

ZUR EINWIRKUNG VON OZON AUF WOLLE UND AMINOSÄUREN

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen genehmigte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

von

Diplom-Chemiker
Joachim Helmut Alfred Quadflieg

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Hartwig Höcker
Privatdozentin Dr. Marlies Fabry

Tag der mündlichen Prüfung: 05. September 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für Jutta

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist, den Kenntnisstand über die Stabilität von Wolle gegenüber Ozon zu erweitern. Die Arbeit soll dazu beitragen, die Prozesse, die bei der Ozonisierung von Wolle ablaufen, besser zu verstehen.

Als Modellsubstanzen wurden Histidin und weitere Aminosäuren sowie Polyamid bei Ozoneinwirkung näher untersucht und mit dem Verhalten der Wolle gegenüber Ozon verglichen.

- Festes, reines Histidin reagiert kaum bei Ozoneinwirkung. Die Ozonisierung von Histidinlösungen hingegen zeigt, dass Histidin schnell und nachhaltig durch Ozon oxidiert wird.
- Der Ozonverbrauch von Histidin verläuft in zwei Etappen, die in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer durch unterschiedlichen Ozonverbrauch im Verhältnis von 3,5:1 gekennzeichnet sind.
- Bei Histidinozonisierung im ungepufferten wässrigen Medium wird eine Abnahme des pH-Wertes in Etappen festgestellt. Das Verhältnis der Änderungsraten beträgt 15:5:1. Die Verschiebung in den sauren Bereich deutet an, dass der Imidazol-Ring des Histidins durch Ozon bevorzugt angegriffen wird.
- In Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer konnte bei pH 7,2 die Bildung von bis zu acht Histidin-Abbauprodukten unterschiedlicher Polarität (Retentionszeiten zwischen 6,5 und 27 min) HPLC-analytisch nachgewiesen werden. Dünnschichtchromatographisch wurden sechs Produkte detektiert. Die Zusammensetzung des Produktgemisches, und damit die Ozonolyse, ist abhängig vom eingestellten pH-Wert. Die Variation des pH-Wert des Reaktionsmediums zwischen 3 und 11 führt bei steigendem pH-Wert zu einer höheren Anzahl von Reaktionsprodukten. Während bei niedrigen pH-Werten einzelne Produkte übermäßig stark gebildet werden,

kommt es bei steigendem pH-Werten zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Produktmengen.

- Durch Aminosäureanalyse der Produktgemische aus der Histidinozonisierung, die ohne vorherige Hydrolyse durchgeführt wurde, konnte die Bildung von Asp, Asn und Ser nachgewiesen werden. Die verzögerte Serinbildung deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Aminosäure um ein Sekundärprodukt handelt, das aus Asparaginsäure gebildet wird. Die Ozonisierung von Asparaginsäure konnte dies bestätigen.
- Als Ergebnis des ozonolytischen Histidinabbaus konnte die Bildung von Acetaldehyd und Imidazol massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Daneben wird vor allem ein Produkt ($M=305$ g/mol) gebildet, dessen Zuordnung noch nicht gelungen ist.
- Bei der Ozonisierung von Histidin werden verschiedene Radikalspezies gebildet, die ESR-spektroskopisch nachweisbar sind. Der Nachweis bzw. die Stabilität der Radikalspezies kann durch den Einsatz von Spintrapping-Reagenzien verbessert werden.
- Die Ozonbehandlung der Polyamidfaser Nylon[®]-6,6 resultiert in einer deutlichen Glättung der Faseroberfläche im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Unebenheiten werden durch Ozon offenbar abgetragen.
- Eine Radikalbildung im Polyamid bei Ozonisierung ist nur durch Einsatz von Spintraps nachweisbar. Die Bildung mehrerer Spezies wird ESR-spektroskopisch nachgewiesen. Auch für Polyglycin ist die Bildung von Radikalen nachweisbar, hingegen nicht bei Glycin. Dieser Sachverhalt deutet auf einen direkten Angriff des Ozons an den Peptidbindungen hin.
- Die Einwirkung von Ozon auf Wollkammzug führt zu einer Art Längsriefung, wie sie auch bei einer chlorbehandelten Faser auftritt. Daneben werden deutliche Glättungseffekte durch Abrundung der Schuppenkanten er-

zeugt. Die Schuppenstruktur wird durch Ozon teilweise so stark angegriffen, dass diese nur noch ansatzweise zu erkennen ist. Schlechteres Filzverhalten mit zunehmender Behandlungszeit im Vergleich zur unbehandelten Wollfaser bis hin zur Unfilzbarkeit ist die Folge.

- Bei Wollgewebe wird ebenfalls eine Glättung der Oberfläche durch Ozon erzielt. Der Glättungseffekt geht dabei mit einer Verklebung der einzelnen Wollfasern einher, wodurch neue Verbunde gebildet werden; das gesamte Gewebe fühlt sich spröde an.
- Die Wirksamkeit einer Ozonbehandlung im Hinblick auf das Ausbleichen der Wollfaser oder ihren Schädigungsgrad ist abhängig von der Feuchte bei der Begasung; es wird eine deutliche Hydrophilierung der Faser festgestellt.
- Die Aminosäurezusammensetzung der Wolle, erfährt durch Ozonbehandlung eine deutliche Veränderung. Neben der Oxidation von Cystin zu Cysteinsäure ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Histidinozonisierung eine Zunahme der Aminosäuren Asp+Asn und Ser festzustellen, der Histidinanteil nimmt dagegen ab.
- Anders als bei Polyamid ist auch im unbehandelten Wollkammzug Radikalaktivität nachweisbar. Bei Ozonisierung wird eine Radikalbildung beobachtet. Durch Einsatz von Spintraps kann neben der Detektion weiterer Radikalspezies eine Signalintensivierung bewirkt werden.

SUMMARY

The aim of the present thesis is the improvement of knowledge about the stability of wool during exposure to ozone. This thesis shall contribute to obtain better knowledge of the processes that occur in wool during ozonation .

As model substances, histidine and other amino acids and polyamide have been investigated with regard to the structural change during ozonation. The results are compared with the behaviour of wool against ozone.

- Solid histidine shows no reaction during ozonation. In contrast, the ozonation of aqueous solutions of histidine reveals quick and effective oxidation.
- Ozone consumption during histidine treatment is passing two phases. Depending on the duration of the ozone treatment the consumption rate is decreasing in a ratio of 3.5:1.
- Histidine ozonation in unbuffered liquors shows a characteristic decline of pH value in three phases, where the changing rates decrease with a ratio of 15:5:1. The pH shift towards acidic values points out that the imidazole ring of histidine is preferentially attacked.
- Depending on the duration of the ozone treatment the formation of about eight decomposition products of different polarity (with retention times between 6.5 min and 27 min) at pH 7.2 are detected by HPLC-analysis. Thin layer chromatography of the ozonation product resulted in the detection of six different products. The composition of the product mixture depends on the pH value of the liquor. Variation of pH within a range of 3 and 11 leads to a higher number of products with increasing pH. At the same time, the amounts of the different products are more equally distributed on increasing pH. At high pH there is no product dominating

the mixture whereas at lower pH particular products are preferentially formed.

- Amino acid analysis of the product mixtures obtained by histidine ozonation without prior hydrolysis showed the formation of aspartic acid (Asp), asparagine (Asn) and serine (Ser). Serine formation is retarded, so its formation is considered to result from secondary decomposition of aspartic acid. Analysis of the ozonation product of aspartic acid itself confirmed this assumption.
- As a result of ozonolytic histidine decomposition the formation of acetaldehyde as well as imidazole was found by mass spectroscopic analysis. In addition, a product with high molecular mass ($M=305$ g/mol) is detected that could not be identified.
- Ozonation of histidine leads to the formation of different radical species which are detectable by means of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Formation of these species resp. their stability could be enhanced using spin trapping agents.
- Impact of ozone on the polyamide fibre Nylon[®]-6.6 leads to smoothing of the fibre surface in comparison to untreated material. Apparently, ozone is able to remove inhomogeneities from the fibre surface.
- Using spin trapping agents, formation of radicals in polyamide during ozonation is detected by EPR. Polyglycine shows the same behaviour, while the ozonation of glycine shows no radical formation. These facts point to a direct attack of the peptide bonds during ozonation.
- Changes in the surface topology of ozone treated wool tops show parallels to chlorine treated wool resulting in shrivelled appearance of the surface. In addition, smoothing effects become apparent due to rounding of the cuticle scales. On parts of the fibre the scales are removed to a very high

extent, so the structure can hardly be recognized. In comparison to untreated wool top, a decrease of the felting behaviour is assessed. Long time ozonated wool tops turn out to be unfeltable.

- Ozonation of wool fabrics also leads to a smoothing of the surface. The levelling is due to an extraction of proteinic materials which cover the surface of the single fibres and act as a kind of glue. The fabric obtains a brittle handle.
- The effectiveness of an ozone treatment of wool with regard to bleaching resp. the extent of weakening the fibre depend on the humidity during the ozone treatment. The fibre is apparently hydrophilized.
- Chemical composition of wool, i.e. its amino acid composition undergoes significant changing during exposure to ozone. Not only cystine is oxidised to cysteic acid, in accordance with the results of histidine decomposition an increase of the content of the amino acids Asp+Asn and Ser is detected, furthermore, a decrease of the histidine amount in the fibre.
- Different from polyamide, radical activity is detected in untreated wool top. Nevertheless, radical formation during ozonation of wool is detected. Use of spin trapping agents leads to the detection of additional radical species as well as an increase in intensity of the radical peaks in the EPR spectra.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Abkürzungen für die Aminosäuren entsprechen den von der IUPAC-IUB-Kommission für Nomenklatur herausgegebenen Regeln:

J. Biol. Chem., **1966**, 241, 2491ff.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie, **1967**, 348, 256ff.

Biochem. J., **1972**, 126, 773ff.

Biochem. J., **1984**, 219, 345ff.

Abb.	Abbildung
ABS	Absorption
AD/ID	Außen-/Innendurchmesser
AL	Alkalilöslichkeit
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
BuOH	Butanol
c	Konzentration
CIE	Commission International d'Eclairage, Intern. Beleuchtungskommission
CW-ESR	Continuous-Wave-ESR
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
EE	Essigester
ESR/EPR	Elektronenspinresonanz/Electron Paramagnetic Resonance
EtOH	Ethanol
FT-IR	Fourier-transformations-Infrarotspektroskopie
HBL	Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
I	Intensität
IWTO	International Wool Textile Organization
Kap.	Kapitel

OFDA	Optical fibre diameter analysis
PA	Polyamid
PBN	Phenyl- <i>tert</i> -butyl-nitron
pH	Potentia hydrogenii
R [·]	Radikal
r.F., rel. F.	Relative Feuchte
Ref.	Referenz
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R _f	Retentionswert zur Angabe der Lage von Substanzflecken in der Dünnschichtchromatographie in Relation zur Laufmittelfront
Tab.	Tabelle
TEAP	Triethylaminphosphat
Tr.	Tropfen
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
W-CIE	Weissgrad nach CIE
WKZ	Wollkammzug

INHALTSANGABE

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
INHALTSANGABE.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 WOLLE	1
1.1.1 <i>Aufbau von Wolle.....</i>	<i>1</i>
1.1.1.1 Morphologischer Aufbau feiner Merinowolle	1
1.1.1.2 Chemische Zusammensetzung der Wolle	5
1.1.2 <i>Chemische Eigenschaften.....</i>	<i>6</i>
1.1.3 <i>Oxidation von Wolle</i>	<i>7</i>
1.2 OZON.....	8
1.2.1 <i>Geschichtliches.....</i>	<i>8</i>
1.2.2 <i>Eigenschaften des Ozon.....</i>	<i>9</i>
1.2.3 <i>Reaktivität des Ozons</i>	<i>12</i>
1.2.4 <i>Anwendungen von Ozon in technischen Prozessen.....</i>	<i>14</i>
1.3 ELEKTRONENSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE	14
1.3.1 <i>Wirkprinzipien</i>	<i>14</i>
1.3.2 <i>Beschreibung eines ESR-Spektrometers.....</i>	<i>16</i>
1.3.3 <i>Einsatz von Spintrapping-Reagenzien.....</i>	<i>18</i>
2 PROBLEMSTELLUNG	20
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
3.1 OZONISIERUNG VON AMINOSÄUREN UND MODELLSUBSTANZEN	21
3.1.1 <i>Histidin</i>	<i>21</i>
3.1.1.1 Auswahl der Analysemethoden	22
3.1.1.2 Abbaureaktionen des Histidin bei Oxidation durch Ozon	26

3.1.1.3	Ozonisierung von Histidin in Substanz.....	28
3.1.1.4	Ozonisierung von Histidin in Lösung.....	28
3.1.1.4.1	Ozonverbrauch bei der Ozonisierung von Histidin.....	29
3.1.1.4.2	Änderung des pH-Wertes von Histidinlösungen bei Ozonisierung	31
3.1.1.4.3	Auftrennung und Identifizierung der gebildeten Histidinabbauprodukte	34
3.1.1.4.4	pH-Abhängigkeit der Ozonolyse von Histidin.....	55
3.1.1.4.5	Bildung von Aminosäuren bei der Histidin-Ozonolyse	60
3.1.1.4.6	Abbau des Histidins.....	66
3.1.1.4.7	Radikalbildung bei der Ozonisierung von Histidin.....	67
3.1.2	Ozonisierung weiterer Aminosäuren.....	71
3.1.3	Casein	74
3.1.4	Polyamidfaser (Nylon-6,6)	77
3.1.4.1	Oberflächenveränderung an Nylon-6,6 durch Ozon.....	78
3.1.4.2	Radikalbildung in Polyamid-6,6 durch Ozonisierung und Vergleich mit ozonisiertem Polyglycin	80
3.2	VERÄNDERUNG DER WOLLSTRUKTUR DURCH OZON	84
3.2.1	Veränderungen der Faseroberfläche	84
3.2.2	Veränderung der Aminosäurezusammensetzung.....	99
3.2.2.1	Einfluss der Faserfeuchte	99
3.2.2.2	Auswirkungen der Ozonisierungsdauer.....	102
3.2.3	Ausbleichen der Wolle	104
3.2.4	Filzverhalten von ozonisiertem Kammzug	106
3.2.5	Anfärbbarkeit von Wollkammzug	108
3.2.6	Radikalbildung bei Ozonisierung von Wolle.....	110
4	EXPERIMENTELLES	116
4.1	MATERIALIEN	116
4.1.1	Textilien	116
4.1.2	Chemikalien.....	116
4.2	BEHANDLUNGEN.....	117

4.2.1	<i>Begasungen mit Ozon</i>	117
4.2.2	<i>Belichtungen</i>	120
4.3	ANFÄRBETEST MIT ASTRAZONBLAU FRR	120
4.4	TITRATION ZUR ERMITTLUNG DES OZONVERBRAUCHES.....	120
4.5	PH-WERTVERÄNDERUNG VON HISTIDINLÖSUNGEN.....	121
4.6	ANALYTIK.....	121
4.6.1	<i>Bestimmung der Faserfeinheit</i>	121
4.6.2	<i>Alkalilöslichkeit (AL)</i>	121
4.6.3	<i>Aminosäureanalyse</i>	122
4.6.4	<i>Filzprüfung</i>	122
4.6.5	<i>Quantitative Bestimmung des Histidinabbaus mittels Pauly-Reagenz</i> .	122
4.6.6	<i>Mikroskopie</i>	124
4.6.6.1	Faserquerschnittbereitung	124
4.6.6.1	Licht- und Photometermikroskopie	124
4.6.6.2	Rasterelektronenmikroskopie	124
4.6.7	<i>Farbmessung</i>	124
4.6.8	<i>Tryptophan-Bestimmung</i>	125
4.6.9	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	125
4.6.10	<i>HPLC-Analytik</i>	125
4.6.11	<i>Spektroskopische Methoden</i>	126
4.6.11.1	UV/VIS-Spektroskopie	126
4.6.11.2	IR-Spektroskopie	126
4.6.11.3	ESR-Spektroskopie	126
4.6.11.4	MALDI-TOF-MS.....	127
5	LITERATURVERZEICHNIS	128
	Danksagung.....	134
	Lebenslauf.....	136

1 EINLEITUNG

1.1 Wolle

1.1.1 Aufbau von Wolle

1.1.1.1 Morphologischer Aufbau feiner Merinowolle

Wolle ist die natürliche Verwirklichung einer Verbundstruktur. Ihre Fasern bestehen aus zwei verschiedenen Zelltypen. Die spindelförmigen Cortexzellen im Faserinneren, welche mit mehr als 90 % den Hauptbestandteil der Faser ausmachen¹, werden als Ganzes von den Cuticulazellen in ein bis zwei, bisweilen auch mehr Lagen umgeben. Untereinander sind die einzelnen Zellen durch den Zellmembrankomplex von einander abgegrenzt.

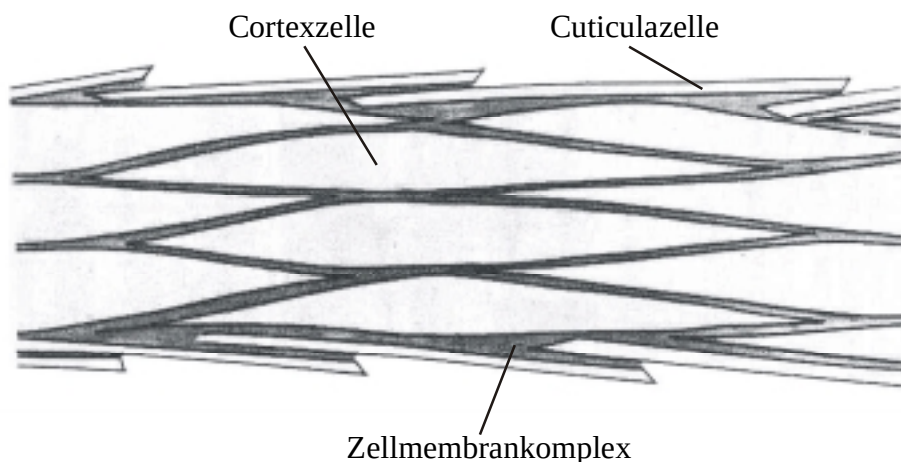


Abb. 1. Schematische Darstellung der natürlichen Verbundstruktur der Wollfaser².

Die Cuticulazellen an der Faseroberfläche überlappen in Längsrichtung und bilden eine dachziegelartige Struktur aus einander überlappenden Schuppen, wobei die freiliegenden Schuppenkanten zur Faserspitze hin ausgerichtet sind (Abb. 2).

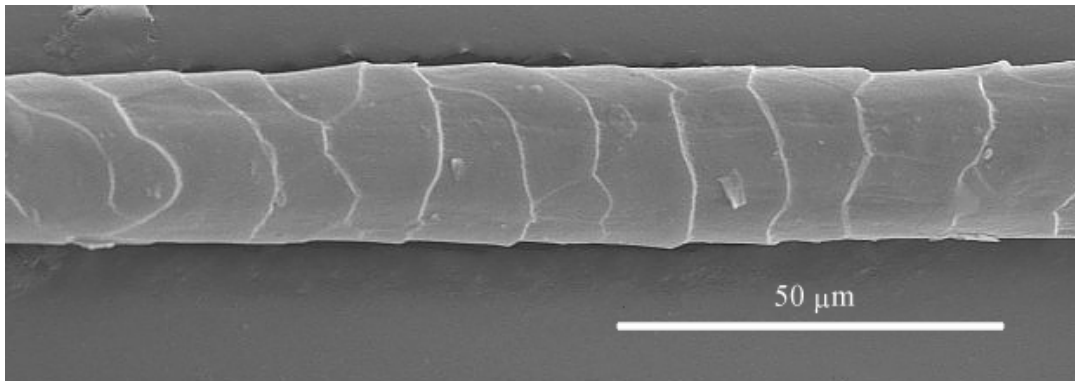


Abb. 2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer intakten Wollfaser (Balken: 50 μm). Die Cuticulaschuppen weisen eine mittlere Schuppenkantenhöhe von ca. 0,8 μm auf. Sie sind entlang der Wuchsrichtung der Faser (Faserwurzel im Bild links, Faserspitze rechts) ausgerichtet.

Während die Cortexzellen für die mechanischen Eigenschaften der Wollfaser verantwortlich sind, beeinflusst die morphologische Feinstruktur der Cuticula die makroskopischen Eigenschaften. Die Cuticula selbst weist eine Mehrschichtenstruktur auf, die in Abb. 3 dargestellt ist.

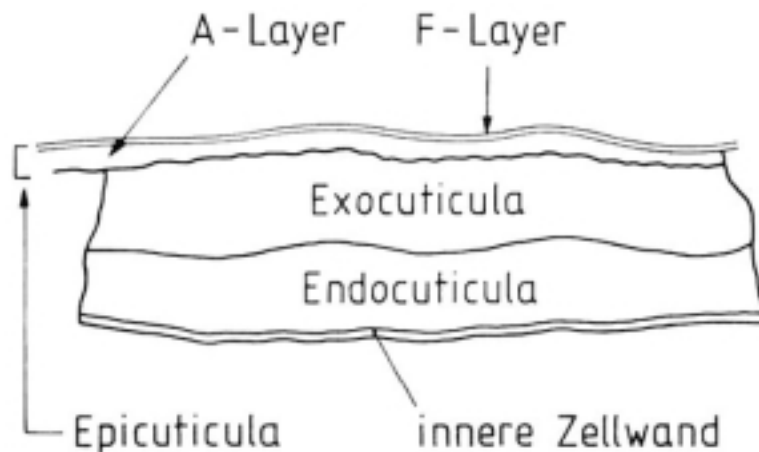


Abb. 3. Schematische Darstellung des Querschnittes der Cuticula von Wolle³.

Sie ist aus drei proteinogenen Schichten unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung, der Endocuticula, der Exocuticula sowie der gemischt lipidisch-proteinischen, damit hydrophoben, Epicuticula aufgebaut. Eine besondere Rolle spielt dabei die Aminosäure Cystin (Cys_2), deren Anteil (gemessen in mol%

Halbcystin) an den einzelnen Schichten der Cuticula in beträchtlichem Maße variiert. Die Endocuticula weist mit lediglich 3 mol% den geringsten Halbcystingehalt auf. Die außen liegende F-layer (früher als Epicuticula bezeichnet) ist nach gegenwärtiger Nomenklatur Teil der Epicuticula und verfügt immerhin über einen Anteil von 12 mol%. Die Exocuticula (früher: Exocuticula „B“) weist ihrerseits einen Halbcystingehalt von über 15 mol% auf; die wie die F-Layer zur Epicuticula zählende A-Layer (früher: Exocuticula „A“) kann mit rund 35 mol% den höchsten Halbcystingehalt vorweisen.

Der hohe Cystinanteil der A-Layer ist für die hohe Vernetzungsdichte und geringe Quellbarkeit dieser Schicht und somit ihre geringe Durchlässigkeit für andere Substanzen wie z.B. Farbstoffe verantwortlich.

Die Morphologie des Faserinneren, des Cortex, ist recht komplex; er kann ebenfalls als Verbundwerkstoff angesehen werden (Abb. 4).

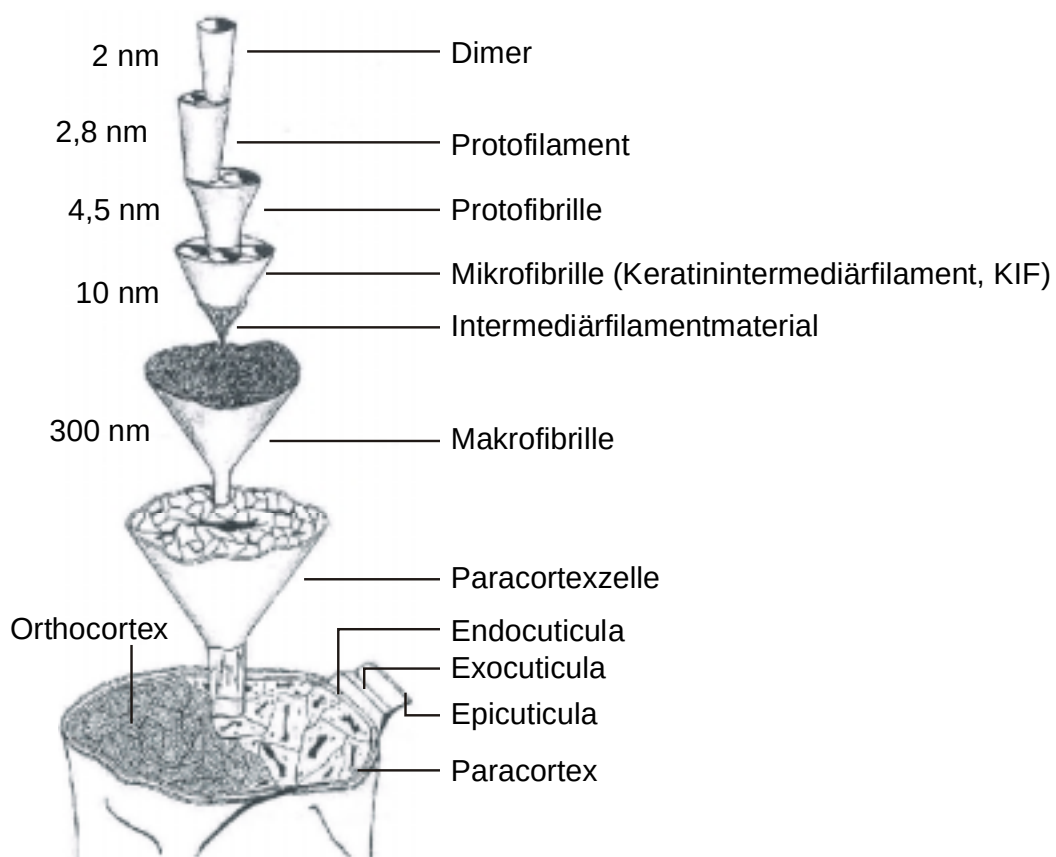


Abb. 4. Schematisches Hierarchiemodell der Merinowollfaser nach Aebi (Zeichnung: B. Denda)^{3,4}.

Eine Cortezelle besitzt einen Durchmesser von etwa 6 μm und ist ca. 100 μm lang. Die Cortezellen enthalten die Makrofibrillen. Ihr Durchmesser beträgt 200-300 nm. Die Makrofibrillen enthalten ihrerseits fibrilläre Strukturen, die als Mikrofibrillen oder auch Intermediärfilamente bezeichnet werden. Eine Makrofibrille enthält bis zu 900 solcher 10 nm dicken Mikrofibrillen⁵. Der Aufbau der Mikrofibrillen ist in Abb. 5 dargestellt und zeigt, dass die Wollstruktur letztendlich auf ein Coiled-Coil Dimer als Basis-Einheit reduziert werden kann (vgl. auch Abb. 6). Diese bilden durch Assoziation aufgrund verschiedener lateraler Wechselwirkungen größere Einheiten (Protofilament, Protofibrille) bis hin zum rund 10 nm starken Keratinintermediärfilament (KIF), welches letztendlich aus 16 Heterodimeren besteht.

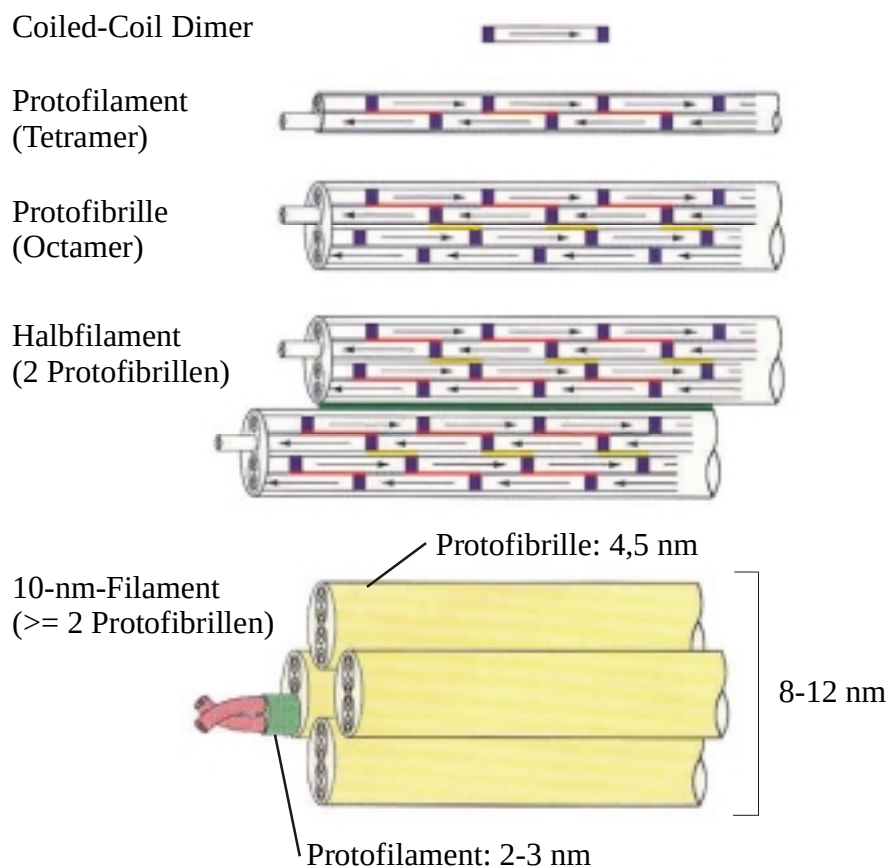


Abb. 5. Modell für die Anordnung der Keratinmoleküle in der Mikrofibrille³. Die Pfeilspitzen deuten in Richtung des C-Terminus.

Das in Abb. 5 als Ausgangspunkt dargestellte Coiled-Coil-Dimer besteht als Heterodimer aus zwei umeinander gewundene Proteinhelices (Abb. 6).

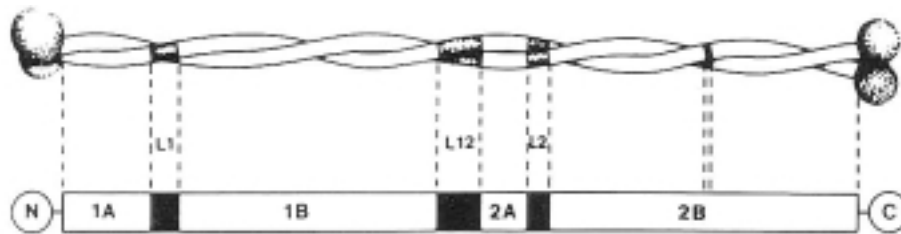


Abb. 6. Schematische Darstellung eines Coiled-Coil-Dimers aus zwei Proteinketten³.

Der Bereich zwischen N-Terminus (links dargestellt) und dem C-Terminus (beide nichthelical) besteht aus 4 α -helicalen Segmenten (1A, 1B, 2A, 2B) unterschiedlicher Länge sowie drei sie verbindenden ebenfalls nichthelicalen Linkersegmente (Linker; L1, L12, L2). Die Topographie des Heterodimers konnte von AEBI auf rasterelektronenmikroskopischem Wege nachgewiesen werden⁶.

1.1.1.2 Chemische Zusammensetzung der Wolle

Im allgemeinen versteht man unter Wolle die Schafwolle, d.h. die 5-30 cm langen Haare des Hausschafes mit seinen verschiedenen Rassen, des weiteren aber auch die feinen Unterhaare des südamerikanischen Lamas, des Kamels, des Kaninchens und der Ziegen⁷.

Wasserfreie Wolle besteht zu 97 % aus Proteinen, den restlichen Anteil machen strukturelle Lipide (2 %), Mineralsalze, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate (zusammen 1 %) aus. Die Elementaranalyse von Wolle zeigt folgende Zusammensetzung (Tab. 1):

Tab. 1. Elementaranalyse von Merinowolle^{3,8}.

Bestandteil	Anteil in Gew. %
Kohlenstoff	50,5
Wasserstoff	6,8
Sauerstoff	22,0
Stickstoff	16,5
Schwefel	3,7
Asche	0,5

Sieht man einmal vom Schwefelanteil der Wolle ab, so ist diese Zusammensetzung für Proteine charakteristisch.

Der ungewöhnlich hohe Schwefelanteil erklärt sich aus dem hohen Gehalt an der Aminosäure Cystin, die zwei Schwefelatome in einer Disulfidbrücke enthält. Die Disulfidbrücken sind hauptsächlich für die hohe Stabilität der Wollfaser verantwortlich, die sich in einer hohen Naßzugkraft und weitgehender Unlöslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln bemerkbar macht³. Einen weiteren stabilisierenden Effekt bewirken Isodipeptidbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen kationischen und anionischen Gruppen der Seitenketten, die den amphoteren Charakter der Wolle bedingen. Insgesamt lassen sich 24 verschiedene am Aufbau der Peptidketten beteiligte Aminosäuren in der Wollfaser nachweisen³.

1.1.2 Chemische Eigenschaften

Wolle enthält aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Aminosäuren sowohl basische als auch saure Gruppen an den Kettenenden sowie in den Seitenketten. Deshalb ist sie befähigt, Säuren und Basen zu binden: die Wolle ist ein Polyampholyt. Die Reaktion mit starken Säuren führt zur fortschreitenden Umwandlung von Carboxylatgruppen in Carboxylgruppen, während unter Einwir-

kung von Alkalien protonierte Amino- (Endgruppen, Lys) oder Guanidinogruppen (Arg) in den ungeladenen Zustand überführt werden.

Übermäßige Zufuhr von Säuren führt zur Hydrolyse der Wolle und zur Freisetzung der beteiligten Aminosäuren, was man sich in der Aminosäureanalytik zunutze macht. Allerdings werden dabei einige Aminosäuren chemisch verändert: Asparagin und Glutamin werden zu den freien Säuren desamidiert, Tryptophan wird zerstört. Moderate saure (Teil-)Hydrolysen sind in der Vergangenheit zur Aufklärung der Wollstruktur eingesetzt worden^{9,10,11,12}.

Die Behandlung mit starken Alkalien führt zur Zersetzung der Wolle. Dabei werden neben den Peptidbindungen auch die Seitenketten abgebaut. Besonders empfindlich sind die Cystin-Gruppen, da vor allem die Schwefelbrücken durch die Einwirkung von Alkalien chemisch verändert werden. Untersuchungen alkalibehandelter Wolle führten zur Entdeckung des Lanthionins und des Lysinoalanins^{13,14}. Die daraus entwickelte Analytik der Alkalilöslichkeit (AL) wird zur Einschätzung des Schädigungsgrades der Wolle nach sauren und oxidativen Behandlungen eingesetzt¹⁵. Für die Untersuchung alkalisch vorbehandelter Wollen wird die Methode der Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit (HBL) eingesetzt¹⁶.

1.1.3 Oxidation von Wolle

Die Oxidationsempfindlichkeit der Wolle ist auf nur wenige der in den Wollproteinen enthaltenen Aminosäuren zurückzuführen. Der wichtigste Angriffspunkt für Oxidationsmittel sind in erster Linie die schwefelreichen Aminosäuren Cystin und Methionin¹⁷.

Da die Stabilität der Wollfaser maßgeblich durch die Disulfidbrücken des Cystins beeinflusst wird, konzentrieren sich die meisten Untersuchungen deshalb auf den oxidativen Abbau des Cystins z.B. bei oxidativer Bleiche^{17,18} oder der Filzfreiausrüstung^{17,19}. Dabei sind bei spaltungsfreier Oxidation drei verschiedene Cystinoxide nachweisbar^{20,21}.

Methionin wird je nach Stärke des Oxidationsmittels zum Monoxid²² oder zum Sulfon²³ oxidiert. Weiterhin können auch Tryptophan²⁴, Tyrosin²⁴, Lysin^{25,26}, Histidin^{25,26} und Prolin²⁷ oxidativ verändert werden.

1.2 Ozon

1.2.1 Geschichtliches^{28,29,30}

Sauerstoff existiert neben seiner normalen Form als O₂-Molekül (Disauerstoff) ebenfalls in einer um ein Sauerstoffatom erweiterten energiereicheren Form als Ozon (Trisauerstoff) O₃.

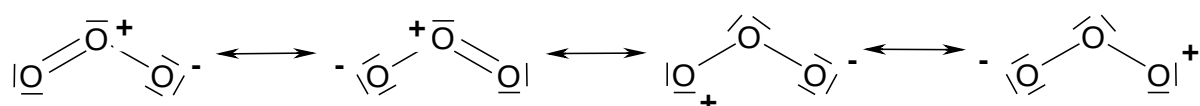
Bekannt ist Ozon bereits seit dem Jahr 1840, als SCHÖNBEIN es anhand seines charakteristischen stechenden Geruchs nachweisen konnte³¹. Die Benennung erfolgte unter Zuhilfenahme des griechischen Ausdrucks „ozein“ für „riechen“. Im Jahre 1857 konstruierte SIEMENS die erste Apparatur zur Darstellung von Ozon aus Sauerstoff mittels stiller elektrischer Entladung (sog. Siemensscher Ozonisator)³². 1905 entdeckte HARRIES, dass Alkene durch Behandlung mit Ozon Aldehyde bilden³³. Eine allgemein akzeptierte und anerkannte Interpretation des zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismus, die bis heute Gültigkeit hat, stellte CRIEGEE erstmalig 1951 vor³⁴. Er arbeitete und veröffentlichte auch in den nachfolgenden Jahrzehnten immer wieder zum Thema Ozon, um seine Theorie weiter zu verfeinern, zuletzt im Jahre 1975³⁵. Arbeiten von MURRAY et al.³⁶, BAULD und BAILEY³⁷ sowie KUCZKOWSKI³⁸ beschäftigen sich darüber hinaus mit der Ozonolyse auf Basis des von CRIEGEE vorgeschlagenen Mechanismus und konnten weitere Erkenntnisse über den stereochemischen Ablauf der Ozonolyse im Detail gewinnen.

1.2.2 Eigenschaften des Ozon

Ozon ist ein instabiles, in höheren Konzentrationen blaues diamagnetisches Gas, dessen stechender Geruch für die Namensgebung maßgeblich war (siehe Kap. 1.2.1). Es kann noch bis zu einer Konzentration von 0,01 ppm an seinem charakteristischen Geruch identifiziert werden; der MAK-Wert für Ozon beträgt $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($= 0,1 \text{ ppm}$)³⁹. Bei Abkühlung kondensiert Ozon zunächst zu einer tiefblauen Flüssigkeit (Siedepunkt $-112 \text{ }^\circ\text{C}$; zum Vergleich: Siedepunkt Sauerstoff: $-183 \text{ }^\circ\text{C}$) und bildet bei weiterem Absenken der Temperatur einen schwarz-violetten Feststoff (Schmelzpunkt $-193 \text{ }^\circ\text{C}$)^{28,29}.

In allen Aggregatzuständen ist Ozon instabil und zerfällt in Disauerstoff; während die Zersetzung des gasförmigen Ozons ohne katalytische Einwirkung nur langsam vonstatten geht, können flüssiges oder festes Ozon explosionsartig in O_2 zerfallen.

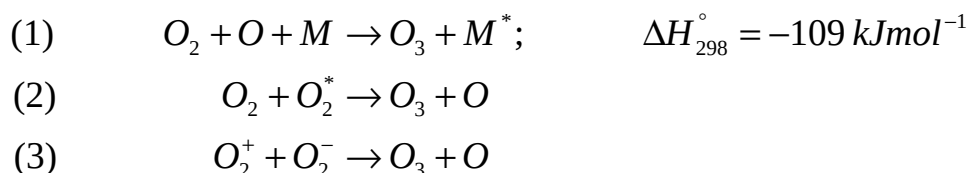
Wie die isoelektronischen ONCl und ONO^- ist auch das O_3 -Molekül gewinkelt (Gleichung 1). Der Bindungswinkel wurde mit $116,8^\circ$ ermittelt, die Bindungslänge beträgt $127,8 \text{ pm}$, die beiden äußeren Sauerstoffatome sind 218 pm voneinander entfernt.



Gleichung 1. Resonanzstrukturen des Ozons in der Beschreibung nach VB(valance bond)-Theorie.

Die Bildung von Ozon erfolgt durch stille elektrische Entladung aus Disauerstoff oder Luft in metallbeschichteten, wassergekühlten Glasröhren, an die eine niederfrequente Hochspannung (50-500 Hz bei 10-20 kV) angelegt ist (Siemens-Ozonisator). Bei Verwendung von reinem Sauerstoff enthält das entstehende Ozon-Sauerstoff-Gemisch einen Ozonanteil von 10-15 %. Die Bildung erfolgt

an der Metallbeschichtung der Glasröhren (Gleichung 2, (1)), über angeregte O_2 -Moleküle (Gleichung 2, (2)) oder durch Rekombination von Ionen (Gleichung 2, (3)):



Gleichung 2. Bildungsmöglichkeiten von Ozon im Siemensschen Ozonisator.

Die ebenfalls stark exotherme Rückreaktion von Ozon mit atomarem Sauerstoff kann verhindert werden, indem Ozon aus dem Gasgemisch entweder durch direkte chemische Reaktion oder Ausfrieren zur späteren Verwendung entfernt und so dem atomaren Sauerstoff als Reaktionspartner entzogen wird.

Ozon zeigt ausgeprägtes Absorptionsverhalten gegenüber energiereicher ultravioletter Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 220 und 290 nm. Als Bestandteil der Stratosphäre ist es für das Leben auf der Erde deshalb von elementarer Bedeutung, da es einen beträchtlichen Teil des schädlichen (weil mutagenen) kurzwelligen Anteil des Sonnenlichtes aus dem Wellenspektrum herausfiltert.

Spätestens seitdem in den 70er Jahren eine starke Abnahme der Ozonkonzentration über den Erdpolen registriert werden konnte und diese 1985 erstmals wissenschaftlich beschrieben wurde⁴⁰, ist die Ozonschicht Forschungsobjekt verschiedenster Wissenschaftszweige. Die mittlerweile verbotene Verwendung von Fluorchlorkohlenwasserstoffen als Treibmittel in Spraydosen bzw. in Kühlschränken und Klimaanlage sowie der Abgasausstoß von in großer Höhe fliegenden Verkehrsflugzeugen sind entscheidend am Abbau der Ozonschicht in der Stratosphäre beteiligt („Ozonlochproblematik“). Jüngsten Untersuchungen zufolge scheint das Ausmaß des Ozonlochs nicht mehr zuzunehmen, im Gegenteil:

im aktuellen Jahr fällt das Ozonloch über der Antarktis deutlich geringer aus als in den Vorjahren⁴¹.

Ozon entsteht auch in den unteren Schichten der Atmosphäre durch photochemische Reaktion unter Katalyse von Stickoxiden und reaktiven Kohlenwasserstoffen, für deren Bildung industrielle, vor allem aber Kraftfahrzeugemissionen verantwortlich sind. Vor allem im Sommer wird dadurch Ozon in der unteren Atmosphäre angereichert (sog. Sommer-Smog); als bedenklich wird dabei eine Konzentration von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Einstunden-Wert) angesehen⁴². Bei Erreichen dieses Wertes kann die Lungenfunktion bei körperlicher Anstrengung maßgeblich beeinträchtigt werden; deshalb muss beim ersten Auftreten dieser Ozonkonzentration die Bevölkerung unverzüglich unterrichtet und, falls nötig, ein beschränktes Fahrverbot verhängt werden. Die Auswirkungen bestimmter Ozonkonzentrationen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2. Wirkung bestimmter Ozonkonzentrationen auf den menschlichen Organismus⁴³.

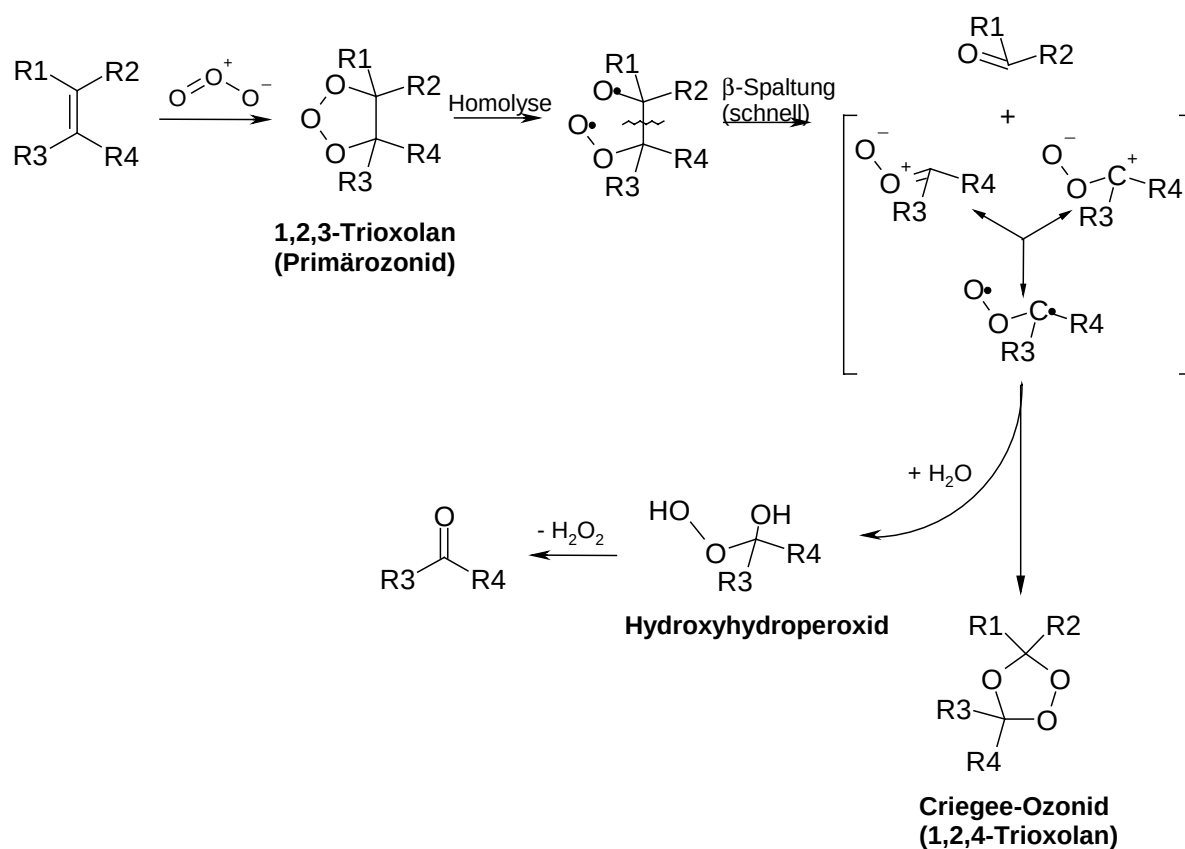
Konzentrationsbereich	Wirkung auf den Organismus
$> 30 \mu\text{g}/\text{m}^3$	Wahrnehmung mit dem Geruchssinn, es tritt jedoch ein schneller Gewöhnungseffekt ein.
$> 70 \mu\text{g}/\text{m}^3$	erste Reizzustände der Augenbindehaut
$> 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$	eventuell Kopfschmerzen
$> 160 \mu\text{g}/\text{m}^3$	bei Tieren sinkt die Abwehrbereitschaft für bakterielle Lungenerkrankungen
$160\text{-}200 \mu\text{g}/\text{m}^3$	Lungenfunktionsveränderungen, insbesondere bei körperlicher Belastung
$200 \mu\text{g}/\text{m}^3$	erhöhte Anzahl von weissen Blutkörperchen, Immunsystem wird inaktiviert
$240\text{-}300 \mu\text{g}/\text{m}^3$	Zunahme der Häufigkeit von Asthma-Anfällen
$240\text{-}700 \mu\text{g}/\text{m}^3$	Abnahme der Leistungsfähigkeit
$> 400 \mu\text{g}/\text{m}^3$	Husten, Brustschmerzen, nach vier Stunden: Hormon-Enzymveränderungen
$> 800 \mu\text{g}/\text{m}^3$	entzündliche Reaktion des Gewebes
$> 1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$	nach 6 bis 10 Stunden erste Chromosomenschädigung beim Menschen

Ozon besitzt darüber hinaus auch ein nicht zu vernachlässigendes Potential als Treibhausgas: seine Treibhausaktivität ist verglichen mit der von Kohlendioxid um rund das 2000fache stärker.

1.2.3 Reaktivität des Ozons

Ausgehend von der Resonanzformel für Ozon (vgl. Schema 1) lassen sich verschiedene Möglichkeiten für den Ozonangriff ableiten. Neben der Reaktion als Dipol in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition⁴⁴ sind auch elektrophile⁴⁵, nucleophile⁴⁶ und radikalische⁴⁷ Reaktionen möglich.

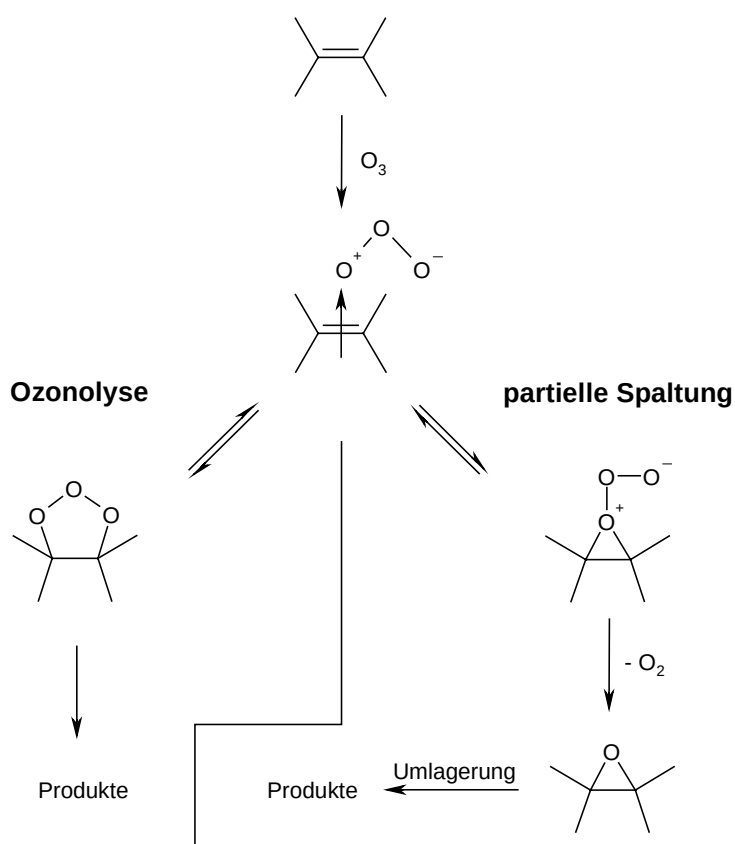
Der Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition wurde von Criegee aufgeklärt. Bei der Addition von Ozon an eine C=C-Doppelbindung kommt es zur Ausbildung eines Primärozonids (1,2,3-Trioxolan, Gleichung 3).



Gleichung 3. Darstellung des Mechanismus für die Ozonolyse ungesättigter Kohlenwasserstoffe nach CRIEGEE³⁵.

Das Primärozonid wird homolytisch gespalten, und bei der nachfolgenden schnellen β -Eliminierung wird ein Aldehyd oder Keton abgetrennt. Im nächsten Schritt entsteht entweder in einer erneuten Cycloaddition das sog. Criegee-Ozonid, ein 1,2,4-Trioxolan, oder es wird durch Anlagerung eines Wassermoleküls ein Hydroxyhydroperoxid gebildet. Durch Abspaltung von Wasserstoffperoxid endet die Reaktion in der Bildung eines weiteren Aldehyds bzw. Ketons.

Bei einem elektrophilen Angriff wird hingegen nur ein Atom des Ozonmoleküls umgesetzt. Charakteristisch für Reaktionen dieser Art ist deshalb die Abspaltung von molekularem Sauerstoff. Da dabei nur der π -Anteil der C=C-Doppelbindung gespalten wird, spricht man in diesem Fall von einer partiellen Spaltung⁴⁸. Besonders bei sterisch anspruchsvollen Olefinen wird die normale Ozonolyse zugunsten der partiellen Spaltung und Epoxidbildung zurückgedrängt.



Gleichung 4. Reaktionswege bei der Ozonolyse bzw. bei der partiellen Spaltung bei Angriff von Ozon auf Olefine.

Doch nicht nur C=C- Doppelbindungen können mit Ozon reagieren, vielmehr wird auch die Ozonisierung von C-H-Bindungen beobachtet.

Bei wässriger Ozonisierung bei pH-Werten über 9 werden OH-Radikale gebildet, die schneller als Ozon selber reagieren⁴⁹.

Eine umfassende Darstellung zur (organischen) Ozonchemie gibt BAILEY in einer zweibändigen Abhandlung^{50,51}.

1.2.4 Anwendungen von Ozon in technischen Prozessen

Neben seinem Potential als Reaktionspartner in der organischen Synthese ist Ozon heutzutage aus vielen technischen Prozessen nicht mehr wegzudenken. So wird Ozon vielfach in der Wasserbehandlung eingesetzt, sei es in der Abwasserbehandlung⁵², bei der Entfärbung textiler Abwässer⁵³ oder zur Trinkwasseraufbereitung^{54,55,56}. Auch Schwimmbadwasser wird bei der Aufbereitung mit Ozon desinfiziert^{57,58}.

In der Textilverarbeitung sind Verfahren zur Druckvorbehandlung von Wolle⁵⁹ sowie zur chlorfreien Filzfreiausrüstung^{60,61,62} bekannt.

1.3 Elektronenspinresonanzspektroskopie

1.3.1 Wirkprinzipien

Die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) wurde erstmals 1945 von ZAVOISKY aufbauend auf Forschungsergebnissen von Stern und Gerlach^{63,64} bzw. Uhlenbeck und Goudsmit⁶⁵ als Meßmethode zur Identifizierung paramagnetischer Substanzen und Radikale beschrieben⁶⁶.

Das Prinzip der ESR macht sich zunutze, dass Elektronen ein magnetisches Moment, den Spin, besitzen, der bei Einwirkung eines äußeren Magnetfelds nach den Gesetzen der Quantenmechanik entartet und zwei diskrete, energetisch getrennte Einstellungen annimmt (Zeeman-Effekt)⁶⁷. Dabei wird die Feldstärke gemessen, bei der die Elektronen in Resonanz mit einer monochromatischen Strahlung kommen^{68,69}.

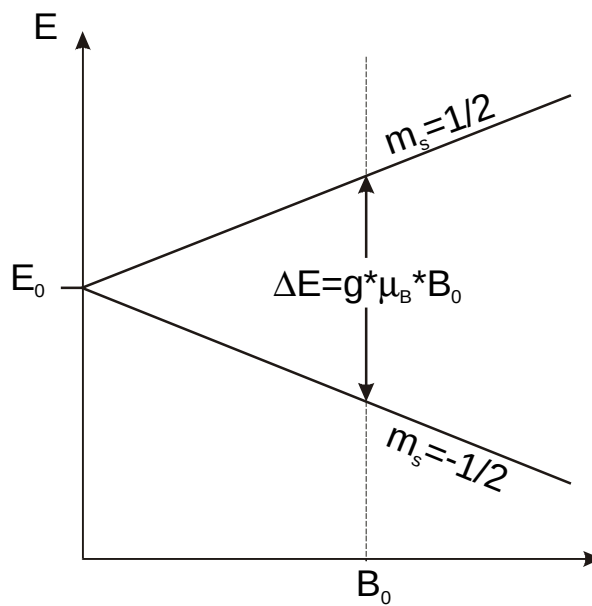


Abb. 7. Energieniveauschema zur Aufspaltung des Elektronenspins im homogenen äußeren Magnetfeld B_0 (Zeeman-Effekt).

Die Energiezustände, die das System bei Entartung annimmt, ergeben sich aus

$$E = m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B_0 \text{ mit } m_s = \frac{1}{2} \text{ oder } m_s = -\frac{1}{2} \quad (2)$$

(m_s =Spinquantenzahl des Elektrons, g =Landé-Faktor, μ_B =Bohrsches Magneton ($=9,27408 \cdot 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$) und B_0 =Magnetfeld).

Der Landé-Faktor ist eine Proportionalitätskonstante; der Wert für das freie Elektron beträgt $g_E = 2,00232$.

Durch Differenzbildung unter Einbeziehung der Planckschen Beziehung $E = h \cdot \nu$ ergibt sich die Resonanzbedingung

$$E_a - E_b = \Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (3)$$

mit h =Plancksches Wirkungsquantum ($=6,62618 \cdot 10^{-34}$ Js) und ν =Frequenz.

Die Größe der energetischen Aufspaltung hängt dabei linear von der Stärke des äußeren Magnetfeldes ab. Die Energie, die zur Anregung von Übergängen zwischen den Zuständen E_a und E_b nötig ist, kann durch Mikrowellenstrahlung, deren Strahlungswellenlänge im Zentimeterbereich liegt, hervorgerufen werden. Diese Energieabsorption im Resonanzfall wird im ESR-Experiment nachgewiesen. Dabei wird das bei der Resonanzfeldstärke beobachtete ESR-Signal nicht in Form eines Absorptionssignals, sondern aus Gründen der Spektrenauswertung üblicherweise als dessen 1. Ableitung registriert.

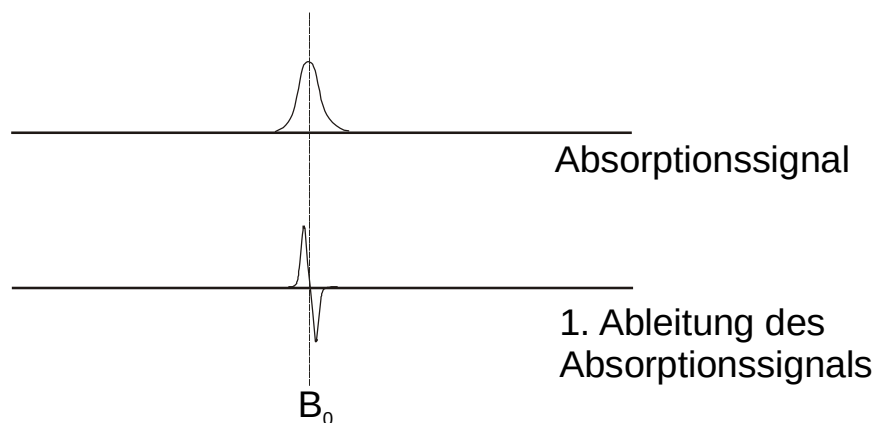


Abb. 8. Vergleich des vom Detektor registrierten Absorptionssignals und der zur Auswertung erhaltenen 1. Ableitung des Signals.

1.3.2 Beschreibung eines ESR-Spektrometers

Die folgende Beschreibung bezieht sich auf ein X-Band-ESR-Spektrometer (Mikrowellenfrequenz 9-10 GHz, Wellenlänge $\lambda \approx 3$ cm), welches für die Messungen benutzt wurde (siehe Abb. 9).

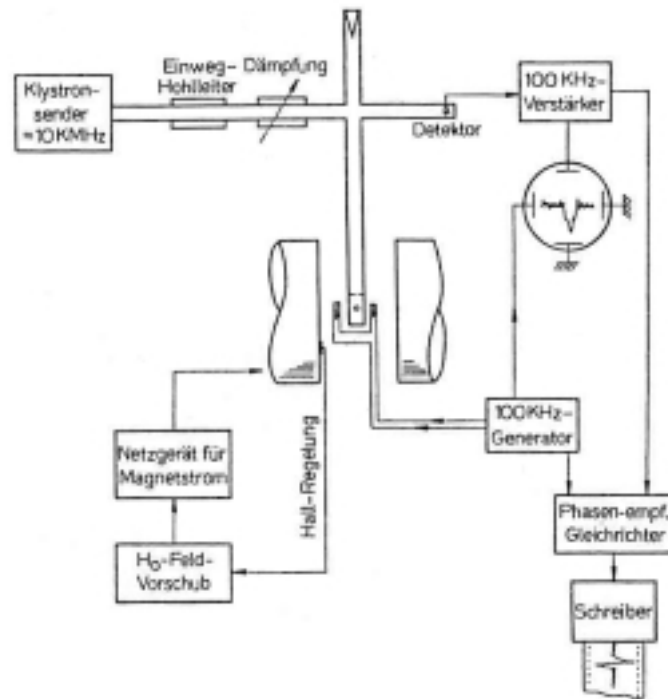


Abb. 9. Blockschaftbild und Aufbau eines Continuous-Wave(CW)-ESR-Spektrometers⁷⁰.

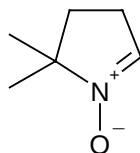
Die benötigte Mikrowellenenergie wird durch ein auf die Eigenfrequenz des Hohlraumresonators abgestimmtes Klystron bereitgestellt. Die Mikrowellenstrahlung wird durch den Hohlleiter in die Cavity (Messraum) mit der zu untersuchenden Probe eingestrahlt, die sich zwischen den Polen eines durch eine Hall-Sonde geregelten Elektromagneten befindet. Vor jeder Messung wird im Messraum eine stehende Welle erzeugt. Da die Mikrowellenfrequenz unveränderlich ist, wird das Magnetfeld über einen bestimmten Feld-Bereich verändert, um so eine genaue Detektion der Resonanz zu ermöglichen. Bei Erreichen der Resonanzbedingungen bricht die stehende Welle im Messraum zusammen. Die dadurch hervorgerufene Störung wird vom Detektor aufgezeichnet.

Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wird das Absorptionssignal durch Einstrahlung eines zusätzlichen parallel zum äußeren Feld liegenden Magnetfeldes moduliert. Zu diesem Zweck befinden sich am Resonator zwei Wechselstromspulen. Durch ständige periodische Veränderung kann das ursprüngliche Gleichstromsignal wesentlich rauschärmer verstärkt werden.

Die Anwendungsbereiche der ESR-Spektroskopie sind Untersuchungen zum magnetischen Verhalten von Metallen, Übergangsmetallionen, Gitterfehlstellen und stabilen organischen Radikalen. Kurzlebige Radikale müssen stabilisiert oder kontinuierlich erzeugt werden, um so der Messung zugänglich zu sein.

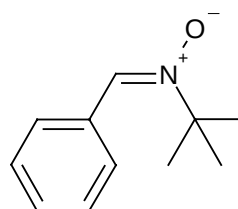
1.3.3 Einsatz von Spintrapping-Reagenzien

Die direkte Charakterisierung von Radikalspezies ist wünschenswert, jedoch in der Praxis aufgrund der Kurzlebigkeit der zu detektierenden Spezies oft nicht möglich. Mit dem Einsatz sog. Spintrapping-Reagenzien⁷¹ (kurz: Spintraps) können diese Schwierigkeiten überwunden werden. Das Prinzip des Spintrapping liegt darin, die kurzlebigen Radikalspezies durch Anlagerung an ein geeignetes Molekül in eine langlebigere Form zu überführen. In der Praxis haben sich Moleküle bewährt, die der Klasse der C-Nitroso-Verbindungen bzw. den Nitronen angehören^{72,73}. Beispiele für letztere Verbindungsklasse stellen das hydrolyseempfindliche 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) (1) und das stabilere α -Phenyl-N-*tert*-butylnitron (PBN) (2) dar.



5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
(DMPO)

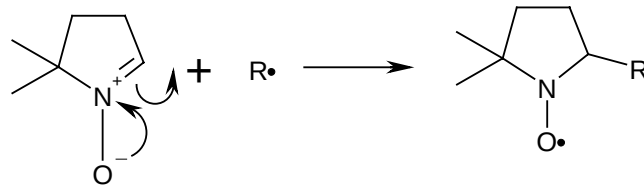
1



α -Phenyl-N-*tert*-butylnitron
(PBN)

2

Die Nitronen bilden bei der Reaktion mit kurzlebigen Radikalspezies Spin-Addukte höherer Stabilität (Gleichung 5), die ihrerseits freie Radikale darstellen und deshalb durch die ESR erfasst werden können.



Gleichung 5. Bildung eines Spin-Adduktes durch Reaktion eines Radikals ($R\cdot$) mit einem Molekül DMPO.

Das ESR-Signal der solchermaßen „eingefangenen“ Radikale darf durch den Spin-Trap in seiner Form nicht grundlegend verändert werden.

2 PROBLEMSTELLUNG

Die Proteinfaser Wolle wird von oxidierend wirkenden Stoffen angegriffen und meist irreparabel geschädigt. Das in den Sommermonaten verstärkt in Bodennähe gebildete Ozon ist neben Fluor das stärkste bekannte Oxidationsmittel.

Zur Klärung der Wirkung von Ozon auf Wolle soll zunächst anhand von ausgewählten Modellsubstanzen die Reaktion mit Ozon untersucht werden. Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Detektion von Abbau- oder Spaltprodukten, die bei der Ozonisierung auftreten. Als Modellsubstanzen werden Aminosäuren, Polyaminosäuren und Polyamid verwendet.

Die bei der Einwirkung auf die in der Wolle nur in den Seitenketten zu findenden ungesättigten Gruppen primär entstehenden Ozonide können unter Bildung von Radikalen zerfallen, die ihrerseits weitere Oxidationsvorgänge bewirken können.

Mikroskopische Methoden, hier vor allem die Rasterelektronenmikroskopie, können Aufschluss über die Veränderung der Oberflächentopographie der Wollfaser geben. Die Parameter für das Ausmaß der Schädigung der Wolle sollen ermittelt werden.

Angesichts der während der Ozonisierung als Zwischenstufen auftretenden Radikale liegt die Überlegung nahe, dass bei der Einwirkung von Ozon auf Wollmaterialien radikalische Abbau- bzw. Zwischenprodukte entstehen können. Stabile bzw. stabilisierte Radikale sind mittels Elektronenspinresonanz (ESR) detektierbar, so dass zu einer Aussage über die Vorgänge bei der durch Ozon bewirkten Veränderung von Wolle gelangt werden kann. Auch hier sollen zunächst anhand von Modellsubstanzen die Stellen, an denen Radikalbildung auftreten kann, lokalisiert werden.

Anschließend sollen die durch Untersuchung der Modellsubstanzen gewonnenen Erkenntnisse auf Wolle übertragen werden.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

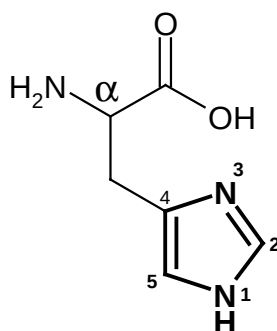
3.1 Ozonisierung von Aminosäuren und Modellsubstanzen

3.1.1 Histidin

Mittels Aminosäureanalyse können in Wolle insgesamt bis zu 24 Aminosäuren nachgewiesen werden³. Den größten Anteil hat dabei das Serin (Ser) mit 900 $\mu\text{mol/g}$, gefolgt von den Aminosäuren ohne reaktive Seitenketten (Glycin (Gly) 760 $\mu\text{mol/g}$, Leucin (Leu) 680 $\mu\text{mol/g}$ etc.). Weiterhin findet man große Mengen an Glutaminsäure (Glu) und Arginin (Arg) mit jeweils rund 600 $\mu\text{mol/g}$.

Mit lediglich rund 80 $\mu\text{mol/g}$ oder $0,835 \pm 0,110$ mol% gehört Histidin zu den durch saure Hydrolyse freisetzbaren Aminosäuren, deren Anteil an der chemischen Zusammensetzung der Wollfaser im unteren Bereich angesiedelt sind.

Die von PAULY postulierte⁷⁴ und von KNOOP und WINDAUS^{75,76} bestätigte Struktur des Histidins (3) besitzt insgesamt je zwei basische (die primäre Aminogruppe der Hauptkette und den sekundären Stickstoff im Imidazolring) und saure Zentren (die Carboxylgruppe der Hauptkette und den Pyrrolstickstoff im Imidazolring in Position 1).



3

Aufgrund seines Asymmetriezentrums am α -C-Atom kann Histidin in zwei möglichen Konfigurationen vorliegen; die natürlich vorkommende Struktur des Histidins ist die einer L-Aminosäure. In reiner isolierter Form ist Histidin als

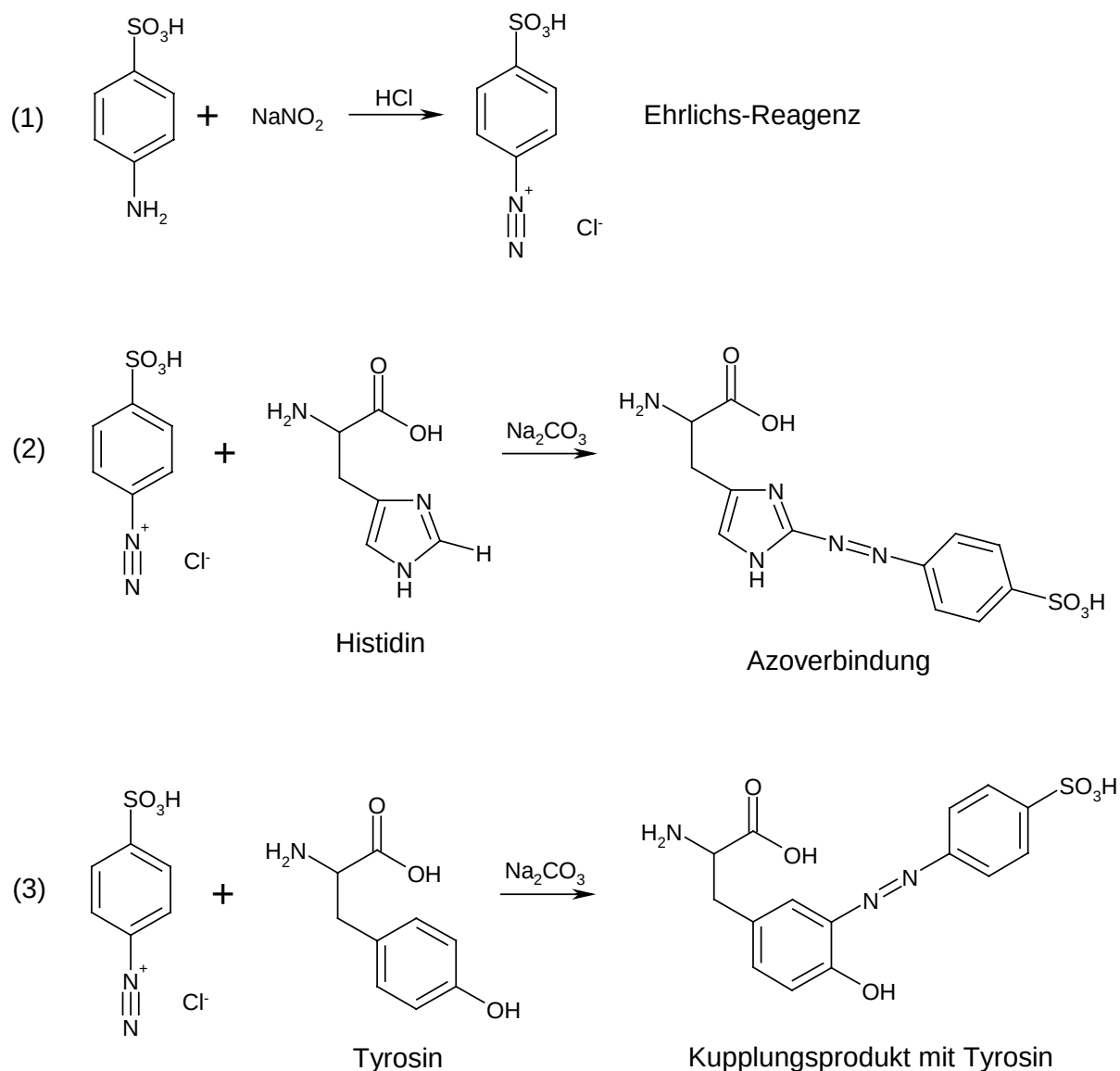
rohweißer, streufähiger Feststoff erhältlich, der mäßig bis gut in Wasser löslich ist (43 g/1000 ml bei 25 °C)⁷⁷.

Neben gut untersuchten oxidationsempfindlichen Aminosäuren wie Tryptophan oder Cystin stellt auch Histidin (3) trotz seines absolut gesehen geringen Anteils am Wollprotein einen möglichen Angriffspunkt in der Peptidkette der Wolle dar. So ist die C=C-Doppelbindung im Imidazolring der Seitenkette (in Fettdruck hervorgehoben) ein möglicher Ansatzpunkt für einen elektrophilen Angriff durch Ozon.

3.1.1.1 Auswahl der Analysenmethoden

Histidin und seine Abbauprodukte sollten sich aufgrund der zu erwartenden unterschiedlichen Polarität dünnschichtchromatographisch an Kieselgel unter Verwendung geeigneter Laufmittelsysteme trennen lassen. Als brauchbares Laufmittel hat sich eine Mischung aus Essigsäureethylester, Ethanol und Wasser im Volumenverhältnis von 6:5:2 erwiesen, wobei Ethanol als Lösungsvermittler zwischen Wasser und dem unpolareren Essigsäureethylester fungiert.

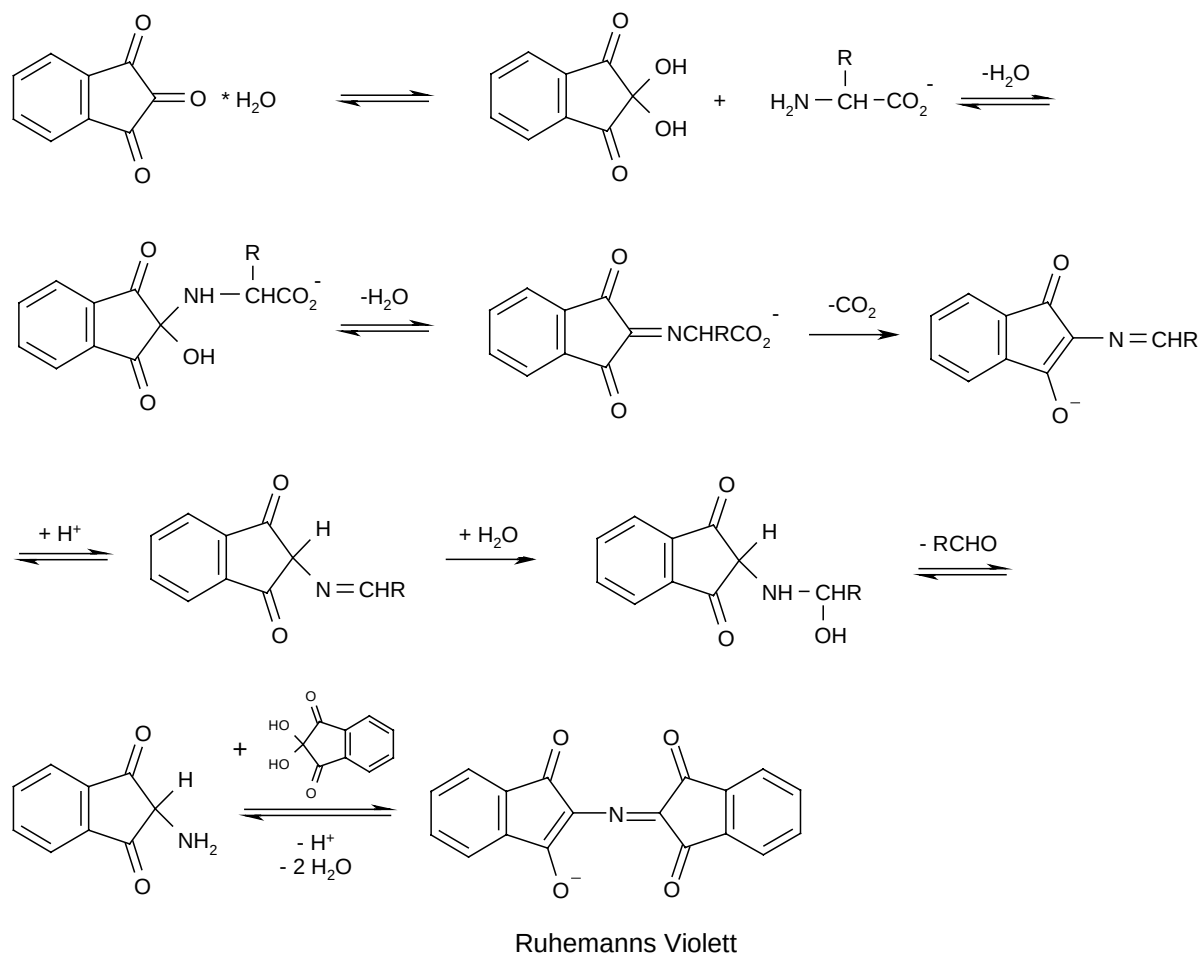
Die Entwicklung der DC-Platten erfolgt mit zwei unterschiedlichen Reagenzien. PAULY hat unter Verwendung von Ehrlichs-Reagenz Histidin mittels Azokuppung als roten Farbstoff nachweisen können⁷⁴. Zur Entwicklung der DC-Platten mittels Ehrlichs Reagenz müssen zwei Lösungen nacheinander auf die Platten gesprüht werden: die erste Komponente enthält Sulfanilsäure, Natriumnitrit sowie verdünnte Salzsäure in wässriger Lösung; als eigentliche Entwicklerlösung wird anschließend eine konzentrierte Sodalösung in Wasser aufgesprüht, bei deren Einwirkung die gelb bis rot gefärbten Produktflecken erscheinen (Gleichung 6). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 0,3 µg.



Gleichung 6. Bildung von Ehrlichs-Reagenz aus Sulfanilsäure, Natriumnitrit und Salzsäure [Gl.(1)], und Kupplung mit Histidin , [Gl. (2)], bzw. Tyrosin , [Gl. (3); Substitution des Benzolringes in *o*-Position, da *p*-Position blockiert ist], zur entsprechenden Azoverbindung (sog. Pauly-Reaktion⁷⁴).

Neben Histidin ist auch der Hydroxyphenylrest des Tyrosins mit Ehrlichs-Reagenz zu einer ebenfalls gefärbten Azoverbindung kuppelbar. Da die Untersuchungen aber an reinem Histidin durchgeführt wurden, ist eine Störung der Sensitivität dieser Nachweismethode durch Tyrosin somit auszuschließen.

Wie die meisten Aminosäuren wird auch Histidin durch eine alkoholische Ninhydrin-Lösung angefärbt. Bei Reaktion mit Aminosäuren wird in einem über mehrere Zwischenstufen führenden Mechanismus ein gefärbtes Produkt (Ruhemanns Violett) gebildet (Gleichung 7).



Gleichung 7. Darstellung der chemischen Abläufe bei der Bildung von Ruhemanns Violett durch Reaktion von Ninhydrin mit Aminosäuren⁷⁸.

Durch Anlagerung eines Wassermoleküls geht Ninhydrin über in ein Diol, welches unter Decarboxylierung und Abspaltung des entsprechenden Aldehyds unter Austausch der OH-Gruppe des Ninhydrins mit der primären Aminogruppe der Aminosäure reagiert. Durch Anlagerung eines weiteren Ninhydrinmoleküls und Abspaltung von Wasser entsteht bei gleichzeitigem Austritt eines Protons das blau bis violett gefärbte, als Ruhemanns Violett bezeichnete Anion⁷⁹. Die

zyklische Aminosäure Prolin bildet als einzige nicht Ruhemanns Violett sondern einen gelblichen Farbkörper aus, wodurch Prolin im Vergleich zu anderen Aminosäuren in der Dünnschichtchromatographie unmittelbar identifiziert werden kann.

Der aromatische Charakter des Imidazolringes im Histidin und die damit verbundene UV-Aktivität eröffnet eine weitere Detektionsmöglichkeit für Abbau- produkte, bei denen der Imidazolring noch intakt ist. In der High-Performance-Liquid-Chromatography-(HPLC)-Analytik an einer unpolaren stationären Phase (sog. reversed phase) bei Verwendung eines geeigneten Puffersystems erfolgt die Detektion der aufgetrennten Fraktionen bei einer Wellenlänge im nahen UV-Bereich ($\lambda = 220 \text{ nm}$). Eine Unterscheidung und Quantifizierung der Zahl der gebildeten, ebenfalls UV-aktiven Abbau- bzw. Reaktionsprodukte kann somit erfolgen.

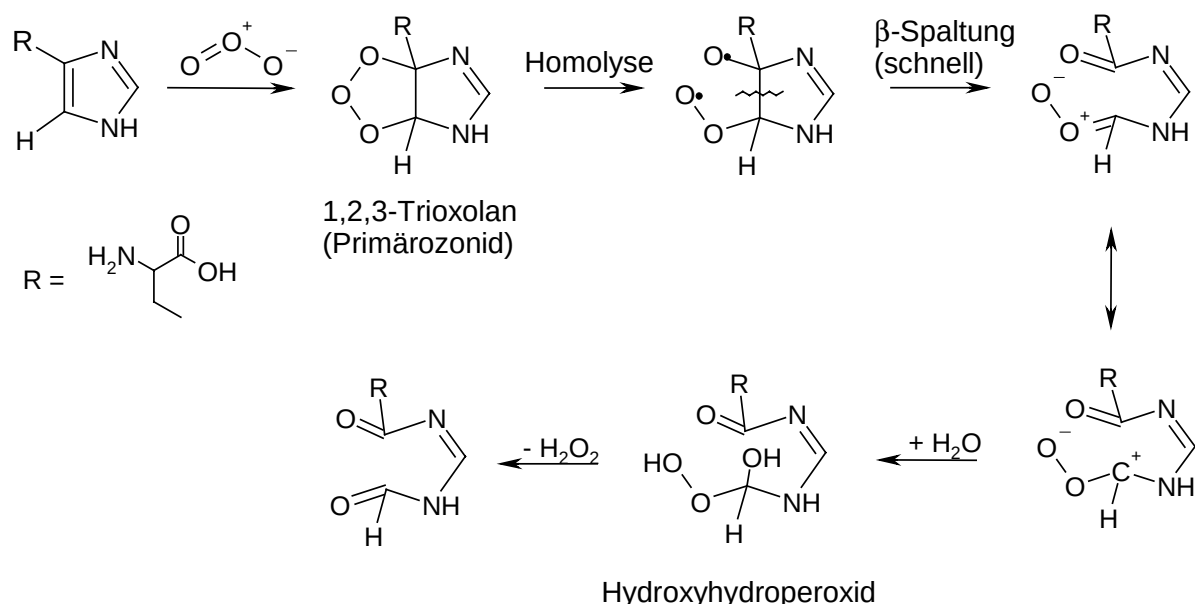
Eine etablierte Methode zur konstitutionellen Analytik stellt die Infrarotspektroskopie dar, bei der mittels Energie geeigneter Frequenzen Molekülschwingungen angeregt und detektiert werden, mit Hilfe derer auf das Vorhandensein funktioneller Gruppen geschlossen werden kann. Die Probenpräparation ist abhängig davon, in welcher Form die zu untersuchende Probe vorliegt. Da die Reaktionsprodukte der Ozonisierung von Histidin in fester Form gewonnen werden konnten, wurde die Analytik am KBr-Preßling durchgeführt.

Massenspektroskopische (MS-)Methoden können ebenfalls einen Aufschluss über die Art der gebildeten Abbauprodukte geben. Eine bezogen auf die Stofffreisetzung aus einer Probe „sanfte“ Methode steht mit der MALDI-TOF-MS-Methode zur Verfügung (MALDI-ToF= Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight). Dabei werden mittels Laserenergie kleinste Stoffportionen aus der Probenoberfläche verdampft, ionisiert, fragmentiert und beschleunigt.

nigt. Anschließend werden die Massen der Fragmente über die Flugzeiten bestimmt.

3.1.1.2 Abbaureaktionen des Histidin bei Oxidation durch Ozon

Die Ozonisierung von Histidin, bei der die C=C-Doppelbindung des Imidazolringes im Sinne einer 1,3-dipolaren Cycloaddition angegriffen wird, beinhaltet aufgrund der Einbindung der Doppelbindung in eine Ringstruktur einige grundlegende Änderungen im Vergleich zum schon behandelten „normalen“ Criegee-Mechanismus (vgl. Kap. 1.2.3).



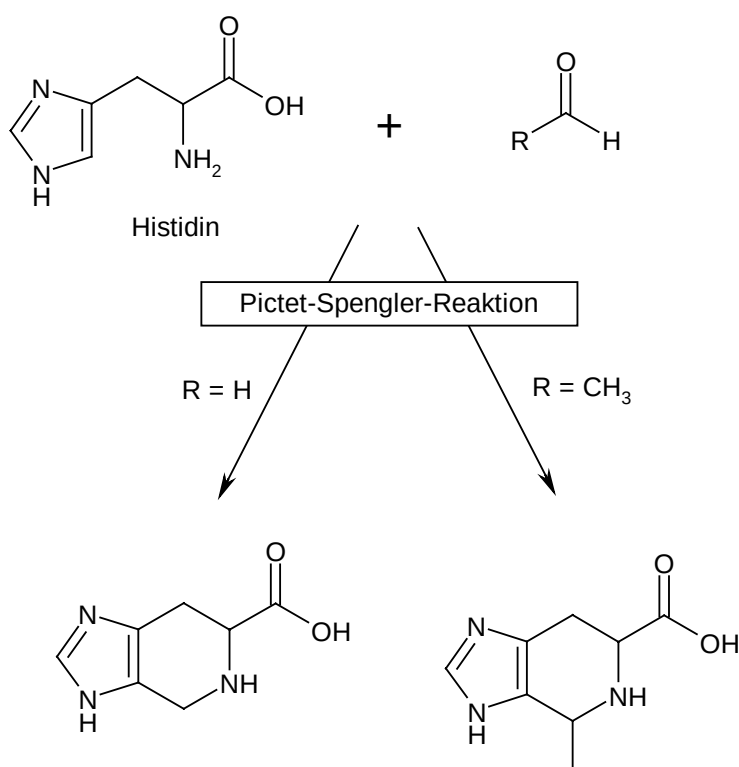
Gleichung 8. Hypothetischer Reaktionsablauf des Ozonsangriffs an die Imidazolgruppe des Histidins bei Annahme des Criegee-Mechanismus.

Im Falle des Histidins verhindert der noch intakte Teil des Imidazolrings die Bildung des Criegee-Ozonids, so dass sofort die Ausbildung des Hydroxyhydroperoxids und die nachfolgende Wasserstoffperoxidabspaltung erfolgt.

Aufbauend auf dem Criegee-Mechanismus ergänzt PRIOR diesen durch ein Schema, das beim Trioxolanzerfall die Bildung verschiedener Radikale fordert⁸⁰, was in der Folge zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten führen

kann, wenn man die Möglichkeit der Weiterreaktion auch mit Histidin selbst in Betracht zieht.

Ein sekundärer Prozeß kann bei der sog. Pictet-Spengler-Reaktion ablaufen, bei der Histidin mit Aldehyden, die bei der Ozonisierung gebildet werden können⁸¹, unter Cyclisierung des N-Terminus reagieren kann^{82,83} (Gleichung 9).



Gleichung 9. Umsetzung von Histidin mit Aldehyden in der Pictet-Spengler-Reaktion.

Desweiteren wird auch die Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) bei der Ozonisierung von Aminosäuren^{84,85} sowie die Bildung von OH-Radikalen diskutiert. Beide Spezies sind potentielle Reaktionspartner für das Histidin.

3.1.1.3 *Ozonisierung von Histidin in Substanz*

Histidin ist ein ungiftiger weißer, pulveriger und streufähiger Feststoff, der ohne weitere Vorkehrungen zu handhaben ist. Zunächst wurde das Verhalten des Histidins gegenüber Ozon untersucht. Dabei wird Histidin in Substanz der Ozonisierung unterworfen, indem in der weiter unten beschriebenen Apparatur trockenes Ozon Histidin (Schichtdicke bei 1 g Substanzmenge bedingt durch den Säulendurchmesser von ca. 5 mm) von unten nach oben durchströmt. Die Ozonisierungsdauer betrug dabei 2 h, die Ozonrate 230 mg/h. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der durch die Ozonisierung äußerlich unveränderten Substanz zeigt, dass bei den gewählten Bedingungen keine Abbauprodukte gebildet werden.

3.1.1.4 *Ozonisierung von Histidin in Lösung*

Aus den Ergebnissen der bisherigen Ozonisierungen in fester Phase geht hervor, dass der Histidinabbau bei trockener Begasung offenbar kaum fortschreitet. Es steht aber zu erwarten, dass ähnlich wie bei den Untersuchungen an Wolle bei hoher Luftfeuchtigkeit ein deutlich schnellerer Fortschritt der Oxidation stattfindet als in trockenem Zustand. Auf eine Ozonisierung mit feuchtem Ozon wird im folgenden verzichtet; vielmehr wird die Behandlung des Histidins direkt in Lösung durchgeführt.

3.1.1.4.1 Ozonverbrauch bei der Ozonisierung von Histidin

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Ermittlung des Ozonverbrauchs bei der Ozonisierung beschrieben^{86,87,88,89}. Als einfache und zuverlässige Methode hat sich die Iod-Thiosulfat-Titration erwiesen^{90,91}. Dabei wird ein Ozonstrom in eine wässrige Kaliumiodidlösung eingeleitet und die gebildete Iod-/Iodid-Lösung mit einer Natriumthiosulfatmaßlösung titriert. Durch Extrapolation kann die Menge des gebildeten Ozons ermittelt werden. Auf diese Weise wurde die Ozonrate unter den gewählten Geräteeinstellungen zu 230 mg/h (entspricht 4,8 mmol/h) bestimmt.

Zur Ermittlung des Ozonverbrauchs durch Histidin wird eine Differenzmethode angewandt, indem der Ozonstrom zunächst nach Durchgang durch reines Wasser in einer KI-Lösung aufgefangen und das entstandene I_2 titriert wird. Anschließend wird bei gleichen Ozonisierungsbedingungen (Ozonrate, Durchflussmenge) eine Histidinlösung ozonolytisch behandelt. In beiden Fällen wird also nicht verbrauchtes Ozon bestimmt.

Durch Auftragen der Differenz zwischen der Ozonaufnahme durch die KI-Lösung ohne bzw. mit vorgeschalteter Histidinlösung über die Ozonisierungsdauer sollte sich ermitteln lassen, zu welchem Zeitpunkt wie viel Ozon verbraucht wurde.

Die zunächst verwendete 0,05-molare Histidinlösung stellte sich als zu konzentriert heraus, als dass der erwartete Abfall der Verbrauchskurve innerhalb 30-minütiger Ozonisierung sichtbar würde. Daraufhin wurde die Konzentration an Histidin in der zu begasenden Lösung von 7,8 mg/l ($\equiv$ 0,05 mol/l) deutlich auf 1 mg/ml ($\equiv$ 0,0064 mol/l) verringert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 10 dargestellt. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Während der ersten 5 min Ozonisierungsdauer wurde eine Verbrauchsrate von 0,0136 mmol/min ermittelt. Nach 5 min ist eine deutliche Abnahme der Verbrauchsrate festzustellen. Im Zeitintervall zwischen 5 und 20 min sinkt diese auf

etwa ein Drittel ab; der Verbrauch an Ozon beträgt in diesem Zeitraum 0,0041 mmol/min. Danach fällt der Ozonverbrauch schlagartig ab. Zu diesem Zeitpunkt ist das Histidin vollständig oxidiert und das gebildete Ozon wird demnach zu 100 % in die KI-Lösung eingetragen.

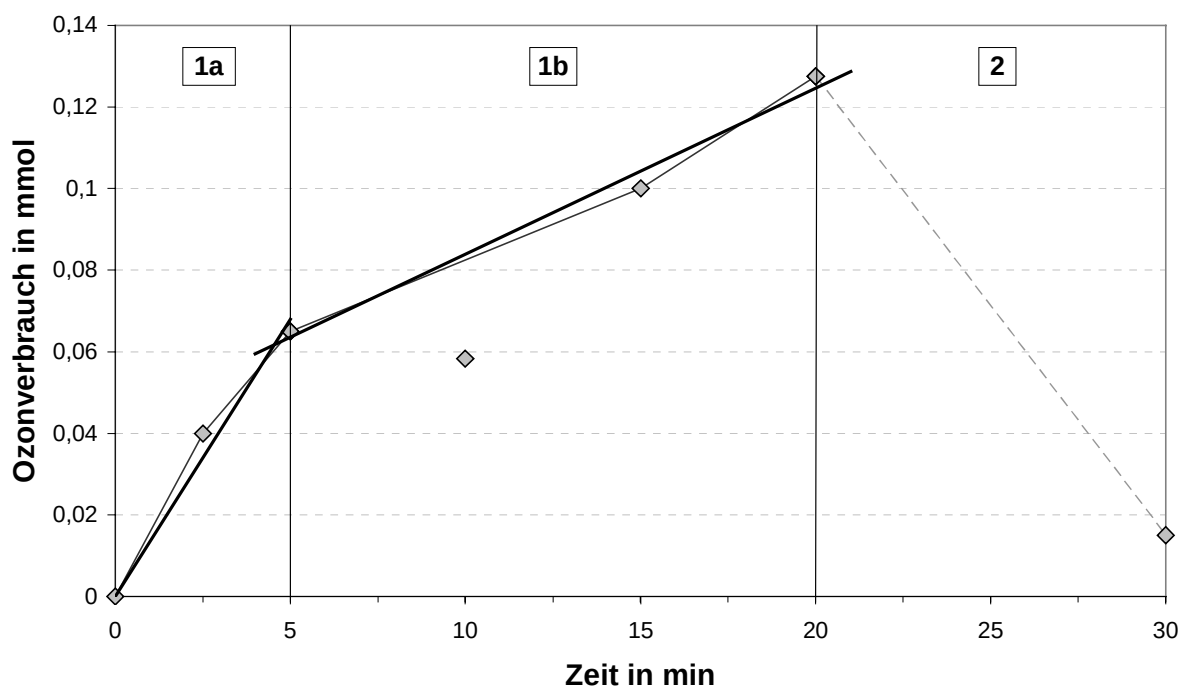


Abb. 10. Ozonverbrauch einer schwach konzentrierten Histidinlösung ($c = 0,0064$ mol/l, $V = 10$ ml). Der Verbrauch wurde durch Titration mit Natriumthiosulfat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und Vergleich der Histidinlösung mit reinem Wasser ermittelt. Der deutlich abweichende Messwert bei $t = 10$ min wurde bei der Ermittlung der Regressionsgeraden nicht berücksichtigt.

Tab. 3. Ermittlung des Ozonverbrauchs in mmol/min einer 0,0064molaren Histidinlösung (= 1g His/l) zu verschiedenen Zeiten während einer Gesamtreaktionszeit von 30 min. Die Verbrauchsrate innerhalb der Intervalle ergibt sich aus den Steigungen der Regressionsgeraden aus Abb. 10.

Zeitintervall	Bereich in Abb. 10	Ozonverbrauch in mmol/min
0-5 min	1a	0,0136
5-20 min	1b	0,0041
> 20 min	2	-

3.1.1.4.2 Änderung des pH-Wertes von Histidinlösungen bei Ozonisierung

Wie HPLC-analytische Untersuchung anzeigen werden, ist der ozonolytische Histidinabbau in Lösung abhängig ist vom pH-Wert der wässrigen Lösung (Kap. 3.1.1.4.4). Da bei der Ozonisierung ungesättigter Verbindungen Säuren als Endprodukte auftreten (so wird beispielsweise aus Cyclohexen bei Ozonisierung Adipinsäure gebildet), stellt sich nun die Frage, ob und in welchem Maße sich der pH-Wert einer ungepufferten wässrigen Histidinlösung ändert. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wird die Entwicklung des pH-Wertes einer ungepufferten Histidinlösung während der Ozonisierung verfolgt. Als Referenzen dienten zudem destilliertes sowie Leitungswasser. Der besseren Übersicht wegen sind die pH-Werte nicht absolut sondern als Veränderungen im Verhältnis zum Ausgangswert aufgetragen. Die Ausgangswerte für die Lösungen bzw. Flüssigkeiten sind nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tab. 4. pH-Werte verschiedener Medien vor Beginn einer Ozonbehandlung (t=0 s).

Untersuchtes Medium	pH-Wert bei t=0 s
Destilliertes Wasser	5,2
Leitungswasser	8,9
Histidin-Lösung (c= 0,05 mol/l)	6,9
Histidin-Lösung (c= 0,01 mol/l)	6,9

Bei Ozonisierung der verschiedenen Ausgangslösungen ist während der ersten 10 min Begasungsdauer generell eine Abnahme des pH-Wertes zu verzeichnen (Abb. 11). Der pH-Wert des Leitungswasser pendelt sich anschließend bei einer Differenz von $\Delta\text{pH}=0,4$ ein, während der pH-Wert des destillierten Wassers langsam weiter abnimmt. Im Falle der 0,05-molaren Histidinlösung ist eine deutliche Abnahme des pH-Wertes zu verzeichnen, deren Rate sich nach einem anfänglichen Wert von etwa 0,05/min auf 0,02/min vermindert. Auch nach 60-

minütiger Ozoneinwirkung sinkt der pH-Wert weiterhin mit der Rate von 0,02/min.

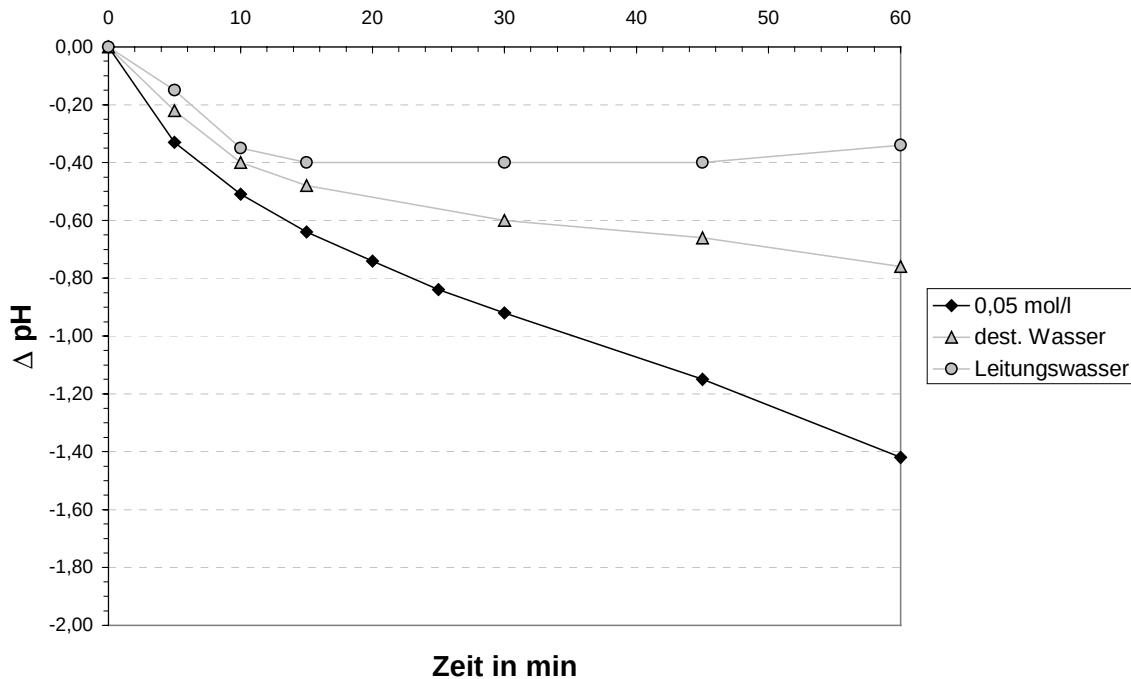


Abb. 11. pH-Wertveränderung einer mäßig konzentrierten Histidinlösung ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) bei Begasung mit Ozon in Abhängigkeit von der Behandlungszeit. Als Referenz sind ebenfalls die Werte für Leitungs- bzw. destilliertes Wasser eingetragen.

Die stetige Abnahme des pH-Wertes deutet darauf hin, dass dieser in ursächlichem Zusammenhang mit der Histidinkonzentration steht. Im Folgeschluss sollte nach Abbau der gesamten Histidinmenge in der Lösung der pH-Wert nicht oder nur noch wenig weiter abnehmen. Zur Sichtbarmachung eines Effektes bzw. zur Detektion des Endpunktes des Histidinabbaus wird im folgenden die Konzentration der Ausgangslösung von 0,05 auf 0,01 mol/l verringert und diese Lösung erneut bei gleichen Bedingungen der Ozonisierung unterworfen (Abb. 12, Tab. 5).

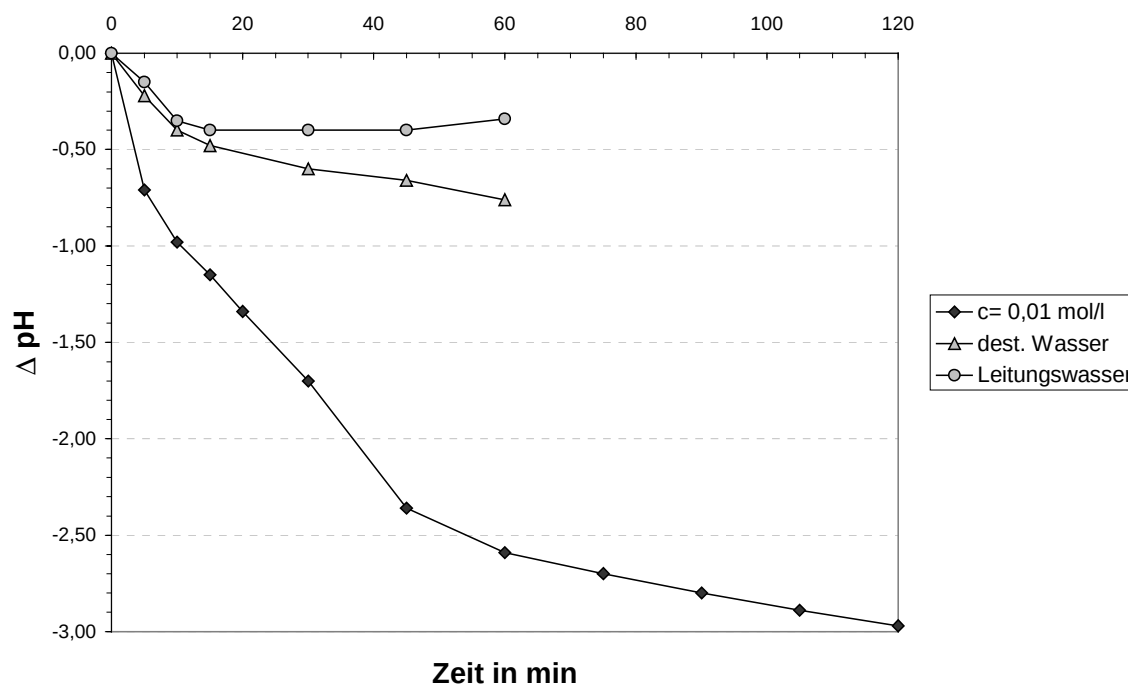


Abb. 12. pH-Wert-Veränderung einer schwach konzentrierten Histidinlösung ($c = 0,01 \text{ mol/l}$) bei Begasung mit Ozon in Abhängigkeit von der Behandlungszeit. Als Referenz sind ebenfalls die Werte für Leitungs- bzw. destilliertes Wasser eingetragen.

Tab. 5. Abnahmeraten des pH-Wertes bei Ozonisierung einer 0,01-molaren Histidinlösung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

	Zeit in min	Abnahme pH-Wert	Verhältnis A:B:C
A	0-5	0,12/min	15
B	5-45	0,04/min	5
C	45-120	0,008/min	1

Der Verlauf der pH-Abnahme kann anhand von Abb. 12 in drei Bereiche eingeteilt werden. Während der ersten fünf Minuten der Ozonisierung nimmt der pH-Wert der Histidinlösung mit einer Rate von 0,12/min ab. Diese Rate sinkt zwischen 5 und 45 min Reaktionszeit auf 0,04/min. Nach 45 min ist eine erneute Abnahme zu verzeichnen: bis 120 min Reaktionszeit sinkt die Abnahmerate des pH-Wertes auf unter 0,01/min und damit auf den Wert destillierten Wassers. Die ermittelten Sinkraten stehen somit im Verhältnis von 15:5:1. Der Vergleich mit

der Abnahmerate für destilliertes Wasser zeigt also, dass nach rund 45 min kein Ozon mehr durch das Histidin verbraucht wird, dass also Histidin bei den gewählten Versuchsbedingungen größtenteils oxidiert worden ist.

3.1.1.4.3 Auftrennung und Identifizierung der gebildeten Histidinabbauprodukte

Bei der Ozonisierung hochkonzentrierter Histidinlösungen mit Konzentrationen nahe der Löslichkeitsgrenze ($c = 40 \text{ g/l} \equiv 0,257 \text{ mol/l}$) tritt mit zunehmender Begasungsdauer eine Verfärbung der Lösung von beinahe farblos bei kurzzeitiger Exposition gegenüber Ozon bis hin zu einem intensiven Gelbton bei längerer Behandlungszeit auf. Lässt man diese Lösungen über einige Tage im Dunklen stehen, so intensiviert sich diese Verfärbung je nach Behandlungsdauer bis hin zu einer zinnoberroten Färbung (Abb. 13). Diese Farbentwicklung ist bereits von Tryptophan bekannt, ist dort aber um ein Vielfaches stärker, so dass sich schon nach kurzer Zeit intensiv rotbraun gefärbte Lösungen bilden.

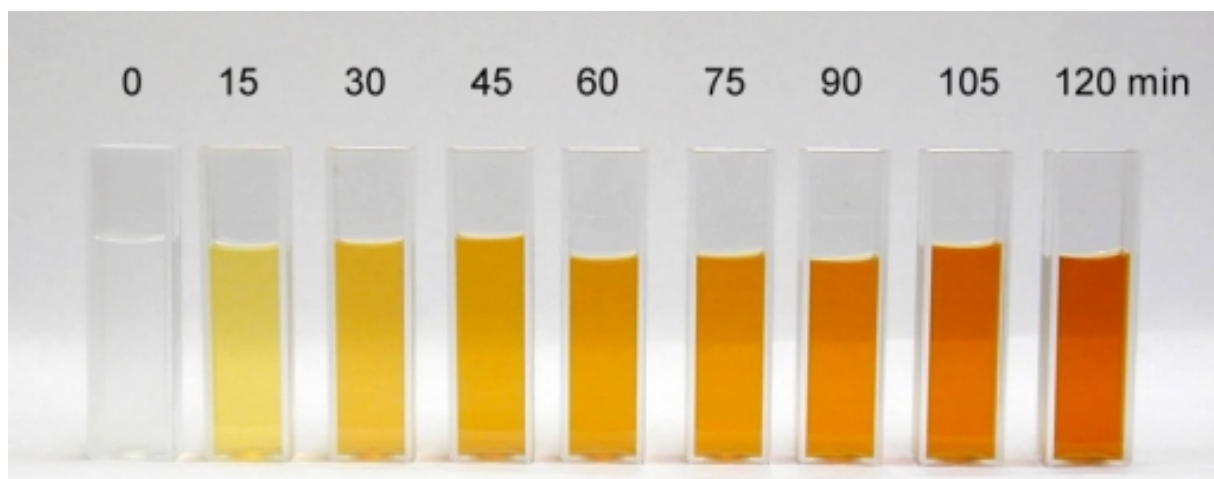


Abb. 13. Farbänderungen unterschiedlich lang ozonisierter Histidinlösungen ($c = 40 \text{ g/l} \equiv 0,257 \text{ mol/l}$) nach fünftägiger Dunkelreaktion (0 min = unbehandelt als Referenz; vgl. Messdaten in Abb. 14).

Unterwirft man diese Lösungen zur weiteren Analytik der Gefriertrocknung, so variiert die Färbung der Produkte ebenfalls von zitronengelb bis dunkelbraun. Die leicht hygroskopischen Produkte zeichnen sich durch eine deutlich bessere Löslichkeit, Ausdruck einer erhöhten Hydrophilie, im Vergleich zum unbehandelten Histidin aus.

Betrachtet man die Absorptionsmaxima und die Wellenlängen, bei der das jeweilige Maximum auftritt, so stellt man fest, dass sich nicht nur die Wellenlänge bei längeren Behandlungszeiten zu höheren Werten verschiebt, sondern dass gleichzeitig der maximale Wert der Absorption ansteigt und sich asymptotisch einem Grenzwert annähert (Abb. 14).

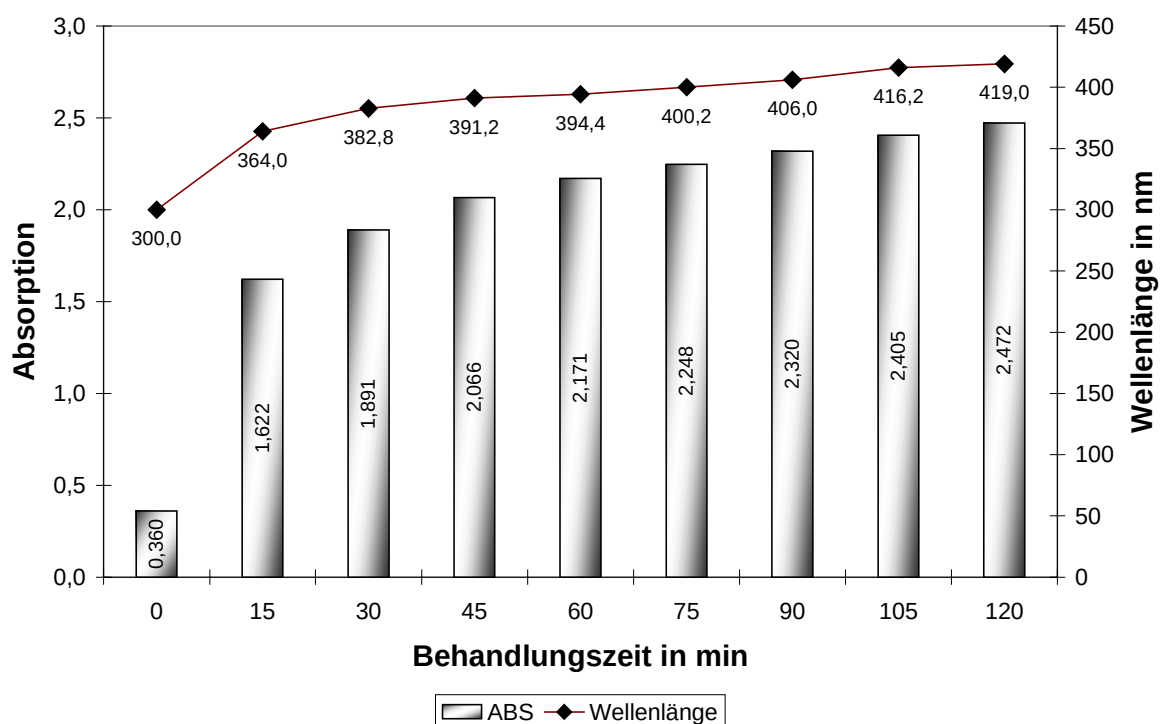


Abb. 14. Absorption (ABS) und Wellenlänge unterschiedlich lange ozonisierter Histidinlösungen ($c = 40 \text{ g/l} \equiv 0,257 \text{ mol/l}$) nach fünftägiger Dunkelreaktion (0 min = unbehandelt als Referenz; Messdaten zu Abb. 13).

In einer Wiederholung der Ozonisierung mit identischen Parametern wurde nach zweitägiger Dunkelreaktion eine dünnschichtchromatographische Auftrennung

der erhaltenen wässrigen Lösungen vorgenommen (Abb. 15). Die zugehörigen R_f -Werte finden sich in Tab. 6 wieder.

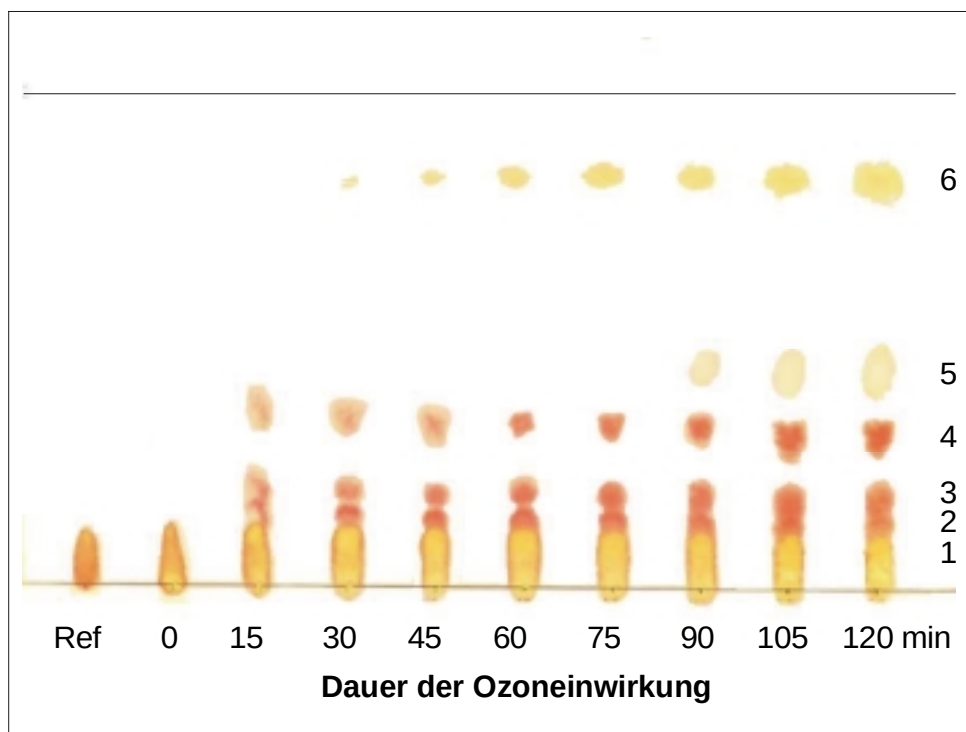


Abb. 15. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Ozonisierungsprodukte einer Histidinlösung der Konzentration ($c = 0,257 \text{ mol/l}$; $230 \text{ mg O}_3/\text{h}$) nach zweitägiger Dunkelreaktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (Laufmittel: $\text{EE}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 6:5:2, Entwickler: Pauly-Reagenz; DC-Scan wurde zwecks verbesserter Darstellung digital nachbearbeitet).

Tab. 6. R_f -Werte zu den im Dünnschichtchromatogramm in Abb. 15 nachgewiesenen Produktflecken.

Produkt-Nr. aus Abb. 15	R_f -Wert
1	0,10
2	0,16
3	0,21
4	0,34
5	0,44
6	0,88

Mit zunehmender Ozonisierungsdauer lassen sich insgesamt sechs Ozonisierungsprodukte nachweisen, die unterschiedliches Retentionsverhalten in der Dünnschichtchromatographie zeigen. Bei gleich bleibender Auftragsmenge der Lösungen auf der Startlinie kann anhand der Intensität der Färbung der Produktflecken grob die Bildung bzw. der Abbau einzelner Produkte eingeschätzt werden. Die Intensität der Produktflecken 2 und 3 nimmt zunächst bis zu einer Ozonisierungszeit von 60 min zu und schwächt sich nachfolgend wieder ab. Die Bildung der Produkte 4 und 6 nimmt über die gesamte Begasungsdauer zu, während Produkt 5 erst nach längerer Exposition gebildet wird.

Aus den dünnschichtchromatographischen Trennungen (s.o) ist ersichtlich, dass sich die Verteilung der Ozonisierungsprodukte mit zunehmender Dauer der Oxidationszeit verändert. Zur näheren Untersuchung wurde mittels HPLC eine Zeitstudie unternommen, die Aufschluß über die Verteilung der Intensitäten geben und herausstellen soll, wie sich die Verteilung der Produkte gestaltet und welcher Art mögliche Veränderungen sind. Es soll untersucht werden, ob eine Fluktuation innerhalb der Produkte stattfindet, d.h. ob Produkte, die sich während der Ozonisierung bilden, unter Umständen auch wieder abgebaut werden, wenn die Dauer der Ozoneinwirkung lange genug gewählt wird. Abb. 16 stellt die Veränderung einer 0,05-molaren Histidinlösung nach 30-minütigen Durchleitens von Ozon einer unbehandelten Histidinlösung gleicher Konzentration gegenüber.

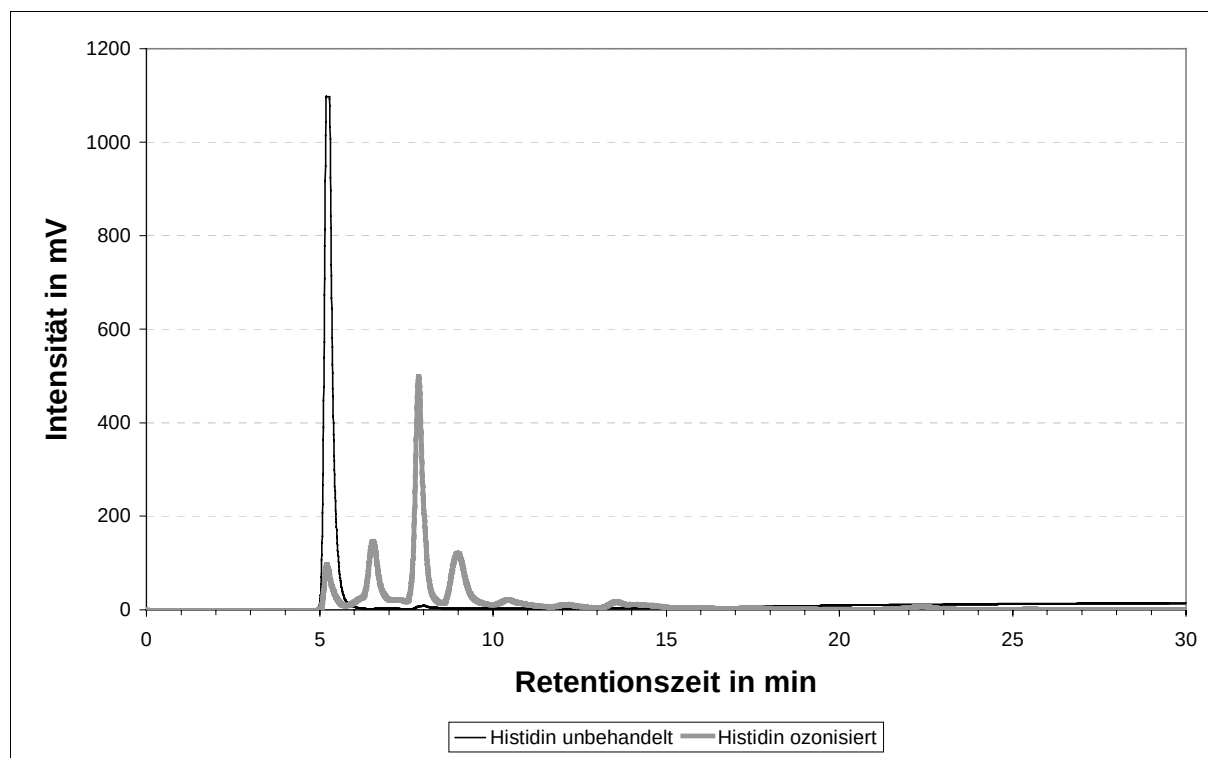


Abb. 16. Vergleichendes HPLC-Chromatogramm zur Histidinozonisierung mit unbehandeltem reinen Histidin (dünne Linie) und ozonisiertem Histidin (dicke Linie); Ozonbehandlung: 10 ml 0,05 mol/l wässrige Lösung, 30 min Ozon bei 230 mg O₃/h; Eluent: TEAP-Puffer, c=0,02 mol/l, pH 3,0.

Das Signal des unbehandelten Histidin erscheint weit vorne im Chromatogramm. Es wird bereits nach einer Retentionszeit von 5,2 min vom Detektor erfasst. Weitere Signale werden nicht aufgezeichnet. Nach einer Ozonisierungszeit von 30 min ist die Intensität des Histidinsignals aufgrund des oxidativen Abbaus deutlich vermindert. In der Folge werden mehrere Abbauprodukte detektiert. Nach 6,5, 8 und 9 min sind Produktsignale mit einer Intensität zu sehen, die die des Histidinrestsignals teilweise deutlich übersteigt. Zwischen 10 und 15 min Retentionszeit sind drei weitere intensitätsschwache Signale auszumachen.

Zur Untersuchung der eingangs erwähnten möglichen Intensitätsveränderungen, somit der Neubildung bzw. des Abbaus der bei der Histidinoxidation gebildeten Abbauprodukte, zeigen Abb. 17a) und b) das Ergebnis einer Zeitstudie zum Histidinabbau in Form mehrerer überlagerter Chromatogramme, die zur

besseren Unterscheidung farblich hervorgehoben sind. Die Behandlungszeiten wurden zwischen 15 und 450 min variiert. Über die Bezeichnung der Produktsignale bzw. deren Korrelation mit den Retentionszeiten gibt Tab. 7, zu den Intensitätsverhältnissen Tab. 8 Auskunft.

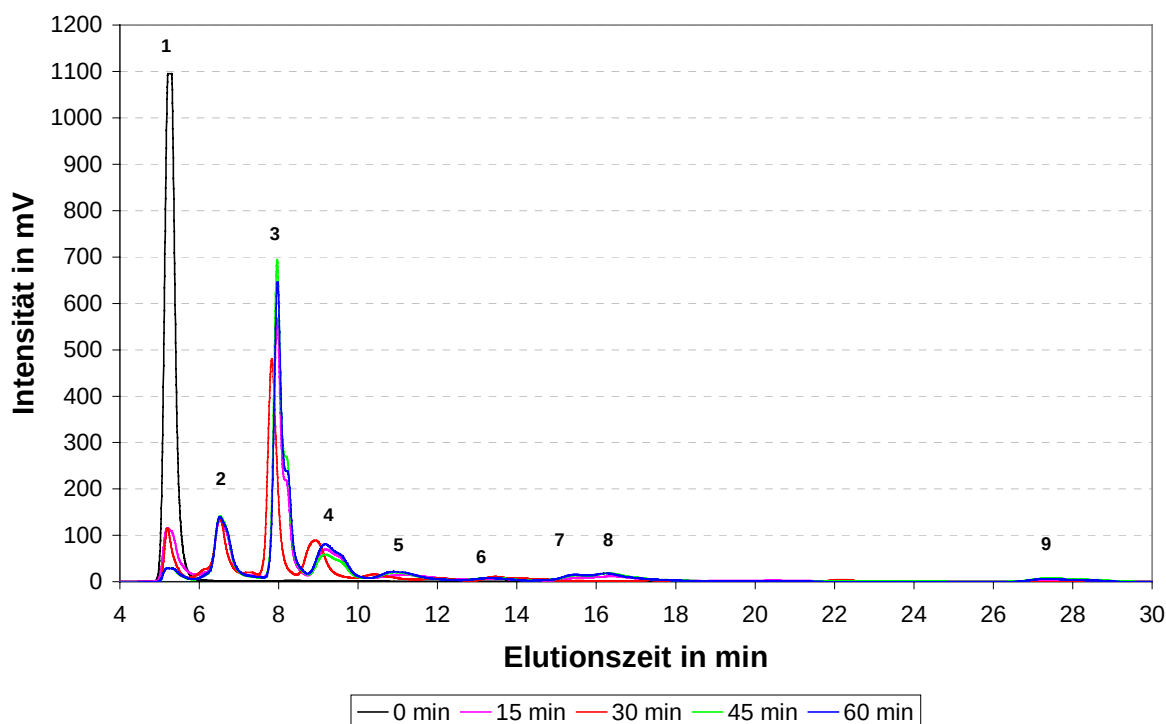


Abb. 17a). HPLC-Chromatogramm unterschiedlich lang ozonisierter Histidin-Lösungen im Vergleich zum unbehandelten Histidin (0 min), Begasungszeiten 15, 30, 45 und 60 min (weitere siehe Abb. 17b); $c_{\text{His}} = 0,05 \text{ mol/l}$, Ozonbehandlung bei $230 \text{ mg O}_3/\text{h}$; Eluent: TEAP, $c=0,02 \text{ mol/l}$, pH 3,0. Zur Nummerierung der Peaks siehe Tab. 7 und Tab. 8.

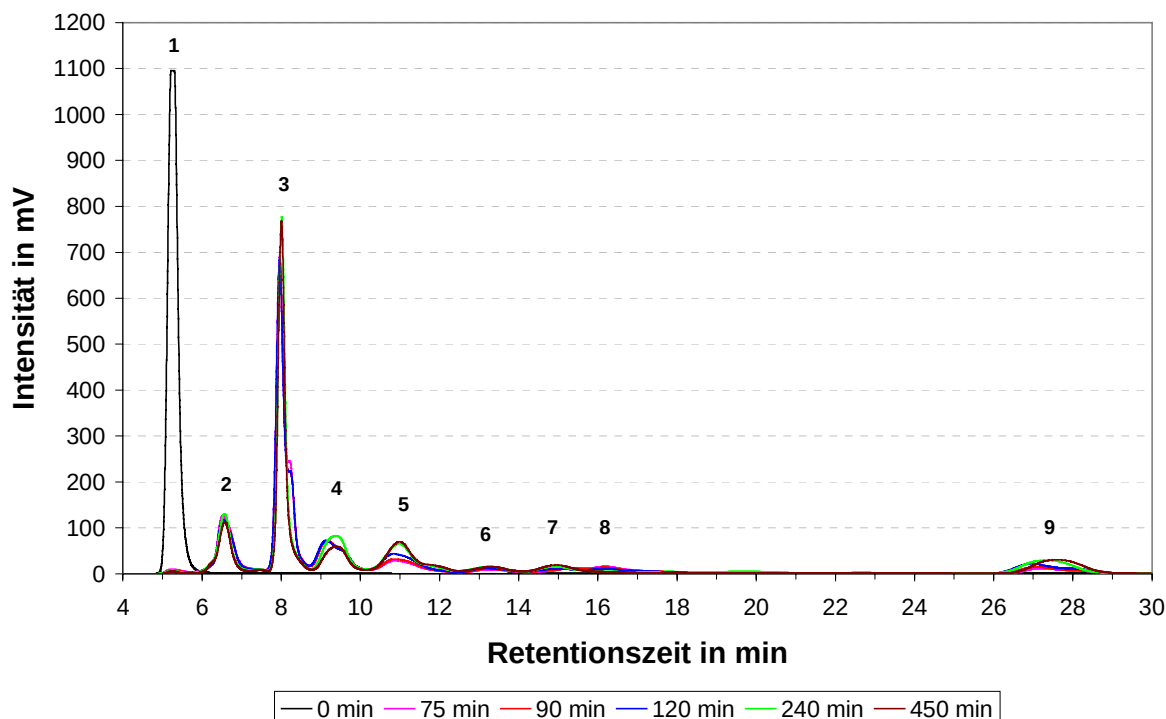


Abb. 17b). HPLC-Chromatogramm unterschiedlich lang ozonisierter Histidin-Lösungen im Vergleich zum unbehandelten Histidin (0 min), Begasungszeiten 75, 90, 120, 240 und 450 min (weitere siehe Abb. 17a); $c_{\text{His}} = 0,05$ mol/l, Ozonbehandlung bei 230 mg O_3/h ; Eluent: TEAP, $c=0,02$ mol/l, pH 3,0. Zur Nummerierung der Peaks siehe Tab. 7 und Tab. 8.

Tab. 7. Zuordnung der Retentionszeiten der Produktpeaks aus der HPLC-Analytik ozonisierter Histidinlösungen.

Retentionszeit t_R in min	$t_{R,\text{max}} - t_{R,\text{min}}$ in min	Peak-Nr.
5,20-5,25	0,05	1 (Histidin)
6,52-6,58	0,06	2
7,96-8,01	0,05	3
9,14-9,41	0,27	4
10,84-11,22	0,38	5
13,19-13,41	0,22	6
14,93-15,66-	0,69	7
16,16-16,37	0,21	8
26,96-27,7	0,74	9

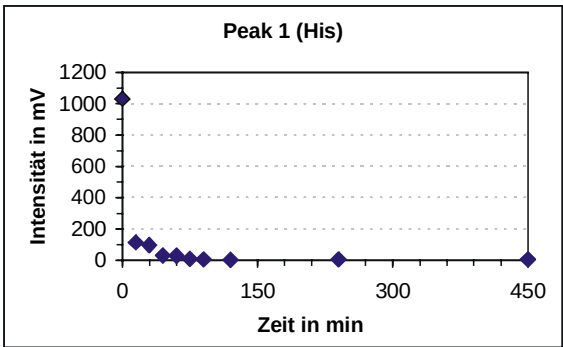
Die Zuordnung der Retentionszeiten zu den einzelnen Produktsignalen zeigt, dass die Lage der Peaks mit zunehmender Retentionszeit stärker streut: während die Signale 1 (Histidin-Signal) bis 3 über alle Auftrennungen nur im Bereich von rund 0,05 min (= 3s) variieren, steigt die Differenz bis zum Signal 9 auf 0,74 min (45 s) an.

Tab. 8. Intensitäten (als Peakhöhen) in mV der in Abb. 17 dargestellten Produktsignale der mittels HPLC nachgewiesenen Abbauprodukte (Signalnummerierung gemäß Tab. 7).

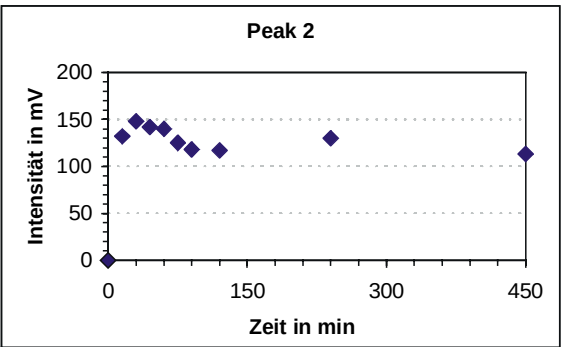
Reaktionszeit in min	Signal-Nr.								
	Intensität in mV (Peakhöhen)								
	1 (His)	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1032	-	-	-	-	-	-	-	-
15	115	132	566	69	14	5	8	11	2
30	97	148	499	121	22	12	18	-	-
45	30	142	695	59	20	9	14	19	8
60	29	140	646	81	22	8	16	19	7
75	9	125	692	72	28	9	13	15	12
90	6	118	650	72	32	10	11	13	14
120	3	117	685	72	43	12	10	10	21
240	6	130	776	82	65	15	15	-	28
450	6	113	768	60	70	15	19	-	31

Anhand der Peakhöhen kann zudem eine Zuordnung nach Haupt- und Nebenprodukten getroffen werden. Als Hauptprodukt wird Signal 3 angesehen, wichtige Nebenprodukte zeigen die Signale 2 und 4 an, weitere Nebenprodukte stellen die Signale 5 und 9 dar. Untergeordnet, jedoch nicht zu vernachlässigen, sind die Signale der Produkte 6-8, die nur in geringen Mengen gebildet werden.

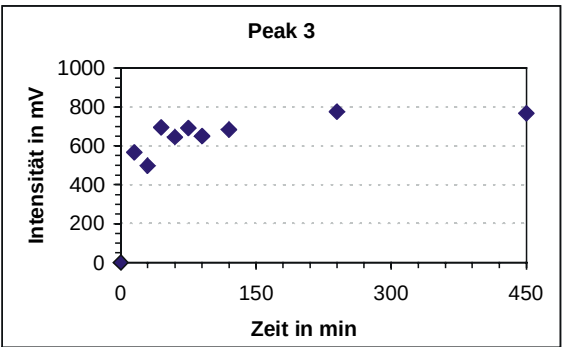
Zur besseren Unterscheidung und Verdeutlichung der Tendenz der Bildung bzw. eines möglichen weiteren Abbaus der Ozonisierungsprodukte sind die Intensitäten aus Tab. 8 für die einzelnen Peaks gesondert in Abb. 18. a)-i) dargestellt.



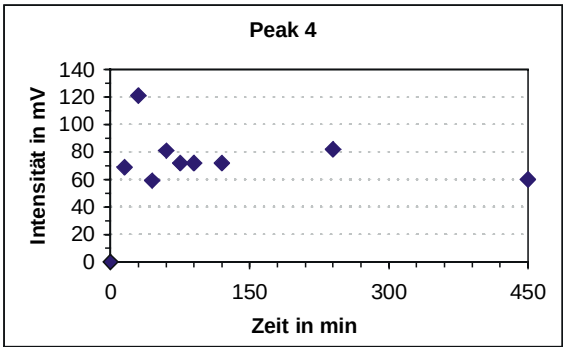
a)



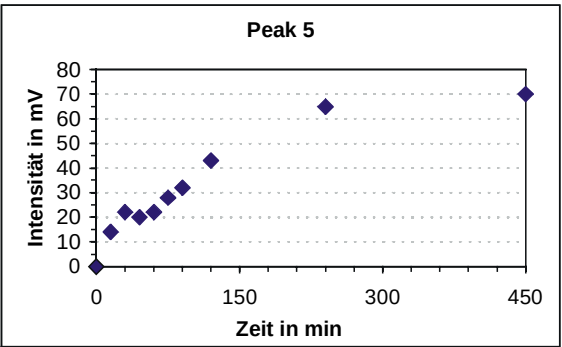
b)



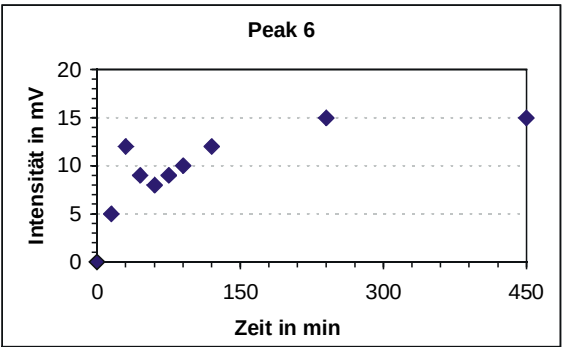
c)



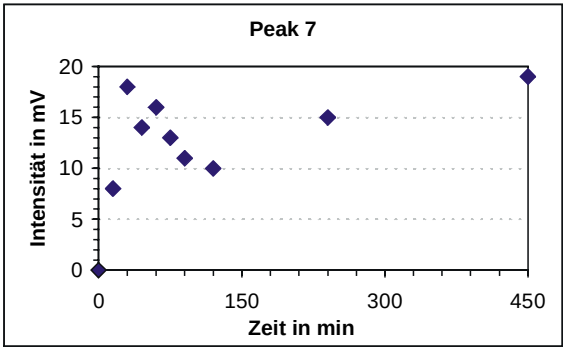
d)



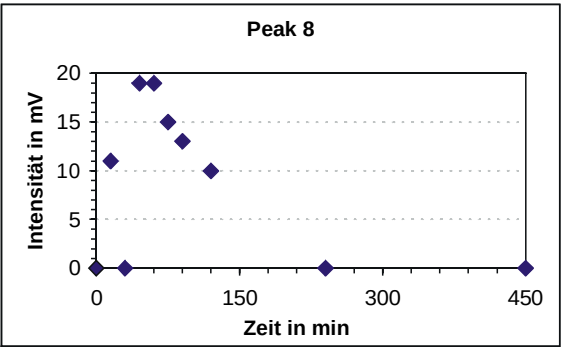
e)



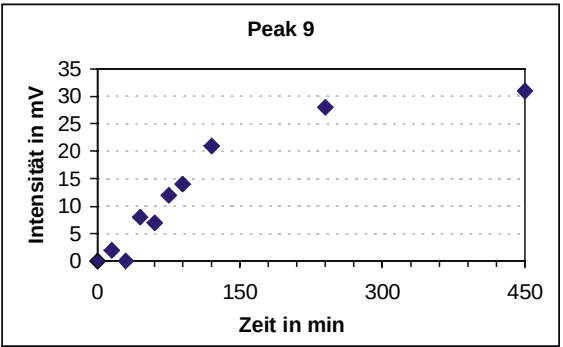
f)



g)



h)



i)

Abb. 18 a)-i). Veränderung der Intensität (Peakhöhen) der mittels HPLC-Analytik nachgewiesenen Produkte bei Ozonisierung von Histidin in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer nach Einzelsignalen (Peak 1-9) aufgeteilt (vgl. Abb. 17 und Tab. 8).

Aus Abb. 18a) ist der Histidinabbau (Peak 1) deutlich ersichtlich. Der Abbau findet anfangs sehr schnell statt: nach nur 15-minütiger Behandlung mit Ozon ist die Peakhöhe bereits auf 11 % der Ausgangshöhe zurückgegangen. Danach nimmt die Peakhöhe deutlich langsamer ab, und nach 450 min Ozonisierungsdauer beträgt die nachgewiesene Restmenge an Histidin gemessen an der Peakhöhe nur noch rund 0,5 % des ursprünglichen Wertes.

Für die folgende Betrachtung der Intensitätsverläufe der Abbauprodukte kann man die Einzelsignale wiederum in Gruppen einteilen, wobei die Gruppen nach prinzipiellem Veränderung der Intensitäten zu unterscheiden sind: zur ersten Gruppe können die Peaks 3,5,6 und 9 zusammengefasst werden, die allesamt einen schnellen Anstieg der Intensität aufweisen. Die Peaks 4 und 7 weisen prinzipiell ähnliche Verläufe auf wie die der Vorgruppe, jedoch ist die Entwicklung im Behandlungszeitraum zwischen 15 und 60 min uneinheitlich. Praktisch keine sichtbaren Veränderungen der Peakintensität weist das Produkt Nr. 2 auf, dessen Intensität nach 450-minütiger Ozonisierung den gleichen Wert aufweist wie zu Beginn der Behandlung. Einzig Produkt Nr. 8 weist im Verlauf der Ozonisierung zunächst eine Zunahme der Intensität auf; nach einer Ozonisierungsdauer von 60 min aber nimmt die Intensität wieder ab, so dass das Produkt nach 240 min unter die Nachweisgrenze der HPLC-Analytik absinkt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass abgesehen von einer Ausnahme (Produkt Nr. 8) die Abnahme der Ausgangssubstanz Histidin einhergeht mit einer über die Ozonisierungsdauer nachgewiesenen stetigen Zunahme (Produkte 3-7) und oder gleich bleibenden Menge (Produkt 2) an Abbauprodukten.

In einer zweiten Studie wurde die Bildung der Abbauprodukte des Histidins während der Ozonisierung einer deutlich niedriger konzentrierten Lösung über

einen kürzeren Zeitraum ($t = 2,5\text{--}30\text{ min}$) und in kürzeren Intervallen verfolgt (Abb. 19).

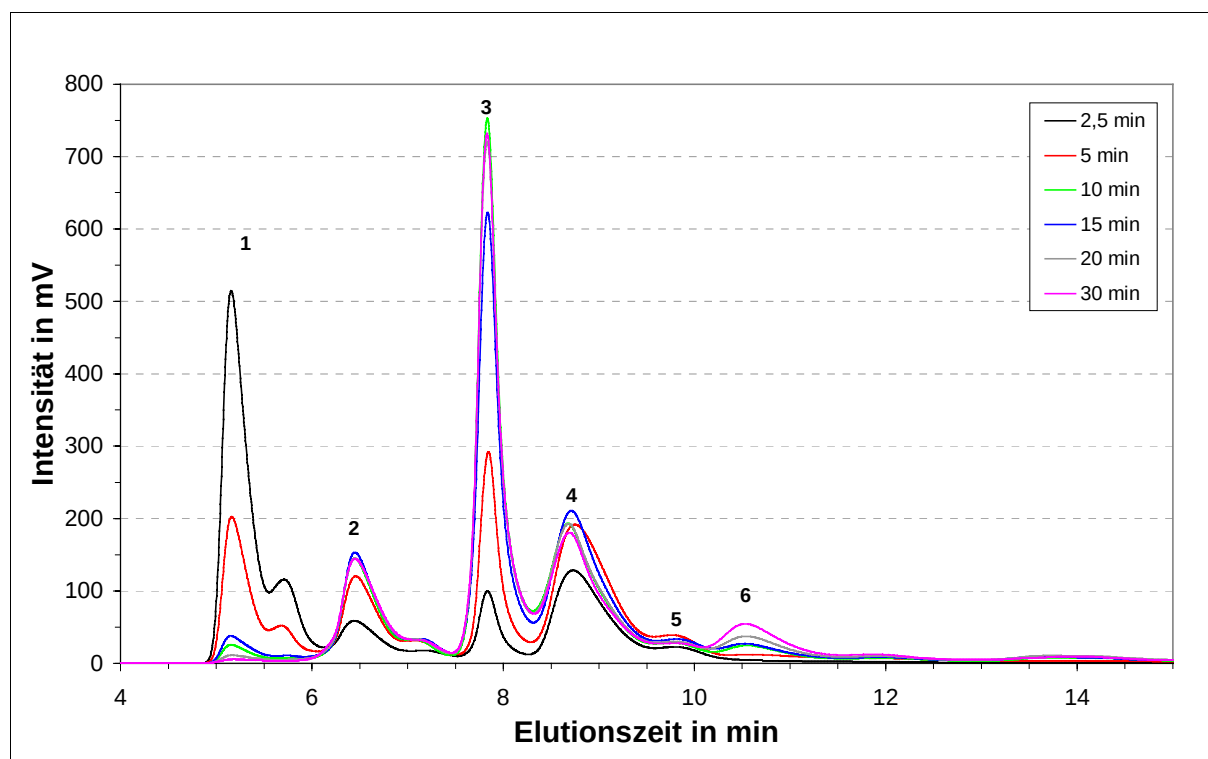


Abb. 19. Überlagerung der HPLC-Trennungen nach verschiedenen Begasungszeiten zur Ermittlung des Ozonverbrauchs von Histidin in Abhängigkeit von der Begasungszeit ($c_{\text{His}} = 0,064\text{ mol/l}$, Ozonbehandlung bei $230\text{ mg O}_3/\text{h}$ Elutionsmittel: TEAP-Puffer $0,02\text{ mol/l}$, pH $3,0$, Flussrate $0,5\text{ ml/min}$).

Jenseits des in Abb. 19 dargestellten Elutionsbereich wurden aufgrund der niedrigeren Konzentration der Histidinlösung keine weiteren Signale aufgezeichnet. Das zusätzliche Signal in der Nähe des Histidinpeaks könnte auf eine Verunreinigung der Stammlösung zurückzuführen sein. Ein Vergleich mit Imidazol zeigt, dass dieses bei den gewählten Parametern einen Retentionswert von $5,65\text{ min}$ aufweist, so dass eine mögliche Abspaltung von Imidazol für den Seitenpeak des Histidinsignals verantwortlich sein könnte.

Der Histidinabbau folgt den bereits beschriebenen Beobachtungen und ist in Tab. 9 und Abb. 20 dargestellt. Auch die Bildung der ozonbedingten Abbauprodukte kann erneut nachvollzogen werden. Als Hauptprodukt erweist sich das mit

Signal 3 bezeichnete Produkt, dessen Peakhöhe im Verlauf der Reaktionszeit drastisch ansteigt. Ebenfalls in der Intensität des gemessenen Signals steigen die Produkte 2 und 6 an, wenn auch nicht so dramatisch wie Produkt 3. Im Gegensatz zu den weiter oben beschriebenen Ergebnissen ist in diesem Fall kein Produkt zu finden, das einem Sekundärabbau unterliegt. Ozonolytisch abgebaut wird einzig und allein die Ausgangssubstanz Histidin.

Tab. 9. Intensitäten (als Peakhöhen) in mV der in Abb. 19 dargestellten Signale mittels HPLC nachgewiesenen Abbauprodukte bei der Ozonisierung einer wässrigen Histidinlösung der Konzentration $c_{\text{His}} = 0,064 \text{ mol/l}$ (Signalnummerierung gemäß Abb. 19).

Reaktionszeit in min	Signal-Nr. Intensität in mV (Peakhöhen)					
	1 (His)	2	3	4	5	6
2,5	514,7	58,8	99,9	128,6	22,7	5,8
5	202,4	120,5	291,8	192,0	39,1	12,3
10	25,7	144,8	752,9	193,2	28,5	24,8
15	38,2	153,3	623,0	209,9	33,4	27,6
20	11,3	145,3	719,9	192,9	30,2	37,7
30	5,8	144,3	731,7	180,8	28,0	54,5

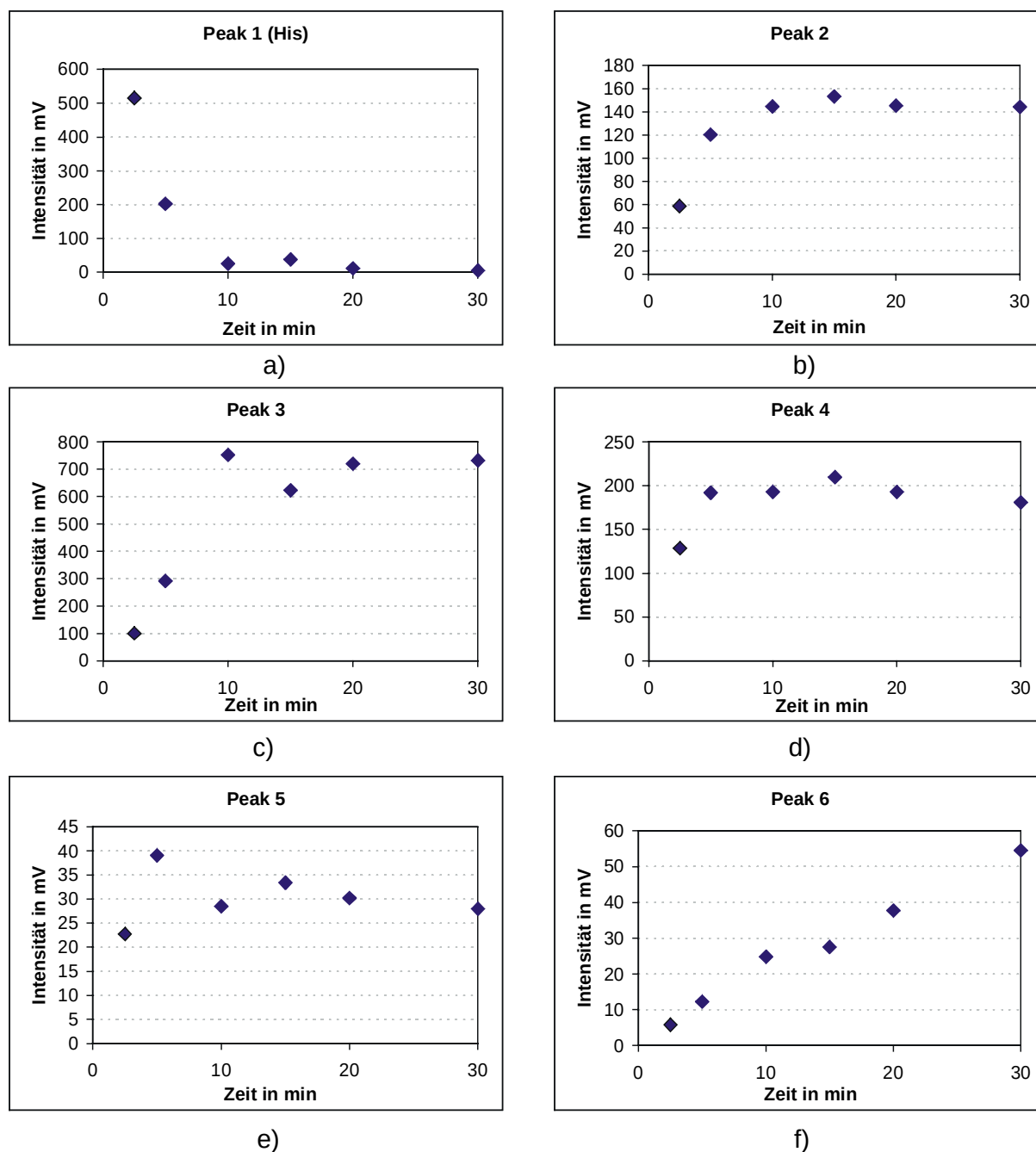


Abb. 20a)-f). Veränderung der Intensität (Peakhöhen) der mittels HPLC-Analytik nachgewiesenen Produkte bei Ozonisierung einer wässrigen Histidin ($c_{\text{His}} = 0,064 \text{ mol/l}$) in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer (Ozonproduktion 230 mg/h) nach Einzelsignalen (Peak 1-6) aufgeteilt (vgl. Abb. 19 und Tab. 9).

Zwischen der Abnahme der Histidinkonzentration und den Peakhöhen der mittels HPLC-Analytik bestimmten Abbauprodukte besteht ein linearer Zusammenhang, wie durch Anfertigen einer Verdünnungsreihe und deren Untersuchung durch HPLC gezeigt werden konnte. Die ermittelte Eichkurve folgt einer

Geraden mit sehr gutem Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,999$), so dass die Abnahme an Histidin während der Ozonisierung quantitativ zu erfassen ist. Unter Beachtung der durch die Messanordnung vorgegebenen maximal verwendbaren Histidinkonzentration von 1 mg/ml wurden wässrige Histidinlösungen dieser Konzentration für die Ozonisierung verwendet, so dass die erhaltenen Lösungen ohne weitere Verdünnung und somit Zeitverlust vermessen werden konnten. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 21 wiedergegeben.

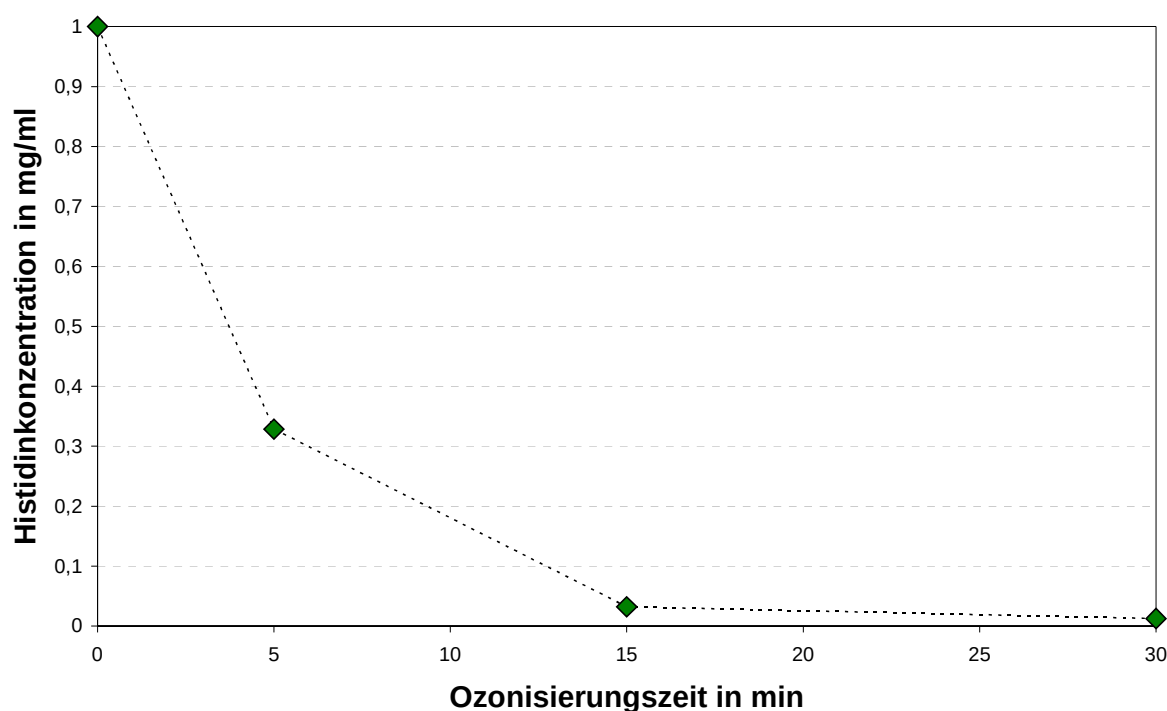


Abb. 21. Abnahme der Histidinkonzentration ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration von 1 mg/ml ($\approx 6,4$ mmol/l) bei Durchleiten eines Ozonstromes von 230 mg O_3 /h.

Bei Vergleich mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen muss die Tatsache der unterschiedlichen Konzentrationen der eingesetzten Histidinlösungen beachtet werden. Aber auch hier zeigt sich, dass der durch Ozon hervorgerufene oxidative Abbau des Histidins sehr schnell vonstatten geht. Bei den gewählten Parametern nimmt die Ausgangskonzentration an Histidin von 1 mg/ml binnen 30 min ab auf rund 1% des Ausgangswertes.

Zur Klärung der bei der Ozonisierung des Histidins auftretenden, mittels DC nachgewiesenen Reaktionsprodukte könnte eine massenspektroskopische Untersuchung der gefriergetrockneten Substanzen beitragen. Zu diesem Zweck wurden einige der bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen erhaltenen Ozonisierungsprodukte sowie Imidazol selbst mittels MALDI-ToF-MS untersucht.

Eine vorab vorgenommene dünnschichtchromatographische Trennung der bei Ozonisierung von Histidin und Imidazol erhaltenen Produkte zeigt eindeutig, dass die Ausgangssubstanz oxidativ verändert wurde. Die Produkte der Ozonisierung werden deutlich durch Ninhydrin angefärbt (Abb. 22). Die entsprechenden Molekülmassen der zugehörigen Ozonisierungsprodukte sollten durch MALDI-ToF-MS-Analytik nachweisbar sein.

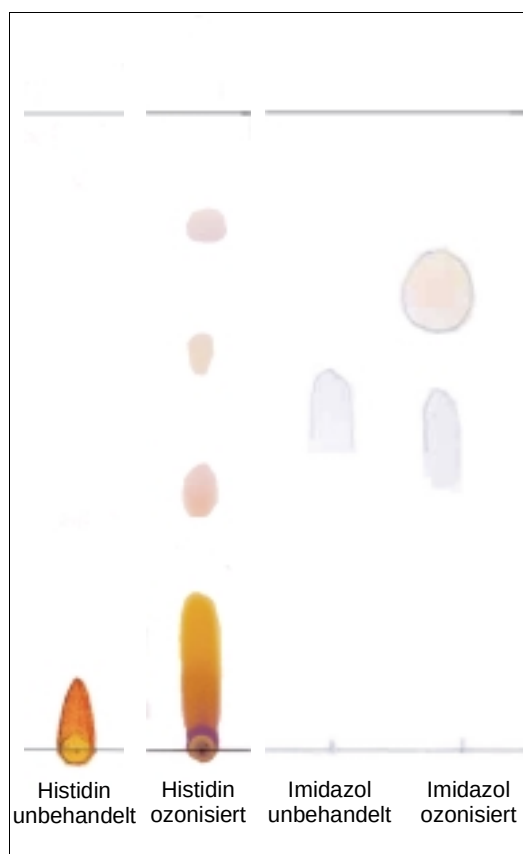


Abb. 22. Dünnschichtchromatogramm von ozonisiertem Histidin bzw. Imidazol; mit Ninhydrin (links) bzw. mit Pauly-Reagenz (rechts) angefärbt (Konzentration beider Ausgangslösungen: $c = 0,1 \text{ mol/l}$, Ozonisierungsdauer: 30 min bei $230 \text{ mg O}_3/\text{h}$; Laufmittel: EE/EtOH/H₂O 6:5:2; v:v:v).

Die Untersuchung der beiden Reinsubstanzen mittels MALDI-TOF-MS ergab folgendes Bild: während Histidin neben seiner Molekülmasse von 156,07 g/mol ($\text{His}+\text{H}^+$) ein weiteres, nicht zuzuordnendes Signal bei 178,08 g/mol aufweist (Tab. 11), ist ein interessanter Effekt beim Imidazol auszumachen (Tab. 10): die beim Messvorgang dem System zugeführte Laserenergie reicht offenbar aus, um Imidazol zu dimerisieren bzw. vermutlich zu tetramersieren: das Molekülmassenspektrum weist Signale auf bei $M=68,935$ g/mol ($\text{Imidazol}+\text{H}^+$), $M=137,105$ g/mol ($2*\text{Imidazol}+\text{H}^+$) sowie bei $M=268,298$ g/mol bei einem Intensitätsverhältnis der Signale von etwa 8:3:1. Das letzte Signal stimmt bis auf eine Masse von 4 g/mol exakt mit der vierfachen Molekülmasse des Imidazols überein, so dass dieses Signal als „Tetramer-4H“ bezeichnet wurde. Eine der detektierten Masse zugrunde liegende Verknüpfung der Imidazolmoleküle ist jedoch unbekannt.

Das gleiche Bild bietet sich nach erfolgter Ozonbehandlung einer Imidazollösung; die Signalintensitäten haben sich mit 3:1:1 jedoch zugunsten der höheren Homologen verschoben. Hier gibt die massenspektroskopische Untersuchung im Gegensatz zum Ergebnis der Dünnschichtchromatographie keinen Hinweis auf mögliche Produkte.

Tab. 10. Vergleich der aus MALDI-TOF-MS-Untersuchungen erhaltenen Molekülmassen für reines und für ozonisiertes Imidazol (Angaben der Molekülmassen in g/mol).

Imidazol					
unbehandelt			ozonisiert		
	Faktor			Faktor	
68,935	1	$\text{Imidazol}+\text{H}^+$	68,909	1	$\text{Imidazol}+\text{H}^+$
137,105	2	$\text{Dimer}+\text{H}^+$	137,04	2	$\text{Dimer}+\text{H}^+$
268,298	3,93	"Tetramer-4H ⁺ "	268,236	3,94	"Tetramer-4H ⁺ "

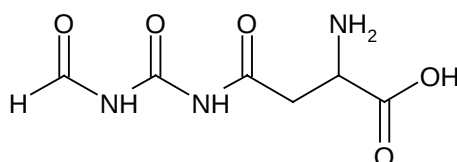
Im Falle des Histidins muss unterschieden werden zwischen einer kurz behandelten Lösung niedriger Konzentration (30 min ozonisiert, $c=0,05$ mol/l) und einer höher konzentrierten Histidinlösung, die deutlich länger ozonisiert wurde (90 min ozonisiert, $c=0,13$ mol/l), wobei das Molverhältnis von Ozon zu Histidin in beiden Varianten zwischen 2,3 und 2,5 lag (Tab. 11).

Tab. 11. Vergleich der aus MALDI-TOF-MS-Untersuchungen erhaltenen Molekülmassen für reines und für unterschiedlich ozonisiertes Histidin (Ozonrate: 230 mg/h), Angaben der Molekülmassen in g/mol.

Histidin					
unbehandelt		$c_{\text{His}} = 0,05$ mol/l, 30 min O_3		$c_{\text{His}} = 0,13$ mol/l, 90 min O_3	
156,08	Histidin+ H^+	44,89	Acetaldehyd+ H^+	44,89	Acetaldehyd+ H^+
		68,92	Imidazol+ H^+		
		102,04	?		
		156,07	Histidin+ H^+	156,06	Histidin+ H^+
		172,02	His + OH	172,00	His + OH
178,08	?				
		240,13	?		
		253,13	?		
				261,16	?
		305,16	?	305,14	?

Neben nicht umgesetzter Ausgangssubstanz (156,07 g/mol) wird in beiden Fällen ein massereiches Signal aufgezeichnet (305,1 g/mol), das bislang nicht zugeordnet werden kann. Daneben werden Signale niedermolekularer Produkte detektiert, die den Molekülmassen von Acetaldehyd+ H^+ (44,89 g/mol) und Histidin+OH (172,02 g/mol) entsprechen; keines dieser Signale kann im Spektrum der Reinsubstanz detektiert werden. Nach der Kurzbehandlung konnte auch die Masse von Imidazol+ H^+ (68,92 g/mol) detektiert werden. Weitere weniger intensive Signale bei $M=102,04$ g/mol sowie im Bereich um Molekülmassen von 250 g/mol ließen sich noch nicht zuordnen.

KOTIAHO et al. finden in Untersuchungen mittels Elektrospray-Massenspektroskopie bei der Histidinozonisierung ein Produkt mit der Masse 204 g/mol („His+3O“), welches als 2-Amino-4-oxo-4-(3-formylureido)-butansäure (4) vorgeschlagen wird⁹². In den vorliegenden MALDI-ToF-Experimenten wird ein solches Massensignal nicht gefunden.



4

Infrarotspektroskopische Untersuchungen weisen deutliche Unterschiede für eine unbehandelte (Abb. 23) und für eine ozonisierte Histidinprobe (Abb. 24) auf.

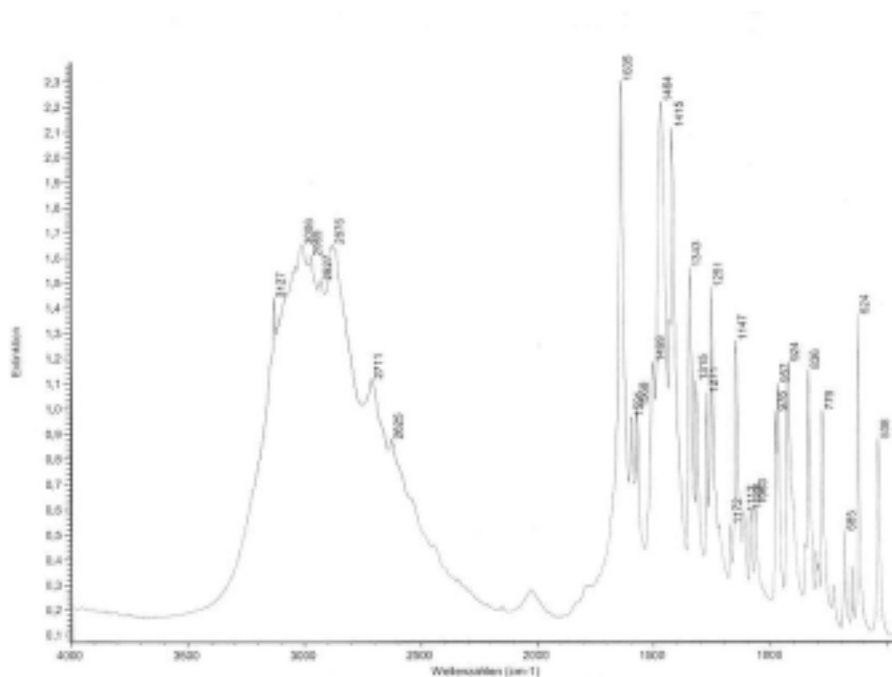


Abb. 23. IR-Spektrum von unbehandeltem Histidin (Probenkörper: KBR-Preßling).

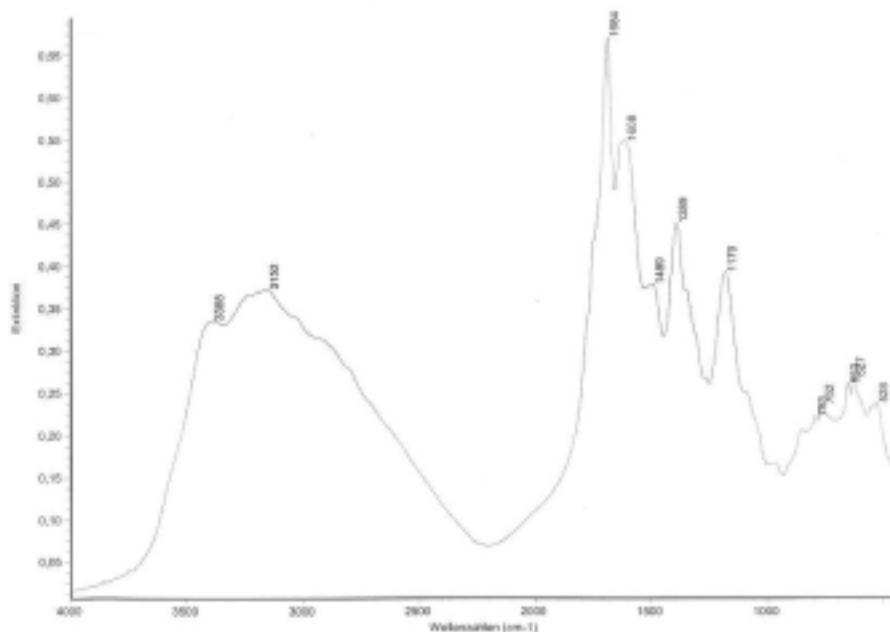


Abb. 24. IR-Spektrum von ozonisiertem Histidin (Probenkörper: KBR-Preßling). Dazu wurden 500 mg Histidin in 25 ml dest. Wasser gelöst, 90 min bei 230 mg O₃/h behandelt und anschließend gefriergetrocknet.

Das Spektrum des unbehandelten Histidins entspricht der in der Literatur gefundenen Vergleichsspektren⁹³. Der Vergleich der beiden Spektren zeigt zwei Auffälligkeiten. Die Extinktion des Gesamtspektrums des ozonisierten Histidins ist im Vergleich zu dem des unbehandelten Histidins bei gleicher Probeneinwaage deutlich gesunken. Unterschiede fallen auch bei Betrachten der Absorptionsbanden im unteren Wellenzahlenbereich ($\tilde{\nu}$ = 1500–500 cm⁻¹) auf.

Die Zahl der Absorptionsbanden beim ozonisierten Histidin und die Liniendichte ist im Vergleich zum unbehandelten Histidin deutlich verringert, die Linienbreite im Gegensatz dazu stark erhöht. Da die ozonisierte Probe nicht aufgereinigt wurde, steht zu vermuten, dass die mittels DC nachgewiesene Vielzahl von Reaktionsprodukten in ähnlichen Bereichen absorbieren und sich die Absorptionsbanden daher überlagern und somit die starke Verbreiterung der Peaks bewirken. Dennoch können aus den vorliegenden Ergebnissen einige Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die für Aminosäuren (AS) charakteristischen Schwingungen sind für unbehandeltes Histidin in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12. Zuordnung charakteristischer funktioneller Gruppen des unbehandelten Histidins im Infrarotspektrum.

Absorptionsbande (Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in cm^{-1})	Zuordnung
3040	$-\text{NH}_3^+$
2969, 2927	$\nu(\text{CH}_2)$
2876	$\nu(\text{CH})$
2100, 2500	typisch für AS
1635	$\delta(\text{NH}_2)$
1591	$-\text{COO}^-$
1568	$\delta(\text{NH}_3^+)$

Der Vergleich mit dem IR-Spektrum von Imidazol⁹³ lässt eine Aussage über die vom Imidazolring im Histidin hervorgerufenen Absorptionsbanden zu. Banden, die in beiden Spektren auftreten, sind in Tab. 13 aufgelistet.

Tab. 13. Zuordnung von Absorptionsbanden unterhalb $\tilde{\nu}=2000\text{ cm}^{-1}$ aus dem IR-Spektrum des Histidins, die auf den Imidazolring zurückzuführen sind (Vergleich mit dem Imidazolspektrum aus der Aldrich FT-IR Library⁹³), * = doppelte Zuordnung, siehe Text).

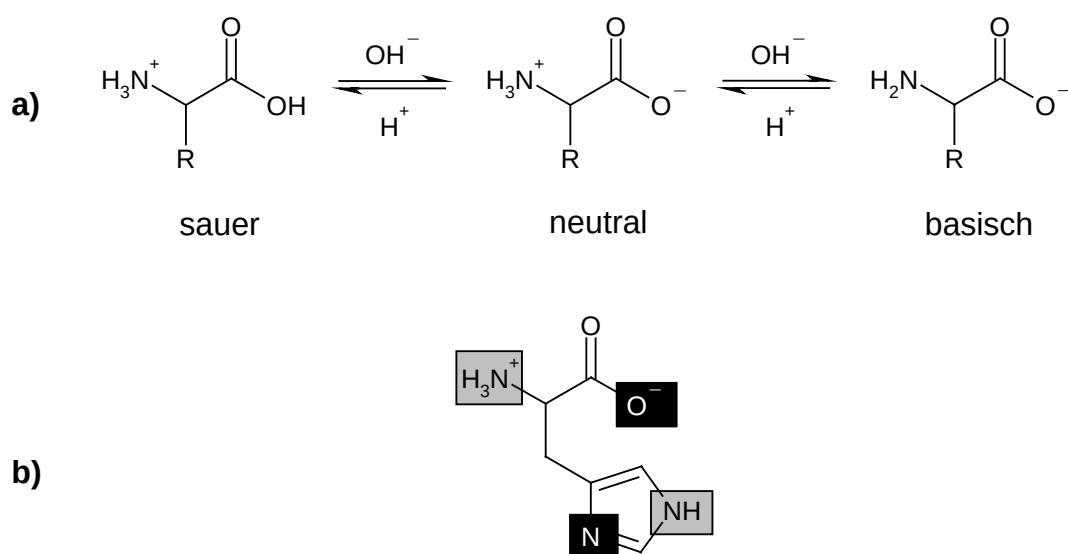
Absorptionsbanden Imidazol in cm^{-1}	Gefundenen Banden im Histidin-Spektrum in cm^{-1}
1590	1591*
1560	1568*
1500	1499
1460	1464
1380	-
1270	1271
1140	1147
1060	1063
850	-
840	836
620	624

Die Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu}=1591\text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu}=1568\text{ cm}^{-1}$ lassen jeweils eine doppelte Zuordnung zu: die Bande bei $\tilde{\nu}=1591\text{ cm}^{-1}$ wurde im IR-Spektrum des unbehandelten Histidins der Carboxylgruppe, die Bande bei $\tilde{\nu}=1568\text{ cm}^{-1}$ der Deformationsschwingung der NH_3^+ -Gruppe zugeordnet.

Die Zuordnung der Absorptionsbanden im Spektrum des ozonisierten Histidins wird dadurch erschwert, dass ein Produktgemisch vorlag, welches ohne weitere Auftrennung für die IR-Spektroskopie verwendet wird. Dennoch deuten die Banden bei $\tilde{\nu}=1608$ bzw. $\tilde{\nu}=1684\text{ cm}^{-1}$ auf die noch immer vorhandene Anwesenheit der NH_2 - bzw. NH_3^+ -Gruppe hin. Die Lokalisierung der charakteristischen Carboxyl-Schwingungen scheint unmöglich.

3.1.1.4.4 pH-Abhängigkeit der Ozonolyse von Histidin

Der Ladungszustand der Aminosäuren ist aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften abhängig vom jeweiligen pH-Wert. Im sauren Bereich tritt mehr und mehr Protonierung auf, während im basischen pH-Bereich eine Deprotonierung erfolgt (Gleichung 10). Analoges gilt für die sauren und basischen funktionellen Gruppen in den Seitenketten der α -Aminosäuren.

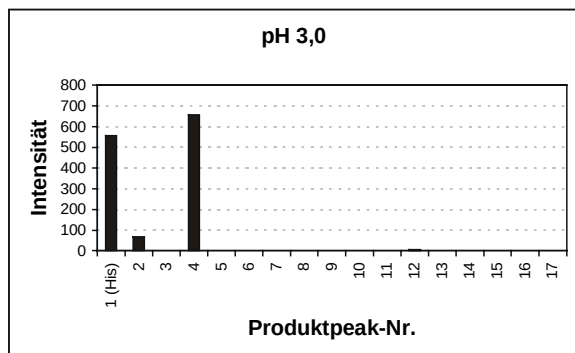


Gleichung 10. a) pH-Abhängigkeit des Ladungszustandes von Aminosäuren
 b) Saure Zentren (grau) und basische Zentren (schwarz) des Histidins.

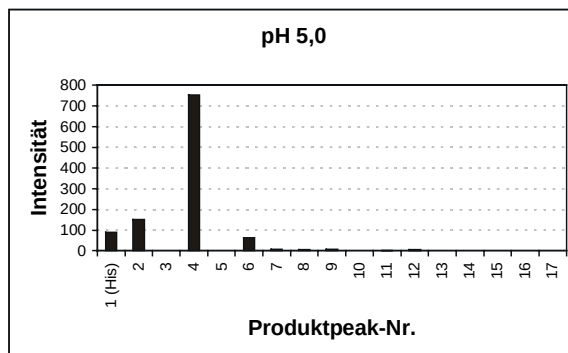
Deshalb lässt sich auch bei der Ozonisierung von Aminosäuren eine pH-Abhängigkeit erwarten, die HPLC-analytisch erfasst werden soll. Dazu werden fünf 0,05-molare Lösungen von Histidin in Davies-Universalpuffer⁹⁴ unterschiedlicher pH-Werte hergestellt und jeweils 10 ml davon für 30 min einem O₂/O₃-Strom mit einem Ozongehalt von 230 mg/h ausgesetzt. Nach der Ozonisierung wird auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und mittels HPLC aufgetrennt.

Die Ergebnisse dieser Analyse der Abbauprodukte und deren Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Elutionszeit sind in Abb. 25a-e dargestellt. Die

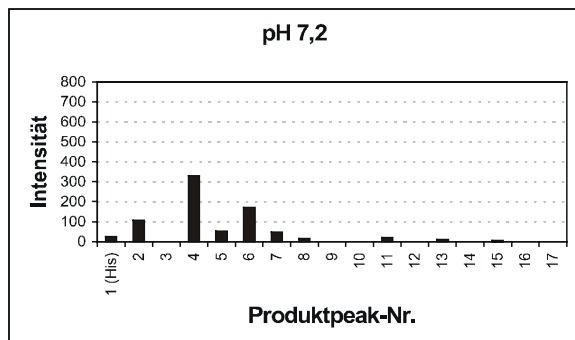
Darstellung ist dabei nach den eingestellten pH-Werten unterteilt. Die Korrelation der Signale zu den Retentionszeiten bzw. die Nummerierung der Produktpeaks ist aus Tab. 14 ersichtlich.



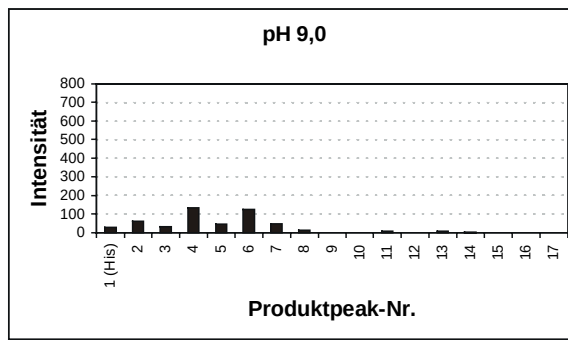
a)



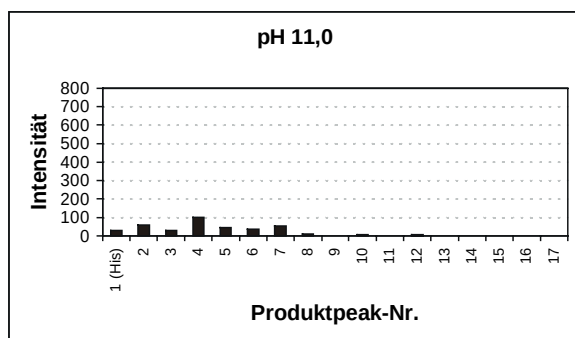
b)



c)



d)



e)

Abb. 25a-e. Charakteristische Verteilung der Intensitätspeaks aus der HPLC-Trennung von bei unterschiedlichen pH-Werten ozonisierten Histidinlösungen in Davies-Universalpuffer; Angaben der Peakhöhen nach Korrektur um die Signale der reinen Pufferlösungen; Ozonisierung: 30 min bei 230 mg O₃/h (zur Zuordnung bzw. Nummerierung der Produktpeaks vgl. Tab. 14).

Tab. 14. Zuordnung der Retentionszeiten der Produktpeaks aus der HPLC-Analytik von bei verschiedenen pH-Werten ozonisierten Histidinlösungen.

Retentionszeit t_R in min	$t_{R,max} - t_{R,min}$ in min	Peak-Nr.
5,23-5,32	0,09	1
6,47-6,54	0,07	2
7,22	-	3
7,83-7,93	0,10	4
8,30-8,32	0,02	5
8,78-8,93	0,15	6
10,51-10,69	0,18	7
12,21-12,74	0,53	8
13,56-13,79	0,23	9
14,42	-	10
14,59-15,19	0,60	11
17,23-17,34	0,11	12
18,03-18,20	0,17	13
23,79	-	14
24,02	-	15
25,11	-	16
26,31	-	17

Die durch HPLC-Analytik erhaltenen Chromatogramme bei verschiedenen pH-Werten ozonisierte Histidinlösungen weisen deutliche Unterschiede auf. Zunächst fällt sofort die stark differierende Zahl der Signale, d.h. der Produkte auf, die durch die Ozonisierung gebildet werden. Diese Zahl steigt mit zunehmendem pH-Wert an: während bei pH 3,0 nur drei Produkte und bei pH 5,0 vier Haupt- und 3 Nebenprodukte geringer Intensität nachweisbar sind, können bei den höheren pH-Werten von 7,2, 9,0 sowie 11,0 bis zu zehn unterschiedliche Produktsignale unterschiedlicher Intensität aufgezeichnet werden. Ein weiteres Ergebnis dieser pH-Studie erhält man, wenn man die Verteilung der Intensitäten (Peakhöhen) der Produktsignale in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert vergleicht (Tab. 15).

Tab. 15. Vergleich der Intensitäten (Peakhöhen) der mittels HPLC-Analytik ermittelten Produktpeaks bei der Ozonisierung wässriger Histidinlösungen unterschiedlicher pH-Werte.

pH-Wert	Zahl der Peaks	I_{max} in mV	I_{min} in mV	I_{max}-I_{min}	Mittlere Peakhöhe in mV
3,0	4	657,4	5,4	652,2	321,5
5,0	8	753,1	2,1	751,0	121,3
7,2	10	330,5	5,3	325,2	78,0
9,0	10	132,9	6,2	126,7	49,0
11,0	10	101,7	7,5	94,2	38,9

Zunächst wird die Differenz zwischen maximaler und minimaler Peakhöhe bei den einzelnen pH-Werten verglichen. Es zeigt sich, dass diese Differenz bei pH 5,0 am größten ist, bis pH 11,0 aber deutlich absinkt. Bei niedrigen pH-Werten dominieren also einzelne Produkte mengenmäßig betrachtet, während sich bei höheren pH-Werten zwar mehr Produkte, diese jedoch in geringerer Menge bilden. Damit korreliert die mittlere Peakhöhe, die durch Mittelwertbildung über alle Peakhöhen bei einem pH-Wert berechnet wurden (Tab. 15, Abb. 26). Auch hier ist ein deutlicher Abwärtstrend festzustellen, bei dem die mittlere Peakhöhe von pH 3,0 bis pH 11,0 kontinuierlich abnimmt.

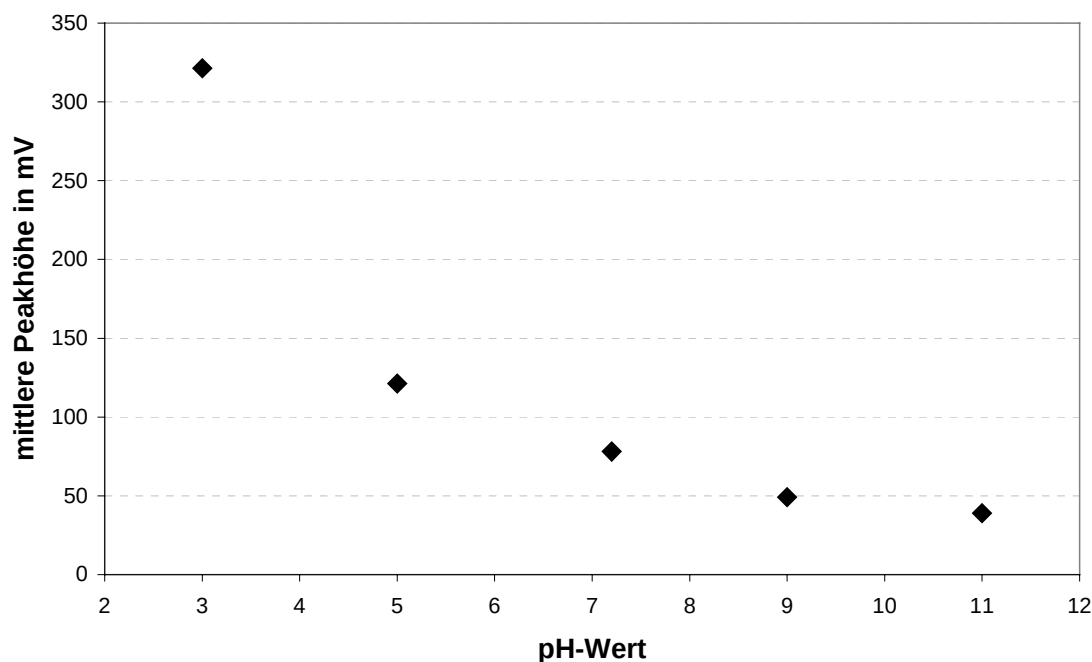


Abb. 26. Abnahme der mittleren Peakhöhen der durch HPLC-Analytik ermittelten Produkte bei der Ozonisierung wässriger Histidinlösungen bei unterschiedlich eingestellten pH-Werten.

Darüber hinaus wird bei zunehmendem pH-Wert mehr Histidin verbraucht, was auf einen höheren Umsatz bei höheren pH-Werten schließen lässt. In kinetischen Untersuchungen zur Histidinozonisierung konnte PRYOR für mehrere Aminosäuren, darunter auch Histidin, Geschwindigkeitskonstanten für den ozonolytischen Abbau in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert ermitteln⁹⁵, die tatsächlich in einem Bereich zwischen pH 2 und pH 7 mit zunehmendem Wert um ein Vielfaches anstiegen.

Die Ozonisierung von Histidin in wässrigen Medien weist also eine deutliche pH-Abhängigkeit auf. Nicht endgültig geklärt ist, ob diese Abhängigkeit nur vom Ladungszustand der Aminosäure bei verschiedenen pH-Werten abhängt (vgl. Gleichung 10), oder ob Ozon bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Reaktivität aufweist bzw. unterschiedlichen Reaktionsmechanismen unterliegt. So ist beispielsweise bekannt, dass Ozon bei pH-Werten größer zehn nicht mehr nach dem Criegee-Mechanismus reagiert, sondern dass vielmehr Hydro-

xyl-Radikale gebildet werden, die unselektiver und schneller mit organischen Substanzen reagieren können als Ozon⁹⁶.

3.1.1.4.5 Bildung von Aminosäuren bei der Histidin-Ozonolyse

Das Produkt der Ozonisierung einer Histidinlösung nach Gefriertrocknung wird der Aminosäureanalyse unterworfen, um so weiteren Aufschluss über den Histidinabbau während der Ozonisierung zu erlangen. Untersucht wurden die Ozonisierungsprodukte des Histidins nach unterschiedlichen Behandlungszeiten. Je 10 ml einer wässrigen Histidinlösung der Konzentration 0,05 mol/l wurden einmal 30 min bzw. einmal 450 min einem Ozonstrom (230 mg O₃/h) ausgesetzt, die farblich kaum veränderten Lösungen bei –78 °C eingefroren und 24 h gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Produkte hatten eine blassbeige bis intensiv gelbe Färbung. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse der Ozonisierungsprodukte ist in Abb. 27 graphisch dargestellt.

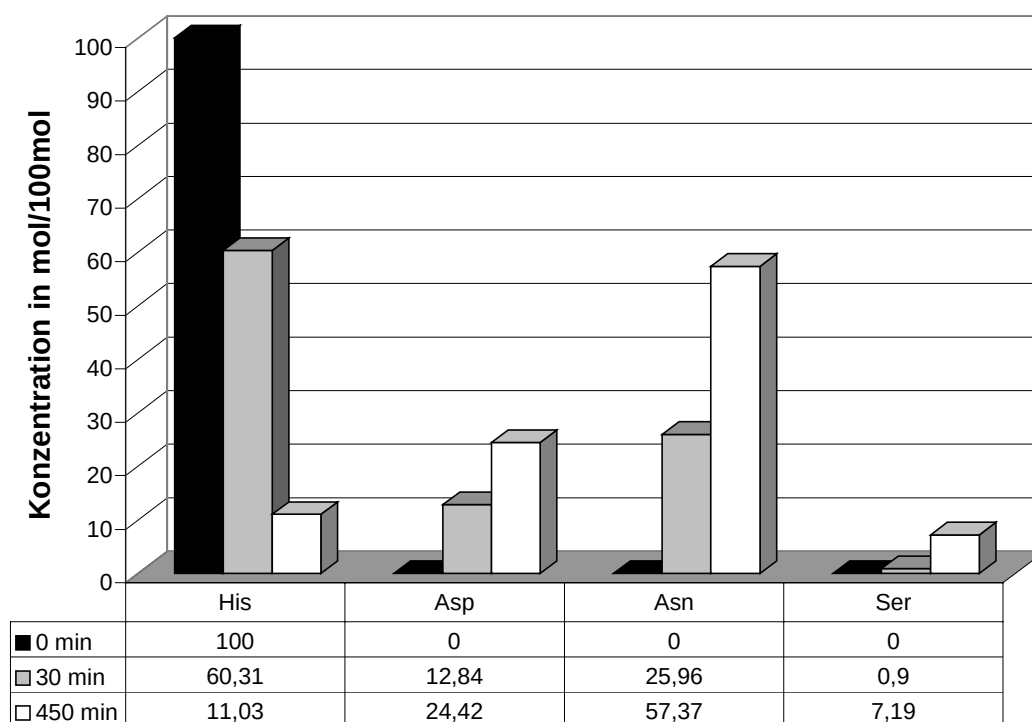
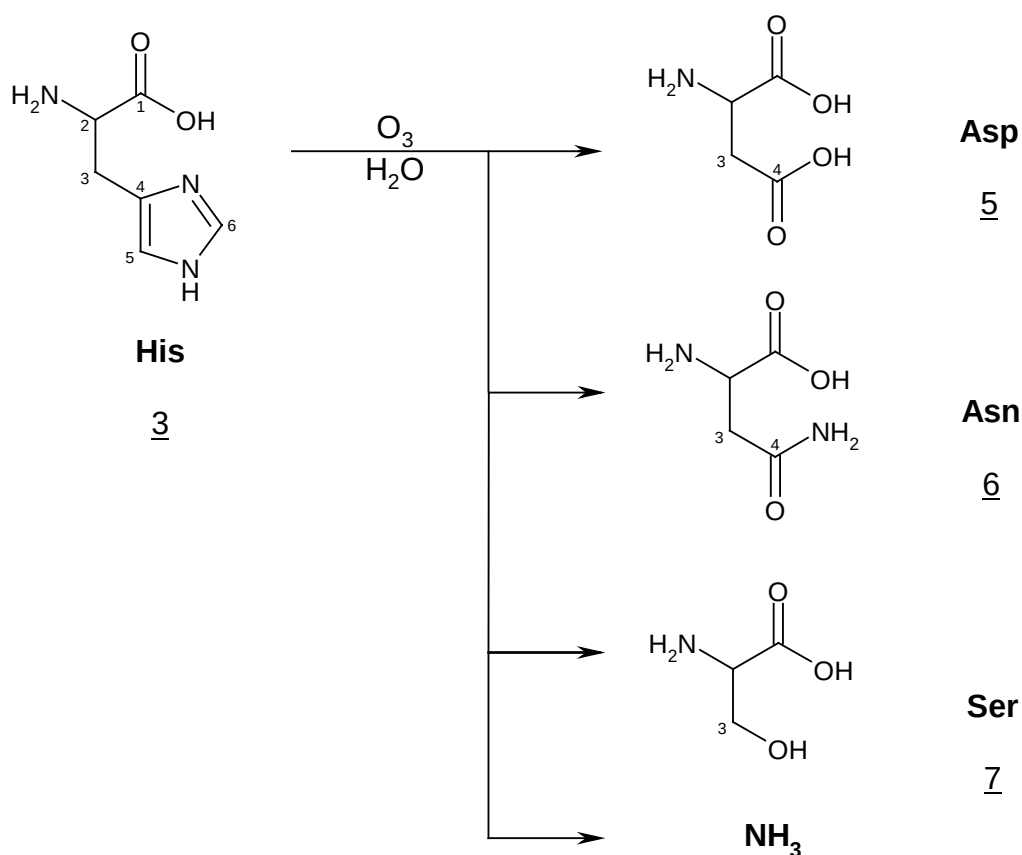


Abb. 27. Aminosäurezusammensetzung des Ozonisierungsproduktes einer 0,05-molaren wässrigen Histidinlösung in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer (230 mg O₃/h).

Neben der Freisetzung erheblicher, nicht quantifizierbarer Mengen an Ammoniak sowie der Detektion eines nicht näher bestimmbar Signals konnte darüber hinaus die Bildung dreier Aminosäuren nachgewiesen werden, die nach ihrem Elutionsverhalten als Asparagin (Asp, 5), Asparaginsäure (Asn, 6) sowie Serin (Ser, 7) identifiziert wurden und deren Valenzstrichformel in Gleichung 11 dargestellt ist.



Gleichung 11. Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Asparagin (Asn) und Serin (Ser), die mittels Aminosäureanalyse neben Ammoniak (NH_3) als Abbauprodukte bei der Ozonisierung von Histidin (His) nachgewiesen wurden.

Auch STADTMAN et al. konnten die Bildung von Asparaginsäure bzw. deren Derivate aus Histidin durch Markierungsversuche beim oxidativen Abbau von Glutamin-Synthetase und Rinderserum-Albumin mittels Ozon nachweisen⁹⁷.

Die Bildung von Ammoniak bei der Ozonisierung von Histidin überrascht nicht, hingegen besteht hinsichtlich der Bildung von Asparaginsäure und Serin noch keine Klarheit über den Bildungsmechanismus.

Die im Vergleich zu Asp/Asn verzögerte Bildung von Serin (0,19 mol% nach 30 min, 7,19 mol% nach 450 min, vgl. Abb. 27) könnte auch als Sekundärabbauprodukt aus Asp/Asn zu erklären sein, indem Asp/Asn abermals mit Ozon (oder anderen aktiven Spezies) reagiert haben. Bei der Ozonisierung einer wässrigen 0,05-molaren Asparaginsäure-Lösung wurden tatsächlich Spuren von Serin (ca. 62

1 mol%) gefunden. In einer parallel dazu untersuchten ozonisierten Asparagin-Lösung konnte hingegen kein Serin nachgewiesen werden.

In den Dünnschichtchromatogrammen in Abb. 28 werden die bei den Ozonisierungen erhaltenen Produkte mit den gefundenen Aminosäuren als Referenzmaterial verglichen. Das verwendete Laufmittel in Abb. 28a) ist auf die Natur der Ozonisierungsprodukte abgestimmt, während das in Abb. 28b) eingesetzte Laufmittel eher auf die Eigenschaften der als Referenz mituntersuchten Aminosäuren Rücksicht nimmt. Für den Vergleich zwischen Ozonisierungsprodukten und Aminosäuren scheint letzteres besser geeignet zu sein, da sich hier eindeutige R_f -Werte ermitteln lassen (Tab. 16).

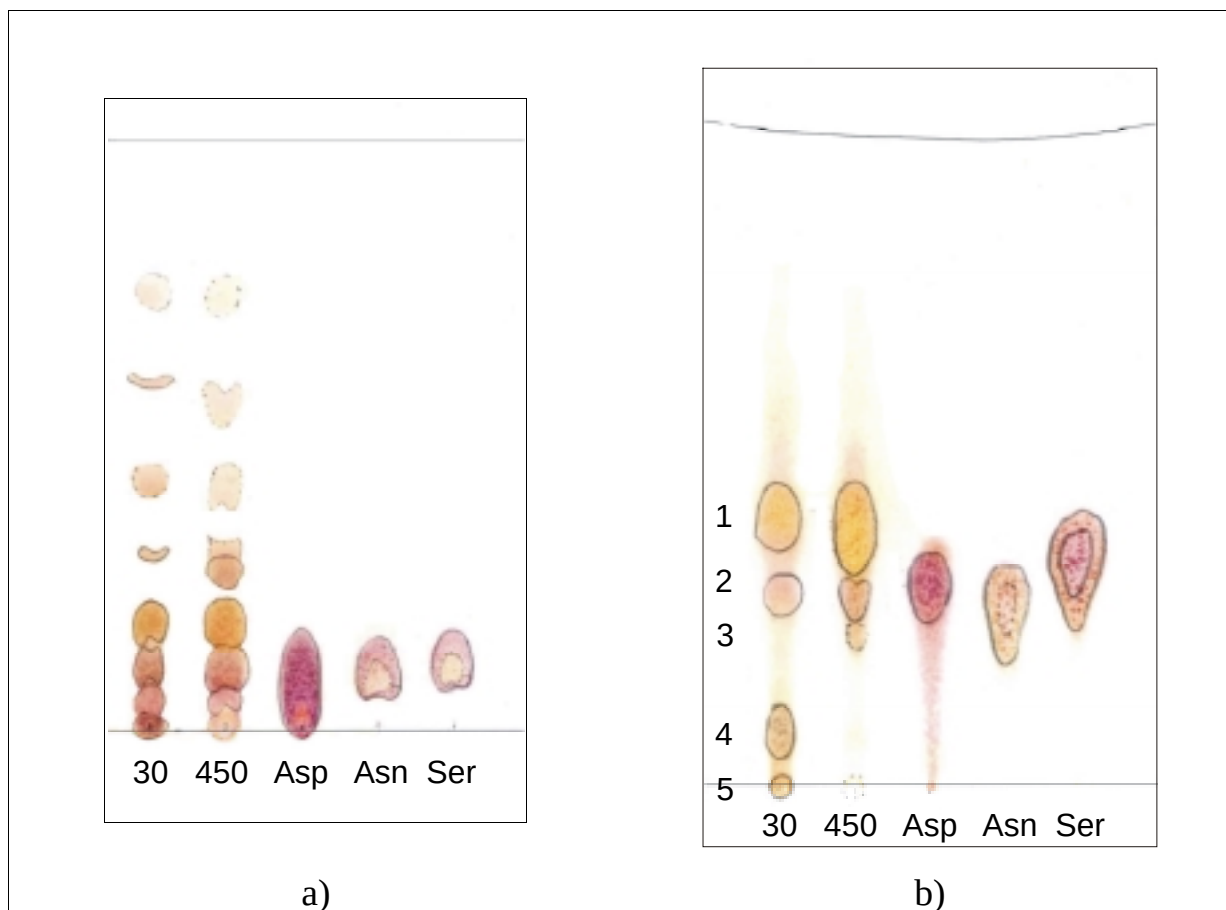


Abb. 28. Dünnschichtchromatogramme unterschiedlich lange ozonisierter Histidinlösungen (30 min und 450 min) nach Gefriertrocknung sowie der Aminosäuren Asp, Asn und Ser (Laufmittel bei a): EE/EtOH/Wasser 6:5:2 (v:v:v), Laufmittel bei b): EtOH/BuOH/H₂O/Eisessig 3:1:1:1 (v:v:v:v). R_F-Werte siehe Tab. 16).

Tab. 16. R_F-Werte der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von unterschiedlich lange ozonisierten Histidinlösungen (30 und 450 min) und der als Referenzsubstanzen mitaufgetragenen Aminosäuren Asp, Asn und Ser (DC aus Abb. 28b), Laufmittel: EtOH/BuOH/H₂O/Eisessig 3:1:1:1 (v:v:v:v)).

	30 min	450 min	Asp	Asn	Ser
1	0,41	0,41			
2	0,29	0,29	0,31	0,28	0,35
3		0,23			
4	0,08				
5	0	0			

Die R_f -Werte der Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure und Serin liegen allesamt in einem ähnlichen Bereich (0,28-0,35). Dazu finden sich bei ozonisier-tem Histidin keine direkten Übereinstimmungen, dennoch kann man die Signale der Aminosäuren den Signalen 2 bzw. 3 der ozonisierten Proben zuordnen: Serin zeigt die größte Abweichung von dem für Signal 2 ermittelten R_f -Wert von 0,29. Aus der Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung zeigt sich aber, dass Serin von den identifizierten Aminosäuren mit 7,2 mol% den geringsten Anteil hat, was zur Folge hat, dass die Anfärbung mit Ninhydrin in den ozonisierten Proben nicht so intensiv ist, und sich das Serin-Signal in Signal Nr. 2 verbergen kann. Der R_f -Wert des Asparagins ist Substanzfleck 2 des länger ozonisierten Histidins zugeordnet. Die Begründung findet sich wiederum im Anteil dieser Aminosäure an der gefundenen Gesamtmenge: während sich der Anteil im kurz ozonisierten Histidin sich nicht hinreichend mit Ninhydrin anfärben lässt, ist dies bei der länger ozonisierten Probe hingegen möglich. Die Asparaginsäure stimmt am besten mit den gefundenen Produktflecken der ozonisierten Histidinproben des entwickelten Dünnschichtchromatogramms überein.

Sowohl Abb. 28a) als auch die HPLC-analytisch ermittelten Ergebnisse zeigen aber deutlich, dass die gefundenen Aminosäuren nicht die einzigen Ozonisierungsprodukte des Histidins sind. Die über die in der Aminosäureanalyse gefundenen Aminosäuren hinaus im DC detektierten, mit Ninhydrin entwickelten Produktflecken konnten in der Aminosäureanalyse mit einer Ausnahme eines nicht als Aminosäure identifizierbaren Signal nicht erfasst bzw. zugeordnet werden.

3.1.1.4.6 Abbau des Histidins

Die quantitative Bestimmung des Histidinabbaus kann mit dem von Pauly weiterentwickelten Ehrlichs-Reagenz zur Diazotierung des Imidazolring in der Histidinseitenkette durchgeführt werden⁷⁴. Die Absorption des Reaktionsproduktes im sichtbaren Bereich des Lichts ($\lambda_{\max} = 454 \text{ nm}$) macht eine einfache spektrophotometrische Bestimmung möglich.

Zur Sicherstellung einer guten Reproduzierbarkeit wurde dazu ein Zeitschema ausgearbeitet, nach dem die Eichung und die späteren Messungen ausgeführt wurden (vgl. Experimenteller Teil).

Begast wurden 15 ml einer wässrigen Histidinlösung ($c = 100 \text{ mg/l}$) bei pH 7,2. Nach der Ozonisierung wurden für die anschließende Bestimmung davon 10 ml entnommen und mit den Pauly-Reagenzien versetzt.

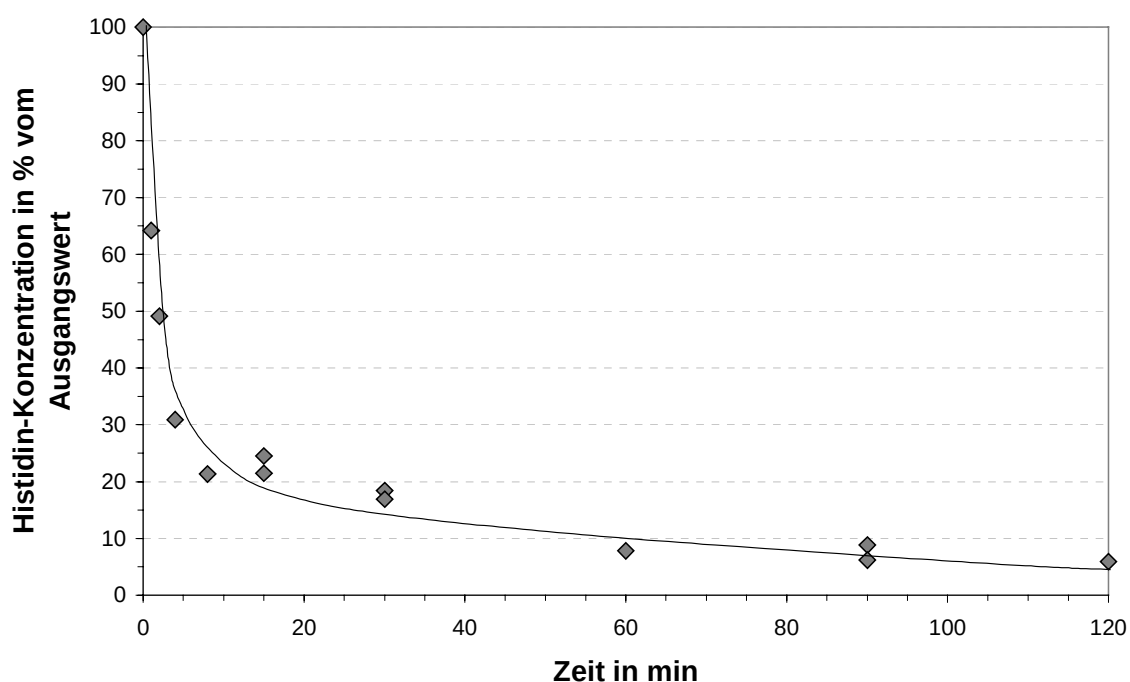


Abb. 29. Abbau der Aminosäure Histidin bei Ozonisierung in wässriger Lösung. Die quantitative Erfassung geschieht nach Diazotierung der Imidazolgruppe des Histidin in 2-Position mit Pauly-Reagenz (vgl. Gleichung 6), die Absorption der gefärbten Lösungen wird anschließend im UV/Vis-Spektrometer bei $\lambda = 454 \text{ nm}$ gemessen.

Die Einteilung der y-Achse in Abb. 29 wurde so gewählt, dass die verbliebene Histidinkonzentration in Prozent vom Ausgangswert angezeigt wird. Die Histidinkonzentration nimmt exponentiell ab: nach 2 min ist die Konzentration auf 50 % und nach 8 min auf nur noch 25 % des ursprünglichen Wertes gesunken. Der Abbau verlangsamt sich danach, so dass nach etwa einer Stunde noch 10%-der Ausgangsmenge an Histidin nachgewiesen werden kann.

3.1.1.4.7 Radikalbildung bei der Ozonisierung von Histidin

Im Criegee-Mechanismus zur Alken-Ozonisierung (siehe Kap. 1.2.4 und 3.1.1.2) wird ein Biradikal als mögliche Zwischenstufe nach der β -Spaltung postuliert. Dieses Radikal ist sicher nicht ohne weiteres isolierbar, jedoch könnten über einen weiteren unbekannten Mechanismus stabile Radikale gebildet werden.

Die Elektronenspinresonanz(ESR)spektroskopie ist eine bewährte und gut untersuchte Methode zur Detektion von Radikalen und paramagnetischer Substanzen (siehe Kap. 1.3). Zur Stabilisierung kurzlebiger Radikale wird zudem die sog. Spintrap-Technik eingesetzt (Kap. 1.3.3).

Falls also Radikalspezies bei der Histidin-Ozonisierung gebildet werden, sollten sie mittels ESR-Experiment nachweisbar sein. Als Spintrap-Reagenzien werden 5,5-Dimethyl-pyrrolin-N-oxid (DMPO) und α -Phenyl-N-*tert*-butylnitron (PBN) eingesetzt und zu Beginn der Behandlung der Histidin-Lösung zugesetzt.

Die Ozonisierungen wurden in zwei unterschiedlichen Reihen durchgeführt (Tab. 17), wobei zunächst die Konzentration der Ausgangslösung bei konstanter Ozonisierungsdauer variiert wurde (A-C). In der zweiten Reihe (D-F) wurde die Ozonisierungsdauer variiert und im Gegenzug die Konzentration der Histidinlösung unverändert gelassen. Durch die Wahl der Parameter ergeben sich unterschiedliche Mol-Verhältnisse zwischen Ozon und Histidin; bis auf Reihe A wird mit einem Überschuss an Ozon gearbeitet. Die Parameter für die Begasungen C

und D sind identisch, deshalb sollten sich im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbare Spektren ergeben.

Tab. 17. Variation der Ozonisierungsparameter bei Begasung wässriger Histidinlösungen zur anschließenden Messung der Elektronenspinresonanz.

Ozonisierungsdauer in min		Ozonmenge in mmol bei 230 mg/h	c_{His} in mol/l	Menge His in 10 ml Lösung in mmol	Verhältnis O_3 zu His
A	30	2,44	0,25	2,5	0,976
B	30	2,44	0,15	1,5	1,627
C	30	2,44	0,05	0,5	4,88
	20	1,62	0,05	0,5	3,24
	10	0,81	0,05	0,5	1,62

Nach Gefriertrocknung der ozonisierten Lösungen wurden die Ozonisierungsprodukte des Histidins in Pulverform ESR-spektroskopisch vermessen.

Die Spektren der Ozonisierungen A bis C sind in Abb. 30 dargestellt.

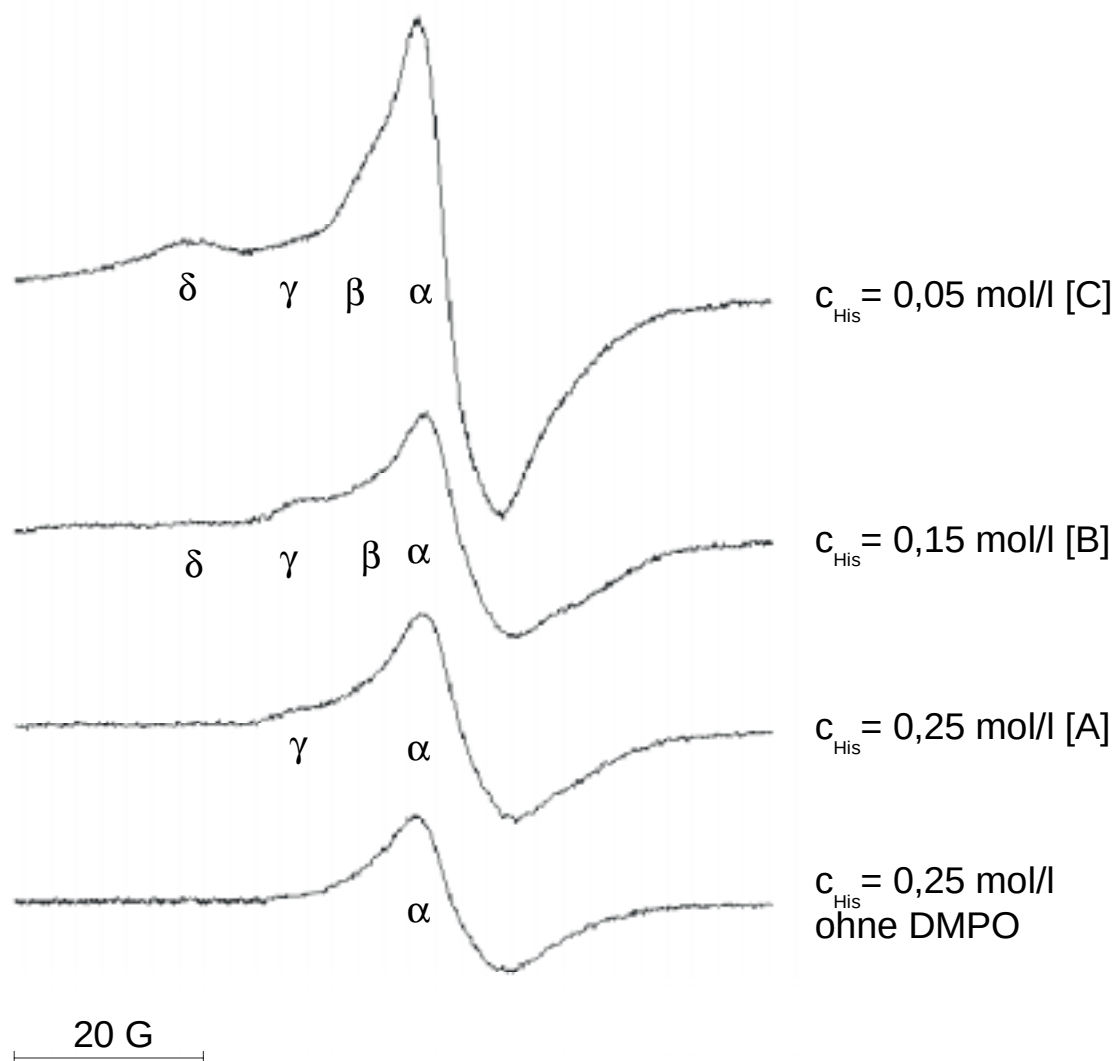


Abb. 30. ESR-Signale von Histidin nach 30-minütiger Ozonisierung (230 mg O_3/h) in wässriger Lösung (Legende: Konzentration der begasten Lösung) unter Zugabe von DMPO als Spintrap. Vor der ESR-Messung wurden die Lösungen gefriergetrocknet und die Spektren des pulverförmig erhaltenen Produktes aufgenommen.

Die ESR-Spektren zeigen vier verschiedene Radikalspezies, die in Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung gebildet werden: neben dem intensiven Hauptsignal (α) bilden sich bei Ozonbehandlung niedriger konzentrierten Lösungen drei weitere Signale unterschiedlicher Intensität aus, von denen sich eines (β) als erkennbare Schulter des α -Signals ausbildet. Das mit γ bezeichnete Signal erscheint bereits in dem nach Ozonisierung der Lösung der höchsten Konzentration erhaltenen ESR-Spektrum [A] als Schulter, zeigt sich bei der

Untersuchung niedriger konzentrierten Lösungen aber als eigenständiges Signal mit einer im Vergleich zum Hauptsignal deutlich schwächeren Intensität. Bei geringeren Konzentrationen bildet sich ein weiteres zu niedrigeren Feldstärken verschobenes Signal, das mit δ bezeichnet wurde. Dieses ist in Spektrum [B] als schwache Schulter wahrzunehmen, in Spektrum [C] hingegen als eigenständiges Signal detektierbar. Der Vergleich bei einer Konzentration von 0,25 mol/l zeigt, dass bei dieser Konzentration die Zugabe von DMPO zu der zu begasenden Lösung nach Gefriertrocknung bereits zur Detektion weiterer Signale als Addukte des Spintrap-Reagenzes führt, während ohne DMPO-Zugabe nur das α -Signal registriert wird. Die Signal-Intensität der Spektren gemessen am Hauptsignal steigt bei der Begasung niedriger konzentrierten Lösungen.

Abb. 31 zeigt die ESR-Spektren der Begasungen D-F (Parameter siehe Tab. 17).

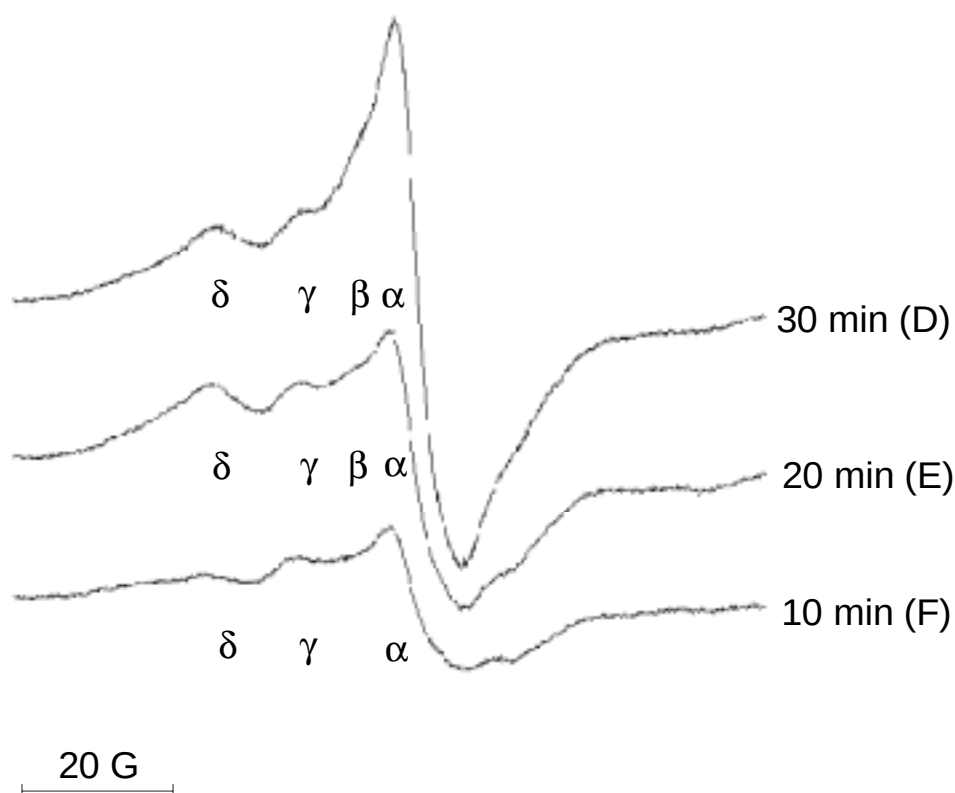


Abb. 31. ESR-Signale von Histidin nach Ozonisierung von 0,05-molaren wässrigen Histidin-Lösungen (Zeitangabe: Ozonisierungsdauer) unter Zugabe von DMPO als Spintrap. Vor der ESR-Messung wurden die Lösungen gefriergetrocknet.

Bereits nach 10-minütiger Begasung bildet sich die Struktur des Spektrums mit drei Radikalspezies (α , γ und δ) aus. Nach 20-minütiger Begasung (E) zeigt sich die mit β bezeichnete Schulter. Die Intensität der erhaltenen Spektren steigen mit zunehmender Ozonisierungsdauer an, was bedeutet, dass der Histidinabbau nach 30 min entweder noch nicht abgeschlossen ist und weiterhin neue Radikale gebildet werden.

Die ESR-Spektren der bei gleichen Parametern ozonisierten Histidinlösungen (Spektrum C aus Abb. 30 und Spektrum D aus Abb. 31) sind ähnlich, aber nicht identisch. Die mit γ bzw. δ bezeichneten Signale aus Spektrum D sind ebenfalls in Spektrum C vorhanden, fallen aber durch geringere Intensitäten (vor allem die des γ -Signals) auf. Einen Hinweis auf die Ursachen dieser kleinen Unterschiede könnte in der Tatsache zu finden sein, dass die empfindliche ESR-Methode geringfügige Abweichungen der eingestellten Versuchsparameter und einer entsprechenden Verschiebung bei Radikalbildung und -abbau während der Ozonisierung als Intensitätsabweichung registriert.

3.1.2 Ozonisierung weiterer Aminosäuren

Neben Histidin wurde auch der Einfluss von Ozon auf weitere Aminosäuren untersucht: Tryptophan und Cystin als bekanntermassen sehr oxidationsempfindliche Spezies, Asparaginsäure mit einer weiteren Carboxylgruppe in der Seitenkette und Lysin mit ϵ -Aminofunktion sowie Glycin als neutrale Aminosäure. Bis auf Cystin konnten alle Aminosäuren in wässriger Lösung ozonisiert werden, Cystin aufgrund seiner weitgehenden Unlöslichkeit in wässriger Suspension.

Tryptophan und Histidin zeigen nach Ozonisierung ein deutliches ESR-Signal, was auf die Ausbildung einer Radikalpopulation gewisser Stabilität schliessen lässt (Abb. 32). Bei Lysin ist im Vergleich dazu nach Ozonisierung nur ein äu-

sserst schwacher Effekt nachweisbar, Glycin und Glutaminsäure zeigen keinerlei Radikalbildung.

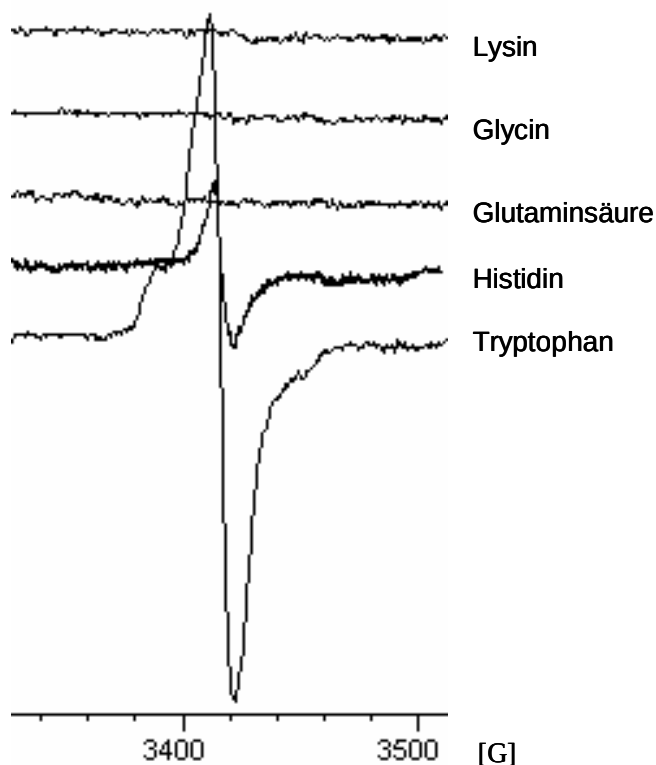


Abb. 32. Vergleich der ESR-Signale von Tryptophan, Histidin, Glutaminsäure, Glycin und Lysin, nach Ozonisierung (jeweils in 0,05 molarer wässriger Lösung).

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der erhaltenen Produkte der Ozonisierung von Glutaminsäure und Lysin zeigt anders als bei Histidin keine diskreten Signale (Abb. 33), sondern vor allem im Falle des Lysins ein langes Tailing der Produkte, was lediglich die Aussage zulässt, dass eine Teilumsetzung des Ausgangsmaterials stattgefunden hat. Für Glutaminsäure kann aufgrund dieser Ergebnisse festgestellt werden, dass die Empfindlichkeit gegenüber Ozon offenbar nicht sonderlich ausgeprägt ist.



Abb. 33. Dünnschichtchromatographische Trennung der ozonisierten Aminosäuren Glutaminsäure und Lysin im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen (die ozonisierten Aminosäuren sind doppelt aufgetragen).

Cystin kann aufgrund seiner Unlöslichkeit nur in Wasser suspendiert hinsichtlich seiner Empfindlichkeit gegenüber Ozon untersucht werden. Die nachfolgenden ESR-Spektren (Abb. 34) zeigen, dass durch die Begasung eine Veränderung bewirkt und gegenüber dem unbehandelten Material (links) ein deutlich hervortretendes Radikalsignal generiert wird (Mitte). Das rechts abgebildete ESR-Spektrum von UV-bestrahltem Cystin zeigt im Vergleich dazu eine geradezu drastische Veränderung, was mit der Ausbildung eines in früheren Arbeiten⁹⁸ bereits beschriebenen charakteristischen Musters einhergeht und, das auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Radikalspezies schließen lässt.

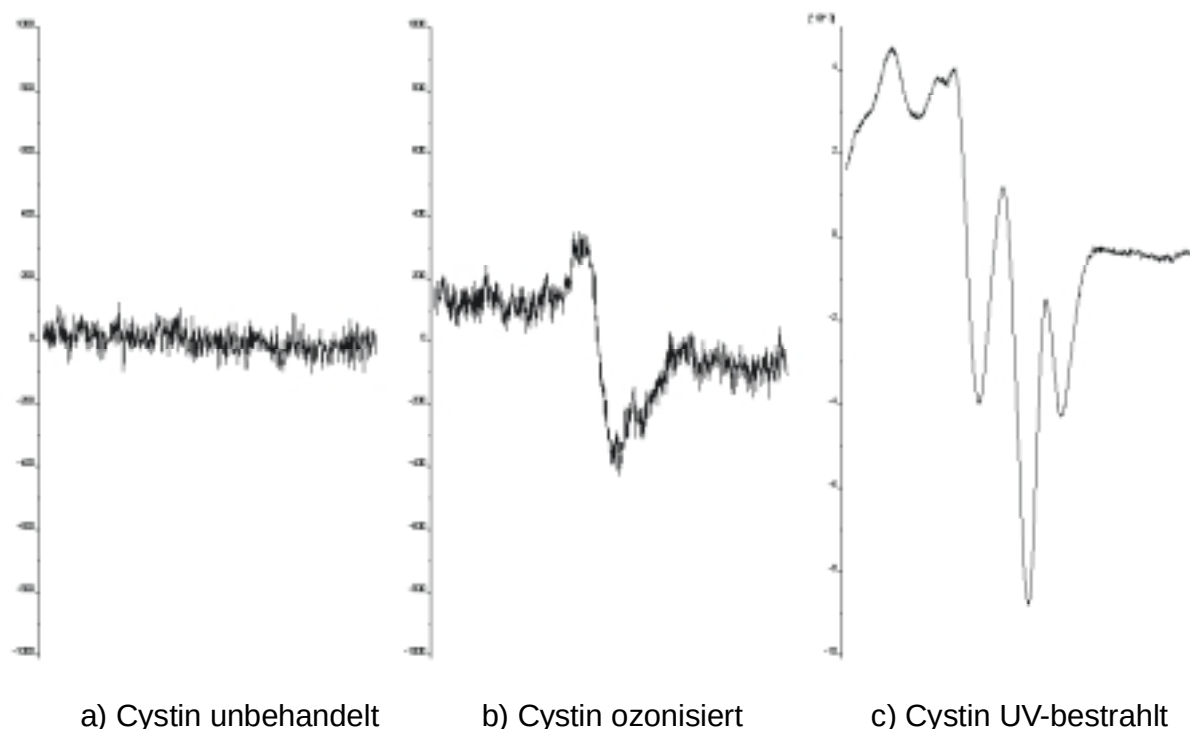


Abb. 34. ESR-Spektren von unbehandeltem Cystin im Vergleich zu ozonisiertem und bestrahltem Cystin.

3.1.3 Casein

Casein⁹⁹ ist der wichtigste Eiweißbestandteil der Milch. Es ist ein histidin- und tryptophanreiches Protein, das in Reinform als weißes bis gelbliches, schwach hygroskopisches Pulver vorliegt. Casein ist unlöslich in Wasser, aber löslich in Alkalien. In Kuhmilch liegt es als Calciumcaseinat vor mit einem Massenanteil von rund 3 %. Es sind insgesamt drei Caseine bekannt, die allesamt den Caseinanteil in der Milch ausmachen. Durch Fraktionierung können abhängig vom Molekulargewicht α -, β - und γ -Casein unterschieden werden. Alle Fraktionen enthalten 17-18 Aminosäuren unterschiedlichen Mengenverhältnisses, von denen die wichtigsten in Tab. 18 aufgeführt sind.

Tab. 18. Zusammensetzung von Casein^{100,101} (Histidinanteil grau unterlegt).

Aminosäure	Casein ¹⁰⁰ (g/100 g)	Casein ¹⁰¹ (g/100 g)
Arg	3,26	3,7
His	2,82	2,9
Ile	4,66	5,4
Leu	8,79	9,5
Lys	7,35	8,1
Met	2,70	2,8
Cys	0,41	0,3
Phe	4,79	5,2
Tyr	4,77	5,8
Thr	3,98	4,7
Trp	1,14	1,6
Val	6,10	6,7

Untersucht wurden Natriumcaseinat, ein rohweißes wasserlösliches Pulver, dessen wässrige Lösung eine schwache Trübung aufwies, sowie ein saures Hydrolysat des Caseins, eine gelborange Masse, deren klare wässrige Lösung ebenfalls eine gelborange Farbe aufwies. Zudem haftete dem Hydrolysat ein strenger, unangenehmer Geruch an.

Beide Substanzen wurden als wässrige Lösung (c= 5g/l) eine Stunde einem Ozonstrom ausgesetzt und anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 35).

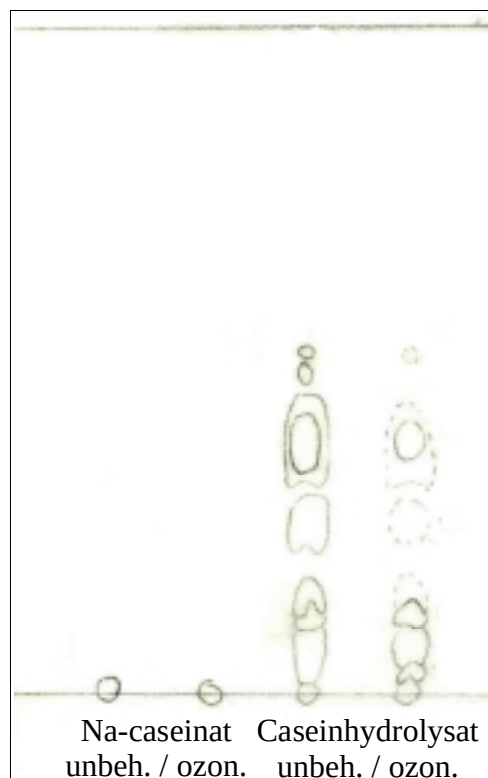


Abb. 35. Dünnschichtchromatogramm von Na-Caseinat und Caseinhydrolysat jeweils unbehandelt (unbeh.) und nach 1-stündiger Ozonisierung (die gestrichelten Markierungen zeigen schwache, die ausgezogenen Markierungen starke Intensität der Produktflecken). Laufmittel: EE/EtOH/Wasser 6:5:2 (v:v:v), Entwicklung: Ninhydrin.

Im Falle des Natrium-Caseinats wurde durch Ozoneinwirkung keine Teilhydrolyse ausgelöst. Die auf der Startlinie des Chromatogramms aufgetragene Substanz konnte nicht aufgetrennt werden.

Beim sauren Caseinhydrolysat ist eine Veränderung sowohl in der Produktverteilung als auch in der Intensität der ninhydringefärbten Produktflecken sichtbar.

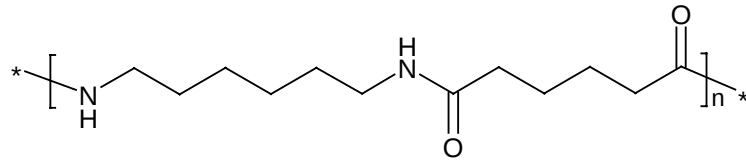
Tab. 19. R_f -Werte und Farbbeschreibungen der Produktflecken im Dünnschichtchromatogramm von unbehandeltem sowie ozonisiertem Caseinhydrolysat (vgl. Abb. 35); Konzentration der Lösung: 5 g/l, Dauer der Ozonbehandlung 1 h bei 230 mg O₃/h.

Caseinhydrolysat			
unbehandelt		ozonisiert	
R_f -Wert	Farbe	R_f -Wert	Farbe
0,51	beige	0,5	beige
0,49	beige	0,48	beige
0,43	violett		
		0,38	violett, beige-violett umrahmt
0,3	rosa		
		0,26	rosa
0,24	rosa		
0,17	rosa	0,16	rosa-braun
0,11	beige-rot	0,11	beige
0,03-0,09	violett-orange	0,04-0,1	violett-orange
		0,03	violett-orange

3.1.4 Polyamidfaser (Nylon-6,6)

Wolle ist eine proteinische Faser, d.h. die Verknüpfung der sie bildenden Aminosäuren der Hauptkette erfolgt durch Ausbildung peptidischer Bindungen. Die Peptidbindungen liegen der Natur der Proteinfaser entsprechend in hoher Anzahl und Dichte vor.

Um die Wirkung einer Ozonbehandlung auf die Hauptkette (Backbone) zu untersuchen, sollte eine Modellfaser verwendet werden, die ebenfalls Peptidbindungen in der Hauptkette aufweist, die aber im Gegensatz zur Proteinfaser keine Seitenketten aufweist. Solchermaßen strukturell reduziert können Polyamidfasern als Modellsubstanz angesehen werden. In diesem Fall wurde aufgrund der direkten Verfügbarkeit das Nylon-6,6 (8) ausgewählt.



8

3.1.4.1 Oberflächenveränderung an Nylon-6,6 durch Ozon

Wie bei der Wolle lohnt ein näherer Blick auf die Oberfläche einer Nylon-6,6-Faser. Im unbehandelten Zustand und verglichen mit einer Merinowollfaser kann die Topographie als glatt bezeichnet werden (Abb. 36). Es sind an mehreren Stellen des gewählten Faserausschnittes längliche Riefen mit Tiefen von unter 1 µm zu sehen, die vermutlich bei der Fabrikation der Faser entstanden sind. Es sind kaum Ablagerungen zu erkennen.

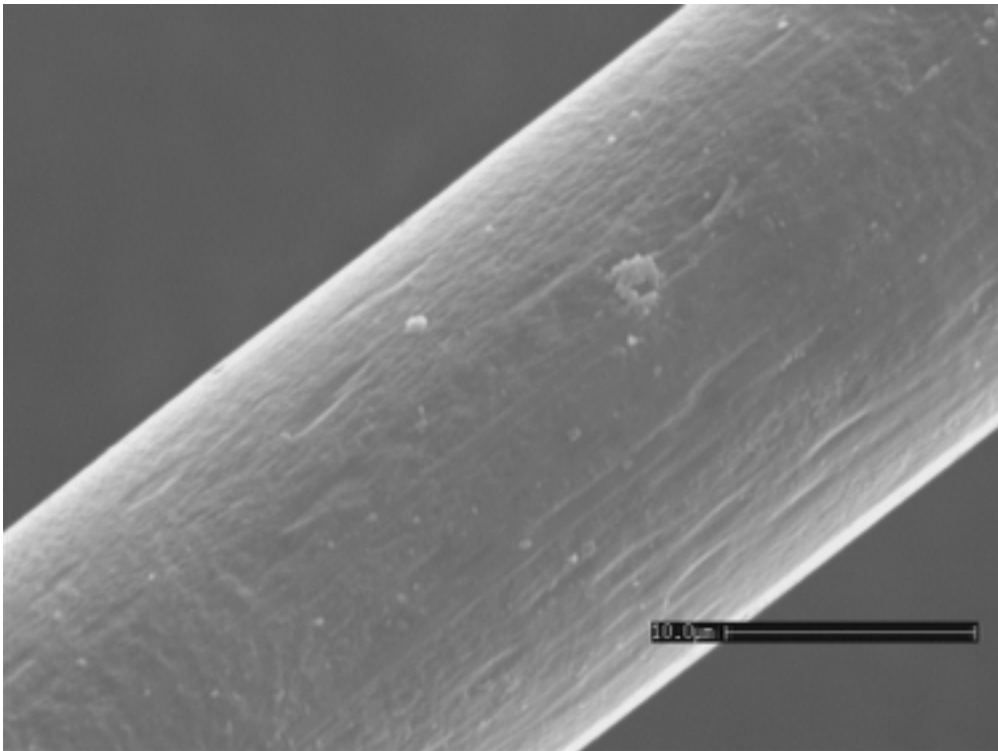


Abb. 36. REM-Aufnahme einer unbehandelten Polyamidfaser vom Typ Nylon-6,6.

Die Nylon-Fasern wurden dann einem Ozonstrom ausgesetzt, der mit einer Rate von 230 mg/h 3 Stunden auf die Fasern einwirken konnte. Die relative Feuchte

wurde während der gesamten Expositionszeit auf rund 98 % gehalten. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer ozonbehandelten Faser unterscheidet sich drastisch vom unbehandelten Material. Die länglichen Vertiefungen, die vor der Ozonisierung noch deutlich zu erkennen waren, sind nicht mehr zu erkennen (Abb. 37). Die gesamte Oberfläche hat eine deutliche Glättung erfahren, Oberflächenstrukturen sind nicht nachzuweisen. Erhöht hat sich hingegen die Häufigkeit von Ablagerungen auf der Oberfläche

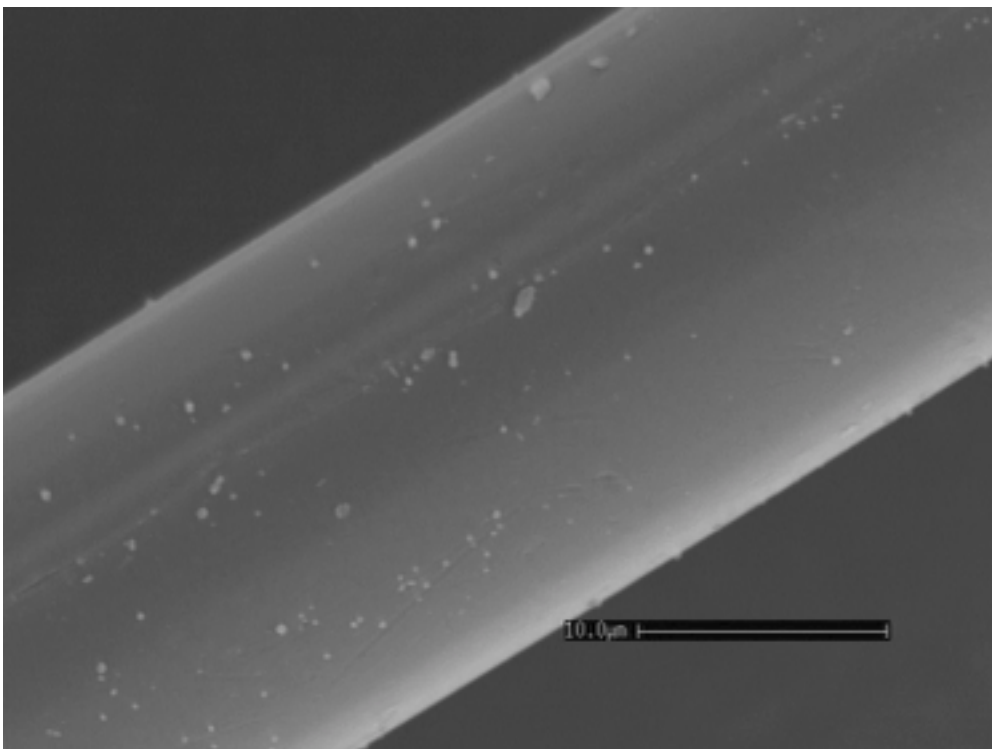


Abb. 37. REM-Aufnahme einer Polyamidfaser nach 3-stündiger Begasung mit Ozon (230 mg/h).

Noch deutlicher wird die Glättung der Fasern in der nachstehenden Abbildung, die ein Bündel von drei Fasern zeigt (Abb. 38). Alle drei Fasern wirken absolut glatt, abgesehen von den Fragmentablagerungen auf der Oberfläche, die sich in ihrer Größe deutlich sichtbar von denen in der vorigen Abbildung unterscheiden.

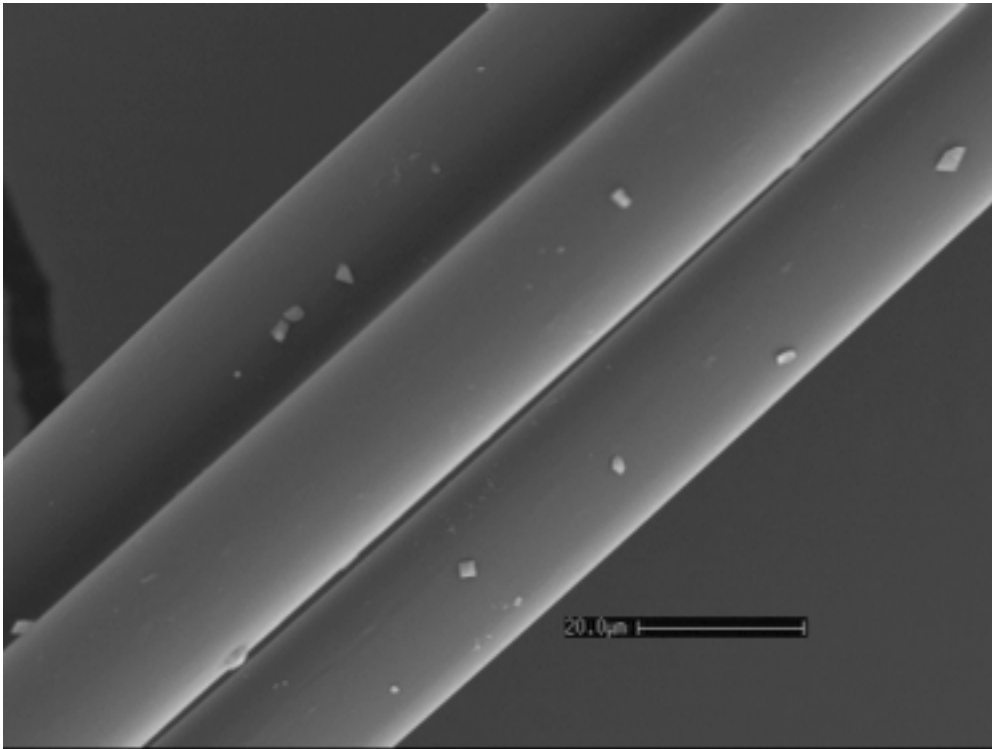


Abb. 38. REM-Aufnahme eines Bündels aus drei Polyamidfasern nach 3-stündiger Behandlung mit Ozon (230 mg/h).

3.1.4.2 Radikalbildung in Polyamid-6,6 durch Ozonisierung und Vergleich mit ozonisiertem Polyglycin

Auch die Polyamidfaser wurde auf Radikalbildung hin mittels ESR-Spektroskopie unter Einsatz der bereits vorgestellten Spintrap-Reagenzien untersucht. Aufgrund der Struktur des Polyamids, genauer gesagt durch die nichtvorhandenen Seitenketten, kann Aufschluss darüber gewonnen werden, ob an der Hauptkette eine Radikalbildung stattfindet. Damit sollte beim Vergleich mit ozonisierter Wolle eine Aussage darüber möglich sein, in welchem Maße die Hauptkette zu einer Radikalbildung in der Wolle beiträgt. Um kurzlebige Radikale detektieren zu können, wird vor der Ozonisierung DMPO als Spintrap-Reagenz zugegeben.

Abb. 39 zeigt einen Vergleich zwischen unbehandeltem, ohne und mit DMPO-Zusatz ozonisiertem Polyamid Nylon-6,6.

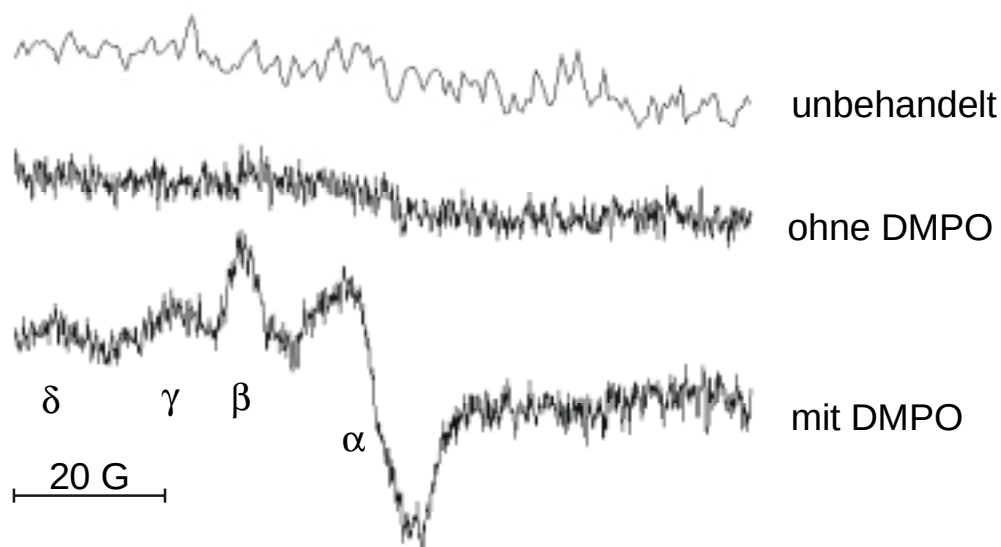


Abb. 39. ESR-Signale von Polyamid Nylon-6,6 nach Ozonisierung in Wasser unter Zusatz von DMPO als Spintrap-Reagenz.

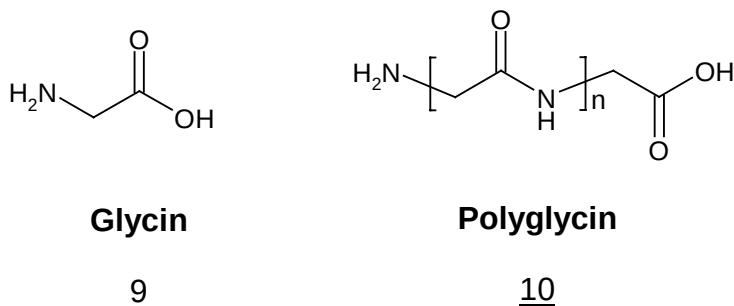
Die im Vergleich zu den weiteren Darstellungen in Abb. 39 entzerrte Darstellung des Messergebnisses für das unbehandelte Material erklärt sich aus der Verwendung einer an die Sweep-Weiten der eigentlichen Messung angepassten Detektion. Unabhängig davon wird beim unbehandelten Material kein ESR-Signal detektiert. Auch nach Ozonisierung ohne Zusatz von DMPO als Spintrap sind keine bei Normbedingungen stabilen Radikale nachweisbar. Dies ist bei Zusatz von DMPO anders. Hier werden nach Ozonisierung neben dem mit α bezeichneten intensiven (Haupt-)Signal drei weitere Radikalspezies (β , γ , δ) nachgewiesen, deren Resonanz im Vergleich zum Hauptsignal zu niedrigeren Feldstärken (höheren g -Werten) verschoben ist (Tab. 20).

Tab. 20. Feldstärke und g-Werte der bei der Ozonisierung von Polyamid-6,6 gefundenen ESR-Signale (Abb. 39).

Signal	Feldstärke in G	g-Wert
α	3366	2,03469
β	3381	2,02516
γ	3391	2,01956
δ	3409	2,00861

Diese Daten zeigen, dass bei der Ozonisierung von Polyamid-6,6 Radikalspezies gebildet werden, die aufgrund ihrer Kurzlebigkeit nur mit Hilfe eines Spintrap-Reagenzes durch ESR-Spektroskopie sichtbar gemacht werden können. Aufgrund der unverzweigten Struktur des Polyamids steht fest, dass die detektierten Radikalspezies nur am „Backbone“ gebildet werden können. Zu vermuten ist eine Spaltung der Peptidbindungen, da die C4- bzw. die C6-Ketten im Polyamid keinen Angriffspunkt für Ozon, beispielsweise in Form einer Doppelbindung, bieten.

Während die Häufigkeit an Peptidbindungen im Polyamid-6,6 pro Wiederholungseinheit zwei Bindungen auf 14 Atome der Hauptkette beträgt, ist diese bei dem (ebenfalls unverzweigten) Polymeren der Aminosäure Glycin (9) mit einer Bindung pro 3 Atome der Hauptkette deutlich größer.



Der beim Polyamid-6,6 gefundene Effekt sollte sich also auch bei Polyglycin (10) nachweisen lassen und aufgrund der höheren Anzahl von Peptidbindungen

in verstärktem Maße auftreten. Abb. 40 zeigt die Ergebnisse der ESR-spektroskopischen Untersuchung von Polyglycin.

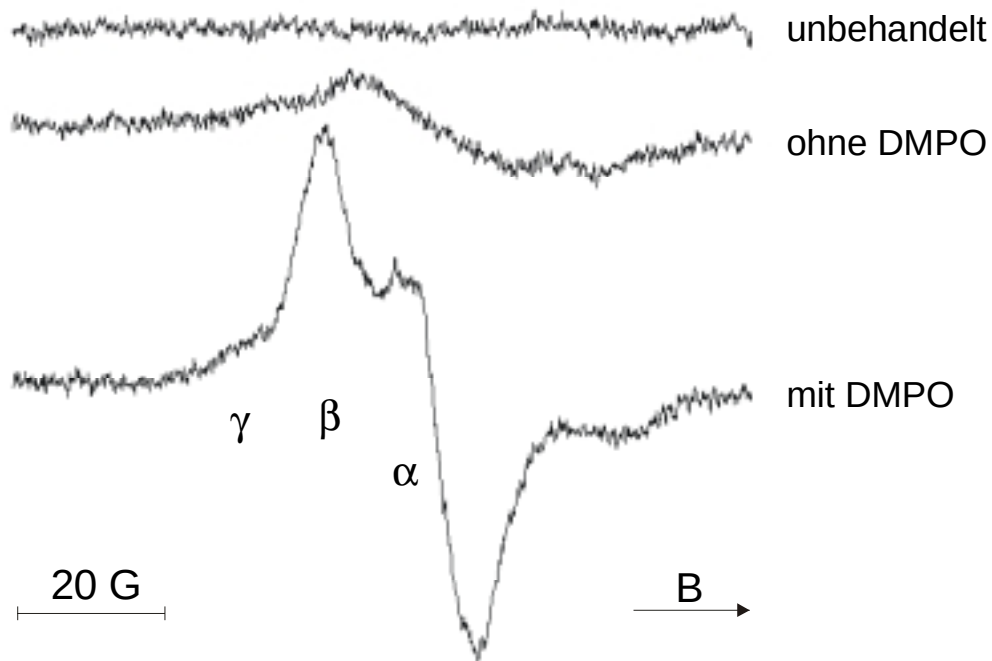


Abb. 40. ESR-Signale von Polyglycin nach Ozonisierung in Wasser unter Zusatz von DMPO als Spintrap-Reagenz (Polyglycin in Wasser suspendiert 30 min mit Ozon (230 mg O₃/h) begast).

Bei deutlich geringerer Probenmenge (ca. 20 mg) im Vergleich zu 100 mg Probengewicht beim Polyamid ist die Intensität der detektierten Signale deutlich höher. Ohne eine genaue quantitative Bestimmung durchführen zu können lässt sich dennoch feststellen, dass die absolute Zahl der Radikalspezies bei gleichen Ozonisierungsparametern gestiegen ist. Dies spricht ebenfalls dafür, dass bei der Ozonisierung die Peptidbindung attackiert wird. Einen weiteren Hinweis liefert die Betrachtung der ESR-Signale ozonisierten Glycins (Abb. 41). Hier findet sich auch bei Einsatz eines Spintraps nur ein sehr schwaches α -Signal, während ohne DMPO kein Signal detektiert wird.

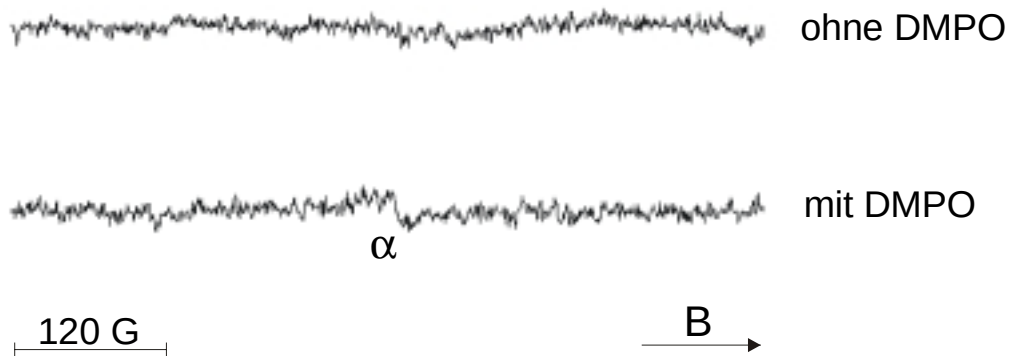


Abb. 41. ESR-Signale von Glycin nach Ozonisierung unter Zusatz von DMPO als Spintrap-Reagenz.

3.2 Veränderung der Wollstruktur durch Ozon

Wie stark Ozon als Oxidationsmittel zu wirken in der Lage ist, wurde bereits im einführenden ersten Teil dieser Arbeit beschrieben.

Somit sind bei der Proteinfaser Wolle deutliche Veränderungen durch die Begasung mit Ozon zu erwarten, die sich sowohl im äußeren Erscheinungsbild wie auch in der chemischen Zusammensetzung äußern sollten.

3.2.1 Veränderungen der Faseroberfläche

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine vergleichsweise einfache und schnelle Methode dar, kleinste Strukturen zu visualisieren^{102,103}. Die folgenden rasterelektronischen Aufnahmen (Abb. 42, Abb. 43) zeigen äußerlich intakte Merino-Wollfasern mit einer vorbildlich scharf abgegrenzten Schuppenstruktur.

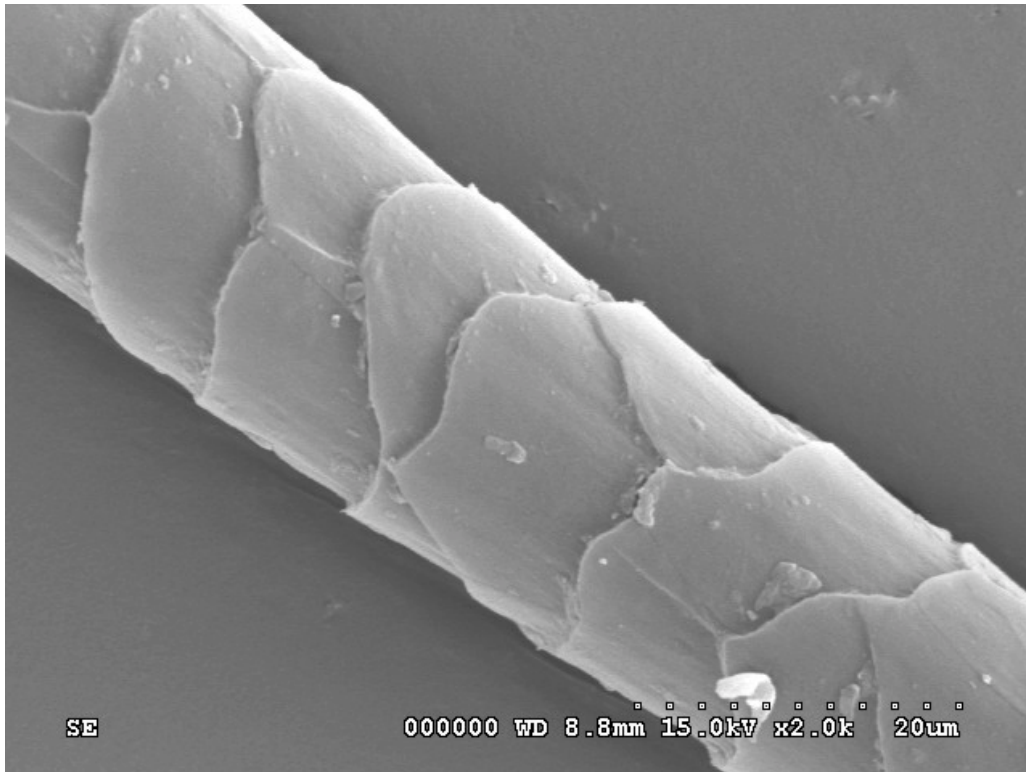


Abb. 42. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 2000fach) einer unbehandelten Wollfaser entlang der Wuchsrichtung (Wurzel unten rechts, Spitze oben links).

Hier und da sind kleine Fragmente vermutlich der Cuticula zu erkennen, die sich durch die normale mechanische Belastung abgelöst haben. Die Oberfläche der Schuppen weist eine Längsstruktur¹⁰⁴ auf, zeigt aber keinerlei Anzeichen, die auf eine massive Schädigung hindeuten würden.

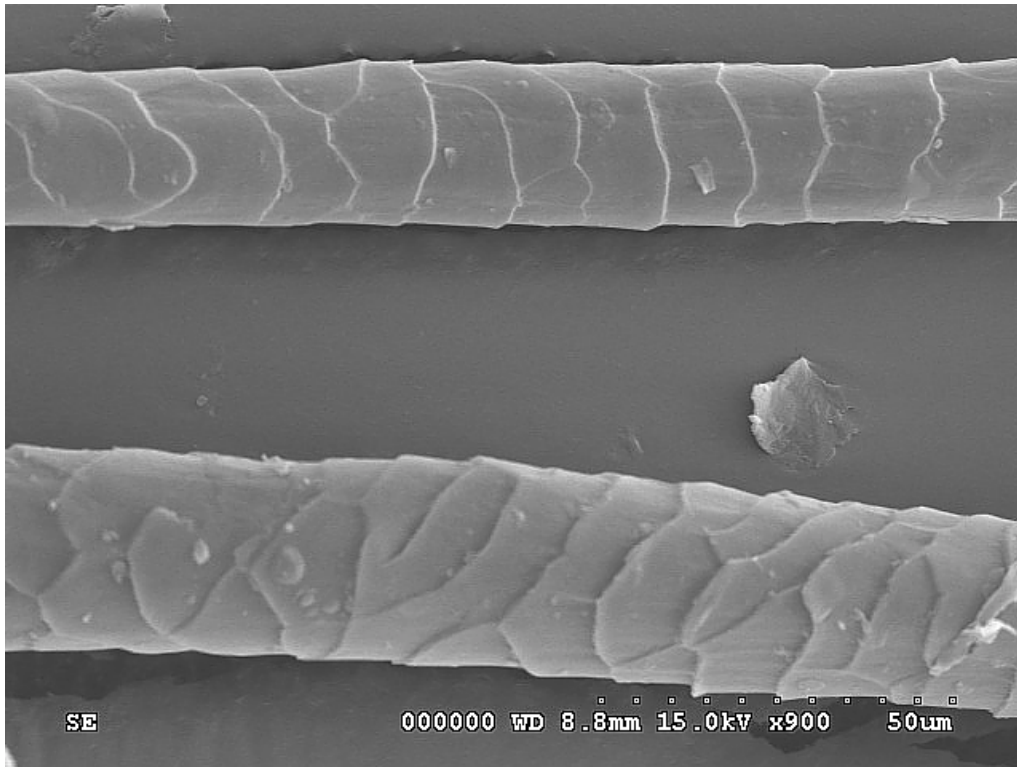


Abb. 43. REM-Aufnahmen zweier unbehandelter Wollfasern (Vergrößerung 900fach) mit unterschiedlich ausgeprägten Schuppenkanten, Wuchsrichtung gegenläufig (oben von links nach rechts).

Innerhalb der Wollprobe zeigen verschiedene Fasern Unterschiede in der äußeren Erscheinungsform, was sich vor allem durch eine unterschiedliche Ausprägung der Schuppenstruktur bemerkbar macht. In einer wie auch immer gearteten Behandlung bzw. Veränderung der Wollfaser durch oxidierend wirkende Methoden sollten sich diese morphologischen Unterschiede niederschlagen.

Nach dreistündiger Ozonisierung bei einer relativen Feuchte von 98 % und einer Ozonrate von 230 mg/h zeigen sich deutliche Folgen des oxidativen Angriffes auf die Wollfasern, die sich innerhalb ein und derselben Probe jedoch unterschiedlich bemerkbar machen.

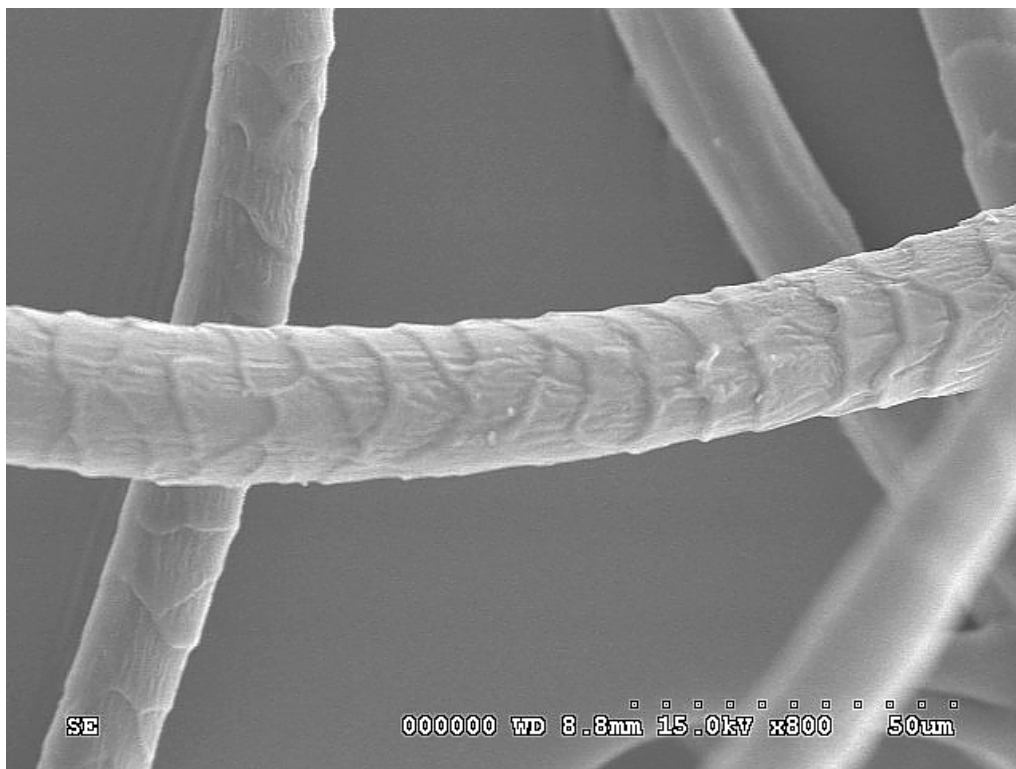


Abb. 44. REM-Aufnahme (Vergrößerung 800fach) von Merino-Wollfasern nach dreistündiger Einwirkung von Ozon (230 mg/h, 98 % r.F.)

Die Oberfläche der in Abb. 44 im Vordergrund abgebildeten Faser zeigt eine Art Riefung entlang der Faserachse. Quer zur Wuchsrichtung des Haares zeichnen sich diese Veränderungen nicht ab. Es liegen kaum Ablagerungen (z.B. Cuticularesten etc.) auf der Oberfläche vor. Die Schuppenstruktur weist neben einer im Vergleich zur unbehandelten Faser Abrundung der Schuppenkanten keine äußerlichen Veränderungen auf. Die Längsriefung wird noch deutlicher bei Betrachtung von Abb. 45.

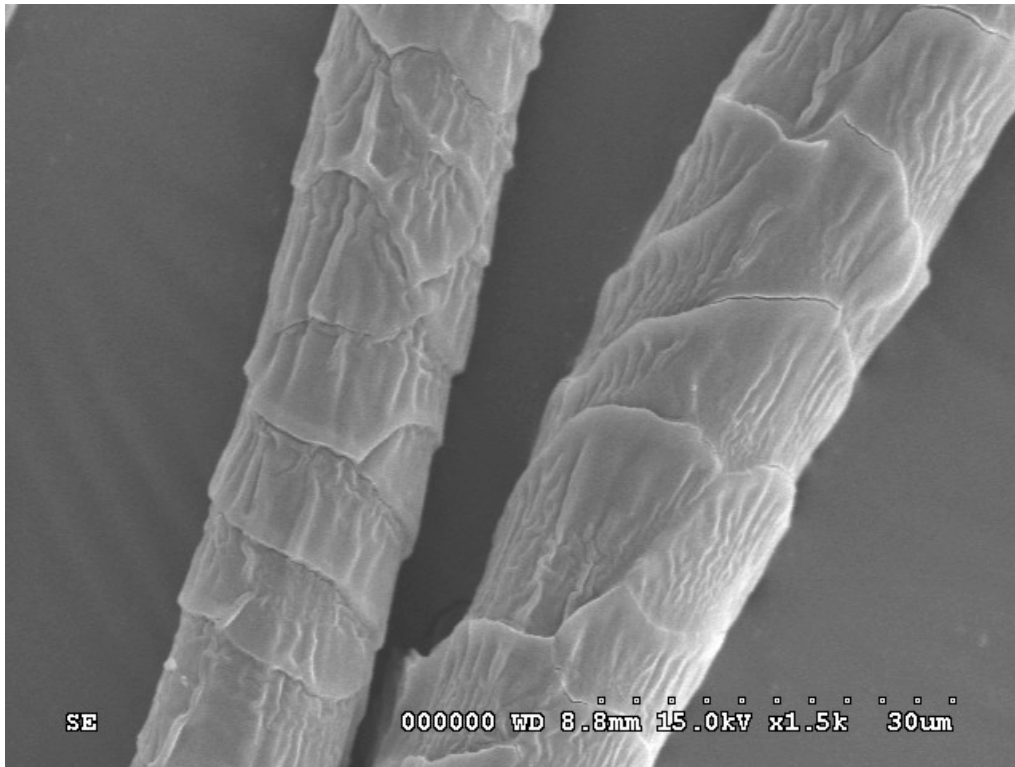


Abb. 45. REM-Aufnahme von Merino-Wollfasern in 1500facher Vergrößerung nach dreistündiger Einwirkung von Ozon (230 mg/h, 98 % r.F.).

Die Schuppenkanten treten infolge der oxidativen Behandlung in dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme deutlich hervor. Die rauere Oberfläche zeigt sich in der Ausbildung von Strukturen entlang der Faser, jedoch sind dies offenbar keine Ablagerungen sondern resultieren höchstwahrscheinlich aus substantiellem Abbau in der Wollfaser.

Die nach der Ozonisierung feststellbare bessere Benetzbarkeit der Fasern resultiert offenbar auch aus der Entfernung der Oberflächenlipide, wodurch die Faser hydrophiler wird und leichter aufquellen kann. Dieser Effekt könnte ebenfalls zum Ausbildung des beschriebenen Erscheinungsbildes beitragen.

Diese Veränderung ist aber nur eine Erscheinungsform von ozonisierter Wolle. Innerhalb ein und derselben Probe lassen sich weitere Veränderungen nachweisen, wie die folgenden Abbildungen zeigen.

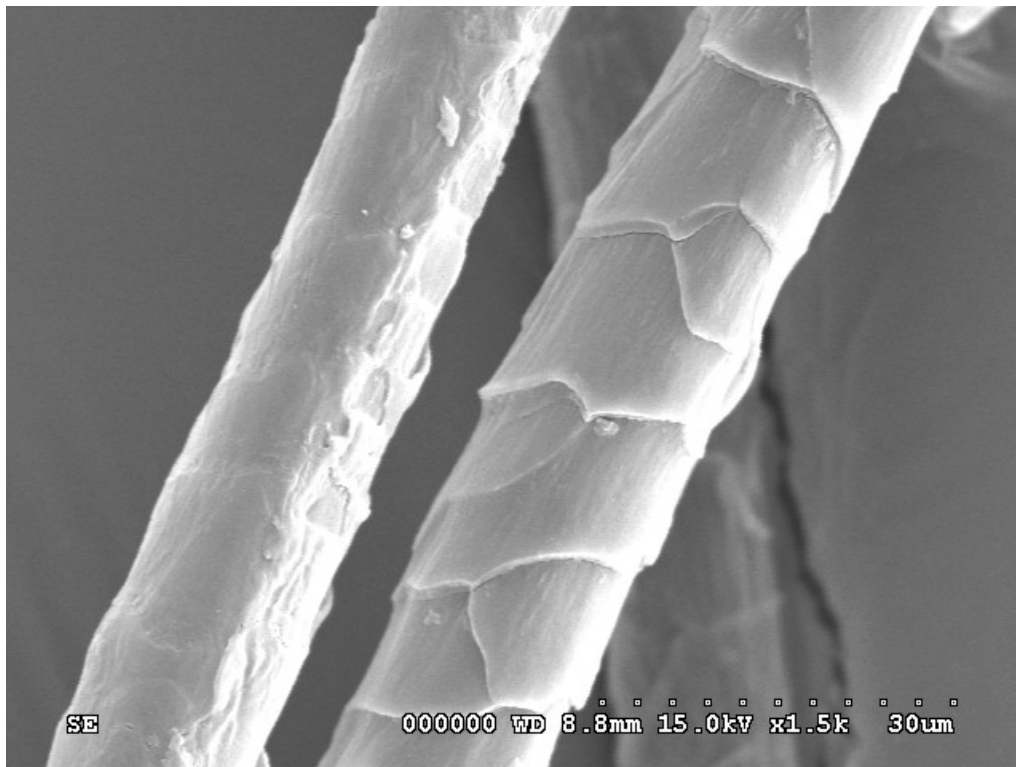


Abb. 46. REM-Aufnahme von Merino-Wollfasern in 1500facher Vergrößerung nach Einwirkung von Ozon (3 h, 230 mg O₃/h, 98 % r.F.).

Abb. 46 zeigt zwei Fasern mit sehr unterschiedlichem äußeren Erscheinungsbild: eine äußerlich wenig veränderte Wollfaser mit scharfer Schuppenkantenstruktur liegt neben einer anderen Faser in ein und demselben Kammzug, deren Erscheinungsbild radikal verändert worden ist. Die ehemalige Schuppenstruktur ist kaum noch zu erkennen. Die Oberfläche ist unregelmäßig und zerklüftet.

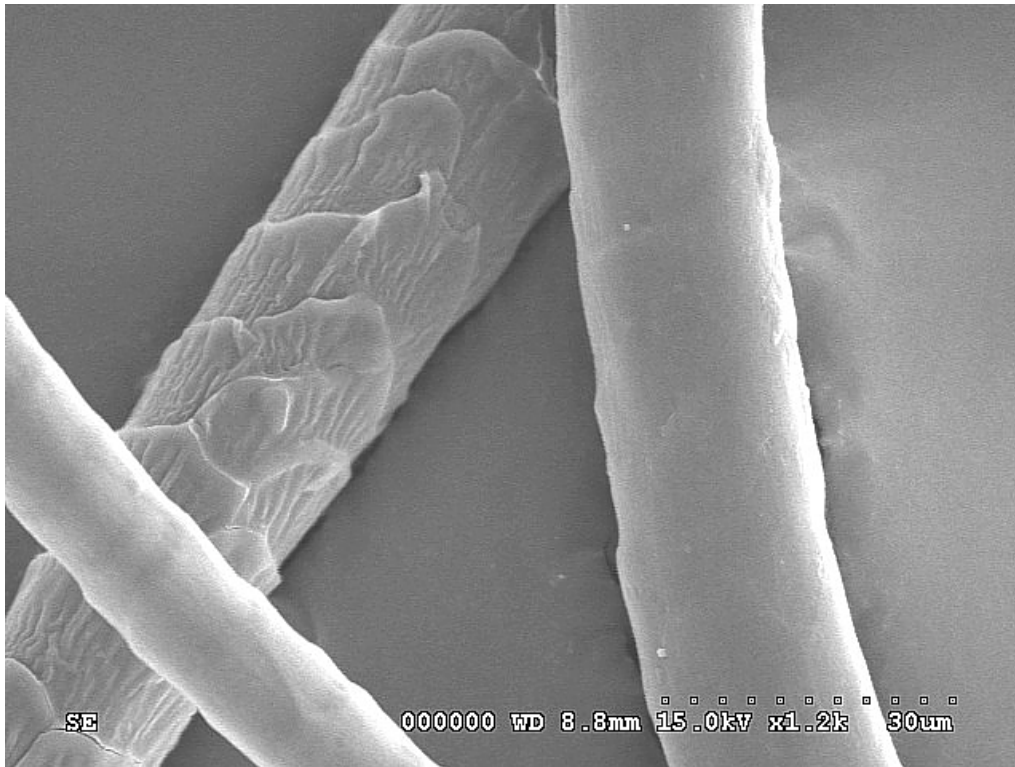


Abb. 47. REM-Aufnahme eines Merinowollkammzuges in 1200facher Vergrößerung nach Einwirkung von Ozon (3 h, 230 mg O₃/h, 98 % r.F.).

In Abb. 47 stehen einer Faser mit der schon beschriebenen Baumrindenstruktur zwei nahezu völlig glatte Fasern gegenüber, an deren Rand die Schuppenstruktur nur noch zu erahnen ist.

Die aufgezeigten äußerlichen Veränderungen der Wollfaser nach intensiver Ozoneinwirkung ähneln bereits bekannten Erscheinungen bei Wollfasern, die zwecks Filzfreiausrüstung mit Chlor behandelt wurden (Abb. 47).

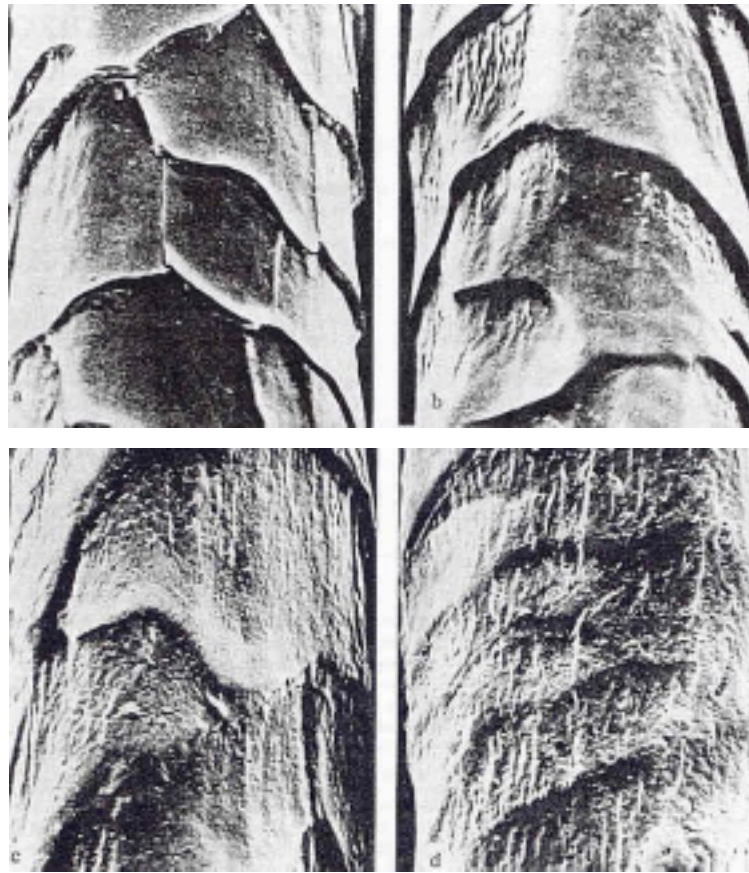


Abb. 48. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wolle mit unterschiedlicher Expositionszeit gegenüber Chlor¹⁰⁵.

Abb. 49 und Abb. 50 zeigen die Kett- bzw. Schussfäden von unbehandeltem Wollgewebe.

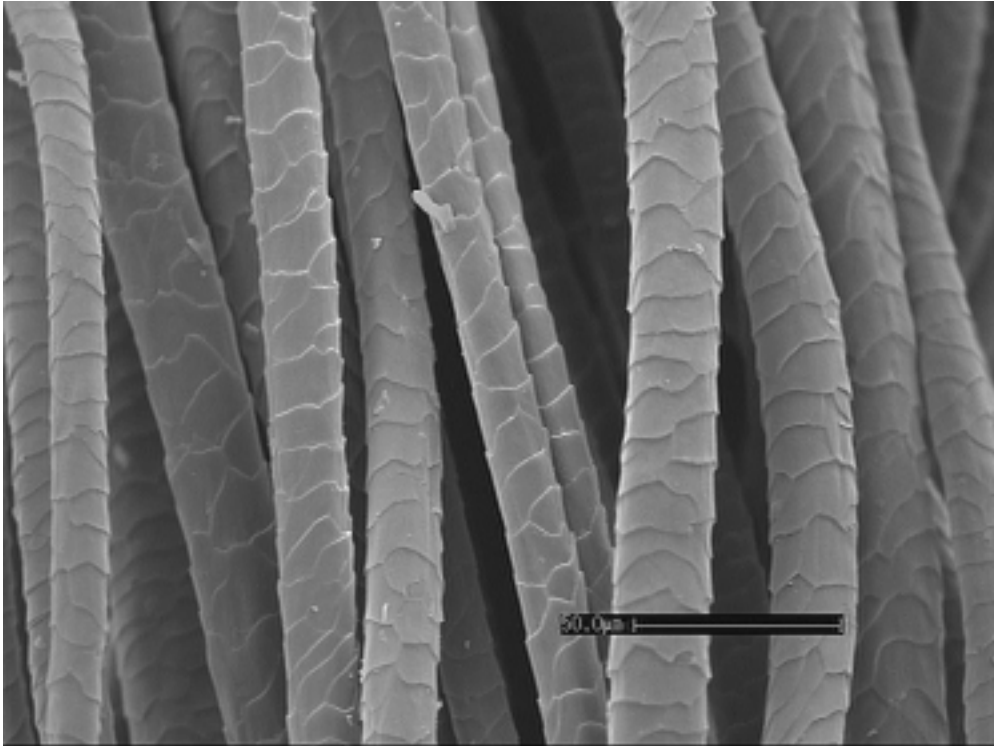


Abb. 49. REM-Aufnahme der Kettfasern von unbehandeltem Wollgewebe.

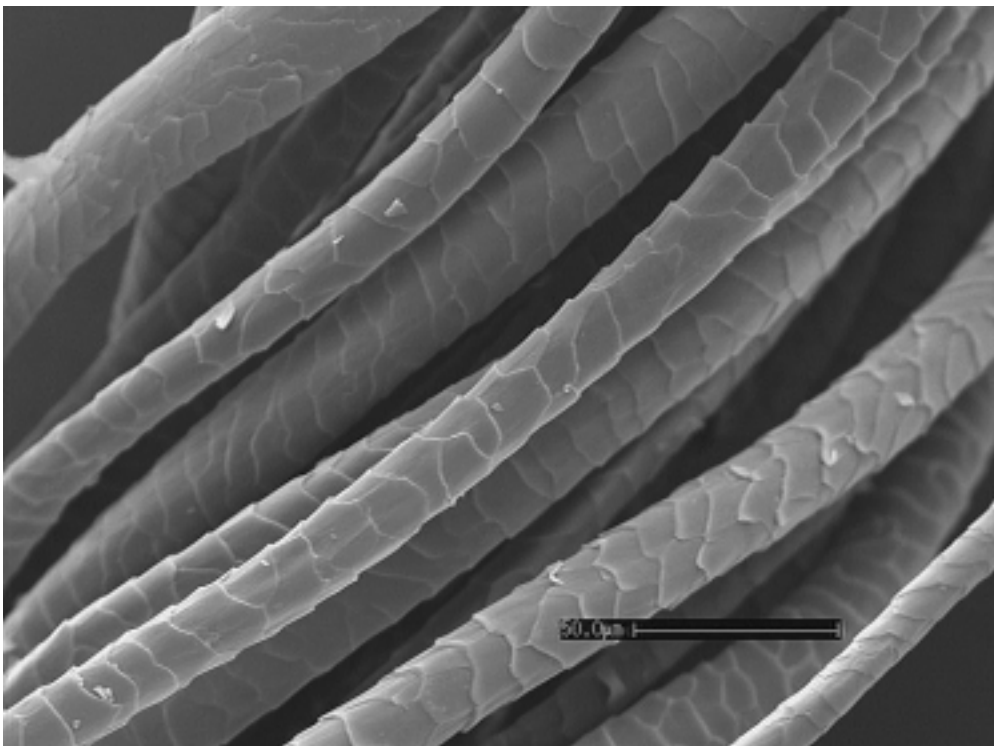


Abb. 50. REM-Aufnahme der Schussfasern von unbehandeltem Wollgewebe.

Wie schon bei den REM-Aufnahmen des unbehandelten Wollkammzuges gezeigt, weisen die Einzelfasern eine intakte Schuppenstruktur auf, es sind keine sichtbaren Schäden der Cuticula und kaum Ablagerungen in Form von Cuticula-resten als Folge von Faserabrieb nachzuweisen. Das untersuchte Gewebe weist allerdings Fasern höchst unterschiedlichen Dicke auf; die Durchmesser der in Abb. 50 sichtbaren Fasern variieren in einem Bereich von 10-30 μm .

Abb. 51 und Abb. 52 zeigen jeweils Ausschnitte eines Wollgewebes nach 3-stündiger Exposition gegenüber Ozon in einer Ozon-Sauerstoff-Atmosphäre (relative Feuchte: 98 %) bei einer Ozonisierungsrate (Ozonproduktion) von 230 mg/h. Zunächst kann augenscheinlich ein ähnlicher Effekt beobachtet werden wie bei der Ozonisierung der Wollkammzugfasern: die Topographie der Faser-oberfläche erfährt eine deutliche Veränderung. Die Schuppenstruktur der Cuticula hat eine Glättung erfahren und ist nur noch hier und da zu erahnen.

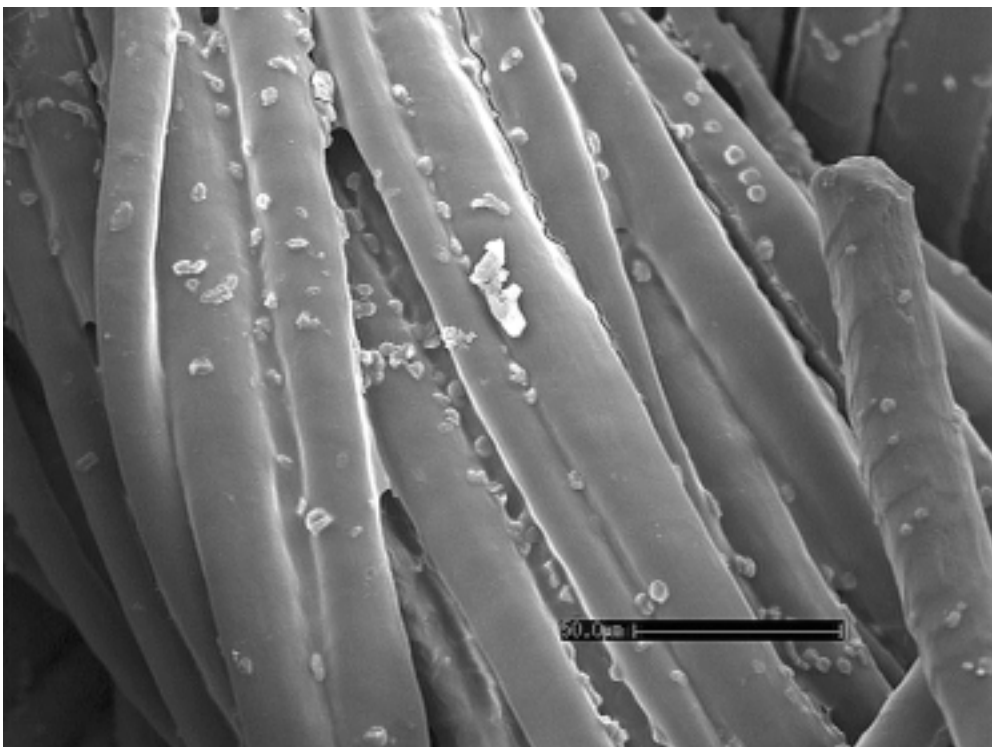


Abb. 51. REM-Aufnahme von Wollgewebe nach Behandlung mit Ozon (3 h, 230 mg O_3/h , 98 % r.F., Vergrößerung 500fach).

Abb. 51 zeigt darüber hinaus einen weiteren interessanten Effekt als Folge der Ozonexposition: während der Ozoneinwirkung kleben die Fasern regelrecht zusammen und bilden neue Verbunde aus, die sich über mehrere Fasern, teilweise in Fadenstärke, hinweg erstrecken. Der Bruch dieser Verbunde erfolgt durch überwiegend geringe mechanische Einwirkung und erzeugt gezackte Bruchkanten zwischen den Einzelfasern (Abb. 52). Ein ursächlicher Zusammenhang der Verklebung mit der zur Kontrastierung und Ableitung der entstehenden Potentiale notwendigen Beschichtung der Fasern mit Gold kann ausgeschlossen werden¹⁰⁶. Die sichtbaren Fragmente stammen nur teilweise vom Bruch der Faserverklebungen; wie im folgenden gezeigt wird, sind jedoch auch deutliche Anzeichen eines Aufbrechens der Cuticula festzustellen. Das Auftreten von Faserverklebungen ist auch bei der Chlorierung von Wolle als sog. Top-hardening bekannt¹⁰⁷. Die Folge daraus ist ein deutlich spröderer Griff des Gewebes. Abb. 52 zeigt ebenfalls, dass die Oberfläche der Fasern im Bündel auffallend glatt ist.

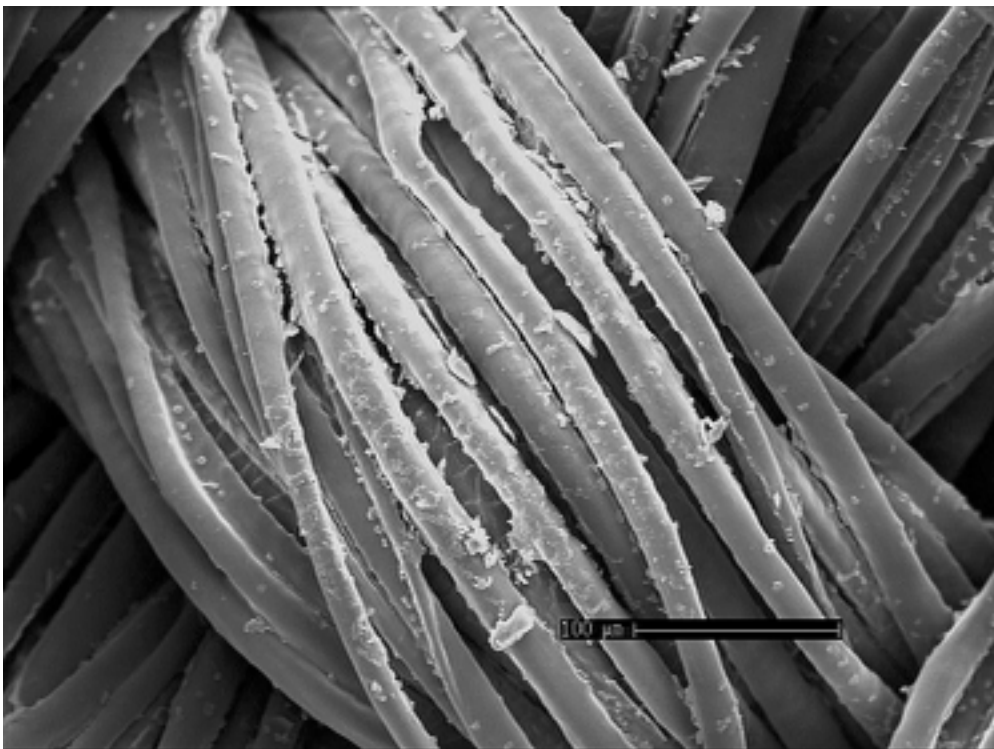


Abb. 52. REM-Aufnahme von Wollgewebe nach mit Ozon (3 h, 230 mg O₃/h, 98 % r.F., 250fache Vergrößerung).

Die in Abb. 53 dargestellten Fasern weisen neben der schon bekannten Glättung eine Veränderung, die auch schon im Gesamtgewebe (Abb. 51) sichtbar wurde: fast ausschließlich auf den geglätteten Fasern finden sich Ablagerungen oder Auswüchse.

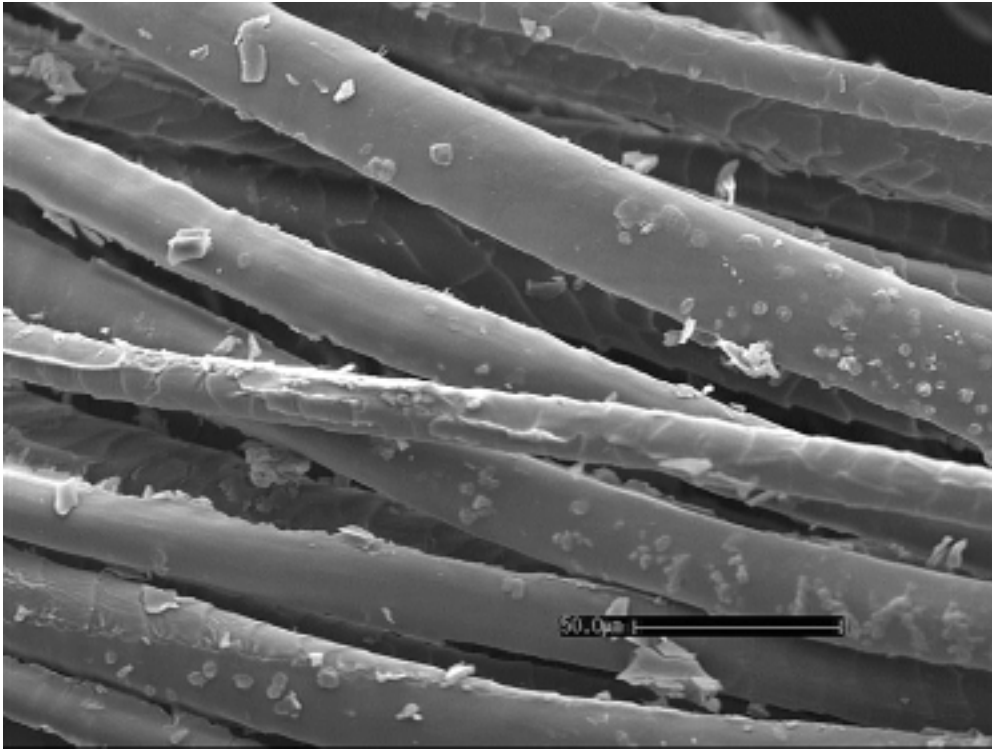


Abb. 53. REM-Aufnahme einer Probe von Kettfasern eines 3 h lang ozonisierten Wollgewebes.

Abb. 54 zeigt diese Oberflächenveränderungen im Detail. Oben rechts in der Aufnahme ist eine leichte Erhebung auszumachen, durch die quer ein Riss verläuft. Die weiter unten im Bild liegenden „Pocken“ weisen grundsätzlich ähnliche Erhebungen auf, allerdings wächst aus deren Mittelpunkt eine weitere Stufe heraus. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass diese Strukturen nicht durch externe Ablagerungen entstanden sind, sondern vielmehr aus der Faser heraus gebildet wurden. Proteinisches Material tritt bei der Ozonisierung durch einen nicht näher bekannten Mechanismus durch entstehende Risse in der Cuticula nach außen. Die Aufnahme zeigt darüber hinaus verschiedene Stadien dieser „Pockenbildung“.

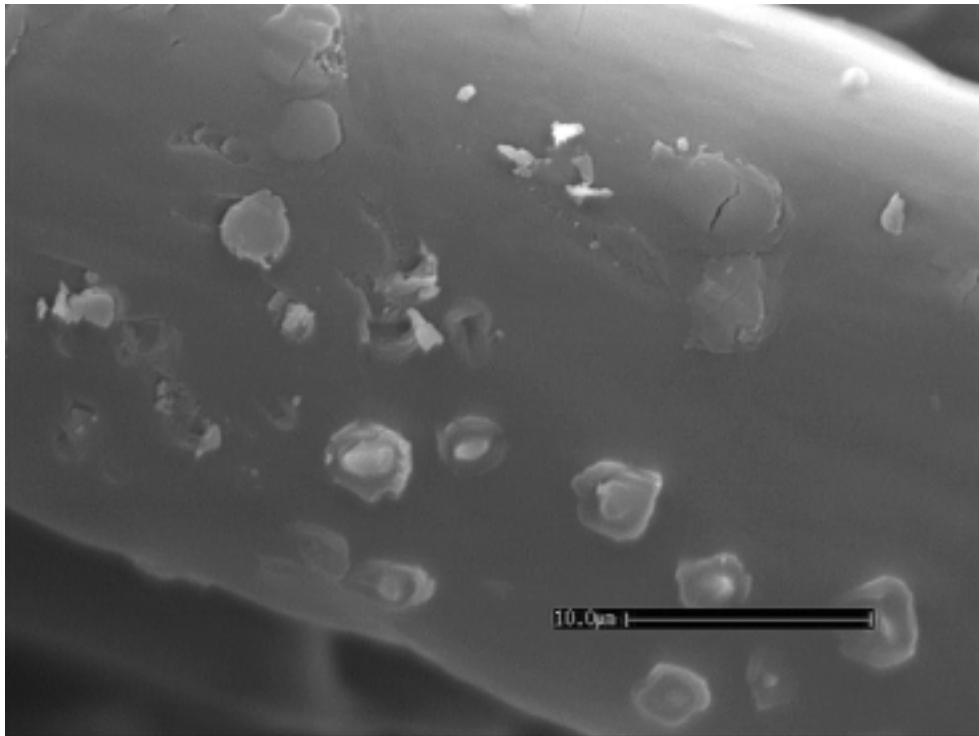


Abb. 54. REM-Aufnahme einer Kettfaser von ozonisiertem Wollgewebe (3 h, 230 mg O₃/h, 98 % r.F.) in 3000facher Vergrößerung: Nahaufnahme von Oberflächenveränderungen.

Abb. 55 zeigt eine starke Vergrößerung eines Faserbereiches mit veränderter, jedoch noch erkennbarer Schuppenstruktur. Deutlich sichtbar sind Risse in der Cuticula der im Bild unten dargestellten Faser, die sich während der Ozonisierung gebildet haben. Auf der oberen, deutlich weniger stark in Mitleidenschaft gezogenen Faser hat sich ein beträchtliches Bruchstück einer Cuticulaschuppe abgelagert. Die blättchenartigen Bruchstücke stammen hingegen vom Bruch der Verklebungen zwischen den Fasern.

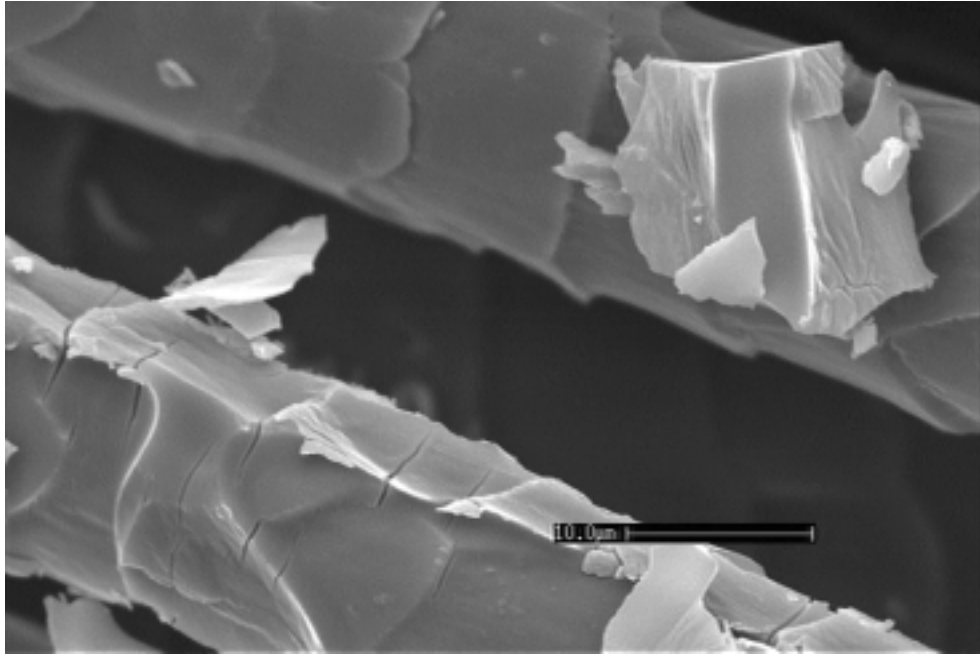


Abb. 55. REM-Aufnahme einer Faser aus den Kettfäden eines 3 h lang ozonisier-ten Wollgewebes in 2300facher Vergrößerung: Ablagerungen von großen Cuticulabruchstücken.

Abb. 56 zeigt zusammenfassend anhand eines Ausschnittes mehrerer Schussfasern noch einmal die wichtigsten Ergebnisse: die Riefung der Faseroberfläche (unten rechts), die Glättung der Faseroberfläche (Mitte und oben rechts), die teilweise noch intakte Schuppenstruktur (oben links) sowie die gebrochenen Verklebungen mit den charakteristischen scharfen Bruchkanten (Mitte und unten links). Ergänzend sind in Abb. 57 die bereits o.a. pockenartigen Ablagerungen auf der geglätteten Faseroberfläche zu sehen.

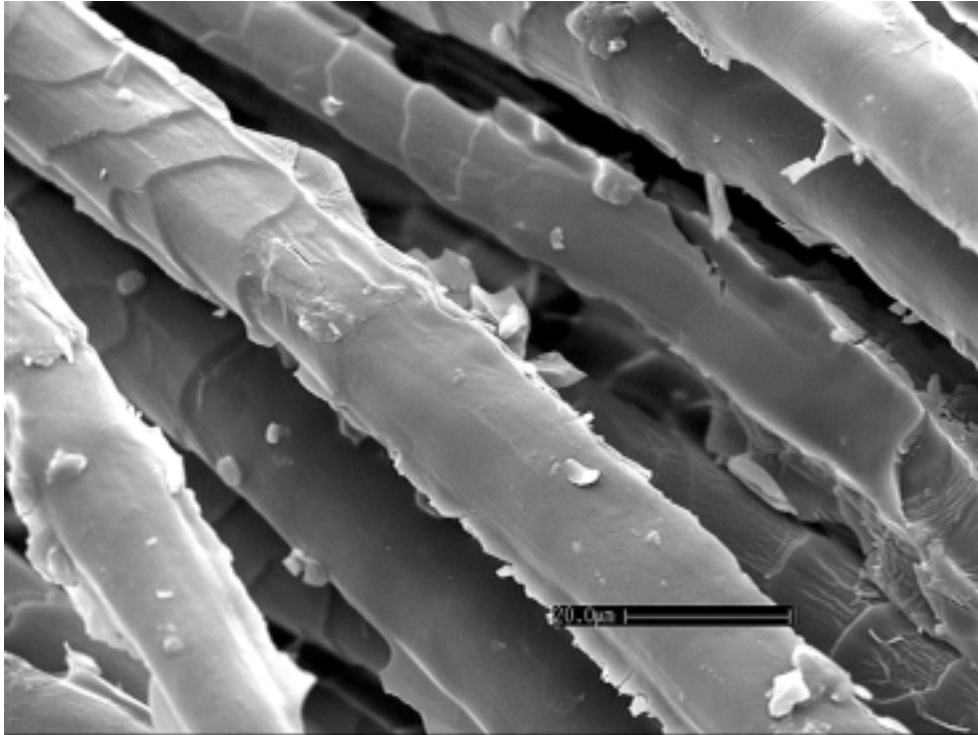


Abb. 56. REM-Aufnahme einer Faser aus den Schussfäden eines 3 h lang ozonierten Wollgewebes in 1000-facher Vergrößerung.



Abb. 57. REM-Aufnahme einer Faser aus den Schussfäden eines 3 h lang ozonierten Wollgewebes in 1000-facher Vergrößerung.

3.2.2 Veränderung der Aminosäurezusammensetzung

3.2.2.1 Einfluss der Faserfeuchte

Bekannt ist, dass die mechanischen Eigenschaften der Wolle maßgeblich von der Feuchtigkeit der Faser abhängig sind¹⁰⁸. Doch zeigen auch die chemischen Eigenschaften bzw. die Reaktivität der Wolle bei der Ozonisierung der Wollfaser Abhängigkeiten von der Faserfeuchte. Die Faserfeuchte ist bedeutend für die Auswirkungen des Ozons auf die Faser. Dies hängt mit der Quellung der Wollfaser in feuchter Atmosphäre zusammen, die dazu führt, dass Ozon und gebildete Sauerstoffaktivspezies schneller und tiefer in die Wollfaser eindiffundieren können.

Bei der Begasung von Wollkammzug wurde deshalb die Faserfeuchte variiert und eine Ozonisierung unter drei verschiedenen Bedingungen vorgenommen. Neben raumtrockenem Kammzug (rel. F. ca. 45 %), der mit trockenem Ozon behandelt wurde (rel. F. ca. 10 %), wurde ebenfalls raumtrockener Kammzug eingesetzt, der mit Ozon begast wurde, welches zuvor durch eine auf 40 °C klimatisierte Durchflussskammer auf eine relative Luftfeuchte von 98 % gebracht wurde. In einer dritten Variante wurde die Wollprobe zuvor mindestens eine Stunde in destilliertem Wasser aufbewahrt und vor der Behandlung abgequetscht. Um Feuchtigkeitsverluste zu verhindern, wurde wiederum mit angefeuchtetem Ozon behandelt. Die Begasungsdauer betrug jeweils 60 min bei einer Ozonrate von 230 mg/h (= 4,9 mmol/h).

Tab. 21 und Abb. 58 stellen die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlungen auf die Aminosäurezusammensetzung der Wolle im Vergleich zur unbehandelten Faser dar.

Tab. 21. Prozentuale Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung von Wollkammzug nach Ozonisierung im Vergleich zu unbehandeltem Material in Abhängigkeit vom Feuchtegrad des Kammzuges und des Ozons (W= Wolle, O= Ozon; die Aminosäuren, die in den Abschnitten 3.1.1.4.5 und 3.1.2 behandelt wurden, sind grau hinterlegt).

	Aminosäurezusammensetzung			
	Anteil in mol%	Veränderung zur Referenz in %		
	Unbehandelt (Referenz)	W: trocken/ O: trocken	W: trocken O: feucht	W: feucht O: feucht
Ala	5,55	1,5	-2,2	1,4
Arg	6,42	9,4	-2,3	-1,5
Asp/Asn	6,29	2,8	3,5	14,5
CysSO ₃ H	0,15	41,9	79,1	946,2
Cystin	6,65	-1,8	-3,7	-12,9
Glu/Gln	12,07	3,8	5,0	3,9
Gly	9,39	0,9	-1,1	2,0
His	0,86	1,3	-4,7	-23,2
Ile	4,03	-2,6	-4,1	-4,3
Leu	8,71	1,6	0,0	7,7
Lys	3,13	-0,5	-0,7	-4,8
Met	0,25	-40,0	36,7	26,5
Orn	0,06	-29,9	-16,9	-18,7
Phe	2,73	10,9	7,2	4,7
Pro	9,01	-17,6	-5,5	-14,7
Ser	8,16	1,6	2,8	4,4
Thr	6,22	1,7	2,3	1,2
Tyr	3,51	-6,4	-1,9	-41,9
Val	6,80	0,1	-2,5	-1,1

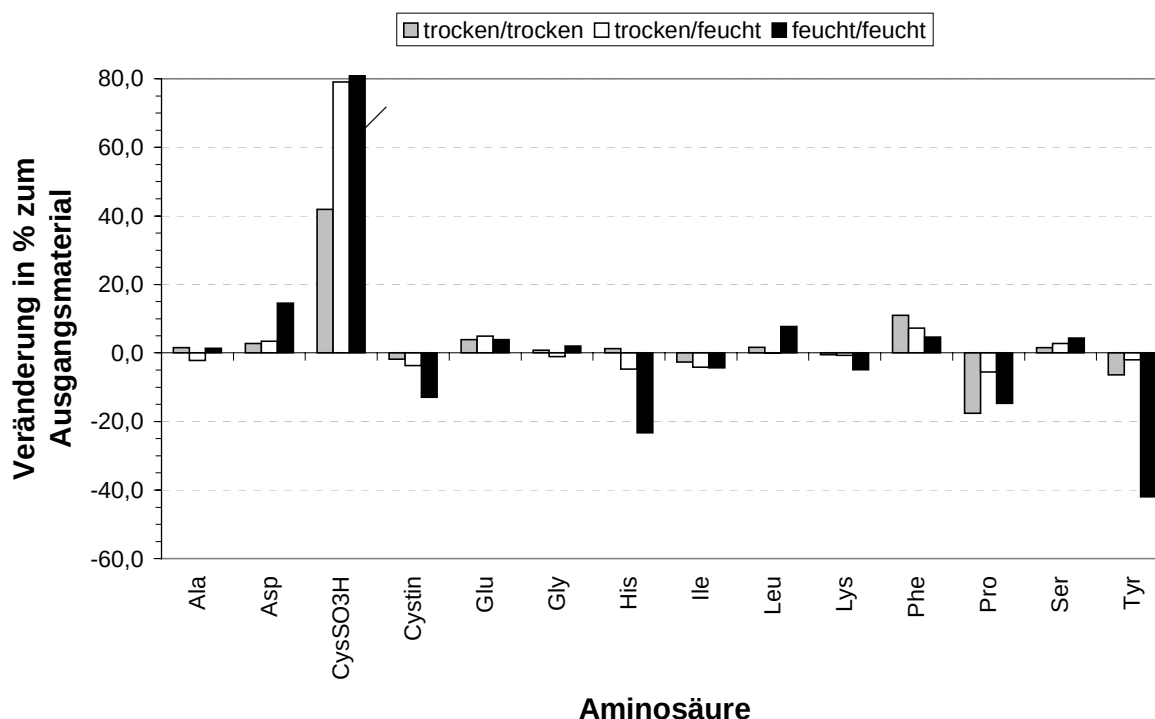


Abb. 58. Aminosäurezusammensetzung von ozonisierten Wollkammzügen unterschiedlicher Feuchte (ausgewählte Aminosäuren; Legende: Feuchte von Wollkammzug/Feuchte von Ozon).

Erster Indikator für eine Schädigung der Wollstruktur ist der Gehalt an Cystin bzw. Cysteinsäure nach der Behandlung. Der Einfluss der Faserfeuchte zeigt sich hier auch besonders deutlich. Der stärkste Cystinabbau wurde bei feuchter Begasung (schwarze Säulen) erzielt: der Cystingehalt ist bezogen zum Ausgangswert um über 12 % gesunken, während der Cysteinsäuregehalt gleichzeitig auf rund das 10fache angestiegen ist. Bei teilfeuchter Behandlung (Ozon bei 98 % r. F.; weiße Säulen) ist der Effekt bereits deutlich geringer (Cystin -3,7 %, CysSO₃H +79 %), aber immer noch größer als bei Begasung bei rund 40 % relativer Feuchte (hellgraue Säulen).

3.2.2.2 *Auswirkungen der Ozonisierungsdauer*

Im vorigen Abschnitt wurde der Einfluss der relativen Feuchte bei der Ozonisierung von Wollkammzügen auf die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung beschrieben. Im folgenden wird die Änderung der chemischen Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Dauer der Ozoneinwirkung dargestellt. Die Feuchtebedingungen wurden so eingestellt, dass ein maximaler Effekt erzielt wird, d.h. die Ozonisierung wurde bei 98 % r.F. durchgeführt. Je nach Länge der Ozonisierung zeigen sich neben dem starken Anstieg des Cysteinsäuregehaltes auch bei anderen Aminosäuren teilweise deutliche Änderungen des Anteils an der Aminosäurezusammensetzung (Abb. 59).

Bei der Ozonisierung von Histidin konnten Asparaginsäure und Asparagin sowie Serin als Abbauprodukte nachgewiesen werden (siehe 3.1.1.4.5). Die Veränderungen dieser Aminosäuren in den Wollhydrolysaten wurden deshalb mit besonderer Aufmerksamkeit verfolgt (Tab. 22).

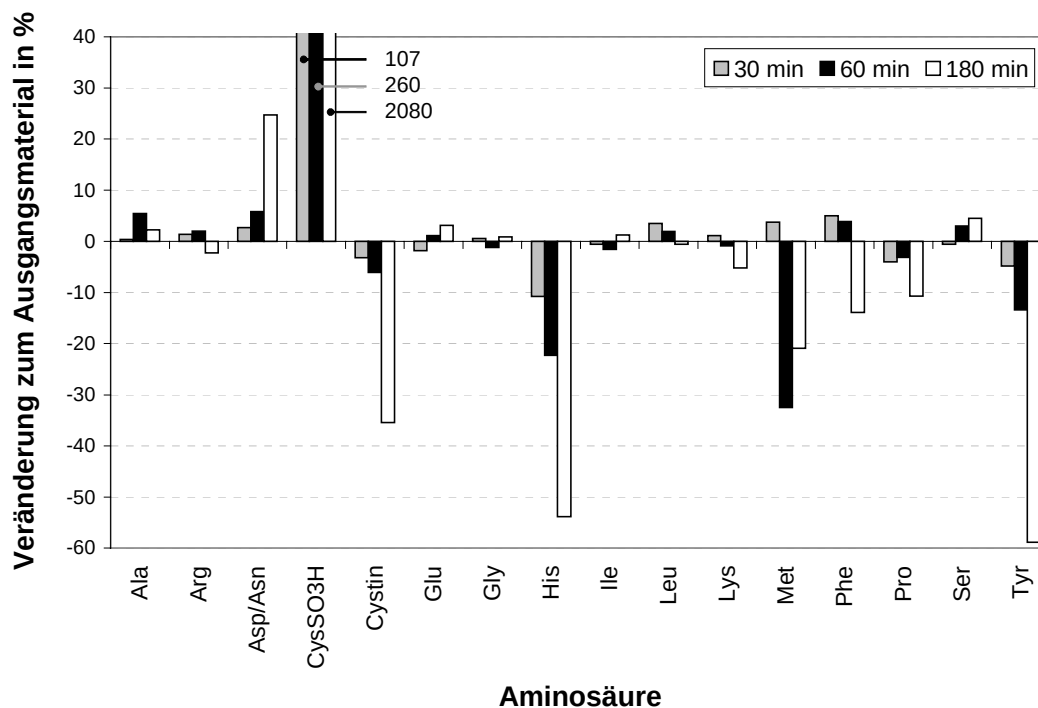


Abb. 59. Aminosäureanalyse der Hydrolysate ozonisierter Wollkammzüge nach unterschiedlicher Expositionszeit; Ozonisierung bei 98 % r.F.

Tab. 22. Veränderungen des Anteils (in %) ausgewählter Aminosäuren im Hydrolysat unterschiedlich lang ozonisierter Wollkammzüge im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

Ozonisierungszeit in min	His	Asp+Asn *	Ser	Glu	Gly	Lys
30	-10,8	2,7	-0,6	-1,8	0,6	1,1
60	-22,3	5,8	3	1,1	-1,2	-0,9
180	-53,8	24,7	4,5	3,1	0,8	-5,2

* Durch die bei der sauren Hydrolyse auftretende Desamidierung von Asparagin zu Asparaginsäure kann in der Aminosäureanalyse nicht zwischen beiden unterschieden werden. Der angegebene Wert ist deshalb als Summe beider Aminosäuren anzusehen.

Die in Abschnitt 3.1.1.4.5 gefundenen Zusammenhänge zwischen den Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure, Asparagin und Serin können nach den vorliegenden Ergebnissen auch auf die Wolle selbst übertragen werden.

Die Veränderung der bezeichneten Aminosäuren folgt dem bei der Histidinoanalyse aufgezeigten Muster. Die Menge an Histidin nimmt über die gesamte

Ozonisierungsdauer auf weniger als die Hälfte der Ausgangsmenge nach 3 h ab; hingegen nimmt der Anteil an Asparaginsäure+Asparagin zu. Hier ist nach 3-stündiger Begasung eine Zunahme von fast 25 % zu verzeichnen. Die Bildung von Serin setzt verzögert ein. Die Zunahme der Serinkonzentration ist zudem nicht stark ausgeprägt.

Die Abnahme des Lysins im Hydrolysat kann ebenfalls mit den Ergebnissen der Ozonolyse der Reinsubstanz in Einklang gebracht werden; eine dünnschichtchromatographische Trennung (vgl. Kap. 3.1.2, Abb. 33) zeigt eindeutig die (Teil-)Umsetzung des Lysins.

Für Glycin kann keine eindeutige Tendenz hinsichtlich einer Korrelation der Veränderung des Anteils am Hydrolysat mit der Ozonisierungsdauer aufgezeigt werden. Gleiches gilt für Glutaminsäure, die nach dünnschichtchromatographischer Trennung keine Anzeichen eines ozonbedingten Abbaus zeigte (vgl. Kap. 3.1.2, Abb. 33).

3.2.3 Ausbleichen der Wolle

Wie auch andere Oxidationsmittel (z.B. Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder Chlor) bewirkt Ozon eine von den Behandlungsbedingungen abhängige mehr oder weniger deutliche Aufhellung auch rohweißen Wollgewebes bzw. Wollkammzug. Die in der Wollfaser vorhandenen Chromophore werden durch Oxidation entfärbt, so dass die behandelten Materialien durch Weißgrad- bzw. Farbmessung allgemein von Rohmaterial unterschieden und klassifiziert werden können. Auch der Grad des Ausbleichens des Kammzugmaterials nach 60-minütiger Ozonisierung zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den Feuchtebedingungen während der Behandlung (Abb. 60).

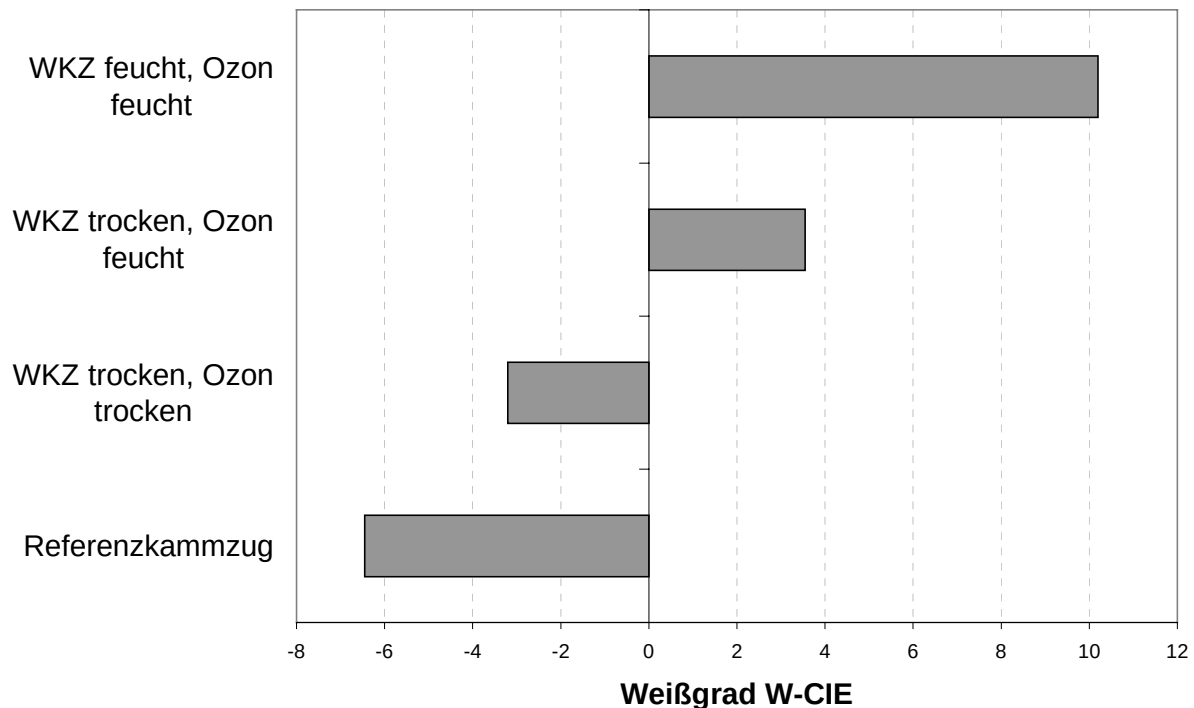


Abb. 60. Ausbleichen (als Weißgrad W-CIE) von ozonisierten Wollkammzügen (WKZ) in Abhängigkeit von der Faserfeuchte (Ozonisierung 60 min, 230 mg O₃/h).

Der Referenzkammzug weist einen Weißgrad von etwa W-CIE = -6 auf, was einen akzeptablen Wert für einen cremeweißen Wollkammzug darstellt. Die trockene Ozonisierung hellt den Kammzug ansatzweise auf, jedoch steigt der Weißgrad auf einen Wert von lediglich -3 an. Bei Begasung des raumtrockenen Materials mit feuchtem Ozon (r.F. = 98%) hellt sich der Kammzug deutlich auf: der Weißgrad steigt in den positiven Bereich. Noch deutlicher hingegen ist die Aufhellung bei vorheriger Quellung des Kammzugs in destilliertem Wasser und der anschließenden Behandlung mit angefeuchtetem Ozon. Ein Weißgrad von +10 entspricht der Bleichwirkung einer konventionellen aktivierten Peroxidbleiche in moderatem pH-Bereich¹⁰⁹.

Die Ergebnisse der Messung der Alkalilöslichkeit als Maß für den Grad der Schädigung zeigen eine ähnliche Tendenz (Abb. 61).

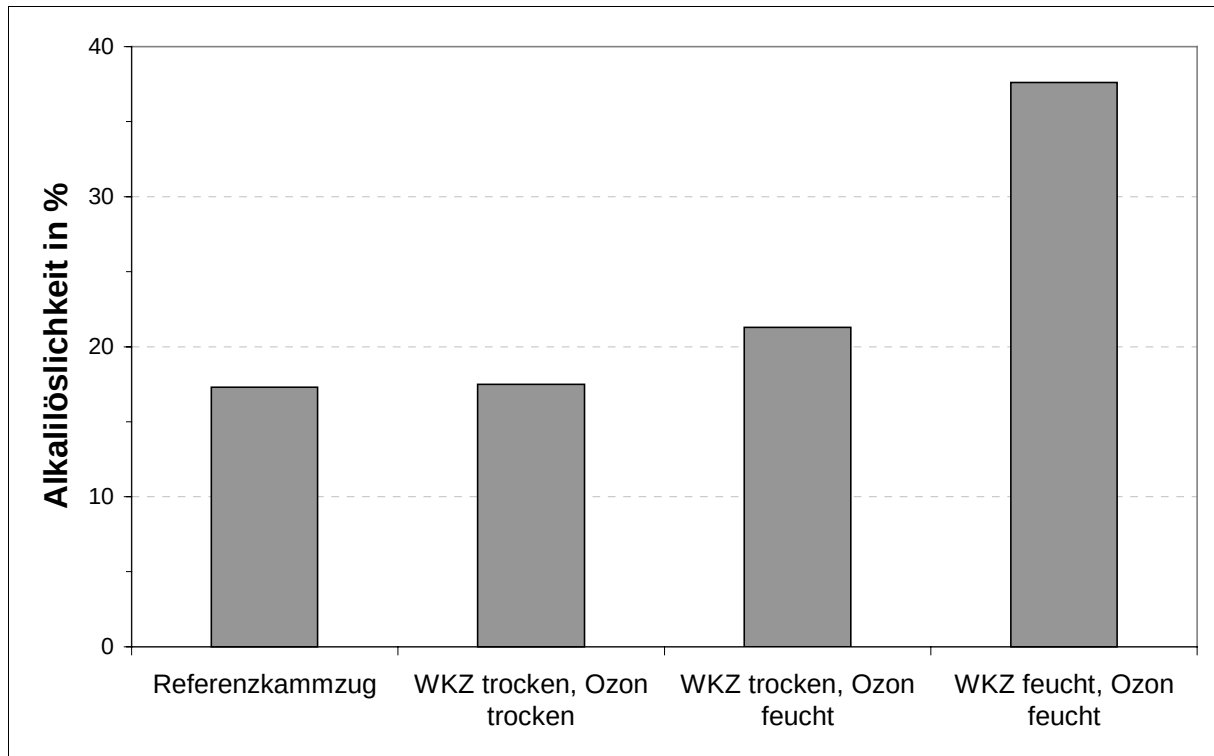


Abb. 61. Alkalilöslichkeit von unter unterschiedlichen Feuchtebedingungen ozonisierten Wollkammzügen (Ozonisierung 60 min, 230 mg O₃/h).

Während der trocken/trocken begaste Wollkammzug (17,5 %) nur marginal stärker löslich ist als das Referenzmaterial (17,3 %), zeigt der vollständig durchgefeuchtete Wollkammzug einen Schädigungsgrad nahe der 40 %-Marke, was eine Weiterverwendung in der textilen Kette nahezu unmöglich machen würde. Einen Zwischenwert stellt der mit feuchtem Ozon begaste trockene Kammzug dar, dessen Schädigungsgrad 21,3 % beträgt.

3.2.4 Filzverhalten von ozonisiertem Kammzug

Wolle ist, anders als Baumwolle oder Seide, in der Lage, zu filzen. Dieser Effekt ist bei der Herstellung textiler Flächen (z.B. als Filter- oder Füllmaterial) durchaus gewollt, soll bei Kleidung möglichst verringert werden, um Qualitätsverluste bis hin zur Unbrauchbarkeit zu verhindern.

Die Neigung der Wolle zu filzen kann als Maß für die Rauhigkeit der Oberfläche der Wolle dienen. Mit dem Abtragen der Schuppenkanten (vgl. Kap. 3.2.1)

wird das unterschiedliche Reibungsverhalten, je nachdem ob Faserverschiebungen in Richtung der Wurzel (bevorzugt, da weniger Widerstand) oder in Richtung der Spitze erfolgen, angeglichen. Dadurch wird die Tendenz, dass sich die Wollfasern durch die Faserverschiebungen in Richtung der Faserspitze an den Schuppenkanten verhaken und so das Filzen auslösen, verringert.

Ozonisierte Wollkammzüge sowie eine Mischung aus unbehandeltem und ozonisiertem Kammzug wurden auf ihr Filzverhalten hin untersucht (Tab. 23). Als Referenz dient dabei unbehandelter Kammzug.

Tab. 23. Filzverhalten von bei unterschiedlichen Feuchtebedingungen ozonisier-
ten Kammzügen (Bestimmung nach IWTO 20-69).

Probe	Durchmesser der Filzkugel in cm (Doppelbestimmung)	Filzdichte in g/cm ³
Unbehandelt	2,37	0,143
Ozonisiert (1h)	2,88	0,080
Ozonisiert (3h)	nicht filzbar	-

Unbehandelter Kammzug lässt sich naturgemäß sehr gut filzen, die nach einstündigem Filzen erhaltene Filzkugel weist einen mittleren Durchmesser von 2.37 cm bei einer Filzdichte von 0,143 g/cm³ auf.

Für einen ozonisierten Kammzug ist nach der in den rasterelektromenmikroskopischen Untersuchungen (siehe Kap. 3.2.1) aufgezeigten Glättung der Wolloberfläche durch Abtrag oder Verkleben der Schuppenstruktur der Faser eine deutlich schlechtere Filzbarkeit zu erwarten. Für einen Kammzug, der für eine Stunde einem Ozonstrom ausgesetzt war, wird dies im Filztest bestätigt. Die Filzneigung des Materials ist deutlich vermindert, die erhaltene Filzkugel weist einen um 5 mm größeren Durchmesser auf als die unbehandelte Referenzprobe. Die Filzdichte ist dabei rund 40% niedriger als die des Ausgangsmaterials.

Eine noch länger ozonisierter Kammzugprobe (Ozonisierungsdauer: 3 h) kann schließlich nicht mehr gefilzt werden; die Ausbildung einer Filzkugel wird durch starkes Schäumen der Pufferlösung beim Filzen verhindert .

3.2.5 Anfärbbarkeit von Wollkammzug

Durch Behandlung mit Ozon wird die eher hydrophobe Wollfaser hydrophiliert, was sich z.B. an einer besseren Benetzbarkeit bei Einbringen der Wolle in Wasser zeigt. Zur Anzeige der Veränderungen der Hydrophilie kann ein einfacher Anfärbetest mit Astrazonblau FFR als Farbstoff zu Hilfe genommen werden, der eindrucksvoll die deutlich erhöhte Hydrophilie belegt. Abb. 62a) und b) zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Querschnitte der angefärbten Wollfasern. Links abgebildet ist das Ergebnis der Referenzfärbung von unbehandeltem Wollkammzug. Die Anfärbung ist mit bloßem Auge kaum zu erkennen. Rechts (Abb. 62b) im Vergleich das Resultat für die Anfärbung von Wollfasern, die zuvor eine Stunde in Ozon-Sauerstoffatmosphäre behandelt wurden. Die Intensität der Anfärbung sowie die Eindringtiefe des Farbstoffs in den Faserquerschnitt zeugen von einer drastisch erhöhten Hydrophilie.

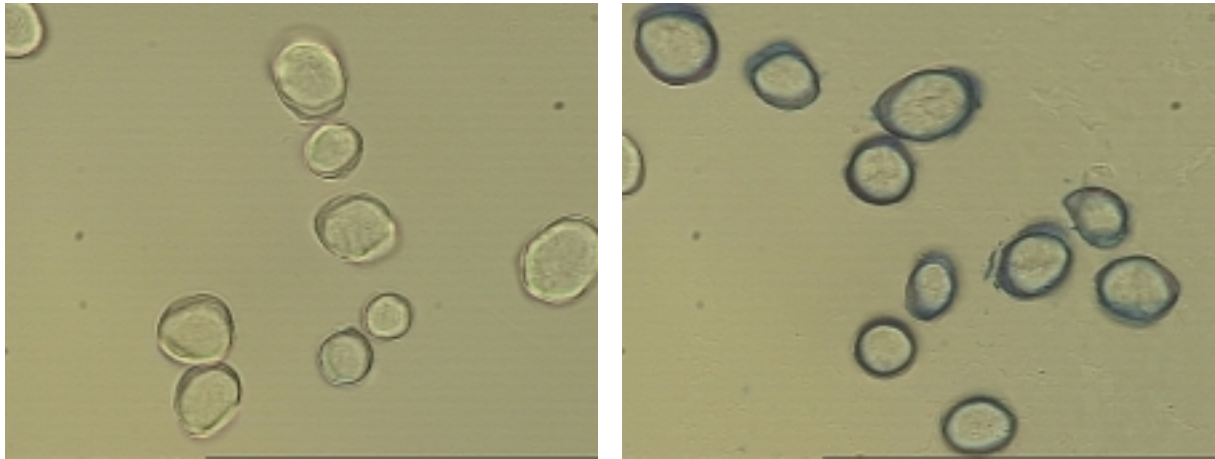


Abb. 62. a) Querschnitt von mit Astrazonblau FFR angefärbten unbehandelten Wollfasern
 b) Querschnitt von mit Astrazonblau FFR angefärbten Wollfasern nach Ozonisierung

Mittels Farbmessung der angefärbten Fasern kann das unterschiedliche Verhalten von unbehandeltem und ozonisiertem Kammzug und der optische Eindruck des Ergebnisses quantifiziert werden (Abb. 63). Aufgezeigt sind die Änderung der Farbdifferenz (DE) sowie die Änderungen der Parameter L^* (Helligkeit), a^* (rot/grün) und b^* (gelb/blau) (CIELab-Farbsystem^{110,111}) im Vergleich zu einer nicht angefärbten Wolle.

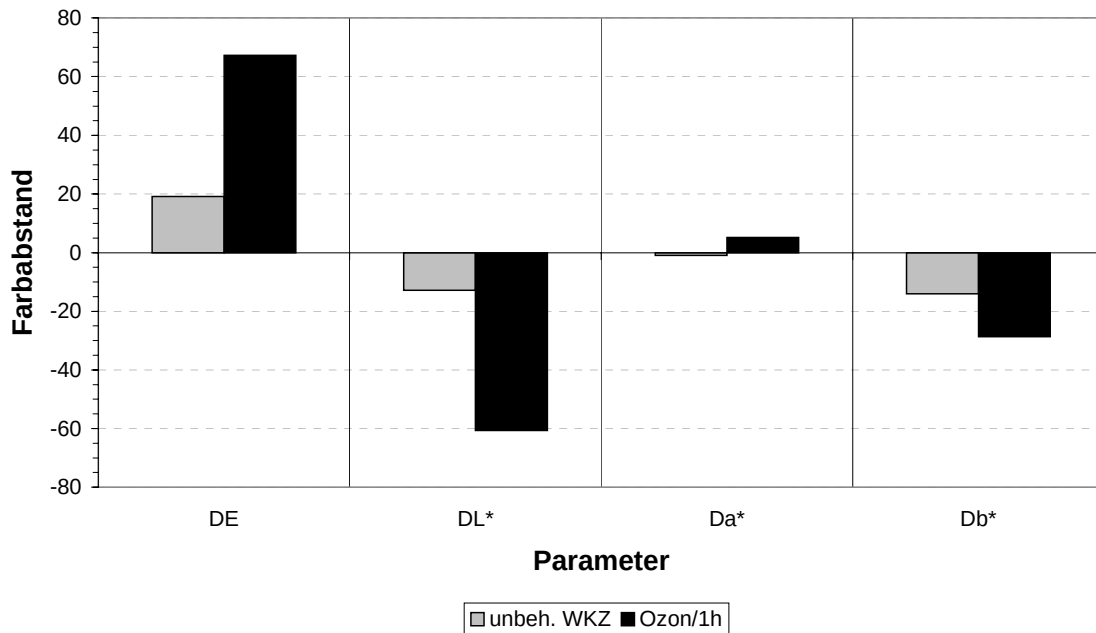


Abb. 63. Farbabstände (nach CIELAB) von mit Astrazonblau FFR angefärbten Proben unbehandelten und ozonisierten Wollkammzugs im Vergleich zum Ausgangsmaterial (WKZ=Wollkammzug).

Der Gesamtfarbabstand DE der ozonisierten Wolle beträgt ein Vielfaches des unbehandelten Materials. Der Helligkeitswert DL* zeigt ein im Vergleich zum nichtozonisierten Material durch die intensivere Färbung ausgelöste stärkere Abdunklung. Ausschlaggebend für die Beurteilung der Färbung ist vor allem der Db*-Wert, der die Gelb/Blau-Verschiebung anzeigt. Auch hier spiegelt sich der optische Eindruck der gefärbten Fasern wider: die Verschiebung des Farbeindrucks der ozonisierten Fasern in den Blaubereich ist viel intensiver als beim unbehandelten Material.

3.2.6 Radikalbildung bei Ozonisierung von Wolle

ESR-spektroskopische Untersuchungen an Wollfasern haben gezeigt, dass Rohwolle nicht frei von paramagnetischen Spezies ist¹¹². Neben paramagnetischen Verunreinigungen, die in der Regel bei der Wollwäsche entfernt werden, können auch organische Radikale auftreten, die eine Wäsche „überleben“ können¹¹². Die

Herkunft dieser Signale ist nicht sicher geklärt. Allgemein wird die Anwesenheit verschiedener Aminosäureradikalspezies postuliert, die auf Tyrosin, Tryptophan, Cystin und Glycin zurückzuführen sind^{113,114}. Diese Radikale werden durch UV-Bestrahlung gebildet⁹⁸, wobei bereits das gewöhnliche Tageslicht ausreicht, dem Wolle beispielsweise bei Transport und Lagerung ausgesetzt ist. Wolle kann also organische Radikale stabilisieren, ohne dass die Wollstruktur dadurch nachhaltig geschädigt würde.

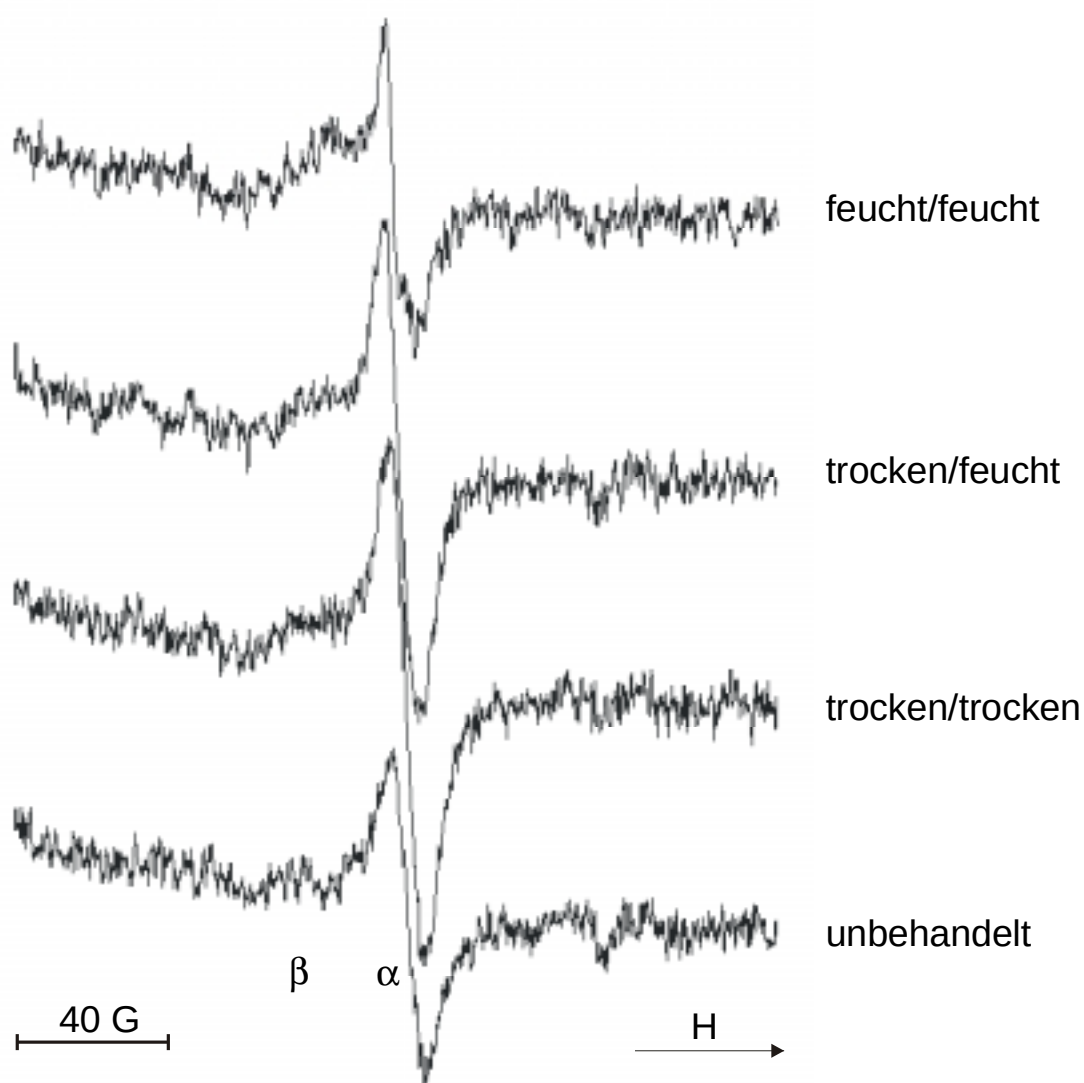


Abb. 64. ESR-Signale von un behandelter und ozonisierter Wolle (Ozonisierung 60 min, 230 mg O₃/h). Die Beschriftungen bezeichnen die Feuchte von Wolle bzw. Ozon (vgl. Kap. 3.2.2 und 3.2.3).

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Feuchtebedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Intensität der Ozoneinwirkung haben. Abb. 64 zeigt das Ergebnis ESR-spektroskopischen Untersuchung von in feuchtem Zustand ozonisierter Wollen. Bei gleichen Probenmengen kann zwar eine Erhöhung der Signalintensität, also eine Erhöhung der Anzahl an Radikalen in den ozonisierten Proben im Vergleich zum unbehandelten Ausgangsmaterial festgestellt werden, jedoch bestehen zwischen den ozonisierten Wollen keine maßgeblichen Unterschiede in der Radikalaktivität.

Eine Erhöhung der eingestrahlten Mikrowellenleistung kann Hinweise auf weitere Radikalspezies liefern, da nicht alle Radikale ihren Sättigungszustand bei der gleichen abgestrahlten Leistung erreichen (sog. Power-Saturation-Technik). Abb. 65 zeigt die ESR-Spektren von Wolle, die in feuchtem Zustand ozonisiert wurde, bei zwei unterschiedlichen Mikrowellenleistungen.

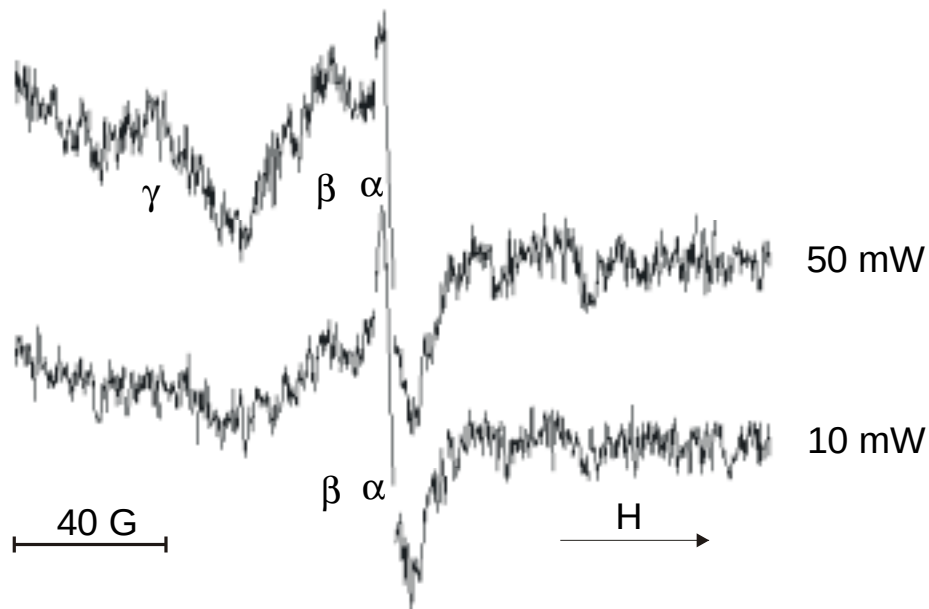


Abb. 65. ESR-Signale von in feuchtem Zustand ozonisierter Wolle bei unterschiedlichen Mikrowellenleistungen.

Veränderungen bei hoher Mikrowellenleistung machen sich zunächst in einem veränderten Verhältnis der Intensitäten der ESR-Signale bemerkbar. Signal α zeigt sich in der Intensität unverändert, während das Signal β eine deutliche Intensitätssteigerung erfährt. Hin zu niedrigeren Feldstärken verschoben zeigt sich bei höherer Leistung ein zusätzliches Signal γ , das auf die Anwesenheit einer weiteren Radikalspezies hindeutet.

Analog zur Ozonisierung der Aminosäuren wurden Untersuchungen zur Wollozonisierung nach vorheriger Behandlung des Wollmaterials mit den Spintrap-Reagenzien 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO; Abb. 66) oder α -Phenyl-*tert*-butyl-nitron (PBN; Abb. 67) durchgeführt.

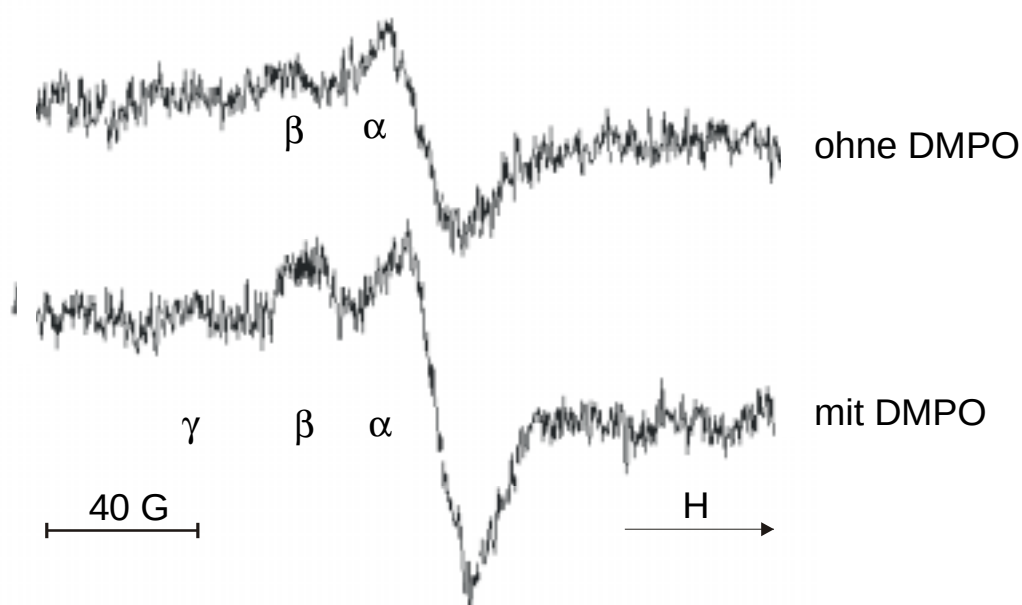


Abb. 66. Einfluss des Spintraps DMPO auf das ESR-Signale von in feuchtem Zustand ozonisierter Wolle im Vergleich zu ohne DMPO-Zusatz ozonisierter Wolle.

Die Zugabe von DMPO bewirkt bei gleicher Mikrowellenleistung (hier: 10 mW) eine deutliche Erhöhung der Intensität des Spektrums bei gleicher Probenmenge. Die Intensität (Peakhöhe) des Hauptsignals (α) hat sich erhöht, ebenso ist das

mit β bezeichnete Radikalsignal bei DMPO-Zusatz intensiver geworden. Im Tieffeld zeigt sich darüber hinaus das Signal einer weiteren Radikalspezies (γ).

Bei Behandlung mit dem Radikalfänger PBN zeigt die Wolle im ESR-Spektrum wie auch bei Einsatz von DMPO als Spintrap die Anwesenheit einer Radikalspezies (γ) an, die ohne PBN-Zusatz nicht detektiert wird. In allen Proben findet sich das scharf abgegrenzte Hauptsignal (α). Die Peakhöhe und Intensität ist dabei unabhängig von der Ozonisierungszeit. Das ohne PBN-Ausrüstung auftretende, mit β bezeichnete Radikalsignal zeigt sich nach 30-minütiger Ozonisierung eher als Schulter des Hauptsignals denn als eigenständiges Signal, das γ -Signal hebt sich deutlich vom Untergrundrauschen ab. Nach längerer Ozoneinwirkung werden weiterhin alle Radikalspezies detektiert, die in kürzerer Ozonisierungszeit auftreten, das β -Signal ist wieder mehr als eigenständiges Signal zu beobachten. Die Intensität des γ -Signals hingegen ist nicht mehr so hoch.

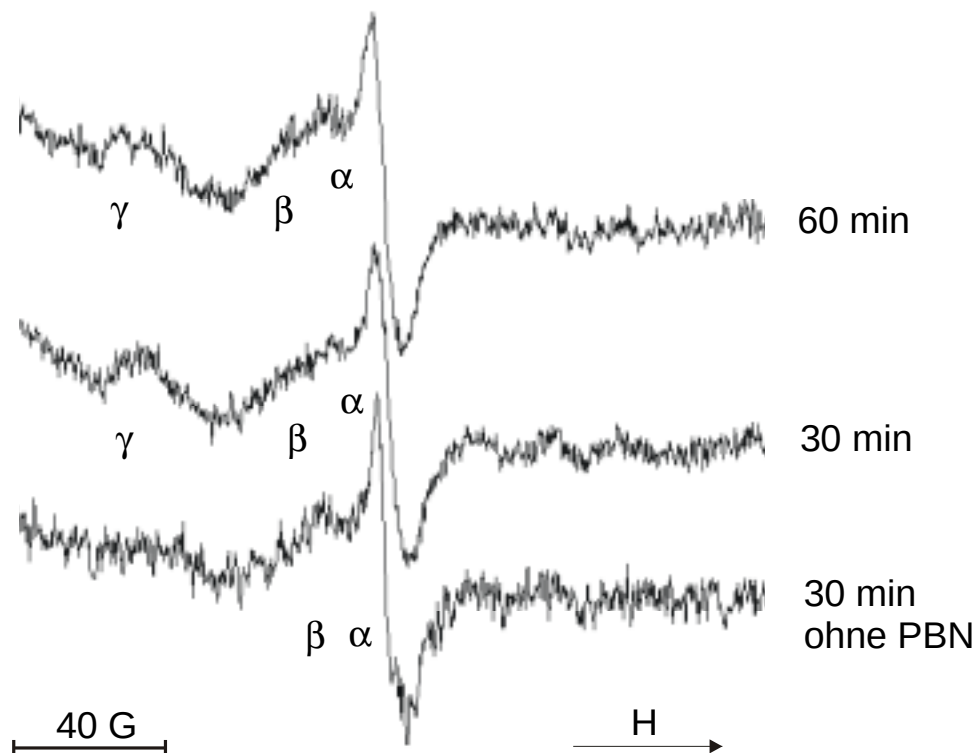


Abb. 67. Einfluss des Spintraps PBN auf das ESR-Signale von in feuchtem Zustand unterschiedlich lange ozonisierter Wolle im Vergleich zu ohne PBN-Zusatz ozonisierter Wolle.

Die Untersuchung an Wollkammzug hat gezeigt, dass über die im unbehandelten Zustand vorhandene Anwesenheit paramagnetischer Signale der Wolle hinaus durch Ozonisierung weitere Radikalspezies gebildet werden, die von der Wolle stabilisiert werden. Spintrapping-Studien haben zudem ergeben, dass auch Radikalspezies auftreten, die Wolle nicht stabilisieren kann und die erst durch Einsatz von Spintrapping-Reagenzien im ESR-Spektrum sichtbar werden.

4 EXPERIMENTELLES

4.1 Materialien

4.1.1 Textilien

Merino Wollkammzug, Feinheit: 20 μm (BWK, Bremen)

Polyamidflocke (PA 6.6, Feinheit: 20,74 μm ; BWF, Offingen)

4.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Kaliumjodid	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Natriumthiosulfat-Titrisollösung	Fa. Merck, Darmstadt
Na-Caseinat, Caseinhydrolysat	Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen
Imidazol	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
L-Histidin	Fa. Degussa, Hanau
L-Tryptophan	Fa. Degussa, Hanau
L-Cystin	Fa. Merck, Darmstadt
L-Lysin	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
L-Asparaginsäure	Fa. Degussa, Hanau
L-Asparagin	Fa. Degussa, Hanau
L-Glycin	Fa. Degussa, Hanau
L-Glutaminsäure	Fa. Degussa, Hanau
5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -Phenyl- <i>tert</i> -N-butyl-nitron (PBN)	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)

4.2 Behandlungen

4.2.1 Begasungen mit Ozon

Die Ozonbehandlung erfolgte mit Hilfe der in Abb. 68 dargestellten Laboranlage. Ozon wird durch stille elektrische Entladung in einem Labor-Ozonisator 301.7 der Firma Erwin Sander Elektroapparatebau GmbH, Uetze-Eltze, erzeugt. Die Beschickung des Gerätes erfolgte mit handelsüblichem Sauerstoff aus Druckgasflaschen ohne weitere Vorbehandlung.



Abb. 68. Laborozonisator mit temperierter Begasungskammer, Sicherheitswaschflasche und Kaliumiodid-Lösung zur Vernichtung überschüssigen Ozons.

Ozonseitig sind eine im Wasserbad temperierbare Begasungskammer, nachfolgend eine Sicherheitsflasche sowie eine Waschflasche mit Kaliumiodidlösung zur Vernichtung überschüssigen Ozons angeschlossen (Abb. 69).

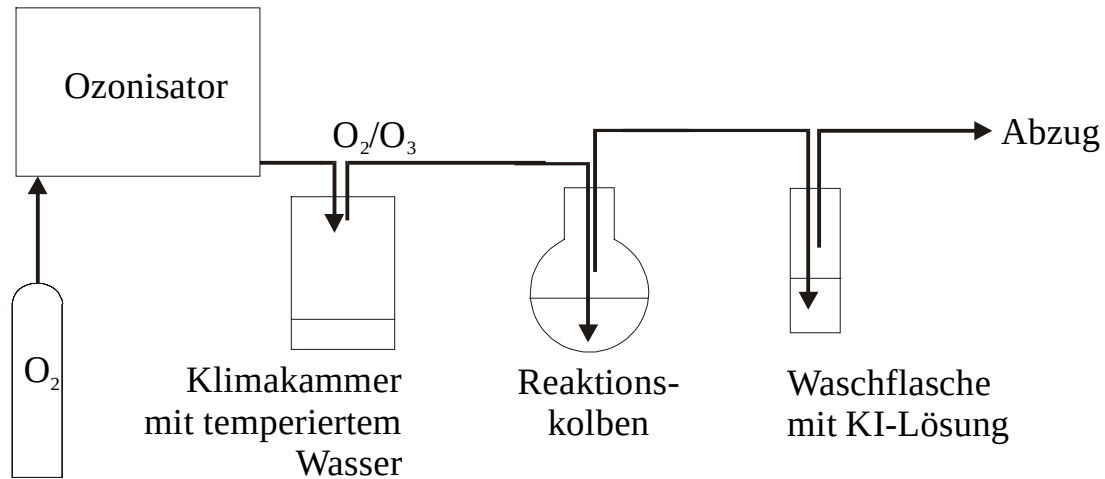


Abb. 69. Grundsätzliche Anordnung zur Ozonisierung von Lösungen (Feststoffozonisierungen können entweder im Kolben erfolgen oder nach Austausch in einer Glassäule mit integrierter Glasfritte).

Die Begasungen erfolgten bei gleichen Geräteparametern und einem konstanten Sauerstoff/Ozon-Strom mit einem Ozongehalt von 230 mg/h. Die Ozonkonzentration wurde iodometrisch durch Einleiten der Gasmischung in wässrige Kaliumiodidlösung und anschließender Rücktitration mittels Natriumthiosulfat-Lösung bestimmt.

Die Begasung von Gewebeproben erfolgte in der modifizierten temperierten Begasungskammer, in der durch gezielte Zugabe von Wasser bestimmte relative Luftfeuchtigkeiten eingestellt werden konnten.

Über ein modifiziertes Gaseinleitungsrohr mit dünner Düse wurden diverse Aminosäurelösungen in 25 bzw. 50 ml Rundkolben (NS 14,5) begast (Abb. 70).

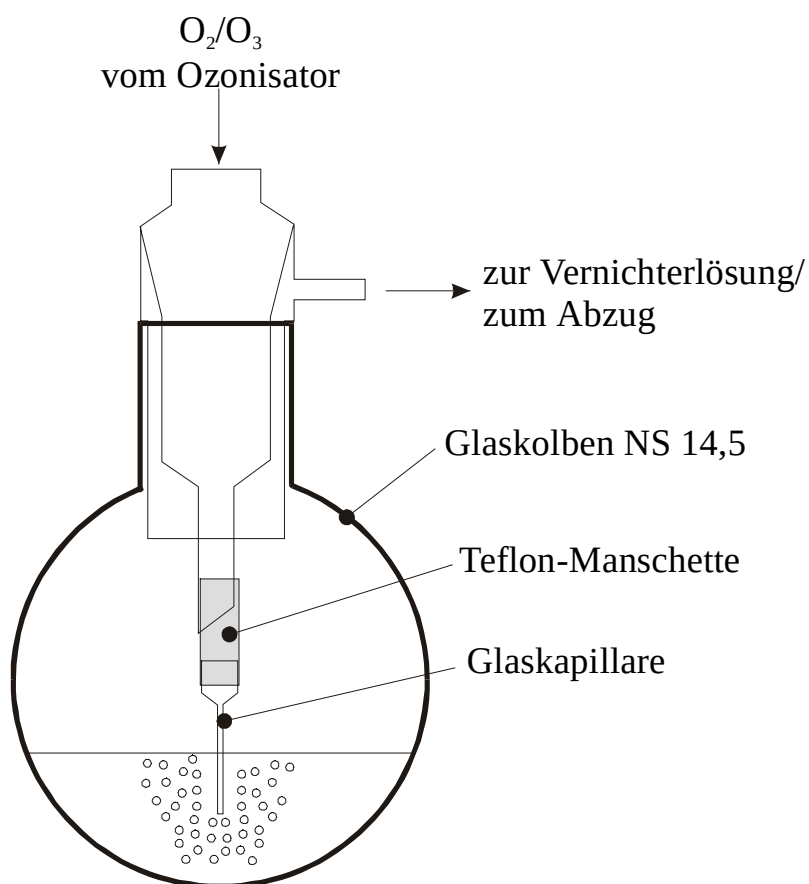


Abb. 70. Glaskolben NS 14,5 mit modifiziertem Gaseinleitungsrohr, bestehend aus einem gekürzten handelsüblichen Einleitungsrohres, einer Teflon-Manschette beliebiger Länge und einer aus Pasteurpipetten gefertigten Glaskapillare.

Um die Produkte für die ESR-Messung zugänglich zu machen (wässrige Lösungen können im ESR-Spektrometer nicht ohne weiteres vermessen werden), wurden die erhaltenen Lösungen bei -78 °C tiefgekühlt und anschließend gefriergetrocknet.

Zur Begasung ungelöster Substanzen (Histidin und Derivate, Wollkammzug) wurden diese in eine Chromatographie-Säule mit Glasfritte eingebracht und von unten nach oben mit Ozon/Sauerstoff durchströmt. Durch Zugabe von Wasser in eine vorgeschaltete Begasungskammer konnte im Gasstrom eine bestimmte Luftfeuchtigkeit eingestellt werden.

4.2.2 Belichtungen

Wollkammzug wurde mit UV-reicher Strahlung in einer Quarzapparatur mit einer Hg/Xe-Höchstdrucklampe von Canrad-Hanovia (Typ Hg/Xe 200W) bestrahlt. Ein Langpass-Filter WG 254 der Firma AMKO, Uetersen, wurde verwendet, das nur Licht des Wellenlängenbereiches $\lambda > 254$ nm durchlässt.

4.3 Anfärbetest mit Astrazonblau FRR

Wolle wurde mit einer wässrigen Lösung von Astrazonblau FRR 200 % (C.I. Basic Blue 69; Bayer, Leverkusen) 5 min lang bei 60 °C gefärbt. Es wurde eine Lösung von 0,175 g/l an Astrazonblau FFR in Wasser (Flottenverhältnis: 1:40) vorgelegt. Anschließend wurde sorgfältig gespült.

4.4 Titration zur Ermittlung des Ozonverbrauches

Zur Bestimmung des Ozonverbrauches bei der Ozonisierung von Histidin werden 20 g Kaliumiodid in 210 ml dest. Wasser gelöst und mittels einer Waschflasche in den Ozonstrom geschaltet. Bei Ozondurchgang wird Iodid zum Iod reduziert, wodurch sich die Lösung rotbraun verfärbt. Mit 0,1-molarer Natriumthiosulfatlösung wird bis zur erstmaligen Entfärbung der Lösung titriert und aus dem Verbrauch an Maßlösung der Ozonverbrauch in mg berechnet (1 ml 0,1n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zeigen 2,4 mg Ozon an). Durch Differenzbildung der erhaltenen Verbrauchswerte bei vorherigem Durchgang des Ozons durch einen mit Wasser bzw. der zu untersuchenden Histidinlösung gefüllten Rundkolben wird der Ozonverbrauch der Histidinlösung bestimmt.

4.5 pH-Wertveränderung von Histidinlösungen

Der pH-Wert einer wässrigen Histidinlösung wird in Abhängigkeit von der Ozonisierungsdauer durch Messung mittels eines mobilen pH-Meters bestimmt. In bestimmten Intervallen wird der Ozonstrom unterbrochen und der pH-Wert der Lösung gemessen. Anschließend wird der Ozonstrom wieder aktiviert und die Ozonisierung fortgesetzt.

4.6 Analytik

4.6.1 Bestimmung der Faserfeinheit

Die Bestimmung der Faserdurchmesser erfolgte nach IWTO-47-95 mit Hilfe eines Uster OFDA 100-Gerätes (Fa. Zellweger Uster, Uster, CH).

4.6.2 Alkalilöslichkeit (AL)

Zur Bestimmung der Alkalilöslichkeit wurde die IWTO-Vorschrift 4-60 verwendet.

Eine Probe von 500 mg Wolle wurde eingewogen und eine Stunde bei 65 °C in 50 ml 0,1 M NaOH-Lösung erhitzt. Anschließend wurde über einen Glasfiltertiegel (Porengröße 1) abgesaugt, mit 1 %iger Essigsäure neutralisiert und mit ca. 1 l dest. Wasser gewaschen. Schließlich wurde bei 110 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Der Gewichtsverlust der Probe (Trockensubstanz) wird in Prozent angegeben. Unbehandelte Wolle besitzt eine Alkalilöslichkeit von etwa 15 ± 2 %.

4.6.3 Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalytik wurde nach saurer Totalhydrolyse mit dem automatischen Analysator Alpha Plus II (Pharmacia LKB, Freiburg) nach der Methode von Spackman, Stein und Moore¹¹⁵ durchgeführt.

Ca. 100 mg Wolle wurden in ein Bombenrohr eingewogen und mit 6-7 ml 5,7 M HCl versetzt. Das Bombenrohr wurde evakuiert und zugeschmolzen. Anschließend wird 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, mit dest. Wasser aufgenommen und erneut eingengt. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, bis kein Geruch nach HCl mehr festzustellen war.

Die Analytik ozonisierter wässriger Aminosäurelösungen erfolgte nach Gefrier-trocknung direkt ohne weitere hydrolytische Vorbehandlung.

4.6.4 Filzprüfung

Nach der IWTO-Vorschrift 20-69 (1969) wurde ein Gramm Wolle (Normklima nach DIN 53802) zusammen mit 50 ml eines Puffers, pH 7, mit der Zusammensetzung 6,81 g/l KH_2PO_4 und 1,14 g/l NaOH in einem standardisierten Stahlbehälter von 150 ml Inhalt auf einer Schüttelmaschine mit dreidimensionaler Bewegung 1 h geschüttelt. Aus der losen Wolle bildete sich eine Filzkugel, deren Durchmesser gemessen wurde. Filzkugeln mit kleinem Durchmesser deuten auf ein gutes, Filzkugeln mit großem Durchmesser auf ein schlechtes Filzvermögen der Wolle hin. In allen Fällen wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

4.6.5 Quantitative Bestimmung des Histidinabbaus mittels Pauly-Reagenz

Zur Eichung des Verfahrens wird zunächst eine Reihe mit 15 Verdünnungen ausgehend von einer Histidin-Stammlösung ($c = 100 \text{ mg/l}$) hergestellt. Inklusive der Stammlösung stehen somit 16 verschiedenen konzentrierte Lösungen zur Ver-

fügung. Die Durchführung der Eichung sowie der Messung erfolgt zwecks Ausschlusses äußerer Einflüsse nach einem festen Zeitschema (Schema 1):

Beginn Zugabe Lösung A	00:00	00:10	00:20	min
Beginn Zugabe Lösung B	00:40	00:50	01:00	min
Messung ($\lambda = 454 \text{ nm}$)	03:40	03:50	04:00	min

Probentabelle

16	15	14
13	12	11
10	9	8
7	6	5
4	3	2
1		

Schema 1. Zeitschema der Durchführung der Eichreihe zur Quantifizierung des Histidinabbaus durch Ozon.

Lösung A

1 ml Sulfanilsäure-Na-Salz-Lösung ($c = 0,4 \text{ mol/l}$)

1 ml Natriumnitratlösung ($c = 0,4 \text{ mol/l}$)

5 ml einer 0,25-molaren wässrigen HCl-Lösung.

Lösung B

2-molare wässrige Natriumcarbonat-Lösung.

Pro Verdünnung ($V = 10 \text{ ml}$) werden 7 Tr. Lösung A und 5 Tr. Lösung B zugegeben.

Bei der Eichung werden maximal 3 Verdünnungen gleichzeitig bearbeitet, bei der späteren Untersuchung des Histidinabbaus wird jeweils 5 min nach Ende der Begasung mit Ozon mit der Zugabe von Lösung A begonnen. Die Messung erfolgt bei der anhand der Stammlösung am Absorptionsmaximum ermittelten Wellenlänge ($\lambda = 454 \text{ nm}$).

4.6.6 Mikroskopie

4.6.6.1 Faserquerschnittbereitung

Für die Lichtmikroskopie werden Fasern in ein Acrylatharz (Historesin[®], Leica, Bensheim) eingebettet und bei RT mittels eines Rotationsmikrotoms Supercut 2050 (Leica) Schnitte in Schnittdicken von 20 µm angefertigt. Für die Mikroskopie werden die Schnitte in ein Immersionsöl ($n_D = 1,515$) eingebettet.

4.6.6.1 Licht- und Photometermikroskopie

Die licht- und photometermikroskopische Untersuchung der Fasern und Faserquerschnitte erfolgte mittels eines Scanning Photometermikroskops MPM 800 (Fa. Zeiss, Jena).

4.6.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die REM-Untersuchung wurden Wollschnipsel auf einem Probenträger in einem Sputter Coater S150B, Fa. Edwards, Marburg, mit einer dünnen Goldschicht versehen und bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV im REM S360 (Fa. Leica, Bensheim) untersucht.

4.6.7 Farbmessung

Der Weißgrad W-CIE und der Gelbwert G-DIN 6167 wurden mittels des Farbmessgerätes Datacolor 3890 der Firma Datacolor, Marl, unter Verwendung der Auswertungssoftware IRIS durchgeführt. Die Messungen erfolgten ohne Glanz mit der Blende 18 mm und wurden unter Verwendung der Lichtart D65 und des 10°-Beobachtungswinkels durchgeführt. Das gebleichte Gewebe wird zweilagig vermessen, für die Kammzugmessungen wurden ca. 3,5 g Wollmaterial, welches

sich in einem Probenbehälter befindet, verwendet. Bei jeder Probe wurden 5 Messungen vorgenommen, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde.

Die Farbwerte sind nach dem CIELab-System berechnet und beziehen sich auf Lichtart D65.

4.6.8 Tryptophan-Bestimmung

Die Aminosäure Tryptophan wurde kolorimetrisch (p-Dimethylaminobenzaldehyd-Verfahren) bestimmt.

4.6.9 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden DC-Platten der Firma Merck verwendet (DC-Alufolien Kieselgel 60, Schichtdicke 0,2 mm, mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄). Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Essigester, Ethanol und Wasser im Verhältnis 6:5:2 (v:v:v) eingesetzt, als Entwickler kam das von PAULY modifizierte Ehrlichs Reagenz (diazotierte Benzolsulfonsäure) bzw. Ninhydrin zum Einsatz⁷⁴. Die entwickelten Platten wurden anschließend auf einem HP-Flachbettscanner digitalisiert und im jpg-Format abgespeichert. Die im Ergebnisteil abgebildeten DC-Scans wurden mit einer handelsüblichen Software (Corel Photo-Paint 8.0) nachbearbeitet.

4.6.10 HPLC-Analytik

Folgende Geräte wurden für die HPLC-Trennung benutzt:

HPLC-Anlage bestehend aus einem Merck-Hitachi L-6200A Gradientenformer und Pumpe, einem Merck-Hitachi L-4250 UV/Vis-Detektor, einem Merck-Hitachi F 1050 Fluoreszenzdetektor und einem Merck-Hitachi D-6000 Interface (alle Geräte Firma Merck, Darmstadt). Die Probenaufgabe erfolgte mittels eines Perkin-Elmer Autosamplers (Firma Perkin-Elmer, Überlingen). Aufzeichnung

der Spektren erfolgte mit der Software Merck-Hitachi HPLC-Manager D-7000 auf einem Personalcomputer. Als Trennsäule diente eine Nucleosil 100-5 C₁₈ reversed-phase-Säule (250/8/4 mm; Länge/AD/ID) mit 20 mm-Vorsäule mit dem gleichen Trennmaterial der Firma CS Chromatographie-Service, Langerwehe.

Die HPLC-Trennungen wurden bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) durchgeführt, die Flussrate betrug 0,5 ml/min (Druck: 120-140 bar, abhängig vom jeweiligen Eluenten).

Als Eluent diente 0,02 M Triethylammoniumphosphatpuffer, pH 3,0.

4.6.11 Spektroskopische Methoden

4.6.11.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektren wurden an einem Doppelstrahlphotometer Shimadzu UV-160 A der Firma Shimadzu Europa GmbH, Duisburg in PS-Einmalküvetten (Schichtdicke 1 cm) aufgenommen. Als Referenz diente das jeweilige Lösungsmittel.

4.6.11.2 IR-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektren wurden auf dem Gerät 60 SXX FT-IR-Spectrometer der Firma Nicolet mit einer Auflösung von vier Wellenzahlen aufgenommen. Die pulverförmigen Proben wurden mit KBr gemörsert und nach Pressen zu einer Tablette vermessen.

4.6.11.3 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanzspektren wurden mit einem ER 200 D /ESP 3220 (aufgerüstete Gerätekonfiguration entspricht ESP 300) ESR-Spektrometer der

Firma Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Die Computereinheit arbeitet basierend auf OS/9 mit der Bruker-ESR-Software ESP 300e. Die Proben wurden in CFQ-ESR-Röhrchen (Firma Wilmad, Boca Raton, USA) (Durchmesser: 10 mm bzw. 4 mm) in einem Rechteckresonator ST7940_400 bei Raumtemperatur gemessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Bruker-Software WIN-EPR 2.11.

4.6.11.4 MALDI-TOF-MS

Alle MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem BRUKER BIFLEXTM III MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker-Fanzen Analytik GmbH, Bremen) aufgenommen, das mit einer SCOUT-Ionenquelle, einem Ionenspiegel (Reflektron) und Standard-*microchannel-plate*-Detektoren ausgerüstet ist. Die Matrixanregung erfolgte über einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Pulsdauer von 3 ns. Der Druck im Massenanalysator betrug ca. $2 \cdot 10^{-7}$ bar. Die Beschleunigungsspannung lag bei 20 kV. Zur externen Kalibrierung der Massen wurden Proteinstandards (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unter gleichen Geräteparametern vermessen. Als Matrixsubstanz wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure verwendet.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ J. A. MacLaren, B. Milligan; *Wool Science*, Science Press, Marrickville, Australien, **1981**, 3.
- ² J. D. Leeder; *Wool Sci Rev.*, **1986**, 63, 3ff.
- ³ H. Zahn, F. J. Wortmann, H. Höcker; *Chemie in unserer Zeit*, **1997**, 6, 280ff.
- ⁴ R. Eichner, P. Rew, A. Engel, U. Aebi; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1985**, 455, 381.
- ⁵ U. Aebi, W. E. Fowler, P. Rew, T.-T. Sun; *J. Cell. Biol.*, **1983**, 97(10), 1131ff.
- ⁶ S. V. Strelkov, H. Herrmann, N. Geisler, R. Zimbelmann, P. Burkhard, U. Aebi; *Proc. 10th Intern. Wool Text. Res. Conf.*, **2000**, KNL-4.
- ⁷ *CDRömpf Chemie Lexikon, Version 1.0*, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, **1995**.
- ⁸ H. Zahn, F. J. Wortmann, G. Wortmann, R. Hoffmann; Wool in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, **1996**, Vol. A28, 395ff.
- ⁹ S. J. Leach, E. M. J. Parkhill; *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.*, **1955**, Australien, C, 92f.
- ¹⁰ M. C. Corfield, A. Robson; *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.*, **1955**, Australien, C, 79f.
- ¹¹ A. S. Inglis, C. M. Roxburgh, H. Takayanagi; *Anal. Biochem.*, **1974**, 61, 25ff.
- ¹² S. J. Leach, G. E. Rogers, B. K. Filshie; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 105, 270ff.
- ¹³ R. S. Asquith, J. B. Speakman; *Nature*, **1952**, 170, 798ff.
- ¹⁴ A. Patchornik, M. Sokolovsky; *J. Amer. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1860ff.
- ¹⁵ A. L. Smith, M. Harris; *American Dyest. Report*, **1936**, 25, 542ff.
- ¹⁶ K. Lees, F. F. Elsworth; *Proc. Intern. Wool Text. Res. Conf.* **1955**,

- Australien, C, 363f.
- ¹⁷ H. Zahn; *Textilveredlung*, **1982**, 17, 421ff.
 - ¹⁸ R. Levene; Wool Bleaching in: *Chemical Processing of Fibres and Fabrics*, **1984**, B, 305ff.
 - ¹⁹ C. S. Whewell; in: *Chemistry of Natural Protein Fibers*, Plenum Press, New York, London, **1977**.
 - ²⁰ M. Harris, A. L. Smith; *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **1937**, 18, 623f.
 - ²¹ U. Schumacher-Hamedat, Dissertation RWTH Aachen 1985
 - ²² Y. Shechter, Y. Burstein, A. Patchornik; *Biochemistry*, **1975**, 14, 4497ff.
 - ²³ C. H. W. Hirs; *J. Biol. Chem.*, **1956**, 219, 611ff.
 - ²⁴ G. R. Stark; *Adv. Prot. Chem.*, **1970**, 24, 261ff.
 - ²⁵ C. Earland, C. S. Knight; *Biochem. Biophys. Acta*, **1955**, 17, 457ff.
 - ²⁶ C. Robbins; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1971**, 22, 339ff.
 - ²⁷ L. Machclan; *Naturwissenschaften*, **1959**, 46, 357f.
 - ²⁸ N. N. Greenwood, A. Earnshaw; *Chemie der Elemente*, 1. korr. Nachdruck der 1. Auflage, VCH Weinheim, **1990**.
 - ²⁹ Holleman-Wiberg; *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 91.-100. Auflage, de Gruyter Berlin; **1985**
 - ³⁰ Ozon, *CDRömpp Chemie Lexikon*, Version 1.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag **1995**
 - ³¹ C. F. Schönbein; *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **1840**, 10, 706ff.
 - ³² T. C. Manley, S. J. Niegowski; *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* 2nd ed., **1967**, 14, 410.
 - ³³ C. Harries; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1903**, 36, 1933ff.
 - ³⁴ R. Criegee; *Abst.*, 120th Nat. Meet. Am. Chem. Soc. New York, **1951**, 22M.
 - ³⁵ R. Criegee; *Angew. Chem.*, **1975**, 21, 765-771.
 - ³⁶ P. R. Story, R. W. Murray, R. D. Youssefyeh; *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 3144ff.
 - ³⁷ N. L. Baud, J. A. Thompson, C. E. Hudson, P. S. Bailey; *J. Am. Chem.*

- Soc., **1968**, 90, 1822ff.
- ³⁸ R. P. Lattimer, R. L. Kuczkowski, C. W. Gillies; *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 348ff.
- ³⁹ Kühn, Birett; Merkblätter gefährliche Arbeitsstoffe Vol. 7.
- ⁴⁰ J. C. Farman, B. G. Gardiner, J. D. Shanklin; *Nature*, **1985**, 315, 207ff.
- ⁴¹ *Der Spiegel*, Ausgabe 40/2002, **2002**.
- ⁴² 22. BImSchV (Verordnung über Immissionswerte) zum BImSchG in der Fassung vom 26.10.1993.
- ⁴³ <http://www.elab.at/Deutsch/Analysen/Luft/Tests/Ozon/ozon.html>
- ⁴⁴ R. Huisgen; *Angew. Chemie*, **1963**, 75, 604ff.
- ⁴⁵ J. Meinwald; *Chem. Ber.*, **1955**, 88, 1889ff.
- ⁴⁶ G. A. Olah, N. Yoneda, D. G. Parker; *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 2251ff.
- ⁴⁷ W. R. Wadt, W. A. Godard, III.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 3004ff.
- ⁴⁸ P. S. Bailey, A. G. Lane; *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 4473
- ⁴⁹ B. Chutny, J. Kucery; *Radiat. Res. Rev.*, **1974**, 5, 1ff.
- ⁵⁰ P. S. Bailey; *Ozonation in Organic Chemistry* Vol. I, Academic Press, New York, **1978**.
- ⁵¹ P. S. Bailey; *Ozonation in Organic Chemistry* Vol. II, Academic Press, New York, **1982**.
- ⁵² J. Hoigné in: *Process Technologies for Water Treatment*, Plenum Press, New York, **1988**.
- ⁵³ A. Ugur; *J.S.D.C.* **1997**, 113(7/8), 211f.
- ⁵⁴ Richtlinien für die Verwendung von Ozon zur Wasseraufbereitung (ZH 1/474), Köln: Heymanns **1983**.
- ⁵⁵ DVGW-Schriftenreihe, Wasser, **1988**, 54, 97ff.
- ⁵⁶ Masschelein; *Ozonisation Manual for Water and Wastewater Treatment*, Wiley, New York, **1982**.
- ⁵⁷ F. Tiefenbrunner; *Gas, Wasser, Wärme*, **1977**, 31(12), 388ff.
- ⁵⁸ M. Bataller, E. Veliz, R. Perez-Rey, L. A. Fernandez, M. Gutierrez, A.

- Marquez; *Ozone: Science & Engineering*, **2000**, 22(6), 677ff.
- ⁵⁹ J. Shao, C. J. Hawkyard, C. M. Carr; *J.S.D.C.* **1997**, 113, 126ff.
- ⁶⁰ W. J. Thorsen, W. H. Ward, M. M. Millard; *J. Appl. Polym. Sci.* **1979**, 24(2), 523ff.
- ⁶¹ W. J. Thorsen; *Text. Res. J.* **1979**, 49(10), 595ff.
- ⁶² T. Karakawa, R. Umehara, H. Ichimura, K. Nakase, K. Ohshima; *Sen'i Gakkaishi* **2002**, 58(4), 45ff.
- ⁶³ W. Gerlach, O. Stern; *Z. Phys.* **1921**, 8, 110ff.
- ⁶⁴ W. Gerlach, O. Stern; *Z. Phys.* **1922**, 9, 349ff.
- ⁶⁵ G. E. Uhlenbeck, S. Goudsmit; *Naturwissenschaften* **1925**, 13, 953ff.
- ⁶⁶ E. Zavoisky; *J. Phys. U.S.S.R* **1945**, 9, 211ff.
- ⁶⁷ P. W. Atkins; *Physikalische Chemie*, VCH-Verlag, Weinheim, **1990**.
- ⁶⁸ R. Kirmse, J. Stach, *ESR-Spektroskopie*, Akademie-Verlag Berlin **1985**
- ⁶⁹ J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz; *Electron Paramagnetic Resonance*, Wiley-Interscience, **1994**.
- ⁷⁰ K. Scheffler, H. B. Stegmann; *Elektronenspinresonanz*, Springer-Verlag, Berlin, **1970**.
- ⁷¹ E. G. Janzen, B. J. Blackburn; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 4481ff.
- ⁷² E. G. Janzen, D. L. Haire; *Adv. Free Rad. Chem.* **1990**, 1, 253ff.
- ⁷³ G. R. Büttner; *Free Radical Biol. Med.* **1987**, 3, 259ff.
- ⁷⁴ H. Pauly; *Z. Physiol. Chem.*, **1904**, 42, 508ff.
- ⁷⁵ F. Knoop, A. Windaus; *Beitr. Chem. Physiol. Path.*, **1904**, 7, 144ff.
- ⁷⁶ F. Knoop; *Beitr. Chem. Physiol. Path.*, **1907**, 10, 111ff.
- ⁷⁷ K. Hoffmann; Imidazole and Its Derivatives in: *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*; Interscience Publishers Inc., New York, **1953**.
- ⁷⁸ Skriptum zur Vorlesung Proteinchemie, Lehrstuhl für Textilchemie und Makromolekulare Chemie der TH Aachen, **1993**.
- ⁷⁹ W. Beyer, W. Walter; *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 22. Auflage, Verlag S. Hirzel, Stuttgart, **1991**.

- ⁸⁰ W. Pryor; *Free Radical Biol. Med.*, **1994**, 17(5), 451ff.
- ⁸¹ L. Hureiki, J. P. Croué, B. Legube, M. Doré; *Ozone Science & Engineering*, **1998**, 20, 381-402.
- ⁸² A. Kleemann; *Chemiker-Zeitung*, **1982**, Sonderdruck 106, 151-167.
- ⁸³ A. Neuberger; *Biochem. J.*, **1944**, 38, 309-314.
- ⁸⁴ J. R. Kanofsky, P. Sima; *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 9039ff.
- ⁸⁵ A. Michaeli, J. Feitelson; *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 59(3), 284ff.
- ⁸⁶ Watanabe, I., Maeda, H., Saiki, S.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho **1999**, JP 98-158569 19980608.
- ⁸⁷ Ohira, M.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho **1997**, JP 96-136255 19960530.
- ⁸⁸ Hatsutori, A., Tachibana, K., Yoshida, A., Yoshiike, N.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho **1994**, JP 92-235667 19920903.
- ⁸⁹ Asai, K., Igiarashi, T.; *Optical and Quantum Electronics* **1975**, 7(3), 211ff.
- ⁹⁰ Bedienungsanleitung Fischer-Ozonisator.
- ⁹¹ Muehlheims, F., Volz, An., Kley, D.; *Ber. Fernforschungsanlage Juelich* **1988**, Juel-2218.
- ⁹² T. Kotiaho, M. N. Eberlin, P. Vainiotalo, R. Kostianinen; *Am. Soc. Mass. Spectr.*, **2000**, 11, 526ff.
- ⁹³ The Aldrich Library of FT-IR Spectra, Ed. 1, Vol. 2, **1985**.
- ⁹⁴ M. Rauen; *Biochem. Taschenbuch*, II. Teil, 90 ff.
- ⁹⁵ Pryor, W. A., Giamalva, D. H., Church, D. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7094ff.
- ⁹⁶ Bailey, P.S.; *Ozonization in Organic Chemistry*, Vol II, Academic Press **1982**.
- ⁹⁷ Stadtman, E. R., Berlett, B. S., Levine R. G.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(8), 4177ff.
- ⁹⁸ D. Goddinger; *Dissertation RWTH Aachen*, **1994**.
- ⁹⁹ Casein, *CDRömpf Chemie Lexikon*, Version 1.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag **1995**.

- ¹⁰⁰ Nutrient Requirements for Swine, 10th Revised Edition, **1998**.
- ¹⁰¹ Statutory Rule No. 432, Regul. 5b on §2.4 of Sched. 1; Processed Cereal-based Foods and Babyfoods for Infant and Young Children Regulation (Northern Ireland), **1997**.
- ¹⁰² C. Gehrtsen, H. Vogel; Physik 17. Aufl., Springer-Verlag, **1993**.
- ¹⁰³ K.-H. Phan; Dissertation RWTH Aachen, **1994**.
- ¹⁰⁴ J. A. Swift, J. R. Smith; *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.*, **2000**, Aachen, CD-ROM
- ¹⁰⁵ C. A. Anderson, M. T. Goldsmith, H. J. Katz, G. F. Wood; *Appl. Polym. Symp.*, **1974**, 18, 715 ff.
- ¹⁰⁶ K.-H. Phan; persönliche Mitteilung.
- ¹⁰⁷ J. Jackson, M. A. Rushforth, H. Thomas; *Proc. 8th Int. Wool Text. Res. Conf. (Christchurch/NZL)*, **1990**, Vol. IV, 360ff.
- ¹⁰⁸ H. Zahn, F.-J. Wortmann, G. Wortmann, R. Hoffmann; *Ullmanns Encycl. Indust. Chem.*, A28, 395, VCH-Verlag, Weinheim, **1996**.
- ¹⁰⁹ J. Quadflieg, Diplomarbeit RWTH Aachen, **1998**.
- ¹¹⁰ Farbmessung in der Textilindustrie, *Bayer Farbenrevue Sonderheft 3/2D*, **1986**.
- ¹¹¹ Farbmetrische Bestimmung von Farbabständen bei Körperfarben nach der CIELAB-Formel (DIN 6174); *Deutsche Normen*, Deutsches Institut für Normung e.V. Berlin, **1976**.
- ¹¹² J. J. Windle; *Text. Res. J.*, **1962**, 32, 963ff.
- ¹¹³ A. Shatkay, I. Michaeli; *Text. Res. J.*, **1971**, 41, 269ff.
- ¹¹⁴ A. Shatkay, I. Michaeli; *Photochem. Photobiol.*, **1973**, 15, 119ff.
- ¹¹⁵ H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore; *Anal. Chemie.*, **1958**, 30, 1190ff.

DANKSAGUNG

Meinem Lehrer, Univ.-Prof. Dr. Hartwig Höcker, danke ich für die Themstellung für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können.

Privatdozentin Dr. Marlies Fabry danke ich für die Übernahme des Co-Referates.

Dr. Karola Schäfer bin ich für die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes zu Dank verpflichtet.

Marion Arndt und Mathias Dechesne danke ich für ihre Hilfestellungen und die gute Kooperation im Labor.

Dr. Josef Föhles und Dr. Monika Casaretto danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Dr. Kim-Hô Phan und Stephan Rütten danke ich für die Anfertigung der raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Darüber hinaus möchte ich auch Anita Verbovsek für die Durchführung der MALDI-ToF-MS-Analytik sowie Michaela Salin-Krings für die Durchführung der IR-Analytik danken.

Allen Kolleginnen und Kollegen des DWI danke ich für interessante Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) „Otto von Guericke“, die einen Teil der Arbeit mit dem Projekt 12052 gefördert hat.

Meiner Frau Jutta danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft, für viele Tips und Anregungen beim Verfassen der Arbeit und für ihre moralische Aufbauarbeit in Zeiten des Zweifels.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern, die mich seit Beginn meines Studiums finanziell wie moralisch immer unterstützt und dazu beigetragen haben, mein Ziel niemals aus den Augen zu verlieren.

LEBENS LAUF

Name: Joachim H. A. Quadflieg
Familienstand: verheiratet
Geburtsdatum: 3. August 1970
Geburtsort: Aachen
Eltern: Alfred M. Quadflieg
Monika M. Quadflieg, geb. Geulen

Werdegang

1977-1981 Kath. Grundschule Reumontstraße, Aachen
1981-1990 Bischöfliches Pius-Gymnasium, Aachen
1990 Allgemeine Hochschulreife

1990-1991 Grundwehrdienst in Hermeskeil und Diez/Lahn

WS 1991/1992 Beginn des Chemiestudiums an der RWTH Aachen
April 1994 Diplom-Vorprüfung
September 1998 Abschluss des Chemiestudiums mit der Diplomprüfung
Diplomarbeit: „Einfluß von Ultraschall auf oxidative Prozesse an Wolle“

seit Oktober 1998: Promotion am Deutschen Wollforschungsinstitut an der RWTH Aachen e.V. (DWI) bei Univ.-Prof. Dr. H. Höcker zum Thema „Zur Einwirkung von Ozon auf Wolle und Aminosäuren“

05.September 2003: Tag der mündlichen Prüfung