МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АНОСОВА ЛЮДМИЛА СЕРГІЇВНА

УДК 615.225.4:547.821:543.544.42.062:535.24

ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України, м. Харків.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
БОНДАР ВОЛОДИМИР СТЕПАНОВИЧ
Донецький національний медичний університет, професор кафедри фармації та фармакології

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
ПАРЧЕНКО ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ
Запорізький державний медичний університет,
професор кафедри природничих дисциплін для іноземних студентів і токсикологічної хімії

кандидат фармацевтичних наук, доцент
ПОЛЯК ОЛЬГА БОГДАНІВНА
Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського,
доцент кафедри фармацевтичної хімії

Захист відбудеться «06» травня 2021 р. о 13-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 у Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий "__" квітня 2021 року

В. о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
професор О. А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 антиагрегації 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 використовували 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 проведені 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. описани 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 твердих 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 тонкошарової хроматографії (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 високоефективної рідинної хроматографії (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 pH 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 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-методики 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 Тернопільского 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 «Сінтез 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).

Публікації. Матеріали даної дисертаційної роботи опубліковано у 11 наукових роботах, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях (2-за кордоном), 5 тез доповідей, 1 методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, 6 розділів власних експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків (18 с.). Загальний обсяг дисертації становить 220 сторінок. Робота ілюстрована 47 таблицями та 14 рисунками, 1 схемою. Список використаних джерел нараховує 149 найменувань, з них кирилицею – 60 та латиницею – 89.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Клопідогрель: фармакологічні та токсикологічні властивості; методи аналізу (огляд літератури)

Клопідогрель – представник антиагрегантних лікарських засобів, що застосовуються в медичній практиці для лікування серцево-судинної системи. Клопідогрель за хімічною структурою є метил-(+)-(S)-альфа-(о-хлорфеніл)-6,7-дигідротієно[3.2-с]піридин-5(4Н)-ацетатом.

На рис. 1 та 2 приведені формули клопідогрелю та його неактивного метаболіту клопідогрель карбонової кислоти

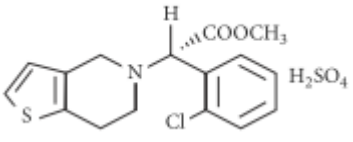


Рис. 1 Структурна формула клопідогрелю.

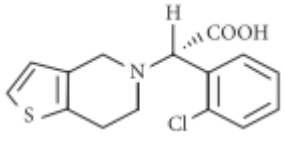


Рис. 2 Структурна формула метаболіту-клопідогрель карбонової кислоти

В даному розділі описано основні фізико-хімічні та фармакологічні властивості клопідогрелю, розглянуто особливості їх фармакокінетики та фармакодинаміки. Розглянуто спектр побічних реакцій, викликаних досліджуваним

препаратом, фактори та причини, що зумовлюють легеневу кровотечу при тривалій терапії чи передозуванні клопідогрелем, чим зумовлені летальні випадки отруєнь та суїциду. За результатами аналізу літературних джерел обґрунтовано доцільність досліджень, присвячених розробці методик ізолювання, ідентифікації та кількісного визначення клопідогрелю і його метаболіту в біологічному матеріалі, на основі чого зроблено висновок про актуальність розробки методів системного хіміко-токсикологічного аналізу цього лікарського засобу.

Розділ 2. Об'єкти та методи дослідження

В розділі наведено характеристики речовин, розчинників, реактивів, які використовуються для проведення досліджень, описується методика приготування стандартних розчинів та реактивів. Викладено інформацію щодо методів, які було використано в роботі.

Розділ 3. Розробка методів виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти

Вивчено реакційну здатність клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення. За результатами експериментальних досліджень вибрано реакції з реагентами з межею виявлення 1 мкг клопідогрелю чи клопідогрель крбонової кислоти в пробі: з реактивами Вагнера, Бушарда, Драгендорфа, Драгендорфа (в модифікації за Муньє), Маркі, Манделіна, реагують також з розчином кобальту тіоціонату. Клопідогрель, на відміну від його метаболіту, дає реакцію гідроксамової проби. Клопідогрель карбонова кислота реагує з реактивом ФПН (суміш розчину хлориду заліза(III), хлорної і нітратної кислот) .

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

Визначено рухливість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти на пластинках високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ), Sorbfil та Alugram Sil в 27 системах розчинників для тонкошарової хроматографії (ТШХ) аналізу, серед яких є такі, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)). Опрацьовано склад підтверджуючих систем розчинників для розділення досліджуваного препарату з основним структурним метаболітом 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 Для візуалізації зон клопідогрелю та клопідогрель карбрнової кислоти на пластинках використано опромінення УФ-світлом (λ = 278 нм) та обробку реактивом Драгендорфа. Дані наведені в таблиці 1.

Ідентифікували клопідогрелю за продуктом лужного гідролізу - клопідогрель карбоновою кислотою - методом ТШХ наступним чином: 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 розміром 10 х 10 см в камері об'ємом 500 $см^3$, в яку вносили 50 мл систем розчинників. Камеру насичували впродовж 30 хв.

Таблиця 1

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	ВЕТШХ	Alugram	Sorbfil	ВЕТШХ	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
н-бутанол – кислота ацетатна концентрована – вода (1:1:1)	0,88	0,81	0,79	0,68	0,65	0,70
н-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
гексан – етилацетат – етанол (30:10:5)	0,98	0,97	0,87	0,80	0,76	0,81
хлороформ – ацетон (80:20)	**0,57**	0,96	0,95	**0,32**	0,54	0,57

Пластини елюювали в системі розчинників хлороформ – ацетон (8:2) та проявляли 5 % розчином феруму (ІІІ) хлориду. На хроматограмі виявлялась одна

пляма на рівні з клопідогрель карбоновою кислотою, що також забарвлюється у фіолетовий колір після наступної обробки 5% розчином феруму (III) хлориду.

Ідентифікацію клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти проводили уніфікованим ВЕРХ-методом на мікроколоночному рідинному хроматографі «Міліхром А-02» на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків) при використанні металевої колонки з неполярним сорбентом Prontosil C 18, 5 мкм. Як рухому фазу застосовували суміш ацетонітрилу з 0,2 М розчином літію перхлорату у 0,005 М розчині кислоти хлорної; лінійний градієнт від елюенту А (5 % ацетонітрилу та 95% буферного розчину) до елюенту Б (100% ацетонітрилу) протягом 40 хв, швидкість елюювання 100 мкл/хв; оптимальний тиск насосом 2,8 – 3,2 МПа, температурний режим колонки 37 – 40^{o}С; об´єм проби для введення – 4 мкл. Багатоканальне детектування речовин за значеннями 8 довжин хвиль (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм) проводили із застосуванням УФ-спектрофотометра (рис. 3, табл.2).

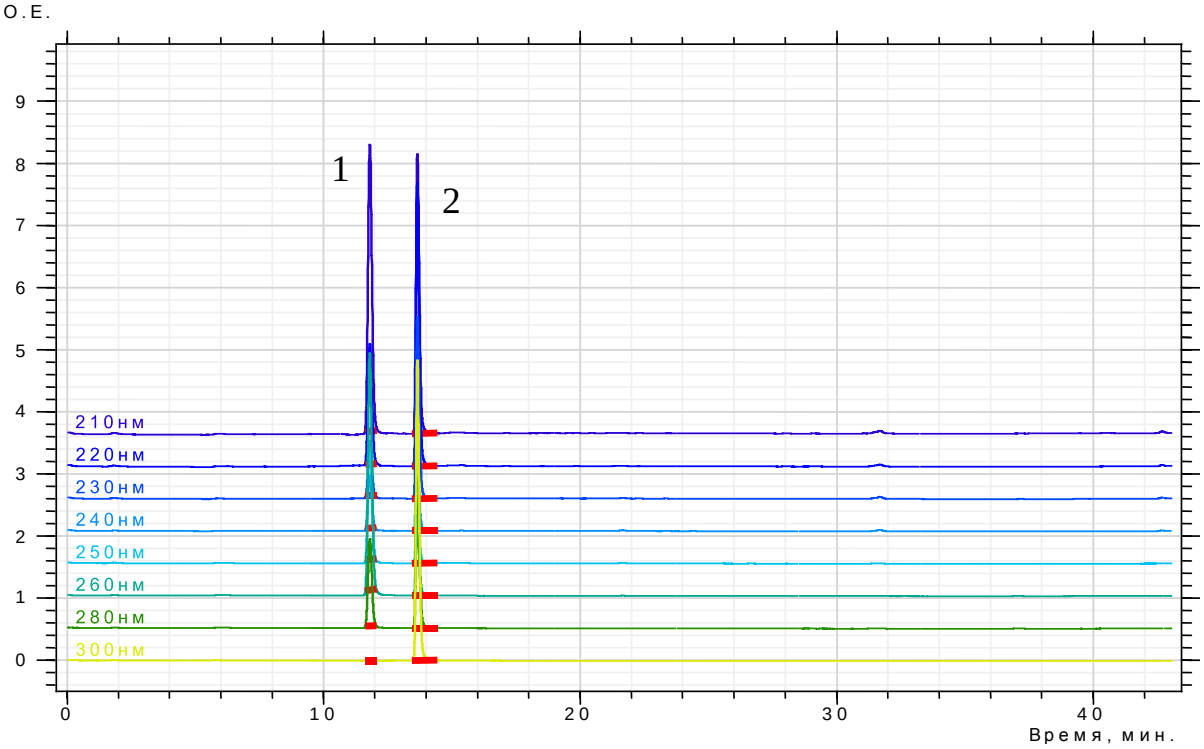


Рис. 3 ВЕРХ-хроматограма суміші рочинів клопідогрель карбонової кислоти (1) та клопідогрелю (2)

Встановлено основні хроматографічні параметри клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти за зазначених умов – час та об'єм утримування, спектральні відношення (табл. 2 та рис. 3), а також мінімальну концентрацію речовини в розчині, яку можна визначити за допомогою наведеної методики.

Мінімальна концентрація клопідогрелю та клопідогрель 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 говорити, що ВЕРХ-методика із застосуванням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02» забезпечує задовільне розділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти.

Таблиця 2

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 / 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		
		1,087			0,7912		
	300нм / 210нм	0,6231	0,6248	0,76	0,03487	0,03543	1,38
		0,6211			0,03578		
		0,6301			0,03564		

Розділ 4. Розробка методів кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти

Кількісне визначення клопідогрелю та його метаболіту проводили фізико-хімічними методами (ВЕРХ, методами абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектру та екстракційної фотометрії).

В УФ-спектрі абсорбції клопідогрелю з використанням як розчинника 0,1 М

розчину кислоти хлоридної спостерігали максимуми поглинання за довжин хвилі 270, 278 та 300 нм. Шляхом виконання серії експериментів та розрахунку значень питомого і молярного коефіцієнтів світлопоглинання доведено, що оптична густина розчинів клопідогрелю в 0,1 М розчині кислоти хлоридної за довжин хвилі 270 та 300 нм не підлягає основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

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

Шляхом виконання серії експериментів та розрахунку значень питомого і молярного коефіцієнтів світлопоглинання доведено, що оптична густина розчинів клопідогрель карбонової кислоти в 0,1 М розчині кислоти хлоридної за довжини хвилі 270 нм не підлягає основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

Таким чином, проводили кількісне визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти УФ-спектрофотометричним методом за довжини хвилі 278 нм.

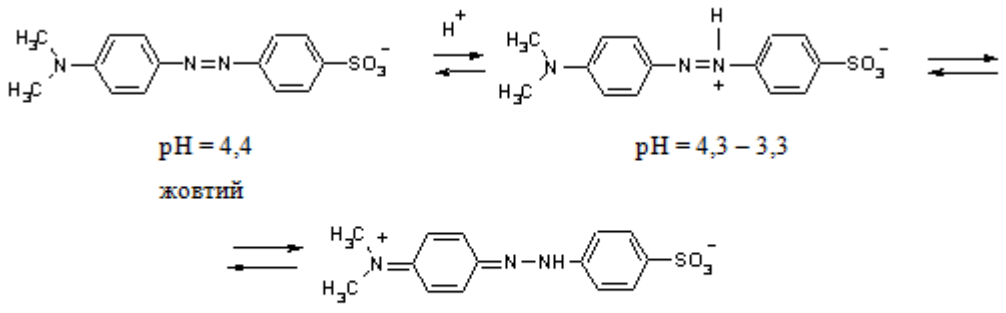
Для кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти розроблено УФ-спектрофотометричні методики та досліджено їх основні валідаційні характеристики – лінійність, правильність та збіжність:

• для клопідогрелю – методику можна застосовувати в інтервалі концентрацій 20 – 200 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату ±1,24%;

• для клопідогрель карбонової кислоти – методику можна застосовувати в інтервалі концентрацій 20 – 200 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату ±2,54%.

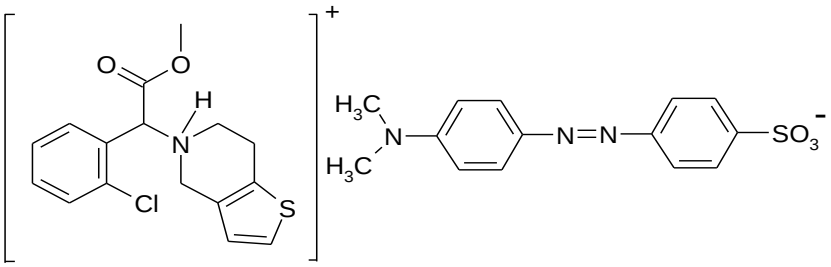
Встановлено, що межа кількісного виявлення клопідогрелю *LOD* дорівнює 1,144 мкг/мл, межа кількісного виявлення клопідогрель карбонової кислоти *LOD* дорівнює 1,655 мкг/мл; межа кількісного визначення клопідогрелю *LOQ* дорівнює 3,467 мкг/мл, межа кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти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

Розроблено екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення клопідогрелю на основі реакції утворення іонного асоціату з метиловим оранжевим.



Як органічний розчинник використовували хлороформ, який найчастіше застосовують в судово-токсикологічному аналізі.

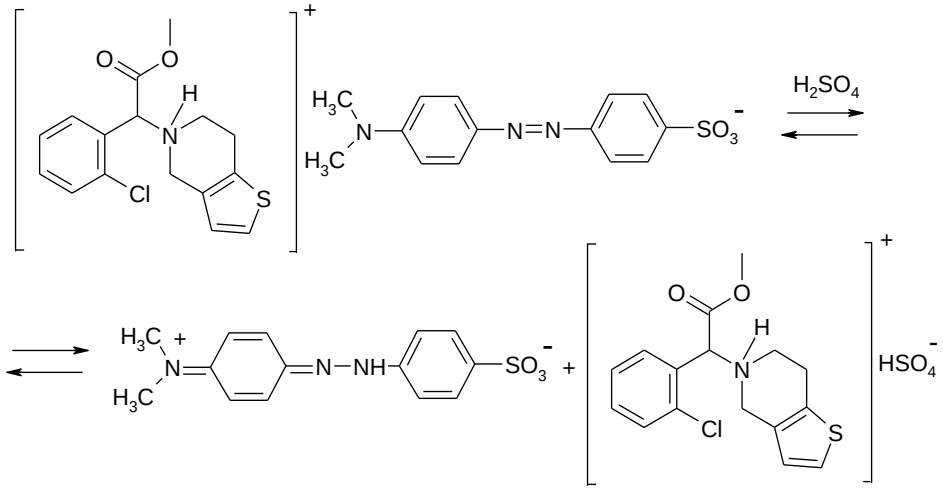
Структуру іонного асоціату клопідогрелю з метиловим оранжевим можна подати формулою:



Метиловий оранжевий в кислому середовищі з клопідогрелєм утворює іонні асоціати, що екстрагуються хлороформом. При цьому хлороформний шар забарвлюється в жовтий колір.

Іонні асоціати клопідогрелю з метиловим оранжевим в найбільшій кількості екстрагуються хлороформом при pH = 4,6. Тому для дослідженнях використовували ацетатну буферну суміш з pH 4,6.

Аналіз виконували в двох варіантах: безпосередньо вимірюючи оптичну густину хлороформного шару за довжини хвилі 540 нм, а також для підвищення чутливості методики хлороформний шар руйнували додаванням до нього 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі:



При цьому одержували інтенсивне рожеве забарвлення, зв’язане з вивільненням метилового оранжевого. Кількість метилового оранжевого – еквівалентна кількості клопідогрелю в іонних асоціатах.

Шляхом дослідження основних валідаційних характеристик – лінійності, правильності та збіжності – показано, що методику можна використовувати при визначенні клопідогрелю в інтервалі концентрацій від 10 до 200 мкг в пробі.

Відносна невизначеність середнього результату становить ±1,85 %. Встановлено, що межа кількісного виявлення клопідогрелю *LOD* дорівнює 3,367 мкг/мл; межа кількісного визначення клопідогрелю *LOQ* дорівнює 10,204 мкг/мл. Значення відносного стандартного відхилення середнього результату для клопідогрелю ($RSD_{\bar{x}}$) – 0,99 %.

Кількісне визначення клопідогрелю та його метаболіту проводили уніфікованим методом ВЕРХ, який дозволяє отримувати надійні та відтворювані результати досліджень. При розробці методики кількісного визначення

клопідогрелю методом ВЕРХ як розчинник використовували суміш 0,01 М розчину кислоти хлоридної та води (1:1). Площа піків розчинів клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти лінійно залежить від його концентрації в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату для клопідогрелю ±1,75 %, а клопідогрель карбонової кислоти – ±2,02 % . Встановлено, що межа кількісного виявлення клопідогрелю *LOD* дорівнює 2,334 мкг/мл; для клопідогрель карбонової кислоти - 2,027 мкг/мл, межа кількісного визначення клопідогрелю *LOQ* дорівнює 7,074мкг/мл, для клопідогрель карбонової кислоти -6,143 мкг/мл. Значення відносного стандартного відхилення середнього результату для клопідогрелю $(RSD_{\bar{x}})$ – 0,49 %, для клопідогрель карбонової кислоти - $(RSD_{\bar{x}})$ – 0,59 %.

В результаті досліджень уніфікованим методом ВЕРХ було отримано 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.

Розділ 5. Дослідження умов екстракції клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти з водних розчинів органічними розчинниками

Для розробки оптимальних умов ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу попередньо було вивчено екстракцію речовини із водних розчинів широко застосовуваними в хіміко-токсикологічному аналізі органічними розчинниками в залежності від pH середовища (рис. 4, рис.5).

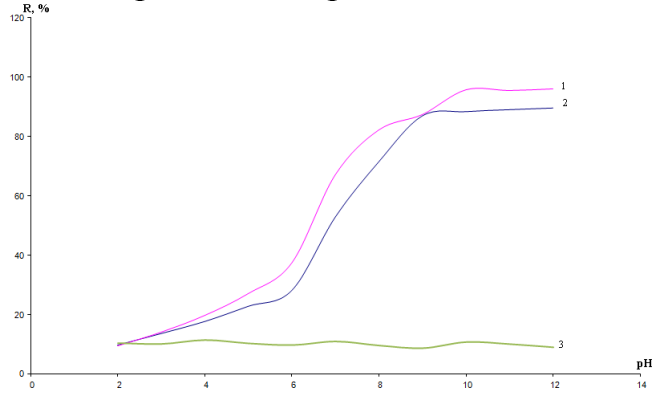


Рис. 4 Залежність ступеня екстракції клопідогрелю з водних розчинів від pH середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер, 3-гексан

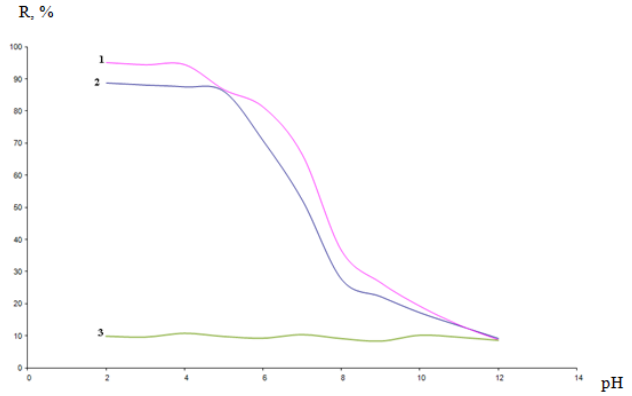


Рис. 5 Залежність ступеня екстракції клопідогрель карбонової кислоти з водних розчинів від pH середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер, 3- гексан

Потрібне значення pH середовища створювали за допомогою універсальних буферних розчинів з pH від 2,0 до 12,0.

Встановлено, що хлороформ та діетиловий етер можна використовувати для екстракції клопідогрелю із «лужного» витягу з біологічного матеріалу, а також для екстракції клопідогрель карбонової кислоти із «кислого» витягу з біологічного матеріалу.

Показано, що гексан практично не екстрагує клопідогрель та клопідогрель карбонову кислоту із водних розчинів незалежно від pH середовища, тому його

можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.

Розділ 6. Виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу

При дослідженні виділення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу та біологічних рідин використовували модельні суміші діючих речовин з печінкою, що не зазнала гнилісних змін, кров'ю та сечею. Кількість клопідогрелю, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в біологічних рідинах та тканинах людини при смертельних отруєннях.

Вивчено можливість ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислот із біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка, Стаса-Отто.

Методи О. О. Васильєвої та В. П. Крамаренка дозволяють виділити достатньо велику кількість клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу. Також, цими методами ми отримували витяги, які практично не містили співекстрактивних речовин, що могли б заважати виявленню АФІ методом ТШХ. Кількісне визначення досліджуваних речовин в цих витягах можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки, оскільки поглинання в контрольних дослідах для зазначених випадків практично відсутнє (не перевищує 5 % від поглинання у відповідних основних дослідах).

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.

Досліджено ступінь ізолювання клопідогрелю та клопідогель карбонової кислоти з біологічного матеріалу за допомогою модифікованого окремого методу ізолювання, що використовується в роботі з барбітуратами (метод П. Валова) – метод є ефективним в роботі з клопідогрель карбоновою кислотою (ступень ізолювання сягає 68 – 69%). Клопідогрель даним методом не ізолюється.

Для ізолювання клопідогрелю та його метаболіту – клопідогрель карбонової кислоти з біологічних рідин організму були розроблені наступні методики: методика I (до модельної суміші додавали хлоридну кислоту), і методика II (до модельної суміші додавали трихлорацетатну кислоту) ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із крові дозволяють виділити достатньо велику кількість досліджуваних речовин із крові. Проте, слід зазначити, що за методикою II ми отримуємо витяг, який майже не містить співекстрактивних речовин, що могли б заважати виявленню діючої речовини методом ТШХ. Кількісне визначення досліджуваних речовин в цьому витягу можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки.

Кількісні параметри розроблених методик ізолювання клопідогрелю та

клопідогрель карбонової кислоти із біологічного матеріалу наведено в табл. 3.

Слід підкреслити, що за методом Стаса-Отто клопідогрель та клопідогрель карбонова кислота із біологічного матеріалу не ізолюються.

За запропонованими методиками ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти із сечі ми отримуємо витяги, які практично не містять співекстрактивних речовин. Кількісне визначення досліджуваних речовин в цих витягах можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки.

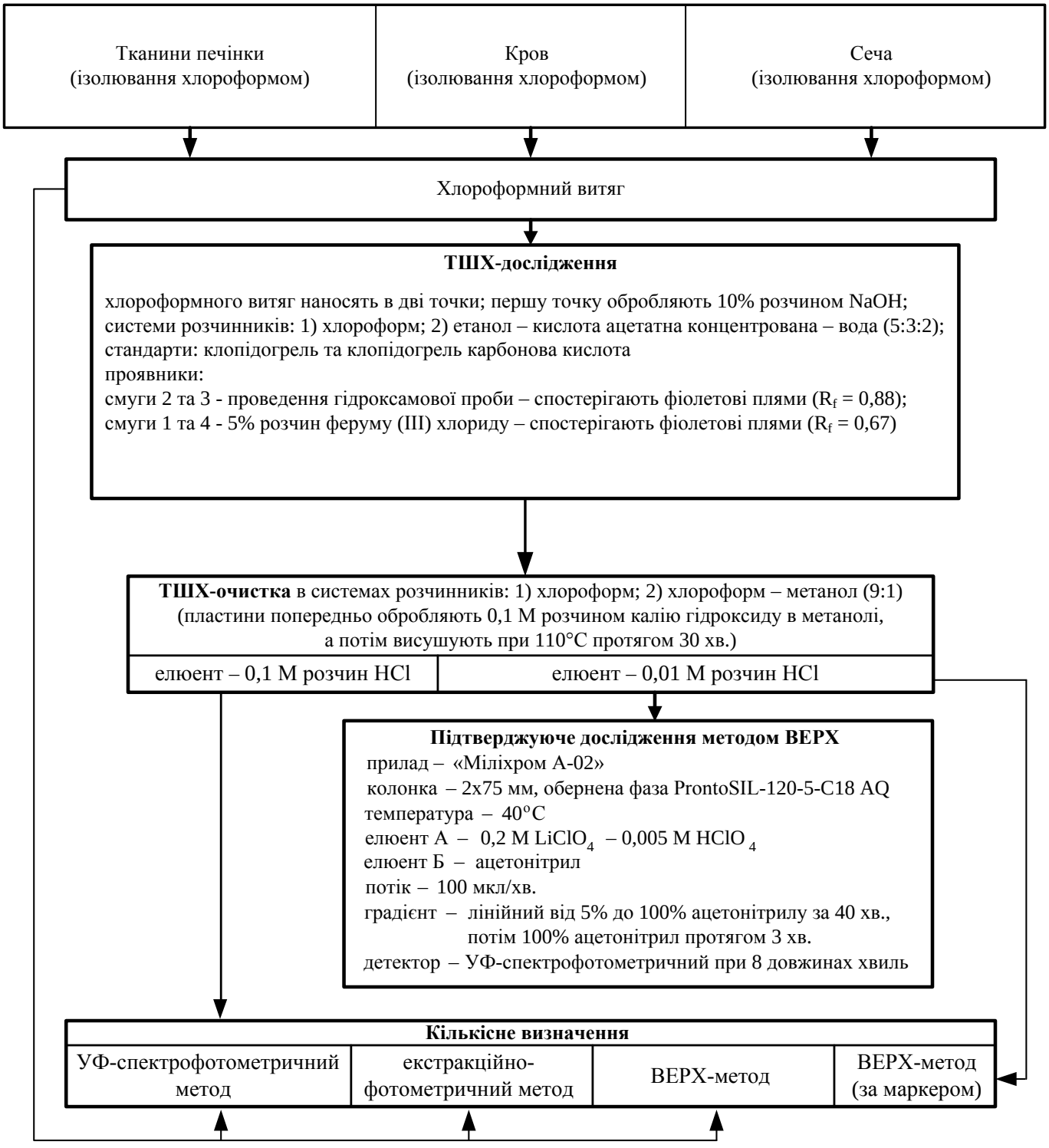
Запропоновано методику ТШХ-очистки витягів із об'єктів біологічного походження шляхом елюювання пластин в системі розчинників хлороформ-метанол (90:10). Попередньо пластини елюють в хлороформі – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов препарат залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу. З пластин клопідогрель елюють 0,01 М розчином кислоти хлоридної. Методика дозволяє виділити з пластини не менш як 98 % препарату.

За результатами проведених досліджень запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель (рис.6).

Таблиця 6

Результати ізолювання клопідогрелю та клопідогрель карбнової кислоти із об'єктів біологічного походження різними методами(n = 3; P = 0,95)

Метод ізолювання	Виділено клопідогрелю , %			Виділено клопідогрель карбонової кислоти ,%	
	УФ-спектрофотометрична (λ = 278 нм) методика	екстракційно-фотометрична методика	ВЕРХ-методика після ТШХ-очистки	УФ-спектрофотометрична (λ = 278 нм) методика	ВЕРХ-методика після ТШХ-очистки
за О. О. Васильєвою	57,24 ± 5,66	54,88 ± 3,44	54,17±4,19	53,24 ± 2,82	51,88±3,79
за В. П. Крамаренком	64,27 ± 4,12	60,50± 0,92	60,83±1,79	55,21 ± 4,83	53,44±5,70
методика ізолювання хлороформом із печінки	81,17 ± 2,40	--	--	---	--
методика ізолювання хлороформом із печінки (після екстракційної очистки)	64,58 ± 3,12	--	--	---	--
методика I ізолювання хлороформом із крові (з хлоридною кислотою)	65,15 ± 2,48	63,45±4,56	62,35±2,98	59,32 ± 2,27	58,32±2,89
методика II ізолювання хлороформом із крові (з трихлорацетатною кислотою)	59,74 ± 4,66	53,81±3,54	55,02±3,23	65,15 ± 2,48	68,32±2,89
методика ізолювання хлороформом із сечі	68,64 ± 3,89	75,34±5,94	74,14±3,94	75,15 ± 2,84	73,32±2,89
за П. Валовим	--	--	--	69,32 ± 2,27	68,32±2,89



Примітка.
*Використовують пластини із закріпленим шаром силікагелю, наприклад, «Sorbfil» ПТСХ-ІА або ПТСХ-ІІВ

Рис.6 Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на клопідогрель

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 ± 1,24 %, для клопідогрель карбонової кислоти ±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 ±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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

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. 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)).*

Тези доповідей

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 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. Сінтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: Тези доповідей Всеукаїнської 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)).*

Методичні рекомендації

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)).*

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. Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2021.

Дисертація присвячена розробці методів комплексного системного хіміко-токсикологічного дослідження клопідогрелю. Розроблено методики виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти кольоровими реакціями, ТШХ, ВЕРХ в присутності інших лікарських речовин.

Розроблено три методики кількісного визначення клопідогрелю та дві – кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти методами УФ-спектрофотометрії (л = 278 нм), екстракційної фотометрії (для клопідогрелю) з використанням як реагенту метилового оранжевого, уніфікованим ВЕРХ. Розроблені методики апробовано на витягах із об’єктів біологічного походження до та після їх ТШХ-очистки.

Порівняно ефективність загальних методів ізолювання органічних речовин кислотного характеру щодо клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти та розроблено індивідуальні методики ізолювання клопідогрелю із біоматеріалу.

Запропоновано покроковий алгоритм хіміко-токсикологічного аналізу біоматеріалу на клопідогрель та доповнення до загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин, що дозволяють не втратити клопідогрель при проведенні неспрямованого дослідження.

Ключові слова: клопідогрель, клопідогрель карбонова кислота, метаболіти, ТШХ, УФ-спектрофотометрія, екстракційна фотометрія, ВЕРХ, біологічний матеріал, печінка, кров, сеча.

АННОТАЦИЯ

Аносова Л. С. Химико-токсикологическое исследование клопидогреля. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на получения научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харков, 2021.

Диссертационная работа посвящена систематическому химико-токсикологическому исследованию клопидогреля.

Разработаны чувствительные методики идентификации клопидогреля и его «маркера» клопидогрель карбоновой кислоты и некоторых других лекарственных веществ с сердечно-сосудистой активностью с помощью качественных реакций и метода тонкослойной хроматографии – подобраны реактивы и системы растворителей, которые позволяют отдифференцировать их один от другого, исследовано хроматографическое поведение веществ в общепринятых в химико-токсикологическом анализе системах растворителей, изучено их отношение к проявителям, которые применяются в общем ТСХ-скрининге токсичных веществ.

Разработаны методики количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты методом УФ-спектрофотометрии – л = 278 нм (растворитель – 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты); методики дают возможность определять препарат в пределах концентраций от 20 мкг/мл до 200 мкг/мл; относительная неопределенность среднего результата для клопидогреля составляет ±1,24 % , для клопидогрель карбоновой кислоты -2,54 %; и методом экстракционной фотометрии (с использованием в качестве реагента метилового оранжевого, который образует с клопидогрелем ионный ассоциат) – методика дает возможность определить от 10 мкг до 200 мкг клопидогреля в пробе; относительная неопределенность среднего результата ±1,85 %

Разработанные методики апробированы на извлечениях из объектов биологического происхождения как до, так и после их ТСХ-очистки.

Проведен анализ клопидогреля в сравнении с клопидогрель карбоновой кислотой методами ВЭЖХ (с использованием ВЭЖХ- анализатора «Милихром А-02»); показано, что применяемые методики обеспечивают удовлетворительное разделение исследованных веществ.

Разработаны методики количественного определения клопидогреля методами ВЭЖХ (методика линейна в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 400 мкг/мл; относительная неопределенность среднего результата составляет для клопидогреля ±1,75 %, для клопидогрель карбоновой кислоты ±2,02 %)

Показана возможность применения разработанных ВЭЖХ-методик для количественного определения клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты в извлечениях из биологического материала после их ТСХ-очистки. Установлены оптимальные условия экстракции клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты из водных растворов – наиболее высокую степень экстракции обеспечивают хлороформ и диэтиловый эфир в щелочной и кислой среде.

Впервые исследована возможность применения общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования органических веществ кислотного и основного характера – А. А. Васильевой, Стаса–Отто и В. Ф. Крамаренко – для выделения клопидогреля и его метаболита из биологического материала. Установлена эффективность изолирования клопидогрель карбоновой кислоты из биологического материала с помощью модифицированного частного метода, который используется в работе с барбитуратами (метод П. Валова), – метод обеспечивает выделение ~75 % препарата.

Разработаны индивидуальные методики изолирования клопидогреля из биологического материала с помощью хлороформа и методики выделения клопидогреля из биологических жидкостей организма (крови, мочи). Предложена методика очистки клопидогреля и его метаболита от соэкстрактивных веществ в извлечениях из биологического материала с применением метода ТСХ.

Впервые предложен пошаговый алгоритм выполнения направленного химико-токсикологического анализа биологического материала на клопидогрель, обоснованы его отдельные этапы – методики изолирования препарата, очистки полученных извлечений из биологического материала, обнаружения с помощью комплекса цветных реакций, ТСХ и ВЭЖХ, а также количественного определения. Общая схема ТСХ-скрининга органических ядов дополнена операциями, которые позволят не потерять клопидогрель при проведении ненаправленного исследования.

Ключевые слова: клопидогрель, клопидогрель карбоновая кислота, метаболиты, ТСХ, УФ-спектрофотометрия, экстракционная фотометрия, ВЭЖХ, биологический материал, печень, кровь, моча.

ABSTRACT

Anosova L. S. Chemical and toxicological study of clopidogrel. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on a specialty 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to the development of methods of complex systemic chemical - toxicological research of clopidogrel. Methods for detection of clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid by color reactions, TLC, HPLC in the presence of other drugs have been developed.

Three methods for quantitative determination of clopidogrel and two methods for quantitative determination of clopidogrel carboxylic acid by UV spectrophotometry (л = 278 nm), extraction photometry (for clopidogrel) using methyl orange as a reagent, a unified HPLC method. The developed methods were tested on extracts from objects of biological origin before and after their TLC purification.

The efficiency of general methods of isolation of organic substances of acid character concerning clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid is compared and individual methods of isolation of clopidogrel from biomaterial are developed.

A step-by-step algorithm of chemical-toxicological analysis is proposed biomaterial for clopidogrel and addition to the general scheme of TLC screening organic substances that allow you to not lose clopidogrel during an unfocused study.

Key words: clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, metabolites, TLC, UV spectrophotometry, extraction photometry, HPLC, biological material, liver, blood, urine.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія;
ВЕТШХ	– високоефективна тонкошарова хроматографія;
ССЗ	–серцево-судинні захворювання
ТШХ	– тонкошарова хроматографія;
УФ	– ультрафіолетовий (спектр);
ФПН	–суміш розчину хлориду заліза(III), хлорної і нітратної кислот;
TIAFT	– Міжнародною асоціацією судових токсикологів (The International Association of Forensic Toxicologists)

Підписано до друку: 01.04.21 р. Формат 60х90/16.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний.
Умов. друк. арк. 0,9 Тираж 100 прим.
НФаУ
вул. Пушкіньска, 53 м. Харків 61002