РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧАННЯ ДИГІДРОСТРЕПТОМІЦИНУ СУЛЬФАТУ ТА ПРОКАЇНУ БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ В ІН'ЄКЦІЙНИХ СУСПЕНЗІЯХ

*Р. Д. Остапів, канд. біол. наук,
В. І. Ткаченко, канд. біол. наук
М. І. Березюк, молодший науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна,
romostapiv@scivp.lviv.ua

Мета роботи полягала у розробці та валідації методики одночасної ідентифікації та кількісного визначання дигідрострептоміцину та бензилпеніциліну в ін'єкційних суспензіях. Методику валідували, досліджуючи два препарати у формі ін'єкційних суспензій із вмістом бензилпеніциліну 108–144 мг/мл та дигідрострептоміцину 180–220 мг/мл. Випробні зразки розчиняли у воді очищеній Р, а стандартні зразки: бензилпеніциліну – у метанолі (до концентрації 126 мкг/мл), дигідрострептоміцину – у воді очищеній Р (до концентрації 200 мкг/мл). Максимально допустима сумарна невизначеність аналізу становила 1,64 %, що є в межах рекомендацій ДФУ 2.0. Зразки розділяли на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному хроматографічною колонкою Luna C18(2) 250×4,6 мм, 5 μм. Мобільною фазою була суміш ацетонітрилу та розчину 0,01 М натрію гептансульфонату з 0,05 М натрію фосфатом тризаміщеним, підкисленим 0,1 М фосфатною кислотою до рН 6,0, в об'ємному співвідношенні 2:8.

За вищевказаних умов вдалось повністю розділити дигідрострептоміцин та бензилпеніцилін. При цьому, встановлені параметри хроматографічної системи не виходили за межі, зазначені в рекомендаціях FDA. Калібрувальні криві були лінійними у рекомендованому ДФУ 2.0 діапазоні (80–120 % від номінальної концентрації відповідної діючої речовини). Відношення кількості доданого до випробних проб стандартного зразку з наступним його виявленням у препараті складало 99,35–100,79 % для бензилпеніциліну та 99,49–100,12 % – для дигідрострептоміцину, що не виходить за межі, рекомендовані у ДФУ 2.0. Критерій прецизійності становив 0,07 для дигідрострептоміцину та 0,08 – для бензилпеніциліну, що є у межах, рекомендованих у ДФУ 2.0. При цьому, результати дослідження різними аналітиками у різний час відрізнялись на 1,3 % для дигідрострептоміцину та на 0,98 % – для бензилпеніциліну, що цілком вкладається у межі, прийняті у рекомендаціях FDA та ДФУ 2.0.

Отже, розроблена та валідована нами методика одночасного визначання дигідрострептоміцину сульфату та бензилпеніциліну прокаїну в ін'єкційних суспензіях може вважатись придатною для рутинних аналізів.

Ключові слова: ВАЛІДАЦІЯ, ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІН, ДИГІДРОСТРЕПТОМІЦИН, ІН'ЄКЦІЙНІ СУСПЕНЗІЇ, ВЕТЕРИНАРНІ ПРЕПАРАТИ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF DIHYDROSTREPTOMYCIN SULPHATE AND PROCAINE BENZYL PENICILLIN IN INJECTION SUSPENSIONS

R. D. Ostapiv, V. I. Tkachenko, M. I. Bereziuk

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
romostapiv@scivp.lviv.ua

The aim of the work was to develop and validate a method for the simultaneous identification and quantification of dihydrostreptomycin and benzylpenicillin in injectable suspensions. The method was validated by testing two preparations in the form of injectable suspensions containing benzylpenicillin 108–144 mg/ml and dihydrostreptomycin 180–220 mg/ml. Test samples were dissolved in purified water *P*, and standard samples: benzylpenicillin - in methanol (up to a concentration of 126 µg/ml), dihydrostreptomycin - in purified water *P* (up to a concentration of 200 µg/ml). The maximum allowable total uncertainty of the analysis was 1.64%, which is within the recommendations of SFU 2.0. The samples were separated on a Dionex Ultimate 3000 chromatograph equipped with a Luna C18 (2) 250 × 4.6 mm, 5 µm chromatographic column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and a solution of 0.01 M sodium heptanesulfonate with 0.05 M sodium phosphate trisubstituted, acidified with 0.1 M phosphoric acid to pH 6.0, in a volume ratio of 2: 8.

Under mentioned conditions, dihydrostreptomycin and benzylpenicillin were completely separated. The established parameters of the chromatographic system did not exceed the limits specified in the FDA recommendations. The calibration curves were linear in the recommended SFU 2.0 range (80–120% of the nominal concentration of the corresponding active substance). The ratio of the amount of standard sample added to the test samples with its subsequent detection in the preparation was 99.35–100.79% for benzylpenicillin and 99.49–100.12% for dihydrostreptomycin, which does not exceed the limits recommended in SFU 2.0. The precision criterion was 0.07 for dihydrostreptomycin and -0.08 for benzylpenicillin, which is within the limits recommended in SFU 2.0. At the same time, the results of the study by different analysts at different times differed by 1.3% for dihydrostreptomycin and 0.98% for benzylpenicillin, which is well within the limits adopted in the recommendations of the FDA and SFU 2.0.

Therefore, the method developed and validated by us for the simultaneous determination of dihydrostreptomycin sulfate and benzylpenicillin procaine in injectable suspensions can be considered suitable for routine analysis.

Keywords: VALIDATION, HIGHLY EFFICIENT LIQUID CHROMATOGRAPHY BENZYL PENICILLIN, DIHYDROSTREPTOMYCIN, INJECTION SUSPENSIONS, VETERINARY PREPARATIONS.

Бензилпеніцилін та дигідрострептоміцин – перші відкриті антибіотики беталактамової та аміноглікозидної груп. Бензилпеніцилін інгібує синтез пептидогліканів бактерій, тоді як дигідрострептоміцин блокує синтез протеїнів, зв'язуючись з 30S субодиницею рибосом (Fernandes et al., 2013; Krause et al., 2016). Завдяки своїм бактерицидним властивостям, дигідрострептоміцин та бензилпеніцилін широко використовуються у ветеринарії. Зокрема, обидва антибіотики входять до складу порошків для перорального використання, ін'єкційних суспензій та інтрацестернальних ветеринарних препаратів (Kotsiumbas, 2015). Визначання кількісного вмісту бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у ветеринарних препаратах проводять переважно методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Однак, визначання утруднене низькою хроматографічною рухливістю і передбачає застосування складних солей гептан- та октансульфонатів (Gerhardt et al., 1994; Jain et al., 2009). Крім цього,

в ін'єкційних суспензіях на процес екстракції цих антибіотиків можуть впливати допоміжні речовини: парагідроксибензоати, різноманітні олії рослинного походження, тригліцериди та багатоатомні спирти (Kotsiumbas, 2015). Тому більшість методів передбачають складну екстракцію й роздільне визначання кількісного вмісту бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину, що збільшує час аналізу (Gerhardt et al., 1994; Jain et al., 2009; Samanidou et al., 2009; Martínez-Mejía & Rath, 2015).

Метою нашої роботи є розробити та валідувати методику одночасного визначання бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у суспензіях для ін'єкцій.

Матеріали і методи. У роботі використані стандартні зразки (СЗ) бензилпеніциліну прокаїну та дигідрострептоміцину сульфату, виробництва Sigma-Aldrich (Швейцарія). Розчин кожного антибіотика з концентрацією 2 мг/мл готували з урахуванням чистоти, зазначеній у сертифікаті, шляхом розчинення у метанолі (для бензилпеніциліну прокаїну) та воді очищеній *P* (для дигідрострептоміцину сульфату). Основні розчини антибіотиків розводили тими самими розчинниками до потрібних концентрацій робочих розчинів стандартних зразків (200 мкг/мл). В якості досліджуваних проб використовували відповідні суспензії для ін'єкцій із вмістом бензилпеніциліну прокаїну – 200 мг/мл та дигідрострептоміцину сульфату – 200 мг/мл (препарати № 1 та № 2). Проби розчиняли до концентрації 2 мг/мл у воді очищеній *P*. В якості плацебо використовували розчинники (воду очищену *P* та метанол).

Аналіз виконано на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером ACC-3000 та спектрофотометричним детектором VWD-3100. Проби розділяли на хроматографічній колонці Luna C18(2) 250*4,6, 5 μ m. Елюентом слугувала суміш ацетонітрилу та розчину гептансульфонату натрію (0,01 М) з натрієм фосфатом тризаміщеним (0,05 М), підкисленим 0,1 М фосфатною кислотою до рН 6,0, у об'ємному співвідношенні 2:8. Об'єм інжекції складав 0,005 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки 30 °С, час одного розділення – 15 хвилин. Довжина хвилі детекції – 200 нм. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010 та програмного забезпечення Chromeleon 7.2. Розраховували повну невизначеність аналізу та валідували методику за показниками: вибірковість, придатність хроматографічної системи, прецизійність, лінійність, внутрішньолабораторна повторюваність.

Результати й обговорення. Згідно з ДФУ 2.0, максимально допустима невизначеність методу аналізу не має перевищувати 3,2 % за розрахунком (DFU 2.0, 2015):

$$\max \Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 10 \cdot 0,32 = 3,2\%$$

де: *B* – допуски вмісту діючої речовини, які закладаються виробником препарату (± 10 % за специфікаціями виробників препаратів № 1 та № 2).

У таблиці 1 наведені значення невизначеностей для процедур готування розчинів зразків препаратів із вмістом бензилпеніциліну прокаїну та дигідрострептоміцину сульфату та стандартів діючих речовин, які встановлені калібруванням ваг, колб та дозаторів:

Невизначеність процедур готування проб (Δ_{SP}), згідно з ДФУ 2.0 (як для бензилпеніциліну прокаїну окремо, так і для дигідрострептоміцину, окремо) обчислювали за формулою (DFU 2.0, 2015):

$$\Delta_{SP} = \sqrt{2 \cdot 0,17^2 + 2 \cdot 0,50^2 + 0,4^2 + 2 \cdot 0,98^2} = \sqrt{2,6386} = 1,62\% \leq 3,2\%$$

Невизначеність вимірювання стандартного зразка (Δ_{FAOT}^{STD}), згідно з ДФУ 2.0, обчислювали, підставивши значення невизначеностей автосемплера та детектора хроматографа (DFU 2.0, 2015):

$$\Delta_{FAOT,r}^{STD} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,13 \times 0,18 = 0,17$$

Невизначеність вимірювання досліджуваних зразків (Δ_{FAOT}^{SMPL}), згідно з ДФУ 2.0,

обчислювали, підставивши значення похибок автосемплера та детектора хроматографа (DFU 2.0, 2015):

$$\Delta_{FAO,r}^{SMPL} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,13 \times 0,34 = 0,32$$

Обчислена сумарна невизначеність вимірювання ($\Delta_{FAO\tau}$) становить:

$$\Delta_{FAO,r} = (0,17)^2 + (0,32)^2 = 0,13$$

Обчислена сумарна невизначеність аналізу ($\Delta_{AS,r}$), згідно з ДФУ 2,0 (як для бензилпеніциліну окремо, так і для дигідрострептоміцину сульфату, окремо) становить (DFU 2.0, 2015):

$$\Delta_{AS,r} = \sqrt{1,62^2 + 0,13^2} = 1,64$$

Отже, $\Delta_{AS,r}$ (1,64%) < $\max \Delta_{AS,r}$ (3,2%), а значить методика є придатною для подальшого оптимізування та валідації.

Таблиця 1

Компоненти загальної невизначеності при випробуваннях препаратів із вмістом бензилпеніциліну прокаїну та дигідрострептоміцину сульфату

Операція готування проб	Параметр формули обчислення	Невизначеність
PPC3 (бензилпеніциліну прокаїну)		
1. Відбір наважки СЗ бензилпеніциліну прокаїну	m_0	0,40%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17%
3. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1	0,98%
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 10 мл	10	0,50%
PPBП (бензилпеніциліну прокаїну та дигідрострептоміцину сульфату)		
5. Відбір об'єму досліджуваного препарату	1	0,98%
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 200 мл	200	0,17%
7. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1	0,98%
8. Доведення до об'єму в мірній колбі 10 мл	10	0,50%
PPC3 (дигідрострептоміцину сульфату)		
1. Відбір наважки СЗ дигідрострептоміцину сульфату	m_0	0,40%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17%
3. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1	0,98%
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 10 мл	10	0,50%

Наступним кроком було проведення випробувань методики за параметром вибіркості. Визначання вибіркості проводили, порівнюючи хроматограми робочого розчину стандартного зразку (PPC3), робочого розчину випробної проби (PPBП) і розчину плацебо (РРПл). Жоден пік на хроматограмі РРПл повністю або частково не перекривається за часом затримки з піками прокаїну, бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину на хроматограмах PPC3 та PPBП (рис. 1) (DFU 2.0, 2015).

А)

Б)

Б)

Г)

Д)

Рис.1. Хроматограми розчинів порівняння (А – метанол, Б – вода), стандартних зразків прокаїну гідрохлориду (В), бензилпеніциліну прокаїну (Г), дигідрострептоміцину (Д) та препарату з вмістом бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину (Е).

Оскільки вдалось розділити бензилпеніцилін, дигідрострептоміцин та прокаїн, проводили дослідження придатності хроматографічної системи згідно з вимогами та рекомендаціями FDA для методу рідинної хроматографії (Validation of Chromatographic Methods, 1994).

За отриманими хроматограмами РРВП та РРСЗ обчислили параметри придатності хроматографічної системи.

Відносний стандартний відхил (RSD) обчислювали для хроматограм, за якими проводиться оцінка кількісного вмісту.

У таблиці 2 наведено результати перевірки придатності хромагорафічної системи.

Таблиця 2

Характеристики хроматографічних піків бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину

Параметри	Характеристики хроматографічних піків			Діапазон нормування
	Дигідрострептоміцин	Бензилпеніцилін	Прокаїн	
Час затримки, хв.	4,2	8,1	18,8	—
Ефективність хроматографічної колонки (N)	3111	6300	13680	не менше 2000
Коефіцієнт симетрії піку (As)	1,41	1,19	1,02	від 0,8 до 1,5
Відносний стандартний відхил (RSD), %	0,33	0,14	0,55	не більше 1,43
Ширина піку, хв.	0,65	0,96	0,89	—
Ступінь розділення R_s	3,90	5,31	9,88	не менше 1,5

Оскільки зареєстровані параметри придатності хроматографічної системи не виходять за межі, встановлені рекомендаціями FDA, проводили подальшу валідацію методики за параметром лінійність (Validation of Chromatographic Methods, 1994).

Оскільки розчини стабільні протягом доби, проводили подальшу валідацію методики за параметром лінійність. Використовуючи діапазон концентрацій 80-120 % відносно номінального вмісту діючих речовин згідно рекомендацій встановлених ДФУ 2.0 (DFU 2.0, 2015). На рис. 2. представлені графіки лінійності бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину.

Рис. 2. Графік залежності площі піків від концентрації дигідрострептоміцину (А) та бензилпеніциліну (Б).

Оскільки коефіцієнт R^2 як для площ піків бензилпеніциліну, так і для дигідрострептоміцину був у межах, рекомендованих ДФУ 2.0 (ДФУ 2.0, 2015), методику продовжили валідувати за показником прецизійності способом додавання. Кількості стандартних зразків, які додані/виявлені та відсоток виявлення зазначені у таблиці 3.

Таблиця 3

Кількості доданих дигідрострептоміцину сульфату та бензилпеніциліну прокаїну до досліджуваних препаратів та відсоток їх виявлення методом, що валідується

№	Препарат № 1			
	Бензилпеніцилін		Дигідрострептоміцин сульфат	
	Кількість внесеного стандартного зразка, мг	% повернення	Кількість внесеного стандартного зразка, мг	% повернення
1	22,1	99,35	22,4	99,55
2	40,4	100,67	40,0	100,07
3	61,3	100,20	60,1	100,12
4	81,9	100,07	82,9	100,01
5	100,0	99,84	99,1	99,44
№	Препарат № 2			
	Бензилпеніцилін		Дигідрострептоміцин сульфат	
	Кількість внесеного стандартного зразка, мг	% повернення	Кількість внесеного стандартного зразка, мг	% повернення
1	7,6	99,54	15,6	99,81
2	20,8	100,16	28,4	99,49
3	31,3	100,79	38,1	100,11
4	38,12	100,58	50,5	100,01
5	54,5	99,64	81,5	99,78

Результати аналізу модельних розчинів та їх статистичну обробку наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Дослідження методу визначання кількісного вмісту бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у препаратах № 1 та № 2 щодо відповідності критеріям прецизійності та правильності

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
Дигідрострептоміцину сульфат			
$\bar{Z}$	99,93	—	
S_z	0,37	—	
Δz	0,69	$\leq 3,2$	Відповідає
δ	0,07	1) $\delta \leq 0,204\%$	Відповідає
Бензилпеніцилін			
$\bar{Z}$	100,04	—	
S_z	0,49	—	
Δz	0,91	$\leq 3,2$	Відповідає
δ	-0,08	1) $\delta \leq 0,204\%$	Відповідає

Отже за коефіцієнтами Δz та δ параметри прецизійності відповідають вимогам, зазначеним у ДФУ 2.0 (DFU 2.0, 2015).

Наступним кроком було дослідження внутрішньолабораторної повторюваності. Аналіз проводили два аналітики, які використовували різний посуд і при цьому виконували по 4 паралельних вимірювання для однієї серії препарату в різні дні в одній лабораторії згідно методу визначання бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у препаратах № 1 та № 2.

В таблиці 5. наведено маси наважок, використані для приготування робочих розчинів.

Таблиця 5

Маси наважок, використані різними аналітиками для приготування робочих розчинів

Зразки	1 день (дослід 1)		2 день (дослід 2)	
Дигідрострептоміцину сульфат				
	PPCЗ	PPBP	PPCЗ	PPBP
Наважка, <i>m</i> , г	0,0518	1	0,0526	1
Бензилпеніцилін прокаїн				
	PPCЗ	PPBP	PPCЗ	PPBP
Наважка, <i>m</i> , г	0,0529	1	0,053	1

Характеристики внутрішньолабораторної повторюваності методики визначання кількісного вмісту дигідрострептоміцину сульфату для дослідів 1–2 наведено у таблиці 6.

Таблиця 6

Результати досліджень з внутрішньолабораторної повторюваності методики з визначання дигідрострептоміцину у препаратах №1 та №2

№ аналізу	m_i , мкг/мл			
	Препарат № 1		Препарат № 2	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
	m_i^1	m_i^2	m_i^1	m_i^2
1	195,04	197,07	184,65	185,16
2	190,05	195,23	184,55	185,22
3	192,42	194,38	184,88	185,31
4	193,21	194,71	184,74	185,25
середнє ($\bar{m}$)	192,81	195,35	184,71	185,24
S_m , %	1,074	0,614	0,105	0,045
S_{intra} , %	1,091		0,265	
Δ_{intra} , %	0,24		0,14	

Характеристики внутрішньолабораторної повторюваності методики визначання кількісного вмісту бензилпеніциліну для дослідів 1 та 2 наведено у таблиці 7.

Таблиця 7

Результати досліджень з внутрішньолабораторної повторюваності методики з визначання бензилпеніциліну у препаратах №1 та №2

№ аналізу	m_i , мкг/мл			
	Препарат №1		Препарат №1	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
	m_i^1	m_i^2	m_i^1	m_i^2
1	114,52	112,79	131,42	133,33
2	113,73	113,09	131,55	133,13
3	113,49	112,03	131,31	133,66
4	113,93	112,65	131,50	133,51
середнє ($\bar{m}$)	113,92	112,64	131,45	133,41
S_m , %	0,39	0,40	0,08	0,1775
S_{intra} , %	0,80		0,981	
Δ_{intra} , %	0,16		0,741	

Величини Δ_{intra} для дигідрострептоміцину та бензилпеніциліну, обчислені при перевірці внутрішньолaborаторної повторюваності, становлять 0,24 та 0,16 %, що відповідає вимозі (DFU 2.0, 2015):

$$\Delta_{intra} \leq \Delta_{As} = 0,24 \text{ та } 0,16 \% \leq 3,2\%$$

В И С Н О В К И

Досліджувані характеристики методу ідентифікації прокаїну, бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину та кількісного визначання вмісту бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у препаратах № 1 та № 2 не виходять за межі критеріїв, зазначених у директиві FDA та ДФУ 2,0 (DFU 2.0, 2015; Validation of Chromatographic Methods, 1994), тому метод придатний для використання під час рутинних випробувань.

Перспективи досліджень. Розробка та валідація методики одночасного визначення кількісного вмісту бензилпеніциліну та дигідрострептоміцину у інтрацистернальних ветеринарних препаратах.

References

Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, Vol 1. P. 922–929 [In Ukrainian].

Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, Vol 1. P. 910–916 [In Ukrainian].

Fernandes R., Amador, P, Prudêncio (2013). Cr. β -Lactams chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in Medical Microbiology. 24(1): 7–17. DOI: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.

Gerhardt G.C., Salisbury Cr.D., Macnebl J.D. (1994). Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. Journal of AOAC INTERNATIONAL. 77(3): 765–767. DOI: 10.1093/jaoac/77.3.765.

Jain R., Wu Z., Tucker I.G. (2009). A stability-indicating HPLC assay with diode array detection for the determination of a benzylpenicillin prodrug in aqueous solutions. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 20 (5): 841–846. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.06.046.

Kotsiumbas I. Ya., Kosenko Yu. M., et al. (2015). Dovidnyk kormovykh dobavok i premiksiv. Lviv: TzOV VF «Afisha»; 1408 p. [In Ukrainian].

Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 6: 1–8. DOI: 10.1101/cshperspect.a027029.

Martínez-Mejía M.J. & Rath S. (2015). Use of experimental design to optimize a triple-potential waveform to develop a method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in pharmaceutical veterinary dosage forms by HPLC-PAD. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 104 (10): 81-89. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.026.

Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, USA: FDA, 1994. 33.

Samanidou V. F., Giannakis D. E., Papadaki A. (2009). Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. Journal of Separation Science. 32 (9): 1302-1311. DOI: 10.1002/jssc.200800758.