

УДК 615.22.074:543.544

<https://doi.org/10.23888/HMJ2022104361-372>

Разработка и валидация методики количественного определения метопролола в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС

П. Ю. Мыльников, Ю. Транова, А. В. Шулькин[✉], С. В. Селезнев, С. С. Якушин, Е. Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова,
Рязань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Шулькин Алексей Владимирович, alekseyskulkin@rambler.ru

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Метопролол — селективный β_1 -адреноблокатор, без внутренней симпатомиметической активности. Эффективность метопролола доказана в многочисленных клинических исследованиях при терапии артериальной гипертензии, стенокардии напряжения, инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности. Для повышения эффективности и безопасности проводимой терапии целесообразно проводить терапевтический лекарственный мониторинг метопролола, для чего необходима чувствительная методика его количественного определения.

Цель. Разработка, валидация и апробация методики определения метопролола в плазме крови людей с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС).

Материалы и методы. Работа выполнена на ВЭЖХ-МС/МС «Ultimate 3000» TSQ Fortis (Thermo Fisher, США). Для пробоподготовки применяли ацетонитрил с использованием в качестве внутреннего стандарта фексофенадина гидрохлорид в концентрации 10 нг/мл, который добавляли к образцам плазмы в соотношении 3:1. Объем вводимой пробы составил 5 мкл. Разделение выполняли на колонке UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm, 3 μ m, 100Å с аналогичной предколонкой при температуре 35°C, в градиентном режиме элюирования в соотношении 0,1% раствора кислоты муравьиной/ацетонитрил: 0 мин — 80%/20%, 0,1 мин — 45%/55%, 5 мин — 10%/90%, 10 мин — 80%/20%, со скоростью потока 300 мкл/мин. Детектирование проводили в положительном режиме ионизации электроспреем, напряжение электроспрея 4000 В, оболочечный газ 50 arb, вспомогательный газ 10 arb, продувочный газ 1 arb, температура испарителя 350°C, ион-транспортующей трубки — 300°C, с использованием режима мониторинга множественных реакций (MRM) со скоростью подачи аргона 2 мТорр, 268 m/z → 115,5 m/z, Collision Energy 18 V, Tube lens 95 V, 268 m/z → 191 m/z, Collision Energy 17 V, Tube lens 95 V. Матрицей служила плазма крови здоровых добровольцев.

Результаты. Аналитический диапазон методики находился в диапазоне 2–1000 нг/мл. Апробацию разработанной методики провели на пациенте с артериальной гипертензией. В ходе анализа у пациента в плазме крови детектировалась равновесная концентрация метопролола 12,0 нг/мл (предварительно пациент принимал метопролола тартрат в дозе 12,5 мг два раза в день в течение недели), а через 2 ч после приема препарата — 31,0 нг/мл.

Заключение. Разработан, валидирован и апробирован метод количественного определения метопролола с помощью ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови людей.

Ключевые слова: метопролол; ВЭЖХ-МС/МС; терапевтический лекарственный мониторинг

Для цитирования:

Мыльников П. Ю., Транова Ю., Шулькин А. В., Селезнев С. В., Якушин С. С., Якушева Е. Н. Разработка и валидация методики количественного определения метопролола в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2022. Т. 10, № 4. С. 361–372. <https://doi.org/10.23888/HMJ2022104361-372>.

<https://doi.org/10.23888/HMJ2022104361-372>

Development and Validation of HPLC-MS/MS Method for Quantitative Determination of Metoprolol in Blood Plasma of Patients

Pavel Yu. Myl'nikov, Yuliya Tranova, Aleksey V. Shchul'kin[✉], Sergey V. Seleznev, Sergey S. Yakushin, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Corresponding author: Aleksey V. Shchul'kin, alekseishulkin@rambler.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION: Metoprolol is a selective β_1 -adrenoblocker without intrinsic sympathomimetic activity. The effectiveness of metoprolol has been proven in numerous clinical studies in the treatment of arterial hypertension, stable angina, myocardial infarction, chronic heart failure. To improve the efficiency and safety of the therapy, it is advisable to carry out therapeutic drug monitoring of metoprolol, which requires a sensitive method for its quantitative determination.

AIM: To develop, validate and test a method for the determination of metoprolol in human plasma using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection (MS/MS).

MATERIALS AND METHODS: The work was performed on Ultimate 3000 TSQ Fortis HPLC-MS/MS (Thermo Fisher, USA). For sample preparation, acetonitrile was used with fexofenadine hydrochloride at a concentration of 10 ng/ml as an internal standard, which was added to plasma samples in 3:1 ratio. The volume of the injected sample was 5 μ l. Separation was performed on UCT Selectra C18 4.6 mm \times 100 mm, 3 μ m, 100 A column with a similar pre-column at 35°C, in gradient elution mode in proportion of 0.1% formic acid solution/acetonitrile: 0 min — 80%/20%, 0.1 min — 45%/55%, 5 min — 10%/90%, 10 min — 80%/20%, at flow rate of 300 μ l/min. Detection was performed in positive electrospray ionization mode, electrospray voltage 4000 V, sheath gas 50 arb, auxiliary gas 10 arb, purge gas 1 arb, evaporator temperature 350°C, ion transport tube temperature 300°C, using the multiple reaction monitoring mode (MRM) at argon flow rate 2 mTorr, 268 m/z \rightarrow 115.5 m/z, Collision Energy 18 V, Tube lens 95 V, 268 m/z \rightarrow 191 m/z, Collision Energy 17 V, Tube lens 95 V. The blood plasma of healthy volunteers served as matrix.

RESULTS: The analytical range of the technique was 2–1000 ng/ml. The developed technique was tested on a patient with arterial hypertension. During the analysis, an equilibrium concentration of metoprolol of 12.0 ng/ml was detected in the patient's blood plasma (previously, the patient took metoprolol tartrate at a dose of 12.5 mg twice a day for a week), and in 2 hours after taking the drug — 31.0 ng/ml.

CONCLUSION: A method for the quantitative determination of metoprolol in human blood plasma using HPLC-MS/MS has been developed, validated and tested.

Keywords: *metoprolol; HPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring*

For citation:

Myl'nikov P. Yu., Tranova Yu., Shchul'kin A. V., Seleznev S. V., Yakushin S. S., Yakusheva E. N. Development and Validation of HPLC-MS/MS Method for Quantitative Determination of Metoprolol in Blood Plasma of Patients. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2022;10(4):361–372. <https://doi.org/10.23888/HMJ2022104361-372>.

Актуальность

Метопролол — селективный β 1-адреноблокатор, без внутренней симпатомиметической активности. В сердце, блокируя β 1-адренорецепторы, метопролол урежает частоту сердечных сокращений (ЧСС), угнетает проводимость и возбудимость, снижает сократимость миокарда [1].

Эффективность метопролола доказана в многочисленных клинических исследованиях.

Известно, что метопролол снижает риск развития сердечно-сосудистых осложнений у больных с артериальной гипертензией. Показано, что действие метопролола преимущественно опосредовано за счет предупреждения смертей от ишемической болезни сердца (ИБС) и инсульта, кроме этого он способен снижать частоту внезапной смерти [1, 2]. Высокая эффективность метопролола при лечении стенокардии подтверждена в клинических исследованиях APSIS и IMAGE [1, 3, 4].

Метопролол входит в немногочисленную группу β -адреноблокаторов. Данная группа препаратов характеризуется способностью достоверно улучшать отдаленный прогноз больных после инфаркта миокарда (ИМ). В мета-анализе, включающем более 35000 пациентов, перенесших ИМ, применение β -адреноблокаторов сопровождалось снижением на 20–25% риска развития тяжелых осложнений — смерти от сердечно-сосудистых причин, внезапной смерти и повторного ИМ [1, 5, 6].

Метопролола сукцинат в лекарственной форме CR/XL в исследовании MERIT-HF вызывал достоверное сниже-

ние смертности у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [7].

Метопролол является липофильным β -блокатором, который метаболизируется изоферментом цитохрома P450 CYP2D6 с образованием O-деметилметопролола и α -гидроксилометопролола, которые, в свою очередь, выводятся с мочой [8].

Метаболит α -гидроксилометопролол также обладает активностью в отношении блокады β 1-адренорецепторов [9].

Показано, что фармакокинетика метопролола может варьировать в зависимости от ряда факторов, в частности от состояния печени и желудочно-кишечного тракта, возраста [10], активности изоферментом цитохрома P450 CYP2D6 [8] и ряда других факторов [11]. Для повышения эффективности и безопасности проводимой терапии целесообразно проводить терапевтический лекарственный мониторинг метопролола [12], для чего необходима чувствительная методика его количественного определения, что и послужило целью настоящего исследования.

Цель. Разработать и валидировать методику количественного определения метопролола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС).

Материалы и методы

В исследовании использовали субстанцию метопролола тартрата (Sigma-Aldrich, США). Структурная формула метопролола и фрагментация его молекулы представлены на рисунке 1.

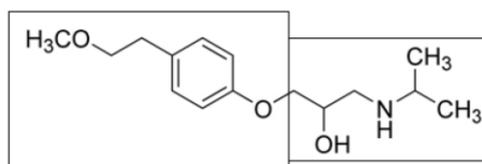


Рис. 1. Структурная формула метопролола и основной продукт его фрагментации.

Работа была выполнена на ВЭЖХ «Ultimate 3000» и МС/МС-детекторе TSQ Fortis (Thermo Fisher, США). Управление

системой и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47).

Для пробоподготовки применяли ацетонитрил с использованием в качестве внутреннего стандарта фексофенадина гидрохлорид (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США) в концентрации 10 нг/мл, который добавляли к образцам плазмы в соотношении 3:1 (600 мкл ацетонитрила с фексофенадином и 200 мкл плазмы). Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 1 минуты, затем центрифугировали при 19 000 g (Avanti JXN-3 «Beckman Coulter», США) в течение 10 минут при 4°C. Надосадочную жидкость в объеме 600 мкл переливали пипеткой в промаркированные виалы и помещали в автосемплер для последующего анализа.

Объем вводимой пробы составил 5 мкл.

Разделение выполняли на колонке UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm, 3 μm, 100 Å с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-3UM при температуре 35°C, в градиентном режиме элюирования в соотношении 0,1% раствора кислоты муравьиной/ацетонитрил: 0 мин — 80%/20%, 0,1 мин — 45%/55%, 5 мин — 10%/90%, 10 мин — 80%/20%, со скоростью потока 300 мкл/мин. Время удерживания метопролола в данных условиях составило 6,0 мин.

Детектирование проводили в положительном режиме ионизации электроспреем с напряжением 4000 В, оболочечный газ 50 arb, вспомогательный газ 10 arb, продувочный газ 1 arb, температура испарителя 350°C, ион-транспортующей трубки — 300°C, с использованием режима мониторинга множественных реакций (MRM) со скоростью подачи аргона 2 мТорр. Использовали следующие переходы:

- метопролол 268 m/z → 115,5 m/z, Collision Energy 18 V, Tube lens 95 V, 268 m/z → 191 m/z, Collision Energy 17 V, Tube lens 95 V;

- фексофенадин 502,3 m/z → 171 m/z, Collision Energy 27 V, Tube lens 110 V, 502,3 m/z → 466,2 m/z, Collision Energy 27 V, Tube lens 110 V.

Точную навеску стандартного образца метопролола массой 3 мг помещали в пластиковую пробирку объемом 5 мл и

растворяли в 3 мл метанола, после чего пробирку тщательно перемешивали на вортексе. Таким образом конечная концентрация метопролола в растворе составила 1 мг/мл. Полученный раствор разводили метанолом в 100 раз для получения раствора с концентрацией 10 мкг/мл. Рабочие растворы готовили путем разведения стандартных растворов метопролола водой Milli-Q. В эппендорф на 1,5 мл добавляли воду и исходные стандартные растворы. После чего пробирки тщательно перемешивали на вортексе.

В качестве биологической матрицы использовалась холостая плазма крови, полученная от здоровых добровольцев. Калибровочные образцы для проведения валидации готовили путем добавления 20 мкл соответствующего рабочего раствора метопролола к 180 мкл (разводили в 10 раз матрицей) холостой плазмы крови с последующим интенсивным перемешиванием на вортексе.

Валидацию биоаналитического метода проводили на основе решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Рассчитывали следующие показатели:

- селективность;
- градуировочную кривую (линейность);
- нижний предел количественного определения;
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- перенос пробы;
- матричный эффект;
- стабильность образцов.

Результаты

В ходе выполнения валидации биоаналитической методики выполняли анализ холостой матрицы без добавления стандарта метопролола и матрицы с добавлением метопролола до конечной кон-

центрации 2 нг/мл и фексофенадина — 10 нг/мл. На хроматограммах образцов холостой матрицы не фиксировались пики со временем удерживания, соответствующим

времени удерживания метопролола и фексофенадина (рис. 2, 3). Полученные результаты подтверждают селективность предлагаемой методики.

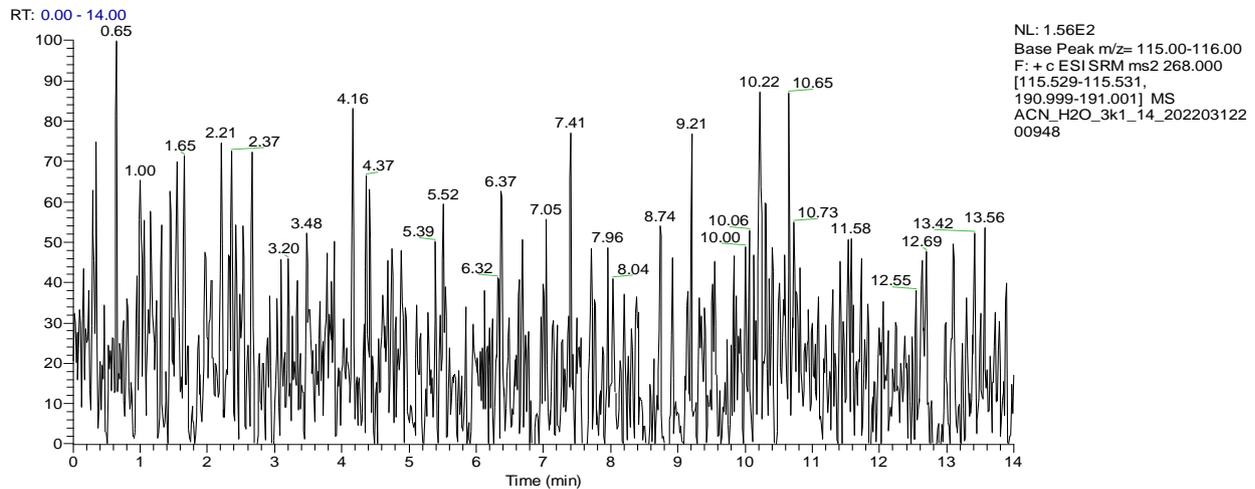


Рис. 2. Хроматограмма образцов холостой матрицы без добавления стандарта метопролола.

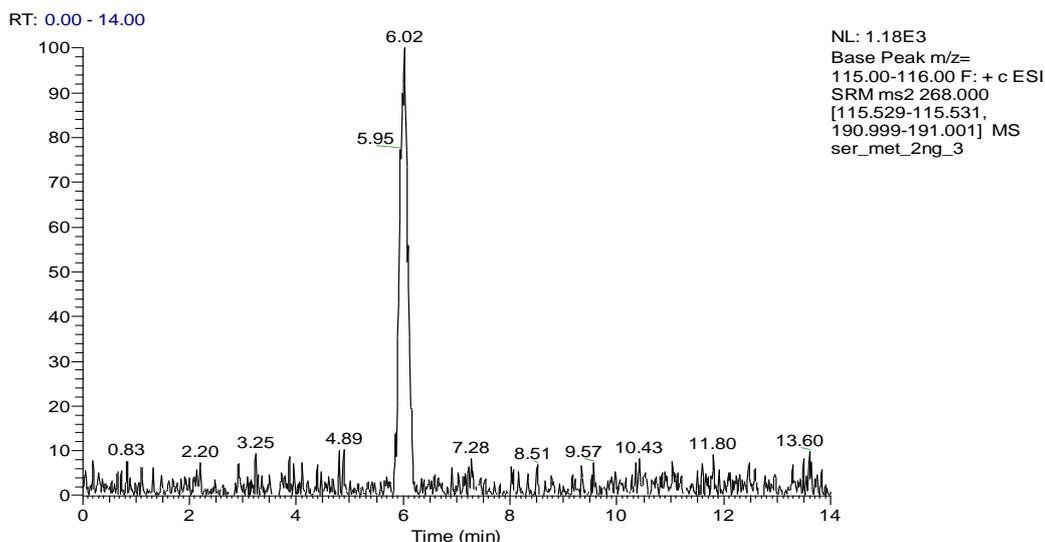


Рис. 3. Хроматограмма образцов матрицы с добавлением стандарта метопролола до конечной концентрации 2 нг/мл.

Предел обнаружения метопролола в матрице с помощью разработанного метода составил 0,5 нг/мл, при этом соотношение сигнала к шуму было не менее 3. При этом *нижний предел количественного определения* (НПКО) метопролола составил 2 нг/мл, отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Далее в ходе разработки и валидации методики строили *градуировочную кривую*. Для этого проводили анализ пулированных образцов холостой матрицы, в которые добавляли равные объемы рабочих растворов метопролола до получения концентраций целевого вещества 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 800, 1000 нг/мл. По полученным значениям строили 3 гра-

дуировочные кривые в координатах отношение площади пика метопролола к площади пика фексофенадина от концентрации метопролола в плазме крови (образец графика 1 приведен на рис. 4), которые описываются уравнениями линейной регрессии:

$$Y = 0,00254765 + 0,00662667 * X \quad R^2 = 0,9998$$

$$Y = 0,00308657 + 0,0066395 * X \quad R^2 = 0,9996$$

$$Y = 0,00223864 + 0,00641326 * X \quad R^2 = 0,9998$$

Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99).

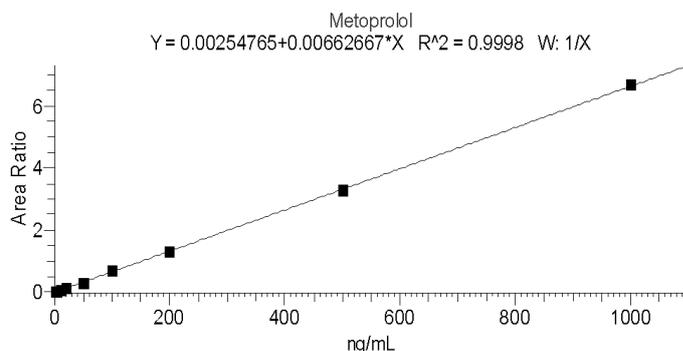


Рис. 4. График 1 зависимости отношения площади пика метопролола к площади пика фексофенадина от концентрации метопролола.

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, соответствовали принятым нормам: не более 15% для всех значений и не более 20% для НПКО.

Следующим этапом работы было определение *точности и прецизионности метода*. Прецизионность представляет собой относительное стандартное отклонение, а точность — относительная по-

грешность. Растворы контролей качества метопролола с концентрациями 2, 5, 500 и 800 нг/мл анализировали в рамках трех циклов. Прецизионность и точность оценивали внутри цикла и между циклами. Анализ 5 образцов проводили для каждой концентрации метопролола и внутри каждого цикла. Полученные величины соответствовали принятым нормам (не более 20% для НПКО и не более 15% — для остальных точек) (табл. 1).

Таблица 1. Точность и прецизионность методики количественного определения метопролола в плазме крови внутри и между циклами

	Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация средняя, нг/мл	Средняя точность E, %	SD	Прецизионность, RSD %
Внутри цикла	2	2,08	4,2	0,3	14,40
	5	5,42	8,47	0,51	9,41
	500	534,4	6,89	26,24	4,91
	800	769,83	3,77	29,53	3,84
Между циклами	2	2,04	1,8	0,27	13,34
	5	5,38	7,51	0,59	10,92
	500	515,59	3,12	38,19	7,41
	800	786,37	1,70	39,59	5,03

Стабильность. Оценивалась стабильность анализируемого вещества и внутреннего стандарта в составе рабочих растворов, анализируемого вещества в биологической матрицы при хранении, а также после пробоподготовки.

Стабильность рабочих растворов оценивали путём их хроматографического исследования после разведения до концентрации нижнего и верхнего контроля качества (5 и 800 нг/мл), указанное разведение учитывали в дальнейшем при расчёте концентраций. Анализировали площадь пиков метопролола и фексофенадина сразу после приготовления и после хранения при -80°C в течение 30 дней.

Для оценки стабильности анализируемого вещества в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии (долгосрочной стабильности) готовили образцы, аналогичные по составу образцам нижнего и верхнего контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные — после хранения в замороженном состоянии при -80°C в течение 30 дней.

Для оценки краткосрочной стабильности метопролола после пробоподготовки исследовали образцы нижнего и верхнего контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после получения, а остальные — после хранения в автосамплере при $+6^{\circ}\text{C}$ в течение 1 сут.

Для оценки стабильности анализируемого вещества в составе плазмы крови при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C готовили образцы, аналогичные по составу образцам нижнего и верхнего контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные после трехкратного цикла заморозки-разморозки. Исследовали по 3 независимых образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Анализ полученных результатов показал, что метопролол стабилен как в составе рабочих растворов, так и в составе плазмы крови при разных условиях пробоподготовки: в замороженном состоянии -80°C в течение 30 сут, в лотке автосамплера в те-

чение 1 сут при $+6^{\circ}\text{C}$ и при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C .

Перенос пробы. В ходе работы проводили последовательную оценку пробы с концентрацией метопролола 1000 нг/мл, а затем оценку образца чистой матрицы. Результаты анализа показали, что на хроматограмме чистой матрицы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам метопролола.

Матричный эффект. В холостую плазму из шести различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы аналита для получения нижнего и верхнего контроля качества. Чистые растворы аналита (на воде) были приготовлены с такими же концентрациями.

Матричный эффект рассчитывали как отношение площади пика в присутствии матрицы к площади пика в отсутствие матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Рассчитанные относительное стандартное отклонение матричного эффекта метопролола, фексофенадина и нормализованного матричного эффекта метопролола находились в пределах нормы (не более 15%).

Апробацию разработанной методики провели на пациенте с артериальной гипертензией, который проходил стационарное лечение в Рязанском областном клиническом кардиологическом диспансере и принимал метопролола тартрат в дозе 12,5 мг два раза в день. Забор крови у пациента выполнялся в рамках проведения исследования «Клиническое одномоментное контролируемое исследование резистентной Артериальной Гипертензии для разработки персонализированного подхода к терапии (САГА)» (выписка из локального этического комитета №, пациент подписал информированное согласие). Полученные хроматограммы представлены на рисунках 5 и 6.

В ходе анализа у пациента в плазме крови детектировалась равновесная концентрация метопролола 12,0 нг/мл (пред-

варительно пациент принимал метопролола тартрат в указанной дозе в течение не-

дели), а через 2 ч после приема препарата — 31,0 нг/мл.

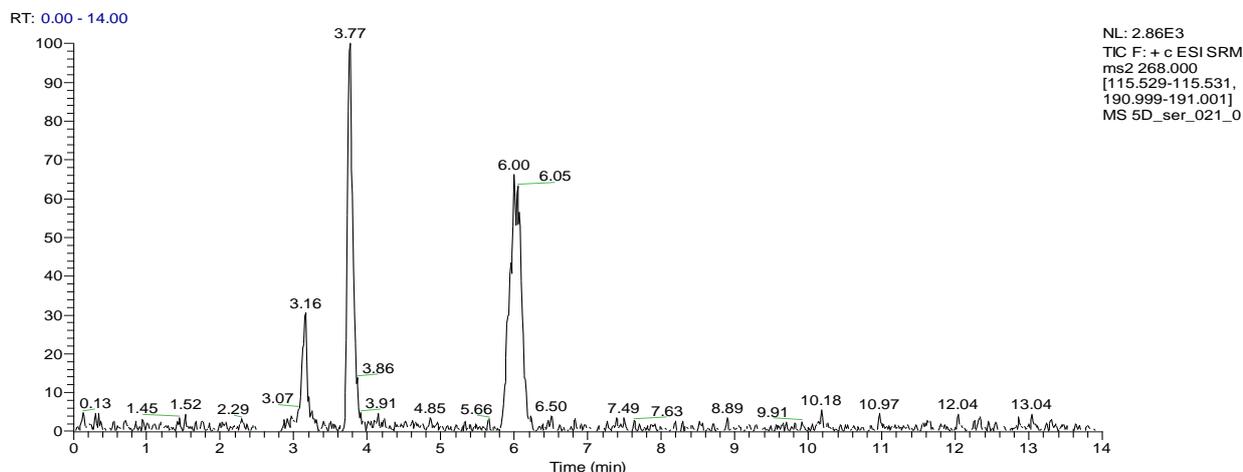


Рис. 5. Хроматограмма плазмы крови пациента перед приемом очередной дозы метопролола (равновесная концентрация).

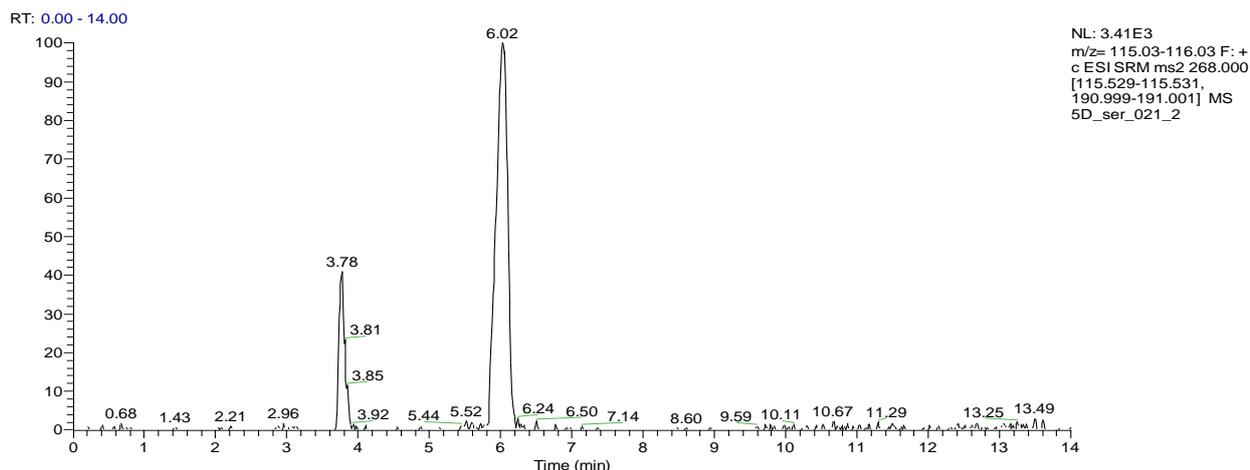


Рис. 6. Хроматограмма плазмы крови пациента через 2 ч после приема метопролола.

Интересно отметить, что на хроматограммах пациента, принимавшего метопролол, кроме пика на 6 мин детектировался пик на 3,78 мин с такими же MRM переходами. Скорее всего, этот пик обусловлен метопрололовой кислотой — метаболитом метопролола, характеризующейся таким же m/z и такими же продуктами распада [13].

Обсуждение

В ходе настоящего исследования разрабатывалась и валидировалась методика

количественного определения метопролола в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС. В доступной литературе описано несколько аналогичных методик.

А. А. Zoerner, и др. разработали способ одновременного детектирования ивабрадина, ребоксетина и метопролола методом ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовка заключалась в добавлении к 200 мкл плазмы человека этилацетата. Хроматографическое разделение проводили на колонке ВЕН С18 длиной 50 мм с градиентным элюированием смесью воды и метанола,

каждый из которых содержал 2 мМ ацетата аммония, в течение 4,5 мин. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации электроспреем (ESI+). Разработанный метод был линеен в диапазоне 1 нг/мл до 500 нг/мл для всех трех аналитов [14].

Описан метод одновременного определения метопролола и бисопролола в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитические диапазоны метода составляли от 5 до 250 нг/мл и 1–250 нг/мл для метопролола и бисопролола соответственно. Была продемонстрирована пригодность разработанного метода для терапевтического мониторинга лекарственных средств во время лечения артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний [15].

В другой методике ВЭЖХ-МС/МС детектирования метопролола в плазме крови людей экстракция аналита из биологического материала осуществляли третбутилметиловым эфиром. Для разделения использовали колонку Kromasil C18 (5 мкм, 100 × 4,6 мм) с изократической подвижной фазой из 5 мМ формиата аммония, рН 3,5 и ацетонитрила (15:85% v/v). Ионизация образца проводилась методом ионизации электрораспылением в режиме положительных ионов.

Анализ выполнялся в MRM m/z 268,15 → 115,90. Линейность метода была

установлена в диапазоне концентраций 1,505–538,254 нг/мл с прецизионностью и правильностью в диапазоне от 4,67 до 7,41% и от 90,66 до 98,15% соответственно [16].

Таким образом, разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС анализа концентрации метопролола в плазме крови обладает не меньшей чувствительностью, но отличается более простой пробоподготовкой.

При апробации данной методики в реальной клинической практике у пациента были получены концентрации метопролола в плазме крови, укладывающиеся в его терапевтический диапазон (20–500 нг/мл) [17], что подтверждает ее адекватность.

Заключение

Разработанный метод ВЭЖХ-МС/МС является удобным и точным методом количественного анализа метопролола в плазме крови людей. Предложенная методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, матричный эффект, стабильность. Методика имеет аналитический диапазон 2–1000 нг/мл. Метод количественного определения метопролола ВЭЖХ-МС/МС может применяться в клинической практике с целью проведения лекарственного мониторинга и изучения фармакокинетики метопролола у пациентов с артериальной гипертензией.

Список источников

1. Кулешова Э.В. Лекарственные формы и клинический эффект метопролола // Артериальная гипертензия. 2009. Т. 15, № 3. С. 262–267. doi: [10.18705/1607-419X-2009-15-3-262-267](https://doi.org/10.18705/1607-419X-2009-15-3-262-267)
2. Wikstrand J., Warnold I., Tuomilehto J., et al. Metoprolol versus thiazide diuretics in hypertension. Morbidity results from the MAPHY Study // Hypertension. 1991. Vol. 17, № 4. P. 579–588. doi: [10.1161/01.hyp.17.4.579](https://doi.org/10.1161/01.hyp.17.4.579)
3. Savonitto S., Ardissio D., Egstrup K., et al. Combination therapy with metoprolol and nifedipine versus monotherapy in patients with stable angina pectoris. Results of the international multicenter angina exercise (IMAGE) study // Journal of the American College of Cardiology. 1996. Vol. 27, № 2. P. 311–316. doi: [10.1016/0735-1097\(95\)00489-0](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00489-0)
4. Rehnqvist N., Hjemdaht P., Billing E., et al. Treatment of stable angina pectoris with calcium antagonists and beta-blockers. The APSIS study. Angina Prognosis study in Stockholm // Cardiology. 1995. Vol. 40, № 12, Suppl. 1. P. 301.
5. Freemantle N., Cleland J., Young P., et al. Beta-blockade after myocardial infarction: systematic review and meta-regression analysis // BMJ. 1999. Vol. 318, № 7200. P. 1730–1737. doi: [10.1136/bmj.318.7200.1730](https://doi.org/10.1136/bmj.318.7200.1730)
6. Dargie H.J. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomized trial // Lancet. 2001. Vol. 357, № 9266. P. 1385–1390. doi: [10.1016/s0140-6736\(00\)04560-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04560-8)
7. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL randomised intervention

- trial in congestive heart failure (MERIT-HF) // *Lancet*. 1999. Vol. 353, № 9169. P. 2001–2007. doi: [10.1016/S0140-6736\(99\)04440-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04440-2)
8. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., и др. Клиническая фармакогенетика β-адреноблокаторов: возможности повышения эффективности и безопасности терапии // *Сердце*. 2006. Т. 5, № 3. С. 162–165.
 9. De Jesus Antunes N., Cavalli R.C., Marques M.P., et al. Stereoselective determination of metoprolol and its metabolite α-hydroxymetoprolol in plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics during pregnancy // *Chirality*. 2013. Vol. 25, № 1. P. 1–7. doi: [10.1002/chir.22102](https://doi.org/10.1002/chir.22102)
 10. Лазебник Л.Б., Михеева О.М., Дроздов В.Н., и др. Фармакокинетика и фармакодинамика эналаприла и метопролола у пожилых с патологией органов пищеварения // *Клиническая геронтология*. 2007. № 1. С. 22–28.
 11. Шулькин А.В., Филимонова А.А., Трунина Т.П., и др. Фармакотерапия артериальной гипертензии у пациентов на гемодиализе // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016. № 3. С. 26–34.
 12. Aonuma K., Shiga T., Atarashi H., et al. Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Cardiovascular Drugs Clinical Use of Blood Drug Concentration Monitoring (JCS 2015) — Digest Version // *Circulation Journal*. 2017. Vol. 81, № 4. P. 581–612. doi: [10.1253/circj.CJ-66-0138](https://doi.org/10.1253/circj.CJ-66-0138)
 13. Dias E., Hachey B., McNaughton C., et al. An LC-MS assay for the screening of cardiovascular med-
 - ications in human samples // *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013. Vol. 937. P. 44–53. doi: [10.1016/j.jchromb.2013.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.010)
 14. Zoerner A.A., Schroeder Ch., Kayacelebi A.A., et al. A validated, rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous ivabradine, reboxetine, and metoprolol analysis in human plasma and its application to clinical trial samples // *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013. Vol. 927. P. 105–111. doi: [10.1016/j.jchromb.2013.01.016](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.016)
 15. Rodina T.A., Mel'nikov E.S., Dmitriev A.I., et al. Simultaneous Determination of Metoprolol and in Human Serum by HPLC-MS/MS for Clinical Drug Monitoring // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018. Vol. 51, № 8. P. 1111–1118. doi: [10.1007/s11094-018-1750-4](https://doi.org/10.1007/s11094-018-1750-4)
 16. Ishaq B.M., Reddy L.S.S., Basha G.M., et al. Rapid and Sensitive Bioanalytical Method Development and Validation for Quantification of Metoprolol Using LC-MS/MS in Human Plasma // *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 2020. Vol. 42, № 02. P. 171–179. doi: [10.52568/000636/JCSP/42.02.2020](https://doi.org/10.52568/000636/JCSP/42.02.2020)
 17. Regenthal R., Krueger M., Koepfel C., et al. Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs // *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. 1999. Vol. 15, № 7–8. P. 529–544. doi: [10.1023/a:1009935116877](https://doi.org/10.1023/a:1009935116877)

References

1. Kuleshova EV. Formulation and effects of metoprolol. *Arterial Hypertension*. 2009;15(3): 262–7. (In Russ). doi: [10.18705/1607-419X-2009-15-3-262-267](https://doi.org/10.18705/1607-419X-2009-15-3-262-267)
2. Wikstrand J, Warnold I, Tuomilehto J, et al. Metoprolol versus thiazide diuretics in hypertension. Morbidity results from the MAPHY Study. *Hypertension*. 1991;17(4):579–88. doi: [10.1161/01.hyp.17.4.579](https://doi.org/10.1161/01.hyp.17.4.579)
3. Savonitto S, Ardissino D, Egstrup K, et al. Combination therapy with metoprolol and nifedipine versus monotherapy in patients with stable angina pectoris. Results of the international multicenter angina exercise (IMAGE) study. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(2):311–6. doi: [10.1016/0735-1097\(95\)00489-0](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00489-0)
4. Rehnqvist N, Hjemdahl P, Billing E, et al. Treatment of stable angina pectoris with calcium antagonists and beta-blockers. The APSIS study. *Angina Prognosis study in Stockholm. Cardiologia*. 1995;40(12, Suppl 1):301.
5. Freemantle N, Cleland J, Young P, et al. Beta-blockade after myocardial infarction: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ*. 1999; 318(7200):1730–7. doi: [10.1136/bmj.318.7200.1730](https://doi.org/10.1136/bmj.318.7200.1730)
6. Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomized trial. *Lancet*. 2001;357(9266):1385–90. doi: [10.1016/s0140-6736\(00\)04560-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04560-8)
7. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999;353(9169):2001–7. doi: [10.1016/S0140-6736\(99\)04440-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04440-2)
8. Sychev D. A., Ramenskaya G. V., Ignatiev I. V., et al. Clinical pharmacology of beta-adrenoblockers: possibilities to increase efficacy and safety of therapy. *Heart*. 2006;5(3):162–5. (In Russ).
9. De Jesus Antunes N, Cavalli RC, Marques MP, et al. Stereoselective determination of metoprolol and its metabolite α-hydroxymetoprolol in plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics during pregnancy. *Chirality*. 2013;25(1): 1–7. doi: [10.1002/chir.22102](https://doi.org/10.1002/chir.22102)
10. Лазебник ЛБ, Микheyeva OM, Дроздов VN, et al. Фармакокинетика и фармакодинамика эналаприла и метопролола у пожилых с патологией органов пищеварения. *Клиническая Геронтология*.

- 2007;(1):22–8. (In Russ).
11. Shchulkin AV, Filimonova AA, Trunina TP, et al. Pharmacotherapy of arterial hypertension at patients on the hemodialysis. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2016;(3):26–34. (In Russ).
 12. Aonuma K, Shiga T, Atarashi H, et al. Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Cardiovascular Drugs Clinical Use of Blood Drug Concentration Monitoring (JCS 2015) — Digest Version. *Circulation Journal*. 2017;81(4):581–612. doi: [10.1253/circj.CJ-66-0138](https://doi.org/10.1253/circj.CJ-66-0138)
 13. Dias E, Hachey B, McNaughton C, et al. An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013;937:44–53. doi: [10.1016/j.jchromb.2013.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.010)
 14. Zoerner AA, Schroeder Ch, Kayacelebi AA, et al. A validated, rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous ivabradine, reboxetine, and metoprolol analysis in human plasma and its application to clinical trial samples. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013;927:105–11. doi: [10.1016/j.jchromb.2013.01.016](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.016)
 15. Rodina TA, Mel'nikov ES, Dmitriev AI, et al. Simultaneous Determination of Metoprolol and in Human Serum by HPLC-MS/MS for Clinical Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(8):1111–8. (In Russ). doi: [10.1007/s11094-018-1750-4](https://doi.org/10.1007/s11094-018-1750-4)
 16. Ishaq BM, Reddy LSS, Basha GM, et al. Rapid and Sensitive Bioanalytical Method Development and Validation for Quantification of Metoprolol Using LC-MS/MS in Human Plasma. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 2020;42(02):171–9. doi: [10.52568/000636/JCSP/42.02.2020](https://doi.org/10.52568/000636/JCSP/42.02.2020)
 17. Regenthal R, Krueger M, Koepfel C, et al. Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. 1999;15(7–8):529–44. doi: [10.1023/a:1009935116877](https://doi.org/10.1023/a:1009935116877)

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ № МД-13.10.2022.3.

Этика. Использованы данные пациента в соответствии с письменным информированным согласием.

Информация об авторах:

Мыльников Павел Юрьевич — к.б.н., ассистент кафедры фармакологии, SPIN: 8503-3082, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>, e-mail: dukeviperlr@gmail.com

Транова Юлия — очный аспирант кафедры фармакологии, SPIN-код: 2732-8760, <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>, e-mail: yulyatran@gmail.com

✉ Шулькин Алексей Владимирович — д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии, SPIN: 2754-1702, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>, e-mail: alekseishulkin@rambler.ru

Селезнев Сергей Владимирович — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии с курсом медико-социальной экспертизы, SPIN: 4532-5622, <https://orcid.org/0000-0002-4069-8082>.

Якушин Сергей Степанович — д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии с курсом медико-социальной экспертизы, SPIN: 7726-7198, <https://orcid.org/0000-0002-1394-3791>, e-mail: prof.yakushin@gmail.com

Якушева Елена Николаевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии, SPIN: 2865-3080, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Вклад авторов:

Мыльников П. Ю., Транова Ю. — разработка и валидация методики.

Шулькин А.В. — концепция и дизайн исследования, написание статьи.

Селезнев С.В. — апробация методики на пациенте.

Якушин С.С. — апробация методики на пациенте, редактирование статьи.

Funding. The work was carried out within the framework of the Grant of President of the Russian Federation No. MD-13.10.2022.3.

Ethics. The data is used in accordance with the informed consent of patient.

Information about the authors:

Pavel Yu. Myl'nikov — Cand. Sci (Biology), Assistant of the Department of Pharmacology, SPIN: 8503-3082, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>, e-mail: dukeviperlr@gmail.com

Yuliya Tranova — Postgraduate Student of the Department of Pharmacology, SPIN-код: 2732-8760, <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>, e-mail: yulyatran@gmail.com

✉ Aleksey V. Shchul'kin — MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology, SPIN: 2754-1702, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>, e-mail: alekseishulkin@rambler.ru

Sergey V. Seleznev — MD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Hospital Therapy with a Course of Medical and Social Expertise, SPIN: 4532-5622, <https://orcid.org/0000-0002-4069-8082>.

Sergey S. Yakushin — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Hospital Therapy with a Course of Medical and Social Expertise, SPIN: 7726-7198, <https://orcid.org/0000-0002-1394-3791>, e-mail: prof.yakushin@gmail.com

Elena N. Yakusheva — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor; Head of the Department of Pharmacology, SPIN: 2865-3080, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Contribution of the authors:

Myl'nikov P. Yu., Tranova Yu. — development and validation of the methodology.

Shchul'kin A. V. — concept and design of the study, writing an article.

Seleznev S. V. — approbation of the technique on the patient.

Yakushin S. S. — approbation of the technique on the patient, editing of the article.

Якушева Е.Н. — общее руководство работой, редактирование статьи.

Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Yakusheva E. N. — general management of the work, editing of the article.

Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article all authors.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.