

Synthese und Charakterisierung neuer Stärkederivate für die klinische Anwendung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim
Fachbereich Naturwissenschaften
der Universität Kassel

von
Frank Böttger
aus Kassel

Kassel
April 2003

Erstgutachter	Prof. Dr. H. Follmann
Zweitgutachter	Prof. Dr. H. Frauenrath

Prüfungsgremium	Prof. Dr. H. Follmann
	Prof. Dr. H. Frauenrath
	Prof. Dr. H. Wöhrmann
	Prof. Dr. F. W. Herberg

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Der Blutvolumenmangel	1
1.2 Synthetische Volumenersatzmittel	3
1.2.1 Dextran	5
1.2.2 Gelatine	6
1.2.3 Hydroxyethylstärke	6
2. Aufgabenstellung	9
3. Theoretischer Teil	12
3.1 Die Stärke	12
3.1.1 Biosynthese von Stärke	13
3.1.2 Das Stärkekorn	14
3.1.3 Die Komponenten Amylopektin und Amylose	17
3.2 Modifikationen von Stärke	20
3.2.1 Stärkeether	22
3.2.2 Stärkeester	24
3.3 Anwendungen von Stärken und Stärkederivaten	30
4. Experimenteller Teil	33
4.1 Technische Daten	33
4.1.1 Der Synthesereaktor	33
4.1.2 Kernresonanzspektroskopie	34
4.1.3 FT-IR-Spektroskopie	37
4.1.4 Rasterelektronenmikroskopie	38
4.1.6 Sonstige Geräteangaben und technische Details	38
4.2 Chemikalien	40
4.2.1 Chemikalien für die NMR-Spektroskopie	40
4.2.2 Chemikalien für die Charakterisierungsmethoden	40
4.2.3 Chemikalien zur Synthese	41
4.2.4 Biochemikalien für enzymatische Untersuchungen	42
4.2.5 Chemikalien für die Herstellung physiologischer Lösungen	42
4.2.6 Lösungsmittel	42
4.3 Charakterisierungsmethoden	43
4.3.1 Bestimmung des Substitutionsgrades von Stärkeestern	43

4.3.2	Bestimmung des Substitutionsgrades von Carboxymethylstärken	46
4.3.3	Bestimmung des Substitutionsmusters von Carboxymethylstärken	48
4.3.4	Bestimmung des Verzweigungsgrades	50
4.3.5	Bestimmung der reduzierenden Enden	52
4.3.6	Titrimetrische Bestimmung des MS von Carboxymethylstärken	53
4.3.7	Bestimmung der reduzierenden Enden von Stärken mit Dinitrosalicylsäure	54
4.3.8	Bestimmung des Wassergehaltes von Stärken	55
4.3.9	Bestimmung der Viskosität von Stärkelösungen	56
4.3.10	Charakterisierung von Stärkehydrolysen über Drehmomentmessung	57
4.3.11	Calciumkompatibilität von Carboxymethylstärkelösungen	58
4.3.12	Bestimmung der Autoklavierbeständigkeit von Stärkederivaten	58
4.4	Synthesevorschriften	61
4.4.1	Verfahren zur Aufarbeitung von Stärken und Stärkederivaten	61
4.4.2	Verfahren zur partiellen Säurehydrolyse unterschiedlicher Stärken	62
4.4.3	Verfahren zur Reduktion der reduzierenden Enden von Stärken	67
4.4.4	Verfahren zur Darstellung von Stärkeestern in wässriger Lösung / Suspension mit Carbonsäureanhydriden	70
4.4.5	Verfahren zur Darstellung von Stärkeestern in Formamid mit Carbonsäureanhydriden bzw. Carbonsäurechloriden	76
4.4.6	Verfahren zur Veresterung von Stärken mit freien Carbonsäuren und Carbodiimiden	78
4.4.7	Verfahren zur 6-O-Tritylierung von Stärken	79
4.4.8	Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in niederen Alkoholen	80
4.4.9	Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in Aceton	91
4.4.10	Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in DMSO	94
4.4.11	Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in Wasser	98
4.4.12	Sequentielle Transformation von Stärken zur Darstellung von partiell hydrolysierten, entzweigten, reduzierten Carboxymethylstärken in wässriger Lösung	103
4.5	Enzymatische Untersuchungsmethoden	110
4.5.1	Bestimmung des Acetatgehaltes in Acetylstärkelösungen	110
4.5.2	Bestimmung des Succinatgehaltes in Succinylstärkelösungen	110
4.5.3	Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch α -Amylasen	111
4.5.4	Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch β -Amylase	113
4.5.5	Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch Pullulanase	113
4.5.6	Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch Amyloglucosidase	114
4.5.7	NMR-Charakterisierung der enzymatisch gebildeten Spaltprodukte	115
4.6	Physiologische Lösungen	116

4.6.1	Herstellung klinischer Prüfmuster	116
4.6.2	Stabilität von elektrolytenbalancierten Lösungen	118
4.7	Externe Messungen	120
4.7.1	Molekulargewichtsbestimmungen	120
4.7.2	Messung des Kolloidosmotischen Druckes	120
4.7.3	<i>In vitro</i> Abbaukinetik mit Vollblut	121
4.7.4	Natriumgehalt in Carboxymethylstärken	121
4.7.5	Blutgerinnungsinterferenzen mit Carboxymethylstärkelösungen	121
5.	Ergebnisse	123
5.1	Synthese und Strukturermittlung von Stärkeestern	123
5.1.1	Synthese der polyanionischen Stärkeester	123
5.1.2	Synthese der neutralen Stärkeester	125
5.2	Stabilitätsuntersuchung der Stärkeester	127
5.2.1	Stabilität unterschiedlicher Stärkeester während der Sterilisation	127
5.2.2	Stabilität von Succinylstärkelösungen bei unterschiedlichen pH-Werten	129
5.3	Enzymatischer Abbau von Stärkeestern	131
5.3.1	α -Amylase-Abbau der neutralen Stärkeester	131
5.3.2	α -Amylase-Abbau der polyanionischen Stärkeester	134
5.4	Synthesen von Carboxymethylstärken	139
5.4.1	Synthesen in heterogenen Reaktionssystemen	140
5.4.2	Synthesen in homogenen Reaktionssystemen	145
5.5	Physikochemische Charakterisierung einiger Carboxymethylstärken	151
5.5.1	Natrium-Gehalte ausgewählter Carboxymethylstärken	151
5.5.2	Viskosität und kolloid-osmotischer Druck von CMS-Lösungen	151
5.5.3	Calciumkompatibilität von CMS-Lösungen	153
5.5.4	Autoklavierbeständigkeit von CMS	153
5.6	Enzymatischer Abbau von Carboxymethylstärken	155
5.6.1	α -Amylase-Abbau von Carboxymethylstärken	155
5.6.2	β -Amylase-Abbau von Carboxymethylstärken	161
5.6.3	Amyloglucosidase-Abbau von Carboxymethylstärken	163
5.6.4	Pullulanase-Abbau von Carboxymethylstärken	165
5.6.5	NMR-Charakterisierung enzymatischer Abbauprodukte	167
5.7	Physiologische Charakterisierung einiger CMS-Lösungen	169
5.7.1	Abbau von CMS in Citratblut	169
5.7.2	Beeinflussung der Blutgerinnung durch CMS	173

6. Diskussion	174
6.1 Struktur und Stabilität der Stärkeester	174
6.2 Beurteilung der Synthesemethoden von CMS	182
6.2.1 Einfluss der Syntheseparameter auf das Substitutionsmuster	182
6.2.2 Vorteile des etablierten Eintopfverfahrens	195
6.3 Strukturelle Betrachtung der synthetisierten Carboxymethylstärken	207
6.3.1 Enzymatische Hydrolyse unterschiedlicher Carboxymethylstärken	207
6.3.2 Strukturmodell der synthetisierten Carboxymethylstärken	217
6.3.3 Physikochemische Eigenschaften von CMS-Lösungen	219
6.4 Verwendung von CMS als Blutvolumenersatzmittel	223
7. Zusammenfassung und Ausblick	225
Literaturverzeichnis	229
Abkürzungen	237
Substanzverzeichnis	239
Danksagung	242
Erklärung	243
Tabellenanhang	244

1. EINLEITUNG

Der Anlass der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Verwendung neuer kaltwasserlöslicher Stärkederivate im klinischen Bereich zur Prophylaxe und Therapie des Blutvolumenmangels. Die als Hauptprodukt der Photosynthese in grünen Pflanzen gebildete Stärke muss in diesem Zusammenhang als makromolekularer heterogener Naturstoff einerseits, als chemisch gut definierte Substanz mit der Struktur einer Poly-D-glucose andererseits, und schließlich hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Medizinalprodukt betrachtet werden. Diese Vielfalt und die notwendige Heranziehung auch älterer Literatur bedingen eine Reihe uneinheitlicher Bezeichnungsweisen wie zum Beispiel Molekulargewicht neben Molmasse. Gebräuchlich ist auch die Betrachtung von Blutvolumenersatzmitteln als „künstliche Kolloide“, während der Begriff Kolloid anderweitig kaum noch Verwendung findet, da die Strukturen definierter Biomoleküle, insbesondere Proteine, bekannt sind, ihre physikochemischen Eigenschaften individuell gemessen werden können und sich die Eigenschaften solcher „kolloidalen Systeme“ lückenlos und nicht abgrenzbar zwischen denen der Lösungen niedermolekularer Verbindungen und der hochmolekularen, unlöslichen Stoffe einordnen.

Im Folgenden wird einleitend auf die Pathophysiologie des Volumenmangels eingegangen und dessen Therapiemöglichkeiten mit den derzeitigen künstlichen Plasmaersatzmitteln beschrieben. Die Eigenschaften von Stärke und ihr chemisches Potenzial sind Gegenstand des Theoretischen Teils 3.

1.1 Der Blutvolumenmangel

Die Behandlung von Störungen des Flüssigkeits- und Volumenhaushalts ist eine lebenswichtige Voraussetzung für eine stabile Körperhomöostase. Im Bereich der präklinischen und operativen Medizin ist die Hypovolämie bzw. der Volumenmangel die häufigste Störung der Volumenregulation. Beim hypovolämischen Patienten liegen ein vermindertes zirkulierendes Blutvolumen und ein reduzierter Rückstrom zum Herzen vor. Ein intravasaler Volumenmangel ist eine kritische Belastung des Organismus und kann unbehandelt zu gravierenden Komplikationen führen. Das Ziel einer Volumentherapie ist die Wiederherstellung eines adäquaten intravasalen Flüssigkeitsvolumens zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Gewebsdurch-

blutung, um die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten zu gewährleisten [1 - 7].

Als Ursache eines intravasalen Volumenmangel können eine Reihe von pathologischen Zuständen oder Erkrankungen angesehen werden, die in der nachfolgenden Tabelle in vier Gruppen zusammengefasst wurden.

Tab. 1-1. Ursachen des intravasalen Volumenmangels [5].

1. Blutverlust:
· Trauma (Organ-, Weichteil-, Knochen-, Gefäßverletzungen)
· Perioperative Blutungen
· Spontane Blutungen (Aneurysmaruptur, gastroint. Blutungen, Tumore, etc.)
2. Verlust von Plasmaflüssigkeit:
· Peritonitis, Pleuritis, Sepsis, Pankreatitis, Ileus
· Ascites, Fisteln
· Verbrennungen
3. Wasser- und Elektrolytverluste:
· Wasser- und Salzverlust: Dehydratation (z.B. exzessives Schwitzen)
· Gastrointestinal-Trakt: Erbrechen, Diarrhoe, Darmspülung, Fisteln
· Nierenerkrankungen
· Morbus Addison
· Diabetes insipidus
· Diuretikatherapie
4. Verminderte Aufnahme:
· Flüssigkeitskarenz
· Mangel-, Fehlernährung
· Ältere, pflegebedürftige Personen

Volumenmangel aktiviert zunächst im Organismus eine Anzahl von physiologischen Kompensationsmechanismen, die bei gesunden Menschen in der Lage sind Volumenverluste bis zu etwa 20 % auszugleichen. Darüber hinaus ist eine schnelle und effektive Wiederauffüllung des intravasalen Volumens unerlässlich, um in erster Linie das Herzzeitvolumen und den Perfusionsdruck der Organe aufrechtzuerhalten. Wird der Patient nicht durch eine Volumenzufuhr von außen stabilisiert, so manifestiert sich ein hypovolämischer Schock mit den potentiellen Folgen von Einzel- oder Multiorganversagen.

1.2 Synthetische Volumenersatzmittel

Unter dem Begriff Volumenersatzmittel werden Flüssigkeiten aufgefasst, welche nicht zu starke Blutverluste an Stelle von konserviertem Vollblut ausgleichen. Sie dienen der Füllung des Blutgefäßsystems sowie der Normalisierung des osmotischen Druckes. Sie besitzen keine Sauerstofftransportfunktionen, keine Gerinnungsfaktoren, Immunoglobuline, Erythrocyten und Puffersubstanzen. Man unterscheidet zwischen körpereigenen Kolloiden als Plasmaersatzstoff und synthetischen Kolloiden mit dieser Funktion. Die Aufgabe, bei höheren Blutverlusten neben Wasser und Elektrolyten auch wasserbindende Makromoleküle zuzuführen, um das Flüssigkeitsvolumen für längere Zeit im Intravasalraum zu halten, erfüllt unter physiologischen Bedingungen im wesentlichen das Serumalbumin, dessen Gehalt im Blutserum 4 bis 5,5 % beträgt. Die breite Anwendung von Humanalbumin bei Volumenmangel wird jedoch neben der begrenzten Verfügbarkeit und dem hohen Preis durch eine Reihe von Unverträglichkeitsreaktionen verhindert [2].

Künstliche Kolloide als Plasmaersatz haben sich daher als unentbehrliche Therapeutika am Unfallort und in der Klinik durchgesetzt. Ihre Anwendung ist jedoch nicht nur auf Notfallsituationen beschränkt. Neben der ursprünglichen Funktion, fehlendes Blutvolumen zu ersetzen, haben sich eine Reihe anderer Anwendungen etabliert, z.B. bei der Eigenblutentnahme vor größeren operativen Eingriffen oder bei der Hämodilution zur Behandlung von arteriellen Verschlusskrankheiten und bei Mikrozirkulationsstörungen, als Kryokonservierungsmittel für Human-Zellen, zur Organperfusion und als polymerer Träger zur Bindung und gezielten Verabreichung von Arzneistoffen oder Kontrastmitteln („Controlled-Drug-Release“) [8 - 15]. Gerade durch bestehende Infektionsgefahren (Hepatitis- und HIV-Risiko) und mögliche Unverträglichkeitsreaktionen in der Transfusionstherapie ist ein erhöhter Bedarf an körperfremden Plasmaersatzmitteln zu verzeichnen. Bei Angehörigen bestimmter Sekten (z.B. den Zeugen Jehovas) ist die Behandlung größerer Blutverluste gänzlich auf den Einsatz körperfremder Plasmaersatzstoffe beschränkt.

Bei allen künstlichen Kolloiden stellt die Volumenwirkung den Hauptwirkmechanismus dar. Makromoleküle, die nicht in der Lage sind, die Endothelbarriere der Gefäße frei zu passieren, bauen intravasal einen erhöhten kolloidosmotischen Druck (KOD) auf und binden somit das Wasser im Gefäßsystem. Im Gegensatz zu reinen Elektrolytlösungen wie „physiologischer Kochsalzlösung“ (0,9 % NaCl) verbleiben die polymeren Substanzen eine gewisse Zeit im Intravasalraum und halten dadurch den KOD relativ konstant [1]. Um die Volumenwirkung abschätzen zu können, werden kolloidale Lösungen bevorzugt, die einen KOD vergleichbar mit dem des Plasmas haben. Der Volumeneffekt ist proportional zur Konzentration der zugeführten Kolloidlösung und indirekt proportional zur Molmasse des gelösten Stoffes [5]. Im Unterschied zum molekular einheitlichen Protein Albumin sind alle synthetischen Kolloide von polydispenser Natur mit einer breiten Molekulargewichtsverteilung.

Die Dauer der Volumenwirksamkeit eines Plasmaersatzmittels ist abhängig von Ausmaß und Geschwindigkeit der Elimination. Entscheidend ist hierbei der Abbau durch körpereigene Enzyme und die anschließende renale Ausscheidung der Abbauprodukte. Aufgrund der Polydispersität der Makromoleküle finden sich in jeder Lösung größere und kleinere Moleküle, welche unterschiedlich schnell ausgeschieden werden. Eine wichtige Kenngröße von künstlichen Plasmaersatzmitteln ist daher der Mittelwert der Molekulargewichtsverteilung [4]. Hierbei sind vor allem zwei statistische Angaben gebräuchlich, zum einen der Mw-Wert, welcher ein Gewichtsmittel der Molmassen darstellt, in dem die höheren Molmassen einen stärkeren Beitrag leisten und zum anderen der Mn-Wert, der das normale Zahlenmittel aller Molmassen wiedergibt. Da in dem polymeren Gemisch von Plasmaersatzstoffen stets ein leichter Überhang an Molekülen mit hohen Molmassen besteht (Lansing-Kraemer-Verteilung) ist Mw immer größer als Mn [1].

Ein idealer Plasmaersatz müsste einen stabilen und verlässlichen Volumeneffekt, eine gute Verträglichkeit und vollständige Elimination nach der gewünschten Volumenwirkdauer von ca. vier bis sechs Stunden, keine Einschränkung von Organfunktionen, sowie keine Beeinflussung der Hämostase und des Immunsystems aufweisen. Leider ist bis heute keines der auf dem Markt erhältlichen Produkte in der Lage, alle diese Anforderungen zu erfüllen [16 - 20]. Die Vorteile körperfremder bzw. künstlicher Plasmaersatzlösungen liegen neben der Haltbarkeit, Lagerungsfähigkeit und der sofortigen Einsatzbereitschaft in ihrer hohen Verfügbarkeit und ihrem günstigem Preis. Die nachfolgende Tabelle 1-2 stellt die generellen Vor- und Nachteile von derzeitig verwendeten Plasmaersatzlösungen gegenüber.

Tab. 1-2. Vor- und Nachteile von körperfremden Plasmaersatzlösungen.

Vorteil	Nachteil
Unbegrenztes Angebot	Mitunter Nebenreaktionen
Gute Lagerfähigkeit	Mengenbegrenzung (wegen Erhalt der Sauerstoffkapazität und Blutgerinnungsfunktionen)
Sofortige Anwendbarkeit	Anreicherung im Körper
Verbesserung der Fließeigenschaft des Blutes	
Sterilisierbarkeit	
keine Krankheitsübertragung	

Im Folgenden werden die im klinischen Einsatz befindlichen synthetischen Plasmaersatzstoffe Dextran, Gelatine und Hydroxyethylstärke vorgestellt. Auf die Möglichkeit des Volumenersatzes mit künstlichen Sauerstoffträgern wie Hämoglobinlösungen oder Perfluorkarbon-Emulsionen, die allesamt noch in der Entwicklung sind [21, 22, 23], wird nicht näher eingegangen.

1.2.1 Dextran

Klinisch verwendete Dextranmoleküle bestehen aus einer Kette von etwa 200 bis 450 Glucosemolekülen, die größtenteils α -1,6-glycosidisch verknüpft sind und zusätzlich α -1,3- und α -1,4-glycosidische Verzweigungen aufweisen. Durch dieses Verknüpfungsmuster sind Dextrane in tierischen Organismen enzymatisch schwer abbaubar. Sie werden in Mikroorganismen, durch Enzyme wie die Dextranase (Sucrose-glucanglucosyltransferase) des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* aus saccharosehaltigen Lösungen als Reservestoff und Membranbestandteil synthetisiert. Das native Dextran mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen ist wegen seiner hohen Viskosität, Antigenität und der fehlenden osmotischen Wirksamkeit nicht als kolloidales Volumenersatzmittel geeignet und muss daher zunächst durch saure Hydrolyse in unterschiedlich große Bruchstücke gespalten, fraktioniert und gereinigt werden. Alle Dextranlösungen sind polydispers, bestehend aus einem Gemisch von Polyglucanen mit einem breitem Molekulargewichtsspektrum [1]. Für den klinischen Alltag stehen 6- und 10%ige Lösungen von Dextranen mit einem mittleren Molekulargewicht von 40000 und 70000 zur Verfügung. Aufgrund der hohen onkotischen Aktivität dieser Lösungen kommt es nach Gabe der Präparate durch nachströmende Gewebsflüssigkeit zu einem zweiten Volumeneffekt, weshalb Dextrane auch als Plasmaexpander bezeichnet werden. Die Volumenwirkdauer von hochmolekularen Dextranlösungen beträgt 5 bis 6 Stunden und die von mittelmolekularen Dextranen 3 bis 4 [4].

Dextranpräparate besitzen, bedingt durch sog. „Coating“ von Thrombocyten, eine antithrombotische Wirkung. Die daraus resultierenden Effekte auf die Hämostase nehmen dosisabhängig und mit steigendem Molekulargewicht zu. Durch die hohe Eigenviskosität der Dextrane kann es bei renaler Ausscheidung von größtenteils intakten Molekülen zu einer erhöhten Viskosität des Harns bis hin zu schweren Nierenfunktionsstörungen kommen. Des Weiteren wurden bei der Applikation von Dextranlösungen Fälle von schweren anaphylaktoiden und anaphylaktischen Reaktionen beobachtet. Diese schweren Unverträglichkeitsreaktionen, der Einfluß auf die Blutgerinnung und die Nierenfunktion haben zu einem starken Rückgang der klinischen Anwendung geführt [5].

1.2.2 Gelatine

Gelatine ist ein Abbauprodukt des Kollagens, welches am Aufbau von Bindegewebe, Knorpel, Sehnen und Bändern beteiligt ist. Kollagen macht ca. 30 % der Gesamtproteinmenge von Säugetieren aus. Kollagen besteht aus drei Polypeptidketten (jeweils mit einem Molekulargewicht von 100000 bis 120000) in Helixform, die sich wiederum in einer übergeordneten Spirale vereinigen. Bei der Produktion von Gelatine wird zunächst das Rinder-Kollagen durch saure oder alkalische Hydrolyse depolymerisiert. Anschließend werden die so erhaltenen Polypeptidfragmente mit einer Molmasse von ca. 12000 Dalton bis zu einem mittleren Molekulargewicht von 30000 bis 35000 mit Bernsteinsäure, Glyoxal-Wasserstoffperoxid oder Diisocyanat quervernetzt [1]. Die Gelatine-Präparate haben eine Volumenwirksamkeit von bis zu drei Stunden. Sie besitzen keinen volumenexpandierenden, sondern nur einen volumenfüllenden Effekt. Ein Einfluss von Gelatine-Lösungen auf die plasmatische und zelluläre Gerinnung geht zumeist nicht über Dilutionseffekte hinaus. Hinweise auf eine Störung der Nierenfunktion liegen nicht vor, ebenso wenig sind für Gelatine längerfristige Speicherphänomene beschrieben. Gegen Gelatine lassen sich im Serum Antikörper nachweisen, bei einigen Patienten kommt es nach erhöhter Anwendung zur Histaminfreisetzung und mitunter zu anaphylaktoiden Unverträglichkeitsreaktionen [4]. Ob es durch die Infusion von Gelatine zu einer Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) kommen kann, ist derzeit nicht völlig ausgeschlossen [4]. Bislang ist in der Literatur noch kein Fall einer Übertragung durch eine Gelatineinfusion beschrieben worden.

1.2.3 Hydroxyethylstärke

Native Stärken bestehen je nach Provenienz zu unterschiedlichen Anteilen aus zwei verschiedenen Polyglucanen, welche in für die Pflanzen charakteristischer Weise in sog. Stärkekörnern kompakt angeordnet sind (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.2). Der geringere Anteil (i.d.R. etwa 20 %) entfällt auf Amylose, eine vorwiegend lineare Kette von bis zu über 1000 Glucosemolekülen, welche α -1,4-glycosidisch verknüpft sind. Die Hauptkomponente des Stärkekorns besteht aus Amylopektin. Amylopektin ist ein kompaktes, buschartig verzweigtes Makromolekül, welches neben der α -1,4-glycosidischen Verknüpfung viele α -1,6-Verknüpfungen aufweist. Es besitzt eine dem im tierischen Organismus vorkommenden Reservekohlenhydrat Glykogen ähnliche Struktur.

Ausgangsmaterial zur Herstellung von Hydroxyethylstärken ist hochverzweigtes Amylopektin, welches aus der Stärke von speziell gezüchteten Mais-, Reis- und anderen Getreidesorten in Anteilen von größer 95 % (sog. wachsige Stärken) vorkommt [24, 25]. Hierfür wurde neuerdings auch die Verwendung von Amylopektin aus transgenen amylopektinreichen Kartoffeln für die Herstellung von Plasmaersatzmitteln patentiert [26]. Unveränderte Stärke wird im Blut durch α -Amylase rasch hydrolytisch gespalten; um dies zu verzögern und um dem Polymer eine vollständige Wasserlöslichkeit zu verleihen ist eine partielle Substitution der Stär-

ke an den Grundmolekülen notwendig. Bei der Herstellung müssen die Stärkekörner zunächst aufgebrochen und die Makromoleküle durch Säureeinwirkung oder enzymatischen Abbau bis zu einer geeigneten Größe gespalten werden. Anschließend erfolgt in alkalischer Lösung eine Veretherung mit Ethylenoxid zur Hydroxyethylstärke [27 - 30].

Aufgrund der Vielfalt der auf dem Markt befindlichen Hydroxyethylstärken müssen stets eine Reihe von physikochemischen Parametern angegeben werden, die auf die pharmakologische Wirkung einen entscheidenden Einfluss haben. Die Kenngrößen MS, DS und C2/C6 sind im wesentlichen für alle Stärkederivate gebräuchlich und lassen speziell im Fall der Anwendung als Plasmaersatzstoff Aussagen über den Volumeneffekt, die Viskosität und die Eliminationsrate zu. Die Abkürzung **MS** bedeutet **molarer Substitutionsgrad**; dieser Wert gibt an, wieviel Mol Substituent (also hier Hydroxyethylgruppen) pro Mol Glucose gebunden vorliegen. Da jeder Glucosebaustein in der Stärke höchstens drei Hydroxylgruppen für Umsetzungen zur Verfügung stellen kann, beträgt der theoretische Maximalwert 3,0. Die klinisch eingesetzten Hydroxyethylstärken haben einen MS-Wert von 0,4 bis 0,6. Eine etwas andere Form der Angabe des Substitutionsgrades ist der **DS-Wert** („degree of substitution“). Der DS-Wert stellt das Mengenverhältnis von substituierten Glucoseresten zur Gesamtzahl aller Glucosereste dar. Definitionsgemäß kann der Wert bei einer erschöpfenden Substitution maximal 1,0 betragen. Bei einer einheitlichen, mittleren Substitution sollte der MS-Wert ungefähr dem DS-Wert entsprechen. Liegt der MS über dem DS, so kann von einer Mehrfachsubstitution einiger Monomerbausteine ausgegangen werden. Bei Hydroxyethylstärken kann es aufgrund gleicher Funktionalität der Seitenkette ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ anstelle von $-\text{OH}$) zusätzlich zu einer Mehrfachsubstitution des Hydroxyethylrestes kommen. Wegen der Gefahr der Verwirrung muss erwähnt werden, dass in der allgemeinen nichtmedizinischen englischsprachigen Stärkeliteratur der Substitutionsgrad generell als DS-Wert angegeben wird, dieser aber inhaltlich dem bereits erwähnten MS-Wert gleichzusetzen ist.

Für die Pharmakokinetik ist es ebenfalls bedeutsam, an welcher Hydroxylgruppe der Glucose (Hydroxylgruppe an C-2, C-3 oder C-6) der Substituent gebunden vorliegt. Hierbei wird sich gewöhnlich auf die Hydroxylgruppen an C-Atom 2 und C-Atom 6 beschränkt. Der sog. **C2/C6-Wert** gibt das Verhältnis der partiellen Substitutionsgrade an **C-2** und **C-6** wieder.

Die intravasale Verweildauer von HES-Lösungen nimmt mit ansteigendem mittlerem Molekulargewicht und ansteigendem Substitutionsgrad zu und liegt im Bereich von ca. vier Stunden. Die Ausscheidung von HES-Lösungen erfolgt fast ausschließlich über die Niere. Hinsichtlich der Auswirkungen auf das Gerinnungssystem wurden neben den allgemeinen Dilutionseffekten vor allem bei höhermolekularen und hochsubstituierten HES-Präparaten verschiedene Interaktionen mit Gerinnungsfaktoren beobachtet [20, 31]. Die moderneren mittel-molekularen, mittelsubstituierten HES-Lösungen (HES 200/0,5; HES 130/0,4) gelten zwar diesbezüglich als weitgehend unbedenklich, jedoch besteht derzeit auch für diese Präparate eine Dosisbeschränkung [5]. Bei wiederholter Gabe über einen längeren Zeitraum kommt es bei einigen Patienten zu starkem Juckreiz (Pruritus) auf der Haut, welche nicht auf allergi-

schen Reaktionen beruht, sondern sich wahrscheinlich auf die Speicherung von hochsubstituierten, hochmolekularen Fraktionen zurückführen lässt [7].

Anders als in den USA, in denen nur langsam spaltbare hochmolekulare und hochsubstituierte Hydroxyethylstärken zur Volumensubstitution zugelassen sind, werden in Europa und insbesondere in Deutschland die HES-Präparate als häufigstes körperfremdes Plasmaersatzmittel eingesetzt.

2. AUFGABENSTELLUNG

Als artifizielle Volumenersatzmittel werden heute Lösungen aus Gelatine, Gelatinederivaten, Dextran und insbesondere aus Hydroxyethylstärke (HES) eingesetzt. Neben den gewünschten Wirkungen der Plasmaersatzlösungen bestimmen in hohem Maße unerwünschte Nebenwirkungen die Wahl der einzusetzenden Substanz. So hat die Entwicklung von kolloidalen Volumenersatzmitteln bisher noch nicht zu einem Produkt geführt, welches neben der gewünschten Wirkung auf das Kreislaufsystem und nach einer der Indikation angepassten Verweildauer im Gefäßsystem rasch und vollständig aus dem Körper eliminiert wird dabei aber nicht toxisch, nicht antigen und frei von schweren Nebenwirkungen ist.

Die Dextran-Präparate zeigen das umfangreichste Spektrum an Nebenwirkungen mit zum Teil tödlichem Ausgang. Dextrane werden in Deutschland so gut wie nicht mehr eingesetzt und werden auf lange Sicht vom Markt verschwinden. Gelatine-Lösungen weisen aufgrund des tierischen Rohstoffs eine höhere Inzidenz von anaphylaktoiden bzw. anaphylaktischen Reaktionen auf. Zusätzlich führt das theoretisch mögliche Risiko einer Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie zu einer deutlich verringerten Akzeptanz dieses Pharmakons. Die neueste Generation von niedermolekularen Hydroxyethylstärken zeigen derzeit die beste Verträglichkeit. Dennoch sind auch diese HES-Lösungen nicht frei von Nebenwirkungen, die vorzugsweise nach hochdosierter und wiederholter Applikation auftreten. So muss als derzeit größtes Problem die Speicherung von HES in den Zellen des mononuklearen phagozytierenden Systems (MPS; früher retikuloendotheliales System = RES) angesehen werden. Insgesamt betrachtet scheint die Neuentwicklung eines besseren Plasmaersatzstoffes auf Stärkebasis erfolversprechender zu sein, als mit anderen polymeren Substanzen.

Die Aufgabe dieser Doktorarbeit besteht darin, eine für klinische, vornehmlich parenterale Anwendungen geeignete wasserlösliche, physiologisch verträgliche Stärkeverbindung zu entwickeln, welche die genannten Nachteile der bisherigen künstlichen kolloidalen Volumenersatzmittel vermeidet. Native Stärke ist wasserunlöslich und würde im Blut einem sofortigen Abbau durch körpereigene α -Amylase unterliegen. Aus diesem Grund muss die Stärke bis zum Erreichen des gewünschten physikochemischen und physiologischen Eigenschaftsprofils vielfältig modifiziert werden. Zur Erzielung einer optimalen Löslichkeit und zur deutlichen Verlangsamung des intravasalen Abbaus müssen Substituenten an einen Teil der freien Hydroxylgruppen der Glucosebausteine gebunden werden. Vorher muss die native Stärke zur

Einstellung der Viskosität durch Teilhydrolyse abgebaut werden. Die Substituenten können grundsätzlich über eine Ether- oder Esterbindung eingeführt werden.

Wegen der erforderlichen physikochemischen Eigenschaften kommen für die Substitution der Stärken nur polare Seitenketten in Frage. Besonders interessant erscheinen potentiell anionische Substituenten, da sie neben einem erhöhten Wasserbindungsvermögen aus verschiedenen Gründen eine geringere Akkumulation im Körper erwarten lassen. Durch die höhere Wasserbindungskapazität könnten geringere Konzentrationen der Wirksubstanz und geringer substituierte Stärkemoleküle verwendet werden. Dies sollte sich in einer weiteren Verringerung der Nebenwirkungsrate widerspiegeln. Polyanionische Stärkeether sind hauptsächlich durch Carboxyalkylierungsreaktionen über Williamson-Varianten oder Michael-Additionen darstellbar. Als Modellsubstanz für diese Derivateklasse soll die bereits in anderen technischen und medizinischen Anwendungen erprobte Carboxymethylstärke verwendet werden [32].

Informationen über anionische Stärken als mögliche Bestandteile von Blutvolumenersatzlösungen sind in der Literatur nur sehr spärlich zu finden. Von Thompson et al. wurde die Verwendung von Carboxymethylstärke als Plasmaersatzmittel wegen einer schwachen Toxizität negiert [33]. In der chinesischen Literatur findet man sogar vereinzelt Angaben über Volumentherapie-Studien von Carboxymethylstärken. In diesen Studien konnte die prinzipielle Eignung aus pharmakologischer und toxikologischer Sicht erstmals gezeigt werden [34]. Die getesteten Substanzen waren aber von einer auf dem Herstellungsverfahren beruhenden Uneinheitlichkeit geprägt, wodurch aus physiologischer Sicht Nachteile zu befürchten sind. Dies könnte die Ursache dafür sein, weshalb Carboxymethylstärken als Plasmaersatzmittel nach jetzigem Kenntnisstand in China nicht angewendet werden; in der westlichen Welt stellen sie hinsichtlich des Verwendungszweckes ein Novum dar.

Aufgabe dieser Arbeit ist es daher, ein Syntheseverfahren zu erarbeiten, welches möglichst variabel und effizient den Zugang zu maßgeschneiderten, einheitlichen Stärkederivaten ebnet. Dieses Verfahren sollte idealerweise die notwendigen Reaktionsschritte zur Molekulargewichtsanpassung und zur Carboxymethylierung vereinen. Der Herstellungsprozess sollte generell für mehrere Substitutionstypen und -muster optimierbar sein. Prinzipiell sind hierbei Reaktionsbedingungen zu favorisieren, die einen Transfer in die großtechnische Produktion erlauben. Für diesen Zweck sollen alle Reaktionsansätze in einem Laboraufbau durchgeführt werden, der reproduzierbare Syntheseergebnisse ermöglicht. Es müssen Aufarbeitungsmethoden erarbeitet werden, welche die Produkte in der für die medizinischen Zwecke notwendigen Reinheit verfügbar machen.

Für den klinischen Einsatz dieser Substanzen ist die genaue Kenntnis der sterischen und chemischen Struktur unerlässlich, da sie Pharmakokinetik und Pharmakologie beeinflussen. Aus diesem Grund müssen spektroskopische Analysemethoden (NMR und FT-IR) zur Untersuchung der Biopolymere entwickelt oder adaptiert werden. Aufgrund der Komplexität der Moleküle kann eine umfassende Aussage über den Aufbau nur durch zusätzliche enzymati-

sche Charakterisierungen gelingen. Hierzu sollten Enzym-Assays aufgebaut werden, welche neben strukturellen Informationen, schnell und kostengünstig auch Angaben über den physiologischen Abbau liefern. Darüber hinaus würde dieses *In-vitro*-Verfahren auch die Vergleichbarkeit zu den bisher gebräuchlichen Volumenersatzmitteln gewährleisten.

Soweit möglich sollen aus einheitlich synthetisierten Carboxymethylstärken Prüfmuster für präklinische Studien hergestellt werden. Diese Studien würden in Kooperation mit der Firma B. Braun Melsungen AG durchgeführt werden. Voraussetzung dafür wäre eine vorherige Bestimmung der relevanten physikochemischen Parameter der Testlösungen.

Die Verwendung von Stärkeestern aus niederen aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäuren, speziell von Acetylstärke als Plasmaersatzmittel wurde bereits an anderer Stelle vorgeschlagen [35, 36]. Der Vorteil von veresterten Stärken wird durch eine vollständige Metabolisierbarkeit bzw. Ausscheidung begründet. Untersuchungen mit Acetylstärke ergaben eine gute physiologische Verträglichkeit [37], das Produkt kam jedoch aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit beim Sterilisationsprozess und der unzureichenden Stabilität in wässriger Lösung über den im klinisch geforderten längeren Lagerzeitraum nicht auf den Markt. Galenisch stabile Stärkeester, die gleichzeitig den pharmazeutischen Anforderungen gerecht werden, sind derzeit nicht bekannt. Eine Teilaufgabe dieser Doktorarbeit besteht deshalb ferner darin, die Ursache für die Instabilität der acylierten Stärken zu untersuchen, um strukturelle Anforderungen an einen stabilen Stärkeester formulieren zu können. Voraussetzung hierfür ist die Synthese und Charakterisierung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Stärkeester.

3. THEORETISCHER TEIL

3.1 Die Stärke

Stärke stellt das wesentliche Sekundärprodukt der Photosynthese dar. Sie ist das wichtigste Kohlenhydrat der menschlichen Nahrung und das Reserve-Polysaccharid von fast allen Pflanzen. Die Stärke ist nach der Cellulose der häufigste polymere Zucker. Im Gegensatz zu freier Glucose ist die Stärke osmotisch unwirksam und in der Pflanze weitgehend immobilisiert. Durch den morphologischen Aufbau der Stärke wird eine optimale Raumausnutzung gewährleistet sowie ein schneller enzymatischer Abbau ermöglicht.

Die Stärke wird direkt nach der Photosynthese in den Chloroplasten der grünen Pflanzenteile gebildet und in Form von ovalen Partikeln mit ca. 1 μm Durchmesser im Stroma temporär deponiert. Die nebenstehende Abbildung zeigt einen Chloroplasten mit zwei solcher granulären Stärkepartikeln. Mit isolierten Chloroplasten kann Stärke auch *in vitro* synthetisiert werden.

Eine längere Speicherung der Stärke erfolgt in ebenfalls mikroskopisch kleinen Körnchen in den wenig differenzierten Amyloplasten des pflanzlichen Speichergewebes. Besonders hoch ist der Stärkegehalt in Getreidekörnern (bis zu 75 % der Trockenmasse), in Kartoffelknollen (etwa 65 %) und in anderen pflanzlichen Speicherorganen. Die charakteristischen Stärkekörner sind in kaltem Wasser praktisch unlöslich, quellen aber beim Erhitzen in Wasser stark auf. Etwa 15 bis 25 % der Stärke lässt sich durch längeres Kochen kolloidal in Lösung bringen. Die Bildung und Eigenschaften der Stärke sind in zahlreichen Lehrbüchern und Übersichtsartikeln ausführlich beschrieben worden [38 - 43].

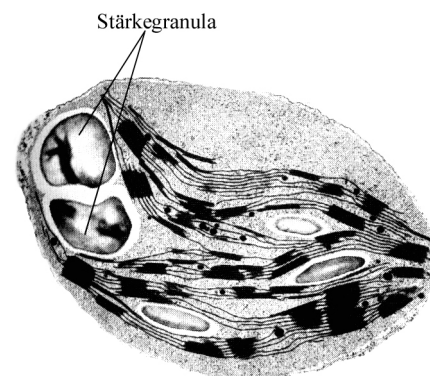


Abb. 3-1. Chloroplast mit Stärkekörnern.

3.1.1 Biosynthese von Stärke

Die Knüpfung der glycosidischen Bindungen bei Polysacchariden erfolgt über mit Nucleosid-diphosphaten aktivierte Zucker. Im ersten Schritt des in Abbildung 3-2 dargestellten Syntheseweges wird ausgehend von Glucose-6-phosphat durch das Enzym Phosphoglucomutase Glucose-1-phosphat bereitgestellt.

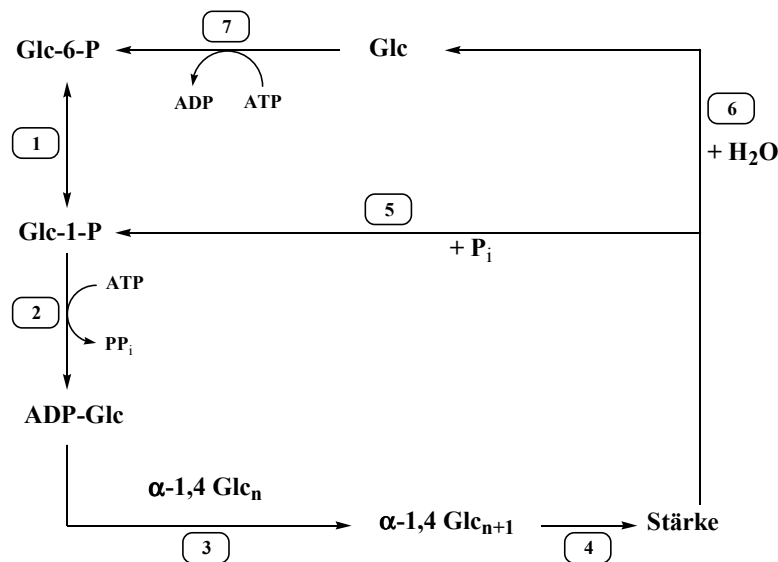


Abb. 3-2. Allgemeines Schema der Stärke-Biosynthese bzw. des Abbaus [44]. (1) Phosphoglucomutase; (2) ADP-Glucose Pyrophosphorylase; (3) granula-gebundene und lösliche Stärkesynthasen; (4) verzweigende Enzyme; (5) Stärke Phosphorylase; (6) Amylasen, entzweigende Enzyme, Maltasen; (7) Hexokinase.

Die anschließende Bildung von ADP-Glucose durch ADP-Glucose-Pyrophosphorylase geschieht in allen bisher untersuchten stärke-akkumulierenden Plastiden [44]. Die Umsetzung von Glucose-1-phosphat zu ADP-Glucose wird bei einer niedrigen P_i- und einer hohen 3-Phosphoglycerat-Konzentration stimuliert. Diese Situation liegt bei einer hohen Saccharosekonzentration im Cytosol vor. Die Aktivität der Stärkesynthasen führt zum linearen Produkt Amylose. Bei der Synthese des α-1,4-verknüpften Polyglucans wird die Glucose von der ADP-Glucose stets an das nichtreduzierende Ende der wachsenden Kette transferiert. Hierbei spielen sowohl lösliche Isoformen der Stärkesynthasen als auch solche Enzyme, die mit bereits vorhanden Stärkegranula assoziiert sind eine entscheidende Rolle. Das Amylopektin wird sehr wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel von Stärkesynthasen, verzweigenden Enzymen (auch als Q-Enzyme bezeichnet) und entzweigenden Enzymen gebildet. Die α-1,6-glycosidischen Verknüpfungen werden von den verzweigenden Enzymen in lineare Polyglucane eingeführt, die Verzweigungspunkte bilden den Anfang neuer Ketten, welche durch die Stärkesynthase bis zu dem Punkt verlängert werden, an welchem erneut Verzweigungen eingeführt werden. Ein Zuviel an Verzweigungen wird durch die Beteiligung von entzwei-

genden Enzymen wieder auf das durchschnittliche Maß herunterreguliert (sog. „preamylopectin trimming model“) [44]. Das Auftreten von löslichen, hochverzweigten Phytoglykogenen in den Endospermen von Mais- und Reis-Mutanten wird ebenfalls in diesem Zusammenhang diskutiert [45]. Die Produkte werden schließlich in Form von Granula in den Chloroplasten gespeichert. Ein Abbau der granulären Stärke kann zum einen durch eine stärke-spezifische Phosphorylase oder durch Amylasen und entsprechende entzweigende Enzyme erfolgen.

3.1.2 Das Stärkekorn

Die Bildung und Ablagerung der Stärke in den Pflanzen erfolgt in Form von Stärkekörnern. Diese weisen für jede Pflanze artspezifische Formen, Größen und Schichtungen auf, so dass aufgrund dieser Kennzeichen die Herkunft der Stärke unter dem Mikroskop feststellbar ist. Die nachfolgende Abbildung zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einiger Stärkesorten.

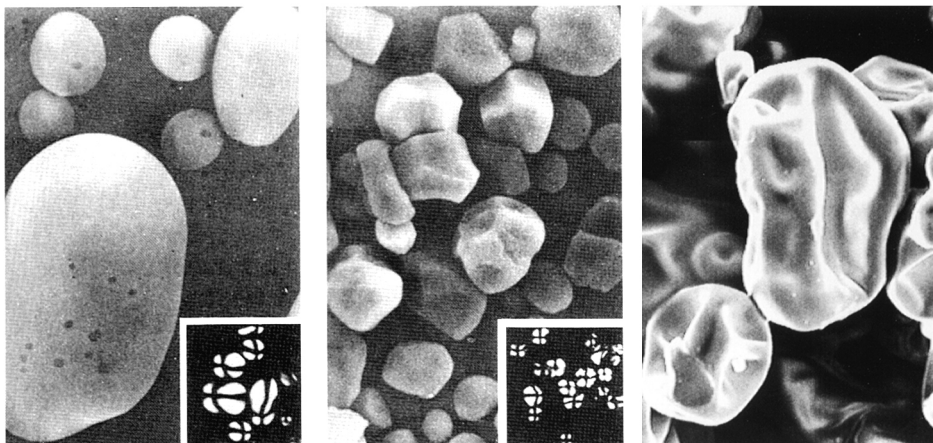


Abb. 3-3. REM-Aufnahmen einiger Stärkekörner (v.l.n.r. Kartoffel, Mais, Wachsmais) [46].

Stärkekörner zeichnen sich durch eine Reihe besonderer Eigenschaften aus. So zeigen sie bei Betrachtung im polarisierten Licht Doppelbrechung, die sich in Form eines Kreuzes darstellt. In Abbildung 3-3 sind solche Mikroskopiebilder in der rechten unteren Ecke von den Kartoffel- und Maisgranulabildern dargestellt.

Stärke besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit zur Wasseraufnahme, verbunden mit einem Aufquellen der Stärkekörner. Die Quellbarkeit ist stark von der Temperatur abhängig, bis ca. 40 °C verläuft sie reversibel. Bei Suspensionen in Wasser nimmt der Durchmesser luftgetrockneter Stärkekörner um 30...40 % zu. Bei weiterer Erwärmung der Suspension setzt oberhalb einer bestimmten Temperatur eine irreversible, starke Quellung ein. Diesen Temperaturbereich, der etwa bei 75...90 °C liegt, nennt man die Gelatinisierungs- oder Verkleisterungstemperatur. Die Körner verlieren ihre Doppelbrechung und die Viskosität der Suspension steigt beträchtlich an. Während der Gelatinisierung verlieren die Stärkekörner ihre Morpholo-

gie [47]. In diesem Stadium zeigen die Suspensionen die größte Viskosität und es beginnt die Diffusion eines Teils der Amylose aus dem Stärkekorn. Bei weiterer Erwärmung bis auf 90 °C platzen die Stärkekörner auf, was einen Viskositätsabfall zur Folge hat. Molekulare Lösungen entstehen aber erst weit oberhalb von 100 °C, hierbei werden die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen vollständig aufgebrochen. Die allgemeinen provenienzenabhängigen Charakteristika werden in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Tab. 3-1. Allgemeine Eigenschaften einiger granulärer Stärken [48].

Stärkequelle	Löslichkeit % bei 95 °C	Verkleisterungs- temp. [°C]	granuläre Form	Durchmesser der Stärkekörner [µm]
Kartoffel	82	59...68	oval / sphärisch	40...100
Weizen	41	58...64	rund / linsenfö- mig	20...30
Mais	25	62...72	rund / polyedrisch	2...15
Wachsmais	23	63...72	rund / polyedrisch	5...15

Der Durchmesser der Stärkekörner liegt zwischen 10 µm (Reiskorn) und 100 µm (Kartoffel). Sie enthalten nahezu reine Stärke. Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin variiert innerhalb der Stärken unterschiedlichen pflanzlichen Ursprungs und bestimmt grundlegend mehrere physikochemische Eigenschaften der Stärkekörner. Die Eigenschaften werden ebenso durch die Lokalisierung dieser Komponenten innerhalb des Korns sowie deren Interaktion untereinander beeinflusst. Getreidestärken enthalten noch 1...2 % Fette oder Fettsäuren, Knollenstärken 0,07...0,22 % Phosphat, das als Ester an Amylopektin gebunden ist. Des Weiteren findet man in der Stärke noch 0,1...2 % Protein. Die Moleküle innerhalb des Korns weisen einen gewissen Kristallisationsgrad auf. Man unterscheidet zwischen Stärketyp A (vorwiegend in Getreidestärken) und dem Typ B (in Knollenstärken), beide besitzen ein unterschiedlichen Wassergehalt [49]. Das Wasser hat bei der Strukturbildung des Stärkekorns eine wichtige Rolle, es gewährleistet die optimale Festigkeit des Korns. Bei Getreidestärken liegt dieses Optimum bei ca. 13 % Wasser, bei Kartoffelstärke bei ca. 19 % Wasser. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung über die chemischen Bestandteile der häufigsten Stärken.

Tab. 3-2. Chemische Zusammensetzung einiger nativer Stärken (TS = Trockensubstanz) [48].

Stärkequelle	Stärkegehalt im Rohstoff [%]	Amylose % TS	Lipide % TS	Proteine % TS	Phosphor % TS	Gleichge- wichtsfeuchte [%]
Kartoffel	17...19	23	0,03	0,06	0,08	19
Weizen	62...70	28	0,8	0,40	0,06	13
Mais	68...75	27	0,7	0,35	0,02	13
Wachsmais	68...75	1	0,15	0,25	0,01	13

Stärkekörner weisen im Kern einen amorphen Bereich ohne erkennbare Organisation auf, dieses Zentrum wird als Hilum bezeichnet. Der morphologische Aufbau der Körner wird maßgeblich durch die Anordnung des Amylopektins bestimmt. Die unverzweigten kürzeren Ketten des Amylopektins treten in Clustern auf und bilden dort in einer dichten Anordnung Doppelhelices aus. Die geordnete Packung solcher Doppelhelices führt zu kristallinen Lamellen. Diese alternieren mit amorphen Lamellen, in denen die Verzweigungen des Amylopektins lokalisiert liegen. Diese strukturelle Einheit wiederholt sich periodisch in Abständen von ca. 9 nm. Die abwechselnden kristallinen und amorphen Lamellen sind konzentrisch angeordnet und führen so zu mehreren hundert Nanometern großen semikristallinen Zonen. Dieser Bereich alterniert wiederum mit amorphen Zonen in denen die Organisation der Amylopektin-Moleküle weniger geordnet ist. Eine amorphe und eine semikristalline Zone wird schließlich als Wachstumsring bezeichnet. Diese Ringe sind im Mikroskop sichtbar. In der nachfolgenden Abbildung wird der komplexe Aufbau eines Stärkekorns illustriert.

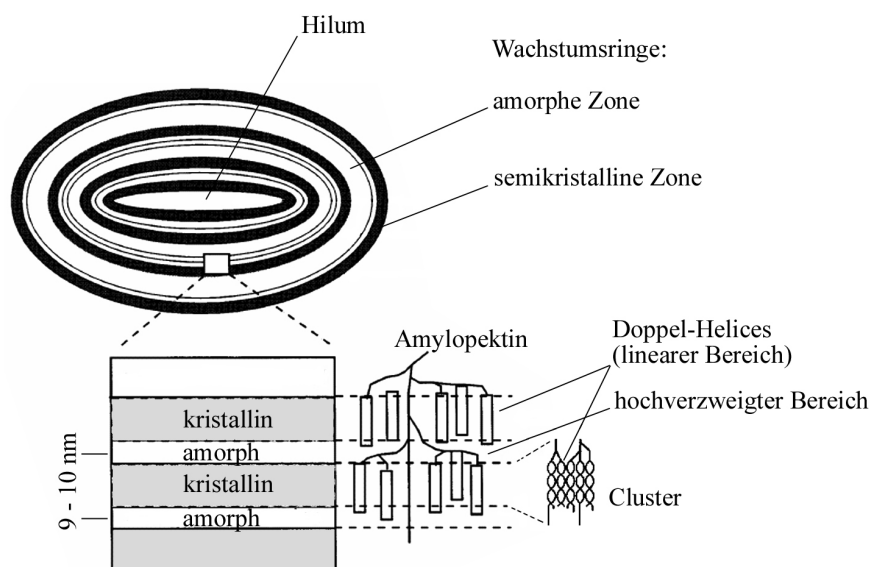


Abb. 3-4. Stärke Korn – Aufbau und innere Organisation [44, 45].

Die Lokalisierung von Amylose innerhalb des Stärkekorns ist immer noch Gegenstand aufwendiger Untersuchungen [50]. Sie scheint als Vorläufer des Amylopektins teilweise in freier Form als auch in Form von Komplexen fest assoziiert vorzuliegen [39, 49]. In der nativen Form scheint die Amylosefraktion reaktiver zu sein als das Amylopektin, nach geeigneter physikalischer Vorbehandlung oder in Lösung zeigen jedoch beide Komponenten die gleiche Reaktivität [51].

Die Struktur der Stärkekörner bestimmt größtenteils die Reaktivität sowie den Ort der Reaktion. Bei einigen Reaktionen findet ein Großteil der Umsetzungen an der Oberfläche der Stärkekörner statt. In anderen Fällen werden innere Bereiche bevorzugt umgesetzt, hierbei müssen die Reagenzien zunächst durch die Oberfläche der Granula diffundieren. Bei diesen diffusionskontrollierten Reaktionen werden die Stärkemoleküle in den amorphen Regionen stärker umgesetzt als in den kristallinen. In Wachsmais- und Sorghumstärke existieren sogar Kanäle, die mitunter zu inneren Kavitäten im Stärkekorn führen. Die Stärkemoleküle in diesen Teilen sind für einige Reagenzien leichter zugänglich und reagieren somit zuerst [52 - 55].

3.1.3 Die Komponenten Amylopektin und Amylose

Stärke besteht hauptsächlich aus zwei Polysaccharid-Fractionen, welche getrennt isolierbar sind. Beide sind aus α -D-Glucose aufgebaut, unterscheiden sich aber in Größe und Struktur. Die Glucose liegt in der 4C_1 -Form vor und wird als Monomerbaustein von Polyglucanen auch manchmal als Anhydroglucose-Einheit (AGE) bezeichnet, da sie durch die Summenformel $C_6H_{10}O_5$ repräsentiert wird.

Amylopektin

Amylopektin ist das größte existierende Biopolymer, seine Molmasse kann von mehreren Millionen bis zu Milliarden Dalton reichen. Das α -1,4-verknüpfte Makromolekül ist über α -1,6-glycosidische Verknüpfungen zu ca. 5 % verzweigt. Gegenwärtige Modelle beschreiben die Feinstruktur als eine buschartige Verknüpfung von verschiedenen linearen Fragmenten. Diese Ketten lassen sich zwei ungefähr gleichverteilten Populationen zuordnen. Anhand der relativen Lage innerhalb der makromolekularen Struktur wird zwischen A- und B-Ketten unterschieden. Die A-Ketten sind unverzweigt und über eine einzelne Verknüpfung mit den B-Ketten verbunden. Die B-Ketten können mehrere Verzweigungen tragen. Jedes Amylopektinmolekül besitzt noch eine C-Kette, welche das einzige reduzierende Ende trägt. Eine größenchromatographische Untersuchung der Ketten ergibt eine bimodale Verteilung, in welcher die erste Fraktion, die aus A-Ketten und kleinen B-Ketten besteht, einen mittleren Polymerisationsgrad (DP) von 15 Glucosebausteinen aufweist und die zweite Fraktion, die von längeren B-Ketten gebildet wird, einen durchschnittlichen DP von ca. 45 Glucoseresten hat [45, 48, 56, 57]. Strukturell und funktionell betrachtet ist das Amylopektin die wichtigere Fraktion,

denn es ist schon allein in der Lage die komplexen Stärkegranula zu bilden. Nahezu reines Amylopektin kann aus Wachsmaisstärke gewonnen werden, d.i. Pflanzensorte, in der durch Züchtung der Amylosegehalt auf nahezu null Prozent gebracht worden ist. Es existieren noch eine Reihe anderer wachsiger Stärkesorten, wie z.B. Wachtreisstärke. Daneben gibt es neuere Genotypen, in welchen teilweise durch Antisense-Techniken verzweigende oder entzweigende Enzyme zur Erzeugung amylopektin-reicherer bzw. amylose-reicherer Stärkefraktionen ausgeschaltet wurden, ferner die Phosphorylase zur Reduzierung des Phosphatgehaltes in Kartoffelstärke [44, 58]. Auf diese Weise konnte erstmals eine amylosefreie Kartoffelsorte erzeugt werden. In der folgenden Abbildung wird das derzeit gültige Strukturmodell für Amylopektin schematisch dargestellt.

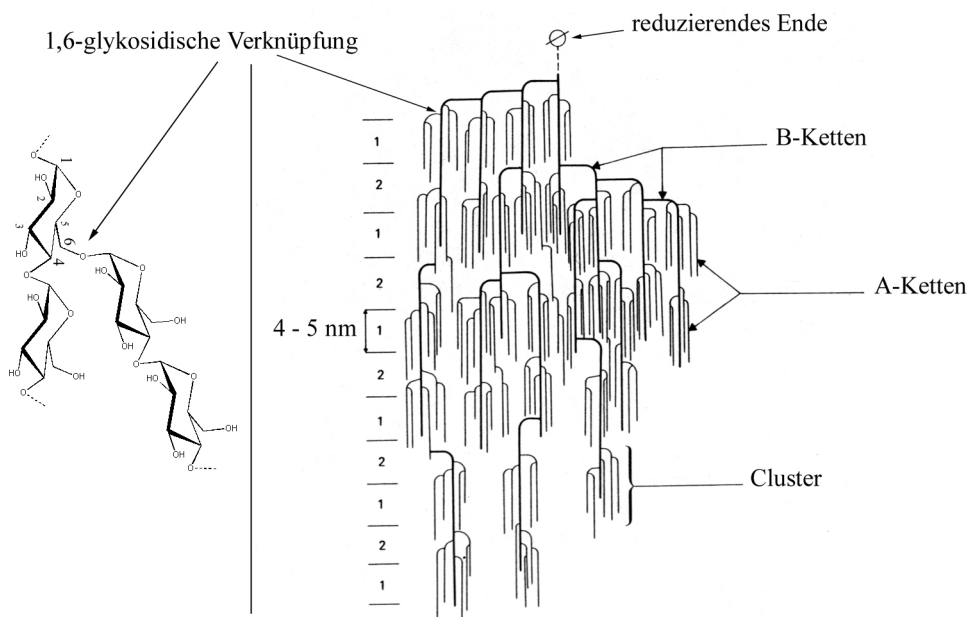


Abb. 3-5. Amylopektinmodell [39, 59].

Amylose

Die Amylose ist die niedermolekulare Polysaccharid-Fraktion der Stärke. Sie hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 10^5 bis 10^6 . Die Glucosereste sind in der Amylose überwiegend 1,4-glycosidisch verknüpft. Eine vollständig lineare Amylose existiert nicht, denn sie weist stets in geringem Maße 1,6-glycosidische Verzweigungen auf [60]. Amylose bildet mit Lipiden und vielen anderen Substanzen stabile Komplexe, indem sie solche Stoffe in einer helikalen Struktur einschließt [39, 42, 48, 49]. Die altbekannte Blaufärbung von Stärkelösungen nach der Zugabe von elementarem Iod („Iod-Stärke-Reaktion“) beruht auf dem Vorkommen solcher Helices: Die Iod-Moleküle lagern sich kettenförmig ins Innere der Helix ein und nehmen durch Polarisierung ihrer Elektronenhüllen in dieser weitgehend nichtwässrigen Um-

gebung eine tiefblaue Farbe an. Stark verzweigte Polysaccharide färben sich mit Iod lediglich braun oder rotbraun. Ohne Komplexpartner kann die Amylose nur über kurze Strecken stabile Helixsegmente mit 6 bis 8 Glucoseeinheiten pro Windung bilden, so dass sich insgesamt eine knäuelartige Struktur in Lösung ergibt. Amylose bildet unterhalb von 80 °C keine stabile wässrige Lösung und fällt schließlich als kristalline Substanz aus. Dieser Prozess, der auf der Bildung von vielen intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beruht, wird in der Stärkechemie als Retrogradation bezeichnet.

Die Tabelle 3-3 gibt einen Überblick über die Eigenschaften von Amylose und Amylopektin.

Tab. 3-3. Eigenschaftsprofil von Amylose und Amylopektin.

	Amylose	Amylopektin
mittlere Molmasse	$10^5 \dots 10^6$ g/mol	$10^7 \dots 10^8$ g/mol
Verknüpfung	α -1,4-D-Glc (überwiegend)	α -1,4-D-Glc α -1,6-D-Glc
Überstruktur	nahezu linear	buschartig verzweigt
physikalische bzw. physikochemische Eigenschaften	ausgezeichnete Filmbildung, harte Filme	höhere Kleisterviskosität, sehr gute Filmbildung, weiche, viskose und verformbare Filme
	Fähigkeit zur Kristallisation	hohe Klebkraft, Bildung von klaren, durchsichtigen Kleistern
	Löslichkeit in Wasser erst oberhalb 124 °C	Löslichkeit in Wasser unter 100 °C
	Einschlussverbindungen mit organischen Substanzen und Iod	keine Einschlussverbindungen
	Blaufärbung mit Iod	schwache Iod-Reaktion (rot-braun)

3.2 Modifikationen von Stärke

Stärke kann auf vielfältige Art und Weise modifiziert werden. Sämtliche Modifikationen dienen der Anpassung an gewünschte physikalisch-chemische Eigenschaften: Veränderung der Gelatinisierungstemperatur, verändertes Retrogradationsverhalten bzw. erhöhte Löslichkeit (damit einhergehend eine Variation des polaren Charakters der Polysaccharide), verringerte Viskosität, gute Gefrier-Tau-Stabilität, modifiziertes Wasserbindungsvermögen [58]. Daneben spielen vor allem im Nahrungsmittelbereich Eigenschaften wie Geruchs- und Geschmacksneutralität sowie Aussehen bzw. Klarheit des hergestellten Gels bzw. des modifizierten Stärkekleisters (-paste) eine entscheidende Rolle. In der pharmazeutischen Industrie wird die Modifizierung teilweise zur Erzielung einer bestimmten pharmakologischen Wirkung durchgeführt. Eine Derivatisierung wird manchmal auch unternommen, um einen biologischen Abbau der Stärke zu verzögern oder zu verhindern. Die Tabelle 3-4 fasst die wesentlichen Gründe für eine Modifizierung von Stärken zusammen.

Tab. 3-4. Gründe und Ziele der Derivatisierung von Stärken.

Modifikation von Kocheigenschaften / Verkleisterung / Auflösetemperatur
Verhältnis Feststoff – Viskosität
Säure-, Hitze- und Scherstabilität von Lösungen
Verringerung der Retrogradation
Klarheit / Glanz / Textur von Gelen und Pasten
Erhöhung der Gefrier-Tau-Stabilität von Pasten / Gelen
Verringerung der Alterung von Pasten / Gelen
Erhalt der granulären Struktur
Filmbildungseigenschaften
Adhäsion / Kohäsion
Änderung des ionischen Charakters
Änderung des hydrophilen Charakters
Verminderung des biologischen Abbaus
Wirkstoffbindung

Man unterscheidet zwischen physikalisch sowie chemisch modifizierten Stärken. Bei der sogenannten vorgelatinisierten Stärke, wird die unbehandelte Stärke zunächst als Suspension oberhalb ihrer Gelatinisierungstemperatur erhitzt. Das Gel wird zu einem dünnen Film ausgerollt, getrocknet und anschließend zu einem feinen Pulver zermahlen. Ein anderes Verfahren beruht auf der Sprühtrocknung aus einer zuvor gelatinisierten Stärkesuspension. Vorgelatinisierte Stärke findet vor allem in der Lebensmittelindustrie breite Anwendung, wird aber auch in anderen industriellen Zweigen benötigt [39, 40]. Der Vorteil liegt in der erhöhten Quellbarkeit und Gelbildung in kaltem Wasser; solche „Instant-Gel“-Stärken werden beispielsweise bei Erzeugnissen wie Puddings oder Kuchenfüllungen benötigt, bei deren Herstellung zum Teil keine Gelatinisierung durch Erhitzen möglich ist.

Unter kontrollierten Bedingungen lässt sich Stärke säurehydrolytisch in Derivate umwandeln, die mit Wasser auch bei höheren Konzentrationen niedrigviskose Lösungen ergeben. Entsprechende Verfahren werden großtechnisch zur Herstellung sogenannter dünnkochender Stärken durchgeführt [61]. Das Produkt hat ein geringeres Molekulargewicht bzw. einen verminderten Polymerisationsgrad. In dispergierter Stärke werden größtenteils die α -1,4-Bindungen hydrolysiert, in granulärer Form hingegen sind diese Bindungen überwiegend in den kristallinen Regionen der Stärkekörner anzutreffen, dies führt zu einer verstärkten Hydrolyse der α -1,6-Verzweigungspunkte, weil der amorphe Bereich der Körner für einen Säureangriff am anfälligsten ist. Solche Stärken finden ihre größte Anwendung in der Lebensmittelindustrie sowie in Textil- und Papier-Manufakturen [61, 62].

Stärkemoleküle werden sowohl in freier als auch in granulärer Form chemisch modifiziert. Die gängigsten Methoden zur Derivatisierung sind vor allem die Säurebehandlung, die Oxidation, Veretherung von Stärke sowie die teilweise Vernetzung („Cross-Linking“) und die partielle Veresterung. Eine Vielzahl von Übersichtsartikeln und Monographien existiert zu diesem Thema [32, 41, 42, 63 - 71].

In Abb. 3-6 sind die unterschiedlichen Modifikationsmöglichkeiten von Stärken zusammengestellt.

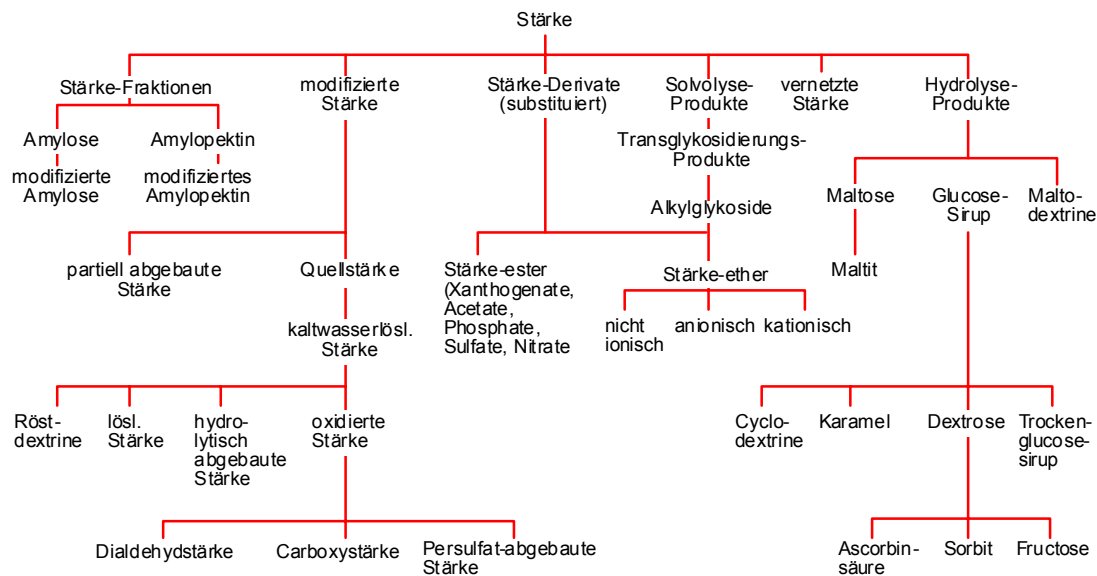


Abb.: Übersicht über aus Stärke zugängliche Produkte

Abb. 3-6. Übersicht über aus Stärke zugängliche Produkte [38].

3.2.1 Stärkeether

Veretherungen von Stärken an den Hydroxylgruppen sind prinzipiell nach den für niedermolekulare Alkohole üblichen Reaktionen, die keine oder alkalische Katalysatoren erfordern, möglich. Saure Katalysatoren sind bei Umsetzungen, die weitgehend polymeranalog verlaufen sollen, wegen der Labilität der glycosidischen Bindungen bei niedrigen pH-Werten ohnehin nicht einsetzbar. Technische Realisierung bei der Stärke-Veretherung finden hauptsächlich drei Methoden [63, 68]:

- die Williamson-Synthese unter nucleophiler Substitution von Verbindungen mit aliphatisch gebundenem Halogen
- die Anlagerung von Oxiranen (Epoxiden)
- die Michael-Addition aktivierter Olefine

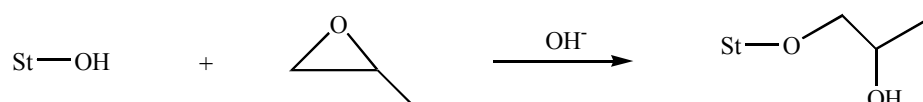
Diese Reaktionen verlaufen in Gegenwart von Alkali. Vollständige Umsetzung der Stärke wird selten angestrebt und erreicht, da bei der Stärkeether-Synthese in der Regel niedrige Substitutionsgrade zur Vermittlung von Kaltwasserlöslichkeit ausreichen. Abgesehen von Umsetzungen mit Halogen-Verbindungen sind katalytische Alkalimengen ausreichend.

Stärken werden überwiegend in heterogenen Systemen in drei technischen Verfahrensvarianten verethert [63]:

- durch Tempern eines Gemisches aus wasserarmer Stärke, Alkali und Veretherungsreagenz,
- durch Einwirkung des Veretherungsmittels auf Stärke in wässrig/alkalischer Suspension,
- durch Umsetzung des Polysaccharids in einem inerten organischen Lösungsmittel als Reaktionsmedium.

Nach der ersten Variante sind sowohl niedrig- als auch hochsubstituierte Produkte herstellbar, da die geringe Wassermenge des Reaktionsgemisches noch nicht zu einer Verkleisterung der Stärkederivate führt. Da aus prozesstechnischer und anwendungsbezogener Sicht granuläre Derivate bevorzugt werden, sind in wässriger Suspension nur Stärkederivate mit Substitutionsgraden bis ca. 0,1 problemlos zugänglich. Zur Vermeidung einer Gelatinierung des Substrates werden niedrige Reaktionstemperaturen gewählt, wässrige Natriumchlorid- oder Natriumsulfat-Lösungen als Suspensionsmittel eingesetzt und die Alkali-Konzentrationen möglichst niedrig gehalten [72]. In kaltem Wasser auch in Gegenwart von Salzen lösliche, höher substituierte Derivate der Stärke werden vorteilhaft in organischen Suspensionsmitteln, in der Regel mit Wasser partiell mischbare niedere Alkohole oder Ketone, synthetisiert, die die Substrate und deren Reaktionsprodukte nicht lösen oder zu stark anquellen [63]. Die Derivatisierung der Stärke kann auch in homogenen Systemen durchgeführt werden. Die Stärke wird dabei in Wasser oder einem organischen Lösungsmittel, z. B. in Dimethylsulfoxid, gelöst [68, 69]. Nachteilig und aufwendig bei dieser Verfahrensweise ist aber die Isolierung der Stärkederivate aus den meist hochviskosen Reaktionsgemischen.

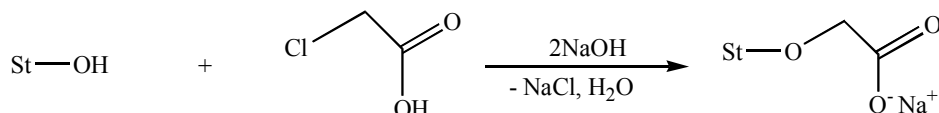
Von den Stärkeethern sind insbesondere Hydroxypropyl- und Hydroxyethylstärken am weitesten verbreitet [42, 73]. Beide werden mit unterschiedlichen Substitutionsgraden in großem Maßstab in der Papier- und Textilindustrie als Zusätze benötigt [62]. Aufgrund ihres Wasserbindevermögens und ihrer Kaltwasserlöslichkeit werden sie aber auch im Nahrungsmittelbereich vielseitig eingesetzt [40, 41]. Bei der Darstellung von Hydroxypropylstärken wird üblicherweise die Stärke mit Propylenoxid unter Basenzugabe umgesetzt („St“ steht für Stärke) [74]:



Auf analoge Weise lassen sich durch Umsetzung mit Ethylenoxid Hydroxyethylstärken erhalten. Speziell angepasste Hydroxyethylstärken dienen im klinischen Bereich als Plasmaersatzmittel (siehe Abschnitt 1.2.3). Die Kaltwasserlöslichkeit von Hydroxyalkylstärken wird dadurch erklärt, dass die Einführung der Hydroxyalkylgruppen die native Struktur des Amy-

lopektins förmlich aufbläht und somit eine Reaggregation der Makromoleküle durch die aufgespreizten „Äste“ vermindert wird [7].

Die Klasse der Carboxyalkylstärken, welche in der Regel durch Williamson-Synthesen erhalten werden, wird in Abschnitt 6.2.1 noch ausführlicher beschrieben. Die gebräuchlichste Methode zur Darstellung ist ein „Slurry-Verfahren“, in welchem die granuläre Stärke in niederen Alkoholen, vorzugsweise in Isopropanol aufgeschlämmt und unter Basenzugabe mit Monochloressigsäure in einer S_N2-Reaktion gemäß Williamson umgesetzt wird [68, 69].



Tertiäre Aminoalkylether, quaternäre Ammoniumether und aminoethylierte Stärke sind sogenannte kationische Stärken [40], welche neben ihrem Hauptanwendungsgebiet in der Papierindustrie [62, 75, 76, 77] unter anderem als Bestandteil flüssiger Detergentien Verwendung finden, da sie neben der Aminofunktion zusätzlich hydrophobierende Gruppen aufweisen [78].

In den Bereich der Stärkeether fallen auch teilweise vernetzte Stärken. Umsetzungen mit Epichlorhydrin unter alkalischen Bedingungen führt zur Ausbildung intermolekularer Etherbrücken [41]. Stärke kann durch synthetische Makromoleküle gepfropft werden. Die entstehenden Pfropf-Copolymere sind verzweigte Makromoleküle deren Rückgrat die Stärke ist. Für die Polymerisation kommen unter anderem Acrylamid, Acrylnitril oder Methacrylsäure in Betracht [40, 79]

3.2.2 Stärkeester

Mit der Veresterung von Stärken werden prinzipiell ähnliche Ziele verfolgt wie mit den bisher besprochenen Derivatisierungen [41, 63, 67 - 71]:

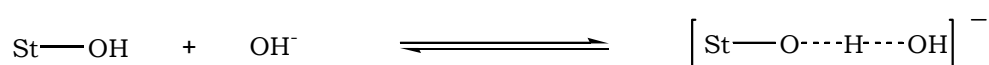
- Erniedrigung der Gelatinisierungstemperatur
- Erhöhung der Lösungsstabilität der natürlichen Polymeren
- Einführung hydrophilierender bzw. hydrophobierender ionischer oder nichtionischer Gruppen zur Veränderung der Polarität der Polymeren

Die bei Reaktionen von Stärken mit unterschiedlichen Carbon- und Mineralsäurederivaten anvisierten Substitutionsgrade orientieren sich an diesen Zielen. Es wurden sowohl sehr niedrig als auch sehr hoch veresterte Produkte synthetisiert, von denen größtenteils nur die zuerst genannten technische Bedeutung erlangt haben [63]. In der Regel setzt ein glatter Vereste-

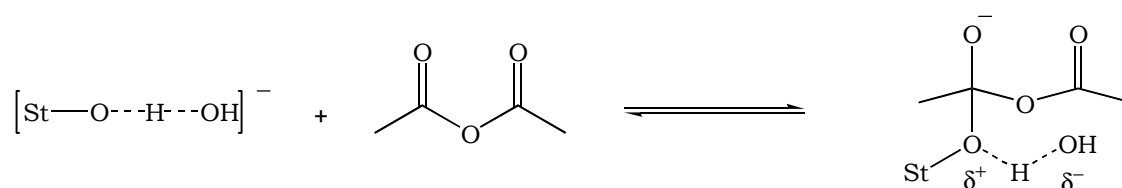
rungs-Verlauf eine Vorbehandlung der Stärke, z. B. durch Erhitzen in Wasser oder wässrigem Pyridin [68] wie auch in Ammoniak [80] zur Erhöhung ihrer Reaktivität voraus.

Die technisch bedeutendsten organischen Stärkeester sind die Acetate; sie werden unter breiter Variation des Substitutionsgrades hergestellt. Schwach veresterte Acetate mit Substitutionsgraden bis ca. 0,5 sind durch Einwirkung von Acetanhydrid oder Vinylacetat [81] auf Stärke in wässriger Suspension zugänglich:

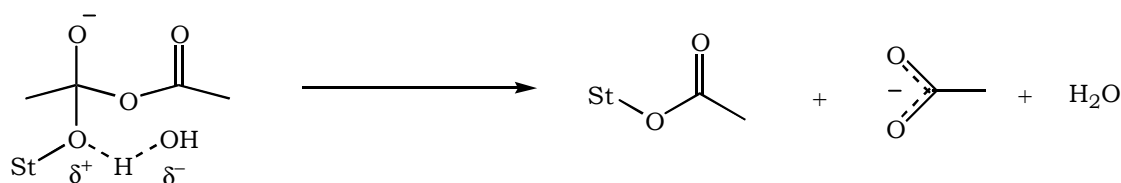
In wässriger Suspension wird durch zugeführte Hydroxidionen die Nucleophilie der Sauerstoffatome der Stärkehydroxygruppen durch eine teilweise Deprotonierung erhöht. In der Literatur [63, 68] wird dieser Vorgang auch als Bildung eines sogenannten „Stärke-Alkali-Komplexes“ bezeichnet.



Der starke nucleophile Charakter dieses „Komplexes“ führt zu einem beschleunigten Angriff auf das Anhydrid.



Das sich bildende Gleichgewicht wird durch die Elimination des resonanzstabilisierten Acetatians und eines Moleküls Wasser zur Produktseite hin verschoben.

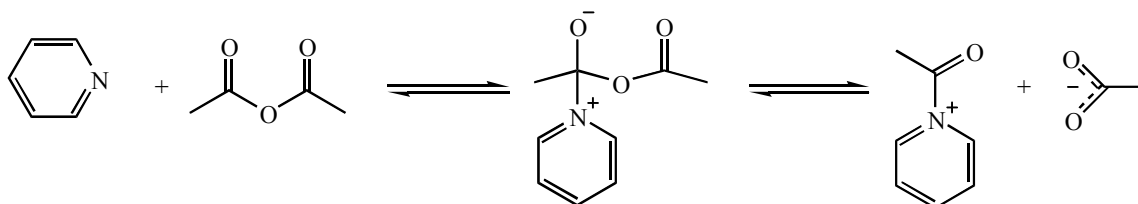


Die Umsetzung mit dem Anhydrid verläuft mit Substitutionsausbeuten bis zu 70 %, wenn das Veresterungsreagenz der Stärkesuspension bei 20...25 °C und pH-Werten von 8,5...10,0, die durch kontinuierliche Zugabe verdünnter Natronlauge konstant gehalten werden, langsam zudosiert wird. Bei zu hohen pH-Werten wird zum einen das zugeführte Anhydrid hydrolysiert und zum anderen setzt die Verseifung des sich bildenden Stärkeesters ein.

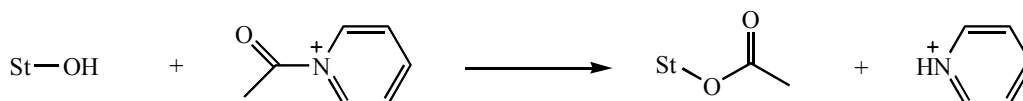
Acetate mit hohem Substitutionsgrad resultieren aus der Veresterung von in organischen Lösungsmitteln suspendierten Stärken mit Acetanhydrid in Gegenwart basischer Katalysatoren. Bevorzugtes Suspensionsmittel für die Stärke-Acetylierung ist Pyridin. Über die Variation der

Anhydrid-Menge oder der Reaktionszeit lassen sich in diesem Lösungsmittel Produkte mit breit gefächerten Substitutionsgraden synthetisieren.

Pyridin dient bei der Umsetzung von nativer granulärer Stärke einmal zur Reaktivitätssteigerung der Stärkekörner und zum anderen als Katalysator für die Reaktion, in deren Verlauf ein reaktives Acylpyridinium-Ion als Intermediat entsteht.



Durch die erhöhte Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms wird der nucleophile Angriff der Stärke-Hydroxygruppen erleichtert, das anschließend abstrahierte Proton wird von Pyridin als Base aufgenommen.

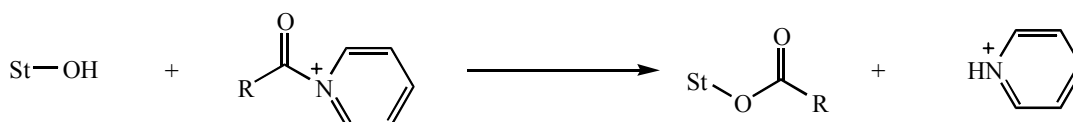
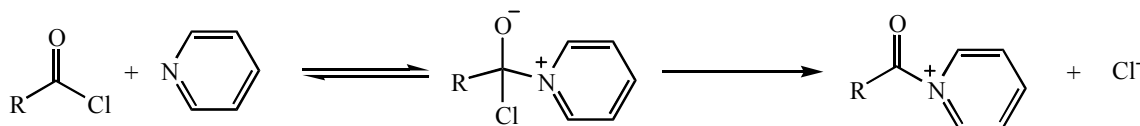


Es ist üblich im Überschuss mit Pyridin zu arbeiten, es dient dann ebenfalls als Lösungsmittel wenn die Stärke ausreichend genug acetyliert ist. Benutzt man Formamid als Lösungsmittel, so ist es möglich die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin von Anfang an in einem homogenen System durchzuführen.

Stärkeester höherer Fettsäuren [82 - 85]

Ester der Stärke mit höheren Fettsäuren werden bevorzugt mit Anhydriden oder Chloriden dieser Carbonsäuren als Acylierungsmittel in Gegenwart von Pyridin hergestellt.

Der Einsatz von Säurechloriden erfordert wegen freiwerdendem Hydrogenchlorid den Einsatz von Basen; die am häufigsten eingesetzte Base ist das Pyridin. Der Mechanismus verläuft ähnlich wie oben über die Bildung eines reaktiven Acylpyridinium-Ions:



Bei den niederen Fettsäuren wird in der Regel das Anhydrid der Säure eingesetzt, bei den höheren Fettsäuren ist die Präparation der Säurechloride der oftmals leichtere Weg. Säurechloride werden auch häufig zur Synthese von Stärkebenzoaten und Stärke-p-toluolsulfonaten eingesetzt [68, 80, 86].

Mit einigen Fettsäuren sind auf diesem Wege sehr hohe Substitutionsgrade erreichbar; es wurden Triester aus Maisstärke und Propansäure, Butansäure, Decansäure und Hexadecansäure gewonnen. Die Eigenschaften der Fettsäureester werden wesentlich von der Kettenlänge des Säurerestes geprägt. Mit einigen Fettsäuren ist gerade bei amyloseichen Stärken der erreichbare Substitutionsgrad begrenzt. Dies wird durch die helicale Struktur der Amylose und der dadurch bedingten sterischen Hinderung, der unterschiedlichen Reaktivitäten der Hydroxygruppen der Glucoseeinheiten und dem durch die eingeführten Acylgruppen bewirkten Abschirmungseffekt begründet.

Fettsäureester lassen sich durch Einwirkung von Acylchloriden auf Alkali-Stärken in einer Schotten-Baumann-Reaktion [68, 87, 97, 98] oder durch basenkatalysierte Umesterung von Stärke mit den Methylestern langkettiger Carbonsäuren gewinnen. Bei dem letzteren Verfahren gelangten Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für das Polysaccharid und Natriummethanolat als Katalysator bei Temperaturen von 80...100 °C zum Einsatz.

Gleichzeitige oder nacheinander erfolgende Umsetzung von Stärke mit zwei oder mehr Carbonsäurederivaten führt zu den entsprechenden Mischestern [88]. Über die Art und Menge bei der Mischveresterung eingesetzten Säuren lassen sich die Eigenschaftsbilder der Stärkeester gezielt variieren [89]. Des Weiteren existieren noch einige Verfahren zur Darstellung von Stärkeestern aus aromatischen Carbonsäurederivaten [85]. Stärkeester aus Anthranilsäurederivaten werden in der Papierindustrie angewendet [76, 77]. Als bioabbaubare Mikropartikel wurden Acryloyloxystärken diskutiert [83, 87].

Stärkeester von Di- und Tricarbonsäuren [35, 89 - 92]

Veresterungen von Stärke mit Di- oder Tricarbonsäuren sind in der Regel auf Umsetzungen des Polysaccharids mit den inneren Anhydriden dieser Carbonsäure beschränkt, da deren Chloride naturgemäß potentielle Vernetzungsmittel für das natürliche Polymere sind. Erhalten werden Produkte mit einer bzw. zwei Carboxylgruppen je Ester-Rest, die insbesondere in der Salzform stark hydrophilierend wirken. Signifikante Beeinflussungen der Lösungseigenschaften der Stärke werden daher schon bei niedrigen Veresterungsgraden erzielt.

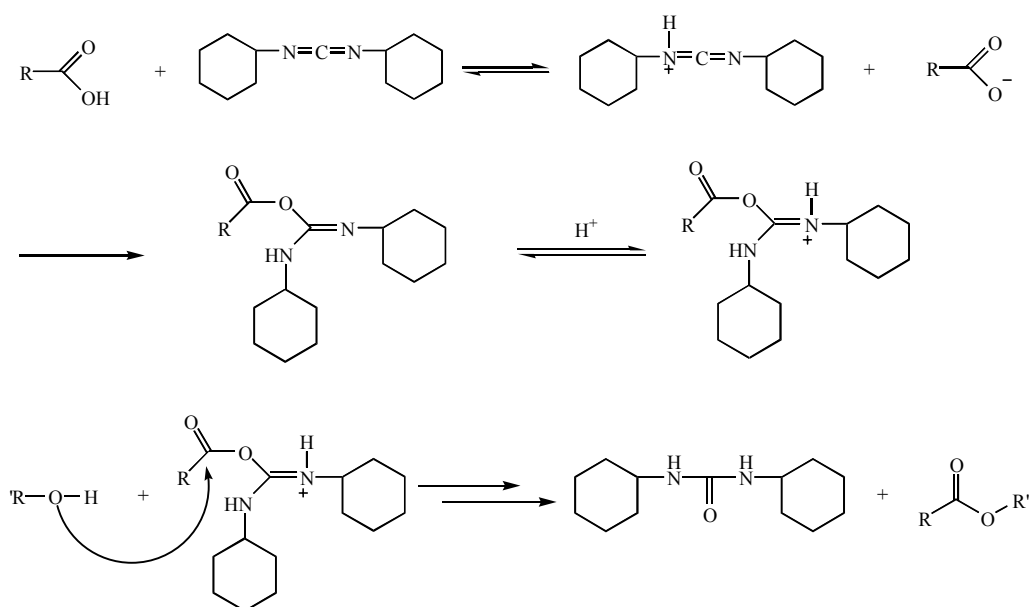
Hauptsächlich verwendete Anhydride mehrbasischer Carbonsäuren sind die der Bernsteinsäure, Alkenylbernsteinsäure, Maleinsäure, Zitronensäure und Phthalsäure. Stärkesuccinate werden sowohl im Festbettverfahren, bei denen Stärke mit Bernsteinsäureanhydrid gemischt und bei 100...150 °C derivatisiert wurde, als auch in wässriger Suspension oder in Lösung hergestellt. Das Lösungsverfahren ermöglicht die problemlose Herstellung hochsubstituierter Produkte. Besonderes Interesse haben Alk(en)ylbernsteinsäureester der Stärke gewonnen, denen die Kombination aus hydrophober Alk(en)yl- und hydrophiler Carboxylgruppe quasi Ten-

sidcharakter verleiht, Einsatzmöglichkeiten als polymere Emulgatoren eröffnet und hohe Lösungsviskositäten vermittelt [78]. Für die Herstellung von Stärkecitratn wurden Festbettverfahren beschrieben, bei denen Stärke unterschiedlichster Provenienz mit partiell neutralisierter Zitronensäure bei Temperaturen oberhalb 100 °C zur Reaktion gebracht werden [93, 85]. Die Zitronensäure wird dabei als Ammoniumsalz oder als wässrige Lösung, deren pH-Wert auf 4...6,5 eingestellt wird, eingesetzt. Durch diese Maßnahme wird ein Stärkeabbau während der Veresterungsreaktion, bei der Vernetzungen der Polysaccharid-Moleküle kaum vermeidbar sind, minimiert. Die erzielten Substitutionsgrade sind bei dieser Methode jedoch sehr gering.

Stärkeester via Carbodiimid-Kopplung

Eine Möglichkeit der schonenden Veresterung von Alkoholen mit Carbonsäuren ist der Einsatz von wasserabspaltenden Reagenzien wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Carbodiimide finden vielfältigen Nutzen in der präparativen organischen Chemie, insbesondere zur Wasserabspaltung bei Peptid-Synthesen, Oligonucleotid-Synthesen und in der Heterocyclen-Synthese [94, 95, 96].

Der Mechanismus ist dem einer nucleophilen Substitution vergleichbar. Aus der eingesetzten freien Säure und dem DCC entsteht zunächst unter Addition ein isolierbares O-Acylisoharnstoffderivat, welches aufgrund der erhöhten Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms gegenüber nucleophilen Angriffen durch Alkohole oder Thiole zugänglicher ist.

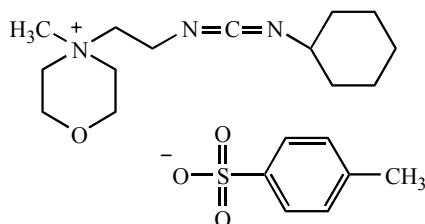


Die Esterbildung im letzten Schritt wird von der Ausfällung von schwerlöslichem Dicyclohexylharnstoff (DHU) begleitet.

Die Reaktion kann auf eine Vielzahl von Säuren und Alkoholen angewendet werden. In der Regel wird sie in aprotischen apolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Diethylether, Tetrahydrofuran und Acetonitril durchgeführt. Die Effizienz der Carbodiimidmethode kann

durch Zugabe anderer Katalysatoren wie z.B. 4-Dialkylaminopyridine, diverser Phosphororganen und Säuren um ein wesentliches erhöht werden.

In der Biochemie sind bei der Darstellung von Peptiden und Oligonucleotiden in wässriger Lösung wasserlösliche Carbodiimid-Derivate wie beispielsweise N-Cyclohexyl[-N'-(2-(N-methylmorpholino)-ethyl)-carbodiimid-4-toluolsulfonat als aktivierendes Reagenz zur Anwendung gekommen.



Hierdurch konnten die Synthesen von wasserlöslichen Peptiden auf einfachen Wegen in einem homogenen System durchgeführt werden. Carbodiimid-Varianten werden auch benutzt, um an bereits funktionalisierte Polysaccharide wie beispielsweise Carboxymethylstärken Wirkstoffe oder Komplexbildner zu binden, hierbei wird häufig das wasserlösliche N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) eingesetzt [10]. Ansonsten existiert wenig Literatur über den Einsatz von Carbodimiden bei Veresterungsreaktionen von Stärken. Bei der Phosphorylierung von Amylose unter milden Bedingungen wird die Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid in Verbindung mit β -Cyanoethylphosphat in Pyridin beschrieben [99].

3.3 Anwendungen von Stärken und Stärkederivaten

Ursprünglich ein normales Produkt der Landwirtschaft hat Stärke als „nachwachsender Rohstoff“ heute eine große Bedeutung erlangt. Die Zahl der Stärke enthaltenden oder auf Stärke basierenden Produkte ist beträchtlich und wächst stetig. Derzeit sind bereits über 600 verschiedene Anwendungen von Stärke etabliert. Aufgrund der biotechnologischen und chemischen Modifikationsmöglichkeiten übertrifft sie in ihrer industriellen Nutzung die Cellulose [100]. Der größte Konsument von Stärkeprodukten ist die Nahrungsmittelindustrie, derzeit wird etwas mehr als die Hälfte der produzierten Stärke in Nahrungsmitteln verarbeitet. Ein weiterer großer Anteil entfällt auf die Papierherstellung sowie die übrige technische Industrie. Ebenfalls ergeben sich eine Vielzahl von Anwendungen im pharmazeutischen Sektor. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über den Verbrauch von Stärkeprodukten in Europa für das Jahr 1998. Der Gesamtverbrauch lag bei ca. 7,5 Millionen Tonnen [101].

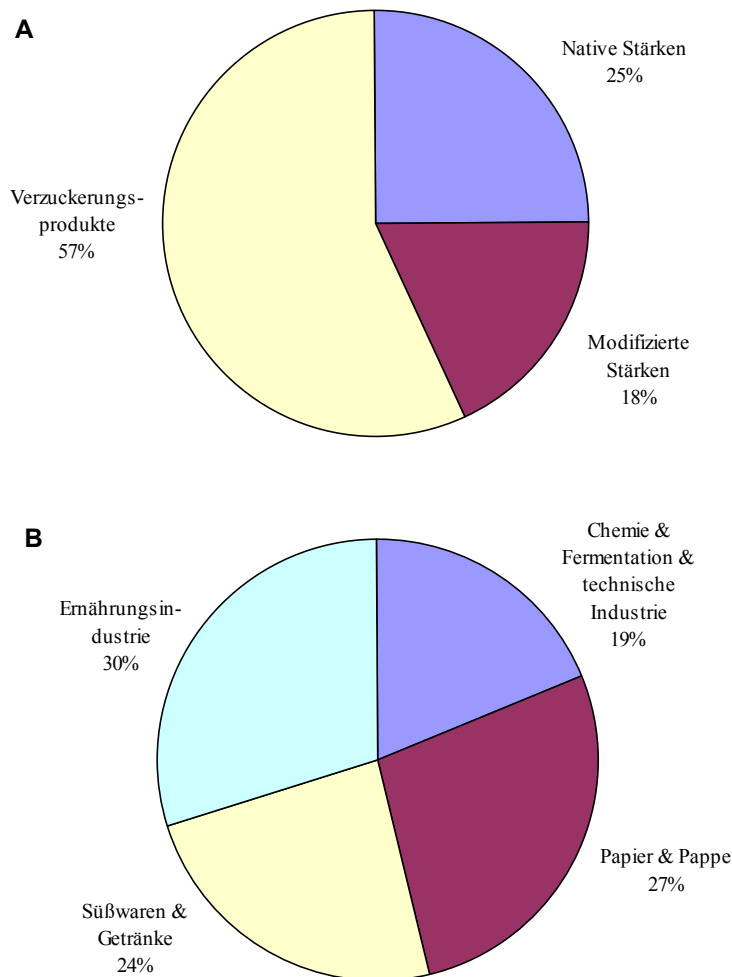


Abb. 3-7. Verbrauch von Stärkeprodukten in Europa 1998. A: Anteile pro Produktgruppe. B: Anteile pro Sektor. Gesamtverbrauch ca. 7,5 Mio Tonnen.

Unveränderte (native) Stärke findet ihre größte Verwendung im Nahrungsmittelbereich, sei es als Reinprodukt oder als Bestandteil von Getreide und Kornerzeugnissen. Stärke ist ein Rohstoff zur Produktion von Stärkesirup. Die Stärkeverzuckerung wird heute fast ausschließlich durch den kombinierten Einsatz von stärke-spezifischen Hydrolasen durchgeführt. Als Produkte werden sirupöse Pasten mit unterschiedlichen Dextroseequivalenten erhalten, welche direkt weiter verarbeitet werden. Den größten Einsatz finden sie bei der Herstellung von Getränken und Süßwaren [101]. Durch zusätzliche Behandlung mit Isomerasen werden Sirupe erhalten, die mit einem Gehalt von 42 % Fructose und etwa 54 % Glucose dem Invertzucker sehr ähnlich sind. Spröder, fester Stärkezucker, wird unter anderem zur Herstellung fester Zuckerwaren benötigt.

Alternativ kann Stärke fermentiert werden, um Ethanol oder andere industrielle Chemikalien zu gewinnen [100]. In diesem Zusammenhang sind auch die technisch immer bedeutsameren Cyclodextrine zu nennen [102]. Neben dem kalorischen Aspekt wird Stärke größtenteils als Verdickungsmittel und Gelbildner angewandt. Stärke dient der Herstellung von Kleistern und Klebstoffen sowie als Papierhilfsmittel z. B. zum Verleimen des Papiers. In der Papierindustrie dienen derivatisierte Stärken der Verbesserung der Papieroberflächeneigenschaften und verhindern beispielsweise ein Auslaufen der Tinte beim Bedrucken oder Beschriften [103]. In der Textilindustrie ist Stärke Bestandteil von Appreturen [104]. Eine Mischung aus Kartoffel- und Mais- oder Getreidestärkederivaten wird zum „Schlichten“ von Textilien eingesetzt, ebenso ist Stärke ein „Steifungsmittel“ für Wäsche. Polyanionische Stärken wie Carboxymethylstärke dienen in Waschmitteln als Schmutzaufnehmer [105]. Des Weiteren finden solche Derivate eine verbreitete Anwendung in der analytischen Chemie sowie als Komplexbildner für Schwermetalle in der Wasseraufbereitung [106]. Applikationen ergeben sich in der Film- und Faserindustrie [107] und im gesamten Bereich von geformten Produkten (Plasten, Schäume, etc.) [108]. In der Erzaufbereitung und der Erdölbohrung werden Stärkederivate als Flokkungsmittel und Stabilisator von Spülflüssigkeiten verwendet. Anwendung findet Stärke auch in Farben und Baustoffen [109, 110]. Stärke wird unter anderem den Kunststoff-Formulierungen beigemischt, um „bioabbaubare“ Materialien zu erhalten [111]. In der pharmazeutischen Industrie wird Stärke als Tablettenbindemittel oder zur Retardierung, Pharmakomodulation oder als Trägersystem von Wirkstoffen verwandt [8, 11, 12, 112, 113, 114]. Reisstärke und Stärkederivate werden in der Kosmetik zur Herstellung von Pudern gebraucht. Die obigen Beispiele sind nur ein kleiner Ausschnitt aus dem breiten Spektrum der möglichen Anwendungen. Aufgrund des pharmazeutischen Hintergrundes der vorliegenden Arbeit werden in der abschließenden Tabelle nochmals die vielfältigen Verwendungen von Stärken und Stärkederivaten in Pharmazie und Medizin hervorgehoben.

Tab. 3-5. Anwendung von Stärken und Stärkederivaten in Pharmazie und Medizin [115, 116].

Bezeichnung, Verarbeitungs- und Darreichungsform	Stoffliche Basis	Beabsichtigte Wirkung
Pulver, Puder	Nativstärken (Mais, Weizen, Kartoffel, Reis), Formalin-St., ANM, HES, CES	Handschuhpuder, Wundstreupuder, Gleitmittel; Resorbierbarkeit
Granulate, Tabletten, Komprimierte, Kapseln	Nativstärken, Quellstärken, Stärkeether (CMS), (Cyclo)-Dextrine; Glucosesirup, Dextrose	Bindemittel, Sprengmittel, Wirkstoff-Schutz u. -Freisetzung, Mikroverkapselung
Salben, Pasten, Gele, feste Lösungen	Formalin-St., ANM, Stärkeether (CMS), Salben, Cremes, Dextrine, Stärkekleister	Dermatologia, fettfreie Salben, Cremes, Zahnpasten, Wirkstoff-Einschl. u. Freisetzung
Resorbierbare Schwämme u. Schäume	Gefrier-Koazervate, Verschäumungsprod. v. Nativstärken (Zusätze Gelatine, PVC, Wirkstoffe)	Sekretabsorption, innere Tamponaden, Wirkstoff-Applikationen, Implantate, Hämostatika, Resorbierbarkeit
Kontrastmittel, Infusionslösungen	Amylopektin, CMS, HES, HPS, Stärke u. Gelatine, Sorbitol, Iodamylosen; CMS-Konjugate	Sedimentationshemmung, Wirkstoffstabilisierung, Viskositätsregulierung, Nachweisbarkeit
Plasmaersatzmittel, Wirkstoff-, Mineralstoff-Träger	HES, HPS, CMS; Kartoffelstärke;	Blutvolumenergänzung, Injizierbarkeit, Pharmakamodulation
Stärkewirkstoffe, Arzneimittel, Antigene	Dialdehyd-, Dicarboxyl-Stärke, Stärke-Sulfate, Oxid. Stärkesulfate, Iod-Stärken, CMS, an Stärke gebundene Pharmaka	Entgiftung, Wunddesinfektion, Anti-Tuberculose-, Arteriosklerose-, Lipämie, Antitumor-Agens, Blutgerinnungshemmung (Heparinoid)

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Technische Daten

4.1.1 Der Synthesereaktor

Bei einer Vielzahl der in Abschnitt 4.4 erläuterten Synthesen wurde die Reaktionsführung in einem speziellen Reaktionsgefäß vollzogen. Dieser Reaktor ist in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt. Er stellt eine Eigenentwicklung dar und wurde in den Werkstätten der Universität Kassel angefertigt.

Das Reaktionsgefäß hat ein maximales Fassungsvermögen von ca. 1500 ml. Mit einem Laborrührwerk sind Ansatzgrößen mit einem Stärkeanteil von über 300 g durchführbar. Der doppelwandige Aufbau des Unterteils erlaubt eine exakte Temperaturkontrolle des Reaktionsgemisches über einen externen Thermostaten. Das Oberteil ist über einen Planschliff mit Teflondichtung und Spannklemmen mit dem Unterteil verbunden, im Oberteil befinden sich neben dem Gewinde für die Teflonhülse, welche den Glasrührer hält, drei kleine Normschliffe (NS 14,5) und ein großer Normschliff (NS 29) für den Aufsatz entsprechender Glasgeräte oder für das Einbringen zusätzlicher Messgeräte, wie beispielsweise pH-Elektroden oder Thermometer. Der Aufbau kann mit weiteren Messsystemen kombiniert werden; unter anderem konnte mit einem Drehmomentmessgerät der Firma IKA der rheologische Verlauf einer Reaktion „online“ gemessen werden (siehe Abschnitt 4.3.10 und 4.4.2).

Mit diesem Reaktionsgefäß sind reproduzierbare Synthesen unter definierten Bedingungen – wahlweise unter Schutzgas – mit hohen Ausbeuten sequentiell durchführbar.

Laborrührer:	Laborrührer Typ RZR, Fa. Heidolph
Drehmomentmessplatz:	Rührwerk, Eurostar Power con.visc, Fa. IKA Messsystem, Viscoklick VK 250 control, Fa. IKA PC-Steuerung über Labworldsoft 2.6
Thermostat:	Umwälzthermostat, Modell Thermomix 5 BU, Fa. B. Braun Melsungen AG
Teflongeräte:	PTFE-Mehrweg-Manschetten, Fa. Bohlender PTFE-Hülse, Fa. Bohlender PTFE-Spezialdichtung, Ø 10 mm, Fa. Bohlender

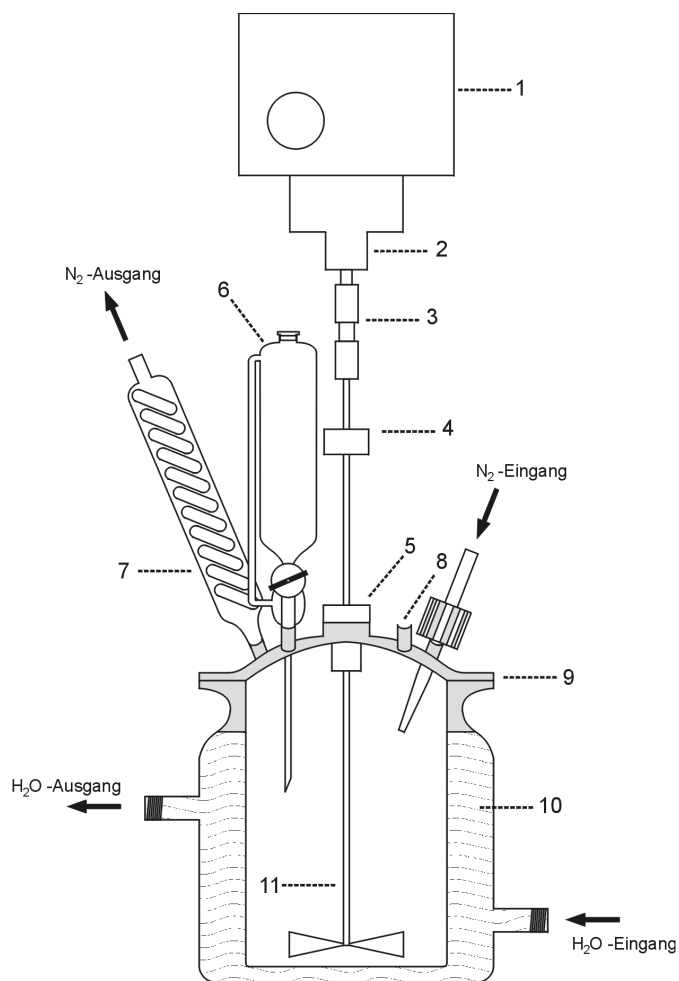


Abb. 4-1. Schematischer Aufbau des Reaktionsgefäßes.

1 Laborrührwerk, 2 Spannfutter bzw. Ansatz für Drehmomentmessgerät, 3 Kupplung, 4 Stabilisator (Teflon), 5 Teflonhülse mit Gummidichtung, 6 Tropftrichter NS 14,5 (Bsp.), 7 Rückflusskühler NS 14,5 (Bsp.), 8 NS 29, 9 Planschliff mit Teflondichtung, 10 Außenmantel, 11 Glasrührer mit Propeller.

4.1.2 Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden im NMR-Laboratorium der Universität Kassel mit einem Varian Unity Inova 500 MHz-Gerät von Herrn Dr. Martin Maurer aufgenommen. Das Gerät war ausgestattet mit einem 5 mm Breitbandprobenkopf. Bei allen Messungen wurden die ersten vier Messpunkte der FIDs durch „Linear Prediction“ korrigiert. Die Messfrequenz betrug 500 MHz bei ¹H-NMR-Experimenten und 125 MHz bei ¹³C-NMR-Experimenten. Eine Vielzahl der Spektren wurde unter Verwendung eines externen Standards (mit einem d₄-3-(Trimethylsilyl)-propionsäure Natriumsalz-Lösung (kurz TSP; 5,4 mg/ml D₂O) befüllten NMR-Innenröhrchens) referenziert (ohne Suszeptibilitätskorrektur). Bei wiederholten Messungen von Stärkederivaten und bei der Bestimmung von Substitutionsgraden und -mustern sowie bei Hochtemperaturmessungen wurde ohne externen Standard gearbeitet. Die hierbei

erhaltenen Spektren wurden indirekt referenziert. Bei einigen Messungen in D₂O wurde ein zu intensives HDO-Signal durch „Presaturation“ abgeschwächt.

Bei ¹³C-NMR-Messungen die der Quantifizierung von Signalen dienen sollten, wurde der NOE durch „Inversed Gated Decoupling“ (kurz IGATED) unterdrückt. Solche Messungen liefen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen bei hohen Akkumulationsraten über Nacht. Die ¹H-NMR-Spektren wurden in der Regel standardisiert mit 64 Scans bzw. 128 Scans pro Messung bei einer Aquisitionszeit von 6 s und einem Relaxationsdelay von 4 s mit einem 35°-Puls aufgenommen. Die Spektralweite betrug 5267 Hz (-0.9 bis +9.7 ppm).

Probenvorbereitung

Bei den standardisierten ¹H-NMR-Messungen wurden die aufgereinigten Stärken und Stärkederivate in 1 ml Lösungsmittel (i. Allg. D₂O) gelöst und anschließend in ein NMR-Röhrchen überführt, in welches gegebenenfalls zusätzlich ein Innenröhrchen mit externem Standard eingebracht wurde.

Es wurde besonders darauf geachtet, dass monomere Bestandteile und Salze durch vorherige Dialyse aus den Probensubstanzen entfernt wurden. War bei einigen Proben das HDO-Signal zu intensiv – und sollte auf „Presaturation“ dieses Signals verzichtet werden – so wurde die Substanz in D₂O aufgenommen, gelinde erwärmt, anschließend eingefroren und gefriergetrocknet. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis sich das HDO-Signal zufriedenstellend verkleinert hatte und somit weniger intensive, in enger Nachbarschaft befindliche Signale auswertbar wurden.

Wurden Stärkederivate mit ionisierbaren Seitengruppen vermessen, so wurde je nach gewünschter Signallage ein standardisierter pH-Wert von 1,0 bzw. 7,4 eingestellt. Die ¹³C-NMR-Spektren solcher Verbindungen erwiesen sich als weniger pH-sensibel und konnten ohne zuvorige pH-Einstellung aufgenommen werden.

Die Hochtemperaturmessungen wurden bei 70 °C durchgeführt, vor der Messung wurden die Probelösungen im Wasserbad auf 70 °C temperiert, damit sich das für den Messvorgang notwendige thermische Gleichgewicht schneller einstellen konnte.

Für eine vollständige Charakterisierung der Stärkeether und insbesondere den in dieser Arbeit synthetisierten Carboxymethylstärken war es notwendig, bei einem Teil der ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Messungen die Probensubstanz in ihre monomeren Bausteine säurehydrolytisch zu zerlegen. Hierzu wurden im Allgemeinen 100 mg Stärkederivat in ein kleines Glaskölbchen überführt und vorsichtig unter Schwenken mit 1 ml 25 %iger (v/v) D₂SO₄ in D₂O überschichtet. Das Glaskölbchen wurde dann mit einem Schliffstopfen fest verschlossen und zusätzlich mit Parafilm versiegelt. Nun wurde der Inhalt durch leichtes Schütteln vermischt und das Ganze wurde im Ölbad für fünf Stunden bei 90 °C erwärmt. Das so erhaltene bräunlich gefärbte Monomerenmisch wurde über eine sehr kleine D2-Glasfritte partikelfrei filtriert und anschließend in ein NMR-Röhrchen überführt und so direkt mit den jeweiligen Standardparametern (s.o.) vermessen. Die Konzentrationen aller Lösungen lagen in der Regel zwi-

schen 50 und 100 mg/ml Lösungsmittel; sofern nicht anders vermerkt, wurde als Lösungsmittel Deuteriumoxid verwendet.

Notation der spektroskopischen Angaben

Bei den ^1H -NMR-Untersuchungen der intakten Polymere wurden aufgrund der hohen Linienbreiten und vielfältigen Signalüberlagerungen chemische Verschiebungsbereiche zur Charakterisierung der Substanzen angegeben. Die für die entsprechenden Signale verantwortlichen Protonen und deren Anzahl wurden in Klammern aufgeführt.

Bei den ^1H -NMR-Spektren der Totalhydrolysate wurden neben der Signalzuordnung soweit möglich die entsprechende Multiplizität und die dazugehörigen Kopplungskonstanten mit angegeben. Bei den ^{13}C -NMR-Spektren wurden nur eindeutige und intensive Signale protokolliert, die Angabe der Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Kernen erfolgte ebenfalls in Klammern.

Bei der Auflistung der NMR-spektroskopischen Daten (in Abschnitt 4.4) wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett, m = Multiplett, nicht aufgel. = durch Überlagerung von mehreren Signalen nicht aufgelöster Spektralbereich, J = Kopplungskonstante, δ = chemische Verschiebung.

Bei den Zuordnungen wurden folgende Kurzschreibweisen verwandt:

Die in Klammern angegebenen Suffixe (u) und (s) kennzeichnen Signale, welche von unsubstituierten bzw. substituierten Glucose-Species stammen. Bei den ^{13}C -NMR Angaben werden die C-Atome gemäß der unteren Abbildung nummeriert. Bei den ^1H -NMR-Angaben gilt für die H-Atome die gleiche Zuordnungsnummerierung wie für die C-Atome. Bei Aufnahmen am intakten Polymer kennzeichnet die Angabe (1-4) bzw. (1-6) Protonen von 1-4- bzw. 1-6-glycosidisch verknüpften Glucosebausteinen. Die Suffixe (t), (α -r) und (β -r) kennzeichnen Protonen terminaler Glucosebausteine der nichtreduzierenden Enden sowie der reduzierenden Enden in α - oder β -Konfiguration. Die Nummerierung der Kerne wird nochmals durch die nachfolgende Abbildung einer Anhydroglucoseeinheit erläutert.

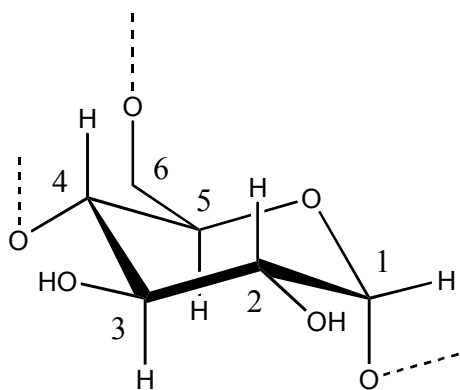


Abb. 4-2. Nummerierung der Kerne innerhalb eines Glucoseresestes.

Alle chemischen Verschiebungen (δ) wurden in ppm angegeben, die Angabe der Kopplungskonstanten (J) erfolgte in Hz. Sämtliche spektroskopische Daten wurden entgegen allen anderen Zahlenwerten aus gebräuchlichen Gründen in der englischen Dezimalschreibweise notiert.

4.1.3 FT-IR-Spektroskopie

Die IR-Messungen ausgewählter Stärkepräparate wurden an einem Spektrometer Modell FTS-40A der Firma BioRad durchgeführt.

Sämtliche Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

Number of Scans:	8
Delay:	10 s
Sampling:	UDR-2
Resolution:	8
Aperture:	open
Apodization:	triangular
Start WN:	4000
End WN:	500
Velocity:	5 kHz
Zero Fill:	1
Filter:	1,12 kHz
Laser WN:	15800,82
Igram Symetry:	single sided

Die Proben wurden in der Regel über ATR-Technik vermessen. Ein geringer Teil der IR-Spektren wurde mit Hilfe der diffusen Reflexionstechnik aufgenommen.

Für die ATR Messungen wurde das Spektrometer mit einer Einfachreflexions-Diamant-ATR-Einheit Modell Golden Gate der Firma Specac, GB ausgerüstet und zusätzlich zur Substanzfixierung mit einem Saphir-Anpressstempel versehen. Für die diffusen Reflexionsmessungen wurde ein entsprechender Adapter der Firma BioRad in den Strahlengang des Spektrometers eingesetzt.

Probenvorbereitung für die ATR-Aufnahmen bzw. diffuse Reflexionsmessungen

Bei der Methode der abgeschwächten Totalreflexion (engl. kurz ATR) besteht ein Vorteil darin, dass Stoffe vermessen werden können, welche unter anderem aufgrund mangelnder Durchlässigkeit nicht direkt in den Strahlengang gebracht werden können.

Die in dieser Arbeit synthetisierten und aufgereinigten Stärkeproben lagen prinzipiell als Lyophilisat mit einem papierähnlichen Habitus vor, welche sich äußerst schlecht mit herkömmlichen Probenpräparationsmethoden für die IR-Spektroskopie verarbeiten ließen (d.h. KBr-Pressling, Nujol-Bettung). Die ATR-Methode erwies sich insbesondere aufgrund der einfa-

chen Probenvorbereitung als optimal geeignet. Hierbei wurde eine geringe Menge des Lyophilisats mit einer Pinzette auf das Diamantfenster der ATR-Einheit gebracht, die Probe wurde mit dem drehmomentbegrenzten Anpressstempel fixiert und vermessen. Die resultierenden Spektren waren allesamt von guter Qualität und mussten lediglich hinsichtlich ihrer Signalintensitäten mittels eines ATR-Korrekturfaktors korrigiert werden.

Bei den diffusen Reflexionsmessungen wurde die möglichst fein zerteilte Probensubstanz in einen kleinen Probentiegel überführt, welcher bis zum Rand abschließend befüllt wurde. Der Probentiegel wurde in die vorgesehene Öffnung des diffusen Reflexionsadapters gestellt und das Spektrum wurde danach aufgezeichnet.

Notation der spektroskopischen Angaben

Bei der Angabe IR-spektroskopischer Daten in Abschnitt 4.4 wurden folgende Abkürzungen verwandt: $\bar{\nu}$ = Wellenzahl (in cm^{-1}), s = Bande mit starker Intensität, m = Bande mit mittlerer Intensität, w = Bande mit schwacher Intensität. In Einzelfällen wurden entsprechende Zuordnungen der jeweiligen Banden in Klammern mit angegeben.

4.1.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einiger ausgewählter Stärkeproben wurden am Rasterelektronenmikroskop des Fachbereichs Physik der Universität Kassel von Herrn Dr. Alexander Vollkopf durchgeführt.

Die Proben wurden in Form eines feingemörserten Pulvers auf ein doppelseitig klebendes Graphitpad mittels eines Pinsels aufgebracht, welches zuvor auf einem normalen Glasobjektträger zentral fixiert wurde. Das überschüssige Pulver wurde durch vorsichtiges Pusten entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in eine Metallbedampfungsanlage eingebracht und dort mit einer 5 nm dünnen Chromschicht bedampft. Die Präparate konnten so mit einer zufriedenstellenden Vergrößerung und ausreichendem Kontrast vermessen werden.

4.1.6 Sonstige Geräteangaben und technische Details

UV-VIS-Photometer

Zweistrahlphotometer Modell Uvikon 860, Fa. Kontron Instruments

Dialyse

Dialysiermembranschlauch: Typ Visking, regenerierte Cellulose, cut-off 10...20 kDa,
Fa. Roth

Dialysierschlussklemmen: Dichtungslängen 25 mm und 45 mm, Fa. Roth

Gefriertrocknung

Gefriertrocknungsanlage: Modell LDC-2, Fa. Christ

Sterilisation

Laborautoklaven: Typ Sanoklav, Fa. Schütt Labortechnik
Typ HST 4-5-6, Fa. Zirbus

Zentrifugen

Laborkühlzentrifuge: Typ RC5C, Fa. Sorvall Instruments
Rotor: Typ Sorvall GSA, Max. 13000 U/min, Fa. DuPont
Vakuum-Zentrifuge (SpeedVac): Vakuum-Konzentrator, Fa. Bachofer

Viskositätsmessung

Viskosimeter: Mikro Ubbelohde-Kapillarviskosimeter, Gerätekonstante
 $K = 0,009868 \text{ mm}^2/\text{s}^2$, Fa. Schott-Geräte

Einwegmaterialien

Spritzen: Sterican, Luer-Lock BL/LB, diverse Größen, Fa. B. Braun Melsungen AG
Kanülen: Omnifix, Luer, diverse Größen, Fa. B. Braun Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter: Minisart NML, Celluloseacetat, 0,2 μm , 0,45 μm , 0,8 μm , \varnothing 26 mm, Fa. Sartorius
Minisart plus, Celluloseacetat/Glasfaser, 0,2 μm , 0,45 μm , \varnothing 26 mm, Fa. Sartorius
Reagiergefäße: 1,5 ml, 3 ml, Fa. Sarstedt
Pipettenspitzen: 100 μl , 1000 μl , 5000 μl , Fa. Sarstedt
Dispenserspitzen: Stepper-Tips, Model 8100, 15 ml, 60 ml, Fa. Nichiryo
Einwegküvetten: 10 x 4 x 45 mm, 1 ml, 3 ml, Fa. Sarstedt

Glasgeräte

NMR-Röhrchen: Typ 507-PP-8, Fa. Wilmad
NMR-Innenröhrchen: Typ WGS-5-BL, Coaxial-Insert, Fa. Wilmad
Rollrandgläser: 75/23 mm, Vial-Rollrand mit Gummistopfen und Aluminiumkappe, 20 ml, Fa. Merck Eurolab GmbH
Schraubdeckelgläser: 75/27 mm, 71/21 mm, mit teflonbesch. Deckel, 16 ml, 30 ml, Fa. Merck Eurolab GmbH
sonstige Glasgeräte: Standardglasgeräte, Fa. Schott, Fa. Brand

4.2 Chemikalien

4.2.1 Chemikalien für die NMR-Spektroskopie

- Deuteriumoxid, Deuterierungsgrad 99,95 %, Fa. Deutero GmbH
- Dimethylsulfoxid-d₆, Deuterierungsgrad 99,95 %, Fa. Deutero GmbH
- Salzsäure-d₁ in Deuteriumoxid, Deuterierungsgrad 99,5 %, Fa. Deutero GmbH
- Natronlauge-d₁ in Deuteriumoxid, Deuterierungsgrad 99,5 %, Fa. Deutero GmbH
- Schwefelsäure-d₂ 98 Gew.% in Deuteriumoxid, Deuterierungsgrad 99,5 %, Fa. Deutero GmbH
- 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-d₄ Natriumsalz, Deuterierungsgrad 98 %, Fa. Merck Eurolab GmbH

4.2.2 Chemikalien für die Charakterisierungsmethoden

Bestimmung der Calciumkompatibilität von CMS-Lösungen

- Calciumchlorid-Dihydrat, reinst, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, zur intravenösen Infusion, Fa. B. Braun Melsungen AG

Bestimmung der pH-abhängigen Stabilität von Succinylstärkelösungen

- 5 N Natronlauge, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- 5 N Salzsäure, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, zur intravenösen Infusion, Fa. B. Braun Melsungen AG
- Natriumacetat, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Natriumcarbonat, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH

Nachweis der reduzierenden Enden mit Dinitrosalicylsäure

- 3,5-Dinitrosalicylsäure, zur Analyse, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- Kalium, Natrium-tartrat-Tetrahydrat, zur Analyse, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- Maltose-Monohydrat, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Natriumhydroxid, Microprills, Fa. Riedel-de-Haën

Titrimetrische Bestimmung des MS von Carboxymethylstärken

- 5 N Natronlauge, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- 5 N Salzsäure, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Carboxymethylstärke MS = 0,1, Emsize 60, Fa. Emsland-Stärke GmbH
- Methylrot-Mischindikator-Lösung, Fa. Fluka

- Salzsäure 32 %, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH

4.2.3 Chemikalien zur Synthese

Stärkerohstoffe/-derivate

- Dünnkochende Wachsmaisstärke, Fa. McGaw, USA
- Enzymatisch modifizierte Kartoffelstärke, Paselli SA 2, Fa. Avebe-Deutschland GmbH
- Hydroxyethylstärke 200/0,5, Fa. Ajinomoto, Japan
- Native Wachsmaisstärke, Fa. Knorr AG

Hydrolyse von Stärken

- 5 N Natronlauge, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- 5 N Salzsäure, Combi-Titrisol, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Pullulanase (EC 3.2.1.41), aus *Klebsiella pneumoniae*, Suspension in 3,2 M (NH₄)₂SO₄, Fa. Sigma-Aldrich GmbH

Reduktion der reduzierenden Enden von Stärken

- Natriumborhydrid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH

Synthese von Stärkeethern

- 4-Dimethylaminopyridin, purum, Fa. Fluka
- Chloressigsäure Natriumsalz, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Chloressigsäure, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Natriumhydroxid, Microprills, Fa. Riedel-de-Haën
- Triphenylchlormethan, purum, Fa. Fluka, Fa. Acros

Synthese von Stärkeestern

- (+)-Di-O-acetyl-L-weinsäureanhydrid 97 %, purum, Fa. Fluka
- 2,2-Dimethylbernsteinsäureanhydrid 98 %, zur Synthese, Fa. Acros
- 2,2-Dimethylglutarsäureanhydrid 98 %, zur Synthese, Fa. Acros
- 3,3-Dimethylglutarsäureanhydrid 99 %, zur Synthese, Fa. Acros
- 4-Dimethylaminopyridin, purum, Fa. Fluka
- Bernsteinsäureanhydrid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Chlorameisensäureethylester (Ethylchlorformiat), zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Diglykolsäureanhydrid (3-Oxaglutarsäureanhydrid) 90 %, techn., Fa. Fluka
- Dodecylbernsteinsäureanhydrid 95 %, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Essigsäureanhydrid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Glutarsäureanhydrid 95 %, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH

- N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Pivalinsäure, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Pivalinsäureanhydrid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Propionsäureanhydrid, zur Synthese, Fa. Merck Eurolab GmbH

4.2.4 Biochemikalien für enzymatische Untersuchungen und Umsetzungen

- Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3), aus *Aspergillus niger*, Lyophilisat, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- Enzym-Fertigtest für Bernsteinsäure (Succinat), UV-Test, Fa. R-Biopharm GmbH
- Enzym-Fertigtest für Essigsäure (Acetat), UV-Test, Fa. R-Biopharm GmbH
- Pullulanase (EC 3.2.1.41), aus *Klebsiella pneumoniae*, Suspension in 3,2 M (NH₄)₂SO₄, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- α-Amylase (EC 3.2.1.1) Typ iX-A, aus Humanspeichel, Lyophilisat, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- α-Amylase (EC 3.2.1.1) Typ VI-B, aus Schweinepankreas, Lyophilisat, Fa. Sigma-Aldrich GmbH
- β-Amylase (EC 3.2.1.2) Typ I-B, aus Süßkartoffel, Suspension in 2,3 M (NH₄)₂SO₄, Fa. Sigma-Aldrich GmbH

4.2.5 Chemikalien für die Herstellung physiologischer Lösungen

- 0,1 mol Natronlauge, Fixanal, Fa. Riedel-de-Haën
- 0,1 mol Salzsäure, Fixanal, Fa. Riedel-de-Haën
- Calciumchlorid-Dihydrat, reinst, Fa. Merck Eurolab GmbH
- D(+)-Glucose-Monohydrat, DAB, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, zur intravenösen Infusion, Fa. B. Braun Melsungen AG
- Kaliumchlorid, reinst, Fa. Merck Eurolab GmbH
- L-(-)-Äpfelsäure 97 %, zur Analyse, Fa. Sigma-Aldrich
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat, zur Analyse, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Natriumchlorid, reinst, Fa. Merck Eurolab GmbH
- Wasser für Injektionszwecke, Fa. B. Braun Melsungen AG

4.2.6 Lösungsmittel

Die verwendeten organischen Lösungsmittel hatten, sofern in Einzelfällen nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „zur Synthese“. Die Lösungsmittel wurden soweit erforderlich nach den üblichen Methoden absolutiert.

Bei Reaktionen in wässrigen Systemen und beim Ansetzen von wässrigen Lösungen wurde stets bidestilliertes Wasser verwandt.

4.3 Charakterisierungsmethoden

4.3.1 NMR-spektroskopische Bestimmung des Substitutionsgrades von Stärkeestern

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Stärkeestern wurde der molare Substitutionsgrad über $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. Hierzu wurden die Stärkeester in D_2O gelöst und wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben standardisiert vermessen. Betrachtet man das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von underivatisierter Stärke (siehe hierzu auch Abbildung 4-7 in Abschnitt 4.3.4) so liegt in dem Bereich von ca. 3.1 bis 4.2 ppm ein Multiplett-Signal mit hoher Linienbreite, welches durch die Protonen der bezüglich ihrer chemischen Umgebung sehr ähnlichen aber nicht identischen Anhydroglucoseeinheiten verursacht wird. Die Summe der equatorialen, anomeren Protonen an C-1 der Anhydroglucoseeinheiten (Abb. 4-2) verursachen ein breites Signal im Bereich von ca. 5.1 bis 5.5 ppm. Erfolgt eine Acylierung mit Carbonsäurederivaten, so wird in der Regel zumindest durch einen Teil des Acylrestes ein zusätzliches breites Signal im aliphatischen Bereich bei höherem Feld erzeugt. Können Teile des gebundenen Säurerestes separiert aufgelöst werden, so lässt sich nach der Signalzuordnung, durch entsprechende Verhältnisse der Signalintegrale der molare Substitutionsgrad (MS) bestimmen. Dabei ist darauf zu achten, dass evtl. auftretende Signale von Monomeren nicht mit integriert werden. Die sehr viel schärferen Peaks der monomeren Verunreinigungen können jedoch bei Bedarf separat integriert werden, um den Gehalt an freier Säure zu bestimmen (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3.12).

Die nachfolgende Abbildung 4-3 zeigt exemplarisch ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer Succinylstärke, die jeweiligen Integrale der Signalbereiche sind mit Großbuchstaben gekennzeichnet, hierbei steht A für das Integral über den Bereich von 5.1 – 5.5 ppm (anomere Bereich) und B für das Integral über den Bereich von 3.3 bis 4.1 ppm (restliche Protonen des Pyranoserings), C steht für den Integralbereich von 2.0 – 2.9 ppm (Methylengruppen des Succinylrestes).

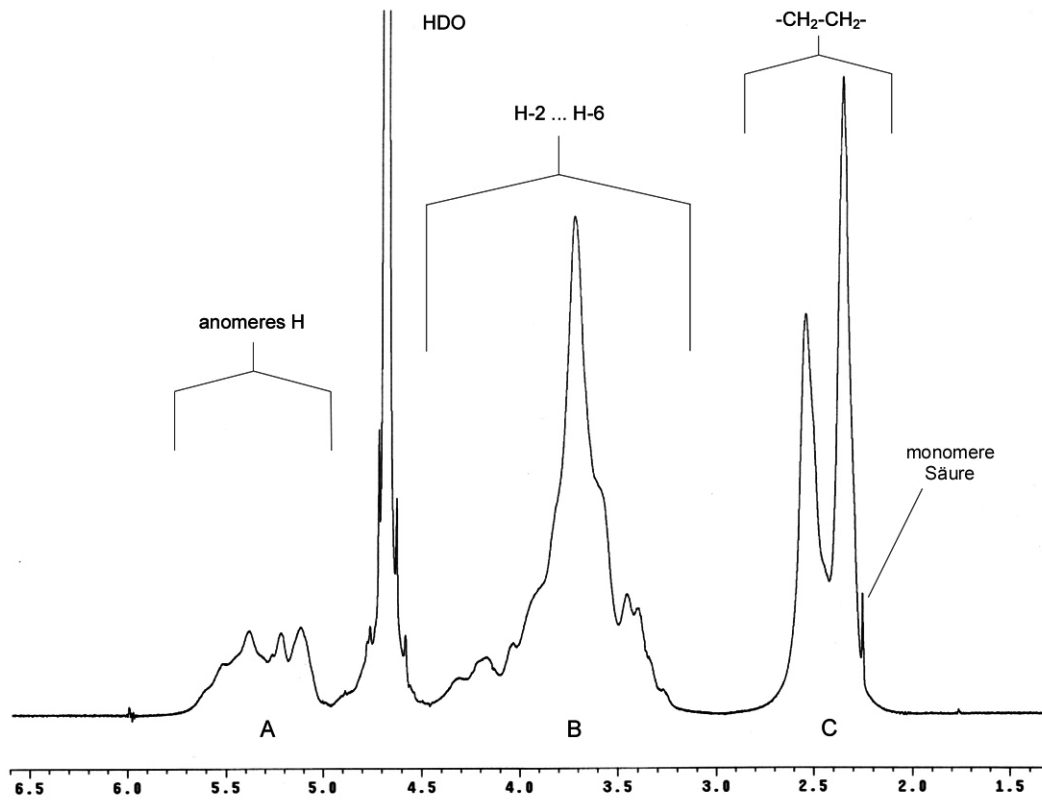


Abb. 4-3. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer Succinylstärke (5.8) in D_2O .

In der umseitigen Tabelle 4-1 sind die Verhältnisse und die Integrationsbereiche zur Berechnung der MS-Werte von den in dieser Arbeit synthetisierten Stärkeestern aufgeführt. Alle MS-Werte sind nur auf das Integral über den Signalfeld der anomeren Protonen (A) bezogen.

Tab. 4-1. Formeln zur Berechnung der MS-Werte von Acylstärken nach Integration der ¹H-NMR-Signale.

Stärkeester	Formel zur Berechnung von MS	Integrationsbereich C (Signale des eingeführten Substituenten)
Acetylstärke 3.1	$MS = \frac{C}{3A}$	<i>Methylgruppe des Acetylrests,</i> Integral von 1.8-2.2 ppm (3H)
Propionylstärke 4.1	$MS = \frac{C}{5A}$	<i>Ethylgruppe des Propionylrests,</i> Integral von 0.7-1.2 ppm und 2.1-2.7 ppm (Σ = 5H)
Pivaloylstärke 14.1	$MS = \frac{C}{9A}$	<i>t-Butylgruppe des Pivaloylrests,</i> Integral von 0.8-1.5 ppm (9H)
Succinylstärke 5.1, ... , 5.9	$MS = \frac{C}{4A}$	<i>Methylengruppe des Succinylrests,</i> Integral von 2.0-2.9 ppm (4H)
2,2-Dimethylsuccinylstärke 6.1	$MS = \frac{C}{8A}$	<i>2,2-Dimethylsuccinylrest,</i> Integral von 0.9-1.5 ppm und 2.3-2.8 ppm (Σ = 8H)
Dodecenylsuccinylstärke 7.1	$MS = \frac{C}{23A}$	<i>Dodecenylrest,</i> Integral von 0.5-2.0 ppm (23H)
Glutarylstärke 8.1	$MS = \frac{C}{6A}$	<i>Glutarylrest,</i> Integral von 1.5-1.9 ppm und 2.0-2.8 ppm (Σ = 6H)
2,2-Dimethylglutarylstärke 9.1	$MS = \frac{C}{10A}$	<i>2,2-Dimethylglutarylrest,</i> Integral von 0.7-1.4 ppm und 1.5-2.0 ppm und 2.2-2.6 ppm (Σ = 10H)
3,3-Dimethylglutarylstärke 10.1	$MS = \frac{C}{10A}$	<i>3,3-Dimethylglutarylrest,</i> Integral von 0.8-1.5 ppm und 1.9-2.3 ppm und 2.3-2.8 ppm (Σ = 10H)
Ethoxycarbonyl- /formylstärke 13.1	$MS_1 = \frac{C_1}{3A} \text{ bzw. } MS_2 = \frac{C_2}{A}$	<i>Ethoxycarbonyl- bzw. Formylrest,</i> C ₁ : Integral von 1.3-1.8 ppm (3H) C ₂ : Integral von 6.5-7.8 ppm (1H)

4.3.2 NMR-spektroskopische Bestimmung des Substitutionsgrades von Carboxymethylstärken

Die Ermittlung des molaren Substitutionsgrades von Carboxymethylstärken ist aufgrund von Signalüberlagerungen nicht über ^1H -NMR-Messungen am intakten Polymer möglich. Eine nichtinvasive Bestimmung ist nur über ^{13}C -NMR-Messungen unter Zuhilfenahme der Inversed-Gated-Decoupling-Technik möglich (siehe auch Abschnitt 4.1.2). Nach der Messung wird das Integral des separierten Carboxylsignals der eingeführten Carboxymethylgruppe bei ca. 180 ppm mit dem Integral des C-6-Signals der Anhydroglucoseeinheiten bei ca. 61 ppm in Relation gesetzt, dieses Verhältnis gibt den molaren Substitutionsgrad direkt wieder. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein solches ^{13}C -NMR-Spektrum einer Carboxymethylstärke mit den entsprechenden Zuordnungen.

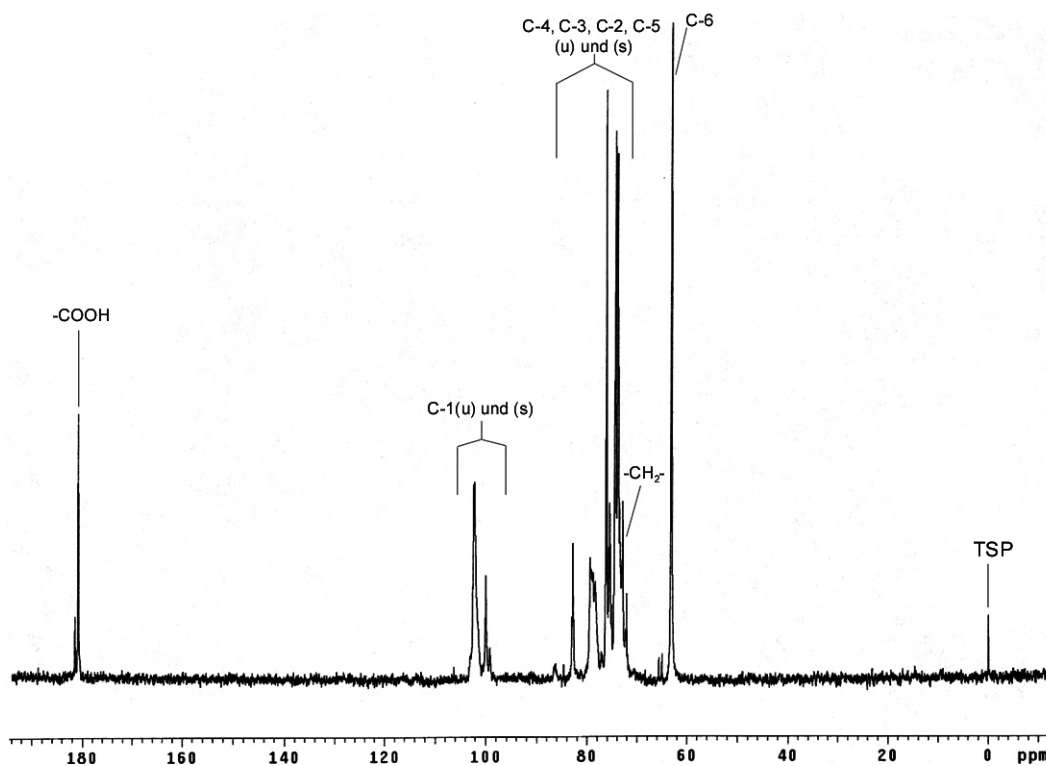


Abb. 4-4. ^{13}C -NMR-Spektrum (IGATED) einer Carboxymethylstärke (17.6) in D_2O .

Die Methode hat jedoch den Nachteil, dass man sehr lange Messzeiten für ein gut integrierbares Spektrum benötigt (i.d.R. Messung über Nacht) und dass die relative Fehlerbreite größer ist als bei ^1H -NMR Messungen. Andererseits lässt sich nur mit dieser Methode der partielle Substitutionsgrad bezüglich einer Carboxymethylierung in gemischten Stärkeethern (wie z. B. in Carboxymethyl-hydroxyethylstärke) relativ sicher bestimmen; dies setzt jedoch aufgrund der geringeren Empfindlichkeit einen höheren Carboxymethylgehalt voraus.

Aufgrund der langen Messzeiten und der höheren Ungenauigkeit wurde eine ^1H -NMR-Methode aus der Literatur [117] adaptiert und favorisiert. Hierbei wird vor der eigentlichen

Messung die Carboxymethylstärke mit D_2O/D_2SO_4 gemäß Abschnitt 4.1.2 hydrolysiert. Es resultiert eine Lösung monomerer Substanzen bestehend aus Glucose und unterschiedlichen Carboxymethylglucosen in α - und β -Konfiguration. Diese Lösung wird nachfolgend als Totalhydrolysat bezeichnet. Gegenüber dem Spektrum einer Carboxymethylstärke ist in dem Spektrum des Monomergemisches der Signalbereich der Methylengruppen des Carboxymethylrestes vom α - und β -anomerem Bereich sowie von den restlichen Protonen des Glucoseringes sehr gut separiert. Zusätzlich wird das breite HDO-Signal durch den niedrigen pH-Wert sehr weit tieffeldverschoben, wodurch keine relevanten Signal-Bereiche mehr überdeckt werden. Der Substitutionsgrad ergibt sich aus dem Verhältnis der Integralsumme aller Methylen-Signale zur doppelten Integralsumme aller anomeren Signale. Dieser Sachverhalt wird durch die nachfolgende Abbildung 4-5 verdeutlicht.

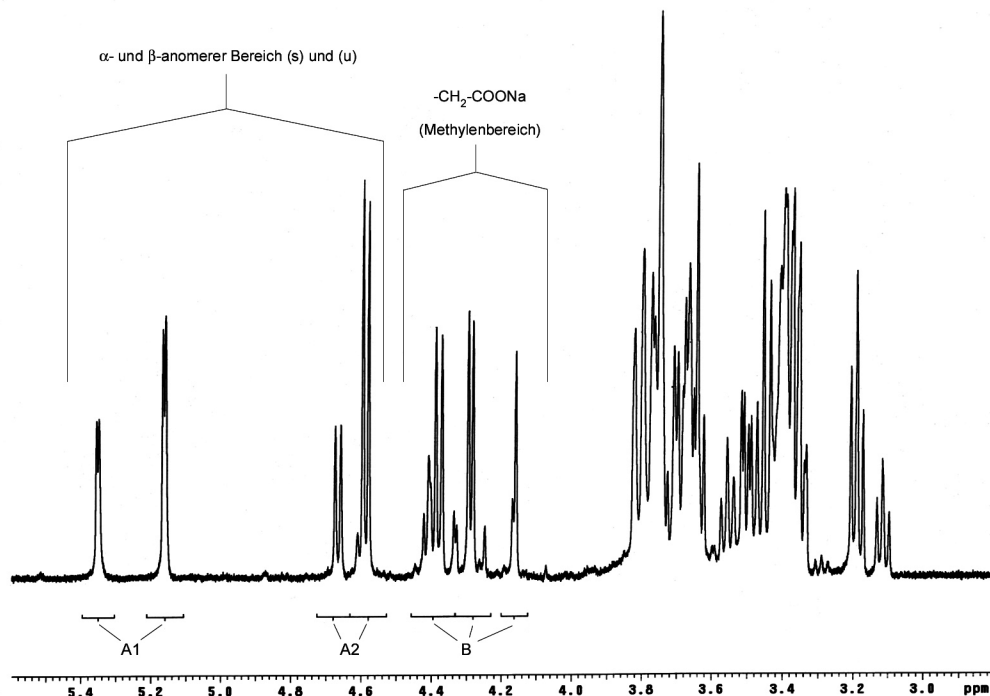


Abb. 4-5. 1H -NMR-Spektrum eines Totalhydrolysats einer Carboxymethylstärke (**16.16**) in D_2O/D_2SO_4 .

Hierbei steht A1 für das Integral über den Bereich der α -anomeren Signale von substituierter und unsubstituierter Glucose und A2 analog für den Signalbereich der β -anomeren Protonen. Der Buchstabe B kennzeichnet das Integral über den gesamten Signal-Bereich der Methylen-Protonen, welche je nach Substitutionsposition der Carboxymethylgruppe innerhalb der Glucose eine leicht unterschiedliche chemische Verschiebung aufweisen.

Der molare Substitutionsgrad wird nun wie folgt berechnet:

$$MS = \frac{B(\text{Integral von } 4.18 - 4.70 \text{ ppm})}{2 \cdot [A1(\text{Integral von } 5.16 - 5.42 \text{ ppm}) + A2(\text{Integral von } 4.54 - 4.76 \text{ ppm})]}$$

Bei der Messung muss beachtet werden, dass ohne Innenröhrchen bzw. ohne externen Standard gearbeitet wird, da bedingt durch das Innenröhrchen ein Phasenfehler in der Basislinie verursacht wird, welcher durch Basislinienkorrektur nicht vollständig eliminiert werden kann. Die Referenzierung der Signale erfolgt daher indirekt.

Des weiteren lässt sich mit der $^1\text{H-NMR}$ -Messung des Totalhydrolysats zeitgleich neben dem molaren Substitutionsgrad - durch eine veränderte Auswahl der Integrationsgrenzen - auch das Substitutionsmuster beschreiben. Dies wird im nächsten Abschnitt eingehender erläutert

4.3.3 NMR-spektroskopische Bestimmung des Substitutionsmusters von Carboxymethylstärken

Der partielle Substitutionsgrad an den jeweiligen Hydroxylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten lässt sich gleichfalls durch obiges Messverfahren bestimmen. Um eine Aussage treffen zu können, ob der Carboxymethylrest an der OH-Gruppe des C-Atoms 2, 3 oder 6 lokalisiert ist (Abbildung 4-2), müssen bei entsprechender Signalzuordnung lediglich die Integrationsgrenzen modifiziert werden. Die Zuordnung der Methylensignale der eingeführten Carboxymethylgruppen zu den jeweiligen Substitutionspositionen gelang unter Zuhilfenahme der Literatur [117, 118].

Bei der Angabe des Substitutionsortes wird nur das C-Atom genannt, welches die OH-Gruppe trägt, die substituiert worden ist. Wird in dieser Arbeit also von einer C-2 substituierten Stärke gesprochen, so bedeutet dies eigentlich, dass die Hydroxylfunktion am C-Atom 2 der Anhydroglucoseeinheit verestert oder verethert worden ist und eine O-2-substituierte-Stärke entstanden ist.

Die Abbildung zeigt nochmals das in Abb. 4-5 abgebildete Spektrum einer Carboxymethylstärke, jedoch mit einer detaillierten Zuordnung der Signale.

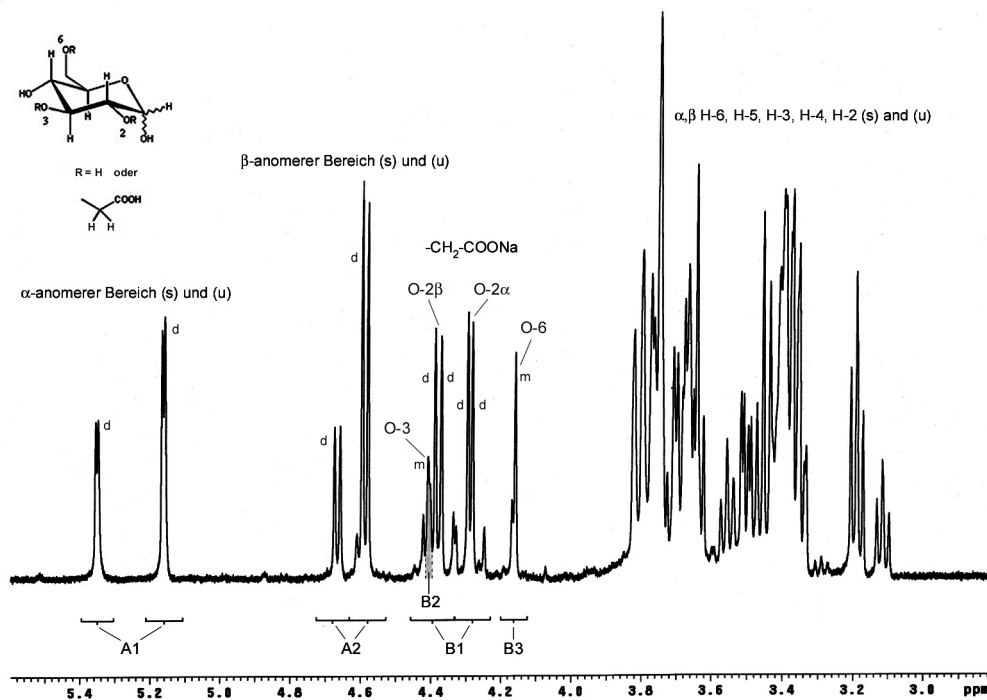


Abb. 4-6. ^1H -NMR-Spektrum eines Totalhydrolysats einer Carboxymethylstärke (**16.16**) in $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$ mit den entsprechenden Signalzuordnungen.

Das Kürzel (s) steht für substituierte Glucose-Species und das Kürzel (u) für unsubstituierte Glucosemoleküle, wobei sich gezeigt hat, dass die Signallagen der anomeren Protonen von O-6-Carboxymethylglucosen und derer von unsubstituierten Glucosemolekülen identisch sind [117]. Eine C-6-Substitution lässt sich lediglich im Methylenbereich, genauer zwischen 4.17 und 4.21 ppm, erkennen.

Die mittlere Verteilung der Substituenten auf die unterschiedlichen Hydroxylgruppen wird in dieser Arbeit auch als Substitutionsmuster bezeichnet. Die einzelnen partiellen Substitutionen werden durch folgende Verhältnisse errechnet:

$$\text{MS(C2)} = \frac{\text{B1}(\text{Integral von } 4.25 - 4.48 \text{ ppm}) - \text{B2}(\text{Integral von } 4.42 - 4.44 \text{ ppm})}{2 \cdot [\text{A1}(\text{Integral von } 5.16 - 5.42 \text{ ppm}) + \text{A2}(\text{Integral von } 4.54 - 4.76 \text{ ppm})]}$$

$$\text{MS(C3)} = \frac{\text{B2}(\text{Integral von } 4.42 - 4.44 \text{ ppm})}{2 \cdot [\text{A1}(\text{Integral von } 5.16 - 5.42 \text{ ppm}) + \text{A2}(\text{Integral von } 4.54 - 4.76 \text{ ppm})]}$$

$$\text{MS(C6)} = \frac{\text{B3(Integral von 4.17 - 4.21 ppm)}}{2 \cdot [\text{A1(Integral von 5.16 - 5.42 ppm)} + \text{A2(Integral von 4.54 - 4.76 ppm)}]}$$

Es ist zu beachten, dass der partielle Substitutionsgrad für die Substitution an der OH-Gruppe an C-3 nicht exakt bestimmbar ist, da das zugrundeliegende Signal vom intensiveren Nachbarmethylensignal vom Substitutionsort C-2 teilweise überlappt wird und somit niemals grundlinienaufgelöst ist. Eine Angabe des MS(C3) ist folglich stets fehlerhaft und ist im ungünstigsten Falle nur von halbquantitativer Güte. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit oftmals der partielle Substitutionsgrad MS(C2+C3) angegeben, welcher neben dem Substitutionsgrad an der OH-Gruppe an C-2 den stets wesentlich geringeren Substitutionsgrad an der OH-Gruppe von C-3 beinhaltet.

Bei der Bestimmung des Substitutionsgrades an C-6 muss beachtet werden, dass in enger Nachbarschaft Signale geringer Intensität liegen, welche von unsubstituierter Glucose in schwefelsaurer Lösung stammen, dies konnte durch mehrere Vergleichsversuche bewiesen werden. Dieser Matrixhintergrund erhöht oftmals bei sehr geringen Carboxymethylierungsgraden (MS ~ 0,04) den Wert der C-6 Substitutionen.

Mit dem MS(C2+C3)-Wert kann im Vergleich zum Substitutionsgrad an der OH-Gruppe an C-6 (MS(C6)) eine exakte Aussage über die Reaktivitätenabfolge von primären und sekundären OH-Gruppen in Stärken in Abhängigkeit von den jeweiligen Reaktionsbedingungen getroffen werden. Durch die Bildung des Quotienten dieser beiden Werte kann eine weitere anschauliche Größe gewonnen werden. Diese Relation, welche in der medizinischen Literatur über Stärkederivate (insbesondere HES) auch als C2/C6-Verhältnis bezeichnet wird [119], ist aus physiologischer Sicht von großem Interesse, da erwartungsgemäß der Substitutionsort neben dem Substitutionsgrad einen Einfluss auf die Metabolisierbarkeit hat. Das C2/C6-Verhältnis ist ebenso ein Maß für die Einheitlichkeit einer Substitution und somit ein entscheidendes Kriterium für Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

4.3.4 NMR-spektroskopische Bestimmung des Verzweigungsgrades

Von Stärken und von einigen Stärkederivaten lässt sich über ¹H-NMR-Hochtemperaturmessungen der Verzweigungsgrad sowie die mittlere Kettenlänge bestimmen. Hierzu wurde ein Verfahren aus der Literatur [120] angepasst und modifiziert. Die Substanz wird in D₂O gelöst bzw. suspendiert, auf 70 °C temperiert und bei dieser Temperatur vermessen. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Signallage der anomeren Protonen von Anhydroglucoseeinheiten, die ausschließlich α-1,4-glycosidisch verknüpft sind, und solchen anomeren Protonen von Anhydroglucoseeinheiten, die zusätzlich an einer α-1,6-glycosidischen Verknüpfung

beteiligt sind. In der nachfolgenden Abbildung ist ein Spektrum einer partiell abgebauten Wachsmaisstärke mit den Zuordnungen der relevanten Signale ersichtlich.

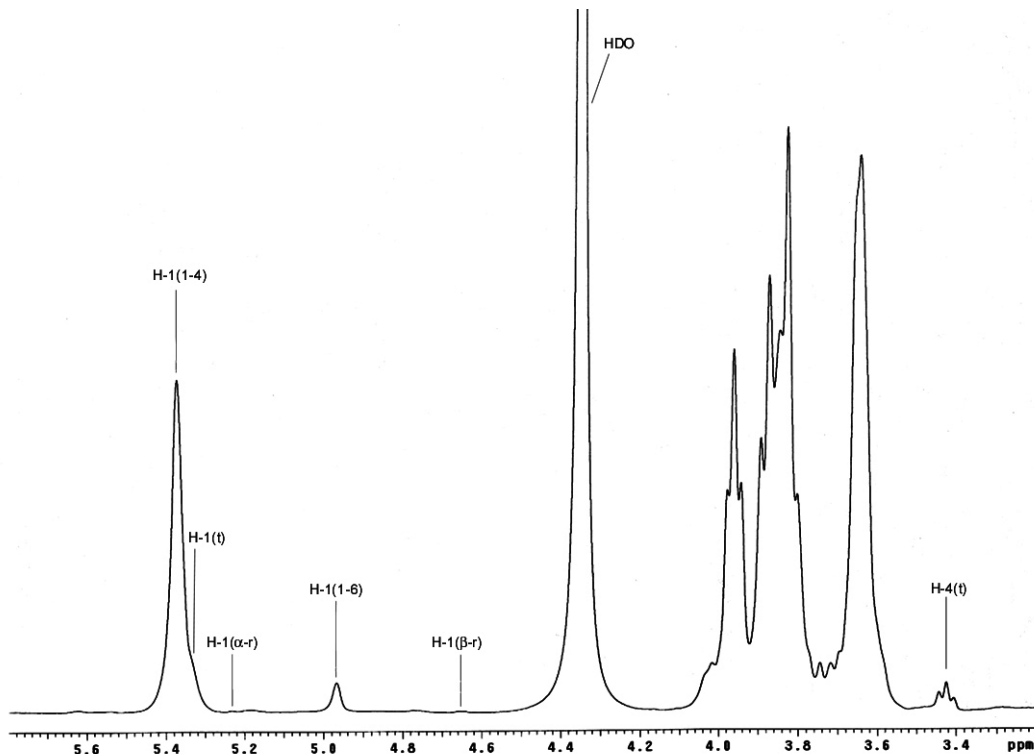


Abb. 4-7. ^1H -NMR-Spektrum einer partiell abgebauten Wachsmaisstärke (**1.10**) in D_2O , $70\text{ }^\circ\text{C}$.

Das Signal bei 5.38 ppm stammt von anomeren Protonen von Anhydroglucosen mit α -1,4-Verknüpfung, kurz H-1(α -1-4), die Schulter dieses breiten Signals bei 5.34 ppm stammt von Protonen von terminalen, nichtreduzierenden Glucoseeinheiten welche α -1,4-glycosidisch verknüpft sind, kurz H-1(α -1-4(t)). Das Signal bei 4.97 ppm stammt von anomeren Protonen von Anhydroglucoseeinheiten die an einer 1,6-glycosidischen Verknüpfung beteiligt sind. Dieses Signal wurde erst durch die Messung bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ auswertbar, da durch die erhöhte Temperatur das sehr breite benachbarte HDO-Signal verschoben wird und somit das relativ kleine Signal nicht mehr überdeckt wird. Der mittlere Verzweigungsgrad (VZG in %) und die damit verknüpfte mittlere Kettenlänge (CLn, reziprokes Verhältnis) wird durch die folgende Beziehung der Integrale ermittelt:

$$\text{VZG \%} = \frac{\text{Integral über H-1(1-6)}}{\text{Integral über [H-1(1-4) + H-1(t) + H-1(1-6)]}} \cdot 100$$

$$CL_n = \frac{\text{Integral über [H-1(1-4) + H-1(t) + H-1(1-6)]}}{\text{Integral über H-1(1-6)}}$$

Bei der Bestimmung von Verzweigungsgraden von Carboxymethylstärken ist zu beachten, dass sich aufgrund der erhöhten Varianz der chemischen Umgebung der anomeren Protonen die Signalbreite und Inhomogenität des anomeren Bereiches erheblich erhöht. Deshalb ist gerade bei höheren Substitutionsgraden ($MS > 0,4$) die Fehlerbreite deutlich größer als bei unsubstituierten Stärken. Im Extremfall kann keine sinnvolle Aussage über den Verzweigungsgrad einer Carboxymethylstärke getroffen werden. Der Fehler ist abhängig vom Substitutionsgrad (kleine Fehler bei geringer Substitution) und der Güte der Basislinienkorrektur. In Ermangelung von Standardsubstanzen sowie alternativen Bestimmungsmethoden ist eine genaue Fehlerabschätzung bisher noch nicht möglich. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Analyse der Verzweigungsgrade von methylierten Stärken beobachtet. Dort war der Verzweigungsgrad aufgrund einer Überlagerung der anomeren Signale von 2-O-methylierten-1,6-verknüpften Glucosebausteinen mit denen von nichtsubstituierten 1,4-verknüpften Glucosemonomeren ebenfalls fehlerbehaftet [121].

4.3.5 NMR-spektroskopische Bestimmung der reduzierenden Enden

Dieses Verfahren beruht ebenfalls auf der Verschiebung des HDO-Signals bei $^1\text{H-NMR}$ -Hochtemperaturmessungen. Die Substanz wird in D_2O gelöst bzw. suspendiert, auf $70\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert und bei dieser Temperatur vermessen. Es wird das Spektrum auf Vorhandensein der sehr kleinen Signale bei 5.23 und 4.65 ppm der anomeren Protonen von den reduzierenden Enden der Stärkemoleküle in α - bzw. β -Konfiguration ($\text{H-1}(\alpha\text{-r})$ bzw. $\text{H-1}(\beta\text{-r})$) hin überprüft. Die Lage dieser Signale ist in der Abbildung 4-7 markiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die übereinandergelegten, vergrößerten Spektrenausschnitte von Wachsmaisstärke mit reduzierenden Enden und Wachsmaisstärke nach der Behandlung mit NaBH_4 , d.h. ohne reduzierende Enden.

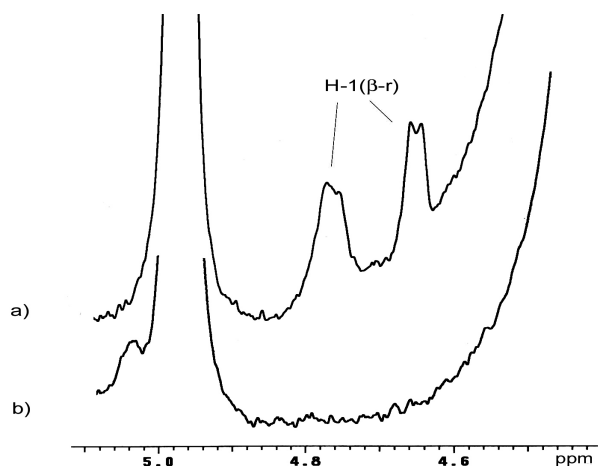


Abb. 4-8. Vergleich zweier $^1\text{H-NMR}$ -Spektren-Ausschnitte einer partiell abgebauten Wachsmaisstärke a) vor Reduktion (1.10) b) nach Reduktion mit NaBH_4 (2.1) in D_2O , $70\text{ }^\circ\text{C}$.

Das Verfahren dient als Beweis für die vollständige Reduktion der reduzierenden Enden und stellt eine spektroskopische Alternative zum Nachweis mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (Abschnitt 4.3.7) dar. Die Bestimmung ist aufgrund der sehr kleinen Signalintensität nur von halbquantitativem Wert, d.h. es können durch direkten Vergleich von unterschiedlich hydrolysierten Stärken lediglich Aussagen über die Rangordnung des Hydrolysegrades getroffen werden. Aufgrund der Signálnähe der H-1(α -r)-Resonanz zum sehr viel intensiveren H-1(1-4)-Signal konzentriert sich diese Methode auf das Vorhandensein des gut separierten H-1(β -r)-Signal.

4.3.6 Titrimetrische Bestimmung des Substitutionsgrades von Carboxymethylstärken

Die Bestimmung des Substitutionsgrades von in der Säureform gefällten Carboxymethylstärken über Säure-Base-Titration wurde gemäß [122, 123] modifiziert.

Es wurden ca. 500 mg der zu untersuchenden Probe in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 200 ml einer Lösung bestehend aus 150 ml Methanol, 4,6 ml 32 %iger Salzsäure und 45 ml bidest. Wasser versetzt. Die Probe wurde für vier Stunden durch Rühren in der sauren Methanollösung suspendiert. Nach der Säurewäsche wurde der Feststoff über eine D3-Glasfritte abfiltriert und 6 bis 8 mal mit 80 %igem Methanol säurefrei gewaschen. Hierbei wurde das Filtrat mit einer Methylrot-Mischindikator-Lösung auf seine Neutralität überprüft. Das Präzipitat wurde auf der Glasfritte leicht trockengesaugt und anschließend im Vakuumtrockenschrank für 2 Stunden bei 90 °C getrocknet. Die Probe wurde über Nacht im evakuierten Exsikkator über Blaugel und Natriumhydroxid aufbewahrt.

Es wurden nun exakt 200 mg der in der Säureform befindlichen Carboxymethylstärke in 200 ml bidest. Wasser gelöst und mit 50 ml 0,1 N Natronlauge versetzt. Zu dieser Lösung wurden dann 13 Tropfen Methylrot-Mischindikator-Lösung gegeben, hierbei verfärbte sich die alkalische Lösung grün/grau. Es wurde mit 0,1 N Salzsäure bis zum Erreichen des sehr schwach rosa gefärbten Umschlagpunktes titriert. Der molare Substitutionsgrad (MS) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$MS = \frac{162 \cdot 5(V_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}})}{10000 - 58 \cdot 5(V_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}})}$$

Hierbei gibt der Term in Klammern den Verbrauch an Natronlauge in Milliliter an, um 200 mg in der Säureform befindliche Carboxymethylstärke zu neutralisieren. Der Faktor fünf relativiert den Verbrauch auf ein Gramm Substanz. Die Zahlen 162 und 58 stehen für die Molmasse von Anhydroglucose bzw. für die Molmasse der deprotonierten Carboxymethylgruppe.

4.3.7 Bestimmung der reduzierenden Enden von Stärken mit Dinitrosalicylsäure

Der photometrische Nachweis von reduzierenden Enden enzymatisch abgebauter Stärke mit Dinitrosalicylsäure in alkalischer Lösung wird in [124 - 128] beschrieben. Diese Methode wurde auf eine Vielzahl von Stärkederivaten übertragen. Mit ihr lässt sich über die Bestimmung der reduzierenden Enden einerseits die Vollständigkeit der Reduktion von Stärken mit Natriumborhydrid überprüfen und andererseits der Hydrolysegrad von Stärken und Stärkederivaten bei Enzymreaktionen ermitteln.

Für die Herstellung der Farbstofflösung wurden beispielsweise 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure in 200 ml 2 N Natronlauge suspendiert; zu dieser orangefarbenen Suspension wurden 300 g Kalium-Natrium-tartrat gegeben und die Mischung wurde mit bidest. Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Bei der Durchführung des Tests wurde ein Milliliter der zu analysierenden Lösung bzw. Suspension in ein 15 ml Schraubdeckelgläschen gegeben, zu dieser Lösung wurde ein Milliliter der obigen Farbreagenzlösung gegeben und vorsichtig umgeschwenkt. Das Gläschen wurde fest mit einem Schraubdeckel mit Teflondichtung verschlossen und für exakt fünf Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Erhitzen wurde die Probe aus dem Wasserbad genommen und für ca. fünf Minuten abgekühlt, bei Anwesenheit von reduzierenden Enden verfärbte sich die anfänglich gelbe Lösung rot. Es wurde die Lösung mit 10 ml Wasser versetzt und kurz durchgeschüttelt. Die Extinktion der Lösung wurde nun bei 546 nm aufgenommen.

Der in der Wärme gebildete Farbstoff ist für mehrere Stunden stabil, so dass die Extinktion auch später gemessen werden kann. Dadurch lassen sich mit dieser Methode sehr schnell und reproduzierbar ganze Serien von Proben analysieren. Es muß jedoch für jede angesetzte Farbreagenzlösung eine eigene Eichreihe mit Maltose erstellt werden. Mit ihr lassen sich die Extinktionswerte in Reduktionsequivalente umrechnen. Um die Genauigkeit der Methode zu verdeutlichen, wird in der nachfolgenden Abbildung eine Maltose-Eichreihe exemplarisch dargestellt.

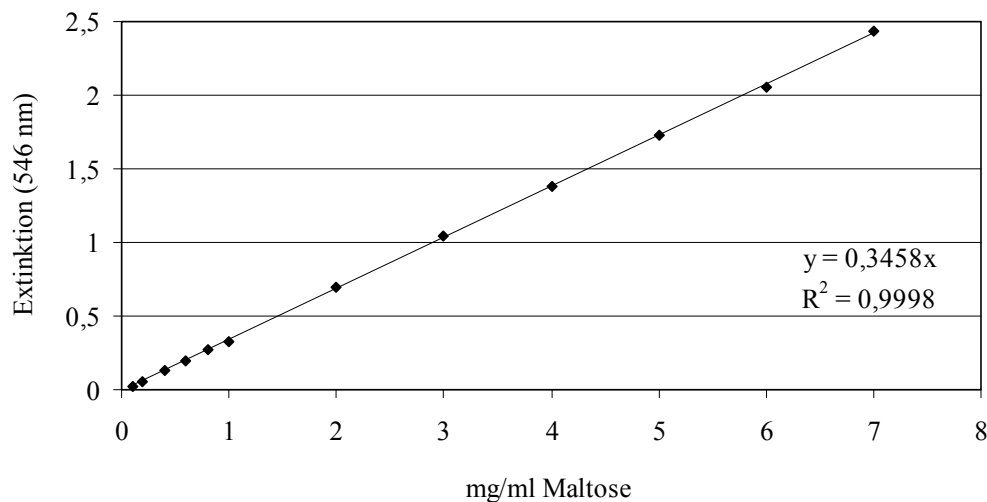


Abb. 4-9. Maltose-Eichreihe in einem typischen Konzentrationsbereich von 0...8 mg.

Mittels der berechneten Regressionsgeraden wurden die Extinktionen der untersuchten Stärke- und Stärkederivateproben in Reduktionsequivalente in Einheiten von mg/ml Maltose bzw. $\mu\text{mol/ml}$ Maltose umgerechnet.

4.3.8 Bestimmung des Wassergehaltes von Stärken

Für die Berechnung von Ansatzgrößen und bei der Bestimmung von Ausbeuten war es mitunter notwendig, den Feuchtigkeitsgehalt von den jeweiligen Stärkerohstoffen zu kennen bzw. zu ermitteln. Hierzu wurde eine bekannte Standardmethode entsprechend modifiziert [62].

Es wurden 5,000 g des jeweiligen Stärkerohstoffes in ein vorgetrocknetes, austariertes Wägeg­läschen eingewogen. Das offene Wägeg­läschen wurde samt Deckel für fünf Stunden bei 90 °C im Vakuumtrockenschrank aufbewahrt und anschließend für 30 Minuten im evakuierten Exsikkator abgekühlt. Das Wägeg­läschen wurde verschlossen und die Substanz zurückgewo­gen.

Der Wassergehalt wird als prozentualer Anteil der ungetrockneten Originalsubstanz ausgedrückt:

$$\% \text{ Wassergehalt} = \frac{(W_1 - W_2) \cdot 100}{W_1}$$

Hierbei ist W_1 des Gewicht der ungetrockneten Originalsubstanz und W_2 das Gewicht der getrockneten Probe.

4.3.9 Bestimmung der kinematischen bzw. dynamischen Viskosität von Stärkelösungen

Das Fortschreiten der säurekatalysierten Hydrolyse von Stärken (Abschnitt 4.4.2) läßt sich durch eine zeitabhängige Viskositätsbestimmung der Reaktionslösung beschreiben. Zu diesem Zweck entnimmt man dem Ansatz bei gewissen Zeiten eine Probe und analysiert sie wie unten beschrieben. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Viskosität der Lösung und dem Molekulargewicht der zugrundeliegenden Stärke. Diese Tatsache kann nach dem Erstellen einer Eichkurve ausgenutzt werden, um bei Säurehydrolysen das jeweilige Molekulargewicht über Viskositätsmessungen zu bestimmen bzw. letztlich den Endpunkt der Hydrolyse festzulegen. Für jeden Stärkerohstoff muss eine Eichkurve erstellt werden. Arbeitet man bei der Hydrolyse unter exakt reproduzierbaren Bedingungen, d.h. identische Verhältnisse hinsichtlich Rohstoff, Konzentration, Temperatur, Reaktionsgefäß und Durchmischung, so kann man ein bestimmtes Molekulargewicht mit mittlerer Genauigkeit sogar durch eine definierte Reaktionsdauer erreichen.

Durchführung der Viskositätsmessung

Bei der Durchführung der Messung wurde ein Teil der Reaktionslösung – welcher gegebenenfalls auf eine gewünschte Konzentration verdünnt wurde – entnommen und auf 60 °C temperiert. Zur Viskositätsbestimmung wurden ca. 20 ml dieser Lösung in ein auf 60 °C temperiertes Ubbelohde-Viskosimeter überführt. Es wurde die Durchflußzeit t zwischen zwei Ringmeßmarken gemessen, diese Messung wurde dreifach wiederholt.

Die kinematische Viskosität ν in mm^2/s der Flüssigkeit kann mit der Gerätekonstanten k nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\nu = k \cdot t$$

mit $k = 0,009868 \text{ mm}^2/\text{s}^2$.

Aus der kinematischen Viskosität ν kann über die Beziehung $\nu = \eta/\rho$ die dynamische Viskosität η in $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ermittelt werden, wobei ρ die Dichte der jeweiligen Lösung bezeichnet.

4.3.10 Charakterisierung von Stärkehydrolysen über Drehmomentmessung

Die kinematische Viskosität ist zwar eine einfach zu bestimmende Größe, das Verfahren ist jedoch aufgrund der zeitlichen Verzögerung zwischen Probenentnahme und Erhalt des Viskositätswertes nicht optimal geeignet, um eine exakte Aussage über den jeweiligen Ist-Zustand der Stärkehydrolyse zu treffen. Aus diesem Grunde wurde nach einer Methode gesucht, welche eine „Online“-Beschreibung des Reaktionsverlaufes erlaubt. Es wurde überprüft, ob der von der Firma IKA angebotene Drehmomentmessplatz für diese Aufgabenstellung einsetzbar bzw. empfindlich genug ist (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.1 bzw. 4.4.2). Hierbei erfasst während des Rührprozesses ein Kraftaufnehmer eine dem Drehmoment proportionale Reaktionskraft. Die kontinuierlich registrierten Drehmomentwerte sind mit entsprechenden Gerätekonstanten in Viskositäten umrechenbar und stellen somit eine zur Beurteilung des Hydrolysefortschrittes relevante Größe dar. Die gesamte Mess- und Regeltechnik, die Steuerung des Rührwerkes sowie die digitale Datenaufnahme und –verwertung erfolgte über das Programm Labworldsoft. Auf diesem Wege wurden charakteristische Drehmomentkurven unterschiedlicher Stärkehydrolysen protokolliert. Nachfolgend wird eine solche Kurve exemplarisch dargestellt:

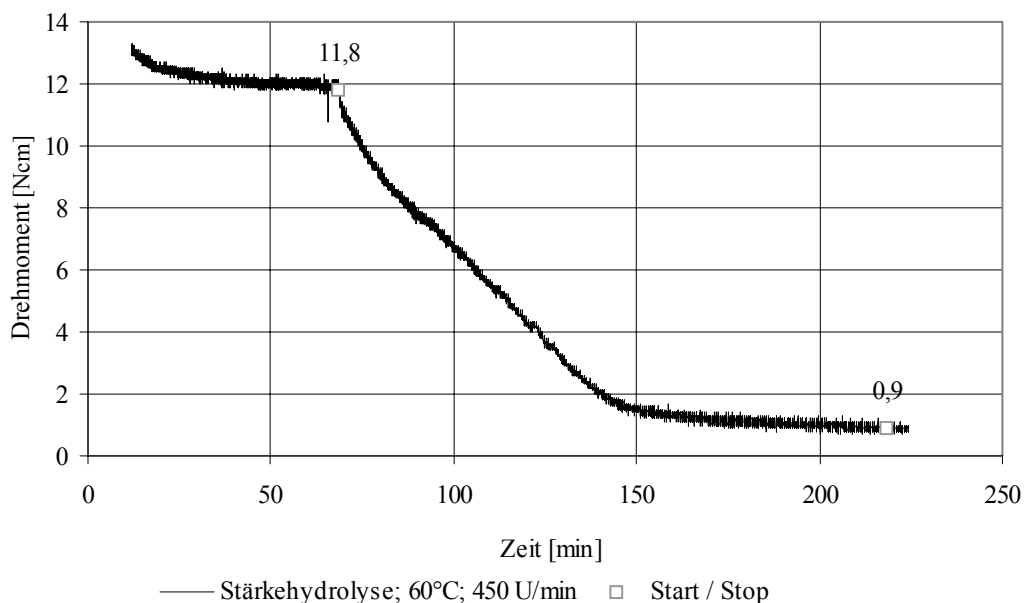


Abb. 4-10. Drehmomentverlauf einer Stärkehydrolyse (Abbaustärke 1.6).

4.3.11 Bestimmung der Calciumkompatibilität von Carboxymethylstärkelösungen

Es wurde photometrisch überprüft, ob sich bei einer Zugabe von Calcium-Ionen die Transmission einer Carboxymethylstärkelösung verändert, denn dies könnte auf die Bildung von schwerlöslichen Calciumkomplexen schließen lassen.

Es wurden 120 mg Carboxymethylstärke **16.16** in 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst und über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter klarfiltriert. Es wurde die Transmission im Bereich von 300...800 nm der Carboxymethylstärkelösung nach Zugabe unterschiedlicher Volumina einer Calciumchloridlösung (20 mmol/l in 0,9 %iger Kochsalzlösung) in einer Quarzküvette gemessen und mit den Transmissionswerten der Kontrolllösungen verglichen. Nachfolgend werden die Zusammensetzungen der Kontroll- und Testlösungen wiedergegeben. Das Ansetzen und Durchmischen der Lösungen erfolgte unmittelbar vor der eigentlichen Messung in der Küvette.

Kontrolle 1: 200 µl CMS-Lösung + 800 µl 0,9 % NaCl-Lösung

Kontrolle 2: 500 µl CMS-Lösung + 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung

Kontrolle 3: 200 µl 0,9 % NaCl-Lösung + 800 µl CaCl₂-Lösung

Kontrolle 4: 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung + 500 µl CaCl₂-Lösung

Test 1: 200 µl CMS-Lösung + 800 µl CaCl₂-Lösung

Test 2: 500 µl CMS-Lösung + 500 µl CaCl₂-Lösung

Der pH-Wert sämtlicher Lösungen betrug $7,4 \pm 0,2$. Die Transmissionsspektren von Kontrolle 1 und Test 1 sowie von Kontrolle 2 und Test 2 wurden durch Überlagerung auf ihre Kongruenz überprüft. Desweiteren wurde der Transmissionswert bei 550 nm bei Kontrolle 3 und 4 auf 100 % gesetzt und dazu die Transmissionswerte bei Kontrolle 1 und 2 und bei Test 1 und 2 ins Verhältnis gesetzt.

4.3.12 Bestimmung der Autoklavierbeständigkeit von Stärkederivaten

Für die klinische Anwendung als Plasmaersatz ist eine ausreichende Stabilität der Stärkederivate in Lösung notwendig. Ein besonders hoher Energieeintrag findet beim Sterilisationsprozess statt. Die Überprüfung der Beständigkeit der substituierten Stärken beim Autoklavieren stellt somit ein wichtiges Kriterium des Anforderungsprofils dar.

Sterilisation von Carboxymethylstärken

Es wurden in einer Schottflasche 5 g Carboxymethylstärke **17.1** in 100 ml sterilfiltriertem bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde für ca. 30 Minuten bei 121 °C in einem Laborautoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde die Lösung zunächst optisch auf Verfärbungen oder Trübungen überprüft und anschließend in Rundkolben aufgeteilt eingefroren. Die

Lösung wurde gefriergetrocknet und die Substanz wurde NMR-spektroskopisch auf eventuell eingetretene Veränderungen hin untersucht.

Sterilisation von Succinylstärken

Es wurden je 0,40 g Succinylstärke **5.8** in Rollrandgläser eingewogen und jeweils mit 10 ml der nachfolgenden Pufferlösung aufgefüllt, es wurden jeweils zwei Probelösungen für eine entsprechende Doppelbestimmung angesetzt:

- Vial 1 isotone Kochsalzlösung
- Vial 2 100 mM Acetat-Puffer, pH 4
- Vial 3 100 mM Acetat-Puffer, pH 5
- Vial 4 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6
- Vial 5 100 mM Phosphat-Puffer, pH 7
- Vial 6 100 mM Phosphat-Puffer, pH 8
- Vial 7 100 mM Carbonat-Puffer, pH 9

Die Rollrandgläser wurden versiegelt und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Lösungen wurden optisch auf Verfärbungen und Trübungen untersucht. Anschließend wurden jedem Rollrandglas mit einer Spritze 1 ml Probenlösung entnommen und in ein 2 ml Eppendorf-Cup gegeben. Die Cups wurden in einen Zentrifugen-Vakuum-Konzentrator gegeben und das Lösungsmittel wurde abgezogen. Die Trockensubstanzen wurden mit je einem Milliliter Deuteriumoxid aufgenommen und die Lösungen wurden so NMR-spektroskopisch vermessen. Hierbei wurde insbesondere das Verhältnis zwischen gebundenem und freiem Succinat bestimmt (gemäß Abschnitt 4.3.1).

Paralell zur NMR-Methode wurden der Succinat-Gehalt der autoklavierten Proben enzymatisch (nach Abschnitt 4.5.2) bestimmt.

Sterilisation diverser Stärkeester

Es wurde systematisch eine Reihe strukturell unterschiedlich acylierter Stärken hinsichtlich ihrer Autoklavierbeständigkeit untersucht.

Hierzu wurden jeweils 100 mg des entsprechenden Stärkeesters in ein Rollrandglas eingewogen und mit 5 ml Deuteriumoxid aufgefüllt. Von jeder Lösung wurde ein Milliliter entnommen und der pH-Wert gemessen, für den späteren Vergleich wurden von diesen unsterilen Lösungen ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Die Rollrandgläser wurden nun mit Gummistopfen und Aluminiumkappe versiegelt und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Es wurden anschließend von jeder Lösung der pH-Wert sowie ein ^1H -NMR-Spektrum gemessen. Es wurden die Substitutionsgrade vor und nach dem Sterilisationsprozess (gemäß Abschnitt 4.3.1) sowie die pH-Werte verglichen. Wenn die Substitutionsgrade aufgrund überlappender Signaltbereiche numerisch nicht auswertbar waren, wurde eine Stabilitätsaussage durch direkten Spektrenvergleich getroffen. Auf diese Weise wurden folgende Stärkederivate untersucht:

- Acetylstärke **3.1**, MS = 0,38
- Propionylstärke **4.1**, MS = 0,26
- Pivaloylstärke **14.1**, MS = 0,10
- Succinylstärke **5.4**, MS = 0,35
- Succinylstärke **5.6**, MS = 0,63
- 2,2-Dimethylsuccinylstärke **6.1**, MS= 0,25
- Dodecenylsuccinylstärke **7.1**, MS = 0,04
- Glutarylstärke **8.1**, MS = 0,45
- 2,2-Dimethylglutarylstärke **9.1**, MS = 0,38
- 3,3-Dimethylglutarylstärke **10.1**, MS = 0,57
- 3-Oxaglutarylstärke **11.1**, MS = <0,04
- Di-O-acetylweinsäureester **12.1**, MS = <0,04

Bei den Acetyl- und Succinylstärken wurde der ungebundene Säuregehalt zusätzlich enzymatisch (nach Abschnitt 4.5.1 und 4.5.2) bestimmt.

4.4 Synthesevorschriften

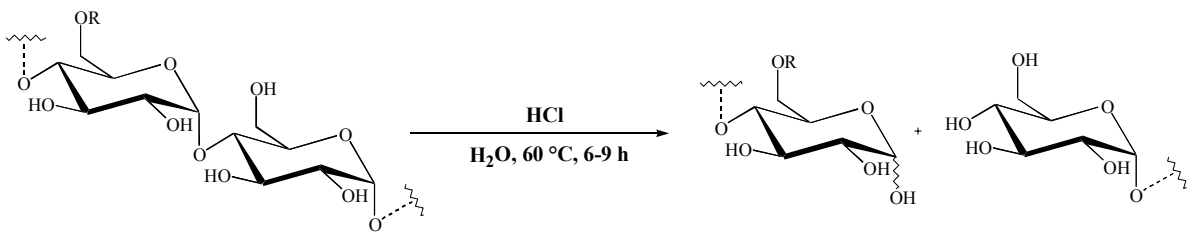
4.4.1 Allgemeines Verfahren zur Aufarbeitung von Stärken und Stärkederivaten

Sollen partiell abgebaute Stärken oder derivatisierte Stärken aus wässrigen Lösungen bzw. Suspensionen isoliert werden, so ist eine Fällung des Produktes in niederen Alkoholen – vorzugsweise Ethanol – die einfachste und schnellste Lösung. Hierbei wird zunächst die aufzuarbeitende Lösung durch eine D2-Glasfritte gesaugt, um größere Partikel und Inhomogenitäten zu entfernen und anschließend mittels eines Tropftrichters langsam in einen fünffachen Überschuss eisgekühlten Ethanols getropft. Hierbei fällt das Produkt zunächst fadenförmig aus. Die Fällung wird unter stetigem Rühren vollzogen, dadurch werden aus den anfänglichen Stärkefäden allmählich feinverteilte, großvolumige Flocken. Durch den fortschreitenden Wasserentzug verlieren diese Flocken ihren kohäsiven Charakter und werden pulvrig. Nach dem Beenden der Fällung, welche sich je nach Ansatzgröße über mehrere Stunden hinziehen kann, wird das gesamte Präzipitat über eine D2-Glasfritte abgesaugt und das farblose Pulver mehrfach mit 90 %igem Ethanol gewaschen. Das Produkt, welches noch Salze und niedermolekulare Abbauprodukte enthalten kann, wird an der Luft oder im Vakuumtrockenschrank bei 60 °C getrocknet.

Höhere Reinheitsgrade können dadurch erreicht werden, indem man eine Lösung bzw. Suspension des neutralisierten Rohproduktes – hierbei kann es sich um ein Aliquot des neutralisierten Reaktionsansatzes oder um ein zuvor gelöstes Ethanolpräzipitat handeln – zunächst über eine D2-Glasfritte filtriert und anschließend im Dialysierschlauch gegen das 100- bis 1000-fache Volumen an bidest. Wasser 24 bis 48 Stunden lang dialysiert. Das Dialysat wird mit Silbernitrat-Lösung auf Chloridfreiheit überprüft. Nach der Dialyse wird die aufgereinigte Lösung über eine D3-Glasfritte vorfiltriert und anschließend mittels eines 0,45 bzw. 0,8 µm Spritzenvorsatzfilters in Rundkolben klarfiltriert. Die Lösungen werden eingefroren und gefriergetrocknet. Nach der Lyophilisation resultiert in der Regel ein farb- und geruchloser, großvolumiger Feststoff mit einem papierähnlichen Habitus.

Es muss beachtet werden, dass speziell bei den hydrophilen Stärkederivaten während der Dialyse starke Verdünnungseffekte auftreten. Die hohe Volumenzunahme des Retentates führt letztlich zu einer verlängerten Gefrier Trocknungsdauer. Aus diesem Grund musste insbesondere bei größeren Ansätzen sukzessive aufgearbeitet werden.

4.4.2 Allgemeines Verfahren zur partiellen Säurehydrolyse unterschiedlicher Stärken



native Wachsmaisstärke,
dünnkochende Wachsmaisstärke,
enzymatisch modifizierte Kartoffelstärke

R: H oder AGE
(abhängig vom Molekulargewicht
und Verzweigungsgrad)

1.1, 1.2, ..., 1.15
1 = Abbaustärke, .1, .2, ... = Molekulargewicht

R: H oder AGE
(abhängig vom Molekulargewicht
und Verzweigungsgrad)

Die Stärke wird in dem Reaktionsgefäß (Abschnitt 4.1.1) vorgelegt und die 10 bis 12-fache Menge (w/v) Wasser unter Rühren langsam hinzugegeben. Die entstehende Suspension wird nun stetig gerührt und allmählich erwärmt. Der Ansatz wird durch das Erwärmen homogener und nimmt an Viskosität zu; um eine möglichst große Homogenität zu erreichen, ist eine einsetzende Verkleisterung bzw. ein Verlust der granulären Struktur erstrebenswert. Die für diesen Prozess erforderliche Mindesttemperatur ist von der jeweilig eingesetzten Stärke abhängig. Bei nativer Wachsmaisstärke sind 60 °C als ausreichend anzunehmen, bei dünnkochender Wachsmaisstärke und enzymatisch modifizierter Kartoffelstärke hingegen sind 80 °C als Homogenisationstemperatur zu wählen.

Nach Erreichen der maximalen Homogenität lässt man den Ansatz unter ständigem Rühren auf 60 °C abkühlen und startet die Hydrolyse durch die Zugabe von Salzsäure. Die Reaktionsmischung wird bei dieser Temperatur gerührt, wobei ein allmählicher Abfall der Viskosität zu verzeichnen ist (siehe Abschnitt 4.3.9 und 4.3.10). Nach gewünschter Hydrolysedauer wird die Reaktion durch Neutralisation mit Natronlauge beendet. Es resultiert eine niedrigviskose, opaleszierende „Abbaustärkelösung“, welche direkt weiter umgesetzt werden kann oder zunächst aufgearbeitet wird (siehe Abschnitt 4.4.1).

Charakteristische Daten der Produkte 1.1...1.15

Abbaustärke 1.1: Laborjournal-Substanz 001

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 120 g nativer Wachsmaisstärke und 50 ml 5 N Salzsäure in 1500 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4,5 Stunden.

Ausbeute: 102,1 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Molekulargewicht (Mw): $1,7 \cdot 10^6$

Verzweigungsgrad: 5,0 %

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.51\text{-}5.27$ (m, Maximum bei 5.41 ppm, H-1(1-4)), 5.35 (Schulter, H-1(t)), 5.23 (~d, schwach, H-1(α -r)), 4.97 (m, schwach, H-1(1-6)), 4.80 (s, HDO),

4.64 (~d, schwach, H-1(β -r)), 4.15-3.50 (nicht aufgel., Maxima bei 3.96, 3.84, 3.65 ppm, 6H, H-2, ..., H-6), 3.42 (m(~dd), H-4(t))

^{13}C -NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 102.5 (C-1), 79.6 (C-4), 76.2 (C-3), 74.4 (C-2), 74.0 (C-5), 63.3 (C-6)

^1H -NMR(D₂O/D₂SO₄, TSP ext. Std.): δ = 5.20 (d, 1H, H-1(α), J=3.8), 4.82 (HDO), 4.62 (d, 1H, H-1(β), J=8.1), 3.85 (dd, 1H, H-6'(β), J= 2.2, J=12.4) 3.80, 3.79 (m, 2H, H-5(α), H-6'(α)), 3.72 (dd, 1H, H-6(α), J=5.9, J=12.8), 3.70 (dd, 1H, H-6(β), J=5.5, J=12.5), 3.68 (dd=t, 1H, H-3(α), J=9.7, J=9.7), 3.55 (dd, 1H, H-2(α), J=3.8, J=9.8), 3.50 (dd, 1H, H-3(β), J=9.4, J=9.4), 3.45 (ddd, 1H, H-5(β), J=2.2, J=5.4, J=9.9), 3.39 (dd, 1H, H-4(β), J=9.1, J=9.7), 3.38 (dd, 1H, H-4(α), J=9.3, J=9.6), 3.22 (dd, 1H, H-2(β), J=8.0, J=9.4).

FTIR(ATR): 3327 s, 2826 s, 1409 s, 1364 s, 1148 s, 1077 s, 1011 s

Abbaustärke 1.2: Laborjournal-Substanz 059

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 30 g nativer Wachsmaisstärke und 15 ml 5 N Salzsäure in 500 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 6 Stunden.

Ausbeute: 24,2 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

21,4 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 1,182 mm²/s (einer 6 %igen neutralen Lösung, 60 °C)

Molekulargewicht (Mw): 555000

Verzweigungsgrad: 5,1 %

spektroskopische Daten: Die NMR- und IR-Daten sind bei allen Abbaustärken nahezu identisch, deshalb sind die unter Abbaustärke 1.1 aufgeführten spektroskopischen Angaben als repräsentativ anzusehen. Es existieren zwar kleinere Unterschiede bei Stärken verschiedener Provenienz und hoher Molekulargewichtsdifferenz, diese machen sich jedoch größtenteils durch unterschiedliche Signalintensitäten und Linienbreiten bemerkbar. Diese feinen Abweichungen lassen sich schwer numerisch angeben und sollten daher anhand direkter Spektrenvergleiche diskutiert werden.

Abbaustärke 1.3: Laborjournal-Substanz 064

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 9 Stunden.

Ausbeute: 93,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

89,4 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 0,876 mm²/s (einer 5 %igen sauren Lösung, 59 °C)

Molekulargewicht (Mw): 172000

Verzweigungsgrad: 5,3 %

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke 1.1 und 1.2.

Abbaustärke 1.4: *Laborjournal-Substanz 065*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 8,5 Stunden.

Ausbeute: 94,6 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

87,5 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 0,894 mm²/s (einer 5 %igen sauren Lösung, 59 °C)

Molekulargewicht (Mw): 201000

Verzweigungsgrad: 5,3 %

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.5: *Laborjournal-Substanz 067*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 50 ml 5 N Salzsäure in 950 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 1 Stunde. Der Reaktionsverlauf wurde durch kontinuierliche Drehmomentmessung (Änderung des Rührwiderstandes der Lösung) verfolgt (s. Abschn. 4.3.10).

Ausbeute: 92,3 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Drehmomentdifferenz: 10,4 Ncm

Molekulargewicht (Mw): $6,5 \cdot 10^6$

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.6: *Laborjournal-Substanz 068*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 2,5 Stunden. Der Reaktionsverlauf wurde durch kontinuierliche Drehmomentmessung (Änderung des Rührwiderstandes der Lösung) verfolgt (s. Abschn. 4.3.10).

Ausbeute: 94,5 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Drehmomentdifferenz: 10,8 Ncm

Molekulargewicht (Mw): $3,0 \cdot 10^6$

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.7: *Laborjournal-Substanz 069*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 2,5 Stunden. Der Reaktionsverlauf wurde durch kontinuierliche Drehmomentmessung (Änderung des Rührwiderstandes der Lösung) verfolgt (s. Abschn. 4.3.10).

Ausbeute: 82,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Drehmomentdifferenz: 13,5 Ncm

Molekulargewicht (Mw): $3,3 \cdot 10^6$

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.8: *Laborjournal-Substanz 071*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 2,2 Stunden. Der Reaktionsverlauf wurde durch kontinuierliche Drehmomentmessung (Änderung des Rührwiderstandes der Lösung) verfolgt (s. Abschn. 4.3.10).

Ausbeute: 93,8 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Drehmomentdifferenz: 12,9 Ncm

Molekulargewicht (Mw): $4,0 \cdot 10^6$

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.9: *Laborjournal-Substanz 078*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 5 Stunden.

Ausbeute: 96,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Molekulargewicht (Mw): $1,1 \cdot 10^6$

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.10: *Laborjournal-Substanz FAS1*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 8 Stunden. Anschließend Reduktion eines Aliquots mit NaBH₄ gemäß Abschnitt 4.4.3.

Ausbeute: 106 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

85,5 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 0,886 mm²/s (einer 5 %igen sauren Lösung, 60 °C)

Molekulargewicht (Mw): 288000

Verzweigungsgrad: 5,3 %

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.11: *Laborjournal-Substanz FAS2*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g nativer Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 8 Stunden. Anschließend Reduktion des gesamten Ansatzes mit NaBH₄ gemäß Abschnitt 4.4.3.

Ausbeute: 96,0 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

87,4 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 0,924 mm²/s (einer 5 %igen sauren Lösung, 61 °C)

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.12: *Laborjournal-Substanz FAS3*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g dünnkochender Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 5 Stunden. Anschließend Reduktion des gesamten Ansatzes mit NaBH₄ gemäß Abschnitt 4.4.3.

Ausbeute: 93,2 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

82,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

kinematische Viskosität: 0,848 mm²/s (einer 5 %igen sauren Lösung, 60 °C)

Molekulargewicht (Mw): 287000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.13: *Laborjournal-Substanz 077*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus 100 g dünnkochender Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 5 Stunden. Anschließend Reduktion des gesamten Ansatzes mit NaBH₄ gemäß Abschnitt 4.4.3.

Ausbeute: 95,8 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

kinematische Viskosität: 1,523 mm²/s (einer 10 %igen sauren Lösung, 60 °C)

Molekulargewicht (Mw): 270000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.14: *Laborjournal-Substanz AbStCH01*

Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus dünnkochender Wachsmaisstärke. Diese partiell abgebaute Stärke wurde von B. Braun Medical AG, Schweiz (St. Gallen) hergestellt und in Form eines Ethanolpräzipitates geliefert. Der jeweils benötigte Teil der gelieferten Menge (ca. 5 kg) wurde vor weiteren Umsetzungen dialysiert und lyophilisiert.

Molekulargewicht (Mw): 110000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

Abbaustärke 1.15: *Laborjournal-Substanz AbStCH02*

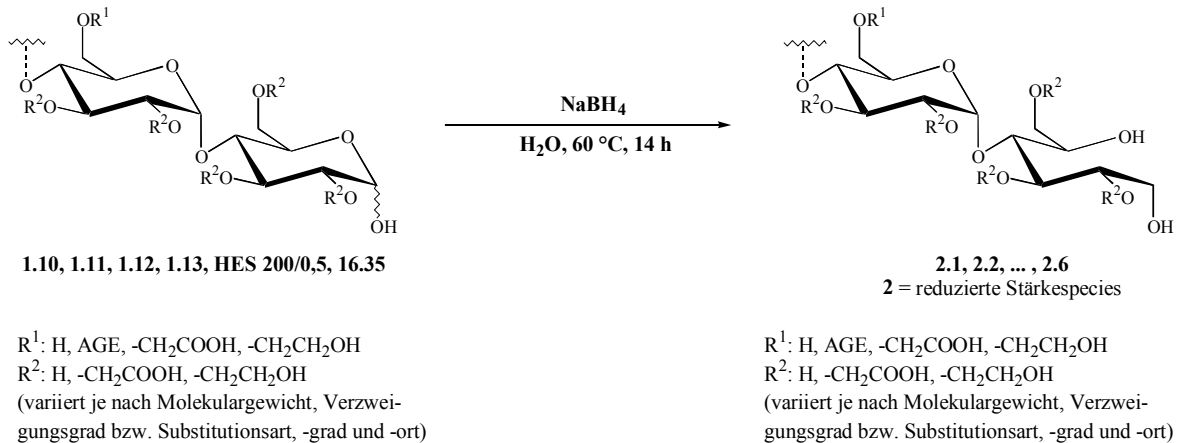
Nach obigem Verfahren 4.4.2 aus enzymatisch modifizierter Kartoffelstärke. Diese partiell abgebaute Stärke wurde von B. Braun Medical AG, Schweiz (Crissier) hergestellt und in Form eines sprühgetrockneten, unreinen Rohproduktes geliefert. Bei den in Abschnitt 4.4.12 beschriebenen sequentiellen Transformationen wurde dieses Produkt ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. Der Stärkegehalt wurde durch Dialyse und anschließende Lyophilisation eines Aliquots ermittelt. Es resultierte ein Gehalt an partiell abgebauter Stärke von 65,8 %. Das bedeutet ca. 34,2 % des Rohproduktes entfallen auf Bestandteile kleiner 20 kDa (Salze, Kohlenhydrate) und Wasser.

Molekulargewicht (Mw): 143000

Verzweigungsgrad: 4,0 %

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Abbaustärke **1.1** und **1.2**.

4.4.3 Allgemeines Verfahren zur Reduktion von Stärken



Die partiell hydrolysierte Stärke (Abschnitt 4.4.2) bzw. das entsprechende Stärkederivat wird in dem Reaktionsgefäß (Abschnitt 4.1.1) vorgelegt und zunächst mit bidest. Wasser versetzt. Man rührt hierbei zuerst langsam und später kräftiger, um eine möglichst homogene Suspension bzw. Lösung zu erhalten. Der pH-Wert wird im Bereich von 7 bis 9 gehalten. Dann wird der Ansatz unter Rühren auf 60 °C erwärmt. Man entnimmt für Vergleichszwecke ca. 10 ml der Lösung. Nun werden je nach Stärkemenge 0,5 bis 5 g festes Natriumborhydrid über einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten langsam zur Stärkelösung gegeben; ist die hierbei eintretende Gasentwicklung zu heftig, wird etwas langsamer gerührt. Anfänglich kann es zu einer starken Schaumbildung kommen, welche durch den Einsatz eines Schaumbrechers vermieden wird. Die Reaktionslösung wird bei 60 °C in der Regel 14 Stunden gerührt, nach dieser Zeit ist keine Gasentwicklung mehr registrierbar. Man entnimmt eine Probe, um die Vollständigkeit der Reduktion zu überprüfen (gemäß Abschnitt 4.3.7). Wenn die Reduktion vollständig ist, kann die Lösung weiter umgesetzt werden bzw. kann die reduzierte Abbaustärke oder das reduzierte Stärkederivat isoliert werden. Ansonsten kann durch eine erneute Zugabe von Natriumborhydrid nachreduziert werden. Sollen vorzeitig noch eventuell vorhandene Anteile an Natriumborhydrid eliminiert werden, so kann dies durch die Zugabe geringer Mengen Aceton geschehen. Die Aufarbeitung bzw. Isolierung des Produktes erfolgt nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode. Das gebildete Natriumborat wird durch Dialyse entfernt.

Charakteristische Daten der Produkte 2.1...2.6

reduzierte Abbaustärke **2.1**: Laborjournal-Substanz FAS 1 red

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 4 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10** und 0,93 g (24,6 mmol) NaBH_4 in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 14 Stunden.

Ausbeute: 3,9 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 269000

Verzweigungsgrad: 5,3 %

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, 70\text{ }^\circ\text{C}, \text{TSP int. Std.}): \delta = 5.51\text{-}5.27$ (m, Maximum bei 5.41 ppm, H-1(1-4)), 5.35 (Schulter, H-1(t)), 5.23 (~d, schwach, H-1(α -r)), 4.97 (m, schwach, H-1(1-6)), 4.80 (s, HDO), 4.64 (~d, schwach, H-1(β -r)), 4.15-3.50 (nicht aufgel., Maxima bei 3.96, 3.84, 3.65 ppm, 6H, H-2, ..., H-6), 3.42 (m(~dd), H-4(t))

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 102.5$ (C-1), 79.6 (C-4), 76.2 (C-3), 74.4 (C-2), 74.0 (C-5), 63.3 (C-6)

FTIR(ATR): 3327 s, 2826 s, 1409 s, 1364 s, 1148 s, 1077 s, 1011 s

reduzierte Abbaustärke **2.2**: *Laborjournal-Substanz FAS 2 red*

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 100 g (616,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.11** und 4,67 g (123,5 mmol) NaBH_4 in 1000 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 16 Stunden. Direkte Umsetzung des Hydrolyseansatzes **1.11**.

Ausbeute: 96,0 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

87,4 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 261000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei reduzierter Abbaustärke **2.1** und Abbaustärke **1.2**.

reduzierte Abbaustärke **2.3**: *Laborjournal-Substanz FAS 3 red*

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 100 g (616,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.12** und 0,76 g (20 mmol) NaBH_4 in 1000 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 14 Stunden. Direkte Umsetzung des Hydrolyseansatzes **1.12**.

Ausbeute: 93,2 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

82,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 260000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei reduzierter Abbaustärke **2.1** und Abbaustärke **1.2**.

reduzierte Abbaustärke **2.4**: *Laborjournal-Substanz 077*

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 100 g (616,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.13** und 0,60 g (15,9 mmol) NaBH_4 in 1000 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 24 Stunden. Direkte Umsetzung des Hydrolyseansatzes **1.13**.

Ausbeute: 95,8 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 264000

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei reduzierter Abbaustärke **2.1** und Abbaustärke **1.2**.

reduzierte Carboxymethylstärke **2.5**: *Laborjournal-Substanz 049*

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 10 g Carboxymethylstärke **16.35** und 0,60 g (15,9 mmol) NaBH₄ in 100 ml bidest. Wasser bei RT für 24 Stunden.

Ausbeute: 9,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

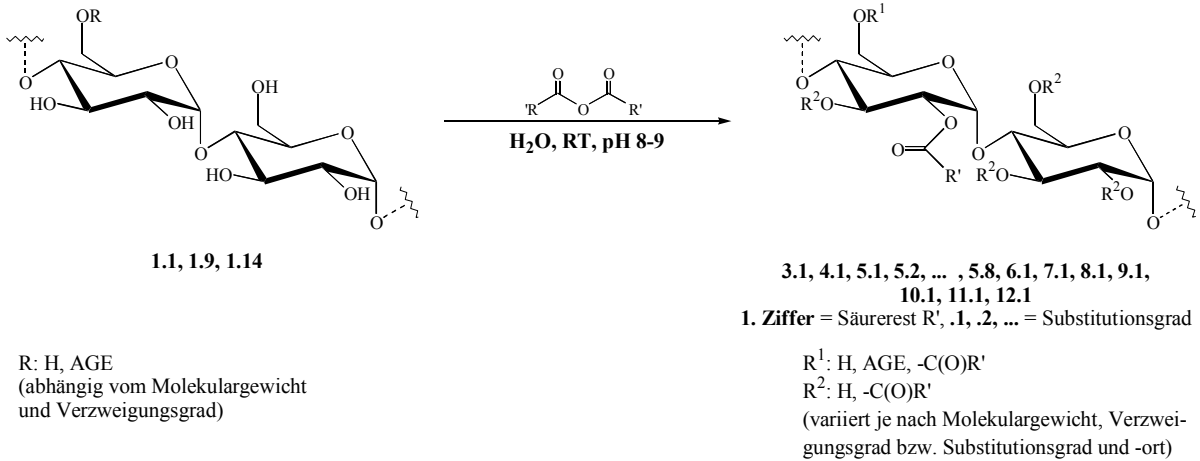
reduzierte Hydroxyethylstärke **2.6**: *Laborjournal-Substanz HES 200/0.5*

Nach obigem Verfahren 4.4.3 aus 6 g Hydroxyethylstärke 200/0,5 (Fa. Ajinomoto) und 0,50 g (13,2 mmol) NaBH₄ in 100 ml bidest. Wasser bei RT für 24 Stunden.

Ausbeute: 5,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

4.4.4 Allgemeines Verfahren zur Darstellung von Stärkeestern in wässriger Lösung bzw. Suspension mit Carbonsäureanhydriden



In einem Dreihalskolben mit Tropftrichter und pH-Elektrode wird die partiell hydrolysierte Stärke (gemäß Abschnitt 4.4.2) bei Raumtemperatur in bidest. Wasser gelöst bzw. suspendiert. Mit verdünnter Natronlauge wird ein anfänglicher pH-Wert von 8,5 eingestellt. Es werden über einen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden unter Rühren entsprechende Mengen des Säureanhydrids zugetropft. Durch gleichzeitiges Zutropfen von Natronlauge (vorzugsweise 2 N) wird der pH-Wert möglichst zwischen 8 und 9 gehalten. Handelt es sich bei dem Säureanhydrid um einen Feststoff, so wird die entsprechende Menge spatelweise hinzugegeben, wobei man bei jeder erneuten Anhydridzugabe warten sollte, bis sich das Anhydrid größtenteils aufgelöst bzw. umgesetzt hat. Ein pH-Wert kleiner 6 ist zu vermeiden, um einen weiteren Abbau der Stärke zu verhindern, ebenso sollte der pH-Wert nicht über einen längeren Zeitraum oberhalb 9 liegen, um die konkurrierende Verseifung des sich bildenden Esters zu vermeiden. Um reproduzierbare Substitutionsgrade zu erreichen, empfiehlt sich der Einsatz einer pH-Stat-Schaltung.

Nach beendeter Zugabe des Anhydrids, wird das Reaktionsgemisch für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Aufgrund eintretender Hydrolyse des noch nicht umgesetzten Anhydrids muß der pH-Wert weiterhin kontrolliert und durch evtl. Zugabe von Natronlauge zwischen 8 und 9 gehalten werden. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Der Ansatz wird nach dem in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Verfahren aufgearbeitet.

*Charakteristische Daten der Produkte 3.1, 4.1, 5.1...5.8, 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1**Acetylstärke 3.1: Laborjournal-Substanz 010*

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 2,5 g (15,4 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 1,0 g (10 mmol) Acetanhydrid in 20 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 2,95 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
2,43 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,38

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.58-5.00$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.47-3.25 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.21-1.94 (nicht aufgel., 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 174.1, 100.2, 77.3, 73.9, 61.1, 21.1$

FTIR(ATR): 3710-3030 s, 2920 s, 2089 m, 1734 s, 1572 s, 1373 m, 1242 s, 1023 s

Propionylstärke 4.1: Laborjournal-Substanz 014

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 2,5 g (15,4 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 2,0 g (15 mmol) Propionsäureanhydrid in 20 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 2,13 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
1,85 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,26

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.59-4.99$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.43-3.23 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.45-2.21 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.10-0.91 (nicht aufgel., 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 188.4, 176.8, 100.1, 77.3, 74.0, 72.0, 60.8, 27.7, 8.9$

FTIR(ATR): 3673-3030 s, 2930 s, 1734 s, 1572 s, 1415 w, 1347 w, 1201 w, 1148 w, 1023 s

Succinylstärke 5.1: Laborjournal-Substanz 025

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 3,1 g (31 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei 80 °C.

Ausbeute: 4,31 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
3,84 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,12

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.57-5.03$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.37-3.22 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.59-2.26 (nicht aufgel., 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 181.8, 176.1, 175.6, 100.3, 77.3, 74.0, 72.2, 71.8, 69.9, 61.1, 34.8, 32.5, 31.1$

FTIR(ATR): 3746-3272 s, 2910 s, 2147 m, 1729 s, 1561 s, 1410 m, 1295 w, 1154 w, 1023 s

Succinylstärke 5.2: Laborjournal-Substanz 024

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 3,1 g (31 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei 60 °C.

Ausbeute: 4,10 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
3,63 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,14

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.3: Laborjournal-Substanz 023

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 3,1 g (31 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei 40 °C.

Ausbeute: 3,96 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
3,41 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,32

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.4: Laborjournal-Substanz 019

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 3,1 g (31 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 4,36 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
3,87 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,35

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.5: Laborjournal-Substanz 012

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 2,0 g (20 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 4,78 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
4,13 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,43

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.6: Laborjournal-Substanz 022

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 9,3 g (93 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 5,78 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
4,53 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,63

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.7: Laborjournal-Substanz 020

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 6,2 g (62 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 5,46 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
4,81 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,68

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

Succinylstärke 5.8: Laborjournal-Substanz 036

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 40,0 g (247 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.14** und 24,7 g (247 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 500 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 55,1 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
42,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,70

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Succinylstärke **5.1**.

2,2-Dimethylsuccinylstärke 6.1: Laborjournal-Substanz 088

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 1,9 g (11,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 1,0 g (7,8 mmol) 2,2-Dimethylbernsteinsäureanhydrid in 30 ml bidest. Wasser bei 30 °C.

Ausbeute: 1,88 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,25

¹H-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 5.88-5.12 (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.57-3.20 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.80-2.37 (nicht aufgel., 2H, -CH₂-), 1.44-1.00 (nicht aufgel., 6H, 2 x -CH₃-)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 189.2, 180.8, 175.7, 102.3, 99.1, 79.8, 76.1, 74.2, 74.0, 62.4, 50.3, 46.8, 44.4, 42.3, 28.1

Dodecenylysuccinylstärke 7.1: Laborjournal-Substanz 079

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 9,6 g (59,2 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 8,0 g (30 mmol) Dodecenylybernsteinsäureanhydrid in 100 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur für 24 Stunden.

Ausbeute: 9,71 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
9,31 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,04

¹H-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 6.12-5.95 (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 5.68-4.90 (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.37-3.22 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 1.85-0.63 (nicht aufgel., 23H, Dodecenyly-)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 188.3, 102.8, 79.8, 77.9, 73.8, 73.4, 62.5

Glutarylstärke 8.1: Laborjournal-Substanz 026

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 7,1 g (62 mmol) Glutarsäureanhydrid in 40 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 5,92 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
4,70 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,45

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.75\text{-}4.95$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.70-3.20 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.70-2.00 (nicht aufgel., 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 1.90-1.60 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 183.1, 175.8, 100.0, 76.0, 74.0, 71.8, 61.0, 37.2, 33.6, 21.8$

FTIR(ATR): 3694-3251 s, 2946 s, 2110 m, 1729 s, 1567 s, 1410 m, 1316 w, 1242 w, 1148 w, 1012 w

2,2-Dimethylglutarylstärke 9.1: Laborjournal-Substanz 081

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 9,6 g (59,2 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 8,42 g (59,2 mmol) 2,2-Dimethylglutarsäureanhydrid in 100 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 10,35 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
8,76 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,38

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.})$: $\delta = 5.94\text{-}5.08$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.52-3.28 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.59-2.25 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.97-1.59 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.36-0.80 (nicht aufgel., 6H, 2 x $-\text{CH}_3-$)

3,3-Dimethylglutarylstärke 10.1: Laborjournal-Substanz 082

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 9,6 g (59,2 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 8,42 g (59,2 mmol) 3,3-Dimethylglutarsäureanhydrid in 100 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 11,40 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)
9,82 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,57

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.})$: $\delta = 5.98\text{-}5.11$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.57-3.31 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.78-2.26 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.26-2.04 (nicht aufgel., 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.40-0.94 (nicht aufgel., 6H, 2 x $-\text{CH}_3-$)

3-Oxaglutarylstärke 11.1: Laborjournal-Substanz 090

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 9,6 g (59,2 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 6,87 g (59,2 mmol) Diglykolsäureanhydrid in 100 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 6,45 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): < 0,04

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 6.15-5.90$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), $5.71-5.12$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.56-3.18 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.22-2.08 (nicht aufgel., 4H, 2 x -CH₂-)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 180.9, 102.5, 79.6, 76.2, 74.4, 74.0, 63.3$

Di-O-acetylweinsäurestärkeester 12.1: Laborjournal-Substanz 087

Nach obigem Verfahren 4.4.4 aus 9,6 g (59,2 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.9** und 12,8 g (59,2 mmol) Di-O-acetylweinsäureanhydrid in 100 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur.

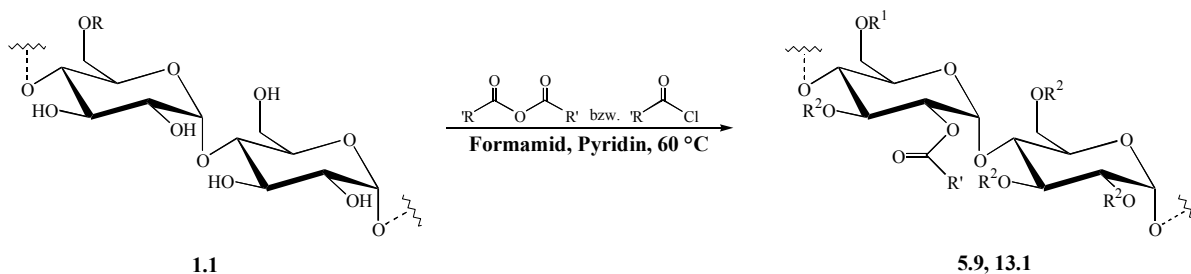
Ausbeute: 6,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): < 0,04

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 6.12-5.70$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), $5.70-5.05$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.25-3.20 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.28-2.01 (nicht aufgel., 6H, 2 x -CH₃-)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 175.1, 102.5, 79.5, 75.7, 74.4, 74.0, 63.3, 20.5$

4.4.5 Allgemeines Verfahren zur Darstellung von Stärkeestern in Formamid mit Carbonsäureanhydriden bzw. Carbonsäurechloriden



1.1

5.9, 13.1

R: H, AGE
(abhängig vom Molekulargewicht
und Verzweigungsgrad)

R¹: H, AGE, -C(O)R'
R²: H, -C(O)R'
(variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsgrad und -ort)

In einem Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rückflusskühler und aufgesetztem Trockenrohr wird die entsprechende Menge Abbaustärke vorgelegt. Man gibt zunächst Pyridin und anschließend Formamid hinzu. Die Mischung wird bei 50 °C solange gerührt bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Danach werden bei 60 °C entsprechende Mengen des Säureanhydrids bzw. Säurechlorids langsam hinzugegeben. Man lässt die Lösung für 16 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Anschließend fällt man den Stärkeester mit Ethanol oder Aceton aus dem Reaktionsgemisch aus und reinigt ihn auf. Die Stärkeester von mehrwertigen Säuren fallen hierbei als Pyridinium-Salze an. Es ist jedoch möglich, die Ester in die Säureform zu überführen. Dazu wird das Stärkederivat durch Eingießen der Reaktionslösung in einem Überschuss eiskalter 2 N Salzsäure - welche gegebenenfalls mit Ethanol versetzt wurde - ausgefällt. Um das Natriumsalz des Halbesters zu erhalten, kann man nun die Säureform in einer eiskalten gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung lösen und anschließend erneut mit Ethanol oder Aceton fällen. Die endgültige Aufarbeitung der anfallenden Produkte erfolgt nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode, wobei auch wasserunlösliche Stärkederivate auf diese Weise aufgereinigt werden können. Hierbei wird anstatt einer wässrigen Lösung die wässrige Suspension des hydrophoben Stärkeesters gegen bidest. Wasser dialysiert; dadurch können Spuren von Pyridin und Formamid restlos entfernt werden.

Charakteristische Daten der Produkte 5.9 und 13.1

Succinylstärke 5.9: Laborjournal-Substanz 013

Nach obigem Verfahren 4.4.5 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke 1.1 und 7,5 g (75 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 7 g (89 mmol) Pyridin in 50 ml Formamid bei 70 °C für 52 Stunden.

Ausbeute: 2,71 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad (MS): 0,99

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.59\text{-}4.79$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.56-3.33 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.95-2.03 (nicht aufgel., 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 181.4, 176.1, 160.4, 77.3, 74.0, 72.2, 60.1, 32.8, 31.4$

FTIR(ATR): 3730-3413 s, 1740 s, 1577 s, 1415 m, 1258 w, 1154 w, 1023 s

Ethoxycarbonyl-/formylstärke **13.1**: *Laborjournal-Substanz 016*

Nach obigem Verfahren 4.4.5 aus 3,0 g (18,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1** und 2,1 g (19 mmol) Ethylchlorformiat und 1,5 g (19 mmol) Pyridin in 20 ml Formamid bei 60 °C für 16 Stunden.

Ausbeute: 1,95 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Substitutionsgrad MS(Ethoxycarbonyl-): 0,15

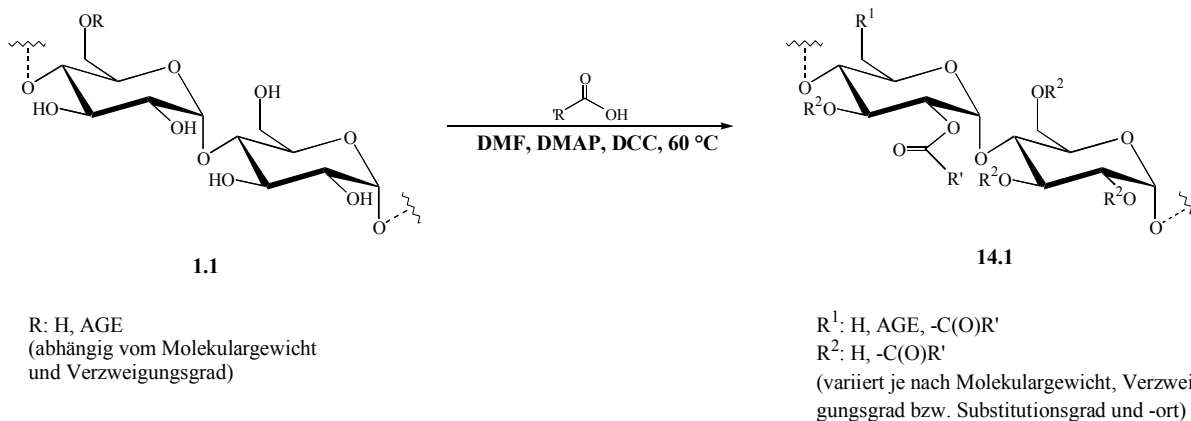
Substitutionsgrad MS(Formyl-): 0,17

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 8.22\text{-}8.01$ (nicht aufgel., 1H, $-\text{C}(\text{O})\text{-H}$), 5.52-5.04 (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.50-3.22 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 4.28-4.07 (nicht aufgel., 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 1.28-1.12 (nicht aufgel., 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 164.4, 156.2, 100.6, 77.9, 74.1, 72.1, 69.7, 67.5, 66.2, 61.3, 14.4$

FTIR(ATR): 3657-3030 s, 2090 s, 1729 s, 1263 s, 1148 w, 1018 s, 924 w

4.4.6 Allgemeines Verfahren zur Veresterung von Stärken mit freien Carbonsäuren und Carbodiimiden



In einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Trockenrohr und Thermometer werden 50 ml trockenes Dimethylformamid vorgelegt. Anschließend wird die bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Stärke hinzugegeben und unter Rühren auf 60 °C erwärmt. Sobald sich die Abbaustärke gelöst hat, wird die Carbonsäure sowie das 4-Dimethylaminopyridin hinzugegeben. Zu der Lösung werden dann, über einen Zeitraum von 5 Minuten, äquimolare Mengen in DMF gelöstes Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Die Reaktionsmischung wird für ca. 48 Stunden gerührt. Hierbei ist eine Gelbfärbung zu beobachten, die im Verlauf der Reaktion zunehmend intensiver wird und bis in den braunen Bereich gehen kann. Trotz der erhöhten Temperatur kann es bereits zu einem teilweisen Ausfällen des bei der Reaktion entstehenden Dicyclohexylharnstoffs kommen. Das schwerlösliche Harnstoffderivat wird über eine Glasfritte abfiltriert. Das dunkle Filtrat wird in eiskaltes Ethanol gegossen, der ausfallende Stärkeester wird abfiltriert und sehr sorgfältig mit Ethanol gewaschen. Die weitere Aufarbeitung des Stärkederivats erfolgt nach dem in 4.4.1 beschriebenen Verfahren.

Charakteristische Daten von Pivaloylstärke **14.1**: *Laborjournal-Substanz 032*

Nach obigem Verfahren 4.4.6 aus 2,5 g (15,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 1,0 g (10 mmol) Pivalinsäure, 0,61 g (5 mmol) 4-Dimethylaminopyridin und 2,27 g (11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml Dimethylformamid bei 60 °C für 48 Stunden.

Ausbeute: 1,84 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

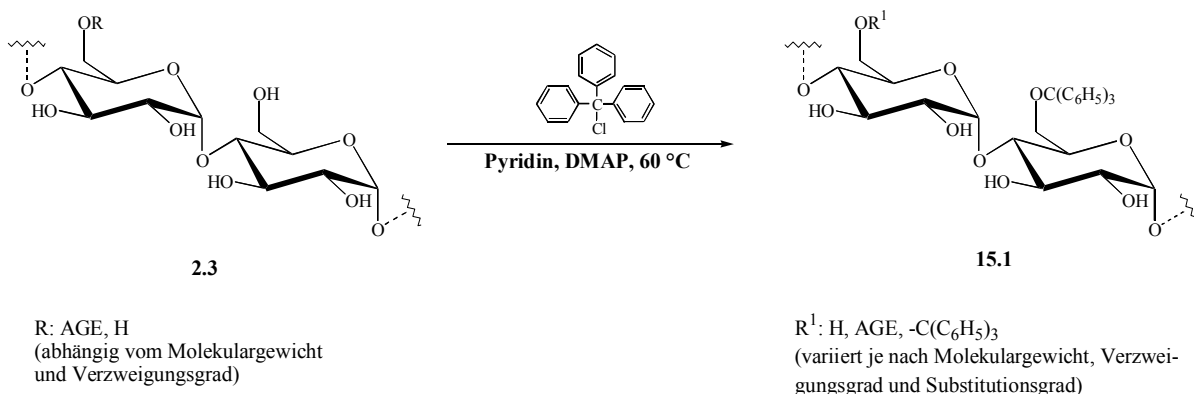
Substitutionsgrad (MS): 0,10

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 5.95\text{-}5.09$ (nicht aufgel., 1H, anomeres H), 4.80 (s, HDO), 4.40-3.00 (nicht aufgel., 6H, H-2, ..., H-6), 2.10-1.38 (nicht aufgel., keine Zuordnung), 1.38-0.90 (nicht aufgel., 9H, 3 x $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $\delta = 156.2, 100.4, 77.6, 74.0, 72.2, 61.1, 33.3, 27.2, 25.3$

FTIR(ATR): 3683-3025 s, 2115 w, 1708 s, 1520 s, 1415 w, 1347 m, 1232 s, 1154 w, 1033 s

4.4.7 Verfahren zur 6-O-Tritylierung von Stärken



Die bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Abbaustärke wird in einem Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rückflußkühler und Trockenrohr vorgelegt. Die Stärke wird unter Rühren in abs. Pyridin bei 85 °C gelöst. Anschließend wird das zuvor in abs. Pyridin gelöste Dimethylaminopyridin hinzugegeben. Es wird für eine halbe Stunde bei 60 °C gerührt und anschließend das in abs. Pyridin gelöste Triphenylmethylchlorid über einen Zeitraum von 30 Minuten hinzugetropft. Der Ansatz wird für 16 Stunden bei 60 °C gerührt.

Die gelbe Lösung wird dann mit einem halben Volumenanteil von Dioxan versetzt und mehrfach gut durchgeschüttelt. Diese Lösung wird in einen zehnfachen Überschuss an Methanol gegeben. Hierbei fällt das Stärkederivat zusammen mit Tritylnebenprodukten aus. Der Niederschlag wird über eine Glasfritte abgesaugt und mit Methanol gewaschen, das gelbliche Filtrat wird verworfen. Das Präzipitat wird über Nacht an der Luft getrocknet und danach ca. 4 bis 5 Stunden in einem Soxhlet-Extraktor mit Ether extrahiert. Der Feststoff wird in Dioxan gelöst und erneut in Methanol gefällt, gewaschen und an der Luft getrocknet. Es resultiert eine wasserunlösliche 6-O-Tritylstärke.

Charakteristische Daten von 6-O-Tritylstärke **15.1**: *Laborjournal-Substanz 076*

Nach obigem Verfahren 4.4.7 aus 3,0 g (18,5 mmol Anhydroglucose) reduzierter Abbaustärke **2.3**, 2,44 g (20 mmol) 4-Dimethylaminopyridin und 15,33 g (55,5 mmol) Triphenylmethylchlorid in insges. 120 ml abs. Pyridin bei 60 °C für 16 Stunden.

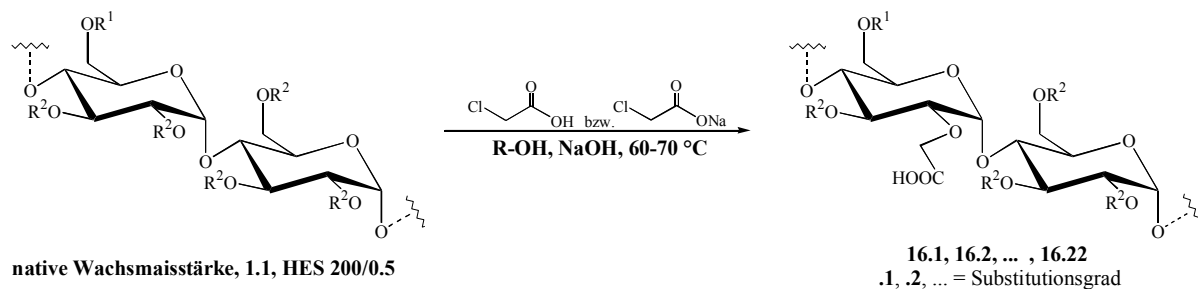
Ausbeute: 3,65 g farbloser Feststoff (Methanolpräzipitat)

¹H-NMR(DMSO-d₆): δ = 8.48-6.25 (nicht aufgel., aromatisch), 6.20-4.45 (nicht aufgel., anomeres H), 4.45-2.18 (nicht aufgel., H-2, ..., H-6)

¹³C-NMR(DMSO-d₆): δ = 144.3, 138.1-126.2, 100.4, 97.9, 85.3, 79.8, 72.3, 63.2

FTIR(ATR): 3368 s, 3054s, 2923 s, 1589 s, 1490 s, 1448 s m, 1223 s, 1150 w, 1024 s

4.4.8 Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in niederen Alkoholen



R^1 : H, AGE, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 R^2 : H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 (variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsgrad und -ort)

R^1 : H, AGE, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 R^2 : H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 (variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsart, -grad und -ort)

Die jeweilige Stärke wird in das Reaktionsgefäß mit Rückflusskühler und Tropftrichter vorgelegt. Der Alkohol (Methanol, Ethanol oder 2-Propanol) wird hinzugegeben und die Suspension wird unter Rühren bis zum gelinden Rückfluss (bei 2-Propanol bevorzugt nur auf 60 °C) erwärmt. Zu dieser Suspension wird nun Monochloressigsäure bzw. Monochloressigsäure-Natriumsalz, welche(s) zuvor in möglichst wenig Alkohol gelöst wurde, gegeben. Die Rührfrequenz wird erhöht und es erfolgt die tropfenweise Zugabe einer konzentrierten Lösung aus Natriumhydroxid in Wasser bzw. in wässrigem Alkohol. Die Reihenfolge der Reagenzien-Zugabe kann auch umgekehrt werden. In diesem Fall wird das Natriumhydroxid auf einmal zur Stärkesuspension gegeben und diese Mischung vor der Monochloressigsäure-Zugabe für eine Weile gerührt.

Abschließend wird bei kontrollierter Reaktionstemperatur für 2 bis 6 Stunden gerührt. Danach wird der Ansatz über eine Glasfritte abfiltriert und der Feststoff mit 80 %igem Ethanol gewaschen, trocken gesaugt und im Vakuumtrockenschrank bei 60 °C getrocknet. Eine weitere Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgt nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode.

Eine Verklumpung der Reaktionsmischung kann durch rechtzeitiges Verdünnen mit dem entsprechenden Alkohol vermieden werden. Bei nicht-reduzierten Stärkespecies kann es aufgrund der hohen Alkalimengen zu einer Gelbfärbung während des Reaktionsverlaufs kommen.

*Charakteristische Daten der Produkte 16.1...16.22***Carboxymethylstärke 16.1: Laborjournal-Substanz 044**

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 2,0 g (50,0 mmol) Natriumhydroxid und 2,0 g (21,2 mmol) Monochloressigsäure in 20 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 60 °C für 6 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 4,3 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

3,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,7 : 1,6

MS: 0,13

MS(C₂+C₃): 0,10

MS(C₆): 0,03

MS(C₃): 0,02

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 3,3

Reaktionseffizienz (RE(%)): 18,8

¹H-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 5.66-5.49 (m, Maximum bei 5.54 ppm, H-1), 5.45-5.19 (m, Maximum bei 5.31 ppm, H-1), 5.25 (Schulter, H-1), 4.88 (m, H-1), 4.70 (s, HDO), 4.28-3.27 (nicht aufgel., Maxima bei 4.10, 3.86, 3.75, 3.55 ppm), 3.32 (m)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 178.5, 100.4, 80.7, 77.3, 74.0, 73.5, 73.3, 72.2, 70.8, 70.0, 61.0

¹H-NMR(D₂O/D₂SO₄, TSP ext. Std.): δ = 5.38 (d, 1H, H-1(α-s), J=3.8), 5.19 (d, 1H, H-1(α-u), J=3.8), 4.82 (HDO), 4.69 (d, 1H, H-1(β-s), J=8.0), 4.61 (d, 1H, H-1(β-u), J=8.0), 4.44 (m, 2H, α,β-3-O-CH₂COOH), 4.42 (d, 1H, β-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.39 (d, 1H, β-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.34 (d, 1H, α-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.30 (d, 1H, α-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.18 (m, 2H, α,β-6-O-CH₂COOH), 3.84, 3.79, 3.78 (je m, H-6'(β), H-5(α), H-6'(α), (u) und (s)), 3.72, 3.69, 3.67 (je m, H-6(α), H-6(β), H-3(α), (u) und (s)), 3.58 (dd, 1H, H-3(β-s), J=9.0, J=9.0), 3.52 (dd, 1H, H-2(α-u), J=3.8, J=9.8), 3.47 (dd, 1H, H-3(β-u), J=9.2, J=9.2), 3.44, 3.39 (je m, H-5(β), H-4(β), H-4(α), (u) und (s)), 3.21 (dd, 1H, H-2(β-u), J=8.0, J=9.5), 3.14 (dd, 1H, H-2(β-s), J=8.0, J=9.5)

FTIR(ATR): 3330 s, 2926 s, 1740 m, 1594 m, 1411 m, 1322 s, 1149 s, 1082 m, 1010 m

Carboxymethyl-hydroxyethylstärke 16.2: Laborjournal-Substanz 048

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,8 g (15,2 mmol HE-/Anhydroglucose) Hydroxyethylstärke 200/0,5 (Fa. Ajinomoto), 0,8 g (20,0 mmol) Natriumhydroxid und 0,75 g (8,0 mmol) Monochloressigsäure in 30 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 6 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 3,2 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

2,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,5 : 1,3

MS: 0,05

Reaktionseffizienz (RE(%)): 9,4

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.71\text{-}5.15$ (m, Maxima bei 5.63, 5.44, 5.29 ppm, H-1), 5.20 (Schulter, H-1), 4.85 (m, H-1), 4.69 (s, HDO), 4.18-4.03 (m, $-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 4.03-3.40 (nicht aufgel., Maxima bei 3.89, 3.83, 3.77, 3.72, 3.65, 3.55, 3.49 ppm), 3.40-3.25 (m, Maximum bei 3.32 ppm)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 178.2, 100.1, 99.2, 97.1, 82.5, 82.0, 80.0, 77.9, 75.8, 75.2, 74.1, 72.4, 72.3, 70.8, 70.1, 61.8, 61.3$

Carboxymethylstärke **16.3**: *Laborjournal-Substanz 053*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 4,0 g (100,0 mmol) Natriumhydroxid und 4,0 g (42,3 mmol) Monochloressigsäure in 25 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 6 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 11,7 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

8,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,7 : 1,6

MS: 0,37

MS(C₂+C₃): 0,31

MS(C₆): 0,06

MS(C₃): 0,05

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 5,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 53,6

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.4**: *Laborjournal-Substanz 054*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 8,0 g (200,0 mmol) Natriumhydroxid und 8,0 g (84,7 mmol) Monochloressigsäure in 30 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 6 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 14,4 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

9,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,4 : 3,2

MS: 0,69

MS(C₂+C₃): 0,58

MS(C₆): 0,11

MS(C₃): 0,06

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 5,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 50,4

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.5**: *Laborjournal-Substanz 055*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 12,0 g (300,0 mmol) Natriumhydroxid und 12,0 g (127 mmol) Monochloressigsäure in 35 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 6 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 17,7 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

11,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 2,1 : 4,9

MS: 0,70

MS(C₂+C₃): 0,56

MS(C₆): 0,14

MS(C₃): 0,06

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 34,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.6**: *Laborjournal-Substanz 060*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 75,0 g (462,6 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 25,0 g (625,0 mmol) Natriumhydroxid und 26,3 g (278,0 mmol) Monochloressigsäure in 330 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 102,1 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

74,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,6 : 1,4

MS: 0,37

MS(C₂+C₃): 0,30

MS(C₆): 0,07

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,3

Reaktionseffizienz (RE(%)): 61,7

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.7**: *Laborjournal-Substanz 061*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 75,0 g (462,6 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 29,0 g (725,6 mmol) Natriumhydroxid und 34,0 g (360,0 mmol) Monochloressigsäure in 330 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 117,0 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

72,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 1,6

MS: 0,47

MS(C₂+C₃): 0,39

MS(C₆): 0,08

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,9

Reaktionseffizienz (RE(%)): 60,3

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.8**: *Laborjournal-Substanz 062*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 75,0 g (462,6 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 37,8 g (945,6 mmol) Natriumhydroxid und 39,7 g (420,0 mmol) Monochloressigsäure in 380 ml Methanol/Wasser (90:10 v/v) bei 67 °C für 5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 103,4 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

72,6 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,9 : 2

MS: 0,40

MS(C₂+C₃): 0,34

MS(C₆): 0,06

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 5,7

Reaktionseffizienz (RE(%)): 44,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.9**: *Laborjournal-Substanz 040*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 5,0 g (125,0 mmol) Natriumhydroxid und 4,5 g (47,6 mmol) Monochloressigsäure in 65 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 8,3 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

7,6 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 2

MS: 0,22

MS(C₂+C₃): 0,16

MS(C₆): 0,06

MS(C₃): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,6

Reaktionseffizienz (RE(%)): 28,6

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.10: Laborjournal-Substanz 041

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 2,5 g (62,5 mmol) Natriumhydroxid und 2,25 g (23,8 mmol) Monochloressigsäure in 45 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 5,4 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

4,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 2

MS: 0,26

MS(C₂+C₃): 0,17

MS(C₆): 0,09

MS(C₃): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,9

Reaktionseffizienz (RE(%)): 33,8

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.11: Laborjournal-Substanz 042

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 5,0 g (30,8 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 2,5 g (62,5 mmol) Natriumhydroxid und 2,25 g (23,8 mmol) Monochloressigsäure in 45 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde gleichzeitig mit dem Natriumhydroxid zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 5,2 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

4,5 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 2

MS: 0,07

MS(C₂+C₃): 0,04

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,3

Reaktionseffizienz (RE(%)): 9,1

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.12: Laborjournal-Substanz 050

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 4,8 g (120,3 mmol) Natriumhydroxid und 4,5 g (47,6 mmol) Monochloressigsäure in 65 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 11,3 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

7,35 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 2

MS: 0,27

MS(C₂+C₃): 0,19

MS(C₆): 0,08

MS(C₃): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,4

Reaktionseffizienz (RE(%)): 33,8

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.13**: *Laborjournal-Substanz 051*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 9,6 g (240,0 mmol) Natriumhydroxid und 9,0 g (95,2 mmol) Monochloressigsäure in 110 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 16,6 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,5 : 3,9

MS: 0,72

MS(C₂+C₃): 0,59

MS(C₆): 0,13

MS(C₃): 0,08

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,5

Reaktionseffizienz (RE(%)): 48,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.14**: *Laborjournal-Substanz 052*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 18,5 g (462,5 mmol) Natriumhydroxid und 13,5 g (142,9 mmol) Monochloressigsäure in 155 ml Ethanol/Wasser (95:5 v/v) bei 78 °C für 1,5 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 16,4 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 2,3 : 7,5

MS: 1,18

MS(C₂+C₃): 0,86

MS(C₆): 0,32

MS(C₃): 0,17

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,7

Reaktionseffizienz (RE(%)): 50,9

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.15: Laborjournal-Substanz 063

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 15,1 g (93 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.14**, 5,84 g (146 mmol) Natriumhydroxid und 6,8 g (72,4 mmol) Monochloressigsäure in 210 ml 2-Propanol/Wasser (95:5 v/v) bei 50 °C für 17 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 8,0 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

4,5 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,8 : 1,6

MS: 0,50

MS(C₂+C₃): 0,38

MS(C₆): 0,12

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 3,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 64,1

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.16: Laborjournal-Substanz 066

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 40,0 g (222 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.3**, 16,0 g (400 mmol) Natriumhydroxid und 23,6 g (250 mmol) Monochloressigsäure in 400 ml 2-Propanol/Wasser (95:5 v/v) bei 60 °C für 24 Stunden. Die Monochloressigsäure wurde vor der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 42,0 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

32,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,1 : 1,8

MS: 0,59

MS(C₂+C₃): 0,48

MS(C₆): 0,11

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,4

Reaktionseffizienz (RE(%)): 52,2

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.17: Laborjournal-Substanz FE1

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 0,5 g (12,5 mmol) Natriumhydroxid und 1,43 g (12,3 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 1,9 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,1 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,71

MS(C₂+C₃): 0,57

MS(C₆): 0,14

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,1

Reaktionseffizienz (RE(%)): 71,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.18**: *Laborjournal-Substanz FE2*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,0 g (25 mmol) Natriumhydroxid und 2,87 g (24,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 2,4 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,6 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 2 : 2

MS: 1,17

MS(C₂+C₃): 0,88

MS(C₆): 0,29

MS(C₃): 0,11

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 3,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 58,5

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke **16.19**: *Laborjournal-Substanz FE3*

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,5 g (37,5 mmol) Natriumhydroxid und 4,29 g (36,9 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 2,0 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,2 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 3 : 3

MS: 1,29

MS(C₂+C₃): 0,86

MS(C₆): 0,43

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 43,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.20: Laborjournal-Substanz FE4

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 2,0 g (50,0 mmol) Natriumhydroxid und 5,73 g (49,2 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 2,2 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 4 : 4

MS: 1,49

MS(C₂+C₃): 0,97

MS(C₆): 0,52

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,9

Reaktionseffizienz (RE(%)): 37,3

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.21: Laborjournal-Substanz FE5

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 2,0 g (50,0 mmol) Natriumhydroxid und 2,87 g (24,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 2,3 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,0 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 2 : 4

MS: 0,71

MS(C₂+C₃): 0,39

MS(C₆): 0,32

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 35,3

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

Carboxymethylstärke 16.22: Laborjournal-Substanz FE19

Nach obigem Verfahren 4.4.8 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) reduzierter Abbaustärke **2.2**, 0,5 g (12,5 mmol) Natriumhydroxid und 1,43 g (12,3 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 50 ml 2-Propanol/Wasser (4:1 v/v) bei 60 °C für 4 Stunden. Das Natriumsalz der Monochloressigsäure wurde nach der Natriumhydroxidzugabe zur Stärkesuspension gegeben.

Ausbeute: 1,9 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

1,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,78

MS(C₂+C₃): 0,63

MS(C₆): 0,15

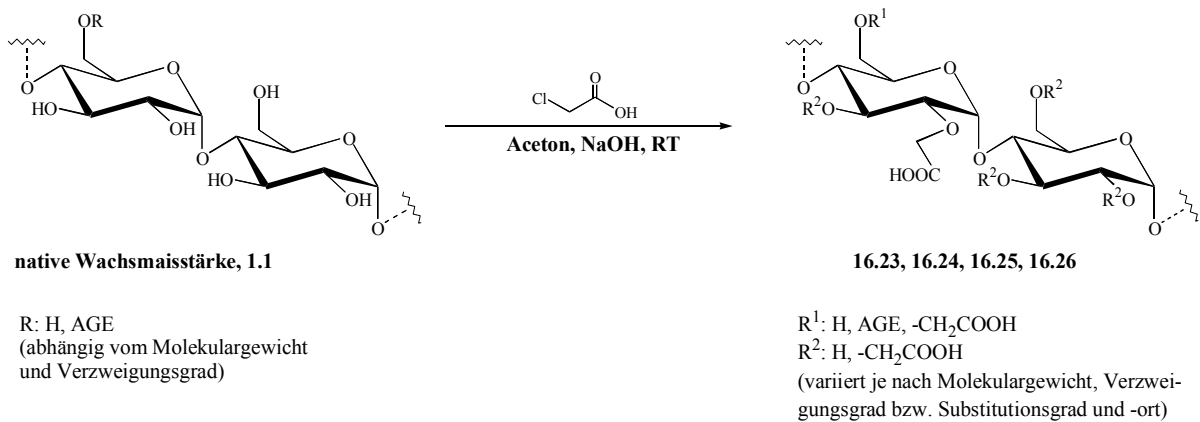
MS(C₃): 0,08

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 78,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.1**.

4.4.9 Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in Aceton



Die jeweilige Stärke wird in einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler in Aceton unter Rühren bei Raumtemperatur suspendiert und die entsprechende Menge einer 25 %igen Natronlauge hinzugegeben. Hierbei quellen die Stärkekörner auf. Der Ansatz wird durch eine erhöhte Rührfrequenz stärker durchmischt, um ein Verkleben bzw. Verklumpen der Stärke zu vermeiden. Die alkalische Suspension wird zunächst für eine Stunde gerührt, danach wird die Monochloressigsäure portionsweise über einen Zeitraum von 15 Minuten hinzugegeben. Der Ansatz wird schließlich für weitere fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Aufgrund der hohen Alkalimengen kommt es bei nicht-reduzierten Stärkespecies zu einer Gelbfärbung während des Reaktionsverlaufs. Abschließend wird die Suspension über eine Glasfritte abfiltriert und der Feststoff mit Aceton mehrfach gewaschen, trockengesaugt und im Vakuumtrockenschrank bei 60 °C getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt kann nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode weiter aufgearbeitet werden.

Charakteristische Daten der Produkte 16.23...16.26

Carboxymethylstärke **16.23**: *Laborjournal-Substanz 046*

Nach obigem Verfahren 4.4.9 aus 2,5 g (15,4 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.1**, 0,81 g (20,25 mmol) Natriumhydroxid und 1,28 g (13,5 mmol) Monochloressigsäure in 35 ml Aceton bei Raumtemperatur für 4 Stunden.

Ausbeute: 2,1 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

2,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 0,9 : 1,3

MS: 0,11

MS(C₂+C₃): 0,08

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,7

Reaktionseffizienz (RE(%)): 12,5

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.66\text{-}5.49$ (m, Maximum bei 5.54 ppm, H-1), 5.45-5.19 (m, Maximum bei 5.31 ppm, H-1), 5.25 (Schulter, H-1), 4.88 (m, H-1), 4.70 (s, HDO), 4.28-3.27 (nicht aufgel., Maxima bei 4.10, 3.86, 3.75, 3.55 ppm), 3.32 (m)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 178.5, 100.4, 80.7, 77.3, 74.0, 73.5, 73.3, 72.2, 70.8, 70.0, 61.0$

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.38$ (d, 1H, H-1(α -s), J=3.8), 5.19 (d, 1H, H-1(α -u), J=3.8), 4.82 (HDO), 4.69 (d, 1H, H-1(β -s), J=8.0), 4.61 (d, 1H, H-1(β -u), J=8.0), 4.44 (m, 2H, α,β -3-O- CH_2COOH), 4.42 (d, 1H, β -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, J=17.0), 4.39 (d, 1H, β -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, J=17.0), 4.34 (d, 1H, α -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, J=17.0), 4.30 (d, 1H, α -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, J=17.0), 4.18 (m, 2H, α,β -6-O- CH_2COOH), 3.84, 3.79, 3.78 (je m, H-6'(β), H-5(α), H-6'(α), (u) und (s)), 3.72, 3.69, 3.67 (je m, H-6(α), H-6(β), H-3(α), (u) und (s)), 3.58 (dd, 1H, H-3(β -s), J=9.0, J=9.0), 3.52 (dd, 1H, H-2(α -u), J=3.8, J=9.8), 3.47 (dd, 1H, H-3(β -u), J=9.2, J=9.2), 3.44, 3.39 (je m, H-5(β), H-4(β), H-4(α), (u) und (s)), 3.21 (dd, 1H, H-2(β -u), J=8.0, J=9.5), 3.14 (dd, 1H, H-2(β -s), J=8.0, J=9.5)

FTIR(ATR): 3330 s, 2926 s, 1740 m, 1594 m, 1411 m, 1322 s, 1149 s, 1082 m, 1010 m

Carboxymethylstärke **16.24**: *Laborjournal-Substanz 056*

Nach obigem Verfahren 4.4.9 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 3,12 g (78 mmol) Natriumhydroxid und 5,0 g (52,9 mmol) Monochloressigsäure in 40 ml Aceton bei Raumtemperatur für 5 Stunden.

Ausbeute: 14,63 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

9,56 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl- CH_2 -COOH : NaOH): 1 : 0,9 : 1,3

MS: 0,23

Reaktionseffizienz (RE(%)): 26,7

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.23**.

Carboxymethylstärke **16.25**: *Laborjournal-Substanz 057*

Nach obigem Verfahren 4.4.9 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 4,0 g (100 mmol) Natriumhydroxid und 6,0 g (63,5 mmol) Monochloressigsäure in 50 ml Aceton bei Raumtemperatur für 5 Stunden.

Ausbeute: 13,62 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

9,30 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl- CH_2 -COOH : NaOH): 1 : 1 : 1,6

MS: 0,45

MS(C_2+C_3): 0,38

MS(C_6): 0,07

MS(C_3): 0,04

Verhältnis $MS(C_2+C_3) / MS(C_6)$: 5,4

Reaktionseffizienz (RE(%)): 43,7

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.23**.

Carboxymethylstärke **16.26**: *Laborjournal-Substanz 058*

Nach obigem Verfahren 4.4.9 aus 10,0 g (61,7 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 4,92 g (123 mmol) Natriumhydroxid und 7,0 g (74,1 mmol) Monochloressigsäure in 70 ml Aceton bei Raumtemperatur für 5 Stunden.

Ausbeute: 15,78 g farbloser Feststoff (gewaschenes Rohprodukt)

10,43 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,2 : 2

MS: 0,55

$MS(C_2+C_3)$: 0,45

$MS(C_6)$: 0,10

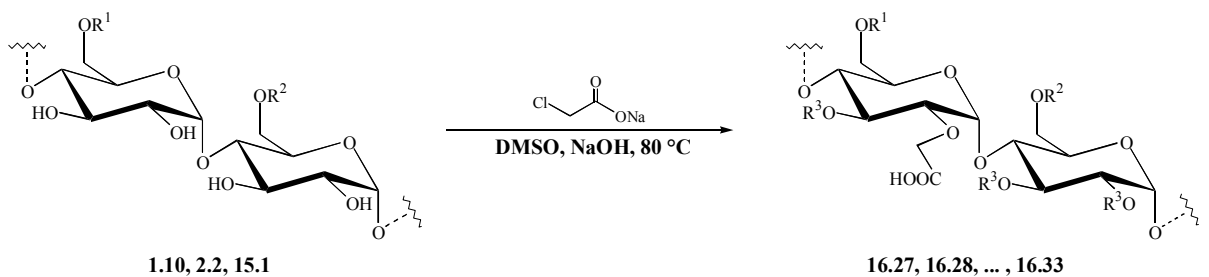
$MS(C_3)$: 0,04

Verhältnis $MS(C_2+C_3) / MS(C_6)$: 4,5

Reaktionseffizienz (RE(%)): 45,8

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.23**.

4.4.10 Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in DMSO



1.10, 2.2, 15.1

R¹: H, AGE, -C(C₆H₅)₃
 R²: H, -C(C₆H₅)₃
 (variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsgrad und -ort)

16.27, 16.28, ... , 16.33

R¹: H, AGE, -CH₂COOH, -C(C₆H₅)₃
 R²: H, -CH₂COOH, -C(C₆H₅)₃
 R³: H, -CH₂COOH
 (variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsart, -grad und -ort)

Die partiell hydrolysierte Stärke bzw. das Stärkederivat wird in das Reaktionsgefäß vorgelegt und in DMSO unter Rühren bei 80 °C gelöst. Zu dieser Lösung wird das feste Natriumhydroxid gegeben. Es wird solange gerührt, bis erneut eine klare Lösung entstanden ist. Ist die zugrundeliegende Stärke zuvor nicht gemäß Abschnitt 4.4.3 reduziert worden, stellt sich bereits jetzt eine Gelbfärbung des Ansatzes ein. Nun wird zu der alkalischen Lösung portionsweise das Natriumsalz der Monochloressigsäure gegeben und bei 80 °C für die jeweilige Reaktionszeit gerührt. Verglichen mit Carboxymethylierungen in anderen Lösungsmitteln ist die während der Reaktion eintretende Verfärbung nichtreduzierter Stärken in DMSO am intensivsten ausgeprägt. Nach Ablauf der Reaktionszeit lässt man die dunkel gefärbte Lösung abkühlen und tropft sie langsam in einen Überschuss an kaltem Ethanol. Hierbei fällt das Produkt gummiartig und voluminös aus. Man filtriert den Feststoff ab und wäscht intensiv mit Ethanol. Das noch gefärbte Rohprodukt kann nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode weiter aufgereinigt werden.

Charakteristische Daten der Produkte 16.27...16.33

Carboxymethylstärke 16.27: Laborjournal-Substanz FE11

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke 1.10, 0,50 g (12,5 mmol) Natriumhydroxid in 30 ml DMSO gelöst und 1,43 g (12,3 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,61 g schwach brauner Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,21

MS(C₂+C₃): 0,18

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 6,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 21,0

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{pD}=1, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.78\text{-}5.55$ (m, Maximum bei 5.65 ppm, H-1), 5.55-5.19 (m, Maximum bei 5.38 ppm, H-1), 5.28 (Schulter, H-1), 4.95 (s, HDO), 4.62 (~d, schwach, H-1(β -r)), 4.60-4.37 (m, Maximum bei 4.41, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 4.20-3.44 (nicht aufgel., Maxima bei 4.10, 3.86, 3.75, 3.60 ppm), 3.40 (m)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O}, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 177.5, 102.1, 99.4, 82.1, 79.8, 77.8, 75.8, 74.3, 72.4, 72.3, 70.4, 69.8, 61.2$

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4, \text{TSP ext. Std.}): \delta = 5.40$ (d, 1H, H-1(α -s), $J=3.9$), 5.20 (d, 1H, H-1(α -u), $J=3.9$), 4.82 (HDO), 4.71 (d, 1H, H-1(β -s), $J=8.0$), 4.63 (d, 1H, H-1(β -u), $J=8.0$), 4.46 (m, 2H, α,β -3-O- CH_2COOH), 4.44 (d, 1H, β -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, $J=17.0$), 4.41 (d, 1H, β -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, $J=17.0$), 4.35 (d, 1H, α -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, $J=17.0$), 4.32 (d, 1H, α -2-O- $\text{CH}_a\text{H}_b\text{COOH}$, $J=17.0$), 4.20 (m, 2H, α,β -6-O- CH_2COOH), 3.85, 3.80, 3.79 (je m, H-6'(β), H-5(α), H-6'(α), (u) und (s)), 3.73, 3.69, 3.68 (je m, H-6(α), H-6(β), H-3(α), (u) und (s)), 3.59 (dd, 1H, H-3(β -s), $J=9.1$, $J=9.1$), 3.54 (dd, 1H, H-2(α -u), $J=3.8$, $J=9.8$), 3.49 (dd, 1H, H-3(β -u), $J=9.1$, $J=9.1$), 3.45, 3.40 (je m, H-5(β), H-4(β), H-4(α), (u) und (s)), 3.22 (dd, 1H, H-2(β -u), $J=8.0$, $J=9.4$), 3.15 (dd, 1H, H-2(β -s), $J=8.0$, $J=9.4$)

FTIR(ATR): 3336 s, 2928 s, 1725 s, 1591 s, 1411 s, 1363 s, 1148 s, 1079 m, 1014 m

Carboxymethylstärke **16.28**: *Laborjournal-Substanz FE12*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,0 g (25 mmol) Natriumhydroxid und 2,87 g (24,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,56 g schwach brauner Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl- CH_2 -COONa : NaOH): 1 : 2 : 2

MS: 0,47

MS(C_2+C_3): 0,40

MS(C_6): 0,07

Verhältnis MS(C_2+C_3) / MS(C_6): 5,7

Reaktionseffizienz (RE(%)): 23,5

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.27**.

Carboxymethylstärke **16.29**: *Laborjournal-Substanz FE13*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,5 g (37,5 mmol) Natriumhydroxid und 4,29 g (36,9 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,89 g schwach brauner Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl- CH_2 -COONa : NaOH): 1 : 3 : 3

MS: 0,50

MS(C_2+C_3): 0,44

MS(C₆): 0,06

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 7,3

Reaktionseffizienz (RE(%)): 16,7

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.27**.

Carboxymethylstärke **16.30**: *Laborjournal-Substanz FE14*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,0 g (25 mmol) Natriumhydroxid und 5,73 g (49,2 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,95 g schwach brauner Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 4 : 2

MS: 1,22

MS(C₂+C₃): 0,39

MS(C₆): 0,83

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 0,5

Reaktionseffizienz (RE(%)): 30,5

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.27**.

Carboxymethylstärke **16.31**: *Laborjournal-Substanz FE15*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,5 g (37,5 mmol) Natriumhydroxid und 7,16 g (61,5 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,72 g schwach brauner Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 5 : 3

MS: 0,71

MS(C₂+C₃): 0,45

MS(C₆): 0,26

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,7

Reaktionseffizienz (RE(%)): 14,2

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.27**.

Carboxymethylstärke **16.32**: *Laborjournal-Substanz FE20*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 2,0 g (12,3 mmol Anhydroglucose) reduzierter Abbaustärke **2.2**, 0,5 g (12,5 mmol) Natriumhydroxid und 1,43 g (12,3 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 40 ml DMSO bei 80 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 0,97 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,21

MS(C₂+C₃): 0,18

MS(C₆): 0,03

MS(C₃): 0,02

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 6,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 21,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.27**.

2,3-O-Carboxymethyl-6-O-tritylstärke **16.33**: *Laborjournal-Substanz 095*

Nach obigem Verfahren 4.4.10 aus 1,0 g 6-O-Tritylstärke **15.1**, 0,2 g (5 mmol) Natriumhydroxid und 0,58 g (5 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml DMSO bei 55 °C für 24 Stunden.

Ausbeute: 0,87 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

Nachfolgende Angaben bezogen auf Carboxymethylgehalt:

MS: 0,95

MS(C₂+C₃): 0,92

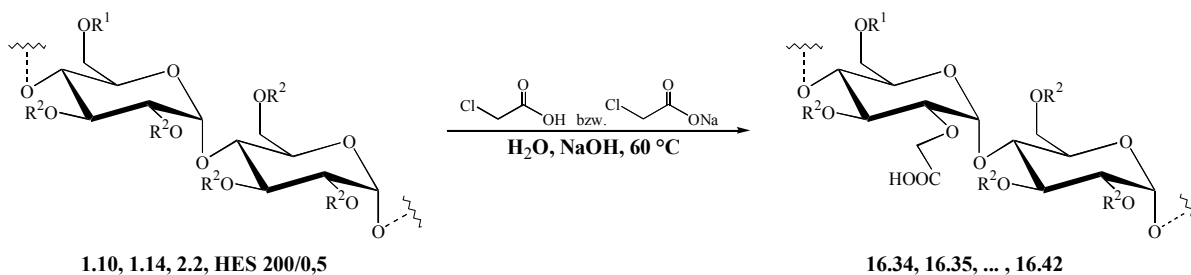
MS(C₆): 0,03

MS(C₃): 0,21

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 30,7

Ermittlung dieser Daten nach Totalhydrolyse von **16.32** in D₂O/D₂SO₄ (dabei erfolgt Detritylierung).

4.4.11 Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylstärken in Wasser



1.10, 1.14, 2.2, HES 200/0,5

16.34, 16.35, ... , 16.42

R¹: H, AGE, -CH₂CH₂OH

R²: H, -CH₂CH₂OH

(variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsgrad und -ort)

R¹: H, AGE, -CH₂CH₂OH, -CH₂COOH

R²: H, -CH₂CH₂OH, -CH₂COOH

(variiert je nach Molekulargewicht, Verzweigungsgrad bzw. Substitutionsart, -grad und -ort)

Die entsprechende Stärke bzw. das Stärkederivat wird in das Reaktionsgefäß vorgelegt und unter kräftigem Rühren langsam mit bidest. Wasser versetzt. Die Suspension bzw. der gelartige Kleister wird dann unter Rühren auf 60 °C gebracht. Zu der Mischung wird das feste Natriumhydroxid bzw. Natronlauge gegeben, hierbei kann es je nach Stärke und zugrundeliegendem Molekulargewicht zu einem stärkeren Aufquellen der Granula kommen. Ist die eingesetzte Stärke zuvor nicht gemäß Abschnitt 4.4.3 reduziert worden, so setzt auch hier durch die hohe Alkalikonzentration ein zunehmende Gelbfärbung ein. In die alkalische Reaktionsmischung wird nun portionsweise über einen Zeitraum von 20 Minuten die Monochloressigsäure bzw. deren Natriumsalz gegeben. Es wird für die entsprechende Reaktionszeit bei 60 °C gerührt. Durch die fortschreitende Carboxymethylierung wird der Ansatz zunehmend homogener und klarer. Abschließend wird die Lösung zweckmäßig nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet, bei kleineren Ansätzen wird die gesamte Reaktionslösung neutralisiert und anschließend dialysiert und lyophilisiert.

Charakteristische Daten der Produkte 16.34...16.42

Carboxymethylstärke **16.34**: Laborjournal-Substanz 047

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 2,5 g (15,4 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.14**, 1,5 g (37,5 mmol) Natriumhydroxid und 2,02 g (21,4 mmol) Monochloressigsäure in 10 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur für 3 Stunden.

Ausbeute: 2,15 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,4 : 2,4

MS: 0,07

MS(C₂+C₃): 0,04

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 1,3

Reaktionseffizienz (RE(%)): 5,0

¹H-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 5.66-5.49 (m, Maximum bei 5.54 ppm, H-1), 5.45-5.19 (m, Maximum bei 5.31 ppm, H-1), 5.25 (Schulter, H-1), 4.88 (m, H-1), 4.70 (s, HDO), 4.28-3.27 (nicht aufgel., Maxima bei 4.10, 3.86, 3.75, 3.55 ppm), 3.32 (m)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 178.5, 100.4, 80.7, 77.3, 74.0, 73.5, 73.3, 72.2, 70.8, 70.0, 61.0

¹H-NMR(D₂O/D₂SO₄, TSP ext. Std.): δ = 5.38 (d, 1H, H-1(α -s), J=3.8), 5.19 (d, 1H, H-1(α -u), J=3.8), 4.82 (HDO), 4.69 (d, 1H, H-1(β -s), J=8.0), 4.61 (d, 1H, H-1(β -u), J=8.0), 4.44 (m, 2H, α,β -3-O-CH₂COOH), 4.42 (d, 1H, β -2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.39 (d, 1H, β -2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.34 (d, 1H, α -2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.30 (d, 1H, α -2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.18 (m, 2H, α,β -6-O-CH₂COOH), 3.84, 3.79, 3.78 (je m, H-6'(β), H-5(α), H-6'(α), (u) und (s)), 3.72, 3.69, 3.67 (je m, H-6(α), H-6(β), H-3(α), (u) und (s)), 3.58 (dd, 1H, H-3(β -s), J=9.0, J=9.0), 3.52 (dd, 1H, H-2(α -u), J=3.8, J=9.8), 3.47 (dd, 1H, H-3(β -u), J=9.2, J=9.2), 3.44, 3.39 (je m, H-5(β), H-4(β), H-4(α), (u) und (s)), 3.21 (dd, 1H, H-2(β -u), J=8.0, J=9.5), 3.14 (dd, 1H, H-2(β -s), J=8.0, J=9.5)

FTIR(ATR): 3330 s, 2926 s, 1740 m, 1594 m, 1411 m, 1322 s, 1149 s, 1082 m, 1010 m

Carboxymethylstärke **16.35**: *Laborjournal-Substanz 049*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 75,15 g (463 mmol Anhydroglucose) nativer Wachsmaisstärke, 45,23 g (1130 mmol) Natriumhydroxid und 60,75 g (650 mmol) Monochloressigsäure in 450 ml bidest. Wasser bei Raumtemperatur für 3 Stunden.

Ausbeute: 75,1 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

63,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COOH : NaOH): 1 : 1,4 : 2,4

MS: 0,18

MS(C₂+C₃): 0,15

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 5,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 12,9

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.36**: *Laborjournal-Substanz FE6*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 1,0 g (25 mmol) Natriumhydroxid und 2,87 g (24,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 3,3 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

2,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,55

MS(C₂+C₃): 0,44

MS(C₆): 0,11

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 4,0

Reaktionseffizienz (RE(%)): 55,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.37**: *Laborjournal-Substanz FE7*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 2,0 g (50 mmol) Natriumhydroxid und 5,73 g (49,2 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 3,80 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

3,29 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 2 : 2

MS: 1,12

MS(C₂+C₃): 0,81

MS(C₆): 0,31

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,6

Reaktionseffizienz (RE(%)): 56,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.38**: *Laborjournal-Substanz FE8*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 3,0 g (75 mmol) Natriumhydroxid und 8,6 g (73,8 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 3,8 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

3,3 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 3 : 3

MS: 1,39

MS(C₂+C₃): 0,95

MS(C₆): 0,44

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 46,3

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.39**: *Laborjournal-Substanz FE9*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 3,0 g (75 mmol) Natriumhydroxid und 14,32 g (123 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 2,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 5 : 3

MS: 1,33

MS(C₂+C₃): 0,91

MS(C₆): 0,42

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,2

Reaktionseffizienz (RE(%)): 26,6

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.40**: *Laborjournal-Substanz FE10*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.10**, 4,0 g (100 mmol) Natriumhydroxid und 14,32 g (123 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 3,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 5 : 4

MS: 1,44

MS(C₂+C₃): 0,97

MS(C₆): 0,47

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,1

Reaktionseffizienz (RE(%)): 28,8

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethylstärke **16.41**: *Laborjournal-Substanz FE18*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 4,0 g (24,6 mmol Anhydroglucose) reduzierter Abbaustärke **2.2**, 1,0 g (25 mmol) Natriumhydroxid und 2,86 g (24,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 20 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 2,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1 : 1

MS: 0,53

MS(C₂+C₃): 0,45

MS(C₆): 0,08

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 5,6

Reaktionseffizienz (RE(%)): 53,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **16.34**.

Carboxymethyl-hydroxyethylstärke **16.42**: *Laborjournal-Substanz 091*

Nach obigem Verfahren 4.4.11 aus 50,0 g (270 mmol HE-/Anhydroglucose) Hydroxyethylstärke 200/0,5 (Fa. Ajinomoto), 4,0 g (100 mmol) Natriumhydroxid und 11,65 g (100 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz in 500 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 5 Stunden.

Ausbeute: 52,3 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

43,9 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,4 : 0,4

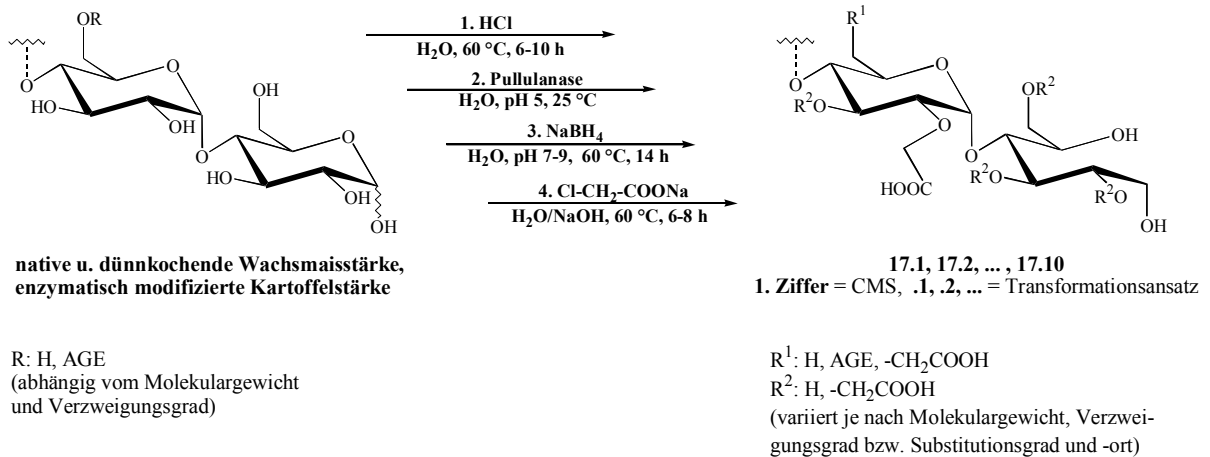
MS(Carboxymethyl-): 0,04

Reaktionseffizienz (RE(%)): 10,8

¹H-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 5.71-5.15 (m, Maxima bei 5.63, 5.44, 5.29 ppm, H-1), 5.20 (Schulter, H-1), 4.85 (m, H-1), 4.69 (s, HDO), 4.18-4.03 (m, -CH₂-COOH), 4.03-3.40 (nicht aufgel., Maxima bei 3.89, 3.83, 3.77, 3.72, 3.65, 3.55, 3.49 ppm), 3.40-3.25 (m, Maximum bei 3.32 ppm)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 178.2, 100.1, 99.2, 97.1, 82.5, 82.0, 80.0, 77.9, 75.8, 75.2, 74.1, 72.4, 72.3, 70.8, 70.1, 61.8, 61.3

4.4.12 Sequentielle Transformation von Stärken zur Darstellung von partiell hydrolysierten, entzweigten, reduzierten Carboxymethylstärken in wässriger Lösung



Es wird die entsprechende Stärke in das Reaktionsgefäß (s. Abschn. 4.1.1) vorgelegt und unter Rühren mit bidest. Wasser versetzt. Die Rührfrequenz wird erhöht, um eine möglichst homogene, mitunter gelartige Suspension zu erhalten. Die Temperatur wird auf einen für die jeweilige Stärke günstigen Bereich angehoben (s. Abschn. 4.4.2). Hierbei wird durch die einsetzende Verkleisterung bzw. das Anschwellen und Aufbrechen der Stärkekörner eine maximale Homogenität erreicht. Der Ansatz wird unter stetigem Rühren auf eine Temperatur von 60 °C gebracht. Die Säurehydrolyse wird durch die Zugabe der Salzsäure gestartet. Die Reaktionsmischung verliert während der Hydrolyse zunehmend an Viskosität und wird allmählich klarer. Nach einem typischen Zeitraum von 6 bis 9 Stunden wird eine Probe entnommen, um die kinematische Viskosität (nach Abschn. 4.3.9) bzw. später das Molekulargewicht (nach Abschn. 4.6.1) zu bestimmen. Die Hydrolyse wird dann durch Neutralisation mit Natronlauge beendet. Es resultiert eine opaleszierende, kolloidale Lösung einer partiell hydrolysierten Stärke.

Soll die Stärke, neben der statistisch verlaufenden Säurehydrolyse der glycosidischen Bindungen, zusätzlich durch eine spezifische Hydrolyse der α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen in ihrem Verzweigungsgrad verringert werden, so kann dies direkt im Anschluss nach der Neutralisation durch eine enzymatische Hydrolyse mit Pullulanase erfolgen. Hierzu wird der Reaktionsansatz auf eine Temperatur von 25 °C gebracht, ein pH-Wert von 5,0 eingestellt und die Enzymreaktion durch die Zugabe entsprechender Menge Pullulanase gestartet. Der Ansatz wird nun für mindestens 24 Stunden bei 25 °C gerührt. Nach der enzymatischen Hydrolyse wird der Ansatz zum Inaktivieren der Proteine für eine Stunde auf ca. 100 °C erwärmt und anschließend auf 60 °C abgekühlt.

Für die folgende Reduktion der reduzierenden Enden der Stärkemoleküle wird ein pH-Wert von ca. 9 eingestellt. Man entnimmt für Vergleichszwecke eine Probe und gibt unter stetigem Rühren die notwendige Menge an Natriumborhydrid portionsweise über einen Zeitraum von

30 Minuten langsam zur Reaktionslösung. Ist die Gasentwicklung zu heftig, wird etwas langsamer gerührt, starke Schaumbildung kann durch den Einsatz eines Schaumbrechers vermieden werden. Die Lösung wird bei 60 °C in der Regel über Nacht gerührt, nach dieser Zeit ist keine Gasentwicklung mehr registrierbar. Man entnimmt eine Probe, um die Vollständigkeit der Reduktion gemäß Abschnitt 4.3.7 zu überprüfen. Wenn die Reduktion vollständig ist, kann die Lösung weiter umgesetzt werden, ansonsten durch eine erneute Zugabe von Natriumborhydrid nachreduziert werden.

Für die Carboxymethylierung der partiell abgebauten, wahlweise entzweigten sowie reduzierten Stärke wird unter Rühren bei 60 °C zum noch leicht getrübbten Reaktionsansatz die entsprechende Menge an festem Natriumhydroxid gegeben. Hierbei klärt sich der Ansatz auf und bei ausreichender Reduktion kommt es zu keiner Verfärbung mehr. Es wird für eine halbe Stunde gerührt und anschließend spatelweise das Natriumsalz der Monochloressigsäure in die alkalische Reaktionslösung gegeben. Man rührt den Ansatz bei 60 °C für eine typische Reaktionszeit von ca. 6 Stunden.

Schließlich wird die klare Lösung über eine D3-Glasfritte abfiltriert und nach dem Abkühlen auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Die endgültige Aufarbeitung erfolgt nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Arbeitsmethode. Soll die Carboxymethylstärke ausschließlich in der Säureform bzw. als Natriumsalz vorliegen, so kann dies durch eine wie in Abschnitt 4.4.5 beschriebene Behandlung erreicht werden.

Charakteristische Daten der Produkte 17.1...17.10

Carboxymethylstärke **17.1**: *Laborjournal-Substanz 072,073*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 aus 100 g (617 mmol Anhydroglucose) dünnkochender Wachsmaisstärke und 40 ml 5 N Salzsäure in 960 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 7 Stunden. Anschließend Reduktion mit 0,60 g (15,9 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 14 Stunden. Direkte Umsetzung mit 14,8 g (370 mmol) Natriumhydroxid und 43,1 g (370 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 5 Stunden.

Ausbeute: 98,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

79,2 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,6 : 0,6

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 194000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 196000

Verzweigungsgrad: 5,4 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 5,0 %

MS: 0,42

MS(C₂+C₃): 0,37

MS(C₆): 0,05

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 7,4

Reaktionseffizienz (RE(%)): 70,0

¹H-NMR(D₂O, pD=1, TSP ext. Std.): δ = 5.83-5.52 (m, Maximum bei 5.67 ppm, H-1), 5.52-5.21 (m, Maxima bei 5.49 und 5.38 ppm, H-1), 5.31 (Schulter, H-1), 4.96 (m), 4.80 (s, HDO), 4.51-4.30 (m, Maxima bei 4.41, -CH₂COOH), 4.30-4.16 (m, Maxima bei 4.21, -CH₂COOH), 4.16-3.34 (nicht aufgel., Maxima bei 4.08, 3.85, 3.70, 3.60, 3.52 ppm), 3.40 (m)

¹³C-NMR(D₂O, TSP ext. Std.): δ = 176.3, 102.1, 99.8, 82.1, 79.8, 77.9, 75.9, 75.2, 74.0, 73.9, 70.7, 70.2, 63.1

¹H-NMR(D₂O/D₂SO₄, TSP ext. Std.): δ = 5.37 (d, 1H, H-1(α-s), J=3.6), 5.18 (d, 1H, H-1(α-u), J=3.8), 4.82 (HDO), 4.69 (d, 1H, H-1(β-s), J=7.9), 4.61 (d, 1H, H-1(β-u), J=7.9), 4.43 (m, 2H, α,β-3-O-CH₂COOH), 4.41 (d, 1H, β-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.38 (d, 1H, β-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.32 (d, 1H, α-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.29 (d, 1H, α-2-O-CH_aH_bCOOH, J=17.0), 4.18 (m, 2H, α,β-6-O-CH₂COOH), 3.83 (dd, 1H, H-6'(β), J=2.3, J=12.5), 3.78, 3.77 (je m, H-5(α), H-6'(α), (u) und (s)), 3.71, 3.68, 3.67 (je m, H-6(α), H-6(β), H-3(α), (u) und (s)), 3.58 (dd, 1H, H-3(β-s), J=9.2, J=9.2), 3.53 (dd, 1H, H-2(α), J=3.8, J=9.9), 3.48 (dd, 1H, H-3(β-u), J=9.0, J=9.0), 3.43 (ddd, 1H, H-5(β), J=2.2, J=5.4, J=9.8), 3.38 (dd, 1H, H-4(β), J=9.7, J=9.8), 3.38 (dd, 1H, H-4(α), J=9.3, J=9.6), 3.21 (dd, 1H, H-2(β-u), J=7.9, J=9.5), 3.14 (dd, 1H, H-2(β-s), J=7.9, J=9.5).

FTIR(ATR): 3330 s, 2928 s, 1728 s, 1590 s, 1411 s, 1362 s, 1149 s, 1078 s, 1014 s

Carboxymethylstärke **17.2**: *Laborjournal-Substanz 074*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 aus 300 g (1850 mmol Anhydroglucose) dünnkochender Wachsmaisstärke und 120 ml 5 N Salzsäure in 880 ml bidest. Wasser bei 60 °C für 7 Stunden. Anschließend Reduktion mit 3,12 g (82,4 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 28 Stunden. Direkte Umsetzung mit 37,0 g (925 mmol) Natriumhydroxid und 107,8 g (925 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 253 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

197 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,5 : 0,5

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 45000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 38000

Verzweigungsgrad: 6,0 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 5,4 %

MS: 0,31

MS(C₂+C₃): 0,27

MS(C₆): 0,04

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 6,8

Reaktionseffizienz (RE(%)): 62,0 %

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.3**: *Laborjournal-Substanz 083*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) NaBH₄ bei Raumtemperatur für 24 Stunden. Direkte Umsetzung mit 18,5 g (463 mmol) Natriumhydroxid und 53,9 g (463 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 4,5 Stunden.

Ausbeute: 115,1 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

72,4 g, farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,8 : 0,8 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 143000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 155000

Verzweigungsgrad: 4,0 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 3,9 %

MS: 0,34

MS(C₂+C₃): 0,30

MS(C₆): 0,04

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 7,6

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.4**: *Laborjournal-Substanz 084*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 3,0 g (79,3 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 24 Stunden. Direkte Umsetzung mit 21,1 g (526,6 mmol) Natriumhydroxid und 53,9 g (526,6 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 16 Stunden.

Ausbeute: 112,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

74,5 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,9 : 0,9 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 143000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 196000

Verzweigungsgrad: 3,8 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 3,8 %

MS: 0,41

MS(C₂+C₃): 0,36

MS(C₆): 0,05

Verhältnis $MS(C_2+C_3) / MS(C_6)$: 7,2

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.5**: *Laborjournal-Substanz 085*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) $NaBH_4$ bei 60 °C für 24 Stunden. Direkte Umsetzung mit 37,0 g (925 mmol) Natriumhydroxid und 107,7 g (925 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 48 Stunden.

Ausbeute: 206,4 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

123,7 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 1,5 : 1,5 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 143000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 223000

Verzweigungsgrad: 3,9 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 3,8 %

MS: 0,75

$MS(C_2+C_3)$: 0,65

$MS(C_6)$: 0,10

Verhältnis $MS(C_2+C_3) / MS(C_6)$: 6,5

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.6**: *Laborjournal-Substanz 086*

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) $NaBH_4$ bei 60 °C für 16 Stunden. Direkte Umsetzung mit 14,8 g (370 mmol) Natriumhydroxid und 43,1 g (370 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 4,5 Stunden.

Ausbeute: 139,9 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

81,1 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,6 : 0,6 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (Mw): 143000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (Mw): 188000

Verzweigungsgrad: 3,8 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 4,3 %

MS: 0,33

$MS(C_2+C_3)$: 0,3

MS(C₆): 0,03

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 10,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.7: Laborjournal-Substanz 092**

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 16 Stunden. Direkte Umsetzung mit 5,18 g (129,5 mmol) Natriumhydroxid und 15,08 g (129,5 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 6,5 Stunden.

Ausbeute: 108,7 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

64,1 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,2 : 0,2 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

MS: 0,06

MS(C₂+C₃): 0,04

MS(C₆): 0,02

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 2,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke **17.8: Laborjournal-Substanz 093**

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 16 Stunden. Direkte Umsetzung mit 8,4 g (210 mmol) Natriumhydroxid und 23,3 g (200 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 110 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

65,6 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,3 : 0,3 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Molekulargewicht (M_w): 143000

Molekulargewicht nach Carboxymethylierung (M_w): 192000

Verzweigungsgrad: 4,0 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 3,8 %

MS: 0,14

MS(C₂+C₃): 0,13

MS(C₆): 0,01

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 13

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke 17.9: Laborjournal-Substanz 094

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 4 Stunden. Direkte Umsetzung mit 12,26 g (307 mmol) Natriumhydroxid und 35,71 g (307 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 4 Stunden.

Ausbeute: 109 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

63,8 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,5 : 0,5 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

MS: 0,18

MS(C₂+C₃): 0,16

MS(C₆): 0,02

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 8,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

Carboxymethylstärke 17.10: Laborjournal-Substanz 100

Nach obigem Verfahren 4.4.12 jedoch ohne Säurehydrolyse aus 150 g (mindestens 610,5 mmol Anhydroglucose) Abbaustärke **1.15** (Rohprodukt mit dialysierbeständigem Stärkeanteil von ca. 66 %) in 500 ml bidest. Wasser. Enzymreaktion bei pH 5,0 mit 100 U Pullulanase bei 25 °C für 24 Stunden, anschließend Hitzeinaktivierung (60 min bei 100 °C) danach Reduktion mit 4,0 g (105,7 mmol) NaBH₄ bei 60 °C für 16 Stunden. Direkte Umsetzung mit 12,8 g (320 mmol) Natriumhydroxid und 32,27 g (320 mmol) Monochloressigsäure-Natriumsalz bei 60 °C für 18 Stunden.

Ausbeute: 131 g farbloser Feststoff (Ethanol-fällung)

85,2 g farbloser Feststoff (dialysiert u. lyophilisiert)

molares Verhältnis (AGE : Cl-CH₂-COONa : NaOH): 1 : 0,5 : 0,5 (nicht exakt)

Nachweis von reduzierenden Enden: negativ

Verzweigungsgrad: 4,0 %

Verzweigungsgrad nach Pullulanase-Abbau: 2,8 %

Verzweigungsgrad nach Carboxymethylierung: 3,6 %

MS: 0,20

MS(C₂+C₃): 0,18

MS(C₆): 0,02

MS(C₃): 0,02

Verhältnis MS(C₂+C₃) / MS(C₆): 9,0

spektroskopische Daten: siehe Angaben bei Carboxymethylstärke **17.1**.

4.5 Enzymatische Untersuchungsmethoden

4.5.1 Bestimmung der Acetatfreisetzung aus Acetylstärke

Die Bestimmung des Acetatgehaltes erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen enzymatischen Essigsäure-Test-Kits. In dem Test wird die zu bestimmende Essigsäure in Gegenwart des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und Coenzym A zu Acetyl-CoA umgesetzt. Das gebildete Acetyl-CoA reagiert mit Oxalacetat unter Katalyse durch Citrat-Synthase (CS) zu Citrat. Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird aus L-Malat und Nicotin-adenin-dinucleotid (NAD^+) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Die Menge der NADH-Bildung wurde bei 340 nm photometrisch gemessen und daraus die Essigsäure-Konzentration rechnerisch ermittelt. Die Durchführung des Tests und die Auswertung der Rohdaten wurde gemäß der Betriebsanweisung vollzogen.

Reaktionslösung: 1,00 ml Puffer (pH 8,4), 0,20 ml NAD^+ /CoA-Lösung, 0,20 ml ATP-Lösung, 0,10 ml Stärkelösung, 1,40 ml Wasser, mischen und Nullwert aufnehmen, dann Zugabe von 0,02 ml MDH/CS-Suspension, erneut mischen und Extinktion nach 2 min aufnehmen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,01 ml ACS-Suspension gestartet. Beim Stillstand der Reaktion (nach ca. 15 bis 20 min) wurden die Extinktionen der Lösungen gemessen.

4.5.2 Bestimmung der Succinatfreisetzung aus Succinylstärke

Die Bestimmung des Succinatgehaltes erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen enzymatischen Bernsteinsäure-Test-Kits. Bei dem Test wird die zu bestimmende Bernsteinsäure unter Katalyse durch Succinyl-CoA-Synthetase (SCS) mit Inosin-5'-triphosphat (ITP) und Coenzym A zu Succinyl-CoA umgesetzt. Das bei dieser Reaktion entstehende Inosin-5'-diphosphat (IDP) reagiert mit Phosphoenolpyruvat (PEP) in Gegenwart von Pyruvat-Kinase (PK) zu ITP und Pyruvat. Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) reduziert. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge wird photometrisch bei 340 nm bestimmt und ist der Bernsteinsäure-Menge äquivalent. Die Durchführung des Tests und die Auswertung der Rohdaten wurde gemäß der Betriebsanweisung vollzogen.

Reaktionslösung: 1,00 ml Puffer (pH 8,4), 0,10 ml NADH-Lösung, 0,10 ml CoA/ITP/PEP-Lösung, 0,10 ml Stärkelösung, 1,40 ml Wasser, 0,05 ml PK/LDH-Suspension. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02 ml SCS-Suspension gestartet. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 15 bis 20 min) wurden die Extinktionen der Lösungen gemessen.

4.5.3 Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch α -Amylasen

Es wurde die Abbaurate von unterschiedlich abgebauten Stärken sowie von Stärkeethern und Stärkeestern in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt. Hierbei wurde der jeweilige Hydrolysegrad über die Bestimmung der zunehmenden Menge an reduzierenden Enden mittels der Dinitrosalicylsäure-Methode (s. Abschn. 4.3.7) ermittelt. Im Testsystem wurden jeweils zwei unterschiedliche α -Amylase-Konzentrationen (0,1 U/ml und 1 U/ml) eingesetzt. Der hierzu etablierte, standardisierte Test wird nachfolgend skizziert:

Pufferlösung:	20 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 10 mM NaCl
Enzymstammlösung:	α -Amylase (E.C. 3.2.1.1) aus Schweinepankreas in Puffer lösen, 10 U/ml
Substratstammlösung:	Substrat in Puffer lösen, 30 mg/ml
Durchführung:	6 ml bzw. 6,9 ml Puffer in 15 ml Schraubdeckelglas vorlegen Zugabe von 1 ml bzw. 0,1 ml Enzymstammlösung (Endkonz. 1 U/ml bzw. 0,1 U/ml) 5 Minuten bei 37 °C inkubieren Zugabe von 3 ml Substratlösung (Endkonz. 9 mg/ml) Proben bei 37 °C inkubieren
Probenentnahmezeiten:	0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h
Farbreaktion:	1 ml Probe + 1 ml Farbreagenzlösung 5 Minuten im Wasserbad bei 100 °C erwärmen 10 ml bidest. Wasser hinzugeben und Extinktion bei 546 nm messen.

Es wurden jeweils entsprechende Blindwerte (Puffer zuzüglich Substrat in Testkonzentration bzw. Enzym und Puffer) ermittelt und später von den Rohextinktionsdaten subtrahiert. Diese korrigierten Extinktionen wurden über Eichkurven (s. Abschn. 4.3.7) in Reduktionsequivalente umgerechnet und graphisch gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Aus diesen Kurven mit einem typischen hyperbolischen Verlauf konnte die Hydrolisierbarkeit der jeweiligen Stärken und Stärkederivate vergleichend ermittelt werden.

Enzymatischer Abbau von CMS und HES unter physiologischen Bedingungen

Es wurde ein *in vitro* Testsystem entwickelt, welches weitgehend den Abbaubersuchen in Vollblut entspricht (siehe Abschnitt 4.7.3). In diesem System wurden je vier Stärkederivate mit zwei unterschiedlichen α -Amylasen unter physiologischen Bedingungen (d.h.: Amylase-serumkonzentration, pH 7,4; 37 °C) inkubiert. In jeder Testreihe wurden bei definierten Zeiten Proben entnommen. Das Zeitraster der Probenentnahme war mit dem der Abbaubersuche in Vollblut identisch. Bei den entsprechenden Zeiten wurde je eine Probe für die Molekulargewichtsbestimmung gemäß Abschnitt 4.7.1 sowie je eine Probe für die in Abschnitt 4.3.7 beschriebene Farbreaktion zur Bestimmung des Hydrolysegrades entnommen. Die Proben zur Molekulargewichtsbestimmung wurden durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 100 °C und durch Einstellen einer 0,01 %igen Natriumazidkonzentration für den Versand in die Schweiz stabilisiert.

Ziel dieser vergleichenden Untersuchung war es, mögliche Rückschlüsse auf den Mechanismus der physiologischen Elimination von Carboxymethylstärken zu ziehen. Die Durchführung und Zusammensetzung der Enzymanalyse wird durch das nachfolgende Testprotokoll erläutert:

Pufferlösung:	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4; 10 mM NaCl
Enzymstammlösungen:	α -Amylase aus Schweinepankreas in obigem Puffer, 10 U/ml α -Amylase aus Humanspeichel in obigem Puffer, 10 U/ml
Substrat-Stammlösungen:	750 mg CMS 17.4 mit Pufferlösung ad 25 ml 750 mg CMS 17.5 mit Pufferlösung ad 25 ml 750 mg CMS 17.8 mit Pufferlösung ad 25 ml 750 mg HES 200/0,5 mit Pufferlösung ad 25 ml
Durchführung:	17,25 ml Puffer in 30 ml Schraubdeckelglas vorlegen Zugabe von 250 μ l Enzymstammlösung (Endkonz. 0,1 U/ml) 5 Minuten bei 37 °C inkubieren Zugabe von 7,5 ml Substrat (Endkonz. 9 mg/ml) Proben bei 37 °C inkubieren
Probenentnahmezeiten:	0 h; 1 h; 2 h; 3,5 h; 5,5 h; 8 h

Farbreaktion und Messung wie oben.

4.5.4 Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch β -Amylase

Der Ablauf und die Auswertung dieser enzymatischen Untersuchung verlief analog der unter Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Methode.

Pufferlösung:	50 mM Natriumacetat, pH 4,8
Enzymstammlösung:	β -Amylase (E.C. 3.2.1.2) aus Süßkartoffel in Puffer lösen, 10 U/ml
Substratstammlösung:	Substrat in Puffer lösen, 10 mg/ml
Durchführung:	6 ml Puffer in 15 ml Schraubdeckelglas vorlegen Zugabe von 1 ml Enzymstammlösung (Endkonz. 1 U/ml) 5 Minuten bei 20 °C inkubieren Zugabe von 3 ml Substrat (Endkonz. 3 mg/ml) Proben bei 20 °C inkubieren
Probenentnahmezeiten:	0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h
Farbreaktion:	1 ml Probe + 1 ml Farbreagenzlösung 5 Minuten im Wasserbad bei 100 °C erwärmen 10 ml bidest. Wasser hinzugeben und Extinktion bei 546 nm messen.

4.5.5 Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch Pullulanase

Der Ablauf und die Auswertung dieser enzymatischen Untersuchung verlief analog der unter Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Methode.

Pufferlösung:	50 mM Natriumacetat, pH 5,0
Enzymstammlösung:	Pullulanase (E.C. 3.2.1.41) aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Puffer lösen, 10 U/ml
Substratstammlösung:	Substrat in Puffer lösen, 10 mg/ml
Durchführung:	6 ml Puffer in 15 ml Schraubdeckelglas vorlegen Zugabe von 1 ml Enzymstammlösung (Endkonz. 1 U/ml)

5 Minuten bei 25 °C inkubieren
Zugabe von 3 ml Substrat (Endkonz. 3 mg/ml)
Proben bei 25 °C inkubieren

Probenentnahmezeiten: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h

Farbreaktion: 1 ml Probe + 1 ml Farbreagenzlösung
5 Minuten im Wasserbad bei 100 °C erwärmen
10 ml bidest. Wasser hinzugeben und Extinktion
bei 546 nm messen.

4.5.6 Enzymatischer Abbau von Stärkederivaten durch Amyloglucosidase

Der Ablauf und die Auswertung dieser enzymatischen Untersuchung verlief analog der unter Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Methode.

Pufferlösung: 200 mM Natriumacetat, pH 4,5

Enzymstammlösung: Amyloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) aus *Aspergillus niger* in Puffer lösen, 10 U/ml

Substratstammlösung: Substrat in Puffer lösen, 10 mg/ml

Durchführung: 6 ml Puffer in 15 ml Schraubdeckelglas vorlegen
Zugabe von 1 ml Enzymstammlösung (Endkonz. 1 U/ml)
5 Minuten bei 55 °C inkubieren
Zugabe von 3 ml Substrat (Endkonz. 3 mg/ml)
Proben bei 55 °C inkubieren

Probenentnahmezeiten: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h

Farbreaktion: 1 ml Probe + 1 ml Farbreagenzlösung
5 Minuten im Wasserbad bei 100 °C erwärmen
10 ml bidest. Wasser hinzugeben und Extinktion
bei 546 nm messen.

4.5.7 NMR-Charakterisierung der enzymatisch gebildeten Spaltprodukte

Es wurden NMR-spektroskopisch die Spaltprodukte aus dem enzymatischen Verdau der folgenden Substratlösungen untersucht:

- Carboxymethylstärke **17.4**, MS = 0,41
- Carboxymethylstärke **17.5**, MS = 0,75
- Carboxymethylstärke **17.8**, MS = 0,14
- Hydroxyethylstärke 200/0.5, MS = 0,5

Hierzu wurden diese vier Stärkederivate unter jeweils optimalen Bedingungen mit den oben verwendeten Enzymen α -Amylase (E.C. 3.2.1.1) aus Humanspeichel, β -Amylase (E.C. 3.2.1.2) aus Süßkartoffel, Pullulanase (E.C. 3.2.1.41) aus *Klebsiella pneumoniae* und Amyloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) aus *Aspergillus niger* inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Enzyme durch fünfzehnminütiges Erhitzen der Lösungen auf 100 °C inaktiviert und das ausgefallene Protein wurde entfernt. Die Lösungen wurden in einen Dialysierschlauch überführt und zweimal für 16 h gegen 10 l bidest. Wasser dialysiert. Das Retentat wurde in Einhalsrundkolben eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde gewogen und der Verzweigungsgrad sowie Substitutionsgrad nach Abschnitt 4.3.2 bzw. 4.3.3 und 4.3.4 NMR-spektroskopisch bestimmt.

α -Amylase

Es wurden jeweils 225 mg der oben aufgeführten Substrate in ein 30 ml Schraubdeckelglas eingewogen und mit 24,75 ml Puffer gelöst. Die Lösungen wurden für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l Enzymstammlösung (10 U/ml in obigen Puffer) gestartet. Die Lösungen wurden für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Konzentrationen im Test waren folgende:

Testvolumen:	25 ml (20 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 10 mM NaCl)
Substratkonzentration:	9 mg/ml
Enzymkonzentration:	0,1 U/ml

β -Amylase

Es wurden jeweils 225 mg der oben aufgeführten Substrate in ein 30 ml Schraubdeckelglas eingewogen und mit 22,5 ml Puffer gelöst. Die Lösungen wurden für fünf Minuten bei 20 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 2,50 ml Enzymstammlösung (10 U/ml in obigen Puffer) gestartet. Die Lösungen wurden für 8 Stunden bei 20 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Konzentrationen im Test waren folgende:

Testvolumen:	25 ml (50 mM Natriumacetat, pH 4,8)
Substratkonzentration:	9 mg/ml
Enzymkonzentration:	1 U/ml

Pullulanase

Es wurden jeweils 225 mg der oben aufgeführten Substrate in ein 30 ml Schraubdeckelglas eingewogen und mit 22,5 ml Puffer gelöst. Die Lösungen wurden für fünf Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 2,50 ml Enzymstammlösung (10 U/ml in obigen Puffer) gestartet. Die Lösungen wurden für 24 Stunden bei 25 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Konzentrationen im Test waren folgende:

Testvolumen:	25 ml (50 mM Natriumacetat, pH 5,0)
Substratkonzentration:	9 mg/ml
Enzymkonzentration:	1 U/ml

Amyloglucosidase

Es wurden jeweils 225 mg der oben aufgeführten Substrate in ein 30 ml Schraubdeckelglas eingewogen und mit 24 ml Puffer gelöst. Die Lösungen wurden für fünf Minuten bei 55 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Enzymstammlösung (10 U/ml in obigen Puffer) gestartet. Die Lösungen wurden für 8 Stunden bei 55 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Die Konzentrationen im Test waren folgende:

Testvolumen:	25 ml (200 mM Natriumacetat, pH 4,5)
Substratkonzentration:	9 mg/ml
Enzymkonzentration:	0,4 U/ml

4.6 Physiologische Lösungen**4.6.1 Herstellung klinischer Prüfmuster**

Für physiologische und physikochemische Untersuchungen wurden aus ausgewählten Carboxymethylstärken Lösungen hergestellt, welche in ihrer galenischen Zusammensetzung einem späteren kommerziellen Produkt als Plasmaersatzmittel sehr nahe kommen.

Es wurden aus den nach Abschnitt 4.4.12 dargestellten Carboxymethylstärken **17.4**, **17.6** und **17.8** jeweils 100 ml einer 4 und 6 %igen Lösung hergestellt. Die Lösungen wurden hinsichtlich ihrer theoretischen Osmolarität durch die Zugabe von entsprechenden Mengen Natriumchlorid und Glucose auf einen physiologischen Normalwert von ca. 300 mOsmol/l [129] eingestellt. Für die Berechnung der notwendigen Substanzmengen wurde der Natriumionengehalt der jeweiligen Carboxymethylstärken gemessen (s. Abschn. 4.7.4). Bei den Lösungen musste aus klinisch gebräuchlichen Gründen der Natriumchloridgehalt in „viertelisotoner“ (38,5 mmol/l), „halbisotoner“ (77 mmol/l) bzw. „zweidrittelsotoner“ (102,7 mmol/l) Konzentration vorliegen. Aus dem selben Grund wurden die in der Osmolaritätsbilanz fehlenden Teilchenzahlen durch die schrittweise Einstellung von Glucosekonzentrationen in Abständen

von 1 % (55,5 mmol/l), 1,5 % (83,25 mmol/l), 2 % (111,0 mmol/l) und 2,5 % (138,8 mmol/l) ausgeglichen.

Ansetzen der physiologischen Testlösungen

Zur Herstellung der klinischen Prüfmuster wurden nachfolgende Substanzen eingewogen:

Tab. 4-2. Einwaagen zur Herstellung von je 100 ml klinischen Prüfmusterlösungen von Carboxymethylstärke.

Bezeichnung	Einwaage CMS	Einwaage NaCl	Einwaage Glucose·H ₂ O
CMS 17.4 (MS=0,41) 4 %ig	4,00 g	0,450 g	1,650 g
CMS 17.4 (MS=0,41) 6 %ig	6,00 g	0,225 g	2,200 g
CMS 17.6 (MS=0,33) 4 %ig	4,00 g	0,450 g	1,650 g
CMS 17.6 (MS=0,33) 6 %ig	6,00 g	0,225 g	2,751 g
CMS 17.8 (MS=0,14) 4 %ig	4,00 g	0,600 g	1,100 g
CMS 17.8 (MS=0,14) 6 %ig	6,00 g	0,600 g	1,100 g

Die in Tabelle 4-3 aufgeführten Substanzen wurden jeweils in einem 100 ml Messkolben vorgelegt und mit Wasser für Injektionszwecke auf 100 ml aufgefüllt. Nach Durchmischung wurden jeweils ca. 10 ml der entsprechenden Lösung mittels einer Spritze über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter in ein Rollrandglas klarfiltriert, mit einem Gummistopfen und einer Aluminiumkappe verschlossen. Die versiegelten Proben wurden in einem Laborautoklaven für 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Die so hergestellten klinischen Prüfmuster wurden bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Die nachfolgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen wieder:

Tab. 4-3. Zusammensetzung der klinischen Prüfmuster.

Lösung	Na ⁺ -Gehalt in mmol/l	Cl ⁻ -Gehalt in mmol/l	Glucose-Gehalt in mmol/l	theoretische Osmola- rität in mOsmol/l
CMS 17.4 4 %	147,1	77	83,25	307,3
CMS 17.4 6 %	143,6	38,5	111	293,1
CMS 17.6 4 %	134,7	77	83,25	295,0
CMS 17.6 6 %	125,1	38,5	138,8	302,4
CMS 17.8 4 %	131,2	102,7	55,5	289,4
CMS 17.8 6 %	145,4	102,7	55,5	303,6

4.6.2 Stabilität von elektrolytenbalancierten Lösungen

In der folgenden Versuchsreihe wurde überprüft, ob bei einigen Stärkederivaten eventuelle Inkompatibilitäten – insbesondere Verfärbungen, Trübungen oder pH-Instabilitäten – bei der Herstellung und Sterilisation von Lösungen mit physiologischem Elektrolytenprofil auftreten.

Ansetzen der Stammlösung

Die in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Substanzen wurden in einem Liter bidest. Wasser gelöst:

Tab. 4-4. Elektrolytzusammensetzung der Stammlösung.

Chemikalien			Kationen in mmol				Anionen in mmol	
	Einwaage	mmol/l	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	Malat ²⁻
KCl	0,37 g	5		5			5	
NaCl	5,26 g	90	90				90	
CaCl₂·2H₂O	0,37 g	2,5			2,5		5	
MgCl₂	0,14 g	1,5				1,5	3	
L-Äpfelsäure	3,45 g	25						25
NaOH	2,00 g	50	50					
		Σ in mmol	140	5	2,5	1,5	103	25
		Σ in mval	140	5	5	3	103	50
		Gesamtsumme	153				153	

pH-Wert der Stammlösung

Es wurden 100 ml der Stammlösung entnommen und deren pH-Wert gemessen, anschließend wurde mit 0,1 N Natronlauge ein pH von 7,4 eingestellt.

pH-Wert Stammlösung: 5,78
 Verbrauch an 0,1 N Natronlauge: 1,90 ml
 (bis pH von 7,40 erreicht)
 Titrationsacidität: 0,19 mmol/l

Zusammensetzung der Testlösungen und Sterilisation

In Rollrandgläsern wurden nachfolgende Substanzen eingewogen und mit 10 ml obiger Stammlösung aufgefüllt. Die Gläser wurden mit Septum und Aluminiumkappe fest verschlossen und anschließend für 15 min bei 121°C autoklaviert.

- a) 10 ml Stammlösung
- b) 0,60 g HES 200/0.5 (Fa. Ajinomoto) + 10 ml Stammlösung
- c) 0,60 g HES **2.6** + 10 ml Stammlösung
- d) 0,60 g CMS **17.4** + 10 ml Stammlösung
- e) 0,60 g Glucose + 10 ml Stammlösung

Bei den Lösungen b), c) und d) wurden zuvor aus den jeweiligen Stärkederivaten entsprechend konzentrierte Lösungen in bidest. Wasser angesetzt und das Maß der reduzierenden Enden mit der Dinitrosalicylsäure-Methode bestimmt (s. Abschn. 4.3.7).

Nach der Sterilisation erfolgte eine erneute pH-Wert-Messung sowie eine optische Überprüfung der Lösungen auf evtl. aufgetretene Verfärbungen.

4.7 Externe Messungen

Ein Teil des relevanten Datenmaterials wurde durch Messungen und Untersuchungen an zuvor hergestellten Stärkederivaten – insbesondere Carboxymethylstärken und zum geringeren Teil auch Succinylstärken – in auswärtigen Laboratorien erhalten.

4.7.1 Molekulargewichtsbestimmungen

Die Molekulargewichtsbestimmungen von Stärken und Stärkederivaten wurden durch die Firma B. Braun Medical AG, Schweiz (St. Gallen bzw. Crissier) durchgeführt.

Die Messungen erfolgten durch Herrn Dr. Andreas Fisch und Herrn Alberto Izuzquiza. Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte über Streulichtmessungen (MALLS) mit vorgeschalteter Größenausschlusschromatographie (GPC).

Geräte und Messmethodik

GPC/SEC-Säulen:	Ultrahydrogel Waters
SEC-Pumpen:	HPLC L-7110 und L-7612, Fa. Merck
Injektionsautomatik:	Typ 698, Fa. Metrohm und Typ L-7200, Fa. Merck
Detektor:	Refraktometer WGE Dn-1000, Fa. Wyatt Technology
Streulichtdetektor:	MiniDawn und Dawn EOS, Fa. Wyatt Technology
Temperatur:	25°C
Laufmittel:	KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ -Puffer
Flussrate:	1 ml/min
Scans per Messung:	100

Die Auswertung der SEC-Chromatogramme erfolgte mit der zugehörigen Software ASTRA 4.20 der Fa. Wyatt Technology.

4.7.2 Messung des Kolloidosmotischen Druckes

Die Bestimmung des Kolloidosmotischen Druckes (KOD) einiger Carboxymethylstärkelösungen erfolgte ebenfalls durch die Firma B. Braun Medical AG, Schweiz (Crissier). Die zu vermessenden Lösungen wurden aus den nach Abschnitt 4.4.12 hergestellten Carboxymethylstärken in der Schweiz angesetzt. Die Messungen wurden mit einem Kolloid-Osmometer des Typs Osmomat 50 an folgenden Carboxymethylstärken durchgeführt:

- . Carboxymethylstärke **17.8**, MS = 0,14
- . Carboxymethylstärke **17.4**, MS = 0,41
- . Carboxymethylstärke **17.5**, MS = 0,75

Zur Messung wurde eine osmotische Zelle verwendet, deren unterer, abgeschlossener Teil mit einer definierten Elektrolytlösung gefüllt und vom oberen Teil durch eine semipermeable Membran getrennt ist. Die Proben wurden in den oberen Teil der Zelle gefüllt. Aus dem unteren Teil diffundiert so lange Lösungsmittel in den oberen, bis der osmotische Druckgradient ausgeglichen ist. Dabei entsteht ein Unterdruck in dem unteren Teil der Zelle, der elektronisch registriert wird.

Es wurde jeweils gegen eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10000 bzw. 30000 Dalton gemessen. Die Untersuchungen wurden als Dreifachbestimmung erfasst.

4.7.3 *In vitro* Abbaukinetik mit Vollblut

Von einigen Carboxymethylstärken wurde durch die Firma B. Braun Medical AG, Schweiz (Crissier) von Herrn Dr. Andreas Fisch und Herrn Alberto Izuzquiza das *in vitro* Abbauverhalten in Vollblut untersucht. Hierzu wurden 3 %ige (w/v) Carboxymethylstärkelösungen in isotoner Kochsalzlösung hergestellt und mit Citratblut vermischt. Das Ganze wurde bei 37 °C für 0; 1; 2; 3,5; 5,5 und 8 Stunden inkubiert und anschließend zum Ausfällen der Plasmaproteine mit Trichloressigsäure versetzt. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert und die im Überstand befindlichen Stärkefragmente hinsichtlich ihrer Molmassenverteilung über GPC/MALLS untersucht.

Es wurden die Molmassen folgender Stärkederivate nach Inkubation mit Vollblut analysiert:

- Carboxymethylstärke **17.5**, MS = 0,75
- Carboxymethylstärke **17.4**, MS = 0,41
- Carboxymethylstärke **17.8**, MS = 0,14
- Hydroxyethylstärke Mw 70 kDa, MS = 0,6
- Hydroxyethylstärke Mw 130 kDa, MS = 0,4
- Hydroxyethylstärke Mw 200 kDa, MS = 0,5

4.7.4 Natriumgehalt in Carboxymethylstärken

Der Natrium-Ionen-Gehalt einiger dialysierter und lyophilisierter Carboxymethylstärken wurde von Herrn Dr. Wolfgang Heinrich von der Firma B. Braun Melsungen AG gemessen. Die Bestimmung erfolgte über Atomabsorptionsspektroskopie.

4.7.5 Blutgerinnungsinterferenzen mit Carboxymethylstärkelösungen

Mit den nach Abschnitt 4.6.1 hergestellten klinischen Prüfmustern wurde im Februar/März 2002 in der Anaesthesiologie des Universitätsklinikums in Erlangen im Rahmen der Dissertation von Frau Yvonne Koch unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Edgar Pscheidel eine klinische Studie durchgeführt.

Hierbei sollte der Einfluss von ausgewählten physiologischen Carboxymethylstärke-Lösungen auf die Blutgerinnung von Probandenvollblut im Vergleich zum konventionellen Plasmaersatzmittel Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5) *in vitro* untersucht werden. Bei den Untersuchungen wurden folgende labordiagnostische Parameter bestimmt:

- . Thrombozytenfunktionstest
- . Thrombelastografie
- . Quick-Wert
- . aPTT (activated Partial Thromboplastin Time)
- . TZ (Thrombinzeit)
- . Faktor VIII
- . WF (Willebrand Faktor)

Die Studie wurde von der Firma B. Braun Melsungen in Auftrag gegeben und von Frau Kerstin Faude und Herrn Dr. Michael Boll entworfen und betreut.

Die Probanden hatten nach eingehender Aufklärung über Sinn, Zweck und möglichen Nebenwirkungen der Untersuchung in die von der Ethikkommission der Universität Erlangen-Nürnberg genehmigte Studie schriftlich eingewilligt. Vor Beginn der Studie wurden alle Probanden auf mögliche bereits bestehende Blutgerinnungsstörungen untersucht und darüber aufgeklärt, dass vor und während der Studie keine blutgerinnungshemmenden Substanzen eingenommen werden dürfen. Den Untersuchern war bei der Durchführung der Studie und der Auswertung der Ergebnisse der Inhalt der klinischen Prüfmuster nicht bekannt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Synthese und Strukturermittlung von Stärkeestern

Es wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Stärkeester synthetisiert, die sich in der chemischen Struktur des eingeführten Acylrestes und dem Grad der Substitution unterscheiden. Die strukturelle Bandbreite der präparierten Ester erforderte die Anwendung unterschiedlicher Acylierungsverfahren. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Synthesearbeiten beschrieben, wobei eine Unterteilung zwischen polyanionischen und neutralen Stärkeestern gemacht wird. Zugunsten der Variabilität sind nicht alle Herstellungsverfahren hinsichtlich Ausbeute und Reproduzierbarkeit optimiert worden.

5.1.1 Synthese der polyanionischen Stärkeester

Der Begriff polyanionische Stärkeester umfasst die Halbestere von mehrwertigen Carbonsäuren. Die Darstellung beruht auf der Umsetzung von Stärken mit aktivierten Dicarbonsäuren – in der Regel mit den inneren Anhydriden – unter Zugabe von Basen. Die Dicarbonsäuren können zusätzliche Alkyl- oder Alkenylseitenketten besitzen oder Hydroxylfunktionen tragen. Die meisten Synthesen wurden in wässriger Lösung unter schwach alkalischen Bedingungen durchgeführt. Der optimale pH-Bereich für die Veresterung liegt zwischen 8,0 und 9,0. Hierbei wird der nukleophile Charakter der Stärke-Hydroxylgruppen durch geringe Deprotonierung erhöht. Bei höheren pH-Werten wird die konkurrierende Hydrolyse des eingesetzten Anhydrids sowie die Verseifung des entstehenden Stärkeesters begünstigt.

Auf diese Weise wurden durch Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid Succinylstärken mit molaren Substitutionsgraden von 0,12 bis 0,70 erhalten. Trotz zwei- bis dreifacher molarer Überschüsse an Bernsteinsäureanhydrid bei den Ansätzen **5.6** und **5.7** konnte in wässriger Lösung aufgrund der konkurrierenden Nebenreaktionen kein höherer Substitutionsgrad erreicht werden. Die höchsten Veresterungsgrade wurden bei Raumtemperatur erzielt. Bei den Ansätzen **5.1**, **5.2** und **5.3** wurden die Veresterungen bei 40 °C, 60 °C bzw. 80 °C und äquimolaren Verhältnissen durchgeführt, innerhalb dieser Temperaturreihe verringerte sich die Reaktionseffizienz von 35 % bei Raumtemperatur auf 12 % bei 80 °C. Die Reaktionseffizienz gibt an, welcher Anteil der ursprünglich eingesetzten Säure nach der Reaktion an den Stärkehydroxylgruppen gebunden vorliegt. Definitionsgemäß verschlechtert sich der Wert oberhalb äquimolarer Zugaben.

Das beste Resultat bezüglich der Reaktionseffizienz wurde bei der Umsetzung **5.8** einer größeren Menge von stärker hydrolysierte Abbaustärke **1.14** erreicht. Hier konnten 70 % des eingesetzten Anhydrids an das Polyglucan gebunden werden. Die Durchführung dieses Ansatzes wurde in dem in Abschnitt 4.1.1 vorgestellten Reaktionsgefäß vollzogen, in dem gegenüber den kleineren Ansätzen **5.1...5.7** mit Magnetrührereinsatz, durch das angepasste mechanische Rührwerk optimale Durchmischungsbedingungen herrschen. Aufgrund der geringeren Molmasse der Ausgangsstärke lag bei diesem Ansatz zusätzlich eine geringere Viskosität der Reaktionslösung vor, was ebenfalls zu einer besseren Durchmischung führte.

Noch höhere Substitutionsgrade waren mit Bernsteinsäureanhydrid nur in nicht-wässrigem Milieu realisierbar. In Formamid konnte die gelöste Stärke bei 60 °C mit dem ca. sechsfachen molaren Überschuß an Bernsteinsäureanhydrid unter Zugabe von Pyridin bis zu einem molaren Substitutionsgrad von 0,99 umgesetzt werden (siehe Succinylstärke **5.9**). Das in geringem Überschuß eingesetzte Pyridin fungierte zum einen als Base und verhinderte eine weitere Depolymerisation der Abbaustärke und bildete zum anderen mit dem entsprechenden Säureanhydrid bzw. Säurechlorid ein in der Carbonylreaktivität gesteigertes Acylpyridinium-Ion.

Die folgenden polyanionischen Stärkeester wurden in wässriger Lösung nach dem bereits beschriebenen Verfahren synthetisiert. Bei der Veresterung mit Glutarsäureanhydrid **8.1** wurden vergleichbare Resultate wie bei den Umsetzungen mit Bernsteinsäureanhydrid erzielt. Die Glutarylstärke aus diesem Ansatz hatte einen MS-Wert von 0,45. Ferner wurden Veresterungen mit 2,2-Dimethylbernsteinsäureanhydrid und Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid sowie 2,2-Dimethyl- und 3,3-Dimethylglutarsäureanhydrid durchgeführt. Mit den dimethylsubstituierten Anhydriden wurden bei identischer Reaktionsführung vergleichbare Veresterungsgrade erzielt. Der Substitutionsgrad betrug bei den Glutarylvarianten **9.1** und **10.1** 0,38 bzw. 0,57. Die Abweichungen im MS-Wert können evtl. durch Schwankungen des pH-Wertes bei der Synthese erklärt werden. Eine für reproduzierbare Ansätze erforderlich pH-Stat-Schaltung war nicht vorhanden. Die 2,2-Dimethylsuccinylstärke **6.1** wies einen Substitutionsgrad von 0,25 auf, das molare Verhältnis des Ansatzes war geringer als bei allen Succinylstärkeansätzen. Die Umsetzung mit Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid **7.1** verlief aufgrund der Hydrophobie des Anhydrids in wässriger Lösung mit der geringsten Effizienz, der Substitutionsgrad betrug lediglich 0,04. Allerdings reichte diese geringe Modifikation aus, um der partiell abgebauten Stärke ein neues Eigenschaftsprofil zu verleihen: Neben einer erreichten Kaltwasserlöslichkeit hat eine Lösung dieser Dodecenylnsuccinylstärke einen Detergenzcharakter mit einer ausgeprägten Tendenz zur Schaumbildung. Die übrigen anionischen Acylstärken bilden klare, weitestgehend schaumfreie Lösungen.

Die Reaktionen mit Diglykolsäureanhydrid **11.1** und Di-O-Acetylweinsäureanhydrid **12.1** führten nur zu sehr gering substituierten Stärkeestern, der Substitutionsgrad muss jeweils mit kleiner 0,04 angegeben werden, da in beiden Fällen NMR-spektroskopisch eine so geringe Substitution nicht mehr exakt ermittelt werden kann.

Alle Stärkeester wurden nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und sind farb- und geruchlos.

In der nachfolgenden Tabelle 5-1 werden die Substitutionsgrade der unterschiedlichen Stärkederivate zusammengefasst. Die nur mit geringer Ausbeute verlaufenen Umsetzungen mit Diglykolsäureanhydrid und mit Di-O-Acetylweinsäureanhydrid werden nicht aufgeführt.

Tab. 5-1. Substitutionsgrade und Reaktionssysteme der synthetisierten polyanionischen Stärkeester.

Stärkeester	Reaktionssystem	molarer Substitutionsgrad
Succinylstärke 5.1 ... 5.8	Wasser / NaOH	0,12 ... 0,70
Succinylstärke 5.9	Formamid / Pyridin	0,99
2,2-Dimethylsuccinylstärke 6.1	Wasser / NaOH	0,25
Dodecenylnsuccinylstärke 7.1	Wasser / NaOH	0,04
Glutarylstärke 8.1	Wasser / NaOH	0,45
2,2-Dimethylglutarylstärke 9.1	Wasser / NaOH	0,38
3,3-Dimethylglutarylstärke 10.1	Wasser / NaOH	0,57

5.1.2 Synthese der neutralen Stärkeester

Bei der Darstellung der unterschiedlichen Stärkeester mit unverzweigten oder verzweigten Acylresten konnte neben den oben beschriebenen Verfahren der Veresterung in wässriger Lösung und der Veresterung in Formamid auch eine auf dem Stärkegebiet unbekannt Methode etabliert werden.

In den Ansätzen **3.1** und **4.1** wurde aus wässriger Lösung mit Acetanhydrid bzw. Propionsäureanhydrid eine Acetylstärke mit einem MS von 0,38 sowie eine Propionylstärke mit einem MS von 0,26 erhalten. Bei dem Ansatz zur Darstellung der Propionylstärke erwies sich die höhere Unpolarität von Propionsäureanhydrid als hinderlich. Das Anhydrid bildete mit dem Wasser ein Zwei-Phasen-System, in dem erst durch die Umsetzung mit der Stärke im schwach alkalischen bzw. durch die konkurrierende Hydrolyse des Anhydrids allmählich eine homogene Lösung entstand. Aufgrund der geringeren Reaktivität von Propionsäureanhydrid und der schlechteren Durchmischung ist der erreichbare Substitutionsgrad in wässriger Lösung stärker limitiert als bei der Umsetzung mit Essigsäureanhydrid. Die Propionylstärke ist, je nach Molmasse der Ausgangsstärke, bereits bei Substitutionsgraden größer 0,3 nicht mehr kaltwasserlöslich, dieser Effekt wird bei der Acetylstärke erst viel später beobachtet.

Das Problem der ineffizienten Veresterung in wässriger Lösung mit hydrophoben Säureanhydriden tritt verstärkt bei zunehmender Unpolarität auf. Diese Tatsache erklärt die erfolglose Acylierung mit Pivalinsäureanhydrid, das wegen der tertiär-Butylgruppen stark unpolar ist und mit Wasser ein Zwei-Phasen-Gemisch bildet. In diesem heterogenen System ist die Reaktionsgeschwindigkeit für eine merkliche Acylierung der Stärkehydroxylgruppen zu gering, es resultiert lediglich ein langsame Hydrolyse des Anhydrids.

Pivaloylstärke konnte jedoch erstmals in einem homogenen Reaktionssystem aus Abbaustärke und freier Pivalinsäure in Dimethylformamid unter Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin synthetisiert werden. Orientierende Versuche haben ergeben, dass sich auch andere freie Carbonsäuren wie beispielsweise Weinsäure über diese Methode mit Stärke verestern lassen, so dass hier Stärkeester zugänglich sind, die bisher nicht realisierbar waren. Die auf diese Weise dargestellte Pivaloylstärke **14.1** weist einen Substitutionsgrad von 0,10 auf. Aufgrund der eingeführten Substituenten wird eine Aggregation benachbarter Stärkemoleküle über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verhindert. Daher bilden bei nicht allzu großer Substitution und bei geringeren Molmassen der Abbaustärke selbst derart unpolare Stärkeester in geringer Konzentration in kaltem Wasser stabile Lösungen.

Das aus der Acylierung mit Ethylchloroformiat in Formamid/Pyridin erhaltene Stärkederivat **13.1** stellt, wie die NMR-spektroskopische Charakterisierung zeigte, einen gemischten Stärkeester dar. Im dialysierten Produkt ist neben dem Methyl- und Methylensignal des eingeführten Ethoxycarbonylrestes ein zusätzliches Formylsignal vorhanden. Es konnte nicht geklärt werden, ob der Formiat-Anteil des gemischten Stärkeesters aus der Reaktion mit dem Phosgenderivat resultierte oder aus einer Nebenreaktion mit dem Lösungsmittel. Für beide Acylreste konnte ein unabhängiger Substitutionsgrad bestimmt werden. Er betrug für den Formylrest 0,17 und für den Ethoxycarbonylrest 0,15.

Die Stärkeester aus den wässrigen Ansätzen wurden direkt nach der Synthese dialysiert und lyophilisiert, die übrigen Ester wurden zunächst durch eine Ethanol-Fällung aus dem organischen Lösungsmittel isoliert und anschließend dialysiert und lyophilisiert. Alle Präparate waren farb- und geruchlos sowie kaltwasserlöslich.

Die Ergebnisse dieser unterschiedlichen Acylierungsmethoden werden in der Tabelle 5-2 zusammengefasst.

Tab. 5-2. Substitutionsgrade und Reaktionssysteme der synthetisierten neutralen Stärkeester.

Stärkeester	Reaktionssystem	molarer Substitutionsgrad
Acetylstärke 3.1	Wasser / NaOH	0,38
Propionylstärke 4.1	Wasser / NaOH	0,26
Pivaloylstärke 14.1	DMF / DMAP / DCC	0,10
Ethoxycarbonyl-/formylstärke 13.1	Formamid / Pyridin	0,15 / 0,17

5.2 Stabilitätsuntersuchung der Stärkeester

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die Verwendung von Acetylstärke als Plasmaersatzmittel mehrfach im Blickpunkt der angewandten medizinischen Forschung stand. Trotz vielversprechender klinischer Ergebnisse, scheiterte die Weiterentwicklung insbesondere aufgrund der galenischen Instabilität des Stärkeesters. Die Ergebnisse der nachfolgenden Experimente sollen eine Einordnung der Stabilität der in dieser Arbeit synthetisierten, strukturell unterschiedlichen Stärkeester ermöglichen. Vergleichbare systematische Untersuchungen zur Charakterisierung der Stabilität einer Stärkeesterbindung, insbesondere unter Sterilisationsbedingungen existieren in der Literatur nicht.

5.2.1 Stabilität unterschiedlicher Stärkeester während der Sterilisation

Es wurden eine Reihe unterschiedlich acylierter Stärken hinsichtlich ihrer Autoklavierbeständigkeit untersucht. Hierzu wurden aus den oben beschriebenen Stärkeestern einprozentige Lösungen in Deuteriumoxid hergestellt und anschließend für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert (siehe auch Abschnitt 4.3.12). Es wurde der pH-Wert und NMR-spektroskopisch der Substitutionsgrad vor und nach dem viertelstündigen Sterilisieren bestimmt.

Für die Einteilung der Stärkeester wurde eine entsprechende Klassifizierung definiert: Stärke-derivate, in denen mehr als 99 % aller Esterbindungen intakt blieben wurden als hoch-stabil eingestuft, Stärkeester bei denen mehr als 97 % aller Esterbindungen den Sterilisationsprozess überstanden haben wurden als mittel-stabil bezeichnet, und Stärkeester bei denen weniger als 95 % der Acylbindungen beständig blieben wurden als gering-stabil angesehen. Die Beurteilung der Stabilität basiert auf zwei Gesichtspunkten. Erstens wurden die MS-Werte über Protonenresonanzspektroskopie vor und nach dem Autoklavieren bestimmt und verglichen.

Zweitens wurde durch direkten Vergleich von Original-Spektren eine Aussage getroffen, ob eine verstärkte Hydrolyse stattgefunden hatte oder nicht. Diese halbquantitative Beurteilung gewann an Bedeutung, wenn die Integrale mit einer hohen Fehlerbreite behaftet waren. Bei einigen Derivaten kam es vor, dass das Signal der freien Säure in dem Signalebereich der gebundenen Säure lag. Eine Unterscheidung beider Signale war aufgrund der unterschiedlichen Linienbreiten zwar eindeutig gegeben, jedoch ließen sich beide Signale nicht mehr exakt bzw. unabhängig voneinander quantifizieren. In diesen Fällen musste eine halbquantitative Abschätzung durch direkte Spektrenvergleiche gemacht werden. Diese Beurteilung wurde genauso hoch bewertet wie die numerische Auswertung der Integrale.

Der anfängliche pH-Wert aller Lösungen (ungepuffert) lag zwischen 5,1 und 6,8; nur eine Lösung hatte einen höheren pH-Wert von 7,4. Die Veränderung des pH-Wertes gab einen ersten Anhaltspunkt für eine stattgefundene Hydrolyse, das Ausmaß der pH-Wert-Änderung ließ jedoch keinen genauen Rückschluss auf den Umfang der stattgefundenen Hydrolyse zu. Bei direkten Vergleichen der Hydrolyseraten zweier Stärkeester muss allerdings der anfängliche pH-Wert, besonders bei hohen pH- Differenzen, mit in Betracht gezogen werden.

Die Stärkeester Acetylstärke **3.1**, Propionylstärke **4.1** und Pivaloylstärke **14.1** waren insgesamt von einer hohen Stabilität gegenüber dem Sterilisationsprozess gekennzeichnet. Im Vergleich untereinander erschienen die Pivaloyl- bzw. die Propionylstärke stabiler als die Acetylstärke. Im NMR-Spektrum der autoklavierten Propionylstärkelösung war kaum freie Säure sichtbar. Eine aufgrund der geringeren Löslichkeit der Pivaloylstärke bedingte schlechtere Spektrenqualität machte die numerische Auswertung ein wenig unsicher, jedoch ergab ein direkter Vergleich der identisch aufgenommenen Spektren keinen Hinweis auf Abbau. Aufgrund der Tatsache, dass die Pivaloylstärkelösung den höchsten anfänglichen pH-Wert aufwies, was eine Verseifung des Esters eher begünstigt, ist eine höhere oder zumindest identisch hohe Stabilität wie bei der Propionylstärke anzunehmen.

Die Succinylstärke **5.4** zeigte zusammen mit der 2,2-Dimethylsuccinylstärke **6.1** die geringste Stabilität, wobei die Hydrolyse der letzteren noch ausgeprägter war. Hier wurden beim Sterilisationsvorgang ca. 56 % der Esterbindungen hydrolysiert. Diese Hydrolyserate wurde in der Versuchsreihe von keinem anderen Präparat erreicht. Die dodecenylylsuccinylierte Stärke **7.1** wies eine höhere Stabilität als die beiden vorhergehenden Varianten auf, es muss jedoch betont werden, dass dieser Stärkeester nur sehr gering substituiert war und demzufolge eine Detektion der relativen Änderung des Substitutionsgrades mit größeren Fehlern behaftet ist. Der direkte Spektrenvergleich ließ jedoch eine insgesamt mittlere Stabilität erkennen.

Die Glutarylstärke **8.1** bzw. die beiden dimethylsubstituierten Glutarylstärken **9.1** und **10.1** wiesen eine wesentlich höhere Stabilität auf als die Succinylstärkespecies. Wegen der unterschiedlichen pH-Werte vor der Sterilisation und der unterschiedlichen MS-Werte kann jedoch innerhalb der Reihe der Glutarylstärken keine Abstufung der Stabilität der Esterbindung getroffen werden. Die Glutarylstärken sind insgesamt als mittel-stabil anzusehen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Die strukturelle und mechanistische Ursache für die Stabilität bzw. Instabilität der jeweiligen Esterbindungen wird vergleichend in Kapitel 6.1 analysiert.

Tab. 5-3. Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung unterschiedlicher Stärkeester.

Stärkeester	pH vor Sterilisation	pH nach Sterilisation	MS vor Sterilisation	MS nach Sterilisation	Abbau in %	Stabilität
Acetylstärke 3.1	5,3	4,8	0,38	0,38	0,5 (0,9)	hoch
Propionylstärke 4.1	5,4	5,0	0,26	0,26	0,4	hoch
Pivaloylstärke 14.1	6,6	6,4	0,10	0,11	0	hoch
Succinylstärke 5.4	6,2	6,0	0,35	0,30	14,3 (15,4)	gering
2,2-Dimethylsuccinylstärke 6.1	6,6	5,8	0,25	0,11	56,0	gering
Dodecenylsuccinylstärke 7.1	6,0	5,5	0,04	0,04	-	mittel
Glutarylstärke 8.1	6,1	6,1	0,45	0,44	1,0	mittel
2,2-Dimethylglutarylstärke 9.1	6,8	6,5	0,38	0,37	1,0	mittel
3,3-Dimethylglutarylstärke 10.1	7,4	7,0	0,57	0,56	1,0	mittel

Bei den Acetyl- und Succinylstärken wurde die freigesetzte Säuremenge zusätzlich enzymatisch bestimmt. Die Ergebnisse werden in der jeweiligen Spalte in Klammern aufgeführt. Es ist zu berücksichtigen, dass der enzymatische Nachweis wesentlich empfindlicher ist als die NMR-spektroskopische Methode.

5.2.2 Stabilität von Succinylstärkelösungen bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Esterhydrolyse ist pH-abhängig. Um das Ausmaß der Esterspaltung in Succinylstärkelösungen genauer zu untersuchen, wurden aus Succinylstärke **5.8** mit einem Substitutionsgrad von 0,70 unterschiedlich gepufferte vierprozentige Lösungen hergestellt und anschließend für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Ein Vergleich mit den obigen Ergebnissen an **5.4** hat gezeigt, dass die Hydrolyse der höher substituierten Succinylstärke noch ausgeprägter war. Es ist festzustellen, dass ein erhöhter Substitutionsgrad, ein erhöhter Salzgehalt sowie eine verlängerte Sterilisationsdauer einen merklichen Einfluss auf die Stabilität des Esters haben. Im günstigsten Fall, d.h. in isotoner Kochsalzlösung bei pH 4 und pH 5 waren ca. 40 % der Esterbindungen hydrolysiert. Ab einem pH-Wert von 6, war eine deutliche Zunahme der Hydrolyserate zu erkennen. Je alkali-

schers der pH-Wert wurde desto größer war die beobachtete Instabilität der Succinylstärke. Bei einem pH-Wert von 9 waren bereits 75 % aller Esterbindungen hydrolysiert. Diese Tendenz liegt nicht nur in der erhöhten Verseifungsgeschwindigkeit der Esterbindung bei steigendem pH-Wert begründet, sondern lässt sich auch mit der zunehmenden Deprotonierung der freien Säuregruppe des Halbesters erklären. Dieses Phänomen wird jedoch eingehender in Kapitel 6.1 diskutiert.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Succinylstärke gegenüber dem Sterilisationsprozess als nicht ausreichend stabil einzustufen ist. Ein Einsatz im Sinne einer pharmakologischen Anwendung als Plasmaersatzlösung erscheint daher ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der Sterilisation von unterschiedlich gepufferten Succinylstärkelösungen sind in der Tabelle 5-4 zusammengetragen. Es wird die Menge der nach dem Autoklavieren freigesetzten Bernsteinsäure im prozentualen Verhältnis zur zuvor gebundenen Menge angegeben.

Tab. 5-4. Freisetzung von Bernsteinsäure nach Sterilisation einer Succinylstärkelösung bei unterschiedlichen pH-Werten.

Pufferlösung	NMR-Methode	Enzym-Methode
	%	%
Isotone Kochsalzlösung (pH ~ 5)	44	41
Acetat-Puffer pH 4	39	41
Acetat-Puffer pH 5	44	41
Phosphat-Puffer pH 6	47	49
Phosphat-Puffer pH 7	57	56
Phosphat-Puffer pH 8	66	64
Carbonat-Puffer pH 9	75	74

Der Vergleich beider Bestimmungsmethoden ergibt eine gute Übereinstimmung. Obgleich bei vorhandener Ausstattung die NMR-Methode die bequemere ist, da eine Eichreihe entfällt. Hier kann das Verhältnis zwischen gebundener und freier Bernsteinsäure direkt bestimmt werden.

5.3 Enzymatischer Abbau von Stärkeestern

Die Proben wurden wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas insgesamt 24 Stunden inkubiert. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden nach definierten Zeitabschnitten Aliquote der Inkubationslösungen entnommen und analysiert. Da bei jedem enzymatischen Hydrolyseschritt ein neues reduzierendes Ende entsteht, konnte der Abbau durch die Farbreaktion mit Dinitrosalicylsäure photometrisch quantitativ verfolgt werden. Durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten konnten auf diese Weise für die jeweiligen Stärkederivate charakteristische Abbaukurven erhalten werden.

Die α -Amylase ist eine Endo-Glucanase und spaltet Glycosidbindungen innerhalb von α -(1-4)-verknüpften Glucoseketten. Aus Stärke werden als Hauptprodukt lineare und verzweigte Oligosaccharide mit drei und mehr Glucoseeinheiten gebildet. Die gemessenen Extinktionswerte können mittels einer Eichreihe aus Maltose in Reduktionsequivalente umgerechnet werden. Über die Substratkonzentration in der Testlösung wird berechnet wieviel Monomereinheiten – Anhydroglucose bzw. substituierte Anhydroglucose – vorliegen. Dies entspricht mit ausreichender Genauigkeit der Gesamtzahl der potentiellen reduzierenden Enden bzw. der glycosidischen Bindungen. Bei der Berechnung der Molmassen der Monomereinheiten muss die jeweilige Substitution berücksichtigt werden. Aus dem Verhältnis der gemessenen reduzierenden Enden und der maximal möglichen reduzierenden Enden wird das Ausmaß der Hydrolyse bestimmt. Es wurden relative Aktivitäten definiert, indem die unterschiedlichen Abbauraten der Stärkederivate mit den Abbauraten der jeweiligen unsubstituierten Ausgangsstärken ins Verhältnis gesetzt wurden.

5.3.1 α -Amylase-Abbau der neutralen Stärkeester

Es wurde der α -amylolytische Abbau von Acetylstärke **3.1** mit einem Substitutionsgrad von 0,38 und Pivaloylstärke **14.1** mit einem Substitutionsgrad von 0,10 sowie des gemischt substituierten Derivates Ethoxycarbonyl-/Formylstärke **13.1** mit einem MS(Ethoxycarbonyl) von 0,15 und einem MS(Formyl) von 0,17 untersucht. Diese Stärkederivate waren alle aus der Abbaustärke **1.1** synthetisiert. Bei diesem Ausgangsmaterial wurden nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml 30,2 % der glycosidischen Bindungen hydrolysiert. Dieser Abbau kann als nahezu vollständig angesehen werden, da selbst bei einer Verzehnfachung der Enzymkonzentration auf 1 U/ml nach der gleichen Zeitspanne eine nur unwesentlich höhere Hydrolyse von 32,4 % resultierte. Bei dieser hohen Enzymkonzentration war dieser Abbau bereits nach zehn Stunden erreicht.

Im Vergleich zum Ausgangsmaterial wurde bei den Stärkederivaten ein verringerter Abbau gemessen. Der stärkste Abbau unter den Stärkeestern fand in **13.1** statt, hier wurden nach 24 Stunden 24,6 % der glycosidischen Bindungen gespalten. Betrachtet man den zeitlichen Ver-

lauf der Produktbildung in Abbildung 5-1, so ist erkennbar, dass der Endwert des Umsatzes dieses Substrats zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht wurde. Eine Versuchsreihe mit einer höheren Amylasekonzentration wurde bei diesem Derivat aufgrund von Substanzmangel nicht durchgeführt, so dass sich keine genaue Aussage über den Endpunkt des Abbaus treffen lässt. Dennoch wird bei einer Extrapolation des Graphen deutlich, dass man sich bereits nahe des maximalen Substratabbaus befindet. Im Verhältnis zur Abbaustärke **1.1** zeigte das Enzym mit diesem Substrat eine relative Aktivität von 81,5 %.

Bei der Enzymspaltung von Acetylstärke **3.1** als Substrat und einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml war der Umsatz durch die α -Amylase deutlich geringer. Hier betrug die relative Aktivität nach 24 Stunden nur noch 48,7 %. Das bedeutet, dass innerhalb dieser Zeitspanne lediglich 14,7 % der glycosidischen Bindungen der acylierten Stärke hydrolysiert werden konnten. Die Produktbildungskurve in Abbildung 5-1 deutet wie bei Substanz **13.1** auf eine noch nicht vollständig abgeschlossene Enzymreaktion hin. Auch hier muss analog gefolgert werden, dass ein weiterer Abbau nur noch in geringem Maße stattgefunden hätte.

Durch den sterischen Einfluss der Substituenten wurden bei der Pivaloylstärke **14.1** nach 24 Stunden bei den beiden α -Amylasekonzentrationen 0,1 U/ml und 1 U/ml nur 12,1 % bzw. 15,4 % der glycosidischen Bindungen hydrolysiert. Dies bedeutet eine Verringerung der Aktivität des Enzyms gegenüber der Abbaustärke auf 40,1 % (bei 0,1 U/ml). Die Enzymreaktion war bei einer Konzentration von 1 U/ml nach 24 Stunden vollständig abgeschlossen, der Verlauf des Graphen bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml in Abbildung 5-1 zeigt bei diesem Zeitpunkt noch eine leichte Steigung.

Der voluminöse, unpolare tertiär-Butylrest der Pivaloylstärke hat den größten Einfluss auf die Aktivität der α -Amylase. Hervorzuheben ist, dass dieser Effekt bereits bei einer vergleichsweise geringen Substitution von 0,10 auftrat. Obwohl die Acetylstärke einen wesentlich höheren Substitutionsgrad von 0,38 hat, wurde sie dennoch besser abgebaut. Bei der Ethoxycarbonyl-/Formylstärke muss beachtet werden, dass, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, die Struktur und dadurch auch das eventuelle Ausmaß der Substitution nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

Das nachfolgende Diagramm illustriert den oben beschriebenen Sachverhalt. Die Reihenfolge der Anfangsgeschwindigkeiten korreliert mit der Reihenfolge der Endwerte.

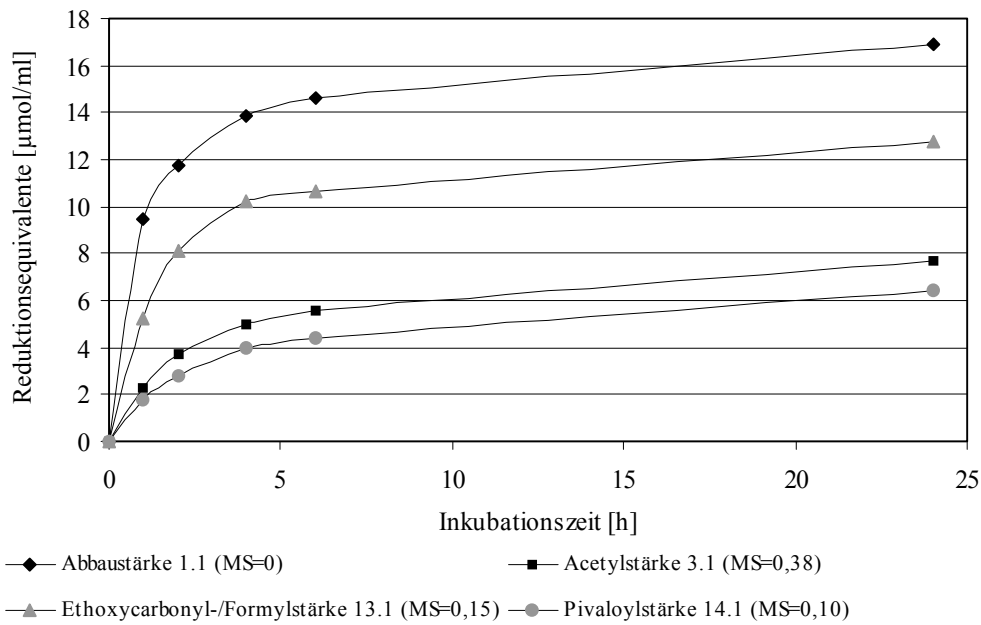


Abb. 5-1. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) verschiedener neutraler Stärkeester.

In der Tabelle 5-5 werden die Zahlenwerte für den Abbau der jeweiligen Substrate nach 24 Stunden nochmals abschließend zusammengefasst.

Tab. 5-5. Enzymatische Hydrolyse verschiedener neutraler Stärkeester nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml α -Amylase.

Substrat	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.1	0	30,2	100
Ethoxycarbonyl-/formylstärke 13.1	0,15/0,17	24,6	81,5
Acetylstärke 3.1	0,38	14,7	48,7
Pivaloylstärke 14.1	0,10	12,1	40,1

5.3.2 α -Amylase-Abbau der polyanionischen Stärkeester

Es wurden acht unterschiedlich substituierte Succinylstärken durch enzymatischen Abbau mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas charakterisiert. Bei allen Derivaten außer **5.5** und **5.9** wurde die Untersuchung mit zwei Enzymkonzentrationen durchgeführt (0,1 U/ml und 1 U/ml). Aufgrund des einheitlichen Substitutionstyps und des identischen Ausgangsmaterials ist bei diesen Stärkeestern ein direkter Vergleich des Abbauverhaltens zulässig.

Die hoch substituierten Succinylstärken mit einem Substitutionsgrad größer 0,6 wurden nach 24 Stunden bei der geringeren α -Amylasekonzentration nahezu überhaupt nicht abgebaut. Bei der Succinylstärke **5.6** mit einem MS von 0,63 wurden lediglich 1,1 % der glycosidischen Bindungen hydrolysiert, was einer relativen Aktivität von 3,6 % entspricht. Die Succinylstärken **5.7** und **5.9** mit einem MS von 0,68 bzw. 0,99 blieben unter obigen Bedingungen völlig unverändert. Bei Substanz **5.7** ergab sich erst bei einer Enzymkonzentration von 1 U/ml nach 24 Stunden ein leichter Umsatz von 1,5 % verglichen mit einer Hydrolyse von 3,0 % bei Substanz **5.6**.

Die Succinylstärken **5.3**, **5.4** und **5.5** mit den Substitutionsgraden 0,32, 0,35 und 0,43 wurden deutlich stärker hydrolysiert. Bei Substanz **5.5** wurden bei einer α -Amylase-konzentration von 0,1 U/ml nach 24 Stunden bereits 7,9 % der glycosidischen Bindungen gespalten. Dies entspricht im Verhältnis zum Ausgangsmaterial einer relativen Aktivität von 26,2 %. Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse von **5.5** der glycosidischen Bindungen ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Vergleicht man den Abbau der Substanzen **5.3** und **5.4** (s. Tab. 5-6), so fällt auf, dass Substanz **5.4** trotz des etwas höheren Substitutionsgrades von der α -Amylase stärker abgebaut wird. Bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml wird **5.3** nach 24 stündiger Inkubation zu 9,5 % hydrolysiert und **5.4** zu 12,9 %. Dieser Unterschied ist bei der höheren Enzymkonzentration nicht mehr so ausgeprägt, hier wird **5.3** zu 14,6 % und **5.4** zu 16,2 % hydrolysiert. Das Ergebnis impliziert, dass sich beide Substanzen im Substitutionsmuster unterscheiden müssen. Die Substituenten bei Succinylstärke **5.3** müssen so verteilt sein, dass eine effizientere Abschirmung der glycosidischen Bindungen gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse resultiert als dies bei Substanz **5.4** der Fall ist.

Die succinylierten Stärken **5.1** und **5.2** werden aufgrund ihrer ähnlichen Substitutionsgrade in Höhe von 0,12 und 0,14 erwartungsgemäß annähernd gleich gut abgebaut. Die Substanz **5.1** wird bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml und einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu 22,0 % hydrolysiert und Substanz **5.2** zu 20,3 %. Dies entspricht einer relativen Aktivität von 72,8 % bzw. 67,2 %. Bei einer α -Amylasekonzentration von 1 U/ml werden die beiden Substanzen noch stärker hydrolysiert. Hier resultiert bei **5.1** ein Abbau von 24,8 % bzw. bei **5.2** ein Abbau von 24,2 % der glycosidischen Bindungen.

Für die Darstellung des enzymatischen Umsatzes wurde sich in dem nachfolgendem Diagramm auf eine repräsentative Auswahl von Succinylstärken beschränkt. Bei den nicht vertretenen Succinylstärken wird die Lage der Kurven – mit Ausnahme von Succinylstärke **5.3** – durch den jeweiligen Substitutionsgrad bestimmt. Zum Vergleich wird in Abbildung 6-2 in Abschnitt 6.1 die relative α -Amylaseaktivität gegenüber succinylierten Stärken mit steigenden MS-Werten graphisch dargestellt.

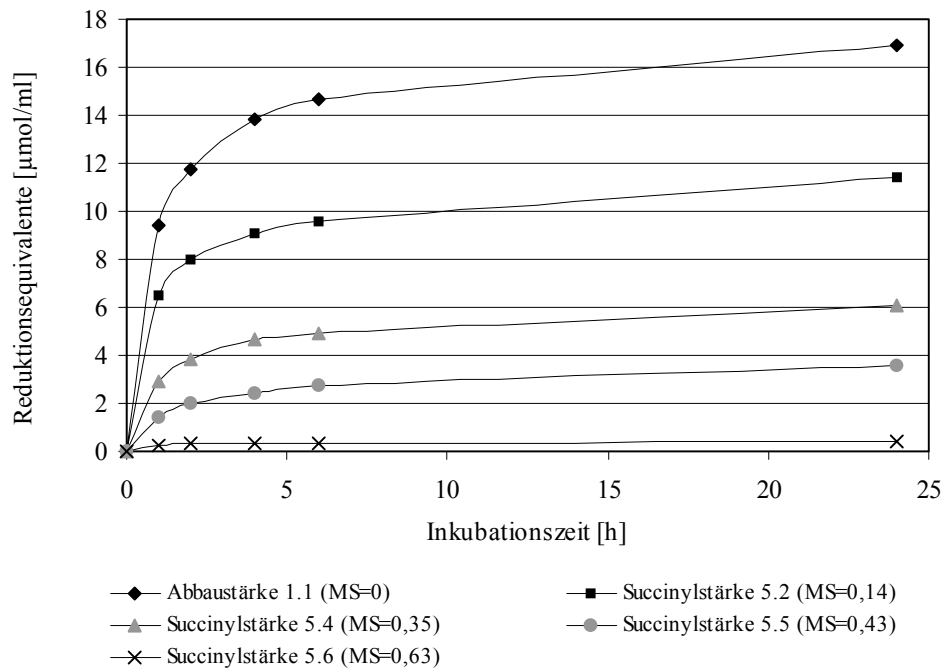


Abb. 5-2. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) verschiedener Succinylstärken.

Aus Abb. 5-2 wird auch ersichtlich, dass die Anfangsgeschwindigkeiten des enzymatischen Abbaus mit steigendem Substitutionsgrad abnehmen.

Eine Aussage, wie groß der Einfluss der eingeführten negativen Ladungen auf die enzymatische Hydrolyse der glycosidischen Bindungen im Vergleich zum Abbau der neutralen Stärkeester ist, kann aufgrund der zu geringen Zahl verfügbarer Substanzen nicht eindeutig getroffen werden. Vergleicht man die enzymatische Hydrolyse von Acetylstärke **3.1** mit der Hydrolyse von gleichartig hoch substituierter Succinylstärke **5.4**, so stellt man fest, dass die Acetylstärke stärker abgebaut wird. Dies kann einerseits durch die fehlende Ladung der Seitenkette aber andererseits auch durch den geringeren sterischen Anspruch des Acetylrestes gegenüber dem Succinylrest begründet werden. Welcher der beiden Effekte den Abbau durch α -Amylase stärker beeinflusst kann nicht ersehen werden. Die Pivaloylstärke **14.1** mit einem MS-Wert von 0,10 wird nur zu 12,1 % hydrolysiert, hingegen wird die Succinylstärke **5.1** mit einem MS-Wert von 0,12 zu 22,0 % hydrolysiert. Dieser gravierende Unterschied ist allein auf die räumliche Abschirmung der glycosidischen Bindungen durch den voluminösen und

unpolaren tertiär-Butylrest zurückzuführen. Die sterische Ausdehnung scheint, ab einer gewissen Größe der Seitenkette, einen höheren Einfluss, auf den enzymatischen Umsatz zu haben als eine negative Ladung.

In der Tab. 5-6 sind die Hydrolysegrade für die Inkubationsdauer von 24 Stunden für alle getesteten Succinylstärken aufgeführt. Es werden nur die Werte des enzymatischen Abbaus bei einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml angegeben.

Tab. 5-6. Hydrolyse verschiedener Succinylstärken nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml α -Amylase.

Substrat	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.1	0	30,2	100
Succinylstärke 5.1	0,12	22,0	72,8
Succinylstärke 5.2	0,14	20,3	67,2
Succinylstärke 5.3	0,32	9,5	31,5
Succinylstärke 5.4	0,35	12,9	42,7
Succinylstärke 5.5	0,43	7,9	26,2
Succinylstärke 5.6	0,63	1,1	3,6
Succinylstärke 5.7	0,68	0,0	0,0
Succinylstärke 5.9	0,99	0,0	0,0

Das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse von 2,2-Dimethylsuccinylstärke **6.1** fällt wie die Abbaukurve in Abbildung 5-3 zeigt deutlich geringer aus als bei einer gleichartig substituierten Succinylstärke. Das Substrat **6.1** wurde bei einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml nach 24 Stunden zu 7,8 % abgebaut, dies entspricht im Vergleich zur Abbaustärke **1.9** einer relativen Aktivität von 27,8 %. Die Dodecenylnsuccinylstärke **7.1** wird trotz ihres geringen Substitutionsgrades von 0,04 nur im gleichen Maße abgebaut wie die Succinylstärke **5.1** mit einem Substitutionsgrad von 0,12. Nach 24 Stunden wurden bei **7.1** bei einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml 22,6 % der glycosidischen Bindungen hydrolysiert, was mit einer relativen Aktivität von 80,4 % gleichzusetzen ist. Die beiden Stärkeester aus der Umsetzung mit Diglykolsäureanhydrid **11.1** bzw. mit Di-O-Acetylweinsäureanhydrid **12.1** haben einen etwas geringeren Substitutionsgrad als **7.1**, er wurde in beiden Fällen mit kleiner als 0,04 angegeben. Aufgrund der geringen Substitution und fehlender sterisch anspruchsvoller Alkyl- oder Alkenylgruppen sind beide Derivate gut hydrolysierbar. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml wurde die Substanz **11.1** zu 27,4 % und die Substanz **12.1** zu 25,7 % hydrolysiert. Dies entspricht einer relativen Aktivität von 97,5 % bzw. 91,5 %.

In der Abbildung 5-3 werden die Abbaukurven der jeweiligen Stärkeester dargestellt. Die Substanzen mit sehr geringen Substitutionsgraden (**11.1**, **12.1** und **7.1**) sowie die unsubstituierte Abbaustärke **1.9** zeigen in den Anfangsgeschwindigkeiten ihrer Hydrolyse nur geringfügige Unterschiede.

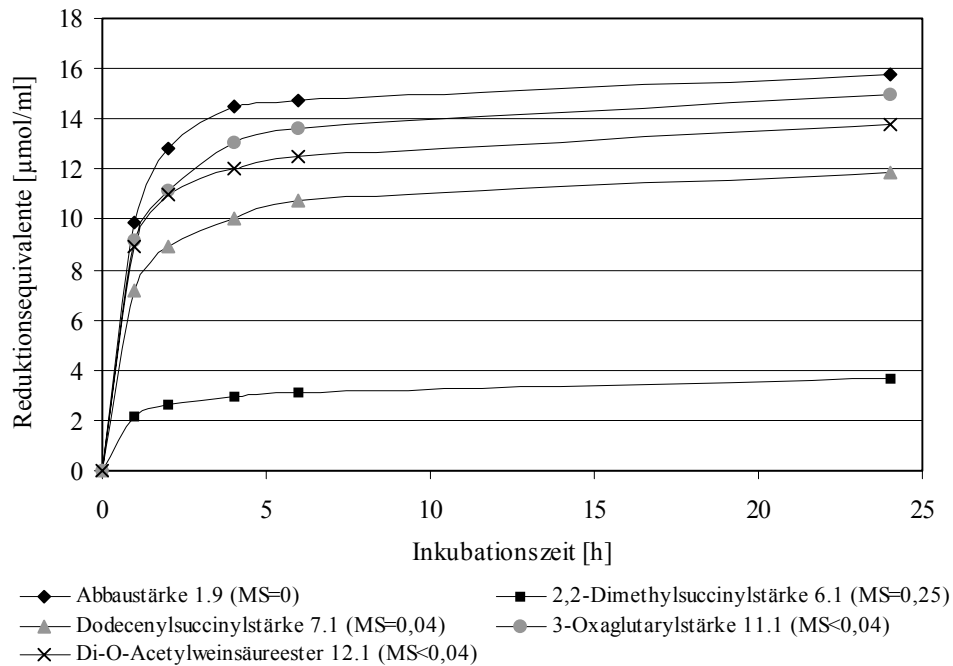


Abb. 5-3. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) verschiedener polyanionischer Stärkeester.

Abbildung 5-4 zeigt den enzymatischen Abbau verschiedener Glutarylstärken sowie deren Edukte Abbaustärke **1.1** und Abbaustärke **1.9**. Die Glutarylstärke **8.1** wurde aus Abbaustärke **1.1** synthetisiert und die beiden Dimethylglutarylstärken **9.1** und **10.1** aus Abbaustärke **1.9**. Die Stärke **1.1** wird bei einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml nach 24 Stunden zu 30,2 % abgebaut, die Stärke **1.9** zu 28,1 %. Die geringe Differenz im Abbau dürfte durch die unterschiedlichen Molmassen beider Abbaustärken bzw. den geringfügig verschiedenen Verzweigungsgraden bedingt sein.

Bei einer Enzymkonzentration von 0,1 U/ml wurden die Glutarylstärken selbst nach 24 Stunden so gut wie gar nicht abgebaut. Die Glutarylstärke **8.1** mit einem Substitutionsgrad von 0,45 wurde lediglich zu 1,1 % hydrolysiert, die beiden anderen Substanzen wurden zu 0,5 % bzw. überhaupt nicht hydrolysiert. Bei einer α -Amylasekonzentration von 1 U/ml konnte nur eine unwesentlich höhere Hydrolyse beobachtet werden.

Vergleicht man den Abbau von Glutarylstärke **8.1** mit der ähnlich hoch substituierten Succinylstärke **5.5**, so wird ersichtlich, dass die Succinylstärke mehr als sechsmal stärker hydrolysiert wird. Die Glutarylstärken stellen somit ein für die α -Amylase wesentlich schlechter hydrolysierbares Substrat dar als die Succinylstärken.

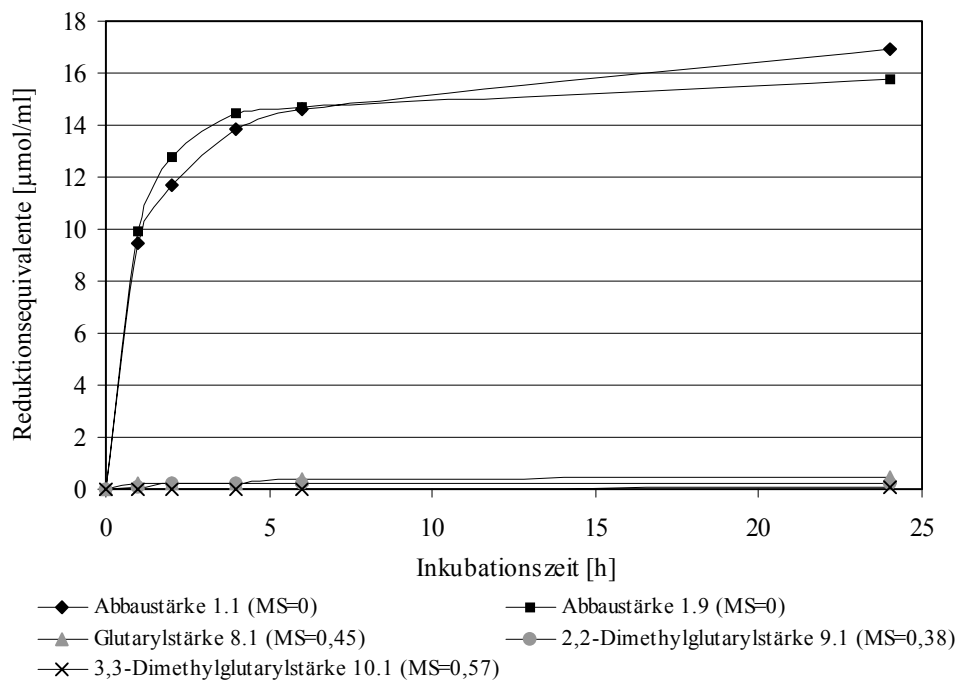


Abb. 5-4. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) verschiedener polyanionischer Stärkeester.

Die Hydrolysraten nach 24-stündiger Inkubationszeit und einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml der in Abbildung 5-3 und 5-4 aufgeführten Stärkeester sind in Tabelle 5-7 zusammengefasst.

Tab. 5-7. Hydrolyse verschiedener polyanionischer Stärkeester nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml α -Amylase.

Substrat	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.1	0	30,2	100
Abbaustärke 1.9	0	28,1	100
3-Oxaglutarylstärke 11.1	> 0,04	27,4	97,5
Di-O-acetylweinsäurestärkeester 12.1	> 0,04	25,7	91,5
Dodeceny succinylstärke 7.1	0,04	22,6	80,4
2,2-Dimethylsuccinylstärke 6.1	0,25	7,8	27,8
Glutarylstärke 8.1	0,45	1,1	3,6
2,2-Dimethylglutarylstärke 9.1	0,38	0,5	1,8
3,3-Dimethylglutarylstärke 10.1	0,57	0,0	0,0

5.4 Synthesen von Carboxymethylstärken

Die Veretherung von Stärke-OH-Gruppen stellt andere Anforderungen an eine zur optimalen Produktbildung günstigen Reaktionsführung als Veresterungsreaktionen an Stärke.

In den meisten organischen Lösungsmitteln sind Stärken und Stärkefraktionen, unabhängig von ihrem Molekulargewicht, unlöslich. Es entsteht aus dem Stärke-Feststoff, welcher in der Regel granulär vorliegt, und dem organischen, zumeist alkoholischen Lösungsmittel ein Zwei-Phasen-Gemisch. In der Industrie werden großtechnische Veretherungen mit Stärke in solchen heterogenen Systemen durchgeführt. Der überwiegende Grund dieser Vorgehensweise ist der Erhalt der granulären Struktur der Stärkekörner, welche aus prozess- und anwendungstechnischer Sicht von Vorteil ist. Ein weiterer positiver Aspekt eines solchen sog. „slurry“-Verfahrens (dt.: Aufschlammung) ist die bessere Durchmischbarkeit des Ansatzes bei hohem Substanzeinsatz bzw. großen Stärkemengen. Im Falle der Carboxymethylierung – und ebenso bei zahlreichen anderen Veretherungen – ist ein gewisser Wasseranteil für die Synthese unerlässlich. Dieser Wasseranteil wird benötigt, um die kompakte Struktur der Stärkekörner durch ein leichtes Aufquellen aufzulockern, um sodann mit der vorzugsweise eingesetzten Base Natriumhydroxid die Reaktivität der Stärkehydroxylgruppen zu erhöhen. Einen zu hohen Wassergehalt gilt es jedoch zu vermeiden, da es ansonsten zu einem sehr starken Aufquellen der Stärkekörner sowie zu einem Verkleben der Feststoffe kommen kann. Im Extremfall verklumpt der Ansatz irreversibel. Ein weiterer Nachteil ist, dass aufgrund der Heterogenität die Reaktion primär an der Grenzfläche fest-flüssig stattfindet bzw. die Reaktanden in die aufgequollenen Stärkekörner diffundieren müssen, um dort mit ausreichender Reaktionsgeschwindigkeit mit den Hydroxylfunktionen der Stärkemoleküle reagieren zu können.

Die Umsetzungen von Stärke in einem homogenen Reaktionssystem spielen aus industrieller Sicht bisher eine eher untergeordnete Rolle. In wässrigen Systemen muss zudem ein eventuell höheres Maß an Nebenreaktionen der Veretherungsreagenzien berücksichtigt werden. Ebenso ist die bei herkömmlichen Synthesen wegen langer Alkalisierungs- und Reaktionszeiten auftretende Gelbfärbung in homogenen Systemen wesentlich ausgeprägter und dadurch sehr viel schwieriger zu entfernen. Können jedoch solche Schwierigkeiten vermieden werden, indem beispielsweise ein anderes Lösungsmittel und eine andere Base verwendet wird oder die Stärke entsprechend vorbehandelt wird, so hat die Synthese in homogener Lösung klare Vorteile. Ein wesentlicher Aspekt dabei ist, dass die Reaktion nicht mehr durch die Diffusionsraten der Reaktanden an den Grenzflächen bestimmt wird und dass durch die bessere Verteilung der in Lösung befindlichen Stärkemoleküle eine einheitlichere Reaktionsführung garantiert werden kann. Inwiefern sich diese einheitliche Reaktionsführung auf das Substitutionsmuster auswirkt soll geklärt werden.

Die in dieser Arbeit in heterogenen Systemen synthetisierten Carboxymethylstärken sind näherungsweise alle nach dem klassischen „slurry“-Verfahren hergestellt worden. Die Synthesearbeiten in homogenen Systemen (siehe Abschnitt 5.4.2) sind, bis auf wenige Ansätze in

Dimethylsulfoxid, in wässriger Lösung durchgeführt worden. Carboxymethylierungen in homogener Lösung von partiell hydrolysierten Stärken, die größtenteils keine granuläre Struktur mehr aufweisen, sind mit einer derartigen Substitutionsbreite in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

Bei allen Ansätzen galt es primär zu untersuchen, in welchem Lösungsmittel hinsichtlich des Substitutionsgrades und der Reaktionseffizienz die besten Ergebnisse erreicht werden können. Es waren Reaktionssysteme mit einer gewissen Robustheit gegenüber den beschriebenen Problemen zu entwickeln. Ein weiteres Bewertungskriterium war die in den jeweiligen Systemen realisierbare Verteilung der Substituenten entlang der Polymerkette bzw. auf die unterschiedlichen Hydroxylgruppen der Monomereinheiten. Die Synthesen wurden ebenfalls unter ökonomischen Aspekten beurteilt. Hierbei stand vor allem die gedachte pharmazeutische Anwendung der Carboxymethylstärken als Plasmaersatz im Vordergrund, d.h. den Carboxymethylierungen müssen mehrere Modifikationsschritte vor- oder nachgeschaltet werden können. Letztlich muss aus dem Verfahren reproduzierbar ein wohldefiniertes, einheitliches und leicht aufzuarbeitendes Produkt resultieren.

5.4.1 Synthesen in heterogenen Reaktionssystemen

Es wurden in den niederen Alkoholen Methanol, Ethanol und Isopropanol partiell hydrolysierte und native Wachsmaisstärken mit Monochloressigsäure bzw. ihrem Natriumsalz und Natriumhydroxid in unterschiedlichen molaren Verhältnissen gemäß Abschnitt 4.4.8 umgesetzt. Zusätzlich wurden Synthesen in Aceton als Suspensionsmittel durchgeführt (Abschnitt 4.4.9).

Umsetzungen in Methanol

Die Carboxymethylierung in Methanol wurde bis auf einen Ansatz (**16.1**) mit nativer Wachsmaisstärke als Ausgangsmaterial durchgeführt. Es kann prinzipiell zwischen den Ansätzen in kleinerem Maßstab (**16.1**, **16.3**, **16.4** und **16.5**), d. h. in geringem Reaktionsvolumen, und den höher dimensionierten Synthesen **16.6**, **16.7** und **16.8** unterschieden werden. Die Synthesen im kleinen Maßstab wurden mit einer Standardschliffapparatur aus Kolben, Rückflusskühler, Tropftrichter und Magnetrührer durchgeführt, wohingegen die größeren Ansätze in dem speziell angefertigten Reaktionsgefäß (Abschnitt 4.1.1) mit mechanischem Rührwerk vollzogen wurden. Der durchschnittliche Wassergehalt lag in der Regel bei den Synthesen zwischen 10 und 15 % (v/v). Mit Ausnahme von **16.1** (60 °C) wurden sämtliche Umsetzungen unter leichtem Rückfluss, d.h. bei ca. 67 °C durchgeführt. In Methanol wurde bei allen Synthesen Monochloressigsäure als Carboxymethylierungsreagenz verwandt, welche stets vor dem Natriumhydroxid zum Ansatz gegeben wurde. Es wurde immer etwas mehr als die doppelte molare Menge Natriumhydroxid wie Monochloressigsäure hinzugegeben (siehe Tabelle 5-8). Im Ansatz **16.1** wurde trotz ähnlicher molarer Verhältnisse wie bei den Ansätzen **16.3**, **16.6** und **16.7**

nur der geringe Substitutionsgrad von 0,13 realisiert, was einer Reaktionseffizienz von 18,8 % entspricht. Dies lag offenbar an der Verwendung des partiell hydrolysierten Ausgangsmaterials, bei dem ein Verklumpen des Reaktionsansatzes bereits bei viel geringeren Wassergehalten beobachtet wurde; dies verhinderte eine möglichst feine Verteilung der Reaktanden und lieferte zusätzlich aufgrund der erschwerten Isolierung des Produktes geringere Ausbeuten. Bei Ansatz **16.3** wurde trotz gleicher Ansatzgröße ein Substitutionsgrad von 0,37 und eine Reaktionseffizienz von 53,6 % erreicht. Der Unterschied kann, wie oben beschrieben, durch die bessere Reaktionsführung bei heterogenen Synthesen mit nativen Stärken erklärt werden. Bei **16.6** wurde mit einer etwas geringeren Menge Monochloressigsäure ebenfalls ein Substitutionsgrad von 0,37 erreicht. Hier konnte die bessere Reaktionseffizienz in Höhe von 61,7 % durch die Verwendung des Reaktors, welcher eine gleichförmigere und stärkere Durchmischung des Reaktionsansatzes gewährleistete, erzielt werden. Die beiden anderen Ansätze im Reaktor lieferten Carboxymethylstärken mit einem Substitutionsgrad von 0,40 (**16.8**) bzw. 0,47 (**16.7**). Die größere Reaktionseffizienz bei Ansatz **16.7** von 60,3 % gegenüber 44,0 % bei Ansatz **16.8** liegt in den unterschiedlichen molaren Verhältnissen begründet. Trotz der identischen Reaktionsführung kam es bei Ansatz **16.8** aufgrund der höheren Alkalimengen zu einem stärkeren Anschwellen und Verklumpen der Stärkekörner, wohingegen der Ansatz **16.7** auch während der Reaktion seinen anfänglichen pulvrigen Charakter beibehielt. Die höchsten Substitutionsgrade wurden bei den Umsetzungen **16.4** und **16.5** erreicht, hier resultierte trotz der geringen Ansatzgrößen aufgrund der hohen molaren Überschüsse an Monochloressigsäure ein Substitutionsgrad von 0,69 bzw. 0,70. Für die Synthesen mit Magnetrührereinsatz scheint in Methanol dieser Substitutionsbereich nahe dem maximal Möglichen zu liegen, denn wie in Tabelle 5-8 ersichtlich, führte die merkliche Erhöhung des Einsatzes an Monochloressigsäure und Natriumhydroxid bei Ansatz **16.5** zu keiner weiteren Steigerung des Substitutionsgrades und somit zu einer Verringerung der Reaktionseffizienz.

Bei allen Synthesen in Methanol wurde eine gewisse Gelbfärbung der Stärke beobachtet. Die Verfärbung war bei den Umsetzungen mit den größten Alkalimengen am stärksten. Nachfolgend sind die in Methanol erreichten Substitutionsgrade und Reaktionseffizienzen der einzelnen Ansätze tabellarisch zusammengefasst. Im Anhang dieser Arbeit befinden sich umfangreichere Tabellen über sämtliche Carboxymethylierungsreaktionen heterogener wie homogener Natur.

Tab. 5-8. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Methanol.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.1	Abbaustärke 1.1	0,13	1 : 0,7 : 1,6	18,8
16.3	native Wachsmaisstärke	0,37	1 : 0,7 : 1,6	53,6
16.6	native Wachsmaisstärke	0,37	1 : 0,6 : 1,4	61,7
16.8	native Wachsmaisstärke	0,40	1 : 0,9 : 2,0	44,0
16.7	native Wachsmaisstärke	0,47	1 : 0,8 : 1,6	60,3
16.4	native Wachsmaisstärke	0,69	1 : 1,4 : 3,2	50,4
16.5	native Wachsmaisstärke	0,70	1 : 2,1 : 4,9	34,0

In einem weiteren Ansatz **16.2** wurde versucht, kommerzielle Hydroxyethylstärke (HES 200/0,5) in Methanol in geringem Maße zu carboxymethylieren. Es resultierte eine Carboxymethyl-hydroxyethylstärke mit einem auf die Carboxymethylgruppen bezogenen Substitutionsgrad von 0,05. Die Synthese verlief mit einer Effizienz von 9,4 %. Während der Umsetzung wurde aus der pulvrigen Substanz allmählich ein klebriger, gummiartiger Feststoff, zusätzlich war bei diesem Ansatz die Gelbfärbung aufgrund der geringen Molmasse des Stärkederivats besonders ausgeprägt.

Umsetzungen in Ethanol

Die Umsetzungen in Ethanol erfolgten nur in kleineren Ansätzen mit Volumina von ca. 50 bis 150 Millilitern und Stärkemengen von ca. 10 Gramm. Es wurde wie oben Monochloressigsäure als Veretherungsmittel eingesetzt, und vor dem Natriumhydroxid zur Ethanol-Stärke-Suspension gegeben. Die Reaktionen wurden einheitlich bei einer Temperatur von ca. 78 °C durchgeführt. Der durchschnittliche Wassergehalt der Ansätze lag zwischen 8 und 12 % (v/v). Auch in Ethanol wurde stets mehr als die doppelte molare Menge Natriumhydroxid gegenüber der zugegebenen Menge Monochloressigsäure eingesetzt. Die Synthesen **16.9** und **16.10** wurden mit partiell abgebauter Wachsmaisstärke **1.1** durchgeführt. Bei den Ansätzen **16.12**, **16.13** und **16.14** hingegen wurde native Wachsmaisstärke als Edukt verwendet. Die erreichten Substitutionsgrade waren insbesondere bei den Ansätzen **16.9**, **16.10** und **16.12**, wie Tabelle 5-9 zeigt, geringer als bei den Umsetzungen in Methanol. Hier lagen die Substitutionsgrade im Mittel um 0,25 und die Reaktionseffizienzen um 32 %. In diesen Ansätzen konnte kein wesentlicher Reaktivitätsunterschied zwischen der Abbaustärke und nativer granulärer Stärke festgestellt werden. Jedoch war die Durchmischung bei **16.12** wesentlich homogener, da bei **16.9** und **16.10** die Suspension gegen Ende der Reaktion vollends verklumpte. Die Gelbfärbung war bei diesen beiden Ansätzen ebenfalls am intensivsten und nur durch längere Dialyse restlos zu entfernen. Bei der Carboxymethylierung **16.14** wurde mit einem Substitutionsgrad

von 1,18 ein höheres Resultat erzielt als bei der vergleichweisen Umsetzung in Methanol (**16.5**). Der Unterschied in den Substitutionsgraden wurde wahrscheinlich durch den größeren Überschuss an Natriumhydroxid bedingt. Die Tabelle 5-9 fasst die Ergebnisse der Synthesen in Ethanol zusammen.

Tab. 5-9. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Ethanol.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.9	Abbaustärke 1.1	0,22	1 : 0,8 : 2	28,6
16.10	Abbaustärke 1.1	0,26	1 : 0,8 : 2	33,8
16.12	native Wachsmaisstärke	0,27	1 : 0,8 : 2	33,8
16.13	native Wachsmaisstärke	0,72	1 : 1,5 : 3,9	48,0
16.14	native Wachsmaisstärke	1,18	1 : 2,3 : 7,5	50,9

Umsetzungen in Isopropanol

Unter den heterogenen Reaktionen wurden in Isopropanol die meisten Carboxymethylierungsversuche durchgeführt. Bei sämtlichen Synthesen wurden partiell hydrolysierte Wachsmaisstärken als Edukt eingesetzt. Natriumhydroxid wurde stets in der doppelten Menge wie Monochloressigsäure bzw. in der gleichen Menge wie das Natriumsalz der Monochloressigsäure zugegeben. Bis auf Reaktion **16.15**, welche bei 50 °C stattfand, wurden alle Veretherungen bei 60 °C durchgeführt.

Bei den Ansätzen **16.15** und **16.16** wurden Stärkemengen von bis zu 100 g in dem Reaktor umgesetzt. Die Carboxymethylstärke **16.15** wurde aus Abbaustärke **1.14** dargestellt und hatte einen Substitutionsgrad von 0,50. Die Reaktion verlief mit einer Effizienz von 64,1 %. Substanz **16.16** wurde aus Abbaustärke **1.3** synthetisiert und wies einen Substitutionsgrad von 0,59 auf. Die Synthese verlief mit einer Effizienz von 52,2 %. In beiden Carboxymethylierungsansätzen wurde die Monochloressigsäure vor dem Natriumhydroxid zur Stärkesuspension gegeben. Die geringere Reaktionseffizienz von **16.16** gegenüber **16.15** lag vermutlich in dem wesentlich ungünstigeren Reaktionsverlauf begründet, denn bei **16.16** kam es wegen des höheren Wassergehaltes von ca. 13 % (gegenüber ca. 6 % bei **16.15**) trotz der höheren Molmasse des Ausgangsmaterials zu einem sehr starken Verklumpen der Stärke, so dass die Reaktion vorzeitig abgebrochen und aufgearbeitet werden musste. Substanz **16.15** verfärbte sich jedoch aufgrund der geringen Molmasse und der dadurch bedingten höheren Anzahl an reduzierenden Enden sehr stark. Aufgrund der erschwerten Aufarbeitungen wurden in beiden Fällen geringere Ausbeuten erzielt. Die übrigen Synthesen in Isopropanol wurden in sehr viel kleinerem Maßstab mit einem Standardaufbau und Magnetrührereinsatz durchgeführt. Bei

allen Reaktionen wurde zunächst die Natronlauge und dann das Natriumsalz der Monochloressigsäure zur Stärkesuspension gegeben. Sämtliche Ansätze hatten einen Wassergehalt von ca. 20 % (v/v). Bis auf Carboxymethylstärke **16.22**, welche aus reduzierter Abbaustärke **2.2** dargestellt wurde, wurden alle übrigen Synthesen mit Abbaustärke **1.10** durchgeführt. Aufgrund des relativ hohen Wassergehaltes und der Tatsache, dass partiell hydrolysierte Stärken eingesetzt wurden, verliefen die Synthesen nicht mehr so, wie es üblicherweise bei den „slurry“-Verfahren zu beobachten ist. Statt einer mehr oder weniger pulvrigen Suspension bildete die Stärke während der Reaktion allmählich mit dem vorhandenen Wasser eine gelartige untere Phase. Das Wasser-Stärke-Alkohol-Verhältnis war allerdings noch so gewählt, dass die wachswichte Konsistenz der unteren Phase erhalten blieb und es nicht zu einem Verkleben des Ansatzes kam. Im Gegensatz zu den anderen Synthesen war bei Ansatz **16.22** durch die vorherige Reduktion der reduzierenden Enden der Abbaustärke keinerlei Verfärbung zu beobachten. Tabelle 5-10 fasst alle Carboxymethylierungsergebnisse in Isopropanol zusammen. Aus ihr wird ersichtlich, dass die höchsten Substitutionsgrade und Reaktionseffizienzen in den eben beschriebenen kleineren Ansätzen mit hohem Wassergehalt erreicht wurden.

Tab. 5-10. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Isopropanol.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.15	Abbaustärke 1.14	0,50	1 : 0,8 : 1,6	64,1
16.16	Abbaustärke 1.3	0,59	1 : 1,1 : 1,8	52,2
16.17	Abbaustärke 1.10	0,71	1 : 1 : 1	71,0
16.21	Abbaustärke 1.10	0,71	1 : 2 : 4	35,3
16.22	reduzierte Abbaustärke 2.2	0,78	1 : 1 : 1	78,0
16.18	Abbaustärke 1.10	1,17	1 : 2 : 2	58,5
16.19	Abbaustärke 1.10	1,29	1 : 3 : 3	43,0
16.20	Abbaustärke 1.10	1,49	1 : 4 : 4	37,3

Die allgemein gültige Aussage trifft auch hier zu: je höher der molare Überschuss an Natriumchloracetat, desto höher der erreichte Substitutionsgrad. Dagegen, wie bei **16.18** und **16.21** ersichtlich, ein übermäßiger Einsatz von Natriumhydroxid sich eher negativ auf die Reaktionseffizienz auswirkte. Wie Ansatz **16.19** und **16.20** zeigen, war zwar oberhalb des zweifachen molaren Überschusses an Natriumchloracetat noch ein deutlicher Anstieg des Substitutionsgrades zu verzeichnen, die Effizienz der Umsetzung nahm jedoch bereits merklich ab.

Umsetzungen in Aceton

Neben den Carboxymethylierungen in niederen Alkoholen wurden heterogene Reaktionen mit Aceton als Suspensionsmittel durchgeführt. Sämtliche Synthesen fanden bei Raumtemperatur statt. In Aceton wurden nur geringe Mengen an Stärke (max. 10 g) im Standardaufbau umgesetzt. Die verwendete Monochloressigsäure wurde nach der Alkalisierung mit Natronlauge zugegeben. Der durchschnittliche Wassergehalt lag zwischen 20 und 30 % (v/v). Wie in Tabelle 5-11 ersichtlich, variierten die molaren Verhältnisse nicht besonders stark. Bei Ansatz **16.24** und insbesondere bei **16.23** wurden aufgrund schlechter Durchmischung lediglich geringe Substitutionsgrade und Reagenzienaubeuten erreicht. Die Ergebnisse der Umsetzungen **16.25** und **16.26** sind mit denen in Methanol vergleichbar, obwohl bei den Synthesen in Aceton deutlich weniger Natriumhydroxid eingesetzt wurde. Bei allen Ansätzen war im Verlauf der Reaktion eine zunehmende Gelbfärbung zu beobachten.

Tab. 5-11. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Aceton.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.23	Abbaustärke 1.1	0,11	1 : 0,9 : 1,3	12,5
16.24	native Wachsmaisstärke	0,23	1 : 0,9 : 1,3	26,7
16.25	native Wachsmaisstärke	0,45	1 : 1 : 1,6	43,7
16.26	native Wachsmaisstärke	0,55	1 : 1,2 : 2	45,8

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass in heterogenen Reaktionssystemen auch aus partiell hydrolysierten Stärken in einem sehr breiten Bereich definierte Substitutionsgrade erreicht werden können. In Isopropanol wurden die höchsten Substitutionsgrade und Reaktionseffizienzen erreicht. Carboxymethylierungen in den anderen Lösungsmitteln verliefen insbesondere mit partiell abgebauten Stärkespecies aufgrund der häufig auftretenden Verklumpungen nicht optimal. Allen Synthesen war die zunehmende Gelb- bis Braunfärbung der Reaktionsgemische gemein. Durch die Verwendung von reduzierter Abbaustärke **2.2** konnte in **16.22** eine Verfärbung völlig vermieden werden.

5.4.2 Synthesen in homogenen Reaktionssystemen

Bei Synthesen in einem homogenen Reaktionssystem wird die Stärke von dem jeweiligen Lösungsmittel gelöst. Dabei können auch anfängliche Suspensionen durch eine allmähliche Funktionalisierung der Stärke in eine homogene Lösung übergehen. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Synthesen verliefen überwiegend spätestens ab dem Alkalisierungsschritt – also vor der eigentlichen Funktionalisierung – in einem nahezu homogenen System. Es wur-

den Carboxymethylstärken in Dimethylsulfoxid (siehe Abschnitt 4.4.10) und Wasser synthetisiert, wobei in wässriger Lösung zwei unterschiedliche Synthesereihen durchgeführt wurden. In der ersten Reihe wurde lediglich mit variierenden Stärken und Ansatzgrößen gearbeitet (siehe Abschnitt 4.4.11). Demgegenüber war in der zweiten Versuchsreihe die Carboxymethylierung der letzte Schritt eines mehrstufigen Eintopfverfahrens (siehe Abschnitt 4.4.12).

Umsetzungen in DMSO

In DMSO wurden Carboxymethylierungen mit kleineren Ansatzmengen in Volumina von bis zu 40 ml bei 80 °C durchgeführt. Der durchschnittliche Wassergehalt lag näherungsweise bei allen Synthesen unter 2 % (v/v). Für die Reaktionsführung war ein Standardlaboraufbau mit Magnetrührereinsatz ausreichend. Die partiell hydrolysierte Stärke wurde zunächst in DMSO gelöst, anschließend wurde Natriumhydroxid und dann Natriumchloracetat hinzugegeben. Natriumhydroxid wurde meist in äquimolaren Mengen zum Natriumsalz der Monochloressigsäure eingesetzt. Mit Ausnahme von **16.32** und **16.33**, wo reduzierte Abbaustärke bzw. reduziertes Stärkederivat als Edukt vorlag, verfärbten sich sämtliche Lösungen im Laufe der Reaktion tiefbraun. Bei **16.32** und **16.33** war zwar ebenfalls eine leichte Verfärbung zu beobachten, diese resultierte jedoch vom Lösungsmittel und konnte im Gegensatz zu den anderen Ansätzen restlos durch Dialyse entfernt werden. Bei einigen Carboxymethylstärken war die Verfärbung selbst nach mehrfacher Dialyse noch schwach vorhanden. Die Umsetzungen verliefen insgesamt mit geringer Effizienz, wobei dennoch ein breites Spektrum an Substitutionsgraden erreicht werden konnte. Wie in der nachfolgenden Tabelle 5-12 ersichtlich, wurde die höchste Reaktionseffizienz und gleichzeitig der höchste Substitutionsgrad bei Ansatz **16.30** erzielt. Ansatz **16.27** und **16.32** belegen, dass die Reduktion der reduzierenden Enden keine Auswirkung auf die Reaktivität der Stärke hat. Durch die bei **16.32** ausgeschalteten Nebenreaktionen der Stärke konnte die Aufarbeitung erleichtert und somit die Ausbeute erhöht werden. Grundsätzlich verlief die Isolierung der Carboxymethylstärken aber aufgrund der verringerten Molmasse des Ausgangsmaterials nur mit geringen Ausbeuten. Vergleicht man die Synthesergebnisse mit den Resultaten der Ansätze in Isopropanol, so wird die geringere Reaktivität der Stärke in DMSO deutlich. Hier konnten höhere Substitutionsgrade nur mit sehr hohen Natriumchloracetat-Überschüssen erreicht werden, dabei ist anscheinend ein nur mäßiger Überschuss an Natriumhydroxid vorteilhaft.

Tab. 5-12. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in DMSO.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.27	Abbaustärke 1.10	0,21	1 : 1 : 1	21,0
16.32	reduzierte Abbaustärke 2.2	0,21	1 : 1 : 1	21,0
16.28	Abbaustärke 1.10	0,47	1 : 2 : 2	23,5
16.29	Abbaustärke 1.10	0,50	1 : 3 : 3	16,7
16.31	Abbaustärke 1.10	0,71	1 : 5 : 3	14,2
16.33	6-O-Tritylstärke 15.1	0,95	-	-
16.30	Abbaustärke 1.10	1,22	1 : 4 : 2	30,5

Die Substanz **16.33** nimmt eine Sonderrolle unter den in DMSO dargestellten Carboxymethylstärken ein. Hier wurde zuvor gemäß Abschnitt 4.4.7 aus reduzierter Abbaustärke eine 6-O-Tritylstärke synthetisiert. Die Tritylstärke ist in DMSO löslich und basenstabil, so dass über diesen Umweg der Schutzgruppentechnik eine 2,3-O-Carboxymethylstärke dargestellt werden konnte. Diese regioselektiv veretherte Stärke wurde insbesondere als analytischer Standard für NMR-spektroskopische Charakterisierungen von Carboxymethylstärken benötigt. Die eingeführte Triphenylmethylgruppe kann im Gegensatz zum Carboxymethylrest im Säuren wieder abgespalten werden.

Umsetzungen in wässriger Lösung

Im Lösungsmittel Wasser wurden nahezu alle Synthesen mit partiell abgebauter Wachsmaisstärke in kleinerem Maßstab durchgeführt. Nur in Ansatz **16.35** wurden größere Mengen (75 g) native Wachsmaisstärke im Reaktor umgesetzt. Außerdem wurde dort im Gegensatz zu den übrigen Ansätzen Monochloressigsäure statt deren Natriumsalz als Veretherungsreagenz eingesetzt. In allen Reaktionen wurde Natriumhydroxid vor dem Veretherungsmittel in den Ansatz gegeben. Sämtliche Synthesen wurden bei 60 °C durchgeführt.

Substanz **16.35** war eine Ausnahme in dieser ersten Synthesereihe. Aufgrund des Einsatzes von granulärer Stärke bildete sich hier zunächst bei der Vermischung mit Wasser ein hochviskoser, trüber Kleister, welcher erst im Laufe der Carboxymethylierung zu einer hochviskosen, klaren Lösung wurde. Nach dem Abkühlen erstarrte diese Lösung zu einem klaren Gel. Die teilweise Inhomogenität des Ansatzes und die durch die hohe Viskosität bedingte ineffektive Durchmischung erklären den vergleichsweise geringen Substitutionsgrad von 0,18 und der schlechten Reaktionseffizienz von 12,9 %. Wie Tabelle 5-13 zeigt, wurden in den kleineren Ansätzen mit Abbaustärke als Edukt wesentlich bessere Resultate erzielt. Hier wurde bereits nach der Natriumhydroxidzugabe aus der anfänglichen viskosen Suspension eine nur schwach getrübe Lösung. Die Reaktionsmischungen ließen sich über den gesamten Umsetzungszeit-

raum problemlos rühren und wurden spätestens kurz nach der Natriumchloracetat-Zugabe zu klaren Lösungen. Mit großen Überschüssen an Natriumchloracetat und Natriumhydroxid ließen sich in dem wässrigen System früher nicht beobachtete hohe Substitutionsgrade bis nahe 1,5 erreichen. Hierbei schien ein mehr als dreifacher molarer Überschuss an Veretherungsreagenz keine nennenswerte Steigerung der Substitution mehr zu bewirken. Dies belegen die Ansätze **16.38**, **16.39** und **16.40**, hier wurde durch die Erhöhung der Natriumchloracetat-Zugabe lediglich die Reaktionseffizienz verringert. Vergleicht man Ansatz **16.36** mit **16.37** so wird ersichtlich, dass eine Verdopplung der Natriumchloracetat- und Natriumhydroxid-Menge zu einem doppelt so hohen Substitutionsgrad führt. Dies scheint ein Anzeichen für eine – zumindest in einem bestimmten Anfangsbereich existierende – lineare Abhängigkeit zwischen eingesetzten Stoffmengen und den dazugehörigen Substitutionsgraden zu sein. Wie bei den Umsetzungen in Isopropanol und DMSO konnte anhand von **16.41** und **16.36** gezeigt werden, dass eine zuvorige Reduktion der reduzierenden Enden die Reaktivität der Stärke gegenüber einer alkalischen Veretherung nicht verändert. Der Ansatz **16.41** war auch der Einzige innerhalb der Reihe, welcher während der Reaktion keinerlei Gelb- oder Braunfärbungen entwickelte.

Tab. 5-13. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Wasser.

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
16.35	native Wachsmaisstärke	0,18	1 : 1,4 : 2,4	12,9
16.41	reduzierte Abbaustärke 2.2	0,53	1 : 1 : 1	53,0
16.36	Abbaustärke 1.10	0,55	1 : 1 : 1	55,0
16.37	Abbaustärke 1.10	1,12	1 : 2 : 2	56,0
16.39	Abbaustärke 1.10	1,33	1 : 5 : 3	26,6
16.38	Abbaustärke 1.10	1,39	1 : 3 : 3	46,3
16.40	Abbaustärke 1.10	1,44	1 : 5 : 4	28,8

In einem weiteren Ansatz **16.42** wurde in wässriger Lösung kommerzielle Hydroxyethylstärke in einem geringen Grade carboxymethyliert. Bezogen auf die Carboxymethylgruppe betrug der Substitutionsgrad 0,04. Die Reaktionseffizienz des Ansatzes lag bei nur 10 %. Zusammen mit dem Ergebnis der Carboxymethylierung von HES in Methanol (Ansatz **16.2**), kann also allgemein von einer wesentlich geringeren Reaktivität der Hydroxyethylstärke gegenüber weiterer Veretherung ausgegangen werden.

Umsetzungen in wässriger Lösung (Eintopfverfahren)

Bei der zweiten Ansatzreihe in wässriger Lösung stellt die Carboxymethylierung den letzten Transformationsschritt in einer Reihe unterschiedlicher Modifikationen dar (siehe Abschnitt 4.4.12). In dem Verfahren wird zunächst native Stärke säurekatalytisch bis zum Erreichen eines gewünschten Molekulargewichtes hydrolysiert. Nach der Hydrolyse können weitere Modifikationen, wie beispielsweise enzymatische Entzweigungen des Amylopektins mittels Pullulanase oder Isoamylase, erfolgen. Anschließend werden die reduzierenden Enden dieser partiell abgebauten Stärken mit Natriumborhydrid reduziert. Nach der Reduktion können Derivatisierungen wie Veretherungen oder Veresterungen der Stärke durchgeführt werden. In dem in dieser Arbeit etablierten mehrstufigen Eintopfverfahren wurde von zwei unterschiedlichen granulären Stärkemarkierungen ausgegangen. In den beiden Ansätzen **17.1** und **17.2** wurde dünnkochende Wachsmaisstärke als Ausgangsmaterial verwendet. Bei den übrigen Synthesversuchen wurde Kartoffelstärke eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Reaktionsgefäß unter standardisierten Bedingungen (Volumen, Temperatur, etc.) durchgeführt. Bei den Ansätzen mit Kartoffelstärke wurde, wie bereits in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, der Hydrolyseschritt extern im Technikum der Firma B. Braun Medical AG durchgeführt. Dadurch konnten erstmals größere Mengen Carboxymethylstärken mit variierenden Substitutionsgraden aus derselben Abbaustärke (als Abbaustärke **1.15** bezeichnet) hergestellt werden. Dies war insbesondere für spätere vergleichende physikochemische und physiologische Charakterisierungen von Bedeutung. Da diese Charge jedoch in Form eines unsaubereren Rohproduktes geliefert wurde, sind Aussagen über die Synthesen bezüglich der vorherrschenden molaren Verhältnisse und der erzielten Reaktionseffizienzen sehr unsicher. Dieses Rohprodukt zeigte zwar zunächst in wässriger Lösung – aufgrund der unsachgemäßen Isolierung aus dem Hydrolyseansatz – bei erhöhter Temperatur eine gewisse Gelbfärbung, welche jedoch durch den Reduktionsschritt deutlich vermindert werden konnte. Der noch schwach vorhandene Gelbton blieb während dem stark alkalischen Veretherungsschritt unverändert. Die Verfärbung war nach der Aufarbeitung des Produktes – sei es Dialyse und Gefriertrocknung oder Ethanolpräzipitation – restlos verschwunden und kehrte auch nach erneuter Alkalisierung nicht zurück, d.h. dass die Reduktion der partiell abgebauten Stärke ausreichend war. Die noch nach der Reduktion vorhandene Gelbfärbung beruhte höchstwahrscheinlich auf niedermolekulare resistente Abbauprodukte des Hydrolyseansatzes. Bei den Synthesen **17.1** und **17.2** trat ein solches Phänomen nicht auf, hier wurde jeweils direkt nach der eigenständig durchgeführten Hydrolyse der gesamte Ansatz mit Natriumborhydrid reduziert. In beiden Fällen blieb die Lösung in den weiteren Behandlungen stets klar und farblos. Für beide Ansätze kann eine Angabe über die Reaktionseffizienz gemacht werden, sie lag bei **17.1** bei 62 % und bei **17.2** bei 70 %. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Synthesen mit Kartoffelstärke (**17.3...17.10**) eine ähnlich hohe Effizienz aufwiesen. Die erzielten Substitutionsgrade sind in der nachfolgenden Tabelle 5-14 ersichtlich. Dabei wurde überwiegend darauf geachtet, dass die Substitutionsgrade in einem für die klinische Anwendung vermeintlich in-

interessanten Substitutionsbereich von bis zu 0,45 liegen. Dieser Bereich konnte durch das Syntheseverfahren absolut zufriedenstellend abgedeckt werden. In dem wässrigen Eintopfverfahren sind wie Ansatz **17.5** belegt auch ohne Weiteres höhere Substitutionsgrade erreichbar. Wie die erste Synthesereihe in wässriger Lösung bereits gezeigt hat, stellt der Substitutionsgrad in Höhe von 0,75 noch bei weitem nicht die Obergrenze dar.

Tab. 5-14. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Wasser (Eintopfverfahren; **1.15** ist Kartoffelstärke).

Substanz	Ausgangsmaterial	MS	molares Verhältnis (AGU:ClAc:NaOH)	RE %
17.7	Abbaustärke 1.15	0,06	-	-
17.8	Abbaustärke 1.15	0,14	-	-
17.9	Abbaustärke 1.15	0,18	-	-
17.10	Abbaustärke 1.15	0,20	-	-
17.2	dünnk. Wachsmaisstärke	0,31	1 : 0,5 : 0,5	62,0
17.6	Abbaustärke 1.15	0,33	-	-
17.3	Abbaustärke 1.15	0,34	-	-
17.4	Abbaustärke 1.15	0,41	-	-
17.1	dünnk. Wachsmaisstärke	0,42	1 : 0,6 : 0,6	70,0
17.5	Abbaustärke 1.15	0,75	-	-

Die in der Tabelle 5-14 aufgeführten Carboxymethylstärken wurden für physiologische und klinische Voruntersuchungen in größeren Mengen (> 100 g) synthetisiert und entsprechend dem in Abschnitt 4.4.1 beschriebenem Aufarbeitungsprotokoll isoliert und gereinigt. Insgesamt waren die im Eintopfverfahren durchgeführten Synthesen allen bisher beschriebenen Carboxymethylierungen in Reaktionsführung und Reproduzierbarkeit eindeutig überlegen. Dieser Sachverhalt wird in Abschnitt 6.2.2 diskutiert.

5.5 Physikochemische Charakterisierung einiger Carboxymethylstärken

5.5.1 Natrium-Gehalte ausgewählter Carboxymethylstärken

Die Natriumionen-Gehalte der Substanzen in Tab. 5-15 wurden über Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Tab. 5-15. Natrium-Ionen-Gehalt einiger Carboxymethylstärken.

Probe	MS	Natrium-Ionen-Gehalt in mg pro g Probe
CMS 17.7	0,06	4,7
CMS 17.8	0,14	16,4
CMS 17.2	0,31	24,1
CMS 17.6	0,33	33,2
CMS 17.3	0,34	35,0
CMS 17.4	0,41	40,3
CMS 17.1	0,42	36,1
CMS 17.5	0,75	53,4

Die beiden aus Wachsmaisstärke stammenden Carboxymethylstärken **17.2** und **17.1** haben einen etwas geringeren Natrium-Gehalt als gleichwertig substituierte CMS-Varianten aus Kartoffelstärke (vgl. z. B. mit **17.6** bzw. mit **17.4**). Der Unterschied beruht auf der Zusammensetzung der Kartoffelstärke, die von Natur aus einen höheren Phosphatgehalt und somit einen höheren Kationen-Gehalt als Wachsmaisstärke aufweist.

5.5.2 Viskosität und kolloid-osmotischer Druck von CMS-Lösungen

Es wurden die beiden Testsubstanzen Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5) und Carboxymethylstärke **17.1** untersucht. Die Hydroxyethylstärke hat einen MS-Wert von 0,5 und die Carboxymethylstärke einen von 0,4. Beide Derivate wurden aus Wachsmaisstärke synthetisiert und haben eine vergleichbare Molmasse von ca. 200000 g/mol.

Die kinematische Viskosität einer jeweils sechsprozentigen Lösung mit isotonem Kochsalzgehalt wurde bei 37 °C zweifach bestimmt. Die Substanz **17.1** wurde zusätzlich in vierprozentiger Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert. Die Viskosität wurde zunächst mit einem Ubbelohde-Kapillar-Viskosimeter (s. Abschnitt 4.3.9) gemessen. Aus der kinematischen Viskosität lässt sich durch Multiplikation mit der Dichte der Lösung die dynamische

Viskosität berechnen. Die Messergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 5-16. Viskosität und Dichte verschiedener Stärkederivatelösungen.

Lösung	kinemat. Viskosität in mm ² /s	dynam. Viskosität in mPa·s	Dichte bei 37 °C in g/ml	pH-Wert
HES 200/0.5 6%ig in NaCl	1,978	2,107	1,065	4,1
CMS 17.1 6%ig in NaCl	2,427	2,664	1,098	4,3
CMS 17.1 4%ig in NaCl	1,627	1,757	1,080	4,4
CMS 17.1 4%ig in NaCl	1,627	1,757	1,080	4,6
CMS 17.1 4%ig in NaCl	1,560	1,685	1,080	10,6

Die Ergebnisse zeigen, dass bei gleichkonzentrierten Lösungen die Carboxymethylstärke trotz des geringeren Substitutionsgrades eine höhere Viskosität aufweist. Vierprozentige Lösungen aus **17.1** haben eine geringere Viskosität als handelsübliche, sechsprozentige HES-Präparate. In Carboxymethylstärkelösungen ist die Viskosität eine pH-abhängige Größe, bei hohen pH-Werten fällt sie leicht ab.

Der kolloid-osmotische Druck einer sechsprozentigen Hydroxyethylstärkelösung sowie von sechsprozentigen Carboxymethylstärkelösungen **17.4**, **17.5**, **17.8** (je ca. 300 mOsmol) wurde gemäß Abschnitt 4.7.2 gemessen. Es ergaben sich folgende KOD-Werte:

Tab. 5-17. KOD-Werte verschiedener Stärkederivatelösungen.

Substanz	MS	KOD (Membran 10 kDa) in mm Hg	KOD (Membran 20 kDa) in mm Hg
CMS 17.8	0,14	40,1	25,9
CMS 17.4	0,41	60,0	39,8
CMS 17.5	0,75	73,4	60,9
HES 200/0,5	0,5	-	30,5

Der KOD-Wert von Human-Plasma beträgt ca. 28 mm Hg [130].

5.5.3 Calciumkompatibilität von CMS-Lösungen

Die Zusammensetzung und Durchführung des Testsystems zur Bestimmung der Calciumkompatibilität einer aus Carboxymethylstärke **16.16** hergestellten Lösung wird ausführlich in Abschnitt 4.3.11 beschrieben. Das Prinzip beruht auf der Veränderung der Transmission einer CMS-Lösung nach Zugabe von Calcium-Ionen. Das gemessene Ergebnis wird in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben. Die Kontrolle bestand aus Carboxymethylstärke in physiologischer Kochsalzlösung. Die Testlösung wurde unmittelbar vor der photometrischen Messung mit 0,016 mmol bzw. 0,01 mmol Calcium-Ionen inkubiert.

Tab. 5-18. Ergebnisse der Calciumkompatibilitätsuntersuchungen von CMS-Lösungen.

Lösung	Transmission bei 550 nm
Kontrolle 1	96,6 %
Test 1	96,8 %
Kontrolle 2	94,3 %
Test 2	94,0 %

Nach Zugabe der unterschiedlichen Mengen an Calcium-Ionen konnte kein signifikanter Transmissionsunterschied gefunden werden. Dies bedeutet, dass Carboxymethylstärke in wässriger Lösung keine schwerlöslichen Komplexe mit Calcium bildet.

5.5.4 Autoklavierbeständigkeit von CMS

Es wurde die Stabilität einer Lösung aus Carboxymethylstärke **17.1** gegenüber dem Sterilisationsprozess untersucht (s. Abschnitt 4.3.12). Aus der autoklavierten Lösung wurde die Carboxymethylstärke durch Lyophilisation zurückgewonnen, in D₂O aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen. Der Vergleich mit zuvor analog aufgenommenen Spektren ergab keinerlei Unterschied, d.h. weder in der Lage noch in der relativen Intensität der jeweiligen Signale. Des Weiteren konnten keine zusätzlichen Signale detektiert werden, welche auf Umlagerungs- oder Abbauprodukte hätten schließen lassen. Im Rahmen der Empfindlichkeit von ¹H-NMR-Messungen kann also von einer Stabilität der Carboxymethylstärke gegenüber Sterilisationsverfahren ausgegangen werden. Zusätzlich wies die autoklavierte Lösung keine Geruchs- oder Farbveränderung auf, der pH-Wert blieb ebenfalls konstant.

Neben der Stabilität einer reinen Carboxymethylstärkelösung wurde Carboxymethylstärke **17.4** in einer elektrolytenbalancierten Lösung gelöst und mit identisch zusammengesetzten HES- und Kontrolllösungen nach dem Autoklavieren bezüglich einer pH-Wert-Änderung und einer Verfärbung der Lösung verglichen. Die Zusammensetzung der Lösungen und die Durchführung des Prüfverfahrens sind in Abschnitt 4.6.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle

5-19 zusammengefasst. Die Intensität der Färbung wurde nicht photometrisch verfolgt, so dass geringere Unterschiede evtl. nicht erkannt worden sind. Durch die Untersuchung konnte bestätigt werden, was sich bereits im Vorfeld in zahlreichen Vorversuchen und Beobachtungen gezeigt hat: eine Carboxymethylstärke, die aus reduzierter Abbaustärke synthetisiert worden ist, zeigt bezüglich einer Verfärbung eine extrem hohe Toleranz gegenüber starken pH- und Temperaturschwankungen, darüberhinaus treten keine Nebenreaktionen mit organischen Anionen wie beispielsweise Malat auf.

Tab. 5-19. Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von „elektrolytenbalancierten“ Lösungen.

	Lösung a) Stammlösung ohne Kolloid	Lösung b) Stammlösung + 6% HES	Lösung c) Stammlösung + 6% HES reduziert	Lösung d) Stammlösung + 6% CMS reduziert	Lösung e) Stammlösung + 6% Glucose
Reduktionsequivalente	-	0,67 mmol/l	0,18 mmol/l	0,09 mmol/l	-
pH-Wert (vor Sterilisation)	7,45	7,14	9,19	7,74	7,29
pH-Wert (nach Sterilisation)	7,30	6,80	8,70	7,37	6,14
pH-Änderung	0,15	0,34	0,49	0,37	1,15
Farbigkeit (nach Sterilisation)	klar, farblos	klar, farblos	klar, farblos	klar, farblos	klar, gelblich

Vergleichbar durchgeführte Studien der Firma B. Braun Medical AG mit HES-Spezifikationen, die ein geringeres Molekulargewicht hatten, ergaben bei niedrigeren Anfangs-pH-Werten eine deutlichere Gelbfärbung als hier beobachtet. Diese Gelbfärbung war erst bei einem pH-Wert um 5 vernachlässigbar.

5.6 Enzymatischer Abbau von Carboxymethylstärken

Die enzymatische Charakterisierung der synthetisierten Carboxymethylstärken leistet eine Information über den strukturellen Aufbau der Biopolymere und einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Ausscheidungsmechanismus bei einer pharmazeutischen Anwendung als Blutvolumenersatzmittel. Die Auswertung der bei den Enzymabbauversuchen anfallenden Daten wurde nach dem in Abschnitt 5.3 beschriebenen Verfahren vollzogen. Eine Beschreibung der Wirkungsweise der verwendeten Enzyme findet man in Abschnitt 6.3.

Nachfolgend wird zunächst auf die Hydrolyseexperimente mit α -Amylase (EC 3.2.1.1) aus Schweine-Pankreas und Human-Speichel eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse des Abbaus durch β -Amylase (EC 3.2.1.2) aus Süßkartoffel, Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) aus *Aspergillus niger* und Pullulanase (EC 3.2.1.41) aus *Klebsiella pneumoniae* geschildert. Des Weiteren wurde wie in Abschnitt 4.5.7 beschrieben, eine kleine Auswahl von Carboxymethylstärken sowie eine kommerzielle Hydroxyethylstärke mit den bereits genannten Enzymen inkubiert und die nach der Dialyse im Retentat verbleibenden Fraktionen mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

5.6.1 α -Amylase-Abbau von Carboxymethylstärken

Bei der Darstellung der Ergebnisse des α -amylolytischen Abbaus wurde zwischen Carboxymethylstärken aus einstufigen Synthesen und denen aus der sequentiellen Transformation des Eintopfverfahrens unterschieden. In diesem Abschnitt beziehen sich sämtliche Hydrolyseresultate auf α -Amylase aus Schweinepankreas bei einer Enzymkonzentrationen von 0,1 U/ml erhalten. Nur in Einzelfällen wurden Hydrolyseraten bei einer Enzymkonzentration von 1 U/ml mit in Betracht gezogen. Bei den Carboxymethylstärken aus den einstufigen Präparationen wurde partiell abgebaute Wachsmaisstärke **1.10** und native Wachsmaisstärke als Edukt verwendet. Diese beiden Substanzen dienten als Bezugspunkt für die relativen Enzymaktivitäten. In beiden Fällen waren nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ca. 30 % der glycosidischen Bindungen hydrolysiert. Abbaustärke **1.10** wurde etwas stärker umgesetzt als die granuläre Wachsmaisstärke. Da bei einer höheren Amylasekonzentration von 1 U/ml nach dem gleichen Zeitraum identische Reduktionswerte gefunden wurden, kann vom Erreichen des Endwertes ausgegangen werden. In der Abbildung 5-5 sind die Abbaukurven einer Auswahl von Carboxymethylstärken zusammengetragen. Der Hydrolyseverlauf der nativen Wachsmaisstärke ist nicht dargestellt, da aufgrund der hohen Anfangsviskosität eine Probenentnahme bei frühen Zeitpunkten nur schwer möglich war. Die Substanz **16.6** und **16.7** wurden in Methanol und Substanz **16.35** in Wasser aus nativer Wachsmaisstärke synthetisiert. Die abgebildeten CMS-Varianten **16.27**, **16.28** und **16.30** wurden in DMSO aus Abbaustärke **1.10** hergestellt. Betrachtet man die Reihenfolge der Kurven von oben nach unten, so erkennt

man, dass die Höhe des Umsatzes der Substrate in erster Linie vom molaren Substitutionsgrad abhängt; dies gilt ebenfalls für die Höhe der Anfangsgeschwindigkeiten.

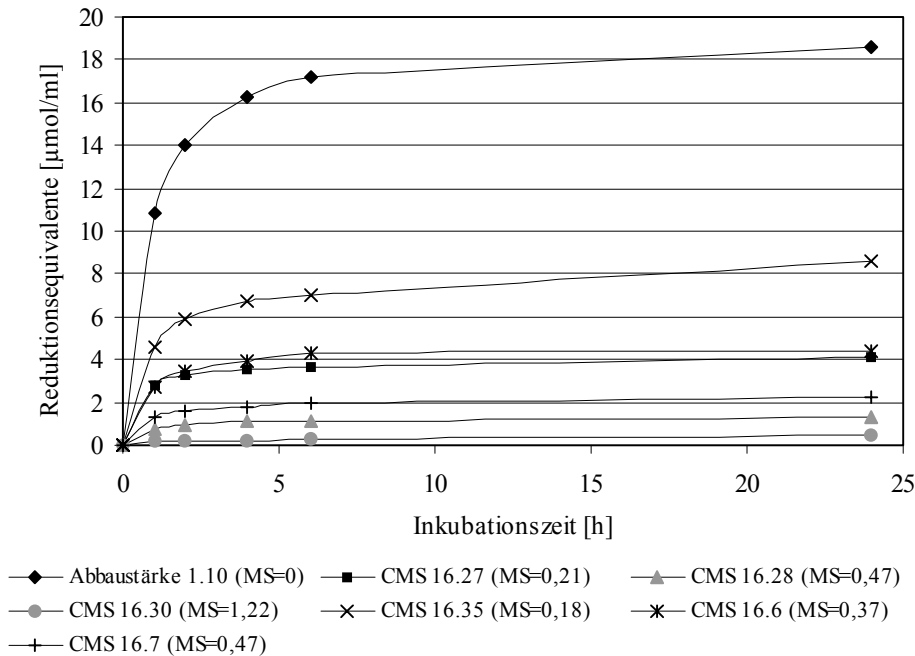


Abb. 5-5. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) verschiedener Carboxymethylstärken.

Der Umfang des hydrolytischen Abbaus wird jedoch nicht alleine durch die Höhe des Substitutionsgrades bestimmt. Beispielsweise wird Substanz **16.6** trotz des wesentlich höheren MS-Wertes etwa gleich stark umgesetzt wie **16.27**. Ebenso stellt **16.7** ein etwas besseres Substrat dar als **16.28**, obwohl beide Derivate den gleichen Substitutionsgrad haben. Die Abweichungen vom Trend können am ehesten durch die unterschiedliche Herstellungsweise der Stärkeether erklärt werden. Die heterogene Synthese von **16.6** und **16.7** führte aufgrund der Reaktionsbedingungen zu einer weniger einheitlichen Verteilung der Substituenten entlang des Polymergerüsts, so dass wahrscheinlich im Stärkemolekül Bereiche mit hoher und geringer Substituentendichte entstanden sind. Durch diese clusterartige Substitution kann der erhöhte Enzymumsatz erklärt werden, da in den Regionen mit geringer bis keiner Substituentendichte mehr glycosidische Bindungen gespalten werden können als bei einer zufälligen und gleichförmigen Verteilung der Substituenten. Die entstehenden Spaltprodukte bestehen überwiegend aus hochsubstituierten, nicht mehr hydrolysierbaren Stärkefragmenten. Die Heterogenität der Substitution wurde zusätzlich durch den Einsatz granulärer Wachsmaisstärke als Ausgangsmaterial verstärkt. Die Heterogenität scheint bei Substanz **16.35** aufgrund des wässrigen Reaktionssystems und des geringeren Substitutionsgrades nicht so ausgeprägt wie bei den Substanzen **16.6** und **16.7**. Der Vergleich mit der homogen synthetisierten Carboxymethylstärke **16.27** ergibt eine nur um 2 % höhere Hydrolyse, dieser Unterschied kann durch den

geringeren Substitutionsgrad und dem geringeren (C2+C3)/C6-Verhältnis erklärt werden. Der Einfluss des (C2+C3)/C6-Verhältnis wird nicht nur bei einem Vergleich des Abbaus von ähnlich hoch substituierten Carboxymethylstärken deutlich. Gemäß dem sehr geringen Umsatz von Substanz **16.17** sollte oberhalb eines molaren Substitutionsgrades von ca. 0,7 kein wesentlicher Abbau mehr stattfinden. Die Substanz **16.30** wird aber mit einem (C2+C3)/C6-Verhältnis von 0,5 sogar bei einem MS-Wert von 1,2 noch messbar hydrolysiert; die an sekundären Hydroxylgruppen gebundenen Substituenten hemmen offenbar die enzymatische Hydrolyse der glycosidischen Bindung stärker als Substituenten die sich an der primären OH-Gruppe befinden.

In Tabelle 5-20 sind die Hydrolysewerte und die relativen Amylaseaktivitäten nach 24-stündiger Inkubation für die einstufig synthetisierten Carboxymethylstärken sowie Substanzparameter zur Erklärung des Hydrolyseverhaltens zusammengefasst.

Tab. 5-20. Hydrolyse verschiedener Carboxymethylstärken nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml α -Amylase.

Substrat (Präparation in)	Ausgangsmaterial	MS	(C2+C3)/C6	Hydrolyse in %	rel. Aktivität in %
Abbaustärke 1.10	Wachsmaisstärke	0	-	33,3	100
Wachsmaisstärke	-	0	-	30,2	100
CMS 16.27 DMSO	Abbaustärke 1.10	0,21	6,0	14,6	43,8
CMS 16.28 DMSO	Abbaustärke 1.10	0,47	5,7	4,7	14,1
CMS 16.17 <i>i-Prop</i>	Abbaustärke 1.10	0,71	4,1	0,1	0,3
CMS 16.30 DMSO	Abbaustärke 1.10	1,22	0,5	1,2	3,6
CMS 16.35 H ₂ O	Wachsmaisstärke	0,18	5,0	16,5	54,6
CMS 16.6 MeOH	Wachsmaisstärke	0,37	4,3	9,0	29,8
CMS 16.8 MeOH	Wachsmaisstärke	0,40	5,7	9,4	31,1
CMS 16.7 MeOH	Wachsmaisstärke	0,47	4,9	4,9	16,2

Die Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren sind alle in einem homogenen Reaktionssystem aus partiell hydrolysierten Stärke synthetisiert worden. Dadurch kann das unterschiedliche Hydrolyseverhalten dieser Stärkederivate größtenteils auf die Höhe des Substitutionsgrades und auf die Verteilung der Substituenten innerhalb der Glucosebausteine zurückgeführt werden. Da in zwei Fällen (**17.1** und **17.2**) abgebaute Wachsmaisstärke statt abgebauter Kartoffelstärke als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, muss beim Vergleich der Hydrolyseraten gegebenenfalls der Einfluss des Rohstoffes bzw. der unterschiedliche Verzweigungsgrad mit in Betracht gezogen werden.

In Diagramm 5-6 sind die Abbaukurven von Carboxymethylstärken aus Abbaustärke **1.15** mit einem Substitutionsgrad bis 0,3 dargestellt.

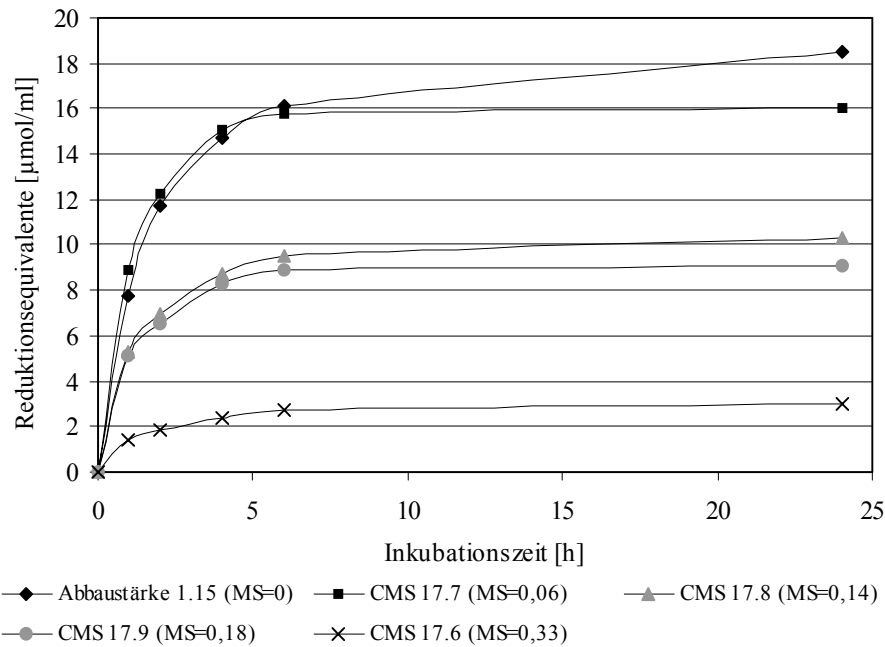


Abb. 5-6. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren.

Die Reihenfolge der Kurven wird eindeutig durch den Substitutionsgrad des jeweiligen Stärkeethers bestimmt. Die Abbaustärke **1.15** scheint bei der vorliegenden Enzymkonzentration von 0,1 U/ml nach 24 Stunden noch nicht erschöpfend hydrolysiert zu sein. Parallelversuche mit einer α -Amylasekonzentration von 1 U/ml haben aber gezeigt, dass bei allen Substraten der Endwert nach 24-stündiger Inkubation praktisch vollständig erreicht worden ist. Die nur sehr gering substituierte Carboxymethylstärke **17.7** weist bis zu einem Zeitraum von sechs Stunden einen ähnlichen Hydrolyseverlauf wie das unsubstituierte Ausgangsmaterial auf, danach ist fast schon der Endwert des Umsatzes erreicht. Die Abbaukurven von **17.8** und **17.9** liegen aufgrund des verwandten Substitutionsgrades eng beieinander. Nach 24 Stunden unterscheidet sich das Maß der Hydrolyse nur um 2 %. Die Carboxymethylstärke **17.6** ist mit ihrem Substitutionsgrad von 0,33 das schlechteste Substrat.

In Abb. 5-7 wurden Beispiele mit einem Substitutionsgrad über 0,4 ausgewählt. Die aufgeführte Substanz **17.1** hat zwar ein vergleichbares Molekulargewicht wie die anderen Derivate, wurde aber aus partiell abgebauter Wachsmaisstärke hergestellt und besitzt einen höheren Verzweigungsgrad. Zusätzlich wurden die Abbaukurven der kommerziellen Hydroxyethylstärke und der daraus stammenden carboxymethylierten Modifikation (CM-HES **16.42**) aufgeführt.

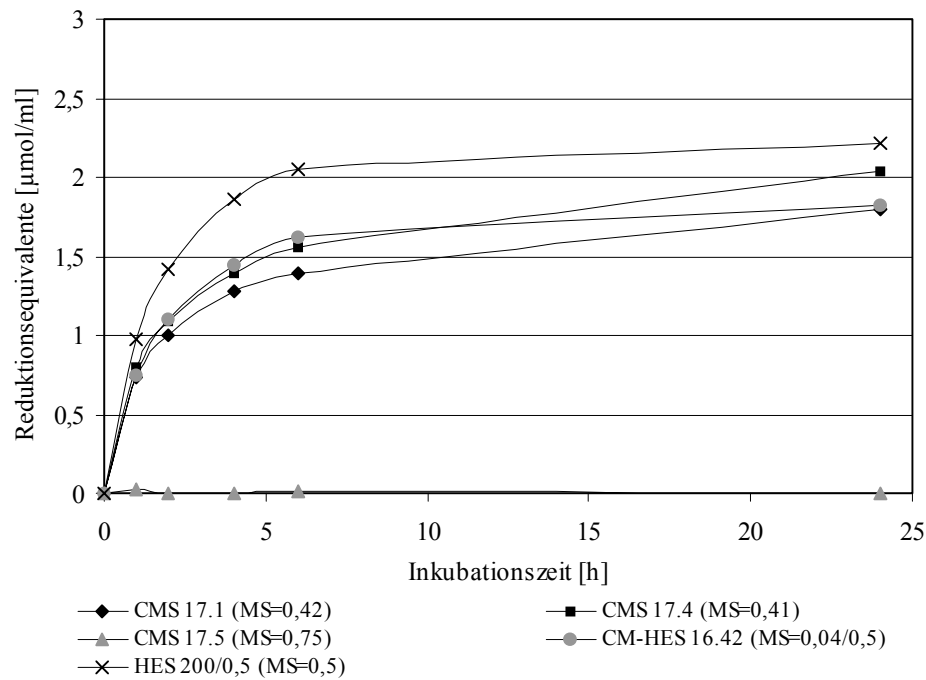


Abb. 5-7. α -Amylase-Abbau (0,1 U/ml) von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren.

Die Substanz **17.4** wird trotz des gleichwertigen Substitutionsgrades und (C2+C3)/C6-Verhältnisses etwas besser umgesetzt als CMS **17.1**. Der geringe Unterschied kann in diesem Fall nur durch den anderen Stärkerohstoff bzw. durch den höheren Verzweigungsgrad von **17.1** erklärt werden. Die Hydroxyethylstärke wird am stärksten hydrolysiert. Im Endwert scheint sie, wie der Vergleich mit **17.4** darlegt, dem Hydrolysegrad einer Carboxymethylstärke mit einem Substitutionsgrad von ca. 0,4 zu entsprechen. Anhand **16.42** ist zu erkennen, dass eine geringfügige Carboxymethylierung dieser Hydroxyethylstärke zu einem merklichen Einbruch im Enzymumsatz führt. CMS **17.5** wird mit einem Substitutionsgrad von 0,75 überhaupt nicht hydrolysiert. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei einer Amylasekonzentration von 1 U/ml gemacht. In Tabelle 5-21 sind die Hydrolyseergebnisse für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden und einer α -Amylasekonzentration von 0,1 U/ml zusammengefasst.

Tab. 5-21. Hydrolyse von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml α -Amylase.

Substrat	Ausgangsmaterial	MS	(C2+C3)/C6	Hydrolyse in %	rel. Aktivität in %
Abbaustärke 1.15	Kartoffelstärke	0	-	33,1	100
Abbaustärke 17.1	Wachsmaisstärke	0	-	33,3	100
Abbaustärke 17.2	Wachsmaisstärke	0	-	31,4	100
CMS 17.7	Abbaustärke 1.15	0,06	-	29,2	88,2
CMS 17.8	Abbaustärke 1.15	0,14	13,0	19,4	58,6
CMS 17.9	Abbaustärke 1.15	0,18	8,0	17,4	52,6
CMS 17.2	Abbaustärke 17.2	0,31	6,8	7,6	24,2
CMS 17.6	Abbaustärke 1.15	0,33	9,9	6,0	18,1
CMS 17.3	Abbaustärke 1.15	0,34	7,6	7,2	21,8
CMS 17.4	Abbaustärke 1.15	0,41	7,2	4,2	12,7
CMS 17.1	Abbaustärke 17.1	0,42	7,4	3,7	11,1
CMS 17.5	Abbaustärke 1.15	0,75	6,5	0	0
CM-HES 16.42	HES 200/0.5	0,04/0,5	-	3,8	11,4
HES 200/0.5	Wachsmaisstärke	0,5	-	4,5	13,5

Aus der Gesamtheit der Hydrolyseversuche mit α -Amylase lässt sich folgendes Resümee ziehen:

- Bei vergleichbaren Substitutionsgraden werden in heterogener Phase synthetisierte Carboxymethylstärken stärker hydrolysiert als homogen synthetisierte (vgl. **16.35**, **16.27** u. **17.9**; vgl. **16.6**, **16.8** u. **17.1**; vgl. **16.28** mit **16.7**).
- Je höher das (C2+C3)/C6-Verhältnis, desto geringer ist der enzymatische Umsatz (vgl. **16.17**, **17.5** u. **16.30**; vgl. **17.2**, **17.6** u. **17.3**).
- Hydroxyethylstärke wird bei gleichem Substitutionsgrad stärker umgesetzt als Carboxymethylstärke (vgl. **17.4**, **17.1** mit HES 200/0.5 u. CM-HES **16.42**).
- Der zugrundeliegende Stärkerohstoff hat einen Einfluss auf den enzymatischen Abbau (vgl. **17.4** mit **17.1**).

5.6.2 β -Amylase-Abbau von Carboxymethylstärken

Bei den Abbauversuchen mit β -Amylase wurden nur die Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren berücksichtigt; diese Proben (außer 17.1 und 17.2) sind aus partiell abgebauter Kartoffelstärke synthetisiert worden. Im Diagramm 5-8 sind die Abbaukurven einiger ausgewählter Carboxymethylstärkespezies abgebildet. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit α -Amylase fällt der generell geringere Umsatz durch β -Amylase auf. Der Endwert der Hydrolyse wurde bereits nach sechsstündiger Inkubation bei einer Enzymkonzentration von 1 U/ml erreicht.

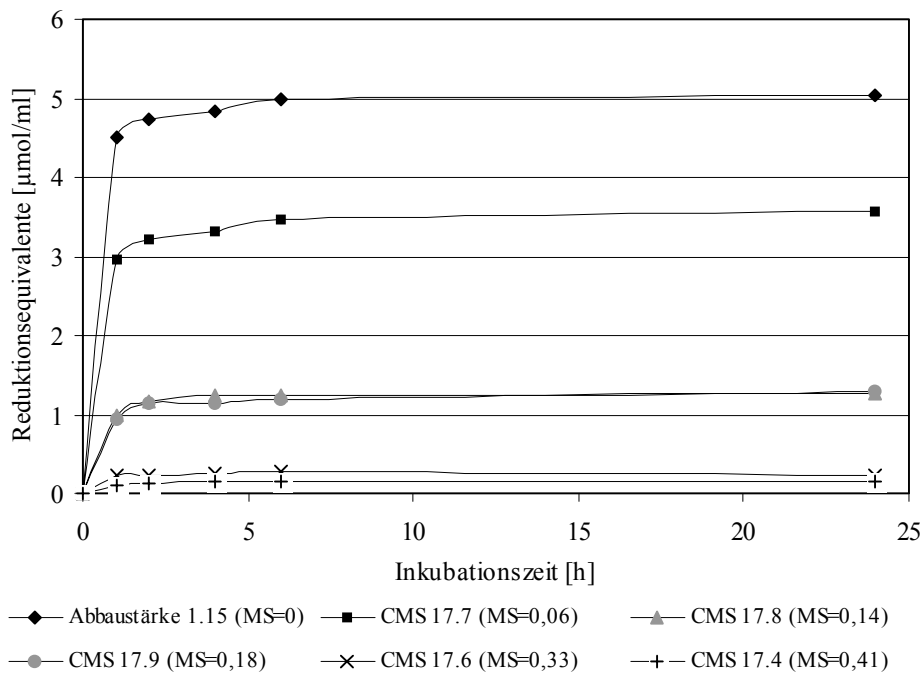


Abb. 5-8. β -Amylase-Abbau (1 U/ml) verschiedener Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren.

Anhand der Abbaukurven von Abbaustärke 1.15 und CMS 17.7 ist zu erkennen, dass bereits eine geringe Carboxymethylierung den Umsatz um ca. 25 % reduziert. Bei den Substanzen 17.8 und 17.9 liegt die Hydrolyse der glycosidischen Bindungen sogar um ca. 75 % unter dem Wert für das native Substrat. Obwohl sich beide Proben im Substitutionsgrad unterscheiden, sind die beiden Kurven deckungsgleich. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Carboxymethylstärken 17.6 und 17.4 gefunden.

Tabelle 5-22 fasst die gemessenen Endwerte aller Abbauversuche mit β -Amylase zusammen. Aus ihr wird erkennbar, dass der Umsatz praktisch nur durch den molaren Substitutionsgrad bestimmt wird. Kleinere Abweichungen ergaben sich lediglich bei den Carboxymethylstärken aus Wachsmaisstärke (17.2 und 17.2). Die aufgeführte Hydroxyethylstärke ist in dem Ausmaß ihrer Hydrolyse mit einer Carboxymethylstärke mit einem Substitutionsgrad von 0,4 ver-

gleichbar. Eine geringfügige Carboxymethylierung der HES führt auch hier zu einer weiteren Verringerung des Abbaus.

Tab. 5-22. Hydrolyse von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren nach 24-stündiger Inkubation mit 1 U/ml β -Amylase.

Substrat	Ausgangsmaterial	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.15	Kartoffelstärke	0	26,5	100
Abbaustärke 17.1	Wachsmaisstärke	0	24,5	100
Abbaustärke 17.2	Wachsmaisstärke	0	23,1	100
CMS 17.7	Abbaustärke 1.15	0,06	19,9	75,1
CMS 17.8	Abbaustärke 1.15	0,14	7,0	26,4
CMS 17.9	Abbaustärke 1.15	0,18	7,2	27,2
CMS 17.2	Abbaustärke 17.2	0,31	2,6	11,3
CMS 17.6	Abbaustärke 1.15	0,33	1,4	5,3
CMS 17.3	Abbaustärke 1.15	0,34	1,8	6,8
CMS 17.4	Abbaustärke 1.15	0,41	0,9	3,4
CMS 17.1	Abbaustärke 17.1	0,42	1,7	6,9
CMS 17.5	Abbaustärke 1.15	0,75	0	0
CM-HES 16.42	HES 200/0.5	0,04/0,5	0,3	1,2
HES 200/0.5	abgeb. Wachsmaisstärke	0,5	1,0	4,1

5.6.3 Amyloglucosidase-Abbau von Carboxymethylstärken

Mit Amyloglucosidase in einer Konzentration von 1 U/ml wurden die gleichen Carboxymethylstärken wie in Abschnitt 5.6.2 untersucht. In Relation zur Hydrolyse mit α -Amylase war der Umsatz mit Amyloglucosidase für alle Substrate merklich höher. Das untenstehende Diagramm 5-9 weist die Abbaukurven der gleichen Substanzen wie in Abbildung 5-8 auf.

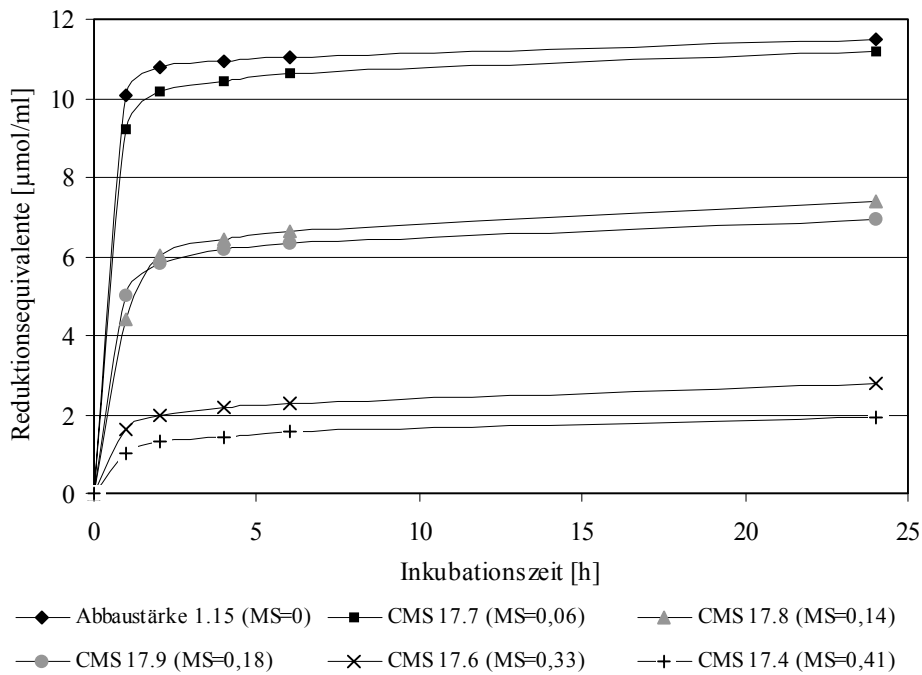


Abb. 5-9. Amyloglucosidase-Abbau (1 U/ml) verschiedener Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren.

Aus der Reihenfolge der Abbaukurven ist zu erkennen, dass die Hydrolyse der glycosidischen Bindungen durch Amyloglucosidase ausschließlich durch die Substitutionsgrade bestimmt wird. Abweichungen, die bei α -Amylase und β -Amylase aufgrund zusätzlicher Strukturparameter auftraten, sind hier nicht zu beobachten. Tabelle 5-23 bestätigt diese Annahme, die relative Enzymaktivität fällt stetig bei steigendem Substitutionsgrad. Da Amyloglucosidase sowohl α -1,4-glycosidische als auch α -1,6-glycosidische Verknüpfungen spalten kann, ist auch kein merklicher Unterschied zwischen Carboxymethylstärken aus unterschiedlichen Rohstoffen bzw. mit variierenden Verzweigungsgraden zu verzeichnen. Die Probe 17.5 wird trotz ihres hohen Substitutionsgrades noch langsam abgebaut, so dass der Grenzwert der Substitution für eine noch mögliche enzymatische Hydrolyse höher zu liegen scheint als bei den anderen Amylasen. Die ebenfalls analysierte Hydroxyethylstärke zeigt den gleichen Umsatz wie eine Carboxymethylstärke mit einem Substitutionsgrad um 0,4.

Tab. 5-23. Hydrolyse von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren nach 24-stündiger Inkubation mit 1 U/ml Amyloglucosidase.

Substrat	Ausgangsmaterial	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.15	Kartoffelstärke	0	61,2	100
Abbaustärke 17.1	Wachsmaisstärke	0	61,5	100
Abbaustärke 17.2	Wachsmaisstärke	0	58,4	100
CMS 17.7	Abbaustärke 1.15	0,06	62,1	100
CMS 17.8	Abbaustärke 1.15	0,14	41,0	67,0
CMS 17.9	Abbaustärke 1.15	0,18	38,4	62,7
CMS 17.2	Abbaustärke 17.2	0,31	17,8	30,5
CMS 17.6	Abbaustärke 1.15	0,33	16,5	26,7
CMS 17.3	Abbaustärke 1.15	0,34	16,9	27,6
CMS 17.4	Abbaustärke 1.15	0,41	11,9	19,4
CMS 17.1	Abbaustärke 17.1	0,42	10,8	17,6
CMS 17.5	Abbaustärke 1.15	0,75	0,8	1,3
CM-HES 16.42	HES 200/0.5	0,04/0,5	8,1	13,2
HES 200/0.5	abgeb. Wachsmaisstärke	0,5	10,5	17,1

5.6.4 Pullulanase-Abbau von Carboxymethylstärken

Die Ergebnisse der Hydrolyseversuche mit Pullulanase sind nicht so einheitlich wie die der anderen enzymatischen Untersuchungen. Die untere Abbildung 5-10 zeigt die Abbaukurven einiger Carboxymethylstärken.

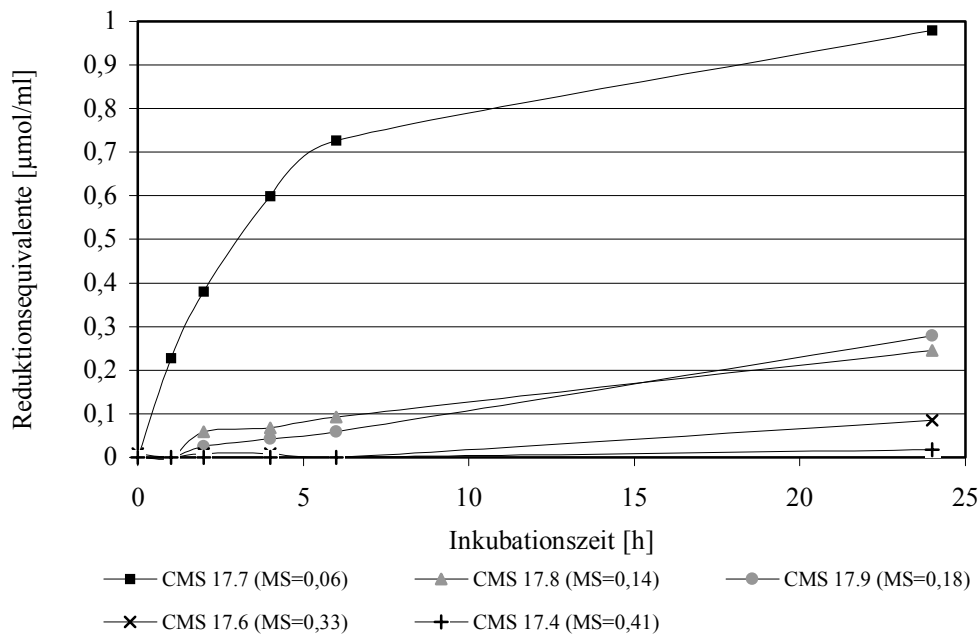


Abb. 5-10. Pullulanase-Abbau (1 U/ml) verschiedener Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren.

Aufgrund der geringen Substratkonzentration und der Spezifität des Enzyms wurden nur geringe Reduktionsequivalente gemessen. Aus den Kurvenverläufen kann gefolgert werden, dass nach einem Zeitraum von 24 Stunden noch nicht der Endwert der Hydrolyse erreicht ist. Die Kurve für die Hydrolyse der unmodifizierten Stärke wurde nicht dargestellt. Wie der Tabelle 5-24 entnommen werden kann, wurden sämtliche unmodifizierten Stärken in einem unerwartet hohen Maße umgesetzt. Dieser unverhältnismäßige Umsatz lässt sich mit der normalen Pullulanaseaktivität nicht erklären; möglicherweise kann es sich um eine Nebenaktivität des verwendeten Enzympräparates handeln. Eine Überprüfung dieser Vermutung konnte aus Ermangelung einer reinen Amylosefraktion nicht mehr rechtzeitig unternommen werden. Denn warum dieses Phänom nicht auch bei den gering substituierten Carboxymethylstärken aufgetreten ist, kann mit der obigen Annahme nicht erklärt werden. Aus den genannten Gründen wurden in der nachfolgenden Tabelle keine relativen Enzymaktivitäten angegeben. Generell kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass der enzymatische Umsatz mit zunehmendem Substitutionsgrad stark abnimmt. Der genaue Grenzwert für eine Hydrolyse kann

aber mit den bisherigen Ergebnissen nicht ermittelt werden. Hierzu müssten erneut Messungen mit wesentlich höheren Substratkonzentrationen erfolgen.

Tab. 5-24. Hydrolyse von Carboxymethylstärken aus dem Eintopfverfahren nach 24-stündiger Inkubation mit 1 U/ml Pullulanase.

Substrat	Ausgangsmaterial	MS	Hydrolyse in %
Abbaustärke 1.15	Kartoffelstärke	0	11,5
Abbaustärke 17.1	Wachsmaisstärke	0	15,6
Abbaustärke 17.2	Wachsmaisstärke	0	14,3
CMS 17.7	Abbaustärke 1.15	0,06	5,4
CMS 17.8	Abbaustärke 1.15	0,14	1,4
CMS 17.9	Abbaustärke 1.15	0,18	1,6
CMS 17.2	Abbaustärke 17.2	0,31	1,1
CMS 17.6	Abbaustärke 1.15	0,33	0,5
CMS 17.3	Abbaustärke 1.15	0,34	0,2
CMS 17.4	Abbaustärke 1.15	0,41	0,1
CMS 17.1	Abbaustärke 17.1	0,42	0,4
CMS 17.5	Abbaustärke 1.15	0,75	0,4
CM-HES 16.42	HES 200/0.5	0,04/0,5	0,4
HES 200/0.5	abgeb. Wachsmaisstärke	0,5	0,9

5.6.5 NMR-Charakterisierung enzymatischer Abbauprodukte

Die Enzymhydrolysate der Carboxymethylstärken **17.8**, **17.4** und **17.5** und der kommerziellen Hydroxyethylstärke HES 200/0.5 wurden nach Inaktivierung des jeweiligen Enzyms von niedermolekularen Hydrolyseprodukten durch Dialyse befreit und anschließend gefriergetrocknet. Die so gewonnenen Fraktionen wurden durch NMR-Spektroskopie bezüglich des molaren Substitutionsgrades, der partiellen Substitutionsgrade an C-2, C-3 und C-6 und des Verzweigungsgrades untersucht. Diese Strukturdaten wurden mit den Werten der intakten Derivate verglichen.

Die Versuche mit α -Amylase ergaben für die höhermolekulare enzym-behandelte Fraktion von **17.8** einen Anstieg im molaren Substitutionsgrad, hierbei war insbesondere der Anteil der Substitution an C-2 und C-3 erhöht. Beim mittleren Verzweigungsgrad war ebenfalls ein Anstieg zu verzeichnen. Ein ähnlicher Trend, wenngleich weniger ausgeprägt, wurde bei **17.4** gefunden. Bei Substanz **17.5** wies die höhermolekulare Fraktion innerhalb der Fehlerbreite keine Veränderungen auf. Bei der Hydroxyethylstärke konnte mit der verwendeten Analyse-methode nur der Verzweigungsgrad untersucht werden, dieser war nach der Enzymhydrolyse erhöht.

Nach dem Abbau durch β -Amylase war in der höhermolekularen Fraktion der Substanz **17.8** ebenfalls der molare Substitutionsgrad durch einen gesteigerten C-2-Anteil erhöht. Bei Substanz **17.4** wurde keine Veränderung registriert. Der Verzweigungsgrad aller Fraktionen war leicht erhöht; da jedoch der Fehler bei höher substituierten Stärkederivaten größer ausfällt, ist diesem Ergebnis nur ein geringer Stellenwert beizumessen. In der Fraktion von Substanz **17.5** wurden erhöhte Substitutionsgrade gemessen, obwohl ein Abbau aufgrund der hohen Derivatisierung sehr unwahrscheinlich erscheint.

Bei den Versuchen mit Pullulanase wurden bei sämtlichen Substanzen keine wesentlichen Veränderungen gefunden. Die geringen Unterschiede spiegeln höchstwahrscheinlich die Fehlerbreite des Systems wieder.

Nach Behandlung mit Amyloglucosidase ergab sich für **17.8** der insgesamt höchste Anstieg im molaren Substitutionsgrad und dem mittleren Verzweigungsgrad (VZG). In den Fraktionen der anderen Derivate konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Abschließend werden alle ermittelten Strukturparameter der von niedermolekularen Bruchstücken befreiten Abbauprodukte in Tabelle 5-25 zusammengefasst.

Tab. 5-25. Charakterisierung der im Retentat der Dialyse befindlichen Spaltprodukte des Enzymhydrolysats.

		093	084	085	HES 200/0.5
		17.8	17.4	17.5	
ohne Enzym	MS	0,14	0,41	0,75	0,5
	C2+C3	0,13	0,36	0,65	-
	C6	0,01	0,05	0,10	-
	(C2+C3)/C6	13,0	7,2	6,5	-
	VZG in %	3,8	3,8	3,8	5,2
α -Amylase 0,1 U/ml	MS	0,20	0,41	0,73	-
	C2+C3	0,18	0,37	0,65	-
	C6	0,02	0,04	0,08	-
	(C2+C3)/C6	9,0	9,3	8,2	-
	VZG in %	6,7	4,5	4,2	6,1
β -Amylase 1 U/ml	MS	0,18	0,41	0,87	-
	C2+C3	0,16	0,36	0,74	-
	C6	0,02	0,05	0,13	-
	(C2+C3)/C6	8,0	7,2	5,7	-
	VZG in %	4,3	4,4	4,7	5,3
Pullulanase 1 U/ml	MS	0,16	0,39	0,76	-
	C2+C3	0,14	0,35	0,67	-
	C6	0,02	0,04	0,09	-
	(C2+C3)/C6	7,0	8,8	7,1	-
	VZG in %	4,0	4,3	4,3	4,5
Amyloglucosidase 0,4 U/ml	MS	0,25	0,43	0,74	-
	C2+C3	0,22	0,39	0,65	-
	C6	0,03	0,04	0,09	-
	(C2+C3)/C6	7,3	9,8	6,8	-
	VZG in %	8,0	4,4	3,7	5,4

5.7 Physiologische Charakterisierung einiger CMS-Lösungen

5.7.1 Abbau von CMS in Citratblut

Es wurden von der Firma B. Braun Medical AG in Humanblut *in vitro* Abbaukinetiken der Carboxymethylstärken **17.4**, **17.5** und **17.8** und des Blutvolumenersatzmittels Hydroxyethylstärke gemessen (s. Abschnitt 4.7.3). Die bei den einzelnen Inkubationszeiten gemessenen Molmassen sind für die jeweiligen Derivate in Diagramm 5-11 dargestellt.

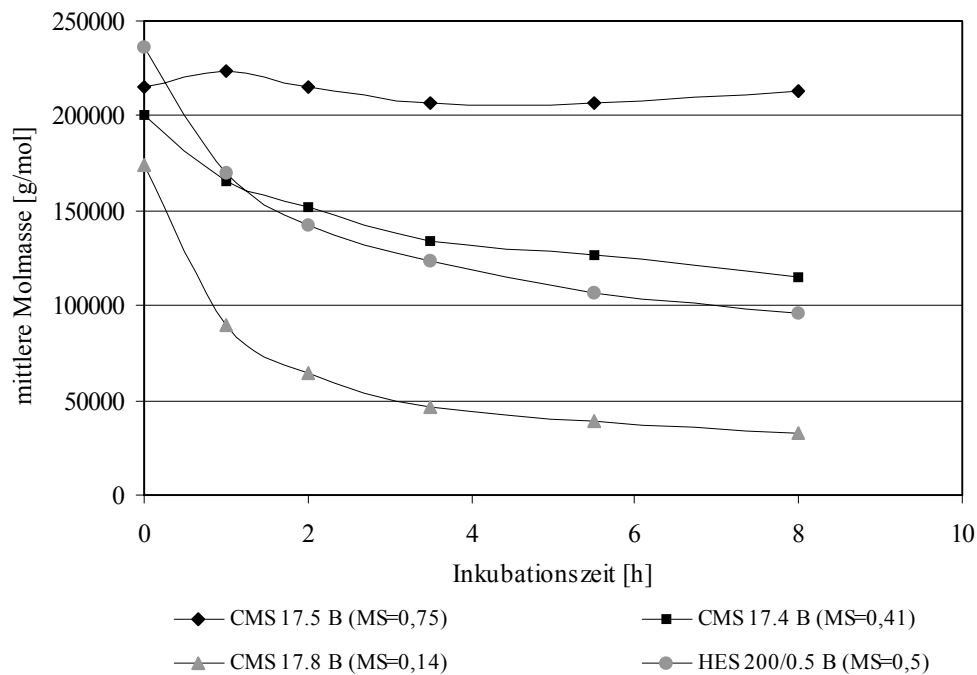


Abb. 5-11. Abnahme der mittleren Molmasse (M_w) von ausgewählten Stärkederivaten nach der Inkubation mit Vollblut.

Die Reihenfolge der Stärkederivate beim Abbau in Blut ist identisch mit den bereits in Abschnitt 5.6 beobachteten Abstufungen der Enzymhydrolyse. Die Carboxymethylstärke **17.5** mit einem Substitutionsgrad von 0,75 erfährt keine Molmassenveränderung. Die abnehmende Molekulargewichtskurve der Carboxymethylstärke **17.4** mit dem Substitutionsgrad von 0,41 gleicht der der Hydroxyethylstärke mit einem MS-Wert von 0,5. Die größte Verringerung der Molmasse wurde bei Substanz **17.8** gemessen. In Diagramm 5-12 sind die Abbaukurven der selben Substanzen nach identischen Inkubationszeiten mit α -Amylase aus Humanspeichel (0,1 U/ml) dargestellt. Auch hier konnte keine Abnahme der mittleren Molmasse bei Carboxymethylstärke **17.5** festgestellt werden. Ebenso weisen Carboxymethylstärke **17.4** und die Hydroxyethylstärke einen ähnlichen Verlauf der Molekulargewichtsabnahme auf, obwohl im

Gegensatz zum Abbau in Vollblut hier das hydroxyethylierte Derivat merklich schneller hydrolysiert wird.

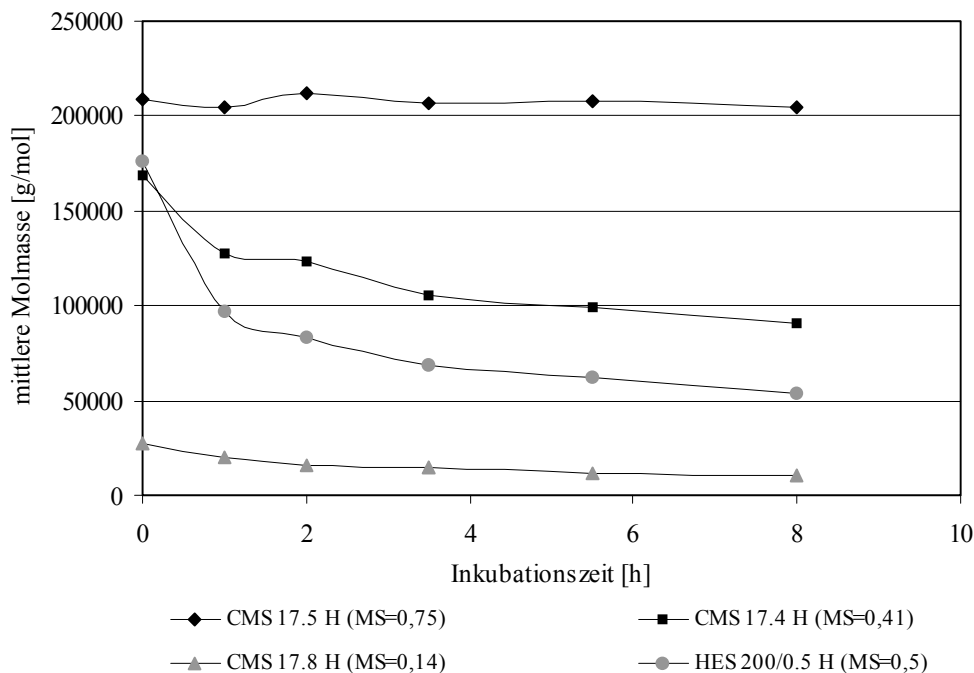


Abb. 5-12. Abnahme der mittleren Molmasse (M_w) von ausgewählten Stärkederivaten nach der Inkubation mit α -Amylase aus Humanspeichel (0,1 U/ml).

Insgesamt sollten die Carboxymethylstärken entgegen der vorliegenden Messwerte eine vergleichbare Ausgangsmolmasse besitzen (0-Stunden-Wert), zumal alle Substanzen aus dem gleichen Ausgangsmaterial synthetisiert wurden und ein Abbau der Stärke wegen der alkalischen Umsetzung nicht stattfinden konnte, dürften sich die ursprünglichen Molmassen nur um dem durch die Substitution bedingten zusätzlichen Betrag unterscheiden. Eine schleichende Enzymreaktion während des Probentransportes aufgrund einer eventuell noch vorhandenen Enzymaktivität kann ausgeschlossen werden, da jede Probe genügend lange bei 100 °C erhitzt worden ist und anschließend das denaturierte Enzym entfernt wurde. Bereits im Vorfeld der Studie lieferten Mehrfachbestimmungen und Blindversuche von unterschiedlichen Carboxymethylstärken und der dazugehörigen Ausgangsmaterialien nicht reproduzierbare und zum Teil widersprüchliche Molmassen. Aus den genannten Gründen kann der Fehler nur in der angewandten Analysenmethode bzw. den zugrundeliegenden Messparametern der Firma B. Braun Medical AG liegen. Inwieweit die Gesamtaussage dieser Versuchsreihe dadurch beeinträchtigt wird, lässt sich nur schwer abschätzen. Die parallel dazu durchgeführten und von der Molekulargewichtsbestimmung unabhängigen Enzymversuche zeigen zumindest eine Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Abbautrends. Nachfolgend werden analoge Abbauversuche mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas präsentiert. Bis auf den stärkeren Unterschied zwischen 17.4 und der kommerziellen Hydroxyethylstärke sind die Ergebnisse,

angesichts der Ungenauigkeiten bei der Molmassenbestimmung, identisch mit denen der Hydrolyseversuche mit α -Amylase aus Humanspeichel.

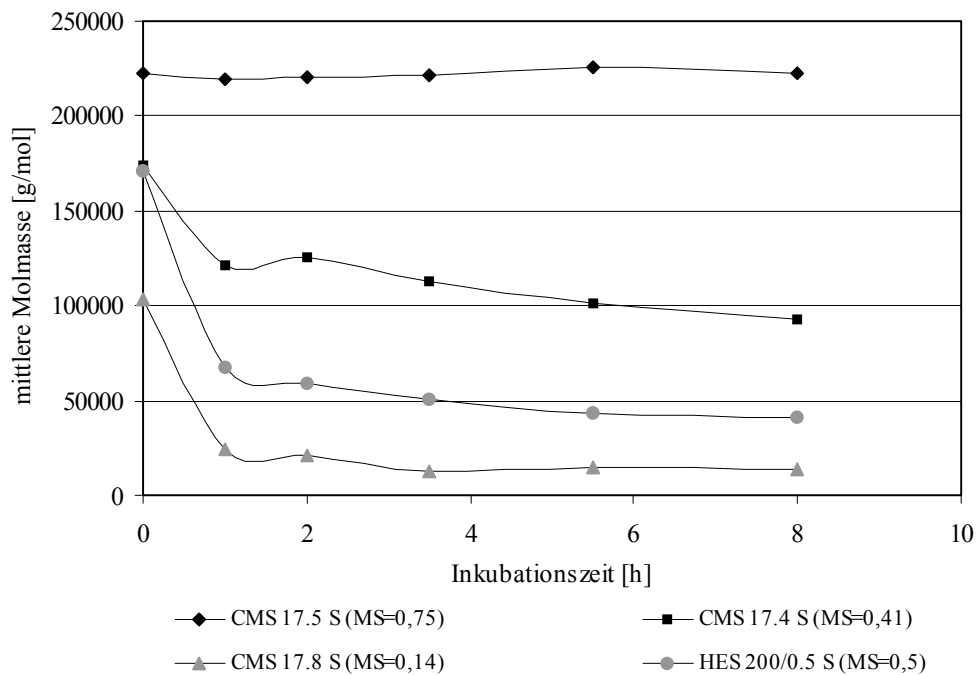


Abb. 5-13. Abnahme der mittleren Molmasse (Mw) von ausgewählten Stärkederivaten nach der Inkubation mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas (0,1 U/ml).

In Tabelle 5-26 sind die Ergebnisse der drei Reihen von Abbauversuchen zusammengefasst. Aus den Daten wird ersichtlich, dass trotz der teilweise großen Unterschiede in den anfänglichen Molmassen die prozentuale Änderung nach einer achtstündigen Inkubation in Vollblut mit den Resultaten der Enzymhydrolysen korreliert.

Tab. 5-26. Prozentuale Mw-Abnahme ausgewählter Stärkederivate nach Inkubation mit Vollblut bzw. unterschiedlichen α -Amylasen (8-Stunden-Werte).

Substrat	MS	Mw-Abnahme nach achtstündiger Inkubation mit (%)		
		Citratblut	α -Amylase aus Human-Speichel	α -Amylase aus Schweine-Pankreas
CMS 17.8	0,14	80,9	87,2	59,9
CMS 17.4	0,41	42,3	46,6	46,5
CMS 17.5	0,75	0,7	0	2,1
HES 200/0.5	0,5	59,4	76,0	69,2

Abschließend werden die in der gleichen Versuchsreihe über die Bestimmung der Reduktionsequivalente erhaltenen Hydrolyseraten bzw. relativen Amylaseaktivitäten in den beiden folgenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 5-27. Vergleich der Hydrolyseraten mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas (0,1 U/ml, 8-Stunden-Werte).

Substrat	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.15	0	29,5	100
CMS 17.8	0,14	17,2	58,3
CMS 17.4	0,41	2,9	9,8
CMS 17.5	0,75	0	0
HES 200/0.5	0,5	4,4	14,0

Tab. 5-28. Vergleich der Hydrolyseraten mit α -Amylase aus Humanspeichel (0,1 U/ml, 8-Stunden-Werte).

Substrat	MS	Hydrolyse in %	relative Aktivität in %
Abbaustärke 1.15	0	29,1	100
CMS 17.8	0,14	16,8	57,7
CMS 17.4	0,41	2,4	8,2
CMS 17.5	0,75	0	0
HES 200/0.5	0,5	3,6	11,6

5.7.2 Beeinflussung der Blutgerinnung durch CMS

Die *in vitro* Untersuchung über die Auswirkungen von Carboxymethylstärkelösungen auf die Blutgerinnung wurde in der Universitätsklinik Erlangen unter der Leitung von Herrn PD Dr. Pscheidl durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, ob dieses neue Stärkederivat im Rahmen der Volumenersatztherapie Auswirkungen auf die Gerinnung hat und wie evtl. Veränderungen im Verhältnis zur handelsüblichen Hydroxyethylstärkelösungen zu bewerten sind. Spezielles Interesse galt dabei der Thrombozytenfunktion.

Bei dieser Untersuchung wurden je vier- und sechsprozentige Lösungen von den Carboxymethylstärken **17.4**, **17.6** und **17.8** mit einem Substitutionsgrad von 0,41, 0,33 und 0,14 verwendet. Um unterschiedliche klinische Situationen nachahmen zu können, wurden bei dieser Studie zwei Blutverdünnungsstufen (20 % und 40 %) eingesetzt. Neben den neuartigen Lösungen aus CMS wurden noch zwei handelsübliche Stärkelösungen aus HES sowie eine Gruppe mit Ringerlösung miteinbezogen. Zusammen ergaben sich dadurch 18 Ansätze mit Studienlösungen. Da die Blutentnahme bei den Probanden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurden, wurden zur Standardisierung an jedem Tag zusätzlich die Gerinnung in einer unverdünnten Blutprobe untersucht sowie ein Blutbild bestimmt. Es waren insgesamt neun Probanden in diesem Versuchsvorhaben eingeschlossen. Mit dem Blut der jeweiligen Probanden wurden im Verlauf dieser Studie jeweils alle Substanzen getestet.

Während der Blutentnahme wurde das Blut direkt in handelsübliche 10 ml Spritzen abgenommen, in denen sich zu diesem Zeitpunkt bereits die unterschiedlichen Testsubstanzen befanden. Anschließend wurden die Blut-Präparatemischungen in handelsübliche Gerinnungsröhrchen umgefüllt. Für die jeweiligen Blutentnahmen wurden die Probanden neu punktiert, um eine Gerinnungsaktivierung in liegenden Venenverweilkanülen ausschließen zu können. Nach 15 Minuten wurde standardisiert ein Thrombelastogramm mit jeweils vier verschiedenen Proben durchgeführt. Das restliche Blut wurde für die Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation (ADP-, Ristocetin- und Adrenalinstimuliert) sowie für die Untersuchung der plasmatischen Gerinnung (Faktor VIII, TPZ, aPTT und Ristocetin CoFaktor) verwendet.

Eine Auswertung der jeweiligen Laborwerte ergab, dass die plasmatische Gerinnung nur durch den Verdünnungsfaktor signifikant beeinträchtigt wurde. Eine spezifische Wirkung der handelsüblichen oder neuen Lösungen konnte nicht gefunden werden. Zwischen den jeweiligen Lösungen konnten keine signifikanten Unterschiede erkannt werden. Lediglich bei den Daten der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und den Reaktionszeiten bzw. Thrombusbildungszeiten des Thrombelastogramms ergaben sich bei den HES-Spezifikationen leichte Abweichungen von der Norm. Dieser Trend wurde bei den CMS-Lösungen nicht gefunden. Das Ergebnis muss jedoch durch zusätzliche statistische Verfahren verifiziert werden. Zusammenfassend konnte durch die Studie von Herrn Dr. Pscheidl gezeigt werden, dass in dem gewählten *in vitro* Modell die Carboxymethylstärkelösungen keine größere Beeinträchtigung der Gerinnung verursachen als die handelsüblich verwendeten HES-Präparate.

6 DISKUSSION

6.1 Struktur und Stabilität der Stärkeester

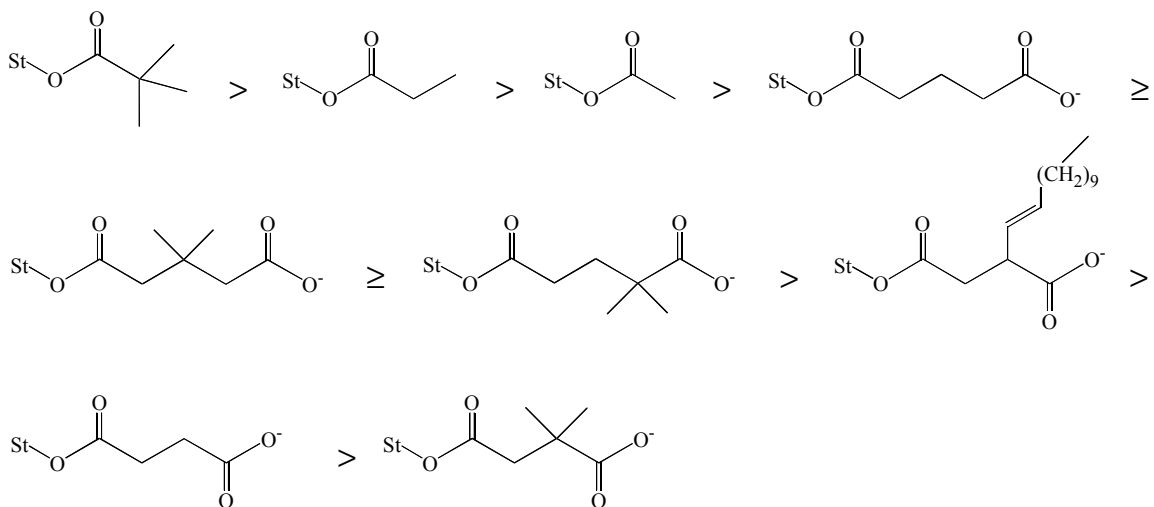
Die Sterilisationsversuche der unterschiedlichen Stärkeester sollten eine Aussage über die Stabilität der Esterbindung ermöglichen bzw. Strukturinformationen für weitere stabile Stärkeester liefern. Die Sterilisation stellt einen unverzichtbaren Prozessschritt bei der Herstellung von klinischen Infusionslösungen dar. Ein weiterer Punkt ist die erforderliche Langzeitstabilität der Stärkeesterlösungen für die notwendigen Aufbewahrungszeiträume und -bedingungen. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine Langzeitlagerungsversuche durchgeführt, für diesbezügliche Aussagen müssen die Ergebnisse der Sterilisationsversuche extrapoliert werden.

Bei den bereits in klinischen Testphasen befindlichen Acetylstärkeelösungen [131, 132, 133] wurden zwar zahlreiche physikochemische und enzymatische Untersuchungen publiziert [134 - 138], die galenische Instabilität solcher Lösungen – insbesondere bei längerem Lagerzeitraum - wurde in der Literatur jedoch bisher nicht erwähnt.

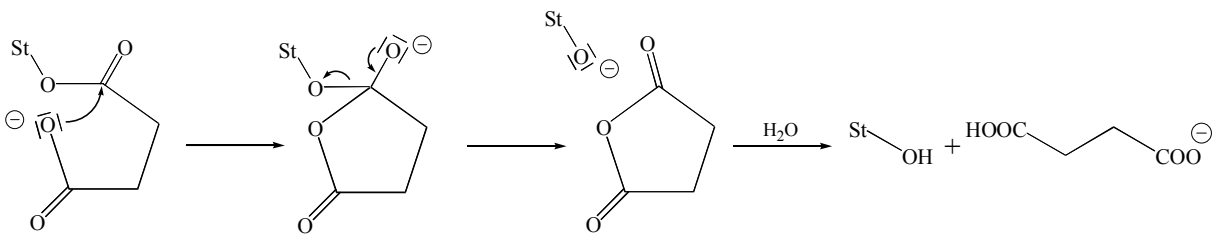
Es existieren andere Studien, aus denen sich Rückschlüsse auf die Stabilität von Stärkeestern ziehen lassen [139, 140]. In diesen Untersuchungen wurde der mikrobielle Abbau von Stärkeestern aus einwertigen, unverzweigten Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von 2 bis 8 C-Atomen beschrieben. Neben der Variation in der Esterkettenlänge wurden mehrere Substitutionsgrade pro Stärkeestertyp analysiert. Die Langzeituntersuchungen wurden durchgeführt, um den biologischen Abbau der Acylstärken zu simulieren. Die Stärkeester sind aufgrund ihres variablen Eigenschaftsprofils teilweise dazu geeignet, bestimmte petrochemische Polymere zu ersetzen. Dabei ist ein möglichst hoher biologischer Abbau ein wichtiges Kriterium für die Auswahl des Esters. In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei höheren Estergruppenkettenlänge ein geringerer anaerober Abbau stattfand. Eine Erhöhung des Substitutionsgrades zeigte den gleichen Effekt. Die biologische Umwandlung basiert auf der Zerlegbarkeit der Stärkederivate durch mikrobielle Enzyme. Die enzymatische Hydrolyse wird bei derartigen Langzeitversuchen wiederum von der Stabilität der Esterbindung mitbeeinflusst, denn wenn aufgrund von Verseifungen der Esterbindungen der Substitutionsgrad sinkt, steigt der Umsatz durch abbauende Enzyme. Das bedeutet, dass die Stärkeester, die den geringsten biologischen Abbau zeigten, zugleich die beständigsten Esterbindungen hatten.

Laakso und Sjökolm beschreiben den Einfluss der Stabilität der Esterbindung auf die enzymatische Hydrolyse von Acryloylstärken [83]. Die Stärke wurde mit Acrylsäurechlorid verestert, um später daraus über Blockpolymerisation Mikropartikel für pharmazeutische Anwendungen aufbauen zu können. Es wurde unter anderem der Abbau von Acryloylstärke durch Amyloglucosidase beschrieben, die Substitution verringerte erwartungsgemäß den Grad der Hydrolyse gegenüber der nativen Stärke. Nach einer 8- bzw. 16-wöchigen Lagerung der acryloylierten Stärke bei pH 5,5 konnte ein erhöhter enzymatischer Abbau beobachtet werden. Die erhöhte Substrataktivität konnte mit der während der Lagerung eintretenden Hydrolyse der Esterbindungen erklärt werden.

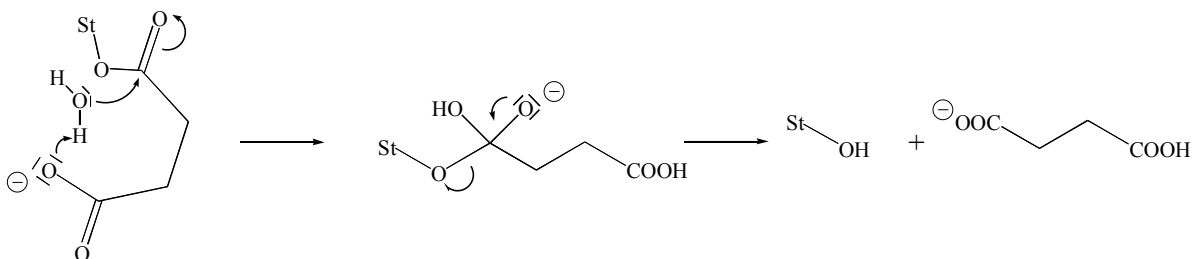
Will man die Stabilität eines bestimmten Esters in wässriger Lösung verstehen, so ist eine mechanistische Betrachtung der Hydrolyse der Esterbindung unerlässlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit der basenkatalysierten Hydrolyse von Acylverbindungen wird von mehreren Faktoren bestimmt. Einen wesentlichen Einfluß hat die Nucleophilie des angreifenden Reagens, die Polarisierbarkeit der Carbonylgruppe sowie der Natur der Abgangsgruppe. Zusätzlich wird die Verseifung der Esterbindung in hohem Maße von sterischen Aspekten mitbestimmt. Da sich das Nucleophil – in diesem Falle Wasser bzw. ein Hydroxid-Ion – im ersten Schritt an das positiviertete C-Atom der Carbonylgruppe anlagert, erfolgt die Reaktion um so leichter, je besser dieses Atom von außen zugänglich ist. Umgekehrt verläuft bei einer Abschirmung des Carbonyl-C-Atoms durch voluminöse Nachbargruppen die Substitution entsprechend langsamer. Dieser Effekt konnte bei der Sterilisation der neutralen Stärkeester beobachtet werden. Hier war der Ester mit dem räumlich anspruchsvollen Pivaloylrest stabiler als die Propionylstärke, welche wiederum langsamer hydrolysiert wurde als die Acetylstärke. Fasst man die Ergebnisse der Sterilisationsversuche dieser Arbeit zusammen, so ergibt sich für die untersuchten Stärkeester folgende strukturabhängige Stabilitätsreihenfolge:



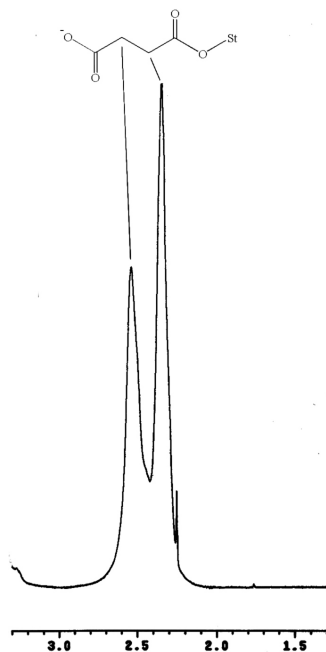
Der sterische Einfluss geht, wenn auch in unterschiedlichem Maße, selbstverständlich von allen Nachbargruppen aus. Bei den anionischen Stärkeestern wurde trotz der relativ großen räumlichen Ausdehnung der Substituenten eine überproportional hohe Instabilität der Acylbindungen beobachtet. Die erhöhte Instabilität der Esterbindung bei Nachbargruppen mit Säurefunktionen lässt sich auf eine intramolekulare Katalyse zurückführen. Eine derartige nukleophile Katalyse tritt zum Beispiel bei Phthalsäurehalbestern von Alkoholen auf, die ziemlich stark sauer sind (Phenyl- und Trifluoethylester), wobei die konjugierte Base der Carboxylgruppe katalytisch wirkt. Auch bei den Succinyl- und Glutarylstäerken wäre es möglich, dass die deprotonierte Carboxylgruppe mit ihrem negativ geladenem Sauerstoff die Esterbindung angreift und das zunächst gebildete Anhydrid schließlich hydrolysiert wird. Die nachfolgende Reaktionsgleichung illustriert diesen Mechanismus am Beispiel der Succinylstärke:



Die Mitwirkung von intramolekular vorhandenen Gruppen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse wurde ebenfalls an Derivaten der Acetylsalicylsäure eingehend untersucht [141]. Die Esterbindung in der Acetylsalicylsäure wird in der deprotonierten Form der Säure viel rascher verseift als im elektrisch neutralen Molekül, was darauf hinweist, dass die Carboxylatgruppe an der Reaktion teilnimmt. Der obige Mechanismus konnte jedoch durch Isotopenmarkierungen ausgeschlossen werden, stattdessen verläuft diese intramolekulare Katalyse der Verseifung unter Beteiligung eines Moleküls Wasser. Überträgt man diesen Mechanismus auf die Hydrolyse der Esterbindung von Succinylstäerken, so ergibt sich folgender Reaktionsablauf:



Welcher der beiden Reaktionsmechanismen bei den untersuchten Succinyl- bzw. Glutarylstäerken zutrifft wurde nicht geklärt. Jedoch bleibt in beiden Fällen die katalytische Wirkung der in die Stärke eingeführten anionischen Carboxylgruppen bei der Esterspaltung unbe-



stritten. Die nebenstehende Abbildung zeigt einen Spektrenausschnitt einer dargestellten Succinylstärke. Die beiden sichtbaren Signale werden von den in ihrer chemischen Umgebung verschiedenen Methylengruppen des Halbesters erzeugt.

Abb. 6-1. Ausschnitt eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums einer Succinylstärke.

Bei den gesamten Untersuchungen zur Stabilität und Sterilisationsbeständigkeit der Stärkeester kann aufgrund der pK_a -Werte der zugrundeliegenden Dicarbonsäuren davon ausgegangen werden, dass bei den vorliegenden pH-Werten alle Säurefunktionen dissoziiert vorlagen. Bei der Succinylstärke **5.8** wurde die Stabilität der Esterbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert im schwach sauren bis schwach alkalischen Bereich untersucht (siehe Abschnitt 4.3.12 und 5.2.2). Das Ergebnis zeigte, dass die Hydrolyse der Acylbindung um so ausgeprägter war je höher der pH-Wert lag. Die Instabilität bei ca. 120 °C war jedoch selbst bei einem pH-Wert von vier noch beträchtlich (40 % aller Esterbindungen). Daraus lässt sich folgern, dass die Acidität der Carboxylfunktion der Nachbargruppe so hoch ist, dass selbst im schwach Sauren noch die überwiegende Zahl der Säurefunktionen in ihrer Anionenform vorliegen und somit die intramolekulare Hydrolyse, wie oben beschrieben, katalysieren können.

Vergleicht man nochmals die Stabilität der anionischen Stärkeester untereinander, so hat sich gezeigt, dass die Succinylstärken am stärksten hydrolysiert werden. Bei den substituierten Succinylstärken **6.1** und **7.1** wird im Falle des 2,2-Dimethylsuccinylrestes die Hydrolyse beschleunigt und im Falle des Dodecenylnsuccinylrestes die Hydrolyse der Esterbindung verlangsamt. Daraus kann für die Succinylstärke gefolgert werden, dass sterisch weniger anspruchsvolle Seitenketten der Nachbargruppe eine intramolekulare Substitution eher beschleunigen und erst voluminösere Reste diesen Effekt verhindern. Bei der Glutarylstärke und den beiden dimethylsubstituierten Varianten **9.1** und **10.1** konnte kein solch signifikanter Unterschied im Hydrolyseverhalten beobachtet werden. Die höhere Esterbindungsstabilität des Glutarylrestes gegenüber dem Succinylrest könnte ein Indiz für den Mechanismus mit dem beteiligten Molekül Wasser sein, da im anderen Reaktionsverlauf durch die zusätzliche Methylengruppe des Glutarylrestes ein energetisch bevorzugter sechsgliedriger Übergangszu-

stand durchlaufen werden würde, was wiederum zur Folge hätte, dass die Glutarylstärke schneller hydrolysiert werden müsste als die Succinylstärke.

Bei der Beurteilung des Reaktionsmechanismus muss der Einfluss des Stärkemoleküls beachtet werden. Es wäre durchaus denkbar, dass durch Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Stärkerückgrat bestimmte Konformationen der Nachbargruppe energetisch begünstigt werden und somit andere Übergangszustände bei der intramolekularen Katalyse favorisiert wären.

Dass sich die Substitution bzw. die Struktur der Stärken auf die enzymatische Spaltung auswirkt wurde bereits oben angedeutet. Die in dieser Arbeit synthetisierten Stärkeester wurden alle mittels α -Amylase enzymatisch charakterisiert (siehe Abschnitt 4.5.3 und 5.3). Man findet ähnlich durchgeführte Studien in der Literatur beschrieben. Von Coma et al. wurden sehr gering substituierte Acetylstärken aus unterschiedlichen nativen Stärkerohstoffen synthetisiert und hinsichtlich ihres Abbaus durch α -Amylase aus *Aspergillus oryzae* untersucht [142]. Der Abbau wurde als „Biofragmentierung“ bezeichnet und über ein prozentuales Verhältnis von freigesetzten Glucose-Equivalenten zu theoretisch möglichen Glucose-Equivalenten ausgedrückt. Die bei der Hydrolyse entstehenden reduzierenden Zucker wurden über eine kolorimetrische Methode bestimmt [143, 144]. Die sehr geringe Acetylierung von 0,079 % bzw. 1,2 % (DS<0,008 bzw. DS<0,012) führte hier, aufgrund der durch die Substitution hervorgerufenen Auflockerung der granulären Struktur, sogar zu einem verstärkten enzymatischen Abbau. Wootton und Chaudhry untersuchten den enzymatischen Abbau von Hydroxypropyl- und Acetylstärke mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas [145]. Die Acetylstärke war mit einem Substitutionsgrad von 0,07 relativ gering substituiert. Die Hydrolyse wurde ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit durch eine Farbreaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure verfolgt. Es hat sich gezeigt, dass die Substitution den enzymatischen Abbau verringerte, wobei der voluminösere Hydroxypropylrest den stärkeren Einfluss zeigte.

Von Heins und Kulicke et al. wurden mehrere aus partiell abgebauter Stärke synthetisierte Acetylstärken mit einem Substitutionsgrad von 0,4 bis 0,8 über NMR-Spektroskopie, GPC-MALLS und enzymatische Analyse charakterisiert [136]. Aufgrund der gedachten Anwendung der Acetylstärke als Blutvolumenersatzmittel wurde diese Untersuchung im Vergleich zur kommerziellen Hydroxyethylstärke durchgeführt. Der enzymatische Abbau wurde unter Bedingungen durchgeführt, welche näherungsweise im Blut vorherrschen (Phosphat-Puffer, pH 7,4, 37 °C, 2,5 mmol Ca²⁺) mit einer α -Amylasekonzentration von 0,144 U/ml. Die nach definierten Inkubationszeiten erhaltenen Spaltprodukte wurden hinsichtlich ihrer Molmassenverteilung über GPC-MALLS charakterisiert. Die Acetyl- und Hydroxyethylstärke ähnelten sich in ihrem Verhalten gegenüber dem enzymatischen Abbau sehr. Es wurde gefunden, dass der enzymatische Abbau mit steigender Substitution abnimmt. Bei der Acetyl- und Hydroxyethylstärke wurde beobachtet, dass eine Substitution der OH-Gruppe am C-2-Atom der Glucoseeinheiten den enzymatischen Umsatz stärker hemmt als eine Substitution an der C-6-Position.

Zu den in dieser Arbeit ausführlicher untersuchten Succinylstärken existieren in der Literatur keine enzymatischen Charakterisierungsstudien unter annähernd physiologischen Bedingungen. Einen Hinweis auf eine eventuelle Verwendung als Plasmaersatz findet man bisher lediglich in dem breiten Schutzanspruch einer Patentschrift, welche die Verwendung von Acetylstärke als Plasmaersatz favorisiert [35]. Marcazzan et al. beschreiben den enzymatischen Abbau von unterschiedlich succinylierten Varianten aus Amylose, Amylopektin und Stärke durch α -Amylase aus Schweine-Pankreas [146]. In der Untersuchung wurde gezeigt, dass die α -Amylase die Succinylstärken in Abhängigkeit von ihrem Substitutionsgrad abbaut. Parallel zur Farbreaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure wurde die Hydrolyse von Succinylstärke, welche mit dem spin label 4-Amino-Tempo paramagnetisch markiert war, über ESR-Messungen verfolgt. Laut den Autoren gab es Unterschiede in diesen beiden Nachweismethoden, denn es wurde mit der Farbreaktion keine Aktivität der α -Amylase an Succinylamylopektin gemessen, wohl aber mit der ESR-Methode. Eine fehlende Enzymaktivität kann anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden, denn es wurden mit der identischen kolorimetrischen Methode nachweislich Enzymaktivität gegenüber sehr viel höher substituierten Succinylstärken gemessen, welche aus partiell abgebauter Wachsmaisstärke hergestellt wurden, was nahezu reinem Amylopektin entspricht. Trotzdem konnte von den Autoren bei allen Succinylstärken eine lineare Korrelation zwischen dem Succinylgehalt der Stärke und der α -Amylaseaktivität hergestellt werden. Diese Korrelation konnte, wie die nachfolgende Abbildung 6-2 zeigt, durch eigene Messungen an wesentlich höher substituierten Succinylstärken ebenfalls beobachtet werden. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse gibt annähernd den Grenzsubstitutionsgrad der enzymatischen Hydrolyse an, ab diesem Wert konnte kein enzymatischer Abbau mehr gemessen werden (siehe auch Abschnitt 5.3.2). Die Abweichungen von der linearen Regression können evtl. durch geringe Unterschiede im Substitutionsmuster der Succinylstärken erklärt werden.

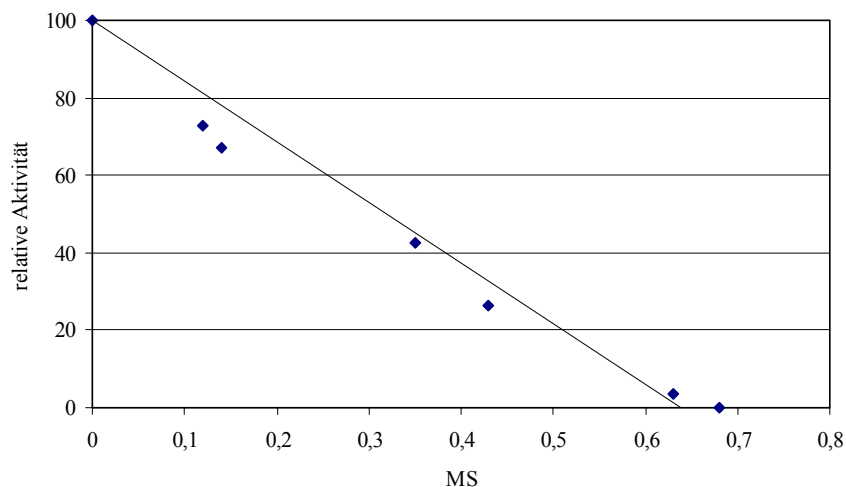


Abb. 6-2. Aktivität von α -Amylase aus Schweine-Pankreas (0,1 U/ml) gegenüber succinylierten Stärken mit unterschiedlichen Substitutionsgraden als Substrat.

In [146] wurde der Grenzwert der enzymatischen Hydrolyse bei wesentlich geringeren Substitutionsgraden erreicht. Jedoch muss bedacht werden, dass die Substitutionsgrade über eine FTIR-Methode bestimmt wurden, welche nicht mit der Genauigkeit einer NMR-Bestimmung vergleichbar ist. Des Weiteren wurden die Succinyl-stärken aus nativen Stärken synthetisiert, was bedeutet, dass bei geringen Substitutionen keine vergleichbaren Wasserlöslichkeiten erreicht werden konnten und somit die Enzymreaktionen entsprechend verlangsamt abliefen.

Neben der bereits erwähnten Verwendung von Acetylstärke als Plasmaersatzmittel existieren in der Literatur weitere Studien über injizierbare Stärkeester, in denen die pharmazeutische Anwendung ebenfalls mit der Stabilität der Esterbindung verknüpft ist. Kratzl et al. synthetisierten aus löslicher Stärke und Acetylsalicylsäurechlorid in einem Zweiphasensystem aus wässriger KOH und wenig Chloroform eine Acetylsalicylstärke [147]. Der dargestellte Ester hatte einen molaren Substitutionsgrad von 0,85. Das so erhaltene hochmolekulare Analgetikum wurde an Hunden getestet. Nach einer intramuskulären Injektion wurde der Acetylsalicylat-Gehalt im Blut kolorimetrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde ungebundene Acetylsalicylsäure intramuskulär verabreicht. Parallel zur Studie in Hunden wurden vergleichende Untersuchungen mit radioaktiv markierten Stärkederivaten in Kaninchen durchgeführt. In beiden Versuchsreihen wurden lediglich 5 % der ursprünglich injizierten Menge an freier Acetylsalicylsäure im Blut wiedergefunden. Dies wurde mit einer besonders hohen Stabilität der Esterbindung zwischen Acetylsalicylsäure und Stärke begründet, welche durch physiologische Prozesse nach einem Zeitraum von 12 Stunden nicht merklich hydrolysierbar zu sein scheint [148].

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Stabilität der Stärkeesterbindung bei Substituenten mit hoher räumlicher Ausdehnung am höchsten ist. Die Stabilität kann jedoch aufgrund auftretender Nachbargruppeneffekte deutlich vermindert sein. Eine Unterdrückung der Nachbargruppeneffekte durch zusätzliche Seitenketten innerhalb der Substituenten scheint nach bisherigen Untersuchungen nicht möglich.

Der enzymatische Abbau der Stärkederivate durch α -Amylase ist bei vergleichbaren Substitutionsgraden bei kleineren Seitenketten am größten, wobei eine vorhandene negative Ladung eine geringfügig hemmende Wirkung zu haben scheint. Bei einer medizinischen Anwendung stellt der Abbau der Stärkeester durch stärke-spaltende Hydrolasen und insbesondere durch α -Amylase ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der physiologischen Wirkung (Volumenwirkdauer) bzw. der erforderlichen Metabolisierbarkeit (Elimination) dar. Substanzen, die nicht auf enzymatischen Wege ausreichend abgebaut werden können, sind für derartige Anwendungen ungeeignet.

Letztlich sind für eine Anwendung als Plasmaersatzmittel – aus physiologischen und physikochemischen Gründen – nur kleinere und polare Seitenketten sinnvoll. Nach der im günstigsten Falle durch den Organismus gesteuerten Hydrolyse der Esterbindung sollten diese Sub-

stituenten möglichst verstoffwechselt werden oder zumindest nicht toxisch oder allergen sein. Solche Bedingungen scheinen aber, mit der gleichzeitigen Anforderung nach ausreichender galenischer Stabilität, nur selten erfüllbar zu sein. Dieses Dilemma wird am besten anhand der Charakterisierungsergebnisse der Succinyl- und Glutarylsterne ersichtlich. Die Stabilität der Esterbindung konnte hier zwar durch die Erhöhung um ein C-Homologes signifikant gesteigert werden, dadurch wurde jedoch gleichzeitig der enzymatische Abbau des Polymers nahezu verhindert.

Aus den oben genannten Gründen sollte bis auf weiteres ein Einsatz von Stärkeestern als Volumersatzmittel nicht in Betracht gezogen werden.

6.2 Beurteilung der Synthesemethoden von CMS

In den beiden folgenden Punkten werden die Ergebnisse der Carboxymethylierung von Stärke in unterschiedlichen Lösungsmitteln diskutiert. Dabei wird insbesondere herausgearbeitet, inwiefern sich Unterschiede wie Stärkesorte und Vorbehandlung, Art des Lösungs- und Veretherungsmittels, Stöchiometrie und Reaktionsführung auf den Substitutionsgrad und auf die Verteilung der Substituenten (Substitutionsmuster) auswirken. Besonders wichtig scheint eine Beurteilung des etablierten Eintopfverfahrens, da hier sämtliche notwendigen Modifikations-schritte zur Herstellung eines vermeintlichen Plasmaersatzstoffes aus dem Rohstoff Stärke in einem Prozess vereint werden konnten.

6.2.1 Einfluss der Syntheseparameter auf das Substitutionsmuster

Die Carboxymethylierung von Polysacchariden und insbesondere von Cellulose und Stärke stellt an sich eine seit langem bekannte und angewandte Derivatisierungsmethode dar. Aufgrund des wachsenden Verständnisses der strukturellen Beschaffenheit von Polyglucanen und der besser erkennbaren Komplexität der Systeme ist Forschungsbedarf noch immer vorhanden. Die steigende Zahl der Anwendungsgebiete von individuell angepassten Stärkederivaten und die zunehmenden Möglichkeiten zur besseren Analyse der Feinstruktur führen zu immer höheren Anforderungen an die Leistungsfähigkeit und Präzision der Synthesen. Dabei müssen für die wachsende Zahl an Stärkemedifikationen neue Synthesewege gefunden oder bestehende adaptiert und optimiert werden. Die Darstellung von monodispersen Carboxymethylstärken mit einem definierten Modifikationsprofil bezüglich Molmasse, Verzweigungsgrad und Verteilung der Substituenten ist zwar derzeit noch nicht möglich, aber Gegenstand aktueller und zukünftiger Bestrebungen.

Die in der Literatur beschriebenen Carboxymethylierungsverfahren finden nahezu ausschließlich in heterogenen Reaktionssystemen statt. Hashimoto und Furukawa carboxymethylierten native Stärke in Isopropanol und Methanol. Die höchsten Substitutionsgrade im Bereich von 0,3...0,4 erzielten sie in Isopropanol mit einem Wassergehalt von 10...15 %. Die Substitutionsgrade wurden über Leitfähigkeitstiterung ermittelt [149]. Sloan et al. stellten Carboxymethylstärken in einem Substitutionsbereich von 0,1 bis 0,9 aus Amylomaistärke mit einem Amylosegehalt von ca. 60 % in einem Slurry-Verfahren in Ethanol dar. Bei den Synthesen wurden mit moderaten molaren Überschüssen gute Umsetzungsraten erreicht. Die Substitutionsgrade wurden Titration mit ermittelt. Weiterhin wurden die rheologischen Eigenschaften dieser kaltwasserlöslichen, hoch-amylosehaltigen Carboxymethylstärken bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen untersucht [150]. Thewlis setzte native Weizenstärke in konzentrierter Natriumsulfatlösung mit Monochloressigsäure und Natriumhydroxid um. Das Natriumsulfat verhinderte ein starkes Aufquellen der Stärkekörner in dem wässrigen Milieu.

In diesem Reaktionssystem wurden Substitutionsgrade kleiner 0,1 erzielt und die Produkte hatten eine intakte Körnerstruktur. In einer zweiten Variante erfolgte eine Derivatisierung der Stärke in Alkohol, wodurch wesentlich höhere Substitutionsgrade erreicht wurden ($MS > 0,5$). Die Substitutionsgrade wurden durch Titration ermittelt und die Viskosität der wässrigen Natriumcarboxymethylstärke-Kleister wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert und Salzgehalt gemessen [151]. Ceh stellte eine Reihe von Carboxymethylderivaten aus Maisstärken nach unterschiedlichen heterogenen Verfahren dar. Hierbei wurden Methoden zur Darstellung von CMS in wässriger Alkalilösung, in Aceton und aus Reagenzien im festen Zustand miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Reaktionsdauer und Temperatur variiert. Insgesamt wurden Substitutionsgrade in einem Bereich von 0,1 bis 0,8 erreicht, wobei die besten Reaktionseffizienzen und die höchsten Substitutionsgrade in Aceton erzielt wurden. Neben der Viskosität der Produkte wurden zwei unterschiedliche nass-chemische Bestimmungsmethoden des Substitutionsgrades diskutiert [152]. Hebeish und Khalil et al. haben die Darstellung von Carboxymethylstärken unter verschiedenen Bedingungen beschrieben. Dabei wurde der Einfluss des Flüssigkeits/Stärke-Verhältnisses, der Reagenzienkonzentrationen, der Reaktionszeit und der Reaktionstemperatur auf die Effizienz der Umsetzung von Reis- und Maisstärke untersucht. Im Falle der Reisstärke wurden sämtliche Synthesen in wässriger Alkalilösung durchgeführt, wobei die besten Reaktionseffizienzen bei geringen Substitutionsgraden erreicht wurden. Bei Maisstärke wurden als Lösungs- bzw. Suspensionsmittel Isopropanol, Dimethylformamid, Cyclohexan, Aceton und Methanol mit wechselnden Wassergehalten eingesetzt. Ein Wassergehalt von 20 % erwies sich dabei größtenteils als Optimum. Die höchsten Umsetzungen wurden in Isopropanol und die niedrigsten in reinem Wasser erzielt [153, 154]. Analoge Versuche wurden von Bhattacharyya et al. mit Mais- und Amaranthstärke durchgeführt. Es wurden die gleichen Reaktionsparameter variiert, um die optimalen Reaktionsbedingungen in den Lösungsmitteln, Dimethylformamid, Cyclohexan, Ethanol, Aceton, Butanol, Methanol und Isopropanol zu ermitteln. Es wurde darauf geachtet, bei der Substitution den granulären Charakter der Stärken zu erhalten. Höhere Substitutionsgrade ($MS > 0,45$) wurden jedoch nur im gelatinisierten Zustand und nach mehrfacher Wiederholung des Carboxymethylierungsschrittes erreicht [155]. Beenackers et al. führten umfangreiche Carboxymethylierungsversuche an Kartoffelstärken durch und verglichen die Ergebnisse mit den Literaturdaten von Khalil und Bhattacharyya. In der Synthesestudie wurden neben Aceton mehrere niedere Alkohole als Lösungsmittel verwendet. Die Substitutionsgrade der Carboxymethylstärken wurden nach säurehydrolytischer Spaltung der Polymere durch HPLC-Analyse des Monomergemisches bestimmt. Der höchste in einem Carboxymethylierungsschritt erreichte Substitutionsgrad betrug 1,33 und wurde mit einer Reaktionseffizienz von 57 % in Isopropanol realisiert [156]. Heinze et al. führten weitere Carboxymethylierungs-Varianten durch. Neben herkömmlichen nativen Stärken variierender Provenienz wurden auch wachsige und amylose-reiche Sorten carboxymethyliert. Vereinzelt wurden sogar vorbehandelte Stärken (gelatinisiert oder hydrolysiert) bzw. Dextrine eingesetzt. Die Synthesen wurden entweder in einem gewöhnlichen

Slurry-Verfahren in alkoholischen Medien oder in homogener Lösung in DMSO durchgeführt. In den alkoholischen Suspensionen wurden je nach Stärketypus Reaktionseffizienzen von bis zu 60 % erreicht. Die Substitutionsgrade lagen hierbei in der Regel zwischen 0,3 und 0,5. Höhere Substitutionen wurden zumeist durch wiederholte Carboxymethylierung realisiert [157]. In DMSO wurden aufgrund der extrem hohen molaren Überschüsse (10 bis 20-fach) an Natriumhydroxid und Natriumchloracetat insgesamt sehr hohe Substitutionsgrade erzielt ($MS > 1,1$) [158]. Neben diesen Synthesearbeiten übertrugen Heinze et al. eine Reihe von Charakterisierungsmethoden für Carboxymethylcellulosen erfolgreich auf die Analyse von Carboxymethylstärken [117, 159, 160, 161]. Parallel zur Bestimmung von un-, mono-, di- und trisubstituierten Glucoseresten über HPLC-Analyse eines säurehydrolytischen Totalabbaus der Stärkederivate wurde die Verteilung der Substituenten innerhalb der Anhydroglucoseeinheiten gemäß der von Bach Tuyet et al. [117] entwickelten Methode NMR-spektroskopisch untersucht. Die so ermittelten Substitutionsmuster wurden mit den Ergebnissen eines von Spurlin [162] stammenden statistischen Verfahrens, welches ursprünglich zur Berechnung der Substituentenverteilung in Cellulosederivaten gedacht war, verglichen. Volkert et al. entwickelten ein industrielles einstufiges, heterogenes Verfahren zur Darstellung von hochsubstituierten Carboxymethylstärken. Die aus Isopropanol erhaltenen Produkte hatten einen Substitutionsgrad von 1 bis 1,5. In der Studie wurden zahlreiche Stärkesorten carboxymethyliert und deren physikochemischen Eigenschaften und Bioabbaubarkeiten ermittelt. Die Verteilung der Substituenten wurde über ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestimmt [163].

Die literaturbekannten Synthesen wurden fast ausschließlich in heterogenen Lösungsmittelsystemen durchgeführt. Selbst die wenigen Ansätze mit granulären Stärken in wässrigen Systemen sind nicht als homogen zu bezeichnen, obwohl bei einigen von ihnen während der Umsetzung aufgrund der relativ hohen Substitution eine Wasserlöslichkeit der Stärken eintrat. Einzig die beschriebenen Carboxymethylierungen in Dimethylsulfoxid fanden in homogener Lösung statt, jedoch wird in diesem Zusammenhang in der Literatur teilweise von induzierten Phasentrennungen bzw. sich bildenden Mikroreaktionsräumen berichtet [158, 164]. Studien über die Carboxymethylierung von partiell abgebauten Stärken in homogenen Reaktionssystemen und der Analyse der dabei erzielten Substitutionsmuster findet man in der Literatur nicht vor.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der eigenen Carboxymethylierungen in den untersuchten heterogenen und homogenen Reaktionssystemen diskutiert. Sofern möglich werden Vergleiche mit Literaturdaten gezogen. Da bereits in Abschnitt 5.4 neben den erzielten Substitutionsgraden die zugehörigen Reaktionseffizienzen dargestellt wurden, wird der Schwerpunkt auf das Substitutionsmuster der synthetisierten Carboxymethylstärken gelegt. Unter dem Begriff Substitutionsmuster wird die Verteilung der eingeführten Substituenten auf die drei unterschiedlichen Hydroxylgruppen an C-2, C-3 und/oder C-6 der Glucosereste verstanden. Informationen über die Verteilung der Substituenten entlang der Ketten des polymeren Grundgerüsts können derzeit nur durch enzymatische Abbaueversuche erhalten werden. Rückschlüsse

dieser Art werden in Abschnitt 5.6 und 6.3.1 gezogen. Bei der Beschreibung der Substitutionsmuster wird die bereits in Abschnitt 4.3.3 erläuterte Vereinfachung bei der Angabe der partiellen Substitutionsgrade gewählt. Aufgrund der Analysenmethode lässt sich der partielle Substitutionsgrad an C-3 nur mit größerem Fehler einzeln bestimmen. Aus diesem Grunde wurden die beiden partiellen Substitutionsgrade von C-2 und C-3 gemeinsam bestimmt und in einem Wert zusammengefasst. Wo eine getrennte Betrachtung beider Werte vonnöten war, wurde der Anteil der C-3-Substitution halbquantitativ abgeschätzt. Die Genauigkeit dieser Abschätzung war bei allen nachfolgenden Betrachtungen ausreichend. Um zu zeigen, dass der Anteil der C-3-Substitution an der Summe der beiden partiellen Substitutionsgrade (C2+C3) stets gering war, d.h. nicht über 10...20 %, werden im Anhang exemplarisch einige Werte angegeben. Diese Werte sind auf Kosten der C-2-Substitution eher noch zu hoch. Das Problem der Fehlerbehaftung der über NMR-Methoden bestimmten partiellen Substitutionsgrade an C-3 wird in der Literatur verschwiegen; die dortigen numerischen Angaben einer C-3-Substitution sind ebenfalls nur von halbquantitativer Güte [117, 159]. Genauere und ähnlich schnelle Analysenverfahren wie die NMR-spektroskopische Bestimmung des Substitutionsmusters existieren nicht. Als einzige Alternative wäre eine aufwendige Untersuchung über GLC zu nennen, in der zunächst die Carboxymethylstärken oder -cellulosen zu den entsprechenden Hydroxyethylverbindungen reduziert, anschließend total hydrolysiert, die Monomerbausteine mit Borhydrid reduziert und schließlich peracetyliert werden müssen; erst dann erfolgt die gaschromatographische Analyse des komplexen Gemisches [165].

Bei der Synthese von Hydroxyethylstärken ist bekannt, dass durch eine Variation der molaren Verhältnisse von Stärke, Base und Veretherungsmittel unterschiedliche Substitutionsmuster bzw. C2/C6-Verhältnisse in einem Bereich von etwa 0,5 bis 12 erreichbar sind [30]. Inwiefern eine gleichartige Änderung der molaren Verhältnisse eine Steuerung des Substitutionsmusters bei der Synthese von Carboxymethylstärken ermöglicht, ist bisher noch nicht untersucht worden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen die Erfahrungswerte bzw. die etablierten molaren Verhältnisse der HES-Synthese nicht auf die Carboxymethylierung übertragbar sind.

Substitutionsmuster in Methanol

Die in Methanol synthetisierten Carboxymethylstärkevarianten hatten einen Substitutionsgrad von 0,13 bis 0,70. Über diesen gesamten Bereich lag der Anteil der C-2-Substitution durchschnittlich bei ca. 70 %, ca. 15...20 % entfielen auf die partielle Substitution an C-6 und die übrigen 10...15 % entsprechend auf die Substitution an C-3. Die Reaktivitätsreihenfolge ist demzufolge für alle methanolischen Ansätze mit C2>C6>C3 anzugeben. Die relative Einheitlichkeit des Substitutionsmusters über alle erzielten Substitutionsgrade wird durch Diagramm 6-3 illustriert. Hier sind die Ansätze nach steigenden MS-Werten sortiert. Die jeweilige Bal-

kenhöhe repräsentiert den gesamten Substitutionsgrad und die Unterteilung der einzelnen Balken gibt den partiellen Substitutionsgrad an C-6 (oben) bzw. an C2+C3 (unten) wieder.

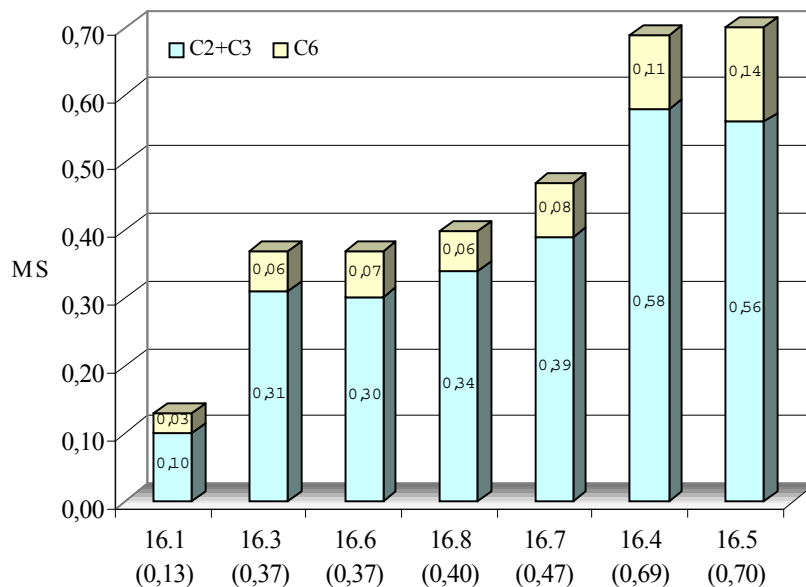


Abb. 6-3. Substitutionsmuster der in Methanol synthetisierten Carboxymethylstärken.

Bildet man aus den partiellen Substitutionsgraden der einzelnen Substanzen den Quotienten $(MS(C2+C3)/MS(C6))$, so erhält man einen entsprechenden Eindruck über das Ausmaß der jeweiligen Regioselektivitäten (siehe Abschnitt 4.3.3). Dieses Verhältnis lag für die obigen Ansätze im Bereich von 3,3 bis 5,7. Das Höchste wurde bei Carboxymethylstärke **16.8** und das Niedrigste bei **16.1** gefunden. Obwohl die Hydroxylgruppe an C-2 bevorzugt substituiert wird, sind die erreichten Regioselektivitäten nicht überragend. Es wurde in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, dass die Ansätze in Methanol aufgrund der nur schlecht möglichen Reaktionsführung – wenn auch nahezu ausschließlich native Stärken eingesetzt wurden – keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte. Bei der Analyse der Substituentenverteilung wird diese mangelnde Reproduzierbarkeit ebenfalls deutlich, die Ansätze **16.1**, **16.3**, **16.6** und **16.7** haben trotz ihrer nahezu identischen molaren Ansatzgrößen keine übereinstimmenden Substitutionsmuster. Die Verhältnisse der partiellen Substitutionsgrade schwanken hier zwischen 3,3 und 5,2. In der Literatur wird von Heinze et al. hingegen von einer hohen Reproduzierbarkeit bei der Carboxymethylierung von Kartoffelstärke in Methanol berichtet [C19].

Substitutionsmuster in Ethanol

Bei den Synthesen in Ethanol wurde sowohl Abbaustärken als auch native Wachsmaisstärken eingesetzt und Substitutionsgrade zwischen 0,22 und 1,18 erzielt. Aus Abbildung 6-4 wird ersichtlich, dass die Carboxymethylstärken aus Ethanol bei ähnlichen molaren Verhältnissen einen höheren C-6-Anteil am Substitutionsmuster haben als die Derivate aus Methanol.

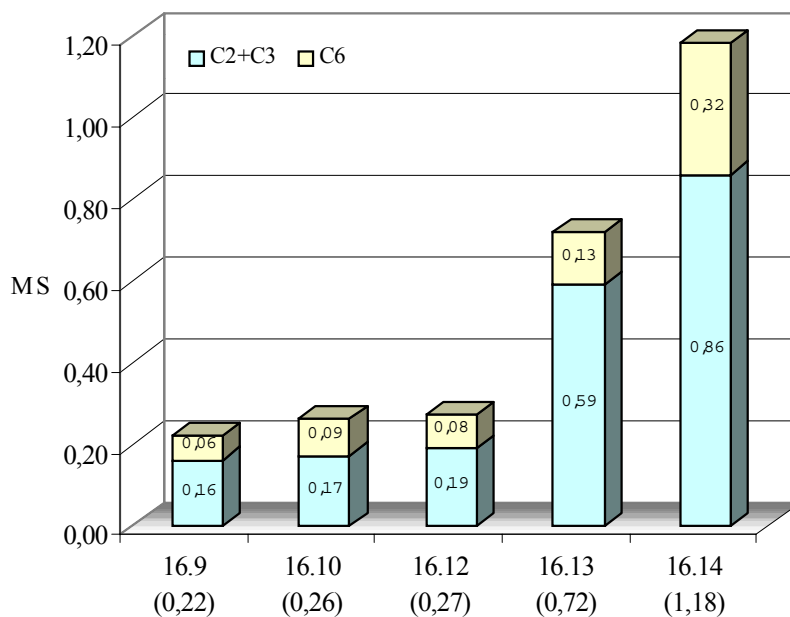


Abb. 6-4. Substitutionsmuster der in Ethanol synthetisierten Carboxymethylstärken.

Der C-3-Anteil am Substitutionsgrad lag bei allen Carboxymethylstärken aus Ethanol bei ca. 10 %, der C-6-Anteil schwankte zwischen 20 und 35 % und der C-2-Anteil zwischen 55 und 70 %. Daher ergab sich für alle Ansätze folgende Reaktivitätsabstufung der Anhydroglucosehydroxylgruppen: C2>C6>C3. Die (C2+C3)/C6-Verhältnisse lagen insgesamt zwischen 1,9 und 4,5, wobei Ansatz **16.13** das höchste und Ansatz **16.10** das niedrigste Verhältnis hervorbrachte. Vergleicht man in der obigen Abbildung die Ansätze **16.9**, **16.10** und **16.12** miteinander so ist kein gravierender Unterschied erkennbar. Insbesondere **16.10** und **16.12** weisen den gleichen Substitutionsgrad und das gleiche Substitutionsmuster auf. Da **16.10** aus Abbaustärke **1.1** synthetisiert wurde und **16.12** aus nativer Wachsmaisstärke, kann davon ausgegangen werden, dass bei den Umsetzungen in Ethanol die Natur bzw. Überstruktur der Stärke (granulär oder weitgehend amorph) keinen wesentlichen Einfluss auf die Verteilung der Substituenten innerhalb der Monomerbausteine zu haben scheint. Bei den Ansätzen **16.13** und **16.14** wurden trotz der hohen Substitutionsgrade keine vergleichsweise erhöhten C-6-Anteile gemessen, und das obwohl zusätzlich gegenüber den anderen Synthesen höhere Alkalimengen eingesetzt wurden.

Substitutionsmuster in Isopropanol

Die Umsetzungen in Isopropanol wurden ausschließlich mit partiell abgebauten Stärken durchgeführt. Die Substitutionsgrade der dabei erhaltenen Carboxymethylstärken lagen zwischen 0,50 und 1,49. Diagramm 6-5 zeigt, dass die Synthesen in Isopropanol insgesamt zu einer heterogeneren Verteilung der Substituenten führten als bisher, d.h. es wurde neben der Reaktivitätsreihenfolge $C2 > C6 > C3$ die Abstufung $C6 \geq C2 > C3$ gefunden.

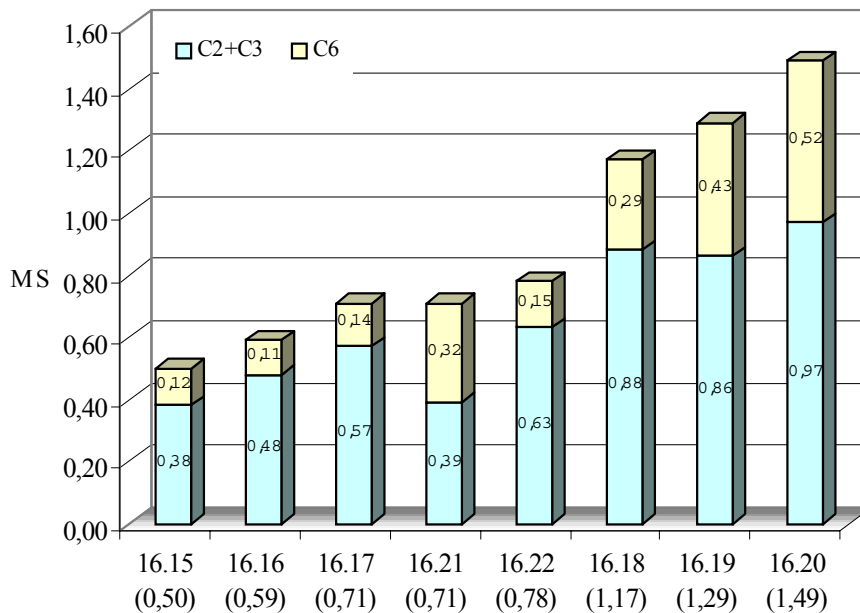


Abb. 6-5. Substitutionsmuster der in Isopropanol synthetisierten Carboxymethylstärken.

Der Anteil der partiellen Substitution an C-Atom 6 lag insgesamt zwischen ca. 45 und 20 %, der an C-3 zwischen ca. 9 und 12 % und der an C-2 schließlich zwischen ca. 45 und 70 %. Für die $(C2+C3)/C6$ -Verhältnisse ergaben sich Werte zwischen 1,2 und 4,4. Relativ hohe Regioselektivitäten bezüglich einer Substitution an C-2 wurden, wie die Ansätze **16.17** und **16.22** belegen, für äquimolare Verhältnisse von Stärke, Natriumhydroxid und Natriumchloracetat gefunden. Eine Ausnahme bildet hierbei Ansatz **16.16**, indem trotz höherer molarer Zugaben an Chloressigsäure und Natriumhydroxid das größte $(C2+C3)/C6$ -Verhältnis erreicht wurde. Obwohl die molaren Verhältnisse mit denen von **16.18** vergleichbar waren, wurde nur ein wesentlich geringerer Substitutionsgrad erreicht. Am einheitlichen Substitutionsmusters von Carboxymethylstärke **16.17** und **16.22** ist zu erkennen, dass eine Reduktion des Ausgangsmaterials vor der Veretherung keinen Einfluss auf die Regioselektivität der Carboxymethylierung hat. Bei den Ansätzen **16.22**, **16.18**, **16.19** und **16.20** führten die kontinuierlichen Anhebungen der molaren Mengen von Chloressigsäure und Natriumhydroxid nicht nur zu erhöhten Substitutionsgraden, sondern auch zu verringerten $(C2+C3)/C6$ -Verhältnissen. Die stetige Abnahme dieses Verhältnisses von 4,2 auf 1,9 ist einerseits auf die steigenden Substitutions-

grade zurückzuführen, denn durch eine fortschreitende Blockierung der reaktiveren OH-Gruppe an C-2 müssen weitere Substituenten zunehmend die Position an C-6 angreifen. Andererseits hat die zunehmende Alkalimenge (von äquimolar bis zum vierfachen Überschuss) eine Steigerung der relativen Reaktivität der Hydroxylgruppe an C-6 zur Folge, da nun die gegenüber der Hydroxylgruppe an C-2 geringere Acidität durch den Überschuss an Natriumhydroxid kompensiert werden kann. Diese Annahme wird durch einen Vergleich der beiden Substanzen **16.18** und **16.21** bestätigt, hier führte eine Verdoppelung der Basenzugabe bei Ansatz **16.21** gegenüber **16.18** zu einer Gleichstellung der Reaktivitäten der primären und sekundären OH-Gruppen.

In der Literatur findet man Untersuchungen über die Substitutionsmuster von Carboxymethylstärken, welche aus nativen Stärken in Isopropanol hergestellt wurden. Für hohe Substitutionsgrade (d.h. MS von 1,0 und 1,5) wurden (C2+C3)/C6-Verhältnisse in Höhe von 2,1 gefunden [117, 166]. Für mittlere Substitutionsgrade im Bereich von 0,33 bis 0,45 wurden Verhältnisse von 4,8 bis 6,5 beschrieben [158].

Substitutionsmuster in Aceton

In Aceton wurden nur wenige Carboxymethylierungen durchgeführt. Nahezu allen Ansätzen, mit Ausnahme von **16.23**, lagen native Stärken als Ausgangsmaterial zugrunde. Es wurden Substitutionsgrade in Höhe von 0,11 bis 0,55 erreicht. Nur drei der in Aceton synthetisierten Carboxymethylstärken wurden hinsichtlich ihres Substitutionsmusters analysiert (Abb. 6-6).

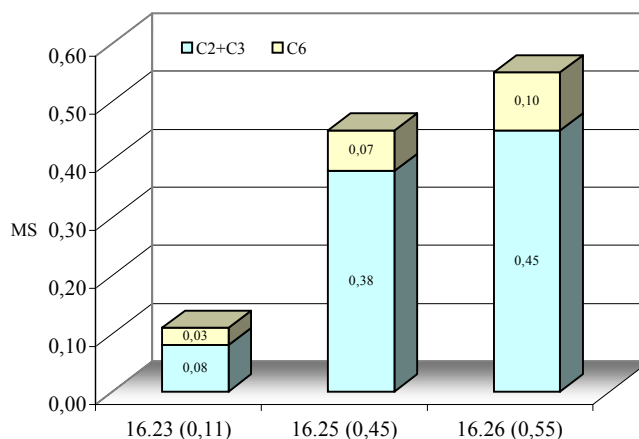


Abb. 6-6. Substitutionsmuster der in Aceton synthetisierten Carboxymethylstärken.

Der Anteil der partiellen Substitution an C-3 lag im Durchschnitt unter 10 %, der an C-6 zwischen 27 und 15 % und an C-2 zwischen 60 und 75 %. Damit ergeben sich für die Synthesen in Aceton ähnlich hohe C-2-Regioselektivitäten wie für die Umsetzungen in Methanol. Für den gesamten Substitutionsbereich gilt die Reaktivitätsreihenfolge C2>C6>C3. Bei Ansatz **16.26** wurden gegenüber Ansatz **16.25** geringfügig die zugegebenen Mengen an Natriumhydroxid und Monochloressigsäure erhöht, wodurch sich bei gleicher Reaktionseffizienz das (C2+C3)/C6-Verhältnis von 5,4 auf 4,5 erniedrigte. Bei Ansatz **16.23** wurde aufgrund der schlechten Reaktionskontrolle nicht nur eine minimale Reaktionseffizienz erreicht, sondern

auch das geringste (C2+C3)/C6-Verhältnis in Höhe von 2,7 gemessen. Allerdings kann die Abweichung im Substitutionsmuster bei solch geringen Substitutionsgraden in der Messgenauigkeit der Bestimmungsmethode begründet liegen.

Substitutionsmuster in Dimethylsulfoxid

In DMSO wurden aus Abbaustärken carboxymethylierte Produkte mit einem Substitutionsgrad von 0,21 bis 1,22 erhalten. Neben der C2>C6>C3 Reihenfolge wurde hier auch die Reaktivitätsabstufung C6>C2>C3 gefunden. In Abbildung 6-7 ist der Anteil der jeweiligen partiellen Substitutionsgrade am Gesamtsubstitutionsgrad dargestellt.

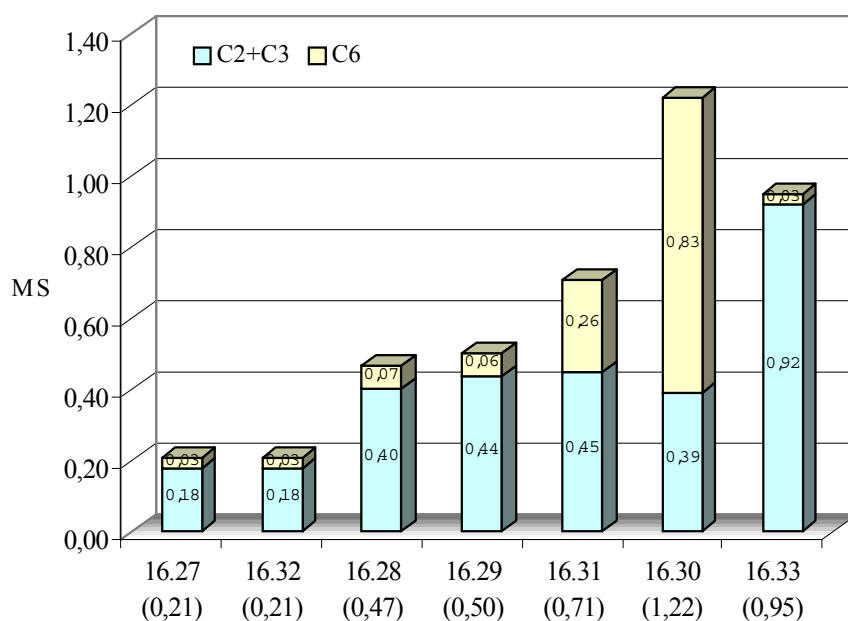


Abb. 6-7. Substitutionsmuster der in DMSO synthetisierten Carboxymethylstärken.

Der partielle Substitutionsgrad an C-2 lag zwischen 25 und 80 % des gesamten Substitutionsgrades, der auf die Substitution an C-3 entfallende Anteil lag zwischen 7 und 12 % und der Anteil an C-6 zwischen 12 und 68 %. Die (C2+C3)/C6-Verhältnisse lagen zwischen 0,47 und 7,3; bei Ansatz **16.33** wurde wie unten erläutert sogar ein Verhältnis von 30,7 erreicht. Die Carboxymethylstärken **16.27** und **16.32** belegen aufgrund ihres identischen Substitutionsgrades und -musters erneut, dass eine Reduktion der terminalen Aldehydfunktionen der partiell abgebauten Stärken keinen Einfluss auf die Reaktivität der Hydroxylgruppen hat. Bei der Reaktion **16.32** wurde reduzierte Abbaustärke unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei **16.27** eingesetzt. Von Ansatz **16.28** zu **16.30** und von Ansatz **16.29** zu **16.31** wurden jeweils nur die molaren Mengen an Natriumchloracetat erhöht, die restlichen Parameter blieben konstant. Die Erhöhung der Natriumchloracetat-Zugabe führte in beiden Fällen zu einem höheren Gesamtsubstitutionsgrad und zu einem stark verringertem (C2+C3)/C6-Verhältnis.

Insgesamt weisen die Produkte aus DMSO in ihrem Substitutionsmuster die größte Heterogenität auf. Zum einen konnten bei geringen und mittleren Substitutionsgraden hohe Regioselektivitäten bezüglich einer Substitution an C-2 erreicht werden, andererseits waren aber insbesondere bei hohen Substitutionsgraden durch eine Variation der molaren Verhältnisse der Ausgangsmaterialien umgekehrte Regioselektivitäten möglich. Die ungewöhnlich hohe partielle Substitution an C-6 wurde bereits bei der Carboxymethylierung nativer Stärken mit sehr hohen molaren Überschüssen an Natriumhydroxid und Natriumchloracetat beobachtet [158].

Die in dem obigen Diagramm enthaltene Carboxymethylstärke **16.33** stellt einen Sonderfall dar, da hier das vorliegende Substitutionsmuster durch Tritylierung der primären Hydroxylgruppe am C-6-Atom erzwungen wurde. Ein solcher Syntheseweg ist notwendig, wenn das erhaltene Produkt eine äußerst hohe Regioselektivität aufweisen soll, welche durch normale Synthesevariationen in diesem Maße nicht realisierbar ist. Eine 6-O-Tritylierung von Polysacchariden ist eine seit langem bekannte Methode zum Blockieren bzw. Schützen von primären OH-Gruppen [167, 168]. 6-O-Tritylstärke ist in DMSO löslich und kann weiter umgesetzt werden. Auf diese Weise wurde 6-O-Tritylstärke in DMSO mit Natriumchloracetat unter Zugabe von Natriumhydroxid erfolgreich umgesetzt. Die so erhaltene 2,3-O-Carboxymethyl-6-O-tritylstärke wurde bei der Probenvorbereitung für die NMR-spektroskopische Charakterisierung detrityliert und das Substitutionsmuster bezüglich des Carboxymethylrestes in aufgeklärt. Für präparative Zwecke lässt sich ohne nennenswerten Abbau des Polysaccharid-Grundgerüsts die Tritylgruppe durch saure Hydrolyse in kaltem Methanol oder Ethanol entfernen [158]. In neueren Arbeiten wurden Tritylierungen von Stärke mit Monoethoxytripenylmethylchlorid sowohl in N,N-Dimethylacetamid/Lithiumchlorid als auch in DMSO durchgeführt. Das 6-O-geschützte Produkt wurde anschließend in DMSO carboxymethyliert [169]. Derart substituierte Stärkederivate können als Referenzsubstanzen zur Entwicklung neuer Analysemethoden dienen oder als pharmazeutische Bezugsgrößen für Struktur-Wirkungs-Beziehungen benötigt werden. Eine über dem Umweg der Schutzgruppentechnik geführte industrielle Produktion von O-2-carboxymethylierter Stärke scheint nicht besonders vorteilhaft, zumal wie unten gezeigt eine bereits ausreichend hohe O-2-Selektivität in wässriger Lösung dank des in dieser Arbeit etablierten Eintopfverfahrens mit einem geringerem Synthesaufwand möglich ist.

Substitutionsmuster in Wasser

In Wasser wurden nach den Umsetzungen Substitutionsgrade von 0,18 bis 1,44 erreicht, derart hohe Substitutionen wurden in wässrigen Systemen mit nur einem Carboxymethylierungsschritt bisher noch nicht realisiert. Als Ausgangsmaterial kam bis auf Ansatz **16.35** partiell abgebaute Wachsmaisstärke zum Einsatz. Bei allen Reaktionen wurde die Reaktivitätsreihenfolge C2>C6>C3 gefunden. Die Abbildung 6-8 zeigt die Verteilung der Substituenten mit steigendem Substitutionsgrad.

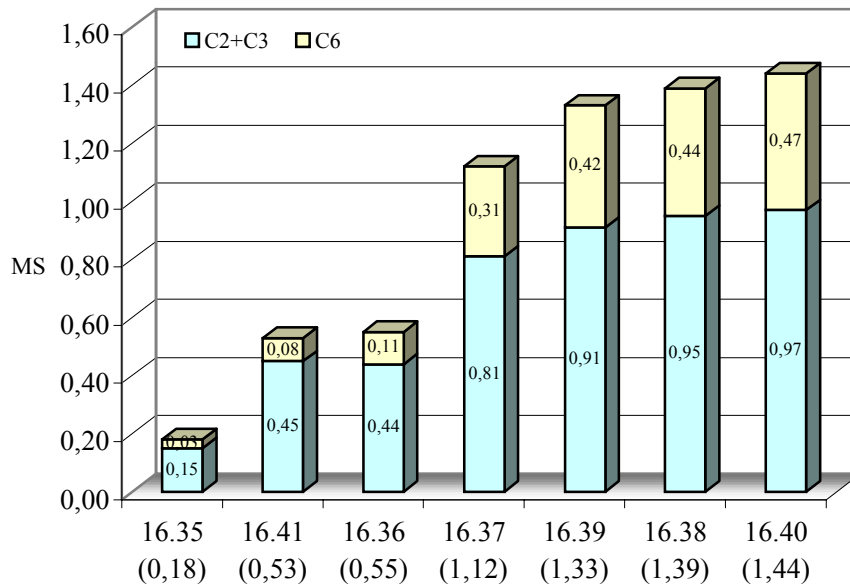


Abb. 6-8. Substitutionsmuster der in Wasser synthetisierten Carboxymethylstärken.

Insgesamt wurden (C2+C3)/C6-Verhältnisse in einem Bereich von 2,1 bis 5,6 erzielt. Bei den höher substituierten carboxymethylstärken ($MS > 1$) wurden trotz unterschiedlicher molarer Verhältnisse nahezu gleiche Verteilungsmuster gefunden, eine überproportionale Steigerung der Chloressigsäure-Zugabe von Ansatz **16.38** zu **16.39** hatte weder eine Erhöhung des Substitutionsgrades noch einen Anstieg des C-6-Anteils zur Folge. Die höchsten partiellen Substitutionen an C-2 wurden bei Ansatz **16.35**, **16.41** und **16.36** gefunden. Hier wurden größtenteils auf Anhydroglucose bezogene äquimolare Mengen an Natriumchloracetat und Natriumhydroxid eingesetzt.

Das Substitutionsmuster der Carboxymethylstärken aus dem in Abschnitt 4.4.12 beschriebenen Eintopfverfahren wird im folgenden Abschnitt 6.2.2 ausführlich beschrieben.

Aus den gesamten Substitutionsmustern lassen sich Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Reaktivitäten der sekundären und primären Hydroxylgruppen des Stärkegerüsts ziehen. Die nachfolgende Tabelle gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Reaktivitätsabstufungen der unterschiedlichen Hydroxylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten gegenüber einer Carboxymethylierung in den verschiedenen Suspensions- bzw. Lösungsmitteln.

Tab. 6-1. Reaktivitätsreihenfolge der unterschiedlichen Stärkehydroxylgruppen in den untersuchten Lösungsmitteln.

Lösungs- bzw. Suspensionsmittel	Reaktionssystem	Reaktivitätsabstufung der OH-Gruppen an C2,C3 und C6	Bereiche von MS(C2+C3)/MS(C6)
Methanol	heterogen	C2>C6>C3	3,3...5,7
Ethanol	heterogen	C2>C6>C3	1,9...4,5
Isopropanol	heterogen	C2>C6>C3 C2≥C6>C3	1,2...4,4
Aceton	heterogen	C2>C6>C3	2,7...5,4
DMSO	homogen (inkl. Schutzgruppentechnik)	C2>C6>C3 C2>C6≥C3 C2>C3>>C6 C6>C2>C3	0,47...7,3 (30,7)
Wasser	heterogen/homogen	C2>C6>C3	2,1...5,6
Wasser	homogen (Eintopfverfahren)	C2>C6>C3 C2>C6≥C3	6,5...13,0

Die in der Tabelle enthaltenen Reaktivitätsabstufungen weisen nahezu in allen Reaktionssystemen die gleiche Reihenfolge auf. In den überwiegenden Fällen ist die Reaktivität der OH-Gruppe an C-2 am höchsten, danach folgt meist die OH-Gruppe an C-6 und schließlich die OH-Gruppe an C-3. In den Reaktionssystemen DMSO und Wasser wurde vereinzelt beobachtet, dass kein signifikanter Reaktivitätsunterschied zwischen den Hydroxylfunktionen an C-3 und C-6 bestand. Wie bereits oben erwähnt, wurde in DMSO sogar in einem Fall eine Umkehrung der vorherrschenden Regioselektivitäten beobachtet. Im gleichen Reaktionssystem konnte über Schutzgruppentechnik eine Carboxymethylierung der OH-Gruppe an C-6 verhindert werden. In Isopropanol wurde in einem Ansatz eine Gleichverteilung zwischen den Substituenten an C-2 und C-6 erreicht. Um die aufgeführten Reaktivitätsreihenfolgen untereinander vergleichen zu können, müssen die Verhältnisse der partiellen Substitutionsgrade betrachtet werden. Dies kann im Einzelnen unter Zuhilfenahme der obigen Balkendiagramme oder der tabellarischen Zusammenstellung im Anhang geschehen. Die Tabelle 6-1 gibt durch die Angabe der minimal und maximal erreichten (C2+C3)/C6-Verhältnisse einen Gesamteindruck über die Bandbreite und Höhe der erreichten Regioselektivitäten. Es ist, wie in Abschnitt 6.2.2 ausführlich erläutert, bereits zu erkennen, dass im Eintopfverfahren die höchsten C-2-Regioselektivitäten mit einer relativ schmalen Streuung über einen größeren Substitutionsbereich erzielt werden konnten.

Bei der obigen Diskussion der Reaktivitäten wurde außer Acht gelassen, dass die primäre OH-Gruppe am C-6-Atom aufgrund der verzweigten Struktur des Amylopektins nicht mit der

gleichen Häufigkeit wie die Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 für Umsetzungen zur Verfügung steht. Da aber keine relativen Geschwindigkeitskonstanten ermittelt wurden, ist diese Tatsache nur in wenigen Fällen zu berücksichtigen, d.h. eine geringfügige Korrektur in Höhe von 4...5 % fällt mitunter nur beim Vergleich der partiellen Substitutionsgrade an C-3 und C-6 ins Gewicht.

Die erhöhte Reaktivität der sekundären gegenüber den primären Hydroxylgruppen bei der Substitution von Stärken wird mehrfach in der Literatur beschrieben. Im Regelfall wurden diese Beobachtungen zur Regioselektivität bei der Funktionalisierung von nativen Stärken gemacht. In einigen Arbeiten findet man das Substitutionsmuster von heterogen synthetisierten, nativen Carboxymethylstärken beschrieben. Hier wurden insgesamt die gleichen Reihenfolgen der relativen Reaktivitäten der Hydroxylgruppen beobachtet wie in den heterogenen Synthesen dieser Arbeit, wobei die erreichten Regioselektivitäten bezüglich einer Substitution an C-2-Atom teilweise geringer waren [117, 157, 166]. Bei Synthesen in DMSO wurde allerdings bei hohen Substitutionsgraden eine vorherrschende Reaktivität der OH-Gruppe an C-6 beschrieben wurde [158]. Neben der Charakterisierung von Carboxymethylstärken wurden zahlreiche Analysen der Substitutionsmuster anderer carboxymethylierter Polyglucane publiziert. Bei der Aufklärung der partiellen Substitutionsgrade bediente man sich dort größtenteils der ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Es wurde bei Carboxymethylcellulose über breite Substitutionsbereiche hinweg nahezu ausschließlich die Reaktivitätsreihenfolge $\text{C2} > \text{C6} > \text{C3}$ gefunden [170, 171]. Teilweise wurden zusätzlich unter Zuhilfenahme statistischer Modelle relative Geschwindigkeitskonstanten der unterschiedlichen Hydroxylgruppen bestimmt [172, 173]. Bei hohen Substitutionsgraden wurden in manchen Fällen andere Reaktivitätsreihenfolgen beobachtet [174, 175, 176]. Bei Carboxymethylpullulanen war aufgrund des andersartigen Aufbaus aus 1,6-verknüpften Maltotrioseeinheiten eine Einbeziehung der relativen Häufigkeiten der freien Hydroxylgruppen nötig, unter dieser Gewichtung wurde gefunden, dass die Reaktivität der OH-Gruppen gegenüber einer Veretherung gemäß der Reihenfolge $\text{C2} > \text{C4} > \text{C6} > \text{C3}$ abnahm [177]. Die gefundenen Reihenfolgen von relativen Reaktivitäten der Carboxymethylierungsreaktion von Polyglucanen stimmen mit denen von anderen Veretherungsreaktionen größtenteils überein. Beispielsweise wurde bei der Analyse des Substitutionsmusters von Hydroxypropylstärken über ^1H -NMR und GLC-MS gefunden, dass sowohl in heterogenen als auch in homogenen Reaktionssystemen die Reihenfolge der relativen Reaktivitäten $\text{C2} > \text{C3} > \text{C6}$ beträgt [178, 179]. Die gleichen Reihenfolgen wurden bei kationischen Stärken (O-(2-hydroxy-3-trimethylammoniumpropyl)ether) und Methylstärken beschrieben [180, 181]. Hingegen wurde bei den als Plasmaersatzmitteln geeigneten Hydroxyethylstärken eine geringfügig verschiedene Reaktivitätsabstufung $\text{C2} > \text{C6} > \text{C3}$ ermittelt [119, 182].

Warum in basischen Veretherungen die sekundäre OH-Gruppe an C-Atom 2 reaktiver ist als die primäre OH-Gruppe an C-6 ist noch nicht vollständig verstanden. Eine wahrscheinliche Ursache wäre die höhere Acidität der Hydroxylgruppe an C-2 aufgrund der Nähe zum anomeren Zentrum. Dieses Argument wird unterstützt durch die steigende Regioselektivität der C-2-

Substitution bei einer Verringerung der Basenzugabe. Auf dieser Basis lässt sich auch gleichzeitig die erhöhte Regioselektivität bei Oxiran-Additions-Reaktionen gegenüber Williamson Veretherungen erklären, denn bei der Addition eines Oxirans bedarf es nur katalytischer Mengen an Base. Zusätzlich scheinen stereoelektronische Effekte einen Einfluss zu haben, da das eben beschriebene Verhalten in α -verknüpften Polyglucanen ausgeprägter ist als in β -verknüpfter Cellulose [179].

Insgesamt scheint das grundsätzliche Verteilungsmuster der Substituenten innerhalb der Anhydroglucoseeinheiten in erster Näherung unabhängig davon zu sein, ob die Reaktion homogener oder heterogener Natur war. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass bei partiell abgebauten Stärken zumindest die Kontinuität der Regioselektivität sowie das Ausmaß der C-2-Substitution durch die Reaktionsführung bzw. der Art der Reaktion beeinflussbar ist. Unumstritten ist der Einfluß der molaren Verhältnisse auf das Substitutionsmuster, durch eine geschickte Wahl der Parameter kann hier in einem gewissen Maße die Verteilung der Substituenten gesteuert werden. Wie in Abschnitt 6.3 und 6.2.2 erläutert wird, spielen das Lösungsmittel und die Art der Reaktionsführung (ob homogen oder heterogen) eine entscheidende Rolle für die Verteilung der Substituenten entlang des polymeren Grundgerüsts. Dabei ist neben der Provenienz der Stärke die Art und die Dauer der Vorbehandlung von entscheidender Bedeutung. Die im Zuge der Carboxymethylierung fortschreitende Substitution beeinflusst ebenso den weiteren Verlauf und die Position der nachfolgenden Substituenten. Inwiefern sich die Temperatur und die Reaktionsdauer auf die Verteilung der Substituenten auswirken, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

6.2.2 Vorteile des etablierten Eintopfverfahrens

Zur Erreichung der erforderlichen physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften eines auf Stärke basierenden Plasmaersatzstoffes müssen vielfältige Modifizierungen der Stärke durchgeführt werden. Zunächst muss die Stärke in möglichst einheitlicher Form einem niedrigen mittlerem Molekulargewicht in einem Bereich von ca. 70000 bis 200000 g/mol angepasst werden. Nach einer eventuellen Veränderung des Verzweigungsgrades erfolgt eine Reduktion der reduzierenden Enden, um die ansonsten später ablaufenden Nebenreaktionen im Alkalischen zu unterbinden. Schließlich soll die derartig vorbehandelte Stärke je nach Verwendungszweck bzw. erwünschter physiologischer Funktion entsprechend carboxymethyliert werden. Der dadurch erreichte molare Substitutionsgrad liegt vorzugsweise in einem Bereich von 0,05...0,5; zusätzlich ist ein hohes C2/C6-Verhältnis zu erreichen. Hierzu wurde ein Verfahren entwickelt, welches vorteilhafterweise eine sequentielle Durchführung sämtlicher Modifikationsschritte ohne Isolierung der Zwischenprodukte in einem Reaktor ermöglicht. Unter dem Gesichtspunkt der klinischen Anwendung des Produkts werden die einzelnen Verfahrensschritte nachfolgend im Vergleich zum bisherigen Stand der Technik erörtert.

Hydrolyseschritt

In dieser Arbeit wurden nahezu alle Carboxymethylierungen mit partiell abgebauten Stärken durchgeführt. Aufgrund der anwendungsbezogenen Anforderung stellt die Molekulargewichtsanpassung eine wesentliche Voraussetzung für die nachfolgenden Syntheseschritte dar. Es galt zu überprüfen, inwieweit durch die Hydrolyse der zugrundeliegenden Stärke die Reaktionsführung und die Reaktivität bei den weiteren Umsetzungen sowie das spätere Substitutionsmuster beeinflusst werden. Der Einheitlichkeit wegen wurde bei den meisten Umsetzungen im Eintopfverfahren bereits teilhydrolysierte Stärke einer größeren Charge eingesetzt, die daraus synthetisierten Carboxymethylstärken unterschieden sich somit nur noch in dem Maß der Funktionalisierung. Dadurch wurde eine Korrelation zwischen den jeweiligen Substitutionsgraden und den Ergebnissen der physikochemischen und pharmakologischen Untersuchungen ermöglicht. War ein geringfügiger Unterschied im mittleren Molekulargewicht zweier Ansätze für die späteren Charakterisierungen unwichtig, so wurde die Hydrolyse der jeweils eingesetzten Stärke als erster Schritt des Eintopfverfahrens in einem speziell angefertigten Reaktor durchgeführt. Die Hydrolysen verliefen problemlos mit jeder eingesetzten Stärkesorte. Die einzelnen Ansätze unterschieden sich jedoch teilweise im Temperaturverlauf, der Hydrolysedauer und der eingesetzten Stärke- und Säuremengen.

Ein hydrolytischer Abbau der glycosidischen Bindungen wird in der Regel säure- oder enzymkatalysiert durchgeführt. Bei der Herstellung von Hydroxyethylstärken als Blutvolumenersatzmittel werden zur notwendigen Molekulargewichtsanpassung beide Verfahren in der Patentliteratur beschrieben [7, 183]. Dabei ist vornehmlich auf eine möglichst enge Molekulargewichtsverteilung bzw. geringe Polydispersität zu achten, d.h. es sind insbesondere die hoch- und niedermolekularen Fraktionen zu eliminieren bzw. zu minimieren. Im Zusammenhang mit Hydroxyethylstärke besteht der Verdacht, dass solche hochmolekularen und zusätzlich überdurchschnittlich hoch substituierten Fraktionen für zahlreiche Nebenwirkungen verantwortlich sind [7]. Es muss aber eingeräumt werden, dass die genaue Art der für die mannigfaltigen Nebenreaktionen verantwortlichen HES-Fraktionen aus dem polydispersen HES-Gemisch noch nicht bekannt ist [16].

Heutzutage hat sich bei der Herstellung von Plasmaersatzmitteln die chemische, saure Hydrolyse durchgesetzt. Üblicherweise wird hierbei, um die Viskosität des Ansatzes zu senken, zunächst die eingesetzte native Stärke in einem Slurry-Verfahren unterhalb der Verkleisterungstemperatur mit Säure vorbehandelt. Anschließend erfolgt die Hydroxyethylierung dieser dünnkochenden Stärke und erst dann wird die endgültige Molekulargewichtseinstellung sowie die Aufarbeitung des Produktes durchgeführt [29]. Die für klinische Produkte gebräuchlichere Säurehydrolyse wird nicht nur aus prozesstechnischen Gründen favorisiert. Zusätzlich besteht der Verdacht, dass durch eine ursprüngliche enzymatische Hydrolyse des Ausgangsmaterials mit biotechnischen α -Amylasen die für die körpereigenen α -Amylasen wichtigen „Soll-Bruchstellen“ des Stärkederivates bereits gespalten werden, wodurch eine Eliminierung des Plasmaersatzmittels verzögert bzw. erschwert wird. Letztlich soll diese Art der Molekularge-

wichtsanpassung somit zu vermehrten Speicherphänomenen im Organismus führen. Eindeutige experimentelle Befunde bzw. klinische Untersuchungen bezüglich dieses Phänomens existieren jedoch nicht.

Bei der Säurehydrolyse werden bevorzugt Mineralsäuren eingesetzt, wobei Salzsäure die höchsten Hydrolyseraten erzielt [184]. Liegen die Stärkemoleküle erst aufgrund eines gewissen Hydrolysegrades und einer bestimmten Temperatur nahezu isoliert in wässriger Lösung vor, so sollte die säurekatalytische Spaltung der glycosidischen Bindung überwiegend zufällig verlaufen. In Hydrolysestudien an Amylose und Amylopektin wurde aber eine geringfügig höhere Säurestabilität der 1,6-glycosidischen Bindung gefunden [42]. Diese Tatsache konnte durch eigene Messungen an den partiell hydrolysierten Stärken bestätigt werden, wie in Abschnitt 4.4.2 und 6.4 ersichtlich nahm der Verzweigungsgrad der Stärken mit abnehmenden Molekulargewicht leicht zu.

In der Literatur werden auch weniger konventionelle Verfahren zum Abbau von Stärken beschrieben. Es existieren beispielsweise Verfahren zum Ultraschall-Abbau von Stärken oder über einen Abbau durch Hochdruckhomogenisation, welche beide zu engen Molekulargewichtsverteilungen führen sollen [185, 186]. Des Weiteren wird ein sog. „Semi-dry“-Verfahren beschrieben, in welchem die Stärke in einem Mikrowellenreaktor mit Salzsäure besprüht wird und auf diese Weise mit minimiertem Energie- und Wassereinsatz hydrolysiert wird [187].

Da in der vorliegenden Arbeit das gewünschte Produkt zunächst aufgrund möglichst hoher Glykogenverwandtschaft einen hohen Verzweigungsgrad aufweisen sollte, wird auf die Option der Stärkeentzweigung durch entsprechende Enzyme (siehe Abschnitt 4.4.12) im Folgenden nicht näher eingegangen. Nach den durchgeführten Hydrolysen wurde der jeweilige Ansatz neutralisiert bzw. ein pH-Wert zwischen 8 und 9 eingestellt. Danach konnte wahlweise bei der noch vorherrschenden Temperatur (60 °C) oder nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit der Reduktion begonnen werden.

Reduktionsschritt

Generell kann eine Reduktion der terminalen Aldehyd-Funktionen in Polysacchariden durch eine Reihe von Reagenzien wie Natriumborhydrid, Schwefelwasserstoff, Blausäure, etc. ermöglicht werden [188, 189]. Dies kann beispielsweise geschehen, um das Molekulargewicht zu bestimmen, um das Polymer gegenüber einem alkalischen Abbau zu stabilisieren oder um beispielsweise reduktive Kupplungen mit anderen Reagenzien durchzuführen.

Bei einer Reihe von Umwandlungen der Cellulose ist eine zuvorige Reaktivitätssteigerung bzw. Strukturänderung durch eine langanhaltende Alkalisierung vonnöten. Hierbei wurde neben der Verfärbung ein allmählicher Abbau der Alkali-Cellulose beobachtet [190]. Dieser überwiegend bei höheren Temperaturen (ca. 100 °C) stattfindende Abbau beginnt am reduzierenden Ende der Cellulose-Moleküle. Hierbei kommt es durch eine Reihe von Umlagerungen zu einer schrittweisen Abspaltung von Monomereinheiten, welche wiederum weiter zu unter-

schiedlichen Carbonsäuren fragmentieren [191]. Da diese sog. Peeling-Reaktion vom reduzierenden Kettenende fortschreitet, kann man sie unterbinden, wenn man die endständigen Aldehydgruppen zum Alkohol reduziert oder aber z. B. durch Polysulfid zur Aldonsäure aufoxidiert. Ein der Cellulose ähnliches Verhalten ist im alkalischen Milieu auch bei anderen Polylucanen einschließlich Stärke zu beobachten. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen wurden zwar weder besonders hohe Temperaturen noch lange Alkalisierungszeiträume eingehalten, die als Nebenreaktion zu bezeichnenden Verfärbungen gingen jedoch eindeutig von den reduzierenden Enden der Stärkemoleküle aus. Ein Indiz dafür war die vorzeitig eintretende und intensivere Verfärbung von partiell abgebauten Stärken gegenüber den nativen Stärken in gleich konzentrierten alkalischen Lösungen. Der Beweis erfolgte schließlich durch die Entfernung der reduzierenden Enden durch eine Reduktion mit Natriumborhydrid. Die Abwesenheit der terminalen Aldehydfunktionen konnte durch kolorimetrische und NMR-spektroskopische Messungen bestätigt werden. Bereits bei den Synthesen in Isopropanol und DMSO sowie in den einstufigen Reaktionen in wässriger Lösung konnte exemplarisch gezeigt werden, dass bei der Verwendung von derartig reduzierter Abbaustärke keine Verfärbungen mehr bei den alkalischen Umsetzungen zu beobachten waren. Ferner konnte in Abschnitt 5.4 und 5.6 belegt werden, dass die Stärke nach der Reduktion hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Derivatisierungen und ihrem Verhalten gegenüber einem enzymatischen Abbau keine Unterschiede zu unbehandelter Stärke zeigte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Reduktionsschritt stets bei allen Carboxymethylierungen im Eintopfverfahren der partiellen Hydrolyse nachgeschaltet. Durch die Reduktion der terminalen Aldehydfunktionen konnte eine Reihe wesentlicher Verbesserungen erreicht werden. Da keine Reinigungsschritte zur Entfärbung des Stärkederivates mehr nötig waren, wurde die Aufarbeitung wesentlich vereinfacht und dadurch weniger arbeits- und kostenintensiv. Das bei der Reduktion entstandene Natriumborat konnte restlos durch Dialyse entfernt werden. Bedingt durch die gewählte Reihenfolge Hydrolyse, Reduktion und Carboxymethylierung wiesen die so dargestellten Carboxymethylstärken keinerlei reduzierende Enden mehr auf und waren demzufolge mit einer hohen Stabilität gegenüber hohen Alkalikonzentrationen gekennzeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass Lösungen aus solchen Carboxymethylstärken bei physiologischem pH und angepasstem Elektrolytenprofil selbst nach dem Autoklavieren und längerer Lagerung keine Gelbfärbung entwickelten.

In der Literatur wird der alkalische Abbau von Stärken und die damit im Zusammenhang stehende Verfärbung nur unzureichend erwähnt. Ceh [192] beobachtete bei der alkalischen Carboxymethylierung von nativen Stärken eine Abnahme der Molmassen bei zunehmender Reaktionsdauer. Das Problem der Verfärbung wird einzig in der Patentliteratur über stärkebasierte Plasmaersatzmittel beschrieben. Als Lösungsvorschläge für die Entfärbung nach der alkalischen Veretherung werden hier zumeist aufwendigere Aufarbeitungsverfahren wie Aktivkohle- und Ionenaustauscherbehandlungen sowie mehrfache Ultrafiltration aufgeführt [26, 27, 28, 193]. In wenigen Fällen wird die Verwendung von Natriumborhydrid bei der Darstel-

lung von Stärkederivaten für den klinischen Einsatz beschrieben. Dort wurden jedoch lediglich unbehandelte, native Stärken oder dünnkochende Stärken vor einer alkalischen Hydroxyethylierung mit NaBH_4 reduziert. Bei der Herstellung von Plasmaersatzmitteln wird eine derart erhaltene Roh-HES entsprechend ihrem Verwendungszweck säurehydrolytisch einem bestimmten Molekulargewicht angepasst und anschließend aufgearbeitet. Im späteren Produkt sind schließlich wieder vermehrt reduzierende Enden vorhanden, was zur Folge hat, dass die derzeitigen kommerziellen HES-Lösungen eine gewisse pH-Sensibilität aufweisen. Um die ansonsten bei der Sterilisation auftretenden Verfärbungen zu unterbinden, weisen die auf dem Markt befindlichen HES-Lösungen einen schwach sauren pH-Wert (6,0...6,5) auf. Das Phänomen der Verfärbung ist insbesondere bei niedermolekularen HES-Spezifikationen zu beobachten und scheint bei Vorhandensein von metabolisierbaren Anionen (wie z.B. Malat) in sog. elektrolytenbalancierten Lösungen sogar verstärkt aufzutreten, was teilweise zu einer noch unphysiologischeren pH-Wert-Einstellung solcher Produkte führte. Diese systemimmanenten Nachteile der herkömmlichen Herstellungsverfahren können durch die in dieser Arbeit entwickelte Vorgehensweise beseitigt werden. Durch die Sequenz des neuen Herstellungsverfahrens konnte sichergestellt werden, dass das am Ende resultierende Stärkederivat, wie bereits oben beschrieben, eine außerordentliche pH-Kompatibilität aufweist.

Die Reduktion erfolgte in der Regel über Nacht, um sicherzustellen, dass sämtliche Aldehydfunktionen reduziert sind und überschüssiges Borhydrid zersetzt worden ist. Die für die Reduktion notwendige Borhydridmenge stieg teilweise bei einer Konzentrationsänderung der Abbaustärke von 10 auf 30 % (w/v) aufgrund der Viskositätserhöhung und der dadurch bedingten schlechteren Durchmischbarkeit überproportional an. Für die nachfolgende Funktionalisierung wurde der Ansatz nach erfolgter Reduktion mit Natriumhydroxid versetzt. Hierbei wurde bereits durch die Alkalisierung aus den mitunter noch schwach getrübbten Lösungen zumeist ein klarer, homogener Ansatz. Dank der Reduktion können zur Aktivierung der Stärkehydroxylgruppen beliebig lange Alkalisierungszeiträume gewählt werden. In der Regel betrug die Dauer einer solchen Vorbehandlung mit Natriumhydroxid ca. eine Stunde.

Carboxymethylierung

Die Ergebnisse der Carboxymethylierungsversuche wurden bereits diskutiert und mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren verglichen. Im Folgenden soll erweiternd verdeutlicht werden, dass die im Eintopfverfahren durchgeführten Carboxymethylierungen aufgrund der optimierten Prozessführung hinsichtlich Reaktionseffizienz und Regioselektivität wesentliche Verbesserungen gegenüber den herkömmlichen Herstellungsweisen darstellen.

Der Veretherung lag zunächst eine Lösung aus einer partiell abgebauten, reduzierten und alkalisierten Stärke zugrunde. Zu dieser in der Reaktivität gesteigerten kolloidalen, z.T. noch opaleszierenden Stärke-Lösung wurde bei vorzugsweise 60 °C unter Durchmischung eine entsprechende Menge an Natriumchloracetat gegeben. Der Ansatz wurde für vier bis sechs

Stunden gerührt. Schließlich wurde die Carboxymethylierung durch Neutralisation der alkalischen, klaren Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 beendet.

In Abschnitt 5.4.2 wurde bereits erwähnt, dass bei einem Großteil der sequentiellen Ansätze eine unreine Charge einer partiell abgebauten Kartoffelstärke verwendet werden musste, wodurch sich Schwierigkeiten bzw. Ungenauigkeiten bei der Angabe der stöchiometrischen Verhältnisse ergaben. In Abschnitt 4.4.2 wurde erläutert, dass ein Aliquot dieser verunreinigten Rohabbaustärke dialysiert und lyophilisiert wurde. Dadurch, dass neben den Salzen und der Restfeuchte auch niedermolekulare Stärkefragmente entfernt wurden, konnte der ursprüngliche Stärkegehalt bzw. die Gesamtzahl potentiell zur Verfügung stehender Hydroxylgruppen nicht mehr rekonstruiert werden. Verlässliche numerische Angaben können lediglich bei Umsetzungen 17.1 und 17.2 gemacht werden, hier wurden verglichen mit den übrigen Carboxymethylierungen und den Literaturwerten die höchsten Reaktionseffizienzen von ca. 70 % und sehr gute Substanzausbeuten von bis zu 80 % (nach allen Verfahrensschritten) erzielt. Trotz der Einschränkung bei den übrigen Ansätzen kann insgesamt eine Aussage über die Abhängigkeit der molaren Substitution von den zugrundeliegenden Molaritäten getroffen werden. Abbildung 6-9 stellt die im Eintopfverfahren erreichten Substitutionsgrade in eine solche Beziehung.

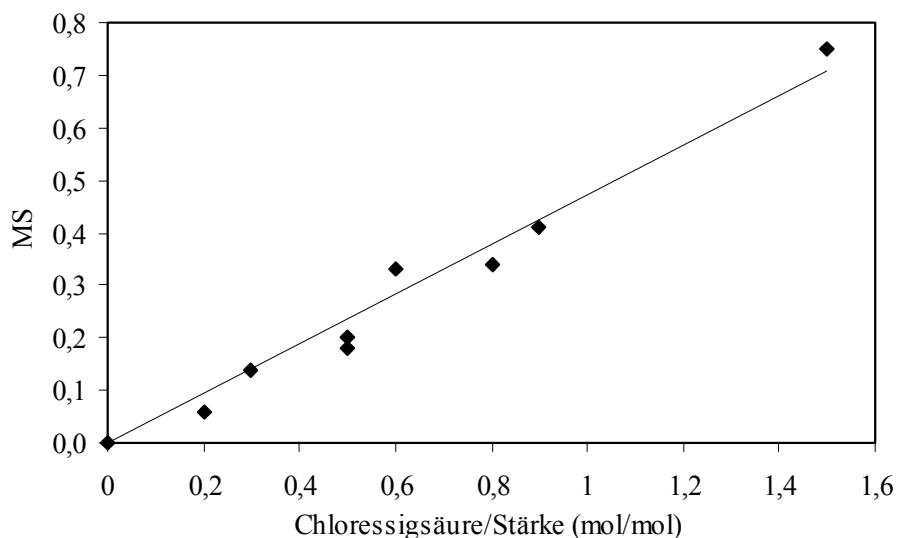


Abb. 6-9. Substitutionsgrad in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis (Synthesen in Wasser, Eintopfverfahren).

Es wird ersichtlich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den dargestellten Größen besteht. Die geringen Abweichungen von der linearen Regression lassen sich auf die teilweise unterschiedlichen Reaktionszeiten der einzelnen Ansätze zurückführen. Es wird jedoch deutlich, dass bei genauer Kenntnis der molaren Verhältnisse mit einer erstellten Eichreihe ein präzises Erreichen eines zuvor definierten Substitutionsgrades möglich sein sollte. Hinsichtlich einer zukünftigen Validierung des Verfahrens muss betont werden, dass eine entspre-

chende Eichgerade sowohl für jedes Ansatzvolumen und jede Stärkesorte als auch für die unterschiedlichen Molekulargewichte (oder zumindest gewisse Molekulargewichtsbereiche) ermittelt werden muss. Vorherige Synthesereihen mit unterschiedlichen Stärken dienen lediglich als Anhaltspunkt für eine entsprechende Dimensionierung des geplanten Ansatzes. Ergänzend zu den Carboxymethylierungen im Eintopfverfahren geben die einstufigen Synthesen in wässriger Lösung einen guten Hinweis über den weiteren Verlauf der obigen Kurve. Hier wurden wegen der größeren molaren Überschüsse wesentlich höhere Substitutionsgrade erreicht. In Abbildung 6-10 wurde eine identische Auftragung der Syntheseparameter und -ergebnisse gewählt. Obwohl hier die Ansätze mit Wachsmaisstärke statt Kartoffelstärke durchgeführt wurden und die Reaktionsmaßstäbe wesentlich kleiner waren, lassen sich gewisse Gemeinsamkeiten erkennen.

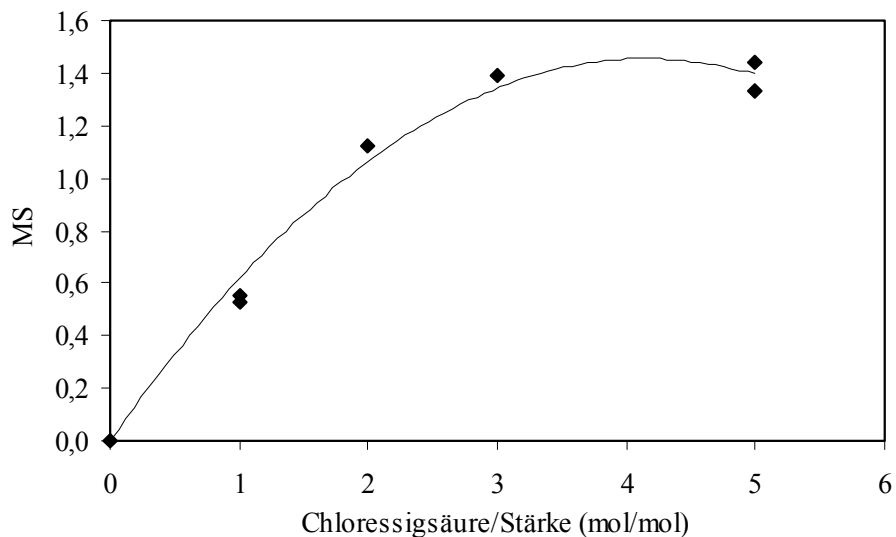


Abb. 6-10. Substitutionsgrad in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis (Synthesen in Wasser).

Unter den gegebenen Synthesebedingungen scheint ein Sättigungsverhalten zu existieren, in der bei den einstufigen Reaktionen in wässriger Lösung der maximal erreichbare Substitutionsgrad bei ca. 1,5 liegt. Der Anfangsverlauf des Graphen gleicht dem linearen Verlauf in Abb. 6-9.

Bei den gesamten Diagrammen dieser Art muss berücksichtigt werden, dass die jeweilige Alkalimenge in dem auf der Abszisse dargestellten molaren Verhältnissen nicht enthalten ist. Dies bedeutet jedoch nicht, dass ein Einfluss der Natriumhydroxidkonzentration vernachlässigbar ist. Dass sich die Alkalimenge auf die Reaktionseffizienz auswirkt wurde bereits in Abschnitt 5.4 erklärt und in 6.2.1 konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Variation des Verhältnisses von Monochloressigsäure und Natriumhydroxid in einem gewissen Rahmen das Substitutionsmuster steuern lässt. Die isolierte Betrachtung ist aber dennoch zulässig, da bei

den Synthesen größtenteils konstante Verhältnisse von 1:1 zwischen Chloressigsäure und Natriumhydroxid vorlagen.

Obwohl bereits in Abschnitt 6.2.1 ausführlich die Carboxymethylierungsversuche diskutiert wurden, wird ein Teil der Resultate zur besseren Gegenüberstellung mit dem Eintopfverfahren an dieser Stelle dargelegt. Es wurden gleichartige Diagramme von den Ergebnissen der Synthesen in den organischen Lösungsmitteln angefertigt, dort wurden jedoch größtenteils wesentlich höhere Molaritäten eingesetzt, so dass ein direkter Vergleich einiger Bemerkungen bedarf. Bei den Korrelationen der Syntheseparameter ergaben sich in den meisten Lösungsmitteln nur uneinheitliche Zusammenhänge. Die auffälligen „Ausreißer“ in solchen Auftragsungen basierten auf der mangelhaften Reaktionskontrolle, welche wiederum aus dem ungünstigen Zusammenspiel zwischen Abbaustärke, Wassergehalt und Suspensionsmittel resultierte. Neben diesen starken Abweichungen vom Trend endeten alle Kurven in einem Sättigungsbereich, welcher generell bei Substitutionsgraden von unter 50 % des theoretisch Möglichen lag. Unter den heterogenen Synthesen wurden die einheitlichsten Ergebnisse in Isopropanol erreicht. Es ergab sich nach obigem Auftragungsmuster ein nahezu linearer Anfangsverlauf der Trendlinie mit einer allmählichen Abflachung bei hohen molaren Verhältnissen (Sättigungsbereich). Bei der nachfolgenden Darstellung wurden Ausreißer nicht berücksichtigt.

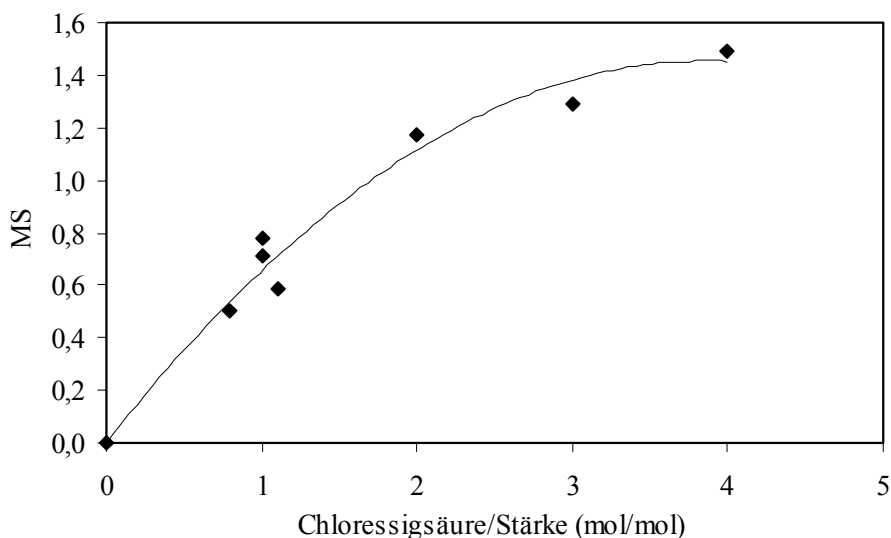


Abb. 6-11. Substitutionsgrad in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis (Synthesen in Isopropanol).

Abbildung 6-11 ist dem der einstufigen Synthesen in wässriger Lösung sehr ähnlich. Der maximale Substitutionsgrad liegt wahrscheinlich bei einem vergleichbaren Chloressigsäure/Stärke-Verhältnis. Da in dem System Isopropanol aber so gut wie keine Synthesen mit geringen molaren Verhältnissen (< 1) durchgeführt wurden, ist der lineare Anfangsverlauf nicht abgesichert.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass eine im Slurry-Verfahren durchgeführte Carboxymethylierung partiell hydrolysierten Stärken keine einheitliche Reaktionskontrolle zulässt und keine reproduzierbaren Ergebnisse liefert. Ein Einsatz von nativen Stärken für den Veretherungsschritt würde zwar die Steuerung des Slurry-Verfahrens erleichtern, letztlich aber aufgrund der Morphologie der Stärkegranula verstärkt zu Regionen führen, in denen eine überproportionale Kumulation von Substituenten vorherrscht. Diese hochsubstituierten Bereiche würden nach der Molekulargewichtsanpassung größtenteils konserviert bleiben und somit schließlich zu einem polydisperseren System führen. Aus pharmazeutischer Sicht gilt es eine derart uneinheitliche Substitution in jedem Fall zu vermeiden, denn aufgrund fehlender Eliminationsmechanismen solcher hochsubstituierten Spezies sind schädliche Speicherphänomene vorprogrammiert. Dies ist der Hauptgrund, warum die Molekulargewichtsanpassung vor der Veretherung erfolgen sollte. Zusätzlich bleibt die Option einer weiteren Derivatisierung, einschließlich einer eventuellen Veresterung, erhalten.

Die Vorteile des Eintopfverfahrens liegen nicht nur in der einheitlichen und reproduzierbaren Reaktionsführung. Vielmehr war bei der Analyse der Substitutionsmuster, eine bemerkenswert homogene Verteilung der Substituenten zu beobachten. Diese über einen breiten Substitutionsbereich erhaltene Regioselektivität war bei keinem anderen Lösungsmittel bzw. Syntheseverfahren möglich. Das Balkendiagramm 6-12 zeigt die erreichten Substitutionsmuster.

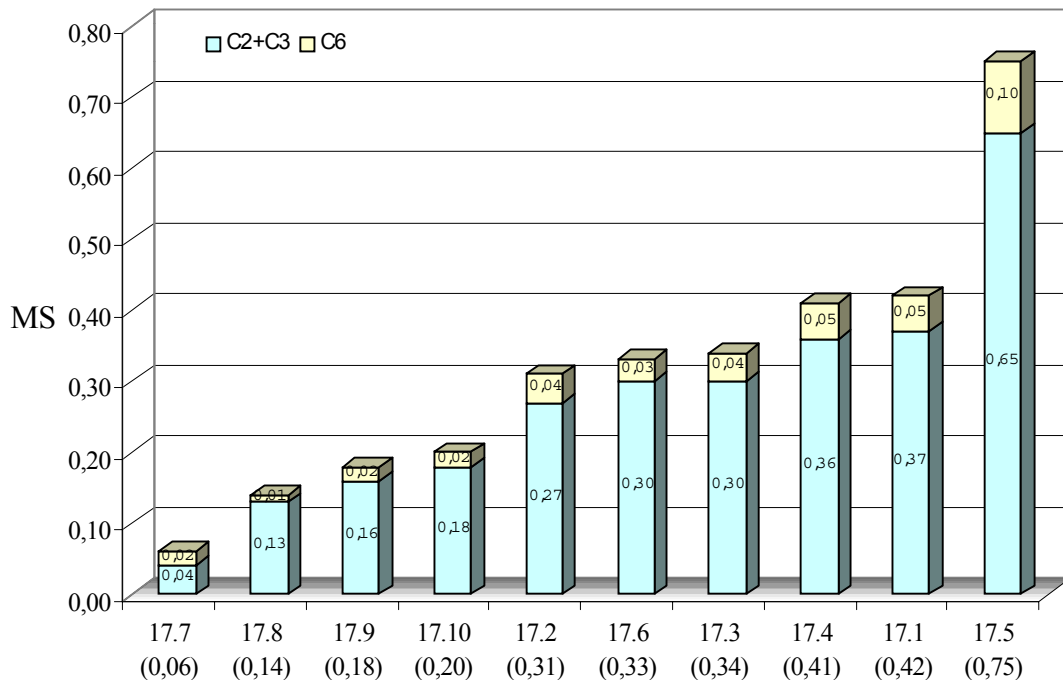


Abb. 6-12. Substitutionsmuster der Carboxymethylstärken aus wässriger Lösung (Eintopfverfahren).

Es ist deutlich zu erkennen, dass nahezu unabhängig vom Substitutionsgrad der überwiegende Teil der Substituenten an der OH-Gruppe am C2-Atom lokalisiert ist. Es entfallen im Dur-

schnitt ca. 85...90 % der gesamten molaren Substitution auf diesen partiellen Anteil. Der recht hohe C6-Anteil der Carboxymethylstärke **17.7** resultiert aus der Ungenauigkeit der Bestimmung des partiellen Substitutionsgrades an dieser Position. Wie aus den Tabellen des Anhan- ges ersichtlich liegen die (C2+C3)/C6-Verhältnisse der Substanzen zwischen 7 und 13, ledig- lich bei Substanz **17.7** und **17.5** wurden geringere Werte ermittelt. In keinem anderen Synthe- severfahren wurden derart hohe Verhältnisse gemessen. Der Vergleich zu den einstufigen kleineren Ansätzen in Wasser zeigt, dass die Reaktionsführung und die der Carboxymethylierung vorgeschalteten Syntheseschritte einen großen Einfluss auf die Regioselektivität haben, denn dort wurden bei vergleichbaren Substitutionsgraden nur (C2+C3)/C6-Verhältnisse von ca. 5 beobachtet. In den organischen Lösungsmitteln fielen diese Verhältnisse größtenteils noch geringer aus. Aus pharmakologischer Sicht ist die im Eintopfverfahren erreichte Regio- selektivität äußerst wünschenswert, da ein überwiegender C2-Substitutionsanteil die effektiv- ste Verzögerung eines α -amylolytischen Abbaus darzustellen scheint; eine erhöhte C6- Substitution würde zur Dauer der Volumenwirksamkeit einen wesentlich geringeren Beitrag leisten und evtl. zusätzlichen Ballast für den Organismus bedeuten. Diese Annahme konnte wie Abschnitt 6.3.1 zeigt, durch enzymatische Abbauversuche an unterschiedlich substituier- ten Carboxymethylstärken bereits *in vitro* belegt werden. Einen endgültigen Beweis würden pharmakokinetische Studien mit unterschiedlich regioselektiv veretherten Carboxyme- thylstärken *in vivo* liefern. Mit dem etablierten mehrstufigen Verfahren steht jedenfalls ein Instrument zur Verfügung, welches es erlaubt, durch gezielte Substitution eine definierte pharmakologische Wirksamkeit zu erreichen.

Aufarbeitung und Isolierung

Ein wesentlicher Vorteil des Eintopfverfahrens besteht auch in dem nahtlosen Übergang von der Synthese zum Aufarbeitungsprozess. Am Ende des letzten Reaktionsschrittes liegt eine neutralisierte wässrige Lösung vor, aus welcher durch Dialyse oder Ultrafiltration die Salze und niedermolekularen Bestandteile beseitigt werden. Mit dieser Aufreinigungstechnik sind sämtliche auftretenden Verunreinigungen restlos entfernbar. Nach dem Erreichen des ge- wünschten Reinheitsgrades kann die Carboxymethylstärke durch Lyophilisation oder Sprüh- trocknung in Form eines reinweißen Pulvers gewonnen und bei entsprechender Lagerung an- nähernd unbegrenzt aufbewahrt werden. Durch den im Herstellungsverfahren implementierten Reduktionsschritt ist eine ansonsten gebräuchliche Aktivkohlebehandlung, zur Entfärbung des Produktes nicht mehr notwendig.

Vorteile des Lösungsmittels

Viele der oben aufgeführten Vorteile liegen in der Wahl des Lösungsmittels begründet. Ob- wohl Carboxymethylierungen in wässriger Lösung vereinzelt in der Literatur beschrieben wurden, stellen die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesearbeiten in ihrer Gesamtheit und Leistungsfähigkeit ein Novum dar. Angefangen von der Säurehydrolyse über die Reduktion

der terminalen Aldehydfunktionen bis hin zur alkalischen Veretherung konnten alle Transformationsschritte sequentiell in einem Lösungsmittelsystem vollzogen werden. Dabei hat sich gezeigt, dass unter den durch die pharmazeutische Anwendung bestimmten Rahmenbedingungen die Carboxymethylierung in dem wässrigen System des Eintopfverfahrens die besten Resultate erzielte. Viele Vorzüge hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Reaktionsführung konnten bereits durch die Entwicklung und den Einsatz des standartisierten Reaktionsaufbaus erreicht werden, insbesondere bei den wässrigen Umsetzungen. Es konnten zwar im Reaktor ähnlich dimensionierte Ansätze in Isopropanol durchgeführt werden, jedoch verliefen diese Versuche bei dem Einsatz von partiell abgebauten Stärken nicht reproduzierbar. Wie Abb. 6-13 veranschaulicht, endete die Reaktion oft in einer restlosen, irreversiblen Verklumpung des Ansatzes. Dieses Verhalten wurde allerdings nicht bei jeder Synthese in Isopropanol oder anderen Alkoholen beobachtet. Da sich aber der Wassergehalt des Systems für ein gegebenes Zielprodukt nicht beliebig frei bestimmen lässt, muss bei ungünstigen Verhältnissen stets mit einem unvermeidbaren Festwerden des Ansatzes gerechnet werden



Abb. 6-13. Verklumpter Carboxymethylierungsansatz in Isopropanol (Durchführung im Reaktor).

Solche Ereignisse sind beim Einsatz von partiell abgebauten Stärken in wässrigen Systemen nicht denkbar. Die Synthesen finden hier von Anbeginn in einer homogenen Phase statt, und eine derartige homogene Reaktionsführung spiegelt sich sogar in einer einheitlicheren Substitution wieder. Zum Vergleich wird in Abbildung 6-14 ein wässriger Carboxymethylierungsansatz im Eintopfverfahren gezeigt. Der Ansatz ist trotz vorhergehender Modifikationen und der dadurch bedingten hohen Substanzkonzentrationen klar und farblos. Die Lösung ließ sich über den gesamten Syntheszeitraum mühelos und mit konstanter Geschwindigkeit rühren.



Abb. 6-14. Ansatz nach dem Carboxymethylierungsschritt im Eintopfverfahren.

Insgesamt zeigen sämtliche Synthesergebnisse, dass einheitlich substituierte Stärkederivate aus bereits ausreichend hydrolysierten Stärken nur in wässriger Lösung darstellbar sind. Für eine großtechnische Produktion stellt ein Verzicht auf organische Lösungsmittel auch sicherheitstechnische und umweltrelevante Verbesserungen dar. Eine ansonsten notwendige restlose Entfernung von Lösungsmittelspuren aus dem pharmazeutischen Endprodukt entfällt ebenfalls. Basierend auf den genannten Vorzügen sollte gegenüber den konventionellen Carboxymethylierungsverfahren eine merkliche Reduktion der Produktionskosten realisierbar sein. Schließlich sollte ein Upscaling ohne weitere Komplikationen möglich sein. In Einzelfällen konnte die Menge an eingesetzter Stärke bereits um das hundertfache gesteigert werden. Im Technikum der Firma B. Braun Medical AG konnten nach dem oben beschriebenen Eintopfverfahren („Böttger-Verfahren“) bereits erste Pilotansätze im Kilogramm-Maßstab mit Erfolg durchgeführt werden.

6.3 Strukturelle Betrachtung der synthetisierten Carboxymethylstärken

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher Substitutionsgrade und Substituentenverteilungen auf monomerer Ebene der modifizierten Polyglucane diskutiert. Schwieriger ist es, die Substituentenverteilung entlang des polymeren Grundgerüsts bzw. die Sequenzabfolge der eingeführten Seitengruppen entlang der Polymerkette bei Stärkederivaten zu analysieren. Es existieren eine Reihe von Ansätzen, die auf einen zufälligen Abbau des Polymers basieren, deren Ergebnisse dann mit statistischen Berechnungen verglichen werden. Ein anderer Weg ist der gezielte Abbau der Stärkederivate durch Enzyme. Die Vorteile der enzymatischen Hydrolyse liegen in der unterschiedlichen Spezifität der verschiedenen stärkeabbauenden Enzyme. Je nach Modifikation der Stärke wird der Umsatz des Substrates andersartig beeinflusst. Das Ausmaß dieser Hemmung hängt vom Substitutionsgrad als auch von der Art und der Position des Substituenten ab. Durch die Analyse der Spaltprodukte lässt sich schließlich zusammen mit den aus anderen Methoden zugänglichen Strukturdaten ein Bild über den Aufbau der Stärkederivate gewinnen.

6.3.1 Enzymatische Hydrolyse unterschiedlicher Carboxymethylstärken

Die glycosidische Bindung in Oligosacchariden, Polysacchariden und Glykokonjugaten ist unter physiologischen Bedingungen stabil. Die relative Stabilität dieser acetalischen Bindung beruht auf einem stabilisierenden induktiven Effekt der Nachbargruppen des glycosidischen Kohlenstoffatoms, welche in der Regel eine Hydroxyl- oder eine N-Acylaminogruppe tragen. Die hydrolytische Spaltung von glycosidischen Verbindungen wird von mehr oder minder spezifischen Glycosid-Hydrolasen katalysiert. Diese Enzyme werden auch als Glykosidasen (EC 3.2.n.n) und im Fall von Polysacchariden als Glykanasen bezeichnet. Entsprechend ihrer Fähigkeit Bindungen innerhalb einer Polysaccharidkette oder vom glykonischen Ende her zu spalten, wird zwischen Endo- und Exo-Glykanasen unterschieden. Bei der enzymatischen Hydrolyse von glycosidischen Verknüpfungen kann die Reaktion je nach Enzym unter Erhalt ($\alpha \rightarrow \alpha$ bzw. $\beta \rightarrow \beta$) oder unter Inversion ($\alpha \rightarrow \beta$ bzw. $\beta \rightarrow \alpha$) der anomeren Konfiguration verlaufen. Die invertierenden Enzyme können im Gegensatz zu den konfigurationserhaltenden Enzymen keine Transglycosylierungen katalysieren. Die Spaltung einer glycosidischen Bindung verläuft generell über eine Säure-Katalyse [194]. Der inzwischen durch zahlreiche Untersuchungen an bakteriellen und tierischen Glykosidasen belegte Mechanismus ist in Abb. 6-15 dargestellt.

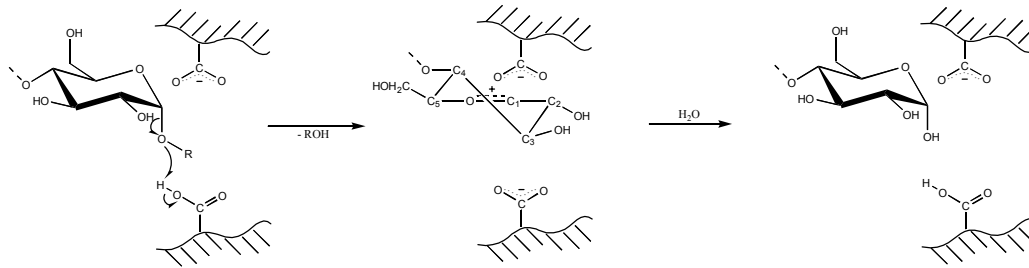


Abb. 6-15. Mechanismus *via* Carbenium-Ion-Intermediat.

Hierbei wird zunächst durch einen Protonen-Donor, in der Regel einen sauren Glutamat- oder Aspartatrest der glycosidische Sauerstoff protoniert. Durch den Abgang von R-OH wird die glycosidische Bindung gebrochen und es entsteht ein Glycosylkation. Dieses Oxocarbenium-Ion ist durch Resonanz mit dem freien Elektronenpaar des Ringsauerstoffs und durch eine stärker basische Carboxylatgruppe des aktiven Zentrums stabilisiert. Die Mesomerie mit dem Ringsauerstoff führt aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters zu einer verdrehten („twisted“) Sesselkonformation des Glucoserests. Das Glycosylkation reagiert mit einem Molekül Wasser unter Übertragung von H^+ auf das Carboxylation und OH^- auf den Zuckerrest. Neben der Stabilisierung des Übergangszustandes beruht die katalytische Wirkung auf dem Ausschluss des wässrigen Mediums im aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch sind die reagierenden Gruppen vor einer deaktivierenden Wirkung durch Solvatation geschützt.

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwandten Enzyme kurz hinsichtlich ihrer Struktur und Spezifität beschrieben.

α -Amylase

Der α -Amylase kommt in dieser Arbeit eine in doppelter Hinsicht bedeutende Rolle zu. Sie wird einerseits als biochemisches Werkzeug für strukturelle Aussagen über die veränderten Biopolymere benutzt und andererseits können mit ihrer Hilfe erste *in vitro* Informationen über Pharmakokinetiken und Eliminationsmechanismen für einen späteren klinischen Einsatz der Stärkederivate gewonnen werden.

α -Amylasen (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolasen, EC 3.2.1.1) stellen eine Gruppe von Endo-Amylasen dar, welche die Hydrolyse der α -D-(1,4)-glycosidischen Verknüpfung in Stärkekomponenten, Glykogen und zahlreichen Oligosacchariden katalysieren. Die meisten α -Amylasen haben eine Molmasse von ca. 50000 Da. Alle bisher untersuchten α -Amylasen sind Calcium-Enzyme, wobei die Anzahl der Calcium-Atome je nach Ursprung des Enzyms schwankt; sie sind für die Stabilität der Tertiärstruktur verantwortlich. Die pH-Aktivitätskurve ist relativ breit mit einem Optimum zwischen 6 und 8. In Säugetieren kommt die α -Amylase in Speichel- und Pankreassekreten vor. Für eine maximale Aktivität wird hier zu-

sätzlich Chlorid benötigt. Die Aminosäuresequenz der Amylasen aus Schweine-, Mensch-, Maus- und Ratten-Pankreas zeigen einen hohen Grad an Homologie. Als Modellsystem für enzymatische Studien wird meist die α -Amylase aus Schweine-Pankreas verwendet. Sie katalysiert über einen multiplen Angriff die Hydrolyse von internen α -(1,4)-glycosidischen Bindungen in Amylopektin oder Amylose in Richtung des nichtreduzierenden Endes [195, 42]. Hierbei entstehen im Falle der Amylose nach einem erschöpfendem Abbau Maltose, Maltotriose und Maltotetrose, beim Amylopektin entstehen zusätzlich unterschiedliche α -Amylase-Grenzdextrine. Durch Röntgenstrukturanalyse und Inhibitorexperimente konnte der Aufbau der Enzyme und die Struktur des aktiven Zentrums aufgeklärt werden [196, 197]. α -Amylasen bestehen aus drei Domänen: die zentrale N-terminale Domäne A, mit einer $(\beta/\alpha)_8$ -barrel-Struktur, dient als Gerüst auf welchem die weiteren Domänen B und C und die funktionell wichtigen Zentren (aktives Zentrum, Calcium- und Chlorid-Bindungsstelle) platziert sind. Das aktive Zentrum enthält fünf Bindungspositionen für je einen Glucosebaustein. Der katalytische Angriff findet zwischen Position 3 und 4 statt [196]. In der älteren Literatur ist die Nummerierung der Positionen umgedreht, so dass nach dortigen Angaben die Hydrolyse zwischen Bindungsstelle 2 und 3 stattfindet [198]. Für die katalytische Wirkung an diesen Bindungsstellen sind primär die Aminosäuren Asp197, Glu233 und Asp300 von essentieller Bedeutung.

β -Amylase

Die Molmasse von kristalliner β -Amylase (EC 3.2.1.2) aus der Süßkartoffel beträgt 197000 Da. Das Enzym stellt ein Tetramer aus vier 48000 Da großen Untereinheiten dar; jede Untereinheit besitzt eine Substrat-Bindungsstelle. Alle pflanzlichen β -Amylasen benötigen für ihre Aktivität eine freie Thiolgruppe und Calcium-Ionen. Das pH-Optimum der β -Amylasen liegt zwischen 4 und 5. Das Exo-Enzym greift an der vorletzten glycosidischen Bindung vom nichtreduzierendem Ende der Stärke-Kette (oder Glykogen) an und spaltet spezifisch unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum β -Maltose ab. Auch hier wird ähnlich wie bei der α -Amylase ein multipler Angriff des Enzyms beobachtet; es werden wiederholt mehrere Bindungen der Substrat-Kette gespalten, bevor der Enzym-Substrat-Komplex dissoziiert. Die Richtung des Angriffs verläuft vom nicht-reduzierendem Ende zum reduzierendem Ende hin und ist somit der der α -Amylase entgegengesetzt. Die Hydrolyse durch β -Amylase wird von α -(1,6)-glycosidischen Verzweigungen gestoppt, die Verzweigungsstelle kann von dem Enzym auch nicht umgangen werden. Es entstehen dadurch neben β -Maltose je nach Stärke unterschiedliche β -Grenzdextrine. Exo-Enzyme haben anders als Endo-Enzyme ein aktives Zentrum in Form einer tiefen Tasche. Die β -Amylase besitzt aber ebenso wie die α -Amylase mehrere Bindungsregionen innerhalb des aktiven Zentrums und eine katalytische Stelle mit Protonen-Donoren und Protonen-Akzeptoren, an welcher die spezifische Hydrolyse der glycosidischen Bindung erfolgt [42]. In der β -Amylase aus Sojabohne wurden Glu186 und Glu380 als katalytische Reste identifiziert [199].

Pullulanase

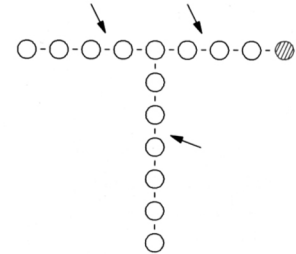
Kommerzielle Varianten von Pullulanase (α -Dextrin-6-glucoanhydrolase; EC 3.2.1.41; limit dextrinase, debranching enzyme, Amylopektin-6-glucoanhydrolase, Pullulanglucoanhydrolase) stammen entweder aus *Bacillus acidopullulyticus* oder aus *Klebsiella planticola*. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse der α -1,6-glycosidischen Verknüpfung in Amylopektin, Glykogen und Pullulan. Ihre Wirkung auf Glykogen ist jedoch unvollständig. Das Enzym aus *Klebsiella pneumoniae* hat eine Molmasse von 66000 Da und ein Temperaturoptimum von 50 °C sowie ein pH-Optimum von 6,5 [61]. In Pflanzen existiert noch ein weiteres entzweigendes Enzym. Die Isoamylase (Glycogen-6-glucoanhydrolase, EC 3.2.1.68, debranching enzyme) ist das einzige Enzym, das Glykogen vollständig entzweigen kann, ist aber im Gegensatz zur Pullulanase nicht in der Lage Pullulan zu hydrolysieren [200].

Amyloglucosidase

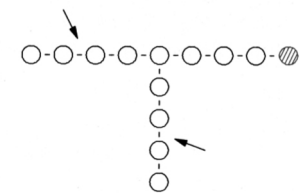
Das Exo-Enzym (1,4- α -D-Glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.3; γ -Amylase, Amyloglucosidase, Glucoamylase) katalysiert die Abspaltung von Glucoseeinheiten vom nichtreduzierenden Ende von Stärke und Glykogen. Das Endprodukt der Hydrolyse ist Glucose in β -Konfiguration. Glucoamylasen aus Pilzen sind Glycoproteine und stellen Mischungen verschiedener Isoenzyme dar. Die Isoenzyme aus *Aspergillus niger* haben die gleiche spezifische Aktivität und besitzen ihre maximale Aktivität bei einem pH zwischen 4 und 5. Entgegen der α -Amylase benötigt die Amyloglucosidase keine Metall-Ionen. Das aktive Zentrum enthält sechs oder sieben Bindungsstellen. Die katalytische Position befindet sich zwischen Bindungsstelle 1 und 2. Neben Glutamat und Aspartat, die an der Spaltung der glycosidischen Bindung beteiligt sind, wird das aktive Zentrum von Tryptophan-Resten umgeben. Amyloglucosidase wandelt geringe Mengen an Stärke vollständig in Glucose um, weshalb dieses Enzym in Stärke-Assays Verwendung findet. Amyloglucosidase ist in der Lage α -1,2-, α -1,3-, α -1,4- und α -1,6-glycosidische Bindungen zu spalten. Die höchste Aktivität besteht für die Hydrolyse der 1,4-glycosidischen Bindung.

Nachfolgend werden die einzelnen Enzyme mit ihren unterschiedlichen Spezifitäten gegenübergestellt. Die nebenstehenden Abbildungen stellen einen Ausschnitt aus einem Polyglucan und die charakteristischen Angriffspunkte der jeweiligen Enzyme dar (• ist das reduzierende Ende).

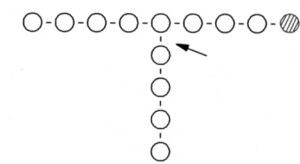
Die **α -Amylase** ist eine Endo-Glucanase, die Bindungen innerhalb einer α -1,4-Kette spaltet. Lineare und verzweigte Oligosaccharide mit drei und mehr Glucoseeinheiten sind das Hauptprodukt.



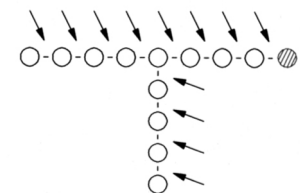
Die **β -Amylase** ist eine Exo-Glucanase, welche ausschließlich von α -1,4-Ketten Maltoseeinheiten abspaltet. Neben Maltose entsteht somit ein hochverzweigtes Grenz-dextrin.



Die **Pullulanase** spaltet ausnahmslos α -1,6-Bindungen. Als Produkt entstehen α -1,4-Glucane.



Amyloglucosidase ist ein Exo-Enzym, welches Glucose abspaltet, unbeachtet dessen ob diese α -1,4- oder α -1,6-verknüpft sind. Glucose ist das einzige Produkt.



Die für kommerzielle Anwendungen gebräuchlichen Stärkederivate wurden durch eine Reihe von enzymatischen Hydrolysestudien näher charakterisiert. French und Robyt beschrieben den Abbau von Hydroxyethylamylose durch α -Amylase aus Schweine-Pankreas [198]. Sie fanden, dass für eine Hydrolyse der glycosidischen Bindung die Glucoseeinheiten an der Bindungsstelle 4 keine Hydroxyethylgruppe an C-2 und an der Bindungsstelle 3 überhaupt keine Hydroxyethylgruppe tragen dürfen. Von der Bindungsstelle 2 wurde keine Substitution an C-6 toleriert. Des Weiteren findet man eine Reihe von Studien über Hydroxyethylstärken, die für den therapeutischen Einsatz als Plasmaersatzmittel gedacht waren. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um ein Bild über die Struktur der Substanzen zu erhalten und um Informationen über die Pharmakokinetik zu gewinnen. Vorschläge über ein komplexeres Sub-

stitutionsmuster der eingesetzten Derivate als bisher angenommen kamen unter anderem von Banks und Greenwood [201] und führten zu der allgemeinen Erkenntnis, dass die Resistenz der Hydroxyethylstärke mit steigendem Substitutionsgrad gegenüber dem Abbau durch α -Amylase zunimmt und dass das Verhältnis 2-O-HEG zu 6-O-HEG von klinischer Relevanz ist [202]. Wie die Arbeiten von Yoshida et al. zeigen, werden von der α -Amylase in der Hydroxyethylstärke nur glycosidische Bindungen in Nachbarschaft zu unsubstituierten Anhydroglucoseeinheiten gespalten [203]. Weiterhin wird 6-O-hydroxyethylsubstituierte HES *in vivo* schneller hydrolysiert als 2-O-hydroxyethylsubstituierte HES bei gleichem MS, DS und Mw [204]. Diese Unterschiede werden auf den Nachbargruppeneffekt der Hydroxyethylreste, welcher an C-2 aufgrund der stärkeren sterischen Abschirmungen der glycosidischen Bindungen ausgeprägter ist als an C-6, zurückgeführt [182]. Sommermeyer et al. bekräftigten durch eigene Untersuchungen diese Ergebnisse und konnten auf dieser Basis differierende Eliminierungsraten verschiedener HES-Spezifikationen erklären [119]. Ferber, Nitsch und Förster postulierten in diesem Zusammenhang einen eliminationsverzögernden Amylase-Substrat-Komplex und untersuchten in klinischen Studien nach der Infusion variierender Hydroxyethylstärken die Molekulargewichtsverteilungen im Serum und Urin von Patienten [205]. Die strukturverwandten Hydroxypropylstärken wurden in der Vergangenheit ebenfalls ausführlich mittels stärkeabbauenden Enzymen charakterisiert. Leegwater und Luten inkubierten Hydroxypropylstärken mit einem Substitutionsgrad von 0,02 bis 0,45 mit Pankreatin und registrierten die freiwerdenden reduzierenden Enden mit der Ferricyanid-Methode [206]. Hood und Mercier untersuchten über Phosphatgruppen quervernetzte O-2-Hydroxypropylstärke (MS=0,045), welche aus granulärer Maniokstärke hergestellt wurde, mit Kombinationen aus β -Amylase, Amyloglucosidase und Pullulanase. Hierbei wurden die Reduktionsequivalente des Verdaus bestimmt und eine chromatographische Auftrennung der Spaltprodukte vollzogen. Die Autoren gelangten so zu einem Strukturmodell, in welchem die Substituenten in den amorphen Bereichen der Stärkekörner nahe den Verzweigungsgraden des Amylopektins liegen [207]. Wootton et al. charakterisierten eine Reihe unterschiedlicher Hydroxypropylstärken in einem Substitutionsbereich von 0,03 bis 0,17 mit α -Amylase aus Schweine-Pankreas. Der Abbau nahm bei allen Varianten mit zunehmenden Substitutionsgrad ab, obwohl bei den granulären Produkte eine sehr leichte Substitution den Umsatz förderte. Des Weiteren wurden die Abbauprodukte einer Fraktionierung unterworfen und die dabei erhaltenen Oligosaccharid- und Polysaccharidfraktionen charakterisiert. Die Ergebnisse variierten je nach zugrundeliegendem Stärkerohstoff [208 - 211]. Perera und Hoover untersuchten die Suszeptibilität granulärer Stärken gegenüber α -Amylase in Abhängigkeit von physikochemischen Vorbehandlungen und zunehmenden Hydroxypropylierungsgraden. Entfettende und aufquellende Maßnahmen sowie eine Hydroxypropylierung bis zu einem MS von ca. 0,25 führten zu einer verstärkten Hydrolyse der Stärkekörner [212]. Kavitha und BeMiller untersuchten mit verschiedenen Kombinationen aus Isoamylase, β -Amylase, α -Amylase und Amyloglucosidase den Ort und die Verteilung von Hydroxypropylgruppen innerhalb intakter Stärkegranula. Die

Komponenten Amylopektin und Amylose der Stärkekörner wiesen unterschiedliche Hydrolyseverhalten auf. Amylose war höher substituiert als Amylopektin, in welchem die Substituenten überwiegend nahe den Verzweigungsgraden lokalisiert waren. In beiden Fraktionen wurde eine uneinheitliche Verteilung der Substituenten gefunden [213]. Unterstützt durch $^1\text{H-NMR}$ - und GLC-MS-Analysen kamen Richardson et al. für vergleichbare Hydroxypropylstärken zu analogen Ergebnissen [179].

Steeneken et al. charakterisierten Methylstärken aus heterogenen Synthesen mit intakten Stärkekörnern und solche aus homogenen Synthesen mit gelösten Stärken. Die Derivate wurden mit α -Amylase und Amyloglucosidase abgebaut und anschließend die Spaltprodukte isoliert und charakterisiert. In den granulären Derivaten erfolgte überwiegend in den amorphen Bereichen nahe der Verzweigungsgrade eine clusterartige Substitution, wohingegen die Methylstärken aus der gelösten Stärke eine eher zufällige Verteilung der Substituenten aufwiesen. Der Substitutionsort der Methylgruppen innerhalb der Monomereinheiten hatte ebenfalls einen Einfluss auf die enzymatische Spaltung. Die glycosidischen Bindungen in Nachbarschaft zu 6-O-methylierten Glucoseeinheiten wurden leichter hydrolysiert als Bindungen die an Monomereinheiten mit Methylsubstituenten an sekundären Hydroxylgruppen angrenzen [214, 181]. Übereinstimmende Ergebnisse wurden von Mischnick [181] an Methylamylosen und von van der Burgt et al. an granulären Methylstärken mit hohen Verzweigungsgraden gefunden [121, 215, 216].

Es existieren auch eine Reihe von Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von granulären, heterogen substituierten Carboxymethylstärken. Hayashi inkubierte eine hochsubstituierte ($\text{MS}=0,61$) und eine geringsubstituierte ($\text{MS}=0,38$) Carboxymethylstärke mit verschiedenen Mengen an Humanspeichel und registrierte die Zunahme an reduzierendem Zucker. Die geringer substituierte Variante wurde durch die im Speichel befindliche α -Amylase stärker hydrolysiert als die hochsubstituierte [217]. Ling et al. beschreiben, dass der enzymatische Abbau von Stärkekleistern mit zunehmender Carboxymethylierung geringer ausfällt. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass eine schwache Carboxymethylierung ($\text{MS}=0,05$) die enzymatische Hydrolyse von Stärken mit intakter granulärer Struktur zunächst leicht erhöht. Die Kleister aus den substituierten Stärken wiesen außerdem eine deutlich verminderte Tendenz zur Retrogradation auf [218]. Kwon et al. analysierten neben den physikochemischen Eigenschaften den Abbau von höher substituierten Carboxymethylstärken ($\text{MS}=0,4$ bis $0,6$) durch α -Amylase, indem sie den freiwerdenden reduzierenden Zucker mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure quantifizierten und ins Verhältnis zum Gesamtgehalt an Glucose setzten. Die so erhaltenen Hydrolysegrade lagen bei den Derivaten zwischen 3 und 5 % gegenüber den 25 % bei der nativen Stärke [219]. Jingwu und Dahua beschreiben das Verhalten von Carboxymethylstärken in einem Substitutionsbereich von 0,3 bis 1,7 gegenüber dem Verdau durch α -Amylase und Amyloglucosidase. Um eine Aussage über die Verteilung der Substituenten entlang der Polymerkette treffen zu können, bestimmten sie das Freiwerden unsubstituierter Glucose und die Anzahl der Kettenbrüche pro 1000 Monomereinheiten. Sie kamen zu

dem Ergebnis, dass aus Carboxymethylstärken mit einem heterogenen Substitutionsmuster nach dem enzymatischen Abbau mehr Reduktionsequivalente freigesetzt werden als aus Carboxymethylstärken mit einheitlicher bzw. zufälliger Verteilung der Substituenten entlang der Polymerketten. Hierbei wurde angenommen, dass ähnlich wie bei den oben erwähnten ungeladenen Stärkeethern nur Bindungen zwischen zwei unsubstituierten Glucosebausteinen gespalten werden können [220, 221].

Eine bei allen Stärkederivaten beschriebene Eigenschaft ist die Abnahme des enzymatischen Umsatzes mit zunehmenden Substitutionsgrad. Dieser naheliegende Zusammenhang gilt jedoch mitunter nicht für den gesamten Substitutionsbereich, denn bei granulären Stärken führt eine geringe Substitution zu einer Auflockerung der kompakten Struktur, wodurch die Zugänglichkeit für hydrolysierende Enzyme erhöht wird.

Die Art der Abhängigkeit des α -amylolytischen Umsatzes vom Substitutionsgrad ist bei den Carboxymethylstärken dieser Arbeit von pharmazeutischer Relevanz, da erst bei einem bekannten Zusammenhang dieser beiden Parameter die gewünschten pharmakologischen Eigenschaften gezielt einstellbar sind. In Abb. 6-16 wird diese Beziehung für eine Serie von Carboxymethylstärken dargestellt.

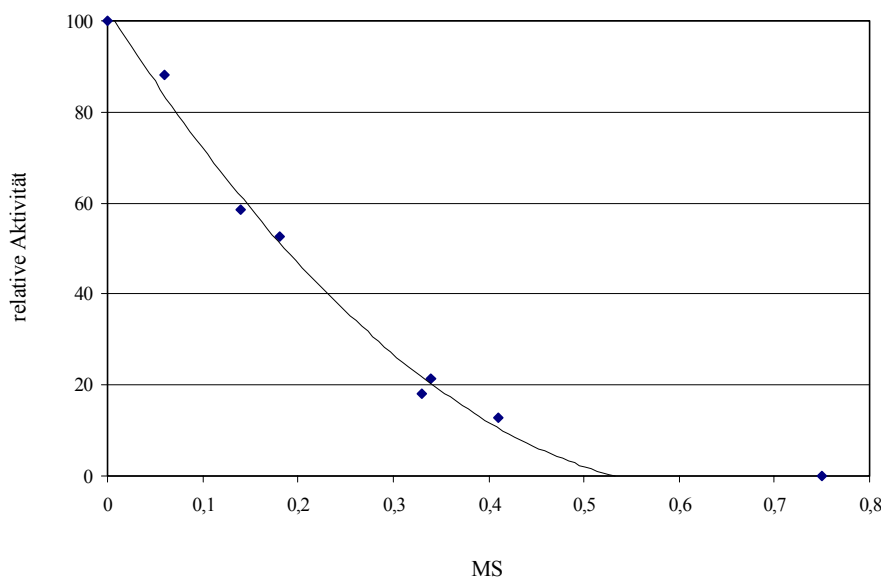


Abb. 6-16. Aktivität von α -Amylase aus Schweine-Pankreas (0,1 U/ml) gegenüber Carboxymethylstärken mit unterschiedlichen Substitutionsgraden als Substrat (100 % Aktivität : Abbaustärke).

Die Abhängigkeit zeigt, dass bei den im Eintopfverfahren hergestellten Derivaten die relative α -Amylase-Aktivität bis zu einem Substitutionsgrad von ca. 0,4 nahezu linear abfällt, danach flacht die Kurve stark ab. Diese Beziehung gilt für die Carboxymethylstärken, die gemäß Abschnitt 4.4.12 aus einer abgebauten Kartoffelstärke synthetisiert worden sind und ein vergleichbares Substitutionsmuster aufweisen. In Abschnitt 5.6.1 wurde bereits auf einige Ursachen des unterschiedlichen enzymatischen Umsatzes der einzelnen Carboxymethylstärken

eingegangen. Die an anderen Stärkederivaten beschriebene Funktionsweise der α -Amylase lässt sich zunächst auf den Abbau von Carboxymethylstärken übertragen. Das nachfolgende Modell illustriert gemäß French und Robyt [198] die Anordnung des Stärkederivates im aktiven Zentrum der α -Amylase und die hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung zwischen Bindungsstelle 3 und 4.

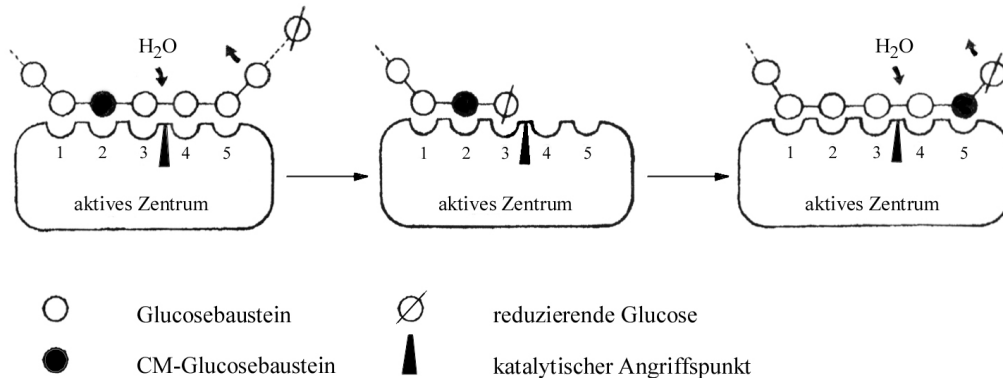


Abb. 6-17. Schematische Darstellung der Bindung und Spaltung einer Carboxymethylstärke im aktiven Zentrum von α -Amylase.

In der Abbildung wird unterstellt, dass – wie an anderen Derivaten bestätigt und für Carboxymethylstärken postuliert [220, 221] – nur die glycosidischen Bindungen zwischen zwei unsubstituierten Monomereinheiten hydrolysierbar sind. Ein Beweis dieser naheliegenden Annahme wurde aber bisher für carboxymethylierte Stärken noch nicht erbracht. Mit Hilfe des obigen Modells kann jedoch erklärt werden, warum bei uneinheitlich substituierten Derivaten mehr glycosidische Bindungen gespalten werden als bei einer homogenen Verteilung der Substituenten. In den heterogenen Carboxymethylstärken existieren hochsubstituierte Bereiche sowie längere Abschnitte ohne Modifikationen, dies führt dazu, dass die α -Amylase aufgrund ihres multiplen Angriffsmechanismus in den unsubstituierten Bereichen ungehindert mehrere benachbarte Bindungen spalten kann, bevor der Enzym-Substrat-Komplex dissoziiert. Letztlich entstehen durch die enzymatische Hydrolyse solcher Derivate mehr reduzierende Enden als bei Carboxymethylstärken mit einer gleichmäßigen Substituentenverteilung. Demzufolge würden die aus dem sequentiellen Eintopfverfahren stammenden Stärkederivate die gleichmäßigste Verteilung der Carboxymethylgruppen entlang des polymeren Grundgerüsts aufweisen, da sie bei vergleichbaren Substitutionsgraden enzymatisch weniger hydrolysiert wurden als die aus anderen Verfahren herrührenden Carboxymethylstärken.

Ein genaueres Bild über den Spaltungsmechanismus von Carboxymethylstärken erfordert die an der Hydrolyse und Substratbindung beteiligten Aminosäurereste in das Modell einzubeziehen. Abbildung 6-18 stellt einen Ausschnitt einer Carboxymethylstärkekette dar, welche im aktiven Zentrum von α -Amylase gebunden vorliegt. Der Übersichtlichkeit wegen sind nur die

wesentlichen Aminosäuren der Bindungsstellen 3 und 4 gezeichnet. Dem Schema liegt die dreidimensionale Struktur des Wasserstoff-Bindungs-Netzwerks von Acarbose (ein α -Amylase-Inhibitor) im aktiven Zentrum der Schweine-Pankreas α -Amylase nach der Röntgenstrukturanalyse zugrunde [196].

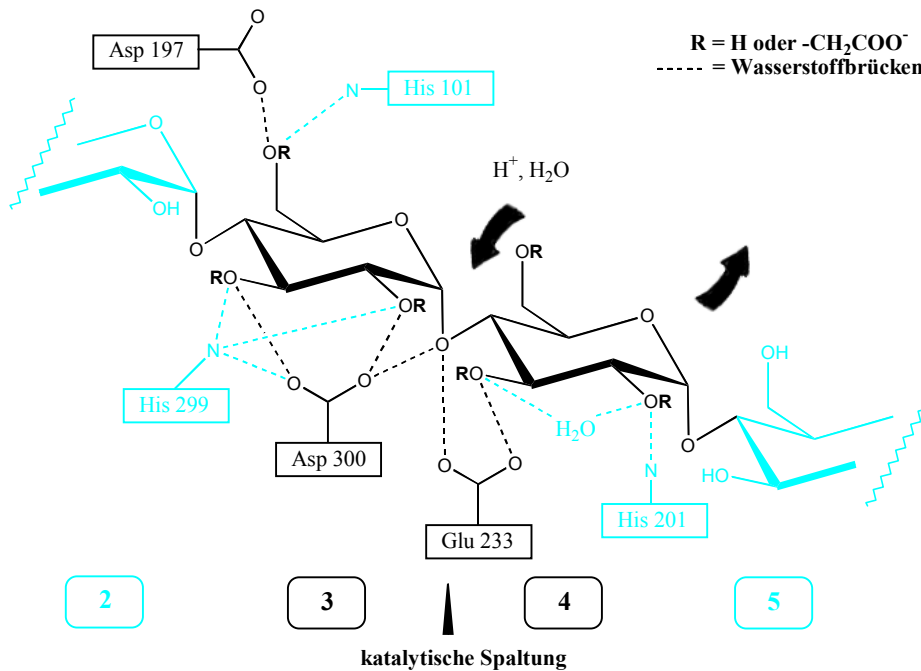


Abb. 6-18. Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum einer α -Amylase mit koordinierter Carboxymethylstärke und den für die katalytische Spaltung verantwortlichen Aminosäuren (Asp = Aspartat, Glu = Glutamat, His = Histidin).

In Abb. 6-18 wird klar, dass die beiden Glucoseeinheiten an Bindungsstelle 3 und 4 nicht carboxymethyliert sein dürfen, da ansonsten die für die Hydrolyse verantwortlichen Aminosäuren Asp 300, Glu 233 und Asp 197 wegen der Nachbarschaft der Substituenten den Bindungsbruch wohl kaum mehr katalysieren könnten. Im Falle der Carboxymethylstärke müssen gegenüber anderen Stärkederivaten neben dem sterischen Einfluss der Carboxymethylreste auch deren elektronische Abstoßung mit den Aminosäuresseitenresten berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde dementsprechend festgestellt, dass Substrate, die überwiegend an den sekundären Hydroxylgruppen carboxymethyliert waren schlechter umgesetzt wurden, als solche die einen vergleichsweise höheren Anteil einer C-6-Substitution aufwiesen. Dies kann offenbar durch den Aufbau des aktiven Zentrums der α -Amylase und der Koordination des Substrats erklärt werden, da die Carboxymethylreste an den sekundären Hydroxylgruppen die glycosidische Bindung durch ihre Nähe stärker abschirmen, katalytisch wichtige Gruppen verdrängen sowie strukturell essentielle Wasserstoffbrückenbindungen unterbinden. Der dominierende Einfluss der Substituenten an C-2 und C-3 gilt aller Voraussicht nach auch für die in Abbildung 6-18 nicht enthaltenen Bindungsstellen 1, 2 und 5.

Es muss eingeräumt werden, dass in dieser Arbeit nur in Einzelfällen nachgewiesen wurde, dass Carboxymethylstärken mit einem Substitutionsgrad größer eins und einem hohen C-6-Anteil zu einem geringen Teil enzymatisch abgebaut wurden. In diesen Substraten kann näherungsweise davon ausgegangen werden, dass jede Monomereinheit einen Substituenten trägt, so dass nach obigen Ausführungen eigentlich gar keine Bindungsspaltung mehr stattfinden dürfte. Dass dennoch ein geringer Abbau stattgefunden hat, ist vielleicht dadurch begründbar, dass ein Substituent an Position 6 der Glucoseeinheit zwar an der Enzymbindungsstelle 3 eine Hydrolyse verhindert, an Bindungsstelle 4 jedoch – aufgrund fehlender Wasserstoffbrückenbindungen – keinen derartigen negativen Einfluss ausüben kann.

Insgesamt kann für die unterschiedlichen Substitutionsorte folgende Reihenfolge für die Hemmung der enzymatischen Abbaubarkeit festgestellt werden:

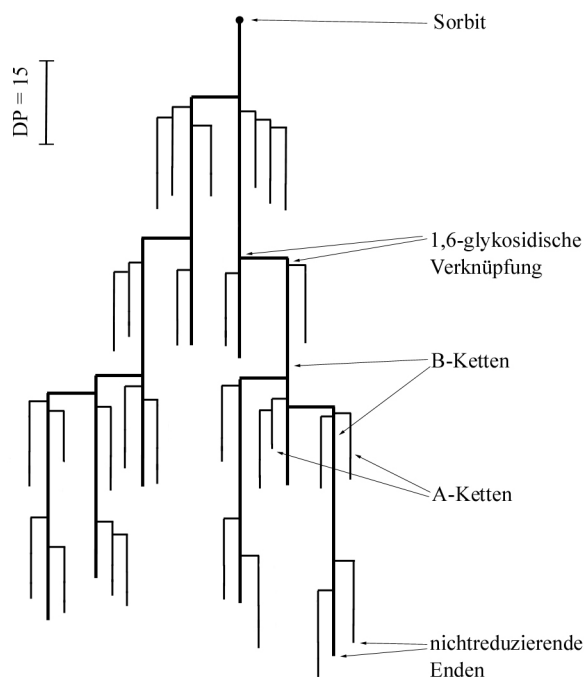


Für eine maßgeschneiderte Pharmakokinetik der Wirksubstanz ist diese Information bedeutsam. Ein gezielt variiertes Substitutionsmuster ermöglicht danach eine Steuerung des enzymatischen Abbaus und somit eine Kontrolle der Volumenwirkdauer. Die in dieser Arbeit für klinische Zwecke synthetisierten Carboxymethylstärken sind gegenüber herkömmlichen Derivaten dadurch ausgezeichnet, dass sie eine überwiegende Substitution der sekundären Hydroxylgruppen aufweisen. Diese Substituenten sind zusätzlich gleichförmiger entlang des polymeren Grundkörpers verteilt, als dies bei gewöhnlichen Synthesevarianten der Fall wäre. Ein derartiges Substitutionsmuster bewirkt eine größtmögliche *in vitro* Inaktivität als α -Amylase-Substrat, was, wie die Abbauprobe in Blut (Abschnitt 5.7.1) belegen, auch einer maximalen Hemmung des Abbaus *in vivo* entspricht. Dies ermöglicht wiederum einen geringen Derivatisierungsgrad, zum Erreichen der gewünschten pharmakologischen Wirkung. Durch das Fehlen von hochsubstituierten Bereichen, sind Speicherphänomene bei den gleichförmig substituierten Carboxymethylstärken sehr wahrscheinlich nicht zu erwarten.

6.3.2 Strukturmodell der synthetisierten Carboxymethylstärken

Im Folgenden werden die aus den enzymatischen Abbauprobe und der NMR-Analyse der enzymatischen Spaltprodukte gewonnenen Daten genutzt, um einen modellhaften Eindruck über die mögliche Struktur einiger im Eintopfverfahren synthetisierten Carboxymethylstärken zu erhalten. Der 1972 von Robin und Mercier präsentierte Strukturvorschlag für Kartoffel-Amylopektin (Abb. 3-5) dient noch heute als Grundlage für weiterführende Strukturaussagen [222]. Im Wesentlichen ist das Amylopektin aus einer Reihe von linearen Ketten aufgebaut, welche über α -1,6-glycosidische Verknüpfungen miteinander verbunden sind. Im Amylopektin existieren eine Reihe von längeren Ketten aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosen (sog. B-Ketten), an welchen über eine α -1,6-glycosidische Bindung eine größere Anzahl an

kürzeren Ketten gebunden ist, diese Ketten weisen erneut eine α -1,6-glycosidische Verzweigung auf, über welche eine lineare Kette ohne Verzweigungen gebunden wurde (sog. A-Ketten). Insgesamt ist das Verzweigungsmuster von heterogener Natur, d. h. die Verzweigungspunkte sind in bestimmten Bereichen des Makromoleküls gehäuft anzutreffen. Die Abstände zwischen diesen Regionen mit hoher Verzweigungsdichte betragen ca. 6000 pm, was einer Kette aus ca. 15 Glucoseeinheiten entspricht ($DP = 15$) [222]. Auf der Basis dieser Erkenntnisse und den eigenen experimentellen Daten wurde das Amylopektin-Modell einer säurehydrolytisch abgebauten, reduzierten Kartoffelstärke skizziert (Abb. 6-19).



Das polydisperse Gemisch der teilhydrolysierten Stärke hatte ein mittleres Molekulargewicht (M_w) von ca. 140000. Im Mittel ist das Polymer somit aus ca. 860 Glucosebausteinen aufgebaut. Davon weisen aufgrund des Verzweigungsgrades in Höhe von 4 % ca. 35 Einheiten, neben ihrer α -1,4-glycosidischen Verknüpfung, zusätzlich eine α -1,6-glycosidische Bindung auf. Die durchschnittliche Kettenlänge beträgt demnach ca. 25 Glucoseeinheiten. Das vormals reduzierende Ende wurde durch die Behandlung mit Natriumborhydrid zum Zuckeralkohol reduziert.

Abb. 6-19. Amylopektin-Modell der partiell abgebauten, reduzierten Kartoffelstärke (Abbaustärke **1.15**).

Die dargestellte Abbaustärke **1.15** war Ausgangsmaterial von zahlreichen Carboxymethylierungen im Eintopfverfahren. Drei dieser CMS-Varianten, nämlich CMS **17.8** ($MS=0,14$), CMS **17.4** ($MS=0,41$), CMS **17.5** ($MS=0,75$) wurden mit den Enzymen α -Amylase, β -Amylase, Amyloglucosidase und Pullulanase behandelt. Der Verdau wurde dialysiert, das Dialysat verworfen und das Retentat gefriergetrocknet. Die lyophilisierte Substanz enthielt nur CM-Fractionen, die größer waren als die Ausschlussgrenze der Dialysiermembran (ca. 20000 g/mol). Diese höhermolekularen Spaltprodukte wurden NMR-spektroskopisch bezüglich ihres molaren Substitutionsgrades, des C2/C6-Verhältnisses und des Verzweigungsgrades charakterisiert.

Um eine Aussage über die Lokalisierung der Carboxymethylgruppen innerhalb des Polymers zu treffen, werden die NMR-spektroskopischen Daten des intakten Derivates mit denen der enzymatisch abgebauten Spezies verglichen. Diese Methode hat jedoch gerade wegen der

fehlenden chromatographischen Paralleluntersuchungen einige Mängel. Die Behandlung mit Pullulanase ergab durch den geringen Umsatz des Enzyms und der fehlenden Sensitivität des Analysesystems keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Größen. Bei der Bestimmung der Verzweigungsgrade von höher substituierten Stärkederivaten kommt die in Abschnitt 4.3.4 beschriebene Messungenauigkeit hinzu. Aus diesen Gründen kann die nachfolgenden Beschreibung nur äußerst vage die Position der Substituenten beschreiben.

Bei der gering substituierten Carboxymethylstärke **17.8** war nach dem α -amylolytischen Abbau der MS-Wert erhöht und der Verzweigungsgrad gestiegen. Das (C2+C3)/C6-Verhältnis blieb im Rahmen der Fehlerbreite unverändert. Der Abbau durch β -Amylase führte zu einer leichten Erhöhung des Substitutionsgrades, die anderen Parameter blieben eher unberührt. Die Amyloglucosidase bewirkte den höchsten relativen Anstieg des Substitutions- und Verzweigungsgrades bei den im Retentat befindlichen Spaltprodukten. Das (C2+C3)/C6-Verhältnis war im Mittel bei diesen Fragmenten etwas erniedrigt. Insgesamt lässt sich nun schlussfolgern, dass die anfänglichen Carboxymethylierungen überwiegend jenseits der nichtreduzierenden Enden der Stärkemoleküle stattfinden, da die Exoenzyme β -Amylase und Amyloglucosidase nur gering- bzw. unsubstituierte Fragmente abgespalten haben. Das Endoenzym α -Amylase muss größtenteils unverzweigte und unsubstituierte Bereiche herausgeschnitten haben, weshalb schließlich die Substitution vorzugsweise in den Innenbereichen des Amylopektins nahe der verzweigten Regionen erfolgt sein muss. Bei der mittelsubstituierten Carboxymethylstärke **17.4** wurden keine wesentlichen Veränderungen der registrierten Messgrößen beobachtet und das obwohl vorherige enzymatische Charakterisierungen (Abschnitt 5.6) eindeutig gezeigt haben, dass bei diesem Substrat noch ein Abbau resultiert. Dies kann nur bedeuten, dass bei den homogenen Synthesen im Eintopfverfahren beim Übergang von niederen Substitutionsgraden (MS bis ca. 0,20) in den klinisch relevanten mittleren Substitutionsbereich (MS ca. 0,25 - 0,50) die Verteilung der Carboxymethylgruppen entlang des polymeren Rückgrats immer einheitlicher wird.

Anhand der hochsubstituierten Carboxymethylstärke **17.5** konnte lediglich nochmals gezeigt werden, dass bei einem derart hohen Substitutionsgrad mit relativ gleichmäßiger Verteilung der Substituenten kein enzymatischer Umsatz mehr stattfinden kann.

6.3.3 Physikochemische Eigenschaften von CMS-Lösungen

Die physikochemischen Eigenschaften der Carboxymethylstärkelösung sind für die spätere Anwendung als Blutvolumenersatzmittel von essentieller Bedeutung. Die Viskosität und das Fließverhalten der Lösungen müssen dem klinischen Anforderungsprofil gerecht werden und im Idealfall dem natürlichen Vorbild gleichen. Über den kolloid-osmotischen Druck erhält man Informationen über die Wasserbindungsfähigkeit der Polymere und kann das Ausmaß des Volumeneffektes ableiten. Zusammen mit den enzymatischen Abbaustudien können schließlich Aussagen über die Dauer der Volumenwirkung gemacht werden. Entscheidend ist

der Aufbau und die Struktur der eingesetzten Makromoleküle, weshalb die Eigenschaften der Lösungen aus Stärkederivaten nicht nur auf dem Molekulargewicht und dem Substitutionstyp beruhen, sondern insbesondere auch vom Grad der Modifikation und der Verteilung der Substituenten abhängen. Bei den in dieser Arbeit favorisierten Carboxymethylstärken sind aufgrund des polyanionischen Charakters zusätzlich die Salzkonzentrationen und der pH-Wert der Lösungen zu berücksichtigen. Einige grundsätzliche Einblicke sind aus der Literatur erhältlich.

Shimizu und Araki carboxymethylierten Kartoffelstärke in Methanol. Die so erhaltenen Natrium-Carboxymethylstärken hatten einen Substitutionsgrad von 0,2; 0,5; 0,97 und 1,23. Es wurden von den wässrigen Lösungen dieser Substanzen die Viskositäten und die osmotischen Drücke gemessen. Der osmotische Druck nahm mit der Konzentration und dem Substitutionsgrad zu. Bei den Viskositätsbestimmungen hatte die Carboxymethylstärke mit dem Substitutionsgrad 0,5 unerwarteterweise den höchsten Wert. Die Autoren begründeten die Tatsache mit der Annahme, dass diese Carboxymethylstärke eine völlig andere Verteilung der Substituenten aufweisen müsse [223]. Kwon et al. beschrieben unter anderem das Lösungsverhalten und die rheologischen Eigenschaften einiger Carboxymethylstärken ($MS = 0,5$ bis $0,6$). Alle Carboxymethylstärken bildeten klare und gegenüber Retrogradation beständige Lösungen. Die Viskositäten von Carboxymethylstärken aus nativen Wachsmaisstärken waren gegenüber Lösungen aus dem Ausgangsmaterial erhöht, wohingegen die Lösungen der Derivate, die aus säurevorbehandelten Stärken synthetisiert waren, eine deutlich geringere Viskosität aufwiesen [219]. Zhang und Wu beschrieben eine Anzahl physikochemischer Eigenschaften von wässrigen Carboxymethylstärkelösungen. Die Autoren konnten zeigen, dass Carboxymethylstärken in Lösung die typischen Eigenschaften eines Polyelektrolyts aufweisen. Die Konformation (knäuelartig oder gestreckt) der Makromoleküle in Lösung – und somit auch die Viskosität der Lösung – wurde durch die Elektrolytenkonzentration und den pH-Wert beeinflusst. Beispielsweise wurde beim Übergang zu hohen Elektrolytgehalten und zu niedrigen pH-Werten die Abnahme der Viskosität durch die Verringerung bzw. Vermeidung von interelektronischen Abstoßungen der Carboxylatgruppen angenommen, wodurch die Moleküle von einer weitgehend gestreckten Anordnung in eine eher knäuelartige Form übergehen. Zusätzlich wurden charakteristische Zusammenhänge zwischen der Viskosität und dem Substitutionsgrad, der Verteilung der Substituenten und dem Molekulargewicht herausgearbeitet. Hierbei ergaben sich steigende Viskositäten bei zunehmenden Substitutionsgraden und Molmassen. Je einheitlicher die Verteilung der Substituenten war, desto höher war die gemessene Viskosität [224].

In dieser Arbeit wurden die Viskositäten von verschiedenen konzentrierten Carboxymethylstärkelösungen mit isotonem Kochsalzgehalt und unterschiedlichen pH-Werten im Vergleich zu einer kommerziellen Plasmaersatzlösung aus Hydroxyethylstärke gemessen. Die Lösung aus CMS 17.1 ($MS = 0,4$) hatte bei gleichem pH und gleicher Konzentration (6 %) trotz des geringeren Substitutionsgrades eine merklich höhere Viskosität als die Hydroxyethylstärkelö-

sung ($MS = 0,5$). Dieselbe Carboxymethylstärke wies in vierprozentiger Konzentration eine niedrigere Viskosität auf als die kommerzielle HES-Lösung. Beim Erhöhen des pH-Wertes von 4,5 auf 10,5 war eine leichte Erniedrigung der Viskosität zu beobachten. Der kolloidosmotische Druck einer sechsprozentigen Carboxymethylstärkelösung (CMS 17.4, $MS = 0,41$) lag ca. 30 % über dem der kommerziellen HES-Lösung. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine CMS-Lösung mit einem Substitutionsgrad von ca. 0,4 in vierprozentiger Konzentration die gleiche Volumenwirksamkeit aufweist wie Hydroxyethylstärke mit einem MS von ca. 0,5 in sechsprozentiger Lösung. Dies konnte mittlerweile durch weitere KOD-Messungen seitens B. Braun bestätigt werden. Bei der gleichen Volumenwirksamkeit haben HES-Lösungen schließlich eine höhere Viskosität. Im Allgemeinen senken Plasmaersatzstoffe zwar die Vollblutviskosität, erhöhen aber die Plasmaviskosität, wodurch eine Durchblutung der feinen Kapillaren (Mikrozirkulation) erschwert werden kann [225]. Aus diesem Grunde ist die geringere Viskosität der Carboxymethylstärkelösungen bei gleichem Volumeneffekt ein medizinischer Vorteil.

Die Abhängigkeit der CMS-Struktur vom pH-Wert der Lösung konnte NMR-spektroskopisch beschrieben werden. Im deprotonierten Zustand wird sich das Makromolekül aufgrund elektronischer Abstoßungen so anordnen, dass die negativen Seitenketten den größtmöglichen Abstand zueinander haben. Die Orientierung der eingeführten Reste zur jeweiligen Monomereinheit wurde bisher noch nicht näher betrachtet. Die Abbildung 6-20 zeigt zwei Spektren der Carboxymethylstärke 16.16 bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Signalzuordnung der Methylengruppe des Carboxymethylrestes gelang durch begleitende HMQC- und APT-Messungen. Beim physiologischen pH von 7,4 liegt die Carboxylgruppe aufgrund des pK_a -Wertes von 3,75 [226] vollständig dissoziiert als Natriumsalz vor.

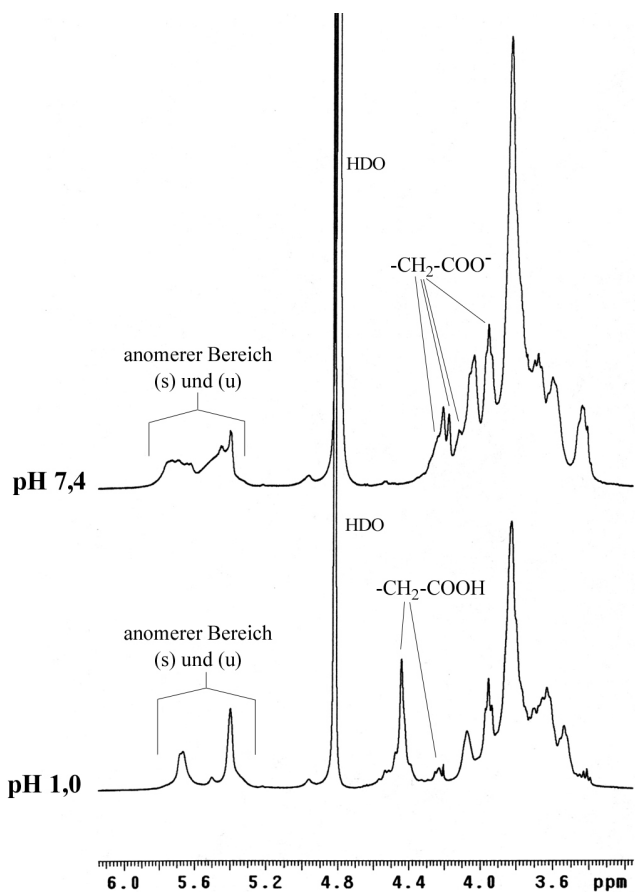


Abb. 6-20. ^1H -NMR-Spektren der Carboxymethylstärke 16.16 bei unterschiedlichen pH-Werten.

Hier wird die anomere Region aufgrund von vielfältigen Signalüberlagerungen durch ein sehr uneinheitliches Multiplett geprägt. Die Methylengruppe des Substituenten wird durch mehrere nicht grundlinienaufgelöste Signale repräsentiert.

Im stark Sauren liegen die Carboxylgruppen in ihrer protonierten Form vor. In dieser Form ist die Wasserlöslichkeit des Stärkederivates am geringsten, obgleich Unlöslichkeiten nur bei hochmolekularen (granulären), niedrigsubstituierten Carboxymethylstärken auftreten. Das Spektrum weist bei einem pH von 1,0 im Vergleich zum Spektrum der anionischen Form eine deutlich verminderte Signalvielfalt auf. Der anomere Bereich besteht aus drei diskreten Signalen und die Methylengruppe verursacht zwei gut separierte, tieffeldverschobene Peaks. Das Multiplett der übrigen Protonen des Stärkegerüsts bleibt bei beiden pH-Werten in seiner Gestalt nahezu unverändert. Der Übergang von der ionisierten Form zur Säureform führt zu einer Ordnung innerhalb der Struktur des Stärkederivates. Der durch die zunehmende Einheitlichkeit der Signale dokumentierte Wegfall von Orientierungsmöglichkeiten des Substituenten kann durch das Ausbilden bzw.

Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen erklärt werden. In der Abbildung 6-21 wird dies durch eine mögliche Wasserstoffbrücke des protonierten Carboxymethylrestes zum Sauerstoff der glycosidischen Bindung illustriert. Für die deprotonierte Form ist eine solche Anordnung nicht denkbar. Insgesamt existieren im Neutralen und schwach Alkalischen mehr Freiheitsgrade für die Substituenten, wodurch die höhere Signalvielfalt verständlich wird.

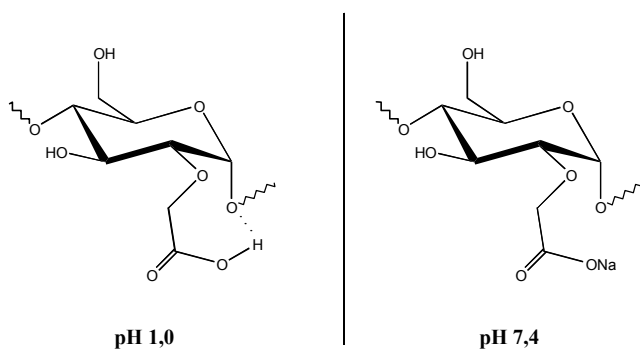


Abb. 6-21. Linkes Bild: Wahrscheinliche Fixierung des Carboxymethylrestes im sauren Bereich. Rechtes Bild: Im Alkalischen ist diese zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung nicht möglich.

6.4 Verwendung von CMS als Blutvolumenersatzmittel

Die Carboxymethylstärke kann derzeit in der Verwendung als Plasmaersatzmittel nur im Vergleich mit Hydroxyethylstärke, welche sich im Volumenersatzmarkt zunehmend als Produkt der Wahl etabliert hat, bewertet werden. Hierbei muss unterschieden werden, inwiefern etwaige Differenzen auf dem in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsverfahren beruhen oder auf die neue Substanzklasse zurückzuführen sind.

Die im Eintopfverfahren synthetisierten Carboxymethylstärken weisen aufgrund der Umsetzungen in homogener Lösung eine gleichförmige Verteilung der Substituenten auf. Schon in Abschnitt 6.3.1 wurde erläutert, dass ein derartiges Substitutionsmuster einen positiven Einfluss auf die Pharmakokinetik haben wird. Aufgrund des Herstellungsprozesses der Hydroxyethylstärken kann davon ausgegangen werden, dass diese Stärkederivate eher eine heterogene Verteilung der Hydroxyethylgruppen besitzen, was eine mögliche Erklärung für die bei HES beobachteten Speicherphänomene sein könnte. Ob der in dieser Arbeit beobachtete geringere enzymatische Umsatz von vergleichbar substituierten Carboxymethylstärken teilweise auf den Unterschied im Substitutionsmuster zurückzuführen ist, konnte wegen fehlender HES-Vergleichssubstanzen nicht untersucht werden. Neben der Verteilung der Substituenten entlang des Stärkegerüsts ist für die pharmakologische Wirkung der partielle Substitutionsgrad der verschiedenen Hydroxylgruppen der Glucosebausteine von Bedeutung. Diese durch das sog. C2/C6-Verhältnis ausgedrückte Kenngröße ist sowohl bei den herkömmlichen Hydroxyethylstärken als auch bei den auf neuem Wege synthetisierten Carboxymethylstärken in relativ breiter Variation steuerbar. Ein weiterer auf dem Herstellungsverfahren basierender Vorteil der Carboxymethylstärken ist das Fehlen der endständigen Aldehydfunktionen. Durch die Reduktion der reduzierenden Enden nach der finalen Molekulargewichtsanpassung – eine Vorgehensweise, die auch auf andere Derivate einschließlich Hydroxyethylstärken übertragbar wäre – wird dem Polymer eine sehr gute pH-Kompatibilität verliehen, wodurch eine Sterilisation und eine Darreichungsform bei physiologischem pH-Werten erstmals möglich wird. Ebenso werden weitere Nebenreaktionen wie beispielsweise die Bildung von Maillard-Produkten durch die Reduktion unterbunden. Beim Carboxymethylrest als Substituent ist unabhängig von den Reaktionsbedingungen prinzipiell von einer einheitlicheren Funktionalisierung auszugehen, da eine Mehrfachsubstitution der Seitenketten, was bei der Hydroxyethylstärke beobachtet wird, ausgeschlossen ist. Des Weiteren ist bei der Umsetzung in alkalischer Lösung aufgrund der elektronischen Abstoßung benachbarter Carboxymethylgruppen ein natürliches Bestreben zum größtmöglichen Abstand gegeben, was zusätzlich eine möglichst gleichförmige Verteilung der Substituenten unterstützen könnte.

Die hohe negative Ladungsdichte des Polymers vermeidet mit hoher Wahrscheinlichkeit die bei Hydroxyethylstärke beobachteten Speicherphänomene in den Zellen des mononukleären

phagozytierenden Systems, die zu Juckreiz oder Beeinträchtigungen der Immunfunktion führen können. Durch elektronische Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und den anionischen Carboxymethylstärken kann insgesamt von einer verringerten intrazellulären Speicherung ausgegangen werden. Ob durch den polyanionischen Charakter ein verlangsamtes renales Eliminationsverhalten resultiert, bleibt zu untersuchen.

Sehr vielversprechend sind die Ergebnisse der präklinischen Studien zur Blutgerinnungsinterferenz (Abschnitt 5.7.2). Hier konnte im direkten Vergleich einiger thrombelastografischer Parameter gezeigt werden, dass Hydroxyethylstärke einen Einfluss auf die Kollageninduzierte Thrombozytenaggregation und auf die Thrombusbildungszeit zu haben scheint, wohingegen Carboxymethylstärke dieses Verhalten nicht zeigte. Die Signifikanz dieses Resultates muss über weitere statistische Auswertungen endgültig belegt werden. Sicher ist aber das Ergebnis, dass Carboxymethylstärkelösungen entgegen vieler Bedenken keine größere Beeinflussung auf die Blutgerinnung ausüben als Hydroxyethylstärken. Die Vorteile von CMS hinsichtlich der Verbesserung der Mikrozirkulation bzw. der therapeutischen Hämodilution wurden bereits in Abschnitt 6.3.3 erwähnt. Die bessere Volumenwirksamkeit der Carboxymethylstärke ermöglicht einen niedrigeren Substitutionsgrad und einen geringeren Substanzeinsatz als in dem bisher klinisch verwendeten Stärkederivat.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein neuartiges, mehrstufiges Syntheseverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe gezielt und reproduzierbar eine Vielzahl unterschiedlicher Stärkederivate (Ether und Ester) hergestellt werden können, die hinsichtlich ihres Eigenschaftsprofils und ihrer Reinheit für die klinische Anwendung als Blutvolumenersatzmittel geeignet sind. Die einzelnen Reaktionsschritte wurden in der Wahl des Lösungsmittels, der Veretherungsreagenzien, Reaktionsdauer, -temperatur und Ausbeute sowie der Minimierung von Nebenreaktionen für die Rohstoffe Wachsmaisstärke und Kartoffelstärke optimiert. Hierbei spielte die Stöchiometrie zwischen dem Veretherungsreagenz, der Alkalimenge und der eingesetzten Stärke eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Substitution und war gleichzeitig bedeutsam für die Verteilung der Substituenten auf die unterschiedlichen Hydroxylgruppen der Glucosereste. Die Synthesen wurden dahingehend gestaltet, dass mit einer hohen Regioselektivität die Substitution der sekundären Hydroxylgruppen vor der primären begünstigt werden konnten.

Bisher bekannte Synthesemethoden zur Carboxymethylierung waren nicht problemlos auf die Umwandlung von partiell abgebauten Stärken übertragbar. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren in heterogenem Medium zeigten bei sämtlichen Reaktionsparametern nur eine unzureichende oder uneinheitliche Substitution der Abbaustärken. Hierbei kam es oft zu irreversiblen Verfärbungen und Verklumpungen des Reaktionsansatzes, wodurch die an sich schon ungünstige Polydispersität der Derivate zusätzlich erhöht wurde. Durch die Synthesearbeiten dieser Dissertation gelang es nun, sämtliche notwendigen Modifikationsschritte in ein homogenes, wässriges System zu transferieren und sequentiell ohne zwischenzeitliche Aufarbeitung in einem einfachen Eintopfverfahren durchzuführen. Dabei wurden folgende Reaktionsstufen in einer dafür entwickelten, validierfähigen Syntheseapparatur durchgeführt:

- partielle säurekatalytische Hydrolyse zur Molekulargewichtsanpassung,
- enzymatische Modifizierung vorwiegend zur Entzweigung der Stärken,
- Reduktion der reduzierenden Enden zur Vermeidung späterer Nebenreaktionen und
- Carboxymethylierung als eigentlicher Funktionalisierungsschritt.

In erster Linie wurden mit dem Verfahren definierte Carboxymethylstärken (d.h. Stärkederivate mit $-O-CH_2-COO^-$ -Funktionen) synthetisiert. Die so erhaltenen Verbindungen waren gegenüber den auf herkömmlichen Wege dargestellten CMS-Varianten durch ein besonders einheitliches Substitutionsmuster gekennzeichnet. Nach reduktiver Entfernung der terminalen

Aldehydfunktionen mit Natriumborhydrid wurden keine Nebenreaktionen mehr beobachtet, und gleichzeitig konnte dadurch den Stärkederivaten eine außerordentliche Stabilität gegenüber Alkalien verliehen werden.

Die auf diesem Wege gewonnenen Carboxymethylstärken scheinen nach dem bisher ermitteltem Kenntnisstand hervorragend für die Anwendung als Blutvolumenersatzmittel geeignet zu sein und sind von ihrem strukturellen Aufbau her als neuartig anzusehen. Sie können nach dem neuen Herstellungsprozess definiert mit variablen

- Substituenten,
- Substitutionsgraden,
- Substitutionsmustern,
- Verzweigungsgraden und
- Molmassen

in hohen Substanzausbeuten (> 80 %) synthetisiert werden. Ein eigens entwickeltes, auf Dialyse und Lyophilisation beruhendes Aufarbeitungsverfahren kann nahtlos an den letzten Reaktionsschritt angeschlossen werden und liefert Produkte in hoher Reinheit. Die Synthesen werden derzeit von der Firma B. Braun Melsungen AG in den Technikumsmaßstab übertragen und bilden die Grundlage für die geplante Herstellung des pharmazeutischen Produktes.

Nach dem Eintopfverfahren wurden für physiologische und präklinische Untersuchungen verschiedene Carboxymethyl- und Carboxymethylhydroxyethylstärken in größeren Mengen (> 100 g) aus Wachsmais- und Kartoffelstärke mit Substitutionsgraden von 0,04 bis 0,75 pro Glucoserest synthetisiert. Diese Substanzen wurden spektroskopisch und enzymatisch charakterisiert. Es wurden NMR-spektroskopische Verfahren etabliert, die es erlauben, den Substitutionsgrad, das Substitutionsmuster (C2/C6-Verhältnis) und den Verzweigungsgrad von Carboxymethylstärken reproduzierbar und mit hoher Genauigkeit in einem breiten Bereich zu bestimmen. Für eine Quantifizierung der reduzierenden Enden wurde eine einfache Farbreaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure etabliert, welche eine schnelle und präzise Bestimmung der terminalen Aldehydfunktionen von Stärken und Stärkederivaten erlaubt. Auf der Grundlage dieser Methode wurde ein für Glucosidasen anwendbares Laborverfahren entwickelt. Dieses Verfahren gibt schnell und kostengünstig Auskunft über den Abbau unterschiedlichster Stärkederivate. Insgesamt wurde mit dieser Methode der Abbau von mehr als 50 unterschiedlichen Stärkederivaten durch die Enzyme α -Amylase (EC 3.2.1.1), β -Amylase (EC 3.2.1.2), Pullulanase (EC 3.2.1.41) und Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) untersucht. Auf diese Weise konnten auch physiologisch relevante *in vitro* Abbaukinetiken mit humaner α -Amylase gemessen werden, welche mit der Abbaukinetik der Stärkederivate in Blut vergleichbar sind. Somit konnte ein *in-vitro*-Screening-Modell geschaffen werden, welches das Abschätzen der Metabolisierbarkeit neuer Stärkederivate, deren Abbaugeschwindigkeit und die Vergleiche zu bekannten Substanzen erlaubt. Durch die verschiedenen Enzymspezifitäten konnten Anhaltspunkte für den strukturellen Aufbau der Stärkederivate gewonnen werden. Die Gesamtheit der

Analyseverfahren lieferte ein breites Spektrum an Informationen über die modifizierten Polyglucane und die Möglichkeit Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu beschreiben.

Mit ausgewählten Carboxymethylstärken wurden Prüfmuster für präklinische Studien und physikochemische Charakterisierungen hergestellt. Neben der Bestimmung von klinisch relevanten Parametern wie dem kolloid-osmotischen Druck wurden bei unterschiedlichen Elektrolytzusammensetzungen eine hohe Autoklavierbeständigkeit der Lösungen nachgewiesen. Eine Beeinflussung der Hämostase durch Carboxymethylstärken konnte durch eine von B. Braun Melsungen AG veranlasste Studie ausgeschlossen werden. Dabei lieferte die Testsubstanz ein besseres Ergebnis als der bisherige klinische Standard Hydroxyethylstärke.

Neben der Charakterisierung der Stärkeetherderivate Carboxymethylstärke wurde auch die Stabilität von Stärkeestern behandelt. Hierzu wurden zehn strukturell unterschiedliche Stärkeester über zum Teil neuartige Syntheseverfahren dargestellt. Anhand von Sterilisationsversuchen der Stärkeesterlösungen konnte eine Stabilitätsreihenfolge für die verschiedenen Acylgruppen aufgestellt werden. Keiner der für die medizinische Anwendung geeigneten Stärkeester zeigte die erforderliche Beständigkeit, um den Sterilisationsprozess ohne Abbau zu überstehen. Auf der Basis dieser Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass acylierte Stärken nach bisherigem Wissensstand, trotz der Aussichten auf eine optimale Pharmakokinetik, für die Verwendung als Plasmaersatzmittel nicht geeignet sind.

LITERATURVERZEICHNIS

Im Text dieser Arbeit werden Literaturverweise durch eine entsprechende Ziffer in eckigen Klammern kenntlich gemacht. Bei der Zitierung von Patenten steht DE für deutsches Patent, DD für DDR-Patent, EP für europäisches Patent, US für amerikanisches Patent, J für japanisches Patent, NL für niederländisches Patent, F für französisches Patent und WO für weltweites Patent. Bei den deutschen Patenten kennzeichnet der vorgestellte Buchstabe „O“ eine Offenlegungsschrift.

- 1 Lutz, H. (1975), Plasmaersatzmittel, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- 2 Baron, J.-F., Treib, J. (1998), Volume Replacement, Springer Verlag Berlin.
- 3 Treib, J. (2000), Volume Therapy, Springer Verlag Berlin.
- 4 Boldt, J. (2001), Volumenersatztherapie, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- 5 Boldt, J. (2002), Aktuelle Perspektiven in der Volumenersatztherapie, UNI-MED Bremen.
- 6 Zander, R., Weidhase, R. (2002), Abstracts, 12. Internationales Symposium Intensivmedizin und Intensivpflege, Bremen.
- 7 Steinbereithner, K., Bergmann, H. (1988), Hydroxyäthylstärke – Aktuelle Theorie und Praxis -. In: Beiträge zur Anaesthesiologie und Intensivmedizin. Ed. Peter, K., et al., Verlag Wilhelm Maudrich Wien. 5-97.
- 8 Rongved, P., Fritzell, T. H., Strande, P., Klaveness, J. (1996), Carbohydrate Research **287**, 77-89.
- 9 Helbich, T. H., Gossman, A., Mareski, P. A., et al. (2000), J. Magn. Reson. Imaging **11**, 694-701.
- 10 Mareski, P., et al. (1999), WO 99/42139.
- 11 Meier, B. (2000), WO 00/48637.
- 12 Meier, B. (2001), EP 1190719 A1.
- 13 Hedlund, B. E., Weber, T. P., Dragsten, P. R., et al. (2002), US 6479468.
- 14 Burghard, W., Sommermeyer, K., Henning, K., Bepperling, F. (1994), EP 0620005 A1.
- 15 Burghard, W., Sommermeyer, K., Henning, K., Bepperling, F. (1996), DE 4310974 C2.
- 16 Sirtl, C., Laubenthal, H., Dieterich, H. J., et al. (1990), Beitr. Anaesth. Intensivmed. (Wien) **31**, 35-53.
- 17 Kannan, S., Milligan, K. R. (1999), Intensive Care Med. **25**, 220-222.
- 18 Lelli, A. (1991), Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

- 19 Förster, H., Wicarkzyk, C., Dudziak, R. (1981), *Infusionstherapie* **2**, 88-94.
- 20 Asskali, F., Lehmann, G., Förster, H. (2002), *Krankenhauspharmazie* **23**, 100-109.
- 21 Tobias, M. D. (2000), *Anesthesiology Online*. In:
<http://www.anesthesiologyonline.com>.
- 22 Riess, J. G., Le Blanc, M. (1978), *Angew. Chem.* **90**, 654-668.
- 23 Sommermeyer, K., Eichner, W. (1997), EP 0912197 B1.
- 24 Asskali, F., Lehmann, G., Förster, H. (2000), *Krankenhauspharmazie* **21**, 362-368.
- 25 Rudolph, E. (1995), Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- 26 Grüll, D., Stifter, U. (2000), EP 1075839 A1.
- 27 Krazs, W., Weisert, A. (1978), O DE 2814032.
- 28 Omoto, H. (1978), O DE 2700011.
- 29 Hershenson, H. et al. (1969), O DE 1813571.
- 30 Anonymous, (1973), F 73.01316.
- 31 Jamnicki, M., Bombeli, T., Seifert, B., et al. (2000), *Anesthesiology* **93**, 1231-1237.
- 32 Hofreiter, B. T. (1986), *Miscellaneous Modifications*. In: *Modified Starches: Properties and Uses*. Ed. Wurzburg, O. B., CRC Press Florida, 179-196.
- 33 Thompson, W. L., Britton, J. J., Walton, R. P. (1962), *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **136**, 125-132.
- 34 Plasma Substitute Jt. Res. Group (1978), *Hua Hsueh Hsueh Pao (China)* **36**, 49-76.
- 35 Förster, H., Asskali, F., Nitsch, E. (1993), WO 93/01217.
- 36 Asskali, F., Förster, H. (1994), *Anaesthesist* **43**, 11f.
- 37 Behne, M., Tomas, H., Förster H., et al. (1998), *Anesth. Analg.* **86**, 856-860.
- 38 Stärke (1985), *Schriftenreihe des Fonds der Chemischen Industrie*, Heft 25.
- 39 Galliard, T. (1987), *Critical Reports on Applied Chemistry Volume 13, Starch: Properties and Potential*, John Wiley & Sons Chichester.
- 40 Tegge, G. (1982), Stärke. In: *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, 4. Aufl., Band **22**, Verlag Chemie Weinheim, 165-208.
- 41 Daniel, J. R., Whistler, R. L., Voragen, A. C. J., Pilnik, W. (1994), *Starch and Other Polysaccharides*. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A25, Verlag Chemie Weinheim, 1-62.
- 42 Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Paschall, E. F. (1984), *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd Ed., Academic Press New York.
- 43 Kindl, H. (1994), *Biochemie der Pflanzen*, Springer Verlag Berlin.
- 44 Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998), *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 85-112.
- 45 Smith, A. M. (1999), *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 223-229.
- 46 Lehmann, J. (1998), *Carbohydrates: Structure and Biology*, 2nd Ed., Georg Thieme Verlag Stuttgart.

- 47 Hermansson, A.-M., Svegmak, K. (1996), *Trends in Food Science & Technology* **7**, 345-353.
- 48 Appelqvist, I. A. M., Debet, M. R. M. (1997), *Food Rev. Int.* **13**, 163-224.
- 49 Rein, H. (1997), *Deutsche Apotheker Zeitung* **130**, 770-778.
- 50 Atkin, N. J., Cheng, S. L., Abeysekara, R. M., Robards, A. W. (1999), *Starch/Stärke* **51**, 163-172.
- 51 Steeneken, P. A. M. (1984), *Starch/Stärke* **36**, 13-18.
- 52 Sahai, D., Jackson, D. S. (1996), *Starch/Stärke* **48**, 249-255.
- 53 BeMiller, J. N. (1997), *J. Appl. Glycosci.* **44**, 43-49.
- 54 Huber, K. C., BeMiller, J. N. (2000), *Carbohydrate Polymers* **41**, 269-276.
- 55 Huber, K. C., BeMiller, J. N. (2001), *Cereal Chem.* **78**, 173-180.
- 56 Oates, C. G. (1997), *Trends in Food Science & Technology* **8**, 375-382.
- 57 Mua, J. P., Jackson, D. S. (1997), *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3840-3847.
- 58 BeMiller, J. N. (1997), *Starch/Stärke* **49**, 127-131.
- 59 French, D. (1972), *Denpun Kagaku (China)* **19**, 8-25.
- 60 Cura, J. A., Jansson, P.-E., Krisman, C. R. (1995), *Starch/Stärke* **47**, 207-209.
- 61 Schenck, F. W., Hebeda, R. E. (1992), *Starch Hydrolysis Products: Worldwide Technology, Production and Application*, Verlag Chemie Weinheim.
- 62 Kearney, R. L., Maurer, H. W. (1990), *Starch and Starch Products in Paper Coating*, TAPPI Press Atlanta.
- 63 Engelskirchen, K. (1987), *Umwandlung von Stärke*. In: Houben-Weyl. *Methoden der organischen Chemie*, E20/3, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2135-2175.
- 64 Husemann, E., Werner, R. (1963), *Umwandlung von Cellulose und Stärke*. In: Houben-Weyl. *Methoden der organischen Chemie*, Makromolekulare Stoffe Teil 2, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 862-915.
- 65 Jarowenko, W. (1986), *Acetylated Starch and Miscellaneous Organic Esters*. In: *Modified Starches: Properties and Uses*. Ed. Wurzburg, O. B., CRC Press Florida, 56-75.
- 66 Trubiano, P. C. (1986), *Succinate and Substituted Succinate Derivatives of Starch*. In: *Modified Starches: Properties and Uses*. Ed. Wurzburg, O. B., CRC Press Florida, 132-147.
- 67 Whistler, R. L. (1945), *Adv. Carbohyd. Chem.* **1**, 279-307.
- 68 Roberts, H. J. (1967), *Nondegradative Reactions of Starch*. In: *Starch: Chemistry and Technology*. Ed. Whistler, R. L., Paschall, E., Vol. 2, Academic Press New York, 439-493.
- 69 Roberts, H. J. (1967), *Starch Derivatives*. In: *Starch: Chemistry and Technology*. Ed. Whistler, R. L., Paschall, E., Vol. 2, Academic Press New York, 293-350.
- 70 Radley, J. A. (1968), *The Starch Esters and Ethers*. In: *Starch and its Derivatives*. Ed. Radley, J. A., 4th Ed., Chapman and Hall London, 354-419.
- 71 Kerr, R. W. (1950), *Chemistry and Industry of Starch*, 2nd Ed., Academic Press New

York.

- 72 Hjermstad, E. T. (1972), US 3706730.
- 73 Lammers, G., et al. (1996), WO 96/06866.
- 74 Pal, J., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. (2000), Carbohydrate Polymers **43**, 155-162.
- 75 Johansson, H., Lund, T., Larsson, A. (1997), EP 0786475 A2.
- 76 Speakman, E. L. (1970), US 3513156.
- 77 Parmerter, S. M. (1971), US 3620913.
- 78 Thomaides, J. S., Burkert, J. (1997), US 5627273.
- 79 Bayazeed, A., Farag, S., Shaarawy, S., Hebeish, A. (1998), Starch/Stärke **50**, 89-93.
- 80 Wolff, I. A., Olds, D. W., Hilbert, G. E. (1951), J. Am. Chem. Soc. **73**, 346-349.
- 81 Smith C. W., Tuschhoff, J. V. (1963), US 3081296.
- 82 Billmers, R. L., Tessler, M. M. (1995), Polym. Mat. Sci. Engin. **72**, 190-191.
- 83 Laakso, T., Sjöholm, I. (1987), J. Pharm. Sci. **76**, 935-939.
- 84 Wurzburg, O. B. (1960), US 2935510.
- 85 Minkema, W. H. (1959), US 2868780.
- 86 Caldwell, C. G. (1958), US 2825727.
- 87 Jantas, R. (1997), J. Appl. Polym. Sci. **65**, 2123-2129.
- 88 Rudolph, S. E., Glowaky, R. C. (1977), O DE 2639349.
- 89 Neigel, D., Scotchie, L. J., Tessler, M. M. (1997), US 5629416.
- 90 Kettlitz, B., Schierbaum, F. (1989), DD 266498 A1.
- 91 Paschall, E. F., Katzbeck, W. J. (1959), US 2891947.
- 92 Caldwell, C. G. (1953), US 2661349.
- 93 Klaushofer, H., Berghofer, E., Steyrer, W. (1978), Starch/Stärke **30**, 47-51.
- 94 Kropf, H., Schaumann, J. (1993), In: Houben-Weyl. Methoden der organischen Chemie, E15/2, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 103-116.
- 95 Jeschkeit, H., Strube, M. (1984), J. Prakt. Chem. **326**, 638.
- 96 Doleschall, G., Lempert, K. (1963), Tetrahedron Lett. **18**, 1195.
- 97 Aburto, J., Alric, I., Borredon, E. (1999), Starch/Stärke **51**, 132-135.
- 98 Jeon, Y.-S., Viswanathan, A., Gross, R. A. (1999), Starch/Stärke **51**, 90-93.
- 99 Sanella, J. L., Whistler R. (1963), Arch. Biochem. Biophys. **102**, 226.
- 100 Röper, H. (2002), Starch/Stärke **54**, 89-99.
- 101 De Baere, H. (1999), Starch/Stärke **51**, 189-193.
- 102 Schierbaum, F., Vorwerg, W. (1996), Starch/Stärke **48**, 422-426.
- 103 Heath, H. D., Ernst, A. J., Hofreiter, B. T., Rankin, J. C. (1969), Tappi **52**, 1647-1651.
- 104 Mostafa, K. M., El-Sanabary, A. A. (1997), Polymer Degradation and Stability **55**, 181-184.
- 105 Baumann, F. (1971), DE 2118902 C2.
- 106 Kim, B. S., Lim, S.-T. (1999), Carbohydrate Polymers **39**, 217-223.
- 107 Kleemiß, M., Hoppe, L., Weber, G. (2000), O DE 19911209 A1.

- 108 Bhattacharyya, D., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. (1996), Carbohydrate Polymers **31**, 79-82.
- 109 Bayerlein, F. (1971), DE 2132813 C3.
- 110 Ragheb, A. A., El-Sayiad, H. S., Hebeish, A. (1997), Starch/Stärke **49**, 238-245.
- 111 Fritz, H. G., Aichholzer, W., Seidenstücker, T., Widmann, B. (1995), Starch/Stärke **47**, 475-491.
- 112 Lochner, T. (1997), WO 97/46592.
- 113 Claudius, J. S., Neau, S. H. (1998), Int. J. Pharm. **168**, 41-48.
- 114 Schierbaum, F., Vorweg, W. (1997), Starch/Stärke **49**, 30-36.
- 115 Schierbaum, F., Vorweg, W. (1996), Starch/Stärke **48**, 375-379.
- 116 Schierbaum, F., Vorweg, W. (1996), Starch/Stärke **48**, 417-421.
- 117 Bach Tuyet, L. T., Ilyama, K., Nakano, J. (1985), Mokuzai Gakkaishi (Japan) **31**, 8-13.
- 118 Kragten, E. A., Leeftang, B. R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. (1992), Carbohydrate Research **228**, 433-437.
- 119 Sommermeyer, K., Cech, F., Schmidt, M., Weidler, B. (1987), Krankenhauspharmazie **8**, 271-278.
- 120 Nilsson, G. S., Bergquist, K.-E., Nilsson, U., Gorton, L. (1996), Starch/Stärke **48**, 352-357.
- 121 Burgt, Y. E. M. van der, Bergsma, J., Bleeker, I. P., et al. (1998), Carbohydrate Research **312**, 201-208.
- 122 Mitchell, G., Wijnberg, A. C. (1995), Starch/Stärke **47**, 46-50.
- 123 Mitchell, G., Wijnberg, A. C. (1997), Starch/Stärke **49**, 485-488.
- 124 Grassl, M., Walter, H. E. (1983), α -Amylase. In: Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer, H. U., 3rd Ed. Vol. 2A, Verlag VCH Weinheim, 151-152.
- 125 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, et al. (1956), Analytical Chemistry **28**, 350-356.
- 126 Miller, G. L. (1959), Analytical Chemistry **31**, 426-428.
- 127 Bottle, R. T., Gilbert, G. A. (1958), Analyst **83**, 403-406.
- 128 Bruner, R. L. (1964), Determination of reducing value. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. Ed. Whistler, R. L., Vol. IV, Academic Press, New York, 67-71.
- 129 Ciba-Geigy (1977), Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik, 8. Aufl., Ciba-Geigy AG Basel.
- 130 Tonnessen, T., Tollofsrud, S., Kongsgaard, U. E., Noddeland, H. (1993), Acta Anaesthesiol. Scand. **37**, 424-426.
- 131 Bremerich, D. H., Lische, V., Asskali, F., et al. (2000), Int. J. Clin. Pharm. Therap. **38**, 408-414.
- 132 Asskali, F., Warnken, U., Förster, H. (2001), Deutsche Medizinische Wochenschrift **126**, 1-6.
- 133 Behne, M., Hermes, T., Bremerich, D. H. (1998), Anesth. Analg. **86**, 856-860.
- 134 Warnken, U. H., Asskali, F., Förster, H. (2000), Starch/Stärke **52**, 261-266.

- 135 Warnken, U. H., Asskali, F., Förster, H. (2001), *Chromatographia* **53**, 85-88.
- 136 Heins, D., Kulicke, W.-M., Käuper, P., Thielking, H. (1998), *Starch/Stärke* **50**, 431-437.
- 137 Graaf, R. A., Lammers, G., Janssen, L. P. B. M., Beenackers, A. A. C. M. (1995), *Starch/Stärke* **47**, 469-475.
- 138 Falk, H., Stanek, M., Wutka, R. (1997), *Starch/Stärke* **49**, 488-491.
- 139 Rivard, C., Moens, L., Roberts, K., et al. (1995), *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 848-852.
- 140 Bikiaris, D., Pavlidou, E., Prinos, J. et al. (1997), *Polymer Degradation and Stability* **60**, 437-447.
- 141 Christen, H. R., Vögtle, F. (1992), *Organische Chemie: Von den Grundlagen zur Forschung*, Band 1, 2. Aufl., Otto Salle Verlag Frankfurt am Main.
- 142 Coma, V., Copinet, A., Couturier, Y., Prudhomme J.-C. (1995), *Starch/Stärke* **47**, 100-107.
- 143 Somogyi, M. (1952), *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
- 144 Nelson, N. (1944), *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
- 145 Wootton, M., Chaudhry, M. A. (1979), *Starch/Stärke* **31**, 224-228.
- 146 Marcazzan, M., Vianello, F., Scarpa, M., Rigo, A. (1999), *J. Biochem. Biophys. Methods* **38**, 191-202.
- 147 Kratzl, K., Kaufmann, E. (1961), *Monatsh. für Chemie* **92**, 371-378.
- 148 Kratzl, K., Kaufmann, E., Kraupp, O., Stormann, H. (1961), *Monatsh. für Chemie* **92**, 379-383.
- 149 Hashimoto, S., Furukawa, I. (1962), *Sci. Eng. Rev. Doshisha Univ.* **3**, 43-54.
- 150 Sloan, J. W., Mehlretter, C. L., Senti, F. R. (1962), *J. Chem. Eng. Data* **7**, 156-158.
- 151 Thewlis, B. H. (1969), *Die Stärke* **21**, 21-24.
- 152 Ceh, M. (1972), *Die Stärke* **24**, 124-127.
- 153 Khalil, M. I., Hashem, A., Hebeish, A. (1990), *Starch/Stärke* **42**, 60-63.
- 154 Hebeish, A., Khalil, M. I. (1988), *Starch/Stärke* **40**, 147-150.
- 155 Bhattacharyya, D., Singhal, R. S., Kulkarni, P. (1995), *Carbohydrate Polymers* **27**, 247-253.
- 156 Tijssen, C. J., Kolk, H. J., Stamhuis, E. J., Beenackers, A. A. C. M. (2001), *Carbohydrate Polymers* **45**, 219-226.
- 157 Heinze, T., Pfeiffer, K., Lazik, W. (2001), *J. Appl. Polym. Sci.* **81**, 2036-2044.
- 158 Heinze, T., Pfeiffer, Liebert, T., Heinze, U. (1999), *Starch/Stärke* **51**, 11-16.
- 159 Croon, I., Purves, C. B. (1959), *Svensk Papperistidn* **62**, 876-882.
- 160 Heinze, T., Röttig, K., Nehls, I. (1994), *Macromol. Rapid Commun.* **15**, 311-317.
- 161 Heinze, T., Erler, U., Nehls, I., Klemm, D. (1994), *Angew. Makromol. Chem.* **215**, 93-106.
- 162 Spurlin, H. M. (1939), *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2222-2227.

- 163 Volkert, B. (2002), Presentation at the 54th Starch Convention Detmold, Germany.
- 164 Liebert, T., Heinze, T. (1998), *Macromol. Symp.* **130**, 271-283.
- 165 Ukai, S., Honda, A., Nagai, K., Kiho, T. (1990), *J. Chromatogr.* **513**, 338-343.
- 166 Zhang, J. (1992), *Huaxue Shijie (Japan)* **32**, 129-131.
- 167 Pfannemüller, B., Richter, G. C., Husemann, E. (1975), *Carbohydrate Research* **43**, 151-161.
- 168 Green, J. W. (1963), Triphenylmethyl Ethers. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Ed. Whistler, R. L., Vol. III, Academic Press, New York, 327-332.
- 169 Heinze, T., Heinze, U., Grote, C., et al. (2001), *Starch/Stärke* **53**, 261-268.
- 170 Tezuka, Y., Tsuchiya, Y., Shiomi, T. (1996), *Carbohydrate Research* **291**, 99-108.
- 171 Parfondry, A., Perlin, A. S. (1977), *Carbohydrate Research* **57**, 39-49.
- 172 Baar, A., Kulicke, W.-M., Szablikowski, K. (1994), *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 1483-1492.
- 173 Reuben, J., Conner, H. T. (1983), *Carbohydrate Research* **115**, 1-13.
- 174 Gautier, S., Lecourtier, J (1991), *Polymer Bulletin* **26**, 457-464.
- 175 Capitani, D., Porro, F., Segre, A. L. (2000), *Carbohydrate Polymers* **42**, 283-286.
- 176 Kai, X., Enpu, W., Yueping, L., Yuan, L. (1993), *Xianweisu Kexue Yu Jishu* **1**, 46-52.
- 177 Glinel, K., Sauvage, J. P., Oulyadi, H., Huguet, J. (2000), *Carbohydrate Research* **328**, 343-354.
- 178 Xu, A., Seib, P. A. (1997), *J. Cereal Science* **25**, 17-26.
- 179 Richardson, S., Nilsson, G. S., Bergquist, K.-E., et al. (2000), *Carbohydrate Research* **328**, 365-373.
- 180 Wilke, O., Mischnick, P. (1997), *Starch/Stärke* **49**, 453-458.
- 181 Steeneken, P. A. M., Woortman, A. J. J. (1994), *Carbohydrate Research* **258**, 207-221.
- 182 Kulicke, W.-M., Roessner, D., Kull, W. (1993), *Starch/Stärke* **45**, 445-450.
- 183 Sommermeyer, K., Henning, K., Görg, M., Maul, T. (1998), EP 1001993 B1.
- 184 Singh, V., Ali, S. Z. (2000), *Carbohydrate Polymers* **41**, 191-195.
- 185 Nitsch, E. (1993), O DE 4132701 A1.
- 186 Sommermeyer, K., Görg, M., Henning, K. (1996), WO 96/10042.
- 187 Klingler, R., Busch, K.-G., Vahedi, B. (1997), *Starch/Stärke* **49**, 391-395.
- 188 Green, J. W. (1963), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Ed. Whistler, R. L., Vol. III, Academic Press, New York, 49-54.
- 189 Yalpani, M. (1988), *Studies in Organic Chemistry* **36**, Polysaccharides: Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations, Elsevier Amsterdam.
- 190 Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., et al. (2001), *Comprehensive Cellulose Chemistry* Volume 1, Fundamentals and Analytical Methods, Wiley-VCH Weinheim.
- 191 Hauptmann, S (1988), *Organische Chemie*, 2. Aufl., VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig.
- 192 Ceh, M., Stropnik, C., Leskovar, S. (1976), *Die Stärke* **28**, 122-125.

- 193 Zhao, C. (1999), EP 1078636 A1.
- 194 Walsh, C. (1977), Enzymatic reaction mechanisms, W. H. Freeman and Company San Francisco.
- 195 Robyt, J. F., French, D. (1967), Arch. Biochem. Biophys. **122**, 8-16.
- 196 Qian, M., Haser, R., Buisson, G. (1994), Biochemistry **33**, 6284-6294.
- 197 Machius, M., Vertesy, L., Huber, R. (1996), J. Mol. Biol. **260**, 409-421.
- 198 Chan, Y., Braun, P. J., French, D., Robyt, J. F. (1984), Biochemistry **23**, 5795-5800.
- 199 Mikami, B., Motoyasu, A., Utsumi, S. (1997), J. Appl. Glycosci **44**, 387-388.
- 200 Manners, D. J. (1997), J. Appl. Glycosci. **44**, 83-85.
- 201 Banks, W., Greenwood, C. T., Muir, D. D. (1973), Brit. J. Pharmac. **47**, 172-178.
- 202 Yoshida, M., Yamashita, T., Matsuo J., Kishikawa, T. (1973), Die Stärke **25**, 373-376.
- 203 Yoshida, M., Kishikawa, T. (1984), Starch/Stärke **36**, 167-169.
- 204 Yoshida, M., Minami, Y., Kishikawa, T. (1984), Starch/Stärke **36**, 209-212.
- 205 Ferber, H. P., Nitsch, E., Förster, H. (1985), Drug Res. **35**, 615-622.
- 206 Leegwater, D. C., Luten, J. B. (1971), Die Stärke **23**, 430-432.
- 207 Hood, L. F. (1978), Carbohydrate Research **61**, 53-66.
- 208 Wootton, M., Chaudhry, M. A. (1981), Starch/Stärke **33**, 135-137.
- 209 Azemi, B. M. N. M., Wootton, M. (1984), Starch/Stärke **36**, 273-275.
- 210 Azemi, B. M. N. M., Wootton, M. (1985), Starch/Stärke **37**, 50-52.
- 211 Azemi, B. M. N. M., Wootton, M. (1995), Starch/Stärke **47**, 465-469.
- 212 Perera, C., Hoover, H. (1998), Starch/Stärke **50**, 206-213.
- 213 Kavitha, R., BeMiller, J. N. (1998), Carbohydrate Polymers **37**, 115-121.
- 214 Steeneken, P. A. M., Smith, E. (1991), Carbohydrate Research **209**, 239-249.
- 215 Burgt, Y. E. M. van der, Bergsma, J., Bleeker, I. P., et al. (2000), Carbohydrate Research **325**, 183-191.
- 216 Burgt, Y. E. M. van der, Bergsma, J., Bleeker, I. P., et al. (2000), Carbohydrate Research **327**, 423-429.
- 217 Hayashi, T. (1967), Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Japan) **8**, 151-155.
- 218 Chen, Ling, Lu, Shengyu, Wen, Qibiao (1999), Ziran Kexueban (China) **6**, 79-83.
- 219 Kwon, K., Auh, J. H., Park, K. H., et al. (1997), Starch/Stärke **49**, 499-505.
- 220 Zhang, Jingwu, Wu, Dahua (1991), Tianjin Daxue Xuebao (Japan) **4**, 82-87.
- 221 Zhang, Jingwu, Wu, Dahua (1992), Huaxue Shijie (Japan) **7**, 310-314.
- 222 Robin, J. P., Mercier, C., Charbonniere R., Guilbot, A. (1974), Cereal Chem. **51**, 389-406.
- 223 Shimizu, T., Araki, M. (1970), Nihon-Nogei-Kagaku-Kaishi (Japan) **44**, 107-110.
- 224 Zhang, J., Wu, D. (1992), J. Appl. Polym. Sci. **46**, 369-374.
- 225 Marguth, R., Oortmann, G.-H. (1993), Krankenhauspharmazie **14**, 300-303.
- 226 Uekama, K., Horiuchi, Y., Hirayama, F. (1989), Carbohydrate Research **192**, 323-330.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Anhydroglucoseeinheit (engl. AGU)
ANM	Tetramethylol-Acetylendiarnstoff-vernetzte Stärke (<i>Amylum non mucilaginosum</i>)
APT	Attached Proton Test
aPTT	activated Partial Thromboplastin Time
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total reflexion
bidest.	bidestilliert
BSE	bovine spongioforme Encephalopathie
C2/C6	Unter dem C2/C6-Verhältnis wird das Verhältnis der molaren Substitution der OH-Gruppe an C-Atom 2 der Anhydroglucoseeinheit zur molaren Substitution der OH-Gruppe an C-Atom 6 verstanden.
CES	Cyanoethylstärke
CM-HES	Carboxymethyl-hydroxyethylstärke
CMS	Carboxymethylstärke
COSY	Correlation Spectroscopy
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	degree of polymerization (Polymerisationsgrad)
DS / MS	degree of substitution (in der englischsprachigen Literatur oft identisch mit MS)
dynam.	dynamisch
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	und andere
ext. St.	externer Standard
Fa.	Firma
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GLC	Gas Liquid Chromatography

Glc	Glucose
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunden
HE-	Hydroxyethylrest
HES	Hydroxyethylstärke
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGATED	Inversed Gated Decoupling
kinemat.	kinematisch
KOD	Kolloid Osmotischer Druck
MALLS	Multi-Angle Laser Light Scattering
Mn	mittleres Molekulargewicht (Zahlenmittel)
MPS	mononukleares phagozytierendes System
MS	Massenspektroskopie
MS	Molarer Substitutionsgrad (Mol Substituent pro Mol Glucose)
Mw	mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Spectroscopy)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NS	Normschliff
P _i	anorganisches Phosphat
RE(%)	Reaktionseffizienz in %. Das prozentuale Verhältnis der ursprünglich eingesetzten Veretherungs- bzw. Veresterungsmittelmenge zur nach der Reaktion am Polymer gebundenen Menge.
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RES	reticuloendetheliales System (heute als MPS bezeichnet)
RT	Raumtemperatur
T.S.	Trockensubstanz
Tab.	Tabelle
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TSP	3-(Trimethylsilyl)-propionsäure Natriumsalz
TZ	Thrombinzeit
WF	Willebrand Faktor
zzgl.	zuzüglich

SUBSTANZVERZEICHNIS*partiell abgebaute Stärken*

- 1.1 Abbaustärke, $1,7 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.2 Abbaustärke, $0,6 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.3 Abbaustärke, 172.000 g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.4 Abbaustärke, 200.000 g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.5 Abbaustärke, $6,5 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.6 Abbaustärke, $3,0 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.7 Abbaustärke, $3,3 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.8 Abbaustärke, $4,0 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.9 Abbaustärke, $1,1 \cdot 10^6$ g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.10 Abbaustärke, 288.000 g/mol, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.11 Abbaustärke, aus nativer Wachsmaisstärke
- 1.12 Abbaustärke, aus dünnkochender Wachsmaisstärke
- 1.13 Abbaustärke, 270.000 g/mol, aus dünnkochender Wachsmaisstärke
- 1.14 Abbaustärke, 110.000 g/mol, aus dünnkochender Wachsmaisstärke
- 1.15 Abbaustärke, 143.000 g/mol, aus Kartoffelstärke

partiell abgebaute, reduzierte Stärken bzw. reduzierte Stärkederivate

- 2.1 reduzierte Abbaustärke, 269.000 g/mol, aus Abbaustärke 1.10
- 2.2 reduzierte Abbaustärke, 261.000 g/mol, aus Abbaustärke 1.11
- 2.3 reduzierte Abbaustärke, 260.000 g/mol, aus Abbaustärke 1.12
- 2.4 reduzierte Abbaustärke, 264.000 g/mol, aus Abbaustärke 1.13
- 2.5 reduzierte Carboxymethylstärke, MS=0,18, aus Carboxymethylstärke 16.35
- 2.6 reduzierte Hydroxyethylstärke MS=0,50, aus Hydroxyethylstärke 200/0,5

Stärkeester

- 3.1 Acetylstärke, MS=0,38, aus Abbaustärke 1.1
- 4.1 Propionylstärke, MS=0,26, aus Abbaustärke 1.1
- 5.1 Succinylstärke, MS=0,12, aus Abbaustärke 1.1
- 5.2 Succinylstärke, MS=0,14, aus Abbaustärke 1.1
- 5.3 Succinylstärke, MS=0,32, aus Abbaustärke 1.1
- 5.4 Succinylstärke, MS=0,35, aus Abbaustärke 1.1
- 5.5 Succinylstärke, MS=0,43, aus Abbaustärke 1.1

- 5.6 Succinylstärke, MS=0,63, aus Abbaustärke 1.1
- 5.7 Succinylstärke, MS=0,68, aus Abbaustärke 1.1
- 5.8 Succinylstärke, MS=0,70, aus Abbaustärke 1.14
- 5.9 Succinylstärke, MS=0,99, aus Abbaustärke 1.1
- 6.1 2,2-Dimethylsuccinylstärke, MS=0,25, aus Abbaustärke 1.9
- 7.1 Dodecenylnsuccinylstärke, MS=0,04, aus Abbaustärke 1.9
- 8.1 Glutarylstärke, MS=0,45, aus Abbaustärke 1.1
- 9.1 2,2-Dimethylglutarylstärke, MS=0,38, aus Abbaustärke 1.9
- 10.1 2,2-Dimethylglutarylstärke, MS=0,57, aus Abbaustärke 1.9
- 11.1 3-Oxaglutarylstärke, MS<0,04, aus Abbaustärke 1.9
- 12.1 Di-O-Acetylweinsäurestärkeester, MS<0,04, aus Abbaustärke 1.9
- 13.1 Ethoxycarbonyl-/formylstärke, MS=0,15/0,17, aus Abbaustärke 1.1
- 14.1

Stärkeether

- 15.1 6-O-Tritylstärke, aus Abbaustärke 2.3
- 16.1 Carboxymethylstärke, MS=0,13, aus Abbaustärke 1.1
- 16.2 Carboxymethylstärke, MS=0,05, aus Abbaustärke 1.1
- 16.3 Carboxymethylstärke, MS=0,37, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.4 Carboxymethylstärke, MS=0,69, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.5 Carboxymethylstärke, MS=0,70, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.6 Carboxymethylstärke, MS=0,37, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.7 Carboxymethylstärke, MS=0,47, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.8 Carboxymethylstärke, MS=0,40, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.9 Carboxymethylstärke, MS=0,37, aus Abbaustärke 1.1
- 16.10 Carboxymethylstärke, MS=0,26, aus Abbaustärke 1.1
- 16.11 Carboxymethylstärke, MS=0,07, aus Abbaustärke 1.1
- 16.12 Carboxymethylstärke, MS=0,27, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.13 Carboxymethylstärke, MS=0,72, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.14 Carboxymethylstärke, MS=1,18, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.15 Carboxymethylstärke, MS=0,50, aus Abbaustärke 1.14
- 16.16 Carboxymethylstärke, MS=0,59, aus Abbaustärke 1.3
- 16.17 Carboxymethylstärke, MS=0,71, aus Abbaustärke 1.10
- 16.18 Carboxymethylstärke, MS=1,17, aus Abbaustärke 1.10
- 16.19 Carboxymethylstärke, MS=1,29, aus Abbaustärke 1.10
- 16.20 Carboxymethylstärke, MS=1,49, aus Abbaustärke 1.10
- 16.21 Carboxymethylstärke, MS=0,71, aus Abbaustärke 1.10
- 16.22 Carboxymethylstärke, MS=0,78, aus reduzierter Abbaustärke 2.2
- 16.23 Carboxymethylstärke, MS=0,11, aus Abbaustärke 1.1

- 16.24 Carboxymethylstärke, MS=0,23, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.25 Carboxymethylstärke, MS=0,45, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.26 Carboxymethylstärke, MS=0,55, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.27 Carboxymethylstärke, MS=0,21, aus Abbaustärke 1.10
- 16.28 Carboxymethylstärke, MS=0,47, aus Abbaustärke 1.10
- 16.29 Carboxymethylstärke, MS=0,50, aus Abbaustärke 1.10
- 16.30 Carboxymethylstärke, MS=1,22, aus Abbaustärke 1.10
- 16.31 Carboxymethylstärke, MS=0,71, aus Abbaustärke 1.10
- 16.32 Carboxymethylstärke, MS=0,21, aus reduzierter Abbaustärke 2.2
- 16.33 2,3-O-Carboxymethyl-6-O-tritylstärke, MS=0,95, aus 6-O-Tritylstärke 15.1
- 16.34 Carboxymethylstärke, MS=0,07, aus Abbaustärke 1.14
- 16.35 Carboxymethylstärke, MS=0,18, aus nativer Wachsmaisstärke
- 16.36 Carboxymethylstärke, MS=0,55, aus Abbaustärke 1.10
- 16.37 Carboxymethylstärke, MS=1,12, aus Abbaustärke 1.10
- 16.38 Carboxymethylstärke, MS=1,39, aus Abbaustärke 1.10
- 16.39 Carboxymethylstärke, MS=1,33, aus Abbaustärke 1.10
- 16.40 Carboxymethylstärke, MS=1,44, aus Abbaustärke 1.10
- 16.41 Carboxymethylstärke, MS=0,53, aus reduzierter Abbaustärke 2.2
- 16.42 Carboxymethyl-hydroxyethylstärke, MS=0,04/0,50, aus HES 200/0,5
- 17.1 Carboxymethylstärke, MS=0,42, aus dünnkochender Wachsmaisstärke
- 17.2 Carboxymethylstärke, MS=0,31, aus dünnkochender Wachsmaisstärke
- 17.3 Carboxymethylstärke, MS=0,34, aus Abbaustärke 1.15
- 17.4 Carboxymethylstärke, MS=0,41, aus Abbaustärke 1.15
- 17.5 Carboxymethylstärke, MS=0,75, aus Abbaustärke 1.15
- 17.6 Carboxymethylstärke, MS=0,33, aus Abbaustärke 1.15
- 17.7 Carboxymethylstärke, MS=0,06, aus Abbaustärke 1.15
- 17.8 Carboxymethylstärke, MS=0,14, aus Abbaustärke 1.15
- 17.9 Carboxymethylstärke, MS=0,18, aus Abbaustärke 1.15
- 17.10 Carboxymethylstärke, MS=0,20, aus Abbaustärke 1.15

DANKSAGUNG

Für die fachliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Follmann danken. Seine zahlreichen Denkanstöße, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine kritischen Fragen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Herrn Follmann sei ebenso für seinen Einsatz in der Zusammenarbeit mit der Firma B. Braun Melsungen gedankt.

Herrn Prof. Dr. Herbert Frauenrath danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Maurer, der sämtliche NMR-Experimente durchführte und mir über die Jahre hinweg stets helfend zur Seite stand.

Meinen Kolleginnen und Kollegen in der Biochemie danke ich vor allem für die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Frau Irmtraud Hammerl-Witzel und Frau Angelika Wattrudt sei an dieser Stelle für die tatkräftige und hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Enzym-Assays gedankt. Frau Frauke Tönsmann danke ich für ihren vorbildlichen Einsatz bei der Optimierung von Carboxymethylierungsreaktionen im Rahmen ihres Praktikums.

Herrn Prof. Dr. F. W. Herberg und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die nette Aufnahme in das neubesetzte Fachgebiet Biochemie danken.

Der Firma B. Braun Melsungen AG gilt mein besonderer Dank für die finanzielle Förderung, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Hierbei seien insbesondere Herr Dr. Rainer Dammeyer und Frau Kerstin Faude genannt, welche mir durch ihre fachliche und freundschaftliche Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz fortwährend sehr geholfen haben.

Meiner Freundin Natascha und meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie mich die ganze Zeit über auf vielfältige Weise unterstützt haben.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

TABELLENANHANG

CMS aus niederen Alkoholen**CMS aus Methanol**

Tab. A-1. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Methanol.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
048 16.2	0,05	-	-	-	-	1 : 0,5 : 1,3	9,4	-
044 16.1	0,13	0,10	0,03	0,02	3,3	1 : 0,7 : 1,6	18,8	C2>C6≥C3
053 16.3	0,37	0,31	0,06	0,05	5,2	1 : 0,7 : 1,6	53,6	C2>C6≥C3
060 16.6	0,37	0,30	0,07	-	4,3	1 : 0,6 : 1,4	61,7	C2>C6>C3
062 16.8	0,40	0,34	0,06	-	5,7	1 : 0,9 : 2,0	44,0	C2>C6>C3
061 16.7	0,47	0,39	0,08	-	4,9	1 : 0,8 : 1,6	60,3	C2>C6>C3
054 16.4	0,69	0,58	0,11	0,06	5,3	1 : 1,4 : 3,2	50,4	C2>C6>C3
055 16.5	0,70	0,56	0,14	0,06	4,0	1 : 2,1 : 4,9	34,0	C2>C6>C3

CMS aus Ethanol

Tab. A-2. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Ethanol.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
<i>042</i> 16.11	0,07	0,04	0,03	-	1,3	1 : 0,8 : 2	9,1	C2>C6>C3
<i>040</i> 16.9	0,22	0,16	0,06	0,03	2,7	1 : 0,8 : 2	28,6	C2>C6>C3
<i>041</i> 16.10	0,26	0,17	0,09	0,03	1,9	1 : 0,8 : 2	33,8	C2>C6>C3
<i>050</i> 16.12	0,27	0,19	0,08	0,03	2,4	1 : 0,8 : 2	33,8	C2>C6>C3
<i>051</i> 16.13	0,72	0,59	0,13	0,08	4,5	1 : 1,5 : 3,9	48,0	C2>C6>C3
<i>052</i> 16.14	1,18	0,86	0,32	0,17	2,7	1 : 2,3 : 7,5	50,9	C2>C6>C3

CMS aus 2-Propanol

Tab. A-3. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in 2-Propanol.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
<i>063</i> 16.15	0,50	0,38	0,12	-	3,2	1 : 0,8 : 1,6	64,1	C2>C6>C3
<i>066</i> 16.16	0,59	0,48	0,11	-	4,4	1 : 1,1 : 1,8	52,2	C2>C6>C3
<i>FE1</i> 16.17	0,71	0,57	0,14	-	4,1	1 : 1 : 1	71,0	C2>C6>C3
<i>FE5</i> 16.21	0,71	0,39	0,32	-	1,2	1 : 2 : 4	35,3	C2≥C6>C3
<i>FE19</i> 16.22	0,78	0,63	0,15	0,08	4,2	1 : 1 : 1	78,0	C2>C6>C3
<i>FE2</i> 16.18	1,17	0,88	0,29	0,11	3,0	1 : 2 : 2	58,5	C2>C6>C3
<i>FE3</i> 16.19	1,29	0,86	0,43	-	2,0	1 : 3 : 3	43,0	C2>C6>C3
<i>FE4</i> 16.20	1,49	0,97	0,52	-	1,9	1 : 4 : 4	37,3	C2>C6>C3

CMS aus organischen Lösungsmitteln**CMS aus Aceton**

Tab. A-4. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Aceton.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
<i>046</i> 16.23	0,11	0,08	0,03	-	2,7	1 : 0,9 : 1,3	12,5	C2>C6>C3
<i>056</i> 16.24	0,23	-	-	-	-	1 : 0,9 : 1,3	26,7	C2>C6>C3
<i>057</i> 16.25	0,45	0,38	0,07	0,04	5,4	1 : 1 : 1,6	43,7	C2>C6>C3
<i>058</i> 16.26	0,55	0,45	0,10	0,04	4,5	1 : 1,2 : 2	45,8	C2>C6>C3

CMS aus DMSO

Tab. A-5. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in DMSO.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
<i>FE11</i> 16.27	0,21	0,18	0,03	-	6,0	1 : 1 : 1	21,0	C2>C3≥C6
<i>FE20</i> 16.32	0,21	0,18	0,03	0,02	6,0	1 : 1 : 1	21,0	C2>C6≥C3
<i>FE12</i> 16.28	0,47	0,40	0,07	-	5,7	1 : 2 : 2	23,5	C2>C6>C3
<i>FE13</i> 16.29	0,50	0,44	0,06	-	7,3	1 : 3 : 3	16,7	C2>C6>C3
<i>FE15</i> 16.31	0,71	0,45	0,26	-	1,7	1 : 5 : 3	14,2	C2>C6>C3
<i>095</i> 16.33	0,95	0,92	0,03	0,21	30,7	-	-	C2>C3>>C6
<i>FE14</i> 16.30	1,22	0,39	0,83	-	0,47	1 : 4 : 2	30,5	C6>C2>C3

CMS aus Wasser**CMS aus Wasser**

Tab. A-6. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Wasser.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
<i>091</i> 16.42	0,04	-	-	-	-	1 : 0,4 : 0,4	10,0	-
<i>047</i> 16.34	0,07	0,04	0,03	-	1,3	1 : 1,4 : 2,4	5,0	C2>C6>C3
<i>049</i> 16.35	0,18	0,15	0,03	-	5,0	1 : 1,4 : 2,4	12,9	C2>C6>C3
<i>FE18</i> 16.41	0,53	0,45	0,08	-	5,6	1 : 1 : 1	53,0	C2>C6>C3
<i>FE6</i> 16.36	0,55	0,44	0,11	-	4,0	1 : 1 : 1	55,0	C2>C6>C3
<i>FE7</i> 16.37	1,12	0,81	0,31	-	2,6	1 : 2 : 2	56,0	C2>C6>C3
<i>FE9</i> 16.39	1,33	0,91	0,42	-	2,2	1 : 5 : 3	26,6	C2>C6>C3
<i>FE8</i> 16.38	1,39	0,95	0,44	-	2,2	1 : 3 : 3	46,3	C2>C6>C3
<i>FE10</i> 16.40	1,44	0,97	0,47	-	2,1	1 : 5 : 4	28,8	C2>C6>C3

CMS aus Wasser im Eintopfverfahren

Tab. A-7. Ergebnisse der Carboxymethylierungen in Wasser nach sequentieller Transformation.

Substanz	MS	MS(C2+C3)	MS(C6)	MS(C3)	MS(C2+C3)/ MS(C6)	molares Verhältnis	RE%	Reaktivität
092 17.7	0,06	0,04	0,02	-	2,0	-	-	C2>C6>C3
093 17.8	0,14	0,13	0,01	-	13,0	-	-	C2>C3>C6
094 17.9	0,18	0,16	0,02	-	8,0	-	-	C2>C6≥C3
100 17.10	0,20	0,18	0,02	0,02	9,0	-	-	C2>C3≥C6
074 17.2	0,31	0,27	0,04	-	6,8	1 : 0,5 : 0,5	62,0	C2>C6≥C3
086 17.6	0,33	0,30	0,03	-	10,0	-	-	C2>C6≥C3
083 17.3	0,34	0,30	0,04	-	7,5	-	-	C2>C6≥C3
084 17.4	0,41	0,36	0,05	-	7,2	-	-	C2>C6≥C3
073 17.1	0,42	0,37	0,05	-	7,4	1 : 0,6 : 0,6	70,0	C2>C6≥C3
085 17.5	0,75	0,65	0,10	-	6,5	-	-	C2>C6>C3