

¿Cómo prevenir la trombosis frente al riesgo hemorrágico? Caracterización de Heparinas de Baja Masa Molecular por Cromatografía de Exclusión por Tamaño

Feltrinelli, M.; López, E.E.
INTI-Química
eelopez@inti.gob.ar

Introducción

Durante años, la heparina no fraccionada o simplemente heparina (HNF) se ha utilizado para el tratamiento de la trombosis. Las HNF tienen un efecto anticoagulante y propiedades farmacológicas variables según el tamaño de las moléculas. La HNF es un glicosaminoglicano que se obtiene de mucosa intestinal de cerdo o de pulmón bovino y tiene una masa molecular heterogénea (media de 15.000 daltons). La heparina ejerce su efecto anticoagulante uniéndose a la antitrombina III (ATIII) para inactivar a los factores IIa (trombina) y Xa y tiene un cociente de actividad anti-factor Xa / anti-factor IIa de 1:1. Su unión a las proteínas plasmáticas, plaquetas, macrófagos y células endoteliales, limita su biodisponibilidad y explica la alta variabilidad de la respuesta anticoagulante. Como alternativa superadora se desarrollaron las heparinas de baja masa molecular (HBPM), que constituyen un grupo heterogéneo de sustancias derivadas de la heparina clásica por despolimerización de sus cadenas mediante distintos métodos químicos o enzimáticos (Tabla 1). Se obtienen así fragmentos con una masa molecular media de 5000 Daltons (Da).

HBPM	Mw (*) (Da)	anti-Xa/ anti-IIa	Depolimeri- zación
Enoxaparina	4500	3.3 – 5.3	β- eliminación alcalina
Dalteparina	6000	1.9 – 3.2	Óxido nitroso
Nadroparina	4300	2.5 – 4.0	Óxido nitroso
Tinzaparina	6500	1.5 - 2.5	heparinasa
HNF	15000	1	-

(*) Masa molecular relativa promedio en masa.

Tabla 1: Características de las principales HBPM

Las HBPM poseen una mayor capacidad de inhibición de la función anti-Xa que de la anti-IIa, con un cociente de actividad antiXa/anti-IIa >1 (aproximadamente entre 5:1 y 2:1, según su masa molecular).

Hay que destacar que las HBPM son fármacos distintos y no intercambiables y que, cada HBPM tiene una distribución de masas moleculares específica que determina su actividad anticoagulante, su riesgo hemorrágico

y la duración de la acción, presentando una serie de ventajas respecto a la HNF. En el mercado local se realiza la elaboración de HBPM tanto para exportación como la comercialización del medicamento en mercado interno. Existen algunos establecimientos que carecen del instrumental analítico para el control de calidad del producto, y requieren los servicios del INTI.

Objetivo

Caracterizar muestras de enoxaparina mediante la determinación de la distribución de masas moleculares (MM) haciendo uso de la Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) según lo establecido por la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) para verificar el cumplimiento de dichos requisitos.

Descripción

El instrumental utilizado consistió en un sistema para cromatografía líquida marca Waters Alliance 2695 provisto con un detector de arreglo de diodos Waters PDA 996 (UV) en serie con un detector de índice de refracción Waters RID 2410 (IR) y una columna cromatográfica de 300 x 80 mm rellena con sílica porosa (5 µm) marca Bischoff ProntoSIL 60-5-Si 5.0 µm.

Como referencia se empleó el estándar de referencia de la Ph. Eur. "Heparin Low-Molecular-Mass for calibration CRS" (LMM CRS lot N° 1C y 1E, Mn 3700). El origen de las muestras analizadas provenía del proceso de obtención de la HBPM y de muestras comerciales. Se siguieron los lineamientos de la Ph. Eur. correspondientes a la monografía para Heparins, Low-Molecular-Mass, identification C.

Para el cálculo se determina la relación entre las áreas de los picos obtenidos con el detector IR y las áreas obtenidas con el detector UV para el estándar de referencia de Mn 3700. Se grafican los tiempos de retención para cada pico del cromatograma IR con su correspondiente masa molecular (Mi) y se ajusta con una función polinomial preferentemente de 3^{er} grado. De la interpolación se obtienen los valores de Mw característicos de la muestra.

Resultados

Se debe cumplir además de lo establecido para HBPM lo indicado para cada producto en particular (ver Tabla 2).

Caracterización de HBPM	
Masa molecular relativa promedio en masa (Mw)	≤ 8000 Da
Al menos 60 % de la masa total	< 8000 Da
Caracterización de Enoxaparina	
Masa molecular relativa promedio en masa (Mw)	3800 – 5000 Da
% Masa < 2000 Da	12.0 - 20.0
2000 Da < % Masa < 8000 Da	68.0 - 82.0

Tabla 2: especificaciones según Ph. Eur.

En base al análisis de las áreas obtenidas con el LMM CRS y las distintas muestras se puede analizar el cumplimiento o no de las especificaciones de la monografía. En las Figuras 1 y 2 se observan los perfiles cromatográficos típicos del testigo.

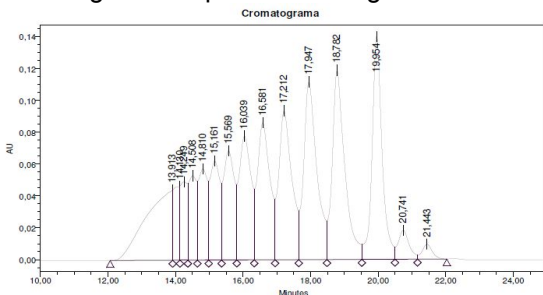


Figura 1: Cromatograma UV del LMM CRS

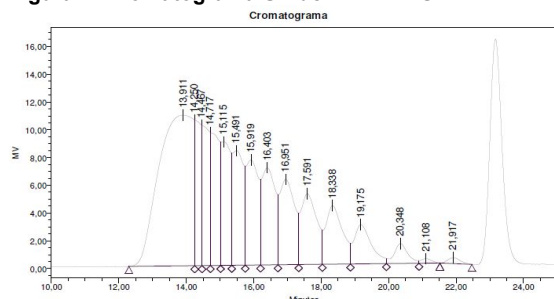


Figura 2: Cromatograma IR del LMM CRS

Un ejemplo de una Enoxaparina se muestra en la Fig. 3 y su Tabla 3

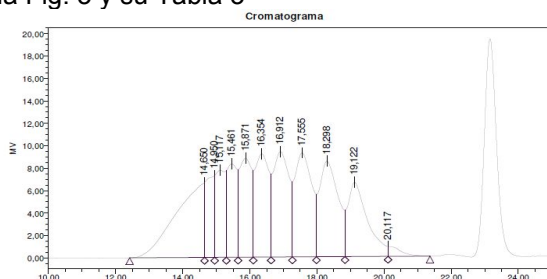


Figura 3: Cromatograma IR de una muestra de enoxaparina comercial

En la Fig. 4 y su Tabla 4 se muestra un lote de producción que no alcanzó la especificación para Enoxaparina.

Mw (Da)	% Masa < 8000 Da	% Masa < 2000 Da	2000 Da < % Masa < 8000 Da
4825	87.2	16.8	70.5

Tabla 3: valores calculados según Ph. Eur.

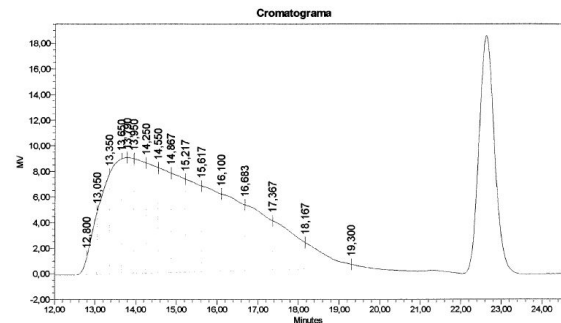


Figura 4: Cromatograma IR de un lote de producción fuera de especificación

Mw (Da)	% Masa < 8000 Da	% Masa < 2000 Da	2000 Da < % Masa < 8000 Da
6290	68.2	9.8	58.4

Tabla 4: valores calculados según Ph. Eur.

La polinomial de ajuste de 3^{er} grado recomendada en Ph Eur presentó un coeficiente de correlación (R) superior a 0.998.

Conclusiones

A partir de la implementación del estudio de la distribución de masas moleculares en estos glicosaminoglicanos se puede establecer si una muestra cumple o no las especificaciones correspondientes a la Ph. Eur. Esto permite a los laboratorios farmacéuticos y empresas farmoquímicas elaboradoras de estos mucopolisacáridos asegurar la calidad de su producción, tanto para la comercialización en el país como para el comercio exterior. Esta determinación se debe complementar con los demás requerimientos analíticos descritos en la monografía y en una segunda etapa se espera evaluar la repetibilidad del método y reproducibilidad interna del laboratorio.

Bibliografía

Baños Llanos (2001). Nuevas perspectivas en el tratamiento antitrombótico *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25, 93-104.

Bullorsky, E.O., Ceresetto, J., Dubosq, C., Palmer, S., Rabinovich, O., Shanley, C., Stemmelin, G. (2013). Efecto de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) de primera y segunda generación sobre la prueba de generación de trombina. *Hematología*, 17, 231-237.

Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Ed.), (2008). Heparins, low molecular-mass, *European Pharmacopoeia*, pp. 2151-2152

Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Ed.), (2008). Enoxaparina sodium. *European Pharmacopoeia*, pp. 1920-1921.