

## ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗЧИНІВ ГЕПАРИНУ, ЯКІ ЗБЕРІГАЮТЬ У СКЛЯНИХ ТА ПЛАСТИКОВИХ АМПУЛАХ, МЕТОДОМ ЛАЗЕРНО-ДЕСОРБЦІЙНОЇ МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

**Ключевые слова:** гепарин, масс-спектрометрия MALDI ToF, десорбция

Останні два десятиріччя мас-спектрометричні методи, а особливо порівняно новий метод «м'якої іонізації» MALDI ToF (матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації), широко застосовують для досліджень у галузі протеоміки як індивідуально, так і в комбінації з іншими мас-спектрометричними та хроматографічними методами [1, 2]. Окрім того, за допомогою цього методу було проведено ряд досліджень по вивченню різних видів біологічних взаємодій, таких, наприклад, як білок–білкові, білок–лігандні або взаємодії типу білок–наночастинка [3, 4]. За допомогою методу MALDI ToF та його різновидів, таких як LDI (безматрична лазерна десорбція/іонізація), DIOS (десорбція/іонізація з поверхні поруватого кремнію) та GALDI (графітоактивована лазерна десорбція/іонізація), також було досліджено великий спектр низькомолекулярних біологічних речовин, таких, як жовчні кислоти, амінокислоти і холестерин [5, 6, 7, 8].

Все це продемонструвало можливість застосування методу MALDI ToF для структурного аналізу вуглеводів. Гепарин/гепарансульфат, як глікоз-аміноглікани, являють особливу складність для структурного аналізу, оскільки вони сульфатовані і неоднорідні. У літературі описано різні способи дослідження структури гепарину за допомогою комбінації мас-спектрометричних методів з такими методами, як високоефективна рідинна хроматографія в поєднанні з ферментативним розщепленням для одержання інформації про структуру гепаринових олігосахаридів і їх послідовності [9].

Для мас-спектрометричного дослідження гепарину та його похідних використовують, в основному, метод матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації, причому як матриці застосовують як органічні кислоти (наприклад гідроксикоричні [10]), так й іонні рідини [11]. Однак ці методи застосовують переважно для лабораторних досліджень внаслідок складності пробопідготовки. Для цілей сучасної медицини необхідні аналізи з простою пробопідготовкою, які дадуть змогу оцінити вплив на медичний препарат таких факторів як матеріал упаковки, оскільки в створенні якісних препаратів для парентерального застосування важливе місце займає первинна упаковка і, передусім, матеріал, з якого виготовлено контейнер.

Упродовж багатьох років традиційної упаковкою для парентеральних лікарських засобів були скляні ампули, однак в останні роки поширення у фармацевтичній практиці набула упаковка, виготовлена з полімерних матеріалів. Таким чином, розроблення методик, що дають змогу оцінити вплив на медичні препарати, зокрема гепарин, матеріалу, з якого виготовлено ампулу, є актуальним завданням сучасної фармацевтичної промисловості.

## **Матеріали та методи дослідження**

Як вихідні розчини було використано препарати Гепарин, розчин для ін'єкцій, 5 000 МО/мл по 5 мл в поліетиленових ампулах (виробництва ТОВ «НІКО», м. Макіївка, Україна) та Гепарин, розчин для ін'єкцій, 5 000 МО/мл по 5 мл у скляних ампулах (виробництва РУП «Белмедпрепарати», Республіка Білорусь). Концентрація розчинів за діючою речовиною гепарину натрієвої солі становила близько 25,3 мг/мл.

Вимірювання здійснювали за допомогою приладу «Autoflex II» (Bruker Daltonics, Германия). Мас-спектри одержували в режимі реєстрації позитивних іонів методом безматричної лазерної десорбції/іонізації (LDI) і вир-методом матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI ToF), де як матрицю використовували насичений розчин синапової кислоти в суміші ацетонітрил/вода в об'ємному співвідношенні 1:1. Для виконання експерименту із застосуванням MALDI ToF розчин аналіту змішували з матрицею в об'ємному співвідношенні 1:1 і ретельно перемішували.

Для обох методів пробопідготовку здійснювали таким чином: зразок у кількості 2 мкл наносили на стандартну сталеву підкладку і залишали його на 10 хв до повного висихання розчину, потім вміщували в робочу зону приладу.

Результуючі спектри одержували підсумовуванням ста одинарних мас-спектрів. Оброблення спектрів робили за допомогою програмного забезпечення «FlexAnalysis» (Bruker Daltonics, Германия).

Вимірювання методом MALDI ToF виконували в діапазоні мас 2 000–200 000 Да. Вимірювання методом LDI здійснювали в діапазоні мас до 2 000 Да.

Серія вимірювань тривала 14 діб. Експеримент виконували таким чином: з ампул виливали розчин, ретельно промивали деіонізованою водою і залишали на 3 доби для екстракції/десорбції гепарину з матеріалу первинної упаковки і встановлення рівноваги. Потім вимірювали мас-спектри одержаних розчинів. Аналогічну операцію повторювали кожні три доби упродовж двох тижнів. Також було одержано мас-спектри безпосередньо розчину гепарину, що містився в скляній та пластиковій ампулах і деіонізованої води, налитій в попередньо стерилізовані і запаяні скляну і пластикову ампули.

## **Результати дослідження та обговорення**

До низькомолекулярних гепаринів (НМГ) відносять солі сульфатованих глюкозаміногліканів з середньою молекулярною масою менше, ніж 8 000 Да, не менше 60% загальної маси яких мають молекулярну масу менш ніж 8 000 Да. Під час дослідження розчинів гепарину методом MALDI ToF в мас-спектрах спостерігали одиничні піки з низькою роздільною здатністю в діапазоні мас близько 200 000 Да на межі чутливості приладу. Наявність подібних піків за відсутності піків, відповідних НМГ, можна пояснювати тим, що присутній в розчині гепарин зв'язується з високомолекулярними білками, вміст яких нормується відповідно до монографії Європейської фармакопеї (концентрацією до 0,5%) й іонізується у вигляді комплексу з білком [12].

Оскільки одержані методом MALDI ToF мас-спектри мають низьку роздільну здатність і не дають змогу визначити наявність в мас-спектрі безпосередньо гепарину або його фрагментів, було здійснено дослідження розчинів гепарину в області низьких мас (до 2 000 Да) з використанням методу LDI безматричної лазерної десорбції/іонізації.

Оглядові мас-спектри розчинів гепарину, одержаних під час екстракції зі скляної та пластикової ампул, зареєстровані упродовж 14 діб свідчать, що для розчинів, які містяться в пластиковій ампулі, фрагментація в цілому вище, ніж для розчинів зі скляної.

На підставі аналізу одержаних мас-спектрів можна стверджувати, що для всіх спектрів з плином часу спостерігається загальне збільшення кількості фрагментів, що свідчить про поступову деградацію гепарину за послідовних витягах і, відповідно, зменшення концентрації. Формуються полімерні ланцюги з масою від 3 000 до 40 000 Да. Середня молекулярна маса «комерційних» гепаринів, які застосовують як лікарські препарати, знаходиться в більш вузьких межах – від 12 000 до 16 000 Да.

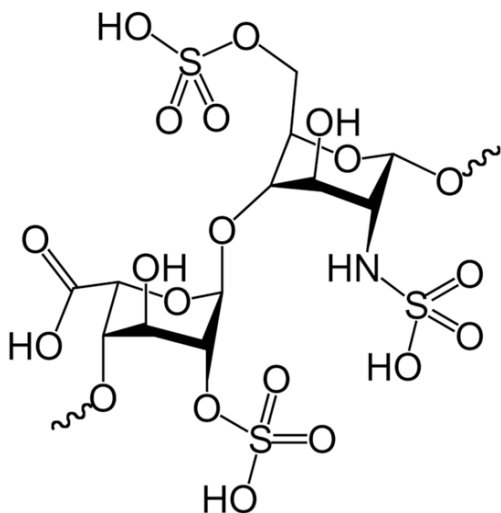


Рис. 1. Структурна одиниця гепарину, молекулярна маса 593 Да

Слід зазначити, що в усіх випадках не спостерігали піки, відповідні структурній одиниці гепарину (593 Да), однак для всіх зразків є характерним фрагмент масою 424 Да, який відповідає структурній одиниці гепарину з відщепленими іміно- та карбоксильною групами (рис. 2).

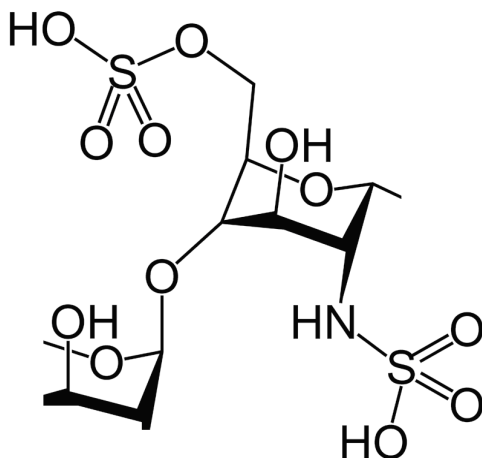


Рис. 2. Фрагмент структурної одиниці гепарину, зареєстрований в мас-спектрах, молекулярна маса 424 Да

Поряд з піком 424 Да в мас-спектрах розчинів завжди присутній пік з молекулярною масою 338 Да. Цей пік спостерігають в мас-спектрах розчинів, які містять і не містять гепарин. Це вказує на його ймовірну приналежність до компонентів технологічного процесу виробництва субстанції і дає змогу використовувати його як репер для оцінки відносного вмісту фрагментів гепарину в досліджуваних розчинах.

У таблиці наведено відношення відносних інтенсивностей вищезазначених піків з масами 424 і 338 Да. Різницю в оціночних величинах відносного вмісту фрагмента структурної одиниці гепарину в зразках зі скляної та пластикової ампул можна пояснити різними властивостями поверхні, з якої гепарин десорбується в розчин (зокрема різною пористістю).

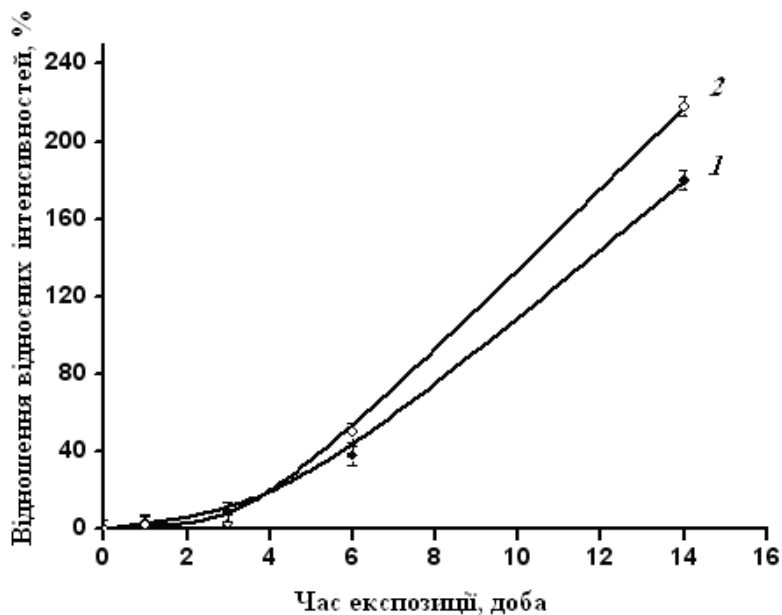
Т а б л и ц я

**Відношення відносних інтенсивностей піків 424 Да та 338 Да залежно від часу експозиції для скляної та пластикової ампул**

Час експозиції	Скло	Пластик
1 доба	3	2
3 доби	9	2,6
6 діб	38	50
14 діб	180	218

П р и м і т к а: величини наведено у % з похибкою  $\pm 5\%$ .

Результати ілюстровано на рис. 3, де наведено відносний вміст структурної одиниці гепарину в мас-спектрах, одержаних для скляної та пластикової ампул залежно від часу експозиції.



**Рис. 3. Графіки залежності відносного вмісту в розчині фрагмента структурної одиниці гепарину від часу експозиції:**

1 – крива десорбції гепарину з пластикової ампули, 2 – крива десорбції гепарину зі скляної ампули

З рис. 3 випливає, що криві мають схожу форму і близький за значеннями відносний вміст гепарину, що може свідчити про те, що процес десорбції розчинів гепарину зі стінок скляних і пластикових ампул носить аналогічний характер.

## В и с н о в к и

1. У разі дослідження комерційних розчинів гепарину методом MALDI ToF визначенню гепарину перешкоджає наявність в розчині домішкового вмісту високомолекулярних білків, тому для дослідження гепарину під час його зберігання в ампулах слід вважати оптимальним використання методу безматричної лазерно-десорбційної мас-спектрометрії.

2. З плином часу у відкритих ампулах відбувається деградація гепарину, про що свідчить збільшення загальної кількості фрагментів структурних одиниць гепарину, причому цей процес є однаково характерним як для скляних, так і для пластикових ампул упродовж усього періоду вимірювань.

3. За даними мас-спектрометричного аналізу (зокрема за характером зареєстрованих мас-спектрів і за кількістю продуктів десорбції) десорбція гепарину з поверхні скляної та пластикової ампул упродовж 14 діб відбувалась аналогічно. Таким чином, можна вважати допустимим використання пластикових ампул як альтернативу скляним.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Gobom J., Nordhoff E.* High-throughput proteomics using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Expert Rev Proteomics.* – 2005. – V. 2, Issue 3. – P. 407–420.

2. *Hanjo L., Eng J., Yates III J. R. et al.* Identification of 2D-gel proteins: A comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to  $\mu$  LC-ESI tandem mass spectrometry // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* – 2003. – V. 14, Issue 9. – P. 957–970.

3. *Декина С. С., Романовская И. И., Громовой Т. Ю.* Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // *Biopolymers and Cell.* – 2011. – V. 27, N 6. – P. 442–445.

4. *Андрусишина И. Н., Голуб И. А., Дидикин Г. Г и др.* Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди // *Біотехнологія.* – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 51–59.

5. *Алексеев С. А., Севериновская О. В., Гурская С. В. и др.* Модифицированный пористый кремний для идентификации компонентов желчи методом DIOS // *Доп. НАН України.* – 2010. – № 6. – С. 164–168.

6. *Севериновская О. В., Варзацкий О. А., Шульга С. В. и др.* Применение ионообразующей добавки для масс-спектрометрического анализа и идентификации биологических объектов // *Химия, физика и технология поверхности.* – 2011. – Т. 2, № 3. – С. 348–351.

7. *Снегир С. В., Севериновская О. В., Власова Н. Н. и др.* Исследование состава ассоциатов таурохолатата натрия методом масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией // *Масс-спектрометрический журн.* – 2007. – № 4 (2). – С. 99–102.

8. *Шмыголь И. В., Севериновская О. В., Васильева Н. С. и др.* Масс-спектрометрическое изучение адсорбции гистамина и аргинина на различных видах поверхности пористого кремния методом лазерной десорбционной ионизации // *Химия, физика и технология поверхности.* – 2007. – № 13. – С. 341–349.

9. *Bultel L., Landoni M., Grand E. et al.* UV-MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis of Heparin Oligosaccharides Obtained by Nitrous Acid Controlled Degradation and High Performance Anion Exchange Chromatography // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 21, Issue 1. – P. 178–190.

10. *Kett W. C., Coombe D. R.* A structural analysis of heparin-like glucosaminoglycans using MALDI-TOF mass spectrometry // *Spectroscopy.* – 2004 – V. 18, Issue 2. – P. 185–201.

11. *Przybylski C., Gonnet F., Bonnaffé D. et al.* HABA-based ionic liquid matrices for UV-MALDI-MS analysis of heparin and heparan sulfate oligosaccharides // *Glycobiology.* – 2010. – V. 20, Issue 2. – P. 224–234.

12. *European Pharmacopeia. 7<sup>th</sup> ed. Monographs HEPARINS, LOW-MOLECULAR-MASS.* – 2011. – 2151 p.

Надійшла до редакції 19. 03. 2014.

*О. В. Севериновская<sup>1</sup>, Н. И. Карандеева<sup>2</sup>, И. Н. Осипова<sup>2</sup>, А. Г. Лисицкий<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup> Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины, г. Киев*

*<sup>2</sup> Фармацевтическая фирма «НИКО», г. Макеевка, Донецкая обл.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРОВ ГЕПАРИНА, СОХРАНЯЕМЫХ В СТЕКЛЯННЫХ И ПЛАСТИКОВЫХ АМПУЛАХ, МЕТОДОМ ЛАЗЕРНО-ДЕСОРБЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**Ключевые слова:** гепарин, масс-спектрометрия MALDI ToF, десорбция

### АННОТАЦИЯ

В настоящем исследовании практическая задача допустимости хранения гепарина в ампулах, изготовленных из разных материалов, была изучена методами матрично-активированной и безматричной десорбционной ионизации в сочетании с времяпролетным анализатором.

Было показано, что в случае исследования промышленных растворов гепарина методом МАЛДИ–ТоФ исследование затруднено присутствием белка-стабилизатора. Таким образом, оптимальным методом для исследования хранения гепарина в ампулах является метод безматричной десорбционной масс-спектрометрии.

Было установлено, что деградация гепарина происходит во время хранения в открытых ампулах, что подтверждается увеличением числа фрагментов структурных единиц гепарина, и этот процесс является характерным как для стеклянных, так и для пластиковых ампул на протяжении всего периода измерений.

Также было показано, что в соответствии с результатами масс-спектрометрического анализа (в частности с видом масс-спектров и количеством продуктов) десорбция с поверхности стеклянной и пластиковой ампул происходила сходным образом на протяжении 14 суток. Таким образом, пластик может быть использован в качестве альтернативы стеклу при изготовлении ампул.

*O. V. Severinovskaya<sup>1</sup>, N. I. Karandeyeva<sup>2</sup>, I. N. Osipova<sup>2</sup>, A. G. Lisitskiy<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

*<sup>2</sup>Pharmaceutical company «НИКО», Makiyivka, Donetsk region*

STUDIES OF HEPARINE SOLUTIONS PRESERVED IN GLASS AND PLASTIC AMPOULES BY THE  
METOD OF LASER DESORPTION MASS SPECTROMETRY

**Key words:** heparin, MALDI ToF mass spectrometry, desorption

ABSTRACT

In this study the practical problem of permissibility of heparin preservation in ampoules made of various materials was investigated by methods of matrix-assisted and matrix-free laser desorption/ionization combined with time-of flight analyzer.

It was shown that in the case of investigation of fabricated solutions of heparin by MALDI ToF method the investigation of heparin is restricted by presence of protein-stabilizer. Thus, the method of choice for investigation of heparin preservation in ampoules is the matrix-free laser desorption mass spectrometry.

It was found out that heparin degradation takes place during the period of preservation in opened ampoules which fact is confirmed by increase of fragments number of structural units of heparin and this process is characteristic both for glass and plastic ampoules during the whole period of measurements.

It has been also shown that, according to results of mass spectrometric analysis (in particular to character of obtained mass spectra and number of desorption products) the evolution of heparin from the surface of glass and plastic ampoules was almost similar during 14 days. Thus, plastic may be used as alternative to glass as material for fabrication of ampoules.

*Електронна адреса для листування з авторами: severinovskaya.o@gmail.com*