

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 615.225.4:543.857.6

ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ В АНАЛІЗІ КЛОПІДОГРЕЛЮ

© В. С. Бондар, Л. С. Аносова

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: запропоновано умови якісного аналізу клопідогрелю та його основного метаболіту, що одночасно є продуктом його лужного та кислотного гідролізу, – клопідогрель карбонової кислоти – методом ВЕРХ. Встановлено, що лужний гідроліз клопідогрелю відбувається кількісно. Розроблено методики кількісного визначення клопідогрелю та продукту його метаболізму – клопідогрель карбонової кислоти – методом ВЕРХ.

Ключові слова: клопідогрель, лужний гідроліз, кислотний гідроліз, клопідогрель карбонова кислота, вискоєфективна рідинна хроматографія.

Вступ. У практиці хіміко-токсикологічного аналізу досить поширеною є ситуація, що характеризується повною невизначеністю переліку речовин, на наявність яких треба проводити аналіз. Такою, наприклад, є ситуація отруєння невідомою речовиною або речовинами.

Одним з найбільш поширених методів хіміко-токсикологічного аналізу є вискоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), але її використання у традиційному вигляді вимагає застосування для кожної речовини «своєї» хроматографічної колонки, «своїх» мобільних фаз, а також «своєї» унікальної процедури аналізу [6]. У ситуації невизначеності це потребує великої кількості експериментів, а, відповідно, великої кількості матеріалів для аналізу.

Альтернативою традиційному ВЕРХ-аналізу є тиражований ВЕРХ-аналізатор для аналізу великої кількості речовин, створити який зроблено багато спроб [5, 7, 8]. Цей підхід полягає в проведенні аналізу всіх сполук певного списку – від 20 до 500 найменувань – в одній хроматографічній системі, заздалегідь відкаліброваної по кожній речовині окремо. Ідентифікацію піків на хроматограмі досліджуваної речовини виконують шляхом порівняння її часу утримування та спектральних характеристик у ділянці УФ-спектра з параметрами, заздалегідь отриманими для стандартних речовин. Сукупність таких «довідкових» параметрів являє собою «базу даних». Застосування ВЕРХ-аналізатора спрощує процедуру аналізу та зводить його тривалість до мінімуму. Прототип такого аналізатора розроблено на основі хроматографа «Міліхром А-02» та має ряд переваг [3]:

– хроматограф «Міліхром А-02» виготовляється за технологією, що гарантує зберігання його основних технічних характеристик від приладу до приладу;

– робота з колонками об'ємом лише 0,2 мл, що дозволяє, маючи 1 кг сорбенту однієї партії,

зробити 5000 однакових колонок, та декілька років використовувати їх без коректування «бази даних»;

– забезпечення економії коштовних рухомих фаз;

– застосування елюентів, що мають високу прозорість в короткохвильовій ділянці УФ-спектра та не містять УФ-поглинаючих домішок, що виявляються в вигляді додаткових піків на хроматограмі; наявність в рухомій фазі кислоти (рН 2,8) поліпшує хроматографування карбонових кислот, а високий вміст іонів літію поліпшує хроматографування амінів;

– УФ-детектування проводять одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм, тому кожній речовині на хроматограмі відповідає 8 піків з однаковим часом утримування, але з різними амплітудами, що прямо пропорційні абсорбції речовини. Для кожної речовини розраховуються 7 характерних нормованих спектральних параметрів – відношення площ піків при довжинах хвиль $\lambda_2 - \lambda_8$ до площі піку при довжині хвилі $\lambda_1 = 210$ нм ($R = S_{\lambda} / S_{210}$). Сукупність цих спектральних відношень R разом з величиною об'єму утримування (V_R) використовують для ідентифікації піку речовини на хроматограмі.

Нами було поставлено за мету провести аналіз клопідогрелю та продукту його метаболізму [4] – клопідогрель карбонової кислоти – методом ВЕРХ в зазначених умовах.

Методи дослідження. У роботі використано такі реактиви: клопідогрель фармакопейної чистоти та клопідогрель карбонова кислота кваліфікації "х. ч."

Для проведення досліджень використовували розчини клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в суміші 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та води (1:1) різних концентрацій. Об'єм проби складав 2 мкл.

Попередньо проводили хроматографування розчинника – суміші 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та води (1:1).

Роботу з хроматографом “Міліхром А-02” (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ) виконували на базі НВФ “Аналітика” (м. Харків). Обробку хроматограм проводили за допомогою програми “Аналітика – Chrom”, розробленої цією ж установою.

У роботі використовували колонку ϕ 2 × 75 мм, упаковану оберненою фазою ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия), що має ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок.

Градентне елюювання виконували змішуванням двох елюентів: елюент А – [4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄] – H₂O (5:95); елюент Б – ацетонітрил «для ВЕРХ».

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

Правильність методики аналізу періодично контролювали шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину [3].

Методика побудови градувальних графіків для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти. 0,1000 г речовини вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,1М розчину кислоти хлористоводневої 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 дві мірні колби місткістю 50,0 мл вносили 20,00 та 10,00 мл стандартного розчину 2 відповідно і доводили об’єми розчинів до позначки розчинником (розчини 3 та 4 відповідно, концентрація 200 та 100 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 2 і доводили об’єм розчину до позначки розчинником (розчин 5, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 та 20,00 мл розчину 4

відповідно і доводили об’єми розчинів до позначки розчинником (розчини 6 та 7 відповідно, концентрація 10 та 20 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 6 та доводили об’єм розчину до позначки розчинником (розчин 8; концентрація 1 мкг/мл).

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

Методика лужного гідролізу клопідогрелю. У мірну колбу місткістю 50,0 мл вносили 10,00 мл розчину клопідогрелю 3, додавали 2 мл 10 % розчину гідроксиду натрію при кімнатній температурі та через 2 хв доводили об’єм розчину до позначки розчинником (лужний гідролізат).

Методика кислотного гідролізу клопідогрелю. До 10 мл розчину клопідогрелю 3 додавали 50 мл 6 М розчину кислоти хлористоводневої та кип’ятили на водяній бані протягом 1 год зі зворотним холодильником. Після охолодження суміші її екстрагували хлороформом тричі порціями по 20 мл. Хлороформні витяги об’єднували та упарювали досуха. Сухий залишок розчиняли в 10 мл розчинника (кислотний гідролізат).

Методика визначення клопідогрелю за клопідогрель карбоновою кислотою. У ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили по 10,00 мл розчинів клопідогрелю 3, 4, 5 та 7, додавали по 2 мл 10% розчину гідроксиду натрію та через 2 хв доводили об’єми розчинів до позначки розчинником. Хроматографування отриманих сумішей проводили в вищезазначених умовах; об’єм проби становив 2 мкл.

Результати й обговорення. Основні хроматографічні параметри клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти при визначенні методом ВЕРХ за зазначеною методикою наведено в таблиці 1, а типову хроматограму – на рисунку 1.

При цьому встановлено, що мінімальна концентрація клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в розчині, що можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 0,25 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин у введеному об’ємі проби 0,5 нг.

Таблиця 1. Основні хроматографічні параметри клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти при визначенні методом ВЕРХ

Речовина	t _R	V _R	R (S _x / S ₂₁₀)							
			210 нм	220 нм	230 нм	240 нм	250 нм	260 нм	280 нм	300 нм
			210 нм	210 нм	210 нм	210 нм	210 нм	210 нм	210 нм	210 нм
Клопідогрель	13,738	1373,8	1,0000	0,9837	0,6383	0,2167	0,2058	0,2801	1,0756	0,6231
Клопідогрель карбонова кислота	11,849	1184,9	1,0000	0,4088	0,1750	0,1813	0,3783	0,2977	0,7897	0,0348

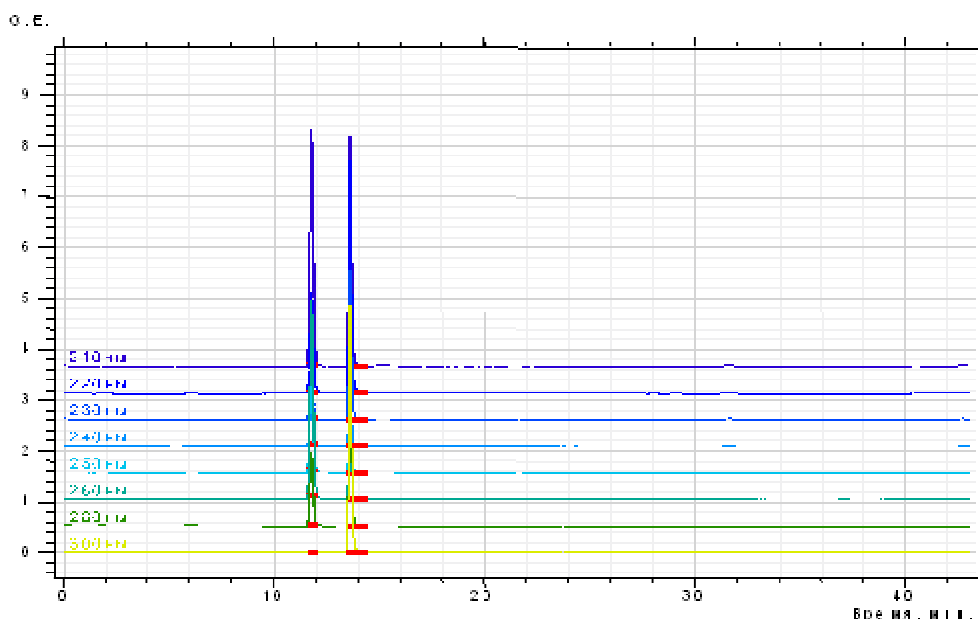


Рис. 1. Хроматограма розчинів клопідогрель карбонової кислоти (1) та клопідогрелю (2), що отримана за методом ВЕРХ.

Становить інтерес вивчення методом ВЕРХ також продукту лужного гідролізу клопідогрелю та продукту розпаду клопідогрелю в умовах кислотного гідролізу, що застосовують в аналізі препаратів групи бензодіазепінів [2].

У таблиці 2 наведено основні хроматографічні параметри отриманих лужного та кислотного гідролізатів при визначенні методом ВЕРХ за зазначених умов.

Таблиця 2. Основні хроматографічні параметри лужного та кислотного гідролізатів при визначенні методом ВЕРХ

Речовина	t_R	V_R	$R(S_\lambda / S_{210})$							
			$\frac{210 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{220 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{230 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{240 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{250 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{260 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{280 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{300 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$
Лужний гідролізат	11,853	1185,3	1,0000	0,4117	0,1698	0,1854	0,3774	0,7845	0,0298	0,3024
Кислотний гідролізат	11,857	1185,7	1,0000	0,4200	0,1747	0,1801	0,3798	0,7877	0,0254	0,3110

лено серію розчинів зазначених речовин та проведено їх хроматографування за вказаних умов.

За отриманими даними будували градувальні графіки, використовуючи як робочу довжину хвилі 280 нм для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти. Даним графікам відповідають рівняння прямих (1) та (2) відповідно виду $y = bx + a$, що мають вигляд [1]:

$$S = 0,0005912 \cdot C - 0,001385, \quad (1)$$

$$S = 0,0006082 \cdot C - 0,001247, \quad (2)$$

де S – площа піку, а C – концентрація речовини, мкг/мл.

Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей [1] наведено в таблиці 3.

Таблиця 3. Метрологічні характеристики градувальних залежностей (1) та (2) площі піку від вмісту речовини ($y = bx + a$), отриманих методом ВЕРХ

Пряма	r^2	b	a	S^2	Δb	Δa
1	0,9998	0,0005912	-0,001385	0,000002529	0,000005713	0,001075
2	0,9998	0,0006082	-0,001247	0,000002017	0,000005102	0,0009604

Після перевірки значущості коефіцієнтів a в рівняннях (1) та (2) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівнянь виду $y = bx$ [1].

Отримані залежності лінійні для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в діапазоні концентрацій від 1 до 400 мкг/мл, що

відповідає вмісту речовин у введеному об'ємі проби від 2 нг до 800 нг відповідно.

Отримані градієнтні графіки та рівняння прямих (1) та (2) було використано для розрахунку концентрації клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в модельних розчинах.

Отримані дані наведено в таблицях 4 та 5.

Таблиця 4. 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	$\bar{X} = 99,73$ $S = 1,096$ $S_{\bar{X}} = 0,548$ $\Delta \bar{X} = 1,74$ $\varepsilon = \pm 1,75\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 99,73 \pm 1,74$
50,0	0,02815	49,96	99,92	
100,0	0,05747	99,55	99,55	
200,0	0,1181	202,11	101,06	

Таблиця 5. 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	0,005886	9,88	98,80	$\bar{X} = 99,11$ $S = 1,853$ $S_{\bar{X}} = 0,927$ $\Delta \bar{X} = 2,95$ $\varepsilon = \pm 2,98\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 99,11 \pm 2,95$
50,0	0,02994	49,43	98,86	
100,0	0,05897	97,16	97,16	
200,0	0,1235	203,26	101,63	

Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,81\%$ та $\pm 2,98\%$ відповідно.

Проведене кількісне визначення клопідогрелю за продуктом його лужного та кислотного гідролізу – клопідогрель карбоновою кислотою. Проводили лужний або кислотний гідроліз клопідогрелю (див. експ. част.) та виконували хро-

матографування отриманих розчинів в зазначених умовах. Концентрацію клопідогрелю в розчині розраховували за допомогою рівняння прямої (2) та коефіцієнта перерахунку клопідогрель карбонової кислоти на клопідогрель, що дорівнює 1,037.

Результати наведено в таблиці 6.

Таблиця 6. Результати кількісного визначення клопідогрелю методом ВЕРХ у модельних розчинах за клопідогрель карбоновою кислотою за умов лужного гідролізу ($\lambda = 280$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину клопідогрелю, мкг/мл	Площа піку	Знайдено клопідогрелю		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10,0	0,005816	10,13	101,30	$\bar{X} = 101,30$ $S = 0,652$ $S_{\bar{X}} = 0,326$ $\Delta \bar{X} = 1,04$ $\varepsilon = \pm 1,02\%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 101,30 \pm 1,04$
50,0	0,02964	50,75	101,50	
100,0	0,05877	100,42	100,42	
200,0	0,1195	203,96	101,98	

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

Оскільки клопідогрель карбонова кислота є основним продуктом метаболізму клопідогрелю [4], цю методику можна використовувати для визначення «загального клопідогрелю» в біологічних об'єктах.

Встановлено, що кислотний гідроліз клопідогрелю відбувається не кількісно.

Висновки. 1. Проведено аналіз клопідогрелю та продукту його лужного гідролізу – клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ.

2. Проведено лужний та кислотний гідроліз клопідогрелю, виконано дослідження продуктів гідролізу методом ВЕРХ. Встановлено, що при цьому утворюється клопідогрель карбонова кислота, що підтверджується за величинами часу утримування та спектральних характеристик.

3. Розроблено методики кількісного визначення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти методом ВЕРХ.

4. Встановлено, що лужний гідроліз клопідогрелю відбувається кількісно, що дозволяє використовувати градувальний графік для кількісного визначення клопідогрель карбонової кислоти для кількісного визначення клопідогрелю за продуктом його лужного гідролізу.

Література

- 1 Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств / С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
2. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / пер. с нем; под ред. В. В. Налимова. – М.: Мир, 1994. – 223 с.
3. Перспективы применения высокоэффективной жидкостной хроматографии в скрининговом анализе / Г. И. Барам, В. В. Болотов, Б. Н. Изотов, Г. П. Петюнин, Н. П. Молибога [и др.] // Журнал хроматографічного товариства. – 2004. – Т. IV, № 1. – С. 11–20.
4. Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry / P. P. Lagorce, Y. Y. Perez,

- J. J. Ortiz [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1998. – Vol. 720 (1 – 2). – P. 107 – 117.
5. Bogusz M. Standardized HPLC/DAD system, based on retention indices and spectral library, applicable for systematic toxicological screening / M. Bogusz, M. Wu // J. Anal. Toxicol. – 1991. – Vol. 15. – P. 188–197.
6. European Pharmacopea. – 4 ed. – Council of Europe. – Strasbourg, 2002. – 2416 p.
7. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection / B. K. Logan, D. T. Stafford, I. R. Tebbett, C. M. Moore // J. Anal. Toxicol. – 1990.
8. Tracqui A. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD / A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin // J. Forensic Sci. – 1995. – Vol. 40 (2). – P. 254 – 262.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ КЛОПИДОГРЕЛЯ

В. С. Бондарь, Л. С. Аносова

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: предложены условия качественного анализа клопидогреля и его основного метаболита, который является одновременно продуктом его щелочного и кислотного гидролиза, – клопидогрель карбоновой кислоты – методом ВЭЖХ. Установлено, что щелочной гидролиз клопидогреля протекает количественно. Разработаны методики количественного определения клопидогреля и продукта его метаболизма – клопидогрель карбоновой кислоты – методом ВЭЖХ.

Ключевые слова: клопидогрель, щелочной гидролиз, кислотный гидролиз, клопидогрель карбоновая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография.

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF CLOPIDOGREL

V. S. Bondar, L. S. Anosova

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the conditions of analysis of clopidogrel and its main metabolite, which is the product of its alkaline and acid hydrolysis, – clopidogrel carboxylic acid – by HPLC method have been offered. It has been set, that the alkaline hydrolysis of clopidogrel occurs quantitatively. The methods of quantitative determination of clopidogrel and product of its metabolism – clopidogrel carboxylic acid – by HPLC method have been developed.

Key words: clopidogrel, alkaline hydrolysis, acid hydrolysis, clopidogrel carboxylic acid, high-performance liquid chromatography.