

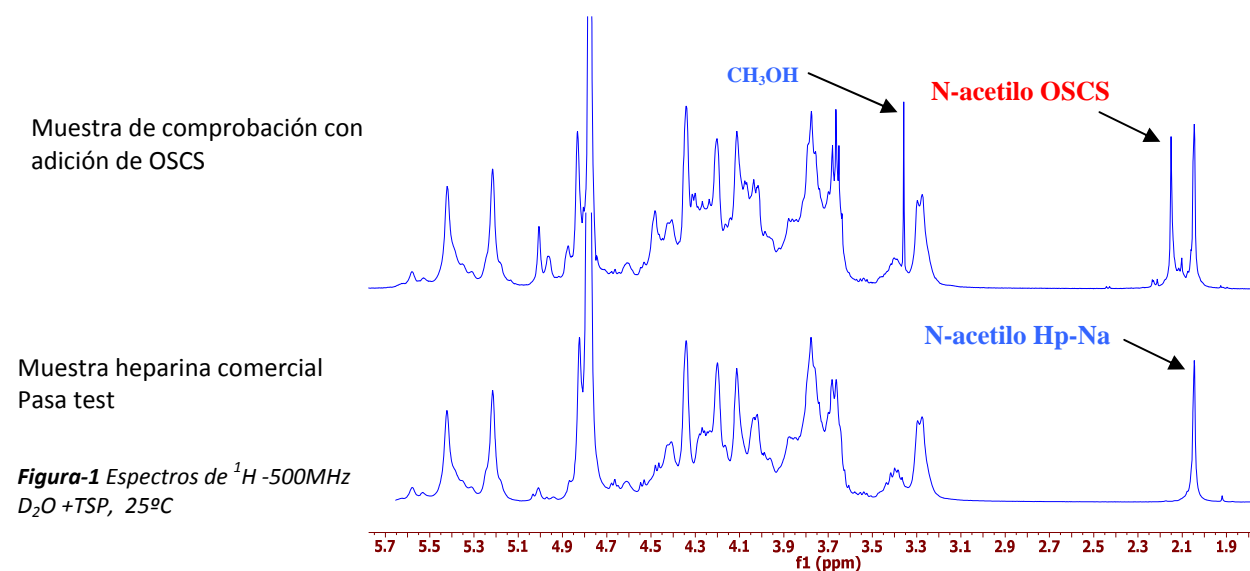
Análisis por RMN: Heparinas

Octubre 2013

Las heparinas son una mezcla compleja de glucosaminoglicanos sulfatados (CAGs) aislados principalmente de la mucosa intestinal de cerdo y se utilizan ampliamente como agente anticoagulante y antitrombótico.

Diferencias en los procesos de extracción y purificación de los crudos pueden producir variaciones en los niveles de impurezas en la heparina. Algunas, como el dermatán sulfato¹ (DS), procedentes del proceso de producción están aceptadas dentro de unos límites. En cambio, otras como el sulfato de condroitín persulfatado (OSCS), ajeno al proceso de producción, no se admiten.

En 2008 se detectó un incremento de las reacciones alérgicas relacionadas con el uso de heparina y la FDA determinó que se debían a la presencia de OSCS². Organismos internacionales como la Farmacopea Europea (EP) y la USP han incluido en sus monografías el uso de espectros de protón adquiridos en equipos Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de 500 MHz para evaluar la presencia de impurezas en las muestras de heparinas. En el espectro de ¹H-RMN en la zona próxima a 2 ppm únicamente debe detectarse la señal del metilo del N-acetilo de la heparina (δ 2.05±0.03 ppm) y no observarse la señal del metilo del N-acetilo del OSCS a 2.16±0.03 ppm.



En la Figura 1 se muestran los espectros de ¹H-RMN de dos muestras de heparinas, en el espectro de la parte inferior no se observa ninguna señal atribuible al OSCS y por tanto la muestra cumpliría los requisitos. Por el contrario, en el espectro superior se observa una señal coincidente con la señal del metilo del N-acetilo del OSCS y esta muestra no sería apta para su comercialización.

Mediante los equipos de RMN de 500 MHz Agilent y Bruker disponibles en la Unidad de RMN es posible la detección de la presencia del OSCS. Llegándose a detectar intensidades comparables a los satélites de ¹³C de la señal del N-acetilo de la heparina (figura-2). La sensibilidad y resolución que se obtiene en los

¹ Peter Bigler et al. "Improved impurity fingerprinting of heparin by high resolution 1H NMR Spectroscopy", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **49**, 1060–1064 (2009).

² Marco Guerrini et al, "Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events", Nature Biotechnology **26**, 669-675 (2008).

David A. Keire et al, "Assay of possible economically motivated additives or native impurities levels in heparin by 1H NMR, SAX-HPLC, and anticoagulation time approaches", Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis, **52**, 656-664, (2010)

equipos de 500 MHz, permite cumplir sin dificultades los requerimientos de los últimos protocolos de análisis.

En las monografías vigentes^{3,4} se incluyen requerimientos sobre las relaciones de intensidades de determinadas señales y el perfil del espectro. En las zonas comprendidas entre 0.10-2.00 ppm, 2.10-3.10 ppm y 5.70-8.00 ppm, la intensidad de las señales no identificadas debe ser menor del 4% de la intensidad de la señal a 5.42 ppm. La zona entre 3.35-4.55 ppm debe presentar un perfil similar al del espectro de referencia. Las señales correspondientes a disolventes u otros productos relacionados con el proceso, deben ser identificadas para poder ser aceptados.

Los informes realizados por la Unidad de RMN proporcionan una completa información, no sólo con los gráficos de los espectros y las correspondientes ampliaciones, sino también con tablas resumen de las intensidades de las señales clave (Figura3). También se indica si las distintas señales cumplen o no las condiciones exigidas en las metódicas de la USP o EP.

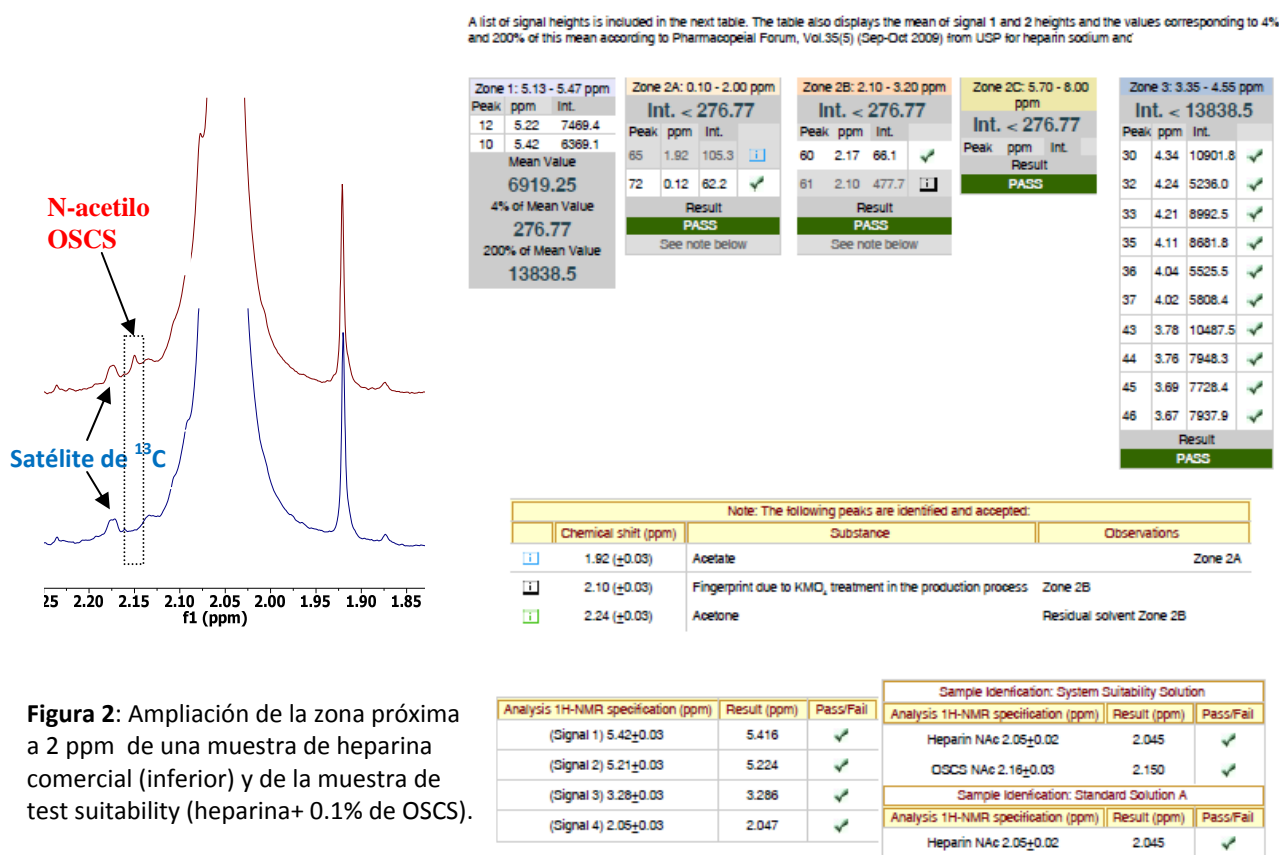


Figura 2: Ampliación de la zona próxima a 2 ppm de una muestra de heparina comercial (inferior) y de la muestra de test suitability (heparina+ 0.1% de OSCS).

Figura 3

Los equipos de la Unidad de RMN utilizados en estos análisis trabajan de acuerdo con la normativa ISO-9001:2008 y están sometidos a un exhaustivo procedimiento de calibraciones y comprobación de funcionamiento. Es posible realizar los análisis siguiendo protocolos que cumplan las normas GMP.

³ European Pharmacopoeia 7.0 Heparin Sodium 08/2010/0333 ,

⁴ USP Heparin Sodium , Pharmacopoeial Forum Vol 35(5) Sep-Oct-2009