https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-61-74
УДК 615.9

Check for updates
CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров[1]*, Д. С. Богданова[1], О. А. Мискив[1], А. В. Алешина[1], И. Е. Шохин[1], Ю. В. Медведев[1,2], Н. С. Багаева[1], И. М. Коренская[3]

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
3 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

***Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 18.10.2019. **Статья принята к печати:** 22.11.2019

Резюме

Введение. Комбинированные лекарственные препараты, содержащие в составе сальбутамол, бромгексин, амброксол и гвайфенезин, оказывают одновременно муколитическое, отхаркивающее и бронхолитическое действие. Разработка методики совместного определения действующих веществ в биологической жидкости является необходимой процедурой для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств. В настоящее время литературных данных о совместном определении, бромгексина, амброксола и гвайфенезина нет, но существует ряд опубликованных работ по отдельному определению анализируемого вещества в биологической жидкости. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции. В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные производные анализируемых веществ.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был использован способ твердофазной экстракции.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,1–20 нг/мл в плазме крови для сальбутамола, 0,25–25 нг/мл в плазме крови для бромгексина, 0,075–3 нг/мл в плазме крови для амброксола и 10–2000 нг/мл в плазме крови для гвайфенезина. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин.

Ключевые слова: сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, Н.С. Багаева проводила статистическую обработку полученных результатов, И. Е. Шохин, И. М. Коренская и Ю. В. Медведев отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Богданова Д. С., Мискив О. А., Алешина А. В., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., Коренская И. М. Разработка и валидация методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 61–74.

Development and Validation of Salbutamol, Bromhexine, Ambroxol and Guauaifenesin Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS Method

Timofey N. Komarov[1]*, Dana S. Bogdanova[1], Olga A. Miskiv[1], Alexandra V. Aleshina[1], Igor E. Shohin[1], Yuri V. Medvedev[1,2], Natalia S. Bagaeva[1], Irina M. Korenskaya[3]

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
3 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

***Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.n.komarov@yandex.ru

Received: 18.10.2019. **Accepted:** 22.11.2019

Abstract

Introduction. Multicomponent oral drugs containing salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin have a mucolytic, expectorant and bronchodilator effect. The development method for determination substances in biological fluids is a main procedure for performing the analytical part of pharmacokinetic studies and bioequivalence studies of multicomponent drugs. There is no published data of the determination of bromhexine,

© Комаров Т. Н., Богданова Д. С., Мискив О. А., Алешина А. В., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., Коренская И. М., 2019
© Komarov T. N., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Aleshina A. V., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., Korenskaya I. M., 2019

ambroxol and guaifenesin, but there a lot of published methods for divided determination analytes in a biological fluid. This study presents the development and validation of a method of the determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human blood plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. A sample preparation was perfomed by solid-phase extraction. Deuterated derivatives were used as internal standards.

Aim. The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma by HPLC with tandem mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma by HPLC with tandem mass spectrometric detection. A sample was prepared using solid-phase extraction.

Results and discussion. The method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, limit of quantification, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The analytical range of the was 0.1–20 ng/mL in plasma for salbutamol, 0.25–25 ng/mL in plasma for bromhexine, 0.075–3 ng/mL in plasma for ambroxol, and 10–2000 ng/mL in plasma for guaifenesin. Method could be applied to determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in plasma for PK and BE studies.

Keywords: salbutamol, bromhexine, ambroxol, guaifenesin, plasma, HPLC-MS / MS, determination, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv, Alexandra V. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results, Igor E. Shohin, Irina M. Korenskaya and Yuri V. Medvedev carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Aleshina A. V., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., Korenskaya I. M. Development and validation of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guauaifenesin determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 61–74.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в составе комбинированной терапии при острых и хронических легочных заболеваний, таких как бронхиальная астма, пневмония, эмфизема легких, коклюш, пневмокониоз и туберкулез легких, для лечения применяются многокомпонентные лекарственные препараты. Данные комбинированные препараты, содержащие в составе сальбутамол, бромгексин, амброксол и гвайфенезин, оказывают одновременно муколитическое, отхаркивающее и бронхолитическое действие.

Сальбутамол ((RS)-2-трет-Бутиламино-1-(4-окси-3-оксиметил-фенил)-этанол) – бронхорасширяющее лекарственное средство. Относится к препаратам из группы селективных агонистов β_2-адренорецепторов [1]. Фармакологическое действие сальбутамола является бронхолитическим и токолитическим, направлено на купирование бронхиальной астмы при хронической обструктивной болезни легких, а также при хроническом бронхите, в составе комбинированных препаратов облегчает отхождение мокроты из бронхов [2].

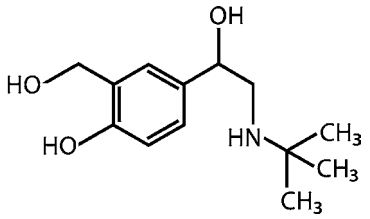

Рисунок 1. **Структурная формула сальбутамола**

Figure 1. **The structural formula of salbutamol**

Бромгексин (2-Амино-3,5-дибром-N-циклогексил-N-метилбензолметанамин) – лекарственный препарат, используемый для лечения кашля. Бромгексин оказывает муколитическое, отхаркивающее и противокашлевое действие. Применяется при острых и хронических бронхолегочных заболеваниях, сопровождающихся образованием мокроты повышенной вязкости [2].

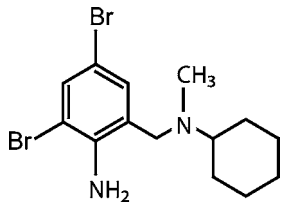

Рисунок 2. **Структурная формула бромгексина**

Figure 2. **The structural formula of bromhexine**

Амброксол (4-[(2-амино-3,5-дибромфенил) метиламино]циклогексан-1-ол) – лекарственное препарат, оказывающий муколитическое и отхаркивающее действие, является активным метаболитом бромгексина. Амброксол также используют в качестве самосто-

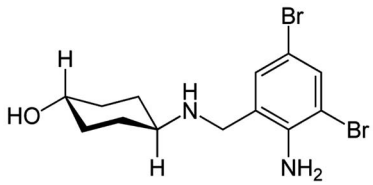

Рисунок 3. **Структурная формула амброксола**

Figure 3. **The structural formula of ambroxol**

ятельного лекарственного средства при лечении заболеваний дыхательных путей с образованием вязкой мокроты, остром и хроническом бронхите, пневмонии и бронхиальной астме с затруднением отхождения мокроты [2].

Гвайфенезин (3-(2-Метоксифенокси)-1,2-пропандиол) – лекарственное средство, используемое при заболеваниях дыхательных путей с затрудненным отхождением вязкой мокроты [2]. Гвайфенезин является препаратом из группы секретолитиков, стимулирует секрецию бронхиальных желёз и отделение слизевого секрета [1].

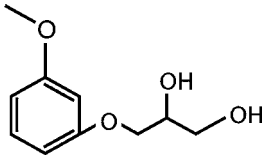

Рисунок 4. Структурная формула гвайфенезина

Figure 4. The structural formula of guaifenesin

В настоящее время в рецензируемых журналах опубликован ряд работ по определению сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным или одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС, МС). В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки используется способ твердофазной экстракции (ТФЭ) и в некоторых случаях способ жидкость-жидкостной экстракции (таблица 1).

Разработка методики совместного определения действующих веществ является необходимой процедурой для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств. В настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению сальбутамола бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции. В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные производные анализируемых веществ.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
Сальбутамол			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	0,20–15,00	[3]
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	0,10–50,00	[4]
Бромгексин			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	0,15–30,00	[5]
Амброксол			
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	0,20–200,00	[6]
ВЭЖХ-МС/МС	осаждение белков метанолом	1,00–20,00	[7]
ВЭЖХ-МС	ЖЖЭ	1,00–100,00	[8]
ВЭЖХ-МС/МС	осаждение белков ацетонитрилом	2,00–200,00	[9]
ВЭЖХ-МС/МС	осаждение белков ацетонитрилом	0,50–200,00	[10]
Гвайфенезин			
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	1,00–4000,00	[11]
ВЭЖХ-МС	ЖЖЭ	25,00–6400,00	[12]
ВЭЖХ-МС/МС с применением способа химической ионизацией при атмосферном давлении	ЖЖЭ	5,00–2000,00	[13]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LCMS-8040, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и тандемным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония. Для пробоподготовки использованы картриджи Oasis HLB (1 cc, 10 mg, 30 µm), Waters, США.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (UHPLC-grade, J.T.Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (for LC-MS, Merck Millipore); аммиак водный (for analysis, Panreac, Испания) вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы сальбутамола сульфата (Toronto Researc Chemicals, содержание 98,0 %), Д9-сальбутамола (Toronto Research Chemicals, содержание 98,65 %, изотопная чистота

98,2 %), бромгексина гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %), Д3-бромгексина гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 99,7 %, изотопная чистота 99,5 %), амброксола гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %), Д5-амброксола гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 100,0 %, изотопная чистота 98,0 %), гвайфенезин (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %) и Д3-гвайфенезин (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %, изотопная чистота 99,8 %).

Исходные стандартные растворы сальбутамола, бромгексина, амброксола, гвайфенезина и дейтерированных производных анализируемых веществ, используемых в качестве внутренних стандартов, готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, промежуточные и рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходные стандартные растворы, промежуточные и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

Картриджи для твердофазной экстракции, предварительно помещённые в устройство для проведения ТФЭ, подключённое к насосу для фильтрования, активировали последовательной промывкой 500 мкл метанола и 500 мл воды.

К 300 мкл калибровочного образца (либо к 300 мкл интактной плазмы крови для приготовления бланка), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта, затем прибавляли 600 мкл воды, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем загружали на картридж. Далее промывали картриджи 500 мкл воды, затем смывали образец 400 мкл метанола (таблица 2).

Образцы упаривали при 45 °С под током азота до сухого остатка, затем сухой остаток перерастворяли в 100 мкл 10 % раствора муравьиной кислоты, перемешивали и помещали в автосамплер хроматографа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму) с добавлением 0,08 % аммиака водного (по объёму), элюент В: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле (по объёму) с добавлением 0,08 % аммиака водного (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	90	10	1,00
0,50	90	10	
5,00	25	75	
5,50	0	100	
7,00	0	100	
7,50	90	10	
9,00	90	10	

- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–9,00 мин.
- Режим ионизации: положительный.
- Условия детектирования сальбутамола: 240,25 → 148,10 m/z.
- Условия детектирования Д9-сальбутамола: 249,25 → 149,10 m/z.
- Условия детектирования бромгексина: 377,10 → 263,95 m/z; 377,10 → 114,15 m/z.
- Условия детектирования Д3-бромгексина: 380,10 → 263,90 m/z; 380,10 → 117,15 m/z.
- Условия детектирования амброксола: 379,05 → 263,95 m/z.
- Условия детектирования Д5-амброксола: 384,10 → 263,90 m/z.
- Условия детектирования гвайфенезина: 199,15 → 122,10 m/z; 199,15 → 77,10 m/z.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень	Концентрация аналита, нг/мл				Концентрация внутреннего стандарта, мл			
	САЛ	БР	АМБ	ГВ	Д9-САЛ	Д3-БР	Д5-АМБ	Д3-ГВ
1	0,10	0,25	0,075	10,00	5,00	5,00	1,00	500,00
2	0,25	0,50	0,10	25,00	5,00	5,00	1,00	500,00
3	0,50	1,00	0,25	50,00	5,00	5,00	1,00	500,00
4	1,00	2,50	0,50	100,00	5,00	5,00	1,00	500,00
5	2,50	5,00	0,75	250,00	5,00	5,00	1,00	500,00
6	5,00	10,00	1,00	500,00	5,00	5,00	1,00	500,00
7	10,00	20,00	2,00	1000,00	5,00	5,00	1,00	500,00
8	20,00	25,00	3,00	2000,00	5,00	5,00	1,00	500,00

- Условия детектирования Д3-гвайфенезина: 202,15 → 78,05 m/z.
- Время удерживания сальбутамола и Д9-сальбутамола: около 2,4 мин.
- Время удерживания бромгексина и Д3-бромгексина: около 5,5 мин.
- Время удерживания амброксола и Д5-амброксола: около 4,6 мин.
- Время удерживания гвайфенезина и Д3-гвайфенезина: около 4,3 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики определения действующих веществ в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС необходимо полноценно использовать сочетание разделяющей способности метода жидкостной хроматографии и высокой чувствительности и селективности тандемного масс-спектрометрического детектора, позволяющее достичь максимально эффективных результатов.

Применение тандемного масс-спектрометрического детектирования позволяет достичь высокой чувствительности и селективности методики при определении веществ, но при анализе биологических образцов, содержащих огромное число соединений, являющихся метаболитами действующих (исследуемых) веществ, необходимо подобрать условия хроматографического разделения и удерживания для селективного определения веществ, а также во избежание появления «перекрещивающихся» сигналов детектора и возникновения ложноположительных результатов.

Одной из задач данного исследования являлась разработка методики совместного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина. Также необходимо было подобрать условия хроматографического разделения и детектирования для дейтерированных производных анализируемых веществ, используемых в качестве внутренних стандартов.

В процессе подбора условий детектирования бромгексина и его метаболита амброксола возникли некоторые трудности. Амброксол является одним из множества метаболитов бромгексина, который образуется из исходного соединения путём N-деметилирования и гидроксилирования по циклогексильному радикалу в пара-положении, вследствие чего имеет схожую структуру и близкую по значению молекулярную массу с бромгексином. При сканировании фрагментарных ионов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных наиболее интенсивный сигнал был получен от иона-продукта с отношением массы к заряду 263. Амброксол и бромгексин имеют в структурном составе радикалы брома. Природный бром состоит из двух стабильных изотопов ^{79}Br (50,56 %) и ^{81}Br (49,44 %). За счет изотопного состава брома, содержащегося в бромгексине и амброксоле, происходит перекрывание сигнала молекулярных ионов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных при совместном присутствии в анализируемом объекте. В таблице 4 приведены молекулярные массы ионов-прекурсора с учетом изотопной картины и ионов-продуктов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных.

Для идентификации выше перечисленных веществ подбор масс-спектрометрических условий детектирования не привел к достижению селективных результатов, и была высока вероятность получения ложноположительных значений сигнала в случае наложения зон элюирования исследуемых веществ при недостаточном хроматографическом разделении. Кроме того, подобные перекрещивания могли возникать также в ходе исследования образцов, полученных от добровольцев, в которых возможно присутствие иных метаболитов со схожей структурой. Данные риски многократно повышаются в случае пренебрежения хроматографическим разделением и элюированием исследуемых соединений с мёртвым объёмом.

Таким образом, для достоверного и селективного определения бромгексина и амброксола необходимо обеспечить хроматографическое разделение данных веществ и обеспечить селективное время удерживания.

При выборе условий хроматографического разделения была подобрана колонка Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм; 5 мкм. Определяемые вещества отличаются по показателю липофильности и константе диссоциации. Например, бромгексин является более липофильным в сравнении с остальными анализируемыми веществами. Для достижения удерживания веществ на неподвижной фазе был выбран сорбент, имеющий привитые фенильные группы, так как все определяемые вещества имеют в своем

Таблица 4. Молекулярные массы ионов-прекурсора и ионов-продукта бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных

Table 4. The molecular masses of precursor ions and product ions of bromhexine, ambroxol and treeized derivatives

Вещество	Бромгексин	Д3-бромгексин	Амброксол (осн. метаболит)	Д5-амброксол
Отношение массы к заряду иона-прекурсора с учётом изотопной картины*	375, 376, **377**, 378	379, **380**, 381, 382	377, 378, **379**, 380, 381	382, 383, **384**, 385, 386
отношение массы к заряду иона-продукта	263	263	263	263

Примечание: * – полужирным шрифтом выделены массы ионов, имевших наибольшую интенсивность.

Note: * – the m/z of ions with the highest intensity are highlighted in bold.

структуре фенильный фрагмент, и по принципу «подобия» данные вещества имеют большее сродство к фенильным сорбентам.

Далее в процессе разработки методики при выборе подвижной фазы были испытаны 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде – элюент А и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, поскольку данные элюенты обеспечивали максимальную ионизацию исследуемых веществ в электроспрее. При этом сальбутамол плохо удерживался на колонке и образовывал несимметричный пик, за счет использования неподходящей подвижной фазы. Эмпирическим путём были подобраны следующие элюенты: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с добавлением 0,08 % аммиака водного – элюент А; 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле с добавлением 0,08 % аммиака водного – элюент В. Данная подвижная фаза обеспечивает достаточную буферную емкость и элюирование всех исследуемых веществ в виде ровных и симметричных пиков.

При выборе пробоподготовки анализируемых объектов были рассмотрены несколько способов: осаждение белков органическим растворителем (метанол или ацетонитрил) и твердофазная экстракция. При осаждении белков ацетонитрилом как более неполярным в сравнении с метанолом пики некоторых анализируемых веществ были несимметричными, и происходило, так называемое «размывание» пика. При осаждении белков метанолом вещества имели высокую степень извлечения и при выбранных условиях хроматографического разделения имели узкую, симметричную форму пика. При использовании данного способа пробоподготовки для определения сальбутамола и бромгексина удалось достичь уровня НПКО, 0,100 нг/мл и 0,250 нг/мл соответственно, для амброксола удалось достичь третьего уровня концентраций (таблица 2) – 0,250 нг/мл, для гвайфенезина пятого уровня концентраций (таблица 2) – 250 нг/мл. Для достижения уровня НПКО всех анализируемых веществ в качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции, который обеспечивает концентрирование аналитов, что актуально при анализе веществ низких концентраций.

Таким образом, была разработана методика совместного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, а подобранные условия масс-спектрометрического детектирования позволили достичь необходимого уровня НПКО.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [9], а также руководств FDA [10] и EMA [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов ана-лита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентраций сальбутамола в диапазоне 0,10 нг/мл – 20,00 нг/мл, бромгексина в диапазоне 0,25 нг/мл – 25,00 нг/мл, амброксола в диапазоне 0,075 нг/мл – 3,00 нг/мл, гвайфенезина в диапазоне 10,00 нг/мл – 2000,00 нг/мл, а также рабочего раствора внутреннего стандарта до концентраций Д9-сальбутамола 5,00 нг/мл, Д3-бромгексина 5,00 нг/мл, Д5-амброксола 1,00 нг/мл, Д3-гвайфенезина 500,00 нг/мл. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ или их сигнал не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 5, 6.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов анализируемых веществ и внутренних стандартов без влияния биологической матрицы (W_y_x), а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени извлечения анализируемых веществ и внутренних стандартов из биологической матрицы (SA_y_x).

Эффект матрицы был оценен на нижнем (таблица 2 и 3) и верхнем уровнях (таблица 2, № 8) аналитического диапазона концентраций сальбутамола (0,50 нг/мл и 20,00 нг/мл), бромгексина (1,00 нг/мл и 25,00 нг/мл), амброксола (0,25 нг/мл и 3,00 нг/мл) и гвайфенезина (50,00 нг/мл и 2000,00 нг/мл). Для внутренних стандартов (Д9-сальбутамол, Д3-бромгексин, Д5-амброксол, Д3-гвайфенезин) эффект матрицы был рассчитан на уровнях 5,00 нг/мл, 5,00 нг/мл, 1,00 нг/мл, 500,00 нг/мл соответственно. Данные представлены в таблице 5.

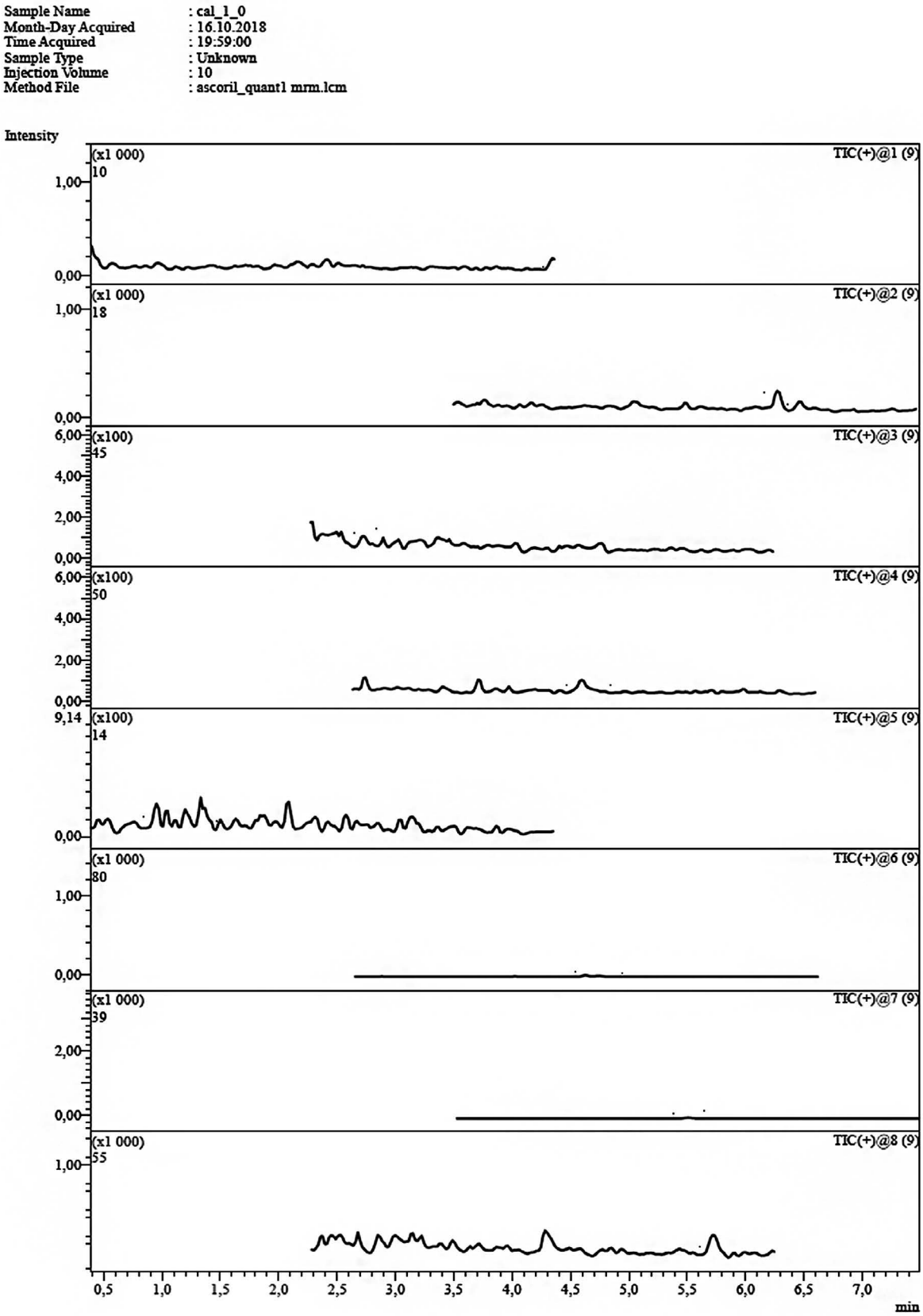

Рисунок 5. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 5. **Chromatogram of a blank plasma sample**

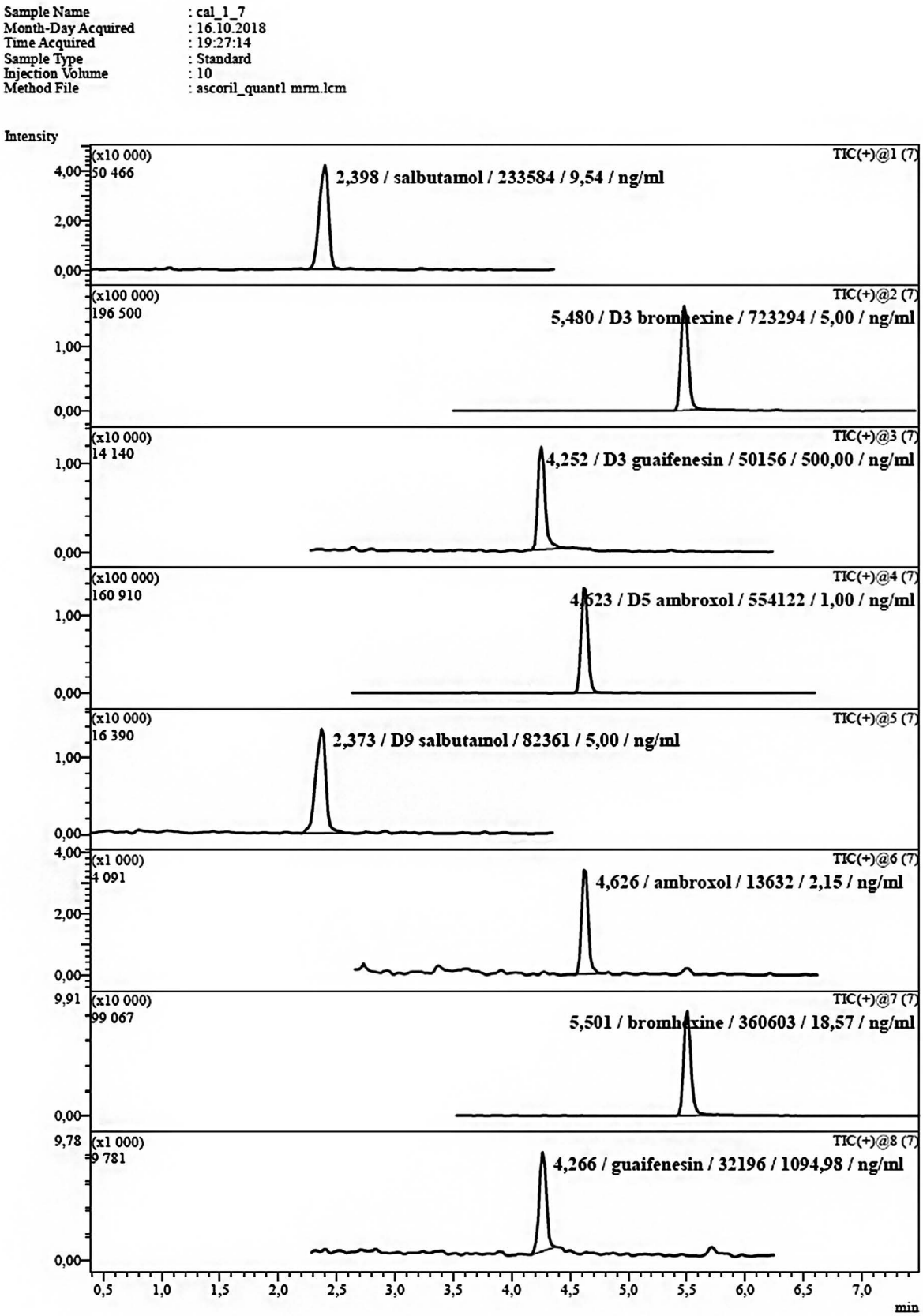

Рисунок 6. Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица 3)

Figure 6. Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table 3)

Таблица 5. **Расчёт фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутренних стандартов**

Table 5. **Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards**

№	Mf анализируемых веществ				Mf внутренних стандартов				Нормализованный Mf			
	САЛ	БР	АМБ	ГВ	Д9-САЛ	Д3-БР	Д5-АМБ	Д3-ГВ	САЛ	БР	АМБ	ГВ
3-1.	1,23	0,98	1,00	0,92	1,14	1,04	1,21	1,17	1,08	0,94	0,83	0,79
3-2.	1,31	0,95	1,44	1,30	1,20	0,96	1,25	1,23	1,09	0,99	1,16	1,06
3-3.	1,33	0,93	1,04	1,07	1,09	0,93	0,95	1,20	1,22	1,00	1,10	0,89
3-4.	1,22	0,82	1,25	1,08	1,07	0,92	1,14	1,23	1,14	0,88	1,09	0,88
3-5.	1,08	0,73	1,19	1,06	1,04	0,90	1,15	1,12	1,03	0,81	1,03	0,95
3-6.	1,19	0,78	1,10	1,14	1,07	0,84	1,18	1,32	1,12	0,92	0,93	0,86
Среднее									1,11	0,93	1,02	0,91
CV, %									5,82	7,61	12,00	10,20
8-1.	1,08	1,01	0,87	1,46	1,33	1,22	1,15	1,09	0,81	0,83	0,75	1,34
8-2.	1,06	1,03	0,86	1,19	1,42	1,18	1,13	1,12	0,74	0,87	0,76	1,06
8-3.	1,03	1,01	0,90	1,11	1,28	1,21	1,16	0,98	0,81	0,83	0,78	1,13
8-4.	1,02	0,99	0,78	1,43	1,32	1,20	1,16	0,92	0,78	0,82	0,67	1,55
8-5.	1,08	1,04	0,86	1,20	1,36	1,16	1,17	0,99	0,79	0,90	0,73	1,21
8-6.	1,06	1,01	0,75	1,09	1,27	1,22	1,18	0,95	0,84	0,83	0,63	1,15
Среднее									0,79	0,85	0,72	1,24
CV, %									4,03	3,48	7,99	14,46

Фактор матрицы рассчитывали, как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения белков, к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали, как отношение значения фактора матрицы анализируемого вещества к фактору матрицы внутреннего стандарта. Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, соответствуют нормам, не более 15 %.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта и рабочих стандартных растворов до получения концентраций анализируемых веществ и внутренних стандартов, указанных в таблице 3, соответствующих каждому калибровочному уровню. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта от отношения концентрации аналита к концентрации внутреннего стандарта в плазме крови.

Уравнения калибровочных графиков и коэффициенты корреляции составили для сальбутамола $y = 1{,}47216*x + 0{,}0262065$, $R = 0{,}9965$, для бромгексина $y = 0{,}130989*x + 0{,}0119420$, $R = 0{,}9958$, для амброксола $y = 0{,}0109012*x + 0{,}00118227$, $R = 0{,}9952$, для гвайфенезина $y = 0{,}285365*x + 0{,}0169923$, $R = 0{,}9953$. Графики приведены на рисунках 7–10.

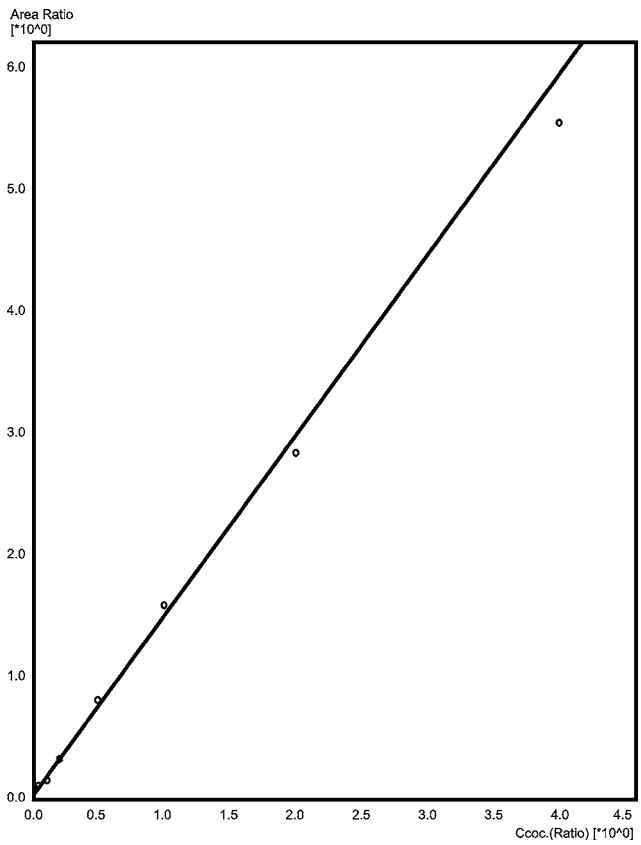

Рисунок 7. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика сальбутамола к площади пика Д9-сальбутамола от отношения концентрации сальбутамола к концентрации Д9-сальбутамолав плазме крови**

Figure 7. **The calibration curve dependence of the ratio area peak of salbutamol to the D9-salbutamol on the concentration ratio of salbutamol to the D9-salbutamol in plasma**

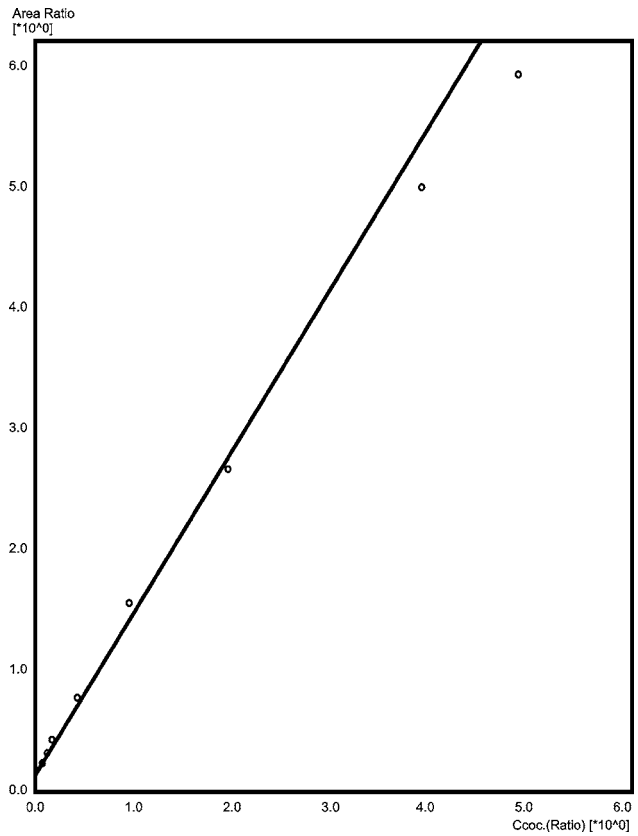

Рисунок 8. Калибровочный график зависимости отношения площади пика бромгексина к площади пика Д3-бромгексина от отношения концентрации бромгексина к концентрации Д3-бромгексина в плазме крови

Figure 8. The calibration curve dependence of the ratio area peak of bromhexine to the D3-bromhexine on the concentration ratio of bromhexine to the D3-bromhexine in plasma

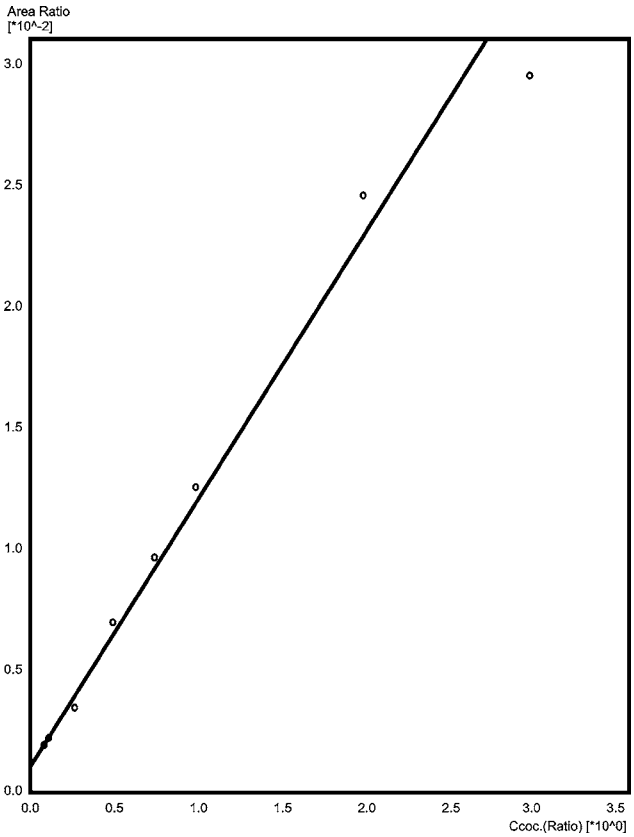

Рисунок 9. Калибровочный график зависимости отношения площади пика амброксола к площади пика Д3-амброксола от отношения концентрации амброксола к концентрации Д3-амброксола в плазме крови

Figure 9. The calibration curve dependence of the ratio area peak of ambroxol to the D3-ambroxol on the concentration ratio of ambroxol to the D3-ambroxol in plasma

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 6.

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО, низкий уровень (таблица 2, № 3), средний уровень (таблица 2, № 7), верхний уровень (таблица 2, № 8). Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точности и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (*E*, %), приведенные в таблице 7.

Таблица 6. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений

Table 6. Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values

№	Концентрация номинальная, нг/мл				Концентрация рассчитанная, нг/мл				E, %				Норма, не более %
	САЛ	БР	АМБ	ГВ	САЛ	БР	АМБ	ГВ	САЛ	БР	АМБ	ГВ	
1	0,10	0,25	0,075	10,00	0,10	0,24	0,08	10,46	4,23	–4,85	0,96	4,57	20
2	0,25	0,50	0,10	25,00	0,22	0,52	0,10	23,77	–12,61	3,99	0,82	–4,90	15
3	0,50	1,00	0,25	50,00	0,49	1,10	0,22	45,21	–1,35	9,55	–10,92	–9,57	15
4	1,00	2,50	0,50	100,00	1,08	2,56	0,54	87,33	7,70	2,22	7,18	–12,68	15
5	2,50	5,00	0,75	250,00	2,66	5,51	0,78	273,52	6,45	10,23	3,68	9,41	15
6	5,00	10,00	1,00	500,00	5,33	9,75	1,04	528,94	6,53	–2,50	4,14	5,79	15
7	10,00	20,00	2,00	1000,00	9,54	18,58	2,15	1094,98	–4,57	–7,13	7,42	9,50	15
8	20,00	25,00	3,00	2000,00	18,72	22,12	2,60	1957,87	–6,39	–11,53	–13,28	–2,11	15

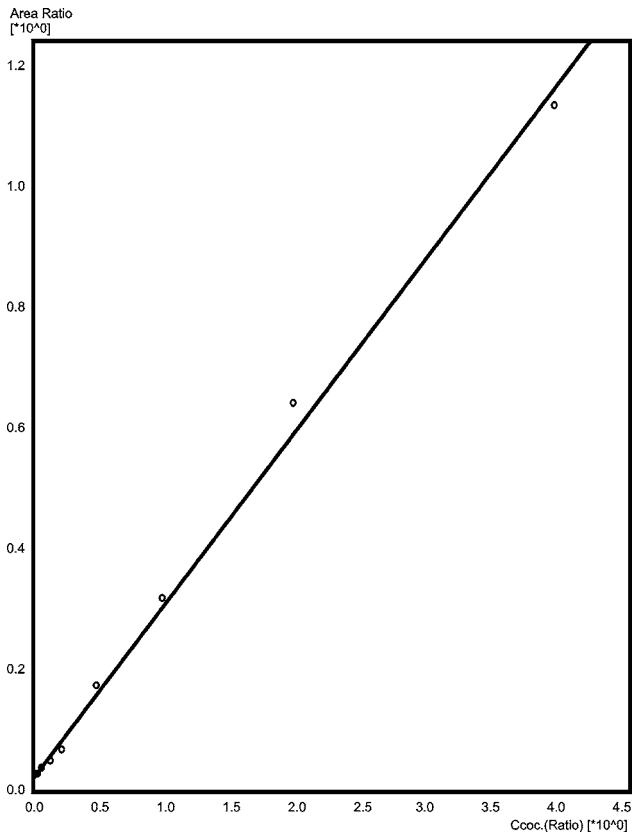

Рисунок 10. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика гвайфенезина к площади пика Д3-гвайфенезина от отношения концентрации гвайфенезина к концентрации Д3-гвайфенезина в плазме крови**

Figure 10. **The calibration curve dependence of the ratio area peak of guaifenesin to the D3-guaifenesin on the concentration ratio of guaifenesin to the D3-guaifenesin in plasma**

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За нПКО методики принималась минимальная концентрация веществ в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение веществ со значениями RSD и E не более 20 %.

Нижний предел количественного определения методики составил 0,10 нг/мл для сальбутамола, 0,25 нг/мл для бромгексина, 0,075 нг/мл для амброк-сола, 10,00 нг/мл для гвайфенезина. Хроматограмма плазмы крови с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО приведена на рисунке 11.

Отношение сигнал/шум по пикам исследуемых веществ на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения LabSolutions не превышает 10,8.

Таблица 7. **Точность и прецизионность методики (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Table 7. **Accuracy and precision (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
Сальбутамол												
0,10	0,10	0,10	0,10	0,01	0,01	0,01	13,88	10,42	5,96	1,80	3,50	4,27
0,50	0,47	0,49	0,49	0,03	0,02	0,01	5,62	4,82	1,56	–5,36	–2,58	–1,60
10,00	9,57	10,06	9,76	0,53	0,66	0,40	5,50	6,60	4,05	–4,35	0,61	–2,39
20,00	19,36	19,55	19,36	0,92	0,70	0,74	4,76	3,60	3,83	–3,22	–2,23	–3,23
Бромгексин												
0,25	0,27	0,26	0,26	0,02	0,02	0,01	9,21	7,52	2,18	8,00	4,56	3,23
1,00	0,92	0,95	0,96	0,04	0,05	0,05	4,43	4,89	5,58	–7,56	–5,36	–4,23
20,00	18,85	18,87	19,08	0,47	0,53	0,67	2,51	2,80	3,49	–5,76	–5,64	–4,59
25,00	21,47	22,22	23,00	0,57	1,33	0,37	2,64	6,01	1,61	–14,14	–11,11	–8,00
Амброксол												
0,075	0,073	0,074	0,074	0,01	0,00	0,00	7,74	5,71	3,38	–2,13	–1,60	–1,24
0,25	0,23	0,24	0,25	0,01	0,01	0,01	3,04	4,54	2,73	–6,56	–3,12	–1,92
2,00	2,01	1,99	2,01	0,06	0,07	0,06	2,84	3,27	2,95	0,32	–0,31	0,50
3,00	2,78	2,83	2,86	0,16	0,18	0,07	5,67	6,52	2,60	–7,51	–5,52	–4,53
Гвайфенезин												
10,00	10,87	10,37	10,32	0,071	0,87	0,48	6,57	8,35	4,63	8,71	3,74	3,22
50,00	51,99	50,86	51,09	1,76	1,75	1,39	3,39	3,45	2,73	3,97	1,72	2,17
1000,00	1013,28	1022,64	952,98	65,06	50,04	378,97	6,42	4,89	39,77	1,33	2,26	–4,70
2000,00	1982,52	1940,95	1870,99	97,04	97,40	366,51	4,89	5,02	19,59	–0,87	–2,95	–6,45

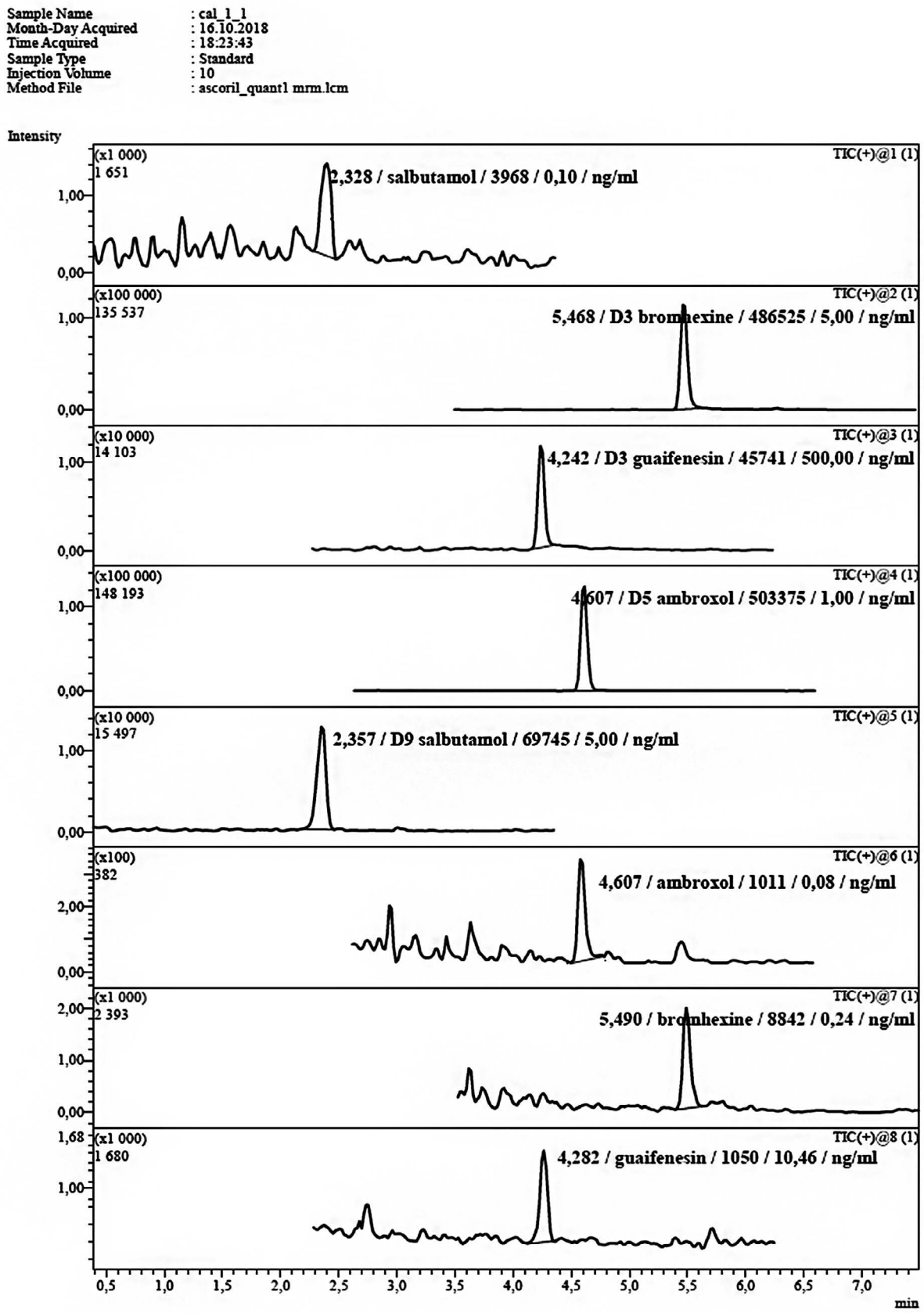

Рисунок 11. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 11. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the level LLOQ

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре –45 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре –45 °С) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутренних стандартов, с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,10–20,00 нг/мл в плазме крови для сальбутамола, 0,25–25,00 нг/мл в плазме крови для бромгексина, 0,075–3,00 нг/мл в плазме крови для амброксола и 10,00–2000,00 нг/мл в плазме крови для гвайфенезина. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин.

ЛИТЕРАТУРА

1. DrugBank. Available at: https://www.drugbank.ca/drugs/DB09019; https://www.drugbank.ca/drugs/DB01001; https://www.drugbank.ca/drugs/DB00874; https://www.drugbank.ca/drugs/DB06742.
2. Регистр лекарственных средств. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1338.htm; https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_276.htm; https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_175.htm; https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2287.htm.
3. Schmeer, K., Sauter, T., Schmid J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1997; 777(1): 67–72. Doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00432-9.
4. Joyce K. B., Jones A. E., Scott R. J., Biddlecombe R. A., Pleasance S. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 1998; 12(23): 1899–1910. Doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981215)12:23<1899::AID-RCM417>3.0.CO;2-I/.
5. Liu J., Chen X., Hu Y., Cheng G., Zhong D. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC–MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010; 51(5): 1134–1141. Doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.024.
6. Kim H., Yoo J. Y., Han S. B., Lee H. J., Lee K. R. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2003); 32(2): 209–216. Ddoi.org/10.1016/S0731-7085(03)00059-1.
7. Wen A., Hang T., Chen S., Wang Z., Ding L., Tian, Y., Xu X. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC–MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2008; 48(3): 829–834. Doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.032.
8. Su F., Wang F., Gao W., Li H. Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI). *Journal of Chromatography B*. 2007; 853(1-2): 364–368. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.015.
9. Hang T. J., Zhang M., Song M., Shen J. P. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica chimica acta*. (2007); 382(1-2): 20–24. Doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.015.
10. Dong X., Ding L., Cao X., Jiang L., Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomedical Chromatography*. (2013); 27(4): 520–526. Doi.org/10.1002/bmc.2824.
11. Eichhold T. H., McCauley-Myers D. L., Khambe D. A., Thompson, G. A., Hoke S. H. (II). Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrorphan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedic alanalysis*. 2007; 43(2): 586–600. Doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.018.
12. Wen J., Zhang H., Xia C., Hu X., Xu W., Cheng X., Xiong Y. A sensitive liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry method for the simultaneous determination of pentoxyverine citrate and guaifenesin in human plasma – application to pharmacokinetic and bioequivalence studies. *Biomedical chromatography*. 2010; 24(4): 351–357. Doi.org/10.1002/bmc.1298.
13. Chen X., Huang J., Kong Z., Zhong D. Sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005; 817(2): 263–269. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.011.
14. Pubchem. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2083#section=Solubility; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2442#section=Chemical-and-Physical-Properties; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2132#section=Experimental-Properties.
15. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: *Гриф и К*. 2013: 280.
16. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
17. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.

REFERENCES

1. DrugBank. Available at: https://www.drugbank.ca/drugs/DB09019; https://www.drugbank.ca/drugs/DB01001; https://www.drugbank.ca/drugs/DB00874; https://www.drugbank.ca/drugs/DB06742.
2. Register of medicines. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1338.htm; https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_276.htm; https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_175.htm; https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2287.htm.
3. Schmeer, K., Sauter, T., Schmid J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1997; 777(1): 67–72. Doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00432-9.
4. Joyce K. B., Jones A. E., Scott R. J., Biddlecombe R. A., Pleasance S. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid

chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 1998; 12(23): 1899–1910. Doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981215)12:23<1899::AID-RCM417>3.0.CO;2-I/.

5. Liu J., Chen X., Hu Y., Cheng G., Zhong D. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC–MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010; 51(5): 1134–1141. Doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.024.
6. Kim H., Yoo J. Y., Han S. B., Lee H. J., Lee K. R. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2003); 32(2): 209–216. Ddoi.org/10.1016/S0731-7085(03)00059-1.
7. Wen A., Hang T., Chen S., Wang Z., Ding L., Tian, Y., Xu X. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC-MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2008; 48(3): 829–834. Doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.032.
8. Su F., Wang F., Gao W., Li H. Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *Journal of Chromatography B*. 2007; 853(1-2): 364–368. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.015.
9. Hang T. J., Zhang M., Song M., Shen J. P. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica chimica acta*. (2007); 382(1-2): 20–24. Doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.015.
10. Dong X., Ding L., Cao X., Jiang L., Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomedical Chromatography*. (2013); 27(4): 520–526. Doi.org/10.1002/bmc.2824.
11. Eichhold T. H., McCauley-Myers D. L., Khambe D. A., Thompson, G. A., Hoke S. H. (II). Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrorphan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedic alanalysis*. 2007; 43(2): 586–600. Doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.018.
12. Wen J., Zhang H., Xia C., Hu X., Xu W., Cheng X., Xiong Y. A sensitive liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry method for the simultaneous determination of pentoxyverine citrate and guaifenesin in human plasma – application to pharmacokinetic and bioequivalence studies. *Biomedical chromatography*. 2010; 24(4): 351–357. Doi.org/10.1002/bmc.1298.
13. Chen X., Huang J., Kong Z., Zhong D. Sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005; 817(2): 263–269. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.011.
14. Pubchem. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2083#section=Solubility; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2442#section=Chemical-and-Physical-Properties; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2132#section=Experimental-Properties.
15. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. M.: *Grief and K*. 2013: 280.
16. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
17. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.