

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Аносова Людмила Сергіївна

УДК 615.225.4:547.821:543.544.42.062:535.24

ДИСЕРТАЦІЯ

Хіміко-токсикологічне дослідження клопідогрелю

15.00.02-фармацевтична хімія та фармакогнозія

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Л.С. Аносова

Науковий керівник:

Бондар Володимир Степанович, доктор фармацевтичних наук, професор

Харків -2021

АНОТАЦІЯ

Аносова Л. С. Хіміко-токсикологічне дослідження клопідогрелю. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія (Фармацевтичні науки).- Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. 2021.

У дисертації викладено основні методики виділення клопідогрелю та його метаболіту із об'єктів біологічного походження, а також методи їх ідентифікації та кількісного визначення, які придатні для цілей клініко-токсикологічних та судово-хімічних досліджень.

Наводиться загальна характеристика клопідогрелю, його фізико-хімічні властивості, особливості фармакокінетики та можливі шляхи метаболізму, описуються побічні ефекти та токсична дія даного препарату.

Показано, що більшість побічних ефектів, викликаних прийомом цих препаратів, спостерігається у пацієнтів з факторами ризику із сторони серцево-судинної системи. Відмічено, що основним протипоказом до застосування антиагрегантів є їх одночасне вживання з НПВС (напроксеном), ацетилсаліциловою кислотою, які можуть викликати раптову кровотечу та летальний результат.

Для визначення клопідогрелю в біологічному матеріалі при комбінованих отруєннях необхідна розробка ефективних методів виділення та чутливих методик ідентифікації та кількісного визначення, які придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу при встановленні причини летальних отруєнь та діагностиці станів гострих інтоксикацій даним препаратом при комбінованих отруєннях.

Представлені методики ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю в розчинах, які можна застосовувати при проведенні судово-хімічних досліджень.

Вивчено реакційну здатність досліджуваних сполук з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення.

Встановлено можливість ідентифікації клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в системах розчинників, що рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) та опрацьовано склад підтверджуючих систем, які можна використовувати для ТШХ-дослідження при отруєнні вказаним препаратом.

Вивчено УФ-спектри даних речовин в 0,1 НСІ. Встановлено межі концентрацій, в яких поглинання клопідогрелю та його метаболіту в 0,1 М розчині НСІ підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера.

Для ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю і клопідогрель карбонової кислоти опрацьовано умови їх аналізу методом ВЕРХ. В роботі використано хроматографічні визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ проводять на хроматографі «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ, РФ). Обробку хроматограм проводять за допомогою програми «Аналітика – Chrom», розробленої НВФ «Аналітика» (м. Харків). Придатність ВЕРХ-системи періодично контролюють шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину.

Ідентифікацію клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти проводять за основними хроматографічними параметрами – абсолютними часом та об'ємом утримування та спектральними характеристиками R .

Методика дозволяє виявити 2 нг клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в пробі.

Застосування вперше запропонованого комплексу методик дозволить ефективно, експресно та специфічно ідентифікувати та кількісно визначити клопідогрель та його метаболіт – клопідогрель карбонову кислоту – у витягах

із об'єктів біологічного походження, що в свою чергу дозволить фіксувати випадки гострих та смертельних отруєнь зазначеним препаратом.

Для розробки ефективних методик ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з кров'ю, сечею та печінкою, що не зазнали гнилісних змін. Кількість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано виходячи з даних наукової літератури щодо кількості речовин в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях.

При виконанні спрямованого дослідження біологічного матеріалу на клопідогрель рекомендовано застосовувати методику ізолювання хлороформом із тканин печінки з екстракційною очисткою для виділення нативної речовини та методику ізолювання підлуженою водою для виділення його метаболіту.

При ізолюванні клопідогрель потрапляє до «лужного» хлороформного витягу, а клопідогрель карбонова кислота – до «кислого» хлороформного витягу.

Аналіз «кислих» хлороформних витягів виконують відповідно до загальноприйнятої схеми ТПХ-скринінгу в загальній системі розчинників для речовин кислого та нейтрального характеру хлороформ – ацетон (80:20). Пляма клопідогрель карбонової кислоти в цій системі розчинників має $R_f = 0,32$.

Як проявники використовують: УФ-світло – зелена пляма; розчин FeCl_3 (для проявлення похідних кислоти саліцилової і піразолону-5) – пляма клопідогрель карбонової кислоти забарвлюється в фіолетовий колір; послідовно реактив Драгендорфа та кислоту сульфатну (для проявлення алкалоїдів та похідних 1,4-бензодіазепіну) – пляма клопідогрель карбонової кислоти забарвлюється в коричневий колір.

З проявниками HgSO_4 та дифенілкарбазоном, з розчином калію перманганату клопідогрель карбонова кислота не дає забарвлення.

Далі проводять ТШХ-дослідження в окремих системах розчинників для відповідних груп речовин.

Для клопідогрель карбонової кислоти рекомендується на цьому етапі проводити дослідження в системі розчинників ізопентанол – ізобутанол (50:50). Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластину проявляють реактивом ФПН та спостерігають пляму фіолетового кольору ($R_f = 0,64$).

Підтверджуюче дослідження виконують в трьох системах розчинників – ізопентанол – ізобутанол (20:80), ізопентанол – ізобутанол (80:20), хлороформ – ацетон (80:20). Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластини проявляють реактивом Маркі, реактивом Манделіна, розчином кобальту тіоціанату та спостерігають плями червоного, жовтого і фіолетового кольору відповідно ($R_f = 0,52; 0,81; 0,32$ відповідно).

Ідентифікацію проводять в присутності «свідка» – клопідогрель карбонової кислоти (використовують стандартний метанольний розчин з концентрацією 1 мкг/мкл).

Підтверджуюче дослідження виконують методом деривативної тонкошарової хроматографії таким чином: на лінію старту хроматографічної пластини наносять в дві точки зазначену вище кількість отриманого етанольного розчину. Першу точку обробляють 10 % розчином натрію гідроксиду та висушують при кімнатній температурі. Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносять по 10 мкл розчинів «свідків» – клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти (концентрація 1 мкг/мкл). Пластину висушують та елюють в системі розчинників етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2). Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластину проявляють на смугах 2 та 3, використовуючи методику проведення гідроксамової проби – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,88$). Да-

лі пластину проявляють на смугах 1 та 4 5 % розчином феруму (III) хлориду – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,67$).

Ідентифікацію проводять в присутності «свідка» – клопідогрелю (використовують стандартний хлороформний розчин з концентрацією 1 мкг/мкл).

Кількісне визначення клопідогрелю карбонової кислоти проводять за УФ-спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками.

Для проведення кількісного визначення клопідогрелю УФ-спектрофотометричними та екстракційно-фотометричними методами, були приготовлені стандартні розчини клопідогрелю бісульфату різної концентрації та побудовані градувальні графіки.

Як компенсаційний розчин при УФ-спектрофотометричному визначенні оптичної густини використовують 0,1 моль/л розчин кислоти хлоридної.

При екстракційно-фотометричному методі як компенсаційний розчин використовуємо хлороформ.

Ключові слова: клопідогрель, клопідогрель карбонова кислота, ізолювання, ідентифікація, кількісне визначення, умови екстракції, виділення.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.*(Особистий внесок здобувача у роботі - 80% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
2. Бондар В. С., Аносова Л. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44.*(Особистий внесок здобувача у роботі - 80% - (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку))*.

3. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії . *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1. С. 50 – 52. (*Особистий внесок здобувача у роботі -65% - (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)*).
4. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала . *Фармация Казахстана*. 2013. №7. С. 34 – 37. (*Особистий внесок здобувача у роботі -60% (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)*).
5. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей . *Фармация Казахстана*. 2013. №9. С. 59 – 60. (*Особистий внесок здобувача у роботі - 60% (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)*).
6. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка) . *Український медичний альманах*.. 2013. Т. 16. №1 (додаток). С. 154. (*Особистий внесок здобувача у роботі - 70% (особисто здобувачем проведений збір інформаційних даних, проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)*).
7. Bondar V. S. Anosova L. S. Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of

Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, 2013. Kharkiv. Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 80% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку).*

8. Аносова Л. С., Бондар В. С. Необходимость химико-токсикологического исследования клопидогреля. Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 140-річчю з дня народж. Засл. проф. М. С. Бокаріуса та 110-річчю з дня народж. проф. М. М. Бокаріуса, 10 – 11 верес. 2009 р., Харків. 2009. С. 302 – 304. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 95% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, матеріал підготовлен до друку))*
9. Бондар В. С., Аносова Л. С. Розробка методів ідентифікації клопидогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. 2010. Т. 1. С. 137. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 90% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовлен матеріалу до друку))*
10. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопидогрелю та його метаболіту. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича, 12 – 13 квітня 2018 р., Харків.

2018. – С. 358. (*Особистий внесок здобувача у роботі - 60% (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)*)).

11. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: Методичні рекомендації. Київ. 2014. .25с. (*Особистий внесок здобувача у роботі - 55% (особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи)*)).

SUMMARY

Anosova L. S. Chemical and toxicological examination of clopidogrel. - Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of Pharmaceutical Sciences in specialty 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and Pharmacognosy (Pharmaceutical Sciences).- National Pharmaceutical University of the Ministry of health of Ukraine. 2021.

The dissertation presents the main methods of isolation of clopidogrel and its metabolite from objects of biological origin, as well as methods of their identification and quantification, which are suitable for the purposes of clinical toxicology and forensic chemical research.

General characteristics of clopidogrel, its physicochemical properties, pharmacokinetics and possible metabolic pathways are described, side effects and toxic effects of this drug are described.

It is shown that most of the side effects caused by taking these drugs are observed in patients with risk factors from the cardiovascular system. It is noted that the main contraindication to use

antiplatelet agents are their concomitant use with NSAIDs (naproxen), acetylsalicylic acid, which can cause sudden bleeding and death.

To determine clopidogrel in biological material in combined poisoning, it is necessary to develop effective methods of isolation and sensitive methods of identification and quantification, which are suitable for chemical and toxicological analysis in determining the cause of lethal poisoning and diagnosis of acute intoxication with this drug poisoning in combination.

Methods of identification and quantification of bedbugs in solutions that can be used in forensic chemical research are presented.

The reactivity of the test compounds with a number of reagents used in forensic chemical practice for rapid detection has been studied.

The possibility of identification of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid in solvent systems recommended by the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) has been established and the composition of confirmatory systems that can be used for TLC testing in case of poisoning by this drug has been developed.

The UV spectra of these substances in 0.1 Hcl were studied. The concentration limits at which the uptake of clopidogrel and its metabolite in 0.1 M HCl solution obeys the Bouguer-Lambert-Beer law have been established.

To identify and quantify clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid, the conditions of their analysis by HPLC were developed. Chromatographic Determination of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid by HPLC is performed on a chromatograph "Milichrome A-02" (CJSC "EcoNova", Novosibirsk, Russia). Processing of chromatograms is carried out using the program "Analytics - Chrom", developed by NVF "Analytics" (Kharkov). The suitability of the HPLC system is periodically monitored by chromatography of a special control multicomponent solution.

Identification of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid is performed by the main chromatographic parameters - absolute time and volume of retention and spectral characteristics of R.

The method allows to detect 2 ng of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid in the sample.

The application of the first proposed set of methods will allow effective, rapid and specific identification and quantification of clopidogrel and its metabolite - clopidogrel carboxylic acid - in extracts from objects of biological origin, which in turn will record cases of acute and fatal poisoning by this drug.

To develop effective methods for isolating clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid from biological material, model mixtures of the drug with blood, urine and liver that did not undergo putrefactive changes were used. The amount of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid used for model experiments was calcu-

lated based on data from the scientific literature on the amount of substances in human organs and tissues in fatal poisoning.

When performing a targeted study of biological material on clopidogrel, it is recommended to use the method of isolation of chloroform from liver tissues with extraction purification to isolate the native substance and the method of isolation with alkaline water to isolate its metabolite.

When isolated, clopidogrel enters the "alkaline" chloroform extract, and clopidogrel carboxylic acid - to the "acid" chloroform extract.

Analysis of "acidic" chloroform extracts is performed in accordance with the generally accepted scheme of TLC screening in the general system of solvents for substances of acidic and neutral nature of chloroform - acetone (80:20). The clopidogrel carboxylic acid spot in this solvent system has $R_f = 0.32$.

As developers use: UV light - a green spot; FeCl_3 solution (for the development of derivatives of salicylic acid and pyrazolone-5) - the stain of clopidogrel carboxylic acid turns purple; successively Dragendorff reagent and sulfuric acid (for the development of alkaloids and 1,4-benzodiazepine derivatives) - the spot of clopidogrel carboxylic acid turns brown.

With developers of HgSO_4 and diphenylcarbazone, with a solution of potassium permanganate clopidogrel carboxylic acid does not give color.

Next, TLC studies are performed in separate solvent systems for the respective groups of substances.

For clopidogrel carboxylic acid, it is recommended at this stage to conduct research in the solvent system of isopentanol - isobutanol (50:50). Pre-plate is eluted in chloroform to purify from co-extractives.

The plate is developed with FPN reagent and a purple spot is observed ($R_f = 0.64$).

Confirmatory study is performed in three solvent systems - isopentanol - isobutanol (20:80), isopentanol - isobutanol (80:20), chloroform - acetone (80:20). Pre-plate is eluted in chloroform to purify from co-extractives.

The plates are developed with Marki's reagent, Mandelin's reagent, cobalt thiocyanate solution and spots of red, yellow and violet color are observed, respectively ($R_f = 0.52; 0.81; 0.32$, respectively).

Identification is carried out in the presence of a "witness" - clopidogrel carboxylic acid (using a standard methanol solution with a concentration of $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$).

The confirmatory study is performed by the method of derivative thin layer chromatography as follows: on the starting line of the chromatographic plate is applied at two points the above amount of the obtained ethanol solution. The first point is treated with 10% sodium hydroxide solution and dried at room temperature. $10 \mu\text{l}$ of "witness" solutions - clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid (concentration $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) are applied to the starting line of the chromatographic plate. The plate is dried and eluted in a solvent system of ethanol - concentrated acetic acid - water (5: 3: 2). Pre-plate is eluted in chloroform for purification from co-extractives.

The plate is developed on lanes 2 and 3, using the hydroxam test method - violet spots are observed ($R_f = 0.88$). Next, the plate is developed on lanes 1 and 4 with 5% solution of iron (III) chloride - violet spots are observed ($R_f = 0.67$).

Identification is carried out in the presence of a "witness" - clopidogrel (using a standard chloroform solution with a concentration of $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$).

Quantitative determination of clopidogrel carboxylic acid is performed by UV spectrophotometric and HPLC methods.

To quantify clopidogrel by UV spectrophotometric and extraction-photometric methods, standard solutions of clopidogrel bisulfate of different concentrations were prepared and calibration graphs were constructed.

As a compensating solution in the UV spectrophotometric determination of optical density using $0.1 \text{ mol} / \text{l}$ hydrochloric acid solution.

In the extraction-photometric method, chloroform is used as a compensating solution.

Key words: clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, isolation, identification, quantification, extraction conditions, isolation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1 КЛОПІДОГРЕЛЬ: ФАРМАКОЛОГІЧНІ ТА ТОКСИКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ; МЕТОДИ АНАЛІЗУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	28
1.1 Фармакологічні властивості, його фармакодінаміка, фармакокінетика, всмоктування, розподіл, метаболізм та виведення.....	30
1.2 Токсикологічні властивості клопідогрелю.....	35
1.3 Фізико-хімічні властивості клопідогрелю. Методи ідентифікації та кількісного визначення.....	38
1.3.1 Методи ідентифікації та кількісного визначення лікарської субстанції.....	40
1.3.2 Методи визначення клопідогрелю та його домішок в лікарських засобах.....	42
1.3.3 Методи визначення клопідогрелю та його метаболітів в біологічних матеріалах.....	49
Висновки до розділу 1.....	54
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1 Об'єкти досліджень, засоби вимірювань, пристрої.....	56
2.2 Реактиви та їх приготування.....	58
2.3 Вибір загальної методології досліджень.....	64
2.4 Методи досліджень.....	64
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	65
3.1 Визначення клопідгрелю за допомогою якісних реакцій...	65
3.2 Застосування методів хроматографії для ідентифікації клопідогрелю та його метаболіту-клопідогрель карбонової кислоти.....	68
3.2.1 Ідентифікація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом тонкошарової хроматографії	69
3.2.2 Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту – клопідогрель карбонової кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії.....	78
Висновки до розділу 3.....	84
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА МЕТОДІВ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	86
4.1 Кількісне визначення клопідогрелю методом УФ-спектрофотометрії.....	86
4.1.1 Побудова градуувального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю..	89
4.1.2 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних	

розчинах за допомогою розробленої методики УФ-спектрофотометричного визначення	92
4.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти до методом УФ-спектрофотометрії	94
4.2.1 Побудова градувального графіка для УФ- спектрофото-метричного визначення клопідогрель кар- бонової кислоти.....	97
4.2.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової ки- слоти в модельних розчинах за допомогою розробленої методики УФ-спектрофотометричного визначення	100
4.3 Валідаційні характеристики УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у розчинах.....	102
4.4 Кількісне визначення клопідогрелю методом екстракцій- ної фотометрії.....	104
4.4.1 Встановлення значення рН середовища, оптималь- ного для проведення аналізу.....	106
4.4.2 Вибір оптимального об'єму розчину метилового оранжевого	108
4.4.3 Побудова градувального графіка для екстракцій- но-фотометричного визначення клопідогрелю.....	110
4.4.4 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики екстрак- ційно-фотометричного визначення.....	113
4.5 Валідаційні характеристики екстракційної фотометрії ви- значення клопідогрелю у розчинах.....	115
4.6 Кількісне визначення клопідогрелю методом вискоєфек- тивної рідинної хроматографії.....	117
4.6.1 Побудова градувального графіка для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ.....	122
4.6.2 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кі- лькісного визначення.....	125
4.7 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти методом вискоєфективної рідинної хроматографії.....	126
4.7.1 Побудова градувального графіка для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ.....	126
4.7.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової ки- слоти в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення.....	130
4.8 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кількісного визна- чення клопідогрель карбонової кислоти	131

4.9. Валідаційні характеристики ВЕРХ -методу визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у розчинах..	133
4.10 Порівняльна оцінка результатів УФ-спектрофотометричної, екстракційно-фотометричної та ВЕРХ-методик кількісного визначення клопідогрелю.....	135
4.11 Порівняльна оцінка результатів УФ-спектрофотометричної та ВЕРХ-методик кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти.....	137
Висновки до розділу 4.....	138
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ ЕКСТРАКЦІЇ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ.....	141
5.1 Дослідження ступеня екстракції клопідогрелю із водних розчинів органічними розчинниками.....	141
5.2 Дослідження ступеня екстракції клопідогрель карбонової кислоти із водних розчинів органічними розчинниками.....	146
Висновки до розділу 5.....	148
РОЗДІЛ 6 ВИДІЛЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	150
6.1 Ізолювання клопідогрелю із тканин печінки.....	152
6.1.1 Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою оксалатною (модифікований метод О. О. Васильєвої).....	152
6.1.2 Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка).....	153
6.1.3 Ізолювання клопідогрелю етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (модифікований метод Стаса-Отто).....	154
6.1.4 Ізолювання клопідогрелю хлороформом.....	156
6.2 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із тканин печінки.....	157
6.2.1 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти водою, підкисленою кислотою оксалатною (модифікований метод О. О. Васильєвої).....	157
6.2.2 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка).....	158
6.2.3 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (модифікований метод Стаса-Отто).....	160
6.2.4 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти підлуженою водою (модифікований метод П. Валова).....	161
6.2.5 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти хло-	

роформом.....	162
6.3 Ізолювання клопідогрелю із біологічних рідин організму..	163
6.3.1 Ізолювання клопідогрелю із крові (методика І).....	163
6.3.2 Ізолювання клопідогрелю із крові (методика ІІ).....	164
6.3.3 Ізолювання клопідогрелю із сечі.....	166
6.4 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із біологічних рідин організму.....	167
6.4.1 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові (методика І).....	167
6.4.2 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові (методика ІІ).....	168
6.4.3 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із сечі..	169
6.5 Ідентифікація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у витягах із об'єктів біологічного походження.....	170
6.6 ТШХ-очистка витягів із об'єктів біологічного походження	171
6.7 Кількісне визначення клопідогрелю у витягах із об'єктів біологічного походження.....	172
6.7.1 Кількісне визначення клопідогрелю за УФ-спектрофотометричною методикою.....	172
6.7.2 Кількісне визначення клопідогрелю за екстракційно-фотометричною методикою.....	172
6.7.3 Кількісне визначення та ідентифікація клопідогрелю за ВЕРХ-методикою.....	174
6.8 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти у витягах із об'єктів біологічного походження.....	174
6.8.1 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти за УФ-спектрофотометричною методикою.....	174
6.8.2 Кількісне визначення та ідентифікація клопідогрель карбонової кислоти за ВЕРХ-методикою.....	175
6.9 Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель.....	179
Висновки до розділу 6.....	182
ВИСНОВКИ.....	184
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	187
ДОДАТКИ.....	204
Додаток А. Список публікацій.....	204
Додаток Б. Акти впровадження.....	208
Додаток В. Методичні рекомендації «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель».....	220

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфат
ВЕРХ	високоєфективна рідинна хроматографія
ДФУ	Державна Фармакопея України
ІХС	Ішемічна хвороба серця
КЕФ	Капілярний електрофорез
ЛЗ	лікарський засіб
РХ	рідина хроматографія
ССЗ	серцево-судинні захворювання
ТТП	тромботична тромбоцитопенічна пурпура
ТШХ	Тонкошарова хроматографія
DOE	експериментальні дослідження
ХТА	хіміко-токсикологічний аналіз
CAM	фармакологічно активний метаболіт
CLO	клопідогрель
CLP	клопідогрель бісульфату
ССА	клопідогрелю карбонова кислота
CYP	Цитохром Р450
LOD	найменша кількість, яка виявляється
LOQ	найменша кількість, яка вимірюється
RSD	відносне стандартне відхилення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) займають перше місце в більшості країн світу серед усіх причин смерті. В Україні близько 70% людських смертей викликані ССЗ, в тому числі і атеротромбозом, який широко поширений і в даний час займає провідне місце в структурі загальної смертності. Крім того, в Україні більше 50 % всіх захворювань і п'ята частина всіх випадків інвалідності припадає на долю ішемічної хвороби серця та інсульту.

Упродовж останніх років провідне місце серед препаратів з механізмом тромбоцитарної агрегації займає клопідогрель, який ефективно застосовується в комплексному лікуванні ССЗ (нестабільна стенокардія, гострий інфаркт міокарду, транзиторні ішемічні атаки, гострий ішемічний інсульт, гостра ішемія кінцівок).

Клопідогрель був схвалений Американською адміністрацією по харчовим продуктам і лікарських засобів (FDA) для широкого клінічного застосування в 1997 р. Європейське медичне агентство (ЕМА) схвалила клопідогрель в 1998 г. Спочатку мова йшла про монотерапію для зниження ризику ускладнень атеросклерозу у хворих з нещодавно перенесеним інсультом, інфарктом міокарда (ІМ) або діагностованим атеросклерозом артерій нижніх кінцівок з клінічними проявами.

Дослідження, проведені клінічним кардіологом І.С. Явеловим, дозволили використовувати клопідогрель в комбінованій терапії при різних ССЗ.

Сьогодні профілактика і лікування кардіологічних хвороб і хвороб системи кровообігу є однією із пріоритетних проблем охорони здоров'я. Лікарські засоби для лікування захворювань серцево-судинної системи посідають одне з перших місць на ринку лікарських препаратів. Є.А.Редькіною, Н.О. Ткаченко, В.В. Гладишевим було проведено маркетингові дослідження українського ринку антиагрегантів. Із проведених авторами досліджень, стає зрозуміло, що провідну позицію займає підгрупа

B01AC04 Клопідогрель, на яку припадає 44,8% усього ринку антиагрегантів. Даний лікарський препарат входить в перелік лікарських засобів для лікування пацієнтів з ускладненнями ССЗ, викликаними COVID-19, згідно протоколів лікування, які затверджені Міністерством охорони здоров'я України.

Авторами Фукусако Т, Ямасіта Х, Омото М, Мацуда К, Шинохара К, Фухімура Ю. описані неодноразові випадки отруєння клопідогрелем. В роботах таких авторів Коцабай Г, Окглар І, Акая В, Гюлер К. О описані випадки самогубства клопідогрелем.

В науковій літературі висвітлено багато методик аналізу клопідогрелю у лікарських засобах, біологічних рідинах людини для вивчення фармакокінетики та фармакодинаміки. Але не має жодного хіміко-токсикологічного дослідження препарату, вживаного як в терапевтичних, так і у токсичних дозах. Тому ми вважаємо, що проведення такого дослідження є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (номер державної реєстрації 0103U000475) термін дії 2003-2013 рр., перереєстровано «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0114U000958), а також планом проблемної комісії «Фармація» НАМН та МОЗ України. Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні вченої ради Національного фармацевтичного університету від 25 червня 2009 р. (протокол № 11).

Мета і завдання дослідження

Метою дисертаційної роботи є обґрунтування схеми хіміко-токсикологічного дослідження об'єктів біологічного походження на клопідогрель, що включає методики його ізолювання із біологічних рідин та твер-

дих тканин, методики виявлення та кількісного визначення клопідогрелю в отриманих витягах, а також методики додаткової очистки витягів із біологічних об'єктів.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- проаналізувати та узагальнити дані наукової літератури відносно фізико-хімічних, фармакологічних та токсикологічних властивостей клопідогрелю та його основного неактивного метаболіту - клопідогрель карбонової кислоти, що на сьогодні застосовуються у медичній практиці
- дослідити метаболіти клопідогрелю та обрати серед них речовину-«маркер», за допомогою якої можна проводити ідентифікацію та кількісне визначення клопідогрелю у витягах з об'єктів біологічного походження паралельно з дослідженням за нативною речовиною;
- запропонувати кольорові реакції для попереднього виявлення клопідогрелю та його «маркеру», виділеного з біологічного матеріалу.
- розробити чутливі методики виявлення та ідентифікації клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу ТШХ, що дозволять відрізнити його від препаратів, що можуть застосовуватись для супутньої терапії, а також очистити витяги з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин.
- розробити методики виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методами ВЕРХ.
- розробити методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу (ВЕРХ, екстракційно-фотометричну, УФ-спектрофотометричну).
- вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на ступінь екстракції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з водних розчинів;

- дослідити можливість застосування загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин кислотного та основного характеру до клопідогрелю та його неактивного метаболіту;
- розробити індивідуальні методики виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з біологічних тканин та рідин організму (крові, сечі).
- запропонувати умови очищення клопідогрелю та його маркеру від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу за допомогою методів екстракції та хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
- запропонувати схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель.

Об'єкт дослідження. Хіміко-токсикологічний аналіз клопідогрелю та його «маркеру».

Предмет дослідження. Методики ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із об'єктів біологічного походження, методики їх виявлення та кількісного визначення у модельних розчинах та витягах із біологічного матеріалу, методики очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель та клопідогрель карбонову кислоту.

Методи дослідження. Для ідентифікації клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у розчинах та витягах із біологічного матеріалу використовували методи ТШХ, реакційної ТШХ, ВЕРХ, кольорові реакції; для кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти – УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний та ВЕРХ-методи. Для ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка, П. Валова, Стаса – Отто, а також окрему методику ізолювання хлороформом із ліофілізованого біологічного матеріалу.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше виконано комплекс системних досліджень клопідогрелю як об'єкта хіміко-токсикологічного аналізу.

З продуктів метаболізму клопідогрелю обрано маркер – клопідогрель карбонову кислоту – та рекомендовано проводити хіміко-токсикологічне дослідження на клопідогрель паралельно за маркером та нативною речовиною. Розроблено підтверджуючу методику виявлення клопідогрелю з використанням підходів реакційної та двомірної ТШХ, що дає можливість специфічно визначати клопідогрель в умовах хіміко-токсикологічного дослідження.

Вперше встановлено хроматографічну поведінку клопідогрелю та його маркеру в умовах загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних отрут та запропоновано доповнення до цієї схеми з метою виявлення клопідогрелю. Встановлено основні хроматографічні параметри клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти при дослідженні методом ВЕРХ в системі «ВЕРХ-аналізатора», що застосовують в хіміко-токсикологічному та криміналістичному аналізі в країнах СНД.

Розроблено нові УФ-спектрофотометрична, екстракційно-фотометрична та ВЕРХ-методику кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, придатні для цілей хіміко-токсикологічного та криміналістичного аналізу.

Встановлено оптимальні умови екстракції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з водних розчинів хлороформом, діетиловим етером та гексаном. Вперше порівняно ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних отрут щодо клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти. Запропоновано методики виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з біологічних рідин організму (крові, сечі).

На підставі виконаних досліджень вперше запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель.

Практичне значення отриманих результатів

На підставі комплексу проведених досліджень розроблено схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель, що знайшла своє відображення в підготовлених методичних рекомендаціях «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель», які рекомендовано застосовувати в практичній роботі відділень судово-медичної токсикології для вирішення питань щодо отруєння клопідогрелем, в клінічних лабораторіях з метою визначення клопідогрелю в біологічних рідинах, а також у криміналістичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження клопідогрелю впроваджено в практичну роботу відділень судово-медичної токсикології Херсонської (акт впровадження від 18.12.2014р), Житомирського (акт впровадження від 03.11.2013р), Черкаської (акт впровадження від 18.11.2013р) та Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт впровадження від 28.10.2013), в навчальний процес кафедри клінічної біохімії й судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт впровадження від 05.11.2013р), кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 18.11.2013р), кафедри неорганічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 21.11.2013р), кафедри фармації Івано-Франківського державного медичного університету (акт впровадження від 29.10.2013р), кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії Луганського державного медичного університету (акт впровадження від 18.11.2013р), кафедри хімії Донецького національного медичного університету (акт впровадження від 03.11.2013 р), кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження від 21.11.2013 р), кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (акт впровадження 20.12.2020 р).

Особистий внесок здобувача

Разом з науковим керівником визначено мету та задачі досліджень, розроблено методичні підходи, згідно з якими підібрано методи виконання експериментальної частини дисертації. Особисто проведено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та систематизацію отриманих результатів, сформульовано висновки роботи.

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. Персональний внесок у всіх опублікованих зі співавторами (В. С. Бондар, З. В. Шовкова) працях вказується за текстом дисертації, а також в авторефераті у списку фахових публікацій.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації

Основні результати та положення дисертаційної роботи викладено і обговорено на Всеукраїнській науково-практичній конференції: «Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу (Харків, 2009), VII Національний з'їзд фармацевтів. «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010), Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю з дня народження професора О. М. Гайдукевича «Синтез та аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 2013), XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo «Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs» (Kharkiv, 2013), Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 140-річчю з дня народження заслуженого проф. М. С. Бокаріуса та 110-річчю з дня народження проф. М. М. Бокаріуса (Харків, 2018).

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, п'яти роз-

ділів експериментальних досліджень, висновків, 3 додатки (18 стор.) та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 220 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 168 сторінок), ілюстровано 47 таблицями, 14 рисунками, 1 схемою. Перелік використаної літератури містить 149 джерел, серед яких 89 – іноземні.

РОЗДІЛ 1
КЛОПІДОГРЕЛЬ:
ФАРМАКОЛОГІЧНІ ТА ТОКСИКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ;
МЕТОДИ АНАЛІЗУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Серцево-судинні захворювання займають перше місце в більшості країн світу серед усіх причин смерті. Нйчастіше в основі серцево-судинних ускладнень лежить атеротромбоз [1, 2]. Атеротромбоз - збірна назва для патологічних процесів, що відбуваються в судинах головного мозку, серця та інших внутрішніх органів, кінцівок. Атеротромбоз, згідно клінічної характеристики, - процес тромбоутворення на атеросклеротично змінених судинах, який веде до таких ускладнень, як інфаркт міокарда та інсульт [2, 3 ,4]. Клінічним проявом атеросклерозу є атеротромбоз, що лежить в основі переважної більшості гострих уражень коронарних (нестабільна стенокардія, гострий інфаркт міокарда), мозкових (транзиторні ішемічні атаки, гострий ішемічний інсульт) і периферичних артерій (гостра ішемія кінцівок). Всі види атеротромбоза широко поширені і в даний час займають провідне місце в структурі загальної смертності в більшості розвинених країн [5, 6]. У структурі загальної смертності різні прояви і ускладнення атеротромбоза займають близько 28 %. Його наявність скорочує середню очікувану тривалість життя на 5-7 років. Зазвичай атеротромбоз розвивається у віці після 50-55 років, частіше хворіють чоловіки [4, 7].

В Україні серцево-судинні захворювання (ССЗ) є основною причиною смертності, саме вони викликали 67 % смертей [8, 9]. Крім того, в Україні більше 50 % всіх захворювань і п'ята частина всіх випадків інвалідності припадає на частку ішемічної хвороби серця та інсульту [10, 11].

Встановлення провідної ролі тромбоцитарної ланки гомеостаза в патогенезі атеротромбозу сприяло розробці великої кількості лікарських препаратів, які показали свою ефективність у великих багатоцентрових дослідженнях у хворих з гострим коронарним синдромом, хронічною формою ішемічної

хвороби серця, в тому числі при черезшкірних реваскуляризаційних процедурах [12,13].

Тривале застосування антиагрегантів - один з дієвих способів попередження несприятливих наслідків при патології серцево-судинної системи [9, 14].

Для профілактики і лікування ускладнень атеротромбозу використовують такі групи препаратів: тромболітичні засоби, антитромбінові препарати (гепарини і антагоністи Ха фактора), а також антитромбоцитарні препарати.

З урахуванням фізіологічних механізмів згортання крові антиагреганти препарати за механізмом дії поділяють на групи [13,14]:

1. Ті, які порушують метаболізм арахідонової кислоти, необоротно блокують ЦОГ-1тромбоцитів: ацетилсаліцилова кислота (Аспірин, Аспекард, Аспірин Кардіо, Ацекардін, Полокард, Терапін, Екорин і ін.) та комплексні препарати, які її містять (з гідроксидом магнію - Кардіомагніл, Кардіо-Магніт форте; з дипіридамолом - Агренокс).
2. Інгібітори фосфодіестерази тромбоцитів, що діють на рівень цАМФ в тромбоцитах: дипіридамолом (Курантил).
3. Блокатори аденозиндифосфат (АДФ) рецепторів: тієнопіридини – тилопідин (Тиклід, Вазотік, Іпатон, Тиклопидин-Ратіофарм), клопідогрель (Платогрель, Плавикс, Ареплекс, Атерокард, Деплатт, Зілт, Клопігріт, Клопілет, Плагріл, Ноклот, Тромбонет).
4. Блокатори ІІb / ІІІа рецепторів тромбоцитів - ептифібатид (Інтегрилін), тирофибан (В Україні не зареєстрований).

У комплексному лікуванні атеросклерозу активно застосовують тільки антитромбоцитарні засоби, ефективність яких перевірена з позицій доказової медицини: серед основних груп лікарських препаратів для лікування патології серцево-судинної системи особливе місце займає клопідогрель [9, 11, 12].

В 2016 році Є. А. Редькіною, Н.О. Ткаченко, В.В. Гладишевим було проведено маркетингові дослідження українського ринку антиагрегантів. На території України в групі "Антиагреганти" зареєстровано 87 номенклатурних

позицій відповідно до міжнародної класифікації АТС. Їх випускають 49 виробників з 18-ти країн світу. На сьогоднішній день більша частина цього сегмента фармацевтичного ринку представлена зарубіжними фірмами-виробниками - їх частка становить 55,2 %, частка українських виробників - 44,8 %. Асортимент сформований 11 підгрупами антиагрегантів, провідну позицію займає підгрупа B01AC04 Клопідогрель, на яку припадає 44,8 % [15]. Підгрупа клопідогрелю представлена такими лікарськими засобами: Плавікс (Санофі-Авентіс, Франція), Плагріл (Д-р Редіс, Індія), Клопідогрел-Тева (Ізраїль), Лопісел (Актавіс, Мальта), Зілт (KRKA, Словенія), Клопідекс (Белупо, Хорватія), Клопідогрель (ОЗ ГНЦЛС ООО, Україна), Атерокард (АТ «Київський вітамінний завод», Україна), Тромбонет (ПАТ «Фармак», Україна), Клопідогрель-Фармекс (Товариство з обмеженою відповідальністю «Фармацевтична фірма «Вертекс», Україна). Даний лікарський засіб випускається тільки в формі таблеток [16, 17].

На сьогоднішній день йдуть дослідження клопідогрелю в формі суппозиторіїв. Це представлено роботами Є. А. Редькіною, Н. О. Ткаченко, В. В. Гладишевим [18, 19].

1.1 Фармакологічні властивості клопідогрелю, його фармакодинаміка, фармакокінетика, всмоктування, розподіл, метаболізм та виведення

Клопідогрель-представник групи тієнопіридину, механізм дії якого пов'язаний з блокадою P_2Y_{12} рецепторів тромбоцитів, що перешкоджає стимулюючій дії на них АДФ і подальшій активації глікопротеїнових рецепторів $GP IIb/IIIa$ [1, 20]. Клопідогрель також уповільнює вивільнення вмісту щільних гранул тромбоцитів (наприклад, кальцію, серотоніну), і альфа гранул (наприклад, фібриногену і тромбоспондину), які посилюють агрегацію тромбоцитів [21, 22].

Препарат необоротно модифікує нízькоафінні АДФ-рецептори, впливаючи на тромбоцити впродовж усього періоду їх життя (приблизно 7 днів). На

відміну від аспірину, тієнопіридинові інгібітри агрегації тромбоцитів, такі як клопідогрель, не інактивують циклооксигеназу тромбоцитів для запобігання синтезу вазоконстрикторних простагландинів і тромбоксану A_2 [22, 23].

При прийомі клопідогрелю по 75 мг щодня, інгібування агрегації тромбоцитів демонструється вже в перший день лікування з досягненням стійкої антиагрегатної ефективності 40-60 % між 3-м і 7-м днями. Після припинення прийому препарату, агрегація тромбоцитів і час кровотечі зазвичай повертається до початкових значень впродовж 5 днів [24, 25].

Інгібування агрегації тромбоцитів при пероральному прийомі препарату діє впродовж 2 годин (первинна реакція) [26].

Максимальна реакція при пероральному прийомі відмічається через 3-7 днів. Інгібування агрегації тромбоцитів досягає стабільності між 3-м і 7-м днями лікування при застосуванні щоденної дози в 75 мг. Максимальний ефект, на АДФ-індукційну агрегацію тромбоцитів, підтримується впродовж мінімуму 3 місяців при прийомі 75 мг / день [24, 26]. Ударна доза в 300-400 мг приводить до пікового інгібування агрегації тромбоцитів впродовж 2-5 годин [27].

Тромбоцити, піддані дії клопідогрелю, необоротно змінюються, але впродовж приблизно 5 днів після припинення лікування параметри коагуляції, в тому числі агрегації тромбоцитів і час кровотечі, поступово вернаються до початкових значень, оскільки змінені тромбоцити вже замінені [27, 28].

При прийомі препарату по 75 мг / день впродовж 7 днів, повне відновлення функції тромбоцита не відбувалося протягом 7 днів після прийняття останньої дози клопідогрелю [27, 29].

Рівні концентрації препарату (терапевтичний рівень).

Час до реєстрації максимальної концентрації після перорального прийому становить -0,7-1 годину. Пік плазмової концентрації основного метаболіту, тобто похідного карбонової кислоти 2,6 мкг / мл досягається через 0,7-0,9 години після прийому однієї дози в 75 мг. Пік плазмової концентрації основного метаболіту (неактивного) в рамках від 1,6 до 4,9 мкг / мл, досягається

через 0,8-1,1 години після одноразового прийому дози клопідогрелю в дозуванні 50-150 мг. Фармакокінетика головного метаболіту лінійна в діапазоні доз 50-150 мг [27, 29].

Всмоктування. Таблетки клопідогрелю для прийому всередину добре всмоктуються. Всмоктування відбувається швидко, але є неповним. Результати досліджень *in vitro* показують, що поглинання клопідогрелю в клітини Caco-2 обмежується Р-глікопротеїном (Р-gp, ABCB1), що свідчить про те, що Р-gp може впливати на кишкову абсорбцію та пероральну біодоступність клопідогрелю [26, 29]. На біодоступність не впливає прийом їжі [30].

Розподіл. Основний циркулюючий метаболіт (похідне карбонової кислоти) і вихідна сполука - сильно пов'язані з протеїном (94 % і 98 % відповідно) і в штучних умовах двосторонньо зв'язуються з білком плазми [32, 32].

Середня максимальна концентрація незміненого клопідогрелю в плазмі (близько 2,2-2,5 нг / мл після одноразового застосування дози в 75 мг) спостерігається приблизно через 45 хв після прийому [20, 27].

Метаболізм. Клопідогрель неактивний *in vitro*, і біотрансформація печінки необхідна, щоб виразити повну антиагрегаційну активність препарату [24, 33, 34].

In vitro і *in vivo* існує два основних шляхи його метаболізму: один відбувається за участю естераз і призводить до гідролізу з утворенням основного (неактивного) циркулюючого метаболіту- похідного карбонової кислоти SR26334 (яке становить 85 % всіх метаболітів, що циркулюють в плазмі крові, пов'язаних з препаратом). Даний метаболіт гідролізується карбоксилестеразою 1 (CES1). Похідне карбонової кислоти не чинить інгібуючого дії на тромбоцити [21]. Активним метаболітом, є похідне тіолу [24]. В цій системі залучені ферменти системи цитохрому Р450. Спочатку клопідогрель перетворюється в проміжний метаболіт 2-оксо-клопідогрель. В результаті подальшого метаболізму 2-оксо-клопідогрелю утворюється тіолове похідне - активний метаболіт. *In vitro* цей метаболічний шлях опосередкований ферментами CYP 3A4, CYP 2C19, CYP 1A2 і CYP 2B6. Активний метаболіт клопідогрелю

(тіолове похідне), який був виділений *in vitro*, швидко та необоротно зв'язується з рецепторами на тромбоцитах, тим самим перешкоджаючи агрегації тромбоцитів [25, 32, 35].

Дослідження кінетики ферментів *in vitro* показали, що CYP1A2 (35,8 %), CYP2B6 (19,4 %) і CYP2C19 (44,9 %) сприяють утворенню 2-оксоклопідогрелю, тоді як CYP2B6 (32,9 %), CYP2C9 (6,79 %), CYP2C19 (20,6 %) та CYP3A4 (39,8 %) сприяють утворенню активного метаболіту клоп-АМ відповідно [24, 36]. За підрахунками, CYP2C19 сприяє приблизно 50 % загального утворення клоп-АМ із клопідогрелю і, таким чином, відіграє значну роль у біоактивації клопідогрелю, тоді як інші ізоферменти вносять свій внесок меншою мірою. У літературі є суперечливі дані про те, чи можуть ці шляхи біотрансформації бути насиченими, тобто чи клопідогрель та його активний метаболіт мають лінійну фармакокінетику. Хоча дані різноманітних досліджень свідчать про те, що клопідогрель та його основний неактивний метаболіт SR26334 демонстрували лінійну ФК у широкому діапазоні доз (50 - 900 мг) [25, 26, 37], дані Peer et al. [33, 38] та Horenstein et al. [27, 39] повідомили про ~ 4-кратне та ~ 2-кратне збільшення AUC клоп-АМ при збільшенні дози клопідогрелю з 75 мг до 600 мг та з 300 мг до 900 мг відповідно, Horenstein et al. повідомили, що збільшення дози клопідогрелю з 75 до 150 або 300 мг призвело до ~ 1,5- та ~ 2,2-кратного збільшення AUC клоп-АМ у екстенсивних, проміжних та поганих метаболізаторах CYP2C19 [27, 30]. Ці висновки підтверджують наявність нелінійності в процесах біоактивації клопідогрелю. Схема утворення метаболітів клопідогрелю представлена на рисунку 1.1.

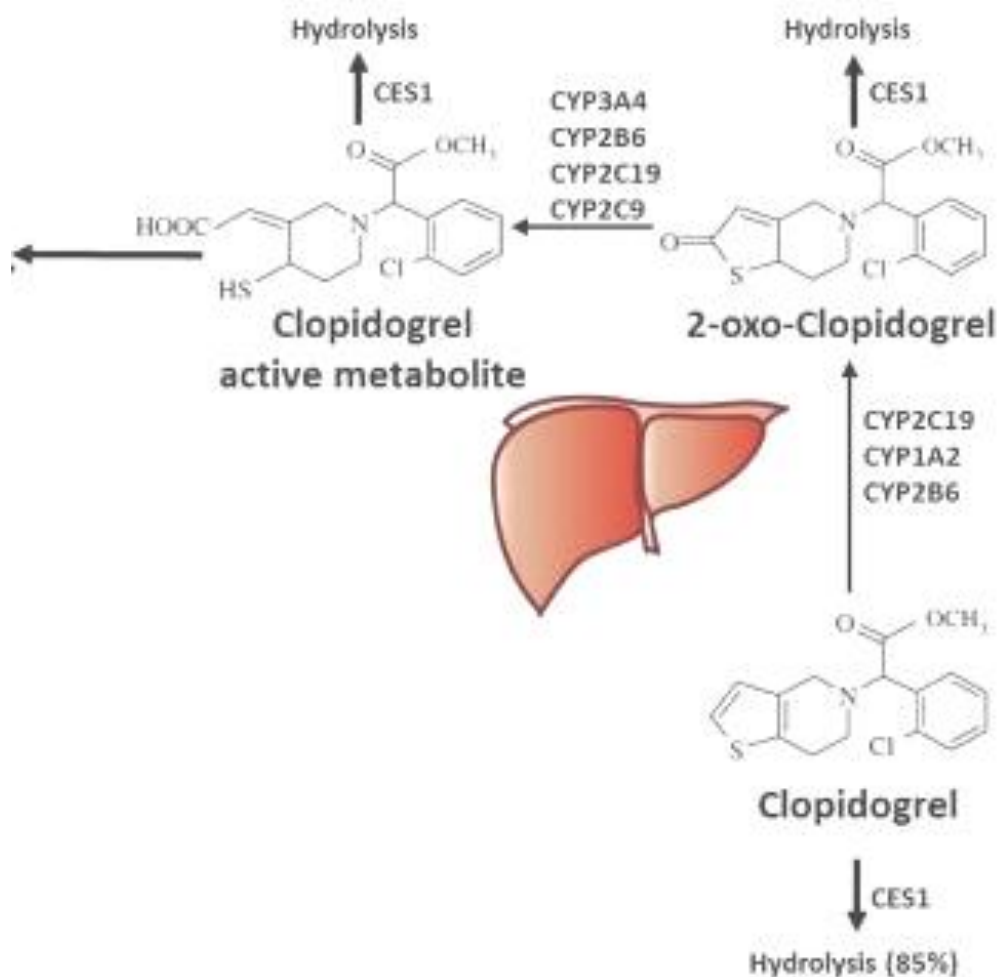


Рис 1.1 Схема метаболізму клопідогрелю

Виведення. Після прийому міченого ізотопом клопідогрелю спостерігалося 50 % -е ниркове виділення його впродовж п'яти днів. Після прийому однієї міченої дози і впродовж стабільного стану, ниркове виділення становить -41 % і 46 %, відповідно. Ні вік, ні ниркова функція, ні стать пацієнта не впливають на терапевтичну ефективність препарату. Екскреція через кишечник через 5 днів після прийому міченої дози клопідогрелю склала 46 %. У свою чергу, після прийому однієї міченої дози і протягом підтримки стабільної концентрації препарату в крові, виділення через кишечник склало відповідно – 51 % і 48 % [21].

Мінімум 50 % препарату (продуктів його обміну) виділяється з сечею, близько 48 % дози всмоктується з кишечника на основі даних метаболітів [24].

1.2 Токсикологічні властивості клопідогрелю

З віком кількість медикаментів, які вживають люди похилого віку тільки збільшується. Постійні болі, порушення всмоктуваності шлунково-кишкового тракту, погана пам'ять можуть бути причиною передозування препаратів і медикаментозного отруєння.

Клопідогрелю гідросульфат належить до групи засобів, що впливають на згортання крові та агрегацію тромбоцитів, підгрупи антиагрегантів (деагреганти). Клопідогрелю гідросульфат виявляє подразнюючу дію при контакті зі слизовими оболонками очей, має загальнотоксичну дію [33, 34].

Клопідогрелю бісульфат в Російській Федерації віднесли до шкідливих речовин. На дану речовину розроблені і підготовлені відповідно до вимог ГОСТ 12.1.016-79 «Повітря робочої зони. Вимоги до методик вимірювання концентрацій шкідливих речовин »з ізм. 1, ГОСТ 12.1.005-88 методичні вказівки. Орієнтовний безпечний рівень впливу (ОБРВ) клопідогрелю гідросульфату в повітрі робочої зони 0,2 мг / м³[40].

Так як клопідогрель не використовується в монотерапії, а використовується в комбінованій терапії, може виникати таке явище як лікарська взаємодія.

Лікарська взаємодія - це зміна ефектів препарату, обумовлену недавнім або одночасним прийомом інших лікарських засобів (міжлікарська взаємодія) або прийомом препарату разом із їжею (взаємодія ліків з їжею) або прийомом біологічно активних добавок (взаємодія ліків з дієтичними добавками) [27, 28]. Оскільки фармакологічний ефект клопідогрелю тісно пов'язаний з його біоактивацією через ферменти CYP, інші супутні ліки, що пригнічують активність відповідних ферментів CYP (наприклад, CYP2C19, CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6 та CYP1A2), можуть перервати антитромбоцитарну активність клопідогрелю і негативно впливає на клінічний результат. Наприклад, інгібування тромбоцитів значно зменшилось при одночасному застосуванні клопідогрелю із сульфонілсечовинами (субстрати CYP2C9) [38], фенпроку-

моном (субстрат CYP3A4 та CYP2C9) [39] або іншими інгібіторами CYP3A4, такими як кетоконазол, еритроміцин та толеандоміцин). Було показано, що одночасний прийом грейпфрутового соку спричиняє більш ніж на 80 % зниження біоактивації клопідогрелю внаслідок придушення CYP2C19 на додаток до його добре встановленого впливу на CYP3A4 [38,39]. Цікаво, що інгібітор CYP3A4 ітраконазол виявляв сильніший інгібуючий ефект на клопідогрель PD у здорових добровольців, що не експресують генотип CYP3A5, ніж у тих, хто носить експресорний генотип CYP3A5 [37, 42].

Лікарська взаємодія призводить до того, що знижують активність ферменту CYP, і призведе до накопичування клопідогрелю та отруєння ним [43, 44]. При передозуванні клопідогрелю можливе подовження часу кровотечі з подальшими ускладненнями. У разі виникнення кровотечі рекомендується симптоматичне лікування [44, 45].

В аналізі Кларка наркотиків і отрут в фармацевтичних препаратах, біологічних рідинах і матеріалах розтину повідомлялося про один випадок навмисного передозування під час клінічних випробувань. 34-річні жінки проковтнули разову дозу 1050 мг (що еквівалентно 14 стандартним таблеткам по 75 мг) клопідогрелю без супутніх небажаних ефектів спочатку. Але спеціальної антидотової терапії немає [45, 46].

Дуже рідко спостерігалися випадки тромботичної тромбоцитопенічної пурпури (ТТП) після застосування клопідогрелю, іноді навіть після його короточасного застосування. ТТП маніфестує тромбоцитопенією і мікроангіопатичною гемолітичною анемією з неврологічними проявами, нирковою дисфункцією або гарячкою. ТТП потенційно є станом, що загрожує життю і вимагає негайного лікування, зокрема із застосуванням плазмафорезу [46].

Також авторами Фукусако Т, Ямасіта Х, Омото М, Мацуда К, Шинохара К, Фухімура Ю. був описан випадок тромботичної тромбоцитопенічної пурпури, асоційованої з клопідогрелем в 2007 році [46].

Придбана гемофілія. Повідомлялося про випадки розвитку придбаної гемофілії після застосування клопідогрелю. У випадках підтвердженого ізо-

льованого підвищення активованого часткового тромбопластинового часу, що супроводжується або не супроводжується кровотечею. Пацієнти з підтвердженим діагнозом придбаної гемофілії повинні знаходитися під наглядом лікаря і отримувати лікування, застосування клопідогрелю повинно бути припинено [44, 46].

Лікування. Антидот фармакологічної активності клопідогрелю невідомий. При необхідності негайного корегування тривалості кровотечі дія клопідогрелю може бути припинена шляхом переливання тромбоцитарної маси [43,46].

Отруєння. На сьогоднішній день цей лікарський засіб використовується з метою самогубства. Авторами Kocabay G, Okçular I, Akkaya V, Güler K. у 2006 році повідомлялося про випадок 49-річного чоловіка, який прийняв передозування 1650 мг клопідогрелю із суїцидальними намірами. У пацієнта спостерігалися аномалії агрегації тромбоцитів [47].

Автори Borderías Clau L, Garrapiz López J, Caballero G. також повідомляли про легеневу кровотечу та гемоторакс після масового прийому клопідогрелю для спроби самогубства [48].

Al Asmar R, Zeid F. повідомляє про отруєння клопідогрелем, який визвав гострий гемоторакс, що викликав геморагічний шок після малоточного торакоцентезу у пацієнта на клопідогрелі [49].

Терапевтична доза клопідогрелю становить 75 мг на добу, але дозволено у окремих випадках застосовувати 300-400 мг добу. Добова доза вище 1500 мг може бути смертельною [50].

За інформацією, наведеною у науковій літературі за останні 10 років, клопідогрель представляє інтерес з точки зору хіміко-токсикологічних досліджень, оскільки на сьогодні лікарські засоби для лікування захворювань серцево-судинної системи посідають одне з перших місць на ринку лікарських препаратів, і, як наслідок, смертельні випадки при прийомі зазначених препаратів трапляються досить часто [47, 48, 49]. Трапляється це, в першу чергу, звичайно ж, через загострення основного захворювання у пацієнтів при неві-

рному підборі препарату або внаслідок резистентності до нього організму. Але також нерідкі випадки суїцидів серцево-судинними засобами. При цьому зустрічаються як моно-, так і полівалентні отруєння.

Більшість серцево-судинних захворювань супроводжується зміною реологічних властивостей крові, світовим стандартом у коригуванні яких є клопідогрель. Зараз клопідогрель входить як основний антиагрегантний препарат в протоколи терапії ураження судин нижніх кінцівок, ГКС, для вторинної профілактики ІХС і після коронарного стентування American Heart Association [24, 26].

Інформація щодо отруєнь клопідогрелем на території України відсутня, не в останню чергу тому, що методи його хіміко-токсикологічного дослідження не розроблено, а клінічна картина отруєнь та передозувань не має чітко виражених специфічних симптомів за рахунок прийому на фоні суміші інших лікарських засобів.

1.3 Фізико-хімічні властивості клопідогрелю. Методи ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю

Клопідогрель (агрегаль, зілт, лістаб, плавікс, лопірел, егітромб) належить до антиагрегантних лікарських засобів; за хімічною структурою є метил-(+)-(S)-альфа-(*o*-хлорфеніл)-6,7-дигідротієно[3.2-с]піридин-5(4Н) ацетатом [51, 52].

У медицині клопідогрель застосовується у вигляді солі сульфатної кислоти - клопідогрелю гідросульфату (далі клопідогрель), описаного в монографії Європейської фармакопеї. Структурна і брутто-формула цієї речовини наведені нижче (рисунок 1.2).

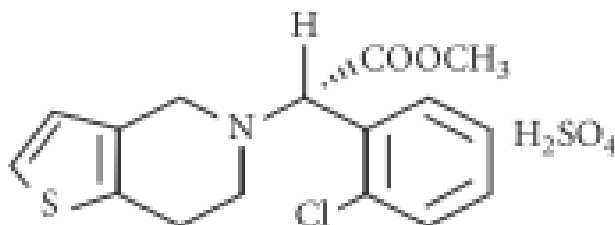


Рис 1.2 Структурна формула клопідогрелю



М.м. 419,9

Клопідогрель – білий або злегка жовтий порошок, гіркий на смак, без особливостей запаху. Практично нерозчинний у воді при нейтральному рН, легко розчинний при рН 1, легко розчинний у метанолі, мало розчинний в метиленхлориді, помірно розчинний в ацетоні, практично не розчинний в етанолі. Розчиняється в розведених мінеральних кислотах [51, 52].

Плавиться клопідогрель в діапазоні температур 184°C [51].

Молекула клопідогрелю має асиметричний атом вуглецю, що створює можливість для утворення двох оптичних ізомерів з R та S конфігурацією. Клопідогрель – лікарська речовина з одним активним енантіомером і одним енантіомером з побічними ефектами. (S) -ізомер клопідогрелю має всю бажану антитромбоцитарну активність і незначну нейротоксичність, тоді як (R) -енантіомер не дає внесок в позитивну активність, але, по суті справи, відповідає за всю нейротоксичність. Таким чином, тільки (S) -клопідогрель був зроблений і вийшов на ринок [52].

Містить не менше 99,0 % і не більше 101,1 % $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ в перерахунку на безводну і вільну від залишкових розчинників речовини [53].

Відомо, що після орального застосування лікарської форми клопідогрелю в плазмі крові фіксується як діюча речовина –клопідогрель так і його метаболіт клопідогрель карбонова кислота [54].

Автором Редькіной Є. А. було становлено, что клопідогрель дуже легко розчинний у воді горячий та 0,1 М розчині натрію гідроксиду, димексиді, та пропіленгліколі (при нагріванні), 0,1 М розчині кислоти хлоридної, розчин-

ний у гліцерині, малорозчинний у поліетиленоксиді 400 та твині- 80 (навіть при нагріванні), практично не розчиний у розплавленому твердому жирі, оліях соняшниковій, касторовій, та вазеліновій навіть при нагріванні [55].

1.3.1 Методи ідентифікації та кількісного визначення лікарської субстанції

Згідно Європейської та Британської Фармакопеї, Фармакопейної статті Російської Федерації є такі методи ідентифікації та кількісного визначення лікарської речовини:

1. ІЧ-спектроскопія. Інфрачервоний спектр субстанції, знятий в диску з калію бромідом, в області від 4000 до 400 см^{-1} за положенню смуг поглинання повинен відповідати спектру стандартного зразка клопідогреля.

Якщо спектри відрізняються, випробувану субстанцію і стандартний зразок клопідогреля розчиняють окремо в мінімальних обсягах етанолу безводного, випарюють до сухого на водяній бані і записують спектри сухих залишків [51, 56, 57].

- 2 *Питоме оптичне обернення* +54 до +58 (ангідридні субстанції). Розчинити 0,250 г в метанолі та розбавити до 25 мл тим же розчинником [51, 57]. Даний метод використовували для аналізу оригінального та генеричного препарату клопідогрелю [62].

Кількісне визначення. Алкаліметрія, пряме титрування. Близько 0,16 г (точна наважка) субстанції розчиняють в суміші 10 мл ацетону, 10 мл метанолу та 30 мл води. Титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду. Кінцеву точку титрування визначають потенціометрично. Під час титрування може спостерігатися утворення осаду. Паралельно проводять контрольний дослід.

1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 20,99 мг клопідогрелю сульфату $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6\text{S}_2$ [51, 56, 57].

Згідно даних Clopidogrel Clarke's Analysis of Drugs and Poisons існують такі методи дослідження [45].

1. *Газова хроматографія*. Колонка DB1 (30m*0,25mm, 0,1µm товщина плівки). Температура колонки від 120⁰ до 290⁰ розганяється за 30 хвилин, проводиться протягом 3х хвилин. Температура інжектора: 290⁰. Газ-носії гелій, швидкість потоку 40 см /с. Виявлення MS (CI (хімічна іонізація), режим FS (повне сканування)). Час утримання клопідогрелю (похідне карбонової кислоти), 6,5 хв.
2. *УФ-спектроскопія*. Клопідогрель карбонова кислота має три спектри поглинання-270, 278, 308 нм.
3. *Мас-спектроскопія*. Головні іони при m/z 262, 264, 110, 138, 125, 152, 89,77 (клопідогрель бісульфат).

Авторами Lyudmyla Antypenko, Svitlana Gladysheva, Svitlana Vasyuk була проведене визначення клопідогрелю бісульфату чистої речовини УФ-спектрофотометричним методом для лікарських форм [58]. Було виявлено, що в метанольному розчині бісульфат клопідогрелю може бути просто, за низькою вартістю, швидким і точно якісно і кількісно визначено за допомогою УФ-спектроскопії в чистій речовині за максимум поглинання при 203 нм. Перевірка запропонованого способу показав, що калібрувальна крива мала гарну лінійність ($r^2 = 0,9929$) у концентрації діапазон тягання 1,0-2,6 мг / 100 мл. LOD знайдено становив 0,59 мг / 100 мл, а LOQ становив 1,78 мг / 100 мл. Такі критерії, як точність, точність, міцність та міцність також показала високу валідність і відтворюваність методу, помітивши високу важливість звичайного перемішування і температури 20 ° C[59].

Агравал та ін.,[60,66] розробили та перевірили стабільність, що вказує на ВЕРХ метод визначення бісульфату клопідогрелю як субстанції та в фармацевтичній лікарській формі. Метод використовував алюмінієві пластини TLC з попереднім покриттям з силікагелем 60F-254 як нерухомою фазою. Система розчинників складалася з вуглецю тетрахлорид / хлороформ / ацетон (6: 4: 0,15, об / об). Клопідогрель бісульфату піддавали кислотному та лужному гідролізу, окисленню, фотодеградації та сухій термічній обробці. Денситометричний аналіз бісульфату клопідогрелю проводили в режимі поглинання

при 230 нм. Дані лінійної регресії для калібрувальних графіків показали хороший лінійний взаємозв'язок з $r^2 = 0,9999 / 0,001$ у діапазоні концентрацій 200 - 1000 нг. Межі виявлення та кількісного визначення становили 40 та 120 нг на плямі, відповідно. Препарат зазнає кислотного гідролізу, основного гідролізу, окислення та термічної деградації [66].

1.3.2 Методи визначення клопідогрелю та його домішок в лікарських засобах

Згідно Державної Фармакопеї України клопідогрель в таблетках можна визначати наступним чином [53]:

1. Ультрафіолетовий спектр поглинання розчину, виготовленого у випробуванні «Однорідність дозованих одиниць», в області від 250 нм до 300 нм повинен мати максимум за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння, приготований у випробуванні «Однорідність дозованих одиниць».
2. Переглядають хроматограму, одержану в розділі «Кількісне визначення». Результати: на хроматограмі випробуваного розчину час утримання основного піка має відповідати часу утримання основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

Кількісне визначення клопідогрелю в таблетках виконують за допомогою методів вискоєфективної рідинної хроматографії і абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області спектру. Клопідогрель екстрагують із таблеток ацетонітрилом і хроматографують на колонці Nova-Pak C18 з УФ-детекцією при 220 нм. Нерухома фаза: овомукоїд, білок, що здатний розпізнавати птичні ізомери, хімічно прищеплений до частинок силікагелю близько 5 мкм діаметром і розміром пор 120 А. Рухома фаза – суміш 0,067 М фосфатного буферного розчину (рН = 7,95) і ацетонітрилу (75:25). Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв. Об'єм проби, що вводиться 10 мкл. Результати визначення в методі

ВЕРХ становлять $99,85 \pm 0,04 \%$; в методі УФ-спектрофотометрії – $100,08 \pm 0,09 \%$ [39].

Важливою складовою фармацевтичної розробки лікарської форми є забезпечення її стабільності при заданих умовах зберігання, що означає підбір сукупності біофармацевтичних факторів, які гарантують збереження параметрів готової лікарської форми в рамках специфікації і необхідних параметрів біодоступності. Відповідно до діючих вимог шляхи утворення домішок в процесі виробництва і зберігання повинні ретельно вивчатися на етапі фармацевтичної розробки та досліджень стабільності, а їх наявність і кількісний вміст в подальшому контролюватися. Вплив процесів деградації на параметри ефективності та безпеки ЛЗ як з точки зору можливої появи домішок різного токсикологічного профілю, так і зниження вмісту діючої речовини, робить їх ретельне вивчення і оцінку вкрай критичними при виконанні технологічної розробки ЛЗ, особливо застосовуваних при життєвонебезпечних патології. З метою оцінки ступеня впливу різних біофармацевтичних факторів на параметри стабільності лікарського засобу (ЛЗ) з властивостями фізико-хімічної нестабільності було виконано багато робіт з порівняльного вивчення кількісного і якісного вмісту домішок в ЛЗ на основі клопідогрелю.

При виготовленні таблеток клопідогрелю бісульфату контролюють таку домішку, як клопідогрель карбонова кислота. Це наведено в роботах таких авторів [62, 63, 64].

Фармакопея-29,30 США (USP-32) [96,97] перерахували методи визначення клопідогрелю в їх монографіях, пропонуючи використовувати рідинну хроматографію з Ultron ES-OVM L 57, хіральна специфічна колонка (4,6 мм × 150 мм) упакована з розміром частинок 5,0 мкм. Ацетонітрил і фосфатний калійний буфер (10 мМ) (75:25, v / v) використовували як рухому фазу. Швидкість потоку становила приблизно 1,0 мл / хв і 220 нм, використовуваних як довжина хвилі виявлення. Коли аналіз проводився цим методом, невідомо досліджувана домішка елююється в порожньому обсязі системи. Відомі споріднені сполуки клопідогрелю були наведені на малюнку 1.3.

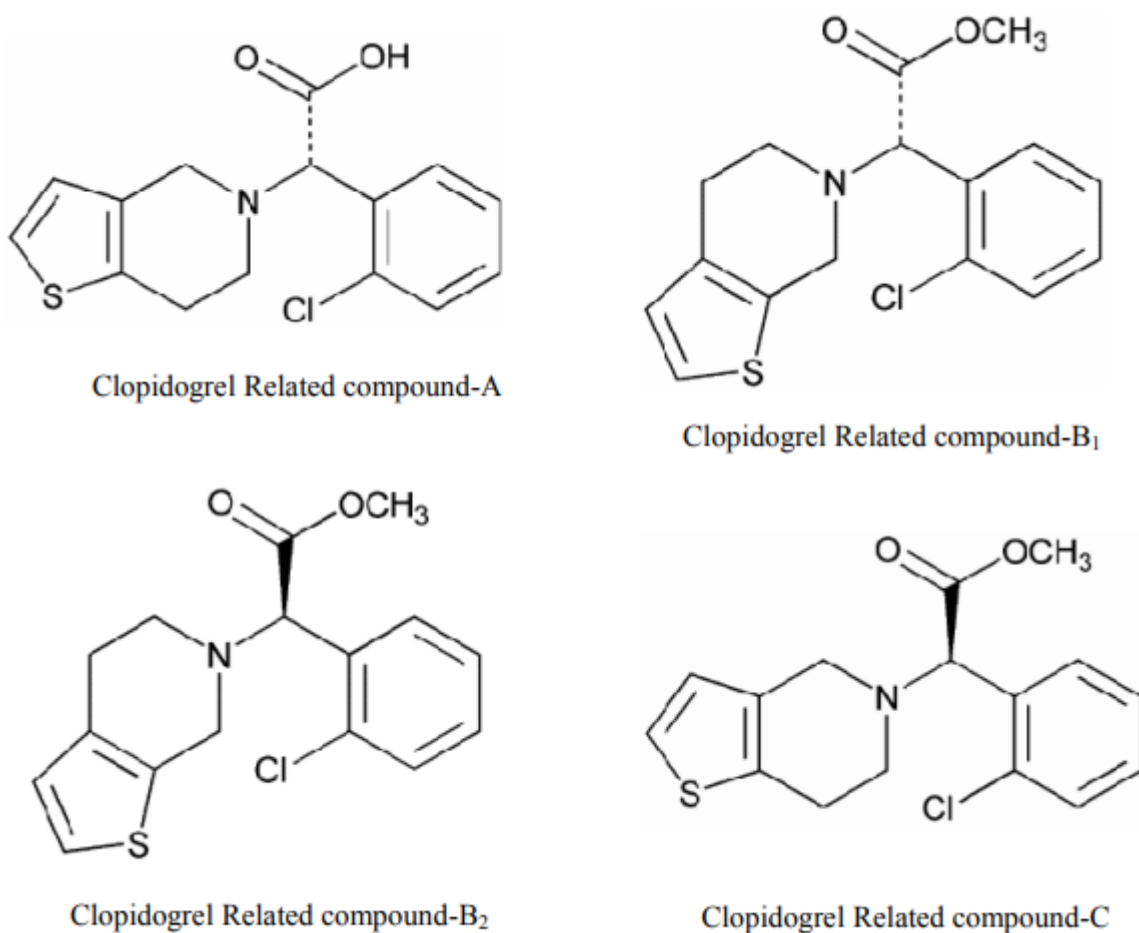


Рис. 1.2 Домішки в лікарському засобі клопідогрелю бісульфату

Клопідогрель-безилат містить єдиний стереогенний центр і має такі домішки, як ((+) - (S) - (о-хлорфеніл) -6,7-дигідротієно [3,2-с] піридин-5 (4Н) - оцтова кислота, гідрохлорид), який відомий як домішка А та (Метил (+/-) - (о-хлорфеніл) -4,5-дигідротієно [2,3-с] піридин-6 (7Н) -ацетат, гідрохлорид), який відомий як домішка В. Вони вводяться під час виробництва. Авторами Pawaskar P.S., Dighe V.V. був розроблен зворотньофазний рідинний хроматографічний метод визначення (+) - (S) - (о-хлорфеніл) -6,7-дигідротієно [3,2-с] піридин-5 (4Н) –оцтовий кислота, гідрохлорид та метил (+/-) - (о-хлорфеніл) -4,5-дигідротієно [2,3-с] піридин-6 (7Н) -ацетат, гідрохлорид з клопідогрелю безилату [59,60]. Високоєфективний метод рідинної хроматографії (ВЕРХ) затверджено для кількісного визначення домішки А (клопідогрель карбонової кислоти) та домішки В з клопідогрелю бесилату за допомогою ультрафіо-

летового детектора при 220 нм. Розроблений метод зміг розділити домішку А і домішку В клопідогрелю безилату з основним препаратом впродовж 50 хв. Проведено хроматографічне розділення хроматографією зворотної фази з використанням колонки С 8 (Zorbax SB C 8 250 мм х 4,6 мм х 5 мкм), з рухомою фазою, що включає буферний розчин та ацетонітрил у градієнтній композиції при швидкості потоку 1,0 мл / хв при температурі 25 ° С. Межа виявлення і межа кількісного визначення домішки А були виявлено, що 0,07 мкг / мл і 0,20 мкг / мл, а домішки В виявлено 0,10 мкг / мл і 0,30 мкг / мл відповідно. Лінійність реакції домішки А знаходилася в межах від 0,20 мкг / мл до 3,0 мкг / мл при $r > 0,9999$. Лінійність реакції домішки В знаходилася в діапазоні від 0,30 мкг / мл до 4,5 мкг / мл при $r > 0,9995$. Метод був затверджений та визнаний придатним для визначення домішки А та домішки В в клопідогрелю бесилатного основного препарату [61].

Авторами AMR LOTFY SABER, MOHAMED ALAA ELMOSALLAMY було запропоновано рідкі хроматографічні та потенціометричні методи для визначення клопідогрелю [61]. Для визначення клопідогрелю у фармацевтичних препаратах розроблено дві різні методики. Був розроблен метод ВЕРХ, де хроматографічний аналіз проводиться на колонці Nova-Pak® C18 (3,9 мм × 150 мм, 5 мкм) з аміачний буфер формату, доведений мурашиною кислотою до рН 4,0, ацетонітрилом (40:60, об. / об.) як рухому фазу та детектування при 225 нм. Отримано хорошу лінійність (0,9993, r), точність ($\geq 99,20$ %) та точність ($\leq 0,6$ RSD). Потенціометричні вимірювання базуються на іонній парі тетра- (п-хлорфеніл) борат-клопідогрель як електроактивний матеріал, що включає пластифіковану ПВХ-мембрану з о-нітрофеніл-октиловий ефір або діоктил-фталат. Перед використанням датчик витримують впродовж щонайменше двох днів у 0,1 М розчині лікарського засобу. Це демонструє швидку та стабільну реакцію Нернста на клопідогрель у діапазоні концентрацій $1,0 \times 10^{-5} \sim 1,0 \times 10^{-2}$ М та діапазоні рН 1,5 - 4,0. Отримані результати із середнім коефіцієнтом відновлення 100,6 % та середнім стандартним відхиленням 0,86 % від номінального. Метод демонструє розумну селективність щодо

клопідогрелю гідрогенсульфату за наявності багатьох катіонів. Відсутність значних перешкод спричинені допоміжними речовинами та розріджувачами [61]. Аналогічним методом користувалися автори роботи, при порівняльному аналізі фізико-хімічних показників оригінального та генеричного препаратів клопідогрелю [63, 64, 65].

Для клопідогрелю описані шляхи кислотного, лужного гідролітичного розкладання, окисної і фотодеградації, а також вплив температурного чинника на процес руйнування молекули [65]. Клопідогрель містить складноефірну групу і є сполукою, яка легко піддається гідролізу з утворенням фармакологічно неактивної сполуки.

Продукт гідролізу клопідогрелю (рисунок 1.4) представляє собою деметильоване з'єднання, його утворення знижує вміст діючої речовини і контролюється в готовій лікарській формі як домішка А [63,64,65].

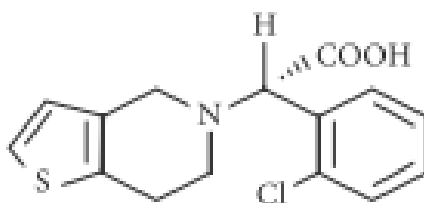


Рис. 1.3 Продукт гідролізу клопідогрелю (клопідогрель карбонова кислота)

Наял та ін.,[66] провели порівняльне дослідження з 18 марками таблеток PLAVIX містить клопідогрель гідрогенсульфат до лікарського засобу-новатора для однорідності маса, профіль домішок, вміст, властивості розчинення та стійкість. Для того, щоб мати можливість відокремлюють R-енантіомер клопідогрелю, енантіоспецифічну рідинну хроматографію. Метод був використаний для визначення домішок та для проведення аналізу. Відповідно до порівняльного дослідження, більшість брендів були не схожими на вихідний лікарський засіб: їх кількість домішок становила вище, вміст клопідогрелю нижчий, профілі розчинення різні і після трьох місяців в умовах

стресу в оригінальній упаковці, результати для зразків та посилення істотно відрізнялись у більшості випадків [65, 66]. Склад клопідогрелю оцінювався також із застосуванням методу капілярного зонального електрофорезу з використанням для поділу енантіомерів циклодекстринів [64, 66].

Для порівняння оригінального препарату клопідогрелю та генеричного препарату клопідогрелю були використані наступні методи [67, 69]: Метод УФ-спектрофотометрії був використаний для ідентифікації та кількісного визначення субстанції клопідогрелю у складі препаратів. Наважки із вмістом субстанції близько 50 мг диспергували у 50 мл метанолу, центрифугували і розводили водою у співвідношенні 1:50 (0,02 %). Спектри поглинання реєстрували в діапазоні довжини хвиль від 200 до 260 на спектрофотометрії «Specord 40 M», Німеччина. Паралельно реєстрували спектр 0,02 % розчину стандартної субстанції. Для розрахунку кількісного вмісту використовували значення оптичних густин досліджуваних розчинів при 225нм.

Авторами також було запропоновано наступні методики виявлення клопідогрелю бісульфату в субстанціях та фармацевтичних лікарських формах [66,68,70,71].

Метод ГХ-МС для аналізу бісульфату клопідогрелю. Хроматографічне розділення проводили на пристрої Shimadzu -GCMS-QP2010 Plus, обладнаному колоною МЕТА-5Х (30,0 м X 0,32 мм X 0,25 мм), газом-носієм був He, і витратою газу 1,27 мл / хв. Мас-спектри були отримані за допомогою іонізації електронним ударом (EI) при 70 eV, якісний аналіз проводився в режимі сканування, а кількісний - у режимі SIM. Час утримання біссульфату клопідогрелю становив близько 17,2 хв. Клопідогрель бісульфат піддавали кислотному та лужному гідролізу, окисленню та фотодеградації. Метод був перевірений для різних параметрів. Результати свідчать про те, що препарат був сприйнятливий до деградації. Усі піки розкладених продуктів були виділені з активного фармацевтичного інгредієнта зі значним різним часом утримування. Оскільки метод може ефективно відділяти лікарський засіб від продуктів

його розпаду, його можна використовувати як метод, що вказує на стабільність [72,73].

У роботі авторів представлено розробку та підтвердження нового методу ВЕРХ-УФ для одночасного кількісного визначення клопідогрелю та продукту його гідролізу клопідогрелю карбонової кислоти (ССА) з субстанцій та лікарських форм. Розробка хроматографічного методу заснована на підході до експериментальних досліджень (DOE). Кількісний аналіз вибраних сполук проводили за допомогою рідинної хроматографічної системи Waters (Waters, Мілфорд, Массачусетс, США), що складається з багаторазової системи подачі 600 Е, системи Waters AF у лінійному дегазаторі, 486 УФ-регульованого детектора поглинання та Waters 717 плюс автосамплер. Вихідний сигнал контролювали та обробляли за допомогою програмного забезпечення Empower (Waters, Milford, MA, USA) [74, 75]. Хроматографічне розділення було досягнуто на колонці Hypersil Gold, 5 мкм 150 x 4 мм (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Об'єм ін'єкції становив 10 мкл, а пачка УФ-детектора виконувалась при 210 нм. Елюція була ізократичною з рухомою фазою що складається з сумішей ацетонітрилу та трифторуксусної кислоти. Точний склад рухомої фази, швидкість потоку та температуру колонки визначали за допомогою експериментальної конструкції [75, 76, 77].

Мітакос та Пандері [78] розробили та перевірили оберненофазну ВЕРХ, метод визначення стабільності клопідогрелю у фармацевтичній галузі лікарські форми. Визначення проводили на напівмікроколонці BDS C8 (250 × 2,1 мм внутрішньовенно, розмір частинок 5 мкм); рухома фаза складалася із суміші 0,010 М дигідрофосфат натрію (рН 3,0) та ацетонітрил (35:65, об. / об.), що перекачуються в потоці швидкість 0,30 мл / хв. УФ-детектор працював при 235 нм, і в якості нього використовували напроксен внутрішній стандарт. Час утримання клопідогрелю та напроксену, які використовувались як внутрішнього стандарту, становили 3,08 та 6,28 хв відповідно. Калібрувальні графіки є лінійними ($r = 0,9991$, $n = 6$), в діапазоні концентрацій клопідогрелю 1,00–3,00 мкг / мл. внутрішньо- та міжденні значення РСД були 1,96 %. Межі

виявлення та кількісного визначення становили 0,12 та 0,39 мкг / мл відповідно.

Високоєфективний рідинно-хроматографічний метод з оберненою фазою був розроблений та затверджений для одночасного хроматографічного елюювання трьох серцево-судинних препаратів, а саме клопідогрелю, аспірину (ASP) та аторвастатину. Метод був розроблений у плазмі щурів та дозованому складі з високоякісним хроматографічним розділенням між піками лікарського засобу за допомогою аналітичної колонки з нержавіючої сталі, термобета-основної, C18 (25 × 0,46 см, 5 мкм). Систему експлуатували при 25 ° С з використанням рухомої фази, що складається з ацетонітрилу та фосфатного буфера (рН 3,0) у співвідношенні градієнтів при швидкості потоку 1 мл хв (-1) з детектуванням ультрафіолету при 232 нм. Параметричну статистику, тобто коефіцієнт кореляції 0,999, оцінювали для всіх препаратів, що мають лінійність у досліджуваному діапазоні концентрацій (10-10 000 нг мл (-1)) у плазмі щурів, використовуючи незважену калібрувальну криву. Точність зразків для шести повторних вимірювань на нижній межі рівня кількісного визначення була в межах. Метод був застосовний для контролю якості згаданих препаратів у сировині, сипучих лікарських та фармацевтичних складах, а також у фармакокінетичних дослідженнях [77].

1.3.3 Методи визначення клопідогрелю та його метаболітів в біологічних матеріалах

Проведений аналіз даних наукової літератури свідчить, що відомий антиагрегантний засіб клопідогрель викликає значний інтерес у лікарів та токсикологів. Вивчається кінетика даного препарату, його розподіл в плазмі людини, його вивидення.

Було вивчено методи одночасної оцінки клопідогрелю та клопідогрель карбонова кислоти у плазмі крові людини [79, 80, 81]. Застосовується для вивчення біодоступності 75 мг клопідогрелю. Використовували високоєфектив-

вну рідинну хроматографію – іонізація електророзпиленням розроблено метод тандемної мас-спектрометрії (LC – ESI-MS – MS) для одночасної оцінки клопідогрелю (SR25990C) та його метаболіт карбонової кислоти (SR26334) у плазмі крові людини. як внутрішній стандарт був глімепірид. Екстракція SR25990C, його метаболіту із плазми (0,3 мл) передбачає очистку фосфорною кислотою з наступною твердофазною екстракцією (SPE). Одержуємо чисті екстракти в кількісному визначенні 98,05 %, 85,45 %, для SR25990C, SR26334 відповідно. Елюати твердофазною екстракцією без сушіння та відновлення аналізують PX – MC – MC, в присутності стандартного зразку. Об'єм ін'єкції становить 2 мкл, загальний хроматографічний час роботи 5,0 хв. Метод є лінійний у діапазоні від 0,25 до 25,0 нг / мл для SR25990C і від 50,0 до 6000,0 нг / мл для SR26334, з коефіцієнтом кореляції $\geq 0,9989$ та 0,9984 відповідно [79, 80, 81].

Таким методом можна визначати активний метаболіт клопідогрелю [79, 82]. Для визначення 2-оксо-клопідогрелю, вирішального проміжного метаболіту в плазмі людини, був встановлений метод чутливої та селективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометричної (LC – MS / MS). Хроматографічне розділення проводили на колонці Sapphire C18 після підготовки зразка рідини-рідини з метиловим трет-бутиловим ефіром. Виявлення проводили на потрійному квадрупольному мас-спектрометрі, що працював у режимі багаторазового моніторингу реакцій (MRM) в режимі електророзпилювальної іонізації (ESI). Метод був перевірений з точки зору конкретності, точності, точності та межі кількісного визначення. Калібрувальні криві становили від 0,50 до 50,0 нг / мл з хорошою лінійністю. Стабільність була повністю перевірена додаванням 1,4-дитіо-DL-третолу (DTT) до зразка плазми до і в процесі підготовки. Затверджений метод виявився придатним для використання у фармакокінетичному дослідженні після одноразового перорального прийому 75 мг таблеток клопідогрелю у людей, що може внести свій внесок у інтенсивне вивчення клінічних лікарських взаємодій клопідогрелю

та індивідуального лікування [82]. Практичному застосуванню цього методу присвячені роботи авторів [83, 84, 85].

Для одночасного кількісного визначення ацетилсаліцилової кислоти (аспірин), саліцилової кислоти, клопідогрелю та карбонової кислоти метаболіту клопідогрелю в плазмі людини була розроблена рідинна хроматографія у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS / MS) [76]. Хроматографічне розділення було досягнуто на колонці Waters Symmetry Shield™ C18 (150 × 4,6 мм, 5 мкм) з використанням 3,5 мм ацетату амонію (pH 3,5) - ацетонітрилу (10:90, об. / Об.) як рухомої фази зі швидкістю потоку 0,75 мл. /хв. Даний метод був успішно застосований для терапевтичного моніторингу аспірину та клопідогрелю у 67 пацієнтів з ІХС [87, 88].

Для дослідження біоеквівалентності неактивного метаболіту карбонової кислоти клопідогрелю в сироватці крові використовували ВЕРХ з УФ-детектуванням [88, 89]. Аналітична процедура передбачає екстракцію аналіту рідина-рідина та внутрішній стандарт (фенітоїн) етилацетатом. Використовували рухому фазу, що складалася з 0,05 М фосфатного буфера, що містив триетиламін (0,5 мл / л; pH 5,7) та ацетонітрил (56:44 об / об), і хроматографічне розділення досягали за допомогою аналітичної колонки C18 при довжині хвилі детектора 220 нм. Калібрувальні криві були лінійними в діапазоні концентрацій 0,05-10 мкг / мл клопідогрель карбонової кислоти в сироватці крові людини. Загальний час аналізу становив 5,5 хв, а нижні межі виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ) становили 0,02 та 0,05 мкг / мл відповідно. Затверджений метод був застосований у рандомізованому перехресному дослідженні біоеквівалентності двох різних препаратів клопідогрелю у 24 здорових добровольців.

Капілярний електрофорез - відносно новий інструментальний метод аналізу. Метод капілярного електрофорезу (КЕФ) заснований на поділі комути складної суміші в кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля.

Для аналізу клопідогрелю та його метаболіту карбонової кислоти впер-

ше було розроблено та затверджено метод капілярного електрофорезу. До оптимізації методу визначали залежність рН ефективної рухливості обох сполук для того, щоб визначити початковий рН працюючого буфера. Оптимізований метод продемонстрував свою селективність та лінійність у діапазоні концентрацій 2-100 мкм для обох сполук. Межі виявлення та кількісного визначення методу становили, відповідно, 1,2 та 3,7 мкм для клопідогрелю та 1,1 та 3,2 мкм для метаболіту карбонової кислоти. Цей метод підходить для кількісного аналізу клопідогрелю та його метаболіту у зразках сироватки. Затверджений метод також застосовували для визначення кінетичних параметрів ферментативного гідролізу клопідогрелю. Отримані видимі K (м) 145 ± 30 мкм та V (макс.) 0,4, 1,5 та 3,4 мкм / хв відповідно для концентрацій ферментів 1,0, 2,0 та 4,0 ОД / мл [90].

Для визначення клопідогрелю в біологічних рідинах та чистої фармацевтичної субстанції був використаний електродний метод [91].

Конструкція та експлуатаційні характеристики селективних електродів клопідогрель бісульфату (CLP) були розроблені три типи електродів: пластикова мембрана I, дротова мембрана з покриттям II і графітована III, електроди базувались на включенні CLP у сполучні речовини фосфомолібдової кислоти (PMA), аміачна соляна сіль (ARS) та фосфовольфрамова кислота (PTA) відповідно. Електроди відображають рівняння Нернста із середнім калібрувальним графіком нахилів $55,97 \pm 0,460$; $57,57 \pm 0,227$ та $58,03 \pm 0,150$ мВ 10^{-1} для трьох електродів відповідно, в лінійному діапазоні концентрацій $1,0 \times 10^{-7}$, - $1,0 \times 10^{-2}$ моль L^{-1} з препарату, з межами виявлення $5,01 \times 10^{-8}$, $4,10 \times 10^{-8}$ і $5,00 \times 10^{-8}$ моль L^{-1} для електродів I, II та III відповідно. Безпечний діапазон рН запропонованих електродів становив (1,2-4,6). Вплив можливих видів, що заважають, таких як вивчено неорганічні катіони, цукри та амінокислоти. Результати були вигідні порівняно з результатами, отриманими за еталонним методом [91].

Авторами Wenyi Hua , Michael Lesslie, Brian T Hoffman, Christopher Binns & Daniel Mulvana був запропонований метод виначення клопідгрелю,

клопідогрель карбонової кислоти та активного метаболіту в плазмі людини [91]. Застосовували метод LC – MS / MS для кількісного визначення фармакологічно-активний метаболіт (СAM) у плазмі людини шляхом стабілізації тіолової групи аналіту за допомогою 2-бром-3'-метоксиацетофенон (ВМАР) дериватизація [91].

Для токсикологічного скринінгу клопідогрелю в біологічному матеріалі застосовували метод ВЕРХ з діодно-матричною детекцією. Зразки плазми одноразово екстрагували при рН = 9,5 сумішшю хлороформу, ізопропанолу і *n*-гептану (60:14:26); отримані витяги хроматографували на колонці Nova-Pak C18 4 мкм (300 мм × 3,9 мм, I. D.); рухома фаза – суміш метанолу, тетрагідрофурану і фосфатного буферного розчину з рН = 2,6 (65:5:30); швидкість 0,8 мл/хв. Час утримування становить 4,05 хв. [92,93].

Інша модифікація цього методу передбачає використання внутрішнього стандарту – хлордіазепоксиду. Плазму, що містить клопідогрель і внутрішній стандарт, піддавали рідинно-рідинній екстракції при лужному рН. Після випаровування органічного шару клопідогрель і внутрішній стандарт змішували з сумішшю етанол – гексан (80:20) і вводили в колонку для ВЕРХ. Енантіомери розділяли на колонці 25 см Cheralcel OD-H; рухома фаза етанол – гексан (60:40), швидкість 0,6 мл/хв. Енантіомери клопідогрелю кількісно визначали за допомогою флуоресцентного детектора при довжині хвилі 300 і 470 нм. Метод дозволяє проводити пряме кількісне визначення клопідогрелю без попередньої дериватизації [89,93].

Метод оберненофазної ВЕРХ з флуоресцентною детекцією було застосовано для одночасного визначення клопідогрелю і його двох основних метаболітів (N-оксиду клопідогрелю і N-дезметилклопідогрелю) у біологічних рідинах людини. Після селективної екстракції сумішшю метиленхлорид – ізопропанол ці сполуки хроматографували на колонці Spherisorb ODS-2 (5 мкм), використовуючи суміш одноосновного натрію фосфату і метанолу (45:55) як рухома фаза. Межа виявлення методу 5 нг/мл для клопідогрелю в плазмі і сечі і 10 нг/мл для його двох основних метаболітів [93,94,95].

Висновки до розділу 1

Проведений аналіз даних наукової літератури свідчить, що відомий антиагрегантний засіб клопідогрель викликає значний інтерес у лікарів. Зараз клопідогрель входить як основний антиагрегантний препарат в протоколи терапії ураження судин нижніх кінцівок, ГКС, для вторинної профілактики ІХС і після коронарного стентування American Heart Association.

У випадку протипоказань до застосування (бронхіальна астма, виразковий гастрит і виразкова хвороба шлунку і дванадцятипалої кишки) йому взагалі немає рівних. Цьому сприяє також відсутність доказової резистентності клопідогрелю на фоні його тривалого застосування. Є багато методик ідентифікації та кількісного визначення в лікарських засобах, субстанціях. Також проводяться дослідження клопідогрелю та його метаболітів в біологічних рідинах людини з метою вивчення фармакінетики та біодоступності лікарської речовини. Даний лікарських засіб використовується для самогубства. Проте в літературі немає жодних даних про хіміко-токсикологічне дослідження. Фармацевтичний ринок розвивається. З'являються нові лікарські засоби. Взаємодія цих лікарських засобів з клопідогрелем вивчена достатньо мало. Методи його ідентифікації та кількісного визначення розроблені недостатньо, і, більш того, вони не носять системного характеру. Відкритим залишається питання щодо розробки ефективних методів ізолювання клопідогрелю та його метаболіту із біологічного матеріалу. Відсутні дані про методи ідентифікації та кількісного визначення досліджуваної речовини та її метаболіту, придатних для цілей судово-хімічного аналізу. Необхідними є розробка простих та швидких методик підготовки зразків із біологічного матеріалу з метою ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю та його метаболіту із використанням сучасних фізико-хімічних методів аналізу: ВЕРХ/УФ, УФ- та екстракційної спектрометрії.

Тому, розробка ефективних методів ізолювання клопідогрелю з біологічного матеріалу та діагностика отруєнь цим препаратом при проведенні ток-

сикологічних досліджень є актуальною, хіміко-токсикологічний аналіз кло-підогрелю також необхідний для контролю лікування, особливо в разі важких отруєнь.

РОЗДІЛ 2.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

2.1 Об'єкти досліджень, засоби вимірювань, пристрої

Об'єкти дослідження - Клопідогрель бісульфат (далі по тексту Клопідогрель) субстанція-порошок, виробник: ПРАТ «Фармак», Україна, відповідає Європейській фармакопеї з вмістом діючої речовини 99,31%. (серія LM2504208) [94].

Допоміжні об'єкти (стандарти) [95,96]

Клопідогрель карбонова кислота (CLA) субстанція-порошок, виробник: Кусум Хелтхкер Пвт Лтд, Індія, відповідає НТД (серія No. :CLA1DKG92D [65]

Ацетисаліцилова кислота ($\geq 99\%$, SIGMA)

Фенобарбітал ($\geq 98,6\%$, SIGMA)

Еналаприла малеат (вторинний стандарт, відповідає USP, SIGMA-ALDRICH) [97]

Ніфедипін ($\geq 98\%$, SIGMA)

Матеріали:

1. Фільтр «Червона стрічка»
2. Кварцеві кювети з товщиною шару 10 мм. Технічні характеристики: Кварцеве скло (діапазон довжин хвиль 190 - 1100 нм) Довжина оптичного шляху: 10 мм. Габаритні розміри (ШхВ): 12,5х45 мм.

Як тонкі шари використовували:

1. *пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (BETCX)* виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція - $5 \div 20$ мкм, товщина шару 130 ± 25 мкм, розмір пластин - 10×10 см);
2. *пластини «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ* с УФ-індикатором (силікагель СТХ-1ВЕ, тип підкладки - ПЕТФ, зв'язуючу речовину - силиказоль, фракція - $8 \div 12$

мкм, товщина шару - 100 мкм, розмір пластин - 10 × 10 см) ;

3. пластини Alugram Sil G / UV254 фірми Macherey-Nagel (Німеччина)
(силікагель G254, товщина шару - 200 мкм, розмір пластин - 10 × 10 см).

Пристрої:

1. Хроматографічна камера об'ємом 500 мл.
2. ВЕРХ-аналізатор, прототип якого розроблений на основі хроматографа «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ). Колонка з оберненою фазою, градієнтне елюювання, УФ-детекція. У розробленому прототипі аналізатора застосовуються колонки Ø2 × 75 мм, упаковані оберненою фазою ProntoSIL - 120 - 5 - C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH», Німеччина).
3. Іономер ЭВ-74. ДЕСТ 22261
4. Фотоелектроколориметри КФК-2 (світлофільтр з $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$ нм)
5. Спектрофотометр СФ-46. Спектральний діапазон роботи спектрофотометра 190 - 1100 нм, основна абсолютна похибка спектрофотометра:- в спектральному діапазоні 400-750 нм,% 0.5; - в іншому діапазоні,% не більше 1. Похибка відлікового пристрою установки довжин хвиль, нм ± 0.5 . Похибка відлікового пристрою установки довжин хвиль,% 0.15.
6. Система упарювання Omega-12 з електричною плиткою і одноразовими алюмінієвими віалами для розпарювання.
7. Ультрацентрифуга Eppendorf Centrifuge 5427.
8. Дозатор змінного обсягу Eppendorf Research® plus 100-1000 мкл і 10-100 мкл.

Посуд

Камери хроматографічні скляні; колби конічні скляні лабораторні вмістимістю 100 і 250 мл; склянки скляні хімічні лабораторні об'ємом 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мл; колби скляні лабораторні мірні об'ємом 5, 10, 25,

50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мл; піпетки скляні мірні на 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0 мл; лійки скляні лабораторні різного діаметру; чашки порцелянові випарювальні лабораторні різного обсягу; циліндри мірні на 10, 50, 100, 250, 500, 1000 мл; палочки скляні - посуд, який належить до мірної, має відповідні протоколи калібрування.

2.2 Реактиви та їх приготування

Для приготування рухомих фаз, стандартних розчинів, детектуючих розчинів, при пробопідготовці були використані наступні реактиви [98]:

Реактив Вагнера: в мірній колбі ємністю 50,0 мл в 10 - 15 мл води розчиняли 2 г калію йодиду; до цього розчину додавали 1 г йоду; після розчинення йоду доводили об'єм розчину водою до мітки.

Реактив Бушарда: в мірній колбі ємністю 100,0 мл в 10 - 15 мл води розчиняли 2 г калію йодиду; до цього розчину додавали 1,27 г йоду; після розчинення йоду доводили об'єм розчину водою до мітки.

Реактив Драгендорфа: 1) в 20 мл кислоти нітратної ($\rho = 1,18$ г / мл) розчиняли 8 г вісмуту нітрату основного; 2) в 30 мл води розчиняли 27,2 г калію йодиду; змішували розчини 1 і 2; через кілька днів рідина фільтрували в мірну колбу ємністю 100,0 мл і доводили об'єм розчину водою до мітки.

Реактив Драгендорфа, модифікований за Муньє: 1) в 10 мл кислоти ацетатної льодяної розчиняли 0,85 г вісмуту нітрату основного і додавали 40 мл води; 2) в 20 мл води розчиняли 8 г калію йодиду; змішували розчини 1 і 2; перед застосуванням 1 мл отриманого розчину змішували з 2 мл кислоти ацетатної льодяної і 40 мл води.

Реактив Марки: до 1 мл кислоти сульфатної концентрованої додавали 1 краплю формаліну і охолоджували; використовують свіжоприготовлений.

Реактив Ердмана: до 20 мл кислоти сульфатної концентрованої додавали 10 крапель 15 % кислоти нітратної та збовтували. Реактив Шейблера: в 20 мл води розчиняли 5 г натрію вольфрамату; до отриманого розчину дода-

вали 10 мл 25 % розчину кислоти фосфатної і збовтували.

Реактив ФПН: в мірній колбі ємністю 100,0 мл в 5 мл води розчиняли 0,23 г ферум (III) хлориду, додавали 45 мл 20 % розчину кислоти перхлоратної і доводили до мітки 50 % розчином кислоти нітратною.

Реактив Фреде: до розтертого в порошок амонію (або натрію) молібдату додавали кислоту сульфатну концентровану. Суміш інтенсивно збовтували. Отриманий насичений розчин кислоти молібденової в кислоті сульфатній концентрованій зливали з осаду. Реактив використовують свіжоприготовлений. При стоянні реактив може змінювати своє забарвлення.

Реактив Манделіна: до 0,01 г амонію ванадату додавали 2 мл кислоти сульфатної концентрованої. Реактив повинен бути свіжоприготовлений.

Розчин кобальту тіоціанату: змішували 1 г кобальту (II) нітрату і 4 г калію тіоціанату і розчиняли в 20 мл води.

Кислота сульфатна концентрована х.ч., ДЕСТ 4204-77

Кислота нітратна концентрована х.ч. ДЕСТ 701-89

Метиловий оранжевий. В роботі використовували 0,02 % рзчин метилового оранжевого. 0,2 г метилового оранжевого переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки. Приготований розчин переносили в склянку з темного скла і додавали в неї ж 200 см³ хлороформу - хлороформ екстрагує з розчину метилового оранжевого продукти окислення, які можуть заважати проведенню визначення.

Розчин калію перманганату - для речовин-відновників: в мірній колбі ємністю 100,0 мл в 10 - 15 мл 0,25 моль / л розчину кислоти сульфатної розчиняли 1 г калію перманганату; доводили об'єм розчину цим же розчинником до мітки;

Розчин ферум (III) хлориду - для виявлення речовин, які містять у своїй структурі фенольний гідроксил: в мірній колбі ємністю 100,0 мл в 10 - 15 мл води розчиняли 5 г ферум (III) хлориду; доводили об'єм розчину водою до мітки;

50 % розчин кислоти сульфатної в етанолі - для виявлення похідних фенотіазину: в мірну колбу ємністю 100,0 мл вносили 50 мл кислоти сульфатної концентрованої; доводили об'єм розчину етанолом до мітки;

Розчин нінгідрину - для виявлення речовин, які містять в структурі первинну або вторинну аміногрупу: в мірній колбі ємністю 100,0 мл в 10 мл кислоти хлористоводневої розчиняли 0,5 г нінгідрину; доводили об'єм розчину ацетоном до мітки;

Розчин меркурій (II) сульфату – в мірній колбі ємністю 250,0 мл в 25 мл кислоти сульфатної концентрованої розчиняли 4 г меркурій (II) сульфату; доводили об'єм розчину водою до мітки;

Розчин діфенілкарбазону - в мірній колбі ємністю 50,0 мл в 10 мл етанолу розчиняли 0,1 г діфенілкарбазону; доводили об'єм розчину цим же розчинником до мітки.

Кислота ацетатна льодяна, х.ч., ДЕСТ 61-75;

Метанол, х.ч., ДЕСТ 6995-77;

Натрію гідроксид, х.ч., ТУ 2642-001-33813273-97;

Етанол, ДЕСТ Р 51652-2000

Ацетонітрил для рідиної хроматографії, о.с.ч., ТУ 2634-002-54260861-2013;

Діетиловий ефір, ч.д.а., ТУ 2600-001-45682126-06

Толуол для хроматографії, ч.д.а., СТП ТУ КОМП 3- 059-08;

Трихлорметан, х.ч., ТУ 2631-066-44493179-01,

Етилацетат (extra pure, Scharlau, Іспанія)

Концентрований розчин амоніаку 25 % (extra pure, Scharlau, Іспанія)

Калію гідрофталат - х.ч., ДСТУ 2216-93

Вода очищена (ДФУ І.2, С. 391). Прозора, безбарвна рідина, без запаху, кольору, смаку, рН від 5,0 до 7,0.

В екстраційно-фотометричному методі для встановлення значення рН, при якому ступінь екстракції іонних асоціатів максимальна, було приготов-

лено ряд буферних розчинів (ацетатних та фталатних) з рН від 3,0 до 6,0.

Приготування фталатних буферних розчинів:

Розчин №1 – кислота хлоридна, 0,1 моль / л.

Приготування: з фіксанала.

Розчин №3 - калію гідрофталат $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$, 0,2 моль / л.

Приготування: на аналітичних вагах відважували 40,845 г калію гідрофталата, переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 мл, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили до мітки цим же розчинником, ретельно перемішували і фільтрували через складчастий фільтр «червона стрічка».

Для отримання буферного розчину з **рН = 3,0** в мірну колбу ємністю 200,0 см³ вносили 40,80 см³ розчину №1, додавали 50,00 см³ розчину №3, доводили об'єм розчину водою очищеної до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **рН = 3,5** в мірну колбу ємністю 200,0 см³ вносили 15,70 см³ розчину №1, додавали 50,00 см³ розчину №3, доводили об'єм розчину водою очищеної до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Приготування ацетатних буферних розчинів:

Готували 1 М розчини ацетатною кислоти і гідроксиду натрію. 116,28 см³ концентрованої ацетатної кислоти ($\rho = 1,055 \text{ г / см}^3$) переносили в мірну колбу ємністю 2000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

40,00 г натрію гідроксиду переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

Для отримання буферного розчину з **рН = 4,2** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 197,90 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеної

до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 4,5** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 124,10 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 4,6** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 108,90 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 4,7** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 96,80 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 4,8** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 87,20 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 5,2** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 64,80 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

Для отримання буферного розчину з **pH = 6,0** в мірну колбу ємністю 500,0 см³ вносили 52,30 см³ 1 М розчину ацетатної кислоти, додавали 50,00 см³ 1 М розчину гідроксиду натрію, доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично.

до мітки, контролювали рН розчину потенціометрично

Приготування універсальної буферної суміші:

Готували розчин суміші кислот фосфатної, ацетатної і боратної в концентрації 0,04 моль / дм³ по відношенню до кожної з них.

2,47 г кислоти боратної, 2,12 см³ кислоти фосфатної концентрованої ($\rho = 1,86 \text{ г / см}^3$) і 2,33 см³ кислоти ацетатної концентрованої ($\rho = 1,055 \text{ г / см}^3$) переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

Готували 0,2 моль / дм³ розчин натрію гідроксиду:

8,00 г натрію гідроксиду переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

Для отримання буферного розчину з бажаним значенням рН до 50,00 - 100,00 см³ суміші кислот додавали невеликими порціями розчин натрію гідроксиду при перемішуванні, контролюючи рН потенціометрично.

Готували 3 **модельні суміші препарату з печінкою**, що не зазнала гнильних змін. Для цього до 10 г подрібненої печінки (розмір часток не повинен перевищувати 1 мм) додавали 1,00 мл стандартного розчину клопідогрелю або клопідогрель карбонової кислоти (5 мг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу.

Готували також контрольну суміш печінки з розчинником (0,1 моль / л розчин кислоти хлористоводневої), дослідження якої проводили паралельно з основними.

Роботу з хроматографом «Міліхром А-02» виконуємо на базі НПФ «Аналітика». Обробку хроматограм проводимо за допомогою програми

«Аналітика - Chrom», розробленої цією ж установою.

2.3 Вибір загальної методології досліджень

Хіміко-токсикологічне дослідження клопідогрелю має бути проведене так, щоб цей процес завершувався створенням схеми хіміко-токсикологічного дослідження матеріалу на клопідогрель та його маркет-метаболіт.

Вирішення цієї проблеми дозволяє використовувати фізико-хімічні підходи, які дають можливість науково обґрунтувати методику хіміко-токсикологічного визначення клопідогрелю. При цьому основним завданням є вибір тих методик, які придатні для проведення хіміко-токсикологічного аналізу, так як для цілей практичної медицини потрібні зручні і експресні методи.

2.4 Методи досліджень

В сучасній практиці дослідження лікарських засобів знаходять широке застосування фізичні, хімічні, фізико-хімічні, біологічні методи.

Під час написання даної дисертаційної роботи застосовувалися фізичні методи дослідження, а саме - визначення реакції середовища (pH).

Також були використані фізико-хімічними методи аналізу, до яких належать: оптичні (спектрофотометрія в ультрафіолетовій області спектра та екстракційна фотометрія) і хроматографічні методи (тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія).

Для проведення статистичної обробки отриманих даних використовували програмне забезпечення MS Excel 2007. Валідація розроблених методик проводилась з урахуванням вимог зарубіжних посібників з валідації біоаналітичних методик («Керівництва по експертизі лікарських засобів», М., 2013, посібників FDA, EMA).

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ

КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

Відомо, що після орального застосування лікарської форми клопідогрелю, в плазмі крові фіксується як діюча речовина -клопідогрель (середня максимальна концентрація незміненого клопідогрелю в плазмі близько 2,2-2,5 нг/ мл після одноразового застосування дози в 75 мг) і його метаболіт клопідогрель карбонова кислота (85% від загального об'єму всіх метаболітів) [40], останній можна використовувати як маркер в процесі виявлення клопідогрелю, тому розробку методик ідентифікації проводили як відносно нативної речовини, так і за її метаболітом.

3.1 Виявлення клопідогрелю за допомогою якісних реакцій

Оскільки в літературних джерелах відсутні відомості про реакції, якими можна підтвердити наявність клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, були використані реактиви, які рекомендовані Clarke та іншими авторами [49] для виявлення речовин кислотного та основного характеру. Склад реактивів та методики їх виготовлення описані в літературі.

При пошуку якісних реакцій на клопідогрель було вивчено його взаємодію з деякими реагентами, що широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі [98]: реактив Вагнера, реактив Бушарда, реактив Драгендорфа, реактив Драгендорфа, модифікований за Муньє; реактив Маркі, реактив Ердмана, реактив Шейблера, реактив ФПН, реактив Фреде, реактив Манделіна, розчин кобальту тіоціанату; кислота сульфатна концентрована; кислота нітратна концентрована.

Оскільки в структурі клопідогрелю присутня естерна група, для нього виконували гідроксамову пробу [98].

Паралельно вивчали взаємодію зазначених реагентів з основним метаболітом клопідогрелю – клопідогрель карбоновою кислотою.

Для цього приготували стандартний розчин клопідогрелю та стандартний метанольний розчин клопідогрелю карбонової кислоти.

Для приготування стандартного розчину 50,0 клопідогрелю бісульфату вносили в ділильну лійку, розчиняли в 10 мл води очищеної, підлужували 10 % рзчиним гідроксиду натрію до рН 9 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Хлороформні шари об'єднували і фільтрували через паперовий фільтр "Червона стрічка" з 1 г натрію сульфату безводного в мірну колбу ємністю 50,0 мл, доводили об'єм хлороформом до мітки. Отримували стандартний хлороформний розчин 1, з концентрацією 1 мкг / мкл.

10,0 мл стандартного хлороформного розчину клопідогрелю 1 вносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл і доводили об'єм розчину хлороформом до мітки (стандартний хлороформний розчин 2, концентрація 0,1 мкг / мкл).

Готували стандартний метанольний розчин клопідогрелю карбонової кислоти наступним чином: 50,0 мг клопідогрелю карбонової кислоти вносили в мірну колбу ємністю 50,0 мл, розчиняли в метанолі і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до мітки (стандартний метанольний розчин 1, концентрація 1 мкг / мкл).

10,0 мл стандартного метанольного розчину клопідогрелю карбонової кислоти 1 вносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл і доводили об'єм розчину метанолом до мітки (стандартний метанольний розчин 2, концентрація 0,1 мкг / мкл).

Реакції проводили на хроматографічних пластинах «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ розміром 2 × 2 см (силікагель СТХ-1ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8 ÷ 12 мкм, товщина шару – 100 мкм). Розчини речовин наносили на пластину в точку. Після висушування плям при кімнатній температурі пластини обробляли відповідними реактивами.

Такий спосіб виконання якісних реакцій дозволяє підвищити їх чутливість в кілька разів [99, 100].

Результати проведених реакцій наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Результати кольорових реакцій клопідогрелю
з деякими загальноприйнятими реагентами**

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг	
	клопідогрель	клопідогрель карбонова кислота
Реактив Вагнера	коричневе / 0,1	коричневе / 0,1
Реактив Бушарда	коричневе / 0,1	коричневе / 0,1
Реактив Драгендорфа	коричневе / 0,1	коричневе / 0,1
Реактив Драгендорфа, модифікований за Муньє	жовтогаряче / 0,1	жовтогаряче / 0,1
Реактив Маркі	червоне / 0,1	червоне / 0,1
Реактив Ердмана	—	—
Реактив Шейблера	—	—
Реактив ФПН	—	фіолетове / 0,1
Реактив Фреде	—	—
Реактив Манделіна	жовте / 0,1	жовте / 0,1
Розчин кобальту тіоціанату	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1
Кислота сульфатна концентрована	—	—
Кислота нітратна концентрована	—	—
Гідроксамова проба	фіолетове / 0,1	—
Розчин ферум(III) хлориду	—	фіолетове / 0,1

При проведенні гідроксамової проби пластини обробляють 10 % розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі, обробляють 5 % розчином гідроксиламіну гідрохлориду в етанолі, висушують при кімнатній температурі та обробляють 2 % розчином феруму (III) хлориду. Клопідогрель карбонова кислота не дає реакції.

У більшості проведених якісних реакцій для клопідогрелю зафіксовано такі ж результати як для клопідогрель карбонової кислоти – лише дія ФПН, розчину ферум (III) хлориду та гідроксамова проба дозволяє віддиференціювати їх один від одного.

Реактиви Ермана, Шейблера, Фреде, кислота сульфатна концентрована та кислота нітратна концентрована з досліджуваними речовинами не дали позитивних результатів.

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що кольорові реакції, а також здатність аналізованих сполук до природної флуоресценції можна використовувати лише для попереднього скринінгу наявності клопідогрелю та клопідогрелю карбонової кислоти в пробах біологічного матеріалу.

Проведені дослідження висвітлено в літературі [101]. *В. С. Бондар, Л. С. Аносова*. Розробка методів ідентифікації клопідогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. – Х., 2010. – Т. 1. – С. 137.

3.2 Застосування методів хроматографії для ідентифікації клопідогрелю та його метаболіта – клопідогрель карбонової кислоти

Хроматографічний аналіз знайшов широке застосування в криміналістиці та судово-медичній еспертизі. Цей метод дозволяє вирішити важливі завдання в сфері розслідування злочинів, виявити причину лікарської засоби, які використовувалися для самогубства. Спеціальні методики та обладнання дають можливість проводити якісний аналіз з метою ідентифікації відомих продуктів, що знаходяться в суміші з іншими речовинами або отриманих новим шляхом [102].

Скринінг лікарських сполук методом ТШХ в судово-хімічному аналізі проводиться в стандартизованих системах розчинників. Даний метод аналізу, у порівнянні з іншими фізико-хімічними методами, характеризується експресністю, доступністю та простотою виконання, а отриманий позитивний результат свідчить про необхідність проведення подальших досліджень.

3.2.1 Ідентифікація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом тонкошарової хроматографії

Дані, наведені в науковій літературі, свідчать про те, що тонкошарова хроматографія є одним з найпоширеніших методів, які застосовують для ідентифікації речовин як в фармацевтичному, так і в хіміко-токсикологічному аналізі [103, 104, 105].

В опрацьованих літературних джерелах методики виявлення клопідогрелю у суміші з метаболітом методом ТШХ висвітлені недостатньо [122]. Тому на першому етапі експериментальних досліджень нами вивчено залежність значень R_f клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у системах розчинників, які використовуються у токсикологічних відділеннях вітчизняних бюро судово-медичних експертиз та системах розчинників, що рекомендуються Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) для виявлення лікарських речовин основного та кислотного характеру [123]. При виборі хроматографічних систем враховували фізико-хімічні властивості препаратів та полярність розчинників.

На наш погляд як маркер при виявленні клопідогрелю методом ТШХ може бути використаний його основний метаболіт – клопідогрель карбонова кислота, яку можна легко одержати в лабораторних умовах.

У зв'язку з цим ми поставили за мету розробити умови виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в присутності інших лікарських препаратів з групи серцево-судинних засобів за допомогою тонкошарової хроматографії з використанням трьох типів тонких шарів.

Для проведення досліджень використовували такі лікарські речовини як ацетилсаліцилова кислота, еналаприл, ніфедипін, фенобарбітал. Вибір зазначених препаратів для порівняльного дослідження обумовлений можливістю їх сумісного застосування, ураховуючи протоколи лікування патології серцево-судинної системи [16, 50].

Як тонкі шари використовували пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – $5 \div 20$ мкм, товщина шару 130 ± 25 мкм, розмір пластин – 10×10 см); пластини «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (силікагель СТХ-1ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – $8 \div 12$ мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластин – 10×10 см); пластини Alugram Sil G/UV254 фірми Macherey-Nagel (Німеччина) (силікагель G₂₅₄, товщина шару – 200 мкм, розмір пластин – 10×10 см).

Дослідження проводили в 27 системах розчинників (табл. 2 та 3), серед яких системи 1 – 4 застосовують в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин, системи 5 – 9 визнано стандартними Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів, системи 10 – 27 досліджено з метою підбору оптимальної окремої системи розчинників для дослідження клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти.

Хроматографування проводили в камерах об'ємом 500 см³, в які вносили по 50 мл відповідних систем розчинників. Камеру насичували впродовж 30 хв. На лінію старту на відстані 2 см від краю пластини наносили по 10 мкл 0,1 % метанольних розчинів речовин, що досліджували. Довжина шляху пробігу розчинників становила 8 см. Після досягнення системами розчинників лінії фінішу пластини виймали з камери, висушували при кімнатній температурі і проявляли відповідними реактивами.

Для проявлення плям речовин на пластинах використовували УФ-світло до та після обробки парами кислоти хлоридної, деякі реактиви, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних отрут (розчин калію перманганату – для виявлення кокаїну, речовин-відновників; розчин феруму (III) хлориду – для виявлення похідних піразолону-5, кислоти саліцилової та інших речовин, що містять в своїй структурі фенольний гідроксил; реактив Драгендор-

фа з послідовною обробкою пластин кислотою сульфатною – для виявлення алкалоїдів, похідних 1,4-бензодіазепіну, кислоти *l*-амінобензойної та інших речовин, що містять в своїй структурі третинний атом нітрогену; 50 % розчин кислоти сульфатної в етанолі – для виявлення похідних фенотіазину; розчин нінгідрину з наступним нагріванням пластин – для виявлення фенілалкіламінів та речовин, що містять в структурі первинну або вторинну аміногрупу; розчини меркурію (II) сульфату та дифенілкарбазону – для виявлення похідних кислоти барбітурової) [98, 106].

Результати хроматографічного дослідження клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в присутності інших лікарських препаратів наведено в табл. 3.2. та 3.3.

Таблиця 3.2

Результати проявлення плям клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти і деяких інших речовин з серцево-судиною активністю на хроматографічних пластинах різними проявниками

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг					
	Клопідог- рель	Клопідог- рель карбо- нова кисло- та	Кислота ацетилсалі- цилова	Фенобарбі- тал	Еналаприл	Ніфедипін
1	2	3	4	5	6	7
УФ-світло (на пластинах з УФ-індикатором)	Зелене /0,1	Зелене /0,1	Зелене /0,1	Синє /0,1	Зелене /0,1	Зелене /0,1
1 % розчин калію перманганату в 0,25 моль/л розчині кислоти сульфатної	-	-	-	-	-	-
пари йоду	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1
5 % розчин феруму (III) хлориду	-	фіолетове/0,1	-	-	-	-
послідовно реактив Драгендорфа і кислота сульфатна	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1	-	-	коричне- ве/0,1	коричне- ве/0,1
50 % розчин кислоти сульфатної в етанолі	-	-	-	-	-	-
послідовно 1,6 % розчин меркурію (II) сульфату і 0,2 % розчин дифенілкарбазону в етанолі	-	-	-	-	-	-
0,5 % розчин нінгідрину в суміші кислоти хлорид- ної розведеної і ацетону (1:10)	-	-	-	-	-	-

Таблиця 3.3

**Значення R_f для клопідогрелю, клопідогрель карбонової кислоти
та деяких інших препаратів в загальних системах розчинників ($n = 3$)**

Система розчинників	Тонкий шар	Препарати					
		Клопідогрель	Клопідогрель кар- бонова кислота	Ацетилсалцилова кислота	Фенобарбітал	Еналаприл	Ніфедипін
1	2	3	4	5	6	7	8
хлороформ – діоксан – ацетон – 25 % розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5)	Sorbfil	0,95	0,78	0,05	0,52	0,86	0,90
	BETSHX	0,91	0,75	0,08	0,58	0,70	0,85
	Alugram	0,88	0,70	0,00	0,60	0,75	0,86
толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амо- ніаку (45:45:7,5:2,5)	Sorbfil	0,98	0,82	0,09	0,51	0,86	0,94
	BETSHX	0,95	0,78	0,06	0,68	0,74	0,85
	Alugram	0,90	0,73	0,00	0,63	0,71	0,80
етилацетат – метанол – 25 % розчин амоніа- ку (85:10:2,5)	Sorbfil	0,95	0,78	0,05	0,50	0,88	0,92
	BETSHX	0,94	0,76	0,03	0,58	0,72	0,85
	Alugram	0,98	0,72	0,00	0,62	0,75	0,87
хлороформ – <i>n</i> -бутанол – 25 % розчин амоні- аку (70:40:5)	Sorbfil	0,95	0,79	0,03	0,61	0,86	0,90
	BETSHX	0,92	0,75	0,09	0,58	0,78	0,89
	Alugram	0,89	0,72	0,00	0,63	0,75	0,86

Продовж. табл 3.3

1	2	3	4	5	6	7	8
хлороформ – ацетон (80:20)	Sorbfil	0,57	0,32	0,13	0,59	0,07	0,98
	BETIIIХ	0,96	0,54	0,15	0,07	0,07	0,91
	Alugram	0,95	0,57	0,07	0,00	0,00	0,80
хлороформ – метанол (90:10)	Sorbfil	0,96	0,75	0,25	0,89	0,29	0,99
	BETIIIХ	0,95	0,76	0,33	0,75	0,14	0,88
	Alugram	0,94	0,73	0,31	0,46	0,00	0,92
етилацетат – метанол – 25 % розчин амоніаку (85:10:5)	Sorbfil	0,88	0,80	0,37	0,99	0,28	0,99
	BETIIIХ	0,91	0,76	0,16	0,89	0,07	0,97
	Alugram	0,95	0,75	0,12	0,99	0,04	0,92
метанол – <i>n</i> -бутанол (60:40)	Sorbfil	0,97	0,75	0,79	0,86	0,63	0,74
	BETIIIХ	0,97	0,75	0,77	0,87	0,58	0,91
	Alugram	0,91	0,72	0,79	0,80	0,87	0,92
метанол – 25 % розчин амоніаку (100:1,5)	Sorbfil	0,93	0,68	0,93	0,93	0,92	0,96
	BETIIIХ	0,88	0,70	0,88	0,92	0,99	0,90
	Alugram	0,86	0,73	0,82	0,73	0,99	0,83

Найбільш оптимальною системою розчинників для дослідження клопідогрелю і клопідогрель карбонової кислоти є система етанол: кислота ацетатна концентрована: вода (5: 3: 2) на будь-яких пластинах з досліджених і система хлороформ: ацетон 80:20 на пластинах Sorbfil ПТСХ-ІІВ. Дані наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Значення R_f для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в різних системах розчинників і тонких шарах сорбенту

Система розчинників	Значення R_f клопідогрелю			Значення R_f клопідогрель карбонової кислоти		
	Sorbfil	BETШХ	Alugram	Sorbfil	BETШХ	Alugram
1	2	3	4	5	6	7
етилацетат – метанол (90:10)	0,94	0,94	0,93	0,67	0,72	0,75
хлороформ – метанол (100:1,5)	0,97	0,99	0,99	0,81	0,78	0,76
бензол – діоксан – 25% розчин амоніаку (12:7:1)	0,78	0,92	0,93	0,67	0,70	0,69
<i>n</i> -бутанол – кислота ацетатна концентрована – вода (1:1:1)	0,88	0,81	0,79	0,68	0,65	0,70
<i>n</i> -бутанол – кислота ацетатна концентрована – вода (4:1:5)	0,90	0,69	0,79	0,70	0,76	0,74
етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2)	0,88	0,85	0,86	0,67	0,70	0,68
гексан – хлороформ – триетиламін (14:9:4)	0,99	0,96	0,88	0,72	0,75	0,70
бензол – етанол – триетиламін (9:1:1)	0,96	0,93	0,97	0,72	0,71	0,75
гексан – толуен – триетиламін (15:10:2)	0,77	0,96	0,51	0,62	0,70	0,73
гексан – триетиламін (15:2)	0,99	0,75	0,99	0,79	0,75	0,70
гексан – хлороформ – 25% розчин амоніаку (14:9:4)	0,29	0,20	0,28	0,23	0,26	0,21
ізопентанол – ізобутанол (8:2)	0,97	0,85	0,80	0,81	0,75	0,69
ізопентанол – ізобутанол (5:5)	0,81	0,95	0,88	0,64	0,65	0,60
ізопентанол – ізобутанол (2:8)	0,53	0,91	0,71	0,52	0,77	0,75
ацетонітрил – метанол (6:4)	0,97	0,96	0,86	0,76	0,81	0,79
гексан – ацетон – 25% розчин амоніаку (20:20:1)	0,94	0,96	0,96	0,78	0,74	0,74
гексан – етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (30:30:5:1)	0,94	0,94	0,85	0,76	0,75	0,79

Продовж. табл 3.4

1	2	3	4	5	6	7
гексан – етилацетат – етанол (30:10:5)	0,98	0,97	0,87	0,80	0,76	0,81

У системах розчинників хлорформ-ацетон 80:20 на пластинах Sorbfil ПТСХ-ІІВ вивчали поведінку клопідогрелю і клопідогрель карбонової кислоти, при обробці деякими реактивами, які застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних отрут. Результати проявлення плям досліджуваних препаратів наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

**Результати проявлення плям клопідогрелю
та клопідогрель карбонової кислоти
на хроматографічних пластинах різними проявниками**

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг в пробі	
	клопідогрель	клопідогрель карбонова кислота
УФ-світло	салатна флуоресценція / 0,1	салатна флуоресценція / 0,1
1 % розчин калію перманганату в 0,25 М розчині кислоти сульфатної	—	—
5 % розчин феруму (ІІІ) хлориду	—	фіолетове / 0,1
послідовно реактив Драгендорфа та кислота сульфатна	жовтогаряче / 0,1	жовтогаряче / 0,1
50 % розчин кислоти сульфатної в етанолі	—	—
послідовно 5 % розчин меркурію (ІІ) сульфату та 0,1% розчин дифенілкарба- рбазону в хлороформі	—	—

Цікаве вивчення продуктів, що утворює клопідогрель в умовах лужного гідролізу, методом ТШХ.

Для визначення концентрації гідроксиду натрію, при якому проходить повний гідроліз клопідогрелю, готували 1 %, 5 %, 7 % і 10 % розчини натрію гідроксиду: в ряді мірних колб ємністю 100,0 мл в 10 - 15 мл води розчиняли 1,0; 5,0; 7,0 і 10,0 г натрію гідроксиду відповідно; доводили обсяги розчинів водою до мітки.

На лінію старту хроматографічної пластини на відстані 2 см від краю пластини наносили 10 мкл стандартного хлороформного розчину клопідогрелю в 2 точки і 10 мкл стандартного метанольного розчину клопідогрель карбонової кислоти; 1 точку клопідогрелю обробляли відповідним розчином натрію гідроксиду і висушували при кімнатній температурі; елюювали пластини в системі розчинників хлороформ:ацетон 80:20 і проявляли реактивом Драгендорфа.

Гідроліз клопідогрелю протікає повністю в разі використання 10 % розчину натрію гідроксиду - в цьому випадку після прояви пластини на першій полосі спостерігається тільки 1 пляма - на рівні свідка клопідогрель карбонової кислоти; у всіх інших випадках спостерігається 2 плями - на рівні свідків клопідогрелю і клопідогрель карбонової кислоти.

Нами встановлено, що для повного перебігу лужного гідролізу клопідогрелю як в розчині, так і на хроматографічних пластинах, необхідним і достатнім є використання 10 % розчину натрію гідроксиду.

Ідентифікували клопідогрель за продуктом лужного гідролізу - клопідогрель карбонової кислоти - методом ТШХ наступним способом: на лінію старту хроматографічної пластини наносять в точку 1 – 10 мкг стандартного хлороформного розчину клопідогрелю, обробляють її 10 % розчином натрію гідроксиду та висушують при кімнатній температурі.

Поряд на лінії старту хроматографічної пластини наносили 10 мкл розчину клопідогрель карбонової кислоти з концентрацією 1 мг/мл . Хроматографування проводили на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (див. п. 2.4.1) розміром 10×10 см в камері об'ємом 500 см^3 , в яку вносили 50 мл систем розчинників. Камеру насичували впродовж 30 хв.

Пластини елюювали в системі розчинників хлороформ – ацетон (8:2) та проявляли 5 % розчином феруму (III) хлориду.

На хроматограмі виявлялась одна пляма на рівні з клопідогрель карбо-

новою кислотою, що також забарвлюється у фіолетовий колір після наступної обробки 5 % розчином феруму (III) хлориду.

Враховуючи вищенаведене, для ідентифікації клопідогрелю запропоновано методику, що базується на комплексному використанні лужного гідролізу клопідогрелю, кольорових реакціях та методу ТШХ:

На лінію старту хроматографічної пластини наносять в дві точки 1 – 10 мкг клопідогрелю. Першу точку обробляють 10 % розчином натрію гідроксиду та висушують при кімнатній температурі. Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносять по 10 мкл хлороформних розчинів «свідків» – клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти (концентрація 1 мг/мл). Пластину висушують та елюють в системі розчинників етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2). Пластину проявляють на смугах 2 та 3, використовуючи методику проведення гідроксамової проби – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,88$). Далі пластину проявляють на смугах 1 та 4 5 % розчином феруму (III) хлориду плями – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,67$).

3.2.2 Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту – клопідогрель карбонової кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії

Метод високоефективної рідинної хроматографії є одним з найбільш поширених методів, що застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі [107, 108, 109]. Метод добре зарекомендував себе як такий, що має високі експлуатаційні характеристики, проте його використання у традиційному вигляді вимагає застосування для кожної речовини «своєї» хроматографічної колонки, «своїх» мобільних фаз, а також «своєї» унікальної процедури аналізу.

Метод ВЕРХ часто використовується у всіх областях досліджень лікарської речовини не тільки при аналізі, але також як спосіб виявлення супутних речовин в лікарському засобі[63, 64].

Практика хіміко-токсикологічного аналізу досить часто вимагає вирішення задач, що характеризуються повною невизначеністю переліку речовин, наявності яких треба проводити аналіз. В цьому випадку при проведенні ВЕРХ-аналізу за традиційною методикою необхідно провести велику кількість експериментів, а, відповідно, витратити велику кількість реактивів та інших допоміжних матеріалів.

Хроматографічний аналіз проводили на мікроколоночному рідинному хроматографі «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова») [110] за уніфіцированою методикою ВЕРХ, розробленою автором - Барам Г. Ю.

Обернено-фазовий варіант хроматографії використовується як варіант з високою швидкістю встановлення сорбційної рівноваги, легкістю і повнотою десорбції компонентів з неполярного сорбенту в невеликих обсягах розчинника. Дослідження проводилися на колонці 2 мм x 75 мм з неполярних сорбентом Prontosil 120-5 C18 AQ, 5 мкм. Сорбент Prontosil володіє високою сорбційною здатністю, інертністю до речовин, механічною міцністю, термостійкістю.

Рухома фаза включала органічний розчинник та буферний розчин. Ацетонітрил фільтрували через мембрану МПА-МА-Н-2 (ТУ 6-05-1909-81) з розміром пір 0,15-0,25 мкм, дегазували під вакуумом. Буферний розчин включав іонно-парний агент - 0,2 М розчин перхлорату літію в 0,005 М розчині хлорної кислоти, який перед використанням розбавляли в 25 разів з потенциометричної установкою значення рН 3,0 шляхом додавання 0,005 М розчину перхлоратної кислоти.

Гradientне елюювання сумішами розчинників є лінійним gradientом від елюента А (5 % ацетонітрил і 95 % буфер) до елюента В (100 % ацетонітрил) впродовж 40 хв. Метод найшвидшого режим забезпечував зменшення полярності елюента з додаванням менш полярного розчинника

(ацетонітрилу) і зниження утримування компонентів. Метод найшвидшого режиму створював умови для виходу з колонки всіх компонентів зразка у вигляді вузьких зон. Заключна стадія градієнта відповідала фазі з високим вмістом ацетонітрилу. Регенерацію колонки проводили протягом 2 хв сумішшю розчинників (2 % ацетонітрил і 98 % буферний розчин).

Термостат колонки твердотільного типу з електронагрівачем забезпечував оптимальні умови хроматографії і відтворюваність результатів. Оптимальний тиск насоса 2,8 - 3,2 МПа; швидкість потоку рухомої фази 100 мкл / хв; оптимальне значення температури - 37 - 40°C. Обсяг зразків для введення становив 4 мкл.

Детектування речовини після його виходу з колонки проводилося з використанням двухпроменевого багатохвильового УФ-спектрофотометра в діапазоні довжин хвиль 190-360 нм, точність довжини хвилі 0,5 нм. Для багатоканального виявлення речовин рекомендуються довжини хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 і 300 нм. Для кожного значення довжини хвилі на хроматограмі речовин спостерігався відповідний пік з тим же часом утримування, але з різними амплітудами, прямо пропорційними згасанню речовини (коефіцієнт поглинання електромагнітного випромінювання за даної довжини хвилі).

Симетричні гострі піки на хроматограмах були отримані із застосуванням уніфікованої методики ВЕРХ для аналізу препарату, що дозволило розрахувати результати за допомогою комп'ютерної програми «МультиХром» («Амперсенд», Росія), яка входить до складу хроматографа.

Порівняльна оцінка спектральних співвідношень дозволяє отримувати більш надійні та відтворювані результати, а також ідентифікувати речовини з близькими значеннями параметрів утримування.

ВЕРХ-аналіз виконується в таких умовах: швидкість потоку – 100 мкл/хв.; елюювання – лінійний градієнт від 5 % до 100 % ацетонітрилу за 40 хв., потім 100 % ацетонітрил впродовж 3 хв.; температура колонки – 40°C.

Правильність методики аналізу періодично контролюється шляхом хро-

матогографування спеціального контрольного багатоконпонентного розчину, що складається з бромід-іону, уридину, кофеїну, прозерину, *m*-нітроаніліну, *n*-нітроаніліну та трифтазину.

Роботу з хроматографом «Міліхром А-02» виконували на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків).

В зазначених умовах проводили хроматографування клопідогрелю та його метаболіту – клопідогрель карбонової кислоти.

Розчини клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти готували наступним способом: 0,1000 г речовини (клопідогрелю бісульфату або клопідогрель карбонової кислоти) вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 500 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 1000,0 мл вносили 500,00 мл 0,01 М розчину кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (розчинник).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 20,00 мл стандартного розчину 2 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 3, концентрація 100 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 3 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 4, концентрація 10 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 100,0 мл вносили по 10,00 та 5,00 мл розчину 4 відповідно та доводили об'єми розчинів до позначки розчинником (розчини 5 та 6 відповідно; концентрація 1 та 0,5 мкг/мл).

Розчини клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти 3, 4, 5 та 6 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби становив 2 мкл.

Попередньо проводили хроматографування розчинника.

Отримані результати наведено в табл. 3.6. та на рис. 3.1.

Таблиця 3.6

**Результати визначення основних хроматографічних параметрів
клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ**

Параметр		клопідогрель			клопідогрель карбонова кислота		
		x_i	\bar{x}	RSD, %	x_i	\bar{x}	RSD, %
Час утримування (t_R), хв.		13,741	13,738	0,35	11,851	11,849	0,14
		13,784			11,831		
		13,689			11,865		
Об'єм утримування (V_R), мкл		1374,1	1373,8	0,35	1185,1	1184,9	0,14
		1378,4			1183,1		
		1368,9			1186,5		
Спектральні відношення ($R = S_\lambda / S_{210}$)	210нм	1,0000	1,0000	0	1,0000	1,0000	0
		1,0000			1,0000		
		1,0000			1,0000		
	220нм 210нм	0,9831	0,9741	0,93	0,3954	0,4088	3,28
		0,9742			0,4088		
		0,9649			0,4222		
	230нм 210нм	0,6383	0,6483	1,36	0,175	0,1750	6,40
		0,6517			0,1638		
		0,6549			0,1862		
	240нм 210нм	0,2167	0,2203	1,79	0,1813	0,1849	4,54
		0,2196			0,1945		
		0,2245			0,1789		
	250нм 210нм	0,2058	0,2044	2,54	0,3783	0,3789	2,50
		0,1986			0,3887		
		0,2087			0,3698		
	260нм 210нм	0,2801	0,2811	2,07	0,2977	0,2962	1,98
		0,2873			0,3011		
		0,2758			0,2897		
	280нм 210нм	1,0756	1,0787	0,28	0,7897	0,7869	0,79
		1,0789			0,7798		
		1,0817			0,7912		
	300нм 210нм	0,6231	0,6248	0,76	0,03487	0,03543	1,38
		0,6211			0,03578		
		0,6301			0,03564		

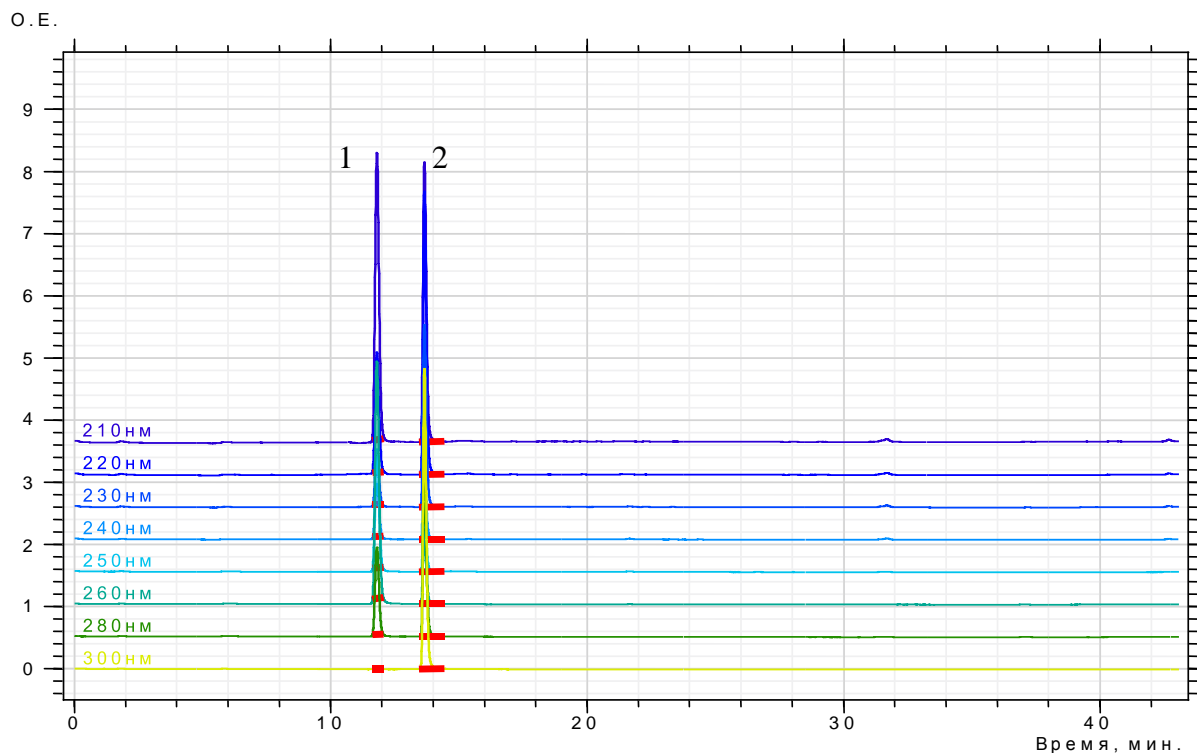


Рис. 3.1 ВЕРХ-хроматограма суміші розчинів клопідогрелю карбонової кислоти (1) та клопідогрелю (2)

Мінімальна концентрація клопідогрелю та клопідогрелю карбонової кислоти в розчині, яку можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин в пробі 2 нг.

Таким чином, можна сказати, що ВЕРХ-методика із застосуванням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02» забезпечує задовільне розділення клопідогрелю та його метаболіту.

Результати досліджень висвітлено в літературі [111, 112] *В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова* Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.,

В. С. Бондар, Л. С. Аносова. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.

Висновки до розділу 3

1. Запропоновано кольорові реакції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з деякими загальноприйнятими реактивами, а також з використанням реактивів для виявлення сполук, які містять естерну групу, придатні для ідентифікації речовини у хіміко-токсикологічному аналізі.
2. При проведенні аналізу досліджуваних речовин- клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом нормальнофазової тонкошарової хроматографії прийнятною рухомою фазою для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти є етанол-кислота ацетатна концентрована-вода (5: 3: 2) на будь-яких пластинах з досліджених і система хлороформ - ацетон (80:20) на пластинах Sorbfil ПТСХ-ІІВ.
3. Запропоновано реактиви для проявлення плям клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти на хроматографічних пластинах; встановлено їх чутливість: пари йоду з чутливістю 1,0 мкг в пробі, послідовно реактив Драгендорфу та кислота сульфатна (чутливість 1, мкг в пробі), для клопідогрель карбонової кислоти – 5% розчин ферум (ІІІ) хлориду (чутливість 1, мкг в пробі).
4. Розроблений метод реакційної ТШХ (реакція лужного гідролізу клопідогрелю) для виявлення клопідогрелю за допомогою його «маркеру» - клопідогрель карбонової кислоти.
5. Одним із сучасних методів ідентифікації аналізованих речовин був обраний метод ВЕРХ. Вивчено хроматографічну поведінку клопідогрелю та його «маркера» – клопідогрель карбонової кислоти – в умовах застосування методу ВЕРХ; встановлено їх основні хроматографічні параметри. Одержані експериментальні дані внесено до бази даних «ВЕРХ-аналізатора» для аналізу отруйних речовин, розробленого ЗАТ «Еко-Нова». Обрано канал 280нм/210 нм для подальшого дослідження. Мінімальна концентрація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в розчині, яку можна визначити даним методом, становить 1 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин в пробі 2 нг.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії . *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1. С. 50 – 52. *(Особистий внесок здобувача у роботі -65 % - (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*
2. Бондар В. С.,. Аносова Л. С. Розробка методів ідентифікації клопідогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. *Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. 2010. Т. 1. С. 137. (Особистий внесок здобувача у роботі - 90 % (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовлен матеріалу до друку))*
3. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопідогрелю та його метаболіту. Сінтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича, 12 – 13 квітня 2018 р., Харків. 2018. – С. 358. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 60 % (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА МЕТОДІВ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

4.1 Кількісне визначення клопідогрелю методом УФ-спектрофотометрії

Метод УФ-спектрометрії широко використовується в аналізі якості субстанцій та лікарських форм і описаний в більшості провідних фармакопей світу. В контролі якості метод використовується для речовин, які мають зв'язані кратні зв'язки. Метод УФ-спектрофотометрії є неспецифічним, проте необхідний в контролі якості стандартних зразків як незалежний додатковий метод [113-116]. Також даний метод використовується не тільки для ідентифікації речовин в лікарських формах, а також і для кількісного визначення діючих речовин в лікарських субстанціях [117].

На сьогодні спектрофотометричний метод аналізу, оснований на вимірюванні світлопоглинання в УФ-області спектру, широко застосовується в практиці хіміко-токсикологічного аналізу [118-120].

Також УФ- спектрофотометрія широко використовується в аналізі лікарської рослини сировини [121].

Для кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти даним методом, необхідно вибрати довжину хвилі.

Стандартні розчини клопідогрелю готували наступним чином:

100,0 мг клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 10,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином ки-

слоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 100 мкг/мл).

Знімали УФ-спектр поглинання стандартного розчину клопідогрелю 2 на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 230 – 330 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Одержаний УФ-спектр поглинання розчину клопідогрелю наведено на рис. 4.1.

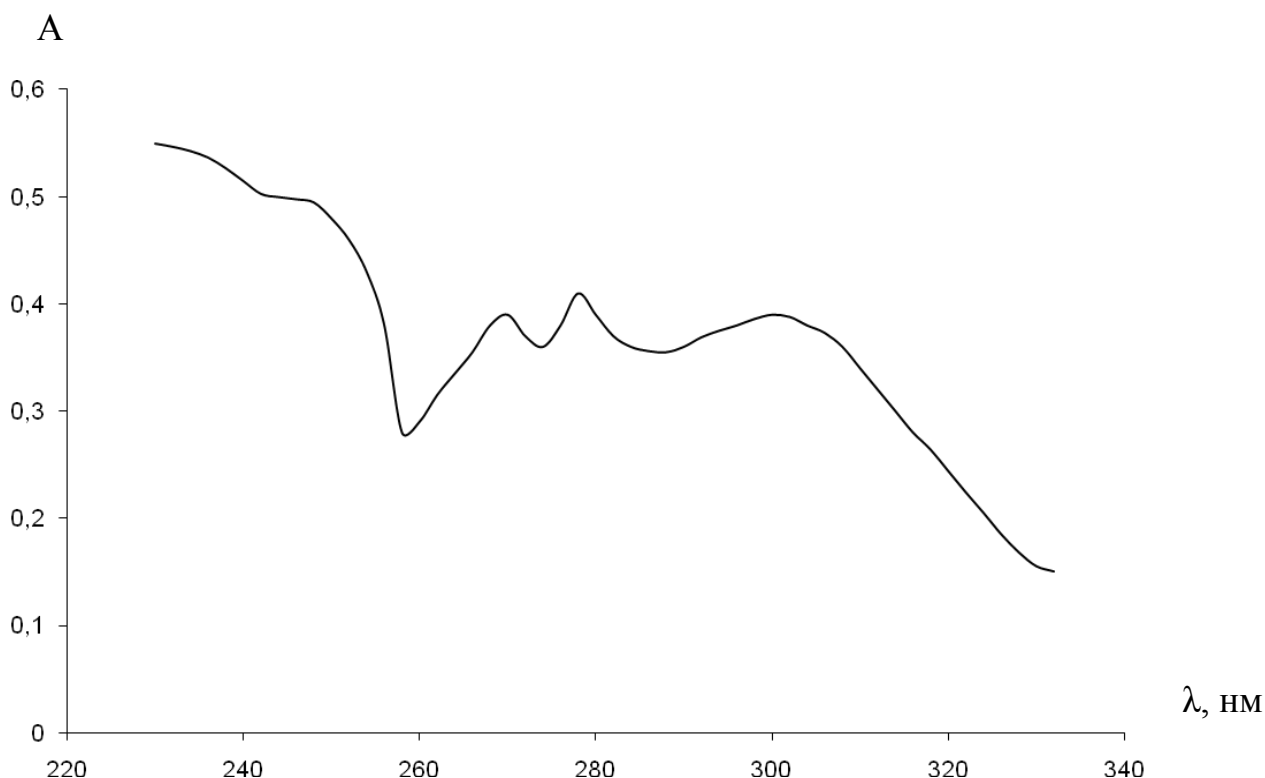


Рис. 4.1 УФ-спектр клопідогрелю в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація 100 мкг/мл; $l = 10$ мм);

В УФ-спектрі абсорбції клопідогрелю з використанням як розчинника 0,1 М розчину кислоти хлоридної спостерігали максимуми поглинання за довжини хвилі 270, 278 та 300 нм (див. рис. 4.1), що відповідає даним, наведеним в літературі [5,55,96,97].

У три мірні колби місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00; 15,00 та 5,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єми розчинів

0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчини 3, 4 та 5 відповідно; концентрація 200, 150 та 50 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 2 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчин 6, концентрація 20 мкг/мл).

Після ретельного перемішування вимірювали оптичну густину розчинів клопідогрелю 2, 3, 4, 5 та 6 на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Експеримент виконували тричі.

Для розрахунку питомого ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) і молярного (ε) коефіцієнтів світлопоглинання користувались формулами 4.1 та 4.2 відповідно.

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A}{l \cdot C}, \quad (4.1)$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

C – концентрація досліджуваного розчину, %;

l – товщина шару рідини в кюветі, см.

$$\varepsilon = \frac{A}{l \cdot c} = \frac{A}{l \cdot C} \cdot \frac{M}{10} = A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10}, \quad (4.2)$$

де c – концентрація досліджуваного розчину, моль/л;

M – молекулярна маса досліджуваної речовини, г/моль.

Отримані дані наведено в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Результати визначення питомого і молярного
коефіцієнтів світлопоглинання клопідогрелю
в 0,1 М розчині кислоти хлоридної ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Оптична густина, A	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологічна характеристика для $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ($n = 5$; $P = 0,95$)	ε	Метрологічна ха- рактеристика для ε ($n = 5$; $P = 0,95$)
20,0	0,088	44,0	$\bar{X} = 42,0$ $S = 1,2$ $S_{\bar{X}} = 0,5$ $\Delta \bar{X} = 1,4$ $\varepsilon = \pm 3,4\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} =$ $= 42,0 \pm 1,4$	1416,0	$\bar{X} = 1350,5$ $S = 37,3$ $S_{\bar{X}} = 16,7$ $\Delta \bar{X} = 46,4$ $\varepsilon = \pm 3,4\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} =$ $= 1350,5 \pm 46,4$
50,0	0,208	41,6		1338,8	
100,0	0,411	41,1		1322,7	
150,0	0,625	41,7		1340,9	
200,0	0,829	41,5		1333,9	

Шляхом виконання серії експериментів та розрахунку значень питомого ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) і молярного (ε) коефіцієнтів світлопоглинання показано, що оптична густина розчинів клопідогрелю в 0,1 М розчині кислоти хлоридної за довжини хвилі 270 та 300 нм не підпорядковується основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

Отже, проводити кількісне визначення клопідогрелю УФ-спектрофотометричним методом треба за довжиною хвилі 278 нм.

4.1.1 Побудова градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю

Для побудови градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю готували стандартний розчин клопідогрелю у 0,1 М розчині кислоти хлоридної.

100,0 мг клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм

розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 10,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 100 мкг/мл).

У три мірні колби місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00; 15,00 та 5,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єми розчинів 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 3, 4 та 5 відповідно; концентрація 200, 150 та 50 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 2 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчин 6, концентрація 20 мкг/мл).

Після ретельного перемішування вимірювали оптичну густину розчинів клопідогрелю 2, 3, 4, 5 та 6 на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Експеримент виконували тричі.

За результатами виміру оптичної густини будували градувальний графік. Результати наведено в табл. 4.2 та на рис. 4.2.

Таблиця 4.2

**Залежність оптичної густини розчинів клопідогрелю
від його концентрації ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Оптична густина		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
1	2	3	4
20,0	0,088	0,090	1,70
	0,090		
	0,091		

Продовж. табл 4.2

1	2	3	4
50,0	0,208	0,208	1,21
	0,211		
	0,206		
100,0	0,411	0,411	0,85
	0,415		
	0,408		
150,0	0,625	0,623	0,33
	0,624		
	0,621		
200,0	0,829	0,832	0,37
	0,831		
	0,835		

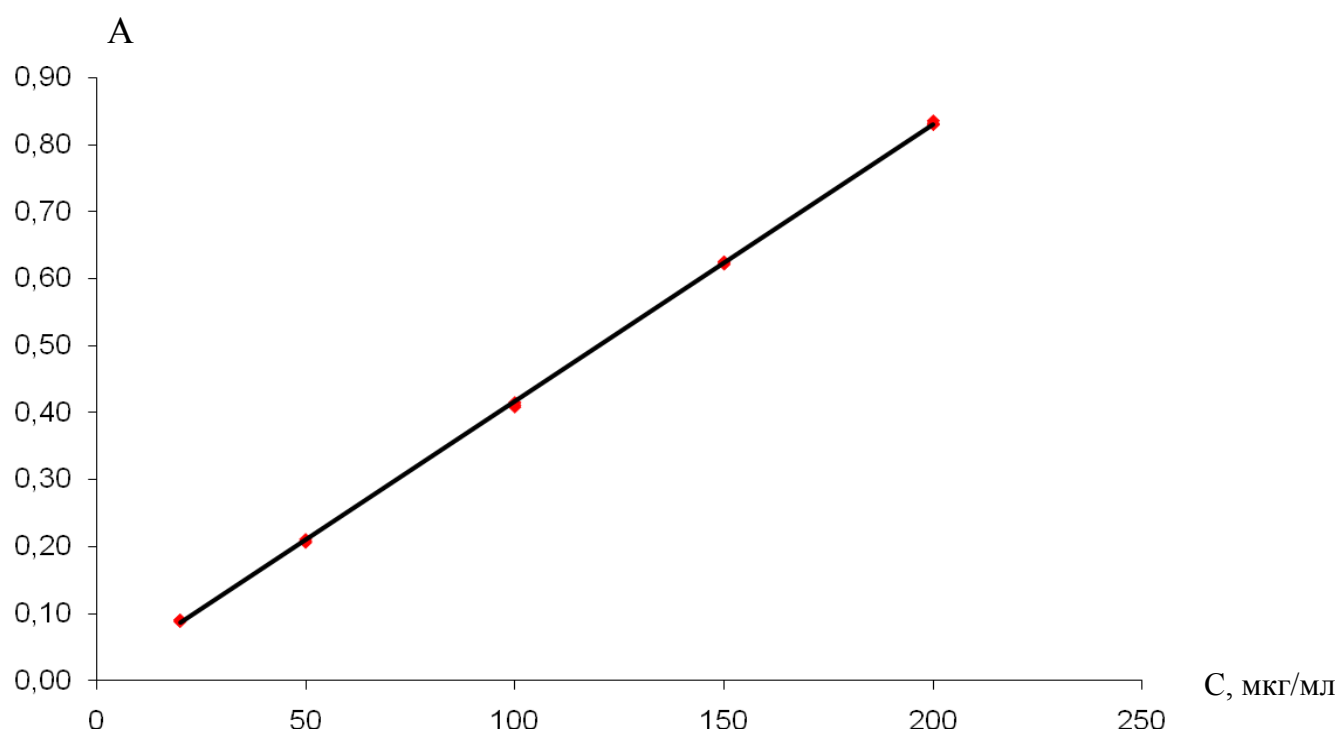


Рис. 4.2 Градувальний графік для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)

Наведеному градувальному графіку відповідає рівняння прямої (4.3) виду $y = bx + a$, що має вигляд:

$$A = 0,004104 \cdot C + 0,005220, \quad (4.3)$$

де A – оптична густина розчину клопідогрелю;

C – концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл.

Застосовуючи метод найменших квадратів, розраховано рівняння градувальної прямої, яким описується лінійність між оптичною густиною та концентрацією клопідогрелю в пробі. Параметри лінійної залежності рівняння регресії, розрахованого методом найменших квадратів, представлено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Метрологічна характеристика градувальної залежності оптичної густини від вмісту клопідогрелю ($y = bx + a$), отриманої методом УФ-спектрофотометрії ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм) ($n = 5$; $P = 0,95$)

r	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9999	0,004104	0,005220	0,00001418	0,00003217	0,003951

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (4.3) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b'x$.

Наведені в табл. 4.2 та на рис. 4.2 дані свідчать про те, що оптична густина розчинів клопідогрелю підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера в інтервалі концентрацій від 20 до 200 мкг/мл.

4.1.2 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики УФ-спектрофотометричного визначення

Розроблену методику УФ-спектрофотометричного визначення використовували для кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено п'ять модельних розчинів клопідогрелю з концентрацією 20,0; 50,0; 100,0; 150,0 та 200,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.1.1). Оптичну густину модельних розчинів клопідогрелю вимірювали при довжині хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Для розрахунку вмісту клопідогрелю в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.2) або рівняння прямої (4.3).

Результати кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

**Результати УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю
у модельних розчинах ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Оптична густина	Знайдено клопідогрелю		Метрологічна характеристика ($n = 5$; $P = 0,95$)
		мкг/мл	%	
20,0	0,088	20,17	100,85	$\bar{X} = 99,92$ $S = 0,99$ $S\bar{X} = 0,44$ $\Delta\bar{X} = 1,24$ $\varepsilon = \pm 1,24\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 99,92 \pm 1,24$
50,0	0,208	49,41	98,82	
100,0	0,411	98,87	98,87	
150,0	0,625	151,02	100,68	
200,0	0,829	200,73	100,37	

З даних, наведених у табл. 4.4, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрелю методом УФ-спектрофотометрії не перевищує $\pm 1,24\%$.

Розроблену УФ-спектрофотометричну методику використовували для кількісного визначення клопідогрелю, виділеного із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.7.1) і для вивчення екстракції клопідогрелю із водних розчинів різними органічними розчинниками (див. розд. 5, п. 5.1).

4.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти методом УФ-спектрофотометрії

Стандартні розчини клопідогрель карбонової кислоти готували наступним способом:

100,0 мг клопідогрель карбонової кислоти вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 10,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 1 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 100 мкг/мл).

Знімали УФ-спектр поглинання стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 2 на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 220 – 330 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Одержаний УФ-спектр поглинання розчину клопідогрель карбонової кислоти наведено на рисунку 4.3.

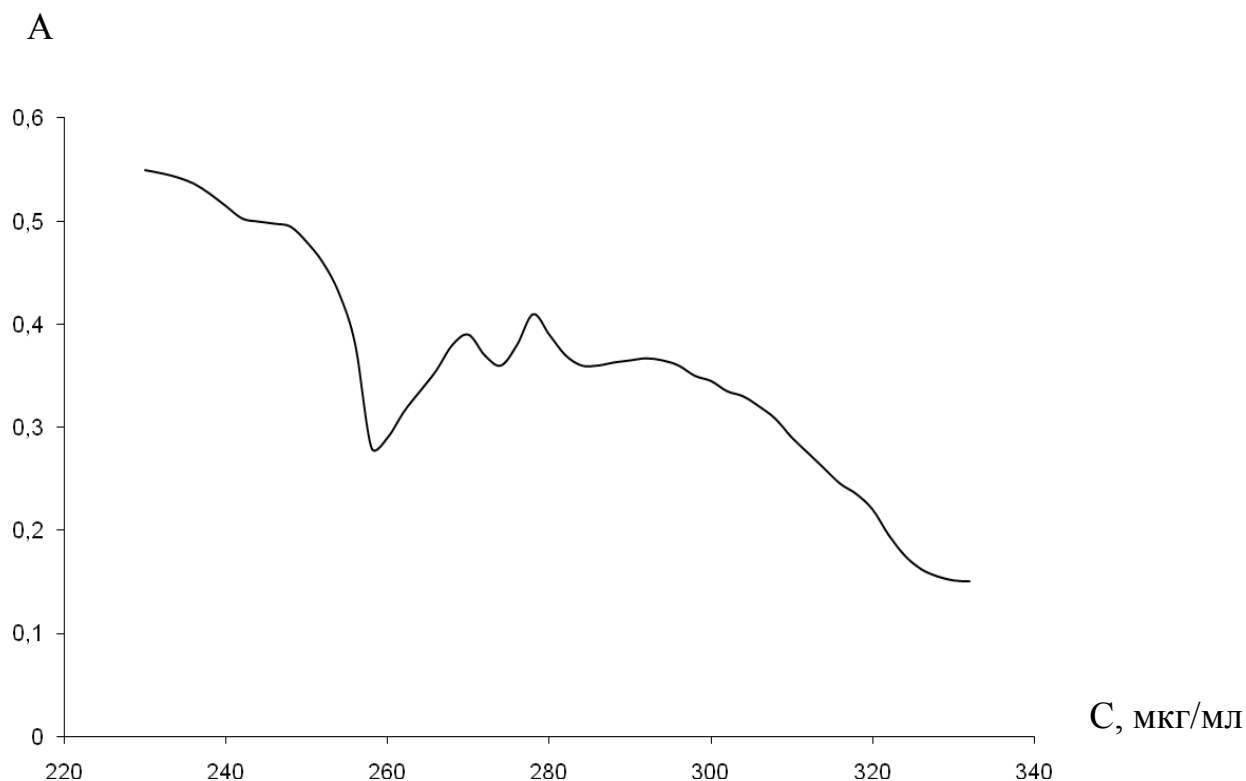


Рис 4.3 УФ-спектр клопідогрель карбонової кислоти в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація 100 мкг/мл; $l = 10$ мм);

В УФ-спектрі абсорбції клопідогрель карбонової кислоти з використанням як розчинника 0,1 М розчину кислоти хлоридної спостерігали максимуми поглинання за довжини хвилі 270 та 278 нм (див. рис. 4.3).

У три мірні колби місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00; 15,00 та 5,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 1 і доводили об'єми розчинів 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчини 3, 4 та 5 відповідно; концентрація 200, 150 та 50 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 2 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчин 6, концентрація 20 мкг/мл).

Після ретельного перемішування вимірювали оптичну густину розчинів клопідогрель карбонової кислоти 2, 3, 4, 5 та 6 на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Експеримент виконували тричі.

Для розрахунку питомого ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) і молярного (ϵ) коефіцієнтів світлопоглинання користувались формулами 4.1 та 4.2 відповідно.

Отримані дані наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5

**Результати визначення питомого і молярного
коефіцієнтів світлопоглинання клопідогрель карбонової кислоти
в 0,1 М розчині кислоти хлоридної ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл	Оптична густина, А	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологічна характеристика для $A_{1\text{см}}^{1\%}$ (n = 5; P = 0,95)	ϵ	Метрологічна характеристика для ϵ (n = 5; P = 0,95)
20,0	0,084	42,0	$\bar{X} = 40,9$ $S = 0,7$ $S_{\bar{X}} = 0,3$ $\Delta \bar{X} = 0,9$ $\epsilon = \pm 2,2\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 40,9 \pm 0,9$	1402,0	$\bar{X} = 1364,5$ $S = 23,6$ $S_{\bar{X}} = 10,5$ $\Delta \bar{X} = 29,3$ $\epsilon = \pm 2,2\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 1364,5 \pm 29,3$
50,0	0,201	40,2		1342,0	
100,0	0,404	40,4		1348,6	
150,0	0,611	40,7		1359,8	
200,0	0,821	41,1		1370,3	

Шляхом виконання серії експериментів та розрахунку значень питомого ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) і молярного (ϵ) коефіцієнтів світлопоглинання показано, що оптична густина розчинів клопідогрель карбонової кислоти в 0,1 М розчині кислоти хлоридної при довжині хвилі 270 нм не підпорядковується основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

Таким чином, проводити кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти УФ-спектрофотометричним методом можна за довжиною хвилі 278 нм.

Як розчинник при розробці методики кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом УФ-спектрофотометрії використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

4.2.1 Побудова градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрель карбонової кислоти

Для побудови градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрель карбонової кислоти готували стандартний розчин клопідогрель карбонової кислоти у 0,1 М розчині кислоти хлоридної.

100,0 мг клопідогрель карбонової кислоти вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 10,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 1 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 100 мкг/мл).

У три мірні колби місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00; 15,00 та 5,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 1 і доводили об'єми розчинів 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**розчини 3, 4 та 5** відповідно; концентрація 200, 150 та 50 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 2 і доводили об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**розчин 6**, концентрація 20 мкг/мл).

Після ретельного перемішування вимірювали оптичну густину розчинів клопідогрель карбонової кислоти 2, 3, 4, 5 та 6 на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Експеримент виконували тричі.

За результатами виміру оптичної густини будували градуовальний графік. Результати наведено в табл. 4.6. та на рис. 4.4.

Таблиця 4.6

**Залежність оптичної густини розчинів клопідогрель карбонової
кислоти від його концентрації ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл	Оптична густина		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
20,0	0,074	0,075	4,09
	0,078		
	0,072		
50,0	0,208	0,201	3,23
	0,201		
	0,195		
100,0	0,404	0,400	1,15
	0,395		
	0,401		
150,0	0,611	0,605	0,85
	0,604		
	0,601		
200,0	0,823	0,822	0,12
	0,821		
	0,822		

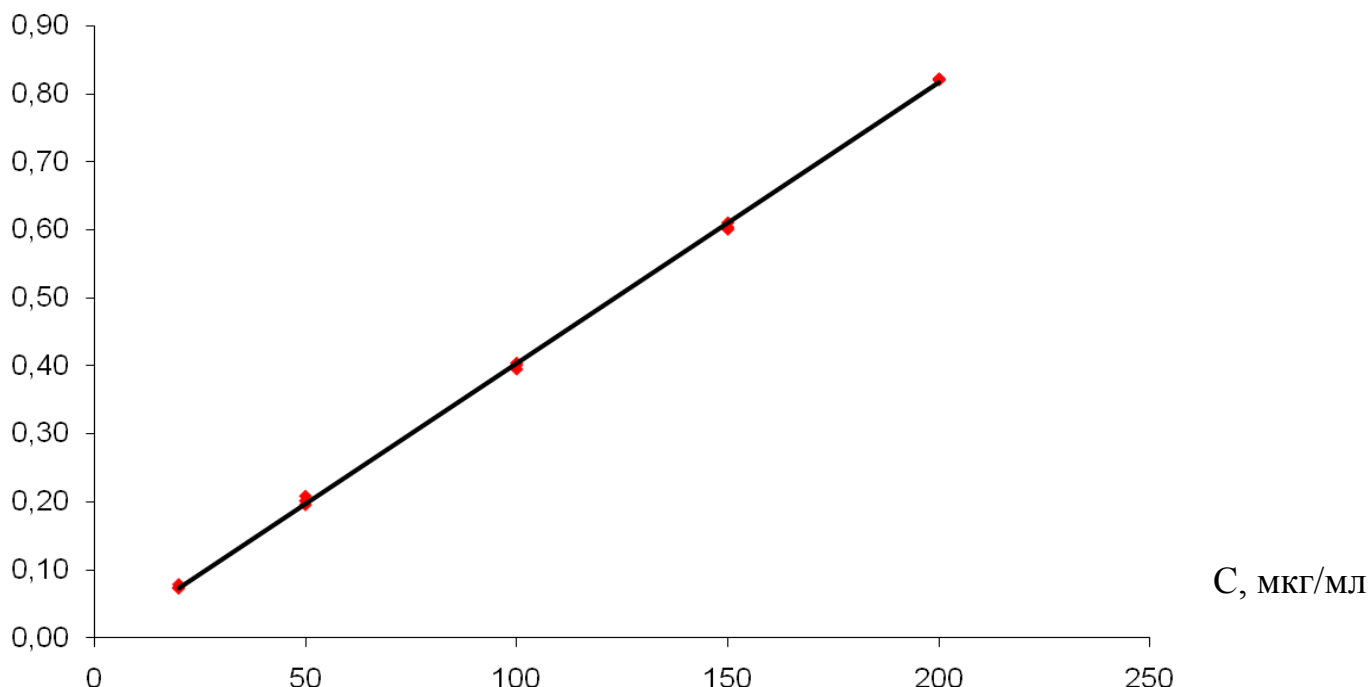


Рис 4.4 Градувальний графік для УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрель карбонової кислоти ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)

Наведеному градувальному графіку відповідає рівняння прямої (4.4) виду $y = bx + a$, що має вигляд:

$$A = 0,004128 \cdot C - 0,008667, \quad (4.4)$$

де A – оптична густина розчину клопідогрель карбонової кислоти;

C – концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл.

Застосовуючи метод найменших квадратів, розраховано рівняння градувальної прямої, яким описується лінійність між оптичною густиною та концентрацією клопідогрель карбонової кислоти в пробі. Параметри лінійної залежності рівняння регресії, розрахованого методом найменших квадратів, представлено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

**Метрологічна характеристика градувальної залежності
оптичної густини від вмісту клопідогрель карбонової кислоти ($y = bx + a$),
отриманої методом УФ-спектрофотометрії
($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм) ($n = 15$; $P = 0,95$)**

r	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9998	0,004128	-0,008667	0,00003000	0,00004679	0,005746

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (4.4) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b'x$.

Наведені в табл. 4.6. та на рис. 4.4. дані свідчать про те, що оптична густина розчинів клопідогрель карбонової кислоти підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера в інтервалі концентрацій від 20 до 200 мкг/мл.

4.2.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах за допомогою розробленої методики УФ-спектрофотометричного визначення

Розроблену методику УФ-спектрофотометричного визначення використовували для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено п'ять модельних розчинів клопідогрель карбонової кислоти з концентрацією 20,0; 50,0; 100,0; 150,0 та 200,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.2.1). Оптичну густину модельних розчинів клопідогрель карбонової кислоти вимірювали за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Для розрахунку вмісту клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.4.) або рівняння прямої (4.4).

Результати кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

**Результати УФ-спектрофотометричного визначення
клопідогрель карбонової кислоти
у модельних розчинах ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)**

Концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл	Оптична густина	Знайдено клопідогрель карбонової кислоти		Метрологічна характеристика ($n = 5$; $P = 0,95$)
		мкг/мл	%	
20,0	0,078	20,99	104,95	$\bar{X} = 101,41$ $S = 2,08$ $S_{\bar{X}} = 0,93$ $\Delta \bar{X} = 2,58$ $\varepsilon = \pm 2,54\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 101,41 \pm 2,58$
50,0	0,201	50,79	101,58	
100,0	0,404	99,97	99,97	
150,0	0,611	150,11	100,07	
200,0	0,821	200,99	100,50	

З даних, наведених у табл. 4.8., випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрель карбонової кислоти методом УФ-спектрофотометрії не перевищує $\pm 2,54\%$.

Розроблену УФ-спектрофотометричну методику використовували для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти, виділеної із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.8.1) і для вивчення екстракції клопідогрель карбонової кислоти із водних розчинів різними органічними розчинниками (див. розд. 5, п. 5.2).

4.3 Валідаційні характеристики УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у розчинах

Валідацію УФ-спектрофотометричного методу визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у 0,1 М розчині хлоридної кислоти проводили за наступними параметрами: лінійність, прецизійність, правильність та відтворюваність [124, 125, 126, 127].

Методика визначення клопідогрелю та його метаболіту УФ-спектрофотометричним методом валідована за параметрами: діапазон лінійності, межі виявлення (*LOD*) та кількісного визначення (*LOQ*), правильність та прецизійність [125, 127].

Для визначення діапазону лінійності УФ-спектрофотометричні методики аналізу препаратів використовували градувальні графіки, побудовані в координатах: А, (оптична густина розчину) – С, мкг/мл (концентрація розчинів досліджуваної речовини) (рис. 4.3, 4.4).

В табл. 4.9. наведені основні валідаційні характеристики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти: інтервал лінійності градувального графіку у діапазоні концентрацій; коефіцієнти регресії рівняння градувального графіку, які розраховані методом найменших квадратів.

Таблиця 4.9

Коефіцієнти регресії градувальних графіків $y=bx+a$ кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти УФ-спектрофотометричним методом ($P = 95\%$)

Коефіцієнти регресії градувального графіку		Довірчі інтервали коефіцієнтів регресії		Коефіцієнт кореляції (R)	Інтервал лінійності графіку, мкг/мл
а	в	Δa	Δb		
1	2	3	4	5	6
Клопідогрель ($n = 5$)					
$5,22 \cdot 10^{-3}$	$41,04 \cdot 10^{-4}$	$39,51 \cdot 10^{-4}$	$32,17 \cdot 10^{-6}$	0,9999	20,0 - 200,0

Продовж.табл 4.9

1	2	3	4	5	6
Клопідогрель карбонова кислота ($n = 5$)					
$-86,67 \cdot 10^{-4}$	$41,28 \cdot 10^{-4}$	$57,46 \cdot 10^{-4}$	$46,79 \cdot 10^{-6}$	0,9998	20,0 - 200,0

Встановлено, що лінійність градувальних графіків клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у координатах (А) - (С, мкг/мл) спостерігалась в інтервалах концентрацій 20,0 – 200,0 мкг/мл.

Значення межі виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ) розраховували на основі параметрів градувальної прямої (стандартного відхилення вільного члена Sa та її тангенса нахилу b) згідно відповідним рівнянням:

$$LOD = 3,3 Sa / b ; \quad (4.5)$$

$$LOQ = 10 Sa / b., \quad (4.6)$$

Встановлено, що межа кількісного виявлення клопідогрелю LOD дорівнює 1,144 мкг/мл, межа кількісного виявлення клопідогрель карбонової кислоти LOD дорівнює 1,655 мкг/мл; межа кількісного визначення клопідогрелю LOQ дорівнює 3,467 мкг/мл, межа кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти LOQ дорівнює 5,015 мкг/мл.

Правильність та прецизійність УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти встановлювали за значенням відносного стандартного відхилення середнього результату у відсотках - $RSD\bar{x}$ для різних концентрацій досліджуваної речовини в модельних розчинах при використанні градувального графіку або рівняння прямої. Значення відносного стандартного відхилення середнього результату для клопідогрелю ($RSD\bar{x}$) – 0,44 %, значення відносного стандартного відхилення середнього результату для клопідогрель карбонової кислоти ($RSD\bar{x}$) – 0,92 %

При визначенні вмісту препаратів у модельних розчинах УФ-спектрофотометричним методом встановлено, що за розробленою методикою

у досліджуваних діапазонах концентрацій відносна невизначеність середнього результату не перевищувала: для клопідогрелю $\pm 1,24 \%$ (таб.4.4.); для клопідогрелю карбонової кислоти $\pm 2,58\%$ (таб 4.7.).

Встановлено, що правильність та прецизійність результатів застосування розробленої методики для концентрацій клопідогрелю та клопідогрелю карбонової кислоти в інтервалі лінійності градувальних графіків в модельних розчинах не перевищувала 1,0, що свідчило про близькість результатів аналізу до їх справжнього значення.

Таким чином, розроблена та валідована УФ-спектрофотометрична методика може застосовуватися для кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрелю карбонової кислоти у біологічному матеріалі та лікарських формах.

4.4 Кількісне визначення клопідогрелю методом екстракційної фотометрії

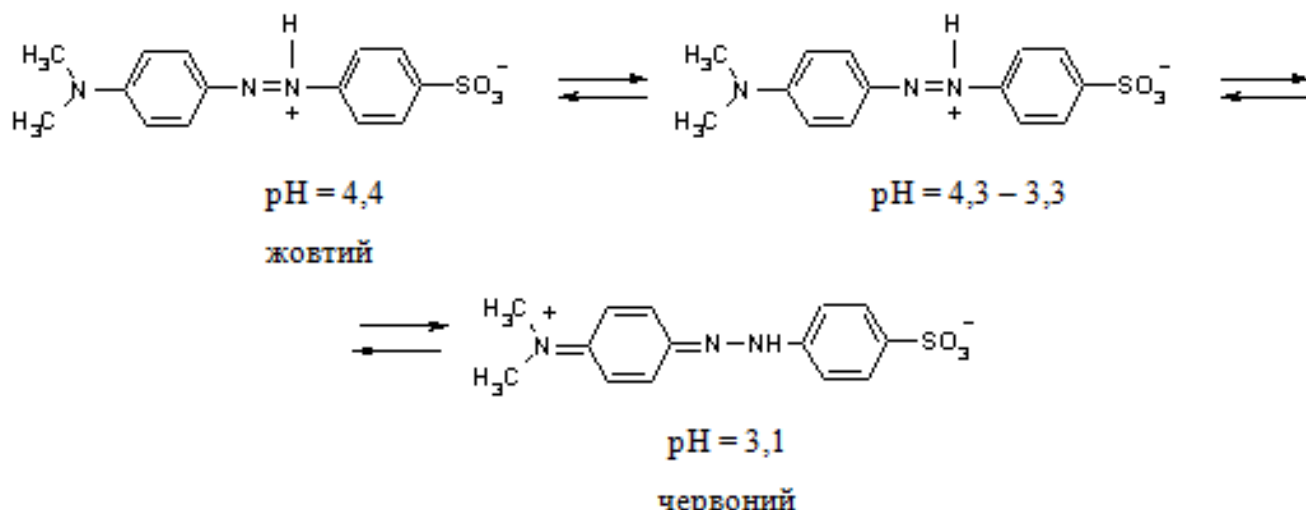
Екстракційно-фотометричний метод кількісного визначення ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів реакції при взаємодії речовин, що визначаються, з відповідними реагентами. Забарвлені продукти, що утворилися, екстрагують органічними розчинниками і визначають оптичну густину отриманих розчинів за допомогою спектрофотометра або фотоелектроколориметра. Здатність екстрагуватися органічними розчинниками спостерігається не у всіх сполук, що складаються з великих іонів. На цю здатність впливають такі чинники, як склад і будова іонів, природа екстрагента, рН водної фази тощо [128, 129].

При визначенні основ та їх солей як реагенти часто використовують кислотні індикатори (метилловий оранжевий, бромфеноловий синій, бромтимоловий синій та ін.) [115, 116].

Нами вивчено можливість використання для екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю як кислотного барвника метило-

вого оранжевого, який досить часто використовують з зазначеною метою в екстракційній фотометрії.

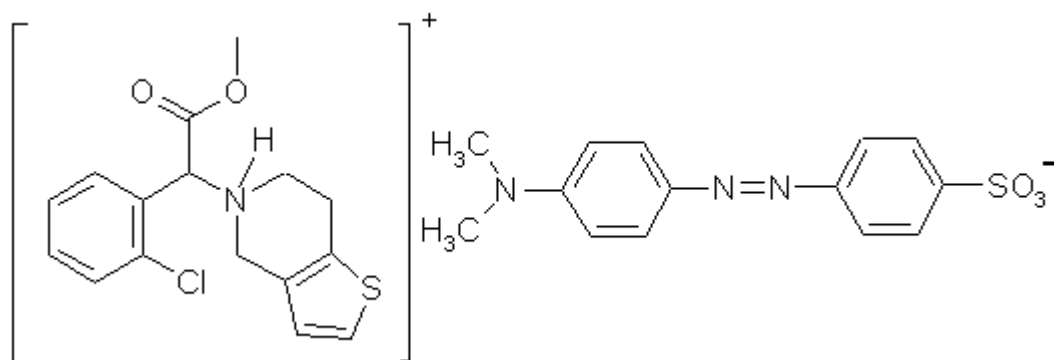
Метилловий оранжевий – натрієва сіль 4-диметиламіноазобензен-4-сульфоїкислоти. Розчини метилового оранжевого в воді при $\text{pH} = 4,4$ і вище мають жовте забарвлення, а в кисліших середовищах ($\text{pH} \leq 4,3$) – червоне, що пов'язане з утворенням хінондіімінної структури:



Інтервал переходу кольору від червоного до жовтого знаходиться в межах змін pH середовища від 3,1 до 4,4.

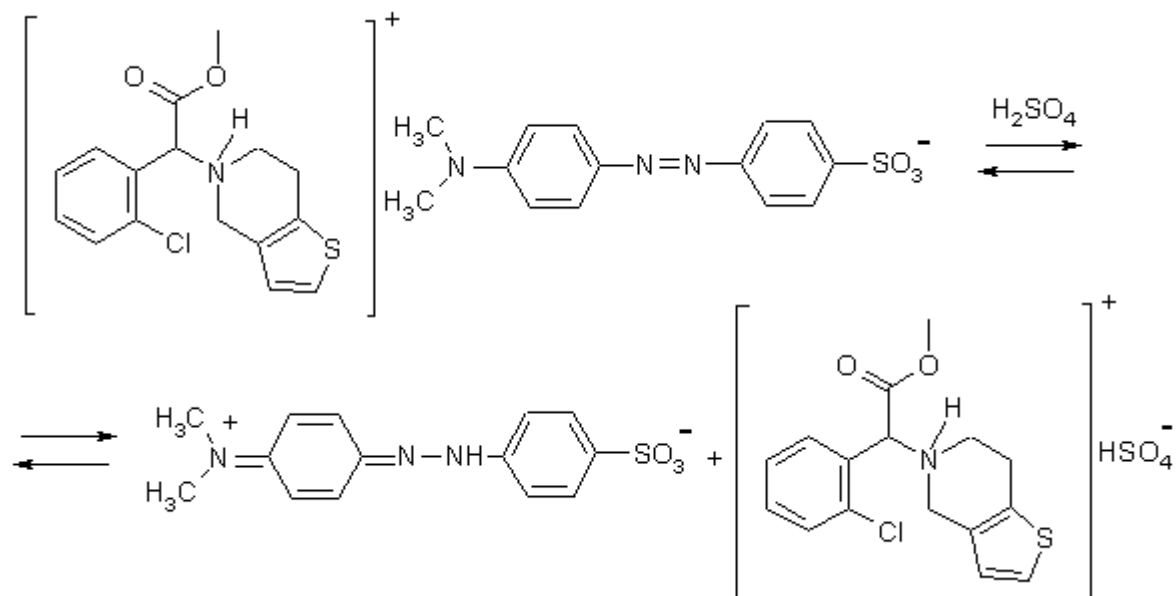
Нами встановлено, що метилловий оранжевий в кислому середовищі з клопідогрелем утворює іонні асоціати, що екстрагуються хлороформом. При цьому хлороформний шар забарвлюється в жовтий колір.

Структуру іонного асоціату клопідогрелю з метиловим оранжевим можна подати формулою:



Хлороформний розчин іонних асоціатів має малу інтенсивність забарвлення, тому для підвищення інтенсивності забарвлення і, відповідно, чутли-

вості методу отримані іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі:



При цьому одержували інтенсивне рожеве забарвлення, пов'язане з вивільненням метилового оранжевого. Кількість метилового оранжевого при цьому еквівалентна кількості клопідогрелю в іонних асоціатах. Потрібно зазначити, що сам метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом з водних розчинів, а тому не заважає кількісному визначенню клопідогрелю.

4.4.1 Встановлення значення рН середовища, оптимального для проведення аналізу

Для встановлення значення рН, при якому має місце максимальний ступінь екстракції іонних асоціатів, було виготовлено ряд буферних розчинів (ацетатних та фталатних) з рН від 3,0 до 6,0 (розділ 2). Величини рН буферних розчинів контролювали за допомогою іономіру ЭВ-74.

В роботі використовували 0,02 % розчин метилового оранжевого.

Стандартний розчин клопідогрелю 1 готували у 0,01 М розчині кислоти хлоридної наступним способом: 50,0 мг клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняли у 0,01 М розчині кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину 0,01 М розчином кислоти хлоридної до поз-

начки (**стандартний розчин 1**, концентрація 200 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 10,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єм розчину 0,01 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 20 мкг/мл).

В ряд ділильних лійок вносили по 5,00 мл буферної суміші з різними значеннями рН, по 5,00 мл 0,02 % розчину метилового оранжевого та по 5,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 2. До отриманих сумішей додавали по 10,00 мл хлороформу. Суміші у ділильних лійках струшували впродовж 5 хв. за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв. для розділення шарів. Збирали по 8,00 мл хлороформних шарів, відкидаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до них по 2,00 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 в кюветі з товщиною шару 10 мм (світлофільтр з $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Експеримент виконували тричі.

Результати виконаних досліджень наведено в табл. 4.10.

Таблиця 4.10

Залежність оптичної густини розчинів іонних асоціатів метилового оранжевого з клопідогрелем від рН середовища ($\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)

рН буферної суміші	Оптична густина		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
1	2	3	4
3,00	0,22	0,21	5,413
	0,22		
	0,20		
3,50	0,33	0,32	3,125
	0,31		
	0,32		
4,20	0,41	0,41	4,878
	0,39		
	0,43		
	0,11		

Продовж.табл 4.10

1	2	3	4
4,50	0,43	0,45	5,879
	0,44		
	0,48		
4,60	0,56	0,56	3,571
	0,58		
	0,54		
4,70	0,41	0,42	6,299
	0,40		
	0,45		
4,80	0,35	0,34	5,094
	0,32		
	0,35		
5,20	0,20	0,21	8,248
	0,20		
	0,23		
6,00	0,11	0,10	17,321
	0,11		
	0,08		

Наведені в табл. 4.10 дані свідчать, що іонні асоціати клопідогрелю з метиловим оранжевим в найбільшій кількості екстрагуються хлороформом при рН = 4,6. Тому при всіх подальших дослідженнях використовували ацетатну буферну суміш з рН 4,6.

4.4.2 Вибір оптимального об'єму розчину метилового оранжевого

Оптимальну кількість 0,02 % розчину метилового оранжевого розраховували за максимальним виходом продукту реакції, тобто за максимальним світлопоглинанням.

В ряд ділильних ліжок вносили по 5,00 мл ацетатної буферної суміші з рН = 4,6, по 5,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 2 та по 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 та 7,00 мл 0,02 % розчину метилового оранжевого. До отриманих сумішей додавали по 10,00 мл хлороформу. Суміші у ділильних ліжках стру-

шували протягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали по 8,00 мл хлороформних шарів, відкидаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до них по 2,00 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на фотоелектроколометрі КФК-2 в кюветі з товщиною шару 10 мм (світлофільтр з $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Експеримент виконували тричі.

Результати виконаних досліджень наведено в табл. 4.11.

Таблиця 4.11

Залежність оптичної густини розчинів іонних асоціатів метилового оранжевого з клопідогрелем від доданого об'єму 0,02% розчину метилового оранжевого ($\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)

Додано 0,02% розчину метилового оранжевого, мл	Оптична густина		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
3,00	0,41	0,41	4,878
	0,39		
	0,43		
4,00	0,51	0,51	1,961
	0,50		
	0,52		
5,00	0,56	0,56	3,571
	0,58		
	0,54		
6,00	0,55	0,55	1,818
	0,56		
	0,54		
7,00	0,56	0,55	3,149
	0,56		
	0,53		

Наведені в табл. 4.11. дані свідчать, що 5,00 мл – це оптимальний об'єм 0,02 % розчину метилового оранжевого для проведення кількісного визначення клопідогрелю.

4.4.3 Побудова градуєвального графіка для екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю

Для побудови градуєвального графіка використовували стандартні розчини клопідогрелю в 0,01 М розчині кислоти хлоридної.

50,0 мг клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняли у 0,01 М розчині кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину 0,01 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 200 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 і доводили об'єм розчину 0,01 М розчином кислоти хлоридної до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 40 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 5,00; 10,00 та 20,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 2 відповідно і доводили об'єми розчинів 0,01 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчини 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 8,00; 10,00; 14,00 та 16,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1 відповідно і доводили об'єми розчинів 0,01 М розчином кислоти хлоридної до позначки (розчини 6, 7, 8 та 9 відповідно, концентрація 16, 20, 28 та 32 мкг/мл).

В ряд ділительних лійок вносили по 5,00 мл ацетатного буферного розчину з $\text{pH} = 4,6$, по 5,00 мл 0,02 % розчину метилового оранжевого та по 5,00 мл розчинів клопідогрелю 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 та 9 відповідно. До отриманих сумішей додавали по 10,00 мл хлороформу. Суміші у ділительних лійках струшували впродовж 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали по 8,00 мл хлороформного шару, відкидаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до них по 2,00 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержані суміші ретельно перемішували та визначали оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 в кюветі з товщиною шару 10 мм (світлофільтр з $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм).

Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Експеримент виконували тричі.

За результатами виміру оптичної густини будували градувальний графік. Результати наведено в табл. 4.12 та на рис. 4.5.

Таблиця 4.12

**Залежність оптичної густини розчинів іонних асоціатів
метилового оранжевого з клопідогрелем від кількості клопідогрелю
($\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)**

Введено клопідогрелю в пробу, мкг	Оптична густина		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
10,00	0,12	0,13	13,323
	0,12		
	0,15		
20,00	0,17	0,175	4,949
	0,17		
	0,185		
40,00	0,27	0,27	3,704
	0,28		
	0,26		
80,00	0,46	0,45	3,849
	0,46		
	0,43		
100,00	0,56	0,56	3,571
	0,58		
	0,54		
140,00	0,74	0,74	1,351
	0,75		
	0,73		
160,00	0,81	0,82	2,112
	0,81		
	0,84		
200,00	1,00	1,00	2,508
	1,03		
	0,98		

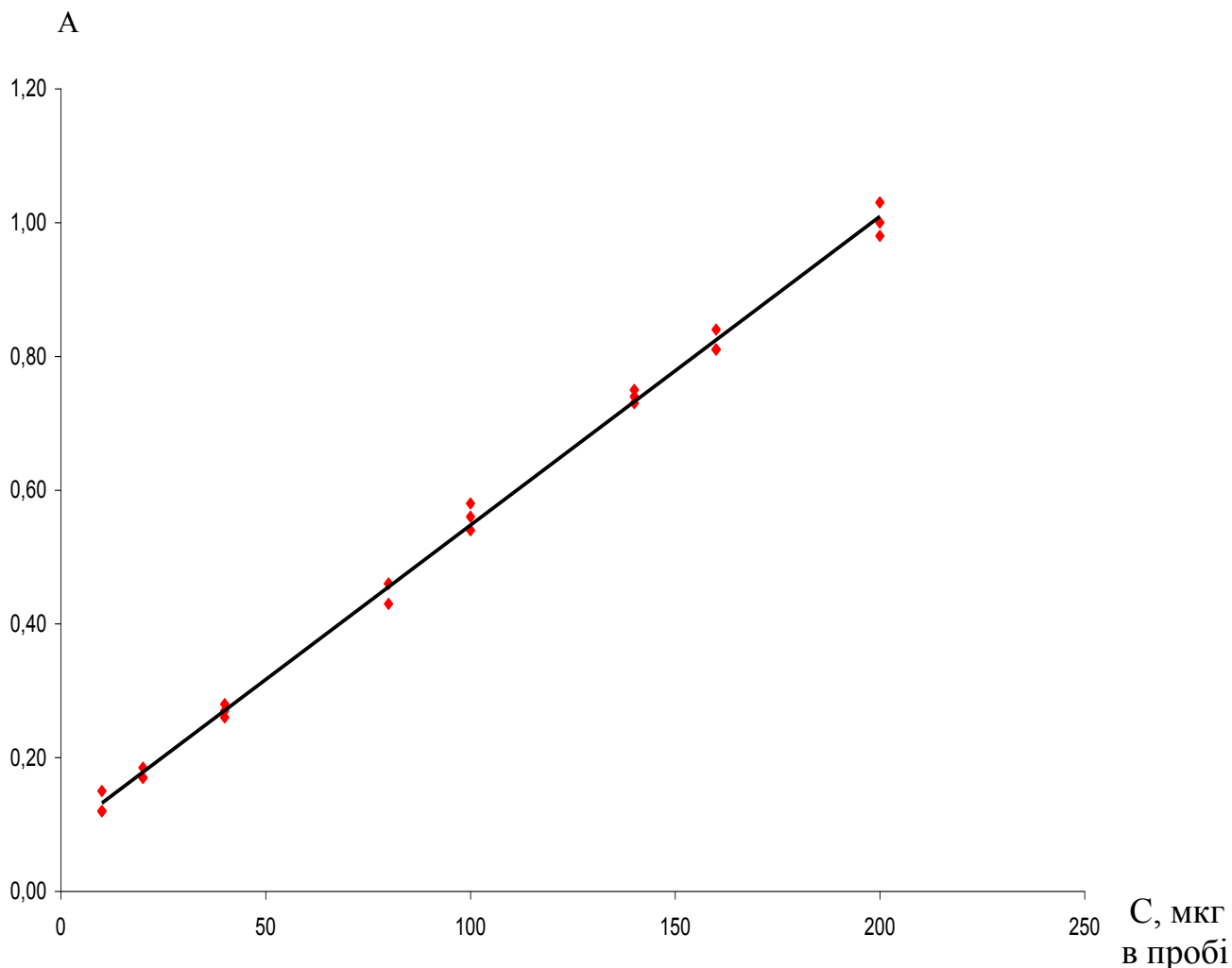


Рис 4.5 Градувальний графік для екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю ($\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)

Наведеному градувальному графіку відповідає рівняння прямої (4.7) виду $y = bx + a$, що має вигляд:

$$A = 0,004617 \cdot C + 0,08567, \quad (4.7)$$

де A – оптична густина розчину іонних асоціатів метилового оранжевого з клопідогрелем;

C – вміст клопідогрелю в пробі, мкг.

Метрологічну характеристику отриманої градувальної залежності наведено в табл. 4.13.

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (4.7) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b'x$ [125].

Таблиця 4.13

Метрологічна характеристика градувальної залежності оптичної густини розчинів іонних асоціатів метилового оранжевого з клопідогрелем від вмісту клопідогрелю ($y = bx + a$), отриманої методом екстракційної фотометрії ($\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм) ($n = 8$; $P = 0,95$)

r	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9987	0,004617	0,08567	0,0002231	0,00009788	0,01114

Наведені в табл. 4.12 та на рис. 4.5 дані свідчать про те, що оптична густина розчинів іонних асоціатів метилового оранжевого з клопідогрелем підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера в інтервалі концентрацій від 10 до 200 мкг клопідогрелю в пробі.

4.4.4 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики екстракційно-фотометричного визначення

Розроблену методику екстракційно-фотометричного визначення використовували для кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено вісім модельних розчинів клопідогрелю з концентрацією 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 20,0; 28,0; 32,0 та 40,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.2.3).

В ряд ділительних ліжок вносили по 5,00 мл ацетатного буферного розчину з $pH = 4,6$, по 5,00 мл 0,02 % розчину метилового оранжевого та по 5,00 мл виготовлених модельних розчинів клопідогрелю. До отриманих сумішей додавали по 10,00 мл хлороформу. Суміші у ділительних ліжках струшували впродовж 5 хв. за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв. для розділення шарів. Збирали по 8,00 мл хлороформного шару, відкидаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до них по 2,00 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержані суміші рете-

льно перемішували та визначали оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 в кюветі з товщиною шару 10 мм (світлофільтр з $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Для розрахунку вмісту клопідогрелю в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.5) або рівняння прямої (4.7).

Результати кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 4.14.

Таблиця 4.14

Результати екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю у модельних розчинах ($\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)

Внесено клопідогрелю в пробу, мкг	Оптична густина	Знайдено клопідогрелю		Метрологічна характеристика ($n = 8$; $P = 0,95$)
		мкг	%	
10,00	0,13	9,60	96,00	$\bar{X} = 99,20$ $S = 2,19$ $S_{\bar{X}} = 0,77$ $\Delta \bar{X} = 1,83$ $\varepsilon = \pm 1,85\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 99,20 \pm 1,83$
20,00	0,175	19,35	96,75	
40,00	0,27	39,92	99,80	
80,00	0,45	78,91	98,64	
100,00	0,56	102,74	102,74	
140,00	0,74	141,72	101,23	
160,00	0,82	159,05	99,41	
200,00	1,00	198,04	99,02	

З даних, наведених у табл. 4.14, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрелю методом екстракційної фотометрії не перевищує $\pm 1,85\%$.

Розроблену методику екстракційно-фотометричного визначення використовували для кількісного визначення клопідогрелю, виділеного із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.7.2).

Отримані результати опубліковано в літературі [130] *Бондар В. С., Аносова Л. С.* Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. Український медичний альманах. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44.

4.5 Валідаційні характеристики екстракційної фотометрії визначення клопідогрелю у розчинах

Валідацію екстракційного фотометричного методу визначення клопідогрелю у 0,01 М розчині кислоти хлоридної проводили за наступними параметрами: лінійність, прецизійність, правильність та відтворюваність [124, 125, 126, 127].

Методика визначення клопідогрелю екстракційно-фотометричним методом валідована за параметрами: діапазон лінійності, межі виявлення (*LOD*) та кількісного визначення (*LOQ*), правильність та прецизійність [125, 127].

Для визначення діапазону лінійності екстракційно-фотометричної методики аналізу препаратів використовували градуювальні графіки, побудовані в координатах: А, (оптична густина розчину) – С, мкг/мл (концентрація розчинів досліджуваної речовини) (рис. 4.5).

В табл. 4.15. наведені основні валідаційні характеристики кількісного визначення клопідогрелю: інтервал лінійності градуювального графіку у діапазоні концентрацій; коефіцієнти регресії рівняння градуювального графіку, які розраховані методом найменших квадратів.

Таблиця 4.15

Коефіцієнти регресії градуювальних графіків $y=bx+a$ кількісного визначення клопідогрелю екстракційно-фотометричним методом ($P = 95\%$)

Коефіцієнти регресії градувального графіку		Довірчі інтервали коефіцієнтів регресії		Коефіцієнт кореляції (R)	Інтервал лінійності графіку, мкг/мл
а	в	Δа	Δв		
Клопідогрель (n = 8)					
85,67·10 ⁻⁴	46,17·10 ⁻⁴	11,14·10 ⁻³	97,88·10 ⁻⁶	0,9987	10,0 - 200,0

Встановлено, що лінійність градувальних графіків у координатах (А) - (С, мкг/мл) спостерігалась в інтервалах концентрацій 10,0 – 200,0 мкг/мл.

Значення межі виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ) розраховували на основі параметрів градувальної прямої (стандартного відхилення вільного члена S_a та її тангенса нахилу b) згідно відповідним рівнянням (4.5, 4.6).

Встановлено, що межа кількісного виявлення клопідогрелю LOD дорівнює 3,367 мкг/мл; межа кількісного визначення клопідогрелю LOQ дорівнює 10,204 мкг/мл.

Правильність та прецизійність екстракційно-фотометричної методики кількісного визначення клопідогрелю встановлювали за значенням відносного стандартного відхилення середнього результату у відсотках - $RSD\bar{x}$ для різних концентрацій досліджуваної речовини в модельних розчинах при використанні градувального графіку або рівняння прямої. Значення відносного стандартного відхилення середнього результату для клопідогрелю ($RSD\bar{x}$) – 0,99 %.

При визначенні вмісту препаратів у модельних розчинах екстракційно-фотометричним методом встановлено, що за розробленою методикою у досліджуваних діапазонах концентрацій відносна невизначеність середнього результату не перевищувала: для клопідогрелю $\pm 1,85$ % (таб.4.14.).

Встановлено, що правильність та прецизійність результатів застосування розробленої методики для концентрацій клопідогрелю в інтервалі лінійності градувальних графіків в модельних розчинах не перевищувала 1,0, що свідчило про близькість результатів аналізу до їх справжнього значення.

Таким чином, розроблена та валідована екстракційно-фотометрична методика може застосовуватися для кількісного визначення клопідогрелю у біологічному матеріалі та лікарських формах.

4.6 Кількісне визначення клопідогрелю методом високоефективної рідинної хроматографії

Як зазначалося вище, в аналізі лікарських речовин широко використовується метод високоефективної рідинної хроматографії – не тільки для якісного, а й для кількісного визначення [107-109, 131].

Розвиток аналітичної служби в напрямках проведення моніторингу ефективності лікування населення засобами, що впливають на згортання крові і агрегацію тромбоцитів та діагностики інтоксикацій при застосуванні цих ліків базується на розробці ефективних та експресних методик аналізу препаратів у біологічних об'єктах ВЕРХ- методом.

Ідентифікація та кількісне визначення досліджуваної речовини у лікарських формах ВЕРХ-методом були проведені за різними умовами хроматографування.

ВЕРХ-методика була розроблена для аналізу клопідогрелю у таблетках та включала колонку (0,15 м x 4,6 мм, 5 мкм) з нерухомою фазою (овомукоїд, білок, який здатний розпізнавати оптичні ізомери, хімічно прищеплений до частинок силікагелю). Рухома фаза складалась з суміші фосфатного буферного розчину та ацетонітрилу (75:25) та застосовувалась після фільтрування та дегазації. Швидкість подання рухомої фази в колонку – 1,0 мл/хв. Детектування проводили спектрофотометрично за довжиною хвилі 220 нм. Об'єм проби, що вводився - 10 мкл [53].

Для виявлення та визначення домішок у лікарських формах клопідогрелю ВЕРХ-методом Сеткіною С. Б. та співавторами були рекомендовані наступні умови: хроматографічна колонка UltronES-OVM (4,6 мм × 150 мм, 5 мкм); рухома фаза – суміш 75 % ацетонітрилу та 25 % фосфатного буферного розчину (ізократичний режим); швидкість потоку складала 1 мл/мхв, температура термостату колонки – 40°; об'єм проби для введення – 1 мкл. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 220 нм. Встановлено, що час утримування клопідогрелю становив 2,84 хв [63].

P.S. Pawaskar та співавторами для моніторингу наявності домішок у лікарських формах клопідогрелю бесилату розроблено ВЕРХ-методику у обернено-фазному варіанті, яка базувалась на використанні колонки Zorbax SB C8 (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм), нелінійного градієнту при застосуванні рухомої фази (суміші фосфатного буферного розчину (pH 3,0) та ацетонітрилу). Об'єм проби для введення – 10 мкл. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 220 нм. Встановлено, що час утримування домішки А, клопідогрелю бесилату та домішки В становив 11,0 хв, 22,0 хв та 25,0 хв відповідно[59].

Amr Lotfy Saber та співавторами рекомендовано при ВЕРХ-дослідженні лікарських форм з клопідогрелем у обернено-фазному варіанті застосування колонки Nova-Pak® C₁₈ (3,9 мм × 150 мм, 5 мкм). Елюювання проведено у ізократичному режимі при використанні рухомої фази – суміш ацетонітрилу та форміатного буферного розчину pH 4,0 (60:40). Швидкість потоку складала 1 мл/мхв, температура термостату колонки – 25°; об'єм проби для введення – 20 мкл. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 225 нм. Час утримування клопідогрелю становив 5,10 хв [61].

Дослідження суміші клопідогрелю бісульфату з аспірином у лікарських формах проводили Chatrabhuji P.M. та співавтори в обернено-фазном варіанті на колонці Shimadzu Phenomenex Luna (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм); ізократичному режимі надання рухомої фази у колонку. Рухома фаза включала фосфатний буферний розчин та ацетонітрил у співвідношенні (40:60). Швидкість потоку складала 1 мл/мхв, температура термостату колонки – 25°; об'єм проби для введення – 20 мкл. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 226 нм. Час утримування аспіріну та клопідогрелю становив 6,3 та 8,4 хв відповідно [132].

Вибір оптимальних умов для ВЕРХ-аналізу клопідогрелю та його метаболітів в біологічних об'єктах базувався на дослідженнях Valentina Anuta та співавторів при застосуванні хеометричних розрахунків в умовах: хроматографічне розділення на колонці Hypersil Gold (150 x 4 мм, 5 мкм).

Об'єм проби для введення – 10 мкл. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 210 нм. Автори застосовували ізократичний режим надання в колонку рухомої фази, яка складалась з ацетонітрилу, 0,1% розчину кислоти трифлуороацетатної та фосфатного буферного розчину. Встановлено, що час утримування клопідогрель карбонової кислоти та клопідогрелю в оптимальних умовах становив 2,62 та 5,79 хв відповідно [73].

ВЕРХ-аналіз плазми крові людини для вивчення фармакокінетики клопідогрелю та його метаболіту був проведений Рубиновим Ю. В. та Красних Л.М. із співавторами при застосуванні хроматографу "Agilent 1100" (USA) з масс-спектрометрическим детектором. Розділення проводилось на колонці Zorbax SB C18 (4,6 x 50мм, 1,8 мкм). Температура разделения 40°C. Рухому фазу - ацетонітрил та деіонізовану воду з 0,1% розчином форміатної кислоти (15:85) надавали в колонку в ізократичному режимі, швидкість потоку – 0,3 мл/хв, об'єм для введення – 30 мкл [54,133].

Nitesh K. Patel та співавторами рекомендували ВЕРХ-умови ідентифікації клопідогрелю та його метаболіту у плазмі крові: колонка з оберненою фазою Zorbax SB C-18 (75 мм x 4,6 мм, 3,5 мкм); рухома фаза – буферний розчин (0,1 % розчин кислоти форміатної та 10 М розчину амонію форміату) та ацетонітрил (10:90); ізократичний режим надання у колонку. Об'єм для введення – 2,0 мкл; детектування проводили масс-спектрометрическим детектором. Встановлено, що час утримування складав для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти – 4,10 та 2,60 хв відповідно [77].

Wenyi Hua та співавторами ВЕРХ- метод застосований для більш широкого дослідження метаболізму клопідогрелю у плазмі крові в умовах: колонка з оберненою фазою XBridge™ BEH C18 (100 мм x 2,1 мм, 2,5 мкм); рухома фаза – А - буферний розчин (вода та 0,1% розчин кислоти форміатної– 100:0,2) та В – метанол-ацетонітрил-0,1% розчин кислоти форміатної (50:50:0,2), нелінійний градієнтний режим надання у колонку. Об'єм для введення – 2,0 мкл; детектування проводили масс-спектрометрическим детектором [91].

Mohamed El-Husseiny El-Sadek та співавторами проведено ВЕРХ дослідження метаболіту клопідогрелю – клопідогрель карбонової кислоти у плазмі крові за умовами: колонка з оберненою фазою symmetry C18 (75 мм x 4,6 мм, 3,5 мкм Waters, USA); рухома фаза – метанол-деіонізована вода та форміатна кислота (75:25:0,1), ізократичний режим надання у колонку. швидкість потоку – 0,5 мл/хв; детектування проводили масс-спектрометрическим детектором [134].

Octavian Croitoru із співавторами був розроблений простий, чутливий і селективний метод градієнтної рідинної хроматографії з оберненою фазою для одночасного кількісного визначення клопідогрелю, його метаболіту клопідогрелю карбонової кислоти і аторвастатину в сироватці крові людини. Метод був застосований для вивчення потенційно небезпечної фармакокінетичної взаємодії між клопідогрелем і аторвастатином у пацієнтів з антиагрегантною і статиноювою терапією.

Зразки плазми були депротейнізовані з ацетонітрилом. Хроматографічне розділення проведено на аналітичній колонці BDS Hypersil C₁₈ (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Рухома фаза складалася з 10 мМ натрій-фосфатного буферного розчину (рН 2,6 з додаванням 85% кислоти ортофосфорної), ацетонітрилу і метанолу. Нелінійний градієнтний режим подачі рухомої фази в колонку проводився протягом 20 хвилин, швидкість потоку - 1 мл в хв, об'єм проби - 20 мкл. В якості внутрішнього стандарту використовували ібупрофен. Виявлення речовин в суміші проводили УФ-детектором при 220 нм. Встановлено, що час утримування клопідогрелю, його метаболіту клопідогрелю карбонової кислоти та аторвастатину становило 12,68, 9,66 та 10,99 хв відповідно [93].

Таким чином, сучасні методи ВЕРХ аналізу клопідогрелю, та його метаболітів вказують на відсутність систематичних досліджень, що не дозволяє підібрати оптимальні умови для аналізу лікарських засобів в біологічних об'єктах і фармацевтичних препаратах.

Метою даної роботи є ідентифікація та кількісне визначення клопідогрелю та його метаболіту за допомогою уніфікованого методу ВЕРХ, який дозволяє отримувати надійні та відтворювані результати досліджень.

Представлені раніше методи аналізу клопідогрелю та його метаболіту методом ВЕРХ мають недоліки. Використання ізократичного режиму елюювання обмежує можливість виходу всіх компонентів зразка з колонки в вузьких зонах і ефективний розподіл сумішей лікарських речовин. Використання нелінійного градієнта при елюювання клопідогрелю та його метаболіту ускладнює процес хроматографії.

Виявлення лікарської речовини при одній довжині хвилі знижує вірогідність результатів, отриманих при ідентифікації, оскільки дозволяє використовувати тільки параметри утримування без урахування спектральних співвідношень. Методики ВЕРХ для аналізу клопідогрелю та його метаболіту мають обмеження в їх застосуванні для дослідження сумішей з іншими лікарськими речовинами.

З огляду на можливість комплексного лікування захворювань серцево-судинної системи з застосуванням різних препаратів, аналіз на клопідогрель та його метаболіт уніфікованим методом ВЕРХ є актуальним завданням дослідження.

При розробці методики кількісного визначення клопідогрелю за допомогою методу ВЕРХ як розчинник використовували суміш 0,01 М розчину кислоти хлоридної та води (1:1).

Для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ використовували хроматограф «Міліхром А-02». Умови експерименту наведено вище (див. розд. 3, п. 3.2.2). Максимальна площа піку клопідогрелю на хроматограмі спостерігається за довжини хвилі 280 нм – $R = 1,0787$ (див. розд. 3, п. 3.2.2, табл. 6), яку і було використано для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ.

4.6.1 Побудова градуовального графіка для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ

Для побудови градуовального графіка для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ готували стандартний розчин клопідогрелю у суміші 0,01 М розчину кислоти хлоридної та води (1:1).

0,1000 г клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,01 М розчину кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 500 мкг/мл).

У три мірні колби місткістю 50,0 мл вносили 40,00; 20,00 та 10,00 мл стандартного розчину 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до позначки розчинником (**розчини 3, 4 та 5** відповідно, концентрація 400, 200 та 100 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл стандартного розчину 2 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (**розчин 6**, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 5 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (**розчин 7**, концентрація 10 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 7 та доводили об'єм розчину до позначки розчинником (**розчин 8**, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини клопідогрелю 3, 4, 5, 6, 7 та 8 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби становив 2 мкл. Хроматографування кожного розчину проводили тричі.

За результатами експерименту будували градуовальний графік, використовуючи як робочу довжину хвилі 280 нм. Результати наведено в табл. 4.16 та на рис. 4.6.

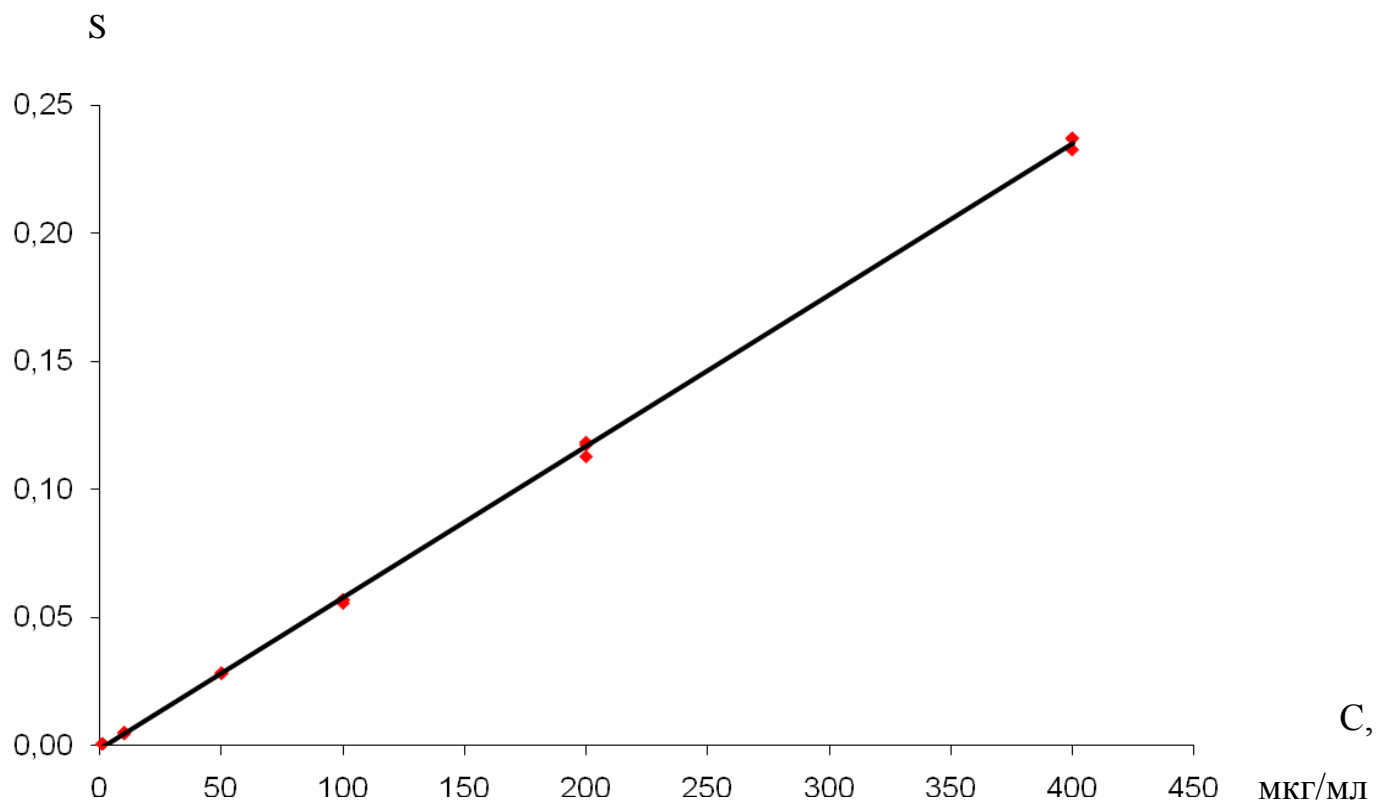


Рис. 4.6 Градувальний графік для кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Таблиця 4.16

Залежність площі піку розчинів клопідогрелю від його концентрації ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Площа піку		
	S_i	\bar{S}	RSD, %
1	2	3	4
1,0	0,0004330	0,0004388	2,20
	0,0004500		
	0,0004330		
10,0	0,004927	0,004737	5,61
	0,004433		
	0,00485		
50,0	0,02805	0,02810	0,31
	0,02820		
	0,02805		

Продовж.табл.4.16

1	2	3	4
100,0	0,05682	0,05635	1,35
	0,05675		
	0,05547		
200,0	0,1184	0,1162	2,57
	0,1128		
	0,1174		
400,0	0,2374	0,2358	1,09
	0,2328		
	0,2371		

Наведеному градуєвальному графіку відповідає рівняння прямої (4.8) виду $y = bx + a$, що має вигляд:

$$S = 0,0005912 \cdot C - 0,001385, \quad (4.8)$$

де S – площа піку розчину клопідогрелю;

C – концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл.

Метрологічну характеристику отриманої градуєвальної залежності наведено в табл. 4.17.

Таблиця 4.17.

Метрологічна характеристика градуєвальної залежності

площі піку від вмісту клопідогрелю ($y = bx + a$),

отриманої методом ВЕРХ ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл) ($n = 6$; $P = 0,95$)

r	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9998	0,0005912	-0,001385	0,000002529	0,000005713	0,001075

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (4.8) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b'x$.

Наведені в табл. 4.16. та на рис. 4.6. дані свідчать про те, що площа піку розчинів клопідогрелю лінійно залежить від їх концентрації в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл, що відповідає вмісту клопідогрелю в пробі від 2 нг до 800 нг відповідно.

4.6.2 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення

Розроблену методику кількісного визначення методом ВЕРХ використовували для кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено чотири модельні розчини клопідогрелю з концентрацією 10,0; 50,0; 100,0 та 200,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.6.1.). Хроматографування модельних розчинів клопідогрелю проводили в вищезазначених умовах; об'єм проби становив 2 мкл.

Для розрахунку вмісту клопідогрелю в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.6.) або рівняння прямої (4.8).

Результати кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 4.18.

Таблиця 4.18

Результати кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ у модельних розчинах ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Площа піку	Знайдено клопідогрелю		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10,0	0,004435	9,84	98,40	$\bar{X} = 99,73$ $S = 1,10$ $S\bar{X} = 0,55$ $\Delta\bar{X} = 1,74$ $\varepsilon = \pm 1,75\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 99,73 \pm 1,74$
50,0	0,02815	49,96	99,92	
100,0	0,05747	99,55	99,55	
200,0	0,1181	202,11	101,06	

З даних, наведених у табл. 4.18 випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрелю методом ВЕРХ не перевищує $\pm 1,75\%$.

Розроблену ВЕРХ-методику використовували для кількісного визначення клопідогрелю, виділеного із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.7.3).

Отримані результати опубліковано в літературі [135] *Бондар В. С., Аносова Л. С.* Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис.* 2012. №4 (24). С. 73 – 78.

4.7 Кількісне визначення клопідогрелю карбонової кислоти методом високоєфективної рідинної хроматографії

При розробці методики кількісного визначення клопідогрелю карбонової кислоти за допомогою методу ВЕРХ як розчинник використовували суміш 0,01 М розчину кислоти хлоридної та води (1:1).

Для кількісного визначення клопідогрелю карбонової кислоти методом ВЕРХ використовували хроматограф «Міліхром А-02». Умови експерименту наведено вище (див. розд. 3, п. 3.2.2). Максимальна площа піку клопідогрелю карбонової кислоти на хроматограмі спостерігається за довжини хвилі 280 нм – $R = 0,7869$ (див. розд. 3, п. 3.2.2, табл. 6), яку і було використано для кількісного визначення клопідогрелю карбонової кислоти методом ВЕРХ.

4.7.1 Побудова градувального графіка для кількісного визначення клопідогрелю карбонової кислоти методом ВЕРХ

Для побудови градувального графіка для кількісного визначення клопідогрелю карбонової кислоти методом ВЕРХ готували стандартний розчин клопідогрелю карбонової кислоти у суміші 0,01 М розчину кислоти хлоридної та води (1:1).

0,1000 г клопідогрелю карбонової кислоти вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,01 М розчину кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 2**, концентрація 500 мкг/мл).

У три мірні колби місткістю 50,0 мл вносили 40,00; 20,00 та 10,00 мл стандартного розчину 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до позначки розчинником (розчини 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 400, 200 та 100 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл стандартного розчину 2 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 6, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 5 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 7, концентрація 10 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 7 та доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 8, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини клопідогрель карбонової кислоти 3, 4, 5, 6, 7 та 8 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби становив 2 мкл. Хроматографування кожного розчину проводили тричі.

За результатами експерименту будували градувальний графік, використовуючи як робочу довжину хвилі 280 нм. Результати наведено в табл. 4.19. та на рис. 4.7.

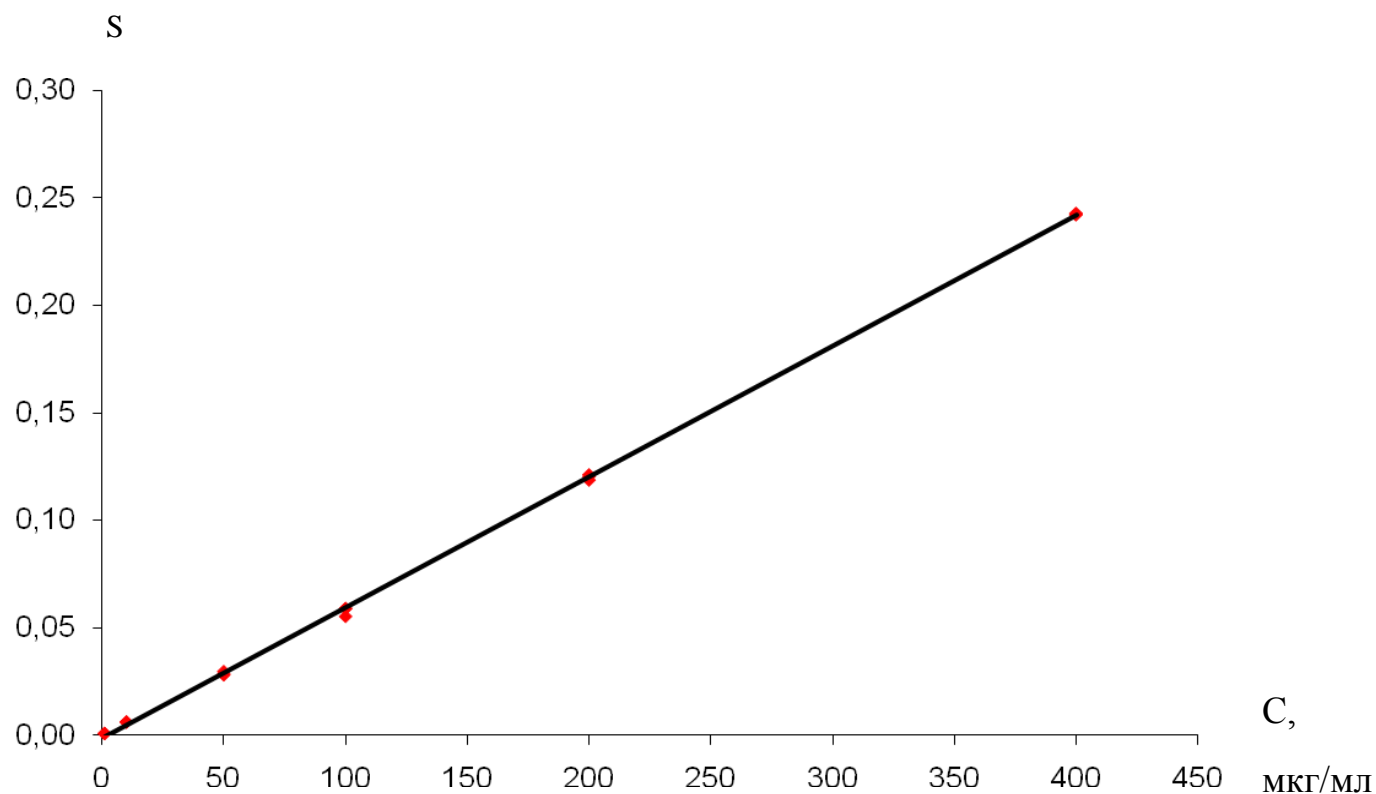


Рис 4.7 Градувальний графік для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Таблиця 4.19

Залежність площі піку розчинів клопідогрель карбонової кислоти від його концентрації ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл	Площа піку		
	S_i	\bar{S}	RSD, %
1	2	3	4
1,0	0,0005330	0,0005355	2,52
	0,0005500		
	0,0005230		
10,0	0,005857	0,005889	1,32
	0,005833		
	0,005978		
50,0	0,02945	0,02852	2,91
	0,02827		
	0,02785		

Продовж.табл.4.19

1	2	3	4
100,0	0,05888	0,05758	3,71
	0,05875		
	0,05512		
200,0	0,1204	0,1201	1,06
	0,1187		
	0,1212		
400,0	0,2427	0,2427	0,14
	0,2424		
	0,2431		

Наведеному градуєвальному графіку відповідає рівняння прямої (4.9) виду $y = bx + a$, що має вигляд:

$$S = 0,0006082 \cdot C - 0,001247, \quad (4.9)$$

де S – площа піку розчину клопідогрель карбонової кислоти;

C – концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл.

Метрологічну характеристику отриманої градуєвальної залежності наведено в табл. 4.20.

Таблиця 4.20

**Метрологічна характеристика градуєвальної залежності
площі піку від вмісту клопідогрель карбонової кислоти ($y = bx + a$),
отриманої методом ВЕРХ ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл) ($n = 6$; $P = 0,95$)**

r	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9998	0,0006082	-0,001247	0,000002017	0,000005102	0,0009604

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (4.9) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b'x$.

Наведені в табл. 4.19 та на рис. 4.7 дані свідчать про те, що площа піку розчинів клопідогрель карбонової кислоти лінійно залежить від їх концентрації в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл, що відповідає вмісту клопідогрель карбонової кислоти в пробі від 2 нг до 800 нг відповідно.

4.7.2 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення

Розроблену методику кількісного визначення методом ВЕРХ використовували для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено чотири модельні розчини клопідогрель карбонової кислоти з концентрацією 10,0; 50,0; 100,0 та 200,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.7.1.). Хроматографування модельних розчинів клопідогрель карбонової кислоти проводили в вищезазначених умовах; об'єм проби становив 2 мкл.

Для розрахунку вмісту клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.7) або рівняння прямої (4.9).

Результати кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 4.21.

Таблиця 4.21.

Результати кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ у модельних розчинах ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину клопідогрель карбонової кислоти, мкг/мл	Площа піку	Знайдено клопідогрель карбонової кислоти		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10,0	0,005046	10,35	103,50	$\bar{X} = 102,00$ $S = 1,30$ $S\bar{X} = 0,65$ $\Delta\bar{X} = 2,06$ $\varepsilon = \pm 2,02\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 102,00 \pm 2,06$
50,0	0,02988	51,18	102,36	
100,0	0,05981	100,39	100,39	
200,0	0,1225	203,46	101,73	

З даних, наведених у табл. 4.21. випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ не перевищує $\pm 2,02$ %.

Розроблену ВЕРХ-методику використовували для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти, виділеної із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.8.2).

Отримані результати опубліковано в літературі [135] *Бондар В. С., Аносова Л. С.* Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. Фармацевтичний часопис. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.

4.8 Кількісне визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти

Розроблену методику кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ використовували для кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах різних концентрацій.

Було виготовлено чотири модельні розчини клопідогрелю з концентрацією 10,0; 50,0; 100,0 та 200,0 мкг/мл згідно з методикою, наведеною вище (див. розд. 4, п. 4.6.1.).

В мірну колбу місткістю 50,0 мл вносили 10,00 мл відповідного модельного розчину клопідогрелю, додавали 2 мл 10 % розчину натрію гідроксиду та через 2 хв доводили об'єм розчину до позначки розчинником.

Хроматографування отриманих сумішей проводили в вищезазначених умовах; об'єм проби становив 2 мкл.

Для розрахунку вмісту клопідогрелю в модельних розчинах використовували градувальний графік (див. рис. 4.6.) або рівняння прямої (4.8) та коефіцієнту перерахунку клопідогрель карбонової кислоти на клопідогрель, що дорівнює 1,037.

Результати кількісного визначення клопідогрелю в модельних розчинах за допомогою розробленої методики клопідогрель карбоною кислотою наведено в табл. 4.22.

Таблиця 4.22

**Результати кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ
у модельних розчинах за клопідогрель карбоною кислотою
($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)**

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Площа піку	Знайдено клопідогрелю		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10	0,005816	10,13	101,30	$\bar{X} = 101,20$ $S = 0,83$ $S_{\bar{X}} = 0,42$ $\Delta \bar{X} = 1,32$ $\varepsilon = \pm 1,31\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 101,20 \pm 1,32$
50	0,02964	50,75	101,50	
100	0,05854	100,03	100,03	
200	0,1195	203,96	101,98	

З даних, наведених у табл. 4.22. випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні клопідогрелю за клопідогрель карбоною кислотою методом ВЕРХ не перевищує $\pm 1,31\%$.

Отримані дані свідчать про те, що лужний гідроліз клопідогрелю відбувається кількісно. Це дозволяє використовувати градувальний графік для кількісного визначення клопідогрель карбоною кислотою для кількісного визначення клопідогрелю за продуктом його лужного гідролізу.

Оскільки клопідогрель карбонова кислота є основним продуктом метаболізму клопідогрелю [28], цю методику можна використовувати для визначення «загального клопідогрелю» в біологічних об'єктах.

Розроблену ВЕРХ-методику використовували для кількісного визначення клопідогрелю, виділеної із біологічного матеріалу (див. розд. 6, п. 6.7.3).

Отримані результати опубліковано в літературі [135].

Переваги нашої методики

Серед сучасних методів аналізу для створення баз параметрів ідентифікації та розділення масивів досліджуваних речовин у біологічних об'єктах ВЕРХ-метод є одним з найбільш придатних методів за чутливістю та селективністю.

Розроблені раніше методики ВЕРХ-аналізу клопідогрелю, його метаболітів та інших лікарських препаратів відрізняються застосуванням різних умов хроматографування (різних сорбентів, органічних розчинників, буферних розчинів), які базуються на індивідуальних властивостях досліджуваних речовин.

Важливим напрямом для ХТА є використання уніфікованою ВЕРХ-методики, придатною для дослідження біологічних об'єктів під час комбінованого лікування серцево-судинних захворювань та при отруєннях сумішами лікарських препаратів та наркотичних речовин.

Недоліком даної методики є слабка матеріальна база сучасних медичних установ, що обмежує її практичне застосування. Зміна умов аналізу за уніфікованою методикою призведе до порушення надійності і відтворюваності результатів.

4.9 Валідаційні характеристики ВЕРХ -методу визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у розчинах

Валідацію **ВЕРХ-методом** визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти проводили за наступними параметрами: лінійність, прецизійність, правильність та відтворюваність [124, 125, 126, 127].

Для визначення діапазону лінійності **ВЕРХ-методом** аналізу клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти використовували градуювальні графіки, побудовані в координатах: S , мм² (площа піку) – C , мкг/мл (концентрація розчинів досліджуваної речовини) (рис. 4.6., 4.7.).

В табл. 4.23 наведені основні валідаційні характеристики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти: інтервал лінійності градуовального графіку у діапазоні концентрацій; коефіцієнти регресії рівняння градуовального графіку, які розраховані методом найменших квадратів.

Таблиця 4.23

Коефіцієнти регресії градуовальних графіків $y=bx+a$ кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ ($P = 95\%$)

Коефіцієнти регресії градуовального графіку		Довірчі інтервали коефіцієнтів регресії		Коефіцієнт кореляції (R)	Інтервал лінійності графіку, мкг/мл
а	в	Δа	Δв		
Клопідогрель (n = 6)					
-13,85·10 ⁻⁴	59,12·10 ⁻⁵	10,75·10 ⁻⁴	57,13·10 ⁻⁷	0,9964	1,0 - 400,0
Клопідогрель карбонова кислота (n = 6)					
-12,47·10 ⁻⁴	60,82·10 ⁻⁵	96,04·10 ⁻⁵	51,02·10 ⁻⁷	0,9998	1,0 - 400,0

Метод визначення препарату за допомогою ВЕРХ валідованого за параметрами: діапазон лінійності, межа виявлення (LOD), межа кількісного визначення (LOQ),

В результаті досліджень уніфікованим методом ВЕРХ були отримані параметри утримування препарату і спектральні залежності, що дозволило включити отримані результати в базу даних щодо ідентифікації гіпотензивних препаратів при терапевтичному моніторингу лікування окремим препаратом або комплексного лікування захворювань серцево-судинної системи.

Проведена розробка методу кількісного визначення препарату методом ВЕРХ на модельних розчинах з використанням різних концентрацій препарату. Зміст препарату визначали за рівнянням $S = 0,5 \cdot 10^{-4} + 1,8 \cdot 10^{-3}$; коефіцієнт кореляції склав 0,9964.

Встановлено, що відносна похибка середнього результату не

перевищувала $\pm 2,12$ % при ВЕРХ-аналізі препарату в модельних розчинах.

Розрахунок валідаційних характеристик методу ВЕРХ для визначення препарату дозволив встановити діапазон лінійності (5,0 - 100,0 мкг / мл), межа кількісного визначення (5,0 мкг / мл або 20,0 нг в пробі), правильність і точність дослідження (відносне стандартне відхилення RSD не перевищувало 0,83 %, що вказувало на точність аналізу).

4.10 Порівняльна оцінка результатів УФ-спектрофотометричної, екстракційно-фотометричної та ВЕРХ-методик кількісного визначення клопідогрелю

Нами було проведено порівняльний аналіз результатів кількісного визначення клопідогрелю, отриманих за допомогою запропонованих методик.

Метрологічну характеристику результатів кількісного визначення, отриманих за допомогою кожної із запропонованих методик, наведено в табл. 4.24.

Таблиця 4.24

Метрологічна характеристика результатів кількісного визначення клопідогрелю за різними методиками у модельних розчинах

Методика	μ_0	n	f = n - 1	\bar{X}	S	S^2	$S\bar{X}$	$\Delta\bar{X}$	ε , %
УФ-спектрофотометрична	100,00	5	4	99,92	0,99	0,98	0,44	1,24	1,24
екстракційно-фотометрична	100,00	8	7	99,20	2,19	4,80	0,77	1,83	1,85
ВЕРХ-методика (пряме визначення)	100,00	4	3	99,73	1,10	1,21	0,55	1,74	1,75
ВЕРХ-методика (визначення за клопідогрель карбоною кислотою)	100,00	4	3	101,20	0,83	0,69	0,42	1,32	1,31

Для кожної із методик кількісного визначення вирішували питання про наявність або відсутність систематичної помилки. Для цього розраховували контрольні критерії t за формулою:

$$t = \frac{|\bar{X} - \mu_0|}{S} \sqrt{n} \quad (4.10)$$

$$t_1 = 0,18; t_2 = 1,03; t_3 = 0,49; t_4 = 2,89.$$

Для першого випадку $t(P, f) = t(0,95; 4) = 2,78$, для другого випадку $t(P, f) = t(0,95; 7) = 2,36$, для третього та четвертого – $t(P, f) = t(0,95; 3) = 3,18$, тому для всіх методик $t_{\text{розн}} < t(P, f)$ і можна зробити висновок, що результати кількісного визначення за всіма запропонованими методиками не навантажені систематичною помилкою.

Для порівняння відтворюваності результатів, отриманих за різними методиками кількісного визначення, розраховували критерій Бартлета за формулами:

$$\chi^2 = 2,303(f_g \lg s^2 - \sum f_i \lg s_i^2) \quad (4.11)$$

$$s^2 = \frac{\sum f_i s_i^2}{\sum f_i} \quad (4.12)$$

$$\chi^2 = 5,51.$$

$\chi^2(P, f) = \chi^2(0,99; 3) = 11,3$, тобто $\chi^2_{\text{розн}} < \chi^2(P, f)$ і можна зробити висновок, що різниця між окремими середньоквадратичними помилками S_1^2, S_2^2, S_3^2 та S_4^2 не є значущою.

Для порівняння середніх результатів, отриманих за кожною методикою, розраховували критерій Стюдента за формулою [125]:

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (4.13.)$$

$$t_{1,2} = 0,81; t_{1,3} = 0,27; t_{1,4} = 2,11; t_{2,3} = 0,56; t_{2,4} = 2,28; t_{3,4} = 2,13.$$

$$f_{1,2} = 11; f_{1,3} = f_{1,4} = 7; f_{2,3} = f_{2,4} = 10; f_{3,4} = 6.$$

$$t(0,95; 11) = 2,20; t(0,95; 7) = 2,36; t(0,95; 10) = 2,23; t(0,95; 6) = 2,45.$$

Тому для всіх методик $t_{\text{розр}} < t(P, f)$ і можна зробити висновок, що середні результати кількісного визначення за всіма запропонованими методиками не мають між собою значущої різниці [125,126].

4.11 Порівняльна оцінка результатів УФ-спектрофотометричної та ВЕРХ-методик кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти

Нами було проведено порівняльний аналіз результатів кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти, отриманих за допомогою запропонованих методик.

Метрологічну характеристику результатів кількісного визначення, отриманих за допомогою кожної із запропонованих методик, наведено в табл. 4.25.

Таблиця 4.25

Метрологічна характеристика результатів кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти за різними методиками у модельних розчинах

Методика	μ_0	n	$f = n - 1$	\bar{X}	S	S^2	$S\bar{X}$	$\Delta\bar{X}$	$\epsilon, \%$
УФ-спектрофотометрична	100,00	5	4	101,41	2,08	4,33	0,93	2,58	2,54
ВЕРХ-методика	100,00	4	3	102,00	1,30	1,69	0,65	2,06	2,02

Для кожної із методик кількісного визначення вирішували питання про наявність або відсутність систематичної помилки. Для цього розраховували контрольні критерії t за формулою (4.10) [125]:

$$t_1 = 1,52; t_2 = 3,08.$$

Для першого випадку $t(P, f) = t(0,95; 4) = 2,78$, для другого випадку $t(P, f) = t(0,95; 3) = 3,18$, тому для всіх методик $t_{\text{розр}} < t(P, f)$ і можна зробити висновок, що результати кількісного визначення за всіма запропонованими методиками не навантажені систематичною помилкою.

Для порівняння відтворюваності результатів, отриманих за різними методиками кількісного визначення, розраховували критерій Фішера за формулою [125,126]:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ при } s_1^2 \geq s_2^2 \quad (4.14)$$

$$F = 2,56.$$

$F(P, f_1, f_2) = F(0,99; 4; 3) = 16,69$, тобто $F_{\text{розр}} < F(P, f_1, f_2)$ і можна зробити висновок, що різниця між середньоквадратичними помилками S_1^2 та S_2^2 не є значущою.

Для порівняння середніх результатів, отриманих за кожною методикою, розраховували критерій Стьюдента за формулою (4.13) [125]:

$$t_{1,2} = 0,52.$$

$$f_{1,2} = 7; t(0,95; 7) = 2,36.$$

Тому $t_{\text{розр}} < t(P, f)$ і можна зробити висновок, що середні результати кількісного визначення за запропонованими методиками не мають між собою значущої різниці.

Висновки до розділу 4

1. Розроблено методику УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю, що дає можливість визначити препарат у межах концентрації від 20 мкг до 200 мкг в 1 мл розчину. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,24 \%$.
2. Розроблено методику УФ-спектрофотометричного визначення клопідогрелю карбонової кислоти, що дає можливість визначити її у межах концентрації від 20 мкг до 200 мкг в 1 мл розчину. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 2,54 \%$.
3. Розроблено методику екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю з використанням як реагенту кислотного барвника метилового оранжевого, що утворює з клопідогрелем іонні асоціати. Запропонована мето-

дика дає можливість визначити від 10 мкг до 200 мкг клопідогрелю в пробі. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,85 \%$.

4. Розроблено методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії. Запропоновані методики дають можливість визначити зазначені речовини в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 200 мкг/мл, що відповідає їх вмісту в пробі від 2 нг до 400 нг відповідно. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,75 \%$ та $\pm 2,02 \%$ відповідно.
5. Встановлено, що розроблену методику кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ можна використовувати для кількісного визначення клопідогрелю. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,31 \%$.
6. Представлені раніше методи аналізу клопідогрелю та його метаболіту методом ВЕРХ мають недоліки. Використання ізократического режиму елюювання обмежує можливість виходу всіх компонентів зразка з колонки в вузьких зонах і ефективний розподіл сумішей лікарських препаратів. Використання нелінійного градієнта при елюювання клопідогрелю та його метаболіту ускладнює процес хроматографії. З огляду на можливість комплексного лікування захворювань серцево-судинної системи з застосуванням різних препаратів, аналіз на клопідогрель та його метаболіт уніфікованим методом ВЕРХ є актуальним завданням дослідження.
7. Встановлено, що всі розроблені методики не навантажені систематичною помилкою, а різниці між відповідними значеннями середньоквадратичної помилки та середніх результатів не є значущими, тобто результати кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти є відтворюваними та достовірними.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоефективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.*(Особистий внесок здобувача у роботі - 80 % (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку)).*
2. Бондар В. С., Аносова Л. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44.*(Особистий внесок здобувача у роботі – 80 % - (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку)).*
3. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопідогрелю та його метаболіту. Сінтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича, 12 – 13 квітня 2018 р., Харків. 2018. – С. 358. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 60 % (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)).*

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ ЕКСТРАКЦІЇ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

5.1 Дослідження ступеня екстракції клопідогрелю із водних розчинів органічними розчинниками

В сучасному хіміко-токсикологічному аналізі для ізолювання токсичних речовин із біологічного матеріалу, для очищення витягів із біологічного матеріалу від домішок, для виділення токсичних речовин із попередньо очищених витягів широко застосовується метод екстракції органічними розчинниками [136]. Цей метод застосовується при визначенні токсичних речовин за допомогою деяких якісних реакцій, при кількісному визначенні цих речовин екстракційно-фотометричними та УФ-спектрофотометричними методами, при концентруванні речовин, що знаходяться в сильно розведених розчинах. Теоретичні основи і практичні прийоми екстракції широко висвітлено в літературі [137, 138, 139].

Екстракція – процес витягування розчинниками відповідних речовин із різноманітних об'єктів. У відповідності до фазного стану об'єкту, з якого екстрагують відповідні сполуки, процеси витягування поділяють на екстракцію в системі «тверде тіло – рідина» і на екстракцію в системі «рідина – рідина» (рідинну екстракцію) [98].

Рідинна екстракція – процес розподілу розчиненої речовини між двома рідкими фазами, що не змішуються, однією з яких в більшості випадків є вода, а другою – органічний розчинник. Витягування речовини з фази органічного розчинника в водну фазу називається реекстракцією.

Дуже важливим є те, що при використанні методів екстракції відсутнє хімічне перетворення речовин, що розподіляються, і не утворюються побічні продукти. Речовини, виділені за допомогою методу екстракції, як правило, не містять домішок, пов'язаних з процесами сорбції. Завдяки цим властивостям

метод екстракції широко застосовується в токсикологічній хімії, хімічній технології, фармації, біохімії тощо [137-139].

Перехід речовини, що екстрагується, з одного розчинника в інший відбувається в результаті різниці концентрацій і неоднакової розчинності цієї речовини в обох розчинниках. Згідно закону розподілу, речовина, розчинена в двох рідинах, що не змішуються, розподіляється між ними в постійному співвідношенні. Це співвідношення для ідеальних систем залежить тільки від температури і природи речовини і не залежить від концентрації.

На ступінь рідинної екстракції впливають такі фактори: температура (вплив температури на ступінь екстракції пояснюється зміною розчинності речовин в кожній фазі та взаємної розчинності органічної і водної фази; температура впливає на міжмолекулярну взаємодію розчинених речовин); природа органічного розчинника і речовини, що екстрагується; ступінь іонізації сполук, що екстрагуються, яка в свою чергу, залежить від концентрації іонів водню в водній фазі (при екстракції недисоційовані молекули переходять в органічну фазу, а іони, що добре гідратовані молекулами води, залишаються в водній фазі); сольватація (енергія переносу речовини, що має два або більше формальні заряди, з водної фази в органічну залежить від діелектричної проникності розчинника; іони і полярні молекули сольватуються здебільшого розчинником, у якого більш висока діелектрична проникність; вода в сумішах з органічними розчинниками є найчастіше кращим сольватуєчим агентом для сполук іонного характеру); наявність висолювачів (деякі речовини – амонію сульфат, натрію хлорид тощо – можуть впливати на величину коефіцієнту розподілу; зниження розчинності в водній фазі призводить до збільшення коефіцієнту розподілу); співвідношення об'ємів водної і органічної фаз; кількість повторних екстракцій [98].

Ступінь екстракції (R) – це відношення кількості екстрагованої речовини до загальної (початкової) кількості цієї речовини в водному розчині:

$$R = \frac{A - I_0}{N} \quad (5.1.)$$

де R – ступінь екстракції речовини, %;

A – кількість речовини, що екстрагувалась органічним розчинником, г;

N – загальна (початкова) кількість речовини в водному розчині, г.

Кількість речовини A , що екстрагується органічним розчинником, можна визначити експериментальним шляхом, застосовуючи відповідний метод кількісного визначення [98].

В експерименті використовували *стандартний розчин клопідогрелю 1*, що готували наступним чином:

100,0 мг клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняли у 5,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 2000 мкг/мл).

Приготування універсальної буферної суміші:

Готували розчин суміші кислот фосфатної, ацетатної і боратної в концентрації 0,04 моль / дм³ по відношенню до кожної з них: 2,47 г кислоти боратної, 2,12 см³ кислоти фосфатної концентрованої ($\rho = 1,86$ г / см³) і 2,33 см³ кислоти ацетатної концентрованої ($\rho = 1,055$ г / см³) переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

Готували 0,2 моль / дм³ розчин натрію гідроксиду: 8,00 г натрію гідроксиду переносили в мірну колбу ємністю 1000,0 см³, розчиняли в невеликій кількості води очищеної і доводили цим же розчинником до мітки.

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за допомогою розробленої УФ-спектрофотометричної методики (див. п. 4.1). Розрахунок концентрації клопідогрелю виконували за допомогою градуювального графіка (див. рис. 4.2.) або за рівнянням прямої (4.3). Потрібне значення рН середовища створювали за допомогою універсальних буферних розчинів з рН від 2,0 до 12,0.

В ряд ділильних ліжок вносили по 9,00 мл відповідних буферних розчинів та по 1,00 мл стандартного розчину клопідогрелю 1; до отриманих сумі-

шей додавали по 10,00 мл відповідного органічного розчинника. Суміші в ділительних лійках струшували впродовж 5 хв за допомогою механічного струшувача, залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали органічні шари в хімічні стакани та випаровували на водяній бані до повного видалення органічного розчинника. Залишок розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної.

Вимірювали оптичну густину отриманих розчинів при довжині хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Отримані результати наведено в табл. 5.1. та на рис. 5.1.

Таблиця 5.1

**Вплив рН середовища і природи органічного розчинника
на ступінь екстракції клопідогрелю з водних розчинів (n = 3)**

рН	Ступінь екстракції (R, %)		
	хлороформ	гексан	діетиловий етер
2,0	9,32	10,37	9,76
3,0	13,95	10,09	13,66
4,0	19,59	11,35	17,72
5,0	26,94	10,29	22,84
6,0	37,26	9,72	28,16
7,0	66,94	10,90	52,89
8,0	82,05	9,60	71,53
9,0	87,25	8,75	87,00
10,0	95,57	10,70	88,43
11,0	95,33	10,05	89,08
12,0	95,90	9,03	89,64

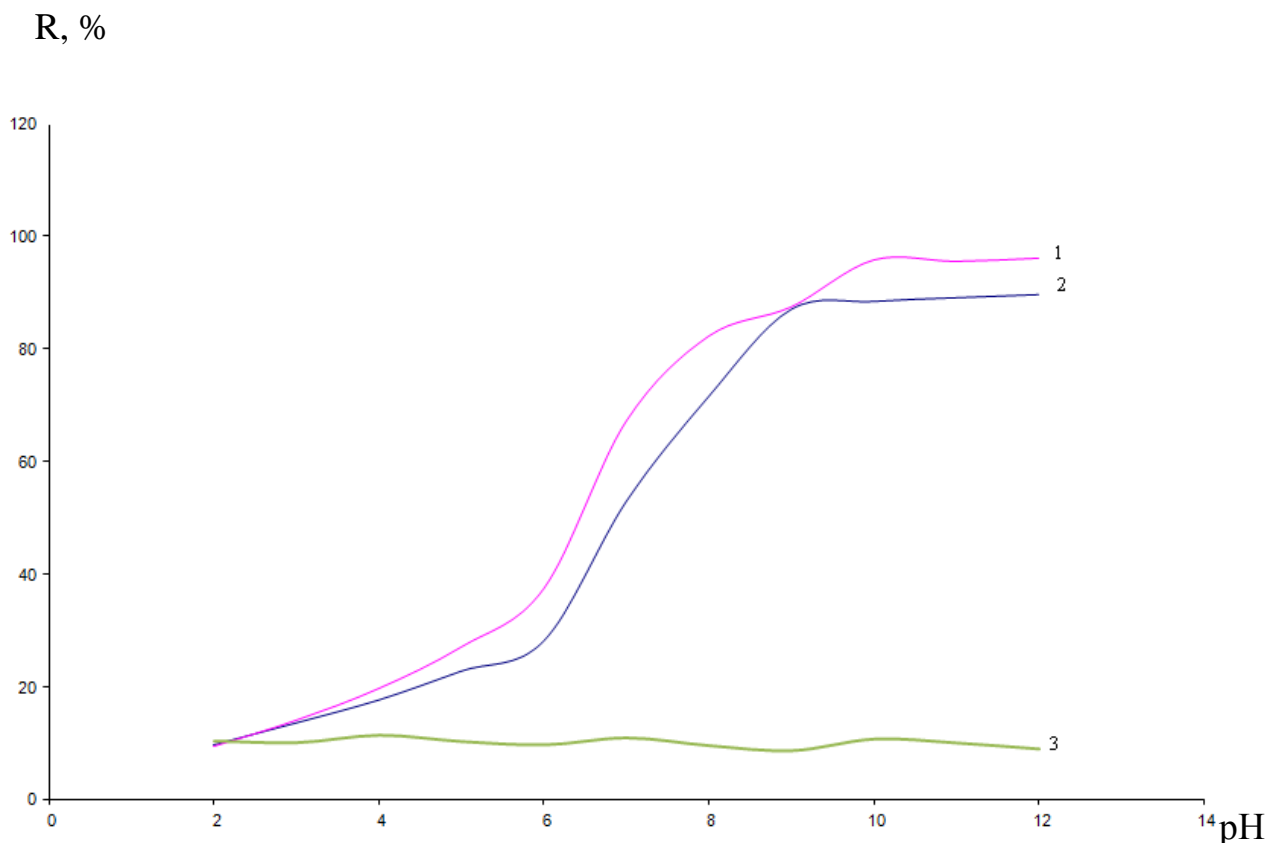


Рис. 5.1 Залежність ступеня екстракції клопідогрелю з водних розчинів від рН середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер, 3-гексан

Дані табл. 5.1 і рис. 5.1 свідчать про те, що помітна екстракція клопідогрелю хлороформом починається при $\text{pH} = 5,0 - 6,0$ та досягає максимуму (95%) в інтервалі $\text{pH} = 10,0 - 12,0$. Екстракція діетиловим етером починається при $\text{pH} = 5,0 - 6,0$ та досягає максимуму (90%) в інтервалі $\text{pH} = 10,0 - 12,0$.

Таким чином, хлороформ та діетиловий етер можна використовувати для ізолювання клопідогрелю із біологічного матеріалу в лужному середовищі.

Гексан практично не екстрагує клопідогрель із водних розчинів незалежно від рН середовища, тому його можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.

Отримані результати опубліковано в літературі [140]. *Bondar V. S. Anosova L. S.* Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX

International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76.

5.2 Дослідження ступеня екстракції клопідогрель карбонової кислоти із водних розчинів органічними розчинниками

В експерименті використовували *стандартний розчин клопідогрель карбонової кислоти 1*, що готували наступним чином:

100,0 мг клопідогрель карбонової кислоти вносили в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняли у 5,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (**стандартний розчин 1**, концентрація 2000 мкг/мл).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за допомогою розробленої УФ-спектрофотометричної методики (див. п. 4.2). Розрахунок концентрації клопідогрель карбонової кислоти виконували за допомогою градувального графіка (див. рис. 4.4.) або за рівнянням прямої (4.4). Потрібне значення рН середовища створювали за допомогою універсальних буферних розчинів з рН від 2,0 до 12,0.

В ряд ділительних ліжок вносили по 9,00 мл відповідних буферних розчинів та по 1,00 мл стандартного розчину клопідогрель карбонової кислоти 1; до отриманих сумішей додавали по 10,00 мл відповідного органічного розчинника. Суміші в ділительних ліжках струшували впродовж 5 хв за допомогою механічного струшувача, залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали органічні шари в хімічні стакани та випаровували на водяній бані до повного видалення органічного розчинника. Залишок розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної.

Вимірювали оптичну густину отриманих розчинів за довжини хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Отримані результати наведено в табл. 5.2. та на рис. 5.2.

Таблиця 5.2

**Вплив рН середовища і природи органічного розчинника
на ступінь екстракції клопідогрель карбонової кислоти
з водних розчинів (n = 3)**

рН	Ступінь екстракції (R, %)		
	хлороформ	гексан	діетиловий етер
2,0	94,92	9,89	88,71
3,0	94,36	9,61	88,14
4,0	94,60	10,86	87,49
5,0	86,32	9,81	86,08
6,0	81,16	9,25	70,70
7,0	66,14	10,42	52,17
8,0	36,62	9,13	27,58
9,0	26,37	8,28	22,29
10,0	19,06	10,22	17,20
11,0	13,45	9,57	13,16
12,0	8,84	8,56	9,29

Дані табл. 5.2. і рис. 5.2. свідчать про те, що помітна екстракція клопідогрель карбонової кислоти хлороформом та діетиловим етером спостерігається при рН = 2,0 – 6,0 та досягає максимуму (95% та 88% відповідно) в інтервалі рН = 2,0 – 4,0.

Таким чином, хлороформ та діетиловий етер можна використовувати для ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу в кислому середовищі.

Гексан практично не екстрагує клопідогрель карбонову кислоту із водних розчинів незалежно від рН середовища, тому його можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.

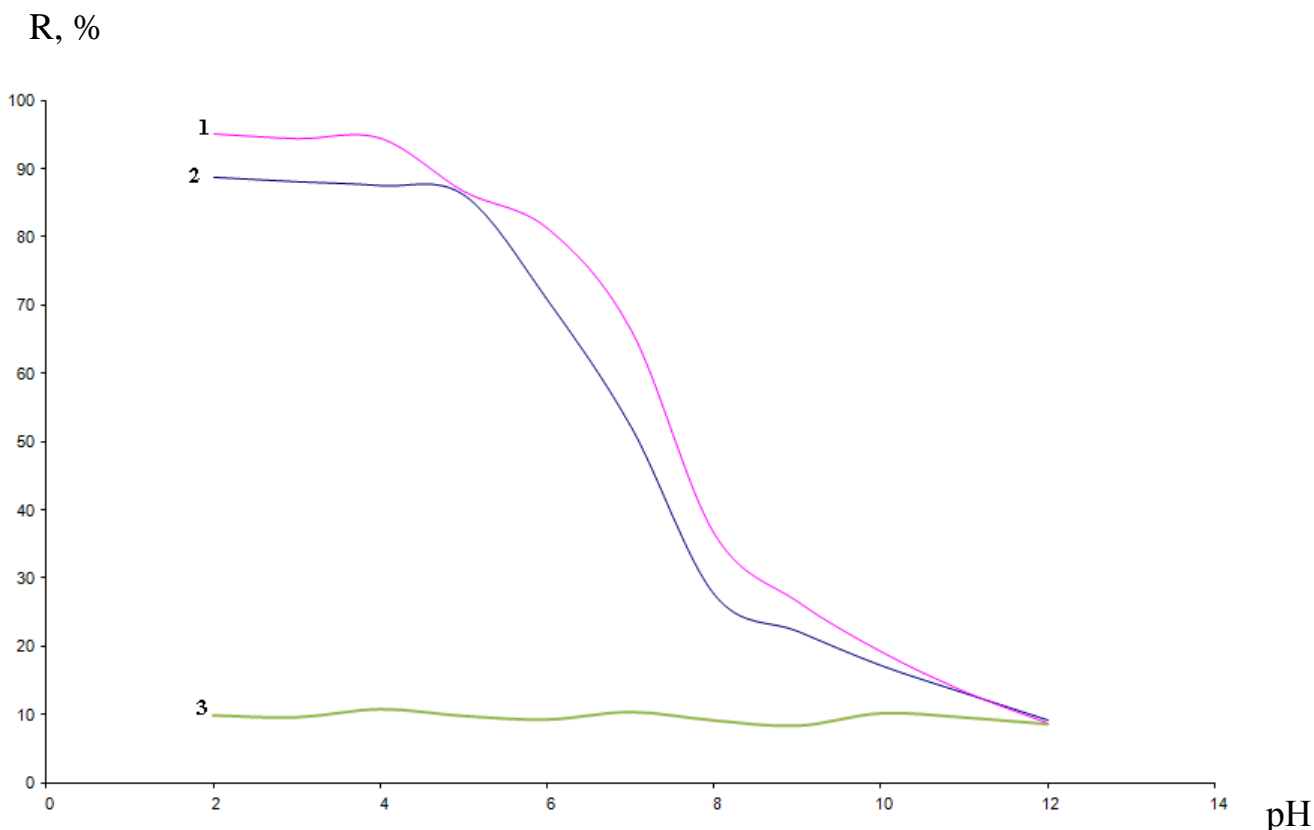


Рис. 5.2 Залежність ступеня екстракції клопідогрель карбонової кислоти з водних розчинів від рН середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер, 3-гексан.

Отримані результати опубліковано в літературі [140]. *Bondar V. S. Anosova L. S.* Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26. Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76.

Висновки до розділу 5

1. Вивчено умови екстракції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із водних розчинів органічними розчинниками (хлороформ, гексан, діетиловий етер) при різних значеннях рН. Встановлено, що ступінь екстракції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти залежить від природи органічного розчинника і від рН середовища.

2. Найбільш ефективними екстрагентами для клопідогрелю є хлороформ ($R = 95\%$ при $pH = 10,0 - 12,0$) та діетиловий етер ($R = 90\%$ при $pH = 10,0 - 12,0$). Гексан зручно застосовувати для очищення «кислих» та «лужних» водних витягів із біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин, а для екстракції клопідогрелю з «лужних» водних витягів краще використовувати хлороформ і діетиловий етер.
3. Найбільш ефективними екстрагентами для клопідогрель карбонової кислоти є хлороформ ($R = 95\%$ при $pH = 2,0 - 6,0$) та діетиловий етер ($R = 88\%$ при $pH = 2,0 - 6,0$). Хлороформ і діетиловий етер можна застосовувати для екстракції клопідогрель карбонової кислоти із водних розчинів в кислому середовищі.
4. Результати даних досліджень можуть бути використані для вибору оптимальних умов ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу у хіміко-токсикологічному аналізі.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Bondar V. S. Anosova L. S. Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, 2013. Kharkiv. Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 80 % (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку).*

РОЗДІЛ 6

ВИДІЛЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА КЛОПІДОГРЕЛЬ КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Особливістю проведення хіміко-токсикологічного аналізу є те, що досліджуються біологічні об'єкти з низьким рівнем концентрації токсичних речовин. Тому надзвичайно важливим при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень є процес виділення їх із біологічної матриці [141-147].

Незважаючи на широке застосування клопідогрелю в медичній практиці і наявність випадків летальних отруєнь цим препаратом [44-46], методи його виділення із біологічного матеріалу на сьогодні практично не вивчено.

Ми поставили за мету вивчити можливості ізолювання клопідогрелю та його метаболіту – клопідогрель карбонової кислоти – із біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів [98]: О. О. Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною), Стаса-Отто (ізолювання етанолом, підкисленим кислотою оксалатною), В. П. Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сульфатною), П. Валова (ізолювання підлуженою водою), проаналізувати їх переваги та вади і розробити за необхідності більш ефективний та експресний метод ізолювання препарату із біологічного матеріалу, а також запропонувати зручні та специфічні методи ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у витягах із біологічного матеріалу.

При дослідженні виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гnilісних змін. Для цього до 10 г подрібненої печінки (розмір частинок не повинен перевищувати 1 мм) додавали 1,00 мл розчину препарату в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (10 мг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші печінки з розчинником (0,1 М розчин кислоти хлоридної), дослідження яких

проводили паралельно з основними.

Кількість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури [44-46] щодо кількості препарату та його метаболіту в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях.

Готували стандартний розчин клопідогрелю бісульфату наступним чином: 1,0000 г клопідогрелю бісульфату вносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 0,1 моль / л розчині кислоти хлоридної і доводили об'єм розчину цим же розчинником до мітки (стандартний розчин, концентрація 10 мг / мл).

Готували *стандартний хлороформний розчин клопідогрелю* дотримуюсячим чином: 50,0 мг клопідогрелю бісульфата вносили в ділильну лійку, розчиняли в 10 мл води очищеної, підлужували 10 % розчином натрію гідроксиду до $\text{pH} = 9$ і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Хлороформні шари об'єднували і фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного в мірну колбу ємністю 50,0 мл, доводили об'єм хлороформом до мітки (**стандартний хлороформний розчин 1**, концентрація 1 мкг / мкл).

Для виділення препаратів класичними методами нами була проведена незначна їх модифікація, яка полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г. Екстракцію клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із отриманих витяжок проводили хлороформом, а процеси проціджування через марлю та фільтрування було замінено на центрифугування.

6.1 Ізолювання клопідогрелю із тканин печінки

6.1.1 Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою оксалатною (модифікований метод О. О. Васильєвої)

Для виділення препаратів класичними методами нами була проведена незначна їх модифікація, яка полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г.

10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрелем заливали 20 мл води очищеної, після цього суміш підкислювали 10 % розчином кислоти оксалатної до $\text{pH} = 2$ за універсальним індикаторним папером та залишали на 2 години при постійному перемішуванні і контролі pH середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв. при 5000 об./хв.) та зливали водний витяг. Біологічний матеріал ще двічі впродовж години настоювали з водою, підкисленою 10 % розчином кислоти оксалатної до $\text{pH} = 2$. Кислі водні витяги об'єднували, переносили у ділильну ліжку та тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Отримані витяги («кислий» хлороформний витяг) в подальшому не досліджували, бо клопідогрель при $\text{pH} = 2$ хлороформом практично не екстрагується (див. п. 4.1).

Кислий водний витяг підлужували розчином амоніаку до $\text{pH} = 11$ і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв. при 5000 об./хв.)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (витяг 1).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.1).

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 5 мл отриманого хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили

після очистки отриманого хлороформного витягу за методом ТШХ (див. р. 6. п. 6.6.).

Отримані результати наведено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

**Результати ізолювання клопідогрелю водою,
підкисленою кислотою оксалатною**

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	57,24	$S = 2,28$; $S\bar{X} = 1,32$; $\Delta \bar{X} = 5,66$; $\varepsilon = \pm 9,89\%$
екстракційно- фотометричний	54,88	$S = 1,39$; $S\bar{X} = 0,80$; $\Delta \bar{X} = 3,44$; $\varepsilon = \pm 6,27\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	54,17	$S = 1,69$; $S\bar{X} = 0,97$; $\Delta \bar{X} = 4,19$; $\varepsilon = \pm 7,73\%$

6.1.2 Ізолювання клопідогрел. водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка)

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрелем додавали 0,01 М розчин кислоти сульфатної з таким розрахунком, щоб тверді частинки біологічного матеріалу було вкрито рідиною. Вміст склянки перемішували, додавали краплями 20% розчин кислоти сульфатної до рН = 2 за універсальним індикаторним папером та залишали на 2 години при постійному перемішуванні і контролі рН середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв) та зливали водний витяг. Біологічний матеріал ще двічі впродовж години настоювали з водою, підкисленою кислотою сульфатною до рН = 2. Кислі водні витяги об'єднували, переносили у ділильну лійку та двічі екстрагували діетиловим етером порціями по 10 мл. Етерні витяги відділяли та в подальшому не досліджували.

Кислий водний витяг підлужували 20 % розчином натрію гідроксиду до

pH = 11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (витяг 2).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелу методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.1).

Кількісне визначення клопідогрелу проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 5 мл отриманого хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманого хлороформного витягу за методом ТШХ (див. розд. 6. та п.6.6.).

Отримані результати наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

**Результати ізолювання клопідогрелю водою,
підкисленою кислотою сульфатною**

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	64,27	$S = 1,66$; $S\bar{X} = 0,96$; $\Delta \bar{X} = 4,12$; $\varepsilon = \pm 6,41\%$
екстракційно- фотометричний	60,50	$S = 0,37$; $S\bar{X} = 0,21$; $\Delta \bar{X} = 0,92$; $\varepsilon = \pm 1,52\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	60,83	$S = 0,72$; $S\bar{X} = 0,42$; $\Delta \bar{X} = 1,79$; $\varepsilon = \pm 2,94\%$

6.1.3 Ізолювання клопідогрелю етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (модифікований метод Стаса-Отто)

Метод Стаса-Отто застосовують у практиці вітчизняних токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи, як правило, для ізолювання

лікарських отруйних речовин із гнилого біологічного матеріалу. У зв'язку з чим дану методику ми використали для встановлення ступеня ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з біологічних проб.

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрелем додавали 96 % етанол до утворення дзеркальної поверхні над біологічним матеріалом, підкислювали 10 % спиртовим розчином кислоти оксалатної до $\text{pH} = 2$ за універсальним індикаторним папером та залишали на 24 години при постійному перемішуванні і контролі pH середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв) та зливали спиртовий витяг. Біологічний матеріал ще двічі протягом доби настоювали з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною до $\text{pH} = 2$. Кислі спиртові витяги об'єднували, переносили в порцелянову чашку та випаровували на водяній бані (при температурі не вище 40°C) до густоти сиропу. Сиропоподібну рідину обробляли абсолютним етанолом, додаючи його краплями доти, поки білки не припиняли осаджуватися з витягів. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали спиртовий витяг, випаровували на водяній бані (при температурі не вище 40°C) до густоти сиропу і знову проводили обробку сиропоподібної рідини абсолютним етанолом. Осадження білків і інших домішок з витягу проводили доти, поки вони не припиняли осаджуватися після додавання абсолютного етанолу. До очищеного таким чином спиртового витягу додавали 5 мл води очищеної; якщо при цьому утворювався осад, його відділяли центрифугуванням (впродовж 5 хв при 5000 об/хв). Кислий водно-спиртовий витяг переносили в ділильну лійку і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Отримані витяги («кислий» хлороформний витяг) в подальшому не досліджували, бо клопідогрель при $\text{pH} = 2$ хлороформом практично не екстрагується (див. розд. 5, п. 5.1).

Кислий водно-спиртовий витяг підلужували 25 % розчином амоніаку до $\text{pH} = 11$ і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через папе-

ровий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (витяг 3).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.1).

Виявити клопідогрель в отриманому витягу не вдалося.

6.1.4 Ізолювання клопідогрелю хлороформом

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрелем додавали 30 г натрію сульфату безводного, змішували та періодично перемішували в ступці до утворення сипкої маси (біля 2 – 3 годин). У вузьку нижню частину скляної колонки діаметром 17 – 20 мм поміщали марлевий тампон, заливали хлороформ (частина від попередньо відміряного хлороформу об'ємом 100 мл) та засипали отриману сипку масу, періодично додаючи хлороформ таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося «дзеркало» товщиною 1 – 2 см, після повного перенесення сипкої маси колонку залишали на годину. Далі над колонкою поміщали ділильну лійку з залишком хлороформу, який пропускали через колонку із швидкістю 60 – 80 крапель за хвилину, утримуючи «дзеркало» над біологічним матеріалом. Хлороформний витяг збирали до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводили хлороформом до позначки (**витяг 4**).

З метою екстракційної очистки 50 мл отриманого витягу тричі реекстрагували 0,1 М розчином кислоти хлоридної порціями по 10 мл. Хлороформні шари відокремлювали та надалі не досліджували. Водні шари об'єднували, підлужували 25 % розчином амоніаку до $\text{pH} = 11$ та тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Хлороформні шари збирали до мірної колби місткістю 50,0 мл через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного та доводили хлороформом до позначки (**витяг 5**).

По 10, 20, 50 та 100 мкл отриманих хлороформних витягів використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.1).

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за УФ-спектрофотометричною методикою в 10 мл отриманих хлороформних витягів (див. розд.4, п. 4.1).

Отримані результати наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Результати ізолювання клопідогрелю хлороформом

Витяг	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
витяг 4	81,17	$S = 0,97$; $S\bar{X} = 0,56$; $\Delta\bar{X} = 2,40$; $\varepsilon = \pm 2,96\%$
витяг 5	64,58	$S = 1,26$; $S\bar{X} = 0,73$; $\Delta\bar{X} = 3,12$; $\varepsilon = \pm 4,83\%$

6.2 Ізолювання клопідогрелів карбонової кислоти із тканин печінки

Для виділення клопідогрелів карбонової кислоти класичними методами нами була проведена незначна їх модифікація, яка полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г.

6.2.1 Ізолювання клопідогрелів карбонової кислоти водою, підкисленою кислотою оксалатною (модіфований метод О. О. Васильєвої)

10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрелів карбоновою кислотою заливали 20 мл води очищеної, після цього суміш підкислювали 10% розчином кислоти оксалатної до рН = 2 за універсальним індикаторним папером та залишали на 2 години при постійному перемішуванні і контролі рН середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв) та зливали водний витяг. Біологічний матеріал ще двічі протягом години на-

стоювали з водою, підкисленою 10 % розчином кислоти оксалатної до $\text{pH} = 2$. Кислі водні витяги об'єднували, переносили у ділильну лійку та тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Одержані витяги («кислий» хлороформний витяг) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 6**).

По 5, 10 та 100 мкл одержаного хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.2).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаного хлороформного витягу за методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

**Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти водою,
підкисленою кислотою оксалатною**

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика ($n = 3$; $P = 0,95$)
УФ-спектрофотометричний	53,24	$S = 1,14$; $S\bar{X} = 0,66$; $\Delta\bar{X} = 2,82$; $\varepsilon = \pm 10,30\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	51,88	$S = 1,53$; $S\bar{X} = 0,88$; $\Delta\bar{X} = 3,79$; $\varepsilon = \pm 13,81\%$

6.2.2 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка)

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрель карбоновою кислотою додавали 0,01 М розчин кислоти сульфатної з таким розра-

хунком, щоб тверді частинки біологічного матеріалу було вкрито рідиною. Вміст склянки перемішували, додавали краплями 20 % розчин кислоти сульфатної до $\text{pH} = 2$ за універсальним індикаторним папером та залишали на 2 години при постійному перемішуванні і контролі pH середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв) та зливали водний витяг. Біологічний матеріал ще двічі протягом години настоювали з водою, підкисленою кислотою сульфатною до $\text{pH} = 2$. Кислі водні витяги об'єднували, переносили у ділильну лійку та тричі екстрагували діетиловим етером порціями по 10 мл. Одержані витяги («кислий» етерний витяг) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл та доводили об'єм діетиловим етером до позначки (**витяг 7**).

По 5, 10 та 100 мкл одержаного етерного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.2).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного етерного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаного етерного витягу за методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.5

Таблиця 6.5

Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти водою, підкисленою кислотою сульфатною

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика ($n = 3$; $P = 0,95$)
УФ-спектрофотометричний	55,21	$S = 1,94$; $S\bar{X} = 1,12$; $\Delta\bar{X} = 4,83$; $\varepsilon = \pm 19,15\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	53,44	$S = 2,30$; $S\bar{X} = 1,33$; $\Delta\bar{X} = 5,70$; $\varepsilon = \pm 24,33\%$

6.2.3 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (модифікований метод Стаса-Отто)

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрель карбоновою кислотою додавали 96 % етанол до утворення дзеркальної поверхні над біологічним матеріалом, підкислювали 10 % спиртовим розчином кислоти оксалатної до $\text{pH} = 2$ за універсальним індикаторним папером та залишали на 24 години при постійному перемішуванні і контролі pH середовища. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв) та зливали спиртовий витяг. Біологічний матеріал ще двічі впродовж доби настоювали з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною до $\text{pH} = 2$. Кислі спиртові витяги об'єднували, переносили в порцелянову чашку та випаровували на водяній бані (при температурі не вище 40°C) до густоти сиропу. Сиропоподібну рідину обробляли абсолютним етанолом, додаючи його краплями доти, поки білки не припиняли осаджуватися з витягів. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали спиртовий витяг, випаровували на водяній бані (при температурі не вище 40°C) до густоти сиропу і знову проводили обробку сиропоподібної рідини абсолютним етанолом. Осадження білків і інших домішок з витягу проводили доти, поки вони не припиняли осаджуватися після додавання абсолютного етанолу. До очищеного таким чином спиртового витягу додавали 5 мл води очищеної; якщо при цьому утворювався осад, його відділяли центрифугуванням (протягом 5 хв. при 5000 об./хв.). Кислий водно-спиртовий витяг переносили в ділильну ліжку і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Одержані витяги («кислий» хлороформний витяг) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 8**).

По 5, 10 та 100 мкл одержаного хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див.

роз.3. п. 3.2.2).

Виявити клопідогрель карбонову кислоту в отриманому витягу на вдалося.

6.2.4 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти підлуженою водою (модифікований метод П. Валоуа)

10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрель карбоною кислотою переносили до ступки, додавали до нього 10 г чистого піску і ретельно розтирали. Гомогенізовану масу переносили до склянки, ступку ополіскували 20 мл води очищеної та переносили до склянки. В склянку з гомогенізованим біологічним матеріалом додавали 2 мл 10 % розчину натрію гідроксиду. Вміст склянки залишали на 30 хв. при постійному перемішуванні, після чого суміш центрифугували (впродовж 30 хв при 3000 об/хв) та збирали центрифугат до чистої склянки. Настоювання біологічного матеріалу з новою порцією підлуженої води проводили ще двічі протягом 30 хв. До об'єднаних лужних водних витягів додавали 0,05 М розчин кислоти сульфатної до рН = 2. Рідину нагрівали на водяній бані протягом 20 хв, а потім центрифугували впродовж 30 хв при 3000 об/хв. Центрифугат збирали до ділильної лійки та тричі екстрагували хлороформом порціями по 20 мл. Одержані витяги («кислий» хлороформний витяг) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 9**).

По 5, 10 та 100 мкл одержаного хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. роз.3. п. 3.2.2).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного хлороформно-ізопропанольного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки

одержаного хлороформного витягу за методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.6.

Таблиця 6.6

Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти підлученою водою (модифікація II методу П. Валова)

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	69,32	$S = 0,92$; $S\bar{X} = 0,53$; $\Delta\bar{X} = 2,27$; $\varepsilon = \pm 5,78\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	68,32	$S = 1,17$; $S\bar{X} = 0,67$; $\Delta\bar{X} = 2,89$; $\varepsilon = \pm 7,55\%$

6.2.5 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти хлороформом

До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з клопідогрель карбоновою кислотою додавали 30 г натрію сульфату безводного, змішували та періодично перемішували в ступці до утворення сипкої маси (біля 2 – 3 годин). У вузьку нижню частину скляної колонки діаметром 17 – 20 мм поміщали марлевий тампон, заливали хлороформ (частина від попередньо відміряного хлороформу об'ємом 100 мл) та засипали отриману сипку масу, періодично додаючи хлороформ таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося «дзеркало» товщиною 1 – 2 см, після повного перенесення сипкої маси колонку залишали на годину. Далі над колонкою поміщали ділильну лійку з залишком хлороформу, який пропускали через колонку із швидкістю 60 – 80 крапель за хвилину, утримуючи «дзеркало» над біологічним матеріалом. Хлороформний витяг збирали до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводили хлороформом до позначки (**витяг 10**).

По 10, 20, 50 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ

(див. роз.3. п. 3.2.2).

Виявити клопідогрель карбонову кислоту в отриманому витягу на вдалося.

6.3 Ізолювання клопідогрелю із біологічних рідин організму

Зважаючи на результати, отримані при ізолюванні клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з печінки хлороформом, ми спробували використати цей розчинник для ізолювання препарату із крові та сечі.

При дослідженні виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічних рідин використовували модельні суміші крові та сечі з препаратом. Для цього до 10 мл відповідної біологічної рідини додавали 1,00 мл розчину препарату в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (10 мг препарату), ретельно перемішували і залишали на годину. Готували також контрольні суміші біологічних рідин з розчинником (0,1 М розчин кислоти хлоридної), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури [44-46] щодо кількості препарату в біологічних рідинах людини при смертельних отруєннях.

6.3.1 Ізолювання клопідогрелю із крові (методика I)

До 10 мл модельної суміші крові з клопідогрелем бісульфатом додавали 5 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером рН суміші (при необхідності краплями додавали 6 М розчин кислоти хлоридної до $\text{pH} = 2$), залишали на 2 години при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (вродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину та тричі екстрагували діетиловим етером порціями по 5 мл. Етерні витяги відділяли та в подальшому не досліджували.

Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до рН = 11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (витяг 8).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. розд.3 п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 5 мл отриманого хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманого хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Отримані результати наведено в табл. 6.7.

Таблиця 6.7

Результати ізолювання клопідогрелю із крові (методика І)

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	65,15	$S = 0,99$; $S\bar{X} = 0,78$; $\Delta\bar{X} = 2,48$; $\varepsilon = \pm 3,81\%$
екстракційно- фотометричний	63,45	$S = 1,84$; $S\bar{X} = 1,06$; $\Delta\bar{X} = 4,56$; $\varepsilon = \pm 7,19\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	62,35	$S = 1,20$; $S\bar{X} = 0,69$; $\Delta\bar{X} = 2,98$; $\varepsilon = \pm 4,78\%$

6.3.2 Ізолювання клопідогрелю із крові (методика ІІ)

До 10 мл модельної суміші крові з клопідогрелем бісульфатом додавали 5 мл 10 % водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішували та залишали на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували

(впродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину, перевіряли рН (має дорівнювати 2) та тричі екстрагували діетиловим етером порціями по 5 мл. Етерні витяги відділяли та в подальшому не досліджували.

Водний шар підлужували 50% розчином натрію гідроксиду до рН = 11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 9**).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. розд.3 п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 5 мл отриманого хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманого хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Отримані результати наведено в табл. 6.8.

Таблиця 6.8

Результати ізолювання клопідогрелю із крові (методика II)

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	59,74	$S = 1,88$; $S\bar{X} = 1,08$; $\Delta\bar{X} = 4,66$; $\varepsilon = \pm 7,80\%$
екстракційно- фотометричний	53,81	$S = 1,43$; $S\bar{X} = 0,82$; $\Delta\bar{X} = 3,54$; $\varepsilon = \pm 6,58\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	55,02	$S = 1,30$; $S\bar{X} = 0,75$; $\Delta\bar{X} = 3,23$; $\varepsilon = \pm 5,87\%$

6.3.3 Ізолювання клопідогрелю із сечі

До 10 мл модельної суміші сечі з клопідогрелем додавали 0,1 М розчин кислоти хлоридної до $\text{pH} = 2$ і тричі екстрагували діетиловим етером порціями по 5 мл. Етерні витяги відділяли та в подальшому не досліджували.

Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до $\text{pH} = 11$ і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (впродовж 5 хв при 5000 об/хв)). Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 10**).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ (див. розд.3 п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрелю проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 5 мл отриманого хлороформного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманого хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Отримані результати наведено в табл. 6.9.

Таблиця 6.9

Результати ізолювання клопідогрелю із сечі

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика ($n = 3$; $P = 0,95$)
УФ-спектрофотометричний	68,64	$S = 1,57$; $S\bar{X} = 0,90$; $\Delta\bar{X} = 3,89$; $\varepsilon = \pm 5,67\%$
екстракційно-фотометричний	75,34	$S = 2,39$; $S\bar{X} = 1,38$; $\Delta\bar{X} = 5,94$; $\varepsilon = \pm 9,09\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	74,14	$S = 1,59$; $S\bar{X} = 0,92$; $\Delta\bar{X} = 3,94$; $\varepsilon = \pm 6,14\%$

6.4 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із біологічних рідин організму

6.4.1 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові (методика І)

До 10 мл модельної суміші крові з клопідогрель карбоною кислотою додавали 5 мл 10 % водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішували та залишали на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (вродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину, перевіряли рН (має дорівнювати 2 – 3) та тричі екстрагували сумішню сумішню хлороформу з ізопропанолом (8:2) порціями по 20 мл. Отримані витяги («кислий» хлороформно-ізопропанольний витяг) об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 11**).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. розд.3, п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного хлороформно-ізопропанольного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаного хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.10.

Таблиця 6.10

**Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові
(методика І)**

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	59,32	$S = 0,92$; $S\bar{X} = 0,53$; $\Delta \bar{X} = 2,27$; $\varepsilon = \pm 5,78\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	58,32	$S = 1,17$; $S\bar{X} = 0,67$; $\Delta \bar{X} = 2,89$; $\varepsilon = \pm 7,55\%$

6.4.2 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові (методика ІІ)

До 10 мл модельної суміші крові з клопідогрель карбоновою кислотою додавали 10 мл 1 М розчину кислоти хлоридної, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером рН суміші (при необхідності по краплях додавали 6 М розчин кислоти хлористоводневої до рН = 2), залишали на 2 години при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (впродовж 5 хв при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину та тричі екстрагували хлороформом порціями по 20 мл. Отримані витяги («кислий» хлороформний витяг) об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 50,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 12**).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. розд.3, п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного хлороформно-ізопропанольного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаного хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.11.

Таблиця 6.11

**Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із крові
(методика II)**

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	65,15	$S = 0,99$; $S\bar{X} = 0,78$; $\Delta \bar{X} = 2,48$; $\varepsilon = \pm 3,81\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	68,32	$S = 1,17$; $S\bar{X} = 0,67$; $\Delta \bar{X} = 2,89$; $\varepsilon = \pm 7,55\%$

6.4.3 Ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із сечі

До 10 мл модельної суміші сечі з клопідогрель карбоною кислотою додавали 0,1 М розчин кислоти хлоридної до рН = 2 і тричі екстрагували сумішню сумішню хлороформом порціями по 20 мл. Отримані витяги («кислий» хлороформний витяг) об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 50,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (**витяг 13**).

По 5, 10 та 100 мкл отриманого хлороформного витягу використовували для ідентифікації клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ (див. розд. 3, п. 3.2.1.).

Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти проводили за спектрофотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаного хлороформно-ізопропанольного витягу. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаного хлороформного витягу методом ТШХ (див. розд 6. та п. 6.5.).

Одержані результати наведено в табл. 6.12.

Таблиця 6.12

Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти із сечі

Метод кількісного визначення	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний	75,15	$S = 0,99$; $S_{\bar{X}} = 0,78$; $\Delta \bar{X} = 2,48$; $\varepsilon = \pm 3,81\%$
ВЕРХ (після ТШХ-очистки)	73,32	$S = 1,17$; $S_{\bar{X}} = 0,67$; $\Delta \bar{X} = 2,89$; $\varepsilon = \pm 7,55\%$

6.5 Ідентифікація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у витягах із об'єктів біологічного походження

Ідентифікацію клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинах «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (див. п. 3.2.1) в системі розчинників етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2) в присутності «свідків» – хлороформних розчинів клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти (концентрація 1 мг/мл).

Хроматографування проводили в камері об'ємом 500 см³, в яку вносили 50 мл системи розчинників. Камеру насичували впродовж 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становить 8 см.

Попередньо пластини елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин (за цих умов клопідогрель та клопідогрель карбонової кислота залишаються на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу).

Для проявлення плям на пластинах використовували реактив Драгендорфа та 5 % розчин ферум (ІІІ) хлориду.

За допомогою запропонованих реактивів можна виявити 0,1 мкг клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти відповідно в пробі (див. розд. 3, п. 3.1.).

Плями співекстрактивних речовин при цьому знаходяться або на лінії

фінішу, або на лінії старту та не заважають виявленню клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти.

6.6 ТШХ-очистка витягів із об'єктів біологічного походження

Зазначену кількість хлороформного витягу випаровували на водяній бані до об'єму 0,5 мл та кількісно наносили на лінію старту хроматографічної пластини «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (див. п. 3.2.1) смугою шириною 2 см. Поряд наносили 10 мкл стандартного хлороформного розчину препарату (концентрація 1 мкг/мкл).

Пластину елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов препарат залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування елюювали пластини в системі розчинників хлороформ – метанол (90:10), висушували та проявляли в УФ-світлі.

Хроматографування проводили в камері об'ємом 500 см³, в яку вносили 50 мл системи розчинників. Камеру насичували впродовж 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становить 8 см.

За допомогою скальпелю навпроти плями «свідка» з пластини ретельно знімали сорбент з площі 3 см × 1 см в скляний флакон. У флакон додавали 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлоридної (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшували впродовж 5 хв, після чого фільтрували до мірної колби місткістю 10,0 мл та доводили через фільтр («червона стрічка») відповідним розчинником до позначки.

6.7 Кількісне визначення клопідогрелю у витягах із об'єктів біологічного походження

6.7.1 Кількісне визначення клопідогрелю за УФ-спектрофотометричною методикою

Зазначену кількість витягів випаровували на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Оптичну густину отриманого розчину або зазначеного елюату (при проведенні ТШХ-очистки) визначали при $\lambda = 278$ нм та довжині кювети 10 мм. Концентрацію клопідогрелю в розчині (С, мкг/мл) розраховували за допомогою градуювального графіка (див. рис. 4.2.) або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації (4.3).

Кількість клопідогрелю в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою (6.1.):

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2}, \text{ де} \quad (6.1.)$$

- С – концентрація клопідогрелю в розчині, що аналізується, мкг/мл;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, мл;
- V_3 – об'єм 0,1 М розчину кислоти хлоридної, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТШХ-очистки), мл.

6.7.2 Кількісне визначення клопідогрелю за екстракційно-фотометричною методикою

Зазначену кількість витягів випаровували на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняли в

10,00 мл 0,01 М розчину кислоти хлоридної. У ділильну лійку вносили 5,00 мл ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, додавали 5,00 мл 0,02 % розчину метилового оранжевого та 5,00 мл отриманого розчину або 5,00 мл відповідного елюату (при проведенні ТШХ-очистки), до отриманої суміші додавали 10,00 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували впродовж 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 8,00 мл хлороформного шару, відкидаючи його перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до нього 2,00 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали її оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 (довжина кювети 20 мм, світлофільтр з $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$ нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ. Кількість клопідогрелю в об'ємі розчину (С, мкг) розраховували за допомогою градуювального графіка (див. рис. 4.5) або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від вмісту клопідогрелю в пробі (4.7.).

Кількість клопідогрелю в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою (6.2.):

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4}, \text{де} \quad (6.2.)$$

- С – кількість клопідогрелю в пробі, що аналізується, мкг;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, мл;
- V_3 – об'єм 0,01 М розчину кислоти хлоридної, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТШХ-очистки), мл;
- V_4 – об'єм розчину або отриманого елюату, що взято для аналізу, мл.

6.7.3 Кількісне визначення та ідентифікація клопідогрелю за ВЕРХ-методикою

Для визначення клопідогрелю 1,00 мл відповідного елюату змішували з 1,00 мл води очищеної та хроматографували за вищезазначених умов (див. розд. 4, п. 4.6); об'єм проби становив 2 мкл.

Ідентифікацію клопідогрелю проводили за основними хроматографічними параметрами – абсолютними часом та об'ємом утримування та спектральними характеристиками (див. табл. 3.6).

Концентрацію клопідогрелю в розчині (С, мкг/мл) розраховували за допомогою градувального графіка (див. рис. 4.6) або за відповідним рівнянням лінійної залежності площі піку від концентрації розчину клопідогрелю (4.8).

Кількість клопідогрелю в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою (6.3):

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5}{V_2 \cdot V_4}, \text{ де} \quad (6.3)$$

- С – концентрація клопідогрелю в розчині, що аналізується, мкг/мл;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, мл;
- V_3 – об'єм отриманого елюату, мл;
- V_4 – об'єм отриманого елюату, що взято для аналізу, мл;
- V_5 – об'єм суміші елюат – розчинник, що аналізується, мл.

6.8 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти у витягах із об'єктів біологічного походження

6.8.1 Кількісне визначення клопідогрель карбонової кислоти за УФ-спектрофотометричною методикою

Зазначену кількість витягів випаровували на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Оптичну густину отриманого ро-

зчину або зазначеного елюату (при проведенні ТШХ-очистки) визначали при $\lambda = 278$ нм та довжині кювети 10 мм. Концентрацію клопідогрель карбонової кислоти в розчині (С, мкг/мл) розраховували за допомогою градувального графіка (див. рис. 4.4) або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації (4.4).

Кількість клопідогрель карбонової кислоти в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою (6.4):

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2}, \text{ де} \quad (6.4)$$

- С – концентрація клопідогрель карбонової кислоти в розчині, що аналізується, мкг/мл;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, мл;
- V_3 – об'єм 0,1 М розчину кислоти хлоридної, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТШХ-очистки), мл.

6.8.2 Кількісне визначення та ідентифікація клопідогрель карбонової кислоти за ВЕРХ-методикою.

Для визначення клопідогрель карбонової кислоти 1,00 мл відповідного елюату змішували з 1,00 мл води очищеної та хроматографували за вищезазначених умов (див. розд. 4, п. 4.7.1); об'єм проби становив 2 мкл.

Ідентифікацію клопідогрель карбонової кислоти проводили за основними хроматографічними параметрами – абсолютними часом та об'ємом утримування та спектральними характеристиками (див. табл. 4.18.).

Концентрацію клопідогрель карбонової кислоти в розчині (С, мкг/мл) розраховували за допомогою градувального графіка (див. рис. 4.7.) або за відповідним рівнянням лінійної залежності площі піку від концентрації роз-

чину клопідогрель карбонової кислоти (4.9).

Кількість клопідогрель карбонової кислоти в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою (6.5):

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5}{V_2 \cdot V_4}, \text{ де} \quad (6.5)$$

- C – концентрація клопідогрель карбонової кислоти в розчині, що аналізується, мкг/мл;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, мл;
- V_3 – об'єм отриманого елюату, мл;
- V_4 – об'єм отриманого елюату, що взято для аналізу, мл;
- V_5 – об'єм суміші елюат – розчинник, що аналізується, мл.

Результати ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти наведені в таблиці 6.13 та 6.14

Таблиця 6.13

**Результати ізолювання клопідогрелю
із об'єктів біологічного походження ($n = 3$; $P = 0,95$)
УФ-спектрофотометричний метод кількісного визначення**

Метод ізолювання	Виділено клопідогрелю, %	Метрологічна характеристика ($n = 3$; $P = 0,95$)
1	2	3
за О. О. Васильєвою	$57,24 \pm 5,66$	$S = 2,28$; $S\bar{X} = 1,32$; $\Delta\bar{X} = 5,66$; $\varepsilon = \pm 9,89\%$
за В. П. Крамаренком	$64,27 \pm 4,12$	$S = 1,66$; $S\bar{X} = 0,96$; $\Delta\bar{X} = 4,12$; $\varepsilon = \pm 6,41\%$
методика ізолювання хлороформом із печінки	$81,17 \pm 2,40$	$S = 0,97$; $S\bar{X} = 0,56$; $\Delta\bar{X} = 2,40$; $\varepsilon = \pm 2,96\%$
методика ізолювання хлороформом із печінки (після екстракційної очистки)	$64,58 \pm 3,12$	$S = 1,26$; $S\bar{X} = 0,73$; $\Delta\bar{X} = 3,12$; $\varepsilon = \pm 4,83\%$

Продовж.табл. 6.13

1	2	3
методика І ізолювання хлороформом із крові	$65,15 \pm 2,48$	$S = 0,99; S\bar{x} = 0,78; \Delta\bar{x} = 2,48; \varepsilon = \pm 3,81\%$
методика ІІ ізолювання хлороформом із крові	$59,74 \pm 4,66$	$S = 1,88; S\bar{x} = 1,08; \Delta\bar{x} = 4,66; \varepsilon = \pm 7,80\%$
методика ізолювання хлороформом із сечі	$68,64 \pm 3,89$	$S = 1,57; S\bar{x} = 0,90; \Delta\bar{x} = 3,89; \varepsilon = \pm 5,67\%$

Таблиця 6.14

**Результати ізолювання клопідогрель карбонової кислоти
із об'єктів біологічного походження (n = 3; P = 0,95)
УФ-спектрофотометричний метод кількісного визначення**

Метод ізолювання	Виділено клопідогрель карбонової кислоти, %	Метрологічна характеристика (n = 3; P = 0,95)
1	2	3
за О. О. Васильєвою	$53,24 \pm 2,82$	$S = 1,14; S\bar{x} = 0,66; \Delta\bar{x} = 2,82; \varepsilon = \pm 10,30\%$
за В. П. Крамаренком	$55,21 \pm 4,83$	$S = 1,94; S\bar{x} = 1,12; \Delta\bar{x} = 4,83; \varepsilon = \pm 19,15\%$
за П. Валовим	$69,32 \pm 2,27$	$S = 0,92; S\bar{x} = 0,53; \Delta\bar{x} = 2,27; \varepsilon = \pm 5,78\%$
методика І ізолювання хлороформом із крові	$59,32 \pm 2,27$	$S = 0,92; S\bar{x} = 0,53; \Delta\bar{x} = 2,27; \varepsilon = \pm 5,78\%$
методика ІІ ізолювання хлороформом із крові	$65,15 \pm 2,48$	$S = 0,92; S\bar{x} = 0,53; \Delta\bar{x} = 2,27; \varepsilon = \pm 5,78\%$
методика ізолювання хлороформом із сечі	$75,15 \pm 2,84$	$S = 0,99; S\bar{x} = 0,78; \Delta\bar{x} = 2,48; \varepsilon = \pm 3,81\%$

Слід ще раз підкреслити, що за методом Стаса-Отто клопідогрель та клопідогрель карбонова кислота із біологічного матеріалу не ізолюються.

Методи (таблиця 6.13. та 6.14.) О. О. Васильєвої та В. П. Крамаренка

дозволяють виділити достатньо велику кількість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу. Крім того, за цими методами ми отримували витяги, які практично не містять співекстрактивних речовин, що могли б заважати виявленню препаратів методом ТШХ. Кількісне визначення препаратів в цих витягах можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки, оскільки поглинання в контрольних дослідках для зазначених випадків практично відсутнє (не перевищує 5 % від поглинання у відповідних основних дослідках).

Найбільш експресним та зручним у виконанні методом ізолювання клопідогрелю з біологічного матеріалу є, на наш погляд, метод ізолювання хлороформом. Метод дозволяє швидко виділити від 60 до 80% препарату.

Слід зазначити, що клопідогрель карбонова кислота за цією методикою із біологічного матеріалу не ізолюється.

Пряме УФ-спектрофотометричне кількісне визначення клопідогрелю в витягах 5 та 7 є небажаним, оскільки для цих випадків поглинання в контрольних дослідках досягає 20 % від поглинання у відповідних основних дослідках. Після екстракційної та ТШХ-очистки поглинання в контрольних дослідках практично відсутнє.

І методика I, і методика II ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із крові дозволяють виділити достатньо велику кількість препаратів із крові. Проте, слід зазначити, що за методикою II ми отримуємо витяг, який практично не містить від співекстрактивних речовин, що могли б заважати виявленню препаратів методом ТШХ. Кількісне визначення препаратів в цьому витягу можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки.

За запропонованими методиками ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із сечі ми отримуємо витяги, які практично не містять співекстрактивних речовин. Кількісне визначення препаратів в цих витягах можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-

фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки.

Проведення кількісного визначення за методом ВЕРХ після ТШХ-очистки повністю дозволяє виключити вплив співекстрактивних речовин на результати аналізу.

Отримані результати опубліковано в літературі [148, 149]. *Бондарь В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В.* Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала. Фармация Казахстана. 2013. №7. С. 34 – 37.

6.9 Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопидогрель

Спрямований аналіз біологічного матеріалу на клопидогрель рекомендовано виконувати за схемою 1.

При виконанні спрямованого дослідження біологічного матеріалу на клопидогрель рекомендовано застосовувати методику ізолювання хлороформом (див. п. 6.1.4).

Ідентифікацію клопидогрелю проводять методом ТШХ на хроматографічних пластинах «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (див. п. 3.2.1.) наступним чином: на лінію старту хроматографічної пластини наносять в дві точки зазначену нижче кількість отриманого хлороформного витягу. Першу точку обробляють 10 % розчином натрію гідроксиду та висушують при кімнатній температурі. Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносять по 10 мкл хлороформних розчинів «свідків» – клопидогрелю та клопидогрель карбонової кислоти (концентрація 1 мг/мл). Пластину висушують та елюють в системі розчинників етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2).

Спрямований аналіз біологічного матеріалу на клопидогрель представлено на схемі 1.

Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі (для згущених витягів). За цих умов клопидогрель залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу. Хроматографування проводять в камері

об'ємом 500 см^3 , в яку вносять 50 мл систем розчинників. Камеру насичують впродовж 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становить 5 см.

Пластину проявляють на смугах 2 та 3, використовуючи методику проведення гідроксамової проби – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,88$). Далі пластину проявляють на смугах 1 та 4 5% розчином ферум (III) хлориду плями – спостерігають фіолетові плями ($R_f = 0,67$).

Для ідентифікації клопідогрелю використовують по 100 мкл отриманих хлороформних витягів. В випадку негативного результату по 1/10 частині отриманих хлороформних витягів випаровують на водяній бані до об'єму 0,3 – 0,5 мл і по 100 мкл згущених витягів використовують для ідентифікації клопідогрелю.

Визначення клопідогрелю проводять також методом ВЕРХ як за незміним препаратом, так і за його «маркером» – клопідогрель карбоновою кислотою. Ідентифікацію клопідогрелю проводять за основними хроматографічними параметрами клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти – абсолютними часом та об'ємом утримування та спектральними характеристиками (див. табл. 3.6).

Кількісне визначення клопідогрелю проводять за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл отриманого витягу до та після його ТШХ-очистки (див. розд. 6 та п. 6.6.).

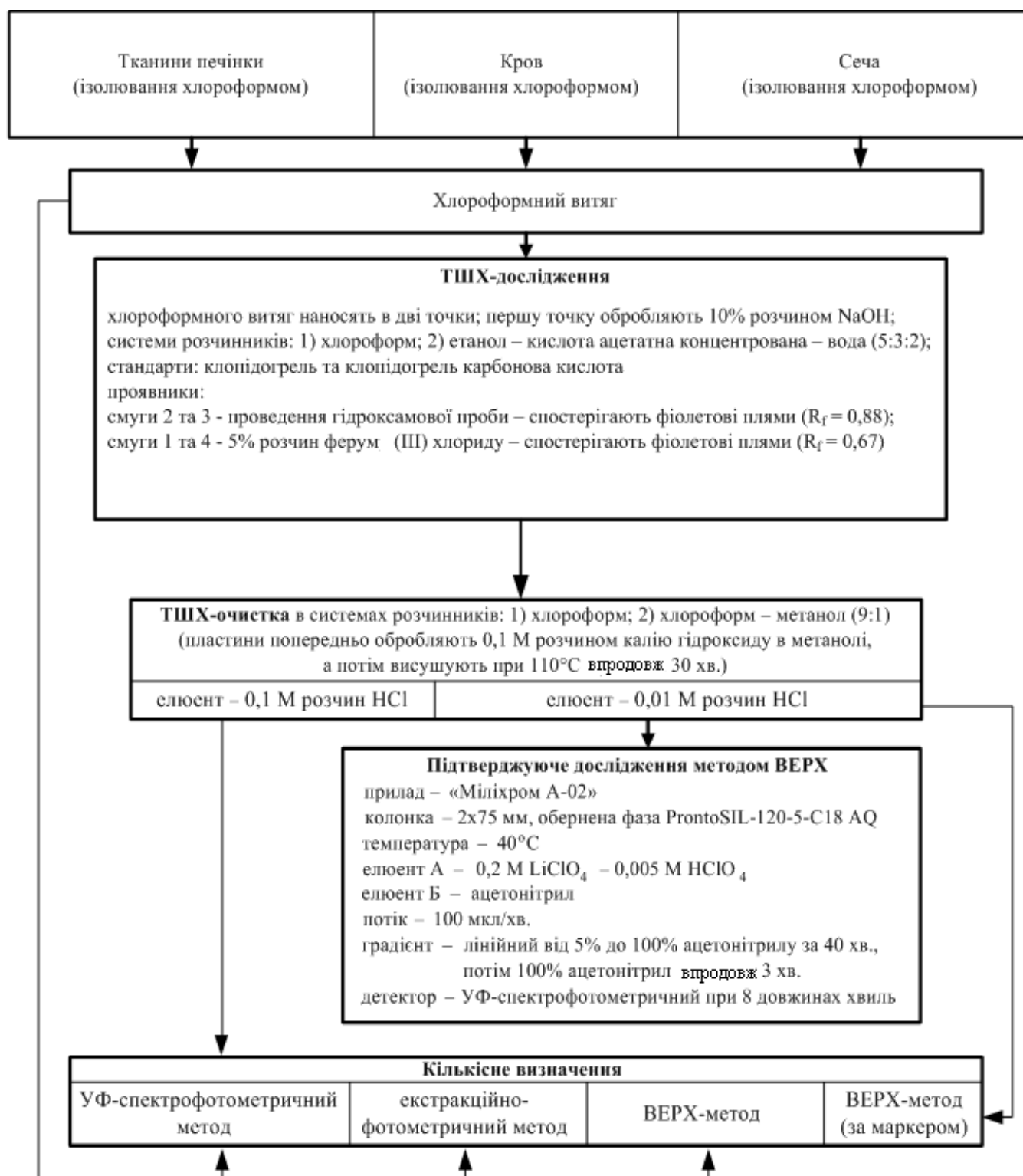


Схема 1. Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клонідогтель

Висновки до розділу 6

1. Вивчено умови ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з біологічного матеріалу на модельних сумішах з печінкою методами О. О. Васильєвої, Стаса-Отто та В. П. Крамаренка, П. Валова. З використаних методів для клопідогрелю найбільш ефективними є методи О. О. Васильєвої та В. П. Крамаренка, що дозволяють ізолювати до 60 % та 65 % досліджуваної речовини відповідно. Для клопідогрель карбонової кислоти найбільш ефективним є метод П. Валова, що дозволяє ізолювати до 80% досліджуваної речовини. За методом Стаса-Отто клопідогрель та клопідогрель карбонова кислота не ізолюється із біологічного матеріалу.
2. Запропоновано експресну методику ізолювання клопідогрелю хлороформом, що дозволяє виділити до 80% досліджуваної речовини.
3. Запропоновано методики ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з біологічних рідин організму (крові і сечі), що дозволяють виділити до 60 % досліджуваної речовини.
4. Запропоновано умови ідентифікації клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в отриманих витягах методом ТШХ.
5. Запропоновано методику ТШХ-очистки витягів із біологічного матеріалу.
6. Для кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти у витягах з біологічного матеріалу застосовано розроблені УФ-спектрофотометричну, екстракційно-фотометричну та ВЕРХ-методику як до, так і після ТШХ-очистки витягів.
7. Запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала . *Фармация Казахстана*. 2013. №7. С. 34 – 37. (Особистий внесок здобувача у роботі -60 % (особисто здобува-

чем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку).

2. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей . *Фармация Казахстана*. 2013. №9. С. 59 – 60. *(Особистий внесок здобувача у роботі – 60 % (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)).*
3. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка). *Український медичний альманах*.. 2013. Т. 16. №1 (додаток). С. 154. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 70 % (особисто здобувачем проведений збір інформаційних даних, проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)).*
4. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: Методичні рекомендації. Київ. 2014. .25с. *(Особистий внесок здобувача у роботі – 55 % (особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи)).*

ВИСНОВКИ

Вперше на основі комплексних систематичних досліджень наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання, що виявляється в розробці методів хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) клопідогрелю, обґрунтовано схему спрямованого ХТА біологічного матеріалу на клопідогрель, що містить методики його ізолювання із біологічного матеріалу, очищення отриманих витягів, ідентифікації та кількісного визначення.

1. Маркером клопідогрелю обрано його неактивний метаболіт - клопідогрель карбонову кислоту.
2. Розроблено чутливі методики ідентифікації клопідогрелю та його маркеру -клопідогрель карбонової кислоти за допомогою кольорових реакцій, ТШХ . – підібрано реактиви та системи розчинників, що дозволяють віддиференціювати їх один від одного, досліджено хроматографічну поведінку речовин в загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі системах розчинників, вивчено їх відношення до проявників, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу токсичних речовин.

За результатами досліджень вивчено поведінку клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ. Встановлено їх основні параметри утримування, спектральні відношення та основні параметри розділення піків речовин в умовах аналізу. Межа виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти ВЕРХ-методом – 80,0 нг в пробі.

3. Розроблено методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, придатні для ХТА (ВЕРХ, екстракційна фотометрія, УФ-спектрофотометрія).

Запропоновано методику екстракційно-фотометричного визначення клопідогрелю з використанням метилового оранжевого, що дає

можливість визначити діючу речовину у межах концентрацій 10,0 – 200,0 мкг в пробі.

Визначено умови аналізу клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра, придатні для ХТА. Встановлено, що препарат та його метаболіт можливо визначити у межах концентрацій 20,0 – 200,0 мкг/мл. Відносна невизначеність середнього результату для клопідогрелю становить $\pm 1,24 \%$, для клопідогрель карбонової кислоти $\pm 2,54 \%$.

Запропоновано методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти ВЕРХ-. Встановлено, що препарат та його метаболіт можливо визначити ВЕРХ-методом у межах концентрацій 1–400 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату для клопідогрелю $\pm 1,75 \%$, а клопідогрель карбонової кислоти – $2,02 \%$.

Встановлено, що всі розроблені методики не навантажені систематичною помилкою, а різниці між відповідними значеннями середньоквадратичної помилки та середніх результатів не є значущими, тобто результати кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти є відтворюваними та достовірними..

4. Встановлено оптимальні умови екстракції клопідогрелю та його метаболіту із водних розчинів –найбільш високий ступінь екстракції забезпечують хлороформ та діетиловий етер в кислому (для клопідогрель карбонової кислоти) та лужному (для клопідогрелю) середовищах. Гексан можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.
5. Вперше досліджено можливість застосування загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин кислотного та основного характеру – О. О. Васильєвої, Стаса–Отто та В. П. Крамаренка, Валова – для виділення

клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу. Встановлено ефективність ізолювання клопідогрелю з біологічного матеріалу за допомогою модифікованого методу Крамаренко— метод забезпечує виділення ~65% препарату, для клопідогрель карбонової кислоти – метод П.Валова, який дозволяє виділити до ~65% діючої речовини. Розроблено ефективні методики виділення клопідогрелю з біологічної тканини хлороформом. Із тканини печінки даним методом виділяється 81 % досліджуваної сполуки. Слід зазначити, що клопідогрель карбонова кислота за цією методикою із біологічного матеріалу не ізолюється.

6. Розроблено індивідуальні методики ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу за допомогою хлороформу та методики виділення клопідогрелю та його метаболіту з біологічних рідин організму (крові, сечі). Запропоновано методику очищення від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу із застосуванням методу ТШХ.
7. За результатами досліджень запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Capodanno D., Alberts M. J., Angiolillo D. J. Antithrombotic therapy for secondary prevention of atherothrombotic events in cerebrovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2016. Vol. 13. P. 609–622.
2. Айнетдинова Д. Х., Удовиченко А. Е., Сулимов В. А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам у больных ишемической болезнью сердца. *Рациональная фармакотерапия в Кардиологии*. 2007. № 3. С. 53–59.
3. Панченко Е. П. Концепция атеротромбоза – основа патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний. Основные направления антитромботической терапии. *Человек и лекарство*. 2005. № 7. С. 433–438.
4. Панченко Е. П. Атеротромбоз: механизмы развития и реально проводимая терапия. *Атеротромбоз*. 2008. № 1. С. 22–26.
5. Явелов И. С. Место клопидогреля в современном лечении острого коронарного синдрома. *Atherothrombosis, specialized medical journal*. 2020. № 1. P. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2020-1-72-81>.
6. Clopidogrel Response Variability: Etiology and Clinical Relevance / L. Bonello et al. *Current Cardiovascular Risk Reports*. 2015. Vol. 9, № 3. P. 1–9.
7. Anticoagulation with or without Clopidogrel after Transcatheter Aortic-Valve Implantation / V. J. Nijenhuis et al. *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 18. P. 1696–1707. DOI: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1915152> (Date of access: .12.02.2020).
8. Aspirin with or without Clopidogrel after Transcatheter Aortic-Valve Implantation / J. Brouwer et al. *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383, № 15. P. 1447–1457. DOI: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2017815> (Date of access: 12.02.2020).
9. Явелов И. С. Пероральные антиагреганты при коронарной болезни сердца: позиции клопидогреля. *Атеротромбоз*. 2013. № 2. С. 2–19.

10. Meta-analysis of clopidogrel pretreatment in acute coronary syndrome patients undergoing invasive strategy / R. Nairooz et al. *International Journal of Cardiology*. 2017. Vol. 229, № 15. P. 82–89.
11. Мировой банк: основные причины смертности в Украине. – Режим доступа: www.rus.newsru.ua. (09.02.2021)
12. Patti G., Micieli G., Cimminiello C., Bolognese L. The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovasc. Ther.* 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8703627> (Date of access: 12.02.2021).
13. Clinical Pharmacokinetics of Clopidogrel and Its Metabolites in Patients with Cardiovascular Diseases / M. Karaźniewicz-Łada et al. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014. Vol. 53, № 2. P. 155–164.
14. Effect of Clopidogrel on Thrombus Formation in an Ex Vivo Parallel Plate Flow Chamber Model Cannot Be Reversed by Addition of Platelet Concentrates or vWF Concentrate / J. Kira et al. *Anesthesia & Analgesia*. 2017. Vol. 124, № 4. P. 1091–1098.
15. Редькіна Є. А., Ткаченко Н. О., Гладишев В. В. Маркетингові дослідження українського ринку антиагрегантів. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 3-4. С. 12–15.
16. Компендиум 2019 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко. Київ: Морион, 2019. 2573 с. URL: https://compendium.com.ua/info/347044/klop-dogrel_-sanof-/ (дата звернення: 13.02.2021).
17. Державний формуляр лікарських засобів. URL: <https://www.moz.gov.ua/ua/portal/> (дата звернення: 13.02.2021).
18. Редькіна Є. А., Гладишев В. В., Бурлака Б. С., Пухальська І. О. Вивчення впливу допоміжних речовин на вивільнення клопідогрелю з ректальних супозиторіїв. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики*. 2018. Т. 11, № 1 (26). С. 74–78.
19. Редькіна Є. А., Гладишев В. В., Бурлака Б. С., Пухальська І. О. Вивчення впливу концентрації поверхнево-активних речовин на вивільнення клопі-

- догрелю з ректальних супозиторіїв. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2018. Т. 11, № 2. С. 185–189
20. Мамедов Н. М. Преимущества клопидогрела во вторичной профилактике ишемической болезни сердца: от механизма действия до клинических исследований. *Лечебное дело*. 2017. № 2. С. 74–78.
 21. The Hawaii clopidogrel lawsuit: the possible effect on clinical laboratory testing / A. Wu et al. *Personalized Medicine*. 2015. Vol. 12, №. 3. P. 111–125.
 22. Лысенко Г. И., Ткаченко В. И. Роль клопидогреля в профилактике сердечно-сосудистых катастроф. *Мистецтво лікування*. 2011. № 3 (79). С. 58–63.
 23. Platelet Function Analyzer-200 P₂Y Results Are Predictive of the Risk of Major Adverse Cardiac Events in Korean Patients Receiving Clopidogrel Therapy Following Acute Coronary Syndrome / H. H. Lim et al. *Ann. Lab. Med.*. 2018. Vol. 38, № 5. P. 413–419. DOI: <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.5.413> (Date of access: 13.02.2021).
 24. Липовецкий Б. М. Атеросклероз и его осложнения со стороны сердца, мозга и аорты. Руководство для врачей. Санкт–Петербург : Спец Лит, 2017. 210 с.
 25. Clopidogrel Pharmacogenetics / N. L. Pereira et al. *Circ. Cardiovasc. Interv.*. 2019. Vol. 12, № 4. e007811. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.119.007811> (Date of access: 13.02.2021).
 26. Лысенко Г. И., Ткаченко В. И. Роль клопидогреля в профилактике сердечно-сосудистых катастроф. *Дистанційне навчання*. 2011. № 3 (79) 2011. С. 58–66.
 27. Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) / N. Beckerath et al. *Trial. Circulation*. 2005. Vol. 8, № 112(19). P. 2946–50.

28. Martindale: The Complete Drug Reference / ed. by S. Sweetman. 33rd ed. London : Pharmaceutical Press, 2002. P. 863–981.
29. Jiang X.-L., Samant S., Lesko L.J., Schmidt S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *Clin. Pharmacokinet.* 2015. № 54. P. 147–166. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-014-0230-6> (Date of access: 13.02.2021).
30. Harmsze AM, Van Werkum JW, Moral F, Ten Berg JN, Hackeng CM, Klungel OH, et al. Sulfonylureas and on-clopidogrel platelet reactivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Platelets.* 2011. № 22(2). P.98–102.
31. Sibbing D, von Beckerath N, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Sarafoff N, et al. Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel. *Eur Heart J.* 2010. № 31(10). P. 1205–1211.
32. Holmberg MT, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Grapefruit juice inhibits the metabolic activation of clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther.* 2014. №95(3). P. 307–313.
33. Physicians` Desk Reference. 54th ed. Montvale : Medical Economics, 2000. P. 2756–2758.
34. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Москва : ООО «Изд-во «Новая волна», 2010. 1216 с.
35. Computer assisted substance identification in systematic toxicological analysis: New life for old methods? / R. Linden et al. *Forensic Science International.* 2010. Vol. 202, № 1. P. 53–60.
36. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel / J.-M. Pereillo et al. *Drug Metab. Dispos.* 2002. № 11. P. 1288–1295. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.30.11.1288> (Date of access: 13.02.2021).
37. Ultra-Performance LC MS/MS Method for Quantification of Clopidogrel Active Metabolite / X. Delavenne et al. *J. Sep. Sci.* 2010. № 33. P. 1968–1972. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201000115> (Date of access: 12.02.2021)
38. A sensitive and rapid ultra HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its derivatized active thiol metabolite in human plas-

- ma. *Journal of chromatography* / C.J. Peer et al. *Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012. № 1. P. 132–139.
39. Effectiveness of clopidogrel dose escalation to normalize active metabolite exposure and antiplatelet effects in CYP2C19 poor metabolizers/ R.B. Horenstein, et al. *J Clin Pharmacol*. 2014. № 58. P. 865–872. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcph.293> (Date of access: 13.02.2021).
 40. Методика измерений массовой концентрации метил-(+)-(8)-альфа-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротиено [3,2-с] пиридин-5(4H)-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: 23.02.2021).
 41. Luo Zhong-hua, Wen Jing-bing. Determination of Residual Solvents in Drug Substance of Clopidogrel Bisulfate by Static Headspace Gas Chromatography. *J. Natural. Sci. Hunan Normal Univ*. 2013. URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Determination-of-Residual-Solvents-in-Drug-of-by-Jingbing/b61377e5848ca2d2713d9fab9a275b9837ddc45d> (Date of access: 14.02.2021).
 42. Lynch S. S. Drug interactions. *MSD Manuals*. 2019. URL: <https://www.msdmanuals.com/en-jp/professional/clinical-pharmacology/factors-affecting-response-to-drugs/drug-interactions> (Date of access: 14.02.2021).
 43. Hobson A. R., Qureshi Z., Banks P., Curzen N. Gender and responses to aspirin and clopidogrel: insights using short thrombelastography. *Cardiovasc. Ther*. 2009. № 27. P. 246–252. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2009.00106.x> (Date of access: 12.02.2021).
 44. Zhou S.-F., Liu J.-P., Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab. Rev*. 2009. № 41. P. 89–295. DOI: <https://doi.org/10.1080/03602530902843483> (Date of access: 12.02.2021).

45. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed. / ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. London : The Pharm. Press, 2011. 2609 p.
46. Case of thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel / T. Fukusako et al. *Rinsho Shinkeigaku*. 2007. Vol. 47, № 10. P. 635–638.
47. Kocabay G., Okçular I., Akkaya V., Güler K. Suicide attempt with clopidogrel. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006. Vol. 25, № 12. P. 731–734.
48. Borderías C. L., Garrapiz L. J., Caballero G. Pulmonary haemorrhage and haemothorax after massive ingestion of clopidogrel as a suicide attempt. *Arch. Bronconeumol.* 2009. Vol. 45, № 11. P. 570–571. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.06.009> (Date of access: 13.02.2021).
49. Al Asmar R., Zeid F. Acute Hemothorax Causing Hemorrhagic Shock Following Small-bore Thoracocentesis in a Patient on Clopidogrel: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2020. Vol. 12, № 3. e7431. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.7431> (Date of access: 12.02.2021).
50. Протоколи лікування серцево-судинної системи : Наказ МОЗ України від 17.04.2014 № 275. Київ, 2014.
51. European Pharmacopea / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. 8th ed. Strasbourg, 2016. 2380 p.
52. Lin G.-Q., You Q.-D., Cheng J.-F. Chiral drugs: chemistry and biological action. Hoboken : Wiley, 2011. 472 p.
53. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : PIPEГ, 2001. 556 с.
54. Рувинюв Ю. В. Изучение фармакокинетики нового отечественного препарата содержащего клопидогрел : дисс. ... на соискание ученой степ. канд. биол. наук. Старая Куравна, 2011. 186 с.
55. Редькіна Є. А. Розробка складу, технології і дослідження ректальних супозиторіїв анти агрегатної дії з клопидогрелем : дис. ... на здобуття наук. ступ. канд. фармацевт. наук. Запоріжжя, 2020. 220 с.
56. Фармакопейная статья РФ14-03-2019 «Клопидогреля сульфат

- (Clopidogreli sulfas), 1-е изд. Москва. 2019. 15с.
57. British Pharmacopoeia / London United Kingdom. Vol. I. 2016. 1259 p.
 58. Antypenko L., Gladysheva S., Vasyuk S. Development and validation of clopidogrel bisulphate determination in bulk by UV spectrophotometric method. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2016. Vol. 3, № 2. P. 17–22.
 59. Pawaskar P. S., Dighe V. V., Adhyapak S. S., Shambhu N. S., Mestry D Y. 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-Chloro phenyl)-4,5-Dihydrothieno[2,3-c]pyridine-6(7H)-acetate, Hydrochloride from Clopidogrel Besylate. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*. 2013. Vol. 2, № 1. P.19–23.
 60. Karazniewicz-Lada M., Glowka F., Oszkinis G. Capillary Zone Electrophoresis Method for Determination of (+)-S Clopidogrel Acid Metabolite in Human Plasma and Urine Designed for Biopharmaceutic Studies. *J. Chromatogr. B*. 2010. № 878. P. 1013–1018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.033> (Date of access:11.02.2021).
 61. Liquid Chromatographic and Potentiometric Methods for Determinations of Clopidogrel / Amr Lotfy Saber. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008. Vol. 16, № 2. P. 11–18.
 62. Mohan A. Identification and characterization of a principal oxidation impurity in clopidogrel drug substance and drug product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. № 47 (1). P. 183–189.
 63. Сравнительная оценка содержания примесей в лекарственных средствах, содержащих клопидогреля бисульфат / С. Б. Сеткина и др. *Вестник фармации*. 2014. № 2 (64). С. 50–58.
 64. Чекман І. С., Геращенко І. І. Порівняльне вивчення фізико-хімічних показників оригінального та генеричного препаратів клопідогрелю. *Фармацевтичний журнал*. 2006. № 2. С. 100–104.
 65. Влияние биофармацевтических факторов на эквивалентность in vitro

- воспроизведенных лекарственных средств на основе клопидогреля /С.Б. Сеткина и др. / *Вестник фармации*. 2014. № 1(63). С. 33-38.
66. Nawal Alarfaj A. Stability Indicating Liquid Chromatography for Determination of Clopidogrel bisulphate in Tablets: Application to Content Uniformity Testing. *J. Saudi Chem. Soc.* 2012. Vol. 16, № 1. P. 23–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.10.016>. (Date of access: 11.02.2021).
 67. Development and Validation of UV-Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Clopidogrel Bisulfate in Bulk and Tablet Dosage Form / L. D. Patil et al. *Der. Pharm. Chem.* 2013. № 5. P. 282–287.
 68. Patel R. B., Shankar M. B., Patel M. R., Bhatt K. K. Simultaneous Estimation of Acetylsalicylic Acid and Clopidogrel Bisulphate in Pure Powder and Tablet Formulation by High-Performance Column Liquid Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *J. AOAC Int.* 2008. № 91. P. 750–755.
 69. Samer Housheh, Trefi S., Mohammad Haroun, Chehna M. F. A Novel GC-MS for the Determination of Clopidogrel Bisulfate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms. *J. Chem. Pharm. Sci.* 2014. № 7. P. 312–316.
 70. In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/ quadrupole-time-of-flight mass spectrometry / E. Tyrkko et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. Vol. 405. P. 6697–6709.
 71. Shin B. S., Yoo S. D. Determination of Clopidogrel in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectroscopy: Application to a Clinical Pharmacokinetic Study. *Biomed. Chromatogr.* 2007. № 21. P. 883–889.
 72. Assay Method for the Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry / P. Lagore et al. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 2008. Vol. 720, Iss. 1-2. P. 107–117. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00452-6) (Date of access: 14.02.2021).
 73. Anuta V., Sarbu I., Mircioiu I., Velescu B. S. Development of a New HPLC

- Method for Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Major Metabolite Using a Chemometric Approach. *Curr. Heal. Sci. J.* 2015. № 41. P. 11–21.
74. Pawan K. Porwal, Akhalaque Ahmed R. A., Chhajed S. S., Chatpalliwar V. A. Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantitation of Clopidogrel, Aspirin and Atorvastatin in Rat Plasma and its Application to the Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. Sci.* 2015. № 53. P. 1155–1162. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu210>. (Date of access: 14.02.2021).
75. Rupali Sajjanwar, Shyamala Bhaskaran, Kulesh Kalati, Shailendra Kumar Jha. A Validated Reverse Phase HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Clopidogrel Bisulphate and Rivaroxaban in Pharmaceutical Application. *J. App. Pharm. Res.* 2015. № 3. P. 9–16.
76. Phani Kumar V., Sunandamma Y. Simultaneous Determination of Clopidogrel and Pioglitazone by High Performance Liquid Chromatography in Bulk Drug and Dosage Forms. *Int. J. Pharm. Sci.* 2013. № 2. P. 1–9.
77. Nitesh K. Patel, Gunta Subbaiah, Hiten Shah, Mohan Kundlik, Pranav S. Shrivastav. Rapid LC–ESI–MS–MS Method for the Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Carboxylic Acid Metabolite in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science*. 2008. Vol. 46. P. 867–875.
78. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology/ A.Mitakos et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. № 28. P. 431–438.
79. Yu-Han Li, Min Song, Tai-Jun Hang. Development of an LC–MS/MS method for determination of 2-oxo clopidogrel in human plasma. *J. Pharm. Anal.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 12–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.07.004> (Date of access: 12.02.2021).
80. Patel N. K., Subbaiah G., Shah H., Kundlik M., Shrivastav P. S. Rapid LC–ESI–MS–MS Method for the Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Carboxylic Acid Metabolite in Human Plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 2008. № 46. 867–875. URL: <https://academic.oup.com/chromsci/article/46/10/867/450186> (Date of access:

- 13.02.2021).
81. Zacharis C. K., Vastardi E. A. Validated LC Method for the Determination of Enantiometric Purity of Clopidogrel Intermediate Using Amylase-Based Stationary Phase. *Chromatographia*. 2015. № 78. P. 819–824. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-015-2892-0> (Date of access: 14.02.2021).
 82. Sensitive and Rapid Ultra HPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Detection of Clopidogrel and its Derivated Active Thiol Metabolite in Human Plasma / C. Peer et al. *J. Chromatogr. B*. 2012. № 880. P. 132–139. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570023211007604> (Date of access: 11.02.2021).
 83. Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method to Determine Clopidogrel in Human Plasma. Use of incurred samples to test back-conversion / L. Silvestro et al. *J. Chromatogr. B*. 2010. № 878. P. 3134–3142.
 84. Simultaneous Quantitation of Acetylsalicylic Acid and Clopidogrel Along with their metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / Y. S. Chhonker. *Biomed. Chromatogr.* 2016. № 30. P. 466–473.
 85. Quantification of Clopidogrel in Human Plasma by Sensitive Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry / R. V. Nirogi et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. № 20. P. 1695–1700. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.2497> (Date of access: 10.02.2021).
 86. HPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Clopidogrel, its Carboxylic Acid Metabolite and Derivated Isomers of Thiol Metabolite in Clinical Samples / Karazniewicz-Lada M. et al. *J. Chromatogr. B*. 2012. № 911. P. 105–112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.11.005> (Date of access: 10.02.2021).
 87. Bahrami G., Mohammadi B., Sisakhtnezhad S. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Inactive Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Serum: Application to a Bioequivalence Study. *J.*

- Chromatogr. B.* 2008. № 864. P. 168–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.049> (Date of access: 10.02.2021).
88. Alireza Foroumadi, Hoda Lavasani, Lida Hakemi. Sensitive Quantification of Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Plasma by LC with UV Detection. *Chromatogr.* 2009. № 70. P. 953–956.
89. Serra H., Bronze Mdo R., Simplicio A. L. Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Carboxylic Acid Metabolite by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 2010. № 878. P. 1480–1486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.044> (Date of access: 10.02.2021).
90. bin-Ibrahim S. F., Alarfaj N. A., Aly F. A. Determination of Clopidogrel bisulphate Using Ion-Selective Electrodes in Bulk, Pharmaceutical Formulation and in Biological Fluids. *Journal of American Science.* 2012. Vol. 8, № 12. P. 276–283.
91. Development of a sensitive and fast UHPLC–MS/MS method for determination of clopidogrel, clopidogrel acid and clopidogrel active metabolite H4 in human plasma / Wenyi Hua et al. *Bioanalysis.* 2015. Vol. 7, № 12. P. 1471–1482.
92. Nordgren H. K., Bodin K., Beck O. Chromatographic screening for clopidogrel and metabolites in urine using liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry techniques. *Ther. Drug Monit.* 2002. Vol. 24, № 3. P. 410–416.
93. Croitoru O., Spiridon A. M., Belu I., Turcu-Ştiolică A., Neamţu J. Development and Validation of An HPLC Method for Simultaneous Quantification of Clopidogrel Bisulphate, its Metabolite and Atorvastatin in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Anal. Meth. Chem.* 2015. № 2015. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/892470> (Date of access: 10.02.2021).
94. Дорофеев В. Л., Арзамасцев А. П. Стандартные образцы для фармакопейного анализа. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2010. Т. 8, № 5. С. 6–10.

95. European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance/ Directorate for the Quality of Medicines. *CRS. EDQM*. 2014. 1240p.
96. The United States Pharmacopoeia 29th revision. / National formular 24th edition (USP 29-NF24). 2009. 1460p.
97. The United State Pharmacopoeia 30th revision. / National formular 25th edition (USP 30 NF 25). 2007. 1280p.
98. Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств. Москва : Мысль, 1993. 272 с.
99. Арзамасцев А. П. Выявление фальсифицированных лекарственных средств с использованием современных аналитических методов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2004. Т. 38. № 3. С. 48–51.
100. О.А. Горошко. Сорбенты для тонкослойной хроматографии в фармацевтическом анализе. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010. Т. 44, № 9. С.53–56.
101. Бондар В. С., Аносова Л. С. Розробка методів ідентифікації клопідогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. *Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес.* 2010 р.. Харків. 2010. Т. 1. С. 137.
102. Фицев И. М., Блохин В. К., Будников Г. К. Хроматографические методы в криминалистической экспертизе. *Журнал аналитической химии*. 2004. Т. 59, № 12. С. 1289–1298.
103. Бондар В. С., Багуля А. В. Качественные реакции и ТСХ в химико-токсикологическом анализе дифенина. *Фармация Казахстана*. 2013. № 7. С. 38–40.
104. Хіжніченко О. В., Гудзенко Н. В., Чубенко О. В. Хіміко-токсикологічне дослідження нових лікарських засобів – потенційних об'єктів немедичного використання методом хроматографії у тонких шарах сорбенту. *Фармац. журн.* 2012. № 6. С. 74–78.
105. Мерзлікін С. І., Бондар В. С., Болотов В. В. Застосування хроматографії

- в тонких шарах сорбенту для ідентифікації субстанції діакамфу та її технологічних домішок. *Вісник фармації*. 2002. № 1 (29). С. 14–16.
106. Раменская Г.В., Родионова Г.М., Кунецова Н.И., Петухова А.Е. ТСХ–скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией. Москва: ГЭОТАР–Медиа, 2010. 240 с.
 107. Петюнін Г. П., Хіжніченко О. В. Визначення декстропропаксифену в біологічному матеріалі методом високоефективної рідинної хроматографії. *Фармацевтичний журнал*. 2011. № 3. С. 65–70.
 108. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі кетотифену / В. В. Болотов та ін. *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, № 5. С. 40–42.
 109. Перспективы применения высокоэффективной жидкостной хроматографии в скрининговом анализе / Г. И. Барам та ін.. *Журнал хроматографічного товариства*. 2004. Т. IV. №1. С. 11 – 20.
 110. Барам Г. И. Хроматограф “Миличром А–02“. Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ–УФ». Новосибирск : ЗАО Институт хроматографии, 2005. 64 с.
 111. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар та ін. *Український медичний альманах*. 2013. . Т. 16, №1. . С. 50 – 52.,
 112. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоефективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.
 113. Eissa M. S., Abou Al M. S. Alamein Innovative spectrophotometric methods for simultaneous estimation of the novel two–drug combination: Sacubitril/Valsartan through two manipulation approaches and a comparative statistical study. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 193, № 3. – P. 365–374. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.050> (Date of access: 14.02.2021).
 114. Validated Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Buprenorphine and Naloxone in Pharmaceutical Dosage Forms / E. Sourı et al.

- Iran. J. Pharm. Res.* 2017. Vol. 16, № 1. P. 112–119.
115. Helmy A. G., Abdel-Gawad F. M., Mohamed E. F. Spectrophotometric study on Determination of Aripiprazole in Tablets by Charge–Transfer and Ion–Pair Complexation Reactions with Some Acceptors. *Asian J. Pharm. Anal.* 2012. Vol. 2, № 1. P. 12–19.
 116. Vinay K. B., Revanasiddappa H. D., Rajendraprasad N., Basavaiah K. Sensitive, selective and extraction–free spectrophotometric determination of lamotrigine in pharmaceuticals using two sulphonthalein dyes. *Thai. J. Pharm. Sci.* 2011. Vol. 35, № 2. P. 65–75.
 117. Spectrophotometric method development and validation for determination of chlorpheniramine maleate in bulk and controlled release tablets / M. Ashfaq et al. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2018. Vol. 31, Suppl. 1. P. 353–358.
 118. Бушуев Е. С., Бабаханен Р. В., Соловьева Т. Л. Применение спектрофотометрии в химико-токсикологическом анализе. Санкт–Петербург : ВВМ, 2006. 126 с.
 119. Omar M. A., Derayea S. M., Abdel-Lateef M. A., El Hamd M. A. Derivatization of labetalol hydrochloride for its spectrofluorimetric and spectrophotometric determination in human plasma: Application to stability study. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 190, Iss. 5. P. 457–463. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.059> (Date of access: 14.02.2021).
 120. Вергейчик Т. Х., Линникова В. А., Гуськова Г. Б. Использование УФ–спектрофотометрии для выявления условий экстракции метапрота из водных растворов. *Фармация и фармакология.* 2014. № 5 (6). С. 11–16.
 121. Oguegbulu N. E., Uche I. F. Extraction and detection of the quarternary alkaloids of the stem bark of *Alstonia boonei* plant by the sulphonphthalein dye–stuff ion–pair complexation at pH 5,58. *J. Pharm. and Biomed. Sci.* 2012. Vol. 15, № 15. P. 1–3.
 122. Thin-Layer Chromatography: a modern practical approach. /Wall P. E. *Royal society of chemistry.* 2005. 184 p.

123. Clarke's analysis of drugs and poisons. /Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.
124. Придатність аналітичних методів для конкретного застосування: Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань. ДП "Укр-метрестестстандарт" .Друге видання. Київ, 2016.
125. Bioanalytical Method Validation : Guidance for Industry / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration ; Center for Drug Evaluation and Research (CDER) ; Center for Veterinary Medicine (CVM). *Biopharmaceutics*. 2013. 28 p. URL: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf> (Date of access: 12.02.2021).
126. Клименко Л. Ю. Комплексний підхід до розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в хіміко-токсикологічному аналізі: дис. ... на здобуття наук. ступ. доктор. фармацевт. наук. Харків, 2015. 816 с.
127. Грызодуб А. И. Стандартизированные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств. Харьков, 2016. 396 с.
128. Болотов В. В., Ткаченко В. Г. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення лопераміду. *Вісник фармації*. 2002. № 4 (32). С. 12–14.
129. Екстракційно-фотометричне визначення галідору / С. В. Баюрка та ін. *Вісник фармації*. 2001. № 4 (28). С. 30–32.
130. Бондар В. С., Аносова Л. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю . *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44.
131. Meyer V. R. Practical High–Performance Liquid Chromatography. 5th ed. New York : Wiley–VCH, 2010. 426 p.
132. Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous quantitation of clopidogrel bisulphate and aspirin in bulk drug / P.M.Chatrabhuji, et al. *Analytical Chemistry An Indian Journal*. 2014. Vol. 15, № 2. P. 43-48.

133. Красных Л.М., Карлицкая А.А., Исмагилов Т.Д., Салар Еиса задеф. Количественное определение клопидогрела в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором. *Биомедицина*. 2011. № 4. С. 96-97.
134. Determination of Clopidogrel Carboxylic Acid in Human Plasma by LC-MS/MS / Mohamed El-Husseiny El-Sadek et al. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 2. P. 447-455. DOI: <https://doi.org/104236/ajac.2011.24054>. (Date of access: 14.02.2021).
135. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.
136. Мелентьев А. Б. Влияние pH среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно–основными свойствами. *Судебно–медицинская экспертиза*. 2003. № 2. С. 40–43.
137. Мірошніченко Ю. О. Дослідження ступеня екстракції кетотифену із водних розчинів органічними розчинниками. *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, № 1. С. 164.
138. Шорманов В. К., Андреева Ю. В., Омельченко В. А. Экстракция флу-тамида из водных растворов. *Судебно–медицинская экспертиза*. 2014. Т. 57, № 5. С. 18–20.
139. Дармограй Н. М., Галькевич І. Й. Вивчення умов екстракції міртазапіну органічними розчинниками з водних розчинів. *Фармацевтичний часопис*. 2012. № 1. С. 37–39.
140. Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid / Anosova L. S. et al. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo. Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76.
141. Загальні методи ізолювання отруйних та сильнодіючих речовин із біологічного матеріалу : метод. рек. / В. Г. Бурчинський та ін. Одеса : Астропринт, 2010. 44 с.
142. Болотов В. В. Вивчення методів ізолювання клопідогрель карбонової

- кислоти з об'єктів біологічного походження. *Вісник фармації*. 2008. №3 (55). С. 20 – 22.
143. Методы изолирования кетотифена из тканей печени / Ю. А. Мирошниченко и др. *Фармация Казахстана*. 2013. № 7. С. 41–44.
144. Бондар В. С., Багуля А. В. Сравнительная оценка методов изолирования дифенина из биологического материала. *Фармация Казахстана*. 2013. № 10. С. 32–35.
145. Осипчук Л. І., Галькевич І. Й. Методи виділення силденафілу з біологічного матеріалу. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2013. № 3–4. С. 42–45.
146. Дармограй Н. М., Галькевич І. Й. Розробка умов ізолювання міртазапіну з біологічного матеріалу. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики* : зб. наук. ст. 2012. № 10. С. 46–48.
147. Baiurka S., Karpushina S. Detection and determination of venlafaxine in liver tissue by colour tests, TLC, UV–spectroscopy, HPLC with multi–wave detection. *J. Chem. Pharm. Res.* 2013. Vol. 5, № 12. P. 1110–1120.
148. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Ізолювання клопідогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка). *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1 (додаток). С. 154.
149. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала. *Фармация Казахстана*. 2013. №7. – С. 34 – 37.

ДОДАТКИ

Додаток А. Список публікацій

1. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. *Фармацевтичний часопис*. 2012. №4 (24). С. 73 – 78. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 80% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
2. Бондар В. С., Аносова Л. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 80% - (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконані експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
3. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії . *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16, №1. С. 50 – 52. *(Особистий внесок здобувача у роботі -65% - (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
4. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала . *Фармация Казахстана*. 2013. №7. С. 34 – 37. *(Особистий внесок здобувача у роботі -60% (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
5. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей . *Фармация Казахстана*. 2013. №9. С. 59 – 60. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 60% (осо-*

бисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку)).

6. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Ізолювання клопидогрелю водою, підкисленою кислотою сульфатною (модифікований метод В. П. Крамаренка) . *Український медичний альманах*.. 2013. Т. 16. №1 (дода-ток). С. 154. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 70% (особисто здобувачем проведений збір інформаційних даних, проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*
7. Bondar V. S. Anosova L. S. Development of the isolation procedure for clopi- dogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, 2013. Kharkiv. Kharkiv: NUPh, 2013. P. 76. *(Особистий внесок здобувача у ро- боті - 80% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних дже- рел, виконано експериментальні дослідження, підготовлено статтю до друку))*
8. Аносова Л. С., Бондар В. С.Необходимость химико-токсикологического исследования клопидогреля. Впровадження сучасних наукових досяг- нень в судову експертизу: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з між- нар. участю, присвяч. 140-річчю з дня народж. Засл. проф. М. С. Бокарі- уса та 110-річчю з дня народж. проф. М. М. Бокаріуса, 10 – 11 верес. 2009 р., Харків. 2009. С. 302 – 304. *(Особистий внесок здобувача у ро- боті - 95% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних дже- рел, матеріал підготовлен до друку))*

9. Бондар В. С., Аносова Л. С. Розробка методів ідентифікації клопідогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу. Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. 2010. Т. 1. С. 137. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 90% (особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовлен матеріалу до друку))*
10. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Застосування тонкошарової хроматографії для аналізу клопідогрелю та його метаболіту. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича, 12 – 13 квітня 2018 р., Харків. 2018. – С. 358. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 60% (особисто здобувачем проведено експериментальну хімічну частину дослідження, підготовлено статтю до друку))*.
11. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: Методичні рекомендації. Київ. 2014. .25с. *(Особистий внесок здобувача у роботі - 55% (особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи))*.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. Всеукраїнській науково-практичній конференції: «Впровадження сучасних наукових досягнень в судову експертизу (Харків, 10-11 вересня 2009, форма участі – публікація тез).
2. ІV Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 15-17 вересня, 2010, форма участі – публікація тез).
3. Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю з дня народження професора О.М. Гайдукевича «Сінтез та аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 25-26 квітня 2013, форма участі – публікація тез).
4. XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo «Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid. Actual Questions of Development of New Drugs» (Kharkiv, April 25 – 26, 2013., форма участі – публікація тез).
5. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 140-річчю з дня народження Заслуженого проф. М. С. Бокаріуса та 110-річчю з дня народження проф. М. М. Бокаріуса (Харків, 2018).

Додаток Б. Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

з науково-педагогічної роботи

Львівського національного

медичного університету

імені Данила Галицького,

чл.-корр. АМН України



М. Р. Гжегоцький

Метопіда 2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;

професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідуючий кафедрою
токсикологічної та аналітичної хімії,
к. фарм. н., доц.

Кучер М. М.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ДЗ «Луганський державний
медичний університет»
проф. Ю.Г. Пустовий
«18» «*вересня*» 2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес та науково-дослідну роботу кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет» в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

*Зав. кафедрою фармацевтичної
хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ»,
д.біол.н., професор*

Відповідальний за впровадження:

*Доцент кафедри фармацевтичної
хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ», к.фарм.н*

О.А. Орлова

В.Г. Ткаченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор

Харківської медичної
академії післядипломної
освіти, професор

О. М. Хвисяк

2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти.

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідуючий кафедрою
клінічної біохімії, судово-медичної
токсикології та фармації,
доктор фармацевтичних наук, професор



Г. П. Петюнін



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор

Донецького національного
медичного університету

ім. М. Горького,

дл.-кор. НАМН України

Ю. В. Думанський

3 листопада 2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**1. Назва пропозиції для впровадження:**

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;

професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондар, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри хімії Донецького національного медичного університету ім. М. Горького в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідуючий кафедрою хімії,
д-х. н., проф.

Матвієнко А. Г.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукових робіт
Запорізького державного
медичного університету,
професорВ.О.Туманський
2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення дифеніну, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Багуля О. В.

3. Джерела інформації:

1. Бондар, В. С. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі дифеніну / В. С. Бондар, О. В. Багуля // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 45 – 47.
2. Бондарь, В. С. Качественные реакции и ТСХ в химико-токсикологическом анализе дифенина / В. С. Бондар, А. В. Багуля // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 38 – 40.
3. Бондар, В. С. Розробка умов визначення дифеніну методом газо-рідинної хроматографії, придатних для цілей хіміко-токсикологічного аналізу / В. С. Бондар, О. В. Багуля, О. В. Байдак // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 53 – 54.
4. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на дифенін: методичні рекомендації / В. С. Бондар, О. В. Багуля. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри токсикологічної і неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідуючий кафедрою
токсикологічної і неорганічної хімії,
д. фарм. н., проф.

Панасенко О. І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор

Івано-Франківського
національного медичного
університету, професор

М. М. Рожко

29 жовтня 2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри хімії фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідуючий кафедрою
хімії фармацевтичного факультету,
д. х. н., доц.

Стецьків А. О.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор

Національного
фармацевтичного
університету,

чл.-кор. НАН України, проф.

В. П. Черних

2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;

професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки студентів.

Завідуюча кафедрою
токсикологічної хімії,
д. х. н., проф.



Журавель І. О.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського, МОЗ України
д.бїод.н., професор

І. М. Кліщ

20 грудня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, які придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Валентинівська, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондар В. С., Аносова Л. С. Високоефективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю. Фармацевтичний часопис. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.
2. Бондар В. С., Аносова Л. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю. Український медичний альманах. 2012. Т. 15, №5. С. 43 – 44.
3. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Український медичний альманах. 2013. Т. 16, №1. С. 50 – 52.
4. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала. Фармация Казахстана. 2013. №7. С. 34 – 37.
5. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей. Фармация Казахстана. 2013. №9. С. 59 – 60.
6. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: Методичні рекомендації. Київ. 2014. 25 с.

4. Впроваджено:

В навчальний процес кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України в лекційний курс при вивченні теми «Хіміко-токсикологічне дослідження речовин, що ізолюються полярними розчинниками».

5. Термін впровадження: жовтень – листопад 2020 р.

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації. Результати наукових досліджень можуть бути використані для підготовки слухачів.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії,
д.фарм.н., проф.



Л. С. Логойда

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник

Харківського обласного бюро
судово-медичної експертизи

Кравченко Ю. М.

28 жовтня 2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В роботу відділення судово-медичної токсикології Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи.

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані при судово-токсикологічних дослідженнях.

Завідуюча відділенням
судово-медичної токсикології



Рибалка Л. І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник

Житомирського обласного бюро
судово-медичної експертизи

Данилюк В. В.

2013 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В роботу відділення судово-медичної токсикології Житомирського обласного бюро судово-медичної експертизи.

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані при судово-токсикологічних дослідженнях.

Судовий експерт токсиколог

І.О.Нефьодов

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник

Херсонського обласного бюро
судово-медичної експертизиЛисенко Є. М.
18 грудня 2014 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В роботу відділення судово-медичної токсикології Херсонського обласного бюро судово-медичної експертизи.

5. Термін впровадження: вересень – грудень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані при судово-токсикологічних дослідженнях.

Завідуюча відділенням
судово-медичної токсикології



Ерліш О. О.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник КУ

Черкаське обласне бюро
судово-медичної експертизи "

Федоренко М.А.

2013 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методики ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю, що придатні для хіміко-токсикологічних досліджень.

2. Установа, її адреса, виконавці:

кафедра токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету,
м. Харків, вул. Блюхера, 4;
професор Бондар В. С., аспірант Аносова Л. С.

3. Джерела інформації:

1. Бондарь, В. С. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биоматериала / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 34 – 37.
2. Бондар, В. С. Екстракційно-фотометричне визначення клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 43 – 44.
3. Бондар, В. С. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі клопідогрелю / В. С. Бондар, Л. С. Аносова // Фармацевт. часоп. – 2012. – №4 (24). – С. 73 – 78.
4. Бондар, В. С. Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 50 – 52.
5. Бондар, В. С. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель: методичні рекомендації / В. С. Бондар, Л. С. Аносова, З. В. Шовкова. – Харків: Вид-во НФаУ, 2013. – 20 с. (проект).

4. Впроваджено:

В роботу відділення судово-медичної токсикології Черкаського обласного бюро судово-медичної експертизи.

5. Термін впровадження: вересень – жовтень 2013 р.**6. Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.

Результати наукових досліджень можуть бути використані при судово-токсикологічних дослідженнях.

Завідуючий відділенням
судово-медичної токсикології

Савченко М. А.

Додаток В. Методичні рекомендації «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на клопідогрель»

Міністерство охорони здоров'я України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

“УЗГОДЖЕНО”

Директор Департаменту реформ
та розвитку медичної допомоги

МОЗ України

М. Хобзей

15. 04

2014 р.

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА КЛОПІДОГРЕЛЬ**

(методичні рекомендації)

(29.14/59.14)

Київ – 2014