

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion: Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 34

### Hyaluronsäure - Untersuchung einer komplexen Polysaccharidprobe mit der GPC/SEC

#### Problemstellung

Neben vielen anderen Polysacchariden wie Dextran, Pullulan und Chitosan soll in unserem Labor nun auch Hyaluronsäure untersucht werden. Ist es möglich eine Hyaluronsäureprobe mit den gleichen Bedingungen zu analysieren wie z. B. eine Dextranprobe? Es handelt sich schließlich in beiden Fällen um Polysaccharide.

#### Frage

Welche chromatographischen Bedingungen muss man für die GPC/SEC-Analyse von Hyaluronsäure wählen und wie können die Ergebnisse interpretiert werden?

#### Antwort

Obwohl nahezu alle Verbindungen aus der Klasse der Polysaccharide aus den gleichen Grundbausteinen, einem Zuckermolekül mit der Zusammensetzung  $C_6H_{12}O_6$ , aufgebaut sind ist Ihre Struktur aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfungsformen vollkommen verschieden. Manche Polysaccharide wie z.B. Gummi Arabicum sind außerdem noch mit einem Proteinanteil verbunden. Daher werden für viele Polysaccharide spezielle chromatographische Bedingungen benötigt um verwertbare Resultate erzielen zu können.

Im Fall der Hyaluronsäure handelt es sich um ein langkettiges Polysaccharid, welches aus linearen Ketten besteht (Abbildung 1). Ungewöhnlich ist die sehr hohe Kettensteifigkeit der Moleküle die durch die Verknüpfungsstruktur der Hyaluronsäure hervorgerufen wird. Dies führt wiederum dazu, dass die Moleküle in Lösung eine extrem hohe Intrinsic Viskosität und einen sehr großen hydrodynamischen Radius aufweisen. Die Hyaluronsäure zeichnet sich durch strukturoviskose Eigenschaften aus: Ihre Viskosität verändert sich mit einwirkenden mechanischen Kräften - genauer nimmt die Viskosität ab, je stärker die Scherkräfte werden.

Berücksichtigt man diese Eigenschaften der Hyaluronsäure dann muss man für die Analyse dieser Verbindung mit der GPC/SEC folgende Bedingungen wählen:

- Es muss eine Trennsäule mit sehr großen Poren verwendet werden, z. B. eine ViscoGel A7000 Trennsäule.
- Die Konzentration der Hyaluronsäureprobe darf nicht zu hoch gewählt werden, um Wechselwirkungen zwischen den Molekülen zu vermeiden. Eine geeignete Hyaluronsäure-Konzentration wäre z.B. 0,5 mg/ml bei einem Injektionsvolumen von 50  $\mu$ l.
- Die Flussrate darf ebenfalls nicht zu hoch gewählt werden, um die Scherkräfte auf der Trennsäule möglichst gering zu halten. Eine geeignete Flussrate wäre z.B. 0,35 ml/min.
- Bei der Probenvorbereitung benötigt man Zeit, um die langkettigen Moleküle vollständig in Lösung zu bringen (mehrere Stunden lösen, ggf. über Nacht).
- Bereits bei der Probenvorbereitung ist darauf zu achten, dass keine zu großen Scherkräfte auf die Probe einwirken (z.B. durch zu schnelles Rühren). Dies kann zu Brüchen in den sehr kettensteifen und langkettigen Molekülen führen. Die Probe wird dadurch bereits vor der GPC/SEC-Analyse verändert. Auch zu hohe Temperaturen sind zu vermeiden (thermischer Kettenabbau.)

Berücksichtigt man all diese Dinge, dann können sehr gute Chromatogramme und auch exakte und reproduzierbare Ergebnisse für die Hyaluronsäureproben erhalten werden (Abbildung 2). Die Wiederfindungsraten liegen im Bereich > 90%. Als Laufmittel kann ein herkömmlicher Phosphatpuffer bei neutralem pH-Wert verwendet werden.

Interessant ist der Mark-Howink-Strukturplot für Hyaluronsäureproben (Abbildung 3). Der Mark-Houwink-Plot ist der zentrale Strukturplot in der GPC/SEC. Es werden logarithmisch die Intrinsic Viskositäten gegen das Molekulargewicht der Probe aufgetragen.

$$\log IV = \log k + a \times \log Mw$$

(Mark-Houwink-Gleichung)

Für ein Polymer oder Biopolymer, das eine lineare Kette ohne Verzweigungen ausbildet, muss sich eine Gerade ergeben mit einer Steigung von 0,6-0,8 (a-Wert). Für verzweigte Polymere resultiert ein geringerer a-Wert. Aus

dem Mark-Houwink-Plot können über die Zimm-Stockmayer-Theorie die Verzweigungsgrade von Polymer- und Biopolymerproben ermittelt werden. Prinzipiell gilt, dass ein Polymerelement mit einer größeren intrinsischen Viskosität bei gleichem Molekulargewicht eine geringere molekulare Dichte und somit eine offenere, eventuell gestrecktere Form aufweist mit ggf. weniger Verzweigungen im Molekül.

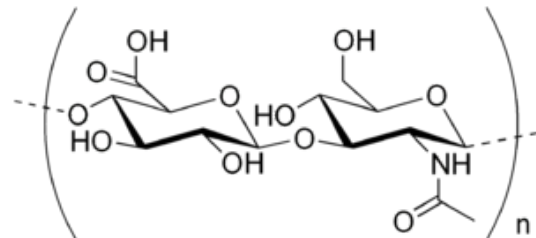
Für Hyaluronsäureproben erhält man (wie in Abbildung 3 zu sehen) keine Gerade im Mark-Houwink-Strukturplot, sondern einen gekrümmten Verlauf. Diesen gekrümmten Verlauf könnte man als eine mit steigendem Molekulargewicht zunehmende Anzahl an Verzweigungen interpretieren. Dies wäre aber eine Fehlinterpretation, da man weiß, dass es sich bei der Hyaluronsäure um ein langkettiges Polysaccharid handelt, welches aus linearen Ketten aufgebaut ist. Die Krümmung im Mark-Houwink-Strukturplot rührt vielmehr daher, dass die Molekülketten mit steigender Länge immer flexibler werden und sich damit immer besser eine knäuelartige Struktur ausbilden kann. Daher verschiebt sich der  $a$ -Wert (Steigung) von  $>1$  bei kleinen Molekulargewichten hin zu  $0,7$  bis  $0,8$  bei sehr großen Molekulargewichten. Dieser Effekt ist im Bereich der synthetischen Polymere, z.B. bei den ebenfalls sehr kettensteifen Polyurethanen bekannt.

### Fazit

Hyaluronsäure ist ein langkettiges Polysaccharid welches aus linearen Ketten aufgebaut ist. Aufgrund Ihrer Verknüpfungsstruktur bildet die Hyaluronsäure sehr kettensteife Moleküle aus die in Lösung einen sehr großen hydrodynamischen Radius und somit auch sehr große intrinsische Viskositäten aufweisen. Daher müssen für eine erfolgreiche GPC/SEC-Analyse von Hyaluronsäureproben spezielle Bedingungen gewählt werden; die Trennsäule muss große Poren enthalten und die Konzentration der Proben sowie die Flussrate dürfen nicht zu hoch gewählt werden. Auch die Probenvorbereitung muss schonend verlaufen; zu hohe Scherraten und Temperaturen sind zu vermeiden. Beachtet man all diese Dinge dann können exakte und reproduzierbare GPC/SEC-Ergebnisse erzielt werden.

**Abbildung 1:**

Disaccharidwiederholungseinheit der Hyaluronsäure ( $-4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-$ )<sub>n</sub>



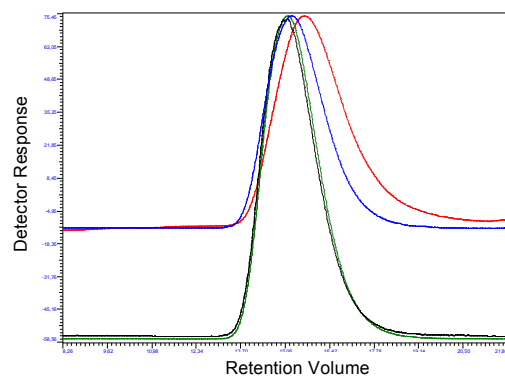
**Abbildung 2:**

Dreifachchromatogramm einer Hyaluronsäureprobe mit Ergebnissen

Rot = Brechungsindexdetektor, Blau = Viskositätsdetektor,

Grün = Rechtwinkel-Lichtstreuungsdetektor (RALS),

Schwarz = Kleinwinkel-Lichtstreuungsdetektor (LALS)



Ergebnisse:

Mw = 1,29 Millionen Dalton

Mn = 540.000 Dalton

Polydispersität = Mw/Mn = 2,38

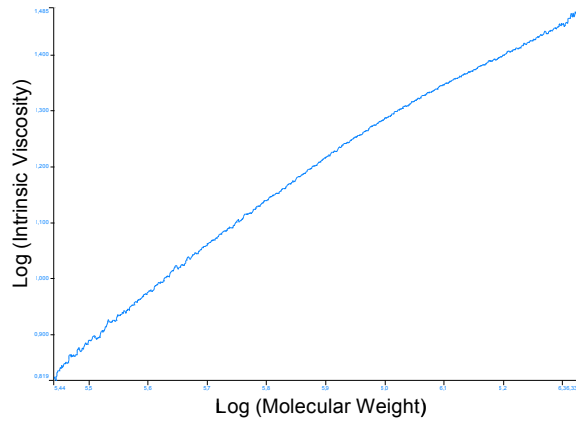
Intrinsische Viskosität in dl/g = 16,72

Hydrodynamischer Radius in nm = 65,40

Wiederfindungsrate in Prozent = 99,75

**Abbildung 3:**

Mark-Houwink-Plot einer linearen  
Hyaluronsäureprobe



Autor:

Dr. Gerhard Heinzmann

Malvern Instruments GmbH

Tel: +49 (0)7032 9777 0

Fax: +49 (0)7032 77854

e-mail: [gerhard.heinzmann@malvern.com](mailto:gerhard.heinzmann@malvern.com)

Web: [www.Malvern.de](http://www.Malvern.de)

[Weitere Informationen zu Viscotek](#)

[GPC / SEC Systemen von Malvern](#)