

ヒアルロン酸の GPC/SEC 多角度光散乱分析

著者

Jasmin Preis*,
Friedhelm Gores, and
Günter Reinhold
*Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ヒアルロン酸の堅牢な GPC/SEC 多角度光散乱解析について説明します。従来の GPC/SEC と濃度検出器の組み合わせは見かけのモル質量を提供するだけですが、このセットアップには、絶対モル質量を得られるという利点があります。

はじめに

ヒアルロン酸 (HA) はグルクロン酸単位と N-アセチル-D-グルコサミン単位を連結した二糖類で構成される巨大分子です。HA の分子量は 5,000 から 20,000,000 Da の範囲で、最高 25,000 の二糖類単位を連結できます。ヒアルロン酸は、医療や化粧品の分野で多用されます。

ヒアルロン酸のモル質量分布の測定方法には GPC/SEC を選択します。オンライン多角度光散乱と示差屈折率検出器を組み合わせ、実際のモル質量を得ることができます。光散乱データ評価の屈折率増分 (dn/dc) は、オンラインまたはオフライン (専用機器を使用) で測定するか、もしくは文献から取得できます¹。

実験方法

表 1 を参照してください。

結果と考察

高モル質量サンプルを GPC/SEC 分析するには、GPC/SEC で流量を下げ、濃度を低くして、せん断により誘起された鎖延長やオーバーロードの影響を回避する必要があります。したがって、高モル質量の HA を分析するときに、ロード量、流量、粒子とポアサイズの観点で、GPC/SEC 条件とカラムを最適化する必要があります。

これらの問題を回避し、相互作用のないクロマトグラフィーを提供するには、大きめの粒子 (10 μm) と大型の Agilent SUPREMA 多孔性カラムを使用します。これは移動相として PBS pH 7.4 を使用したときの正確な GPC/SEC 測定には有益です。

表 1. 機器およびサンプル条件

	条件
ポンプ	イソクラテックポンプ 流量: 0.5 mL/min 移動相: リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4
注入システム	オートサンプラ 注入量: 100 μL
カラム	Agilent SUPREMA 10 μm プレカラム、8 \times 50 mm (p/n SUA080510) Agilent SUPREMA 10 μm 30 \AA 、8 \times 300 mm (p/n SUA0830103e1) Agilent SUPREMA 10 μm 10,000 \AA 、8 \times 300 mm (p/n SUA0830101e4) Agilent SUPREMA 10 μm 10,000 \AA 、8 \times 300 mm (p/n SUA0830101e4)
サンプル濃度	0.5 mg/mL
検出器	示差屈折率 (RI) 検出器 多角度光散乱検出器 (MALLS) @ $\lambda = 638 \text{ nm}$
検出器のセットアップ	Agilent ReadyVLS キット デキストラン/プルラン (p/n PSS-VLSKITR1PD20)
ソフトウェア	Agilent WinGPC

高モル質量標準溶液が不足しているため、光散乱検出の使用を推奨します。この検出手法により、実際のモル質量の測定も可能になります。GPC/SEC 多角度光散乱でモル質量を測定するとき、HA の含水率 (最高約 12 %) も考慮する必要があります。

ヒアルロン酸の dn/dc 値 0.165 は光散乱データの評価に使用されました²。

図 1 に、RI 検出器で測定されたスライス濃度とオンラインで測定されたモル質量を示します。サンプル回収率はほぼ 100 % で、これはすべての材料がカラムから溶出したことを示しています。溶出量とともにモル質量が明らかに減少していることは、モル質量については分離が達成されたことの証拠です。

図 2 にヒアルロン酸サンプルの累積分布を含む質量分布を示します。

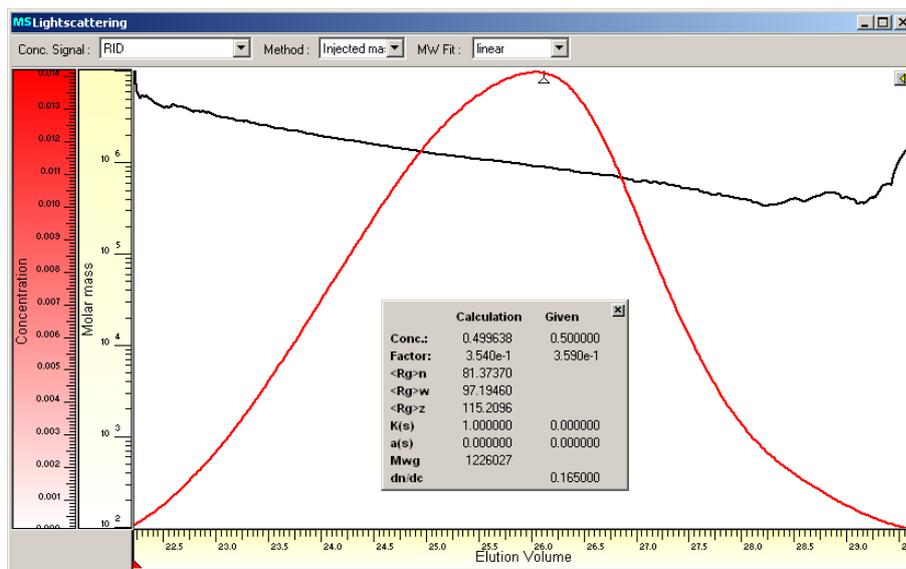


図 1. ヒアルロン酸サンプルの溶出図 (赤:RI 検出器のクロマトグラム (濃度)、黒:モル質量の測定値 (MALLS))

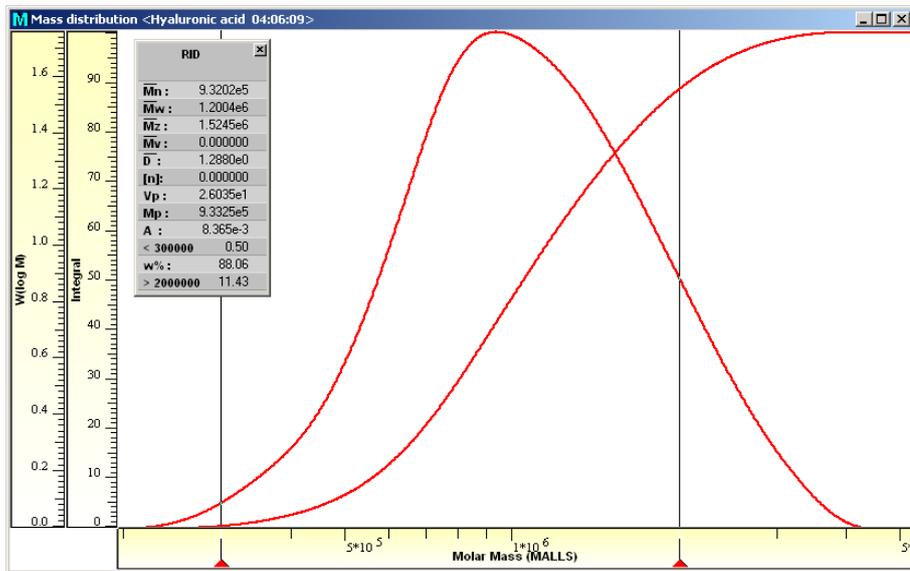


図 2. ヒアルロン酸サンプルのモル質量分布と累積分布

表 2 は、ブルラン標準を使用した従来のキャリブレーション (RI のみ、見かけのモル質量) と GPC/SEC 多角度光散乱分析から得られたヒアルロン酸サンプルのモル質量の平均を示しています。光散乱法で測定された重量平均分子量 (Mw) は、従来のブルラン検量線から得られた値の 3 分の 1 です。GPC/SEC は、溶液中の流体力学的サイズに基づいて分離を行うため、従来のキャリブレーションと GPC/SEC 多角度光散乱分析で得られたモル質量の差は、特定のモル質量におけるブルラン鎖の流体力学的サイズが、同一のモル質量の HA のサイズと比べて著しく小さいことを示します。

表 2. RI 検出器と MALLS により測定された分子量の比較

	ブルラン キャリブレーション*	MALLS
Mn [Da]	1,224,000	932,000
Mw [Da]	3,818,000	1,200,000
Mp [Da]	1,398,000	933,000

* 最高タンパク質分子量標準品:
Mp = 2,500,000 Da

結論

ヒアルロン酸を、Agilent SUPREMA カラム、および最適化された粒子とポアサイズを使用した GPC/SEC 多角度光散乱で分析して、堅牢な分離を実現し、信頼性の高い結果を得ることができます。ブルラン標準物質と RI 検出器に基づく従来のキャリブレーションでは、Mw が 3 倍も過大評価されます。実際の平均分子量値は、MALLS のような絶対検出器を使った場合に測定されます。

参考文献

1. Gupta, R. C. *et al.* Veterinary Pharmacology and Toxicology, Volume 6, **2019**.
2. Lavrenko, P. N.; Linow, K-J; Gornitz, E. *In* Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1992**, pp 517–531.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA44973.5730439815

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2023

Printed in Japan, March 2, 2023

5994-5701JAJP