

Ozan Halisçelik

Yüksek Kimyager / Chemist MSc

Servis Müdür Yardımcısı

Assistant Service Manager

Ant Teknik Cihazlar



KOZMETİK ÜRÜNLERDE HYALURONİK ASİT ANALİZİ

ANALYSIS OF HYALURONIC ACID

Kozmetik ve parfümeri ürünlerinde kalite kontrol, ürün geliştirme ve Ar-Ge çalışmaları, yasal gereksinimlere uyum gibi nedenlerle esans, koruyucu, hyaluronik asit ve SPF (güneş koruma faktörü) gibi farklı analizler talep edilmektedir. Bu analizler için HPLC, GC, GCMS, LCMSMS, UV-VIS-NIR gibi farklı analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Hyaluronik asit, D-N-asetilglukozaminin ve D-glukonik asitin dönüşümü olarak bağlandığı ve cilt, tendonlar, kaslar, kıkırdak, kan damarları ve beyin gibi dokularda vücuda dağıldığı bilinen ve moleküler ağırlığı 1,000,000'u aşan asidik bir mukopolisakariddir. Hyaluronik asit doğal olarak canlı organizmalarda bulunması nedeniyle, biyolojik uyumluluğu yüksektir ve cerrahi prosedürler gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Hyaluronik asitin vivo olarak aşamalı olarak parçalandığından, daha uzun süreler için geçerli olan daha yüksek molekül ağırlığına sahip Hyaluronik asit için artan bir ihtiyaç vardır. Hyaluronik asit aynı zamanda yüksek nemlendirme etkisine sahiptir ve bu nedenle kozmetik bir katkı maddesi olarak kullanılır. Hyaluronik asitin farmasötik formülasyon impüriteleri ve üretim aşaması fragmentleri LCMSMS ESI ile kontrol edilmektedir. Bu yazıda ise, hyaluronik asidin analizinde Boyut Eleme Kromatografisinin (SEC- Size Exclusion Chromatography) kullanımına örnekler verilecektir.

Various applications such as flavours, preservatives, hyaluronic acid and SPF (sun protection factor) in cosmetics and perfumery products are of concern due to quality control, product development and R&D studies and regulatory purposes. Several analytical techniques such as HPLC, GC, GCMS, LCMSMS, UV-VIS-NIR are used to meet the demands from cosmetics industry.

Hyaluronic acid is an acidic mucopolysaccharide in which D-N-acetylglucosamine and D-gluconic acid are alternately bonded, and is known to be distributed throughout the body in tissues such as the skin, tendons, muscles, cartilage, blood vessels and brain; with a molecular weight in excess of 1,000,000. Since hyaluronic acid exists naturally in living organisms, its high biocompatibility is of interest, and it has been used in applications such as surgical procedures. Since hyaluronic acid gradually degrades in vivo, there is a growing need for hyaluronic acids with higher molecular weights, which remain effective for longer periods. Hyaluronic acid also has a high moisturizing effect, and thus is used as a cosmetic additive. Pharmaceutical formulation impurities and production step fractions of hyaluronic acid are controlled by LCMSMS ESI. Here, we would like to introduce examples of the use of Size Exclusion Chromatography (SEC) for the analysis of hyaluronic acid.

Analysis of Standard Samples

Fig.1 shows the structural formula of hyaluronic acid. When using size-exclusion chromatography for the analysis of macromolecules that contain ionic dissociation groups, these ionic groups within the molecule will repel each other, causing the molecule to expand. These ionic interactions can be suppressed by adding a salt in the mobile phase. In particular, in the case of a hydrophilic molecule such as polysaccharides, the existence of any sort of ionic groups will frequently cause pattern deformation and unstable measurement results. In this example, sodium sulfate was used as the salt. The analytical conditions are shown in Table 1.

Fig. 2 shows an example of the analysis of sodium hyaluronate derived from rooster comb. The sample is dissolved to give a 0.1% concentration in the 50mM aqueous solution of sodium sulfate used as the mobile phase.

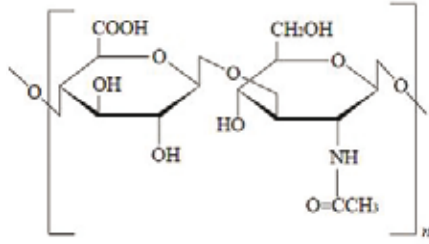
Fig. 3 shows an example of the analysis of sodium hyaluronate derived from human umbilical cord. In the same manner as with Fig.2, the sample is dissolved to give a 0.1% concentration in 50mM aqueous solution of sodium sulfate.



Standart Numunelerin Analizi

Şekil 1, hyaluronik asidin yapısal formülünü göstermektedir. İyonik ayrışma grupları içeren makro moleküllerin analizi için Boyut Eleme Kromatografisi kullanılırken, molekül içindeki bu iyonik gruplar birbirlerini iterek molekülün genişlemesine neden olur. Bu iyonik etkileşimler, mobil fazda bir tuz eklenerek baskılanabilir. Özellikle, polisakaritler gibi bir hidrofilik molekül olması durumunda, her türlü iyonik grubun varlığı sıklıkla model deformasyonuna ve dengesiz ölçüm sonuçlarına neden olacaktır. Bu örnekte, tuz olarak sodyum sülfat kullanılmıştır. Analitik koşullar Tablo 1'de gösterilmektedir.

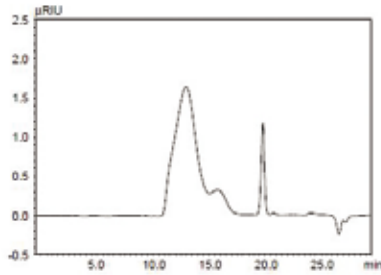
SHIMADZU Prominence Boyut Eleme Kromatografisi (SEC) Sistemi
SHIMADZU Prominence Size Exclusion Chromatography (SEC) System



Şekil 1. Hyaluronik Asidin Yapısal Formülü
Fig.1 Structural Formula of Hyaluronic Acid

Kolon	: Shodex OHPak SB-806M HQ x 2
Mobil Faz	: 50mM Na2SO4 Sulu Çözeltisi
Akış Hızı	: 1.0mL/dk
Kolon Sıcaklığı	: 40°C
Dedektör	: RID-10A
Enjeksiyon Hacmi	: 50µL

Tablo 1 Analitik Koşullar

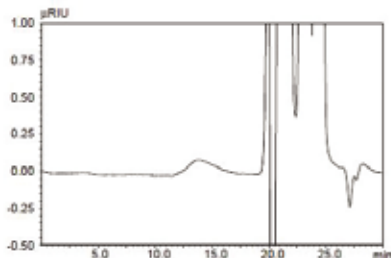


Şekil 3. İnsan Göbek Kordonundan Sodyum Hyaluronatın Kromatogramı.
Fig. 3 Chromatogram of Sodium Hyaluronate Derived from Human Umbilical Cord.

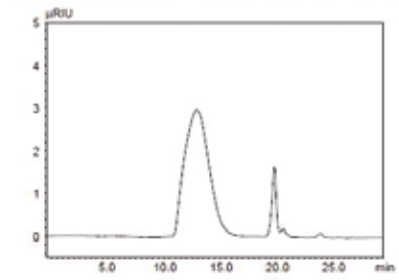
Şekil 2, horoz ibiğinden elde edilen sodyum hyaluronatın analiz örneğini göstermektedir. Numune, mobil faz olarak kullanılan 50mM sulu sodyum sülfat solüsyonunda %0,1 konsantrasyona gelecek şekilde çözünür. Şekil 3, insan göbek kordonundan türetilmiş sodyum hyaluronatın analiz örneğini göstermektedir. Şekil 2'deki ile aynı şekilde, numune, 50 mM sulu sodyum sülfat çözeltisi içinde %0,1 konsantrasyona gelecek şekilde çözünür.

Kozmetik Ürünlerin ve Alkolsüz İçeceklerin Analizi

Hyaluronik asit içerdikleri iddia edilen bazı kozmetik ürünleri ve alkolsüz içecekleri analiz ettik. Analitik koşullar Tablo 1'de gösterilmektedir. Şekil 4'te alkolsüz bir içeceğe, Şekil 5 ve Şekil 6'da ise sırasıyla kozmetik A ve kozmetik B ürünlerine ait kromatogramlar gösterilmektedir. Kozmetik A, mobil faz olarak kullanılan 50 mM sulu sodyum sülfat solüsyonunda 10 kat sulandırıldıktan sonra analiz edilmiştir. Alkolsüz içecek ve kozmetik B, seyreltme olmaksızın, ancak 0.45 µm gözenekli filtreden süzüldükten sonra analiz edilmiştir. 11 ile 17 dakika arasındaki tepe noktalarının (pik) Hyaluronik asit olduğu varsayılmaktadır.



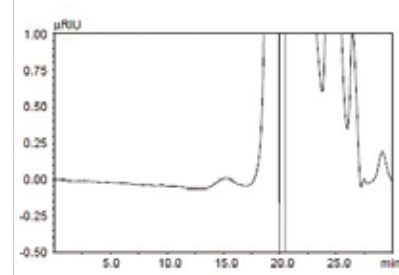
Şekil 5. Kozmetik A Ürününe Ait Kromatogram.
Fig. 5 Chromatogram of Cosmetic A.



Şekil 2. Horoz İbiğinden Elde Edilen Sodyum Hyaluronat'a Ait Kromatogram
Fig. 2 Chromatogram of Sodium Hyaluronate from Rooster Comb

Column	: Shodex OHPak SB-806M HQ x 2
Mobile Phase	: 50mM Na2SO4 Aqueous Solution
Flow Rate	: 1.0mL/min
Column Temp.	: 40°C
Detection	: RID-10A
Inj. Volume	: 50µL

Table 1 Analytical Conditions



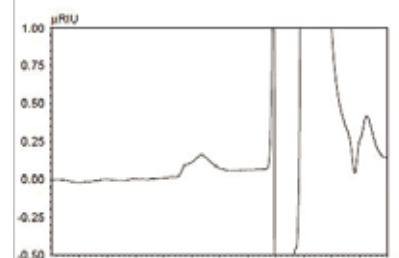
Şekil 4. Alkolsüz İçeceğe Ait Kromatogram.
Fig. 4 Chromatogram of a Soft Drink.

Analysis of Cosmetics and Soft Drinks

We analyzed some cosmetics and soft drinks that claim to contain hyaluronic acid. The Analytical conditions are shown in Table 1. Chromatograms are shown for a soft drink in Fig.4, cosmetic A in Fig.5, and cosmetic B in Fig.6. Cosmetic A was analyzed after being diluted 10-fold in a 50mM aqueous sodium sulfate solution used as the mobile phase. The soft drink and cosmetic B were analyzed without dilution, but after filtration through a 0.45µm pore filter. The peaks between 11 and 17minutes are presumed to be hyaluronic acid.

Referanslar\References

•Shimadzu Uygulama Notu, HPLC No. L322.



Şekil 6. Kozmetik B Ürününe Ait Kromatogram.
Fig. 6 Chromatogram of Cosmetic B