

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XV, 39

SECTIO D

1960

Z Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego
Akademii Medycznej w Lublinie
p. o. Kierownik: dr Kazimierz Zagórski

Kazimierz ZAGÓRSKI i Zdzisław FRANECKI

**Badania przebiegu hydrolizy dekstranu w obecności kationitu
wodorowego**

**Исследования над ходом гидролиза декстрана в присутствии
H — катионита**

**Investigations on the Hydrolysis of Dextran in the Presence
of Hydrogen Cationite**

Hydroliza dekstranu surowego jest reakcją, od której zależy zarówno jakość, jak i wydajność preparatu klinicznego. Dekstran surowy otrzymywany najczęściej sposobem fermentacji podpowierzchniowej z sacharozy lub innych węglowodanów posiada bardzo duży ciężar drobinowy, rzędu kilkunastu milionów (7), i z tej przyczyny nie nadaje się do stosowania dożylnego. Długie łańcuchy tego polimeru powodują bowiem zlepianie się krwinek oraz niebezpieczne zatory naczyniowe w narządach mięsnych (9). Dekstran stosowany do celów leczniczych, jako objętościowy środek, zastępujący osocze krwi, winien składać się z drobin o ściśle określonej długości.

Wielkości cząsteczek, a stąd średnie ciężary cząsteczkowe dekstranu klinicznego różnią się dla różnych preparatów, zaznacza się jednak wyraźny podział na dwie grupy. Preparaty wytwarzane w USA, krajach skandynawskich i Danii mają średni ciężar cząsteczkowy ok. 75 000, utrzymują się w krążeniu 3—4 dni i zawierają cząsteczki o rozgałęzionej budowie, natomiast preparaty angielskie mają wyższy ciężar cząsteczkowy ok. 175 000, utrzymują się w krążeniu dłużej i mają budowę prawie wyłącznie liniową (5). Preparat polski „Poliglukan” jest zbliżony do pierwszej grupy, posiada średni ciężar cząsteczkowy ok. 60 000, niską lepkość wewnętrzną i składa się głównie z jednej frakcji (6).

Częściową depolimeryzację surowego dekstranu przeprowadza się przez hydrolizę kwasami lub alkaliami, na drodze enzymatycznej (14), za pomocą ultradźwięków (4), lub też przez degradację pod wpływem wysokiej temperatury (16). Została również przebadana możliwość bezpośredniej syntezy średnicząsteczkowego dekstranu. Stosowano przy tym jako akceptory glikozy niektóre cukry (np. maltozę, α -metyloglikozyd i in. (3), lub też małe cząsteczki dekstranu, np. o ciężarze cząsteczkowym rzędu 5—20 tys. (2, 10). Dekstran otrzymany przy pomocy

akceptorów ma ciężar cząsteczkowy rzędu kilkudziesięciu tysięcy (7) i po oczyszczeniu może być stosowany do celów leczniczych. Próbowano również produkować dekstran w drodze czystej syntezy chemicznej przez polimeryzację glikozy (8).

W badaniach naszych postanowiliśmy przekonać się, czy do częściowej depolimeryzacji dekstranu surowego można zastosować wymienniki jonowe w postaci kwaśnej. Wymienniki te znalazły już zastosowanie w hydrolizie wielocukrów (12) i białek (11) z dobrym skutkiem.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

a. Surowiec

Użyty do badań dekstran surowy otrzymano z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie. Dekstran ten pochodził z fermentacji półtechnicznej, prowadzonej metodą głębinową przy użyciu bakterii *Leuconostoc mesenteroides* szczep L. i sacharozy, jako podstawowego surowca.

W celu oczyszczenia dekstranu surowego uwolniono go od alkoholu metylowego przez ogrzewanie w suszarce próżniowej (24^h, 1 Tor, 50°C). 5 g suchego dekstranu rozpuszczono następnie w wodzie, uzyskując 500 g 1% roztworu. Aby badany dekstran uwolnić od śladów glikozy i frakcji niskocząsteczkowych wytrącono go z roztworu przez powolne dodawanie metanolu. W tym celu do 500 g 1% silnie mieszanego roztworu dekstranu wkroplono bardzo powoli (1 ml/min.) z biurety 260 ml alkoholu metylowego (temp. 21°C). Wytrącony dekstran odsączono na lejku Schotta G 4 i wysuszono w suszarce próżniowej. Z tak oczyszczonego surowca przygotowano 1% roztwór do badań.

b. Kationit wodorowy

Jako katalizatora hydrolizy użyto Wofatytu KPS-200 o budowie polistyrenowej z grupami czynnymi —SO₃H. Kationit przygotowano w następujący sposób: zwilżoną żywicę wytrząsano z roztworem wodorotlenku sodowego (5%), następnie wymyło ją wodą destylowaną i przeprowadzono w postać kwaśną przez wytrząsanie z nadmiarem 4,4 n kwasu solnego. W końcu przemyto żywicę wodą destylowaną do usunięcia jonów Cl⁻ i wysuszono na powietrzu.

c. Hydroliza i oznaczanie ciężaru cząsteczkowego

Celem śledzenia postępu hydrolizy dekstranu w zależności od czasu, przeprowadzono reakcję w zatopionych ampułkach, które ogrzewano w specjalnym aparacie. Aparat ten składał się z ogrzewanego naczynia szklanego, zaopatrzonego w chłodnicę zwrotną i metalową wkładkę,

w którą wstawiano zatopione ampułki. Woda znajdująca się na dnie naczynia utrzymywana była w ciągłym łagodnym wrzeniu przez elektryczny grzejnik. Wnętrze naczynia wypełniała nasycona para wodna, która zapewniała stałą temperaturę przez czas trwania hydrolizy.

Zatopione ampułki, zawierające roztwór surowego dekstranu i kwaśną żywicę jonowymienną ogrzewane były w temperaturze 100°C. W określonych odstępach czasu wyjmowano z aparatu jedną ampułkę i oznaczano ciężar cząsteczkowy zawartego w niej dekstranu przy zastosowaniu metody pomiaru stężenia grup końcowych (13). Metoda ta polega na utlenianiu końcowych wolnych grup aldehydowych dekstranu żelaziczankiem; powstały w wyniku reakcji żelazocjanek przeprowadzono w błękit pruski, którego stężenie określano kolorymetrycznie.

d. Odczynniki stosowane przy oznaczaniu ciężaru cząsteczkowego dekstranu

Roztwór A: 0,8% roztwór żelaziczanku potasu.

Roztwór B: 8 g bezwodnego węgla sodowego rozpuszcza się w 100 ml wody, dodaje 15 ml świeżo sporządzonego 1% roztworu NaCN i całość rozcieńcza wodą do 500 ml.

Roztwór C: 3,5 g ałunu żelazowo-amonowego (12 H₂O) rozpuszcza się w 100 ml wody, dodaje 37 ml kwasu fosforowego (85%) i dopeinia wodą do 500 ml. Roztwór wzorcowy: 1% wodny roztwór dekstranu o znanym ciężarze cząsteczkowym.

Do 15 ampulek jenajskich pojemności 10 ml wiano biuretą po 6 ml 1% wyjściowego roztworu dekstranu surowego i dodano po 3 g kationitu. Po zatopieniu ampulek, ogrzewano je w opisanym wyżej aparacie w temperaturze 100°C przez następujący okres czasu:

Nr amp.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Czas ogrzewania (godziny)	0,40	1,00	2,00	2,30	2,45	3,00	3,15	3,30
Nr amp.	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	
Czas ogrzewania (godziny)	3,45	4,00	4,30	5,00	6,00	8,00	10,00	

Po określonym czasie ogrzewania, wyjmowano pojedyncze ampułki z aparatu, szybko chłodzono, po czym oddzielono roztwór dekstranu od kationitu za pomocą pipety, na końcu której umocowano igłę iniekcijną, zawierającą filtr z waty. Roztwory przesączone przez bibułę do probówek użyto do oznaczeń średniego ciężaru cząsteczkowego.

Do trzech kolbek miarowych pojemności 50 ml odważono na wadze

analitycznej różne ilości badanego roztworu, a do czwartej kolbki wzorcowy roztwór dekstranu. Do kolbek tych dodano następnie wody destylowanej, uzupełniając objętość do 10 ml. Do piątej kolbki wiano jedynie 10 ml wody destylowanej, oznaczając ją jako ślepa próbę. Następnie do wszystkich kolbek odmierzono z biurety po 2,5 ml roztworu A i tyleż roztworu B. Z kolei kolbki umieszczone w statywie drucianym wstawiono do wrzącej wody dokładnie na 8 minut. Po szybkim ochłodzeniu kolbek w bieżącej wodzie dodano do każdej kolbki 25 ml roztworu C i po wymieszaniu odstawiono na 25 min. Po tym czasie kolbki dopełniono wodą destylowaną do kreski i po wymieszaniu oznaczono ekstynkcje w spektrofotokolorymetrze (B a. L — Spectronic Colorimeter) przy długości fali światła 575 m μ , ustawiając uprzednio zero skali na ślepa próbę.

Numeryczne ciężary cząsteczkowe wyliczono opierając się na zasadzie, że ekstynkcje jednakowych stężeń roztworu badanego i wzorcowego są odwrotnie proporcjonalne do ciężarów cząsteczkowych dekstranu badanego i wzorca.

Wartości ekstynkcji dla jednakowych stężeń frakcji badanej i wzorca wyznaczono z wykresów zależności E/C.

$$E_b : E_w = M_w : M_b$$

więc
$$M_b = \frac{E_w \cdot M_w}{E_b}$$

E_w — ekstynkcja roztworu wzorcowego, E_b — ekstynkcja roztworu badanego, M_w — ciężar cząsteczkowy wzorca, M_b — ciężar cząsteczkowy roztworu badanego, C — stężenie roztworu.

Jako wzorca użyto frakcji dekstranu o ciężarze cząsteczkowym 39 200 oznaczonym osmometrycznie.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W tab. 1 zebrano wyniki pomiarów ciężarów cząsteczkowych próbek dekstranu, poddanych hydrolizie przez różny przeciąg czasu. Z oznaczonych ciężarów cząsteczkowych wyliczono wartości stopnia polimeryzacji (SP) poszczególnych próbek z wzoru:

$$SP = \frac{\text{ciężar cząst. dekstranu}}{\text{ciężar cząst. glikozy} - H_2O}$$

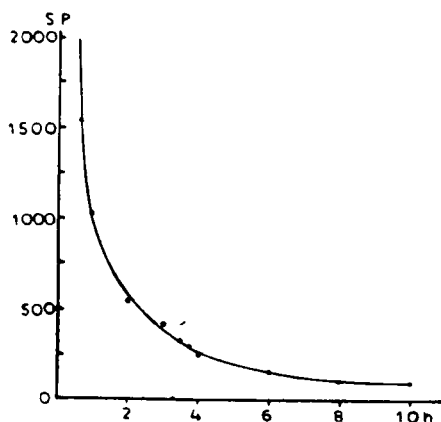
Stopień hydrolizy (SH) obliczono, przyjmując za 100%, rozerwanie wszystkich wiązań glikozydowych:

$$SH \% = \frac{100}{SP}$$

Tabela 1

Nr amp.	Czas hydrolizy	Cięż. cząstk.	SP	SH
I	0,40	249 150	1538	0,065
II	1,00	166 170	1026	0,0975
III	2,00	87 410	540	0,185
IV	2,30	63 205	390	0,256
V	2,45	70 080	433	0,231
VI	3,00	66 352	410	0,244
VII	3,15	48 275	298	0,336
VIII	3,30	51 780	320	0,313
IX	3,45	47 898	296	0,338
X	4,00	39 413	243	0,411
XI	4,30	30 182	186	0,537
XII	5,00	—	—	—
XIII	6,00	25 118	155	0,645
XIV	8,00	17 612	111	0,92
XV	10,00	15 631	96	1,036

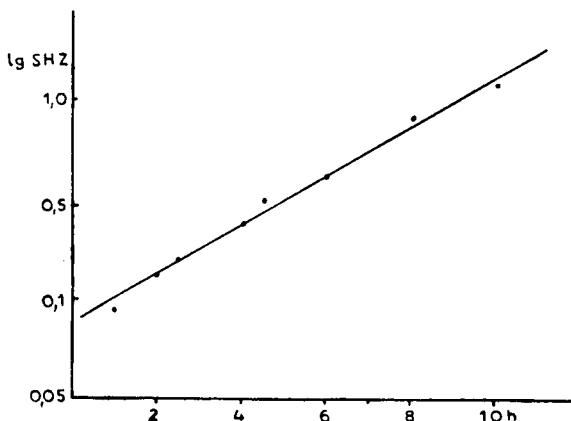
Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania tego sposobu hydrolizy do częściowej depolimeryzacji dekstranu surowego. Wykres zmian stopnia polimeryzacji (ryc. 1) pozwala na dość ściśle określenie czasu potrzebnego na uzyskanie preparatu o żądanych właściwościach. Stosowana obecnie w przemyśle metoda hydrolizy kwaso-



Ryc. 1. Zależność stopnia polimeryzacji od czasu trwania hydrolizy.
Dependence of the degree of polymerization on the duration of hydrolysis.

wej posługuje się najczęściej kwasem solnym lub siarkowym, co powoduje konieczność stosowania drogiej aparatury, odpornej na działanie tych związków, a ponadto utrudnia przystosowanie tej metody do pracy ciągłej. Trudne jest również całkowite usunięcie dodanych jonów z preparatu hydrolizowanego. Wolff I. A. i współpracownicy (15) wykazali, że dekstran depolimeryzowany przy użyciu kwasu siarkowego, po wytrąceniu metanolem zawierał 2—4% Na_2SO_4 , lub 0,5% NaCl po hydrolizie kwasem solnym.

Mechanizm przebiegu hydrolizy w obecności kontaktu jonitowego jest prawdopodobnie taki sam jak przy hydrolizie kwasami rozpuszczalnymi; wskazuje na to prostoliniowy przebieg wykresu zależności $\lg \text{SHZ}$ od czasu trwania hydrolizy (ryc. 2). Podobny przebieg tej funkcji, charakterystyczny dla reakcji pierwszego stopnia, stwierdził, dla hydrolizy dekstranu kwasami, Wolff (15).



Ryc. 2. Zależność logarytmu stopnia hydrolizy od czasu jej trwania.
Dependence of the logarithm of the degree of hydrolysis on its duration.

Hydroliza dekstranu wobec kontaktu jonitowego może być łatwo przystosowana do pracy ciągłej, polegającej na przesączaniu ogrzanego roztworu przez kolumny wypełnione katalizatorem. Znajomość funkcji szybkości reakcji oraz jej współczynników może pozwolić na daleko posuniętą automatyzację tego procesu.

PIŚMIENICTWO

1. Bixler G. H., Hines G. E., McGhee R. M. i Shurter R. A.: Dextran. A Staff-Industry Collaborative Report... *Ind. Eng. Chem.* **45**, 692—705, 1953.
2. Hehre E. J.: Low Molecular Weight Dextran as Modifier of Dextran Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4866—4871, 1953.

3. Koepsell H. J. i in.: Enzymatic Synthesis of Dextran. Acceptor Specificity and Chain Initiation. *J. Biol. Chem.* 200, 793—795, 1953.
4. Lockwood A. R., James A. E. i Pautard F. G.: Studies on the Breakdown Product of Dextran Formed by Ultrasonic Vibration. — *Research (Lond.)* 4, 46—48, 1951.
5. Mioduszewski J. Z.: Środki zastępcze plazmy krwi. *Biul. Inf. Inst. Farm.* 6, 21—39, 1958.
6. Murawski K. i Krysiak J.: Dekstran w porównaniu z innymi środkami zastępczymi osocza. *Pol. Tyg. Lek.* 8, 1188—1189, 1211—1216, 1953.
7. Murawski K.: Nowe postępy wiedzy w zakresie dekstranu. *Postępy Wiedzy Medycznej.* 3, 291—304, 1954.
8. Pacsu E. i Mora P. T.: Polycondensation of d-Glucose and other Simple Sugars in Presence of Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 1045—1051, 1950.
9. Thorsen G. i Hint H.: Aggregation, Sedimentation and Intravascular Sludging of Erythrocytes. *Acta Chir. Scand. Supl.* 154, 1950.
10. Tsuchiya H. M., Hellman N. N. i Koepsell H. J.: Factors Affecting Molecular Weight of Enzymatically Synthesized Dextran. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 757—759, 1953.
11. Underwood G. E. i Deatherage E.: Use of an Ion-exchange Resin for the Hydrolysis of Casein and Coffee Proteins. *Science.* 115, 95—98, 1952.
12. Wadmann W. H.: Some Reactions of Sugars Catalysed by a Cation-Exchange Resin. *J. Chem. Soc.* 74, 3051—3058, 1952.
13. Waksmundzki A. i Zagórski K.: Badanie stopnia polimeryzacji dekstranu klinicznego za pomocą kolorymetrycznej metody oznaczania grup końcowych. *Przem. Chem.* 37, 48—51, 1958.
14. Whiteside-Carlson V. i Carlson W.: Enzymic Hydrolysis of Dextran. *Science.* 115, 43—45, 1952.
15. Wolff I. A., Mehlretter C. L., Mellies R. L. i in.: Production of Clinical-Type Dextran. Partial Hydrolytic Depolymerization and Fractionation of the Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* Strain NRRL B-512. *Ind. Eng. Chem.* 46, 370—377, 1954.
16. Wolff I. A., Watson P. R., Sloan J. W. i Rist C. E.: Controlled Thermal Depolymerization of Dextran. *Ind. Eng. Chem.* 45, 755—759, 1953.

Р Е З Ю М Е

Авторами исследован ход процесса гидролиза сырого декстрана в присутствии H — катионита в качестве катализатора. Величины молекулярных весов гидролизированных проб, а равно рассмотрение хода зависимости логарифма степени гидролиза от времени (рис. 2) указывают, что гидролиз декстрана в присутствии H — катионита является реакцией первого порядка.

Общий ход гидролиза в условиях опыта указывает на возможность использования этого метода для промышленной деполимеризации сырого декстрана, в особенности, непрерывной системой.

Рис. 1. Зависимость степени полимеризации от продолжительности гидролиза.

Рис. 2. Зависимость логарифма степени гидролиза от его продолжительности.

SUMMARY

The authors studied the process of hydrolysis of native dextran in the presence of hydrogen cationite as catalyst. The results of the measurements of the molecular weight of hydrolyzed samples as well as the study of the dependence of the logarithm of the degree of hydrolysis on the time of its duration (Fig. 2) prove that hydrolysis of dextran in the presence of cationite is a reaction of the first order.

The general course of experimental hydrolysis points to a possibility of using this method for industrial depolymerization of native dextran, especially by the continuous method.