

Е.А. Арианова,
аспирант кафедры фармацевтической химии
с курсом токсикологической химии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

М.Н. Богачук,
аспирант кафедры фармацевтической химии
с курсом токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

О.И. Передеряев,
к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии
с курсом токсикологической химии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

E.A. Arianova,
post-graduate student of the chair of pharmaceutical
chemistry with a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

M.N. Bogachuk,
post-graduate student of the chair of pharmaceutical
chemistry with a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

O.I. Perederyaev,
PhD, lecturer of the chair of pharmaceutical chemistry
with a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ

THE METHODS OF ASSESSMENT OF QUALITY AND SAFETY OF MEDICAMENTS ON THE BASIS OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Олег Игоревич Передеряев, доцент кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии

Адрес: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13

Телефон: 8 (495) 691-13-92

E-mail: pharma@bk.ru

Аннотация. Рассмотреть наиболее актуальные методы качественного и количественного определения низкомолекулярного гепарина, а также анализ его некоторых примесей.

Annotation. To consider the methods for assessing quality and safety of drugs on the basis of low molecular weight heparin.

Ключевые слова. Гепарин, низкомолекулярный гепарин, препараты низкомолекулярного гепарина, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, капиллярный зоннальный электрофорез.

Key words. Heparin, low molecular weight heparin, low molecular weight heparin drugs, high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, capillary zone electrophoresis.

ВЫВОДЫ

Лекарственные средства на основе низкомолекулярных гепаринов находят все более широкое применение для профилактики и лечения тромбозов, а также нарушений микроциркуляции крови. В связи с этим на рынке наблюдается тенденция к увеличению числа таких лекарственных средств, в том числе за счет препаратов дженериков, что обуславливает необходимость создания комплексного подхода к оценке их качества и безопасности

Профилактика и лечение тромбозов, а также нарушение микроциркуляции имеют важное значение для клинической практики в связи с ростом числа больных с заболеваниями, сопровождающимися тромбозами и эмболиями. К подобным заболеваниям относятся инфаркт миокарда, тромбозы сосудов конечностей, мозга, легких, глаз и др. Для лечения подобных заболеваний возникает необходимость назначения антикоагулянтов, в том числе таких, как гепарин и его производные.

Низкомолекулярные гепарины представляют собой смесь полимеров высокосульфированных мукополисахаридов, состоящих из последовательно чередующихся остатков D-глюкоронат 2-сульфата и N-ацетилглюкозамин-6-сульфат (соединенных связью 1-4), имеющих диапазон молекулярных масс от 5000 до 40000 Да. Такая структура представляет собой сложный объект для качественного и количественного анализа и способствует возможному загрязнению сходными по структуре и свойствам примесями, которые сложно обнаружить.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Методы оценки подлинности низкомолекулярных гепаринов

Если рассматривать фармакопейные методы исследования НМГ, то наиболее подробно методы определения подлинности низкомолекулярных гепаринов представлены в Европейской и Британской фармакопеях. В отношении данных препаратов оба нормативных документа очень схожи. Общая статья на низкомолекулярные гепарины в разделе определения подлинности предусматривает использование ядерно-магнитного резонанса, соотношение активностей анти-фактора Ха к анти-фактору II-a, эксклюзионную хроматографию и испытания на натрий или кальций (в зависимости от препарата). В то же время соотношение активностей анти-фактора Ха к анти-фактору II-a и эксклюзионная хроматография являются количественными методами.

В других источниках можно встретить спектрофотометрические методики, а также методики, основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярном электрофорезе.

1. *Спектрофотометрические методы.* Существует методика определения гепарина в области длин волн 200–300 нм [1]. Этот метод используют в качестве дополнительного метода определения подлинности субстанций НМГ.

2. *Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).* В фармакопейных исследованиях, как правило, используют эксклюзионный вариант ВЭЖХ для определения диапазона молекулярных масс НМГ.

В литературе можно найти и другие подходы. Так, авторы работы [2] описывают метод определения подлинности и молекулярно-массового распределения НМГ с помощью метода ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

В работе [3] для анализа низкомолекулярных гепаринов использовали обращенную анионную

хроматографию с модификацией неподвижной фазы цетилтриметил аммонием. НМГ предварительно химически или ферментативно деполимеризовали.

В статье [4] авторы предлагают для анализа НМГ комбинацию двух методов: анионообменную ВЭЖХ и электрофорез в полиакриламидном геле. С помощью такого сочетания методов была показана возможность определения отдельных структурных остатков НМГ.

В работе [5] предлагается метод эксклюзионной хроматографии для разделения различных фракций НМГ и дальнейшего их анализа с помощью обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ с масс-детектированием.

Авторы статьи [6] исследовали влияние высокого и низкого давления на степень разделения НМГ в эксклюзионной хроматографии. Показано, что оптимальные условия разделения создавались при высоком давлении (20–30 Бар).

3. *Методы капиллярного электрофореза.* Очень большое распространение среди методов анализа НМГ имеет капиллярный электрофорез (КЭ), который пока не находит широкого применения в фармакопейных исследованиях. Как правило, КЭ позволяет определить в препаратах низкомолекулярного гепарина различные полисахаридные остатки.

Авторы статьи [8] предлагают использовать метод капиллярного электрофореза для количественной оценки содержания в препаратах НМГ сульфат ионов. Также на электрофореграммах были хорошо отделимы фосфат ионы (они использовались в качестве внутреннего стандарта) и хлорид ионы

Встречается описание метода гель-электрофореза для анализа НМГ. Например, описывают [9] метод анализа олигосахаридов в градиентном полиакриламидном гель-электрофорезе. Анализ полисахаридного состава производили методом одномерного электрофореза в градиентном геле (12/25%), что позволило разделить как низкомолекулярные остатки, так и высокомолекулярные остатки. Электрофорез делали при различном токе: 250, 500 и 1000 В. Окраску осуществляли красителем азур А (Azure A). В результате была получена электрофореграмма с изображением полос полисахаридов различной массой.

4. *Биологические методы.* Широко применяются в Европейской и Британской фармакопеях для подтверждения качества НМГ. В этом случае проводят определение соотношения активности антифактора Ха к активности антифактора IIa, что является биологическим показателем антитромботической активности.

Определение примесей в низкомолекулярных гепаринах

Наиболее существенным показателем качества низкомолекулярного гепарина является анализ сопутствующих примесей. В зарубежных фармакопеях нормируется содержание свободного азота, кальция, натрия, соотношение сульфат ионов к карбоксилат ионам, тяжелые металлы и бактериальные эндотоксины, а также потеря в массе при высушивании.

Препараты НМГ в качестве дженериков производятся во многих странах мира. В данной ситуации встает вопрос о единых подходах к контролю качества и безопасности НМГ, а также способов его производства. В частности, существующие различия в используемых стандартах могут привести к определению в составе препаратов НМГ различных компонентов [7].

Так, наиболее известный случай загрязнения связан с обнаружением примеси хондроитин сульфата в препаратах НМГ, в частности, в Китае на ранних стадиях производства в лекарственное средство попал хондроитин-сульфат. Контроль НМГ на наличие этого вещества не был предусмотрен спецификацией качества на гепарин. В итоге, по данным статьи [23], от подобного загрязнения умерло 238 пациентов в США. С помощью ЯМР-спектроскопии в препаратах НМГ были определены примеси высокосульфированного хондроитин-сульфата, дерматан-сульфата, хондроитин-сульфата А и С; у 94 из 145 образцов было повышенное содержание этанола до 9,5%. Также обнаружены ацетон и муравьиная кислота (0,04%), ацетат натрия и метанол (0,5%) [10].

Сегодня в России обязательно нормируется содержание высокосульфированного хондроитина в препаратах инъекционной формы гепарина. Разработаны и предложены две методики идентификации данной примеси — капиллярный электрофорез в свободном растворе (зональный капиллярный электрофорез) и ¹H-ЯМР-спектроскопия. Однако допускается присутствие дерматан-сульфата.

В мировой литературе описано достаточно много способов обнаружения хондроитин сульфата в препаратах низкомолекулярного гепарина.

В одной из статей [11] описаны способы разделения хондроитин- сульфата и гепарина методами капиллярного электрофореза и анионообменной хроматографии. ВЭЖХ предлагается проводить в условиях градиентной подвижной фазы воды и 20 mM Трис с 2,5 M натрия хлорида, доведенного до pH = 3 ортофосфорной кислотой. Для разделения хондроитинсульфата и гепарин-сульфата использовали фосфатный буфер. Детектирование производили при длине волны 200 нм.

Сходная методика определения хондроитин-сульфата и дерматан-сульфата в гепарин-сульфате методом ВЭЖХ предложена авторами работы [12]. Была предложена колонка Dionex IonPac® AS11-НС, подвижная фаза градиент вода / натрия хлорид с 20 mM Трис и детектирование при 215 нм.

Также в литературе описан опыт использования ЯМР метода для определения высокосульфированного хондроитин-сульфата в препаратах НМГ [13].

Количественное определение НМГ в зарубежных фармакопеях проводится при помощи метода эксклюзионной ВЭЖХ и определения соотношения активности антифактора Ха к антифактору Па. Однако количественное определение может быть проведено и с помощью методов капиллярного электрофореза и других вариантов ВЭЖХ.

ВЫВОДЫ

С учетом возрастающей актуальности НМГ проблемам оценки их качества и безопасности посвящено множество работ. Однако, рассматривая используемые методики, необходимо отметить, что в каждом случае существуют свои задачи и ограничения, что обуславливает отсутствие единых подходов для оценки их качества и безопасности НМГ.

Для анализа НМГ можно выделить несколько наиболее перспективных методов: ВЭЖХ и капиллярный электрофорез для качественного и количественного определения как НМГ, так и примесей в нем; биологические методы для оценки подлинности и количественного определения НМГ.

Анализ научных публикаций показывает, что состав НМГ и возможных примесей не изучен полностью. Особую тревогу вызывает то обстоятельство, что на окончательный состав лекарственных средств на основе НМГ влияет как источник его получения, так и способ переработки. В частности разнообразие сырья и методов получения НМГ способствуют появлению большого числа трудноопределяемых примесей. Это приводит к необходимости создания комплексного подхода к оценке качества и безопасности НМГ, включающего в себя качественный и количественный анализ НМГ, его биологическую активность, а также анализ известных и возможных примесей.

Список литературы

1. Селеменев В.Ф., Хохлова О.Н., Хохлов В.Ю., Щербинин Р.Л. Определение гепарина спектрофотометрическим и фотоколориметрическим методами // Химико-фармацевтический журнал. 1999. № 8. С.47–48.
2. Rahul P. Patel, Christian Narkowicz, Glenn A. Jacobson. Effective reversed-phase ion pair high-performance liquid chromatography method for the separation and character-

- ization of intact low-molecular-weight heparins // *Analytical Biochemistry*. 2009. V.387. P. 113–121.
3. *Pierre A.J. Mourier, Christian Viskov*. Chromatographic analysis and sequencing approach of heparin oligosaccharides using cetyltrimethylammonium dynamically coated stationary phases // *Analytical Biochemistry*. 2004. V. 332. P. 299–313.
 4. *Romain R. VIVE, Sarah GOODGER and David A. PYE* // Combined strong anion-exchange HPLC and PAGE approach for the purification of heparan sulphate oligosaccharides // *Biochem. J.* 2001. V.354. P.141–147.
 5. *Stacie L. Eldridge, Albert K. Korir, Sarah M. Gutierrez et al.* Heterogeneity of depolymerized heparin SEC fractions: to pool or not to pool? // *Carbohydrate Research*. 2008. V. 343. P. 2963–2970.
 6. *Andr'e Ziegler, Joseph Zaia*. Size-exclusion chromatography of heparin oligosaccharides at high and low pressure. // *Journal of Chromatography B*. 2006. V. 837. P. 76–86.
 7. *Timothy King J., Umesh R. Desai*. A capillary electrophoretic method for fingerprinting low molecular weight heparins // *Analytical Biochemistry*. 2008. V. 380. P. 229–234.
 8. *Peter Mikus, Iva Valaskova, Emil Havranek*. Analytical characterization of heparin by capillary zone electrophoresis with conductivity detection and polymeric buffer additives // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004. V. 36. P. 441–446.
 9. *Kevin G. RICE, Marry K. ROTTINK, Robert J. LINHARDT*. Fractionation of heparin-derived oligosaccharides by gradient polyacrylamide-gel electrophoresis // *Biochem.* 1987. V. 244. P. 512–522.
 10. *Tanja Beyer, Magnus Matz, Daniela Brinz et al.* Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. V. 40. Is. 4. P.297–304.
 11. *David A. Keire, Michael L. Trehy, John C. Reepmeyer*. Analysis of crude heparin by ¹H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010. V. 51. P. 921–926.
 12. *Michael L. Trehy, John C. Reepmeyer, Richard E. Kolinski, Benjamin J. Westerberger, Lucinda F. Buhse*. Analysis of heparin sodium by SAX/HPLC for contaminants and impurities // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009. V. 49. P. 670–673.
 13. *Shawn Bairstow, Jeff McKee, Mark Nordhaus, Richard Johnson*. Identification of a simple and sensitive microplate method for the detection of oversulfated chondroitin sulfate in heparin products // *Analytical Biochemistry*. 2009. V. 388. P. 317–321.