

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

ANALIZA CROMATOGRAFICĂ A CLOPIDOGRELULUI. STUDII FARMACOCINETICE

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF.UNIV.DR. NEAMȚU JOHNY

STUDENT-DOCTORAND:
SPIRIDON ADELA-MARIA

CRAIOVA
2015

CUPRINS

I. INTRODUCERE.....	3
II. STADIUL CUNOAȘTERII.....	3
III. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	4
III.1. Motivarea alegerii temei de cercetare	4
III.2. Analiza simultană a clopidogrelului bisulfat, atorvastatinei calcice și acidului acetilsalicilic din comprimate prin cromatografia de lichide de înaltă performanță.....	4
III.3. Contribuții la dezvoltarea unei metode cromatografice de lichide de înaltă performanță cu fază inversă pentru detecția simultană a metabolitului de acid carboxilic al clopidogrelului și pantoprazolului din plasma umană: Studiu pilot	6
III.4. Contribuții la dezvoltarea și validarea unei metode cromatografice de lichide de înaltă performanță cu fază inversă pentru detecția simultană a clopidogrelului bisulfat, metabolitului său de acid carboxilic și atorvastatinei din plasma umană: Studiu farmacocinetic	7
IV. CONCLUZII.....	11
V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:.....	11

Cuvinte cheie: cromatografie de lichide de înaltă performanță, clopidogrel bisulfat, eluție în gradient, studiu farmacocinetic

I. INTRODUCERE

Analiza cromatografică a clopidogrelului din probe biologice a evoluat odată cu necesitățile terapeutice și strategia de reducere a rezistenței multifactoriale a acestui medicament.

Cercetarea de față propune estimări calitative și cantitative ale clopidogrelului și metabolitului său de acid carboxilic din comprimate și din plasma umană prin cromatografia de lichide de înaltă performanță. Elementul de noutate îl constituie studierea profilului farmacocinetic al clopidogrelului alături de alte două medicamente incluse în schema terapeutică, atorvastatina și pantoprazolul.

II. STADIUL CUNOAȘTERII

Această parte a tezei de doctorat este alcătuită din trei capitole cu informații din literatura de specialitate (ghiduri cu recomandări internaționale, articole științifice).

Primul capitol al tezei de doctorat descrie incidența evenimentelor cardiovasculare de natură aterotrombotică, mecanismele principale de producere și manifestările clinice ale aterotrombozei. Prevenția în bolile cardiace de natură aterotrombotică a devenit o abordare pe viață, implementându-se recomandări precise cu privire la dietă, modul de viață și scăderea factorilor de risc [1].

Capitolul al doilea contribuie la definirea profilului farmacologic al medicamentului clopidogrel, prin prezentarea particularităților farmacocinetice, farmacodinamice, indicațiilor și modului de administrare, interacțiunilor medicamentoase dintre clopidogrel-atorvastatină și clopidogrel-pantoprazol. Sunt prezentate rezultatele studiilor clinice din literatură de specialitate și strategia terapeutică recomandată de către ghidurile internaționale de cardiologie pentru pacienții cu sindrom coronarian acut și riscuri cardiovasculare majore [2].

În capitolul al treilea sunt prezentate metodele cromatografice din literatura de specialitate, aplicațiile lor în studiile de bioechivalență și biodisponibilitate precum și studiile farmacocinetice ale clopidogrelului și a metabolitului său de acid carboxilic.

Clopidogrelul a fost analizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță : HPLC-MS [3], HPLC-MS-MS [4-9], HPLC-UV[10-11]. Sunt descrise etapele analizei

cromatografice începând de la pregătirea probelor de plasmă, tehnicile recente de extracție plasmatică, separarea prin eluție izocratică [12] și în gradient [4], optimizarea compoziției fazei mobile și a pH-ului acestora prin ajustarea cu soluții tampon.

Stadiul cunoașterii conține partea teoretică și include elaborarea pe baza analizei literaturii de specialitate a unei liste de metode analitice de determinare a clopidogrelului și a metabolitului derivat de acid carboxilic din probe biologice [13].

III. CONTRIBUȚII PERSONALE

III.1. Motivarea alegerii temei de cercetare

În acest capitol sunt menționate detaliile referitoare la motivarea alegerii studiilor farmacocinetice clopidogrel-atorvastatină respectiv clopidogrel-pantoprazol și importanța determinării profilului concentrației plasmatice în timp a clopidogrelului la pacienții cu riscuri cardiovasculare majore.

III.2. Analiza simultană a clopidogrelului bisulfat, atorvastatinei calcice și acidului acetilsalicilic din comprimate prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

Acest capitol propune un studiu design pentru optimizarea compoziției fazei mobile (tampon KH_2PO_4 și acetonitril) cu parametrii cromatografici rezoluție (R_s), timpul de retenție (t_R) și factorul de trenare (T_f). Au fost efectuate 11 experimente randomizate pentru optimizarea metodei cromatografice folosind softul MODDE 9.1., modelul CCF (Central Composite Face-Centered) quadratic, ajustat cu PLS (Partial Least Squares – pentru mai multe răspunsuri).

Analiza cromatografică a fost determinată folosind cromatograful de lichide „Thermo Finnigan Surveyor” echipat cu un detector cu rețea de fotodiode și un soft de achiziție a datelor „Thermo Finnigan Xcalibur”. Separarea a fost realizată folosind o coloană cromatografică cu faze inversate de tip HDS Hypersil C_{18} (250x4.6 mm; 5 μm). Faza mobilă a fost optimizată cu ajutorul rezultatelor obținute din designul propus și a constat într-un amestec tampon KH_2PO_4 0.01 M (cu pH=2.6 ajustat cu acid ortofosforic 85%) :acetonitril :metanol 20:40:40 (v/v/v)) cu debitul de 0.8 mL·min⁻¹.

Liniaritatea metodei a fost determinată în intervalul de concentrații de 0.03-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru clopidogrel bisulfat, 0.03-2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru acidul acetilsalicilic și 0.04-1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru atorvastatină. Precizia a fost determinată prin analiza de șase ori a soluțiilor probelor de control (0.05, 0.3, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru clopidogrel bisulfat, 0.08, 0.1, 0.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru atorvastatină și 0.05, 0.5, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pentru acidul acetilsalicilic).

Separarea prin cromatografia de lichide de înaltă performanță a clopidogrelului bisulfat, acidului acetilsalicilic și atorvastatinei din comprimate este redată în figura 1 [14]. Timpii de retenție pentru compușii de analizat au fost: 3.138 minute pentru acidul acetilsalicilic, 4.133 minute pentru atorvastatină și 6.833 minute pentru clopidogrel bisulfat.

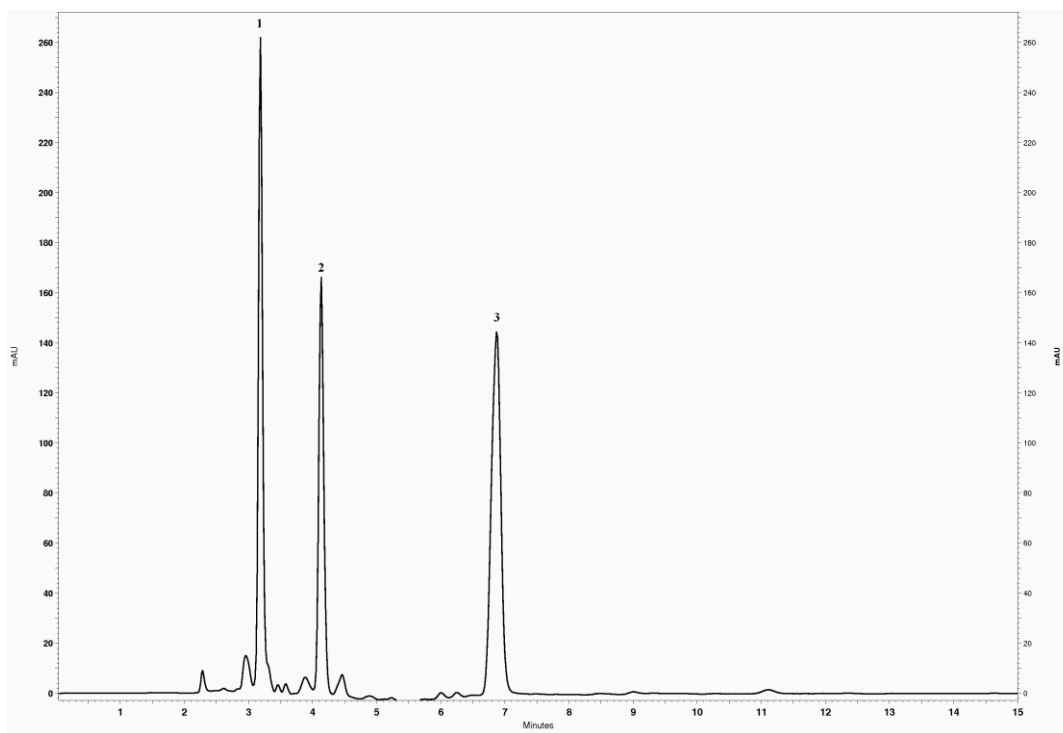


Figura 1. Cromatograma din comprimate obținută pentru acidul acetilsalicilic (peak 1) atorvastatină (peak 2), clopidogrel bisulfat (peak 3) cu faza mobilă tampon KH_2PO_4 0.01 M (pH=2.6) :acetonitril:metanol 20:40:40 (v/v/v)

III.3. Contribuții la dezvoltarea unei metode cromatografice de lichide de înaltă performanță cu fază inversă pentru detecția simultană a metabolitului de acid carboxilic al clopidogrelului și pantoprazolului din plasma umană: Studiu pilot

În vederea analizei interacțiunii medicamentoase clopidogrel-pantoprazol a fost dezvoltată și validată o metodă cromatografică simplă și specifică pentru estimarea simultană a metabolitului de acid carboxilic al clopidogrelului și pantoprazolului în plasma umană.

Analiza s-a efectuat cu același sistem cromatografic „Thermo Finnigan Surveyor”. Faza mobilă a fost formată din apă (pH=3 ajustat cu acid ortofosforic 85%): metanol: acetonitril 36:10:54 (v/v/v) și debitul de 1 mL·min⁻¹. Probele de plasmă au fost preparate prin adăugarea de 25 μL SI (ibuprofen) 100 μg·mL⁻¹ și 25 μL de soluții de lucru la 0.5 mL de plasmă (obținută prin centrifugarea probelor de sânge la 4000 rpm pentru zece minute). Proteinele plasmatică au fost precipitate cu 1 mL de acetonitril. Proba a fost centrifugată din nou. Supernatantul a fost evaporat sub un curent de azot, iar reziduul obținut a fost reluat în metanol. Volumul injectat a fost de 20 μL.

Metoda a fost validată conform ICH [15] în vederea liniarității, limitei de cuantificare, preciziei, acurateței, specificității și aplicată cu succes în detecția concentrației plasmatică a clopidogrelului și pantoprazolului la doi pacienți aflați sub tratament cu 75 mg clopidogrel și 20 mg pantoprazol. Liniaritatea a fost observată în domeniul de concentrații de 0.03-5 μg·mL⁻¹ pentru metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului și 0.04-5 μg·mL⁻¹ pentru pantoprazol. Limitele de cuantificare au fost de 0.03 μg·mL⁻¹ pentru metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului și 0.04 μg·mL⁻¹ pentru pantoprazol. Timpii de retenție ai metabolitului de acid carboxilic, pantoprazolului și ibuprofenului (5 μg·mL⁻¹) au fost 4.083 minute, 4.550 minute și 9.817 minute.

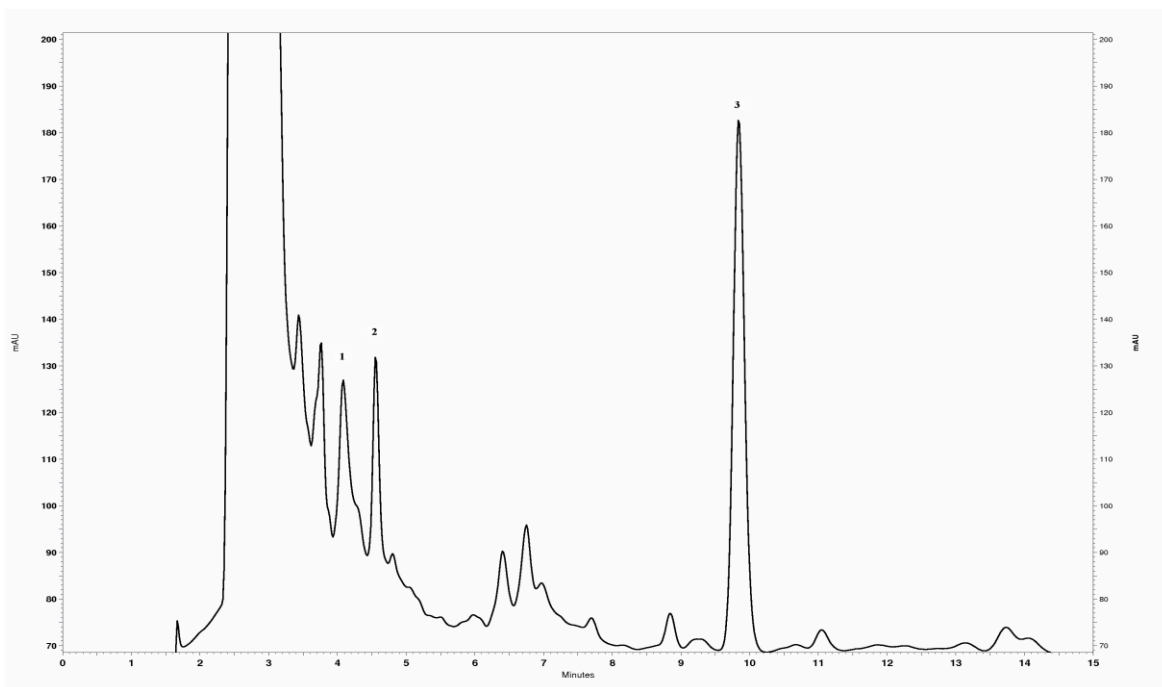


Figura 2. Cromatograma unei probe plasmatice de la un pacient la 45 de minute post-doză sub tratament cu 75 mg clopidogrel și 20 mg pantoprazol cu metoda propusă (peak-ul 1-metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului, peak-ul 2- pantoprazolul, peak-ul 3- SI (ibuprofen) $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

III.4. Contribuții la dezvoltarea și validarea unei metode cromatografice de lichide de înaltă performanță cu fază inversă pentru detecția simultană a clopidogrelului bisulfat, metabolitului său de acid carboxilic și atorvastatinei din plasma umană: Studiu farmacocinetic

Numeroase ghiduri internaționale oferă recomandări importante cu privire la modalitatea de prescriere a antiagregantelor plachetare și statinelor pentru pacienții cu aterotromboză (sindrom coronarian acut, accident vascular cerebral, boală arterială periferică) [16]. Obiectivul principal al cercetării a fost detecția plasmatică a clopidogrelului și a metabolitului său în prezența atorvastatinei. Pentru elaborarea acestui obiectiv am considerat oportună folosirea ca metodă de separare a analiților de interes cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).

Detecția simultană a clopidogrelului bisulfat, metabolitului său de acid carboxilic și atorvastatinei din plasma umană a fost realizată cu același sistem cromatografic „Thermo Finnigan Surveyor” cu eluție în gradient [17], a cărei compoziție este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1. Eluția în gradient pentru metoda cromatografică în gradient

Time (min)	Solvent A (Tampon fosfat)	Solvent B (ACN)	Solvent C (CH ₃ OH)
0.01	90	10	0
2.00	90	10	0
3.00	60	40	0
4.00	30	50	20
8.00	30	50	20
10.00	30	40	30
18.00	30	50	20
19.00	90	10	0
20.00	90	10	0

Toate probele de plasmă au fost tratate identic conform următoarei tehnici de lucru : la 0.5 mL plasmă au fost adăugați 20 μL soluție standard intern ibuprofen (50 μg·mL⁻¹), 20 μL soluție standarde de lucru pentru fiecare analit în parte și 200 μL soluție de HCl (2 M). Precipitarea proteinelor s-a realizat cu 500 μL acetonitril. Probele au fost agitate energic pentru 5 minute și centrifugate pentru 10 minute la 4500 rpm. Supernatantul a fost evaporat sub un curent de azot la temperatura ambientală. Reziduul obținut a fost redizolvat în 500 μL metanol și 20 μL au fost injectați în coloana cromatografică.

Liniaritatea metodei a fost determinată pentru 8 nivele de concentrație cuprinse în intervalul 0.008-2 μg·mL⁻¹ pentru clopidogrel bisulfat, 0.01-4 μg·mL⁻¹ pentru metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului și 0.005-2.5 μg·mL⁻¹ pentru atorvastatină. Curba de calibrare a fost realizată pornind de la limita de cuantificare de 0.008 μg·mL⁻¹ pentru clopidogrel bisulfat, 0.01 μg·mL⁻¹ pentru metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului și 0.005 μg·mL⁻¹ pentru atorvastatină. Timpii de retenție ai metabolitului de acid carboxilic al clopidogrelului, atorvastatinei, ibuprofenului (2 μg·mL⁻¹)

și clopidogrelului bisulfat au fost 9.663, 10.998, 11.802, 12.682 minute conform cromatogramei din figura 3. Au fost determinate studii de degradare forțată pentru determinarea stabilității substanței active și interferența excipienților.

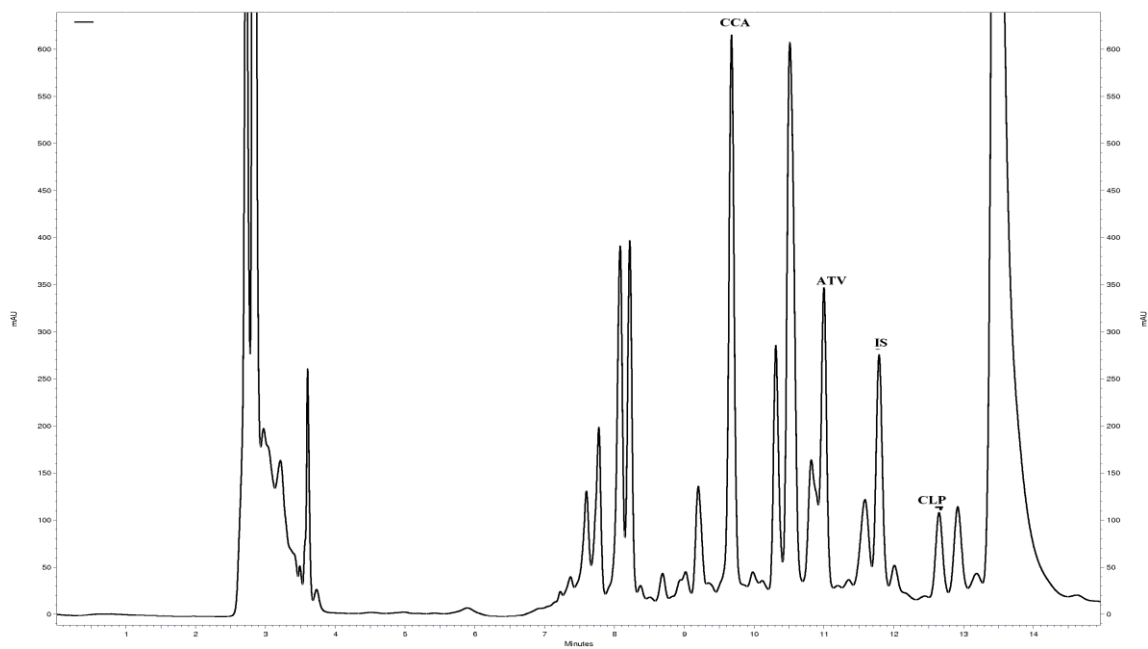


Figura 3. Cromatograma unei probe plasmatică de la un pacient la 40 de minute de la administrarea clopidogrelului 75 mg și atorvastatinei 40 mg folosind metoda în gradient cu debitul de 1 mL·min⁻¹

Metoda a fost aplicată într-un studiu farmacocinetic la pacienții cu polimedicație cu 75 mg clopidogrel și 20, 40 respectiv 80 de mg atorvastatină. Pentru metabolitul de acid carboxilic al clopidogrelului au fost obținute următoarele rezultate: $C_{max} = 4.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 1 \text{ h}$, $t_{1/2} = 4.51 \text{ h}$ pentru pacientul 1, $C_{max} = 4.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 1.24 \text{ h}$, $t_{1/2} = 3 \text{ h}$ pentru pacientul 2, $C_{max} = 3.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 1 \text{ h}$, $t_{1/2} = 5.21 \text{ h}$ pentru pacientul 3. În cadrul aceluiași studiu au fost determinați și parametrii farmacocinetici ai atorvastatinei, obținându-se următoarele valori : $C_{max} = 0.09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 3 \text{ h}$, $t_{1/2} = 8.51 \text{ h}$ pentru pacientul 1, pentru $C_{max} = 0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 2.52 \text{ h}$, $t_{1/2} = 8.37 \text{ h}$ pentru pacientul 2, $C_{max} = 0.19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{max} = 3.06 \text{ h}$, $t_{1/2} = 9.32 \text{ h}$ pentru pacientul 3. Pentru pacienții incluși în studiu efectul atorvastatinei asupra parametrilor farmacocinetici ai clopidogrelului este modest și nu se recomandă ajustarea dozelor sau stoparea medicației hipolipemiante.

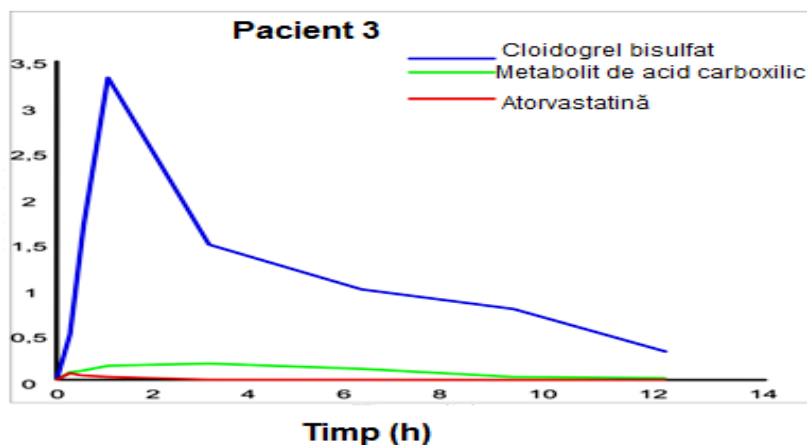
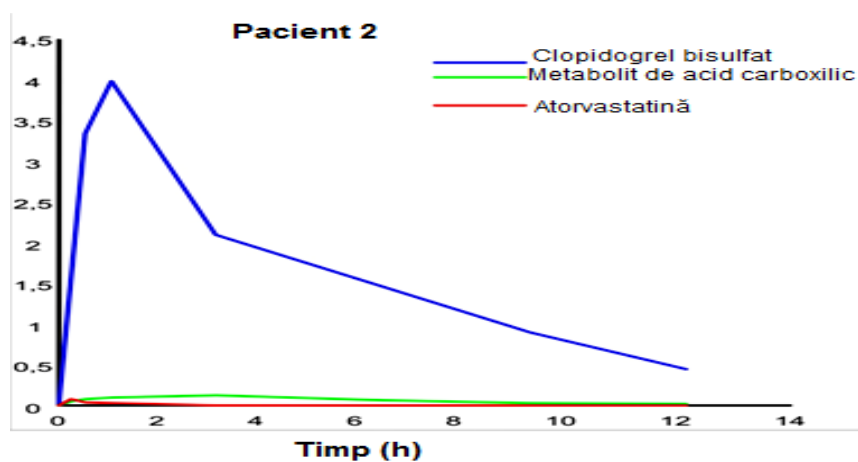
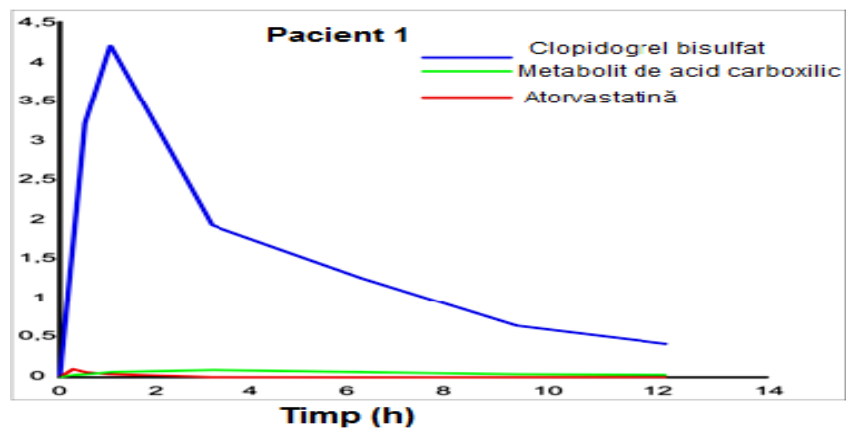


Figura 4. Profilul concentrației plasmatice a clopidogrelului bisulfat, metabolitului său de acid carboxilic și atorvastatinei în timp la trei pacienți după administrarea a 75 mg clopidogrel și 20 mg (pacient 1), 40 mg (pacient 2) și 80 mg (pacient 3) atorvastatină

IV. CONCLUZII

Au fost propuse teste preliminare pe parcursul metodei cromatografice pentru optimizarea compoziției fazei mobile (tampon KH_2PO_4 și acetonitril) cu parametrii cromatografici: rezoluție (R_s), timpul de retenție (t_R) și factorul de trenare (T_f). Analiza cromatografică din comprimate a fost posibilă prin folosirea unei faze mobile optimizate cu ajutorul rezultatelor obținute din designul propus, formată din tampon KH_2PO_4 0.01M (cu pH=2.6 ajustat cu acid ortofosforic 85%): acetonitril: metanol 20:40:40 (v/v/v).

Analiza cromatografică simultană a clopidogrelului și pantoprazolului din plasma umană a fost determinată prin eluție izocratică cu faza mobilă formată din apă (pH=3 ajustat cu acid ortofosforic 85%): metanol: acetonitril 36:10:54 (v/v/v) și debitul de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Metoda validată a fost aplicată cu succes în detecția concentrației plasmatice a clopidogrelului și pantoprazolului la doi pacienți aflați cu tratament antiagregant plachetar cu clopidogrel.

Următoarea etapă a constat în dezvoltarea și validarea unei metode cromatografice cu eluție în gradient pentru determinarea simultană a clopidogrelului bisulfat, metabolitului său de acid carboxilic și atorvastatinei din plasma pacienților cu tratament antiagregant plachetar cu 75 mg clopidogrel și 20, 40 respectiv 80 mg de atorvastatină.

Analizele cromatografice se pot continua pe probe plasmatice la pacienții cu risc cardiovascular major și se pot analiza posibilele interacțiuni medicamentoase din schema de tratament.

V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. M.Z. Khalil, Role of Antiplatelet Therapies in Preventing Atherothrombosis, J. Hematol. Thromb. Dis.2013, Vol.1, Issue 2.
2. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation, Eur. Heart.J., September 11, 2015.
3. H. Ksycinska, P.Rudzki, M. Bukowska-Kiliszek, Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS, J Pharm Biomed Anal. 2006 May 3; 41 (2):533-9.

4. L. Silvestro, M.Gheorghe, A.Iordachescu, V.Cuica, A.Tudoroni, S.Rizea Savu, I.Tarcomnicu, Development and validation of an HPLC-MS/MS method quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion, *Anal. Bioanal Chem.* 401(2011)1023-1034.
5. A. Robinson, J.Hillis, C.Neal, A.C. Leary, The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007,848(2):344-54.
6. J-J. Zou, H-W Fan, D-Q.Guo, Y-B.Li, Simultaneous Determination of Clopidogrel and Its Carboxylic Acid Metabolite (SR26334) in Human Plasma by LC–ESI–MS–MS: Application to the Therapeutic Drug Monitoring of Clopidogrel, *Chromatographia*; 2009, 70(11):1581-1586.
7. G.Di Girolamo, P. Czerniuk, R.Bertuola, Bioequivalence of two tablet formulations of clopidogrel in healthy Argentinian volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study, *Clin Ther.* 2010 Jan; 32(1):161-70.
8. S.R. Reddy, K.Rao Divi, I.S.Chandiran, Development and validation of high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous quantification of clopidogrel and its metabolite in human plasma, *J. Chromatogr. B.*, 2010, 873(3-4):502-8.
9. M. Karazniewicz-Lada, D.Danielak, A.Tezyk, HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of clopidogrel, its carboxylic acid metabolite and derivatized isomers of thiol metabolite in clinical samples, *J. Chromotogr B*; 911:105-12.
10. G. Bahrami, B. Mohammadi, S. Sisakhtnezhad, High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study, *J Chromatogr B.*; 864(1-2).
11. M-R. Rouini, Y.H. Ardakani, A. Foroumadi, Sensitive Quantification of Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Plasma by LC with UV Detection, *Chromatographia*, Volume 70, 953-956.
12. J-J. Zou, H-W Fan, D-Q.Guo, Y-B.Li, Simultaneous Determination of Clopidogrel and Its Carboxylic Acid Metabolite (SR26334) in Human Plasma by LC–ESI–MS–MS: Application to the Therapeutic Drug Monitoring of Clopidogrel, *Chromatographia*; 2009, 70(11):1581-1586.

13. Adela-Maria Spiridon, J. Neamtu, Ionela Belu, Adina Turcu-Stiolică, O. Croitoru. Chromatographic Analyses of Clopidogrel and Its Carboxylic Acid Metabolite in Biological Samples, Current Health Sciences Journal, vol.41, Supliment 6, 2015.
14. Adela-Maria Spiridon, J. Neamtu, Ionela Belu, Adina Turcu-Stiolică, O. Croitoru. Simultaneous Analysis of Clopidogrel Bisulfate, Acetylsalicylic Acid and Atorvastatin calcium in Tablets by HPLC Method, Current Health Sciences Journal , Vol. 41, Nr.2, aprilie-iunie 2015
15. International Conference of Harmonization, "ICH Q2B : Validation of Analytical Procedures : Terms and Definitions", Step 5, 1996.
16. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: A Report of the American College of Cardiology /American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.
17. O.Croitoru, Adela-Maria Spiridon, Ionela Belu, Adina Turcu-Stiolică, J. Neamtu Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Quantification of Clopidogrel Bisulfate, its Carboxylic Acid Metabolite and Atorvastatin in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study, Journal of Analytical Methods in Chemistry