

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛОПИДОГРЕЛЯ

Аносова Л. С.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место в большинстве стран мира среди всех причин смертности^{1,2}. В Украине около 70% человеческих смертей вызваны ССЗ, в том числе и атеротромбозом, который широко распространен и в настоящее время занимает ведущее место в структуре общей смертности. Кроме того, в Украине более 50% всех заболеваний и пятая часть всех случаев инвалидности приходится на долю ишемической болезни сердца и инсульта³.

В последние годы ведущее место среди препаратов с механизмом тромбоцитарной антиагрегации занимает клопидогрель, который эффективно применяется в комплексном лечении ССЗ (нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда, преходящие ишемические атаки, острый ишемический инсульт, острая ишемия конечностей)^{4,5}

Сегодня профилактика и лечение кардиологических болезней и болезней системы кровообращения является одной из приоритетных проблем здравоохранения. Лекарственные средства для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест на рынке лекарственных препаратов. Е.А. Редькиной, Н.А. Ткаченко, В.В. Гладышевым были проведены маркетинговые исследования украинского рынка антиагрегантов. Из проведенных авторами исследований становится понятно, что ведущую позицию

¹ Capodanno D., Alberts M.J., Angiolillo D.J. Antithrombotic therapy for secondary prevention of atherothrombotic events in cerebrovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2016. Vol. 13. P. 609–622.

² Айнетдинова Д.Х., Удовиченко А.Е., Сулимов В.А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам у больных ишемической болезнью сердца. *Рациональная фармакотерапия в Кардиологии*. 2007. № 3. С. 53–59.

³ Мировой банк: основные причины смертности в Украине. URL: www.rus.newsru.ua. (09.02.2021).

⁴ Компендиум 2019 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко. Киев: Морион, 2019. 2573 с. URL: https://compendium.com.ua/info/347044/klop-dogrel_-sanof-/ (дата обращения: 13.02.2021).

⁵ Державний формуляр лікарських засобів. URL: <https://www.moz.gov.ua/ua/portal/> (дата обращения: 13.02.2021).

занимає підгрупа B01AC04 Клопидогрель, на которую приходится 44,8% всего рынка антиагрегантів^{6, 7}.

Данный лекарственный препарат входит в перечень лекарственных средств для лечения пациентов с осложнениями ССЗ, вызванными COVID-19, согласно протоколов лечения, утвержденных Министерством здравоохранения Украины^{8,9}.

Авторами Т. Фукусакі, Х. Ямасита, М. Омото, К. Мацуда, К. Шиохара, Ю. Фухимура. Описаны неоднократные случаи отравления клопидогрелем. В работах таких авторов, как Г. Коцабай, И. Оклар, В. Акая, К. Гюлер В описаны случаи самоубийства клопидогрелем^{10,11}.

В научной литературе освещены многие методики анализа клопидогреля в лекарственных субстанциях и средствах, биологических жидкостях человека для изучения фармакокинетики и фармакодинамики. Но нет ни одного химико-токсикологического исследования препарата, применяемого как в терапевтических, так и в токсических дозах¹². Поэтому проведение химико-токсикологического исследование данного препарата в сегодняшних реалиях жизни становится актуальным.

⁶ Редькіна Є.А., Ткаченко Н.О., Гладішев В.В. Маркетингові дослідження українського ринку антиагрегантів. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 3. 4. С. 12–15.

⁷ Вивчення цінової кон'юнктури вітчизняного ринку антиагрегантів / Є. А. Редькіна, Н. О. Ткаченко, В. В. Гладішев, І. О. Пухальська. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017. Т. 10, № 2 (24). С. 214–213

⁸ Явелов И.С. Место клопидогреля в современном лечении острого коронарного синдрома. *Atherohrombosis, specialized medical journal*. 2020. № 1. P. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2020-1-72-81>.

⁹ Anticoagulation with or without Clopidogrel after Transcatheter Aortic-Valve Implantation / V. J. Nijenhuis et al. *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 18. P. 1696–1707. DOI: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1915152> (Date of access: 12.02.2020).

¹⁰ Borderías C.L., Garrapiz L.J., Caballero G. Pulmonary haemorrhage and haemothorax after massive ingestion of clopidogrel as a suicide attempt. *Arch. Bronconeumol.* 2009. Vol. 45, № 11. P. 570–571. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.06.009> (Date of access: 13.02.2021).

¹¹ Al Asmar R., Zeid F. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2020. Vol. 12, № 3. e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431> (Date of access: 12.02.2021).

¹² Необходимость химико-токсикологического исследования клопидогреля. Л. С. Аносова, В. С. Бондарь. Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 140-річчю з дня народж. Засл. проф. М.С. Бокаріуса та 110-річчю з дня народж. проф. М.М. Бокаріуса, 10–11 верес. 2009 р., Харків : Оберіг, 2009. С. 302–304.

1. Методы изолирования клопидогреля и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала

Для разработки эффективных методик изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала использовали модельные смеси препарата с кровью, мочой и печенью, не подвергшихся гнилостным изменениям^{13,14,15}. Для этого до 10,00 г измельченной печени или до 10,00 мл крови или мочи добавляли 1,00 мл стандартного раствора клопидогреля бисульфата (10 мг) или клопидогрель карбоновой кислоты (5 мг) в 0,1 моль / л растворе кислоты соляной, тщательно перемешивали и оставляли на сутки. Готовили контрольные смеси биологического материала с растворителем (0,1 моль/л раствор кислоты соляной), исследования которых проводились параллельно.

Количество клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты, которое использовали для проведения модельных опытов, было рассчитано исходя из данных научной литературы по количеству веществ в органах и тканях человека при смертельных отравлениях.

Изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала рекомендуется проводить с помощью общепринятых модифицированных методов А.А. Васильевой и В.П. Крамаренко. Модификация методов заключается в уменьшении навесок биологического материала до 10 г, а также в соответствующем уменьшении объемов органических растворителей и замене стадий процеживания на центрифугирование – получают по 25,0 мл подъемникам (V₁).

Методика изолирования клопидогрель карбоновой кислоты подцелоченной водой (модификация метода П. Валова). 10,00 г биологического материала переносят в ступку, добавляют к нему 10 г чистого песка и тщательно растирают. Гомогенизированную массу переносят в стакан, ступку ополаскивают 20 мл воды очищенной и переносят в тот же стакан. В стакан с гомогенизированным биологическим материалом добавляют 2 мл 10% раствора натрия гидроксида. Содержимое стакана оставляют на 30 мин. при постоянном перемешивании, после чего смесь центрифугируют (в течение 30 мин. при 3000 – 5000 об. / мин.) и собирают центрифугат в чистый стакан.

¹³ Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала. *Фармация Казахстана*. 2013. № 7. С. 34–37.

¹⁴ Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей. *Фармация Казахстана*. 2013. № 9. С. 59–60.

¹⁵ Аносова Л.С., Бондарь В.С., Шовкова З.В. Ізольовання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка). *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, № 1 (додаток). С. 154.

Настаивания биологического материала с новыми порциями подщелоченной воды проводят еще дважды в течение 30 мин. К объединенным щелочным водным извлечениям добавляют 0,05 моль / л раствора кислоты серной до $pH=2$, который определяют по универсальной индикаторной бумаге. Жидкость нагревают на водяной бане в течение 20 мин., а затем центрифугируют в течение 30 мин. при 3000–5000 об. / мин. Центрифугат собирают в делительную воронку и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 20 мл. Полученные выдержки («кислое» хлороформное извлечение А) объединяют и дважды реэкстрагуют 10% раствором натрия гидроксида порциями по 20 мл. К объединенным щелочным водным извлечениям добавляют 25% раствор кислоты серной до $pH = 2$ по универсальной индикаторной бумаге и дважды экстрагируют хлороформом порциями по 10 мл. Полученные выдержки («кислое» хлороформное извлечение Б) объединяют, фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Методика изолирования клопидогреля хлороформом из тканей печени. К 10,00 г биологического материала добавляют 30 г натрия сульфата безводного, смешивают и периодически перемешивают в ступке до образования сыпучей массы (около 2–3 часа). В узкую нижнюю часть стеклянной колонки диаметром 17–20 мм помещают марлевый тампон, заливают хлороформ (часть от предварительно отмеренного хлороформа объемом 100 мл) и засыпают полученную сыпучую массу, периодически добавляя хлороформ таким образом, чтобы над биологическим материалом постоянно содержалось «зеркало» толщиной 1–2 см; после полного переноса сыпучей массы колонку оставляют на час. Далее над колонкой закрепляют делительную воронку с остатком хлороформа, который пропускают через колонку со скоростью 60–80 капель в минуту, удерживая «зеркало» над биологическим материалом. Хлороформное извлечение с целью экстракционной очистки трижды реэкстрагуют 0,1 моль / л раствором кислоты соляной порциями по 20 мл. Хлороформный слой отделяют и впредь не исследуют. Водные слои объединяют, подщелачивают 25% раствором аммиака до $pH = 11$ по универсальной индикаторной бумаге и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирования (в течение 5 мин. При 3000–5000 об. / Мин.)). Хлороформные выдержки объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Методика изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из крови. К 10,00 мл крови добавляют 5 мл 10% водного раствора кислоты трихлоруксусной и 20 мл воды очищенной, перемешивают и оставляют на час при постоянном перемешивании. Смесь центрифугируют (в течение 5 мин. при 3000–5000 об. / мин.). Сливают надосадочную жидкость, проверяют рН (должно быть равным 2 по универсальной индикаторной бумаге) и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 5 мл. Полученные выдержки («кислые» хлороформное извлечение) объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Водный слой подщелачивают 50% раствором едкого натрия до $\text{pH} = 11$ по универсальной индикаторной бумаге и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирование (в течение 5 мин. при 3000–5000 об./мин.)). «Щелочные» хлороформные выдержки объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Методика изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из мочи. До 10,00 мл мочи добавляют 0,1 моль / л раствор кислоты соляной до $\text{pH} = 2$ по универсальной индикаторной бумаге и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 5 мл. Полученные выдержки («кислые» хлороформные извлечения) объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Водный слой подщелачивают 50% раствором едкого натрия до $\text{pH} = 11$ по универсальной индикаторной бумаге и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирование (в течение 5 мин. при 3000–5000 об./ мин.)). «Щелочные» хлороформные выдержки объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем хлороформом до отметки (V_1).

Данные по эффективности применения предложенных методик изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют, что при проведении ненаправленного анализа биологического материала клопидогрель можно изолировать с помощью общепринятых методов А.А. Васильевой и В.П. Крамаренко, а клопидогрель карбоновую кислоту – только методом А.А. Васильевой; указанные методы

позволяют выделить достаточно большое количество веществ и получить извлечение в достаточной мере освобождены от экстрактивных веществ. При изолировании этими методами клопидогрель попадает в «щелочное» хлороформное извлечение, а клопидогрель карбоновая кислота – в «кислое» хлороформное извлечение.

Таблица 1

**Результаты изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из объектов биологического происхождения
($n = 3, P = 0,95$)**

Методика изолирования	Выделено, % (методика количественного определения)	
	клопидогрель	клопидогрель карбоновая кислота
по О.О. Васильевой («кислое» хлороформное извлечение)	–	52,53 ± 4,19 (I*) 52,31 ± 3,21 (III)
по О.О. Васильевой («щелочное» хлороформное извлечение)	57,75 ± 5,08 (I) 57,74 ± 5,58 (II) 55,27 ± 4,00 (III)	–
по В.П. Крамаренко	64,23 ± 5,44 (I) 63,99 ± 5,58 (II) 61,04 ± 3,54 (III)	–
методика изолирования подщелоченной водой из печени	–	70,95 ± 3,71 (I) 70,63 ± 3,21 (III)
методика изолирования хлороформом из печени	81,17 ± 3,40 (I) 82,54 ± 4,25 (II) 80,12 ± 3,14 (III)	
методика изолирования хлороформом из крови («кислое» хлороформное извлечение)	–	64,64 ± 4,20 (I) 64,68 ± 2,86 (III)
методика изолирования хлороформом из крови («щелочное» хлороформное извлечение)	57,30 ± 3,91 (I) 54,97 ± 3,36 (II) 56,53 ± 3,82 (III)	–
методика изолирования хлороформом из мочи («кислое» хлороформное извлечение)	–	76,62 ± 4,58 (I) 75,36 ± 2,76 (III)
методика изолирования хлороформом из мочи («щелочное» хлороформное извлечение)	73,65 ± 4,96 (I) 75,14 ± 4,54 (II) 75,81 ± 4,82 (III)	–

*I – УФ-спектрофотометрическая методика;
II – экстракционно-фотометрическая методика;
III – ВЭЖХ-методика после ТСХ-очистки

При выполнении направленного исследования биологического материала на клопидогрель рекомендуется применять методику изолирования хлороформом из ткани печени с экстракционной очисткой для выделения нативного вещества и методику изолирования подщелоченной водой для выделения его метаболита¹⁶.

2. Методики идентификации и количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты

Определение клопидогреля с помощью качественных реакций

Поскольку в литературных источниках отсутствуют сведения о реакции, которыми можно подтвердить наличие клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты, были использованы реактивы, которые рекомендованы Clarke и другими авторами¹⁷ для обнаружения веществ кислотного и основного характера. Состав реактивов и методики их изготовления описаны в литературе.

При поиске качественных реакций на клопидогрель было изучено его взаимодействие с некоторыми реагентами, широко применяемые в химико-токсикологическом анализе¹⁸: реактив Вагнера, реактив Бушарда, реактив Драгендорфа, реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье; реактив Марки, реактив Эрдмана, реактив Шейблера, реактив ФПН, реактив Фреде, реактив Манделина, раствор тиоцианата кобальта; сульфатная кислота концентрированная; кислота азотная концентрированная.

Поскольку в структуре клопидогреля присутствует эстерная группа, для него выполняли гидроксамовую пробу.

Параллельно изучали взаимодействие указанных реагентов с основным метаболитом клопидогреля – клопидогрель карбоновой кислотой.

Для этого приготовили стандартный раствор клопидогреля и стандартный метанольный раствор клопидогрель карбоновой кислоты.

¹⁶ Бондар В.С., Аносова Л.С. Розробка методів ідентифікації клопидогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. Фармація України. *Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України*, 15–17 верес. 2010 р., Харків. Х., 2010. Т. 1. С. 137.

¹⁷ Al Asmar R., Zeid F. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2020. Vol. 12, № 3. e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431> (Date of access: 12.02.2021).

¹⁸ Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств. Москва : Мысль, 1993. 272 с.

Для приготовления стандартного раствора 50,0 клопидогреля бисульфата вносили в делительную воронку, растворяли в 10 мл воды очищенной, подщелачивали 10% раствором гидроксида натрия до pH 9 и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 10 мл. Хлороформные слои объединяли и фильтровали через бумажный фильтр «Красная лента» с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу емкостью 50,0 мл, доводили объем хлороформом до метки. Получали стандартный хлороформный раствор 1 с концентрацией 1 мкг / мкл.

10,0 мл стандартного хлороформного раствора клопидогреля 1 вносили в мерную колбу емкостью 100,0 мл и доводили объем раствора хлороформом до метки (стандартный хлороформный раствор 2, концентрация 0,1 мкг / мкл).

Готовили стандартный метанольный раствор клопидогрель карбоновой кислоты следующим образом: 50,0 мг клопидогрель карбоновой кислоты вносили в мерную колбу емкостью 50,0 мл, растворяли в метаноле и доводили объем раствора тем самым растворителем до метки (стандартный метанольный раствор 1, концентрация 1 мкг / мкл).

10,0 мл стандартного метанольного раствора клопидогрель карбоновой кислоты 1 вносили в мерную колбу емкостью 100,0 мл и доводили объем раствора метанолом до метки (стандартный метанольный раствор 2, концентрация 0,1 мкг / мкл).

Реакции проводили на хроматографических пластинах “Sorbfil” ПТСХ-ШВ размером 2 × 2 см (силикагель СТХ-1BE, тип подложки – ПЭТФ, связующее вещество – силиказоль, фракция – 8 × 12 мкм, толщина слоя – 100 мкм). Растворы веществ наносили на пластину в точку. После высушивания пятен при комнатной температуре пластины обрабатывали соответствующими реактивами.

Такой способ выполнения качественных реакций позволяет повысить их чувствительность в несколько раз.

Результаты проведенных реакций приведены в таблице 2.

При проведении гидроксамовой пробы пластины обрабатывают 10% раствором NaOH, высушивают при комнатной температуре, обрабатывают 5% раствором гидроксиламина гидрохлорида в этаноле, высушивают при комнатной температуре и обрабатывают 2% раствором ферума (III) хлорида. Клопидогрель карбоновая кислота не дает реакции.

Таблица 2

**Результаты цветных реакций клопидогреля
с некоторыми общепринятыми реагентами**

Реагент	Окрашивание / чувствительность, мкг	
	клопидогрель	клопидогрель карбоновая кислота
Реактив Вагнера	коричневое / 0,1	коричневое / 0,1
Реактив Бушарда	коричневое / 0,1	коричневое / 0,1
Реактив Драгендорфа	коричневое / 0,1	коричневое / 0,1
Реактив Драгендорфа, модифицированный за Мунье	Оранжевое / 0,1	Оранжевое / 0,1
Реактив Марки	красное / 0,1	красное / 0,1
Реактив Эрдмана	—	—
Реактив Шейблера	—	—
Реактив ФПН	—	фиолетовое / 0,1
Реактив Фреде	—	—
Реактив Манделина	желтое / 0,1	желтое / 0,1
Раствор кобальта тиоцианата	фиолетовое / 0,1	фиолетовое / 0,1
Кислота сульфатная концентрированная	—	—
Кислота нитратная концентрированная	—	—
Гидроксамовая проба	фиолетовое / 0,1	—
Раствор ферум (III) хлорида	—	фиолетовое / 0,1

В большинстве проведенных качественных реакций для клопидогреля зафиксированы такие же результаты, как для клопидогрель карбоновой кислоты – только действие ФПН, раствора ферум (III) хлорида и гидроксамовая проба позволяет отдифференцировать их друг от друга.

Реактивы Эрдмана, Шейблера, Фреде, кислота концентрированная сульфатная кислота и азотная концентрированная с исследуемыми веществами не дали положительных результатов.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что цветные реакции, а также способность анализируемых соединений к естественной флуоресценции можно использовать только для предварительного скрининга наличия клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в пробах биологического материала.

Специфический способ обнаружения клопидогреля методом реакционной (деривативной) ТСХ

Для определения концентрации гидроксида натрия, при котором проходит полный гидролиз клопидогреля, готовили 1%, 5%, 7% и 10%

растворы натрия гидроксида: в ряде мерных колб емкостью 100,0 мл в 10–15 мл воды растворяли 1,0; 5,0; 7,0 и 10,0 г натрия гидроксида соответственно; доводили объемы растворов водой до метки.

На линию старта хроматографической пластины на расстоянии 2 см от края пластины наносили 10 мкл стандартного хлороформного раствора клопидогреля в 2 точки и 10 мкл стандартного метанольного раствора клопидогрель карбоновой кислоты; 1 точку клопидогреля обрабатывали соответствующим раствором гидроксида натрия и высушивали при комнатной температуре; элюировали пластины в системе растворителей хлороформ: ацетон 80:20 и проявляли реактивом Драгендорфа.

Гидролиз клопидогреля протекает полностью в случае использования 10% раствора натрия гидроксида – в этом случае после проявления пластины на первой полосе наблюдается только 1 пятно – на уровне свидетеля клопидогрель карбоновой кислоты; во всех других случаях наблюдается 2 пятна – на уровне свидетелей клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты.

Нами установлено, что для полного течения щелочного гидролиза клопидогреля как в растворе, так и на хроматографических пластинах необходимым и достаточным является использование 10% раствора натрия гидроксида.

Идентифицировали клопидогреля за продуктом щелочного гидролиза – клопидогрель карбоновой кислоты – методом ТСХ следующим способом: на линию старта хроматографической пластины наносят в точку 1–10 мкг стандартного хлороформного раствора клопидогреля, обрабатывают ее 10% раствором гидроксида натрия и высушивают при комнатной температуре.

Рядом на линии старта хроматографической пластины наносили 10 мкл раствора клопидогрель карбоновой кислоты с концентрацией 1 мг/мл. Хроматографирование проводили на пластинах “Sorbfil” ПТСХ-ПВ (см. п. 2.4.1) размером 10 × 10 см в камере объемом 500 см³, в которую вносили 50 мл систем растворителей. Камеру насыщали в течение 30 мин.

Пластины элюировали в системе растворителей хлороформ-ацетон (8: 2) и проявляли 5% раствором ферума (III) хлорида.

На хроматограмме проявлялось одно пятно на уровне с клопидогрель карбоновой кислотой, также окрашивается в фиолетовый цвет после последующей обработки 5% раствором сульфата железа (III) хлорида.

Учитывая вышеизложенное, для идентификации клопидогреля предложена методика, базирующаяся на комплексном использовании щелочного гидролиза клопидогреля, цветных реакциях и метода ТСХ:

На линию старта хроматографической пластины наносят в две точки 1–10 мкг клопидогреля. Первую точку обрабатывают

10% раствором натрия гидроксида и высушивают при комнатной температуре. Рядом на линию старта хроматографической пластины наносят по 10 мкл хлороформных растворов «свидетелей» – клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты (концентрация 1 мг/мл). Пластину высушивают и элюируют в системе растворителей этанол – кислота ацетатная концентрированная – вода (5:3:2) (рис. 1). Пластину проявляют на полосах 2 и 3, используя методику проведения гидроксамовой пробы – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,88$). Далее пластину проявляют на полосах 1 и 4-5% раствором сульфата железа (III) хлорида пятна – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,67$).

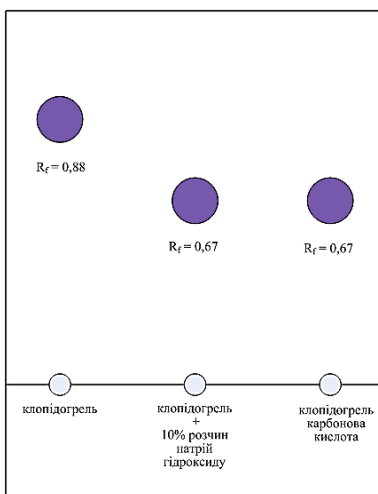


Рис. 1. Способ определения клопидогреля методом реакционной (деривативной) ТСХ

Методика идентификации клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ^{19,20}.

¹⁹ Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії. В.С. Бондар, Л.С. Аносова, З.В. Шовкова. *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1. С. 50–52.

²⁰ Аносова Л.С., Шовкова З.В., Бондар В.С. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопідогрелю та його метаболіту. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича, 12–13 квітня 2018 р., Харків, НФаУ, 2018. С. 358.

Идентификацию клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных извлечениях из объектов биологического происхождения проводят методом ТСХ на хроматографических пластинках с закрепленным слоем силикагеля.

В качестве тонких слоев использовали:

1) пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) производства Эстонии (сорбент КСКГ, фракция – $5 \div 20$ мкм, толщина слоя 130 ± 25 мкм, размер пластин – 10×10 см);

2) пластины “Sorbfil” ПТСХ-ПВ с УФ-индикатором (силикагель СТХ-1ВЭ, тип подложки – ПЭТФ, связывающее вещество – силиказоль, фракция – $8 \div 12$ мкм, толщина слоя – 100 мкм, размер пластин – 10×10 см);

3) пластины Alugram Sil G/UV254 фирмы Macherey-Nagel (Германия) (силикагель G₂₅₄, толщина слоя – 200 мкм, размер пластин – 10×10 см).

Хроматографирование проводят в камерах объемом 500 мл, в которые вносят 10 мл систем растворителей. Камеры насыщают в течение 30 мин. Длина пути пробега растворителей составляет 8 см.

Для идентификации клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты 2,00 мл соответствующего хлороформного извлечения испаряют на водяной бане при температуре 60°C до практически полного удаления органического растворителя; сухой остаток растворяют в 1,00 мл 96% этанола. 100 мкл полученного этанольного раствора наносят на линию старта хроматографической пластины; в случае отрицательного результата увеличивают объем до 500 мкл.

При проведении **ненаправленного исследования биологического материала** анализ «кислых» хлороформных извлечений выполняют в соответствии с общепринятой схемой ТСХ-скрининга в общей системе растворителей для веществ кислого и нейтрального характера хлороформ – ацетон (90:10).

Пятно клопидогрель карбоновой кислоты в этой системе растворителей имеет $R_f = 0,32$.

Как проявители используют: УФ-свет – зеленое пятно; раствор FeCl₃ (для проявления производных салициловой кислоты и пиразолона-5) – пятно клопидогрель карбоновой кислоты окрашивается в фиолетовый цвет; последовательно реактив Драгендорфа и кислоту серную (для проявления алкалоидов и производных 1,4-бензодиазепина) – пятно клопидогрель карбоновой кислоты окрашивается в коричневый цвет.

Далее проводят ТСХ-исследование в отдельных системах растворителей для соответствующих групп веществ.

Для клопидогрель карбоновой кислоты рекомендуется на этом этапе проводить исследования в системе растворителей изопентанол – изобутанол (50:50). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от соэкстрактивных веществ.

Пластину проявляют реактивом ФПН и наблюдают пятно фиолетового цвета ($R_f = 0,64$).

Указанные проявители позволяют определить 0,1 мкг клопидогрель карбоновой кислоты в пробе.

Подтверждающее исследование выполняют в трех системах растворителей – изопентанол – изобутанол (20:80), изопентанол – изобутанол (80:20), хлороформ – ацетон (80:20). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от соэкстрактивных веществ.

Пластины проявляют реактивом Марки, реактивом Манделина, раствором кобальта тиоцианата и наблюдают пятна красного, желтого и фиолетового цвета соответственно ($R_f = 0,52; 0,81; 0,32$ соответственно).

Указанные проявители позволяют выявить 0,1 мкг клопидогрель карбоновой кислоты в пробе.

Идентификацию проводят в присутствии «свидетеля» – клопидогрель карбоновой кислоты (используется стандартный метанольный раствор с концентрацией 1 мкг / мкл).

Анализ «щелочных» хлороформных выдержек выполняют в соответствии с общепринятой схемой ТСХ-скрининга в одной из следующих общих систем растворителей 1 или 2 для веществ основного характера:

1. хлороформ – диоксан – ацетон – 25% раствор аммиака (47,5: 45: 5: 2,5)

2. толуол – ацетон – этанол – 25% раствор аммиака (45: 45: 7,5: 2,5).

R_f клопидогреля в этих системах растворителей составляет 0,95 и 0,98 соответственно.

Как проявители используют: УФ-свет – зеленое пятно; последовательно реактив Драгендорфа и кислоту серную (для проявления алкалоидов, производных 1,4-бензодиазепина и кислоты п-аминобензойной) – пятно клопидогреля окрашивается в коричневый цвет в отличие от пятен экстрактивных веществ, цвет которых желто-коричневый и быстро исчезает; 50% раствор кислоты серной в этаноле (для проявления производных фенотиазина).

Далее проводят ТСХ-исследование в отдельных системах растворителей для соответствующих групп веществ.

Для клопидогреля рекомендуется на этом этапе проводить исследования в системе растворителей изопентанол – изобутанол

(20:80). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ.

Пластину проявляют реактивом Марки и наблюдают пятно красного цвета ($R_f = 0,53$). Указанный проявитель позволяет выявить 0,1 мкг клопидогреля в пробе.

Подтверждающее исследование выполняют методом деривативной тонкослойной хроматографии следующим образом: на линию старта хроматографической пластинки наносят в две точки указанное выше количество полученного этанольного раствора. Первую точку обрабатывают 10% раствором натрия гидроксида и высушивают при комнатной температуре. Рядом на линию старта хроматографической пластинки наносят по 10 мкл растворов «свидетелей» – клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты (концентрация 1 мкг / мкл). Пластину высушивают и элюируют в системе растворителей этанол – кислота уксусная концентрированная – вода (5: 3: 2). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ.

Пластину проявляют на полосах 2 и 3, используя методику проведения гидроксамовой пробы – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,88$). Далее пластину проявляют на полосах 1 и 4 5% раствором железа (III) хлорида – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,67$). Указанные проявители позволяют выявить 0,1 мкг веществ в пробе.

Идентификацию проводят в присутствии «свидетеля» – клопидогреля (используют стандартный хлороформный раствор с концентрацией 1 мкг / мкл).

При проведении *направленного исследования биологического материала на клопидогрель по нативному веществу* проводят предварительную идентификацию клопидогреля методом ТСХ в системе растворителей изопентанол – изобутанол (20:80). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ.

Пластину проявляют реактивом Марки и наблюдают пятно красного цвета ($R_f = 0,53$).

Подтверждающее исследование выполняют методом деривативной тонкослойной хроматографии следующим образом: на линию старта хроматографической пластинки наносят в две точки указанное выше количество полученного этанольного раствора. Первую точку обрабатывают 10% раствором натрия гидроксида и высушивают при комнатной температуре. Рядом на линию старта хроматографической пластинки наносят по 10 мкл растворов «свидетелей» – клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты (концентрация 1 мкг / мкл). Пластину высушивают и элюируют в системе растворителей этанол –

кислота уксусная концентрированная – вода (5: 3: 2). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ.

Пластину проявляют на полосах 2 и 3, используя методику проведения гидроксамовой пробы – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,88$). Далее пластину проявляют на полосах 1 и 4 5% раствором железа (III) хлорида – наблюдают фиолетовые пятна ($R_f = 0,67$).

Идентификацию проводят в присутствии «свидетеля» – клопидогреля (используют стандартный хлороформный раствор с концентрацией 1 мкг / мкл).

При проведении *направленного исследования биологического материала на клопидогрель по метаболиту – клопидогрель карбоновой кислоте* – проводят предварительную идентификацию клопидогреля карбоновой кислоты методом ТСХ в системе растворителей изопентанол – изобутанол (50:50). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ. Пластину проявляют реактивом ФПН и наблюдают пятно фиолетового цвета ($R_f = 0,64$).

Подтверждающее исследование выполняют в трех системах растворителей – изопентанол – изобутанол (20:80), изопентанол – изобутанол (80:20), хлороформ – ацетон (80:20). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от экстрактивных веществ.

Пластины проявляют реактивом Марки, реактивом Манделлина, раствором кобальта тиоцианата и наблюдают пятна красного, желтого и фиолетового цвета соответственно ($R_f = 0,52; 0,81; 0,32$ соответственно).

Идентификацию проводят в присутствии «свидетеля» – клопидогрель карбоновой кислоты (используется стандартный метанольный раствор с концентрацией 1 мкг / мкл).

Количественное определение клопидогреля проводят по УФ-спектрофотометрической, экстракционно-фотометрической и ВЭЖХ-методиками в 5,00; 2,00 и 5,00 мл (V_2) хлороформных извлечениях соответственно до и после их ТСХ-очистки.

Количественное определение клопидогрель карбоновой кислоты проводят по УФ-спектрофотометрической и ВЭЖХ-методиками в 10,00 и 5,00 мл (V_2) хлороформных извлечений соответственно до и после их ТСХ-очистки.

УФ-спектрофотометрическая методика количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты.

Методика построения градуировочных графиков для УФ-спектрофото-метрического определения клопидогреля и

клопидогрель карбоновой кислоты. 125,0 мг клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты вносят в мерную колбу вместимостью 250,0 мл, растворяют в 0,1 моль / л растворе кислоты соляной и доводят объем раствора тем самым растворителем до метки (стандартный раствор 1, концентрация 500 мкг / мл).

В пять мерных колб вместимостью 100,0 мл вносят из бюретки 40,00; 30,00; 20,00; 10,00 и 4,00 мл стандартного раствора 1 соответственно и доводят объемы растворов 0,1 моль / л раствором кислоты соляной до метки (растворы 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно, концентрация 200, 150, 100, 50 и 20 мкг / мл соответственно).

После тщательного перемешивания записывают УФ-спектр растворов №4 клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты в диапазоне длин волн 220–350 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм. Как компенсационный раствор используют 0,1 моль / л раствор кислоты соляной. В диапазоне длин волн 270–290 нм в УФ-спектрах клопидогреля бисульфата и клопидогрель карбоновой кислоты наблюдаются максимумы поглощения (в эксперименте – при длине волны 278 нм) измеряют оптическую плотность растворов клопидогреля бисульфата и клопидогрель карбоновой кислоты № 2–6 на спектрофотометре СФ-46 при этом длине волны в кювете с толщиной слоя 10 мм. Как компенсационный раствор используют 0,1 моль / л раствор кислоты соляной.

По полученным данным строят градуировочные графики зависимости оптической плотности A от концентрации клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты в растворе C (мкг / мл) и рассчитывают соответствующие уравнения линейной зависимости.

Для определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных выдержках указанное количество извлечения (V_2) испаряют на водяной бане при температуре 60°C до полного удаления органического слоя. Сухой остаток растворяют в 10,00 мл 0,1 моль / л раствора кислоты соляной (V_3). После тщательного перемешивания определяют оптическую плотность полученного раствора при определенной длине волны в кювете с толщиной слоя 10 мм. Как компенсационный раствор используют 0,1 моль / л раствор кислоты соляной.

Концентрацию клопидогреля бисульфата и клопидогрель карбоновой кислоты в растворе C (мкг / мл) рассчитывают с помощью соответствующего градуировочного графика или соответствующим уравнением линейной зависимости оптической плотности от концентрации вещества в растворе.

Количество клопидогреля бисульфата или клопидогрел карбоновой кислоты в навеске биологического материала X (мкг / 10 г) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R},$$

где

- C – концентрация вещества в растворе, который спектрофотометрируют, мкг/мл
- V₁ – объем хлороформного извлечения, который получили из навески биологического материала, мл;
- V₂ – объем хлороформного извлечения, который взят для анализа, мл;
- V₃ – объем 0,1 моль / л раствора кислоты соляной, который используется для растворения сухого остатка, мл;
- R – степень изолирования вещества из биологического материала, %.

Экстракционно-фотометрическая методика количественное определение клопидогреля²¹.

Методика построения градуировочного графика для экстракционно-фотометрического определения клопидогреля. 50,0 мг клопидогреля бисульфата вносят в мерную колбу вместимостью 250,0 мл, растворяют в 0,01 моль / л растворе кислоты соляной и доводят объем раствора тем самым растворителем до метки (стандартный раствор 1, концентрация 200 мкг / мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносят 20,00 мл стандартного раствора клопидогреля бисульфата 1 и доводят объем раствора 0,01 моль / л раствором кислоты соляной до метки (раствор 2, концентрация 40 мкг / мл). В три мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносят из бюретки 5,00; 10,00 и 20,00 мл раствора клопидогреля бисульфата 2 соответственно и доводят объемы растворов 0,01 моль / л раствором кислоты соляной до метки (растворы 3, 4 и 5 соответственно, концентрация 2, 4 и 8 мкг / мл соответственно). В четыре мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносят из бюретки 8,00; 10,00; 14,00 и 16,00 мл стандартного раствора клопидогреля бисульфата 1 соответственно и доводят объемы растворов 0,01 моль / л раствором кислоты соляной до метки (растворы 6, 7, 8 и 9 соответственно, концентрация 16, 20, 28 и 32 мкг / мл соответственно).

В ряд делительных воронок вносят по 5,00 мл ацетатного буферного раствора с pH = 4,6, по 5,00 мл 0,02% раствора метилового оранжевого

²¹ Экстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. В.С. Бондар, Л.С. Аносова. Укр. мед. альм. 2012. Т. 15, № 5 (додаток). С. 43–44.

и по 5,00 мл растворов клопидогреля бисульфата 2–9 соответственно. К полученным смесям добавляют по 15,00 мл хлороформа. Смеси в делительных воронках встряхивают в течение 5 мин. с помощью механического смесителя и оставляют на 10 мин. для разделения слоев. Собирают по 10,00 мл хлороформных слоев, сливая их первые и последние порции (около 1,00 мл), и добавляют к ним по 1,00 мл 1% раствора кислоты серной в абсолютном этаноле. Полученные смеси тщательно перемешивают и определяют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-2 в кювете с толщиной слоя 20 мм (светофильтр с $\lambda_{\text{эф}} = 540 \pm 10$ нм). Как компенсационный раствор используют хлороформ.

По полученным данным строят градуировочный график зависимости оптической плотности A от концентрации клопидогреля бисульфата в растворе C (мкг / мл) и рассчитывают соответствующее уравнение линейной зависимости.

Для определения клопидогреля в полученных извлечениях указанное количество извлечения (V_2) испаряют на водяной бане до полного удаления органического слоя. Сухой остаток растворяют в 10,00 мл 0,01 моль/л раствора кислоты соляной (V_3) и тщательно перемешивают. В делительную воронку вносят 5,00 мл ацетатного буферного раствора с $\text{pH} = 4,6$, 5,00 мл 0,02% раствора метилового оранжевого и 5,00 мл полученного раствора или соответствующего элюата (при проведении ТСХ-очистки), к полученной смеси добавляют 15,00 мл хлороформа. Далее выполняют исследования как указано выше.

Концентрацию клопидогреля бисульфата в растворе C (мкг/мл) рассчитывают с помощью градуировочного графика или по соответствующему уравнению линейной зависимости оптической плотности от концентрации клопидогреля бисульфата в растворе.

Количество клопидогреля бисульфата в навеске биологического материала X (мкг / 10 г) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R},$$

где

- C – концентрация клопидогреля бисульфата в растворе, который фотометрируется, мкг / мл
- V_1 – объем хлороформного извлечения, который получен с навески биологического материала, мл;
- V_2 – объем хлороформного извлечения, который был взят для анализа, мл;

- V_3 – объем 0,01 моль / л раствора кислоты соляной, использованный для растворения сухого остатка (или объем полученного элюата при выполнении ТСХ-очистки), мл;
- R – степень изолирования клопидогреля из биологического материала, %

Методика идентификации и количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ²².

Определение проводят на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск, РФ). Обработку хроматограмм проводят с помощью программы «Аналитика-Chrom», разработанной НПФ «Аналитика» (г. Харьков).

Условия хроматографирования:

- колонка – $\varnothing 2 \times 75$ мм;
- обращенная фаза ProntoSIL–120–5–C18AQ (“Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH“, Германия);
- эффективность не меньше 5000 теоретических тарелок;
- температура – 40⁰С;
- элюент А – [4 моль/л LiClO₄ – 0,1 моль/л HClO₄] – H₂O (5: 95);
- элюент Б-ацетонитрил «для ВЭЖХ»;
- поток-100 мкл / мин.;
- градиент-линейный от 5% до 100% ацетонитрила за 40 мин., потом 100% ацетонитрил в течение 3 мин.;
- детектор-УФ-спектрофотометрический для 8 длин волн (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм).

Пригодность ВЭЖХ-системы периодически контролируем путем хроматографии специального контрольного многокомпонентного раствора.

Методика построения градуировочных графиков для количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ. 250,0 мг клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты вносят в мерную колбу вместимостью 250,0 мл, растворяют в 0,01 моль/л растворе кислоты хлористоводородной и доводят объем раствора тем самым растворителем до метки (стандартный раствор 1, концентрация 1000 мкг/мл).

В четыре мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносят из бюретки 40,00; 20,00; 10,00 и 5,00 мл стандартного раствора 1 соответственно и доводят объемы растворов 0,01 моль/л раствором кислоты хлористоводородной до метки (раствор 2, 3, 4 и 5 соответственно,

²² Бондар В.С., Аносова Л.С. Високоэффективна рідина хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис* 2012. № 4 (24). С. 73–78.

концентрация 400, 200, 100 и 50 мкг/мл соответственно). В две мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносят 20,00 и 2,00 мл раствора 5 соответственно и доводят объемы растворов 0,01 моль/л раствором кислоты хлористоводородной до метки (раствор 6 и 7 соответственно, концентрация 10 и 1 мкг/мл соответственно).

Растворы 2–7 хроматографируют при вышеописанных условиях; объем пробы для хроматографии составляет 2 мкл.

По полученным данным строят градуировочные графики зависимости площади пика S от концентрации клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты в растворе C (мкг/мл) и рассчитывают соответствующие уравнения линейной зависимости.

Для определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных извлечениях проводят хроматографирование соответствующих полученных элюатов при вышеописанных условиях; объем пробы–2 мкл. При необходимости объем пробы может быть увеличен до 200 мкл.

Идентификацию клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты проводят по основным хроматографическим параметрам–абсолютными временем и объемом удерживания, и спектральными характеристиками R (табл. 3).

Методика позволяет выявить 2 нг клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в пробе.

Таблица 3

Основные хроматографические параметры клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты при определении методом ВЭЖХ

Вещество	t_R	V_R	$R(S_i / S_{10})$							
			210нм 210нм	220нм 210нм	230нм 210нм	240нм 210нм	250нм 210нм	260нм 210нм	280нм 210нм	300нм 210нм
клопидогрель	13,73 8	1373, 8	1,0000	0,9837	0,6383	0,2167	0,2058	0,2801	1,0756	0,6231
клопидогрель карбоновая кислота	11,84 9	1184, 9	1,0000	0,4088	0,1750	0,1813	0,3783	0,2977	0,7897	0,0348

Концентрацию клопидогреля бисульфата и клопидогрель карбоновой кислоты в растворе C (мкг/мл) рассчитывают с помощью соответствующего градуировочного графика или по соответствующему уравнению линейной зависимости площади пика от концентрации вещества в растворе.

Количество клопидогреля бисульфата или клопидогрель карбоновой кислоты в навеске биологического материала X (мкг/10 г) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R},$$

- где – С-концентрация вещества в элюате, мкг / мл;
 – V_1 – объем хлороформного извлечения, полученного из навески биологического материала, мл;
 – V_2 – объем хлороформной вытяжки, взятой для анализа, мл;
 – V_3 – объем полученного элюата, мл;
 – R – степень изолирования вещества из биологического материала, %.

3. Методика ТСХ-очистки извлечений из биологического материала

Указанное количество хлороформного извлечения (V_2) испаряют на водяной бане при температуре 60⁰С до сухого остатка, который растворяют в 0,5 мл 96% этанола и количественно наносят на линию старта хроматографической пластины с закрепленным слоем силикагеля полосой шириной 2 см. Рядом наносят 10 мкл стандартного раствора клопидогреля или клопидогрель карбоновой кислоты (концентрация 1 мкг/мкл) соответственно.

Пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от соэкстрактивных веществ – один раз или, при необходимости, дважды. В этих условиях клопидогрель и клопидогрель карбоновая кислота остается на линии старта, а соэкстрактивные вещества мигрируют к линии финиша.

После высушивания элюют пластину в системе растворителей хлороформ – ацетон (80:20), высушивают, проявляют полосу «свидетеля» реактивом Драгендорфа и наблюдают пятна коричневого цвета с $R_f = 0,57$ и $0,32$ соответственно.

Хроматографии проводят в камере объемом 500 мл, в которую вносят 10 мл системы растворителей. Камеру насыщают в течение 30 мин. Длина пути пробега растворителей составляет 8 см.

С помощью скальпеля напротив пятна «свидетеля» с пластины тщательно снимают сорбент с площади 3 см × 1 см в стеклянный флакон. Во флакон добавляют 10 мл 0,1 моль/л раствора кислоты хлористоводородной – V_3 (при следующем проведении количественного определения по УФ-спектрофотометрической методике) или 10 мл 0,01 моль/л раствора кислоты хлористоводородной – V_3 (при следующем проведении количественного определения по экстракционно-фотометрической или ВЭЖХ-методике) и встряхивают в течение 5 мин., после чего фильтруют в мерную колбу емкостью 10,0 мл и доводят объем раствора

через фильтр («красная лента») соответствующим растворителем до отметки (элюат).

Предложенные методики ТСХ-очистки позволяют выделить из пластины не менее как 95% вещества.

ВЫВОДЫ

Применение впервые предложенного комплекса методик позволит эффективно, экспрессно и специфически идентифицировать и количественно определить клопидогрель и его метаболит – клопидогрель карбоновую кислоту – в извлечениях из объектов биологического происхождения, в свою очередь позволит фиксировать случаи острых и смертельных отравлений указанным препаратом.

Предложенные методики идентификации и количественного определения не позволяют выявить клопидогрель при приеме средней терапевтической дозы, благодаря чему невозможно сделать ложноположительный вывод об отравлении клопидогрелем.

Эксперт может позволить себе выбирать методику количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в зависимости от наличия у него соответствующего оборудования и цели исследования.

АННОТАЦИЯ

На сегодня заболевания сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест в статистике заболеваемости. Большинство из этих заболеваний сопровождается изменением реологических свойств крови, поэтому практически в любой схеме лечения больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, кроме смеси антигипертензивных, антиангинальных и антиаритмических средств, мы видим антиагрегантный препарат клопидогрель.

Критический обзор литературных источников показал, что информация о химико-токсикологическом анализе клопидогреля крайне недостаточна – способы его изолирования и исследования в биосубстратах не разработаны.

В статье предложены методики изолирования клопидогреля и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты – по объектам биологического происхождения, разработан собственно автором путем модификации общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования органических веществ кислотного и основного характера.

Рекомендовано к использованию впервые разработанные автором методики определения и количественного содержания клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в извлечениях из биологического

материала с помощью тонкослойной хроматографии и оптических методов анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Capodanno D., Alberts M. J., Angiolillo D. J. Antithrombotic therapy for secondary prevention of atherothrombotic events in cerebrovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2016. Vol. 13. P. 609–622.

2. Айнетдинова Д.Х., Удовиченко А.Е., Сулимов В.А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам у больных ишемической болезнью сердца. *Рациональная фармакотерапия в Кардиологии*. 2007. № 3. С. 53–59.

3. Мировой банк: основные причины смертности в Украине. URL: www.rus.newsru.ua. (09.02.2021)

4. Компендиум 2019 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко. Киев: Морион, 2019. 2573 с. URL: https://compendium.com.ua/info/347044/klop-dogrel_-sanof-/ (дата обращения: 13.02.2021).

5. Державний формуляр лікарських засобів. URL: <https://www.moz.gov.ua/ua/portal/> (дата обращения: 13.02.2021).

6. Редькіна Є.А., Ткаченко Н.О., Гладишев В.В. Маркетингові дослідження українського ринку антиагрегантів. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 3. 4. С. 12–15.

7. Вивчення цінової кон'юнктури вітчизняного ринку антиагрегантів / Є.А. Редькіна, Н.О. Ткаченко, В.В. Гладишев, І.О. Пухальська. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017. Т. 10, № 2 (24). С. 214–213

8. Явелов И.С. Место клопидогреля в современном лечении острого коронарного синдрома. *Atherohrombosis, specialized medical journal*. 2020. № 1. P. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2020-1-72-81>.

9. Anticoagulation with or without Clopidogrel after Transcatheter Aortic-Valve Implantation / V. J. Nijenhuis et al. *N. Engl. J. Med*. 2020. Vol. 382, № 18. P. 1696–1707. DOI: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1915152> (Date of access:12.02.2020).

10. Borderías C.L., Garrapiz L.J., Caballero G. Pulmonary haemorrhage and haemothorax after massive ingestion of clopidogrel as a suicide attempt. *Arch. Bronconeumol*. 2009. Vol. 45, № 11. P. 570–571. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.06.009> (Date of access: 13.02.2021).

11. Al Asmar R., Zeid F. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel:

A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2020. Vol. 12, № 3. e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431> (Date of access: 12.02.2021).

12. Необходимость химико-токсикологического исследования клопидогреля. Л.С. Аносова, В.С. Бондарь. Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 140-річчю з дня народж. Засл. проф. М.С. Бокаріуса та 110-річчю з дня народж. проф. М.М. Бокаріуса, 10–11 верес. 2009 р., Харків : Оберіг, 2009. С. 302–304.

13. Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала. *Фармация Казахстана*. 2013. №7. С. 34–37.

14. Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей. *Фармация Казахстана*. 2013. №9. С. 59–60.

15. Ізольовання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка). Л.С. Аносова, В.С. Бондар, З.В. Шовкова. *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1 (додаток). С. 154.

16. Бондар В.С., Аносова Л.С. Розробка методів ідентифікації клопідогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. *Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України*. 15–17 вересня. 2010 р. Харків, 2010. Т. 1. С. 137.

17. Al Asmar R., Zeid F. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2020. Vol. 12, № 3. e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431> (Date of access: 12.02.2021).

18. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств. Москва : Мысль, 1993. 272 с.

19. Бондар В.С., Аносова Л.С., Шовкова З.В. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії. *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, № 1. С. 50–52.

20. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопідогрелю та його метаболіту. В.С. Бондар, Л.С. Аносова, З.В. Шовкова. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня

народження доктора фармацевтичних наук, професора
О.М. Гайдукевича, 12–13 квітня 2018 р., Харків, НФаУ, 2018. С. 358.

21. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю.
В.С. Бондар, Л.С. Аносова. *Український медичний альманах*. 2012.
Т. 15, № 5 (додаток). С. 43–44.

22. Бондар В.С., Аносова Л.С. Високоєфективна рідинна
хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012.
№ 4 (24). С. 73–78.

Information about the author:

Anosova Lyudmila Sergeevna,

Candidate of Pharmaceutical Sciences,

Deputy Director

Municipal Enterprise “Primary Medical and Sanitary Care Center”

of the Pokrovsk City Council

161, Marshal Moskalenko str., Pokrovsk, Donetsk region, 85300, Ukraine