

CHROM. 5619

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANALYTISCHE
VERFAHREN ZUR AUFTRENNUNG SAURER MUCOPOLYSACCHARIDEI. UNTERSUCHUNG SÄULENCHROMATOGRAPHISCHER
TRENNVERFAHREN

R. BOHN UND D. A. KALBIEN

Pharmakologisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (B.R.D.)*

(Eingegangen am 5. August 1971)

SUMMARY

Comparative studies on analytical methods for the separation of acidic mucopolysaccharides. I. Column chromatographic techniques

A comparative study was made of the efficiency of some most frequently used column chromatographic techniques for the separation of acidic mucopolysaccharides. The investigation showed that cetylpyridinium chloride cellulose and DE-52 cellulose were superior to all other column supports tested (Dowex 1 X2; Zerolit H-IP, SRA 132; DEAE-Sephadex A-25; QAE-Sephadex A-50; ECTEOLA-cellulose). However, in no case a complete separation of a mixture containing hyaluronic acid, keratan sulphate, chondroitin sulphate A, chondroitin sulphate C, dermatan sulphate, heparan sulphate, and heparin could be achieved.

EINFÜHRUNG

Die ausführlichen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte über Pathologie und Verlauf zahlreicher Gewebeerkrankungen haben gezeigt, dass zwischen Alterationen des Bindegewebes und charakteristischen Verschiebungen seiner Mucopolysaccharid (MPS)-Zusammensetzung enge Zusammenhänge bestehen. Um genaue Einblicke in diese Vorgänge zu gewinnen, ist die Kenntnis des MPS-Verteilungsmusters von grosser Bedeutung. Aus diesem Grunde sind in den letzten Jahren viele Verfahren entwickelt und beschrieben worden, die sich mit dem Nachweis, der Auftrennung und Bestimmung dieser Stoffe befassen¹⁻²².

Die Vielzahl der aufgeführten Verfahren lässt bereits vermuten, dass zur Beantwortung einer bestimmten Fragestellung nicht alle Methoden in gleichem Masse geeignet sind. Daher erschien uns eine kritische Überprüfung und Durchsicht dieses umfangreichen Materials im Hinblick auf die Auftrennung saurer MPS angebracht.

Aus der Reihe der eingangs erwähnten analytischen Verfahren nehmen chromatographische Trennmethode — unter ihnen vor allem säulenchromatographische

* Direktor: Prof. Dr. R. DOMENJOZ.

Verfahren — einen besonders breiten Raum ein. Aus diesem Grunde konzentrieren sich die nun folgenden Untersuchungen auf diese Verfahren.

MATERIAL UND METHODIK

Als Untersuchungsmaterial dienten uns folgende MPS-Vergleichssubstanzen, die sämtlich als Na-Salze vorlagen: Hyaluronsäure, HY (Light & Co., London); Keratansulfat, KS (Dr. GREILING, Aachen); Heparansulfat, HS (Dr. CIFONELLI, Chicago); Chondroitin-4-sulfat, CSA (Dr. CIFONELLI, Chicago); Chondroitin-6-sulfat, CSC (Dr. CIFONELLI, Chicago); Dermatansulfat, DS (Dr. CIFONELLI, Chicago); und Heparin, HE (Light & Co., London).

Die als Säulenmaterial verwendeten Stoffe sind in der Tabelle I aufgeführt. Die Aufbereitung des Säulenmaterials und die Packung der Chromatographiesäulen erfolgte entsprechend den allgemeinen Vorschriften der Herstellerfirmen und den Angaben der einzelnen Autoren.

TABELLE I

CHARAKTERISTIKA DER ALS SÄULENMATERIAL VERWENDETEN STOFFE

<i>Material</i>	<i>Körnung</i> (<i>mm</i> $\times 10^{-3}$)	<i>Kapazität</i> (<i>mäqtic./g</i>)	<i>Hersteller- oder</i> <i>Bezugsfirma</i>
Dowex 1 X2	70-130	3.6	Serva, Heidelberg
QAE-Sephadex A-50	40-120	4-5	Pharmacia, Uppsala
DEAE-Sephadex A-25	40-120	3.5	
G-25 Sephadex	20-80	—	
Zerolit H-11, SRA-132 Vernetzung: 7-9%	70	3-4	Serva, Heidelberg
DE-52-Celluloseaustauscher (microgranular preswollen)	30	1	Whatman, London
ECTEOLA-Celluloseaustauscher	20-50	0.20	Serva, Heidelberg
Cellulosepulver Typ Nr. 123a	—	—	Schleicher und Schüll, Dassel

Wie aus der Tabelle II hervorgeht, wurden die Formate der Chromatographiesäulen so gewählt, dass sie ein Verhältnis von Durchmesser zu Höhe von mindestens 1:10 bis 1:20 aufwiesen.

Vor dem Auftragen wurde das Untersuchungsmaterial gewöhnlich in Wasser aufgenommen, für die Chromatographie an Dowex 1 X2 in 0.05 N Natronlauge gelöst. Die aufgetragene Probenmenge lag — entsprechend der Kapazität und Menge des jeweils verwendeten Austauschers — zwischen 1 und 250 mg MPS.

Ausser bei der Chromatographie an Cellulosesäulen, die mit Cetylpyridiniumchlorid gespült wurden ("CPC-Cellulose") und auf die noch näher eingegangen wird, erfolgte die chromatographische Trennung an den anderen Säulen bei Raumtemperatur.

Die Fraktionierung der MPS an den Ionenaustauschern wurde durch Gradienten-

TABELLE II

CHARAKTERISTISCHE DATEN DER ZUR CHROMATOGRAPHIE VERWENDETEN SÄULEN

Säulenmaterial	Säulenformat Durchm. × Höhe in cm	Volumen der Säulenfüllung (ml)	Durchfluss- geschwindigkeit (ml/h)	Volumen der aufgefangenen Fraktionen (ml)	
Dowex 1 X2	1 × 100	78	60	10	
	1.5 × 45	80	120	10	
	1 × 20	10	80	2	
Sephadex					
	A-25	1.5 × 45	80	115	5
	QAE	1.5 × 45	80	110	5
G-25	2.5 × 40	105	120	10	
Zerolit II-IP, SRA-132	1.5 × 45	80	120	10	
DE-52-Celluloseaustauscher	1.5 × 45	80	100	10	
	1 × 20	10	40	2	
ECTEOLA-Cellulose	1.5 × 45	80	100	10	
Cellulosepulver Typ Nr. 123a	1.5 × 45	80	110	10	
	1 × 20	10	60	2	

tenelution durchgeführt, bei der die Polyanionen durch stufenweise oder kontinuierliche Erhöhung der Ionenstärke in der Elutionslösung nach steigender Affinität zum Austauscher desorbiert werden.

Zur Verfolgung des Fraktioniervorganges eignete sich besonders die von uns bereits an anderer Stelle beschriebene "CPC-Methode"²³, mit der das Säuleneluat, das in einem automatisch arbeitenden Fraktionscollector (Gilson-Medical, Middleton, Wisc., U.S.A.) aufgefangen wurde, während der Chromatographie kontinuierlich auf seinen MPS-Gehalt untersucht wurde. Die weitere Analyse der anfallenden MPS-Fraktionen erfolgte durch colorimetrische¹⁻⁸ und enzymatische²¹ Bestimmungsmethoden.

ERGEBNISSE

Für die Beurteilung der untersuchten säulenchromatographischen Trennverfahren war es wichtig, das Elutionsverhalten und die prozentuale Wiederfindung der einzelnen MPS genau zu erfassen. Dabei ergaben sich für die von uns verwendeten Austauschertypen deutliche Unterschiede, die aus den nachfolgenden Tabellen zu ersehen sind.

Chromatographie an Dowex 1 X2

Die Untersuchungsergebnisse, die wir bei der Chromatographie der MPS an Dowex 1 X2-Austauscher mit den eingangs erwähnten Methoden erhielten, sind in Tabelle III dargestellt. Während die Hyaluronsäure wegen ihrer geringen Ionenstärke fast quantitativ von den übrigen MPS abgetrennt werden konnte, war eine weitere Auftrennung der übrigen Substanzen nicht möglich; sie überlagerten sich deutlich in unterschiedlicher Menge bei allen Konzentrationsstufen des Gradienten.

TABELLE III

ELUTIONSVERHALTEN DER MPS BEI DER CHROMATOGRAPHIE AN DOWEX 1 X₂ UND PROZENTUALE WIEDERFINDUNG IN DEN FRAKTIONEN

MPS	Molarität der NaCl-Elutionslösung					
	0,5	1,0	1,25	1,5	2,0	3,0
HY	98,5					
KS			12,0	20,3	17,8	28,7
CSA/C			3,8	67,0	17,5	9,5
DS			10,2	26,0	37,5	26,5
HS			82,5	11,2	6,3	
HE			2,5	40,5	40,0	8,0

Nach Untersuchungen von SCHILLER *et al.*²⁰ und TELLER UND ZIEMANN¹⁰ liessen sich an diesem Austauscher Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Heparin scharf voneinander trennen, wobei die Substanzen nahezu quantitativ bei einer charakteristischen Kochsalzkonzentration eluiert wurden. Auch wir konnten zeigen, dass die Elution der Hauptmenge dieser MPS mit den dafür angegebenen Lösungsmittelkonzentrationen erfolgte; jedoch stellten wir wiederholt fest, dass ein Teil der MPS auch bei anderen Salzkonzentrationen eluiert wurde und somit eine gute Separation unmöglich machte.

Da die MPS — wie bereits erwähnt — starken Schwankungen hinsichtlich ihres Proteinanteils, ihrer Struktur und Ionenstärke unterworfen sind, müssen als mögliche Ursache für die verschiedenen Ergebnisse vor allem Unterschiede in den verwendeten Vergleichssubstanzen angenommen werden. Weiterhin muss bemerkt werden, dass durch die starke Schrumpfung des Dowex-Harzes bei steigender Salzkonzentration der Säulenfluss während der Chromatographie verlangsamt und das Trennergebnis verändert werden kann. Auch die molekulare Struktur des verwendeten Austauschers ist für das säulenchromatographische Trennergebnis von Bedeutung. Im Gegensatz zu Cellulose- und Sephadex-Ionenaustauschern besitzen die Sorbentien auf Kunstharzbasis eine wesentlich geringere innere Oberfläche. Da das Netzwerk ihrer Matrix sehr engmaschig ist, wird die Diffusion von Polyelektrolyten in das Innere der Austauscherteilchen herabgesetzt und die Zugänglichkeit zu den austauschaktiven Gruppen erschwert. Diese Eigenschaften bedingten bei unseren Trennversuchen an Dowex 1 X₂ in vielen Fällen einen undeutlichen Übergang zwischen den einzelnen Substanzpeaks.

Chromatographie an DE-52 Cellulose-Austauscher

Im Gegensatz zur Chromatographie der MPS an Dowex 1 X₂ zeigte ihre Fraktionierung an einem Cellulose-Austauscher DE-52 (microgranular preswollen) bessere Ergebnisse. Um mit diesem schwach-basischen Austauscher die maximalste Kapazität zu erzielen, arbeiteten wir in unseren Trennversuchen in saurem Milieu, da nur in diesem pH-Bereich alle tertiären Aminogruppen des Anionenaustauschers ionisieren.

Wie aus der Tabelle IV zu entnehmen ist, liessen sich Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat in dieser Versuchsanordnung nahezu quantitativ voneinander trennen. Ausser Keratansulfat und Heparin, die über einen grösseren Molaritätsbereich eluiert wurden, erschienen die übrigen MPS bei einer definierten

Salzkonzentration des Elutionsmittels zu etwa 0,5% in scharf voneinander abgesetzten Zonen. Die Auftrennung der stereoisomeren Chondroitinsulfate A und C sowie die vollständige Separation von Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin war mit diesem Austauscher jedoch nicht zu erreichen.

TABELLE IV

ELUTIONSVERHALTEN UND PROZENTUALE WIEDERFINDUNG DER MPS BEI IHRER FRAKTIONIERUNG AN EINER DE-52 CELLULOSE-SÄULE

MPS	0.05 M HCl	Molarität des Elutionsmittels (NaCl in 0.05 M HCl)			
		0.5	0.75	1.0	2.0
HY	99.1	1.0	—	—	—
KS	31.0	33.2	30.2	—	—
CSA/C	—	98.5	1.5	—	—
DS	—	—	97.4	2.0	—
HS	—	4.1	95.0	—	—
HE	—	—	24.5	50.8	18.7

Neben den günstigen Trenneigenschaften ist es ein weiterer Vorteil dieses Austauschers, dass die Volumenänderung des Säulenbettes während der Chromatographie gering ist. Dadurch bleibt die Säulendurchflussgeschwindigkeit konstant und es werden gut reproduzierbare Versuchsergebnisse erhalten.

Chromatographie an CPC-Cellulosesäulen

Ähnliche Eigenschaften, wie die des beschriebenen DE-52 Cellulose-Austauschers, hatten auch Säulen, die mit Cellulosepulver gefüllt waren. Zur Auftrennung der MPS an derartigen Säulen werden die aufgetragenen Substanzen zunächst auf dem Austauscher mit einer 1%igen Cetylpyridiniumchlorid-Lösung gefällt; die dabei gebildeten Mucopolysaccharid-Cetylpyridiniumchlorid-Komplexe werden dann — gemäss ihrer Beständigkeitskonstanten — durch verschiedene Konzentrationen der Magnesiumchlorid-Elutionslösung zerlegt und die Polysaccharide nach steigender Ionenstärke getrennt.

Mit dieser Methode, die von einigen Autoren zur Fraktionierung der MPS benutzt worden ist^{13,17}, erhält man scharf voneinander abgesetzte Peaks. So wird Keratansulfat, das in überschüssiger Cetylpyridiniumchlorid-Lösung löslich ist und im Durchfluss erscheint, nahezu quantitativ von der Hyaluronsäure, die bei 0.3 M NaCl eluierbar ist, getrennt. Demgegenüber kommt es jedoch bei der Auftrennung von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparin zu starken Überlagerungen.

Mit einer einfachen Modifikation dieser Versuchsanordnung, die auch von ANTONOPOULOS UND GARDELL¹² und SVEJCAR UND ROBERTSON²² beschrieben wurde, konnten wir, wie aus der Tabelle V hervorgeht, eine weitere Auftrennung dieser Stoffe erzielen. Jede Elutionslösung enthielt zusätzlich 0.05% CPC; um eine Ausfällung der Salze auf der Säule und in der Elutionslösung zu vermeiden, wurde die Chromatographie bei einer konstanten Temperatur von 25° vorgenommen. Da die in 1%iger CPC-Lösung äquilibrierte Cellulose im Verlauf von einer Woche 5% ihrer Kapazität verlor, verwendeten wir für jede Säule neues Füllmaterial.

TABELLE V

ELUTIONSVERHALTEN UND PROZENTUALE WIEDERFINDUNG DER MPS BEI DER FRAKTIONIERUNG AN EINER CPC-CELLULOSE-SÄULE

MPS	1% CPC	0.3 M NaCl	Molarität der MgCl ₂ -Elutionslösung		
			0.75	1.0	1.5
HY	1.1	98.9	—	—	—
KS	98.5	1.5	—	—	—
CSA/C	—	—	98.2	1.8	—
DS	—	—	99.3	3.7	—
HS	—	—	99.2	0.8	—
HE	—	—	—	45.5	74.5

In wiederholten Trennversuchen zeichnete sich bei der Chromatographie der MPS an einer CPC-Cellulose-Säule das in der Tabelle V wiedergegebene Elutionsverhalten der einzelnen Stoffe ab. Während die Auftrennung der Hyaluronsäure und des Keratansulfates nahezu quantitativ gelang, erschien der Hauptanteil der Chondroitinsulfate, des Dermatansulfates und des Heparansulfates in einer Fraktion bei einer Konzentration von 0.75 M MgCl₂ in der Elutionslösung. Das Heparin liess sich mit dieser Versuchsanordnung von den übrigen MPS abtrennen, da der gebildete Heparin-Cetylpyridiniumchlorid-Komplex erst durch höhere Salzkonzentrationen in der Elutionslösung zerlegt wird.

Chromatographie an Cellulosepulversäulen

Eine weitere Methode zur Fraktionierung von MPS an Cellulosesäulen ist von GARDELL¹⁶ beschrieben worden. Hierbei werden die MPS mit Bariumacetat bei verschiedenen Äthanolkonzentrationen präzipitiert und eluiert. Unsere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass dieses Verfahren gegenüber den vorher beschriebenen keine Vorteile bietet, da damit nur Chondroitinsulfat und Heparansulfat getrennt werden konnten.

Chromatographie an ECTEOLA-Cellulose

Wenig erfolgreich waren auch Trennversuche an ECTEOLA-Cellulose, wie sie von GREILING UND STUHLSATZ¹⁷ und RINGERTZ UND REICHARD¹⁸ durchgeführt wurden. In unseren Versuchen, deren Ergebnisse in Tabelle VI dargestellt sind, zeigt sich deutlich, dass die Hyaluronsäure als nicht sulfatiertes Polyanion bei dem sauren Milieu während der Chromatographie nicht vom Austauscher gebunden wird und somit im Durchlauf erscheint. Damit ist es möglich, sie von den anderen MPS abzutrennen. Die Chondroitinsulfate, das Keratansulfat und das Heparin wurden dagegen in mehrere Unterfraktionen zerlegt, die sich bei allen Molaritäten der Elutionslösung überlagerten, so dass eine Auftrennung dieser Substanzen in keiner Weise möglich war.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von GREILING UND STUHLSATZ¹⁷ konnten wir die sulfatierten MPS mit diesem Verfahren erst bei höheren Molaritäten eluieren, was wahrscheinlich auf einen verschiedenen Sulfatierungsgrad der benutzten Standardsubstanzen zurückzuführen ist.

TABELLE VI

ELUTIONSVERHALTEN UND PROZENTUALE WIEDERFINDUNG DER MPS BEI IHRER FRAKTIONIERUNG AN EINER ECTEOLA-CELLULOSE-SÄULE

MPS	0.05 M HCl	Molarität des Elutionsmittels (NaCl in 0.05 M HCl)						
		0.5	0.75	1.0	1.25	1.6	2.0	3.0
HY	98.6	—	—	—	—	—	—	—
KS	—	—	18.7	25.0	31.2	19.4	5.1	—
CSA/C	—	—	11.4	39.7	37.5	13.0	6.5	—
DS	—	—	8.6	20.3	26.5	31.1	12.1	1.1
HE	—	—	—	—	9.8	31.9	43.9	14.7

Die genannten Autoren konnten — nach vorheriger Gelfiltration an Sephadex G-25 und Ermittlung der Kettenlänge durch Uronsäure- und Endgruppenbestimmung — beweisen, dass es sich bei der Chromatographie nicht um eine mögliche Fraktionierung nach Kettenlängen handelt; sie vermuteten daher, dass das Elutionsverhalten der MPS lediglich durch deren Ionenstärke, d.h. durch die Anzahl der Sulfatgruppen, bestimmt wird. In diesem Falle müssten die MPS in den einzelnen Unterfraktionen einen steigenden Sulfatgehalt aufweisen.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die nach der Chromatographie an ECTEOLA-Cellulose erhaltenen Fraktionen gemäss ihren Uronsäurewerten vereinigt, eingengt und ihr Sulfatgehalt nach saurer Hydrolyse nephelometrisch bestimmt. Bei der Bildung der molaren Quotienten aus den Uronsäure- und Sulfatwerten konnten wir, wie in der Tabelle VII dargestellt ist, ein deutliches Ansteigen des Sulfatierungsgrades der MPS in den einzelnen Fraktionen feststellen, wodurch die Richtigkeit obiger Annahme bestätigt wird.

TABELLE VII

ANALYTISCHE DATEN DER BEI DER CHROMATOGRAPHIE VON CHONDROITINSULFAT AN ECTEOLA-CELLULOSE GEWONNENEN FRAKTIONEN

Molarität der Elutionslösung (NaCl)	Uronsäuregehalt in mMol pro ml Fraktionslösung	Sulfatgehalt in mMol pro ml Fraktionslösung	Molarer Quotient Uronsäure zu Sulfat
0.75	1.7	1.53	1.11
1.0	1.03	0.90	1.04
1.25	1.66	1.55	1.07
1.6	0.85	0.86	0.99
2.0	1.43	1.52	0.94

Chromatographie an Zerolit H-IP, SRA-132

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Chromatographie der MPS an ECTEOLA-Cellulose erhielten wir bei der Verwendung von Zerolit, einem gemischt basischen Kunstharzaustauscher, als Säulenmaterial. Wegen seiner grösseren Basizität verschiebt sich das Elutionsdiagramm der Polyanionen bei der Fraktionierung an diesem

Austauscher in Richtung höherer Molaritäten des Elutionsmittels; während der erste Chondroitinsulfatpeak bei der Chromatographie an ECTEOLA-Cellulose bei einer Konzentration von 0.75 *M* NaCl erscheint, erfolgt die Elution an Zerolit erst bei einer Gradientenkonzentration von 1.25 *M* NaCl. Mit Ausnahme von Hyaluronsäure, die bei einer Salzkonzentration von 0.5 *M* NaCl an diesem Austauscher desorbiert wurde, liessen sich die übrigen MPS in mindestens fünf Unterfraktionen auftrennen, die sich jedoch alle überlagerten und nicht voneinander unterschieden werden konnten.

Chromatographie an Sephadex Ionenaustauschern QAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephadex A-25)

Da die Matrix der DOWEX-Austauscher einerseits nur eine geringe Porenweite und die der Cellulose-Austauscher andererseits eine grosse Porenweite aufweisen, nehmen die in unsere Versuche einbezogenen Sephadex-Austauscher in Hinblick auf ihre Struktur und Chromatographieeigenschaften eine Mittelstellung ein. Ihre hydrophile, weitmaschige Dextran-Matrix ermöglicht eine günstige Diffusion der Polyelektrolyte zu den austauschaktiven Gruppen, wodurch sich bei der Chromatographie scharf voneinander abgesetzte Substanzpeaks erzielen lassen. Jedoch stellt die durch die Gelstruktur bedingte, mit Veränderungen der Ionenstärke des Elutionsmittels einhergehende Quellung und Schrumpfung dieser Sephadextypen eine unerwünschte physikochemische Eigenschaft dar, die sich bei der praktischen Durchführung der Fraktionierung und vor allem bei der Regeneration des Austauschers unangenehm bemerkbar macht. Erwartungsgemäss ist dieser unerwünschte Effekt bei den stark basischen Austauschern, die die grösste Volumenänderung zeigen, besonders deutlich ausgeprägt. Während der Fraktionierung kommt es dadurch zu einer Verlangsamung des Säulendurchflusses, die einen ungünstigen Einfluss auf die Chromatographiedauer und das Trennergebnis hat. So schrumpfte in unseren Versuchen z.B. QAE-Sephadex A-50 während der Chromatographie mit einem Kochsalz-Gradienten (0.5–3.0 *M*) auf ein Achtel seines ursprünglichen Volumens.

Die Ergebnisse unserer Trennversuche mit DEAE-Sephadex sind in der Tabelle VIII dargestellt. Wie aus der Tabelle VIII zu entnehmen ist, wird die Hyaluronsäure — ähnlich wie bei den bereits erwähnten Austauschtypen — schon bei der niedrigsten Ionenstärke der Elutionslösung vom Austauscher desorbiert, während die übrigen MPS, überlagert, bei höheren Salzkonzentrationen eluiert werden. Eine hundert-

TABELLE VIII

ELUTIONSVERHALTEN UND PROZENTUALE WIEDERFINDUNG DER MPS BEI DER FRAKTIONIERUNG AN DEAE-SEPHADEX

MPS	Molarität des Elutionsmittels (NaCl in 0.01 <i>M</i> HCl)			
	0.5	1.25	1.5	2.0
HY	99.0	—	—	—
HS	—	78.1	21.9	—
CSA/C	—	—	92.2	7.8
DS	—	—	83.7	16.3
HE	—	—	82.3	17.7

prozentige Auftrennung von Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Heparin, wie sie von SCHMIDT²¹ mit dieser Methode erzielt wurde, konnten wir nicht erreichen.

DISKUSSION

Wie aus unseren vorstehend beschriebenen Versuchsergebnissen hervorgeht, erscheint eine völlige Fraktionierung aller von uns geprüften MPS an einem Ionenaustauscher nicht möglich.

Im Gegensatz zu einigen, in der Literatur beschriebenen Befunden^{10, 13, 20, 21} konnten wir immer eine gewisse "Überlagerung" der einzelnen Polyanionen feststellen. Das gilt besonders für die Chromatographie an Dowex 1 X2-Austauschersäulen, mit denen wir in keiner Weise die von SCHILLER *et al.*²⁰ und TELLER UND ZIEMANN¹⁰ beschriebene Auftrennung zwischen Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Heparin erhalten konnten.

Diese Differenzen in den Ergebnissen dürften zum grössten Teil auf die Heterogenität und biologische Varianz der untersuchten Stoffklasse zurückzuführen sein. Bei allen analytischen Versuchen ist zu berücksichtigen, dass die starken Schwankungen der MPS hinsichtlich Proteinanteil, Ionenstärke, Molekulargewicht und das Vorkommen von Hybriden die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse derartiger Trennversuche stark beeinträchtigen können.

Aus diesen Gründen erscheint eine exakte Analyse der MPS nur durch ein kombiniertes Verfahren möglich, bei dem die Substanzen weitgehend aufgetrennt und anschliessend mit geeigneten colorimetrischen Methoden näher bestimmt werden.

DANK

Für die Überlassung der Mucopolysaccharid-Vergleichssubstanzen sind wir Herrn Dr. H. GREILING, Aachen, und Herrn Dr. J. A. CIFONELLI, Chicago, zu grossem Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die gängigsten säulenchromatographischen Separationsmethoden im Hinblick auf ihre Trennleistung von sauren Mucopolysacchariden überprüft. Als Vergleichssubstanzen dienten Hyaluronsäure, Keratansulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin. Die besten Trenneffekte konnten bei der Anwendung von DE-52 Cellulose Anionenaustauschersäulen und mit Cetylpyridiniumchlorid gespülte Cellulosesäulen erhalten werden, die damit deutlich den verwendeten Kunstharzaustauschern Dowex 1 X2 und Zerolit H-1P, SRA-132 überlegen waren. Eine vollständige Separation eines Mucopolysaccharid-Gemisches an einem einzigen Säulentyp liess sich jedoch mit diesen Verfahren ebensowenig wie unter Einbeziehung weiterer Säulenmaterialien (DEAE-Sephadex A-25; QAE-Sephadex A-50; ECTEOLA-Cellulose) erzielen. Als Ursache für die wiederholt festgestellten "Überlagerungen" einzelner Polyanionen während eines Chromatographievorganges sowie für die geringe Reproduzierbarkeit einiger Trennmethoden werden die Heterogenität und grosse biologische Varianz der untersuchten Stoffklasse diskutiert.

LITERATUR

- 1 A. EBERHARD, *Dissertation*, Med. Fak., Bonn, 1966.
 - 2 T. BITTER UND H. MUIR, *Anal. Biochem.*, 4 (1962) 339.
 - 3 Z. DISCHE, *J. Biol. Chem.*, 107 (1947) 1189.
 - 4 L. A. ELSON UND W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1824.
 - 5 S. GOSIL, H. J. BLUMENTHAL, E. DAVIDSON UND S. ROSEMAN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1205.
 - 6 J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER UND L. F. LELOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 959.
 - 7 F. BERGLUND UND B. SÖRBÖ, *Acta Chim. Scand.*, 13 (1959) 2121.
 - 8 J. H. ROE, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 335.
 - 9 J. K. HERD, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 117.
 - 10 W. TELLER UND A. ZIEMANN, *Klin. Wochenschr.*, 44 (1966) 1142.
 - 11 G. MARZULLO UND J. W. LASIL, *Anal. Biochem.*, 183 (1967) 575.
 - 12 C. A. ANTONOPOULOS UND S. GARDELL, *Acta Chim. Scand.*, 17 (1963) 1474.
 - 13 C. A. ANTONOPOULOS, S. GARDELL, J. A. SZIRMAI UND E. R. DE TYSSONK, *Biochim. Biophys. Acta*, 83 (1964) 1.
 - 14 E. R. BERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 129.
 - 15 A. DELBRÜCK, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 409.
 - 16 S. GARDELL, *Acta Chim. Scand.*, 11 (1957) 608.
 - 17 H. GREILING, H. UND H. W. STUHLSATZ, *Z. Physiol. Chem.*, 330 (1964) 149.
 - 18 R. H. PEARCE, J. M. MATHIESON UND B. J. GRIMMER, *Anal. Biochem.*, 24 (1968) 141.
 - 19 N. R. RINGERTZ UND P. REICHARD, *Acta Chim. Scand.*, 14 (1960) 393.
 - 20 S. SCHILLER, G. A. SLOVER UND A. DOREMAS, *J. Biol. Chem.*, 230 (1961) 983.
 - 21 M. SCHMIDT, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 349.
 - 22 J. SVEJCAR UND W. V. ROBERTSON, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 333.
 - 23 R. BOHN, V. DINNENDAHL UND D. A. KALBIEN, *Z. Anal. Chem.*, 247 (1969) 312.
 - 24 V. DINNENDAHL, *Dissertation*, Math.-Nat. Fak., Bonn, 1970.
- J. Chromatogr.*, 62 (1971) 399-408