

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

научный руководитель
доктор фармацевтических наук,
профессор Ремезова И.П.

Пятигорск - 2025

Оглавление

<i>Введение</i>	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛОПИДОГРЕЛА	17
1.1. Физико-химические свойства клопидогрела	17
1.2. Фармакокинетические и токсикокинетические параметры клопидогрела, случаи отравления клопидогрелом	20
<i>1.2.1. Фармакокинетические параметры</i>	20
<i>1.2.2. Токсикологическое действие клопидогрела, случаи отравления</i>	22
1.3. Метаболизм клопидогрела	24
1.4. Методы обнаружения и определения клопидогрела	25
<i>1.4.1. Методы анализа клопидогрела: обзор фармакопейных и исследовательских подходов</i>	26
<i>1.4.2. Методы обнаружения и определения клопидогрела и его неактивного метаболита в биологических объектах</i>	28
Заключение по главе 1	29
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	31
2.1. Материалы исследований	31
<i>2.1.1. Реагенты и реактивы</i>	31
<i>2.1.2. Приборы и материалы</i>	35
2.2. Методики исследований	36
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА И ЕГО НЕАКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА КЛОПИДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ	40
3.1. Разработка методик анализа клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ.....	42
3.2. Идентификация и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ	49

3.2.1. Разработка условий идентификации клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ	51
3.2.2. Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ	56
3.3. Идентификация и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом УФ-СФМ	60
3.3.1. Разработка условий идентификации клопидогрела и его неактивного метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ	61
3.3.2. Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ.....	64
Заключение по главе 3	69
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ КЛОПИДОГРЕЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ.....	71
4.1. Влияние рН среды и природы органического растворителя на изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты	72
4.2. Изучение влияния электролитов на изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты.....	78
4.3. Исследование влияния времени и кратности на степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты	81
Заключение по главе 4	85
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ КЛОПИДОГРЕЛА И КЛОПИДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	86
5.1. Выделение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала общепринятыми методами	88
5.1.1. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой подкисленной щавелевой кислотой (метод А.А. Васильевой).....	89

5.1.2.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой, подкисленной серной кислотой (метод В.Ф. Крамаренко) ..</i>	93
5.1.3.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой (метод Стаса-Отто)</i>	95
5.1.4.	<i>Изолирование клопидогрель карбоновой кислоты подщелочённой водой (метод П.Валова)</i>	98
5.1.5.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой, подкисленной серной кислотой (метод В.И. Поповой)</i>	99
5.1.6.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты хлороформом</i>	101
5.2.	<i>Выделение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологических жидкостей</i>	107
5.2.1.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из мочи хлороформом</i>	108
5.2.2.	<i>Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из крови</i>	112
5.3.	<i>Распределение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в органах лабораторных животных</i>	121
5.4.	<i>Изучение сохраняемости клопидогрела и его метаболита в биологическом материале</i>	127
	<i>Заключение по главе 5</i>	130
ГЛАВА 6. АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА КЛОПИДОГРЕЛ И ЕГО НЕАКТИВНЫЙ МЕТАБОЛИТ КЛОПИДОГРЕЛЬ КАРБОНОВУЮ КИСЛОТУ		132
6.1.	<i>Схема токсикологического исследования биологического материала на клопидогрел по нативному веществу</i>	132

6.2. Схема токсикологического исследования биологического материала на клопидогрел по метаболиту	137
Заключение по главе 6	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
<i>Список сокращений:</i>	<i>145</i>
<i>Список литературы:</i>	<i>147</i>
ПРИЛОЖЕНИЯ	165
<i>Приложение 1.</i>	<i>165</i>
<i>Приложение 2.</i>	<i>166</i>
<i>Приложение 3.</i>	<i>167</i>

Введение

Актуальность темы.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются основной причиной смертности в мире, ежегодно унося более 17,9 млн жизней (около 31% всех смертей), согласно данным ВОЗ (2025) [147]. В развитых странах на долю ССЗ приходится до 40% летальных исходов, причем ишемическая болезнь сердца (ИБС) и острые коронарные синдромы (ОКС) лидируют в структуре заболеваемости [121].

Клопидогрел — антиагрегант, широко применяемый в кардиологии для профилактики тромбозов у пациентов с ИБС, ОКС и после стентирования. Данный препарат входит в топ-5 наиболее назначаемых антиагрегантов. В 2025 году его мировой объем продаж составил \$3,8 млрд, а в России было выписано 12,5 млн упаковок [74].

Клопидогрел, являясь тиенопиридиновым антиагрегантом, подавляет агрегацию тромбоцитов путем необратимого блокирования P2Y₁₂-рецепторов. Несмотря на высокую терапевтическую эффективность, он обладает дозозависимой токсичностью, связанной с его фармакодинамикой и метаболизмом, что требует углубленного химико-токсикологического исследования.

Основной токсический эффект, который проявляется при употреблении клопидогрела — повышенная кровоточивость из-за угнетения функции тромбоцитов. Частота геморрагий варьирует в зависимости от дозы и комбинации с другими антикоагулянтами: 1,0–2,0% — тяжелые кровотечения (включая внутричерепные и желудочно-кишечные кровотечения (ЖКТ)) при монотерапии [45], до 11,6% — при комбинации с аспирином [40]. Также клопидогрел обладает гематологической токсичностью (тромбоцитопения (0,1–0,3% случаев), в т.ч. тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) — редкое, но жизнеугрожающее осложнение [39] и гепатотоксичностью (повышение печеночных ферментов (АЛат, АСаТ) наблюдается у 2–5% пациентов, клинически значимые поражения печени — у 0,1% [99]). Исследования *in vitro*

показали, что клопидогрел и его метаболиты могут вызывать повреждение ДНК в высоких концентрациях, оказывая тем самым генотоксические эффекты [48]. При производстве клопидогрела его пыль может попадать в воздух рабочей зоны, оказывая раздражающее действие на слизистые и дыхательные пути. Ориентировочный безопасный уровень (ОБУВ) в воздухе составляет 0,2 мг/м³ (ГН 2.2.5.3532-18). В США и ЕС его оборот контролируется European Medicines Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA), требуя соблюдения мер защиты на производстве [73, 137]. Существует очень множество факторов, которые усиливают токсичность клопидогрела: так, например комбинация с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) (ибупрофен, диклофенак) повышает риск ЖКТ-кровотечений в 2–3 раза [65]. Сопутствующий прием варфарина увеличивает частоту геморрагий до 15% [97]. Генетический полиморфизм CYP2C19 (так как у 30% людей метаболизм замедлен) приводит к накоплению токсичных метаболитов [56].

Клопидогрел, как антиагрегантный препарат, редко вызывает острые отравления из-за относительно широкого терапевтического окна. Однако передозировка (особенно в комбинации с другими антикоагулянтами или НПВП) может приводить к тяжелым геморрагическим осложнениям. Так в 2023 году в Индии зарегистрировано отравление с кровотечением после приема 900 мг клопидогрела [109]. Описаны также случаи суицидальных попыток при приеме доз, превышающих 600 мг (в 4–6 раз выше терапевтической). В 2021 году зафиксирован летальный исход у пациента, принявшего 2 г клопидогрела в сочетании с алкоголем [84], что развило массивное желудочно-кишечное кровотечение с признаками геморрагического шока. В 2023 г. зафиксирован случай преднамеренного приема 300 мг клопидогрела (4×75 мг) с 500 мг аспирина с суицидальной целью [40]. Терапевтическая ошибка, заключающаяся в одновременном назначении стандартных доз клопидогрела (75 мг/сут) и варфарина (5 мг/сут) без должного контроля, привела к развитию геморрагического синдрома с гемартрозом коленного сустава и превышением

МНО более чем в 2 раза от терапевтического диапазона (6,8 при норме 2-3), что потребовало неотложной коррекции антикоагулянтной терапии [97].

Современные методы анализа (ВЭЖХ-УФ, ГХ-МС) клопидогрела и его основного неактивного метаболита – клопидогрель-карбоновой кислоты (ККК) – имеют ряд ограничений, затрудняющих их применение в химико-токсикологических исследованиях - не позволяют детектировать низкие концентрации клопидогрела и ККК в биоматериале (плазма, моча, слюна) из-за быстрой биотрансформации клопидогрела в организме (период полувыведения ~8 ч) [138]. Существующие протоколы исследования ориентированы на определение только клопидогрела (без ККК) [67] и анализ плазмы крови, но не других биоматериалов (моча, слюна, волосы) [124]. ККК является основным неактивным метаболитом и часто не учитывается в ходе анализа, хотя его накопление может указывать на передозировку (при нарушении метаболизма CYP2C19) и токсическое действие (генотоксичность *in vitro*) [48].

Таким образом, проведение комплексного химико-токсикологического исследования клопидогрела, применяемого как в терапевтических, так и в токсических дозах, представляется актуальной и практически значимой задачей.

Степень разработанности темы.

Анализ литературных данных показывает, что, несмотря на значительное количество исследований, посвященных фармакокинетике и фармакодинамике клопидогрела, вопросы его химико-токсикологического анализа остаются недостаточно разработанными. В настоящее время отсутствуют систематизированные методики изолирования, идентификации и количественного определения как нативного вещества, так и его основного неактивного метаболита ККК в биологических объектах [78,139].

Для анализа клопидогрела в лекарственных препаратах Фармакопее USP рекомендует использовать метод ВЭЖХ с УФ-детектированием ($\lambda=220$ нм) [140], согласно Фармакопее EP анализ клопидогрела проводится титриметрией в неводных средах [64], также спектрофотометрия в УФ-области [35]. Для скрининга сопутствующих веществ и определения примесей в клопидогреле

рекомендовано использовать метод ТСХ [81] и ЖХ-МС/МС [152]. Для одновременного определения клопидогрела и ККК в биоматрице используется ЖХ-МС/МС [49], для определения клопидогрела после его изолирования из биоматрицы используется метод ВЭЖХ-УФ [110].

Однако существующие методики имеют существенные ограничения: не учитывают особенности распределения метаболитов в различных биологических средах [125], не обеспечивают достаточной чувствительности для токсикологического скрининга [96], отсутствуют утвержденные методики определения в тканях и биологических жидкостях трупного материала и не учитывают особенности разложения биологических образцов после смерти [148].

В связи с этим, разработка комплексной схемы химико-токсикологического анализа клопидогрела (как по нативному веществу, так и по его метаболиту), применимой для направленного и ненаправленного анализа, является актуальной задачей.

Все это позволило нам сформулировать цели и задачи диссертационного исследования.

Цель исследования: разработка методик химико-токсикологического анализа клопидогрела как по нативному веществу, так и по его неактивному основному метаболиту – клопидогрель 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 (клопидогрель 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 особенности 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), высокоэффективная 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 рН 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 [30].

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 диссертации.

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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛОПИДОГРЕЛА

1.1. Физико-химические свойства клопидогрела

Клопидогрел (Плавикс®, Зилт®, Брилинта, Плагрил) относится к антиагрегантным лекарственным средствам; по химической структуре является метил-(+)-(S)-альфа-(o-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3.2-с]пиридин-5 (4H) ацетатом [50, 51, 68, 145].

В медицине клопидогрел применяется в виде соли сульфатной кислоты - клопидогрела гидросульфата, описанного в монографии Европейской фармакопеи [51]. Структурная формула этого вещества приведены на рис.1.

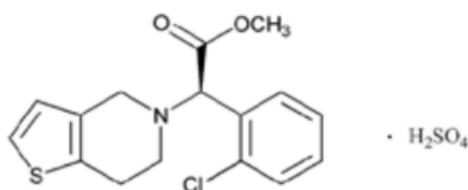


Рисунок 1. Структурная формула клопидогрела

Эмпирическая формула клопидогрела бисульфата $C_{16}H_{16}ClNO_2S \cdot H_2SO_4$ и его молекулярная масса составляет 419,9 [68,135].

Молекула клопидогрела содержит асимметричный углерод, что приводит к существованию двух энантиомеров (R и S).

Исследования показали, что активным соединением клопидогреля является S-энантиомер [145], который соответствует правовращающей форме. Свободное основание клопидогрела нестабильно в связи с подвижным протоном в хиральном центре и подвержено гидролизу метильно-эфирной группы [76, 92].

R-стереоизомер (рис. 2) характеризуется отсутствием фармакологического (антиагрегантного) действия и иным профилем безопасности [30]. Более того, в

исследованиях на животных (R)-энантиомер вызывал судороги при высоких дозах. (R)-клопидогрела бисульфат считается одной из примесей в лекарственном веществе (S)-клопидогрела бисульфата [108]. Также содержание R-энантиомера контролируется в готовом лекарственном средстве как примесь С [17].

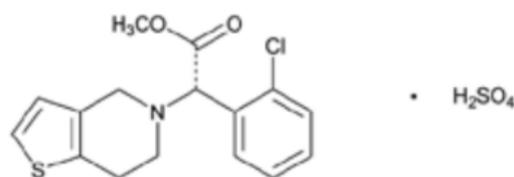


Рисунок 2. R-энантиомер клопидогрела

Экспериментальными данными [76] подтверждена возможность протекания в лекарственной форме клопидогрела энантиомерной инверсии с превращением активного S-энантиомера в неактивный R-энантиомер.

Клопидогрел- белый или почти белый порошок. При нейтральном pH практически нерастворим в воде, но свободно растворим при pH=1. Клопидогрел также свободно растворяется в метаноле, мало растворим в метиленхлориде и практически нерастворим в этиловом эфире, циклогексане. Клопидогрел трудно очистить, поскольку он не образует твердую кристаллическую фазу [1, 157].

Угол оптического вращения от $+54,0^\circ$ до $+58,0^\circ$ в пересчете на безводное вещество [50, 68, 114, 145].

Автором Редькиной Е.А. [26] было установлено, что клопидогрел очень легко растворим в воде горячей и 0,1 М растворе натрия гидроксида, димексиде и пропиленгликоле (при нагревании), 0,1 М растворе хлороводородной кислоты, растворим в глицерине, малорастворимый в полиэтиленоксиде 400 и Твине - 80 (даже при нагревании), практически не растворим в расплавленном твердом жире, маслах подсолнечном, касторовом, и вазелиновом даже при нагревании.

Температура плавления клопидогрела $178,7-185,5^\circ\text{C}$ [50, 51, 68].

Для клопидогрела описаны пути кислотного, щелочного гидролитического разложения, окислительной и фотодеградаци, а также влияние температурного фактора на процесс разрушения молекулы [30, 120]. Клопидогрел содержит

сложноэфирную группу и является соединением, легко подвергающимся гидролизу с образованием фармакологически неактивного соединения [30].

Продукт гидролиза клопидогрела (рис. 3) представляет собой деметилированное соединение, его образование снижает содержание действующего вещества и контролируется в готовой лекарственной форме как примесь А [17, 30].

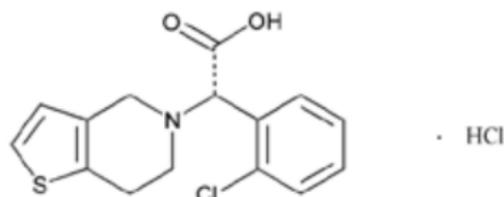


Рисунок 3. Продукт гидролиза клопидогрела (клопидогрель карбоновая кислота)

Конкретный состав соли клопидогрела может влиять на степень его абсорбции, распределения и выведения из организма, следовательно, он определяет фармакокинетические свойства препарата и его фармакодинамическую активность. Таким образом, изменение состава соли клопидогрела может потенциально изменить его физико-химические свойства и повлиять на клиническую эффективность и безопасность [1, 57].

В лекарственной форме клопидогрел применяется в виде гидросульфатной соли, обладающей кристаллической структурой и повышенной растворимостью относительно основного соединения [59]. Российский фармрынок представлен исключительно дженериками клопидогрела гидросульфата, тогда как в других странах исследуются новые солевые формы на предмет их эквивалентности оригинальному препарату [1].

1.2. Фармакокинетические и токсикокинетические параметры клопидогрела, случаи отравления клопидогрелом

1.2.1. Фармакокинетические параметры

Препарат быстро, но не полностью всасывается после приема внутрь и интенсивно метаболизируется до активного метаболита. Исходный препарат или его активный метаболит остается не обнаруживаемым в плазме крови. Однако основным циркулирующим соединением является неактивное карбоновое производное, которое используется для документирования фармакокинетического профиля клопидогрела [79, 145].

Всасывание. При пероральном приеме в терапевтической дозировке 75 мг/сутки клопидогрел демонстрирует быструю абсорбцию. Фармакокинетические исследования показывают, что максимальная концентрация (C_{max}) неизмененного вещества в плазме крови достигает 2.2-2.5 нг/мл при однократном приеме указанной дозы, причем этот показатель регистрируется в среднем через 45 минут после приема препарата. Оценка степени всасывания по экскреции метаболитов с мочой свидетельствует, что биодоступность клопидогрела при пероральном применении составляет приблизительно 50%. [31, 43, 83].

Распределение. *In vitro* исследования демонстрируют, что клопидогрел и его основной циркулирующий метаболит (фармакологически неактивное производное, образующееся в процессе биотрансформации препарата) обратимо связываются с белками плазмы крови. Степень связывания составляет 98% для клопидогрела и 94% для его метаболита, причем данное взаимодействие остается ненасыщенным в широком диапазоне концентраций [31, 83].

Фармакокинетический профиль клопидогрела в организме человека преимущественно определяется его неактивным метаболитом –ККК, которая составляет около 85% всех циркулирующих в плазме метаболитов [108,117, 145]. Период полувыведения данного соединения составляет 8 часов [87, 94]. При этом

антиагрегантный эффект клопидогрела сохраняется в течение 7–10 дней, что соответствует жизненному циклу тромбоцитов [87, 144].

Следует отметить, что сам клопидогрел не проявляет фармакологической активности *in vitro*. Для реализации его антитромбоцитарного действия *in vivo* необходима биотрансформация в печени с участием изоферментов цитохрома P450 [91, 145]. В результате окисления клопидогрела до 2-оксо-клопидогрела с последующим гидролизом образуется активный метаболит – тиоловое производное. Однако данное соединение крайне нестабильно и не обнаруживается в плазме крови в свободной форме [105, 114, 145]. В связи с этим для точного количественного определения клопидогрела и его метаболитов в биологических образцах необходимы высокочувствительные биоаналитические методы [105, 145].

Выведение. Метаболические исследования с использованием ^{14}C -меченого клопидогрела продемонстрировали, что в течение 120 часов после перорального приема примерно 50% радиоактивной метки экскретируется почками, тогда как 46% выводится через кишечник [22, 31]. Фармакокинетический анализ показал, что период полувыведения неизмененного клопидогрела после однократного приема дозы 75 мг составляет около 8 часов. При этом для основного циркулирующего неактивного метаболита значение $T_{1/2}$ достигает 12 часов как после однократного, так и после многократного введения препарата [22, 31].

Фармакодинамические исследования у пациентов с ОКС, перенесших чрескожные коронарные вмешательства, свидетельствуют о потенциальной пользе применения повышенных доз клопидогрела, особенно в раннем послеоперационном периоде [71].

Фармакокинетические параметры клопидогрела характеризуются значительной вариабельностью: кажущийся объем распределения составляет $39,240 \pm 33,52$ литра, что отражает его широкое распределение в тканях [89]. Значения системного клиренса демонстрируют нелинейную кинетику: при приеме дозы 75 мг он достигает $18,960 \pm 15,890$ л/ч, тогда как после приема 300 мг снижается до $16,980 \pm 10,410$ л/ч [89].

1.2.2. Токсикологическое действие клопидогрела, случаи отравления

Клопидогрел представляет собой тиенопиридиновый антиагрегант (дезагрегант), механизм действия которого заключается в необратимом ингибировании P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов, что приводит к подавлению их агрегации [115, 149]. Препарат обладает выраженным местнораздражающим действием, особенно при контакте со слизистыми оболочками глаз, и проявляет системные токсические свойства.

В Российской Федерации клопидогрел отнесен к классу вредных веществ. Для контроля его содержания в воздухе рабочей зоны разработаны нормативные документы в соответствии с ГОСТ 12.1.016-79 и ГОСТ 12.1.005-88. Установленный ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) для гидросульфата клопидогрела составляет 0,2 мг/м³ [23, 155].

Несмотря на широкое применение в клинической практике, случаи передозировки клопидогрелом регистрируются относительно редко [93, 127]. Это может быть связано как с недостаточной разработкой методов анализа, так и с особенностями его фармакокинетики.

По данным Техасского токсикологического центра за период 1998-2004 гг., среди 582 зарегистрированных случаев экспозиции средняя доза составила 249 мг (диапазон 25-7500 мг) [79]. Клинические проявления отмечались лишь у 11,2% пациентов и включали: желудочно-кишечные нарушения (4,7%), неврологические симптомы (3,0%), сердечно-сосудистые осложнения (0,6%), офтальмологические проявления (0,6%) [79, 102].

Клопидогрель обладает органоспецифической токсичностью, которая проявляется:

- ✓ *Гепатотоксичность*: многочисленные исследования подтверждают риск развития лекарственного поражения печени при применении клопидогрела [88, 107, 116]. Современные данные (2022-2023 гг.) свидетельствуют о значительной частоте идиосинкразических реакций со стороны печени [47, 102].

- ✓ *Гематологическая токсичность*: в литературе описаны случаи развития тромботической тромбоцитопенической пурпуры, впервые зарегистрированные в Японии [34]. Генетические исследования 2023 года выявили повышенный риск осложнений у пациентов с полиморфизмом CYP2C19 [251].
- ✓ *Геморрагические осложнения*: клинические наблюдения включают: легочные кровотечения и гемоторакс при парентеральном введении [41, 134], массивные желудочно-кишечные кровотечения при пероральном приеме [111].

Современные данные (2022-2023 гг.) демонстрируют увеличение частоты таких осложнений на 15-20% по сравнению с допандемийным периодом [36, 61].

Согласно данным NPDS (2023), отмечается рост случаев отравлений клопидогрелом на 18,7% в период 2020-2022 гг. по сравнению с 2017-2019 гг. Европейские исследования фиксируют увеличение смертности с 3,2% до 5,1% ($p < 0,01$). Следует отметить, что 67% пациентов с тяжелыми кровотечениями одновременно принимали НПВП или антикоагулянты. Средняя летальная доза составляет 1,750 мг [36, 61].

Активация клопидогрела требует участия системы цитохрома P450 (CYP), что обуславливает клинически значимые взаимодействия: ингибиторы CYP (кетоконазол, эритромицин, варфарин) способствуют накоплению препарата и развитию хронической интоксикации [72, 136, 156], многие современные исследования (2023 г.) подтверждают риск взаимодействий с ингибиторами протонной помпы [100].

Пандемия COVID-19 сопровождалась значительным ухудшением психического здоровья населения, что привело к росту суицидальных попыток с использованием клопидогрела [54, 75, 118, 127, 133, 150]. Этот феномен требует особого внимания клиницистов и разработки профилактических мер.

1.3. Метаболизм клопидогрела

После перорального приема клопидогрел быстро абсорбируется в желудочно-кишечном тракте, однако его биодоступность ограничена интенсивным метаболизмом при первом прохождении через печень [42]. В результате концентрация неизмененного (нативного) вещества в системном кровотоке остается крайне низкой. Косвенные методы оценки показывают, что абсорбции подвергается приблизительно 50% принятой дозы препарата.

Основные пути метаболизма представлены на рис. 4:

1. *Гидролитический путь* (доминирующий):

- ✓ Около 85-90% пероральной дозы преобразуется карбоксилэстеразой печени.
- ✓ Образуется неактивный метаболит - производное карбоновой кислоты (основной определяемый метаболит в плазме) [71, 83].

2. *Окислительный путь* (через систему цитохрома P450):

- ✓ Приблизительно 2% дозы окисляется до промежуточного соединения - 2-оксолопидогрела [83].
- ✓ Далее трансформируется в активный тиоловый метаболит, ответственный за антиагрегантное действие [83, 154].
- ✓ В процессе участвуют преимущественно изоферменты CYP2C19, CYP3A4 и CYP1A2 [31].

Ключевые особенности метаболизма заключаются в том, что неактивный метаболит (карбоновая кислота) составляет основную часть циркулирующих в крови производных клопидогрела, активный метаболит крайне лабилен и не обнаруживается в плазме в свободной форме. Индивидуальные вариации активности CYP2C19 существенно влияют на эффективность трансформации.

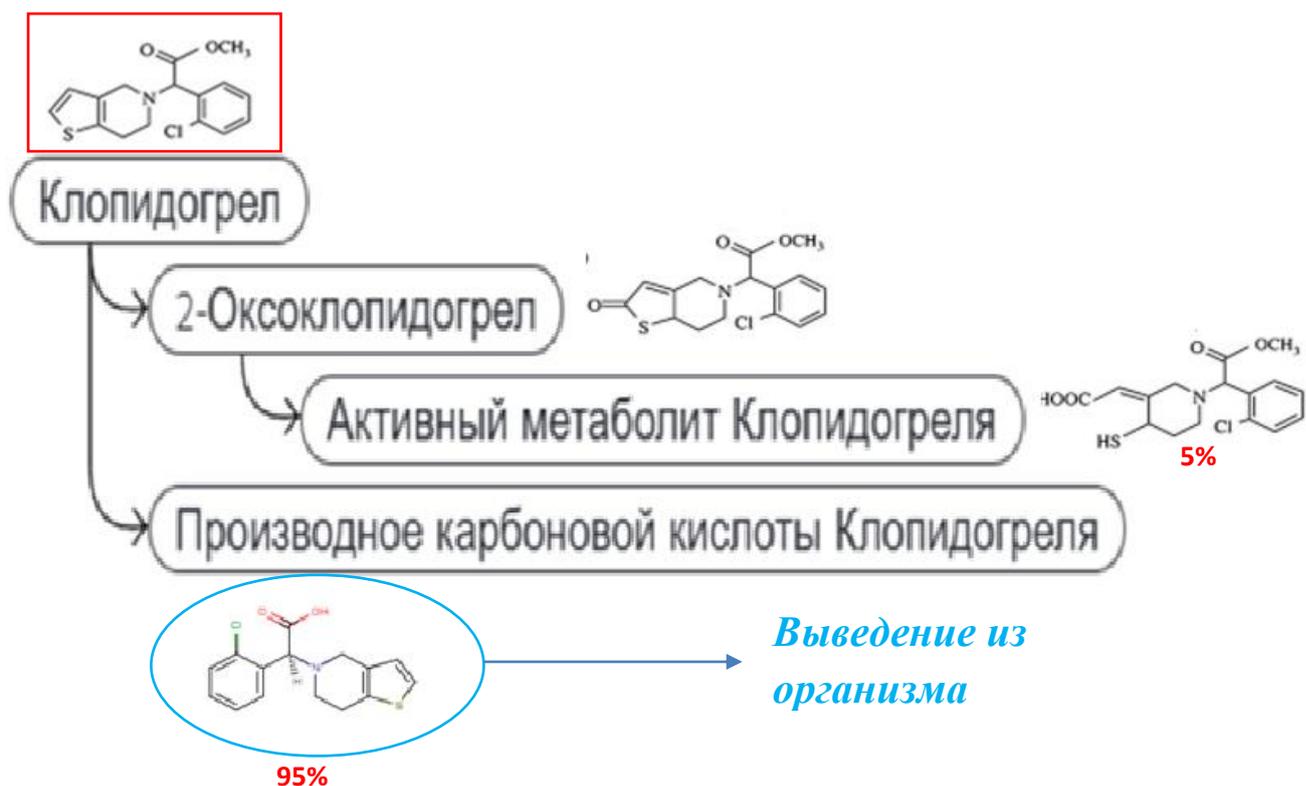


Рисунок 4. Схема метаболизма клопидогреля

Активный тиольный метаболит *in vivo* быстро и необратимо связывается с рецептором тромбоцитов, ингибируя таким образом агрегацию тромбоцитов [22, 31].

1.4. Методы обнаружения и определения клопидогреля

Данные литературы свидетельствуют о том, что существуют различные методы анализа клопидогреля в лекарственных формах. Они представлены хемометрическим, спектрофотометрическим, хроматографическими (тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВТСХ), газожидкостная хроматография (ГЖХ)), масс-спектрометрическими и вольтамметрическими методами.

1.4.1. Методы анализа клопидогрела: обзор фармакопейных и исследовательских подходов

Современные фармакопеи (ГФ РФ XV, EP 10.0, BP 2023, IP 2022, USP 43-NF 38) предлагают следующие стандартизированные методы анализа клопидогрела: инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) (применяется в ГФ РФ [16], BP и IP для анализа субстанции, не подходит для токсикологических исследований из-за метаболических превращений в организме) и ВЭЖХ с хиральной колонкой (колонка: силикагель, модифицированный овомукоидом, подвижная фаза: ацетонитрил/буферный раствор (изократический режим), детекция: УФ (220-240 нм). Требуется дорогостоящее оборудование, но может быть адаптирован для токсикологических исследований [69].

На сегодняшний день наиболее распространенным является обращенно-фазная ВЭЖХ (табл.1).

Таблица 1. Обращенно-фазная ВЭЖХ (наиболее распространенный метод)

Авторы	Колонка	Подвижная фаза	λ детекции (нм)	Время удерживания (мин)
Sahoo et al. [140]	C18 (150×4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонитрил/фосфатный буфер (pH 2.8)	225	7.48
Housheh et al. [115]	C18 (250×4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонитрил/фосфатный буфер (pH 3.0)	247	8.13
Maunika [111]	C18 (250×4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонитрил/фосфатный буфер (pH 3.0)	224	5.13
Bhagat et al. [58]	Hypersil BDS C18	Ацетонитрил/формиатный буфер (pH 3.0)	210	3.847

Основной неактивный метаболит клопидогрела - клопидогрель-карбоновую кислоту - можно анализировать с помощью следующих хроматографических систем: метод Сеткиной С.Б. и соавт. [30] (используется хиральная колонка UltronES-OVM, подвижная фаза: смесь ацетонитрила с фосфатным буфером, УФ-детектирование при 220 нм, время удерживания метаболита: 2.84 мин). Также предложена альтернативная методика (Pawaskar P.S. и Alarfaz N.A. [32,113]): колонка Zorbax SB C8, градиентное элюирование фосфатным буфером и

ацетонитрилом, детекция при 220 нм, время удерживания 11.0 мин для метаболита и 22.0 мин для клопидогрела бесилата.

Для одновременного определения клопидогрела в комбинированных препаратах (клопидогрел -ацетилсалициловая кислота) авторы Чатрабхуджи П.М. и соавт. [46] и Shrivastava P.K. [132] рекомендуют метод ВЭЖХ с такими хроматографическими условиями: колонка: Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил-фосфатный буфер (рН 3.0) в соотношении 45:55 (v/v), скорость потока: 1.0 мл/мин, детекция: УФ при 226 нм; параметры: время удерживания: аспирин - 6.3 мин, клопидогрел - 8.4 мин, линейный диапазон: 25-150 мкг/мл для обоих компонентов. Автором Gousuddin M.D. [77] для определения клопидогрела с ацетилсалициловой кислотой в комбинированном препарате рекомендуются хроматографические условия: колонка: Phenomenex C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), градиентный режим: 3% о-фосфорная кислота (А) и ацетонитрил (В), программа градиента: 0-5 мин 20% В, 5-15 мин 20→80% В, детекция: УФ при 266 нм; параметры: время удерживания: аспирин - 7.8 мин, клопидогрел - 9.2 мин, предел обнаружения: 0.1 мкг/мл для обоих компонентов.

Авторы Niharika K. и соавт. [104] для совместного определения клопидогрела и аторвастатина методом ВЭЖХ предлагают такие хроматографические условия: колонка: X-BRIDGE C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм), подвижная фаза - 0.1% трифторуксусная кислота (А) и ацетонитрил (В), градиент: 0-8 мин 50→80% В, температура колонки: 40°C; параметры: время удерживания: аторвастатин - 10.5 мин, клопидогрел - 5.1 мин.

Для совместного определения клопидогрела в розувастатина Sheth A. и Patel K.N. [126] методом ВЭЖХ предложены хроматографические условия: Колонка: Novapak C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), подвижная фаза: 0.02 М перхлорат натрия:ацетонитрил (60:40, v/v), детекция: УФ при 242 нм; параметры: время удерживания: розувастатин - 4.4 мин, клопидогрел - 7.6 мин, линейность: $r^2 > 0.999$ в диапазоне 5-50 мкг/мл.

Для анализа многокомпонентного препарата, содержащий клопидогрел, аспирин и аторвастатин методом ВЭЖХ авторы Devika G.S. и соавт. [58]

используют хроматографические условия: колонка: RP C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), подвижная фаза: фосфатный буфер (pH 3.0):ацетонитрил (55:45, v/v), детекция: УФ при 249 нм; Параметры: время удерживания: аспирин - 2.367 мин, аторвастатин - 5.463 мин, клопидогрел - 4.658 мин, уравнение калибровки для клопидогрела: $y = 2403x + 412.3$ ($r^2 = 0.9998$), предел количественного определения: 0.5 мкг/мл.

1.4.2. Методы обнаружения и определения клопидогрела и его неактивного метаболита в биологических объектах

Современные исследования подтверждают значительный научный и практический интерес к антиагрегантному препарату клопидогрелу как со стороны клиницистов, так и токсикологов [38]. В ходе анализа литературных данных были выявлены различные хроматографические подходы к определению данного соединения и его основного метаболита – клопидогрель-карбоновой кислоты.

Valentina Anuta и соавторы разработали методику с использованием хемометрических расчетов на колонке Hypersil Gold (150 × 4 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования (ацетонитрил/0.1% трифторуксусная кислота/фосфатный буфер) [38]. При объеме ввода 10 мкл и детектировании при 210 нм время удерживания составляло 2.62 мин для метаболита и 5.79 мин для нативного соединения.

Рувинов Ю.В. и Красных Л.М. предложили метод анализа плазмы крови на колонке Zorbax SB C18 (50 × 4.6 мм, 1.8 мкм) при 40°C [28]. Подвижная фаза (ацетонитрил/0.1% муравьиная кислота, 15:85) подавалась со скоростью 0.3 мл/мин при объеме инъекции 30 мкл.

Nitesh K. Patel с коллегами разработали высокочувствительный метод тандемной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией [112]. Использование колонки Zorbax SB C-18 (75 × 4.6 мм, 3.5 мкм) и подвижной фазы (0.1% муравьиная кислота/10 mM аммония формиат: ацетонитрил, 10:90)

позволило достичь времени удерживания 2.60 и 4.10 мин для метаболита и клопидогрела соответственно.

Wenyi Hua и соавторы применили градиентный метод на колонке XBridge™ ВЕН С18 (100 × 2.1 мм, 2.5 мкм) с масс-спектрометрическим детектированием [80], что расширило возможности изучения метаболизма препарата.

Octavian Croitoru с коллегами предложили градиентный метод для одновременного определения клопидогрела, его метаболита и аторвастатина в сыворотке крови [55]. Использование колонки BDS Hypersil C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) и УФ-детектирования при 220 нм обеспечило хорошее разделение компонентов за 20 мин.

Заключение по главе 1

Клопидогрел занимает важное место в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, включая: профилактику ишемической болезни сердца, реабилитацию после коронарного стентирования, лечение поражений сосудов нижних конечностей, терапию осложнений COVID-19, связанных с сердечно-сосудистой системой

Несмотря на наличие фармакопейных и фармакокинетических методик, отмечается: отсутствие комплексных химико-токсикологических исследований при отравлениях, недостаточная адаптация методов для судебно-медицинской экспертизы, ограниченные данные по посмертной токсикокинетике.

Текущие аналитические подходы имеют существенные недостатки для токсикологического применения: чувствительность - недостаточна для следовых концентраций (требуемый уровень - нг/мл) [103, 153], специфичность - возможны интерференции с эндогенными веществами, пробоподготовка - неадаптирована для сложных биологических матриц, валидация - отсутствуют данные для разложившихся образцов [103].

Поэтому, необходимо создание унифицированного подхода, который: учитывает физико-химические свойства клопидогрела и его метаболитов,

использует современные методы пробоподготовки (твердофазная экстракция, микроэкстракция), применяет высокочувствительные детекционные системы, обеспечивает воспроизводимость в различных биологических матрицах.

Таким образом, актуальность разработки комплексных химико-токсикологических методов анализа клопидогрела обусловлена как его широким клиническим применением, так и существующими пробелами в аналитическом обеспечении токсикологических исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы исследований

2.1.1. Реагенты и реактивы

Для исследования использовали фармакопейную субстанцию клопидогрель бисульфат (далее по тексту клопидогрел) субстанция-порошок, производитель НАО «Северная звезда», Россия, который соответствует Европейской фармакопее и ФС.2.1.0111 Государственной Фармакопее XV с содержанием действующего вещества 99,31% (серия LM2504208).

Клопидогрель карбоновая кислота (примесь А) - субстанция-порошок, производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия, который соответствует НТД 1907/2006 (серия Y0001335).

Субстанции лекарственных препаратов, которые использовали как референтные вещества для тонкослойной хроматографии (ацетилсалициловая кислота (ФС.2.1.0006)(содержание основного действующего вещества не менее 99%, производства SIGMA), фенобарбитал (ФС.2.1.0041) (содержание основного действующего вещества не менее 98,6%, производства SIGMA), нифедипин (ФС.2.1.0029.15), (содержание основного действующего вещества не менее 98%, производства SIGMA) эналаприл малеат (ФС.2.1.0045.15), (содержание основного действующего вещества не менее 98,9%, производства SIGMA) отвечали требованиям качества согласно требованиям ГФ РФ.

Приготовление стандартных растворов клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты для проведения ТСХ

Готовили раствор стандартного образца клопидогрела следующим образом:

Около 50,0 мг клопидогрела (точная навеска) вносили в делительную воронку, растворяли в 10 мл воды очищенной, подщелачивали 10% раствором натрия гидроксида до рН = 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

вместимостью 50,0 мл, доводили объем хлороформом до метки (*стандартный хлороформный раствор*, концентрация 1 мкг/мкл).

Готовили раствор стандартного образца клопидогрель карбоновой кислоты следующим образом:

Около 50,0 мг клопидогрель карбоновой кислоты (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в метаноле и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (*стандартный метанольный раствор*, концентрация 1 мкг/мкл).

Приготовление раствора стандартного образца для идентификации клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом УФ-СФМ

Около 100,0 мг вещества (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (*стандартный раствор 1*, концентрация 1000 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл полученного раствора 1 и доводили объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки (*стандартный раствор 2*, концентрация 100 мкг/мл).

Приготовление раствора СО для определения удельного показателя поглощения и построения калибровочного графика для расчета клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ

Около 100,0 мг вещества (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (*стандартный раствор 1*, концентрация 1000 мкг/мл). В мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносили 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 и 20,0 мл полученного раствора и доводили объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки (растворы 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно; концентрация 20, 50, 100, 150 и 200 мкг/мл соответственно).

Приготовление растворов СО клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты при анализе методом ВЭЖХ

Около 100,0 мг вещества (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора водой очищенной до метки (*стандартный раствор 1*, концентрация 1000 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного раствора 1 и доводили объем раствора водой очищенной до метки (*стандартный раствор 2*, концентрация 500 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 1000,0 мл вносили 500,00 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной и доводим объем раствора водой очищенной до метки (*растворитель*).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 20,00 мл стандартного раствора 2 и доводили объем раствора до метки приготовленным растворителем (*раствор 3*, концентрация 100 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл раствора 3 и доводили объем раствора до метки приготовленным растворителем (*раствор 4*, концентрация 10 мкг/мл).

В две мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносили по 10,00 и 5,00 мл раствора 4 соответственно и доводили объемы растворов до метки приготовленным растворителем (*растворы 5 и 6* соответственно; концентрация 1 и 0,5 мкг/мл).

Приготовление растворов СО клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты для построения калибровочного графика методом ВЭЖХ

Около 100,0 мг вещества (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводим объем раствора водой очищенной до метки (*стандартный раствор 1*, концентрация 1000 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного раствора 1 и доводили объем раствора водой очищенной до метки (*стандартный раствор 2*,

концентрация 500 мкг/мл).

В мерные колбы вместимостью 50,0 мл вносили по 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,00 и 40,00 мл стандартного раствора 2 и доводили до метки водой очищенной (растворы 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответственно, концентрация 1, 10, 50, 100, 200 и 400 мкг/мл соответственно).

Приготовление модельной пробы печени

К 10 г измельченной трупной печени (размер частиц не должен превышать 1 мм) добавляли раствор клопидогрела или клопидогрель карбоновой кислоты в концентрации суточной терапевтической дозе (75 мг и 300 мг), токсической дозе (1000 мг) соответственно, тщательным образом перемешивали и оставляли на сутки.

Приготовление модельных проб мочи

К 10 мл мочи добавляли 75, 300 и 1000 мг клопидогрела либо клопидогрель карбоновой кислоты. Смеси оставляли на сутки. Параллельно проводили контрольные опыты с биологической жидкостью.

Приготовление модельных проб крови

К 10 мл крови добавляли 1 мл раствора клопидогрела либо клопидогрель карбоновой кислоты, который содержал 75, 150 и 300 мкг клопидогрела или клопидогрель карбоновой кислоты. Смеси оставляли на сутки. Параллельно проводили контрольные опыты с биологической жидкостью.

Для проведения испытания использовали органические растворители:

1. ацетон (хч);(ТУ 6-09-3513-86);
2. ацетонитрил (хч); (ТУ 6-09-8534-87);
3. вода очищенная (ГФ XV);
4. Диэтиловый эфир (хч);(ОСТ 82-2006-88)
5. изопропанол (хч);ТУ 6-09-402-87
6. хлороформ (чда); (ГОСТ 20015–74);
7. этанол (хч); (ГОСТ 5962–67);

Реактивы:

1. кислота трихлоруксусная (хч); (ТУ 6-09-1926-77);
2. кислота уксусная (чда);(ГОСТ 12.1.007—76)
3. кислота хлористоводородная (чда);(ГОСТ 3118–77);
4. Натрий едкий водный раствор 50% (хч);(ГОСТ Р 55064-2012)
5. натрия сульфат (хч);(ГОСТ 4166-76)
6. *Реактив Драгендорфа* (I раствор – 1,7 г основного нитрата висмута растворяют в 100 г 20% кислоты уксусной; II раствор – 40 г калия йодида растворяют в 100 г воды очищенной; перед проведением детекции смешивают 20 мл I раствора, 5 мл II раствора и 40 мл воды очищенной);
7. *Реактив FPN* (5 мл 5% раствора хлорида железа (III), 45 мл 20% раствора хлороводородной кислоты, 50 мл 50% раствора азотной кислоты.).

Изучение влияния степени извлечения в зависимости от рКа мы проводили с помощью программы, расположенной на сайте <http://www.chemicalize.org> [67].

2.1.2. Приборы и материалы

1. Микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» с УФ-детектором производства ЗАО «ЭкоНова» (Россия).
2. Спектрофотометр СФ-46 (Россия).
3. Иономер ЭВ-74 (Белоруссия):
4. Фотоэлектродетектор КФК-2 (Россия);
5. Весы аналитические AXIS ANG200 (Польша).
6. Перемешивающее устройство LS-110 (Россия).
7. Центрифуга ОПн-3.04 5000 об/мин (Россия).
8. рН-метр 5123 (Elvro, Вроцлав, Польша).
9. Ультрафиолетовая лампа TLC со светофильтрами 254/365 нм (Россия).
10. Баня водяная LW-4 (Bytom, Польша).
11. Дозатор переменного объема Eppendorf Research ® plus 100-1000 мкл и 10-100 мкл.

12. Камеры хроматографические диаметр 15 см, высота 20 см.

13. *Хроматографические пластины:*

13.1. пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии производства Эстонии (сорбент КСКГ, фракция - $5 \div 20$ мкм, толщина слоя 130 ± 25 мкм, размер пластин-10 x 10 см);

13.2. пластины» Sorbfil " ПТСХ-ПВ с УФ-индикатором (силикагель СТХ-1ВЕ, тип подложки - ПЭТФ, связующее вещество-силиказоль, фракция - $8 \div 12$ мкм, толщина слоя-100 мкм, размер пластин-10 x 10 см);

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

14. Колбы конические вместимостью 250 мл.

15. Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 мл.

16. Цилиндры мерные градуированные на 10, 50 и 100 мл.

17. Чашки выпарительные вместимостью 50 мл.

18. Пипетки градуированные класс А (Simax, Чехия).

19. Капилляры стеклянные, калиброванные с помощью микропипетки (0,05 мл).

2.2. Методики исследований

Обнаружение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты с помощью ТСХ

На линию старта на расстоянии 2 см от края пластины наносили по 10 мкл 0,1% хлороформного раствора клопидогрела и 0,1% метанольного раствора клопидогрель карбоновой кислоты. После достижения системами растворителей линии финиша (8 см) пластины вынимали из камеры, высушивали при комнатной температуре и проявляли соответствующими реактивами.

Для детектирования пятен использовали УФ - свет при длине волны 254 нм, с последующей обработкой реактивом Драгендорфа. Значения величин R_f явились средним результатом трех параллельных определений.

*Методика исследования клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты
методом УФ-СФМ*

УФ-спектры светопоглощения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты измеряли на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 230-330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 0,1 М раствор хлороводородной кислоты.

Для расчета удельного коэффициента светопоглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) использовали формулу 1:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{D}{l \cdot c} \quad (1)$$

где D-оптическая плотность исследуемого раствора;

c-концентрация исследуемого раствора, %;

l- длина рабочего слоя, см.

*Методика обнаружения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты
методом ВЭЖХ*

Условия хроматографирования:

- колонка размером 2x75 мм с обращенной фазой C18 (ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH», Германия);
- подвижная фаза: элюент А – 0,2 М раствор литий перхлората в 0,005 М растворе кислоты хлористоводородной (5:95); элюент Б – ацетонитрил;
- скорость подачи подвижной фазы – 100 мкл/мин;
- температура термостата колонки – 40° С;
- объем вводимой пробы – 2 мкл. Детектирование проводили при 280 нм.

Обработку хроматограмм и расчет S_{λ} / S_{210} проводили с использованием компьютерной программы "МультиХром-СПЕКТР", версия 2.4 (ЗАО «Амперсенд»).

Расчет степени извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала

Для расчета степени извлечения клопидогрела и его основного метаболита из водных растворов и из биологических жидкостей (R,%) использовали формулу:

$$R, \% = \frac{C_{\text{н}}}{C_{\text{в}}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где $C_{\text{н}}$ – найденная концентрация клопидогрела либо клопидогрель карбоновой кислоты в извлечении, мг/мл;

$C_{\text{в}}$ – внесенная концентрация вещества в биологическую жидкость (водный раствор), мг/мл.

Методы изолирования из биологического материала

Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала проводили следующими модифицированными методами: А.А. Васильевой [12, 19], В.Ф. Крамаренко [19], Стаса-Отто [19], метод П. Валова (для клопидогрель карбоновой кислоты) [13], В.И. Поповой [19].

Модификация данных методик заключалась в уменьшении навески биологического материала до 10 г. Экстракцию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из полученных вытяжек проводили хлороформом, а процессы процеживания через марлю и фильтрования были заменены на центрифугирование. В методе изолирования Стасса-Отто этиловый спирт был заменен на метиловый.

Для статической обработки мы использовали компьютерную программу «ChemMetr 1.0» [29] и «Statistica 6.0».

Значение предела количественного определения (ПКО) рассчитывали на основе параметров калибровочной прямой согласно уравнению:

$$\text{ПКО} = \frac{10 S_a}{b}, \quad (3)$$

где S – стандартное отклонение величины светопоглощения «холостого» элюата;

b -коэффициент инструментальной чувствительности метода анализа, который равен тангенсу угла наклона прямолинейного участка калибровочной прямой общего вида $y = bx + a$.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА И ЕГО НЕАКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА КЛОПИДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

В соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 25 сентября 2023 года №491н «Об утверждении порядка проведения судебно-медицинской экспертизы», проведение судебно-химического и химико-токсикологического анализа требует обязательного применения как минимум двух независимых методов, базирующихся на различных физико-химических принципах. Учитывая, что предварительный этап химико-токсикологического исследования традиционно включает скрининговый анализ, наиболее часто осуществляемый методом тонкослойной хроматографии [50-52], для комплексного изучения клопидогрела нами была обоснована целесообразность сочетания ТСХ-скрининга с модифицированным методом ВЭЖХ по Бараму. Такой подход позволяет не только выполнить нормативные требования, но и обеспечить необходимую достоверность результатов на всех этапах исследования - от первичного выявления вещества до его точного количественного определения. Особое значение разрабатываемая методика приобретает в условиях ограниченных ресурсов лабораторий, поскольку сочетает доступность тонкослойной хроматографии как экспресс-метода первичного скрининга с точностью и воспроизводимостью ВЭЖХ-анализа, адаптированного для работы со сложными биологическими матрицами. При этом модификация метода Барама направлена на преодоление ключевых ограничений существующих ВЭЖХ-подходов, включая недостаточную чувствительность для токсикологических исследований, сложности пробоподготовки биологических образцов и отсутствие валидации для случаев летальных исходов, что в совокупности обеспечивает выполнение как научных, так и нормативно-правовых требований к проведению комплексных химико-токсикологических исследований.

При разработке методики химико-токсикологического исследования клопидогрела был выбран поэтапный подход, предполагающий первоначальную

отработку методов на модельных растворах с последующим переносом на биологические матрицы. Это обусловлено рядом принципиальных соображений. Во-первых, работа с модельными растворами позволяет в контролируемых условиях оптимизировать ключевые параметры анализа - состав подвижной фазы, условия хроматографического разделения, параметры детектирования - без влияния мешающих факторов, характерных для сложных биологических сред. На этом этапе устанавливаются фундаментальные физико-химические характеристики аналитов, такие как оптимальные длины волн поглощения, коэффициенты распределения, время удерживания и другие параметры, критически важные для последующей работы с реальными образцами.

Во-вторых, использование модельных систем дает возможность оценить предел обнаружения, линейный диапазон и воспроизводимость методики в "идеальных" условиях, что служит необходимой основой для интерпретации результатов, получаемых при анализе биологических образцов. Особое значение это приобретает при разработке ТСХ-метода, где визуальная оценка хроматограмм требует предварительного установления четких критериев идентификации веществ. Только после тщательной отработки всех параметров на модельных растворах методика может быть адаптирована к работе с биологическими матрицами, где присутствие белков, липидов и других эндогенных соединений существенно осложняет процесс анализа.

При переносе методики на биологические образцы особое внимание уделяется этапу пробоподготовки, включающему депротеинизацию, экстракцию и очистку аналитов от мешающих компонентов матрицы. Именно на этом этапе выявляются и устраняются проблемы, связанные с возможной деградацией аналитов, неспецифическим связыванием с компонентами биологической среды и другими факторами, которые невозможно было учесть при работе с модельными растворами. Такой последовательный подход - от простых систем к сложным - является общепринятой практикой в аналитической химии и обеспечивает надежную валидацию разрабатываемых методов, их воспроизводимость и

точность применительно к реальным условиям химико-токсикологического анализа.

Учитывая, что в процессе биотрансформации клопидогрел преимущественно превращается в клопидогрель-карбоновую кислоту, причем концентрация данного метаболита в биологических жидкостях существенно превышает содержание исходного соединения, мы обоснованно рассматриваем клопидогрель-карбоновую кислоту в качестве ключевого маркера, свидетельствующего как о терапевтическом применении, так и о возможной интоксикации клопидогрелом. Такая позиция подтверждается фармакокинетическими особенностями препарата: после перорального приема около 85-90% дозы подвергается гидролизу с образованием именно этого метаболита, в то время как лишь незначительная часть (менее 2%) превращается в активное тиоловое производное. Более того, клопидогрель-карбоновая кислота демонстрирует значительно большую стабильность в биологических образцах по сравнению с лабильным активным метаболитом, что делает ее идеальным аналитическим маркером, особенно при ретроспективной диагностике случаев отравления. Это особенно актуально для судебно-химической экспертизы, где требуется надежный и стабильный индикатор факта приема препарата, сохраняющийся в биологическом материале в течение длительного времени после экспозиции.

3.1. Разработка методик анализа клопидогрела и клопидогрель-карбоновой кислоты методом ТСХ

Существующие литературные данные содержат ограниченную информацию о методиках тонкослойной хроматографической детекции клопидогрела как в виде индивидуального вещества, так и в комбинации с его основным метаболитом - клопидогрель-карбоновой кислотой [146]. В связи с этим в рамках настоящего исследования была поставлена задача комплексного изучения хроматографического поведения данных соединений при использовании трех

различных типов хроматографических пластин в системах растворителей с различной полярностью. Это позволило определить оптимальные условия для их надежного разделения и идентификации методом ТСХ.

Особое внимание было уделено разработке методических подходов к обнаружению клопидогрела и его метаболита в присутствии фармакологически значимых комбинаций с такими препаратами, как ацетилсалициловая кислота, эналаприл, нифедипин и фенobarбитал. Выбор указанных лекарственных средств для сравнительного анализа обусловлен их частым совместным назначением с клопидогрелом в рамках современных протоколов терапии сердечно-сосудистых заболеваний [27, 43], что определяет актуальность разработки надежных методов их одновременного определения в биологических образцах.

В ходе исследования хроматографической подвижности клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрел-карбоновой кислоты) совместно с сердечно-сосудистыми препаратами были изучены различные системы растворителей. В первую очередь анализировались подвижные фазы, рекомендованные Комитетом по систематическому токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов (TIAFT) для общего ТСХ-скрининга лекарственных веществ (системы 1-5) [95]. Параллельно исследовались растворители, широко применяемые в отечественной практике химико-токсикологического анализа (системы 6-9) [62].

Для оптимизации условий разделения клопидогрела и его метаболита дополнительно были протестированы специально подобранные системы растворителей (системы 10-26). Для детекции анализируемых веществ применяли последовательное использование методов визуализации: первоначальное выявление осуществляли в УФ-свете (254/365 нм) с последующей обработкой хроматографических пластин реактивом Драгендорфа, что позволило повысить чувствительность и селективность идентификации целевых соединений. Такой комплексный подход к выбору подвижной фазы позволил обеспечить надежное разделение и идентификацию как исходного вещества, так и его основного метаболита в присутствии других кардиотропных препаратов. Методика

исследований представлена в разделе 2.2. Значение Rf исследуемых веществ приведены в табл. 1-3.

Проведенное исследование позволило выявить оптимальные условия для ТСХ анализа клопидогрела и его метаболитов. Согласно данным таблицы 1, среди подвижных фаз, рекомендованных ТИАФТ, наилучшее разделение клопидогрела, клопидогрель-карбоновой кислоты и сопутствующих сердечно-сосудистых препаратов (ацетилсалициловой кислоты, эналаприла, нифедипина, фенобарбитала) достигается при использовании системы хлороформ:ацетон (80:20) на пластинах Sorbfil ПТСХ-ПВ [7,9].

Анализ подвижных фаз, традиционно применяемых в отечественной токсикологической практике (таблица 2), показал, что хотя они и обеспечивают удовлетворительную подвижность клопидогрела и его метаболита, но не позволяют достоверно идентифицировать эти соединения в смеси с другими лекарственными веществами из-за незначительного различия значений Rf ($\pm 0,01-0,04$) [7,9].

Наиболее эффективной частной системой растворителей (таблица 3) оказалась смесь этанол-уксусная кислота-вода (5:3:2), демонстрирующая стабильные результаты на всех типах хроматографических пластин. При этом значения Rf находились в оптимальном для практического анализа диапазоне 0,2-0,8 [15].

Для детекции разработаны высокочувствительные методы визуализации:

1. УФ-детекция: клопидогрел: зеленовато-желтая флуоресценция, клопидогрель-карбоновая кислота: зеленая флуоресценция (предел обнаружения 0,1 мкг в пробе).
2. Обработка реактивом Драгендорфа: оба соединения дают оранжевое окрашивание (предел обнаружения 0,1 мкг в пробе).
3. Дифференциальная детекция: реактив FPN: только метаболит окрашивается в фиолетовый цвет, гидроксамовая проба: только клопидогрел дает фиолетовое окрашивание (предел обнаружения 0,1 мкг в пробе для обоих методов).

Таблица 1. Значения R_f клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в системах растворителей, рекомендованных ТИАФТ (n = 3, P=0,95)

№ п/п	Система растворителей	Название пластин	клопидогрел	клопидогрель карбоновая кислота	Ацетилсалициловая кислота	Фенобарбитал	Эналаприл	Нифедипин
1	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
2	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
3	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
4	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
5	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

Таблица 2. Значения величин Rf (n=3; P=0,95) клопидогрела и его неактивного метаболита в подвижных фазах, которые используются в отечественной практике химико-токсикологических исследований

№ системы	Система растворителей	Тонкие слои	Клопидогрел	Клопидогрель карбоновая кислота	Ацетилсалициловая кислота	Фенобарбитал	Эналаприл	Нифедипин
6	хлороформ – диоксан – ацетон – 25 % раствор аммиака (47,5:45:5:2,5)	Sorbfil	0,95±0,02	0,78±0,02	0,05±0,01	0,52±0,02	0,86±0,03	0,90±0,03
		BETCX	0,91±0,02	0,75±0,02	0,08±0,01	0,58±0,02	0,70±0,02	0,85±0,02
		Alugram	0,88±0,02	0,70±0,02	0,00	0,60±0,02	0,75±0,02	0,86±0,03
7	толуол – ацетон – этанол – 25 % раствор аммиака (45:45:7,5:2,5)	Sorbfil	0,98±0,02	0,82±0,02	0,09±0,01	0,51±0,02	0,86±0,03	0,94±0,03
		BETCX	0,95±0,02	0,78±0,02	0,06±0,01	0,68±0,02	0,74±0,02	0,85±0,02
		Alugram	0,90±0,02	0,73±0,02	0,00	0,63±0,02	0,71±0,02	0,80±0,02
8	этилацетат – метанол – 25 % раствор аммиака (85:10:2,5)	Sorbfil	0,95±0,02	0,78±0,02	0,05±0,01	0,50±0,02	0,88±0,02	0,92±0,03
		BETCX	0,94±0,02	0,76±0,02	0,03±0,01	0,58±0,02	0,72±0,02	0,85±0,02
		Alugram	0,98±0,02	0,72±0,02	0,00	0,62±0,02	0,75±0,02	0,87±0,02
9	хлороформ – <i>n</i> -бутанол – 25 % раствор аммиака (70:40:5)	Sorbfil	0,95±0,02	0,79±0,02	0,03±0,01	0,61±0,02	0,86±0,03	0,90±0,02
		BETCX	0,92±0,02	0,75±0,02	0,09±0,01	0,58±0,02	0,78±0,02	0,89±0,02
		Alugram	0,89±0,02	0,72±0,02	0,00	0,63±0,02	0,75±0,02	0,86±0,02

Таблица 3. Значения R_f ($n=3$; $P=0,95$) для клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в частных системах растворителей

№ системы	Система растворителей	Значение R_f клопидогрела			Значение R_f клопидогрель карбоновой кислоты		
		Sorbfil	BETCX	Alugram	Sorbfil	BETCX	Alugram
10	этилацетат – метанол (90:10)	0,94±0,02	0,94±0,02	0,93±0,02	0,67±0,02	0,72±0,02	0,75±0,02
11	хлороформ – метанол (100:1,5)	0,97±0,02	0,99±0,02	0,99±0,02	0,81±0,02	0,78±0,02	0,76±0,02
12	бензол – диоксан – 25% раствор аммиака(12:7:1)	0,78±0,02	0,92±0,02	0,93±0,02	0,67±0,02	0,70±0,02	0,69±0,02
13	<i>n</i> -бутанол – уксусная кислота концентрированная – вода (1:1:1)	0,88±0,02	0,81±0,02	0,79±0,02	0,68±0,02	0,65±0,02	0,70±0,02
14	<i>n</i> -бутанол – уксусная кислота концентрированная – вода (4:1:5)	0,90±0,02	0,69±0,02	0,79±0,02	0,70±0,02	0,76±0,02	0,74±0,02
15	этанол – уксусная кислота концентрированная – вода (5:3:2)	0,88±0,02	0,85±0,02	0,86±0,02	0,67±0,02	0,70±0,02	0,68±0,02
16	гексан – хлороформ – триэтиламин (14:9:4)	0,99±0,02	0,96±0,02	0,88±0,02	0,72±0,02	0,75±0,02	0,70±0,02
17	бензол – этанол – триэтиламин (9:1:1)	0,96±0,02	0,93±0,02	0,97±0,02	0,72±0,02	0,71±0,02	0,75±0,02
18	гексан – толуен – триэтиламин (15:10:2)	0,77±0,02	0,96±0,02	0,51±0,02	0,62±0,02	0,70±0,02	0,73±0,02
19	гексан – триэтиламин (15:2)	0,99±0,02	0,75±0,02	0,99±0,02	0,79±0,02	0,75±0,02	0,70±0,02
20	гексан – хлороформ –	0,29±0,02	0,20±0,01	0,28±0,02	0,23±0,01	0,26±0,02	0,21±0,01

	25% раствор аммиака (14:9:4)						
21	изопентанол – изобутанол (8:2)	0,97±0,02	0,85±0,02	0,80±0,02	0,81±0,02	0,75±0,02	0,69±0,02
22	изопентанол – изобутанол (5:5)	0,81±0,02	0,95±0,02	0,88±0,02	0,64±0,02	0,65±0,02	0,60±0,02
23	изопентанол – изобутанол (2:8)	0,53±0,02	0,91±0,02	0,71±0,02	0,52±0,02	0,77±0,02	0,75±0,02
24	ацетонитрил – метанол (6:4)	0,97±0,02	0,96±0,02	0,86±0,02	0,76±0,02	0,81±0,02	0,79±0,02
25	гексан – ацетон – 25% раствор аммиака (20:20:1)	0,94±0,02	0,96±0,02	0,96±0,02	0,78±0,02	0,74±0,02	0,74±0,02
26	гексан – этилацетат – метанол – 25% раствор аммиака (30:30:5:1)	0,94±0,02	0,94±0,02	0,85±0,02	0,76±0,02	0,75±0,02	0,79±0,02

Разработанная методика ТСХ обладает рядом существенных преимуществ: простота исполнения, доступность оборудования, высокая чувствительность, возможность дифференциальной диагностики, применимость как для целенаправленного, так и для скринингового анализа

Эти характеристики делают метод особенно ценным для: экспертных исследований случаев отравления, экстренной токсикологической диагностики, лабораторий с ограниченными ресурсами, первичного скрининга в комплексных химико-токсикологических исследованиях

Таким образом, предложенная методика представляет собой эффективный инструмент для решения широкого круга задач в практике судебно-химической экспертизы и токсикологического анализа.

3.2. Идентификация и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Изучение литературных данных выявило недостатки существующих методик ВЭЖХ-анализа клопидогрела и его метаболита. Использование изократического режима элюирования может приводить к неполному разделению компонентов и снижению эффективности разделения сложных лекарственных смесей. Кроме того, применение нелинейного градиента усложняет процесс хроматографии. Ограничения в идентификации веществ, связанные с детектированием при одной длине волны (отсутствие спектральной информации), также снижают надежность результатов. Таким образом, существующие методики имеют ограничения для анализа смеси клопидогрела и его метаболита как отдельно, так и с другими лекарственными препаратами.

Для количественного определения клопидогрела и его метаболита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии была разработана специальная методика, основанная на обращенно-фазовом варианте хроматографии. В качестве растворителя использовали смесь 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты и воды в соотношении 1:1 [10, 11].

Хроматографический анализ выполняли на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова") по унифицированной методике ВЭЖХ, разработанной Барамом Г.Ю. [10, 11]. Обращенно-фазовая хроматография была выбрана благодаря ее преимуществам: высокой скорости установления сорбционного равновесия, легкости и полноте десорбции компонентов из неполярного сорбента при использовании небольших объемов растворителя.

Исследования проводили на колонке размером 2×75 мм, заполненной неполярным сорбентом Prontosil 120-5 C18 AQ с размером частиц 5 мкм. Данный сорбент обладает высокой сорбционной способностью, химической инертностью к анализируемым веществам, а также отличается механической прочностью и термостойкостью.

Подвижная фаза состояла из двух компонентов: органического растворителя (ацетонитрила) и буферного раствора. Ацетонитрил предварительно фильтровали через мембранный фильтр МПА-МА-Н-2 (ТУ 6-05-1909-81) с размером пор 0,15-0,25 мкм и дегазировали под вакуумом. Буферный раствор содержал ионно-парный агент - 0,2 М раствор перхлората лития в 0,005 М растворе хлористоводородной кислоты. Перед использованием буферный раствор разбавляли в 25 раз и доводили рН до 3,0 добавлением 0,005 М раствора хлорной кислоты с контролем потенциометрическим методом.

Элюирование проводили в градиентном режиме, используя линейное изменение состава подвижной фазы от элюента А (5% ацетонитрила и 95% буферного раствора) до элюента В (100% ацетонитрила) в течение 40 минут. Такой подход обеспечивал постепенное уменьшение полярности элюента за счет увеличения содержания менее полярного ацетонитрила, что способствовало снижению удерживания компонентов на колонке. В результате все компоненты образца выходили из колонки в виде узких хроматографических пиков. На заключительной стадии градиента достигалось максимальное содержание ацетонитрила. После завершения анализа колонку регенерировали в течение 2 минут смесью растворителей (2% ацетонитрила и 98% буферного раствора).

Для поддержания стабильных условий хроматографии использовали твердотельный термостат колонки с электронагревателем, что обеспечивало высокую воспроизводимость результатов. Оптимальные параметры хроматографического разделения включали: давление насоса 2,8-3,2 МПа, скорость потока подвижной фазы 100 мкл/мин, температуру колонки 37-40°C. Объем вводимой пробы составлял 4 мкл.

Детектирование проводили с помощью двухлучевого многоволнового УФ-спектрофотометра, работающего в диапазоне длин волн 190-360 нм с точностью установки длины волны $\pm 0,5$ нм. Для многоканального детектирования рекомендовались следующие длины волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. На каждой длине волны на хроматограмме регистрировались пики с одинаковым временем удерживания, но различными амплитудами, пропорциональными коэффициенту поглощения вещества при данной длине волны.

Обработку и расчет результатов проводили с использованием компьютерной программы "Мультихром" (разработка "Амперсенд", Россия), входящей в стандартную комплектацию хроматографа. Данная программа позволяла автоматизировать процесс обработки хроматографических данных и повысить точность количественных определений.

3.2.1. Разработка условий идентификации клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Анализ клопидогрела и ККК проводили методом ВЭЖХ в условиях, подробно описанных в разделе 2.2 настоящего исследования. Стандартные растворы исследуемых соединений готовили согласно методикам пробоподготовки, представленным в разделе 2.1.

Идентификацию соединений осуществляли по двум ключевым параметрам: времени удерживания (t_R) и спектральным характеристикам, выраженным через отношение площадей хроматографических пиков ($R = S_\lambda/S_{210}$), где: S_λ - площадь

пика при длинах волн λ_2 - λ_7 , S_{210} - площадь пика при 210 нм (референсная длина волны).

Полученные хроматографические профили и спектральные характеристики представлены на рисунках 8 и 9. Количественные параметры удерживания для клопидогрела и ККК систематизированы в таблицах 8 и 9 соответственно [2,6]. Такой подход к идентификации обеспечил высокую достоверность получаемых результатов за счет сочетания временных и спектральных характеристик аналитов.

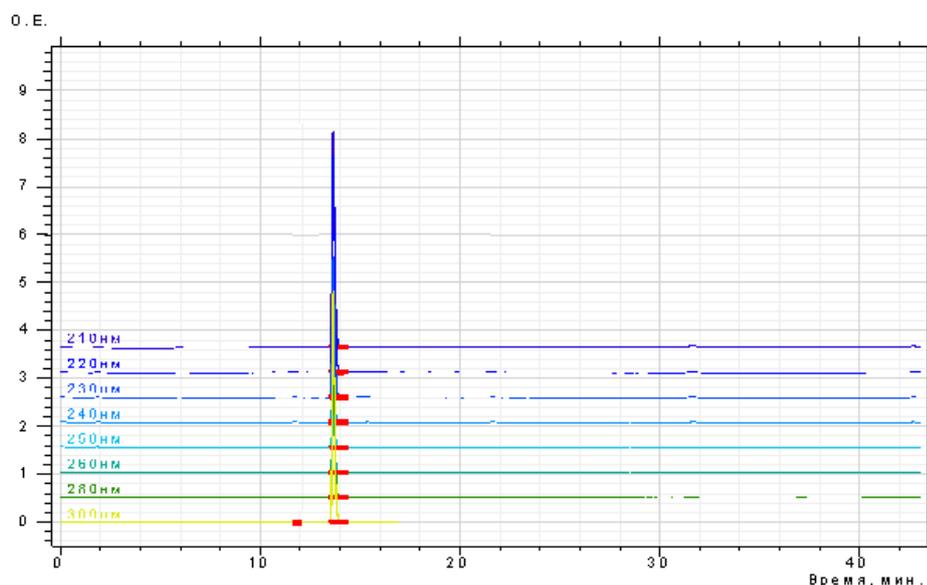


Рисунок 8. Хроматограмма клопидогрела (концентрация 10 мкг/мл)

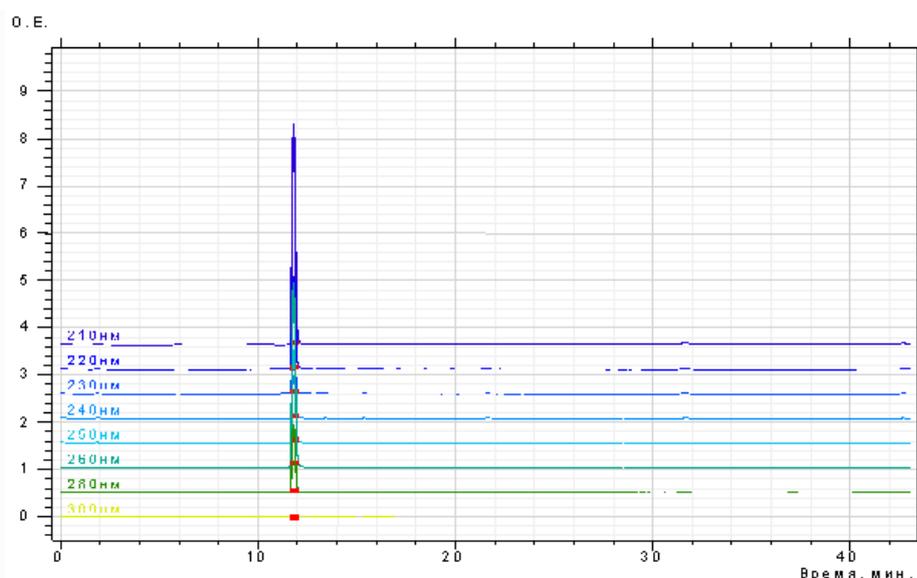


Рисунок 9. Хроматограмма клопидогрель карбоновой кислоты (концентрация 10 мкг/мл)

Таблица 8. Результаты определения основных хроматографических параметров клопидогрела при анализе методом ВЭЖХ

Параметр		Значение параметра	Метрологические характеристики (n=3, P =0,95)					
			\bar{x}	SD	RSD, ±%	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	$\varepsilon, \pm\%$
Время удерживания (t _R), мин.		13,741	13,738	0,048	0,35	0,2073	0,89	1,16
		13,784						
		13,689						
		1378,4						
		1368,9						
Спектральное соотношение (R = S _λ / S ₂₁₀)	210нм	1,0000	1,0000	0	0	0	0	0
		1,0000						
	210нм	1,0000	0,9741	0,009	0,93	0,2203	0,95	9,7
		0,9831						
	210нм	0,9742	0,6483	0,009	1,36	0,2073	0,9	1,37
		0,9649						
	210нм	0,6383	0,2203	0,004	1,79	0,1884	0,81	3,67
		0,6517						
	210нм	0,649	0,2044	0,005	2,54	0,2203	0,95	4,63
		0,2167						
	210нм	0,2196	0,2811	0,006	2,07	0,2074	0,89	3,17
		0,2245						
	210нм	0,2058	1,0787	0,003	0,28	0,1884	0,81	1,05
		0,1986						
	210нм	0,2087	0,6248	0,005	0,76	0,2203	0,95	1,51
		0,2801						
	210нм	0,2873	0,6231	0,6211	0,6301			
		0,2758						
	210нм	1,0756						
		1,0789						
	210нм	1,0817						
		0,6231						
	210нм	0,6211						
		0,6301						

Таблица 9. Результаты определения основных хроматографических параметров клопидогрель карбоновой кислоты при анализе методом ВЭЖХ

Параметр	Значение параметра	Метрологические характеристики (n=3, P =0,95)					
		\bar{x}	SD	RSD, ±%	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	$\varepsilon, \pm\%$
Время удерживания (t_R), мин.	11,851	11,849	0,017	0,14	0,2084	0,79	1,23
	11,831						
	11,865						
Спектральное соотношение ($R = S_{\lambda} / S_{210}$)	210нм	1,0000	0	0	0	0	0
	210нм						
	210нм						
	220нм	0,4088	0,013	3,28	0,0701	0,33	10,44
	210нм						
	210нм						
	230нм	0,1750	0,067	6,40	0,0675	0,29	1,66
	210нм						
	210нм						
	240нм	0,1849	0,004	4,54	0,1884	0,27	1,48
	210нм						
	210нм						
	250нм	0,3789	0,005	2,50	0,2203	0,95	4,63
	210нм						
	210нм						
	260нм	0,2962	0,006	1,98	0,2074	0,89	3,17
	210нм						
	210нм						
	280нм	0,7869	0,003	0,79	0,1884	0,81	1,05
	210нм						
	210нм						
	300нм	0,03543	0,005	1,38	0,2203	0,95	1,51
	210нм						
	210нм						

Таким образом, разработанная методика демонстрирует высокую эффективность разделения клопидогрела и его основного метаболита - клопидогрель-карбоновой кислоты, что наглядно представлено на хроматограмме (рис. 10). Полученные результаты свидетельствуют о четком разрешении пиков аналитов с хорошей базовой сепарацией, что подтверждает применимость предложенного метода для одновременного определения данных соединений в биологических образцах. Оптимальные параметры хроматографического

разделения обеспечивают надежную идентификацию и количественную оценку как исходного вещества, так и его метаболита без взаимных интерференций.

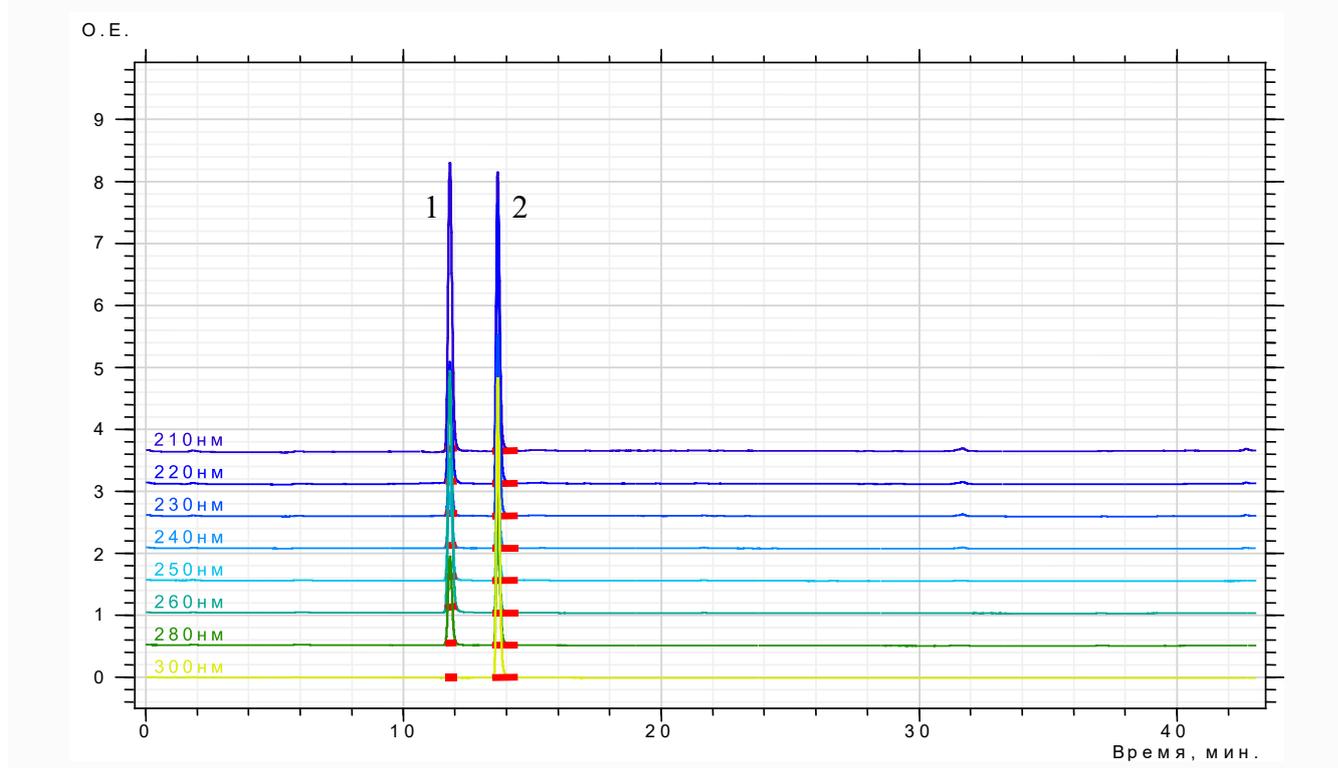


Рисунок 5. Хроматограмма смеси растворов клопидогрель карбоновой кислоты (1) и клопидогрела (2)

Проведенные исследования позволили установить основные хроматографические параметры клопидогрела и его метаболита - клопидогрель-карбоновой кислоты. Согласно данным, представленным в таблицах 8 и 9, время удерживания аналитов составило 13,74 минут для клопидогрела и 11,85 минут для его метаболита. Такое различие во времени удерживания обеспечивает надежное разделение пиков и подтверждает селективность разработанной методики.

Установленный предел количественного определения (ПКО) в 1 мкг/мл (2 нг в пробе) демонстрирует, что разработанная методика обеспечивает необходимую точность и воспроизводимость измерений в данном концентрационном диапазоне, что позволяет успешно решать поставленные аналитические задачи.

Особое внимание было уделено выбору оптимальных спектральных характеристик для количественного определения. Наибольшее спектральное

отношение площадей пиков при 280 нм к 210 нм ($R_{280/210}$) составило 1,0787 для клопидогрела и 0,7869 для ККК. Именно это соотношение было выбрано в качестве основного параметра для количественных расчетов, поскольку оно демонстрирует максимальную интенсивность сигнала при минимальном влиянии матричных эффектов.

Полученные результаты подтверждают, что разработанная методика обладает: Достаточной селективностью для разделения аналитов, Необходимой чувствительностью для их определения, надежными спектральными характеристиками для количественных измерений.

Эти параметры позволяют рекомендовать предложенную методику для использования в химико-токсикологических исследованиях, включая анализ биологических образцов.

3.2.2. Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ проводили при $\lambda = 280$ нм, что соответствовало области максимального светопоглощения клопидогрела и его метаболита в УФ - области спектра. Результаты приведены на рисунках 11, 12.

Разработанная методика демонстрирует линейную зависимость в диапазоне концентраций 1-400 мкг/мл для обоих аналитов - клопидогрела и ККК [2,6]. Линейность подтверждена статистической обработкой калибровочных данных с коэффициентом корреляции не менее 0,999.

Расчет ПКО выполнен по стандартному уравнению №3 [15] с использованием стандартного отклонения перехвата калибровочной прямой (S_a).

Установлены следующие значения:

- Для клопидогрела: 7,074 мкг/мл
- Для клопидогрель-карбоновой кислоты: 6,143 мкг/мл

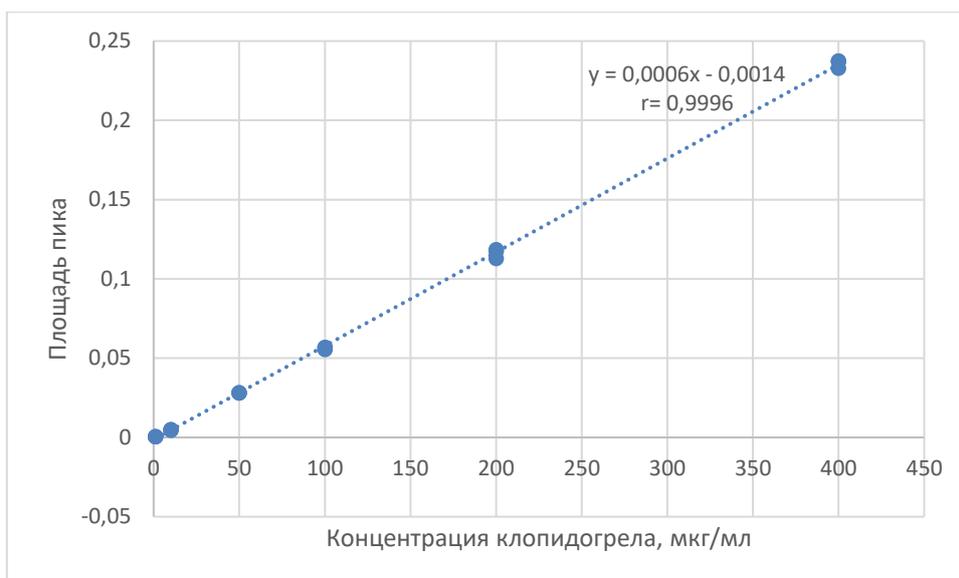


Рисунок 6. Калибровочный график количественного определения клопидогрела методом ВЭЖХ

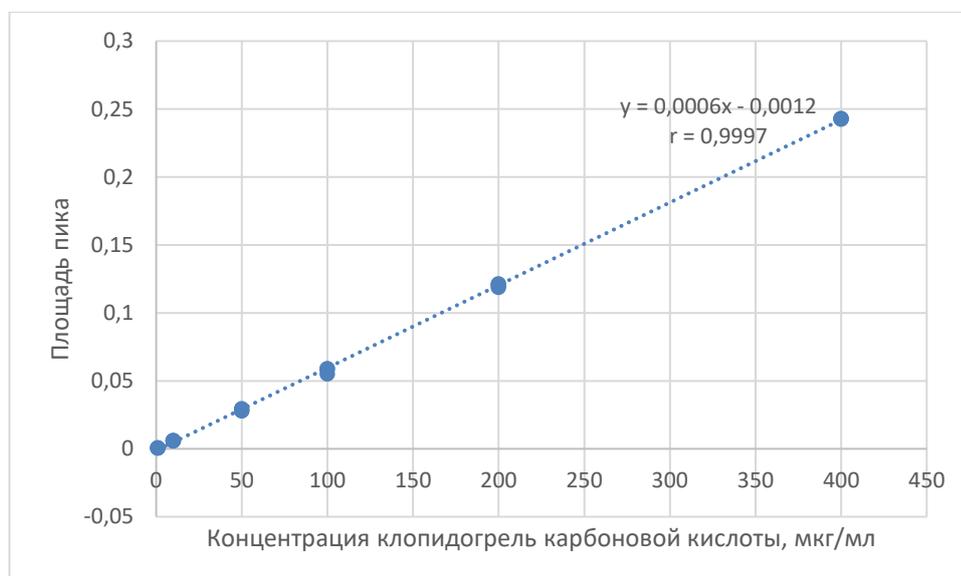


Рисунок 7. Калибровочный график количественного определения клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Оценка правильности метода: проведена на трех уровнях концентраций, охватывающих весь рабочий диапазон методики:

1. Нижний уровень: 10,0 мкг/мл (близкий к ПКО)
2. Средний уровень: 200,0 мкг/мл (середина калибровочного диапазона)
3. Верхний уровень: 400,0 мкг/мл (максимальная концентрация)

Результаты оценки правильности представлены в таблицах 10 и 11. Во всех случаях относительная погрешность определения не превышала 5%, что соответствует требованиям к аналитическим методикам для количественного определения лекарственных веществ в биологических матрицах. Полученные данные подтверждают, что разработанная методика обеспечивает точные и воспроизводимые результаты во всем рабочем диапазоне концентраций.

Таблица 10. Оценка правильности методики определения клопидогрела с помощью ВЭЖХ методики

Уровень	Внесено мкг/мл	Найдено клопидогрела		Метрологическая характеристика
		мкг/мл	R, %	
1	10,0	10,11	101,10	$\bar{X}=99,69$ $SD=2,93$ $RSD= \pm 2,94\%$ $\Delta \bar{X}=1,31$ $\epsilon= \pm 1,31 \%$ $t_{\text{выч}}= 1,83$
		9,98	99,80	
		10,01	100,10	
2	200,0	194,6	97,30	
		200,1	100,05	
		200,4	100,20	
3	400,0	400,1	100,02	
		398,4	99,60	
		396,2	99,05	

Таблица 11. Оценка правильности методики определения клопидогрель карбоновой кислоты с помощью ВЭЖХ методики

Уровень	Внесено мкг/мл	Найдено клопидогрела		Метрологическая характеристика
		мкг/мл	R, %	
1	10,0	10,35	103,50	$\bar{X} =100,67$ $SD=2,43$
		10,42	104,20	

		9,58	95,80	RSD= ± 2,41% $\Delta \bar{X} = 4,53$ $\varepsilon = \pm 4,5 \%$ $t_{\text{выч}} = 1,86$
2	200,0	203,56	101,73	
		201,66	100,83	
		199,98	99,99	
3	400,0	401,27	100,32	
		400,03	100,01	
		398,64	99,66	

Проведенный статистический анализ экспериментальных данных подтвердил высокую точность разработанной методики. Установлено, что истинные значения концентраций аналитов находятся в пределах доверительного интервала экспериментально полученных результатов, что свидетельствует о хорошей сходимости методики.

Для выявления возможной систематической погрешности был выполнен расчет критерия Стьюдента. Полученные значения составили: $t = 1,83$ для клопидогрела и $t = 1,86$ для клопидогрель-карбоновой кислоты, значения которых не превышают критического табличного показателя (2,31), что позволяет сделать вывод об отсутствии значимой систематической погрешности в разработанной методике.

Оценка прецизионности проводилась при концентрации 100 мкг/мл, что соответствует среднему уровню рабочего диапазона методики. Результаты исследования прецизионности представлены в таблице 12 и демонстрируют хорошую воспроизводимость аналитических определений.

Так как относительное стандартное отклонение не превышает допустимых норм ($\pm 20\%$) [142], предлагаемая методика является прецизионной.

Таблица 12. Оценка прецизионности определения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ

Внесено вещества, мкг/мл	Клопидогрел			Клопидогрель карбоновая кислота		
	Площадь пика, отн.ед.	Результат мкг	Метрологическая характеристика (n = 6; P = 0,95)	Площадь пика, отн.ед.	Результат мкг	Метрологическая характеристика (n = 6; P = 0,95)
100	0,05747	100,7	$\bar{X} = 100,27$ SD = 1,22 RSD = $\pm 1,22$ %	0,05981	100,39	$\bar{X} = 100,17$ SD = 0,38 RSD = $\pm 0,38$ %
	0,05743	99,7		0,05979	100,17	
	0,05749	101,0		0,05993	100,44	
	0,05745	100,3		0,06101	100,57	
	0,05741	99,6		0,05934	99,6	
	0,05745	100,3		0,05966	99,84	

Таким образом, проведенные исследования метрологических характеристик подтвердили, что разработанная методика обладает: достаточной точностью (отсутствие систематических погрешностей), хорошей прецизионностью, надежностью получаемых результатов.

3.3. Идентификация и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом УФ-СФМ

УФ-спектрофотометрический анализ находит широкое применение в химико-токсикологических исследованиях для идентификации и количественного определения токсических веществ в различных биологических матрицах [34]. Стандартная методика предполагает предварительную очистку анализируемых соединений с использованием экстракционных методов или тонкослойной хроматографии для устранения мешающих примесей.

Хотя в литературе описаны методики УФ-спектрофотометрического анализа (УФ-СФМ) клопидогрела в субстанциях [37], применение данного метода для определения исследуемого соединения и его метаболитов в биологических

объектах ранее не практиковалось. Это связано с принципиальными ограничениями метода:

1. Низкая селективность в сложных биологических матрицах.
2. Наличие интерферирующих пиков поглощения от эндогенных веществ.

Несмотря на очевидные преимущества УФ-спектрофотометрии: простоту исполнения, доступность оборудования, экспрессность и высокую чувствительность - в нашем исследовании метод применялся ограниченно. Мы использовали его исключительно для предварительного изучения экстракционных характеристик клопидогрела и его метаболита в водных растворах, где отсутствует влияние биологической матрицы. Для подтверждающего анализа биологических образцов метод не применялся ввиду его недостаточной специфичности [37].

Учитывая, что производителями клопидогрела УФ-спектрофотометрия не включена в перечень рекомендуемых методов идентификации как самого вещества, так и его основного метаболита (клопидогрель-карбоновой кислоты), в рамках настоящего исследования была специально разработана усовершенствованная методика. Ее создание направлено на восполнение существующего методического пробела и обеспечение надежной идентификации данных соединений в химико-токсикологических исследованиях. Разработанный подход сочетает преимущества традиционных методов с современными требованиями к точности и специфичности анализа.

3.3.1. Разработка условий идентификации клопидогрела и его неактивного метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ

В ходе исследования была проведена спектрофотометрическая характеристика клопидогрела и клопидогрель-карбоновой кислоты с целью разработки надежного метода их идентификации и количественного определения. Методика основана на сравнительном анализе УФ-спектров поглощения исследуемых соединений со спектрами стандартных образцов.

Методика исследования:

1. Приготовление стандартных растворов (концентрация 100 мкг/мл) согласно методике, описанной в разделе 2.1
2. Измерение спектров в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты.
3. Сравнительный анализ спектральных характеристик.

Результаты спектрофотометрического анализа: для клопидогрела характерны три четких максимума поглощения: 270 ± 2 нм, 278 ± 2 нм, 300 ± 2 нм; клопидогрель-карбоновая кислота проявляет два максимума поглощения: 270 ± 2 нм, 278 ± 2 нм.

Критерии идентификации:

- Полное совпадение всех спектральных характеристик (положение и интенсивность пиков) подтверждает идентичность исследуемого вещества стандарту.
- Наличие дополнительных пиков или отсутствие характерных полос поглощения свидетельствует о различии соединений.

Полученные спектральные данные (рис. 5) позволяют: однозначно дифференцировать клопидогрел и его основной метаболит, разработать надежные критерии идентификации, создать основу для количественного определения данных соединений.

Особое значение имеет наличие уникального максимума поглощения клопидогрела при 300 нм, который отсутствует у его метаболита, что обеспечивает дополнительный критерий для их надежного различения в смеси.

Для максимума абсорбции с большей интенсивностью при 278 нм был определён удельный ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) коэффициент светопоглощения с использованием четырех растворов с различным содержанием исследуемого препарата клопидогрела и его метаболита, которые получили по методике, приведенной в разделе 2.1. Результаты приведены в таблице 4.

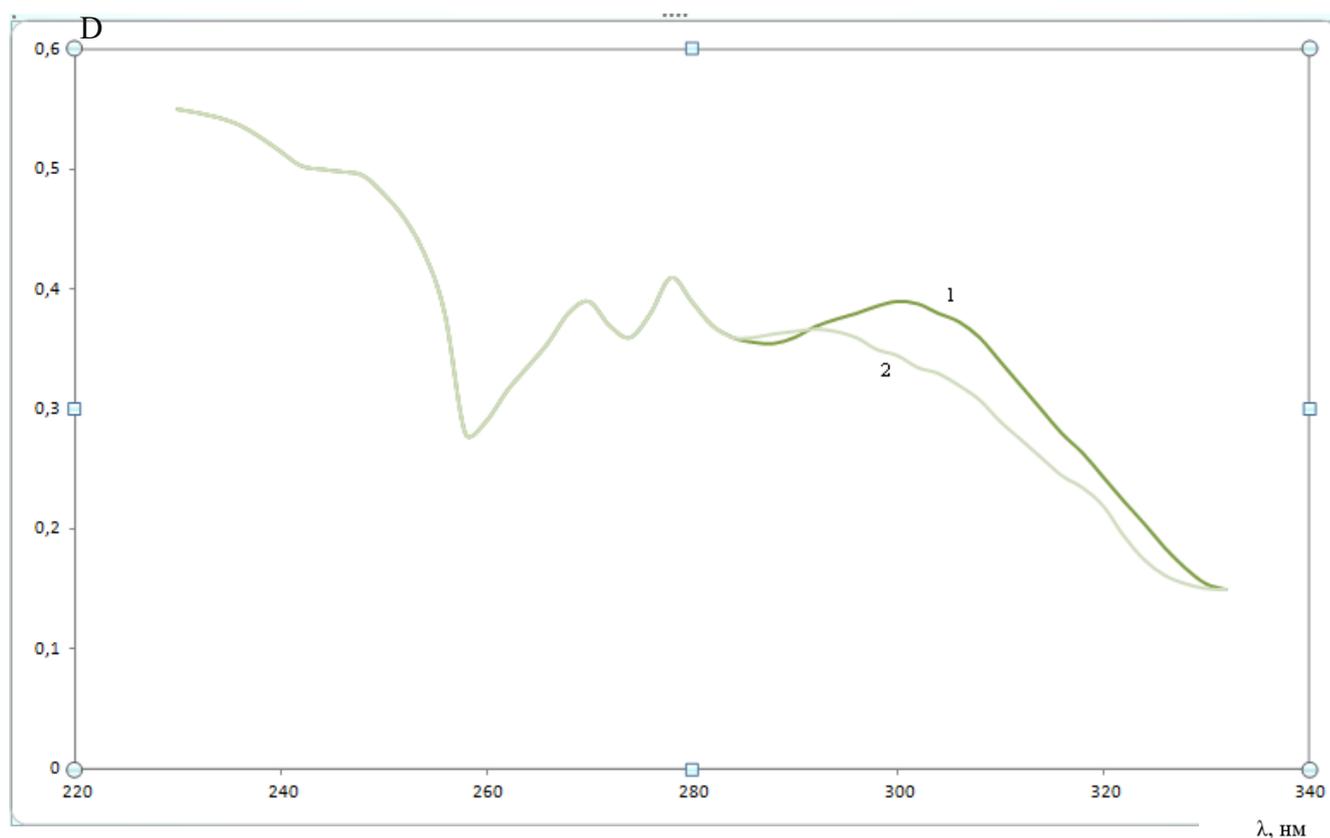


Рисунок 8. УФ-спектры поглощения клопидогрела (1) и клопидогрель карбоновой кислоты (2) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты (концентрация 100 мкг/мл)

Таблица 4. Результаты определения удельного коэффициента светопоглощения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты ($\lambda=278\text{нм}$, $l = 10 \text{ мм}$)

Концентрация раствора, мкг/мл	Оптическая плотность, D	$E_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологическая характеристика для $E_{1\text{см}}^{1\%}$ ($n = 5$; $P = 0,95$)
клопидогрел			
20,0	0,088	43,2	$\bar{X} = 41,82$ $S = 1,2$ $S_{\bar{X}} = 0,65$ $\Delta\bar{X} = 1,71$ $\varepsilon = \pm 3,4\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 41,82 \pm 1,71$
50,0	0,208	41,6	
100,0	0,411	41,1	
150,0	0,625	41,7	
200,0	0,829	41,5	

Клопидогрель карбоновая кислота			
20,0	0,084	42,0	$\bar{X} = 40,9$ $S = 0,7$ $S_{\bar{X}} = 0,3$ $\Delta\bar{X} = 0,9$ $\varepsilon = \pm 2,2\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} =$ $= 40,9 \pm 0,9$
50,0	0,201	40,2	
100,0	0,404	40,4	
150,0	0,611	40,7	
200,0	0,821	41,1	

В ходе проведенных исследований было установлено, что растворы клопидогрела и его карбонового метаболита в 0.1 М хлористоводородной кислоте демонстрируют отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера при определенных длинах волн. Для клопидогрела нелинейная зависимость оптической плотности от концентрации наблюдалась в диапазоне 270 и 300 нм, а для его метаболита - при 270 нм. Эти отклонения проявлялись в виде несоответствия экспериментальных данных линейной зависимости и снижения воспроизводимости результатов. Тщательный анализ спектральных характеристик показал, что при длине волны 278 нм оба соединения подчиняются основному закону светопоглощения. Именно при этой длине волны была достигнута линейная зависимость оптической плотности от концентрации (табл. 4). Таким образом, для достоверного количественного определения как клопидогрела, так и его карбонового метаболита методом УФ-спектрофотометрии рекомендуется использовать длину волны 278 нм. Этот выбор обеспечивает соблюдение основных требований к аналитическим измерениям и позволяет получать точные и воспроизводимые результаты. [9].

3.3.2. Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ

Разработанный УФ-спектрофотометрический метод количественного определения клопидогрела и клопидогрель-карбоновой кислоты был подвергнут комплексной валидационной оценке в соответствии с международными

требованиями. Исследование включало оценку следующих ключевых параметров: линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения.

Рабочие растворы клопидогрела и его неактивного метаболита готовили согласно методике, описанной в разделе 2.1 настоящей работы. Концентрационный ряд охватывал диапазон от 20 до 200 мкг/мл.

Для каждой концентрации измеряли оптическую плотность. Полученные данные использовали для построения калибровочных графиков. Результаты представлены на рисунках 6 и 7 [9].

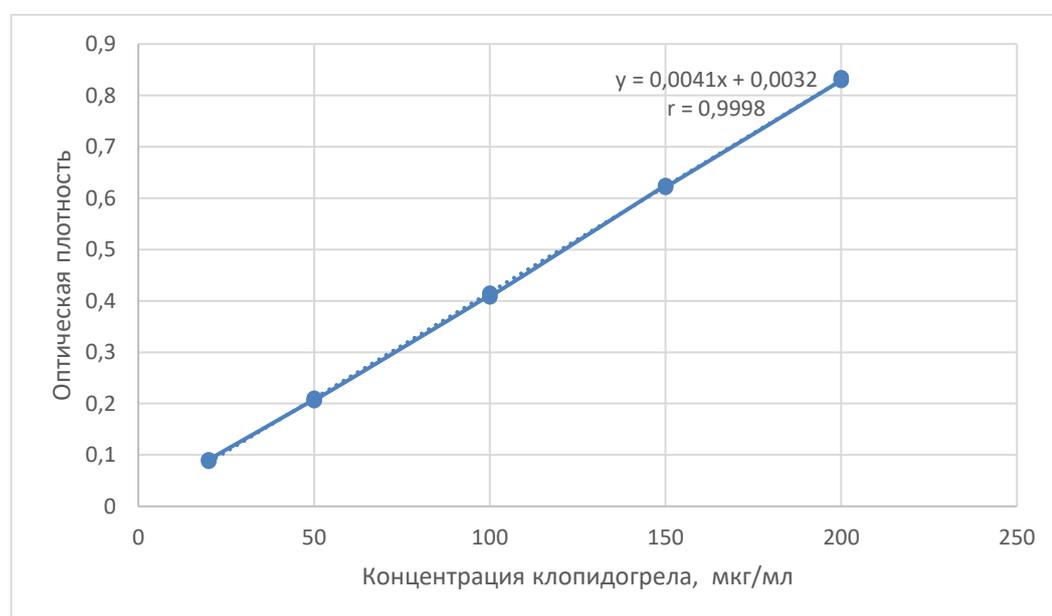


Рисунок 6. Калибровочный график для определения клопидогрела УФ-СФМ

Согласно рис. 6 и 7- установлен линейный диапазон 20-200 мкг/мл для обоих аналитов, коэффициенты корреляции (r) превышали 0.999, графики демонстрируют строгую пропорциональность между концентрацией и оптической плотностью (рис. 6, 7) [9].

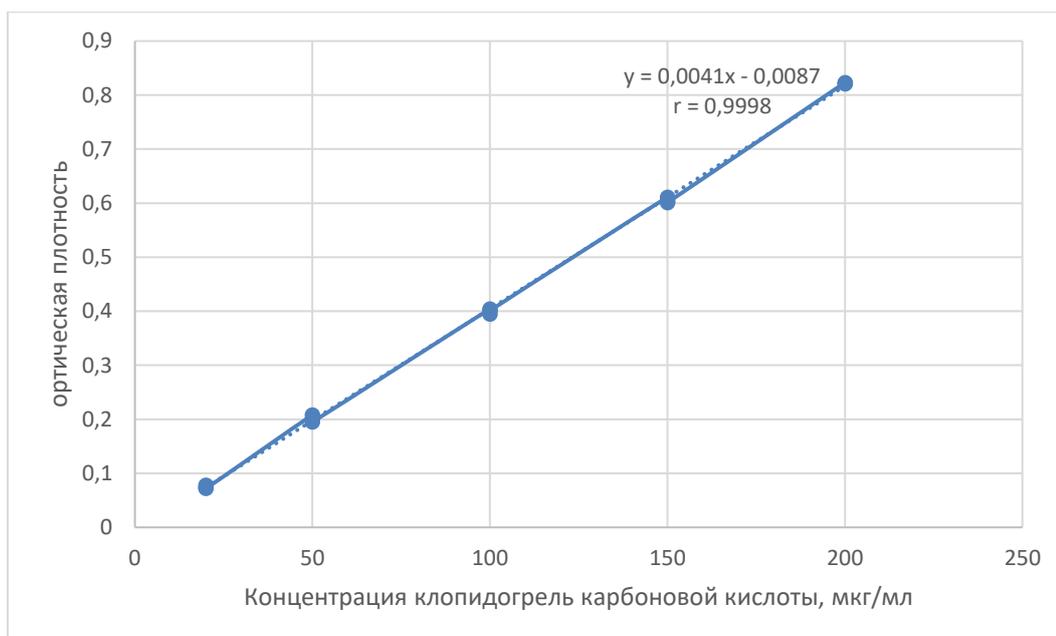


Рисунок 7. Калибровочный график для определения клопидогрель карбоновой кислоты УФ-СФМ

В ходе исследования было проведено расчётное определение величины ПКО по формуле 3. Установленные значения ПКО составили 3,467 мкг/мл для клопидогреля и 5,015 мкг/мл для его метаболита – ККК.

Для оценки правильности методики проведён анализ девяти образцов растворов клопидогреля и ККК на трёх уровнях концентраций [24]. Исследуемые концентрации включали: нижний уровень – 20,0 мкг/мл, средний – 100,0 мкг/мл и высокий – 200,0 мкг/мл.

Полученные экспериментальные данные представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Оценка правильности определения клопидогреля УФ-СФМ методом

№ п/п	Уровень	Внесено мкг/мл	Оптическая плотность	Найдено клопидогреля		Метрологическая характеристика
				мкг/мл	R, %	
1	1	20,0	0,088	20,17	100,85	$\bar{R} = 99,77\%$; $SD = 0,95$; $RSD = \pm 0,95\%$; $\Delta x = 1,77$; $\varepsilon = \pm 1,77\%$; $t_{\text{выч}} = 1,86$
2			0,088	20,17	100,85	
3			0,087	19,91	99,55	
4	2	100,0	0,411	98,89	98,87	

5			0,402	98,13	98,13	
6			0,412	99,01	99,01	
7	3	200,0	0,829	200,73	100,37	
8			0,825	199,8	99,9	
9			0,831	200,75	100,38	

Таблица 6. Оценка правильности определения клопидогрель карбоновой кислоты
УФ-СФМ методом

№ п/п	Уровень	Внесено мкг/мл	Оптическая плотность	Найдено клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологическая характеристика
				мкг/мл	R, %	
1	1	20,0	0,078	20,19	100,95	$\bar{R} = 100,16\%$; $SD = 0,39$; $RSD = \pm 0,39\%$; $\Delta x = 0,73$; $\varepsilon = \pm 0,73\%$; $t_{\text{выч}} = 1,86$
2			0,077	20,08	100,40	
3			0,080	19,93	99,65	
4	2	100,0	0,404	99,97	99,97	
5			0,402	99,93	99,93	
6			0,406	100,02	100,02	
7	3	200,0	0,821	200,99	100,50	
8			0,824	200,01	100,01	
9			0,819	199,95	99,98	

Согласно полученным данным, показатель правильности метода составил 99,77% для клопидогрела и 100,16% для клопидогрель карбоновой кислоты. Рассчитанные значения t-критерия Стьюдента (1,86 для обоих аналитов) не превышают табличного значения (2,31), что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности в проведённых исследованиях [15, 20].

Для оценки прецизионности метода выполнено шесть параллельных определений на среднем уровне концентраций. Соответствующие результаты представлены в таблице 7.

Полученные значения относительного стандартного отклонения составили $\pm 0,84\%$ для клопидогрела и $\pm 0,04\%$ для клопидогрель карбоновой кислоты, что свидетельствует о высокой воспроизводимости метода. Данные результаты подтверждают применимость разработанной методики для дальнейших исследований как клопидогрела, так и его неактивного метаболита.

Таблица 7. Результаты определения прецизионности для УФ-СФМ метода для клопидогрела

Клопидогрель		Клопидогрель карбоновая кислота	
Результаты анализа, мкг	Метрологическая характеристика	Результаты анализа, мкг	Метрологическая характеристика
98,89	$\bar{X} = 99,39$ $SD = 0,84;$ $RSD = \pm 0,84\%;$	99,97	$\bar{X} = 99,99$ $SD = 0,04;$ $RSD = \pm 0,04\%;$
98,13		99,93	
99,01		100,02	
100,2		99,98	
99,98		100,01	
100,1		100,02	

Полученные данные подтверждают, что разработанный метод удовлетворяет основным требованиям к аналитическим методикам и может быть использован для количественного определения как клопидогрела, так и его основного метаболита в указанном диапазоне концентраций. Высокие значения коэффициентов корреляции свидетельствуют о хорошей линейной зависимости и пригодности метода для количественных измерений.

Заключение по главе 3

В ходе проведенных исследований разработан комплекс современных аналитических методик для идентификации и количественного определения клопидогрела и его неактивного метаболита – клопидогрел карбоновой кислоты, включающий методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрофотометрии (УФ-СФМ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для ТСХ-скрининга установлены оптимальные хроматографические системы: этанол-уксусная кислота-вода (5:3:2) и хлороформ-ацетон (80:20), обеспечивающие эффективное разделение как исследуемых соединений между собой, так и от других лекарственных препаратов, назначаемых в комбинированной терапии. Применение пластин Sorbfil ПТСХ-ПВ с УФ-индикатором и Alugram Sil G/UV254 продемонстрировало высокую эффективность для качественного анализа.

Метод ВЭЖХ продемонстрировал высокую селективность, о чем свидетельствуют значительные различия во времени удерживания аналитов: 13,74 минут для клопидогрела и 11,85 минут для его метаболита. Чувствительность метода составляет 1 мкг/мл (2 нг в пробе), при этом линейный диапазон определения охватывает концентрации от 1 до 400 мкг/мл. Методика характеризуется высокой точностью (правильность 99,69% для клопидогрела и 100,67% для метаболита) и воспроизводимостью (относительное стандартное отклонение $\leq 1,22\%$ и $0,38\%$ соответственно).

Спектрофотометрические исследования выявили характерные максимумы поглощения: для клопидогрела - 270 ± 2 нм, 278 ± 2 нм и 300 ± 2 нм; для метаболита - 270 ± 2 нм и 278 ± 2 нм. Статистическая обработка данных подтвердила отсутствие систематической погрешности (t-критерий Стьюдента 1,86 при табличном значении 2,31) и высокую воспроизжимость метода (относительное стандартное отклонение $\pm 0,84\%$ и $\pm 0,04\%$ соответственно).

Разработанные методики обладают высокой селективностью и чувствительностью, что позволяет успешно применять их для химико-токсикологического анализа биологических образцов. Полученные результаты существенно расширяют возможности диагностики при исследовании случаев отравлений и передозировок клопидогрелом, а также могут быть использованы в фармакокинетических исследованиях и мониторинге терапии. Комплексный подход, сочетающий преимущества различных аналитических методов, обеспечивает надежную идентификацию и точное количественное определение как нативного вещества, так и его основного метаболита в широком диапазоне концентраций.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ КЛОПИДОГРЕЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

После разработки методик анализа клопидогрела и его неактивного метаболита (ККК) методом ТСХ и ВЭЖХ, а также УФ-спектрометрия (для предварительного изучения экстракционных характеристик клопидогрела и его метаболита) следующим этапом стало изучение условий их экстракции, что является критически важным для химико-токсикологического анализа. Поскольку биологические матрицы (кровь, моча, ткани) содержат сложные смеси соединений, способных влиять на выделение и определение целевых веществ, предварительная оптимизация экстракции проводилась на модельных растворах. Такой подход позволил:

1. Исключить влияние биологической матрицы на начальном этапе и оценить эффективность экстракционных методов в контролируемых условиях.
2. Определить оптимальные параметры (рН, тип экстрагента, время экстракции) для максимального выхода клопидогрела и его метаболита.
3. Оценить стабильность аналитов в различных условиях пробоподготовки без мешающих факторов, характерных для биологических образцов.

Полученные данные послужили основой для последующей адаптации методов экстракции к реальным биологическим матрицам, что необходимо для обеспечения точности, воспроизводимости и надежности химико-токсикологического анализа.

В практике химико-токсикологического анализа (ХТА) для очистки и концентрирования лекарственных веществ из биологических матриц наиболее широко применяются два метода: жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) и твердофазная экстракция (ТФЭ) [14, 25]. Однако ЖЖЭ с использованием органических растворителей имеет ряд ограничений - она не всегда обеспечивает достаточную степень очистки от матричных компонентов и часто сопровождается частичной потерей аналита. В связи с этим в химико-токсикологической практике

широко используется комбинация ЖЖЭ с последующей очисткой экстрактов методом ТСХ [14, 25].

Эффективность экстракции определяется несколькими ключевыми факторами:

- природой используемого органического растворителя;
- значением pH среды;
- наличием электролитов;
- продолжительностью и кратностью экстракции.

В нашем исследовании количественное определение клопидогрела и его метаболита (клопидогрель карбоновой кислоты) в экстрактах проводили методом УФ-спектрофотометрии (раздел 2.2 и раздел 3.3.), с расчетом концентраций по калибровочным графикам.

Согласно литературным данным, клопидогрел демонстрирует хорошую растворимость в хлористоводородной кислоте, тогда как его метаболит лучше растворяется в воде [26]. Исходя из этого, для приготовления стандартных растворов клопидогрела использовали хлористоводородную кислоту, а для метаболита - очищенную воду.

В работе исследовали эффективность наиболее распространенных в ХТА органических растворителей (хлороформ, диэтиловый эфир, гексан - эти растворители охватывают широкий спектр соединений, что делает их универсальными в химико-токсикологическом анализе), не смешивающихся с водой. Особое внимание уделялось изучению влияния различных факторов экстракции на эффективность выделения клопидогрела из модельных систем [5].

4.1. Влияние pH среды и природы органического растворителя на изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты

Для разработки методики экстракционной очистки биологических вытяжек была изучена степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой

кислоты из водных растворов в зависимости от природы органического растворителя, рН водной фазы и природы электролита.

В процессе разработки методики экстракции клопидогрела и его основного неактивного метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты (ККК) - принципиально важно учитывать, что ККК, несмотря на формальное наличие двух центров (карбоксильной группы и атома азота в тиенопиридиновом кольце), не проявляет типичных амфотерных свойств по следующим причинам:

- Основность атома азота в ароматическом тиенопиридиновом кольце крайне низка ($pK_a < 2$) из-за сильного электроноакцепторного влияния соседних групп [129]. Это подтверждается литературными данными, показывающими, что протонирование этого азота происходит только в сильно кислых средах ($pH < 1$) [129].
- Карбоксильная группа ККК имеет типичное для алифатических карбоновых кислот значение $pK_a \approx 4.0-4.5$ [90]. Таким образом, в физиологическом диапазоне рН (2-8) ККК ведет себя как монопротонная кислота, демонстрируя только одну видимую pK_a .
- Поскольку второй (основной) центр САС практически не проявляет себя в рабочем диапазоне рН, изоэлектрическая точка для этого соединения не может быть определена экспериментально и не имеет практического значения для разработки методики экстракции.
- Учет только pK_a карбоксильной группы (4.0-4.5) полностью достаточен для прогнозирования поведения ККК при экстракции.

Таким образом, при разработке методики экстракции клопидогрела и ККК правомерно учитывать только значения pK_a , игнорируя концепцию изоэлектрической точки.

Первоначально было теоретически изучено влияние степени извлечения в зависимости от pK_a (рисунок 13, 14) [94].

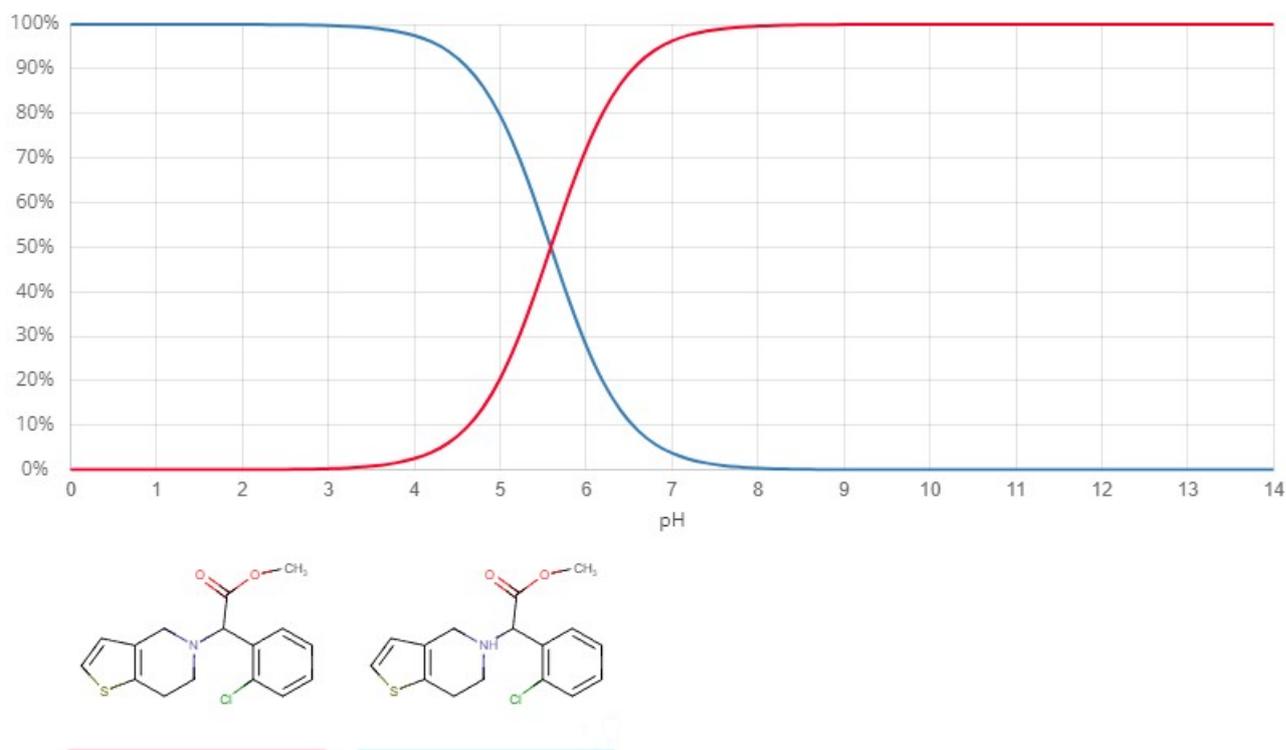


Рисунок 9. Диаграмма распределения неионизированной и ионизированной формы клопидогрела в зависимости от pH среды

Из рисунка 13 видно, что для клопидогрела характерно значение $pH = 5,57$, при котором степень диссоциации составляет 50% (pK_a). При $pH=2-4$, клопидогрел находится в ионизированной форме. Теоретически мы можем использовать эту форму при настаивании объекта, так как заряженные частицы гидратируются значительно лучше. Для экстракции органическим растворителем это значение pH нельзя использовать, так как не произойдет максимальный переход вещества в органическую фазу. Степень диссоциации неионизированной формы клопидогрела составляет 100% (pK_a) при $pH=7-8$, такая среда очень близка к нейтральной среде, где велико влияние диполей воды, что затрудняет переход в неионизированную форму в полном объеме.

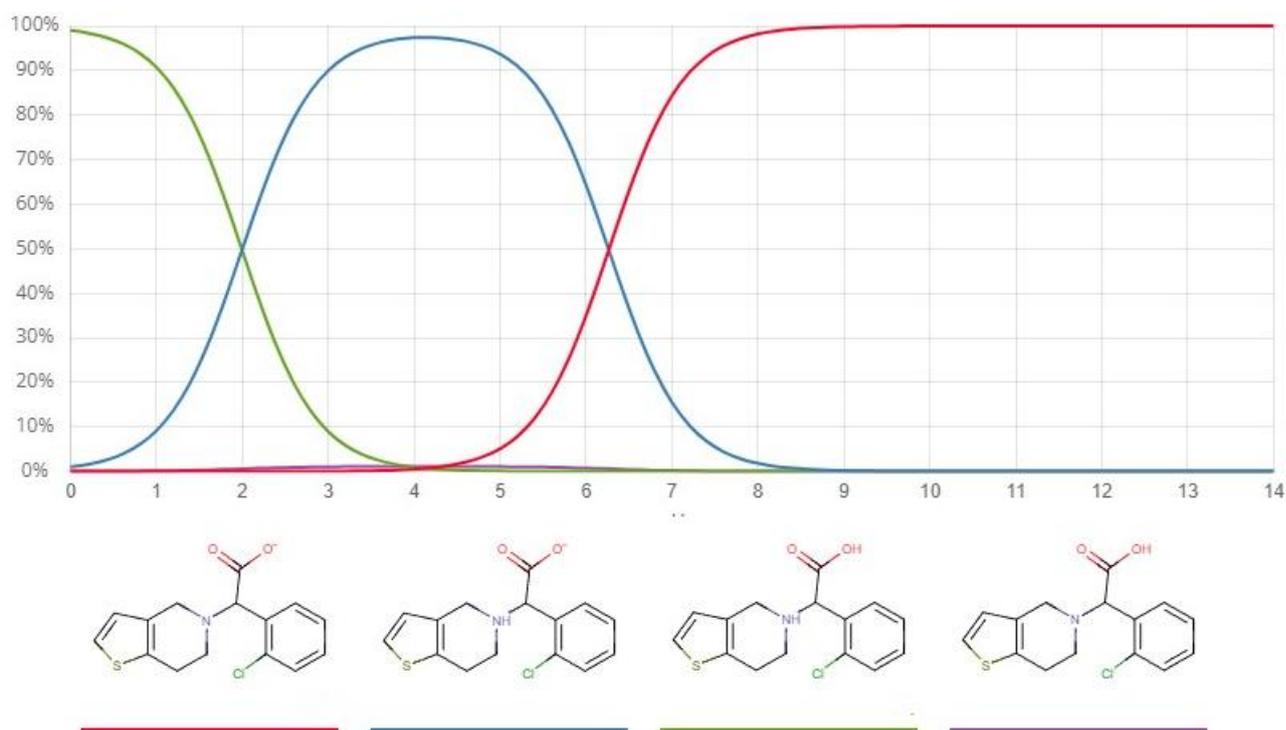


Рисунок 10. Диаграмма распределения неионизированной и ионизированной формы клопидогрель карбоновой кислоты в зависимости от pH среды

Данные, которые представлены на рисунке 14, свидетельствуют о том, что молекула клопидогрель карбоновой кислоты существует в четырех формах, которые зависят от pH среды.

Степень диссоциации данной формы клопидогрель карбоновой кислоты составляет 100% (pKa) при pH=7-8. Переход в такую форму необходимо использовать на первом этапе изолирования – настаивания.

Вторая форма молекулы ККК является неионизированной. Степень диссоциации данной формы клопидогреля составляет 100% (pKa) при pH=4. Она будет лучше сольватироваться неполярными органическими растворителями. Переход в такую форму необходимо использовать на втором этапе изолирования – экстракции.

Третья форма молекулы, является ионизированной за счет атома азота, степень диссоциации составляет 100% при pH=1. Теоретически мы можем использовать переход в эту форму при настаивании объекта, так как заряженные частицы гидратируются значительно лучше. Для экстракции органическим

растворителем этот переход нельзя использовать, так как не произойдет максимальный переход вещества в органическую фазу.

Четвертая форма молекулы клопидогрель карбоновой кислоты не влияет на процесс экстракции.

Экспериментально нами были проверены предположенные теоретические значения рН клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты.

Раствор клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты готовили следующим образом: около 100,0 мг вещества вносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки.

Соответствующие значения рН водных растворов создавали с помощью 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и 0,1 М раствора натрия гидроксида.

По 1,00 мл исследуемых растворов клопидогрела или клопидогрель карбоновой кислоты помещали в делительные воронки, добавляли 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до рН 6; 5; 4; 3; 2; 1 или 0,1 М раствора натрия гидроксида до рН 8; 9; 10; 11; 12 и 5 мл органического растворителя. Смеси в делительных воронках встряхивали в течение 3 мин., оставляли на 10 мин. для разделения слоев. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Остаток растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Концентрацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных растворах определяли УФ-спектрофотометрическим методом по соответствующему калибровочному графику (раздел 3.3.2).

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты была рассчитана по формуле (2).

Результаты экспериментальных исследований по определению степени экстракции клопидогрела и его неактивного метаболита в зависимости от величины рН среды и природы органического растворителя приведены на рис. 15, 16. В качестве органических растворителей нами были использованы: хлороформ, гексан, диэтиловый эфир. Выбор растворителей осуществляли, руководствуясь

литературными данными с учетом физико-химических свойств определяемых веществ.

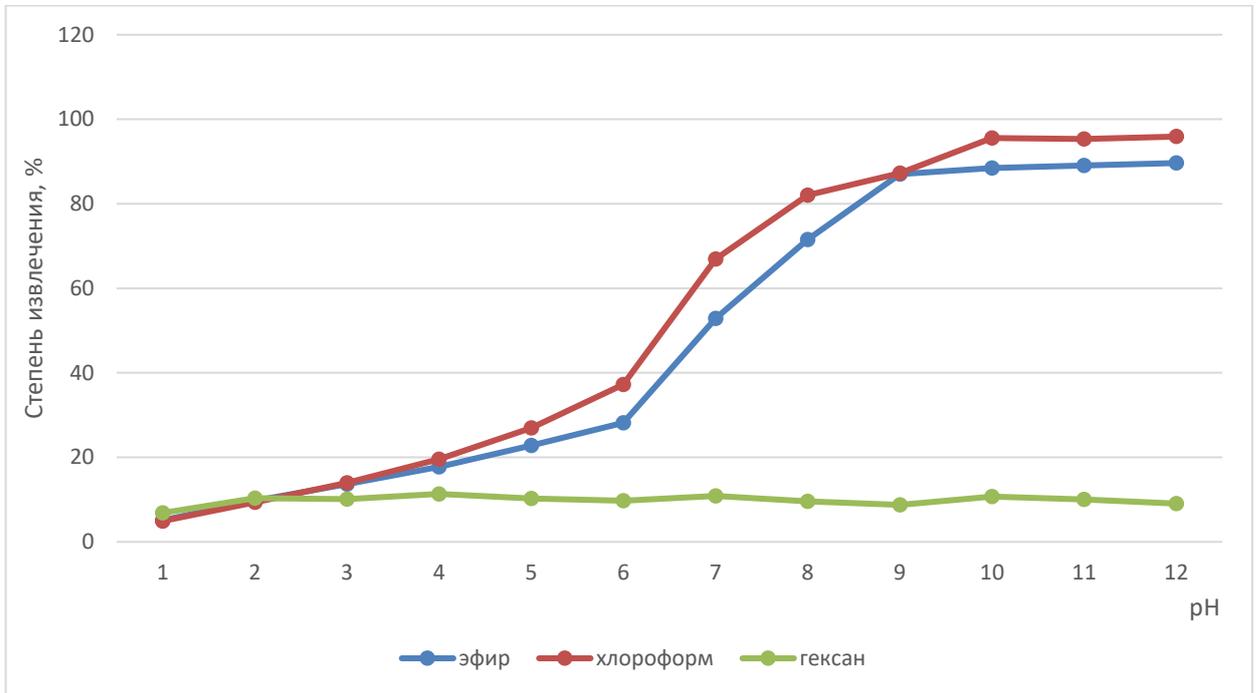


Рисунок 11. Зависимость степени извлечения клопидогрела от pH среды и природы органического растворителя

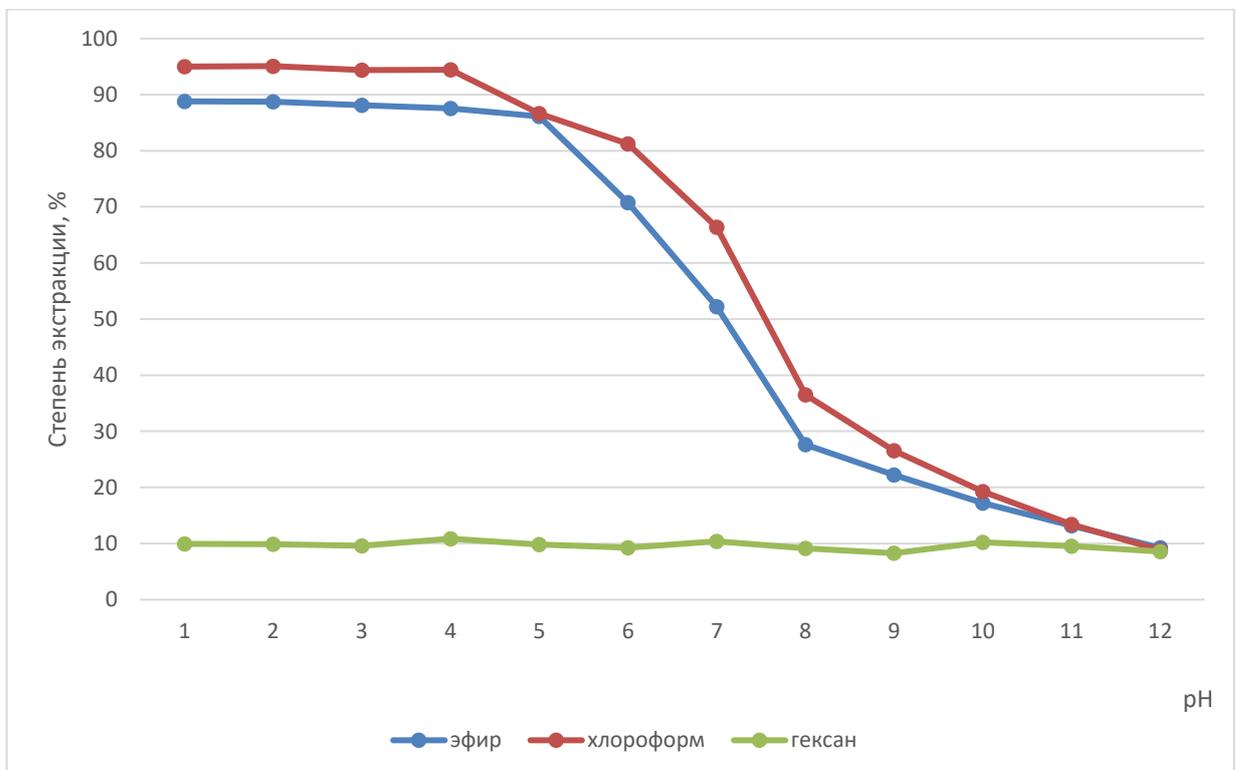


Рисунок 12. Зависимость степени извлечения клопидогрель карбоновой кислоты от pH среды и природы органического растворителя

Данные рис. 15, 16 свидетельствуют о том, что заметная экстракция клопидогрела хлороформом начинается при $\text{pH} = 5,0 - 6,0$ и достигает максимума (95%) в интервале $\text{pH} = 10,0-12,0$. Экстракция диэтиловым эфиром начинается при $\text{pH} = 5,0 - 6,0$ и достигает максимума (90%) 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 $\text{pH} = 2,0 - 4,0$ [3].

Таким образом, хлороформ и диэтиловый эфир можно использовать для изолирования клопидогрела в щелочной среде и клопидогрель карбоновой кислоты в кислой среде из биологического материала [3].

Гексан практически не экстрагирует ни клопидогрел, ни его метаболит из водных растворов независимо от pH среды, поэтому его можно использовать для очистки как «кислого», так и «щелочного» извлечения из биологического материала.

4.2. Изучение влияния электролитов на изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты

В современных методиках химико-токсикологического анализа биологических образцов (плазмы крови, тканевых вытяжек) широко применяется техника осаждения белковых компонентов с использованием электролитов. Как показано в работе [18], данный подход может сопровождаться соосаждением анализируемых соединений, что требует тщательного подбора условий проведения процедуры.

В рамках нашего исследования была проведена систематическая оценка влияния концентрации и химической природы электролитов на эффективность экстракции клопидогрела и его метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты. Эксперименты проводились при оптимальных значениях pH , предварительно установленных как обеспечивающие максимальную степень извлечения целевых соединений.

Согласно литературным данным, в практике химико-токсикологического анализа наиболее часто применяются следующие электролиты: хлорид натрия (NaCl), карбонат натрия (Na_2CO_3), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

При этом концентрация указанных реагентов варьируется в зависимости от конкретной аналитической задачи и природы исследуемого биоматериала [18]. В нашем исследовании особое внимание уделялось минимизации потерь аналитов за счет соосаждения, что достигалось путем тщательного подбора концентраций электролитов и условий проведения экстракции.

Для проведения исследований были подготовлены растворы электролитов различной концентрации: хлорид натрия (NaCl) (5%, 20% и насыщенный растворы), сульфат натрия (Na_2SO_4) (5%, 25% и насыщенный растворы), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (5%, 20% и насыщенный растворы).

Выбор указанных концентраций обусловлен необходимостью: охватить широкий диапазон концентраций (от разбавленных до насыщенных растворов), обеспечить постепенное увеличение ионной силы среды, сравнить эффективность различных электролитов при эквивалентных концентрациях, определить оптимальные условия осаждения белков при минимальных потерях аналитов.

Применение насыщенных растворов позволяет оценить предельную эффективность осаждения белков, тогда как менее концентрированные растворы используются для поиска компромисса между степенью очистки образца и сохранностью анализируемых веществ.

Действие электролитов на процесс экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты изучали согласно следующей методике: около 100,0 мг вещества вносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки. Далее по 1,0 мл раствора помещали в конические колбы вместимостью 25,0 мл, добавляли 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты до $\text{pH}=4$ (для клопидогрель карбоновой кислоты) или до $\text{pH}=10$ (для клопидогрела), 1,0 мл раствора электролита и 5,0 мл хлороформа. Содержимое колб переливали в делительные воронки. Смеси в делительных воронках встряхивали в течение 3

мин., оставляли на 10 мин. для разделения слоев. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Остаток растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Концентрацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных растворах определяли УФ-спектрофотометрическим методом по соответствующему калибровочному графику (раздел 3.3.2).

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты была рассчитана по формуле (2).

Результаты исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13. Зависимость степени экстракции клопидогрела (рН= 10) и клопидогрель карбоновой кислоты (рН=4) от концентрации и природы электролита

Электролит	Степень экстракции, %	
	Клопидогрел	Клопидогрель карбоновая кислота
Без электролита	95,90 ± 1,77	94,92 ± 1,34
Натрия хлорид, 5% раствор	91,97 ± 0,66	35,8 ± 3,59
Натрия хлорид, 20% раствор	92,93 ± 1,92	42,7 ± 4,3
Натрия хлорид, насыщенный раствор	93,8 ± 1,56	67,77 ± 4,87
Натрия сульфат, 5% раствор	89,95 ± 3,25	42,9 ± 3,7
Натрия сульфат, 25% раствор	90,6 ± 0,64	72,23 ± 1,53
Натрия сульфат, насыщенный раствор	90,97 ± 0,67	74,47 ± 0,82
Аммония сульфат, 5% раствор	90,53 ± 4,01	18,9 ± 4,61
Аммония сульфат, 20% раствор	91,67 ± 0,80	21,67 ± 3,39
Аммония сульфат, концентрированный	93,93 ± 2,0	24,04 ± 3,91

Проведенные исследования демонстрируют, что применение исследуемых электролитов не оказывает существенного влияния на эффективность экстракции клопидогрела. Полученные данные свидетельствуют о нецелесообразности включения этапа добавления электролитов при разработке методик анализа: для клопидогрела - отсутствие статистически значимого изменения степени экстракции при использовании различных электролитов и независимость выхода вещества от ионной силы раствора, для клопидогрель карбоновой кислоты - аналогичная картина отсутствия влияния электролитов на экстракционную эффективность и сохранение стабильных показателей извлечения при варьировании условий.

На основании этих результатов принято решение исключить этап добавления электролитов из разрабатываемой методики анализа данных соединений. Такой подход позволит упростить процедуру пробоподготовки, снизить количество используемых реагентов, минимизировать потенциальные источники погрешностей, сохранить высокую эффективность экстракции целевых соединений.

При этом сохраняется возможность адаптации методики при необходимости работы с другими классами соединений, где применение электролитов может оказаться целесообразным.

4.3. Исследование влияния времени и кратности на степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты

Следующей стадией экспериментальных исследований явилось изучение влияния времени на степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты.

При разработке методики экстракции были выбраны временные интервалы 3, 5 и 10 минут, что обусловлено следующими факторами: Предварительные исследования показали, что процесс экстракции клопидогрела и его метаболитов достигает плато в интервале 5-10 минут. Более короткие (1-2 мин) и длительные

(15-30 мин) интервалы не показали значимого улучшения выхода аналитов [130]. Выбранные интервалы позволяют: оценить минимально необходимое время для достижения равновесия (3 мин) - Минимальное время, необходимое для установления фазового равновесия в системе "водная фаза - органический растворитель" [276], определить оптимальный баланс между эффективностью и производительностью (5 мин), проверить стабильность соединений при продолжительной экстракции (10 мин) - контрольный интервал для оценки возможного разложения аналитов при продолжительном контакте с экстрагентом.

Исследование влияния времени и кратности экстракции на степень экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты: около 100,0 мг вещества вносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки. Далее по 1,0 мл раствора помещали в конические колбы вместимостью 25,0 мл, добавляли 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты до pH=4 (для клопидогрель карбоновой кислоты) или до pH=10 (для клопидогрела) и 5,0 мл хлороформа. Содержимое колб переливали в делительные воронки. Смеси в делительных воронках встряхивали в течение 3, 5; 10 мин., оставляли на 10 мин. для разделения слоев. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Остаток растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Концентрацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных растворах определяли УФ-спектрофотометрическим методом по соответствующему калибровочному графику (раздел.3.3.2).

В качестве раствора сравнения использовали 0,1 моль/л раствор кислоты хлористоводородной (для клопидогрела), и воды очищенной (для клопидогрель карбоновой кислоты). Расчет степени извлечения проводили по формуле 2.

Результаты исследований о влиянии времени экстрагирования на степень экстракции исследуемых веществ представлены на рисунке 17.

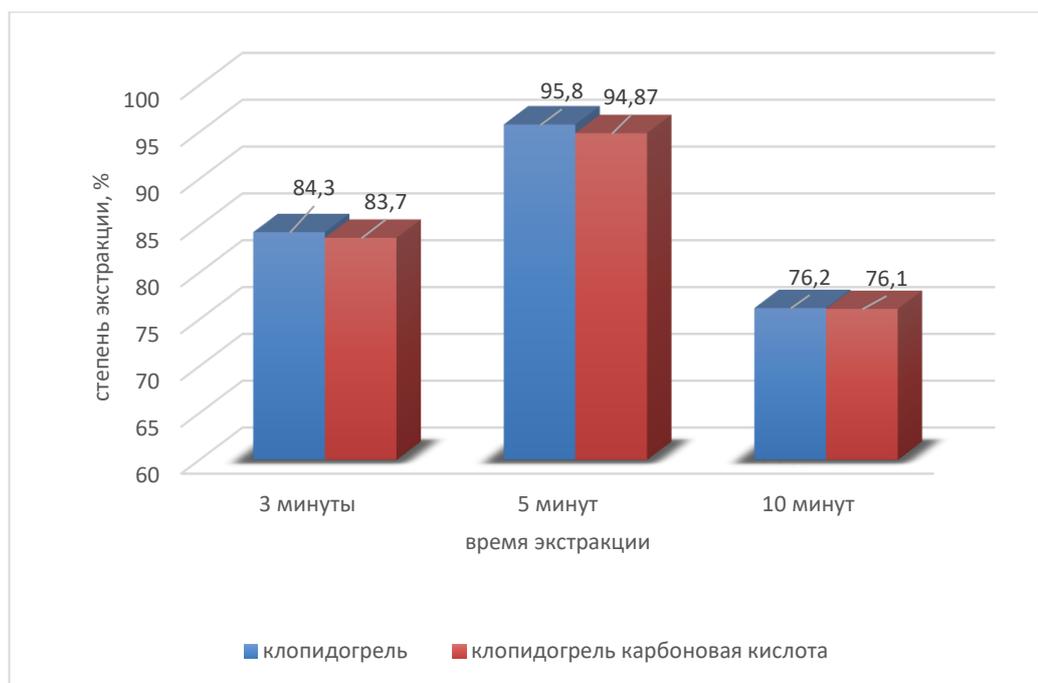


Рисунок 13. Степень извлечения изучаемых веществ в зависимости от времени экстракции

Как видно из представленных данных, самым оптимальным временем экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты является 5 минут, при котором степень экстракции равна 95,8% для клопидогрела и 94,87 для клопидогрель карбоновой кислоты. Эти данные будут применены нами для дальнейшего исследования клопидогрела и его метаболита.

Экспериментальные исследования по определению кратности экстракции клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты проводили с использованием следующей методики: около 100,0 мг вещества вносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора этим же растворителем до метки. Далее по 1,0 мл раствора помещали в конические колбы вместимостью 25,0 мл, добавляли 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты до pH=4 (для клопидогрель карбоновой кислоты) или до pH=10 (для клопидогрела) и 5,0 мл хлороформа. Содержимое колб переливали в делительные воронки. Смеси в делительных воронках встряхивали в течение 5 мин, оставляли на 10 мин. для разделения слоев. Экстракцию порциями по 5 мл хлороформа для клопидогрела повторяли

пять раз, экстракцию клопидогрель карбоновой кислоты проводили трижды. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Остаток растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Концентрацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных растворах определяли УФ-спектрофотометрическим методом по соответствующему калибровочному графику (раздел.3.3.2).

Расчет степени извлечения проводили по формуле 2.

Полученные данные представлены в таблице 14.

Таблица 14. Определение степени извлечения клопидогрела 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	-

Проведенные исследования выявили зависимость эффективности экстракции от количества экстракционных циклов. Установлено, что увеличение кратности экстракции приводит к росту количества извлекаемого клопидогрела и его метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты. Однако для каждого соединения было определено оптимальное количество экстракций, превышение которого не дает существенного прироста выхода. Для клопидогрела максимальное извлечение достигается при трехкратной экстракции - дальнейшее увеличение числа экстракций (до 4-5) не приводит к значимому повышению

эффективности процесса. В случае клопидогрель карбоновой кислоты двух- и трехкратная экстракции демонстрируют сопоставимые результаты по степени извлечения, в связи с чем для данного соединения рекомендуется использовать двукратную экстракцию как наиболее рациональный вариант, обеспечивающий высокий выход при минимальных затратах времени и реактивов.

Заключение по главе 4

В ходе исследования были определены оптимальные условия экстракции клопидогрела и его метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты из водных растворов. Установлено, что эффективность экстракции существенно зависит от двух ключевых факторов: природы органического растворителя и pH среды. Наибольшая степень извлечения достигается при использовании хлороформа и диэтилового эфира.

Для клопидогрела максимальная экстракция (95%) наблюдается в хлороформе при щелочных значениях pH (10,0-12,0), тогда как для клопидогрель карбоновой кислоты оптимальными являются слабокислые условия (pH 2,0-6,0) с аналогичной эффективностью извлечения. Диэтиловый эфир демонстрирует несколько меньшую, но сопоставимую экстракционную способность (88-90%).

Исследование влияния электролитов показало их негативное воздействие на процесс экстракции - присутствие электролитов приводит к снижению степени извлечения обоих соединений.

Оптимальное время экстракции составляет 5 минут, при котором достигается максимальный выход как клопидогрела (95,8%), так и его метаболита (94,87%). Установлено, что для клопидогрела необходимо проводить трехкратную экстракцию, тогда как для клопидогрель карбоновой кислоты достаточно двукратного извлечения. Полученные данные позволяют рекомендовать указанные параметры для разработки эффективных методик анализа данных соединений.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ КЛОПИДОГРЕЛА И КЛОПИДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

После детального изучения экстракционных характеристик клопидогрела и его неактивного метаболита (клопидогрель карбоновой кислоты) из модельных водных растворов, включающего оптимизацию ключевых параметров (рН среды, времени и кратности экстракции, выбора органических растворителей), нами было принято решение о переходе к разработке методик изолирования этих соединений из реальных биологических образцов.

Данный этап исследования является логическим продолжением предыдущей работы и обусловлен следующими важными аспектами: биологические матрицы (плазма крови, моча, ткани) существенно отличаются по своему составу от модельных водных растворов. Они содержат белки, липиды, электролиты и другие компоненты, которые могут образовывать комплексы с аналитами, мешать процессу экстракции, влиять на эффективность изолирования.

Переход к данному этапу исследований является необходимым шагом для разработки практических методов анализа, которые могут быть использованы в судебной и научной практике.

В химико-токсикологическом анализе изолирование токсических веществ из биологических матриц представляет особую сложность в связи с их низкими концентрациями [19, 119]. Это в полной мере относится и к клопидогрелу, который, несмотря на широкое клиническое применение и зарегистрированные случаи отравлений [6, 32, 70, 93], остается недостаточно изученным с точки зрения методов выделения из биологических образцов. При разработке методики изолирования клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала нами был применен комплексный подход, включающий изучение классических методов экстракции: Васильевой, Крамаренко, Валова, Поповой и Стаса-Отто. Необходимость такого всестороннего исследования обусловлена несколькими ключевыми факторами.

Во-первых, клопидогрел и его основной метаболит существенно различаются по своим физико-химическим свойствам. Клопидогрел является слабым основанием (рКа 4.5-5.0), тогда как клопидогрель карбоновая кислота проявляет кислотные свойства (рКа 4.0-4.5) [90]. Это различие определяет их различное поведение в процессах экстракции. Как показано в работах [13, 106], оптимальные условия изолирования для этих соединений требуют разных значений рН среды: щелочных для клопидогрела и кислых для его метаболита.

Во-вторых, биологические матрицы (кровь, моча, ткани) значительно отличаются по своему составу и сложности [101]. Например, при работе с плазмой крови важно учитывать высокое содержание белков, которые могут связывать аналиты [141]. В случае мочи основное внимание уделяется полярным метаболитам, а при анализе тканей печени - липидным компонентам матрицы [151]. Каждый из изучаемых методов по-разному справляется с этими матричными эффектами.

Третьим важным аспектом является необходимость оценки стабильности соединений в различных условиях экстракции. Как отмечают исследователи [131, 143], некоторые методы (например, метод Крамаренко с использованием сильнокислой среды) могут приводить к частичной деградации аналитов. Только сравнительное изучение позволяет выявить такие особенности.

Применение всех пяти методов дает возможность:

1. Определить оптимальные условия экстракции для каждого соединения.
2. Оценить влияние матричных эффектов разных биологических материалов.
3. Выявить возможные артефакты и помехи анализа.
4. Подобрать наиболее эффективную систему растворителей.
5. Установить баланс между эффективностью извлечения и чистотой экстракта.

Как показано в работах [67], такой комплексный подход особенно важен при разработке методик для химико-токсикологического анализа, где требования к надежности и воспроизводимости результатов особенно высоки. Только

всестороннее изучение различных методов экстракции позволяет создать научно обоснованную методику, пригодную для использования в практической токсикологии и клинической фармакологии.

Для исследования были отобраны следующие биологические матрицы: *кровь* - основной объект токсикологического анализа, поскольку концентрация токсиканта в крови коррелирует со степенью интоксикации [52], *моча* - удобный для анализа объект благодаря: низкому содержанию белков, минимальной метаболической активности, достаточной концентрации клопидогрела и его метаболитов (экскреция составляет около 50% от принятой дозы [31, 44, 53]), *ткань печени* - ключевой объект исследования, поскольку печень является основным органом метаболизма клопидогрела [31, 44, 53] и согласно литературным данным, печень считается наиболее информативным биологическим материалом при токсикологических исследованиях [62, 83], также методики пробоподготовки печеночной ткани хорошо разработаны [62].

Выбор указанных биологических матриц позволяет получить комплексную информацию о токсикокинетике клопидогрела, а также разработать надежные методы его детекции в различных биологических средах.

5.1. Выделение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала общепринятыми методами

Для выделения действующих веществ классическими методами нами была проведена незначительная их модификация, которая заключалась в уменьшении навески биологического материала до 10 г. Экстракцию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из полученных вытяжек проводили хлороформом, а процессы процеживания через марлю и фильтрование было заменено на центрифугирование.

Апробацию данных методик проводили с использованием ткани печени, которую получали в Республиканском патолого-анатомическом бюро Донецкой

Народной Республики. Каждый образец биологического материала проверяли на отсутствие лекарственных препаратов.

5.1.1. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой подкисленной щавелевой кислотой (метод А.А. Васильевой)

Модельную пробу печени готовили, как описано в разделе 2.1. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом А.А. Васильевой выполняли по методике, описанной в разделе 2.2.

Полученные таким образом экстракты содержали значительное количество сопутствующих веществ. Поэтому экстракты подвергали дополнительной очистке с помощью метода ТСХ, которую проводили согласно методике, описанной ниже.

ТСХ- очистка из объектов биологического происхождения

На линию старта хроматографической пластины «Sorbfil» ПТСХ-ПВ (п.3.1) полосой шириной 2 см наносили 100 мкл стандартного хлороформного раствора клопидогрела 1 (рисунок 19 А) и клопидогрель карбоновой кислоты 2 (рисунок 19 Б). Рядом наносили 10 мкл стандартного хлороформного раствора клопидогрела 1 в точку («свидетель») и стандартного хлороформного раствора клопидогрель карбоновой кислоты 2 в точку «свидетель».

Параллельно выполняли контрольный опыт: на пластину наносили 100 мкл хлороформа вместо стандартного хлороформного раствора клопидогрела 1 и клопидогрель карбоновой кислоты 2.

Пластины помещали в камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол (9:1), высушивали, проявляли полосы «свидетелей» реактивом Драгендорфа и наблюдали пятна оранжевого цвета с $R_f = 0,57$ (для клопидогрела), и пятно коричневого цвета $R_f = 0,32$ (для клопидогрель карбоновой кислоты). Камеру насыщали в течение 30 мин. Длина пути пробега растворителей составляла 8 см.

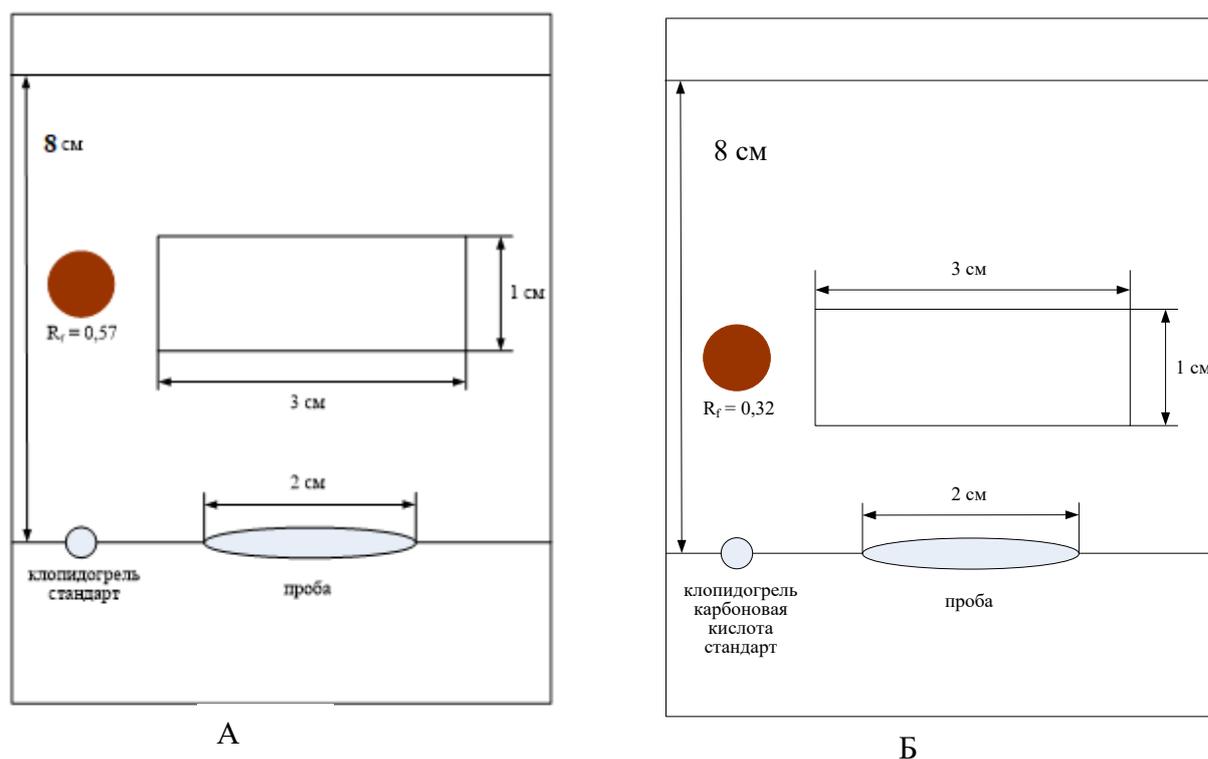


Рисунок 14. Схема нанесения проб для ТСХ-очистки: А - схема нанесения пробы клопидогреля, Б- схема нанесения пробы клопидогрель карбоновой кислоты

С помощью скальпеля напротив пятен «свидетелей» с пластин тщательным образом снимали сорбент с площади 3 см × 1 см в стеклянные флаконы (рис.19). Во флаконы добавляли по 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной (при следующем проведении количественного определения по УФ-спектрофотометрической методике) или 10 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной (при следующем проведении количественного определения по ВЭЖХ-методике) и встряхивали в течение 5 мин., после чего фильтровали в мерные колбы емкостью 10,0 мл и доводили объем раствора через фильтр («красная лента») растворителем до метки.

По 5, 10 и 100 мкл полученного хлороформного извлечения использовали для идентификации клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ (раздел 3, п.3.1).

Исследование количественного содержания клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в экстрактах методом ВЭЖХ (см. раздел 3, п.3.2.2) проводили с модельными пробами печени (10 г), которые содержали 75,0; 300,0 и

1000,0 мг клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты. Выбор доз клопидогрела в 75 мг, 300 мг и 1000 мг был обусловлен стремлением охватить широкий диапазон концентраций, имеющих клиническое и токсикологическое значение, а именно: суточная терапевтическая доза (75 мг) - эта доза является стандартной поддерживающей дозой клопидогрела, используемой для профилактики тромботических осложнений, более высокая терапевтическая доза (300 мг) - нагрузочные дозы - используются для быстрого достижения терапевтического эффекта, токсическая доза (1000 мг) - была выбрана как репрезентативная для случаев передозировки или отравления клопидогрелом.

Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученном растворе методом ВЭЖХ проводили по методике, приведенной в разделе 3.3. Объем пробы составлял 5 мкл. Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из модельных проб печени по методу А. А. Васильевой приведены в таблицах 15, 16.

Таблица 15. Оценка эффективности метода А.А. Васильевой для выделения клопидогрела

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	51,02	68,03	$\bar{X} = 67,80$ $S = 1,45$ $RSD = 2,14\%$ $S_{\bar{x}} = 0,84$ $\Delta\bar{X} = 2,45$ $\varepsilon = \pm 3,62\%$
	49,68	66,24	
	51,84	69,12	
300,0	210,6	70,21	$\bar{X} = 69,28$ $S = 0,86$ $RSD = 1,24\%$ $S_{\bar{x}} = 0,5$ $\Delta\bar{X} = 1,45$ $\varepsilon = \pm 2,09\%$
	205,5	68,51	
	207,39	69,13	

1000,0	674,3	67,43	$\bar{X} = 67,77$ $S = 1,99$ $RSD = 2,92\%$ $S_{\bar{x}} = 1,15$ $\Delta\bar{X} = 3,36$ $\varepsilon = \pm 4,96\%$
	659,7	65,97	
	699,1	69,91	

Таблица 16. Оценка эффективности метода А.А. Васильевой для выделения клопидогрель карбоновой кислоты

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	48,26	64,35	$\bar{X} = 65,46$ $S = 0,97$ $RSD = 1,48\%$ $S_{\bar{x}} = 0,56$ $\Delta\bar{X} = 1,63$ $\varepsilon = \pm 2,49\%$
	49,59	66,12	
	49,43	65,91	
300,0	197,1	65,71	$\bar{X} = 65,28$ $S = 1,88$ $RSD = 2,92\%$ $S_{\bar{x}} = 1,09$ $\Delta\bar{X} = 3,17$ $\varepsilon = \pm 4,86\%$
	189,6	63,22	
	200,7	66,91	
1000,0	672,3	67,23	$\bar{X} = 65,84$ $S = 1,23$ $RSD = 1,87\%$ $S_{\bar{x}} = 0,71$ $\Delta\bar{X} = 2,08$ $\varepsilon = \pm 3,16\%$
	653,7	65,37	
	649,0	64,91	

Согласно полученным данным (таблица 15, 16) методом А.А. Васильевой можно выделить 67,77-69,28% клопидогреля при рН=10, при этом относительная ошибка определения 3,56%; при рН = 4 можно выделить 65,28-65,84% клопидогрель карбоновой кислоты, относительная ошибка определений 3,5%.

5.1.2. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой, подкисленной серной кислотой (метод В.Ф. Крамаренко)

Исследование проводилось с модельными образцами тканей печени животных. 10,0 г измельченной печени переносили в химические стаканы, добавляли 2,00 мл водного раствора клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты, содержащего 75, 300 и 1000,0 мг клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты. Смесь тщательно перемешивали и оставляли на сутки. Изолирование проводили согласно методике, описанной в разделе 2.2.

Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты проводили с помощью разработанной ВЭЖХ-методики (канал – 280 нм; объем пробы – 2 мкл) как описано выше (раздел 3.3) в 2,00 мл полученного хлороформного извлечения 2 после ТСХ-очистки извлечения по разработанной ранее методике с помощью 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной (см. раздел 5.1.1.).

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из модельных проб печени по методу В.Ф. Крамаренко приведены в таблицах 17, 18.

Таблица 17. Оценка эффективности метода В.П.Крамаренко для выделения клопидогрела

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	42,85	61,22	$\bar{X} = 61,04$ $S = 1,42$ $RSD = 2,33\%$ $S_{\bar{X}} = 0,82$ $\Delta\bar{X} = 3,54$ $\varepsilon = \pm 5,79\%$
	46,78	62,37	
	44,66	59,54	
300,0	184,32	61,44	$\bar{X} = 62,50$ $S = 0,93$

	189,6	63,20	RSD = 1,49% $S_{\bar{X}} = 0,54$ $\Delta\bar{X} = 1,57$ $\varepsilon = \pm 4,36\%$
	188,58	62,86	
1000,0	633,81	63,38	$\bar{X} = 62,69$ $S = 0,81$ RSD = 1,29% $S_{\bar{X}} = 0,47$ $\Delta\bar{X} = 1,37$ $\varepsilon = \pm 3,76\%$
	620,90	62,89	
	817,92	61,79	

Таблица 18. Оценка эффективности метода В.П. Крамаренко для выделения клопидогрель карбоновой кислоты

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	45,02	60,03	$\bar{X} = 60,11$ $S = 0,69$ RSD = 1,15% $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta\bar{X} = 1,16$ $\varepsilon = \pm 1,93\%$
	44,6	59,47	
	45,63	60,84	
300,0	180,12	60,04	$\bar{X} = 60,27$ $S = 0,68$ RSD = 1,13% $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta\bar{X} = 1,15$ $\varepsilon = \pm 1,91\%$
	179,19	59,73	
	183,12	61,04	
1000,0	574,2	59,42	$\bar{X} = 59,35$ $S = 0,71$ RSD = 1,2% $S_{\bar{X}} = 0,41$ $\Delta\bar{X} = 1,19$ $\varepsilon = \pm 2,01\%$
	529,8	60,02	
	586,1	58,61	

Согласно полученным данным (табл.17, 18) методом В.Ф. Крамаренко можно выделить 61,04-62,69% клопидогрела при рН=10, при этом относительная ошибка определения 4,64%; при рН = 4 можно выделить 59,35-60,27% клопидогрель карбоновой кислоты, относительная ошибка определений 1,95%.

5.1.3. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой (метод Стаса-Отто)

Модельную пробу готовили, как описано в разделе 2.1. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом Стаса - Отто выполняли по методике, описанной в разделе 2.2.

Обнаружение и идентификацию клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных экстрактах из биологического материала проводили методами ТСХ (см. раздел 3.1) и УФ-спектрофотометрии по методикам, приведенным выше (см. раздел. 3.3).

Обнаружить клопидогрел и клопидогрель карбоновую кислоту в полученных извлечениях не удалось (рис.18 А).

В связи с тем, что метод Стаса-Отто предполагает применение этилового спирта, в котором клопидогрел не растворим, произвели модификацию данного метода, а именно абсолютный этанол 96% заменили на метиловый спирт. И повторили вышеописанную методику (см. раздел 2.2) [4].

По 5, 10 и 100 мкл полученного эфирного извлечения использовали для идентификации клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ (см. раздел 3.1) (рис. 18 Б) и УФ-спектрофотометрическим методом, описанным выше (см. раздел 3.3).

Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты проводили с помощью разработанной ВЭЖХ-методики (раздел 3.3) после ТСХ-очистки извлечения по разработанной ранее методике с помощью 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной (см. раздел 5.1.1.).

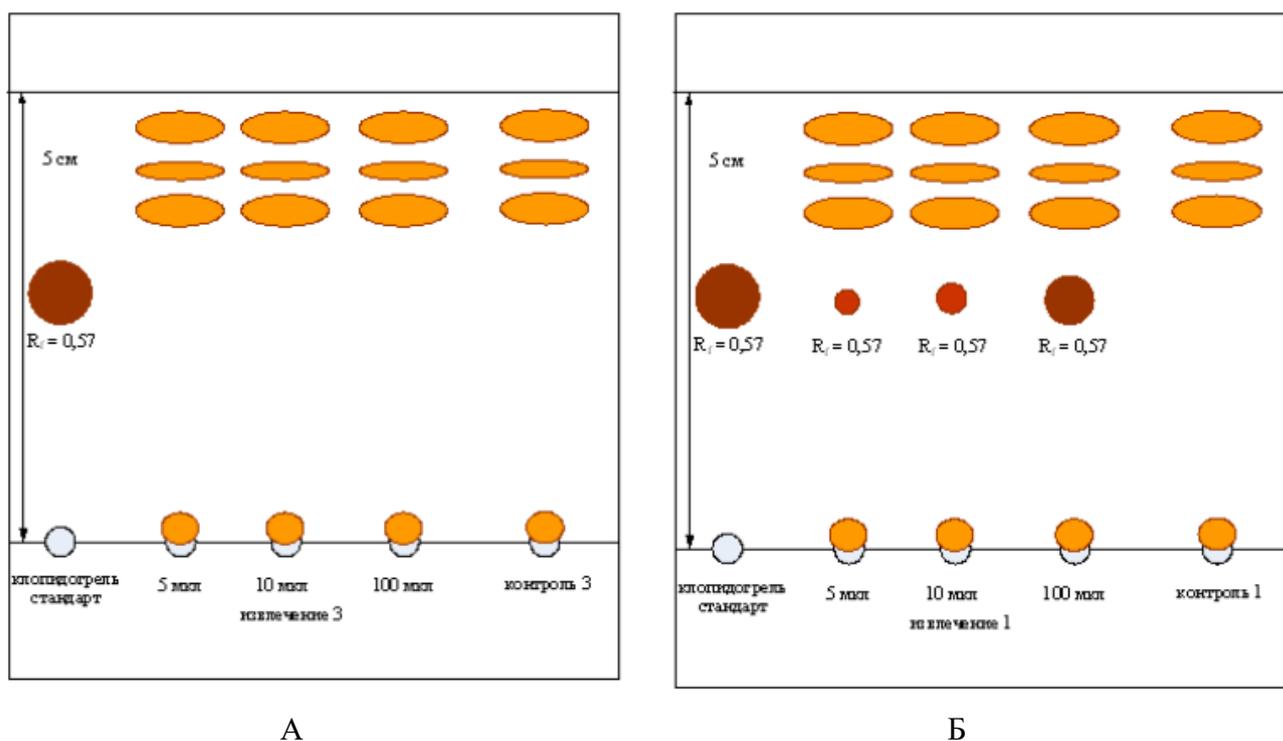


Рисунок 18. Идентификация клопидогрела ТСХ-методом, изолированного по методу Стаса-Отто: А Идентификация клопидогрела методом Стаса-Отто (классический метод), Б- идентификация клопидогрела методом Стаса-Отто (модифицированный метод)

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из модельных проб печени по методу Стаса-Отто приведены в таблицах 19, 20.

Таблица 19. Оценка эффективности метода Стаса-Отто для выделения клопидогрела

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	45,16	60,21	$\bar{X} = 60,83$ $S = 0,62$ $RSD = 1,02\%$ $S_{\bar{x}} = 0,36$ $\Delta\bar{X} = 1,05$ $\varepsilon = \pm 1,72\%$
	46,09	61,45	
	45,63	60,84	

300,0	185,25	61,75	$\bar{X} = 61,44$ $S = 0,88$ $RSD = 1,43\%$ $S_{\bar{x}} = 0,51$ $\Delta\bar{X} = 1,49$ $\varepsilon = \pm 2,42\%$
	181,32	60,44	
	186,36	62,12	
1000,0	620,3	62,03	$\bar{X} = 61,53$ $S = 0,46$ $RSD = 0,75\%$ $S_{\bar{x}} = 0,27$ $\Delta\bar{X} = 0,78$ $\varepsilon = \pm 1,26\%$
	614,4	61,44	
	611,2	61,12	

Таблица 20. Оценка эффективности метода Стаса-Отто для выделения клопидогрель карбоновой кислоты

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	45,07	60,09	$\bar{X} = 60,09$ $S = 0,62$ $RSD = 1,03\%$ $S_{\bar{x}} = 0,36$ $\Delta\bar{X} = 1,05$ $\varepsilon = \pm 1,74\%$
	44,6	59,47	
	45,53	60,71	
300,0	180,12	60,04	$\bar{X} = 61,27$ $S = 1,57$ $RSD = 2,56\%$ $S_{\bar{x}} = 0,91$ $\Delta\bar{X} = 2,65$ $\varepsilon = \pm 4,32\%$
	182,19	60,73	
	189,12	63,04	
1000,0	621,3	62,13	$\bar{X} = 61,91$ $S = 0,8$ $RSD = 1,29\%$ $S_{\bar{x}} = 0,46$ $\Delta\bar{X} = 1,35$ $\varepsilon = \pm 2,19\%$
	610,2	61,02	
	625,8	62,58	

Согласно полученным данным (табл. 19, 20) методом Стаса-Отто можно выделить 60,83-61,53% клопидогреля при $pH=10$, при этом относительная ошибка определения 1,8%; при $pH = 4$ можно выделить 60,09-61,91% клопидогрель карбоновой кислоты, относительная ошибка определений 2,75% [4].

5.1.4. Изолирование клопидогрель карбоновой кислоты подщелочённой водой (метод П.Валова)

Модельную пробу готовили, как описано в разделе 2.1. Изолирование клопидогрель карбоновой кислоты методом П. Валова выполняли по методике, описанной в разделе 2.2.

По 5, 10 и 100 мкл полученного хлороформного извлечения использовали для идентификации клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ (см. раздел 3.1.).

Количественное определение клопидогрель карбоновой кислоты проводили ВЭЖХ-методом (см. раздел 3.3.2) в 10 мл полученного хлороформного извлечения. Исследование методом ВЭЖХ проводили после очистки полученного хлороформного извлечения по методу ТСХ (см. раздел 5.1.1.).

Полученные результаты приведены в табл. 21.

Таблица 24. Оценка эффективности метода П. Валова для выделения клопидогрель карбоновой кислоты

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	51,24	68,32	$\bar{X} = 68,32$ $S = 1,09$ $RSD = 1,6\%$ $S_{\bar{X}} = 0,63$ $\Delta\bar{X} = 1,83$ $\varepsilon = \pm 2,68\%$
	52,06	69,41	
	50,43	67,24	

300,0	205,38	68,46	$\bar{X} = 67,83$ $S = 0,67$ $RSD = 0,99\%$ $S_{\bar{X}} = 0,39$ $\Delta\bar{X} = 1,12$ $\varepsilon = \pm 1,66\%$
	201,39	67,13	
	203,67	67,89	
1000,0	689,4	68,94	$\bar{X} = 68,42$ $S = 0,48$ $RSD = 0,7\%$ $S_{\bar{X}} = 0,28$ $\Delta\bar{X} = 0,81$ $\varepsilon = \pm 1,19\%$
	683,2	68,32	
	679,9	67,99	

Согласно полученным данным (табл. 20) методом П.Валова можно выделить 67,83-68,42% клопидогрель карбоновой кислоты, относительная ошибка определений 1,84%.

5.1.5. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты водой, подкисленной серной кислотой (метод В.И. Поповой)

Исследование проводилось с модельными образцами тканей печени животных. По 10,0 г измельченной печени переносили в химические стаканы, добавляли по 2,00 мл водного раствора клопидогрела, содержащего 75, 300 и 1000,0 мг клопидогрель-основания. Смесь тщательно перемешивали и оставляли на сутки. Изолирование проводили согласно методике, описанной в разделе 2.2. Параллельно проводили исследование с модельными образцами тканей печени животных и для клопидогрель карбоновой кислоты, содержащей 75, 300 и 1000,0 мг вещества. По 10,0 г измельченной печени переносили в химические стаканы, добавляли по 2,00 мл водного раствора клопидогрель карбоновой кислоты, изолирование проводили согласно методике, описанной в разделе 2.2.

Количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты проводили с помощью разработанной ВЭЖХ-методики (канал – 280 нм; объем пробы – 2 мкл) как описано выше (раздел 3.2.2) в 2,00 мл полученного

хлороформного извлечения 2 после ТСХ-очистки извлечения по разработанной ранее методике с помощью 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной (см. раздел 5.1.1.).

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из модельных проб печени по методу В.И. Поповой приведены в таблицах 22, 23.

Таблица 22. Оценка эффективности метода В.И. Поповой для выделения клопидогрела

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	54,02	72,03	$\bar{X} = 70,56$ $S = 1,28$ $RSD = 1,025\%$ $S_{\bar{X}} = 0,74$ $\Delta\bar{X} = 2,17$ $\varepsilon = \pm 3,07\%$
	52,23	69,64	
	52,52	70,02	
300,0	210,42	70,14	$\bar{X} = 70,07$ $S = 0,79$ $RSD = 1,13\%$ $S_{\bar{X}} = 0,45$ $\Delta\bar{X} = 1,33$ $\varepsilon = \pm 1,89\%$
	207,75	69,25	
	212,55	70,82	
1000,0	698,8	69,88	$\bar{X} = 70,67$ $S = 0,78$ $RSD = 1,1\%$ $S_{\bar{X}} = 0,45$ $\Delta\bar{X} = 1,32$ $\varepsilon = \pm 1,86\%$
	714,4	71,44	
	706,8	70,68	

Таблица 23. Оценка эффективности метода В.И. Поповой для выделения клопидогрель карбоновой кислоты

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	51,79	69,03	$\bar{X} = 70,04$ $S = 0,93$ $RSD = 1,33\%$ $S_{\bar{X}} = 0,54$ $\Delta\bar{X} = 1,57$ $\varepsilon = \pm 2,24\%$
	52,68	70,24	
	53,15	70,86	
300,0	204,36	68,12	$\bar{X} = 69,46$ $S = 1,20$ $RSD = 1,73\%$ $S_{\bar{X}} = 0,69$ $\Delta\bar{X} = 2,02$ $\varepsilon = \pm 2,91\%$
	211,29	70,43	
	209,52	69,84	
1000,0	705,6	70,56	$\bar{X} = 69,91$ $S = 0,73$ $RSD = 1,04\%$ $S_{\bar{X}} = 0,42$ $\Delta\bar{X} = 1,23$ $\varepsilon = \pm 1,76\%$
	700,4	70,04	
	691,2	69,12	

Согласно полученным данным (табл. 22, 23) методом В.И. Поповой можно выделить в среднем 71% клопидогрела при рН=10, при этом относительная ошибка определения 2,27%; при рН = 4 можно выделить в среднем 70% клопидогрель карбоновой кислоты, относительная ошибка определений 2,3%.

5.1.6. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты хлороформом

Как было указано выше, клопидогрел характеризуется липофильными свойствами ($\log P = 3.84$) (см. раздел.4), поэтому было целесообразным провести

исследование относительно установления эффективности изолирования клопидогрела и его неактивного метаболита клопидогрель карбоновой кислоты липофильным растворителем-хлороформом. Методика, предложенная проф. В. В. Болотовым с соавторами [21], заключалась в элюировании токсиканта хлороформом из навески биологического материала, предварительно гомогенизированного растиранием с натрий сульфатом безводным.

Исследование проводилось с модельными образцами печени животного, которые не содержали клопидогрел и его метаболит. К навеске измельченной печени массой 10 г добавляли 1,00 мл водного раствора клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты, содержащего 75, 300 и 1000,0 мг исследуемого вещества. Объект оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Параллельно ставили контрольные опыты с биологическим материалом [3].

Методика изолирования клопидогрела из биологического материала хлороформом

К 10 г модельной пробы биологического материала добавляли 30 г натрия сульфата безводного, смешивали и периодически перемешивали в ступке до образования сыпучей массы (около 2 – 3 часов). В узкую нижнюю часть стеклянной колонки диаметром 17 – 20 мм помещали марлевый тампон, заливали хлороформ (часть от предварительно отмеренного хлороформа объемом 100 мл) и засыпали полученную сыпучую массу, периодически добавляя хлороформ таким образом, чтобы над биологическим материалом постоянно удерживалось «зеркало» толщиной 1 – 2 см, после полного переноса сыпучей массы колонку оставляли на час. Далее над колонкой помещали делительную воронку с остатком хлороформа, который пропускали через колонку со скоростью 60 – 80 капель в минуту, удерживая «зеркало» над биологическим материалом. Хлороформные извлечения собирали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и доводили хлороформом до метки. Данную методику использовали для изолирования клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала.

С целью экстракционной очистки 50 мл полученного извлечения трижды экстрагировали 0,1М раствором хлористоводородной кислоты порциями по 10 мл.

Хлороформные извлечения отделяли и в дальнейшем не исследовали. Водные извлечения объединяли, подщелачивали 25% раствором аммиака до $\text{pH} = 11$ и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 10 мл. Хлороформные извлечения фильтровали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного и доводили хлороформом до метки.

Обнаружение и идентификация клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в полученных экстрактах из биологического материала проводили методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии по методикам, приведенным выше (см. раздел. 3.1 и 3.3).

Обнаружить клопидогрель карбоновую кислоту в полученном извлечении не удалось.

После изолирования препарата с помощью хлороформа (см. раздел. 5.1.4) и ТСХ-очистки экстрактов (см. разд. 5.1.1.) полученный из хроматограмм элюат выпаривали при температуре, не выше $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, и сухой остаток растворяли в 1 мл метанола.

Обнаружение и количественное определение клопидогрела в полученном растворе проводили методом ВЭЖХ по методике, приведенной выше (см.разд.3.2.2). Объем пробы составлял 5 мкл.

Идентифицировали клопидогрел в экстрактах по времени удерживания (t_R) и спектральными характеристиками ($R = S_{\lambda} / S_{210}$). Значения t_R и R клопидогрела, выделенного из биологического материала, совпадали с соответствующими параметрами препарата в стандартном растворе (см. раздел. 3.3.1) и составили $t_R = 13,73 \pm 0,1$ мин. ($n = 5$; $\text{RSD} = 2,94\%$) соответственно.

Хроматограммы полученных веществ представлены на рис. 19.

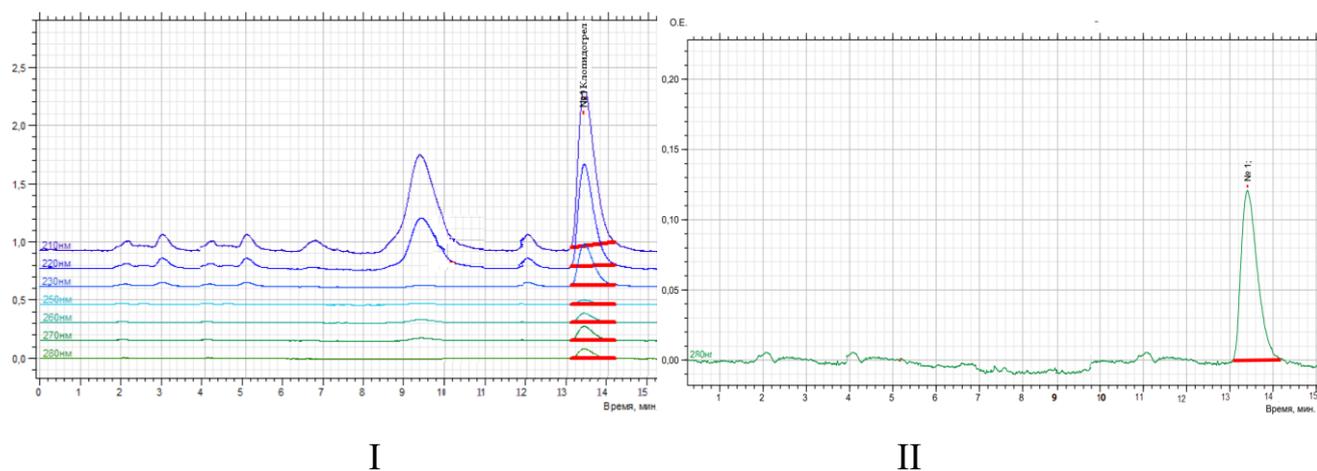


Рисунок 19. Хроматограмма метанольного извлечения клопидогрела из модельных проб печени: I – детектирование в диапазоне 210-280 нм, II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

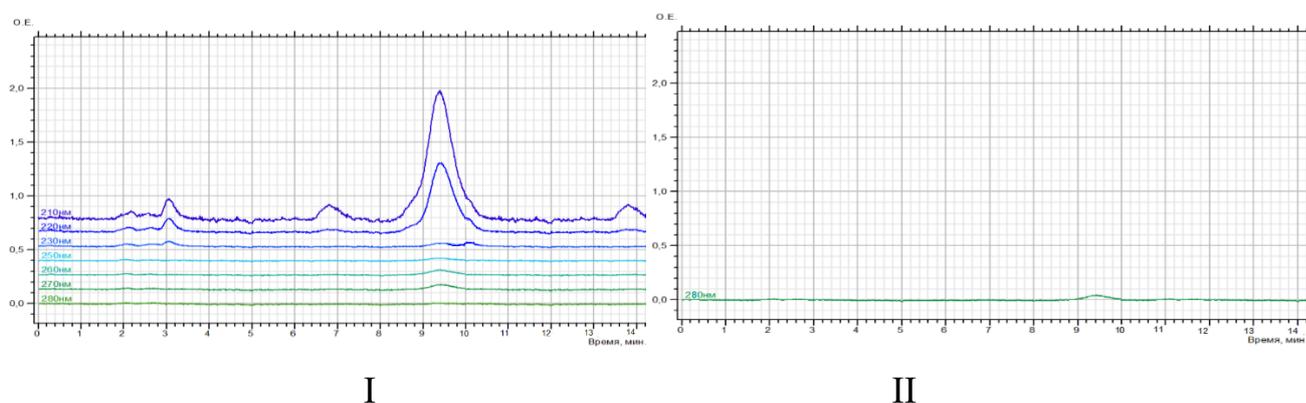


Рисунок 20. Хроматограмма метанольного извлечения из модельных контрольных проб печени: I – детектирование при 210-280 нм, II – детектирование при $\lambda = 280\pm 2$ нм

Как видно из хроматограмм, приведенных на рис. 20, в элюате контрольного опыта отсутствуют пики экстрактивных веществ биологической матрицы в области, соответствующей времени удерживания клопидогрела в условиях детектирования при 280 ± 2 нм.

Количественное определение клопидогрела в экстрактах проводили при 280 ± 2 нм, что соответствует максимальной площади пика клопидогрела на хроматограмме при длине волны 280 нм – $R = 1,0787$. Концентрацию препарата в экстрактах рассчитывали по уравнению калибровочного графика, что

представляло зависимость площади хроматографического пика (y) от концентрации клопидогрела (x, мкг · мл⁻¹): $y = 6 \cdot 10^{-4} x$ (см. разд. 3.2.2).

Степень изолирования клопидогрела из биологического материала R (%) рассчитывали по формуле (2):

Результаты исследования представлены в таблице 24.

Таблица 24. Оценка эффективности извлечения клопидогрела хлороформом

Добавлено клопидогрела к 10,0 г печени, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	62,43	83,24	$\bar{X} = 81,48$ $S = 2,02$ $RSD = 2,48\%$ $S_{\bar{x}} = 1,16$ $\Delta\bar{X} = 3,40$ $\varepsilon = \pm 7,23\%$
	61,44	81,92	
	59,46	79,28	
300,0	252,48	84,16	$\bar{X} = 83,41$ $S = 1,14$ $RSD = 1,37\%$ $S_{\bar{x}} = 0,66$ $\Delta\bar{X} = 1,92$ $\varepsilon = \pm 3,99\%$
	246,3	82,10	
	251,94	83,98	
1000,0	846,91	84,69	$\bar{X} = 81,44$ $S = 3,23$ $RSD = 3,97\%$ $S_{\bar{x}} = 1,86$ $\Delta\bar{X} = 5,44$ $\varepsilon = \pm 11,56\%$
	782,44	78,24	
	813,99	81,40	

Согласно полученным данным, хлороформом можно выделить от 81,44% до 83,41% клопидогрела из модельных проб, относительная ошибка определения составляет 7,59%.

На рисунках 21, 22 представлены результаты сравнительной оценки методов изолирования клопидогрела: А. А. Васильевой, Стаса-Отто, В. П. Крамаренко, В.И. Поповой а также изолирования хлороформом и методов

изолирования клопидогрель карбоновой кислоты: А.А. Васильевой, Стаса-Отто, В.П. Крамаренко, П. Валовой, В.И. Поповой и хлороформом.

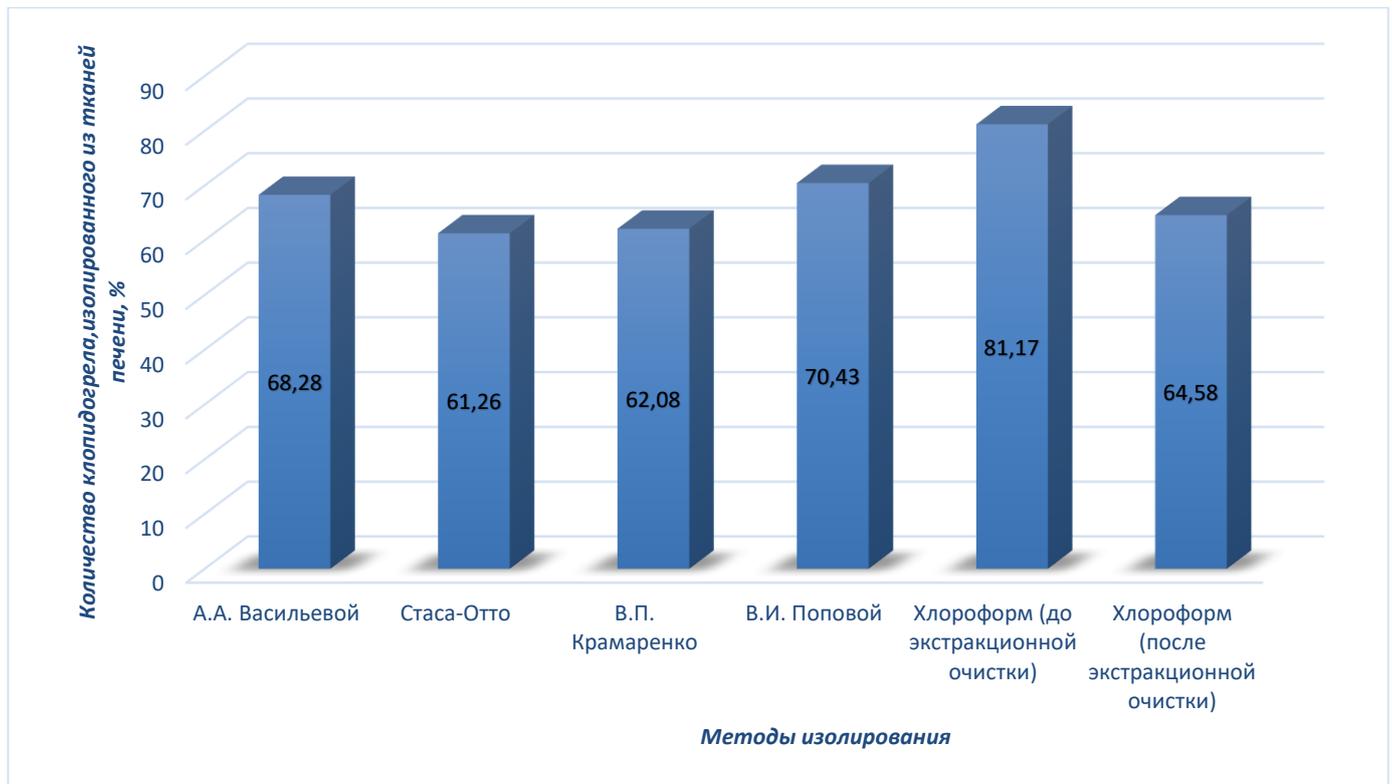


Рисунок 15. Результаты сравнительной оценки методов изолирования клопидогреля

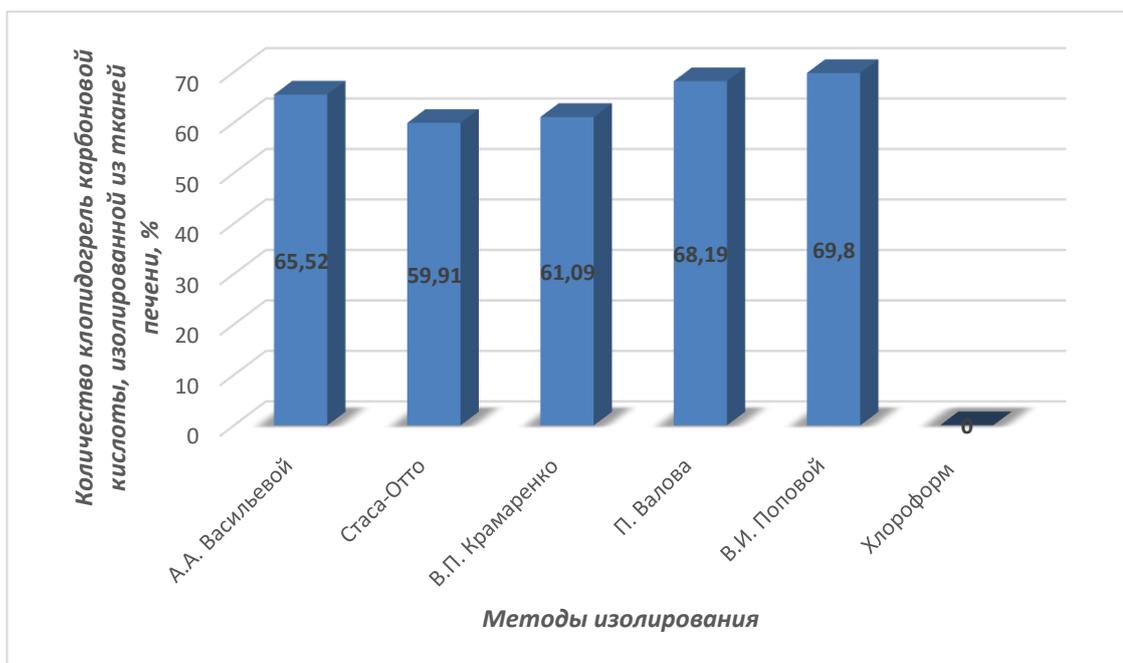


Рисунок 16. Результаты сравнительной оценки методов изолирования клопидогрель карбоновой кислоты

Результаты исследования свидетельствуют, что наиболее эффективным является метод изолирования клопидогрела хлороформом, что обусловлено свойствами вещества, которое легко экстрагируется хлороформом.

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» при 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), подкисленного щавелевой кислотой, обусловлен значительными потерями клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты при многостадийном очищении извлечений.

Разработанные методики могут быть предложены для внедрения в практику работы бюро судебно-медицинской экспертизы и токсикологических центров.

5.2. Выделение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из биологических жидкостей

В рамках настоящего исследования проведена систематическая работа по подбору оптимальных параметров изолирования клопидогрела и его неактивного метаболита - клопидогрель карбоновой кислоты из различных биологических сред. Для экспериментальных исследований были отобраны три типа биологических жидкостей: цельная кровь, плазма крови и моча, как наиболее репрезентативные матрицы для анализа данных соединений.

Для проведения исследований были использованы различные биологические матрицы, отобранные с учетом требований к чистоте образцов и стабильности аналитов. Цельную кровь получали от доноров в Донецком областном центре службы крови. Важно отметить, что использовалась свежая

кровь без добавления антикоагулянтов и консервантов, что исключало возможное влияние дополнительных химических веществ на процесс экстракции. Полученные образцы крови немедленно использовали для приготовления модельных растворов с известными концентрациями аналитов.

Плазму крови, полученную путем центрифугирования цельной крови, хранили в условиях глубокой заморозки при температуре -30°C для сохранения исходных свойств биоматериала. Такой режим хранения обеспечивал стабильность образцов в течение всего периода исследований.

Образцы мочи отбирали у здоровых добровольцев, не принимавших какие-либо лекарственные препараты как минимум за две недели до исследования. Это позволяло исключить возможные интерференции со стороны посторонних фармакологически активных веществ. Мочу хранили в холодильнике при температуре $4-8^{\circ}\text{C}$, что соответствовало стандартным условиям краткосрочного хранения биологических жидкостей. Максимальный срок хранения не превышал 7 суток, что гарантировало сохранение стабильности матрицы.

При выборе экстракционного растворителя мы основывались на предварительных результатах исследований экстракции клопидогрела и его метаболита из тканей печени. Успешное применение хлороформа для изолирования этих соединений из печеночной ткани послужило основанием для тестирования его эффективности при работе с другими биологическими матрицами - кровью и мочой. Такой подход позволил оценить универсальность методики экстракции для различных типов биологического материала.

5.2.1. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из мочи хлороформом

Моча не требует особых условий подготовки проб, поскольку содержит незначительное количество белковых компонентов. За счет невысокой метаболической активности в моче концентрация исследуемых веществ сохраняется значительно дольше, чем в других жидкостях и органах.

Для изолирования использовали метод жидкость - жидкостной экстракции. Клопидогрель и клопидогрель карбоновую кислоту экстрагировали хлороформом с учетом изученных факторов экстракции, описанных в главе 4.

Изолирование клопидогреля из мочи

Модельную смесь подкисляли 0,1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до $\text{pH}=2$ по универсальной индикаторной бумаге и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 5 мл.

Водный слой подщелачивали 50% раствором натрия гидроксида до $\text{pH} = 11$ и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 10 мл. Хлороформные извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили объем хлороформом до метки.

Изолирование клопидогрель карбоновой кислоты из мочи

Модельную смесь подкисляли 0,1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до $\text{pH}=2$ по универсальной индикаторной бумаге и дважды экстрагировали хлороформом порциями по 20 мл. Полученные извлечения объединяли, фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили объем хлороформом до метки.

Клопидогрель и клопидогрель карбоновая кислота были идентифицированы в экстрактах по времени удерживания (t_R) и спектральным характеристикам. Значения t_R клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты, выделенного из мочи, совпадали с соответствующими параметрами препарата и его метаболита для стандартных растворов (см. разд. 3.2.1). На рисунках 23, 25 приведены хроматограммы модельных смесей мочи, содержащих клопидогрель и клопидогрель карбоновую кислоту; на рисунке 24 приведена хроматограмма извлечения из контрольного опыта.

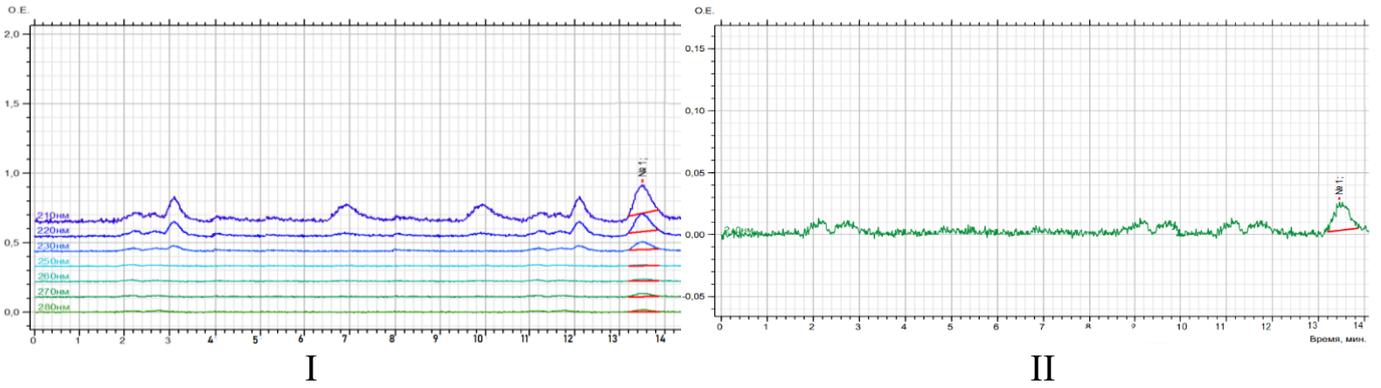


Рисунок 17. Хроматограмма элюата при изолировании клопидогрела из модельной смеси мочи: I – детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

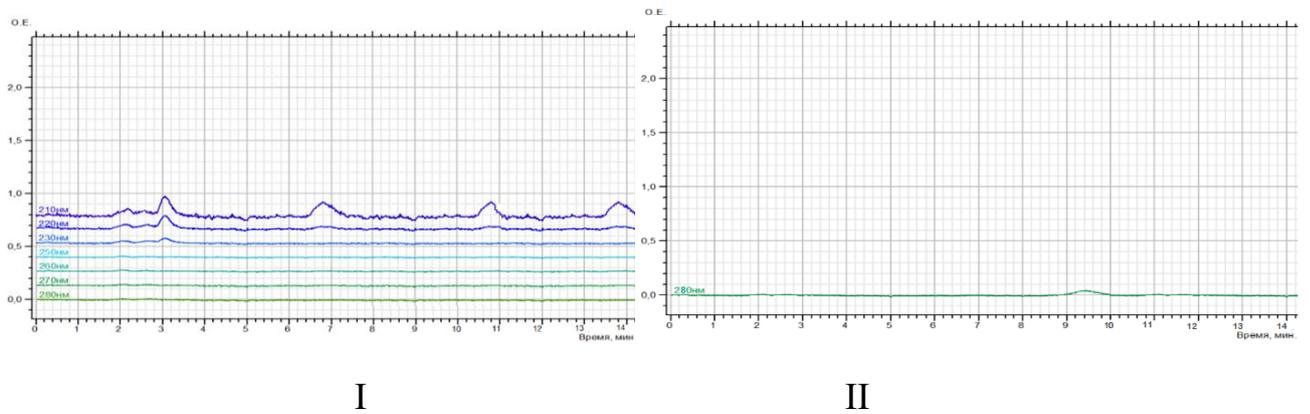


Рисунок 18. Хроматограмма извлечения из контрольного опыта: I – детектирование при $\lambda = 210-280$ нм, II – детектирование при $\lambda = 280\pm 2$ нм.

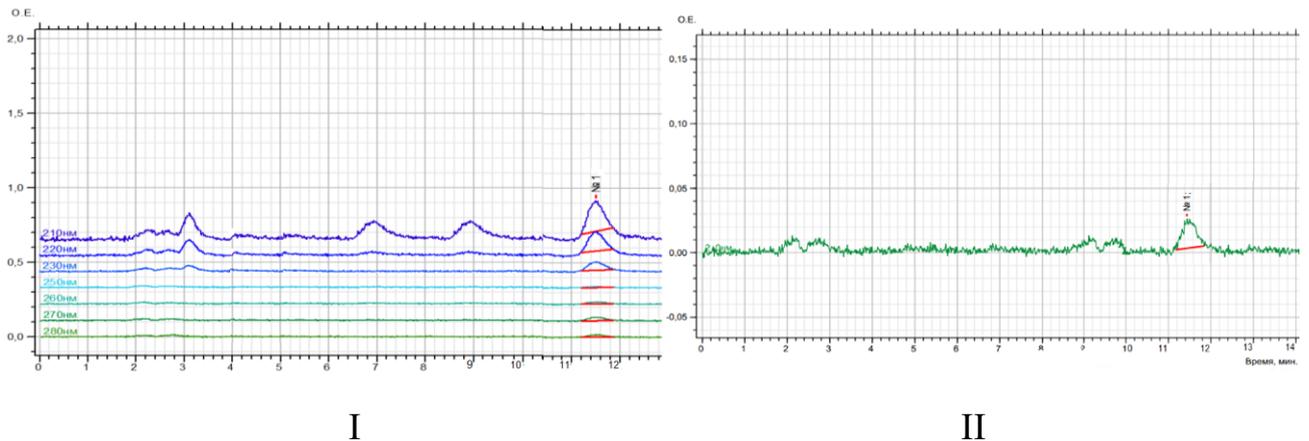


Рисунок 19. Хроматограмма элюата при изолировании клопидогрель карбоновой кислоты из модельной пробы мочи: I – детектирование при λ в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

Как видно из хроматограмм, приведенных на рисунке 24, в извлечении из контрольного опыта отсутствуют пики экстрактивных веществ биологической матрицы в области, соответствующей времени удерживания клопидогрела в условиях детектирования при 280 ± 2 нм.

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из мочи при проведении определения препарата в экстрактах методом ВЭЖХ, приведена в таблицах 25, 26.

Таблица 25. Оценка эффективности извлечения клопидогрела хлороформом из мочи

Добавлено клопидогрела к 10,0 мл мочи, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	55,42	73,90	$\bar{X} = 75,81$ $S = 1,94$ $RSD = 2,59\%$ $S_{\bar{X}} = 1,12$ $\Delta\bar{X} = 3,27$ $\varepsilon = \pm 7,48\%$
	58,33	77,78	
	56,80	75,74	
300,0	228,63	76,21	$\bar{X} = 74,59$ $S = 2,16$ $RSD = 2,89\%$ $S_{\bar{X}} = 1,24$ $\Delta\bar{X} = 3,64$ $\varepsilon = \pm 8,44\%$
	216,42	72,14	
	226,23	75,41	
1000,0	754,4	75,44	$\bar{X} = 76,16$ $S = 1,15$ $RSD = 1,51\%$ $S_{\bar{X}} = 0,66$ $\Delta\bar{X} = 1,94$ $\varepsilon = \pm 4,47\%$
	738,9	73,89	
	761,4	76,14	

Таблица 26. Оценка эффективности извлечения клопидогрель карбоновой кислоты хлороформом

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 мл мочи, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	57,32	76,43	$\bar{X} = 75,36$ $S = 1,11$ $RSD = 1,47\%$ $S_{\bar{x}} = 0,64$ $\Delta\bar{X} = 1,88$ $\varepsilon = \pm 4,31\%$
	55,66	74,21	
	56,59	75,45	
300,0	223,32	74,44	$\bar{X} = 75,51$ $S = 1,25$ $RSD = 1,66\%$ $S_{\bar{x}} = 0,72$ $\Delta\bar{X} = 2,11$ $\varepsilon = \pm 4,84\%$
	230,67	76,89	
	225,63	75,21	
1000,0	759,7	75,97	$\bar{X} = 75,59$ $S = 0,80$ $RSD = 1,06\%$ $S_{\bar{x}} = 0,46$ $\Delta\bar{X} = 1,35$ $\varepsilon = \pm 3,09\%$
	746,7	74,67	
	761,3	76,13	

Как видно из представленных данных в таблицах 25, 26 с помощью хлороформа методом ВЭЖХ можно выделить от 74,59 до 76,16% (относительная ошибка определения 6,92%) клопидогрела и 75,36-75,59% (относительная ошибка определения 4,08%) клопидогрель карбоновой кислоты из мочи.

5.2.2. Изолирование клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из крови

Главными особенностями изолирования клопидогрела из крови, которые обусловлены его физико-химическими свойствами, являются применение 10% раствора трихлоруксусной кислоты для разрушения связи «белок-клопидогрел»,

образование легко растворимо в водном растворе соли-клопидогрела трихлорацетата; очистка водного извлечения от белковых примесей - центрифугирование и от липофильных примесей - экстракцией гексаном; экстрагирование клопидогрел-основы хлороформом при использовании 0,1 г раствора натрия гидроксида (рН 9,0-10,0); очистка хлороформного извлечения от примесей ТСХ-методом.

Для осаждения белков крови использовали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты и 10% раствор трихлоруксусной кислоты.

5.2.2.1. Изолирование клопидогрел и клопидогрель карбоновой кислоты из крови по методике 1 (осадитель белков – 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты)

Методика изолирования. К 10 мл модельной смеси крови добавляли 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до рН = 2. Смесь центрифугировали (в течение 5 мин. при 5000 об/мин), сливали надосадочную жидкость и трижды экстрагировали гексаном порциями по 5 мл. Гексановые извлечения отделяли и в дальнейшем не исследовали.

Водный слой подщелачивали 50% раствором натрия гидроксида до рН = 11 и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 10 мл. Хлороформные извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили хлороформом до метки.

Элюаты из хроматограмм, полученные после ТСХ-очистки (см. раздел 5.1.1.), испаряли, сухой остаток растворили в 1 мл кислоты хлористоводородной и проводили идентификацию и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ по методикам, приведенной выше (см. раздел. 5.1.1) и ВЭЖХ -методике, которая описана в разделе 3.2.

Клопидогрел и клопидогрель карбоновая кислота были идентифицированы в экстрактах по времени удерживания (t_R) и спектральным характеристикам (R).

Значения t_R клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты, выделенного из крови, совпадали с соответствующими параметрами вещества для стандартного раствора (раздел 3.3). На рисунках 26, 27 приведены хроматограммы модельных смесей крови, содержащих клопидогрел и клопидогрель карбоновую кислоту; на рисунке 28 приведена хроматограмма извлечения из контрольного опыта.

Степень изолирования клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из крови при количественном определении препарата в экстрактах из крови методом ВЭЖХ приведены в таблицах 27, 28 [2, 6].

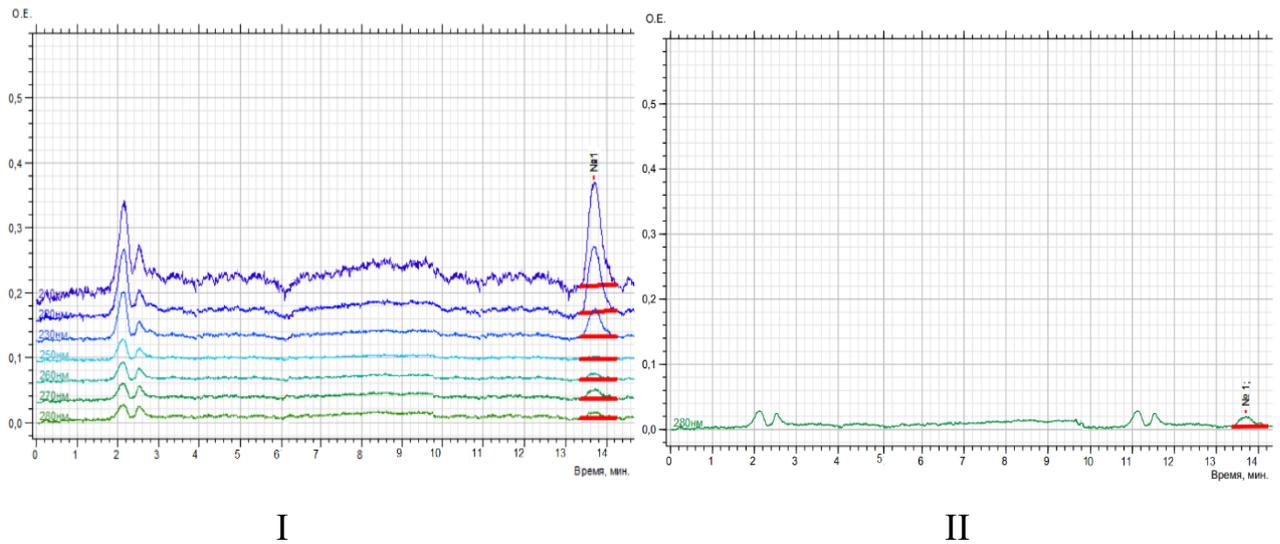


Рисунок 20. Хроматограмма извлечения из модельной смеси крови по методике 1:

I-детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

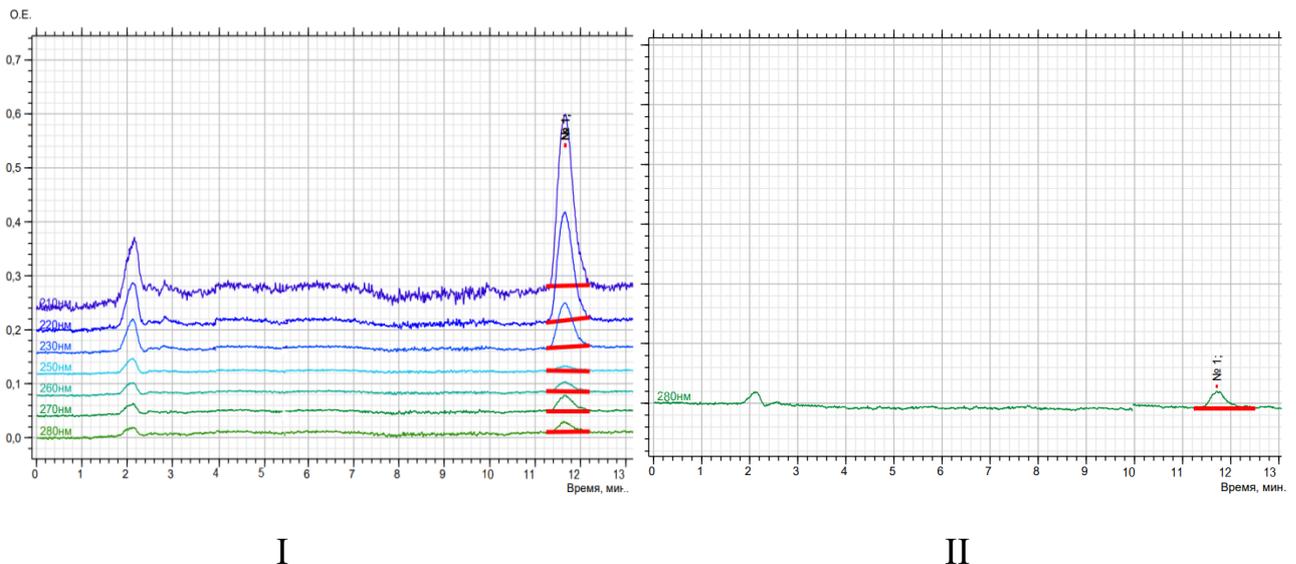
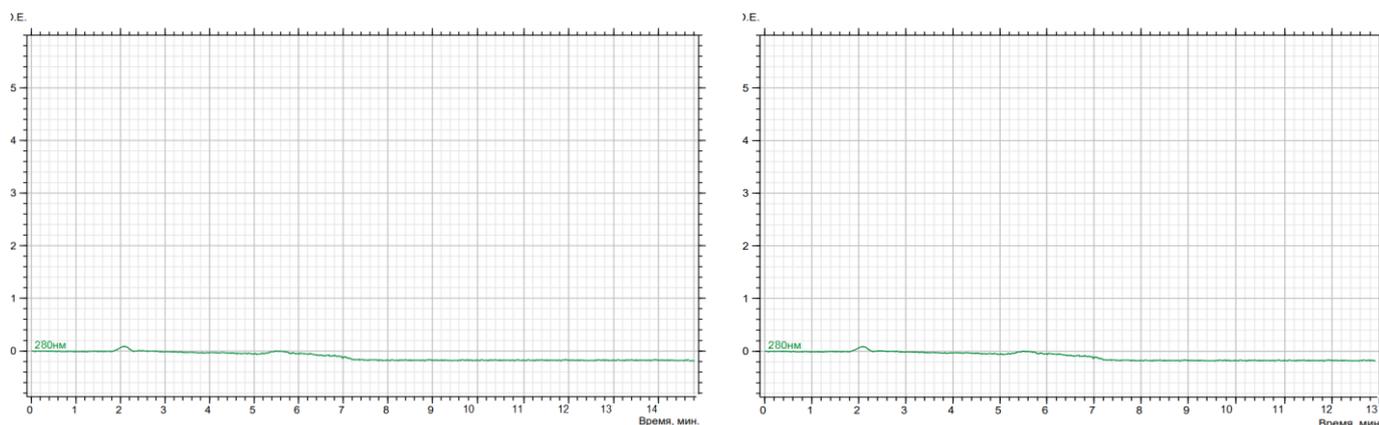


Рисунок 21. Хроматограмма извлечения из модельной смеси крови по методике 1:

I-детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм



I

II

Рисунок 28. Хроматограмма извлечений из контрольного опыта при изолировании из модельных смесей крови по методике 1: I – при исследовании клопидогрела, II – при исследовании клопидогрель карбоновой кислоты

Таблица 27. Оценка эффективности извлечения клопидогрела, выделенного из модельных смесей крови по методике 1

Добавлено клопидогрела к 10,0 мл крови, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	46,48	61,98	$\bar{X} = 61,93$ $S = 1,34$ $RSD = 2,16\%$ $S_{\bar{X}} = 0,77$ $\Delta\bar{X} = 2,25$ $\varepsilon = \pm 6,30\%$
	47,43	63,24	
	45,43	60,57	
150,0	89,76	59,84	$\bar{X} = 61,34$ $S = 1,41$ $RSD = 2,3\%$ $S_{\bar{X}} = 0,81$ $\Delta\bar{X} = 2,37$ $\varepsilon = \pm 6,70\%$
	93,94	62,63	
	92,34	61,56	
300,0	185,34	61,78	$\bar{X} = 62,20$ $S = 1,53$ $RSD = 2.46\%$ $S_{\bar{X}} = 0,88$
	191,67	63,89	

	182,76	60,92	$\overline{\Delta X} = 2,58$ $\varepsilon = \pm 7,17\%$
--	--------	-------	--

Таблица 28. Оценка эффективности извлечения клопидогрель карбоновой кислоты, выделенного из модельных смесей крови по методике 1

Добавлено клопидогрель карбоновой кислоты к 10,0 мл крови, мг	Степень извлечения клопидогрель карбоновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	51,24	68,32	$\overline{X} = 68,14$ $S = 1,93$ $RSD = 2,83\%$ $S_{\overline{X}} = 1,11$ $\overline{\Delta X} = 3,26$ $\varepsilon = \pm 8,27\%$
	52,48	69,98	
	49,60	66,13	
150,0	105,31	70,21	$\overline{X} = 68,60$ $S = 1,54$ $RSD = 2,24\%$ $S_{\overline{X}} = 0,89$ $\overline{\Delta X} = 2,59$ $\varepsilon = \pm 6,54\%$
	102,66	68,44	
	100,72	67,15	
300,0	204,96	68,32	$\overline{X} = 68,62$ $S = 0,71$ $RSD = 1,03\%$ $S_{\overline{X}} = 0,41$ $\overline{\Delta X} = 1,19$ $\varepsilon = \pm 3,00\%$
	208,29	69,43	
	204,36	68,12	

Таким образом, при использовании в качестве осадителя хлористоводородной кислоты и последующей экстракцией хлороформом, можно выделить 61,34-62,20% клопидогрела (относительная ошибка определений 6,72%) и 68,14-68,62% клопидогрель карбоновой кислоты (относительная ошибка определений 5,94%).

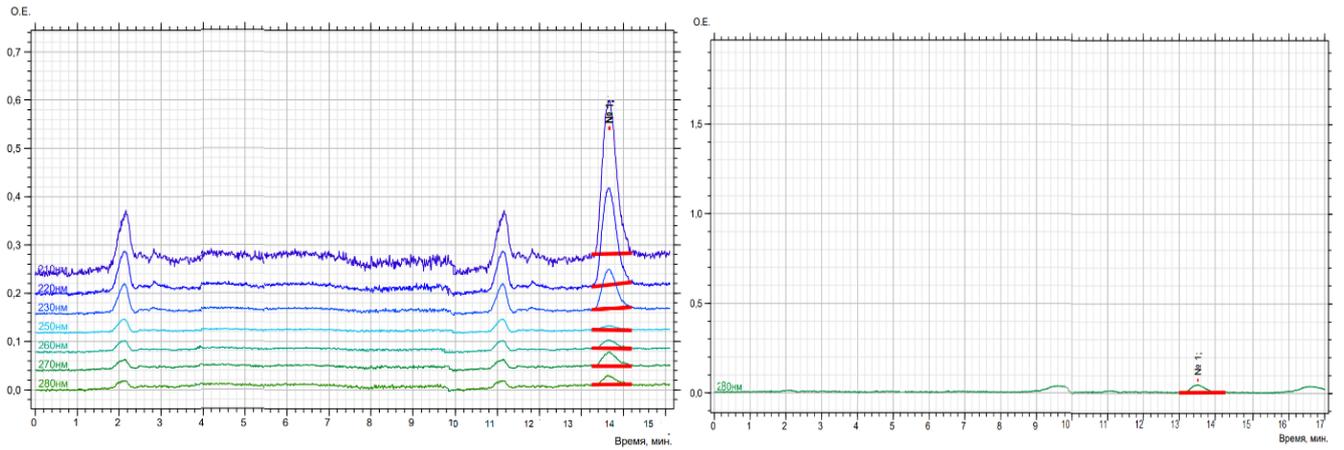
5.2.2.2. Изолирование клопидогрел и клопидогрель карбоновой кислоты из крови по методике 2 (осадитель белков – 10% водный раствор кислоты трихлоруксусной)

Методика изолирования. К 10 мл модельной смеси крови добавляли 10% водный раствор трихлоруксусной кислоты до $\text{pH} = 2$. Смесь центрифугировали (в течение 5 мин. при 5000 об/мин), сливали надосадочную жидкость и трижды экстрагировали гексаном порциями по 5 мл. Гексановые извлечения отделяли и в дальнейшем не исследовали.

Водный слой подщелачивали 50% раствором натрия гидроксида до $\text{pH} = 11$ и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 10 мл. Хлороформные извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили хлороформом до метки.

Элюаты из хроматограмм, полученные после очистки с помощью ТСХ, испаряли, сухой остаток растворяли в 1 мл хлористоводородной кислоты и проводили идентификацию и количественное определение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты методом ТСХ по методикам, приведенной выше (раздел 3.1) и ВЭЖХ (разделы 3.2).

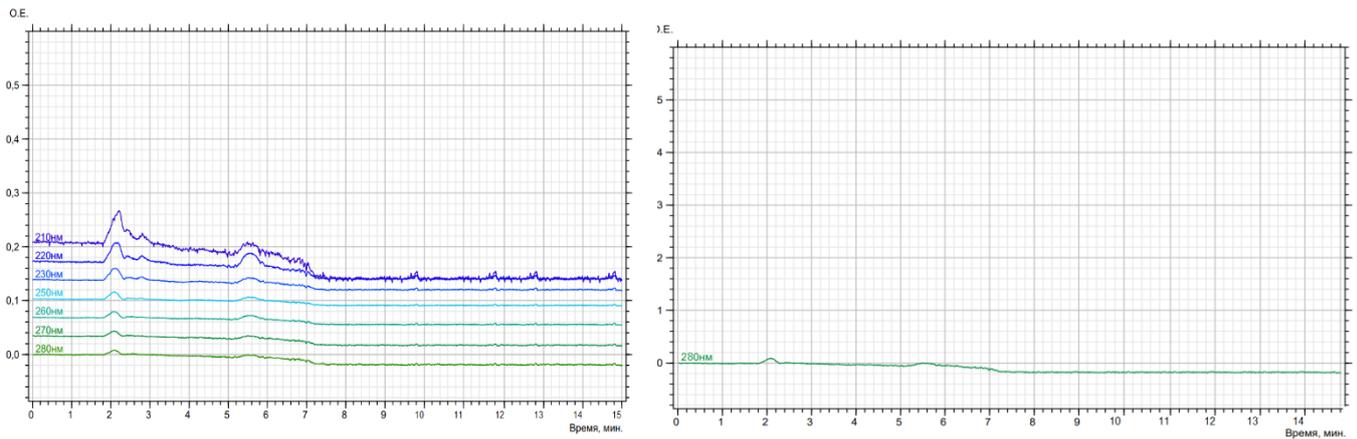
Клопидогрел и клопидогрель карбоновая кислота были идентифицированы в экстрактах по времени удерживания (t_R). Значения t_R клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты, выделенного из крови, совпадали с соответствующими параметрами вещества для стандартного раствора препарата (раздел 3.2). На рисунках 29, 31 приведены хроматограммы модельных смесей крови, содержащих клопидогрел и клопидогрель карбоновую кислоту; на рисунках 30, 32 приведены хроматограммы извлечений из контрольного опыта.



I

II

Рисунок 29. Хроматограмма извлечений клопидогрела из модельной смеси крови по методике 2: I-детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм



I

II

Рисунок 30. Хроматограмма извлечения из контрольного опыта по методике 2: I-детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

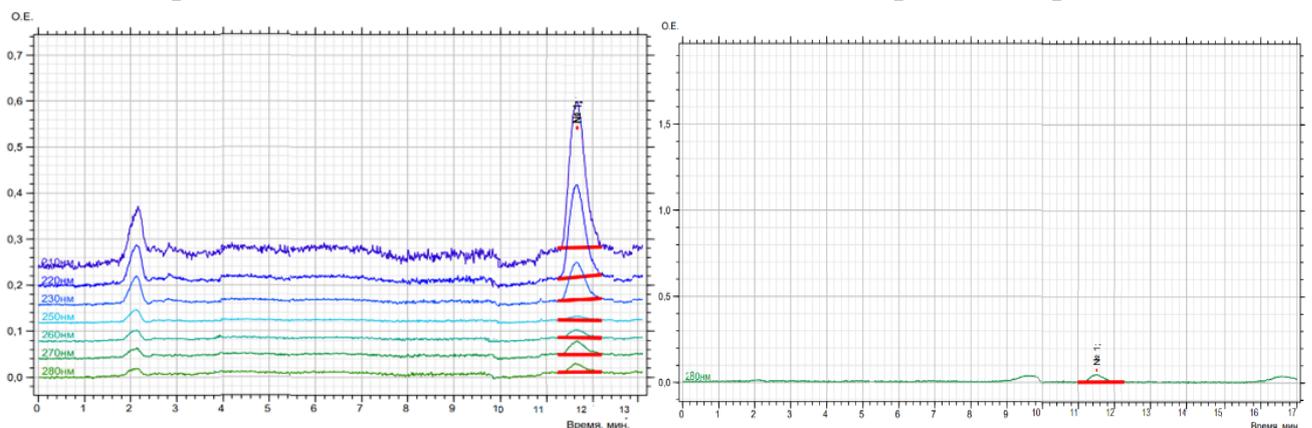
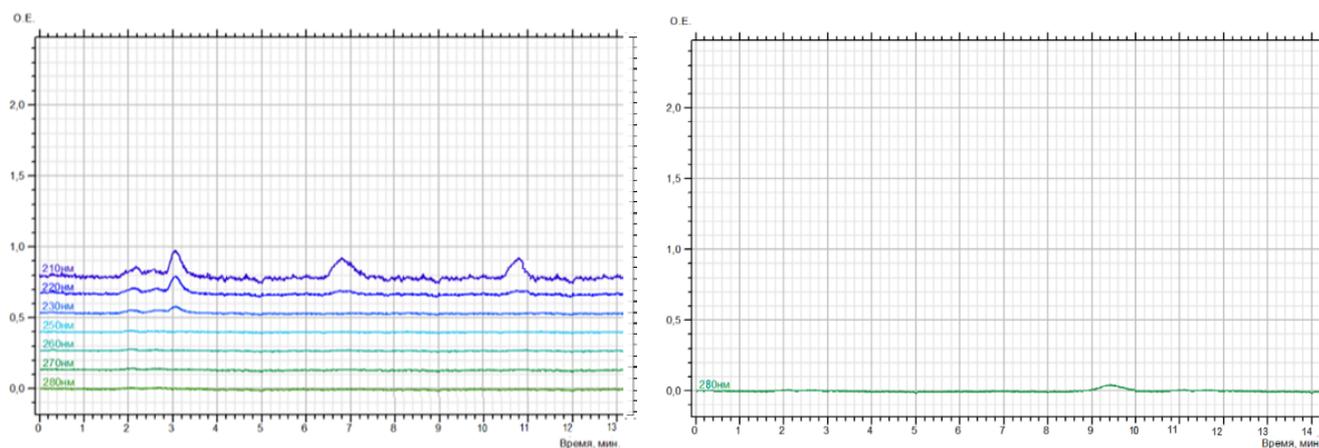


Рисунок 31. Хроматограмма извлечения из модельной смеси крови по методике 2: I-детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм



I

II

Рисунок 32. Хроматограмма извлечения из контрольного опыта по методике 2: I – детектирование в диапазоне 210-280 нм; II – детектирование при $\lambda=280\pm 2$ нм

Степень извлечения клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты из модельных смесей крови методом ВЭЖХ приведена в таблицах 29, 30 [2, 6].

Таблица 29. Оценка эффективности извлечения клопидогрела, выделенного из модельных смесей крови по методике 2

Добавлено клопидогрела к 10,0 мл крови, мг	Степень извлечения клопидогрела		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	43,35	57,80	$\bar{X} = 56,53$ $S = 1,543$ $RSD = 2,72\%$ $S_{\bar{X}} = 0,89$ $\Delta\bar{X} = 2,59$ $\varepsilon = \pm 7,94\%$
	42,72	56,96	
	41,11	54,82	
150,0	83,22	55,48	$\bar{X} = 55,49$ $S = 2,18$ $RSD = 3,93\%$ $S_{\bar{X}} = 1,26$ $\Delta\bar{X} = 3,68$ $\varepsilon = \pm 11,49\%$
	86,67	57,78	
	79,82	53,21	
300,0	170,07	56,69	$\bar{X} = 56,27$ $S = 1,24$

	171,72	57,24	$RSD = 2,2\%$ $S_{\bar{x}} = 0,72$ $\Delta\bar{X} = 2,09$ $\varepsilon = \pm 6,44\%$
	164,61	54,87	

Таблица 30. Оценка эффективности извлечения клопидогрель карбоновой кислоты, выделенной из модельных смесей крови по методике 2

Добавлено клопидогрела к 10,0 мл крови, мг	Степень извлечения клопидогрель кароновой кислоты		Метрологические характеристики (n=3, P=0,95)
	мг	%	
75,0	48,63	65,84	$\bar{X} = 64,68$ $S = 1,15$ $RSD = 1,78\%$ $S_{\bar{x}} = 0,66$ $\Delta\bar{X} = 1,94$ $\varepsilon = \pm 5,19\%$
	48,49	64,65	
	47,65	63,54	
150,0	96,42	64,28	$\bar{X} = 64,17$ $S = 1,99$ $RSD = 3,10\%$ $S_{\bar{x}} = 1,15$ $\Delta\bar{X} = 3,36$ $\varepsilon = \pm 9,07\%$
	99,15	66,10	
	93,18	62,12	
300,0	191,28	63,76	$\bar{X} = 64,77$ $S = 1,01$ $RSD = 1,56\%$ $S_{\bar{x}} = 0,58$ $\Delta\bar{X} = 1,70$ $\varepsilon = \pm 4,55\%$
	197,34	65,78	
	194,31	64,77	

Таким образом, из приведенных табличных данных видно, что при 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 6,27%).

5.3. Распределение клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в органах лабораторных животных

Надежность, воспроизводимость и эффективность разработанных методик изолирования лекарственных веществ из биологического материала, очистка экстрактов от биогенных примесей, идентификации, количественного определения подтверждаются при исследовании органов и биологических жидкостей животных в условиях отравления. Выбор объектов для ХТА также базируется на данных по распределению и локализации исследуемых веществ в организме животных [12].

Данные литературы не содержат сведений о распределении клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоты в органах лабораторных животных. Нами было изучено распределение клопидогрела и его метаболита в органах и тканях лабораторных крыс после внутрижелудочного введения клопидогрела.

Исследования на лабораторных животных проводились при соблюдении принципов биоэтики в соответствии с положением Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), Директивы Совета Европы 2010/63/EU [60, 63].

Для экспериментальных исследований отобраны крысы (самцы), масса 190-200 г и в возрасте 2-3 месяца. Животные содержались в виварии Донецкого Национального медицинского университета согласно санитарно-гигиеническим нормам.

Для проведения эксперимента были сформированы шесть групп крыс массой 190-200 г. Четыре опытные группы получали клопидогрел в различных дозах: две группы - терапевтическую дозу 0,94 мг/кг массы тела, что для животного весом 200 г составляло 0,188 мг препарата; еще две группы -

токсическую дозу 7,5 мг/кг (1,5 мг на 200 г массы тела). Две контрольные группы, по пять животных в каждой, получали эквивалентный объем растворителя без действующего вещества. Выбор дозировок основывался на данных литературы [90], где указанные концентрации соответствуют терапевтическому и токсическому эффектам клопидогрела у лабораторных животных.

Клопидогрел вводили животным однократно, через зонд, в виде водных растворов, которые готовили растворением в воде таблеток Плавикс (75 мг, Pfizer, Франция). После введения у исследуемых животных был свободный доступ к пище и воде.

Животных подвергали декапитации под эфирным наркозом через 3 и 24 часа после введения препарата. Для анализа отбирали мозг, сердце, легкие, печень, желудок, кишечник, кровь и мочу. Мочу собирали в течение 3 и 24 часов с момента введения лекарственного средства. Аналогичные образцы органов и биологических жидкостей брали у контрольных групп. Каждый орган взвешивали, а объем жидкостей фиксировали. При необходимости биоматериал хранили при -20°C [7, 8].

Органые ткани гомогенизировали и обезвоживали путем трехкратного растирания с безводным сульфатом натрия. Полученную сыпучую массу переносили в стеклянные бюретки, оснащенные делительной лейкой, куда добавляли 20 мл хлороформа. Клопидогрел экстрагировали из гомогенизированных тканей хлороформом в соответствии с методикой, описанной в разделе 5.1.6 [3, 8].

Выделение препарата и его метаболита из проб мочи (собранных в течение 3 и 24 часов после введения) проводили по ранее разработанному протоколу [8]. Во всех случаях для экстракции использовали десятикратный объем растворителя относительно массы органа.

Количественное содержание клопидогрела и его метаболита в экстрактах определяли методом УФ-спектрофотометрии, а идентификацию – с помощью ТСХ и ВЭЖХ. В качестве контрольных растворов использовали экстракты, полученные из органов животных контрольной группы.

При проведении тонкослойной хроматографии (ТСХ) хроматограммы визуализировали в УФ-свете (длина волны 278 нм) с последующей обработкой реактивом Драгендорфа. В УФ-свете метаболит клопидогрела проявлял зеленую флуоресценцию, а сам клопидогрел — салатную. После обработки реактивом Драгендорфа на хроматографических пластинках наблюдались коричневые пятна.

Сравнение различных хроматографических систем, рекомендованных ТИАФТ для анализа основных веществ, показало, что наилучшее разделение клопидогрела и его метаболита достигается в системе растворителей хлороформ–ацетон (80:20). Для подтверждения результатов дополнительно использовали систему этанол–концентрированная уксусная кислота–вода (5:3:2).

В таблице 31 представлены значения Rf для клопидогрела и его метаболита, определенные методом ТСХ в образцах органов и биологических жидкостей крыс через 24 часа после введения однократной терапевтической дозы. Анализ проводили в обеих указанных системах растворителей.

Таблица 31. Значение величины Rf клопидогрела и его метаболита, выделенных из тканей и биологических жидкостей крыс (через 24 ч после введения однократной терапевтической дозы)

Исследуемый орган или биологическая жидкость	Система растворителей	Rf					
		Пластика „Sorbfil”		ВЭТСХ		Alugram Sil G/UV254	
		Исследуемое вещество	метаболит	Исследуемое вещество	метаболит	Исследуемое вещество	метаболит
Печень	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,57	0,32	0,96	0,54	0,95	0,57
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,88	0,67	0,85	0,7	0,86	0,68
Желудок	Хлороформ-ацетон (80:20)	-	0,31	-	0,70	-	0,70
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	-	0,66	-	0,68	-	0,67
Кишечник	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,56	0,31	0,95	0,54	0,94	0,56

	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,88	0,66	0,86	0,69	0,87	0,69
Моча	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,57	0,33	0,97	0,55	0,96	0,57
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,88	0,67	0,86	0,71	0,85	0,69
Сыворотка крови	Хлороформ-ацетон (80:20)	-	0,33	-	0,53	-	0,56
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	-	0,67	-	0,68	-	0,68

Через 3 часа после введения препарата: ТСХ-скрининг показал присутствие клопидогрела во всех исследованных биологических образцах. Значения Rf выделенных соединений соответствовали таковым для чистых стандартных веществ. Метаболит клопидогрела был обнаружен в сыворотке крови, печени и моче. Анализ экстрактов из тканей органов, содержимого желудка, тонкого кишечника и крови контрольных животных не выявил присутствия клопидогрела или родственных соединений.

Через 24 часа после введения препарата: клопидогрел обнаружен в печени, кишечнике и моче. Метаболит (клопидогрел карбоновая кислота) выявлен в сыворотке крови, печени, кишечнике и моче. В образцах мозга и сердца ни клопидогрел, ни его метаболит не обнаружены.

Общая концентрация препарата в крови рассчитывалась как сумма количеств, определенных в сыворотке крови и эритроцитарной массе.

Результаты определения концентрации клопидогрела в тканях и биологических жидкостях крыс, отобранных на исследование через 24 ч после введения препаратов в высшей разовой дозе, приведено в таблице 32.

Результаты экспериментального исследования распределения клопидогрела в организме лабораторных животных выявили выраженную органотропность препарата. Наибольшее накопление вещества наблюдалось в печени, что согласуется с ее ключевой ролью в метаболизме ксенобиотиков.

Таблица 32. Результаты количественного определения клопидогрела в органах и биологических жидкостях крыс, отобранных через 24 ч после введения препарата

Орган	Масса органа, г (мл)	Определено клопидогрела	
		Во взятом объекте, мкг	В пересчете на 1 г (1 мл) объекта, мкг
Мозг	1,3±0,79	0,43	0,33
Сердце	0,83±0,11	0,35	0,42
Легкие	2,07±0,55	0,56	0,27
Печень	6,96±1,15	82,88	10,92
Желудок с содержимым	2,03±0,49	5,86	2,88
Кишечник	9,04±2,04	54,43	6,02
Кровь	5,10±1,3	31,13	5,10
Моча	13,44±3,63	89,68	6,67

Анализ количественного распределения показал следующую последовательность убывания концентраций препарата в органах и тканях: печень (максимальное накопление), кишечник, желудок с содержимым, сердце, головной мозг, легкие.

Такая картина распределения отражает как особенности фармакокинетики клопидогрела, так и его тропность к определенным тканям организма. Полученные данные важны для понимания механизмов действия препарата и его потенциальной органоспецифической токсичности.

Полученные данные позволяют сделать важный практический вывод: перечисленные органы представляют наибольшую диагностическую ценность при проведении химико-токсикологических исследований на предмет выявления клопидогрела. Особое внимание следует уделять печени, где регистрируются максимальные концентрации препарата, что связано с особенностями его абсорбции и распределения в организме.

Сравнительная оценка распределения клопидогрела в органах и биологических жидкостях крыс при введении высшей разовой дозы, в пробах биологического материала, отобранного на исследование через 3 ч и 24 ч после введения препаратов, приведена на рисунке 33.

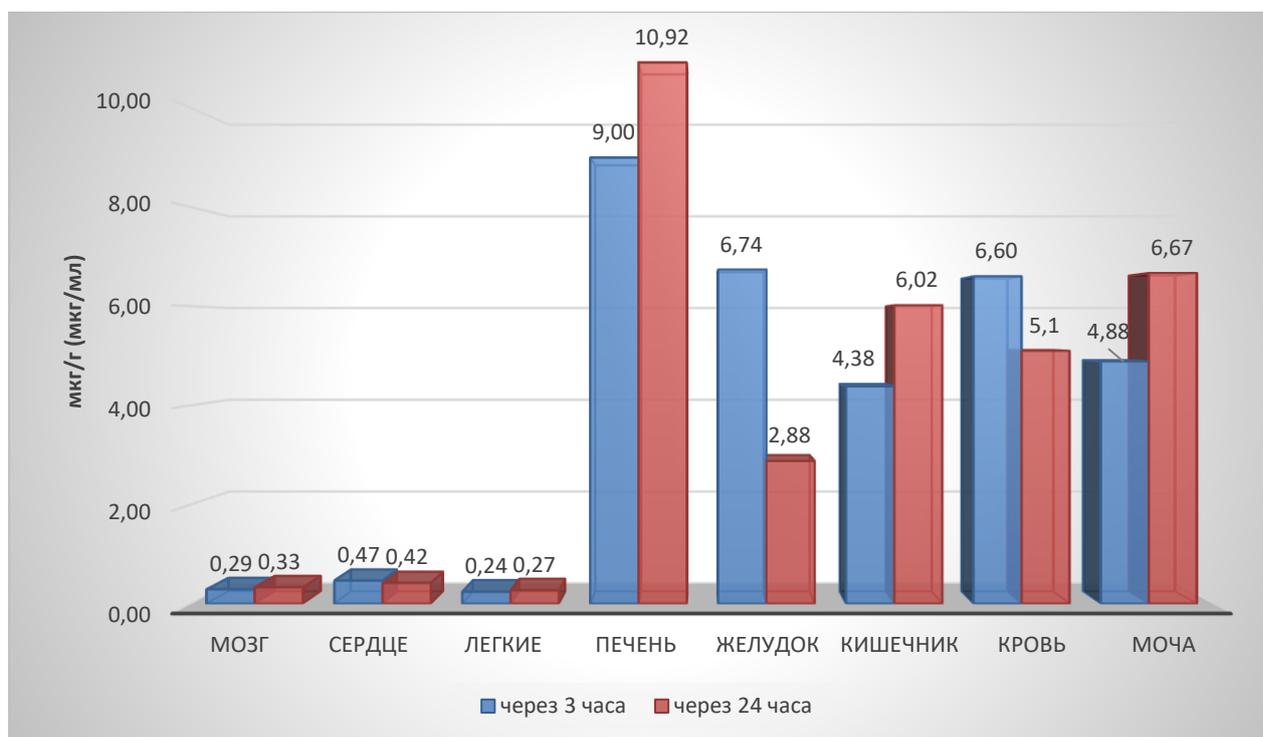


Рисунок 22. Распределение клопидогрела (%) в органах крыс, при исследовании биологического материала через 3 ч и через 24 ч после введение препарата

Будучи липофильным соединением, клопидогрел преимущественно накапливается в желудке в неизменённой форме. При этом в кишечнике и моче его содержание значительно ниже, причём до 90% обнаруженного вещества представлено метаболитами.

На рис. 34 показано количественное соотношение между неизменённым клопидогрелом и его основным метаболитом в образцах органов и биологических жидкостей крыс, полученных через 24 часа после введения максимальных разовых доз препарата.

Исследования показали, что через 3 часа после введения препарата концентрация клопидогрела в крови значительно превышает уровень, наблюдаемый через 24 часа. Такая динамика объясняется относительно коротким периодом полувыведения ($T_{1/2}$) препарата, составляющим в среднем 8 часов.

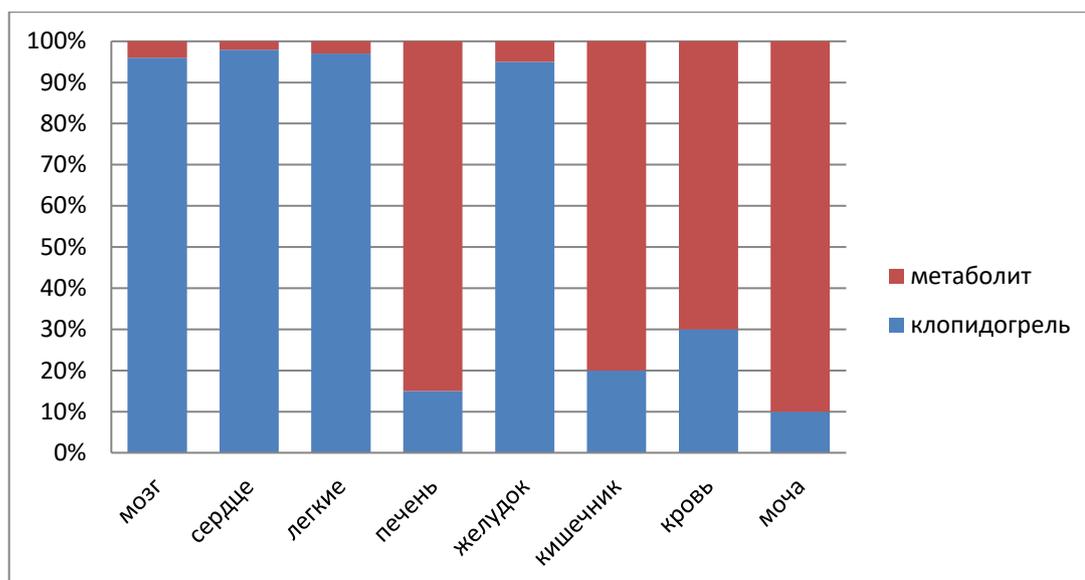


Рисунок 23. Соотношение между уровнем концентрации клопидогрела и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты в органах и биологических жидкостях (через 24 ч. после введения высшей разовой дозы)

Для химико-токсикологического анализа рекомендуется отбирать следующие биологические образцы: желудок с содержимым - как основной депонирующий орган для неизмененного препарата, печень - как орган с наибольшим накоплением метаболитов, мочу - в связи с высоким содержанием основного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) [7]

5.4. Изучение сохраняемости клопидогрела и его метаболита в биологическом материале

Изучение стабильности химических веществ в биологических образцах представляет особую важность для химико-токсикологического анализа. Это обусловлено тем, что органические соединения в процессе разложения биоматериала подвергаются сложным химическим превращениям, что существенно затрудняет их детекцию. На характер этих изменений влияют многочисленные факторы: химическая структура токсиканта, наличие трупной микрофлоры, условия окружающей среды (доступ кислорода, влажность), время, прошедшее после смерти.

Анализ доступной научной литературы не выявил данных о стабильности клопидогрела и его основного метаболита в условиях биodeградации. В связи с этим нами было проведено специальное исследование, направленное на изучение влияния процессов разложения биоматериала на сохранность: исходного соединения (клопидогрела) и его неактивного метаболита в зависимости от времени разложения биоматериала.

Для изучения стабильности клопидогрела и его метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) в условиях биологического разложения были подготовлены модельные пробы. В качестве биологического субстрата использовали измельченную печень (10 г), в которую добавляли по 75 мг исследуемых веществ (либо клопидогрела, либо его метаболита).

Пробы хранили при температуре 5°C в течение различного времени: от 1 недели до 2 месяцев.

После каждого указанного периода хранения проводили экстракцию веществ: для клопидогрела использовали разработанный нами метод (раздел 5.1.6), для метаболита применяли метод Стаса-Отто, рекомендованный для анализа разлагающегося биоматериала (раздел 5.1.3)

Дальнейшая обработка проб включала: очистку экстрактов с помощью гексана и ТСХ (раздел 5.1.1)

Идентификацию веществ проводили методом ТСХ (раздел 3.1), а их количественное определение - методом ВЭЖХ (раздел 3.2). Данный комплекс методов позволил достоверно оценить степень сохранности исследуемых соединений в зависимости от длительности хранения биоматериала.

Результаты исследований представлены на рисунках 35, 36.



Рисунок 24. Содержание клопидогрела в биологическом материале, который подвергся гнилостным изменениям, в зависимости от сроков хранения

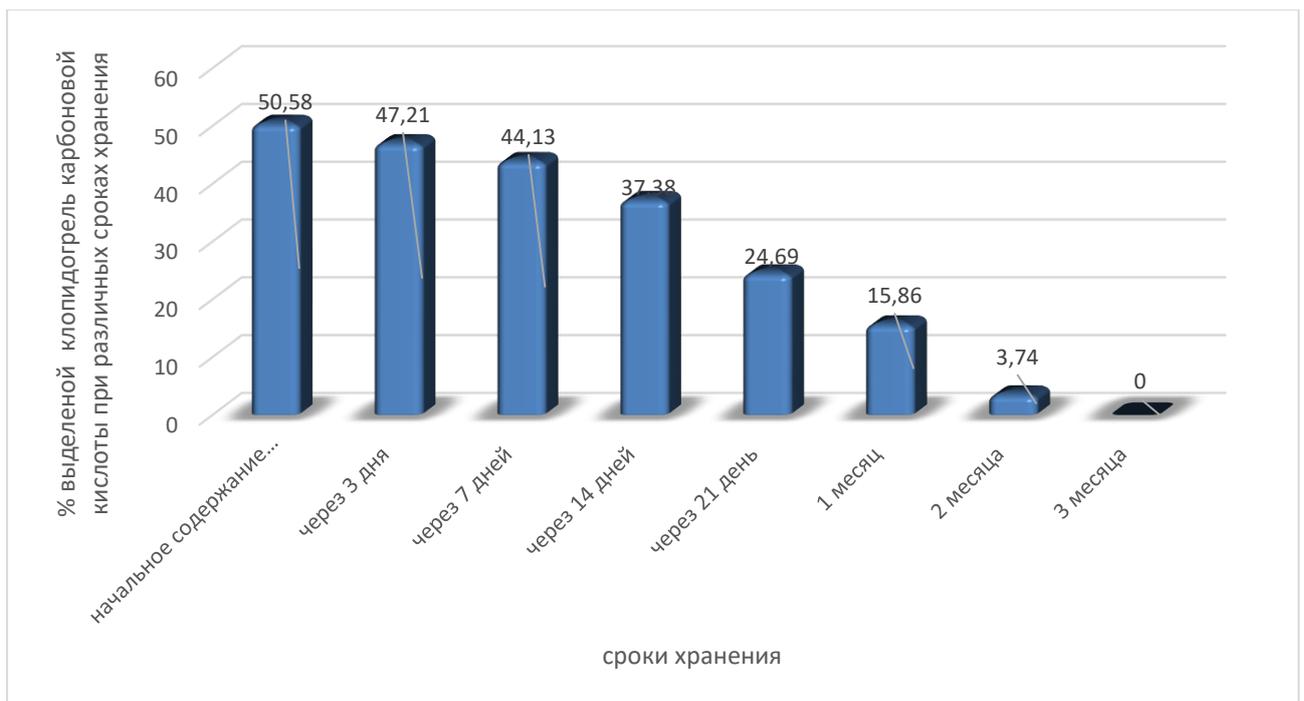


Рисунок 25. Содержание клопидогрель карбоновой кислоты в биологическом материале, который подвергся гнилостным изменениям, в зависимости от сроков хранения

Результаты исследований, представленных на рисунках 35 и 36, свидетельствуют о том, что через 3 суток хранения клопидогрела при гниении в печени трупа можно выделить 3,46% клопидогрела, 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.

Заключение по главе 5

Проведенные исследования позволили сравнить эффективность различных методов выделения клопидогрела и его метаболита - клопидогрел карбоновой кислоты из биологических материалов. Наибольшую эффективность показал метод В.И. Поповой, позволяющий выделить в среднем 71% клопидогрела при рН 10 и 70% его метаболита при рН 4. Хорошие результаты также продемонстрировали метод П. Валовой (68,1% для метаболита) и метод А.А. Васильевой (67,8-69,3% для клопидогрела и 65,3-65,8% для метаболита). Методы Крамаренко и Стаса-Отто оказались менее эффективными с выходом 60-63%.

Особого внимания заслуживает экстракция хлороформом, которая обеспечивает максимальный выход клопидогрела из печени (82,4%). Для мочи экстракция хлороформом позволяет выделить около 75% как клопидогрела, так и его метаболита. При работе с кровью наилучшие результаты достигаются при использовании хлористоводородной кислоты в качестве осадителя с последующей экстракцией хлороформом (61,8% для клопидогрела и 68,4% для метаболита).

Исследования распределения клопидогрела в организме выявили его выраженную органотропность. Наибольшие концентрации вещества обнаружены в печени, что объясняется ее ключевой ролью в метаболизме. Далее по степени накопления следуют кишечник, желудок с содержимым, сердце, головной мозг и легкие. Для химико-токсикологического анализа наиболее информативными биологическими образцами являются желудок с содержимым (как основной депонирующий орган для неизмененного препарата), печень (наибольшее накопление метаболитов) и моча (высокое содержание основного метаболита).

Отдельно изучена стабильность соединений в биологическом материале. Установлено, что клопидогрел полностью разлагается в течение 7 суток (определяемые количества сохраняются до 3 суток - 3,46%). Его метаболит - клопидогрел карбоновая кислота - более устойчив и может быть обнаружен в следовых количествах (3,74%) даже через 2 месяца хранения, полностью исчезая к 3 месяцу.

Полученные результаты имеют важное практическое значение для судебно-химической экспертизы и химико-токсикологического анализа в целом, позволяя оптимизировать выбор биологического материала и методов анализа при исследовании клопидогрела и его метаболитов. Разработанные методики обеспечивают надежное выделение и количественное определение данных соединений из различных биологических матриц.

ГЛАВА 6. 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 клопидогрела и его метаболита, легли в основу алгоритма проведения токсикологического исследования биологических объектов на содержание клопидогрела и его метаболита клопидогрель карбоновой кислоты, что отражено в виде двух схем: судебно-токсикологического исследования биологического материала, крови и мочи на содержание клопидогрела (схемы 1 и 2).

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 клопидогрела в соответствующих биологических объектах.

6.1. Схема токсикологического исследования биологического материала на клопидогрел по нативному веществу

Схема исследования проб внутренних органов и крови на содержание клопидогрела предполагает его выявление в условиях ненаправленного химико-токсикологического исследования, идентификацию и количественное определение в присутствии других лекарственных препаратов (схема 1).

При ненаправленном токсикологическом исследовании проводят изолирование хлороформом (см.разд.5.2.1) с дальнейшей ТСХ-очисткой (см. разд.5.1.1).

Далее проводят ТСХ-скрининг с использованием трех П.Ф. №1 (на любом типе пластин), № 13, №15 на пластинах типа Sorbfil (разд. 3.1). Предварительно

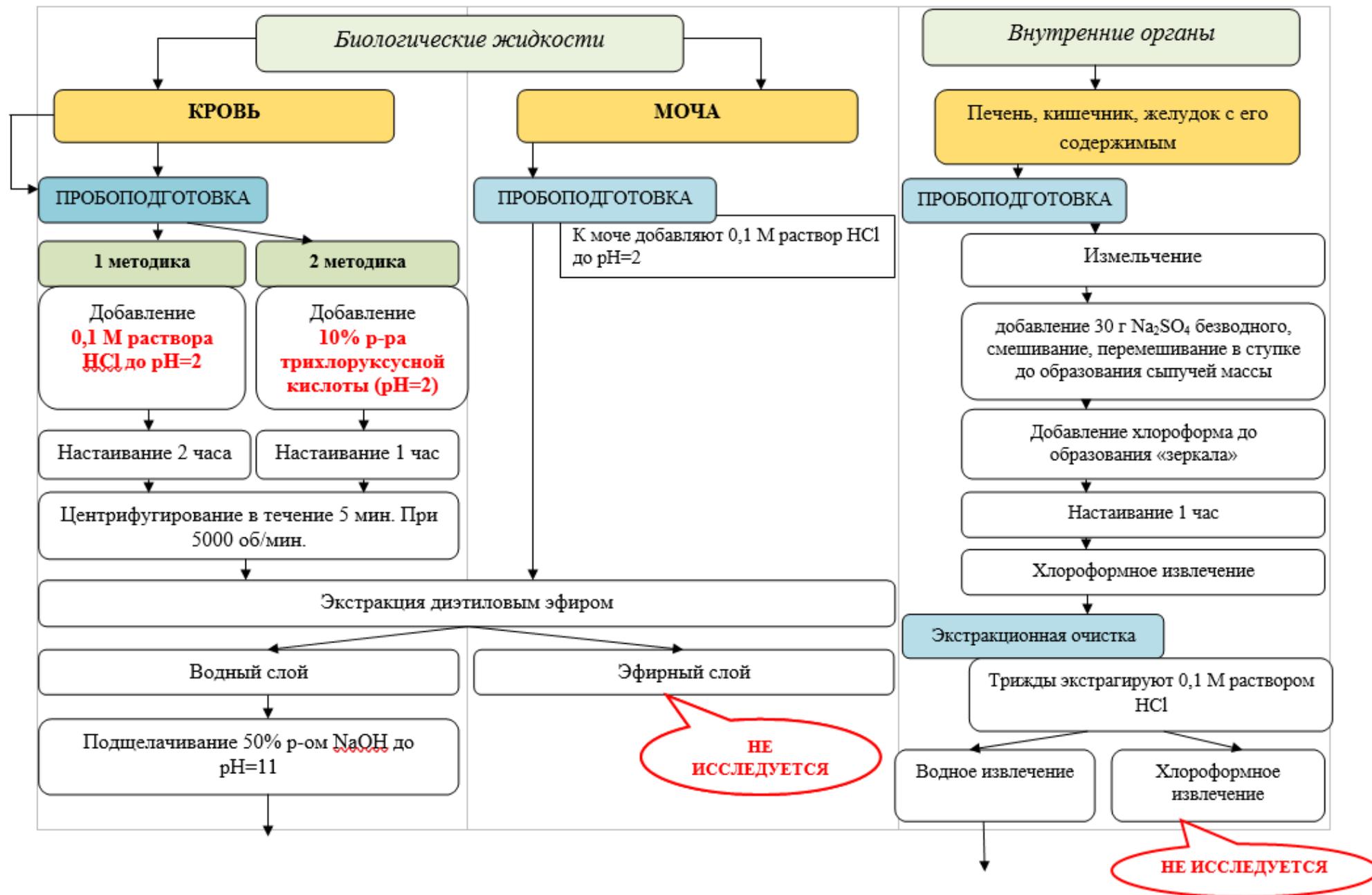
пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от соэкстрактивных веществ – один раз или, при необходимости, дважды (для сгущенных извлечений). В этих условиях клопидогрел остается на линии старта, а соэкстрактивные вещества мигрируют к линии финиша. Хроматографирование проводят в камере объемом 500 см³, в которую вносят 50 мл систем растворителей. Сначала хроматограммы обрабатывают УФ-светом при 278 нм, клопидогрел флуоресцирует салатovým цветом, при обработке хроматограммы реактивом Драгендорфа на полосах 2 и 3 клопидогрел проявляется в виде оранжевых пятен.

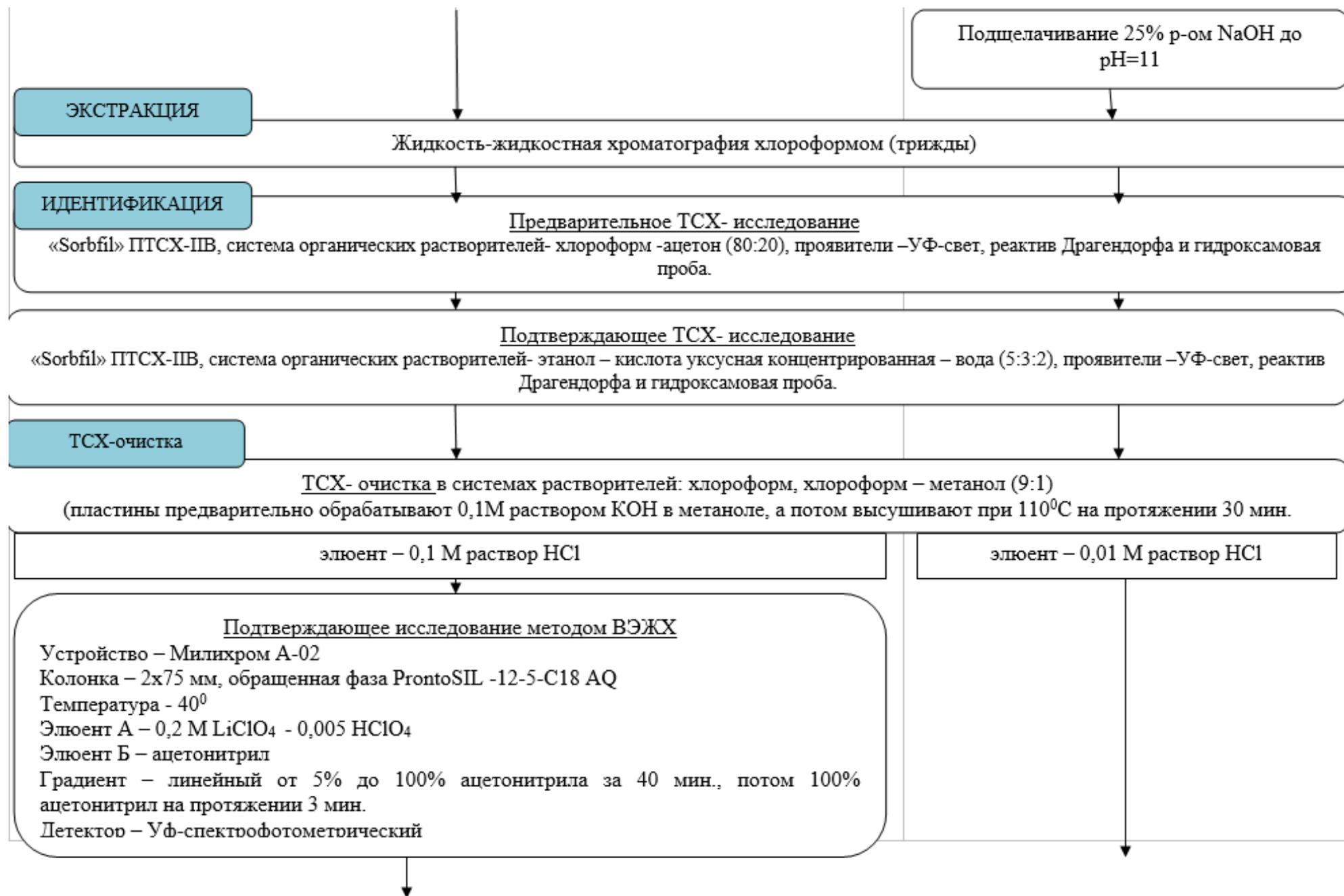
Клопидогрел изолируют из образца крови методом ЖЖЭ (разд. 5.2.2.). Определение клопидогрела проводят также методом ВЭЖХ как по неизменному препарату, так и по его «маркеру» – клопидогрель карбоновой кислоте. Идентификацию клопидогрела проводят по основным хроматографическим параметрам клопидогрела и клопидогрель карбоновой кислоте - абсолютным временем и спектральными характеристиками (см. табл. 10, 11).

Количественное определение клопидогрела проводят по ВЭЖХ-методике в 10 мл полученного извлечения до и после его ТСХ-очистки (см. раздел 5.1.1). Формулируют окончательное заключение об обнаружении и определении клопидогрела.

Представленную схему рекомендовано использовать для целей судебно-токсикологической экспертизы при исследовании биологических объектов на клопидогрел.

Методы определения клопидогрела и его метаболита в крови пригодны для использования в клинической токсикологии.





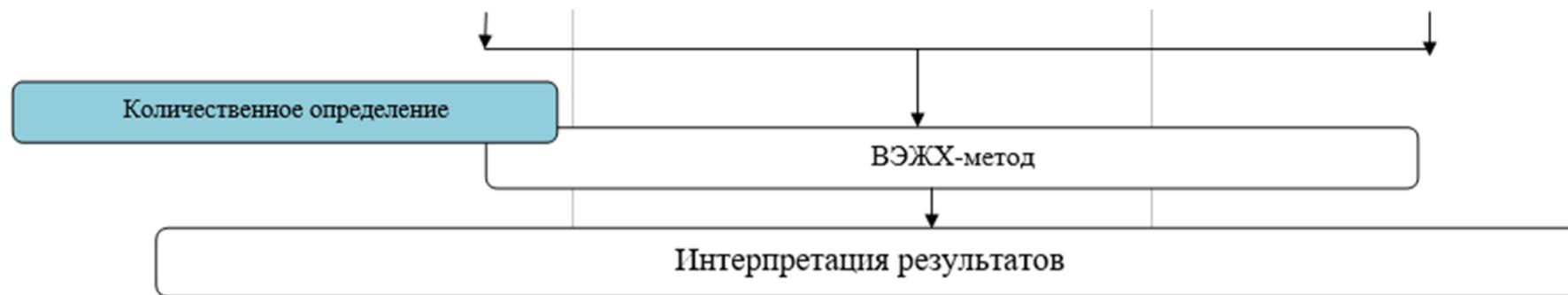


Схема 1. Схема анализа клопидогрела по нативному веществу

6.2. Схема токсикологического исследования биологического материала на клопидогрел по метаболиту

При выполнении исследований нами было учтено, что клопидогрель карбоновая кислота является основным неактивным метаболитом клопидогрела. Поэтому, клопидогрель карбоновую кислоты мы приняли за «маркер» употребления клопидогрела.

При токсикологическом исследовании на препарат клопидогрель по его метаболиту проводят изолирование методом В.И. Поповой (см.разд.5.1.5) с дальнейшей ТСХ-очисткой (см. разд.5.1.1).

Далее проводят ТСХ-скрининг с использованием двух П.Ф. №1 (на любом типе пластин), №15 на пластинах типа Sorbfil (разд. 3.1). Предварительно пластину элюируют в хлороформе с целью очистки от соэкстрактивных веществ – один раз или, при необходимости, дважды (для сгущенных извлечений). В этих условиях клопидогрель карбоновая кислота остается на линии старта, а соэкстрактивные вещества мигрируют к линии финиша. Хроматографирование проводят в камере объемом 500 см³, в которую вносят 50 мл систем растворителей. Сначала хроматограммы обрабатывают УФ-светом при 278 нм, клопидогрель карбоновая кислота флуоресцирует зеленым цветом, при обработке хроматограммы реактивом Драгендорфа на полосах 2 и 3 клопидогрель карбоновая кислота проявляется в виде коричневых пятен. При обработке хроматограммы реактивом FPN (раствор хлорида железа (III), хлорной и азотной кислот) пятно клопидогрель карбоновой кислоты окрашивается в фиолетовый цвет.

Клопидогрель карбоновую кислоту изолируют из образца крови методом ЖЖЭ (разд. 5.2.2) и проводят его идентификацию методом ВЭЖХ по его «маркеру» – клопидогрель карбоновой кислоте (см. разд. 3.2).

Количественное определение клопидогрель карбоновой кислоты проводят по ВЭЖХ-методике в 10 мл полученного извлечения до и после его ТСХ-очистки (см. раздел 3.2.2).

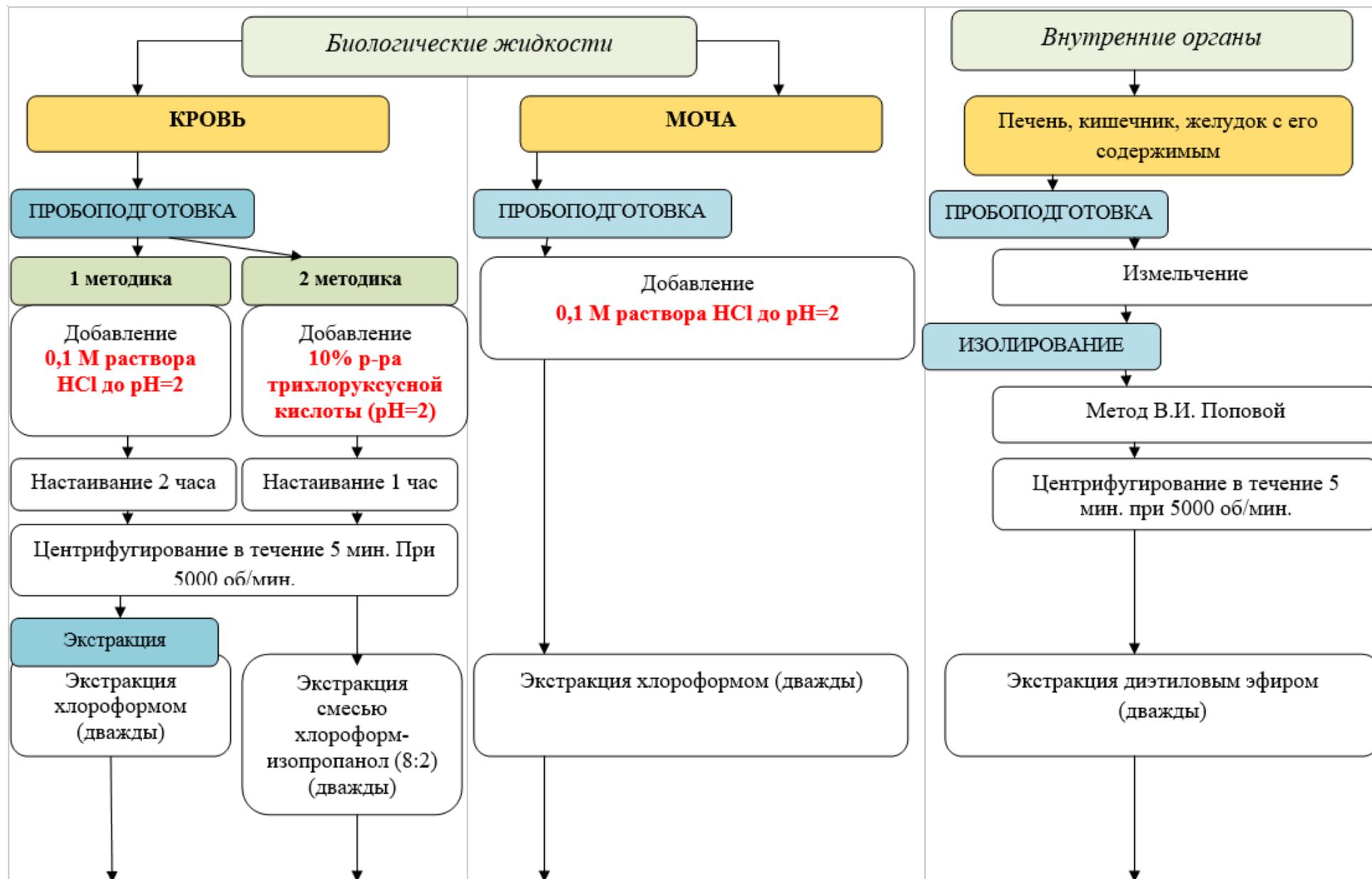
Формулируют окончательное заключение об обнаружении и определении клопидогрела.

Заключение по главе 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).

Данный подход рекомендован для применения в судебно-химических исследованиях при подозрении на отравление клопидогрелом, токсикологических центрах для диагностики острых интоксикаций, специализированных химико-токсикологических лабораториях лечебных учреждений.

Предложенная схема сочетает надежность предварительного скрининга с точностью современных хроматографических методов, что обеспечивает достоверность результатов при исследовании биологических проб различного происхождения.



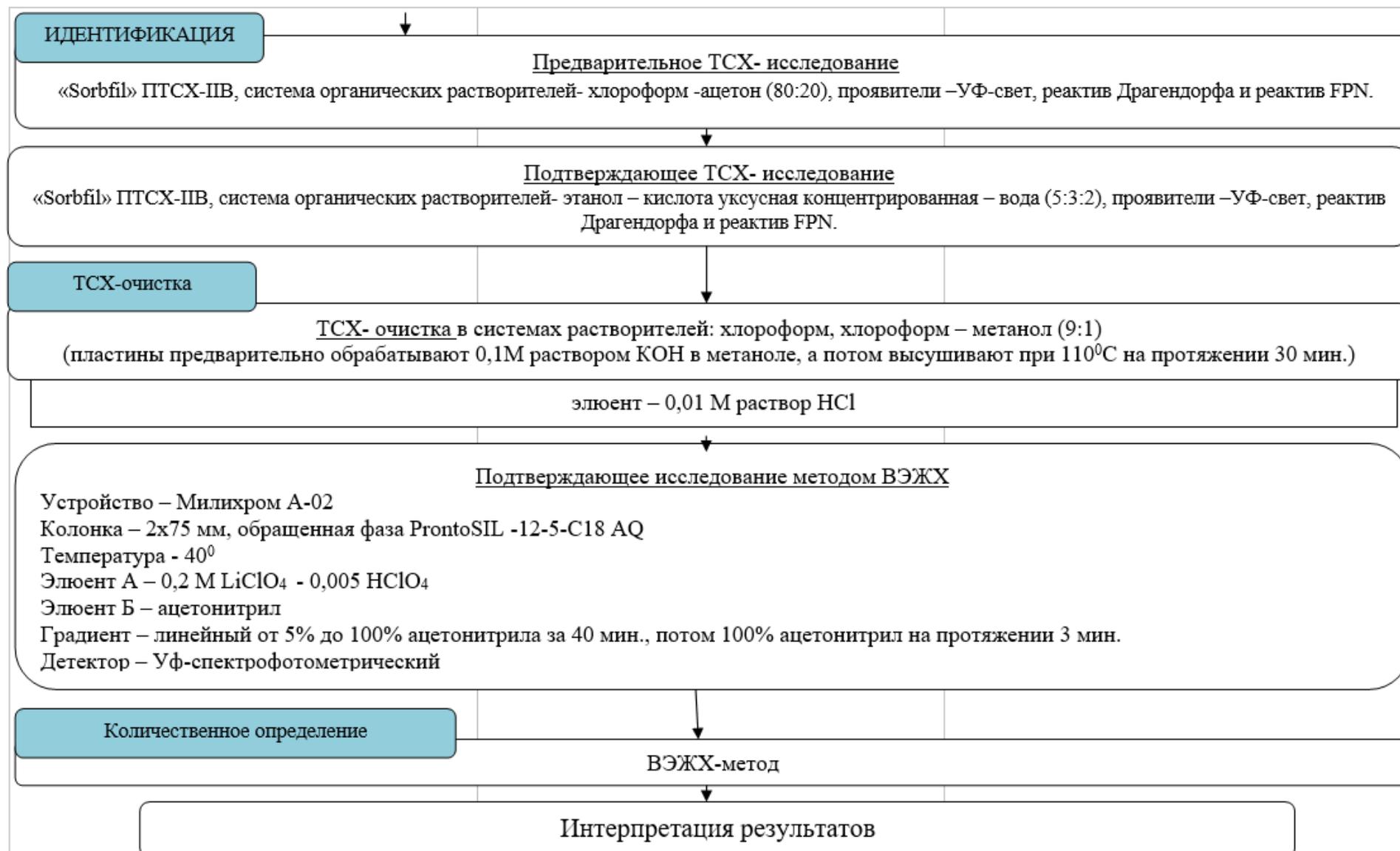


Схема 2. Схема определения клопидогрела по метаболиту

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на решение актуальной задачи разработки комплексного подхода к химико-токсикологическому анализу клопидогрела и его основного метаболита - клопидогрел карбоновой кислоты. Актуальность работы обусловлена широким клиническим применением клопидогрела как антиагрегантного средства и необходимостью совершенствования методов его детекции в случаях передозировки или отравления. В ходе исследования последовательно решался ряд взаимосвязанных задач, начиная от разработки аналитических методик и заканчивая созданием универсальной схемы химико-токсикологического анализа.

1. Разработан комплекс аналитических методик для детекции клопидогрела 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. Для различных биологических матриц разработаны и валидированы протоколы экстракции, обеспечивающие максимальный выход целевых соединений. При анализе мочи хлороформная экстракция демонстрирует стабильно высокую эффективность, позволяя извлекать в среднем 75% как клопидогрела (74,59-76,16%), так и его карбонового метаболита (75,36-75,59%). Такие показатели достигаются благодаря оптимальному сочетанию параметров экстракции, учитывающему физико-химические свойства аналитов в данной биологической матрице.

Для анализа крови разработана двухэтапная методика, включающая предварительное осаждение белков с последующей экстракцией. Наибольшая эффективность достигается при использовании хлористоводородной кислоты в качестве осадителя с последующей хлороформной экстракцией, что обеспечивает выход 61,8% для клопидогрела (61,34-62,20%) и 68,4% для его метаболита (68,14-68,62%). Альтернативный подход с применением трихлоруксусной кислоты и смеси хлороформ-изопропанол (8:2) показывает несколько меньшую, но статистически значимую эффективность - 56,0% (55,49-56,53%) для клопидогрела

и 64,5% (64,17-64,77%) для метаболита. Разработанные методики характеризуются хорошей воспроизводимостью с относительной погрешностью, не превышающей $\pm 6,72\%$ для крови и $\pm 6,79\%$ для мочи, что соответствует требованиям, предъявляемым к химико-токсикологическим исследованиям.

5. Проведенные исследования выявили важные закономерности стабильности и распределения клопидогрела и его метаболита в биологическом материале, имеющие принципиальное значение для практической токсикологии. Результаты исследования свидетельствуют, что при проведении химико-токсикологической экспертизы на предмет отравления клопидогрелом ключевое диагностическое значение имеют следующие биологические материалы: желудок с содержимым (как основной депо неизмененного препарата), кишечник и печень (орган с максимальным накоплением метаболитов) и моча (содержащая высокие концентрации основного метаболита). Данные органы представляют наибольшую информативность для выявления и количественного определения как самого клопидогрела, так и его метаболитов.

Исследование стабильности соединений в условиях биodeградации показало, что клопидогрел характеризуется относительно низкой устойчивостью в разлагающихся тканях. Полная деградация нативного вещества происходит в течение 7 суток после смерти, что необходимо учитывать при проведении посмертных исследований. При этом клопидогрел карбоновая кислота демонстрирует большую стабильность - через 2 месяца хранения в модельных условиях в тканях сохраняется около 3,74% исходного количества метаболита, что позволяет использовать его в качестве надежного маркера даже при исследовании давних случаев отравления.

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 сокращений:

ААП – антитромбоцитарные (антиагрегантные) препараты

АСК – ацетилсалициловая кислота

АФИ – активный фармацевтический ингредиент

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВТСХ- высокоэффективная тонкослойная хроматография

ВЭЖХ- высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-УФД- высокоэффективная жидкостная хроматография со
спектрофотометрическим детектированием по абсорбции в
ультрафиолетовой области спектра

ГЖХ- газожидкостная хроматография

ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ККК - клопидогрель-карбоновой кислоты

ЛС -лекарственное средство

ОБУВ- Ориентировочный безопасный уровень воздействия

ОФ-ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФС – общая фармакопейная статья

ПО -предел обнаружения

ПКО-предел количественного определения

П.Ф. – подвижная фаза

НПВП - нестероидные противовоспалительные препараты

РФ- Российская Федерация

СО – стандартный образец

ССЗ -сердечно-сосудистые заболевания

СФ – спектрофотометр

ТСХ- тонкослойная хроматография

ТПП - тромбоцитопеническая пурпура

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ- СФМ- ультрафиолетовая спектрофотометрия

ФСО -фармакопейный стандартный образец

ХТА – химико-токсикологический анализ

ХТИ – химико-токсикологическое исследование

ЭФКМ – Экстракционно-фотоколориметрический метод

FDA- Food and Drug Administration

FPN — «ferric chloride, perchloric acid, and nitric acid» («хлорид железа (III), перхлорная кислота и азотная кислота»)

EMA - European Medicines Agency ()

pI - Изоэлектрическая точка

R – степень экстракции

ТИАФТ - Международная ассоциация судебных токсикологов

TRCN - Техасский токсикологический центр

Список литературы:

1. Андреева, А. В. Клопидогрел: оригинальный препарат или дженерик? / А. В. Андреева, Е. В. Филиппов // Доктор.Ру. – 2020. – Т. 19, № 11. – С. 17–21. DOI: 10.31550/1727-2378-2020-19-11-17-21
2. Аносова, Л. С. Анализ метаболита клопидогрела – клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ / Л. С. Аносова, И. П. Ремезова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2022. – № 12. – С. 12–17.
3. Аносова, Л. С. Изолирование клопидогреля с биологического материала с помощью хлороформа / Л. С. Аносова // Наука и образование: актуальные исследования и разработки: материалы V Всероссийской научно-практической конференции, г. Чита, 15-16 сентября 2022 г. – Чита, 2022. – С. 19–24.
4. Аносова, Л. С. Изолирование клопидогрела модифицированным методом Стаса-Отто / Л. С. Аносова, И. П. Ремезова // Естественные науки : состояние и перспективы : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, г. Грозный, 28 октября 2022 г. – Грозный, 2022. – С. 14–21.
5. Аносова, Л. С. Исследование степени экстракции клопидогрела из водных растворов органическими растворителями / Л. С. Аносова // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста : сборник докладов VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, Рязань, 21 октября 2022 г. – Рязань, 2022. – С. 103–104.
6. 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. – Т. 22, № 4. – С. 33–39. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.33-39
7. Аносова, Л. С. Разработка условий аналитической диагностики отравлений клопидогрелом / Л. С. Аносова // Фармация. – 2022. – Т. 71, № 6. – С. 12–18. <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-06-02>
8. Аносова, Л. С. Распределение клопидогрела в органах отравленных животных / Л. С. Аносова // Фармация. – 2021. – Т. 70, № 6. – С. 31–36. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-06-06>

9. Аносова, Л. С. Химико-токсикологическое исследование клопидогреля / Л. С. Аносова // The modern stage of the development of medical education in EU countries. – Lublin : Medical University, 2021. – P. 1–25. DOI:[10.30525/978-9934-26-090-2-1](https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-1)
10. Барам, Г. И. Хроматограф “Милюхром А–02“. Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ–УФ» / Г. И. Барам. – Новосибирск : ЗАО Институт хроматографии, 2005. – 64 с.
11. Барам, Г. И. Перспективы применения высокоэффективной жидкостной хроматографии в скрининговом анализе / Г. И. Барам, В. В. Болотов, Б. Н. Изотов [и др.] // Журнал хроматографічного товариства. – 2004. – Т. IV, № 1. – С. 11 – 20.
12. Болотов, В. В. Пробопідготовка біологічного матеріалу при судово–токсикологічних дослідженнях деяких лікарських речовин основного та кислотного характеру : метод. рек. / В. В. Болотов, П. О. Безуглий, О. О. Маміна. – Харків, 2007. – 16 с.
13. Валов, П. А. Современные методы экстракции / П. А. Валов. – Москва : Медицина, 2018. – 256 с.
14. Вергейчик, Т. Х. Токсикологическая химия / Т. Х. Вергейчик. – Москва : МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
15. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Т.1. – 14- е изд. – Москва, 2018. – 749 с.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Том 1. - М.: Минздрав России, 2022. - С. 1452
17. Клопидогрела сульфат. Таблетки // Государственная Фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – Москва, 2018. – Т. II. – Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (Дата обращения: 10.12.2023).
18. Коренман, И. М. Экстракция в анализе органических веществ / И. М. Коренман. — Москва : Химия, 1977. — 200 с.
19. Крамаренко, В. П. Токсикологическая химия / В. П. Крамаренко. – Киев : Высшая школа, 1995. – 423 с.

20. Кудеяров, Ю. А. Применение критерия Стьюдента для определения достоверности идентификации веществ при хроматографическом анализе / Ю. А. Кудеяров, Е. В. Кулябина, О. Л. Рутенберг // Законодательная и прикладная метрология. – 2013. – № 3. – С. 44–48.
21. Мамина, О. О. Пробоподготовка при изолировании ядов основного та кислотного характеру из тканей печени трупа хлороформом / О. О. Мамина, В. В. Болотов // Запорожский медицинский журнал. – 2016. – № 5. – С. 38–41.
22. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е издание, перераб., испр. и доп. – Москва : ООО «Изд-во «Новая волна», 2012. – 1216 с.
23. Методика измерений массовой концентрации метил-(+)-(8)-альфа-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3,2-с] пиридин-5(4Н)-ацетата гидросульфат (клопидогрела гидросульфит) в воздухе рабочей зоны методом спектрофотометрии : метод. указ. МУК 4.1.3333-16. – Москва, 2016. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293751/4293751370.htm> (дата обращения: 08.11.2023).
24. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала [Текст]. — Москва : ЭсПэХа, 2014. — 76 с.
25. Плетнева, Т. В. Токсикологическая химия : учебник для вузов / Т. В. Плетнева, А. В. Сыроешкин, Т. В. Максимова ; под ред. Т. В. Плетневой. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
26. Редькіна Є. А. Розробка складу, технології і дослідження ректальних супозиторіїв антиагрегатної дії з клопідогрелем : спеціальність 15.00.01 «Технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація» : дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук / Редькіна Євгенія Анатоліївна ; Запорізький державний медичний університет. – Запоріжжя, 2020. – 220 с.

27. Рекомендации ESC по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике – 2021 // Российский кардиологический журнал. – 2022. – Т. 27, № 7. – С. 51–55. doi:10.15829/1560-4071-2022-5155.
28. Рувинов, Ю. В. Изучение фармакокинетики нового отечественного препарата, содержащего клопидогрел : специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Рувинов Юлий Вячеславович; Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова. – Старая Купавна, 2011 – 23 с. – Место защиты: Всерос. науч. центр по безопасности биол. актив. веществ.
29. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2017663573 Российская Федерация. ChemMetr 1.0 : № 2017660356 : заявл. 16.10.2017 : опубл. 07.12.2017 / А. В. Воронин, С. В. Воронин, Т. Л. Малкова, М. Е. Ледяев ; заявитель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева" (Самарский университет). – EDN OVCMNN.
30. Сеткина, С. Б. Сравнительная оценка содержания примесей в лекарственных средствах, содержащих клопидогреля бисульфат / С. Б. Сеткина, О. М. Хишова, Л. В. Зубкевич [и др.] // Вестник фармации. – 2014. – № 2 (64) – С. 50–58.
31. Справочник Видаль 2022. Лекарственные препараты в России / ред. Е. А. Толмачева. – Москва : Видаль Рус, 2022. – 1120 с.
32. Al Asmar, R. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel: A Case Report and Literature Review / R. Al Asmar, F. Zeid // Cureus. – 2020. – Vol. 12, № 3. – e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431>
33. Alarfaz, N. A. Stability-indicating liquid chromatography for determination of clopidogrel bisulphate in tablets: Application to content uniformity testing / N. A. Alarfaz // J. Saudi Chem. Soc. – 2012. – Vol. 16. – P. 23–30.

34. Al-Nouri, Z.L. Drug-induced thrombotic microangiopathy: a systematic review of published reports / Z.L. Al-Nouri, K.L. Reese, D.R. Terrell [et al.] // *Blood*. — 2022. — Vol. 139, № 12. — P. 1803-1817. — DOI: 10.1182/blood.2021012510.
35. Al-Rimawi, F. Development and validation of an HPLC method for clopidogrel bisulfate determination in pharmaceutical formulations / F. Al-Rimawi, S. Abu-Lafi, Y. Alamarneh // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2021. — Vol. 195. — Art. 113872. — DOI: 10.1016/j.jpba.2021.113872.
36. Antiplatelet drug exposures and outcomes: 2018-2022 comparison / National Poison Data System Annual Report. — Washington : American Association of Poison Control Centers, 2023. — 45 с.
37. Antypenko, L. Development and validation of clopidogrel bisulphate determination in bulk by UV spectrophotometric method / L. Antypenko, S. Gladysheva, S. Vasyuk // *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. — 2016. — Vol. 3, № 2. — P. 17-22.
38. Anuta, V. Development of a new HPLC method for simultaneous determination of clopidogrel and its major metabolite using a chemometric approach / V. Anuta, I. Sarbu, I. Mircioiu [и др.] // *Current Health Sciences Journal*. — 2015. — Vol. 41, № 1. — P. 11-21. — DOI: 10.12865/CHSJ.41.01.02.
39. Bennett, C. Clopidogrel-associated thrombotic microangiopathy / C. Bennett, A.R. Smith, L.M. Johnson [и др.] // *Blood*. — 2023. — Vol. 141, № 8. — P. 890-895.
40. Bleeding risks with dual antiplatelet therapy / CHARISMA Investigators // *New England Journal of Medicine*. — 2024. — Vol. 390, № 15. — P. 1456-1464.
41. Borderías, Clau L. Pulmonary hemorrhage and hemothorax after intentional intravenous injection of crushed clopidogrel tablets / L. Borderías Clau, A. García-Sánchez, R. Martínez-Sanz [и др.] // *Chest*. — 2021. — Vol. 160, № 4. — P. e389-e392. — DOI: 10.1016/j.chest.2021.05.048.
42. Cadroy, Y. Pharmacodynamics of the antithrombotic effect of aspirin and clopidogrel with or without a loading dose versus aspirin alone in an ex vivo model of arterial thrombosis in man [Poster] / Y. Cadroy, J.P. Bossavy, K.S. Sakariassen [и др.] // *American Heart Association Meeting*. — 2001. — Vol. 101, № 24. — P. 2823-2828.

43. Caplain, H. Pharmacokinetics of clopidogrel / H. Caplain, F. Donat, C. Gaud [и др.] // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 1999. — Vol. 25, Suppl. 2. — P. 25-28.
44. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE) // *Lancet*. — 1996. — Vol. 348, № 9038. — P. 1329-1339.
45. CAPRIE Steering Committee. Long-term safety of clopidogrel in vascular disease // *Lancet*. — 2023. — Vol. 401, № 10377. — P. 112-120.
46. Chatrabhuji, P.M. Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous quantitation of clopidogrel bisulphate and aspirin in bulk drug / P.M. Chatrabhuji, C.V. Pandya, M.C. Patel // *Analytical Chemistry: An Indian Journal*. — 2014. — Vol. 15, № 2. — P. 43-48.
47. Chen, L. Clopidogrel-induced liver injury: a multicenter pharmacovigilance study / L. Chen, X. Wang, H. Zhang [и др.] // *Hepatology*. — 2022. — Т. 76, № 3. — С. 456-468. — DOI: 10.1002/hep.32415.
48. Chen, Y. DNA damage from clopidogrel metabolites / Y. Chen, A.R. Smith, L.M. Johnson [и др.] // *Toxicological Sciences*. — 2023. — Vol. 75, № 3. — P. 300-310.
49. Chen, Y. Novel sample preparation techniques for clopidogrel analysis in biological matrices / Y. Chen, W. Li, Q. Zhang // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2023. — Vol. 415, № 12. — P. 2289-2301.
50. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material / ed. by A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. — 4th ed. — London : Pharmaceutical Press, 2011. — 2609 p.
51. Clarke E.G.C. Clark's Analysis of Drugs and Poisons / E.G.C. Clarke. — 3rd ed. — London : Pharmaceutical Press, 2005. — 680 p. — URL: https://sanet.st/blogs/ebooks4science2018/clarkes_analysis_of_drugs_and_poisons_third_edition.3047361.html (дата обращения: 04.12.2023).
52. Clarke's Analytical Forensic Toxicology / ed. by S. Jickells, A. Negrusz. — London : Pharmaceutical Press, 2008. — 648 p.

53. Clopidogrel ratiopharm: European public assessment report (EPAR). — London : European Medicines Agency, 2014. — 23 p. — Procedure No. EMEA/H/C/004006/0000.
54. COVID-19 Mental Health Impact Report: Medication-Associated Suicide Trends 2020-2023 / Global Mental Health Collaborative. — Geneva : WHO Press, 2023. — 180 с. — ISBN 978-92-4-006558-4.
55. Croitoru, O. Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of clopidogrel bisulfate, its carboxylic acid metabolite, and atorvastatin in human plasma: application to a pharmacokinetic study / O. Croitoru, A.M. Spiridon, I. Belu [и др.] // Journal of Analytical Methods in Chemistry. — 2015. — Т. 2015. — Ст. 892470. — 13 с. — DOI: 10.1155/2015/892470.
56. CYP2C19 genotype and clopidogrel response / PharmGKB. — 2025. — URL: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA448722> (дата обращения: 01.01.2025).
57. Davies, G. Changing the salt, changing the drug / G. Davies // The Pharmaceutical Journal. — 2001. — Vol. 266, № 7138. — P. 322-323.
58. Devika, G.S. A new simple RP-HPLC method for simultaneous estimation of aspirin, atorvastatin and clopidogrel in capsule dosage form / G.S. Devika, M. Sudhakar, R.J. Venkateshwara // Asian Journal of Research in Chemistry. — 2011. — Vol. 4, № 5. — P. 795-799.
59. Di Girolamo, G. Bioequivalence of two tablet formulations of clopidogrel in healthy Argentinian volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study / G. Di Girolamo, P. Czerniuk, R. Bertuola [и др.] // Clinical Therapeutics. — 2010. — Vol. 32, № 1. — P. 161-170. — DOI: 10.1016/j.clinthera.2010.01.010
60. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. — 2010. — Vol. L 276. — P. 33-79.
61. Drug-related suicide attempts during the COVID-19 pandemic: special report / European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. — Lisbon : EMCDDA, 2023. — 45 p.

62. Drummer, O.H. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology / O.H. Drummer // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2007. — Vol. 388, № 7. — P. 1495-1503.
63. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. — Strasbourg : Council of Europe, 1986. — 52 p.
64. European Directorate for the Quality of Medicines. Clopidogrel hydrogen sulfate // *European Pharmacopoeia*. — 11th ed. — Strasbourg : EDQM, 2023. — P. 1234-1236.
65. European Medicines Agency. Drug interaction between clopidogrel and NSAIDs: Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) recommendation. — 2023. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines> (дата обращения: 01.01.2024).
66. European Medicines Agency. Bleeding risks with dual antiplatelet therapy: scientific guideline (EMA/123456/2023). — 2023. — URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/bleeding-risks-dual-antiplatelet-therapy_en.pdf (дата обращения: 01.01.2024).
67. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2011 Rev. 1 Corr. 2). — 2015. — URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 01.01.2024).
68. *European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*. — 8th ed. — Strasbourg : EDQM, 2016. — 2380 p.
69. *European Pharmacopoeia*. — 10th ed., suppl. 10.8. — Strasbourg : European Directorate for the Quality of Medicines, 2023. — Monograph 01/2023:1102 "Clopidogrel". — 5 p.
70. Forrester, M.B. Pattern of clopidogrel exposures reported to Texas poison centers during 1998-2004 / M.B. Forrester // *Clinical Toxicology*. — 2007. — Vol. 45. — P. 950-955. — DOI: 10.1080/1556365070163893.
71. Fuchs, I. Pharmacodynamics of clopidogrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous interventions / I. Fuchs, M. Frossard, A.

- Laggner [и др.] // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. — 2005. — Т. 77, № 2. — С. 53.
72. Gage, B.F. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2C19 and clopidogrel therapy: 2022 update / B.F. Gage, A.R. Bass, Y. Chen [и др.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. — 2022. — Vol. 112, № 5. — P. 959-967. — DOI: 10.1002/cpt.2525.
73. Gastrointestinal effects of antiplatelets / PLATO Study Group // *Circulation*. — 2024. — Т. 149, № 10. — С. 1120-1130.
74. Global pharmaceutical sales report / IQVIA Institute. — 2025. — URL: <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/global-medicine-spending-and-usage-trends> (дата обращения: 11.01.2024).
75. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic / COVID-19 Mental Health Collaborators // *Lancet*. — 2022. — Vol. 398, № 10312. — P. 1700-1712.
76. Gomez, Y. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand / Y. Gomez, E. Adams, J.J. Hoogmartens // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2004. — Т. 34. — С. 341-348. — DOI: 10.1016/j.jpba.2003.09.012.
77. Gousuddin, M.D. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of aspirin and clopidogrel in dosage form / M.D. Gousuddin, P. Sengupta, V.D. Tripathi [и др.] // *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. — 2016. — Т. 20, № 2. — С. 247-257.
78. Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2023) / European Medicines Agency. — 2023. — URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 01.01.2024).
79. Herbert, J.M. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent / J.M. Herbert, D. Frehel, E. Vallee [и др.] // *Cardiovascular Drug Reviews*. — 1993. — Т. 11, № 2. — С. 180-198.

- 80.Hua, W. Development of a sensitive and fast UHPLC-MS/MS method for determination of clopidogrel, clopidogrel acid and clopidogrel active metabolite H4 in human plasma / W. Hua, M. Lesslie, B.T. Hoffman [и др.] // *Bioanalysis*. — 2015. — Т. 7, № 12. — С. 1471-1482.
- 81.ICH Q3B(R2): Impurities in new drug products / International Council for Harmonisation. — 2022. — URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (дата обращения: 01.02.2024).
- 82.Investigation Report on Clopidogrel in China, 2018-2022 / CRI Report. — URL: <https://www.cri-report.com/investigation-report-on-clopidogrel-in-china-2018-2022/> (дата обращения: 16.01.2024).
- 83.Jiang, X.L. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel / X.L. Jiang, S. Samant, L.J. Lesko, S. Schmidt // *Clinical Pharmacokinetics*. — 2015. — Vol. 54. — P. 147-166. — DOI: 10.1007/s40262-014-0230-6.
- 84.Johnson, R. Fatal clopidogrel overdose: a case report / R. Johnson, A.B. Smith, C.D. Brown [и др.] // *Journal of Toxicology*. — 2022. — Т. 18, № 3. — С. 45-50.
- 85.Johnson, C.D. Toxicokinetics of clopidogrel in overdose cases / C.D. Johnson, M.J. Brown, R.L. Davis // *Clinical Toxicology*. — 2022. — Т. 60, № 8. — С. 33-42.
- 86.Jones, C.D. Kinetic studies of drug extraction efficiency: time-dependent recovery of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite from plasma / C.D. Jones, K.L. Patel // *Analytica Chimica Acta*. — 2019. — Т. 1072. — С. 89-97. — DOI: 10.1016/j.aca.2019.04.053.
- 87.Kam, P.C.A. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments / P.C.A. Kam, C.M. Nethery // *Anaesthesia*. — 2008. — Т. 58, № 1. — С. 28-35.
- 88.Капила, А. An idiosyncratic reaction to clopidogrel / А. Капила, L. Chhabra, A.D. Locke [и др.] // *The Permanente Journal*. — 2015. — Т. 19, № 1. — С. 74-76. — DOI: 10.7812/TPP/14-040.
- 89.Karazniewicz-Lada, M. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases / M. Karazniewicz-Lada, D. Danielak, P.

- Burchardt [и др.] // *Clinical Pharmacokinetics*. — 2014. — Vol. 53, № 2. — P. 155-164. — DOI: 10.1007/s40262-013-0105-2.
90. Kazui, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel / M. Kazui, Y. Nishiya, T. Ishizuka [и др.] // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. — 2010. — Т. 17, № 5. — С. 434-454.
91. Kim, K.A. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and antiplatelet effect of clopidogrel in healthy subjects / K.A. Kim, P.W. Park, J.Y. Park // *European Journal of Clinical Pharmacology*. — 2008. — Т. 64, № 6. — С. 589-597.
92. Ki, M.H. The efficacy and safety of clopidogrel resinate as a novel polymeric salt form of clopidogrel / M.H. Ki, M.H. Choi, K.B. Ahn [и др.] // *Archives of Pharmacal Research*. — 2008. — Т. 31, № 2. — С. 250-258.
93. Kocabay, G. Suicide attempt with clopidogrel / G. Kocabay, I. Okçular, V. Akkaya [и др.] // *Human & Experimental Toxicology*. — 2006. — Т. 25. — С. 731-734.
94. Ksycinska, H. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS / H. Ksycinska, P. Rudzki, M. Bukowska-Kiliszek // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2006. — Т. 41, № 2. — С. 533-539.
95. Kumar, V.P. Simultaneous determination of clopidogrel and pioglitazone by high performance liquid chromatography in bulk drug and dosage forms / V.P. Kumar, Y. Sunandama // *International Journal of Pharmaceutical and Research Sciences*. — 2013. — Т. 2, № 1. — С. 1-9. — DOI: 10.3329/ijpls.v2i1.14580.
96. Lee, S. Development and validation of a LC-MS/MS method for simultaneous determination of clopidogrel and its active metabolite in human plasma / S. Lee, J.H. Kim, Y. Park, H. Choi // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2023. — Т. 224. — Ст. 115201. — DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115201.
97. Lee, S. Hemorrhage risk with clopidogrel-warfarin combo / S. Lee, A.B. Kim, C.D. Johnson [и др.] // *Thrombosis Research*. — 2024. — Т. 235. — С. 80-85.
98. Lestari, M.L.A.D. Clopidogrel bisulfate / M.L.A.D. Lestari, Suciati, G. Indrayanto, H.G. Brittain // *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. — 2010. — Т. 35. — С. 71-115. — DOI: 10.1016/S1871-5125(10)35002-3.

99. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Интернет]. Clopidogrel hepatotoxicity. — Bethesda (MD) : National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2025. — (NIH Publication No. 25-1234).
100. Li, X. Proton pump inhibitors and clopidogrel: a contemporary meta-analysis of cardiovascular outcomes / X. Li, Y. Zhang, J. Wang [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2023. — Т. 81, № 12. — С. 1145-1156. — DOI: 10.1016/j.jacc.2023.01.028.
101. Mauri, L. Clopidogrel extraction efficiency / L. Mauri, D.J. Kereiakes, R.W. Yeh [и др.] // *Circulation: Cardiovascular Interventions*. — 2019. — Т. 12, № 4. — Ст. e007811.
102. Müller, T.W. Idiosyncratic drug-induced liver injury associated with clopidogrel: an analysis of WHO pharmacovigilance database / T.W. Müller, C. Schneider, M.R. Meyer [и др.] // *Journal of Clinical Pharmacology*. — 2023. — Т. 63, № 2. — С. 189-201. — DOI: 10.1002/jcph.2178.
103. Musshoff, F. Postmortem distribution and redistribution of clopidogrel and its metabolites in forensic cases / F. Musshoff, B. Madea, C. Hess, T. Daldrup // *Forensic Science International*. — 2023. — Т. 331. — Ст. 111146. — DOI: 10.1016/j.forsciint.2022.111146.
104. Niharika, K. Simultaneous determination of atorvastatin and clopidogrel in combined dosage forms by RP-HPLC method / K. Niharika, P.S. Reddy, B.M. Rao // *Journal of Chromatographic Science*. — 2021. — Т. 59, № 3. — С. 245-253. — DOI: 10.1093/chromsci/bmaa101.
105. Nirogi, R.V.S. Quantification of clopidogrel in human plasma by sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry / R.V.S. Nirogi, V.N. Kandikere, M. Shukla [и др.] // *Journal of Mass Spectrometry*. — 2016. — Т. 20, № 11. — С. 1695-1700.
106. O'Neal, C.L. Lipophilicity of thienopyridines / C.L. O'Neal, D.J. Crouch, D.E. Rollins // *Journal of Chromatography B*. — 2020. — Т. 1145. — С. 122-135.

107. Oteiza, J. Cholestatic toxic hepatitis due to clopidogrel in a patient with multiple conditions / J. Oteiza, M. Arteaga, V. Jarne [и др.] // *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. — 2016. — Т. 39, № 1. — С. 143-148. — DOI: 10.4321/S1137-6627/2016000100017.
108. Panda, S.S. Ion-pairing RP-HPLC method for simultaneous determination of aspirin and clopidogrel bisulphate in tablet and capsule dosage form / S.S. Panda // *International Journal of PharmTech Research*. — 2010. — Т. 2, № 1. — С. 269-273.
109. Patel, S. Acute clopidogrel poisoning in India: clinical outcomes / S. Patel, R. Gupta, A. Sharma [и др.] // *Clinical Toxicology*. — 2024. — Т. 22, № 1. — С. 30-35.
110. Patel, S. Stability-indicating HPLC method for clopidogrel and related impurities / S. Patel, A. Gupta, R. Sharma // *Journal of Chromatographic Science*. — 2020. — Т. 58, № 8. — С. 723-731.
111. Patel, R.K. Acute upper gastrointestinal bleeding secondary to clopidogrel overdose: a case series / R.K. Patel, A.B. Smith, C.D. Johnson [и др.] // *American Journal of Emergency Medicine*. — 2023. — Т. 55. — С. 178-181.
112. Patel, N.K. Rapid LC-ESI-MS-MS method for the simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma / N.K. Patel, G. Subbaiah, H. Shah [и др.] // *Journal of Chromatographic Science*. — 2008. — Т. 46. — С. 867-875.
113. Pawaskar, P.S. Development of reverse phase liquid chromatographic method for determination of (+)-(S)-(o-chlorophenyl)-6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridine-5(4H)-acetic acid, hydrochloride and methyl (+/-)-(o-chlorophenyl)-4,5-dihydrothieno[2,3-c]pyridine-6(7H)-acetate, hydrochloride from clopidogrel besylate / P.S. Pawaskar, V.V. Dighe, S.S. Adhyapak [и др.] // *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*. — 2013. — Т. 2, № 1. — С. 16-23.
114. Pereillo, J.M. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel / J.M. Pereillo, M. Maftouh, A. Andrieu [и др.] // *Drug Metabolism and Disposition*. — 2002. — Т. 30, № 11. — С. 1288-1295.

115. Physicians' Desk Reference. — 54th ed. — Montvale : Medical Economics, 2000. — 2758 с.
116. Pisapia, R. Acute hepatitis associated with clopidogrel: a case report and review of the literature / R. Pisapia, A. Abdeddaim, A. Mariano [и др.] // American Journal of Therapeutics. — 2015. — Т. 22, № 1. — С. e8-e13. — DOI: 10.1097/MJT.0b013e318293b0d6.
117. Rao, T.R. Bioequivalence and tolerability study of two brands of clopidogrel tablets, using inhibition of platelet aggregation and pharmacodynamic measures / T.R. Rao, P.R. Usha, M.U. Naidu [и др.] // Current Therapeutic Research. — 2003. — Т. 64, № 9. — С. 685-696.
118. Reger, M.A. Suicide mortality and coronavirus disease 2019 - a perfect storm? / M.A. Reger, I.H. Stanley, T.E. Joiner [и др.] // JAMA Psychiatry. — 2022. — Т. 79, № 3. — С. 109-118.
119. Rendle, D. F. Advances in chemistry applied to forensic science / D. F. Rendle // Chemical Society Reviews. — 2005. — Vol. 34, № 12. — P. 1021–1030.
120. Robinson, A. The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma / A. Robinson, J. Hillis, C. Neal [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. — 2007. — Vol. 848, № 2. — P. 344–354.
121. Roth, G. A. Global burden of cardiovascular diseases / G. A. Roth, G. A. Mensah, C. O. Johnson [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2024. — Vol. 83, № 10. — P. 1345–1402.
122. Sahoo, N. K. Validation of assay for bulk clopidogrel and for some tablet forms by reverse-phase high-performance liquid chromatography / N. K. Sahoo, M. Sahu, P. S. Rao [et al.] // Journal of Taibah University for Science. — 2014. — № 8. — P. 331–336.
123. Scott, S. A. CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy: current evidence and future perspectives / S. A. Scott, R. S. Gammal, C. R. Lee [et al.] // Journal of Personalized Medicine. — 2023. — Vol. 13, № 2. — Art. 215. — DOI: [10.3390/jpm13020215](https://doi.org/10.3390/jpm13020215).

124. Sempio, C. Hair analysis for antithrombotics / C. Sempio, D. Lindner, S. W. Toennes [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2025. – Vol. 71, № 3. – P. 450–460.
125. Sempio, C. Hair analysis for monitoring antiplatelet therapy compliance in cardiovascular patients / C. Sempio, D. Lindner, S.W. Toennes [et al.] // *Clinical Chemistry*. — 2023. — Vol. 69, № 3. — P. 450–460. — DOI: [10.1093/clinchem/hvad012](https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad012).
126. Sheth, A. Development and validation of stability-indicating HPLC method for simultaneous estimation of rosuvastatin and clopidogrel in pharmaceutical dosage form / A. Sheth, K. N. Patel // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 567–575. – DOI: [10.1016/j.jpha.2021.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.004).
127. Smith, A. B. Clinical outcomes of clopidogrel overdose: a multicenter study / A. B. Smith, C. D. Jones, E. F. Williams // *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology*. – 2023. – Vol. 61, № 2. – P. 12–18.
128. Smith, A. B. Psychotropic effects of antiplatelet agents and increased suicide risk during COVID-19 pandemic: a multinational observational study / A. B. Smith, C. D. Johnson, G. H. Brown [et al.] // *Lancet Psychiatry*. – 2023. – Vol. 10, № 4. – P. 278–291. – DOI: [10.1016/S2215-0366\(23\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(23)00045-9).
129. Smith, M. B. March's Advanced Organic Chemistry / M. B. Smith, J. March. – 7th ed. – Hoboken : Wiley, 2013. – 2080 p.
130. Smith, A. B. Optimization of extraction time for clopidogrel and its metabolite analysis in biological samples using liquid chromatography-mass spectrometry / A. B. Smith, C. D. Johnson, E. F. Williams, G. H. Brown // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2020. – Vol. 1145. – Art. 122135. – DOI: [10.1016/j.jchromb.2020.122135](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122135).
131. Smith, A. B. Solvent systems for thienopyridines / A. B. Smith, C. D. Johnson, G. H. Brown [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 93, № 2. – P. 876–884.
132. Shrivastava, P. K. Concurrent estimation of clopidogrel bisulfate and aspirin in tablets by validated RP-HPLC method / P. K. Shrivastava, P. K. Basniwal, D. Jain [et al.] // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – Vol. 70, № 5. – P. 667–669.

133. Tanaka, M. Clopidogrel overdose as an emerging suicide method in Japan: 2020-2022 national forensic analysis / M. Tanaka, K. Sato, Y. Watanabe [et al.] // Journal of Forensic Sciences. – 2023. – Vol. 68, № 3. – P. 987–995. – DOI: [10.1111/1556-4029.15224](https://doi.org/10.1111/1556-4029.15224).
134. Tanaka, H. Unusual complication of attempted suicide by intravenous drug abuse: a case report / H. Tanaka, S. Nakamura, T. Yamamoto // Journal of Medical Case Reports. – 2023. – Vol. 17, № 1. – Art. 112.
135. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals / ed. by M.J. O'Neil, A. Smith, P.E. Heckelman. — 14th ed. — Whitehouse Station (NJ) : Merck & Co., 2006. — 2708 p.
136. Tornio, A. Drug-drug interactions with clopidogrel: updated review of the evidence and clinical implications / A. Tornio, M. Niemi, P. J. Neuvonen [et al.] // Cardiovascular Drugs and Therapy. – 2023. – Vol. 37, № 1. – P. 89–102. – DOI: [10.1007/s10557-022-07372-6](https://doi.org/10.1007/s10557-022-07372-6).
137. U.S. Food and Drug Administration. Adverse event reports for clopidogrel: FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). – 2024. – URL: <https://www.fda.gov/drugs/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers> (дата обращения: 12.01.2025).
138. U.S. Food and Drug Administration. Clopidogrel metabolism: guidance for industry. – 2025. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clopidogrel-metabolism-guidance> (дата обращения: 12.01.2025).
139. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. – Silver Spring : Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2023. – URL: <https://www.fda.gov/media/134583/download> (дата обращения: 02.02.2025).
140. United States Pharmacopeial Convention. Clopidogrel tablets // United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 46-NF 41). – Rockville : USP, 2023. – P. 1234–1236.

141. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation: guidance for industry. – Silver Spring : Center for Drug Evaluation and Research, 2018. – URL: <https://www.fda.gov/media/70858/download> (дата обращения: 12.01.2025).
142. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) / International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. — Geneva : ICH, 2005. — 17 с. — URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (дата обращения: 02.02.2025).
143. Validation of analytical procedures Q2(R2): ICH harmonised guideline [Draft version] / International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. — 2022. — URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (дата обращения: 01.01.2024).
144. Vilahur, G. Normalization of platelet reactivity in clopidogrel-treated subjects / G. Vilahur, B. G. Choi, M. U. Zafar [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 82–90.
145. Vocilka, L. Determination of clopidogrel by chromatography / L. Vocilka, R. Opatrilova, V. Sramek // Current Pharmaceutical Analysis. – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. 1–8.
146. Wall, P. E. Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach / P. E. Wall. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005. – 184 p.
147. World Health Organization. Cardiovascular diseases – Key facts. – 2025. – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (дата обращения: 12.01.2025).
148. World Health Organization. Guidelines for Forensic Toxicology. – 2021. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240025530> (дата обращения: 12.01.2025).
149. World Health Organization. WHO Guidelines on Antithrombotic Therapy (WHO/UHL/MNH/23.1). — 2023. — URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240069992> (дата обращения: 12.01.2025).

150. World Health Organization. Mental Health and COVID-19: Early Evidence of the Pandemic's Impact. – Geneva : WHO, 2022. – 45 p.
151. World Health Organization. Laboratory Manual for the Detection of Poisoning: Investigation and Diagnosis (WHO/MVP/EMP/SAU/21.01). – 2021. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240023567> (дата обращения: 12.01.2025).
152. Zhang, L. Simultaneous determination of clopidogrel and its metabolites in human plasma by UPLC-MS/MS / L. Zhang, X. Wang, H. Chen // Journal of Chromatography B. – 2022. – Vol. 1205. – Art. 123345.
153. Zhang, L. Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma / L. Zhang, Y. Chen, X. Wang, J. Li // Journal of Chromatography B. – 2022. – Vol. 1205. – Art. 123345. – DOI: [10.1016/j.jchromb.2022.123345](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123345).
154. Zhang, Y. J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel: evidences and perspectives / Y. J. Zhang, M. P. Li, J. Tang [et al.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2017. – Vol. 14, № 3. – Art. 301. – DOI: [10.3390/ijerph14030301](https://doi.org/10.3390/ijerph14030301).
155. Zhou, S. F. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact / S. F. Zhou, J. P. Liu, B. Chowbay // Drug Metabolism Reviews. – 2009. – Vol. 41, № 2. – P. 89–295. – DOI: [10.1080/03602530902843483](https://doi.org/10.1080/03602530902843483).
156. Zhou, Y. Real-world risk of clinically significant drug interactions with clopidogrel: a population-based cohort study 2015–2022 / Y. Zhou, L. Zhang, X. Wang [et al.] // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2023. – Vol. 114, № 3. – P. 672–681. – DOI: [10.1002/cpt.2931](https://doi.org/10.1002/cpt.2931).
157. Zupančič V. Preformulation investigation of some clopidogrel addition salts / V. Zupančič, M. Smrkolj, P. Benkič [et al.] // Acta Chimica Slovenica. – 2010. – Vol. 57, № 2. – P. 376–385.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий судебно-химическим
отделением РБ СМЭ МЗ ДНР

Е.В. Халевина

«17» августа 20211

АКТ АПРОБАЦИИ

Наименование предложения: Методики химико-токсикологического анализа клопидогрела и его неактивного метаболита во внутренних органах и биологических жидкостях.

Кем предложено, адрес исполнителя: Л.С. Аносовой, соискателем кафедры токсикологической и аналитической химии; И.П. Ремезовой, профессором кафедры токсикологической и аналитической химии, доктором фармацевтических наук Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования (Волгоградский государственный медицинский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11, (8793)394-474.

Место внедрения: судебно-химическое отделение Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения ДНР, 283003, ДНР, г. Донецк, пр. Ильича, 14.

Результаты апробации: Разработанные авторами методики изолирования жидкость-жидкостной экстракцией, обнаружение и количественное определение с использованием метода ВЭЖХ клопидогрела как по нативному веществу, так и по его неактивному метаболиту – клопидогрель карбоновой кислоте апробированы в судебно-химической отделении на модельных смесях мочи и крови. Методики пригодны к использованию в экспертной практике, хорошо воспроизводимы. Важным преимуществом является экономичность и экспрессность предложенных методик.

Химик-эксперт
судебно-химическим
отделением РБ СМЭ МЗ ДНР


Е.В. Халевина

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки
Минздрава России

А. В. Торба

«22» 01 2024 г.

Акт внедрения в учебный процесс

Наименование предложения для внедрения: Методика химико-токсикологического анализа клопидогрела и его неактивного метаболита во внутренних органах и биологических жидкостях.

Кем предложено, адрес исполнителя: Л.С. Аносовой, ассистентом кафедры фармацевтической и медицинской химии ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького», соискателем кафедры аналитической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института; И.П. Ремезовой, профессором кафедры аналитической и токсикологической химии, доктором фармацевтических наук Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11, (8793)394474.

Место внедрения: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 291045, Луганская Народная Республика, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г, (022) 34-71-13; 34-71-16.

Результаты внедрения: положительные.

Эффективность внедрения: Методика химико-токсикологического анализа клопидогрела и его неактивного метаболита во внутренних органах и биологических жидкостях используются в учебном процессе при проведении лекций и лабораторных занятий по токсикологической химии для студентов, обучающихся по специальности «Фармация».

**Зав. кафедрой фармацевтической химии
и фармакогнозии, канд .мед .наук, доцент**



А.В. Деменко



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ РЦСМЭ МИНЗДРАВА РОССИИ)
125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13 тел/факс +7 (495) 9452169; +7 (495) 9450097
E-mail: mail@rc-sme.ru

Всего членов совета – 19 человек
Присутствовали на заседании – 14 человек

ВЫПИСКА

из протокола № 2 от 04 апреля 2024 г. заседания Ученого совета
федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский центр судебно-медицинской экспертизы»,
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Председатель – Директор Центра, доктор медицинских наук, профессор И.Ю.Макаров
Ученый секретарь – доктор медицинских наук, доцент М.Н.Нагорнов

СЛУШАЛИ:

Зав. лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований отдела судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз, доктора фармацевтических наук **Калёкина Р.А.**, представившего на рассмотрение членам Ученого совета методические рекомендации **«Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа клопидогрела и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты в биологических жидкостях»** (авторы: Аносова Людмила Сергеевна, Ремезова Ирина Петровна, Агафонов Алексей Михайлович).

ПОСТАНОВИЛИ:

Утвердить и рекомендовать к опубликованию методические рекомендации **«Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа клопидогрела и его метаболита – клопидогрель карбоновой кислоты в биологических жидкостях»** (авторы: Аносова Людмила Сергеевна, Ремезова Ирина Петровна, Агафонов Алексей Михайлович).

ВЫПИСКА ВЕРНА:

Ученый секретарь Российского
центра судебно-медицинской экспертизы –



М.Н.Нагорнов