



УДК 541

Определение некоторых гипотензивных лекарственных веществ в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / тандемной масс-спектрометрии при анализе острых отравлений

Мельников Е.С.¹, Белова М.В.^{1,2}, Родина Т.А.^{3,4}, Раменская Г.В.^{1,3}.

¹ГБОУ ВПО Первый МГМУ им И.М.Сеченова МЗ РФ, Москва

²ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы, Москва

³ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, Москва

⁴ГБУЗ «ГКБ №23 им. Медсантруд» ДЗ г. Москвы, Москва

Поступила в редакцию 25.02.2015 г.

Разработана селективная, чувствительная и воспроизводимая методика количественного определения атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла в плазме крови человека методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). В источнике ионов одновременно использовались электрораспыление (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации путём мониторинга множественных реакций (MRM). Пробоподготовку плазмы проводили путём осаждения белков ацетонитрилом. Расчёты при количественном определении проводили методом внешнего стандарта. Калибровочные кривые носили линейный характер в диапазоне концентраций 10-5000 нг/мл. Разработанная методика может быть использована для диагностики острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол, эналаприл, острые отравления

Determination of some antihypertensive drugs in blood plasma by high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry in the analysis of acute poisonings

Melnikov E.S.¹, Belova M.V.^{1,2}, Rodina T.A.^{3,4}, Ramenskaya G.V.^{1,3}.

¹Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

²The Moscow Department of Health N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow

³The Ministry of Health of the Russian Federation Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow

⁴The Moscow Department of Health City Clinical Hospital №23 n.a. «Medsantrud», Moscow

The selective, sensitive and reproducible method for the quantification of atenolol, bisoprolol, verapamil, metoprolol, nifedipine, enalapril, and propranolol in human blood plasma by reverse phase high

performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS) was developed. Electrospray (ESI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI) were simultaneously used in the ion source. The detection was performed by multiple reaction monitoring (MRM) in positive ionization mode. Sample preparation was performed by plasma protein precipitation with acetonitrile. Calculations in quantitative determination were carried out by external calibration. Calibration curves were linear in the concentration range of 10-5000 ng/ml. The developed method may be used for the diagnosis of acute poisoning by antihypertensive drugs.

Keywords: HPLC-MS/MS, atenolol, bisoprolol, verapamil, metoprolol, nifedipine, propranolol, enalapril, acute poisonings

Введение

Артериальная гипертензия является одним из самых распространённых заболеваний сердечно-сосудистой системы, и для лечения данной патологии существует большое количество лекарственных препаратов, многие из которых включены список ЖНВЛП [1] и стандарты лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы [2-3]. Разнообразие и доступность гипотензивных лекарственных средств (ГЛС) определяют распространённость острых отравлений данными препаратами, а схожесть клинических проявлений при отравлениях затрудняет точную постановку диагноза и назначение эффективного лечения.

Решением данной проблемы может служить разработка селективной, чувствительной и воспроизводимой методики определения ГЛС в плазме крови пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений препаратами этой группы.

По статистике наибольшее токсикологическое значение имеют такие ГЛС, как атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол и эналаприл [4]. Исследуемые вещества имеют значительные различия в структуре молекул (Рисунок 1) и физико-химических свойствах [5]. При диагностике острых отравлений важно проводить анализ за минимальное время, причем токсикант и его концентрация заранее неизвестны. В связи с указанными факторами от аналитического метода определения ГЛС в плазме крови при острых отравлениях требуется сочетание высокой чувствительности и селективности, простая и быстрая процедура пробоподготовки и определение любого из исследуемых ГЛС или их сочетания в рамках одного анализа.

Теоретическая часть

На современном этапе в биоаналитических исследованиях, в частности в лабораторной диагностике острых отравлений ГЛС, наибольшее распространение получили хроматографические методы (газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография) в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием [6–20].

Ранее было показано, что метод ГХ-МС без дериватизации пригоден только для скрининга ГЛС при острых отравлениях без возможности их количественного определения, что связано с процессами термодеструкции и образования хроматографических артефактов [21]. Описаны многочисленные методики анализа ГЛС методом ГХ/МС с дериватизацией [18-20], однако в данном случае увеличивается время анализа, что неприемлемо при диагностике острых отравлений.

Метод ВЭЖХ-МС/МС применим для анализа термолабильных веществ, поэтому может быть использован как для качественного анализа, так и для количественного определения исследуемых ГЛС в плазме крови [7-17]. ВЭЖХ-МС/МС обладает

высокой чувствительностью и селективностью, которые необходимы для проведения химико-токсикологического анализа [22].

В качестве способа пробоподготовки для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС предлагается использовать жидкость-жидкостную экстракцию [7, 13, 15], твердофазную экстракцию [9, 11, 16], сочетание данных способов [11] или осаждение белков плазмы крови [8, 10, 14]. Требованию экспрессности в наибольшей степени удовлетворяет метод осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом [14].

Большинство из рассмотренных методик разработано для определения ГЛС на уровне их терапевтических концентраций, тогда как в случаях острых отравлений концентрация вещества в плазме крови может быть значительно выше [5].

С учётом всех требований к анализу острых отравлений целью настоящего исследования является разработка и валидация биоаналитической методики, имеющей широкий аналитический диапазон и применимой для анализа ГЛС в плазме крови с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС и пробоподготовки путём осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом.

Эксперимент

Стандартные образцы и реактивы. В работе использовали следующие реактивы: метанол LiChrosolv® Reag. Ph Eur (марки gradient grade for liquid chromatography), муравьиная кислота ч.д.а. (Merck), формиат аммония ч.д.а. (Merck), деионизованная вода (электропроводность – 18.2 МОм*см, Millipore simplicity UV, Merck-Millipore). Для приготовления калибровочных растворов использовали стандартные образцы атенолола, бисопролола гемифумарата, верапамила гидрохлорида, метопролола тартрата, нифедипина, пропранолола гидрохлорида и эналаприла малеата производства Sigma-Aldrich, удовлетворяющие требованиям USP.

Стандартные растворы и калибровочные образцы. Исходный стандартный раствор (50000 нг/мл) готовили путём растворения в метаноле навесок стандартных образцов исследуемых веществ. Далее путём разведения готовили серию стандартных растворов с концентрациями ГЛС на уровне 25000 нг/мл, 12500 нг/мл, 5000 нг/мл, 2500 нг/мл, 500 нг/мл, 250 нг/мл, 50 нг/мл. Калибровочные образцы готовили, прибавляя 100 мкл стандартного раствора к 400 мкл интактной («чистой») плазмы. Концентрация ГЛС в калибровочных образцах составила примерно 10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 нг/мл. Точную концентрацию каждого ГЛС выражали в пересчёте на свободное основание и с учётом чистоты стандартных образцов.

Пробоподготовка. К 500 мкл исследуемой плазмы или калибровочного образца прибавляли 700 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 1 мин на шейкере Vortex V-3 (Elmi, Латвия), после чего центрифугировали 15 мин со скоростью 15000 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5427 (Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали их в автосамплер хроматографа.

Хроматографические и масс-спектрометрические условия. Использовался жидкостный хроматомасс-спектрометр LCMS-8040 (система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром, Shimadzu, Япония), укомплектованный системой ионизации DUIS (обеспечивает одновременное использование электрораспыления (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI)), системой градиентного элюирования, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-M20A с диодной матрицей (диапазон длин волн 190-800 нм), термостатом колонок CTO-20AC с диапазоном температур 4-90°C.

Разделение осуществляли на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из элюента А: 0.1% муравьиной кислоты 1 ммоль/л формиата аммония / деионизованная вода – и элюента В: 0.1% муравьиной кислоты 1 ммоль/л формиата аммония / метанол. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования, описанном в таблице 1. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.8 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Таблица 1. Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0.0→2.5	30→45
2.5→4.0	45
4.0→7.0	45→50
7.0→8.5	50
8.5→12	50→90
12→14	90
14→15	90→30
15→20	30

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при положительной ионизации в режиме мониторинга множественных реакций (Multiple reaction monitoring, MRM). Ионы-предшественники, фрагментные ионы и энергии соударений для каждого вещества были подобраны экспериментально и представлены в таблице 2.

Валидация методики. Валидация методики количественного определения атенолола, биспролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов, эффект матрицы, извлечение [23-25].

Селективность методики оценивали при сравнении хроматограмм проб чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов атенолола, биспролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла с хроматограммами проб чистой плазмы. На хроматограмме пробы чистой плазмы не наблюдается пиков, соответствующих по временам удерживанию ГЛС. Времена удерживания имеют следующие величины: атенолол – 1.93 мин, метопролол – 4.28 мин, биспролол – 6.46 мин, пропранолол – 7.43 мин, эналаприл – 8.34 мин, верапамил – 9.99 мин, нифедипин – 12.39 мин.

При оценке линейности проводили анализ 7 проб чистой плазмы с добавлением стандартного раствора атенолола, биспролола, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла до получения концентраций на уровне 10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 нг/мл и 6 проб чистой плазмы с добавлением стандартного раствора верапамила до получения концентраций на уровне 10, 50, 100, 500, 1000, 2500 нг/мл.

Для атенолола, биспролола, верапамила, метопролола, пропранолола и эналаприла построены калибровочные графики с использованием весового коэффициента $1/C$ (рис. 2). Уравнения калибровочных прямых имеют вид: для атенолола $y=6141.19*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99988, для биспролола $y=11588.1*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99916, для верапамила $y=24131.7*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99901, для

метопролола $y=6302.58*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99958, для пропранолола $y=9210.13*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99954, и для эналаприла $y=13588.6*x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99931.

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования ГЛС в режиме MRM при положительной ионизации

Вещество	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, V
Атенолол	267.20	164.00	-30.00
		145.10	-35.00
		133.10	-35.00
		117.10	-35.00
Метопролол	268.20	159.10	-30.00
		133.10	-35.00
		121.10	-35.00
		116.10	-37.00
Бисопролол	326.30	162.10	-23.00
		147.10	-24.00
		133.10	-25.00
		116.20	-28.00
Пропранолол	260.20	183.10	-24.00
		155.10	-26.00
		129.10	-27.00
		116.10	-27.00
Эналаприл	377.20	303.10	-23.00
		234.20	-25.00
		160.10	-24.00
		130.10	-27.00
		117.20	-50.00
Верапамил	455.40	303.20	-33.00
		260.10	-33.00
		165.10	-35.00
		150.10	-35.00
Нифедипин	347.20	254.00	-28.00
		239.10	-30.00
		223.10	-30.00
		195.10	-35.00
		181.00	-50.00

Калибровочная зависимость для нифедипина (рис 3) не может быть описана в данных условиях линейной функцией с требуемой правильностью и прецизионностью, однако наблюдается степенная зависимость вида $y=4\ 156.8*x^{1.0779}$, коэффициент корреляции (r) составляет 0.99985.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по калибровочным уравнениям, укладываются в допустимые нормы отклонений ($\pm 20\%$ для нижней точки аналитического диапазона и $\pm 15\%$ для остальных точек).

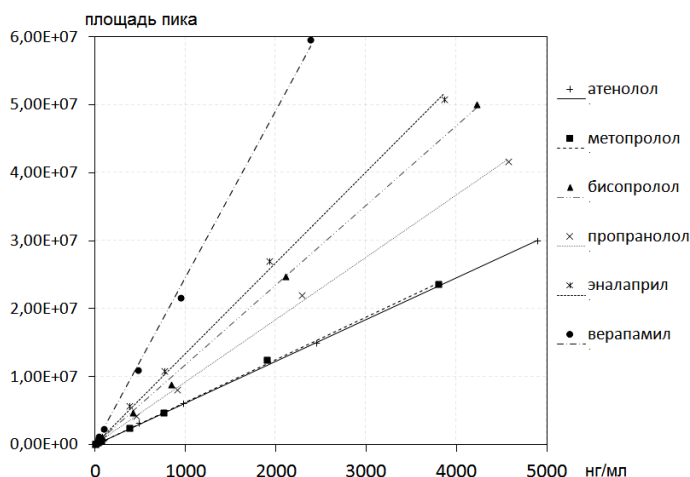


Рис. 2. Калибровочные графики для атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, пропранолола и эналаприла

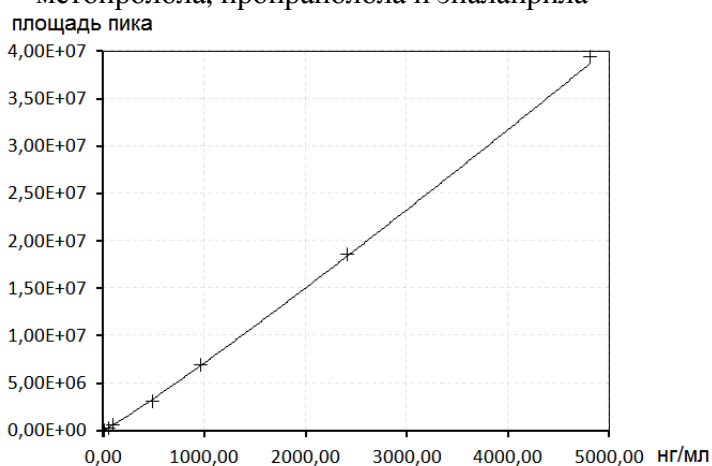


Рис. 3. Калибровочный график для нифедипина

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора атенолола, бисопролола, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла до получения концентраций около: 10, 100, 2500, 5000 нг/мл и 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора верапамила до получения концентраций около: 10, 100, 1000, 2500 нг/мл. Анализ каждого раствора осуществляли по 5 раз в рамках двух аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в табл. 3.

За предел количественного определения (ПКО) методики принималась минимальная концентрация ГЛС в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 9.80 нг/мл для атенолола, 8.45 нг/мл для бисопролола, 9.54 нг/мл для верапамила, 7.61 нг/мл для метопролола, 9.81 нг/мл для нифедипина, 9.14 нг/мл для пропранолола и 7.73 нг/мл для эналаприла. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на рис. 4.

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики внутри одного аналитического цикла и между циклами

	Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
		Найдено, среднее, нг/мл	RSD, %	ε, %	Найдено, среднее, нг/мл	RSD, %	ε, %
Атенолол	9.80	9.23	9.32	-5.80	9.34	8.18	-4.72
	98.00	92.91	4.16	-5.20	93.95	4.45	-4.13
	2450.00	2542.15	3.21	3.76	2524.33	3.83	3.03
	4900.00	4515.75	5.36	-7.84	4617.58	6.01	-5.76
Метопролол	7.61	7.30	9.79	-4.07	7.29	8.91	-4.19
	76.08	83.85	2.14	10.22	84.29	2.02	10.79
	1901.90	1912.17	6.88	0.54	1889.97	6.25	-0.63
	3803.80	3335.48	2.74	-12.31	3454.93	5.22	-9.17
Бисопролол	8.45	8.06	1.72	-4.58	8.07	1.64	-4.55
	84.50	84.66	2.85	0.19	84.67	2.46	0.20
	2112.60	2026.08	9.32	-4.10	2009.19	7.19	-4.89
	4225.20	3961.19	5.32	-6.25	3983.38	4.92	-5.72
Пропранолол	9.14	8.98	1.35	-1.71	8.94	1.82	-2.18
	91.42	97.39	1.49	6.53	97.05	2.42	6.16
	2285.45	2182.23	9.17	-4.52	2147.54	6.96	-6.03
	4570.90	4234.67	4.46	-7.36	4295.19	4.12	-6.03
Эналаприл	7.73	7.14	8.54	-7.69	7.24	7.59	-6.30
	77.25	76.45	12.21	-1.03	75.64	10.12	-2.08
	1931.25	1917.87	6.42	-0.69	1888.16	5.09	-2.23
	3862.50	4089.45	5.74	5.88	4060.21	4.64	5.12
Верапамил	9.54	9.27	4.71	-2.85	9.18	4.64	-3.76
	95.40	95.23	1.09	-0.18	95.29	1.30	-0.11
	954.04	929.63	4.19	-2.56	920.97	3.39	-3.47
	2385.10	2447.13	8.24	2.60	2447.95	6.91	2.64
Нифедипин	9.61	9.79	11.00	1.84	9.77	9.16	1.68
	96.14	92.02	5.55	-4.29	92.24	4.58	-4.05
	2403.45	2471.91	2.77	2.85	2478.08	2.61	3.10
	4806.90	4973.16	2.95	3.46	4913.26	2.76	2.21

Была подтверждена стабильность для стандартных растворов ГЛС (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре от 2 до 8°C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 5°C), на уровнях концентраций 10.00 и 5000.00 нг/мл (2500 нг/мл для верапамила). Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

При последовательном анализе проб с концентрацией ГЛС 100,00 нг/мл и чистой плазмы на хроматограмме чистой плазмы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания ГЛС. Таким образом, перенос пробы отсутствовал.

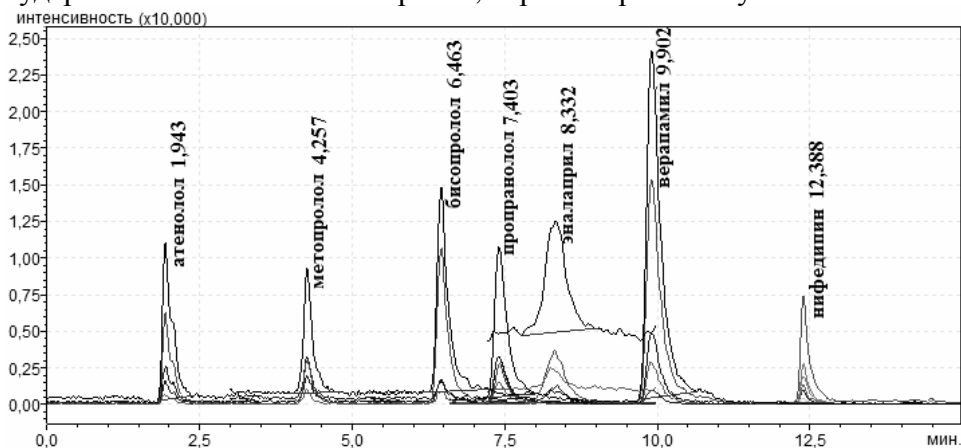


Рис. 4. Хроматограмма образца чистой плазмы с добавлением смеси ГЛС на уровне ПКО

Степень извлечения (recovery, RE) оценивалась как выраженное в процентах отношение площади пика ГЛС, полученной при пробоподготовке и анализе пробы чистой плазмы с добавлением стандартных растворов ГЛС к площади пика того же вещества, полученной при анализе пробы чистой плазмы, в которую раствор ГЛС добавляли после проведения пробоподготовки. Эффект матрицы (matrix-effect, ME) при ионизации DUIS и МС/МС-детектировании рассчитан как отношение площади пика ГЛС полученной при анализе пробы чистой плазмы, в которую раствор ГЛС добавляли после проведения пробоподготовки к площади пика того же вещества, полученной при анализе пробы, в которой вместо чистой плазмы взят равный объем подвижной фазы. Данные по извлечению и эффекту матрицы представлены в таблице 4.

Таблица 4. Степень извлечения и эффект матрицы при анализе ГЛС методом ВЭЖХ-МС-МС

Вещество	Степень извлечения (RE), %			Эффект матрицы (ME), %		
	Концентрация ГЛС в плазме крови, нг/мл					
	10	500	5000 (2500 для верапамила)	10	500	5000 (2500 для верапамила)
Атенолол	34	38	65	100	108	95
Метопролол	40	40	70	115	115	93
Бисопролол	41	37	61	114	106	94
Пропранолол	39	38	62	117	102	91
Эналаприл	51	48	58	106	94	86
Нифедипин	74	74	53	109	131	151
Верапамил	37	39	59	117	103	95

Обсуждение результатов

В ходе разработки методики были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения и масс-селективного детектирования.

Экспериментально подобран оптимальный состав элюентов. При использовании в качестве элюента В ацетонитрила наблюдалось уширение пика эналаприла и низкая чувствительность по нему, не происходило полного разделения пропранолола и эналаприла. Данную проблему удалось решить путём замены ацетонитрила на метанол и применения 0.1% муравьиной кислоты и 1 ммоль/л формиата аммония в качестве динамического модификатора подвижной фазы. В этих условиях рН подвижной фазы лежит в слабокислой области, что способствует протонированию аминогрупп в молекулах ГЛС и, следовательно, положительно сказывается на ионизации электрораспылением. Помимо этого, улучшается удерживание веществ на колонке и достигается их лучшее разделение, чем в отсутствие динамического модификатора.

Пробоподготовка путём осаждения белков плазмы ацетонитрилом дает невысокую степень извлечения на низких и средних калибровочных уровнях (30-50%, кроме нифедипина), однако даже в этих условиях удаётся добиться ПКО порядка 10 нг/мл для всех изучаемых ГЛС, что в сочетании с простотой и экспрессностью позволяет признать осаждение белков ацетонитрилом оптимальным способом пробоподготовки при анализе острых отравлений.

В случае атенолола, биспролола, метопролола, пропранолола, эналаприла и верапамила наблюдается широкий аналитический диапазон методики, охватывающий 3 порядка, площадь пика прямо пропорциональна концентрации. Выявлены некоторые особенности анализа нифедипина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. В частности, это единственный из изученных в данной работе препаратов, для которого невозможно построить калибровку, описываемую линейной функцией. Можно было бы ожидать, что при высоких концентрациях будет наблюдаться насыщение детектора, а калибровочный график будет иметь выпуклый вид. Из всех рассматриваемых веществ только для нифедипина отмечено увеличение эффекта матрицы с ростом концентрации, причём этот процесс происходит логарифмически. Именно эффект матрицы объясняет тот факт, что зависимость площади пика от концентрации нифедипина описывается степенной функцией, а график имеет вогнутый вид. При использовании степенной функции для построения калибровки удаётся получить коэффициент корреляции, а также значения правильности и прецизионности на четырёх валидационных уровнях, которые удовлетворяют требованиям руководств по валидации биоаналитических методик.

Заключение

Разработана и валидирована унифицированная методика анализа некоторых токсикологически значимых гипотензивных лекарственных средств в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Условия пробоподготовки и анализа подобраны и оптимизированы таким образом, что удастся сочетать экспрессность анализа с высокой чувствительностью, селективностью и возможностью измерений в широком диапазоне концентраций. Высокая чувствительность и селективность делает возможным применение методики как при анализе острых отравлений ГЛС, так и при проведении терапевтического лекарственного мониторинга или других видов биоаналитических исследований.

Список литературы

1. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7 декабря 2011 г. N 2199-р г.
2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. N

708н г. Москва "Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при первичной артериальной гипертензии (гипертонической болезни)"

3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1554н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сердечной недостаточности"

4. Медицинская токсикология национальное руководство. Под ред. Е. А. Лужникова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 928 с.

5. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poison*. London: Pharmaceutical Press, 2005.

6. K. Czerwińska E. Wyszomirska T. Kaniewska. Identification and determination of selected medicines reducing hypertension by densitometric and gas chromatographic methods // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2001. Vol. 58 No 5. pp. 331-338.

7. Pujos E, Cren-Olivé C, Paisse O. et al. Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques // *J. Chromatogr. B*. 2009. Vol. 877. No 31. pp. 4007-4014.

8. Gonzalez O, Iriarte G, Rico E. et al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma // *J. Chromatogr. B*. 2010. Vol. 878. No 28. pp. 2685-2692.

9. Kristoffersen L., Øiestad E.L., Opdal M.S. et al. Simultaneous determination of 6 β -blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design // *J. Chromatogr. B*. 2007. Vol. 850. No 1-2. pp. 147-160.

10. Gonzalez O., Alonso R.M., Ferreirós N. et al. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy // *J. Chromatogr. B*. 2011. Vol. 879. No 3-4. pp. 243-252.

11. Gu Q., Chen X., Zhong D. et al. Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2004. Vol. 813. No 1-2. pp. 337-342

12. Smyth W.F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug

molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2005. Vol. 824. No 1-2. pp. 1-20.

13. Wang D., Jiang K., Yang S. et al. Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study // *J. Chromatogr. B*. 2011. Vol. 879, No 20. pp. 1827-1832

14. Li S., Liu G., Jia J. et al. Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2007. Vol. 847. No 2. pp. 174-181.

15. Sarkar A.K., Ghosh D., Das A. et al. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and its application in bioequivalence study // *J. Chromatogr. B*. 2008. Vol. 873. No 1. pp. 77-85.

16. Maurer H.H., Tenberken O., Kratzsch C. et al. Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 β -blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1058. pp. 169-181.

17. Partani P., Modhave Y., Gurule S. et al. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009. Vol. 50. pp. 966-976.

18. Caban M., Stepnowski P., Kwiatkowski M. et al. Determination of β -blockers and β -agonists using gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry - A comparative study of the derivatization // *J. Chromatogr. A*. 2011. Vol. 1218. No 44. pp. 8110-8122.

19. Koppel C., Tenczer J. Scope and limitations of a general unknown screening by gas chromatography-mass spectrometry in acute poisoning // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995. Vol. 6. No 11. pp. 995-1003.

20. Maurer H.H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr.* 1992. Vol. 580. No 1-2. pp. 3-4.

21. Мельников Е.С., Белова М.В., Раменская Г.В. Анализ острых отравлений некоторыми гипотензивными лекарственными веществами методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. № 2. С. 81-88.
22. Maurer H.H. What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening? // J. Chromatogr. A. 2013. Vol. 1292. pp. 19-24.
23. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Под ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. М.: Гриф и К. 2013. 328 с.
24. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2001.
25. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011.

References

1. Rasporjzhenie Pravitel'stva Rossijskoj Federacii ot 7 dekabrja 2011 g. N 2199-r g.
2. Prikaz Ministerstva zdavoohranenija Rossijskoj Federacii ot 9 nojabrja 2012 g. N 708n g. Moskva «Ob utverzhdenii standartov pervichnoj mediko-sanitarnoj pomoshhi pri pervichnoj arterial'noj gipertenzii (gipertonicheskoj bolezni)».
3. Prikaz Ministerstva zdavoohranenija Rossijskoj Federacii ot 24 dekabrja 2012 g. № 1554n «Ob utverzhdenii standartov specializirovannoj medicinskoj pomoshhi pri serdechnoj nedostatochnosti».
4. Medicinskaja toksikologija nacional'noe rukovodstvo. Pod red. E. A. Luzhnikova. M.: GJeOTAR-Media, 2012. 928 p.
5. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poison, London, Pharmaceutical Press, 2005.
6. K. Czerwińska E. Wyszomirska T. Kaniewska. Identification and determination of selected medicines reducing hypertension by densitometric and gas chromatographic methods, Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2001, Vol. 58, No 5, pp. 331-338.
7. Pujos E, Cren-Olivé C, Paisse O. et al. Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques, J. Chromatogr. B, 2009, Vol. 877, No 31, pp. 4007-4014.
8. Gonzalez O, Iriarte G, Rico E. et al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma, J. Chromatogr. B, 2010, Vol. 878, No 28, pp. 2685-2692.
9. Kristoffersen L., Øiestad E.L., Opdal M.S. et al. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design, J. Chromatogr. B, 2007, Vol. 850, No 1-2, pp. 147-160.
10. Gonzalez O., Alonso R.M., Ferreirós N. et al. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy, J. Chromatogr. B, 2011, Vol. 879, No 3-4, pp. 243-252.
11. Gu Q., Chen X., Zhong D. et al. Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B, 2004, Vol. 813, No 1-2, pp. 337-342.
12. Smyth W.F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry, J. Chromatogr. B, 2005, Vol. 824, No 1-2, pp. 1-20.
13. Wang D., Jiang K., Yang S. et al. Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study, J. Chromatogr. B, 2011, Vol. 879, No 20, pp. 1827-1832.
14. Li S., Liu G., Jia J. et al. Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J.

- Chromatogr. B, 2007, Vol. 847, No 2, pp. 174-181.
15. Sarkar A.K., Ghosh D., Das A. et al. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method and its application in bioequivalence study, J. Chromatogr. B, 2008, Vol. 873, No 1, pp. 77-85.
16. Maurer H.H., Tenberken O., Kratzsch C. et al. Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, J. Chromatogr. A, 2004, Vol. 1058, pp. 169-181.
17. Partani P., Modhave Y., Gurule S. et al. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, Vol. 50, pp. 966-976.
18. Caban M., Stepnowski P., Kwiatkowski M. et al. Determination of β -blockers and β -agonists using gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry – A comparative study of the derivatization, J. Chromatogr. A, 2011, Vol. 1218, No 44, pp. 8110-8122.
19. Koppel C., Tenczer J. Scope and limitations of a general unknown screening by gas chromatography-mass spectrometry in acute poisoning, J. Am. Soc. Mass Spectrom, 1995, Vol. 6, No 11, pp. 995-1003.
20. Maurer H.H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr, 1992, Vol. 580, No 1-2, pp. 3-4.
21. Мельников Е.С., Белова М.В., Раменская Г.В. Анализ острых отравлений некоторыми гипотензивными лекарственными веществами методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии, Масс-спектрометрия, 2014, Т. 11, № 2, С. 81-88.
22. Maurer H.H. What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening?, J. Chromatogr. A, 2013, Vol. 1292, pp. 19-24.
23. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Под. ред. проф. А.Н. Миронова, Том I. М.: Гриф и К, 2013, 328 с.
24. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2001.
25. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011.

Мельников Евгений Сергеевич - аспирант, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва, тел. 8-916-554-03-78

Белова Мария Владимировна – к.фарм.н., старший научный сотрудник, ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы, Москва

Родина Татьяна Александровна – к.х.н., с.н.с., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва

Раменская Галина Владиславовна – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Melnikov Evgeniy S. – post-graduate student, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow, e-mail evgeniy.melnikov@gmail.com

Belova Maria V. – PhD, senior researcher, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow

Rodina Tatyana A. – PhD, senior researcher, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow

Ramenskaya Galina V. - PhD, professor, head of chair, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow