مروری بر روش‌های آنالیز دستگاهی جهت تعیین مقدار متابولیت فعال کلوپیدوگرل در محیط‌های بیولوژیک

ساره آقاجان‌پور[1]، نوید نیشابوری نژاد[2]، محمدرضا رویینی[3]، یلدا حسین‌زاده اردکانی[4*]

[1] دانشجوی داروسازی، آزمایشگاه بیوفارماسی و فارماکوکینتیک، گروه فارماسیوتیکس،دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[2] دستیار گروه فارماسیوتیکس، آزمایشگاه بیوفارماسی و فارماکوکینتیک، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[3] استاد، آزمایشگاه بیوفارماسی و فارماکوکینتیک، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[4] دانشیار، آزمایشگاه بیوفارماسی و فارماکوکینتیک، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۷/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۸

چکیده

زمینه و هدف: با وجود مصرف گسترده پیش‌داروی کلوپیدوگرل در طیف وسیعی از بیماران، محققان دریافتند که این دارو با دوز معمول در سه تا چهل درصد افراد مصرف کننده، اثرات آنتی پلاکتی کافی نخواهد داشت لذا تعیین مقدار متابولیت فعال کلوپیدوگرل جهت ارزیابی اثرات این دارو در هر فرد ضروری به‌نظر می‌رسد.

بحث : باتوجه به اهمیت تعیین سطح پلاسمایی متابولیت فعال کلوپیدوگرل، در این مقاله به بررسی و مقایسه تمامی روش‌های آنالیز دستگاهی گزارش شده جهت تعیین مقدار متابولیت فعال کلوپیدوگرل با هدف ارزیابی صحیح فارماکوکینتیک این دارو و در نهایت تجویز دوز مناسب در هر فرد پرداخته شد. با وجود گزارش‌های متعددی از روش آنالیز کلوپیدوگرل، فقط سیزده مطالعه جهت آنالیز میزان متابولیت فعال کلوپیدوگرل در ماتریس بیولوژیک منتشر شده است. بدلیل مقادیر بسیار کم این متابولیت‌ها متعاقب تجویز دوز معمول کلوپیدوگرل عمدتا از روش دستگاهی LC و یا موارد پیشرفته‌تر جهت آنالیز آن استفاده شده‌است. همچنین با توجه به غلظت بسیار کم متابولیت فعال کلوپیدوگرل و نیمه عمر کوتاه آن در بدن، در صورتی که دستیابی به پروفایل کامل سطح پلاسمایی متابولیت دارو در برابر زمان مد نظر محقق باشد، روش بکار گرفته شده باید قابلیت اندازه‌گیری مقادیر در حد پیکو گرم بر میلی‌لیتر را داشته باشد ولی در غیر این صورت دستیابی به مقدار پایین پارامتر LLOQ ضروری نمی‌باشد.

نتیجه گیری: طبق جمع‌بندی کامل روش‌آنالیزهای مورد بررسی در صورت دسترسی به سیستم‌های آنالیز دستگاهی جدیدتر نظیر UHPLC، تفکیک و تعیین مقدار آنالیت‌ها با دقت بسیار بیشتری صورت خواهد پذیرفت. همچنین بدلیل اینکه استفاده از آشکارساز MS/MS، امکان اندازه‌گیری سطح پلاسمایی خود داروی کلوپیدوگرل را نیز مهیا می‌کند، می‌تواند داده‌های تکمیلی فراوانی را در اختیار محققین قرار دهد.

کلمات کلیدی: کلوپیدوگرل، متابولیت فعال کلوپیدوگرل، کروماتوگرافی، آنزیم CYP2C19

نویسنده مسئول:
دانشیار، آزمایشگاه بیوفارماسی و فارماکوکینتیک، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۰۲۱-۶۴۱۲۰
Email: Yh-ardakani@tums.ac.ir

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

مقدمه

کلوپیدوگرل با نام شیمیایی (1)-(S)-α-(2-chlorophenyl)-6,7dihydrothieno[3,2-c]pyridin-5(4H)-acetate hydrogen sulfate، دارویی از نسل دوم مشتقات تینوپیریدینی می‌باشد که با اثرات ضد پلاکتی خود جهت کاهش حوادث آترواسکلروتیک متعاقب جراحی باز پیوند عروق قلب، آنژیوپلاستی به همراه استنت‌گذاری، سکته مغزی و بیماری‌های شریانی تجویز می‌شود.[۱،۲]

کلوپیدوگرل پیش‌دارویی است که بخشی از آن در کبد به متابولیت فعال تیولی متابولیزه می‌شود. متابولیت تیولی با مهار سریع و برگشت‌ناپذیر گیرنده $P2Y_{12}$ پلاکتی از اتصال آدنوزین دی‌فسفات به آن ممانعت نموده و در نهایت سبب مهار تجمع پلاکتی می‌شود. همان‌طور که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود، مسیر متابولیسمی کلوپیدوگرل در کبد به‌صورت کلی به تولید دو دسته متابولیت منجر می‌شود:

الف- روند تولید متابولیت فعال: حدود ۱۵ درصد از کلوپیدوگرل جذب شده، توسط گروهی از آنزیم‌های CYP450 کبدی (به‌ویژه آنزیم‌های CYP2C19، CYP1A2، CYP2B6، CYP2C9 و CYP3A4) به ۲-اکسو کلوپیدوگرل متابولیزه می‌شود که خود طی چند مرحله می‌تواند متابولیت فعال تیولی (شامل H1 تا H4) را تولید کند که کمتر از ۱۰ درصد کل متابولیت‌ها را تشکیل می‌دهد. درواقع طی بازشدن حلقه موجود در ترکیب ۲-اکسوکلوپیدوگرل، دو فرآیند استریوشیمیایی مختلف می‌تواند رخ دهد و در نهایت مخلوط چهار دیاستروایزومر H1 تا H4 تولید شود. با توجه به تصویر شماره ۲، ساختارهای H1 تا H4 شامل ترکیب ۷ -S-کلوپیدوگرل هستند که به دلیل وجود پیوند دوگانه بین کربن شماره ۳ و ۱۶، به دو گروه دیاسترومری تقسیم شده‌اند. در متابولیت‌های ایزومری H1 و H2 پیوند دوگانه مذکور از نوع E و در ترکیبات H3 و H4 از نوع Z می‌باشد، همچنین با توجه به پیکربندی کربن شماره ٤ (R یا S) ترکیبات ایزومری از یکدیگر تفکیک می‌شوند.[۳-۵]

ب-روند تولید متابولیت غیرفعال خود شامل دو مسیر زیر می‌باشد:

مسیر اول- حدود ۸۵ درصد کلوپیدوگرل جذب شده در روند متابولیسم کبدی، توسط آنزیم کربوکسیلیک استراز (CES1) به متابولیت غیرفعال با نام کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید متابولیزه می‌شود.

مسیر دوم- ۲-اکسوکلوپیدوگرل علاوه بر تولید متابولیت فعال، می‌تواند، توسط نوعی دیگر از آنزیم استراز به ایزومر غیرفعال H-endo نیز هیدرولیز شود.[۶]

باوجود اینکه در داده‌های فارماکودینامیکی آزمایشگاهی، فعالیت ضد پلاکتی متابولیت H2، معادل نیمی از فعالیت متابولیت H4، گزارش شده است ولی به دلیل مقادیر بسیار محدود این متابولیت در محیط بیولوژیک، فعالیت بیولوژیکی برای آن در نظر گرفته نمی‌شود؛ همچنین با ارزیابی فعالیت بیولوژیکی این چهار متابولیت در مطالعات متعدد اثبات شده است که متابولیت‌های H1 و H3 در محیط بیولوژیک، غیرفعال می‌باشند. در نتیجه ترکیب ایزومر H4، به عنوان متابولیت فعال اصلی و تنها دیاستریوایزومر با اهمیت بالینی، جهت تعیین ویژگی‌های فارماکوکینتیک کلوپیدوگرل و معیار میزان اثربخشی دارو در بدن، پذیرفته شده است.[۷]

چالش اصلی جهت اندازه‌گیری متابولیت مذکور، شامل مواردی نظیر ناپایداری ترکیب، غلظت پایین آن در مایعات بیولوژیک و وجود چندین ترکیب مشابه این متابولیت به‌صورت هم‌زمان در پلاسما، می‌باشد. رخداد ناپایداری عموماً به دلیل حضورگروه تیولی در ساختار متابولیت‌های H1 تا H4 می‌باشد که قادر به تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با برخی از اجزای موجود در خون و یا پلاسما همچون گلوتاتیون، سیستئین و یا سایر پروتئین‌های حاوی گروه سیستئینی می‌باشد. همچنین احتمال واکنش متابولیت‌ها با یکدیگر به طور بالقوه و دایمریزیشن نیز گزارش شده است که نهایتاً می‌توانند منجر به تخمین میزان کاذب این متابولیت‌ها در خون شود. بنابراین از مراحل ضروری که باید جهت تعیین مقدار صحیح این ماده انجام شود، پایدارسازی ترکیب مذکور خواهد بود. بدین منظور جهت به حداقل رساندن واکنش‌های جانبی بیان شده، یک عامل آلکیلاسیون کننده مانند ۲-برومو-۳'-متوکسی استوفنون (MPB)، در هنگام جمع‌آوری نمونه، به خون گرفته شده از بیمار، افزوده می‌شود تا گروه‌های تیولی متابولیت‌ها، تثبیت شوند و سپس ترکیبات پایدار تشکیل شده، توسط روش‌های دستگاهی، تعیین مقدار می‌گردند.

غلظت پایین این ماده در مایعات بیولوژیک، عامل محدود

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

کننده دیگر در اندازه‌گیری صحیح متابولیت فعال کلوپیدوگرل، محسوب می‌شود به نحوی که حداکثر غلظت پلاسمایی دارو متعاقب تجویز دوز معمول از آن، پایین‌تر از ۲۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر گزارش شده است. بنابراین، روش دستگاهی استفاده شده جهت تعیین مقدار این ماده، باید از میزان حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری (LLOQ) مناسبی برخوردار بوده و همچنین به دلیل حضور دیاستروایزومرها در هنگام متابولیسم این دارو، (متابولیت‌های H1-H3)، اختصاصیت قابل قبولی نیز داشته باشد.[۸]

تا پیش از این روش آنالیزهای متعددی جهت تعیین سطح کلوپیدوگرل پیشنهاد شده بود که در مقاله مروری مرجع ۹ به جمعبندی آن‌ها پرداخته شده‌است اما طی مطالعات بالینی جدید، محققان دریافتند که سه تا ٤٠ درصد از بیماران دریافت کننده دوز رایج درمانی کلوپیدوگرل، اثرات آنتی پلاکتی مورد انتظار را نشان نمی‌دهند، لذا تعیین سطح کلوپیدوگرل جهت پیش‌بینی اثرات ضد پلاکتی راهگشا نمی‌باشد و باید به بررسی و تعیین سطح متابولیت فعال کلوپیدوگرل پرداخت.[۹]

از مهم‌ترین عوامل بروز تفاوت‌های بین فردی بالا در غلظت پلاسمایی این متابولیت (H4) و نهایتاً ایجاد عملکرد ضد پلاکتی خارج از محدوده درمانی در بیماران، می‌توان به تفاوت در سطح آنزیم‌های دخیل در متابولیسم این دارو اشاره نمود که در ذیل به آن، پرداخته شده است:

به دلیل اهمیت فرآیند متابولیسم در فعال‌سازی این دارو، در افراد با پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی متفاوت، غلظت‌های متفاوتی از متابولیت فعال کلوپیدوگرل در پلاسما ایجاد خواهد شد. از آنجا که CYP2C19 نقشی اساسی در فرآیند متابولیسم طیف وسیعی از داروها شامل مهارکننده‌های پمپ پروتون (امپرازول)، ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای (آمی تریپتیلین)، مهارکننده‌های بازجذب سروتونین (سیتالوپرام)، ضدصرع‌ها (اس- مفنیتوئین) و داروهای ضد پلاکت (کلوپیدوگرل) دارد، وجود هر گونه پلی‌مورفیسم ژنتیکی آن، می‌تواند منجر به بروز تغییرات گسترده‌ای در متابولیسم این داروها گردد.[۱۰-۱۲]

در همین راستا، اداره غذا و داروی آمریکا، نیز به بررسی حضور الل‌های CYP2C19*2/*3 به عنوان الل‌های پرخطر که فعالیت متابولیسمی در آن‌ها وجود ندارد و به شدت سبب کاهش سطح متابولیت فعال کلوپیدوگرل و متعاقب آن کاهش اثرات ضدپلاکتی آن می‌شود، توجه ویژه نموده است.

نیاز به فعال‌سازی داروی کلوپیدوگرل توسط برخی از آنزیم‌های سیتوکروم کبدی، این دارو را مستعد تداخل بالقوه با سایر داروهای مصرفی نموده و از سوی دیگر، به دلیل افزایش احتمال تأثیرپذیری و تغییر فعالیت آنزیم‌های مذکور از برخی بیماری‌های زمینه‌ای، اهمیت این مهم دوچندان می‌نماید. به نحوی که اگر برخی از داروهای تجویزشده و یا شرایط خاص بیمار، موجب مهار یا القای تبدیل کلوپیدوگرل به متابولیت‌های فعال شوند، به ترتیب می‌توانند غلظت متابولیت فعال پلاسما را کاهش یا افزایش دهند. برای مثال در مطالعات، اثبات شده است که برخی شرایط التهابی مانند دیابت، چاقی و سن بالا می‌توانند بر عملکرد آنزیم‌های کبدی مؤثر باشند.[۱۳]

طبق مطالعه متاآنـالیزی که توسط Snoep و همکارانش[۱۳] انجام شـد، مشاهده گردید که از هـر پـنج بیمار دریافت کننده کلوپیدوگرل، یک نفر به درمان با پلاویکس (برند کلوپیدوگرل) پاسـخ مناسب نمی‌دهد، به نحوی که در این افراد، عـوارض بالینی نامطلوب از جملـه سـکته قلبـی، سـندرم حاد کرونری و ... تا هشت برابـر بیشـتر از سایرین بروز می‌نماید. همچنین در بررسی ژنتیکی آنزیم CYP2C19 در طی این مطالعه، شـیوع الل CYP2C19*2 بـه صـورت هتروزیگوت معادل ۳/۲۳ درصد و به صورت هموزیگوت برابر ۹/۳ درصد گزارش شده است. در مطالعه متاآنالیز دیگری که در جمعیت آمریکایی و اروپایی انجام شده است، در ۲۱ درصد از بیماران تحت درمان با کلوپیدوگرل، کاهش و یا عدم مهار تجمع پلاکت گزارش شده است. پاسخ‌های ضعیف گزارش شده به کلوپیدوگرل، با افزایش خطر حوادث ایسکمیک مکرر همراه خواهد بود.[۱۴،۱۵]

قابل ذکر است با وجود تمرکز مطالعات جدید فارماکوکینتیک بر بهره‌گیری از محیط بیولوژیک غیر خونی نظیر بزاق و ادرار جهت تعیین مقدار بسیاری از داروها، بر تعیین غلظت متابولیت فعال کلوپیدوگرل در این حوزه‌ها مطالعه‌ای یافت نشد.[۱۶]

از آنجا که اخیراً در نتایج مطالعه‌ای با عنوان کاربرد داروی کلوپیدوگرل ذکر شده است که علی‌رغم حضور داروهای نسل سوم مهارکننده گیرنده P2Y12 در بازار دارویی (پراشوگرل و تیکاگرل)،

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

به دلیل اثرگذاری مناسب، ایمنی کافی، هزینه پایین، دسترسی و شناخت خوب از کلوپیدوگرل، همچنان این دارو به عنوان ضدپلاکت مهمی مطرح است، انجام پژوهش‌هایی جهت میزان اثرگذاری آن ضروری است.[۱۷] همچنین براساس بسیاری از مطالعات صورت پذیرفته، وجود الل‌های غیر فعال آنزیم‌های متابولیسمی در بیماران، به تنهایی قادر به توضیح جامعی از عدم بروز پاسخ درمانی متعاقب مصرف این دارو نمی‌باشد، به نظر می‌رسد تعیین سطح پلاسمایی متابولیت فعال دارو، همچنان و تاکنون، روشی قابل اعتماد، جهت تعیین دوز درمانی مناسب در بیماران باشد. از سوی دیگر، حتی در صورت انجام مطالعه ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در متابولیسم دارو، تعیین سطح متابولیت فعال همچنان ضروری خواهد بود. لذا در این مقاله مروری، روش‌های دستگاهی موجود جهت آنالیز متابولیت فعال کلوپیدوگرل بررسی و جمع‌بندی خواهد شد.

در ادامه بخش مقدمه به گزارش موردی روش‌های آنالیز موجود برای تعیین مقدار متابولیت فعال کلوپیدوگرل در ماتریس بیولوژیک پرداخته خواهد شد.

الف- روش‌های دستگاهی بدون استفاده از پایدارکننده‌های متابولیت‌های تیولی

با وجود اینکه طی مطالعاتی مشخص شد میان سطح پلاسمایی متابولیت غیرفعال کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید و میزان مهار تجمع پلاکتی در پلاسما رابطه معناداری وجود ندارد، تعیین فارماکوکینتیک کلوپیدوگرل در ابتدا با تعیین سطح پلاسمایی این متابولیت انجام می‌شد که به دلیل غلظت بیشتر آن در پلاسما نسبت به متابولیت تیولی، توسط دستگاه‌های متعددی شامل LC-UV، GC-MS و LC-MS تعیین مقدار می‌گردید.[۱۸،۱۹]

با انجام پژوهش‌هایی مانند مطالعه Delavenne و همکاران، که با هدف توسعه یک روش آنالیز دستگاهی جهت تعیین مقدار کلوپیدوگرل، متابولیت‌های فعال و غیرفعال آن توسط دستگاه LC-MS/MS انجام شد، ارزیابی فارماکوکینتیک کلوپیدوگرل توسط متابولیت فعال آن صورت گرفت. در این پژوهش طی ۱۳/۵دقیقه جداسازی کلوپیدوگرل تغییرنیافته و متابولیت‌های فعال و غیر فعال آن از پلاسمای نمونه‌های انسانی جداسازی شدند اما به دلیل عدم پایدارسازی متابولیت تیولی، این مطالعه موفق به رسم منحنی کالیبراسیون برای متابولیت فعال کلوپیدوگرل نشد.[۲۰]

ب- روش‌های دستگاهی با استفاده از پایدارکننده‌های متابولیت‌های تیولی

برای نخستین بار در سال ۲۰۰۸، Takahashi و همکاران ترکیب MPB را به عنوان پایدار کننده متابولیت‌های تیولی پیش از آغاز آنالیز آن پیشنهاد دادند. در این مطالعه، اولین روش معتبرسازی شده توسط دستگاه LC-MS/MS، جهت شناسایی و جداسازی متابولیت تیولی کلوپیدوگرل، متعاقب پایدار نمودن آن، ابداع شده است. در این پژوهش، نشان داده شد که غلظت متابولیت‌های تیولی، در صورت عدم استفاده از پایدارکننده، می‌تواند تنها در طی ۱۰ دقیقه، به کمتر از ۸۰ درصد غلظت اولیه برسد، به‌طوری که در مطالعات پیشین، غلظت متابولیت‌های تیولی، در حدود ۹۰ درصد کمتر از این مطالعه، گزارش شده بود . روش دستگاهی ارائه شده در این مطالعه قادر به تعیین مقدار آنالیت مورد نظر تا غلظت ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر در پلاسما در کمتر از ۵ دقیقه می‌باشد.

به منظور ارزیابی بالینی این روش، ۳۰۰ میلی‌گرم کلوپیدوگرل به ٦٦ داوطلب سالم تجویز و نمونه‌گیری در زمان‌های مختلف انجام گردید. حداکثر غلظت پلاسمایی متابولیت تیولی معادل۳/۱۹ ± ۹/۳۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، پس از گذشت یک ساعت از تجویز دارو گزارش گردید.[۸]

در سال ۲۰۱۰، روش آنالیز دستگاهی سریع‌تری نسبت به مطالعه گذشته و با استفاده از دستگاهUPLC-MS/MS توسط Delavenne و همکاران، به‌منظور تعیین مقدار متابولیت‌های تیولی در پلاسمای انسان با استفاده از پایدارکننده MPB، گزارش گردید. به نحوی که آنالیت مورد نظر با دقت تقریباً مشابه با مطالعه قبل (حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری برابر با غلظت ۸/۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، در کمتر از ۱/۵ دقیقه قابل تعیین مقدار می‌باشد. به منظور ارزیابی بالینی روش ابداع شده، کلوپیدوگرل با دوز ٦۰۰ میلی‌گرم به نه داوطلب سالم تجویز و نمودار غلظت پلاسمایی متابولیت مورد نظر در برابر زمان رسم گردید. در این مطالعه، حداکثر غلظت پلاسمایی متابولیت تیولی معادل ۹/۳۰ ± ٦/۸۲ نانوگرم در میلی پس از گذشت ۰/۱ ± ٤/۰ ساعت از تجویز آن، گزارش گردید.[۲۱]

در سال ۲۰۱۱، روش دستگاهی دیگری با هدف ارزیابی تأثیر مصرف همزمان امپرازول و پنتوپرازول بر سطح متابولیت فعال H4، گزارش گردید. در این پژوهش، Angiolillo و همکاران با استفاده

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

از ستون Shim-Pack XR-ODS II و روش پایدارسازی مشابه با مرجع شماره ۸، موفق به جداسازی متابولیت‌های تیولی H4 و H3 از یکدیگر شدند.[۲۲]

همان‌گونه که در مقدمه بیان گردید، متابولیت فعال تیولی کلوپیدوگرل از چهار دیاستروایزومر تشکیل شده‌اند که Tuffal و همکاران برای نخستین بار در سال ۲۰۱۱ موفق به طراحی روشی استرئوسلکتیو جهت جداسازی چهار متابولیت تیولی در نمونه‌های آزمایشگاهی از یکدیگر شدند. با نظر به اینکه اختصاص به معنای عدم تداخل پیک داخلی با پیک مورد نظر است این مهم در این روش آنالیز حاصل شد. در این روش آنالیز برای نخستین بار، با بکارگیری سیستم UHPLC-MS و در طی مدت زمان هشت دقیقه، جداسازی مشتقات متابولیت تیولی از یکدیگر گزارش شده است. پایدارسازی نمونه‌ها مطابق مرجع شماره ۸ انجام و کارایی روش ابداع شده در یک کارآزمایی بالینی بررسی گردیده است. بر طبق نتایج این مطالعه، سطح پلاسمایی مشتق متابولیت‌های H1 و H2 در نمونه بالینی بسیار کم بوده و قابل اندازه‌گیری نبودند.[۷،۲۳]

شایان ذکر است که در تمامی مطالعاتی که تاکنون شرح داده شد، تنها سطح پلاسمایی متابولیت‌های فعال تیولی مورد بررسی قرار گرفته و امکان همزمانی تعیین آن با سطح پلاسمایی داروی اصلی برای نخستین بار توسط Peer و همکاران و با بکارگیری دستگاه UHPLC-MS/MS گزارش گردید. روش ارائه شده قادر به تعیین سطح پلاسمایی کلوپیدوگرل تا غلظت ۰۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و تعیین سطح متابولیت‌های تیولی تا غلظت ۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پایدارسازی نمونه‌ها همچنان مطابق روش ذکر شده در مرجع شماره ۸ صورت پذیرفته است. باتوجه به تعیین ژنوتایپ آنزیم CYP2C19 در داوطلبین شرکت کننده در کارآزمایی بالینی این مطالعه، مشخص گردید که الل‌هایی که موجب عدم عملکرد آنزیم مذکور می‌گردند، کاهش قابل توجهی را در حداکثر غلظت پلاسمایی کلوپیدوگرل و متابولیت فعال آن نشان می‌دهند.[۲۴]

در سال ۲۰۱۳ نیز گزارش‌های جدیدی جهت آنالیز کلوپیدوگرل و متابولیت‌های آن ارائه گردید که با توجه به عدم مشاهده تغییرات قابل توجه نسبت به مطالعات گذشته، تنها به ذکر نقاط قوت آن‌ها بسنده خواهد شد. در این سال، Furlong و همکاران یک روش جهت جداسازی چهار دیاستروایزومر متابولیت‌های تیولی کلوپیدوگرل توسط دستگاه HPLC-MS/MS ارائه نمودند. تنها مزیت این گزارش نسبت به روش‌های پیشین، ایجاد LLOQ پایین‌تر جهت تعیین سطح متابولیت‌های H1 و H2 می‌باشد ولی با این وجود، دو متابولیت مذکور در هیچ یک از نمونه‌های بالینی ردیابی نشدند.[۲۵]

در مطالعه دیگری، Karaźniewicz-Łada و همکاران روشی را ارائه نمودند که قادر به جداسازی و تعیین مقدار چهار آنالیت مشتق متابولیت تیولی H3، مشتق متابولیت تیولی H4، کلوپیدوگرل و همچنین متابولیت غیر فعال کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید به‌صورت همزمان توسط دستگاه HPLC-MS/MS بود. در این مطالعه با استفاده از روش الکتروفوز لوله مویین، نشان داده شد که در صورت عدم پایدارسازی توسط ترکیب MPB، متابولیت غیرفعال کربوکسیلیک اسید کلوپیدوگرل قابل اندازه‌گیری خواهد بود.[۲۶]

Park و همکاران با معرفی روش جدیدی توسط دستگاه LC-MS/MS، کلوپیدوگرل و متابولیت تیولی آن را در طی مدت زمان دو دقیقه تعیین مقدار نمودند. همچنین علاوه بر کاهش قابل توجه در مدت زمان آنالیز، در این روش برای نخستین بار از ترکیب tris(2-carboxyethyl)phosphine به عنوان پایدار کننده با مکانیسم کاهنده پیوند دی‌سولفیدی بین متابولیت‌های تیولی با دیگر عوامل دارای گروه تیولی در پلاسما استفاده شد. در ارزیابی کارایی بالینی روش مذکور میزان ۱۵۰ میلی‌گرم دارو به شش داوطلب سالم تجویز شد که حداکثر غلظت پلاسمایی متابولیت تیولی کلوپیدوگرل معادل ۳/۳۹ ± ۱/۵٤ نانوگرم در میلی‌لیتر و حداکثر غلظت پلاسمایی کلوپیدوگرل برابر ۵۱/٤ ± ۹۵/٤ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است. همچنین در این مطالعه، به دلیل عدم مشاهده ارتباط معنادار میان حداکثر غلظت پلاسمایی و یا سطح زیر منحنی غلظت–زمان متابولیت تیولی کلوپیدوگرل با پارامترهای مشابه مربوط به کلوپیدوگرل، بر اهمیت تعیین سطح متابولیت تیولی فعال در راستای ارزیابی عملکرد کلوپیدوگرل، تأکید شده است.[۲۷]

در سال ۲۰۱۵ روش آنالیزی بر پایه دستگاه UHPLC-MS/MS ارائه شد که علاوه بر جداسازی همزمان کلوپیدوگرل و متابولیت تیولی H4، قادر به تعیین مقدار سایر متابولیت‌های غیر فعال نظیر کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید،۲–اکسو کلوپیدوگرل و H-endo نیز

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

در پلاسما می‌باشد. البته باید توجه داشت که برخلاف مطالعات پیشین، متابولیت‌های مذکور در این مطالعه توسط انکوباسیون سلول‌های میکروزومال کبدی انسانی تولید شده است.[۲۸]

با ورود داروهایی نظیر ویکاگرل با عملکرد مشابه کلوپیدوگرل به بازار دارویی، روش آنالیز دستگاهی توسط UHPLC-MS/MS با امکان تعیین مقدار هم‌زمان کلوپیدوگرل و ویکاگرل به همراه امکان جداسازی متابولیت‌های فعال H4 و غیر فعال H3 و SM-3 (بیشترین متابولیت تولید شده پس از تجویز ویکاگرل) در پلاسما با هدف مقایسه فارماکوکینتیک دو دارو، در سال ۲۰۱۷ ارائه شد. شایان ذکر است که پایدارسازی نمونه‌ها پلاسمایی مشابه با روند ذکر شده در مطالعه Takahashi و همکاران[۸] صورت گرفته است.[۲۹]

همچنین در این سال دو مطالعه دیگر نیز در این راستا ارائه شدند که در مطالعه نخست، Xue و همکاران با هدف تعیین سطح متابولیت تیولی فعال کلوپیدوگرل در پلاسمای Beagle Dog روش LC-MS/MS را گزارش کردند که به مزیت ویژه‌ای نسبت به گزارش‌های پیشین در آن اشاره نشده است.[۳۰]

همچنین به دلیل تجویز کلوپیدوگرل به عنوان ضدپلاکت رایج در گربه‌ها، در مطالعه دوم، Lyngby و همکاران، روش آنالیز دستگاهی جهت تعیین سطح پلاسمایی کلوپیدوگرل، مشتق متابولیت تیولی کلوپیدوگرل، ۲-اکسو کلوپیدوگرل و متابولیت غیرفعال ۲-اکسو کربوکسیلیک اسید توسط HPLC-MS/MS، در پلاسمای این حیوان ارائه دادند که به دلیل مشخص شدن ناپایداری متابولیت ۲-اکسوکلوپیدوگرل در طی مطالعات پایداری، سایر آزمون‌ها بر روی این ترکیب انجام نگردید.[۳۱]

با توجه به جستجوی انجام شده در منابع، آخرین مطالعه با استفاده از دستگاه LC-MS/MS در سال ۲۰۱۹، با هدف تعیین تأثیر مصرف الکل، به عنوان مهارکننده آنزیم CES1، بر متابولیسم کلوپیدوگرل و با امکان تعیین سطح کلوپیدوگرل، کلوپیدوگرل کربوکسیلات، ۲-اکسو کلوپیدوگرل، ۲- اکسو کلوپیدوگرل کربوکسیلات، H4، اتیل کلوپیدوگرل و اتیل ۲-اکسو کلوپیدوگرل در پلاسمای موش صحرایی توسط Laizure و همکاران ارائه شده است. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که تغییر سطح آنزیم CES1 می‌تواند موجب تغییرات قابل توجه در نحوه متابولیسم کلوپیدوگرل گردد.[۳۲]

بحث

به منظور سهولت در مقایسه روش‌های موجود با یکدیگر و انتخاب روش مناسب، خلاصه ویژگی‌های روش‌های آنالیز دستگاهی بررسی شده جهت تعیین مقدار متابولیت‌های فعال کلوپیدوگرل در پلاسمای انسان، سگ، گربه و موش صحرایی در جدول شماره ۱ آورده شده است که در ذیل به برخی از مهم‌ترین نکات آن پرداخته خواهد شد.

سیستم کروماتوگرافی

همان‌طور که در بخش قبل توضیح داده شد، بعد از تجویز دوز معمول کلوپیدوگرل غلظت متابولیت‌های تیولی فعال آن در پلاسما بسیار کم بوده و امکان تعیین سطح آنالیت‌های مذکور توسط دستگاه HPLC-UV، وجود ندارد و در تمامی گزارش‌های انجام شده با استفاده از این دستگاه، تنها به تعیین مقدار متابولیت غیر فعال کربوکسیلیک اسید اکتفا شده است. به بیان دیگر، تعیین صحیح سطح پلاسمایی این آنالیت‌ها با آشکارساز MS/MS امکان‌پذیر می‌باشد که بدین منظور، این آشکارساز با دستگاه‌های HPLC و UHPLC همگام می‌گردد. اصول ساختاری این دو دستگاه تقریباً مشابه می‌باشد ولی در مواردی دستگاه UHPLC در جداسازی ترکیبات با ساختار مشابه، عملکرد بهتری از خود نشان می‌دهد. از مهم‌ترین ویژگی‌های این دستگاه می‌توان به اندازه ذرات سیلیکا در ستون‌های بکارگرفته شده در آن اشاره نمود؛ به نحوی که اندازه ذرات، کمتر از ۲ میکرومتر است که ساختاری نسبتاً یکپارچه و در هم تنیده را به‌عنوان فاز ساکن کروماتوگرافی فراهم می‌آورد. از سوی دیگر، استفاده از درجه حرارت بالا در این سیستم، موجب کاهش گرانروی فاز متحرک و در نتیجه افزایش سرعت جریان، به‌همراه کاهش قابل توجه در فشار سیستم نسبت به شرایط مشابه در دستگاه HPLC می‌گردد. همراهی دو عامل مذکور، مسیرهای جریانی به هم پیوسته را ایجاد می‌نماید که توسط افزایش کارایی ستون، امکان تفکیک مواد با ساختارهای مشابه را به خوبی فراهم می‌آورد. در پنج مطالعه از سیزده مطالعه مرور شده که موفق به تعیین مقدار دقیق متابولیت H4 کلوپیدوگرل شده‌اند، از دستگاه

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

UPLC استفاده شده است که امکان تفکیک این متابولیت را با کمترین LLOQ نسبت به سایر مطالعات فراهم آورده‌است. همچنین به دلیل اعمال فشار بالا در این روش، آنالیز مواد با سرعت بسیار بیشتری نسبت به دستگاه HPLC انجام می‌گردد. برای مثال، کمترین زمان جداسازی برای ترکیبات مورد نظر در این مطالعه در مقاله رویینی و همکاران[۱۸] و به میزان ۵/۱ دقیقه بوده است که با استفاده از دستگاه UPLC گزارش شده است.

پایدارسازی متابولیت‌های تیولی

از سوی دیگر با توجه به ناپایداری متابولیت‌های تیولی فعال در نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده، تعیین مقدار صحیح این ترکیبات در مایعات بیولوژیک، با پیشنهاد پایدارسازی گروه‌های تیولی، بلافاصله پس از نمونه‌گیری با استفاده از ترکیب MPB میسر گردید که در تمامی روش‌های آنالیز دستگاهی مطابق مطالعه Takahashi و همکاران[۸] این روش معتبر سازی شده بکار گرفته شده است و تنها در یک گزارش در مطالعه Hua و همکاران[۲۷] از ترکیب کاهنده TCEP استفاده شده است. این ترکیب با احیا نمودن پیوند میان گروه‌های تیولی به اندازه‌گیری سطح دقیق متابولیت فعال کلوپیدوگرل کمک می‌کند. مزیت استفاده از این ترکیب کاهنده نسبت به ترکیب پایدار کننده MPB، عدم نیاز به افزودن آن بلافاصله پس از نمونه‌گیری عنوان شده است.

ترکیبات جداسازی شده

همانگونه که ذکر گردید، جداسازی و تعیین مقدار متابولیت فعال تیولی جهت بررسی دقیق عملکرد آنتی پلاکتی کلوپیدوگرل در هر فرد ضروری می‌باشد. لذا در این مطالعه مروری نیز بر روش‌های گزارش شده با توانایی اندازه‌گیری این متابولیت بیشتر تمرکز شده است. خلاصه روش‌های دستگاهی مذکور در جدول شماره ۲ آورده شده است. در این میان، روش‌های دستگاهی نظیر مطالعه Tuffal و همکاران[۷]، علاوه بر جداسازی متابولیت فعال تیولی H4 از سایر متابولیت‌های تیولی، قادر به تفکیک سایر اجزای این ترکیب نیز (H1 تا H4) هستند که تعیین مقدار صحیح‌تری از ترکیب فعال مورد نظر (H4) را فراهم خواهد ساخت. همچنین در دو مطالعه Park و همکاران[۲۶] و Liu و همکاران[۲۸]، علاوه بر امکان تفکیک متابولیت فعال H4، به‌طور هم‌زمان، کلوپیدوگرل و متابولیت اصلی آن (کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید) نیز، تعیین مقدار شده‌اند، لذا با استفاده از روش‌های دستگاهی اخیر، امکان محاسبه دقیق نسبت متابولیکی (نسبت غلظت متابولیت به غلظت دارو) فراهم می‌گردد که در بسیاری از مطالعات فارماکوکینتیکی، پارامتر مهمی محسوب می‌شود. از معایب مهم این دو مطالعه می‌توان به افزایش کاذب سطح متابولیت غیر فعال H3، به دلیل عدم تفکیک ایزومر H2 از آن و همچنین زمان کروماتوگرافی طولانی مطالعه Park و همکاران[۲۶] اشاره نمود.

در مطالعه بالینی Zhao Xue و همکاران[۲۹]، علاوه بر تجویز کلوپیدوگرل، تجویز خوراکی داروی ویکاگرل (آنالوگ جدید کلوپیدوگرل) نیز با رعایت فاصله زمانی تجویز، به برخی از افراد مورد مطالعه صورت گرفته است. در این مطالعه، علاوه بر آنالیت‌های H3 و H4 کلوپیدوگرل، آنالیت H3 متیله غیر فعال (SM3) نیز به عنوان فراوان‌ترین متابولیت داروی ویکاگرل در پلاسما، معرفی و اندازه‌گیری شده است. شایان ذکر است که متابولیت مذکور (SM3)، پس از تجویز خوراکی کلوپیدوگرل نیز، در پلاسمای انسانی یافت شده است.

در آخرین مطالعه صورت پذیرفته در این راستا، تأثیر مهار آنزیم CES1 به‌واسطه مصرف همزمان الکل، بر متابولیسم کلوپیدوگرل در مدل موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است که با توجه به تولید متابولیت‌های ۲-اکسو کلوپیدوگرل و ۲-اکسوکلوپیدوگرل کربوکسیلات به‌واسطه این آنزیم، دو آنالیت مذکور نیز علاوه بر آنالیت‌های کلوپیدوگرل، متابولیت فعال H4 و متابولیت غیر فعال کلوپیدوگرل کربوکسیلات جداسازی و تعیین مقدار شده‌اند. همچنین علاوه بر ترکیبات یاد شده، آنالیت‌های اتیل H4، اتیل کلوپیدوگرل و اتیل ۲-اکسوکلوپیدوگرل نیز که تشکیل آن‌ها به دلیل حضور الکل در بدن حیوان محتمل خواهد بود، در پلاسمای موش صحرایی تعیین مقدار شدند.[۳۲]

ستون کروماتوگرافی

به‌طور کلی، در مطالعات توسعه روش آنالیز، ستون‌های کروماتوگرافی مختلف با توجه به خواص فیزیکو شیمیایی آنالیت مورد نظر، بررسی شده و در نهایت براساس زمان بازداری کمتر و

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

شکل پیک مطلوب‌تر، ستون کروماتوگرافی نهایی انتخاب می‌شود. با توجه به اینکه متابولیت فعال کلوپیدوگرل، ترکیبی نسبتاً هیدروفیل (LogP=1.96) و دارای خاصیت بازی می‌باشد، ستون‌های بکار گرفته شده در این زمینه، همگی از نوع ستون‌های C8 و یا C18 انتخاب شده‌اند که ستون‌هایی مناسب برای کروماتوگرافی فاز معکوس می‌باشند.

در میان ستون‌های بکار گرفته شده در دستگاه HPLC MS/MS، ستون ASCENTIC C18، به دلیل طراحی بهینه سیلیکاژل (تیپ B) و ایجاد سطحی وسیع، به تخلخل مناسب با حضور حداقل گروه‌های سیلانولی آزاد دست یافته است که کارایی مناسبی را در محدوده گسترده‌ای از pH (۱۰/۱–۵) فراهم می‌نماید. به همین دلیل با وجود عدم استفاده از دستگاه UPLC در مطالعه Lyngby و همکاران[۳۰]، زمان بازداری مناسبی (کمتر از ۲ دقیقه) برای تفکیک آنالیت‌ها گزارش شده است.

در مطالعات انجام شده توسط سیستم UHPLC، ستون کروماتوگرافی BEH C18، بیشترین کاربرد را داشته است که از مزایای آن می‌توان به توانایی جداسازی در زمان کمتر با رزولوشن بیشتر، تحمل مناسب نسبت به فاز متحرک در گستره وسیعی از pH (۱۲–۱)، استحکام و ظرفیت آنالیز تعداد زیادی از نمونه‌های بیولوژیک اشاره نمود. این مقاومت، حاصل سه نوع پیوند متفاوتی است که زنجیره‌های کربنی را در این ستون به ذرات سیلیکا متصل می‌نماید. با وجود اینکه هزینه و سرعت آنالیز در صورت استفاده از ستون BEH C8 در سیستم‌های وابسته به UPLC، منطقی به نظر می‌رسد ولی به‌طورکلی کارایی و شکل پیک‌ها در هنگام استفاده از ستون C18، بهتر بوده است؛ به نحوی که امکان تفکیک متابولیت‌های H1 تا H4 تنها در صورت استفاده از ستون C18، فراهم شده است.

دمای ستون کروماتوگرافی

دمای ستون کروماتوگرافی در روش‌های مختلف مورد بررسی، بین۲٤ تا ٤٥ درجه سانتی گراد متغیر بوده است. به‌طور کلی و در شرایط کروماتوگرافی یکسان، با افزایش دمای ستون، جداسازی در زمانی کمتر، با کارایی بیشتر، حساسیت بهتر و قدرت تفکیک بالاتر صورت خواهد پذیرفت. البته در اکثر مواقع، هدف اصلی از افزایش دما، کوتاه نمودن زمان بازداری است و معمولاً با هر درجه افزایش دمای ستون، به‌طور میانگین یک تا دو درصد از طول زمان آنالیز کاسته می‌شود.[۳۳]

فاز متحرک

در مطالعات مرور شده جهت آنالیز داروی کلوپیدوگرل و متابولیت‌های آن، از ترکیبات متفاوتی به‌عنوان فاز متحرک استفاده شده است. به‌طور کلی بررسی این مطالعات نشان می‌دهد که افزودن آمونیوم بی‌کربنات به فاز آبی فاز متحرک، موجب دستیابی به پیک‌های بهتری خواهد شد و همچنین افزودن اسید فرمیک و کاهش pH فاز متحرک، تأثیر بسزایی در تفکیک دو دیاستررومر H2 و H4 از یکدیگر خواهد داشت. در صورت نیاز به جداسازی متابولیت غیرفعال کلوپیدوگرل کربوکسیلیک اسید نیز، افزودن متانول به فاز آلی (به جای استفاده از استونیتریل) نتایج بهتری در پی خواهد داشت.

حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری (LLOQ)

به دلیل غلظت پلاسمایی پایین و نیمه عمر کوتاه آنالیت‌های مورد بررسی، مقدار LLOQ از اهمیت ویژه‌ای در روش‌های آنالیز معتبر سازی شده برخوردار است و هرچه مقدار آن کمتر گزارش شده باشد، روش مورد نظر، نتایج قابل اعتمادتری را در پی خواهد داشت. در میان روش‌های آنالیز دستگاهی مورد بررسی در خصوص تعیین مقدار متابولیت تیولی H4، کمترین میزان LLOQ، معادل با ۰/۰۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر در Liu و همکاران[۲۸] شده است که با توجه به فارماکوکینتیک این متابولیت، میزانی مناسب جهت تعیین مقدار آن به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به مشاهده مقاومت بسیاری از بیماران، به پاسخگویی به درمان با داروی کلوپیدوگرل و فراوانی نسبتاً بالای الل‌های دارای ویژگی کاهش عملکرد آنزیم CYP 450 2C19 در جمعیت ایرانی، انجام مطالعه‌ای جامع با هدف جمع‌بندی مناسب‌ترین روش آنالیز دستگاهی، جهت سنجش سطح پلاسمایی متابولیت فعال

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

کلوپیدوگرل ضروری می‌نماید. با توجه به آنچه بیان شد می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جهت دستیابی به داده‌های دقیق فارماکوکینتیکی این دارو به همراه تحلیل و محاسبه دقیق دوز مناسب در هر بیمار، تعیین مقدار متابولیت فعال تیولی H4، بسیار ضروری است، البته امکان اندازه‌گیری سطح پلاسمایی خود دارو نیز می‌تواند داده‌های تکمیلی فراوانی را در اختیار محققین قرار دهد. جهت حصول به این مهم، استفاده از آشکارساز MS/MS ضروری می‌نماید بدیهی است در صورت دسترسی به سیستم‌های آنالیز دستگاهی جدیدتر نظیر UHPLC، تفکیک و تعیین مقدار آنالیت‌ها با دقت بسیار بیشتری صورت خواهد پذیرفت. از دیگر نکات مهمی که بهتر است در هنگام انتخاب روش دستگاهی مد نظر قرار گیرد، می‌توان به مقدار LLOQ در روش گزارش شده، اشاره نمود. با توجه به غلظت بسیار کم آنالیت‌های اصلی مورد اشاره و همچنین نیمه عمر کوتاه آن‌ها در بدن، در صورتی که دستیابی به پروفایل کامل سطح پلاسمایی متابولیت دارو در برابر زمان مد نظر محقق باشد، روش بکار گرفته شده باید قابلیت اندازه‌گیری مقادیر در حد پیکو گرم بر میلی‌لیتر را داشته باشد ولی در غیر این صورت دستیابی به مقدار پایین پارامتر LLOQ ضروری نمی‌باشد.

جدول ۱: خلاصه روش‌های دستگاهی جهت تعیین مقدار کلوپیدوگرل و یا متابولیت‌های آن

ردیف	شماره مرجع	سال انتشار	روش دستگاهی	آنالیت‌ها	نسبت جرم به بار m/z	ابعاد ستون mm×mm×µm	نوع ستون	دمای ستون °C	فاز متحرک	سرعت جریان ml/min	زمان اجرا min	محدوده خطی بودن ng/ml	LLOQ ng/ml
۱	۸	۲۰۰۸	LC-MS/MS	[1]CAMD	۳۵٤→۵۰٤	۵×۲.۱×۵۰	Inertsil ODS-3	٤۰	متانول ۰.۱٪ فرمیک اسید	۰.۲	۵	۵۰–۰/۵	۰.۵
۲	۷	۲۰۱۰	UHPLC-MS	CAMD	→۵۰٤.۲ ۱۵۵	۱/۷×۱×۱۰۰	BEH C8	٤۰	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل	۰.۲	۲	۵۰–۱	۰.۸
۳	۲۱	۲۰۱۰	LC-MS/MS	H3, H4	-	۲/۲×۲×۷۵	Shim-Pack XR-ODS II	۳۵	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل	۰.۵	-	۲۵۰–۰/۵	۰.۵
٤	۲۲	۲۰۱۱	UHPLC-MS	H1, H2, H3, H4, MP-H endo	۱۵۵→۵۰٤	۲/۲×۲×۷۵	Shim-pack XR-ODS II	/	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل آمونیوم استات ۵ میلی‌مولار	۰.۵	۸	۲۵۰–۰/۵	۰.۵
۵	۲۳	۲۰۱۲	UHPLC–MS/MS	CLP	→۳۲۲.۰ ۲۱۲.۱	۲/۱×۵۰	BEH C18	٤۰	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل آمونیوم استات ۵ میلی‌مولار	۰.۵	۱/۵	۵۰–۰/۰۱	۰/۰۱
				CAMD	۱۵۵→۵۰٤							۱۵۰–۰/۱	۰/۱
۶	۲۵	۲۰۱۳	HPLC–MS/MS	H1, H2, H3	/	/	Ascentis Express RP-amide	/	/	/	۷/۷۵	–۰/۱۲۵ ۱۲۵	۰.۱۲۵
				H4								–۰/۱۰۱ ۱۰۱	۰.۱۰۱
۷	۲۶	۲۰۱۳	LC-[2]MS/MS	H3, H4	→۵۰٤.۱ ۱۵۵	۲.۱×۱۰۰ ۳/۵×	Zorbax Plus C18	٤۰	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل	۰.۳۵	۱۲/۵	۵۰–۰/۲۵	۰/۲۵
				CLP	→۳۲۲.۱ ۲۱۲							–۰/۲۵ ۵۰۰	۰/۲۵
				CLPM	→۳۰۸.۱ ۱۹۸							–۵۰ ۱۰۰۰۰	۵۰.۰
۸	۲۷	۲۰۱۳	LC-MS/MS	CAM	→۳۵٦.۱ ۱۵۵.۲	۳×۲×۵۰	C18 RP column	٤۰	آب دیونیزه ۰.۱٪ فرمیک اسید: استونیتریل	۰.۳	۲	۲۰۰–۰.۵	۰.۵
				CLP	→۳۲۲ ۲۱۱.۹							۲۰–۰.۰۵	۰.۰۵

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

ادامه جدول ۱: خلاصه روش‌های دستگاهی جهت تعیین مقدار کلوپیدوگرل و یا متابولیت‌های آن

ردیف	شماره مرجع	سال انتشار	روش دستگاهی	آنالیت‌ها	نسبت جرم به بار m/z	ابعاد ستون mm×mm×µm	نوع ستون	دمای ستون C°	فاز متحرک	سرعت جریان ml/min	زمان اجرا min	محدوده خطی بودن ng/ml	LLOQ ng/ml
۹	۲۸	۲۰۱۵	UHPLC-MS/MS	H4	۵۰۴.۱→۱۵۵	۱۰۰×۲.۱×۲.۵	X Bridge TM BEH C18	۳۰	آب دیونیزه استونیتریل فرمیک اسید متانول	۰.۶ ۳	۵.۵	۵۰–۰.۰۵	۰.۰۵
				CLP	۳۲۲.۱→۱۸۴.۱							۲۵–۰.۰۵	۰.۰۵
				CLPM Mp-H endo 2-oxo	۳۰۹.۰→۱۷۰.۰							۵۰۰۰–۵	۵
۱۰	۲۹	۲۰۱۷	UHPLC-MS/MS	H3, H4	۵۰۴→۱۵۵	۱۰۰×۲.۱×۱.۷	BEH C18	۴۵	آب دیونیزه استونیتریل فرمیک اسید	۰.۴۵	۶	۲۰۰–۰.۱۰۰	۰.۱۰
				SM3	۳۷۰→۲۱۲							۱۰۰۰–۱.۰۰	۱.۰۰
۱۱	۳۰	۲۰۱۷	LC-MS/MS	CAMD	۵۰۴.۱→۳۵۴.۱	۵۰×۴.۶×۵	Ascentis C18	۴۰	استونیتریل فرمیک اسید	۱	۴	۱۰۰۰–۱	۱
۱۲	۳۱	۲۰۱۷	HPLC–MS/MS	CAMD	۵۰۴.۴→۱۵۵.۲	۱۵۰×۲	C18	/	آب دیونیزه استونیتریل فرمیک اسید	۰.۴	۷	۱۰۰–۱	۱
				CLP	۳۲۲.۲→۲۱۲.۱							۷۶.۶–۰.۸	۰.۸
				CLPM	۳۰۸.۱→۱۹۸.۱							۱۰۰۰۰–۲۰۰	۲۰۰
۱۳	۳۲	۲۰۱۹	LC-MS/MS	CLP	۳۲۲→۲۱۲	۱۰۰×۲.۱	Waters XSelect CSH C18	۲۴	آب دیونیزه استونیتریل فرمیک اسید	۰.۳	۸	/	۰.۵۵
				CLP Carboxylate	۳۰۸→۱۹۸								۲.۷۴
				2-oxo CLP	۳۳۸→۱۵۵								۱.۳۷
				2-oxo CLP Carboxylate	۳۲۴→۱۶۹								۱.۳۷
				H4	۵۰۴→۱۵۵								۰.۶۹
				Ethyl clp	۳۳۶→۲۲۶								۱.۳۷
				Ethyl 2-oxo clp	۳۵۲→۱۲۵								/
				Ethyl H4	۵۱۸→۱۲۵								/

نکات زیر در این جدول باید مد نظر قرار گیرد:

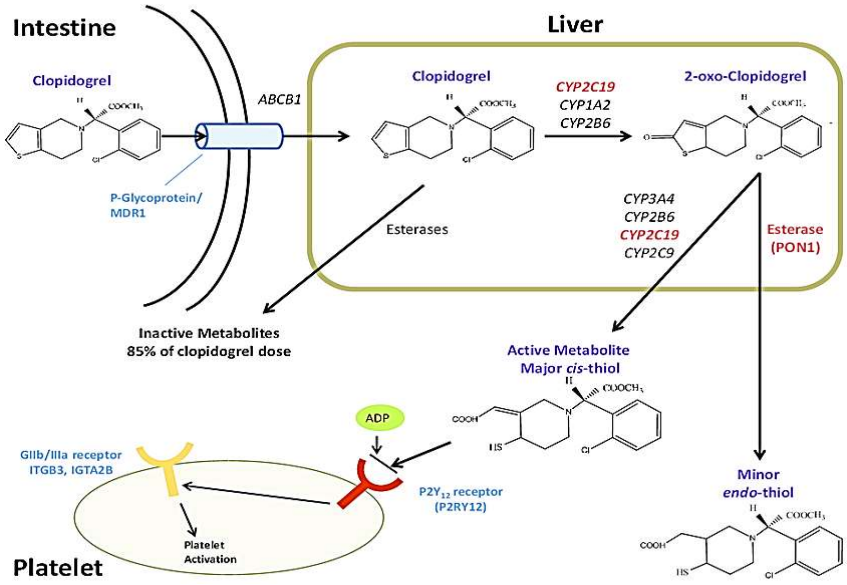
۱- مشتق متابولیت‌های فعال کلوپیدوگرل (CAMD) در واقع همان متابولیت تیولی شامل: H1، H2، H3 و H4 می‌باشد که MPB به آن افزوده و واکنش داده است.

۲- روش الکتروفورز مویین با نمایشگر ماورای بنفش برای تعیین مقدار متابولیت غیرفعال کلوپیدوگرل در نمونه‌های پایدار نشده در این مطالعه استفاده شده است.

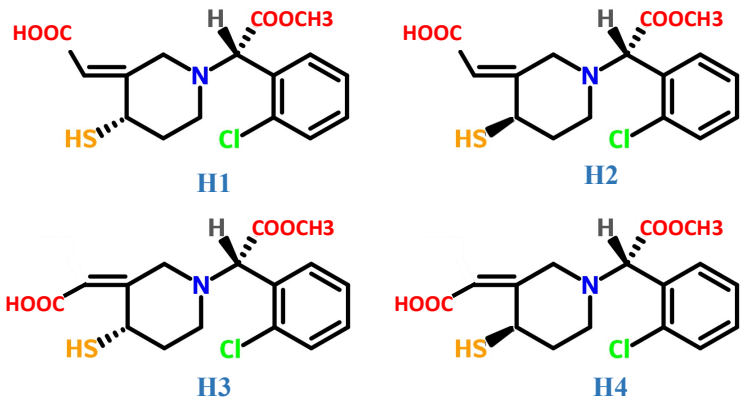
۳- سرعت حلال به صورت خطی تا دقیقه ۵/۵به ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه رسید.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]



شکل ۱: فعال‌سازی متابولیکی داروی کلوپیدوگرل- ابتدا در طی روند اکسیداسیون توسط آنزیم‌های CYP2C19، CYP1A2 و CYP2B6 متابولیت واسط ۲-اکسو کلوپیدوگرل تولید شده و سپس متابولیت فعال، در طی مراحل آنزیمی بعدی و توسط آنزیم‌های CYP3A4، CYP2B6، CYP2C19 و CYP2C9، تولید می‌شود.[۵]



شکل ۲: ساختار شیمیایی متابولیت‌های تیولی کلوپیدوگرل

References

1. SINGH, Sonu S., Kuldeep SHARMA, Deepak BAROT, P. Ram MOHAN, and Vidya B. LOHRAY. "PLAVIX^< TM>, RxMed: Pharmaceutical Information PLAVIX^< TM>, RxMed: Pharmaceutical Information." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2005;821(2): 173-180.
2. Pan, Yuesong, Weiqi Chen, Yun Xu, Xingyang Yi, Yan Han, Qingwu Yang, Xin Li et al. "Genetic polymorphisms and clopidogrel efficacy for acute ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis." Circulation 2017;135(1): 21-33.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

3. Kazui, Miho, Yumi Nishiya, Tomoko Ishizuka, Katsunobu Hagihara, Nagy A. Farid, Osamu Okazaki, Toshihiko Ikeda, and Atsushi Kurihara. "Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite." Drug Metabolism and Disposition 2010;38(1): 92-99.

4. Farid, Nagy A., Atsushi Kurihara, and Steven A. Wrighton. "Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans." The Journal of Clinical Pharmacology 2010;50(2): 126-142.

5. Dansette, Patrick M., Julien Rosi, Gildas Bertho, and Daniel ansuy. "Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy." Nature medicine 2011;17(9): 1040.

6. Casey Laizure, S., Vanessa Herring, Zheyi Hu, Kevin Witbrodt, and Robert B. Parker. "The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance." Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 2013;33(2): 210-222.

7. Tuffal, Gilles, Sebastien Roy, Melanie Lavisse, Denis Brasseur, Joe Schofield, Nathalie Delesque Touchard, Pierre Savi et al. "An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma." Thrombosis and haemostasis 2011; 105 (04): 696-705.

8. Takahashi, Makoto, Henrianna Pang, Kiyoshi Kawabata, Nagy A. Farid, and Atsushi Kurihara. "Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC–MS/MS." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2008;48(4): 1219-1224.

9. Abell, Lynn M., and Eddie C-K. Liu. "Dissecting the activation of thienopyridines by cytochromes P450 using a pharmacodynamic assay in vitro." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2011;339(2): 589-596.

10. Angiolillo, D. J., C. M. Gibson, S. Cheng, C. Ollier, O. Nicolas, L. Bergougnan, L. Perrin, F. P. LaCreta, F. Hurbin, and M. Dubar. "Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies." Clinical Pharmacology & Therapeutics 2011;89(1): 65-74.

11. Payan, Maryam, Nader Tajik, Mohammad Reza Rouini, and Mohammad Hossein Ghahremani. "Genotype and allele frequency of CYP2C19* 17 in a healthy Iranian population." Medical journal of the Islamic Republic of Iran 2015;29: 269.

12. Neyshaburinezhad, Navid, Mohammad Reza Rouini, Hanieh Entezari, Hoda Lavasani, and Yalda Hosseinzadeh Ardakani. "Evaluation of changes in cytochrome P450 2C19 activity in type 2 diabetic rats before and after treatment, by using isolated perfused liver model." Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2020.

13. Snoep, Jaapjan D., Marcel MC Hovens, Jeroen CJ Eikenboom, Johanna G. van der Bom, J. Wouter Jukema, and Menno V. Huisman. "Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis." American heart journal 2007;154(2): 221-231.

14. Sameer, Abu-Eid I., Gharbieh M. Amany, Abed A. Abdela, and Sharif A. Fadel. "CYP2C19 genotypes in a population of healthy volunteers and in children with hematological malignancies in Gaza Strip." Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology 2009;16 (1).

15. Ardakani, Yalda H., and Mohammad-Reza Rouini. "Improved liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its three main metabolites in human plasma, urine and saliva." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2007;44 (5): 1168-1173.

16. Patti, Giuseppe, Giuseppe Micieli, Claudio Cimminiello, and Leonardo Bolognese. "The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal." Cardiovascular Therapeutics 2020 .

17. Rouini, Mohammad-Reza, Yalda H. Ardakani, Alireza Foroumadi, Hoda Lavasani, and Lida Hakemi. "Sensitive quantification of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by LC with UV detection." Chromatographia 2009;70 (5-6): 953-956.

18. Mani, Helen, Stefan W. Toennes, Birgit Linnemann, Dorota A. Urbanek, Jan Schwonberg, Gerold F. Kauert, and Edelgard Lindhoff-Last. "Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy?." Therapeutic drug monitoring 2008;30 (1): 84-89.

19. Taubert, Dirk, Adnan Kastrati, Steffi Harlfinger, Olga Gorchakova, Andreas Lazar, Nicolas von Beckerath, Albert Schömig, and Edgar Schömig. "Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose." Thrombosis and haemostasis 2004;92 (8): 311-316.

20. Delavenne, Xavier, Thierry Basset, Paul Zufferey, Nora Malouk, Silvy Laporte, and Patrick Mismetti. "Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite." Journal of separation science 2010;33 (13): 1968-1972.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

21. Angiolillo, D. J., C. M. Gibson, S. Cheng, C. Ollier, O. Nicolas, L. Bergougnan, L. Perrin, F. P. LaCreta, F. Hurbin, and M. Dubar. "Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies." Clinical Pharmacology & Therapeutics 2011;89 (1): 65-74.

22. Rouini, Mohammad-Reza, Yalda Hosseinzadeh Ardakani, Faezeh Soltani, Hassan Y. Aboul-Enein, and Alireza Foroumadi. "Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous determination of tramadol, and its two main metabolites in human plasma." Journal of Chromatography 2006;B 830 (2): 207-211.

23. Peer, Cody J., Shawn D. Spencer, Dustin AH VanDenBerg, Michael A. Pacanowski, Richard B. Horenstein, and William D. Figg. "A sensitive and rapid ultra HPLC–MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its derivatized active thiol metabolite in human plasma." Journal of Chromatography 2012;B 880: 132-139

24. Furlong, Michael T., Ishani Savant, Moucun Yuan, Laura Scott, William Mylott, Thomas Mariannino, Pathanjali Kadiyala, Vikram Roongta, and Mark E. Arnold. "A validated HPLC–MS/MS assay for quantifying unstable pharmacologically active metabolites of clopidogrel in human plasma:application to a clinical pharmacokinetic study." Journal of Chromatography 2013;B 926: 36-41.

25. Karaźniewicz-Łada, Marta, Dorota Danielak, Paweł Burchardt, Łukasz Kruszyna, Anna Komosa, Maciej Lesiak, and Franciszek Główka. "Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases." Clinical pharmacokinetics 2014;53 (2): 155-164.

26. Park, Jung Bae, Soo Hyeon Bae, Su-Min Jang, Won Jun Noh, Jang-Hee Hong, Kee Dong Yoon, Han Chang Kang, and Soo Kyung Bae. "Direct measurement of active thiol metabolite levels of clopidogrel in human plasma using tris (2-carboxyethyl) phosphine as a reducing agent by LC–MS/MS." Journal of separation science 2013;36 (14): 2306-2314.

27. Hua, Wenyi, Michael Lesslie, Brian T. Hoffman, Christopher Binns, and Daniel Mulvana. "Development of a sensitive and fast UHPLC–MS/MS method for determination of clopidogrel, clopidogrel acid and clopidogrel active metabolite H4 in human plasma." Bioanalysis 2015;7 (12): 1471-1482.

28. Liu, Cai, Youming Lu, Hongbin Sun, Jin Yang, Yongqiang Liu, Xiaojuan Lai, Yanchun Gong et al. "Development and validation of a sensitive and rapid UHPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of the common active and inactive metabolites of vicagrel and clopidogrel in human plasma." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2018;149: 394-402.

29. Zhao Xue, Sun Hui, Zhang Qi, Ren Tian-ming, GU jing-kai. "Determination of Clopidogrel Active metabolite in Beagle Dog Plasma by LC-MS/MS." Journal of Chinese mass spectrometry society 2017 ;38(4).

30. Lyngby, Janne G., Michael H. Court, and Pamela M. Lee. "Validation of a method for quantitation of the clopidogrel active metabolite, clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, and 2-oxo-clopidogrel in feline plasma." Journal of veterinary cardiology 2017;19 (4): 384-395.

31. Laizure, S. Casey, Zhe-Yi Hu, Philip M. Potter, and Robert B. Parker. "Inhibition of carboxylesterase-1 alters clopidogrel metabolism and disposition." Xenobiotica 2020;50 (3): 245-251.

32. Greibrokk, Tyge, and Thomas Andersen. "Temperature programming in liquid chromatography." Journal of separation science 2001;24 (12): 899-909.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2021, Vol. 10, No. 4: 512-525 *Original Article*

Sareh Aghajanpour[1], Navid Neyshaburinezhad[2], Mohammadreza Rouini[3], Yalda Hoseinzadeh Ardakani*[4]

[1] Pharm.D. student, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2] Ph.D. candidate of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmacokinetic Division, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Full Professor of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmacokinetic Division, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Associate Professor of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmacokinetic Division, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Corresponding Author:**
Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy

Tel: 02164120
E-mail:: Yh-ardakani@tums.ac.ir

A Review of Analytical Methods for the Measurments of Clopidogrel Active Metabolite in Biological Matrices

Received: 20 Oct 2020 ; Accepted: 26 Feb 2021

Abstract

Introduction: Despite the widespread use of clopidogrel as a prodrug in a wide range of patients, the researchers found that the drug couldn't have sufficient antiplatelet effects at a usual dose in three to forty percent of patients. So on, measuring clopidogrel active metabolite concentration is seems necessary to evaluate the effects of this drug in each patient.

Discusstion: Due to the importance of determining clopidogrel active metabolite plasma level, in this article, we reviewed and compared all the analysis methods for that which could affects on correct pharmacokinetic evaluation of clopidogrel and thus play an important role in prescribing the appropriate dose of that in each individual therapy. Despite numerous reports of the clopidogrel analysis method, only thirteen studies have been published to analyzing the concentration of clopidogrel active metabolite in a biological matrices. As a result of the very low concentration and short half-life of the clopidogrel active metabolite in the biological matrice, the method used for determining it′s concentration profile should be able to measure values in picogram per millilitre scale.

Discusstion: According to the complete summary of the analyzing methods, employing advanced device analysis systems such as UHPLC lead to much more accurate separation and quantification of analytes. Also, employing the MS / MS detector adding the possibility of measuring the clopidogrel plasma level in the same matrices.

Keywords: Clopidogrel, Clopidogrel Active Metabolite, Chromatography, CYP2C19 enzyme

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.512]