

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 3—11

Zur Analyse von Proteoglykanen

Von M. LIEFLÄNDER und D. DIELENBERG

Aus der Biochemischen Abteilung des Fachbereiches Chemie der Universität Regensburg und dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

(Eingegangen am 12. Mai 1971)

Herrn Professor Dr. Dr. Friedrich TIMM in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet

Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure-, Chondroitin-4- und -6-sulfat-, Dermatansulfat-, Heparin- und Keratansulfat-Peptide wurden nach einem einheitlichen Verfahren aus den entsprechenden Bindegewebe isoliert, unter gleichen Bedingungen hydrolysiert, ihre Aminosäuren, so weit möglich, quantitativ bestimmt und die Ergebnisse untereinander verglichen. Es gelang, auch nach Anwendung verschiedener Proteasen sowie Alkali, nicht, die Glykosaminoglykane vollständig von ihren Peptid- bzw. Aminosäureresten zu befreien. — Während der sauren Hydrolyse von Glykosaminoglykanpeptiden traten Aminosäureverluste auf. Testgemische, die aus hochgereinigten Hyaluronsäuren bzw. Chondroitinsulfaten und Aminosäuren bestanden, wurden sauer hydrolysiert und anschließend säulenchromatographisch quantitativ getrennt und analysiert. Auffallende Verluste wurden für Arginin, Glutaminsäure, Methionin und Tyrosin registriert, Cystein war nahezu vollständig zerstört worden. — Die bei den Hydrolysen auftretenden schwarzen Rückstände wurden isoliert und es konnte gezeigt werden, daß die Aminosäureverluste nicht einfach durch selektive Adsorption an die „Huminstanz“ oder durch eine chemische Reaktion mit deren Vorläufer erklärt werden können. — Auf den Säulendiagrammen fanden sich neben den üblichen Aminosäurepeaks noch neue, ninhydrinpositive, bei 440 nm und 570 nm registrierte Peaks. Derartige Peaks, die besonders zahlreich im Trennbereich der basischen Aminosäuren auftraten, wurden auch nach saurer Hydrolyse von Glucosamin sowie Galaktosamin allein gefunden. Offenbar handelte es sich bei diesen unbekannt Substanzen, zum Teil jedenfalls, um Epimerisierungsprodukte der Hexosamine. Die exakte Bestimmung, zumindest der basischen Aminosäuren, wurde hierdurch z. T. empfindlich gestört. Um die Hexosamine und diese neuen Produkte aus dem Hydrolysat vor der Aminosäureanalyse zu entfernen, ohne dabei die Aminosäuren zu beeinflussen, wurde versucht, sie mit Acetylaceton in flüchtige Chromogene umzuwandeln, was auch gelang. Nur wurden dabei die Verluste an Aminosäuren immer dann sehr groß, wenn sich im Testgemisch Neutralzucker und/oder Uronsäuren befanden. Somit scheidet dieses Verfahren für die quantitative Aminosäurebestimmung saurer Glykosaminoglykan-Peptid-Hydrolysate aus. —

Die Trennbedingungen für Hydrolysate von Glykosaminoglykan-Peptiden und künstliche Hexosamin-Aminosäuren-Testgemische an verschiedenen Ionenaustauschern wurden untersucht. Dabei wurde gefunden, daß in Anwesenheit sehr großer Hexosaminmengen nur die Trennung von Nutzen ist, bei der die Hexosamine auf dem Chromatogramm relativ weit hinter den aromatischen Aminosäuren erscheinen. Trennungen und quantitative Bestimmungen der Aminosäuren-Hexosamin-Hydrolysate nach dem Einsäulenverfahren gelangen im Hinblick auf die basischen Aminosäuren nicht. Sollen diese quantitativ analysiert werden, so sind langwierige Verfahren, wie man sie zur Trennung sog. physiologischer Gemische verwendet, erforderlich.

The analysis of proteoglycans

Glycosaminoglycans, such as the peptides of hyaluronic acid, chondroitin-4- and -6-sulphate, dermatan sulphate, heparin sulphate and keratan sulphate were isolated from the appropriate connective tissues by a uniform method, hydrolysed under the same conditions, their amino acids determined, as far as possible quantitatively, and the results compared. It was not possible to completely free the glycosaminoglycans from their peptide or amino acid residues, even with the use of proteases or alkali, whereas the acid hydrolysis of glycosaminoglycan peptides resulted in losses of amino acids. Test mixtures, consisting of highly purified hyaluronic acids or chondroitin sulphates with amino acids, were hydrolysed with acid and resolved quantitatively and analysed by column chromatography. Marked losses were noted for arginine, glutamic acid, methionine and tyrosine, and cysteine was almost completely destroyed. The black residue produced during the hydrolysis was isolated and it was shown that the loss of amino acids was not simply due to selective adsorption onto this "humine substance" or by a chemical reaction with its precursors. The column profile showed new ninhydrin positive peaks registered at 440 nm and 570 nm, in addition to the usual amino acid peaks. Some peaks were especially numerous in the separation region of the basic amino acids and these were also found after the acid hydrolysis of glucosamine or galactosamine. Some of these unknown substances may be epimerisation products of the hexosamines. The exact determination, at least of the basic amino acids, was therefore subject to a marked interference. In order to remove the hexosamines and these new products from the hydrolysate before the amino acid analysis and without affecting the amino acids, they were converted into volatile chromogens with acetylacetone. Losses of amino acids were then still very appreciable if the test mixture contained neutral sugars and/or uronic acids. This method is therefore unsuitable for the quantitative determination of amino acids in acid hydrolysates of glycosaminoglycan-peptides.

The separation conditions for hydrolysates of glycosaminoglycan-peptides and artificial hexosamine-amino acid test mixtures on different exchangers was investigated. It was found that the separation is only of use when the hexosamines appear relatively late after the aromatic amino acids. The separation and quantitative determination of the amino-hexosamine hydrolysates by the one column method was unsuccessful with respect to the basic amino acids. The quantitative analysis of these would involve further time-consuming procedures as normally used for the resolution of physiological mixtures.

In nativer Form sind die im Bindegewebe vorkommenden Glykosaminoglykane Chondroitin-4- und Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, die Keratansulfate sowie das Heparin kovalent an Protein bzw. Polypeptide ge-

bunden. Ob das gleiche auch für Hyaluronsäuren gilt, ist noch nicht endgültig geklärt (1). Zur Strukturaufklärung der genannten Verbindungen ist es notwendig, genaue Uronsäure-, Hexosamin- und

Aminosäureanalysen durchzuführen. Dabei müssen oft kleine Mengen an Aminosäuren und Neutralzucker neben sehr viel Uronsäure und Hexosamin quantitativ nachgewiesen werden. Das ist mit Hilfe der Papierchromatographie nur bedingt möglich.

Die Methode der Wahl ist die quantitative Trennung der Aminosäuren und Hexosamine an Ionenaustauschersäulen und ihre anschließende Bestimmung mit Ninhydrin (2).

Analyse von Glykosaminoglykanpeptiden

Wie schon ANDERSON und Mitarbeiter (3) zeigten, traten bei der Hydrolyse von Glykosaminoglykanpeptiden Aminosäureverluste auf. Sie hydrolysierten Chondroitin-6-sulfat, das durch Extraktion mit Alkali aus Knorpel isoliert und gereinigt war, zusammen mit Edestin, dessen Aminosäurezusammensetzung sie kannten. Besonders auffallend war der Verlust an Arginin, Glutaminsäure, Prolin, Valin, Isoleucin und Tyrosin. Außerdem fanden sie zahlreiche unbekannte ninhydrinpositive Peaks, ganz gleich, ob sie Chondroitinsulfat allein oder in Gegenwart bekannter Mengen Edestin hydrolysierten. Darüberhinaus enthielten die Hydrolysate beträchtliche Mengen an Ammoniak, das offenbar durch die Zerstörung von Hexosaminen während der Hydrolyse entstanden war. Dieser hohe Ammoniakgehalt verursachte eine erhöhte Basislinie und störte gelegentlich die exakte Bestimmung der basischen Aminosäuren. Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über den Aminosäuregehalt hochgereinigter Hyaluronsäuren (4) und anderer Glykosaminoglykane prüften wir ebenfalls, in welchem Ausmaß Aminosäuren bei der Hydrolyse in Gegenwart von Glykosaminoglykanen zerstört werden. Dazu wollten wir möglichst aminosäurefreie, aber chemisch noch intakte Glykosaminoglykane herstellen, um dann deren Hydrolyse gemeinsam mit zugesetzten, reinsten Aminosäuren durchzuführen und festzustellen, unter welchen Hydrolyse-Bedingungen die Zerstörung von Aminosäuren am besten verhindert werden könnte. Die für die hier geschilderten Versuche benötigten Glykosaminoglykane wurden nach enzymatischem Abbau der entsprechenden Gewebe mit Papain nach den im experimentellen Teil angegebenen Methoden isoliert. Versuche, die Peptide aus den Glykosaminoglykanen durch weiteren enzymatischen Abbau mit Pronase und anschließender Einwirkung von 0,5N Kalilauge (24 Stdn. bei 4°) zu entfernen, führten zu keinem endgültigen Erfolg. So enthielt Chondroitin-4-schwefelsäure, die aus Luftröhrenknorpel vom Rind durch Abbau der Proteine mit Papain gewonnen war, nach der Hydrolyse mit HCl noch insgesamt 227 μMol Aminosäuren/g. Nach der Pronasebehandlung waren es noch 116 μMol Aminosäuren/g und nach Einwirkung von Kalilauge 77 μMol Aminosäuren/g. Bis dahin schien die Kohlenhydratkette chemisch noch nicht sehr stark verändert gewesen zu sein. Eine intensivere Behandlung mit Kalilauge führte jedoch zu einer nennswerten Änderung der Glykosaminoglykanstruktur (Abspaltung von Sulfat-, Acetylgruppen). Ähnliche Befunde erhielten wir mit Hyaluronsäure, auch

hier waren die Peptide durch Einwirkung von Pronase und 0,5N Kalilauge nicht restlos zu entfernen (4). Da sich also die Restpeptide aus den Glykosaminoglykanen nicht weiter entfernen ließen, wurden alle Versuche mit den in Tabelle 1 aufgeführten Glykosaminoglykan-Peptiden durchgeführt.

Tab. 1

Bausteinanalysen einiger Glykosaminoglykan-Peptide in %. Analysiert wurden Hyaluronsäure aus menschlicher Nabelschnur, Heparin aus Rinderlungen, Chondroitin-4-sulfat aus Rindertrachea, Dermatan-sulfat aus Schweinehaut, Chondroitin-6-sulfat aus dem Knorpel von Grundhai, Keratansulfat aus Rindercornea (zur Bezeichnung I und II siehe exp. Teil)

Die Glykosaminoglykane lagen alle als Natriumsalze vor. (* Galaktosewert, bestimmt nach der Anthron-Methode; ** Glucosaminwert, bestimmt nach 5stündiger Hydrolyse der Keratansulfate in 6N Salzsäure)

Baustein	Hyaluronsäure	Heparin	Chondroitin-4-sulfat	Dermatansulfat	Chondroitin-6-sulfat	Keratansulfat	Keratansulfat II
Uronsäure	44,8	34,1	35,5	29,1	36,2	33,6*	34,3*
Hexosamin	41,3	27,7	33,6	28,9	31,8	36,7**	37,1**
Stickstoff	3,5	2,9	3,1	3,3	3,1	2,9	3,1
Schwefel	—	10,9	5,4	5,1	6,0	5,6	6,0
Lysin	—	0,12	0,07	0,32	0,12	0,24	—
Histidin	0,08	0,05	0,03	0,08	0,06	0,17	0,16
Arginin	—	0,02	0,01	0,01	0,03	0,09	—
Asparaginsäure	0,02	0,05	0,19	0,29	0,13	1,04	0,66
Threonin	—	—	0,10	0,02	0,03	0,26	0,11
Serin	0,01	0,03	0,64	0,32	0,17	0,21	0,22
Glutaminsäure	0,02	0,02	0,30	0,37	0,21	0,33	0,27
Prolin	—	—	0,17	0,08	0,22	0,11	0,04
Glycin	0,01	0,06	0,25	0,14	0,16	0,21	0,17
Alanin	—	0,03	0,09	0,26	0,06	0,14	0,10
Cystin/2	—	—	—	—	—	—	—
Valin	—	—	0,15	—	0,05	0,32	0,19
Methionin	—	—	—	—	—	0,11	0,07
Isoleucin	—	—	—	—	—	0,09	0,06
Leucin	—	—	0,23	0,02	0,08	0,13	0,05
Tyrosin	0,01	0,02	0,02	0,71	—	0,10	0,01
Phenylalanin	—	—	0,15	—	0,05	0,29	0,18
Summe der Aminosäuren	0,15	0,40	2,40	2,62	1,37	3,84	2,29

Hyaluronsäure und Chondroitin-4-sulfat hydrolysierten wir in Gegenwart eines Aminosäuren-Testgemisches mit 6N HCl bei 110°. Um einen starken Abbau der Hexosamine und Aminosäuren durch Neben- und Nachfolgereaktionen tunlichst zu vermeiden, haben wir die Proteo- bzw. Peptidoglykane immer in einem relativ großen Volumen Salzsäure 20—24 Stdn. hydrolysiert. Längere Hydrolysezeiten führten nur zu einer weiteren Zerstörung der Hexosamine, die Aminosäurenwerte wurden hierdurch nicht erhöht. Offenbar reichte die Hydrolysezeit aus, um alle Peptidbindungen zu spalten. Kürzere Hydrolysezeiten und geringere Salzsäurekonzentrationen waren nicht zu empfehlen, da unter diesen Bedingungen die Peptide oder Proteine nicht genügend *abgebaut* wurden. Hydrolysen in konzentrierteren Lösungen führten zu größeren Aminosäureverlusten. Wie Tabelle 2 zeigt, treten sowohl bei der Hydrolyse von Hyaluronsäuren als auch Chondroitinsulfaten zum Teil bemerkenswerte Aminosäureverluste auf. Besonders auffallend waren sie für Arginin, Glutaminsäure, Methionin und Tyrosin; Cystin war nahezu ganz zerstört worden. In allen Hydrolysaten lag relativ viel Ammoniumchlorid vor, das auch hier durch Zerstörung der Hexosamine während der Hydrolyse entstanden sein dürfte. Außerdem hatten sich in den gelb bis braun gefärbten Hydrolysaten

Tab. 2

2,5- μ Mol-Aminosäuretestgemisch (eine Lösung, die alle in der Tabelle aufgeführten Aminosäuren enthält, und zwar von jeder Aminosäure 2,5 μ Mol) plus 50 mg des jeweilig aufgeführten Glykosaminoglykans wurden in 50 ml 6N Salzsäure 24 Std. unter N₂ auf 110° erwärmt, die Lösung im Vakuum schonend eingedampft, der trockene Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und jeweils 1 ml der Aminosäureanalyse unterzogen. Desgleichen wurde mit den entsprechenden Glykosaminoglykanen allein verfahren und die erhaltenen Aminosäurewerte von der vorher bestimmten abgezogen. Die in der Tabelle aufgeführten Werte stellen die Ausbeuten in % dar. Der Verlust an Cystein war groß

Aminosäure	Hyaluronsäure*	Hyaluronsäure**	Chondroitin-4-sulfat	Chondroitin-6-sulfat	Mittelwert
Lysin	109,4	111,2	105,7	104,9	107,8
Histidin	99,4	103,1	98,9	100,2	100,4
Arginin	87,1	88,7	84,7	83,3	85,9
Asparaginsäure	92,2	93,7	94,8	93,3	93,5
Threonin	98,2	94,9	93,2	94,3	95,1
Serin	97,8	98,2	95,7	94,1	96,4
Glutaminsäure	88,7	87,1	90,9	91,3	89,5
Prolin	97,2	95,9	94,8	95,6	95,8
Glycin	93,6	92,7	92,9	91,9	92,6
Alanin	93,1	94,2	91,4	93,2	92,9
Valin	100,2	102,4	99,2	99,8	100,4
Methionin	81,1	81,9	70,3	67,3	71,7
Isoleucin	96,5	97,1	94,9	95,7	96,0
Leucin	97,6	95,7	95,9	94,8	96,0
Tyrosin	81,1	77,9	75,2	78,1	78,0
Phenylalanin	99,2	104,7	95,8	96,4	99,0

* aus Glaskörper

** aus Nabelschnur

schwarze, in 6N HCl unlösliche „Huminsubstanzen“ gebildet. Um festzustellen, ob Aminosäuren in nennenswertem Maße von der Huminsubstanz absorbiert werden, haben wir jeweils 30 mg der isolierten „Huminsubstanz“ in 3 ml Aminosäuretestgemisch, das je 1,5 μ Mol der in Tabelle 1 aufgeführten Aminosäuren enthält, geschüttelt, den Niederschlag scharf abzentrifugiert und im Überstand die Aminosäuren quantitativ bestimmt. Bis auf Tyrosin und Phenylalanin fanden wir alle Aminosäuren zu $100 \pm 2\%$ wieder. Nur die Werte für Tyrosin und Phenylalanin lagen um $95 \pm 3\%$ bzw. $93 \pm 4\%$.

Abbau der Uronsäuren und Huminbildung in starker Mineralsäure

Während der salzsauren Hydrolyse der Glykosaminoglykan-Peptide entstanden stets schwarze Niederschläge in nennenswerter Menge. Glucuronsäure, Galakturonsäure sowie Furfurol reagierten ähnlich, wenn sie in 6N HCl unter Rückfluß erhitzt wurden. In jedem Fall entstand schon nach kurzer Reaktionszeit ein schwarzer Niederschlag und die Reaktionslösungen waren gelb bis braun gefärbt. Nach Ausschütteln mit Xylol konnten in der abgetrennten organischen Phase mit Anilin und Eisessig rot gefärbte Lösungen erhalten werden. Die Spektren dieser Lösungen waren gleich und ergaben ein Absorptionsmaximum bei 530 nm. Offenbar bildeten sich intermediär Furfurol oder verwandte Verbindungen, die sofort weiter abgebaut wurden. ANDERSON und Mitarbeiter (5) erhielten bei der Decarboxylierung von Uronsäuren durch Kochen in 19proz. Salzsäure neben CO₂ in geringen Mengen noch andere flüchtige Verbindungen wie Furan, Acetaldehyd und Aceton. Unter dem Einfluß starker Mineralsäuren decarboxylieren die Uronsäuren auch in Glykosaminoglykanen. Dabei sollten sich intermediär ohne oder unter gleichzeitiger Spaltung der Glykosidbindungen die den Uronsäuren entsprechenden Pentosen bilden, die dann unter dem Einfluß

der Mineralsäure in Furfurol und weitere Umwandlungsprodukte übergehen. So einfach scheint der Abbauweg aber nicht zu sein. Es gelang uns nicht, in salzsauren Lösungen von Glucuronsäure bzw. Galakturonsäure (in 2—6N HCl), die unterschiedlich lang auf 110° erhitzt waren, Pentosen wie Arabinose bzw. Xylose gaschromatographisch auch nur in Spuren nachzuweisen, selbst unter Bedingungen nicht, unter denen wir vorher zugesetzte Pentosen wiederfanden. Ähnliches galt für Hyaluronsäure und Chondroitin-6-sulfat. Bei den schwarzen „Huminrückständen“ handelt es sich aufgrund der Elementaranalysen (Tab. 3) um praktisch stickstofffreie Verbindungen, die sich in Natronlauge lösen und mit Säure wieder ausgefällt werden können. Dasselbe Ergebnis erhielten wir, wenn die oben genannten Verbindungen in Gegenwart zugesetzter Aminosäuren hydrolysiert wurden. Es wird demnach praktisch kein Stickstoff aus den Hexosaminen bzw. Aminosäuren in die Huminsubstanz eingebaut.

Tab. 3

Huminartige Rückstände nach 15stündiger Hydrolyse der aufgeführten Substanzen in 6N HCl bei 110°

Huminrückstand aus	C %	H %	N %
Hyaluronsäure	65,2	4,8	0,01
Chondroitin-4-sulfat	64,7	4,4	0,03
Chondroitin-6-sulfat	64,4	4,2	0,00
D-Glucuronsäure	64,4	4,3	0,00
Furfurol	67,5	4,8	0,00

Epimerisierungen

Neben den üblichen Aminosäurepeaks treten, wie das Aminosäurechromatogramm eines Chondroitin-4-sulfat-Peptid-Hydrolysats zeigt (Abb. 1), neue ninhydrinpositive, bei 440 nm und 570 nm registrierte Peaks auf, vor allem im Bereich vor der Asparaginsäure, zwischen Leucin und Tyrosin sowie nach dem Galaktosamin. Der letzte Peak in Abbildung 1 stellt Ammoniak dar, basische Aminosäuren werden in diesem Bereich — nach 7—8 Stunden — nicht von der 69/0,9-Beckman-Unichrom-Säule eluiert. Im Bereich der basischen Aminosäuren traten nach Chromatographie an der 23/0,9-Beckman-Unichrom-Säule neue ninhydrinpositive Peaks auf, die zum Teil im Lysin- (Keratansulfat-Hydrolysats) als auch im Histidinbereich (Hyaluronsäure-Hydrolysats) lagen. Diese Aminosäuren ließen sich daher nicht immer genau bestimmen. Mit den Hydrolysaten der übrigen in Tabelle 1 aufgeführten Glykosaminoglykan-Peptide erhielten wir auf beiden Säulen ähnliche Trennungen. Auch auf dem nach dem Biocal-Einsäulenverfahren erhaltenen Chromatogramm eines Hyaluronsäure-Hydrolysats (Abb. 2) fanden wir im Bereich zwischen Glucosamin und Ammoniak einige neue ninhydrinpositive Substanzen; auf dem Chromatogramm eines Chondroitin-4-sulfat-Hydrolysats (Abb. 3) erschienen sie zum Teil erst hinter dem Ammoniakgipfel. Beim Erhitzen eines Gemisches aus gleichen Teilen Glucuronsäure und Glucosamin in 6N HCl unter Stickstoff auf 110°, entstanden neben viel Ammoniak noch andere ninhydrinpositive Substanzen, deren Lage auf dem Chromato-

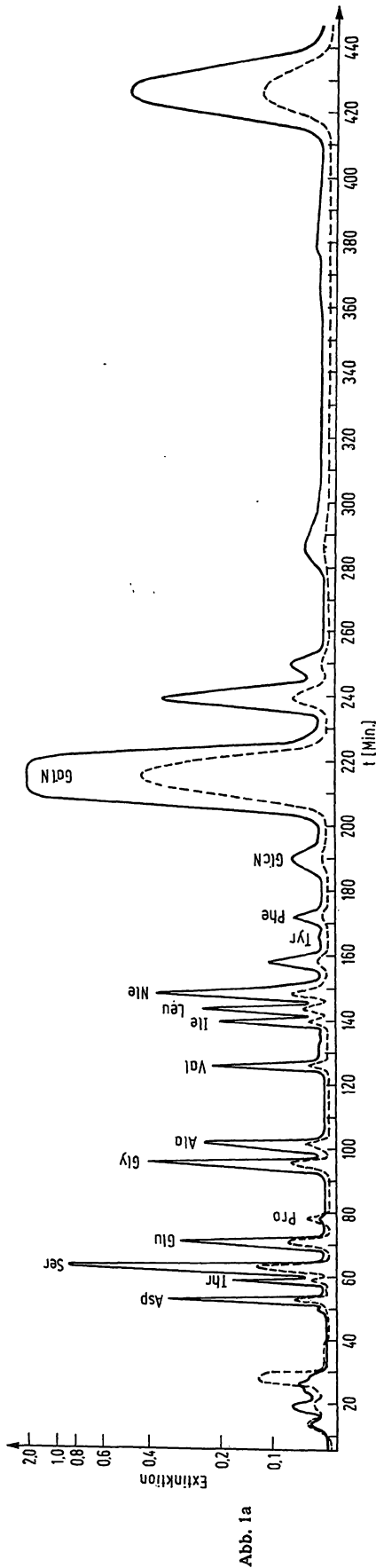


Abb. 1a

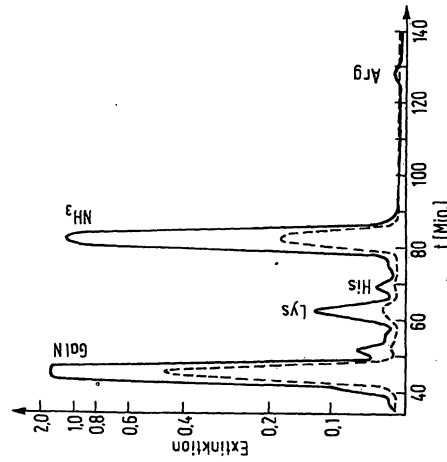


Abb. 1b

Abb. 1a u. 1b
 Aminosäuren-Hexosamin-Diagramm eines Chondroitinschwefelsäure-Hydrolysats. 50 mg Chondroitin-4-sulfat wurden in 50 ml 0N HCl 24 Stdn. unter Stickstoff in einer Ampulle auf 110° erwärmt, das Hydrolysat im Vakuum schonend eingedampft, der Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und zur Analyse 1 ml davon auf die jeweilige Säule des Beckman-Aminosäureanaly- sators aufgetragen
 — = $\lambda = 570$ nm, - - - = $\lambda = 440$ nm

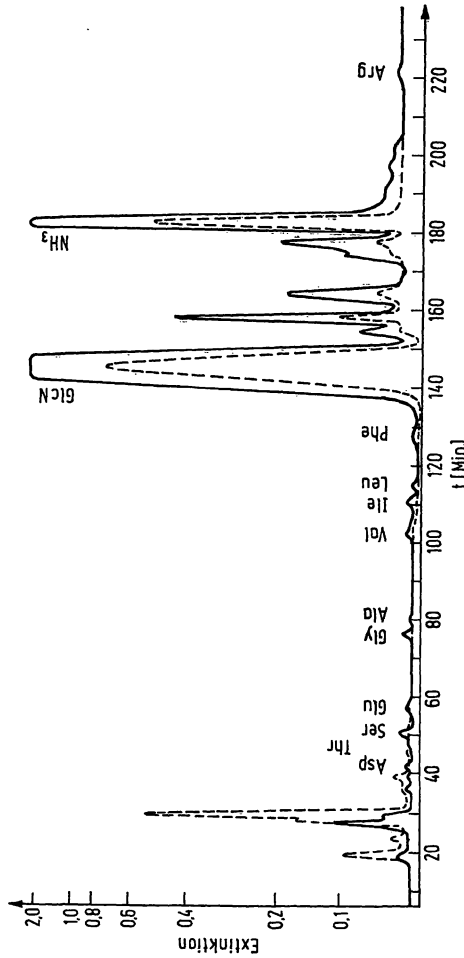


Abb. 2

Aminosäuren-Hexosamin-Diagramm eines Hyaluronsäure-Hydroly- sats nach Auftragen auf die 0,9/60-cm-Säule des Aminosäureanaly- sators BC 200. Mengen und Hydrolysebedingungen wie unter Ab- bildung 1 beschrieben. Die zwischen dem Glucosamin- und Ammo- niakpeak liegenden unbekannt Peaks verhindern eine quantitative Bestimmung von Histidin und Lysin
 — = $\lambda = 570$ nm, - - - = $\lambda = 440$ nm

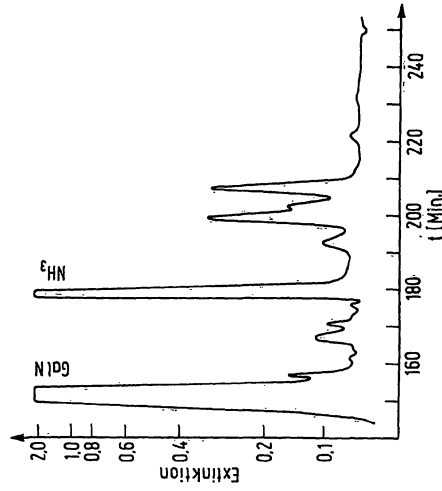
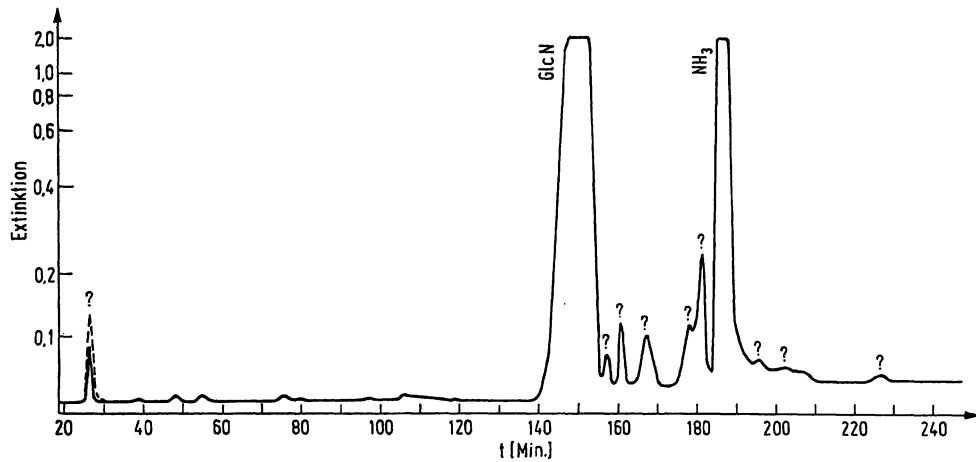


Abb. 3

Ausschnitt aus dem Aminosäuren-Hexosamin- Diagramm eines Chondroitin-4-sulfat-Hydrolysats, das auf der 0,9/60-cm-Säule des BC 200 unter den gleichen Bedingungen, wie unter Abbildung 2 beschrieben, getrennt wurde. Auch hier ist eine exakte Auswertung der basischen Aminosäuren nicht möglich
 — = $\lambda = 570$ nm

Abb. 4

10 mg reinstes Glucosamin-HCl und 10 mg Glucuronsäure wurden in 50 ml 6N HCl 24 Stdn. unter Stickstoff in einer Ampulle auf 110° erhitzt, die Lösung im Vakuum schonend eingedampft, der Rückstand in 2 ml Citratpuffer aufgenommen und 1 ml auf die 0,9/60-cm-Säule des BC 200 aufgetragen. Das Diagramm weist am Anfang einen Peak auf, der sowohl bei 440 nm als auch 570 nm registriert wurde. Zwischen dem Glucosamin- und dem Ammoniakpeak treten zahlreiche neue ninhydrinpositive Substanzen auf, ebenfalls hinter dem Ammoniakpeak. Nicht mit Salzsäure behandeltes Glucosamin-HCl ergab nur einen einzelnen, symmetrischen Peak



gramm (Abb. 4) derjenigen der unbekanntenen ninhydrinpositiven Substanzen des Hyaluronsäure- bzw. Chondroitinschwefelsäure-Hydrolysats entsprach (siehe Abb. 2 und 3).

Welcher Art die neugebildeten ninhydrinpositiven Substanzen sind, wissen wir noch nicht. Da sie aber, jedenfalls zum Teil, durch Behandlung mit Acetylaceton in Pyridinpuffer pH 9,5 in Chromogene umgewandelt werden konnten, ist zu vermuten, daß es sich bei der einen oder anderen neugebildeten Substanz um einen von Glucosamin und Galaktosamin verschiedenen Aminozucker handelt. Diese Vermutungen werden durch einen Befund von MUIR (6) unterstützt, die in einem Chondroitinsulfat-Hydrolysats, besonders nach längerer Einwirkung von 2–6N Salzsäure, einen neuen Aminozucker fand. Nach papierchromatographischer Trennung von Glucosamin und Galaktosamin ergab dieser durch Abbau mit Ninhydrin eine Pentose, die in ihrem chromatographischen Verhalten nicht von Lyxose unterschieden werden konnte. MUIR schloß daher auf Talosamin, das Epimere des Galaktosamins. Offenbar hatte während der Hydrolyse u. a. eine Epimerisierung des Galaktosamins stattgefunden.

Entfernung der Hexosamine und ihrer Umwandlungsprodukte durch Chromogenbildung mit Acetylaceton

Die Umwandlungsprodukte der Hexosamine stören somit, zumindest bei der Aminosäurechromatographie an einer einzigen Ionenaustauschersäule (Einsäulenverfahren) die Bestimmung der basischen Aminosäuren, die in Glykosaminoglykan-Peptid-Hydrolysaten neben großen Mengen an Hexosaminen nur in geringer Menge vorliegen. Um diesen Schwierigkeiten zu entgehen, stellten wir uns die Aufgabe, die Hexosamine und ihre Umwandlungsprodukte durch Chromogenbildung mit Acetylaceton in flüchtige oder nicht mehr mit Ninhydrin reagierende Derivate umzuwandeln, ohne daß dabei die Aminosäuren in Mitleidenschaft gezogen würden.

Erhitzt man Hexosamine in alkalischem Milieu mit Acetylaceton, so erhält man Chromogene, die in saurer Lösung mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd violette bis purpurrote Färbungen ergeben. SCHLOSS (7) fraktio-

nierte diese Chromogene und erhielt neben einer Flüssigkeit mehrere feste Substanzen, die er aber nicht näher charakterisierte. Aus einem ELSON-MORGAN-Reaktionsgemisch (8) destillierten CORNFORTH und FIRTH (9) 2-Methyl-pyrrol und isolierten aus dem Rückstand 2-Methyl-3-acetyl-pyrrol. Es war nach diesen Befunden und nach Arbeiten von CESSI und PILIEGO (10) anzunehmen, daß auch nach Erhitzen eines Hexosamin-Aminosäuren-Gemisches mit Acetylaceton in alkalischem Milieu die Hexosamine quantitativ in Chromogen umgewandelt und wenigstens zum Teil abdestilliert werden könnten. Darüber hinaus hofften wir, daß die nichtflüchtigen Chromogene nicht mit Ninhydrin reagieren und somit auch nicht die Bestimmung der Aminosäuren stören würden.

Aminosäuretestgemische wurden deshalb gemeinsam mit größeren Mengen (etwa 10 μ Mol) Glucosamin und Galaktosamin in einem Pyridinpuffer pH 9,5 eine Stunde lang in Gegenwart von Acetylaceton auf dem Dampfbad erhitzt und das Reaktionsgemisch anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingedampft. Den Rückstand lösten wir in Wasser und entnahmen der Lösung aliquote Teile zur Aminosäureanalyse. Wir konnten auf diese Weise die Hexosamine so weit entfernen, daß sie die Bestimmung der Aminosäuren nicht mehr störten. Die Umwandlungsprodukte der Hexosamine ergaben im gesamten Aminosäuren-Diagramm keine störenden ninhydrinpositiven Peaks, noch gingen sie mit den Aminosäuren selbst in wesentlichem Umfang auf Kosten letzterer ein (siehe Tab. 4, Spalte 1).

Um das Verhalten des Hexosamin-Aminosäuren-Gemisches unter den Bedingungen einer salzsäuren Hydrolyse zu prüfen, haben wir das Testgemisch 20 Stunden lang in 6N HCl auf 110° erhitzt, das „Hydrolysats“ im Vakuum zur Trockene eingedampft und den Rückstand mit Acetylaceton behandelt. Tryptophan wurde zerstört. Auch Methionin und Cystein unterlagen einem partiellen Abbau. Cysteinsäure und Methioninsulfon entstanden nur in geringer Menge. Sie konnten den Verlust an schwefelhaltigen Aminosäuren nicht ausgleichen. Alle übrigen Aminosäuren fanden wir innerhalb der zugelassenen Fehlergrenze quantitativ wieder (Tabelle 4, Spalte 2). Die Hexosamine waren im Chromatogramm nicht mehr nachzuweisen. Fügte man den Aminosäuren-

Tab. 4

Übersicht über die in Gegenwart von Glucosamin, Glucuronsäure bzw. Galaktose durchgeführten Aminosäureanalysen (n = 4) und deren Fehler.
 \bar{x} = wiedergefundene Aminosäuremenge in μg

Spalte 1:
 2,5 μMol Aminosäuretestgemisch (ein Gemisch, das alle in Tabelle 1 aufgeführten Aminosäuren enthält, und zwar von jeder Aminosäure 2,5 μMol) und 10 μMol Glucosamin-HCl wurden in 50 ml 6N Salzsäure 24 Stdn. unter Stickstoff auf 110° erwärmt, die Lösung im Vakuum schonend eingedampft, der trockene Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und jeweils 1 ml der Aminosäureanalyse unterzogen (Beckman-Unichrom-Aminosäureanalysator).

Spalte 2:
 „Hydrolysen“ wie unter 1. Nach Eindampfen des Hydrolysats im Vakuum wurde der trockene Rückstand in Pyridinpuffer pH 9,5 mit Acetylaceton behandelt (siehe exp. Teil), das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen. Analyse wie unter 1.

Spalte 3:
 Gemisch wie unter 1, zusätzlich 10 μMol Glucuronsäure. Hydrolyse, Aufarbeitung und Analyse wie unter 1.

Spalte 4:
 Wie unter 3, nur hier wiederum Aufnahme des trockenen Hydrolyserückstandes in Pyridinpuffer pH 9,5 und anschließende Behandlung mit Acetylaceton. Aufarbeitung und Analyse wie unter 2.

Spalte 5:
 Wie unter 3, nur anstelle von 10 μMol Glucuronsäure 10 μMol Galaktose im Testgemisch.

Spalte 6:
 Wie unter 5, nur daß der Hydrolysenrückstand vor der Analyse mit Acetylaceton in Pyridinpuffer pH 9,5 behandelt wurde.

Aminosäure	Einge- setzte Menge (μg)	1			2			3		
		\bar{x}	s	Fehler %	\bar{x}	s	Fehler %	\bar{x}	s	Fehler %
Lysin	73,1	73,2	1,15	+0,13	71,2	1,11	-2,60	74,1	0,55	+1,37
Histidin	77,6	77,5	0,62	-0,13	76,4	1,17	-1,50	77,9	0,43	+0,39
Arginin	87,1	86,3	1,75	-0,92	83,3	1,17	-7,80	85,0	0,67	-8,15
Asparaginsäure	66,5	66,7	1,18	+0,30	66,4	0,47	-0,15	67,6	0,38	+1,65
Threonin	59,5	59,3	0,51	-0,34	58,1	0,68	-2,35	59,5	0,37	± 0
Serin	52,5	51,8	0,95	-1,33	51,9	0,26	-0,95	52,3	0,43	-0,38
Glutaminsäure	73,5	74,9	1,24	+1,90	72,8	0,22	-0,95	74,3	0,38	+1,07
Prolin	57,5	58,9	1,01	+2,43	57,6	0,41	+0,17	57,5	0,41	± 0
Glycin	37,5	37,5	0,48	-0,27	37,6	0,35	+0,27	37,6	0,44	+0,27
Alanin	44,5	44,9	0,56	+0,90	43,9	0,34	-1,34	44,5	0,35	± 0
Cystin/2	60,0	46,2	1,05	-23,00	32,8	0,81	-45,30	40,6	0,47	-32,30
Valin	58,5	59,2	0,98	+1,19	57,5	0,39	-1,70	57,6	0,29	-1,56
Methionin	74,6	60,6	1,68	-18,76	45,2	0,87	-39,41	56,8	0,41	-23,86
Isoleucin	65,6	65,8	0,38	+0,30	64,2	0,51	-2,13	66,1	0,25	+0,76
Leucin	65,6	65,4	0,76	-0,30	63,5	0,65	-3,20	63,7	0,37	-2,90
Tyrosin	90,6	90,7	0,81	+0,11	89,6	0,64	-1,00	87,2	0,41	-3,75
Phenylalanin	82,6	84,4	0,54	+2,17	82,3	0,68	-0,36	81,6	0,26	-1,21

Aminosäure	4			5			6		
	\bar{x}	s	Fehler %	\bar{x}	s	Fehler %	\bar{x}	s	Fehler %
Lysin	62,1	1,00	-15,05	74,9	0,78	+2,60	63,9	0,41	-12,44
Histidin	66,1	1,16	-14,82	76,5	0,49	-1,42	50,5	0,55	-34,92
Arginin	67,2	2,65	-22,85	84,7	0,52	-2,76	66,6	0,46	-23,53
Asparaginsäure	60,7	0,52	-8,72	66,2	0,39	-0,45	61,1	0,61	-8,01
Threonin	53,2	0,69	-10,59	58,3	0,31	-2,02	52,9	0,33	-10,92
Serin	47,8	0,56	-8,95	51,9	0,28	-0,95	50,8	0,59	-3,23
Glutaminsäure	62,2	1,09	-15,37	70,8	0,39	-3,67	57,9	0,37	-21,22
Prolin	51,5	1,42	-10,43	56,5	0,26	-1,74	51,8	0,22	-9,91
Glycin	33,4	0,46	-10,93	37,5	0,29	± 0	32,9	0,33	-12,26
Alanin	40,8	0,86	-8,31	44,1	0,35	-0,90	41,2	0,57	-7,41
Cystin/2	15,7	3,90	-73,83	33,1	0,59	-46,50	16,0	2,20	-73,30
Valin	52,4	1,62	-10,43	57,1	0,47	-2,39	52,5	0,37	-10,25
Methionin	14,5	2,92	-80,56	18,5	0,56	-75,20	18,4	1,35	-75,32
Isoleucin	59,8	2,02	-8,84	66,5	0,46	+1,37	64,2	0,40	-2,13
Leucin	56,6	1,30	-13,72	65,4	0,38	-0,30	58,9	0,42	-10,21
Tyrosin	76,4	1,29	-15,67	86,8	0,51	-4,20	75,6	0,37	-16,55
Phenylalanin	71,7	0,54	-13,20	79,5	0,49	-3,76	69,5	0,42	-15,86

testgemischen außer Hexosamin noch Glucuronsäure zu, so erhielt man nach 20-stündiger Hydrolyse ebenfalls bis auf Methionin, Cystein und Tryptophan alle Aminosäuren quantitativ zurück (Tabelle 4, Spalte 3). Erst nach Behandlung solcher „Hydrolysate“ mit Acetylaceton in Pyridinpuffer pH 9,5 traten starke Aminosäurenverluste auf (Tabelle 4, Spalte 4). Mit Galaktose anstelle von Glucuronsäure ergab sich ein ähnliches Bild (Tabelle 4, Spalte 5 und 6). Die Hexosamine waren nach der Behandlung der Testgemische mit Acetylaceton bei pH 9,5 nicht mehr auf dem Chromatogramm nachweisbar. Im Zusammenhang mit den eben genannten Aminosäurenverlusten sind Befunde von CESSI und PLIEGO (10) interessant, die Aminosäuren zusammen mit Glucose der Reaktion mit Acetylaceton in alkalischer Lösung unterwarfen. Sie erhielten in den meisten Fällen nach Zugabe

einer salzsauren Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd purpurrot gefärbte Lösungen mit einem Absorptionsmaximum bei 530 nm. Lysin ergab hierbei den höchsten, Tryptophan den niedrigsten Wert. Wir konnten ähnliche Befunde mit Galaktose, Mannose und Glucuronsäure erheben. Erhitzen wir die Kohlenhydrate mit den entsprechenden Aminosäuren zuvor einige Stunden in 6N HCl auf 110°, so ergab die im Vakuum schonend bis zur Trockene eingedampfte Lösung einen dunkelbraunen Rückstand, der, in Wasser gelöst, die genannte Reaktion mit Acetylaceton/*p*-Dimethylaminobenzaldehyd nicht mehr ergab. Es ist demnach nicht möglich, den Verlust an Aminosäuren nach Behandlung der Hydrolysate mit Acetylaceton bei pH 9,5 auf die Bildung ELSON-MORGAN-positiver Substanzen zurückzuführen. Um außer an Testgemischen die Methode auch an Natur-

stoffen zu studieren, haben wir neben Chitin noch die in Tabelle 1 aufgeführten Glykosaminoglykan-Peptide zusammen mit Aminosäuretestgemischen 24 Stunden lang in 6N HCl unter Stickstoff auf 110° erhitzt, das Hydrolysat eingedampft und aliquote Teile direkt bzw. erst nach Behandlung mit Acetylaceton analysiert. Wie Tabelle 5 zeigt, treten größere Aminosäureverluste nach Behandlung mit Acetylaceton in Pyridinpuffer pH 9,5, bei all den Substanzen auf, die Uronsäure bzw. Galaktose enthalten, während die Aminosäuren, die zusammen mit Chitin hydrolysiert wurden, in annehmbaren Mengen zurückerhalten wurden. In Abbildung 5 haben wir die

Chromatogramme der unterschiedlich behandelten Chondroitin-4-sulfat/Aminosäuren-Hydrolysate aufgeführt. Wie man sieht, verschwinden die Hexosamine nach der Acetylacetonbehandlung vollständig, außerdem der in Abbildung 1 zwischen Leucin und Tyrosin liegende ninhydrinpositive, bei 570 nm registrierte Gipfel. Dafür tritt aber im Bereich zwischen Serin und Glutaminsäure ein bei 440 nm registrierter Gipfel auf.

Zur Trennung von Hexosaminen und Aminosäuren an Ionenaustauschersäulen

Vor einigen Jahren gelang es uns (11), unter Verwendung einer Eingradienten-Mikrosäule, Aminosäuren, die in einem Hyaluronsäure-Hydrolysat in geringer Menge vorlagen, aufzutrennen und quantitativ zu bestimmen. Bedingt durch den hohen Glucosamingehalt war es jedoch nicht möglich, den Wert für Leucin und Tyrosin exakt zu ermitteln, da der zwischen Leucin und Tyrosin erscheinende Glucosamingipfel die genannten Aminosäuren teilweise überdeckte. Außerdem war die quantitative Analyse der basischen Aminosäuren aus den oben genannten Gründen problematisch. Das gleiche galt auch bei der Analyse dieses Hydrolysats an Amberlite CG 120 und IRC-50 in einer Apparatur nach HANNIG (12), sowie an Aminex-6-Ionenaustauschharz nach dem Einsäulenverfahren mit dem Biocal-BC-200 und an PA 28- und PA 35-Ionenaustauscherharzen nach dem Zweisäulenverfahren mit dem Beckman-Unichrom-Gerät. Da jedoch die Trennfolge der Hexosamine dank ihrer besonderen ionischen Struktur durch eine Änderung des pH-Bereichs zwischen 3,25 und 4,25 nicht stark beeinflusst wird — was für Aminosäuren nicht gilt —, konnten wir die aromatischen Aminosäuren durch zeitliche Änderung des Pufferwechsels von den Hexosaminen trennen. Dabei erschienen je nach Art des Pufferwechsels die Hexosamine entweder vor, zwischen oder hinter den aromatischen

Tab. 5

Jeweils 50 mg Glykosaminoglykan wurden zusammen mit 5 μ Mol Aminosäuretestgemisch (vgl. Tab. 1,1) in 50 ml 6N Salzsäure 24 Stdn. unter Stickstoff auf 110° erhitzt, das Hydrolysat im Vakuum schonend zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen. Jeweils 4 ml wurden in Kölbchen pipettiert und wiederum bis zur Trockene eingedampft. Der neue Rückstand wurde zur Analyse gleich in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen, der andere mit Acetylaceton in Pyridinpuffer pH 9,5 behandelt (vgl. exp. Teil). Diese Lösung wurde ebenfalls im Vakuum bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 zur Analyse gelöst. In den einzelnen Spalten sind die Aminosäureverluste in Prozent nach Behandlung der Hydrolysate mit Acetylaceton aufgeführt

Hier wurden 25 mg Chitin mit 5 μ Mol Aminosäuretestgemisch hydrolysiert. Aufarbeitung und Analysen wie beschrieben

Aminosäure	Hyaluron-säure	Chondroitin-4-sulfat	Chondroitin-6-sulfat	Heparin	Keratan-sulfat	Chitin
Lysin	39,96	48,62	46,09	44,04	15,30	2,9
Histidin	34,84	38,38	47,67	35,19	12,88	3,1
Arginin	32,34	46,91	46,95	37,12	17,91	3,9
Asparaginsäure	33,16	25,25	30,86	40,39	7,91	1,0
Threonin	30,06	21,29	34,74	34,44	5,78	4,3
Serin	28,05	22,83	32,66	36,11	2,11	3,9
Glutaminsäure	34,15	41,63	43,56	41,68	8,23	4,8
Prolin	63,35	58,91	86,15	69,42	25,80	4,7
Glycin	30,88	25,89	38,19	12,06	8,60	3,0
Alanin	27,67	16,20	34,50	7,55	2,53	1,8
Cystin/2	59,51	81,33	70,33	66,13	44,65	18,2
Valin	29,72	15,62	27,51	15,25	10,63	2,8
Methionin	32,73	21,16	41,56	30,56	64,40	17,3
Isoleucin	30,63	13,63	32,17	22,85	8,63	3,1
Leucin	32,05	19,17	35,99	27,15	10,73	3,9
Tyrosin	28,89	24,08	30,68	28,55	6,63	2,1
Phenylalanin	26,75	18,98	20,06	28,71	8,95	3,4
Tryptophan	—	—	—	—	—	—

Abb. 5a
— $\lambda = 570$ nm
- - - $\lambda = 440$ nm

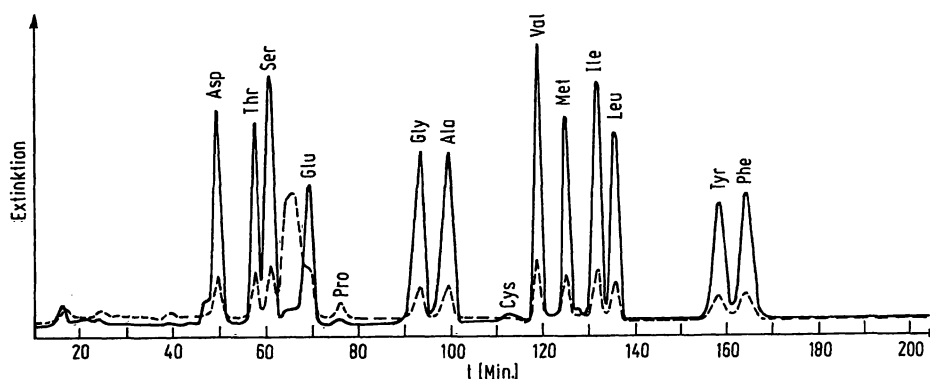


Abb. 5a u. 5b

Aminosäuren-Hexosamin-Diagramm eines Chondroitin-4-sulfat/Aminosäuren-Hydrolysats. 50 mg Chondroitin-4-sulfat wurden zusammen mit einem 2,5 μ Mol-Aminosäuren-Testgemisch (vgl. Tab. 2) in 50 ml 6N HCl unter Stickstoff 24 Stdn. auf 110° erhitzt, das Hydrolysat im Vakuum schonend eingedampft, der Rückstand mit Acetylaceton in wäßrigem Pyridin behandelt, die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen. Jeweils 1 ml wurde auf die entsprechende Säule des Beckman-Geräts aufgetragen

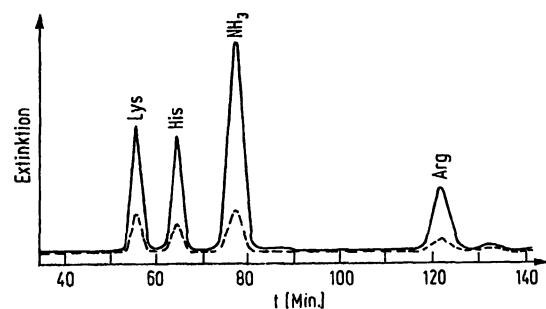


Abb. 5b

Aminosäuren. Die besten Trennungen, vor allem wenn große Mengen Hexosamine neben geringen Mengen Aminosäuren vorlagen, waren die, bei denen die Hexosamine hinter den aromatischen Aminosäuren erschienen. Wie die vorliegenden Untersuchungen weiter zeigen, entstehen bei der Hydrolyse der Glykosaminoglykan-Peptide aus den Hexosaminen ninhydrinpositive Abbauprodukte, die die quantitative Bestimmung der basischen Aminosäuren stören. Sie können zwar durch Chromogenbildung entfernt werden, dadurch tritt aber ein größerer Aminosäurenverlust auf. Deshalb versagte in unserem Fall die Analyse der Glykosaminoglykan-Peptid-Hydrolysate nach dem substanz- und zeitsparenden Einsäulenverfahren ganz. Nur wenn wir nach dem Zweisäulenverfahren und dann bei den basischen Aminosäuren unter Verwendung von Methoden, die der Auftrennung sogenannter physiologischer Aminosäuregemische dienen, arbeiteten, gelang es uns, die basischen Aminosäuren von den Hexosaminen und ihren Abbauprodukten so zu trennen, daß eine quantitative Bestimmung der basischen Aminosäuren möglich war. Bei diesen Verfahren, die im Durchschnitt etwa 6 Stunden dauerten, kamen die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin nach, die Hexosamine vor dem Ammoniakpeak.

Material und Methoden

Material

L-Aminosäuren, D-Glucosamin-HCl, Galaktosamin-HCl und Glucuronsäure waren analysenreine Präparate. — Chitin wurde aus Krebschalen nach HACKMAN (13) dargestellt (Ber. N 6,89 für $(C_8H_{13}NO_5)_n$ (203,2 für $n = 1$); gef. N 6,69%). — Glykosaminoglykan-Peptide haben wir aus menschlicher Nabelschnur, aus Rinderglaskörper, Rinder-Tracheaknorpel, Schweinehaut und Grundhaiknorpel nach Abbau der Gewebe mit Papain (14) isoliert und im präparativen Maßstab durch Chromatographie an DEAE-Sephadex- (15) und Ecteola-Cellulose-Säulen (16) gereinigt. Da so nur eine Trennung in eine Hyaluronsäure-, eine Chondroitinsulfat/Dermatansulfat/Keratansulfat- und eine Heparin-Fraktion möglich war, wurden die chromatographisch abgetrennten Glykosaminoglykan-Peptid-Gemische noch aus einer 5proz. Calciumacetatlösung in 0,5N Essigsäure durch Zugabe von Äthanol bis zu einer jeweils bestimmten Alkoholkonzentration fraktioniert gefällt (17). Die Dermatansulfatfraktion wurde anschließend noch mit Hyaluronidase (18) behandelt. Zur Reindarstellung von Keratansulfat haben wir Rinder-Corneae mit Papain abgebaut und das Keratansulfat in Anlehnung an eine Vorschrift von K. MEYER und Mitarbeiter (17) isoliert. Nach Chromatographie an Ecteola-Cellulose nach GREILING und Mitarbeiter (19) erhielten wir 2 Hauptfraktionen I und II. — Die Analysen der Glykosaminoglykan-Peptide sind in Tabelle 1 enthalten. — Chondroitin-4-sulfat, das laut Tabelle 1 rund 227 μMol Aminosäuren pro Gramm Trockengewicht enthielt, wurde mit Pronase (20) behandelt, das Enzym mit Trichloressigsäure ausgefällt, der Überstand nach Neutralisation mit NaOH dialysiert, an DEAE-Sephadex chromatographiert, dialysiert, mit Dowex X 8 (100–200 mesh, H⁺-Form) entsalzt und gefriergetrocknet. Die Analysen ergaben: Gesamtmenge an Aminosäuren 116 $\mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht; Aminosäuregesamtstickstoff 0,18%; Gesamtstickstoff 3,06%; Gesamtschwefel 5,99%; Acetylgruppen 12,50%; Uronsäure 37,8%; Hexosamin 36,4%. 1 g dieser Substanz wurde in das Kaliumsalz überführt, in 500 ml 0,5N KOH gelöst und 24 Stdn. bei 4° aufbewahrt. Nach Neutralisation mit Eisessig, Dialyse gegen dest. Wasser und Entsalzen mit Dowex X 8 wurde die Lösung gefriergetrocknet. Wir erhielten ein farbloses Produkt,

das sich nach einigen Tagen, auch im Exsikkator über P_2O_5 , gelb färbte. Analysen: Gesamtmenge an Aminosäuren 77 $\mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht; Aminosäuregesamtstickstoff 0,11%; Gesamtstickstoff 2,91%; Gesamtschwefel 6,19%; Acetylgruppen 11,98%; Uronsäure 38,1%, Hexosamin 37,1%.

Methoden

C, H, N und S wurden wie l. c. (11) beschrieben quantitativ bestimmt, N außerdem noch mit Hilfe der Ultramikro-KJELDAHL-NESSLER-Methode (21), die Acetylgruppen nach l. c. (22), Uronsäuren nach l. c. (23), Hexosen nach l. c. (24). Die quantitativen Hexosaminanalysen wurden nach CESSI und PILIEGO (10) sowie mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Dazu wurden stets etwa 10 mg des jeweiligen Glykosaminoglykan-Peptids in 50 ml 4–6N, frisch dest. Salzsäure 5–8 Stdn. unter Stickstoff in zugeschmolzenen Ampullen auf 110° erwärmt, das Hydrolysat schonend im Vakuum eingedampft, der Rückstand in den entsprechenden Puffern gelöst und aliquote Teile zur quantitativen Analyse verwandt. Zur quantitativen Analyse der Aminosäuren wurden jeweils etwa 50 mg des Glykosaminoglykan-Peptids in 50 ml 6N HCl unter den eben genannten Bedingungen 24 Stdn. hydrolysiert und aufgearbeitet. Die Hexosamin- und Aminosäureanalysen wurden mit Hilfe eines automatischen BIOCAL-Aminosäureanalysators BC 200 (Baujahr 1968) an einer 0,9/60 cm-Säule mit BIORAD-Aminex A 6-Ionenaustauscherharz getrennt und mit Ninhydrin nach l. c. (25) quantitativ bestimmt. Das Pufferprogramm lief in der Reihenfolge:

- Citratpuffer pH 3,25 \pm 0,02, der noch 4% Äthanol enthielt (0. bis 62. Minute);
- Citratpuffer pH 4,24 \pm 0,02 (62. bis 125. Minute);
- Citratpuffer pH 6,45 \pm 0,02 (125. bis 235. Minute).

Die Natriumkonzentration aller Puffer war 0,2N, die Durchflußgeschwindigkeit der Puffer betrug 90 ml/Std., die des Ninhydrinreagenzes 45 ml/Std. Als Waschnatronlauge wurde eine 0,4N Lösung (von der 235. bis zur 260. Minute) verwandt. Die Säulentemperatur betrug 53°. Die Trennung und quantitative Bestimmung eines Aminosäuren-Hexosamin-Gemisches dauerte hiernach etwa 4 Stdn. Leider war die quantitative Bestimmung der basischen Aminosäuren in Glykosaminoglykan-Peptid-Hydrolysaten nach dem Einsäulenverfahren nicht möglich. Die Trennung der basischen Aminosäuren, der Hexosamine und ihrer Abbauprodukte war unter folgenden Bedingungen möglich:

- 0,9/40 cm Säule; Harzhöhe 25 cm; Harz Bio Rad Aminex A 5; Elutionsmittel Natriumcitratpuffer pH 4,26 \pm 0,02, 0,38N Na⁺ (0. bis 185. Minute, T = 30°); Natriumcitratpuffer pH 5,28 \pm 0,02, 0,35N Na⁺ (185. bis 330. Minute, T = 55°); 0,2N NaOH (330. bis 350. Minute, T = 55°); Natriumcitratpuffer pH 4,26 wie oben (350. bis 380. Minute, T = 30°); Durchflußgeschwindigkeit der Puffer 60 ml/Std., des Ninhydrins 30 ml/Std.
- 0,9/40 cm Säule; Harzhöhe 25 cm; Harz Bio Rad Aminex 6; Elutionsmittel Natriumcitratpuffer pH 4,30 \pm 0,02, 0,3N Na⁺, T = 50°; Durchflußgeschwindigkeit des Puffers 68 ml/Std., Ninhydrin 34 ml/Std. Dauer der beiden Analysen jeweils 5–6 Stdn. Nach etwa 5 Stdn. erschien der Argininpeak.

Zur Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren sowie der Hexosamine mit dem Beckman-Aminosäureanalysator Unichrom (Baujahr 1967) wurde in einer 0,9/69 cm Säule Ionenaustauscherharz vom Typ PA 28 in einer Füllhöhe von 56 cm benutzt. Die Puffer waren in der 0. bis 85. Minute 0,2N Natriumcitratpuffer pH 3,28 \pm 0,02, in der 85. bis 240. Minute 0,2N Natriumcitratpuffer pH 4,25 \pm 0,02. Zur Trennung der basischen Aminosäuren und Hexosamine wurde eine 0,9/23 cm Säule verwandt, die das Harz PA 35 in einer Höhe von 20 cm enthielt. 0,35N Natriumcitratpuffer pH 5,28 \pm 0,02 wurde als Elutionsmittel verwandt. Die Durchflußgeschwindigkeit beider Puffer betrug 68 ml/Std., die des Ninhydrins 34 ml/Std., die Säulentemperatur betrug 55°. Eine vollständige Analyse an beiden Säulen dauerte insgesamt 7–8 Stdn. Hydroxyprolinanalysen wurden in einem

äquivalenten Teil des jeweiligen Hydrolysats nach STEGEMANN (26) durchgeführt. Zum Nachweis von Pentosen wurde die Glykosaminoglykan-Peptid-Hydrolysate schonend im Vakuum eingedampft und nach KIM und Mitarbeiter (27) aufgearbeitet. Die Neutralzucker wurden nach SWEBLY und Mitarbeiter (28) in die Trimethylsilylderivate umgewandelt und gaschromatographisch nachgewiesen.

Chromogenbildung und Aminosäureanalysen:

- a) Acetylaceton-Reagenz: 1 ml frisch dest. Acetylaceton (Kp. 138–140°) wurde in 100 ml Pyridin/Wasser (9:1) gelöst. Der pH-Wert betrug 9,5. Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt.
- b) Durchführung: Jeweils 50 mg der in Tabelle 3 aufgeführten Glykosaminoglykane wurden in 50 ml 6N HCl 24 Std. unter

Stickstoff in abgeschmolzenen Ampullen auf 110° erhitzt, das Hydrolysat im Vakuum schonend zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen. Jeweils 4 ml wurden in Kölbchen pipettiert und bis zur Trockene im Vakuum eingedampft. Den einen Rückstand nahm man gleich zur Aminosäureanalyse in 5 ml Citratpuffer pH 2,20 auf, den anderen löste man in 40 ml Acetylacetonreagenz (entsprechend 20 ml Acetylacetonreagenz pro μMol Aminosäuretestgemisch; dieses Gemisch enthielt von jeder der in Tabelle 3 aufgeführten Aminosäure 1 μMol). Diese Lösung wurde 60 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, im Vakuum schonend eingedampft, der trockene Rückstand in Wasser gelöst, noch einmal im Vakuum bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 5 ml Citratpuffer pH 2,20 gelöst und aliquote Teile zur Aminosäureanalyse entnommen.

Literatur

1. BALAZS, E. A., Editor, „Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix“, Vol. 2, Academic Press, London und New York (1970). — 2. STEELE, R. S., K. BRENDEL, E. SCHEER und R. W. WHEET, *Analytic. Biochem.* **34**, 206 (1970). — 3. ANDERSON, B., P. HOFFMAN und K. MEYER, *J. biol. Chemistry* **240**, 156 (1965). — 4. LIEFLÄNDER, M., in: E. A. BALAZS, „Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix“, Vol. 2, Seite 749, Academic Press, London und New York (1970). — 5. ANDERSON, D. M. W., S. GARBUIT und S. S. H. ZAIDI, *Analyt. Chim. Acta* **29**, 39 (1963). — 6. MUIR, H., *Biochem. J.* **65**, 33P (1957). — 7. SCHLOSS, B., *Analyt. Chemie* **23**, 1321 (1960). — 8. ELSON, L. A. und W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* **27**, 1824 (1933). — 9. CORNFORTH, J. W. und M. E. FIRTH, *J. Chem. Soc. (London)* **1958**, 1091. — 10. CESSI, C. und F. PILIEGO, *Biochem. J.* **77**, 508 (1960). — 11. LIEFLÄNDER, M. und K. THOMAS, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **342**, 228 (1965). — 12. HANNIG, K., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* **4**, 51 (1959). — 13. HACKMAN, R. H., *Austral. J. Biol. Sci.* **7**, 168 (1954). — 14. BUDECKE, E., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **318**, 33 (1960). — 15. SCHMIDT, M., *Biochem. biophysica Acta*, (Amsterdam) **63**, 346 (1962). — 16. RINGERTZ, N. R. und P. REICHARD, *Acta chem. scand.* **13**, 1467 (1959). — 17. MEYER, K., E. DAVIDSON, A. LINKER und P. HOFFMAN, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) **21**, 506 (1956). — 18. CIFFONELLI, J. A. und L. RODEN, in W. E. M. Lands, Ed. i. Ch., „Biochemical Preparations“ **12**, 5 (1968). — 19. GREILING, H., TH. HERBERTZ und H. W. STUHLSTAZ, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **336**, 149 (1964). — 20. ANDERSON, B., P. HOFFMAN und K. MEYER, *J. biol. Chemistry* **240**, 156 (1965). — 21. STRAUCH, L., *diese Z.* **3**, 165 (1965). — 22. KUHN, R. und H. ROTH, *Chem. Ber.* **66**, 1274 (1933). — 23. BITTER, T. und H. MUIR, *Analytic Biochem.* **4**, 330 (1962). — 24. DREYWOOD, R., *Ind. Engng. Chem. anal. Edit.* **18**, 499 (1947). — 25. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN und S. MOORE, *Analytic. Chem.* **30**, 1190 (1958). — 26. STEGEMANN, H., *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **311**, 41 (1958). — 27. KIM, J. H., T. H. SHONE, B. LIAO und J. G. PIERCE, *Analytic. Biochem.* **20**, 258 (1967). — 28. SWEBLY, C. C., R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).

Prof. Dr. M. Liefländer
Universität Regensburg
84 Regensburg
Postfach