

UNTERSUCHUNG DER HETERODISPERSITÄT VON POLYSACCHARIDEN*

I. FRAKTIONIERUNG DER DEXTRANE MIT SEPHADEX GELFILTER

Von

J. HOLLÓ, E. LÁSZLÓ, M. TÓTH und Z. RÁTHONYI

Lehrstuhl für Landwirtschaftlich-Chemische Technologie, Technische Universität,

Budapest

(Eingegangen am 25. Oktober 1967)

I. Einleitung

Die Forschungen der letzten Jahre wenden sich immer häufiger polymerphysikalischen Untersuchungen zu, die sich außer der Ermittlung der Durchschnittsmolekulargewichte der natürlichen Polymere (Eiweiße, Polysaccharide, Nukleinsäure usw.) auch die Bestimmung ihrer Molekulargewichtsverteilung zum Ziel setzen. Sie wird benötigt, weil sie nicht nur die Klärung der chemischen, physikalischen, der physikochemischen und der kolloidchemischen Eigenschaften der einzelnen Polymere, sondern auch die Beschreibung der Bindungs- und Degradationsvorgänge ermöglicht. Letztere ist besonders bei der Aufklärung der Statistik der Bindungsstabilität und Bindungsspaltung unentbehrlich.

Bei Dextran zeigen sich Heterodispersitätsprobleme in folgenden Fällen:

a) Änderung im Molekulargewicht und in der Molekulargewichtsverteilung während der Dextranfermentation, die Wirkung der Fermentationsumstände (Temperatur, pH , Substrat : Zellenzahl-Verhältnis, Zusammensetzung des Nährbodens usw.) auf die Struktur und die Molekulargewichtsverteilung des entstehenden Dextrans.

b) Die Bestimmung der Spaltungswahrscheinlichkeit von Glykosidbindungen ist beim Ablauf der verschiedenen Degradationsvorgänge (saure, thermische, enzymatische, Bestrahlungsvorgänge usw.) von wesentlicher Bedeutung.

c) Die Verbraucher von Dextran verlangen im allgemeinen ein Produkt mit gegebenem Molekulargewicht und gegebener Molekulargewichtsverteilung. Die Verfolgung der Herstellung durch Fraktionierung sowie die Beurteilung des fertigen Produktes sind gleichfalls nur durch Heterodispersitätsmessungen möglich.

Wie allgemein bekannt, ergeben sich auch bei den Polysacchariden — wie bei anderen Polymeren — Abweichungen im Molekulargewicht je nachdem, ob man es auf Grund des Polymerisationsgrades, der Stoffmenge bzw. der Gestalt des Polymermoleküls ermittelt. Die Abweichung besteht auch bei

* 64. Mitteilung des Lehrstuhls für Landwirtschaftlich-Chemische Technologie der Technischen Universität Budapest über die Erforschung der Polysaccharide.

linear, mit streng identischen Bindungen aufgebauten Molekülen, in erhöhtem Maße besteht sie jedoch, wenn das Polysaccharidmolekül auch in seinen Bindungstypen nicht homogen ist, wie dies z. B. in kleinerem Maße bei der Amylose, Agarose sowie bei einigen Dextranen und in erhöhtem Maße beim Amylopektin, Agaropektin oder bei den verzweigten Dextranen der Fall ist.

Das auf Grund der Stoffmenge gemessene Molekulargewicht (das sogenannte zahlenmäßige Durchschnittsmolekulargewicht) kann auf Grund des Vergleichs von Gesamtkohlenhydratgehalt und Endgruppengehalt ermittelt werden. Zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes sind die Anthron-Methode [1—4] oder die Messung des Zuckergehaltes nach erfolgter Hydrolyse, die Messung des optischen Drehvermögens, für die Messung des Reduktionsvermögens dagegen die SOMOGYI—NELSON-Methode [5—8], die Ferrocyanid-Methode nach PARK—JOHNSON [9], und die Hypojodid-Methode unter den anwendbaren Verfahren vielleicht die bekanntesten. Neuerdings werden zur Messung der Endgruppen auch radioaktive Isotope verwendet [11—12].

Aufschluß über das Durchschnittsmolekulargewicht auf Grund der Stoffmenge sowie über die Gestalt des Moleküls liefern die Bestimmung der Diffusionskonstante [13—15], die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit mit der Ultrazentrifuge [16], die Ermittlung der Grenzviskosität [10, 17—24] und die Untersuchung der Rayleigh-Streulichtmessungen (Lichtstreuung), um nur einige der bekannten Methoden zu nennen.

Ist n_i = die Zahl der i -Moleküle

g_i = das Gewicht der i -ten Moleküle,

M_i = das Molekulargewicht des i -ten Moleküls,

dann kann das zahlenmäßige Durchschnittsmolekulargewicht (\bar{M}_n) aus der Formel

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{\sum n_i},$$

das auf Grund der Masse berechnete (gewichtsmäßige) Durchschnittsmolekulargewicht (\bar{M}_w) hingegen aus der Formel

$$\bar{M}_w = \frac{\sum g_i \cdot M_i}{\sum g_i} = \frac{\sum m_i \cdot M_i^2}{\sum n_i \cdot M_i}$$

berechnet werden, während die Heterodispersität des polymeren Systems durch den Quotienten

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

charakterisiert ist.

Für homodisperse Stoffe ist

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} = 1,$$

für heterodisperse Stoffe dagegen gilt

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} > 1.$$

Ein anschaulicheres Bild als mit diesem Quotienten erhält man, wenn man die polymere Mischung nach irgendeiner Methode, wie etwa durch Fraktionieren in der Ultrazentrifuge, durch säulenchromatographische Elutionsanalyse [28], durch fraktionierte Ausfällung [29—36] oder durch fraktioniertes Rücklösen [37—39] in die den Molekulargewichten entsprechenden Fraktionen zerlegt und dabei die quantitative Verteilung und innerhalb dieser evtl. auch die Heterodispersität untersucht.

Bei säulenchromatographischer Trennung der Dextrane wurden bisher Versuche hauptsächlich mit dem Gelfilter Type Sephadex durchgeführt [40, 41], doch wird auch die Verwendung des *Biogel P* erwähnt [42]. Bei den Sephadex-Filtern handelt es sich um Molekülsiebe, die durch Quervernetzung der linearen Dextranmoleküle hergestellt werden. In Wasser aufgequell und in Säulen gefüllt, sind sie für die Mischungskomponenten mit niedrigem Molekulargewicht durchlässig, während sie die Moleküle, die größer sind als die Poren des Raumnetzes, als Rückstand zurückhalten. Infolgedessen verlassen diese die Säule auf kurzem Wege, während die kleineren Moleküle erst später, nach Erreichen des ihrer Größe entsprechenden Elutionsvolumens erscheinen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Untersuchte Substanzen und Untersuchungsmethoden

Bei unseren Versuchen benutzten wir Säulen aus Sephadex Type G-200, G-100 und G-75. Das Innere der an beiden Enden mit Schliff versehenen, 2×50 cm messenden Säulen wurden zur Verminderung des sog. »Wandeffekts« vor der Beschickung mit 1%iger Lösung von Dimethyldichlorsilan in Benzol bei $80-100^\circ\text{C}$ hydrophobiert. Auf den Boden der Säule wurde die laut Abb. 1/b ausgebildete gläserne Kapillare, auf diese eine Scheibe aus Siebgewebe (400 mesh) gelegt und schließlich der Stopfen mit Glaserkitt eingeklebt. Die Ausbildung des gläsernen Stöpsels und der ableitenden Kapillare verbürgten einen minimalen Totraum und entsprechend auch eine minimale Vermischung

und Retrodiffusion. Die so vorbereitete Säule füllten wir mit destilliertem Wasser und machten sie blasenfrei. Dann wurde sie unter ununterbrochener Speisung mit einer entsprechenden Menge im voraus zum Quellen gebrachten Gels beschickt, durch Waschen stabilisiert, worauf schließlich die Schicht oben auf mit einer Siebscheibe abgedeckt wurde. Oben wurde die Säule mit einem Schliff laut Abb. 1/a abgeschlossen, durch dessen Rohr das als Eluierungsmittel dienende Wasser zugegeben wurde.

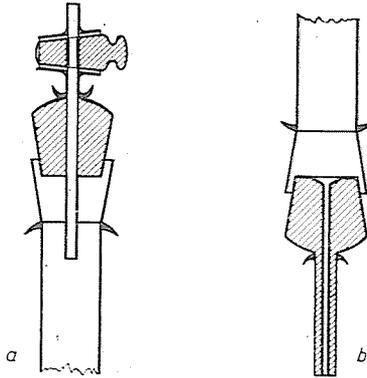


Abb. 1. Die Ausbildung der Säulenden

Beim Fraktionieren bestimmten wir den Kohlenhydratgehalt des Eluats durch Messung des Brechungsindex bzw. nach der Anthron-Methode, das Reduktionsvermögen hingegen nach der PARK—JOHNSON-Methode.

Die Kennwerte der untersuchten Dextranmuster sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1
Kennwerte der Dextranmuster

Muster	$[\eta]$	\bar{M}_{w}	\bar{M}_n	$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$
D/172	0,360	112 000	170 000	1,52
D/37	0,225	27 700	45 000	1,66
D/70	0,265	20 000	69 500	3,47
D/PL	—	10 600	75 000	7,1
D/DX	0,291	25 400	84 500	3,32

2.2. Versuche mit je einer Gelfilter-Type

Die Daten der verwendeten Gelfilter sind:

Sephadex G-200: $W_r = 20$ g/g Bettvolumen 30–40 ml/g
 Sephadex G-100: $W_r = 10$ g/g „ 15–20 ml/g
 Sephadex G-75: $W_r = 7,5 \pm 0,5$ g/g „ 12–15 ml/g

Mit dem aufgequollenen Gel füllten wir Säulen mit 2 cm Durchmesser.
 Die Daten der einzelnen Säulen sind:

G-200:	Bettvolumen	96 ml	Füllungshöhe	30 cm
G-100:	„	124 ml	„	39,5 „
G-75:	„	140 ml	„	44,7 „

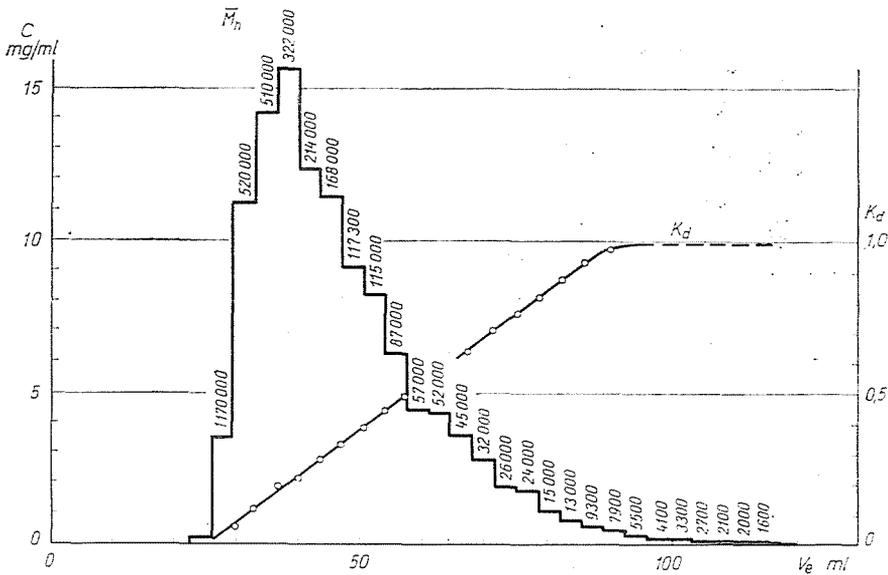


Abb. 2. Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-200

Auf die Säulen gaben wir je 5 ml 10%iger Dextranlösung auf, wonach wir mit destilliertem Wasser eluierten. Das Elutionsvolumen berechneten wir von der Aufgabe der Muster an.

Bei jedem Versuche bestimmten wir das Elutionsvolumen, die Konzentration der einzelnen Fraktionen, das zahlenmäßige durchschnittliche Molekulargewicht der in den Fraktionen enthaltenen gelösten Substanz, und schließlich berechneten wir den Teilungsquotienten.

Im ersten Schritt untersuchten wir an den Dextranen D/172 und D/37, deren Molekulargewichte zwei Extremwerte darstellen, welche Trennungselektivität mit den einzelnen, in ihrem Wasseradsorptionsvermögen unterschiedlichen Gelen sich erzielen läßt. Die Resultate sind den Tabellen 2–7 zu

Tabelle 2
 Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-200

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
5	0	—
8,5	0	—
12	0	—
13,5	0	—
19	0	—
22,5	160	—
26	3 500	1 170 000
29,5	11 200	520 000
33	14 200	510 000
36,5	15 700	322 000
40	12 300	214 000
43,5	11 400	168 000
47	9 100	117 300
50,5	8 200	115 000
54	6 300	37 000
57,5	4 400	37 000
61	4 300	52 000
64,5	3 600	45 000
68	2 750	32 000
71,5	1 860	24 000
75	1 750	26 000
78,5	1 100	15 000
83	835	13 000
86,5	570	9 300
89	501	7 900
92,5	313	5 500
96	231	4 100
99,5	176	3 300
103	126	2 700
106,5	98	2 100
110	74	2 000
113,5	45	1 600
117	0	—

entnehmen. Aus den Meßdaten berechneten wir auch die Teilungsquotienten der einzelnen Fraktionen. Sie sind zusammen mit den Elutionskurven in den Abbildungen 2—7 aufgetragen.

Tabelle 3
 Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-200

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8,5	—	—	82	4700	83 000
12	—	—	85,5	4500	77 500
15,5	—	—	89	3800	65 000
19	—	—	92,5	3000	61 000
22,5	—	—	96	2900	59 000
26	—	—	99,5	2900	54 000
29,5	120	—	103	2600	51 000
33	130	—	106,5	2600	50 000
36,5	225	—	110	2400	49 000
40	330	—	113,5	2000	41 000
43,5	600	485 000	117	1300	33 500
47	7200	333 000	120,5	725	19 000
50,5	8000	275 000	124	345	10 300
54	8700	188 000	127,5	180	6 100
57,5	8600	145 000	131	140	5 100
61	8400	139 000	134,5	90	3 500
64,5	8000	121 000	138	70	1 150
68	7500	116 000	141,5	50	2 070
71,5	7000	112 000	145	40	1 800
75	6100	104 000		30	1 180

Wie aus den Elutionsdaten ersichtlich, lassen sich mit den einzelnen Sephadex-Typen erwartungsgemäß je nach Größe der Moleküle jeweils unterschiedliche Trennungseffekte erzielen. Entsprechend liefern die Typen mit

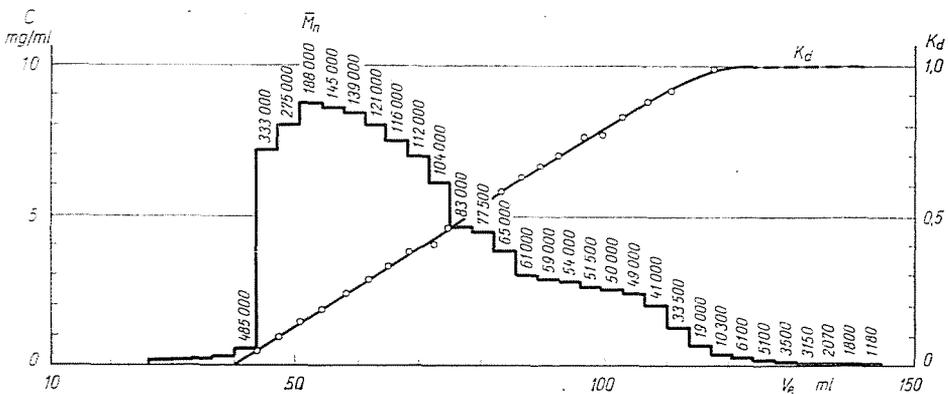


Abb. 3. Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-200

Tabelle 4
Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-100

Elutionsvolumen V (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8,5	—	—	78,5	8800	106 000
12	—	—	82	8190	97 000
15,5	—	—	85,5	7800	99 000
19	—	—	89	7300	94 000
22,5	—	—	92,5	6000	92 000
26	—	—	96	4000	85 000
29,5	—	—	99,5	2900	76 000
33	—	—	103	2500	64 500
36,5	—	—	106,5	2400	60 500
40	—	—	110	2000	55 400
43,5	—	—	113,5	1800	52 500
47	—	—	117	1150	34 000
50,5	25	—	120,5	350	13 400
54	1 440	466 000	124	140	5 100
57,5	8 150	260 000	127,5	77	2 900
61	13 500	204 000	131	70	2 750
64,5	11 200	143 000	134,5	55	1 800
68	10 000	168 000	138	40	1 300
71,5	9 900	126 000	141,5	30	970
75	9 900	116 000	145	0	—

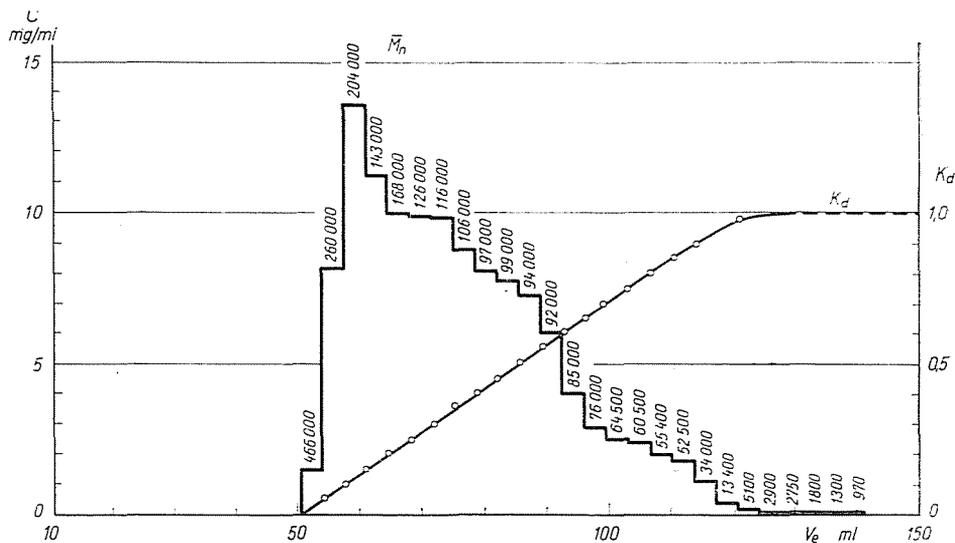


Abb. 4. Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-100

Tabelle 5

Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-100

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8,8	—	—	84,8	4800	11 000
12,6	—	—	88,6	3400	10 800
16,4	—	—	92,4	2100	9 050
20,2	—	—	96,2	1700	7 700
24	355	—	100	1100	6 500
27,8	990	160 000	103,8	1100	5 700
31,6	2870	91 000	107,6	500	5 000
35,4	4800	81 500	111,4	300	4 850
39,2	5600	64 000	115,2	250	4 460
43	5700	58 000	119	160	4 200
46,8	6500	45 600	122,8	100	3 700
50,6	8000	44 000	126,6	100	3 200
54,4	7300	28 900	130,4	35	2 400
58,2	7000	27 300	134,2	30	—
62	6300	23 800	138	30	—
65,8	6200	19 600	141,8	20	—
69,6	5800	15 100	145,6	20	—
73,4	5600	11 900	149,4	0	—
77,2	5200	12 300	153,2	0	—
81	5000	11 700	157	0	—

größerer Porosität im Bereich der größeren Molekulargewichte, jene mit kleinerer Porosität im Bereich der kleineren Molekulargewichte die besseren Resultate. Die Typen G-200 bzw. G-75 ergaben jedoch gegenüber dem Typ

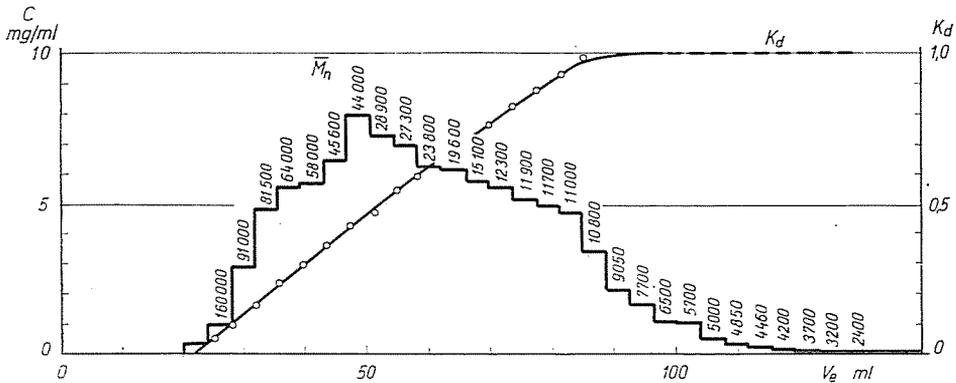


Abb. 5. Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-100

Tabelle 6
 Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-75

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
9,5	—	—	99,5	600	5 750
14	—	—	104	400	4 850
18,5	—	—	108,5	260	4 600
23	—	—	113	170	3 900
27,5	125	181 000	117,5	110	3 150
32	1025	95 000	122	70	2 350
36,5	3900	84 000	126,5	57	2 300
41	6500	76 500	131	40	2 100
45,5	6700	40 000	135,5	35	1 980
50	6900	30 000	140	30	—
54,5	6700	26 500	144,5	20	—
59	6600	20 800	149	20	—
63,5	6300	17 700	153,5	—	—
68	5700	17 110	158	—	—
72,5	4800	15 400	162,5	—	—
77	4500	13 100			
81,5	3500	11 200			
86	2400	9 300			
90,5	1700	8 800			
95	1200	6 400			

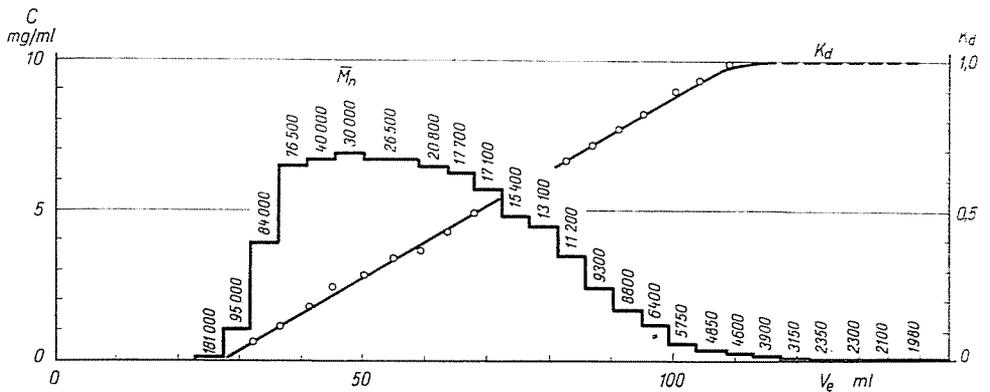


Abb. 6. Fraktionierung von Dextran D/172 mit Sephadex G-75

Tabelle 7

Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-75

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8,7	—	—	82,7	2 500	15 300
12,4	—	—	86,4	1 850	14 900
16,1	—	—	90,1	1 200	8 200
19,8	—	—	93,8	850	7 700
23,5	—	—	97,5	570	7 400
27,2	—	—	101,2	400	5 900
30,9	—	—	104,9	300	5 150
34,6	160	—	108,6	160	3 670
38,3	4 000	115 000	112,3	120	3 300
42	10 000	87 000	116	90	3 300
45,7	17 000	76 000	119,7	63	—
49,4	12 300	72 500	123,4	45	—
53,1	12 100	43 100	127,1	40	—
56,8	11 800	39 400	130,8	36	—
60,5	11 300	37 600	134,5	30	—
64,2	11 000	29 800	138,2	30	—
67,9	10 600	27 100	141,9	23	—
71,6	8 900	26 400	145,6	20	—
75,3	5 700	18 750	149,3	—	—
79	4 000	16 450	153	—	—

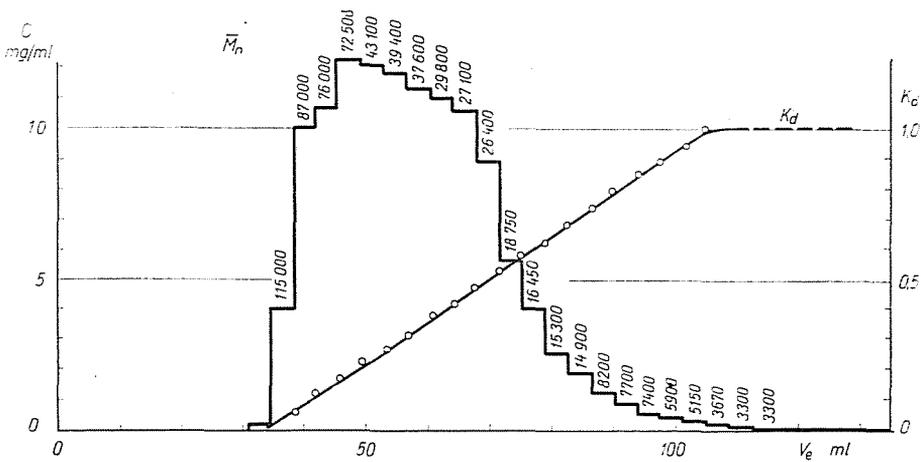


Abb. 7. Fraktionierung von Dextran D/37 mit Sephadex G-75

Tabelle 3
 Fraktionierung von Dextran D/DX mit Sephadex G-100

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8.7	—	—	85	1600	11 200
12.4	—	—	88.7	510	4 100
18.1	—	—	92.4	420	3 530
19.8	—	—	96.1	180	1 850
23.5	72	—	99.8	600	—
27.2	100	—	103.5	460	—
30.9	400	—	107.2	380	—
34.6	1800	181 000	110	260	—
38.3	5400	115 000	113.6	180	—
42	8100	103 000	117.3	150	—
45.7	8800	102 000	121	110	—
48	7000	92 000	124.7	50	—
51.7	6800	52 000	128.4	(500)*	—
55.4	6500	46 000	132.1	(700)*	—
59.1	5500	37 500	135.8	(1000)*	—
62.8	4800	34 000	139.5	(1500)*	—
66.5	1200	25 300	143.2	(1700)*	—
70.2	3500	22 500	146.9	(2100)*	—
73.9	3000	20 300	150.6	(2100)*	—
77.6	2600	18 000			
81.3	2000	14 000			

* NaCl

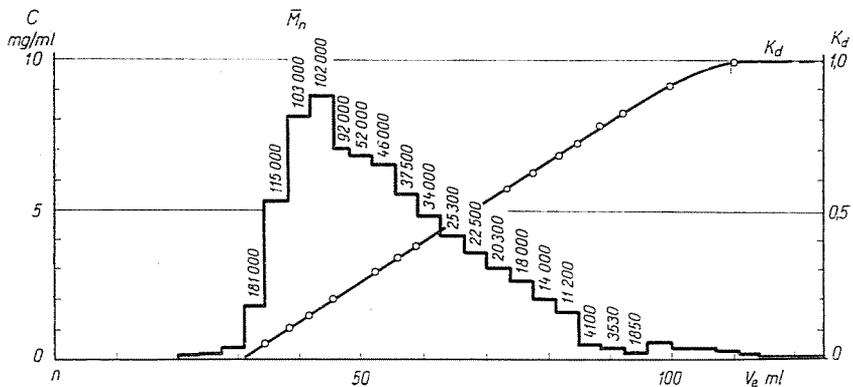


Abb. 8. Fraktionierung von Dextran D/DX mit Sephadex G-100

Tabelle 9
Fraktionierung von Dextran D/PL mit Sephadex G-100

Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n	Elutionsvolumen V_e (ml)	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	\bar{M}_n
8,5	—	—	78,5	250	23 500
12	—	—	82	200	20 500
15,5	—	—	85,5	100	—
19	—	—	89	100	—
22,5	—	—	92,5	90	—
29,5	60	—	96	60	—
29,5	270	172 000	99,5	50	—
33	1300	144 000	103	50	—
36,5	5000	113 000	106,5	40	—
40	7700	10 000	110	37	—
43,5	8100	94 000	113,5	30	—
47	9100	69 000	117	15	—
50,5	7500	61 000	120,5	—	—
54	6000	48 500	125,3	—	—
57,5	5300	43 000	137,3	—	—
61	4700	33 000	157,3	—	—
64,5	2500	28 500	176,8	—	—
68	1300	26 700	182,8	—	—
71,5	700	24 500	—	—	—
75	450	22 800	—	—	—

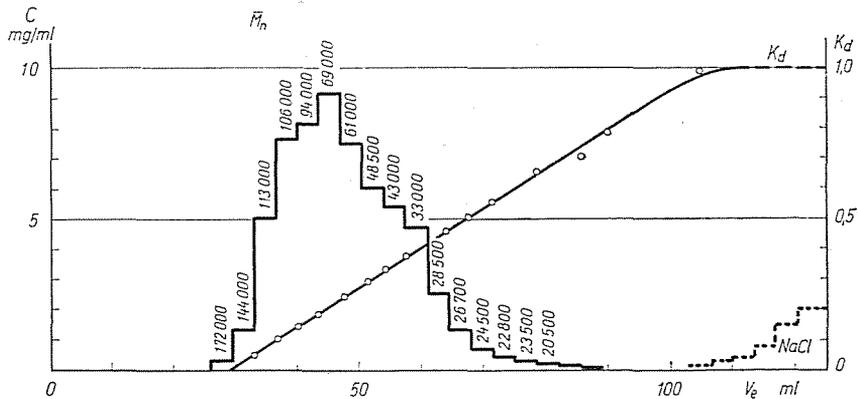


Abb. 9. Fraktionierung von Dextran D/PL mit Sephadex G-100

Gel G-100 weder beim Dextran D/172 noch beim Dextran D/37 so günstige Fraktionierungen, wie zu erwarten war. Mit dem Gel Type G-100 konnten in den Bereichen sowohl der höheren als auch der niedrigeren Molgewichte befriedigende Trennungsergebnisse erzielt werden, bloß die Bereiche der extrem großen bzw. der extrem kleinen Molgewichte wurden enger. Ähnlich gute Trennungsergebnisse erzielten wir auf Gel G-100 auch bei Dextran D/DX mit dem Durchschnittsmolgewicht von 85 000 und bei Dextran D/PL mit dem Durchschnittsmolgewicht von 75 000 (Tabellen 8—9), (Abb. 8—9). Der Vergleich der Heterodispersitätsdaten der untersuchten Dextrane mit den entsprechenden Elutionskurven gestattet es, festzustellen — und gewissermaßen anschaulich vor Augen zu führen —, welche Fraktionen in welchem Verhältnis die gewonnenen Heterodispersitätswerte geliefert haben.

2.3. Versuche mit Schichtsäulen

Der folgende Schritt unserer Versuche sollte die Frage klären, wie es möglich wäre, die bei Verwendung des Gels G-100 beobachteten günstigen Trennungseffekte für die Bereiche sowohl der höheren als auch der niedrigeren Molgewichte weiter zu verschärfen und auszuweiten. Als Lösung bot sich die gemeinsame Verwendung der Gele G-200, G-100 und G-75 von selbst an.

Da die Verwendung hintereinander geschalteter Gele die Aufgabe weitgehend kompliziert hätte, wählten wir statt der Hintereinanderschaltung die schichtweise Beschickung einer einzigen Säule mit den Gelen. Nach unserer Methode läßt sich jeder beliebige Molgewichtsbereich durch Verwendung einer geeigneten Zahl von Schichten und Typen erfassen. Zweckmäßig legt man die Schichten derart übereinander, daß das weniger Wasser aufnehmende, also weniger stark aufquellende und mechanisch festere Gel zuunterst zu liegen komme; nach oben folgt dann die Gelschicht mit der nächst größeren Wasseraufnahmefähigkeit und so weiter. Damit läßt sich trotz der infolge der Schichtung größeren Säulenhöhe eine günstigere Durchflußgeschwindigkeit erzielen. Um einer Vermischung vorzubeugen, legten wir zwischen die einzelnen Schichten Zwischenscheiben mit 400-mesh-Siebgewebe. Die aufgegebene Substanz wird durch die oberste Schicht ebenso wie in einer einfachen Säule abgetrennt, während jedoch die Moleküle der hier eluierten Größe auch in den unteren Schichten eluiert werden und als erste den Boden der Säule verlassen, werden die kleineren Moleküle in einer immer effektvolleren Trennung fraktioniert.

In unserem Falle schichteten wir in einer Säule von 2 cm Durchmesser und 160 cm Länge folgende Füllungen aufeinander auf (Reihenfolge von unten nach oben):

Sephadex G-75	365 mm
Sephadex G-100	395 mm
Sephadex G-200	560 mm

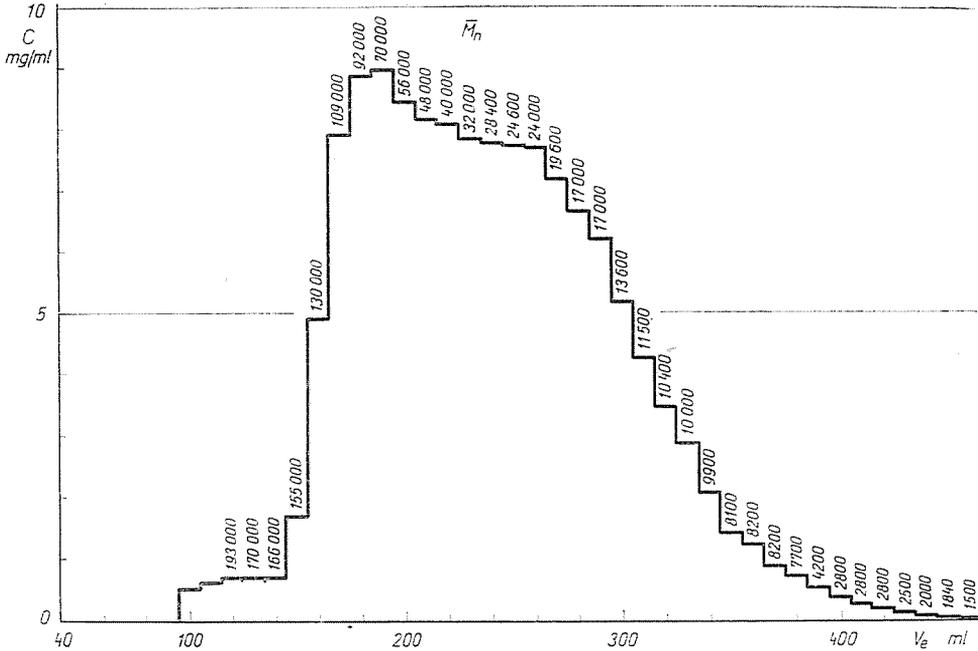


Abb. 10. Fraktionierung von Dextran D/37 mit geschichteten Sephadex-Säulen

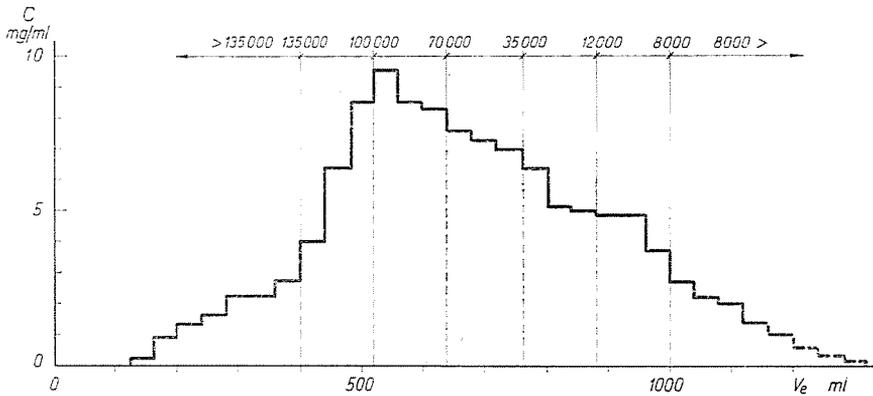


Abb. 11. Fraktionierung von Dextran D/PL mit geschichteten Sephadex-Säulen

Auf die Säule gaben wir 15 ml 5%ige Dextranlösungen auf, die wir mit destilliertem Wasser eluierten. Die durchschnittliche Durchfließgeschwindigkeit betrug 0,2 ml/min.

Zuerst fraktionierten wir das Muster D/37 (Abb. 10). Bei Betrachtung der Elutionskurve kann festgestellt werden, daß sich der Trennungsbereich erwartungsgemäß ausgeweitet hat, daß eine gute Trennung der Dextran-

moleküle mit großem Molekulargewicht und ebenso der Moleküle mit kleinerem Molekulargewicht erzielt wurde, ohne daß die Trennung der Zwischenfraktion weniger scharf geworden wäre.

Auf die gleiche Art und Weise fraktionierten wir auch die Dextrane D/PL und D/DX. Die Trennungskurven sind in Abb. 11—12 aufgetragen. Die Trennung war in diesem Falle wesentlich effektvoller als bei Eluierung durch eine einzige Schicht hindurch, ohne daß sich die Trennungsdauer wesentlich verlängert hätte. Die Methode eignet sich also zur Fraktionierung von Dextra-

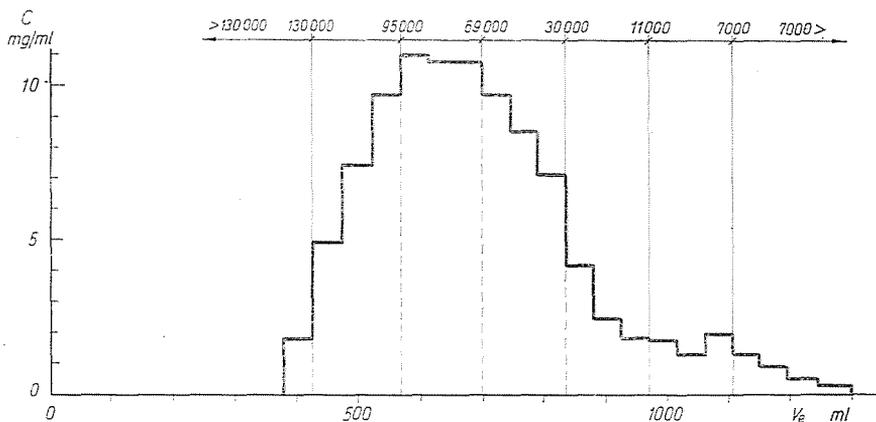


Abb. 12. Fraktionierung von Dextran D/DX mit geschichteten Sephadex-Säulen

nen in einem breiten Band, ebenso aber auch zur Trennung anderer Polysaccharide. Sie kann auch zur Bestimmung der Heterodispersität und Molekulargewichtsverteilung benutzt werden.

Zusammenfassung

Die Publikation betrifft unsere Versuche zur Fraktionierung von Dextranen verschiedener Molekulargewichte und Heterodispersität mit Gelfiltern Sephadex G-200, G-100 und G-75. Die gewonnenen Elutionskurven veranschaulichen die Molekulargewichtsverteilungen und Heterodispersitäten der einzelnen Dextrane gut. Für die weiteren Versuche stellten wir sogenannte Schichtsäulen aus aufeinandergeschichteten Gelfiltern unterschiedlichen Wasseraufnahmevermögens her. Mit solchen Säulen kann innerhalb der durch die Gelfilter bedingten Grenzen ein Trennungsspektrum beliebiger Feinheit erzielt werden.

Literatur

1. LEE, D. O.: in WHISTLER, R. L.: Methods in carbohydrate chemistry. Vol IV, p. 94. Acad. Press, New York 1964
2. SCOTT, T., MELVIN, E.: Analytic. Chem. 1656 (1953)
3. ZIPF, R. E., WALDO, A. C.: J. Lab. Chim. Med. 497 (1952)
4. MORRIS, D. L.: Science 107, 254 (1948)
5. SOMOGYI, M.: Biol. Chem. 195, 19 (1952)
6. SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem. 160, 61 (1945)

7. NELSON, N.: *J. Biol. Chem.* **153**, 376 (1944)
8. MARAIS, J. L., DE WIT., QUICKE, G. V.: *Acta Biochem.* **15**, 373 (1966)
9. PARK, J. T., JOHNSON, M. J.: *J. Biol. Chem.* **81**, 149 (1949)
10. ZEBEC, M., DEZELIC, G., DEZELIC, N., KRATOHLIV, J. P., SCHULZ, K. F.: *Croat. Chim. Acta* **36**, 13 (1964)
11. ISBELL, H. S.: *Science* **113**, 532 (1951)
12. EBERT, K. H., RUPPRECHT, G.: *Makromol. Chem.* **94**, 153 (1966)
13. GREENWOOD, C. T., in WHISTLER, R. L.: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. IV, p. 179. Acad. Press, New York 1964
14. GOESTLING, L. J.: *Advances in Protein Chemistry* **11**, 429 (1956)
15. SCHALAJEWA, L. F.: *Wisokimolekularnije Sojedinjenja* **2**, 1137 (1960)
16. FOSTER, J. F.: in WHISTLER, R. L.: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol IV, p. 207. Acad. Press, New York 1964
17. DAVIS, W. E., ELLIOTT, J. H.: *J. Colloid Sci.* **4**, 313 (1949)
18. VINK, H.: *Makromol. Chem.* **94**, 15 (1966)
19. ZAKRZEWSKI, K., KRYZIAK, J., MURAWSKI, K., MALEC, J.: *Acta Biochimica Polonica* **1**, 27 (1954). Ref: C. A. **49**, 4053c (1955)
20. VAVRA, I., VAVRA, A., BAJALOVIC, I.: *Acta Pharm. Jugoslav.* **12**, 129 (1962). Ref: C. A. **62**, 8932h (1965)
21. MASTRANGELO, S. V. R., CLAY, B., FISKMAN, M. M., HAGAN, A. G., LAZRUS, A., ZAGAR, W.: *Anal. Chem.* **27**, 262 (1955)
22. MARIANI, E., CIFERRI, A.: *Ann. Chim.* **46**, 1001 (1956)
23. SENTI, F. R., HELLMANN, N. N., LUDWIG, N. H., BABCOCK, G. E., TOBIN, R., GLASS, C. A., LAMBERTS, B. L.: *J. Polymer Sci.* **XVII**, 527 (1965)
24. CIFERRI, A., SCHIPPA, G., TORRACA, G., TURRIZIANI, R.: *Ann. Chim.* **46**, 988 (1956)
25. ELIAS, H.: *Makromol. Chem.* **27**, 192 (1958)
26. SCHERF, G., BERG, H.: *Pharmazie* **13**, 366 (1958)
27. FOSTER, J. F.; in WHISTLER, R. L.: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. IV, p. 191. Acad. Press, New York 1964
28. FLODIN, P.: *Dextran gels and their applications in gel filtration*. Ph. D. Dissertation, Uppsala University Uppsala, Sweden (1962)
29. WALLENIUS, G.: *Renal clearance of dextrans and a measure of glomerular permeability*. Supplement 4 to *Acta Societatis Medicorum Uppsaliensis*, Uppsala (1954)
30. JIRGENSONS, BR.: *J. Pr. Chem.* **159**, 303 (1941)
31. JIRGENSONS, BR.: *J. Pr. Chem.* **160**, 21 (1942)
32. JIRGENSONS, BR.: *J. Pr. Chem.* **161**, 30 (1942)
33. RADERECHT, H. J.: *Pharmazie* **13**, 27 (1958)
34. RADERECHT, H. J.: *Pharmazie* **12**, 798 (1957)
35. MOREY D. R., TAMBLYN, J. W.: *J. Appl. Phys.* **16**, 419 (1945)
36. GIESEKUS, H.: *Kolloid. Z.* **158**, 35 (1958)
37. GRANATH, K. A.: *Makromol. Chem.* **28**, 1 (1958)
38. EBERT, K. H., ERNST, E.: *Makromol. Chem.* **56**, 88 (1962)
39. EBERT, K. H., BROSCHE, M., ELGERT, K. F.: *Makromol. Chem.* **72**, 191 (1964)
40. GRANATH, K. A., FLODIN, P.: *Makromol. Chem.* **48**, 160 (1961) 1.
41. WHISTLER, R. L.: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. V, p. 20. Acad. Press, New York 1966
42. ANDERSON, D. M. W., DEA, I. C. M., RAHMAN, S., STODDART, J. F.: *Chem. Commun.* **8**, 145 (1965)

Prof. Dr. János HOLLÓ

Dr. Elemér LÁSZLÓ

Dr. Mihály TÓTH

Zoltán RÁTHONYI

Budapest XI., Gellért tér 4, Ungarn