

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭКСТРАКЦИОННОЙ ФОТОКОЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА

USING THE EXTRACTION PHOTOCOLORIMETRY METHOD FOR CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF CLOPIDOGREL

■ Аносова Л.С.

■ Anosova L.S.

■ Донецкий государственный университет

■ Donetsk State University

E-mail: apteka-NaNya@yandex.ru

Резюме

Согласно данным автора Пучирьян Н.Ф., наиболее часто применяемым антитромбоцитарным (антиагрегантным) препаратом является ацетилсалициловая кислота и клопидогрел. Частота назначения клопидогрела среди препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) составляет 69%. По информации, приведенной в научной литературе за последние 10 лет, клопидогрел представляет интерес с точки зрения химико-токсикологических исследований, поскольку на сегодня лекарственные средства для лечения ССЗ занимают одно из первых мест на рынке лекарственных препаратов, и, как следствие, смертельные случаи при приеме указанных препаратов встречаются достаточно часто.

Целью исследований явилась разработка экстракционно-фотометрической методики определения клопидогрела в биологическом материале, пригодной для химико-токсикологического анализа (судебно-токсикологической экспертизы) с использованием кислотно-основного индикатора метилового оранжевого.

Материалы и методы. Для исследования использовали фармакопейную субстанцию - Клопидогрель бисульфат (далее по тексту Клопидогрел) субстанция-порошок, производитель: НАО «Северная звезда», РФ, соответствует Государственной фармакопее (ФС.2.1.0111) с содержанием действующего вещества 99,31% (серия LM2504208).

Для разработки методики экстракционно-фотометрического определения клопидогрела использовали раствор субстанции в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной.

Определение проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 (светофильтр с $\lambda_{\text{эф}} = 540 \pm 10$ нм) (Россия). В качестве раствора сравнения использовали хлороформ.

Результаты. Хлороформный раствор ионных ассоциатов клопидогрела имеет малую интенсивность окрашивания, поэтому для повышения интенсивности окраски и, соответственно, чувствительности метода полученные ионные ассоциаты разрушали добавлением к их хлороформным растворам 1% раствора серной кислоты в абсолютном этаноле.

Уравнение прямой имеет вид $A = 0,004617 \cdot C + 0,08567$. Линейность градуировочного графика клопидогрела в координатах (A) - (C, мкг в пробе) наблюдалась в интервалах концентраций 10,0 – 200,0 мкг в пробе. Значения LOD и LOQ были рассчитаны с использованием стандартного отклонения перехвата. Они составляли 3,367 мкг/мл и 10,204 мкг/мл соответственно.

Разработанный метод был провалидирован. Значение открываемости для клопидогрела составляет 99,49%. Рассчитанный коэффициент Стьюдента равен 1,86, что не превышает табличного значения (2,31) и указывает на отсутствие систематической ошибки. Относительное стандартное отклонение для клопидогрела составляет $\pm 1,34\%$ что подтверждает возможность использования данного метода для дальнейшего исследования клопидогрела.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ, клопидогрел, экстракционная фотометрия, метиловый оранжевый.

Summary

According to the data of the author Puchiryan N.F., the most commonly used antiplatelet (antiplatelet) drug is acetylsalicylic acid and clopidogrel. The frequency of clopidogrel prescribing among drugs for the treatment of cardiovascular diseases (CVD) is 69%. According to the information provided in the scientific literature over the past 10 years, clopidogrel is of interest from the point of view of chemical and toxicological studies, since today drugs for the treatment of CVD occupy one of the first places on the drug market, and, as a result, deaths when taking these drugs are quite common. The aim of the research was to develop an extraction-photometric technique for determining clopidogrel in biological material suitable for chemical and toxicological analysis (forensic toxicological examination) using the acid-base indicator methyl orange.

Materials and methods. For the study, a pharmacopoeial substance was used - Clopidogrel bisulfate (hereinafter referred to as Clopidogrel) powder substance, manufacturer: «Severnaya Zvezda», Russia, corresponds to the European Pharmacopoeia with an active substance content of 99.31%. (series LM2504208). To develop a technique for the extraction-photometric determination of clopidogrel, a solution of the substance in 0.01 M hydrochloric acid solution was used. The determination was carried out on a photoelectrocolorimeter KFK-2 (light filter with $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10 \text{ nm}$) (Russia). Chloroform was used as a comparison solution.

Results. The chloroform solution of clopidogrel ionic associates has a low staining intensity, therefore, to increase the intensity of coloring and, accordingly, the sensitivity of the method, the obtained ionic associates were destroyed by adding 1% sulfuric acid solution in absolute ethanol to their chloroform solutions. The equation of the line has the form $A = 0.004617 \cdot C + 0.08567$. The linearity of the clopidogrel calibration graph in coordinates (A) - (C, mcg in the sample) was observed in the concentration ranges of 10.0 – 200.0 mcg in the sample. The LOD and LOQ values were calculated using the standard deviation of the intercept. They were 3,367 micrograms/ml and 10,204 micrograms/ml, respectively. The developed method has been validated. The opening value for clopidogrel is 99.49%. The calculated Student coefficient is 1.86, which does not exceed the tabular value (2.31) and indicates the absence of a systematic error. The relative standard deviation for clopidogrel is $\pm 1.34\%$, which confirms the possibility of using this method for further investigation of clopidogrel.

Key words: chemical and toxicological analysis, clopidogrel, extraction photometry, methyl orange.

Библиографическая ссылка на статью

Аносова Л.С. Использование метода экстракционной фотокolorиметрии для химико-токсикологического анализа клопидогрела // Innova. - 2024. - Т. 10. - № 3. - С.19-26.

References to the article

Anosova L.S. Using the extraction photocolormetry method for chemical and toxicological analysis of clopidogrel // Innova. - 2024. - Т. 10. - № 3. - P.19-26.

Глобальной проблемой здравоохранения всех развитых стран [1-3] и эпидемией XXI века [4] являются заболевания сердечно-сосудистой системы (ССЗ) [5,6]. Согласно информации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно от патологии ССЗ умирает около 18 миллионов человек [7]. За последние 20 лет были достигнуты значительные успехи в антитромбоцитарной фармакотерапии, особенно для лечения пациентов с ишемической болезнью сердца [8]. Длительное применение антиагрегантов - один из действенных способов предотвращения неблагоприятных последствий при патологии ССЗ [9,10], основа лечения и вторичной профилактики ССЗ (острый коронарный синдром, транзиторная ишемическая атака, инсульт, заболевания периферических сосудов) [8].

В комплексном лечении атеросклероза активно применяют антитромбоцитарные средства, эффективность которых проверена с позиции доказательной медицины: среди основных групп лекарственных препаратов для лечения патологии сердечно-сосудистой системы особое место занимает клопидогрел [9, 11, 12]. Клопидогрел относится к группе средств, влияющих на свертываемость крови и агрегацию тромбоцитов, подгруппы антиагрегантов (деагреганты).

Согласно данным автора Пучирьян Н.Ф., наиболее часто применяемым антитромбоцитарным (антиагрегантным)

препаратом (ААП) является ацетилсалициловая кислота (АСК) и клопидогрел [8, 12]. Частота назначения клопидогрела среди препаратов для лечения ССЗ составляет 69% [12]. Лидерами потребления на рынке антиагрегантов в стоимостном выражении на протяжении 3 лет являются бренды Плавикс®, Зилт® и Брилинта®, а в натуральном выражении это Зилт®, Плагрил® и небрендовый клопидогрел [13,14]. Эта группа составляет основу антитромбоцитарных препаратов [14]. Клопидогрел, как и близкие к нему структуры, токсичны для организма человека. При контакте со слизистыми оболочками глаз он оказывает раздражающее действие. Из-за общетоксического действия, клопидогрела бисульфат в Российской Федерации отнесли к вредным веществам. Ориентировочный безопасный уровень данного вещества в воздухе рабочей зоны составляет $0,2 \text{ мг/м}^3$. В РФ зарегистрирована таблетированная лекарственная форма в терапевтической дозе 75 мг, но в Китае, Германии, Франции клопидогрел выпускается также в дозе 300 мг. Кардиологом Явловым Я.В. также приводится схема лечения клопидогрелом в дозе 300 мг, и автор указывает, что данная доза является «нагрузочной терапевтической». Таким образом, лечение ССЗ включает в себя два назначения - в дозе 75 мг и в дозе 300 мг (4 таблетки по 75мг) [9].

По информации, приведенной в научной литературе за последние 10 лет, клопидогрель

представляет интерес с точки зрения химико-токсикологических исследований, поскольку на сегодня лекарственные средства для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест на рынке лекарственных препаратов, и, как следствие, смертельные случаи при приеме указанных препаратов встречаются достаточно часто [15,17].

Также известно, что клопидогрел является пролекарством, и для его активации, необходимо работа CYP. Такие лекарственные препараты как варфарин, кетоконазол, эритромицин, препараты сульфаниламочевин при взаимодействии с клопидогрелом могут привести к лекарственному взаимодействию, то есть к снижению активности фермента CYP и накоплению клопидогрела в организме, вследствие чего может развиваться хроническое отравление клопидогрелом [16,17].

Для количественного определения клопидогрела в биологических жидкостях и извлечениях из биологического материала в основном применяются методы газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, требующие наличия в лабораториях дорогостоящей аппаратуры.

Все это делает необходимым разработку простых и экспрессных методик количественного определения клопидогрела, которые могут применяться в химико-токсикологическом анализе, весьма актуальной и необходимой.

В современном химико-токсикологическом анализе большое внимание уделяют методу экстракционной фотометрии. В связи с этим, *целью исследований явилась* разработка экстракционно-фотометрической методики определения клопидогрела в биологическом материале, пригодной для химико-токсикологического анализа (судебно-токсикологической экспертизы) с использованием кислотно-основного индикатора метилового оранжевого.

Материалы и методы. Для исследования использовали фармакопейную субстанцию - Клопидогрель бисульфат (далее по тексту Клопидогрел) субстанция-порошок, производитель: НАО «Северная звезда», РФ, соответствует Государственной фармакопее (ФС.2.1.0111) с содержанием действующего вещества 99,31% (серия LM2504208).

Для разработки методики экстракционно-фотометрического определения клопидогрела использовали раствор субстанции в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной.

Определение проводили на

фотоэлектроколориметре КФК-2 (светофильтр с $\lambda_{\text{эф}} = 540 \pm 10$ нм) (Россия). В качестве раствора сравнения использовали хлороформ.

В процессе разработки наиболее эффективных условий определения были подобраны оптимальные объемы раствора метилового оранжевого и хлороформа. Также было подобрано оптимальное значение pH буферного раствора и длина кюветы - 5 мм. Для подбора оптимального значения pH буферного раствора нами был изготовлен ряд уксусных буферных растворов с pH от 3,0 до 6,0 [18]. Величины pH буферных растворов контролировали потенциометрически.

Методика построения градуировочного графика для экстракционно-фотометрического определения клопидогрела. 50,0 мг клопидогрела вносили в мерную колбу емкостью 250,0 мл, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной и доводили объем раствора 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной до метки (стандартный раствор 1, концентрация 200 мкг/мл).

В мерную колбу емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 20,00 мл стандартного раствора клопидогрела 1 и доводили объем раствора 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной до метки (стандартный раствор 2, концентрация 40 мкг/мл).

В ряд мерных колб емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 5,00; 10,00 и 20,00 мл стандартного раствора клопидогрела 2 соответственно и доводили объемы растворов 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной до метки (растворы 3, 4 и 5 соответственно, концентрация 2, 4 и 8 мкг/мл).

В ряд мерных колб емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 8,00; 10,00; 14,00 и 16,00 мл стандартного раствора клопидогреля 1 соответственно и доводили объемы растворов 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной до метки (растворы 6, 7, 8 и 9 соответственно, концентрация 16, 20, 28 и 32 мкг/мл).

В ряд делительных леек вносили по 5,00 мл уксусного буферного раствора с pH = 4,6, по 5,00 мл 0,02% раствора метилового оранжевого и по 5,00 мл растворов клопидогрела 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 соответственно. К полученным смесям добавляли по 10,00 мл хлороформа. Смеси в делительных воронках встряхивали на протяжении 5 мин. с помощью механического встряхивателя и оставляли на 10 мин. для разделения слоев. Собирали по 8,00 мл хлороформного слоя, отбрасывая их первые и последние порции (около 1,00 мл), и добавляли к ним по 2,00 мл 1% раствора кислоты серной в

абсолютном этаноле. Полученные смеси тщательно перемешивали и определяли их оптическую плотность.

Эксперимент выполняли трижды.

Результаты. Метиловый оранжевый - натриевая соль 4-диметиламиноазобенбензена-4-

сульфо кислоты. Растворы метилового оранжевого в воде при pH = 4,4 и выше имеют желтую окраску, а в более кислых средах (pH ≤ 4,3) – красную, что связано с образованием хинондииминной структуры (рис.1):

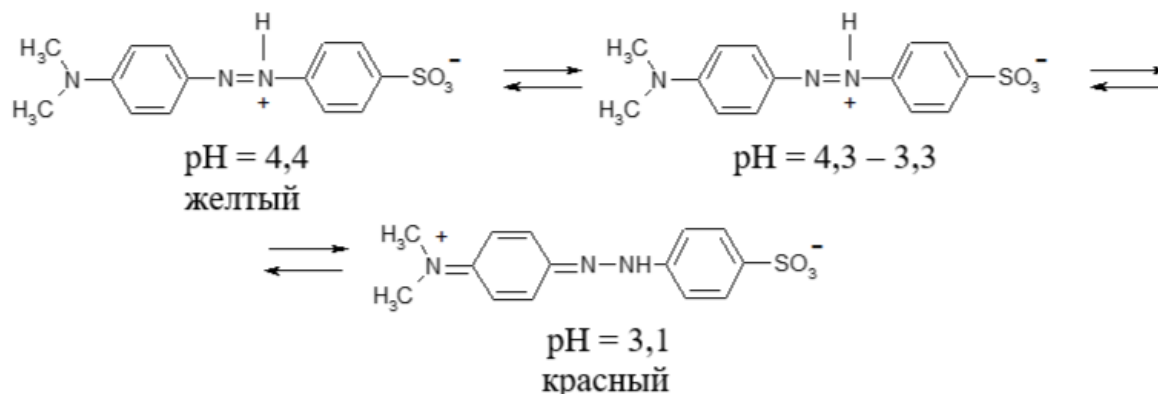


Рисунок 1. Структура метилового оранжевого при различных pH раствора

Установлено, что оптимальное значение количества 0,02% раствора метилового оранжевого составляет 5 мл, а ионные ассоциаты практически полностью экстрагируются в процессе одноразовой экстракции 10 мл хлороформа. Наиболее подходящее значение pH составляет 4,6.

Нами установлено, что 0,02% раствор метилового оранжевого образует с

клопидогрелем в среде уксусного буферного раствора с pH=4,6 ионные ассоциаты, экстрагируемые хлороформом. При этом хлороформный слой окрашивается в желтый цвет. Структуру ионного ассоциата клопидогрела с метиловым оранжевым можно представить формулой (рис.2):

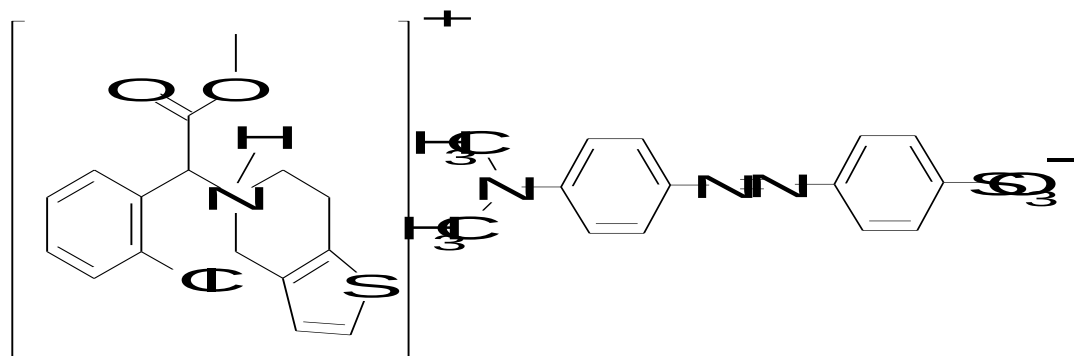


Рисунок 2. Структура ионного ассоциата клопидогрела с метиловым оранжевым

Хлороформный раствор ионных ассоциатов имеет малую интенсивность окрашивания, поэтому для повышения интенсивности окраски и, соответственно, чувствительности метода

полученные ионные ассоциаты разрушали добавлением к их хлороформным растворам 1% раствора серной кислоты в абсолютном этаноле (рис.3):

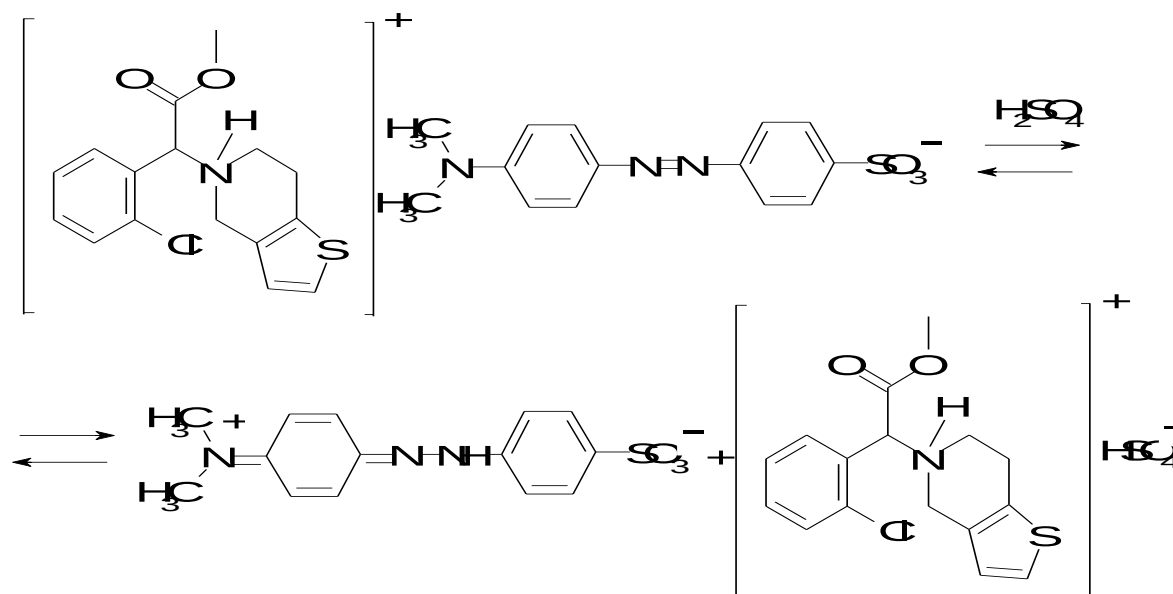


Рисунок 3. Разрушение ионных ассоциатов клопидогрела

Нужно отметить, что сам метиловый оранжевый не экстрагируется хлороформом из водных растворов, а потому не мешает количественному определению клопидогрела.

Для расчета содержания клопидогрела в растворах методом экстракционной фотометрии использовали градуировочный график (рис. 4)

или уравнение прямой (1) $y = bx + a$, имеющего вид [19]:

$$A = 0,004617 \cdot C + 0,08567 \quad (1),$$

где A – оптическая плотность раствора ионных ассоциатов метилового оранжевого с клопидогрелом;

C – содержание клопидогрела в пробе, мкг.

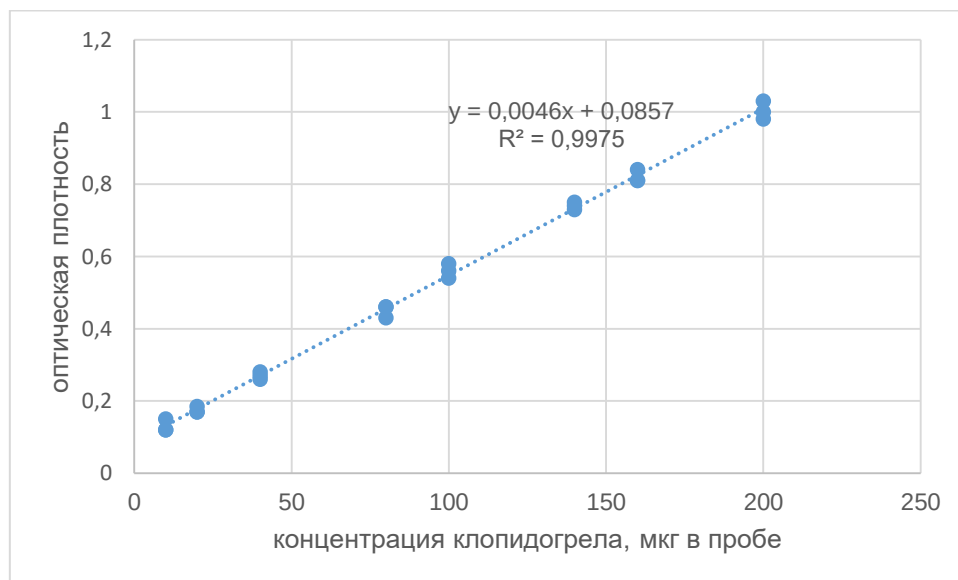


Рисунок 4. Градуировочный график для экстракционно-фотометрического определения клопидогрела ($\lambda_{эф} = 540 \pm 10$ нм; $l = 10$ мм)

Таким образом, установлено, что линейность градуировочного графика клопидогрела в координатах (A) - (C , мкг в пробе) наблюдалась в интервалах концентраций 10,0 – 200,0 мкг в пробе.

Определение правильности устанавливали путем анализа девяти образцов растворов клопидогрела на трех уровнях концентраций. Для этого нами были выбраны: нижний уровень концентраций – 10,0 мкг/мл; средний – 100,0

мкг/мл и высокий – 200,0 мкг/мл. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оценка правильности определения клопидогрела экстракционно-фотометрическим методом

№ п/п	Уровень	Внесено мкг/мл	Оптическая плотность	Найдено клопидогрела		Метрологическая характеристика
				Мкг/мл	R, %	
1	1	10,0	0,131	9,6	96,0	$\bar{R} = 99,49\%$; $SD = 1,98$; $RSD = \pm 1,99\%$; $\Delta x = 3,69$; $\varepsilon = \pm 3,70\%$; $t_{\text{выч}} = 1,86$
2			0,129	9,72	97,2	
3			0,130	10,01	100,1	
4	2	100,0	0,561	102,74	102,74	
5			0,560	101,03	101,03	
6			0,559	99,91	99,91	
7	3	200,0	0,998	198,04	99,02	
8			1,001	199,8	99,4	
9			1,000	200,05	100,02	

Как видно из представленных данных статистической обработки (табл. 1) значение открываемости для клопидогрела составляет 99,49%. Рассчитанный коэффициент Стьюдента равен 1,86, что не превышает табличного значения (2,31) и указывает на отсутствие систематической ошибки.

Для установления прецизионности при определении среднего уровня концентраций проводили шесть параллельных определений. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения прецизионности для определения клопидогрела экстракционно-фотометрическим методом

Внесено, мкг/мл	Оптическая плотность	Результат мкг	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологическая характеристика (n = 6; P = 0,95)
100	0,561	102,74	-2,21	4,8841	$\bar{X} = 100,53$ $SD = 1,35$ $RSD = \pm 1,34 \%$
	0,560	101,03	-0,5	0,25	
	0,556	99,01	1,51	2,2801	
	0,578	99,43	1,1	1,21	
	0,584	100,03	0,5	0,25	
	0,559	100,94	-0,41	0,1681	

Таким образом, относительное стандартное отклонение для клопидогрела составляет $\pm 1,34\%$ что подтверждает возможность

использования данного метода для дальнейшего исследования клопидогрела. Значения LOD и LOQ были рассчитаны с

использованием стандартного отклонения перехвата (S_a) в соответствии с соответствующими уравнениями: $LOD = 3,3 \cdot \frac{S_a^2}{b}$ и $LOQ = 10 \cdot \frac{S_a^2}{b}$. Они составляли 3,367 мкг/мл и 10,204 мкг/мл соответственно.

Заключение. Таким образом, разработанная и подтвержденная валидационными характеристиками экстракционно-фотометрическая методика может применяться для количественного определения клопидогрела в лекарственных формах и биологическом материале при использовании в судебной токсикологии.

Литература.

1. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al.; ESC National Cardiac Societies; ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur Heart J. 2021;42(34):3227-3337. doi: 10.1093/eurheartj/ehab484.
2. 2021 Рекомендации ESC по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике // Российский кардиологический журнал. 2022;27(7):5155. doi:10.15829/1560-4071-2022-5155.
3. Бойцов С.А. Грипп, новая коронавирусная инфекция и сердечно-сосудистые заболевания. // Кардиологический вестник. 2021;16(1):5–9. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin2021160115>
4. Эрлих А.Д. Антикоагулянты и антиагреганты в эпоху COVID-19. // Атеротромбоз. 2021;11(1):58–66. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2021-11-1-58-66>.
5. В.А. Глущенко, И.К. Иркиенко. Сердечно-сосудистая заболеваемость – одна из важнейших проблем здравоохранения. // Медицина и организация здравоохранения. том 4 №1 2019. С. 56-63.
6. Мирхамидова, С. М. Особенности распространенности сердечно-сосудистых заболеваний / С. М. Мирхамидова, Н. Б. Ботирова, С. А. Камбарова. — Текст : непосредственный // Молодой ученый. — 2016. — № 21 (125). — С. 73-76. — URL: <https://moluch.ru/archive/125/34513/> (дата обращения: 06.02.2023).
7. World Health Organization. Global Health Estimates. Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016. // Global Health Estimates Technical Paper. – 2017.
8. Мамедов Н. М. Преимущества клопидогрела во вторичной профилактике ишемической болезни сердца: от механизма действия до клинических исследований. Лечебное дело. 2017. № 2. С. 74–78.
9. Явелов И. С. Место клопидогрела в современном лечении острого коронарного синдрома. *Atherohrombosis, specialized medical journal*. 2020. № 1. Р. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2020-1-72-81>.
10. 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.
11. Patti G., Micieli G., Cimminiello C., Bolognese L. [The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal](https://doi.org/10.1155/2020/8703627). *Cardiovasc. Ther.* 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8703627> (Date of access: 12.06.2023).
12. Пучиньян Н.Ф., Фурман Н.В., Малинова Л.И., Долотовская П.В. Проблема контроля эффективности антитромбоцитарной терапии в кардиологической практике. Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2017;13(1): 107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.20996/1819-6446-2017-13-1-107-115>.
13. Зырянов С.К., Думченко Е.В. Анализ структуры потребления антитромбоцитарных препаратов на российском фармацевтическом рынке: 2014-2016 гг. *Качественная Клиническая Практика*. 2017;(2):29-34.
14. Аналитический отчет «Тенденции и практические аспекты развития российского фармацевтического рынка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www2.deloitte.com/ru/ru/pages/life-sciences-and-healthcare/articles/russian-pharmaceutical-industry-2015.html> (дата обращения: 15.06.2023).
15. 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> (12 May 2023).
16. 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: 12.06.2023).
17. 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: 12.06.2023).

18. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1989. – 448 с.

19. Дюерфель, К. Статистика в аналитической химии: пер. с нем. / К. Дюерфель. – М.: Мир, 1969. – 223 с.