

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ КЛОПІДОГРЕЛЮ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В.

Національний фармацевтичний університет

**Вступ.** Клопідогрель (плавікс) – (+)-(S)-метил-2-(2-хлорфеніл)-2-(6,7-дигідротієно[3,2-с]піридин-5(4H)-іл)ацетат – належить до антиагрегантних лікарських засобів і є світовим стандартом у коригуванні змін реологічних властивостей крові. Практично у будь-якій схемі лікування хворих із серцево-судинними захворюваннями окрім суміші антигіпертензивних, антиангінальних та антиаритмічних засобів ми бачимо саме клопідогрель [3, 6, 9, 10]. Цей препарат належить до малотоксичних лікарських засобів, проте у випадку летальних отруєнь невідомою речовиною судово-медичний експерт-токсиколог повинен встановити повний перелік препаратів, які вживав пацієнт, а не який саме препарат є безпосередньою причиною отруєння. В той же час фіксуються спроби самогубств з використанням клопідогрелю як монопрепарату [8].

Хроматографія в тонких шарах сорбенту (ТШХ) є одним з найпоширеніших методів, що застосовують для ідентифікації речовин, і зокрема клопідогрелю, як в фармацевтичному, так і в хіміко-токсикологічному аналізі [1, 5, 7].

На наш погляд як маркер при виявленні клопідогрелю методом ТШХ може бути використаний його основний метаболіт – клопідогрель карбонова кислота, яку можна легко одержати із препарату в процесі хроматографування [4].

**Мета дослідження.** Метою дослідження є розробка умов виявлення клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в присутності інших лікарських препаратів за допомогою хроматографії в тонких шарах сорбенту.

Роботу виконано за темою: «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (0103U000475).

**Матеріали та методи.** Як тонкі шари використовували пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція –  $5 \div 20$  мкм, товщина шару  $130 \pm 25$  мкм, розмір пластин –  $10 \times 10$  см); пластини «Sorbfil» ПТСХ-ІІВ (силікагель СТХ-ІВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція –  $8 \div 12$  мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластин –  $10 \times 10$  см); пластини Alugram Sil G/UV254 фірми Macherey-Nagel (Німеччина) (силікагель G<sub>254</sub>, товщина шару – 200 мкм, розмір пластин –  $10 \times 10$  см).

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

Хроматографування проводили в камерах

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

В роботі використовували ацетилсаліцилову кислоту, еналаприл, ніфедипін та фенобарбітал – вибір зазначених препаратів для порівняльного дослідження обумовлений можливістю їх спільного застосування з клопідогрелем [3, 6, 9, 10].

Для проявлення плям речовин на пластинах використовували УФ-світло та деякі реактиви, що застосовують в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин (розчин калій перманганату – для виявлення кокаїну, речовин-відновників; розчин ферум (III) хлориду – для виявлення похідних піразолону-5, кислоти саліцилової та інших речовин, що містять в своїй структурі фенольний гідроксил; реактив Драгендорфа з послідовною обробкою пластин кислотою сульфатною – для виявлення алкалоїдів, похідних 1,4-бензодіазепіну, кислоти *n*-амінобензойної та інших речовин, що містять в своїй структурі третинний атом азоту; 50% розчин кислоти сульфатної в етанолі – для виявлення похідних феногіазину; розчин нінгідрину з наступним нагріванням пластин – для виявлення фенілалкіламінів та речовин, що містять в структурі первинну або вторинну аміногрупу; розчини меркурій (II) сульфату та дифенілкарбазону – для виявлення похідних кислоти барбітурової) [1, 5].

Лужний гідроліз препарату при дослідженні методом ТШХ проводили таким чином: на лінію старту хроматографічної пластини наносили в точку 1 – 10 мкг клопідогрелю, обробляли її 10% розчином натрій гідроксиду та висушували при кімнатній температурі. Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносили 10 мкл розчину клопідогрель карбонової кислоти з концентрацією 1 мг/мл. Пластини елюювали в системі розчинників хлороформ – ацетон (80:20).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати хроматографічного дослідження клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в присутності інших лікарських препаратів наведено в табл. 1 та 2.

Результати проявлення плям досліджуваних препаратів наведено в табл. 3.

Дані, що наведено в табл. 1 – 3, свідчать, що для ідентифікації клопідогрелю методом ТШХ можна рекомендувати застосування хроматографічних пластин Alugram, ВЕТШХ та Sorbfil в системі розчинників етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2) та пластин Sorbfil в системі розчинників хлороформ – ацетон (80:20).

**Таблиця 1.** Значення R<sub>f</sub> для клопідогрелю, клопідогрель карбонової кислоти та деяких інших препаратів в загальних системах розчинників (n = 3)

Система розчинників*	Тонкий шар**	Препарати					
		клопідогрель	клопідогрель карбонова кислота	ацетилсаліцилова кислота	фенобарбітал	еналаприл	ніфедіпін
1	A	0,95	0,78	0,05	0,52	0,86	0,90
	B	0,91	0,75	0,08	0,58	0,70	0,85
	B	0,88	0,70	0,00	0,60	0,75	0,86
2	A	0,98	0,82	0,09	0,51	0,86	0,94
	B	0,95	0,78	0,06	0,68	0,74	0,85
	B	0,90	0,73	0,00	0,63	0,71	0,80
3	A	0,95	0,78	0,05	0,50	0,88	0,92
	B	0,94	0,76	0,03	0,58	0,72	0,85
	B	0,98	0,72	0,00	0,62	0,75	0,87
4	A	0,95	0,79	0,03	0,61	0,86	0,90
	B	0,92	0,75	0,09	0,58	0,78	0,89
	B	0,89	0,72	0,00	0,63	0,75	0,86
5	A	0,57	0,32	0,13	0,59	0,07	0,98
	B	0,96	0,54	0,15	0,07	0,07	0,91
	B	0,95	0,57	0,07	0,00	0,00	0,80
6	A	0,96	0,75	0,25	0,89	0,29	0,99
	B	0,95	0,76	0,33	0,75	0,14	0,88
	B	0,94	0,73	0,31	0,46	0,00	0,92
7	A	0,88	0,80	0,37	0,99	0,28	0,99
	B	0,91	0,76	0,16	0,89	0,07	0,97
	B	0,95	0,75	0,12	0,99	0,04	0,92
8	A	0,97	0,75	0,79	0,86	0,63	0,74
	B	0,97	0,75	0,77	0,87	0,58	0,91
	B	0,91	0,72	0,79	0,80	0,87	0,92
9	A	0,93	0,68	0,93	0,93	0,92	0,96
	B	0,88	0,70	0,88	0,92	0,99	0,90
	B	0,86	0,73	0,82	0,73	0,99	0,83

**Примітки:** \*1. хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5); 2. толуен – ацетон – етанол – 25% розчин амоніаку (45:45:7,5:2,5); 3. етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (85:10:2,5); 4. хлороформ – н-бутанол – 25% розчин амоніаку (70:40:5); 5. хлороформ – ацетон (80:20); 6. хлороформ – метанол (90:10); 7. етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (85:10:5); 8. метанол – н-бутанол (60:40); 9. метанол – 25% розчин амоніаку (100:1,5); \*\*A – Sorbfil; B – BETSHX; B – Alugram;

При використанні системи розчинників 9 пластини попередньо обробляли 0,1 моль/л розчину калій гідроксиду в метанолі, а потім ви-

сушували при 110°C протягом 30 хв. В системі розчинників 8 пластини попередньо обробляли 0,1 моль/л розчином натрій броміду [1, 5].

**Таблиця 2.** Значення R<sub>f</sub> для клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти в різних системах розчинників і тонких шарах сорбенту (n = 3)

Система розчинників	Значення R <sub>f</sub>					
	клопідогрель			Клопідогрель карбонова кислота		
	A*	B	B	A	B	B
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

**Примітка:** \*A – Sorbfil; B – BETSHX; B – Alugram.

**Таблиця 3.** Результати проявлення плям клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти на хроматографічних пластинах різноманітними проявниками

Проявник*	Забарвлення / чутливість, мкг в пробі	
	клопідогрель салатна флуоресценція / 0,1	Клопідогрель карбонової кислоти салатна флуоресценція / 0,1
1	—	—
2	—	—
3	—	фіолетове / 0,1
4	жовтогаряче / 0,1	жовтогаряче / 0,1
5	—	—
6	—	—
7	—	—

**Примітки:** \*Проявники: – УФ-світло; – 1% розчин калій перманганату в 0,25 моль/л розчині кислоти сульфатної [5]; – 5% розчин ферум (III) хлориду [5]; – послідовно реактив Драгендорфа та кислота сульфатна [5]; – 50% розчин кислоти сульфатної в етанолі [5]; – послідовно 5% розчин меркурій (II) сульфату та 0,1% розчин дифенілкарбазону в хлороформі [5]; – 0,5% розчин нігідрину [5]; «—» – відсутність забарвлення.

Встановлено, що для повного перебігу лужного гідролізу клопідогрелю як у розчині, так і на хроматографічних пластинах, необхідним і достатнім є використання 10% розчину натрій гідроксиду.

Для ідентифікації клопідогрелю запропоновано специфічну методику, що базується на комплексному використанні лужного гідролізу, кольорових реакцій та методу ТШХ: на лінію старту хроматографічної пластини наносять в дві точки 1 – 10 мкг клопідогрелю. Першу точку обробляють 10% розчином натрій гідроксиду та висушують при кімнатній температурі. Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносять по 10 мкл метанольних розчинів «свідків» – клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти (концентрація 1 мкг/мл). Пластину висушують та елююють в системі розчинників хлороформ – ацетон (80:20) або етанол – кислота ацетатна концентрована – вода (5:3:2). Пластину проявляють на смугах 2 та 3, використовуючи методику проведення гідроксидної проби [2], – спостерігають фіолетові плями

[2], – спостерігають фіолетові плями ( $R_f = 0,57$  або  $0,88$ ). Далі на смугах 1 та 4 пластину проявляють 5% розчином ферум (III) хлориду – спостерігають фіолетові плями ( $R_f = 0,32$  або  $0,67$ ).

**Висновок:** Вивчено хроматографічну поведінку клопідогрелю та його маркера – клопідогрель карбонової кислоти – в умовах ТШХ-скринінгу, з використанням загальних та деяких окремих систем розчинників. Запропоновано реактиви для проявлення плям клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти на хроматографічних пластинах; встановлено їх чутливість. Розроблено умови специфічного способу виявлення клопідогрелю з використанням методу реакційної ТШХ за його маркером – клопідогрель карбоновою кислотою. Результати досліджень можуть бути використані для ідентифікації клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти, ізольованих із біологічного матеріалу.

## ЛІТЕРАТУРА:

1. Еремін С.К. Анализ наркотических средств: руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств / С. К. Еремін, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
2. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений: издание 2-е, пер. и доп. / И. М. Коренман. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
3. Antithrombotic therapy after peripheral vascular treatment: what is evidence-based? / G. Böttcher, G. Gäbel, N. Weiss, H. D. Saeger, H. Bergert // Zentralbl. Chir. – 2012. – V. 137 (5). – P. 425 – 429.
4. Bahrami G. High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study // G. Bahrami, B. Mohammadi, S. Sisakhtnezhad // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. – 2008. – V. 864 (1–2). – 168 – 172.
5. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed. / Edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London: The Pharm. Press, 2011. – 2609 p.
6. Sadanandan S. Clopidogrel: the data, the experience, and the controversies / S. Sadanandan, I. M. Singh // Am. J. Cardiovasc. Drugs. – 2012. – V. 12 (6). – P. 361 – 374.
7. Stability indicating HPTLC determination of clopidogrel bisulphate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form / H. Agrawal, N. Kaul, A. R. Paradkar, K. R. Mahadik // Talanta. – 2003. – V. 61 (5). – P. 581 – 589.
8. Suicide attempt with clopidogrel / G. Kocabay, I. Okçular, V. Akkaya, K. Güler // Hum. Exp. Toxicol. – 2006. – V. 25 (12). – P. 731 – 734.
9. Thomson R. M. Aspirin and clopidogrel for prevention of ischemic stroke / R. M. Thomson, D. C. Anderson // Curr. Neurol. Neurosci. Rep. – 2013. – V. 13 (2). – P. 327.
10. Ziegelstein R. C. Treatment with clopidogrel after myocardial infarction / R. C. Ziegelstein // JAMA. – 2012. – V. 308 (23). – P. 2457.

**Бондар В.С., Аносова Л.С., Шовкова З.В.** Ідентифікація клопідогрелю та його метаболіту за допомогою методу тонкошарової хроматографії // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 50-52.

Вивчено хроматографічну поведінку клопідогрелю та його маркера – клопідогрель карбонової кислоти – методом ТШХ. Запропоновано реактиви для проявлення плям клопідогрелю та клопідогрель карбонової кислоти на хроматографічних пластинах. Розроблено умови специфічного способу виявлення клопідогрелю за клопідогрель карбоновою кислотою.

**Ключові слова:** клопідогрель, клопідогрель карбонової кислоти, тонкошарова хроматографія

**Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковоя З.В.** Идентификация клопидогреля и его метаболита с помощью метода тонкослойной хроматографии // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 50-52.

Изучено хроматографическое поведение клопидогреля и его маркера – клопидогрель карбоновой кислоты – методом ТСХ. Предложены реактивы для проявления пятен клопидогреля и клопидогрель карбоновой кислоты на хроматографических пластинах. Разработаны условия специфического способа обнаружения клопидогреля по клопидогрель карбоновой кислоте.

**Ключевые слова:** клопидогрель, клопидогрель карбонової кислоти, тонкослойная хроматография

**Bondar V.S., Anosova L.S., Showkova Z.V.** Identification of clopidogrel and its metabolite by the method of thin layer chromatography // Ukrainian medical journal. – 2013. – Volume 16, No 1. – P. 50-52.

The chromatographic dealing of clopidogrel and its marker – clopidogrel carboxylic acid – has been studied by the method of TLC. The reagents for the clopidogrel and clopidogrel carboxylic acid spots development on chromatographic plates have been offered. The conditions of specific identification method of clopidogrel by clopidogrel carboxylic acid have been developed.

**Keywords:** clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, thin layer chromatography

Надійшла 01.12.2012 р.  
Рецензент: проф. Л.В.Савченкова