

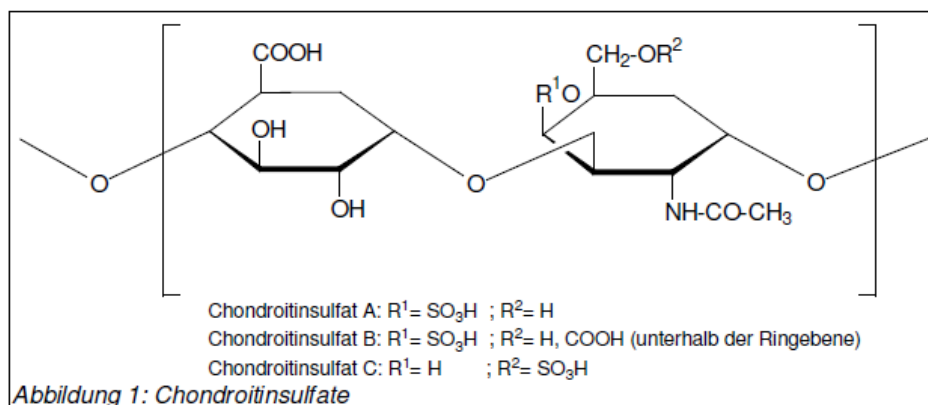
Analytik von Chondroitinsulfat

Hans-Joachim Mierendorff
Chemisches Laboratorium Dr. Hermann Ulex – Hamburg
Glasmoorstrasse 23, D 22851 Norderstedt

Glycosaminoglukane oder „GAG“s (früher Mucopolysaccharide) sind negativ geladene Polysaccharide (Glukane), welche aus 1,4-verknüpften Einheiten von Disacchariden bestehen, in denen ein Mol einer Uronsäure (hier D-Glucuronsäure bzw. L-Iduronsäure) mit der 3-Stellung eines N-acetylierten Aminozuckers (NAG) (Glycosamin) glykosidisch verbunden ist. Bei den Chondroitinen ist regelmäßig Schwefelsäure an Sauerstoff- oder Stickstoffatome gebunden, so daß sie meist stark sauer reagieren.

Die Chondroitinsulfate A und C sind N-Acetyl-D-galactosamin-4 oder -6-sulfate. Ähnlich aufgebaut ist das Chondroitin B, bekannt unter dem Namen Dermatan-sulfat oder β -Heparin aus L-Iduronsäure und NAG-4-sulfat. (Abbildung 1)

Abbildung 1: Chondroitinsulfate



Chondroitinsulfate sind als tierische Proteoglykane die Hauptbestandteile von Knorpel, Knochen und Bindegewebe, sie finden sich jedoch auch in Körperschleimen wieder. Es handelt sich bei diesen Stoffen um Polymere mit Molekulargewichten von 25-50 kDalton, nach FALBE et al. [1995] auch mehr als 1000 kDalton.[1]

Technisch gewonnen wurden sie früher aus Haiknorpel, später auch aus Rinder- bzw.. Schweinetracheen, heutzutage werden sie wegen der BSE-Problematik fast ausschließlich aus Schweinetrachea sowie zunehmend aus Hühnersternum hergestellt.

Chondroitinsulfate finden medizinischen Einsatz als Hautschutz bei Verbrennungen und werden heute in großem Umfang in Kapselform zur oralen Vorbeugung bzw. zur Bekämpfung von schwindendem Knorpelgewebe verwendet. Besonders wegen der letztgenannten Verwendung stellt sich aus der Pharmain-

dustrie und dem daraus resultierendem Markt verstärkt die Frage nach dem „Gehalt“ des handelsüblichen Chondroitins.

Chondroitin war bis vor kurzem in westlichen Pharmacopoeen nicht offizinell, lediglich die Japonica (JSPI 1991) listet „Sodium Chondroitin Sulphate“ unter der Nummer 04805 auf und verlangt unter „Assay“ 2,5 -3,8% Stickstoff und 5,5-7,0 % Schwefel bezogen auf die Trockensubstanz.

Seit neuestem ist Chondrotinsulfat-Natrium im Europäischen Arzneibuch, der EP V.05 [2064], sowie im US-amerikanischen Arzneibuch, der USP XXVIII [CAS 9082-07-9] offizinell. In der EP wird ein Gehalt von 95-105% siccum verlangt; in der USP entspr. 90 – 105% siccum.

An dieser Stelle muß angemerkt werden, daß es bis vor Erscheinen der jeweiligen Monographien keine offiziellen „CRS“-Muster (Chemische Referenz-Substanz) gab; die heute erhältlichen CRS-Muster sind de jure, wenn überhaupt, nur auf die Analysenmethode der jeweiligen Monographie zertifiziert. Daher sind sie nicht als „absolute Referenzmuster“ anzusehen.

In unserem Hause wurden in den letzten 30 Jahren über 3.200 Chondroitinanalysen nach wechselnden Methode durchgeführt und daraus resultierend Muster von herausragender Qualität (hoher Gehalt, hohe Reinheit, spezielle Zusammensetzung) asserviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei +4°C unter Argon- Schutzgasatmosphäre.

Speziell für die hier angeführte Analytik wurden, da es theoretisch keine Werte über 100% geben kann, zwei Chondroitinsulfatnatrium-Muster ex Shark mit theoretischen Gehalten von 103-106% in der Trockensubstanz, ermittelt nach der „Schwefelmethode“, als derzeitige 100% i.T.-Referenzmuster verwendet. Aufgrund der oben genannten Tatsachen erscheint es sinnvoll, den „Assay“ anhand einzelner Molekülbestandteile des Monomeren zu bestimmen, wie z.B. Na / N / S / SO₄ / Glucuronsäure / NAG oder durch ein quantitatives Verfahren, das auf das gesamte Molekül anspricht.

Denkbar sind hier auch physikalische Größen wie optische Drehung, Spektrenanalyse etc.

Um überhaupt einen Bezug auf die Summenformel des Monomeren zu erhalten, muß die Art und Menge der bei der jeweiligen Analyse entstehenden Bruchstücke errechnet werden.

In dieser Arbeit wird von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 505,42 Dalton des monomeren Chondrotindinatriumsulfates siccum [C₁₄ H₁₉ O₁₄ NSNa₂] ausgegangen.

Die wasserhaltige Ware enthält pro Mol 3,5 Mol aq.[567,47 Dalton]

(Faktoren: 89,066 % Trockensubstanz (%Tr.) [Rezip.: 112,78 %])

Der normale (handelsübliche) Wassergehalt, bestimmt durch Trocknung bei 105°C, liegt aber bei ca. 2-10%. (Der theoretische Wassergehalt bei 3,5 mol / mol Wasser entspricht ca. 11%.)

Im Folgenden wird jedoch immer auf die Trockensubstanz berechnet.

Die Tabelle zeigt die Bilanz der einzelnen Bestandteile:

Theor. Gehalt an		x 3,5 aq	Siccum	Merck	Fluka	Roth
Schwefel	S	0,0565	0,0634	5,0-6,7 %	ca. 6,5 %	
Stickstoff	N	0,0247	0,0277	2,3-2,9 %	ca. 2,5 %	2,4-3,2 %
Natrium	Na	0,081	0,091			
Glucuronsäure		0,3421	0,3841		ca. 35 %	
Wasser		ca. 11,28 %	entfällt			

Die in der Tabelle gezeigten Werte sind nur hypothetisch, weil die genaue Zusammensetzung des Chondroitinsulfat-Natrium-Polymers relativ starken natürlichen Schwankungen unterworfen ist.

Es hat sich in der Vergangenheit gezeigt, daß Chondroitin mit beigefügten Zertifikaten gehandelt wurde, welche sich auf Analysenmethoden bezogen, die oftmals z.B. für eine Zubereitung nicht brauchbar waren oder deren Ergebnisse in Anlehnung an die jeweilige Methode ermittelt wurden, ohne die z.T. aufwendigen Apparate oder das entsprechende Equipment zur Verfügung zu haben.

Achtung: In den letzten Jahren sind in unserem Hause ca. 30% der eingelieferten Proben, insbesondere aus den USA und aus Spanien, bei der Herstellung-Hydrolyse des Knorpelgewebes zu stark bearbeitet worden, sodaß der Gehalt an Schwefel teilweise bis auf 0% abgebaut wurde, also nur noch das Aminozucker-Gerüst zurückgeblieben ist.

Diese Produkte wurden oftmals mit „95-105% Gehalten“, ermittelt per HPLC- oder Hexuronsäurebestimmung gelistet, weil diese Bestimmungsmethoden nur auf den verbleibenden Aminozucker-Rest abheben.

Zu beachten: Per definitionem muß Chondroitinsulfat-Na ca. 5-6,5% Schwefel enthalten.

Dieses muß durch eine separate Analyse manifestiert werden!

Folgende Gehaltsbestimmungen sind auszugsweise bekannt und werden mit wechselnder Häufigkeit in der Praxis angewendet:

A. Chemische Bestimmungen

- 1. Molekülbestandteile
 - 1.1 Bestimmung von Schwefel
 - 1.1.1 Schwefelbestimmung als Sulfat nach Ulex
Acidolyse von Chondroitin im oxidierenden Medium bei Siedehitze im Überschuß von Barium-Ionen, gravimetrische Bestimmung als Bariumsulfat.
Mittlerer Zeitaufwand, analytisch genaue Methode. Nicht geeignet für Zubereitungen, kann durch Zusatz von Sulfaten manipuliert werden.[2]
 - 1.1.2 Schwefelbestimmung als Sulfat durch Druckaufschluß mittels Parrbombe

Sehr zeitaufwendige Methode. Verbrennung im Sauerstoff, Titration des entstandenen Sulfates mit Bariumperchlorat, offiziell in Japónica 1991. Kann durch Zusatz von organischen Schwefelverbindungen manipuliert werden.[3]

- 1.1.1. Schwefelbestimmung als Sulfat titrimetrisch nach Ionenaustausch
Ionenaustausch auf starkem Kationen-Austauscher, Titration mit NaOH.
Methode unspezifisch, sehr fälschungsanfällig.
- 1.2. Bestimmung von Stickstoff
 - 1.2.1 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl
Klassischer Aufschluß nach Kjeldahl – Destillation – Titration..
Sehr genau, aber manipulierbar.
 - 1.2.2. Stickstoffbestimmung photometrisch nach Folin-Ciocalteus
Reaktion der Probe mit Folin-Reagenz, - photometrische Messung bei 500nm, besser 720nm.
Diese Methode wird gelegentlich verwendet, ist aber für Chondroitin nicht brauchbar.
- 1.3. Bestimmung von Natrium:
 - 1.3.1 Veraschung – AAS Flamme
Unproblematisch und schnell, aber manipulierbar.
 - 1.3.2. Druckaufschluß – AAS Flamme
Etwas aufwendiger als 1.3.1, sonst genauso
- 1.4 Bestimmung von Glucuronsäure
 - 1.4.1 Hexuronsäurebestimmung mit Carbazol nach T. Bitter + H.M. Muir (1962)
Aufwendige Reaktion mit Carbazollösung in Gegenwart von Borat, photometrische Bestimmung bei 520nm
Methode zeigt starke Streuung.[4]
 - 1.4.2 item nach M. Kosakai + Z. Yosizawa (1979)
Modifizierte Methode 1.4.1.
Sehr zeitaufwendig, aber genau durch sorgfältige Dosierung des Borates, wenig manipulationsgefährdet.[5]
Mangel: Diese Methode fußt auf der Bestimmung des Aminozuckers; sie ist ohne Absicherung des Sulfatgehaltes nicht aussagekräftig.
- 2. Gesamtmolekül

- 2.1 Photometrische Bestimmung mit Dimethylmethylenblau (DMMB)
Umsetzung des Chondroitinsulfates in tris-gepuffertes Lösung mit DMMB in Gegenwart von Jodessigsäure, - zeitkritische photometrische Messung bei 525nm am Zeitmaximum bis maximal 2 Minuten.

Die klassische Methode nach Farndale (1986) ist störanfällig; die Methode nach de Jong (1992) ist aufwendiger, aber sehr genau. Nicht spezifisch für Chondroitin.

- 2.2 Bestimmung des Gesamtmoleküls mit flüssigchromatographischen Methoden
 - 2.2.1 Bestimmung durch Ausschlußchromatographie nach D.W. Choi et. al.
Moderne Methode der Ausschlußchromatographie, die sich an der realen Molekülgröße orientiert. Sie ist methodengemäß besser zur Aufreinigung von Stoffgemischen geeignet als zur quantitativen Bestimmung einzelner Moleküle.
Sehr zeit- und kostenaufwändig, nicht unbedingt fälschungssicher.[6]
 - 2.2.2. Bestimmung durch Ionenpaar – HPLC
Sehr genaue Bestimmung von Chondroitin, auch in Stoffgemischen, jedoch durch die Verwendung von Ionenpaar-Reagenzien bei der Meßwellenlänge 195nm nicht gut reproduzierbar. Unspezifisch: Soehe 1.4.2
 - 2.2.3 Bestimmung durch HPLC nach enzymatischer Umsetzung
Gegenüber 2.2.2 und 2.2.3 sehr viel aufwendiger.
Durch spezifische Auswahl der enzymatischen Reagenzien (Chondroitinase ABC/Collagenase) außerordentlich molekül-spezifisch, sehr preis- und zeitaufwändig, aber genau, fälschungssicher. [7]
- 2.3 Bestimmung des Gesamtmoleküls mit Kapillarzonen-elektrophorese
Moderne Methode mit Ursprung im klinischen Bereich, validiert für die Heparinbestimmung.
Sehr zeit-, preis- und geräteaufwändig; Methode in unserem Hause noch nicht validiert.[8]
- 2.4 Bestimmung des Gesamtmoleküls durch Titration
 - 2.4.1 Titration mit Cetylpyridiniumchlorid-Lösung und turbi-

demetrische Endpunktbestimmung.
Einfache und schnelle Methode.
Kritische Endpunktbestimmung!
Nicht spezifisch: Siehe Kommentar zum EuPharm Bd.4 Nr. 6.3
(2064]
Empfohlene INA-Methode No. 120.002, vorgeschrieben in EP
und USP. [9]

B. Physikalische Bestimmungen

- 1. Bestimmung der optischen Drehung

Einfache, nicht sehr genaue Methode, geeignet zur Produktionskontrolle bei der Herstellung unter stets gleichen Bedingungen.
Ansonsten sehr manipulationsanfällig.

- 2. Bestimmung mittels Ultrarotspektroskopie
Sehr spezifische, aber in praxi nur qualitative Identifikationsmethode für Chondroitin und Heparin, nicht geeignet in Stoffmischungen.

Zusammenfassung

Wir sind in unserem Hause zu der Auffassung gekommen, daß von den uns derzeit bekanntesten o.g. Methoden die praxisnahe Schnellbestimmung des Chondroitin Gehaltes über den Schwefelgehalt die Methode der Wahl ist. Es werden bei handelsüblichen Produkten meistens Gehalte zwischen 92 und 97% i.T. ermittelt.

Bei Analysen für spezielle Zwecke mit Anspruch höchster Genauigkeit empfiehlt sich die Methode HPLC unter o.g. Bedingungen, da bei dieser Methode zur Gehaltsberechnung die Flächenbestimmung eines abgesicherten Chondroitinpeaks zugrunde gelegt wird.

Es muß aber in einer gesonderten Untersuchung der Sulfatgehalt zur Betätigung der molekularen Zusammensetzung geprüft werden.

Die oben unter 2.2.3 und 2.3 genannten Methoden sind ebenso sehr genau, preislich und zeitlich jedoch außerordentlich aufwändig. Sie eignen sich besonders für forensische Schiedsanalysen etc.

Literatur

- [1] Falbe, J., Regitz, M.
Römpp Chemie Lexikon.
9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- [2] Privatmitteilung
H.- J. Mierendorff / Dr. H. Ulex
- [3] Japanische Pharmacopoe
JSPI 1991 Part I: Sodium Chondroitin Sulphate No. 04805
- [4] T. Bitter, H.M. Muir
Anal. Biochem. 4(1962) 330-334
- [5] Massashi Kosakai + Zensaku Yosizawa
Analytical Biochemistry 93 (1979) 295-298

- [6] Don Woong Choi et al.
Journal of Pharm. and Biomed. Anal. 31 (2003) 1229-1236
- [7] L. Horikoshi + E. Imanari
Anal. Biochem. 287 (1999) 222-226
- [8] P. Mikus et al.
Journal of Pharm. and Biomed. Anal. 36 (2004) 441 -446
- [9a] Europäische Pharmacopoe
EP V: Chondroitin Sulphate Sodium [07/2006: 2064]
- [9b] United States Pharmacopoe
USP XXVIII: Chondroitin Sulphate Sodium [9082-07-9]

Autor: H.-J. Mierendorff
in Fa. Chem.Lab. Dr. H. Ulex Nachf.,
Glasmoorstr 23, 22851 Norderstedt

Veröffentlichung dieser revidierten Arbeit : August 2014