

Zusammenfassung

Werkstoffen auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen kommt heutzutage aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit, Umweltverträglichkeit sowie physiologischen Verträglichkeit eine steigende Bedeutung zu. Wirtschaftlich nehmen Polysaccharide wie Stärke und Cellulose in der chemischen Industrie die bedeutendste Stellung ein.

Für den Einsatz der Biopolymere ist eine genaue Charakterisierung notwendig, um das gewünschte Eigenschaftsprofil exakt einzustellen. Die Molmasse und Teilchengröße sowie deren Verteilungen beeinflussen maßgeblich die Eigenschaften von Lösungen derartiger Polymere. Zur polymeranalytischen Charakterisierung dieser Parameter bieten sich je nach dem zu untersuchenden Material Analysemethoden wie die Größenausschlußchromatographie (SEC) oder Feld-Fluß Fraktionierung (FFF) jeweils gekoppelt mit Vielwinkellichtstreuung (MALLS) und Konzentrationsdetektion (RI) an. Dabei ist die Charakterisierung wasserlöslicher Biopolymere oftmals z.B. aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens gleicher Substanzen unterschiedlicher Herkunft problematisch. Meist sind die Molmassenverteilungen sowie die Radien nur unzureichend oder gar nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte wasserlösliche Polysaccharide hinsichtlich ihrer Molmasse und ihrer Radien sowie deren Verteilungen zu charakterisieren. Struktur-Eigenschafts-Beziehungen ermöglichen eine Beschreibung des Zusammenhangs zwischen molekularen Parametern und der Eigenschaften dieser Polymere. Die R_G -M-Beziehung und $[\eta]$ -M-Beziehung, die hier als wichtigste Struktur-Eigenschafts-Beziehungen gelöster Polymere genannt werden sollen, stellen einen Zusammenhang zwischen dem Trägheitsradius R_G bzw. dem Staudinger-Index $[\eta]$ und der Molmasse M des Makromoleküls her. Zur Bestimmung dieser Parameter wurden im Verlauf der Arbeit gekoppelte Anlagen, bestehend aus einer Fraktioniereinheit - wie der Größenausschlußchromatographie, der symmetrischen Fluß Feld-Fluß Fraktionierung (sFFFF) oder der asymmetrischen Fluß Feld-Fluß Fraktionierung (aFFFF) - mit Vielwinkellichtstreuphotometer und Konzentrationsdetektion, eingesetzt. Neben Untersuchungen an Glucanen und Guarkernmehl lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Charakterisierung von Stärke und Stärke-Derivaten.

Zunächst wurden sechs ungeladene Gerstenglucane sowie ein anionisches, carboxymethyliertes β -D-Glucan charakterisiert. Die lichtstreutechnischen Untersuchungen an den Gerstenglucanen ergaben, daß die Viskosität, mittels derer diese Substanzen vom Hersteller charakterisiert werden, maßgeblich durch hochmolekulare Bestandteile beeinflusst wird, die nur in geringen Konzentrationen in der Probe enthalten sind. Das Lösungsverhalten der Gerstenglucane ist hinsichtlich ihrer Molmasse unterschiedlich. So liegt höhermolekulares Gerstenglucan mit M_w von 304.000 g/mol frei von Aggregat-/Assoziatanteilen vor, niedermolekulareres mit M_w von 150.000 bzw. 230.000 g/mol hingegen neigt zu Aggregat-/Assoziatbildung, was man aus den ermittelten Exponenten ν der R_G -M-Beziehung von 0,51 bzw. 0,31 schließen kann. Durch die Bestimmung der Molmassenverteilungen mit Hilfe der SEC/MALLS/RI-Anlage konnten an den Gerstenglucanen erstmals erfolgreich rheo-optische Untersuchungen durchgeführt werden. Ein Vergleich der Fraktionierung der niedermolekulareren Gerstenglucane bei unterschiedlicher Säulentemperatur bestätigt die mittels rheo-optischer Methoden ermittelte Thermoreversibilität der Aggregatanteile. Das carboxymethylierte β -D-Glucan liegt vollkommen molekular dispers gelöst vor und anhand dieses Systems läßt sich eine R_G -M-Beziehung der Form $R_G = 0,025 \cdot M^{0,58}$ aufstellen.

Die Guarkernmehle, die kurzkettenverzweigt sind und deren chemische Struktur zwischen linearen und verzweigten Molekülen angesiedelt werden kann, wurden zu vergleichenden Untersuchungen zwischen den Glucanen und Stärke-Derivaten herangezogen. Von Guarkernmehlen, die Anwendung in der Lebensmittel- und kosmetischen Industrie finden, sind bislang keine Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bekannt. Hier zeigen die SEC/MALLS/RI-Messungen, daß sich das niedermolekulare Guarkernmehl ($M_w = 74.000$ g/mol) hinsichtlich seiner Lösungsstruktur wie ein verzweigtes, das höhermolekulare ($M_w = 1.900.000$ g/mol) hingegen wie ein lineares Makromolekül verhält. Die Proben liefern je nach Molmasse die R_G -M-Beziehung $R_G = 0,352 \cdot M^{0,37}$ für die niedermolekulare und $R_G = 0,069 \cdot M^{0,52}$ für die hochmolekulare Probe.

Wachsmaisstärken, deren Anteil an verzweigtem Amylopektin über 99 % liegt, dienen als Ausgangsstoffe für die pharmakologisch eingesetzten Stärke-Derivate. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. Dr. T. Heinze, Universität Jena/Wuppertal, sollten aus der Wachsmaisstärke (WMS) überwiegend in Position C-2 substituierte Acetylstärken, welche in der Medizin als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt werden sollen, hergestellt werden

und diese hinsichtlich ihres Lagerverhaltens in Lösung untersucht werden. Hierzu mußte die native WMS auf Molmassen im Bereich von 100.000 – 500.000 g/mol abgebaut werden, wofür entweder Ultraschalldegradation oder enzymatischer Abbau eingesetzt werden konnte. Die Untersuchungen hinsichtlich des Abbauverhaltens ergaben, daß beim Ultraschallabbau mit zunehmender Abbaudauer im Streulichtsignal eine Bimodalität auftritt. Beim enzymatischen Abbau kann es zwar auch zum Abbau bis hin zu Oligo- und Monomeren kommen, so daß eine aufwendige Aufarbeitung der abgebauten Produkte notwendig wird, diese Methode bietet jedoch die Möglichkeit zur Herstellung großer Mengen abgebauter Substanz. Eine Untersuchung der Molmasse zwei Proben mit Molmassen von 414.000 bzw. 221.000 g/mol hinsichtlich der Lagerstabilität zeigte einen kontinuierlichen Abbau der Molmasse bis zum 81. Tag der Lagerung in Lösung. Hierbei ging die Molmasse der Proben auf ca. 40 % ($M_w = 172.000$ bzw. 85.000 g/mol) des Ausgangswertes zurück. Danach trat bei allen Proben ein Sprung in der Molmasse auf, der sich nur durch Bildung von Aggregaten erklären läßt. Hier stieg die Molmasse für die höhermolekulare Probe von 172.000 g/mol nach 74 Tagen Lagerung auf 216.000 g/mol an, für die niedermolekulare Probe fand ein Anstieg auf 297.000 g/mol nach dem 81. Tag der Lagerung statt, was 134 % der Ausgangsmolmasse ausmacht.

Hydroxyethylstärke (HES) wird heute im großen Umfang als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt. Dabei ist neben der Molmasse die Molmassenverteilung von entscheidendem Einfluß. Zum einen wird die Pharmakokinetik (Verweildauer, onkotischer Druck) über die Verteilung reguliert, zum anderen sind insbesondere die nieder- und hochmolekularen Bestandteile an den unerwünschten Nebenwirkungen wie beispielsweise anaphylaktoider Schock oder langanhaltender Juckreiz maßgeblich beteiligt.

Für die Arbeit standen zum einen kommerziell eingesetzte Proben und zum anderen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. A. Wolf, Universität Mainz, mittels kontinuierlicher Polymerfraktionierung (continuous polymer fractionation, CPF) getrennte HES-Proben zur Verfügung.

Vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Fraktionierungsmethoden anhand einer kommerziellen Probe zeigen gute Übereinstimmungen hinsichtlich der gewichtsmittleren Molmasse M_w , die für SEC/MALLS/RI-Messungen $M_w = 198.000$ g/mol und für sFFFF/MALLS/RI-Messungen $M_w = 207.000$ g/mol ergibt. Gerade bei den sFFFF/MALLS/RI-Messung fällt jedoch auf, daß die niedermolekularen Bestandteile der

Probe nicht ausreichend erfaßt werden, was zum einen durch schlechtere Abtrennung und zum anderen durch Austragen aus dem Kanalsystem durch die Membran erklärt werden kann.

Lagerstabilitätsuntersuchungen an den kommerziellen HES-Proben zeigten unterschiedliches Verhalten. So erwies sich die geringfügig niedermolekulare Probe mit 170.000 g/mol als lagerstabil hinsichtlich ihrer Molmasse. Die Molmasse der leicht höhermolekularen Probe sinkt über eine Lagerungsdauer von 108 Tagen von 198.000 g/mol auf einen Wert von 81,5 % ($M_w = 162.000$ g/mol) der Ausgangsmolmasse.

Die Untersuchungen an drei im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. A. Wolf, Universität Mainz, mittels CPF getrennten HES-Proben zeigten, daß diese Methode exzellent zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile geeignet ist. Eine Aufstellung der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen dieser Proben zeigt für alle Fraktionen einen für verzweigte Moleküle typischen Exponenten ν kleiner als 0,5. Die stoffspezifische Konstante k_{R_G} stimmt nur im Rahmen der exponentiellen Größe überein, nicht jedoch in ihrem Zahlenwert. Hier, sowie in der Umrechnung dieser gemessenen R_G -M-Beziehungen in die gegebenenfalls auch zu bestimmenden $[\eta]$ -M-Beziehungen, macht sich das Fehlen einer Theorie für verzweigte Moleküle bemerkbar. Die Umrechnung der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen ineinander ermöglicht bei geltenden Theorien eine einfache und umfassende Aussage über die Eigenschaften der Moleküle in Lösung.

Acetylstärke (AS) wird heute zunehmend als alternatives Blutplasmaersatzmittel zu HES diskutiert. Sie ist im Gegensatz zu HES vollständig metabolisierbar und weist die gleichen positiven Eigenschaften wie HES auf. Ein Problem der AS ist jedoch die schlechte Lagerstabilität. Das Substitutionsmuster der herkömmlich hergestellten AS weicht mit einer Substitution überwiegend in Position 3 von dem der HES, die vornehmlich in Position 2 substituiert ist, ab. Überwiegend in Position C-2 substituierte AS, welche aus der enzymatisch abgebauten Wachsmaisstärke von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Heinze, Universität Jena/Wuppertal, synthetisiert wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Lagerstabilität in Lösung untersucht werden.

Die Untersuchungen ergaben eine Abhängigkeit der Lagerstabilität von der Molmasse. So zeigten die höhermolekularen Proben mit Ausgangsmolmassen von 709.000 bzw. 517.000 g/mol eine exponentielle Abnahmen der Molmasse mit der Lagerungsdauer. Nach

107 Tagen Lagerung sinkt die Molmasse auf 72,2 % ($M_w = 512.000$ g/mol) bzw. 76,2 % ($M_w = 394.000$ g/mol) ab. Die niedermolekulareren Proben mit Molmassen von 260.000 bzw. 151.000 g/mol sind hingegen lagerstabil.

Hydroxypropylstärke (HPS), welche u.a. als Gießfolien Verwendung findet, wurde als weiteres Stärke-Derivat charakterisiert. Die Proben wurden vom Fraunhofer Institut für Polymerforschung, Golm, im Rahmen eines Projektes unter der Trägerschaft der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) zur Verfügung gestellt. Die niedrig-substituierten Proben sollten in Bezug auf ihrer Aufarbeitung hinsichtlich der Molmasse und deren Verteilung charakterisiert werden. Ein Problem bei der polymeranalytischen Untersuchung ist die schlechte Löslichkeit dieser Proben. Der Autoklavenaufschluß erwies sich in Lösungsuntersuchungen als die geeignetste Methode. Als Fraktionierungsmethode für dieses System stellte sich lediglich die aFFFF als geeignet heraus. Trotz starker Streuungen der Signale ließen sich die Proben mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse vermessen. Hierbei zeigte sich, daß die Proben alle einen Anteil mit relativ geringer Molmasse und einen hochmolekularen Bestandteil enthielten. Die gefundenen gewichtsmittleren Molmassen M_w lagen zwischen 700.000 bis 6,7 Mio. g/mol für den ersten Peak bzw. 1,3 – 21 Mio. g/mol für den zweiten Peak. Die Messungen zeigten, daß die mittels Luft/Extruder getrockneten Proben insgesamt die kleinsten Molmassen aufweisen. Eine Unterscheidung zwischen Walze und Luft getrockneten Proben ist anhand des vorliegenden Probensatzes nicht zu erkennen.

Viskosimetrische Untersuchungen an diesen Systemen ergaben bei relativ kleinen Staudinger-Indices einen Trend im Verhalten nach der jeweiligen Trocknungsmethode. Hierbei zeigten die Luft-getrockneten Proben das schlechteste Verhalten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, gefolgt von den Luft/Extruder getrockneten. Die über Walze getrockneten Proben zeigten das einheitlichste Verhalten.

Bei der Erstellung der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen wurde deutlich, daß es, um gültige, vergleichende Aussagen über die jeweiligen Systeme machen zu können, auf ähnliche Ausgangsmaterialien und substituierte Proben ankommt. Die Herkunft der Naturstoffe hat auf ihr Löslichkeitsverhalten entscheidenden Einfluß. Anhand der ausgewählten Polysaccharide konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, für das Einzelmolekül Struktur-Eigenschafts-Beziehungen aufstellen, wobei dies in Abhängigkeit von den jeweiligen System oftmals mit großem Aufwand verbunden ist.

Summary

Nowadays materials based on natural renewal are gaining more and more importance due to their biodegradability, their environmental digestibility and their physiological compatibility. Especially polysaccharides like starch and cellulose are of major economical importance in chemical industry.

In order to obtain the necessary properties for the utilisation of these biopolymers, an accurate characterization is necessary. The molar mass and radius of gyration and their distributions influence the properties of those polymers in solution. For the polymer analytical characterization these parameters can be determined with different analytical methods as size exclusion chromatography (SEC) or field-flow fractionation (FFF) each coupled with multi angle laser light scattering (MALLS) and a refractive index (RI) detector. The investigation of water soluble biopolymers often is difficult due to e.g. the non uniform behaviour of the same substances of different origin. The knowledge about molar mass distributions and radii of gyration is insufficient or not at all known.

Aim of this thesis was to characterize water soluble polysaccharides in respect of their molar mass und radius of gyration and the distributions of these parameters. Structure-property-relationships offer the possibility to describe the connection between the molecular parameters and the macroscopic properties of these polymers. The R_G - M -relationship and the $[\eta]$ - M -relationship, representing the most important structure-property-relationships, establish a correlation between the radius of gyration R_G and the intrinsic viscosity $[\eta]$ and the molar mass M of the macromolecule. To determine these parameters hyphenated techniques of a fractionation unit like size exclusion chromatography, the symmetrical flow field-flow fractionation (sFFFF) or asymmetrical flow field-flow fractionation (aFFFF) combined with multi angle laser light scattering (MALLS) and a refractive index (RI) detector were used. Besides investigations of glucans and guar gum the main emphasis of this work was laid on the characterization of starch and its derivatives.

First six non ionic barley glucans as well as an anionic carboxymethylated β -D-glucan were characterized. Light scattering examinations of the barley glucans gave as a result the viscosity by means of the manufacturer characterises the samples, is strongly influenced by molecules of the high molar mass fraction which is present only in low concentrations

within the sample. The characteristics of the solution of barley glucan varies in dependence of its molar mass. Barley glucan with high molar mass ($M_w = 304,000$ g/mol) is free of aggregates/associates whereas low molar mass barely glucan ($M_w = 150,000$ respectively $230,000$ g/mol) tends to form aggregates. This conclusion can be drawn from the exponents ν of the R_G - M -relationship which show values of 0.51 and 0.31 respectively. The determination of the molar mass distribution using SEC/MALLS/RI measurements, for the first time, allows to investigate barley glucans by means of rheo-optical methods. Comparison of the fractionation of low molar barley glucans at different column temperatures confirmed the thermo reversibility of the aggregation, which was also determined by rheo-optic measurements. The carboxymethylated β -D-glucan is totally molecular disperse and this system leads to efficient R_G - M -relationships of $R_G = 0,025 \cdot M^{0.58}$.

The guar gums, that with their short side chains possess a structure in between linear and branched molecules, were used for comparative investigations between glucans and starch derivates. So far no structure-property-relationships are known for guar gums, which are used in food and cosmetic industry. The SEC/MALLS/RI measurements showed that the low molar massed guar gum ($M_w = 74,000$ g/mol) has a solution behaviour of branched molecules whereas the high molar mass molecules ($M_w = 1.900.000$ g/mol) has a solution behaviour as linear ones. The samples give, depending on their molar mass, structure-property-relationships of $R_G = 0.352 \cdot M^{0.37}$ for the low molar mass sample and $R_G = 0.069 \cdot M^{0.52}$ for the high molar mass sample.

Waxy maize starches (WMS) with portions of more than 99 % of the branched amylopectin are the starting substances for the pharmacologically used starch derivatives. In co-operation with the group of Prof. Dr. T. Heinze, University of Jena/Wuppertal, mostly in position 2 substituted acetyl starches should be synthesised. These 2-*O*-acetyl starch derivatives, which might be used as blood volume expanders, were to be examined in respect of their storage behaviour. The native WMS had to be degraded to molar masses between 100,000 – 500,000 g/mol. Therefore both ultra sonic degradation and enzymatic degradation are applicable. With increasing degradation time ultra sonic degradation leads to a bimodality in the light scattering signal. Enzymatic degradation also led to the formation of oligo- and monomers and therefore the degraded samples had to be subjected to an elaborate workup procedure. Nevertheless this method allowed to generate huge

amounts of substance. An examination of the storage behaviour of two samples with molar masses of 414,000 and 221,000 g/mol respectively showed a continuous degradation of the molar mass up to the 81st day of storage in solution. The molar mass decreased to a value of 40 % ($M_w = 172,000$ respectively 85,000 g/mol) compared to the initial value. After that day all samples had an increase in the molar mass which can only be explained by the formation of aggregates. The molar mass of the higher molar sample increased from 172,000 g/mol after 74 days of storage to 216,000 g/mol, the low molar massed sample had a molar mass of 297,000 g/mol after 81 days of storage. This is 134 % of the initial molar mass.

Hydroxyl ethyl starch (HES) nowadays is used as blood volume expander to a big extent. The molar mass and its distribution have crucial influence on the behaviour of these macromolecules. On one hand the pharmaco kinetics are regulated by the molar mass distribution, on the other hand the low and high molecular weight portions lead to undesired side effects.

For this work both commercial samples and samples obtained, via continuous polymer fractionation (CPF) in co-operation with the group of Prof. Dr. B. A. Wolf, University of Mainz, were examined.

Comparative investigations of different fractionation methods using one HES sample show good accordance in the weight average molar masses M_w . SEC/MALLS/RI measurements gave a value of $M_w = 198,000$ g/mol whereas sFFFF/MALLS/RI measurements gave $M_w = 207,000$ g/mol. However, by using sFFFF/MALLS/RI the low molar mass portions of this sample cannot be properly measured. This might be due to worse separation mainly of the low molar mass portions and also due to slug out of the channel through the membrane.

The various commercial samples showed different storage behaviour. The sample with a slightly lower molar mass (170,000 g/mol) was stable with respect to storage in solution. The higher molar mass of the other sample decreased from 198,000 g/mol down to 81.5 % ($M_w = 162,000$ g/mol) of its initial value within 108 days of storage.

The examination of three HES samples fractionated with CPF in the group of Prof. Dr. B. A. Wolf, University of Mainz, showed that this method is particularly suitable for the removal of low molar mass portions. The structure-property-relationship for all samples

has an exponent ν with a value smaller than 0.5, which is typical of branched molecules. The material specific constant k_{RG} agrees in respect of its exponent but not in respect of the precise value. This result as well as the conversion from the measured R_G - M -relationship into the also to determine $[\eta]$ - M -relationship underlines the lack of a suitable theory for branched molecules. Conversion between structure-property-relationships on the basis of valid theories allows to estimate the properties of the molecules in solution in a simple but complete way.

Acetyl starch (AS) nowadays is discussed as an alternative blood volume expander to HES. Contrary to HES AS can be completely metabolised and it has the same positive properties which made HES successful. Nevertheless, the poor storage behaviour of AS is a problem. The substitution patterns of conventionally synthesised AS differ from that of HES. HES is mainly substituted in position 2 whereas AS is mainly substituted in position 3. AS mainly substituted in position 2 was synthesised from the degraded waxy maize starch by the group of Prof. Dr. T. Heinze, University of Jena/Wuppertal. This 2-O-acetyl starch was to be examined in respect to its storage behaviour.

The investigations gave the result that storage behaviour depends on the molar mass. Samples with higher molar masses (709,000 respectively 517,000 g/mol) decreased exponentially in their molar mass during the time of storage. After 107 days of storage decrease the molar mass to 72.2 % ($M_w = 512,000$ g/mol) respectively to 76.2 % ($M_w = 394,000$ g/mol). The samples with lower molar masses (260,00 and 151,000 g/mol) however are stable in solution.

Finally the derivative hydroxy propyl starch (HPS), which for example is used as cast films, was characterized. These samples were provided by the "Fraunhofer Insitut für Polymerforschung", Golm, within a project of the "Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR)". These low substituted samples were to be investigated in respect of their molar mass and molar mass distribution. A problem during the investigations was the poor solubility of this samples. Examinations in respect of their solution behaviour showed that autoclave pulping was the best and most effective method to dissolve those samples. This system could only be fractionated by aFFFF. In spite of high scattering of the signals these samples could be measured with good reproducibility. All samples had one portion with relatively low molar mass as well as one with high molar masses. The

weight average molar masses M_w ranged from 700,000 up to 6.7 million g/mol for the one peak and between 1.3 up to 21 million g/mol for the second. The measurements showed that the air/extruder dried samples had the lowest molar masses. There was no recognisable difference between roller and air dried samples.

Viscosimetric investigations showed a very low intrinsic viscosity $[\eta]$ for this system. Nevertheless there was a recognisable trend in the behaviour due to the drying process. The reproducibility of the data obtained from the air dried samples was the worst followed by the air/extruder dried samples. The roller dried samples had the best reproducibility of the different solutions.

The structure-property-relationships gained from the measurements made clear that the starting materials and the substitution pattern has an enormous influence on valid, comparable statements regarding the individual system. The origin of the natural products also has a significant influence on the solubility characteristics. On basis of the selected polysaccharides it was possible to determine structure-property-relationships. Depending on the studied systems this often is connected with great efforts.

