

На правах рукописи

АНОСОВА ЛЮДМИЛА СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА И ЕГО
ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ХИМИКО-
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2025

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор Ремезова Ирина Петровна

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич, доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Малкова Тамара Леонидовна, доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2024/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Клопидогрел, как тиенопиридиновый антиагрегант, занимает центральное место в современной кардиологической практике, что обусловлено его высокой клинической эффективностью в профилактике тромботических осложнений при ишемической болезни сердца и острых коронарных синдромах (Roth et al., 2024). Однако фармакодинамические особенности препарата, связанные с необратимым ингибированием P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов, определяют его значительный токсикологический потенциал.

Многочисленные клинические наблюдения свидетельствуют о дозозависимом характере нежелательных явлений, включая геморрагические осложнения (1,0-11,6% случаев), гематологическую токсичность (0,1-0,3% случаев тромбоцитопении) и гепатотоксические реакции (Smith et al., 2023; Tanaka et al., 2023). Особую проблему представляет генетически детерминированный полиморфизм CYP2C19, отмечаемый у 30% пациентов и приводящий к изменению фармакокинетического профиля препарата (Zhou et al., 2023).

Современные аналитические методы (ВЭЖХ-УФ, ГХ-МС) демонстрируют ограниченную чувствительность при определении клопидогрела и его основных метаболитов, что связано с быстрой биотрансформацией препарата ($T_{1/2} \approx 8$ ч) и сложностями стандартизации методов пробоподготовки (Sempio et al., 2023). Особого внимания заслуживает проблема количественного определения клопидогрел-карбоновой кислоты - ключевого неактивного метаболита, накопление которого может служить маркером токсического действия (Zhang et al., 2022).

Таким образом, разработка усовершенствованных методов химико-токсикологического анализа клопидогрела и его метаболитов представляет собой актуальную научную задачу, решение которой позволит разработать высокочувствительные методы анализа, которые позволят достоверно идентифицировать случаи передозировки, включая комплексные отравления при сочетанном приеме с другими антикоагулянтами, что особенно актуально в судебно-медицинской практике (Tanaka et al., 2023).

Полученные результаты будут иметь важное значение для судебно-медицинской экспертизы (U.S. FDA, 2023; EMA, 2023).

Степень разработанности темы. Анализ современных научных публикаций свидетельствует о существенных пробелах в методологии химико-токсикологического исследования клопидогрела и его метаболитов (Smith et al., 2020; Zhang et al., 2022). Несмотря на многочисленные работы, посвященные фармакологическим свойствам препарата, до настоящего времени не разработаны методики выделения, идентификации и количественного

определения как самого клопидогрела, так и его основного метаболита - клопидогрел-карбоновой кислоты (ККК) в биологических образцах (Sempio et al., 2023; U.S. FDA, 2023).

Существующие аналитические подходы, рекомендованные международными фармакопеями (USP, EP), включают ВЭЖХ-УФ, титриметрию и спектрофотометрию для анализа лекарственных форм (ЕМА, 2021), а также ЖХ-МС/МС и ТСХ для контроля примесей (Sahoo et al., 2014). При исследовании биологических образцов преимущественно применяются методы ЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-УФ (Sheth et al., 2022). Однако эти методики обладают рядом существенных ограничений: недостаточной чувствительностью для токсикологического скрининга (Robinson et al., 2007), отсутствием учета особенностей посмертного распределения и деградации аналитов (WHO, 2021), а также неспособностью комплексно оценивать фармакокинетику и токсикокинетику как нативного вещества, так и его метаболитов (Tornio et al., 2023).

Указанные методологические ограничения обуславливают необходимость разработки комплексного подхода к химико-токсикологическому анализу клопидогрела, который позволил бы проводить как направленное, так и ненаправленное исследование биологических образцов различного происхождения. Это послужило научным обоснованием для формулирования целей и задач настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования: разработка методик химико-токсикологического анализа клопидогрела как по нативному веществу, так и по его неактивному основному метаболиту – клопидогрел карбоновой кислоте для использования в химико-токсикологическом анализе.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

1. Разработать комплекс взаимодополняющих аналитических методик для детекции клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты), основанных на различных физико-химических принципах: разработать методику тонкослойной хроматографии (ТСХ), оптимизировать методику высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по Бараму для анализа в биологических матрицах, разработать УФ-спектрофотометрический метод идентификации и количественного определения, позволяющий предварительно оценить экстракционные характеристики изучаемых соединений;
2. Провести изучение условий экстракции клопидогрела и его неактивного метаболита – клопидогрел карбоновой кислоты из биологических жидкостей с исследованием ключевых параметров экстракционного процесса, включая оптимизацию рН среды, подбор наиболее эффективного типа экстрагента, определение оптимального времени экстракции и установление необходимой кратности экстракционных процедур;

3. Разработать методику выделения клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) из органов (печень) с использованием органических растворителей. Адаптировать и модифицировать классические методы изолирования лекарственных веществ, разработанные А.А. Васильевой, В.П. Крамаренко, П. Валовым, В.И. Поповым, а также метод Стаса-Отто для оптимизации процесса выделения как клопидогрела, так и его метаболита из тканевых матриц.
4. Разработать методику выделения клопидогрела и его карбонового метаболита из биологических жидкостей (крови и мочи), включающая комплексный подход к разрушению белковых связей и оптимизацию экстракционных параметров.
5. Изучить фармакокинетические особенностей клопидогрела и его основного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) в организме лабораторных животных: исследовать распределения данных соединений в различных органах и тканях крыс, параллельно изучить стабильность клопидогрела и его метаболита в условиях биodeградации.
6. На завершающем этапе исследования разработать схему химико-токсикологического анализа биологических образцов (внутренних органов, крови и мочи) на наличие клопидогрела как по нативному веществу, так и по его основному метаболиту - клопидогрел карбоновой кислоте для применения в практической работе судебно-химических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы Российской Федерации с целью установления фактов передозировки или отравления данным антикоагулянтом.

Научная новизна. В рамках диссертационного исследования был выполнен комплексный химико-токсикологический анализ клопидогрела и его основного метаболита - клопидогрел-карбоновой кислоты. Впервые разработаны и оптимизированы методики выделения и количественного определения данных соединений в различных биологических матрицах (органы, кровь, моча) с использованием современных аналитических подходов.

Особое внимание уделено разработке хроматографических методов анализа. Предложены новые системы для ТСХ-скрининга, позволяющие эффективно разделять клопидогрел и его метаболит в присутствии других сердечно-сосудистых препаратов. Определены параметры хроматографической подвижности в различных системах, включая рекомендованные ТИАФТ и применяемые в отечественной судебно-медицинской практике.

Разработаны и валидированы методики количественного анализа с использованием УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Особого внимания заслуживает инновационный метод выделения липофильных соединений, включающий элюирование хлороформом из обезвоженного биоматериала с последующей очисткой методом ТСХ. Для биологических жидкостей (кровь, моча) предложены оптимальные протоколы жидкостной экстракции.

Впервые изучены фармакокинетические особенности и стабильность клопидогрела и его метаболита в биологическом материале. На основании экспериментальных данных разработаны рекомендации по отбору проб для химико-токсикологического анализа. Полученные результаты позволяют стандартизировать процесс выявления данных соединений в химико-токсикологической практике.

Теоретическая и практическая значимость. Предлагаемая методика химико-токсикологического анализа клопидогрела как по нативному веществу, так и его метаболиту учитывает полученные данные о фармакокинетике, особенностях распределения и стабильности изучаемых соединений в биологических средах. Схема включает оптимальные методы пробоподготовки для каждого типа биоматериала, учитывающие как липофильные свойства нативного клопидогрела, так и гидрофильную природу его метаболита. Особое внимание уделено разработке критериев интерпретации результатов с учетом возможной биотрансформации вещества в организме и посмертных изменений в биологическом материале. Предлагаемый алгоритм исследований позволит стандартизировать процесс выявления как исходного препарата, так и продуктов его метаболизма, что существенно повысит достоверность химико-токсикологической экспертизы в случаях подозрения на отравление или передозировку клопидогрелом. Разработанная схема найдет применение в судебно-медицинской практике, клинической токсикологии.

На основании комплекса проведенных исследований разработана схема химико-токсикологического анализа биологического материала на клопидогрел, что нашло свое отражение в подготовленных методических рекомендациях «Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа клопидогрела и его метаболита-клопидогрель карбоновой кислоты в биологических жидкостях», которые утверждены Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский центр судебно - медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации и рекомендованы для работы в судебно-химических лабораториях Российской Федерации. Данные методические рекомендации апробированы в судебно-химическом отделении Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы министерства здравоохранения ДНР.

Методология и методы исследования. Методологическая основа данного исследования базируется на фундаментальных трудах ведущих российских и зарубежных ученых в области аналитической химии и токсикологии, а также на современных международных нормативных документах, включая актуальные редакции зарубежных фармакопей. В работе применен комплекс современных физико-химических методов анализа: тонкослойная хроматография (ТСХ), высокочувствительная жидкостная хроматография с многоволновым УФ-детектированием

(ВЭЖХ-УФД) и УФ-спектрофотометрия, что позволило обеспечить высокую достоверность и воспроизводимость получаемых результатов.

Пробоподготовка биологических образцов проводилась с использованием усовершенствованных методик жидкостно-жидкостной экстракции для биологических жидкостей и экстракции с применением гидрофильных и амфифильных растворителей для тканевых образцов. При этом были адаптированы и модифицированы классические методы изолирования лекарственных веществ, разработанные А.А. Васильевой, В.П. Крамаренко, П. Валовым, В.И. Поповым, а также метод Стаса-Отто, что позволило оптимизировать процесс выделения как клопидогрела, так и его метаболита из сложных биологических матриц.

Особое внимание уделено разработке и внедрению специальных методик изолирования, учитывающих специфические физико-химические свойства изучаемых соединений. Все полученные экспериментальные данные подверглись комплексной статистической обработке с использованием современных методов математического анализа. Проведена полная валидация разработанных методик в соответствии с требованиями, что подтвердило их надежность и точность при определении как нативного клопидогрела, так и его метаболита - клопидогрел карбоновой кислоты в различных биологических объектах. Такой комплексный методологический подход обеспечил высокую научную достоверность и практическую значимость полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методы идентификации и количественного определения клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты), основанные на комплексе аналитических методик: тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по Бараму и УФ-спектрофотометрии.
2. Оптимальные условия экстракции клопидогрела и клопидогрел карбоновой кислоты из биологических матриц, включающие установленные параметры pH среды, тип экстрагента, время и кратность экстракционных процедур.
3. Методика выделения клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) из биологических образцов органическим растворителем. Модифицированные классические методы изолирования лекарственных веществ, разработанные А.А. Васильевой, В.П. Крамаренко, П. Валовым, В.И. Поповым, а также метод Стаса-Отто для оптимизации процесса выделения как клопидогрела, так и его метаболита.
4. Методики выделения клопидогрела и клопидогрел карбоновой кислоты из биологических жидкостей (крови и мочи), включающие эффективные способы разрушения белковых связей.

5. Закономерности распределения и стабильности клопидогрела и его основного метаболита в организме лабораторных животных и в условиях биodeградации.
6. Схема химико-токсикологического анализа биологических образцов (внутренних органов, крови и мочи) на наличие клопидогрела и клопидогрел карбоновой кислоты.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы подтверждается большим объемом изученного материала, выполнением лабораторных исследований с использованием сертифицированного оборудования. Степень достоверности разработанных методик подтверждена путем их валидации и статистической обработки полученных результатов согласно методическим рекомендациям по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является завершенным научным трудом, выполненная соискателем лично под наставлением научного руководителя. Диссертантом лично осуществлен литературный и патентно-информационный поиск, выполнены экспериментальные исследования, статистическая обработка полученных результатов, их анализ и систематизация, разработана структура и содержание диссертационной работы, сформулированы выводы.

В сотрудничестве с научным руководителем определены цель и задачи исследования, установлен перечень вопросов, которые необходимо решить, разработан комплекс современных химических и физико-химических методов исследования клопидогрела в объектах биологического происхождения, которые предложены для химико-токсикологического анализа указанного антидепрессанта.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, 5 из которых – в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Внедрение результатов исследования. Разработанные методики химико-токсикологического исследования клопидогрела внедрены в практическую работу отделений судебно-медицинской токсикологии Донецкой Народной Республики (акт внедрения от 11.01.2024), в учебный процесс кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки» (акт внедрения от 22.01.2024г.), разработаны и внедрены методические рекомендации «Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа клопидогрела и его метаболита клопидогрель карбоновой кислоты в биологических жидкостях» (протокол №2 от 4 апреля 2024 года заседания ученого совета ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»).

Апробация работы. Основное содержание диссертационной работы изложено и обсуждено на научно-практической конференции с международным участием «Актуальные

проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященную 50-летию кафедры токсикологической химии (Пермь, 2022), Всероссийской научно-практической конференции «Естественные науки: состояние и перспективы развития» (Грозный, 2022), на II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики» (Кемерово, 2022), на VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022), на V Всероссийской научно-практической конференции «Наука и образование: актуальные исследования и разработки» (Чита, 2022), на 9-ой Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2023» г. (Воронеж, 2023 г.), на Всероссийской научно-практической конференции «Естественные науки: состояние и перспективы развития» (Грозный, 2023).

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методикам исследования, четырех глав экспериментального исследования, заключения, списка литературы и 3 приложений. Общий объем диссертации составляет 167 страниц. В работе представлено 31 таблица, 36 рисунков и 2 схемы. Список использованных источников состоит из 157 литературных наименований, из которых 30 – отечественных и 127 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Современный химико-токсикологический анализ клопидогрела

В данной главе описан современный химико-токсикологический анализ клопидогрела (физико-химические, фармакологические свойства клопидогрела и его роль в лечении сердечно-сосудистых заболеваний). Приводятся токсикокинетические и фармакокинетические параметры исследуемого вещества, указываются побочные действия и передозировка веществом. Также в данном разделе приводится механизм метаболизма клопидогрела, а также существующие методы обнаружения и определения как в лекарственных формах, так и в биологических жидкостях.

Материалы и методы исследования

В данной главе приводятся используемые объекты, реактивы, вспомогательные и лабораторное оборудование, методики исследований и расчетные формулы.

Разработка методик анализа клопидогрела и его неактивного метаболита клопидогрель карбоновой кислоты

Приступая к данной работе, мы учли то, что в организме человека клопидогрель подвергается метаболизму с преимущественным образованием клопидогрель карбоновой

кислоты (рис.1). Поэтому нами решено использовать клопидогрель карбоновую кислоту как «маркер» в процессе определения клопидогреля.

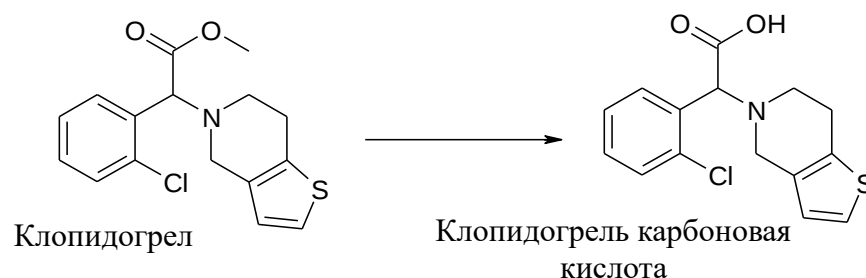


Рисунок 1 – Схема метаболизма клопидогреля

Определена подвижность клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты на пластинках высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), Sorbfil и Alugram Sil в 27 системах растворителей для тонкослойной хроматографии (ТШХ), среди которых 5 систем рекомендованы Международной ассоциацией судебных токсикологов (The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)), 4 системы применяются в общем ТСХ-скрининге органических веществ и 18 систем (табл 1) предложено для оптимального выбора частной системы растворителей при определении клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислот.

При облучении пластин УФ-светом зоны, отвечающие клопидогрелу, флуоресцировали зеленовато-желтым цветом, а клопидогрель карбоновой кислоты – зеленым цветом. При обработке реактивом Драгендорфа пятна обоих соединений окрашивались в оранжевый цвет.

При проявлении пятен на хроматографических пластинах, отличить клопидогрел от его метаболита позволяет обработка пятен реактивом FPN: пятна клопидогреля не проявляются, пятно клопидогрель карбоновой кислоты окрашивается в фиолетовый цвет, так же проведение на пластине гидроксамовой пробы: пятно клопидогреля окрашивается в фиолетовый цвет, пятно клопидогрель карбоновой кислоты не проявляется.

Наиболее оптимальной частной системой растворителей для исследования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты является система этанол- кислота уксусная концентрированная- вода (5: 3: 2) на любых пластинах.

Так же были разработаны условия обнаружения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в присутствии других лекарственных препаратов, применяемых при лечении ССЗ с помощью ТСХ с использованием трех различных пластин. Выбор указанных лекарственных веществ для сравнительного исследования обусловлен возможностью их совместного применения, учитывая протоколы лечения патологии ССЗ.

Для разделения клопидогреля, клопидогрель карбоновой кислоты, ацетилсалициловой кислоты, эналаприла, нифедипина, фенobarбитала из подвижных фаз, рекомендованных TIAFT, оказалась хлороформ: ацетон (80:20) с использованием пластин Sorbfil ПТСХ-ПВ (табл.2).

Таблица 1 – Значение R_f для клопидогрела та клопидогрель карбоновой кислоты в различных системах растворителей и тонких слоях сорбента

Система растворителей	Значение R_f клопидогрела			Значение R_f клопидогрель карбоновой кислоты		
	Sorbfil	ВЭТСХ	Alugram	Sorbfil	ВЭТСХ	Alugram
1	2	3	4	5	6	7
этилацетат – метанол (90:10)	0,94	0,94	0,93	0,67	0,72	0,75
хлороформ – метанол (100:1,5)	0,97	0,99	0,99	0,81	0,78	0,76
бензол – диоксан – 25% раствор аммиака (12:7:1)	0,78	0,92	0,93	0,67	0,70	0,69
<i>n</i> -бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (1:1:1)	0,88	0,81	0,79	0,68	0,65	0,70
<i>n</i> -бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (4:1:5)	0,90	0,69	0,79	0,70	0,76	0,74
этанол – кислота уксусная концентрированная – вода (5:3:2)	0,88	0,85	0,86	0,67	0,70	0,68
гексан – хлороформ – триэтиламин (14:9:4)	0,99	0,96	0,88	0,72	0,75	0,70
бензол – этанол – триэтиламин (9:1:1)	0,96	0,93	0,97	0,72	0,71	0,75
гексан – толуен – триэтиламин (15:10:2)	0,77	0,96	0,51	0,62	0,70	0,73
гексан – триэтиламин (15:2)	0,99	0,75	0,99	0,79	0,75	0,70
гексан – хлороформ – 25 % раствор аммиака (14:9:4)	0,29	0,20	0,28	0,23	0,26	0,21
изопентанол – изобутанол (8:2)	0,97	0,85	0,80	0,81	0,75	0,69
изопентанол – изобутанол (5:5)	0,81	0,95	0,88	0,64	0,65	0,60
изопентанол – изобутанол (2:8)	0,53	0,91	0,71	0,52	0,77	0,75
ацетонитрил – метанол (6:4)	0,97	0,96	0,86	0,76	0,81	0,79
гексан – ацетон – 25 % раствор аммиака (20:20:1)	0,94	0,96	0,96	0,78	0,74	0,74
гексан – этилацетат – метанол – 25 % раствор аммиака (30:30:5:1)	0,94	0,94	0,85	0,76	0,75	0,79
гексан – этилацетат – этанол (30:10:5)	0,98	0,97	0,87	0,80	0,76	0,81

В подвижных фазах, широко применяемых в отечественной практике химико-токсикологических исследований, клопидогрел и его метаболит – клопидогрел карбоновая кислота показали оптимальную для идентификации хроматографическую подвижность. Но идентифицировать клопидогрел и его метаболит в смеси с другими лекарственными

Таблица 2 – Значения R_f клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в системах растворителей, рекомендованных TIAFT ($n = 3$, $P=0,95$)

Система растворителей	Название пластин	клопидогрел	клопидогрель карбоновая кислота	Ацетилсалициловая кислота	Фенобарбитал	Эналаприл	Нифедипин
хлороформ – ацетон (80:20)	Sorbfil	0,57±0,02	0,32±0,02	0,13±0,02	0,59±0,02	0,07±0,01	0,98±0,02
	BETCX	0,96±0,02	0,54±0,02	0,15±0,02	0,07±0,01	0,07±0,01	0,91±0,032
	Alugram	0,95±0,02	0,57±0,02	0,07±0,02	0,00	0,00	0,80±0,02
хлороформ – метанол (90:10)	Sorbfil	0,96±0,03	0,75±0,02	0,25±0,02	0,89±0,03	0,29±0,02	0,99±0,03
	BETCX	0,95±0,02	0,76±0,02	0,33±0,02	0,75±0,02	0,14±0,01	0,88±0,02
	Alugram	0,94±0,02	0,73±0,02	0,31±0,02	0,46±0,02	0,00	0,92±0,02
этилацетат – метанол – 25 % раствор аммиака (85:10:5)	Sorbfil	0,88±0,02	0,80±0,02	0,37±0,02	0,99±0,02	0,28±0,02	0,99±0,02
	BETCX	0,91±0,02	0,76±0,02	0,16±0,01	0,89±0,02	0,07±0,01	0,97±0,02
	Alugram	0,95±0,02	0,75±0,02	0,12±0,02	0,99±0,02	0,04±0,01	0,92±0,02
метанол – <i>n</i> -бутанол (60:40)	Sorbfil	0,97±0,02	0,75±0,02	0,79±0,02	0,86±0,02	0,63±0,02	0,74±0,02
	BETCX	0,97±0,02	0,75±0,02	0,77±0,02	0,87±0,02	0,58±0,02	0,91±0,03
	Alugram	0,91±0,02	0,72±0,02	0,79±0,02	0,80±0,02	0,87±0,02	0,92±0,03
метанол – 25 % раствор аммиака (100:1,5)	Sorbfil	0,93±0,02	0,68±0,02	0,93±0,02	0,93±0,02	0,92±0,03	0,96±0,03
	BETCX	0,88±0,02	0,70±0,02	0,88±0,03	0,92±0,02	0,99±0,03	0,90±0,02
	Alugram	0,86±0,02	0,73±0,02	0,82±0,02	0,73±0,02	0,99±0,03	0,83±0,02

веществами не представляется возможным, так как их значения R_f отличаются в пределах $\pm 0,01-0,04$.

Для идентификации и количественной оценки клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом спектрофотометрии изучен характер УФ-спектров поглощения этих соединений. Для измерения УФ-спектров поглощения использовали растворы клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной (концентрация 100 мкг/мл) в диапазоне 220-350 нм. Установлено, что оптимальными условиями, обеспечивающими наибольшую чувствительность анализа, является $\lambda_{\max} 278 \pm 2$ нм.

Для количественного определения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в модельных растворах предложенными методами применяли градуировочные графики или соответствующие уравнения прямых (рис.2).

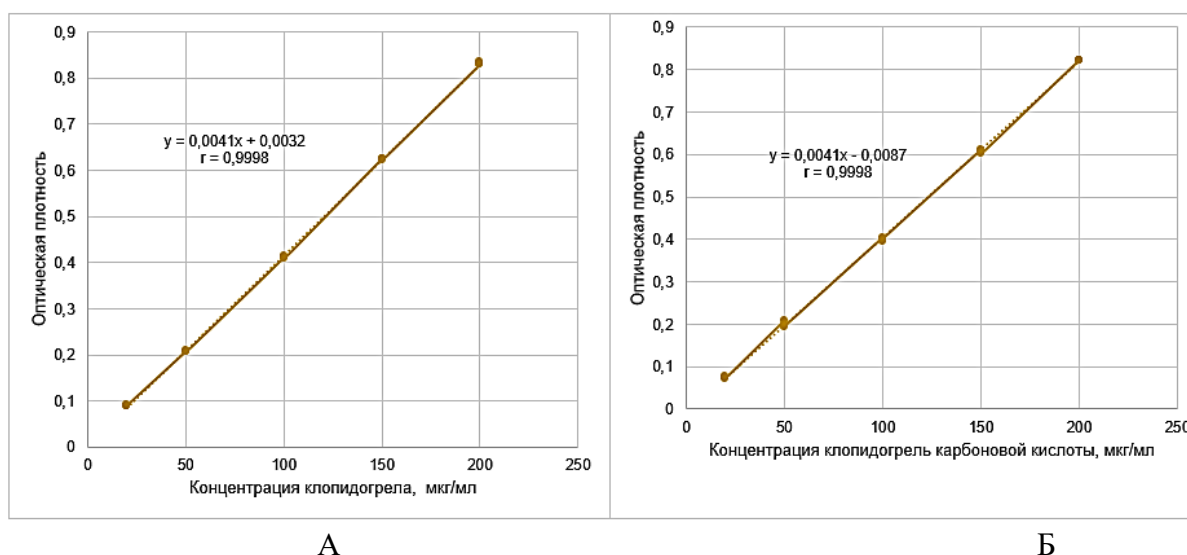


Рисунок 2 – А) Калибровочный график для определения клопидогрела УФ-СФМ;

Б) Калибровочный график для определения клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ

Разработанный УФ-СФМ метод для количественного определения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты был подвержен валидационной оценке по следующим параметрам: линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения. Линейная зависимость оптической плотности растворов клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты от концентрации наблюдается в интервале от 20 до 200 мкг/мл. Предел обнаружения клопидогрела-3,45 мкг / мл, клопидогрель карбоновой кислоты – 5мкг/мл. Как видно из представленных данных значение правильности для клопидогрела составляет 99,77%, для клопидогрель карбоновой кислоты – 100,16%. Рассчитанный коэффициент Стьюдента для клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты равен 1,86, что не превышает табличного значения (2,31) и указывает на отсутствие систематической ошибки. Относительное стандартное отклонение для клопидогрела составляет $\pm 0,84\%$, для клопидогрель карбоновой

кислоты $\pm 0,04\%$, что подтверждает возможность использования данного метода для дальнейшего исследования клопидогрела и его неактивного метаболита.

Идентификацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты проводили унифицированным ВЭЖХ-методом на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром А-02 при использовании металлической колонки с неполярным сорбентом Prontosil С 18,5 мкм. В качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила с 0,2 М раствором лития перхлората в 0,005 М растворе кислоты хлорной; линейный градиент от элюента А (5% ацетонитрила и 95% буферного раствора) к элюенту Б (100% ацетонитрила) в течение 40 мин, скорость элюирования 100 мкл/мин; оптимальное давление насоса 2,8 – 3,2 МПа, температурный режим колонки 37 – 40°C; объем пробы для введения – 4 мкл. Многоканальное детектирование веществ по значениям 8 длин волн (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм) проводили с применением УФ-спектрофотометра (рис. 3, табл.3).

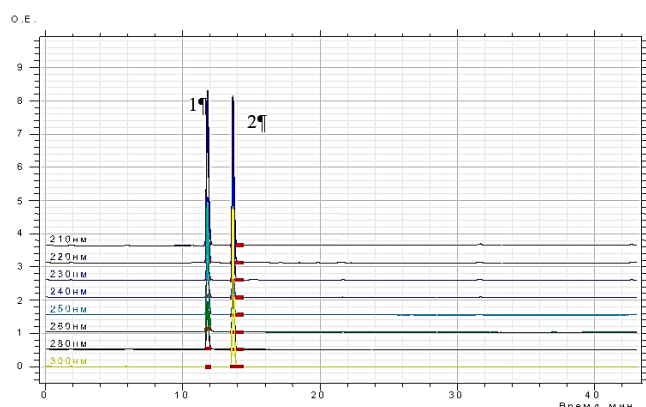


Рисунок 3 – Хроматограмма смеси растворов клопидогрель карбоновой кислоты (1) и клопидогрела (2)

Время удерживания пика клопидогрела около 13,74 мин, а клопидогрель карбоновой кислоты – 11,85 мин. Минимальная концентрация клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в растворе, которую можно определить с помощью приведенной методики, составляет 1 мкг/мл, что соответствует содержанию вещества в пробе 2 нг.

Таблица 3 – Основные хроматографические параметры клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Вещество	t_R	Спектральные соотношения R (S_{λ} / S_{210})							
		210 нм	220 нм	230 нм	240 нм	250 нм	260 нм	280 нм	300 нм
клопидогрел	13,738	1,0000	0,9837	0,6383	0,2167	0,2058	0,2801	1,0756	0,6231
клопидогрель карбоновая кислота	11,849	1,0000	0,4088	0,1750	0,1813	0,3783	0,2977	0,7897	0,0348

Для количественного определения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в модельных растворах предложенными методами применяли градуировочные графики или соответствующие уравнения прямых (рис.4).

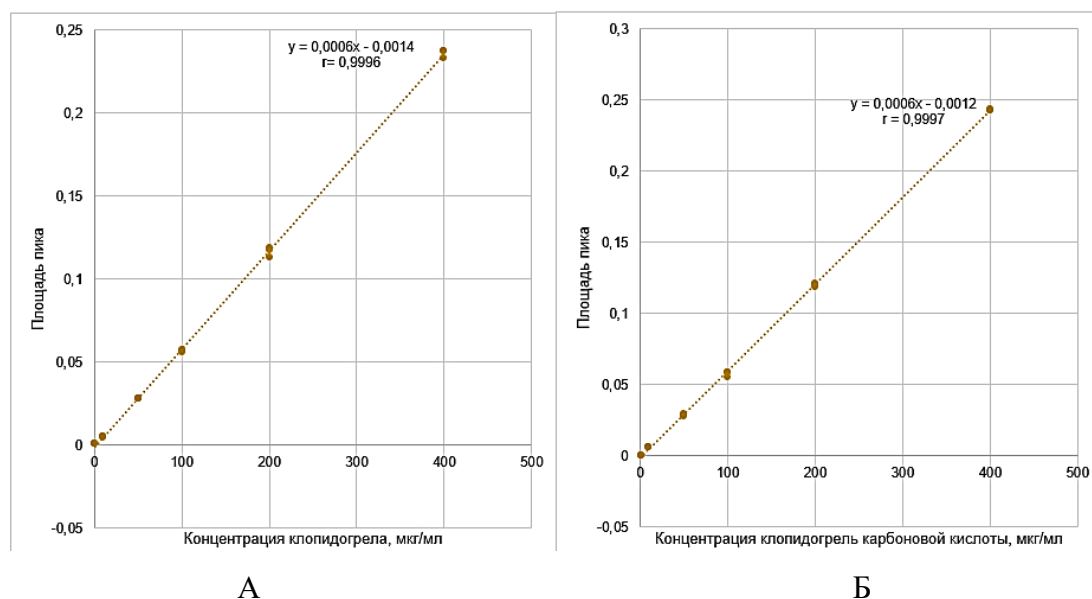


Рисунок 4 – Калибровочный график для определения вещества методом ВЭЖХ:

А- клопидогрела, Б- клопидогрель карбоновой кислоты

Методика количественного определения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты линейна в пределах 1 – 400 мкг/мл; ПКО клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты - 7,074 мкг/мл; значение правильности для клопидогрела составляет 99,69%, для клопидогрель карбоновой кислоты - 100,67%; относительное стандартное отклонение при определении прецизионности - не более $\pm 1,22\%$ для клопидогрела и $\pm 0,38\%$ для клопидогрель карбоновой кислоты.

Изучение условий экстракции клопидогрела и его основного метаболита из водных растворов органическими растворителями

Для выбора оптимальных условий изолирования клопидогрела и его неактивного метаболита из ткани органов трупа и очистки извлечений предварительно было изучено влияние факторов (рН среды – 2,0-12,0; природы экстрагента –хлороформ, диэтиловый эфир, гексан; наличия высаливателя: натрия хлорида, раствор натрия сульфата, раствор аммония сульфата в концентрациях 5%, 20% и насыщенный раствор) на процесс экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из водных растворов. Для количественного определения исследуемых веществ в полученных экстрактах применяли спектрофотометрический метод в УФ-области спектра.

Установлено, что гексан практически не экстрагирует клопидогрель и клопидогрель карбоновую кислоту при значениях рН 1,0 -12,0 и при наличии или отсутствии высаливателя в водной фазе, что свидетельствует о возможности применения гексана для очистки вытяжек от

липофильных примесей (рис.5).

Заметная экстракция клопидогрела хлороформом и диэтиловым эфиром начинается при $\text{pH} = 5,0 - 6,0$ и достигает максимума (95% для хлороформа и 90% для диэтилового эфира) в интервале $\text{pH} = 10,0-12,0$. Заметная экстракция для клопидогрель карбоновой кислоты хлороформом и диэтиловым эфиром наблюдается при $\text{pH} = 2,0 - 6,0$ и достигает максимума (95% и 88% соответственно) в интервале $\text{pH} = 2,0 - 4,0$. Таким образом, хлороформ и диэтиловый эфир можно использовать для изолирования клопидогрела в щелочной среде и клопидогрель карбоновой кислоты в кислой среде из биологического материала (рис.5).

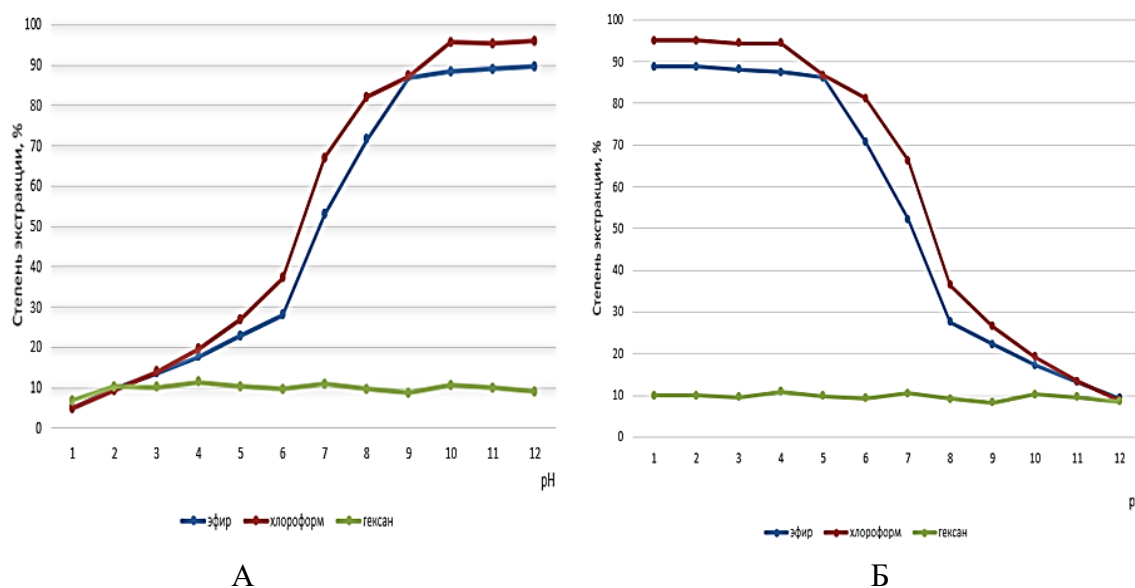


Рисунок 5 – Зависимость степени экстракции от pH среды и природы органического растворителя: А- клопидогрела; Б- клопидогрель карбоновой кислоты

Установлено, что при действии электролитов на клопидогрель карбоновую кислоту, уменьшается степень ее экстракции, то есть все используемые электролиты обладают всаливающим действием. На степень экстракции клопидогрела указанные электролиты практически не оказывают влияния, поэтому при разработке дальнейших методик анализа клопидогрела и его неактивного метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты добавление электролита не проводилось.

Так же было изучено влияние времени на степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты (рис.6). Как видно из представленных данных, самым оптимальным временем экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты является 5 минут, при котором степень экстракции равно 95,8% для клопидогрела и 94,87 для клопидогрель карбоновой кислоты.

Установлено, что при увеличении кратности экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты наблюдается увеличение количества изолируемого вещества (табл.4). Для извлечения клопидогрела из водных растворов необходима трехкратная экстракция, которая

позволяет выделить максимальное количество вещества. Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты при двух- и трехкратной экстракции примерно одинаковая, поэтому нами использовалась двухкратная экстракция при изолировании.

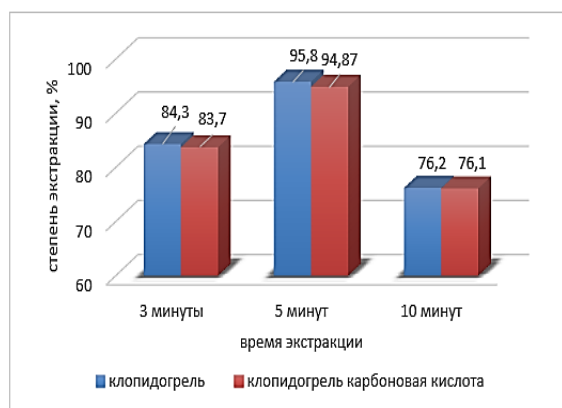


Рисунок 6 – Степень извлечения изучаемых веществ в зависимости от времени экстракции

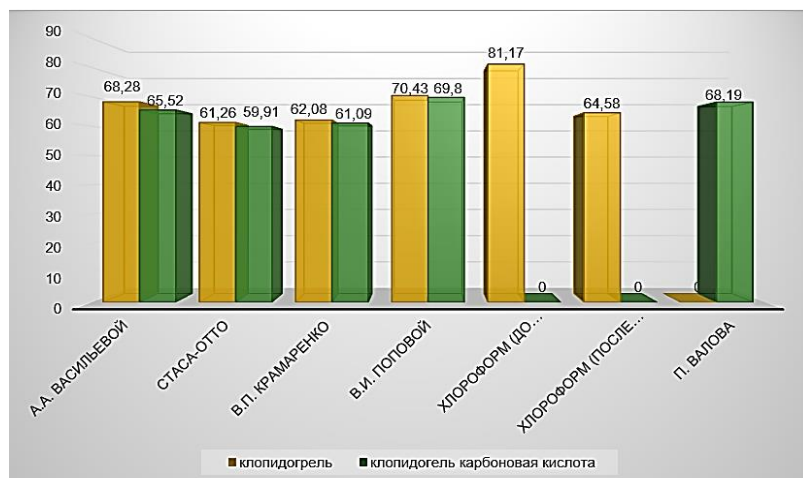


Рисунок 7 – Результаты сравнительной оценки методов изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты

Таблица 4 – Определение степени извлечения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в зависимости от кратности экстракции

Кратность экстракции	Степень экстракции, %	
	Клопидогрел	Клопидогрель карбоновая кислота
1-кратная экстракция	48,93±2,1	48,87±1,5
2-кратная экстракция	76,07±0,59	94,7±0,31
3-кратная экстракция	96,1±0,81	94,88±0,24
4-кратная экстракция	96,13±0,79	-
5-кратная экстракция	96,15±0,8	-

Разработка методик изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала и биологических жидкостей

Следующим этапом нашей работы была разработка методов изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала.

Исследование проводилось с модельными образцами печени животного, которые не содержали клопидогрел и его метаболит. Количество клопидогреля, использовавшегося для проведения модельных опытов, было рассчитано, исходя из данных литературы относительно количества препарата в органах и тканях человека при смертельных отравлениях. Нами были модифицированы методики изолирования клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты по методам А. А. Васильевой, Стаса-Отто, В. П. Крамаренко, П. Валова, В.И. Поповой и разработан метод изолирования хлороформом. Очистка экстрактов была проведена

экстракционным методом при применении гексана и ТСХ-методом в разработанных ранее условиях. После очистки количество клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в извлечениях определяли методом ВЭЖХ. Результаты представлены на рис.7.

Методы А. А. Васильевой и В. П. Крамаренко, Вальной и Поповой позволяют выделить достаточно большое количество клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала. Кроме того, по этим методам мы получали извлечения, которые являются практически освобожденными от соэкстрактивных веществ, которые могли бы мешать выявлению вещества методом ТСХ.

Результаты исследования свидетельствуют, что наиболее эффективным является метод изолирования клопидогрела хлороформом, что обусловлено свойствами вещества, которое легко экстрагируется хлороформом, и позволяет выделить от 81,44% до 83,41% вещества из модельных проб, относительная ошибка определения составляет $\pm 7,59\%$. Хлороформом выделить клопидогрель карбоновую кислоту не удалось.

Среди методов изолирования клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты гидрофильными экстрагентами применение воды, подкисленной серной кислотой позволяет выделить больше вещества из объекта исследования, чем водой, подкисленной щавелевой кислотой, что обусловлено активным разрушением связей «белок-клопидогрел» оптимальном значении – рН 2,0-2,5 и образованием более устойчивой соли клопидогрела сульфата.

Низкий выход клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты при использовании модифицированного метода Стаса-Отто (где этанол был заменен на метанол), подкисленной щавелевой кислотой, обусловлен значительными потерями клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты при многостадийном очищении извлечений.

Для выделения клопидогрель карбоновой кислоты нами рекомендован метод В.И. Поповой, который позволяет выделить при рН = 4 можно 69,46-70,04% вещества, относительная ошибка определений $\pm 2,13\%$.

Проведено исследование по выбору оптимальных условий изолирования клопидогрела и его неактивного метаболита клопидогрель карбоновой кислоты из биологических жидкостей. В качестве биологических жидкостей была использована цельная кровь и моча.

Учитывая результаты, полученные при изолировании клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из печени с помощью хлороформа, мы попытались использовать этот растворитель для изолирования препарата из крови и мочи. Установлено, что с помощью хлороформа можно выделить из мочи 74,59-76,16% клопидогрела (относительная погрешность $\pm 6,79\%$) и клопидогрель карбоновой кислоты 75,36-75,59% (относительная погрешность $\pm 4,08\%$).

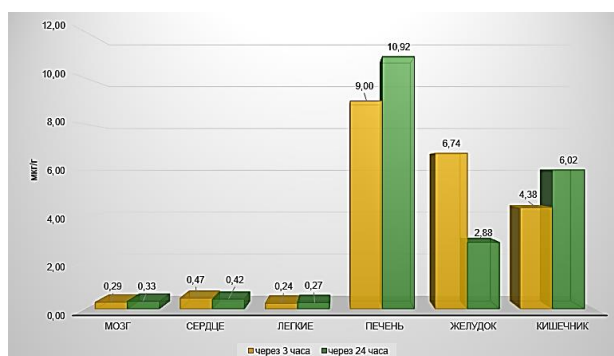
Для изолирования клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из крови мы предложили использовать 2 методики. По первой методике в качестве осадителя белков мы использовали— 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты и последующую экстракцию хлороформом, можно выделить 61,34-62,20% клопидогрела (относительная ошибка определений $\pm 6,72\%$) и 68,14-68,62% клопидогрель карбоновой кислоты (относительная ошибка определений $\pm 5,94\%$), во 2 методе - осаждении белков 10% водным раствором трихлоруксусной кислоты и последующей экстракцией хлороформом (для клопидогрела) и хлороформ-изопропиловый спирт (8:2) (для клопидогрель карбоновой кислоты), можно изолировать 55,49-56,53% клопидогрела (относительная ошибка определений $\pm 8,62\%$) и 64,17-64,77% клопидогрель карбоновой кислоты (относительная ошибка определений $\pm 6,27\%$).

Для выбора объектов для проведения ХТА изучено распределение клопидогрела и его неактивного метаболита в органах лабораторных животных (крысы, самцы). Клопидогрел вводили животным однократно, через зонд, в виде водных растворов, которые готовили растворением в воде таблеток Плавикс (75 мг, Pfizer, Франция). Опытным группам животных вводили клопидогрел в количествах, которые соответствовали терапевтической (0,94 мг/кг) и токсической дозе препарата (7,5 мг/кг). Для исследований отбирали мозг, сердце, легкие, печень, желудок, кишечник, кровь и мочу. Мочу животных собирали в течение 3-х и 24 ч, начиная с момента введения препаратов. Параллельно отбирали эти же биологические жидкости и органы из контрольных групп. Каждый орган взвешивали, а для биологических жидкостей – измеряли их объем.

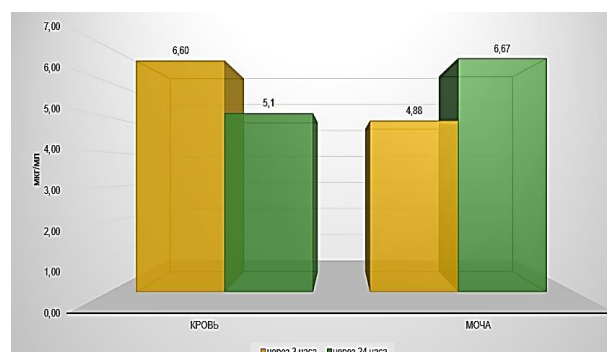
По результатам ТСХ-скрининга установлено, что при приеме однократной терапевтической дозы клопидогрела идентифицируется во всех пробах биологического материала животных, отобранных на исследование через 3 часа, при этом значения Rf выделенных соединений совпадают с соответствующими значениями чистых веществ. Метаболит клопидогрела в отобранных образцах биологического материала обнаружен в печени (рис.8А).

Исследование извлечений из тканей органов, содержимого желудка и тонкого кишечника, а также крови крыс контрольной группы показало отсутствие в данных объектах клопидогрела или близких по структуре веществ.

В биологическом материале, отобранном на исследование через 24 ч после введение животным препарата в количестве, соответствующем однократной терапевтической дозе, методом ТСХ клопидогрел обнаружен в печени, кишечнике и моче (рис.8Б). Метаболит клопидогрела при этом идентифицирован в сыворотке крови, печени, кишечнике и моче.



А



Б

Рисунок 8 – Распределение клопидогрела при исследовании через 3 ч и через 24 ч после введение препарата: А- в органах крыс при исследовании биологического материала;

Б- в биологических жидкостях крыс

В пробах из мозга, сердца, отобранных на исследование через 24 ч после введения однократной терапевтической дозы клопидогрела, методом ТСХ исследуемого препарата и его метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты не обнаружено.

Поскольку клопидогрел является липофильным веществом, основная часть введенной дозы в неизменном виде находится в желудке.

В моче и кишечнике содержание клопидогрела является низким, при чем большее количество (до 90 %) клопидогрела составляют его метаболиты.

На рисунке 9 представлено соотношение между общим количеством исследуемого препарата и его структурного метаболита в пробах из органов и биологических жидкостей крыс, отобранных на исследование через 24 ч после введения высших разовых доз.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для целей химико-токсикологического анализа при летальных отравлениях клопидогрелом рекомендовано на исследование отправлять желудок с содержимым, кишечник, печень и мочу.

Нами определен срок хранения клопидогрела и его неактивного метаболита в биологическом материале при его гниении при температуре 5°C 7, 14, 21 и 28 дней, 2 месяца (рис.10). Результаты исследований свидетельствуют о том, что через 3 суток хранения клопидогрела при гниении в печени трупа можно выделить 3,46%, через 7 суток выявить клопидогрел невозможно. Клопидогрель карбоновую кислоту в количестве 3,74% можно выделить через 2 месяца хранения материала при гниении, через 3 месяца выявить клопидогрель карбоновую кислоту не удалось.

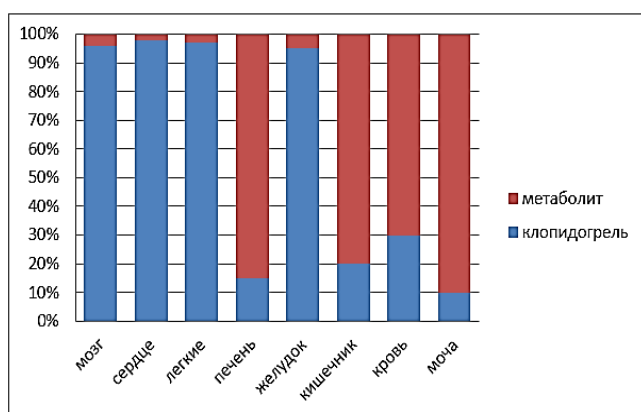


Рисунок 9 – Соотношение между уровнем концентрации клопидогреля и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты в органах и биологических жидкостях (через 24 ч. после введения высшей разовой дозы)

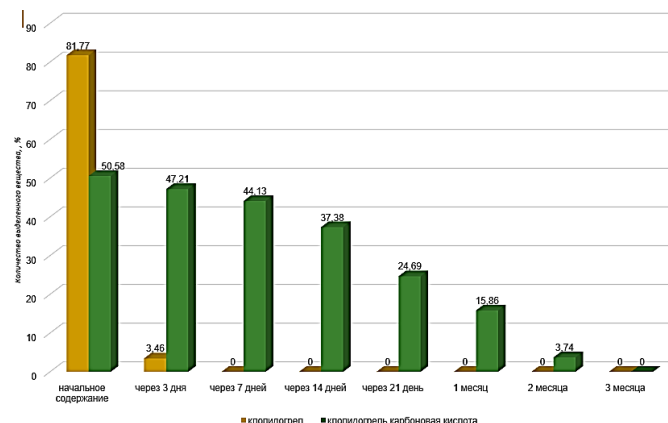


Рисунок 10 – Содержание клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в биологическом материале (печени), который подвергся гнилостным изменениям, в зависимости от сроков хранения

Алгоритм проведения токсикологического исследования биологических объектов на клопидогрел и его неактивный метаболит клопидогрель карбоновую кислоту

Результаты экспериментальных исследований, которые были получены при разработке биоаналитических методик определения клопидогреля и его метаболита, использованы в основе алгоритма проведения химико-токсикологического исследования биологических объектов на содержание клопидогреля и его метаболита клопидогрель карбоновой кислоты, что отражено в виде двух схем: химико-токсикологического исследования биологического материала, крови и мочи на содержание клопидогреля. Схемы состоят из отдельных последовательных шагов, которые включают пробоподготовку, подтверждающие исследования по идентификации и количественному определению как по нативному веществу, так и основному неактивному метаболиту действующего вещества клопидогреля в соответствующих биологических объектах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на решение актуальной задачи разработки комплексного подхода к химико-токсикологическому анализу клопидогреля и его основного метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты. Актуальность работы обусловлена широким клиническим применением клопидогреля как антиагрегантного средства и необходимостью совершенствования методов его детекции в случаях передозировки или отравления. Разработан комплекс аналитических методик для детекции клопидогреля и его метаболита, включающий:

- Метод ТСХ с системами этанол-уксусная кислота-вода (5:3:2) и хлороформ-ацетон (80:20), обеспечивающий разделение аналитов;
- оптимизированную методику ВЭЖХ с временами удерживания 13,74 мин (клопидогрел) и 11,85 мин (метаболит), линейным диапазоном 1-400 мкг/мл и $RSD \leq 1,22\%$;

- УФ-спектрофотометрический метод при 278 нм с диапазоном 20-200 мкг/мл и RSD $\leq 0,84\%$ (для идентификации и количественного определения, позволяющий предварительно оценить экстракционные характеристики изучаемых соединений).

2. Установлены оптимальные условия экстракции:

- максимальный выход достигается при использовании хлороформа (95% для клопидогрела при pH 10-12, для метаболита при pH 2-6) и диэтилового эфира (90% и 88% соответственно);
- оптимальное время экстракции - 5 минут (трехкратная для клопидогрела, двукратная для метаболита);
- Н-гексан рекомендован для очистки экстрактов.

3. Проведенные исследования выявили, что хлороформ демонстрирует высокую эффективность при экстракции клопидогрела из печеночной ткани (81,44-83,41%), однако оказывается малоэффективным для выделения его карбонового метаболита. Для клопидогрел карбоновой кислоты наилучшие результаты показал метод В.И. Поповой при pH=4 (69,46-70,04%), в то время как хлороформная экстракция давала выход менее 20%. Эти различия объясняются полярностью соединений - хлороформ, будучи слабополярным растворителем, эффективно экстрагирует липофильный клопидогрел, но плохо подходит для более полярного метаболита. Таким образом, для комплексного анализа обоих соединений в печеночной ткани необходимо применять комбинированный подход: хлороформную экстракцию для клопидогрела и метод В.И. Поповой для его карбонового метаболита. Полученные данные подчеркивают важность учета химических свойств как аналитов, так и экстрагентов при разработке методов пробоподготовки.

4. Разработаны и валидированы высокоэффективные методики экстракции клопидогрела и его основного метаболита из биологических образцов. Для мочи установлена оптимальная хлороформная экстракция с выходом 74,6-76,2% для клопидогрела и 75,4-75,6% для метаболита. В случае крови максимальная эффективность достигается при двухэтапной обработке: осаждении белков хлористоводородной кислотой с последующей хлороформной экстракцией (61,3-62,2% для клопидогрела и 68,1-68,6% для метаболита). Альтернативная методика с использованием трихлоруксусной кислоты и хлороформ-изопропанольной смеси (8:2) демонстрирует несколько меньшую, но статистически значимую эффективность. Все разработанные протоколы характеризуются высокой воспроизводимостью (относительная погрешность $\leq 6,8\%$) и полностью соответствуют требованиям современных химико-токсикологических исследований.

5. Исследования установили ключевые биоматериалы для диагностики отравлений клопидогрелом: желудок с содержимым (основное депо неизмененного препарата), печень и

кишечник (максимальное накопление метаболитов), а также моча (высокие концентрации основного метаболита). Нативный клопидогрел полностью деградирует в течение 7 суток посмертно, тогда как клопидогрел-карбоновая кислота сохраняет детектируемые уровни (3,74%) даже после 2 месяцев хранения, что делает её надежным маркером для ретроспективной диагностики. Эти данные имеют важное значение для судебно-токсикологической практики.

6. Разработана комплексная методика химико-токсикологического анализа клопидогрела и его метаболита (клопидогрел-карбоновой кислоты) в биологических образцах. Методика включает два этапа: предварительный скрининг ТСХ и последующее точное количественное определение с использованием ТСХ со стандартами и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Применение данной методики обеспечит однозначное повышение точности диагностики случаев отравления клопидогрелом и создаст унифицированный стандарт для его определения в рамках судебно-химической экспертизы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аносова, Л.С. Разработка методики анализа клопидогрела с использованием ВЭЖХ и ее валидация / Л.С. Аносова, И.П. Ремезова, А.М. Агафонов // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2022. – № 22(4). – С. 33-39. DOI: [10.55531/2072-2354.2022.22.4](https://doi.org/10.55531/2072-2354.2022.22.4).
2. Аносова, Л.С. Разработка УФ-спектрофотометрического метода количественного определения метаболита клопидогрела, пригодного для химико-токсикологического анализа / Л.С. Аносова, И.П. Ремезова, А.М. Агафонов // **Фармация**. – 2022. – №71 (7). – С. 18–24. DOI: <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-07-03>
3. Аносова, Л.С. УФ-спектрофотометрия в анализе клопидогрела / Л.С. Аносова // **Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация**. – 2023. – № 2. -С. 68-75.
4. Аносова, Л.С. Разработка условий аналитической диагностики отравлений клопидогрелом / Л.С. Аносова // **Фармация**. – 2022. м №71 (6). С. 12–18. DOI: <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-06-02>
5. Аносова, Л.С. Распределение клопидогрела в органах отравленных животных / Л.С. Аносова // **Фармация**. – 2021. – №70 (6). – С. 31-36. DOI: [10.29296/25419218-2021-06-06](https://doi.org/10.29296/25419218-2021-06-06)
6. Аносова, Л.С. Изучения распределения неактивного и основного метаболита клопидогрела в органах отравленных животных / Л.С. Аносова, И.П. Ремезова // **Тверской медицинский журнал**. – 2023. – № 5. – С. 11-20.
7. Аносова, Л.С. Разработка метода ТСХ-скрининга антитромбоцитарных препаратов: клопидогрела и ацетилсалициловой кислоты для целей химико-токсикологического анализа / Л.С. Аносова, А.М. Агафонов, И.П. Ремезова // Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2023» Воронеж, 28-29 сентября 2023 –

Воронеж: Воронежский государственный медицинский университет, 2023. – С.155-162. DOI: [10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-157-162](https://doi.org/10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-157-162)

8. Аносова, Л.С. Использование метода ТСХ в химико-токсикологическом анализе клопидогрела и его неактивного метаболита / Л.С. Аносова, А.М. Агафонов, И.П. Ремезова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «Естественные науки: состояние и перспективы развития» Грозный, 27 октября 2023 года. – Махачкала: Издательство АЛЕФ, 2023. – С.8-14.

9. Аносова, Л.С. Анализ метаболита клопидогрела – клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ / Л.С. Аносова, И.П. Ремезова // Научно-практический журнал «Вестник пермской государственной фармацевтической академии»: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии» Пермь, 14-15 декабря 2022 г. – Пермь, ПГФА, 2022. – С. 12-17.

10. Аносова, Л.С. Изолирование клопидогрела модифицированным методом Стаса-Отто / Л.С. Аносова, И.П. Ремезова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «Естественные науки: состояние и перспективы развития» Грозный, 28 октября 2022. – Махачкала: Издательство АЛЕФ, 2023. – С.14-21.

11. Аносова, Л.С. Исследование клопидогреля в органах теплокровных животных / Л.С. Аносова // Материалы II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики» Кемерово, 20 мая 2022 г – ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, 2022. – С.298-302.

12. Аносова, Л.С. Исследование степени экстракции клопидогрела из водных растворов органическими растворителями /Л.С. Аносова // Сборник докладов VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» Рязань, 21 октября 2022 г. –Изд-во ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2022. – С. 103-104.

13. Аносова, Л.С. Изолирование клопидогреля с биологического материала с помощью хлороформа / Л.С. Аносова // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Наука и образование: актуальные исследования и разработки». [в 2 ч.]– Чита: ЗабГУ, 2022. – С. 19-24

14. Аносова, Л.С. Химико-токсикологическое исследование клопидогреля / Л.С. Аносова // COLLECTIVE MONOGRAPH «The modern stage of the development of medical education in EU countries». Medical University of Lublin. Poland 2021. Pp. 1-25. DOI: [10.30525/978-9934-26-090-2-1](https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-1).