

3.4.2. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ/ PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, PHARMACOGNOSY

УДК 615.225.4:543.857

DOI: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.33-39

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ

Л.С. Аносова¹, И.П. Ремезова², А.М. Агафонов¹

¹ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького» Минздрава ДНР (Донецк, Россия)

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (Пятигорск, Россия)

Для цитирования: Аносова Л.С., Ремезова И.П., Агафонов А.М. Разработка методики анализа клопидогрела с использованием ВЭЖХ и ее валидация. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2022;22(4):33-39. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.33-39

■ Сведения об авторах

Аносова Л.С. – ассистент кафедры фармацевтической и медицинской химии. ORCID: 0000-0002-9380-4619

E-mail: apteka-NaNya@yandex.ru

Ремезова И.П. – д-р фарм. наук, профессор кафедры токсикологической и аналитической химии. ORCID: 0000-0003-3456-8553

E-mail: i.p.remezova@pmedpharm.ru

Агафонов А.М. – ассистент кафедры фармацевтической и медицинской химии. ORCID: 0000-0002-0682-1366 E-mail: Chuh2008@yandex.ru

Рукопись получена: 25.09.2022

Рецензия получена: 02.11.2022

Решение о публикации: 11.11.2022

■ Аннотация

Цель – разработать методику анализа клопидогрела с использованием ВЭЖХ для целей химико-токсикологического анализа.

Материал и методы. Объекты исследования – клопидогрель бисульфат субстанция-порошок, производитель: ЧАО «Фармак», Украина, соответствует Европейской фармакопее с содержанием действующего вещества 99,31% (серия LM2504208). Хроматографический анализ был проведен на микроколоночном жидкостном хроматографе «Миличром А-02» (ЗАО «Эконова», Россия) по унифицированной методике, разработанной Г.И. Барамом.

Результаты. Наиболее высокое спектральное отношение методом ВЭЖХ наблюдается при 280 нм / 210 нм (максимальная площадь пика клопидогрела $R = 1,0787$). Калибровочный график описывался уравнением: $y = 0,0005912 \cdot x - 0,001385$ ($r = 0,9998$; $S02 = 25,29 \cdot 10^{-7}$); линейность в пределах 1–400 мкг/мл, что соответствует содержанию клопидогрела в пробе от 2 нг до 800 нг соответственно. На основании величин калибровочной прямой было рассчитано значение LOD и LOQ, они составляли 2,334 мкг/мл и 7,074 мкг/мл соответственно.

Выводы. Разработана методика количественного определения клопидогрела методом ВЭЖХ, которая позволяет определять его в смеси. Проведена валидация методики по показателям: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность.

■ **Ключевые слова:** клопидогрел, методика анализа, ВЭЖХ, валидация.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

■ Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием по абсорбции в ультрафиолетовой области спектра; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; РСО – раствор стандартного образца.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHODOLOGY FOR HPLC ANALYSIS OF CLOPIDOGREL

Lyudmila S. Anosova¹, Irina P. Remezova², Aleksei M. Agafonov¹

¹Donetsk National Medical University named after M. Gorky (Donetsk, Russia)

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University (Pyatigorsk, Russia)

Citation: Anosova LS, Remezova IP, Agafonov AM. Development and validation of a methodology for HPLC analysis of clopidogrel. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2022;22(4):33-39. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.33-39

■ Information about authors

Lyudmila S. Anosova – assistant of the Department of Pharmaceutical and medical chemistry. ORCID: 0000-0002-9380-4619

E-mail: apteka-NaNya@yandex.ru

Irina P. Remezova – PhD, Professor, Department of Toxicological and analytical chemistry. ORCID: 0000-0003-3456-8553

E-mail: i.p.remezova@pmedpharm.ru

Aleksei M. Agafonov – assistant of the Department of Pharmaceutical and medical chemistry. ORCID: 0000-0002-0682-1366

E-mail: Chuh2008@yandex.ru

Received: 25.09.2022

Revision Received: 02.11.2022

Accepted: 11.11.2022

■ Abstract

Aim – to develop a methodology for the chemical and toxicological analysis of clopidogrel using HPLC.

Material and methods. The study was performed on Clopidogrel bisulfate substance-powder, manufacturer: PJSC "Farmak", Ukraine, corresponding to the European Pharmacopoeia with an active substance content of 99.31% (LM2504208 series). For the chromatographic analysis we used a micro-column liquid chromatograph "Milichrome A-02" (CJSC "Econova", Russia). The analysis was done according to the unified HPLC technique developed by G.I. Baram.

Results. The highest spectral ratio by HPLC was observed at 280 nm / 210 nm (maximum clopidogrel peak area $R = 1.0787$). The calibration curve for the HPLC method was described by the equation: $y = 0.0005912 \cdot x - 0.001385$ ($r = 0.9998$; $S_{02} = 25.29 \cdot 10^{-7}$); linearity within 1–400 mcg/ml, which corresponded to the content of clopidogrel in the sample from 2 ng to 800 ng, respectively. Based on the values of the calibration curve, the LOD and LOQ were calculated: 2,334 mcg/ml and 7,074 mcg/ml, respectively.

Conclusion. A technique for the quantitative determination of clopidogrel by HPLC has been developed that allows for determining the substance in a mixture. The methodology was validated according to the following criteria: specificity, limit of detection, limit of quantitative determination, linearity, correctness and precision.

■ **Keywords:** clopidogrel, method of analysis, HPLC, validation.

■ **Conflict of interest:** *nothing to disclose.*

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы (ССЗ) (острый коронарный синдром, ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака, заболевания периферических артерий и др.) являются масштабной проблемой XXI века [1, 2]. Более 50% населения Российской Федерации имеет патологию сердечно-сосудистой системы, которая влечет за собой смертельный исход [3, 4].

Наиболее актуальным и требующим особого внимания остается вопрос ишемической болезни сердца (ИБС). ИБС является ведущей причиной смертности в РФ и ряде других стран с 2002 года, а доля этого заболевания в общей смертности с каждым годом растет [5, 6, 7]. Согласно прогнозу ВОЗ, показатели смертности от ССЗ будут продолжать увеличиваться во всем мире [8]. В России высокий уровень смертности от ССЗ связан прежде всего с низким уровнем обращаемости больных в лечебные учреждения, особенно лиц пожилого и старческого возраста с ССЗ в анамнезе [9, 10].

ССЗ требуют медикаментозной коррекции. Клопидогрел – представитель антитромбоцитарных (антиагрегантных) средств, который эффективно применяется в комплексном лечении ССЗ и является препаратом антитромбоцитарной терапии для лечения больных COVID-19 по рекомендациям Российского кардиологического общества (РКО) и Европейского общества кардиологов [11].

В условиях сильных ограничений во время пандемии COVID-19 ухудшилось психоэмоциональное состояние людей, появилась тревожность, хронический стресс, депрессия [12]. Эпидемиологическая обстановка и психическое состояние привели к повышению уровня самоубийств. В качестве препарата для самоубийства неоднократно применялся именно клопидогрел [13]. По информации, приведенной в научной литературе за последние 10 лет, клопидогрел представляет интерес с точки зрения химико-токсикологических исследований, поскольку передозировка данным препаратом и смертельные случаи при его приеме встречаются достаточно часто [14–17]. Связано это в первую очередь

с обострением основного заболевания у пациентов при неверном подборе препарата или вследствие резистентности к нему организма. Но также нередки случаи суицидов, совершенных посредством применения клопидогрела. При этом встречаются как моно-, так и поливалентные отравления [11, 18].

Развитие аналитической службы в направлениях проведения мониторинга эффективности лечения населения средствами, влияющими на свертывание крови и агрегацию тромбоцитов, и диагностики интоксикаций при применении этих лекарств базируется на разработке эффективных и экспрессных методик анализа препаратов в биологических объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Среди современных методов анализа для создания баз параметров идентификации и разделения массивов исследуемых веществ в биологических объектах ВЭЖХ-метод является одним из наиболее подходящих методов с высокой чувствительностью и селективностью.

ЦЕЛЬ

Разработка методики анализа клопидогрела с использованием ВЭЖХ для химико-токсикологического анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – клопидогрел бисульфат (далее 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%) (Chimed, Москва, Россия).

Аналитическое оборудование: хроматографический анализ был проведен на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Россия), по унифицированной ВЭЖХ-методике, разработанной Г.И. Барамом [19].

Условия хроматографирования: колонка размером 2x75 мм с обращенной фазой C18 (ProntoSIL – 120

– 5 – C18 AQ (Bischoff Analytentechnik und Geräte GmbH, Германия); градиентное элюирование выполняется смешиванием двух элюентов: элюент А – [4 М LiClO₄ – 0,1 М HClO₄] – H₂O (5:95); элюент Б – ацетонитрил для ВЭЖХ; скорость подачи подвижной фазы – 100 мкл/мин; температура термостата колонки – 40°C; объем вводной пробы – 2 мкл. Детектирование проводили при восьми длинах волн: 210, 220, 230, 250, 260, 270, 280 и 300 нм.

Обработку хроматограмм и расчет V_R и S_λ / S_{210} проводили с использованием компьютерной программы "МультиХром-СПЕКТР", версия 2.4 (ЗАО «Амперсенд»).

Приготовление элюента А. 0,2 М раствор литий перхлората в 0,005 М растворе кислоты хлорводородной готовили с использованием раствора 1 и раствора 2.

Раствор 1 (4,1 М водный раствор литий перхлората) получали растворением 330 г LiClO₄·3 H₂O в 450 мл бидистиллированной воде при перемешивании и нагреве до 50°C. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и доводили бидистиллированной водой до 500 мл. Раствор фильтровали сквозь мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор 2 (4 М водный раствор LiClO₄ в 0,1 М HClO₄) готовили разведением 2,2 мл кислоты хлористоводородной до объема 250 мл раствором 1.

Элюент А готовили разведением 10 мл раствора 2 до 200 мл бидистиллированной водой.

Приготовление раствора растворителя: в мерную колбу вместимостью 1000,0 мл вносили 500,00 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной и доводили объем раствора водой очищенной до метки.

Приготовление стандартных растворов клопидогрела. 0,1000 г вещества вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора водой очищенной до метки (стандартный раствор 1, концентрация 1000 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного раствора 1 и доводили объем

раствора водой очищенной до метки (стандартный раствор 2, концентрация 500 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 20,00 мл стандартного раствора 2 и доводили объем раствора до метки растворителем (раствор 3, концентрация 100 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл раствора 3 и доводили объем раствора до метки растворителем (раствор 4, концентрация 10 мкг/мл).

В две мерные колбы вместимостью 100,0 мл вносили по 10,00 и 5,00 мл раствора 4 соответственно и доводили объемы растворов до метки растворителем (растворы 5 и 6 соответственно; концентрация 1 и 0,5 мкг/мл).

Растворы клопидогрела 3, 4, 5 и 6 хроматографировали при вышеуказанных условиях. Предварительно проводили хроматографирование растворителя.

Для построения калибровочного графика для количественного определения клопидогрела методом ВЭЖХ готовили стандартный раствор клопидогрела в смеси 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной и воды (1:1).

0,1000 г клопидогрела вносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 10,00 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора водой очищенной до метки (стандартный раствор 1, концентрация 1000 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного раствора 1 и доводили объем раствора водой очищенной до метки (стандартный раствор 2, концентрация 500 мкг/мл).

В три мерные колбы вместимостью 50,0 мл вносили 40,00; 20,00 и с 10,00 мл стандартного раствора 2 соответственно и доводили объемы растворов до метки растворителем (растворы 3, 4 и 5 соответственно, концентрация 400, 200 и 100 мкг/мл соответственно).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл стандартного раствора 2 и доводили объем раствора до метки растворителем (раствор 6, концентрация 50 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл раствора 5 и доводили объем раствора до метки растворителем (раствор 7, концентрация 10 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносили 10,00 мл раствора 7 и доводили объем раствора до метки растворителем (раствор 8, концентрация 1 мкг/мл).

Растворы клопидогрела 3, 4, 5, 6, 7 и 8 хроматографировали при вышеупомянутых условиях (**рисунок 1**). Хроматографию каждого раствора проводили трижды. По результатам эксперимента строили калибровочный график при длине волны 280 нм (**рисунок 2**). Для введения раствора препарата в хроматограф использовали автоматический пробозаборник, вводивший

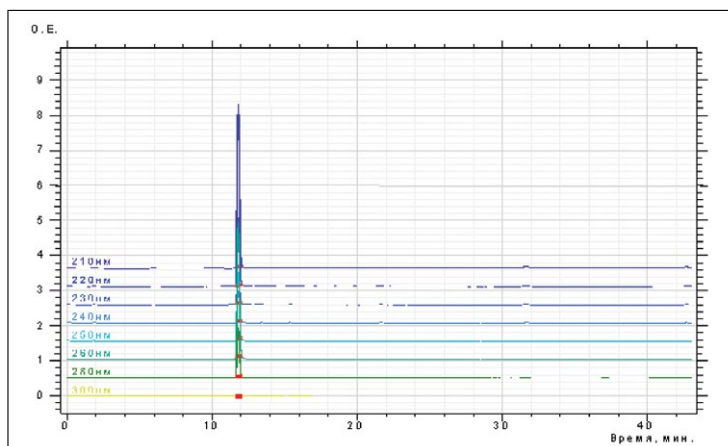


Рисунок 1. Хроматограмма клопидогрела (концентрация 10 мкг/мл).

Figure 1. Chromatogram of clopidogrel (concentration 10 µg/ml).

Таблица 1 / Table 1

Результаты определения основных хроматографических параметров
Results of determination of the main chromatographic parameters

Параметр	Значение параметра	Метрологические характеристики (n=3, P =0,95)					
		\bar{X}	SD	RSD, ±%	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	$\varepsilon, \pm\%$
Время удерживания (tR), мин	13,741	13,738	0,048	0,35	0,2073	0,89	1,16
	13,784						
	13,689						
Спектральное соотношение ($R = S_{\lambda} / S_{210}$)	210 нм 210 нм	1,0000	1,0000	0	0	0	0
	1,0000						
	1,0000						
	220 нм 210 нм	0,9831	0,9741	0,009	0,93	0,2203	0,95
	0,9742						
	0,9649						
	230 нм 210 нм	0,6383	0,6483	0,009	1,36	0,2073	0,9
	0,6517						
	0,6549						
	240 нм 210 нм	0,2167	0,2203	0,004	1,79	0,1884	0,81
	0,2196						
	0,2245						
	250 нм 210 нм	0,2058	0,2044	0,005	2,54	0,2203	0,95
	0,1986						
	0,2087						
	260 нм 210 нм	0,2801	0,2811	0,006	2,07	0,2074	0,89
	0,2873						
	0,2758						
	280 нм 210 нм	1,0756	1,0787	0,003	0,28	0,1884	0,81
	1,0789						
	1,0817						
	300 нм 210 нм	0,6231	0,6248	0,005	0,76	0,2203	0,95
	0,6211						
	0,6301						

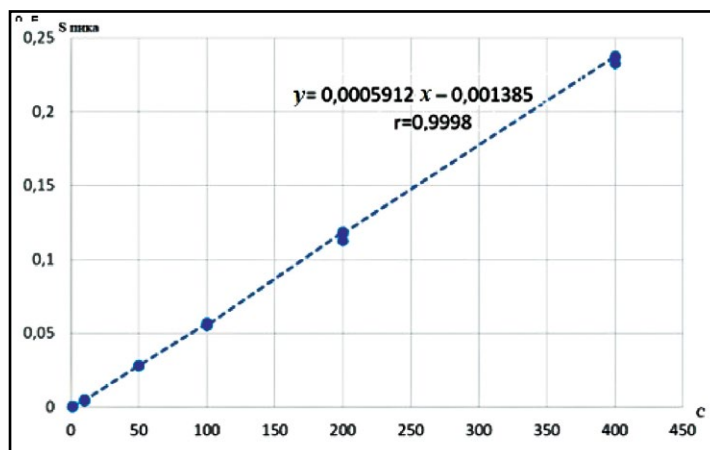


Рисунок 2. Калибровочный график количественного определения клопидогрела методом ВЭЖХ ($\lambda=280$ нм, объем пробы 2 мкл).

Figure 2. A calibration curve of the quantitative determination of clopidogrel by HPLC ($\lambda=280$ nm, sample volume 2 μ l).

в хроматограф 2 мкл исследуемого раствора. Для работы использовали мерную посуду класса А (первого класса) и вспомогательные вещества, которые отвечали требованиям Государственной фармакопеи РФ XIV издания [20].

Перед проведением испытаний проводили проверку пригодности хроматографической системы: относительное стандартное отклонение для площадей пиков клопидогрела должно быть не более 5,0%; коэффициент асимметрии для пиков должен быть не более 2.

Специфичность методики оценивали по появлению одного пика, соответствующему клопидогрелу на хроматограмме. Идентификацию клопидогрела проводили по времени удерживания (tR) и по спектральным характеристикам – отношение площадей пиков при длинах волн λ_2 - λ_8 к площади пика при длине волны $\lambda_1 = 210$ нм ($R = S_{\lambda} / S_{210}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты приведены на рисунке 1. Значения tR, которые используются для идентификации пика вещества на хроматограмме, приведены в таблице 1.

Как видно из полученных данных, время удерживания пика клопидогрела составляет около 13,74 мин.

Минимальная концентрация клопидогрела в растворе, которую можно определить с помощью приведенной методики, составляет 1 мкг/мл, что соответствует содержанию вещества в пробе 2 нг.

Наиболее высокое спектральное отношение 280 нм / 210 нм (максимальная площадь пика клопидогрела $R = 1,0787$), что и было использовано для дальнейшего количественного определения клопидогрела.

Количественное определение клопидогрела методом ВЭЖХ-УФ проводили при $\lambda = 280$ нм, что соответствовало области максимального специфического светопоглощения клопидогрела в УФ – области спектра, применяя при этом метод абсолютной калибровки. Результат приведен в таблице 2.

По полученным результатам, приведенным в таблице 2, строили калибровочный график (рисунок 2). Результаты свидетельствуют, что линейная зависимость при количественном определении исследуемого вещества методом ВЭЖХ наблюдается в пределах концентраций от 1 до 400 мкг/мл.

Методика количественного определения линейна в пределах 1–400 мкг/мл,

Таблица 2 / Table 2

Зависимость площади пика растворов клопидогрела от концентрации его растворов ($\lambda = 280$ нм; объем пробы 2 мкл)

The dependence of the peak area of clopidogrel solutions on the concentration of its solutions ($\lambda = 280$ nm; sample volume 2 μ l)

Концентрация раствора клопидогрела, мкг/мл	Площадь пика		
	S_i	\bar{S}	RSD, $\pm\%$
1,0	0,0004330	0,0004388	2,20
	0,0004500		
	0,0004330		
10,0	0,004897	0,004753	4,06
	0,004533		
	0,004827		
50,0	0,02805	0,02810	0,31
	0,02820		
	0,02805		
100,0	0,05682	0,05635	1,35
	0,05675		
	0,05547		
200,0	0,1184	0,1162	2,57
	0,1128		
	0,1174		
400,0	0,2374	0,2358	1,09
	0,2328		
	0,2371		

что соответствует содержанию клопидогрела в пробе от 2 нг до 800 нг соответственно. На основании величин калибровочной прямой было рассчитано значение LOD и LOQ с использованием стандартного отклонения перехвата (S_a) в соответствии со следующими уравнениями [21]:

$$LOD=3,3 \cdot \frac{S_a^2}{b}$$

$$LOQ=10 \cdot \frac{S_a^2}{b}$$

Они составляли 2,334 мкг/мл и 7,074 мкг/мл соответственно.

Оценка правильности метода определялась при трех уровнях концентрации (таблица 3) [21]. Для этого нами были выбраны: нижний уровень концентраций – 10,0 мкг/мл; средний – 200,0 мкг/мл и высокий – 400,0 мкг/мл.

Полученные данные свидетельствуют о том, что значения, принимаемые за истинные, находятся внутри доверительного интервала среднего результата анализа, полученного экспериментально.

По результатам метрологических характеристик проведена проверка наличия значимой системной погрешности [21]. В результате расчета установлено, что критерий Стьюдента составил $t=1,57$, что не превышает табличного значения $1,57 < 2,776$, поэтому

Таблица 3 / Table 3

Оценка правильности методики определения клопидогрела с помощью унифицированной ВЭЖХ методики

An assessment of the correctness of the methodology for determining clopidogrel using the unified HPLC methodology

Уровень	Внесено мкг/мл	Найдено клопидогреля		Метрологическая характеристика
		Мкг/мл	R, %	
1	10,0	10,11	101,10	$\bar{X}=99,69$ $SD=2,93$ $RSD=\pm 2,94\%$ $\Delta\bar{X}=1,31$ $\epsilon=\pm 1,31\%$
		9,98	99,80	
		10,01	100,10	
2	200,0	194,6	97,30	
		200,1	100,05	
		200,4	100,20	
3	400,0	400,1	100,02	
		398,4	99,60	
		396,2	99,05	

можно сделать вывод об отсутствии систематической ошибки.

Определение прецизионности проводили на концентрации раствора 100 мкг/мл (таблица 4).

Так как RSD не превышает допустимых норм, предлагаемая методика является прецизионной. Из приведенных данных мы видим, что разработанная методика отвечает всем валидационным требованиям и может быть использована для целей химико-токсикологического анализа клопидогрела.

Литературные данные свидетельствуют о том, что метод ВЭЖХ очень часто используется как для анализа лекарственных веществ в лекарственных формах, так и для их анализа в биологических жидкостях, а также для изучения фармакокинетики. Так, ВЭЖХ-методика предлагалась для анализа клопидогрела в таблетках [22–24], для определения примесей в лекарственных формах клопидогрела [25–27], для определения клопидогрела в плазме крови и моче с помощью методов ВЭЖХ [27, 28], ВЭЖХ-МС [29]. Идентификация и количественное определение исследуемого лекарственного средства в лекарственных формах методом ВЭЖХ были проведены в различных условиях хроматографирования.

Предложенные методики анализа клопидогрела методом ВЭЖХ имеют недостатки. Использование изократического режима элюирования ограничивает возможность выхода всех компонентов образца из колонки в узких зонах и эффективное распределение смесей лекарственных препаратов. Применение нелинейного градиента при элюировании клопидогрела усложняет процесс хроматографии. Определение лекарственного вещества при одной длине волны снижает достоверность результатов, полученных при идентификации, поскольку позволяет использовать только параметры удерживания без учета спектральных соотношений.

Таким образом, современные методики анализа клопидогрела с помощью ВЭЖХ указывают

Таблица 4 / Table 4

Оценка прецизионности определения клопидогрела методом ВЭЖХ

The evaluation of the precision of clopidogrel determination by HPLC

Внесено, мкг/мл	Площадь пика, отн. ед.	Результат, мкг	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологическая характеристика (n = 6; P = 0,95)
100	0,05747	100,7	0,43	0,1849	$\bar{X} = 100,27$ $SD = 1,22$ $RSD = \pm 1,22\%$
	0,05743	99,7	-0,57	0,3249	
	0,05749	101,0	0,73	0,5329	
	0,05745	100,3	0,07	0,0009	
	0,05741	99,6	-0,67	0,4489	
	0,05745	100,3	0,07	0,0009	

на отсутствие систематических исследований, что не позволяет использовать их для целей химико-токсикологического анализа.

Градиентное элюирование смесями растворителей в нашем методе представляет собой линейный градиент от элюента А (5% ацетонитрил и 95% буфер) до элюента В (100% ацетонитрил). Метод самого быстрого режима обеспечивал уменьшение полярности элюента с добавлением менее полярного растворителя (ацетонитрила) и снижение удерживания компонентов, тем самым создавая условия для выхода из колонки всех компонентов образца в виде узких зон. Термостат колонки твердотельного типа с электронагревателем обеспечивал оптимальные условия хроматографии и воспроизводимость результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения клопидогрела методом ВЭЖХ, которая позволяет определять его в смеси. Проведена валидация методики по показателям: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность.

Сравнительная оценка спектральных соотношений позволяет получать более надежные и воспроизводимые результаты, а также идентифицировать препараты с близкими значениями параметров удерживания.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Glushhenko VA, Irklienko EK. Cardiovascular morbidity – one of the most vital problems of modern health care. *Medicine and health care organization*. 2019;4(1):56-63. (In Russ.). [Глущенко В.А., Иркиенко Е.К. Сердечно-сосудистая заболеваемость – одна из важнейших проблем здравоохранения. *Медицина и организация здравоохранения*. 2019;4(1):56-63].
2. Kondratieva YuV, Moiseeva KE, Alekseeva AV, et al. Medical and social problems of health of rural school children. *Medicine and health care organization*. 2018;3(4):9-15. (In Russ.). [Кондратьева Ю.В., Моисее-

ва К.Е., Алексеева А.В., и др. Медико-социальные проблемы состояния здоровья сельских школьников. *Медицина и организация здравоохранения*. 2018;3(4):9-15].

3. Alikhanova KA, Omarikulov BK, Abugaliev TO, et al. Results of sociological surveys population of the Karaganda region about the risk factors of stroke. *Fundamental Research*. 2013;9:804-809. (In Russ.). [Алиханова К.А., Омаркулов Б.К., Аbugалиева Т.О., и др. Изучение распространенности заболеваний сердечно-сосудистой системы среди населения Карагандинской области. *Фундаментальные исследования*. 2013;9:804-809].
4. Alekseenko SN, Drobot EN. *Prevention of diseases*. (In Russ.). [Алексеенко С.Н., Дробот Е.Н. Профилактика заболеваний]. Available at: <https://monographies.ru/ru/book/section?id=9649>
5. Shal'nova SA, Deev AD. Coronary heart disease in Russia: incidence rate and treatment (according to epidemiological data). *Terapevticheskii arkhiv*. 2011;83(1):7-12. (In Russ.). [Шальнова С.А., Деев А.Д. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований). *Терапевтический архив*. 2011;83(1):7-12].
6. Ishihara M, Fujino M, Ogawa H. Clinical Presentation, Management and Outcome of Japanese Patients With Acute Myocardial Infarction in the Troponin Era – Japanese Registry of Acute Myocardial Infarction Diagnosed by Universal Definition (JMINUET). *Circulation Journal*. 2015;79(6):1255-1262.
7. Davletov KK, Berkinbayev SF, Amirov BB, et al. Standardization of morbidity and mortality rates as a predicate for correct inter-regional comparisons. *Medicine (Almaty)*. 2015;6:2-5. (In Russ.). [Давлетов К.К., Беркинбаев С.Ф., Амиров Б.Б., и др. Стандартизация показателей заболеваемости и смертности как основа для корректного сравнения разных регионов. *Медицина (Алматы)*. 2015;6:2-5].
8. Romanova MM, Babkin AP, Zuykova AA. Comparative analysis of the incidence of cardiovascular pathology in the therapeutic areas in an urban and a rural clinic. *International journal of applied and fundamental research*. 2017;4:368-371. (In Russ.). [Романова М.М., Бабкин А.П., Зуйкова А.А. Сравнительный анализ заболеваемости сердечно-сосудистой патологией на терапевтических участках в городской и сельской поликлинике. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;4:368-371].
9. *The incidence of the population of Russia 2000–2011 (statistical materials)*. М., 2013. (In Russ.). [Заболеваемость населения России 2000–2011 (статистические материалы). М., 2013]. Available at: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/publications/catalog/doc1139919134734
10. *Healthcare in Russia. Russian statistical yearbook*. М., 2013. (In Russ.). [Здравоохранение в России. Статистический сборник. М., 2013].
11. Anosova LS. Development of conditions for analytical diagnosis of poisoning with clopidogrel. *Farmatsiya*. 2022;71(6):12-18. (In Russ.). [Аносова Л.С. Разработка условий аналитической диагностики отравлений клопидогрелом. *Фармация*. 2022;71(6):12-18]. doi: 10.29296/25419218-2022-06-02
12. Kochetova YuA, Klimakova MV. Psychological State Researches in the Context of the COVID-19 Pandemic [E-journal]. *Journal of Modern Foreign Psychology*. 2021;10(1):48-56. (In Russ.). [Кочетова Ю.А., Климакова М.В. Исследования психического состояния людей в условиях пандемии COVID-19. *Современная зару-*

- бежная психология. 2021;10(1):48-56]. doi: 10.17759/jmfp.2021100105
13. Number of suicide attempts in Colombia as of May 2021, by department. Available at: <https://www.statista.com/statistics/1113062/colombia-number-suicide-attempts-department/>
 14. Borderías Clau L, Garrapiz López J, Caballero G. Pulmonary haemorrhage and haemothorax after massive ingestion of clopidogrel as a suicide attempt. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(11):570-1. doi: 10.1016/j.arbres.2009.06.009
 15. Arslan E. Massive Ingestion of Clopidogrel in a Suicidal Attempt: A Case Report and Review of Literature İntihar Amaçlı Aşırı Doz Clopidogrel Alımı: Olgu Sunumu ve Literatürün Gözden Geçirilmesi. *JAEM*. 2013;12:167-9. doi: 10.5152 /JAEM.2013.046
 16. Fukusako T, et al. Case of thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *Rinsho Shinkeigaku*. 2007;47(10):635-638.
 17. Kocabay G, Okçular I, Akkaya V, Güler K. Suicide attempt with clopidogrel. *Hum Exp Toxicol*. 2006;25(12):731-734.
 18. Anosova LS. The distribution of clopidogrel in the organs of poisoned animals. *Farmaciya*. 2021;70(6):31-36. (In Russ.). [Аносова Л.С. Распределение клопидогрела в органах отравленных животных. *Фармация*. 2021;70(6):31-36]. doi: 10.29296/25419218-2021-06-06
 19. Baram GI. Chromatograph Milichrome A–02. Determination of substances using HPLC–UV databases. Novosibirsk, 2005. (In Russ.). [Барам Г.И. Хроматограф «Миличром А–02». Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ–УФ». Новосибирск, 2005].
 20. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. Vol I. "Measuring utensils"* [electronic edition]. (In Russ.). [Государственная Фармакопея РФ, XIV изд. Том I. «Мерная посуда»]. Available at: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (12 July 2022)
 21. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. Vol I. "Validation of analytical techniques"* [electronic edition]. (In Russ.). [Государственная Фармакопея РФ, XIV изд. Том I. «Валидация аналитических методик»]. Available at: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>
 22. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. Vol II. "Clopidogrel sulfatis tabulettae"* [electronic edition]. (In Russ.). [Государственная Фармакопея РФ, XIV изд. Том II. «Клопидогрела сульфат. Таблетки»]. Available at: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>
 23. *European Pharmacopoea. 7th ed. Council of Europe*. Strasbourg, 2011.
 24. *Derzhavna Farmakopeya Ukraïni. 1-e vid. Dopovnennyya 4*. Harkiv, 2011. (In Ukrain.).
 25. Setkina SB, Hishova OM, Zubkevich LV, et al. Comparative evaluation of the content of impurities in medicinal products containing clopidogrel bisulfate. *Vestnik farmacii*. 2014;2(64):50-58. (In Russ.). [Сеткина С.Б., Хишова О.М., Зубкевич Л.В., и др. Сравнительная оценка содержания примесей в лекарственных средствах, содержащих клопидогрела бисульфат. *Вестник фармации*. 2014;2(64):50-58].
 26. Pawaskar PS, Dighe VV, Adhyapak SS. Development of Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for Determination of (+)-(S)-(o-Chlorophenyl)-6,7-Dihydrothieno [3,2-c] pyridine-5(4H)-acetic acid, Hydrochloride and Methyl (+/-) - (o-Chlorophenyl)-4,5-Dihydrothieno[2,3-c]pyridine-6(7H)-acetate, Hydrochloride from Clopidogrel Besylate. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*. 2017;2(1):16-23.
 27. Saber AL, Elmosallamy MA, Amin AA. Liquid Chromatographic and Potentiometric Methods for Determinations of Clopidogrel. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008;16(2):11-18.
 28. Kavitha J, Kokilambigai KS, Seetharaman R, et al. A Review of Analytical Methods for the determination of Clopidogrel in Pharmaceuticals and Biological Matrices. Critical Reviews in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*. 2018;48(2):119-131. doi: 10.1080/10408347.2018.1427548
 29. Liu G, Dong C, Shen W, et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(1):55-63. doi: 10.1016/j.apsb.2015.11.001

■ Автор для переписки

Аносова Людмила Сергеевна
Адрес: Донецкий национальный медицинский университет
им. М. Горького, пр. Ильича, 16, г. Донецк, Россия, 283003.

E-mail: apteka-NaNya@yandex.ru

■ Corresponding Author

Lyudmila S. Anosova
Address: Donetsk National Medical University n.a. M. Gorky,
16 Ilyich ave., Donetsk, Russia, 283003.