

**Strukturaufklärung
von Cellulosederivaten und Galactanen
mittels chemischer, chromatographischer und
massenspektrometrischer Methoden**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jürgen Heinrich
aus Kaiserslautern

Hamburg 1999

1. Gutachterin: Prof. Dr. P. Mischnick
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Voß

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.1999

für Jonathan

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
November 1994 bis Dezember 1998 unter der Leitung von
Frau Prof. Dr. P. Mischnick
am Institut für Organische Chemie
der Universität Hamburg durchgeführt.

Frau Prof. Dr. P. Mischnick danke ich für die interessante Themenstellung, ihre freundliche Unterstützung und das fortwährende Interesse am Verlauf der Arbeit, sowie die vielfachen Möglichkeiten zur Teilnahme an Tagungen.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Cellulose	4
1.2	Amylose	5
1.3	Strukturaufklärung von Polysacchariden und Polysaccharidderivaten	6
2	Zielsetzung.....	15
3	Spezieller Teil	16
3.1	Analytik von Methylcellulosen und Celluloseacetaten.....	16
3.1.1	Methodisches Konzept.....	18
3.1.2	Substituentenverteilung in Methylcellulosen.....	37
3.1.3	Bestimmung der Substituentenverteilung in Celluloseacetaten'	56
3.1.4	Labeling für die massenspektrometrische Analyse	70
3.2	Analytische Bestimmung von Peeling- und Oxidationsprodukten in Ethylcellulose ...	88
3.2.1	Problemstellung	88
3.2.2	Analytische Ansätze.....	91
3.2.3	Ergebnisse	98
3.2.4	Zusammenfassung.....	102
3.3	Galactane.....	103
3.3.1	Chiralität und Trennmöglichkeiten von D- und L-Zuckern.....	103
3.3.2	Stand der Forschung.....	105
3.3.3	Ergebnisse	107
3.3.4	Zusammenfassung.....	117
4	Zusammenfassung.....	119
5	Summary	122
6	Experimenteller Teil	125
6.1	Allgemeines (Reagenzien/Meßmethoden).....	125
6.2	Probenmaterial	128
6.3	Chemische Methoden.....	129
6.3.1	O-Alkylierungen	129
6.3.2	Methylierungsanalyse	130
6.3.3	Reduktiver Abbau	131
6.3.4	Analysenmethode für carboxylische Gruppen in Ethylcellulose	132
6.3.5	Weitere Derivatisierungsmethoden.....	133
6.3.6	Partialabbau von Cellulosederivaten.....	133

6.4	Synthesen von Modellsubstanzen	136
6.4.1	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -methyl-D-glucose (9-b).....	136
6.4.2	1-Desoxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-1-N-propylamino-D-sorbit (21)	136
6.4.3	1-Desoxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-1- <i>N,N,N</i> -(dimethylpropyl)- ammonium-D-sorbit (22)	137
6.4.4	3-Desoxy-D- <i>arabino/ribo</i> -hexono-1,4-lacton (23)	137
6.4.5	2-Desoxy-D- <i>arabino</i> -hexono-1,5-lacton (25).....	138
6.4.6	1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-D-dulcitol (63-D):	139
6.4.7	1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-L-dulcitol (63-L)	140
6.4.8	1,5-Anhydro-D-dulcitol (79-D).....	140
6.4.9	1,5-Anhydro-L-dulcitol (79-L).....	141
7	Anhang.....	143
7.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	143
7.2	Sicherheitsdaten verwendeter Chemikalien	145
7.3	NMR-Spektren.....	147
7.4	Massenspektren.....	153
8	Literaturverzeichnis	177

1 Einleitung

Eine der wichtigsten Naturstoffklassen bilden die Kohlenhydrate. Unter den nachwachsenden Rohstoffen nehmen sie neben den Proteinen, Fetten und sonstigen Naturstoffen (Steroide, Terpene, Flavonoide etc.) die erste Stelle in der Synthese von Biomasse ein, wobei der pflanzliche Anteil allein knapp 170 Mrd. Tonnen Jahresproduktion ausmacht. Die Hauptvertreter Stärke und Cellulose waren seit jeher wichtige Nahrungsmittel (Getreide, Kartoffeln) und Nutzmaterialien (Holz, Textilien). Durch chemische Derivatisierung nahmen sie auch als industrielle Rohstoffe einen wichtigen Platz in der Wirtschaft ein. Die Entdeckung großer Ölmengen und die schier unerschöpflichen Möglichkeiten der daraus resultierenden Petrochemie drängte das Interesse an den klassischen nachwachsenden Rohstoffe in den Hintergrund. Nach dem Ölpreisschock Anfang der siebziger Jahre und angesichts landwirtschaftlicher Überkapazitäten finden Cellulose und Stärke neben anderen Biopolymeren wie Inulin ihren Platz in Wirtschaft und Wissenschaft, wovon zahlreiche Forschungsprojekte und Symposien zeugen^{1,2,3}.

Aufgrund ihrer hohen Funktionalität (Polyhydroxyaldehyd/keton) besteht bei Kohlenhydraten die Möglichkeit zu intra- und intermonomerer Verknüpfung, die zu höheren Strukturen (Oligomere, Polymere und supramolekulare Strukturen) führt. Nach einfacher Verknüpfung bleiben immer noch Hydroxyfunktionen als Reaktionszentren frei, die zum Aufbau von Kettenverzweigungen (Amylopektin), zur Substitution (Acetate, Sulfate, Pyruvate, Phosphate, etc.) sowie durch intermolekulare Wechselwirkungen zur Bildung supramolekularer Strukturen (Helices, Kristallinität) genutzt werden können.

Entsprechend dieser Fülle von Kombinationsmöglichkeiten nehmen Oligo- und Polysaccharide verschiedene, biologisch wichtige Funktionen ein. Sie bilden die Stützsubstanz in Pflanzen und Tieren (Cellulose, Chitin), fungieren als biologische Speichersubstanz (Stärke, Glykogen), können Gele bilden und spielen eine große Rolle in biologischen Regulations- und Erkennungsmechanismen, die von Glycoproteinen und Lipopolysacchariden gesteuert werden. Das Hauptprodukt pflanzlicher Biosynthese ist mit weitem Abstand die Cellulose, die ein sehr einheitliches Molekül darstellt. Sie besteht aus D-Glucose, die $\beta(1\rightarrow4)$ -glucopyranosidisch verknüpfte Ketten bildet (Abb. 1-1 oben). Die elementare Wiederholungseinheit ist die Cellobiose. Die Anhydroglucoseeinheit (AGU) nimmt hier die 4C_1 -Sesselform ein und stellt aufgrund der vollständig äquatorialen Stellung aller O-Atome die energetisch günstigste Konformation dar. Die Kettenlängen von Cellulose reichen von 1000 bis 15000 je nach Herkunft und Aufschlußverfahren⁴.

Im Tier- und Pflanzenreich existiert mit Chitin ein der Cellulose strukturell sehr ähnliches Gerüstpolysaccharid. Im Gegensatz zur Cellulose tragen hier alle C-2-Kohlenstoffatome eine

Acetamidogruppe (Abb. 1-1 unten). Chitin kommt vor allem im Panzer von Käfern und Krustentieren sowie in Pilzen vor⁵.

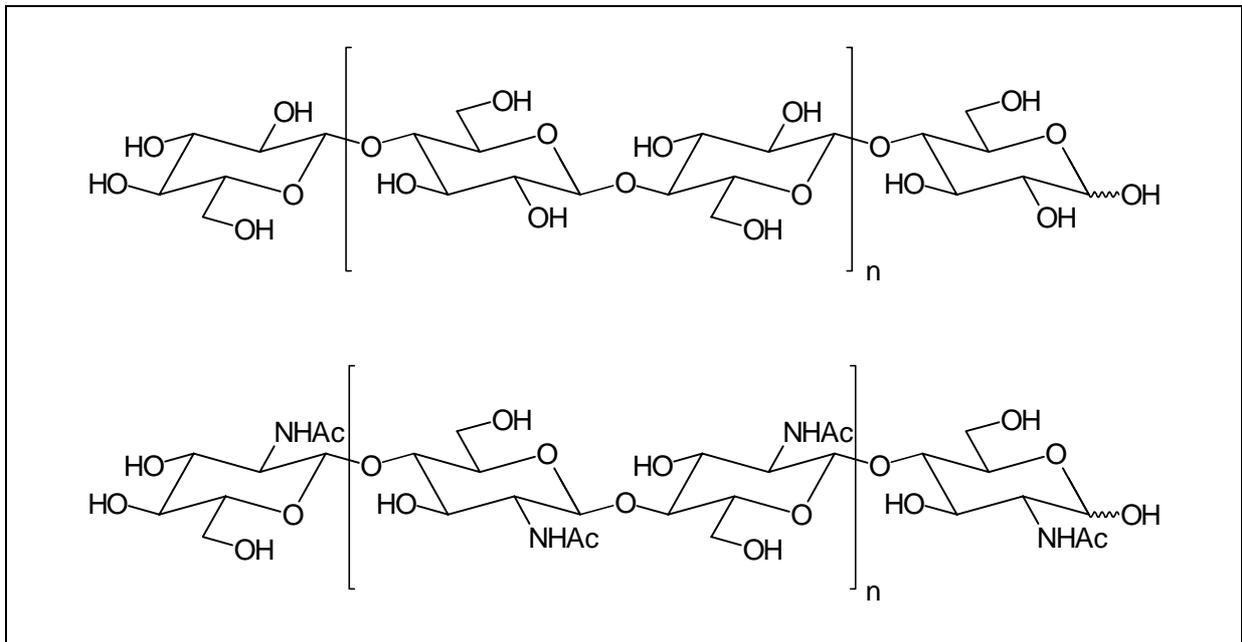


Abb. 1-1: Molekulare Struktur von Cellulose (oben) und Chitin (unten).

An dritter Stelle der natürlich vorkommenden Polysaccharide steht die Stärke. Sie besteht aus zwei Komponenten, der Amylose, die aus unverzweigten Ketten von $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften Glucosebausteinen aufgebaut ist, und dem Amylopektin, welches zusätzlich unregelmäßig an der primären Hydroxylfunktion Verzweigungen aufweist (Abb. 1-2).

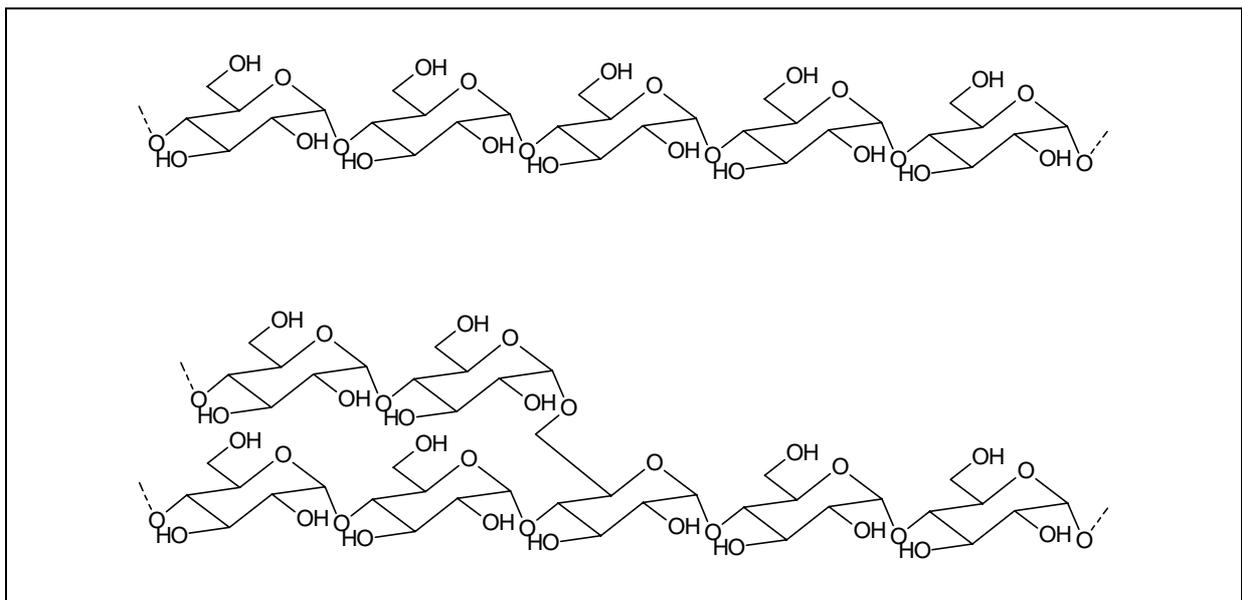


Abb. 1-2: Molekulare Struktur von Amylose (oben) und Amylopektin (unten).

Weitere aus $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften Glucoseeinheiten bestehende Oligo- und Polysaccharide sind beispielsweise Cyclodextrine und Pullulan (Abb. 1-3).

Bei den Cyclodextrinen handelt es sich um cyclische Oligosaccharide, die durch die Einwirkung von *Bacillus macerans* aus Stärke gewonnen werden und eine Ringgröße von 6-8 α -glycosidisch verknüpften AGUs aufweisen. Sie werden nach der Ringgröße des Makrocyclus als α - (n=6), β - (n=7) und γ -Cyclodextrin (n=8) bezeichnet.

Pullulan ist ein Polysaccharid, das von *Aureobasidium pullulans* hergestellt wird und eine trimere Wiederholungseinheit (repeating unit) von $\rightarrow 6)$ - α -D-Glc_p-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc_p-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc_p-(1 \rightarrow aufweist.

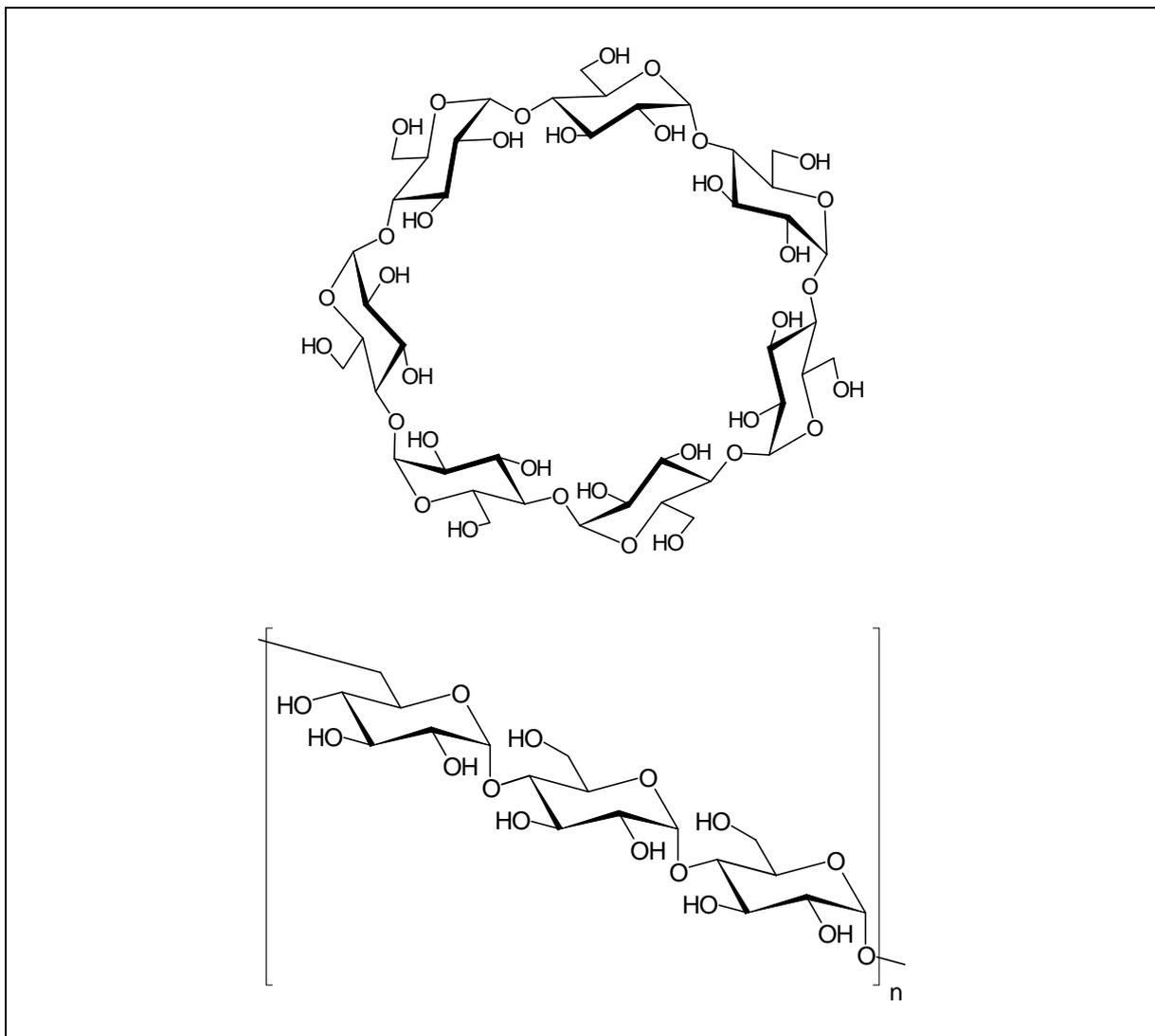


Abb. 1-3: Molekulare Struktur von β -Cyclodextrin (oben) und Pullulan (unten).

1.1 Cellulose

Wie bereits erwähnt können Polysaccharide aufgrund ihrer hohen Dichte von funktionellen Gruppen höhere Strukturen bilden, die auf die Grundstruktur zurückzuführen sind. Bei der Cellulose führt die Rotation zweier benachbarter Glucoseeinheiten um 180° zur Bildung langer Ketten, die intra- und intermolekulare H-Brückenbindungen ausbilden (Abb. 1-4)^{6,7}.

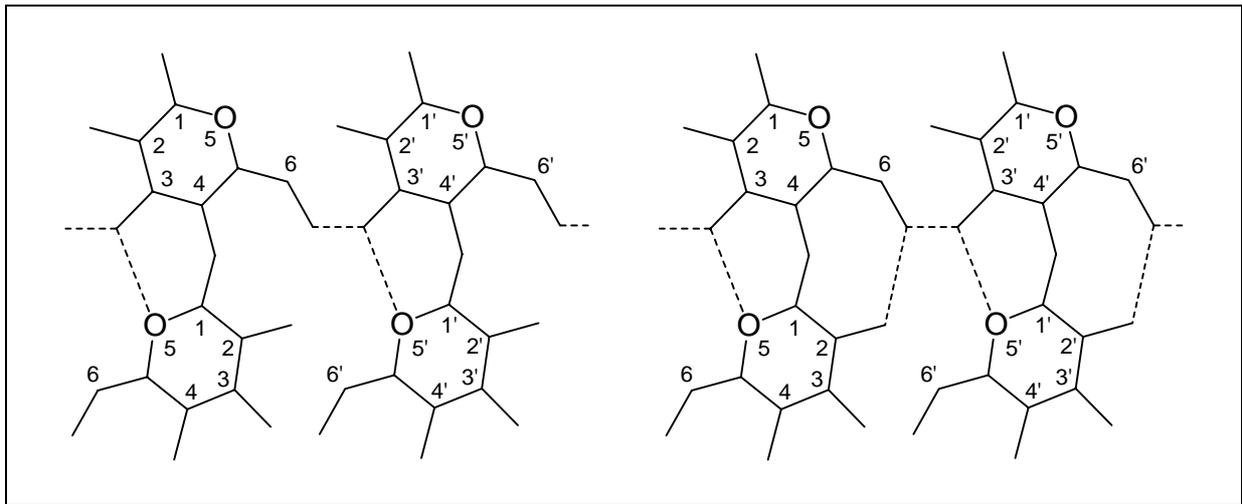


Abb. 1-4: Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb und zwischen den Cellulosemolekülen nach Marchessault und Liang⁶ (links) und Gardner und Blackwell⁷ (rechts).

Die Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich ausschließlich innerhalb einer Schicht in den Cellulosekristallen nicht jedoch zwischen den Celluloseschichten aus⁸. Es wechseln sich kristalline mit amorphen Bereichen ab, die als fransenmicellare⁹ oder fransenfibrilläre Struktur aufgefaßt werden können (Abb. 1-5)^{10,11}.

Auf der molekularen Ebene koexistieren zwei kristalline Phasen, Cellulose I_α und I_β ¹², wovon letztere die thermodynamisch stabilere ist¹³. Cellulose I_α kristallisiert in einer triklinen und Cellulose I_β in einer monoklinen Elementarzelle. Die Ausrichtung der Polymerketten ist parallel, d.h. auf der einen Seite befinden sich die reduzierenden und auf der anderen Seite die terminalen Enden¹⁴.

Behandelt man Cellulose mit 23 %iger Natronlauge, (Mercerisierungsprozeß, benannt nach dem Entdecker Mercer, 1844) werden durch das Eindiffundieren des Reagenz' und Aufbrechen der H-Brückenbindungen die kristallinen Bereiche weitgehend zerstört^{15,16}. Man erhält nach der Regenerierung Cellulose II. Die Ausrichtung der Cellulosemoleküle in der kristallinen Elementareinheit ist antiparallel¹⁷.

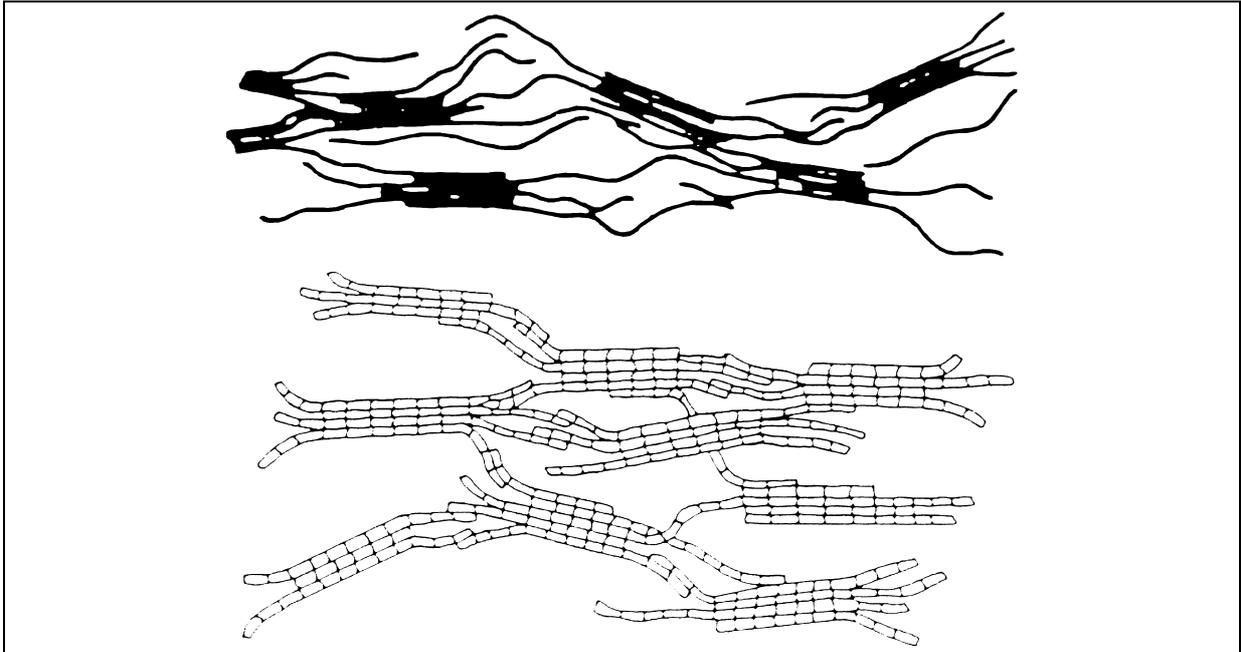


Abb. 1-5: Fransenmicellare (oben, aus Krässig¹⁸) und fransenfibrilläre Struktur (unten)¹⁹ von Cellulose.

Die wichtigsten Quellen für Cellulose sind Baumwolle und Holz. Während Cellulose aus Baumwolle direkt gewonnen wird, müssen bei Holz, wo der Celluloseanteil je nach Herkunft 40-50 % beträgt, die weiteren Bestandteile (Hemicellulose und Lignin) abgetrennt werden. Dabei kommen zwei Aufschlußverfahren zur Anwendung: Das Sulfat- (Kraft-) und das Sulfitverfahren. Beide Verfahren arbeiten unter hohem Druck (5-10 bar) und hohen Temperaturen (140-180 °C). Beim Sulfatverfahren wird mit Natronlauge, Natriumsulfid, Natriumcarbonat und Natriumsulfat zugesetzt, aufgeschlossen. Beim Sulfitverfahren benutzt man hingegen Hydrogensulfitlösungen, deren pH zwischen 2 und 11 variieren kann. Diese extremen Reaktionsbedingungen führen zu einem merklichen Kettenabbau der Cellulosemoleküle entweder durch Säurehydrolyse oder alkalische „Peeling“-Reaktionen. Der alkalische Kettenabbau stoppt durch Bildung carboxylierter Endgruppen^{20,21} stoppt. Der molare Anteil dieser Endgruppen hat entscheidenden Einfluß auf die Eigenschaften der Cellulose und der daraus hergestellten Derivate^{22,23}.

1.2 Amylose

Wie bereits erwähnt bildet Amylose unverzweigte Ketten, die $\alpha(1\rightarrow4)$ glucosidisch verknüpft sind. Sie kommt in Stärkekörnern mit einem Anteil von 20 % vor. Die relative Molekülmasse beträgt je nach Herkunft 17000-225000. Die supramolekulare Struktur von Amylose kann man als spiralförmige Helix mit 6 Glucoseeinheiten pro Windung beschreiben. Diese Helix ist für die Inklusion von Iod beim Stärkenachweis verantwortlich (Abb. 1-6).

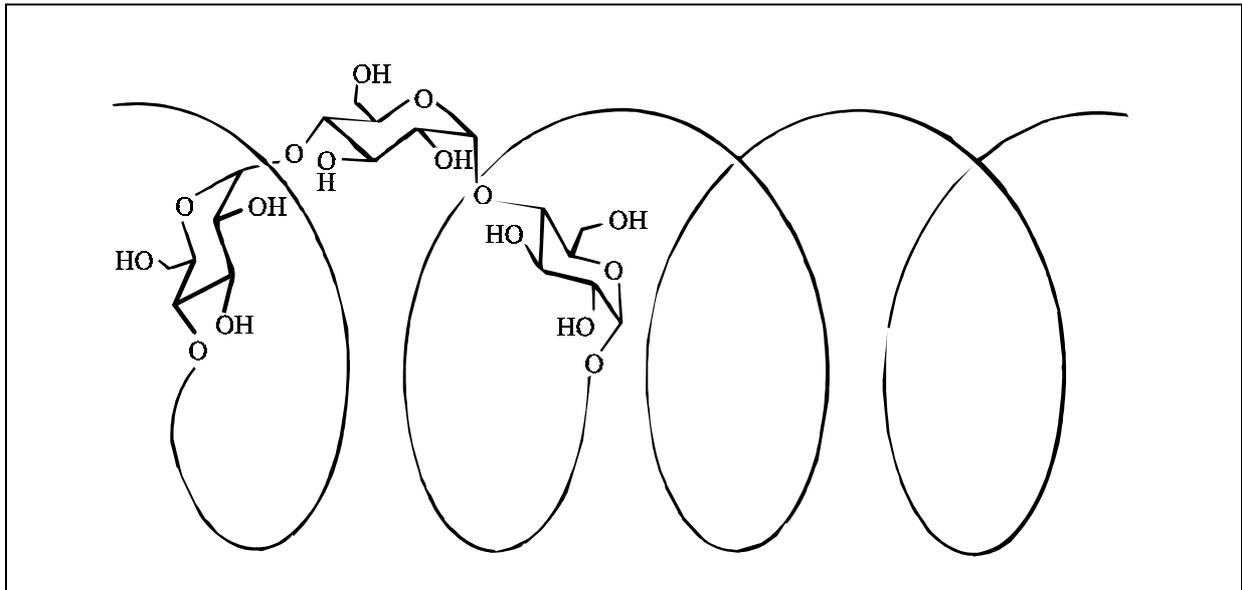


Abb. 1-6: Die helixförmige Struktur von Amylose.

Amylose löst sich bei hoher Temperatur kolloidal in Wasser und kann nach Abtrennung des unlöslichen Amylopektins mit Alkohol aus dem Filtrat gefällt werden.

1.3 Strukturaufklärung von Polysacchariden und Polysaccharidderivaten

Die Strukturaufklärung von Polysacchariden reicht weit zurück. So entdeckten Gay-Lussac und Thénard im Jahre 1811, daß sowohl Stärke und der Hauptbestandteil des Holzes, die Cellulose, aus Kohlenstoff und Wasser im Verhältnis 1:1 aufgebaut sind und bezeichneten diese Substanzen als „Kohlenhydrate“²⁴. Daß Cellulose und Stärke grundsätzlich unterschiedliche Substanzen sind, fanden Payen bzw. Brogniart *et al.*, die diese aus verschiedenen Pflanzen isolierten^{25,26}. Die Bezeichnung Cellulose wurde dem lateinischen Wort „cellula“ für Pflanzenzelle entlehnt. Die Struktur und der polymere Aufbau von Cellulose blieben zunächst jedoch unaufgeklärt. Knapp hundert Jahre später erst veröffentlichten Haworth²⁷ und Freudenberg²⁸ die richtige Struktur der Cellulose als $\beta(1\rightarrow4)$ Glucan, womit drei Parameter der molekularen Struktur aufgeklärt waren: Glucose als ausschließlich die Cellulose aufbauendes Monosaccharid, die Verknüfungspositionen C-1 und C-4 und die Art der glucosidischen Verknüpfung (β).

In Heteroglycanen, wie Alginat, Gummi arabicum, Carageen und Xanthan oder den Zuckeroligomeren in Liposacchariden und Glycoproteinen²⁹ interessieren neben diesen genannten Strukturparametern Art und Länge von Kettenverzweigungen und gegebenenfalls auch die Art und Position von Substituenten.

Eine weitere Fragestellung ist, ob in natürlichen Polysacchariden beide Enantiomere eines Monosaccharids auftreten. Dabei ist zu untersuchen, wo sich diese Einheiten im Polymer be-

finden und in welchem Mengenverhältnis. Ein Beispiel hierfür ist das Auftreten von D- und L-Galactose an den nicht-reduzierenden Kettenenden in manchen Schneckengalactanen³⁰.

Komplizierter gestaltet sich die Analytik von natürlichen und chemisch hergestellten Polysaccharidderivaten. So findet man in natürlichen Poly- und Oligosacchariden eine große Zahl an Ether- und Estergruppen, wie z. B. Methylether, Acetyl-, Phosphat- und Sulfatester oder auch Pyruvatketale. Auch auf chemischen Wege werden eine Vielzahl von Ethern und Estern hergestellt, deren Eigenschaften und Einsatzgebiete sich nach Art und Umfang der Derivatisierung unterscheiden (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Beispiele für Cellulose- und Stärkederivate und deren Anwendungsgebiete^{31,32,33,34,35}

Derivat	DS bzw. MS		Anwendungsgebiet
Celluloseether			
Methylcellulose (MC)	1.2-2.3		Tapetenkleister
Ethylcellulose (EC)			Pharmaindustrie
Carboxymethylcellulose (CMC)	0.5-1.5		Waschmittel, Erdölförderung
Hydroxyethylcellulose (HEC)			Schutzkolloid f. Dispersionsfarben, Baustoffe
Hydroxyethylmethylcellulose (HEMC)	Me 1.3-2.0	HE 0.1-0.4	
Ethylhydroxyethylcellulose (EHEC)			Papierbeschichtung
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Me 1.3-2.0	HP 0.1-1.0	Pharmaindustrie Baustoffindustrie
Organische Celluloseester			
Cellulosetriacetat	2.8-2.9		Fotofilm, Folien
Cellulose-2,5-acetate	2.3-2.5		Zigarettenfilter, Kunstseide, Lackrohstoffe, Folien, Thermoplastische Massen
Celluloseacetopropionat	Ac 0.3	Pc 2.3	Thermoplastische Massen
Celluloseacetobutyrat	Ac 2.1 1.0	Bc 0.6 1.6	Isolierlackrohstoffe, Folien Thermoplastische Massen, Papierlacke
	0.5	2.3	Schmelztauchmassen

1 Einleitung

Tab. 1-1: Beispiele für Cellulose- und Stärkederivate und deren Anwendungsgebiete (Fortsetzung)

Anorganische Celluloseester			
Cellulosenitrat	> 2.3	Explosivstoffe, Munition, Raketentreibstoffe	
	1.8-2.3	Membranen f. Blotting in der Molekularbiologie, Thermo- plastische Kunststoffe, Celluloid, Lackrohstoffe	
Cellulosenitrit	≈ 3	Ausgangsstoff für andere Celluloseester	
Cellulosephosphat		Flammhemmende Wirkung, Ionenaustauschmedium	
Cellulosexanthogenat		Ausgangsstoff für Kunst- seide (Viskoseprozeß)	
Cellulosesulfat		Antistatische Beschichtung photographischer Oberflä- chen	
Stärkeether			
Hydroxyethylstärke (HES)	0.2	Blutplasmexpander	
Hydroxypropylstärke (HPS)	0.2	Lebensmittelzusätze	
kationische Stärkeether	0.2-0.4 % Stickstoffanteil	0.01-0.04 ≈0.4	Papierindustrie Flockungsmittel
Organische Stärkeester			
Stärkeacetate	0.01-0.2	Lebensmittelindustrie	
Anorganische Stärkeester			
Stärkephosphat	≈ 1.0	Papier- und Textiladditive Flockungsmittel, Wundfilme, Lebensmittel	

Die Einführung von Substituenten in das Polysaccharid kann beispielsweise bei linearen 1,4-Glucanen an den Positionen 2, 3 und 6 des Zuckers erfolgen, wobei acht mögliche Substitutionsmuster resultieren, die entweder un-, mono-, di- oder trisubstituiert sind (Abb. 1-7).

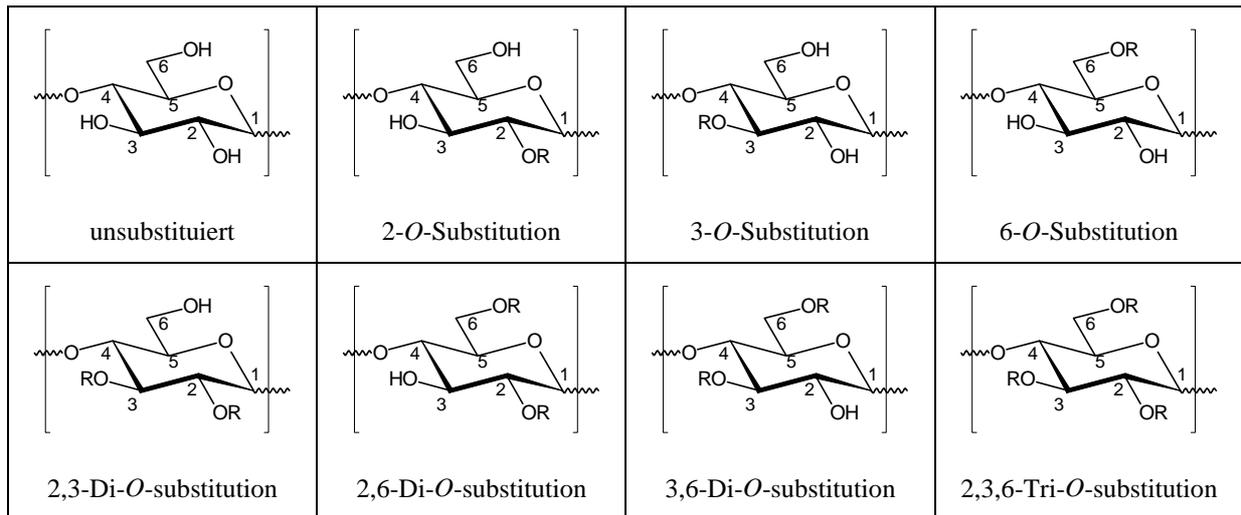


Abb. 1-7: Die acht möglichen Substitutionsmuster eines derivatisierten 1,4-Glucans (R = Substituent).

Eine wichtige Größe zur Beschreibung von Polysaccharidderivaten ist der Substitutionsgrad (degree of substitution; DS), der sich auf die mittlere Anzahl substituierter OH-Gruppen pro Monomereinheit bezieht. Er kann beispielsweise für unverzweigte Glucane Werte von 0-3 annehmen, gemäß der Anzahl derivatisierbarer Hydroxylgruppen in der AGU:

$$DS = \frac{\text{mittlere Anzahl derivatisierter OH - Gruppen}}{AGU} \quad [1-1]$$

Kann es aufgrund der Art des Substituenten zu weiterer Umsetzung am Substituenten kommen, wie zum Beispiel bei Hydroxyalkylsubstituenten, die nach der Substitution wiederum eine freie substituierbare OH-Gruppe tragen, spricht man von molekularem Substitutionsgrad (molar substitution; MS). Er bezieht sich ebenfalls auf die Monomereinheit, wobei hier auch Werte >3 möglich sind:

$$MS = \frac{\text{mittlere Anzahl der Substituenten}}{AGU} \quad [1-2]$$

In Abb. 1-8 ist ein Ausschnitt einer *O*-hydroxyethylierten Cellulose dargestellt. Der DS ist in diesem Falle 2, der MS hingegen 3.

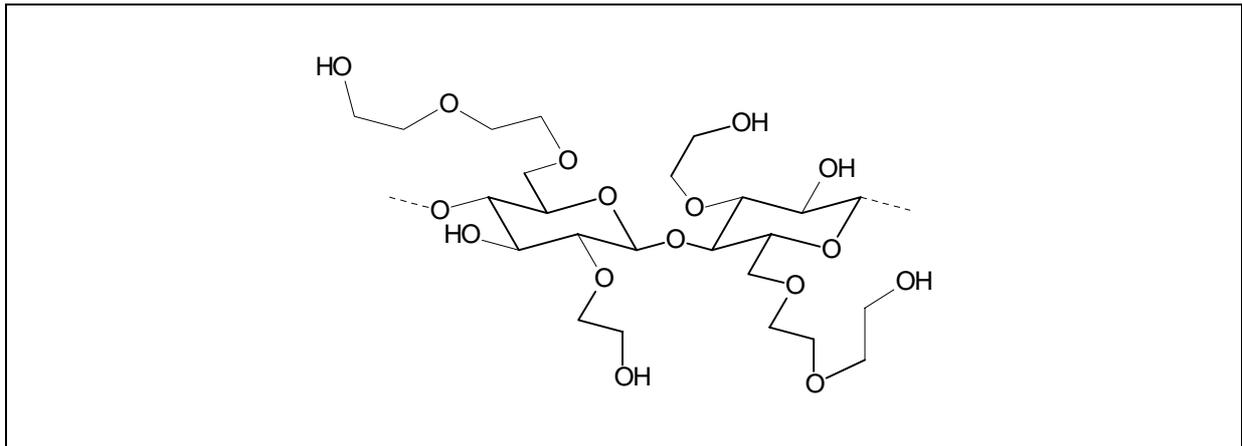


Abb. 1-8: Ausschnitt aus einer Hydroxyethylcellulose

Der DS bzw. MS beschreiben jedoch nur die durchschnittliche Häufigkeit der Substituenten im Polymer und erlauben keine Aussage über die tatsächlichen Eigenschaften des Produktes, wie es am Beispiel der Kaltwasserlöslichkeit von Cellulosederivaten in Tab. 1-2 dargestellt ist. Hier erkennt man deutlich den Einfluß der Substituentenverteilung in der Polysaccharidkette.

Tab. 1-2: DS-Werte, bei denen Kaltwasserlöslichkeit erreicht wird, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen^{36,37,38}.

Reaktionsführung	homogen	heterogen
Methylcellulose	0.6	1.2
Cellulosesulfat	0.3	1.8
Carboxymethylcellulose	0.4-0.5	1.5

Je einheitlicher die Substituenten im Polymer verteilt sind, desto besser sind in diesem Falle die Eigenschaften des Produkts. Erreicht man diese mit niedrigeren DS-Werten, heißt das auch, daß man mit weniger Reagenzien auskommt. Dies ist sowohl in ökonomischer als auch ökologischer Sicht von Vorteil.

Zusammenfassend stehen bei der Strukturaufklärung von Polysacchariden und Polysaccharidderivaten folgende Fragen im Vordergrund:

1. Aus welchen Zuckern besteht und welche relative Zusammensetzung hat das Polysaccharid (Glc, Man, Gal, etc)?
2. Welche absolute Konfiguration besitzen die Zuckerbausteine (D- oder L-Zucker)?
3. Welche Ringform nehmen sie im Polymer ein (Furanose- oder Pyranoseform)?
4. Wie ist das anomere C-Atom konfiguriert (α - oder β -Verknüpfung)?
5. Über welche Positionen erfolgt die glycosidische Verknüpfung (z. B. 1 \rightarrow 4 oder 1 \rightarrow 3)?

6. Gibt es Kettenverzweigung und wie lang sind die Ketten?
7. Gibt es repeating units (z.B. Pullulan mit trimerer Wiederholungseinheit)?
8. Wie ist der dreidimensionale Aufbau des Polysaccharids (Sekundär-, Tertiärstruktur)?
9. Welcher Art sind und an welchen Position befinden sich Substituenten in der Monomereinheit?
10. Wie verteilen sich die Substituenten entlang der Polymerketten?

Diese Punkte können mittels zahlreicher chemischer, spektroskopischer und enzymatischer Methoden untersucht werden.

Fortschritte sowohl im methodischen als auch im apparativen Bereich haben die Analysemöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten immer weiter verbessert. So können selbst Mengen im Mikromaßstab, wie sie bei der Isolation von biologisch aktiven Poly- und Oligosacchariden anfallen, noch eindeutig charakterisiert werden. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Methoden wie die Kernresonanzspektroskopie (NMR), die Gas- und Hochleistungsflüssigchromatographie (GC und HPLC), sowie die Kapillarelektrophorese (CE). Wichtige Beiträge zur Strukturaufklärung von Polysacchariden liefern auch die verschiedenen massenspektrometrischen Methoden (MS). Die Anwendung hochspezifischer Enzyme kann ebenfalls zur Strukturaufklärung herangezogen werden.

Die NMR-Spektroskopie kann vielfältig eingesetzt werden. Mit dieser Methode lassen sich prinzipiell die Art der Monomerbausteine wie auch ihre Verknüpfung (Anomerie, Verknüpfungsstellen und Ringform) in Oligosacchariden aufklären. Für Polysaccharidderivate kann das Verhältnis von 2-, 3- und 6-Substitution (Carboxymethylcellulose, Celluloseacetate) NMR-spektroskopisch bestimmt und der Gesamt-DS abgeschätzt werden^{39,40}.

Die absolute Konfiguration der Zuckermonomere kann hingegen nur mit Methoden, die enantioselektiv sind, bestimmt werden. In den Anfängen der Zuckeranalytik nutzte man linear polarisiertes Licht und bestimmte den Drehwert. Heute kann man hierfür die enantioselektive Elektrophorese, Gas- und Hochleistungsflüssigchromatographie einsetzen. Die Trennung erfolgt gaschromatographisch oder elektrophoretisch nach Derivatisierung mit chiralen Reagenzien, wobei diastereomere Substrate entstehen^{41,42,43,44,45,46}. Nach Überführung der Zucker- enantiomere in flüchtige Derivate (Trifluoracetylierung) gelingt die Trennung neuerdings auch an enantioselektiven GC-Phasen^{47,48}.

Chromatographische Methoden, wie die Gelpermeationschromatographie (GPC), oder auch die Anionenaustauschchromatographie können Aussagen über die Verteilung von Polymerkettenlängen liefern. Die High pH Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)^{49,50} ermöglicht nach säurehydrolytischem Abbau die Bestimmung der Monosaccharide, aus denen ein Poly- oder Oligosaccharid aufgebaut ist.

Zur Ermittlung der Verknüpfungs- und Verzweigungspositionen in Polysacchariden gilt als Standardmethode die Methylierungsanalyse nach Lönngren *et al.*^{51,52,53}, auch Standardmethylierungsanalyse (SMA) genannt (Abb. 1-9).

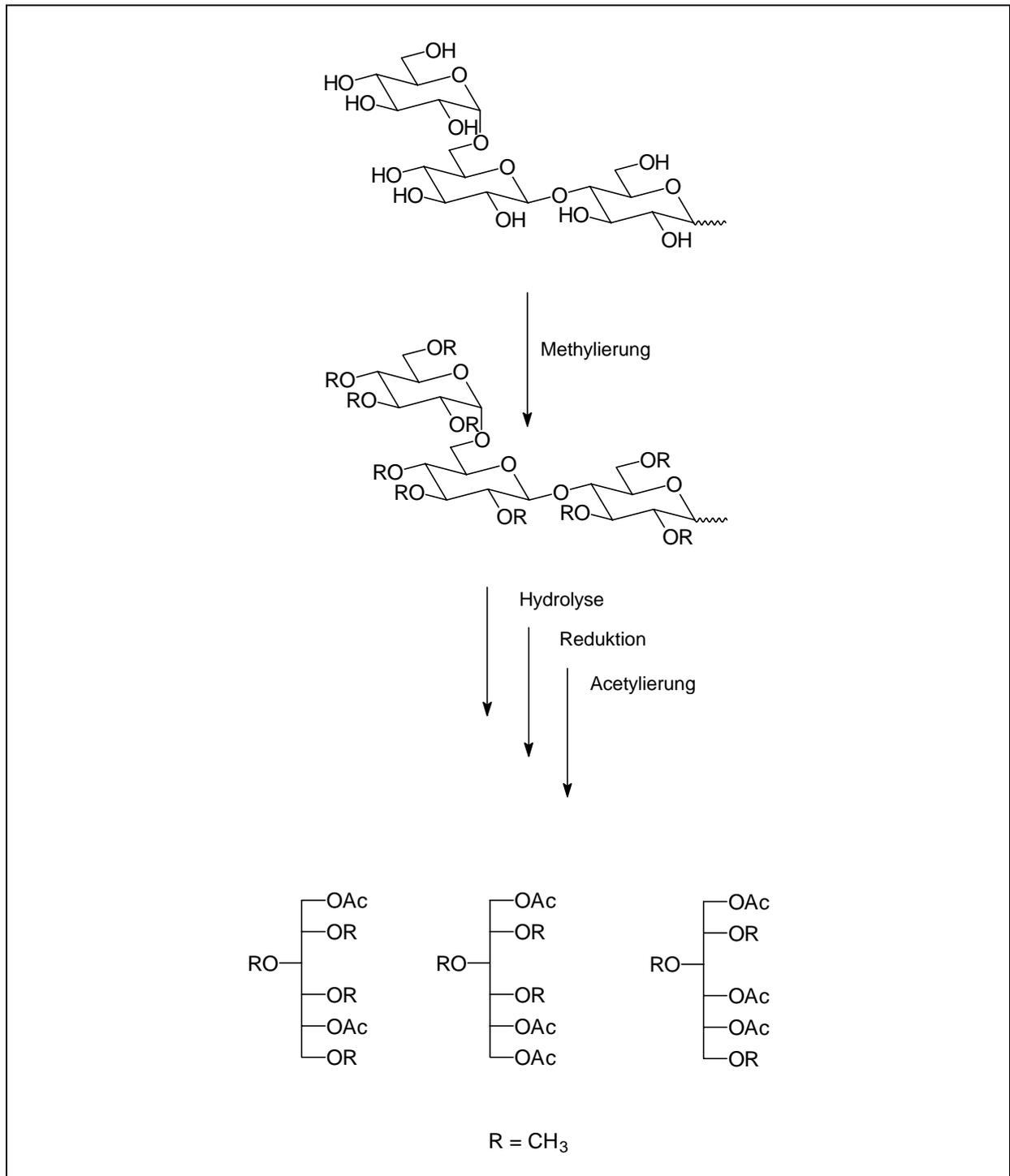


Abb. 1-9: Standardmethylierungsanalyse am Beispiel eines Glucans, das 1→4 und 1→6-Verknüpfungen aufweist.

Hierbei wird das Polysaccharid zunächst permethyliert^{54,55} und dann säurehydrolytisch abgebaut. Man erhält nach Reduktion, gegebenenfalls mit NaBD_4 zur Kennzeichnung des Carbonyl-Kohlenstoffs, und Acetylierung partiell methylierte Alditolacetate, die gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe entsprechender Responsefaktoren quantifiziert werden⁵⁶. Die Identifizierung erfolgt anhand charakteristischer Fragmentierungsmuster ihrer mittels GC-MS-Kopplung erhaltener Massenspektren^{57,58,59,60}. Man gelangt so zu Aussagen über die Art der

das Polysaccharid aufbauenden Zuckermonomere, deren Verknüpfungs- und Verzweigungspositionen, die durchschnittliche Länge der Seitenketten sowie die Art und Position von Substituenten, die unter den genannten Bedingungen stabil sind. Bei labilen oder ionischen Derivaten müssen hingegen spezielle Analysemethoden entwickelt werden^{61,62,63}.

Zur Bestimmung der Ringform 4-verknüpfter Pyranosen und 5-verknüpfter Furanosen eignet sich die SMA nicht, da diese Komponenten das gleiche Abbauprodukt ergeben (Abb. 1-10).

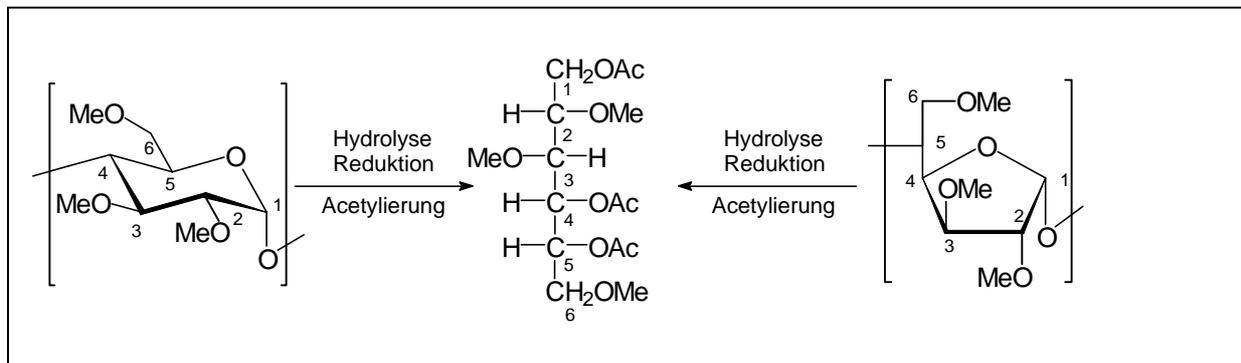


Abb. 1-10: Bildung des gleichen Abbauprodukts aus einer α -1,4-pyranosidisch und einer α -1,5-furanosidisch verknüpften Glucoseinheit nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung.

Die von Rolf und Gray⁶⁴ entwickelte Methode des Reduktiven Abbaus liefert hingegen diese Information, da hier der Abbau unter Ringerhalt erfolgt und zu partiell methylierten 1,5- bzw. 1,4-Anhydroalditolacetaten führt. Zahlreiche Arbeiten zur Strukturaufklärung von Polysacchariden^{65,66,67,68,69,70,71} und zur Bestimmung der Substituentenverteilung in 1,4-Glucanen^{72,73,74} veröffentlicht worden.

Die Methode ist jedoch nicht einfach zu beherrschen, da es bei nur geringen Wasserspuren zu Ringisomerisierung und somit zum Verlust der gewünschten Information kommen kann⁷⁵. Polysaccharide, die Uronsäuren aufweisen⁷⁶ oder Substituenten mit einem -I-Effekt in Position 6, begünstigen gleichermaßen die Ringisomerisierung und limitieren somit die Aussagefähigkeit des Reduktiven Abbaus⁷⁷.

Die Aufklärung der nach reduktivem Abbau entstandenen Produkte erfolgt anhand der Fragmentierungsmuster der jeweiligen mittels GC/MS erhaltenen Massenspektren^{72,78,79}.

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Methoden, wie des Fast Atom Bombardement (FAB)^{80,81}, der Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF)^{81,82,83} und der Electrospray Ionisation (ESI)^{84,85}, können auf der Ebene der Polymermoleküle wichtige Parameter wie die Verknüpfungspositionen⁸⁶ und nach geeigneter Probenvorbereitung die Substituentenverteilung entlang der Kette von Polysaccharidderivaten bestimmt werden. Letztere Methode ist jedoch bislang auf methylierte 1,4-Glucane beschränkt.

Aussagen über die Verteilung von Substituenten entlang der Polymerkette kann man auch durch enzymatische Hydrolyse erhalten^{87,88,89}.

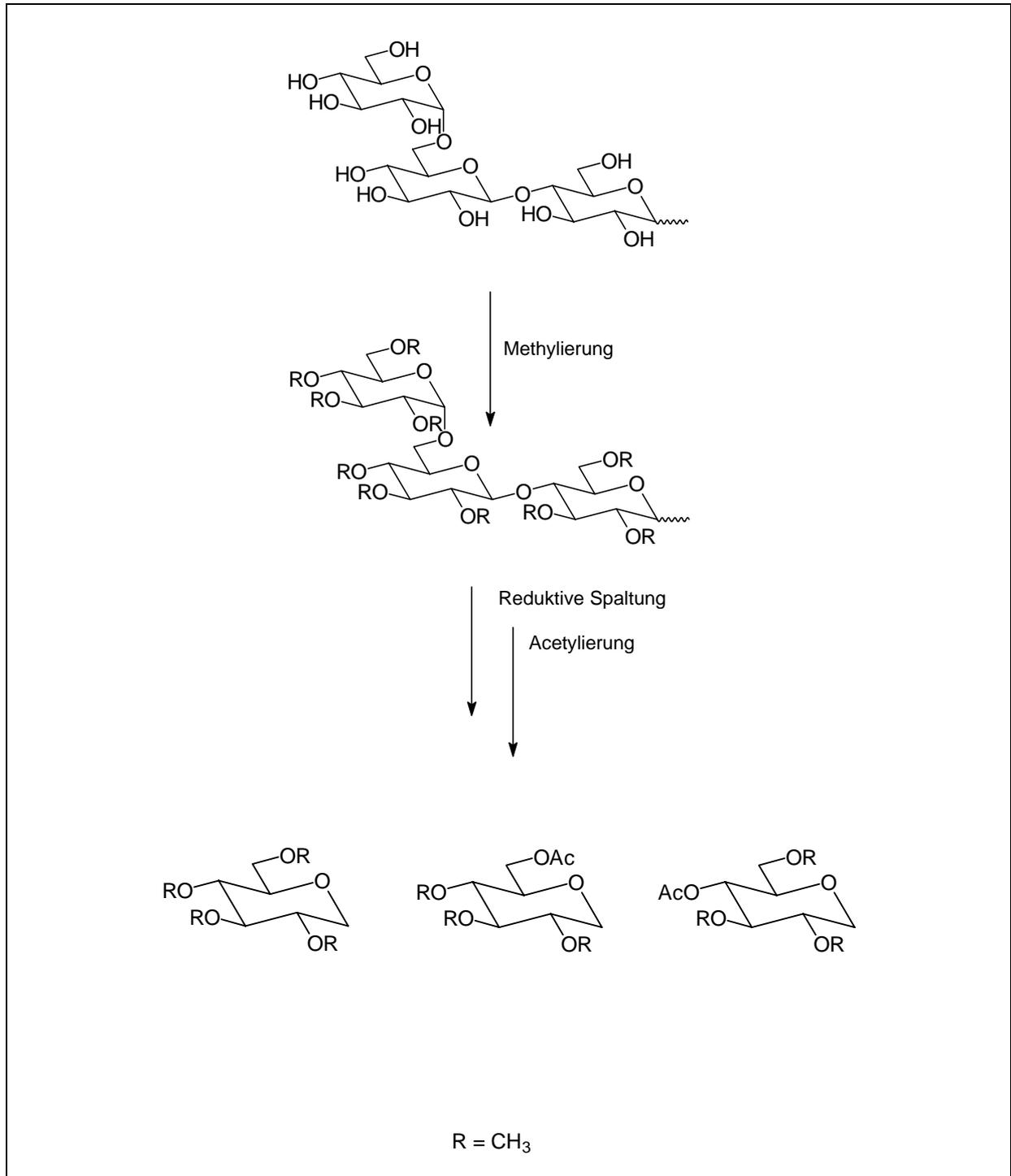


Abb. 1-11: Reduktiver Abbau am Beispiel eines Glucans, das 1→4 und 1→6-Verknüpfungen aufweist

2 Zielsetzung

Im Rahmen des Schwerpunktprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Cellulose und Cellulosederivate - molekulares und supramolekulares Strukturdesign“ sollten neuartige Cellulosederivate hergestellt werden. Ziel war es die Synthese in Richtung regioselektiv substituierter Produkte zu steuern oder neuartige Reaktionssysteme zu testen.

Die analytische Charakterisierung dieser neuen Produkte kann sowohl auf der Monomer- als auch auf der Polymerebene erfolgen und wichtige Anhaltspunkte zu Struktur-Eigenschaftsbeziehungen geben. Bei regioselektiv dargestellten Proben interessiert vor allem die Analyse von Fehlstellen im Substitutionsmuster entlang der Polymerkette.

Für die Analytik der Substituentenverteilung auf der Monomerebene standen hierzu leistungsfähige chemische und chromatographische Methoden zur Verfügung. Auf der Polymerebene sollte die bislang am Beispiel von Methylcellulosen und Methylamylosen entwickelte Oligomeranalyse mittels FAB-MS auf ihre Leistungsfähigkeit und ihre mögliche Anwendbarkeit auf andere Derivattypen, wie beispielsweise Celluloseacetate, geprüft und modifiziert werden. Ein spezielles Analytikproblem stellte die Bestimmung carboxylhaltiger Gruppen in hoch substituierten Ethylcellulosen dar. Hier sollte eine geeignete Analysenmethode mittels ionenchromatographischer und/oder chemischer Methoden entwickelt werden, die die Quantifizierbarkeit der sauren Komponenten erlaubt.

Wie bereits erwähnt kommen in manchen Schneckengalactanen D- und L-Galactose nebeneinander vor. Eine schnelle Bestimmung der Verknüpfungsposition und der absoluten Konfiguration der Galactoseeinheiten ist bislang noch nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der reduktive Abbau und die enantioselektive Gaschromatographie einen Beitrag hierzu leisten können.

3 Spezieller Teil

3.1 Analytik von Methylcellulosen und Celluloseacetaten

Die analytische Charakterisierung der Primärstruktur von Cellulosederivaten ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften (Abb. 3-1).

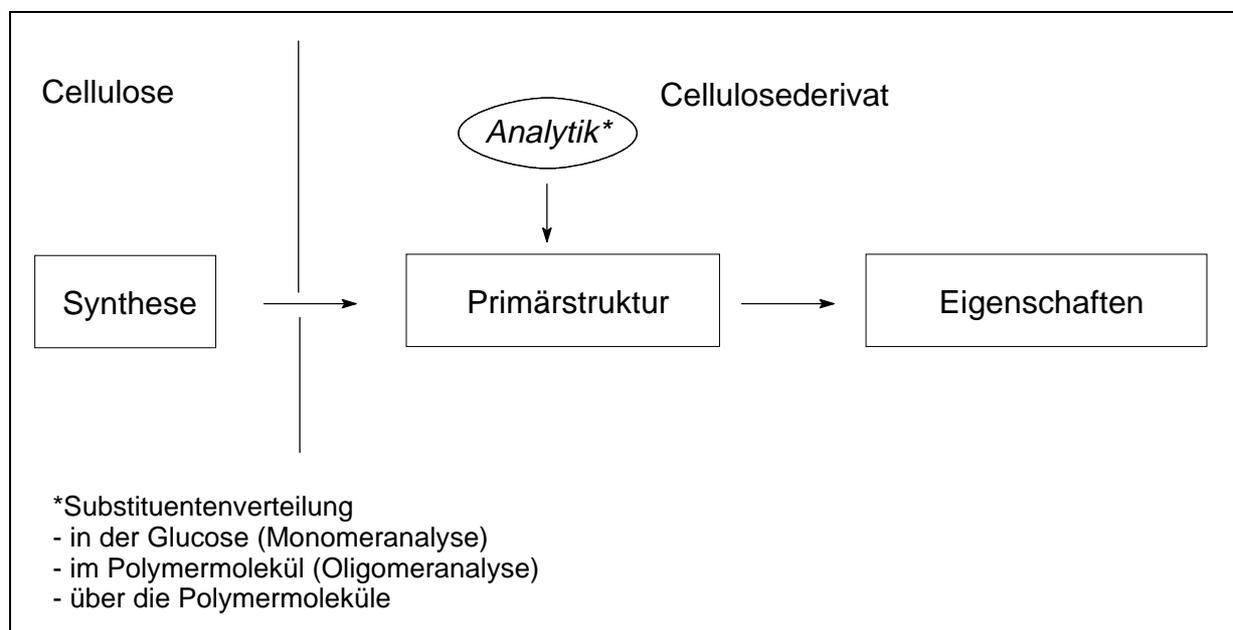


Abb. 3-1: Analytik als Schnittstelle zwischen Synthese und Struktureigenschaften

Die Analytik von Cellulosederivaten kann hierbei auf verschiedenen strukturellen Ebenen erfolgen: Auf der Monomerebene, auf der Ebene des einzelnen Polymermoleküls und über die Polymermoleküle. Darüberhinaus kann man z.B. überprüfen, ob eine Abhängigkeit vom DP besteht (Abb. 3-2).

Die Eigenschaften der Cellulosederivate können sowohl aufgrund der Heterogenität des Materials (Herkunft, Aufschlußverfahren), als auch aufgrund der Herstellungsbedingungen (uneinheitliche Probenvorbereitung, heterogene Reaktionsführung) sehr unterschiedlich sein. Im industriellen Maßstab werden beispielsweise Celluloseveretherungen nach alkalischer Vorbehandlung unter heterogenen Bedingungen durchgeführt (Slurry-Verfahren). Wie bereits erwähnt wird die Wasserlöslichkeit von Methylcellulosen und Cellulosesulfaten bei niedrigeren DS-Werten erreicht, wenn die Reaktion homogen geführt wurde, als bei den entsprechenden

unter heterogenen Bedingungen hergestellten Derivaten. Für Carboxymethylcellulosen wurde der gleiche Effekt nach sogenannter „induzierter Phasenseparation“ gefunden³⁸.

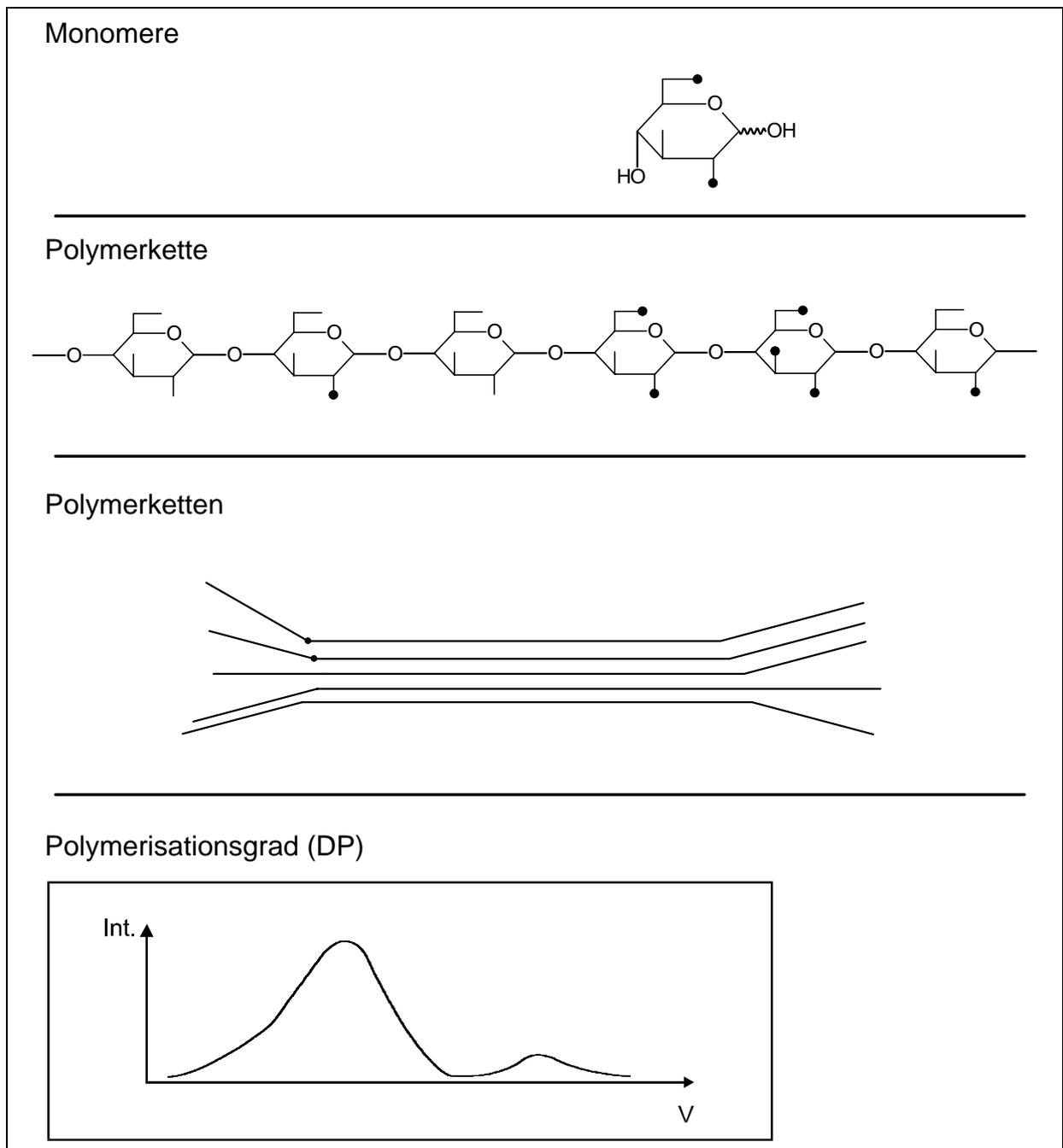


Abb. 3-2: Strukturelle Ebenen bei der analytischen Charakterisierung von Cellulosederivaten. Die schwarzen Punkte symbolisieren substituierte OH-Gruppen.

Es ist zu vermuten, daß sich in diesen Produkten Bereiche höherer und niedriger Substitution in der Polymerkette abwechseln und sich somit die Löslichkeit der Proben bei gleichem DS deutlich gegenüber den unter „homogeneren“ Bedingungen hergestellten Produkten verschlechtert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten einen Beitrag für die

analytische Erfassung dieser vermuteten Heterogenität der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette leisten.

3.1.1 Methodisches Konzept

Neben der Monomeranalyse, die die Verteilung der Substituenten in der Glucoseeinheit liefert, kommt der Bestimmung der Substituentenverteilung auf der strukturellen Ebene des Polymermoleküls besondere Bedeutung zu. Hierbei werden chemische, chromatographische und massenspektrometrische Methoden angewandt.

3.1.1.1 Monomeranalyse

Die Substituentenverteilung in der Glucose wird nach Totalabbau des Cellulosederivats durch Säurehydrolyse, gegebenenfalls nach vorheriger Permethylierung bestimmt. Man erhält bei ausreichend großer Kettenlänge des Polymers, die relativen Anteile an un-, 2-, 3-, 6-mono-, 2,3-, 2,6-, 3,6-di- und trisubstituierten Glucosen. Die Auftrennung der Produkte erfolgt wo möglich wie bereits erwähnt nach Überführung in flüchtige Derivate (Reduktion und Acetylierung) quantitativ mittels Gaschromatographie und gegebenenfalls qualitativ mittels GC/MS-Kopplung.

3.1.1.1.1 Bestimmung des Methylmusters in 1,4-Glucanen mittels HPAEC⁹⁰

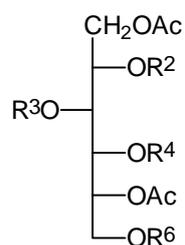
Die Methylierungsanalyse als Standardmethode der Polysaccharidcharakterisierung ist bislang die am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung des Methylmusters von 1,4-Glucanen. Das methylierte Polysaccharid wird zunächst säurehydrolytisch zu Monomeren abgebaut und die Abbauprodukte nach Reduktion und Acetylierung mittels Gaschromatographie getrennt (Abb. 3-3). Diese Methode eignet sich zur Analyse der Substituentenverteilung von Cellulosederivaten verwenden, die entweder ein Methylmuster aufweisen (Methylcellulose) oder in ein komplementäres Methylmuster überführt werden können (Celluloseacetate, -sulfate und Silylcellulosen).

In Tab. 3-1 sind die Hauptprodukte der Standardmethylierungsanalyse entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge in der gaschromatographischen Analyse angegeben (Verbindung **1-a** - **8-a**). Sie können mit Hilfe des Effective-Carbon-Response (ECR) Konzept nach Sweet *et al.*⁵⁶ quantifiziert werden. Des weiteren treten die Produkte aus terminaler Glucose (**9-a**) und terminal-2,3-di-*O*-methylierter Glucose (**10-a**) auf.

Aus Monomerbausteinen, die entweder in Position 6 underivatisiert sind oder dort eine gute Abgangsgruppe besitzen, können während der Hydrolyse zu einem gewissen Anteil auch 1,6-Anhydroderivate entstehen (Tab. 3-2).

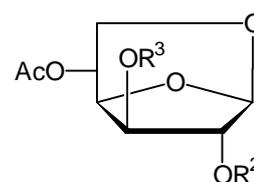
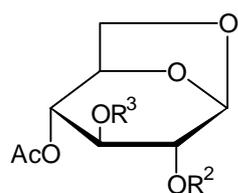
3 Spezieller Teil

Tab. 3-1: Sorbitderivate als Abbauprodukte eines partiell methylierten 1,4-Glucans nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung.



Verbindung	R ²	R ³	R ⁴	R ⁶	Masse	ECR
1-a	Me	Me	Ac	Me	350	745
2-a	Me	Ac	Ac	Me	378	790
3-a	Ac	Me	Ac	Me	378	790
4-a	Me	Me	Ac	Ac	378	800
5-a	Ac	Ac	Ac	Me	406	835
6-a	Me	Ac	Ac	Ac	406	845
7-a	Ac	Me	Ac	Ac	406	845
8-a	Ac	Ac	Ac	Ac	434	890
9-a	Me	Me	Me	Me	322	700
10-a	Me	Me	Me	Ac	350	755

Tab. 3-2: 1,6-Anhydroglucosederivate wie sie nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung eines methylierten Cellulosederivats entstehen können.



Verbg.	R ²	R ³	Masse	ECR	Verbg.	R ²	R ³	Masse	ECR
11	Me	Me	232	445	12	Me	Me	232	445
13	Ac	Me	260	490	14	Ac	Me	260	490
15	Me	Ac	260	490	16	Me	Ac	260	490

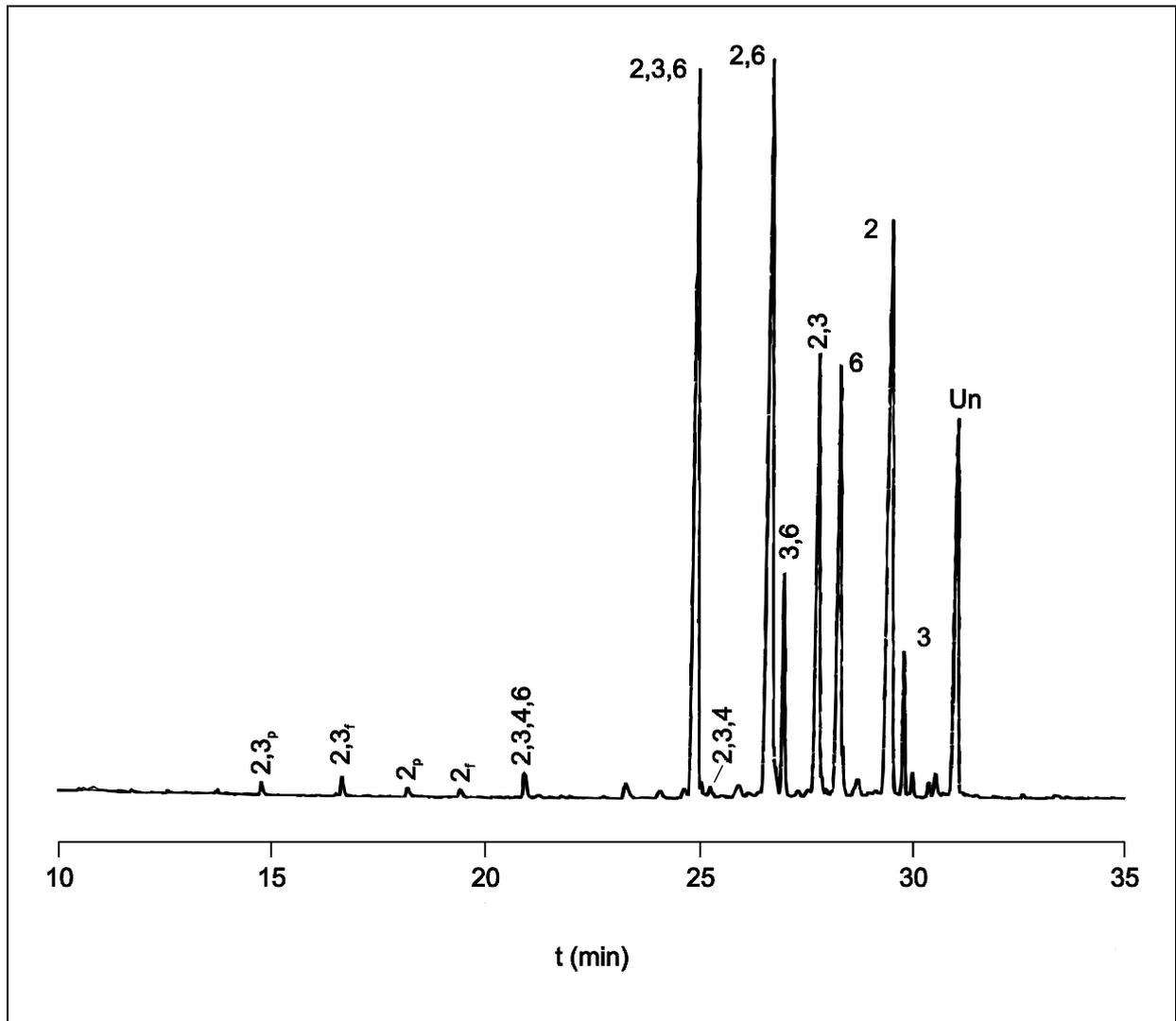


Abb. 3-3: Gaschromatogramm der Produkte aus Methylcellulose mit einem DS von 1.82 nach säurehydrolytischem Abbau und anschließender Reduktion und Acetylierung. Die Ziffern bezeichnen die Position der Methylgruppen. 2,3_p, 2,3_f, 2_p und 2_f bezeichnen 1,6-Anhydroglucosederivate.

Die Entwicklung neuer Ionenaustauschermaterialien hat zur Einführung der HPAEC in die Zuckeranalytik geführt. So können Monosaccharide und deren reduzierte Derivate, Oligosaccharide und ionische Zuckermomere (Carboxymethyl- und Sulfoethyl-Derivate, Zuckersäuren) ionenchromatographisch getrennt werden. Die Detektion erfolgt elektrochemisch mittels gepulster Amperometrie an einer Gold-Elektrode. Die Messung erfolgt idealerweise bei einem Arbeitspotential von 0.05 mV. Dem folgt ein Oxidationspotential (0.6 - 0.75 mV) bei dem der Zucker oxidiert wird, um dann mit Hilfe eines Reduktionspotentials (- 0.15 bis -0.6 mV) die Elektrode zu regenerieren.

Abb. 3-4 zeigt das HPAE-Chromatogramm von neutralen und Aminozuckermonomeren wie sie in Glycoproteinen vorkommen. Die Zucker können in 16 mmolärer Natronlauge bis zur Basislinie getrennt werden.

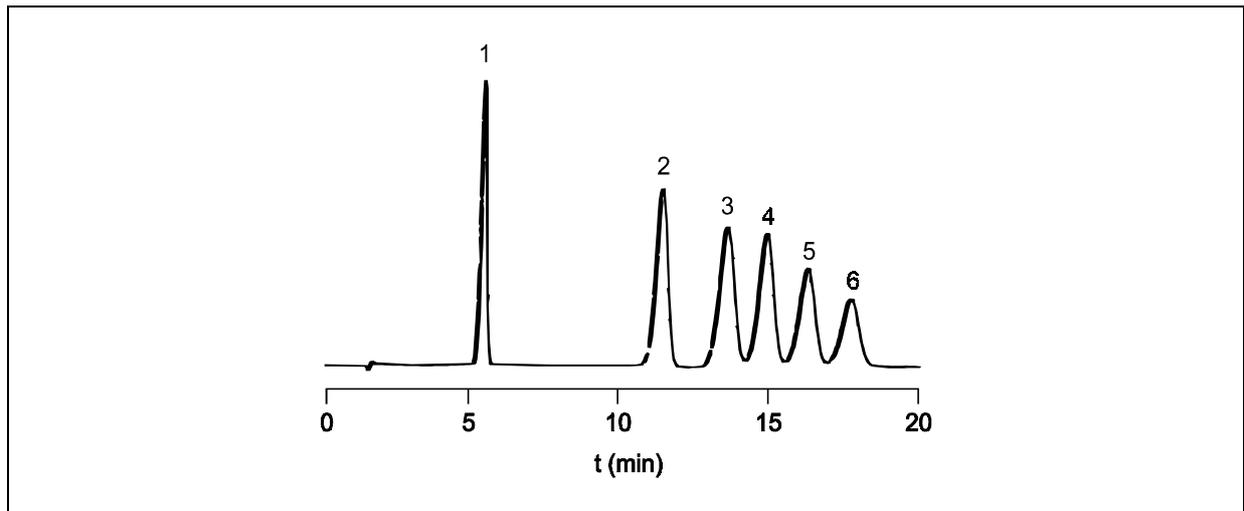


Abb. 3-4: Ionenchromatographische Trennung von Fucose (1), Galactosamin (2), Glucosamin (3), Galactose (4), Glucose (5) und Mannose (6) auf einer CarboPac® PA1-Säule. Eluent: 16 mmol NaOH; Flow: 1 ml/min⁹¹.

Die Trennung eines Cellodextringemischs (DP1-6) zeigt Abb. 3-5. Die Größe der Moleküle führt zu einer starken Wechselwirkung mit dem Austauscherharz und erfordert zur Elution einen Natriumacetatgradienten.

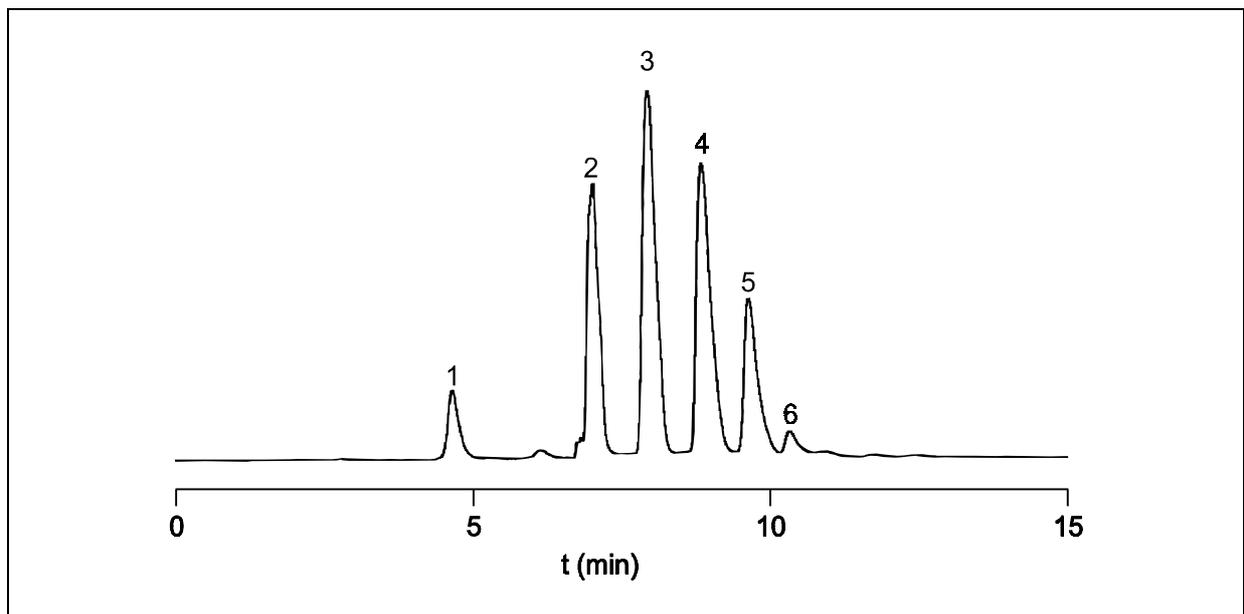


Abb. 3-5: Ionenchromatographische Trennung von Glucose (1), Cellobiose (2), Cellotriose (3), Cellotetraose (4), Cellopentaose (5) und Cellohexaose (6) auf einer CarboPac® PA100-Säule. Eluent: 100 mmol NaOH mit einer linear ansteigenden NaOAc-Konzentration von 0 auf 250 mmol in 15 min; Flow: 1 ml/min.

Die in Abb. 3-4 und Abb. 3-5 demonstrierte Trennleistung der HPLC-Säulen der Carbo Pac®-Reihe sollte nun genutzt werden, um die quantitative Analyse von 1,4-Glucanen, die ein Methylmuster aufweisen zu vereinfachen. Dazu wurde die Trennung eines MC-Hydrolysats

(DS 1.82) bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen durchgeführt. Bei den Trennversuchen war zu bedenken, daß während der Hydrolyse von 1,4-Glucanen zu einem gewissen Teil 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) entsteht, welches aufgrund der Aldehydgruppe amperometrisch detektiert wird. Es zeigte sich, daß die Trennung der Analyten fast bis zur Basislinie mit 20 mmolarer Natronlauge auf der CarboPac PA1[®]-Säule zu erreichen war (Abb. 3-6), auf der halbpräparativen CarboPac PA1[®]-Säule gelang die Trennung hingegen bei 16 mmolarer NaOH. Die CarboPac PA100[®] eignete sich für dieses Trennproblem nicht. Kritisch ist die Elutionszeit des HMF, da diese sehr empfindlich auf die Änderung der Laugenkonzentration reagiert und damit entweder das Signal der 2,3,6-Tri-*O*-methylglucose bzw. der 3,6-Di-*O*-methylglucose verfälscht wird (s. Abb. 3-6). Anhand des käuflichen Standards kann die Elutionszeit bestimmt und die Molarität der Natronlauge auf die spezifische Trenneigenschaft der eingesetzten Säule eingestellt werden.

Die Zuordnung der Peaks erfolgte durch Modellsubstanzen. Glucose und 3-*O*-Methyl-D-glucose waren kommerzielle Produkte. Die anderen Standards wurden säurehydrolytisch aus den entsprechenden regioselektiv methylierten Cyclodextrinderivaten bzw. permethylierter Amylose erhalten.

Die Quantifizierung über die Peakflächen ist nur durch Korrektur mit Responsefaktoren möglich, die durch Vergleich der elektrochemischen Signale der partiell methylierten Standardsubstanzen relativ zu dem Signal der Glucose ermittelt wurden.

Der elektrochemische Response der partiell methylierten Glucosen hängt entscheidend von der Existenz der Aldehydgruppe aber auch von der Zahl und der Position der Substituenten ab, da die Hydroxylgruppen ebenfalls zum amperometrischen Signal beitragen. Das Signal ist am höchsten für Glucose und am niedrigsten für die terminale 2,3,4,6-Tetra-*O*-methylglucose. Kragten *et al.* ermittelten in Arbeiten zu Carboxymethyl- und Sulfoethylcellulosen entsprechende Responsefaktoren^{92,93}. Sie zeigten, daß eine Derivatisierung in 3-Position der Glucose den Response am stärksten schwächte, während Glucosen mit 2- oder 6-Substitution einen etwa ähnlichen Response aufwiesen.

Zur Bestimmung der Responsefaktoren wurden daher Mischungen der sieben möglichen partiell methylierten Glucosen mit Glucose hergestellt. Zur Vermeidung von Fehlern durch Verlassen des linearen Meßbereichs wurden je ein Gemisch im Verhältnis 5:1, 1:1 und 1:5 (partiell methylierte Glucose : Glucose) gemessen. Die Bestimmung des exakten Verhältnisses der Gemische sollte zunächst über das Verhältnis der Protonen am C-1-Kohlenstoff NMR-spektroskopisch erfolgen. Wegen der Überlagerung der Signale mit Ausnahme der Glucosen, die 2-*O*-methyliert sind, war dies nicht möglich. Es wurde daher jeweils ein Teil des Gemischs in die partiell methylierten Alditolacetate überführt und die relative Zusammensetzung gaschromatographisch bestimmt und mit den Ergebnissen aus den HPAE-Chromatogrammen verglichen. Tab. 3-3 zeigt die nach dieser Methode entwickelten Responsefaktoren für partiell methylierte Glucosen und die von Kragten *et al.* ermittelten Faktoren für partiell carboxymethylierte und sulfoethylierte Glucosen.

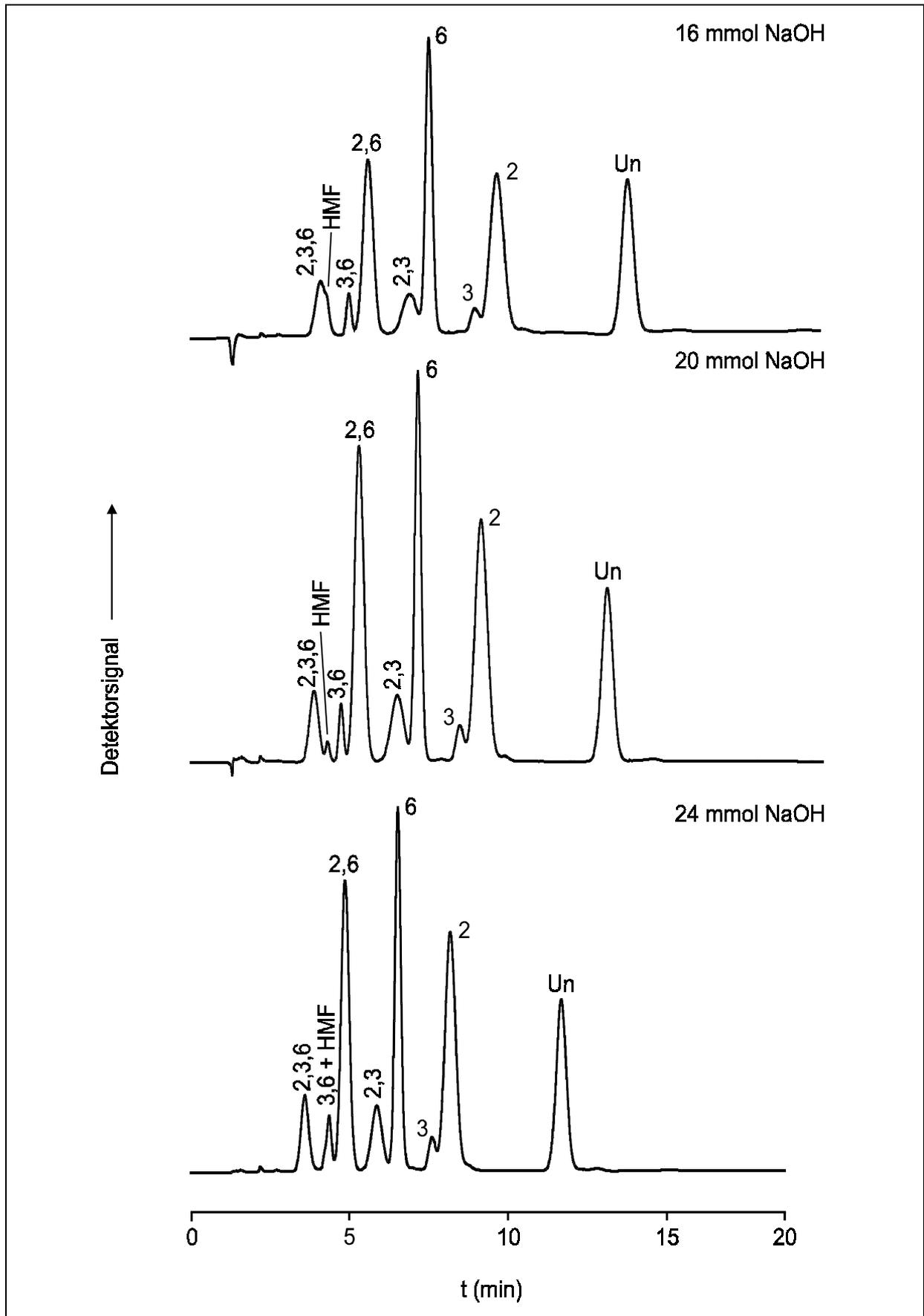


Abb. 3-6: Ionenchromatographische Trennung mit unterschiedlich hoher NaOH-Konzentration von partiell methylierten Glucosen und Glucose nach Hydrolyse von Methylcellulose (DS 1.82). Trennsäule: CarboPac PA1[®] (4x250mm), Flow 1.0 ml/min.

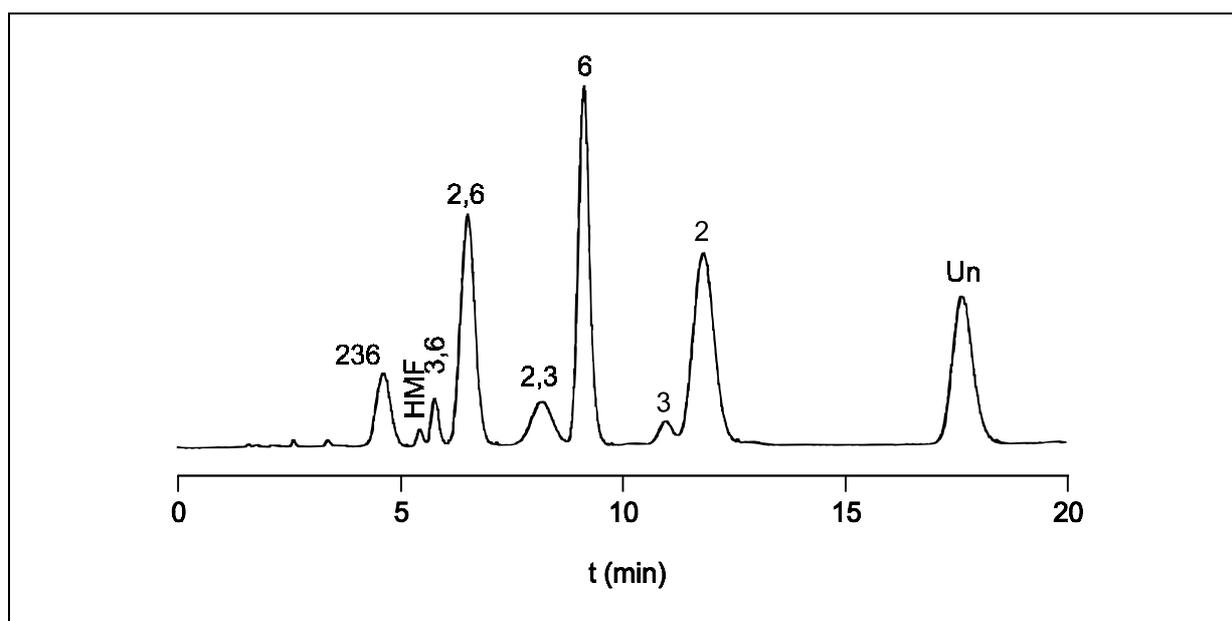


Abb. 3-7: Ionenchromatographische Trennung von partiell methylierten Glucosen und Glucose nach Hydrolyse von Methylcellulose (DS 1.82) mit 16 mmol Natronlauge. Trennsäule: CarboPac PA1[®] (9x250mm); Flow: 4.0 ml/min.

Tab. 3-3: Responsefaktoren von partiell methylierten, sulfoethylierten und carboxymethylierten Glucosen relativ zu Glucose für die gepulste amperometrische Detektion.

	MC ⁹⁰ (R = CH ₃)	SEC ⁹³ (R = CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na)	CMC ⁹² (R = CH ₂ CO ₂ Na)
2,3,6-Tri- <i>O</i> -R-Glc	6.00	-	5.00
2,3-Di- <i>O</i> -R-Glc	2.27	6.25	3.85
2,6-Di- <i>O</i> -R-Glc	2.86	2.78	2.63
3,6-Di- <i>O</i> -R-Glc	3.03	5.88	4.17
2- <i>O</i> -R-Glc	1.49	1.41	1.41
3- <i>O</i> -R-Glc	1.67	-	2.70
6- <i>O</i> -R-Glc	1.16	1.30	1.30
Glc	1.00	1.00	1.00

Am Beispiel der Substituentenverteilung einer Methylcellulose (DS 1.82), die zum einen mittels SMA und andererseits mittels HPAEC und gepulster amperometrischer Detektion ermittelt wurde, zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung beider Methoden (Abb. 3-8).

Einschränkend ist jedoch zu sagen, daß der Response detektorspezifisch zu sein scheint. Die in Tab. 3-3 angegebenen Korrekturfaktoren wurden an einem amperometrischen Detektor, Modell PAD-2[®], Fa. Dionex, ermittelt. Es zeigte sich inzwischen, daß am elektrochemischen Detektor, Modell PED[®], Fa. Dionex, andere Responsefaktoren gelten. Eine eingehende Untersuchung mit den Modellschubstanzen ist noch nicht durchgeführt worden, es läßt sich aber bereits sagen, daß am PED die Faktoren für alle partiell methylierten Glucosen, die eine 3-

Substitution aufweisen, deutlich höher liegen als am PAD-2. Die folgende Tabelle soll von daher nur einen Anhaltspunkt für die Responsefaktoren am PED darstellen:

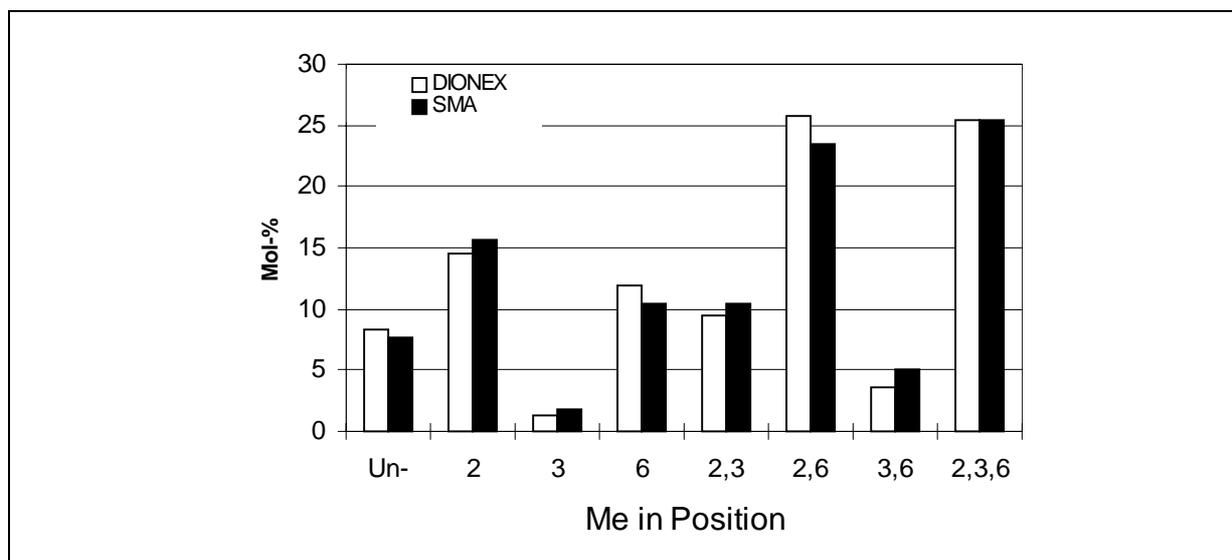


Abb. 3-8: Vergleich der Substituentenverteilung einer Methylcellulose mittels SMA (DS 1.82) und HPAEC (DS 1.81).

Tab. 3-4: Responsefaktoren für partiell methylierte Glucosen aus 1,4-Glucanen bezogen auf Glucose. Vergleich der Detektoren des Typs PAD-2 und PED, Fa. Dionex.

Verbindung	PED	PAD-2
1-b ¹ 2,3,6-Tri- <i>O</i> -me-glc	8.79	6.00
4-b 2,3-Di- <i>O</i> -me-glc	3.94	2.27
2-b 2,6-Di- <i>O</i> -me-glc	2.80	2.86
3-b 3,6-Di- <i>O</i> -me-glc	5.10	3.03
6-b 2- <i>O</i> -Me-glc	1.49	1.49
7-b 3- <i>O</i> -Me-glc	2.10	1.67
5-b 6- <i>O</i> -Me-glc	1.00	1.16
8-b Glc	1.00	1.00

Mit Hilfe der hier ermittelten Responsefaktoren kann die HPAEC-Methode die Bestimmung der Substituentenverteilung von Methylcellulosen und Cellulosederivaten, die in ein komplementäres Methylmuster überführt werden können, deutlich verkürzen. Wie oben gezeigt (Abb. 3-8) stimmen die Ergebnisse der HPAEC-Analyse und der SMA gut überein. Einschränkend ist jedoch zu sagen, daß die HPAEC-Analyse lediglich einen ersten Eindruck über die Substi-

¹ Der Index b kennzeichnet die zum partiell methylierten Sorbitacetat korrespondierende partiell methylierte Glucose bzw. Glucose selbst.

tuentenverteilung vermitteln kann und sich daher für die Routineanwendung bei hohem Probandendurchsatz eignet. Ist jedoch das exakte Ergebnis von Interesse sollte auf die zeitaufwendige aber bewährte Standardmethylierungsanalyse zurückgegriffen werden. Die Anwendbarkeit für anionisch derivatisierte Cellulosen, wie Carboxymethyl- und Sulfoalkylcellulosen muß aufgrund der Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe und der Forschungsgruppe Dr. Puls am Bundesforschungsanstalt für Holz- und Forstwirtschaft, Hamburg-Lohbrügge, gleichfalls eingeschränkt werden. So wurden für partiell carboxymethylierte Glucosen stark von der Literatur abweichende Responsefaktoren gefunden⁹⁴, und zum anderen zerstören partiell sulfoalkylierte Glucosen in kurzer Zeit das Austauschharz der Carbo Pac PA1[®]-Säulen. Die Analyse höherer Alkylcellulosen ist mit dieser Methode wegen der wachsenden Hydrophobie insbesondere der trisubstituierten Monomere nicht möglich. Für diese Derivate und auch solche mit komplexen Substituentenmustern (Mischether), die zum Teil auch Tandemsubstitution erlauben (Hydroxyalkylether), kann das Verteilungsmuster in der Monomereinheit nur mittels GC bestimmt werden. In Tab. 3-5 sind die Cellulosederivate nach Analysierbarkeit entweder mittels HPAEC-PAD oder GC eingeteilt.

Tab. 3-5: Analysenmethoden für die Bestimmung der Substituentenverteilung in der Glucoseinheit von Cellulosederivaten.

Cellulosederivat	HPAEC-PAD	GC
Methylcellulose	x	x
Celluloseacetat ¹	x	x
Cellulosesulfat ¹	x	x
Silylcellulosen ¹	x	x
Carboxymethylcellulose	x	x
Sulfoethylcellulose	(x)	
Ethylcellulose und höhere Alkylether		x
Hydroxyalkylcellulose		x
Alkylhydroxyalkylcellulose		x

¹ Nach Einführung des komplementären Methylmusters.

Cellulosederivate mit labilen Substituenten (Celluloseacetate, Cellulosesulfate, Trialkylsilylcellulosen) müssen vor dem Abbau mittels geeigneter Methoden permethyliert werden, worauf man das komplementäre Methylmuster bestimmt.

Celluloseacetate werden in Trimethylphosphat (TMP) gelöst und mit Methyl-trifluormethansulfonat (Methyl-triflat) und 2,6-Di-*tert*-butylpyridin als Protonenfänger bei Raumtemperatur methyliert^{95,96}. Für Cellulosesulfate entwickelte Gohdes eine neue Methylierungsmethode, die nach Überführung des Cellulosesulfats in das Triethylammoniumsalz zwei kurze Methylierungsschritte mit Lithium-Methylsulfinylmethanid⁹⁷ (Li-Dimsyl) und Iodmethan in DMSO/TMU beinhaltet⁹⁸. Trialkylsilylcellulosen lassen sich aufgrund des basenstabilen

Substituenten unter Standardbedingungen (DMSO, NaOH, MeI)⁵⁵ alkylieren. Hier ist anzumerken, daß es bei der alklischen Methylierung von α -1,4-Glucanen zu Silylwanderung von Position 2 nach Position 3 kommt und das Ergebnis somit verfälscht wird⁹⁹. In allen drei Fällen werden die Substituenten während des säurehydrolytischen Abbaus abgespalten, und man erhält nach Auftrennung durch HPAEC das inverse Methylnmuster.

Die in Kap. 1.3 besprochene Methode des Reduktiven Abbaus scheidet für Cellulosesulfate aufgrund der Desaktivierung der glucosidischen Bindung bei 2-*O*-Substitution und der Unlöslichkeit der ionischen Derivate in Dichlormethan aus. Methylierte Celluloseacetate hingegen können auf diese Weise analysiert werden, indem durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen die Acetylgruppen zu Ethylsubstituenten reduziert werden¹⁰⁰.

3.1.1.1.1 Das Spurlin- und Reuben-Modell

Die auf dem Wege der oben beschriebenen Analysenmethoden erhaltene Substituentenverteilung in den Glucoseeinheiten kann mathematisch mit Hilfe der kinetischen Modelle von Spurlin und Reuben auf Abweichungen geprüft werden.

Spurlin¹⁰¹ nimmt für sein Modell an, daß:

1. alle OH-Gruppen der Cellulose für die Substitutionsreaktion gleich gut zugänglich sind,
2. sich die relativen Geschwindigkeitskonstanten an O-2, O-3 und O-6 während der Reaktion nicht ändern,
3. also die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch Substitution innerhalb der AGU beeinflusst wird,
4. die Reaktion irreversibel ist,
5. und Endgruppen vernachlässigt werden können.

Für die experimentell ermittelten partiellen DS-Werte in den Positionen 2, 3 und 6, die die relativen Reaktivitäten widerspiegeln, kann die komplette Monomerzusammensetzung berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen werden. Eine Übereinstimmung tritt aber nicht immer auf. Das Modell mußte daher modifiziert werden.

Reuben fand bei der Untersuchung von Hydroxyethylcellulosen heraus, daß die Reaktivität am O-3 erhöht wurde, wenn bereits eine Substitution am O-2 erfolgt war. Es muß daher eine weitere, auf das O-3 bezogene Geschwindigkeitskonstante k'_3 eingeführt werden, die die erhöhte Reaktivität am O-3 nach Erstsitution am O-2 berücksichtigt. Dieser positive intramonomere Effekt wurde für die Methylierung, Ethylierung und Hydroxyalkylierung von Cellulosen gefunden^{102,103,104}, während die Carboxymethylierung im Idealfall nach dem Spurlin-Modell verläuft¹⁰⁵. Abweichungen zwischen Experiment und Modell deuten auf eine heterogene Sub-

stituentenverteilung, lassen aber streng genommen nur eine Bewertung des Geschehens innerhalb einer Glucoseeinheit zu.

Der von Arisz definierte Parameter H_1 (Wurzel aus der Summe der quadrierten Einzelabweichungen)⁸⁰ soll das Ausmaß der gesamten Abweichung vom Modell repräsentieren.

$$H_1 = \sqrt{\sum_{i=0}^{236} \Delta s_i^2} \quad [3-1]$$

Daß die wahren Verhältnisse oft komplexer sind, zeigt Abb. 3-9. Hier ist die experimentell bestimmte Substituentenverteilung im Vergleich zu den nach dem Spurlin- und Reuben-Modell berechneten Verteilungsmustern dargestellt.

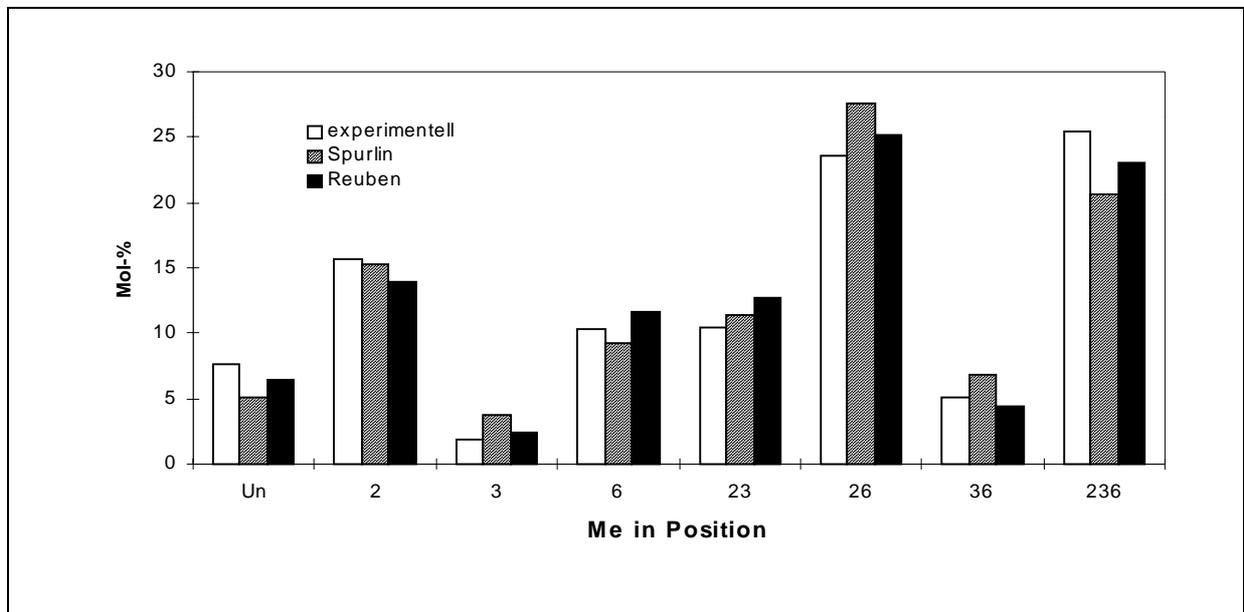


Abb. 3-9: Substituentenverteilung einer Methylcellulose (DS 1.82). Vergleich der experimentell bestimmten Daten mit den nach dem Reuben- und Spurlin-Modell berechneten.

Bei dieser Probe sagen beide Modelle für un- und trisubstituierte AGUs zu niedrige und für 3-mono- und 2,6-disubstituierte Glucoseeinheiten zu hohe Werte voraus, wobei das Spurlin-Modell deutlich stärker abweicht. Insgesamt fittet das Reuben-Modell besser, was man auch an den H_1 -Werten erkennen kann:

$$H_{1(\text{Spurlin})}: \quad 7.5 \qquad H_{1(\text{Reuben})}: \quad 4.6$$

3.1.1.2 Oligomeranalyse

Die nächste interessierende strukturelle Ebene ist die Polymerkette. Aufgrund der Polydispersität von nativen Polysacchariden läßt sich keine exakte Sequenzanalyse durchführen. Gelingt es jedoch, das Polymer statistisch partiell abzubauen, so sollten die entstandenen Oligomere ein Abbild des originalen Polysaccharids darstellen. Diese Methode wurde am Beispiel von Methylcellulosen⁸⁰ entwickelt und durch Studien an Methylamylosen⁸¹ verbessert und soll im folgenden am Beispiel von Cellulosederivaten dargestellt werden.

3.1.1.2.1 Statistischer Partialabbau

Nicht vollständig derivatisierte Cellulosen können als Copolymere aus un-, mono-, di- und tri-substituierten Glucosebausteinen betrachtet werden. Aufgrund der Komplexität von Polysaccharidderivaten kann man für die Anordnung der Monomerbausteine im Polymermolekül keine exakte Sequenz ermitteln, sondern lediglich versuchen, durchschnittliche Verteilungsmuster zu bestimmen. Durch statistischen Partialabbau sollten Oligomere zugänglich sein, die diese Verteilung repräsentieren und analysierbar sind. Durch Perdeuteromethylierung wird zunächst das Probenmaterial chemisch vereinheitlicht. Statistischer Partialabbau wird durch partielle Methanolyse oder Hydrolyse erreicht. Vor der massenspektrometrischen Analyse mittels FAB- oder MALDI-TOF-MS werden die terminalen 4-OH-Gruppen ebenfalls mit CD₃I verethert (Abb. 3-10).

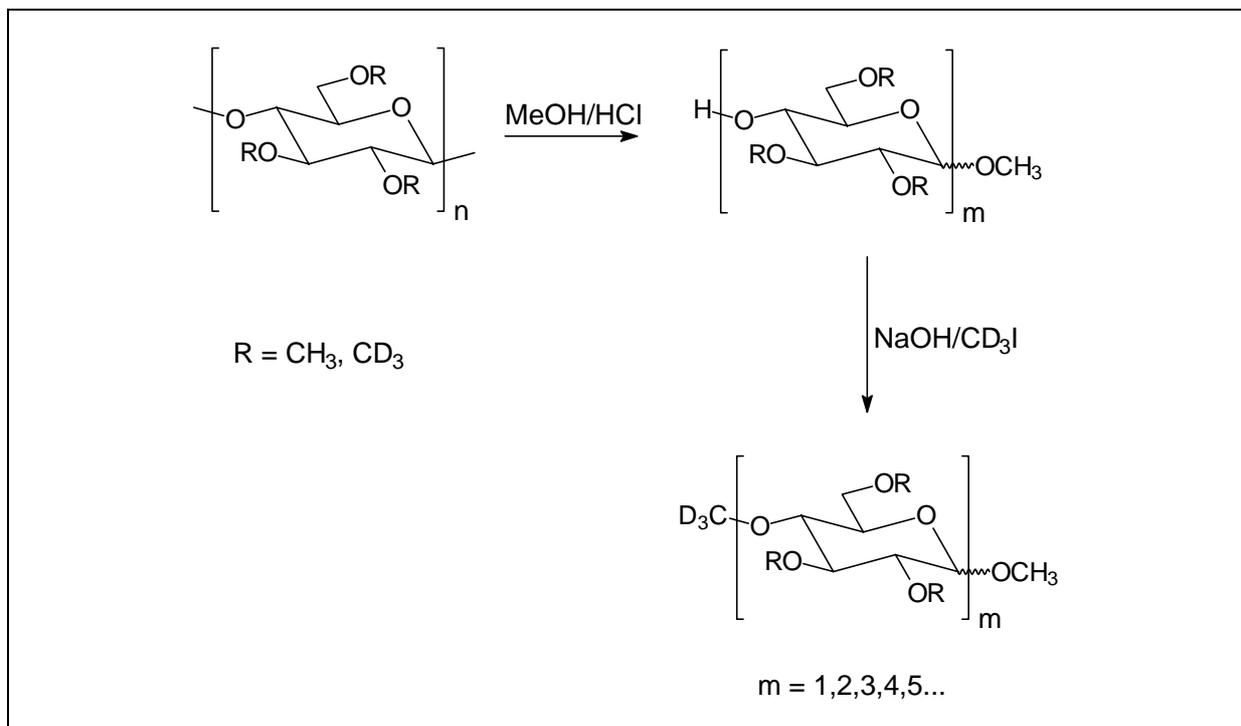


Abb. 3-10: Partialabbau von permethylierter Cellulose (CH₃/CD₃) durch partielle Methanolyse mit anschließender Perdeuteromethylierung

Während Methylcellulosen direkt analysiert werden können, müssen Cellulosederivate mit labilen Substituenten zuerst unter Substituentenerhalt methyliert werden.

3.1.1.2.2 Massenspektrometrische Analyse

In Abb. 3-11 ist der Analysengang der Monomer- und Oligomeranalyse für Methylcellulosen, der am Modell von Methylamylosen entwickelt wurde⁸¹, dargestellt. Die Methylcellulose wird zunächst mit Iodmethan- d_3 permethyliert (A), wobei eine gemischt methylierte und deuteromethylierte Cellulose entsteht. Im Anschluß wird das Polymer durch partielle Methanolyse abgebaut (B), erneut perdeuteromethyliert (C) und das entstandene Oligomerengemisch schließlich massenspektrometrisch untersucht.

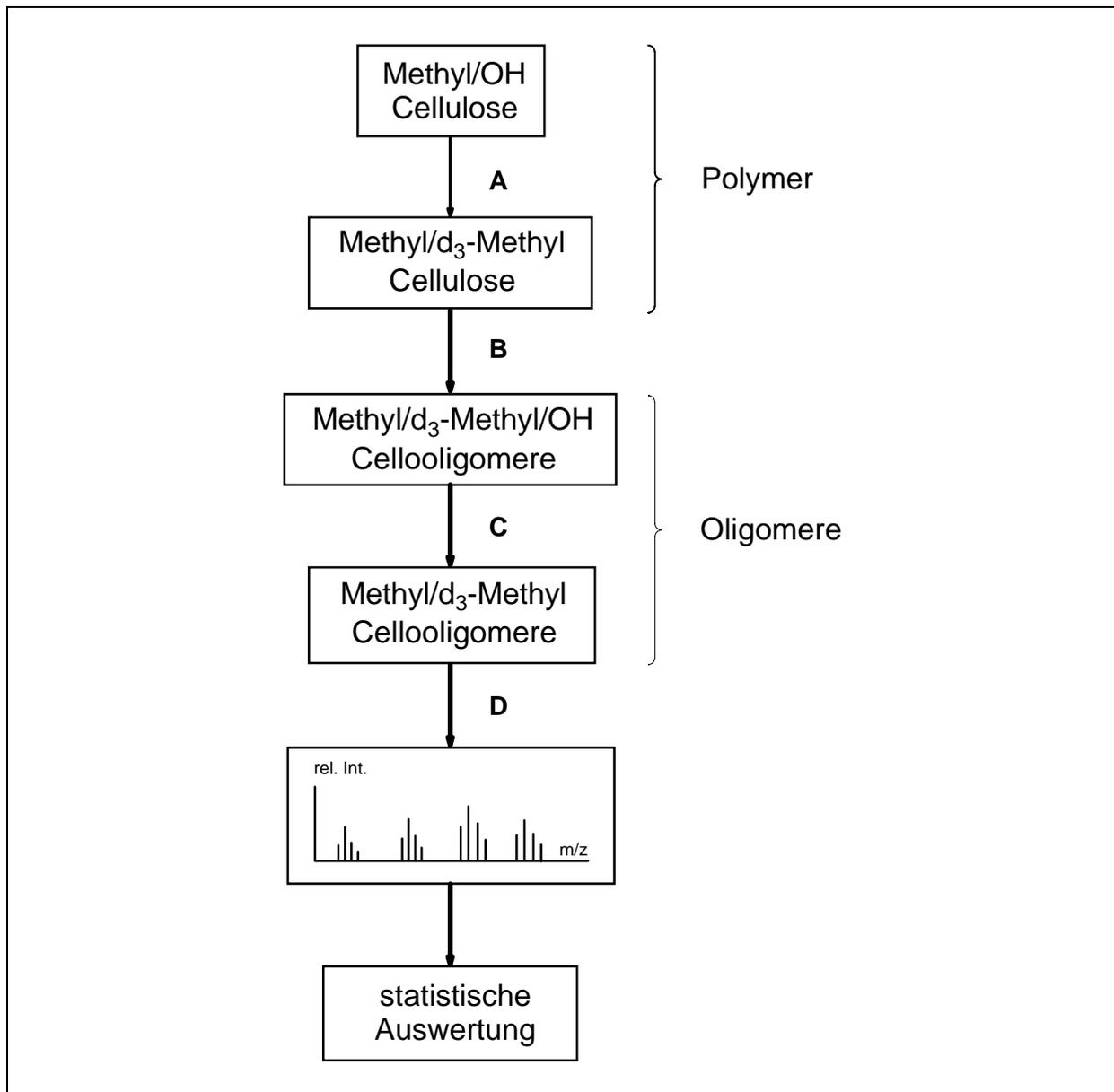


Abb. 3-11: Fließschema zur Herstellung eines Gemischs statistisch abgebauter Cellooligomeren aus Methylcellulosen.

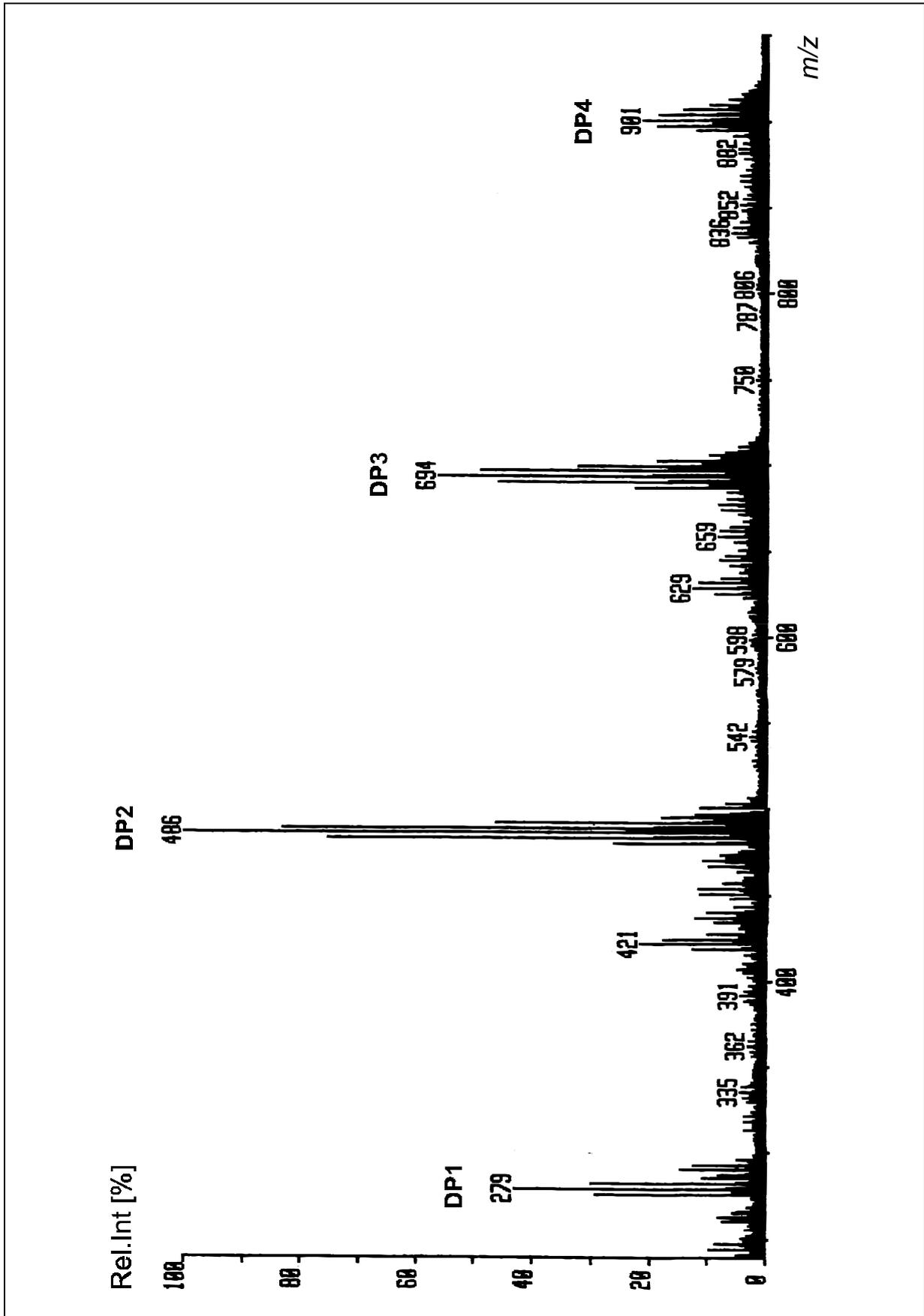


Abb. 3-12: FAB-MS einer Methylcellulose (DS 1.82) nach Durchführung der in Abb. 3-11 angegebenen Reaktionsschritte. Die Bereiche der Celooligomeren sind entsprechend ihres DP's gekennzeichnet.

Das FAB-Massenspektrum der bereits oben besprochenen Methylcellulose (DS 1.82) ist in Abb. 3-12 dargestellt.

Die nach statistischem Partialabbau erhaltenen Oligomerfraktionen weisen Sequenzen mit $\Delta m = 3$ auf, welche aus un-, mono-, di- und trisubstituierten AGUs bestehen können. Die jeweils drei mono- bzw. disubstituierten Glucosebausteine lassen sich massenspektrometrisch nicht unterscheiden. Die Signale repräsentieren Oligomere mit der gleichen Gesamtzahl an Substituenten. So kann ein Dimer, das insgesamt 2 Methylgruppen trägt entweder aus zwei monosubstituierten (MM) oder aus je einem un- und disubstituierten Glucosebaustein (UD und DU) bestehen. Je größer die Anzahl unterschiedlicher Monomierzusammensetzungen ist, desto höher muß dieser Oligomerbaustein entsprechend seiner möglichen Kombinationen am Signal gewichtet werden. In diesem Fall wird das aus einem un- (U) und einem disubstituierten Baustein (D) bestehende Dimer zweifach gewichtet. Insgesamt gibt es bei DP2 16 mögliche Kombinationen, von denen 6 Paare nicht unterscheidbar sind. Die Anzahl dieser Kombinationen läßt sich nach $(U+M+D+T)^n$, d.h. 4^n mit n =Anzahl der Glucosebausteine bzw. DP ausdrücken. Tab. 3-6 - Tab. 3-8 zeigen die möglichen Verteilungsmuster für die jeweiligen Cellooligomerfraktionen von DP2 bis DP4.

Tab. 3-6: Verteilungsmuster für Celldimere (DP2)

Verteilungsmuster	Häufigkeit	Summe	n(CH ₃)
TT	1	1	6
TD	2	2	5
TM	2	3	4
DD	1		4
TU	2	4	3
DM	2		3
DU	2	3	2
MM	1		2
MU	2	2	1
UU	1	1	0
Gesamtsumme		16	

Multipliziert man die Anteile der jeweiligen Oligomerbausteine mit den aus der Monomeranalyse erhaltenen relativen Anteilen an un-, mono-, di- und trisubstituierten Glucosen, so erhält man eine statistische Verteilung, die repräsentativ für das Polymermaterial ist. Die so berechnete Verteilung wird mit den experimentellen Werten verglichen und kann zur Interpretation der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette herangezogen werden.

Die quantitative Auswertung der Massenspektren erfolgt über das Verhältnis der einzelnen Oligomere innerhalb einer DP-Fraktion. Um das Signalrauschen zu eliminieren, wird über das Verhältnis von M zu M + 1 (Isotopenpeak), bzw. der entsprechenden Natriumaddukte [M + Na] zu [M + 1 + Na] korrigiert, da man davon ausgehen kann, daß beide Signale um den glei-

chen Betrag erhöht sind. Dieses Verhältnis ist aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung der einzelnen Atomarten und der Zusammensetzung des jeweiligen Oligomermoleküls ein fester Wert. Die Korrektur K berechnet sich nach Gleichung 3-2 wie folgt:

$$K = \frac{\text{Rel. Int. [M + 1 + Na]} - (\text{Rel. Int. [M + Na]} \times \text{Ber. Int. [M + 1 + Na]/100})}{1 - (\text{Ber. Int. [M + 1 + Na]/100)} \quad [3-2]$$

Rel. Int. = Relative Intensität

Ber. Int. = Berechnete relative Intensität für den Isotopenpeak

Vom Meßwert für $m/z = [M + Na]^+$ wird K abgezogen, und die korrigierten Intensitäten werden innerhalb jeder Oligomerfraktion auf 100 % normiert. Vergleicht man nun die experimentellen Daten mit der aus der Monomeranalyse erhaltenen Verteilung für die jeweilige Oligomerfraktion, so ist eine auftretende Abweichung ein Maß für die Heterogenität der

Tab. 3-7: Verteilungsmuster für Cellotrimere (DP3)

Verteilungsmuster	Häufigkeit	Summe	n(CH ₃)
TTT	1	1	9
TTD	3	3	8
TTM	3	6	7
TDD	3		7
DDD	1	10	6
TTU	3		6
TDM	6		6
TMM	3	12	5
DDM	3		5
TDU	6		5
DDU	3	12	4
DMM	3		4
TMU	6		4
MMM	1	10	3
TUU	3		3
DMU	6		3
MMU	3	6	2
DUU	3		2
MUU	3	3	1
UUU	1	1	0
Gesamtsumme		64	

Substituentenverteilung in der Polymerkette. Für jede Oligomerfraktion DP_x kann nun ein Heterogenitätsfaktor H_x bestimmt werden, der ein quantitatives Maß für die Abweichung liefert. Als praktisch sinnvoll erwies sich eine Auswertung bis DP4. Danach wird das Signal-

Rauschverhältnis der Massenspektren in der Regel zu schlecht. Zudem wird eine quantitative Auswertung mit Zunahme des Massenbereichs, für den die relative Zusammensetzung bestimmt werden soll, kritischer ($\Delta m/z$ bei DP2: $6 \times 3 = 18$, für DP3: $9 \times 3 = 27$, für DP4: $12 \times 3 = 36$, für DP5: $15 \times 3 = 45$).

Tab. 3-8: Verteilungsmuster für Cellotetramere (DP4)

Verteilungs- muster	Häufigkeit	Summe	n(CH ₃)
TTTT	1	1	12
TTTD	4	4	11
TTTM	4	10	10
TTDD	6		10
TTTU	4	20	9
TDDD	4		9
TTDM	12		9
DDDD	1	31	8
TTMM	6		8
TTDU	12		8
TDDM	12		8
DDDM	4	40	7
TTMU	12		7
TDDU	12		7
TDMM	12		7
DDDU	4	44	6
TMMM	4		6
TTUU	6		6
DDMM	6		6
TDMU	24		6
DMMM	4	40	5
DDMU	12		5
TMMU	12		5
TDUU	12		5
MMMM	1	31	4
DDUU	6		4
DMMU	12		4
TMUU	12		4
MMMU	4	20	3
TUUU	4		3
DMUU	12		3
DUUU	4	10	2
MMUU	6		2
MUUU	4	4	1
UUUU	1	1	0
Gesamtsumme		256	

3 Spezieller Teil

Eine Verbesserung der Qualität der Massenspektren, insbesondere bei MALDI-TOF-MS, kann man erreichen, indem das Oligomergemisch vorher säulenchromatographisch fraktio- niert, also der Massenbereich der zu analysierenden Einzelsubstanzen eingengt wird.

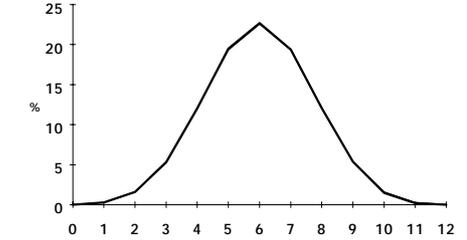
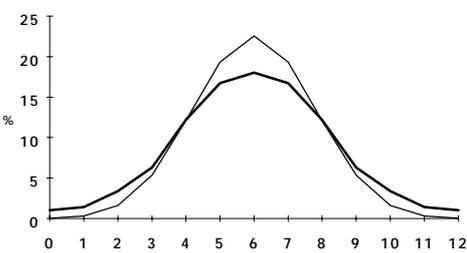
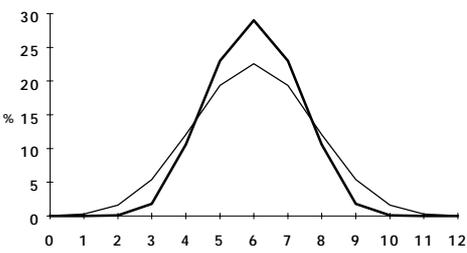
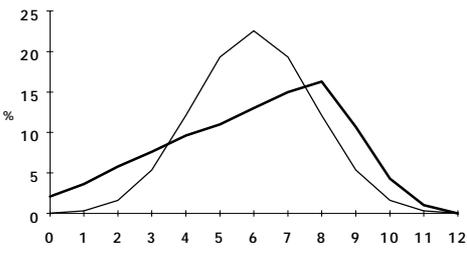
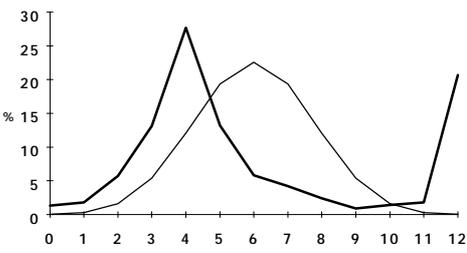
<p style="text-align: center;">Typ A</p> 	<p>Statistische Verteilung der Substituenten im Poly- mermolekül.</p>
<p style="text-align: center;">Typ B</p> 	<p>Oligomere mit mittlerem DS sind vermindert und Oligomere mit niedrigerem und höherem DS sind überrepräsentiert.</p> <p>Substituentenverteilung ist heterogen. (Heterogenität 2.Art)</p>
<p style="text-align: center;">Typ C</p> 	<p>Substituentenverteilung ist stärker regulär. Oligo- mere mit niedrigerem und höherem DS sind unterre- präsentiert.</p> <p>Substituentenverteilung ist heterogen (Heterogenität 2.Art).</p>
<p style="text-align: center;">Typ D</p> 	<p>DS-Gradient in der Probe durch topochemische Reaktionskontrolle.</p> <p>Verteilung ist die Summe mehrerer Verteilungen unterschiedlich substituierter Cellulosemoleküle. Substituentenverteilung ist insgesamt heterogen, in den individuellen Polymerketten hingegen homogen. (Heterogenität 1.Art und/oder 2.Art)</p>
<p style="text-align: center;">Typ E</p> 	<p>Bimodale Verteilung.</p> <p>Die Moleküle weisen extreme Unterschiede in der Dichte der Substitution als Folge konkurrierender oder aufeinander folgender Reaktionen auf. (Heterogenität 1. Art und/oder 2.Art)</p>

Abb. 3-13: Abweichung der massenspektrometrisch ermittelten Verteilungsmuster der tetrameren Fraktion eines Cellulosederivats (dicke Linie) von der statistischen Verteilung der aus der Monomeranalyse erhaltenen Daten (dünne Linie). Modifiziert nach Lit. 81.

Eine weitere Möglichkeit das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, stellt die Einführung geeigneter, die Desorptionsfähigkeit der Oligomeren erhöhender Gruppen („Labeling“) dar. Hierüber wird unten in Kap. 3.1.4 berichtet.

Abb. 3-13 zeigt exemplarisch, wie die Auswertung der Massenspektren für die Oligomerfraktion mit DP4 bei verschiedenen Substitutionsmustern in der Kette aussehen könnte. Eine homogen statistische Verteilung liegt vor, wenn die experimentellen Daten mit der zufälligen Verteilung der un-, mono-, di- und trisubstituierten AGUs aus der Monomeranalyse übereinstimmt (Typ A). Eine heterogene Verteilung 2. Art, d.h. Heterogenität in der Polymerkette, liegt dann vor, wenn Oligomere mit mittlerem DS unter- und solche mit niedrigem und höherem DS überrepräsentiert sind (Typ B). Gleichfalls eine Heterogenität 2. Art bedeutet eine stärker regulärere Substituentenverteilung mit erhöhten Anteilen der Oligomere mit mittlerem DS auf Kosten derer mit niedrigerem und höherem DS (Typ C). Eine stark abgeflachte Verteilung, welche das Ergebnis topochemischer Einflüsse ist, kann als Summe mehrerer Einzelverteilungen aufgefaßt werden. Es handelt sich hierbei um eine Heterogenität 1. Art, d.h. eine Heterogenität über die Polymermoleküle (Typ D). Bimodale Verteilungen weisen auf konkurrierende Reaktionsmechanismen hin. Die Substituenten sind beispielsweise blockartig über die Polymerkette verteilt, wobei es Bereiche mit überwiegend trisubstituierten AGUs und Bereiche mit überwiegend unsubstituierten AGUs gibt (Typ E)⁸¹.

Die so beobachteten Verteilungsmuster zeigen die Zusammenhänge zwischen Reaktionsführung und resultierender Primärstruktur auf und können deutliche Hinweise auf kooperative Effekte entlang der Kette geben.

Um Heterogenität 1. Art (über die Polymermoleküle) und 2. Art (im Polymermolekül) zu unterscheiden, muß geprüft werden, ob die Derivate vor dem Partialabbau fraktionierbar sind (nach DS) bzw. ob die Substituentendichte unabhängig vom DP ist.

3.1.1.2.3 Labeling für die massenspektrometrische Analyse

Die bisherigen Ausführungen zur Untersuchung der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette bezogen sich auf die Analytik von Methylcellulosen oder auf Cellulosederivate, die in ein komplementäres Methylderivat überführt werden und deren ursprüngliche Substituenten vollständig gegen Deuteromethylgruppen ausgetauscht werden können. Die nur geringen Massenunterschiede innerhalb der nach Partialabbau gewonnenen Oligomerfraktionen erlauben eine quantitative Auswertung nach massenspektrometrischer Analyse.

Erste Untersuchungen an gemischt methylierten und ethylierten Oligomeren zeigten die Grenzen dieser Methode auf. Die Quantifizierbarkeit ging verloren, da die Signale der Oligomeren innerhalb einer Fraktion mit höherem Anteil an Ethylgruppen in der FAB-MS stärker detektiert werden als die höher methylierten Oligomere. Dieses Problem könnte man entweder durch Eichung mit Modellsubstanzen überwinden oder aber durch Einführung einer funktionellen Gruppe, die die Desorption im Massenspektrometer so stark verbessert, daß der Einfluß

der Substituentenart ausgeglichen wird. Die Konzepte und Ergebnisse werden in Kap. 3.1.4 erläutert.

3.1.2 Substituentenverteilung in Methylcellulosen

Alkylierungen von Cellulose werden im industriellen Maßstab allgemein unter heterogenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dazu wird Cellulose zunächst in Natronlauge vorgequollen und die so entstandene Alkalicellulose direkt mit den entsprechenden Reagenzien (Methylchlorid, Chloressigsäure, Ethylenoxid unter Zusatz von Isopropanol) umgesetzt.

3.1.2.1 Eigene Proben

Es sollten nun Methylierungen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen unter Variation der Base und des Alkylierungsmittels durchgeführt werden und die Substituentenverteilung dieser Produkte in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette bestimmt werden.

Es wurden zuerst Methylierungen an nicht vorbehandelten Cellulosen durchgeführt. Die eingesetzten Materialien waren Avicel PH200 und Baumwoll-Linters. Letzteres Material lag getrocknet und feucht („never-dried“) vor. Die feuchte Probe wurde vor dem Einsatz in nicht wäßrigen Lösungsmitteln dreimal gegen das entsprechende Lösungsmittel ausgetauscht.

Es wurden drei Lösungsmittelsysteme benutzt:

- 30 %ige NaOH
- DMSO/LiCl (9 %) ¹⁰⁶
- DMAc/LiCl (9 %) ¹⁰⁷.

Tab. 3-9 gibt eine Übersicht über die Reaktionsbedingungen und die erzielten DS-Werte. Bei Alkylierungen in 30 %iger NaOH (**MC1, MC3, MC4**) und DMSO/LiCl (9 %) (**MC7, MC8**) erreicht man mittlere DS-Werte, erhält jedoch heterogenes Probenmaterial. Bei der Umsetzung von mercerisierten Linters (**MC5, MC6**) wurden höhere DS-Werte erzielt, man erhält aber scheinbar immer noch heterogenes Material, wie es die Ergebnisse der Doppelbestimmungen in Tab. 3-9 verdeutlichen. Mercerisierte Avicel (mikrokristalline Cellulose) hingegen lieferte einen geringeren DS (**MC2**).

Im Lösungsmittelsystem DMSO/LiCl (9 %) konnte Cellulose im Gegensatz zu Literaturberichten nicht gelöst werden ¹⁰⁶. Erwartungsgemäß löste sich Cellulose in DMAc/LiCl (9 %). Dieser Lösungszustand brach jedoch nach Zugabe von Base wieder zusammen. Man gelangt hier zu keinen nennenswerten Methyl-DS-Werten (**MC9**). Zum Vergleich wurde auch eine kommerzielle Methylcellulose (Aldrich) mit einem Methyl-DS von 1.82 (**MC10**) untersucht.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-9: Übersicht zur Darstellung von Methylcellulosen.

Nr.	Cellulose Konzentration	Lösungsmittel	Base/Alkylierungsmittel (Äqu./OH)	Reaktionszeit [h]	DS
MC1	Avicel PH 200 50 mg/ml	H ₂ O, gequollen in Stickstoff- atmosph.	NaOH (30 %; 11.9) MeI (3.33)	96	1.20
MC2	Avicel PH200 50 mg/ml	H ₂ O mercerisiert ¹	NaOH (30 %; 11.9) MeI (3.5)	48	0.38
MC3	Linters feucht 25mg/ml	H ₂ O	NaOH (30 %; 23.9) MeI (3.5)	92	1.36 ³ 1.44
MC4	Linters trocken 25mg/ml	H ₂ O	NaOH (30 %; 23.9) MeI (3.5)	94	1.50 ³
MC5	Linters feucht 25mg/ml	H ₂ O mercerisiert ²	NaOH (30 %; 23.9) MeI (3.5)	122	1.62 ³ 2.18
MC6	Linters trocken 25mg/ml	H ₂ O mercerisiert ²	NaOH (30 %; 23.9) MeI (3.5)	122	1.36 ³ 1.93
MC7	Linters feucht 25mg/ml	DMSO/LiCl (9 %)	LiDim syl/MeI (2/2)	48	1.35 ³ 1.83
MC8	Linters trocken 25mg/ml	DMSO/LiCl (9 %)	LiDim syl/MeI (2/2)	54	1.39 ³ 1.07
MC9	Avicel PH 200 10 mg/ml	DMAc/LiCl (9 %)	LiDim syl/MeI (2/2)	24	0.10
MC10	Methylcellulose Aldrich	Kommerzielle Vergleichsprobe			1.82

¹ Proben wurden vor der Methylierung über Nacht in 30 % wäbr. NaOH gequollen und neutral gewaschen.

² Proben wurden vor der Methylierung über Nacht in 30 % wäbr. NaOH gequollen, neutral gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

³ Hier wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die stark abweichenden Werte zeigen heterogenes Probenmaterial an.

3.1.2.1.1 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Monomereinheit

Im folgenden sind die einzelnen Analysenergebnisse ausgewählter Methylcellulosen aus Tab. 3-9 gezeigt und sollen bezüglich ihrer Herstellungsbedingungen diskutiert werden. Wie auf Seite 27 bereits erwähnt, kann man mit Hilfe von mathematischen Modellen, wie sie Spurlin und Reuben entwickelt haben, aus den partiellen DS-Werten die entsprechend der Bernoulli-Statistik zu erwartende Monomerverteilung berechnen. Abweichungen von diesen berechne-

ten Werten sind dann ein Maß für Heterogenität der Substituentenverteilung im Polymer. Im folgenden bezeichnet s_i den molaren Anteil des einzelnen Monomers, c_i die un-, mono-, di- und trisubstituierten Molfraktionen und x_i die partiellen Substitutionsgrade in den Positionen i

Tab. 3-10: Substituentenverteilung von **MC1** aus Avicel PH200 (DS 1.20) im Vergleich zu den nach den Modellen von Spurlin und Reuben berechneten Daten (Mol-%).

MC1					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	36.95	21.05	15.90	28.34	8.61
s_2	14.49	19.62	-5.12	12.33	2.16
s_3	0.98	8.79	-7.81	1.50	-0.52
s_6	12.20	15.46	-3.26	20.82	-8.61
s_{23}	5.22	8.19	-2.97	15.48	-10.26
s_{26}	6.89	14.41	-7.52	9.06	-2.16
s_{36}	1.62	6.46	-4.83	1.10	0.52
s_{236}	21.63	6.02	15.61	11.37	10.26
c_0	36.95	21.05	15.90	28.34	8.61
c_1	27.68	43.87	-16.19	34.65	-6.97
c_2	13.74	29.06	-15.32	25.64	-11.90
c_3	21.63	6.02	15.61	11.37	10.26
x_2	0.482				
x_3	0.295				
x_6	0.424				
DS	1.201	$H_1 = 26.1$		$H_1 = 19.2$	

Im Falle der Avicel erreicht man nach alkalischer Vorbehandlung (Mercerisierung) eine deutlich geringere Abweichung der experimentell bestimmten Substituentenverteilung von der nach Spurlin und Reuben berechneten Verteilungen (**MC2**). Bei diesem Prozeß werden die kristallinen Bereiche der mikrokristallinen Avicel offensichtlich aufgebrochen und so der Methylierung zugänglich. Das Reubensche Modell kommt der aus den experimentellen Daten berechneten Substituentenverteilung näher als das Spurlin-Modell.

Bei den Methylierungen von Cotton-Linters hingegen sieht das Ergebnis anders aus. Man erreicht hier einen deutlich höheren DS mit und ohne alkalische Vorbehandlung. Die heterogene Substituentenverteilung der Proben bleibt jedoch bestehen, wie es die Ergebnisse der Doppelbestimmungen von **MC5** zeigen (Tab. 3-12).

3 Spezieller Teil

Tab. 3-11: Substituentenverteilung von **MC2** aus mercerisierter Avicel PH 200 (DS 0.38) im Vergleich zu den nach den Modellen von Spurlin und Reuben berechneten Daten (Mol-%).

MC2					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	66.86	65.71	1.15	66.52	0.34
s_2	13.07	13.81	-0.74	13.00	0.07
s_3	1.35	2.24	-0.89	1.42	-0.08
s_6	14.04	14.20	-0.16	14.38	-0.34
s_{23}	0.95	0.47	0.48	1.28	-0.33
s_{26}	2.74	2.99	-0.25	2.81	-0.07
s_{36}	0.38	0.48	-0.10	0.31	0.08
s_{236}	0.61	0.10	0.51	0.28	0.33
c_0	66.86	65.71	1.15	66.52	0.34
c_1	28.46	30.25	-1.80	28.80	-0.34
c_2	4.07	3.94	0.13	4.40	-0.33
c_3	0.61	0.10	0.51	0.28	0.33
x_2	0.174				
x_3	0.033				
x_6	0.178				
DS	0.384	$H_1 = 1.8$		$H_1 = 0.7$	

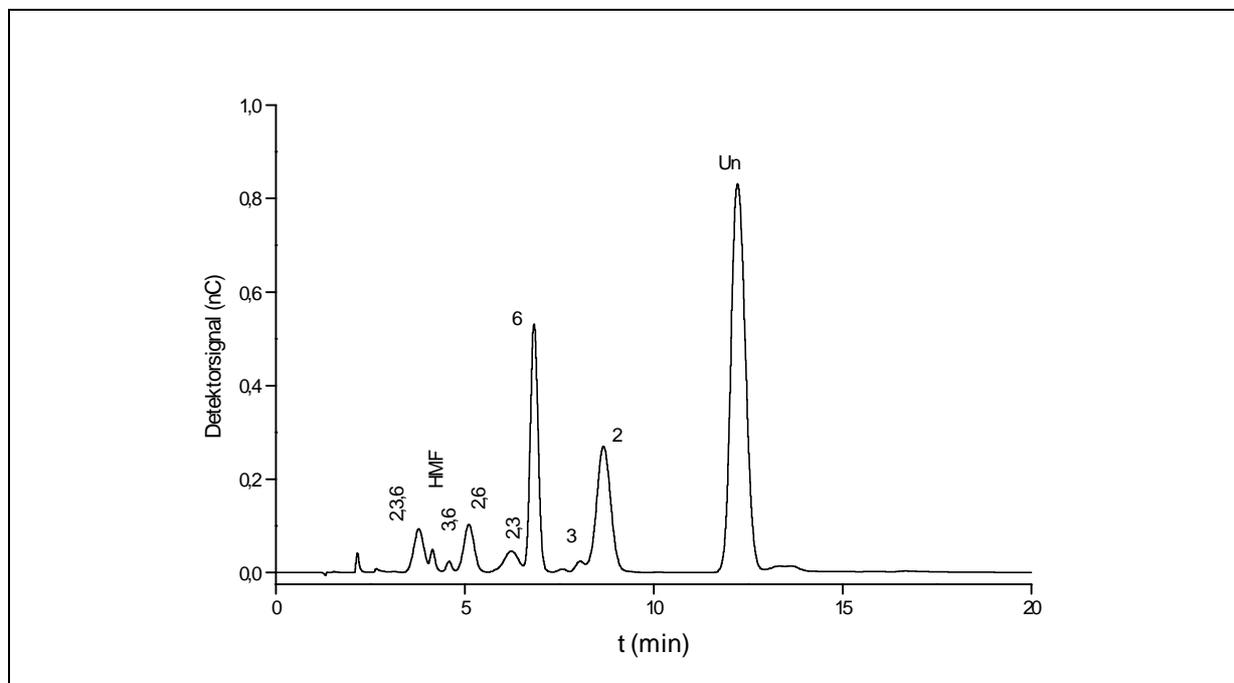


Abb. 3-14: HPAE-Chromatogramm der Hydrolyseprodukte aus **MC1**. Die Ziffern geben die Position der Methylgruppen an.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-12: Substituentenverteilung von **MC5** aus mercerisierten Linters im Vergleich zu den nach den Modellen von Spurlin und Reuben berechneten Daten (Mol-%).

MC5					
1. Analyse					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s ₀	29,92	9,46	20,45	16,69	13,22
s ₂	9,29	13,56	-4,28	6,33	2,96
s ₃	0,83	8,02	-7,19	0,79	0,04
s ₆	9,32	12,78	-3,46	22,55	-13,22
s ₂₃	2,51	11,50	-8,99	18,73	-16,22
s ₂₆	5,59	18,32	-12,72	8,55	-2,96
s ₃₆	1,03	10,83	-9,81	1,07	-0,04
s ₂₃₆	41,52	15,53	25,99	25,29	16,22
c ₀	29,92	9,46	20,45	16,69	13,22
c ₁	19,44	34,36	-14,92	29,67	-10,22
c ₂	9,13	40,65	-31,52	28,35	-19,22
c ₃	41,52	15,53	25,99	25,29	16,22
x ₂	0,59				
x ₃	0,46				
x ₆	0,57				
DS	1,62	H ₁ = 38,92		H ₁ = 29,89	
2. Analyse					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s ₀	16,01	1,96	14,04	5,50	10,50
s ₂	5,87	6,38	-0,51	2,84	3,02
s ₃	0,53	3,90	-3,37	0,36	0,17
s ₆	6,06	5,91	0,15	16,57	-10,50
s ₂₃	2,53	12,68	-10,16	16,22	-13,70
s ₂₆	5,54	19,22	-13,68	8,56	-3,02
s ₃₆	0,92	11,75	-10,82	1,09	-0,17
s ₂₃₆	62,54	38,19	24,35	48,85	13,70
c ₀	16,01	1,96	14,04	5,50	10,50
c ₁	12,46	16,20	-3,73	19,77	-7,31
c ₂	8,99	43,65	-34,66	25,88	-16,89
c ₃	62,54	38,19	24,35	48,85	13,70
x ₂	0,76				
x ₃	0,67				
x ₆	0,75				
DS	2,18	H ₁ : 34,77		H ₁ : 24,78	

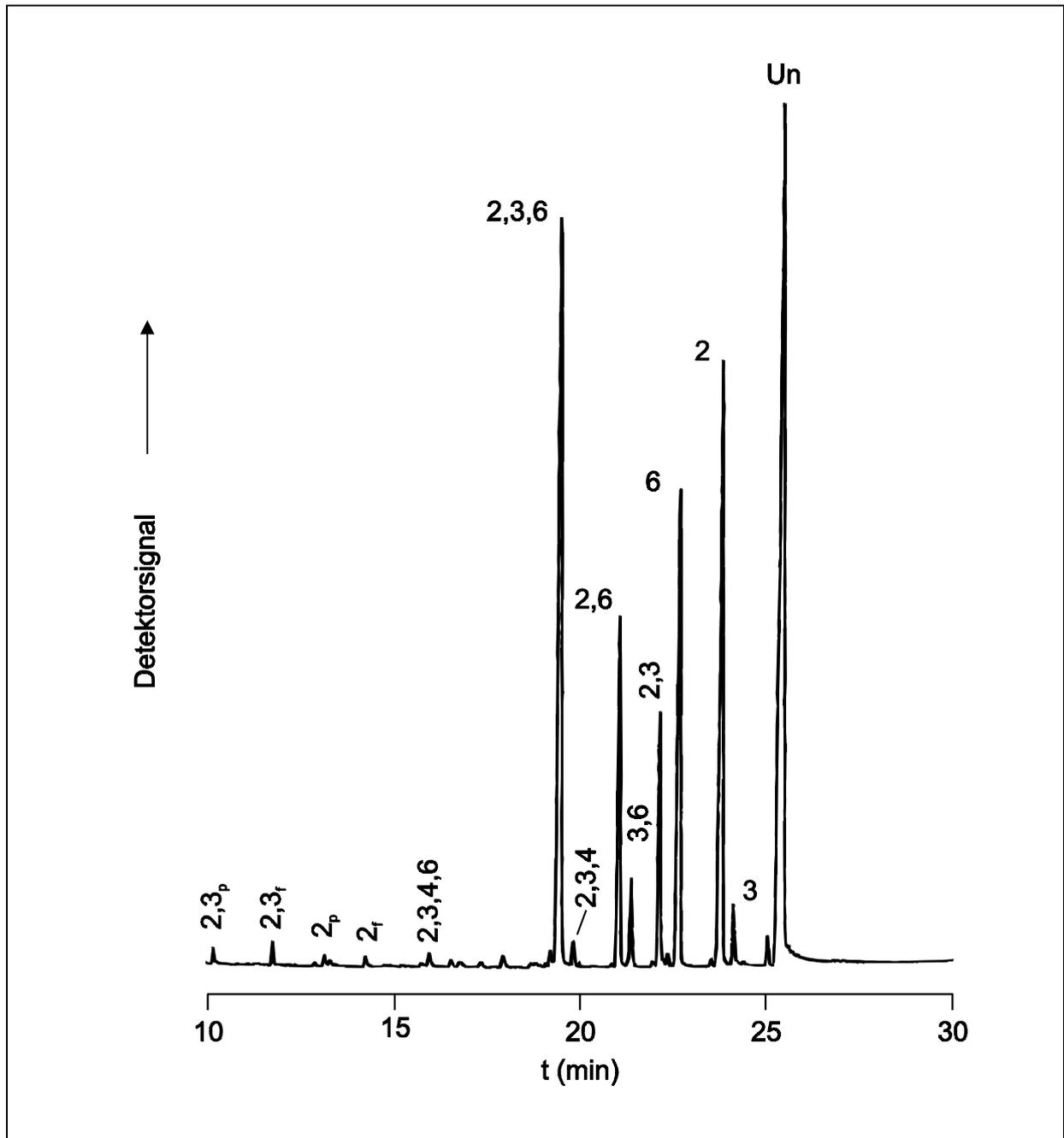


Abb. 3-15: Gaschromatogramm der Produkte nach Methylierungsanalyse von **MC1**. Die Ziffern kennzeichnen die Position der Methylgruppen. 2,3_p, 2,3_f, 2_p und 2_f bezeichnen 1,6-Anhydroglucosederivate.

Die kommerzielle Vergleichsprobe (**MC10**) zeigt eine deutliche, aber nicht so drastische Abweichung der Substituentenverteilung von den nach Spurlin und Reuben berechneten Daten als die Proben **MC1** und **MC5**. Da bei industrieller Herstellung von Methylcellulose Alkali-cellulose als Ausgangsstoff benutzt wird, zeigt diese so vorbehandelte Cellulose die gewünschte Zugänglichkeit aller Hydroxylgruppen, was zu einer überwiegend einheitlichen Verteilung der Substituenten im Polymer führt.

Tab. 3-13: Substituentenverteilung von kommerzieller Methylcellulose (**MC10**) im Vergleich zu den nach den Modellen von Spurlin und Reuben berechneten Daten (Mol-%).

Probe	MC10				
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s ₀	7.66	5.08	2.58	6.42	1.24
s ₂	15.69	15.30	0.39	13.96	1.72
s ₃	1.86	3.80	-1.94	2.46	-0.60
s ₆	10.36	9.18	1.18	11.60	-1.24
s ₂₃	10.41	11.44	-1.03	12.78	-2.37
s ₂₆	23.51	27.65	-4.14	25.23	-1.72
s ₃₆	5.04	6.87	-1.82	4.45	0.60
s ₂₃₆	25.47	20.68	4.79	23.10	2.37
c ₀	7.66	5.08	2.58	6.42	1.24
c ₁	27.91	28.28	-0.37	28.02	-0.11
c ₂	38.96	45.96	-7.00	42.46	-3.50
c ₃	25.47	20.68	4.79	23.10	2.37
x ₂	0.75				
x ₃	0.43				
x ₆	0.64				
DS	1.82	H ₁ = 7.51		H ₁ = 4.58	

Das Ausmaß der Abweichung zwischen experimentellen und berechneten Daten einerseits und einer Probe mit stark (**MC5**) und leicht (**MC10**) abweichender Verteilung der Substituenten verdeutlicht (Abb. 3-16).

Charakteristisch für die Proben mit den stark vom Modell abweichenden Substituentenverteilungen sind die deutlich erhöhten Anteile der un- und trisubstituierten AGUs auf Kosten der mono- und disubstituierten (U-förmige UMDT-Verteilung). Durch die bedingte Wahrscheinlichkeit der Reaktion an Position 2 und 3 im Reuben-Modell wirken sich mathematisch die starken Abweichungen der Anteile an unsubstituierter AGU direkt auf die Abweichung in der 6-monosubstituierten und die der trisubstituierten direkt auf die der 2,3-disubstituierten aus. Dies verdeutlichen die Ergebnisse von **MC5**. Hier fallen die starken Abweichungen vor allem der un-, 6-mono-, 2,3-di- und 2,3,6-trisubstituierten Glucosen auf, während es für die einzelnen Komponenten von **MC10** ähnliche Abweichungen der experimentellen Daten von den berechneten gibt.

Die Ergebnisse der stark heterogenen Proben lassen noch keinen Schluß zu, ob es sich hierbei um eine Heterogenität 1. und/oder 2. Art handelt.

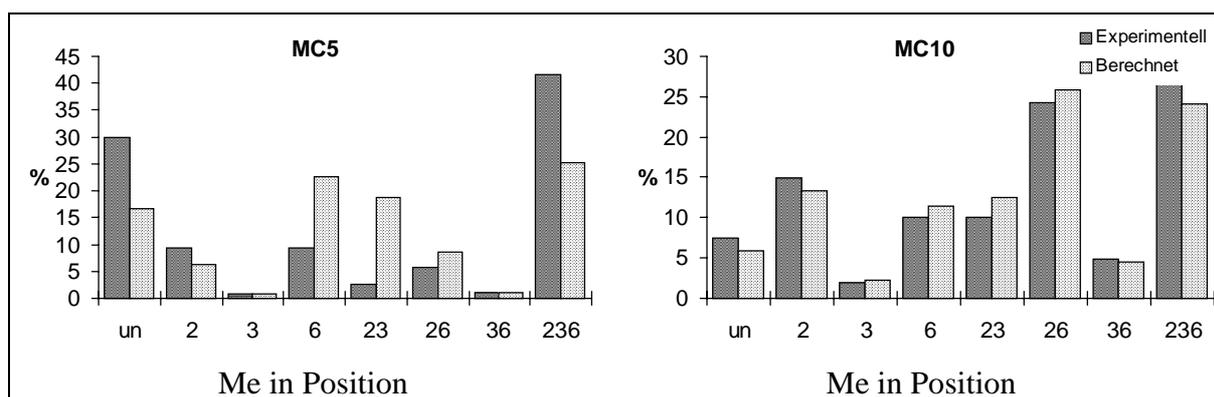


Abb. 3-16: Vergleich der Monomerverteilung aus der Methylierungsanalyse mit den nach Reuben berechneten Daten für **MC5** (1. Analyse, DS 1.62) und **MC10** (DS 1.82).

Um dies aufzuklären, wurde versucht, ein stark heterogenes Probenmaterial (**MC7**; Tab. 3-14) durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln zu fraktionieren. Der Übersichtlichkeit wegen sind in den folgenden Tabellen die nach dem Spurlin-Modell berechneten Daten weggelassen.

Tab. 3-14: Bestimmung der Substituentenverteilung von **MC7** (Mol-%). Dargestellt sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Analysen. Die Werte wurden verglichen mit den nach dem Modell von Reuben berechneten Daten.

Probe	MC7					
	1. Analyse			2. Analyse		
	exp.	Reuben	Abw.	Exp.	Reuben	Abw.
s ₀	37.31	26.13	11.18	21.56	12.56	9.00
s ₂	7.14	5.83	1.31	6.57	4.32	2.26
s ₃	2.24	2.44	-0.19	2.22	1.97	0.26
s ₆	10.26	21.43	-11.18	8.58	17.58	-9.00
s ₂₃	8.25	20.54	-12.29	11.31	22.83	-11.52
s ₂₆	3.47	4.78	-1.31	3.79	6.05	-2.26
s ₃₆	2.19	2.00	0.19	2.49	2.75	-0.26
s ₂₃₆	29.14	16.85	12.29	43.47	31.96	11.52
c ₀	37.31	26.13	11.18	21.56	12.56	9.00
c ₁	19.64	29.70	-10.06	17.37	23.86	-6.49
c ₂	13.91	27.32	-13.41	17.60	31.63	-14.03
c ₃	29.14	16.85	12.29	43.47	31.96	11.52
x ₂	0.48			0.65		
x ₃	0.42			0.60		
x ₆	0.45			0.58		
DS	1.35	H ₁ = 23.57		1.83	H ₁ = 20.92	

708 mg der Probe wurden zunächst mit Chloroform, dann mit Chloroform-Methanol (2:1) und schließlich mit MeOH-Wasser (1:1) extrahiert. Es wurde jeweils über eine Glasfritte filtriert und das Filtrat eingengt. Die erhaltenen Fraktionen und der unlösliche Rest der Probe wurden analysiert. Die Massendifferenz zwischen dem eingesetzten Material und den erhaltenen Fraktionen ist auf Verluste beim Filtrieren zurückzuführen (Tab. 3-15).

Tab. 3-15: Ergebnisse der Fraktionierung von **MC 7**.

Lösungsmittel	Ausbeute	DS	Morphologie	Bezeichnung
CHCl ₃	9.0 mg	2.82	Film	MC7-1
CHCl ₃ /MeOH (2:1)	73.7 mg	2.32	Film	MC7-2
MeOH/H ₂ O (1:1)	14.4 mg	1.97	Feststoff	MC7-3
-	462.3 mg	0.61	Fasern	MC7-4
Verlust	148.6 mg			

Die Substituentenverteilungen der erhaltenen vier Fraktionen sind in der folgenden Tab. 3-16 dargestellt. Wie man sehr gut erkennen kann, ist das Ausmaß der Heterogenität sowohl der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion gegenüber der Originalprobe deutlich abgesenkt, steigt aber mit fallendem DS der jeweiligen Fraktion. Das hat möglicherweise den Grund darin, daß die Fraktionen, die mit stark unpolaren Lösungsmittelgemischen extrahiert wurden, selektivere Schnitte repräsentieren und damit einheitlicher substituierte Anteile des Polymers erfaßt haben als die Fraktionen, die mit polaren Lösungsmitteln extrahiert wurden. Die Restfraktion umfasst somit möglicherweise stark heterogen substituierte Ketten mit mittlerem DS und homogener substituierte Ketten mit niedrigem DS. Um welche Art von Heterogenität es sich bei der ursprünglich ermittelten handelt, kann man letztlich erst entscheiden, wenn man eine Oligomeranalyse durchgeführt hat. Das Ergebnis der Fraktionierung zeigt aber eindeutig, daß man beim Auftreten heterogener Proben immer auf Fraktionierbarkeit prüfen muß.

In Abb. 3-17 sind noch einmal die experimentellen Daten im Vergleich zu den nach dem Modell von Reuben berechneten graphisch dargestellt. **MC7-1** zeigt hier eine sehr homogene Substituentenverteilung, während die Abweichungen mit fallendem DS immer stärker werden. Die experimentellen Werte für un-, 2-mono- und 2,3,6-trisubstituierte Glucosen sind bei allen Fraktionen höher, während die molaren Anteile der restlichen partiell methylierten Glucosen niedriger als berechnet ausfallen.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-16: Substituentenverteilung der Fraktionen von Probe **MC7** (Mol-%). Dargestellt sind die Ergebnisse verglichen mit den nach dem Modell von Reuben berechneten Daten.

Probe	MC7-1			MC7-2		
	exp.	Reuben	Abw.	Exp.	Reuben	Abw.
s ₀	0.70	0.09	0.61	3.83	2.08	1.75
s ₂	0.39	0.23	0.16	5.22	3.80	1.43
s ₃	0.00	0.10	-0.10	1.45	0.94	0.51
s ₆	1.82	2.43	-0.61	8.06	9.81	-1.75
s ₂₃	2.47	3.14	-0.67	6.97	10.66	-3.69
s ₂₆	6.06	6.22	-0.16	16.49	17.92	-1.43
s ₃₆	2.79	2.69	0.10	3.95	4.46	-0.51
s ₂₃₆	85.76	85.09	0.67	54.02	50.33	3.69
c ₀	0.70	0.09	0.61	3.83	2.08	1.75
c ₁	2.21	2.76	-0.55	14.74	14.55	0.19
c ₂	11.32	12.05	-0.73	27.41	33.04	-5.63
c ₃	85.76	85.09	0.67	54.02	50.33	3.69
x ₂	0.95			0.83		
x ₃	0.91			0.66		
x ₆	0.96			0.83		
DS	2.82	H ₁ = 1.31		2.32	H ₁ = 6.16	
Probe	MC7-3			MC7-4		
	exp.	Reuben	Abw.	Exp.	Reuben	Abw.
s ₀	12.18	8.89	3.29	64.28	58.10	6.18
s ₂	8.96	6.78	2.18	7.16	7.81	-0.65
s ₃	2.62	2.02	0.60	2.14	2.80	-0.65
s ₆	12.15	15.44	-3.29	9.09	15.27	-6.18
s ₂₃	12.78	18.85	-6.07	5.60	10.48	-4.88
s ₂₆	9.60	11.78	-2.18	2.70	2.05	0.65
s ₃₆	2.90	3.50	-0.60	1.39	0.73	0.65
s ₂₃₆	38.81	32.74	6.07	7.64	2.76	4.88
c ₀	12.18	8.89	3.29	64.28	58.10	6.18
c ₁	23.73	24.24	-0.50	18.40	25.88	-7.48
c ₂	25.28	34.13	-8.86	9.69	13.27	-3.58
c ₃	38.81	32.74	6.07	7.64	2.76	4.88
x ₂	0.70			0.23		
x ₃	0.57			0.17		
x ₆	0.64			0.21		
DS	1.91	H ₁ = 10.28		0.61	H ₁ = 11.21	

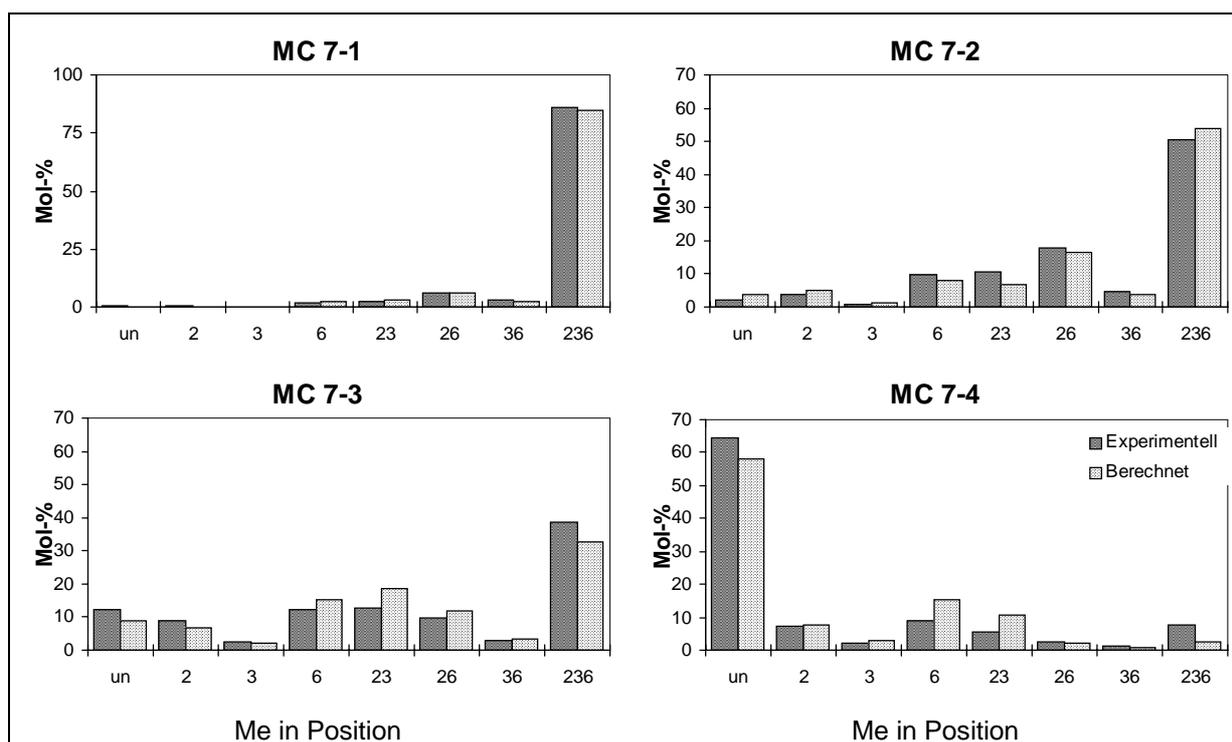


Abb. 3-17: Vergleich der Monomerverteilung aus der Methylierungsanalyse mit den nach Reuben berechneten Daten für die Fraktionen von **MC7**.

3.1.2.1.2 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Polymerkette

Es stellt sich nun die Frage, wie sich die Substituenten entlang der Kette verteilen. Dazu wird zunächst die Methylcellulose mit d_3 -Iodmethan permethyliert, so daß man ein chemisch einheitliches Produkt erhält, das einem statistischen Partialabbau zugänglich ist. Die Deuteromethylgruppen repräsentieren die nicht methylierten Positionen der ursprünglichen Methylcellulose. Die nach dem Partialabbau erhaltenen Oligomerfraktionen stehen stellvertretend für das originale Polymer. Nach massenspektrometrischer Analyse dieser Oligomerengemische und Vergleich der experimentellen Daten mit den nach Bernoulli-Statistik berechneten Verteilung aus der Monomeranalyse erhält man Informationen darüber, ob sich in der Polymerkette Bereiche erhöhter und erniedrigter Substitution befinden und damit eine Heterogenität der Substituentenverteilung entlang der Kette vorhanden ist. Ein Maß für die Repräsentativität des Partialabbaus ist der DS der Oligomerfraktionen. Diese müssen den gleichen DS aufweisen wie das Polymer. Für die im folgenden dargestellten Ergebnisse der massenspektrometrischen Oligomeranalyse der Methylcellulosen **MC1**, **MC2**, **MC7-2** und **MC10** zeigt Tab. 3-17 die DS-Werte in Abhängigkeit vom DP.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-17: Methyl-DS in Abhängigkeit vom DP aus der massenspektrometrischen Oligomeranalyse von **MC1**, **MC2**, **MC7-2** und **MC10**.

Probe	MC1	MC2	MC7-2	MC10
Monomeranalyse	1.20	0.38	2.32	1.82
DP2	1.21	0.38	2.35	1.82
DP3	1.24	0.37	2.32	1.81
DP4	1.27	0.38	2.36	1.80

Es tritt hier zum Teil ein Drift der DS-Werte mit steigendem DP auf. Dies muß man in Rechnung stellen, wenn man Heterogenitätsbetrachtungen hinsichtlich der Abweichung der experimentellen von den berechneten Daten macht.

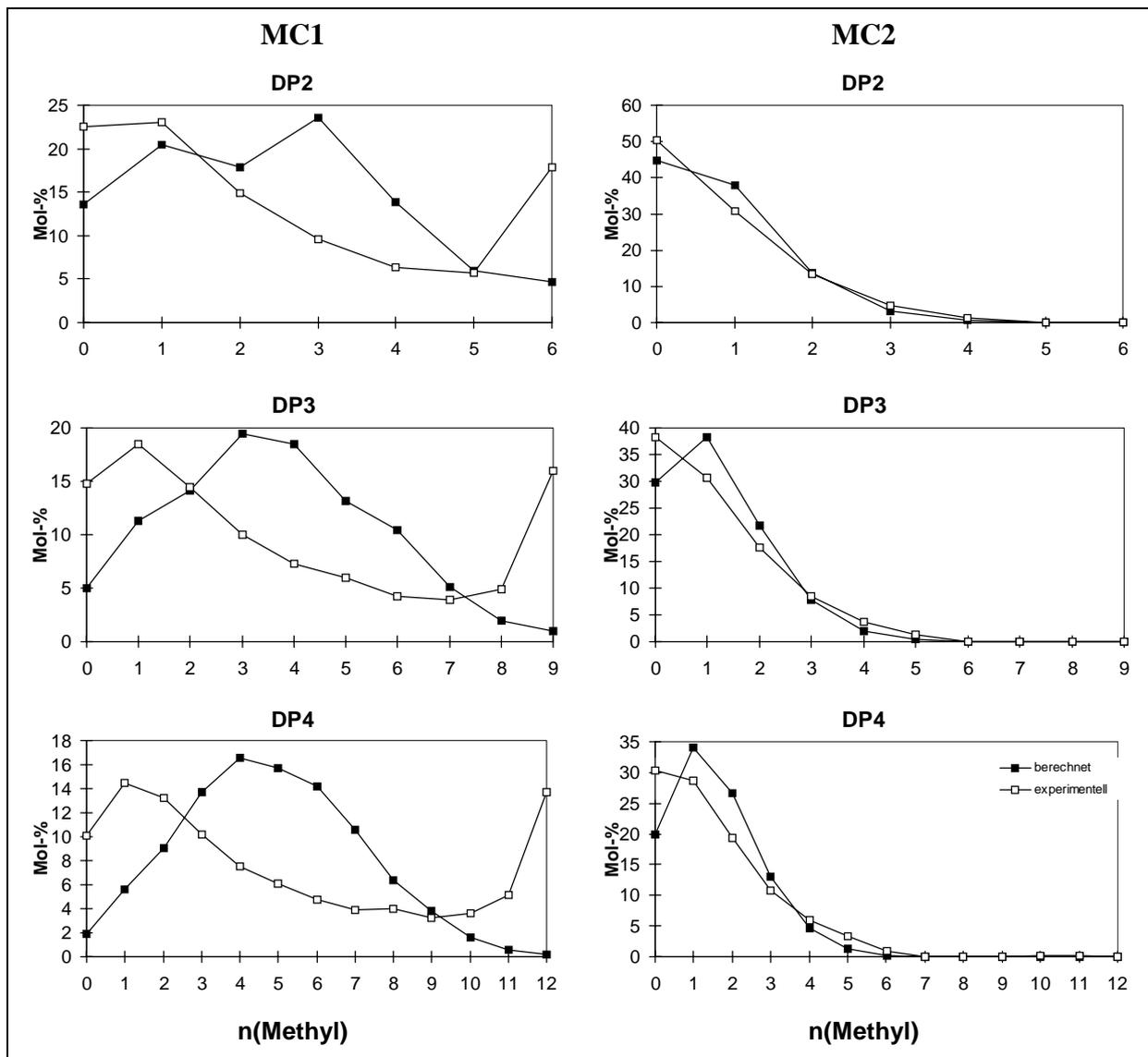


Abb. 3-18: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von **MC1** (DS 1.20) und **MC2** (DS 0.38). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik berechneten Verteilung aus der Monomeranalyse.

Ein Maß für diese Abweichung der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette ist der Heterogenitätsfaktor H_i , wie ihn Arisz eingeführt hat. Er beschreibt mathematisch die Abweichung der experimentellen Daten von denen einer berechneten statistischen Substituentenverteilung. Der Index i bezeichnet dabei den DP des betrachteten Oligomerenbereichs. Tab. 3-18 zeigt die ermittelten Heterogenitätsfaktoren für den dimeren, trimeren und tetrameren Bereich der massenspektrometrischen Oligomeranalyse.

Tab. 3-18: Heterogenitätsparameter der aus der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Oligomerfraktionen von **MC1**, **MC2**, **MC7-2** und **MC10**. H_1 ist der nach dem Spurlin-Modell aus den Daten der Monomeranalyse ermittelte Wert.

Probe	MC1	MC2	MC7-2	MC10
H_1	26.1	1.8	13.2*	7.5
H_2	22.9	9.4	31.7	2.5
H_3	26.2	12.1	33.7	4.2
H_4	26.4	14.2	43.3	6.2

* Wert nicht in Tab. 3-16 dargestellt.

Wie erwartet weist **MC 1** eine starke Heterogenität auf (s. Abb. 3-18). Un- und trisubstituierte Glucosen sind sowohl in der Monomereinheit als auch in den Oligomerfraktionen stark überrepräsentiert. Ob es sich bei dieser bimodalen Verteilung um eine Heterogenität in der Polymerkette, also um Bereiche mit überwiegend trisubstituierten und unsubstituierten Glucoseeinheiten oder um die Koexistenz unterschiedlich stark substituierter individueller Polymerketten handelt, kann für diese Probe abschließend nicht entschieden werden, da sie nicht wie **MC7** fraktioniert wurde.

Die alkalisch vorbehandelte **MC2** zeigt auf der Monomerebene eine deutlich geringere Heterogenität als **MC1**. Auf der Oligomerebene weist sie hingegen deutliche Abweichungen auf, die jedoch nicht so stark ausfallen wie bei **MC1**. Die experimentell erhaltene Kurve (Abb. 3-18) ist gegenüber der berechneten abgeflacht, was eine leichte Heterogenität darstellt. Die alkalische Aktivierung der Cellulose führte somit nicht zu vollständiger Erreichbarkeit aller Hydroxylgruppen während der Veretherungsreaktion. Es waren wohl noch größere kristalline Bereiche in der Cellulose vorhanden, die für die Reagenzien nicht zugänglich waren.

Interessant ist auch das Ergebnis von **MC7-2**. Aus der Monomeranalyse wurde ein nicht unerhebliches Maß an Heterogenität bestimmt ($H_1 = 6.2$). Die Oligomeranalyse hingegen zeichnet ein sehr komplexes Bild. So weist **MC7-2** eine noch höhere Heterogenität auf als **MC1** (s. Tab. 3-18). Beide Proben zeigen eine bimodale Verteilung. Man erkennt ein Maximum bei einem $DS \approx 1.5$ und ein weiteres Maximum bei einem $DS \approx 3.0$ (Abb. 3-19). Bei DP4 tritt sogar noch ein weiteres Nebenmaximum bei einem $DS \approx 0.75$ auf. Die Fraktionierbarkeit von **MC7** läßt die Vermutung zu, daß es sich hier um eine Heterogenität 1. Art, also über die Polymermoleküle und nicht innerhalb der Polymerkette handelt.

3 Spezieller Teil

Die kommerzielle Probe (**MC10**) weist ähnlich wie **MC2** eine leicht heterogene Substituentenverteilung auf, die nur wenig von den berechneten Werten abweicht. Die flachere Kurve zeigt auch hier Bereiche höherer und niedrigerer Substitution an, die ihren Ursprung in noch vorhandenen kristallinen Bereichen der eingesetzten Cellulose haben können und somit zu dieser leichten Heterogenität der Substituentenverteilung in der Polymerkette geführt haben.

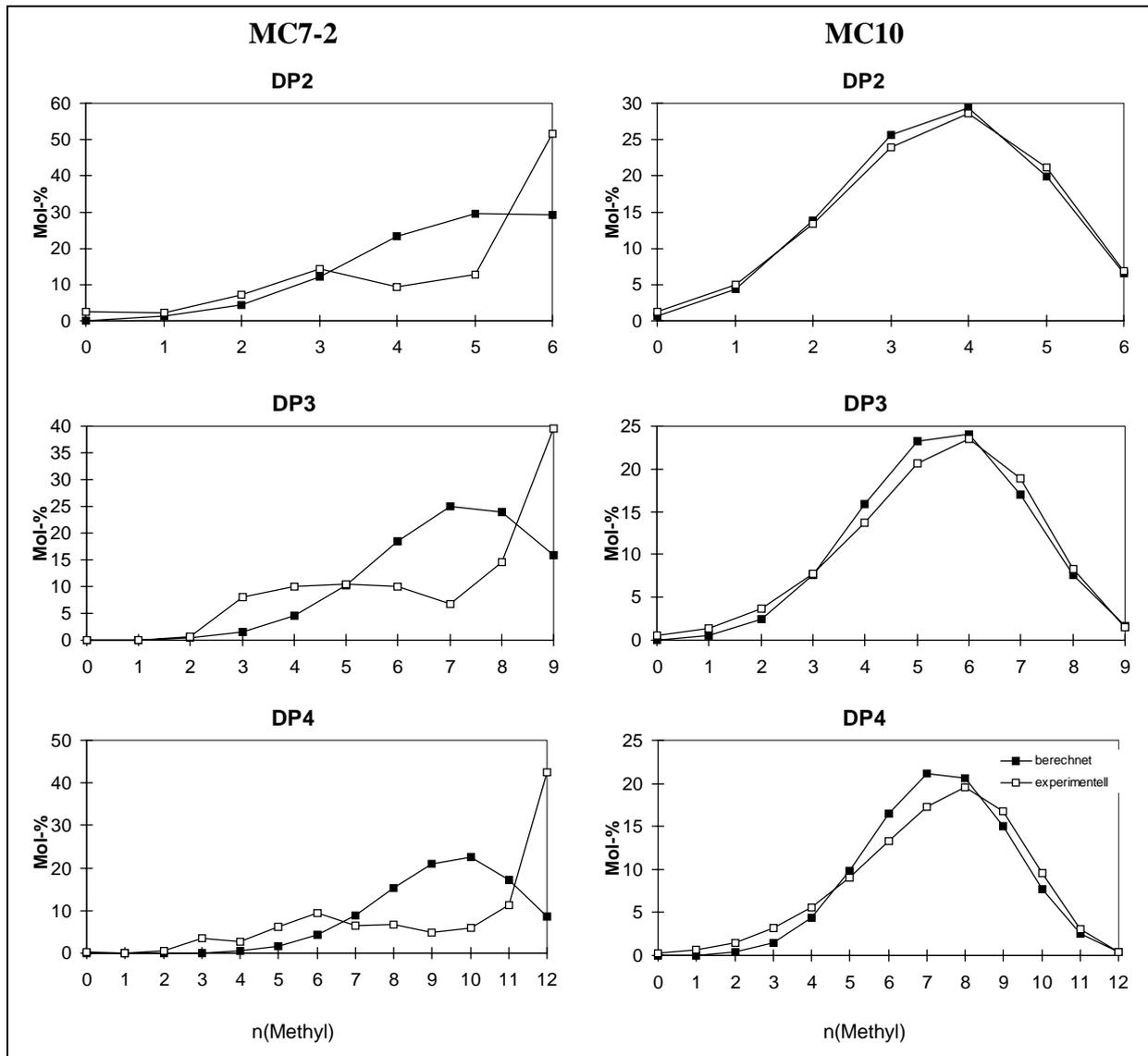


Abb. 3-19: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von **MC7-2** (DS 2.32) und **MC10** (DS 1.82). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik berechneten Verteilung aus der Monomeranalyse.

Die Ergebnisse der Monomer- und Oligomeranalyse lassen folgende Schlüsse zu:

Methylcellulosen, die eine Abweichung vom Reuben Modell aufwiesen, zeigten auch in der Polymerkette eine starke Heterogenität der Substituentenverteilung. Bei solchen Proben sollte auf Fraktionierbarkeit geprüft werden, um eine Heterogenität 1. Art auszuschließen.

Stellt man in der Glucoseeinheit ein geringes Maß an Heterogenität der Substituentenverteilung fest, kann man nicht daraus schließen, daß die Abweichung in der Polymerkette ebenfalls klein ist. Eine Oligomeranalyse ist in jedem Fall durchzuführen, um Klarheit über die Substituentenverteilung im Polymer zu erhalten.

Naturgemäß kann die Monomeranalyse, die einen Totalabbau des Polymers beinhaltet, keine Information über die Nachbarschaft in der Polymerkette liefern. Deshalb erlauben die Modelle von Spurlin und Reuben nur eine Beschreibung der Abweichung der realen Substituentenverteilung von der idealen in der AGU. Der Vergleich der aus der Monomerzusammensetzung nach Bernoulli-Statistik berechneten Verteilung im Oligomer mit den experimentellen Daten kann hingegen Informationen über die direkte Nachbarschaft der Glucoseeinheiten liefern, wie es die oben dargestellten Beispiele verdeutlichen.

3.1.2.2 Regioselektiv dargestellte 2,3-Di-*O*-methylcellulosen

Die Darstellung regioselektiv substituierter Cellulosederivate ist schon lange ein Ziel der organischen Synthese. Es bieten sich hierfür mehrere Wege an.

1. Schutzgruppenchemie
2. Synthesesteuerung durch komplexierende Reagenzien
3. Enzymatische Derivatisierung

Das Synthesekonzept Schutzgruppenchemie ist bislang das erfolgreichste, da man mit raumerfüllenden Gruppen wie dem Triphenylmethyl- (Trityl-)^{108,109} und dem Dimethyl-(2,3-dimethyl-2-butyl)-silyl-(T-exyl)-rest¹¹⁰ die Substitution fast ausschließlich in die 6-Position dirigieren und anschließend Position 2 und 3 derivatisieren kann. Im nächsten Schritt spaltet man die Schutzgruppe ab und erhält ein weitgehend regulär substituiertes Produkt¹¹¹. Über den Weg der Schutzgruppenchemie gelangt man auch zu 6-*O*-mono-alkylierten Produkten¹¹². Methylierungen in Gegenwart komplexierender Reagenzien wie CuCl₂ und HgCl₂^{113,114,115}, Butylzinnnoxiden^{116,117,118} oder Borsäure und Boraten¹¹⁹ wurden bisher nur an Monomeren und Oligomeren durchgeführt.

In der Arbeitsgruppe Prof. Wenz, Universität Karlsruhe wurden 2,3-Di-*O*-methylcellulosen (**MC11** und **MC12**) hergestellt. Der Syntheseweg lief über 6-*O*-Tritylcellulose, die nach Permethylierung entschützt wurde. Der erste Reaktionsschritt beginnt unter heterogenen Bedingungen in Pyridin und verläuft mit fortschreitender Tritylierung durch die sehr hydrophobe Schutzgruppe homogen. Daher kommt der Aktivierung der Cellulose durch Quellen in Natronlauge besondere Bedeutung zu, um möglichst alle primären Hydroxylgruppen gleich gut der Reaktion zugänglich zu machen.

3.1.2.2.1 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Monomereinheit

Bei der Monomeranalyse von 2,3-di-*O*-alkylierten Cellulosen ist zu beachten, daß 2,3-disubstituierte AGUs während der Hydrolyse eine starke Tendenz zur Bildung von 1,6-Anhydroglucopyranose und -furanose aufweisen¹²⁰. Die Blockierung der Aldehydgruppe hat zur Folge, daß diese Produkte bei der HPAEC-Analyse zum einen am Ionenaustauscher nicht zurückgehalten und somit mit dem Totvolumen eluieren und zum anderen nicht bzw. kaum detektiert werden. Der molare Anteil der 2,3-di-*O*-methylierten AGUs wird daher zu niedrig angezeigt. In diesem Falle muß das Hydrolysat gemäß der Standardmethylierungsanalyse reduziert, acetyliert und die Produkte mittels gaschromatographischer Analyse quantifiziert werden.

In Abb. 3-20 und Tab. 3-19 ist die Monomerzusammensetzung zweier unabhängiger Analysen dargestellt. **MC11** weist einen sehr hohen Anteil an trisubstituierten AGUs auf (11 %), der auf Kosten des gewünschten 2,3-di-*O*-methylierten Produktes geht (83.8 %). Erwartungsgemäß treten die weiteren disubstituierten Monomere (2,6 und 3,6) als auch die monosubstituierten Glucosen nur in geringem Maße auf. Völlig unsubstituierte AGUs haben hingegen immer noch einen Anteil von 3 %. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß es Bereiche im Probenmaterial geben sollte, die gar nicht trityliert wurden und solche, die gar nicht methyliert wurden.

Tab. 3-19: Substituentenverteilung von regioselektiv hergestellten 2,3-Di-*O*-methylcellulosen (**MC11** und **MC12**). Dargestellt ist das Ergebnis zweier unabhängiger Analysen (Mol-%).

	MC11		MC12	
s ₀	3.04	3.04	1.85	2.07
s ₂	0.87	0.78	1.74	2.16
s ₃	1.14	0.88	4.78	4.90
s ₆	0.32	0.30	0.00	0.00
s ₂₃	82.67	84.92	89.56	89.12
s ₂₆	0.36	0.00	0.84	0.27
s ₃₆	0.14	0.00	0.00	0.00
s ₂₃₆	11.45	10.09	1.23	1.47
x ₂	0.95	0.96	0.93	0.93
x ₃	0.95	0.96	0.96	0.95
x ₆	0.12	0.10	0.02	0.02
DS	2.03	2.02	1.91	1.90

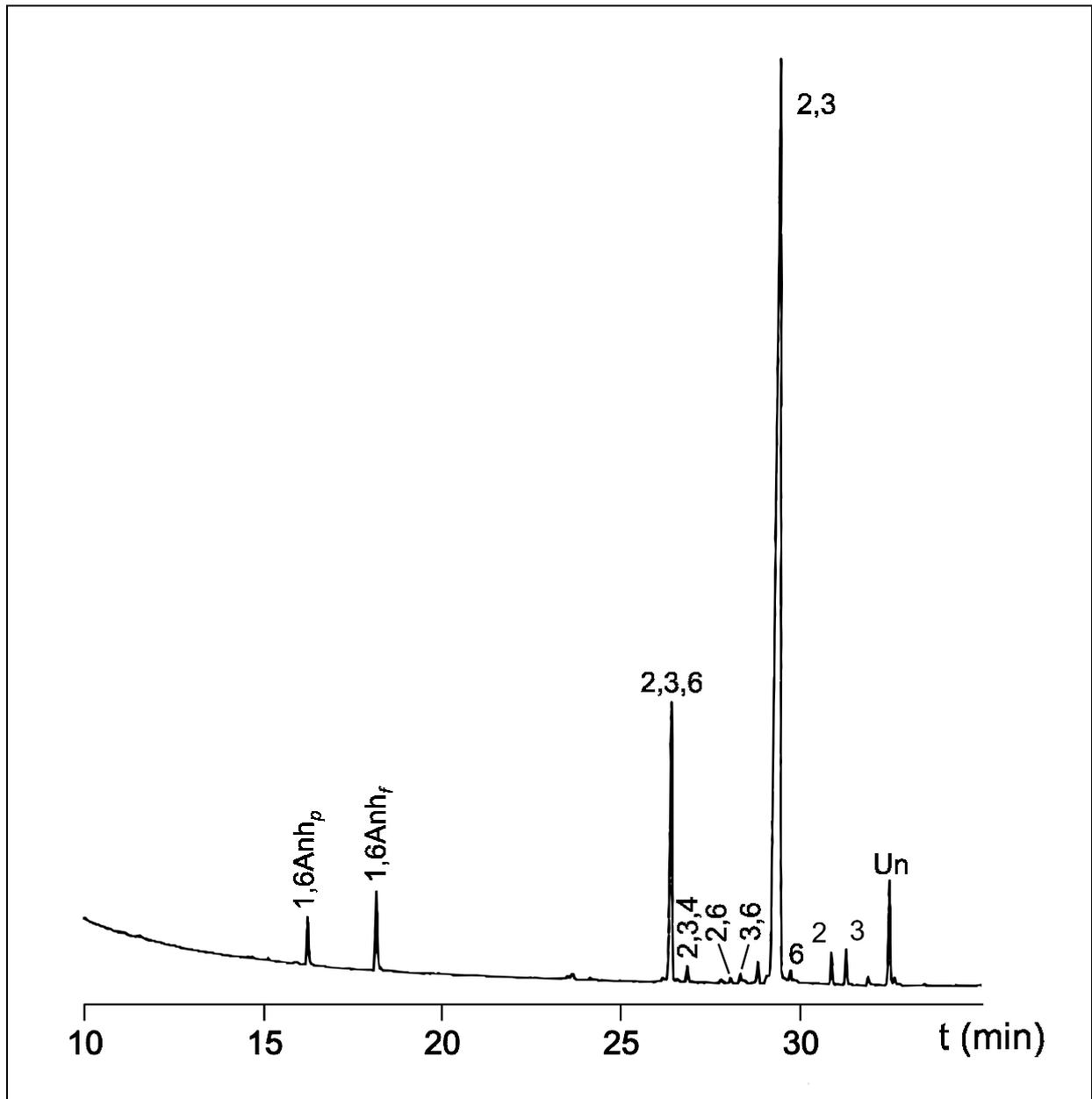


Abb. 3-20: Gaschromatogramm der Produkte aus **MC 11** nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung. Die Ziffern geben die Position der Methylgruppen an. $1,6\text{Anh}_p$ und $1,6\text{Anh}_f$ bezeichnen die 1,6-Anhydroprodukte 2,3-di-*O*-methylierter Glucosebausteine in der Pyranose- und Furanoseform.

MC12 weist hingegen eine sehr viel selektivere Zusammensetzung auf: Knapp 90 % der AGUs entfallen auf die gewünschte 2,3-di-*O*-methylierte Glucose. Der Anteil an trisubstituierten AGUs ist deutlich niedriger (1.35 %). Es fallen aber die 3-*O*-methylierten Monomerbausteine mit knapp 5 % auf, die wahrscheinlich aus Übertritylierung in der 2-Position der 6-*O*-Tritylcellulose herrühren. Trotz des niedrigeren Methyl-DS von 1.9 im Gegensatz zu 2.0 (**MC11**) ist **MC12** die einheitlichere der beiden regioselektiv hergestellten 2,3-Di-*O*-methylcellulosen.

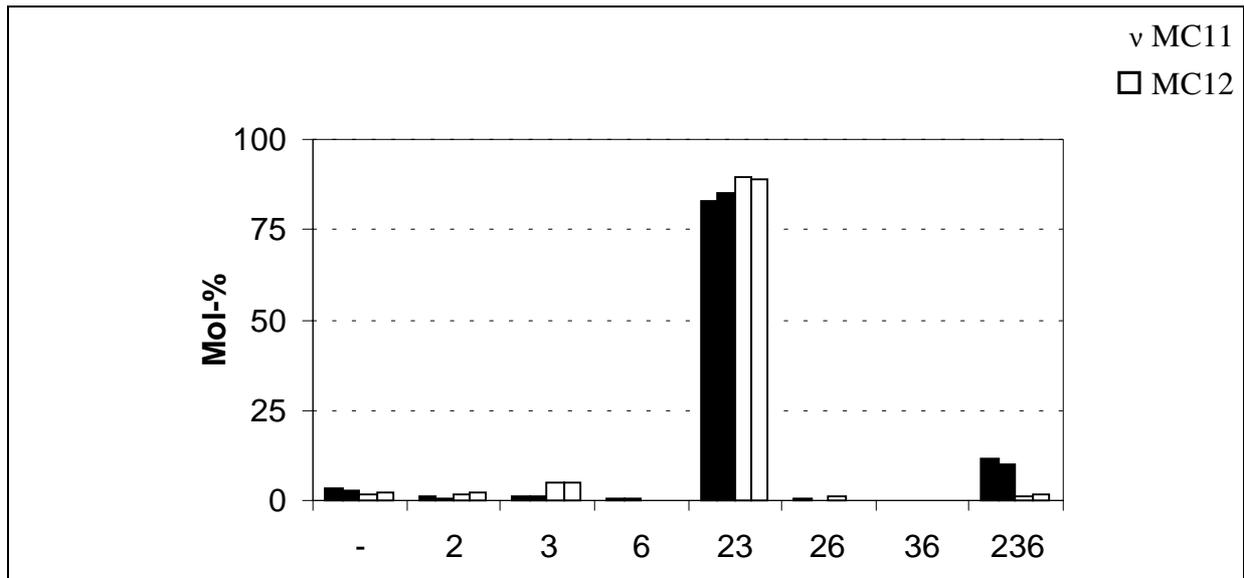


Abb. 3-21: Substituentenverteilung von regioselektiv hergestellten 2,3-Di-O-methylcellulosen **MC11** und **MC12** (Doppelbestimmungen).

3.1.2.2.2 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Polymerkette

Die Oligomeranalyse von **MC11** und **MC12** verdeutlicht den Unterschied zwischen beiden Proben (Abb. 3-22).

MC11 weist im Bereich niedrig substituierter Oligomere bis hin zum mittleren DS der Probe keine merkliche Abweichung von den auf Basis der Monomeranalyse berechneten Daten auf. Der Verlauf der experimentellen Werte im Bereich hoch substituierter Oligomere zeigt hingegen eine deutliche Abweichung von den berechneten Daten. Permethylierte Oligomere sind gegenüber Oligomeren mit geringerem DS sichtlich überrepräsentiert. Dies beweist, daß es in dieser 2,3-Di-O-methylcellulose Blöcke trisubstituierter Glucosen geben muß.

MC12 weist ebenfalls eine Abweichung auf, die sich im Bereich niedrig substituierter Oligomere mit höheren und im Bereich des mittleren DS-Wertes mit niedrigeren experimentellen Werten bemerkbar macht.

Im Falle von **MC11** ist die Abweichung der Daten sehr wahrscheinlich auf lokale Bereiche nicht tritylierter Glucosen zurückzuführen. Die Tritylierung von **MC12** ist hingegen gut verlaufen, d.h. alle Glucoseeinheiten wurden während der Reaktion gleich gut erreicht. Durch einen gewissen Grad an Übertritylierung (2,6-Di-O-Trityl-AGUs) findet man erhöhte Anteile 3-O-methylierter Glucosen, die annähernd statistisch in der Polymerkette verteilt sind.

Da die Reaktion der 6-O-Tritylierung zunächst heterogen verläuft, um dann mit fortschreitender Reaktion homogen weiterzulaufen, kommt der Vorbehandlung der Cellulose besondere Bedeutung zu. Im allgemeinen wird in Natronlauge vorgequollen und dann die Alkalicellulose eingesetzt. Sollten nicht alle kristallinen Bereiche in der Cellulose aufgebrochen worden sein, führt der heterogene Reaktionsbeginn zur Bildung unsubstituierter Bereiche, die sich nach der

Permethylierung der Tritylcellulose als permethylierte Blöcke im Polymer wiederfinden, wie es die durchgeführten Oligomeranalysen verdeutlicht haben (MC11).

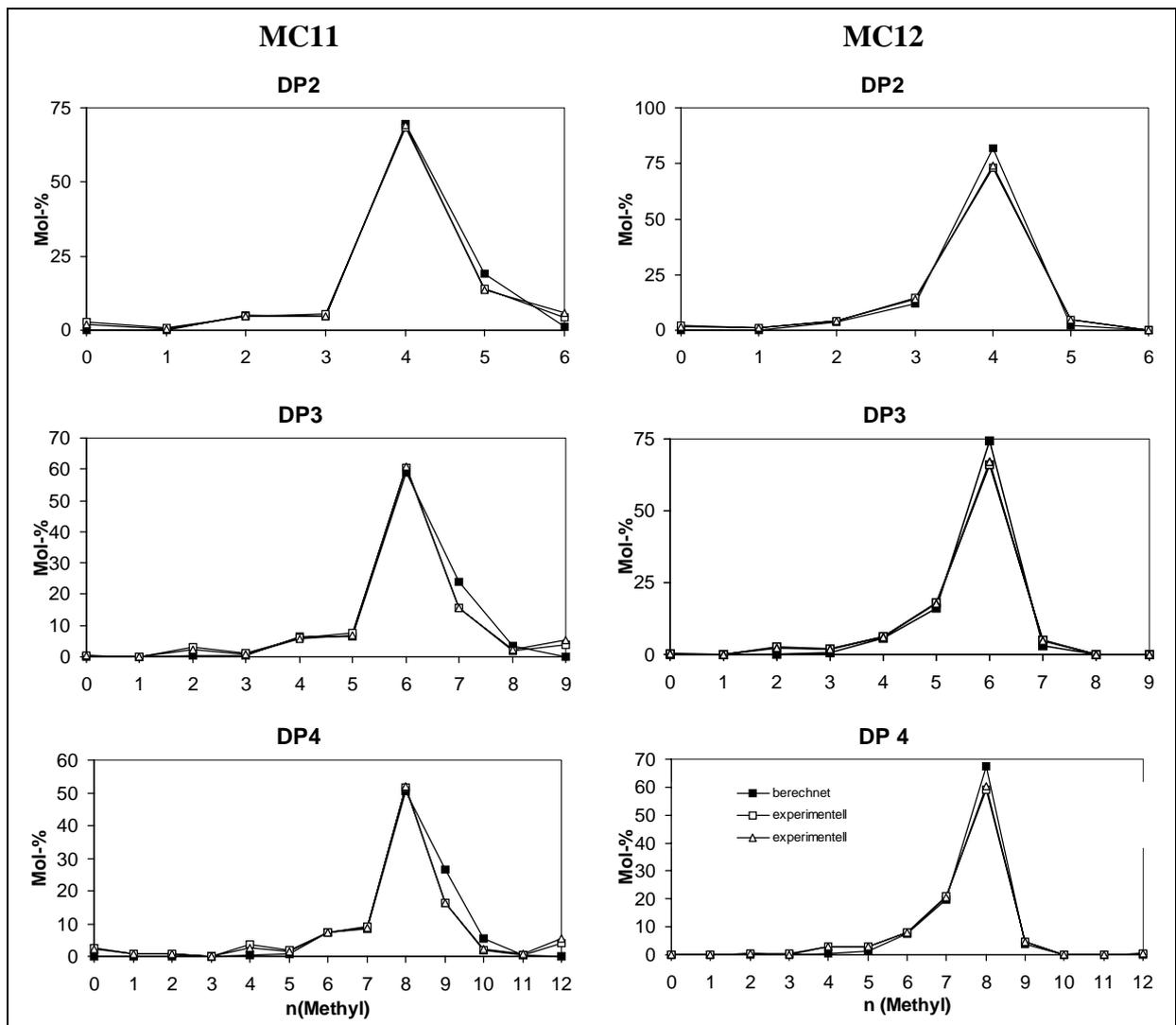


Abb. 3-22: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von MC11 (DS 2.03) und MC12 (DS 1.91). Vergleich der experimentellen Daten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Analysen mit der nach der Bernoulli-Statistik berechneten Verteilung aus der Monomeranalyse.

Die fast identischen Meßwerte der für beide MCs unabhängig voneinander durchgeführten Oligomeranalysen stellen an dieser Stelle noch einmal die Reproduzierbarkeit und Leistungsfähigkeit dieser Methode unter Beweis.

3.1.2.3 Zusammenfassung

Es konnte bei der Untersuchung von Methylcellulosen unterschiedlicher Herkunft die Analyse der Substituentenverteilung in der Monomereinheit und der Oligomerkette erfolgreich angewandt werden. Man kommt dabei zu folgenden Ergebnissen.

Das Modell von Reuben über die Voraussage einer Substituentenverteilung einer Methylcellulose in der Monomereinheit ist dem Modell von Spurlin überlegen, wie es die eigenen Arbeiten erneut unter Beweis stellen. Die Annahme, daß eine Substitution in Position 2 die Zweitsubstitution in Position 3 erhöht, führt zu einer besseren Anpassung an die Realität als das Spurlin-Modell.

Die Bestimmung eines Heterogenitätsparameters kann einen ersten Eindruck von der Heterogenität der Substituentenverteilung in der untersuchten Methylcellulose vermitteln.

Die Durchführung einer massenspektrometrischen Oligomeranalyse nach chemischer Vereinheitlichung und statistischem Partialabbau ist jedoch unerlässlich, um ein genaueres Bild von der Substituentenverteilung in der Polymerkette zu erhalten:

1. Methylcellulosen, für die ein hoher Heterogenitätsparameter in der Monomeranalyse bestimmt wurde, weisen auch bei der Betrachtung der Oligomeren nach massenspektrometrischer Analyse eine hohe Heterogenität der Substituentenverteilung auf (**MC1**). Hier muß in jedem Falle auf Fraktionierbarkeit der Probe geprüft werden (**MC7**).
2. Methylcellulosen, für die ein niedriger Heterogenitätsparameter in der Monomeranalyse bestimmt wurde, können in der Polymerkette eine stärker von der statistisch berechneten abweichende Substituentenverteilung aufweisen. Eindrucksvoll haben dies die Analysen von **MC2**, einer scheinbar homogen substituierten Methylcellulose, **MC7-2**, einer Fraktion, die aus einer heterogenen Methylcellulose stammte, und **MC11**, einer regioselektiv dargestellten 2,3-Di-*O*-methylcellulose, die sehr wahrscheinlich blockartige Bereiche von trisubstituierten Glucosen aufweist, verdeutlicht.

3.1.3 Bestimmung der Substituentenverteilung in Celluloseacetaten^{121,122}

Celluloseacetate sind wichtige industrielle Produkte. Sie finden überwiegend Verwendung als Zigarettenfilter, in der Textilindustrie (Acetatseide) oder als Filme. Die kommerziellen Produkte werden nach Quellung in Essigsäure unter sauren Bedingungen im System Schwefelsäure/Acetanhydrid über das Triacetat hergestellt, welches durch Zugabe von Wasser partiell zum Cellulose-2,5-acetat hydrolysiert wird. Nur auf diesem Wege erhält man lösliche Pro-

dukte. Durch direkte Acetylierung erreicht man dies nicht, was darauf hinweist, daß man auf dem direkten Wege eine andere Substituentenverteilung im Polymer erhält als bei dem Verfahren über das Triacetat.

Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgt durch Verseifung der Acetylgruppen mit Natronlauge und Rücktitration der überschüssigen Base. Die Verteilung der Acetylgruppen auf die Positionen 2, 3 und 6 in der Anhydroglucose kann NMR-spektroskopisch ermittelt werden^{123,124,125}, wobei es hier natürlich darauf ankommt, daß die Probe löslich ist. Bei unlöslichen Celluloseacetaten kann man dies entweder durch Acetylierung mit *d*₆-Acetanhydrid oder durch Trimethylsilylierung erreichen¹⁰⁰. Durch die erstgenannte Methode wird das Polymer chemisch vereinheitlicht, so daß man schärfere NMR-Signale erhält. Auf letztgenanntem Wege kann man durch Vergleich der Ringprotonen mit den Acetylprotonen auch den DS bestimmen. Die Verteilung der Acetylgruppen auf die einzelnen Monomerbausteine kann man NMR-spektroskopisch jedoch nicht ableiten. Hier muß eine modifizierte Methylierungsanalyse durchgeführt werden, indem man die Methylierung unter nicht basischen Bedingungen durchführt.

Die Bestimmung der Substituentenverteilung in der AGU des permethylierten Celluloseacetats erfolgt entweder

- durch Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung, wobei als Abbauprodukte partiell methylierte Sorbitacetate, die das ursprüngliche Acetatmuster⁹⁵ aufweisen, entstehen oder
- durch reduktiven Abbau unter definierten, die Acyl- in Alkylgruppen überführenden Reaktionsbedingungen als gemischt ethylierte und methylierte 1,5-Anhydrosorbitacetate¹⁰⁰,
- durch reduktiven Abbau nach Austausch der Acetyl- gegen Pentylgruppen⁹⁶.

3.1.3.1 Darstellung der Celluloseacetate

Die untersuchten Celluloseacetate waren kommerzielle Produkte (Cellulose-2,5-acetate) oder stammten aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Oppermann, Institut für Faserchemie, Universität Stuttgart.

Hier wurde versucht, durch direkte basische Acetylierung Celluloseacetate zu erhalten, die eine andere Acetylverteilung in der Polymerkette aufweisen, als es unter üblichen direkten sauren Acetylierungsbedingungen möglich ist. Neuere Arbeiten der Firma Eastman-Kodak scheinen über den Einsatz von Titankomplexen (Ti(OiPr)₄) direkt zu acylierten, löslichen Celluloseestern mit unterschiedlich hohem Substitutionsgrad zu gelangen¹²⁶. Tab. 3-20 zeigt die untersuchten Celluloseacetate.

Tab. 3-20: Acetyl-DS und Herstellungsbedingungen der untersuchten Celluloseacetate.

Bezeichnung	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6
DS _{Ac}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0	0.8
Herstellungsbedingungen	sauer indirekt	sauer indirekt	sauer indirekt	basisch direkt	sauer direkt	basisch direkt

3.1.3.2 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Monomereinheit

Die Schwierigkeit bei der Methylierungsanalyse von Celluloseacetaten ist die, daß man keine basischen Methylierungsbedingungen anwenden kann, da diese zu einem Verlust von Acetylgruppen durch Verseifung führen. Es wurde daher eine modifizierte Methylierungsanalyse von Cellulose-2,5-acetaten entwickelt⁹⁵. Als Methylierungsmittel dient Methyl-trifluormethansulfonat (Methyl-triflat) und 2,6-Di-*tert*-butylpyridin als Protonenfänger. Die Methylierung wird in Trimethylphosphat (TMP) durchgeführt. Die Methylierung nach Takeo *et al.* mit Methyl-triflat und 4-Methyl-2,6-di-*tert*-butylpyridin¹²⁷ als Base oder mit Trimethyloxonium-tetrafluorborat (Meerwein-Salz)¹²⁸ und 2,6-Di-*tert*-butylpyridin¹²⁹ sind ebenfalls Methoden, die zur schonenden Methylierung von acetylierten Oligosacchariden angewandt wurden. Die Umsetzung erfolgt in beiden Fällen in Dichlormethan.

3.1.3.2.1 Cellulose-2,5-acetate

Die Cellulose-2,5-acetate ließen sich nach der Methode von Mischnick⁹⁶ problemlos in einem Schritt methylieren. Von **CA1** und **CA2** wurden jeweils Doppelbestimmungen nach zwei unabhängigen Methylierungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-23 dargestellt:

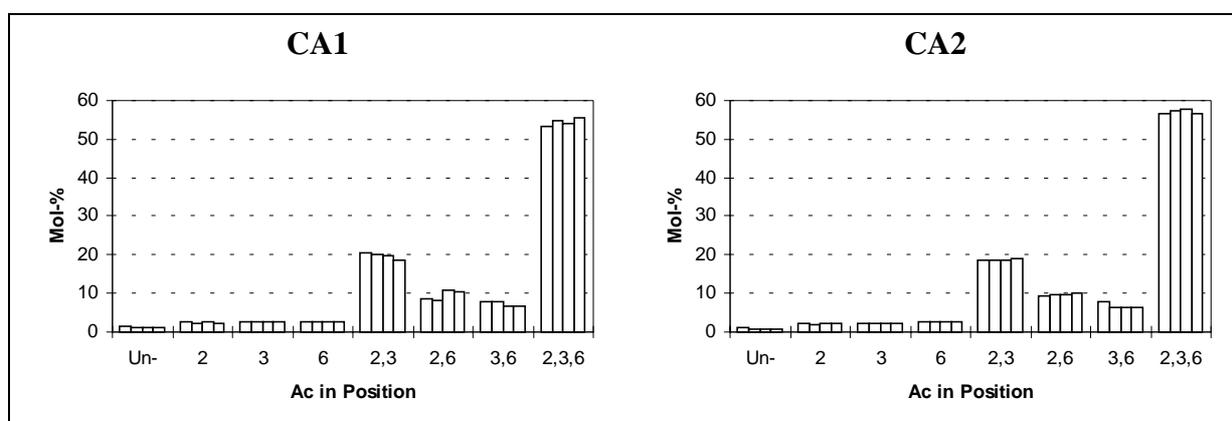


Abb. 3-23: Acetylgruppenverteilung von **CA1** und **CA2** nach einfacher Methylierung in Trimethylphosphat mit 2,6-Di-*tert*-butylpyridin und Methyl-triflat.

In Abb. 3-24 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse von CA3 und CA4 und in Abb. 3-25 die Gaschromatogramme nach Standardmethylierungsanalyse.

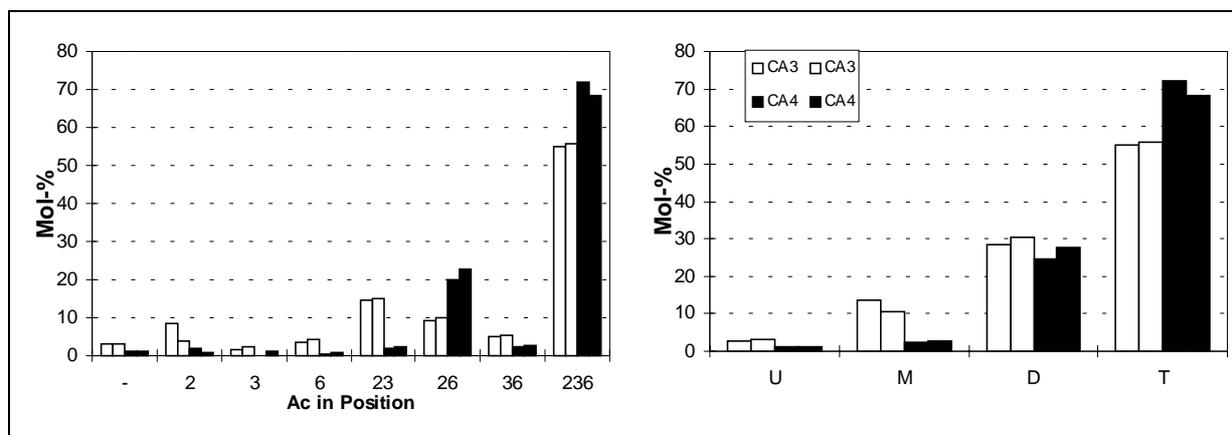


Abb. 3-24: Acetylgruppenverteilung von CA3 und CA4 nach einfacher Methylierung in Trimethylphosphat mit 2,6-Di-*tert*-butylpyridin und Methyltriflat.

In Tab. 3-21 finden sich die detaillierten Angaben zur Substituentenverteilung von CA1 - CA4 verglichen mit den berechneten Werten nach Spurlin und Reuben (s. S.27).

Tab. 3-21: Substituentenverteilung von CA1 - CA4 verglichen mit den nach Spurlin und Reuben berechneten Daten.

	CA1				
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	1.23	0.58	0.65	1.03	0.20
s_2	2.48	3.57	-1.10	3.12	-0.64
s_3	2.73	3.07	-0.34	2.61	0.12
s_6	2.70	1.62	1.08	2.90	-0.20
s_{23}	19.81	19.03	0.78	19.48	0.33
s_{26}	9.40	10.04	-0.64	8.76	0.64
s_{36}	7.22	8.62	-1.40	7.34	-0.12
s_{236}	54.44	53.48	0.95	54.76	-0.33
c_0	1.23	0.58	0.65	1.03	0.20
c_1	7.91	8.26	-0.35	8.62	-0.72
c_2	36.43	37.68	-1.25	35.58	0.85
c_3	54.44	53.48	0.95	54.76	-0.33
x_2	0.86				
x_3	0.84				
x_6	0.74				
DS	2.44	$H_1 = 2.60$		$H_1 = 1.07$	

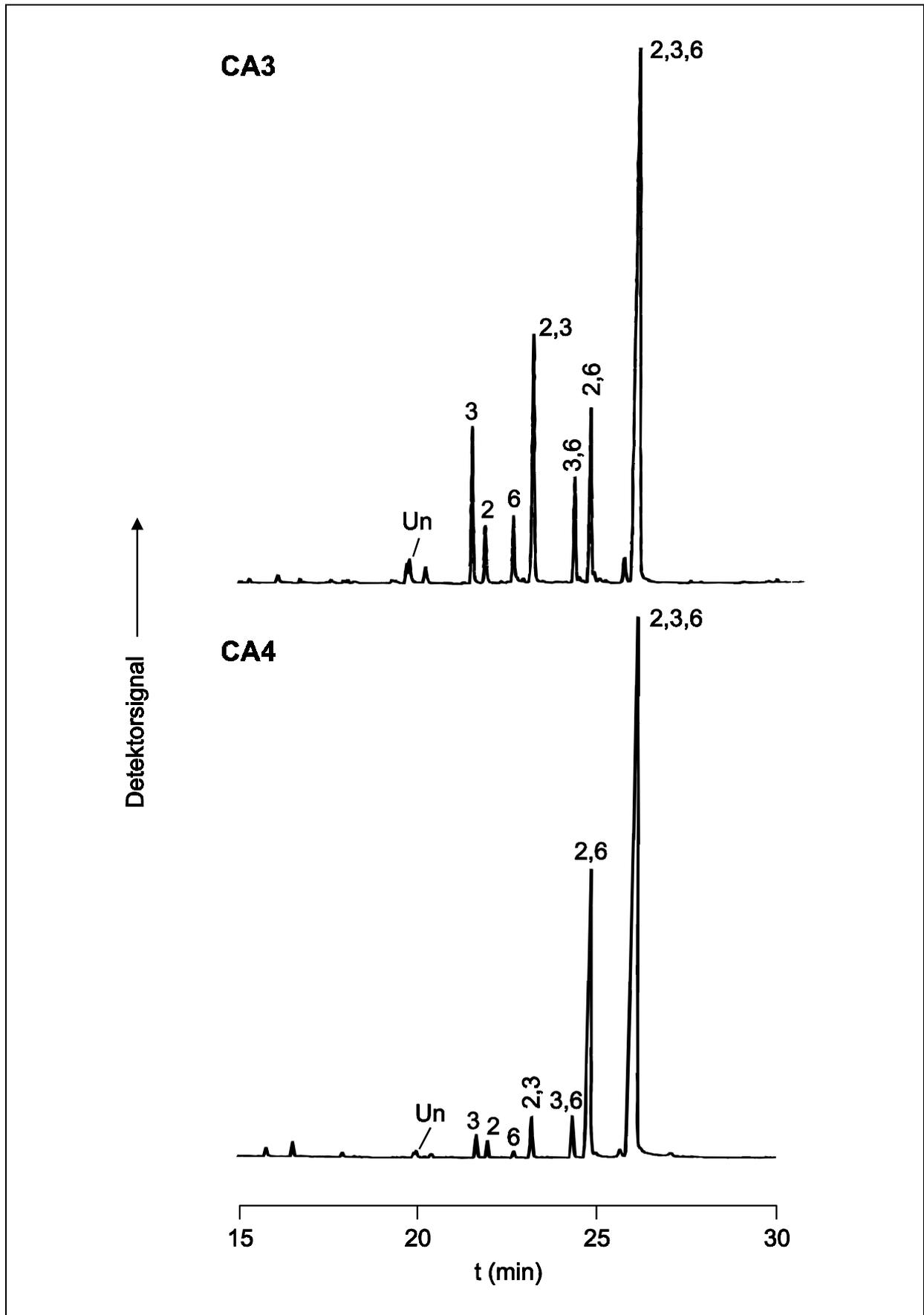


Abb. 3-25: Gaschromatogramme nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung der methylierten Celluloseacetate **CA3** und **CA4** erhaltenen Produkte. Die Ziffern geben die Position der ursprünglichen Acetylgruppen an.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-21: Substituentenverteilung von **CA1 - CA4** verglichen mit den nach Spurlin und Reuben berechneten Daten. (Fortsetzung).

CA2					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	0.86	0.45	0.41	0.82	0.04
s_2	2.09	3.19	-1.10	2.82	-0.72
s_3	2.31	2.52	-0.21	2.15	0.16
s_6	2.57	1.43	1.14	2.61	-0.04
s_{23}	18.70	17.81	0.89	18.18	0.52
s_{26}	9.66	10.11	-0.45	8.94	0.72
s_{36}	6.66	8.00	-1.34	6.83	-0.16
s_{236}	57.13	56.47	0.66	57.65	-0.52
c_0	0.86	0.45	0.41	0.82	0.04
c_1	6.98	7.15	-0.17	7.58	-0.60
c_2	35.03	35.93	-0.90	33.95	1.08
c_3	57.13	56.47	0.66	57.65	-0.52
x_2	0.88				
x_3	0.85				
x_6	0.76				
DS	2.49	$H_1 = 2.43$		$H_1 = 1.28$	
CA3					
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	0.88	0.59	0.29	0.94	-0.06
s_2	3.11	3.92	-0.80	3.57	-0.46
s_3	2.57	2.67	-0.10	2.32	0.24
s_6	2.90	1.80	1.10	2.84	0.06
s_{23}	18.24	17.62	0.62	17.96	0.27
s_{26}	11.30	11.88	-0.58	10.84	0.46
s_{36}	6.80	8.09	-1.29	7.05	-0.24
s_{236}	54.20	53.43	0.77	54.47	-0.27
c_0	0.88	0.59	0.29	0.94	-0.06
c_1	8.58	8.39	0.20	8.74	-0.16
c_2	36.34	37.59	-1.25	35.85	0.49
c_3	54.20	53.43	0.77	54.47	-0.27
x_2	0.87				
x_3	0.82				
x_6	0.75				
DS	2.44	$H_1 = 2.22$		$H_1 = 0.84$	

Tab. 3-21: Substituentenverteilung von **CA1** - **CA4** verglichen mit den nach Spurlin und Reuben berechneten Daten. (Fortsetzung).

	CA4				
	exp.	Spurlin	Abw.	Reuben	Abw.
s_0	0.81	0.05	0.76	0.06	0.74
s_2	0.99	1.27	-0.29	1.26	-0.27
s_3	0.21	0.15	0.07	0.13	0.08
s_6	0.39	0.90	-0.51	1.13	-0.74
s_{23}	3.24	3.77	-0.53	3.78	-0.55
s_{26}	23.07	23.03	0.04	22.80	0.27
s_{36}	2.36	2.67	-0.31	2.44	-0.08
s_{236}	68.94	68.16	0.78	68.39	0.55
c_0	0.81	0.05	0.76	0.06	0.74
c_1	1.59	2.32	-0.73	2.53	-0.94
c_2	28.66	29.47	-0.80	29.02	-0.35
c_3	68.94	68.16	0.78	68.39	0.55
x_2	0.96				
x_3	0.75				
x_6	0.95				
DS	2.66	$H_1 = 1.38$		$H_1 = 1.37$	

Für **CA1** und **CA2** ist der Mittelwert aller vier Analysen (zwei Methylierungen mit je doppelter Folgeanalytik) dargestellt. Für **CA3** und **CA4** sind die Ergebnisse der jeweils ersten Methylierung dargestellt, da dieses Material auch für die Oligomeranalyse eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse der Monomeranalyse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Celluloseacetaten bezüglich ihrer Herstellungsbedingungen. **CA1** - **CA3** wurden säurehydrolytisch aus Cellulose-triacetat hergestellt. Sie weisen einen ähnlichen Acetyl-DS auf (2.44-2.49) und haben eine vergleichbare Monomierzusammensetzung (Abb. 3-26).

Der Anteil an Substitution in Position 6 ist wegen der bevorzugten Hydrolyse des Esters an der primären Hydroxylfunktion deutlich herabgesetzt, während die Positionen 2 und 3 fast gleich hohe Werte aufweisen. Bei Probe **CA4**, die unter basischen Bedingungen hergestellt wurde, ragt der sehr hohe Anteil an 2,6-Di-*O*-Substitution heraus, der $\approx 80\%$ der disubstituierten AGUs ausmacht.

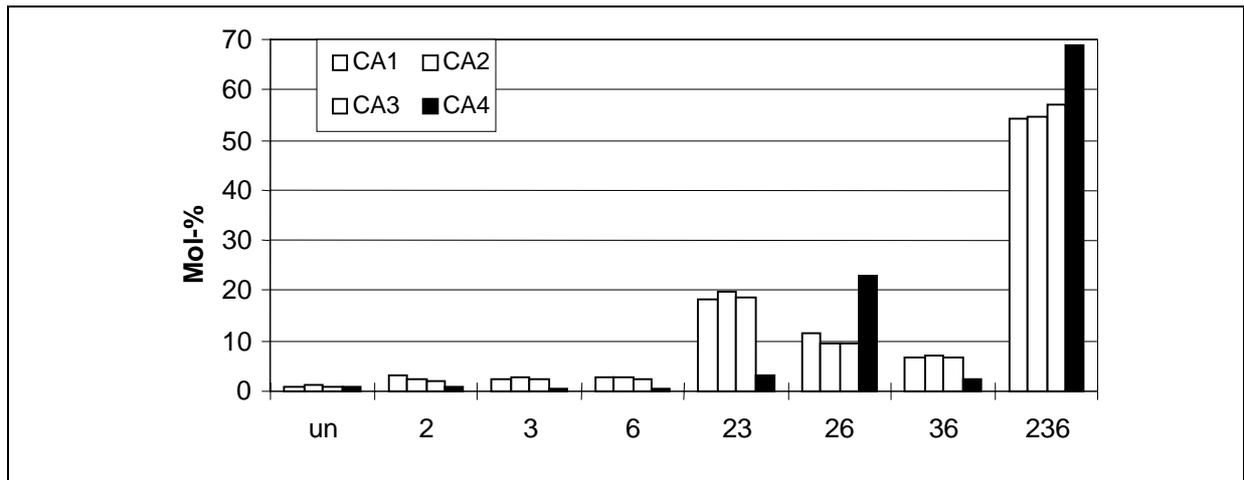


Abb. 3-26: Vergleich der Substituentenverteilung der Celluloseacetate **CA1-CA4**. Dargestellt sind die Ergebnisse aus Tab. 3-21.

Die relative DS-Verteilung verdeutlicht noch einmal den Unterschied der Proben (Abb. 3-27). Während bei **CA1-CA3** der Acetyl-DS in Position 2 und 3 mit ca. je 35 % etwa gleich hoch ist und der DS in Position 6 etwa 30 % ausmacht, ist bei **CA4** hingegen der DS in Position 2 und 6 mit ca. je 35 % etwa gleich hoch und dafür der DS in Position 3 deutlich niedriger. Weiterhin ist zu bemerken, daß das Spurlin-Modell bei den säurehydrolytisch hergestellten Cellulose-2,5-acetaten wie bei den Untersuchungen an Methylcellulosen deutlich schlechtere Übereinstimmung liefert als das Reuben-Modell, während das Reuben-Modell bei der basisch durchgeführten Acetylierung keine bessere Anpassung ermöglicht.

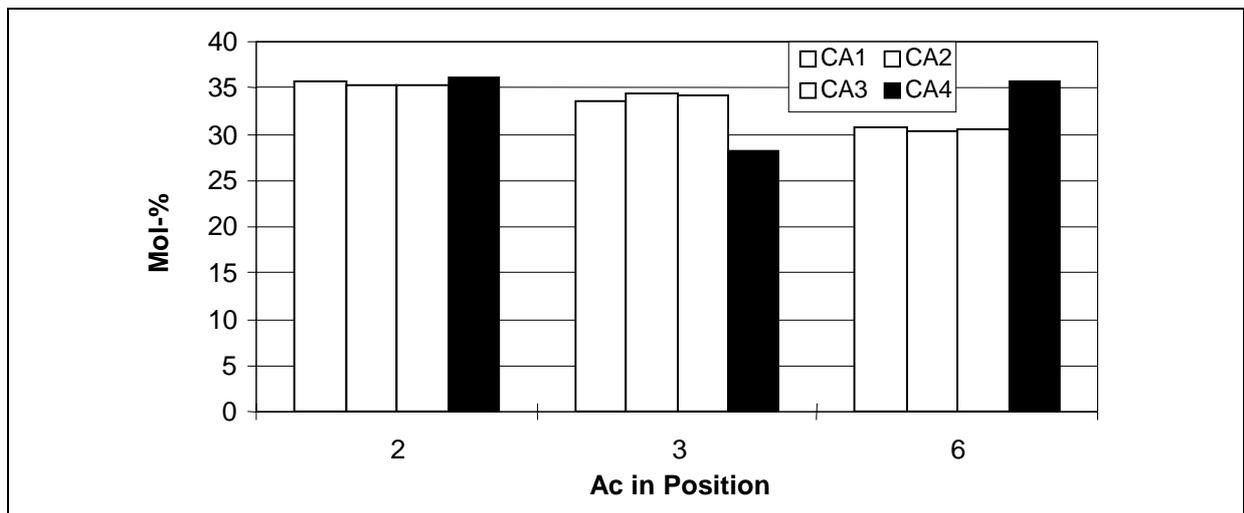


Abb. 3-27: Relative Verteilung der Acetylreste von **CA1 - CA4** auf die Positionen 2, 3 und 6 in %.

3.1.3.2.2 Celluloseacetate mit niedrigem DS

Wie bereits im allgemeinen Teil erwähnt, zeichnet sich Cellulose dadurch aus, daß sie aufgrund ihrer Mikrostruktur quasikristalline Bereiche aufweist, die nur schwer in Lösung zu bringen und so der chemischen Umsetzung nur schwer zugänglich sind. Dies zeigte sich auch bei der Analyse der Celluloseacetate **CA5** und **CA6** mit niedrigem Acetyl-DS.

Die Methylierung der Celluloseacetate wurde zunächst in TMP mit Methyltriflat und 2,6-Di-*tert.*-butylpyridin versucht (A und B). Die Proben ließen sich trotz Behandlung mit Ultraschall und Erhitzens auf 50-75 °C über Nacht nicht lösen, so daß die Reaktion unter heterogenen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Temperatur wurde auf 50 °C gehalten und die Umsetzung nach 4 bzw. 6 Tagen abgebrochen.

Unter gleichermaßen heterogenen Bedingungen verliefen Methylierungen in Dichlormethan mit Methyltriflat und 2,6-Di-*tert.*-butylpyridin¹²⁷. Im ersten Fall wurde über Nacht bei 75 °C methyliert (C) im zweiten 4 Tage bei 75 °C (D). Die drastischen Bedingungen wurden gewählt, weil Umsetzungen bei Raumtemperatur in einem Vorversuch zu fast keiner Methylierung führten. Ein Ansatz mit Meerweinsalz in Dichlormethan schlug ebenfalls fehl.

Wie in Abb. 3-28 zu sehen ist, wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Je nach Umsetzung ergeben sich bei der indirekten Bestimmung zu hohe oder zu niedrige Acetyl-DS-Werte. Unter identischen Bedingungen durchgeführte Ansätze zeigten bei beiden Proben dieselbe tendenzielle Abweichung des Acetyl-DS.

Auch Versuche durch mehrfache Methylierungen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten schlugen fehl, so daß die Analyse von Celluloseacetaten mit niedrigem DS über das komplementäre Methylmuster mit den oben beschriebenen Methylierungsmethoden bislang nicht möglich ist. Aus diesen Gründen wurden **CA5** und **CA6** nicht weiter auf der Oligomerebene untersucht.

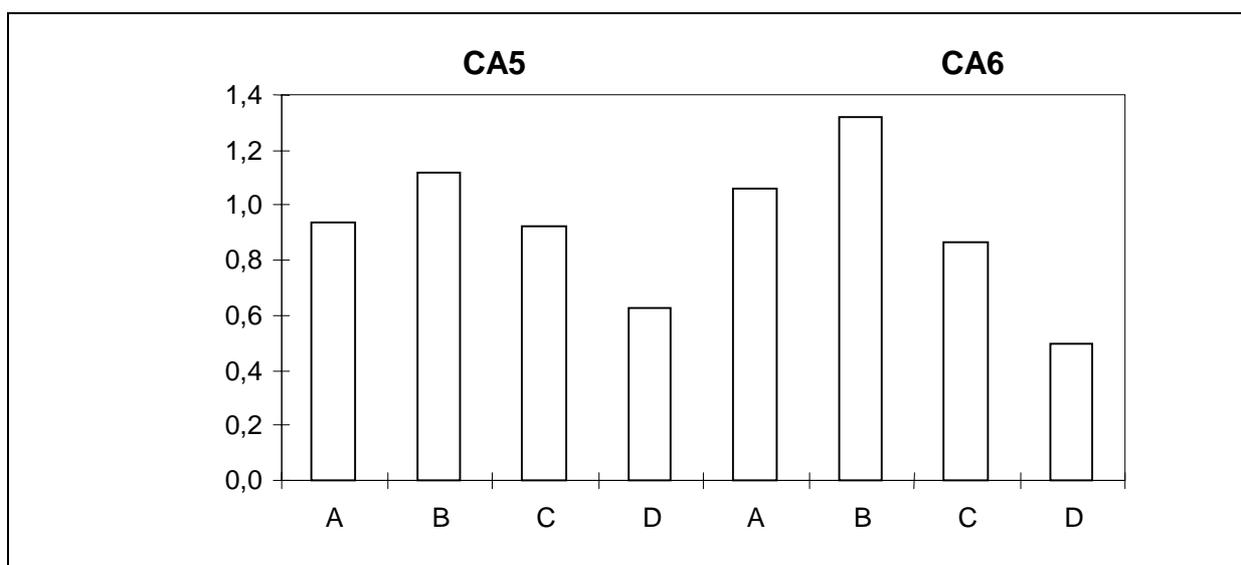


Abb. 3-28: Indirekt bestimmter Acetyl-DS nach Methylierung von **CA5** und **CA6** in TMP (A und B) und in Dichlormethan (C und D)

3.1.3.3 Bestimmung der Substituentenverteilung in der Polymerkette

Partiell methylierte Celluloseacetate können nicht direkt auf der Oligomerebene analysiert werden. Zum einen werden unter den sauren Bedingungen des Partialabbaus Acetylgruppen zum Teil abgespalten, zum anderen ist hier kein statistischer Partialabbau möglich, insbesondere dann, wenn die glycosidische Bindung bei 2-*O*-Acetylierung deaktiviert ist. Zur Vereinheitlichung des Polymers wurden deshalb Versuche unternommen, einen direkten Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch durchzuführen, um so gemischt d_3 -methylierte und methylierte Cellulose zu erhalten.

In der Literatur sind hierfür drei Reaktionssysteme publiziert:

- Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch von acetylierten Methylcellulosen in DMSO mit NaOH^{130,121}.
- Methylierung peracetylierter Oligosaccharide in DMSO mit (Li-Dimsyl)¹³¹.
- Acetyl-Pentyl-Austausch in DMAc mit einem äquimolaren Gemisch von NaH und NaOH¹³².

Zunächst wurde der Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch in DMSO mit NaOH durchgeführt. Die so erhaltene gemischt deuteromethylierte und methylierte Cellulose wurde partiell methanolysiert und erneut mit Iodmethan- d_3 methyliert. Nach der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse der Oligomerfraktionen wurde mit steigendem DP ein erhöhter bzw. uneinheitlicher Acetyl-DS ermittelt. Dies illustrieren die Ergebnisse für die Oligomeranalysen von **CA3** und **CA4**, die in Tab. 3-22 zusammengefaßt sind.

Tab. 3-22: Acetyl-DS in Abhängigkeit vom DP nach Acetyl- d_3 -Methyl-Austausch in DMSO mit NaOH und Iodmethan und partiellem Abbau von **CA3** und **CA4**.

	CA3	CA4
DP2	2.47	2.69
DP3	2.45	2.72
DP4	2.44	2.71

In einem weiteren Versuch wurde das methylierte Celluloseacetat in DMSO gelöst und Li-Dimsyl als Base eingesetzt. Das auf diesem Wege hergestellte Produkt konnte nicht analysiert werden.

Die Probleme konnten letztlich durch zweifachen Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch in DMAc mit einem äquimolaren Basengemisch von NaH und NaOH und Iodmethan überwunden werden. Am Beispiel der massenspektrometrischen Oligomeranalyse von **CA1** - **CA4** ist diese Verbesserung deutlich zu erkennen (Tab. 3-23).

3 Spezieller Teil

Tab. 3-23: Acetyl-DS von **CA1** - **CA4** in Abhängigkeit vom DP nach Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch in DMAc mit NaOH/NaH (1:1) und Iodmethan und anschließendem partiellem Abbau.

	CA1	CA2	CA3	CA4
DP2	2.46	2.51	2.43	2.66
DP3	2.43	2.52	2.44	2.66
DP4	2.43	2.53	2.44	2.66

Diese Ergebnisse legten die Annahme nahe, daß der Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch bei der ersten Methode unvollständig verlief, infolgedessen verbliebene Acetylgruppen in 2-Position einen statistischen Abbau verhinderten.

Eine Ermittlung des Rest-Acetylgehaltes in **CA3** und **CA4** nach Acetyl-Methyl- d_3 -Austausch konnte dies jedoch nicht bestätigen. Der Acetyl-DS liegt für beide Verfahren (NaOH in DMSO bzw. NaOH/NaH in DMAc) in der Größenordnung von 0.1 und weicht auch hinsichtlich der Position nicht signifikant voneinander ab (Tab. 3-24).

Dennoch scheint es, daß sich die Mischung aus harter (NaOH) und weicher (NaH) Base günstig auf die Folgeanalytik auswirkt.

Tab. 3-24: Rest-Acetyl-DS von methyliertem **CA3** und **CA4** nach Acetyl- d_3 -Methyl-Austausch. Vergleich der beiden Methoden (NaOH in DMSO bzw. NaOH/NaH in DMAc).

DS	CA3		CA4	
	NaOH	NaOH/NaH	NaOH	NaOH/NaH
2	0.03	0.03	0.02	0.03
3	0.04	0.05	0.03	0.04
6	0.03	0.04	0.02	0.03
Summe	0.10	0.12	0.07	0.10

Die hier untersuchten Cellulose-2,5-acetate weisen wie auf den Seiten 59ff dargestellt relativ niedrige Heterogenitätswerte für die Monomerebene auf. Es sollte nun untersucht werden, wie die Substituenten entlang der Kette verteilt sind. Dazu wurden die gemischt deuteromethylierten/methylierten Cellulosen partiell methanolysiert und erneut mit Iodmethan- d_3 methyliert. Die so erhaltenen Oligomeregemische wurden massenspektrometrisch untersucht und die experimentellen Daten mit den aus der Monomeranalyse nach der Bernoulli-Statistik berechneten verglichen.

Alle drei durch säurehydrolytische Deacetylierung von Cellulose-2,5-acetat hergestellten Cellulose-2,5-acetate zeigen eine deutliche Abweichung von der statistischen Verteilung der un-, mono-, di und trisubstituierten AGUs (Abb. 3-29 und Abb. 3-30). Die niedrig und hoch substituierten Anteile der Oligomerfraktionen aus dem Partialabbau sind erhöht, während der mittlere DS-Bereich deutlich unterrepräsentiert ist.

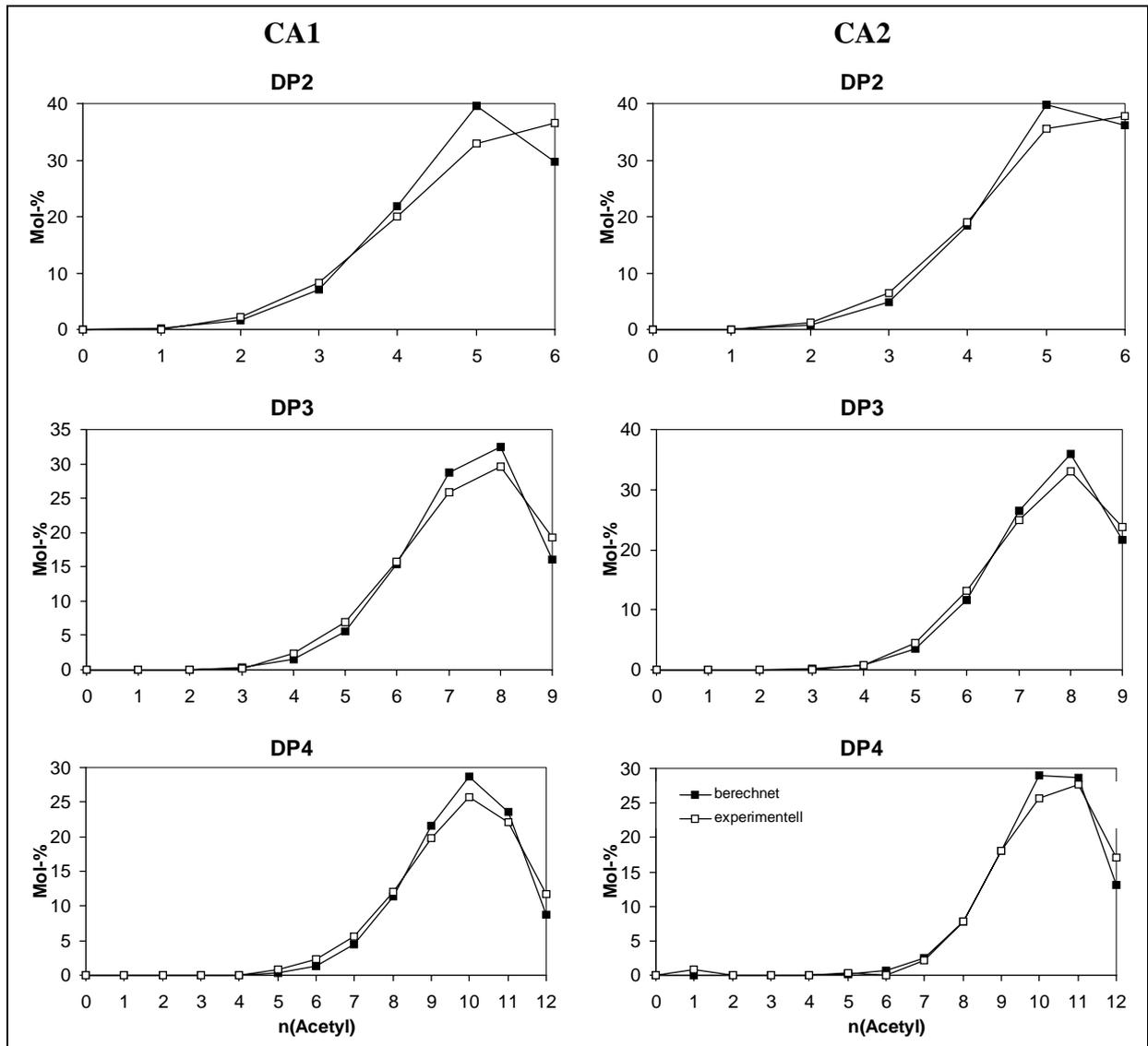


Abb. 3-29: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von CA1 (DS 2.44) und CA2 (DS 2.48). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomerzusammensetzung berechneten Verteilung.

Tab. 3-25: Heterogenitätsparameter der aus der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Oligomerfraktionen von CA1-CA4.

	CA1	CA2	CA3	CA4
H ₁	4.2	3.1	4.5	2.2
H ₂	9.8	4.9	5.7	1.8
H ₃	5.4	4.1	6.6	1.2
H ₄	5.1	5.5	6.4	2.0

Bei dem unter basischen Bedingungen hergestellten Cellulose-2,5-acetat (CA4) beobachtet man hingegen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentell erhaltenen und

den berechneten Daten. Dies verdeutlichen auch die in Tab. 3-25 gezeigten Heterogenitätsparameter.

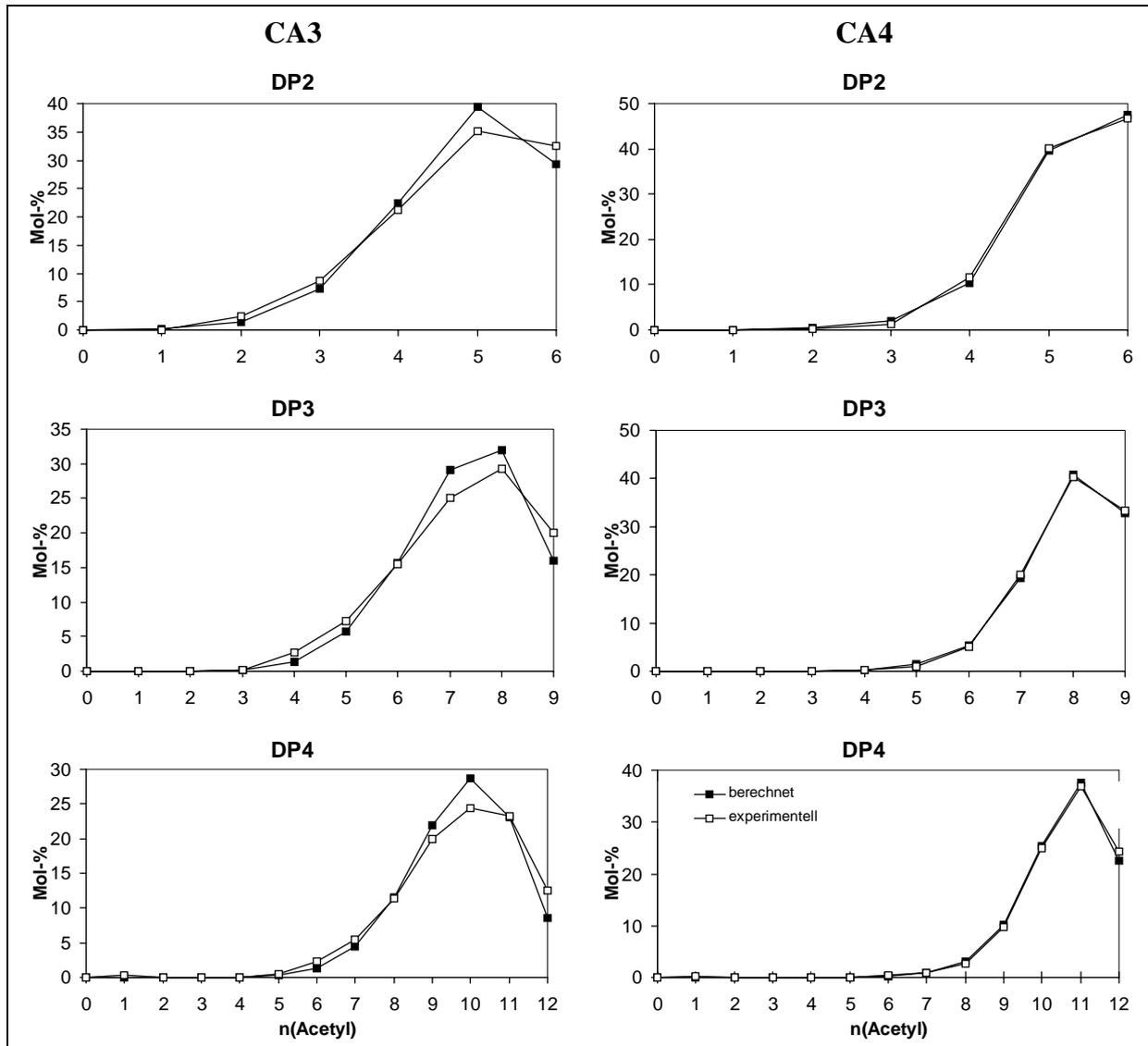


Abb. 3-30: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von **CA3** (DS 2.43) und **CA4** (DS 2.66). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomerzusammensetzung berechneten Verteilung.

Die untersuchten Celluloseacetate weisen deutliche Unterschiede in Bezug auf ihre Herstellungsbedingungen auf. Die in zwei Schritten über das Triacetat hergestellten Proben (**CA1 - CA3**) zeigen eine leichte Abweichung der Substituentenverteilung von der statistisch berechneten. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, daß kristalline Bereiche in der Cellulose nicht vollständig acetyliert wurden. Es ist bekannt, daß Peracetylierung in der Praxis nicht erreicht wird. Diese Heterogenität kann durch den Hydrolyseschritt bis zum DS von 2.5 nicht wieder aufgehoben werden. Trotz dieser leichten Heterogenität besitzen die Proben die gewünschten Eigenschaften, wie z.B. Löslichkeit, die über saure Acetylierung auf direktem Wege nicht möglich ist¹³³.

Probe **CA4**, die unter basischen Bedingungen hergestellt wurde, zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der aus der massenspektrometrischen Oligomeranalyse erhaltenen Daten mit der berechneten statistischen Verteilung. Der Grund hierfür liegt in der Vorbehandlung der Cellulose durch Quellen in Natronlauge. Dies erhöht durch Zerstörung der Kristallinität die Zugänglichkeit der Hydroxylgruppen entscheidend und führt so zu der ideal statistischen Verteilung der Acetylgruppen im Produkt. Somit ist ein Syntheseweg gefunden, auf dem man durch direkte Acetylierung zu löslichen Cellulose-2,5-acetaten kommt, welche ein anderes 2 : 3 : 6-Verhältnis der Acetylsubstitution aufweisen. Die Statistik ist hier besser erfüllt als bei ebenfalls nach alkalischer Reifung hergestellter Ether. Es spielt daher der zusätzliche Einfluß thermodynamischer Kontrolle für die statistische Verteilung eine Rolle. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für Cellulosesulfate diskutiert¹²¹.

3.1.3.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß sich Cellulose-2,5-acetate in gemischt methylierte-/ deuteromethylierte Cellulosen überführen lassen. In einem ersten Schritt wird das Celluloseacetat unter nicht basischen Bedingungen permethyliert, wobei ein stabiles, inverses Methylmuster generiert wird. Die Acetylgruppen werden anschließend unter Einsatz eines äquimolaren Basengemischs mit Iodmethan- d_3 gegen Deuteromethylgruppen ausgetauscht, die das ursprüngliche Acetatomuster repräsentieren. Die so modifizierten Celluloseacetate sind nun einem statistischem Partialabbau zugänglich und können hinsichtlich der Verteilung der Substituenten entlang der Ketten mittels massenspektrometrischer Analyse untersucht werden. Unter Einbeziehung der von Gohdes⁶³ entwickelten Methode zur Bestimmung der Substituentenverteilung in Cellulosesulfaten in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette^{98,121} läßt sich ein Fließschema aufstellen, das sich zur Charakterisierung einer Reihe von Cellulosederivattypen eignet (Abb. 3-31). Wichtig ist hier, daß das Derivat eine Methylcellulose ist oder in eines mit inversem Methylmuster überführt werden kann.

Ausgehend von einem permethylierten Cellulosesulfat (A), erhält man durch acetylierende Desulfatierung (B) ein methyliertes Celluloseacetat. An diese Stelle des Analysenganges gelangt man, wenn man ein Celluloseacetat methyliert (C). Anschließend wird ein direkter Acetyl-Deuteromethyl-Austausch (D) durchgeführt, wobei eine gemischt methylierte und deuteromethylierte Cellulose entsteht. Dies ist auch der Fall, wenn man eine Methylcellulose direkt perdeuteromethyliert (E). Im Anschluß wird das Polymer durch partielle Methanolyse abgebaut (F), erneut perdeuteromethyliert (G) und das entstandene Oligomerengemisch schließlich massenspektrometrisch untersucht.

Die Analyse von Celluloseacetaten mit niedrigem DS läßt sich bislang mit den oben beschriebenen Methoden der modifizierten Methylierungsanalyse nicht reproduzierbar durchführen.

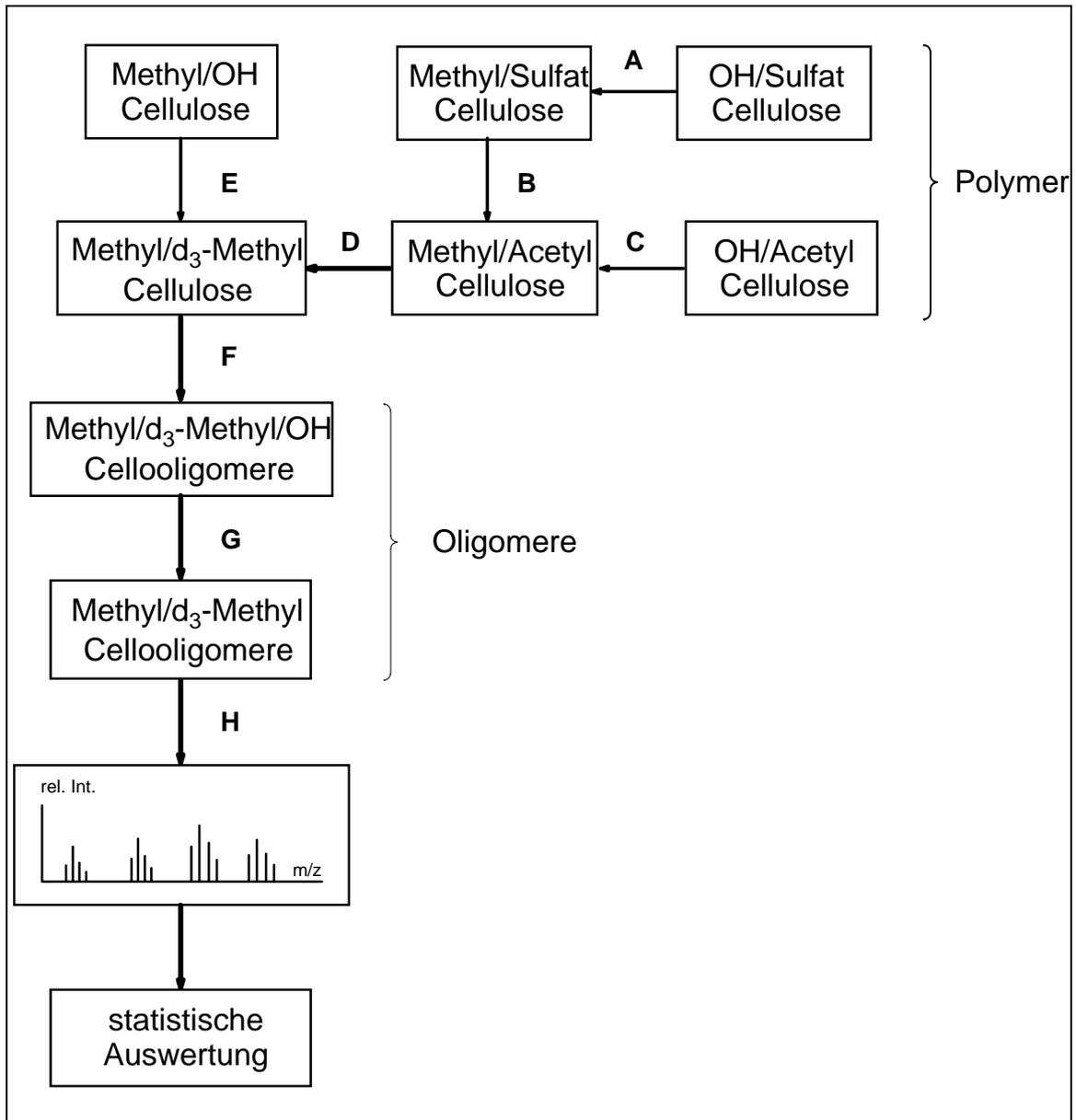


Abb. 3-31: Fließschema zur Herstellung von statistischen Cellooligomeren aus Cellulosesulfaten, Celluloseacetaten und Methylcellulosen.

3.1.4 Labeling für die massenspektrometrische Analyse

Wie bereits ausführlich dargestellt worden ist, kann man mittels massenspektrometrischer Analyse von Oligomerengemischen, die man nach statistischem Partialabbau gemischt methyl-/deuteromethylierter 1,4-Glucane erhält, Aussagen zur Substituentenverteilung in der Polymerkette machen. Voraussetzung dafür ist die Quantifizierbarkeit der Signale der Massenspektren.

Das Signal-Rausch-Verhältnis kann man noch weiter verbessern, indem das Oligomerengemisch vorher säulenchromatographisch fraktioniert, also der Massenbereich der zu analysierenden Einzelsubstanzen eingengt wird. Eine weitere Möglichkeit ist die Einführung geeig-

ner, die Desorptionsfähigkeit der Oligomeren erhöhender Gruppen („Labeling“). Dies ist insbesondere dann nötig, wenn die Oligomeren innerhalb eines DP nicht gleich gut aus der Matrix herausgelöst werden.

Erste Untersuchungen mit gemischt *O*-ethylierten und *O*-methylierten Cellulosen zeigten, daß Oligomere mit steigender Anzahl an Ethylsubstituenten in der Analyse mittels FAB-MS besser detektiert werden, d.h. sie werden unter diesen Bedingungen besser aus der Matrix desorbiert. Die Ionisierbarkeit der stärker ethylierten Oligomere, d.h. die Stabilisierung der positiven Ladung durch den stärkeren +I-Effekt der Ethylgruppen spielt dabei gewiß auch eine Rolle. Dadurch ist die quantitative Auswertung der Massenspektren nicht mehr möglich. Die Quantifizierbarkeit wird zusätzlich dadurch erschwert, daß mit steigender Zahl an C-Atomen der einzelnen Oligomere der M+1-Peak immer höher wird und schließlich das Signal von M übertrifft und das Signal für M+2 zur Auswertung in die Berechnung einbezogen werden muß. Es bieten sich zur Lösung dieses Problems zwei Möglichkeiten an:

1. Eichung des Massenspektrometers mit Modellsubstanzen

Hierzu müßte eine ausreichende Anzahl an definierten Standards synthetisiert werden, die den gesamten Massenbereich einer Oligomerfraktion abdeckt. Bei DP4 wären dies maximal 12 Standards. Wegen des sehr hohen synthetischen Aufwandes wurde diese Methode verworfen.

2. Labeling zur Erhöhung der Desorptionsfähigkeit in der massenspektrometrischen Analyse

Ein vielversprechender Weg wäre hingegen die Einführung einer Gruppe am reduzierenden Ende des Oligomers, die die Desorptionsfähigkeit in der massenspektrometrischen Analyse deutlich erhöht. An erster Stelle bietet sich hier die reduktive Aminierung¹³⁴ an, die bereits in den 80er Jahren^{135,136} zum Labeln von oligomeren Zuckern angewendet wurde und auch ein übliches Verfahren ist, um Zucker in der HPLC oder CE UV-spektroskopisch detektieren zu können¹³⁷. Die Zuckeroligomere wurden reduktiv aminiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Darüberhinaus wurde geprüft, ob ein zusätzlicher Methylierungsschritt, der zu einer Quartärnierung des Stickstoffs führt, einen weiteren Vorteil für die Desorption bringt (Abb. 3-33).

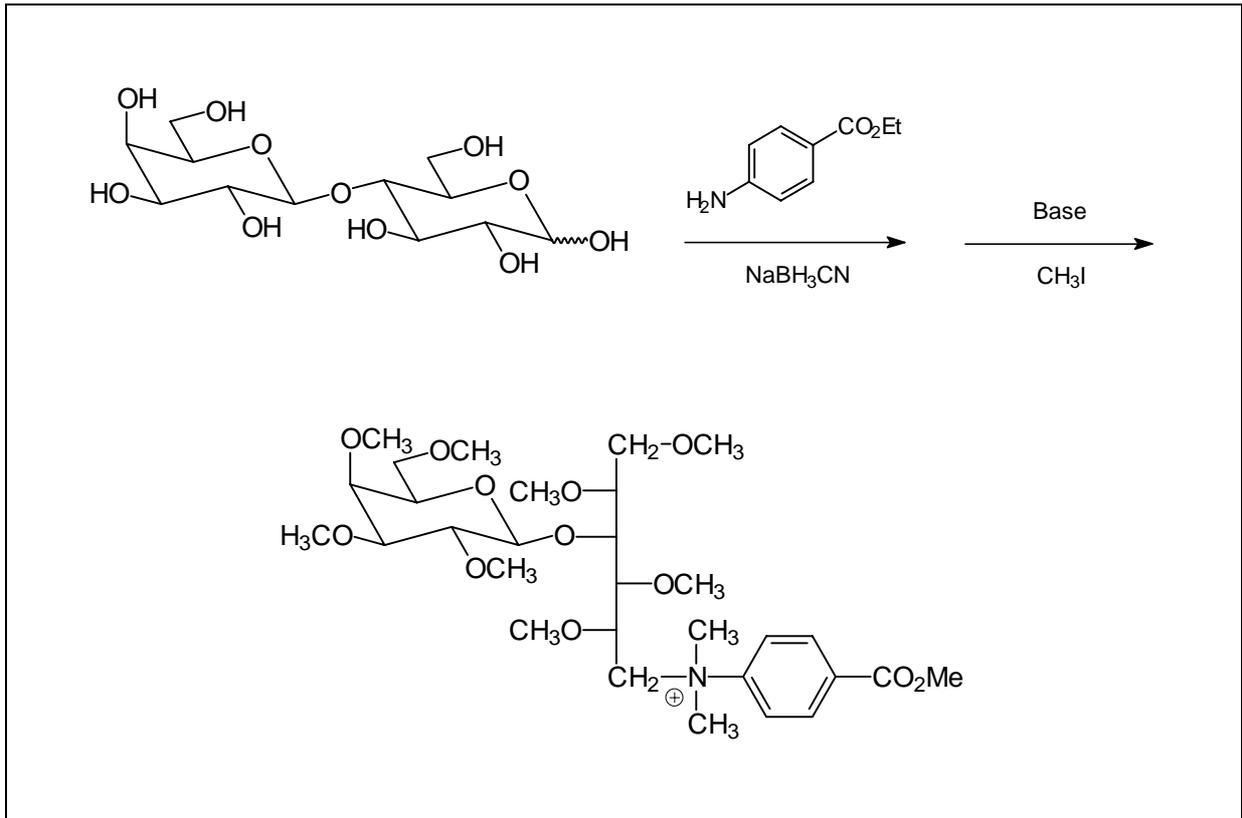


Abb. 3-32: Reduktive Aminierung von Lactose mit p-Aminobenzoesäureethylester und anschließende Permethylierung nach Wang *et al.*¹³⁵.

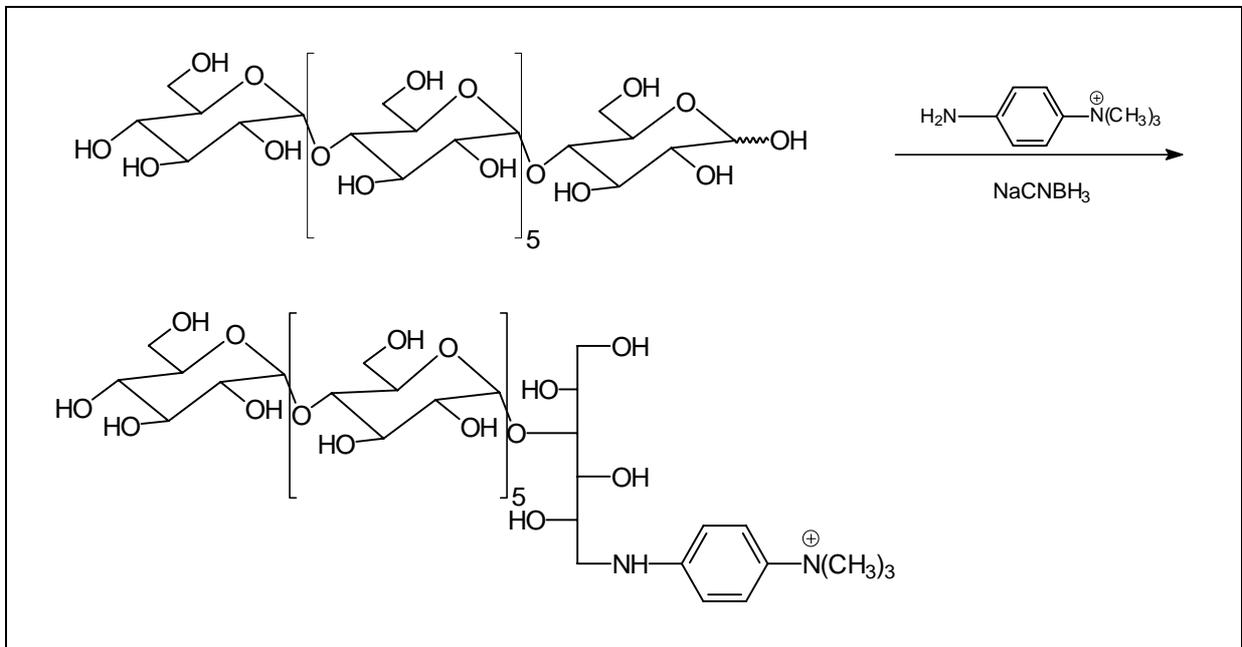


Abb. 3-33: Reduktive Aminierung von Maltoheptaose mit Trimethyl-p-aminophenylammoniumchlorid nach Dell *et al.*¹³⁶.

Mögliche weitere Derivate sind Hydrazone¹³⁸ oder Amine, die durch Lewis-Säure katalysierte Azidolyse mit anschließender Reduktion erhalten werden können¹³². Die letztgenannte

Methode wurde beispielhaft an permethylierter Amylose getestet und führte zu einer entscheidenden Verbesserung der massenspektrometrischen Detektion¹³². Es ist auch wünschenswert, die funktionelle Gruppe simultan mit dem Partialabbau zu Oligomeren einzuführen (Abb. 3-34).

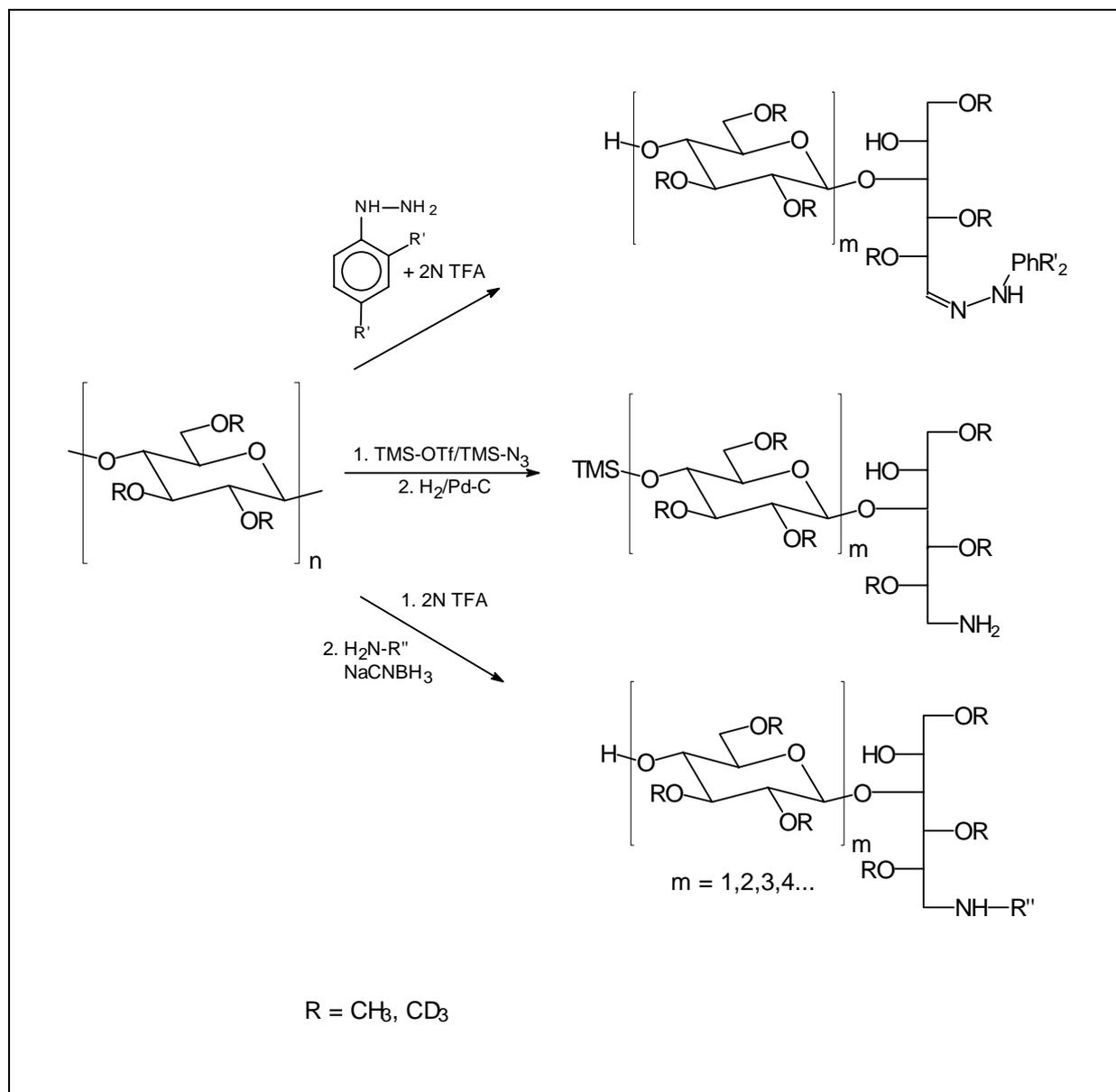


Abb. 3-34: Schema zu Partialabbau und Labeling von gemischt methylierten und deuteromethylierten Cellulosederivaten.

3.1.4.1 Modellversuche an Glucose

Zunächst wurden an permethyliertem Methyl- β -D-glucopyranosid (**17**) Modellversuche durchgeführt.

Zuerst sollte geprüft werden, ob die Stickstofffunktion während der Glycosidspaltung, also simultan mit dem partiellen Polymerabbau eingeführt werden kann. Dies sollte sowohl für die säurekatalysierte Hydrazonbildung als auch für die Lewis-Säure-katalysierte Azidolyse möglich sein.

Der Versuch, das 2,4-Dinitrophenylhydrazon von permethylierter Glucose durch gleichzeitige Hydrolyse des permethylierten Methyl- β -D-glucopyranosids und Hydrazonbildung herzustellen, mißlang. Zum gleichen Ergebnis führte ein Vorversuch, bei dem deuteromethylierte Methylcellulose (**MC10**) unter den Bedingungen für die partielle Hydrolyse (2N Trifluoressigsäure (TFA), 90°C, 2 h)⁸⁰ in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt wurde. Im Massenspektrum wurden nur partiell hydrolysierte Oligomere gefunden.

Die partielle Azidolyse unter Lewis-Säurekatalyse mit anschließender Reduktion ist hingegen grundsätzlich möglich, und wurde bereits am Modell permethylierter Amylose untersucht¹³². Die Methode mußte jedoch aus grundsätzlichen Überlegungen verworfen werden, die auch durch die Modellversuche untermauert wurden.

Der reduktive Abbau verläuft prinzipiell wie folgt: Im ersten Schritt wird der exocyclische Sauerstoff der glycosidischen Bindung von der eingesetzten Lewis-Säure angegriffen und das Glycosid unter Bildung eines cyclischen Oxoniumions gespalten. Danach überträgt Triethylsilan ein Hydridion und man erhält das 4-O-trimethylsilyl derivatisierte Anhydroalditol (Abb. 3-35).

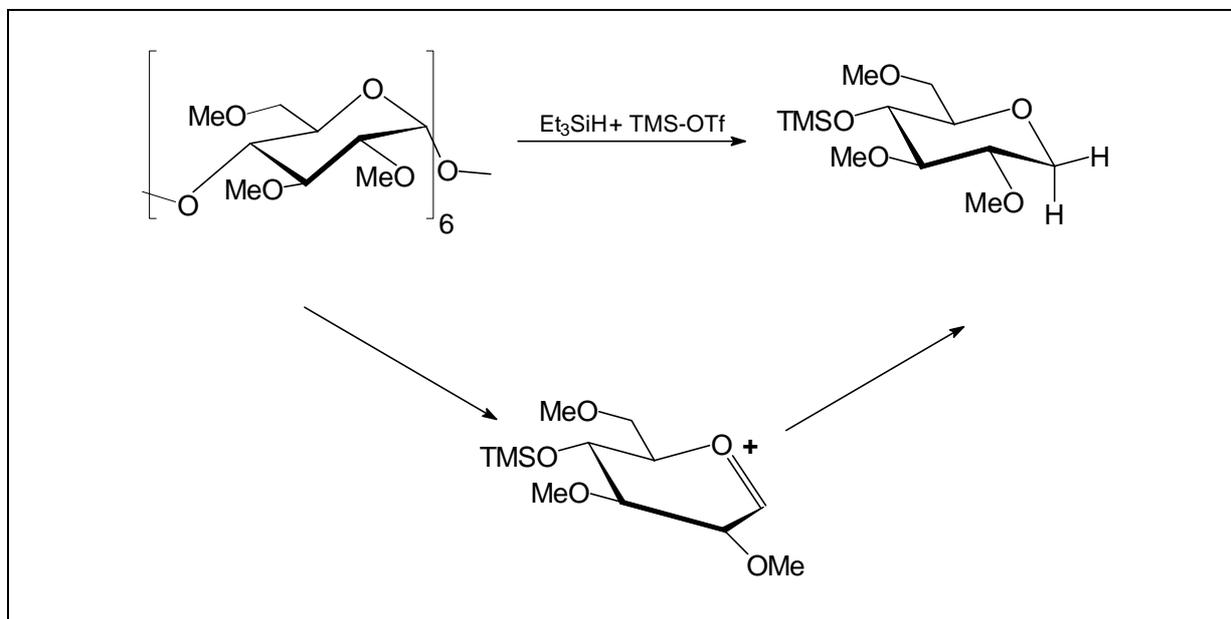
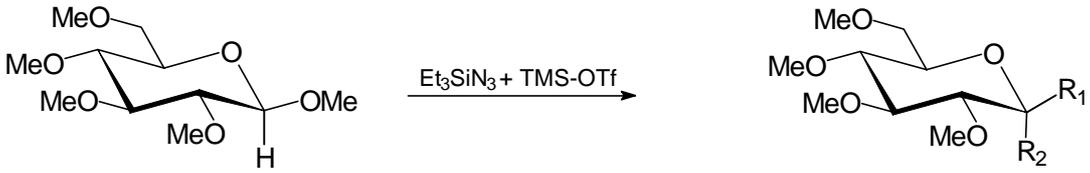


Abb. 3-35: Schema des reduktiven Abbaus am Beispiel von permethyliertem α -Cyclodextrin.

Nun haben bereits Untersuchungen gezeigt, daß es auch bei Abwesenheit eines Hydrid- oder sonstigen Nucleophils zu Anomerisierung kommt^{139,140}. Die eigenen Untersuchungen kamen zum gleichen Ergebnis (Tab. 3-26). Neben dem erwünschten 1- α / β -Azid (**19**, **20**) entstand auch das anomere per-O-methylierte Methyl- α -D-glucopyranosid (**18**).

Tab. 3-26: Produkte der Umsetzung von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid (**17**) mit Trimethylsilyl-Azid (TMS-Azid) und TMS-Triflat.


Verbindung	R ₁	R ₂
17	OMe	H
18	H	OMe
19	H	N ₃
20	N ₃	H

Abb. 3-36 zeigt den Zeitverlauf der Reaktion von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid (**17**) mit Trimethylsilyl-Azid (TMS-Azid) und Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat (TMS-Triflat). Zudem verläuft die Reaktion nicht vollständig: Nach 48 h Reaktionszeit waren noch 17 % Methyl-glucoside vorhanden, die Reaktion also unvollständig. Das TMS-Azid ist demnach ein deutlich schwächeres Nucleophil als Triethylsilan, mit dem Methylglucoside in wesentlich kürzerer Reaktionszeit vollständig reduziert werden.

Das Problem hierbei ist, daß das nach Glycosidspaltung entstandene cyclische Oxoniumion mit einem beliebigen anderen trimethylsilylierten, terminalen Bruchstück von Reversionsprodukte bilden kann (Abb. 3-37). Beim Einsatz des reduktiven Abbaus zur Ermittlung der Verzweigungspositionen und Ringform der Monomere in einem Polysaccharid ist das unerheblich, da man bis zum Monomer abbaut und keine Informationen der nächsten Nachbarn des Bausteins im Polymer bestimmen will. Die Methode der Oligomeranalyse mittels statistischem Partialabbau baut hingegen darauf auf, daß das Polymer zum einen statistisch und zum anderen irreversibel gespalten wird. Ist dies nicht der Fall, wie hier durch die Möglichkeit der Rekombination, wird die zu bestimmende Information verfälscht und somit wertlos.

Ein weiteres Problem ist die Abspaltung der 4-*O*-Trimethylsilyl-Gruppe während der massenspektrometrischen Messung, die durch die saure Matrix bei der MALDI begünstigt wird. Als Folge treten mehrere Serien für jede Oligomerfraktion auf. Detaillierte Untersuchungen mit deuteromethylierter **MC10** wurden hierzu jedoch nicht durchgeführt.

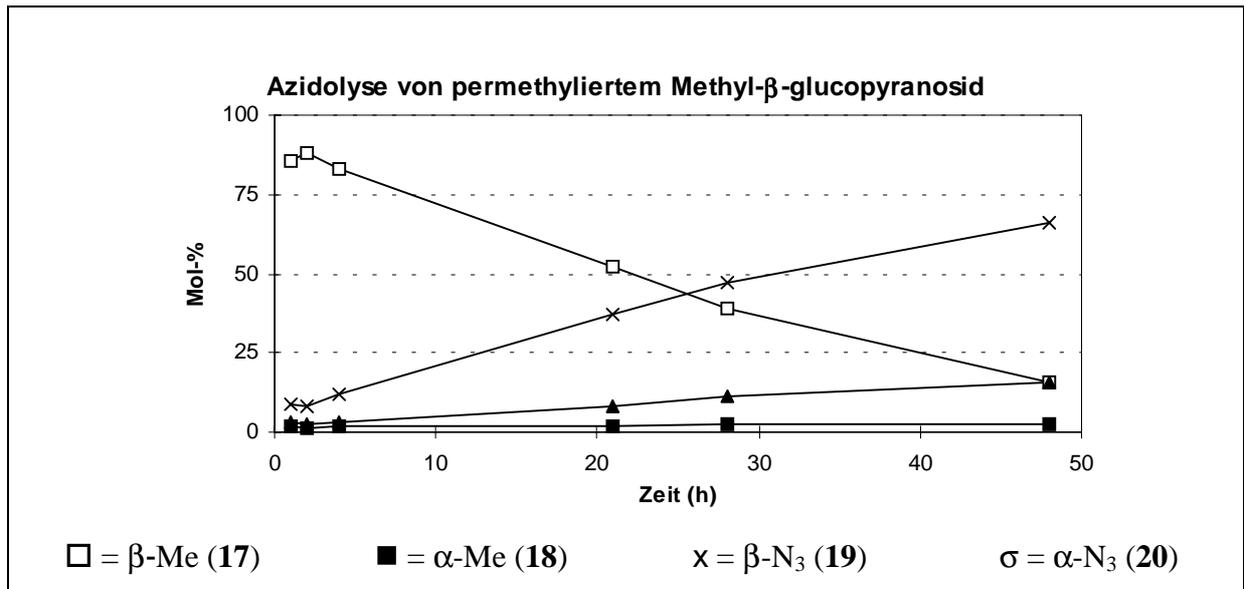


Abb. 3-36: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung der Azidolyse von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid (17) in Mol-%.

Diese Ergebnisse und Überlegungen führten zu dem Schluß, das das Labeln der Oligomere durch Lewis-Säure katalysierten Partialabbau mittels Azidolyse nicht geeignet war.

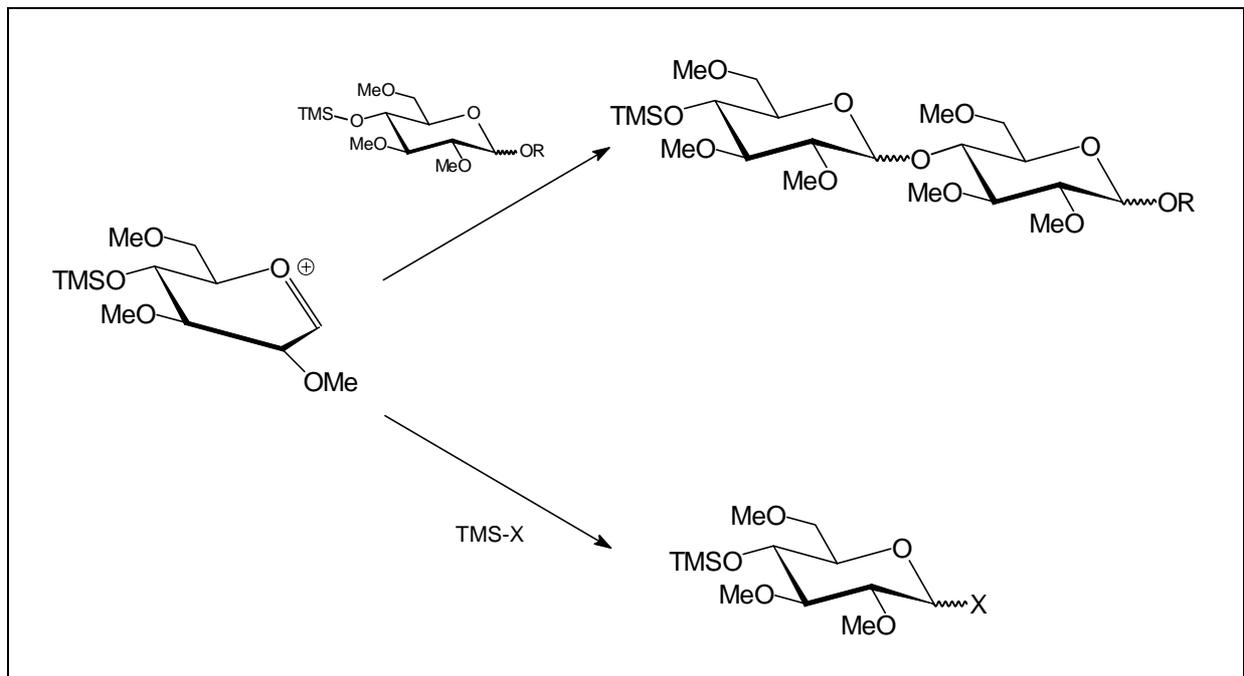


Abb. 3-37: Rekombination (oben) und Nucleophiladdition (unten) des intermediär auftretenden cyclischen Oxoniumions während der Lewis-Säure-katalysierten Glycosidspaltung von permethylierten 1,4-Glucanen.

Der Versuch, in einem Schritt sowohl die glycosidische Bindung zu spalten als auch gleichzeitig eine Stickstofffunktion am C-1 des Zuckers einzuführen, ist nicht gelungen. Daher wurde 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose (9b) als Modell für ein Oligomerenmischung ausge-

wählt, welches nach partieller Hydrolyse vorliegen würde. Die Modellsubstanz (**9b**) läßt sich bequem durch Hydrolyse von (**18**) herstellen. Es wurden folgende Umsetzungen durchgeführt:

1. Reduktive Aminierung mit n-Propylamin
2. Methylierung des unter 1. erhaltenen Produkts

Die reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid wurde leicht modifiziert nach Wang *et al.*¹³⁵ durchgeführt. Wie auch Publikationen zum Labeling von Zuckern für die Detektion in der Kapillarelektrophorese zeigen, ist die reduktive Aminierung keine triviale Reaktion und führt nicht immer zu vollständigem Umsatz¹⁴¹. Das eingesetzte Amin muß sorgfältig ausgewählt werden. Mit n-Propylamin wurde in 2 h 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N*-propyl-amino-D-sorbit (**21**) mit einer Ausbeute von 88 % erhalten. Das Produkt (**21**) wurde anschließend in DMSO mit NaOH und Iodmethan permethyliert. Man erhielt quantitativ 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N,N,N*-(dimethyl-n-propyl)ammonium-D-sorbit (**22**) als Iodid (Abb. 3-38).

Durch die Permethylierung wird eine permanente Ladung in das Molekül gebracht. Dies sollte sich positiv auf die Desorptionsfähigkeit des Moleküls in der Massenspektrometrie auswirken, da das Molekül nicht mehr ionisiert werden muß und daher im Positivionen-Modus viel besser fliegen sollte als ein neutrales Molekül, das erst durch die Ionisierung durch FAB oder MALDI positiv geladen wird. Weiter sollten auch die üblicherweise entstehenden Natrium- und Kaliumadduktgemische unterdrückt werden.

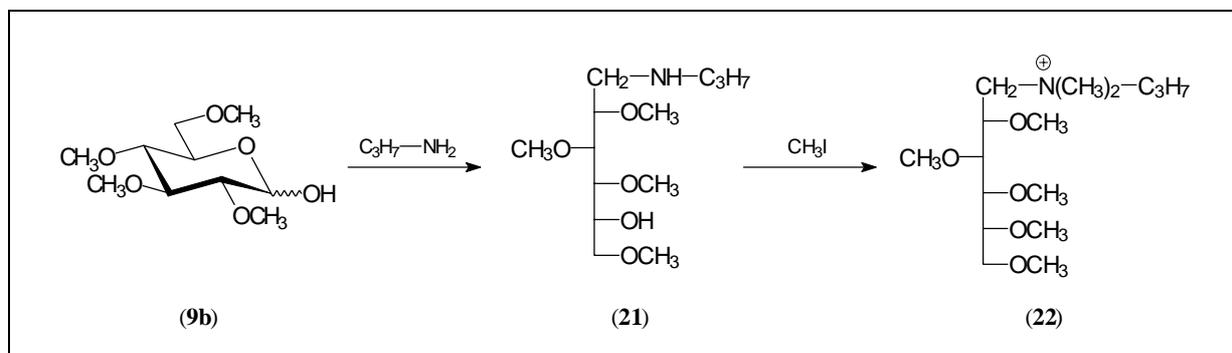


Abb. 3-38: Reduktive Aminierung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose (**9b**) mit n-Propylamin und anschließende Permethylierung.

3.1.4.2 Modellversuche an Methylcellulose (MC10)

Nachdem am Monomer die Methoden zur Fixierung von Stickstofffunktionen am reduzierenden Ende des Zuckers erfolgreich verlaufen waren, sollten diese auf Oligomergemische übertragen werden. Dazu wurde **MC10** zunächst perdeuteromethyliert und anschließend partiell hydrolysiert. Das so entstandene Oligomergemisch wurde dann für die Umsetzung mit n-Propylamin eingesetzt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (s. S. 70)

wurden die Produktgemische zusätzlich mittels GPC fraktioniert (Sephadex LH20) und die jeweiligen Fraktionen massenspektrometrisch untersucht.

Zunächst sollte noch einmal überprüft werden, ob die massenspektrometrische Analyse des partiellen Hydrolysats von perdeuteromethylierter MC10 das gleiche Ergebnis erbringt wie die bisher besprochene Methode der partiellen Methanolyse mit anschließender Perdeuteromethylierung.

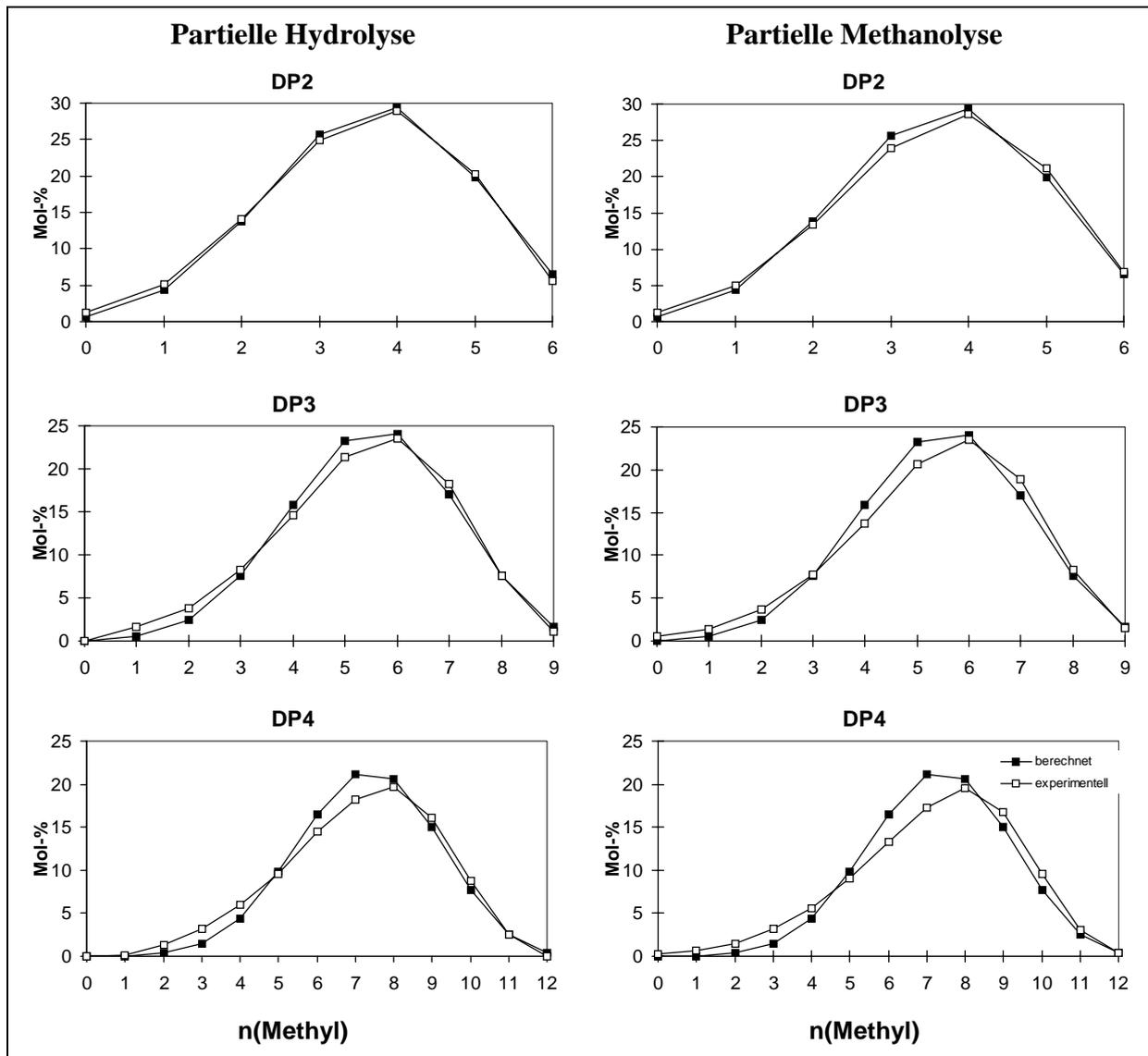


Abb. 3-39: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von MC10 (DS 1.82) nach partieller Hydrolyse (links) bzw. partieller Methanolyse mit anschließender Deuteromethylierung (rechts). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomerzusammensetzung berechneten Verteilung.

In Abb. 3-39 ist die Auswertung der di-, tri- und tetrameren Fraktion aus den Massenspektren der Oligomergemische dargestellt. Tab. 3-27 zeigt zusätzlich noch den DS-Verlauf in Abhängigkeit vom DP und die Heterogenitätsparameter. Im Rahmen der Meßgenauigkeit weisen beide Methoden kein signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen auf.

Tab. 3-27: Vergleich des DS in Abhängigkeit vom DP und der Heterogenitätsparameter der massenspektrometrisch analysierten Oligomerfraktion von MC10 nach partieller Hydrolyse und partieller Methanolyse mit anschließender Perdeuteromethylierung.

Methode	partielle Hydrolyse		partielle Methanolyse + Perdeuteromethylierung	
	DS	H _i	DS	H _i
2	1.79	1.68	1.80	1.63
3	1.79	3.25	1.80	3.29
4	1.79	4.65	1.80	5.02

Dies bedeutet, daß die partielle Hydrolyse als Zwischenprodukt für weitere Derivatisierungen zu keiner Verfälschung des Analysenergebnisses führt.

Die Umsetzung des partiellen Hydrolysats von **MC 10** mit n-Propylamin verlief glatt. Im Massenspektrum findet man nur die Signale der reaktiv aminierte Oligomerfraktionen. Die quantitative Auswertung der Spektren zeigt jedoch niedrigere DS-Werte der Fraktionen als die des ursprünglichen partiellen Hydrolysats. Der qualitative Verlauf hingegen entspricht dem der bisher dargestellten Ergebnisse.

Die Permethylierung des nach reduktiver Aminierung mit n-Propylamin erhaltenen Oligomerenmischs erbrachte ebenfalls das gewünschte Ergebnis. Die Massenspektren weisen nur die erwarteten Signale auf. Die quantitative Auswertung der experimentellen Daten liefert im di-, tri- und tetrameren Oligomerenbereich fast exakt den aus der Monomeranalyse bestimmten DS. Die Heterogenitätsparameter zeigen auch den gleichen Gang wie bei den beiden anfangs besprochenen Methoden. In Tab. 3-28 und Abb. 3-40 sind die Ergebnisse detailliert dargestellt.

Tab. 3-28: Vergleich des DS in Abhängigkeit vom DP und der Heterogenitätsparameter der massenspektrometrisch analysierten Oligomerfraktion von **MC10** nach partieller Hydrolyse und reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und anschließender Permethylierung des nach reduktiver Aminierung erhaltenen Oligomerenmischs.

Methode	Reduktive Aminierung		Reduktive Aminierung + Permethylierung	
	DS	H _i	DS	H _i
2	1.76	3.23	1.82	1.55
3	1.77	3.02	1.81	3.44
4	1.78	3.90	1.81	6.35

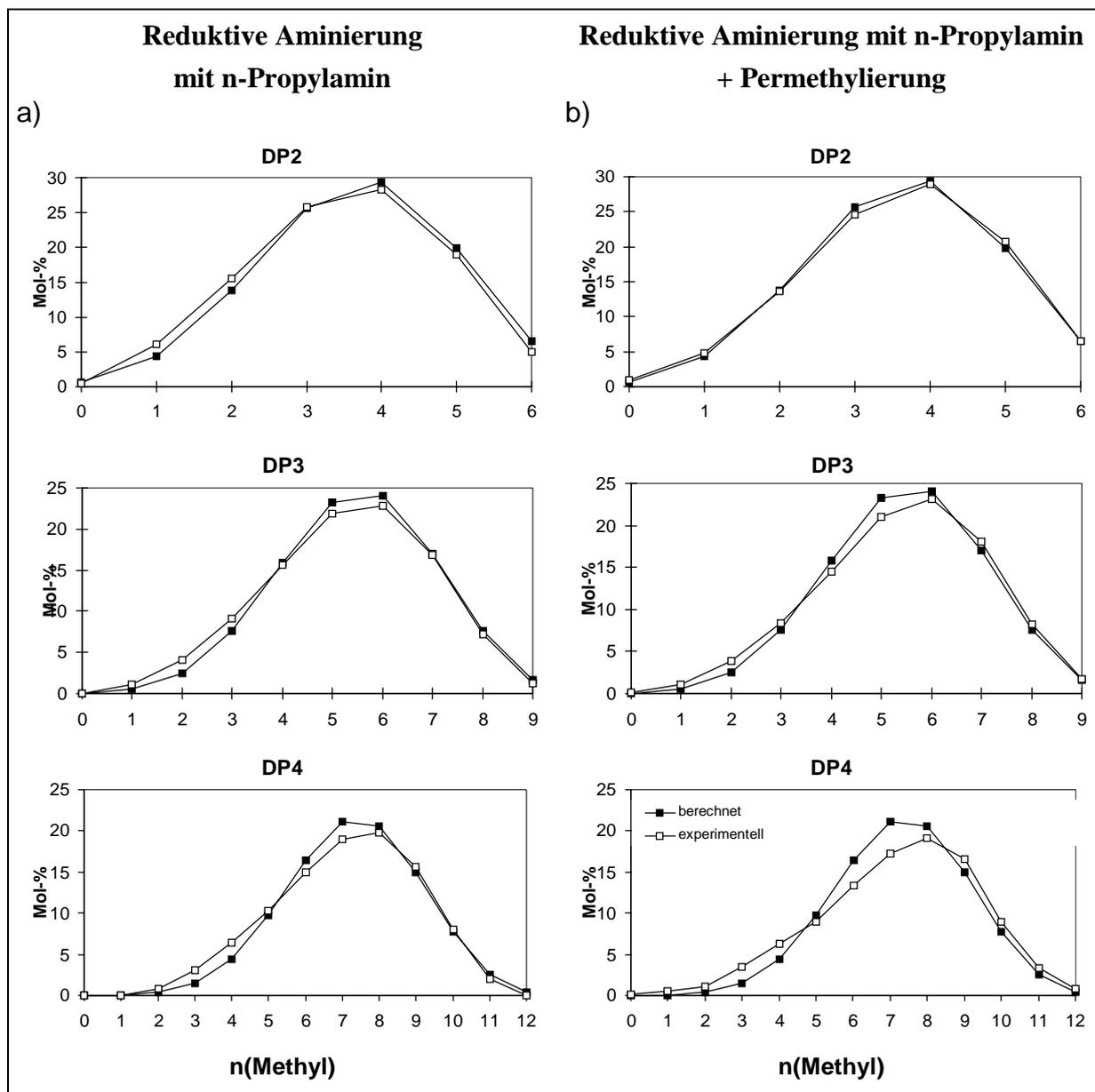


Abb. 3-40: Relative Zusammensetzung der Oligomerfraktionen (DP 2-4) von MC10 (DS 1.82) nach partieller Hydrolyse und anschließender reduktiver Aminierung mit n-Propylamin (a) bzw. Permethylierung des aus a) erhaltenen Oligomerengemischs (b). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomerzusammensetzung berechneten Verteilung.

Beim Vergleich aller Methoden kommt man zu folgendem Ergebnis: Zur Bestimmung der Substituentenverteilung von Methylcellulosen oder Cellulosederivaten, die in ein komplementäres Methylmuster überführt werden können, hat sich die Methode der partiellen Methanolyse des mittels Deuteromethylierung chemisch vereinheitlichten Polymers bewährt. Die weitere Vereinheitlichung durch Deuteromethylierung nach dem Partialabbau wirkt sich zusätzlich günstig auf die Analytik aus. Die partielle Hydrolyse liefert vergleichbare Ergebnisse. Die Umsetzung des partiellen Hydrolysats mit n-Propylamin verläuft ebenfalls glatt. Die Auswertung der Massenspektren der so erhaltenen reduktiv aminierten Cellooligomere führt

zur Bestimmung eines jeweils zu niedrigen Methyl-DS. Der erstgenannten Methode am nächsten kommt die Quartärnisierung des Oligomeregemischs durch Peralkylierung nach reduktiver Aminierung.

3.1.4.3 Modelluntersuchungen an perethylierter Methylcellulose

Die Labelingversuche für die massenspektrometrische Analyse sollten dazu dienen, diese Analyse auch für Derivattypen zugänglich zu machen, die bisher nicht untersucht werden konnten. So konnten FAB-Massenspektren von gemischt ethylierten und methylierten Malto-oligomeren nicht mehr quantitativ ausgewertet werden. Perethylierte Oligomere konnten viel besser desorbiert bzw. ionisiert werden als permethylierte Oligomere¹⁴². Um dies näher zu prüfen, wurde **MC10** perethyliert und das Oligomeregemisch nach partieller Methanolyse und anschließender Perethylierung mittels FAB-MS analysiert. Die Auswertung der FAB-Massenspektren (Abb. 3-41) zeigt, daß Oligomere mit niedrigem Methyl-DS Signale höhere Intensitäten aufweisen als solche mit hohem Methyl-DS. Der aus den experimentellen Daten ermittelte Methyl-DS ist deutlich niedriger (1.4 - 1.5) als der aus der Monomeranalyse berechnete. Es sollte daher untersucht werden, ob die Quartärnisierung der Cellooligomere zu einem Ausgleich dieses Effektes führt.

Dazu wurde analog zu dem oben beschriebenen Verfahren die perethylierte Methylcellulose zunächst partiell hydrolysiert, mit n-Propylamin reduktiv aminiert und anschließend zur Herstellung der quartären Ammoniumverbindung perethyliert.

Wie aus Tab. 3-29 zu sehen ist, hat die Quartärnisierung der Cellooligomere die Quantifizierbarkeit nur wenig verbessert.

Tab. 3-29: Vergleich des DS in Abhängigkeit vom DP der durch FAB massenspektrometrisch analysierten Oligomerfraktionen von perethylierter **MC10** nach partieller Methanolyse und Perethylierung und nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und anschließender Perethylierung.

Methode	Partielle Methanolyse und Perethylierung	Partielle Hydrolyse, reduktive Aminierung mit n-Propylamin und Perethylierung
DP	DS	DS
2	1.52	1.68
3	1.53	1.62
4	1.45	1.51

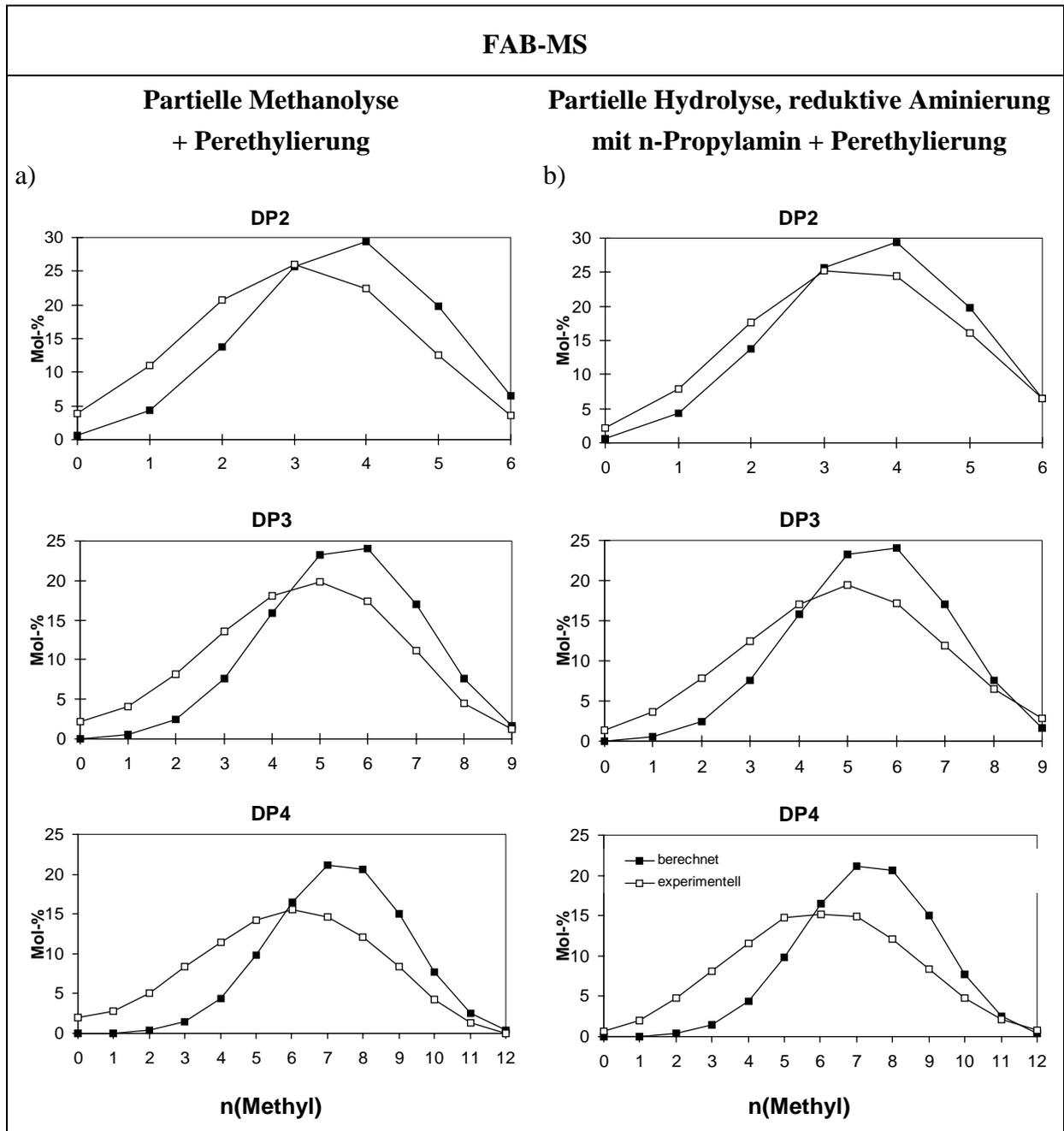


Abb. 3-41: Relative Zusammensetzung der mittels FAB-MS analysierten Oligomerfraktionen (DP 2-4) von perethylierter **MC10** (DS 1.82) nach partieller Methanolyse und anschließender Perethylierung (a) bzw. nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und anschließender Perethylierung (b). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomierzusammensetzung berechneten Verteilung.

In Abb. 3-42 sind die MALDI-TOF-Massenspektren der Trimeren aus partiell abgebauter, perethylierter **MC10** dargestellt: a) nach partieller Methanolyse und Perethylierung und b) nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und Perethylierung. Man sieht hier die deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und die Abwesenheit von Alkalimetallion-Addukten in Spektrum b, welche in Spektrum a zu komplexen Signalgruppen führt.

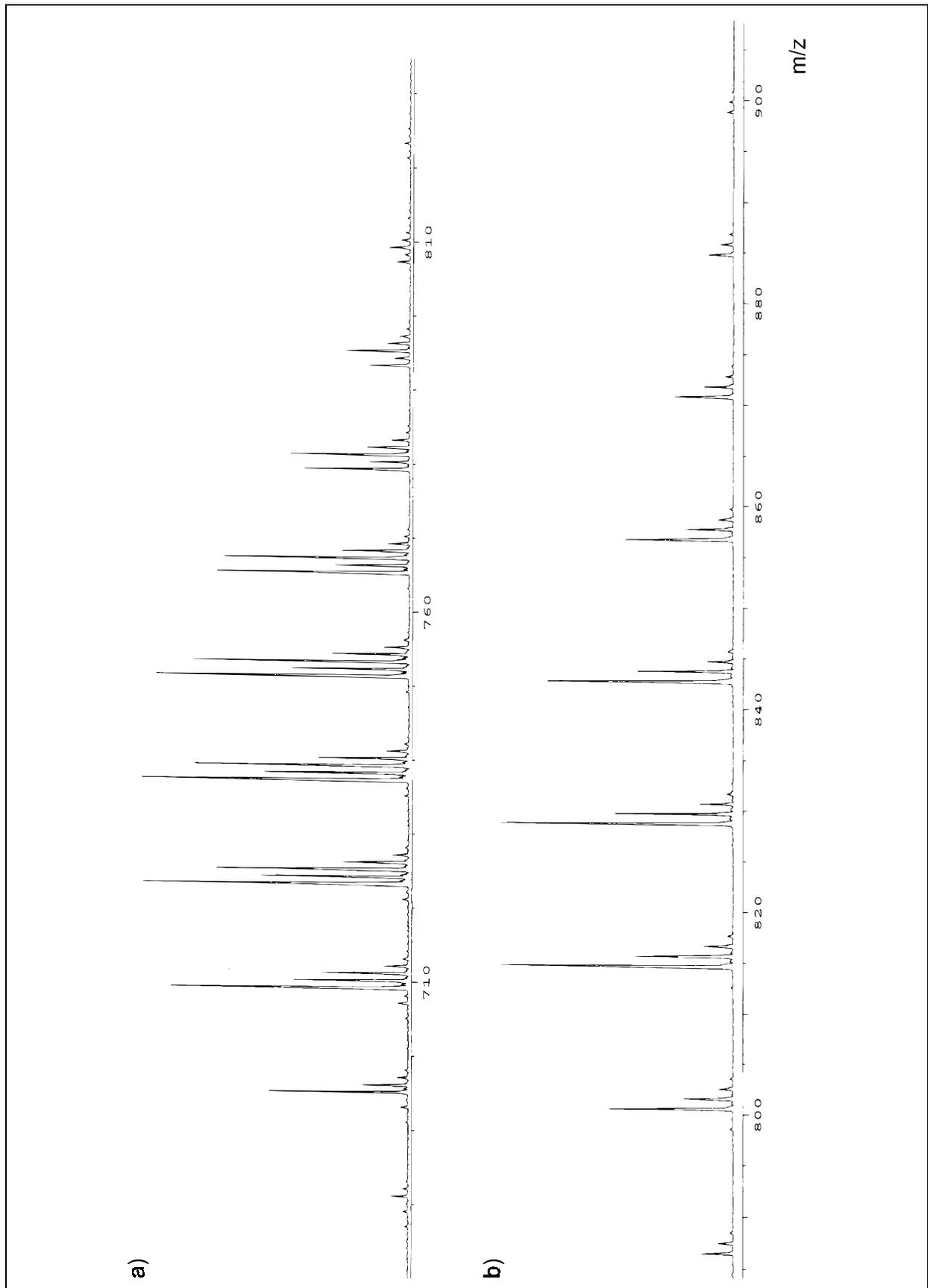


Abb. 3-42: MALDI-TOF-Massenspektren der Trimeren aus perethylierter **MC10** nach partieller Methanolyse und anschließender Ethylierung (a) bzw. nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und Ethylierung (b). In Spektrum a) überlagern sich vermutlich die Signale sowohl der Na- ($M+23$) als auch der K-Addukte ($M+39$).

Ein überraschendes Ergebnis erbrachte die massenspektrometrische Analyse beider Probenge-mische mittels MALDI-TOF-MS (Abb. 3-43). Die DS-Werte der Oligomerfraktionen sind hier höher als die bei der FAB-MS-Analyse ermittelten. Erstaunlicherweise bewegen sich die Werte für die Methylglycoside im gleichen Rahmen wie die der quartärnierten Oligomere. Letztere zeigen jedoch einen deutlichen Drift zu höheren DS-Werten mit steigendem DP (Tab. 3-30).

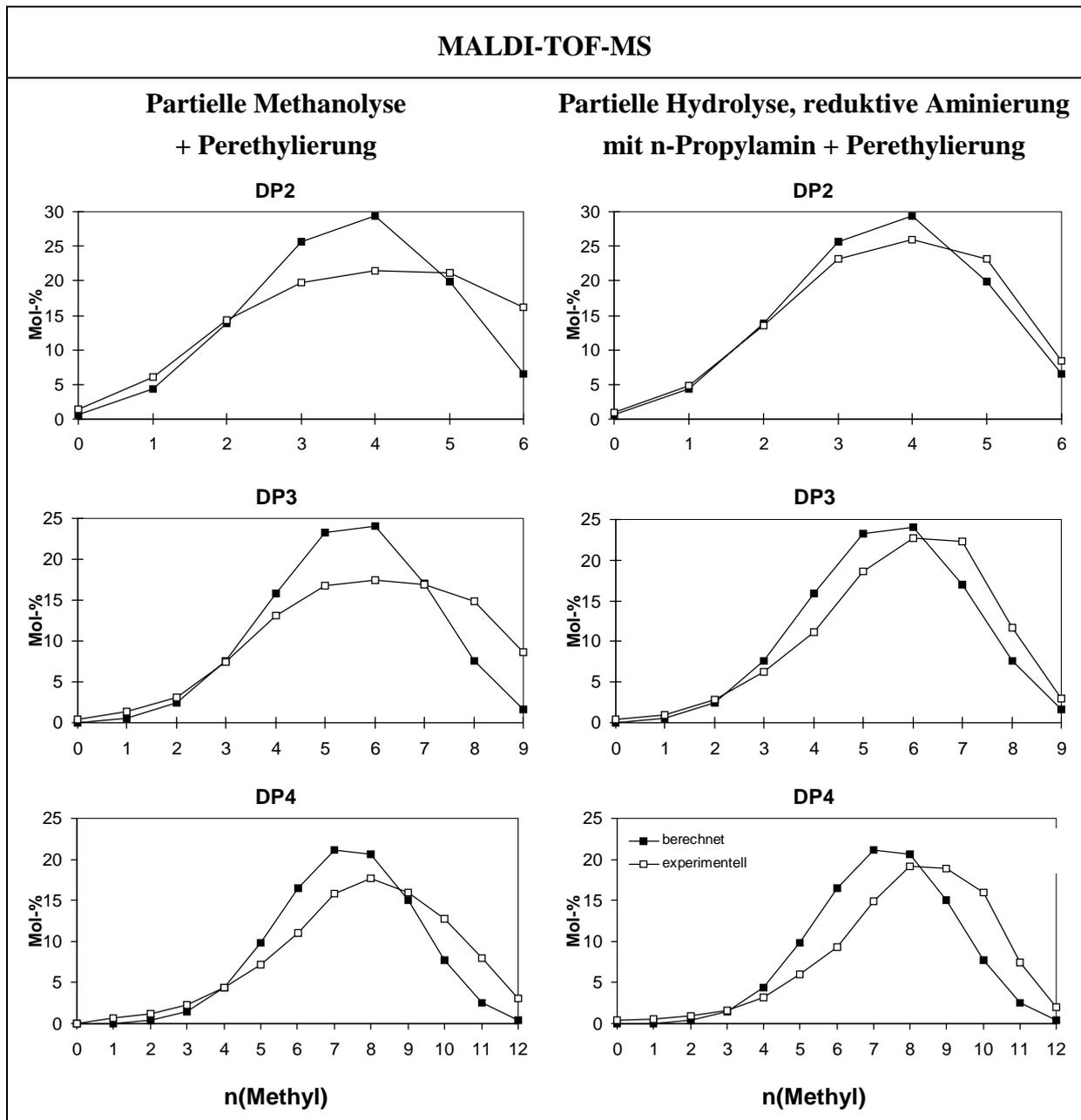


Abb. 3-43: Relative Zusammensetzung der mittels MALDI-TOF-MS analysierten Oligomerfraktionen (DP 2-4) von perethylierter MC10 (DS 1.82) nach partieller Methanolyse und anschließender Perethylierung (a) bzw. nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und anschließender Perethylierung (b). Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomierzusammensetzung berechneten Verteilung.

Tab. 3-30: Vergleich des DS in Abhängigkeit vom DP der durch MALDI-TOF massenspektrometrisch analysierten Oligomerfraktionen von perethylierter **MC10** nach partieller Methanolyse und Perethylierung und nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit n-Propylamin und anschließender Perethylierung.

Methode	Partielle Methanolyse und Perethylierung	Partielle Hydrolyse, reduktive Aminierung mit n-Propylamin und Perethylierung
DP	DS	DS
2	1.91	1.86
3	1.95	1.92
4	1.95	1.99

Um die Frage, was zu den qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlichen Ergebnissen der FAB-MS- und MALDI-TOF-MS-Analyse führte, beantworten zu können, sollen hier noch einmal die Grundlagen der FAB- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie dargestellt werden. Das Prinzip der FAB-MS beruht auf dem Beschuß einer flüssigen Matrix, in der die Probenmoleküle gelöst sind, mit beschleunigten Atomen (Xe oder Cs-Ionen). Dabei wird die Matrix versprüht, und die freigesetzten Verbindungen werden als positive oder negative Ionen, häufig als Natrium- oder Kaliumionenaddukte (Kohlenhydrate) im Massenanalysator registriert. Für unpolare Verbindungen wie Zuckeroligomere und deren methylierte oder acetylierte Derivate erwies sich 3-Nitrobenzylalkohol mit Zusatz von Natriumiodid als geeignete Matrix.

Da hier die Löslichkeit der Probenmoleküle in der Matrix eine entscheidende Rolle spielt, haben die zu geringen Methyl-DS-Werte für gemischt methylierte und ethylierte Cellooligomerfraktionen bei der FAB-MS-Analyse ihre Ursache möglicherweise in der unterschiedlichen Polarität der Analyten. So haben Naylor *et al.*¹⁴³ den Einfluß der Polarität von Peptiden und Proteinen untersucht. Danach reichern sich hydrophobere Moleküle an der Oberfläche der üblicherweise polaren Matrix an und werden deshalb besser desorbiert und detektiert. Das gleiche Phänomen ist möglicherweise für die bessere Desorption höher ethylierter und damit hydrophoberer Cellooligomere verantwortlich. Die Quartärnisierung kann die Polaritätsunterschiede zwar ein wenig vermindern, es reicht aber nicht zur Eliminierung des Oberflächeneffektes und der Diskriminierung höher methylierter Cellooligomermoleküle aus. In diesem Zusammenhang wäre zu überlegen, ob nicht die Einführung einer weiteren Ammoniumverbindung am nichtreduzierenden Ende der Oligomere diese Unterschiede noch besser ausgleichen könnte.

Das Prinzip der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation unterscheidet sich grundlegend von der FAB-Ionisation. Hier ist es wichtig, vereinzelte Probenmoleküle zu haben, die sich auskristallisiert in einem 10^3 - 10^4 -fachen Überschuß der Matrixsubstanz befinden. Die Matrix hat hier vier Funktionen: (i) Aufnahme der Laserenergie und damit Schutz der Probe vor photolytischer Zerstörung, (ii) Übertragung der Energie auf die Probe, die zur Desorption nötig ist, (iii) Übertragung von Protonen zur Ionisierung und (iv) Reduktion der Wechselwir-

kung der Probenmoleküle untereinander. Als sehr gute Matrix für die Analytik unpolarer Proben hat sich α -Cyano-4-hydroxymethylsäure erwiesen. Durch Zugabe von NaI lassen sich wie bei der FAB-MS Kalium-Adukte unterdrücken.

Die zu hohen Methyl-DS-Werte für gemischt methylierte und ethylierte Cellooligomere bei der MALDI-TOF-MS-Analyse haben ihre Ursache möglicherweise in der Probenpräparation, da hier die Einbettung der Probenmoleküle in der kristallinen Matrix sehr wichtig ist. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit von Matrix und Probenmoleküle, wurde zunächst die Matrix auf den Probenteller aufgebracht und danach die gelösten Cellooligomere. Somit war die Matrix möglicherweise nur mit einem organischen Film überzogen und dadurch die geforderte Vereinzelung der Moleküle nicht gewährleistet. Wenn zusätzlich die hydrophoberen Komponenten stärker aggregiert waren, dann erklärt das deren schlechtere Desorption und damit den zu hoch ermittelten Methyl-DS.

Vielleicht ermöglicht die ESI-MS-Technik (Electrospray-Ionisation), die ohne Matrices auskommt, die Lösung der Quantifizierungsprobleme der Massenspektren von gemischt methylierten und ethylierten Cellooligomeren.

Am Beispiel der nach partieller Methanolyse von perdeuteromethylierter **MC10** erhaltenen Cellooligomere wurde diese Methode zur massenspektrometrischen Oligomeranalyse verwendet. Abb. 3-44 zeigt die exzellente Übereinstimmung der mittels FAB- und ESI-MS ermittelten Daten.

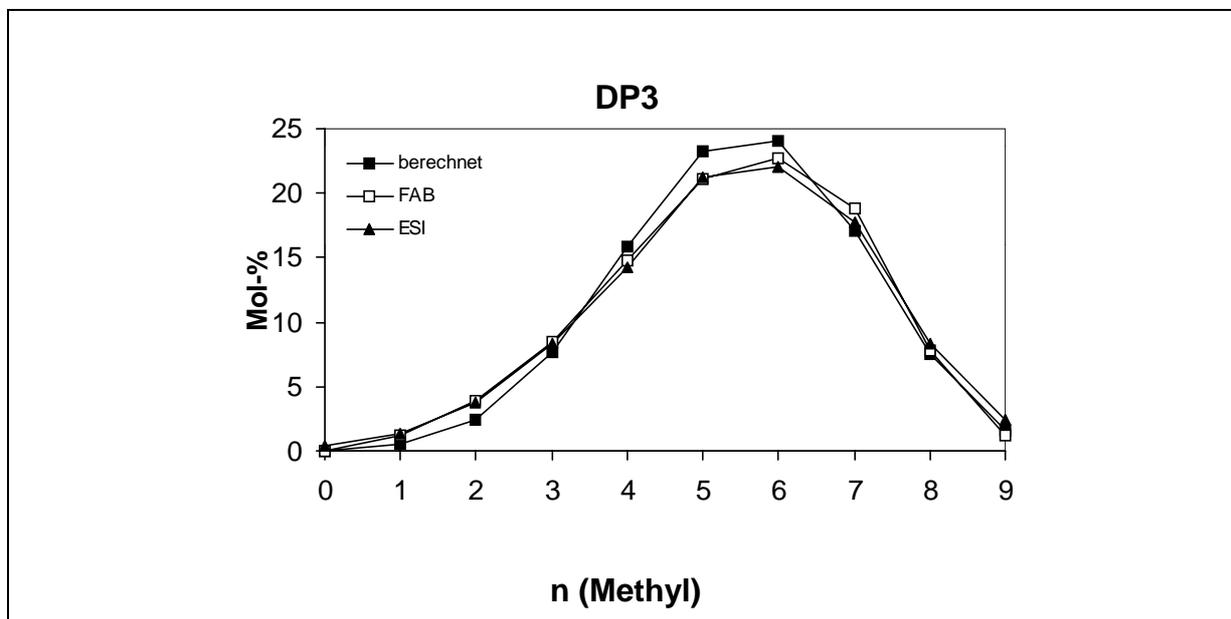


Abb. 3-44: Relative Zusammensetzung der mittels FAB-MS und ESI-MS analysierten Oligomerfraktion (DP 3) von perdeuteromethylierter **MC10** (DS 1.82) nach partieller Methanolyse und anschließender Deuteromethylierung. Vergleich der experimentellen Daten mit der nach der Bernoulli-Statistik aus der Monomerzusammensetzung berechneten Verteilung.

3.1.4.4 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Labeling für die massenspektrometrische Analyse haben gezeigt, daß die reduktive Aminierung partiell hydrolysierter Cellooligomere mit anschließender Quartärnisierung durch Peralkylierung durchführbar ist. Für gemischt methylierte und deuteromethylierte Oligomere findet man eine ausgezeichnete Übereinstimmung der experimentellen Daten. Die Massenspektren gemischt methylierter und ethylierter Oligomere liefern bisher noch keine quantitativ auswertbaren Daten. In der FAB-MS werden die hoch methylierten in der MALDI-TOF-MS die niedrig methylierten Verbindungen diskriminiert. Diese wahrscheinlich auf Matrixeffekte zurückzuführenden Probleme kann möglicherweise die ESI-MS, die ohne Matrix auskommt, überwinden.

3.2 Analytische Bestimmung von Peeling- und Oxidationsprodukten in Ethylcellulose

Ethylcellulosen haben ein breites Anwendungsspektrum. Sie finden hauptsächlich als filmbildende und filmverbessernde Additive in Lacken, Beschichtungen und Tinten Verwendung³⁴. Eine weitere Applikation ist der Zusatz in Medikamenten als Tablettiermittel. Hier gelten strenge Anforderungen an die Produktqualität, da es bei unterschiedlichem Quellverhalten von Medikamenten zu lebensbedrohlichen Situationen kommen kann.

3.2.1 Problemstellung

Es standen zwei Ethylcellulosen **EC1** und **EC2** zur Verfügung, die für den pharmazeutischen Einsatz bestimmt waren. Sie zeigten in der Anwendung ein unterschiedliches Verhalten auf, das mit den industriell eingesetzten analytischen Methoden nicht faßbar war. Der Ethyl-DS beider Proben war identisch (DS = 2.5). Der Gehalt an carboxylischen Gruppen in den Proben könnte jedoch die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten sein. Er beträgt je nach Herstellungsprozeß 8-30 mmol/kg für Chemiezellstoffe und 20-300 mmol/kg für Papierzellstoffe¹⁴⁴ und ist daher von entscheidender Bedeutung für die Verwendungsfähigkeit der Cellulosen als Rohstoff industrieller Produkte.

Es sollte daher untersucht werden, in welcher Menge und von welcher Art die sauren Gruppen in diesen Ethylcellulosen sind.

Es ist schon sehr lange bekannt, daß es bei der alkalischen Behandlung von Polysacchariden zum Kettenabbau, dem sogenannten „Peeling“ kommt. Dabei wird z.B. die Cellulose über Umlagerungs- und Eliminierungsreaktionen abgebaut. Der Kettenabbau stoppt dann unter Bildung carboxylgruppenhaltiger Endgruppen (siehe unten Abb. 3-45 und Abb. 3-46).

Machell und Richards untersuchten Cellulose, die mit Natronlauge behandelt worden war, und schlugen den Mechanismus der Stoppreaktionen, die zur Bildung alkalistabiler Aldonsäuren führen, vor²⁰. Johansson und Samuelson formulierten den Mechanismus der Bildung von 2-C-Methyl-glycerinsäure. Sie isolierten die während der Alkalibehandlung von Cellulose gebildeten Säuren nach Hydrolyse mittels Ionenaustausch-Chromatographie^{21,145}. Tab. 3-31 zeigt die Ergebnisse ihrer Untersuchungen.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-31: Relatives molares Verhältnis der ionenchromatographisch isolierten Aldonsäuren alkali-behandelter Cellulosehydrolysate (nach Johansson und Samuelson^{21,145}).

Aldonsäure	Mol-%	
	A ¹	B ²
3-Desoxy- <i>ribo</i> -hexonsäure	31.0	24.7
3-Desoxy- <i>arabino</i> -hexonsäure	32.5	19.6
2-C-Methylglycerinsäure	29.7	24.9
Arabinonsäure	1.5	8.1
Ribonsäure	n.b.	0.4
2-Desoxy-erythronsäure	n.b.	6.3
2-Desoxy-threonsäure	n.b.	3.6
Gluconsäure	1.5	4.9
Mannonäure	0.3	0.8
Erythronsäure	2.4	4.7
Threonsäure	n.b.	0.4
2-C-Methylribonsäure	1.1	1.0
2-C-Methylarabinonsäure	n.b.	0.6

¹ Mit heißer Natronlauge behandelte Baumwoll-Cellulose.

² Mit heißer Natronlauge behandelte Baumwoll-Cellulose, die vorher in 0.05 M H₂SO₄ gekocht wurde („Hydrocellulose“).

3-Desoxy-*ribo*-hexonsäure, 3-Desoxy-*arabino*-hexonsäure und 2-C-Methylglycerinsäure stellen die Hauptprodukte der Stoppreaktionen des alkalischen Kettenabbaus dar, deren Bildungsmechanismus in den folgenden Abbildungen gezeigt ist. Die Bildung der 2-C-Methylglycerinsäure wird durch zwei *de Bruyn-van Ekenstein*-Umlagerungen zur 4-*O*-verknüpften D-*Ribo*-hex-3-ulose initialisiert. Es erfolgt dann zunächst eine Retro-Aldol-Spaltung, an die sich eine β -Eliminierung anschließt. Das zur Diketose tautomerisierte Produkt lagert sich über eine Benzilsäureumlagerung zur 3-*O*-verknüpften 2-C-Methylglycerinsäure um (Abb. 3-45).

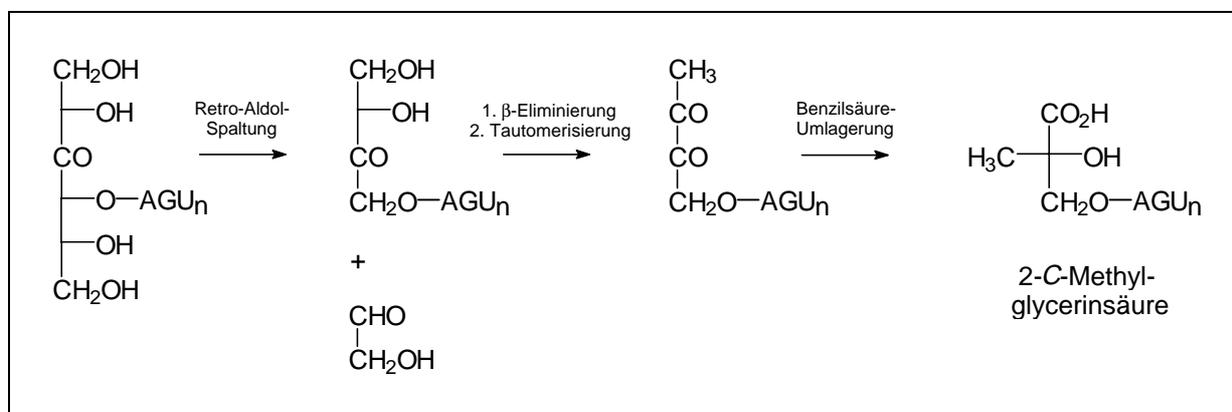


Abb. 3-45: Bildung von 2-C-Methylglycerinsäure bei der Behandlung von Cellulose in heißer Natronlauge²¹

3 Spezieller Teil

Bei der Bildung von 3-Desoxyhexonsäuren beginnt die Peelingreaktion zunächst ebenfalls mit einer *De Bruyn-van Ekenstein*-Umlagerung, der eine β -Eliminierung aus Position 3 folgt. Nach Tautomerisierung zur 4-*O*-verknüpften 3-Desoxy-D-*glycero*-hexos-2-ulose führt wiederum eine Benzilsäureumlagerung zum 4-*O*-verknüpften Produkt in der *ribo*- und *arabino*-Konformation, womit der Kettenabbau stoppt.

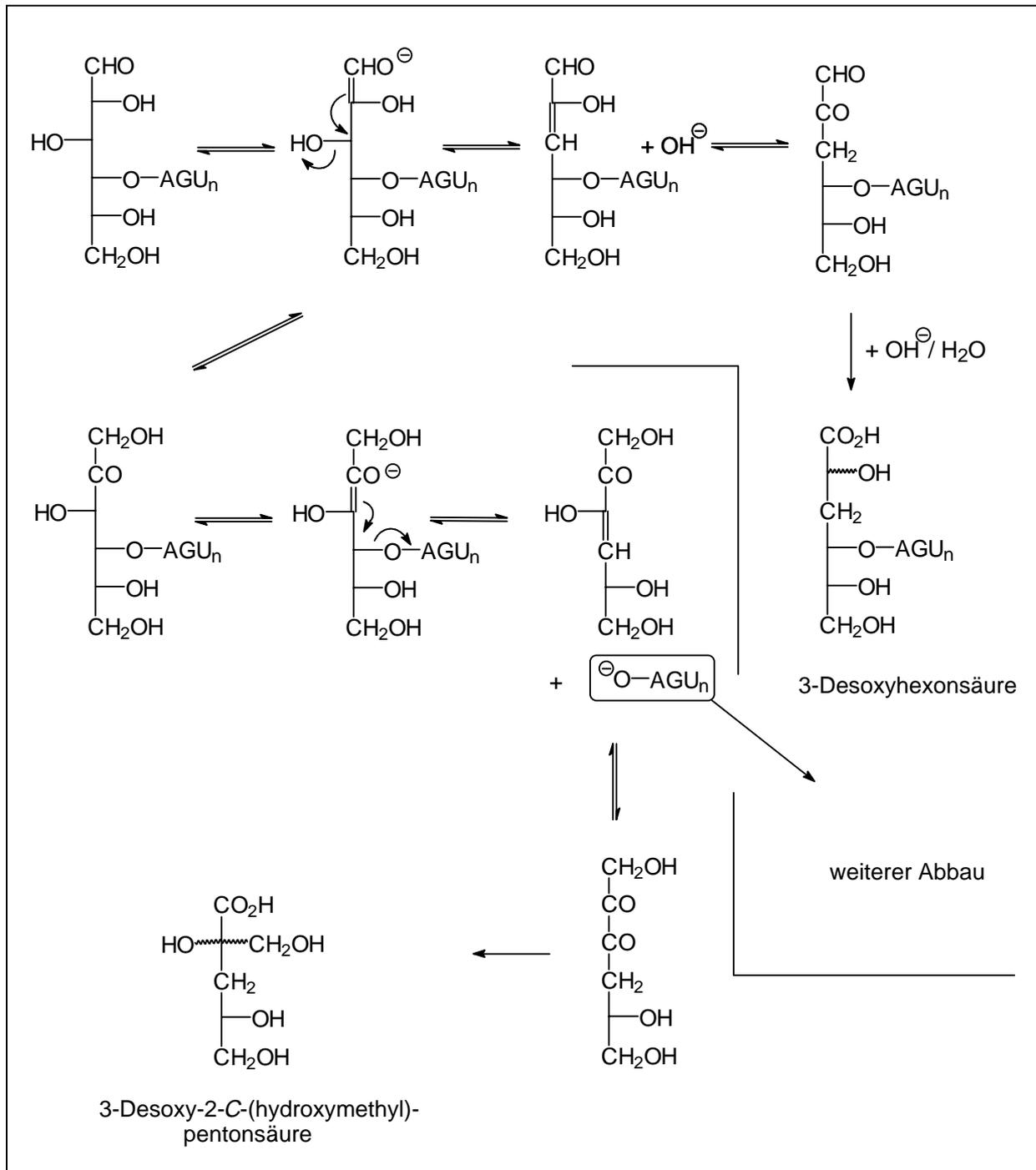


Abb. 3-46: Bildung von 3-Desoxyhexonsäuren und 3-Desoxy-2-C-(hydroxymethyl)-pentonsäuren beim Peeling von Cellulosen in alkalischem Medium²⁰.

3.2.2 Analytische Ansätze

Das Problem bei der Bestimmung der sauren Endgruppen von Ethylcellulosen lag in der geringen Menge der zu analysierenden Komponenten, die nur einen Bruchteil des Polymers ausmachen. Eine simultane Analyse mittels GC, die nach säurehydrolytischem Abbau und anschließender Perethylierung möglich wäre, schied deshalb wegen der stark unterschiedlichen Mengenverhältnisse aus.

Eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Aldonsäuren neben Zuckermonomeren hat Lehrfeld entwickelt¹⁴⁶, wobei der entscheidende Schritt die Darstellung der n-Propylamide der Aldonsäuren ist, die sich jedoch nur aus den Lactonen bilden. Diese Methode war nicht anwendbar, da die kurzkettigen Aldonsäuren keine Lactone bilden können und die Lactonbildung durch den hohen *O*-Ethylierungsgrad behindert ist. Es galt daher, die Aldonsäuren von den Glucoseeinheiten abzutrennen und anzureichern. Es bot sich zunächst der Analysengang an, den Johansson und Samuelson entwickelt hatten:

- Hydrolyse der Ethylcellulose
- Binden der Aldonsäuren an einem Anionenaustauscher
- Abtrennen der Neutralzucker
- Freisetzen der Aldonsäuren.

3.2.2.1 Hydrolyse - Ionenaustauscher - TMS-Derivatisierung - GC (EC1)

Es wurde daher versucht, durch Hydrolyse der Ethylcellulose und Ionenaustausch die Säuren zu isolieren (Abb. 3-47).

Ein erster Versuch wurde mit 20 g Ethylcellulose (**EC1**) durchgeführt. Sie wurde unter Rückfluß mit 4.7 N TFA 5 d unter Rückfluß hydrolysiert. Nach Entfernung der wäßrigen Säure wurde der Rückstand wieder in Wasser aufgenommen und über Nacht mit einem starken Anionenaustauscher in der Hydrogencarbonat-Form gerührt. Dabei verdrängen die Säurekomponenten unter CO₂-Entwicklung das Hydrogencarbonat und werden in Form ihrer Carboxylate zurückgehalten. Überschüssiges Hydrogencarbonat wurde dann durch Zugabe von Essigsäure als CO₂ freigesetzt. Anschließend wurde der Ionenaustauscher in eine Säule gefüllt und die Neutralzuckerfraktion durch Spülen mit Wasser abgetrennt. Es wurde solange mit Wasser gespült, bis dünnschichtchromatographisch kein Zucker mehr nachweisbar war. Der mit den sauren Komponenten beladene Anionenaustauscher wurde in eine Säule gegeben, die bereits mit einigen Millilitern des gleichen Anionenaustauschers in der Acetat-Form befüllt war. Es wurde mit 0.2 N Natriumacetat-Lösung eluiert und die eingeeengten Fraktionen anschließend über einen stark sauren Kationenaustauscher in die Säureform überführt. Nach Entfernung der

dabei entstandenen Essigsäure erhielt man 353.3 mg (1.8 %) Rückstand. Die so gewonnenen Säuren wurden in ihre TMS-Derivate überführt und gaschromatographisch untersucht.

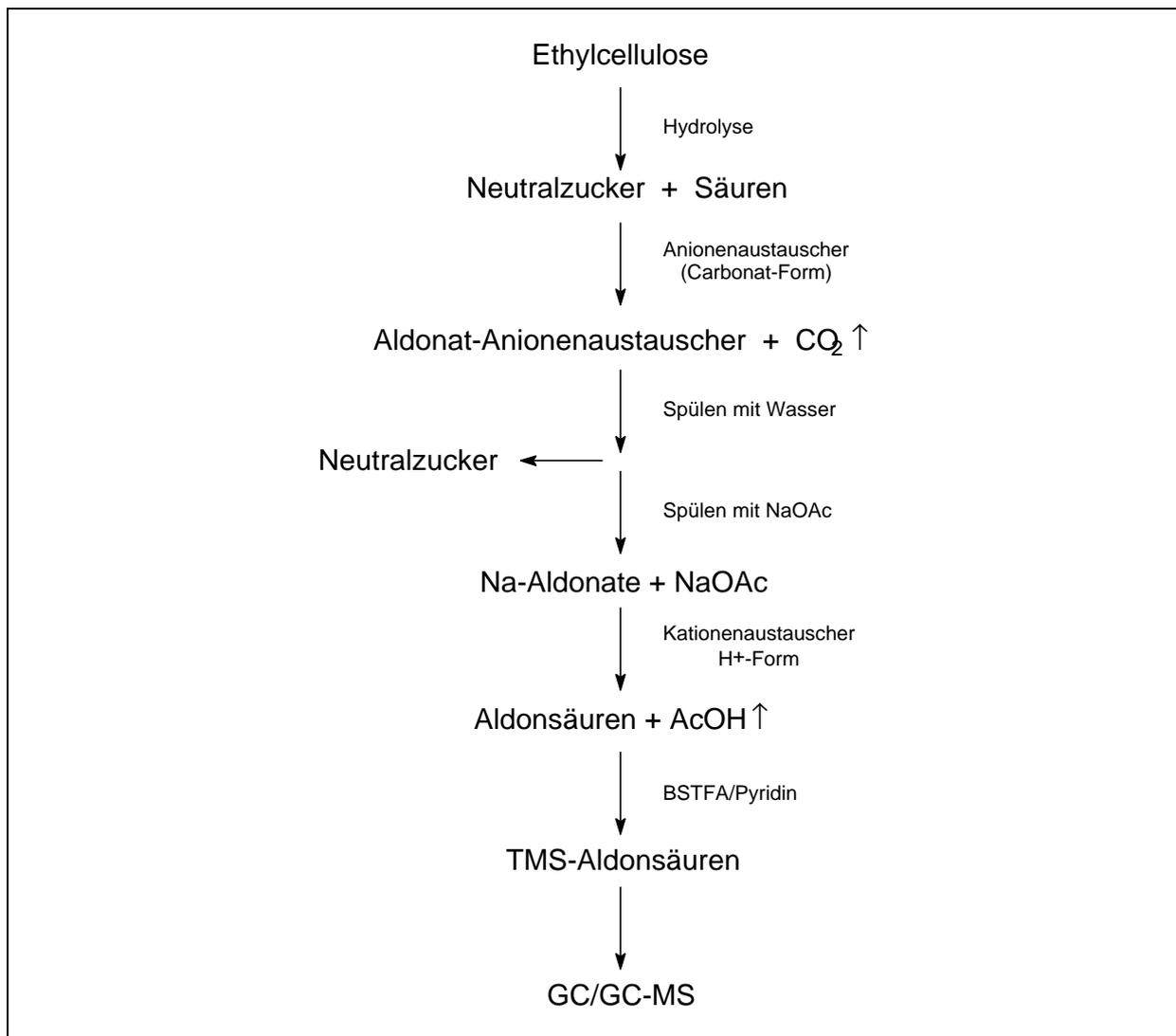


Abb. 3-47: Analysengang der Isolierung von Aldonsäuren aus Ethylcellulose nach Johansson und Samuelson²¹.

Die Chromatogramme wiesen eine Vielzahl von Produkten auf, von denen nur einige wenige identifiziert werden konnten. Dabei handelte es sich meist um Lävulinate der Aldonsäuren. Die erwarteten Hauptkomponenten konnten nur in Spuren identifiziert werden. Des weiteren ist die Interpretation von gemischt ethylierten und trimethylsilylierten Aldonsäuren, die, wie bereits erwähnt, zum Teil in der Form ihrer Lävulinate vorliegen außerordentlich schwierig. Zudem liegen Aldonsäuren bei ausreichender Kettenlänge in Form ihrer γ - oder δ -Lactone vor, was im Falle der längerkettigen Aldonsäuren die gaschromatographische Analyse noch zusätzlich erschwert. Im Produktgemisch wurden auch noch große Mengen an partiell ethylierten und trimethylsilylierten Glucosen gefunden.

In einem zweiten Ansatz wurden 4.9 g **EC1** eingesetzt und zunächst stufenweise hydrolysiert. Dazu „löste“ man die Probe bei RT in konzentrierter TFA, verdünnte auf ca. 9.5 N TFA und kochte unter Rückfluß für 1 h. Dann wurde erneut auf ca. 2.7 N TFA verdünnt und weitere 2 h unter Rückfluß hydrolysiert¹⁴⁷. Man erhielt 4.73 g Neutralfraktion und 85.5 mg (1.8 %) Säurefraktion. Der Masseverlust ist auf säurehydrolytische Abbaureaktionen zurückzuführen. Die gaschromatographische Analyse der so gewonnenen Säurefraktion ergab deutlich niedrigere Anteile an Neutralzuckern, die erwarteten Hauptkomponenten konnten aber auch hier nur in Spuren nachgewiesen werden. Es wurde daher ein alternativer Analysenweg entwickelt.

3.2.2.2 Methanolyse - Perethylierung - Verseifung - Isolierung der Säurekomponenten (EC1+2)

Das Ziel war hier, sowohl ein schonendes Abbauverfahren anzuwenden, um den Materialverlust durch säurehydrolytische Abbaureaktionen und die Bildung von Lävulinsäure zu vermeiden, als auch die Zahl der Analyten, die durch die nicht vollständige Ethylierung der Ethylcellulose vorgegeben ist, zu minimieren.

Zur Depolymerisation der Ethylcellulose wurde daher die Methanolyse gewählt. Man setzt dabei das Polymer sowohl niedrigeren Temperaturen und Säurekonzentrationen als auch kürzeren Reaktionszeiten aus. Zudem löst sich die im Vergleich zur Methylcellulose hydrophobere Ethylcellulose besser als in wäßriger Säure. Durch Bildung von Methylglucosiden bei der Methanolyse ist die Carbonylfunktion als Vollacetal geschützt, wodurch durch Tautomerie eingeleitete Abbauprozesse unterbunden werden. So sollten die Bildung von HMF und das Entstehen der Lävulinsäure deutlich reduziert sein. Die nun vorliegenden partiell ethylierten Methyl-D-glucoside und partiell ethylierten Methylester der Säuren werden im zweiten Schritt perethyliert. Damit reduziert man die Zahl der zu analysierenden Abbauprodukte entscheidend. Es entstehen die perethylierten Methyl-D-glucoside und die perethylierten Säurekomponenten, wobei die Methyl- in die Ethylester überführt werden. Zur Vermeidung von Säureverlusten durch Verseifung wurde die Aufarbeitung in einem Überschuß Phosphatpuffer (pH 6.8) durchgeführt. Die Anreicherung der Säurekomponenten erfolgte durch Verseifung der perethylierten Abbauprodukte in ethanolischer KOH und anschließende Extraktion der perethylierten Methylglucoside nach vorheriger Entfernung des Ethanols und Aufnehmen des Rückstands in Wasser. Durch Ansäuern der wäßrigen Phase werden die perethylierten Carboxylate in die freien Säuren überführt und können mit Dichlormethan extrahiert werden. Die Identifikation und Quantifizierung der Säurekomponenten erfolgte nach Überführung in die Ethyl-, Methyl- oder Trimethylsilylester mittels GC und GC/MS (Abb. 3-48).

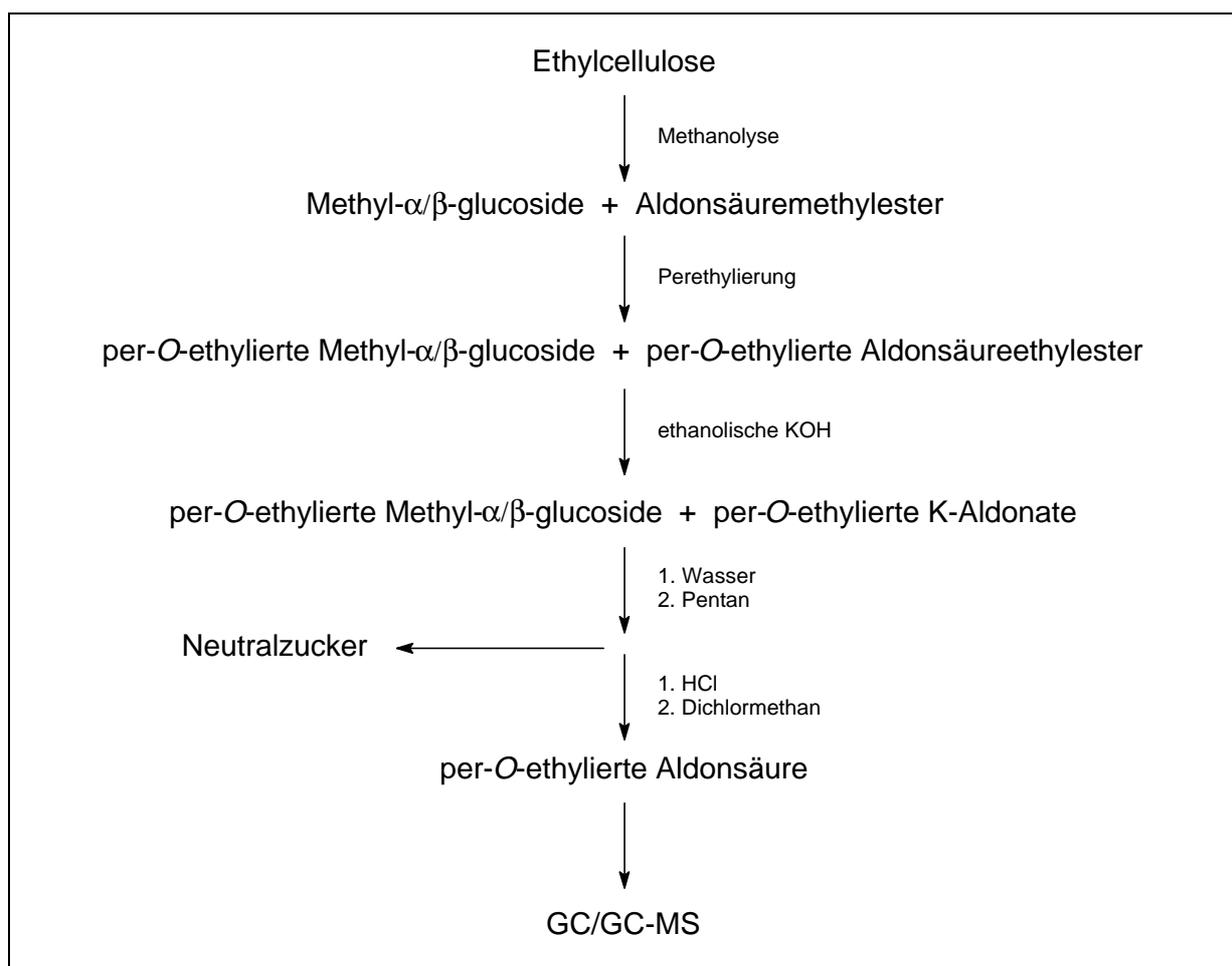


Abb. 3-48: Alternativer Analysengang zur Isolierung von Säurekomponenten aus Ethylcellulosen.

Durch die Verseifung der Ethylester und die anschließende Extraktion der Methylglucoside gelingt die Trennung der neutralen von den sauren Komponenten und ermöglicht die Identifikation und Quantifizierung der carboxylhaltigen Endgruppen in Ethylcellulosen.

3.2.2.3 Synthese von Modellsubstanzen

Die Identifikation der Säuren erfolgte durch Vergleich der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analyse mit Standardsubstanzen.

Die perethylierten Aldonsäuren wurden aus den Lactonen der Erythronsäure, Threonsäure, Ribonsäure, Arabinonsäure, Mannonsäure und Gluconsäure durch basische Ethylierung in DMSO mit NaOH hergestellt. Dabei ist zu bedenken, daß es zu Epimerisierung am α -Kohlenstoff kommt. Dies führt zum Auftreten deutlicher Anteile der entsprechenden perethylierten epimeren Aldonsäure¹⁴⁸, was die Bestimmung der Retentionszeiten jeweils beider Epimere erlaubte. Alkylierung in DMF mit NaH unterdrückt diesen Effekt stark¹⁴⁹.

Die beiden Diastereomeren der 3-Desoxyhexonsäure wurden durch *Kiliani*-Synthese aus 2-Desoxy-D-ribose hergestellt¹⁵⁰. Die Identifikation erfolgte massenspektrometrisch über die Trimethylsilylderivate der γ -Lactone (**23**)¹⁵¹ und der offenen Säureform (**24**)¹⁵² (Abb. 3-50).

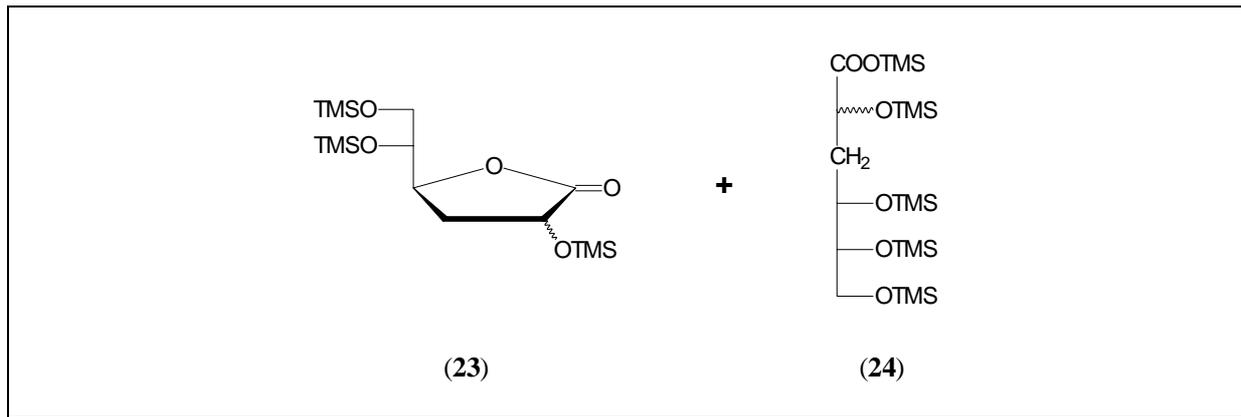


Abb. 3-49: Trimethylsilylderivate der 3-Desoxy-*arabino/ribo*-hexonsäuren.

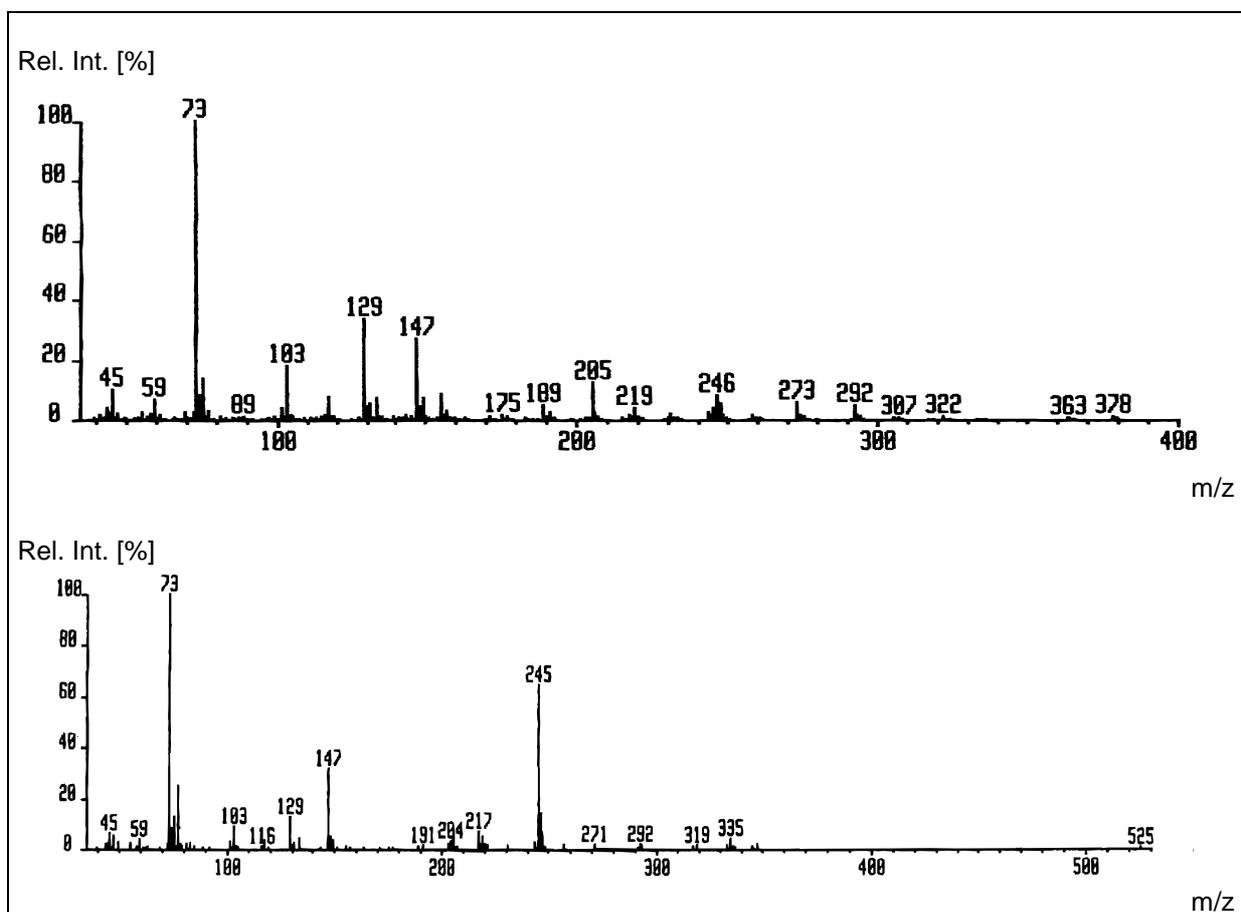


Abb. 3-50: EI-Massenspektren von **23** (oben) und **24** (unten).

2-Desoxy-D-gluconsäure (**25**) wurde durch alkalische Oxidation von 2-Desoxy-D-glucose unter Katalyse von Palladium-Aktivkohle hergestellt und mittels Retentionszeit der HPAEC-PAD-Analyse¹⁵³ identifiziert.

2-C-Methylglycerinsäure (**26**) und 2-Desoxy-D-ribonsäure (**27**) wurden von Muus im Rahmen ihrer Diplomarbeit dargestellt¹⁴⁹.

(Abb. 3-51) zeigt die erwarteten carboxylischen Hauptprodukte aus dem Analysengang 2:

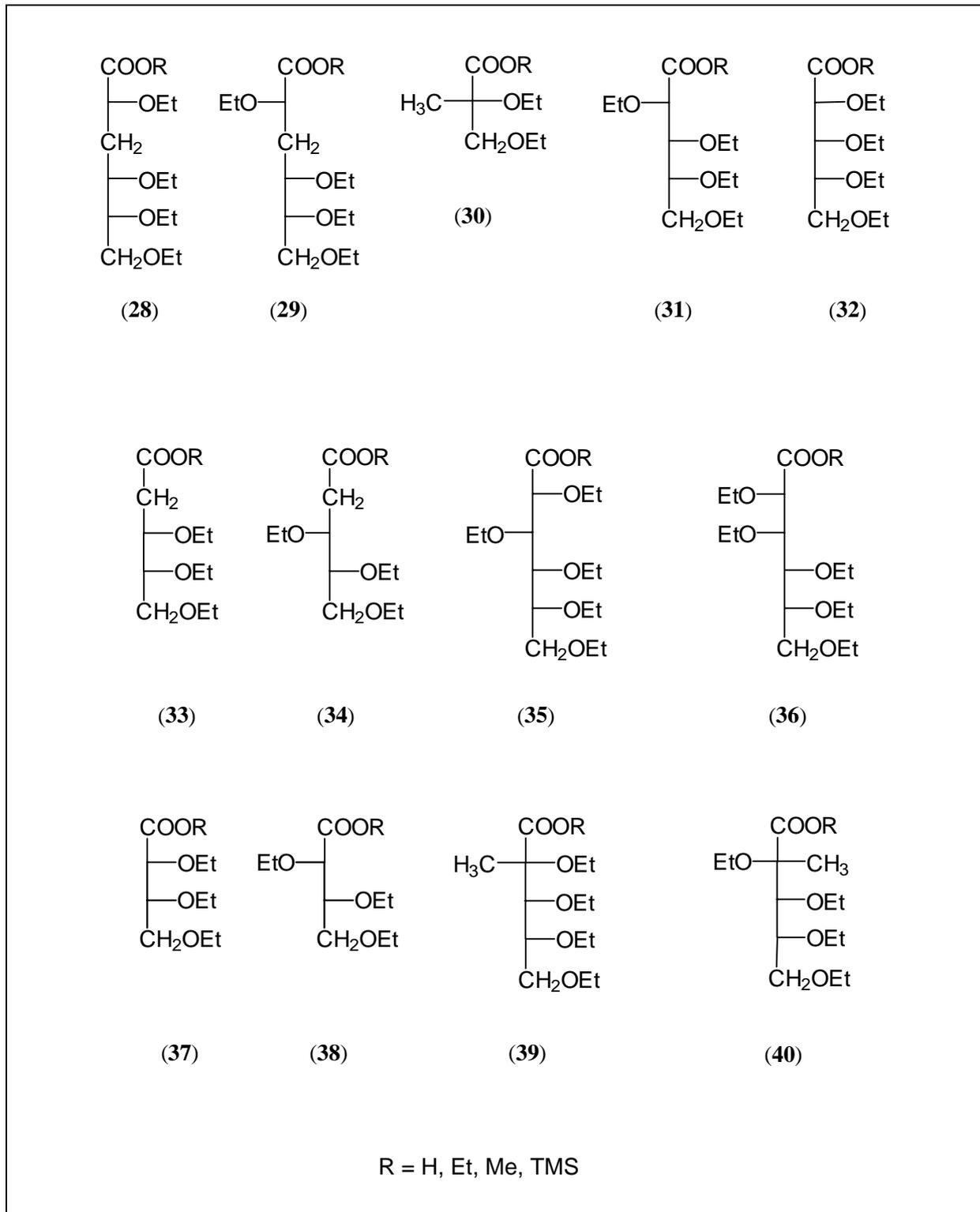


Abb. 3-51: Modellsubstanzen für die gaschromatographische Analyse saurer Endgruppen in Ethylcellulosen nach Methanolyse, Perethylierung, Verseifen, Isolierung der freien Säuren und Überführung in die jeweiligen Methyl- (-c), Ethyl- (-d) und Trimethylsilylester (-e).

Als Beispiel für unterschiedlich veresterte, perethylierte Aldonsäuren sind die EI-Massenspektren der entsprechenden 3-Desoxyhexonsäurederivate in Abb. 3-52 dargestellt. Man kann sehr deutlich die Fragmentationen erkennen, die noch den Säureester beinhalten, da sie eine

3 Spezieller Teil

Massendifferenz von 14 (Me- → Et-Ester), 58 (Me- → TMS-Ester) bzw. 44 (Et- → TMS-Ester) aufweisen. Das gilt in den hier dargestellten Massenspektren insbesondere für den Basispeak.

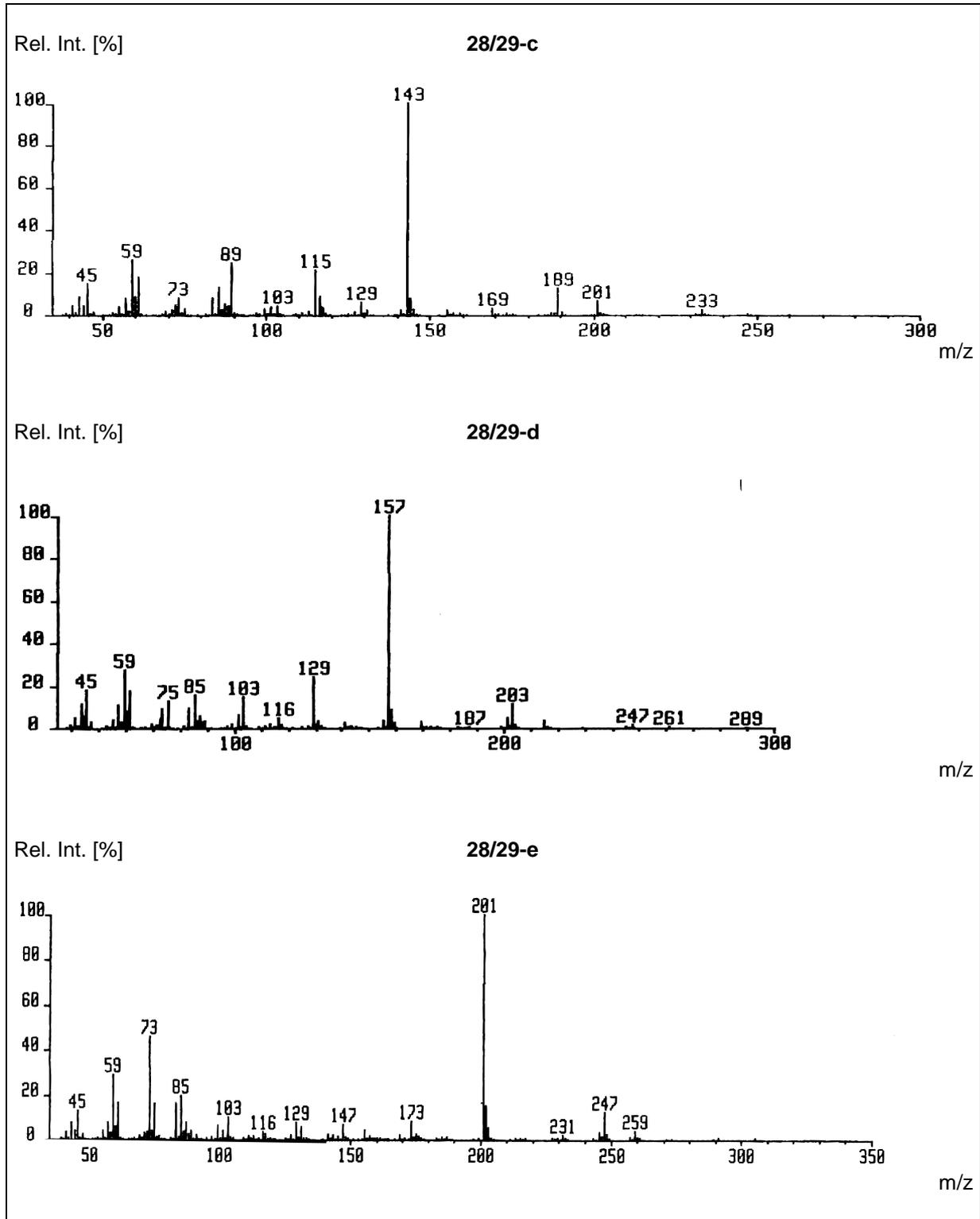


Abb. 3-52: EI-Massenspektren von perethylierter 3-Desoxy-hexonsäure als Methyl- (**28/29-c**), Ethyl- (**28/29-d**) bzw. Trimethylsilylester (**28/29-e**).

Analog zu den eingehend untersuchten Fragmentierungen partiell methylierter Alditolacetate erfolgt die Primärsplattung bevorzugt zwischen zwei Ethoxylgruppen tragenden Kohlenstoffatomen, wobei sich beide Molekülionen bilden können. Aus diesen Molekülionen entstehen dann weitere Sekundärfragmente hauptsächlich durch Eliminierung von Ethanol (-46).

Abb. 3-53 zeigt am Beispiel von Trimethylsilyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*ribo*-hexonat (**28-e**) die Fragmentierung im Massenspektrometer.

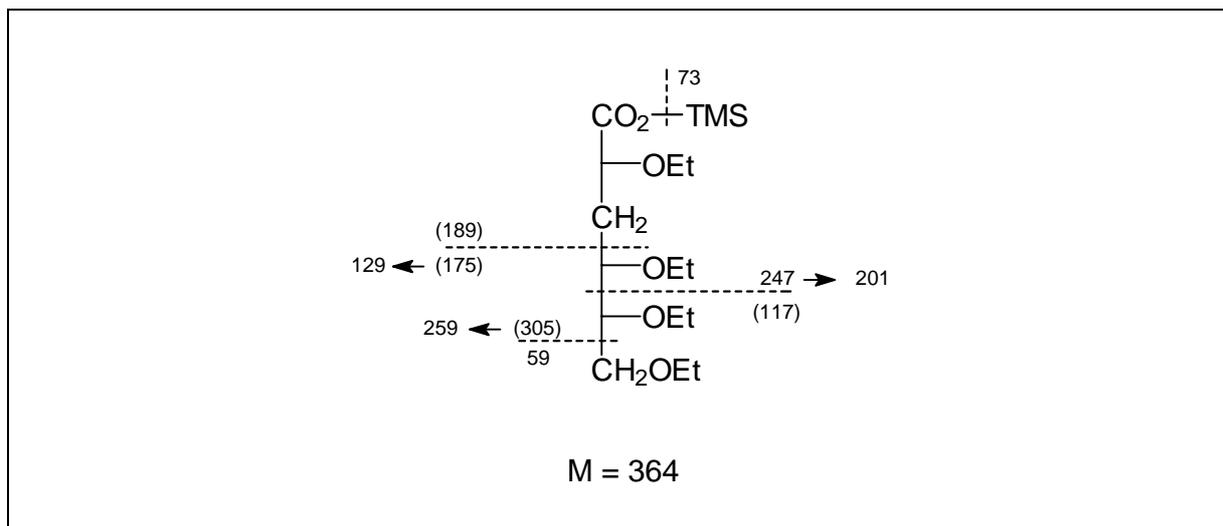


Abb. 3-53: Hauptfragmentierungswege von **28-e** im Massenspektrometer.

Das Hauptfragment ($m/z = 201$) entsteht als Sekundärion nach Ethanol-Eliminierung aus dem Primärfragment ($m/z = 247$), welches durch α -Spaltung zwischen C-4 und C-5 gebildet wurde.

3.2.3 Ergebnisse

Im folgenden ist das relative molare Verhältnis der aus **EC1** und **EC2** nach Methanolyse, Perethylierung, Verseifung und Abtrennung der Neutralzucker isolierten Säurekomponenten dargestellt. Die Analysen wurden parallel durchgeführt, um eine direkte Vergleichbarkeit zu erreichen.

In Tab. 3-32 sind die Ausbeuten für die Neutral- und die Säurefraktion angegeben. Für die Neutralfraktion wurde eine Wiederfindung von $\approx 80\%$ erreicht. Dies ist wahrscheinlich auf Zersetzung während der Hydrolyse, Verluste beim Waschen der organischen Phasen mit Wasser und während der Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck zurückzuführen.

Verluste an Säurekomponenten können während der basischen Ethylierung und während des Verseifungsschritts erfolgen. Der Ansatz wurde nach der Ethylierung in einen Überschuss von

Phosphatpuffer (pH 6.8) überführt. Der pH-Wert blieb stabil bei pH 6.8. Man kann also davon ausgehen, daß in diesem Schritt keine der Säurekomponenten durch eventuelle Verseifung verlorengegangen ist. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht.

Der Verseifungsschritt hingegen wurde mit den Modellsubstanzen perethylierte Glucose und 2,3,4,5,6-Penta-*O*-ethyl-D-gluconsäureethylester (**35-a**) überprüft. Nach Verseifung mit ethanolischer KOH, Entfernung des Ethanols, Extraktion der Glucose, Ansäuern der wäßrigen Phase und Extraktion mit Dichlormethan wurden jeweils 97-100 % der freien 2,3,4,5,6-Penta-*O*-ethyl-D-gluconsäure (**35**) wiedergefunden. Dieser Schritt ist also nicht kritisch.

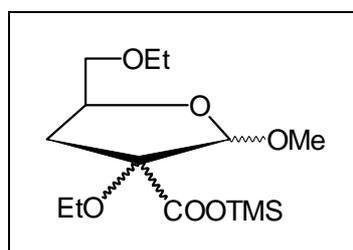
Verluste können somit nur aufgrund der Flüchtigkeit während der Konzentrierungs- und Waschschritte, wie oben bereits bei der Neutralfraktion erwähnt, erfolgen.

Tab. 3-32: Ausbeuten bei der Isolierung der Säurekomponenten in Ethylcellulose **EC1** und **EC2** nach Analysengang 2.

Ethylcellulose	Eingesetzte Menge	Neutralfraktion (Me-Glucoside)	Ausbeute	Säurefraktion (freie Säuren)
EC1	602 mg (2.6 mmol)	630 mg (2.06 mmol)	(79 %)	3.7 mg
EC2	302 mg (1.3 mmol)	312 mg (1.02 mmol)	(78 %)	2.1 mg

In Abb. 3-55 ist die gaschromatographische Analyse der aus **EC1** isolierten Säurekomponenten in Form der TMS-Ester dargestellt.

Neben den erwarteten Komponenten, wurde ein Hauptprodukt nachgewiesen, das von Muus als Methyl-3-desoxy-2,5-di-*O*-ethyl-2-trimethylsiloxycarbonyl- α/β -D-pentofuranosid (**41-e**) identifiziert wurde¹⁴⁹. Es ist ein Produkt, das möglicherweise durch Oxidation der Glucose



(**41-e**)

am C-2-Kohlenstoff und Folgereaktionen während der alkalischen Behandlung der Cellulose entsteht. Es bildet sich dabei unter Kettenbruch eine nicht-reduzierende Endgruppe^{154,155}. Den Entstehungsweg dieser Komponente zeigt Abb. 3-54:

Die dritte Leitsubstanz 2-*C*-Methylglycerinsäure konnte nur in ganz geringen Spuren gefunden und deshalb nicht quantifiziert werden¹⁵⁶. Der Verlust an dieser Komponente hängt sehr wahrscheinlich mit der hohen Flüchtigkeit des Derivats zusammen. Die Erfahrungen bei der Herstellung der Modellsubstanz legen dies nahe¹⁴⁹.

Eine Vielzahl der nur in geringen Anteilen erhaltenen Komponenten konnte bisher noch nicht zugeordnet werden. In Tab. 3-33 ist das Verhältnis der identifizierten Säurekomponenten aus **EC1** und **EC2** dar- und den Ergebnissen von Samuelson und Johansson gegenübergestellt¹⁵⁷.

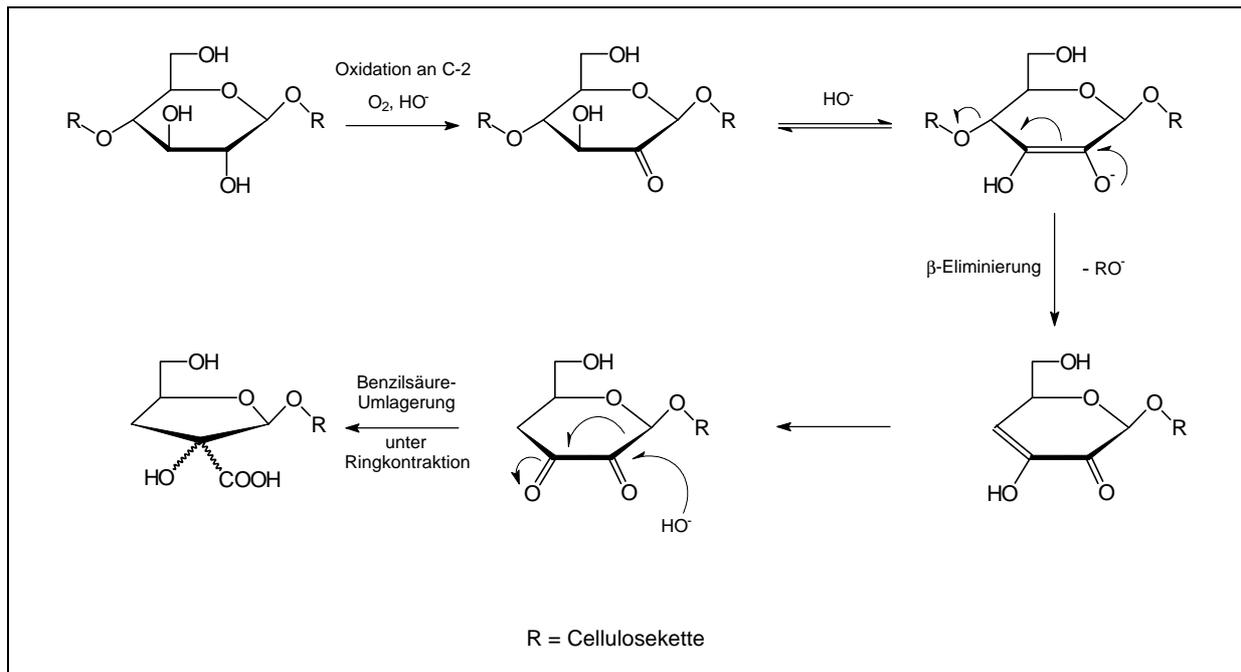


Abb. 3-54: Mögliche Oxidations- und Folgereaktionen, die zur Bildung von 2-Carboxy-3-desoxy- β -D-erythro/threo-pentofuranosid führen¹⁴⁹.

Es fällt auf, daß in den Ethylcellulosen im Vergleich zur Hydrocellulose die Pentonsäuren deutlich unterrepräsentiert sind. Zudem werden in den Ethylcellulosen (30-40 %) im Gegensatz zur Hydrocellulose (4-14 %) sehr hohe Anteile der jeweiligen epimeren Aldonsäuren gefunden. Dies mag auf den Perethylierungsschritt nach der Methanolyse zurückzuführen sein.

Die Desoxyaldonsäuren werden in allen Proben mit deutlich höheren Anteilen an Epimeren gefunden (36-47 %). Dies hat seinen Grund bereits im Peeling-Prozeß (s. Abb. 3-45 und Abb. 3-46).

Zwischen **EC1** und **EC2** lassen sich auch merkliche Unterschiede feststellen. So beträgt der Anteil an unverzweigten Desoxyaldonsäuren in beiden Proben 83 % der gesamten identifizierten Säurekomponenten. In **EC1** entfallen knapp 60 % in **EC2** hingegen ca. 70 % auf die 3-Desoxyhexonsäuren. Weiterhin sind in **EC1** die Tetronsäuren stärker vertreten, in **EC2** dafür stärker die Hexonsäuren.

Diese unterschiedliche Zusammensetzung der Säurekomponenten trägt möglicherweise zum Verhalten beider Proben bei.

Das Hauptprodukt Methyl-3-desoxy-2,5-di-O-ethyl-2-trimethylsiloxycarbonyl- α/β -D-pentofuranosid (**41-e**), das in Tab. 3-33 nicht einbezogen wurde, macht bei **EC1** 81 % und bei **EC2** 78 % der isolierten Säurefraktion aus. Die Proben unterscheiden sich hier nicht signifikant.

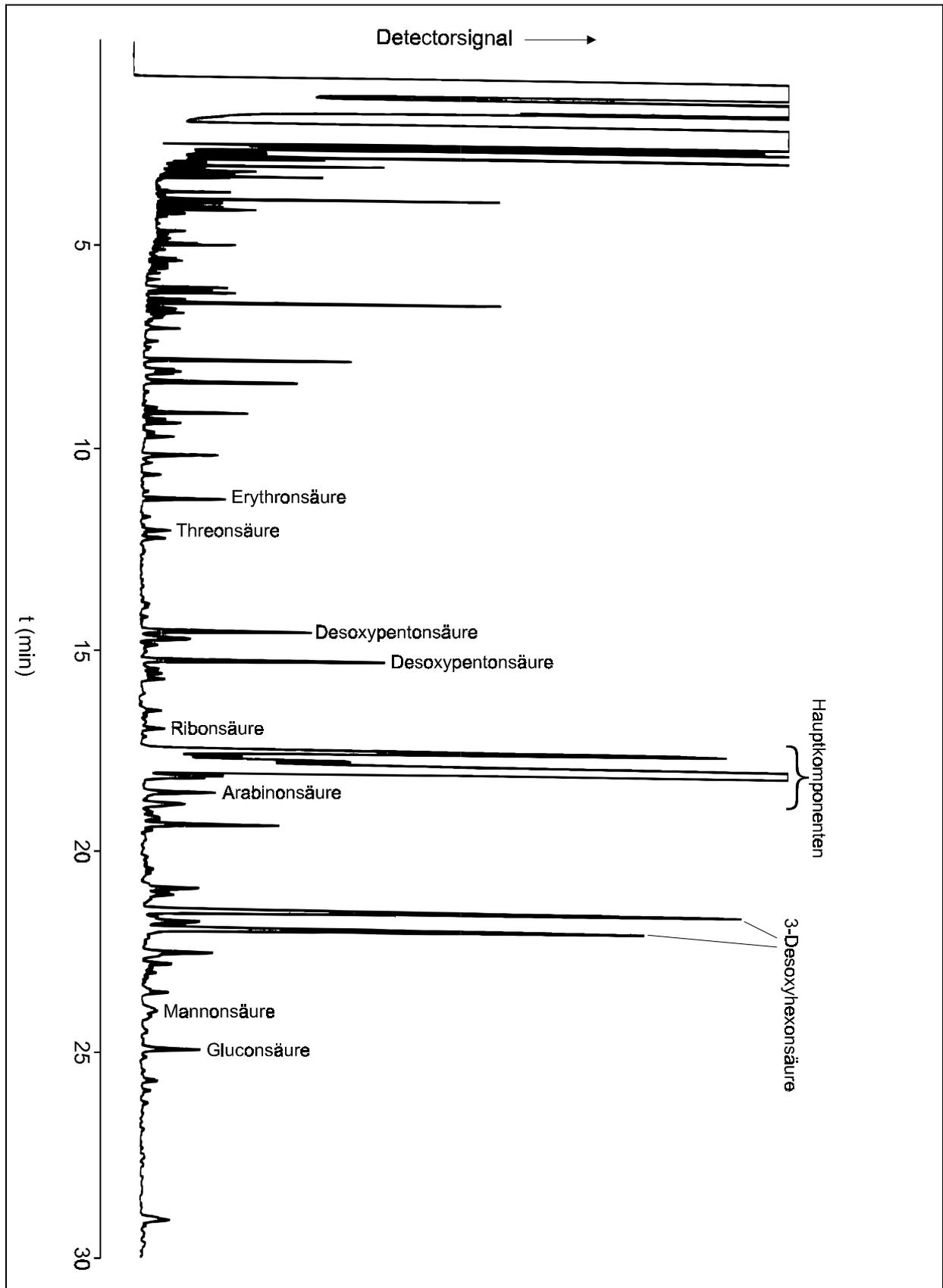


Abb. 3-55: Gaschromatographische Trennung der sauren Bestandteile von Ethylcellulose (EC1) nach Methanolysen, Perethylierung, Verseifung und Abtrennung der Neutralfraktion und anschließender Freisetzung der Komponenten. Gezeigt sind die Trimethylsilylester der perethylierten Säuren.

Tab. 3-33: Relatives molares Verhältnis der nach Analysengang 2 isolierten Säurekomponenten aus **EC1** und **EC2** (Trimethylsilylester) im Vergleich zu den Ergebnissen von Samuelson und Johansson¹⁴⁵.

Aldonsäure	EC1	EC2	Hydrocellulose ¹
3-Desoxy- <i>ribo</i> -hexonsäure	32.5	39.2	33.6
3-Desoxy- <i>arabino</i> -hexonsäure	28.8	32.3	26.7
Arabinonsäure	4.1	4.1	11.0
Ribonsäure	1.7	1.6	0.5
Desoxypentonsäure ²	12.4	7.2	8.6
Desoxypentonsäure ³	9.2	4.2	4.9
Gluconsäure	3.4	4.4	6.7
Mannonäure	1.4	2.1	1.1
Erythronsäure	4.5	2.8	6.4
Threonsäure	1.9	2.0	0.5

¹ Der Anteil der 2-C-Methylglycerinsäure wurde der Vergleichbarkeit wegen herausgerechnet.

² Vermutlich 2-Desoxy-*erythro*-pentonsäure.

³ Vermutlich 2-Desoxy-*threo*-pentonsäure

3.2.4 Zusammenfassung

Es konnte eine Analysenmethode entwickelt werden, die die carboxylhaltigen Komponenten in Ethylcellulosen erfaßt. Sie beinhaltet die Depolymerisation des Polymers durch Methanolyse mit anschließender Perethylierung des Methanolysats. Durch Verseifen der perethylierten Abbauprodukte und Extraktion der Neutralzucker erreicht man die Anreicherung und Trennung der Säurekomponenten von den Glucosen. Diese lassen sich durch Ansäuern und Extraktion in Form der freien Säuren gewinnen und in flüchtige Ester überführen, die dann mittels GC und GC-MS identifiziert werden können.

Der Polymerabbau durch Methanolyse vermindert weitgehend die Bildung von Lävulinsäuren und der Perethylierungsschritt ist hilfreich, um sowohl das Entstehen von Estern zwischen den Säurekomponenten als auch die Bildung von Lactonen der längerkettigen Aldonsäuren zu unterdrücken. Dabei ist die Ethylierung in DMF mit NaH als Base der Methode von Ciucanu und Kerek (DMSO/NaOH) zur Unterdrückung der Epimerbildung vorzuziehen¹⁴⁹.

Problematisch hingegen ist der Substanzverlust über die Vielzahl von Reinigungsschritten, die zu einem deutlichen Verlust der leichtflüchtigen Säurederivate führt. Die Analyse muß in dieser Hinsicht noch optimiert oder gegebenenfalls ein neuer Syntheseweg entwickelt werden.

3.3 Galactane¹⁵⁸

Gegenstand des folgenden Kapitels ist die Untersuchung von Schneckengalactanen, die sowohl D- als auch L-Galactose enthalten. Es sollte geprüft werden, ob der reduktive Abbau von permethylierten Schneckengalactanen aus *Helix pomatia* mit anschließender gaschromatographischer Enantiomerentrennung die simultane Bestimmung der Verknüpfungspositionen und der absoluten Konfiguration der Galactoseeinheiten erlaubt.

3.3.1 Chiralität und Trennmöglichkeiten von D- und L-Zuckern

Der Begriff Chiralität hat seinen Ursprung im griechischen Wort *cheir*, Hand, und kennzeichnet die Abwesenheit einer Drehspiegelachse S_n und einer Spiegelebene als Symmetrieoperation für ein Objekt, wie es zum Beispiel auch für die Hände des Menschen zutrifft. Sie ist insbesondere ein Phänomen der Naturstoffe, das dann auftritt, wenn ein asymmetrisches Zentrum, im häufigsten Falle ein mit vier unterschiedlichen Resten substituierter Kohlenstoff, vorliegt. Asymmetrische Zentren können aber auch an anderen Zentralatomen wie Stickstoff, Phosphor, Bor, Schwefel, um nur einige zu nennen, beobachtet werden. Daneben gibt es auch Formen von axialer (z.B. Allenverbindungen und sterisch gehinderte Biphenyle) und planarer Chiralität bei Paracyclophanen und der Chiralität von molekularen Überstrukturen, wie links- und rechtsgängiger Helices. Abb. 3-56 zeigt als Beispiel die beiden spiegelbildlichen Formen von Glycerinaldehyd. Ein solches Paar nennt man Enantiomerenpaar.

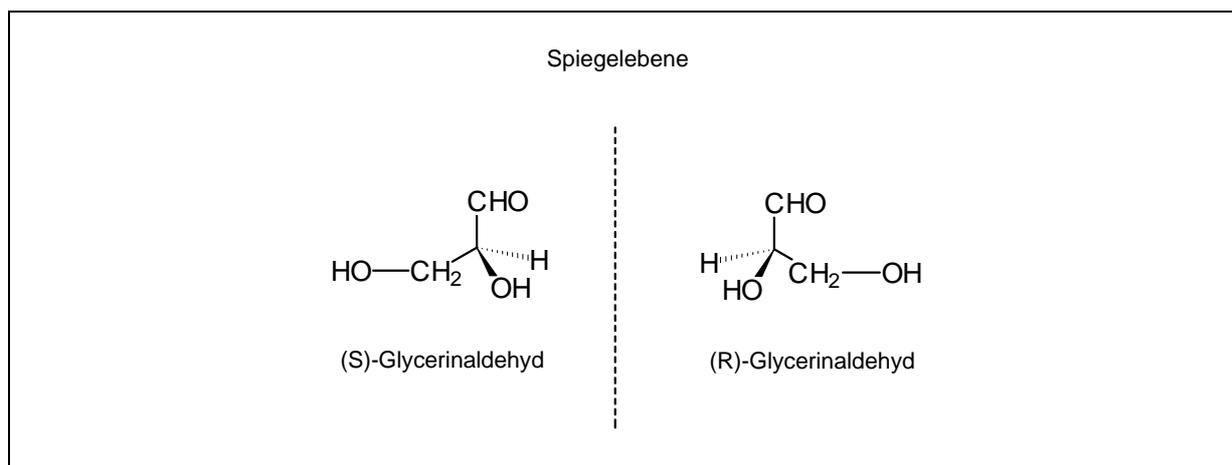


Abb. 3-56: Stereochemische Struktur von Glycerinaldehyd

Glycerinaldehyd kann als die kleinste Aldose mit einem asymmetrischen Kohlenstoff bezeichnet werden. Bei den Zuckern und Aminosäuren benutzt man aus historischen Gründen immer noch die D/L-Nomenklatur. Dabei bestimmt bei den Monosacchariden die Konfiguration des am weitesten von der Aldo- bzw. Ketogruppe entfernten Kohlenstoffs die Bezeich-

nung: D-Zucker sind dabei die Enantiomere, bei denen die in der Fischer-Projektion OH-Gruppe nach rechts (D von dexter, lat.) weist. Demnach entspricht (R)-Glycerinaldehyd dem D-Glycerinaldehyd. Die länger-kettigen Aldosen leiten sich vom Glycerinaldehyd ab. Die mit Abstand größte natürlich vorkommende Gruppe der Monosaccharide sind die Aldo-hexosen mit ihrem Hauptvertreter D-Glucose. Mit der Anzahl n an asymmetrischen C-Atomen erhöht sich die Anzahl der möglichen Konfigurationsisomere auf 2^n , bei den Aldo-hexosen ($n=4$) also 16. Abb. 3-57 zeigt die acht diastereomeren Aldo-hexosen der D-Reihe.

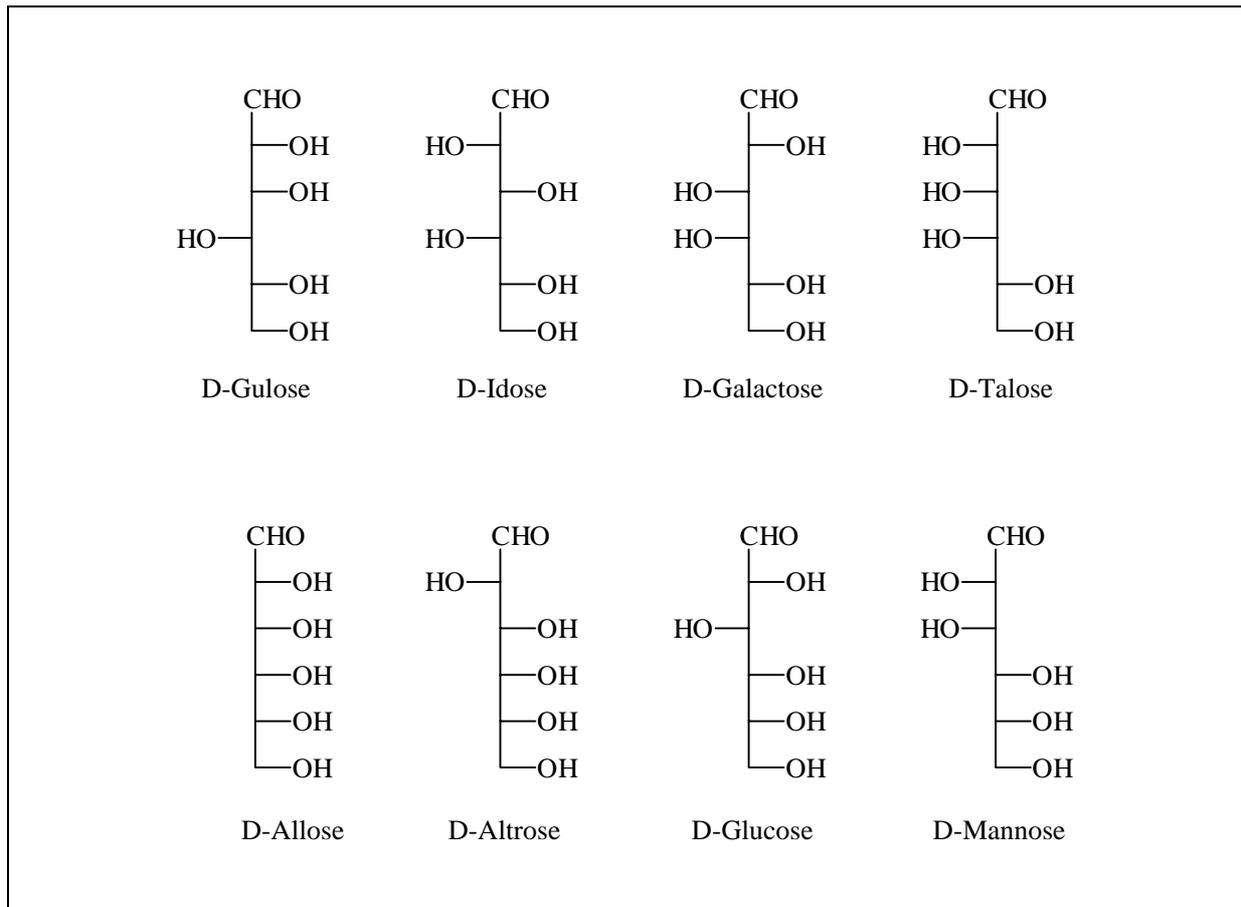


Abb. 3-57: Diastereomere Aldo-hexosen der D-Reihe.

Chiralität kann aber auch nach chemischen Umsetzungen verlorengehen, wobei eine Meso-Form entsteht. So stellen die Reduktionsprodukte von D- und L-Galactose, das gleiche Molekül, nämlich Dulcitol dar. Das hat entscheidende Bedeutung für die chemische Analyse von Galactanen, in denen beide Enantiomere vorhanden sind.

Galactane sind typische Speicherkohlenhydrate zahlreicher Schnecken. Sie sind hochverzweigt und weisen Molmassen von mehreren Millionen auf, was einer Zahl von 15-20000 Galactoseeinheiten pro Molekül entspricht. Im Galactan von *Helix pomatia* (Hp) wurde L-Galactose erstmals durch Bell und Baldwin identifiziert¹⁵⁹. Der L-Galactose-Anteil wurde mit etwa 14 % durch Berechnung der Abweichung des optischen Drehwerts nach Hydrolyse des Galactans bzw. durch den Restgehalt an Galactose nach Inkubation des Hydrolysats mit D-

Galacto-Oxidase bestimmt¹⁶⁰. L-Galactose konnte in vier weiteren Schneckengalactanen aus *Marisa spec.* (Ms), *Arianta arbustorum* (Aa), *Cepaea nemoralis* (Ls) und im Eierschalen-Polysaccharid von *Lymnea stagnalis* (Ls) bestimmt und quantifiziert werden¹⁶⁰.

Die Enantiomeren unterscheiden sich bis auf wenige Ausnahmen nicht in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. So weisen sie den gleichen Schmelzpunkt auf, bilden das gleiche Kristallgitter usw. Deshalb ist die Trennung eines Enantiomerenpaares sehr schwierig. Diastereomere hingegen lassen sich trennen. Eine Trennmöglichkeit ist daher die Überführung in Diastereomere durch Glycosidierung des Enantiomerengemisches mit einem optisch aktiven Alkohol wie z.B. (-)-2-Butanol⁴², Acetalisierung mit (+)-1-Phenylethanthiol⁴³ oder Überführung in andere Derivate. Möglich ist auch der Einsatz enantioselektiver Enzyme, die nur ein Enantiomer akzeptieren¹⁶⁰. Neuere Methoden benutzen die Kapillarelektrophorese, wobei diastereomere Zucker-Boratkomplexe nach reduktiver Aminierung mit (S)-1-Phenylethylamin getrennt werden⁴⁶. Die direkte Trennung von Zuckerenantiomeren in Form ihrer Trifluoracetate gelang mittels enantioselektiver Gaschromatographie zunächst an XE-60-L-Valin-(S)- α -phenylethyl-amid⁴⁷ und später an perpentilyliertem α -Cyclodextrin⁴⁸.

3.3.2 Stand der Forschung

Die gaschromatographische Trennung von Enantiomerengemischen gelang 1966 erstmals durch Gil-Av *et al.*¹⁶¹ an Phasen aus Aminosäure- und Dipeptid-Derivaten, die jedoch eine geringe Temperaturstabilität aufwiesen. Dies konnte durch die Entwicklung der an Polysiloxan gebundenen Diamid-Phasen Chirasil-Val¹⁶² und XE-60-L-Valin-(S)- α -phenylethylamid⁴⁷ überwunden werden. All diese Phasen waren aber bei der Enantioselektivität auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen angewiesen. Die Trennung von Substanzen aus Stoffklassen, die keine Wasserstoffbrückenbindungen aufbauen können, ermöglichten erstmals chirale Metallkomplexe¹⁶³. Die Einführung von Cyclodextrinen¹⁶⁴ und Cyclodextrinderivaten in die enantioselektive Gaschromatographie^{165,166} erweiterte schließlich den Anwendungsbereich, der durch die Variierung der Derivatisierung außerordentlich groß ist. Der Trennmechanismus beruht hier zusätzlich auf der Inklusion der Enantiomeren in den Hohlraum der Cyclodextrine. Regioselektiv derivatisierte Cyclodextrine haben sich daher als sehr leistungsfähige stationäre Phasen für die Trennung von Enantiomerengemischen in der Hochleistungsflüssig-¹⁶⁷ und der Gaschromatographie¹⁶⁸ sowie mittels electrophoretischer Methoden¹⁶⁹ erwiesen.

Enantiomere Zuckergemische konnten anfangs nur in Form ihrer pertrifluoracetylierten Derivate bzw. deren Methylglycoside durch gaschromatographische Analyse getrennt werden¹⁶⁶. Die hierbei verwendeten Phasen ermöglichten die Separation durch Ausbildung diastereomerer Assoziationskomplexe der Enantiomeren mit der chiralen Phase, die auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruhten. Die Einführung von regioselektiv derivatisierten Cyclodextrinen als chirale GC-Phasen erlaubte nun durch Inklusion der Variation der

Derivatisierung die Trennung von Substanzklassen, die deutlich unpolarer waren. Jonas fand in systematischen Untersuchungen an partiell methylierten Methylglucosiden, daß sich nur mono- und di-*O*-methylierte Methyl- α/β -D/L-glucoside gaschromatographisch nach Pertrifluoracetylierung an regioselektiv derivatisierten Cyclodextrinen trennen lassen¹⁷⁰. Sie verwendete folgende enantioselektive Phasen (Tab. 3-34):

Tab. 3-34: Regioselektiv derivatisierte Cyclodextrine für die enantioselektive Gaschromatographie von partiell *O*-methylierten Methylglucosiden nach Pertrifluoracetylierung¹⁷⁰.

Ringgröße	R ²	R ³	R ⁶	Bezeichnung
6	Pe	Pe	Pe	Lipodex A [®]
6	Pe	Ac	Pe	Lipodex B [®]
6	Hex	Hex	Hex	-
6	Pe	Bc	Pe	-
7	Pe	Pe	Pe	Lipodex C [®]
7	Pe	Ac	Pe	Lipodex D [®]

Höher methylierte Methylglucoside konnten hingegen nicht getrennt werden, was die Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung der Verknüpfungspositionen in Polysacchariden bisher verhindert hat.

Nach säurehydrolytischem Abbau eines unbekanntes Poly- oder Oligosaccharids und anschließender Pertrifluoracetylierung erhält man so das gewünschte Ergebnis. Die Gaschromatogramme können hierbei jedoch außerordentlich komplex werden, da je nach Monosaccharid 4-8 Produkte zu trennen sind, nämlich die α - und β -Anomere des D- und L-Enantiomeren in der furanoiden oder pyranoiden Form.

Will man die Verknüpfungspositionen und das Verhältnis der enantiomeren Zucker bestimmen, muß man eine Form der Methylierungsanalyse anwenden. Die klassische Methylierungsanalyse versagt jedoch bei Zuckern, bei denen nach der Reduktion eine *meso*-Form entsteht, und damit die Chiralität verloren geht.

An den chiralen Phasen der ersten Generation¹⁷¹ konnte dennoch das D/L-Verhältnis der Galactoseeinheiten in Galactanen von Bretting *et al.*³⁰ ermittelt werden. Dies gelang allerdings mit Analysenschritten, die zum Teil sehr drastische Bedingungen erforderten. Der Analysengang soll hier kurz skizziert werden:

- Methylierung des Galactans
- Hydrolyse
- Acetylierung
- HPLC-Trennung der partiell methylierten Galactoseacetate.
- Demethylierung der einzelnen Fraktionen
- Trifluoracetylierung

- Gaschromatographische Trennung der so erhaltenen Abbauprodukte an XE-60-L-Valin-(S)- α -phenylethyl-amid

Da beim reduktiven Abbau von permethylierten Galactanen aufgrund des Ringerhalts die Chiralität von Galactose fortbesteht (s. S. 13), sollte diese alternative Form der Methylierungsanalyse prinzipiell die Bestimmung der Verknüfungsposition und der absoluten Konfiguration bzw. des Enantiomerenverhältnisses mittels enantioselektiver GC zulassen. Voraussetzung dafür ist natürlich, daß sich die aus dieser modifizierten Form der Methylierungsanalyse erhaltenen Komponenten an chiralen GC-Phasen trennen lassen.

3.3.3 Ergebnisse

In der Arbeitsgruppe Prof. König wurden neue GC-Phasen auf der Basis von Cyclodextrinen entwickelt, die verbesserte Trenneigenschaften aufwiesen als die in Tab. 3-34 genannten Cyclodextrinderivate. Es sollte daher versucht werden permethylierte Zuckerenantiomere und deren korrespondierende 1,4- und 1,5- bzw. 2,5- und 2,6-Anhydroderivate an den folgenden Phasen zu trennen (Tab. 3-35).

Tab. 3-35: Regioselektiv derivatisierte Cyclodextrine für die enantioselektive Gaschromatographie von per-*O*-methylierten Monossacchariden und deren korrespondierende 1,4- und 1,5- bzw. 2,5- und 2,6-Anhydroalditole.

Ringgröße	R ²	R ³	R ⁶	Bezeichnung
7	Me	Pe	Me	A
8	Me	Pe	Me	B
7	Me	Me	TBDMS	C

3.3.3.1 Permethylierte und reduzierte D- und L-Zucker

Als Modellsubstanzen wurden die Enantiomere von Arabinose, Fructose, Fucose, Galactose, Glucose, Mannose, Rhamnose, Ribose und Sorbose permethyliert. Ein Teil der permethylierten Probe wurde anschließend mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und Triethylsilan reduziert. Tab. 3-36 gibt eine Aufstellung der erhaltenen Verbindungen.

Man erhält nach der Methylierung je Enantiomer bis zu vier Produkte: permethylierte Methyl- α/β -glycofura- und pyranoside. Nach der Reduktion entstehen aus den Aldosen je Enantiomer zwei Produkte nämlich das 1,4- und das 1,5-Anhydroalditol, während die Ketosen je zwei 2,5- und 2,6-Anhydroalditole bilden. 1,5-Anhydro-2,3,4-tri-*O*-methyl-ribitol (**70**), das Reduktionsprodukt von permethylierter Methyl- α/β -D/L-Ribopyranosid, ist eine Mesoform.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-36: Permethylierte Modellsubstanzen für die enantioselektive Gaschromatographie von Zuckermonomeren.

Zucker	Methylglycoside		Anhydroalditole	
	Pyranosid	Furanosid	1,5- resp. 2,6-	1,4- resp. 2,5-
Arabinose	42	43	57	58
Fructose ¹	44	45	59	61
			60	62
Fucose	46	47	63	65
Galactose	48	49	65	66
Glucose	50	n.b.	67	n.b.
Mannose	51	n.b.	68	n.b.
Rhamnose	52	n.b.	69	n.b.
Ribose	53	54	70	71
Sorbose ²	55	56	72	74
			73	75

¹ Aus permethylierter Fructose entstehen nach der Reduktion 2,5- bzw. 2,6-Anhydromannit/sorbit

² Aus permethylierter Sorbose entstehen nach der Reduktion 2,5- bzw. 2,6-Anhydrogulit/idit

Ein Problem tauchte bei der Permethylierung von D/L-Galactose auf, die als Standard zur Zuordnung der terminalen Abbauprodukte der Schneckengalactane dienen sollten. Die direkte Methylierung von Galactose in DMSO führt zur überwiegenden Bildung von permethylierten Galactofuranosiden und somit nach Reduktion zu entsprechend hoher Bildung von 1,4-Anhydro-2,3,5,6-tetra-*O*-methylulcitol (**66**). Dies liegt an der besonderen Wechselwirkung von Galactose mit dem Lösungsmittel DMSO, die insbesondere im basischem Medium die Bildung von Furanosen fördert. Ein Effekt, der bei bereits erfolgter partieller Methylierung noch verstärkt wird¹⁷². Das Furanose/Pyranose-Verhältnis betrug 3,5:1. Durch Umsetzung der Galactose mit methanolischer HCl zu Methyl-galactosiden und anschließender Permethylierung konnte das Furanose/Pyranose-Verhältnis wie erwartet¹⁷³ auf 1:3 umgekehrt werden (Tab. 3-37).

Die Standardsubstanz 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-L-dulcitol (**65-L**) wurde auf diesem Weg hergestellt, indem das nach Reduktion der permethylierten Methyl-L-galactoside entstandene Gemisch aus permethyliertem 1,4- und 1,5-Anhydro-L-dulcitol mittels präparativer GC getrennt wurde.

Der Standard 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (**65-D**) wurde hingegen durch Methylierung und Reduktion von kommerziell erhältlichem Methyl- α -D-galactopyranosid erhalten.

Tab. 3-37: Relative Zusammensetzung (%) der permethylierten Methyl-D-galactoside nach direkter Permethylierung von D-Galactose in DMSO (A) und nach Permethylierung der in methanolischer HCl hergestellten Methyl-D-galactoside in DMSO (B).

Produkt	A	B
α -Gal _f	2.0	10.2
β -Gal _f	76.4	13.8
α -Gal _p	3.4	53.0
β -Gal _p	18.2	22.9

In Abb. 3-58 sind beispielhaft die Enantiomerentrennung von permethylierter D/L-Ribose und D/L-Glucose dargestellt. Abb. 3-59 zeigt die Enantiomerentrennung von per-O-methyliertem 1,4- und 1,5-Anhydro-D/L-Arabinose und eines Gemischs aus 1,5-Anhydro-D/L-dulcitol, -D/L-sorbit und D/L-Mannit.

Die Trennfaktoren (α), die Elutionsreihenfolge und die GC-Bedingungen der gaschromatographischen Trennungen für die permethylierten Zuckerenantiomere sind in Tab. 3-38, und die für die reduzierten Verbindungen in Tab. 3-39 dargestellt.

Die neu entwickelten regioselektiv derivatisierten Cyclodextrinphasen stellen einen deutlichen Fortschritt in der enantioselektiven GC von Neutralzuckern dar: Fast alle untersuchten per-O-methylierte Methylglycoside und deren korrespondierenden 1,4- und 1,5-, respektive 2,5- und 2,6-Anhydroderivate konnten zumindest an einer der Phasen getrennt werden. Die Trennung dieser relativ unpolaren Zuckerderivate war bislang nicht möglich.

Bei den Methylglycosiden konnten an den beiden 2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl-substituierten Cyclodextrinphasen fast alle untersuchten Enantiomergemische getrennt werden. Von den 4 Enantiomerenpaaren der Methylfructoside konnten an Phase C nur drei, von den Sorbosederivaten lediglich nur ein Paar getrennt werden.

Bei den Anhydroderivaten erwies sich Phase A als die trennleistungsfähigste. Ein sehr hoher Trennfaktor wurde für 1,5-Anhydro-D/L-arabinose (**57**) erreicht ($\alpha = 1.3$). Im Gegensatz zu den Methylglycosiden von Fructose und Sorbose konnten hier nun alle 4 Enantiomerenpaare der entsprechenden Anhydroderivate getrennt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die per-O-methylierten Methylglycoside grundsätzlich mittels enantioselektiver GC trennen lassen. Je nach Zucker muß hier aber die stationäre Phase ausgesucht werden, da keine der untersuchten Phasen alle Enantiomergemische trennen kann. Bei den per-O-methylierten Anhydroalditolen ist 2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl-iertes β -Cyclodextrin die leistungsfähigste Trennphase.

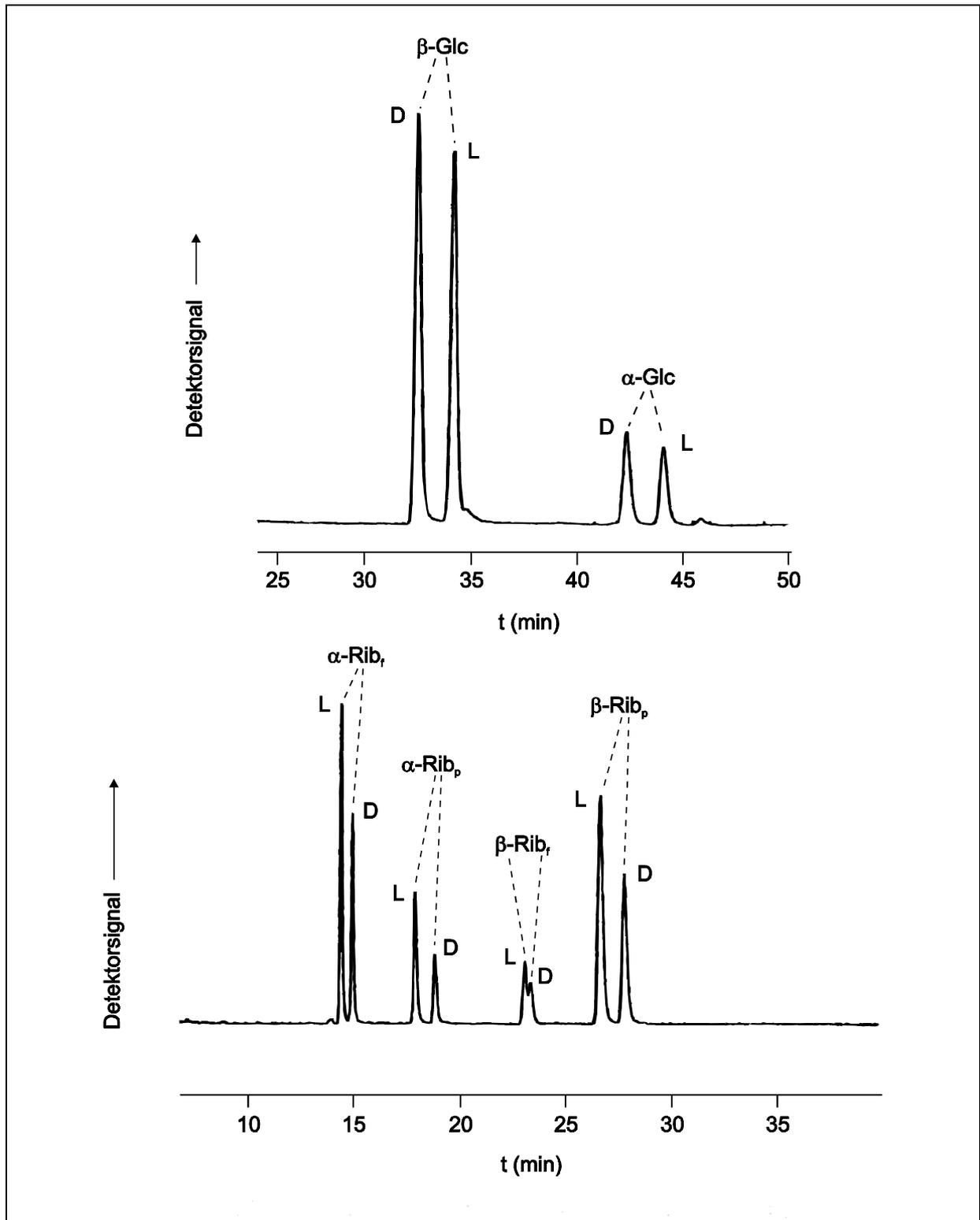


Abb. 3-58: Gaschromatogramm der Enantiomerentrennung von permethylierten Methyl- α,β -D/L-glucopyranosiden auf Säule A bei 85 °C (oben) und Methyl- α/β -D/L-ribofuranosiden und -furanosiden auf Säule B bei 100 °C (unten).

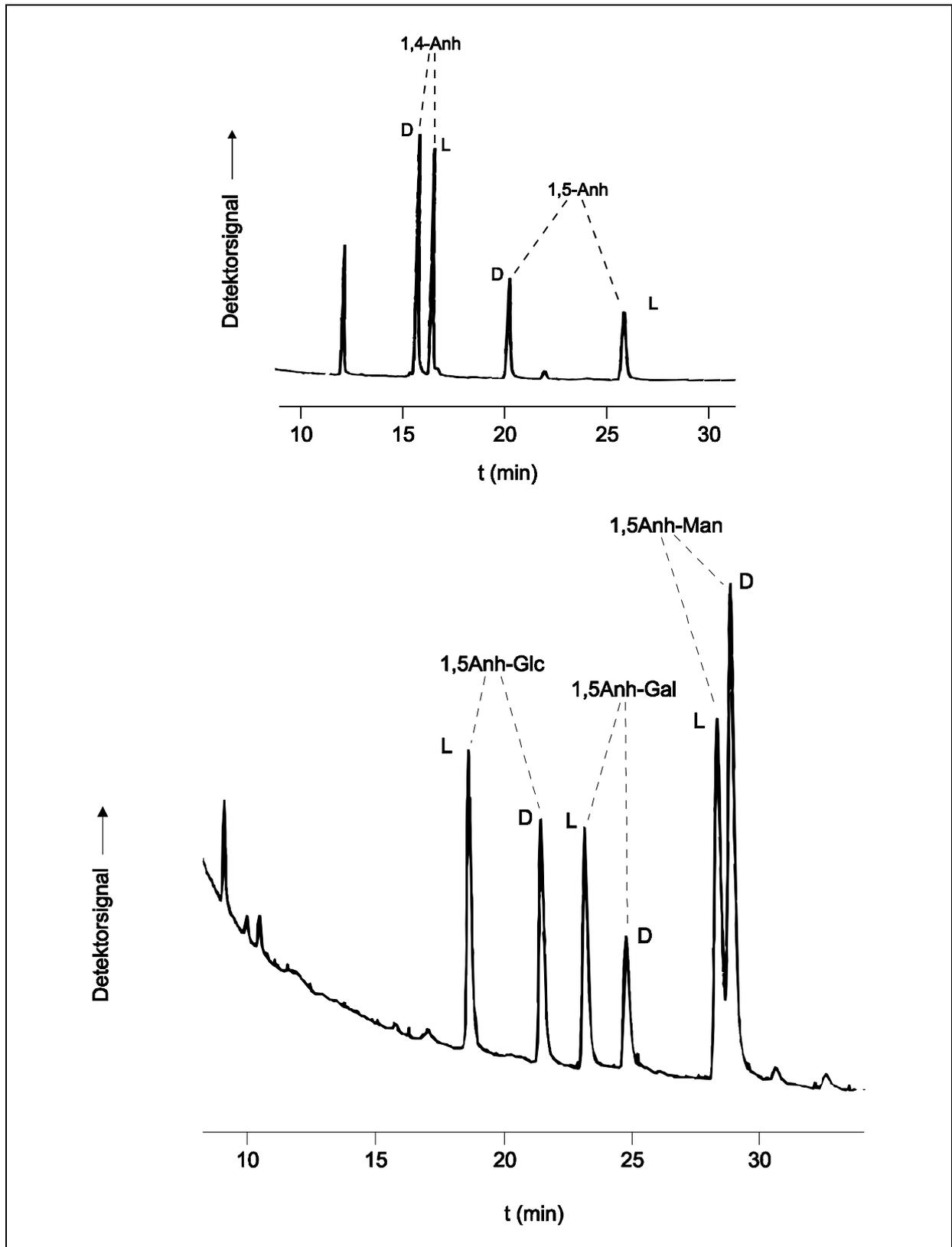


Abb. 3-59: Gaschromatogramm der Enantiomerentrennung von permethylierten 1,4- und 1,5-Anhydro-D/L-arabinose auf Säule A bei 75 °C (oben) und 1,5-Anhydro-D/L-sorbit, 1,5-Anhydro-D/L-dulcitol und 1,5-Anhydro-D/L-mannitol auf Säule A bei 105 °C (unten).

3 Spezieller Teil

Tab. 3-38: Trennfaktoren (α), Elutionsreihenfolge und GC-Bedingungen für die Enantiomerentrennung von per-*O*-methylierten Methylglycosiden¹⁵⁸.

Methyl- α,β -glycoside ^a von	Säule	Temp. (°C)	α	Elutionsreihenfolge ^b
Arabinose	A	90	1.014	L
			1.093	L
Fructose	C	85	1.041	D
			1.063	D
			1.132	D
Fucose	A	90	1.022	D
			1.010	D
Galactose	A	90	1.013	D
Glucose:	A	100	β -Glc _p	D
			α -Glc _p	D
	C		β -Glc _p	D
			α -Glc _p	D
Mannose	A	110	1.000	-
			1.018	D
Mannose	C	100	1.032	- ^c
			1.013	D
Rhamnose:	A	90	1.022	L
	B	100	1.046	D
Ribose:	B	100	α -Rib _f	L
			α -Rib _p	L
			β -Rib _f	L
			β -Rib _p	L
Sorbose ^d	A	100	1.047	D
Sorbose ^d	C	85	1.031	D

^a Bis zu vier Peaks wurden beobachtet: α - und β -Pyranoside and α - and β -Furanoside.

^b Zuerst eluiertes Enantiomer.

^c Nicht bestimmt.

^d Es wurde nur das letzte von vier Peakpaaren getrennt.

Tab. 3-39: Trennfaktoren (α), Elutionsreihenfolge und GC-Bedingungen für die Enantiomeren-trennung von per-*O*-methylierten *D/L*-Anhydroalditolen¹⁵⁸.

Per- <i>O</i> -methylderivat von	Säule	Temp. (°C)	α	Elutionsreihenfolge ^a
1,4-Anhydro-arabinit	A	75	1.049	D
	B	90	1.066	D
1,5-Anhydro-arabinit	A	75	1.295	D
	B	90	1.072	D
2,5-Anhydro-mannit ^b	B	100	1.051	L
2,5-Anhydro-sorbit ^b			1.046	L
2,6-Anhydro-mannit ^c			1.031	L
2,6-Anhydro-sorbit ^c			1.034	L
1,5-Anhydro-fucit	A	75	1.014	D
1,4-Anhydro-fucit			1.182	L
1,4-Anhydro-dulcit	A	90	1.017	D
	C	100	1.034	D
1,5-Anhydro-dulcit	A	90	1.058	L
	C	100	1.074	L
1,5-Anhydro-sorbit	A	100	1.144	L
	B	100	1.033	L
	C	100	1.184	L
1,5-Anhydro-mannit	A	110	1.017	L
	C	110	1.039	D
1,5-Anhydro-rhamnit	A	85	1.017	D
	B	90	1.024	D
1,4-Anhydro-ribit ^d	A	95	1.060	L
2,5-Anhydro-gulit/idit ^e	A	100	1.159/1.159	D/D
2,6-Anhydro-gulit/idit ^e			1.016/1.016	D/D

^a Zuerst eluiertes Enantiomer.

^b Aus der Reduktion von α - and β -Fructofuranosiden.

^c Aus der Reduktion von α - and β -Fructopyranosiden.

^d 1,5-Anhydro-ribitol ist eine Meso-Form.

^e Aus der Reduktion von α - and β -Sorbofuranosiden bzw. α - and β -Sorbopyranosiden. Die Zuordnung der Gulo- und Ido-Konfiguration ist noch nicht gesichert.

3.3.3.2 Galactane

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses für die unterschiedlich verknüpften Galactosebausteine in Schneckengalactanen gelang Bretting *et al.* wie oben bereits erwähnt durch enantioselektive Gaschromatographie der pertrifluoracetylierten Methylgalactoside. Dafür waren mehrere Reaktions- und Reinigungsschritte erforderlich, die zum Teil unter sehr drastischen Bedingungen verlaufen, insbesondere eine mit BCl_3 katalysierte Demethylierung. L-Galactose wurde ausschließlich als terminale Einheit des Polysaccharids identifiziert und liegt im Verhältnis 2:8 - 3:7 neben D-Galactose vor.

Aufgrund der oben beschriebenen Trennungen von permethylierten 1,4- und 1,5-Anhydroalditolen an den neuen enantioselektiven GC-Phasen wurde der reduktive Abbau zur simultanen Bestimmung der Verknüpfungspositionen und der absoluten Konfiguration der Monomerbausteine in Schneckengalactanen geprüft.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen des Reduktiven Abbaus wurde permethyliertes *Helix pomatia*-Galactan (HpG) unter Variation der Reaktionsdauer, der Äquivalentmengen der Reagenzien und der Acetylierungsbedingungen reaktiv abgebaut. Es konnten folgende Bedingungen als optimal angesehen werden. Permethyliertes HpG wird in 0.025 mmolarer Lösung vorgelegt und vier Stunden mit je vier Äquivalenten TMS-Triflat und Triethylsilan umgesetzt. Die beim Einsatz von TMS-Triflat beobachtete Ringisomerisierung kann hier nicht stattfinden, da dies nur bei 1,4-glycopyranosidisch und 1,5-glycofuranosidisch verknüpften Zuckern möglich ist¹⁷⁴. Die Acetylierung erfolgt *in-situ* bei Raumtemperatur mit Essigsäureanhydrid.

In den Gaschromatogrammen fiel auf, daß mehr Abbauprodukte auftraten als erwartet. Die Auswertung der Massenspektren zeigte, daß es sich dabei um die 1-*O*-Acetate der 3,6-verknüpften Galactosen handelt. Diese entstehen wahrscheinlich aus intermediär stabilisierter 1,6-Anhydrogalactopyranose, das während der Acetylierung zur 1,3,6-Tri-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl- α/β -galactopyranose (**76**) reagierte (Abb. 3-60).

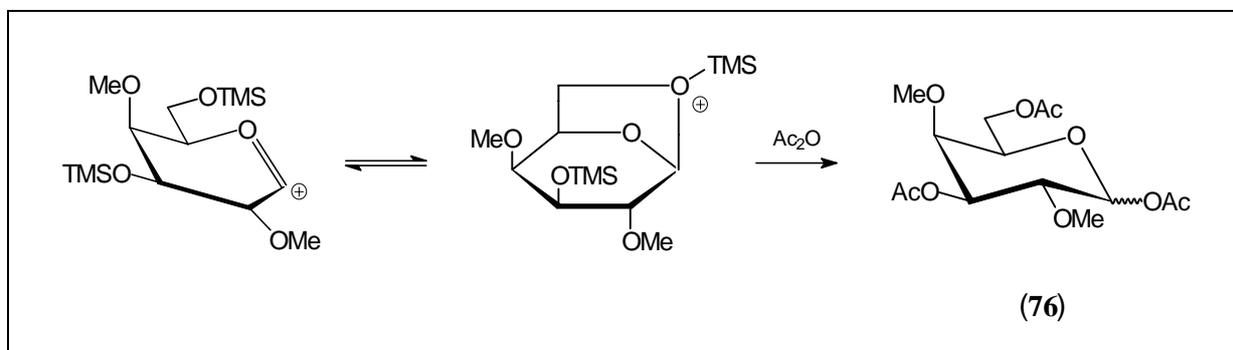


Abb. 3-60: Möglicher Mechanismus der Bildung von 1,3,6-Tri-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl- α/β -galactopyranose (**76**) aus 1,3,6-verknüpften Galactoseeinheiten während des reduktiven Abbaus von permethyliertem HpG.

Die Produkte aus dem reduktiven Abbau von permethyliertem HpG wurden auf der enantioselektiv trennenden Säule A gaschromatographisch untersucht. Wie bereits von Bretting *et al.* gezeigt, befindet sich L-Galactose nur an den nicht reduzierenden Endgruppen der Kettenverzweigungen im Galactan. 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-dulcit zeigte als einzige Komponente eine Trennung auf der chiralen Phase (Abb. 3-61). Das L-Enantiomer wird wie oben bereits gezeigt als erstes eluiert. Das Verhältnis von terminaler D- zu L-Galactose beträgt 65:35. Tab. 3-40 zeigt das Ergebnis der Methylierungsanalyse mittels reduktiven Abbaus verglichen mit den Ergebnissen aus der Standardmethylierungsanalyse. Die Ergebnisse beider Strukturanalysen stimmen weitgehend überein.

Tab. 3-40: Relative molare Zusammensetzung der Galactan-Bausteine von *Helix pomatia*. Vergleich der Ergebnisse der Standardmethylierungsanalyse (SMA) und des Reduktiven Abbaus (RA). Das Ergebnis für den RA wurde nach enantioselektiver GC bestimmt.

Verknüpfungsposition und Konfiguration der Galactose	Molares Verhältnis	
	SMA	RA
terminal D-Gal _p	}4.7	2.9
terminal L-Gal _p		1.5
2-D-Gal _p	1.0	1.2
3-D-Gal _p	0.9	1.2
6-D-Gal _p	0.2	0.4
2,6-D-Gal _p	0.2	0.4
3,6-D-Gal _p	4.4	4.4

Die Auftrennung nur eines Abbauprodukts in der enantioselektiven GC-Analyse ist noch kein Beweis dafür, daß sich L-Galactose ausschließlich an terminalen Positionen im Galactan befindet. Aufgrund der Erfahrungen bei der Entwicklung enantioselektiver GC-Phasen war bekannt, daß sich trifluoracetylierte Zucker besser trennen ließen als methylierte Zucker. Da sich auf den neu entwickelten Phasen nun auch permethylierte Zucker und deren reduzierte 1,5-bzw. 1,4-Anhydroderivate trennen ließen, ist anzunehmen, daß die Trennung partiell methylierter 1,5-Anhydro-D/L-dulcitate wahrscheinlich ist. Möglicherweise könnte aber die Enantioselektivität durch die geringere Flüchtigkeit der Acetate und daher durch die zur Elution erforderlichen hohen Temperaturen zunichte gemacht werden

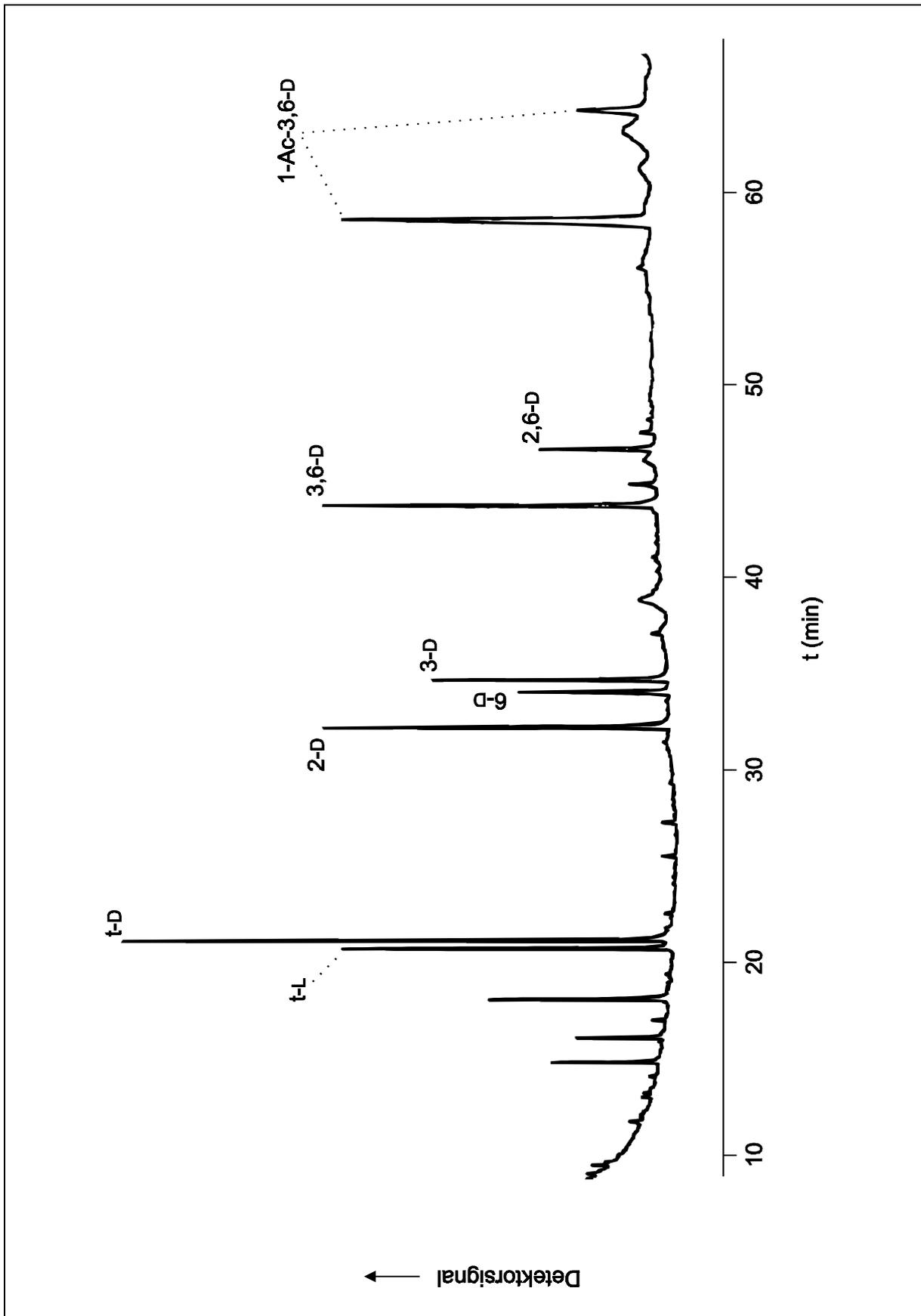


Abb. 3-61: Gaschromatographische Trennung der Abbauprodukte von permethyliertem HpG nach reduktivem Abbau und Acetylierung. Die Trennung erfolgte an Phase A. Die Ziffern geben die Verknüpfungspositionen der Galactoseeinheiten im Galactan an.

3.3.3.3 Untersuchungen von partiell methylierten 1,5-Anhydro-D/L-dulcitetacetaten

Um dies aufzuklären, wurden die Standards 1,5-Anhydro-D-dulcitet und 1,5-Anhydro-L-dulcitet hergestellt. Zunächst stellt man aus Galactose das Pentaacetat (**77**) her¹⁷⁵, setzt dieses mit 30 % Bromwasserstoff in Eisessig zum Tetra-*O*-acetyl-galactopyranosylbromid (**78**) um und reduziert das Produkt mit Lithiumaluminiumhydrid zum 1,5-Anhydro-dulcitet¹⁷⁶ (**79**), wobei die Acetylgruppen gleichzeitig verseift werden.

Zur Bestimmung der Retentionszeiten der 32 möglichen partiell methylierten 1,5-Anhydro-D/L-dulcitetacetate wurden mit beiden enantiomeren 1,5-Anhydrodulciten jeweils drei Methylierungsansätze mit unterschiedlich hohen Mengen an Reagenz durchgeführt. Anschließend wurde *in-situ* mit 1-Methylimidazol, Pyridin und Essigsäureanhydrid acetyliert¹⁷⁷. Aus den Ansätzen wurde jeweils eine repräsentative GC-Probe der partiell methylierten 1,5-Anhydro-D- und -L-dulcitetacetate gemischt und enantioselektiv gaschromatographiert. Die Identifizierung der Produkte erfolgte mittels GC-MS. Die Massenspektren konnten anhand der Literaturspektren zugeordnet werden¹⁷⁸.

Unter den oben genannten Bedingungen (Säule A, 25 m Länge, Temperaturprogramm: Starttemperatur 100 °C, Heizrate 2 °C/min, Endtemperatur 180 °C) konnten nicht alle Enantiomerenpaare getrennt werden, da die Enantioselektivität bei hohen Elutionstemperaturen, wie sie zur Chromatographie der höher acetylierten Anhydrodulcitetderivate nötig sind (Endtemperatur 180 °C), verloren geht. Zu niedrige Temperaturen führen hingegen zu langen Elutionszeiten, wodurch es ebenfalls infolge Peakverbreiterung zum Verlust der Auflösung kommt.

Die Trennleistung konnte auch durch Verwendung einer kürzeren Säule (10m) nicht verbessert werden, da auch hier Elutionstemperaturen von bis zu 160°C für die höher acetylierten Anhydrodulcitate nötig waren.

Eine Möglichkeit die Trennleistung zu verbessern ist die Überführung in Trifluoracetylderivate, die deutlich flüchtiger sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden.

3.3.4 Zusammenfassung

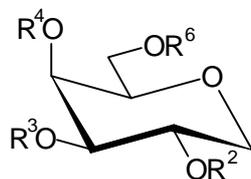
Die Trennung der Enantiomeren einer Vielzahl von permethylierten Aldohexosen, 6-Desoxyaldohexosen und Ketohexosen und deren reduzierter Anhydroderivate an regioselektiv derivatisierten Cyclodextrinphasen konnte demonstriert werden.

Dadurch war es möglich, simultan sowohl die Verknüpfungspositionen als auch die absolute Konfiguration der Galactoseeinheiten im Schneckenagalactan von *Helix pomatia* zu bestimmen.

Die Trennung aller 16 Enantiomerenpaare partiell methylierter 1,5-Anhydro-D/L-dulcitetacetate konnte jedoch bislang nicht erreicht werden.

3 Spezieller Teil

Tab. 3-41: Partiiell methylierte 1,5-Anhydrodulcitacetate als Modellsubstanzen für die enantioselektive Gaschromatographie der Produkte nach reaktivem Abbau eines D- und L-Galactosehaltigen Galactans. Die Liste ist nach der Elutionsreihenfolge auf einer CPSil-8CB-Säule gegliedert.



Verbindung	R ²	R ³	R ⁴	R ⁶
65	Me	Me	Me	Me
80	Ac	Me	Me	Me
81	Me	Ac	Ac	Me
82	Me	Me	Me	Ac
83	Ac	Me	Me	Ac
84	Me	Ac	Me	Ac
85	Me	Me	Ac	Me
86	Ac	Ac	Me	Me
87	Ac	Me	Ac	Me
88	Me	Ac	Ac	Me
89	Me	Me	Ac	Ac
90	Ac	Ac	Ac	Me
91	Ac	Ac	Me	Ac
92	Ac	Me	Ac	Ac
93	Me	Ac	Ac	Ac
94	Ac	Ac	Ac	Ac

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substituentenverteilung einer Reihe von Cellulosederivaten auf zwei wichtigen strukturellen Ebenen, der Monomereinheit und der Polymerkette, bestimmt. Diese Untersuchungen wurden an Methylcellulosen und Celluloseacetaten durchgeführt.

In einem zweiten Komplex wurde eine neue Methode zur Isolierung carboxylhaltiger Gruppen in Ethylcellulose entwickelt.

Die enantioselektive gaschromatographische Trennung von permethylierten Zuckern und deren korrespondierender Anhydroalditole konnte an neuen regioselektiv derivatisierten Cyclodextrinphasen erreicht werden. Dies erlaubte die simultane Bestimmung der absoluten Konfiguration und der Verknüpfungspositionen von Galactosebausteinen in Schneckengalactanen.

Bestimmung der Substituentenverteilung von Cellulosederivaten in der Monomereinheit und in der Polymerkette

Bestimmung der Substituentenverteilung in der Monomereinheit

Die Bestimmung des Substitutionsmusters in der Anhydroglucoseeinheit von Cellulosederivaten erfolgt prinzipiell analog der Standardmethylierungsanalyse. Methylcellulosen werden dabei direkt säurehydrolytisch abgebaut, Celluloseacetate hingegen erst nach Überführung in das inverse Methylmuster durch Methylierung unter milden Bedingungen. Das Substitutionsmuster erhält man nach gaschromatographischer Trennung und Quantifizierung der in flüchtigen Derivate überführten Abbauprodukte. Diese Analysenmethode konnte durch den Einsatz der HPAEC-PAD deutlich verkürzt werden. An der Ionenaustauschersäule CarboPac PA1[®] konnten alle partiell methylierten Glucosebausteine und Glucose getrennt und anhand von Modellsubstanzen Responsefaktoren für jede Komponente relativ zur Glucose bestimmt werden. Somit entfallen die zeitaufwendigen Schritte Reduktion und Acetylierung der klassischen SMA. Die reaktionskinetischen Modelle von Spurlin- und Reuben erlauben mit Hilfe der so erhaltenen Daten eine Aussage über die Abweichung der Substituentenverteilung von einer rein statistischen. Sie können mit ihren Modellen aber keine Aussage über die direkte Nachbarschaft einer AGU in der Polymerkette treffen, da diese Information durch den Totalabbau verlorengegangen ist.

Bestimmung der Substituentenverteilung in der Polymerkette

Auf der Ebene des Polymermoleküls war bereits am Modell von Methylamylosen und -cellulosen eine massenspektrometrische Methode zur Bestimmung der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette entwickelt worden. Sie umfaßt die chemische Vereinheitlichung der Probe durch Perdeuteromethylierung mit anschließendem Partialabbau mittels Methanolyse zu gemischt methyl-/deuteromethylierten Cellooligomeren, deren jeweils relative Zusammensetzung massenspektrometrisch erfaßt werden kann. Mit Hilfe der Monomerzusammensetzung kann man nach der Bernoulli-Statistik für jede Oligomerfraktion ein Substitutionsmuster berechnen und Abweichungen von dieser statistischen Verteilung sichtbar machen. Die chemische Vereinheitlichung ist bei Methylcellulosen durch direkte Deuteromethylierung möglich, in methylierten Celluloseacetaten müssen hingegen die Acetylgruppen gegen Methyl- d_3 -Gruppen ausgetauscht werden. Hier hat sich der Austausch mit Hilfe eines äquimolaren Basengemisches an Natriumhydroxid und Natriumhydrid in DMAc als überlegen erwiesen.

Die Bestimmung der Substituentenverteilung in der Polymerkette mittels Partialabbau und massenspektrometrischer Analyse hat sich als sehr leistungsfähig erwiesen. So konnte Probenmaterial aus Methylcellulosen, das aufgrund der Monomeranalyse und Vergleich mit dem Reuben-Modell eine nur leichte Heterogenität aufwies, als sehr heterogene Probe identifiziert werden. Um eine Heterogenität 1. Art auszuschließen, ist immer auf Fraktionierbarkeit zu prüfen.

Diese Methode eignet sich auch zur Aufdeckung von Fehlstellen, wie sie bei regioselektiven Derivatisierungen auftreten können. Eine regioselektiv hergestellte 2,3-Di-*O*-methylcellulose wies beispielsweise Bereiche auf, die sehr wahrscheinlich aus blockartig trisubstituierten Glucoseeinheiten bestehen.

Labeling für die massenspektrometrische Analyse

Die Möglichkeit mittels massenspektrometrischer Analyse auch andere Derivattypen zu untersuchen wurde am Beispiel gemischt ethylierter/methylierter Cellulose geprüft. Dabei sollten die Probleme, die durch die Diskriminierung hoch methylierter Cellooligomere in der FAB-MS in Voruntersuchungen aufgetreten waren, gelöst werden. Die Einführung einer quartären Ammoniumfunktion in das Oligomer erschien am erfolgversprechendsten. Modelluntersuchungen wurden an Tetra-*O*-methylglucose und gemischt methylierter/deuteromethylierter Cellulose durchgeführt. Die reduktive Aminierung mit anschließender Peralkylierung erwies sich als die beste Methode. Die Übertragung auf gemischt ethylierte/methylierte Cellooligomere brachte in der FAB-MS kaum eine Verbesserung. Bei der MALDI-TOF-MS hingegen wurde eine gegenteilige Diskriminierung gefunden. Hier werden die hoch ethylierten Cellooligomere zu schwach detektiert, so daß ein zu hoher Methyl-DS resultiert. Die Probleme hängen sehr wahrscheinlich mit Matrixeffekten zusammen. Eine

Verbesserung des Analyseergebnisses ist eventuell mit ESI-MS zu erreichen. Erste Modelluntersuchungen hierzu sind vielversprechend.

Bestimmung von Oxidations- und Peelingprodukten in Ethylcellulose

Die carboxylhaltigen Gruppen in säurehydrolytisch abgebauter Ethylcellulose konnten nicht mittels Ionenchromatographie nach Johansson und Samuelson isoliert werden. Es wurde daher ein neuer Analysengang entwickelt, der den methanolytischen Totalabbau des Polymers, die Perethylierung der Abbauprodukte und die Abtrennung der Neutralfraktion nach Verseifen der sauren Komponenten umfaßt. Durch Ansäuern der wässrigen Phase lassen sich diese in der freien Säureform gewinnen. Der entscheidende Trennschritt (Verseifung - Abtrennung der per-*O*-ethylierten Methylglucoside - quantitative Freisetzung der ethylierten Säuren in der H⁺-Form) wurde mehrfach mit Modellsubstanzen reproduzierbar durchgeführt.

Wie erwartet wurden 3-Desoxy-D-*arabino/ribo*-hexonsäuren als Hauptprodukte unter den Aldonsäuren gefunden. Die dritte Leitsubstanz, 2-*C*-Methylglycerinsäure, konnte hingegen nicht gefunden werden. Aufgrund der basischen Ethylierung mit NaOH wurden für die weiteren identifizierten Aldonsäuren zu hohe C-2-Epimere gefunden. Dies kann durch den Einsatz von NaH unterdrückt werden.

Im Gegensatz zum klassischen Verfahren wurde zu 80 % ein Methylglycosid isoliert, das von Muus als Methyl-3-desoxy-2-*C*-carboxyl-2,5-di-*O*-ethyl- α/β -D-pentofuranosid identifiziert wurde.

Galactane

Fortschritte bei der Synthese enantioselektiver Phasen auf der Basis regioselektiv derivatisierter Cyclodextrine haben neue Möglichkeiten, Zuckerenantiomere zu trennen, eröffnet. War es zunächst nur möglich pertrifluoracetylierte Zucker, bzw. trifluoacetylierte Methylglycoside zu trennen, konnte der Anteil an Methylgruppen im Zuckermonomer neben den sonst für die Ausbildung von diastereomeren Assoziaten nötigen Trifluoracetylgruppen ständig erhöht werden.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Phasen war es erstmals möglich, eine große Anzahl an permethylierten Methyl-D/L-glycosiden und deren korrespondierenden 1,4- und 1,5- bzw. 2,5- und 2,6-Anhydroalditolen zu trennen. Die besten Ergebnisse wurden an Heptakis[2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-pentyl]- β -cyclodextrin insbesondere für die Anhydroalditole erzielt.

Damit war auch die simultane Bestimmung der Verknüpfungspositionen und der absoluten Konfiguration der Galactoseeinheiten im Schneckengalactan aus *Helix pomatia* durch reduktiven Abbau des permethylierten Polysaccharids möglich. L-Galactose wurde ausschließlich an nicht-reduzierenden Endgruppen gefunden.

Die Trennung aller möglichen partiell methylierten 1,5-Anhydrodulcitacetaten ist bislang noch nicht gelungen.

5 Summary

The substitution pattern of methyl celluloses and cellulose acetate was determined on two structural levels of the polymer: the anhydro glucose unit and the polymer chain.

The second part of this thesis deals with the carboxylic compounds in ethyl cellulose formed by oxidation and peeling reactions during alkaline cellulose processing. A new method for the isolation of these compounds was established.

In the third part the mixtures of enantiomers of permethylated sugars and their corresponding anhydro alditols were separated by enantioselective gas capillary chromatography on new regioselectively derivatized cyclodextrins as the stationary phase. So the simultaneous determination of linkage positions and absolute configuration of galactose moieties in snail galactans was possible.

Determination of the substitution pattern in cellulose derivatives in the anhydro glucose unit and along the polymer chain

Distribution of substituents in the monomer unit

The determination of the substitution pattern in the anhydro glucose unit of cellulose derivatives is performed analogously to methylation analysis. Methyl cellulose can be analyzed directly, whereas cellulose acetate must be methylated first under mild conditions before acidic degradation. The volatile compounds obtained after hydrolysis, reduction and acetylation can be separated by glc and quantitized according to the ECR concept to give the substitution pattern in the monomer unit. A more rapid method was established by using the HPAEC-PAD. All partially methylated glucose moieties and glucose obtained after hydrolysis of the methylated polymer could be separated on a CarboPac PA1[®] column and response factors relative to glucose were determined with model compounds.

Based on the experimental data the kinetic models of Spurlin and Reuben can determine deviations from a statistical distribution. The models fail to describe the direct neighbourhood of a AGU in the polymer chain, since this information gets lost by total degradation to monomers.

Distribution of substituents along the polymer chain

By model studies on methyl amyloses and methyl cellulose a method for the determination of the substitution pattern along the polymer has already been developed. It comprises the uniformation of the partially methylated polymer by deuteromethylation with subsequent partial

degradation by methanolysis to give mixed methylated/deuteromethylated cellooligomers which can be analyzed by mass spectrometry. Based on the monomer composition a random distribution can be calculated for every oligomer fraction and compared with the experimental data. Methyl cellulose can be deuteromethylated directly. In methylated cellulose acetate the acetyl groups must be exchanged by deuteromethyl groups. The combination of sodium hydroxide/sodium hydride (1:1)/methyl- d_3 iodide in dimethyl acetamide turned out to be superior to the use of only one base.

The determination of the substitution pattern in the polymer chain by partial degradation and mass spectrometric analysis proved to be efficient. A methyl cellulose which seemed to have only a slight deviation of the substitution pattern from the calculated data by the Reuben model turned out to be a very heterogeneous material. To exclude a heterogeneity of first order the polymer material has to be checked for fractionability. With this method irregularities in regioselectively derivatized polysaccharides can be elucidated. In a 2,3-di-*O*-methyl cellulose for instance regions with presumably blockwise trisubstituted glucose units could be identified.

Labeling for mass spectrometric analysis

The possibility to examine other types of cellulose derivatives by mass spectrometric analysis was investigated with mixed ethylated/methylated cellulose. Problems arose in preliminary tests from discrimination of cellooligomers with a higher extent of methyl groups in FAB-MS analysis. To overcome this phenomenon the functionalization with a quarternary ammonium group at the reducing end seemed to be most successful as proved in model studies with tetra-*O*-methyl glucose and mixed methylated/deuteromethylated cellulose. The best results were achieved by reductive amination and subsequent peralkylation. Unfortunately the FAB-MS results of mixed methylated/ethylated cellooligomers showed only a slight improvement, whereas the MALDI-TOF-MS data showed a discrimination of the higher ethylated compounds resulting in a higher methyl DS than expected. Better results might be achieved with ESI mass spectrometry, since preliminary studies with mixed methylated/deuteromethylated cellulose were promising.

Determination of oxidation and peeling products in ethyl cellulose

Isolation of carboxylic compounds in ethyl cellulose with ion-exchange chromatography was not successful. Hence a new method was developed comprising methanolysis, perethylation and separation of the neutral products after saponification of the acidic moieties. Acidification of the aqueous solution yields the perethylated compounds as the free acid. The most important step (saponification - separation of the neutral fraction - re-isolation of the perethylated free acids) was performed several times with model compounds. The acidic compounds were totally recovered.

As expected perethylated 3-deoxy D-*arabino/ribo*-hexonic acid were found as the main components within the aldonic acids. Perethylated 2-C-methyl glyceric acid could not be found due to its volatility. The alkaline ethylation with sodium hydroxide yields too high amounts of the C-2 epimers of all other identified aldonic acids. This can be suppressed by using sodium hydride as the base.

In contrast to the classical procedure of Samuelsson and Johansson about 80 % of the acidic compounds were identified as methyl 3-deoxy 2-C-carboxyl 2,5-di-O-ethyl- α/β -D-pentofuranoside by Muus.

Galactan

Progress in the synthesis of enantioselective stationary phases based on regioselectively derivatized cyclodextrins offered new possibilities for the separation of sugar enantiomers. Since the first enantioselective phases separated only the pertrifluoro acetylated sugars and their methyl glycosides respectively, the extent of methyl groups could be successively increased besides the trifluoroacetyl groups which were necessary to form diastereomeric associates.

In this thesis a number of permethylated methyl-D/L-glycosides and their corresponding anhydro alditols were separated on new regioselectively derivatized cyclodextrins. Best results were achieved with heptakis[2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-pentyl]- β -cyclodextrin, especially for the separation of the permethylated D/L-anhydro alditols.

Hence the simultaneous determination of linkage positions and absolute configuration of galactose moieties in the snail galactan of *helix pomatia* by the reductive cleavage method became possible. L-galactose occurred only in the non-reducing end groups of the galactan.

The separation of all possible partially methylated 1,5-anhydro D/L-galactitols by enantioselective glc could not be achieved yet.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines (Reagenzien/Meßmethoden)

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden hauptsächlich von *Merck*, *Fluka*, *Sigma* und *Aldrich* bezogen, besaßen p.a.-Qualität und waren zum Teil getrocknet. Sofern es erforderlich war, wurden sie vor dem Einsatz getrocknet, destilliert und über Molekularsieb bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gelagert.

Dialyse

Zur Reinigung hochmolekularer Proben wurden Dialyseschläuche der Firma *Spectrapor* mit einer molekularen Gewichtsausschlußgrenze (MWCO) von 12 - 14000 verwendet.

Gefriertrocknung

Dialysierte Proben wurden an dem Gerät Beta A der Firma *Christ* lyophilisiert.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ auf Aluminiumfolie (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma *Merck* verwendet. Es wurde ein- bis zweimal entwickelt und durch UV-Absorption (UV-aktive Derivate), Ansprühen mit Dragendorff's Reagenz (quarternäre Ammoniumverbindungen) oder mit 20 %iger ethanolischer Schwefelsäure mit anschließender thermischer Zersetzung detektiert.

Flüssigchromatographie (LC)

Präparative Trennungen erfolgten unter Normaldruck durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (63-200 µm, Firma *Merck*) oder Größenausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 (Firma *Pharmacia*) und Biogel P2 (Firma *BioRad*).

Ionenchromatographie (IC)

Für die Ionenaustauschchromatographie wurden Ionenaustauscher der Firmen *BioRad* (AG1-X4, AG3-X4 und AG50-W8) und *Merck* (Amberlite IR 120) verwendet.

High-pH Anion Exchange Chromatography mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)

Die ionenchromatographischen Trennungen wurden mit dem System DX300 der Firma *Dionex* an einer CarboPac-PA1-Säule (4x250 mm bzw. 9x250 mm) durchgeführt. Zur Signalaufnahme wurden die gepulsten amperometrischen Detektoren PAD-2 und PED verwendet. Als Eluenten dienten: Eluent A: H₂O, Eluent B: 100 mM NaOH und Eluent C: 100 mM NaOH/1 M NaOAc. Der Flow betrug 1 ml/min.

Die Pulspotentiale und (-zeiten) des PAD-2 waren $E_1 = 0.05$ mV (480 ms), $E_2 = 0.60$ mV (120 ms), $E_3 = -0.60$ mV (60 ms). Die Responsezeit betrug 1 s.

Die Pulspotentiale und (-zeiten) des PED waren $E_1 = 0.05$ mV (400 ms), $E_2 = 0.75$ mV (200 ms), $E_3 = -0.15$ mV (400 ms). Die Responsezeit betrug 1 s. Die Messung erfolgte nach 200 ms (Dauer: 200 ms).

Es wurden je nach Trennproblem folgende Bedingungen gewählt:

- A: Trennung partiell methylierter Monosaccharide: 20 mM NaOH (isokratisch).
- B: Trennung von Cello- und Maltooligomeren, sowie von Zuckersäuren:
Gradientenprogramm: $t = 0$: 100 % Eluent B, $t = 30$ min: 50 % Eluent B und 50 % Eluent C.

Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma *Carlo Erba*, Modell GC 6000 Vega Series 2, mit on-column-Injektor und Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einem Druck von 80 kPa. Als Trennphasen wurden fused silica Kapillarsäulen der Firma *Chrompack* (CPSil 8 CB, 25 m Länge, 0.25 mm Innendurchmesser und 0.25 μ m Filmdicke) und *Supelco* (SPB 5, 30 m Länge, 0.25 mm Innendurchmesser und 0.2 μ m Filmdicke) eingesetzt, versehen mit einem 1 - 2 m langen Retention-gap. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte an einem Integrator der Firma *Merck-Hitachi* Modell D-2500. Es wurden je nach Trennproblem folgende Temperaturprogramme verwendet:

Programm 1: 70 °C (1 min isotherm) - 20 °C/min auf 130 °C - 4 °C/min auf 290 °C

Programm 2: 70 °C (1 min isotherm) - 15 °C/min auf 110 °C - 3 °C/min auf 290 °C

Enantioselektive Gaschromatographie

Die gaschromatographische Trennung von D- und L-Zuckern erfolgte an einem Gerät der Firma *Carlo Erba*, Modell Fractovap 2150 mit Splitinjektion und Flammenionisationsdetektor. Das Trägergas war Wasserstoff mit einem Druck von 50 kPa. Als Trennphasen dienten folgende 3 Phasen:

- A Heptakis[2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-pentyl]- β -cyclodextrin (20 % in OV 1701)
- B Oktakis[2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-pentyl]- γ -cyclodextrin (50 % in OV 1701)

C Heptakis[2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl]- β -cyclodextrin (50 % in OV 1701).

Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte an einem Integrator der Firma *Merck-Hitachi* Modell D-2500. Die Temperaturbedingungen sind in Tab. 3-38 und Tab. 3-39 in Kapitel 3.3.3 oder bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben.

Präparative Gaschromatographie

Die Isolierung von 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-L-dulcitol mittels präparativer GC erfolgte an einem umgebauten Gerät der Firma *Varian*, Modell 1400. Als Trennphase diente eine 1.85 m lange gepackte Edelstahlsäule (4.3 mm i.D., SE-30 Polysiloxan (10 % (w/w) auf Chromosorb W-HP). Als Trägergas diente Helium mit einem Flow von 120 ml/min. Pro Trennung wurden 100 μ l einer 10 % Lösung injiziert und isotherm bei 120 °C eluiert. Die Produkte wurden am Auslaß in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Teflonschlauch ausgefroren.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden nach gaschromatographischer Trennung an dem doppelt fokussierenden Massenspektrometer Modell VG/70-250S der Firma *VG Analytical* oder dem Iontrapmassenspektrometer Modell ITDS der Firma Finnigan MAT aufgenommen. Es wurde in den Aufnamemodi chemische Ionisation (CI) mit Ammoniak als Reaktantgas oder Elektronenstoßionisation (EI) gemessen.

Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie (FAB-MS)

Die FAB-Massenspektren wurden an dem Gerät VG/70-250S nach Beschuß mit Xenon-Atomen (Xenon-Quelle der Firma *Ion-Tech*, Beschleunigungsspannung 8kV) im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen. Als Matrix diente *m*-Nitrobenzylalkohol mit einem Zusatz von Natriumiodid. Für die quantitativen Bestimmungen wurden jeweils zehn Spektren akkumuliert (Multi-Channel-Methode).

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Für die Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren wurde ein Massenspektrometer der Firma *Bruker*, Modell Biflex III mit einem N₂-Laser (337 nm) verwendet. Das Gerät verfügte über die Delayed-Extraction-Technik. Die Aufnahmen erfolgten im Reflector- (doppelte Flugzeit) und Positiv-Ionen-Modus. Die Beschleunigungsspannung betrug 19.5 kV. Als Matrix dienten α -Cyanozimtsäure und NaI. Bei der Analyse quartärnisierter Proben wurde auf NaI verzichtet. Es wurden jeweils 100-150 shots aufsummiert.

Electrospray Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-Massenspektren wurde an einem ESI-oTOF-Massenspektrometer der Firma *PE Biosystems*, Modell Mariner aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte in der nano-spray Technik mit goldüberzogenen Glasskapillaren. Die Arbeitsspannung betrug 700 -900 V. Die Temperatur der Injektionsöffnung betrug 200 °C. Es wurden ca. 3 µl Lösung aufgezogen und jeweils 20 Spektren akkumuliert.

Kernresonanzspektrometrie (NMR)

Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten WM400 (400 MHz: ^1H , 100.6 MHz: ^{13}C) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Signalzuordnungen wurden gegebenenfalls durch ^1H - ^1H - und ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren abgesichert und zur Bestimmung der Multiplizität der ^{13}C -Signale die DEPT-Aufnahmetechnik (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) angewendet. Als Lösungsmittel dienten CDCl_3 mit Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) und D_2O mit Aceton ($\delta = 2.04$ ppm) als internem Standard.

6.2 Probenmaterial

Galactane

Die untersuchten Galactane aus *Arianta arbustorum* (Aa), *Helix pomatia* (Hp) und *Lymnea stagnalis* (Ls) wurden freundlicherweise von Prof. Bretting, Zoologisches Institut, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Cellulosen

Die verwendeten Cellulosen [Linters Buckeye feucht und trocken (Typ 4403/020, DP 1470)] wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Puls, Bundesforschungsinstitut für Holzforschung (BFH), Hamburg-Lohbrügge, zur Verfügung gestellt. Avicel PH200 war eine kommerzielle Probe.

Methylcellulosen

Methylcellulosen wurden zum Teil aus den oben genannten Cellulosen selbst hergestellt. Als Vergleichssubstanz diente eine kommerzielle Methylcellulose der Firma *Aldrich* (9004-67-5). Des weiteren wurden zwei regioselektiv hergestellte 2,3-Di-*O*-methylcellulosen aus der Arbeitsgruppe Prof. Wenz, Polymer-Institut der Universität Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

Ethylcellulosen

Es wurden kommerzielle Ethylcellulosen eingesetzt.

Celluloseacetate

Zwei Celluloseacetate mit niedrigem Acetyl-DS wurden freundlicherweise von Prof. Oppermann, Deutsches Faserinstitut, Denckendorf, zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden vier kommerzielle Cellulose-2,5-acetate untersucht.

6.3 Chemische Methoden

6.3.1 O-Alkylierungen

A Methylierung nach Ciucanu und Kerek⁵⁵

Die zu methylierende Probe wird in trockenem DMSO gelöst, bzw. suspendiert und anschließend mit 5 Äquivalenten pro freier OH-Gruppe fein pulverisiertem Natriumhydroxid versetzt. Nach 30 min wird die entsprechende Menge Iodmethan zugegeben und über Nacht gerührt (bei Monosacchariden ist die Reaktion bereits nach 5-10 Minuten vollständig abgelaufen). Man entfernt die flüchtigen Reaktionsprodukte im Ölpumpenvakuum und führt die Methylierung gegebenenfalls ein zweites Mal durch. Die Aufarbeitung erfolgt entweder durch Dialyse mit anschließender Gefriertrocknung oder durch Zugabe von Wasser und 5 %iger Natriumthiosulfatlösung und Extraktion mit Dichlormethan.

Nach dieser Methode wurden auch Ethylierungen und Acyl-Alkyl-Austausch durchgeführt.

B Modifiziertes Hakomori-Verfahren in DMAc/LiCl⁹⁷

Die Cellulose wird unter Stickstoff in einer frisch hergestellten 9 %igen Lösung von Lithiumchlorid in Dimethylacetamid gelöst. Man gibt dann entweder fein pulverisiertes Natriumhydroxid oder eine frisch hergestellte Lithium-Methylsulfonylmethanid-Lösung als Base zu, kühlt und gibt nach 30 Minuten Einwirkungszeit die entsprechende Menge Iodmethan zu. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter A.

Nach dieser Methode wurde auch Acyl-Alkyl-Austausch durchgeführt.

C Modifiziertes Hakomori-Verfahren in DMSO/LiCl¹⁰⁶

In Wasser gequollene Cellulose wird zunächst durch Lösungsmittelaustausch über Methanol, trockenes Aceton und Petrolether (50/70) jeweils fünfmal gewaschen. Die so behandelte Cellulose wird dann unter Stickstoffatmosphäre in eine 9 %ige Lösung von Lithiumchlorid in DMSO gegeben. Der Petrolether wird im Vakuum entfernt und 24 h bei RT gerührt. Es stellt sich keine Lösung der Cellulose ein. Danach werden 2 Äquivalente pro OH-Gruppe LiDimethyl-Lösung zugegeben und das Reaktionsgemisch im Eisbad gekühlt. Nach 15 min werden 2 Äquivalente pro OH-Gruppe Methyljodid zugegeben und 24-54 h gerührt. Die Aufarbeitung des methylierten Produkts erfolgt mittels Dialyse und Gefriertrocknung.

D Methylierung in wässriger Natronlauge mit Iodmethan

500 mg mercerisierte Cellulose werden unter Stickstoffatmosphäre in 10 ml eiskalter entgaster 30 %iger Natronlauge suspendiert. Dann werden sofort 10 Äquivalente Iodmethan pro AGU zugegeben und bei RT gerührt. Nach 48 h wird die Hälfte des Ansatzes und nach weiteren 48 h der Rest mittels Dialyse und Gefriertrocknung aufgearbeitet.

E Methylierung nach Prehm⁹⁵

40 mg (0.146 mmol) Cellulose-2,5-acetat wurden in 4 ml Trimethylphosphat gelöst. Dann wurden 168 µl (20 Äquivalente pro freier OH-Gruppe) Methyltrifluormethansulfonat und 248 µl (15 Äquivalente pro freier OH-Gruppe) 2,6-Di-*tert.*-butylpyridin versetzt und 5 d bei RT gerührt. Methyltriflat wird durch Zugabe von Methanol zerstört und das methylierte Produkt durch Dialyse und Gefriertrocknung gereinigt. Man erhält 40.8 mg (0.145 mmol, 100 % d. Th.) permethyliertes Cellulose-2,5-acetat.

F Acetyl-Alkyl-Austausch in DMAc mit NaH/NaOH und Methyljodid

10.3 mg (0.038 mmol) methyliertes Celluloseacetat (DS 2.4) werden unter Stickstoffatmosphäre in 2 ml trockenem Dimethylacetamid gelöst und mit je ca. 10 Äquivalenten Natriumhydrid und Natriumhydroxid pro Acetylgruppe versetzt. Nach Abkühlung des Reaktionsgemischs in einem Eisbad werden 20 Äquivalente *d*₃-Methyljodid pro Acetylgruppe zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernung der flüchtigen Substanzen im Stickstoffstrom wird das Verfahren ohne weitere Aufarbeitung wiederholt. Nach Zerstörung des Natriumhydrids mit Methanol wird mit Wasser versetzt und das Produkt mit Dichlormethan extrahiert. Man erhält 8 mg (0.038 mmol, 100 % d. Th.) gemischt methylierte/*d*₃-methylierte Cellulose.

6.3.2 Methylierungsanalyse

Hydrolyse

A Standard-Verfahren mit 2N Trifluoressigsäure

Ca. 2mg der permethylierten Probe werden in einem 1 ml-V-Vial mit 1 ml 2N TFA versetzt und unter Rühren bei 120 °C hydrolysiert. Die Hydrolysedauer beträgt je nach Probenmaterial 2 bis 3 h . Nach Abkühlung auf RT werden die Lösung im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und Reste von TFA durch Kodestillation mit Toluol entfernt.

B Stufenweises Verfahren mit Trifluoressigsäure nach Fengel *et al.*¹⁴⁷

Ca. 2 mg des Probenmaterials werden in 200 µl konzentrierter TFA gequollen, bis eine klare Lösung entsteht. Danach wird mit Wasser auf 9 N TFA verdünnt und 15 min auf 100 °C er-

hitzt. Die abgekühlte Lösung wird weiter auf 2N TFA verdünnt und 2 h bei 120 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt wie beim Standardverfahren.

C Stufenweises Verfahren mit Perchlorsäure

Diese Methode wurde insbesondere bei Methylcellulosen und methylierten Celluloseacetaten mit geringem Methyl-DS verwendet.

Ca. 2 mg des Cellulosederivats werden 10 min bei RT in 100 µl 70 %iger Perchlorsäure gequollen und anschließend nach Verdünnung auf 1.2 N Perchlorsäure 16 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wird mit wäßriger KOH neutralisiert, im Kühlschrank einige Stunden gekühlt und der Überstand vom ausgefallene Kaliumperchlorat nach Zentrifugieren abpipettiert. Die Lösung wird im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft.

Reduktion

Der trockene Rückstand wird mit 0.5 ml einer 0.5 N Lösung von NaBH₄ oder NaBD₄ in 2N Ammoniak versetzt und 1 h bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wird überschüssiges Hydrid mit Eisessig zerstört und fünfmal mit 15 % methanolischer Essigsäure versetzt und zur Trockne eingedampft, um die am Zuckeralkohol entstandenen Borsäureester zu spalten und als Borsäuretrimethylester zu entfernen.

Acetylierung

Der Rückstand wird mit 50 µl Pyridin und 250 µl Essigsäureanhydrid versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wird der Ansatz mit Dichlormethan versetzt und solange mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen bis die Essigsäure vollständig hydrolysiert ist. Man wäscht zweimal mit Wasser, trocknet über CaCl₂ und analysiert die Produkte mittels GC und GC-MS.

6.3.3 Reduktiver Abbau

Allgemein

Zur 0.1 N Lösung einer peralkylierten Probe in Dichlormethan werden je 5 Äqu. Triethylsilan und TMS-Triflat gegeben und 4 h bis zu 24 h bei RT gerührt.

Die Aufarbeitung bei peralkylierten Zuckermonomeren erfolgt durch Rühren mit ges. NaHCO₃-Lsg, bis keine CO₂-Entwicklung mehr zu erkennen ist und zweimaliges Waschen mit Wasser.

Die Abbauprodukte von reaktiv gespaltenen peralkylierten Polysacchariden werden hingegen zunächst *in-situ* acetyliert und dann aufgearbeitet wie oben erwähnt.

Acetylierung

Der Reaktionsansatz wird mit 25 μl Ac_2O versetzt und weitere 20 min - 2 h bei RT gerührt. Danach wird je zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über CaCl_2 getrocknet.

6.3.4 Analysenmethode für carboxyliche Gruppen in Ethylcellulose

Methanolyse

Ethylcellulose **EC1** (601.8 mg, ca. 2.59 mmol) wird aufgeteilt in sechs Portionen in 5 ml-V-Vials mit je 5 ml 1.5 N methanolischer HCl bei 100 °C 2 h gerührt. Die vereinigten Methanolysate werden mit 0.5 N ethanolischer KOH neutralisiert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Man erhält ein fahlgelbes Öl. Die DC-Kontrolle zeigte vollständige Depolymerisation an.

Perethylierung

Das Methanolysat wird in 6.5 ml DMSO gelöst. Dann werden 805.7 mg (20.14 mmol) pulverisiertes Natriumhydroxid zugegeben und die Suspension im Eisbad für 10 min gekühlt. Danach werden 1.65 ml (20.44 mmol) Ethyliodid zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wird dann in 200 ml Phosphatpuffer (pH 6.81), der aus je 100 ml 0.66 N Na_2HPO_4 und 0.66 N KH_2PO_4 hergestellt wurde, geschüttelt, dreimal mit 400 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen fünfmal mit insgesamt 500 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über CaCl_2 wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 693 mg (ca. 84 %) perethylierte Produkte.

Verseifung

Das perethyliertes Methanolysat von **EC1** wird mit 7 ml 0.5 N ethanolischer KOH versetzt und 7 h bei RT gerührt. Dann wird das Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt, mit 10 ml Wasser versetzt und dreimal mit insgesamt 50 ml n-Pentan und zweimal mit insgesamt 40 ml Diethylether die Neutralfraktion extrahiert. Man erhält 629.8 mg (ca. 76 %) perethylierte Methylglucoside.

Extraktion der Säuren

Die wäßrige Phase wird solange mit HCl versetzt, bis die Lösung deutlich sauer reagiert. Danach werden die perethylierten Aldonsäuren in der nicht dissoziierten Form mit Dichlormethan extrahiert und nach Trocknung in die entsprechenden Ethyl-, Methyl- und Trimethylsilylester überführt.

6.3.5 Weitere Derivatisierungsmethoden

Trimethylsilylierung

Ca. 2 mg der zu derivatisierenden Substanz werden mit 30 μ l Pyridin und 120 μ l BSTFA versetzt und 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit Dichlormethan verdünnt und gaschromatographisch untersucht.

Ethyl- und Methylesterdarstellung von freien perethylierten Aldonsäuren

Ca. 2 mg eines Gemisches freier perethylierter Aldonsäuren werden mit 1 ml 1.5 N ethanolischer bzw. methanolischer HCl 2 h bei 100 °C gerührt. Nach Entfernung der Säure im Stickstoffstrom wird mehrmals mit Toluol codestilliert und anschließend in Dichlormethan aufgenommen.

Methylglycosylierung von Zuckermonomeren

D-Galactose (22.2 mg; 0.12mmol) wird in einem 3-ml-V-Vial in 2 ml 1.5 N methanolischer HCl bei 100 °C über Nacht gerührt. Nach Entfernung der Säure im Stickstoffstrom werden die Methylgalactoside nach Methode A permethyliert.

6.3.6 Partialabbau von Cellulosederivaten

Alle partiellen Abbauprozesse wurden durch dünnschichtchromatographische Kontrolle verfolgt, um einen geeigneten mittleren DP zu erhalten. Cellooligomerenmischungen, die nur schwer aufzuarbeiten waren, wurden direkt säulenchromatographisch (Sephadex LH20) gereinigt und fraktioniert.

Partielle Hydrolyse

Ca. 20 mg einer perdeuteromethylierten Methylcellulose werden mit 4 ml 2 N TFA versetzt und 2 h bei 100 °C erhitzt. Nach Erkalten der Lösung wird im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und restliche TFA durch Kodestillation mit Toluol entfernt. Die Massenbereiche nach massenspektrometrischer Analyse sind in Tab. 6-1 dargestellt.

Tab. 6-1: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum nach partieller Hydrolyse einer perdeuteromethylierten Methylcellulose (m/z, jeweils $[M+Na]^+$)

	Massenbereich	Anzahl CH ₃ /CD ₃	
Monomere	245-254	3/0	0/3
Dimere	449-467	6/0	0/6
Trimere	653-680	9/0	0/9
Tetramere	857-893	12/0	0/12

Partielle Methanolyse mit anschließender Perdeuteromethylierung

Ca. 20 mg perdeuteromethylierte Methylcellulose werden mit 4 ml 0.1 N methanolischer HCl versetzt und 1.5 h bei 90 °C gerührt. Die methanolische HCl wird im Stickstoffstrom entfernt und das Oligomerengemisch in DMSO mit NaOH und CD₃I perdeuteromethyliert.

Tab. 6-2: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum einer partiell methanolysierten perdeuteromethylierten Methylcellulose, die anschließend perdeuteromethyliert wurde (m/z, jeweils $[M+Na]^+$)

	Massenbereich	Anzahl CH ₃ /CD ₃	
Monomere	276-285	4/1	1/4
Dimere	480-498	7/1	1/7
Trimere	684-711	10/1	1/10
Tetramere	888-924	13/1	1/13

Die Massenbereiche für partiell methanolysierte, perethylierte Methylcellulose, die danach erneut perethyliert wurde, zeigt Tab. 6-3:

Tab. 6-3: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum nach partieller Hydrolyse einer perethylierten Methylcellulose, die anschließend erneut perethyliert wurde (m/z, jeweils $[M+Na]^+$).

	Massenbereich	Anzahl CH ₃ /C ₂ H ₅	
Monomere	287-329	3/0	0/3
Dimere	491-575	6/0	0/6
Trimere	695-821	9/0	0/9
Tetramere	899-1067	12/0	0/12

Partielle Hydrolyse mit anschließender reduktiver Aminierung

Ca. 20 mg perdeuteromethylierte Methylcellulose werden wie unter 0 partiell abgebaut. Man versetzt das getrocknete Hydrolysat anschließend mit 750 μl MeOH, 85 μl Essigsäure und 185 μl n-Propylamin und rührt 45 min bei RT. Dann werden 80 mg Natriumcyanoborhydrid in 500 μl Methanol und 150 μl Wasser zugesetzt, und man läßt 3 d bei RT rühren. Anschließend wird säulenchromatographisch gereinigt und fraktioniert.

Tab. 6-4: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum (m/z, jeweils $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

	Massenbereich	Anzahl CH_3/CD_3	
Monomere	288-297	3/0	0/3
Dimere	492-510	6/0	0/6
Trimere	696-723	9/0	0/9
Tetramere	900-936	12/0	0/12

Partielle Hydrolyse mit anschließender reduktiver Aminierung und erneuter Alkylierung

Das reduktiv aminierte Cellooligomerenmischung wird in DMSO mit NaOH und CH_3I peremethyliert und anschließend säulenchromatographisch gereinigt und fraktioniert. Die Massenbereiche des Massenspektrums sind in Tab. 6-5 für perdeuteromethylierte Oligomere aus Methylcellulose dargestellt.

Tab. 6-5: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum (m/z, jeweils M^+)

	Massenbereich	Anzahl CH_3/CD_3	
Monomere	322-331	3/0	0/3
Dimere	526-544	6/0	0/6
Trimere	730-757	9/0	0/9
Tetramere	934-970	12/0	0/12

Für analog untersuchte perethylierte Methylcellulose, die partiell hydrolysiert, mit n-Propylamin reduktiv aminiert und im letzten Schritt perethyliert wurde, sind die Massenbereiche in Tab. 6-6 angegeben.

Tab. 6-6: Massenbereiche der Oligomerfraktionen im Massenspektrum (m/z, jeweils M⁺)

	Massenbereich	Anzahl CH ₃ /C ₂ H ₅	
Monomere	378-420	3/0	0/3
Dimere	582-666	6/0	0/6
Trimere	786-912	9/0	0/9
Tetramere	991-1158	12/0	0/12

6.4 Synthesen von Modellsubstanzen

6.4.1 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose (9-b)

50 mg (0.2 mmol) Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid werden in einem Reacti-Vial mit 5 ml 2N Trifluoressigsäure versetzt und 3 h bei 120 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Säure im Stickstoffstrom entfernt. Man kodestilliert zweimal mit Toluol auf, um letzte Wasser- und Säurereste zu entfernen. Man erhält 45 mg (0.19 mmol) Produkt (95 % d. Th.).

¹H-NMR* (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.1 (d, 1H, H-1 α , ³J_{1,2}=3.56Hz), 4.31 (d, 1H, H-1 β , ³J_{1,2}=8.14Hz), 3.58 (dd, 1H, H-6 α , ³J_{6,5}=3.56Hz, ²J_{6,6'}=10.17Hz), 3.40 (dd, 1H, H-6 β , ²J_{6,6'}=11.17, ³J_{6',5}=2.04), 3.36-3.30 (m, 3H, H-4 α , H-5 α , H-6' β), 3.26-3.20 (m, 2H, H-3 α , H-5 β), 3.10-3.05 (m, 1H, H-3 β), 3.02-2.92 (m, 3H, H-2 α , H-6' α , H-4 β), 2.73 (dd, 1H, H-2 β , ³J_{2,1}=8.14Hz, ³J_{2,3}=9.16Hz), 3.30, 3.24, 3.17, 3.09 (4s, 12H, OCH₃-2 α , -3 α , -4 α , -6 α), 3.33, 3.30, 3.24, 3.10 (4s, 12H, OCH₃-2 β , -3 β , -4 β , -6 β)

* α/β -Verhältnis: 3:2

6.4.2 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-O-methyl-1-N-propylamino-D-sorbit (21)

24.4 mg (0.103 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose werden mit einer Lösung aus 640 μ l Methanol, 73 μ l Eisessig und 156 μ l n-Propylamin versetzt und 30 min bei RT gerührt. Dann werden 65 mg NaCNBH₃ hinzugefügt und nach 15 min - da keine Lösung des Salzes erfolgt war - 120 μ l Wasser zugegeben. Man rührt 2 h bei 80 °C und lässt abkühlen. Man erhält nach Reinigung über eine Sephadex-LH20-Säule (Dichlormethan/Methanol 2:1) 25.3 mg (0.091 mmol, 88 % d. Th.) 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-N-propylamino-D-sorbit.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.94 (ddd, 1 H, H-5), 3.74 (ddd, 1 H, H-2, ³J_{2,1a}=4.83 Hz, ³J_{2,1b}=6.62 Hz, ³J_{2,3}=5.60 Hz), 3.69 (dd, 1 H, H-3, ³J_{3,2}=5.6 Hz, ³J_{2,4}=3.05 Hz), 3.59-3.52 (m, 2 H, H-6a,6b), 3.55, 3.50, 3.44, 3.42 (4s, 12 H, OCH₃-2, -3, -4, -6), 3.42-3.38 (m, 1 H, H-4), 2.98 (dd, 1 H, H-1a, ²J_{1a,1b}=12.46 Hz, ³J_{2,1a}=4.83 Hz), 2.86 (dd, 1 H, H-1b, ²J_{1b,1a}=12.21 Hz, ³J_{1b,2}=6.62 Hz), 2.72 (t, 2 H, α-CH₂, ³J_{1',2'}=7.38 Hz), 1.61 (sextett, 2 H, β-CH₂, ³J_{2',1'}=7.38 Hz, ³J_{2',3'}=7.38 Hz), 0.96 (t, 3 H, γ-CH₃, ³J_{3',2'}=7.38 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 80.5 (C-3), 78.9 (C-4), 78.4 (C-2), 73.5 (C-6), 70.0 (C-5), 60.1, 59.2, 59.1, 58.8 (2-, 3-, 4-, 6-OCH₃), 51.4 (α-CH₂), 49.1 (C-1), 21.8 (β-CH₂), 11.5 (γ-CH₃).

6.4.3 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N,N,N*-(dimethylpropyl)ammonium-D-sorbit (22)

25.3 mg (0.091 mmol) 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N*-propylamino-D-sorbit werden in 2.5 ml DMSO gelöst und mit 31.2 mg (0.78 mmol) NaOH versetzt. Nach 15 min werden unter Eiskühlung 50 µl (0.80 mmol) Methyljodid zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wird über eine Sephadex-LH20-Säule (Dichlormethan/Methanol 2:1) gereinigt, und man erhält 42.3 mg (0.094 mmol, 104 % d. Th.) 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N,N,N*-(dimethylpropyl)ammonium-D-sorbit als Iodid.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 4.11 (q, 1 H, H-5), 3.89 (dd, 1 H, H-3), 3.81-3.74 (m, 2 H, H-1a, -6a), 3.55-3.42 (m, 3 H, H-4, -5, -6b), 3.50, 3.47, 3.43, 3.40, 3.39 (5s, 15 H, OCH₃-2, -3, -4, -5, -6), 3.38-3.29 (m, 3 H, α-CH₂, H-1b), 3.12, 3.11 (2s, 6 H, 2 N⁺-CH₃), 1.83 (sextett, 2 H, β-CH₂, ³J_{β,γ}=7.38 Hz), 1.03 (t, 3 H, γ-CH₃, ³J_{γ,β}=7.38 Hz)

¹³C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 80.4 (C-3), 78.6 (C-4), 77.7 (C-2), 74.6 (C-2), 70.3 (C-6), 67.3 (α-CH₂), 66.9 (C-1), 60.3, 59.8, 59.2, 57.5, 57.4 (OCH₃-2, -3, -4, -5, -6), 52.0, 51.8 (N⁺-CH₃), 17.0 (β-CH₂), 10.9 (γ-CH₃).

6.4.4 3-Desoxy-D-*arabino/ribo*-hexono-1,4-lacton (23)

Es werden 59.2 mg (0.91 mmol) KCN und 45.5 mg (0.81 mmol) KOH in 3.75 ml Wasser gelöst und an der Wand eines 25-ml-Spitzkolbens ausgefroren. Danach werden 3.75 ml einer 0.2 molaren Na₂CO₃-Lösung, in der 99.8 mg (0.74 mmol) 2-Desoxy-D-ribose gelöst worden waren, zugegeben und 40 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann über 17 ml eines Kationenaustauschers (Amberlite IR 120, H⁺-Form) deionisiert. Die gesammelten wäßrigen Fraktionen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der fahlgelbe Rückstand wurde

anschließend dreimal mit 1.5 ml Ethanol aufgenommen und erneut eingengt. Man erhielt 113.4 mg (0.70 mmol, 77 % d.Th.) Rohprodukt (Lacton-Form), das nicht weiter aufgetrennt wurde, da beide Diastereomere in alkalisch behandelter Cellulose äquimolar auftreten. Die Identifikation erfolgte massenspektrometrisch in Form der trimethylsilylierten 1,4-Lactone¹⁵¹ und der freien Säuren¹⁵², bzw. als perethylierter Ethylester.

1) 3-Desoxy-2,5,6-tri-*O*-trimethylsilyl-D-*arabino/ribo*-hexono-1,4-lacton (**23**):

EI-MS (VG): *m/z* (Rel. Int. (%)) 43 (4), 45 (10), 59 (7), 69 (3), 73 (100), 75 (14), 89 (1), 101 (4), 103 (18), 117 (7), 129 (33), 131 (5), 133 (7), 147 (27), 149 (7), 155 (8), 189 (5), 205 (12), 219 (4), 246 (8), 273 (6), 292 (5), 322 (1), 363 (0.5), 378 (M^+ ; 0.85).

2) Trimethylsilyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-trimethylsilyl-D-*arabino/ribo*-hexonat (**24**)

EI-MS (VG): *m/z* (Rel. Int. (%)) 43 (2), 45 (6), 59 (4), 73 (100), 75 (13), 77 (25), 83 (2), 101 (3), 117 (3), 129 (13), 131 (2), 133 (4), 147 (32), 148 (5), 149 (3), 191 (2), 204 (3), 205 (5), 217 (7), 219 (5), 245 (64), 246 (14), 247 (7), 257 (2), 271 (2), 292 (2), 317 (1), 333 (1), 335 (4), 345 (1), 347 (2), 525 (M^+-15 ; 0.39).

3) Ethyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino/ribo*-hexonat (**28-d/29-d**)

EI-MS (ITDS): *m/z* (Rel. Int. (%)) 43 (11), 45 (18), 57 (11), 59 (27), 61 (17), 72 (4), 73 (9), 75 (13), 83 (9), 85 (16), 87 (5), 101 (6), 103 (14), 116 (5), 129 (24), 131 (3), 141 (2), 155 (3), 157 (100), 158 (9), 169 (3), 201 (5), 203 (11), 215 (3), 247 (1), 261 (M^+-59 ; 0.34).

6.4.5 2-Desoxy-D-*arabino*-hexono-1,5-lacton (**25**)

Zu einer Lösung von 30 mg (0.18 mmol) 2-Desoxy-D-glucose in 0.5 ml Wasser werden 8.7 mg Palladium-Aktivkohle gegeben und bei 60 °C gerührt, wobei der pH durch Zugabe von Natronlauge konstant auf 9 gehalten wurde. Der Reaktionsverlauf wird mittels HPAEC-PAD verfolgt. Der Katalysator wird durch Filtration abgetrennt und die Lösung über eine Kationenaustauschersäule (Amberlite IR 120, H^+ -Form) entsalzt. Nach Gefriertrocknung erhält man 16.7 mg (0.10 mmol, 57 % d. Th.) 2-Desoxy-D-*arabino*-hexono-1,5-lacton. Die Identifikation erfolgt massenspektrometrisch nach Perethylierung als Trimethylsilyl-2-desoxy-3,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino*-hexonat (**25-e**):

EI-MS (ITDS): *m/z* (Rel. Int. (%)) 43 (21), 45 (21), 57 (25), 59 (14), 61 (33), 73 (44), 75 (36), 83 (10), 85 (100), 86 (10), 99 (6), 101 (5), 103 (8), 111 (12), 115 (4), 116 (8), 129 (34), 143 (9), 157 (21), 171 (4), 187 (7), 203 (75), 215 (5), 261 (4).

6.4.6 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (**63-D**):

Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosid (**48- α**):

Methyl- α -D-galactopyranosid (81.2 mg; 0.418 mmol) wird in 1.6 ml DMSO gelöst, mit 202.8 mg (5.07 mmol) fein gemörsertem NaOH versetzt und 20 min gerührt. Dann wird Methyljodid (300 ml, 4.8 mmol) zugegeben und 18 h methyliert. Nach Zugabe von 5 %-iger Na₂S₂O₃-Lösung wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die org. Phase fünfmal mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird mit EE über Kieselgel gereinigt. Man erhält 40.5 mg (39 % d. Th.) Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosid.

EI-MS (VG): *m/z* (Rel. Int. (%)) 45 (79), 71 (19), 75 (65), 88 (100), 101 (43), 111 (4), 131 (3), 187 (2)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.87 (d, 1H, H-1, ³*J*_{1,2}=3.56 Hz), 3.85 (dd, 1H, H-4), 3.69 (dd, 1H, H-5), 3.64 (dd, 1H, H-2), 3.49 - 3.59 (m, 3H, H-3, H-6,6'), 3.57, 3.52, 3.51, 3.42, 3.41 (5s, 15H, OCH₃-1,2,3,4,6)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 98.0 (C-1), 80.4, 77.9, 76.3, 71.3 (C-2, C-3, C-4, C-5), 69.0 (C-6), 61.4 (OCH₃-4), 59.2 (OCH₃-6), 59.0 (OCH₃-2), 58.3 (OCH₃-3), 55.4 (OCH₃-1)

1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (**63-D**):

Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosid (21.7 mg; 0.087 mmol) werden in 2 ml Dichlormethan gelöst und über Nacht (16h) mit je 10 Äquivalenten Triethylsilan (140 ml) und TMS-Triflat (160 ml) reduziert. Die Reaktion wird mit ges. NaHCO₃-Lösung abgebrochen. Das Rohprodukt wird mit EE/PE (1:1) über Kieselgel gereinigt. Man erhält 5.9 mg (31 % d. Th.) 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (**63-D**).

EI-MS (ITDS): *m/z* (Rel. Int. (%)) 45 (100), 58 (18), 59 (17), 71 (49), 75 (30), 88 (30), 101 (91), 111 (8), 143 (20), 157 (4), 175 (6)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.12 (dd, 1H, H-1e), 3.69 (dd, 1H, H-4), 3.65 - 3.44 (m, 4H, H-2, H-5, H-6,6'), 3.16 (dd, 1H, H-3), 3.09 (dd, 1H, H-1a), 3.57, 3.53, 3.48, 3.40 (4s, 12H, -OCH₃-2,3,4,6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 85.2 (C-3), 77.7 (C-5), 76.3 (C-2), 75.6 (C-4), 71.5 (C-6), 68.1 (C-1), 61.3 (OCH_3 -4), 59.2 (OCH_3 -6), 58.9, 57.9 (OCH_3 -2,3)

6.4.7 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methyl-L-dulcitol (63-L)

Ca. 7 mg L-Galactose werden bei 100 °C 8h in 2 ml 1.5 N MeOH/HCl gerührt. Nach dem Abkühlen wird die methanolische HCl im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand direkt mit NaOH/ CH_3I in DMSO methyliert. Nach der Aufarbeitung wird das Rohprodukt mit je 10 Äquivalenten TMS-Triflat und Triethylsilan reduziert. Man erhält permethyliertes 1,4- und 1,5-Anhydro-L-dulcitol im Verhältnis 1:2. Die beiden Isomere werden anschließend mittels präparativer GC (Trennphase: Heptakis[2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl]cyclomaltoheptaose) getrennt.

$^1\text{H-NMR}$ (δ in ppm): entspricht (63-D)

6.4.8 1,5-Anhydro-D-dulcitol (79-D)

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (78-D)

400 mg (1.03 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-galacto-hexopyranose werden mit 1.1 ml einer 30 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt. Man läßt 2 h bei RT rühren und gibt Diethylether zu. Man erhält nach Waschen der organischen Phase mit Wasser und ges. NaHCO_3 -Lösung und Trocknen über CaCl_2 402 mg (95.5 % d. Th.) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.70 (d, 1H, H-1, $^3J_{1,2}=4.08$ Hz), 5.52 (dd, 1H, H-4, $^3J_{3,4}=3.56$, $^3J_{4,5}=1.27$), 5.40 (dd, 1H, H-3, $^3J_{2,3}=10.68$, $^3J_{3,4}=3.56$), 5.05 (dd, 1H, H-2, $^3J_{1,2}=4.08$, $^3J_{2,3}=10.68$), 4.49 (dd, 1H, H-5, $^3J_{4,5}=3.56$, $^3J_{5,6}=6.10$, $^3J_{5,6'}=6.61$), 4.19 (dd, 1H, H-6, $^3J_{5,6}=6.10$, $^3J_{6,6'}=11.19$), 4.19 (dd, 1H, H-6', $^3J_{5,6'}=6.62$, $^3J_{6,6'}=11.19$), 2.15, 2.11, 2.06, 2.01 (4s, 12H, OCH_3 -2, OCH_3 -3, OCH_3 -4, OCH_3 -6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.3, 170.1, 169.9, 169.8 (CO-2,3,4,6), 88.1 (C-1), 71.1 (C-5), 68.0 (C-3), 67.8 (C-2), 67.0 (C-4), 60.8 (C-6), 20.75, 20.63, 20.58, 20.56 (CH_3 -2,3,4,6)

1,5-Anhydro-D-dulcitol (79-D)

Zu einer Lösung von 380 mg (0.92 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid in 5 ml Diethylether werden über 45 min langsam 12 ml einer 1M Lösung von LiAlH_4 in Diethylether zugetropft. Man läßt 2 h bei RT rühren und gibt vorsichtig Wasser zu, bis keine

H₂-Entwicklung mehr stattfindet. Nach Abtrennung der organischen Phase filtriert man die wäßrige Lösung. Nach Abdestillieren des Wassers am Rotationsverdampfer wird in wenig Wasser (6 ml) wieder aufgenommen und filtriert anschließend über einen starken Kationenaustauscher (IR120, H⁺-Form) und einen schwach basischen Ionenaustauscher (AG3-X4, Freie Base-Form) eluiert. Es wurden nur die Fraktionen vereinigt, die durch Detektion mit ethanolischer Schwefelsäure eindeutig Produkt enthielten. Man erhält nach Gefriertrocknung 83.9 mg (0.511 mmol; 49.6 % d. Th.) 1,5-Anhydro-D-dulcit (**79-D**).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.07 (dd, 1H, H-1e, ²J_{1e,1a}=11.19 Hz, ³J_{1e,2}=5.60 Hz), 4.01 (dd, 1H, H-4), 3.89 (ddd, 1H, H-2, ³J_{2,1a}=11.19, ³J_{2,1e}=5.60), 3.81-3.76 (m, 2H, H-6,6'), 3.67-3.62 (m, 2H, H-3,5), 3.27 (dd, 1H, H-1a, ²J_{1a,1e}=11.19, ³J_{1a,2'}=11.19).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O): δ [ppm] = 79.8, 74.5 (C-3,5), 69.6 (C-1), 69.5 (C-4), 67.1 (C-2), 61.8 (C-6).

6.4.9 1,5-Anhydro-L-dulcit (**79-L**)

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -L-galacto-hexopyranose (**77-L**)

In einem 2-ml-Reacti-Vial werden 49.9 mg Natriumacetat eingewogen und 0.7 ml Acetanhydrid zugegeben. Die Mischung wird auf 85 °C erhitzt, wobei sich das Salz nicht löst. Dann werden 90 mg (0.5 mmol) L-Galactose in zwei Portionen zugegeben und auf 145 °C erhitzt. Es entsteht eine klare Lösung. Nach insgesamt 1 h Reaktionszeit läßt man abkühlen, schüttet die Reaktionslösung auf Eis und läßt 2 h im Eisbad stehen. Man extrahiert dreimal mit Diethylether, wäscht die organische Phase je dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung und Wasser, trocknet über MgSO₄ und engt am Rotationsverdampfer ein. Der Rückstand wird anschließend unter Rückfluß in Petrolether gelöst und über Nacht im Gefrierschrank stehengelassen. Es kristallisieren 42.6 mg (0.11 mmol, 21.8 % d.Th.) peracetylierte Galactose aus. Die gaschromatographische Analyse ergibt 98 % 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α/β -L-galactopyranose (**77-L**) ($\alpha:\beta = 1:17$). Das Produktgemisch wird ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -L-galactopyranosylbromid (**78-L**)

42 mg (0.108 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α/β -L-galactopyranose (**77-L**) werden mit 180 μ l einer 30 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt. Man läßt 3 h bei RT rühren und gibt Diethylether zu. Nach Waschen der organischen Phase mit Wasser und ges. NaHCO₃-Lösung und Trocknen über CaCl₂ wird die Lösung direkt weiter zum 1,5-Anhydro-L-dulcit umgesetzt.

1,5-Anhydro-L-dulcitol (79-L)

Zu der Lösung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α/β -L-galactopyranosylbromid (**78-L**) in 1 ml Diethylether wird über 45 min langsam 1 ml einer 1M Lösung von LiAlH₄ in Diethylether zuge-
tropft. Man läßt über Nacht bei RT rühren und gibt vorsichtig Wasser zu, bis keine H₂-Ent-
wicklung mehr stattfindet. Nach Abtrennung der organischen Phase filtriert man die wäßrige
Lösung. Nach Einengen des Wassers am Rotationsverdampfer auf 1-2 ml wird über einen star-
ken Kationenaustauscher (IR120, H⁺-Form) und einen schwach basischen Ionenaustauscher
(AG3-X4, Freie Base-Form) filtriert. Es wurden nur die Fraktionen vereinigt, die durch Detek-
tion mit ethanolischer Schwefelsäure eindeutig Produkt enthielten. Man erhält nach Gefrier-
trocknung 7.8 mg (0.048 mmol; 44 % d. Th.) 1,5-Anhydro-L-dulcitol (**79-L**).

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abw.	Abweichung
Äqu.	Äquivalente
Ac	Acetyl
AGU	Anhydroglucoseeinheit (Anhydro Glucose Unit)
Ara	Arabinose
Bc	Butyryl
Ber.	berechnet
CA	Celluloseacetat
CE	Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation
CMC	Carboxymethylcellulose
d	Dublett
d	Tag(e)
D	disubstituierte AGU
DC	Dünnschichtchromatographie
Dimsyl	Methylsulfinylmethanid
DMAc	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad (Degree of Polymerization)
DS	Substitutionsgrad (Degree of Substitution)
d. Th.	der Theorie
EC	Ethylcellulose
ECR	Effective-Carbon-Response
EHEC	Ethylhydroxyethylcellulose
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Electrosprayionisation
Et	Ethyl
exp.	experimentell
<i>f</i>	Furanosid
FAB	Fast Atom Bombardement
FID	Flammenionisationsdetektor
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
h	Stunde(n)
H _n	Heterogenitätsparameter
HE	Hydroxyethyl
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEMC	Hydroxyethylmethylcellulose

HES	Hydroxyethylstärke
Hex	Hexyl
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HP	Hydroxypropyl
HPAEC	High-pH Anion-Exchange Chromatography
HpG	<i>Helix pomatia</i> Galactan
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HPS	Hydroxypropylstärke
i.d.	Innendurchmesser
<i>J</i>	NMR-Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
m	Multiplett
M	Molekülmasse
M	monosubstituierte AGU
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight
Man	Mannose
MC	Methylcellulose
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MS	molekularer Substitutionsgrad
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
N	Normal
PAD	Pulsed Amperometric Detection
Pc	Pentoyl
Pe	Pentyl
PED	Pulsed Electrochemical Detection
Pr	Propyl
RA	Reduktiver Abbau
Rel. Int.	Relative Intensität
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
RT	Raumtemperatur
SEC	Sulfoethylcellulose
t	time (Zeit)
T	trisubstituierte AGU
Tab.	Tabelle
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
Temp.	Temperatur
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure, Trifluoracetyl
Thx	Thexyl
TMS	Trimethylsilyl
TMU	Tetramethylurea (Tetramethylharnstoff)
Triflat, Otf	Trifluormethansulfonat
Trityl	Triphenylmethyl
U	unsubstituierte AGU
Verbg.	Verbindung

7.2 Sicherheitsdaten verwendeter Chemikalien

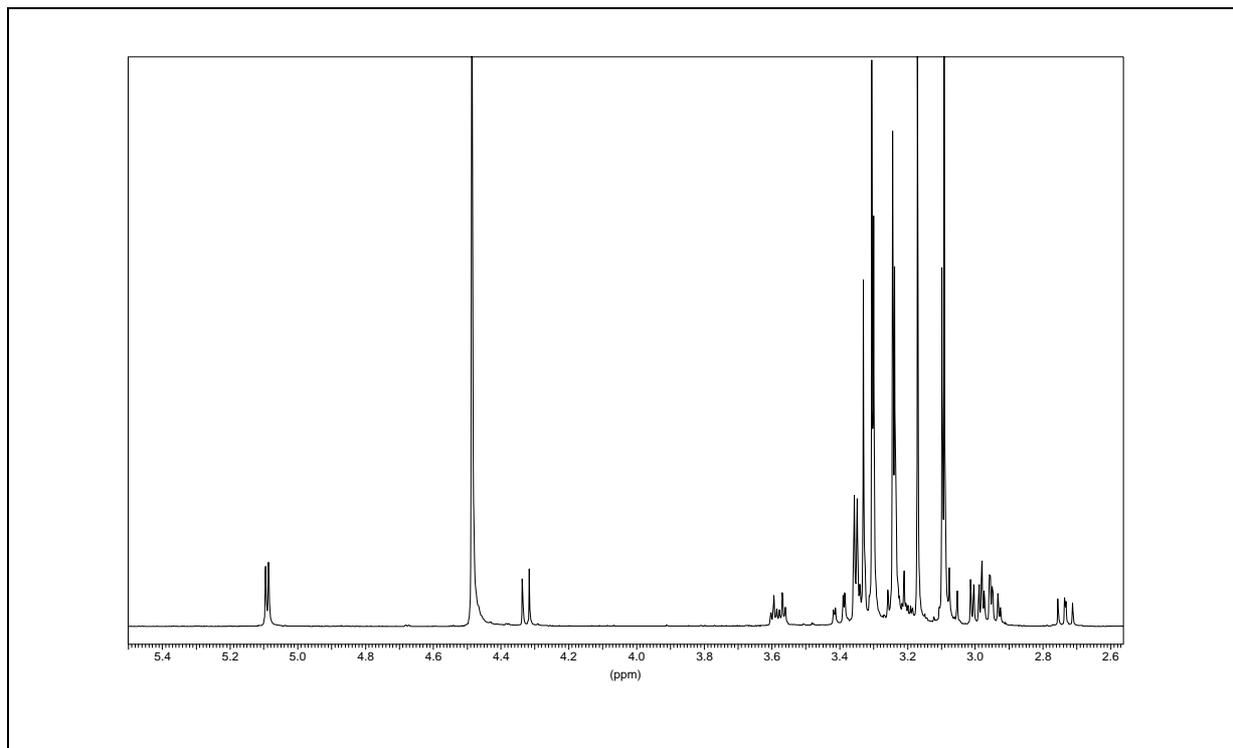
Tab. 7-1: Liste der verwendeten Gefahrstoffe.

Stoffbezeichnung	Gef.- Symbol	R- und S-Sätze	MAK- Werte
Acetylchlorid	F/C	R: 11-14-34 S: 9-16-26-45	
2-Aminopyridin	T	R: 25-36/38 S: 36-45	0.5 ml/m ³
Ammoniaklösung	C	R: 34-37 S: 7-26-36/37/39-45	50 ml/m ³
Bromwasserstoff (33 % in Essigsäure)	C	R: 34-37 S: 7/9-23.2-26-36/37/39-45	2 ml/m ³
Dichlormethan	X _n	R: 40 S: 23.2-24/25-36-37	100 ml/m ³
2,6-Di- <i>tert</i> -butylpyridin	X _i	R: 36/37/38 S: 26	
Diethylether	F ⁺	R: 12-19 S: 9-16-29-33	400 ml/m ³
Dimethylacetamid	X _n	R: 20/21-36 S: 26-28.1-36	10 ml/m ³
Dimethylsulfat	T ⁺	R: 45-E25-E26-34 S: 53-45	
Dimethylsulfoxid	X _i	R: 36/38 S: 26	
2,4-Dinitrophenylhydrazin	X _n	R: 1-22-36/38 S: 35	
Essigsäure	C	R: 10-35 S: 23.2-26-45	10 ml/m ³
Essigsäureanhydrid	C	R: 10-34 S: 26-45	5 ml/m ³
Ethylacetat	F	R: 11 S: 16-23.2-29-33	400 ml/m ³
Iodethan	X _i	R: 10-36/37/38 S: 23.2-26	
Iodmethan	T	R: 21-23/25-37/38-40 S: 36/37-38-45	
Kaliumhydroxid	C	R: 35 S: 26-37/39-45	
Lithiumaluminiumhydrid	F	R: 15 S: 7/8-24/25-43.6	
Methanol	F/T	R: 11-23/25 S: 7-16-24-45	200 ml/m ³
1- <i>N</i> -Methylimidazol	X _n	R: 22-38-41 S: 26-39	
Methylithium	F ⁺ /C	R: 12-14/15-17-34 S: 6.1-7/9-26-36/37/39-45	

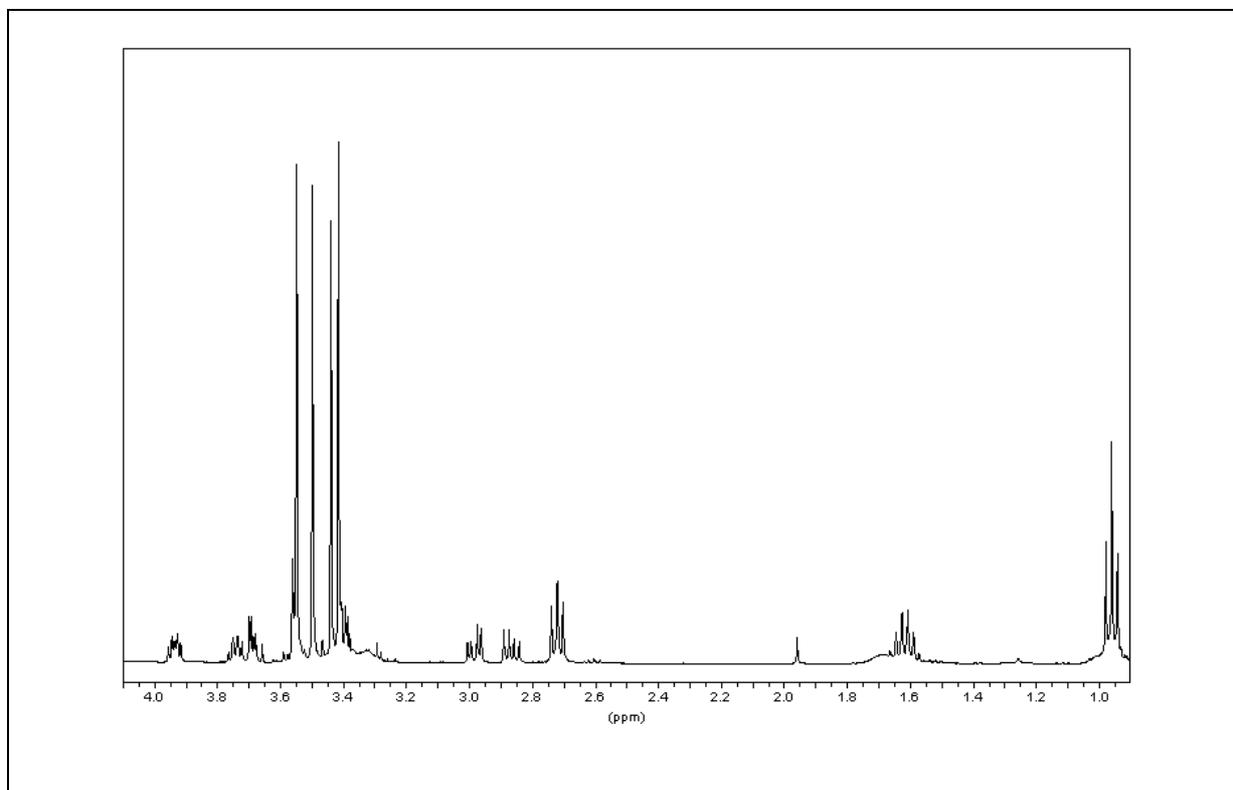
Tab. 7-1: Liste der verwendeten Gefahrstoffe (Fortsetzung).

Methyltrifluormethansulfonat	C	R: 10-34 S: 26-36/37/39-45	
Natriumborhydrid	F/T	R: 15-25-34 S: 14.2-26-36/37/39-43.6-45	
Natriumcyanoborhydrid	F/C	R: 15-34-34 S: 26-36/67/39-43.6-45	
Natriumhydrid	F,C	R: 15-34 S: 7/8-26-36/37/39-43.6-45	
Natriumhydroxid	C	R: 35 S: 26-37/39-45	2 mg/m ³
Perchlorsäure (70-72 %)	O,C	R: 5-8-35 S: 23.2-26-36/37/39-45	
Pyridin	F/X _n	R: 11-20/21/22 S: 26-28.1	5 ml/m ³
n-Propylamin	F,C	R: 11-20/21/22-34 S: 9-16-26-36/37/39-45	
Salzsäure	C	R: 34-37 S: 26-36/37/39-45	5 ml/m ³
Toluol	F/X _n	R: 11-20 S: 16-25-29-33	100 ml/m ³
Triethylsilan	F/X _i	R: 11-36/37/38 S: 8-9-16-26	
Trifluoressigsäure	C	R: 20-35 S: 9-26-27-28.1-45	
Trimethylphosphat	X _n	R: 22-40 S: -	
TMS-Azid	T	R: 10-23/24/25 S: 45	
Trimethylsilyltrifluormethansulfonat		R: 10 S: -	

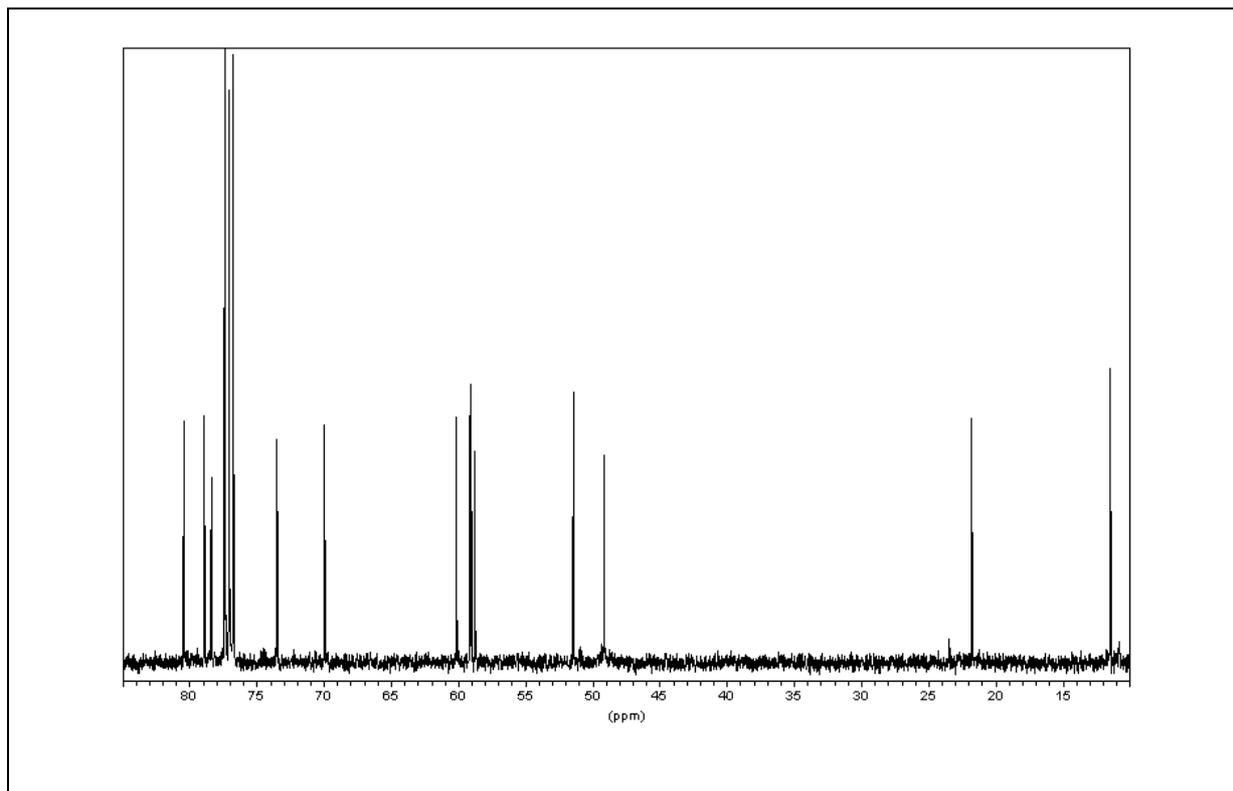
7.3 NMR-Spektren



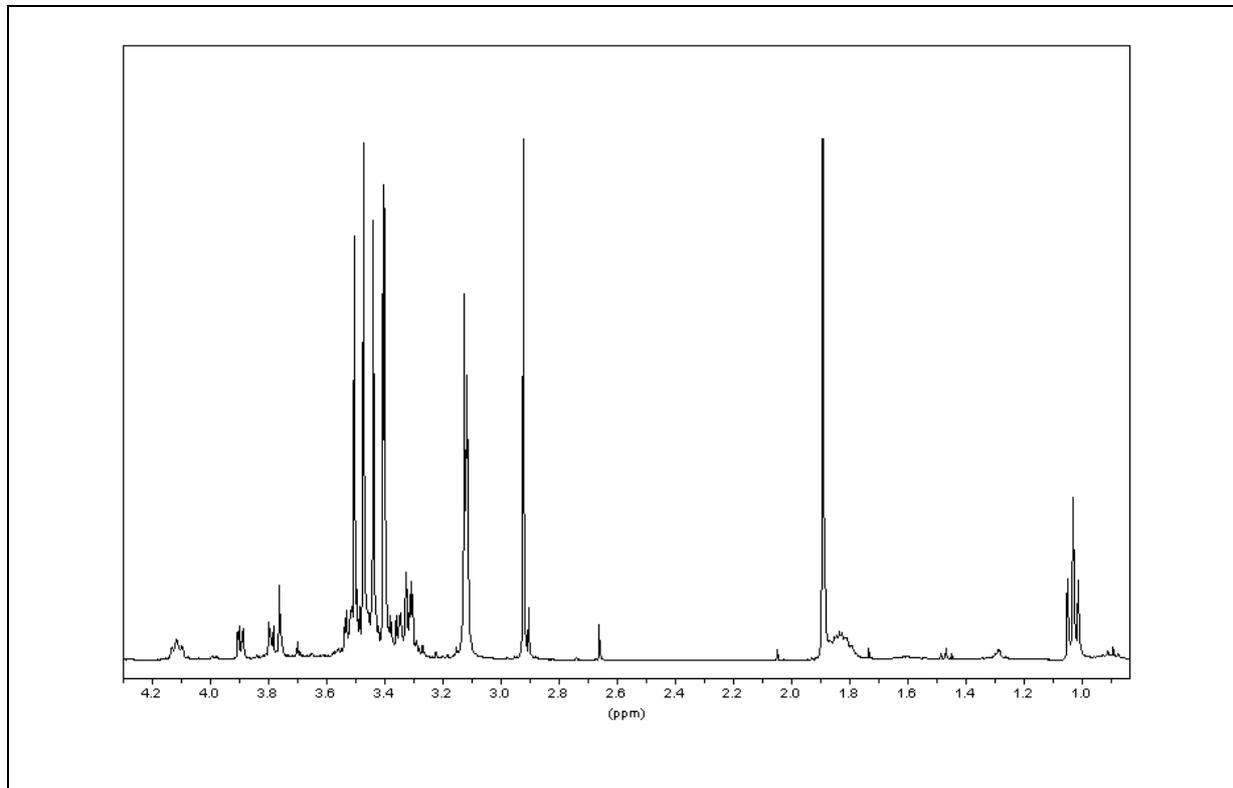
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) von 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-α/β-D-glucose (**9b**)



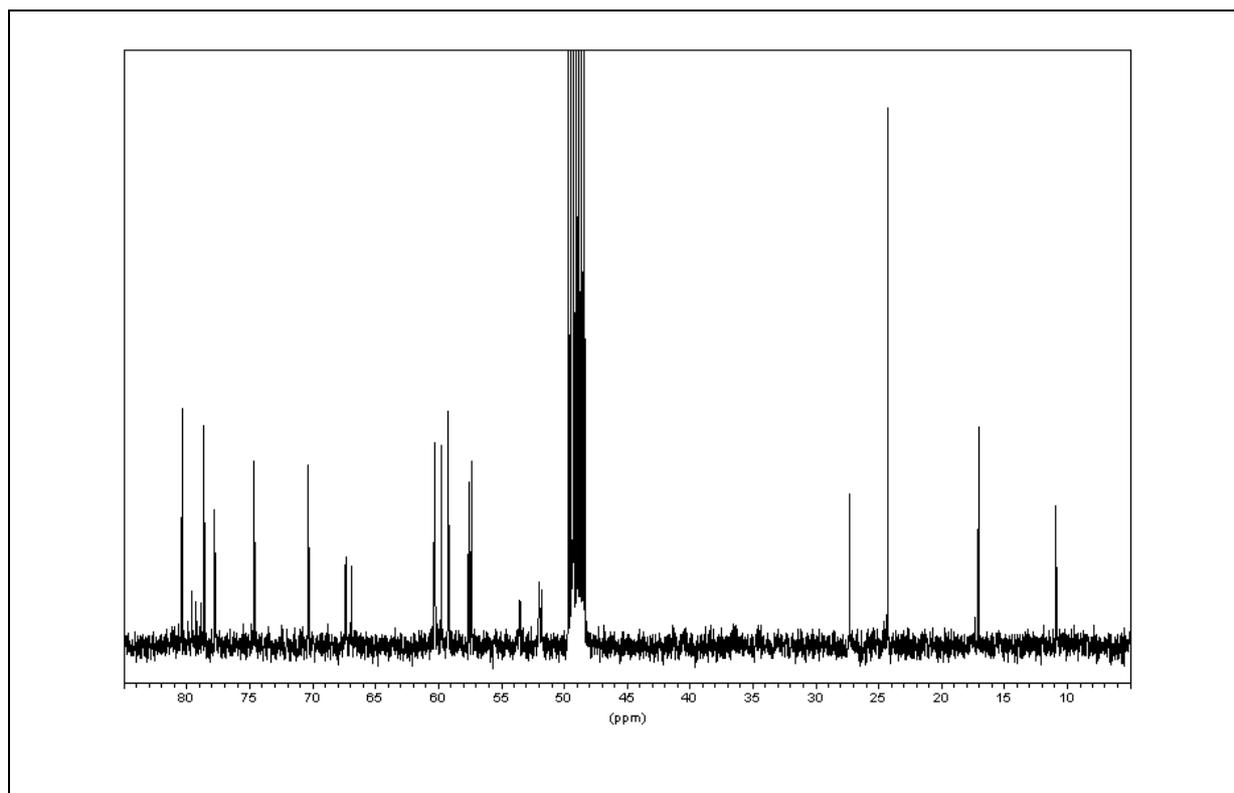
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N*-propylamino-D-sorbit (**21**)



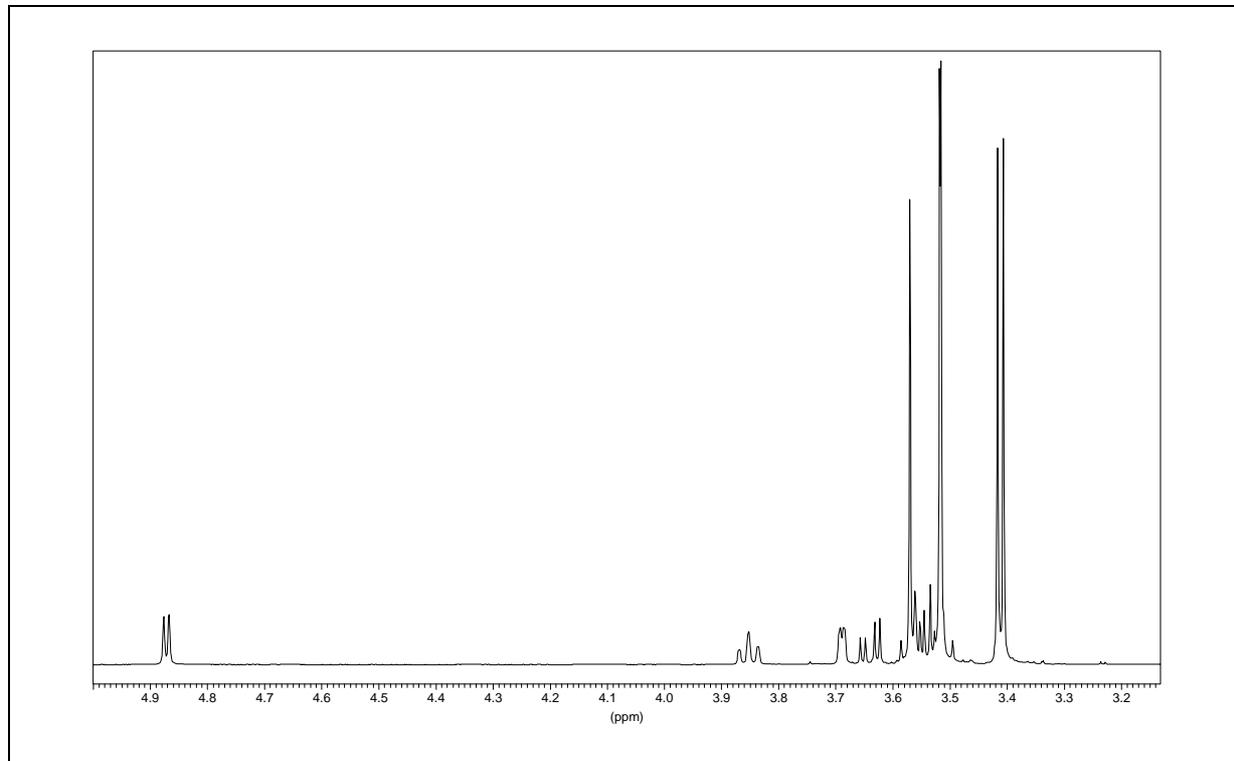
^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von 1-Desoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1-*N*-propylamino-D-sorbit (**21**)



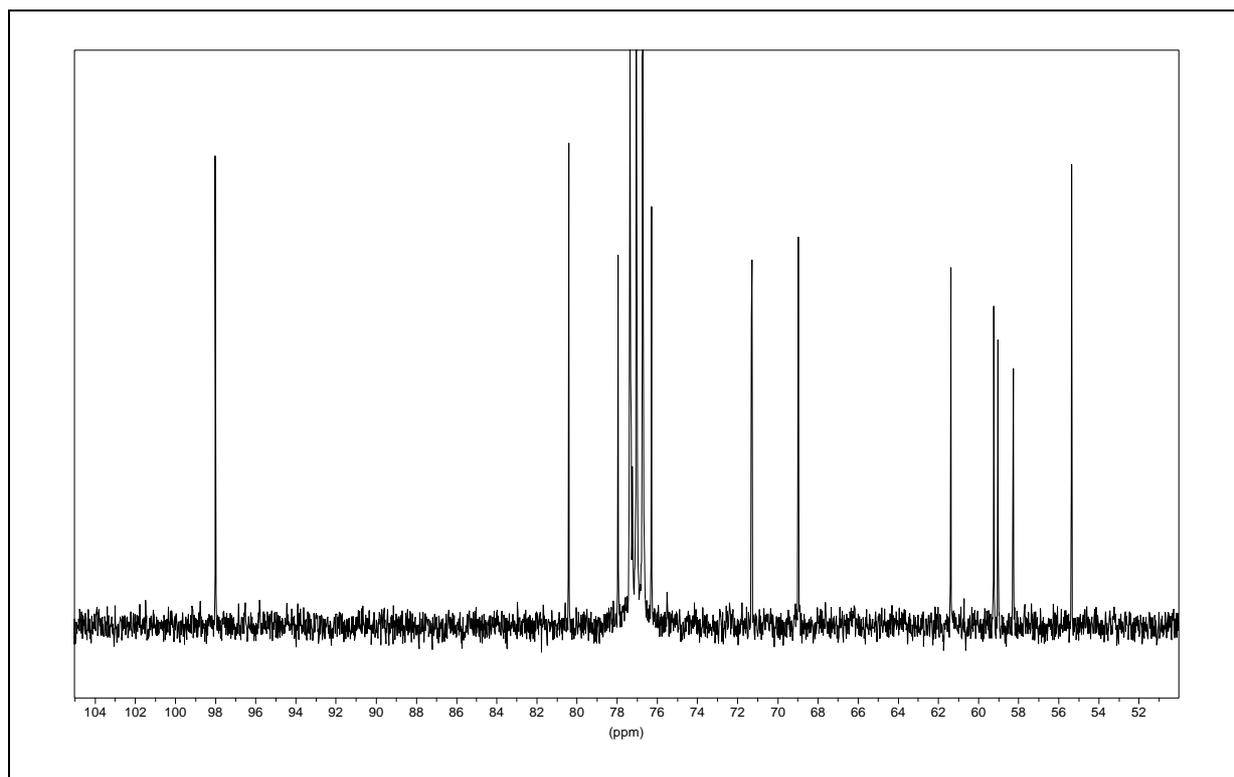
^1H -NMR (400 MHz, MeOD) von 1-Desoxy-2,3,4,5,6-penta-*O*-methyl-1-*N,N,N*-(dimethylpropyl)ammonium-D-sorbit, Iod-Salz (**22**).



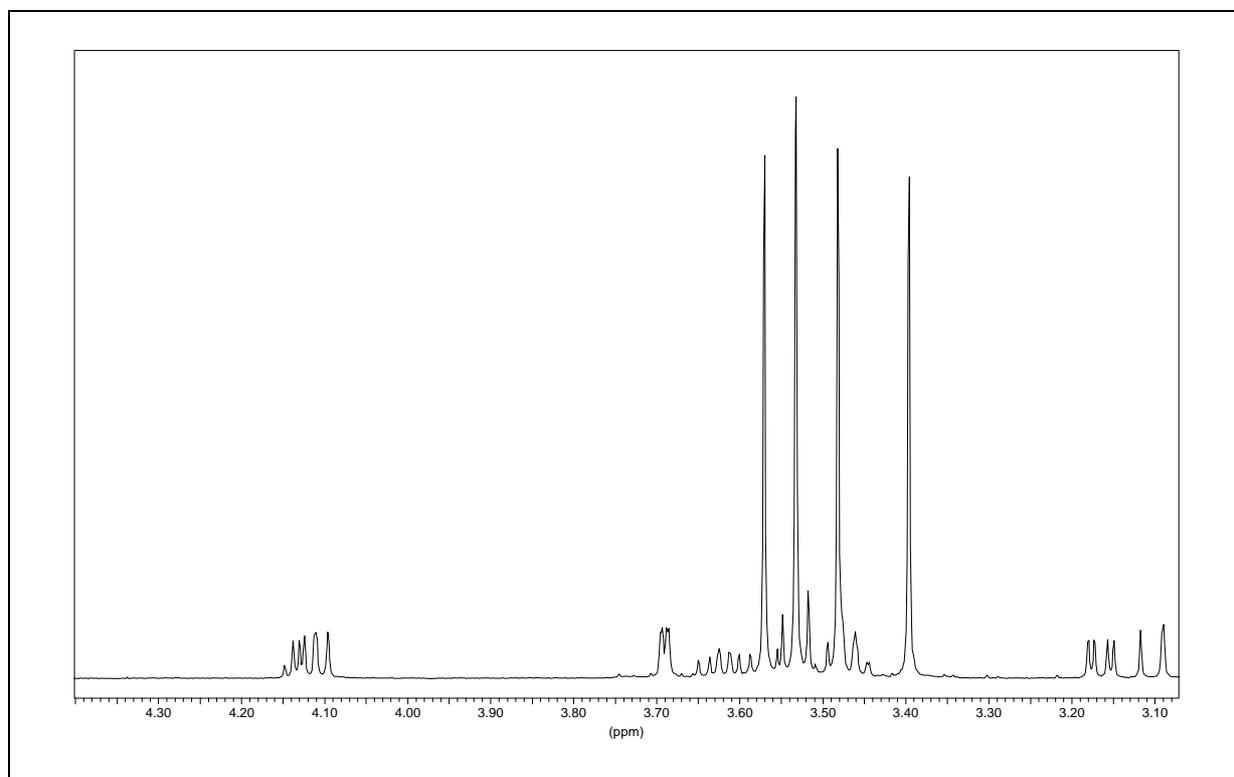
^{13}C -NMR (100.6 MHz, MeOD) von 1-Desoxy-2,3,4,5,6-penta-*O*-methyl-1-*N,N,N*-(dimethylpropyl)ammonium-*D*-sorbit, Iod-Salz (**22**).



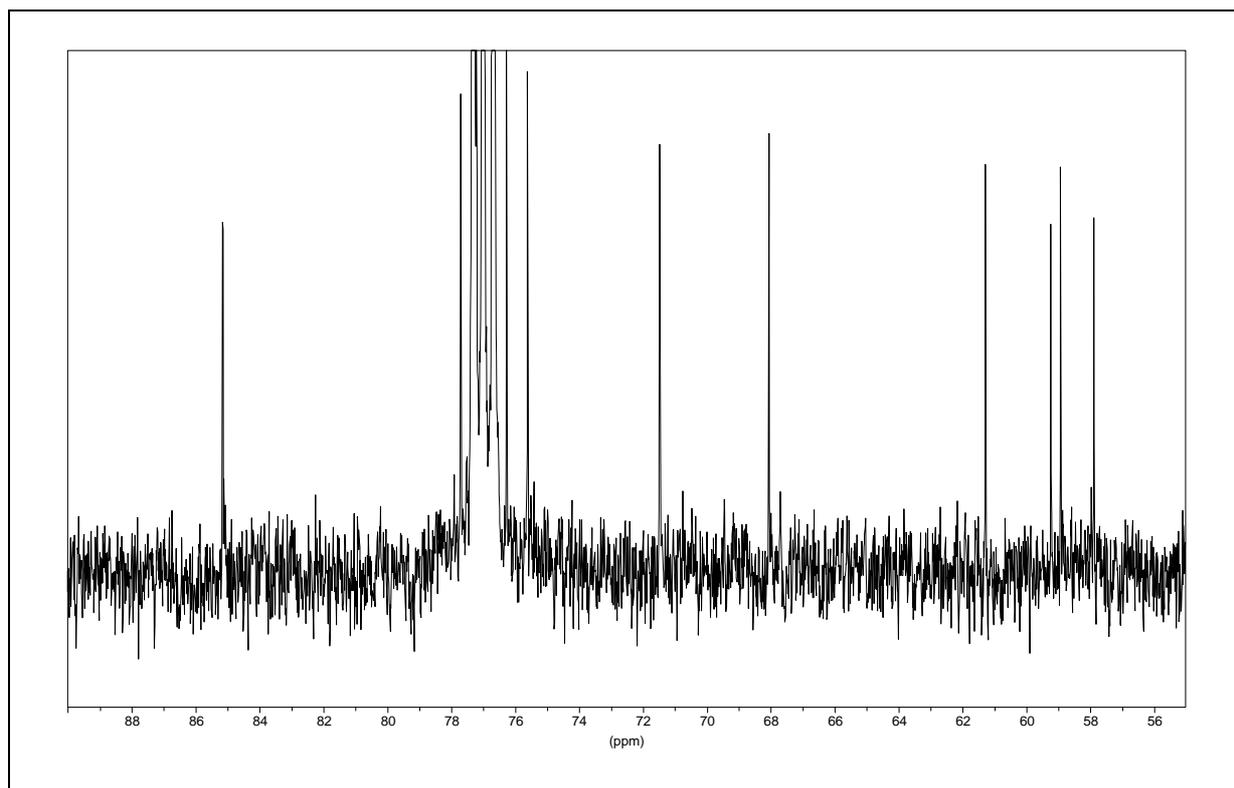
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -*D*-galactopyranosid (**48-a**)



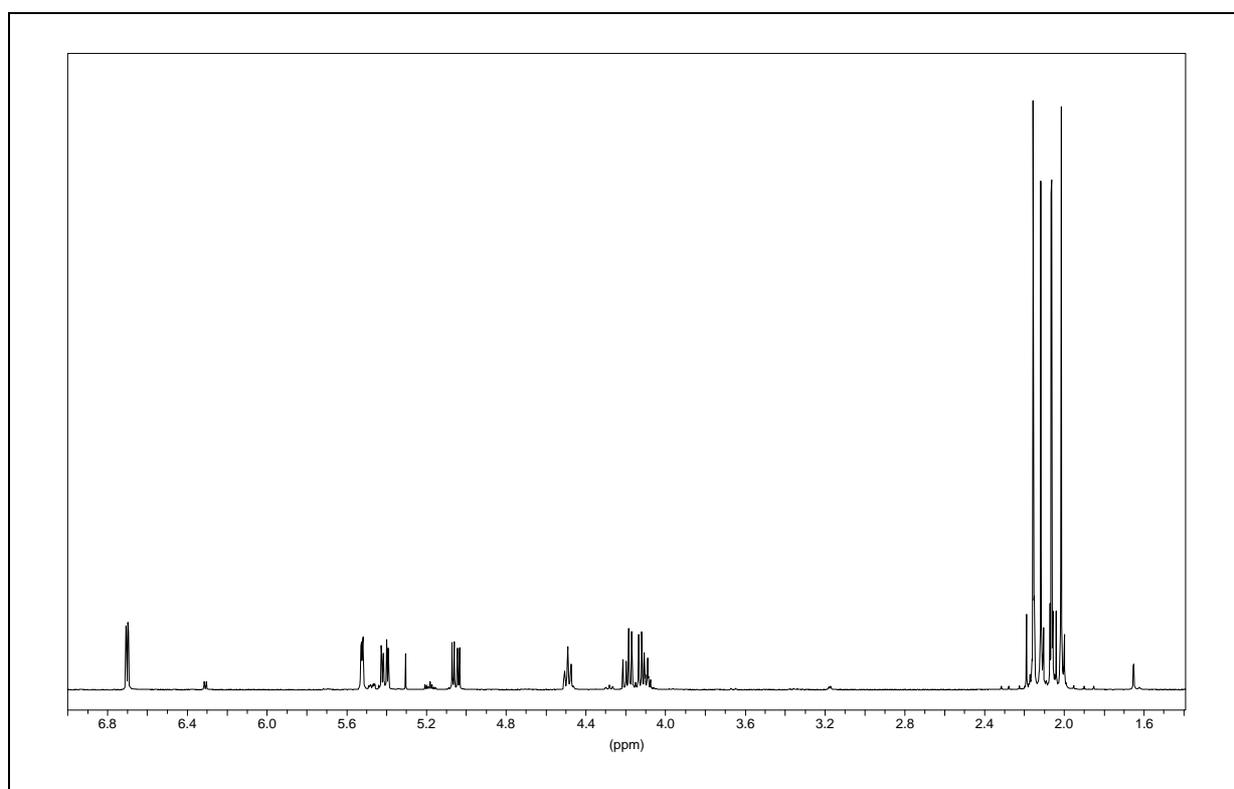
^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosid (**48-a**)



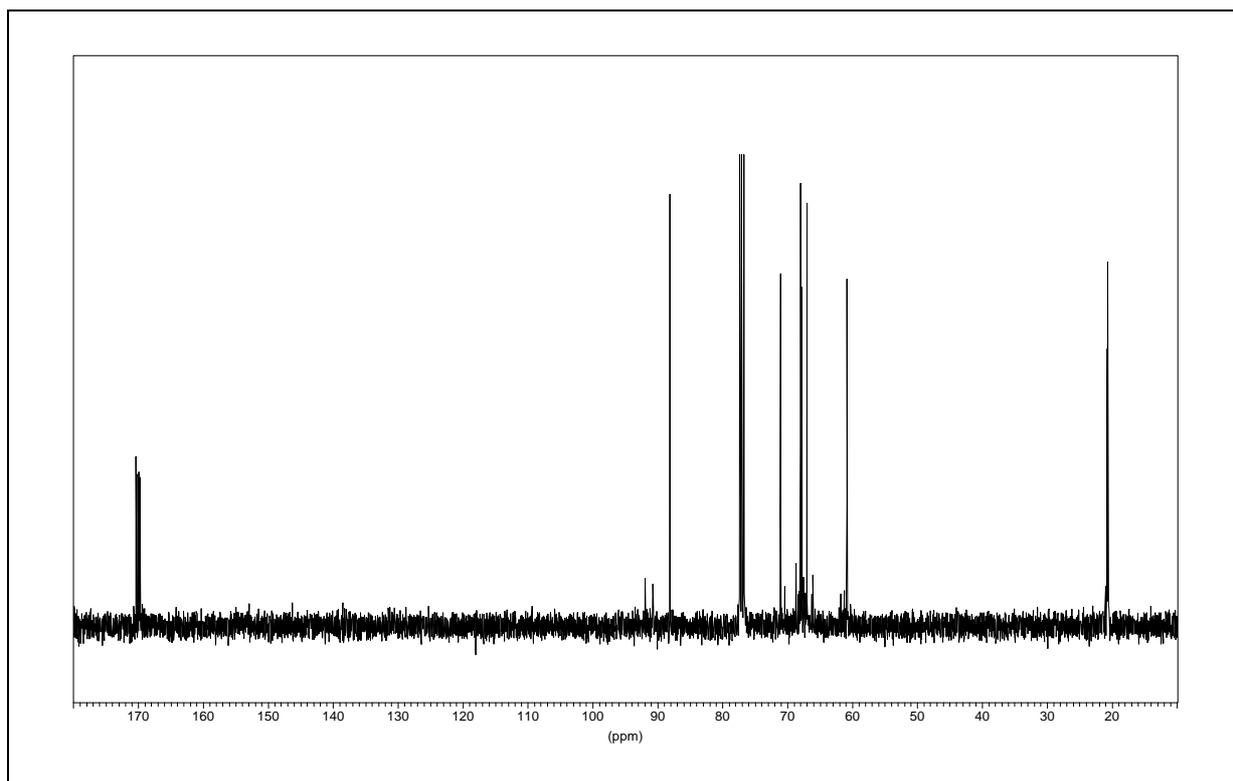
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (**63-D**)



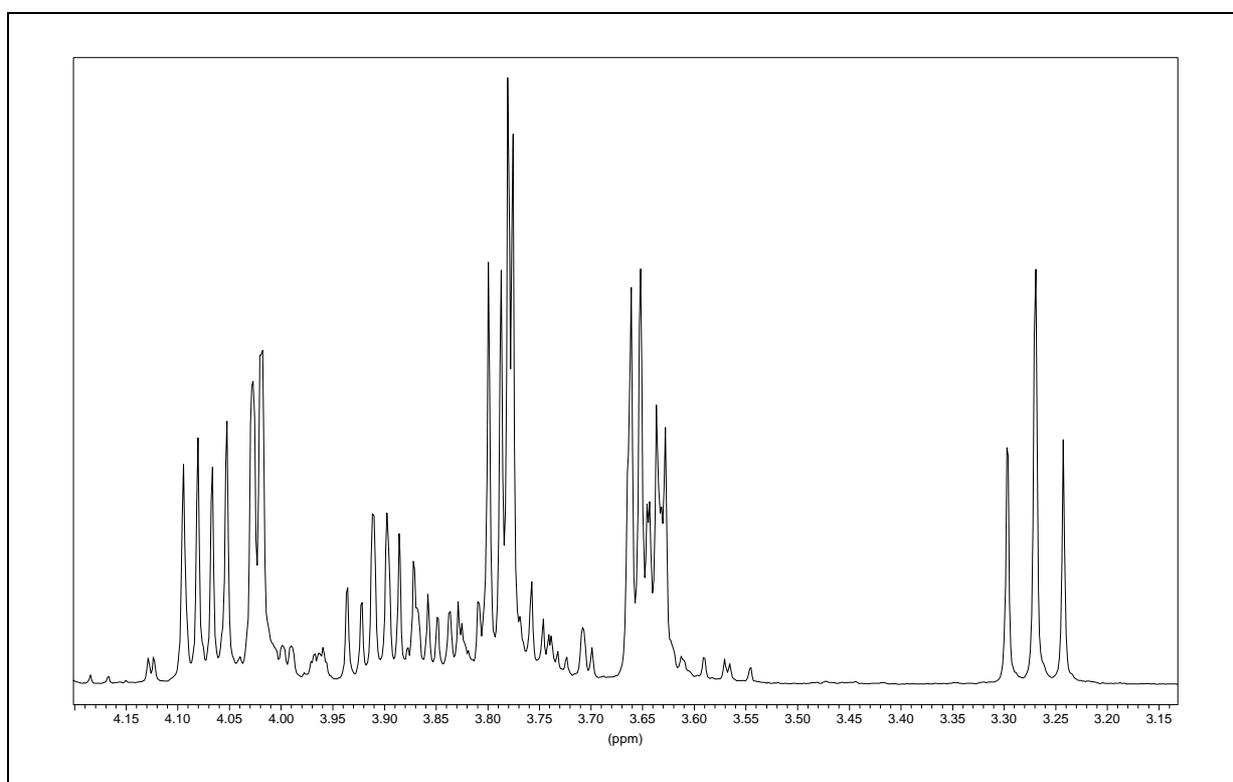
^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-*D*-dulcitol (**63-L**)



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -*D*-galactopyranosylbromid (**78-D**)

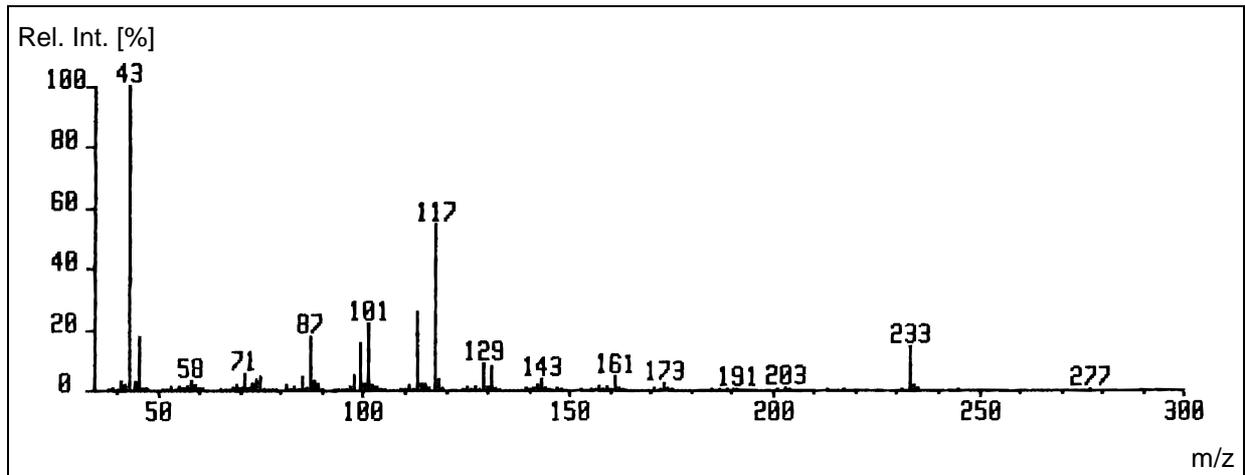


^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosylbromid (**78-D**)

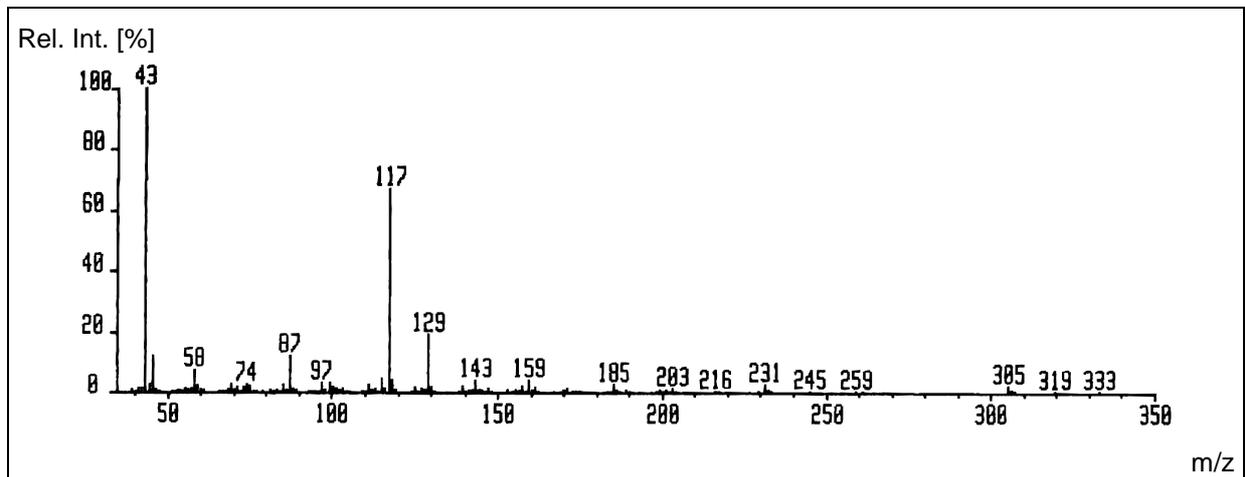


^1H -NMR (400 MHz, MeOD) von 1,5-Anhydro-D-dulcitol (**79-D**)

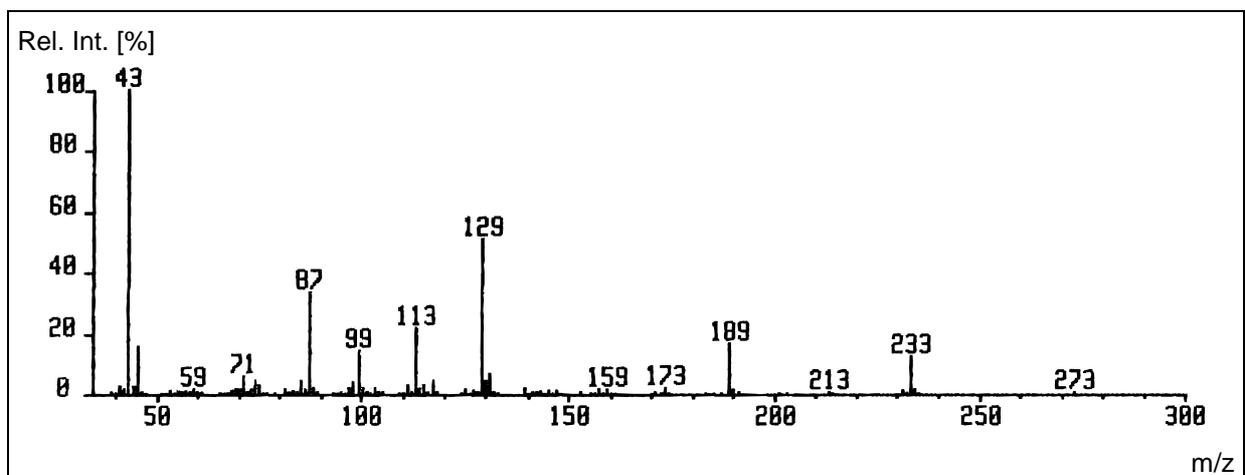
7.4 Massenspektren



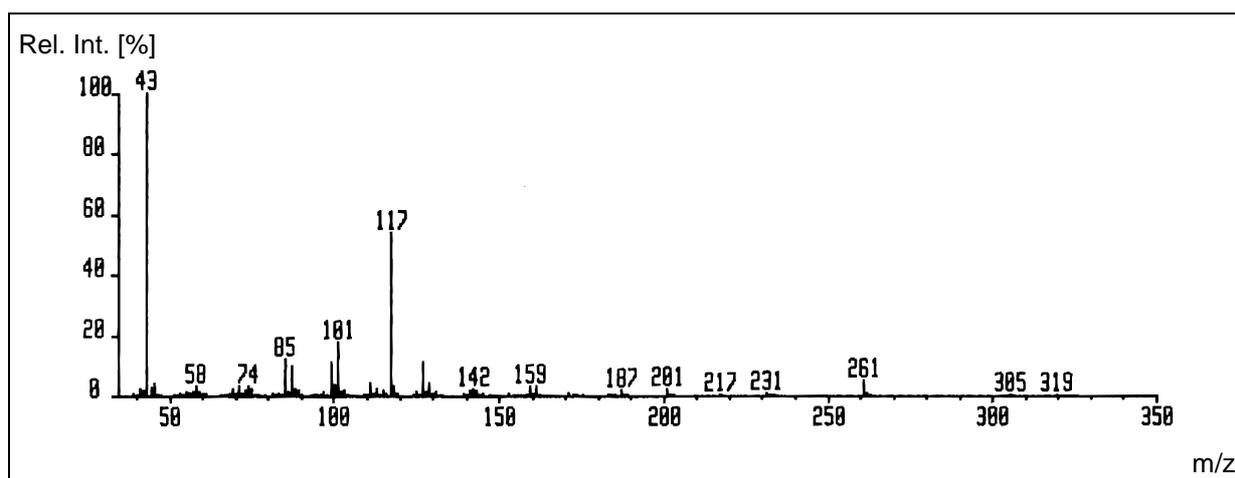
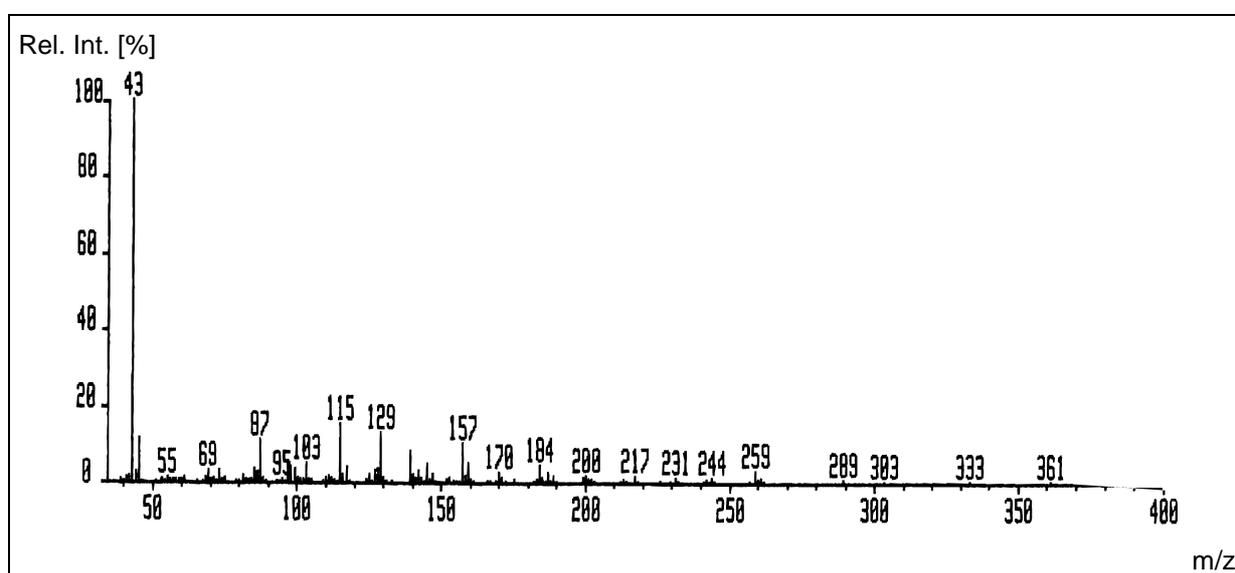
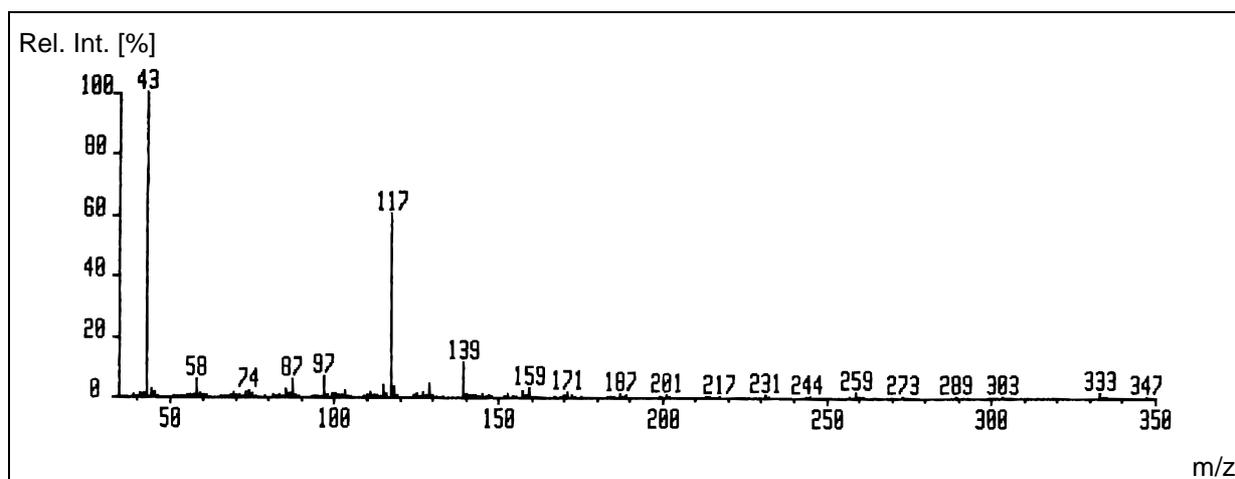
1,4,5-Tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-sorbit (**1-a**)

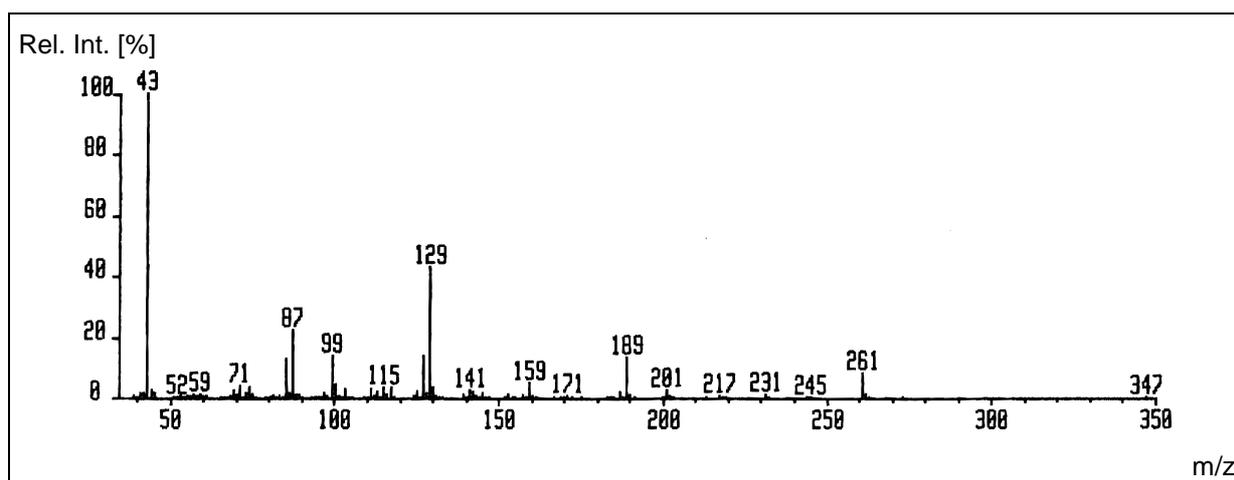
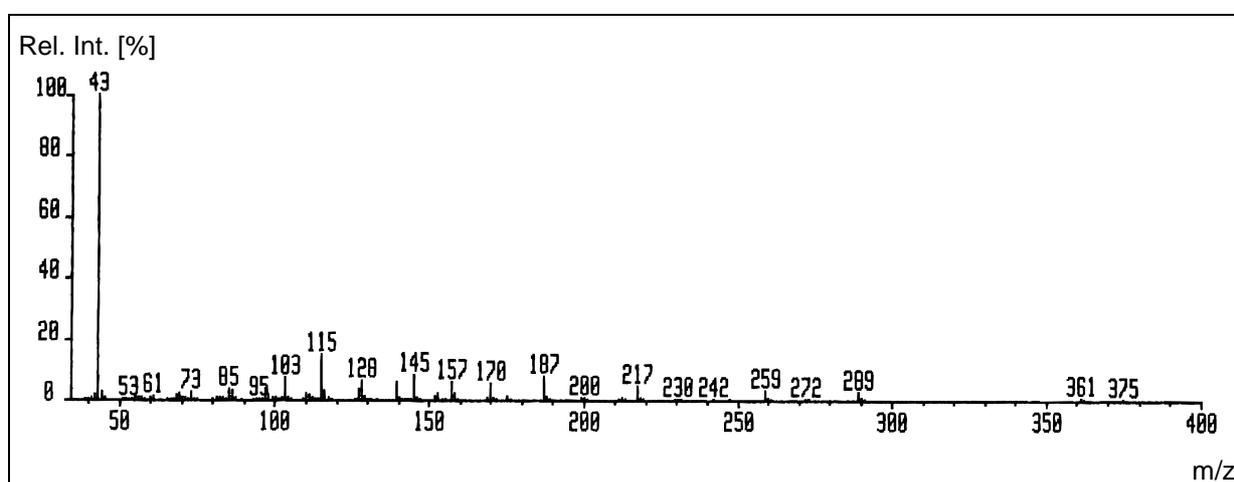
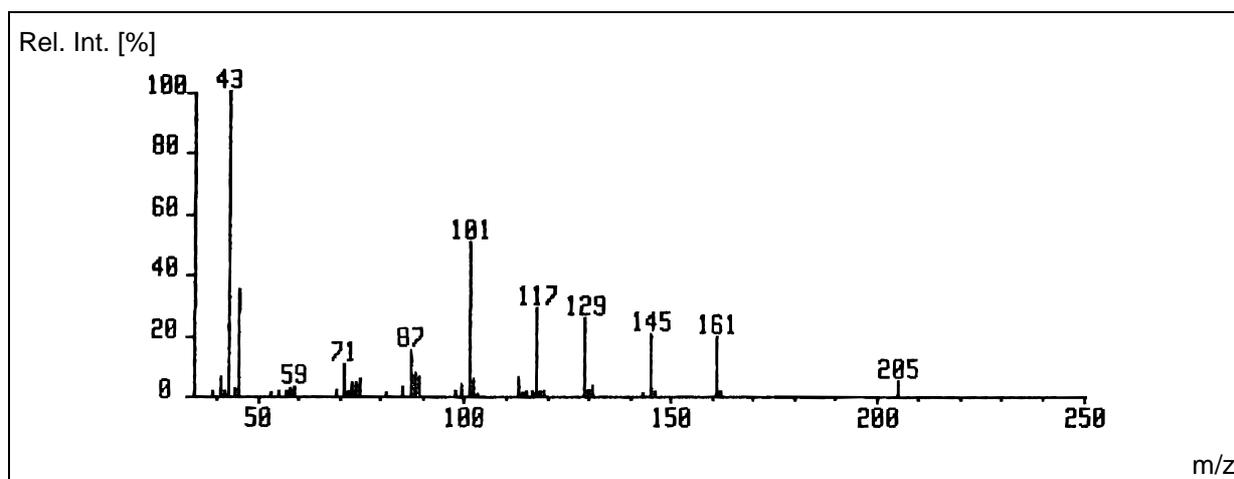


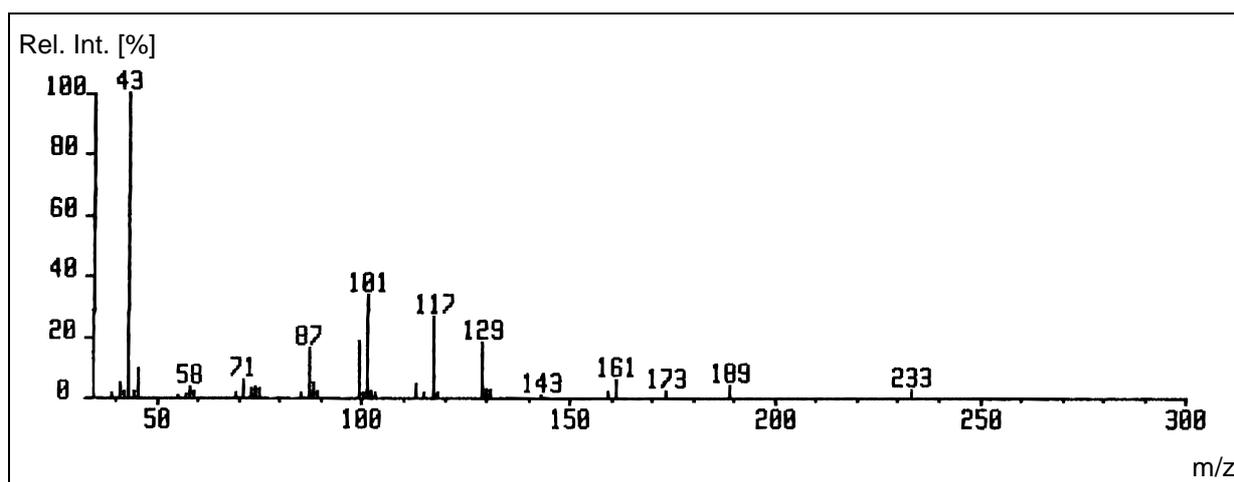
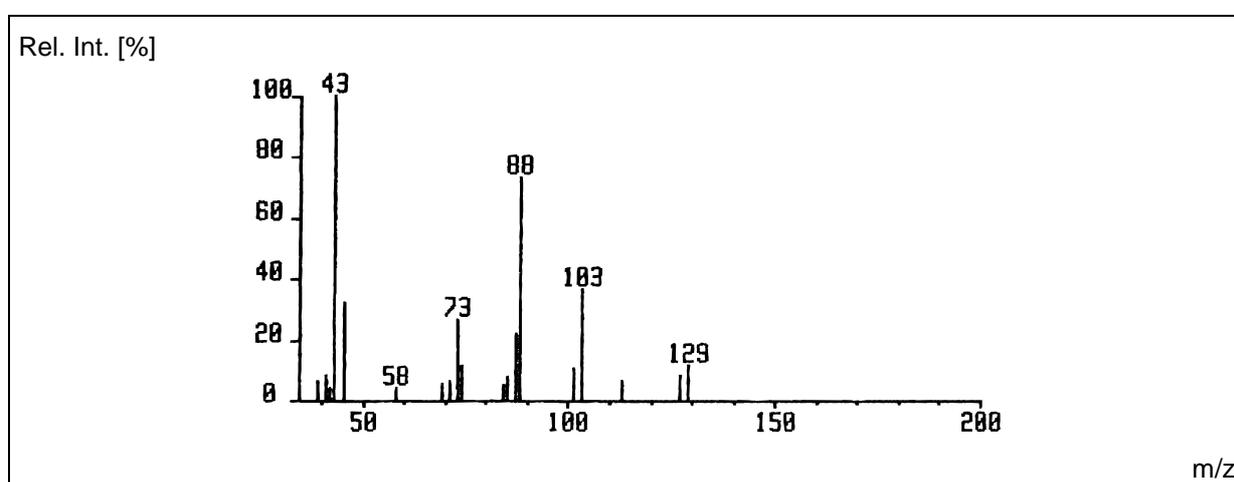
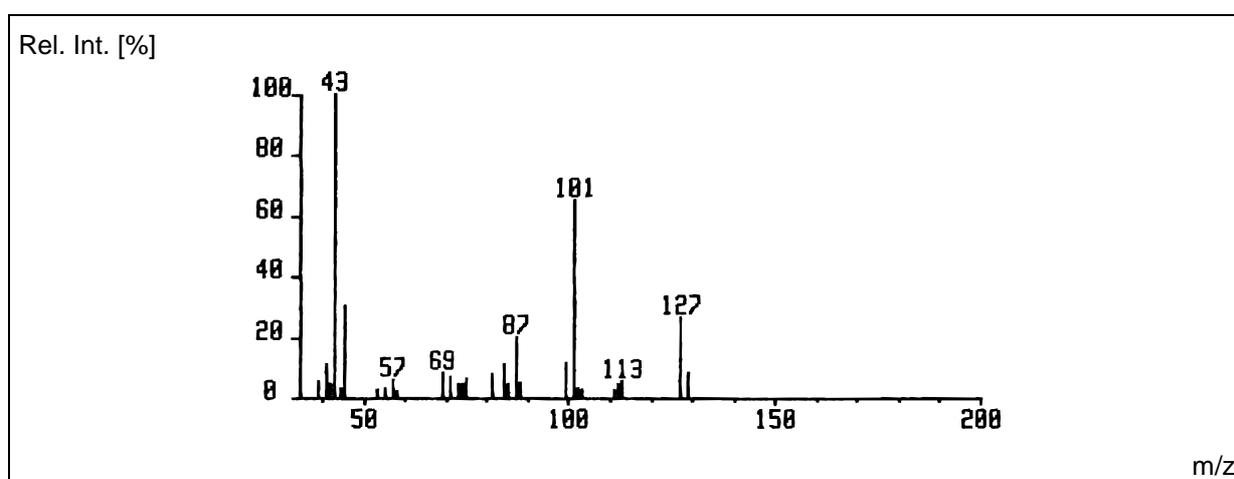
1,3,4,5-Tetra-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-methyl-D-sorbit (**2-a**)

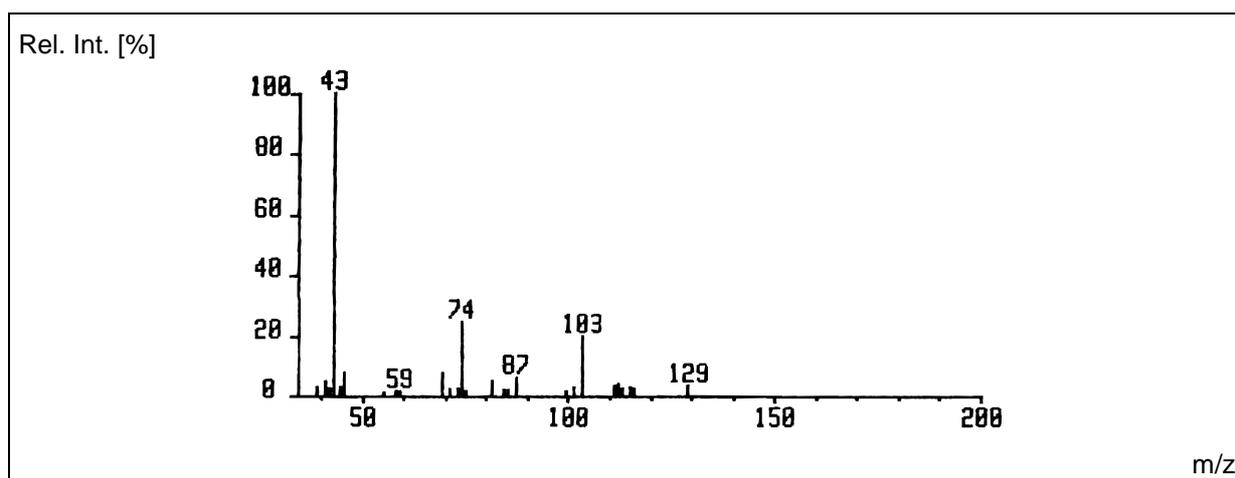
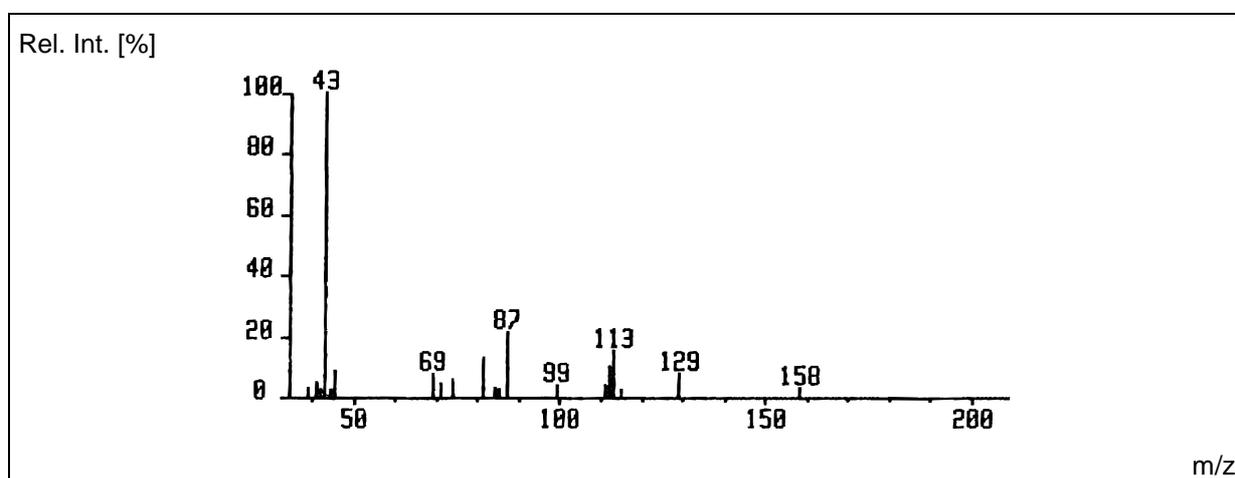
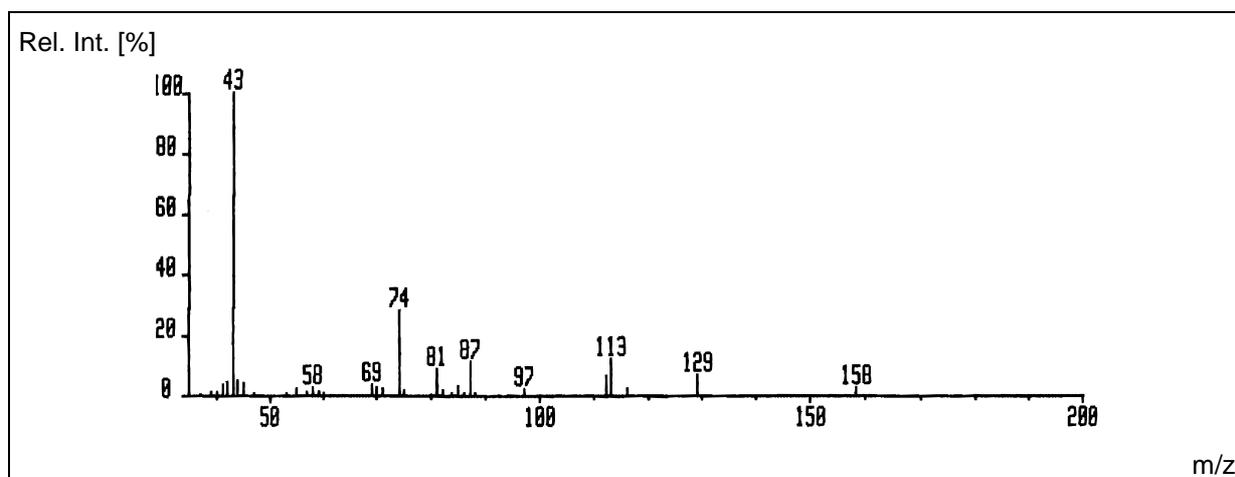


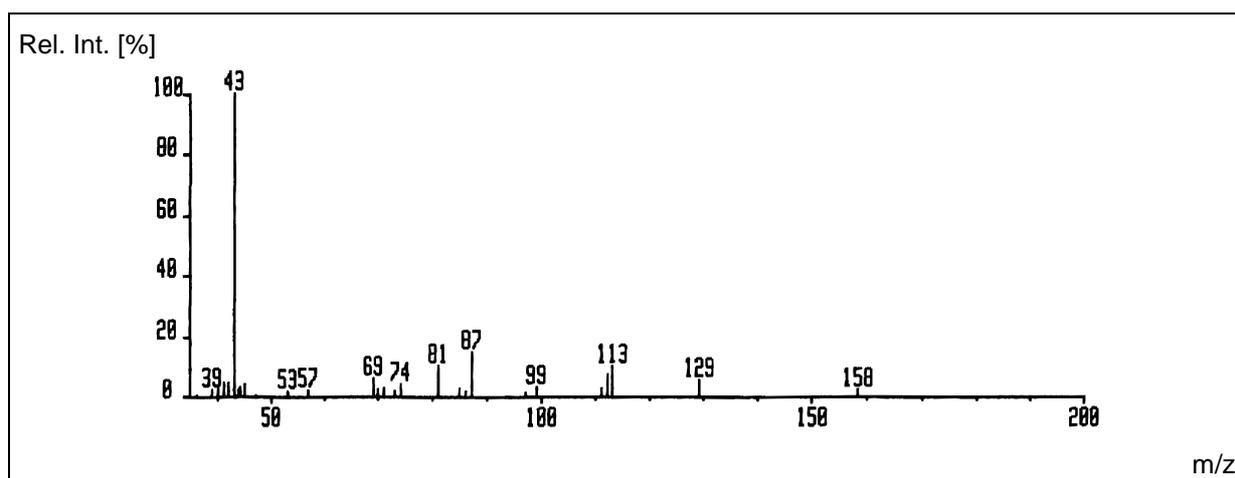
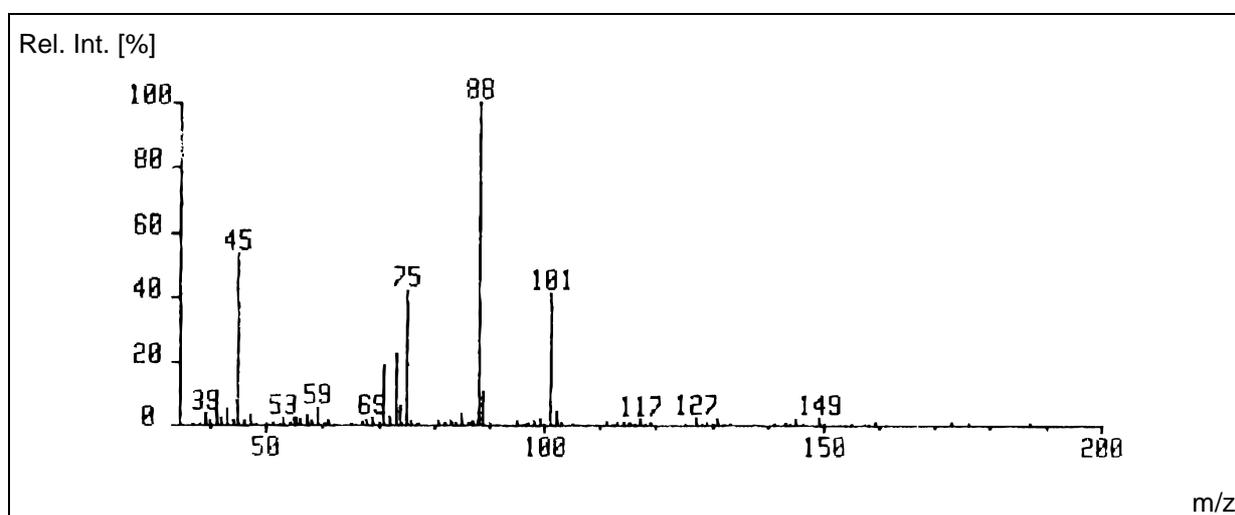
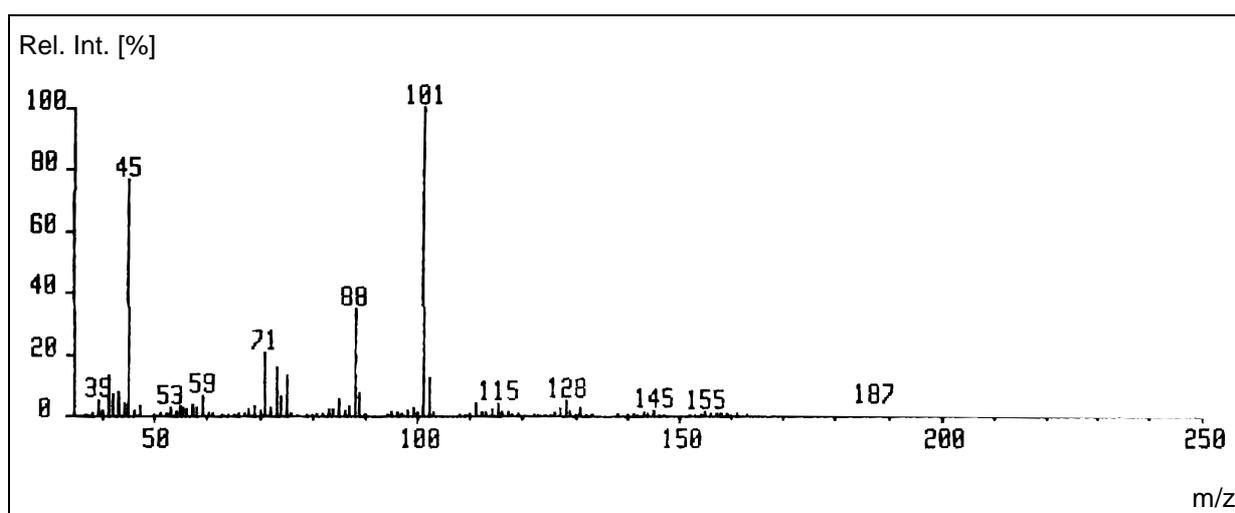
1,2,4,5-Tetra-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-methyl-D-sorbit (**3-a**)

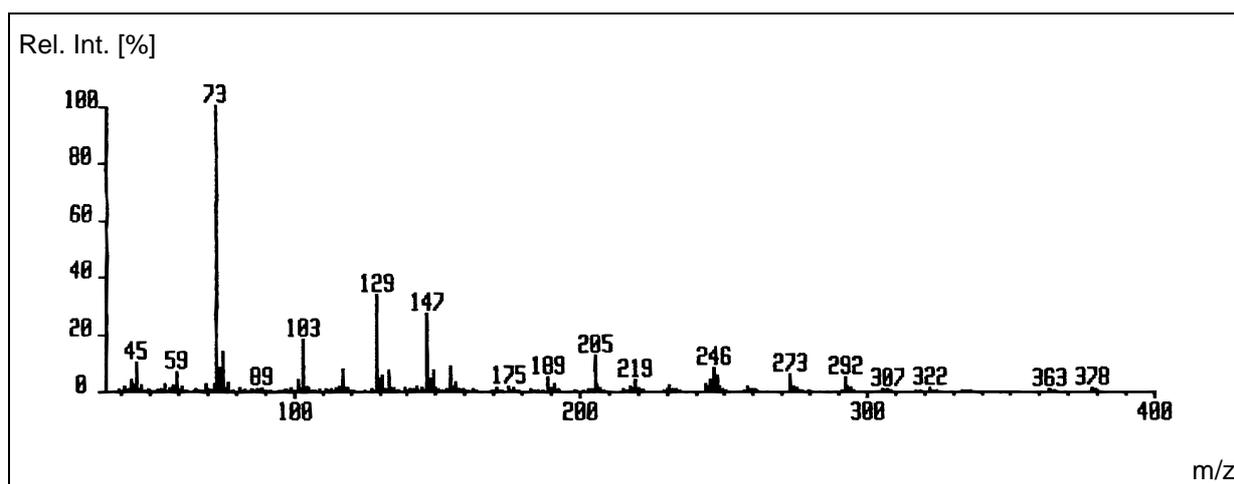
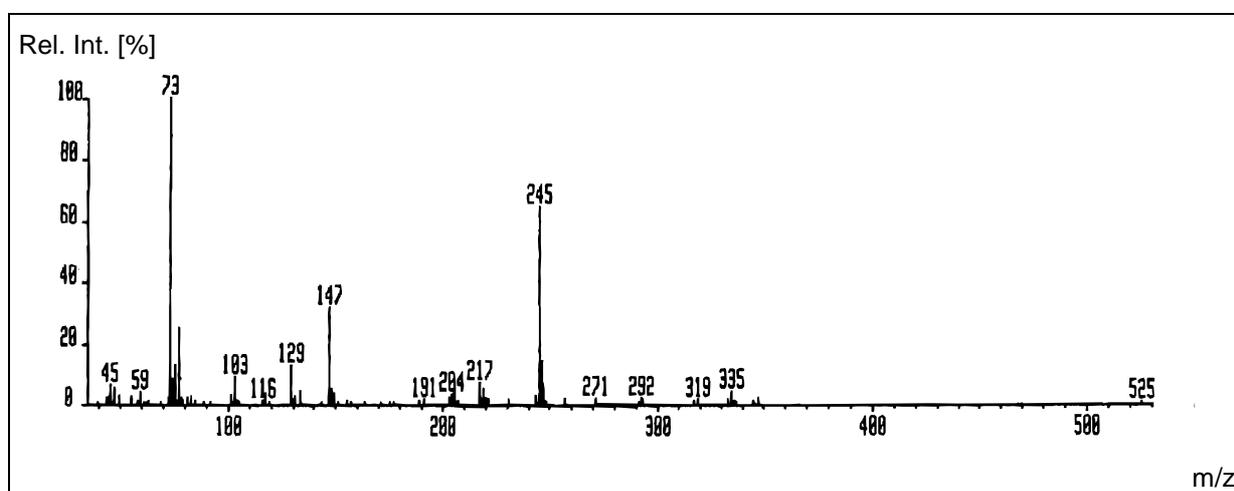
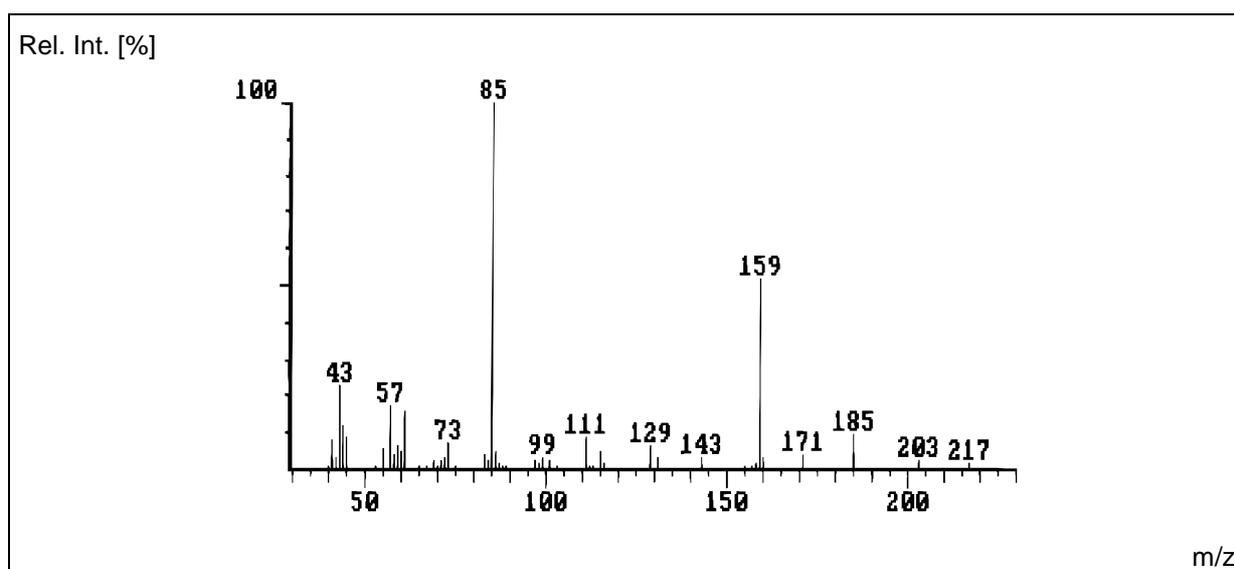
1,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-D-sorbit (**4-a**)1,2,3,4,5-Penta-*O*-acetyl-6-*O*-methyl-D-sorbit (**5-a**)1,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-2-*O*-methyl-D-sorbit (**6-a**)

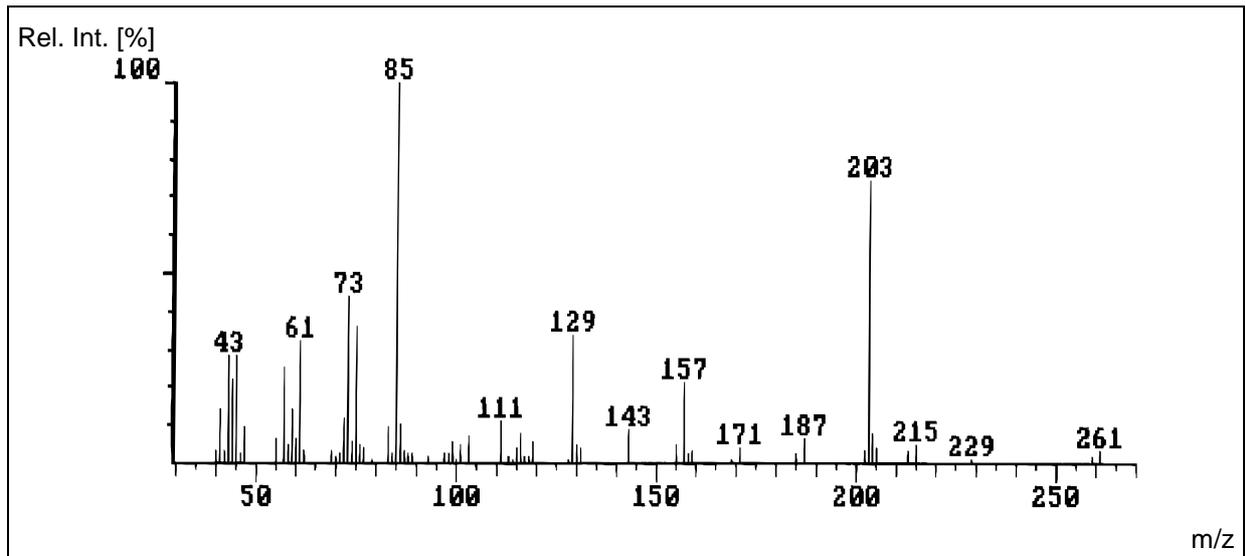
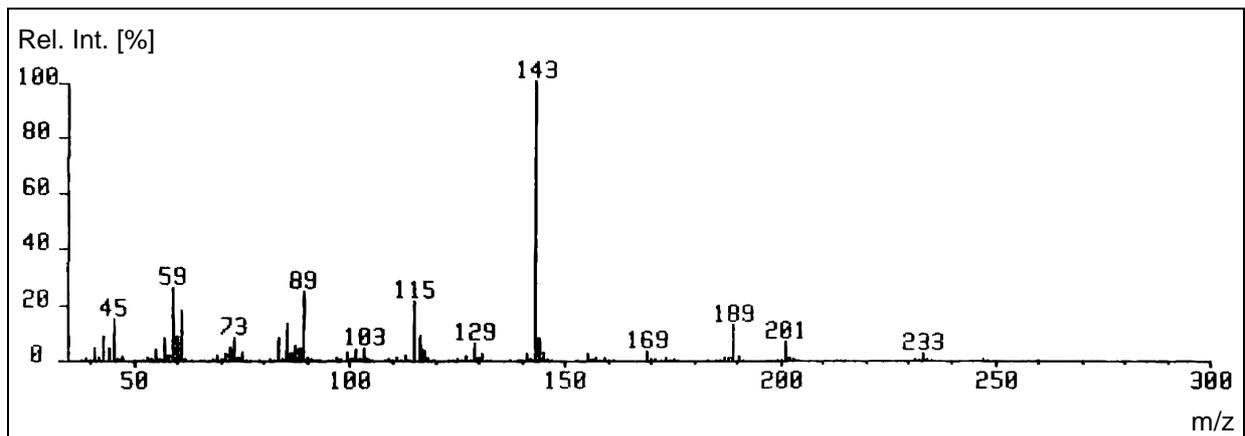
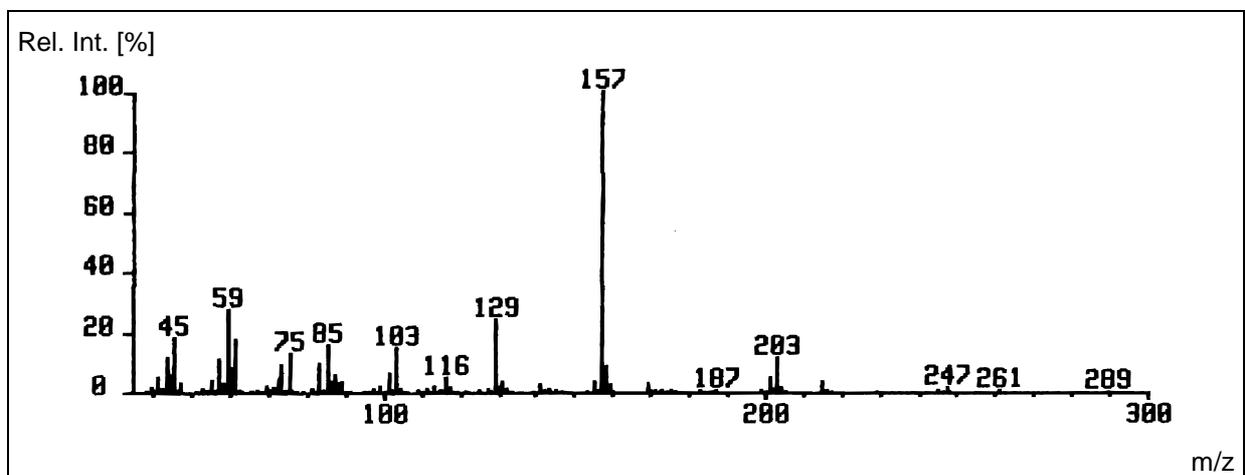
1,2,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-D-sorbit (7-a)1,2,3,4,5,6-Hexa-*O*-acetyl-D-sorbit (8-a)1,5-Di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-sorbit (9-a)

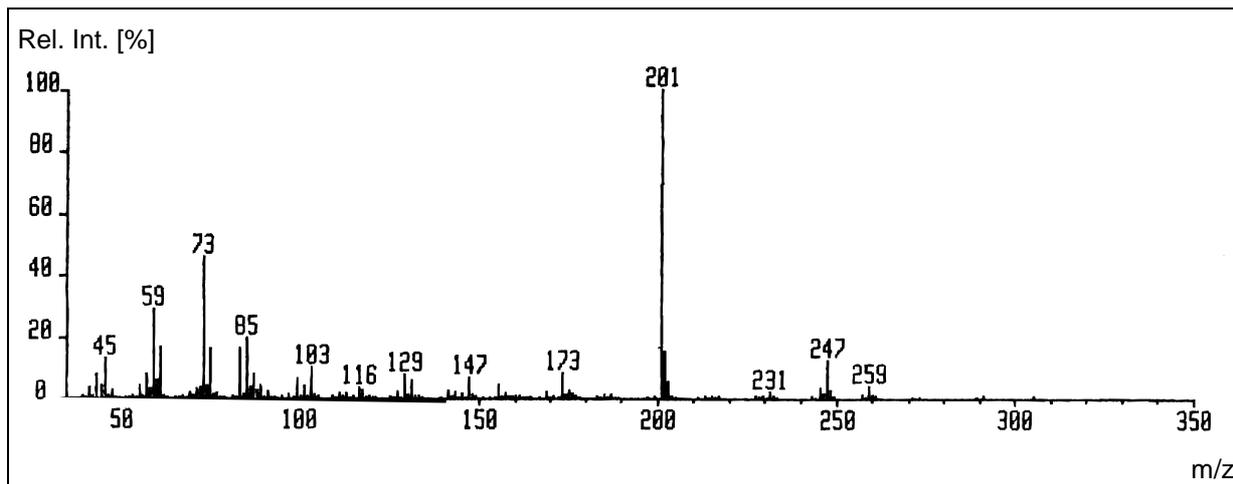
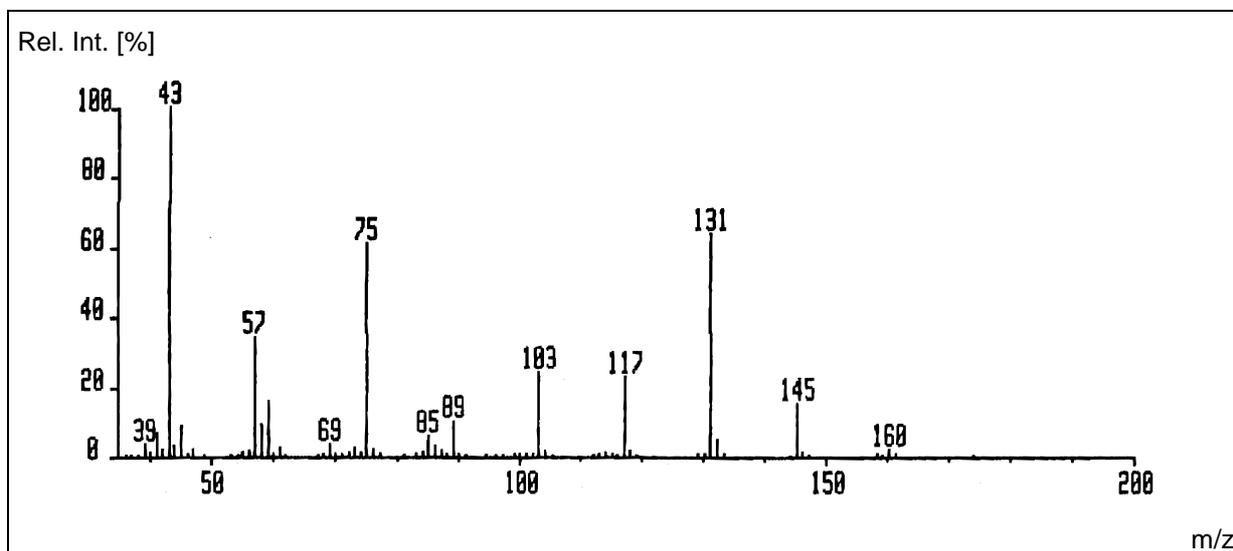
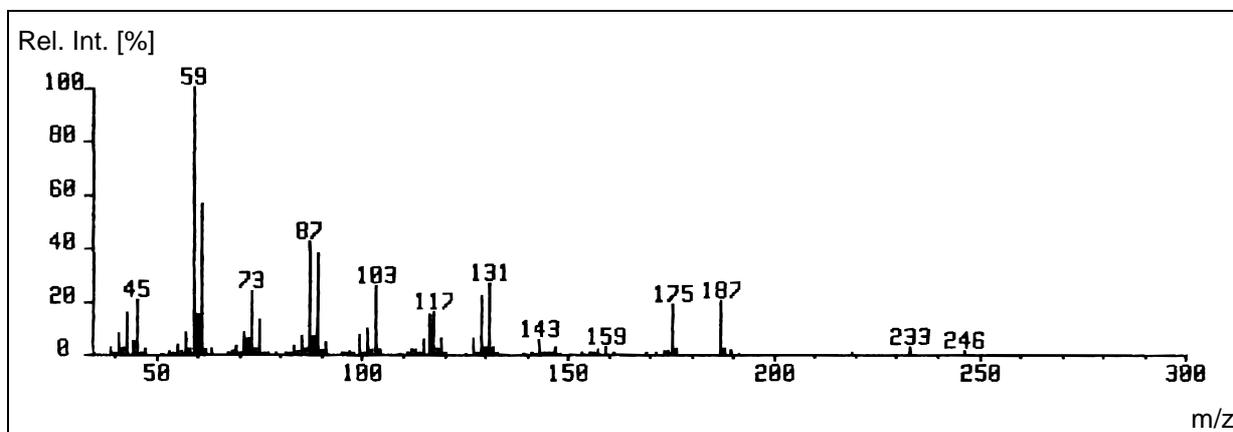
1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-sorbit (**10-a**)4-O-Acetyl-1,6-anhydro-2,3-di-O-methyl-D-glucopyranose (**11**)5-O-Acetyl-1,6-anhydro-2,3-di-O-methyl-D-glucofuranose (**12**)

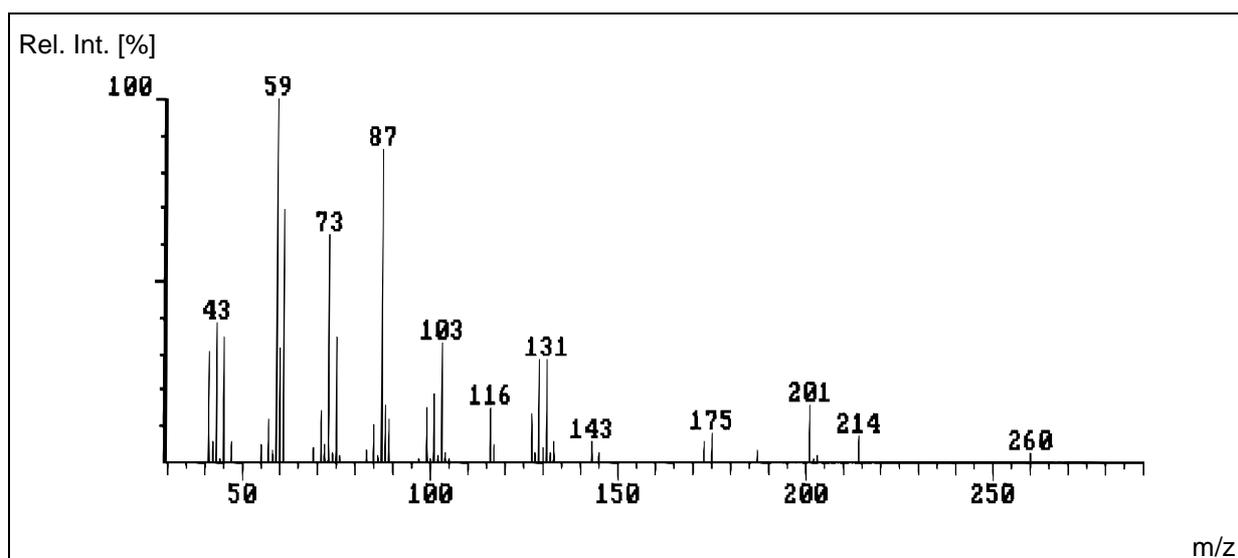
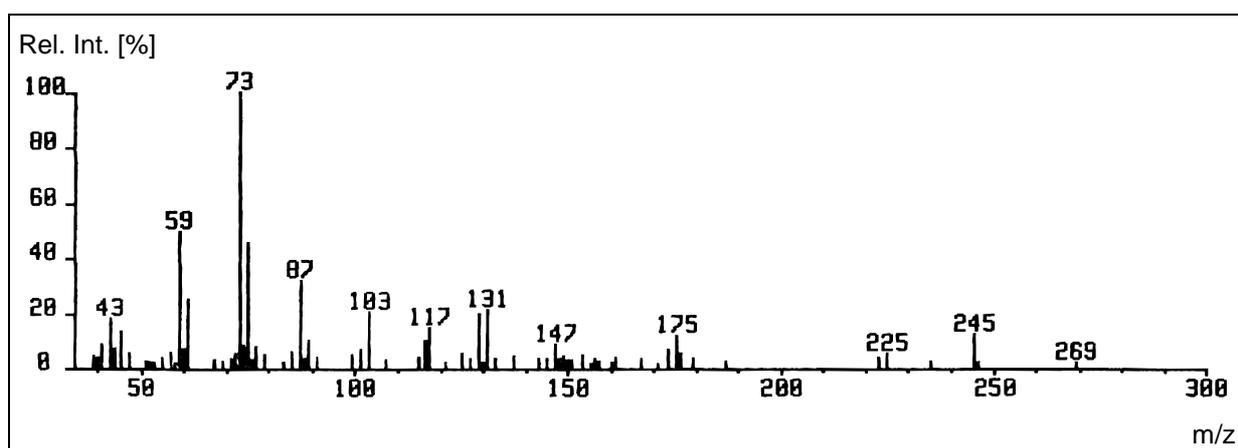
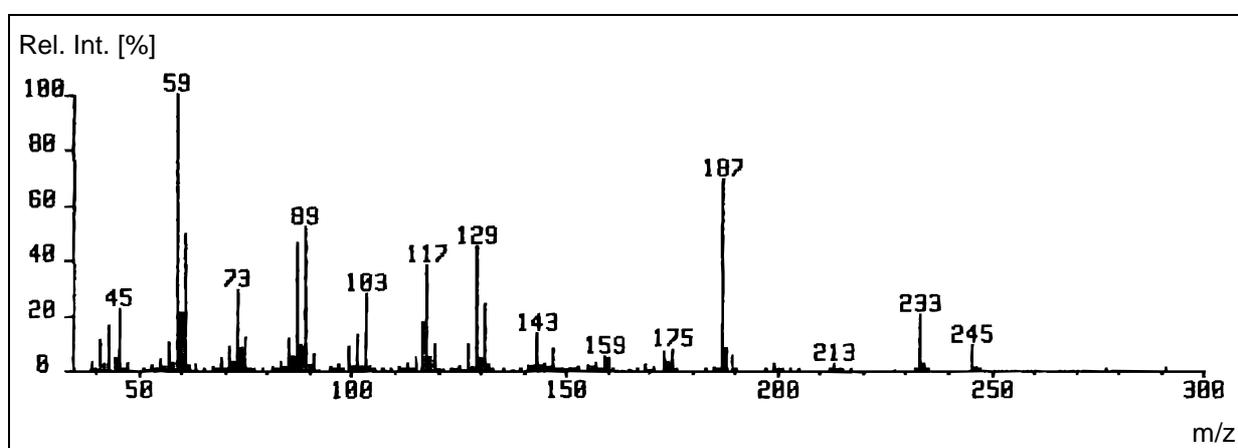
2,4-Di-*O*-acetyl-1,6-anhydro-3-*O*-methyl-D-glucopyranose (**13**)2,5-Di-*O*-acetyl-1,6-anhydro-3-*O*-methyl-D-glucofuranose (**14**)3,4-Di-*O*-acetyl-1,6-anhydro-2-*O*-methyl-D-glucopyranose (**15**)

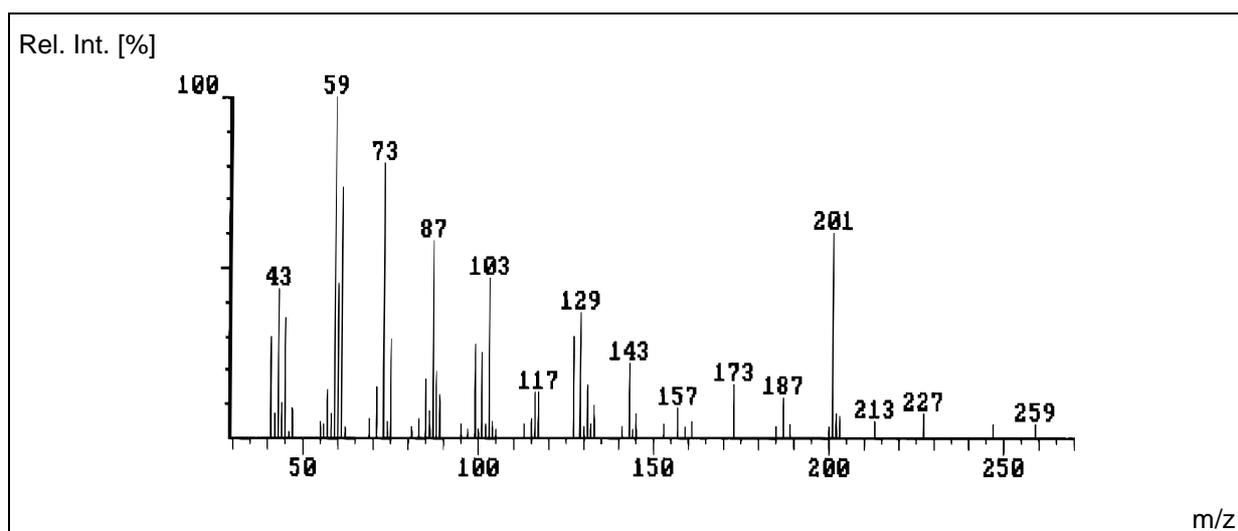
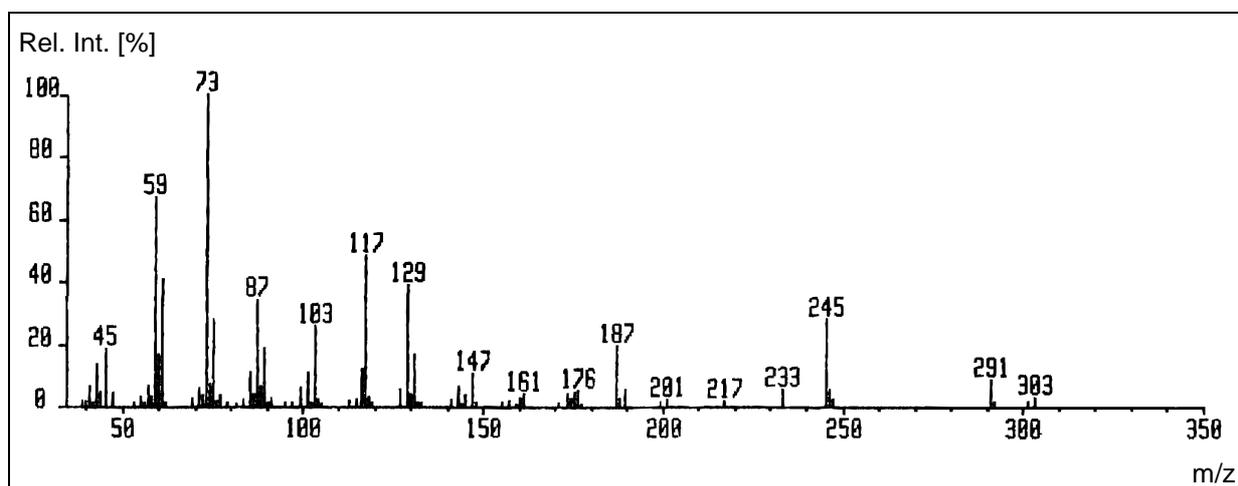
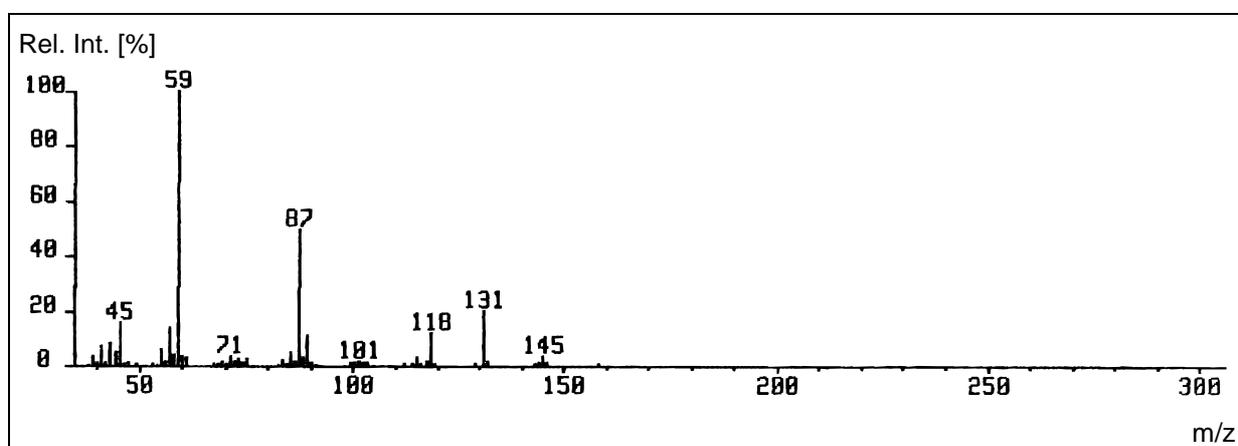
3,5-Di-*O*-acetyl-1,6-anhydro-2-*O*-methyl-D-glucofuranose (**16**)Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid (**17**)2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl- β -D-glucopyranosylazid (**19**)

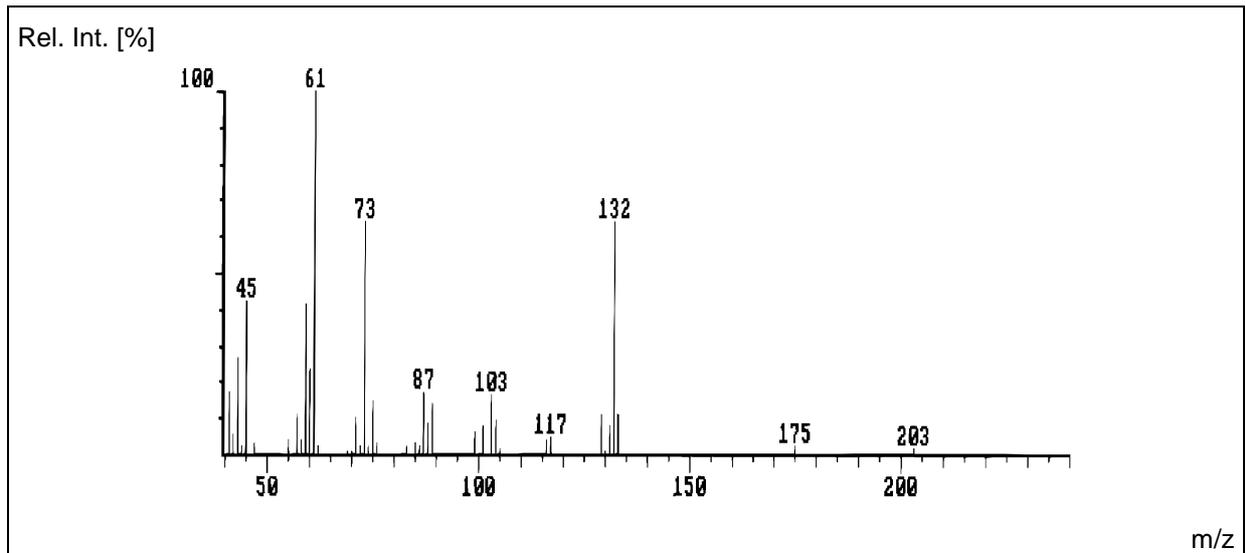
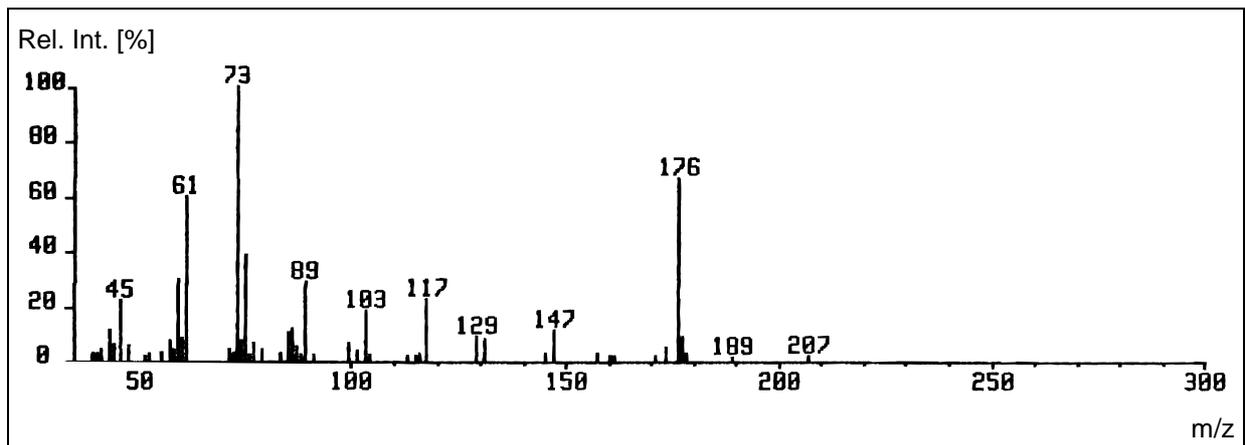
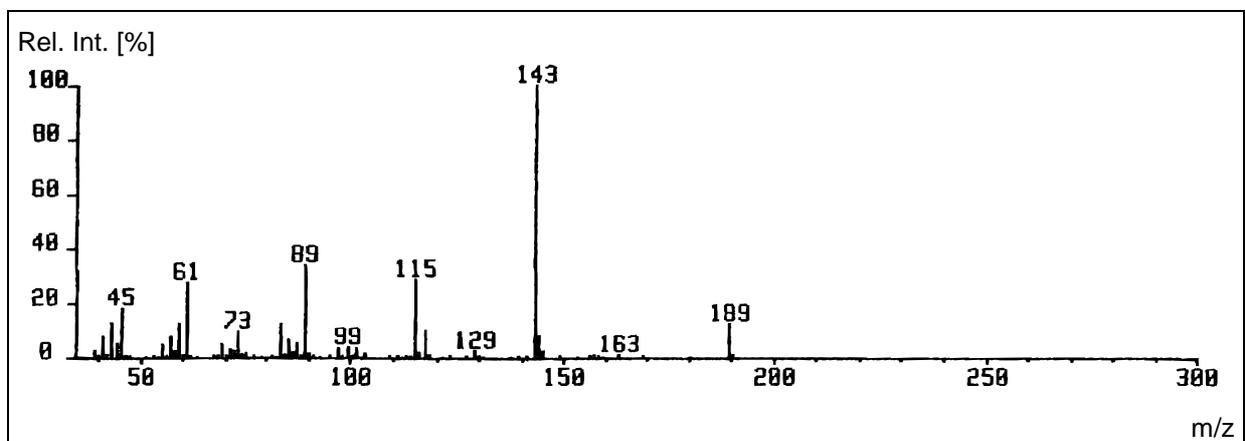
3-Desoxy-2,5,6-tri-*O*-trimethylsilyl-D-*arabino/ribo*-hexono- γ -lacton (23)Trimethylsilyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-trimethylsilyl-D-*arabino/ribo*-hexonat (24)Ethyl-2-desoxy-3,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino*-hexonat (25-d)

Trimethylsilyl-2-desoxy-3,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino*-hexonate (25-e)Methyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino*-hexonate (29-c)Ethyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-*arabino*-hexonate (29-d)

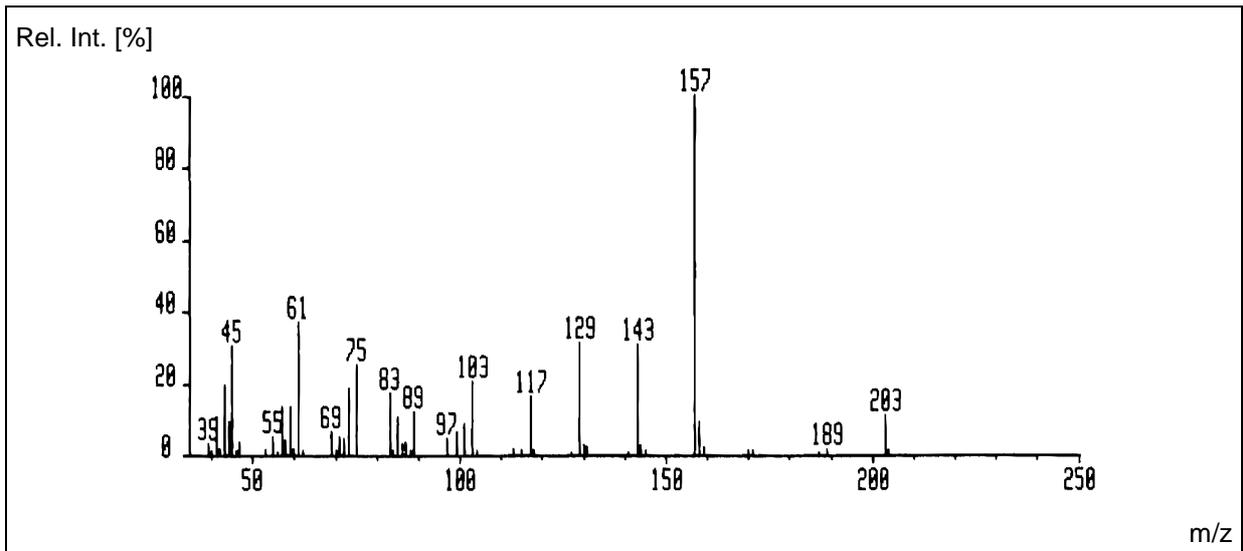
Trimethylsilyl-3-desoxy-2,4,5,6-tetra-*O*-ethyl-D-arabino-hexonate (**29-e**)Ethyl-2,3-di-*O*-ethyl-2-*C*-methylglycerate (**30-d**)Methyl-2,3,4,5-tetra-*O*-ethyl-D-arabinonate (**31-c**)

Ethyl-2,3,4,5-tetra-*O*-ethyl-D-arabinonate (31-d)Trimethylsilyl-2,3,4,5-tetra-*O*-ethyl-D-arabinonate (31-e)Methyl-2,3,4,5,6-penta-*O*-ethyl-D-gluconate (35-c)

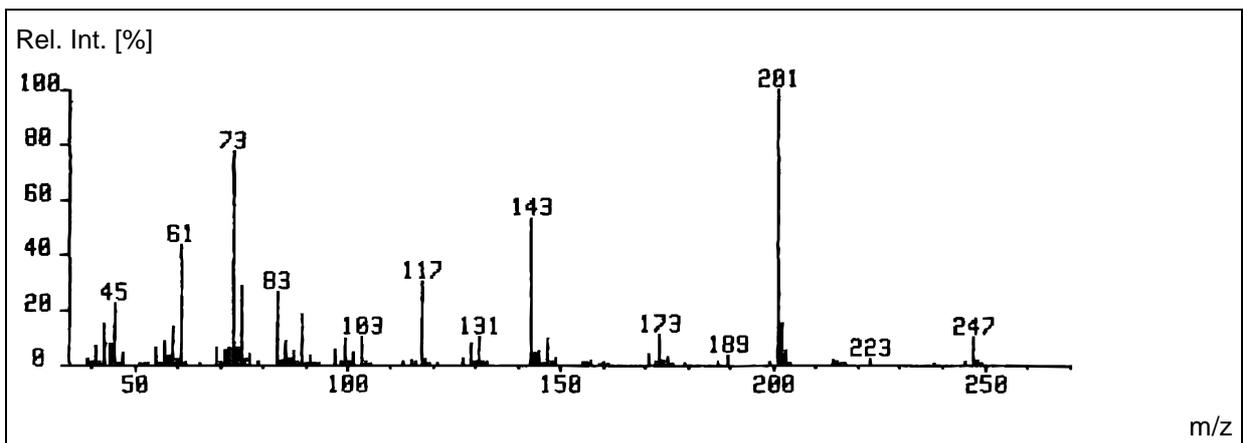
Ethyl-2,3,4,5,6-penta-*O*-ethyl-D-gluconat (**35-d**)Trimethylsilyl-2,3,4,5,6-penta-*O*-ethyl-D-gluconat (**35-e**)Methyl-2,3,4-tri-*O*-ethyl-D-threonat (**38-c**)

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-ethyl-D-threonat (38-d)Trimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-ethyl-D-threonat (38-e)

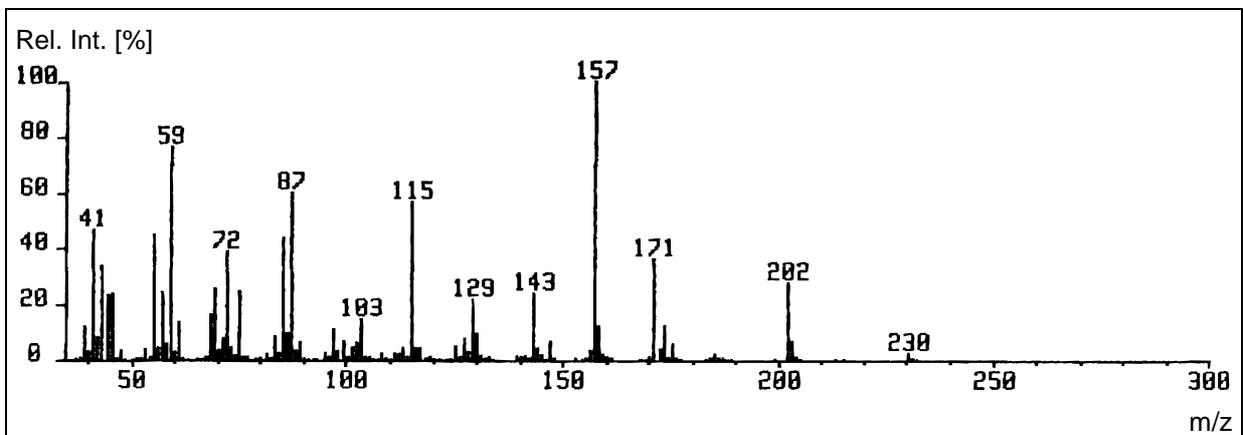
Perethylierte Desoxypentonsäuremethylester



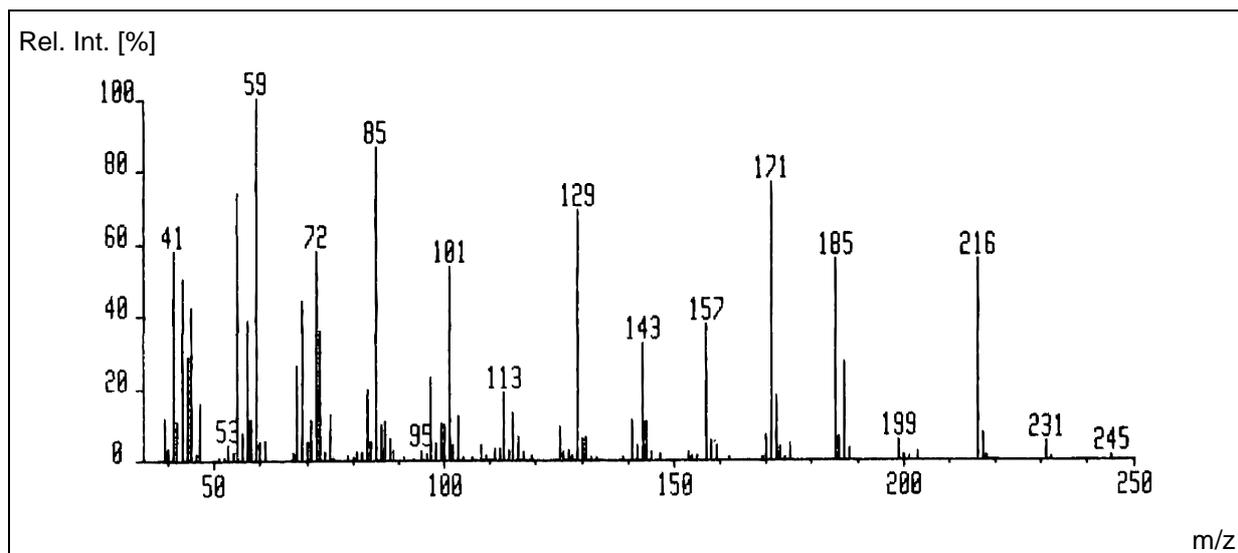
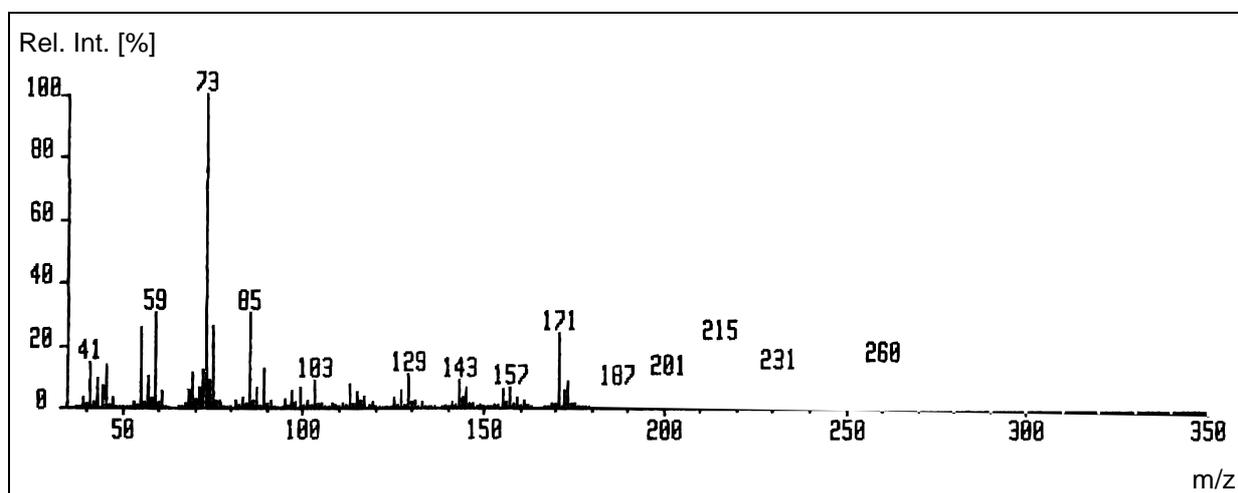
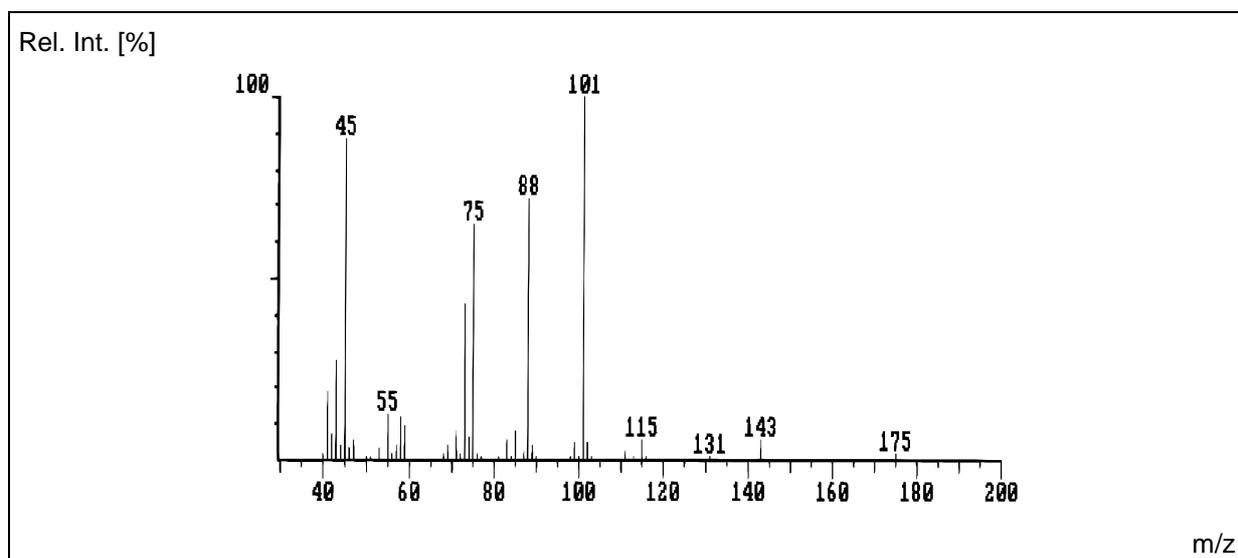
Perethylierte Desoxypentonsäureethylester

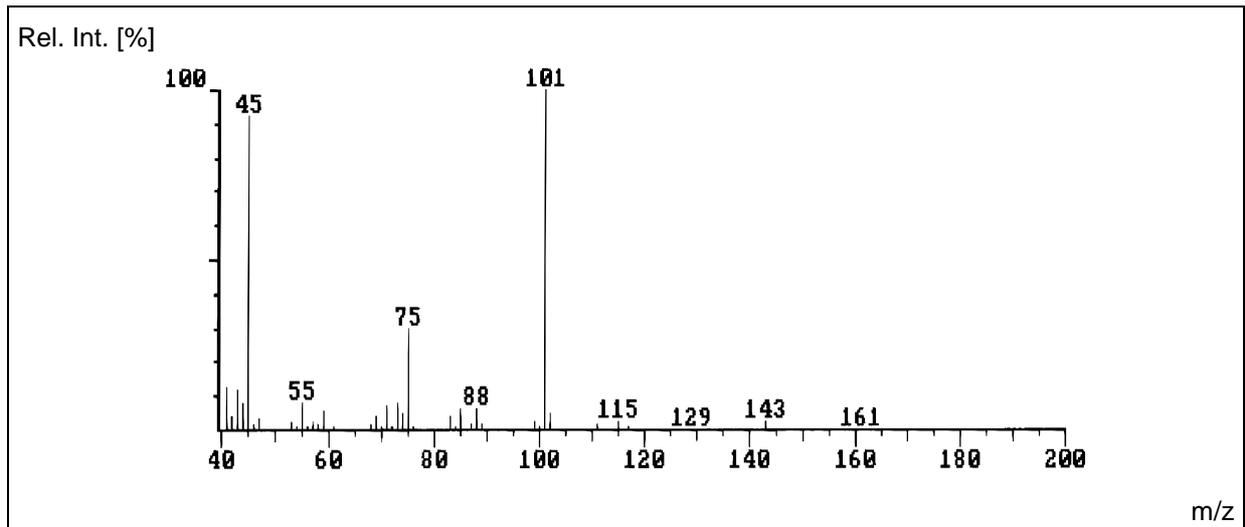
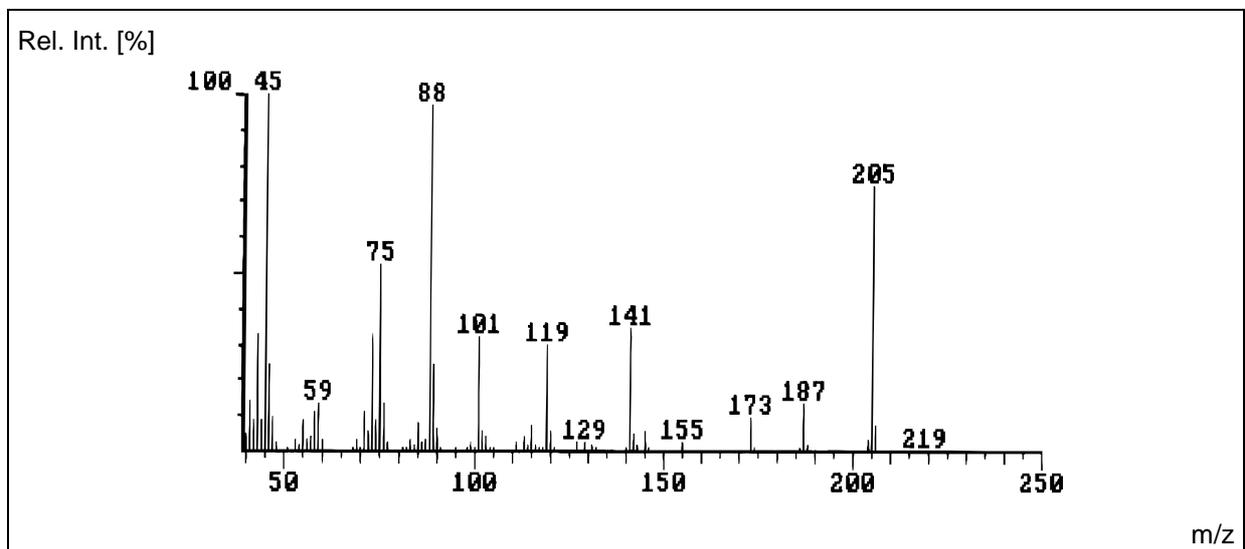
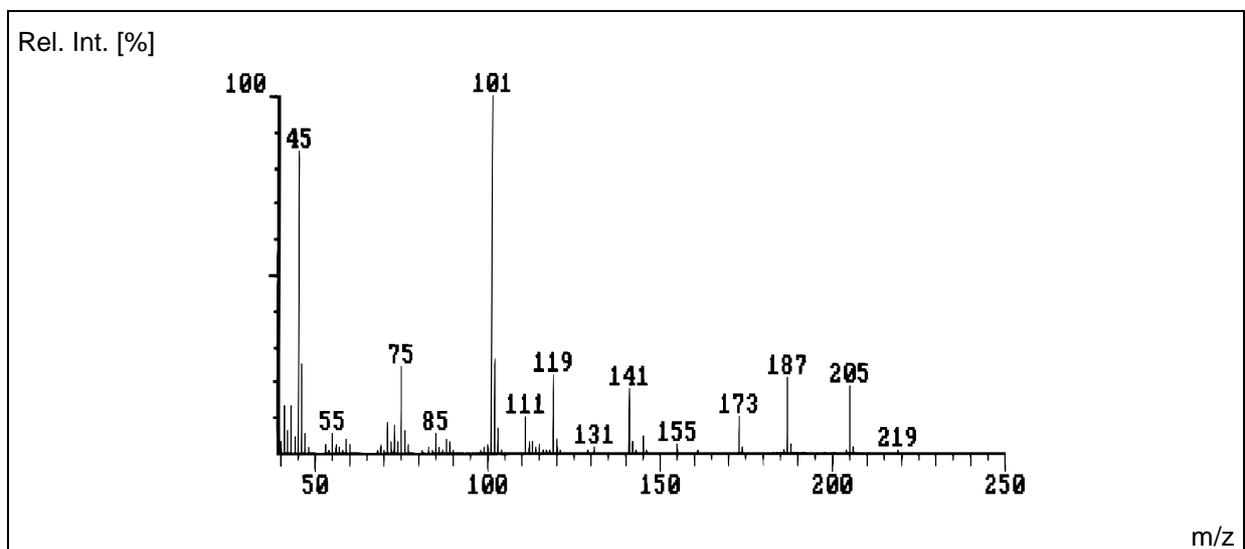


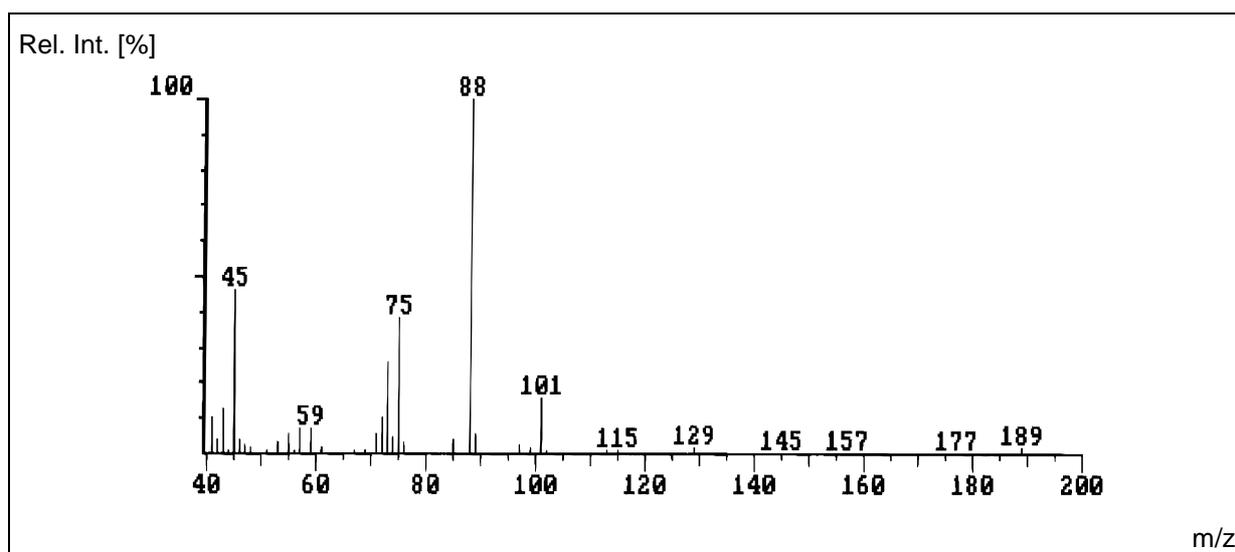
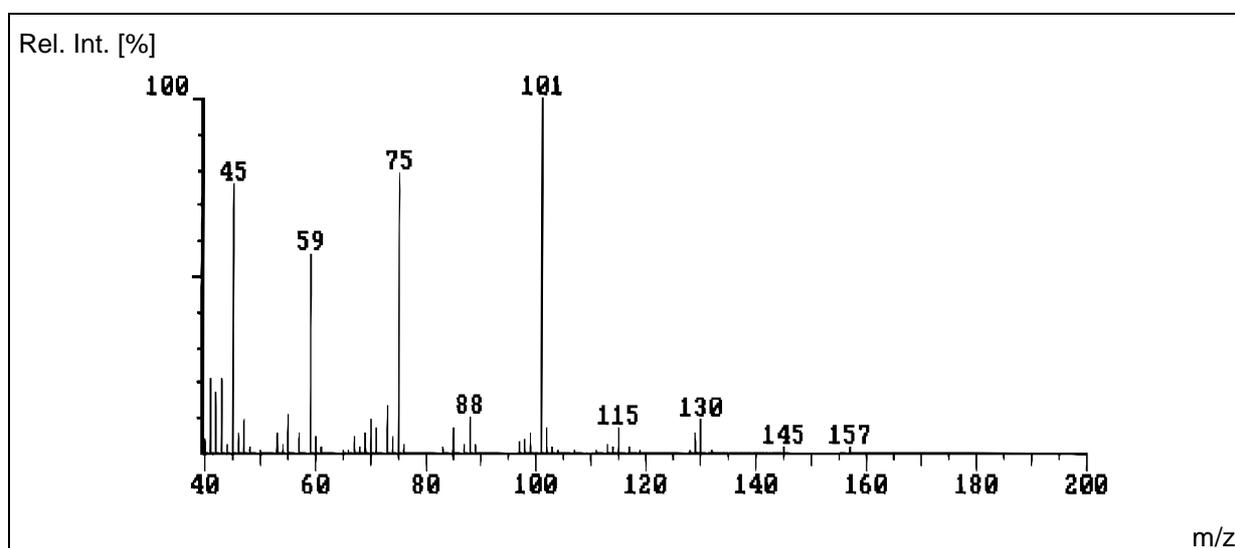
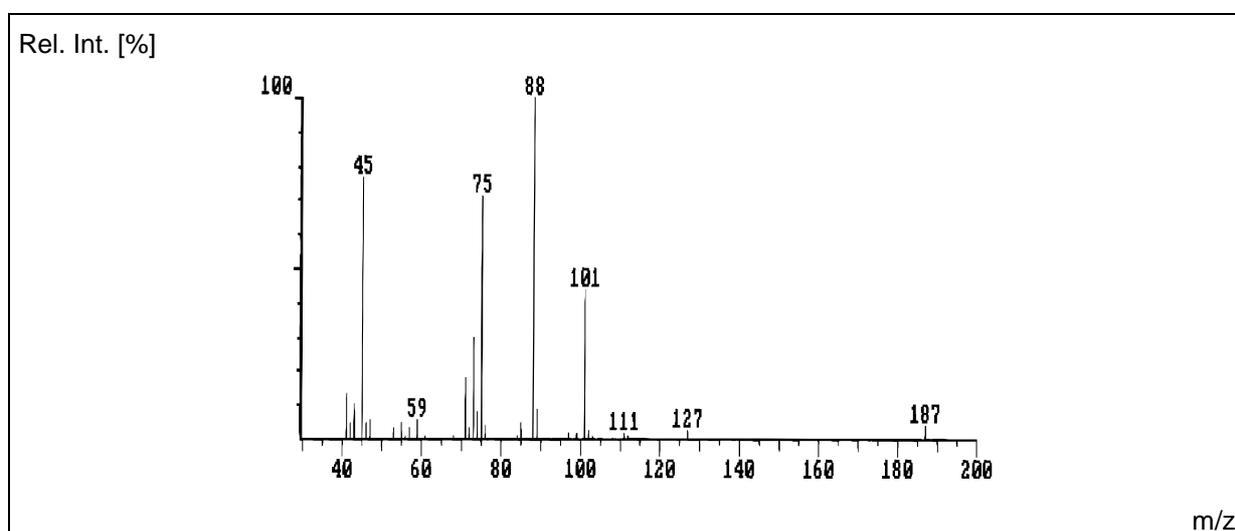
Perethylierte Desoxypentonsäuretrimethylsilylester

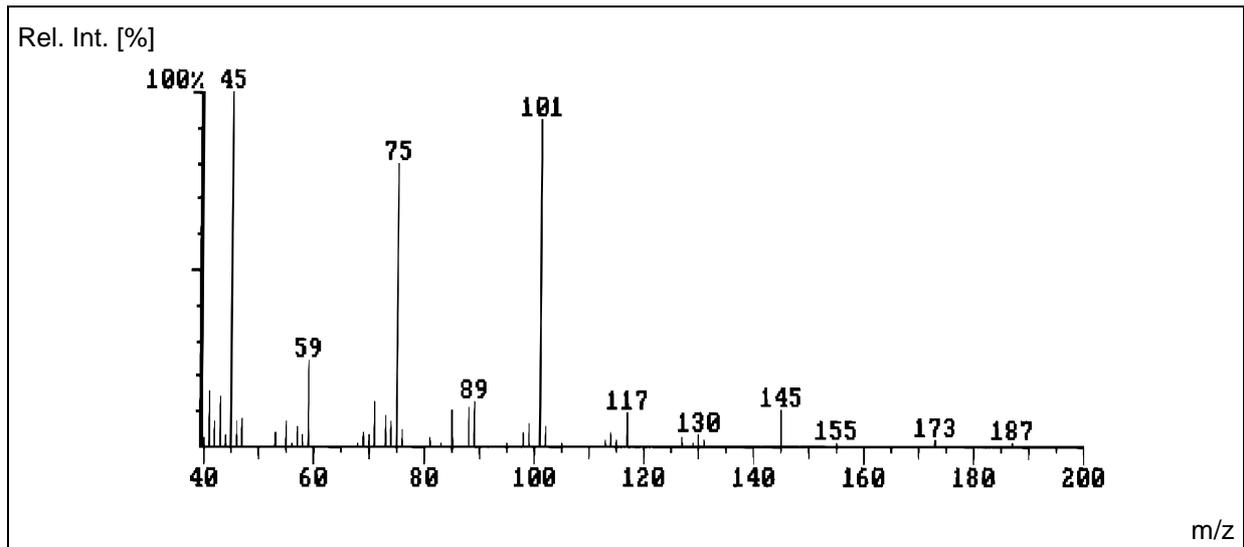
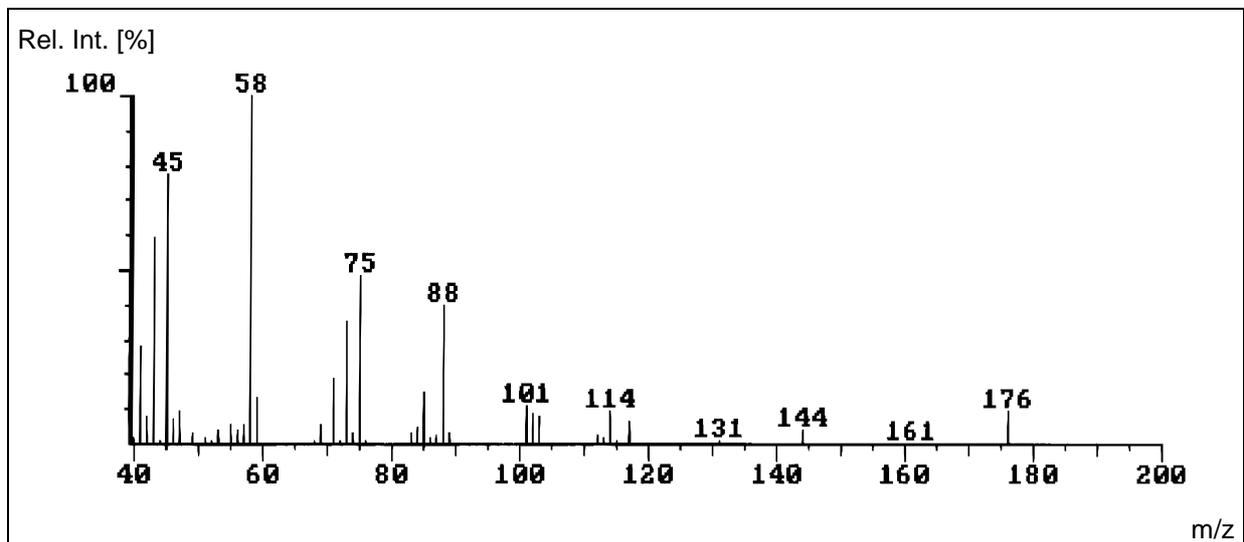
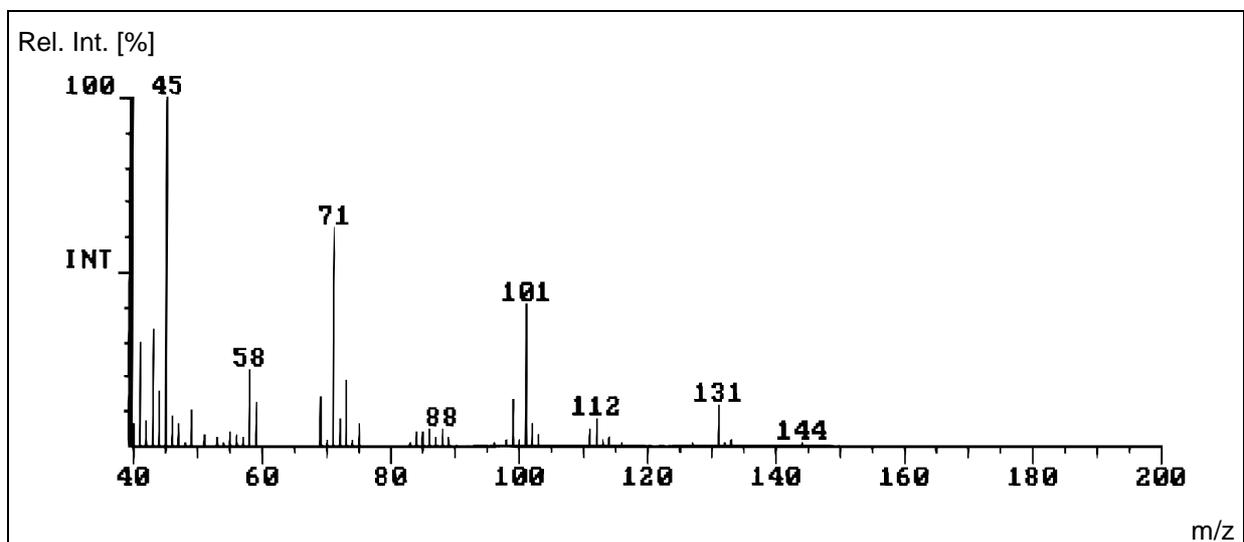


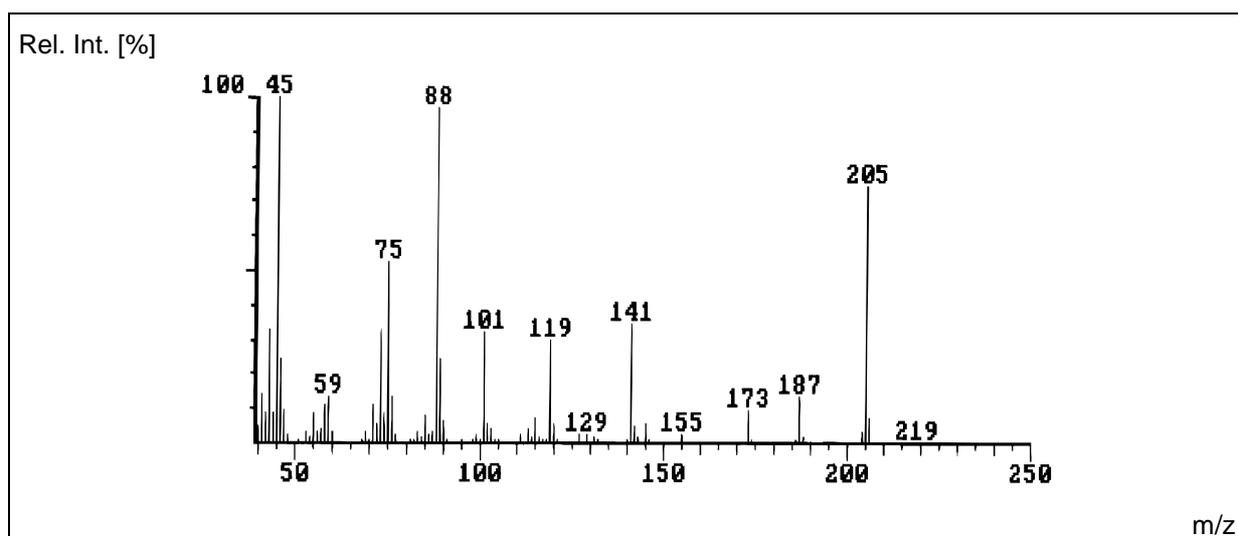
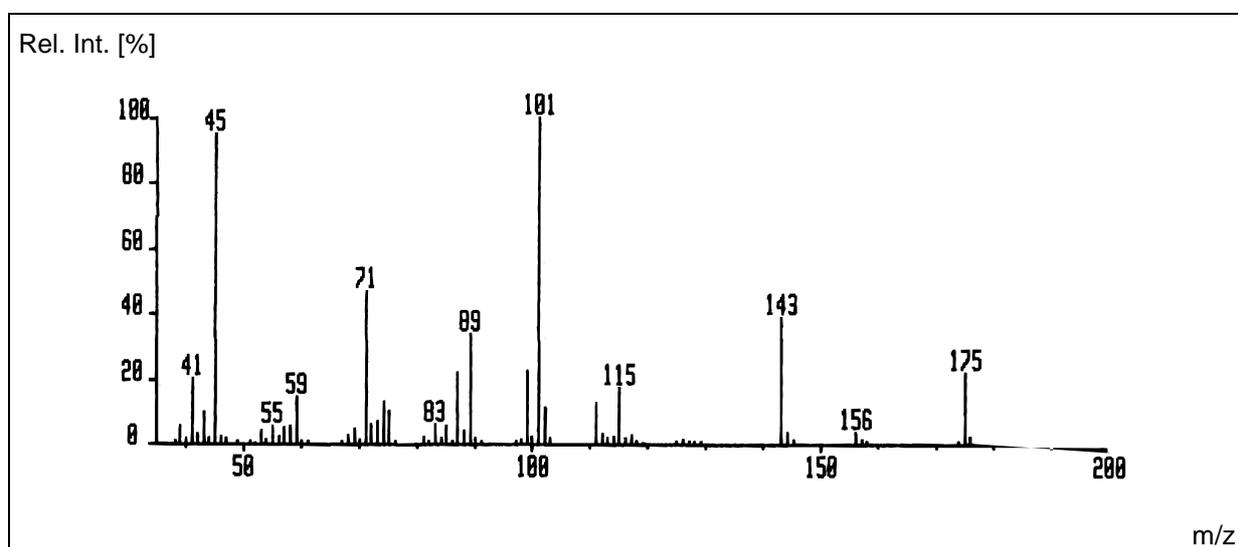
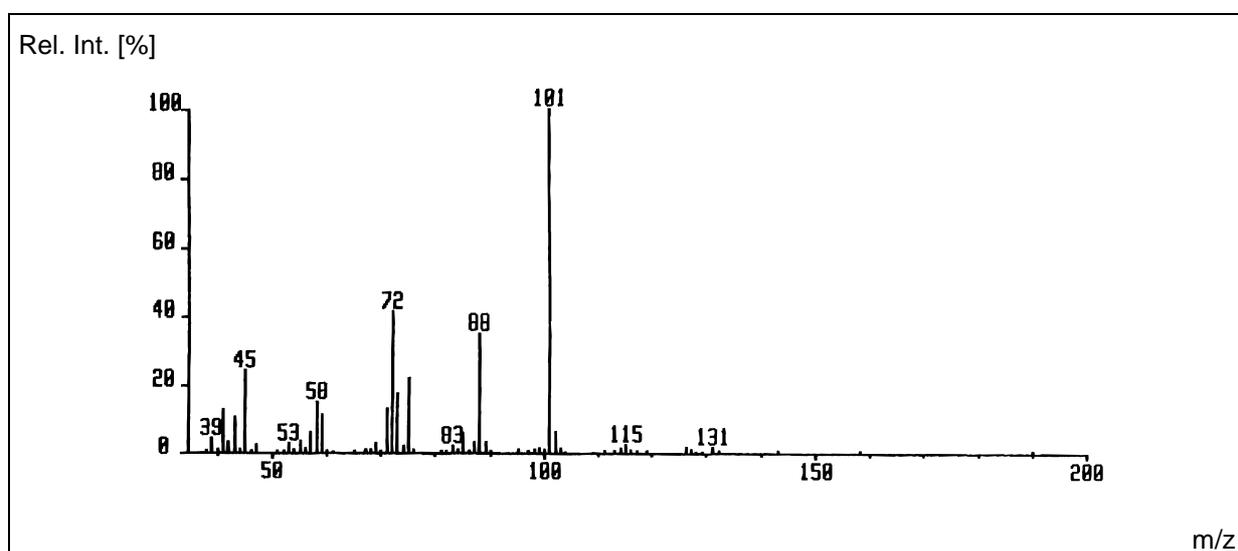
Methyl-3-desoxy-2,5-di-O-ethyl-2-methoxycarbonyl- α/β -D-pentofuranosid (41-c)

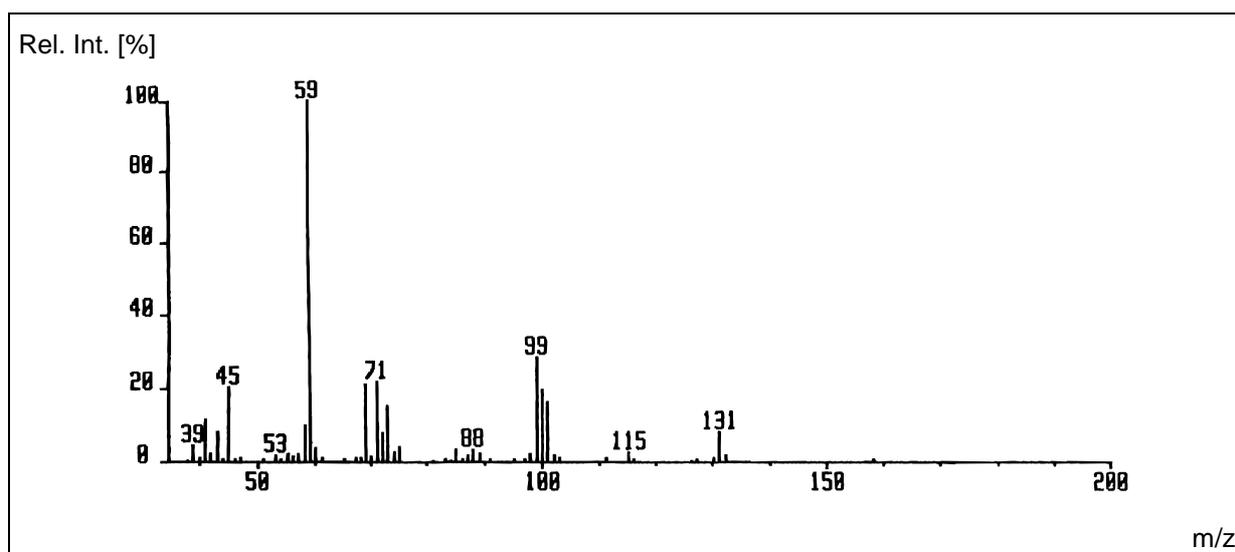
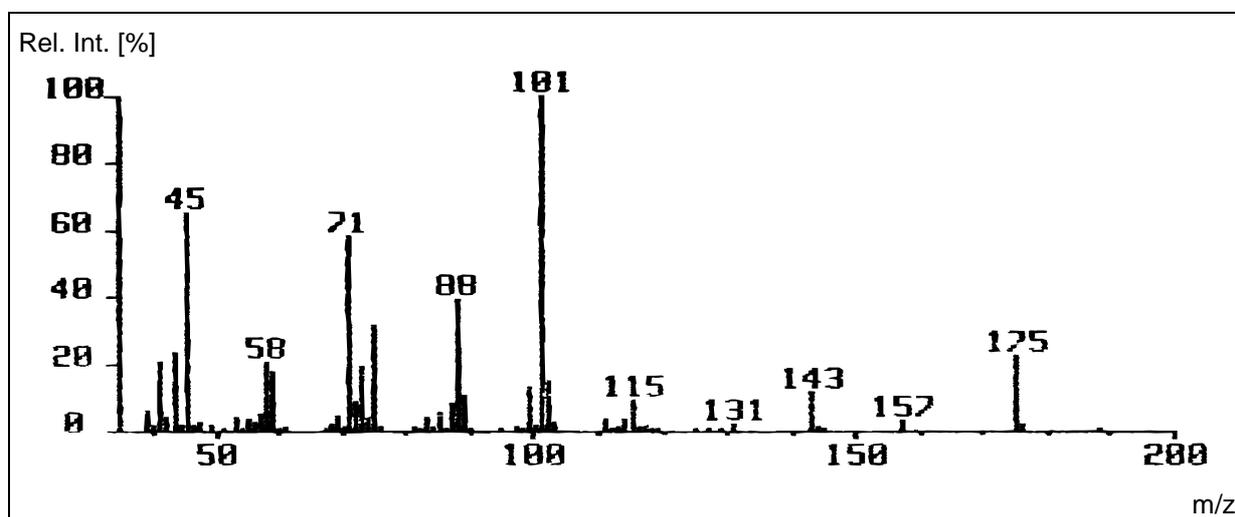
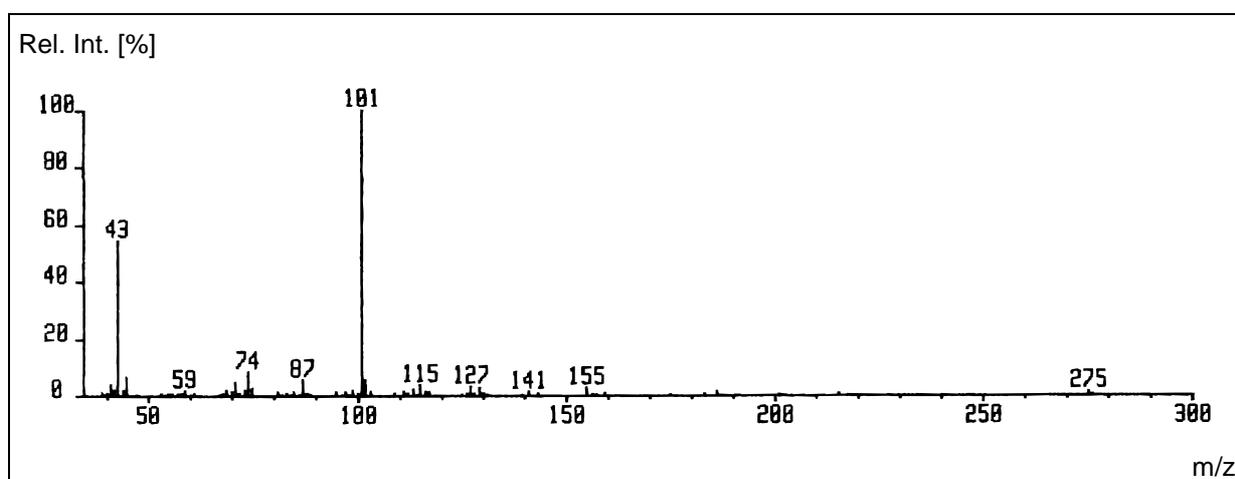
Methyl-3-desoxy-2,5-di-O-ethyl-2-ethoxycarbonyl- α/β -D-pentofuranosid (**41-d**)Methyl-3-desoxy-2,5-di-O-ethyl-2-trimethylsiloxycarbonyl- α/β -D-pentofuranosid (**41-e**)Methyl-2,3,4-tri-O-methyl- α -L-arabinopyranosid (**42- α**)

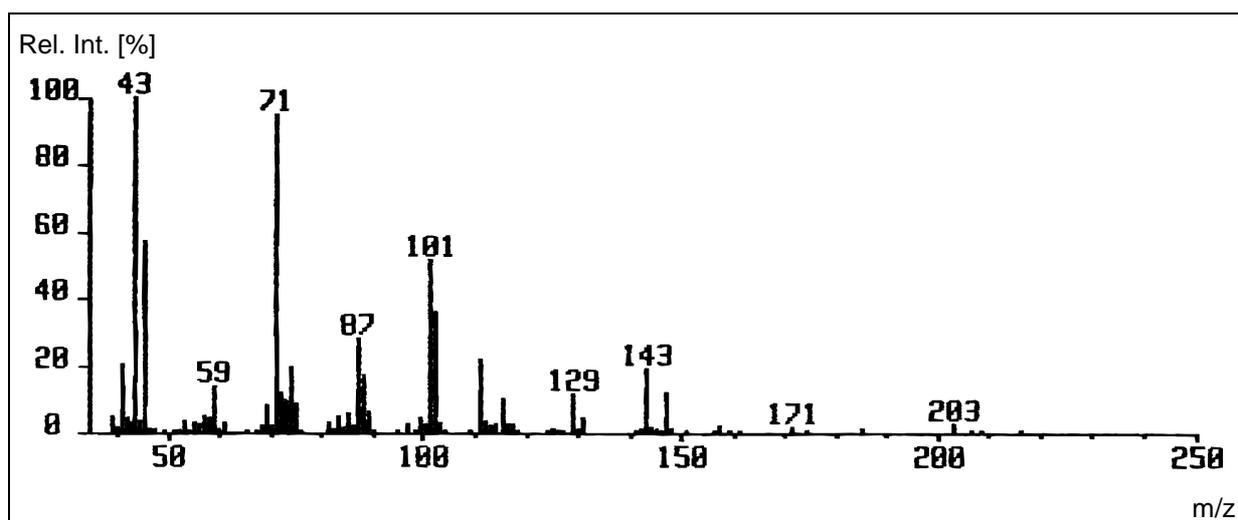
Methyl-2,3,5-tri-*O*-methyl- α -L-arabinofuranosid (**43- α**)Methyl-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl- α -D-fructopyranosid (**44- α**)Methyl-1,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-fructofuranosid (**45- α**)

Methyl-2,3,4-tri-*O*-methyl- α -L-fucopyranosid (**46- α**)Methyl-2,3,5-tri-*O*-methyl- α -L-fucofuranosid (**47- α**)Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactopyranosid (**48- α**)

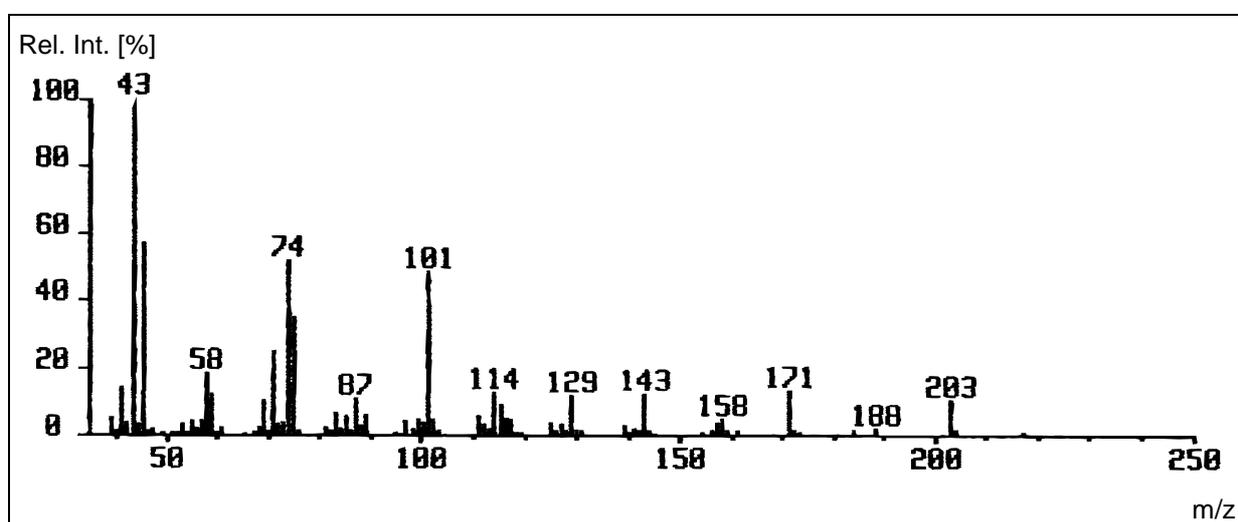
Methyl-2,3,5,6-tetra-*O*-methyl- α -D-galactofuranosid (49- α)1,5-Anhydro-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-arabinose (57)1,4-Anhydro-2,3,5-tri-*O*-methyl-D-arabinose (58)

2,6-Anhydro-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl-D-mannit (59)2,5-Anhydro-1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-mannit (61)1,5-Anhydro-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-fucitol (63)

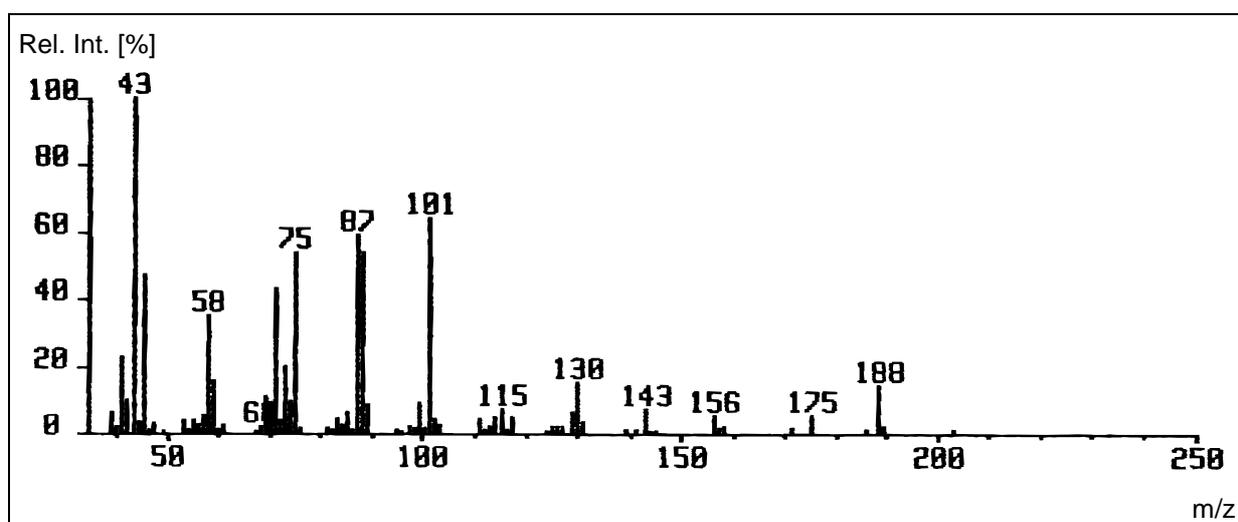
1,4-Anhydro-2,3,5-tri-*O*-methyl-L-fucitol (64)1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-dulcitol (65)1,3,6-Tri-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl- α -D-galactopyranose (76- α)



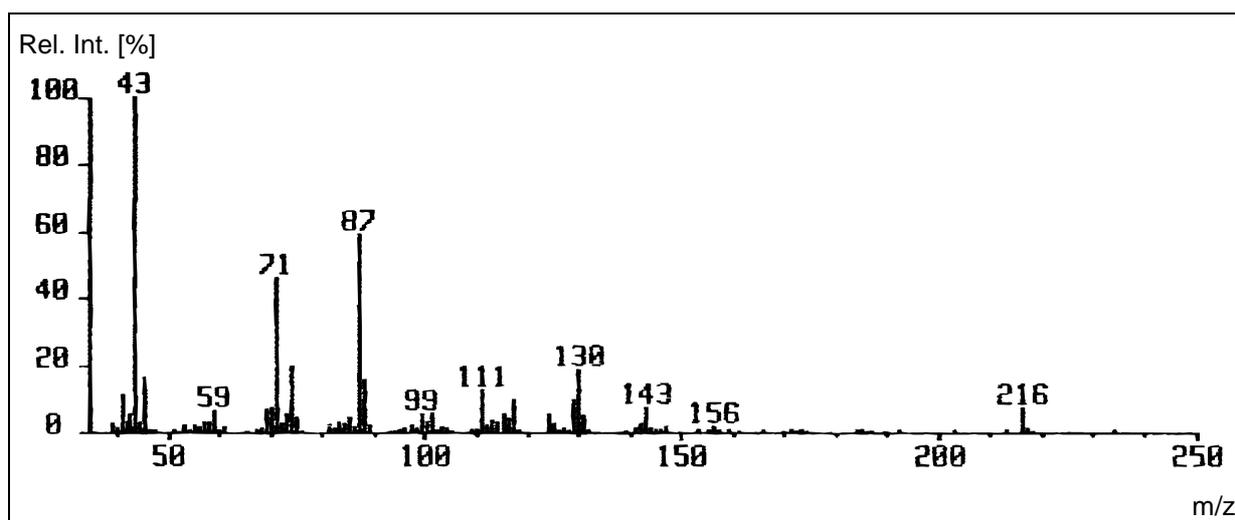
2-O-Acetyl-1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-methyl-D-dulcitol (80)



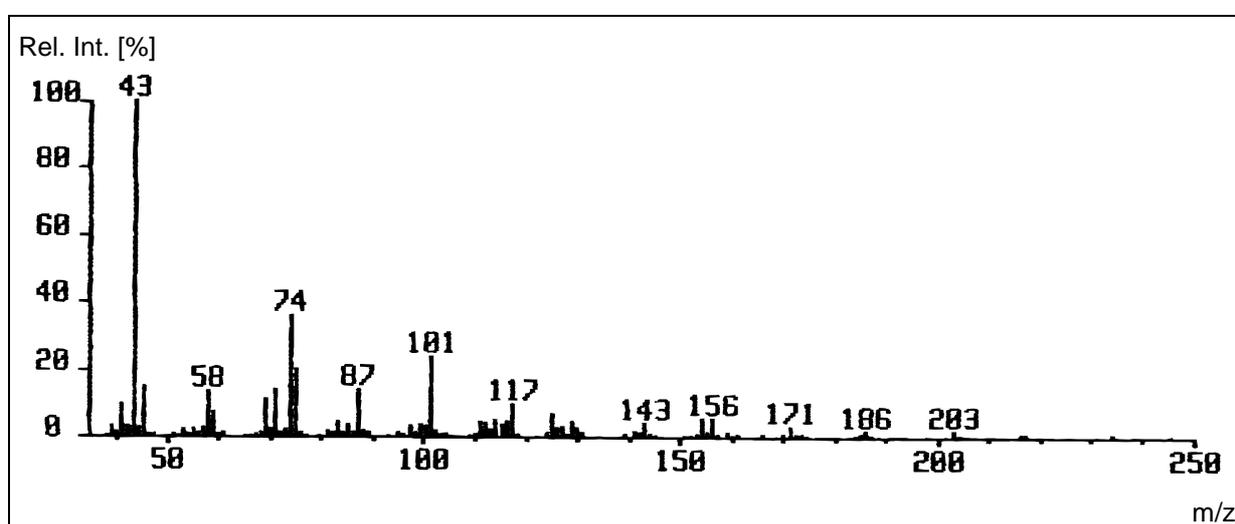
3-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,4,6-tri-O-methyl-D-dulcitol (81)



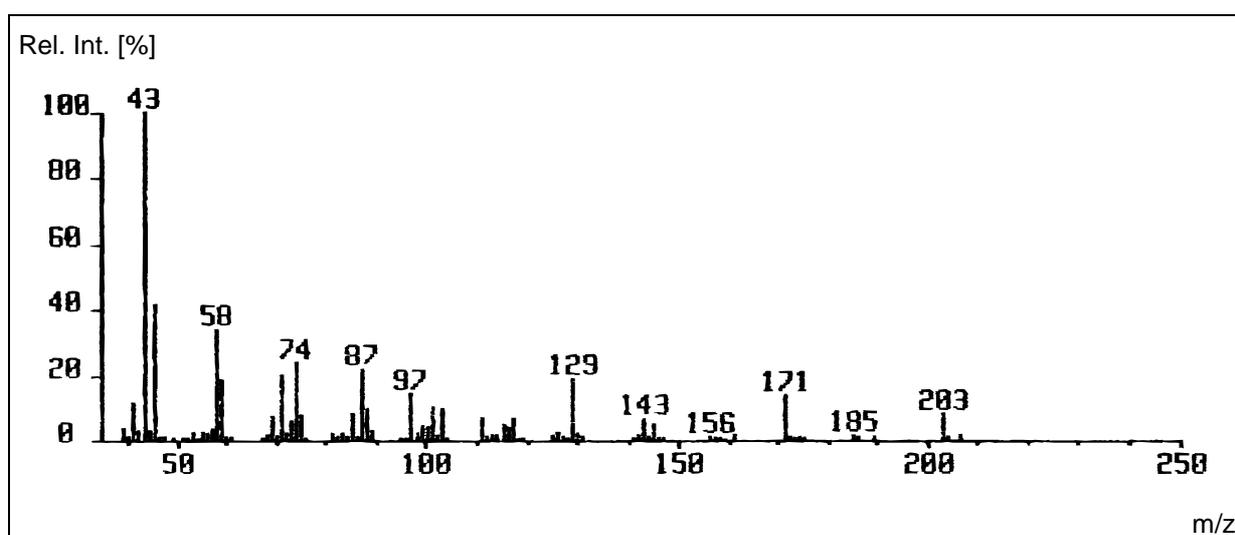
6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,4-tetra-O-methyl-D-dulcitol (82)



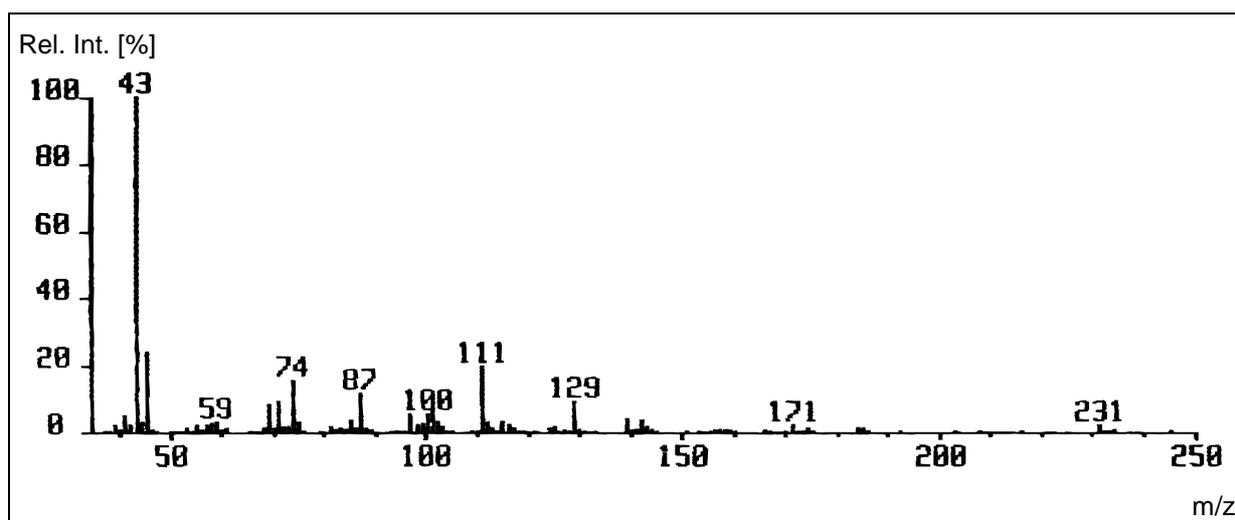
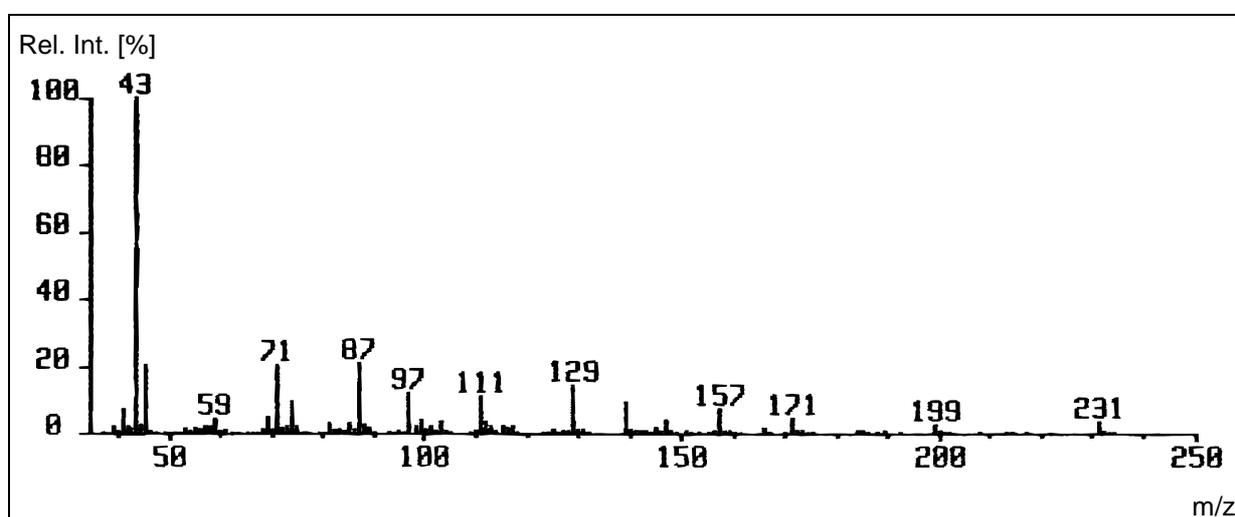
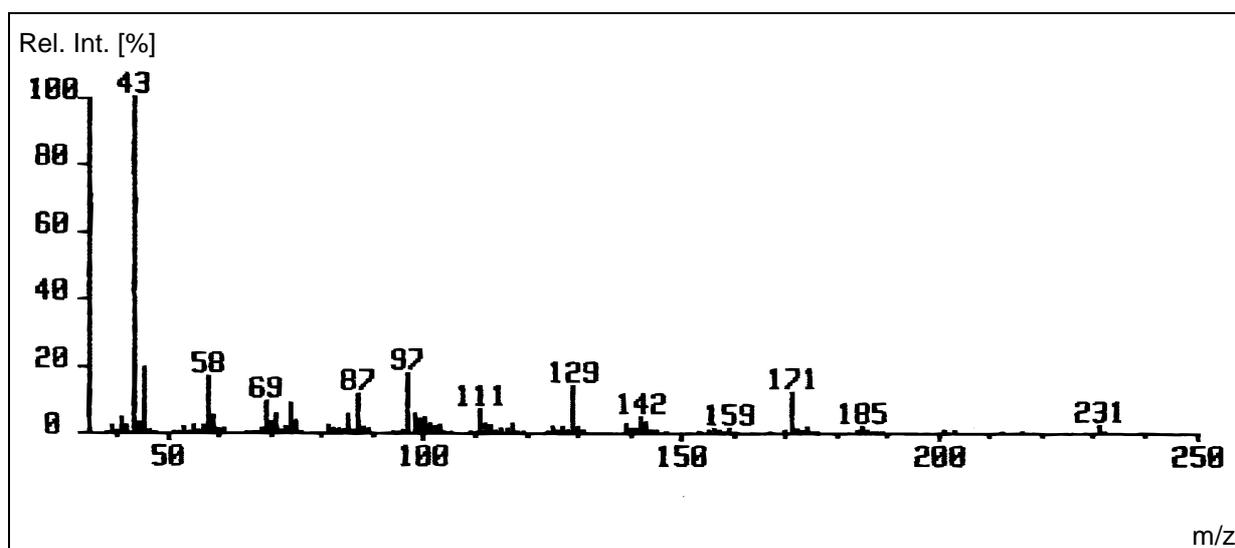
2,6-Di-O-acetyl-1,5-anhydro-3,4-di-O-methyl-D-dulcitol (83)

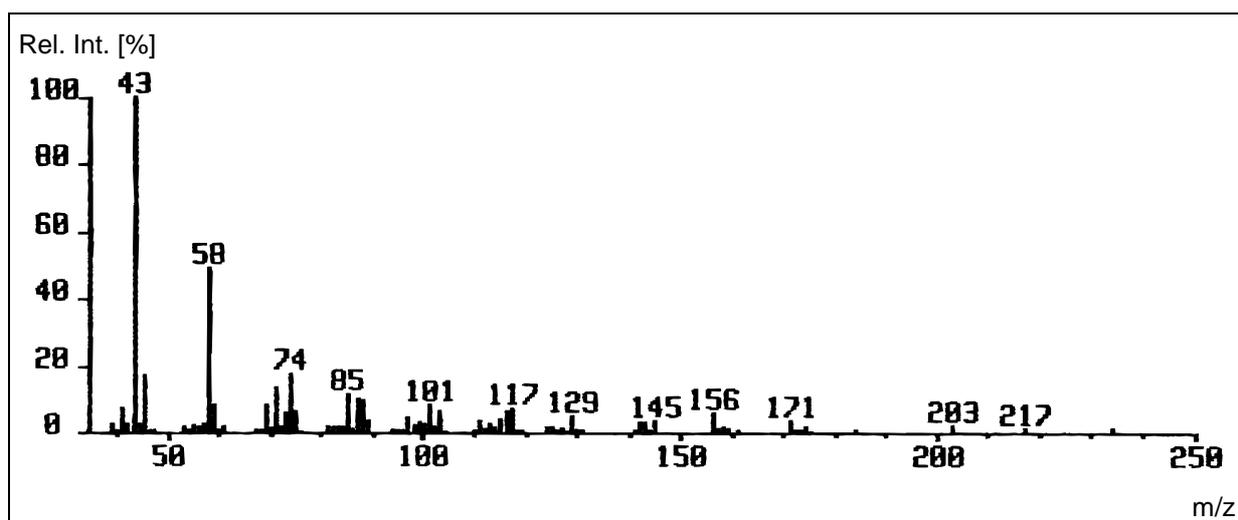


3,6-Di-O-acetyl-1,5-anhydro-2,4-di-O-methyl-D-dulcitol (84)

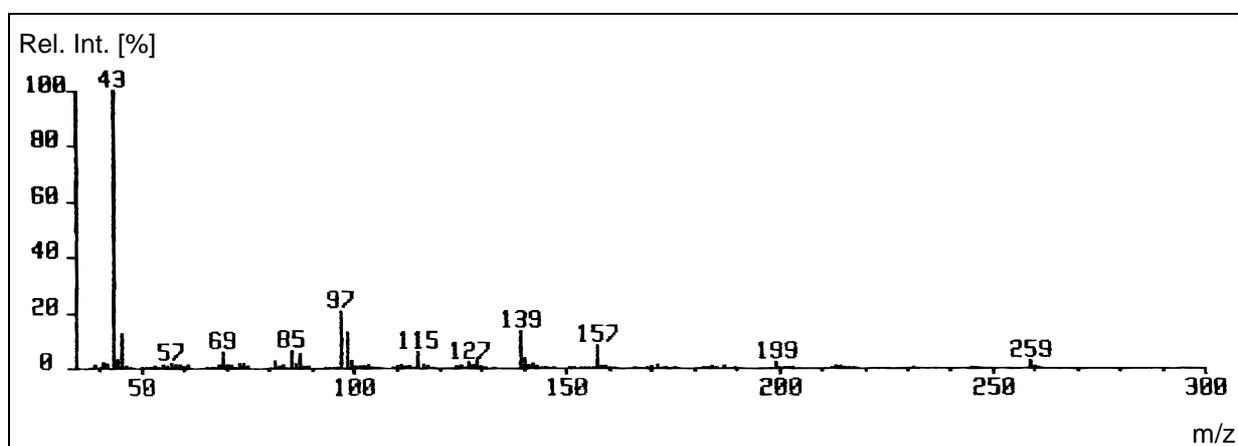


4-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-D-dulcitol (85)

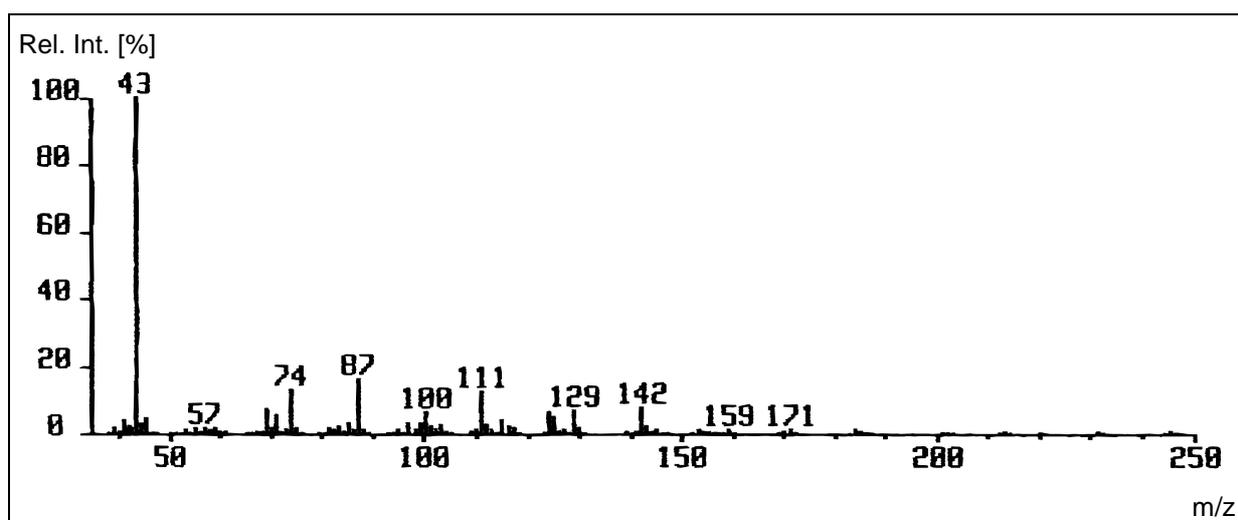
2,3-Di-*O*-acetyl-1,5-anhydro-4,6-di-*O*-methyl-D-dulcitol (86)2,4-Di-*O*-acetyl-1,5-anhydro-3,6-di-*O*-methyl-D-dulcitol (87)3,4-Di-*O*-acetyl-1,5-anhydro-2,6-di-*O*-methyl-D-dulcitol (88)



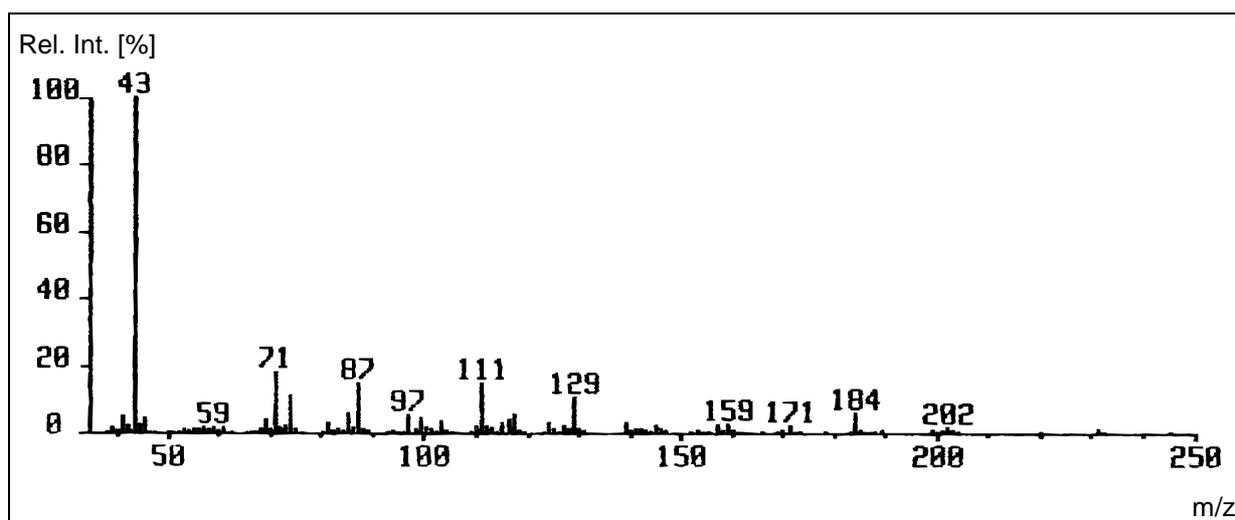
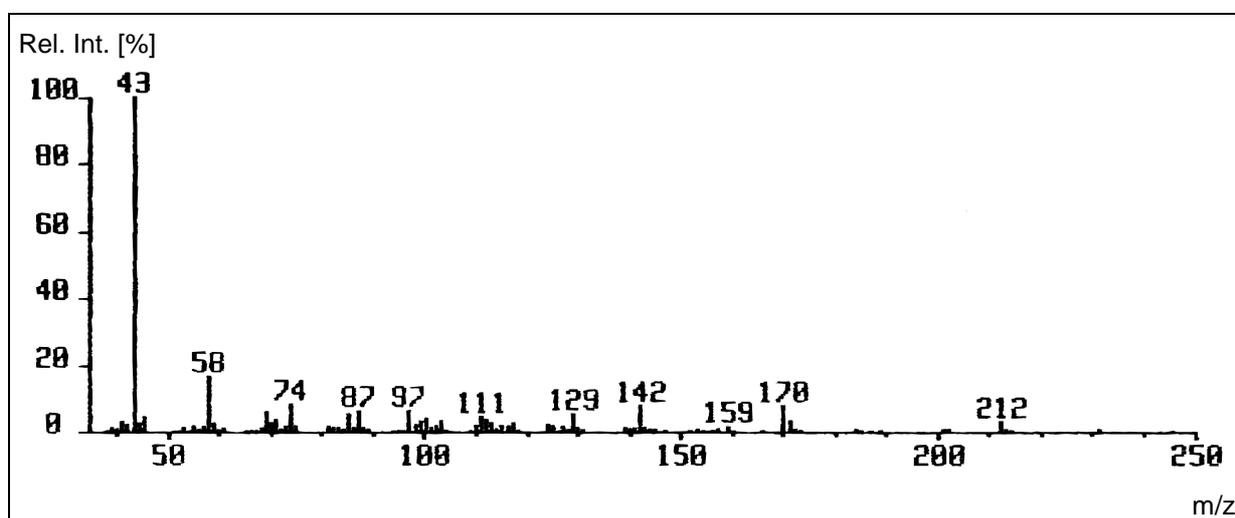
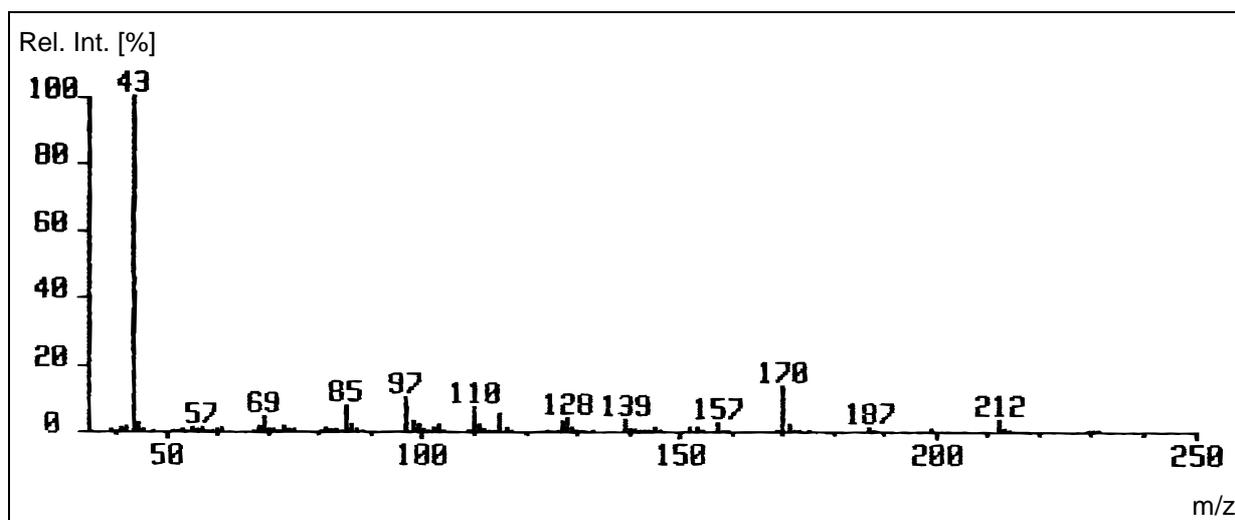
4,6-Di-O-acetyl-1,5-anhydro-2,3-di-O-methyl-D-dulcitol (89)



2,3,4-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-6-O-methyl-D-dulcitol (90)



2,3,6-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-4-O-methyl-D-dulcitol (91)

2,4,6-Tri-*O*-acetyl-1,5-anhydro-3-*O*-methyl-D-dulcitol (92)3,4,6-Tri-*O*-acetyl-1,5-anhydro-2-*O*-methyl-D-dulcitol (93)2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1,5-anhydro-D-dulcitol (94)

8 Literaturverzeichnis

- [1] F. W. Lichtenthaler (Hrsg.). Carbohydrates as Organic Raw Materials. VCH, Weinheim (1991).
- [2] H. Eierdanz (Hrsg.). Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie. VCH, Weinheim (1996).
- [3] W. Praznik, A. Huber (Hg.). Carbohydrates as Organic Raw Materials IV. WUV-Universitätsverlag, Wien (1998).
- [4] H. Krässig. Structure of Cellulose and its Relation to Properties of Cellulose Fibers. in: J.F. Kennedy, G.O. Phillips, D.J. Wedlock und P.A. Williams, *Cellulose and its Derivatives. Chemistry, Biochemistry and Applications*, S. 3-25. Ellis Horwood, Chichester (1985).
- [5] P.A.J. Gorin und E. Barreto-Bergter. The Chemistry of Polysaccharides of Fungi and Lichens. In: G.O. Aspinall (Hg.). *The Polysaccharides, Bd.2*, Academic Press, London 1983.
- [6] R.H. Marchessault und C.Y. Liang. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. III. Mercerized Cellulose. *J. Polym. Sci.*, **43** (1960) 71-84.
- [7] K.H. Gardner und J. Blackwell. The Structure of Native Cellulose. *Biopolymers*, **13** (1974) 1975-2001.
- [8] Y. Takahashi und H. Matsunaga. Crystal Structure of Native Cellulose. *Macromolecules*, **24** (1991) 3968.
- [9] O. Kratky. Über den mizellaren Aufbau und die Deformationsvorgänge bei Faserstoffen. *Kolloid Z.*, **70** (1935) 14-19.
- [10] H.-P. Fink und B. Philipp. Models of Cellulose Physical Structure from the Viewpoint of the Cellulose I \leftrightarrow II Transition. *J. Appl. Polym. Sci.*, **30** (1985) 3779-3790.
- [11] H.-P. Fink, D. Hofmann und H.-J. Purz. Zur Fibrillarstruktur nativer Cellulose. *Acta Polym.*, **41** (1990) 131-137.
- [12] D.L. Vander Hart und R.H. Atalla. Studies of Microstructure in Native Cellulose Using Solid-State ^{13}C NMR. *Macromolecules*, **17** (1984) 1465-1472.
- [13] F. Horii, H. Yamamoto, R. Kitamaru, M. Tanahashi und T. Higuchi. Transformation of Native Cellulose Crystals Induced by Saturated Steam at High Temperatures. *Macromolecules*, **20** (1987) 2946-2949.
- [14] M. Koyama, W. Helbert, T. Imai, J. Sugiyama und B. Henrissat. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (1997) 9091-9095.
- [15] H.P. Fink und E. Walenta. X-ray diffraction investigation of cellulose supramolecular structure at processing. *Das Papier*, **48** (1994) 739-742.

- [16] H.-P. Fink, E. Walenta, J. Kunze, and G. Mann. in: J.F. Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams und L. Piculell (Hrsg.), *Cellulose and Cellulose Derivatives, Physico-chemical Aspects and Industrial Applications*, S. 523-528, Woodhead Publ. Ltd., Cambridge (1995).
- [17] S. Raymond, A. Kvick und H. Chanzy. The Structure of Cellulose II: A Revisit. *Macromolecules*, **28** (1995) 8422-8425.
- [18] H. Krässig. Neuere Strukturansichten auf dem Gebiet der Cellulose. *Das Papier*, **33** (1979) V9-V20.
- [19] H. Krässig und J. Schurz, Cellulose. in: W. Gehartz (Hrsg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Bd. A25, S. 375-391. VCH, Weinheim (1986).
- [20] G. Machell und G.. Richards. The Alkaline Degradation of Polysaccharides. Part II. The Alkali-stable Residues from the Action of Sodium Hydroxide on Cellulose. *J. Chem. Soc.*, (1957) 4500-4506.
- [21] M.H. Johansson und O. Samuelson. The Formation of End Groups in Cellulose during Alkali Cooking. *Carbohydr. Res.*, **34** (1974) 33-43.
- [22] B. Philipp, J. Baudisch, W. Stöhr. Influence of chemical factors on the thermal degradation of cellulose. *Cellulose Chem. Technol.*, **6** (1972) 379-392.
- [23] T. Lindström. Chemical factors affecting the behaviour of fibres during papermaking. *Nordic Pulp Paper Res. J.*, **7** (1992) 181-192.
- [24] J.L. Gay-Lussac und L.J. Thénard, *Recherches Physio-Chimiques*, Bd.2. Deterville, Paris (1811).
- [25] M. Payen. Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **7** (1838) 1052-1056.
- [26] A. Brogniart, T.J. Pelouze und A.B. Dumas. Rapport sur un memoire de M. Payen relatif à la composition de la matière ligneuse. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **8** (1839) 51-53.
- [27] W.N. Haworth. The structure of carbohydrates. *Helv. Chim.Acta*, **11** (1928) 534-548.
- [28] K. Freudenberg. Nachtrag zu der Mitteilung über Methylcellulose. *Ann. Chem.*, **461** (1928) 130-131.
- [29] A.C.J. Voragen und W. Pilnik, Other Polysaccharides. in: B. Elvers, S. Hawkins und W. Russey (Hrsg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Bd. A25, S. 21-57. VCH, Weinheim (1994).
- [30] H. Bretting, G. Jacobs, I. Benecke, W.A. König und J. Thiem. The Occurrence of L-Galactose in Snail Galactans. *Carbohydr. Res.*, **139** (1985) 225-236.
- [31] A.D. French, N.R. Bertonière, O.A. Battista, J.A. Cuculo und D.G. Gray, Cellulose. in: Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, Bd. 5, S. 476-496. John Wiley & Sons, New York (1993).
- [32] S. Gedon und R. Fengl, Organic Cellulose Esters. in: Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, Bd. 5, S. 496-529. John Wiley & Sons, New York (1993).
- [33] R. Fengl, Inorganic Cellulose Esters. in: Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, Bd. 5, S. 529-540. John Wiley & Sons, New York (1993).

- [34] T.G. Majewicz und T.J. Podlas, Cellulose Ethers. in: Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, Bd. 5, S. 541-563. John Wiley & Sons, New York (1993).
- [35] J.R. Daniel und R.L. Whistler, Starch and Starch Derivatives. in: B. Elvers, S. Hawkins und W. Russey (Hrsg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Bd. A25, S. 2-21. VCH, Weinheim (1994).
- [36] S.I. Takahashi, T. Fujimoto, T. Miyamoto und H. Inagaki. Relationship between Distribution of Substituents and Water Solubility of *O*-Methyl Cellulose. *J. Polym. Sci.*, **25** (1987) 987-994.
- [37] I. Nehls, B. Philipp, W. Wagenknecht, D. Klemm, M. Schnabelrauch, A. Stein und T. Heinze. Carbon-13 NMR Spectroscopic Investigations on Regioselectivity of Homogeneous Substitution Reactions in the Anhydro Glucose Ring of Cellulose. *Das Papier*, **44** (1990) 633-640.
- [38] T. Heinze. Ionische Funktionspolymere aus Cellulose: Neue Synthesekonzepte, Strukturaufklärung und Eigenschaften. Habilitationsschrift, Universität Jena, Shaker-Verlag (1998).
- [39] Y. Tezuka. C NMR Structural Study on Cellulose Derivatives with Carbonyl Groups as a Sensitive Probe. in: T.J. Heinze und W.G. Glasser (Hrsg.), *Cellulose Derivatives, Modification, Characterization and Nanostructures*, ACS Symposium Series Bd. 688, S. 163-172, Washington, DC (1998).
- [40] D. W. Lowman. Characterization of Cellulose Esters by Solution-State and Solid-State NMR Spectroscopy. in: T.J. Heinze und W.G. Glasser (Hrsg.), *Cellulose Derivatives, Modification, Characterization and Nanostructures*, ACS Symposium Series Bd. 688, S. 131-162, Washington, DC (1998).
- [41] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling und J.F.G. Vliegthart. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c. *Carbohydr. Res.*, **62** (1978) 349-357.
- [42] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling und J.F.G. Vliegthart. Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary g.l.c. *Carbohydr. Res.*, **77** (1979) 1-7.
- [43] M.R. Little. Separation, by G.L.C., of Enantiomeric Sugars As Diastereoisomeric Dithioacetals. *Carbohydr. Res.*, **105** (1982) 1-8.
- [44] C. Bai, Y. Nishida, H. Ohri und H. Meguro. A highly sensitive HPLC method to discriminate enantiomeric amine deoxy sugars based on the derivatisation with (S)-(+)-TBMB carboxylic acid. *J. Carbohydr. Chem.*, **15** (1996) 217-230.
- [45] C.R. Noe und J. Freissmuth. Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: separation after derivatisation with (S)-(-)-1-phenylethylamine. *J. Chromatogr. A*, **704** (1995) 503-512.
- [46] C.R. Noe, J. Freissmuth, D. Rothley, B. Lachmann und P. Richter. Kapillarelektrophoretische Analytik komplexer Kohlenhydratgemische. *Pharmazie*, **51** (1996) 868-873.
- [47] W.A. König, I. Benecke, S. Sievers. New Results in the Gas Chromatographic Separation of Enantiomers of Hydroxy Acids and Carbohydrates. *J. Chromatogr.*, **217** (1981) 71-80.

- [48] W.A. König, P. Mischnick-Lübbecke, B. Brassat, S. Lutz und G. Wenz. Improved Gas Chromatographic Separation of Enantiomeric Carbohydrate Derivatives Using a New Chiral Stationary Phase. *Carbohydr. Res.*, **183** (1988) 11-17.
- [49] P. Edwards und K.K. Haak. A pulsed amperometric detector for ion chromatography. *American Laboratory* (1983).
- [50] R.D. Rocklin und C. Pohl. Determination of Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *J. Liquid Chrom.*, **6** (1983) 1577-1590.
- [51] H. Björndal, B. Lindberg und S. Svensson. Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, **5** (1967) 433-440.
- [52] H. Björndal, B. Lindberg und S. Svensson. Gas-Liquid Chromatography of Partially Methylated Alditols as their Acetates. *Acta Chem. Scand.*, **21** (1967) 1801-1804.
- [53] H. Björndal, C.G. Hellerqvist, B. Lindberg und S. Svensson. Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden. *Angew. Chem.*, **82** (1970) 643-674, *Int. Ed. Engl.*, **9** (1970) 610-619.
- [54] S.-I. Hakomori. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulphinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, **55** (1964) 205-208.
- [55] I. Ciucanu und F. Kerek. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **131** (1984) 209-217.
- [56] D.P. Sweet, R.H. Shapiro und P. Albersheim. Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, **40** (1975) 217-225.
- [57] N.C. Carpita und E.M. Shea. Linkage Structure of Carbohydrates by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. in: C.J. Biermann und G.D. McGinnis (Hg.), *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Boca Raton (1988).
- [58] K. Heyns, H.F. Grützmacher, H. Scharmann und D. Müller. Massenspektrometrische Strukturanalysen von Kohlenhydraten. *Fortschr. Chem. Forsch.*, **5**(3) (1966) 448-490.
- [59] K. Heyns und H. Scharmann. Massenspektrometrische Untersuchungen von permethylierten Anhydrozuckerbindungen. *Carbohydr. Res.*, **1** (1966) 371-392.
- [60] N.K. Kochetkov und O.S. Chizhov. Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **21** (1971) 29-38.
- [61] O. Wilke und P. Mischnick. Analysis of cationic starches: Determination of the substitution pattern of *O*-(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl ethers. *Carbohydr. Res.*, **275** (1995) 309-318.
- [62] S.G. Zeller, G.W. Griesgraber, und G.R. Gray. Analysis of position of substitution of *O*-carboxymethyl groups in partially *O*-carboxymethylated cellulose by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **211** (1991) 41-45.
- [63] M. Gohdes, P. Mischnick und W. Wagenknecht. Methylation analysis of cellulose sulphates. *Carbohydr. Polym.*, **33** (1997) 163-168.
- [64] D. Rolf und G.R. Gray. Reductive Cleavage of Glycosides. *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982) 3539-3541.

- [65] J.U. Bowie, P.V. Trecony und G.R. Gray. Analysis of Linkage Positions in *Saccharomyces cerevisiae* D-Mannans by the Reductive-Cleavage Method. *Carbohydr. Res.*, **125** (1984) 310-307.
- [66] D. Rolf und G.R. Gray. Analysis of the linkage positions in D-Fructofuranosyl residues by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **131** (1984) 17-28.
- [67] D. Rolf, J.A. Bennek und G.R. Gray. Analysis of linkage positions in D-glucopyranosyl residues by the reductive cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **137** (1985) 183-196.
- [68] S.A.Vodonik und G.R. Gray. Analysis of linkage positions in a polysaccharide containing non-reducing, terminal α -D-glucopyranosyluronic groups by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **172** (1988) 255-266.
- [69] H. Heims, H. Steinhart und P. Mischnick. Determination of the Structures of Pentose-Containing Carbohydrates by the Reductive-Cleavage Method. *Carbohydr. Res.*, **191** (1989) 343-350.
- [70] P.R. Gruber und G.R. Gray. Isolation and analysis by the reductive-cleavage method of linkage positions and ring forms in the *Mycobacterium smegmatis* cell-wall arabinogalactan. *Carbohydr. Res.*, **203** (1990) 79-90.
- [71] K. Kiwitt-Haschemie, H. Heims, H. Steinhart und P. Mischnick. The analysis of agarose by the reductive cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **248** (1993) 267-265.
- [72] P. Mischnick-Lübbecke. Methoden zur Bestimmung der Substitutionsmuster chemisch modifizierter Stärken. Dissertation, Hamburg (1987).
- [73] P. Mischnick-Lübbecke und Ralph Krebber. Characterization of Cyclomalto-Hexaose and Heptaose Derivatives by the Reductive-Cleavage Method. *Carbohydr. Res.*, **187** (1989) 197-202.
- [74] P. Mischnick. Determination of the Patterns of Substitution of Hydroxyethyl- and Hydroxypropyl-Cyclomalto-Heptaoses. *Carbohydr. Res.*, **192** (1989) 233-241.
- [75] J.A. Bennek, D. Rolf und G.R. Gray. 1,4-Anhydro-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-glucitol formed as an artefact in the reductive cleavage of permethylated 1,4-linked glucopyranosides. *J. Carbohydr. Chem.*, **2** (1983) 385-393.
- [76] S.A. Vodonik und G.R. Gray. Analysis by the Reductive Cleavage Method of Linkage Positions in a Polysaccharide containing 4-linked D-Glucopyranosyluronic Residues. *Carbohydr. Res.*, **175** (1988) 93-102.
- [77] J. Heinrich. Untersuchung zum Isomerisierungsverhalten von Polysaccharidderivaten während des Reduktiven Abbaus. Diplomarbeit, Universität Hamburg (1994).
- [78] M.S. Kemper, Dissertation, University of Minnesota, Minneapolis; USA (1988).
- [79] A. VanLangenhove und V.N. Reinhold. Determination of Polysaccharide Linkage and Branching by Reductive Depolymerization. Gas-Liquid Chromatography and Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Reference Data. *Carbohydr. Res.*, **143** (1985) 1-20.
- [80] P.W.F. Arisz, H.J.J. Kauw und J.J. Boon. Substituent distribution along the cellulose backbone in *O*-methylcelluloses using GC and FAB-MS for monomer and oligomer analysis. *Carbohydr. Res.*, **271** (1995) 1-14.

- [81] P. Mischnick und G. Kühn. Model studies on methyl amyloses: correlation between reaction conditions and primary structure. *Carbohydr. Res.*, **290** (1996) 199-207.
- [82] B. Stahl, M. Steup, M. Karas und F. Hillenkamp. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **63** (1991) 1463-1466.
- [83] B. Stahl, S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup und G. Sawatzki. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **223** (1994) 218-226.
- [84] V.N. Reinhold, B.B. Reinhold und S. Chan. Carbohydrate Sequence Analysis by Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.*, **271** (1996) 377-402.
- [85] U. Bahr, A. Pfenninger, und M. Karas, B. Stahl. High-Sensitive Analysis of Neutral Underivatized Oligosaccharides by Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **69** (1997) 4530-4535.
- [86] V.N. Reinhold, B.B. Reinhold und C.E. Costello. Carbohydrate Molecular Weight Profiling, Sequence, Linkage, and Branching Data: ES-MS and CID. *Anal. Chem.*, **67** (1995) 1772-1784.
- [87] M.G. Wirick. Study of the Substitution Pattern of Hydroxyethylcellulose and Its Relationship to Enzymic Degradation. *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.*, **6** (1968) 1705-1718.
- [88] M.G. Wirick. A Study of the Enzymatic Degradation of CMC and Other Cellulose Ethers. *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.*, **6** (1968) 1965-1974.
- [89] R.A. Gelman. Characterization of Carboxymethylcellulose: Distribution of Substituent Groups along the Chain. *J. Appl. Polym. Sci.*, **27** (1982) 2957-2964.
- [90] J. Heinrich und P. Mischnick. Rapid method for the determination of the substitution pattern of *O*-methylated 1,4-glucans by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A*, **749** (1996) 41-45.
- [91] Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Technical Note 20, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA (1993).
- [92] E.A. Kragten, J.P. Kamerling und J.F.G. Vliegthart. Composition analysis of carboxymethylcellulose by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.*, **623** (1992) 49-53.
- [93] E.A. Kragten, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, H. Botter und J.G. Batelaan. Composition analysis of sulfoethylcelluloses by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Carbohydr. Res.*, **233** (1992) 81-86.
- [94] Persönliche Mitteilung Dr. Puls.
- [95] P. Prehm. Methylation of Carbohydrates by Methyl Trifluoromethanesulfonate in Trimethyl Phosphate. *Carbohydr. Res.*, **78** (1980) 372-374.
- [96] P. Mischnick. Determination of the Substitution Pattern in Cellulose Acetates. *J. Carbohydr. Chem.*, **10** (1991) 711-722.
- [97] A.B. Blakeney und B.A. Stone. Methylation of carbohydrates with lithium methylsulphanyl carbanion. *Carbohydr. Res.*, **140** (1985) 318-324.

- [98] M. Gohdes. Substituentenverteilung von Cellulosesulfaten in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette. Dissertation, Universität Hamburg (1997).
- [99] P. Mischnick, M. Lange, M. Gohdes, A. Stein and K. Petzold. Trialkylsilyl derivatives of cyclomaltoheptaose, cellulose and amylose: Rearrangement during methylation analysis. *Carbohydr. Res.*, **192** (1989) 233.
- [100] C.K. Lee und G.R. Gray. Analysis of positions of substitution of *O*-acetyl groups in partially *O*-acetylated cellulose by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.*, **269** (1995) 167-174.
- [101] H.M. Spurlin. Arrangement of substituents in cellulose derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **61** (1939) 2222-2227.
- [102] J. Reuben. Description and Analysis of (Hydroxyethyl)cellulose. *Macromolecules*, **17** (1984) 156-161.
- [103] J. Reuben. Analysis of the ^{13}C -NMR Spectra of Hydrolyzed and Methanolized *O*-Methylcelluloses: Monomer Composition and Models for their Description. *Carbohydr. Res.*, **157** (1986) 201-213.
- [104] J. Reuben und T.E. Casti. Distribution of Substituents in *O*-(2-Hydroxyethyl)cellulose: A ^{13}C -N.M.R. Approach. *Carbohydr. Res.*, **163** (1987) 91-98.
- [105] J. Reuben und H.T. Conner. Analysis of the Carbon-13 N.M.R. Spectrum of Hydrolyzed *O*-(Carboxymethyl)cellulose: Monomer Composition and Substitution Patterns. *Carbohydr. Res.*, **115** (1983) 1-13.
- [106] L. Petrus, D.G. Gray und J.N. BeMiller. Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride /dimethyl sulfoxide solvent with dimethyl sodium activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/Me₂SO. *Carbohydr. Res.*, **268** (1995) 319-323.
- [107] C.L. McCormick und P.A. Callais. Derivatization of cellulose in lithium chloride and *N,N*-dimethylacetamide solutions. *Polymer*, **28** (1987) 2317-2323.
- [108] B. Helferich und H. Koester. Äther des Triphenyl-carbinols mit Cellulose und Stärke. *Ber.*, **57** (1924) 587-591.
- [109] B.R. Harkness und D.G. Gray. Preparation and Chiroptical Properties of Tritylated Cellulose Derivatives. *Macromolecules*, **23** (1990) 1452-1457.
- [110] D. Klemm, M. Schnabelrauch, A. Stein, T. Heinze, U. Erler und S. Vogt. Fortschritte bei der regioselektiven Derivatisierung von Cellulose. *Das Papier*, **45** (1991) 773-778.
- [111] T. Kondo und D.G. Gray. The preparation of *O*-methyl and *O*-ethyl-celluloses having controlled distribution of substituents. *Carbohydr. Res.*, **220** (1991) 173-183.
- [112] T. Kondo. Preparation of 6-*O*-alkylcelluloses. *Carbohydr. Res.*, **238** (1993) 231-240.
- [113] E. Avela und B. Holmbom. Reactions of metal chelates of hydroxyl compounds under anhydrous conditions. I. Selective monosubstitution at secondary hydroxyl groups of anomeric methyl 4,6-*O*-benzylidene-D-glucopyranosides via copper(II) chelates. *Acta Acad. Abo., Ser. B*, **31** (1971) 1-14.
- [114] A.H. Haines. Relative Reactivities of Hydroxyl Groups in Carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **33** (1976) 11-109

- [115] R. Eby, K.T. Webster und C. Schuerch. Regioselective Alkylation and Acylation of Carbohydrates Engaged in Metal Complexes. *Carbohydr. Res.*, **129** (1984) 111-120.
- [116] K. Takeo and K. Shibata. Regioselective alkylation, benzylation and *p*-toluenesulfonylation of methyl 4,6-di-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside. *Carbohydr. Res.*, **133** (1984) 147-151.
- [117] S. David and S. Hanessian. Regioselective manipulation of hydroxyl groups via organotin derivatives. *Tetrahedron*, **41** (1985) 643-663.
- [118] J. Stanek, Jr. Preparation of Selectively Alkylated Saccharides as Synthetic Intermediates. *Top. Curr. Chem.*, **154** (1990) 209-256.
- [119] L. Ehrhardt. Modelluntersuchungen zur Regioselektivität der Alkylierung von Glucanen. Diplomarbeit. Universität Hamburg (1998).
- [120] C. Schuerch. Synthesis and Polymerization of Anhydro Sugars. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **39** (1981) 157-212.
- [121] M. Gohdes und P. Mischnick. Determination of the substitution pattern in the polymer chain of cellulose sulfates. *Carbohydr. Res.*, **309** (1998) 109-115.
- [122] J. Heinrich and P. Mischnick. Determination of the substitution pattern in the polymer chain of cellulose acetates. *J. Polym.*, eingereicht.
- [123] T. Miyamoto, Y. Sato, T. Shibata, H. Inagaki und M. Tanahashi. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Cellulose Acetate. *J. Polym. Sci.*, **22** (1984) 2363-2370.
- [124] T. Iwata, J.-I. Azuma, K. Okamura, M. Muramoto und B. Chun. Preparation and n.m.r. assignment of cellulose mixed esters regioselectively substituted by acetyl and propanoyl groups. *Carbohydr. Res.*, **224** (1992) 277-283.
- [125] Y. Tezuka. ^{13}C NMR determination of the distribution of two ester substituents in cellulose acetates butyrates. *Carbohydr. Res.*, **241** (1993) 285-290.
- [126] K.J. Edgar, T.J. Pecorini und W.G. Glasser. Long-Chain Cellulose Esters: Preparations, Properties, and Perspective. in: T.J. Heinze und W.G. Glasser (Hrsg.), *Cellulose Derivatives, Modification, Characterization and Nanostructures*, ACS Symposium Series Bd. 688, S. 38-60, Washington, DC (1998).
- [127] K. Takeo, H. Mitoh und K. Uemura. Selective chemical modification of cyclomalto-oligosaccharides via *tert*-butyldimethylsilylation. *Carbohydr. Res.*, **187** (1989) 203-221.
- [128] H. Meerwein, G. Hinz, P. Hofmann, E. Kroning und E. Pfeil. Über tertiäre Oxoniumsalze. *J. prakt. Chem.*, **147** (1937) 257-285.
- [129] V.A. Kulshin, U. Zähringer, B. Lindner, K.-E. Jäger, B.A. Dmitriev und E.Th. Rietschel. Structural Characterization of the Lipid A Component of *Pseudomonas aeruginosa* Wild-Type and Pough Mutant Lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, **198** (1991) 697-704.
- [130] T. Kondo, A. Isogai, A. Ishizu und J. Nakano. Preparation of Completely Allylated and Methallylated Cellulose from Methylcellulose and Celluloseacetate. *J. Appl. Polym. Sci.*, **34** (1987) 55-63.

- [131] T. Fontaine, F. Talmont, G.G.S. Dutton und B. Fournet. Analysis of Pyruvic Acid Acetal Containing Polysaccharides by Methanolysis and Reductive Cleavage Methods. *Anal. Biochem.*, **199** (1991) 154-161.
- [132] P. Mischnick. Analytische Charakterisierung von Polysacchariden und Polysaccharidderivaten mittels chemischer, enzymatischer und massenspektrometrischer Methoden. Habilitationsschrift, Universität Hamburg (1996).
- [133] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht. Comprehensive Cellulose Chemistry, Bd. 2, S. 168-182. Wiley-VCH, Weinheim (1998).
- [134] C.F. Lane. Sodium Cyanoborohydride - A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups. *Synthesis*, (1975) 135-146.
- [135] W.T. Wang, N.C. LeDonne, Jr., B. Ackerman und C.C. Sweeley. Structural Characterization of Oligosaccharides by High-Performance Liquid Chromatography, Fast-Atom Bombardement-Mass Spectrometry, and Exoglycosidase Digestion. *Anal. Biochem.*, **141** (1984) 366-381.
- [136] A. Dell, N.H. Carman, P.R. Tiller und J.E. Thomas-Oates. Fast Atom Bombardement Mass Spectrometric Strategies for Characterizing Carbohydrate-containing Biopolymers. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **16** (1988) 19-24.
- [137] P. Oefner und H. Scherz. Capillary electrophoresis and thin-layer electrophoresis of carbohydrates. in: A. Chrambach, M.J. Dunn und B.J. Radola (Hrsg.). *Advances in Electrophoresis. Bd. 7*, S. 157-224. VCH, Weinheim (1994).
- [138] P. Chen, A.G. Baker and M.V. Novotny. The Use of Osazones as Matrices for the MALDI-MS of Carbohydrates. *Anal. Biochem.*, **244** (1997) 144-155.
- [139] C.K. Lee, E.J. Kim und I.-S.H. Lee. Anomerization and transglycosylation reactions of permethylated methyl D-glycopyranosides. *Carbohydr. Res.*, **240** (1993) 197-206.
- [140] C.K. Lee, E.J. Kim und I.-S.H. Lee. Mechanism of anomerization of permethylated methyl D-glycopyranosides by trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate. *Carbohydr. Res.*, **309** (1998) 243-250.
- [141] K. Kakehi, T. Funakubo, Y. Oda und Y. Kitada. Which of the monosubstituted Aminobenzene Derivatives is the Best for Capillary Electrophoresis of Complex Carbohydrate Chains with Laser Induced Fluorometric Detection? *XIX International Carbohydrate Symposium*, Abstract AP 008. San Diego (1998).
- [142] Unveröffentlichte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe.
- [143] S. Naylor, G. Moneti and S. Guyan. Hydrophobic Effects in the Fast Atom Bombardement Mass Spectra of Proteins and Large Peptides. *Biom. Environ. Mass Spectrom.*, **17** (1988) 393-397.
- [144] H. Schleicher und H. Lang. Carbonyl and Carboxyl Groups in Pulps and Cellulose Products. *Das Papier*, **12** (1994) 765-768.
- [145] M.H. Johansson und O. Samuelson. End-wise Degradation of Hydrocellulose During Hot Alkali Treatment. *J. Appl. Polym. Sci.*, **19** (1975) 3007-3013.
- [146] J. Lehrfeld. Simultaneous Gas-Liquid Chromatographic Determination of Aldonic Acids and Aldoses. *Anal. Chem.*, **57** (1985) 346-348.

- [147] D. Fengel, G. Wegener, A. Heizmann und M. Przyklenk. Trifluoroacetic Acid for a Rapid and Careful Hydrolysis of Cellulose and Other Polysaccharides. *Holzforschung*, **31** (1977) 65-71.
- [148] B. Alfredsson und O. Samuelson. Isomerization of β -glucometasaccharinic acid in alkaline medium. *Svensk Papperstidn.*, **65** (1962) 690-692.
- [149] U. Muus. Untersuchungen zur Isolierung und Strukturaufklärung von Peeling- und Oxidationsprodukten in Ethylcellulose. Diplomarbeit, Universität Hamburg (1998).
- [150] H.B. Wood, Jr. Und H.G. Fletcher, Jr. 2-Deoxy-D-ribose. VI. The Preparation of 3-Deoxy-D-ribo-hexonic Acid and 3-Deoxy-D-arabino-hexonic Acid Therefrom. Some Observations on the Kiliani Synthesis. *J. Org. Chem.*, **26** (1961) 1969-1973.
- [151] G. Petersson, O. Samuelson, K. Anjou und E. von Sydow. Mass spectrometric identification of aldonolactones as trimethylsilyl derivatives. *Acta Chem. Scand.*, **21** (1967) 1251-1256.
- [152] G. Petersson. Mass Spectrometry of Aldonic and Deoxyaldonic Acids as Trimethylsilyl Derivatives. *Tetrahedron*, **26** (1970) 3413-3428.
- [153] G.C.A. Luijckx, F. van Rantwijk, H. van Bekkum und M.J. Antal, Jr. The role of deoxyhexonic acids in the hydrothermal decarboxylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **272** (1995) 191-202.
- [154] B. Ericsson, B.O. Lindberg, O. Theander und G. Petersson. Formation of methyl 2-carboxy- β -D-pentofuranosides by oxidation of methyl β -D-glucopyranoside with oxygen in alkaline, aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **23** (1972) 323-325.
- [155] J.T. McCloskey, L.R. Schroeder, J.D. Sinkey und N.S. Thomas. The degradation of methyl- β -D-glucopyranoside by oxygen in alkaline solutions. *Pap. Puu*, **57** (1975) 131-145.
- [156] Nachgewiesen durch Vergleich mit dem Massenspektrum von Ethyl-2,3-di-O-ethyl-2-C-methylglycerat.
- [157] L.A.Th. Verhaar und G.J. DeWilt. The Gas Chromatographic Determination of Polyhydroxy Monocarboxylic Acids Obtained by Oxygenation of Hexoses in Aqueous Alkaline Solutions. *J. Chromatogr.*, **41** (1969) 168-179.
- [158] J. Heinrich, W.A.König, H. Bretting und P. Mischnick. Enantiomer separation of permethylated monosaccharides and 1,5-anhydroalditols and simultaneous determination of linkage positions and absolute configuration in the galactan of *Helix pomatia*. *Carbohydr. Res.*, **299** (1997) 1-6.
- [159] D.J. Bell und E. Baldwin. The chemistry of galactogen from *Helix pomatia*. L-galactose as a component of polysaccharide of animal origin. *J. Chem. Soc.*, **143** (1941) 125-131.
- [160] H. Bretting, N.F. Whittaker, E.A. Karat, K. Königsmann-Lange und J. Thiem. Chemical and Immunochemical Studies on the Structure of Four Snail Galactans. *Carbohydr. Res.*, **98** (1981) 213-236.
- [161] E. Gil-Av, B. Feibush und R. Charles-Sigler. Separation of Enantiomers by Gas Liquid Chromatography with an Optically Active Stationary Phase. *Tetrahedron Lett.*, (1966) 1009-1015.

- [162] H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer. Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.*, **15** (1977) 174-176.
- [163] V. Schurig. Enantiomerentrennung eines chiralen Olefins durch Komplexbildungsgaschromatographie an einem optisch aktiven Rhodium(I)-Komplex. *Angew. Chem.*, **89** (1977) 113-114.
- [164] T. Koscielski, D. Sybilska, J. Jurczak. Separation of α - and β -Pinene into enantiomers in gas-liquid chromatography systems via α -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Chromatogr.*, **280** (1983) 131-134.
- [165] V. Schurig, H.-P. Nowotny. Separation of Enantiomers on Diluted Permethylylated β -Cyclodextrin by High-Resonance Gas Chromatography. *J. Chromatogr.*, **441** (1988) 155-163.
- [166] W.A. König, S. Lutz und G. Wenz. Modifizierte Cyclodextrine - neue, hoehenantioselektive Trennphasen für die Gaschromatographie. *Angew. Chem.*, **100** (1988) 989-990.
- [167] J. Dönnecke. Synthese und Immobilisierung selektiv modifizierter Cyclodextrinderivate für die enantioselektive GC, SFC und LC. Dissertation, Universität Hamburg (1996).
- [168] W.A. König. Enantioselective gas chromatography with modified cyclomalto-oligosaccharides as chiral stationary phases. *Carbohydr. Res.*, **192** (1989) 51-60.
- [169] G. Weseloh. Kapillarelektrophorese und Cyclodextrinderivate. Dissertation, Universität Hamburg (1996).
- [170] D. Jonas. Synthese und gaschromatographische Enantiomerentrennung von partiell O-methylierten Glucosen. Diplomarbeit, Universität Hamburg (1989).
- [171] Die oben genannten Lipodex[®]-Phasen waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt.
- [172] W. Mackie und A.S. Perlin. Pyranose-Furanose and Anomeric Equilibria, Influence of Solvent and of Partial Methylation. *Can. J. Chem.*, **44** (1966) 2039-2049.
- [173] J. Lehmann. Kohlenhydrate. Chemie und Biologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996).
- [174] P. Mischnick und G.A. DeRuiter. Application of the reductive cleavage in the structural investigation of the antigenic polysaccharides of *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium digitatum* with respect to the determination of the ring size of the galactose moieties. *Carbohydr. Polym.*, **23** (1994) 5-12.
- [175] M.L. Wolfrom und A. Thompson. Acetylation. In: *Methods in Carbohydr. Chem.*, Vol. 2, S.211-214. Academic Press Inc., New York (1963).
- [176] R.K. Ness, H.G. Fletcher, Jr., und C.S. Hudson. The Reduction of Acetylated Glycopyranosyl Bromides to 1,5-Anhydroglycitol with Lithium Aluminium Hydride. 1,5-Anhydrohamnitol. *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (1950) 4547-4549.
- [177] L.E. Elvebak II, T. Schmitt and G.R. Gray. Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-fucitol. *Carbohydr. Res.*, **246** (1993) 1-11.

- [178] L.E. Elvebak II, C. Abbott, S. Wall und G.R. Gray. Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-galactitol. *Carbohydr. Res.*, **269** (1995) 1-15.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. W.A. König, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, danke ich für die Bereitstellung regioselektiv methylierter Cyclodextrine und enantioselektiver GC-Phasen. Herrn Prof. Dr. H. Bretting, Zoologisches Institut, Universität Hamburg, danke ich für die Überlassung des Schneckengalactans aus *Helix pomatia*.

Frau A. Meiners danke ich für die Aufnahme zahlreicher GC-MS und FAB-Massenspektren

Herrn Prof. Dr. M. Karas und Frau Dr. U. Bahr, Institut für Analytische Chemie, Universität Frankfurt, Herrn Dr. G. Kühn, Bundesamt für Materialforschung, Berlin, und Herrn Diplom-Chemiker S. Kötter, Universität Hamburg, danke ich für die Aufnahme von MALDI- und ESI-Massenspektren.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich Frau E. Juhas, Frau V. Soltau, Frau S. Weidner und Herrn Dr. V. Sinnwell.

Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Projektes "Neue Charakterisierungsmethoden von Polysacchariden", der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Cellulose und Cellulosederivate - molekulares und supramolekulares Strukturdesign", dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten im Rahmen des Projektes "Modifizierte Stärken", Herrn Dr. J. Vessman, Astra AB, Mölndal, Schweden und der GDCh.

Lutz Ehrhardt, Dr. Michael Gohdes, Ulrike Muus, Nikola Rogmann und Dr. Olaf Wilke danke ich für die angenehme und produktive Zusammenarbeit im Arbeitskreis. Insbesondere danke ich Michael Gohdes für die langjährige Freundschaft von Beginn des Studiums an.

Weiter danke ich den Mitgliedern der Arbeitskreise Prof. Dr. W.A. König und Prof. Dr. J. Voß für den regen Gedankenaustausch während der Diplom- und Doktorarbeit, insbesondere Frau Dr. Melanie Lange und Herrn Dr. Detlev H. Hochmuth.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich tatkräftig während meines Studiums unterstützt hat. Insbesondere danke ich meiner Freundin Heidrun Dörre, meinen Eltern und Schwiegereltern und ganz herzlich auch meinem Onkel Dr. Bernard Heinrich für ihr fortwährendes Interesse und finanzielle Unterstützung.

Publikationen

Poster

XVIII International Carbohydrate Symposium 1996, Mailand, Italien

"Enantioselective glc separation of O-methylated anhydroalditols and simultaneous determination of the absolute configuration and linkage position of galactose moieties in snail galactans"

Symposium "Starch and Cellulose Derivatives - Properties and Characterization",
Centre of Amphiphilic Polymers 1997, Lund, Schweden

"Analysis of the substitution pattern in cellulose acetates and regioselectively substituted methyl celluloses in the glucose unit and in the polymer chain"

Hamburger Makromolekulares Symposium 1997, Hamburg

"Bestimmung der Substituentenverteilung in Polysaccharidderivaten"

XIX International Carbohydrate Symposium 1998, San Diego, CA, USA

"Determination of the Substituent Pattern in the Polymer Chain of Cellulose Acetates"

Originalarbeiten

J. Heinrich und P. Mischnick

"Rapid method for the determination of the substitution pattern of *O*-methylated 1,4-glucans by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection"

J. Chromatogr. A, **749** (1996) 41-45

J. Heinrich, W.A.König, H. Bretting und P. Mischnick

"Enantiomer separation of permethylated monosaccharides and 1,5-anhydroalditols and simultaneous determination of linkage positions and absolute configuration in the galactan of *Helix pomatia*"

Carbohydr. Res., **299** (1997) 1-6.

J. Heinrich and P. Mischnick

"Determination of the substitution pattern in the polymer chain of cellulose acetates"

J. Polym., im Druck