

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG METOPROLOL TRONG HUYẾT TƯƠNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Viết Khấn, Nguyễn Thị Hoài
Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Metoprolol dùng trong điều trị tăng huyết áp, đang có nhu cầu sử dụng cao. Thuốc điều trị bệnh lý tim mạch yêu cầu cách dùng, liều dùng phải chặt chẽ, chính xác, đảm bảo an toàn, hiệu quả cho bệnh nhân. Vì vậy, phương pháp định lượng metoprolol trong huyết tương đơn giản, chính xác, thuận lợi là nhu cầu rất cần thiết. **Mục tiêu:** (1) Xây dựng phương pháp định lượng metoprolol trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và (2) Thẩm định phương pháp phân tích đã xây dựng. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu huyết tương. **Kết quả:** Điều kiện sắc ký: cột Eclipse XDB-C18, detector huỳnh quang, pha động: acetonitril : đệm NaH_2PO_4 (25 mmol/L; pH 3,0) với chương trình gradient dung môi. Phương pháp phân tích đạt các tiêu chí theo hướng dẫn của FDA về thẩm định phương pháp phân tích sinh học. **Kết luận:** Phương pháp HPLC đã xây dựng có thể áp dụng để định lượng metoprolol trong dịch sinh học để nghiên cứu dược động học và tương đương sinh học trong lĩnh vực kiểm soát chất lượng thuốc.

Từ khóa: Metoprolol, huyết tương, HPLC.

Abstract

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF METOPROLOL IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Viet Khan, Nguyen Thi Hoai
Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: Metoprolol has been widely used in the treatment of hypertension. The usage of drugs for cardiovascular diseases is highly required safety and effectiveness for patients. Therefore, a convenient method for the determination of metoprolol in plasma is necessary. **Objectives:** (1) To develop an HPLC method for quantification of metoprolol in human plasma and (2) To validate of the method. **Materials and methods:** human plasma. **Results:** Chromatographic conditions include: Eclipse XDB-C18 column, fluorescence detector, mobile phase: acetonitril : NaH_2PO_4 buffer (25 mmol/L, pH 3.0) with a solvent gradient program. The analytical method met current FDA guidelines for bioanalytical method validation. **Conclusions:** The method can be applied to determine metoprolol in biological fluids for pharmacokinetic and biocompatibility study.

Keywords: Metoprolol, plasma, HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo kết quả điều tra quốc gia năm 2015, tỷ lệ tăng huyết áp ở nước ta là 22,2%, ở nhóm 30-69 tuổi là 30,6%. Chính vì vậy, nhu cầu về thuốc điều trị bệnh lý tim mạch đã và đang rất cấp thiết để phục vụ cho một số lượng lớn bệnh nhân. Metoprolol, thuốc đối kháng chọn lọc thụ thể beta 1 – adrenergic, là một trong những thuốc được sử dụng khá rộng rãi với chỉ định phù hợp cho nhiều tình trạng bệnh lý

tim mạch, đặc biệt là tăng huyết áp, điều trị dài hạn đau thắt ngực, loạn nhịp tim, suy tim độ trung bình hoặc độ nhẹ. Việc sử dụng các thuốc chẹn beta nói chung và metoprolol nói riêng trong điều trị bệnh lý tim mạch yêu cầu sự chính xác và chặt chẽ trong liều sử dụng nhằm đảm bảo hiệu quả về mặt tác dụng dược lý, đồng thời ngăn ngừa những biến chứng có thể xảy ra khi không tuân thủ chế độ liều [1], [2], [3], [4].

- Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Viết Khấn, email: nvietkhan@gmail.com

- Ngày nhận bài: 18/7/2018; Ngày đồng ý đăng: 15/10/2018; Ngày xuất bản: 8/11/2018

DOI: 10.34071/jmp.2018.5.14

Ngoài ra, metoprolol là dược chất nằm trong “Danh mục các dược chất yêu cầu báo cáo số liệu nghiên cứu tương đương sinh học khi đăng ký thuốc” kèm thông tư 08/2010/TT-BYT ngày 26/4/2010 [5]. Nhu cầu theo dõi nồng độ của metoprolol trong huyết tương người là hoàn toàn thực tế và có giá trị trên thực tiễn lâm sàng.

Trên thế giới, dược chất này trong huyết tương được nghiên cứu định lượng bằng phương pháp HPLC với các loại detector UV, huỳnh quang, ... [6], [7], [8]. Ở Việt Nam, theo Tạ Mạnh Hùng và cộng sự, trước khi metoprolol trong huyết tương được định lượng bằng phương pháp HPLC, mẫu cần lắc chiết lỏng – lỏng để tách metoprolol khỏi nền mẫu huyết tương [9]. Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả nghiên cứu phương pháp định lượng metoprolol trong huyết tương bằng HPLC với phương pháp xử lý mẫu đơn giản, detector huỳnh quang và chuẩn nội atenolol.

2. NGUYÊN LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất - dung môi

- Chất chuẩn: metoprolol tartrat (hàm lượng 100,37% - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).
- Chất nội chuẩn: atenolol (hàm lượng 100,17 % - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).
- Huyết tương trắng (SKS : 457041249. HD : 27 – 05 – 2016) của Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương.
- Các hóa chất khác: acid trichloroacetic (TCA), triethylamin, n-butanol, cloroform, dicloromethan, NaOH, methanol (MeOH), acetonitril, NaH_2PO_4 và H_3PO_4 (đạt độ tinh khiết HPLC).

2.2. Thiết bị

Hệ thống HPLC – detector PDA Shimadzu 20AD, Nhật; máy lắc xoay Vortex mixer 250VM HSi, Hàn Quốc; cân phân tích Mettler Toledo, Thụy Sĩ (d=0,1 mg); máy đo pH sens ION™ PH3 HACH, Tây Ban Nha; máy ly tâm Z326K Hermle Labortechnik GmbH, Đức; máy khuấy từ RET-Basic; các dụng cụ thủy tinh chính xác: bình định mức, pipet (loại A) ...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị các dung dịch:

- Pha dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 10 µg/ml, dung môi MeOH.
- Pha dung dịch chuẩn nội gốc có nồng độ 10 µg/ml, dung môi MeOH.

Chuẩn bị mẫu để xây dựng phương pháp

Từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng, cho vào huyết tương trắng để được các nồng độ metoprolol trong huyết tương là 12,5; 25; 50; 100; 200 ng/ml để

tạo các mẫu xây dựng đường chuẩn. Tương tự, các mẫu kiểm soát (QC) ở các nồng độ metoprolol trong huyết tương là 12,5 ng/ml (LQC); 50,0 ng/ml (MQC) và 200 ng/ml (HQC).

Xử lý mẫu

Cho 30 µl dung dịch atenolol 10 µg/ml vào eppendorf (2,0 ml) chứa 700 µl huyết tương có metoprolol, sau đó thực hiện vortex 15 giây, tiếp tục thêm 420 µl MeOH, thực hiện vortex 30 giây, thêm 280 µl TCA/MeOH 5%, thực hiện vortex 90 giây, ly tâm hỗn hợp trong 8 phút ở 15°C (8500 vòng/phút), hút lấy 500 µl phần dịch trong phía trên, lọc qua màng lọc 0,45 µm, dịch lọc được cho vào vial để phân tích [6], [7].

Xây dựng phương pháp định lượng metoprolol trên HPLC

Khảo sát các điều kiện cột sắc ký pha đảo (C8 và C18), các hệ dung môi dùng cho pha động acetonitril (ACN) : đệm phosphate 25 mmol/L với các chế độ gradient khác nhau, tại các pH đệm khác nhau và thay đổi tốc độ dòng với detector huỳnh quang tại bước sóng kích thích 276 nm, bước sóng phát xạ 296 nm, nhiệt độ cột 25°C, thể tích tiêm mẫu: 30 µl [7], [8].

Phương pháp thẩm định:

Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích sinh học (Bioanalytical Method Validation) của FDA năm 2013 về các tiêu chí độ phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ ổn định [10].

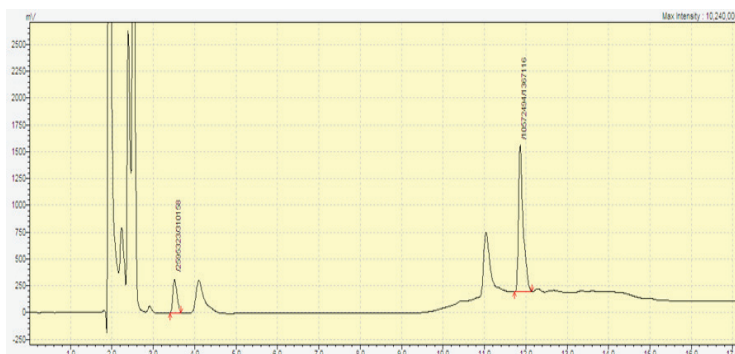
Xử lý các số liệu thống kê được tính toán dựa vào phần mềm Microsoft Excel 2010.

3. KẾT QUẢ

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

- Qua khảo sát các hệ cột C18 và C8, cột Agilent Eclipse XDB-C8 (150x4,6 mm, 5 µm) cho sự phân giải giữa các pic hoạt chất tốt nhất trong cùng điều kiện.

- Sau các thực nghiệm bằng nhiều hệ dung môi pha động với các chế độ gradient khác nhau, tại các pH đệm và tốc độ dòng khác nhau, hệ pha động tối ưu nhất gồm acetonitril: đệm NaH_2PO_4 (25 mmol/L; pH 3,0) với chương trình gradient dung môi: 0,01-3,50 phút: 90% đệm NaH_2PO_4 ; 3,51-3,99 phút: chuyển tiếp nồng độ đệm NaH_2PO_4 từ 90% xuống 75%; 4,00-13,00 phút: 75% đệm NaH_2PO_4 ; 13,01-13,99 phút: chuyển tiếp nồng độ đệm NaH_2PO_4 từ 75% lên 90%; 14,00 phút: 90% đệm NaH_2PO_4 ; tốc độ dòng: 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu: 30 µl.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn và chuẩn nội với chương trình gradient dung môi tối ưu

Sau khi xây dựng được phương pháp định lượng metoprolol trong huyết tương bằng HPLC, tiến hành đánh giá một số chỉ tiêu thẩm định của phương pháp.

3.2. Độ phù hợp của hệ thống sắc ký

Chuẩn bị mẫu metoprolol trong huyết tương có nồng độ 12,5 ng/ml, xử lý mẫu, tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần. Kết quả được trình bày tại bảng 1.

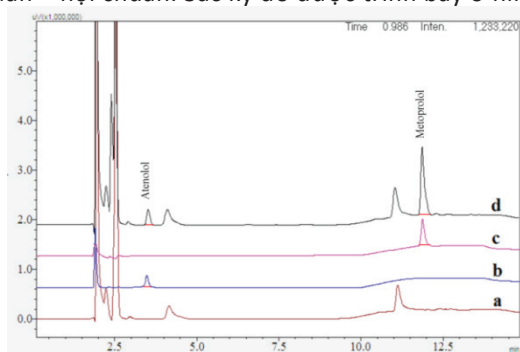
Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp hệ thống sắc ký (n=6)

	Atenolol				Metoprolol			
	t_R (phút)	S (mAu.s)	R_s	N	t_R (phút)	S (mAu.s)	R_s	N
TB	3,47	686739	2,34	5224	11,82	88930	3,59	57749
RSD (%)	0,50	1,13	0,17	0,7	0,15	1,83	0,22	0,3

Theo bảng 1, độ lệch chuẩn tương đối RSD của thời gian lưu t_R và diện tích S nằm trong khoảng cho phép (< 2,0%). Điều này chứng tỏ hệ thống sắc ký phù hợp cho việc định lượng metoprolol sử dụng atenolol làm chuẩn nội trong huyết tương.

3.3. Tính chọn lọc

Tiến hành sắc ký các mẫu huyết tương trắng, dung dịch chuẩn trong MeOH, nội chuẩn trong MeOH, huyết tương trắng thêm chuẩn + nội chuẩn. Sắc ký đồ được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ tổng hợp của các mẫu huyết tương trắng (a), mẫu atenolol chuẩn trong MeOH (b), mẫu metoprolol chuẩn trong MeOH (c), mẫu huyết tương thêm chuẩn + nội chuẩn (d).

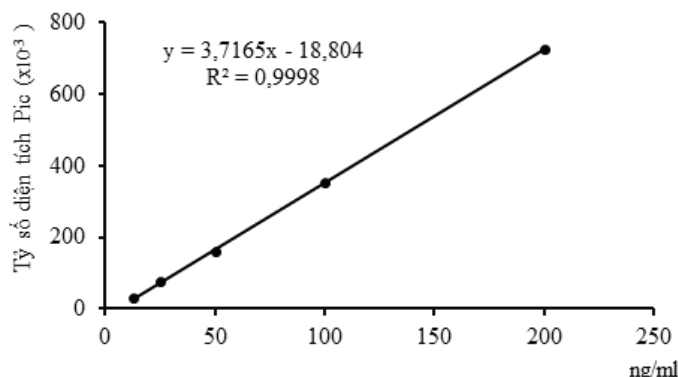
Trên sắc ký đồ cho thấy không có pic của metoprolol và atenolol trong mẫu huyết tương trắng; mẫu huyết tương thêm chuẩn + nội chuẩn có pic của metoprolol đặc trưng ở 11,867 phút và pic của atenolol ở 3,513 phút; có thời gian lưu tương đồng so với thời gian lưu của chất chuẩn trong mẫu chuẩn dung môi MeOH. Pic của metoprolol khá cân đối, sắc nét và tách riêng biệt với các pic lân cận; pic của atenolol cân đối, tách tốt với các pic lân cận. Từ kết quả trên cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu khá tốt.

3.4. Khoảng nồng độ tuyến tính

Tiến hành xác lập mối tương quan giữa tỷ số diện tích pic chuẩn/ chuẩn nội (metoprolol/atenolol) và nồng độ chuẩn (metoprolol). Từ các dung dịch chuẩn, chuẩn bị một dãy các mẫu huyết tương có chứa nồng độ của metoprolol tăng dần: 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml. Tiến hành xử lý theo quy trình xử lý mẫu và phân tích sắc ký. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Sự phụ thuộc giữa tỷ số diện tích pic và nồng độ metoprolol

$C_{\text{metoprolol}}$ (ng/ml)	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0
$S_{\text{metoprolol}} / S_{\text{atenolol}}$ ($\times 10^{-3}$)	31,4	75,3	160,8	352,8	725,7



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa tỷ số diện tích pic và nồng độ metoprolol trong huyết tương

Từ kết quả trên cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính giữa tỷ số diện tích pic và nồng độ metoprolol trong huyết tương. Đường chuẩn hồi quy có dạng đường thẳng và hệ số tương quan là 0,9998 ($> 0,98$); chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính chặt giữa tỷ số diện tích pic và nồng độ metoprolol trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.5. Xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành sắc ký các mẫu, lặp lại trên 3 lô mẫu LQC, MQC và HQC có nồng độ tương ứng là 12,5 ng/ml; 50,0 ng/ml và 200,0 ng/ml, mỗi nồng độ làm 3 mẫu. Xử lý theo quy trình xử lý mẫu. Ghi sắc ký đồ và tỷ số diện tích pic của các mẫu. Tính hàm lượng metoprolol có trong mẫu phân tích bằng phương pháp đường chuẩn. Độ lặp lại của phương pháp dựa vào giá trị RSD. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LQC (12,5 ng/ml)		Mẫu MQC (50,0 ng/ml)		Mẫu LQC (200,0 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	RSD (%)	Độ đúng (%)	RSD (%)	Độ đúng (%)	RSD (%)
Trong ngày (n=3)	113,4	0,8	100,4	3,8	98,9	1,6
Khác ngày (n=3)	108,2	2,3	101,3	7,4	97,7	3,5

Kết quả thẩm định cho thấy, ở các nồng độ thấp, trung bình và cao phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày biến thiên từ 97,7 - 113,4%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày đều có giá trị RSD $< 15\%$, đáp ứng yêu cầu về độ đúng và độ chính xác của phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

3.6. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp

Tiến hành sắc ký các mẫu huyết tương chứa metoprolol có nồng độ giảm dần và huyết tương trắng. Xác định được tại nồng độ metoprolol 3,5 ng/ml, có các diện tích pic đều lớn hơn 5 lần so với diện tích tạp có cùng thời gian lưu trong mẫu huyết tương trắng, đồng xác định được độ đúng đạt 87,93% và độ chính xác với RSD đạt 7,68%. Như vậy, 3,5 ng/ml là giá trị LLOQ của phương pháp.

3.7. Hiệu suất chiết

Chuẩn bị các mẫu metoprolol trong huyết tương và trong pha động ở 3 mức nồng độ LQC, MQC và HQC. Tiến hành phân tích metoprolol trong các mẫu. Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi của metoprolol trong LQC đạt $98,1\% \pm 1,7\%$ (n= 3), trong MQC đạt $99,2\% \pm 1,1\%$ (n= 3), trong HQC đạt $98,5\% \pm 1,3\%$ (n= 3).

3.8. Độ ổn định của dược chất trong huyết tương

Tiến hành khảo sát độ ổn định của metoprolol trong huyết tương trên hai lô mẫu LQC và HQC. Độ ổn định của metoprolol trong huyết tương được đánh giá bằng cách so sánh nồng độ của nó trong các mẫu bảo quản ở nhiệt độ -80°C , đông (trong 24 giờ) - rã đông ở nhiệt độ phòng hoàn toàn (3 chu kỳ) hoặc sau 14 ngày với nồng độ tương ứng trong mẫu ban đầu. Kết quả trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả độ ổn định của metoprolol trong huyết tương

Độ ổn định	Nồng độ metoprolol (ng/ml) (TB $\pm$ SD) (n=3)		Tỷ lệ so với ban đầu (%)
	Nồng độ ban đầu	Nồng độ sau	
3 chu kỳ đông – rã đông	14,18 $\pm$ 0,83	13,97 $\pm$ 1,12	98,52
	197,75 $\pm$ 1,56	188,27 $\pm$ 5,22	95,21
Độ ổn định dài ngày (-80°C, 14 ngày)	14,18 $\pm$ 0,83	13,82 $\pm$ 1,90	97,46
	197,75 $\pm$ 1,56	190,54 $\pm$ 2,67	96,35

Theo kết quả cho thấy, ở cả 2 khoảng nồng độ LQC và HQC, metoprolol trong huyết tương ổn định sau 3 chu kỳ đông rã và sau 14 ngày ở điều kiện -80°C.

4. BÀN LUẬN

Sau khi xây dựng quy trình phân tích, để đảm bảo có thể áp dụng quy trình vào thực tế, cần thẩm định phương pháp với đầy đủ các chỉ tiêu như: độ phù hợp của hệ thống sắc ký, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác, độ đúng, độ ổn định.

Kết quả cho thấy, pic của metoprolol và atenolol xuất hiện trên sắc ký đồ với thời gian lưu và diện tích pic rất ổn định, có các thông số RSD đều nằm trong khoảng cho phép. Do đó, phương pháp đã xây dựng có tính phù hợp cao. Sau khi so sánh và đối chiếu giữa mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương chuẩn + nội chuẩn (Hình 2), mẫu chuẩn metoprolol trong MeOH, mẫu chuẩn atenolol trong MeOH, đã xác định sự có mặt của metoprolol và atenolol khi có nhiều thành phần khác trong mẫu. Đó là pic có thời gian tương đương nhau ở các mẫu huyết tương chuẩn + nội chuẩn, mẫu chuẩn metoprolol và atenolol trong MeOH nhưng lại không xuất hiện ở mẫu huyết tương trắng. Trong khoảng nồng độ đã khảo sát, 12,5 ng/ml đến 200 ng/ml, tỷ số diện tích pic thu được tương ứng có tương quan tuyến tính chặt chẽ với nồng độ của chúng, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9998 > 0,98$ là chấp nhận được cho việc định lượng trong huyết tương ở nồng độ thấp. Khoảng nồng độ tuyến tính thu được phù hợp để định lượng metoprolol trong huyết tương. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ = 3,5 ng/ml) của phương pháp là phù hợp để định lượng metoprolol trong huyết tương. Trong đề tài, kết quả thẩm định có độ đúng cao, độ lặp lại tốt, hiệu suất chiết đạt yêu cầu. Như vậy, phương pháp xây dựng của đề tài nghiên cứu đạt được theo tài liệu hướng dẫn FDA năm

2013 [10], có thể áp dụng để định lượng metoprolol trong huyết tương.

Ở Việt Nam, có một số công trình định lượng metoprolol dưới dạng dược chất trong chế phẩm, nhưng xác định hàm lượng dược chất này trong huyết tương vẫn còn hạn chế. Theo Tạ Mạnh Hùng và cộng sự, metoprolol trong huyết tương được định lượng bằng phương pháp HPLC, detector huỳnh quang, chuẩn nội methylparaben, dùng hỗn hợp dung môi diethyl ether và cloroform lắc chiết trong quá trình xử lý mẫu, pha động gồm đệm phosphat pH 3,5 – acetonitril, tốc độ dòng 1,5 ml/phút, thu được thời gian lưu của hai hoạt chất (3,15 và 6,92 phút) [9]. Phương pháp của chúng tôi có thời gian lưu dài hơn (3,51 và 11,86 phút), tuy nhiên tốc độ dòng thấp hơn, an toàn hơn cho cột sắc ký và cho hệ thống máy cũng như lượng dung môi tiêu tốn không nhiều hơn. Đặc biệt, phương pháp này không cần dùng các dung môi hữu cơ tách chiết, tạo điều kiện thuận tiện và nhanh chóng trong việc phân tích metoprolol trong huyết tương phục vụ theo dõi quá trình trị liệu cho bệnh nhân, hoặc trong nghiên cứu tương đương sinh học.

5. KẾT LUẬN

Quy trình định lượng metoprolol trong huyết tương bằng HPLC được thực hiện trên cột Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm; 5 μ m), detector huỳnh quang với bước sóng kích thích là 276 nm và bước sóng phát xạ là 296 nm, nhiệt độ cột: 25°C, pha động: acetonitril : đệm NaH_2PO_4 (25 mmol/L; pH 3,0) với chương trình gradient dung môi, tốc độ dòng: 0,8 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 30 μ l. Phương pháp phân tích đạt các tiêu chí theo hướng dẫn của FDA về thẩm định phương pháp phân tích sinh học, vì vậy, phương pháp này có thể áp dụng để định lượng metoprolol trong huyết tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2015), Điều tra quốc gia yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm năm 2015, Hà Nội, tr.1-3.

2. Nguyễn Lâm Việt (2010), *Hội nghị triển khai phòng chống tăng huyết áp*, Bộ Y tế, Hà Nội, tr.1-7.

3. Nguyễn Lâm Việt (2008), *"Tăng huyết áp – Vấn đề cần được quan tâm hơn"*, Chương trình mục tiêu Quốc gia phòng chống tăng huyết áp, Viện Tim mạch Việt Nam.
4. Bộ Y tế (2009), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 10867-10875.
5. Bộ Y tế (2010), *"Danh mục các dược chất yêu cầu báo cáo số liệu nghiên cứu tương đương sinh học khi đăng ký thuốc"*, Thông tư 08/2010/TT-BYT, Hà Nội.
6. Antonio J. Braza, Pilar Modamio, Cecilia F. Lastra, Eduardo L. Marino (2002), *"Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorimetric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma"*, Biomedical chromatography, 16, pp. 517-522.
7. Bilal Yilmaz, Kadem Meral, Ali Asci, Yavuz Ornganer (2011), *"Determination of metoprolol in pure and pharmaceutical dosage forms by spectrofluorometry and high performance liquid chromatography"*, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 17(1), pp. 25-31.
8. M. Aqil, A. Ali, A. Ahad, Y. Sultana, A. K. Najmi, N. Saha (2007), *"A validated HPLC method for estimation of metoprolol in human plasma"*, ACTA Chromatographica, 19, pp. 130-140.
9. Tạ Mạnh Hùng, Phạm Thanh Huyền, Hà Thị Tuyền, Đoàn Cao Sơn (2013), *"Nghiên cứu định lượng metoprolol trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối với detector huỳnh quang"*, Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc – Số 1.2013; tập 11.(39), pp 12-16.
10. Food and Drug Administration (2013), *"Bioanalytical Method Validation"*, Biopharmaceutics, 10903 New Hampshire Ave., Silver Spring, MD 20993.