

## Ácido Hialurónico: análisis por RMN

Junio 2012

El ácido hialurónico (HA) es un glucosaminoglucano lineal de elevado peso molecular (entre 200 y 2000 KDa), no sulfatado y constituido por unidades de ácido  $\beta$  1-4, D glucoronico y  $\beta$  1-3, N-acetilglucosamina.

El ácido hialurónico y sus oligómeros son biocompatibles y biodegradables, lo que favorece su aplicación en biomedicina y en el sector farmacéutico. Utilizándose en: operaciones oftalmológicas, tratamiento de la artritis de rodilla, suministro controlado de principios activos, etc. Por sus características y su gran

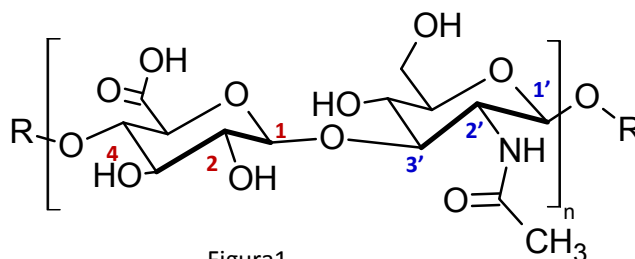


Figura1

capacidad de absorción de agua también tiene un importante papel en cosmética y aplicaciones de estética<sup>1</sup>. Su utilización en campos relacionados con la salud, hace necesario un control muy estricto en cuanto a la identificación y a la determinación de su pureza. En el procedimiento ASTM F2347-03 los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H son una de las opciones propuestas para la caracterización del HA. Por el menor solapamiento de las señales, los espectros de <sup>13</sup>C proporcionan una información complementaria valiosa, aunque requieren tiempos de realización de varias horas.

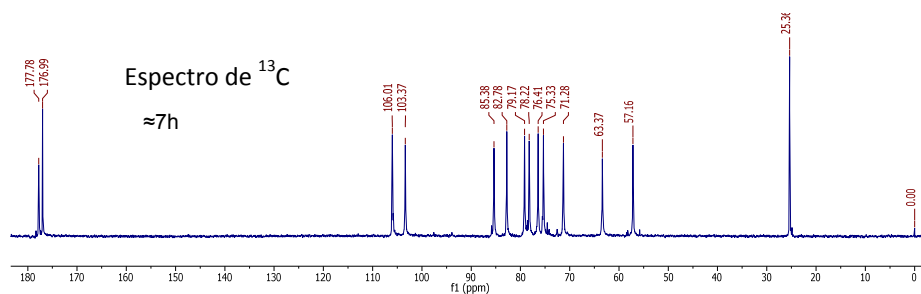
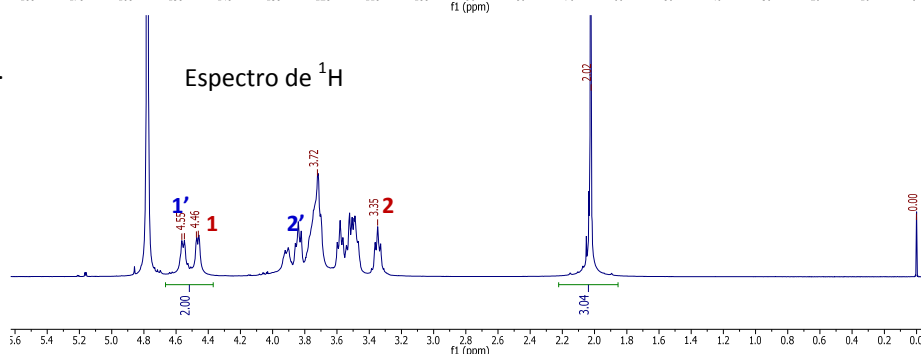


Figura 2 Hialurónico comercial. Varian VNMRS-500-US, 25°C Solución de 43 mg en 0.7ml de D2O, referencia TSP.



La técnica de RMN no sólo puede aplicarse en la identificación, sino que también puede proporcionar información sobre:

- Presencia de impurezas, disolventes o productos de degradación e hidrólisis<sup>2</sup>.
- Determinación de modificaciones en la matriz, por inclusión de elementos para conseguir una mayor reticulación ("cross linking")<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Carole E. Schantea, Guy Zuber, Corinne Herlin, Thierry F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydrate Polymers* **85**, 469–489 (2011)

<sup>2</sup> Y. Tokita & A. Okamoto, Hydrolytic degradation of hyaluronic acid, *Polymer Degradation and Stability* **48**, 269-213 (1995)

- Cambios en el estado de asociación del compuesto, monitorizando las modificaciones de desplazamiento químico y/o el ensanchamiento de las señales<sup>3</sup>. El incremento de la anchura en la señal del carbonilo de amida es indicativa de su participación en puentes de hidrógeno<sup>2</sup>.

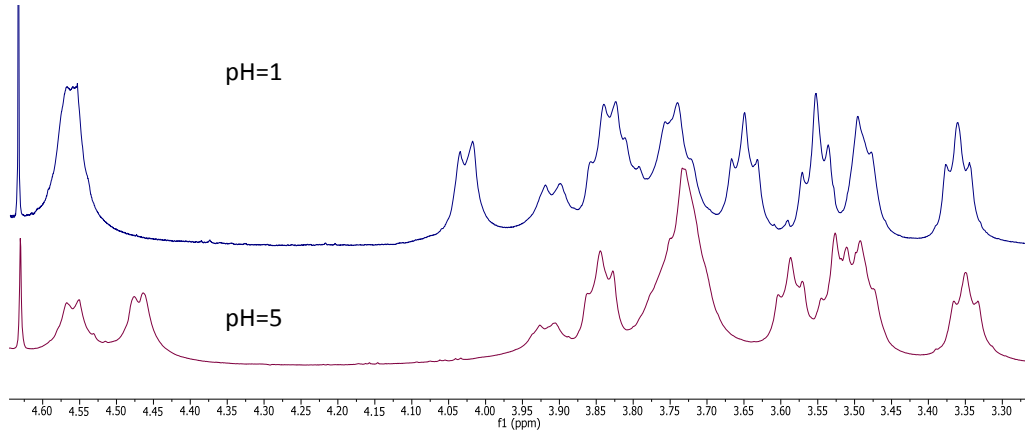
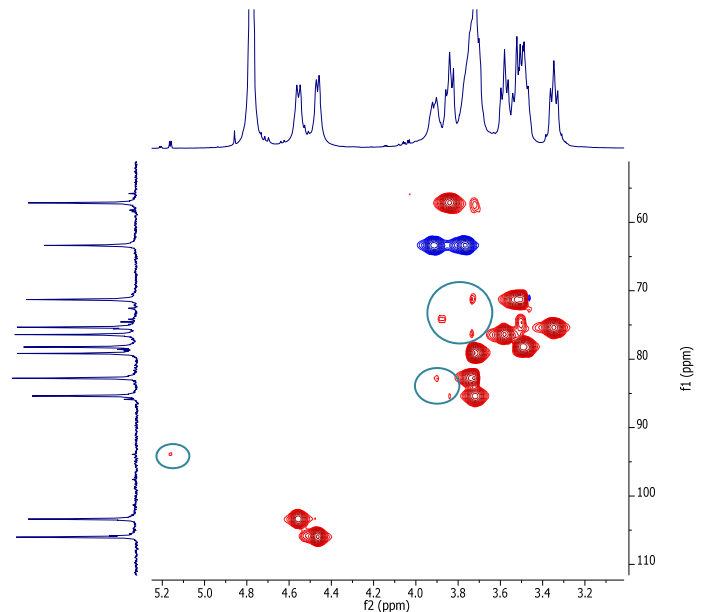


Figura 3 El cambio de PH afecta a las unidades de glucuronico

La complejidad del espectro de  $^1\text{H}$  puede dificultar la identificación, enmascarar impurezas o los fragmentos utilizados para la reticulación. La utilización de experimentos bidimensionales como el  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC mejora la dispersión de las señales, facilitando estas determinaciones.

Figura 4 Experimento HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   
Hialuronico comercial.  
Varian VNMRS-500US. Solución de 43 mg en  
0.7ml de  $\text{D}_2\text{O}$ . Espectro adquirido a  $25^\circ\text{C}$

Detección de productos minoritarios, que en  
el espectro de  $^1\text{H}$  1D están ocultos por las  
señales del producto mayoritario



Mediante el equipo de RMN Agilent VNMRS-500 disponible en la Unidad de RMN es posible realizar estos análisis de acuerdo con el método ASTM. Todos los equipos de la Unidad de RMN trabajan de acuerdo con la normativa ISO-9001-2008 y están sometidos a un exhaustivo procedimiento de calibraciones y comprobación de funcionamiento para asegurar los mejores resultados. Es posible realizar los análisis siguiendo protocolos que cumplan las normas GMP.

<sup>3</sup> **Monica A. Serban, Guanghui Yang, Glenn D. Prestwich**, Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative, *Biomaterials*, 29, 1388-1399 (2008)