

**УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В АНАЛИЗЕ
КЛОПИДОГРЕЛА****Л.С. Аносова***Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького*

Поступила в редакцию 26.07.2021 г.

Аннотация. В большинстве стран мира сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти их граждан. К таким странам принадлежат и страны постсоветского пространства, в которых приблизительно 70% человеческих смертей вызваны различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Согласно рекомендациям Российского кардиологического общества (РКО) и Европейского общества кардиологов в стандарты лечения больных с общим коронарным синдромом (ОКС), как один из вариантов, входит антитромбоцитарная терапия именно клопидогрелем. Особенно актуально применение данного препарата во время лечения пациентов с осложнениями ССЗ, вызванными COVID-19.

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 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.

Целью исследований явилась разработка и валидация методики количественного определения антиагреганта клопидогрела с помощью доступного и широко внедренного в практику химико-токсикологического анализа метода УФ-спектрофотометрии.

Объекты исследования - Клопидогрель бисульфат субстанция-порошок, производитель: ЧАО «Фармак», Украина, соответствует Европейской фармакопее с содержанием действующего вещества 99,31%. (серия LM2504208).

Светопоглощение растворов в УФ-спектре измеряли на спектрофотометре СФ-46 (АО «ЛОМО», Россия), спектральный диапазон измерений – от 200 до 350 нм. Использовали стандартный раствор клопидогрела в 0.1 М растворе хлористоводородной кислоты (100 мкг/мл).

Оптимальной длиной волны, при которой растворы анализируемой субстанции подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера и может быть использована для количественного определения клопидогрела является 278 нм.

Калибровочный график для УФ-спектрофотометрического метода описывался уравнением: $A = 0.004104 \cdot C + 0.005220$; линейность наблюдали в пределах концентраций клопидогрела 20.0-200.0 мкг/мл; LOD и LOQ составили, соответственно, 1.144 мкг и 3.467 мкг в пробе.

Разработанная методика количественного определения клопидогрела с использованием УФ-спектрофотометрического метода удовлетворяют требованиям к методам, рекомендованным для использования в судебной токсикологии, что подтверждено валидационными характеристиками.

Ключевые слова: клопидогрел, УФ-спектрофотометрия, химико-токсикологический анализ, отравление, сердечно-сосудистая система.

В большинстве стран мира сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти их граждан. К таким странам принадлежат и страны постсоветского пространства, в которых приблизительно 70% человеческих смертей вызваны различными сердечно-сосуди-

стыми заболеваниями, в том числе и атеротромбозом [1-4]. Клопидогрел – представитель антитромбоцитарных (антиагрегантных) средств, который эффективно применяется в комплексном лечении ССЗ (острый коронарный синдром, ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака, заболевания периферических артерий и др.) [5-7].

Согласно рекомендациям Российского кардиологического общества (РКО) и Европейского общества кардиологов в стандарты лечения больных с общим коронарным синдромом (ОКС), как один из вариантов, входит антитромбоцитарная терапия именно клопидогрелем.

Особенно актуально применение данного препарата во время лечения пациентов с осложнениями ССЗ, вызванными COVID-19.

Маркетинговые исследования фармацевтического рынка показывают, что в группе антиагреганты зарегистрировано 87 номенклатурных позиций в соответствии с международной классификацией АТС. Их выпускают 49 производителей из 18-ти стран мира. На сегодняшний день большая часть этого сегмента фармацевтического рынка представлена зарубежными фирмами-производителями - их доля составляет 55.2 %, доля отечественных производителей – 44.8 %. Ассортимент сформирован 11 подгруппами антиагрегантов, ведущую позицию занимает подгруппа В01АС04 Клопидогрел, на которую приходится 44.8 % [8].

Клопидогрел представляет собой пролекарство, биотрансформация которого с образованием активного метаболита происходит в печени и биотрансформируется ферментной системой цитохрома Р450. Следовательно, этот антиагрегант не активен *in vitro* [9].

Клопидогрел (зилт, плавикс, лопирел, плагрил) по химической структуре является метил-(+)-(S)-альфа-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротieno[3.2-с]пиридин-5(4Н) ацетатом [10, 11].

В медицине клопидогрел применяется в виде соли серной кислоты - клопидогреля гидросульфата (далее клопидогрел), описанного в монографии Европейской фармакопеи. Российская (ГФ XIV) и украинская фармакопеи (ГФУ) дают описание и методы анализа клопидогреля бисульфата в таблетированной лекарственной форме.

Клопидогрел, как и близкие к нему структуры, токсичны для организма человека. При контакте со слизистыми оболочками глаз, оказывает раздражающее действие [12]. Из-за общетоксического действия, клопидогреля бисульфат в Российской Федерации отнесли к вредным веществам. На данное лекарственное вещество разработаны и подготовлены в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.016-79 «Воздух рабочей зоны. Требования к методикам измерения концентраций вредных веществ» с изм. 1, ГОСТ 12.1.005-88 методические указания. Ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБРВ) клопидогреля гидросульфата в воздухе рабочей

зоны 0.2 мг/м³ [12]. Согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 клопидогрел относится ко 2 классу опасности (токсичности) химических веществ.

Не редко описываются случаи передозировки данного лекарственного препарата. Острая передозировка клопидогрела (1050 мг) у 34-летней женщины не привела к развитию смертельных побочных явлений, но привела к обширному кровотечению. Летальная доза препарата у бабуинов составляла 3000 мг/кг. При этом наблюдались рвота, прострация, затрудненное дыхание и желудочно-кишечное кровотечение [13].

Также авторами Фукусако Т., Ямасита Х., Омото М., Мацуда К., Шинохара К., Фухимура Ю. был описан случай тромботической тромбоцитопенической пурпуры, ассоциированной с клопидогрелем в 2007 году [14].

Сегодня клопидогрел очень часто используется с целью самоубийства. Авторами Коцабей Г., Окгуляр И., Аккая В., Гулер К. в 2006 году сообщалось о случае 49-летнего мужчины, принявшего передозировку 1650 мг клопидогреля с суицидальными намерениями. У пациента наблюдались аномалии агрегации тромбоцитов [15].

Авторы Бордериас Глау Л, Гарापиз Лопез И, Кабаллеро Г. также сообщали о легочном кровотечении и гемотораксе после массового приема клопидогреля при попытке самоубийства [16]. Авторы Ал Асмар Р., Зейд Ф. сообщают об отравлении клопидогрелем, вызвавшим острый гемоторакс, геморрагический шок [17].

Терапевтическая суточная доза клопидогреля бисульфата составляет 75 мг/сут. Для лечения допускается единоразово суточная доза 300 мг, затем переход на терапевтическую дозу - 75 мг ежедневно [3]. При употреблении более высоких доз клопидогреля (более 300 мг ежедневно) может наступить хроническая токсичность, при которой наблюдаемыми эффектами будут острый гастрит, эрозии желудка и рвота. Overdose наблюдается при употреблении клопидогреля в дозе 900 мг. Однократная пероральная доза клопидогреля 1500мг является смертельной [15,17].

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 заболеваний сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест на рынке лекарственных препаратов, и, как следствие, смертельные случаи при приеме указанных препаратов встречаются достаточно ча-

сто [15-17]. Случается это, в первую очередь, конечно же, из-за обострения основного заболевания у пациентов при неправильном подборе препарата или вследствие резистентности к нему организма. Но также нередки случаи суицидов сердечно-сосудистыми средствами. При этом встречаются как моно-, так и поливалентные отравления. Поэтому, химико-токсикологическое исследование клопидогрела является очень актуальным сегодня.

Метод спектрофотометрии в УФ-области спектра широко применяется в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе (ХТА) для идентификации и количественного определения в комбинированных препаратах [18, 19], лекарственных формах [20,21], а также в биологических объектах [22,23]. Также для исследования лекарственных препаратов используют метод производной спектрофотометрии в сочетании с хроматографическими методами [24,25]. Применение УФ-спектрофотометрии в анализе клопидогрела обусловлено особенностями структуры вещества, то есть основывается на наличии в его молекулах ароматических фрагментов.

Для количественного определения клопидогрела в биологических жидкостях и извлечениях из биологического материала в основном применяются методы газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, требующие наличия дорогостоящей аппаратуры в лабораториях [26-29].

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

Предварительно были разработаны методы идентификации [30,31], количественного определения [27,32] и выделения клопидогрела из биологического материала [33,34,35,36].

Целью исследований явилась разработка УФ-спектрофотометрической методики определения клопидогрела в биологическом материале, пригодной для химико-токсикологического анализа (судебно-токсикологической экспертизы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования - Клопидогрель бисульфат (далее по тексту Клопидогрел) субстанция-порошок, производитель: ЧАО «Фармак», Украина, соответствует Европейской фармакопее с содержанием действующего вещества 99.31% (серия LM2504208).

Реактивы соответствовали квалификации «ЧДА»: кислота хлористоводородная (37 %) (Chimmed, Москва, Россия).

Аналитическое оборудование: спектрофотометр СФ-46 (АО «ЛОМО», Россия) в диапазоне длины волны 200-350 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм; весы аналитические AXIS ANG200 (Польша). Для работы использовали мерную посуду класса А (первого класса) и вспомогательные вещества, которые отвечали требованиям Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) [37].

Выбор оптимальной длины волны для УФ-спектрофотометрического определения.

Методика приготовления стандартного раствора клопидогрела: 100.00 мг клопидогреля бисульфата вносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, растворяли в 0.1 М растворе хлороводородной кислоты и доводили объем раствора тем же растворителем до метки (*стандартный раствор 1*, концентрация 1000 мкг/мл).

В мерную колбу емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 10.0 мл стандартного раствора клопидогрела 1 и доводили объем до метки 0.1 М раствором хлороводородной кислоты (*стандартный раствор 2*, концентрация 100 мкг/мл).

Снимали УФ-спектр поглощения стандартного раствора клопидогрела 2 в диапазоне длин волн 230 – 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 0.1 М раствор хлороводородной кислоты.

Полученный УФ-спектр поглощения раствора клопидогрела приведен на рис. 1.

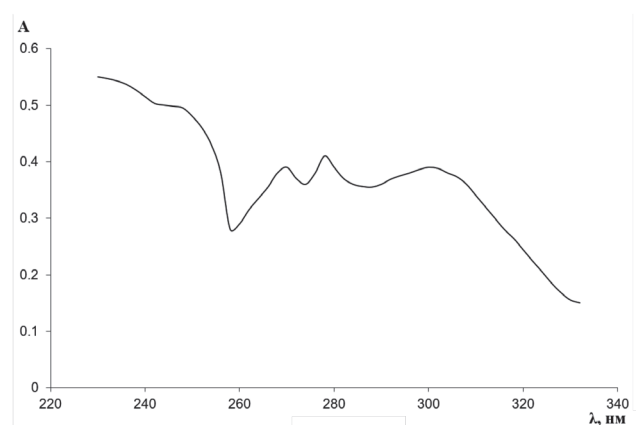


Рис. 1. УФ-спектры поглощения растворов клопидогрела с концентрацией 100.0 мкг/мл в 0.1 М растворе хлористоводородной кислоты

Приготовление модельных растворов клопидогрела.

В три мерные колбы вместимостью 100.0 мл вносили из бюретки 20.0; 15.0 и 5.0 мл стандарт-

Таблица 1

Результаты определения удельного и молярного коэффициентов светопоглощения клопидогрела в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)

Концентрация раствора клопидогрела, мкг/мл	Оптическая плотность, A	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологическая характеристика для $A_{1\text{см}}^{1\%}$ (n = 5; P = 0.95)	ϵ	Метрологическая характеристика для ϵ
20.0	0.088	44.0	$\bar{X} = 42.0$ $S = 1.2$ $S_{\bar{X}} = 0.5$ $\Delta\bar{X} = 1.4$ $\epsilon = \pm 3.4\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 42.0 \pm 1.4$	1416.0	$\bar{X} = 1350.5$ $S = 37.3$ $S_{\bar{X}} = 16.7$ $\Delta\bar{X} = 46.4$ $e = \pm 3.4\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 1350.5 \pm 46.4$
50.0	0.208	41.6		1338.8	
100.0	0.411	41.1		1322.7	
150.0	0.625	41.7		1340.9	
200.0	0.829	41.5		1333.9	

Таблица 2

Зависимость оптической плотности растворов клопидогрела от его концентрации ($\lambda = 278$ нм; $l = 10$ мм)

Концентрация раствора клопидогрела, мкг/мл	Оптическая плотность		
	A_i	\bar{A}	RSD, %
20.0	0.088	0.090	1.70
	0.090		
	0.091		
50.0	0.208	0.208	1.21
	0.211		
	0.206		
100.0	0.411	0.411	0.85
	0.415		
	0.408		
150.0	0.625	0.623	0.33
	0.624		
	0.621		
200.0	0.829	0.832	0.37
	0.831		
	0.835		

ного раствора клопидогрела 1 и доводили объемы до метки 0.1 М раствором хлороводородной кислоты (растворы 3, 4 и 5 соответственно; концентрация 200, 150 и 50 мкг/мл соответственно).

В мерную колбу вместимостью 100.0 мл вносили из бюретки 20.0 мл стандартного раствора клопидогрела 2 и доводили объем до метки 0.1 М раствором хлороводородной кислоты (раствор 6, концентрация 20 мкг/мл).

После тщательного перемешивания измеряли оптическую плотность растворов клопидогрела 2, 3, 4, 5 и 6 на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 0.1 М раствор хлороводородной кислоты. Эксперимент выполняли трижды.

Рассчитывали удельный ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) и молярный (ϵ) коэффициенты светопоглощения (табл. 1).

Построение градуировочного графика для УФ-спектрофотометрического определения клопидогрела. Приготовление растворов проводили согласно описанной выше методике. Эксперимент выполняли трижды.

По результатам измерения оптической плотности строили градуировочный график. Результаты приведены на рис. 2. и табл.2.

Построение градуировочного графика проводили в нормализованных координатах. Для каж-

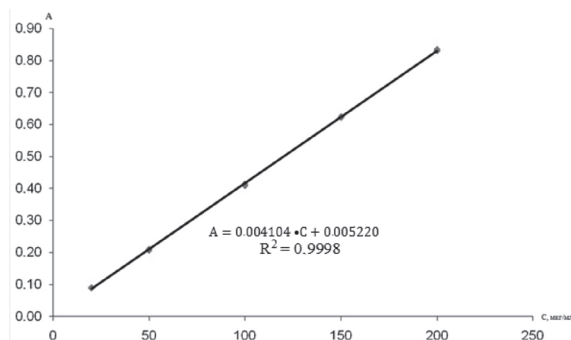


Рис. 2. Градуировочный график для УФ-спектрофотометрического определения клопидогрела ($\lambda = 278$ нм, $l = 10$ мм)

дого из пяти растворов образца рассчитывали среднее значение оптической плотности. Полученные результаты обрабатывали методом наименьших квадратов для прямой $Y = b \cdot x + a$.

РЕЗУЛЬТАТ

Выбор оптимальной длины волны. В УФ-спектре абсорбции клопидогрела с использованием в качестве растворителя 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной наблюдали максимумы поглощения при длине волны 270 ± 2 , 278 ± 2 и 300 ± 2 нм (рис. 1).

Путем выполнения серии экспериментов и расчета значений удельного ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) и молярного (ϵ) коэффициентов светопоглощения показано, что оптическая плотность растворов клопидогрела в 0.1 М растворе хлористоводородной кислоты при длине волны 270 и 300 нм не подчиняется основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

Таким образом, количественное определение клопидогрела с помощью УФ-спектрофотометрического метода проводили при длине волны 278 ± 2 нм.

Полученные данные определения удельного ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) и молярного (ϵ) коэффициентов приведены в табл. 1.

Построение градуировочного графика. По результатам измерения оптической плотности при длине волны 278 нм строили градуировочный график. Результаты приведены в табл. 2 и рис. 2.

Приведенные в табл. 2 и на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что оптическая плотность растворов клопидогрела подчиняется закону светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера в интервале концентраций от 20 до 200 мкг/мл.

Значения поглощения в УФ-области спектра для шести растворов клопидогрела ($m = 6$; $n = 5$) были обработаны с помощью модели линейной регрессии, описанной в общей форме как $y = bx + a$. Значимость коэффициента регрессии a в регрессионной модели была проверена с помощью F-критерия [37], и был сделан вывод о невозможности перехода к уравнению в виде $y = b \cdot x$. Таким образом, калибровочная кривая была описана уравнением $A = 0.004104 \cdot C + 0.005220$ ($r = 0.999$; $S_0^2 = 1.418 \cdot 10^{-5}$; $S_a = 3.951 \cdot 10^{-3}$; $S_b = 3.217 \cdot 10^{-5}$). Клопидогрел показал линейность в диапазоне 20.0-200.0 мг/мл. Предел количественного определения клопидогрела составляет 20.0 мкг/мл. Значения LOD и LOQ были рассчитаны с использованием стандартного отклонения перехвата (S_a) в соответствии с соответствующими уравнениями: $LOD = 3.3 \cdot (S_a^2/b)$ и $LOQ = 10 \cdot (S_a^2/b)$ [37, 38]. Они составляли 1.144 мкг/мл и 3.467 мкг/мл соответственно.

Точность метода и определение правильности определялись при трех уровнях концентрации в течение одного дня (внутри дня) (табл. 3) и в течение трех последовательных дней. Количество повторов измерения уровня концентрации в день составляло три. Для этого нами были выбраны: нижний уровень концентраций – 20.0 мкг/мл; средний – 100.0 мкг/мл и высокий – 200.0 мкг/мл.

После статистической обработки результатов по определению правильности методики значение открываемости составляет 99.77%, границы

открываемости клопидогрела не выходят за рекомендованные пределы, результаты не отягощены систематической ошибкой.

По результатам метрологических характеристик проведена проверка наличия значимой системной погрешности [37].

В результате расчёта установлено, что критерий Стьюдента составил

$$|100.0 - 99.77| \cdot \sqrt{\frac{5}{0.99}} = 0.52,$$

что не превышает табличного значения ($t < t(P, \nu)$), где $P=95\%$ - доверительная вероятность, $\nu = n-1$ – число степеней свободы, то есть $0.52 < 2.776$), поэтому можно сделать вывод об отсутствии систематической ошибки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения клопидогрела с использованием УФ-спектрофотометрического метода удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам, рекомендованным для использования в судебной токсикологии [38], и это подтверждено валидационными характеристиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Capodanno D., Alberts M. J., Angiolillo D. J. // Nature Reviews Cardiology. 2016. Vol. 13, pp. 609–622.
2. Bonello L. // Current Cardiovascular Risk Reports. 2015. Vol. 9, № 3, pp. 1–9.
3. Nijenhuis V.J. // N. Engl. J. Med. 2020. Vol. 382, № 18, pp. 1696–1707.
4. R. Nairooz. // International Journal of Cardiology. 2017. Vol. 229, № 15, pp. 82–89.
5. Vincent J. Nijenhuis, M.D., Jorn Brouwer. // N. Engl. J. Med. 2020. Vol. 382, № 18, pp. 1696–1707.
6. Źurowska-Wolak M., Owsiak M., Bartuś S., Mikos M. // Postępy Kardiologii Interwencyjnej. 2021. № 17(1), pp.39-45.
7. Cierniak-Piotrowska M., Marciniak G., Stańczak J. // Rządowa Rada Ludnościowa, Warszawa 2015. №. 2, pp.46-81.

Таблица 3

Точность и правильность УФ-спектрофотометрического метода (среднесуточное измерение)

Внесено мкг/мл	Оптическая плотность	Найдено клопидогрела		Метрологическая характеристика			
		мкг/мл	R, %	Среднее значение	SD	RSD, %	ϵ , %
20.0	0.088	20.17	100.85	100.42	0.750	±0.74	2.24
	0.088	20.17	100.85				
	0.087	19.91	99.55				
100.0	0.411	98.89	98.87	98.67	0.473	±0.48	1.98
	0.402	98.13	98.13				
	0.412	99.01	99.01				
200.0	0.829	200.73	100.37	100.22	0.274	±0.28	1.24

8. Редькина С. А., Ткаченко Н. О., Гладишев В. В. // Фармацевтический журнал. 2016. № 3-4. С. 12–15.
9. Herbert JM, Savi P. // Thromb Haemost. 2009. № 82, pp.156-7.
10. Physicians` Desk Reference. 71th ed. Montvale. Medical Economics. 2017. 2756 p.
11. A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed. London, The Pharm. Press, 2011, p. 2609.
12. Lin G.-Q., You Q.-D., Cheng J.-F. Hoboken. Wiley. 2011. p.472.
13. Методика измерений массовой концентрации метил-(+)-(8)-альфа-(о-хлорфенил)-6,7-дигидроотиено [3,2-с] пиридин-5(4Н)-ацетата гидросульфат (клопидогрела гидросульфит) в воздухе рабочей зоны методом спектрофотометрии : метод. указ. МУК 4.1.3333-16. Москва, 2016. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456022829> (Дата обращения 13.05.2021).
14. Luo Zhong-hua, Wen Jing-bing. // J. Natural. Sci. Hunan Normal Univ. 2013. № 79 (10), pp. 1279-1293.
15. T. Fukusako. // Rinsho Shinkeigaku. 2007. Vol. 47, № 10, pp. 635–638.
16. Kocabay G., Okçular I., Akkaya V., Güler K. // Hum. Exp. Toxicol. 2006. Vol. 25, № 12, pp. 731–734.
17. Borderías C. L., Garrapiz L. J., Caballero G. // Arch. Bronconeumol. 2009. Vol. 45, № 11, pp. 570–571.
18. Al Asmar R., Zeid F. Acute // Cureus. 2020. Vol. 12, № 3, pp. 7431.
19. M. Attimarad. Attimarad, M. // J. Basic Clin. Pharm. 2010. Vol. 2, Issue 1, pp. 53–61.
20. M. Stolarczyk, A. Apola, A. // Acta Pharm. 2017. Vol. 67, Issue 4, pp. 463–478.
21. M. Stolarczyk, A. Maślanka, A. Apola et al. // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2015. Vol. 148, pp. 66–71.
22. J. Parojčić, K. Karljicković-Rajić, Z. // Biopharm. Drug Dispos. 2003. Vol. 24, Issue 7, pp. 309–314.
23. I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, F. Salinas López, M. Rodríguez Gómez. // Anal. and Bioanal. Chem. 2002. Vol. 373, Issue 4–5, pp. 251–258.
24. Вергейчик Т. Х., Линникова В. А., Гуськова Г. Б. // Изв. Самарского науч. центра Рос. академии наук. 2012. Т. 14, № 5 (3). С. 700–703.
25. Tolba, M. M., M. M. Salim. // J. Chromatogr. Sci. 2016. Vol. 54, Issue 5, pp. 776–789.
26. Барам, Г. И. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. №1. С. 75 – 79.
27. Бондар, В. С., Аносова Л.С. // Фармацевт. часоп. 2012. №4 (24). С. 73 – 78.
28. Pawaskar P.S. // Int. J. Pharm. Res. Sch. 2013. № 2(1), pp. 16-23.
29. P. Pawaskar // Int. J. Pharm Sci. 2013. №5(1), pp. 1971-1976.
30. Бондар В.С., Аносова Л.С. // «Розробка методів ідентифікації клопидогрелю, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу», збірник праць матеріалів VII Нац. з'їзду фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє», 15 – 17 верес. 2010 р., Харків, Т. 1, с. 137.
31. Бондар В. С., Аносова Л. С., Шовкова З. В. // Укр. мед. альм. 2013. Т. 16, №1. С. 50 – 52.
32. Бондар В. С., Аносова Л. С. // Укр. мед. альм. 2012. Т. 15, №5 (додаток). С. 43 – 44.
33. Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. // Фармація Казахстана. 2013. №7. С. 34 – 37.
34. Бондарь В.С., Аносова Л.С., Шовковая З.В. // Фармація Казахстана. 2013. №9. С. 59 – 60.
35. Аносова Л. С., Бондар В. С., Шовкова З. В. // Укр. мед. альм. 2013. Т. 16, №1 (додаток). С. 154.
36. Anosova L. S., Bondar V. S., 2013, «Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid» Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo. Kharkiv. NUPh, 2013, pp. 76.
37. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». Доповнення 2. Харків: ПІРЕГ. 2008. 608 с.
38. Ricardo Dinis-Oliveira, Duarte Nuno Vieira. // Analysis. forensic sciences research. 2016. Vol. 1, №. 1, 42–51.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

*Аносова Л. С., кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармацевтической и медицинской химии, ORCID 0000-0002-9380-4619
E-mail: apteka-nanya@yandex.ru*

*Gorky National Medical University
Anosova L. S., PhD., Assistant Professor, of the Department of Pharmaceutical and Medical Chemistry, ORCID 0000-0002-9380-4619
E-mail: apteka-nanya@yandex.ru*

UV-SPECTROPHOTOMETRY IN THE ANALYSIS OF CLOPIDOGREL

L.S. Anosova

Donetsk National Medical University

Abstract. In most countries of the world, cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of death of their citizens. These countries include the countries of the post-Soviet space, in which approximately 70% of human deaths are caused by various cardiovascular diseases. According to the recommendations of the Russian Society of Cardiology (RKO) and the European Society of Cardiology, the standards for the treatment of patients with general coronary syndrome (ACS), as one of the options, include antiplatelet therapy with clopidogrel. The use of this drug is especially relevant during the treatment of patients with CVD complications caused by COVID-19.

According to the information given 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 medicines for the treatment of diseases of the cardiovascular system occupy one of the first places in the market of medicines, and, as a result, deaths when taking these drugs are quite common.

The aim of the research was to develop and validate a technique for the quantitative determination of the antiplatelet agent clopidogrel using an accessible and widely implemented chemical-toxicological analysis method of UV spectrophotometry.

Objects of research - Clopidogrel bisulfate substance-powder, manufacturer: PJSC "Farmak", Ukraine, corresponds to the European Pharmacopoeia with an active substance content of 99.31%. (LM2504208 series).

The light absorption of solutions in the UV spectrum was measured on the SF-46 spectrophotometer (JSC LOMO, Russia), the spectral measurement range was from 200 to 350 nm. A standard solution of clopidogrel in 0.1 M hydrochloric acid solution (100 mcg/ml) was used.

The optimal wavelength, which obeys the Booger-Lambert-Beer law and can be used to quantify clopidogrel, is 278 nm.

The calibration graph for the UV spectrophotometric method was described by the equation: $A = 0.004104 \cdot C + 0.005220$; linearity was observed within the concentrations of clopidogrel 20.0-200.0 mcg/ml; LOD and LOQ were, respectively, 1.144 mcg and 3.467 mcg in the sample.

The developed method of quantitative determination of clopidogrel using the UV spectrophotometric method meets the requirements for methods recommended for use in forensic toxicology, which is confirmed by validation characteristics.

Keywords: clopidogrel, UV spectrophotometry, chemical and toxicological analysis, poisoning, cardiovascular system.

REFERENCES

1. Capodanno D., Alberts M. J., Angiolillo D. J. *Nature Reviews Cardiology*, 2016, Vol. 13, pp. 609–622.
2. Bonello L. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 2015, Vol. 9, No. 3, pp. 1–9.
3. Nijenhuis V.J. // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, No. 18, pp. 1696–1707.
4. Nairooz R. *International Journal of Cardiology*, 2017, Vol. 229, No. 15, pp. 82–89.
5. Vincent J. Nijenhuis, M.D., Jorn Brouwer. *N Engl J Med*, 2020, Vol. 382, No. 18, pp. 1696–1707.
6. Żurowska-Wolak M, Owsiak M, Bartuś S, Mikos M. *Postepy Kardiologii Interwencyjnej*, 2021, No.17(1), pp.39-45.
7. Cierniak-Piotrowska M, Marciniak G, Stańczak J. *Rządowa Rada Ludnościowa, Warszawa*, 2015; No. 2, pp. 46-81.
8. Red'kina E. A., Tkachenko N. O., Gladishev V.V. *Pharmaceutical journal*, 2016, No. 3-4, pp. 12–15.
9. Herbert JM, Savi P. *Thromb Haemost* 2009; No. 82, pp.156-7.
10. *Physicians' Desk Reference*. 71th ed. Montvale, Medical Economics, 2017, 2756 p.
11. A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed.* London, The Pharm. Press, 2011, 2609 p.
12. Lin G.-Q., You Q.-D., Cheng J.-F. *Chiral drugs: chemistry and biological action*. Hoboken: Wiley, 2011, 472 p.
13. *Metodika izmerenij massovoj koncentracii metil-(+)-(8)-al'fa-(o-hlorfenil)-6,7-digidrotieno [3,2-s] piridin-5(4N)-acetata gidrosul'fat (klopidogrela gidrosul'fit) v vozduhe rabochej zony metodom*

- spektrofotometrii : metod. ukaz. MUK 4.1.3333-16. Moskva, 2016. Available at: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293751/4293751370.htm> (accessed: 23 may 2021).
14. Luo Zhong-hua, Wen Jing-bing. // J. Natural. Sci. Hunan Normal Univ. 2013. No. 79 (10), pp. 1279-1293.
 15. T. Fukusako. // Rinsho Shinkeigaku, 2007, Vol. 47, No. 10, pp. 635–638.
 16. Kocabay G., Okçular I., Akkaya V., Güler K. // Hum. Exp. Toxicol, 2006, Vol. 25, No. 12, pp. 731–734.
 17. Borderías C. L., Garrapiz L. J., Caballero G Arch. Bronconeumol. 2009. Vol. 45, No. 11. P. 570–571.
 18. Al Asmar R., Zeid F. Cureus, 2020, Vol. 12, No. 3. e7431.
 19. Attimarad, M. J. Basic Clin. Pharm. 2010, Vol. 2, Issue 1, pp. 53–61.
 20. M. Stolarczyk, A. Apola, A. // Acta Pharm, 2017, Vol. 67, No. 4, pp. 463–478.
 21. M. Stolarczyk, A. Maślanka, A. Apola et al. // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc, 2015, Vol. 148, pp. 66–71.
 22. J. Parojčić, K. Karljiković–Rajić, Z. // Biopharm. Drug Dispos, 2003, Vol. 24, No. 7, pp. 309–314.
 23. I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, F. Salinas López, M. Rodríguez Gómez. Anal. and Bioanal. Chem, 2002, Vol. 373, No. 4–5, pp. 251–258.
 24. Vergejchik, T. H., Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2012, T. 14, No. 5 (3), pp. 700–703.
 25. Tolba, M. M. J. Chromatogr. Sci, 2016, Vol. 54, No. 5, pp. 776–789.
 26. Baram, G. I., Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny, 2003, T. 135., No., pp. 75 – 79.
 27. Bondar V. S., Anosova L. S., Farmacevt. Chasop, 2012, No. 4 (24), pp. 73 – 78.
 28. Pawaskar P.S., Int. J. Pharm. Res. Sch., 2013, No. 2(1), pp. 16-23.
 29. Pawaskar P. Int. J. Pharm. Sci., 2013, No. 5(1), pp. 1971-1976.
 30. Bondar V. S., Anosova L. S. "Development of methods for identifying clopidogrel suitable for chemical and toxicological analysis", collection of works of materials of the VII National Academy of Sciences. Congress of Pharmacists of Ukraine "Pharmacy of Ukraine. Looking to the future", 15 – 17 September 2010 r., Harkiv, 2010, T. 1, S. 137.
 31. Bondar V. S., Anosova L. S., SHovkova Z., Ukrainian medical almanac, V. 2013, T. 16, No. 1, pp. 50 – 52.
 32. Bondar V. S., Anosova L. S., Ukrainian medical almanac, 2012, T. 15, No. 5 (dodatok), pp. 43 – 44.
 33. Bondar V. S., Anosova L. S., Pharmacy of Kazakhstan, 2013, No. 7, pp. 34 – 37.
 34. Bondar V. S., Anosova L. S., Pharmacy of Kazakhstan, 2013, No. 9, pp. 59 – 60.
 35. Bondar V. S., Anosova L. S., SHovkova Z., Ukrainian medical almanac, 2013, T. 16, No. 1 (dodatok), S. 154.
 36. Anosova L. S., Bondar V. S., 2013, «Development of the isolation procedure for clopidogrel using oxalic acid» Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, Kharkiv, NUPh, 2013, pp. 76.
 37. Derzhavna Farmakopeya Ukraïni. Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnij farmakopejnih centr», Addition 2, Harkiv, RIREG, 2008, 608 p.
 38. Ricardo Dinis-Oliveira, Duarte Nuno Vieira, Analysis. forensic sciences research, 2016, Vol. 1, №. 1, 42–51