

Л. Е. Фруммин<sup>1</sup>, К. П. Юрьева<sup>1\*</sup>, А. В. Матвеев<sup>1</sup>, Е. В. Ворфоломеева<sup>1, 2</sup>,  
И. А. Востров<sup>2</sup>, Г. В. Затонский<sup>3</sup>, Д. И. Прохоров<sup>1</sup>, Е. С. Жаворонок<sup>1, 2</sup>,  
А. В. Панов<sup>1, 2</sup>, Л. Е. Гребенкина<sup>1</sup>, Н. В. Пятигорская<sup>4</sup>,  
Г. Э. Бркич<sup>4</sup>, С. А. Кедик<sup>1, 2</sup>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЭТЕРИФИКАЦИИ БЕНЗИЛОВЫХ ЭФИРОВ ГЕПАРИНА ПРИ СИНТЕЗЕ ОТЕЧЕСТВЕННОГО АНАЛОГА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА — ЭНОКСАПАРИНА

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО МИРЭА — Российский технологический университет, институт тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова, Россия, 119454, Москва, просп. Вернадского, д.78.

<sup>2</sup> “АО “Институт фармацевтических технологий”, Россия, Москва.

<sup>3</sup> ФГБНУ “Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе, Россия, 119435, Москва, Большая Пироговская ул., д. 11.

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО “Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, Москва.

\* e-mail: kristina.yureva\_1994@mail.ru

Исследована стадия этерификации при получении низкомолекулярного гепарина (эноксапарина) методом гидролитической деполимеризации нефракционированного гепарина, которая заключается в обработке предварительно синтезированного гепарината бензетония бензилхлоридом. С помощью методов ВЭЖХ, <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР определено содержание бензиловых фрагментов в синтезированных бензиловых эфирах гепарина и оценена их степень бензилирования. По этим данным рассчитано содержание карбоксильных групп в исходном гепарине, которое составило (0,13 ± 0,01) моль/г. Это позволяет предложить новый способ оценки степени бензилирования гепарина по данным методов <sup>1</sup>H ЯМР и ВЭЖХ. Показано, что с увеличением мольного избытка бензилхлорида содержание фрагментов бензила в бензиловых эфирах гепарина возрастает.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный гепарин; эноксапарин; степень бензилирования; гепаринат бензетония; бензиловый эфир гепарина; нефракционированный гепарин.

Гепарин, как фармацевтическая субстанция, представляет собой полимер биологического происхождения из класса полисахаридов и известен прежде всего своей антикоагулянтной активностью [1 – 3]. Считается, что гепарин биологического происхождения (так называемый нефракционированный гепарин) имеет достаточно высокую молекулярную массу — в среднем от 15,0 до 18,0 кДа [4 – 6]. С этим связан ряд недостатков лекарственных препаратов на его основе, в том числе не всегда удовлетворительная биодоступность, сравнительно высокая частота осложнений и неудобство в использовании [7 – 9]. Эти недостатки значительно менее выражены у его низкомолекулярных аналогов. Ранее [10] мы систематизировали основные способы синтеза низкомолекулярных гепаринов, причем оказалось, что одним из практически значимых методов является гидролитическая деполимеризация нефракционированного гепарина. Она заключается в направленном щелочном гидролизе макромолекулярной цепи исходного гепарина. В результате получается низкомолекулярный гепарин, известный как эноксапарин [10, 11]. В настоящее время эноксапарин и другие отечественные низкомолекулярные гепарины в виде фармацевтических субстанций в России не зарегистрированы и не производятся. В связи с этим в рамках разработки отечественной импортозамещающей технологии получения низкомолекулярных гепаринов мы подробно исследуем все стадии

синтеза и очистки эноксапарина с целью получения отечественного аналога фармацевтической субстанции эноксапарина, отвечающей современным стандартам качества. Ранее [12] исследована и оптимизирована первая стадия синтеза эноксапарина — получение гепарината бензетония реакцией гепарината натрия с хлоридом бензетония в водно-солевых растворах. Новизна и преимущества использованных нами подходов отражены в патентах [13, 14]. Данная работа выполнена в продолжение этих исследований и заключается в исследовании следующего этапа синтеза эноксапарина — этерификации гепарината бензетония бензилхлоридом. Основной характеристикой получаемого бензилового эфира гепарина является степень замещения карбоксильных групп, количественное определение которой представляет собой непростую задачу на производстве. Решение этой задачи и является целью данной работы.

### *Экспериментальная часть*

В качестве сырья использовали нефракционированный высокомолекулярный мукозный гепарин (гепаринат натрия) — субстанция Heparin Sodium Injectable (Changzhou Qianhong Bio-Pharma Co. LTD, PRC). В России отечественное промышленное производство нефракционированного гепарина отсутствует, однако одним из дальнейших направлений работы может быть разработка технологии получения отечественно-

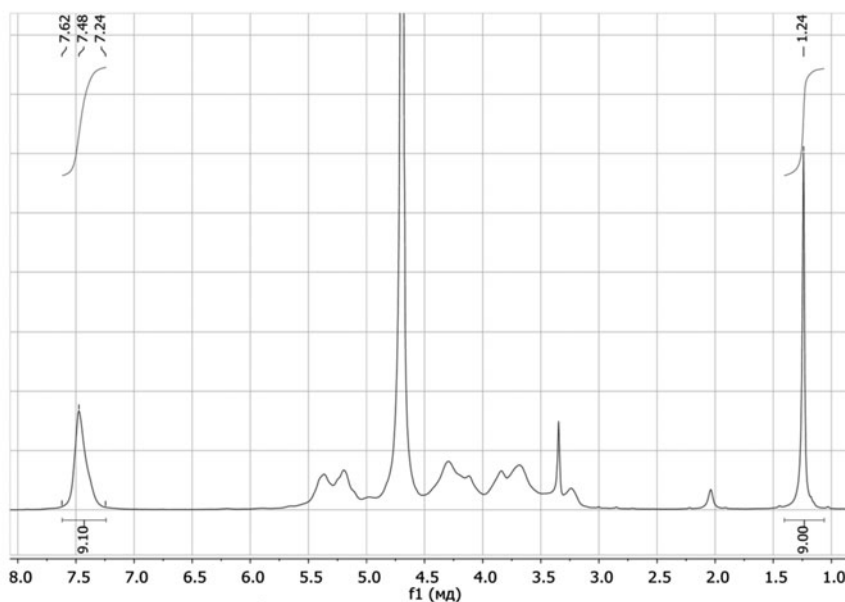


Рис. 1. Типичный  $^1\text{H}$  ЯМР спектр раствора бензилового эфира гепарина в  $\text{D}_2\text{O}$ . В качестве стандарта использован *трет*-бутанол.

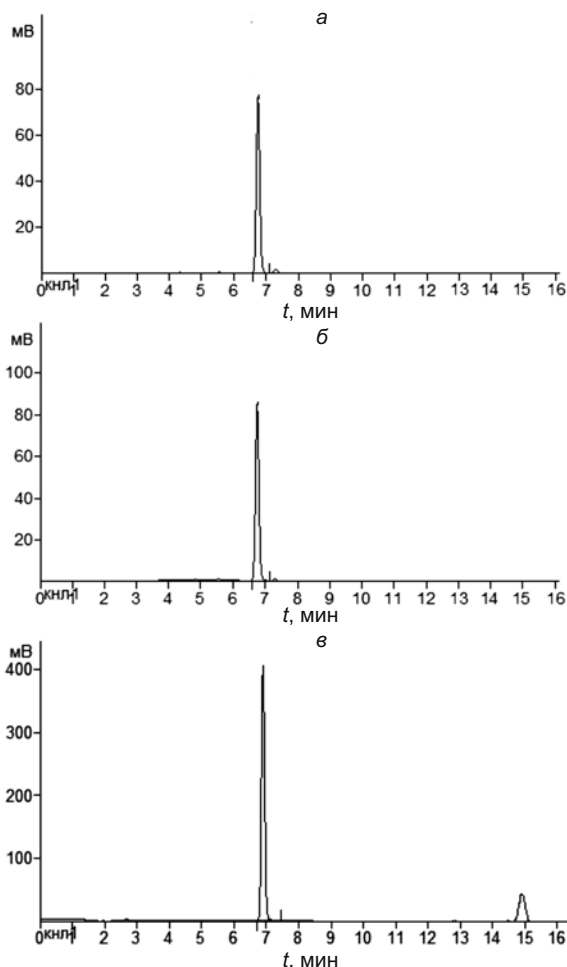
го высокомолекулярного гепарина, в том числе как сырья для синтеза эноксапарина. Кроме того, были использованы хлорид бензетония 99 % (Acros Organics), бензилхлорид 99,5 % (Sigma-Aldrich), хлорид натрия квалификации х.ч. (Химмед, Россия), ацетат натрия безводный (ГОСТ Р 54626 – 2011), NaOH квалификации ч.д.а. (ГОСТ 4328–77), 36 масс. % водный раствор хлороводорода квалификации х.ч. (ГОСТ 3118–77), метанол квалификации х.ч. (ГОСТ 6995–77), а также воду деионизированную (удельное сопротивление 18 МОм · см). В качестве растворителей для синтеза использовали диметилформамид квалификации х.ч. (ГОСТ 20289–74) или метиленхлорид квалификации х.ч. (ГОСТ 9968–86).

Синтез гепарината бензетония проводили по методике [12]. Синтез бензилового эфира гепарина проводили следующим образом: навеску около 8 г гепарината бензетония растворяли в диметилформамиде или метиленхлориде при 40 °С, добавляли бензилхлорид и перемешивали при 40 °С в течение 24 ч. Затем реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, добавляли 40 мл насыщенного раствора ацетата натрия в метаноле и перемешивали в течение 60 мин. Далее перемешивание прекращали, давали раствору отстояться и декантировали надосадочную жидкость. Затем к осадку добавляли 20 мл насыщенного раствора ацетата натрия в метаноле и перемешивали в течение 10 мин, далее снова декантировали и повторяли процедуру 2 раза. Полученный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 15 мл насыщенного раствора ацетата натрия в метаноле, затем — метанолом 3 раза по 15 мл. Осадок сушили в вакуумном эксикаторе над щелочью 24 ч и определяли в нем содержание бензиловых фрагментов методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии, а также содержание замещенных и незамещенных карбоксильных групп методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии. Дополнительно проводили гидролиз образцов

бензилового эфира гепарина для последующего определения содержания в них свободного бензилового спирта. Для этого к 100 мг образца прибавляли фиксированный 2 М водный раствор гидроксида натрия и доводили объем до 4 мл дистиллированной водой. Реакционную массу перемешивали при 60 °С в течение 4 ч в герметично закрытой виае. Затем реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, прибавляли эквивалентное гидроксиду натрия количество хлороводорода в виде 36 % водного раствора и дистиллированную воду до общего объема 0,9 мл. Полученную массу перемешивали при комнатной температуре 10 мин, отбирали пробу 100 мкл для анализа методом ВЭЖХ.

Структуру полученных продуктов подтверждали методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии, спектры регистрировали при 25 °С на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Дополнительно использовали методы  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии и двумерной корреляционной спектроскопии  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  НМВС. Спектры регистрировали при 25 °С на импульсном Фурье-спектрометре Bruker AV-III (Германия) с рабочей частотой 500 МГц для  $^1\text{H}$  и 125 МГц для  $^{13}\text{C}$  в режиме Inverse Gate, подавляющем эффект Оверхаузера. Все ЯМР-спектры регистрировали в растворе  $\text{D}_2\text{O}$ , при количественном ЯМР-анализе в качестве внешнего стандарта использовали *трет*-бутанол.

Исследования методом ВЭЖХ вели при 25 °С на жидкостном хроматографе “Аквилон Стайер”, оснащенном термостатом TS10, контроллером термостата колонок, ВЭЖХ насосом серии 2, дегазатором DG18, UV-ViS detector, снабженном колонкой Nucleodur Pyramide C18 4,6 × 250 мм, в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил : вода = 3:7 объемные части (об. ч), с добавлением 0,1 об. % трифторуксусной кислоты для подав-



**Рис. 2.** Типичные ВЭЖХ-хроматограммы стандартного раствора бензилового спирта (*а*) и образца реакционной массы, полученной в результате гидролиза бензилового эфира гепарина (*б*). Для сравнения приведена ВЭЖХ-хроматограмма раствора бензилового спирта с бензальдегидом (*в*).

ления вторичных взаимодействий за счет возможных диссоциирующих примесей. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм. Для проведения эксперимента реакционную массу (продукты гидролиза бензилового эфира гепарина) разводили подвижной фазой в отношении 1: 9 об. ч., подвергали ультразвуковому воздействию в течение 3 мин и вводили в прибор.

### Результаты и их обсуждение

Как известно, прямой синтез бензилового эфира гепарина из исходного гепарината натрия невозможен, поскольку исходный гепарин (гепаринат натрия) растворим в воде, а бензилхлорид — растворим в органических растворителях. Это обуславливает необходимость получения производных гепарина, например гепарината бензетония, которые растворяются в полярных органических растворителях — диметилформамиде и метиленхлориде. Из гепарината бензетония в среде этих растворителей нами получены бензиловые эфиры гепарина. Типичный  $^1\text{H}$  ЯМР спектр одного из этих продуктов представлен на рис. 1. Можно видеть сигнал в интервале 7,62 – 7,24 м.д., который не

перекрывается другими сигналами спектра и соответствует сигналам ядер водорода фенильного кольца бензильной группы. Сигналы фрагмента  $-\text{CH}_2-$ , которые должны проявляться в области 5,0 – 5,5 м.д., в спектрах полученных продуктов не разрешаются с сигналами аномерных протонов полисахаридной цепи гепарина. Также при 1,24 м.д. на спектрах фиксируется синглет, который соответствует протонам *трет*-бутанольного фрагмента  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$  внешнего стандарта. Это дает возможность рассчитать массовую долю бензильных групп в бензиловом эфире гепарина:

$$w_{\text{ЯМР}} = \frac{a \cdot C_{\text{ТБ}} \cdot M_{\text{Вн}} \cdot V_{\text{обр}}}{5 \cdot m_{\text{обр}}} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где  $a$  — интегральная интенсивность сигналов протонов фенильного кольца бензильной группы, измеренная относительно интегральной интенсивности *трет*-бутанола, принятой за 9;  $C_{\text{ТБ}}$  — концентрация *трет*-бутанола в  $\text{D}_2\text{O}$ , использованной для приготовления образцов;  $M_{\text{Вн}}$  — молярная масса бензильного фрагмента, равная 91 г/моль;  $V_{\text{обр}}$  — объем растворителя, использованного для приготовления образца;  $m_{\text{обр}}$  — масса навески образца бензилового эфира гепарина.

Кроме представленного метода, содержание бензильных фрагментов в бензиловом эфире гепарина можно оценить косвенным путем, определяя содержание свободного бензилового спирта в продуктах гидролиза образцов бензилового эфира гепарина. Для этого нами подобраны условия ВЭЖХ-анализа, позволяющие получать на хроматограммах продуктов гидролиза отдельный, хорошо разрешенный пик в области 6,8 – 7,2 мин (рис. 2, *б*), время удерживания которого совпадает с пиком стандартного раствора бензилового спирта (рис. 2, *а*). Предлагаемая методика позволяет вести гидролиз эфиров без образования бензальдегида, что подтверждается отсутствием на хроматограмме (рис. 2, *б*) дополнительного пика бензальдегида (рис. 2, *в*).

Для количественного определения бензилового спирта нами построена градуировочная зависимость (рис. 3), которая описывается линейным уравнением  $y = 7,8363x + 31,5785$  с коэффициентом корреляции 0,9997. На основании этой зависимости расчет содержания бензилового спирта в образцах реакционной массы (г/г навески образца) проводили по формуле:

$$w_{\text{ВЭЖХ}} = \frac{M_{\text{Вн}} \cdot V_{\text{обр}} \cdot C_{\text{ВнОН}}}{M_{\text{ВнОН}} \cdot m_{\text{обр}}} \cdot 100 \%. \quad (2)$$

где  $M_{\text{Вн}}$  — молярная масса фрагмента бензила;  $V_{\text{обр}}$  — объем исследуемой пробы;  $C_{\text{ВнОН}}$  — концентрация свободного бензилового спирта в образце, определенная на основании градуировочной зависимости;  $M_{\text{ВнОН}}$  — молярная масса бензилового спирта;  $m_{\text{обр}}$  — масса навески образца.

Результаты расчетов по данным  $^1\text{H}$  ЯМР и ВЭЖХ, приведенные на рис. 4, хорошо коррелируют друг с

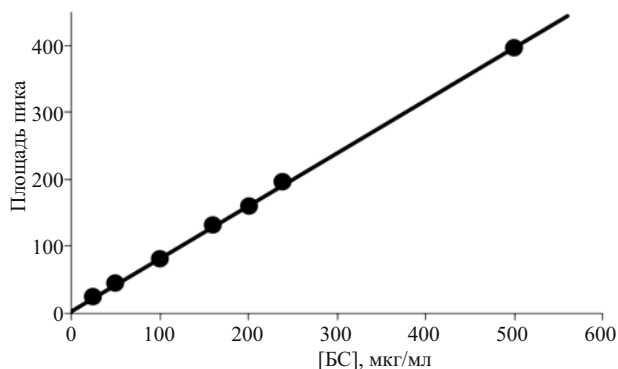


Рис. 3. Градуировочная зависимость площади пика от концентрации стандартного раствора бензилового спирта.

другом. Следует отметить, однако, что  $w_{ВЭЖХ}$  несколько ниже, чем  $w_{ЯМР}$ . Это может быть обусловлено неполным гидролизом сложноэфирной связи бензилового эфира гепарина при подготовке образцов для исследования.

Для того чтобы оценить степень этерификации бензиловых эфиров гепарина, необходимо знать не только содержание бензилового спирта (БС), эквивалентное количеству замещенных карбоксильных групп, но и содержание незамещенных карбоксильных групп. Методы  $^1\text{H}$  ЯМР и ВЭЖХ не могут дать такой информации, однако с помощью количественного метода  $^{13}\text{C}$  ЯМР нам удалось различить замещенные и незамещенные карбоксильные группы. Так, в спектре  $^{13}\text{C}$  IG (рис. 5) в области слабых полей мы наблюдали 2 сигнала при  $\approx 177$  и  $\approx 173$  м.д., которые соответствуют карбоксильным группам. Для однозначного отнесения данных сигналов был получен спектр  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  НМВС (рис. 6). Из данных по корреляции через дальние константы  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  НМВС следует, что сигнал карбоксильной группы в области сильных полей при 173,3 м.д. связан с замещенными карбоксильными группами, а сигнал при 177,3 м.д. соответствует незамещенным  $-\text{COOH}$ . Таким образом, степень бензилирования образца (мол. %)  $v_{\text{ЯМР}}$  может быть определена по соот-

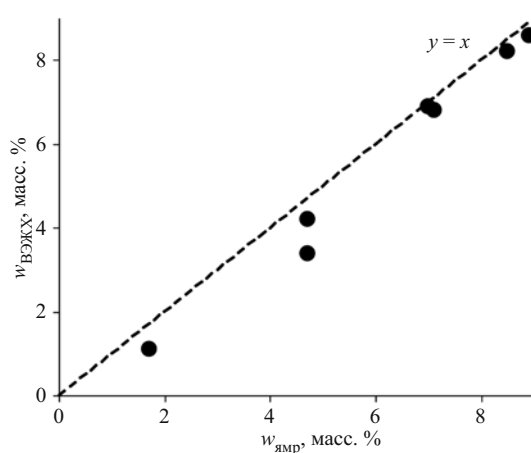


Рис. 4. Корреляция между массовой долей бензиловых фрагментов в бензиловом эфире гепарина, рассчитанной по данным  $^1\text{H}$  ЯМР и ВЭЖХ. Пунктиром обозначена линия равной концентрации.

ношению интегральных интенсивностей этих сигналов:

$$v_{\text{ЯМР}} = \frac{I_{\text{COOR}}}{I_{\text{COOR}} + I_{\text{COOH}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где  $I_{\text{COOR}}$  и  $I_{\text{COOH}}$  — интегральные интенсивности сигналов замещенных и незамещенных карбоксильных групп, соответственно.

Следует отметить, что выделенный на рис. 6 кросс-пик (в сером круге) от минорного сигнала в спектре  $^1\text{H}$  также коррелирует с сигналом замещенной карбоксильной группы. Других кросс-пиков от сигналов бензильной группы в спектре НМВС не наблюдается, что свидетельствует о замещении исключительно по положению С-6 (по карбоксильной группе).

Соотношения интегральных интенсивностей пиков при 177,3 и 173,3 м.д. спектров  $^{13}\text{C}$  IG и значения  $v_{\text{ЯМР}}$  образцов бензилового эфира гепарина представлены в таблице. Анализ полученных данных позволил рассчитать содержание карбоксильных групп в исходном

#### Содержание бензиловых фрагментов и степень бензилирования некоторых образцов бензилового эфира гепарина

Условия синтеза образца		Содержание бензиловых фрагментов*		Соотношение интенсивностей сигналов $\text{COOH} : \text{COOBn}$ по ЯМР $^{13}\text{C}$ IG	Степень бензилирования $v_{\text{ЯМР}}^*$ , мол. %	Общее содержание $\text{COOH}$ , моль/г	
Растворитель	Массовый избыток бензилхлорида	$w_{\text{ЯМР}}$ , масс. %	$w_{\text{ВЭЖХ}}$ , масс. %			по $^1\text{H}$ ЯМР	по ВЭЖХ
Метиленхлорид	2,19	7,0	6,9	(0,68 – 0,76) : 1,00	57 – 60	0,13	0,13
Метиленхлорид	2,19	8,5	8,2	(0,49 – 0,55) : 1,00	65 – 67	0,13	0,13
Метиленхлорид	0,55	4,7	4,2	(0,99 – 1,05) : 1,00	49 – 50	0,12	0,11
Диметилформамид	2,19	8,9	8,6	(0,50 – 0,56) : 1,00	64 – 67	0,14	0,14
Диметилформамид	2,19	7,1	6,8	(0,50 – 0,56) : 1,00	64 – 67	0,11	0,11
Метиленхлорид	2,19	9,0	7,2	-	-	-	-
Метиленхлорид	2,19	9,3	7,6	-	-	-	-
Метиленхлорид	0,22	1,7	1,1	(1,29 – 1,43) : 1,00	-	не определено	-
Диметилформамид	0,07	4,7	3,4	-	-	-	-
Диметилформамид	4,38	11,7	-	(0,62 – 0,68) : 1,00	60 – 62	0,21	-

\* Погрешность результатов, определенная стандартным способом при доверительной вероятности 0,99, составляет 5 %.

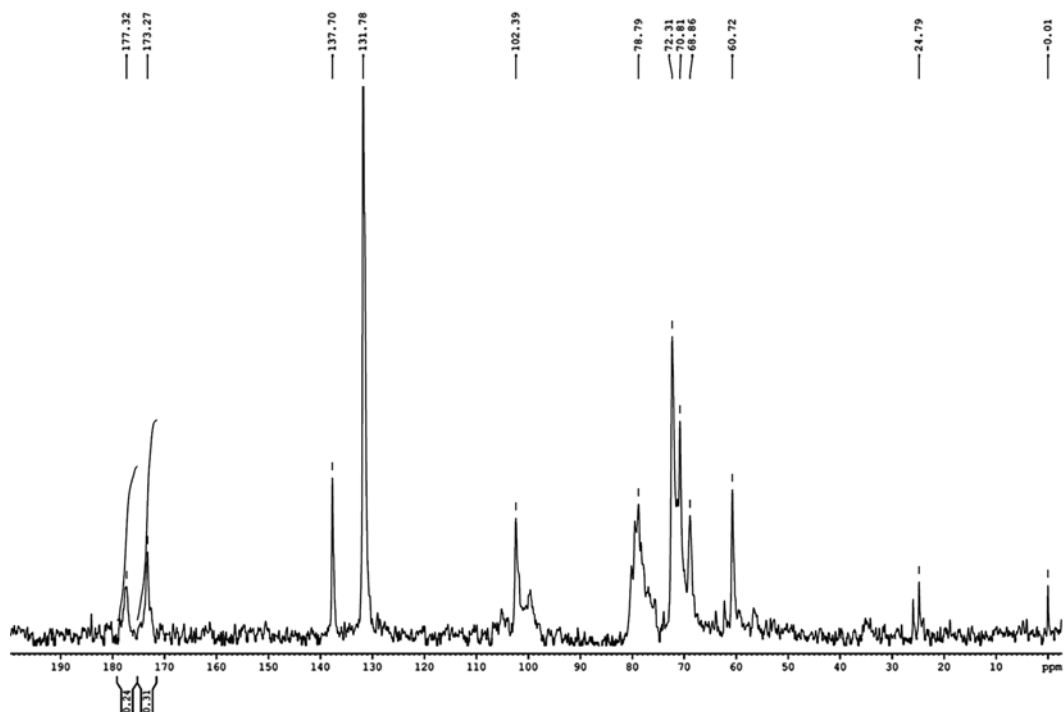


Рис. 5. Типичный спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР образца бензильного эфира гепарина.

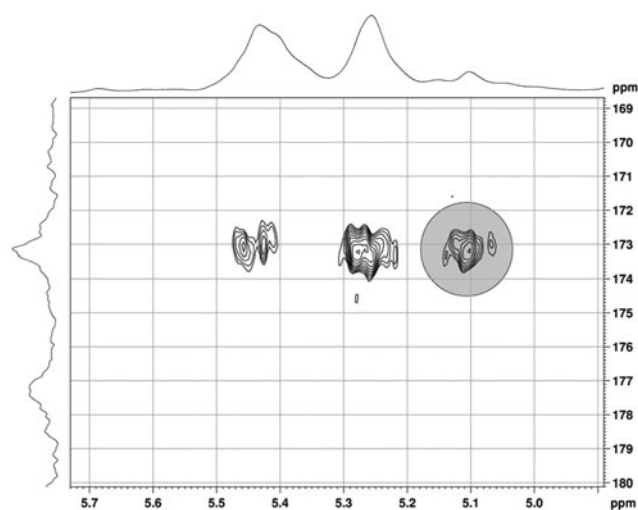


Рис. 6. Спектр  $^1\text{H}$  —  $^{13}\text{C}$  ЯМР образца бензильного эфира гепарина.

гепарине, которое составило  $(0,13 \pm 0,01)$  моль/г. Следует учитывать, что способ определения степени бензилирования методом  $^1\text{H}$  —  $^{13}\text{C}$  ЯМР применим в диапазоне содержаний бензильных фрагментов от 2 до 10 масс. %. Тот факт, что в указанном диапазоне  $w$  рассчитанное содержание карбоксильных групп примерно постоянно, позволяет предложить способ оценки степени бензилирования гепарина по данным методов  $^1\text{H}$  ЯМР и ВЭЖХ.

С увеличением мольного избытка бензилхлорида содержание фрагментов бензила в бензильных эфирах гепарина возрастает, эту корреляцию приближенно можно описать логарифмической зависимостью

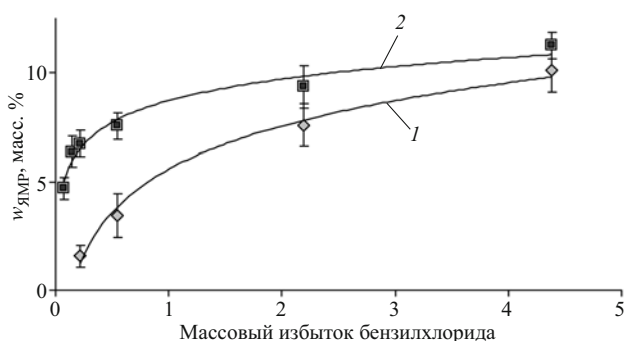


Рис. 7. Влияние избытка бензилхлорида на содержание бензильных фрагментов в бензильном эфире гепарина, синтезированном в среде метиленхлорида (1) и диметилформамида (2).

(рис. 7). Эти зависимости асимптотически приближаются к значению 13 масс. %, соответствующему теоретически максимальному (полное замещение карбоксильных групп). Отметим, что при малых избытках бензилхлорида определяемая массовая доля бензильных фрагментов, коррелирующая со степенью бензилирования, в среде диметилформамида заметно выше, чем в среде метиленхлорида. При больших избытках бензилхлорида это различие нивелируется.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках проектной части государственного задания на 2017 – 2019 гг. (проект 15.2463.2017/4.6).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Heparin: Structure, Drug Delivery Applications and Clinical Outcomes (Pharmacology-research, Safety Testing and Regula-



- tions), N. B. Wilkinson (ed.), Nova Biomedical, New York (2014).
- Heparin: Structure, Function, and Clinical Implications (*Advances in Experimental Medicine and Biology*), R. Bradshaw (ed.), Springer US, Boston, MA (1975).
  - Heparin — A Century of Progress (*Handbook of Experimental Pharmacology*), R. Lever, B. Mulloy, C. P. Page (eds.), Springer, New York (2012).
  - Патент России № 2512768 (2014), *Бюл. изобрет.*, № 10 (2014).
  - Е. М. Шулутко, *Трудный пациент*, **9**(4), 42 – 49 (2011).
  - М. Н. Кудыкин, *Стационарозамещающие технологии: амбулаторная хирургия*, № 3 – 4 (59 – 60), 35 – 41 (2015).
  - А. А. Гадельшина, *Int. J. Appl. Fundam. Res.*, № 9, 354 – 356 (2016).
  - О. Л. Романова, Н. В. Стуров, *Трудный пациент*, **9**(10), 32 – 36 (2011).
  - С. А. Голубев, *Новости хирургии*, **15**(3), 83 – 90 (2007).
  - Л. Е. Фрумин, Е. С. Жаворонок, А. В. Панов и др., *Биофарм. ж.*, **10**(2), 10 – 22 (2018).
  - Enoxaparin Sodium*, *Eur. Pharmacopoeia*, 8.1., 3749 – 3751 (2014).
  - Л. Е. Фрумин, К. П. Юрьева, А. Д. Аскретков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **52**(8), 46 – 50 (2018), *Pharm. Chem. J.*, **52**(8), 735 – 739 (2018).
  - С. А. Кедик, А. В. Панов, Л. Е. Фрумин и др., *Способ получения низкомолекулярного гепарина*, патент RU 2670767, дата подачи заявки 26.12.2017, *Бюл. изобрет.*, № 33 (2018).
  - С. А. Кедик, А. В. Панов, Л. Е. Фрумин и др., *Лабораторное устройство для отмывки порошковых продуктов химических реакций от посторонних примесей*, Патент RU 186728, дата подачи заявки 19.10.2018, *Бюл. изобрет.*, № 4 (2019).

Поступила 03.10.18

## DETERMINATION OF THE DEGREE OF ESTERIFICATION IN HEPARIN BENZYLATES DURING THE SYNTHESIS OF ENOXAPARIN – DOMESTIC ANALOG OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN

L. E. Frumin<sup>1</sup>, K. P. Yur'eva<sup>1\*</sup>, A. V. Matveev<sup>1</sup>, E. V. Vorfolomeeva<sup>1,2</sup>, I. A. Vostrov<sup>2</sup>, G. V. Zatonskii<sup>3</sup>, D. I. Prokhorov<sup>1</sup>, E. S. Zhavoronok<sup>1,2</sup>, A. V. Panov<sup>1,2</sup>, L. E. Grebenkina<sup>1</sup>, N. V. Pyatigorskaya<sup>4</sup>, G. E. Brkich<sup>4</sup>, and S. A. Kedik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov University of Fine Chemical Technology, Moscow Technological University, Moscow, 119571 Russia

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Technologies, Skolkovo, Moscow, 121353 Russia

<sup>3</sup> G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119435 Russia

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

\* e-mail: kristina.yureva1994@mail.ru

We have studied the esterification stage of the low molecular weight heparin (enoxaparin) preparation by the hydrolytic depolymerization of unfractionated heparin. This stage involves the reaction of pre-synthesized benzethonium heparinate with benzyl chloride. Using the HPLC, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR methods, the content of benzyl fragments in synthesized benzyl esters of heparin was determined and their degree of benzylation was estimated. According to these data, the content of carboxyl groups in the initial heparin was calculated, which amounted to 0.13 ± 0.01 mol/g. This result allowed us to propose a new method for estimating the degree of heparin benzylation based on the data 1H NMR and HPLC methods. It is established that, as the mole excess of benzyl chloride increases, the content of benzyl fragments in heparin benzyl esters grows as approximately described by a logarithmic dependence.

**Keywords:** low molecular weight heparin; enoxaparin; benzylation degree; benzethonium heparinate; heparin benzyl ester; unfractionated heparin.