

羧甲基木薯淀粉的取代方式研究

姚杰^{*1} 尤宏¹ 包正¹ 沈晋¹

Klaassien J Ganzeveld² Jan Henk Marsman² Hero J Heeres² 陈文仁³

¹ (哈尔滨工业大学市政环境工程学院环境科学与工程系, 哈尔滨 150090)

² (荷兰格罗宁根大学斯特拉丁研究院化学工程系)

³ (台湾元智大学化学工程研究所, 中坜)

摘要 采用高效液相色谱 (HPLC) 和核磁共振波谱 (¹H NMR) 分析了混水/有机介质中合成羧甲基木薯淀粉的取代方式。发现 HPLC 是一种测定不同条件下合成的羧甲基木薯淀粉取代度 (DS) 的可靠方法。在测量的范围内, 未取代、一取代、二取代和三取代无水葡萄糖单元的摩尔分数分布和 Spurlin 模型非常吻合。用高分辨率 500 MHz ¹H NMR 分析了木薯淀粉羧甲基过程的取代度和反应顺序。依据淀粉和羧甲基淀粉 (CMS) 的结构确定了各个峰位置。比较所得数据发现: 依据 HPLC 计算的 DS_{HPLC} 小于从 500 MHz ¹H NMR 计算所得的 DS_{NMR}。无水葡萄糖单元中 C2、C3 和 C6 的羧甲基化反应顺序为 C6 > C2 > C3。

关键词 羧甲基化, 木薯淀粉, 高效液相色谱, 核磁共振, 取代基分布

1 引言

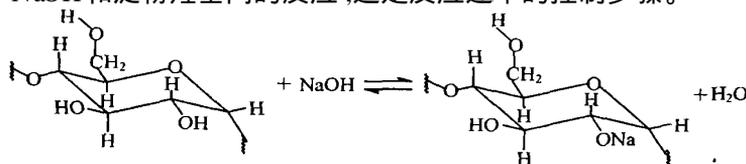
增加木薯淀粉附加值最有效的方法, 是对其进行化学改性以赋予木薯淀粉全新的性能。采用有限的化学改性可以显著地改变淀粉的流变学、物理和化学性能^[1,2]。木薯淀粉羧甲基化会逐渐增加其水溶性, 而当达到一定的取代度 (DS) 时淀粉变为冷水可溶, 且溶液透明^[3,4]。淀粉的羧甲基衍生物会带有羧基的性能, 如: 螯合、离子交换、聚阴离子絮凝和酸性功能及溶液性能, 包括增稠性、凝胶性、吸水性能、吸附性能、粘接性能和成膜性能。羧甲基淀粉 (CMS) 新的性能包括: 粘度增加, 与多价阳离子或聚阴离子相互反应性能及大分子集聚物的形成。而 CMS 的这些性能都取决于 DS、平均分子量和取代基的分布。

虽然淀粉的化学衍生工业化已有 50 历史, 关于木薯淀粉及木薯淀粉羧甲基衍生物的拓扑化学信息却非常有限^[4~6]。掌握取代基分布的详细信息有助于理解分子结构和官能团性能之间的关系。测定取代基分布的最常见方法是 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱, 对淀粉构成单元内 C2、C3 和 C6 位置上取代基提供定量的分析。通过直接键合在 C2、C3 和 C6 位置上及相邻 C1 位置上取代和未取代氢和碳原子信号峰面积的分析, 可计算出各部分 DS 值。HPLC 是测量完全水解羧甲基木薯淀粉样品有效方法。它可测量构成链的重复单元: 未取代、一取代、二取代和三取代无水葡萄糖单元的摩尔分数^[4~10]。比较这些测量值和统计计算所得的结果, 即可获得聚合物链内官能团的分布。将这些结果和从 ¹H NMR 分析获得的数据组合在一起, 即可给出官能团排列方式的完整画面。本研究的目的是用 HPLC 和 500 MHz ¹H NMR 仪阐明在水混合有机溶剂中, 羧甲基化的羧甲基木薯淀粉的取代方式。

2 实验部分

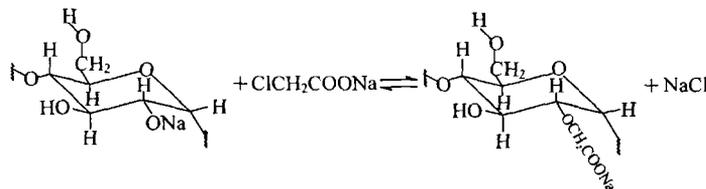
2.1 实验原理

木薯淀粉羧甲基化过程是由一氯乙酸或其钠盐在强碱存在下对羟基醚化得到的。这个方法主要有两个步骤, 第一步是 NaOH 和淀粉羟基间的反应, 这是反应速率的控制步骤。



2003-07-14 收稿; 2004-08-09 接受

第二步是通过 SMCA 的取代形成羧甲基基团,该步骤为 S_N2 亲电子取代反应。



此过程中主要的副反应是 NaOH 和 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 生成了羟乙酸钠,还有其他副反应如羟乙酸钠自身反应或和 SMCA 反应生成二羟乙酸钠。



2.2 材料、试剂和仪器

木薯淀粉(食品级,荷兰 AVEBE 公司);氯乙酸钠(SMCA)(技术级,荷兰 Akzo Nobel 公司); NaOH (片状)(比利时 ACROS ORGANICS 公司);异丙醇(LAB-SCAN 公司)、乙醇(德国 Merck KgaA 公司)、甲醇(LAB-SCAN 公司)、1-丁醇和 2-丁醇(德国 Merck-KgaA 公司)、 H_2SO_4 (德国 Merck KgaA 公司)、 D_2O 和 D_2SO_4 均为分析纯级试剂;叔丁醇(Merck-Schuchardt 公司)。HP3396 高效液相色谱(美国惠普公司),Unity-400 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司)。

2.3 反应装置

木薯淀粉的羧甲基化过程是在 1 L 夹套式反应器中进行的^[3,4],该反应器的 N_2 反吹系统可防止 NaOH 和空气中的 CO_2 反应,配备回流式冷却器以防有机液体损失。使用可调速搅拌器搅拌液体。

2.4 羧甲基化过程

室温下在反应器中混合有机溶剂、适量的水和淀粉。搅拌状态下加热反应器至设定温度。向反应混合物中加入 NaOH 。15 min 后,加入一氯乙酸钠 SMCA 颗粒羧甲基化,定期取样分析取代度 DS 。

2.5 取代度 DS 的分析

采用 HPLC 测定 DS , Yao^[3] 和 Tijssen^[4] 给出了详细过程。从反应器中取出 4 mL 样品,离心后取固体部分。用 20 mL 0.75 mol/L H_2SO_4 在 100 下水解 4 h,然后加 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 中和产生 BaSO_4 沉淀以去除 SO_4^{2-} 。采用 HPLC,两个 Bio-Rad HPX-870 色谱柱串联,64.5 下分离并测得无水葡萄糖:一取代羧甲基无水葡萄糖,二取代羧甲基无水葡萄糖,三取代羧甲基无水葡萄糖^[3~7]。载液 0.008 mol/L H_2SO_4 ,流速为 0.54 mL/min。根据色谱图依据下式:

$$DS = \sum_{i=0}^3 ix_i \quad (1)$$

$$x_i = \frac{F_i A_i / M w_i}{\sum_{j=0}^3 F_j A_j / M w_j} \quad (2)$$

计算 DS 和水解单体的摩尔分数。其中 $i=0$ 无水葡萄糖; $i=1$ 一取代羧甲基无水葡萄糖; $i=2$ 二取代羧甲基无水葡萄糖; $i=3$ 三取代羧甲基无水葡萄糖。 F 是响应系数, Mw 是摩尔重量, A 是液相色谱图的峰面积^[3~7]。理论取代度 DS_i 被定义为:

$$DS_i = n_{A,0} / n_{AGU,0} \quad (3)$$

其中 $n_{AGU,0}$ 为淀粉中无水葡萄糖单元数,当 $n_{\text{NaOH},0} > n_{\text{SMCA},0}$ 时, $n_{A,0} = n_{\text{SMCA},0}$; 当 $n_{\text{NaOH},0} < n_{\text{SMCA},0}$ 时, $n_{A,0} = n_{\text{NaOH},0}$ 。

2.6 用于 ^1H NMR 测量的羧甲基木薯淀粉样品水解

用 ^1H NMR 进行取代位置分析。将 50 g 脱盐的羧甲基木薯淀粉 CMS 样品放进 30 cm 长透析管中,两端封闭,浸入盛满超纯水(MillQ Water)的容器中。跟踪测量容器内水的电导。当水的电导超过 10 μs 时更换超纯水。约 60 h 后水的电导达 0 μs 左右且恒定。这表明所有盐都被去除了。将透析管内的物质转入烧杯中,置于 55 的真空炉中蒸发其中的水分。取干燥并脱盐的样品 50 mg 溶于 1.225 cm^3 D_2O 中,再加入 0.425 cm^3 浓 D_2SO_4 100 下水解 4 h。水解后,样品转入 NMR 管测定 ^1H NMR 谱。

3 结果和讨论

3.1 高效液相色谱 HPLC 分析和峰的定位

图 1 给出了 $DS = 1.3189$ 的羧甲基木薯淀粉的典型 HPLC 谱图。根据色谱图峰 3、4、5、6 计算取代度 DS 。对 HPLC 不同的单体具有不同的响应系数: $F_0 = 1, F_1 = F_2 = F_3 = 1.03$ 。葡萄糖单体的摩尔重量分别为: $Mw_0 = 180 \text{ g/mol}, Mw_1 = 237 \text{ g/mol}, Mw_2 = 294 \text{ g/mol}$ 和 $Mw_3 = 351 \text{ g/mol}$ 。

3.2 HPLC 对官能团取代方式的分析

表 1 列出了根据 HPLC 计算出的未取代无水葡萄糖、一取代无水葡萄糖、二取代无水葡萄糖和三取代无水葡萄糖摩尔分数。从图 2 可以看出,随着 DS 的增加,未取代无水葡萄糖的摩尔分数下降,而一取代无水葡萄糖的摩尔分数增加达最高点 $DS = 0.9$,然后下降。但是在测量的范围内二取代无水葡萄糖的摩尔分数始终增加,三取代无水葡萄糖的摩尔分数很低,未检查出四取代无水葡萄糖。所有曲线符合二项式 Spurlin 分布模型^[6,7]。

$$x_k = \binom{3}{k} \left(\frac{DS}{3} \right)^k \left(1 - \frac{DS}{3} \right)^{3-k} \quad (4)$$

x_k 是未取代无水葡萄糖、一取代无水葡萄糖、二取代无水葡萄糖和三取代无水葡萄糖的摩尔分数, k 为每个无水葡萄糖单元 AGU 取代基的个数 ($k = 0, 1, 2, 3$), DS 是平均取代度。

表 1 羧甲基化条件和对不同样品的 HPLC 分析

Table 1 The etherification conditions and the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of different samples

序号 No	淀粉含量 (%) Starch fraction	理论取代度 DS_t	反应时间 (min) Reaction time	DS_{HPLC}	X_0	X_1	X_2	X_3
1	4	1.1	30	0.2901	0.7625	0.1936	0.0702	0.2633
2	4	1.1	60	0.4130	0.6866	0.2314	0.1285	0.0532
3	4	1.1	150	0.5696	0.5834	0.2883	0.2075	0.056
4	4	1.1	270	0.6668	0.5318	0.34	0.2529	0.06
5	4	1.1	450	0.6804	0.5126	0.349	0.254	0.065
6	8	1.1	270	0.8646	0.2881	0.591	0.335	0.0269
7	8	1.1	390	0.8807	0.2687	0.5954	0.349	0.0403
8	6	2.5	60	1.1781	0.1755	0.52	0.641	0.0496
9	6	2.5	210	1.2645	0.1214	0.5112	0.6977	0.0555
10	6	2.5	330	1.3569	0.0891	0.4918	0.7844	0.0808

*所有样品是在异丙醇和 10% 水混合溶液中完成羧甲基过程的 (all samples are carboxymethylated in organic mixture of isopropanol and 10% H_2O)

3.3 羧甲基木薯淀粉的 1H NMR 谱和峰的归属

图 3a 是木薯淀粉的 1H NMR 谱,其脱盐和水解条件如 2.6 所述。根据无水葡萄糖单元 (AGU) 的结构和 1H NMR 操作条件,峰 1 是由 $-AGU$ 的 C1 位置上的质子引起的,峰 2 是由 $-AGU$ 的 C1 位置上的质子引起的,因为水溶液中, $-AGU$ 的 C1 位置上质子的耦合小于 C2 位置上质子的耦合, $-AGU$ 的 J_{aa} 是 3.5 Hz 而 $-AGU$ 的 J_{aa} 是 7.7 Hz。峰 5 是 $-AGU$ 的 C3 上的羟基引起的。峰 6 和峰 7 是 $-AGU$ 的 C2 和 $-AGU$ 的 C2 上的羟基组合引起的。峰 8 是 $-AGU$ 的 C3 上的羟基的结果。双峰 9 和 10 指示的是 $-AGU$ 的 C6 上的羟基。而双峰 11 和 12 来源于 $-AGU$ 的 C6 位置上的羟基。峰 13 至峰 32 分别由 C6 (), C5 () + C6 (), C3 (), C5 (), C2 () + C3 () 和 C2 () 上的质子引起的。

图 3b 是羧甲基木薯淀粉的 1H NMR 谱,根据高效液相色谱分析计算的 DS_{HPLC} 为 1.3868。图 3b 与图 3a 比较发现,图 3a 中的峰 1 被分成了 A 和 A 两个峰,峰 A 是由于 $-AGU$ 的 C2 位置上的羧甲基对 C1 上的质子的电子云吸引而形成的; A 表明 C2 位置上的羟基没有被取代。峰 2 变成两个双峰 B 和 B ,

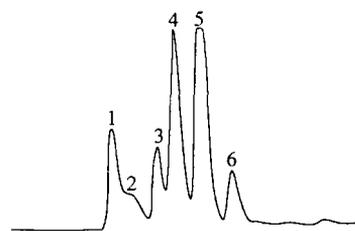


图 1 $DS = 1.3189$ 的羧甲基淀粉的典型 HPLC 谱图

Fig 1 Typical high performance liquid chromatogram of the hydrolyzed carboxymethylated cassava starch with a degree of substitution (DS) of 1.3189

1. 硫酸根 (SO_4^{2-});
2. 氯化物 (chloride);
3. 三取代无水葡萄糖 (trisubstituted anhydroglucose);
4. 二取代无水葡萄糖 (disubstituted anhydroglucose);
5. 一取代无水葡萄糖 (monosubstituted);
6. 未取代无水葡萄糖 (unsubstituted anhydroglucose)。

峰 B 由于 -AGU 的 C2 位置上的羧甲基对 C1 上的质子的电子云吸引而形成的, B 表明 C2 位置上的羟基没有被取代。在 1.5 和 2.1 之间, 有 9 个新峰, 这是 C2、C3 和 C6 位置上的羟基被羧甲基取代的结果。特征峰 C 是由 -AGU 的 C3 上的羧甲基上的质子引起的。双峰 D 和 E 及峰 F 分别是由 -AGU 和 -AGU 的 C2 上的羧甲基的取代结果。峰 G 产生于 -AGU 的 C3 上羧甲基的引入。双峰 H 和 I 源于 -AGU 的 C6 上羧甲基上的质子峰 J 产生于 -AGU 的 C6 上的羧甲基质子。峰 K 和 L 来自于最后 CMS 中残存的 SMCA 上的质子。

3.4 用 500 MHz ¹H NMR 测定取代度 DS

通过对羧甲基木薯淀粉 ¹H NMR 谱的详细分析和峰的定位, 发现峰 C、D、E、F、G、H、I 和 J 分别是由

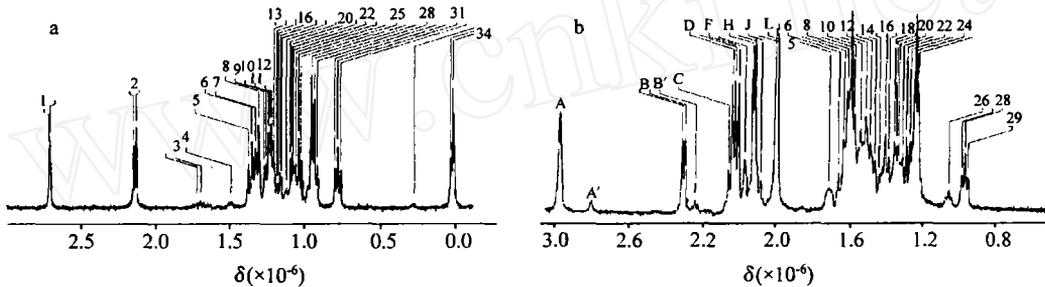


图 3 木薯淀粉 (a) 和羧甲基木薯淀粉 (b) 的 ¹H NMR 谱

Fig 3 The ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of cassava starch (a) and carboxymethyl cassava starch (b)

无水葡萄糖单元 C3, 无水葡萄糖单元和 无水葡萄糖单元 C2, 无水葡萄糖单元 C3, 无水葡萄糖单元和 无水葡萄糖单元 C6 上羧甲基取代而产生的。

DS 是取代基的特征峰面积与无水葡萄糖所有峰面积的比。因此 DS_{NMR} 可根据下式计算:

$$DS_{NMR} = \frac{J_C + J_D + J_E + J_F + J_G + J_H + J_I + J_J}{J_A + J_A + J_B + J_B + \sum_{i=5}^{32} J_i} \quad (5)$$

其中 J 是峰面积。表 2 是羧甲基化条件, 根据 HPLC 谱图计算出的 DS_{HPLC} 和依据 ¹H NMR 计算出的 DS_{NMR} 。从表 2 可以发现: 溶剂是影响羧甲基化过程的重要因素。对木薯淀粉的羧甲基化过程, 1-丁醇和异丙醇是最好的溶剂。提高温度和延长反应时间, DS 、 DS_{HPLC} 和 DS_{NMR} 都增加。比较 DS_{HPLC} 和 DS_{NMR} , 发现 DS_{NMR} 都比 DS_{HPLC} 高。其原因可能是 HPLC 的所有峰不能很好的分离开。

3.5 无水葡萄糖单元 C2、C3 和 C6 位置上羧甲基的分布及取代反应顺序

从图 3b 和峰定位过程可发现无水葡萄糖单元 C2、C3 和 C6 位置上羧甲基分布对应于积分值的比:

$$DS_{NMRC2} = \frac{J_D + J_E + J_F}{J_A + J_A + J_B + J_B + \sum_{i=5}^{32} J_i} \quad (6)$$

$$DS_{NMRC3} = \frac{J_C + J_G}{J_A + J_A + J_B + J_B + \sum_{i=5}^{32} J_i} \quad (7)$$

$$DS_{NMRC6} = \frac{J_H + J_I + J_J}{J_A + J_A + J_B + J_B + \sum_{i=5}^{32} J_i} \quad (8)$$

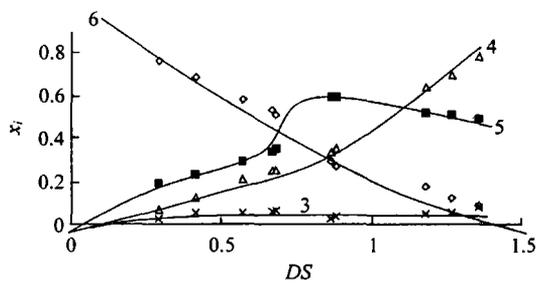


图 2 作为 DS_{HPLC} 函数的羧甲基木薯淀粉单体组成

Fig 2 Monomer composition of carboxymethylated cassava starch as a function of the DS_{HPLC}

i 为取代无水葡萄糖摩尔分数 (i is the molar fraction of substituted anhydroglucose)。3~6 同图 1 (the numbers from 3 to 6 are the same as in Fig 1)。

表 2 羧甲基化条件 DS_{HPLC} 和 DS_{NMR} Table 2 Etherification conditions, DS_{HPLC} and DS_{NMR}

溶剂 Solvent	淀粉含量 Starch fraction (%)	H ₂ O	DS_t	n_{NaOH}/n_{MCA}	T/	反应时间 Reaction time (min)	DS_{HPLC}	DS_{NMR}
1-丁醇 1-Butanol	4	10	1.1	1	45	450	0.8108	1.0305
2-丁醇 2-Butanol	4	10	1.1	1	45	450	0.7739	0.8689
叔丁醇 Tert-butanol	4	10	1.1	1	45	450	0.8126	0.8549
异丙醇 Isopropanol	4	10	1.1	1	45	450	0.8317	0.8725
异丙醇 Isopropanol	8	10	1.1	1	55	450	0.8628	0.9795
异丙醇 Isopropanol	6	10	1.1	1	55	450	0.8794	0.9620
异丙醇 Isopropanol	6	10	1.1	1	55	210	0.8473	0.9215
异丙醇 Isopropanol	8	10	1.1	1	55	450	0.8880	0.9311
异丙醇 Isopropanol	4	10	1.1	1.25	55	330	0.8511	0.944
异丙醇 Isopropanol	4	10	1.1	1.5	55	330	0.8679	0.9311
异丙醇 Isopropanol	4	10	1.1	1	55	1440 + 1440*	1.3189	1.3351

*这是一连续的两步过程,第一步 1440 min,第二步以第一步所得的羧甲基淀粉为原料再羧甲基化 1440 min (this was two consecutive steps process, first step being 1440 min and second step being 1440min with SMC got in the first step as raw material)

而
$$DS_{NMR} = DS_{NMRC2} + DS_{NMRC3} + DS_{NMRC6} \quad (9)$$

表 3 表示出了 DS_{NMR} 、相应 DS_{NMRC2} 、 DS_{NMRC3} 和 DS_{NMRC6} , C2、C3 和 C6 位置上的分布和取代顺序。针对 C3 位置将取代结果标准化。对所有样品, C6 位置上的羟基反应活性最高,其次是 C2 位置上的羟基, C3 位置上的羟基反应活性最小。C3 位置上的羟基活性低于 C2 和 C6 位置上羟基的活性表明: C2 位置上的取代对 C3 位置上羟基的活性有空间上的副影响。

表 3 DS_{NMR} , 相应 DS_{NMRC2} , DS_{NMRC3} 和 DS_{NMRC6} , C2、C3 和 C6 位置上的取代顺序Table 3 DS_{NMR} , relative DS_{NMRC2} , DS_{NMRC3} and DS_{NMRC6} and reaction preference at C2, C3 and C6 positions

溶剂 Solvent	DS_{NMR}	DS_{NMRC2}	DS_{NMRC3}	DS_{NMRC6}	C2 C3 C6
1-丁醇 1-Butanol	1.0305	0.3698	0.1779	0.4837	2.0787 1.2 7189
2-丁醇 2-Butanol	0.8689	0.345	0.1442	0.3797	2.3925 1.2 7302
叔丁醇 Tert-butanol	0.8549	0.3267	0.1442	0.3841	2.2656 1.2 6637
异丙醇 Isopropanol	0.8725	0.3218	0.1567	0.394	2.0536 1.2 5144
异丙醇 Isopropanol	0.9795	0.3842	0.1844	0.4109	2.0835 1.2 2283
异丙醇 Isopropanol	0.9620	0.3882	0.1684	0.4054	2.3052 1.2 4074
异丙醇 Isopropanol	0.9311	0.3781	0.1612	0.3918	2.3455 1.2 4305
异丙醇 Isopropanol	0.944	0.3622	0.1722	0.4006	2.1034 1.2 3264

3.6 结论

通过对不同羧甲基木薯淀粉的 HPLC 分析发现, HPLC 是一种测定不同条件下合成的羧甲基木薯淀粉 DS 的可靠方法。在测量的范围内,未取代、一取代、二取代和三取代无水葡萄糖单元的摩尔分数分布和 Spurlin 模型非常吻合。使用高分辨率 500 MHz ¹H NMR 分析了羧甲基过程的取代度和反应顺序。依据淀粉和 CMS 的结构确定了各个峰位置。比较所得数据发现,依据 HPLC 所计算的 DS_{HPLC} 小于从 500 MHz ¹H NMR 计算所得的取代度 DS_{NMR} 。无水葡萄糖单元中 C2、C3 和 C6 的羧甲基化反应顺序为 C6 > C2 > C3。

References

- Defloor I, Dehing I, Leuven, Delcour J A. *Starch/Stärke*, **1998**, 50: 58 ~ 64
- Qiu H Y, He H M. *Polym. Adv Technol*, **1999**, 10: 468 ~ 472
- Yao J, Katarina J G, Chen W R, He J H. *Starch/Stärke*, **2004**, 56: 100 ~ 107
- Tijssen C J, Kolk H J, Stamhuis E J, Beenackers A C M. *Carbohydrate Polymers*, **2001**, 45: 219 ~ 226
- Heinze T, Ertler U, Nehls I, Klemm D. *Ang Macromol Chemie*, **1994**, 215: 93 ~ 106
- Thomas H, Katy P, Tim L, Ute H. *Starch/Stärke*, **1999**, 51: 11 ~ 16
- Thomas H, Katy P. *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**, 81: 2036 ~ 2044

- 8 Ho Floyd F L, Kbsiewicz D W. *Anal Chem.*, **1980**, 52: 6
- 9 Reuben J, Conner H T. *Carbohydrate Research*, **1983**, 115: 1 ~ 13
- 10 Gidley M J. *Carbohydrate Research*, **1985**, 139: 85 ~ 93
- 11 Bengt L, Ulf L. *Carbohydrate Research*, **1987**, 170: 207 ~ 214

Investigation of Substituted Pattern of Carboxymethylation Cassava Starch

Yao Jie^{*}, You Hong, Bao Zheng, Shen Jin

(Department of Environmental Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

Klaassien J Ganzeveld, Jan Henk Marsman, Hero J Heeres

(Department of Chemical Engineering, Stratingh Institute, University of Groningen, The Netherlands)

Chen Wenren

(Chemical Institute, Yuanzhi University, Zhongli)

Abstract High performance liquid chromatography (HPLC) and proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) were used to analyze the substitution pattern of carboxymethylation cassava starch etherificated in water-miscible organic media. Through HPLC analysis for different carboxymethyl cassava starches, it can be found that HPLC is a reliable technique to determine the degree of substitution (DS) of carboxymethylated cassava starch etherificated at different conditions. The mole fractions of unsubstituted, monosubstituted, disubstituted, and trisubstituted anhydroglucose units are in very good agreement with Spurlin model during the determined range. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) of 500 MHz was used to analyze the degree of substitution and the reaction preference for carboxymethyl process. All peaks were assigned according to the structure of starch and carboxymethyl cassava starch (CMS). Comparing the data it is found that all DS values calculated from HPLC, DS_{HPLC} are lower than those calculated from the spectra of ¹H NMR of 500 MHz, DS_{NMR} . The etherificating reaction preference of C2, C3, and C6 among anhydroglucose is $C6 > C2 > C3$.

Keywords Carboxymethylation, cassava starch, high performance liquid chromatography, proton nuclear magnetic resonance, substituted pattern

(Received 14 July 2003; accepted 9 August 2004)