

CHROM. 5620

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANALYTISCHE
VERFAHREN ZUR AUFTRENNUNG SAURER MUCOPOLYSACCHARIDEII. KOMBINIERTES SÄULENCHROMATOGRAPHISCHES
TRENNVERFAHREN

R. BOHN UND D. A. KALBHEN

*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. II. Combined column chromatographic separation method

A combined chromatographic fractionation method for the complete separation of acidic mucopolysaccharides (MPS) is described, using cetylpyridinium chloride cellulose, DE-52 cellulose and Dowex 1 X 2 successively as column supports. As the results of our comparative studies showed, this method was found to give the best separation effects for all MPS in a mixture of hyaluronic acid, heparin sulphate, chondroitin sulphate A, chondroitin sulphate C, dermatan sulphate, keratan sulphate, and heparin. The amounts of MPS recovery during the fractionation differ from 66.2 % (for heparin sulphate) to 88.9 % (for heparin).

EINFÜHRUNG

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Auftrennung saurer Mucopolysaccharide (MPS) mussten wir wiederholt feststellen, dass zum Teil erhebliche Unterschiede in der Brauchbarkeit der bisher bekannten, veröffentlichten Methoden bestehen. Dabei ist noch zu unterscheiden, dass einige analytische Verfahren zur Charakterisierung einzelner MPS durchaus geeignet sind, nicht aber für die Auftrennung und Differenzierung eines MPS-Gemisches.

In unseren Versuchen¹ zeigte sich, dass dies besonders für elektrophoretische, papier- und dünnschichtchromatographische Methoden gilt. Bessere, wenn auch nicht immer voll befriedigende Ergebnisse liessen sich bei der Verwendung säulenchromatographischer Trennmethode erzielen.

Wie unsere vergleichenden Studien gezeigt haben, erscheint für die chromatographische Auftrennung von MPS-Gemischen die Verwendung von Ionenaustauschzellulose DE-52, und mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC) Cellulosepulver — neben dem

* Direktor: Prof. Dr. R. DOMENJOZ.

Austauscher Dowex 1 X 2 — als Säulenmaterial besonders günstig zu sein. Es sei an dieser Stelle nochmals auf die im Abschnitt Säulenchromatographie dargestellten Ergebnisse (Lit. 1) hingewiesen, aus denen hervorgeht, dass es bei der Verwendung von Dowex 1 X 2 zu beträchtlichen Überlagerungen der MPS kommt, während sie bei der Chromatographie dieser Stoffe an CPC-Cellulosesäulen nur gering (2–4 %) sind.

Obwohl uns die Säulenchromatographie wegen ihrer hohen Trennschärfe den übrigen Separationsmethoden weit überlegen erscheint, kann die Auftrennung einer Mischung vieler, verschiedener MPS an einer einzigen Ionenaustauschsäule nicht erreicht werden. Da während eines einzigen Fraktionierungsprozesses keine vollständige Separation des einen oder anderen MPS möglich war, lag es nahe, durch Kombination verschiedener Austausch- oder Cellulosesäulen einen Trennungsgang auszuarbeiten, mit dem die Bestimmung der qualitativen und quantitativen MPS-Verteilung in einem Substanzgemisch optimal erscheint. Für die Auswahl geeigneter Fraktioniermethoden erschien es uns notwendig und sinnvoll, das zu untersuchende Material bei der ersten Bearbeitung möglichst weitgehend aufzutrennen und mit den anschließenden Verfahren die Komponenten, die im ersten Schritt noch nicht völlig zu trennen waren, weiter zu fraktionieren.

Auf Grund der eingangs beschriebenen Untersuchungen hielten wir die Kombination eines stark basischen Anionenaustauschers (Dowex 1 X2) mit einem Celluloseaustauscher (DE-52) und mit CPC-gespültem Cellulosepulver als Säulenmaterial zur säulenchromatographischen Auftrennung der sauren MPS am besten geeignet.

ERGEBNISSE

In Fig. 1 ist die Anordnung und die Verwendung des von uns vorgeschlagenen Säulensystems in einem Trennschema dargestellt und wird im folgenden detailliert beschrieben.

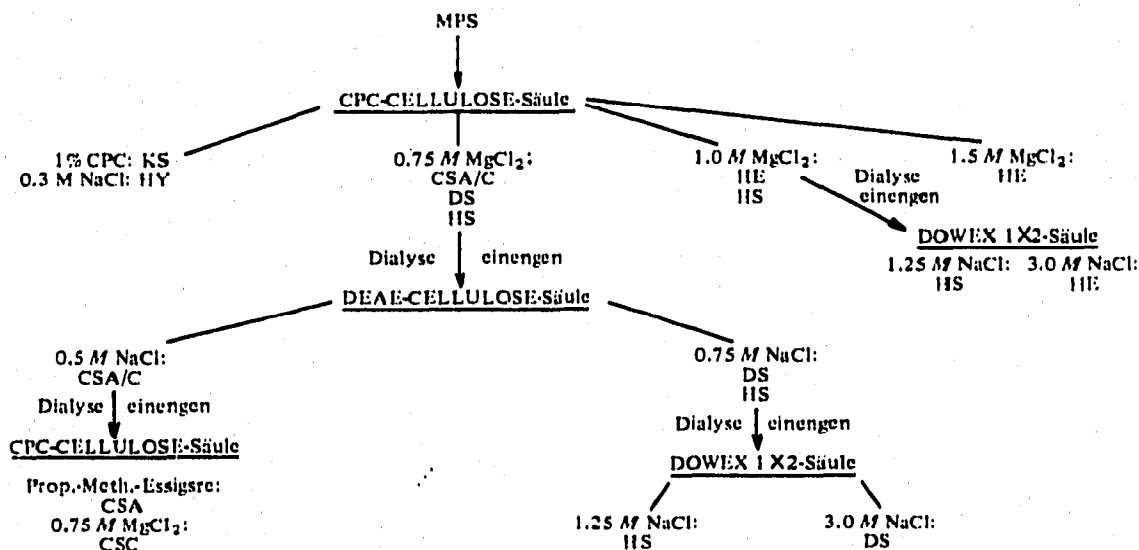


Fig. 1. Säulenchromatographischer Trennungsgang für saure MPS.

Das MPS-Gemisch wird zunächst an einer CPC-Cellulosesäule chromatographiert, wobei Keratansulfat, Hyaluronsäure und Heparin von den übrigen MPS abgetrennt und mit 1%iger CPC-Lösung, 0,3 M NaCl, 1,0 M und 1,5 M $MgCl_2$ eluiert werden.

Der Hauptanteil der Chondroitinsulfate, des Dermatansulfates und des Heparansulfates erscheint bei 0,75 M $MgCl_2$. Ein geringer Prozentsatz dieser Substanzen überlagert sich in der 1,0 M $MgCl_2$ -Fraktion mit Heparin. Der Anteil der Chondroitinsulfate und des Dermatansulfates in dieser Fraktion ist jedoch mit maximal 3,7% so gering, dass er vernachlässigt werden kann.

Das Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat enthaltende Gemisch wird nun zur Entfernung des Cetylpyridiniumchlorids und des Magnesiumchlorids über eine mit 1,5 M Natriumchloridlösung äquilibrierte Sephadex G-25-Säule gefiltriert. Dabei muss als Elutionslösung 1,5 M NaCl verwendet werden, damit eine mögliche Adsorption des Cetylpyridiniumchlorids an der Säule und dadurch bedingte MPS-Substanzverluste vermieden werden.

Die durch dieses Verfahren von Cetylpyridiniumchlorid abgetrennten MPS-haltigen Fraktionen werden zur Entfernung der 1,5 M Natriumchloridlösung nochmals an einer mit destilliertem Wasser äquilibrierten Sephadex G-25-Säule filtriert. Das Filtrat, in dem sich die Chondroitinsulfate, Dermatansulfat und Heparansulfat befinden, wird im Rotationsverdampfer oder durch Gefriertrocknung eingeeengt und an einer Celluloseaustauschsäule vom Typ DE-52 chromatographiert. Dabei lassen sich die Chondroitinsulfate (A und C) zu etwa 98,5% von dem restlichen Dermatansulfat-Heparansulfat-Gemisch abtrennen. Diese zuletzt genannten Substanzen können nach erneuter Entsalzung durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 an einem Dowex 1 X 2-Austauscher weiter fraktioniert werden, wobei eine etwa 82,5% Separation von Heparansulfat und Dermatansulfat erfolgt.

Die bei der Chromatographie des MPS-Gemisches an CPC-Cellulosesäulen enthaltenen Reste von Heparansulfat (etwa 10%) in der mit 1,0 M $MgCl_2$ gewonnenen Fraktion lassen sich ebenfalls an einem Dowex 1 X 2-Austauscher entfernen.

Da die in diesem Trennungsgang erwähnten Methoden keine Differenzierung zwischen Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat ermöglichen, kann zur näheren Charakterisierung der Chondroitinsulfattypen A und C eine Fraktionierung an einer CPC-Cellulose-Säule durchgeführt werden. Dieses von ANTONOPoulos und GARDELL² entwickelte und beschriebene Verfahren gestattete in unseren Versuchen eine Anreicherung des Chondroitin-4-sulfates zu etwa 75% in dem hierbei verwendeten Lösungsmittel (Propanol-Methanol-Eisessig-Wasser, 40:20:1,5:38,5).

Um die Leistungsfähigkeit und Brauchbarkeit dieses Trennungsganges zu demonstrieren, chromatographierten wir nach der oben beschriebenen Methode ein aus Vergleichssubstanzen hergestelltes MPS-Gemisch.

Auftrennung eines definierten Gemisches von Vergleichssubstanzen

Zur Durchführung dieses Trennversuches chromatographierten wir nach dem oben beschriebenen Trennungsgang ein Gemisch, das je 2 mg Hyaluronsäure, Keratansulfat, Heparansulfat und Heparin, je 1,5 mg Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat und 3 mg Dermatansulfat enthielt.

Der Ablauf der Chromatographie wurde einmal durch die Anwendung der automatischen Turbiditätsmessung mit der CPC-Reaktion, zum anderen durch quan-

titative Bestimmungen der Hexuronsäure-, Neutralzucker- und Sulfatgehalte in den einzelnen Fraktionen verfolgt.

Als Ergebnis der Chromatographie erhielten wir die in den Fig. 2-5 dargestellten Elutionsdiagramme, die das Verhalten und die Verteilung der MPS während der Fraktionierung wiedergeben.

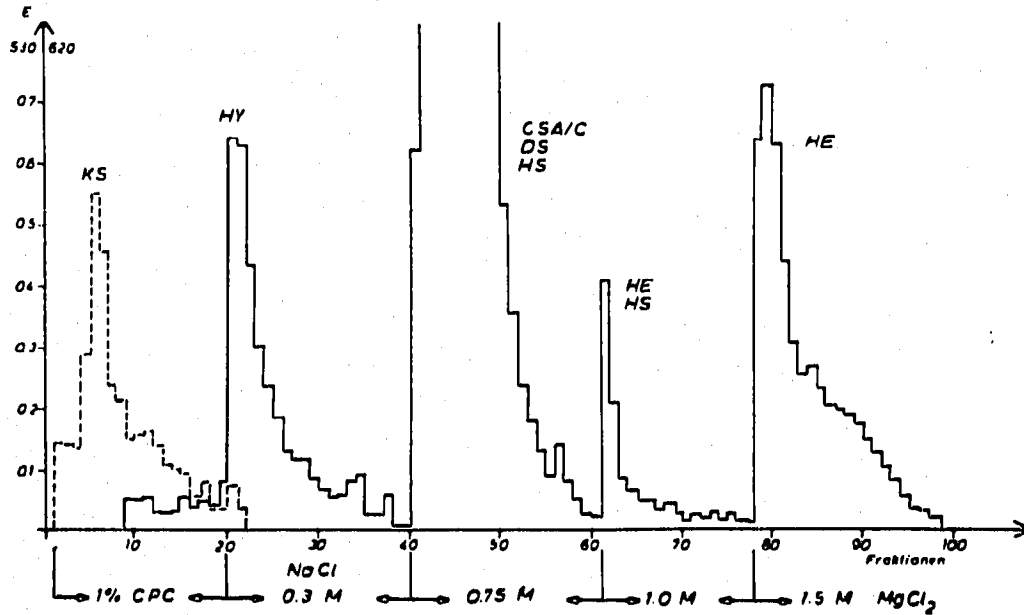


Fig. 2. Auftrennung eines Gemisches der MPS an einer CPC-Cellulosesäule. Unter den auf der Abzisse aufgetragenen Fraktionsnummern ist die Molarität der zur Elution verwendeten Salzlösung angegeben.

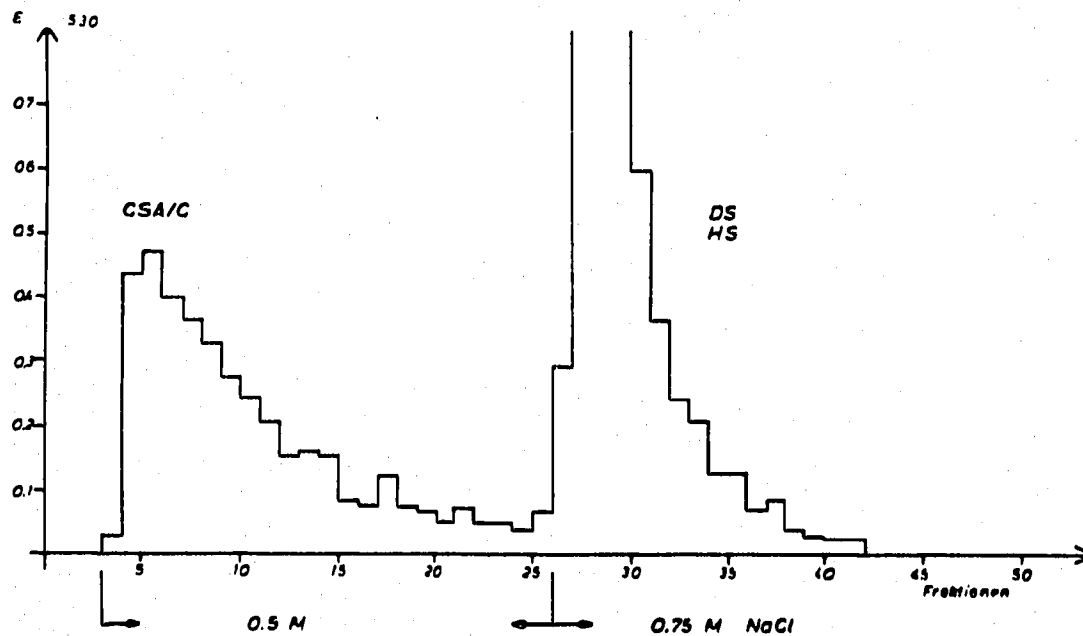


Fig. 3. Auftrennung von Chondroitinsulfat A und C, Heparansulfat und Dermatan-sulfat (0.75 M $MgCl_2$ -Fraktion aus Fig. 2) an einer Cellulose DE-52-Austauschsäule.

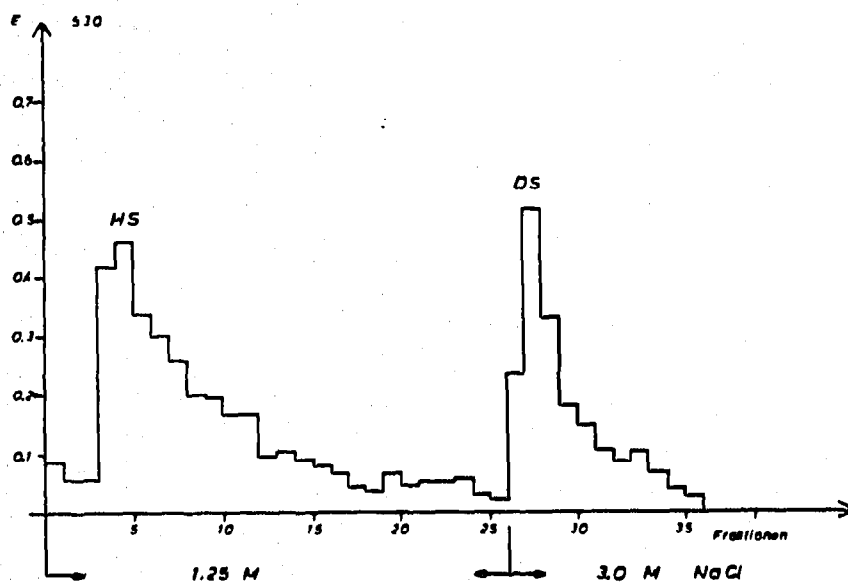


Fig. 4. Auftrennung von Heparansulfat und Dermatan-sulfat (0,75 *M* NaCl-Fraktion aus Fig. 3) an einer Dowex 1 X 2-Austauschsäule.

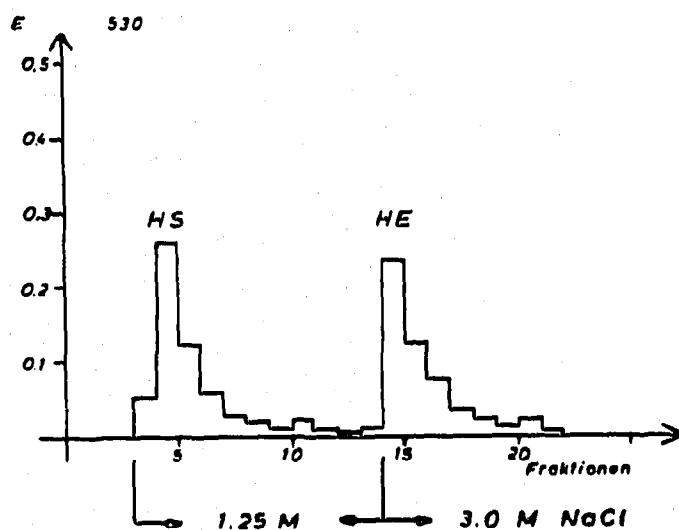


Fig. 5. Auftrennung von Heparansulfat und Heparin (1,0 *M* MgCl₂-Fraktion aus Fig. 2) an einer Dowex 1 X 2-Austauschsäule.

Wie aus den vorangegangenen Abbildungen zu entnehmen ist, konnten die einzelnen Substanzen mit dem verwendeten Verfahren scharf voneinander abgetrennt werden.

Zur weiteren Analyse wurden die den einzelnen Peaks entsprechenden Fraktionen vereinigt, eingengt und analysiert. Dabei erhielten wir die in Tabelle I aufgeführten Daten. Als Bezugswert für die Hexosamin- bzw. Hexuronsäureberechnung wurden die Analysenangaben von CIFONELLI UND MATHEWS³ zugrunde gelegt.

Auf Grund des unterschiedlichen Sulfatierungsgrades von Heparansulfat und Heparin wurden die mmol-Quotienten aus den gefundenen Sulfat- und Hexosamin-

TABELLE I

ANALYTISCHE DATEN DER NACH DEM TRENNUNGSGANG ERHALTENEN MPS-FRAKTIONEN

Fraktion Nr.	Elution bei Molarität	Uronsäure- bzw. Hexosegehalt (%/ml)	MPS-Gehalt (%/ml)	Sulfatgehalt	Hexosamin-Baustein	Abbau der Testes-hyaluronidase	Eluiertes MPS	Prozentuale Wiederfindung
I	0,3 NaCl	272	834	—	Glucosamin	+	HY	83,4
II	1% CPC	241	825	+	Glucosamin	—	KS	82,5
III	1,5 MgCl ₂ 3,0 NaCl	337	880	+	Glucosamin	—	HE	88,9
IV	1,25 NaCl	294	650	+	Glucosamin	—	HS	66,2
V	0,5 NaCl	292	1175	+	Galactosamin	+	CSA/C	78,3
VI	3,0 NaCl	137	1007	+	Galactosamin	—	DS	71,5

TABELLE II

CHARAKTERISTISCHE MMOL-QUOTIENTEN AUS DEN SULFAT- UND HEXOSAMINGEHALTEN FÜR HEPARANSULFAT UND HEPARIN.

MPS	Gefundener mmol-Quotient Sulfat/Hexosamin	Quotient nach Werten von CIFONELLI AND MATHEWS ³
HS	0,97	0,99
HE	2,03	2,33

werten beider Substanzen errechnet und zur Differenzierung herangezogen; das geringer sulfatierte Heparansulfat bildet, entsprechend den Angaben von CIFONELLI UND MATHEWS³, einen sehr viel kleineren Quotienten als Heparin (Tabelle II).

Aus den aufgeführten Analysendaten ergibt sich, dass die einzelnen MPS eines Gemisches in unterschiedlicher Ausbeute in den in Fig. 1 genannten Fraktionen wiedergefunden und aufgetrennt werden können.

Während die prozentuale Wiederfindungsrate für das Heparansulfat, das die grösste Überlagerung mit anderen Polyanionen zeigte (zu 10% mit Heparin, zu 18,4% mit Dermatansulfat), relativ gering war (66,2%), wiesen die übrigen MPS, wie aus Tabelle I hervorgeht, günstigere und mit den Ergebnissen anderer Autoren (TELLER UND ZIEMANN⁴) durchaus vergleichbare Werte auf. In keinem Fall konnten wir jedoch Ausbeuten von über 90% erzielen, wie sie etwa von ANTONOPOULOS *et al.*⁵ und SCHMIDT⁶ erhalten wurden.

DISKUSSION

Der von uns skizzierte Trennungsgang ist nicht als starres Schema aufzufassen, da Art und Reihenfolge der verwendeten Säulentypen sich auch modifizieren lassen. So gelingt z.B. die Trennung von Heparansulfat und Dermatansulfat nicht nur an einem Dowex 1 X 2-Austauscher, sondern auch an einem DEAE-Sephadex-Aus-

tauscher. Allerdings ist — wie bereits erwähnt — seine Handhabung wegen der grossen Volumenänderung während der Chromatographie schwieriger. Während der Chromatographie können die einzelnen Fraktionen kontinuierlich mit der für diesen Zweck entwickelten automatischen "CPC-Methode" untersucht werden. Dabei wird in vielen Fällen ein ausreichender Überblick über die MPS-Verteilung gewonnen, so dass bei einfachen Substanzgemischen der Trennungsgang in abgekürzter Form durchgeführt werden kann. Werden jedoch alle MPS im Untersuchungsmaterial vermutet, so muss der Trennungsgang vollständig durchgeführt und die einzelnen Polyanionen mit den üblichen Bestimmungsverfahren (Bausteinanalysen, enzymatischer Test usw.) qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Wie wir in unseren vergleichenden Studien gezeigt haben, sind Analyse und Auftrennung saurer MPS durchaus schwieriger, als dies häufig in verschiedenen Publikationen dargestellt wird. Die zum Teil recht unterschiedlichen Literaturbefunde dürften im wesentlichen auf die Heterogenität der MPS zurückzuführen sein. Neben unterschiedlichen Molekulargewichten und verschiedenen Ionenstärken (z.B. Sulfatierungsgrad) spielt dabei auch das häufige Vorkommen von Hybriden eine grosse Rolle. Diese biologische Varianz der MPS sollte daher bei allen weiteren analytischen Untersuchungen stärker als bisher berücksichtigt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein säulenchromatographischer Trennungsgang beschrieben, bei dem ein Gemisch verschiedener saurer Mucopolysaccharide nacheinander an einer mit Cetylpyridiniumchlorid gespülten Cellulose-DE-52 Cellulose- und Dowex 1 X2-Säule in seine einzelnen Bestandteile zerlegt und anschliessend mit geeigneten kolorimetrischen Verfahren exakt bestimmt werden kann. Wie sich zeigen liess, war mit diesem Separationsverfahren eine vollständige Auftrennung eines aus Vergleichssubstanzen hergestellten Gemisches von Hyaluronsäure, Keratansulfat, Chondroitinsulfat A und C, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin möglich, wobei die Wiederfindungsraten der einzelnen Polyanionen in den erhaltenen Fraktionen unterschiedlich gross waren. So betrug die Ausbeute für das Heparansulfat, das mit 18 % die grösste Überlagerungsquote mit anderen Vertretern der Stoffklasse aufwies, z.B. 66.2 %. Für die übrigen Polysaccharide schwankte sie zwischen 71.5 % (Dermatansulfat) und 88.9 % (Heparin):

LITERATUR

- 1 R. BOHN, *Dissertation*, Math.-Nat. Fak., Bonn, 1970.
- 2 C. A. ANTONOPOULOS UND S. GARDELL, *Acta Chim. Scand.*, 17 (1963) 1474.
- 3 J. A. CIFONELLI UND M. B. MATHEWS, persönliche Mitteilung.
- 4 W. TELLER UND A. ZIEMANN, *Klin. Wochenschr.*, 44 (1966) 1142.
- 5 C. A. ANTONOPOULOS, S. GARDELL, J. A. SZIRMAI UND E. R. DE TYSSONK, *Biochim. Biophys. Acta*, 83 (1964) 1.
- 6 M. SCHMIDT, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 346.
- 7 R. BOHN, V. DINNENDAHL UND D. A. KALBIEN, *Z. Anal. Chem.*, 247 (1969) 312.