

# Zur Struktur der Dextrane\*.

Von

H. P. Frank und H. Mark.

Aus dem Polytechnic Institute of Brooklyn.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 7. Januar 1954.)

Es wird ein Überblick über den derzeitigen Stand unserer Kenntnis von Dextran gegeben. Im speziellen wird auf die verzweigte Struktur von Dextran eingegangen und auf die Methoden zu deren Bestimmung. Neue Ergebnisse über Molekulargewicht und Molekülgröße von nativem Dextran werden angeführt; besondere Berücksichtigung findet die Methode der Lichtstreuung, mit deren Hilfe Molekulargewichte bis zu 600 Millionen bestimmt wurden. Es wird ferner versucht, die verschiedenen, in der jüngsten Literatur angegebenen Beziehungen zwischen Molekulargewicht und Viskositätszahl miteinander zu vergleichen und in Einklang zu bringen. Schließlich wird auch der Abbau von Dextran besprochen, der im wesentlichen statistischen Gesetzen folgt mit der besonderen Modifikation, die durch die Koexistenz mehrerer Bindungstypen (1,6 und nicht 1,6) von verschiedener Reaktivität notwendig gemacht wird.

## 1. Einleitung.

*Dextran* ist ein Sammelname für eine Reihe von Polyglukosanen<sup>1</sup> mit den folgenden gemeinsamen Eigenschaften: hohe Rechtsdrehung von polarisiertem Licht ( $[\alpha]_D$  180 bis 200°) und Aufbau aus  $\alpha$ -D-Glucopyranose-Bausteinen, die im wesentlichen durch 1,6-Bindungen verknüpft sind.

Dextrane werden durch Fermentation von Rohrzucker mit Leucostoc-Organismen hergestellt; im Verlaufe der Reaktion wird Rohr-

\* Herrn Prof. Dr. A. Franke zum 80. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> M. Stacey und C. R. Ricketts, Sammelreferat in Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. VIII. Wien: Springer-Verlag. 1951.

zucker in Dextran und Fruktose umgesetzt. Die praktisch größte Bedeutung haben Organismen vom Typus *Leuconostoc mesenteroides* (Stamm B 512), die in den Vereinigten Staaten, England und Schweden zur technischen Produktion von Dextran verwendet werden<sup>2</sup>.

Außer dem erwähnten *Leuconostoc*-Stamm wurden auch andere Stämme von *Leuconostoc mesenteroides* und *Streptobacterium dextranicum* untersucht. Die erhaltenen Produkte unterscheiden sich sehr wesentlich in ihrer Struktur sowohl als auch in der Molekülgröße (Tabelle 1).

Tabelle 1<sup>3</sup>. Eigenschaften von Dextranen.

	(1,6)- zu nicht (1,6)-Bindungen	[ $\eta$ ] H <sub>2</sub> O, 25° C
L. mesenteroides, B 512 .....	18	0,94
„ „ B 742 .....	1,9	0,24
„ „ B 1196 .....	7	0,89
„ „ B 1208 .....	20	0,63
<i>Streptobacterium dextranicum</i> , B 1254 .....	8	0,56

Die wesentlichste praktische Bedeutung von mit L. m., B 512, hergestelltem Dextran ist die Verwendung eines partiell hydrolysierten Produkts als Blutplasmaersatzstoff<sup>4</sup>. Abgesehen von seiner praktischen Bedeutung beansprucht Dextran aber auch beträchtliches wissenschaftliches Interesse. Die Arbeiten *Hehres*<sup>5</sup> haben dazu geführt, daß natives Dextran auch mit zellfreier Enzymlyösung hergestellt werden kann und in jüngster Zeit wurde erfolgreich versucht, den Einfluß von Glukosylakzeptoren, wie z. B. Maltose oder besonders niedrigmolekularen Dextrans, auf den Mechanismus der Dextranbildung zu untersuchen<sup>6, 7</sup>. Diese Versuche haben einerseits zum Verständnis des Bildungsmechanismus beigetragen, andererseits aber auch ermöglicht, Dextrane im Molekulargewichtsbereich 50000 bis 100000 direkt ohne den Umweg über die Hydrolyse von extrem hochmolekularen nativen Dextran herzustellen (controlled synthesis).

Schließlich ist auch die Struktur des polymeren Dextranmoleküls als

<sup>2</sup> G. H. Bixler, G. E. Hines, R. M. McGhee und R. A. Shurter, Ind. Eng. Chem. **45**, 692 (1953).

<sup>3</sup> A. Jeanes, Northern Regional Research Laboratories (NRRL), Report of working conference on Dextran, 1951, Peoria, Ill.

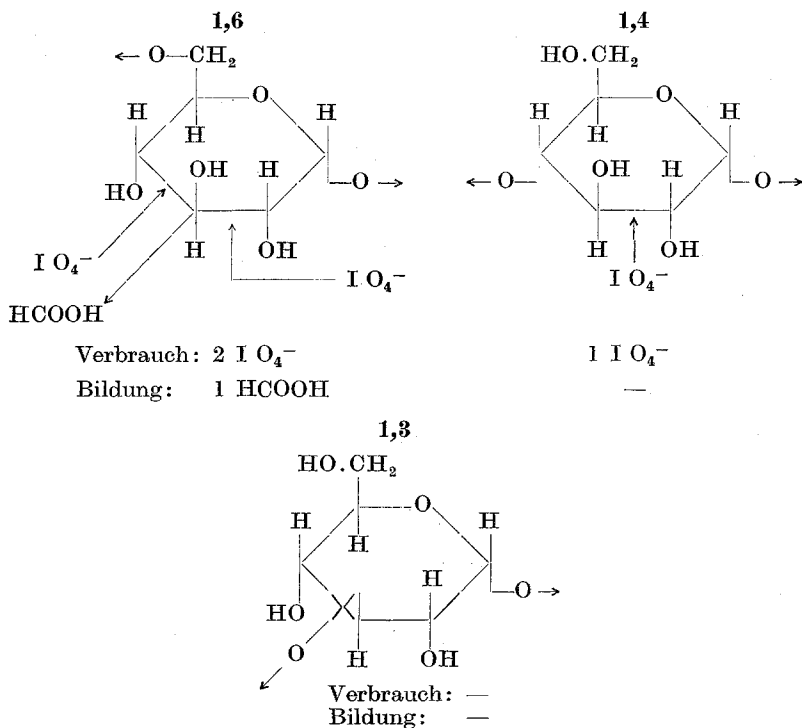
<sup>4</sup> A. J. T. Gronwall und B. G. A. Ingelman, Acta Physiol. Scand. **7**, 97 (1944); **9**, 1 (1945).

<sup>5</sup> E. J. Hehre, Science **93**, 237 (1941); J. Exper. Med. **75**, 339 (1942); Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II **10**, 188 (1948).

<sup>6</sup> H. J. Koepsell, J. Biol. Chem. **200**, 793 (1953).

<sup>7</sup> Unveröffentlichte Versuche der NRRL.





Wie aus dem obigen Schema hervorgeht, ist es möglich, aus der Menge verbrauchten Perjodats bzw. gebildeter Ameisensäure auf die Struktur zu schließen (nach Korrektur für die reduzierenden endständigen Glukoseeinheiten).

In allerjüngster Zeit wurde eine besonders sorgfältige Untersuchung der Perjodatoxydation durchgeführt, in deren Verlauf die zunächst entstehenden Dialdehyde hydriert und dann hydrolysiert wurden<sup>13</sup>.

Die Endprodukte sind also Glycerin bzw. Erythrol bzw. Glukose. Die Übereinstimmung der Ergebnisse dieser sorgfältigen Untersuchung mit der konventionellen Perjodatmethode waren nicht restlos befriedigend und es scheint nicht unmöglich zu sein, daß der Großteil der bisher als 1,4 angesehenen Bindung tatsächlich 1,3 ist.

Was die physikalischen Eigenschaften von Dextranlösungen betrifft, ist diese Diskrepanz allerdings relativ unbedeutend, da die Lösungseigenschaften kaum davon abhängig sein werden, ob Verzweigungen durch 1,3- oder 1,4-Bindungen zustande kommen. Es ist im allgemeinen

<sup>13</sup> J. W. Sloan, Abstract of papers, 124th Meeting Amer. Chem. Soc., Sept. 1953, Chicago, Ill.

üblich geworden, den Verzweigungsgrad als das Verhältnis von (1,6)- zu nicht (1,6)-Bindungen auszudrücken. Normales natives Dextran (Leuc. mes., B 512) zeigt ein Verhältnis (1,6) zu nicht (1,6) von 15 bis 20<sup>9, 14</sup>.

### 3. Molekulargewicht und Molekülgröße.

Eine Besprechung der Molekulargewichte und der Bestimmungsmethoden gliedert sich naturgemäß in zwei Teile: einerseits die Bestimmung von Molekulargewichten von nativem Dextran, das, wie bereits erwähnt, in der Größenordnung von 100 Millionen ist und demgemäß den konventionellen Methoden gewisse Schwierigkeiten entgegengesetzt, andererseits die Molekulargewichte partiell hydrolysierter Dextrane, die im Bereich zwischen 10000 und 10 Millionen untersucht wurden.

Die einzige Methode, die auf natives Dextran erfolgreich anwendbar zu sein scheint, ist die Messung der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung<sup>15</sup>. Derartige Messungen wurden von *Hellman*<sup>8</sup> und von einem von uns<sup>9</sup> ausgeführt. In beiden Fällen wurden Molekulargewichte zwischen 30 und 150 Millionen erhalten. Allerdings ist in diesem Bereich die Messung bei sehr kleinen Konzentrationen und mehr noch bei kleinen Winkeln unvermeidlich, um die Doppelextrapolation  $c \rightarrow 0$  und  $\sin^2 \Theta/2 \rightarrow 0$  korrekt ausführen zu können. Diese Erfordernisse erscheinen in der letzteren Arbeit besser erfüllt zu sein.

Fraktionierung und Bestimmung der Polydispersität sind erschwert durch die minimalen Löslichkeitsunterschiede der verschiedenen Spezies in dem erwähnten Molekulargewichtsbereich. *Hellman*<sup>8</sup> hat eine interessante Fraktionierungsmöglichkeit beschrieben, nämlich Zentrifugierung einer Dextranlösung in einem Feld, das stark genug ist, um die Polymermolekel zu sedimentieren. Man kann dann die Menge des Sediments einerseits und das Molekulargewicht des Dextrans in der überstehenden Lösung andererseits als Zeitfunktion verfolgen.

Eine komplette Fraktionierung wurde nach Überwindung (Tabelle 3) experimenteller Schwierigkeiten in unserem Institut durchgeführt<sup>9</sup>. Der

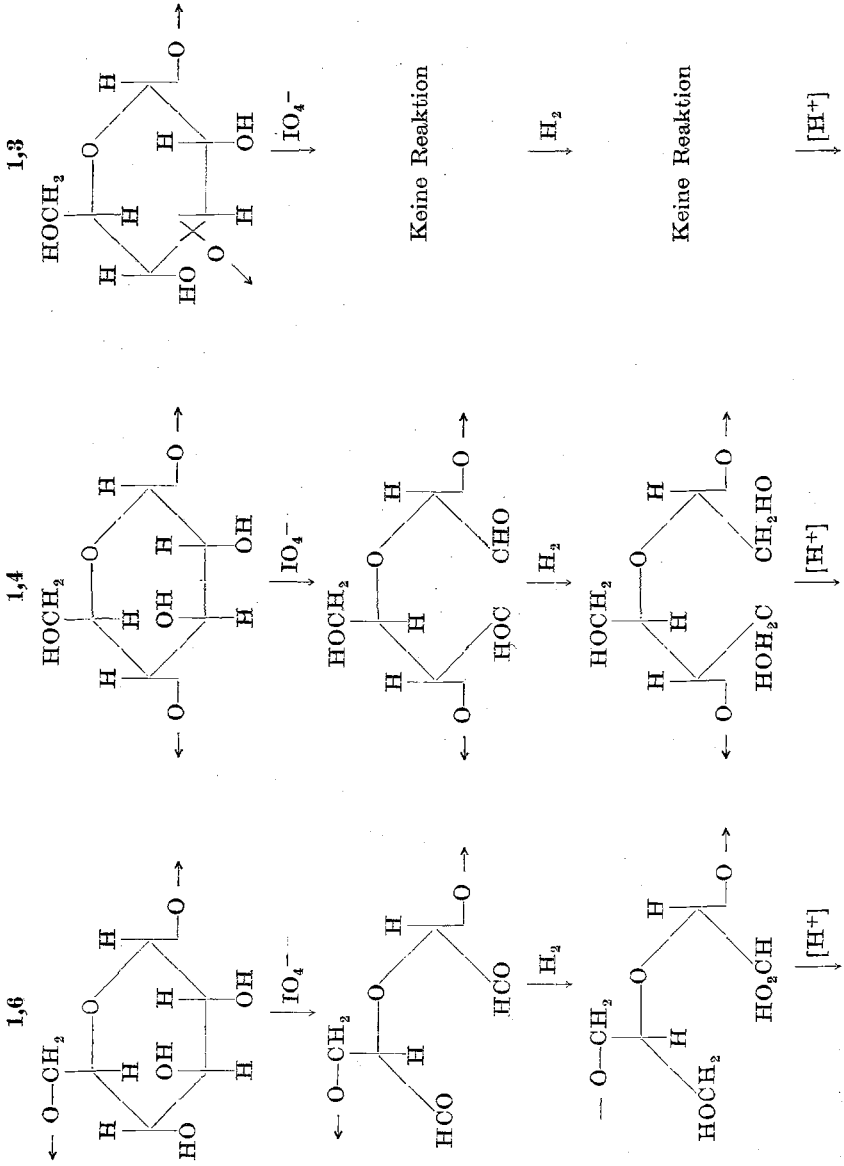
Molekulargewichtsbereich der Fraktionen reicht von 12 bis 600 Millionen, was einer extrem breiten Verteilung gleichkommt. Der mittlere Radius der Moleküle (genauer die Quadratwurzel aus dem mittleren Radius-

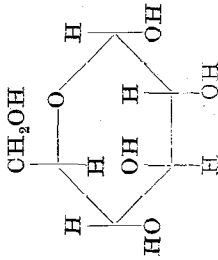
Tabelle 2. Zentrifugierung von nativem Dextran.

Dextran	% Dextran sedimentiert	$\bar{M}_w \cdot 10^{-6}$ des gelösten Dextrans
B 1127	0	82
	7	75
	30	22
	40	10
B 512	0	52
	32	46

<sup>14</sup> I. A. Wolff, C. L. Mehlreter, R. L. Mellies, P. R. Watson, B. T. Hofreiter, P. L. Patrick und C. E. Rist, J. Amer. Chem. Soc., im Druck.

<sup>15</sup> B. H. Zimm, J. Chem. Physics 16, 1099 (1948).





quadrat  $(\overline{R^2})^{1/2}$ ) in wädr. Lösung ist infolge der starken Verzweigung und der daraus folgenden Kompaktheit der Moleküle nicht übermäßig groß und reicht für die oben angeführten Fraktionen von 600 bis 3000 Å (bestimmt aus der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung bei 436 und 546 m $\mu$ ).

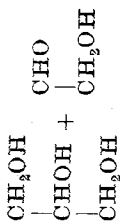
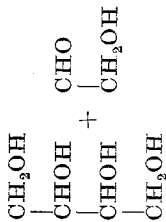
Tabelle 3. Fraktionen von nativem Dextran (B 512).

Fraktion	$\overline{M}_w \cdot 10^{-6}$	$[\eta]_{\text{H}_2\text{O}}$	(1,6) zu nicht (1,6)	$(\overline{R^2})^{1/2}$
1	600	1,98	6	2930
5	95	1,43	8	1770
10	12,6	0,86	35	570

Im Molekulargewichtsbereich der Hydrolysate wurden außer Lichtstreuung eine Reihe anderer mehr oder weniger konventioneller Methoden verwendet: Sedimentationsgeschwindigkeit in Verbindung mit Diffusionsmessungen<sup>16</sup>, Sedimentationsgleichgewicht, osmotischer Druck und Endgruppenbestimmung (unter der Annahme einer reduzierenden Endgruppe pro Molekül)<sup>14, 17, 18</sup>. Die letzteren beiden Methoden liefern Zahlenmittel Molekulargewicht  $\overline{M}_n$  und wurden nur bis zu einer gewissen oberen Grenze des Molekulargewichts verwendet (Endgruppenbestimmung bis 100000, osmotischer Druck bis 300000). Das Verhältnis zwischen Gewichts- und Zahlenmittel  $\overline{M}_w/\overline{M}_n$  kann, wie gewöhnlich, als Maß der Polydispersität angesehen werden.

#### 4. Beziehung zwischen Viskositätszahl und Molekulargewicht.

Im Bereich der relativ niedermolekularen Hydrolysate (bis zu einem Molekulargewicht von



<sup>16</sup> B. Ingelman und M. S. Halling, Ark. Kemi (Mineral. Geol.) 1, 61 (1949).

<sup>17</sup> M. Wales, P. A. Marshall und S. G. Weissberg, J. Polymer Sci. 10, 229 (1953).

<sup>18</sup> M. Somogy, J. Biol. Chem. 160, 61 (1945).

etwa 300000) wurden drei nicht wesentlich verschiedene Beziehungen vom allgemeinen Typ

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

angegeben. Die Zahlenwerte der Konstanten  $K$  und  $a$  für wäßrige Lösungen sind die folgenden:

$$[\eta] = 2,03 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0,43} \text{ }^{14},$$

$$[\eta] = 10^{-3} \cdot M^{0,5} \text{ }^{17},$$

$$[\eta] = 0,87 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0,5} \text{ }^{19}.$$

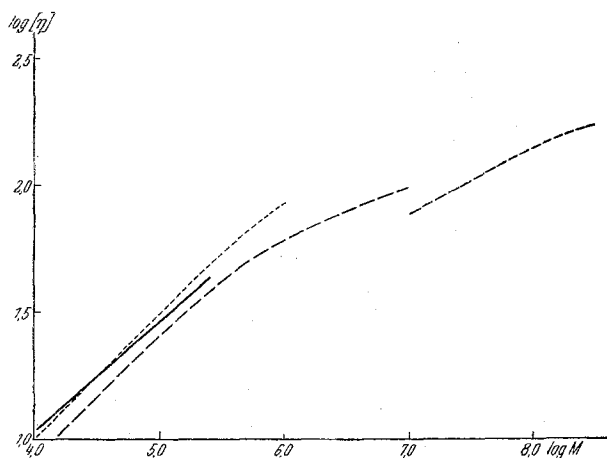


Abb. 1.

———— NRRL <sup>14</sup>, - - - - Senti, Hellman <sup>19</sup>, - · - · Arond, Frank <sup>9</sup>, ····· Wales <sup>17</sup>.

Trotz der Verschiedenheit der Zahlenwerte der Konstanten sind alle Beziehungen sehr ähnlich (Abb. 1). In zwei Fällen<sup>14, 19</sup> wurde  $[\eta]$  direkt mit dem Gewichtsmittel des Molekulargewichts  $\overline{M}_w$  für relativ scharfe Fraktionen in Beziehung gebracht, im dritten Fall<sup>17</sup> mit dem sog. Viskositätsmittel des Molekulargewichts  $\overline{M}_\eta$ , das allerdings für relativ scharfe Fraktionen nur wenig von  $\overline{M}_w$  abweicht. In allen Fällen war der Verzweigungsgrad der verwendeten Fraktionen konstant und unabhängig vom Molekulargewicht: (1,6) zu nicht (1,6) =  $22 \pm 3,5$ <sup>14</sup>. Allerdings scheint die Gültigkeit der oben angeführten Beziehungen auf einen relativ engen Molekulargewichtsbereich begrenzt zu sein.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, tritt oberhalb von etwa 300000 eine Abflachung der Kurven und damit eine Abweichung von der Linearität auf.

<sup>19</sup> F. R. Senti und N. N. Hellman, Abstract of papers, 121st Meeting Amer. Chem. Soc., April 1952, Milwaukee, Wis.



Ähnliche Verhältnisse sind theoretisch behandelt<sup>20</sup> und auch experimentell an verzweigtem Polystyrol demonstriert worden<sup>21</sup>.

*Wales* und Mitarbeiter haben außer wäßr. Lösungen auch Formamid und Wasser-Methanol-Gemische als Lösungsmittel verwendet und ihre Ergebnisse im Rahmen der Viskositätstheorie von *Flory* und *Fox* diskutiert<sup>22</sup>.

Im Molekulargewichtsbereich von 10 Millionen aufwärts wurde die Beziehung zwischen  $[\eta]$  und Molekulargewicht von *Aron*d und *Frank*<sup>9</sup> untersucht. Auf dem doppeltlogarithmischen Diagramm der Abb. 1 ist erkennbar, daß die Beziehung nichtlinear ist und daß die Neigung der Kurve von etwa 0,29 auf 0,13 abnimmt. Allerdings ist der Verzweigungsgrad in dieser Serie von Fraktionen nicht konstant, sondern nimmt mit wachsendem Molekulargewicht zu [(1,6) zu nicht (1,6) nimmt von etwa 200 auf 6 ab]. Dieser Umstand einerseits und die Tatsache, daß die hochmolekularen Fraktionen infolge der Fraktionierungsschwierigkeiten wesentlich inhomogener sind als die relativ niedermolekularen, die den anderen Kurven zugrunde liegen, dürften dafür verantwortlich sein, daß ein völlig glatter Anschluß der Kurven in den beiden Molekulargewichtsbereichen nicht möglich erscheint.

Die Abflachung der Kurve im hohen Molekulargewichtsbereich ist offenbar durch die Verkleinerung des wirksamen Molekülvolumens durch den hohen Verzweigungsgrad bedingt. Dieser Umstand wird auch durch die oben erwähnten direkten Messungen der Moleküldimensionen mit Hilfe der Lichtstreuung illustriert.

## 5. Abbau und Hydrolyse von Dextran.

Für praktische Zwecke, nämlich zur Herstellung eines Produkts, dessen Molekulargröße seiner Verwendung als Blutplasmaersatz entspricht, wird ein partieller Abbau von nativem Dextran durchgeführt. Ein totaler Abbau würde zu Glukose führen. Eine Reihe von Abbaumethoden sind im Laufe der letzten Jahre untersucht worden: bakterieller Abbau<sup>23, 24</sup>, Abbau durch Ultraschall<sup>25, 26</sup>, thermischer Abbau<sup>27, 28</sup>

<sup>20</sup> *B. H. Zimm* und *W. H. Stockmayer*, *J. Chem. Physics* **17**, 1301 (1949).

<sup>21</sup> *B. H. Zimm* und *C. D. Thurmond*, *J. Polymer Sci.* **8**, 477 (1952).

<sup>22</sup> *P. J. Flory* und *T. G. Fox jr.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 1904 (1951).

<sup>23</sup> *B. Ingelman*, *Acta Chem. Scand.* **2**, 803 (1948).

<sup>24</sup> *V. Whitside-Carlson* und *W. W. Carlson*, *Science* **115**, 43 (1952).

<sup>25</sup> *A. R. Lockwood*, *Chem. and Ind.* **1951**, 46. — *A. R. Lockwood*, *F. G. Pautard* und *A. James*, *Research* **4**, 46 (1951).

<sup>26</sup> *M. Stacey*, *Research* **4**, 48 (1951).

<sup>27</sup> *M. Stacey* und *F. G. Pautard*, *Chem. and Ind.* **1952**, 1058.

<sup>28</sup> *I. A. Wolff*, *P. R. Watson*, *J. W. Sloan* und *C. E. Rist*, *Ind. Eng. Chem.* **45**, 755 (1953).

und hauptsächlich Säurehydrolyse<sup>7, 14, 29, 30</sup>. Wir beschränken uns hier auf die Besprechung der beiden letzteren Methoden.

Der thermische Abbau wird bequem meßbar im Temperaturbereich von 180° C aufwärts<sup>28</sup> und wurde zwischen 180 und 210° näher studiert (Tabelle 4).

Tabelle 4. Veränderung von  $[\eta]$  (ursprünglich 1,19) von nativem Dextran bei verschiedenen Temperaturen nach verschiedenen Zeitintervallen.

Temp. °C	Zeit (Stdn.)				
	1	3	5	7	8
150					1,20
170					1,30
180	1,19	1,29	1,07	0,92	0,89
200	1,13	0,45	0,28	0,21	0,19
210	0,54	0,15	0,14	0,05	0,06

Es scheint, daß die Abbaureaktion als solche von einer Neuverteilung der glukosidischen Bindungen begleitet wird, d. h. daß die normalen 1,6-Bindungen zum Teil von neuen Glukosidbindungen in 2-, 3- oder 4-Stellung ersetzt werden. Dieser Vorgang spiegelt sich in der Erniedrigung von (1,6)- zu nicht (1,6)-Bindungen von ursprünglich 16 auf 10 bis 12

wieder. Das Abbauprodukt ist also stärker verzweigt als das Ausgangsmaterial. Dieser Befund steht auch im Einklang mit der Tatsache, daß die Abbauprodukte relativ kleine Viskositätszahlen haben (gemessen an ihrem Molekulargewicht), was durch die größere Kompaktheit und das dadurch bedingte kleinere Volumen der verzweigten Molekel bedingt ist. Diese Begleiterscheinung des thermischen Abbaus, nämlich Zunahme der Verzweigung infolge Neubildung von Glukosidbindungen, ist gerade das Gegenteil dessen, was bei der Säurehydrolyse eintritt.

Wir beschränken uns zunächst auf eine Wiedergabe der ziemlich spärlichen experimentellen Ergebnisse der Säurehydrolyse von Dextran. Messungen wurden bei 70 und 80° C in Schwefelsäurelösung (pH = 1) durchgeführt<sup>14</sup>. Die erhaltenen Reaktionskonstanten erster Ordnung waren  $3,64 \cdot 10^{-3}$  für 80° und  $9,11 \cdot 10^{-3}$  (Std.<sup>-1</sup>) für 70° C. In beiden Fällen handelt es sich um Werte, die bei niedrigem Hydrolysegrad  $\leq 2,0\%$  bestimmt wurden. Aus der Temperaturabhängigkeit ergibt sich eine Aktivierungsenergie von 33,3 Kcal/Mol. In früheren Versuchen wurde 36,0 Kcal/Mol gefunden<sup>31</sup> und Versuche in 0,28 n HCl bei 75, 85 und 100° C ergaben 37,0 Kcal/Mol<sup>30</sup>. Der Verzweigungsgrad erscheint nach der Hydrolyse nur wenig verändert<sup>14</sup>: von (1,6) zu nicht (1,6) von ursprünglich 19 erfolgt eine Zunahme auf 22, was einer geringfügigen Erniedrigung des Verzweigungsgrades entspricht. *Carlqvist*<sup>29</sup> hat ver-

<sup>29</sup> *B. Carlqvist*, Acta Chem. Scand. 2, 759 (1948).

<sup>30</sup> Unveröffentlichte Versuche, *J. Goodkin*, *B. Sundheim* und *H. P. Frank*, Polytechnic Institute of Brooklyn.

<sup>31</sup> Unveröffentlichte Versuche, *C. A. Wilham* und *A. Jeanes*, NRR.L.

gleichende Messungen an Glykogen, Stärke, Dextran und Maltose durchgeführt. Es ergab sich dabei, daß in den beiden ersteren Fällen (im wesentlichen 1,4-Bindungen mit einem geringen Prozentsatz 1,6) die Reaktionskonstante mit zunehmendem Hydrolysegrad ansteigt und bei etwa 50 bis 70% ein Maximum erreicht, um dann bis zu 100% wieder abzunehmen. Die anfängliche Zunahme wurde erklärt durch Zunahme der Zahl leichter hydrolysierbarer endständiger Glukoseeinheiten und die Abnahme durch die Überlagerung eines zweiten Effekts, nämlich die Anreicherung schwerer hydrolysierbarer Dextrine oder anders ausgedrückt durch Anreicherung schwerer hydrolysierbarer 1,6-Bindungen. Aus dem Verhältnis der Reaktionskonstanten von Dextran mit den anderen oben erwähnten Verbindungen kann abgeschätzt werden, daß die Reaktionskonstante für 1,4-Bindungen innerhalb der Kette etwa 4mal größer ist als die für 1,6-Bindungen. Die Reaktionskonstante der Maltose zeigt keine Abhängigkeit vom Hydrolysegrad, die von Dextran (0,05 und 0,21 n HCl bei 100° C) eine stetige Zunahme ohne Maximum. Die Zunahme der Zahl endständiger Glukoseeinheiten dürfte auch in diesem Fall eine Erhöhung der Reaktionskonstante verursachen<sup>32</sup>, während die bevorzugte Hydrolyse von 1,4-Bindungen eine Verarmung an solchen Bindungen und damit eine Erniedrigung der Reaktionskonstante zur Folge haben müßte. Offenbar überwiegt der erstere Effekt. Tatsächlich tritt, wie bereits oben erwähnt, im Verlauf der Hydrolyse eine geringfügige Erniedrigung des Verzweigungsgrades ein. Allerdings ist der Hydrolysegrad im Falle solcher partieller Hydrolysate immer sehr gering ( $\leq 2,0\%$ ). Es wäre sicher lohnend zu untersuchen, inwieweit die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse vom Verzweigungsgrad des verwendeten Dextrans abhängt und in welcher Weise sich der Verzweigungsgrad bei höheren Hydrolysegraden verändert.

<sup>32</sup> Unseres Wissens bestehen in der Literatur keinerlei Angaben über eine 1,6- $\alpha$ -Glukosidoglukose, so daß wir von dem analogen Verhältnis Zellulose-Zellulose und Maltose-Stärke schließen.