

Untersuchungen an hochgereinigten Hyaluronsäuresolen.

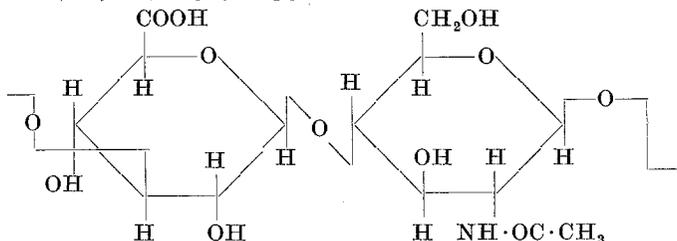
Von
M. Pantlitschko.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.

Mit 8 Abbildungen.

(Eingelangt am 7. Juni 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 19. Juni 1952.)

Hochmolekulare Substanzen, die bei der Hydrolyse Hexosamine, Uronsäuren und manchmal auch Schwefelsäure liefern und gewöhnlich als Mucoide bezeichnet werden, haben, wie die Forschungen der letzten Jahre zeigten, große Bedeutung in physiologischer und medizinischer Hinsicht erlangt. Zu diesen Mucoiden gehören unter anderem Hyaluronsäure, Heparin, Mucoitin- und Chondroitinschwefelsäure, Blutgruppensubstanzen, Kapselsubstanzen verschiedener Bakterien usw. K. Meyer¹ teilt die Mucopolysaccharide in neutrale und saure ein, wobei letztere wieder in einfach und komplex saure unterteilt werden können. Hyaluronsäure, die nach der oben gegebenen Einteilung zu den einfach sauren Mucopolysacchariden zu zählen ist, wurde erstmalig von K. Meyer und Palmer² aus den Glaskörpern tierischer Augen isoliert. Dieselben Autoren³ konnten einige Jahre später dasselbe Mucopolysaccharid aus Nabelschnüren isolieren und genauere Angaben über die chemische Zusammensetzung geben. Sie konnten feststellen, daß es sich um ein schwefelfreies Mucopolysaccharid handelt, das hochpolymeren Charakter hat und aus N-Azetylglucosamin und Glucuronsäure im Verhältnis 1:1 zusammengesetzt ist. Über die Art der Bindung der beiden Grundmoleküle wurden von K. H. Meyer und Mitarbeitern⁴ sowie von Jeanloz⁵ Untersuchungen angestellt. Sie kommen auf Grund der Perjodsäureoxydation zu dem Ergebnis, daß das Grundmolekül ein β -(1,4)-Glucopyranosido-(1,3)-N-Azetyl-glucopyranosamin ist.



¹ K. Meyer, Adv. Protein Chem. **2**, 249 (1945).

² K. Meyer und J. W. Palmer, J. biol. Chem. **107**, 629 (1934).

³ K. Meyer und J. W. Palmer, J. biol. Chem. **114**, 689 (1936).

⁴ K. H. Meyer, J. Fellig und Ed. H. Fischer, Helv. chim. Acta **34**, 939 (1951).

⁵ R. W. Jeanloz, Exper. **6**, 52 (1950).

Das Molekulargewicht wird auf Grund von Strömungsdoppelbrechungs-messungen, wobei Polydispersität festgestellt wurde, in den Grenzen zwischen 200 000 und 400 000 angenommen (Blix und Snellmann⁶). Chain und Duthie^{7, 8} identifizierten den von Duran-Reynals⁹⁻¹³ aufgefundenen Spreading-Faktor als ein hyaluronsäureabbauendes Ferment und nannten es Hyaluronidase. K. Meyer, Dubos und Smyth¹⁴ hatten schon 1936 aus Pneumokokken eine Mucinase isoliert, die ebenfalls imstande war, Hyaluronsäure abzubauen. Durch diese Untersuchungen ergaben sich wesentliche Zusammenhänge mit medizinischen Fragen, so daß in der Folge eine große Anzahl von Arbeiten erschienen sind, die sich sowohl mit dem Substrat als auch mit dem Ferment beschäftigen.

Vorkommen, Darstellung und Reinigung der Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure konnte aus Glaskörpern, Nabelschnüren, hämolytischen Streptokokken A und C, tierischen und menschlichen Gelenksflüssigkeiten, mesenchymalen Tumoren und aus der Haut der verschiedensten Säugetiere isoliert werden^{15, 16}. Ein Vergleich der Eigenschaften der aus verschiedenen Geweben gewonnenen Hyaluronsäure untereinander ist fast unmöglich, da verschiedene Isolierungsmethoden angewendet wurden und die Reinigung nicht immer bis zur absoluten Reinheit durchgeführt wurde. Dies ist vor allem darin begründet, daß die Hyaluronsäure mit Eiweißkörpern Komplexe unbekannter Zusammensetzung liefert, die chemisch voneinander nicht zu trennen sind, so daß meistens physikochemische bzw. biochemische Reinigungsmethoden angewendet werden müssen. Es ist somit die Frage berechtigt, ob Untersuchungen, die an solchen hochgereinigten, aber nicht nativen Hyaluronsäuren angestellt werden, überhaupt einen Einblick in die Aufgaben der Hyaluronsäure im Organismus geben können. Andererseits ist die Hyaluronsäure, wie wir aus ihrer Zusammensetzung wissen, mit ihren vielen reaktionsfähigen Gruppen in der Lage, die verschiedenartigsten Verbindungen zu bilden, und es wird schwer möglich sein, einen auch nur annähernd definierten Komplex mit gleichen Eigenschaften zu isolieren. Wohl aber ist es möglich, aus reinen Hyaluronsäuren unter genau bekannten Bedingungen, die selbstverständlich nicht den natürlichen entsprechen müssen, Symplexe aufzubauen, so daß man daraus Rückschlüsse auf die natürlich vorkommenden zu ziehen berechtigt ist.

Da es sich bei der Hyaluronsäure um ein hochmolekulares Kohlehydrat handelt, besitzt die Elementaranalyse als Reinheitskriterium nur wenig Wert. Der Stickstoffgehalt der Hyaluronsäure kann wohl einen Anhaltspunkt über grobe Verunreinigungen mit Eiweiß geben. Die Angabe eines korrigierten Stickstoffwertes, wie es manche Autoren getan haben, hat wenig

⁶ G. Blix und O. Snellman, Arkiv Kemi Mineral. Geol. A 19, No. 32 (1945).

⁷ E. Chain und E. S. Duthie, Nature 144, 977 (1939).

⁸ E. Chain und E. S. Duthie, Brit. J. Exp. Path. 21, 324 (1940).

⁹ F. Duran-Reynals, C. R. Soc. Biol. Paris 99, 6 (1928).

¹⁰ F. Duran-Reynals, J. exp. Med. 50, 527 (1929).

¹¹ F. Duran-Reynals, J. exp. Med. 55, 703 (1932).

¹² F. Duran-Reynals, J. exp. Med. 58, 161 (1933).

¹³ F. Duran-Reynals, Bact. Rev. 6, 197 (1942).

¹⁴ K. Meyer, R. J. Dubos und E. M. Smyth, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34, 816 (1936).

¹⁵ H. Gibian, Angew. Chem. 63, 105 (1951).

¹⁶ K. Meyer, Physiol. Rev. 27, 335 (1947).

Wert, da es sich zum Beispiel ohne weiteres um ein N-freies Kohlehydrat mit einer Verunreinigung von Eiweiß handeln kann. Die Abwesenheit von Phosphor und Schwefel ist jedoch ein wesentlicher Faktor bei der Beurteilung der Reinheit der Hyaluronsäure. Gerade dieser Punkt wurde von den bisherigen Untersuchern wenig beachtet, bzw. sind nur ganz wenige Angaben über schwefelfreie Hyaluronsäure vorhanden. Die Viskosität, die vielfach als Reinheitskriterium (je höher die Viskosität, desto reiner die Hyaluronsäure) herangezogen worden ist, kann nur unter ganz bestimmten Bedingungen als annäherndes Maß der Reinheit gewertet werden. Vergleiche der Viskositäten der Hyaluronsäure verschiedener Untersucher sind, auch wenn sie auf $\eta_{\text{spez.}}$ /pro Gramm gewählter Konzentration bezogen werden, mit großer Vorsicht zu bewerten.

Tabelle 1.

Autor	Ausgangsprodukt	Temperatur	c in g pro l	Salzkonzentration	η rel.	$\frac{\eta \text{ rel.}}{g}$	pH
<i>Meyer, Smyth Dawson</i> ¹⁷	Nabelschnur	20°	2,5	0,15 m NaCl	9,3	4,3	?
<i>Blix, Snellmann</i> ⁶	Nabelschnur	20°	1,0	0,067 m Phosphatp.	4,3	4,3	7,0
<i>Blix, Snellmann</i> ⁶	Synovialflüssigk.	20°	1,0	0,067 m Phosphatp.	2,5	2,5	7,0
<i>Haas</i> ¹⁸	Nabelschnur	25°	2,3	Borat, Phosphat, Chlorid, Azetat 0,34 m	2,0	1,4	7,0
<i>Madinaveitia, Quibbell</i> ¹⁹	Glaskörper (Tier)	25°	2,5	0,5 m NaCl	1,4	1,16	?
<i>Hadidian, Pirie</i> ²⁰	Nabelschnur	25°	1,0	0,05 Phosphatpuff. 0,05 m NaCl	8,2	8,2	7,0
<i>Seastone</i> ²¹	Streptokokken	21°	1,0	0,15 m NaCl	3,8	3,8	?
<i>K. H. Meyer et al.</i> ⁴	Nabelschnur	?	2,0	0,05 m NaCl	6,84	3,42	?
<i>Follet</i> ²²	Nabelschnur (Schwein)	25°	0,3	0,05 m Phosphat — 0,05 m NaCl	1,15	3,8	7,0

¹⁷ K. Meyer, E. M. Smyth und M. H. Dawson, J. biol. Chem. **128**, 319 (1939).

¹⁸ E. Haas, J. biol. Chem. **163**, 63 (1946).

¹⁹ J. Madinaveitia und T. H. H. Quibbel, Biochem. J. **31**, 625 (1940).

²⁰ Z. Hadidian und N. W. Pirie, Biochem. J. **42**, 266 (1948).

²¹ C. V. Seastone, J. exp. Med. **70**, 361 (1939).

²² A. E. Follet, J. biol. Chem. **176**, 177 (1948).

In Tabelle 1 sind einige der von verschiedenen Untersuchern mitgeteilten Viskositäten und, soweit angegeben, die Bedingungen, unter denen diese Messungen durchgeführt wurden, zusammengefaßt. Man ersieht daraus, daß die verschiedensten Organe als Ausgangsmaterialien verwendet wurden. Die Konzentrationen der untersuchten Lösungen sind ebenso wie die ionalen Bedingungen und die Temperatur durchwegs verschieden. In niederen Salzkonzentrationen ist die Viskosität höher und wird durch geringe Änderungen des Salzgehaltes stark beeinflußt.

Die Nabelschnüre besitzen von allen Ausgangsmaterialien den größten Gehalt an Hyaluronsäure. Es sind die verschiedensten Methoden beschrieben worden, um die Hyaluronsäure zu extrahieren und zu reinigen. Da die Nabelschnüre nicht völlig blutfrei gewaschen werden können, haben verschiedene Autoren^{3, 6} zuerst den Blutfarbstoff durch Behandeln mit Essigsäure zu entfernen versucht. Die Extraktion des polymeren Kohlenhydrates wurde mit Wasser^{3, 6}, verd. Kochsalzlösungen²⁰, verd. Natriumazetat¹⁶ oder verd. wäßr. Phenol durchgeführt²³. Diese verschiedenen Arten der Extraktion, wenn ohne Erwärmung und vorangegangene Trocknung durchgeführt, stellen wohl die schonendste Art der Gewinnung dar. Aber nur oftmalige Wiederholung der Extraktion erfaßt die gesamte vorhandene Hyaluronsäure. Eine Extraktion durch 90%iges Phenol²⁴ oder gesättigte Harnstofflösung kann leicht zur Depolymerisierung führen. An unserem Institut wurde eine Methode entwickelt²⁵, die mit Trichloressigsäure in gepufferter Lösung die Extraktion einer ziemlich reinen Hyaluronsäure ermöglicht.

Die Abtrennung der Hyaluronsäure aus dem so erhaltenen Gemisch von verschiedenen polymeren Kohlehydraten, Eiweiß usw. stellt eine schwierige Aufgabe dar, da die üblichen Enteiweißungsmethoden in diesem Fall versagen. Die Hyaluronsäure bildet mit dem vorhandenen Eiweiß einen Komplex, der in saurer Lösung als unlöslicher Mucinot ausfällt. Aber auch durch neutrale oder alkalische Enteiweißungsmittel gelingt es nicht, den Hyaluronsäure-Eiweißkomplex zu trennen. Über relativ gute Erfolge bei Fällung des Eiweißes mit Alkohol berichten^{6, 20, 3}; mit Alkohol, der an Kaliumazetat gesättigt ist^{26, 24}, mit Pyridin²⁰, mit Ammonsulfat²⁷. Eine vollständige Enteiweißung wird, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, auch nach mehrmaliger Anwendung dieser Methoden nicht erreicht. Die Verdauung mit Pepsin und Trypsin wurde ebenfalls mit gutem Erfolg angewendet²². *K. Meyer*¹⁶ zieht die Verdauung mit Trypsin vor, da er die Feststellung machen konnte, daß in den käuflichen Pepsinpräparaten eine Kohlehydratkomponente vorhanden ist, die zu einer Verunreinigung der Hyaluronsäure führen kann. Die von *Sewag*²⁸ eingeführte Methode, das Eiweiß durch Schüttern von wäßr. Lösungen der verunreinigten Hyaluronsäure mit einem Gemisch von Chloroform mit Butyl-Amyl-Oktylalkohol zu entfernen, wurde ebenfalls mit gutem Erfolg angewendet¹⁵. Selbstverständlich wurden diese Methoden auch nebeneinander angewendet und so auf oft recht umständliche Art ein Salz der reinen Hyaluronsäure dargestellt.

Zur Darstellung der freien Säuren fällte *Meyer* und *Palmer*³ Lösungen von Natriumhyaluronat mit Eisessig. Der teilweise Abbau der bei dieser Art der

²³ *K. Meyer*, J. biol. Chem. **176**, 993 (1948).

²⁴ *J. Rogers*, Biochem. J. **39**, 435 (1945).

²⁵ *W. E. Jancsik* und *E. Kaiser*, Nature **169**, 114 (1952).

²⁶ *T. M. Harris* und *S. Harris*, J. Immunol. **63**, 233 (1949).

²⁷ *R. W. Jeanloz* und *E. Forchielli*, J. biol. Chem. **186**, 495 (1950).

²⁸ *M. G. Sewag*, Biochem. Z. **273**, 419 (1934).

Darstellung der freien Säure auftreten kann, veranlaßte *Jeanloz* und *Forchielli*²⁷, die Methode von *Green* und *Pigman*²⁹ anzuwenden, d. h. die freie Säure durch Filtration von Natriumhyaluronatlösungen durch Ionenaustauscher darzustellen. Auf diesem Wege kommt es natürlich nur zu einer Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Hyaluronsäure und Ionenaustauscher und es wird nie ein vollständiger Austausch aller Natriumionen erzielt.

Versuchstechnik.

W. Pauli und seine Schüler untersuchten in einer Reihe von Arbeiten³⁰⁻³⁴ das elektrochemische Verhalten verschiedener Kohlenhydratsolen, bei denen durch Dialyse und Elektrodialyse die Fremdelektrolyte vollkommen entfernt worden waren. Die Elektrodialyse, besonders unter Zusatz geringer Essigsäuremengen, bewirkt, wenn sie genügend lange fortgesetzt wird, eine vollständige Umwandlung in Kolloidsäuren, wie schon früher an Glykogensolen gezeigt werden konnte³⁵. Es gelingt daher auf diese Weise eine schonende Umwandlung von Hyaluronaten in freie Hyaluronsäure, ohne eventuell vorhandene andere saure Gruppen (Schwefelsäure, Phosphorsäure) abzuspalten.

Die Gewinnung der Hyaluronsäure erfolgte durch Verarbeiten von frischen, von Blut befreiten, menschlichen Nabelschnüren. Von einer Azeton Trocknung wurde Abstand genommen, da eventuelle irreversible Änderungen der Kohlehydrat-Eiweißkomplexe nicht ausgeschlossen sind und die Beobachtung gemacht wurde, daß die Ausbeute an Hyaluronsäure ohne vorangegangene Trocknung größer war. Um die Extraktion zu erleichtern, wurden die Nabelschnüre mit einem Fleischwolf zerkleinert. Die Verwendung eines Turmix hat sich nicht bewährt, da sich das Extraktionsgut anschließend nicht mehr klar zentrifugieren ließ. Anfänglich wurde mit destilliertem Wasser extrahiert, das mit Toluol überschichtet war, um die Fäulnis zu verhindern. Später wurde nach den Angaben von *K. Meyer*²³ mit 2%igem wäßr. Phenol extrahiert. Die Dauer der Extraktion betrug in beiden Fällen 24 Stdn. Anschließend wurde zentrifugiert und die Extraktion etwa 6- bis 8mal wiederholt. Die gesammelten Extrakte wurden mit Essigsäure bis zu pH 4 angesäuert und der entstandene Mucinclot gesammelt und mehrmals mit Wasser durchgeknetet. Um andere Kohlehydrate, in der Hauptsache jedoch Glykogen, zu entfernen, wurde in Wasser unter Zugabe von Lauge gelöst und die Säurefällung 2mal wiederholt. Diese vorgereinigten Mucinclots wurden in Phosphatpuffer von pH 8 gelöst und nach *Sewag*²⁸ von einem großen Teil des Eiweißes befreit. Die *Sewagsche* Methode zeigte nur dann gute Erfolge, wenn die Lösung schwach alkalisch bis neutral reagierte (siehe auch *K. Meyer*^{1,16}). *Hadidian* und *Pirie*²⁰ konnten nachweisen, daß die *Sewagsche* Methode bei geringen Eiweißkonzentrationen bessere Erfolge zeigt, was wir in unseren Versuchen bestätigen konnten. Von einer Pepsinverdauung wurde aus Gründen, die *K. Meyer*¹⁶ darlegte, abgesehen. Sowohl die Pepsin- als auch

²⁹ *J. W. Green* und *W. W. Pigman*, Abstr. Amer. chem. Soc. 113th Meeting, Chicago 1948.

³⁰ *W. Pauli*, Helv. chim. Acta **24**, 1253 (1941).

³¹ *W. Pauli*, *W. Kölbl* und *A. Linsker*, Kolloid-Z. **79**, 273 (1937).

³² *W. Pauli* und *L. Palmrich*, Kolloid-Z. **79**, 69, 174 (1937).

³³ *W. Pauli* und *E. Ripper*, Kolloid-Z. **62**, 162 (1933).

³⁴ *W. Pauli*, *J.* und *St. Szper*, Kolloid-Z. **82**, 335 (1938).

³⁵ *M. Pantlitschko* und *J. Matula*, Mh. Chem. **81**, 179 (1950).

die Trypsinverdauung liefert keine abiureten Abbauprodukte, so daß zwecks Feststellung der Beendigung der Eiweißhydrolyse die Hyaluronsäure jedesmal durch Fällung mit Alkohol isoliert werden mußte. Eine 6- bis 8stündige Trypsinverdauung ergab in der Regel eiweißfreie Produkte. Die *Sewagsche* Enteiweißung wurde vor der Trypsinverdauung durchgeführt, um die Konzentration der Eiweißspaltprodukte nach der Verdauung so niedrig als möglich zu halten. Nach der Verdauung eine *Sewagsche* Enteiweißung durchzuführen²², halten wir für unnötig, denn es zeigte sich, daß in diesem Fall keine weitere Reinigung erzielt werden kann. Dies ist auch leicht verständlich, da es sich bei der *Sewagschen* Methode um eine Adsorption und Denaturierung des Eiweißes an der Chloroformoberfläche handelt, die Eiweißabbauprodukte nach der Verdauung leichter wasserlöslich sind und daher auch keine Denaturierung mehr erfolgen kann. Nach der Trypsinverdauung wird, um eventuell vorhandenen Blutfarbstoff zu entfernen, mit Tierkohle geklärt, zentrifugiert und mit Alkohol gefällt. Die Alkoholfällung muß, um die Eiweißspaltprodukte völlig zu entfernen, mehrmals wiederholt werden. Die letzte Fällung wurde in essigsaurer Lösung durchgeführt, um die nachfolgende Elektrodialyse zu erleichtern. In Tabelle 2 wird der Reinigungsvorgang durch Analysendaten belegt.

Tabelle 2.

Stadium des Reinigungsvorganges	% Stickstoff	% Glucosamin	% Azetyl	% Asche	$\eta_{rel}/0,1\%$
Nabelschnurextrakt	12,1	—	—	—	1,12
Mucin-Clot	6,5	26,8	6,8	—	1,59
Sewag-Enteiweißung	4,7	35,2	8,9	0,53	1,68
Trypsinverdauung	4,0	39,4	—	0,48	—
1. Alkoholfällung	3,9	40,9	—	0,45	—
2. Alkoholfällung	3,7	41,3	9,5	0,43	2,21

Die auf diese Weise dargestellten Proben der Hyaluronsäuren enthielten alle wesentliche Mengen an Asche. Der Stickstoffgehalt wurde mit der Mikrojeldahlmethode bestimmt. Der Acetylgehalt wurde nach *Kuhn* und *Roth*³⁶ in der Originalapparatur bestimmt. Die von diesen beiden Autoren vorgeschlagene Verseifung mit methylalkohol. Lauge konnte nicht angewendet werden, da immer zu hohe Werte gefunden wurden. Ähnliche Beobachtungen konnten *Friedrich* und *Sternberg*³⁷ an chondroitinschwefelsaurem Calcium feststellen. Wie aus früheren Untersuchungen hervorgeht³⁸, entsteht bei der Einwirkung von Alkali auf Kohlehydrate u. a. Ameisensäure, die ebenfalls wasserdampfflüchtig ist und ihre Zerstörung durch Quecksilberoxyd im Destillat erforderlich macht. Auch die Verseifung mit 33 vol%iger Schwefelsäure lieferte ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse. Wir fanden, daß p-Toluolsulfosäure innerhalb von 2 Stdn. bei 100° die gesamten Acetylgruppen in Freiheit setzte und titrierten nach der Wasserdampfdestillation mit 0,01 n Lauge und Mischindikator. Die Glucosaminbestimmung wurde

³⁶ *R. Kuhn* und *H. Roth*, Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 1274 (1933).

³⁷ *A. Friedrich* und *H. Sternberg*, Biochem. Z. **286**, 20 (1936).

³⁸ *F. Wessely*, *M. Pantlitschko* und *R. Wratil*, Wiener klin. Wochenschr. **60**, 406 (1948).

nach *Elson* und *Morgan*³⁹ in der Modifikation von *Boyer* und *Fürth*⁴⁰ bestimmt. Die Hyaluronsäurelösung wurde in 5 n Salzsäure durch 8 Stdn. bei 100° hydrolysiert und anschließend im Exsikkator über NaOH im Vak. zur Trockene verdampft, in Wasser aufgenommen und die Bestimmung durchgeführt. Die Eichkurve wurde mit einem Glucosaminstandard aufgenommen. Die qualitative Untersuchung der Asche ergab neben Spuren von Eisen hauptsächlich die Anwesenheit von Calcium, Magnesium, Kalium und Sulfaten.

Tabelle 3.

Präparat Nr.	Vor der Elektrodialyse			Nach der Elektrodialyse			
	% N	% Glucosamin	% Asche	Dialyse- dauer	% N	% Glucosamin	α_{20}^D
1	3,81	39,8	0,56	12 ^d	3,61	43,5	— 69,5
2	3,78	40,1	0,38	16 ^d	3,72	42,9	— 70,0
3	3,60	41,3	0,43	13 ^d	3,56	43,0	— 69,9
4	3,70	38,3	0,27	14 ^d	3,68	44,7	— 68,9
5	3,56	38,9	0,49	11 ^d	3,48	42,6	— 68,0
Mittelwerte . . .					3,61	43,3	— 69,3

Zur weiteren Reinigung wurden die verschiedenen Hyaluronsäuren in Wasser gelöst und nach dem am Institut bewährten Verfahren durch Elektrodialyse unter Zugabe von Säuren insbesondere Essigsäure (Endkonzentration: 0,01 n) vollständig von höherwertigen Kationen befreit. Die vorstehende Tabelle 3 bringt einen Überblick über die durchgeführten Bestimmungen vor und nach der Elektrodialyse. Asche konnte in den elektrodialysierten Hyaluronsäuren niemals nachgewiesen werden.

Kolloidelektrolyte, die beständig sind, dürfen nur einwertige Gegenionen enthalten, da Kolloidelektrolyte, die höherwertige Gegenionen enthalten, unbeständig sind und durch Inaktivierung der Gegenionen eine Entladung des Kolloides unter Koagulation bewirken³⁰.

pH und Leitfähigkeit.

Die elektrodialysierten Hyaluronsäuresole reagieren ziemlich stark sauer. Die Elektrodialyse hat die Umwandlung in ein azidoide Sol herbeigeführt, dem großen kolloiden Anion stehen nur H-Ionen als Gegenionen gegenüber. Die Äquivalentleitfähigkeit solcher Sole wird daher im wesentlichen von den Gegenionen (H-Ionen) bestimmt, da diese eine etwa 8- bis 10mal so große Grenzbeweglichkeit als das Kolloidion, nämlich 350 gegen 40 bis 50 bei 25°, besitzen. Man kann daher, wie dies *Pauli* und Mitarbeiter³¹⁻³⁴ getan haben, aus der Leitfähigkeit die H-Ionenkonzentration berechnen und diese müßte mit der praktisch gefundenen übereinstimmen, da normalerweise bei den vorliegenden Verdünnungen Aktivitäts- und Leitfähigkeitskoeffizient übereinstimmen.

³⁹ *L. A. Elson* und *W. T. I. Morgan*, *Biochem. J.* **27**, 825 (1933).

⁴⁰ *R. Boyer* und *O. Fürth*, *Biochem. Z.* **282**, 242 (1936).

Tabelle 4.

Präparat Nr.	c/g/L	$\kappa \cdot 10^{-4}$	pH	aH · 10 ⁻⁴	aH berechnet aus	$\frac{\kappa}{C}$
1	0,504	2,46	3,41	3,89	6,15	4,90
2	0,612	3,24	3,31	4,90	8,10	5,28
3	0,830	4,22	3,21	6,20	11,20	5,08
4	1,850	9,32	2,91	12,30	23,30	5,04
5	3,580	14,60	2,70	25,10	36,50	4,98

Die Tabelle 4 bringt eine Zusammenstellung der an den hochgereinigten acidoiden Hyaluronsäuresolen ermittelten Leitfähigkeits- und pH-Werten, sowie eine Gegenüberstellung der aus berechneten $aH = \frac{1000 \kappa}{\lambda_{\infty}}$ und der gefundenen H-Ionenaktivität. Für die Grenzbeweglichkeit des kolloiden Anions wird, wie in früheren Arbeiten (bei Dextrinen, löslicher Stärke, Glykogen^{34,35}) der plausible Wert von $v = 50$ eingesetzt.

Im Gegensatz zu bisher untersuchten Kohlehydratsolen, bei denen eine recht gute Übereinstimmung der berechneten und gefundenen H-Ionenaktivitäten besteht, finden wir bei den Hyaluronsäuresolen keine solche Übereinstimmung. Die aus der Leitfähigkeit berechnete H-Ionenaktivität ist immer größer als die potentiometrisch ermittelte. Daß es sich dabei nicht um Verunreinigung durch Fremdelektrolyte handeln kann, geht aus folgenden zwei Tatsachen hervor: 1. ist das Verhältnis $\kappa:c$ (letzte Kolonne der Tabelle 4) trotz verschieden langer Dauer der Elektrodialyse ein gut reproduzierbarer Wert, 2. ergab eine Kontrolle durch Aschenbestimmungen der elektrodialysierten Sole keine Anhaltspunkte für eine Verunreinigung durch Fremdelektrolyte. (Es wurde nie eine wägbare Menge Asche gefunden.) Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann derzeit noch nicht gegeben werden. Ein Vergleich mit den von *W. Kern*⁴¹ untersuchten Polyacrylsäuren ist nicht ganz zutreffend, denn bei den Polyacrylsäuren sind nur Carboxylgruppen als hydrophile Gruppen vorhanden, so daß es zu ganz anderen Hydratationsverhältnissen wie bei der Hyaluronsäure mit ihren vielen Hydroxylgruppen im Molekül kommt. Eine abnorme Beweglichkeit des Kolloidanions ist auszuschließen, so daß man nur die folgende Tatsache als mögliche Erklärung ins Auge fassen kann. Bei den gelartigen fibroiden Kolloidelektrolyten, die auch geknäuelte sein können, wäre es denkbar, daß nur die an der Teilchenoberfläche sich befindlichen H-Ionen potentiometrisch erfaßt werden, während die im Gelinneren sich befindlichen Gegenionen auch an der Leitfähigkeit beteiligt sind. Daß solche Vorstellungen nicht abwegig sind, ergibt sich aus der Tatsache, daß auch *Zsigmondy*⁴² die Möglichkeit

⁴¹ *W. Kern*, Z. physik. Chem. Abt. A. 181, 249 (1938).

eines Einschusses der Gegenionen im kolloiden Anteil diskutiert. Außerdem wird die aus der Leitfähigkeit berechnete H-Ionenaktivität nie größer gefunden als die Gesamtacidität.

Konduktometrische und Potentiometrische Titration.

Die konduktometrische und potentiometrische Titration der verschiedenen Hyaluronsäuresole zeigen, wie aus Abb. 1, 2 und 3 hervorgeht,

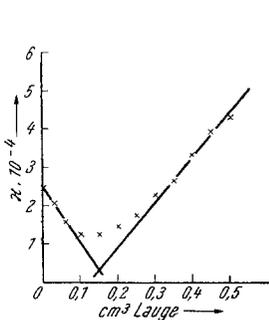


Abb. 1.

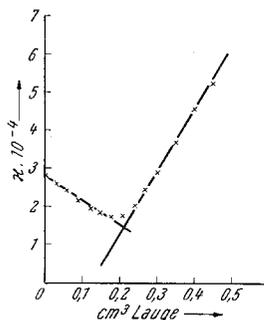


Abb. 2.

das typische Bild von Titrationsen von einbasischen Säuren.

Die Gesamtacidität läßt sich durch pH-Bestimmungen nicht ermitteln, da wegen der unvollständigen Dissoziation der Carboxylgruppen der Hyaluronsäure der größere Teil der H-Ionen inaktiv ist. Diese kann aber durch Titration mit einer starken Lauge ermittelt werden. Das bei der konduktometrischen Titration ermittelte Minimum ist in dem Falle, wo es sich um eine schwache Säure handelt, infolge von Hydrolyse des gebildeten Salzes verbreitert, und der Äquivalenzpunkt wurde daher graphisch durch den Schnittpunkt der an die steilen Kurvenäste angelegten Tangenten ermittelt.

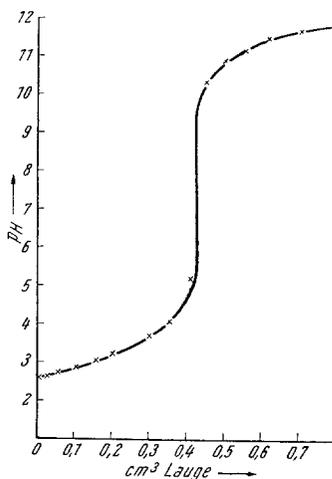


Abb. 3.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der konduktometrischen Titration mit Natronlauge und Barytlauge sowie die potentiometrischen Titrationsen mit Barytlauge zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß der Äquivalenzpunkt

⁴² R. Zsigmondy, Kolloidchemie, 5. Aufl., Allg. Teil S. 190 (1925).

Tabelle 5.

Präparat Nr.	c/g/L	a _H · 10 ⁻⁴	a _{H_I} · 10 ⁻⁴	a _{H_{II}} · 10 ⁻⁴	c _H · 10 ⁻⁴
1	0,504	3,89	7,70	10,50	11,00
2	0,612	4,90	10,10	15,50	16,50
3	0,830	6,20	19,30	—	20,30
4	1,850	12,30	30,00	45,80	47,00
5	3,580	25,10	51,60	82,40	84,30

a_H = H-Ionenaktivität mit Glaselektrode;

a_{H_I} = H-Ionenaktivität ermittelt durch konduktometrische Titration mit NaOH;

a_{H_{II}} = H-Ionenaktivität ermittelt durch konduktometrische Titration mit Ba(OH)₂.

c_H = H-Ionenaktivität ermittelt durch potentiometrische Titration mit Ba(OH)₂.

der Titrationskurven bei Natronlauge immer wesentlich niedriger ist als die Äquivalenzpunkte, die durch Titration mit Barytlauge erhalten werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir³⁵ bei den Glykogensolen. Es handelt sich darum, daß die Inaktivierung und Anlagerung der Bariumionen größer als bei den Natriumionen ist, d. h. die gut löslichen Natriumsalze schwacher Säuren erfahren in diesen hohen Verdünnungen eine stärkere Hydrolyse als die schwerer löslichen Bariumsalze.

Die durch konduktometrische Titration mit Barytlauge erhaltenen Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den durch potentiometrische Titration ermittelten Gesamtaciditätswerten. Sowohl die konduktometrische als auch die potentiometrische ergibt keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein weiterer saurer Gruppen, denn in diesem Fall müßten die Titrationskurven Knicke in ihrem Verlauf aufweisen. (Schwefelsäureester der Hyaluronsäure würden eine wesentlich höhere Dissoziationskonstante besitzen und müßten in den Titrationskurven zu erkennen sein.) Um die Frage zu entscheiden, ob alle Carboxylgruppen der Hyaluronsäure in freier Form vorliegen, kann man unter der Annahme¹⁶, daß die Hyaluronsäure aus Acetylglucosamin-Glucuronsäureeinheiten aufgebaut ist, aus der Konzentration der Sole die Gesamtacidität berechnen.

Tabelle 6.

(Bezeichnungen wie in Tabelle 5.)

Präparat Nr.	c/g/L	m · 10 ⁻³	a _{H_{II}}	c _H	c _H (berechnet)
1	0,504	1,33	10,5	11,0	11,9
2	0,612	1,61	15,0	16,5	14,5
3	0,830	2,21	—	20,3	19,7
4	1,850	4,88	45,8	47,0	44,0
5	3,580	10,01	82,4	84,3	82,4

Ein Vergleich der in Tabelle 7 berechneten Werte mit der konduktometrisch und potentiometrisch bestimmten Gesamtsäurekonzentration ergibt eine gute Übereinstimmung. Diese Tatsache bestätigt, daß es sich bei den dargestellten Solen um einheitliche Produkte handelt, die frei von Verunreinigungen sind.

Pauli, Kölbl und Linsker³¹ untersuchten die Glucuronsäure im Hinblick auf ihre Verwandtschaft mit den aufladenden Monoseglucuronsäuren der Pflanzengummisole und konnten zum Unterschied von der Glucuronsäure eine wesentlich größere Stabilität der ersteren auf Grund ihrer Pyranosestruktur feststellen. Die Dissoziationskonstante der Glucuronsäure bestimmten sie mit $K_c = 4,65 \cdot 10^{-5}$ und fanden in weitem Bereich eine Konzentrationsunabhängigkeit. Auf Grund der aus dem Grundmolekulargewicht berechneten Molarität der Glucuronsäure in der Hyaluronsäure und der Dissoziationskonstante läßt sich die H-Ionenaktivität errechnen.

Tabelle 7.

Präparat Nr.	c/g/L	m · 10 ⁻³	aH (gemessen)	aH (berechnet)
1	0,504	1,33	7,70	7,65
2	0,612	1,61	10,10	8,84
3	0,830	2,21	19,30	9,95
4	1,850	4,88	30,00	46,30
5	3,850	10,01	51,60	64,60

Tabelle 7 zeigt die gefundenen und berechneten Werte, wobei man bei niederen Konzentrationen eine sehr gute Übereinstimmung feststellen kann. Bei höheren Konzentrationen beobachtet man jedoch ein Zurückbleiben der gefundenen H-Ionenaktivität gegenüber den berechneten Werten.

Elektrophoretische Untersuchungen.

Über elektrophoretische Untersuchungen liegen nur wenige Angaben vor^{43, 43 a, 4}. K. H. Meyer berichtet über die Wanderungsgeschwindigkeit von Hyaluronsäure, die mit der Sewagschen Methode von Eiweiß befreit worden war. Die weitere Reinigung wurde von diesem Autor⁴ durch Elektrodialyse, jedoch ohne Rühren durchgeführt, wobei sich die Hyaluronsäure als Gel am Boden absetzte. Bei der elektrophoretischen Untersuchung konnten 3 Komponenten mit anodischer Wanderung festgestellt werden, wobei die Hauptkomponente ohne vorangegangene Elektrodialyse zu etwa 47% mit einer Beweglichkeit von $12,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}^{-1}/\text{Volt}^{-1}$ vorhanden war. Die schneller wandernde Komponente von $16,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}^{-1}/\text{Volt}^{-1}$, die zu 17% vorhanden war, stellt nach der Meinung des Autors⁴ einen Schwefelsäureester der Hyaluronsäure dar. Die langsamste Komponente konnte durch Elektrophorese abgetrennt und als Kohlehydrat identifiziert werden, das nach der

⁴³ L. Hesselwik, Acta Med. Scand. 105, 153 (1940).

^{43 a} G. Blix, Acta physiol. Scand. 1, 29 (1940).

Hydrolyse Glucose liefert. Durch Elektrodekantation konnte keine vollständige Trennung der einzelnen Komponenten erreicht, sondern nur eine Anreicherung der Hyaluronsäure auf etwa 70% erzielt werden.

Die hochgereinigten Hyaluronsäuresole wurden elektrophoretisch untersucht*. Die Hyaluronsäuresole wurden mit einem Veronalacetatpuffer (pH = 8,3, $\mu = 0,1$) verdünnt und 2 Tage gegen dieselbe Pufferlösung dialysiert. Die Untersuchung ergab, daß die hochgereinigten Hyaluronsäuresole eine einheitliche Wanderungsgeschwindigkeit sowohl in den ascending als auch in den descending boundaries zeigten, die Beweglichkeit berechnet sich zu $14,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$ und ist somit etwas höher als die von *K. H. Meyer*⁴ angegebene.

Viskosimetrische Untersuchungen.

Die Eigenschaften hochpolymerer Fadenmoleküle sind neben dem Polymerisationsgrad auch noch durch die Gestalt der Fadenmoleküle bedingt. Da die Hyaluronsäure ein Fadenmolekül darstellt, das viele ionisierbare Carboxylgruppen im Molekül enthält (jedes zweite Grundmolekül ist eine Glucuronsäure), die unter geeigneten Umständen H-Ionen abdissoziieren können, wird sie, ohne ihren Polymerisationsgrad zu ändern, große Änderungen in der Viskosität bei Variation des pH-Wertes zeigen. Die theoretischen Grundlagen für das Verhalten von solchen polyvalenten Fadenmolekülen sind von *Kuhn* und Mitarbeitern^{44,45} sowie von *Katchalsky*⁴⁶ in einer Reihe von Arbeiten über die Polyacrylsäure niedergelegt.

Vorerst wurde die Abhängigkeit der relativen Viskosität von der Konzentration der Hyaluronsäuresole untersucht. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, konnte keine lineare Abhängigkeit der relativen Reibung von der Konzentration gefunden werden.

Bis zu einer Konzentration von etwa 0,08% erfolgt eine starke Reibungszunahme, die jedoch mit zunehmender Konzentration geringer wird und sich schließlich asymptotisch einem Grenzwert nähert. Nach *W. Kuhn*⁴⁵ ist die Reibung polyvalenter Fadenmoleküle, abgesehen vom Polymerisationsgrad, von der Zahl der dissoziierten Gruppen abhängig. Nimmt die Dissoziation zu, so werden die im Fadenmolekül zurückbleibenden negativ geladenen COO-Ionen das Bestreben haben, sich möglichst weit voneinander zu entfernen. Es kommt dadurch zu einer Streckung und stärkeren Hydratisierung des Moleküls, die sich in einer Erhöhung der Reibung manifestiert.

* Herrn Doz. Dr. *Auerswald* (Physiologisches Universitätsinstitut, Wien) bin ich für die Durchführung der Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

⁴⁴ *H. Kuhn*, *Helv. chim. Acta* **31**, 1677 (1948).

⁴⁵ *W. Kuhn*, *O. Künzle* und *A. Katchalsky*, *Helv. chim. Acta* **31**, 1994 (1948).

⁴⁶ *A. Katchalsky*, *O. Künzle* und *W. Kuhn*, *J. Polymer Sci.* **5**, 283 (1950).

Der Dissoziationsgrad wird durch die Dissoziationskonstante der Glucuronsäure gegeben sein und kann durch Zugabe von Säure unterdrückt bzw. durch Zugabe von Lauge gefördert werden. Die Abb. 5

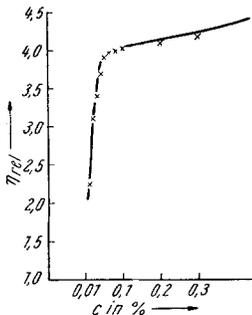


Abb. 4.

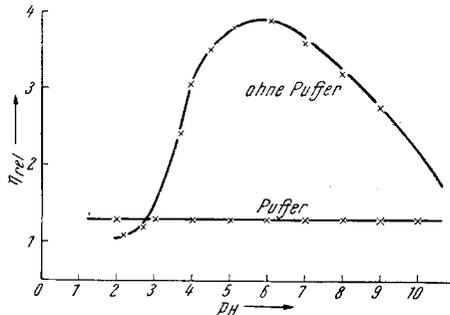


Abb. 5.

zeigt nun, wie eine Änderung des pH-Wertes zu einer Änderung der relativen Reibung der acidoiden Hyaluronsäuresole führt. Die Änderung des pH darf in diesem Falle nicht durch Puffersubstanzen herbeigeführt werden, sondern muß durch Zugabe von entsprechenden Mengen Säure bzw. Lauge erzielt werden.

Im sauren Bereich kommt es zu einer Zurückdrängung der Dissoziation der H-Ionen der Glucuronsäure und somit zu einem Abfall der relativen Reibung. Bei Zugabe von Lauge (d. h. Ansteigen der Dissoziation) wird bei pH 6,0 ein Maximum erreicht. Ähnliche Ergebnisse haben *Katchalsky, Künzle* und *Kuhn*⁴⁶ an Polymetacrylsäure nachweisen können.

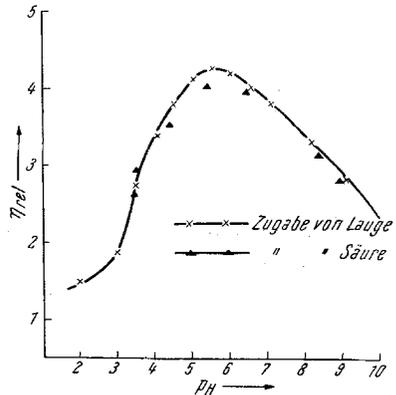


Abb. 6.

Der Reibungsabfall nach pH 6,0 legte die Annahme nahe, daß es zu einer Depolymerisation der Hyaluronsäure im alkalischen Bereich kommt. Einen Beweis, daß es sich um keine Depolymerisationserscheinung handelt, liefert folgender Versuch. Es wurde ein acidoides Hyaluronsäuresol mit steigenden Mengen Lauge bis pH 9,5 versetzt und anschließend wieder sukzessive angesäuert, wobei es im pH-Bereich von 9,5 bis 6,0 zu einem Anstieg der relativen Reibung kommt. Nach Überschreiten des Maximums bei pH 6,0 kommt es infolge der Zurückdrängung der Dissoziation wieder zu einer Abnahme der relativen Reibung, was aus Abb. 6 hervorgeht.

Als weiterer Beweis, daß es zu keiner Depolymerisierung bei kurz-dauernder Einwirkung von Alkali bei Zimmertemperatur kommt, kann folgender Versuch gewertet werden. Ein elektrodialysiertes, acidoides Hyaluronsäuresol wurde mit Lauge auf pH 10,0 gebracht und nach 2 Stdn. durch Dialyse und Elektrodialyse wieder in das acidoides Sol übergeführt. Abgesehen von der Verdünnung, die durch die Dialyse eingetreten war, konnte in der relativen Reibung keine Änderung festgestellt werden, wie eine entsprechende Verdünnung des unbehandelten Soles zeigte.

Der Einfluß von Salzen in verschiedenen Konzentrationen auf die Reibung von acidoiden Hyaluronsäuresolen wurde in der Folge untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß bereits ganz geringe Salzkonzentrationen,

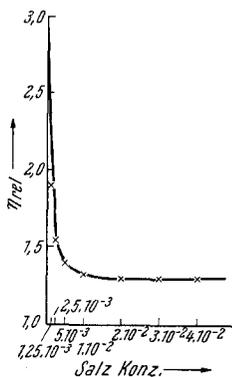


Abb. 7.

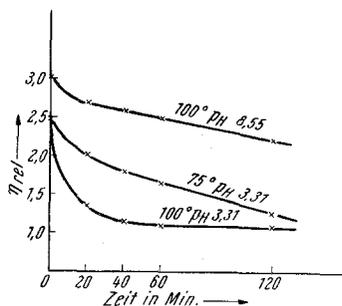


Abb. 8.

die in der Größenordnung von $2-5 \cdot 10^{-3}$ m liegen, die relative Reibung auf einen konstanten Wert herabsetzen. Die Abb. 7 zeigt den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen von Kaliumchlorid auf die relative Reibung des Hyaluronsäuresols Nr. 1.

Ähnliche Ergebnisse jedoch mit höheren Salzkonzentrationen teilten bereits *Hadidian* und *Pirie*²⁰ sowie *K. H. Meyer et al.*⁴ mit. Dieser Salzeinfluß ist auch der Grund, daß in Pufferlösungen von verschiedenen pH-Werten keine Abhängigkeit der relativen Reibung vom pH gefunden werden konnte, da die Reibung auf dem konstanten Salzwert verblieb. Schon *Pauli*³⁰ konnte seinerzeit an hochgereinigten Eiweißlösungen feststellen, daß die Reibung auf Zusatz von Neutralsalzen eine wesentliche Abnahme erfährt und einen konstanten Wert erreicht. In letzter Zeit konnte *Fuos*⁴⁷ zeigen, daß die Viskosität einer Lösung eines ionogenen Kolloides wesentlich höher liegt als die Reibung eines elektrisch neutralen Kolloides vergleichbaren Polymerisationsgrades. Durch Zugabe von Neutralsalzen konnte er die hohe Viskosität des elektrisch geladenen Kolloides auf diejenige eines neutralen Kolloides herabsetzen.

⁴⁷ *R. M. Fuos*, *J. Polymer Sci.* **6**, 305 (1951).

Gereinigte elektrodialysierte Lösungen von acidoiden Hyaluronsäuren zeigen, auch wenn sie bei niedriger Temperatur ohne Zusatz eines Konservierungsmittels aufgehoben werden, einen Reibungsabfall, der jedoch nur während der ersten drei Tage feststellbar ist. Nach dieser Zeit bleibt die Reibung konstant, ein Befund, den auch *Jeanloz* und *Forchielli*²⁷ erheben konnten. Der oben erwähnte Reibungsabfall ist nun anscheinend nicht auf eine Depolymerisation zurückzuführen, sondern es dürfte sich nur um eine Änderung der statistischen Knäuelform handeln, denn es konnte gezeigt werden, daß solche gealterte Sole bei neuerlicher Elektrodialyse wieder den ursprünglichen Ausgangswert erreichen.

Temperaturerhöhung ist auf jeden Fall mit einem Reibungsabfall und einer Depolymerisation verbunden. Es zeigte sich, daß die Wasserstoffionenkonzentration neben der Dauer des Erhitzens einen wesentlichen Einfluß ausüben, wie aus Abb. 8 hervorgeht.

In saurer Lösung tritt der Abfall der Reibung wesentlich rascher und bei niedrigerer Temperatur ein und erreicht bei 100° innerhalb kurzer Zeit (60 Min.) einen konstanten Endwert. Die viskosimetrische Abbaukurve zeigt fast den gleichen Verlauf wie die Abbaukurve, die man bei Einwirkung von Hyaluronidase auf Hyaluronsäure erhält. Im alkalischen Bereich verläuft der Reibungsabfall wesentlich langsamer und hat auch nach 2 Stdn. bei 100° seinen Endwert noch nicht erreicht. Es ergibt sich daraus, daß bei der Darstellung der Hyaluronsäure jedwede Erwärmung vermieden werden muß, um einen Abbau der Hyaluronsäure zu verhindern.

Zusammenfassung.

Hyaluronsäure wurde aus Nabelschnüren gewonnen und weitgehend gereinigt. Durch Elektrodialyse wurden verschiedene Proben in acidoide Sole übergeführt.

Die elektrochemischen Untersuchungen zeigen, daß die Vorstellungen, die man sich über den Aufbau der Hyaluronsäure gemacht hat, zutreffend sind.

Die Abhängigkeit der Viskosität der acidoiden Hyaluronsäuresole von der Konzentration, dem pH, der Fremdelektrolyte und der Temperatur wurde untersucht.