

Zur Struktur der Dextrane

Von

Miloslav Černý und Jaroslav Stanek

Aus dem Institute für Organische Chemie der Karls-Universität, Prag

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 28. Januar 1959)

Es wurden die Eigenschaften der in der Tschechoslowakei hergestellten Dextrane mit Hilfe der Perjodatoxydation und Methylierung studiert. Die Resultate, die durch Bestimmung der freien D-Fructose und des Molekulargewichtes ergänzt worden waren, wurden zur Charakterisierung der Verzweigung der Dextrane benützt.

Die Benützung der Dextrane bzw. deren Fraktionen von geeignetem Molekulargewicht ist heute in der klinischen Praxis ganz üblich und verschiedene Standpunkte, die die Möglichkeit der Benützung von verschiedenen Dextranen beeinflussen, sind in einer Reihe von Referaten¹⁻⁶ zusammengefaßt.

Nach den bisherigen Kenntnissen sind native Dextrane Polysaccharide, die nur glykosidisch gebundene D-Glucoseeinheiten enthalten; das Molekulargewicht der nativen Dextrane bewegt sich dabei zwischen 10^6 und 10^8 und darüber^{5, 7}. Die Moleküle der D-Glucose sind meistens linear gebunden, überwiegend in 1 → 6-Bindungen. Verschiedene Typen der Dextrane unterscheiden sich durch den Gehalt von anderen glykosidi-

¹ T. H. Evans und H. Hibbert, Adv. Carbohydrate Chem. **2**, 203 (1946).

² T. Kobayashi und Y. Tsukano, J. Agric. Chem. Soc. Japan **25**, 421 (1951).

³ G. H. Bialer, G. E. Hines, R. M. McGhee und R. A. Shurter, Ind. Engng. Chem. **45**, 692, 1377 (1953).

⁴ H. S. Isbell und H. L. Frush, Annu. rev. Biochem. **22**, 107 (1953).

⁵ H. P. Frank und H. Mark, Mh. Chem. **85**, 307 (1954).

⁶ J. Málek, L. Lacko, O. Šterba und J. Hospodka, Českoslov. farm. **5**, 546, 605 (1956).

⁷ B. Sedláček, Chem. Listy **48**, 1291 (1954).

sehen Bindungen, in erster Reihe $1 \rightarrow 4$, obwohl auch $1 \rightarrow 3$ -Bindungen zweifellos gefunden worden sind⁸.

Bei allen Studien der Struktur der Dextrane ist es unbedingt notwendig, alle Resultate mit der Bestimmung des Molekulargewichtes in Einklang zu bringen. Die Bestimmung des Molekulargewichtes kann mit Hilfe der teilweise modifizierten klassischen *Fehlingschen* Bestimmung⁹, jodometrisch¹⁰, mit Hilfe des radioaktiven Kohlenstoffes¹¹ oder mittels verschiedener physikalisch-chemischer Methoden^{5, 7, 12} durchgeführt werden.

Die Struktur der Dextrane wurde bisher mit Hilfe von zwei chemischen Methoden, und zwar der Methylierungsanalyse¹³⁻²² und Oxydation durch Salze der Perjodsäure^{8, 19, 23-32}, studiert. Es wurde in beiden

⁸ R. Lohmar, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4974 (1952).

⁹ H. S. Isbell, C. F. Snyder, N. B. Holt und M. R. Dryden, J. Res. Nat. Bur. Stand. **50**, 81 (1953).

¹⁰ L. Lacko und J. Málek, Chem. Listy **51**, 47 (1957).

¹¹ H. S. Isbell, Science [New York] **113**, 532 (1951).

¹² M. Wales, P. A. Marshall und S. G. Weissberg, J. Polymer Sci. **10**, 229 (1953).

¹³ F. L. Fowler, I. K. Buckland, F. Brauns und H. Hibbert, Canad. J. Res. **15 B**, 486 (1937).

¹⁴ F. E. Brauns, Canad. J. Res. **16 B**, 73 (1938).

¹⁵ E. C. Fairhead, M. J. Hunter und H. Hibbert, Canad. J. Res. **16 B**, 151 (1938).

¹⁶ M. Stacey und F. R. Youd, Biochemic. J. **32**, 1943 (1938).

¹⁷ S. Peat, E. Schlüchterer und M. Stacey, J. Chem. Soc. [London] **1939**, 581.

¹⁸ I. Levy, W. L. Hawkins und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 1959 (1942).

¹⁹ S. A. Barker, E. J. Bourne, G. T. Bruce, W. B. Neely und M. Stacey, J. Chem. Soc. [London] **1954**, 2395.

²⁰ M. Stacey und G. Swift, J. Chem. Soc. [London] **1948**, 1555.

²¹ S. A. Barker, E. J. Bourne, A. E. James, W. B. Neely und M. Stacey, J. Chem. Soc. [London] **1955**, 2096.

²² J. Y. Macdonald, J. Amer. Chem. Soc. **57**, 771 (1935).

²³ K. Ahlborg, Svensk Kem. Tidskr. **54**, 205 (1942).

²⁴ T. G. Halsall, E. L. Hirst und J. K. N. Jones, J. Chem. Soc. [London] **1947**, 1427.

²⁵ P. W. Kent, Science [New York] **110**, 689 (1949).

²⁶ A. Jeanes und C. A. Wilham, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2655 (1950).

²⁷ A. Jeanes, C. A. Wilham und G. E. Hilbert, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 3667 (1953).

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

²⁹ M. Wales, P. A. Marshall und S. G. Weissberg, J. Polymer Sci. **10**, 229 (1953).

³⁰ J. W. Sloan, B. H. Alexander, R. L. Lohmar, I. A. Wolff und C. E. Rist, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4429 (1954).

³¹ J. C. Rankin und A. Jeanes, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4435 (1954).

³² A. Jeanes, W. C. Haynes, C. A. Wilham, J. C. Rankin, E. H. Melvin, M. J. Austin, J. E. Cluskey, B. E. Fisher, H. M. Tsuchiya und C. E. Rist, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 5041 (1954).

Fällen gefunden, daß in den Molekülen der Dextrane meistens eine Verzweigung auf 4 bis 6 linear gebundene D-Glucoseeinheiten stattfindet. Eine Konfrontation der Konstitutionsbeweise durch die beiden obenerwähnten Methoden an demselben Muster irgendwelchen Dextrans fehlt jedoch.

Mit Rücksicht auf einige Differenzen in den Literaturangaben^{19, 20, 26} schien es uns notwendig, die Benützung der Perjodatoxydation zu prüfen und die gewonnenen Resultate mit denen der Methylierungsanalyse mit Rücksicht auf das Molekulargewicht der studierten Dextrane zu vergleichen.

Resultate und Diskussion

Zur Auffindung der besten Reaktionsbedingungen für die Oxydation der Dextrane mittels Kaliumperjodats haben wir diese Oxydation und deren Zeitverlauf an einigen einfachen Sacchariden studiert. Von den Monosacchariden wurden D-Glucose und D-Fructose, von den reduzierenden Disacchariden Maltose und Lactose, von den nichtreduzierenden Oligosacchariden Saccharose und Raffinose untersucht (Tab. 1).

Tabelle 1. Verlauf der Oxydation einiger Saccharide mittels Kalium-metaperjodat

	Menge der Ameisensäure in % d. Th. nach ... Stunden									
	24	48	96	144	172	216	288	316	336	388
D-Glucose	—	—	80	—	98	—	—	101	—	102
D-Fructose	—	68	73	—	78	—	—	81	—	81
Maltose	29	58	68	78	—	93	Jod	—	—	—
Lactose	31	59	70	79	—	95	Jod	—	—	—
Saccharose	18	25	49	61	—	80	92	—	98	—
Raffinose	21	47	57	78	—	99	99	—	99	—

D-Glucose: 0,1745 g (0,001 Mol), 250 ml H₂O, 1,72 g (0,0075 Mol) KJO₄
 D-Fructose: 0,0842 g (0,0005 Mol), 250 ml H₂O, 0,85 g (0,0037 Mol) KJO₄
 Maltose: 1,0084 g (0,003 Mol), 250 ml H₂O, 5,00 g (0,022 Mol) KJO₄
 Lactose: 1,0120 g (1,020 Mol), 250 ml H₂O, 5,00 g (0,022 Mol) KJO₄
 Saccharose: 1,5000 g (0,0044 Mol), 250 ml H₂O, 4,4 g (0,019 Mol) KJO₄
 Raffinose: 1,4955 g (0,0025 Mol), 250 ml H₂O, 4,3 g (0,0187 Mol) KJO₄

Es wurde gefunden, daß im Falle der D-Glucose, Saccharose und Raffinose die theoretische Menge Ameisensäure wirklich erhalten wurde; etwas niedrigere Resultate wurden im Falle der Lactose und Maltose beobachtet. Im Falle der D-Fructose haben wir nur 3,24 Mol Ameisensäure an Stelle von 4 Mol erhalten, was im Einklange mit den Angaben anderer Autoren^{33, 34} ist; die niedrigeren Werte der Ameisensäure sind durch zwei nebeneinander verlaufende Reaktionen erklärt.

³³ P. F. Fleury und J. Lange, J. Pharm. Chim. **17**, 409 (1933).

³⁴ Y. Khowine und G. Arragon, Bull. soc. chim. France [5] **8**, 676 (1941).

In einigen Fällen wurden die niedrigeren Werte der Ameisensäure mit dem Auftreten von freiem Jod in der oxydierten Flüssigkeit in Zusammenhang gebracht, was durch Überoxydation²⁴ erklärt worden war. Unsere Befunde stimmen mit denen anderer Autoren³⁵⁻³⁸ gut überein.

Der Verlauf der Oxydation der Sacharide mittels Kaliumperjodats ist von der Temperatur, ferner auch der Konzentration sowohl des oxydierbaren wie auch des oxydierenden Stoffes abhängig. Die Oxydation von 0,07proz. D-Glucose-Lösungen verlief normal, bei der Oxydation von D-Fructose derselben Konzentration wurde binnen 24 Stdn. freies Jod beobachtet. Die Oxydation der Lösungen der D-Fructose in einer Konzen-

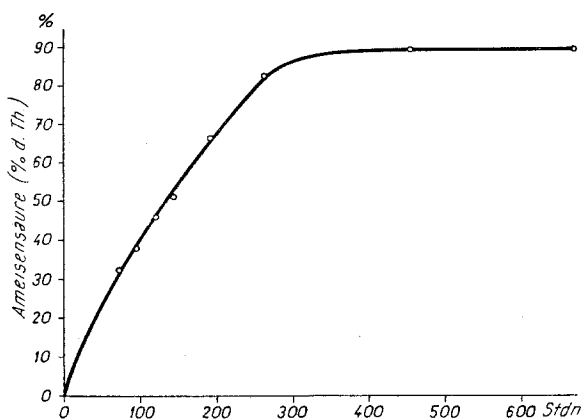


Abb. 1. Typischer Verlauf der Oxydation von Dextran mittels KJO_4 .

tration von 0,035% verlief dagegen normal, und deswegen wurden die meisten Oxydationen in dieser oder noch niedrigerer Konzentration durchgeführt. Höhere Temperatur wie auch direkte Belichtung waren immer mit der Gefahr der Jodabscheidung verbunden, während das zerstreute Tageslicht ohne bemerkbaren Einfluß auf den Verlauf der Oxydation war.

Auch bei den Dextranen haben wir den Zeitverlauf der Oxydation verfolgt (Abb. 1, 2, 3). Es wurde dabei gefunden, daß bei 14—16° (Methode *a* und *b*, Seite 168) und dem Verhältnis 3 Mol KJO_4 auf 1 Mol einer Anhydroglucoseeinheit die Oxydation ganz langsam verlief und maximale Werte an Ameisensäure nach 20 Tagen erhalten wurden. Der typische Verlauf der Oxydation des Dextran SD ist an der Abb. 1 veranschaulicht.

Bei der Oxydation der Dextrane bei 21° (Methode *c*, Seite 169) wurde der maximale Wert der Ameisensäure in 6—8 Tagen erhalten. Die Re-

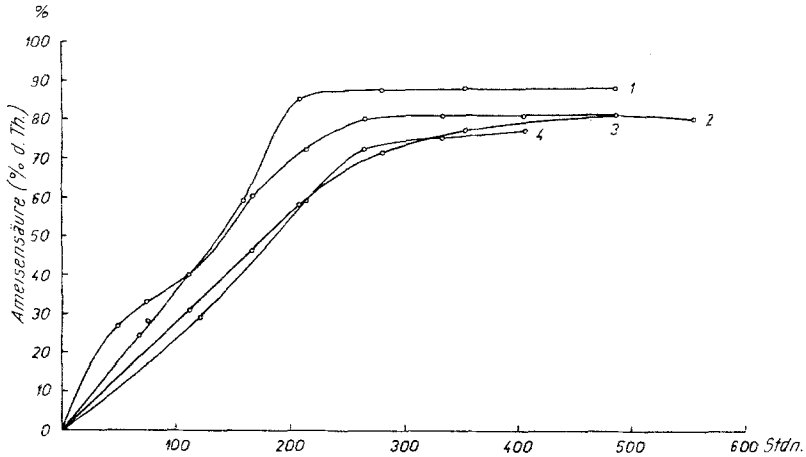
³⁵ A. Wickström, Særtrykk Medd. Norsk Farmac. Selskap **18**, 129 (1956).

³⁶ A. Wickström und A. B. Svendsen, Acta Chem. Scand. **10**, 1199 (1956).

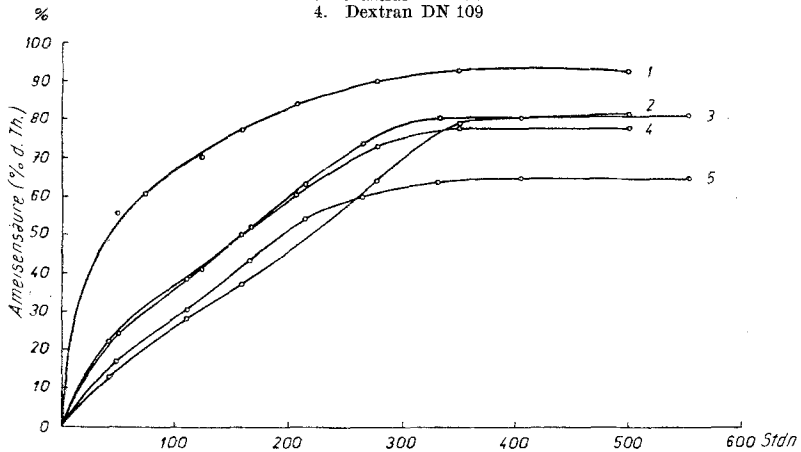
³⁷ W. G. Wright, J. Chem. Soc. [London] **1957**, 1913.

³⁸ D. J. Manners und A. R. Archibald, J. Chem. Soc. [London] **1957**, 2205.

sultate bei 21° lagen gewöhnlich um 1—2% höher im Vergleich mit denen, die unter Anwendung von Methode *a* und *b* (Seite 168) gewonnen wurden.

Abb. 2. Oxydation der Dextrane mittels KJO_4

1. Dextran DN 114
2. Dextran DN 105
3. Dextran DN 110
4. Dextran DN 109

Abb. 3. Oxydation der Dextrane mittels KJO_4

1. Dextran DN 112
2. Dextran DN 116
3. Dextran DN 108
4. Dextran DN 117
5. Dextran D 28/bi

Wir haben durch Kontrollversuche festgestellt, daß Ameisensäure in keinem Falle unter Reaktionsbedingungen, wie wir sie gewöhnlich benützt hatten, von KJO_4 angegriffen ist. Bei höheren Temperaturen, schon bei 26°, haben wir ähnlich wie bei Mono- und Oligosacchariden einen anomalen Reaktionsverlauf mit Jodabscheidung beobachtet (Abb. 4).

*Sloan*³⁰ hatte bei der Arbeit mit NaJO_4 festgestellt, daß bei dem Verhältnis 3 Mol NaJO_4 auf 1 Mol Anhydroglucoseeinheit mehr als 100% der erwarteten Ameisensäure gebildet werden. *Jeanes*^{31, 32} hatte ähnliche Resultate bei Anwendung von 3 Mol NaJO_4 und 25° in 72 Stdn., oder 2 Mol NaJO_4 und 96 Stdn. erhalten.

Bei Verwendung von KJO_4 (3 Mol auf 1 Mol Anhydroglucoseeinheit) unter den Reaktionsbedingungen der Methoden *a*, *b* und *c* haben wir nie zu hohe Ameisensäurewerte beobachtet. Da KJO_4 im Wasser nicht sehr löslich ist, wurde die Oxydation in einer konstanten Lösung von KJO_4

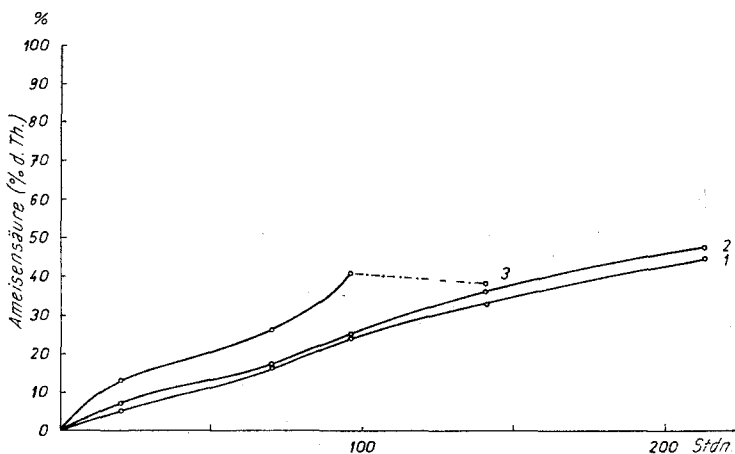


Abb. 4. Einfluß der Temperatur und des Lichtes auf den Verlauf der Oxydation des Dextrans D 28/bi

1. Temperatur 10°, im Dunkeln durchgeführt
2. Temperatur 10°, im Tageslichte durchgeführt
3. Temperatur 26°, im Dunkeln durchgeführt mit Jodabscheidung (— · — · —)

durchgeführt (die Konzentration der JO_4' -Ionen wurde bei der Oxydation nicht geändert).

Jeanes hatte zur Charakterisierung der Dextrane bei Verwendung von NaJO_4 die Menge Ameisensäure, welche nach 72 Stdn. entstanden ist, gewählt^{31, 32}, obwohl sie in einigen Fällen noch nach weiteren 48 Stdn. einen Zuwachs von 2—3% Ameisensäure festgestellt hatte. Soweit keine zuverlässigen gleichzeitig gewonnenen Resultate der Methylierungsanalyse zur Verfügung stehen, ist es nicht möglich zu begründen, warum gerade eine Versuchsdauer von 72 Stdn. gewählt worden war, insbesondere wenn man annehmen muß, daß verschiedene Dextrane nicht gleich schnell oxydiert werden und maximale Ameisensäurewerte nicht nach derselben Zeit zu erwarten sind (Abb. 1, 2, 3).

Mit Rücksicht auf die oben angegebenen Divergenzen haben wir eine solche Menge Ameisensäure als charakteristisch gewählt, welche festgestellt worden war, nachdem die Oxydation aufgehört hatte. In

den nächsten 100 Stdn. darf der Zuwachs an Ameisensäure nicht mehr als 1% betragen (Tab. 2). Bei der Charakterisierung der Dextrane durch

Tabelle 2. Ergebnisse der Oxydation der Dextrane mittels Kalium-metaperjodat
Molekulargewichtsbestimmungen nach *Isbell*⁹

Dextran	Molgew.	Menge der Ameisensäure in % d. Th.	Korrektion ¹	Korrigierte Menge der Ameisensäure ² in % d. Th.
DN 105	34 600	81,4	1,4	80,0
DN 108	32 600	81,1	1,5	79,6
DN 109	83 000	76,3	0,6	75,7
DN 110	45 400	80,6	1,1	79,5
DN 112	4 100	92,0	11,7	80,3
DN 114	40 800	87,4	1,2	86,2
DN 115	215 000	88,3	0,2	88,1
DN 116	107 000	83,0	0,4	82,6
DN 117	42 800	79,2	1,1	78,1
D 28/bi	150 000	66,5	0,3	66,2
SD	31 600	89,3	1,5	87,8

¹ Korrektion nach der Beziehung $k = \frac{48000}{MG}$ (s. S. 166).

² Korrigierte Menge der Ameisensäure nach dem Abrechnen der Korrektion k von der gefundenen Menge der Ameisensäure.

Tabelle 3. Gegenüberstellung der Methylierungsanalyse und Oxydation der Dextrane

Dextran	Ameisensäure % d. Th.	Der Gehalt an D-Fructose in %		Ameisensäure, % d. Th. korr. mit Rücksicht auf den Gehalt der D-Fructose ³		Ameisensäure, % d. Th. ber. aus den Ergebnissen der Methylierungsanalyse ⁴	Schema der Verzweigung
		1	2	1	2		
DN 105	81,4	0,52	0,61	80,3	80,1	80,4	($\overline{\text{---}}$) _n
DN 108	81,1	0,69	0,65	79,6	79,7	79,3	($\overline{\text{---}}$) _n
DN 112	92,0	5,49	5,25	80,4	80,9	79,9	($\overline{\text{---}}$) _n
D 28/bi	66,5	—	—	—	—	68,1	($\overline{\text{---}}$) _n
SD	89,3	—	—	87,8 ⁴		87,6	($\overline{\text{---}}$) _n

¹ D-Fructose wurde kolorimetrisch bestimmt.

² Der Gehalt an D-Fructose wurde aus dem Reduktionsvermögen des Dextrans berechnet (s. S. 170).

³ Berechnet aus der Beziehung $K = \frac{N-2,916 \cdot F}{100-F}$ (s. S. 170).

⁴ Dieser Wert wurde berechnet durch Abrechnung der Korrektion $k = \frac{48000}{MG}$ (s. S. 166).

⁵ Berechnet aus der Beziehung $N = \frac{1+x}{2+x} \cdot 100$ (s. S. 165).

die Menge der gebildeten Ameisensäure haben wir die Vorschläge von *Jeanes*^{31, 32} übernommen.

Weil die Resultate, die wir bei Oxydationen der Dextrane bei 21°

(Methode *c*) und 14—16° (Methode *a* und *b*) gefunden haben, in guter Übereinstimmung waren, kann man annehmen, daß auch die Charakterisierung nach *Jeanes*^{31, 32} verläßlich ist, obwohl ihre Bestimmungen nicht mit Resultaten der Methylierungsanalyse verglichen worden waren.

In dieser Arbeit haben wir die Resultate der Perjodatoxydation mit denen der Methylierungsanalyse konfrontiert (Tab. 3) und meistens eine

Tabelle 4. Methylierungsanalyse der Dextrane

Dextran	Molekularverhältnis der Methyläther der D-Glucose in % Tetra : Tri : Di	1 : x : 1 ¹
DN 105	19,1 : 60,9 : 20,0	1 : 3,11 : 1
DN 108	20,1 : 58,7 : 21,3	1 : 2,84 : 1
DN 112	17,7 : 59,8 : 22,5	1 : 2,97 : 1
D 28/bi	30,8 : 36,3 : 32,9	1 : 1,11 : 1
SD	11,6 : 75,2 : 13,1	1 : 6,06 : 1

¹ Das Molekularverhältnis der Methyläther der D-Glucose wurde auf 1 : x : 1 umgerechnet, indem der Molekulargehalt des Trimethyläthers durch das arithmetische Mittel der Molekulargehalte an Tetra- und Dimethyläther dividiert wurde.

gute Übereinstimmung gefunden. In allen Fällen der Methylierungsanalyse (Tab. 4, 5) haben wir nach der Hydrolyse des Dextranpermethyl-

Tabelle 5. Die Genauigkeit der Bestimmungen bei der quantitativen Methylierungsanalyse

Dextran	Chromatogramm	Molekularverhältnis der Methyläther in %
DN 105	1	18,6 : 60,6 : 20,8
	2	19,6 : 61,3 : 19,2
DN 108	1	19,9 : 60,1 : 20,0
	2	20,2 : 57,2 : 22,6

äthers die Tetra-O-methyl-, Tri-O-methyl- und Di-O-methyl-D-glucose im Molekularverhältnis 1:x:1 erhalten.

Wenn man annehmen kann, daß ein Makromolekül des Dextrans nicht zweimal an derselben Anhydroglucoseeinheit verzweigt ist und daß ihr Molekulargewicht genügend hoch ist, dann muß das Verhältnis des Tetra-O-methyl- und Di-O-methyläthers der D-Glucose stets 1:1 betragen (siehe auch³⁹). Im Falle einer doppelten Verzweigung an irgendeiner Anhydroglucoseeinheit des Moleküls des Dextrans mußte nach der Hydrolyse der entsprechende Monomethyläther der D-Glucose identifiziert werden, was bisher nie gelungen ist.

³⁹ *K. H. Meyer und H. Mark*, Makromolekulare Chemie, Akad. Verlagsges. Leipzig 1953, S. 483.

Nach einigen Angaben der Literatur^{19, 40} ist das oben angegebene Verhältnis des Tetra-O-methyl- und Di-O-methyläthers der D-Glucose nicht in allen Fällen gefunden worden, und man hat die anderen Ergebnisse nicht erklärt. Nur in den Fällen, wo das gefundene Verhältnis wirklich 1:1 ist, kann man annehmen, daß die Zahl x die Anzahl der Verzweigungen des Polysaccharids verläßlich erfaßt.

Aus den Ergebnissen der Methylierungsanalyse der Dextrane kann die theoretische Menge der Ameisensäure, die durch Oxydation des Dextrans mittels KJO_4 entstehen sollte, berechnet werden. Zum Beispiel gibt Dextran vom Typus



nach der Methylierung und darauffolgenden Hydrolyse eine Mischung der Tetra-O-methyl-, Tri-O-methyl- und Di-O-methyl-D-Glucose in dem Verhältnis 1:3:1. Bei der Oxydation desselben Dextrans mittels KJO_4

muß man 80% der Ameisensäure $\left(\frac{4}{5} \cdot 100\right)$ erhalten, die durch Oxydation eines Systems von fünf nichtverzweigten Anhydroglucoseeinheiten entstehen würde.

Aus dem Verhältnis 1:x:1, wobei x die Anzahl der Moleküle des Tri-O-methyläthers der D-Glucose bedeutet, kann man die Menge der Ameisensäure (in %), welche durch Oxydation desselben Dextrans mittels KJO_4 entstehen sollte, nach der Gleichung

$$N = \frac{1+x}{2+x} \cdot 100$$

berechnen, und umgekehrt kann man aus der gefundenen Menge Ameisensäure das x und daher auch das Verhältnis 1:x:1 berechnen:

$$x = \frac{N}{100-N} - 1$$

Das Verhältnis der glykosidischen 1 → 6-Bindungen zu allen anderen (vorwiegend 1 → 4) ist dementsprechend:

$$1 \rightarrow 6 : 1 \rightarrow 4 = (x + 1) : 1$$

Es gibt also mehrere Möglichkeiten, wie man die Dextrane charakterisieren kann:

1. Mittels Bestimmung der bei der Perjodat-oxydation gebildeten Ameisensäure³¹.

2. Mittels des Verhältnisses der Bindungen 1 → 6 : 1 → 4^{26, 29}.

3. Mittels des Verhältnisses 1:x:1¹ (s. Tab. 6).

⁴⁰ E. L. Hirst, L. Hough und J. K. N. Jones, J. Chem. Soc. [London] 1949, 928.

Alle diese Betrachtungen gelten aber nur dann, wenn das Molekulargewicht des Dextrans genügend hoch ist. Bei den Dextranen (bzw. deren Fraktionen) mit niedrigerem Molekulargewicht entspricht das Verhältnis der Tetra-O-methyl-, Tri-O-methyl- und Di-O-methyl-D-glucose einem Ausdruck $(y + 1):x:y$. Dies beeinflusst in solchen Fällen wesentlich die Resultate der Oxydation mittels KJO_4 , da durch Oxydation der Endeinheit des Anhydroglucosesystems noch 3 Moleküle Ameisensäure mehr gebildet werden. Im Falle eines genügend hohen Molekulargewichtes des Dextrans dagegen fallen diese 3 Moleküle Ameisensäure nicht ins Gewicht.

In den Fällen der Hydrolysate mit einem kleineren Molekulargewicht (48 000 und weniger) kann aber diese Menge 4—5% des gesamten Ameisensäuregehaltes, der durch Titration gefunden war, betragen. Es ist daher

Tabelle 6. Die Möglichkeiten der Verzweigung der Dextrane

Typus	Ameisensäure % d. Th.	1 → 6 : 1 → 4	1 : x : 1
$(\text{---})_n$	80,0	4	1 : 3 : 1
$(\text{---})_n$	83,3	5	1 : 4 : 1
$(\text{---})_n$	85,7	6	1 : 5 : 1

notwendig, bei der Bestimmung der Ameisensäure im Falle eines Hydrolysates des Dextrans von dem prozentuellen Gehalt der gefundenen Ameisensäure eine Korrektur

$$k = \frac{48\,000}{MG}$$

abzuziehen, wobei MG das Molekulargewicht des benützten Dextrans bzw. dessen Fraktion ist (s. auch ⁴¹).

Aus den oben angegebenen Betrachtungen ergibt sich, daß es meistens notwendig ist, das Molekulargewicht des studierten Dextrans zu kennen. Aus einer Reihe der Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Dextrane^{5, 7, 9-12} haben wir eine solche, die auf dem Reduktionsvermögen der endständigen aldehydischen Gruppe des Systems der Anhydroglucoseeinheiten begründet ist, gewählt, nämlich die Methode von *Isbell*⁹. Die gefundenen Resultate findet man in Tab. 2. Aus den so gewonnenen Werten haben wir noch die notwendigen Korrekturen der Ameisensäure k berechnet (Tab. 2).

Wie man aus der Tab. 2 ersehen kann, wurden bei den studierten Dextranen in manchen Fällen zu niedrige Werte des Molekulargewichtes gefunden. Da es sich in überwiegender Menge um native Dextrane (mit

⁴¹ *I. A. Wolff, C. L. Mehlretter, R. L. Mellies, P. R. Watson, B. T. Hofreiter, L. P. Patrick und C. E. Rist, Ind. Engng. Chem.* **46**, 370 (1954).

der Ausnahme von D 28/bi und SD) handelte und das Molekulargewicht demgemäß wesentlich größer sein sollte^{5, 7}, haben wir geprüft, ob nicht die untersuchten Proben irgendeine andere reduzierende Substanz enthalten. Es hat sich gezeigt, daß manche von den Dextranen mit gewissen Mengen an D-Fructose (z. B. DN 112 bis zu 5%) verunreinigt sind. Bei der Oxydation der D-Fructose mittels KJO_4 werden, wie wir festgestellt hatten (S. 159), 3,24 Mol Ameisensäure gebildet, und diese Menge muß wesentlich die Molekulargewichtsbestimmung, falls diese auf dem Reduktionsvermögen des Dextrans basiert, beeinflussen.

Deswegen wurde in allen nativen Dextranen die Menge der freien D-Fructose bestimmt, einerseits kolorimetrisch⁴² oder andererseits indirekt durch Errechnen aus der reduzierenden Wirkung des Dextrans (S. 170). Die Resultate, die mit den beiden Methoden erzielt waren, sind in guter Übereinstimmung (Tab. 3). Für die kolorimetrische Bestimmung wurde als Standard Dextran SD, das keine freie D-Fructose enthielt, benützt.

Aus der gefundenen Menge der D-Fructose und aus der Menge der gefundenen Ameisensäure ist es möglich, ganz einfach die korrigierte Menge der Ameisensäure, die einer reinen Substanz (frei von D-Fructose) entspricht, zu errechnen. Es ist möglich, auf diese Weise eine scheinbare Nichtübereinstimmung der Ergebnisse der Oxydationsmethode und Methylierungsanalyse beim Dextran DN 112 (Tab. 3), die durch den hohen Gehalt an freier D-Fructose verursacht war, zu erklären.

Die Menge der titrimetrisch gefundenen Ameisensäure kann annähernd mittels der Korrektur k (berechnet nach *Wolff*⁴¹) auch dann korrigiert werden, wenn es sich um ein natives Dextran mit einem hohen Molekulargewicht handelt. Dies ist möglich durch das sehr ähnliche Reduktionsvermögen der D-Fructose und der Gentiobiase, welche von *Isbell*⁹ als Standard für die Molekulargewichtsbestimmung der Dextrane benützt wurde. Beide Möglichkeiten sind in der Tab. 3 angegeben.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich, daß von den Dextranen der tschechoslowakischen Produktion die als DN 114 und DN 115 bezeichneten als am wenigsten verzweigte zu betrachten sind. Die beiden Dextrane ähneln durch die Anzahl der Verzweigungen dem schwedischen Dextran SD und können praktisch appliziert werden.

Experimenteller Teil

Die benützten Substanzen hat uns das Institut für Hämatologie und Bluttransfusion zu Prag zur Verfügung gestellt. Die als DN bezeichneten Substanzen sind native Dextrane, von den Hydrolysaten ist D 28/bi tschechoslowakischer, SD schwedischer Herkunft.

⁴² C. W. Wise, R. J. Dimler, H. A. Davis und C. E. Rist, Anal. Chem. 27, 33 (1955).

Zu den Oxydationen wurde KJO_4 „Lachema“ benützt; kolorimetrische Messungen wurden am Spektrophotometer Coleman, Model 11 A, durchgeführt.

Der Wassergehalt in den Dextranen wurde durch Trocknen bei 103—104° bis zum konstanten Gewicht bestimmt und lag um 12%.

Die Methylierung der Dextrane wurde mittels Dimethylsulfat nach *Stacey*²⁰ durchgeführt. Das Rohprodukt, das wir nach der zweiten Methylierung bekommen hatten und das durch Natriumsulfat verunreinigt war, wurde aus dem warmen Reaktionsgemisch abgesaugt und der so gewonnene Niederschlag nach dem Trocknen mit warmem Chloroform extrahiert. Aus der Lösung in Chloroform wurde das teilweise methylierte Dextran durch Petroläther gefällt und die so gewonnene Substanz weiter methyliert²⁰. Die Ausbeute nach der dritten Methylierung betrug gewöhnlich 60—80%.

Das nach der dritten Methylierung mittels Dimethylsulfats gewonnene partiell methylierte Dextran wurde durch mehrere Methylierungen mittels

Tabelle 7. Abhängigkeit des Methoxylgehaltes nach der Anzahl der durchgeführten Methylierungen

Anzahl der Methylierungen	1	2	3	4	5
Methoxylgehalt in %	24,8	36,4	38,2	41,4	44,8
Anzahl der Methoxylgruppen in bezug auf eine Anhydroglucoseeinheit.....	1,6	2,4	2,5	2,7	2,95

Methylierungen 1, 2 und 3 nach der *Haworth*schen Methode²⁰, 4 und 5 nach *Muskat* (Methyljodid und Natrium im flüssigen Ammoniak)⁴³

Methyljodids in flüssigem Ammoniak permethyliert. Die rohen Produkte wurden so gereinigt, daß eine Lösung in Chloroform fraktioniert mit Petroläther gefällt und die sich zuerst abscheidenden Ammoniumsalze durch Zentrifugieren beseitigt wurden. Aus der klaren Lösung in Chloroform-Petroläther wurde dann mit einem Überschuß von Petroläther das permethylierte Dextran gefällt. Die gewonnenen Produkte wurden über Phosphorpentoxyd im Vak. bei 80° getrocknet. Durchschnittlich haben wir Produkte mit 44,5% (ber. 45,6%) Methoxyl gewonnen.

Bei dem Dextran D 28/bi wurde die Abhängigkeit des Methoxylgehaltes von der Zahl der durchgeführten Methylierungen verfolgt (s. Tab. 7).

Die Hydrolyse der Methyläther der Dextrane wurde nach den Angaben von *Hirst*⁴⁰ durchgeführt. In den Hydrolysaten haben wir 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose, 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose und 2,3(?)-Di-O-methyl-D-glucose papierchromatographisch identifiziert.

Oxydation der Dextrane

Methode a:

Eine genau gewogene Menge Dextran (ungefähr 1 g, 0,006 Mol) wurde in 200 ml dest. Wasser gelöst bzw. suspendiert und die Flüssigkeit nach der Zugabe von 4,2 g KJO_4 (0,018 Mol) auf 250 ml aufgefüllt. Ein Teil des

⁴³ I. *Muskat*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 693, 2449 (1934).

Kalium-metaperjodats blieb unter diesen Bedingungen ungelöst. Die Reaktionsflüssigkeit wurde von Zeit zur Zeit geschüttelt und im Dunkeln bei 14—16° aufbewahrt. In bestimmten Intervallen wurden 25 ml abpipettiert, immer je 2 ml Äthylenglycol zugegeben und, nachdem der Überschuß des KJO_4 beseitigt war (etwa nach 50 Min.), die Ameisensäure titrimetrisch mittels 0,1 n KOH bestimmt (Phenolphthalein). Der Verbrauch der Lauge-lösung betrug gegen 5 ml.

Methode b:

Etwa 0,1 g (0,0006 Mol) Dextran wurden in 50 ml dest. Wasser gelöst bzw. suspendiert und die Reaktionsflüssigkeit nach Zugabe von 0,42 g KJO_4 (0,0018 Mol) im Dunkeln bei 14—16° unter Umschütteln aufbewahrt. Nach 450 Stdn. wurden 2 ml Äthylenglycol zugegeben und die Ameisensäure wie oben bestimmt.

Methode c:

0,5 g (0,003 Mol) Dextran wurden in 400 ml dest. Wasser gelöst bzw. suspendiert und nach Zugabe von 2,1 g (0,009 Mol) KJO_4 auf 500 ml aufgefüllt. Die Reaktionsflüssigkeit wurde im Thermostat bei 21° stehen gelassen und die Ameisensäure wie oben bestimmt.

Ergebnisse in der Tab. 8.

Tabelle 8. Oxydation der Dextrane mit Hilfe der Methode c durch Kalium-metaperjodat bei 21°

Dextran	DN 105	DN 108	DN 112	SD
Ameisensäure % d. Th.	81,8	83,0	98,2	91,1

Oxydation der Mono- und Oligosaccharide

Eine gewogene Menge des Saccharids wurde in dest. Wasser gelöst und KJO_4 zugegeben. Es wurden stets dieselben Bedingungen, wie bei den Oxydationen der Dextrane angegeben, eingehalten. Gleichzeitig mit jeder Oxydation wurde ein Blindversuch unter denselben Bedingungen, aber ohne Dextran durchgeführt.

Ergebnisse in der Tab. 1.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht wurde nach *Isbell*⁹ bestimmt. Bei den Hydrolysaten mit niedrigerem Molekulargewicht wurde die Einwaage erniedrigt und eine größere Menge des Oxydationsmittels zugegeben.

Ergebnisse in der Tab. 2.

Die Bestimmung der freien D-Fructose

a) chromatographisch:

Etwa 0,5 g Dextran wurden durch 30 Min. Erhitzen mit 25 ml 70proz. Äthylalkohols extrahiert. Der äthanolische Extrakt wurde nach dem Eindicken gleichzeitig mit einer D-Fructoselösung von bestimmter Konzentration chromatographiert (Whatmann Nr. 4). Nach der Sichtbarmachung mit $AgNO_3$ wurde der Gehalt an D-Fructose aus der Größe der beiden Flecke abgeschätzt.

b) kolorimetrisch⁴¹:

Die Bestimmung wurde mit dem Spektrophotometer Coleman, Modell 11 A, Filter PC 4, Länge der Absorptionsschicht 16 mm, $\lambda = 550 \text{ m}\mu$ durchgeführt. Das schwedische Dextran wurde zum Vergleich benützt.

c) durch Errechnen aus dem Reduktionsvermögen des Dextrans nach der Beziehung:

$$F = \frac{0,136 \cdot V}{E} \cdot 100$$

F ist der Gehalt der D-Fructose in Prozenten,
0,136 ist das Reduktionsäquivalent der D-Fructose,
 V der Verbrauch an 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ nach *Isbell*⁹,
 E die Einwaage des Dextrans in Milligramm.

Die korrigierte Menge der Ameisensäure kann man aus dem bekannten Gehalt an D-Fructose und der bekannten Menge der Ameisensäure (titrimetrisch bestimmt) errechnen nach der Beziehung

$$K = \frac{N - 2,916 \cdot F}{100 - F}$$

N ist die Ameisensäuremenge, bestimmt nach *Jeanes*²⁶,

K ist die korrigierte Menge der Ameisensäure in Prozenten, umgerechnet auf reines Dextran,

F ist der Gehalt an D-Fructose (in Prozenten) in dem untersuchten Dextran.

Die Autoren danken hier den Herren Dr. *L. Lacko* und Dr. *J. Málek* aus dem Institut für Hämatologie und Bluttransfusion für die Muster der Dextrane, den beiden Herren sowie Herrn Dr. *B. Sedláček* aus dem Chemischen Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften für wertvolle Diskussionen und Bemerkungen, weiter der Frau *J. Dvořáková* aus dem Institut für Hämatologie und Bluttransfusion für die Durchführung einiger Bestimmungen.