

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Hyaluronsäure

# Hyaluronsäure: Die Verbindung von Thixotropie und Gelpermeationschromatographie

Dr. Gerhard Heinzmann, Dr. Bernd Tartsch

In der Medizin und Kosmetikindustrie werden zunehmend komplexe Bio-Polysaccharide verwendet. Ein Beispiel ist die Hyaluronsäure die zur Behandlung von Gelenkerkrankungen und zur Faltenunterspritzung eingesetzt wird. Es ist wichtig dass diese zum Teil aus natürlichen Quellen stammenden Substanzen einer sehr eingehenden Qualitätskontrolle unterliegen. Eine Methode hierzu ist die Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC) mit Dreifachdetektion.

### Einleitung

Die Gelpermeationschromatographie ist eine etablierte Technik zur Bestimmung von Molekulargewichten und deren Verteilungen. Zunehmend wird diese aus dem Gebiet der synthetischen Polymere her sehr bekannte Technik auch für Biopolymere eingesetzt. Gerade mit der Kombination von Lichtstreuung, Viskositätsdetektion und Brechungsindexdetektion können Biopolymere umfassend charakterisiert werden; neben den absoluten Molekulargewichten können auch die Strukturen und hydrodynamischen Größen der Moleküle exakt bestimmt werden. Am Beispiel der Hyaluronsäure wird der hohe Informationsgehalt dieser Methode dargestellt.

### Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist ein natürlich vorkommender, makromolekularer Stoff der z. B. aus menschlichen Nabelschnüren und Hahnenkämmen extrahiert werden kann. Er findet zunehmend Anwendung in der Medizin und in der kosmetischen Chirurgie und wird daher auch in steigendem Maße biotechnologisch produziert. Hyaluronsäure hat einerseits eine sehr hohe Viskosität

und daneben noch eine zweite Eigenschaft, die sie zu einem der aufregendsten biologischen Materialien im menschlichen Körper macht. Diese Eigenschaft heißt *Thixotropie* und bedeutet, daß sich die Viskosität bzw. die Fließeigenschaften der Hyaluronsäure in Abhängigkeit von ihrer Beanspruchung ändern. Diese ungewöhnlichen Eigenschaften der Hyaluronsäure machen Sie im Bereich der GPC/SEC-Analytik zu einer schwierigen aber auch äußerst interessanten Applikation.

### Charakterisierung von Hyaluronsäure mit Kleinwinkel-Lichtstreuung (LALS) und Viskositätsdetektion

Die bereits angesprochene hohe Viskosität der Hyaluronsäure wird in der GPC/SEC sehr schnell sichtbar. Abbildung 1 zeigt ein Dreifachchromatogramm einer typischen Hyaluronsäureprobe (Lichtstreuung, Viskositätsdetektion, Brechungsindexdetektion). Der Viskositätspeak ist um ein Vielfaches größer als der Lichtstreupeak und der RI-Peak. Die Intrinsische Viskosität von 18,3 dl/g bei einem Molekulargewicht von 1,15 Mio Dalton ist nahezu zehnfach höher als z. B. bei einem Polystyrolmolekül mit vergleichbarem Molekulargewicht. Diese hohen Viskositäten sind bedingt durch eine sehr kettensteife Struktur der Hyaluronsäure. Diese ungewöhnliche Struktur wiederum führt dazu, dass bei der herkömmlichen GPC/SEC-Messung gegen eine Standard-Kalibrierkurve (z. B. Dextrane oder Pullulane) völlig falsche Werte für das Molekulargewicht resultieren, da die Elutionsvolumina der Standards stark von den Elutionsvolumina der Proben abweichen, und zwar dahingehend dass die Elutionsvolumina der Proben kleiner und die resultierenden Molekulargewichte der Proben somit deutlich zu groß sind.

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Hyaluronsäure

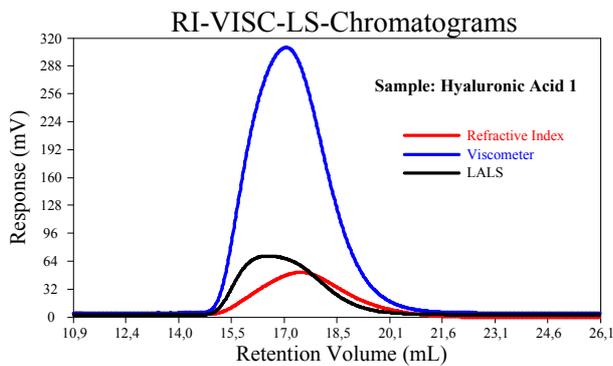


Abbildung 1: Dreifachchromatogramm einer Hyaluronsäure-Probe mit einem mittleren Molekulargewicht ( $M_w$ ) von 1.150.000 D und einer mittleren Intrinsischen Viskosität von 18,3 dl/g. Das Brechungsindexchromatogramm ist 5-fach überhöht dargestellt.



Abbildung 2: Viscotek Dreifachdetektor Modell TDA-302 mit Rechtwinkel- und Kleinwinkel-Lichtstreuungsdetektion ( $90^\circ$  und  $7^\circ$ ), Viskositätsdetektion und Brechungsindexdetektion

Da die Hyaluronsäuremoleküle bedingt durch die Kettensteifheit einen sehr großen molekularen Radius in Lösung aufweisen, ist nur ein Kleinwinkel-Lichtstreuungsdetektor (Low Angle Light Scattering (LALS) Detektor, [3]) in der Lage, die Molekulargewichte dieser Proben exakt und ohne jegliche mathematische Extrapolation oder Korrektur der Daten zu erfassen.

Zusätzlich zur Molekulargewichtsbestimmung über einen LALS-Detektor können die Viskositäten der Hyaluronsäureproben in einer GPC/SEC-Messung über einen Vierkapillar-Viskositätsdetektor erfasst werden, wie er z. B. im Viscotek Dreifachdetektor Modell TDA-302 enthalten ist (Abb. 2). Mit diesen Werten kann dann der sogenannte Mark-Houwink-Plot erstellt werden (logarithmische Auftragung des Molekulargewichtes gegen die Intrinsische Viskosität; Abb. 3), mit dessen Hilfe eine qualitative und quantitative Strukturbestimmung der Proben möglich ist [4].

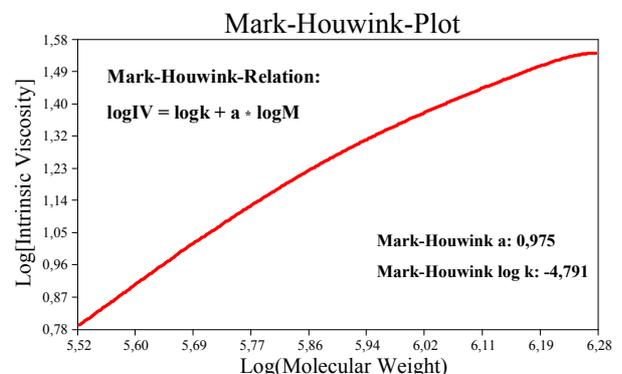


Abbildung 3: Mark-Houwink-Plot für eine Hyaluronsäure-Probe

Die Steigung des Mark-Houwink-Plots ist ein Maß für die Kompaktheit der gelösten Polymermoleküle. Ein  $a$ -Wert von 0,6 – 0,8 ist typisch für ein knäueförmiges Molekül, größere  $a$ -Werte wie z. B. 0,97 für die abgebildete Hyaluronsäureprobe weisen auf eine gestreckte, offenkettige Struktur hin, kleinere  $a$ -Werte wie z. B. 0,4 - 0,5 für Dextrane lassen auf eine kompakte, gegebenenfalls verzweigte Struktur schließen.

## **GPC/SEC mit Dreifachdetektion**

### **Application Note: Hyaluronsäure**

#### **Zusammenfassung**

Die Kleinwinkel-Lichtstreuung (LALS) ist die einzige GPC/SEC-Detektionsmethode, die Molekulargewichte von hochmolekularen Hyaluronsäureproben exakt und ohne jegliche mathematische Extrapolation oder Korrektur der Daten bestimmen kann. In Kombination mit einer Viskositätsdetektion kann die GPC/SEC mit LALS neben absoluten Molekulargewichten auch intrinsische Viskositäten, Größen und Strukturinformationen von makromolekularen Proben exakt und reproduzierbar bestimmen. Damit stellt diese Methode ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung von Hyaluronsäure sowohl im Bereich der Qualitätskontrolle als auch in Forschung und Entwicklung dar.

#### **Literatur:**

- [1] W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly: Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, Wiley & Sons, New York (1979)
- [2] S. Mori, H.G. Barth: Size Exclusion Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1999)
- [3] G. Heinzmann, R. Walkenhorst: Bestimmung von absoluten Molekulargewichten mittels GPC-Kleinwinkellichtstreuung, GIT Spezial – Separation (2002)
- [4] R. Walkenhorst: Polymercharakterisierung mit 3 Augen, GIT (1998)