

Prüfung von Textilien

Bestimmung des Cysteinsäuregehaltes in Wollhydrolysaten

DIN

54 286

Testing of textiles; determination of the cysteic acid content in wool hydrolysates
Essai des textiles; détermination de la teneur en acide cystéique dans les hydrolysats de laine

Zusammenhang mit der von der International Organization for Standardization (ISO) herausgegebenen internationalen Norm ISO 2915, siehe Erläuterungen.

Als Reagenzien sind, soweit nicht anders angegeben, Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ und als Wasser destilliertes Wasser oder Wasser gleicher Reinheit zu verwenden. Lösungen ohne Angabe des Lösungsmittels sind Lösungen in destilliertem Wasser oder Wasser gleicher Reinheit.

1 Zweck und Anwendungsbereich

Cysteinsäure ist eines der Oxidationsprodukte der Aminosäuren Cystin/Cystein. Der Gehalt an Cysteinsäure in Rohwolle ist üblicherweise äußerst gering, er nimmt beim photochemischen Abbau (Bewettern) zu. Ausrüstungsprozesse, wie Aufhellen, Bleichen oder Chloren, führen stets zu einem Cysteinsäureanstieg.

Durch die quantitative Bestimmung des Cysteinsäuregehaltes wird das Ausmaß einer erfolgten oxidativen Einwirkung jeglicher Art direkt erfaßt. In Ausnahmefällen kann es nützlich sein, zum Vergleich unbehandeltes bzw. nicht beanstandetes Material mit zu prüfen.

Die Methode kann auf reinwollenes, ungefärbtes und gefärbtes textiles Material in jeder Form, also auf lose Wolle, Faserband, Vorgarn, Garn oder Gewebe direkt angewendet werden. Bei der Prüfung von Mischungen muß der Wollanteil genau bekannt sein. Die Methode ist auch für die Untersuchung von carbonisierten Wollen geeignet.

2 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Eine Probe des zu untersuchenden Materials wird hydrolysiert. Die in dem erhaltenen Hydrolysat vorhandene Menge Cysteinsäure wird papierelektrophoretisch von den anderen Aminosäuren abgetrennt. Der Papierstreifen wird angefärbt und die Zone mit der Cysteinsäure eluiert. Durch Vergleich mit einer gleichzeitig aufgetragenen bekannten Menge Cysteinsäure kann der Gehalt dieser Aminosäure durch Photometrie quantitativ bestimmt werden.

3 Geräte und Reagenzien

3.1 Geräte

Analysenwaage mit 0,0001 g Meßgenauigkeit

Ventilierter Wärmeschrank zum Trocknen und Hydrolysieren der Analysenproben bei $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ bzw. zum Trocknen der Papiere bei 70°C

Exsikkator, z. B. nach DIN 12 491

Rotationsverdampfer

Elektrophoresekammer und Stromversorgungsgerät

Chromatographie-Papierstreifen mit einem Gewicht von 120 g/m^2 *)

Extraktor nach DIN 12 602

Spektralphotometer oder Filterphotometer mit einem Filter, dessen maximale Absorption um $(500 \pm 10)\text{ nm}$ liegt. (Jedes Gerät ist geeignet, bei dem die Extinktion

*) Über die Bezugsquellen gibt Auskunft:
DIN-Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN, 1 Berlin 30, Burggrafenstraße 4-7.

im Bereich von 0 bis 0,7 auf 0,01 genau abgelesen und die folgende Dezimalstelle noch geschätzt werden kann.)

Thermostat mit hochsiedendem Öl oder Heizplatte mit Asbestplatte

Gebläse

Glasmesser

Bombenröhrchen, Durchmesser $\approx 2\text{ cm}$, Länge 30 cm

Reagenzgläser

Färbeküvette oder Glasschale

Pinzette und Glasstab

Wägegläser, z. B. nach DIN 12 605

1-ml-Vollpipette, z. B. Pipette VPB 1 DIN 12 690

5-ml-Vollpipette, z. B. Pipette VPA 5 DIN 12 690

20-ml-Vollpipette, z. B. Pipette VPB 20 DIN 12 690

Geeichte Präzisionspipetten (0,01 ml)

100-ml- und 250-ml-Rundkolben mit Normschliff
NS 29/32 nach DIN 12 348

5-ml-Meßkolben, z. B. Meßkolben MSA 5 DIN 12 664

100-ml-Meßkolben, z. B. Meßkolben MSA 100 DIN 12 664

3.2 Reagenzien

Methanol

Salzsäure, 5,7 N:

hergestellt aus Salzsäure konz. p. a. Dichte $1,19\text{ g/cm}^3$, die azeotrop destilliert wird

Ninhydrin-Cadmiumreagenz:

100 mg Cadmiumacetat werden in 10 ml Wasser gelöst, dann hintereinander 5 ml Eisessig, 100 ml Aceton und 1 g Ninhydrin hinzugegeben. Das Reagenz ist in einer braunen Flasche im Kühlschrank über eine Woche haltbar. Die zum Anfärben eingesetzte Reagenzmenge darf nur einmal verwendet werden.

Pufferlösung pH = 3,5:

10 ml Pyridin, 100 ml Eisessig und 890 ml destilliertes Wasser. Die Pufferlösung muß nach jeweils fünf Trennungen erneuert werden.

Standard Cysteinsäure-Lösung:

In einem 100-ml-Meßkolben werden 110,6 mg Cysteinsäure-Monohydrat (dies entspricht 100 mg wasserfreier Cysteinsäure) mit destilliertem Wasser gelöst. Vor der Einwaage wird die Cysteinsäure in einer Trocknungspistole über Phosphorpentoxid bei $\approx 70^\circ\text{C}$ 24 Stunden lang getrocknet.

Bariumchlorid-Lösung:

2,5 g Bariumchlorid ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) werden mit destilliertem Wasser im 100 ml Meßkolben gelöst.

Fortsetzung Seite 2 und 3
Erläuterungen Seite 4

Fachnormenausschuß Materialprüfung (FNM) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
Textilnorm, Fachnormenausschuß Textil und Textilmaschinen im DIN

AVA Documents
Document Sharing Hub

4 Probenahme und Probenvorbereitung

Dem zu untersuchenden Material wird eine repräsentative Probe entnommen. Sie muß so groß sein, daß daraus die folgenden Analysenproben gebildet werden können:

Eine Analysenprobe von etwa 1 g zur Bestimmung des Trockengewichtes und eine Analysenprobe von etwa 1 g zur Herstellung des Hydrolysates.

Die Gesamtmenge wird im Extraktor mit Dichlormethan 1 Stunde lang bei einer Mindestgeschwindigkeit von 6 Überläufen je Stunde extrahiert. Nach dem Verdunsten des Dichlormethans werden bei noch nicht versponnener Wolle alle Vegetabilien und alle sonstigen als solche erkennbaren Fremdstoffen entfernt. Proben aus Garn oder Gewebe werden vor der Extraktion in kurze Garnstücke von etwa 1 cm Länge zerlegt. Gefilztes Material, das nicht in das Garn zerlegt werden kann, muß zuvor in kleine Stücke zerschnitten werden. Die vorbereiteten Proben sind dem Normalklima (20 ± 2 °C und $(65 \pm 2)\%$ relative Luftfeuchte nach DIN 53 802 anzugleichen.

5 Durchführung der Analyse

5.1 Wägen

Die in Abschnitt 5 aufgeführten Analysenproben werden nacheinander mit einer Genauigkeit von 0,0001 g abgewogen. Die eine Probe (1 g) dient zur Bestimmung des Trockengewichtes (siehe Abschnitt 5.2), aus der anderen Probe (1 g) wird ein Hydrolysat (siehe Abschnitt 5.3) hergestellt.

5.2 Bestimmung des Trockengewichtes

Die Analysenprobe von 1 g Gewicht wird in einem Wägeglaß bei (105 ± 2) °C eine bestimmte Zeit lang getrocknet. Danach verschließt man das Wägeglaß, läßt es im Exsikkator abkühlen und wägt es. Diese Arbeitsgänge werden solange wiederholt, bis Gewichtskonstanz erreicht ist¹⁾. Die Analysenprobe wird darauf aus dem Wägeglaß herausgenommen und dessen Gewicht bestimmt. Auf diese Weise ergibt sich das Trockengewicht der Analysenprobe. Mit ihm wird das Trockengewicht der anderen Analysenprobe berechnet.

5.3 Hydrolyse

Die Hydrolyse kann wahlweise nach einer der angegebenen Methoden durchgeführt werden:

- Man bringt die für die Hydrolyse vorgesehene gewogene Analysenprobe und 20 ml Salzsäure, 5,7 N, in einen 100-ml-Rundkolben, dem ein Rückflußkühler aufgesetzt wird. Nach Eintauchen des Kolbens in einen mit einem hoch siedenden Öl gefüllten Thermostaten erfolgt bei 105 °C während 4 Stunden die Hydrolyse. Anstelle eines Thermostaten kann auch eine Heizplatte in Verbindung mit einer Asbestplatte verwendet werden. Der Rundkolben wird durch das Loch der Asbestplatte soweit hindurch gesteckt, daß der Flüssigkeitsspiegel noch oberhalb dieser Platte sichtbar ist; der Kolbenboden darf die Heizplatte nicht berühren.
- Man bringt die für die Hydrolyse vorgesehene gewogene Analysenprobe in ein dickwandiges Glasrohr (Maße siehe Abschnitt 3.1) und gibt mit einer Pipette 20 ml Salzsäure, 5,7 N, dazu. Nach Abschmelzen des Bombenröhrchens im Gebläse wird es 24 Stunden bei 105 °C im Wärmeschrank belassen. Während dieser Zeit muß das Röhrchen mehrmals gründlich geschüttelt werden, bis im Hydrolysat kein Faser-Rückstand mehr vorliegt.

Das nach a) oder b) erhaltene Hydrolysat wird durch mehrmaliges Nachspülen mit destilliertem Wasser direkt in einen 250-ml-Rundkolben überführt, sofern die Probe aus nicht carbonisierter Wolle besteht. Liegt dagegen

carbonisierte Wolle²⁾ vor, spült man das Hydrolysat in ein 250-ml-Becherglas und bringt die Lösung zum Kochen. Während des Kochens fügt man aus einer Pipette unter Rühren mit einem Glasstab tropfenweise 1 ml Bariumchlorid-Lösung hinzu. Nach Erkalten der Lösung und Stehen über Nacht wird sie in einen 250-ml-Rundkolben filtriert; das Filterpapier ist gründlich mit destilliertem Wasser nachzuspülen.

Schließlich wird die aus beiden Fällungen im Rundkolben vorliegende Lösung am Rotationsverdampfer bei 50 °C Badtemperatur bis zur sirupösen Konsistenz eingedickt. Um die restliche Salzsäure zu entfernen, wird der Sirup 3mal mit je 10 ml destilliertem Wasser versetzt und jeweils am Rotationsverdampfer eingedickt. Der gesamte Rückstand wird mit destilliertem Wasser in einen 5-ml-Meßkolben überführt, den man bis zum Eichstrich mit Wasser auffüllt.

5.4 Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung wird eine Niedervolt-Apparatur verwendet. Hierzu ist jedes Stromversorgungsgerät mit ≈ 300 Volt Ausgangsspannung geeignet. Die Trennkammer soll Papierstreifen (Bogen) von mindestens 30 cm Länge (= Elektrodenabstand) aufnehmen können.

Durch die Mitte des Papiers wird mit dem Bleistift eine senkrechte Linie gezogen. Dann trägt man auf das trockene Papier mittels einer Präzisionspipette jeweils 0,01 ml des zu untersuchenden Hydrolysates strichförmig auf die Bleistiftlinie von zwei Papierstreifen auf, dadurch wird eine Doppelbestimmung möglich. Auf einen anderen Papierstreifen bzw. auf einen anderen Teil der auf dem Bogen markierten Linie wird 0,01 ml der Cysteinsäure-Standardlösung aufgetragen. In jedem Falle ist darauf zu achten, daß der Pipetteninhalt vollständig, gleichmäßig und jeweils 0,5 cm vom Papierrand entfernt aufgetragen wird. Nach Einbringen der beiden Papierenden in die Elektrodengefäße saugt das Filterpapier den Puffer gleichmäßig an. Die hierfür erforderliche Zeit kann durch Besprühen des Papiers mit Puffer verkürzt werden.

Nun legt man an das pufferfeuchte Papier eine Spannung von 5 bis 8 V/cm an (das sind je nach Papierlänge 200 bis 300 V). Nach 4 bis 5 Stunden ist die Elektrophorese beendet. Dann werden die Papierstreifen (Bogen) mit dem anodischen Papierende nach oben in den Wärmeschrank gehängt und 30 Minuten lang bei 70 °C getrocknet.

5.5 Farbentwicklung und Elution

Die getrockneten Papierstreifen (Bogen) werden mit Ninhydrin-Cadmium-Salzlösung (Zusammensetzung siehe Abschnitt 3.2) angefeuchtet, die in geringer Menge den Boden einer Glasschale bedeckt. Dabei soll das Papier die Reagenzlösung lediglich aufsaugen und keinesfalls darin gebadet werden. Nun werden die Papiere 30 Minuten bei 70 °C in den Wärmeschrank gehängt (anodisches Papierende nach oben). Je nach angelegter Spannung und Dauer der Elektrophorese ist die Cysteinsäure-Zone 5 bis 6 cm vom Start in Richtung Anode gewandert. Die zwei Cysteinsäure-Zonen aus dem Hydrolysat und eine aus der

- 1) Gewichtskonstanz ist erreicht, wenn sich bei erneutem Trocknen während mindestens 30 Minuten das Gewicht der Analysenprobe um höchstens 0,0005 g ändert.
- 2) Die Abänderung der Arbeitsweise bei carbonisierten Wollproben dient lediglich dazu, die restliche Schwefelsäure als Bariumsulfat auszufällen. Wird die restliche Schwefelsäure nicht entfernt, dann kann sich während des Einengens Serinsulfat bilden. Serinsulfat hat den gleichen elektrophoretischen Wanderungsweg wie Cysteinsäure und führt dadurch zu ungenauen Cysteinsäure-Werten.