

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>
УДК 543.632



Обзорная статья/Review article

Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты (обзор)

А. Х. Амандусова^{1*}, К. Р. Савельева¹, А. В. Морозов¹, В. А. Шелехова¹, Л. В. Персанова¹,
С. В. Поляков¹, В. Н. Шестаков¹

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

*Контактное лицо: Амандусова Акжвек Хасановна. E-mail: amandusova.akh@gilsinp.ru

ORCID: А. Х. Амандусова – <https://orcid.org/0000-0001-6309-6853>; К. Р. Савельева – <https://orcid.org/0000-0002-6344-2522>; А. В. Морозов – <https://orcid.org/0000-0002-8987-2651>;
В. А. Шелехова – <https://orcid.org/0000-0001-8597-061X>; Л. В. Персанова – <https://orcid.org/0000-0003-4124-328X>; С. В. Поляков – <https://orcid.org/0000-0003-4234-1156>;
В. Н. Шестаков – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>.

Статья поступила: 20.05.2020. Статья принята в печать: 02.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В обзоре описаны физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, благодаря которым она нашла применение в офтальмологии. Также были рассмотрены способы определения гиалуроновой кислоты с помощью различных аналитических методов.

Текст. Гиалуроновая кислота (ГК) – это высокомолекулярный гликозаминогликан, который состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. Карбоксильные, гидроксильные и ацетоамидные группы придают молекуле этого анионного гетерополисахарида гидрофильные свойства. В зависимости от того, каким способом получают гиалуроновую кислоту, ее молекулярная масса варьируется в широком диапазоне. Разработаны методы количественного определения гиалуроновой кислоты, к которым относятся: метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также ИК-спектроскопический метод.

Заключение. Благодаря своим свойствам гиалуроновая кислота находит широкое применение как активное вещество в составе лекарственных препаратов. На сегодняшний день разработаны методики количественного определения гиалуроновой кислоты, среди которых метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ИК-спектроскопии, рассмотренные в данной статье, представлены также в Японской фармакопее и Европейской фармакопее. Данные методики получили широкое распространение благодаря высокой воспроизводимости, точности и относительной простоте.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, строение ГК, структура ГК, турбидиметрическое титрование, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в сборе и обработке литературных данных, написании статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Амандусова А. Х., Савельева К. Р., Шелехова В. А., Персанова Л. В., Поляков С. В., Шестаков В. Н., Морозов А. В. Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>

Physical and Chemical Properties and Quality Control Methods of Hyaluronic Acid (Review)

Akzhvek Kh. Amandusova^{1*}, Kristina R. Saveleva¹, Andrei V. Morozov¹, Vera A. Shelekhova¹,
Lyudmila V. Persanova¹, Sergei V. Polyakov¹, Vladislav N. Shestakov¹

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

*Corresponding author: Akzhvek Kh. Amandusova. E-mail: amandusova.akh@gilsinp.ru

ORCID: Akzhvek Kh. Amandusova – <https://orcid.org/0000-0001-6309-6853>; Kristina R. Saveleva – <https://orcid.org/0000-0002-6344-2522>;
Andrei V. Morozov – <https://orcid.org/0000-0002-8987-2651>; Vera A. Shelekhova – <https://orcid.org/0000-0001-8597-061X>;
Lyudmila V. Persanova – <https://orcid.org/0000-0003-4124-328X>; Sergei V. Polyakov – <https://orcid.org/0000-0003-4234-1156>;
Vladislav N. Shestakov – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>.

Received: 20.05.2020. Revised: 02.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. This review describes the physicochemical properties that determine the use of hyaluronic acid in ophthalmology. We have studied methods for determining hyaluronic acid using various analytical methods.

Text. Hyaluronic acid is a high molecular weight glycosaminoglycan that consists of repeating disaccharides of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid. Carboxyl, hydroxyl and acetamide groups give hydrophilic properties to the molecule of this anionic heteropolysaccharide. Depending on how the hyaluronic acid is obtained, its molecular weight varies over a wide range. Researchers developed methods for controlling hyaluronic acid, which include the turbidimetric titration method, the method of high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography and IR spectroscopic method.

Conclusion. Due to its properties, hyaluronic acid is widely used as an active ingredient in pharmaceutical preparations. Today, there are a number of methods for the determination of hyaluronic acid, including the method of turbidimetric titration, the method of capillary electrophoresis. High performance liquid chromatography (HPLC) and IR spectroscopy methods are presented in the Japanese Pharmacopoeia and the European Pharmacopoeia. These techniques are widely used due to their high reproducibility, accuracy, and relative simplicity.

© Амандусова А. Х., Савельева К. Р., Шелехова В. А., Персанова Л. В., Поляков С. В., Шестаков В. Н., Морозов А. В., 2020

© Amandusova A. Kh., Saveleva K. R., Shelekhova V. A., Persanova L. V., Polyakov S. V., Shestakov V. N., Morozov A. V., 2020

Keywords: hyaluronic acid, the structure of HA, turbidimetric titration, IR-spectroscopy, HPLC.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors participated in the collection and processing of literature data, writing the article and discussing the results.

For citation: Amandusova A. Kh., Saveleva K. R., Shelekhova V. A., Persanova L. V., Polyakov S. V., Shestakov V. N., Morozov A. V. Physical and chemical properties and quality control methods of hyaluronic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой природный полимер, молекулярная масса (ММ) которого варьируется в широких пределах. Средняя ММ макромолекул ГК, содержащихся в синовиальной жидкости человека, составляет 3 140 000 [1].

Благодаря реологическим свойствам растворы, содержащие ГК, являются идеальными смазочными материалами. Помимо этого, ГК обладает гидрофильными свойствами и действует как амортизирующая жидкость.

ГК обладает рядом «фармакологических эффектов», благодаря которым применяется в офтальмологических препаратах. В офтальмологии ГК используется в хирургической практике и входит в состав материала контактных линз для более комфортного ношения [2].

В настоящее время ГК получают методом ферментации с использованием бактерий (*Streptococcus equi* и *Streptococcus zooepidemicus*), что приводит к более высокой степени очистки ГК, улучшая тем самым переносимость препаратов – слезозаменителей [3].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Гиалуроновая кислота (рисунок 1) представляет собой высокомолекулярный гликозаминогликан, который состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. Атомы водорода COOH-групп некоторых элементарных звеньев β-D-глюкуроновой кислоты могут быть замещены на натрий. Полученные полисахариды называются натриевой или калиевой солью гиалуроновой кислоты (гиалуронат натрия или гиалуронат калия) [1].

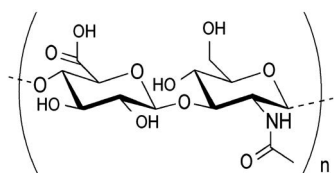


Рисунок 1. Структурная формула гиалуроновой кислоты

Figure 1. Structural formula of hyaluronic acid

В очищенном виде это белый мелкодисперсный порошок. Гиалуроновая кислота – это оптически активный полимер, который растворяется в воде и вод-

ном растворе хлорида натрия, практически нерастворимый в органических растворителях [4, 5].

ГК обладает уникальными реологическими свойствами. Так, в растворе полимерная цепь гиалуронана принимает форму расширенной случайной спирали. Эти цепочки сцепляются друг с другом при очень низких концентрациях. При более высоких концентрациях растворы имеют чрезвычайно высокую, но зависящую от сдвига вязкость. 1 % раствор похож на «желе», но когда он находится под давлением, он легко перемещается и может быть введен через иглу с маленьким отверстием. Поэтому его называют «псевдопластическим» материалом. Эластические свойства раствора изменяются по мере нарастания концентрации и молекулярной массы полимеров [6]. В концентрированных растворах гиалуроновая кислота приобретает различные пространственные структуры.

Первичная структура ГК состоит из повторяющихся дисахаридных звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина с количеством водородных связей до 5, существующих между каждыми двумя соседними дисахаридами. Вторичные структуры формируются в виде двухслойных спиралей в форме ленты путем скручивания каждого дисахаридного блока на 180° по сравнению с теми, которые находятся впереди и позади него в цепи [7]. Третичная структура может образовывать в пространстве как β-слой, так и спиральные конфигурации, которые присущи полимеру в растворе, что объясняется водородными связями между гидроксильными группами вдоль цепи полимера [6].

В таких растворах молекулярные клубки переплетаются между собой и происходит образование областей с пониженным содержанием воды, так как определенные дисахаридные звенья определенной молекулы занимают свободные места. Клубки гиалуроновой кислоты, принимающие форму «сжатой губки», начинают расправляться, когда попадают в водную среду, при этом ГК принимает наиболее энергетически выгодную конформацию [8].

Наличие большого количества гидроксильных групп, приводящее к образованию водородных связей, объясняет способность гиалуроновой кислоты удерживать воду. По некоторым исследованиям ГК может удерживать количество воды в 1000 раз превышающее собственную массу [8]. Связывание воды и возникающее вследствие этого набухание определяет биологическую роль ГК в регулировании прони-

цаемости тканей. Гиалуроновая кислота играет роль основного структурообразующего гликозаминогликана (ГАГ), так как связывает коллагеновые волокна, белки и другие вещества в единую систему, образуя тем самым «буферный объем», который дает ту самую прочность и эластичность для механических тканей [1].

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В работе [9] описан метод определения гиалуроната натрия турбидиметрическим титрованием. Метод основан на определении концентрации вещества в растворе по возрастанию мутности (уменьшение пропускания) при добавлении титранта. В качестве коагулянта для осаждения гиалуроната натрия было использовано катионное поверхностно-активное вещество цетилпиридиний хлорид. Для определения точки эквивалентности был использован фототрод. В проведенном исследовании было показано преимущество использования цетилпиридиний хлорида в качестве титранта с концентрацией 1 мг/мл со значением pH, доведенного до $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ с помощью 1 М гидроксида калия либо фосфорной кислотой при длине волны 520 нм.

В работе было отмечено, что увеличение скорости перемешивания влияло на увеличение процента шума передачи. Это может быть из-за образования пузырьков в титровальном стакане, содержащем раствор образца. Значительная ошибка возникла вблизи точки эквивалентности. Скорость перемешивания оптимизировалась путем титрования с разной скоростью. Наиболее лучшие результаты были получены с постоянной скоростью перемешивания 25 %.

Рассчитано относительное стандартное отклонение содержания гиалуроната натрия в шести образцах растворов, которое для гиалуроната натрия составило 1,08 %.

Промежуточная прецизионность была выполнена путем анализа образцов двумя разными исследователями, использующими разные инструменты. Каждый исследователь подготовил стандартный образец и шесть разных образцов. Относительное стандартное отклонение, полученное из 12 результатов анализа двумя исследователями, составило 1,08 % для гиалуроната натрия.

В работе [10] в качестве биозондера для определения гиалуроновой кислоты (ГК) методом вольтамперометрии с линейной разверткой на ртутном капельном электроде был выбран катионный краситель феносафранин. В результате экспериментов было показано, что при электростатическом взаимодействии феносафранина с гиалуроновой кислотой образуется супрамолекулярный комплекс, что в свою очередь приводит к уменьшению вольтамперометрического тока феносафранина. Именно на этом уменьшении высоты пика тока основан непрямой метод определения гиалуроновой кислоты (ГК).

Использовали разное количество ГК с концентрацией 1 г/л в буферном растворе Бриттона – Робинсона (Б-Р) (pH 4.5), чтобы получить спектры поглощения в УФ- и видимой областях феносафранина и его смесей. Максимум поглощения феносафранина составил 529 нм, в то время как в буферном растворе поглощения не наблюдалось.

Были сняты вольтамперометрические кривые производной второго порядка с линейной разверткой; чувствительность этого метода выше, чем у классической полярографии. Приведены типичные вольтамперограммы системы, в которой взаимодействуют феносафранин и гиалуроновая кислота. Были построены кривые буфера Бриттона – Робинсона (Б-Р).

Кривая для феносафранина в буферном растворе Бриттона – Робинсона (pH 4.5) показала хорошо выраженный вольтамперометрический пик тока восстановления при $-0,42$ В. Он относится к восстановлению пиразиновой группы в молекуле феносафранина. Кривые в растворе феносафранина были сняты с различными добавками гиалуроновой кислоты. После добавления гиалуроновой кислоты пик тока восстановления снижается без изменения своего потенциала; это означает, что феносафранин реагирует с гиалуроновой кислотой, образуя в растворе биосупрамолекулярный комплекс.

Таким образом, концентрация феносафранина в растворе понижается, и высота пика тока восстановления постепенно уменьшается. Уменьшение пика тока пропорционально увеличению концентрации гиалуроновой кислоты, что в дальнейшем используется при ее определении.

В исследовании [11] содержание и молекулярную массу гиалуроновой кислоты определяли капиллярным электрофорезом. При использовании необработанного капилляра с расплавленным кремнеземом (длина 75 микрон) длиной 58 см (эффективная длина 50 см) по истечении 15 мин наблюдали пик гиалуроновой кислоты при 20 кВ в 50 мМ фосфатном буфере (pH 4,0). Калибровочные кривые показали линейную зависимость в концентрации от 0,01 мг/мл до 3,3 мг/мл для всех исследованных образцов ГК. Предел обнаружения ГК при 185 нм составлял 1,0 мкг/мл при отношении сигнал-шум равном 5.

Образцы ГК исследовали в буфере, содержащем пуллулан (ПУ), который использовался в качестве добавки для формирования матрицы. Образцы ГК демонстрировали заметное пиковое уширение при анализе в буферном растворе, содержащем ПУ с заданной молекулярной массой.

Известен анализ гиалуроновой кислоты методом гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии с детектором многоугольного светорассеяния [12].

Система гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии является методом измерения молекулярной массы гиалуроновой кислоты. Истинные молярные массы могут быть получены при использовании многолучевого рассеяния света в сочетании с

детектором показателя преломления. Приращение показателя преломления (dn/dc) для оценки данных рассеяния света может быть определено в режиме реального времени, измерено в автономном режиме с использованием специализированной аппаратуры или взято из литературы.

Образцы с высокой молекулярной массой требуют более низких скоростей потока и концентраций при хроматографировании. Условия гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии были оптимизированы для гиалуроновой кислоты с высокой молекулярной массой в отношении загрузки, скорости потока, размера частиц колонки и пористости. При подготовке образца было учтено содержание воды около 12 %.

Из-за отсутствия высокомолекулярных калибровочных стандартов рекомендуется использовать определение рассеяния света. Это позволяет также измерять истинные молекулярные массы.

Увеличение показателя преломления (dn/dc) для гиалуроновой кислоты (0,165 мл/г) использовалось для оценки данных рассеяния света. Была изучена концентрация, измеренная детектором, а также измеренная молекулярная масса в режиме реального времени. Восстановление образца составило почти 100 %, что указывает на то, что весь материал элюируется из колонки.

В работе [13] авторами определено содержание гиалуроната натрия с концентрацией 2,0 мг/мл в фармацевтическом составе с помощью ВЭЖХ-УФ. Использовали подвижную фазу, состоящую из буфера 0,05 М дигидрофосфата калия, pH доведено до 7,0 гидроксидом калия (10 %). Хроматографию осуществляли при 25 °C и объем раствора, вводимый в колонку BioSer SEC S2000 (300 × 7,8 мм), составлял 10 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин. Обнаружение проводили с использованием УФ-детектора при длине волны 205 нм. Время удерживания гиалуроната натрия составляло около 4,9 мин при коэффициенте асимметрии 1,93.

pH подвижной фазы может влиять на время удерживания аналита, а также чувствительность обнаружения.

Было установлено, что значение pH 7,0 является оптимальным для определения гиалуроната натрия. Концентрация буфера – еще один фактор, который может изменить образование ионной пары.

Снижение высоты пика было замечено при концентрации дигидрофосфата калия менее 0,05 М. Это может быть связано с высоким содержанием водной среды, которая неблагоприятна для ионного связывания.

Инструментальная точность определялась шестью повторностями, рассчитано относительное стандартное отклонение, которое составило 0,49 %.

В исследовании [14] были получены ИК-спектры гиалуроновой кислоты при относительной влажности в диапазоне от 8 до 96 % с шагом 4 %. Инфракрасные спектры измеряли с использованием инф-

ракрасного спектрометра с преобразованием Фурье-преобразования BioRad FTS60a, который был дополнен поляризатором на основе проволоочной сетки. В качестве фона был использован пустой кристалл ATR (без образца).

Интерпретацию ИК-спектра ГК проводили в области 3750–2750 см^{-1} . Широкая полоса поглощения в основном относится к O–H растяжению $\nu_{13}(\text{OH})$ воды. Полоса состоит из (в основном неразрешенных) поддиапазонов, соединенных с водородными связанными гидроксильными группами (3280 см^{-1}), которая включает в себя первый обертоном изгибающего колебания молекул воды при $\nu_2(\text{OH})$: 1650 см^{-1} . При увеличении влажности поглощение $\nu_{13}(\text{OH})$ возрастает.

Кроме того, при указанном выше диапазоне относительной влажности были получены ИК-спектры поглощения в области 1700–1500 см^{-1} для гиалуроновой кислоты (ГК) и хондроитинсульфата (ХС). Поглощение в этой области спектра постепенно уменьшается при более высокой относительной влажности в результате разбавления полисахарида. Увеличенная область показывает, что положение полосы для режима $\nu_{\text{as}}(\text{COO}-)$ сдвигается с 1611 до 1603 см^{-1} для ГК, а также для ХС при увеличении гидратации. Частоты растяжения снижаются в результате образования водородных связей.

Это указывает на то, что наблюдаемый сдвиг частоты обусловлен ассоциацией молекул воды с карбоксильной группой через водородные связи. Дальнейшие изменения положения полос в этой спектральной области не наблюдались. Существование этой полосы в наблюдаемой спектральной области дает убедительные доказательства того, что оптимальное значение pH находится в диапазоне 4–7, что приводит к депротонированному состоянию ($\text{COO}-$). Этот результат подтверждается отсутствием полосы поглощения в группы C=O при 1750–700 см^{-1} .

В работе [15] описывается разработка быстрого, доступного и надежного метода обнаружения гиалуроновой кислоты в сложных образцах.

Метод включает в себя три основных этапа. На первой стадии проводят разделение гиалуроновой кислоты на интерферирующие гликозаминогликаны, а также моно- и олигосахариды фракцией цетилтриметиламмоний бромида. На втором этапе – последующий синтез гиалуроновой кислоты с помощью гиалуронаталлазы *Streptococcus pneumoniae* до 4,5-ненасыщенных дисахаридов (ΔГК2). На заключительной стадии проводят реакцию ΔГК2 с 3-метил-2-бензотиазолинонгидразоном (МБТН), что приводит к интенсивному синему продукту. Коэффициент экстинкции продукта ΔГК2-МБТН составляет 34735 моль⁻¹ при 654 нм. Теоретическая чувствительность анализа составляет 0,07–0,09 мг/л ГК. Практическая чувствительность составляет 0,3 мг/л; максимальная повторяемость достигалась в диапазоне 3–2000 мг/л ГК ($r^2 = 0,9994$). Время анализа составляло 25–60 мин в зависимости от сложности образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре были изучены физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, благодаря которым она применяется в медицине в целом, а в частности в офтальмологическом направлении.

Проанализировав свойства ГК, можно сказать, что данный полимер обладает рядом положительных качеств, среди которых высокая степень удерживания влаги, уникальные реологические свойства, позволяющие ГК проявлять себя как вязкоупругий гель даже при низких концентрациях.

Несмотря на тот факт, что гиалуроновая кислота имеет разные источники происхождения, ее химическая структура всегда одинакова и различается, как уже было рассмотрено выше, только молекулярной массой.

На сегодняшний день известны различные методики количественного определения гиалуроновой кислоты, рассмотренные в данной статье. Среди них метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии и ИК-спектроскопии и др. Данные методики получили большое распространение благодаря высокой воспроизводимости, точности и относительной простоте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сигаева Н. Н., Колесов С. В., Назаров П. В., Вильданова Р. Р. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине. *Вестник Башкирского университета*. 2012;17(3):1220–1241.
2. Uddin Md. S., Mamun A. A., Kabir Md. T., Setu J. R., Zaman S., Begum Y., Amran Md. S. Quality Control Tests for Ophthalmic Pharmaceuticals: Pharmacopoeial Standards and Specifications. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2017;14(2):1–17. DOI: 10.9734/JAMPS/2017/33924.
3. Егоров Е. А. Гиалуроновая кислота: применение в офтальмологии и терапии синдрома «сухого глаза». *РМЖ. Клиническая Офтальмология*. 2013;2:71–73.
4. Tan S. W., Johns M. R., Greenfield P. F. Hyaluronic acid – a versatile biopolymer. *Aust. J. Biotechnol.* 1990;4(1):38–43.
5. Meyer K., Palmer J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629–634.
6. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008;53:397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED.
7. Liao Y.-H., Jones S. A., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*. 2005;12:327–342. DOI: 10.1080/10717540590952555.
8. Хабаров В. К вопросу о концентрации гиалуроновой кислоты в препаратах для биоревитализации. *Эстетическая медицина*. 2015;14(1):3–6.
9. Ruckmani K., Shaikh S. Z., Pavne K., Aamer K., Javed A. A New Simple and Rapid Method for the Determination of Sodium Hyaluronate in Active Pharmaceutical Ingredient and Ophthalmic Formulations by DP5 Photoreactor. *World Journal of Analytical Chemistry*. 2014;2(2):15–22. DOI: 10.12691/wjac-2-2-1.
10. Niu X. L., Sun W., Jiao K. Voltammetric determination of hyaluronic acid based on its interaction with phenosafranine. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2009;45:902–907. DOI: 10.1134/s1023193509080102.
11. Kakehi K., Hayase S., Oda Y., Honda S. High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass. *Journal of Chromatography A*. 1997;768(2):295–305. DOI: 10.1016/s0021-9673(96)01095-3.

12. Gp-sec/malls-анализгиалуроновойкислоты. Available at: <http://www.chromatographyonline.com/gpcsec-malls-analysis-hyaluronic-acid-0>. Accessed: 01.03.2019.
13. Ruckmania K., Shaikh S. Z., Khalilb P., Muneerab M. S., Thusleemb O. A. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2013;3(5):324–329. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.02.001.
14. Arnold K., Servaty R., Schiller J., Binder H. Hydration of polymeric components of cartilage – an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001;28(2):121–127. DOI: 10.1016/s0141-8130(00)00161-6.
15. Pepeliaev S., Hrudikova R., Jilkova J., Pavlik J., Smirnou D., Cerny Z., Franke L. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal*. 2017;94:460–470. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036.

REFERENCES

1. Sigaeva N. N., Kolesov S. V., Nazarov P. V., Vil'danova R. R. Chemical modification of hyaluronic acid and its use in medicine. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2012;17(3):1220–1241. (In Russ.).
2. Uddin Md. S., Mamun A. A., Kabir Md. T., Setu J. R., Zaman S., Begum Y., Amran Md. S. Quality Control Tests for Ophthalmic Pharmaceuticals: Pharmacopoeial Standards and Specifications. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2017;14(2):1–17. DOI: 10.9734/JAMPS/2017/33924.
3. Egorov E.A. Hyaluronic acid: it's usage in ophthalmology and in treatment of dry eye syndrome. *RMZH. Klinicheskaya Oftal'mologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology*. 2013;2:71–73. (In Russ.).
4. Tan S. W., Johns M. R., Greenfield P. F. Hyaluronic acid – a versatile biopolymer. *Aust. J. Biotechnol.* 1990;4(1):38–43.
5. Meyer K., Palmer J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629–634.
6. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008;53:397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED.
7. Liao Y.-H., Jones S. A., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*. 2005;12:327–342. DOI: 10.1080/10717540590952555.
8. Habarov V. On the concentration of hyaluronic acid in preparations for biorevitalization. *Esteticheskaya medicina*. 2015;14(1):3–6. (In Russ.).
9. Ruckmani K., Shaikh S. Z., Pavne K., Aamer K., Javed A. A New Simple and Rapid Method for the Determination of Sodium Hyaluronate in Active Pharmaceutical Ingredient and Ophthalmic Formulations by DP5 Photoreactor. *World Journal of Analytical Chemistry*. 2014;2(2):15–22. DOI: 10.12691/wjac-2-2-1.
10. Niu X. L., Sun W., Jiao K. Voltammetric determination of hyaluronic acid based on its interaction with phenosafranine. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2009;45:902–907. DOI: 10.1134/s1023193509080102.
11. Kakehi K., Hayase S., Oda Y., Honda S. High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass. *Journal of Chromatography A*. 1997;768(2):295–305. DOI: 10.1016/s0021-9673(96)01095-3.
12. Gp-sec/malls-анализгиалуроновойкислоты. Available at: <http://www.chromatographyonline.com/gpcsec-malls-analysis-hyaluronic-acid-0>. Accessed: 01.03.2019.
13. Ruckmania K., Shaikh S. Z., Khalilb P., Muneerab M. S., Thusleemb O. A. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2013;3(5):324–329. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.02.001.
14. Arnold K., Servaty R., Schiller J., Binder H. Hydration of polymeric components of cartilage – an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001;28(2):121–127. DOI: 10.1016/s0141-8130(00)00161-6.
15. Pepeliaev S., Hrudikova R., Jilkova J., Pavlik J., Smirnou D., Cerny Z., Franke L. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal*. 2017;94:460–470. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036.