

**NOWE KIERUNKI BADAŃ I WYZWANIA  
W ANALIZIE LEKÓW HEPARYNOWYCH**

NEW DIRECTIONS OF RESEARCH  
AND CHALLENGES IN THE ANALYSIS OF HEPARIN  
DRUGS

**Radosław Sadowski<sup>\*</sup>, Dominika Krysztofiak,  
Renata Gadzała-Kopciuch<sup>\*</sup>, Bogusław Buszewski**

<sup>1</sup> *Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

<sup>2</sup> *Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń*

*\*e-mail: radoslawsad@gmail.com, rgadz@umk.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka wybranych leków o działaniu przeciwzakrzepowym
  - 1.1. Klasyfikacja i mechanizm działania leków przeciwzakrzepowych
  - 1.2. Heparyna i niskocząsteczkowe heparyny
2. Otrzymywanie leków heparynowych
3. Techniki rozdzielania a nowe kierunki badań i wyzwania w analizie leków przeciwzakrzepowych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr Radosław Sadowski** w roku 2010 ukończył studia na kierunku chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką Prof. dr hab. Renaty Gadzały-Kopciuch. W 2020 r. uzyskał stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemii na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obszar zainteresowań naukowych obejmuje analizę środków biologicznie czynnych w próbkach środowiskowych, środkach ochrony roślin, kosmetykach i lekach z wykorzystaniem różnych metod przygotowania próbek (m.in. LLE, SPE, MIPs, depolimeryzacja enzymatyczna i chemiczna) i końcowego ich oznaczania z wykorzystaniem łączonych technik chromatograficznych.



<https://orcid.org/0000-0001-8329-4769>



**Mgr Dominika Krysztofiak** jest absolwentką Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 2015 uzyskała tytuł magistra chemii przedkładając pracę nt. „*Opracowanie metody depolimeryzacji chemicznej wybranych leków o działaniu przeciwzakrzepowym*”. W latach 2017-2019 pracowała w firmie farmaceutycznej Polpharma S.A. na stanowisku młodszego specjalisty Kontroli Jakości. Obecnie (od 2019 roku) zatrudniona jest w firmie farmaceutycznej Gedeon Richter Polska jako młodszy specjalista ds. analitycznych w Dziale Badań i Rozwoju (R&D). Praca zawodowa pozwala na rozwijanie pasji zapoczątkowanych już na studiach i skupia się na analizie zarówno tradycyjnych, jak i nowych substancji biologicznie aktywnych z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik analitycznych. Poszukiwanie nowych rozwiązań w analizie tych związków wymaga stalego rozwoju i poszerzania wiedzy na podstawie śledzenia aktualnych trendów w chemii analitycznej na podstawie najnowszych osiągnięć dostępnych w literaturze naukowej.



**Prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch** uzyskała tytuł magistra na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz doktora na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest profesorem w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii UMK. W swoim dorobku naukowym posiada publikacje z zakresu nauk o separacyjnych. Polegają one głównie na syntezie nowych sorbentów, takich jak polimery z cząsteczką odcisniętą i polimery magnetyczne do wyodrębnienia związków biologicznie aktywnych. Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN i Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Jest laureatką ogólnopolskich nagród, m.in. Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Medalu Ministra Edukacji.



<https://orcid.org/0000-0002-1434-2824>



**Prof. zw. dr hab. dr h.c. Bogusław Buszewski**, czł. koresp. PAN ukończył studia na Wydziale Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie. W 1986 otrzymał tytuł doktora na Wydziale Technologii Chemicznej Słowackiego Uniwersytetu Technicznego w Bratysławie, Czechosłowacji. W 1992 uzyskał tytuł doktora habilitowanego a w 1994 został profesorem UMK. W 1999 otrzymał tytuł profesora chemii. Od ukończenia studiów był asystentem w Zakładzie Chemii Fizycznej UMCS w Lublinie. Od 1994 roku zaczął organizować grupę badawczą na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) i został kierownikiem Zakładu Chemii Środowiska i Ekoanalitik (obecnie Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitik). Prof. Buszewski był stypendystą Fundacji Alexandra Humboldta oraz profesorem wizytującym na kilku uniwersytetach w: USA, Japonii, UK, Republice Południowej Afryki, Holandii, Austrii, Chinach, na Tajwanie jak również na wielu innych uniwersytetach w Europie. Jest autorem lub współautorem 15 książek, licznych patentów i ponad 600 artykułów naukowych. Jest członkiem rad wydawniczych 26 krajowych i zagranicznych czasopism naukowych z zakresu chemii analitycznej oraz fizykochemii powierzchni i technik separacyjnych. Należy do grona najczęściej cytowanych chemików w Polsce (ponad 12000 cytowań).



<https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

---

**ABSTRACT**

The complexity of the structure of heparin anticoagulants requires appropriate sample preparation to be able to perform the analysis correctly. This stage of the analytical procedure is the most time-consuming and has a key impact on the obtained information. Therefore, it is important to improve the current and search for new solutions for the preparation of samples of anticoagulants as well as the separation and identification of components of such drugs. This paper discusses heparin drugs and new research directions and challenges related to the analytics of heparin anticoagulants.

Keywords: separation techniques, liquid chromatography, anticoagulants, heparins, LMWHs

Słowa kluczowe: techniki rozdzielania, chromatografia cieczowa, leki przeciwzakrzepowe, heparyny, LMWHs

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

2D-LC	– Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa ( <i>ang. Two-dimensional Liquid Chromatography</i> )
CE	– Elektroforeza kapilarna ( <i>ang. Capillary Electrophoresis</i> )
Da	– Dalton
HILIC	– Chromatografia oddziaływań hydrofilowych ( <i>ang. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> )
HPLC	– Wysokosprawna chromatografia cieczowa ( <i>ang. High Performance Liquid Chromatography</i> )
IEC	– Chromatografia jonowymienna ( <i>ang. Ion Exchange Chromatography</i> )
IPC	– Chromatografia par jonowych ( <i>ang. Ion Pair Chromatography</i> )
LC	– Chromatografia cieczowa ( <i>ang. Liquid Chromatography</i> )
LMWHs	– Niskocząsteczkowe heparyny ( <i>ang. Low-Molecular-Weight Heparins</i> )
MS	– Spektrometria mas ( <i>ang. Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	– Tandemowa spektrometria mas ( <i>ang. Tandem Mass Spectrometry</i> )
MW <sub>ag</sub>	– Średnia masa cząsteczkowa ( <i>ang. Molecular Weight Average</i> )
NMR	– Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ( <i>ang. Nuclear Magnetic Resonance</i> )
PAGE	– Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym ( <i>ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SAX	– Sorbent z silnym anionowymieniaczem ( <i>ang. Strong Anion Exchange</i> )
SEC	– Chromatografia wykluczania ( <i>ang. Size Exclusion Chromatography</i> )
UFH	– Heparyna niefrakcjonowana ( <i>ang. Unfractionated Heparin</i> )
ULMWHs	– Ultra niskocząsteczkowe heparyny ( <i>ang. Ultra-Low-Molecular-Weight Heparins</i> )

## WPROWADZENIE

Dynamiczny rozwój cywilizacji ma ogromny wpływ na ludzkie życie. Wzrost tempa życia oraz nieracjonalne zmiany jego stylu życia wpływają na pogorszenie się stanu zdrowia. Dziś, coraz więcej mówi się o tzw. chorobach cywilizacyjnych. Do tych chorób można zaliczyć m.in. choroby układu krążenia, nowotwory czy cukrzycę. Wraz z gwałtownym wzrostem częstości występowania wspomnianych chorób, a także pojawianiem się innych, wcześniej nieznanych, rośnie zapotrzebowanie na leki. W konsekwencji prowadzi to do konieczności poszukiwania nowych środków farmaceutycznych. Jednak wdrożenie nowego leku, który będzie bezpieczny dla zdrowia i życia pacjenta, wymaga licznych i czasochłonnych badań m.in. farmaceutycznych, toksykologicznych i medycznych. Do badań tych wykorzystuje się rozmaite techniki analityczne. Ze względu na konieczność identyfikacji substancji aktywnych, czy zanieczyszczeń preparatów farmaceutycznych na niskim poziomie stężeń niezbędne staje się poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań analitycznych (selektywnych i specyficznych metod) umożliwiających ich oznaczenie. Do takich technik należy chromatografia cieczowa - jedna z najczęściej zalecanych przez farmakopeę metod rozdzielania, w której bardzo istotny jest dobór odpowiedniej kolumny analitycznej i optymalnych warunków prowadzenia procesu tak, by możliwa była identyfikacja wszystkich związków w badanej próbce.

Różnorodność i złożoność struktur chemicznych komponentów leków to punkt wyjścia w kierunku opracowywania metodyki analitycznej, której celem jest rozdzielenie i identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie wszystkich składników badanych farmaceutyków. Przykładem takiego leku jest heparyna, która stosowana jest jako lek przeciwzakrzepowy w leczeniu m.in. zakrzepicy żył głębokich, zawału mięśnia sercowego, dławicy piersiowej, czy zapobieganiu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz zapobieganiu tworzenia się skrzepów w krążeniu pozaustrojowym podczas hemodializy i w profilaktyce okołoperacyjnej [1-5].

Niniejsza praca podejmuje się dyskusji na temat nowych kierunków badań i wyzwań w analityce leków przeciwzakrzepowych z wykorzystaniem łączonych technik chromatograficznych.

### 1. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LEKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWZAKRZEPOWYM

#### 1.1. KLASYFIKACJA I MECHANIZM DZIAŁANIA LEKÓW PRZECIWZAKRZEPOWYCH

Klasyfikacja leków przeciwzakrzepowych oparta jest na miejscu docelowego działania danej substancji aktywnej oraz drogi jej aplikacji. Związki wykazujące właściwości przeciwzakrzepowe mogą bezpośrednio wpływać na aktywność trombiny (bezpośrednie inhibitory trombiny) lub pośrednio zakłócać jej działanie

(pośrednie inhibitory trombiny) poprzez inhibicje m.in. czynnika Xa (czynnik Stuarta-Prowera) lub czynnika IXa (czynnik antyhemofilowy B). Leki przeciwzakrzepowe podawane są drogą pokarmową (doustnie) lub pozajelitowo. Odrębną grupę preparatów przeciwzakrzepowych podawanych doustnie stanowią antagoniści witaminy K. Związki te stosowane są w przypadkach długotrwałego leczenia, podczas gdy parenteralne preparaty aplikuje się w celu zapobiegania i początkowego leczenia powikłań zakrzepowo-zatorowych.

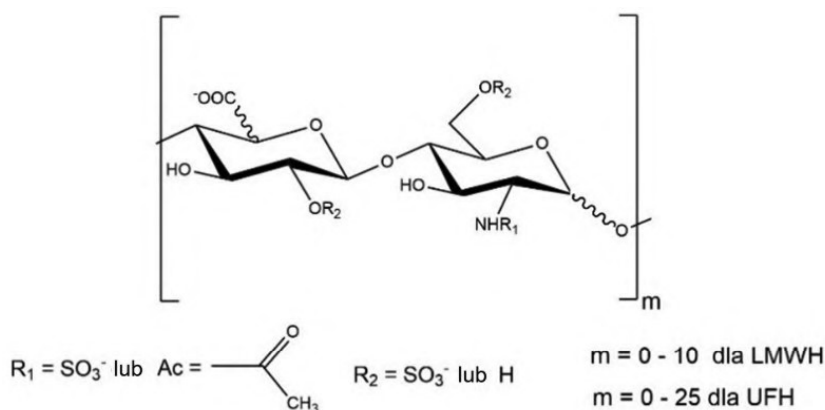
Proces krzepnięcia krwi zostaje aktywowany w wyniku uwolnienia tzw. czynnika tkankowego, wywołanego urazem tkanki lub uszkodzeniem naczyń. Uwolniony czynnik tkankowy w obecności jonów wapnia tworzy kompleks z czynnikiem VIIa (prokowerdyna), a następnie przekształca czynniki krzepnięcia X i IX w ich aktywne formy: Xa oraz IXa. Czynnik Xa przy udziale fosfolipidów oraz aktywnego czynnika Va (proakceleryna) powoduje powstanie kompleksu protrombinazy, który następnie umiejscowiony na błonie fosfolipidów przekształca protrombinę (czynnik II) w jej aktywną formę – trombinę (IIa). Obecność trombiny determinuje przekształcenie fibrynogenu w fibrynę stanowiącą sieć włókien będących szkieletem skrzepu. Ponadto, trombina wykazuje zdolność do utworzenia skrzepu poprzez aktywację płytek krwi oraz receptora śródbłonna, a także aktywację czynników VIII (czynnik przeciwhemofilowy A), XI (czynnik przeciwhemofilowy C) i XIII (fibrynaza).

Leki o działaniu przeciwzakrzepowym powodują zakłócenie reakcji enzymatycznych zachodzących podczas procesu krzepnięcia krwi. Substancje przeciwzakrzepowe wpływają w sposób bezpośredni na zahamowanie aktywności trombiny lub pośredni w wyniku oddziaływania m.in. z czynnikiem Xa, kofaktorem osoczym zwanym antytrombiną III [6]. Wśród najczęściej stosowanych leków przeciwzakrzepowych, które w sposób pośredni hamują aktywność trombiny poprzez wiązanie z antytrombiną III wyróżnić możemy niefrakcjonowaną oraz niskocząsteczkową heparynę. Ponadto pośrednią inhibicję trombiny wykazuje syntetyczny polisacharyd (fondaparynuks) zdolny do zakłócania działania czynnika Xa poprzez zmianę konformacji cząsteczki antytrombiny. Związki z grupy antagonistów witaminy K, np. warfaryna, wpływają także pośrednio na zahamowanie trombiny, na skutek zakłócenia prawidłowego funkcjonowania witamin K, niezbędnej do aktywacji czynników II, VII, IX i X krzepnięcia krwi [6].

## 1.2. HEPARYNA I NISKOCZĄSTECZKOWE HEPARYNY

Heparyna to mieszanina siarczanowanych liniowych polisacharydów. Lek ten jest pierwszym odkrytym naturalnym biopolimerem. Ze względu na rozkład masy cząsteczkowej występuje w trzech postaciach: niefrakcjonowana heparyna (UFH,  $MW_{avg} \sim 15\ 000\ Da$ ), niskocząsteczkowe heparyny (LMWHs,  $MW_{avg} \sim 5000 -$

6000 Da) i ultra niskocząsteczkowe heparyny (ULMWHs, ogólnie  $MW_{avg} < 2000$  Da) [7-8]. Łańcuchy polisacharydowe heparyny składają się z powtarzalnych jednostek disacharydowych kwasu uronowego i glukozaminy (GlcN) połączonych wiązaniem 1-4 glikozydowym. Kwas uronowy to głównie kwas  $\alpha$ -L-iduronowy (IdoA) i kwas  $\beta$ -D-glukuronowy (GlcA). Tak zbudowane disacharydy mogą tworzyć różnej długości łańcuchy oligosacharydów. Każdy z disacharydów (Rys. 1) może być podstawiony grupami siarczanowymi (S) lub acetylowymi (Ac).



Rysunek 1. Wzór strukturalny fragmentu disacharydu w UFH oraz LMWHs, gdzie  $m$  – liczba sekwencji disacharydowych

Figure 1. Structural formula of the disaccharide fragment in UFH and LMWHs, where  $m$  - number of disaccharide sequences

Grupy siarczanowe występują w kwasie uronowym w pozycji 2 (IdoA2S i GlcA2S), a w przypadku glukozaminy reszty występują w pozycji 6 (GlcN6S) i/lub 3 (GlcNS). Grupy acetylowe zlokalizowane są w glukozaminie w pozycji 3 (GlcNAc). Ponadto, większość grup disacharydowych w glukozaminie może posiadać między innymi grupy N-siarczanowane (NS), mniej N-acetylowane (GlcNAc) oraz rzadziej 3-O-siarczanowane (GlcNS3S lub GlcNS3S6S). W takiej kombinacji podstawników możliwe jest rozróżnienie 48 różnych disacharydów wchodzących w skład leków heparynowych [9,10]. Złożoność struktury oligosacharydów, która wpływa na zwiększenie biodostępności jest istotną zaletą właściwości biologicznych tej grupy farmaceutyków. Tak duża różnorodność łańcuchów oligosacharydowych, oprócz oczywistych zalet, generuje jednak pewne ograniczenia w analizie chemicznej. Niewątpliwie trudnym wyzwaniem jest potwierdzenie struktury tak złożonej grupy leków przeciwzakrzepowych. Dlatego też zadaniem analityka jest kompleksowe podejście do problemu badawczego tak,

aby możliwe było poznanie budowy leków o właściwościach przeciwzakrzepowych oraz właściwości jakie z tej budowy mogą wynikać (poprzez wyznaczenie zależności retencyjnych).

Heparyna jest pierwszym lekiem przeciwzakrzepowym. Jej odkrycia dokonano w roku 1916 na Uniwersytecie Johnsa Hopkinsa w Baltimore [11]. W języku łacińskim *hepar* (z greckiego – *hēpar*) oznacza „wątrobę”, natomiast przyrostek „in” znaczy „pochodzący z”. Wyodrębniona substancja powodowała hamowanie krzepnięcia krwi podczas badań przy izolowaniu frakcji z tkanek ssaków. Po 15 latach od jej odkrycia zastosowana została w leczeniu i profilaktyce zakrzepicy żyłnej. Przyczyną tak późnego wdrożenia heparyny w leczeniu tych schorzeń były trudności z oczyszczaniem leku oraz ujednoczeniem standardów dotyczących składu leku (kompozycji farmaceutycznej) [12].

Problem wpływu rodzaju oligosacharydów na właściwości i jakość sprzedawanych leków heparynowych pojawił się w pierwszym dziesięcioleciu XXI wieku w Stanach Zjednoczonych [13-15]. W 2008 roku prawie u stu Amerykanów stwierdzono śmierć spowodowaną zanieczyszczeniem występującym w tego rodzaju lekach. Heparyna farmaceutyczna pozyskiwana jest przez wielu producentów w dużych ilościach (tonach) z tkanek świńskich jelit. Część z nich heparynę wieprzową izoluje z błony śluzowej jelit, podczas gdy inni pozyskują ją z całego jelita. Tak więc sam początkowy proces wyodrębniania heparany ma wpływ na zróżnicowanie składu disacharydowego poszczególnych izolatów, które w kolejnych etapach wytwarzania leku przenoszone są do końcowego produktu farmaceutycznego. Trzeba w tym miejscu zaznaczyć, że wpływ na jakość jelita ma również gatunek świni, dieta, czy środowisko, w którym hodowane są zwierzęta. Produkcja heparyny farmaceutycznej jest objęta tajemnicą handlową. Tak duża liczba czynników, mających wpływ na ostateczny skład i cechy leku, wymusiły konieczność prowadzenia określonych badań kontrolnych, co stanowiło bardzo silny impuls do rozwoju istniejących i poszukiwania nowych rozwiązań analitycznych.

## 2. OTRZYMYWANIE LEKÓW HEPARYNOWYCH

Depolimeryzacja, wykorzystując reakcje chemiczne i enzymatyczne stanowi metodę otrzymywania leków wykazujących działanie przeciwzakrzepowe. Jednym ze związków otrzymywanych na drodze metod depolimeryzacyjnych jest heparyna niskocząsteczkowa (LMWH). Powstaje ona na skutek działania m.in. czynników chemicznych lub cięcia enzymatycznego związku macierzystego (wyjściowego), którym jest heparyna niefrakcjonowana (Rysunek nr 2) [16]. Metody depolimeryzacyjne zostały również zastosowane w celu otrzymania heparyny ultraniskocząsteczkowej. Bemiparyna stanowiąca pochodną heparyny nie frakcjonowa-

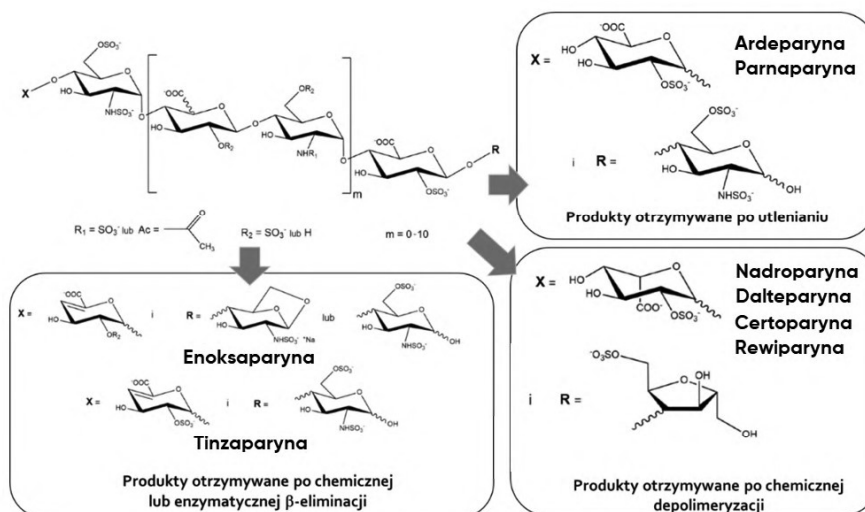


nej, powstała na skutek zastosowania depolimeryzacji alkalicznej związku macierzystego pobranego z śluzówki jelit trzody chlewnej. Ponadto heparyna niefrakcjonowana została wykorzystana do uzyskania ultra-niskocząsteczkowej heparyny, będącej obecnie na etapie badań klinicznych. Substancja ta otrzymywana jest z wykorzystaniem depolimeryzacji chemicznej w środowisku niewodnym [17].

Heparyna niskocząsteczkowa była pierwotnie otrzymywana poprzez fizyczne rozdzielanie za pomocą ultrafiltracji w bioreaktorze membranowym z wykorzystaniem białka wiążącego – maltozy, które jednak nie pozwalało na zastosowanie powyższej metody w wytwarzaniu LMWH na skalę produkcyjną, ze względu na jej niską wydajność. Depolimeryzacja heparyny z wykorzystaniem kontrolowanego, chemicznego bądź enzymatycznego procesu stanowi dogodniejszą metodę otrzymywania LMWH na dużą skalę. Wpływ wybranej metody na wielkość cząsteczek otrzymanej heparyny niskocząsteczkowej zaprezentowano w tabeli 1. Powszechnie stosowana depolimeryzacja chemiczna heparyny niefrakcjonowanej, pomimo swojego szerokiego zastosowania posiada również liczne ograniczenia, wśród których wyróżnić możemy m.in. niską selektywność, obecność produktów ubocznych wpływających na zanieczyszczenie środowiska naturalnego oraz utrudnioną kontrolę procesu [18].

Depolimeryzacja enzymatyczna z uwagi na swoje właściwości m.in. wysoką selektywność, brak szkodliwych produktów ubocznych oraz łagodne warunki prowadzenia procesu, stała się obiektem badań ze względu na jej możliwości w celu otrzymywania leków przeciwzakrzepowych, w tym heparyny niskocząsteczkowej [16].

W ostatnich latach pojawiło się kilka nowatorskich metod depolimeryzacji heparyny, wśród których wyróżnić możemy fizykochemiczną oraz fotochemiczną depolimeryzację. Powyższe metody posiadają jednak pewne wady, które znacząco wpływają na ich ograniczenie m.in. niska selektywność oraz usuwanie podczas depolimeryzacji grup siarczanowych, determinujących aktywność biologiczną heparyny (m.in. aktywność przeciwzakrzepową) [19, 20].



Rysunek 2. Metody depolimeryzacji heparyny niefrakcjonowanej wykorzystywane do otrzymania LMWH [8]

Figure 2. Methods of depolymerization of heparin used for the preparation of LMWHs [8]

Tabela 1. Średnia masa cząsteczkowa wybranych niskocząsteczkowych heparyn w zależności od zastosowanej metody depolimeryzacji

Table 1. Average molecular weight of selected low molecular weight heparins depending on the depolymerization method used

LMWH	Nazwa handlowa	Średnia masa cząsteczkowa [Da] (zakres mas)	Metoda depolimeryzacji
Ardeparin sodium	Normiflo	5500-6500	Depolimeryzacja oksydacyjna $\text{H}_2\text{O}_2$
Certoparin sodium	Sandoparin	3800	Deaminacja azotynem izoamylu
Dalteparin sodium	Fragmin	6000 (5600-6400)	Deaminacja kwasem azotowym(III)
Enoxaparin sodium	Lovenox, Clexane, Neoparin	4500 (3800-5000)	$\beta$ -eliminacja estru benzyłowego heparyny w środowisku zasadowym
Nadroparin sodium	Fraxiparin	4300 (3600-5000)	Deaminacja kwasem azotowym(III)

Parnaparin sodium	Fluxum	5000 (4000-6000)	Depolimeryzacja oksydacyjna
Reviparin sodium	Clivarin	3900 (3000-4500)	Deaminacja kwasem azotowym(III)
Tinzaparin sodium	Innohep, Logiparin	6500 (5500-7500)	Enzymatyczna $\beta$ -eliminacja
Fondaparinux sodium	Arixtra	1726,77	Synteza enzymatyczna (wieloetapowa)
Bemiparin sodium	Tibor, Badyket, Hepadren	3600-3800	Depolimeryzacja w środowisku alkalicznym z czwartorzędową solą amoniową
Semuloparin sodium	-	2400 (2000-3000)	Depolimeryzacja promowana defosfazenem

### 3. TECHNIKI ROZDZIELANIA A NOWE KIERUNKI BADAŃ I WYZWANIA W ANALIZIE LEKÓW PRZECIWKAZKREPOWYCH

Do najczęściej wykorzystywanych metod przygotowania złożonej struktury badanych leków należy oczyszczanie, frakcjonowanie oraz modyfikacje poprzez reakcje enzymatyczne z użyciem heparynaz w celu uzyskania korzystniejszych właściwości w kontekście efektywnego przeprowadzenia analizy chromatograficznej. W literaturze wykorzystywane są takie techniki separacyjne, takie jak: chromatografia jonowymienna (IEC) [21], chromatografia par jonowych (IPC) [22], rzadziej chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [23, 24], dwuwymiarowa chromatografia cieczowa (2D-LC) [25], czy elektroforeza kapilarna (CE) [26-31].

Dotychczasowe osiągnięcia grup badawczych prezentują dwa różne podejścia badań: tzw. „odgórne” (*ang. top-down*) i „oddolne” (*ang. bottom-up*) [32-34]. Celem obu podejść jest analiza strukturalna i kontrola jakości LMWHs wytwarzanych różnymi metodami. Podejście „odgórne” koncentruje się na analizie nienaruszonych składników LMWHs bez wcześniejszego przygotowania próbki. Natomiast strategia „oddolna” wymaga przygotowania próbki między innymi w wyniku procesu depolimeryzacji.

W przypadku podejścia „odgórne” leki heparynowe badane są przy użyciu przede wszystkim spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [35-37], chromatografii wykluczania (SEC) [38, 39], elektroforezy kapilarnej (CE) [40]

oraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE) [41]. Wykorzystanie spektroskopii NMR daje możliwość identyfikacji zanieczyszczeń oraz wykazania różnic pomiędzy wątpliwymi partiami leku, a próbką referencyjną. Pomimo powyższych zalet, ta technika posiada ograniczenia dotyczące możliwości wykrywania związków przy niskich poziomach stężeń oraz miligramowych ilościach czystej próbki. W przypadku SEC możemy wyznaczyć masę cząsteczkową danej LMWHs, określić stopień dyspersyjności oraz wyznaczyć mapę oligosacharydową w badanych próbkach. Pozytywnym aspektem SEC jest również możliwość stosowania tej techniki do przygotowania próbki na etapie frakcjonowania, tak by poszczególne frakcje mogły być poddane kolejnym etapom analizy z wykorzystaniem innych technik lub procedur. Technika PAGE jest natomiast prosta i szybka, co sprawia, że można ją z powodzeniem zastosować do przesiewowej kontroli podczas produkcji lub monitorowania zanieczyszczeń poprzez analizę składu jakościowego frakcji oligosacharydowych badanych leków heparynowych. Mimo wielu zalet, wspomniane techniki nie dają możliwości poznania w pełni heterogenicznej budowy LMWHs.

Chcąc poznać strukturę tak złożonej próbki leku przeciwzakrzepowego należy odpowiednio ją przygotować. Do tego celu stosuje się strategię „oddolną” analizy LMWHs. Próbki leków poddaje się procesowi rozkładu (depolimeryzacji enzymatycznej) przy użyciu Heparynaz (I, II, III) [42,43], przy czym Farmakopea Amerykańska rekomenduje całkowite trawienie próbki z użyciem tych trzech enzymów [44]. Do analizy produktów poddanych cięciu enzymatycznemu powszechnie stosowane są łączone techniki separacyjne [45-49]. Ze względu na obecność grup siarczanowych w cząsteczce leku heparynowego, a więc na anionowy charakter cząsteczki, najczęściej stosowane są techniki separacyjne, zwłaszcza chromatografia jonowymienna (IEC) [50].

IEC to technika, która pozwala na precyzyjną i stosunkowo prostą analizę produktów po całkowitej depolimeryzacji enzymatycznej. Po odpowiednim doborze fazy stacjonarnej i ruchomej uzyskuje się układ do jakościowej i ilościowej analizy podczas rutynowych badań. Dokonując zmian pH, składu buforu, siły elucyjnej, czy też temperatury kolumny możliwe jest selektywne rozdzielenie najmniejszych fragmentów oligosacharydowych tj. disacharydów oraz tetrasacharydów.

Chromatografia jonowymienna ma pewne wady, m. in. problematyczne wykrywanie nienasyconych disacharydów i oligosacharydów w zakresie pomiaru absorpcji promieniowania ultrafioletowego (UV). Niezbędne staje się zatem poszukiwanie nowych rozwiązań w celu zminimalizowania lub wyeliminowania tych wad. Niemniej jednak IEC jest ciągle stosowana do tego typu analiz. Do tej pory większość badań naukowych była skupiona wokół najczęściej stosowanego leku o nazwie handlowej Clexane, gdzie substancją czynną jest enoksaparyna.

W literaturze nie ma wielu publikacji mówiących o analizie innych LMWHs, takich jak np. nadroparyna (nazwa handlowa Fraxiparin), czy dalteparyna (nazwa handlowa Fragmin) (Tab. 1). Wynika to z faktu, że enoksaparyna jest najpowszechniej występującym i stosowanym antykoagulantem obecnym na rynku.

W naszych badaniach [51] podjęliśmy próbę potwierdzenia, że testowane leki heparynowe pochodzą z tego samego źródła, co referencyjna enoksaparyna. Do tego celu posłużono się wyznaczeniem sumy zawartości di- oraz tetrasacharydów zawierających grupę 1,6-anhydro na redukującym końcu dla trzech grup leków heparynowych. Podejście to dostarczyło informacji o różnicach w składzie produktów rozkładu enzymatycznego badanych, nowych potencjalnych antykoagulantów. Zawartość di- oraz tetrasacharydów posiadających grupę 1,6-anhydro mieściła się w zakresie od 18,5 do 22,3%.

Enoksaparyna jest otrzymywana podczas enzymatycznej reakcji  $\beta$ -eliminacji estru benzyłowego heparyny w środowisku alkalicznym, natomiast nadroparyna oraz dalteparyna otrzymywane są za pomocą reakcji chemicznej deaminacji [8]. Opracowana przez nas metoda chromatograficzna daje możliwość rozróżnienia sposobów otrzymywania niskocząsteczkowych heparyn. Wynika to z obecności specyficznych fragmentów cząsteczki obecnych w danej grupie leków. W przypadku enoksaparyny są to grupy 1,6-anhydro, zaś w dalteparynie oraz nadroparynie jest to 2,5-anhydro-D-mannitol. Połączenie IEC z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiło rozdzielenie i identyfikację produktów cięcia enzymatycznego dla komercyjnie dostępnych leków. W wyniku cięcia enzymatycznego komercyjnie dostępnych leków najczęściej otrzymuje się disacharydy. Dzięki temu rozszerzono zastosowanie metodyki o analizę kolejnej grupy LMWHs – produktów chemicznej deaminacji. Dodatkową zaletą niniejszej metodyki jest również możliwość porównywania leków testowych różnych serii z wynikami otrzymanymi dla próbek referencyjnych. Otrzymany rozkład procentowy poszczególnych składników stanowi swoistą „mapę cukrową” danego leku. Dzięki tej mapie możliwe jest śledzenie procesu produkcyjnego każdego rodzaju LMWHs.

Stosowanym w IEC wypełnieniem jest silny anionowymieniacz (SAX). Należy tu jednak zaznaczyć, że kolumny komercyjnie dostępne zawierające silny anionowymieniacz szybko tracą sprawność (w czasie ok. 2 tygodni), co przy wysokiej ich cenie (ok. 3 tys. zł) może stanowić problem natury ekonomicznej. Podstawą przedstawionego kierunku badań było podjęcie próby rozwiązania pojawiających się problemów analitycznych, które mają umożliwić uzyskanie lepszych rezultatów poprzez wykorzystanie nowych faz stacjonarnych w stosunku do tych obecnie stosowanych.

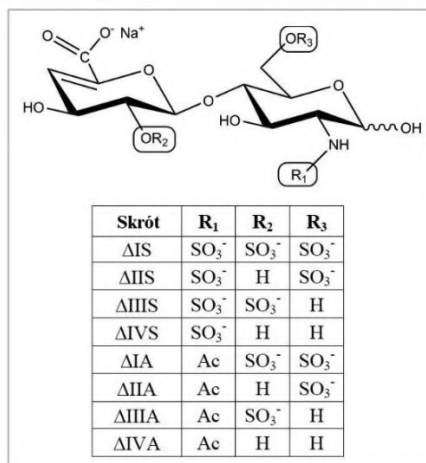
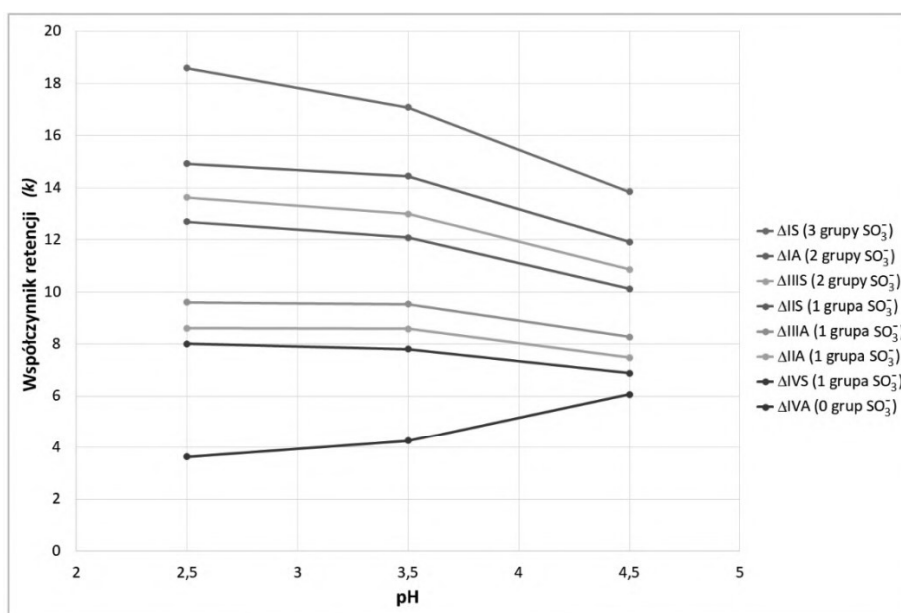
Od wielu lat prowadzone są badania nad wykorzystaniem nowego typu wypełnień kolumn chromatograficznych. W przypadku najpopularniejszego nośnika, jakim jest żel krzemionkowy, do chromatograficznego rozdzielania związków biologicznie aktywnych stosowane były fazy takie jak aminopropylowe, cholesterolowe, fenyłowe, pentafluorofenyłowe, czy też fazy stacjonarne o strukturze dendrymerycznej z kationowymi centrami aktywnymi. Biorąc pod uwagę anionowy charakter leków heparynowych, szczególne te ostatnie wypełnienia zasługują na uwagę. Dane literaturowe pokazują, że tego typu kolumny nigdy wcześniej nie były stosowane do analizy LMWHs, dlatego też podjęliśmy się badań [52] w tym kierunku.

Zbadaliśmy między innymi wpływ pH fazy ruchomej (2,5, 3,0 i 3,5) i temperatury (25, 35 i 45°C) na sprawność rozdzielania produktów enzymatycznej depolimeryzacji. Optymalne warunki analizy dla ośmiu disacharydów uzyskano przy użyciu fazy ruchomej o pH 3,5 i temperaturze 25°C. Kolumny te mogą z powodzeniem być zastosowane do oznaczenia opisanych substancji w lekach heparynowych dostępnych handlowo. Obserwując zmianę wartości współczynników retencji w zależności od pH fazy ruchomej (Rys. 3) możemy zauważyć, że w przypadku związku ΔIVA retencja rośnie wraz ze wzrostem pH. Dla pozostałych siedmiu związków obserwuje się wzrost retencji wraz ze spadkiem pH. Świadczy to o wysokiej selektywności kolumn dendrymerycznych w odniesieniu do tego rodzaju substancji. Co więcej, zmniejszenie retencji obserwowano przy wyższych wartościach pH i wraz ze zmniejszeniem liczby grup siarczanowych w cząsteczce disacharydu.

Kolumny z wypełnieniem dendrymerycznym z powodzeniem mogą być zastosowane do analizy produktów po depolimeryzacji enzymatycznej LMWHs. Fazy te charakteryzują się wysoką selektywnością, krótkim czasem analizy (25 min) oraz wysoką sprawnością, która nie ulega redukcji przez długi okres „życia” (5-6 miesięcy). W konsekwencji przekłada się to na mniejsze zużycie fazy ruchomej, większą liczbę wykonanych analiz oraz niższe wartości granicy wykrywalności (od 0,14 do 0,48 mM). Kolumny dendrymeryczne stanowią więc wartościową alternatywę w stosunku do zalecanych kolumn dostępnych na rynku.

Brak możliwości zastosowania spektrometrii mas, spowodowany wysokim stopniem zasolenia próbki, jest jednym z ważniejszych argumentów, dla których wybiera się alternatywne techniki, a przykładem może być IPC. Wykorzystanie układu ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej umożliwia zastosowanie kolumn o mniejszej średnicy wewnętrznej i wielkości ziaren sorbentu zastosowanego jako fazy stacjonarnej, co zapewnia krótsze czasy analiz oraz wyższą rozdzielczość. Co więcej, etap przygotowania próbki jest jednym z najważniejszych kroków w całym procesie analitycznym. Jest to „wąskie gardło”

całej procedury ze względu na dużą czasochłonność, wysokie koszty, czy też potencjalnie największy stopień prawdopodobieństwa pojawienia się błędów w trakcie kolejnych etapów obróbki próbki. Dlatego też bardzo ważne jest właściwe zaplanowanie tego etapu, gdyż determinuje on rodzaj uzyskanej informacji analitycznej.



Rysunek 3. Wpływ pH na retencję w zależności od liczby grup siarczanowych  
Figure 3. Effect of pH on retention depending on the number of sulfate groups

W przypadku analizy LMWHs wykorzystuje się głównie depolimeryzację enzymatyczną. Jest ona bardzo popularną, prostą, dobrze poznaną i chętnie wykorzystywaną metodą przygotowania próbek heparyn do analizy. Do wad można zaliczyć: długi czas prowadzenia procesu depolimeryzacji, bardzo wysokie koszty enzymów oraz konieczność oczyszczania próbki z pozostałości enzymów poprzez dializę czy wirowanie z zastosowaniem sączków membranowych. Z tego względu w przeprowadzonych badaniach [53] wykorzystaliśmy metodykę cięcia chemicznego jako tańszej, prostszej i szybszej alternatywy w stosunku do depolimeryzacji enzymatycznej.

### UWAGI KOŃCOWE

Prace prowadzone nad otrzymywaniem nowych leków i substancji aktywnych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym i medycynie wymagają poszukiwania nowych lub rozwijania obecnie stosowanych technik analitycznych. Niewątpliwie dominującą rolę odgrywają techniki chromatograficzne połączone z różnymi sposobami detekcji. Przeprowadzona dyskusja w ramach niniejszej pracy potwierdza, że łączone techniki chromatograficzne są kluczowym narzędziem w jakościowej analizie LMWHs oraz w ilościowym określaniu składowych danego leku. Jest to istotne ze względu na konieczność kontroli samego procesu produkcji leków przeciwzakrzepowych (w tym czystości produktu, obecności zanieczyszczeń), jak również w opracowywaniu rozwoju technologii nowych biopodobnych leków heparynowych.

### PODZIĘKOWANIA

Część badań współfinansowana była w ramach projektu „*Krok w przyszłość - stypendia dla doktorantów – V edycja*” realizowanego przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego i współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Grantów badawczych dla młodych naukowców finansowanych z dotacji budżetowej Wydziału Chemii UMK w Toruniu.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Zejc, M. Gorczyca, *Chemia leków*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, 430.
- [2] B. Boneu, *Thrombosis Research* 2000, **100** (2), 113.
- [3] E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe, *Thromb. Haemost.*, 2008, **99**(5), 807.
- [4] E.J. Lewis, X. Xu, *Diabet. Care*, 2008, **31**(Supplement 2), S202.
- [5] M. Sain, V. Kovacic, J. Radic, D. Ljutic, I. Jelcic, *Drugs & Aging*, 2012, **29**(1), 1.



- [6] C. M. Kessler, *Sem. Hematol.*, 2004, **41**, 44.
- [7] R.J. Linhardt, J. Liu, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, **12** (2), 217.
- [8] R. Sadowski, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Curr. Medic. Chem.*, 2019, **26** (1) 166,
- [9] D.L. Rabenstein, *Nat. Prod. Rep.*, 2002, **19** (3), 312.
- [10] Z. Xiao, B.R. Tappen, M. Ly, W. Zhao, L.P. Canova, H. Guan, R.J. Linhardt, *J. Med. Chem.*, 2011, **54** (2), 603.
- [11] J. McLean, *Am. J. Physiol.*, 1916, **41** (2), 250.
- [12] A.K. Kakka, *Best Prac. Res. Cl. Ha.*, 2004, **17**(1), 77.
- [13] H. Liu, Z. Zhang, R.J. Linhardt, *Nat. Product Rep.*, 2008, **26**(3), 313.
- [14] M. Guerrinin M. i in., *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**(6), 669.
- [15] Z. Zhang, M. Weïwer, B. Li, M.M. Kemp, T.H. Daman, R.J. Linhardt, *J. Medic. Chem.*, 2008, **51**(18), 5498.
- [16] R.J. Linhardt, N.S. Gunay, *Sem. Thromb. Hemost.*, 1999, **25**, 5.
- [17] J.M. Walenga, G.H. Lyman, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2013, **88**, 1.
- [18] W. Jingjun, Z. Chong, M. Xiang, L. Ye, X. Xin-Hui, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **101**, 484.
- [19] O. Achour, N. Bridiaïu, A. Godhbani, F. Le Joubioux, J.S. Bordenave, F. Sannier, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **97**, 684.
- [20] K. Higashi, S. Hosoyama, A. Ohno, S. Masuko, B. Yang, E. Sterner, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **67**, 1737.
- [21] L. Yi, L. Yi, Q. Zhang, Y. Meng, J. Hao, B. Xie, H. Gan, D. Li, K. Dong, Z. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 2018, **1569**, 160.
- [22] K. Albert, J.F. Korir, K. Limtiaco, S.M. Gutierrez, C.K. Larive, *Anal. Chem.*, 2008, **80**(4), 1297.
- [23] Y. Ouyang, Ch. Wu, X. Sun, J. Liu, R.J. Linhardt, Z. Zhang, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 2016, **30**(2), 277.
- [24] X. Sun, Z. Guo, M. Yu, C. Lin, A. Sheng, Z. Wang, R.J. Linhardt, L. Chi, *J. Chromatogr. A*, 2017, **1479**, 121.
- [25] Y. Ouyang, Y. Zeng, Y. Rong, Y. Song, L. Shi, B. Chen, X. Yang, N. Xu, R.J. Linhardt, Z. Zhang, *Anal. Chem.*, 2015, **87**(17), 8957.
- [26] S.L. Eldridge, L.A. Higgins, B.J. Dickey, C.K. Larive, *Anal. Chem.*, 2009, **81**(17), 7406.
- [27] Y. Chang, C. Cai, L. Li, J. Miao, E. Ucakturk, G. Li, M. Ly, R.J. Linhardt, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 9356.
- [28] A.D. Zamfir, *Electrophoresis*, 2016, **37**, 973.
- [29] L. Lin, X. Liu, F. Zhang, L. Chi, I.J. Amster, F.E. Leach, Q. Xia, R.J. Linhardt, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**(2), 411.
- [30] V. Ruiz-Calero, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 2001, **914**, 277.
- [31] A. Zamfir, D.G. Seidler, E. Schönherr, H. Kresse, J. Peter-Katalinic, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 2010.
- [32] L. Li, F. Zhang, J. Zaia, R.J. Linhardt, *Anal. Chem.*, 2012, **84**(20), 8822.
- [33] G. Li, J. Steppich, Z. Wang, Y. Sun, Ch. Xue, R.J. Linhardt, L. Li, *Anal. Chem.*, 2014, **86**(13), 6626.
- [34] X. Liu, K. Ange, L. Lin, F. Zhang, L. Chi, R.J. Linhardt, *J. Chromatogr. A*, 2017, **1480**, 32.
- [35] M. Guerrini, T.R. Rudd, L. Mauri, E. Macchi, J. Fareed, E.A. Yates, A. Naggi, G. Torri, *Anal. Chem.*, 2015, **87**(16), 8275.
- [36] D.J. Langeslay, C.N. Beecher, A. Naggi, M. Guerrini, G. Torri, C.K. Larive, *Anal. Chem.*, 2013, **85**(2), 1247.
- [37] G. R. Santos, A.C. Porto P.A. Soares, E. Vilanova, P.A. Mourão, *Glycobiology*, 2017, **27**(7), 625.
- [38] J. Zaia, K. Khatri, J. Klein, C. Shao, Y. Sheng, R. Viner, *Anal. Chem.*, 2016, **88**(21), 10654.

- [39] Q. Zhang, X. Chen, Z. Zhu, X. Zhan, Y. Wu, L. Song, J. Kang, *Anal. Chem.*, 2013, **85**(3), 1819.
- [40] X. Sun, L. Lin, X. Liu, F. Zhang, L. Chi, Q. Xia, R.J. Linhardt, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 1937.
- [41] P. Mourier, P. Anger, C. Martinez, F. Herman, Ch. Viskov, *Anal. Chem. Res.*, 2015, **3**, 46.
- [42] J. Wu, Ch. Zhang, X. Mei, Y. Li, X-H. Xing, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **101**, 484-492.
- [43] U. Aich, Z. Shriver, K. Tharakaraman, R. Raman, R. Sasisekharan, *Anal. Chem.*, 2011, **83**(20), 7815.
- [44] General Chapter <207> "Test for 1,6-anhydro derivative for enoxaparin sodium" in the Second Supplement USP 32–NF 27.
- [45] G. Li, C. Cai, L. Li, L. Fu, Y. Chang, F. Zhang, T. Toida, C. Xue, R.J. Linhardt, *Anal. Chem.*, 2014, **86**(1), 326.
- [46] X. Sun, L. Lin, X. Liu, F. Zhang, L. Chi, Q. Xia, R.J. Linhardt, *Anal. Chem.* 2016, **88**(3), 1937.
- [47] T. Zhang, X. Liu, H. Li, Z. Wang, L. Chi, J.P. Li, T. Tan, *Carbohydr. Polym.*, 2019, **203**, 87.
- [48] F. Galeotti, N. Volpi, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1284**, 141.
- [49] R.L. Miller, S.E. Guimond, M. Prescott, J.E. Turnbull, N. Karlsson, *Anal. Chem.*, 2017, **89**(17), 8942.
- [50] P. Mourier, Ch. Agut, H. Souaifi-Amara, F. Herman, Ch. Viskov, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **115**, 431.
- [51] R. Sadowski, R. Gadzała-Kopciuch, T. Kowalkowski, P. Widomski, L. Jujeczka, B. Buszewski, *J. AOAC INTERNATIONAL*, 2017, **100**(6), 1706.
- [52] R. Sadowski, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Anal. Meth.*, 2020, **12**(7) 977.
- [53] R. Sadowski, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2020, **43**(15), 3036.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 maja 2021 r.