

**Untersuchungen zur oxidativen Entfärbung  
ausgewählter Reaktivfarbstoffe:  
Analyse der Abbauprodukte mittels hochauflösender LC-MS**



Vom Fachbereich C – Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte  
DISSERTATION

von

Marc Schellenträger

aus Remscheid

Wuppertal 2006

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20120229-120927-0

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20120229-120927-0>]

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. S. Gäb

an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich C – Analytische Chemie

in der Zeit von November 2002 bis Januar 2006

### *Danke schön...*

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Siegmund Gäß, für die Bereitstellung des spannenden Themas bedanken. Sein Einsatz und seine Diskussionsbereitschaft haben diese Arbeit maßgeblich unterstützt.

Für die Übernahme des Korreferats und die hervorragende Zusammenarbeit bei Abschlussberichten, Publikationen etc. möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim M. Marzinkowski bedanken.

Herrn Dr. Walter V. Turner danke ich für die Hilfestellungen bei Schwierigkeiten im Umgang mit der englischen Sprache.

Frau Dr. Ute Wollborn sowie Herrn Dr. Matthias Jank von Bayer Industry Services danke ich für die Aufnahme der hochaufgelösten NMR-Spektren sowie für die Hilfe bei deren Auswertung.

Herrn Dr. Uwe Vogt der Firma Lanxess sei herzlich für die Bereitstellung des Baylase<sup>®</sup> RP Systems sowie seine intensive Unterstützung im Rahmen der Arbeiten gedankt.

Für die Unterstützung zum Thema Enzymkinetik danke ich den Herren Prof. Dr. Walter Reineke und Dipl.-Chem. Christian Mandt sehr.

Allen Partnern des Verbundprojektes „OxiteX“ danke ich für die hervorragende und interdisziplinäre Zusammenarbeit, durch die das Projekt zu einem Erfolg wurde.

Bedanken möchte ich mich ferner beim gesamten Arbeitskreis der Analytischen Chemie, besonders aber bei Frau Michaela Wirtz und Herrn Bernd Wallmichrath, die schon seit Jahren mein Leben begleiten und es bunter machen.

Letztlich, aber umso wichtiger, ist mein Dank an Andrea. Sie hat mich in schweren Stunden immer wieder aufgebaut und mir Mut gemacht. Ihre Unterstützung war die wertvollste.

WASSER! Du hast weder Geschmack,  
noch Farbe, noch Aroma. Man kann Dich  
nicht beschreiben. Man schmeckt Dich ohne  
Dich zu kennen. Es ist nicht so, dass man Dich  
zum Leben braucht: Du bist das Leben!

*Antoine de Saint-Exupéry (1900 – 1944)*

*Für Andrea*

## Abstract

The large amount of cotton that continues to be used for textiles means that reactive dyes are still quantitatively the most significant group of dyes. Dying cellulose textiles with reactive dyes is always accompanied by hydrolysis of the dye. The degree to which reactive dyes are fixed to the cellulose fibre is between 55 and 95 %. The dye hydrolysates negatively affect the wet fastness of the dyed textile. For this reason they have to be removed from the textile in an extensive washing process, which means a high consumption of water, energy and time. The resulting colour in the wastewater prevents both direct water recycling in textile finishing and discharge into a sewer. Decolourisation of the wastewater is thus necessary. If it is possible to attain a sufficient level of decolourisation, the water can be reused in the finishing process; this recycling means a great reduction in the necessary chemicals, energy and time.

This work describes the oxidative degradation of selected reactive dyes. The chemical oxidative degradation with peroxodisulphate and an enzymatically catalysed oxidative reaction (Baylase<sup>®</sup> RP) are examined. To this end, certain commercial reactive dyes with typical chromophores and anchor groups were chosen; these were provided to us in the form of trade products with an exact declaration of the content of auxiliary substances. Three of these dyes, called Black C, Yellow D and Red F, were used in extensive investigations of the intermediates and products of oxidative degradation.

After textile finishing, the dyes in the wastewater are present in the hydrolysed form, so that a procedure for the quantitative hydrolysis of the dyes had to be worked out. It was possible to hydrolyse the anchor groups without cleaving the chromophoric system.

The redox potential of peroxodisulphate depends on the pH value of the solution and is large enough to oxidize chloride to chlorine or hypochlorite. In the beginning of the work the question arose as to whether oxidation in the presence of chloride, an important component in dye-baths or wash-waters, leads to contamination with chlorinated aromatic compounds. For this study, 1-naphthol was used as a model compound; an excess of chloride was added to it, and the mixture was treated oxidatively. At pH values of 11 and above, no chlorinated aromatic compounds were found among the oxidation products. The results were quite different in acidic milieu, where a large number of chlorinated aromatic compounds were formed. To prevent additional dangers for the environment, oxidative degradation with peroxodisulphate thus has to take place in alkaline solution. All further studies were carried out in the presence of the amount of base needed to neutralise the protons arising during the reaction with peroxodisulphate.

After the oxidation took place, the concentration of the intermediates was low. To improve detection, the products were first enriched by solid-phase extraction; this also separated them into polar and moderately polar fractions. The main moderately polar compounds were characterised by reversed-phase chromatography with a UV/VIS diode array detector or by mass spectrometry (LC-QToF with ESI). Precision masses, with in most cases deviations of  $\leq 5$  ppm from the theoretical value (W-mode with phosphoric acid as an internal standard), led in combination with plausibility considerations to proposals for the structures. These results were supported in some cases by NMR spectra (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR) of isolated degradation products (preparative HPLC).

The oxidative treatment of the hydrolysates led to intermediates in low concentrations. Only in a few cases was further reaction of the intermediates slower than the degradation of the hydrolysates themselves; in these cases products were observed to increase in concentration, at least for a short time.

At a point where the values required in supplement 38 of the German Waste Water regulation (Abwasserordnung) with  $7 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 436 \text{ nm}$ ),  $5 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 525 \text{ nm}$ ) and  $3 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ) were satisfied, no hydrolysed dyes were detectable. The moderately polar intermediates

formed were also detectable only in traces. Mainly polar products with low molecular weights were found.

The structures of the intermediates based on MS and NMR data make the following generalisations about the degradation pathway possible:

- cleavage of the azo link and formation of OH, NH<sub>2</sub> or NO<sub>2</sub> groups in its stead
- loss of sulphate-ester and sulphonic-acid groups
- loss of hydroxy-ethyl groups
- formation of isoxazole compounds where the basic structure allows it

Comparison of the oxidation methods examined (with peroxodisulphate and Baylase<sup>®</sup> RP) showed two main differences, the speed of decolourisation on the one hand and the number of observed degradation products on the other. Peroxodisulphate was proved to be very effective for rapid decolourisation of dye hydrolysates: complete decolourisation, even of heavily coloured samples, could be achieved within a few minutes. Baylase<sup>®</sup> RP turned out to be slower, decolourisation sometimes taking hours. The reason for this can be found in the different pathways of decolourisation, radical vs. enzymatic mechanisms.

The two oxidative methods differ in the number of degradation products formed. In spite of a ten-fold greater amount of dye, oxidation with peroxodisulphate led to only a few detectable degradation products. The enzymatic system generates a huge number of products, which can be used to elucidate the dyes' decomposition route. Studies with Baylase<sup>®</sup> RP and a higher concentration of dye (1 g L<sup>-1</sup>) showed fewer degradation products, as with the chemical oxidation with peroxodisulphate. It is possible that the surprisingly small number of products is due less to the oxidation method than to some mass-spectrometric discrimination.

---

1.	Einleitung .....	1
2.	Theorie .....	3
2.1	Eigenschaften organischer Farbstoffe .....	3
2.1.1	Über die Farbigkeit und deren Beurteilung .....	3
2.1.2	Reaktivfarbstoffe .....	4
2.1.3	Reaktivbindung durch nukleophile (heteroaromatische) Substitution .....	6
2.1.4	Reaktivbindung durch nukleophile Addition .....	7
2.2	Rechtliche Bestimmungen .....	8
2.3	Chemische Oxidation .....	10
2.3.1	Ozon .....	10
2.3.2	Wasserstoffperoxid .....	13
2.3.3	Peroxodisulfat .....	14
2.3.4	Fällung / Flockung .....	17
2.4	Biologische Methoden .....	18
2.4.1	Aerober biologischer Abbau .....	18
2.4.2	Anaerober biologischer Abbau .....	19
2.5	Einsatz von Enzymen beim Farbstoffabbau .....	20
2.6	Analytik von Reaktivfarbstoffen sowie Produkten der Hydrolyse und des oxidativen Abbaus .....	24
2.6.1	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) ..	24
2.6.2	Interface .....	25
2.6.3	Möglichkeiten der LC-QToF-Kopplung .....	25
2.6.4	Bestimmung von Präzisionsmassen .....	26
3.	Ziel der Arbeit .....	28
4.	Ergebnisse und Diskussion .....	29
4.1	Untersuchung einer möglichen Sekundärbelastung durch das Oxidationsverfahren ...	29
4.2	Auswahl und Hydrolyse der Reaktivfarbstoffe .....	31
4.3	Flüssigchromatographie (LC) .....	34
4.4	Festphasenextraktion (SPE-Anreicherung) .....	35
4.5	Entfärbung mit Peroxodisulfat .....	36
4.5.1	Entfärbungsverfahren .....	36
4.5.2	Optimierung der Oxidationstemperatur .....	37
4.5.3	Ermittlung der erforderlichen Menge Peroxodisulfat gemäß Anhang 38 der Abwasserverordnung .....	37

4.5.4	Entfärbung von Marine C mit Peroxodisulfat.....	38
4.5.5	Entfärbung von Gelb D mit Peroxodisulfat.....	45
4.5.6	Kernresonanzmagnetische Untersuchungen .....	52
4.5.7	Entfärbung von Rot F mit Peroxodisulfat .....	55
4.6	Entfärbung mit Baylase® RP .....	62
4.6.1	Entfärbungsverfahren .....	62
4.6.2	Aufarbeitung der Proben – Entfernung des Enzyms .....	62
4.6.3	Entfärbung von Marine C mit Baylase® RP.....	64
4.6.4	Entfärbung von Gelb D mit Baylase® RP .....	72
4.6.5	Entfärbung von Rot F mit Baylase® RP .....	79
4.7	Vergleich Peroxodisulfat- vs. Baylase® RP-Behandlung.....	86
4.8	Kinetik.....	87
4.8.1	Chemische Oxidation mit Peroxodisulfat .....	87
4.8.2	Chemische Oxidation mit dem Baylase® RP-System .....	89
4.9	Typische Abbaureaktionen.....	93
4.10	Ausblick .....	95
5.	Zusammenfassung.....	97
6.	Experimenteller Teil.....	100
6.1	Hydrolyse der Reaktivfarbstoffe .....	100
6.2	Oxidation der Reaktivfarbstoffe mit Peroxodisulfat .....	100
6.3	Oxidation der Reaktivfarbstoffe mit dem Baylase® RP-System.....	100
6.4	Geräteparameter .....	101
7.	Anhang .....	103
7.1	NMR-Daten von Gelb D Hydrolysat und daraus entstandener Abbauprodukte .....	103
7.2	Bestimmung der Enzymaktivität.....	110
7.3	Materialien .....	111
7.4	Abkürzungsverzeichnis .....	113
7.5	Abbildungsverzeichnis.....	115
7.6	Tabellenverzeichnis.....	118
8.	Literatur.....	120

# 1. Einleitung

Wasser ist für den Menschen von enormer Bedeutung. Aus biologischer Sicht ist es unverzichtbar, ohne die Zufuhr von Wasser stirbt ein Mensch nach wenigen Tagen <sup>[1]</sup>. Auch aus technologischer Sicht ist die Bedeutung des Wassers, besonders seit Beginn der Industrialisierung, stetig angestiegen. Viele Industriezweige sind im Rahmen ihrer Produktion auf Wasser angewiesen. Gleichzeitig ist die Menge an verwendbarem Wasser begrenzt. Nutzbar ist hauptsächlich der Süßwasseranteil; dieser liegt bei 2,6 % des weltweiten Gesamtwasservorkommens <sup>[2]</sup>. Damit beim Gebrauch verschmutztes Wasser wieder in die Hydrosphäre zurückgeführt werden kann, müssen die Verunreinigungen mit aufwendigen Klär- und Säuberungstechniken aus dem Wasser entfernt werden. Der heute geforderte hohe Reinigungsgrad führt zu einem wachsenden Aufwand und damit auch zu steigenden Wasser- und Abwasserkosten. So betragen die Gebühren für einen Kubikmeter Frischwasser in der Bundesrepublik Deutschland Anfang des Jahres 2005 durchschnittlich 1,81 Euro <sup>[3]</sup>; für einen Kubikmeter Abwasser zahlen die Einwohner im Mittel 2,14 Euro <sup>[4]</sup>. Aus ökologischen insbesondere aber aus ökonomischen Gründen findet seit einiger Zeit ein Umdenken statt. Ressourcenschonung und eine nachhaltig ausgelegte Wirtschaftsweise haben eine mehrfache Verwendung von Brauchwasser und die Bildung von Wasser-Kreisläufen zum Ziel. Die Industrie versucht, auf diese Weise Kosten einzusparen und gleichzeitig die Umwelt zu schonen.

Die Textilveredlung zählt zu den abwasserintensivsten Industriebranchen. Pro Tonne veredelten Textils werden 30 bis 350 Tonnen Wasser benötigt, circa 90 % des eingesetzten Wassers fallen hierbei als Abwasser an <sup>[5]</sup>. In Deutschland lag die jährliche Gesamtwasserbelastung der Textilfärbereien bei etwa 80 Millionen Kubikmetern <sup>[6]</sup>. Ressourcenschonung und die Wiederverwendung von Abwasser hat gerade in diesem Industriezweig einen besonders hohen Stellenwert. Aufgrund einer häufig sehr hohen Restfarbigkeit des anfallenden Abwassers ist auf der einen Seite ein direkter Wiedereinsatz in den Veredelungsprozess kaum möglich. Auf der anderen Seite ist die Einleitung des Abwassers in eine Kläranlage nicht nur kostenintensiv, sondern wegen der Farbigkeit sogar reglementiert und je nach Art der im Abwasser enthaltenen Farbstoffe auch wenig zweckmäßig, da sich zum Beispiel Reaktivfarbstoffe in der aeroben biologischen Stufe der kommunalen Kläranlagen nicht ohne weiteres abbauen lassen. Reaktivfarbstoffe stellen bei der Baumwollfärbung die wichtigste Farbstoffgruppe dar. 32 % aller weltweit hergestellten Färbemittel gehören zur Klasse der Reaktivfarbstoffe. Im Jahre 1993 wurden weltweit 336.000 Tonnen eingesetzt <sup>[7]</sup>. Der Aufziehgrad dieser Farbstoffe wird mit 70 - 95 % angegeben, so dass der nicht fixierte Rest in Form von Farb-

stoffhydrolysaten ins Abwasser gelangt <sup>[8]</sup>. Die zur Textilveredlungsindustrie gehörenden Betriebe sind zu 95 % Indirekteinleiter. Zum Teil wird das Abwasser vor der Einleitung in die Kanalisation über eine Fällung / Flockung vorbehandelt <sup>[9]</sup>. Ohne Vorbehandlung kann nach *Jedele* <sup>[10]</sup> in Kläranlagen höchstens mit einer 10 %igen Eliminierung von Reaktivfarbstoffen gerechnet werden, andere Quellen weisen Zahlen von 10 bis 25 % auf <sup>[11]</sup>. Dieser geringe Eliminationsgrad ist durch die starke Wasserlöslichkeit und hohe Stabilität der Farbstoffe in aeroben Kläranlagen bedingt.

Seit Inkrafttreten der Abwasserverordnung und mit ihr der Anhang 38 (Textilindustrie) gelten für den Textilhersteller und Textilveredler strengere Anforderungen an die Einleitung von farbigem Abwasser <sup>[12]</sup>. Eine Einleitung farbiger (und anderer) Konzentrate ist ohne Vorbehandlung nicht mehr erlaubt. Die Entsorgung als Abfall bedeutet für die Textilunternehmen jedoch eine erhebliche wirtschaftliche Belastung. In diesem Zusammenhang muss die Frage aufgeworfen werden, ob das entfärbte Abwasser auf direktem Wege wieder zu verwenden ist, um auf diese Weise den in die Entfärbung investierten Aufwand zumindest teilweise „zurück zu gewinnen“. Dieser ökonomische Ansatz zum produktionsintegrierten Umweltschutz hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es zeigt sich, dass Maßnahmen zur Wassereinsparung und zur Abwasserreduzierung durch ein Recycling des behandelten Wassers insbesondere durch eine prozessnahe Vorgehensweise effizient gestaltet werden können. Wenn ein zeitnahe Recycling des entfärbten Wassers, vielleicht sogar im identischen Prozess möglich ist und keine zusätzlichen Stoffe wie beispielsweise Salze im Recyclingabwasser enthalten sind, muss die Reinigung des Abwassers nicht bis zur vollständigen Entfärbung erfolgen. Der Einfluss auf den Veredlungsprozess muss jedoch sorgfältig untersucht werden.

In der Praxis kommen verschiedene Entfärbungsmethoden zum Einsatz. Sie sind zu unterscheiden in biologische und chemisch / physikalische Verfahren. Häufig werden mehrere Methoden zur Verbesserung der Entfärbungswirkung kombiniert. Im Rahmen dieser Arbeit wird der oxidative Abbau von Reaktivfarbstoffen mit Peroxodisulfat sowie dem enzymatischen Baylase<sup>®</sup> RP-System im Hinblick auf die Wirksamkeit der Entfärbung und die dabei entstehenden Abbauprodukte untersucht. Die Oxidation wird gezielt nur bis zur Entfärbung durchgeführt, da ein prozessnaher Wiedereinsatz des behandelten Abwassers erfolgen soll und daher keine hohe Wasserreinheit erforderlich ist.

## 2. Theorie

### 2.1 Eigenschaften organischer Farbstoffe

#### 2.1.1 Über die Farbigkeit und deren Beurteilung

Die Farbigkeit einer Verbindung entsteht dadurch, dass ein Stoff elektromagnetische Wellen einer bestimmten Länge absorbiert. Für das menschliche Auge ist lediglich der Bereich zwischen 380 und 770 nm sichtbar. Hierbei handelt es sich um den gestreuten und reflektierten Anteil des Spektrums. Die nachfolgende Tabelle 1 stellt den Zusammenhang zwischen dem Wellenlängenbereich des absorbierten Anteils des Lichtes sowie der resultierenden und zu beobachtenden Farbe dar <sup>[13]</sup>.

Wellenlängenbereich [nm]	zugehörige Farbe	gestreutes und reflektiertes Licht Farbe der Verbindung
380 – 430	violett	gelbgrün
430 – 480	blau	gelb
480 – 490	grünblau	orange
490 – 500	blaugrün	rot
500 – 560	grün	purpur
560 – 580	gelbgrün	violett
580 – 595	gelb	blau
595 – 605	orange	grünblau
605 – 750	rot	blaugrün
750 – 770	purpur	grün

**Tabelle 1: Zusammenhang zwischen beobachteter Farbe und des absorbierten Anteils des Lichtes**

Bei Lösungen besteht bei der Beurteilung ihrer Farbigkeit die Schwierigkeit, dass nur in wenigen Fällen klar abgegrenzte Absorptionsmaxima vorliegen, überwiegend wird eine Absorption über einen größeren Wellenlängenbereich beobachtet. Aus diesem Grund wird die Farbigkeit von Lösungen in drei Bereichen betrachtet, nämlich bei  $\lambda = 436$  nm (Gelbbereich),  $\lambda = 525$  nm (Rotbereich) und bei  $\lambda = 620$  nm (Blaubereich) (siehe hierzu auch Kapitel 2.2). Mit Hilfe des spektralen Absorptionskoeffizienten SAK (auch Durchsichtsfarbzahl (DFZ) genannt) kann die Farbigkeit gemäß nachfolgender Formel beschrieben werden <sup>[14]</sup>:

$$\text{SAK oder DFZ} = E/d \text{ mit der Einheit } [\text{m}^{-1}]$$

Der Wert für den SAK (oder die DFZ) wird hierbei über die Messung der Extinktion  $E$  einer zu untersuchenden Lösung bei den vorgehend genannten Wellenlängen von  $\lambda = 436 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 525 \text{ nm}$  und  $\lambda = 620 \text{ nm}$  ermittelt. Der Divisor  $d$  in der Einheit  $[\text{m}]$  gibt die Dicke der bei der Messung verwendeten Küvette an.

### 2.1.2 Reaktivfarbstoffe

Bei dem größten Anteil der Verwendung findenden Farbstoffe handelt es sich um Reaktivfarbstoffe, größtenteils in Form von Azofarbstoffen.

Bereits in den frühen 50iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts erkannte man, dass reaktive Gruppen in wässriger Lösung chemisch an die cellulose Faser gebunden werden können und zu sehr waschechten Färbungen führen <sup>[15]</sup>. Diese Entwicklung hat dazu geführt, dass klassische Färbeverfahren mit der Einführung von Reaktivfarbstoffen stark an Wichtigkeit verloren.

Reaktivfarbstoffe sind wasserlösliche Farbstoffe, welche eine zur kovalenten Verknüpfung mit der Faser befähigende Gruppierung besitzen und mit dieser eine Reaktivbindung eingehen. Diese Kovalenz führt zu einer waschechten Verbindung <sup>[16]</sup>. Die im Farbstoff enthaltene reaktive Gruppe verbindet sich bei Cellulosefasern mit Hydroxygruppen, bei Wolle und Seide mit Amino-, Carboxy-, Hydroxy- und Thiolgruppen <sup>[17]</sup>. Synthefasern wie Polyamid besitzen nur wenige endständige Amino- bzw. Carboxygruppen für eine solche Bindung. Im Laufe des Färbvorgangs diffundiert der Reaktivfarbstoff aus dem als „Färbeflotte“ bezeichneten Färbebad an die Faser und sie hinein, was man als „Ausziehen“ des Farbstoffs aus der Farbflotte bezeichnet. Anschließend geht der Farbstoff eine chemische Bindung mit der Faser ein. Der grundsätzliche Aufbau eines Reaktivfarbstoffmoleküls ist in Abbildung 1 angegeben:

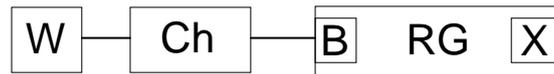


Abbildung 1: Aufbau eines Reaktivfarbstoffs <sup>[18]</sup>

- RG: Reaktivankergruppe (auch mehrere in einem Molekül möglich)
- X: nukleophile Abgangsgruppe ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ , ...), in den meisten Reaktivgruppen enthalten
- B: Brückengruppe / Spacer ( $NH$ , ...)
- Ch: Chromophor (z.B. Azoverbindung)
- W: Gruppen, die die Wasserlöslichkeit erhöhen (meist  $SO_3^-$ -Gruppen)

Die Fixierung des Farbstoffes an der Faser erfolgt mit Hilfe des Reaktivankers. Es ist erwünscht, dass die Bindung Farbstoff-Faser möglichst fest ist. Je fester der Farbstoff an der Faser gebunden ist, desto bessere Waschechtheiten sind zu erwarten. Andere Applikationsklassen wie z.B. die Direktfarbstoffe binden nur infolge von van-der-Waals-Kräften an die Faser, bilden große Kolloide innerhalb der Faser und sind bedingt durch die schwächere Bindung wesentlich leichter wieder aus der Faser zu lösen. Deshalb dürfen Textilien, die mit Direktfarbstoffen gefärbt wurden, in der Regel nur bis maximal 40 °C gewaschen werden. Bei Färbungen mit Reaktivfarbstoffen sind dagegen oftmals Waschttemperaturen bis 95 °C erlaubt.

Aus den zuvor genannten Vorteilen gegenüber anderen Applikationsklassen und der allgemein guten Applizierbarkeit der Reaktivfarbstoffe in technischen Prozessen wird ersichtlich, warum diese Farbstoffe immer noch in sehr großen Mengen erfolgreich eingesetzt werden.

Bis heute sind aus patentrechtlichen Gründen eine Vielzahl von Reaktivgruppen von den Farbstoffherstellern entwickelt worden. Ein derzeitiger Trend besteht darin, Reaktivfarbstoffe mit mehreren Ankergruppen einzusetzen (Mehrfachverankerung), um dadurch die Fixierate zu erhöhen und den Hydrolysatanteil zurückzudrängen. Für den chromophoren Teil kommen vor allem relativ kleine Moleküle in Frage, welche infolge schmaler und steiler Absorptionsbanden klare und brillante Farbtöne liefern <sup>[16]</sup>. Beispielhaft sind in Abbildung 2 einige Reaktivanker abgebildet.

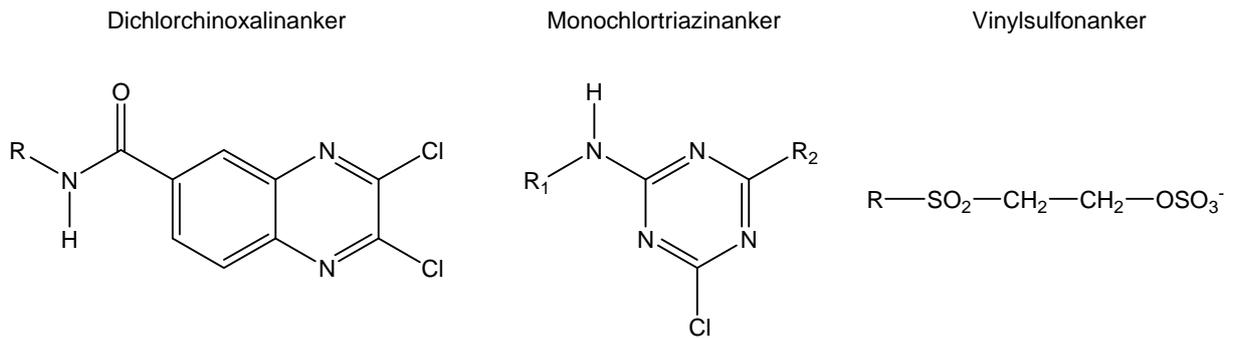


Abbildung 2: Typische Reaktivanker

Die heutzutage hauptsächlich eingesetzten Reaktivankergruppen sind Monochlortriazin, Dichlortriazin, Vinylamid und Vinylsulfon<sup>[19]</sup>. Diese Gruppen gehören zu den im Folgenden beschriebenen Reaktivbindungsarten und setzen alkalische Bedingungen sowie eine erhöhte Temperatur voraus. Je nach Reaktivität der eingesetzten Ankergruppe mit der Textilfaser werden hierbei Heiß- und Kaltfärber unterschieden. Heißfärber besitzen ein geringeres Reaktionsvermögen und müssen durch hohe Temperaturen (70 - 90 °C) und hohe pH-Werte (von 11 bis 12) aktiviert werden. Zu diesen gehören z.B. die Monochlortriazinfarbstoffe. Die Kaltfärber sind hochreaktive Farbstoffe, welche schon bei niedrigeren Temperaturen (30 - 50 °C) und pH-Werten von 10 bis 11 zum Einsatz gelangen. Beispiele hierfür sind die Dichlortriazin- und die Vinylsulfon-Farbstoffe<sup>[20]</sup>. Das Reaktionsprinzip des Reaktivfarbstoffs mit der Faser wird in den folgenden Abschnitten behandelt.<sup>[18,20]</sup>

### 2.1.3 Reaktivbindung durch nukleophile (heteroaromatische) Substitution

Der nukleophile Angriff der Hydroxygruppe der Cellulose an einer Reaktivgruppe wird anhand von Abbildung 3 verdeutlicht. Der Angriff wird durch die Nachbarschaft eines oder mehrerer elektronenziehender Atome zum Kohlenstoffatom mit der *Leavinggroup* erleichtert. Das Halogenatom der Reaktivgruppe wird im Verlauf der Reaktivbindung durch die deprotonierte Hydroxygruppe der Cellulose substituiert. Farbstoffe mit einer wie in Abbildung 3 gezeigten Reaktivgruppe werden fast ausschließlich zur Färbung von Cellulose und nur selten zur Wollfärbung eingesetzt, da bei Wolle unter alkalischen Bedingungen, wie sie in der Reaktivfärbung vorliegen, die Gefahr der Faserschädigung und Vergilbung besteht.

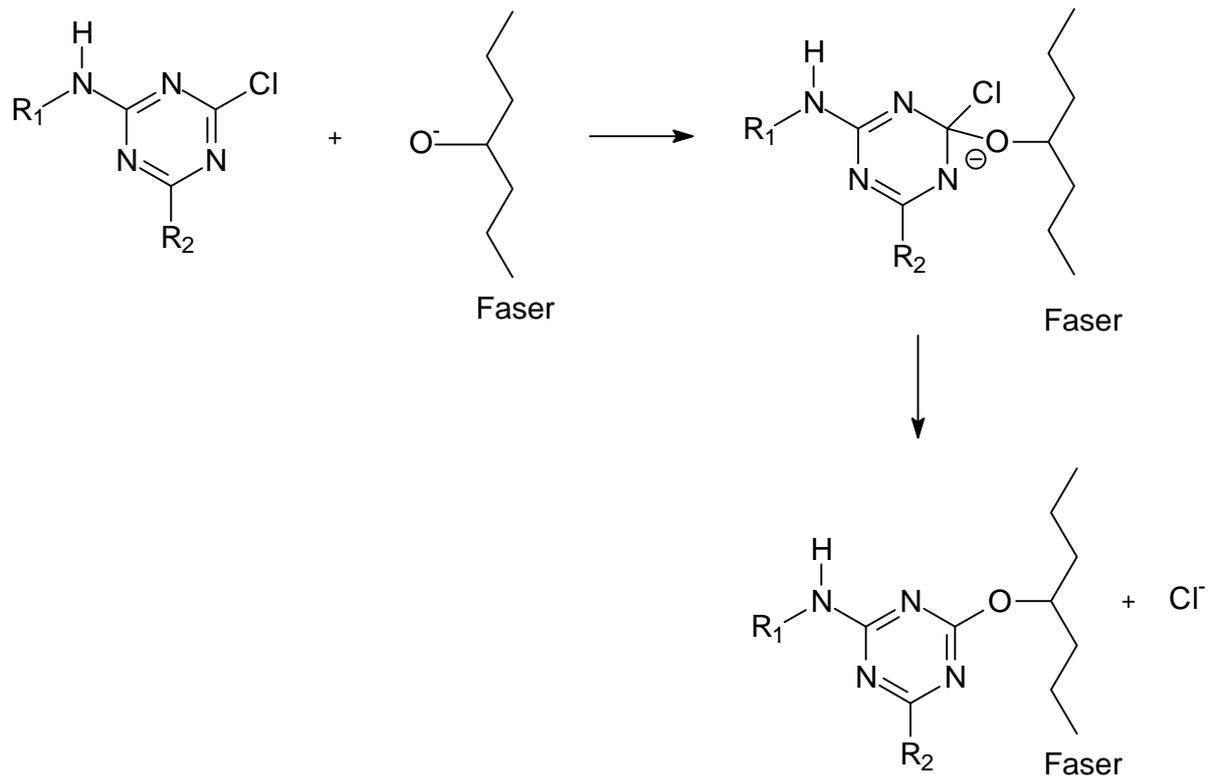


Abbildung 3: Nukleophile Substitution zur Bindung von Reaktivfarbstoffen an Cellulosefasern <sup>[19]</sup>

#### 2.1.4 Reaktivbindung durch nukleophile Addition

Die basenkatalysierte Aktivierung eines Farbstoffmoleküls führt zu einer reaktiven Zwischenstufe (z.B. Vinylsulfon), welche nach dem Prinzip einer Michael-Addition mit der Hydroxygruppe der Faser reagieren kann. In der in Abbildung 4 dargestellten Reaktion wird die Bildung der reaktiven Zwischenstufe durch die elektronenziehende Wirkung der als Brücke dienenden Sulfongruppe erleichtert. Farbstoffe, die nach diesem Mechanismus reagieren, werden ausschließlich zur Cellulosefärbung eingesetzt.

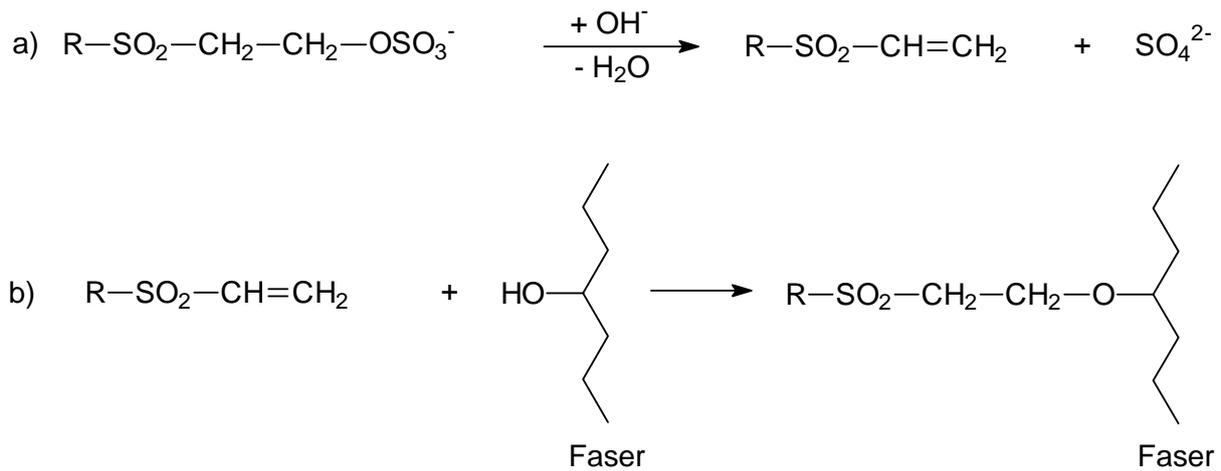


Abbildung 4: Nukleophile Addition zur Bindung von Reaktivfarbstoffen an Cellulosefasern <sup>[19]</sup>

## 2.2 Rechtliche Bestimmungen

Alle Mitgliedstaaten der europäischen Union haben ein gemeinsames Wassergesetz, das als EU-Richtlinie von den Staaten in nationales Recht umzusetzen ist. In der Bundesrepublik Deutschland wird die EU-Richtlinie von der Bundesregierung als Rahmengesetz zum Wasserhaushalt festgeschrieben, da der Gewässerschutz Ländersache ist. Die Bundesländer sind gehalten, in ihren Landeswassergesetzen den rechtlichen Umgang mit der Ressource Wasser entsprechend den Vorgaben durch das Wasserhaushaltsgesetz festzulegen. Die Ländergesetze sind zwar überwiegend einheitlich aufgebaut, unterscheiden sich aber entsprechend den regionalen Erfordernissen. Nachrangige Rechtsverordnungen dienen zur Konkretisierung der in den Gesetzen häufig nur allgemein formulierten Regelungen.

Das Wasserhaushaltsgesetz der BRD bildet die Grundlage der Rahmenabwasserverordnung. Dieser Abwasserverordnung (AbwV) sind momentan 57 branchenspezifische Anhänge zugeordnet, die den Stand der Technik zur Reinhaltung der Gewässer bzw. das Reinigen der Abwässer sowohl für die Direkt- als auch für die Indirekteinleiter vorschreiben. Die je nach Herkunftsbereich eingeteilten Anhänge sind für typische Industriezweige ausgelegt und geben Vorschriften bzw. Grenzwerte zum Vermeiden/Einleiten von Abwasser an.

Der Anhang 38 der Abwasserverordnung wurde erstmalig am 5. September 1984 als Anhang an die damalige Abwasserwaltungsvorschrift (Abwasser VwV) erlassen <sup>[21]</sup> und liegt derzeit in der gültigen Fassung aus dem Jahre 2004 vor <sup>[12,22]</sup>. Er gilt für die Textilherstellung und die Textilveredlung. Der Anhang ist in sechs Abschnitte unterteilt (A-F). In den

allgemeinen Anforderungen wird darauf hingewiesen, dass die Schadstofffracht durch produktions- bzw. prozessintegrierte Maßnahmen so gering wie möglich zu halten ist <sup>[23]</sup>. Bei Restfarbklotzflotten und Restdruckpasten sind die Textilbetriebe dazu verpflichtet, den Anfall soweit wie möglich zu vermeiden und die unvermeidbaren Konzentrate getrennt zu sammeln und zu entsorgen. Eine Wiederverwendung von (gereinigtem) Abwasser soll ausdrücklich angestrebt werden. Ist eine Wiederverwendung der zuvor genannten Konzentrate nicht möglich, muss durch ein Verfahren eine mindestens 95 %-ige Entfärbung erfolgen, bevor eine Einleitung zulässig ist.

Die Anforderungen an die Einleitung von Abwasser (Abschnitt C) geben verschiedene Grenzwerte vor (z.B. CSB, BSB<sub>5</sub>). Für Textilfärbereien stellt hier sicherlich der Grenzwert „Farbigkeit“ das größte Problem dar. Gemessen wird die Färbung als Spektraler Absorptionskoeffizient (SAK [ $\text{m}^{-1}$ ]), der bei drei Wellenlängen in einer qualifizierten Stichprobe oder in einer 2-Stunden-Mischprobe zu bestimmen ist (siehe Tabelle 2) <sup>[14]</sup>.

$\lambda$	Farbe	Grenzwert
436 nm	Gelb	7 $\text{m}^{-1}$
525 nm	Rot	5 $\text{m}^{-1}$
620 nm	Blau	3 $\text{m}^{-1}$

**Tabelle 2: Grenzwerte der Spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK)**

Seit dem 15.07.1994 ist in Deutschland durch eine Änderung der auf dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz basierenden Bedarfsgegenständeverordnung die Anwendung einiger Azofarbstoffe verboten, bei deren reduktiver Spaltung 20 indizierte aromatische Amine insbesondere auf Basis des Benzidins und seiner Homologen entstehen, welche entweder kanzerogen sind <sup>[24-27]</sup> oder im Verdacht stehen, kanzerogen zu sein <sup>[28]</sup>. Dieses Verbot rührt von einer Empfehlung der MAK-Kommission von 1988 her, der sich der Gesetzgeber in der 2. Novelle der Gefahrstoffverordnung und in der TRGS 900 angeschlossen hat <sup>[29-31]</sup>. Die verbotenen Farbstoffe dürfen nicht mehr verarbeitet werden, auch Fertigprodukte, die diese Farbstoffe enthalten, dürfen in Deutschland nicht mehr vertrieben werden.

## 2.3 Chemische Oxidation

Substanzen wie zum Beispiel Ozon oder Peroxidverbindungen sind aufgrund ihres starken Oxidationspotentials in der Lage die Eigenschaften (Farbigkeit) vieler Farbstoffe zu verändern. Hohe Konzentrationen der oxidativen Substanzen führen nicht nur zu einer Entfärbung, sondern häufig auch zu einem Abbau bis zu Wasser, Kohlendioxid und Salzen. Die Oxidationsmittel können direkt oder unter Zugabe von Katalysatoren eingesetzt werden. Ozon und Wasserstoffperoxid bieten den Vorteil, dass sie keine Reststoffe im Abwasser hinterlassen und den Salzgehalt nicht erhöhen. Aufgrund der relativ hohen Kosten der chemischen Oxidation ist eine wirtschaftliche Abwasserbehandlung nur durch bestmögliche Ausnutzung des Oxidationsmittels zu gewährleisten.

Die Oxidationspotentiale der drei chemischen Oxidationsmittel Ozon, Wasserstoffperoxid und Peroxodisulfat sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgeführt <sup>[32]</sup>.

Oxidationsmittel	$E_0$ (sauer)	$E_0$ (basisch)
Ozon	2,07 Volt	1,24 Volt
Wasserstoffperoxid	1,78 Volt	0,88 Volt
Peroxodisulfat	2,18 Volt	2,01 Volt

Tabelle 3: Normalpotentiale verschiedener Oxidationsmittel bei 25 °C

### 2.3.1 Ozon

Anfang der 1970er Jahre erschienen die ersten Arbeiten zur Behandlung von Textilabwasser mittels Ozon in Japan <sup>[33-35]</sup> und den USA <sup>[36,37]</sup>. Auch in Deutschland fanden in den 1970ern Untersuchungen zur Abwasserbehandlung mit Ozon statt <sup>[38]</sup> und alsbald wurde das Verfahren für die Textilabwasserbehandlung vorgeschlagen <sup>[39]</sup>. Sinkende Kosten für dessen Erzeugung liessen Ozon in seiner Wirtschaftlichkeit steigen. Aufgrund der mannigfaltigen und der speziell für die Wasseraufbereitung interessanten sowie relevanten Eigenschaften, wird Ozon eine besondere Bedeutung beigemessen <sup>[40]</sup>. Viele dieser Charakteristika des Ozons sind in der Fachliteratur eingehend beschrieben worden <sup>[41-56]</sup>. Obwohl die Technik des Farbstoffabbaus mit Ozon als etabliert gilt, wird auf diesem Feld immer noch aktiv geforscht <sup>[57-59]</sup>.

Mit seinem Redoxpotential zählt Ozon zu den stärksten Oxidationsmitteln überhaupt<sup>[60]</sup>. Ozon ist grundsätzlich in der Lage nach drei Mechanismen zu reagieren. Bei niedrigen pH-Werten erfolgt überwiegend die direkte Reaktion des molekularen Ozons mit organischen Verbindungen. Ozon greift hierbei aromatische Kohlenwasserstoffe, ungesättigte Kohlenwasserstoffe sowie Stickstoffgruppen an<sup>[61]</sup>. Die meisten Reaktionen des Ozons lassen sich mit einem elektrophilen 1,3-dipolaren Angriff (*Criegee-Mechanismus* bzw. Ozonolyse) auf das Substrat beschreiben<sup>[62]</sup>. Der primäre Schritt bei der Spaltung besteht in der Additionsreaktion des Ozons an Kohlenstoff-Doppelbindungen (Abbildung 5).

Schon im Jahre 1935 hat *Weiss* den bei hohem pH-Wert durch Hydroxidionen induzierten Zerfall von Ozon beschrieben<sup>[63]</sup>. Die Oxidation organischer Substanzen erfolgt hierbei durch gebildete OH-Radikale, die ein noch stärkeres Oxidationspotential als Ozon besitzen.

Die direkte Reaktion von Ozon mit größeren aromatischen Systemen führt nur selten zu einheitlichen Zwischenprodukten<sup>[64]</sup>, im Fall des Abbaus mit Hydroxylradikalen ist dies noch seltener der Fall. OH-Radikale reagieren bevorzugt mit organischen Substanzen an der Stelle der höchsten Elektronendichte, ein selektives Reaktionsverhalten ist allerdings wegen der extrem hohen Reaktivität der Hydroxylradikale nicht zu erwarten<sup>[65]</sup>. Tiefgehende Untersuchungen der Reaktivität von OH-Radikalen mit aromatischen Verbindungen in Wasser führten *Buxton et al.* durch<sup>[66]</sup>.

Die Anwendung von Ozon bietet sich besonders zur Zerstörung von Reaktivfarbstoffen an, die durch andere Verfahren nicht oder nicht genügend aus dem Abwasser eliminiert werden<sup>[67]</sup>. Die Ozonbehandlung von Färbereiabwasser bewirkt nicht nur eine Entfärbung, sondern bei genügend hoher Dosierung auch einen Aufschluss und Abbau von halogenorganischen Verbindungen. Allerdings können bei allen Oxidationsverfahren in Gegenwart von Chlorid halogenorganische Verbindungen neu entstehen. Die Zerstörung oder Neubildung von halogenorganischen Stoffen bei der Ozonbehandlung ist von verschiedenen Faktoren abhängig, u.a. vom Chloridgehalt, von der Ozon-Dosierung und vom pH-Wert<sup>[68,69]</sup>. Die Anwesenheit von weiteren organischen Verbindungen erfordert einen erhöhten Verbrauch an Ozon. Die Entfärbewirkung ist dann besonders effektiv, wenn neben den Farbstoffen wenig andere leicht oxidierbare organische Stoffe (Hilfsmittel) enthalten sind<sup>[70,71]</sup>.

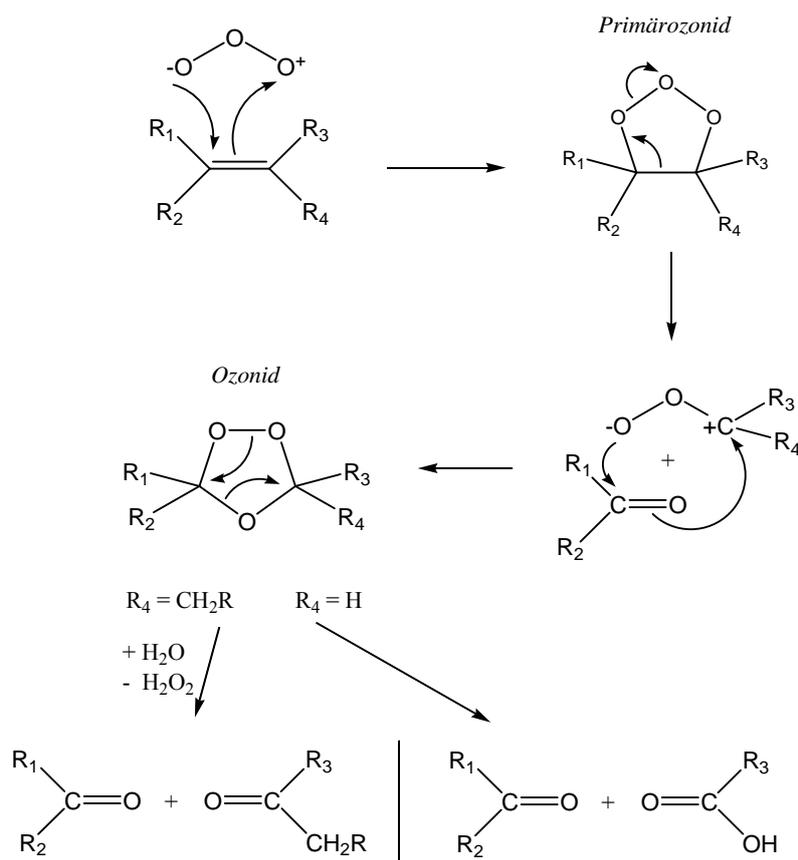


Abbildung 5: Criegee-Mechanismus der Ozonolyse

Als Produkte der Ozonierung aromatischer Verbindungen können organische Säuren wie Oxalsäure, Ameisensäure oder auch Essigsäure nachgewiesen werden <sup>[72]</sup>. Für ein synthetisches Abwasser mit dem Azofarbstoff Orange II wurden von *Liakou* et al. Oxalat, Formiat und Benzolsulfonat mittels Ionenchromatographie gefunden <sup>[56]</sup>. Untersuchungen im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts OXITEX erweiterten das Spektrum stark polarer Abbauprodukte um Substanzen wie Malonat, Acetat, Succinat oder auch Tartrat <sup>[73]</sup>. *Mascolo* et al. untersuchten den Ozon-Abbau des Anthrachinonfarbstoffs Uniblu-A anhand der im Wasser auftretenden Abbauprodukte mittels LC-MS. In einem frühen Stadium der Oxidation ließ sich eine Hydroxylierung des Anthrachinongerüsts nachweisen, längerfristige Oxidation führte zu einem Bruch des aromatischen Systems und letztendlich zur Bildung von niedermolekularen Verbindungen wie Aldehyden, Carbonsäuren, sowie den anorganischen Verbindungen Nitrat und Sulfat <sup>[74]</sup>. Die Reaktion von Ozon mit Azofarbstoffen wurde im Jahr 1993 von *Matsui* et al. beschrieben <sup>[75]</sup>. Es wurde festgestellt, dass die Reaktivität der Azogruppe im Vergleich zu einer olefinischen Doppelbindung sehr klein ist. Aromatische Ringe werden nach *Matsui* durch Ozon eher zerstört als eine Azogruppe. Im genauen Gegensatz hierzu stehen aktuelle Forschungsarbeiten, die mittels Flüssigchromatographie und

gekoppelter hochauflösender Massenspektrometrie gezeigt haben, dass aromatische Ringe sich relativ stabil verhalten, die Azobrücke allerdings unter Ausbildung von Phenolen leicht gespalten wird<sup>[73,76]</sup>.

Als limitierender Faktor bei der Ozonisierung von reaktivfarbstoffhaltigen Farbbädern der Textilveredlungsindustrie kommt die Phasengrenzfläche gas / flüssig in Betracht. Die Verwendung von Füllkörpern oder Fritten, die das Gas besser in die Reaktionslösung einperlen lassen, steigert die Ausnutzung des Ozons<sup>[77]</sup>.

Für ein reaktivfarbstoffhaltiges Mischabwasser haben *Ruppert* und *Bauer* verschiedene Oxidationsverfahren untersucht. UV-Bestrahlung zusätzlich zur Anwendung von Ozon bewirkt aufgrund der nur geringen Eindringtiefe der Strahlung keine verbesserte Entfärbung und somit auch keinen verbesserten Abbau<sup>[78]</sup>.

Aktuelle Arbeiten kombinieren die chemische Oxidation mit Ozon und die gleichzeitige Behandlung mit Ultraschall. So haben *Lall* et al. bei der Untersuchung des Reaktivfarbstoffs Reactive Blue 19 einen signifikanten Anstieg der Reaktionsrate beobachtet, wenn gleichzeitig Ultraschall verwendet wird<sup>[79]</sup>.

### 2.3.2 Wasserstoffperoxid

Die alleinige Oxidation mit Wasserstoffperoxid ist aufgrund der geringen Reaktivität nicht effektiv<sup>[60]</sup>. Das Normalpotential liegt weit unter denjenigen von Ozon bzw. Peroxodisulfat. Untersuchungen von *Minke* und *Rott* an einer Reaktivfärberestflotte (Farbzahl = 515 m<sup>-1</sup>) ergaben einen Bedarf von 13 L 50 %iger Wasserstoffperoxidlösung/m<sup>3</sup> für eine vollständige Entfärbung ohne gleichzeitig einen nennenswerten DOC-Abbau zu erzielen<sup>[80]</sup>. Die hierfür erforderlichen Reaktionsbedingungen wie ein pH-Wert zwischen 5 und 6 sowie eine Temperatur von 80 °C treffen nur auf wenige Abwasserteilströme aus der Produktion zu. Einige Untersuchungen an textilem Sammelwasser (Farbzahl = 80 m<sup>-1</sup>) ergaben einen Bedarf von 6 L der 50 %igen Wasserstoffperoxidlösung/m<sup>3</sup> zur Erzielung einer 50 %igen Abnahme der Farbigeit. Daraus folgt, dass das Verfahren in der Praxis unwirtschaftlich und nicht praktikabel ist.

Die Kombination von Wasserstoffperoxid und UV-Strahlung ermöglicht zwar, farbige Abwässer der textilveredelnden Industrie effektiv zu reinigen, bietet jedoch keine wirtschaftlichen Vorteile gegenüber der alleinigen Behandlung mit Ozon<sup>[81,82]</sup>. Zudem besteht das

Risiko einer Belagbildung auf den Strahleroberflächen, woraus erhöhte Betriebsaufwendungen resultieren können <sup>[70,83]</sup>.

Die technische Weiterentwicklung eines kostengünstigen Oxidationsprozesses führte vor einigen Jahren zu dem inzwischen geschützten ORCAN<sup>®</sup>-Verfahren <sup>[91,92]</sup>. Dieses Verfahren ist in der Lage, durch Einsatz von Luftsauerstoff und Wasserstoffperoxid eine bis zu 90 %ige CSB-Reduktion zu erzielen. Die zur Reaktion notwendigen und für das ORCAN<sup>®</sup>-Verfahren typischen Bedingungen belaufen sich auf Temperaturen von 120 °C und einem Reaktordruck von etwa 4 bar. Der Prozess stützt sich auf eine aggressive Radikalchemie und einen hocheffizienten Stoffaustausch an den Gas / Flüssigkeits-Phasengrenzen <sup>[93]</sup>. Die entstehenden Peroxi- und Hydroxylradikale bedingen durch ihre hohe Oxidationskraft und gleichzeitig geringe Selektivität eine hohe Universalität des ORCAN<sup>®</sup>-Verfahrens <sup>[94]</sup>. Diese ist notwendig, um gleichermaßen Abwasserbelastungsstoffe mit aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Strukturen zu oxidieren.

Aufgrund der Nachhaltigkeit und der Vorteilsvielfalt (Funktionalität und Universalität) der ORCAN<sup>®</sup>-Technik wird dieses Verfahren von der Europäischen Kommission im „Best Available Techniques Reference Document for the Textiles Industry“ als beste verfügbare Technik definiert und für die gezielte Vorbehandlung von biologisch nicht oder schlecht abbaubaren Abwasserteilströmen empfohlen <sup>[95]</sup>.

### 2.3.3 Peroxodisulfat

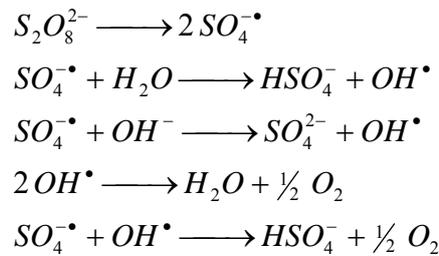
Während die Anwendung von Ozon und Wasserstoffperoxid im Bereich der Textilabwasserentfärbung gut untersucht ist <sup>[71,84,87,96,97]</sup>, liegen nur wenige Erkenntnisse zur Anwendung von Peroxodisulfat (PDS) vor <sup>[98-102]</sup>.

Dabei handelt es sich um ein innovatives Verfahren zur Entfärbung, vorzugsweise bei Temperaturen höher als 80 °C, bei dem keine Rückstände entstehen. Es kommt lediglich zu einer pH-Wert-Absenkung und Aufsalzung <sup>[98]</sup>. Der Vorteil dieses Verfahrens ist in einer Entfärbung unmittelbar am Färbeapparat unter Nutzung der noch heißen Behandlungsbäder zu sehen.

Zur Untersuchung der Wasserbeschaffenheit werden Abwässer oxidativ mit Peroxodisulfat aufgeschlossen <sup>[103]</sup>. Das Verfahren dient der Bestimmung des Stickstoffgehalts in Form von freiem Ammoniak, Ammonium, Nitrat, Nitrit und organischen Stickstoffverbindungen in Wässern. Der Anhang 38 schreibt einen Stickstoffhöchstgehalt von maximal 20 mg L<sup>-1</sup> vor

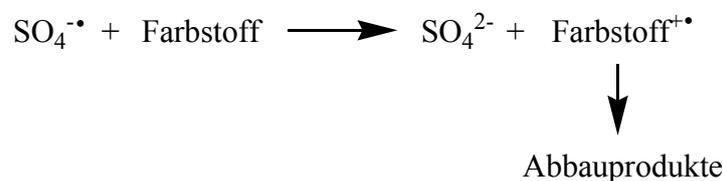
[22]. In der textilverarbeitenden Industrie kommt Peroxodisulfat bei der Gewebebleiche zum Einsatz. Bei der Kaltverweilbleiche lassen sich bei Verwendung dieser Chemikalie mittlere Weißgrade erreichen [104].

Peroxodisulfat ist ein starkes Oxidationsmittel [105]. Die hohe Wirksamkeit von PDS erklärt sich aus der Bildung von Radikalen, welche wie folgt beschrieben wird [99]:

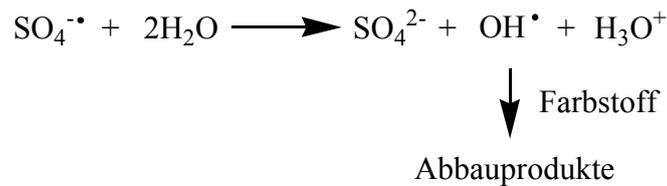


Die Existenz der Sulfatanion-Radikale in wässriger Lösung ist für den pH-Bereich von 1,5 – 10 ESR-spektroskopisch nachgewiesen worden. Allerdings verringert sich die Konzentration dieser Radikale ab einem pH-Wert größer als 8,5, gleichzeitig erfolgt jedoch die vermehrte Bildung von Hydroxylradikalen. Im Widerspruch hierzu beschreiben *Salem et al.* die Oxidation von Coumarin-1, einem Laserfarbstoff, mit PDS nach einem nicht-radikalischen Mechanismus [106]. Hierbei sollen der Farbstoff als Nukleophil und das Peroxodisulfat als Elektrophil wirken.

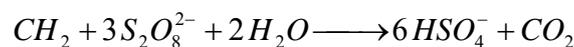
In Abhängigkeit vom pH-Wert vermag das Sulfatanion-Radikal auf zwei Wegen weiter zu reagieren. Bei einem pH kleiner als 8,5 reagiert das Sulfatradikalanion direkt mit dem Farbstoff unter Bildung von Sulfat und einem Farbstoffradikalkation. Dieses Radikal reagiert weiter zu Abbauprodukten.



Bei einem pH-Wert größer gleich 8,5 reagiert das Sulfatradikalanion mit Wasser und bildet neben Sulfat und  $H_3O^+$  auch  $OH^{\bullet}$ -Radikale, die als reaktive Spezies im nächsten Schritt mit dem Farbstoff reagieren und Abbauprodukte liefern.



Der alkalische pH-Wert der Färbebäder von etwa 11 beim Behandlungsstart mit Peroxodisulfat und die Beendigung der Oxidationsreaktion im schwach sauren Milieu bei ca. pH 6 wirken sich offensichtlich positiv auf die Entfärbung aus<sup>[98]</sup>. Modellhaft wird an einer CH<sub>2</sub>-Gruppe der Verbrauch von Peroxodisulfat dargelegt:



Zur Totaloxidation von einem Mol CH<sub>2</sub> werden demnach drei Mole PDS benötigt. In der Literatur wird jedoch darauf hingewiesen, dass Entfärbung sowie BSB<sub>5</sub>- und CSB-Abnahme unterschiedlich bezüglich Intensität, Zeit und Oxidationsmittelaufwand ablaufen<sup>[107]</sup>. So hat *Lange* bei der Untersuchung von Reaktivfarbstoffhydrolysaten festgestellt, dass man in der Regel mit deutlich weniger als 50 % der berechneten Peroxodisulfatmenge zu einem Entfärbeergebnis gelangt, welches den Anforderungen des Anhangs 38 entspricht<sup>[98,108]</sup>.

*McCallum* et al. haben bei ihren Studien am Farbstoff C.I. Reactive Blue 19 ein gutes Entfärbungsverhalten mittels PDS feststellen können<sup>[109]</sup>. Sie postulieren einen radikalischen Abbaumechanismus, der durch einige identifizierte Produkte gestützt wird. *Krishna Prasad* et al. untersuchten die Kinetik der silberionenkatalysierten Oxidation von Phenosafranin mit Peroxodisulfat. Sie fanden heraus, dass die Reaktionen nach einer ersten Ordnung bezüglich der Peroxodisulfat- und Silberionen-Konzentration verläuft<sup>[110]</sup>. Seit einiger Zeit setzt die Firma EUT (Eilenburger Elektrolyse- und Umwelttechnik GmbH) unter der Leitung von *Förster* auf die katalytische *in-situ* Generierung des Oxidationsmittels Peroxodisulfat aus im Abwasser vorhandenem Sulfat. Sobald eine katalytische Umsetzung gelingt, könnte die Persulfat-Oxidation in Konkurrenz mit dem Ozon-Verfahren stehen, da die Kosten drastisch sinken würden<sup>[111]</sup>.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden unterschiedliche Reaktivfarbstoffe bereits mit Peroxodisulfat oxidativ behandelt und deren Abbau mittels HPLC untersucht. Die Diplomarbeit lieferte die ersten Erkenntnisse, auf denen der chemische Oxidationsteil der vorliegenden Arbeit beruht<sup>[112]</sup>.

### 2.3.4 Fällung / Flockung

Über Jahre war die Technik der Fällung / Flockung die einzige ökonomisch sinnvolle Methode der Reinigung farbiger Abwässer<sup>[113,114]</sup>. Bei diesem unspezifischen Reinigungsverfahren werden durch Zugabe von Fällungs- bzw. Flockungsmitteln unter anderem die Farbstoffe in einen ungelösten und damit mechanisch aus dem Abwasser abscheidbaren Zustand überführt<sup>[115]</sup>. Im Verlauf der Flockung erfolgt in einem ersten Schritt durch Neutralisation der Lewis-Säure Eisen- oder Aluminiumsulfat die Bildung positiv geladener Kolloide (Mikroflocken). Die Koagulation, d.h. die Aufhebung der elektrischen Ladung dieser Kolloide wird dann durch Zusatz entgegengesetzt geladener Ionen, z.B. der Farbstoffanionen bewirkt. Im nächsten Schritt erfolgt dann eine Agglomeration der entstabilisierten Kolloide durch polymere, anionische Flockungshilfsmittel (Polyelektrolyte) und Bildung von Makroflocken.

Die Ausfällung der Hydroxide der Metallsalze im neutralen pH-Milieu wurde schon vor mehr als 100 Jahren in England zur Reinigung von Abwässern der Textilindustrie eingesetzt, häufig gefolgt von einer Schlackefiltration<sup>[116]</sup>. Das Verfahren wurde bald darauf auch in Deutschland und in anderen Ländern eingesetzt<sup>[117,118]</sup>.

Auch heute hat diese Methode noch Vorteile und wird immer noch verwendet, sowohl als eigenständiges Verfahren oder in Kombination mit anderen Entfärbungsmethoden<sup>[119]</sup>. *Lin* und *Liu* verwenden einen kontinuierlichen Prozess, kombiniert aus Ozonung und chemischer Koagulation zur Behandlung von textilen Abwässern der Färberei<sup>[120]</sup>. Dieses kombinierte Verfahren hat sich als sehr wirksam herausgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die komplette Entfärbung des Abwassers durch die Ozonung erreicht wird, während die Fällung / Flockung für die Entfernung von gelösten organischen Substanzen und der festen Bestandteile verantwortlich ist.

Aufgrund der großen Anzahl vermarkteter Farbstoffe und den somit resultierenden chemischen Strukturen und Molekülgrößen, ist es sehr schwer, eine einheitliche Methode der Fällung / Flockung zu verwenden. Unterschiedliche Methoden für die Behandlung von reaktivfarbstoffhaltigen Abwässern wurden vorgeschlagen. Es werden kationische Fällungsmittel auf Polymerbasis<sup>[121,122]</sup>, Mischungen aus Wasserstoffperoxid mit Eisen-(II)-sulfat<sup>[87]</sup>, oder die reduktive Vorbehandlung mit Natriumdithionit und anschließender Adsorption an Aktivkohle verwendet<sup>[123]</sup>. Ein Fällungs- / Flockungs-Prozess für die Behandlung farbiger Abwässer anderer Industriezweige (Zellstoffbleiche oder Gerberei) ist in der Literatur beschrieben<sup>[124-126]</sup>. *Vrale* und *Jorden*<sup>[127]</sup>, *Hudson*<sup>[128]</sup>, *Letterman et al.*<sup>[129]</sup>, *Bratby*<sup>[130]</sup> und *Mhaisalkar*<sup>[131]</sup> betonen die Bedeutung des schnellen Rührens während des Fällungs- und Flockungs-Prozesses.

In dem Verfahren der Fällung / Flockung entstehen große Rückstandsmengen, die entsorgt werden müssen. Hierin liegt der größte Nachteil des Verfahrens. Nach den Bestimmungen der Textilarbeitsgruppe Abfall in Verbindung mit der Abfallbestimmungsverordnung müssen diese Rückstände einer Sonderabfallverbrennungsanlage oder einer Sonderabfalldeponie zugeführt werden. Nur in Ausnahmen konnten Fällschlämme noch bis Ende 1997 auf Hausmülldeponien entsorgt werden <sup>[132]</sup>. Durch die seit diesem Zeitpunkt vorgeschriebene Entsorgung als Sonderabfall ist die von ihrem Aufwand her vergleichsweise kostengünstige Methode ökonomisch fragwürdig.

## **2.4 Biologische Methoden**

Industrielle Abwässer, die mit Farbstoffen belastet sind, werden häufig einer biologischen Behandlung unterzogen. Hierzu werden sowohl aerobe als auch anaerobe Techniken verwendet, abhängig von der Art des Abwassers. Aerobe Prozesse eignen sich für Abwässer mit einem chemischen Sauerstoffbedarf kleiner als  $3.000 \text{ mg L}^{-1}$  oder einem biologischen Sauerstoffbedarf kleiner als  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$ . Anaerobe Techniken eignen sich eher für hochbelastete Abwässer. In vielen Fällen wird eine anaerobe Vorbehandlung der hochbelasteten Abwässer durchgeführt, an die sich häufig ein aerober Abbau anschließt.

### **2.4.1 Aerober biologischer Abbau**

Aerob-biologische Reinigungsverfahren bilden schon seit langem die Hauptstufe einer kommunalen Kläranlage sowie der meisten Kläranlagen von Direkteinleitern. Aerob-biologische Verfahren sind optimal geeignet für große Mengen relativ gering belasteten Abwassers, zum Beispiel eines großen Textilveredlungsbetriebes. Bei einem aeroben Verfahren wird durch aerobe Mikroorganismen eine oxidative Spaltung und adsorptive Eliminierung der Abwasserfracht erzielt. Es liegen stoffzerstörende und stofftrennende Verfahren nebeneinander vor. Einer der Hauptnachteile einer mechanisch / aerobiologischen Kläranlage ist, dass die meisten löslichen Farbstoffe (besonders die Reaktivfarbstoffe) aerob nicht entfernt werden können <sup>[133]</sup>.

Nur unter besonderen Bedingungen und in Einzelfällen ist die aerobe Entfärbung und Mineralisierung von Azofarbstoffen möglich<sup>[134-136]</sup>. So konnte für C.I. Acid Orange 7 und p-Aminoazobenzol eindeutig ein aerober Abbau durch Bakterien nachgewiesen werden. Es handelt sich allerdings um Abbauvorgänge, die eine hohe Substratspezifität aufweisen. Bei diesen Textilfarbstoffen handelt es sich jedoch um technisch unbedeutende Produkte<sup>[137,138]</sup>.

Die aerobe Behandlung des Azofarbstoffs C.I. Reactive Black 5 an Belebtschlammflocken zeigt eine unspezifische Entfärbung, die sowohl oxidativ als auch reduktiv verläuft<sup>[139,140]</sup>. Grund hierfür dürfte eine mangelnde Versorgung der Flocken mit Sauerstoff sein. Es kommt zu anaeroben Zonen innerhalb der Flocken oder der immobilisierten Biomasse und somit zu einer anaeroben Spaltung und Entfärbung des Azofarbstoffs. Bei schwacher Belastung eines Belebtschlammes fällt die Sauerstoffkonzentration in einer Flocke innerhalb von 300 µm auf Null ab, bei hoch belasteten Belebtschlämmen bereits nach 74 µm. Belebtschlammflocken weisen einen Durchmesser von 20 bis 1.000 µm auf. Der Anteil, der anaerobe Verhältnisse in der Flocke aufweist, kann somit erheblich sein. Sogar Methanbakterien können in dieser Umgebung überleben<sup>[141,142]</sup>. Die aerobe Farbstoffspaltung in hoch belasteten Belebtschlämmen konnte durch *Schulze-Rettmer* et al. und *Blümel* gezeigt werden<sup>[143,144]</sup>.

## 2.4.2 Anaerober biologischer Abbau

Bei anaeroben Verfahren wird das Abwasser in Reaktoren unter strengem Luftabschluss mit anaeroben Mikroorganismen behandelt. Hierbei werden zwei Stufen mit den ihnen eigenen Bakterienstämmen hintereinander geschaltet. Die optimalen Bedingungen für diese Stufen müssen konstant gehalten werden:

- Hydrolyse und Versäuerungsstufe (pH-Optimum 3,5-5,5 ; Temperatur 30-36 °C)
- Acetogene und methanogene Stufe (pH-Optimum 6,5-7,5 ; Temperatur 35-38 °C)

Durch diese Prozesse erfolgt neben der Adsorption an Klärschlamm nur ein Teilabbau der organischen Fracht. Ein Vorteil besteht darin, dass Bindungen unter anaeroben Bedingungen gespalten werden können, die unter aeroben Verhältnissen intakt bleiben. Das Nachschalten einer aeroben biologischen Stufe ist meistens sinnvoll.

Durch anaerobe Prozesse gelingt neben der Adsorption von unlöslichen Farbstoffen auch die Entfärbung von Azofarbstoffen und manchen basischen Farbstoffen. Phthalocyanin-farbstoffe werden nicht oder kaum zerstört. Weitere Vorteile der anaerob biologischen Abbauprozesse sind deren hohe Umsatzleistung, die verhältnismäßig geringe Menge anfallenden Klärschlammes, sowie die Nutzung des entstehenden Methans im Sinne einer positiven Energiebilanz. Ein Nachteil ist die hohe Empfindlichkeit der anaeroben Biozönose gegenüber Milieuschwankungen und –giften, sowie verhältnismäßig hohe Investitions- und Betriebskosten [133].

Bereits zu Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Forschungsergebnisse über die reduktive Spaltung und Entfärbung von Azofarbstoffen unter anaeroben Bedingungen veröffentlicht [145]. Diese Arbeiten beschäftigten sich ausschließlich mit der Verstoffwechslung und dem Verbleib von Lebensmittelfarbstoffen im menschlichen und tierischen Organismus. Ab Mitte der 1970er Jahre untersuchten Wissenschaftler den Abbau von Azofarbstoffen durch Mikroorganismen in Abwasserbehandlungsanlagen und entwickelten darauf aufbauend Konzepte zur Anwendung in der textilveredelnden Industrie [146-151]. Bei Studien zur anaeroben Farbstoffspaltung standen Azofarbstoffe aufgrund ihrer weiten Verbreitung im Vordergrund, obwohl eine reduktive biologische Entfärbung auch bei vielen Anthrachinon-, Schwefel- und Triphenylmethanfarbstoffen möglich ist [152]. Mittlerweile wurde in einer Vielzahl von Abhandlungen für viele Azofarbstoffe und Bakterienstämme die Möglichkeit einer anaeroben Spaltung aufgezeigt [153-155]. Für wasserunlösliche und damit kaum bioverfügbare Azopigmente konnte hingegen keine Spaltung nachgewiesen werden [156].

## **2.5 Einsatz von Enzymen beim Farbstoffabbau**

Azofarbmittel stellen die mengenmäßig wichtigste Gruppe von Farbstoffen dar. Sie sind in allen Farbtönen und für die meisten Anwendungsgebiete erhältlich [157]. Kennzeichnend für diese Farbstoffe ist die Azogruppe; strukturelle Unterschiede führen gegenüber einem mikrobiologischen Angriff zu einem nicht einheitlichen Verhalten [158]. Der biologisch-chemische Abbau, der durch Enzyme katalysiert wird, stellt eine ökologisch gut verträgliche Alternative zum chemisch oxidativen Verfahren dar. Bedingt durch die niedrigere Prozesstemperatur sind geringere Mengen an Energie nötig. Der enzymatische Prozess der Farbstoffentfärbung verlangt jedoch für den Abbau zu niedermolekularen Stoffen bzw. für eine Mineralisierung die Einhaltung in engen Grenzen festgelegter Prozessbedingungen. Weit ver-

breitet ist der biologische Abbau organischer Stoffe durch Enzyme von Bakterien und Pilzen, wie er in biologischen Abwasserreinigungsanlagen erfolgt. Da hierbei keine gezielte Farbstoffbehandlung erfolgt, kann auch keine genaue Aussage zu den Abbauprodukten gemacht werden. Es werden daher nur die Entfärbung des Abwassers und andere Summenparameter zur Beobachtung der biologischen Leistung herangezogen. Der biologische Abbau wird unterschieden in aerobe, unter überwiegend oxidativen Bedingungen stattfindende Verfahren und in anaerobe Verfahren, bei denen reduktive Bedingungen überwiegen<sup>[159]</sup>. Reaktivfarbstoffe, besonders die Gruppe der gut wasserlöslichen Azofarbstoffe widerstehen dem aeroben bakteriellen Abbau, wie er in kommunalen Kläranlagen vorherrscht. Der enzymatische Abbau unter Verwendung aerober Kulturen von lignolytischen Pilzen findet in neuerer Zeit ein besonderes Interesse<sup>[160]</sup>. Diese Pilze stellen drei wichtige Arten an Enzymen her, die als Lignin-Peroxidasen, Mangan-Peroxidasen und Laccasen bezeichnet werden. Der Pilz benötigt sie für den Abbau von Lignin<sup>[161,162]</sup>.

Peroxidasen sind Enzyme, die die Oxidation einer Vielzahl von aromatischen Strukturen unter Verwendung von Wasserstoffperoxid katalysieren<sup>[163]</sup>. Peroxidasen kommen überall in der Zelle und in unterschiedlichen Protein-Isoformen vor. Sie können mit *recalcitranten* Schadstoffen reagieren, indem sie diese entweder ausfällen oder in andere Produkte umwandeln<sup>[164]</sup>. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Anwendung dieser Enzyme zur Behandlung von Abwasser mit phenolischen Komponenten. Die Fähigkeit von Meerrettich-Peroxidasen (HRP), ligninhaltigen Zellstoffbrei und Abwässer aus der Papierindustrie zu entfärben, wurde in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben<sup>[165-167]</sup>. Ähnliches gilt auch für Laccasen<sup>[168-171]</sup>. Weiterhin wurde die Entfärbungsleistung der Peroxidasen in Textilabwässern analysiert<sup>[172]</sup>. HRPs sind in der Lage, sulfonierte und nicht-sulfonierte Azofarbstoffe wie Remazol Brilliant Blau R abzubauen<sup>[173,174]</sup>. So wurde bei der Behandlung von Kristall Violett, einem basischen Triarylmethanfarbstoff, mit einer käuflichen Meerrettich-Peroxidase Typ II ein hoher Entfärbungsgrad erreicht<sup>[175]</sup>.

Das Verhältnis zwischen biologischer Abbaubarkeit und molekularer Struktur der Farbstoffe hängt von der Art, der Anzahl und der Position der funktionellen Gruppen am aromatischen System ab. Ferner spielt das Molekulargewicht des Farbstoffs eine Rolle<sup>[176]</sup>. Im Fall der sulfonierten Azofarbstoffe bestimmen Position und Anzahl der SO<sub>3</sub>H-Gruppen die Abbaurate des Farbstoffmoleküls. Die Entfärbungsrate der Azofarbstoffe hängt von ihrem Oxidationspotential ab. Eine Verringerung des Oxidationspotentials eines Azofarbstoffs bedingt einen Anstieg in der Entfärbungsrate<sup>[177]</sup>.

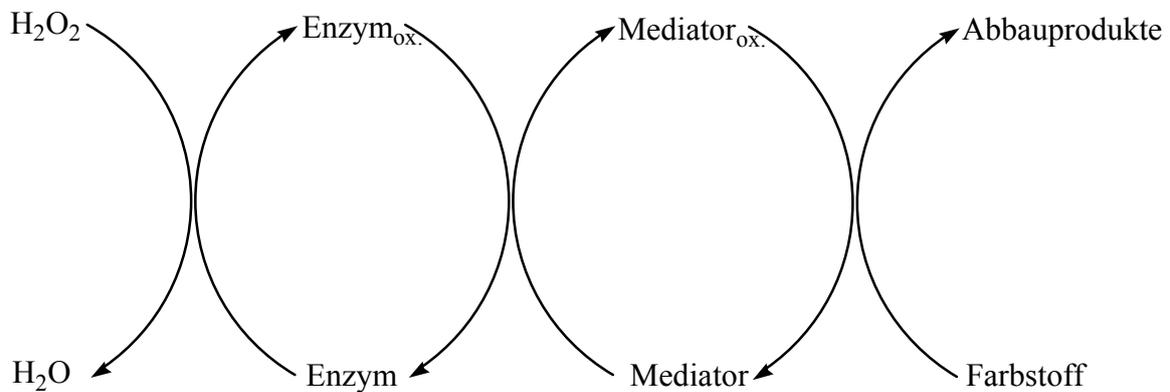
Ein erheblicher Nachteil beim direkten Einsatz von Enzymen ist der Faktor Zeit. Die biologische Entfärbung textiler Abwässer verläuft sehr langsam und kann in einigen Fällen Tage benötigen. Unterschiedliche molekulare Strukturen, bestimmte chromophore Gruppen, die Wasserlöslichkeit und andere Eigenschaften erschweren bzw. verhindern die direkte Bindung des Farbstoffmoleküls an das Enzym. Ein weiterer Nachteil ist das Anfallen von Schlamm bei der Generierung von Biomasse <sup>[178]</sup>.

Durch den Einsatz eines so genannten Mediators wird die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus wesentlich erhöht oder erst möglich. Mediatoren sind meistens kleine, reaktive Moleküle, durch die die Substratspezifität herabgesetzt wird. Die Einsatzbreite des Enzyms wird damit deutlich erhöht. Erste Durchbrüche beim Einsatz von Mediatoren erreichten *Bourbonnais* und *Paice* bei der Zugabe von ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)] zu Laccase <sup>[179]</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass der enzymatische Ligninabbau bei Zellstoff wesentlich effektiver erfolgt, wenn gleichzeitig ein Mediator eingesetzt wird. Repräsentative Untersuchungen wurden für den enzymatischen Ligninabbau mit Laccase allein und in Verbindung mit dem Mediator ATBS durchgeführt. Der Abbau erfolgt bei Einsatz des Mediators etwa um den Faktor sieben effektiver <sup>[180]</sup>. Die Entdeckung der Wirksamkeit eines vermittelnden Moleküls ließ die Untersuchung des Mechanismus für Laccase und ATBS aufleben <sup>[181]</sup>. Die genaue Rolle des ATBS bei der Entlignifizierung wurde jedoch kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen <sup>[182,183]</sup> schlugen vor, dass das System ATBS / Laccase keine Radikalkationen bildet, *Bourbonnais* hingegen schlug die Bildung eines Dikations des ATBS als aktives Reagenz bei der Entlignifizierung vor <sup>[184]</sup>. *Call* hat im Jahr 1995 den erfolgreichen Einsatz des N-Hydroxybenzotriazols, eines weiteren Mediators, beschrieben <sup>[185]</sup>. Im Vergleich zur Entlignifizierung mit reiner Laccase arbeitet das System Laccase / N-Hydroxybenzotriazol etwa zehnmal effektiver. Die Verwendung dieses neuen Vermittlers ist von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht worden <sup>[186-189]</sup>.

Neben den bereits erwähnten Mediatoren werden in der Literatur auch Systeme mit Methylsyringat, Violursäure, Phenothiazin-propionsäure und N-Hydroxyacetanilid beschrieben <sup>[190]</sup>. Dadurch können der Umfang an Substraten und die Geschwindigkeit der Reaktion erhöht werden. Der Reaktionsverlauf lässt sich wie folgt beschreiben: Das Enzym kann aufgrund seiner Molekülgröße das Substrat nur schlecht erreichen. Diese Aufgabe übernimmt ein Mediator, der nach Anlagerung an das Enzym oxidiert wird. Danach verlässt das Mediator-Molekül das Enzym und ist nun seinerseits in der Lage, ein Substrat zu oxidieren, wobei es selbst wieder reduziert wird. Im Idealfall wird der reduzierte Mediator von dem aktivierten Enzym wieder in die oxidierte Form überführt, so dass katalytische Mengen

ausreichen. In der Realität werden allerdings Konkurrenzreaktionen beobachtet, die zu einem Verbrauch des Vermittlers und damit zu einer Entfernung aus dem katalytischen Prozess führen. Weiterhin kann es auch zu einer Enzymdeaktivierung durch den aktivierten Mediator kommen. Beide Vorgänge beeinträchtigen den katalytischen Prozess und erfordern höhere Einsatzmengen der notwendigen Verbindungen, um eine effiziente Entfärbung zu erreichen.

Unter der allgemeinen und vereinfachten Annahme eines komplett katalytischen Reaktionsablaufs kann der Mechanismus wie folgt erklärt werden: Ein oxidierendes Agens (z.B. Wasserstoffperoxid) bringt das Enzym in die oxidierte Form. Dieses reagiert mit dem Mediator in einer Redox-Reaktion. Das oxidierte Mediator-Molekül kann seinerseits in einer Redox-Reaktion mit dem eigentlichen Substrat reagieren. Die nachstehende Abbildung 6 zeigt die schematisierte Oxidation bzw. den Abbau eines Farbstoffmoleküls als Substrat <sup>[191]</sup>.



**Abbildung 6: Schematischer Verlauf des Abbaus von Farbstoffen mit einem Enzym / Mediator-System**

Der enzymatisch katalysierte, oxidative Farbstoffabbau, wie er mit dem Baylase<sup>®</sup> RP-System an den wasserlöslichen Hydrolysaten der Reaktivfarbstoffe in der Färbereipraxis vorgenommen wird, soll mit ausgewählten Farbstoffen der DyStar Textilfarben GmbH, Frankfurt zu den Abbauprodukten mit Hilfe eines LC-MS-Analysenverfahrens untersucht werden. Ein besseres Verständnis des Reaktionsverlaufs wird für eine Optimierung des Praxisverfahrens nützlich sein.

## **2.6 Analytik von Reaktivfarbstoffen sowie Produkten der Hydrolyse und des oxidativen Abbaus**

Analytische Untersuchungen von oxidativ abgebauten Reaktivfarbstoffhydrolysaten werden im Wesentlichen durch die Polarität und den Dampfdruck der Analyten bestimmt. Ausgehend von den sehr gut wasserlöslichen Hydrolysaten, bildet sich bei der Oxidation eine Vielzahl von Produkten mit unterschiedlicher Polarität<sup>[64]</sup>. Es treten mittelpolare bis polare bzw. salzartige Verbindungen auf. Die Verwendung von gaschromatographischen Methoden für eine Trennung ist aufgrund der schweren Verdampfbarkeit der meisten Analyten nicht möglich. Stattdessen wird für mittelpolare Substanzen die Flüssig-Chromatographie (LC) benutzt, die seit Anfang der 1990er Jahre auch routinemäßig mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt wird<sup>[192]</sup>.

Mit einer einzigen LC-Methode ist der gesamte Polaritätsbereich der Abbauprodukte analytisch nicht erfassbar, daher sind für eine vollständige Untersuchung mehrere Analyseverfahren notwendig. Polare bzw. salzartige Verbindungen werden häufig mittels der Ionenchromatographie (IC) untersucht und analysiert.

### **2.6.1 Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS)**

Bereits zu Beginn der 1970er Jahre wurden Methoden zur Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie entwickelt. Aber erst in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts waren die Kopplungsmethoden soweit ausgereift, dass die relativ teuren LC-MS-Systeme in größeren Stückzahlen verkauft werden konnten<sup>[193]</sup>.

Die Kopplung der Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer ist kompliziert. Einerseits müssen die im Eluat gelösten, überwiegend schwer flüchtigen und z.T. thermolabilen Analyten schonend in die Gasphase überführt sowie ionisiert werden. Andererseits muss der Transfer der gebildeten Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers erfolgen. Zu diesem Zweck ein so genanntes Interface zwischen der LC und dem MS eingesetzt.

Es können unterschiedliche LC-Methoden, Interfaces und Massenspektrometer miteinander gekoppelt werden. Die optimale Kombination der einzelnen Komponenten hängt vom jeweiligen Analysenproblem ab.

## 2.6.2 Interface

Das Interface ist die Schnittstelle zwischen LC und MS. Es hat die Aufgabe den Eluentenstrom aus der HPLC in die Gasphase zu überführen und die Analyten zu ionisieren. Bei der LC-MS ist dies nicht so leicht zu erreichen wie bei der GC-MS, da ein wesentlich größeres Volumen an Gas gebildet wird, das vor Eintritt in das Hochvakuum des MS abgeführt werden muss.

Zu diesem Zweck sind verschiedene Interfacetypen konstruiert worden. Die wichtigsten sind derzeit ESI (electrospray ionisation) und APCI (atmospheric-pressure chemical ionisation) für polare bis mittelpolare Analyten <sup>[194,195]</sup>. Die Verbreitung neuerer Techniken, wie APPI (atmospheric-pressure photo ionisation) <sup>[196]</sup> und APLI (atmospheric-pressure laser ionisation) <sup>[197,198]</sup> für unpolare Substanzen bleibt noch abzuwarten.

## 2.6.3 Möglichkeiten der LC-QToF-Kopplung

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Massenspektrometer Q-ToF-Ultima<sup>TM</sup> API der Firma *Micromass*<sup>®</sup> ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Es handelt sich um ein Triplepolmassenspektrometer, dessen Hauptbestandteile ein Quadrupol, eine Stoßzelle und ein Flugzeitanalysator (ToF) sind. Da eine Kombination unterschiedlicher Massenanalytoren vorliegt, spricht man auch von einem Hybridmassenspektrometer <sup>[199]</sup>.

Nicht in der Abbildung zu sehen ist, dass in der Flugröhre des ToFs zwei Ionenreflektoren eingebaut sind. Dadurch können die Ionen dreimal umgelenkt werden, bis sie schließlich auf den Multi-Channel-Plate-Detektor (MCP-Detektor) treffen. Die sich daraus ergebende *W-Optik* hat den Vorteil, dass sich die Flugstrecke verlängert und die Auflösung durch den fokussierenden Effekt der Ionenreflektoren verbessert. Abhängig von den Geräteeinstellungen kann zwischen der W- und der V-Optik gewechselt werden. Die V-Optik, bei der die Ionen, wie in der Abbildung dargestellt, nur einmal umgelenkt werden, hat den Vorteil, dass die Empfindlichkeit höher ist (Faktor 3-4). Nachteilig ist jedoch die kleinere Auflösung (V-Modus:  $\leq 10.000$ ; W-Modus:  $\leq 20.000$ ).

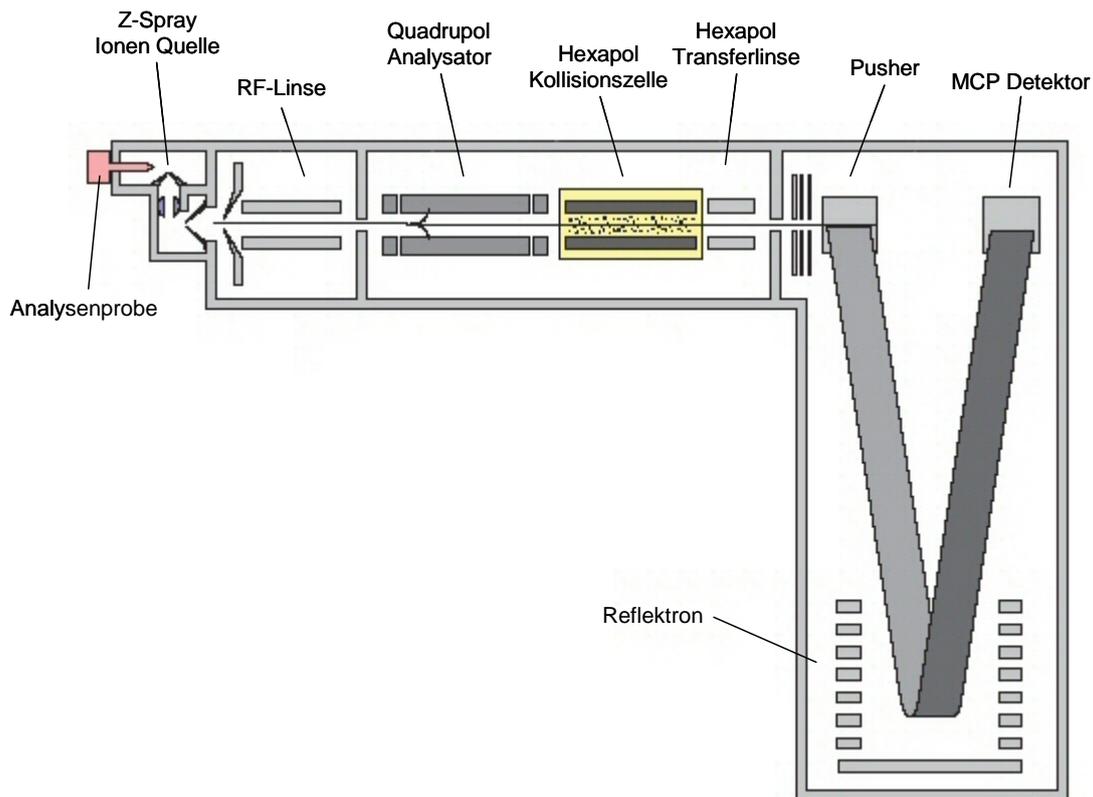


Abbildung 7: QToF-Massenspektrometer der Firma Micromass

Vor dem Massenspektrometer findet eine weitere Detektion mit einem Diodenarraydetektor (DAD) statt. Der DAD misst die Lichtabsorption im UV/VIS-Bereich (200-700 nm) und liefert so wichtige Informationen über den Farbstoffchromophor. Für Quantifizierungen ist der DAD besser geeignet als das MS, da die Lichtabsorption über einen großen Konzentrationsbereich hinweg linear ist. Beim ToF-MS hingegen verläuft die Signalstärke nur in einem relativ kleinen Bereich linear zur Konzentration. Außerdem ist die Ionenausbeute in der ESI- bzw. APCI-Quelle in hohem Maße von der Matrix abhängig. Die Quantifizierung von sehr kleinen und sehr großen Konzentrationen sollte deshalb, wenn möglich, mit dem DAD erfolgen.

#### 2.6.4 Bestimmung von Präzisionsmassen

Unter einer Präzisionsmasse wird im Allgemeinen eine Masse verstanden, die so genau bestimmt wurde, dass die Abweichung von der theoretischen Masse kleiner als 5 ppm ist. Der Nutzen der relativ aufwendigen Präzisionsmassenbestimmung besteht unter anderem in der Möglichkeit, von unbekanntem Verbindungen die Summenformeln zu ermitteln. Als

Beispiel seien die isotoopenreinen Verbindungen  $^{14}\text{N}_2$  ( $m = 28,0061$  Da) und  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$  ( $m = 27,9949$  Da) genannt, deren Massen sich um 400 ppm unterscheiden. Wenn von beiden Verbindungen die Präzisionsmasse bestimmt wurde, sind sie leicht zu unterscheiden. Bei zunehmend größeren Massen steigt die Anzahl der möglichen Summenformeln sprunghaft an. Dennoch kann die molekulare Zusammensetzung in vielen Fällen ermittelt werden, wenn die Anzahl der Möglichkeiten durch Plausibilitätsbetrachtungen eingeschränkt wird. Bei der Suche nach Abbauprodukten können beispielsweise, durch Kenntnis der Ausgangsverbindung, viele Zusammensetzungen ausgeschlossen werden. Auf diese Weise ist häufig auch die Summenformel von relativ großen Molekülen (1.000 Da) zugänglich. Wenn die Summenformel der gemessenen Verbindung bekannt ist, kann die Präzisionsmasse auch als Bestätigung dienen.

Präzisionsmassen können derzeit mit ICR (Ionenzyklotronresonanz)-Massenspektrometern und Flugzeitmassenspektrometern bestimmt werden. Der Einsatz von Flugzeitmassenspektrometern erfordert jedoch eine Auflösung größer 15.000, die zurzeit nur unter Verwendung der W-Optik zu erzielen ist. Außerdem muss zeitnah ein Standard mit gemessen werden, der später zur Korrektur der zu bestimmenden Massen benutzt wird.

Zu diesem Zweck bietet die Firma *Micromass* ein Locksprayverfahren an, das für die LC-MS-Kopplung geeignet ist<sup>[200]</sup>. Das Lockspray stellt quasi eine zweite Elektrosprayquelle dar, die um 90° versetzt zur Elektrosprayquelle der LC angebracht ist. Eine sich schnell drehende Kassette öffnet für fünf Sekunden den Weg für das Spray der LC. Anschließend dreht sich die Kassette weiter und verschließt diesen Weg. Gleichzeitig öffnet sich für eine Sekunde der Weg für das Lockspray. Danach springt die Kassette wieder zum Ausgangspunkt zurück und der Vorgang wiederholt sich.

Mit dieser Methode ist eine sehr zeitnahe Messung von Standardsubstanzen (Lockmassen) möglich, ohne dass der Ionisierungsprozess des Analyten von dem Standard beeinflusst wird. Als Standard sollte eine Verbindung ausgewählt werden, die ungefähr im gleichen Massenbereich liegt wie der Analyt. Zudem sollte darauf geachtet werden, dass die Signalhöhe des Analyten und des Standards vergleichbar sind, d.h. im richtigen Intensitätsbereich liegen.

Die Standard- bzw. Referenzmassen für die Bestimmung der Präzisionsmassen finden sich in einer Publikation aus dem Jahre 1991, die auch das in dieser Arbeit verwendete massenspektrometrische Auswertungsprogramm *MassLynx*<sup>TM</sup> der Firma Waters für die Auswertung heranzieht<sup>[201]</sup>.

### 3. Ziel der Arbeit

Der Industrie ist in den letzten Jahren bewusst geworden, dass es immer wichtiger wird, mit der Ressource Wasser sparsam umzugehen. Besonders abwasserintensive Industriezweige wie die Textilveredlung haben ein starkes ökologisches aber auch ökonomisches Interesse, Wassermengen einzusparen. Das direkte Einleiten von gefärbtem Produktionswasser in die Kanalisation ist zudem aufgrund verschärfter gesetzlicher Bedingungen nicht mehr möglich.

Der Wiedereinsatz von Prozesswasser im Rahmen eines produktionsintegrierten Umweltschutzes ist somit aus Sicht der Unternehmen sinnvoll. Gefärbte Abwässer dürfen jedoch nachfolgende Produktions- bzw. Waschschrte nicht negativ beeinflussen.

Aus diesem Grund soll das Abwasser, günstigerweise in einer prozessnahen Teilstrombehandlung, oxidativ chemisch oder biologisch entfärbt werden. Eine bei der Entfärbungsreaktion entstehende Sekundärbelastung oder Aufgiftung durch die entstehenden Abbauprodukte muss ausgeschlossen sein. Ferner muss sichergestellt sein, dass entstehende Intermediate durch Beeinträchtigung des Produktionsprozesses den erneuten Einsatz des Wassers nicht verhindern.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Hydrolyseprozess ausgewählter Reaktivfarbstoffe im Labormaßstab nachgestellt und das Hydrolysat chemisch mit Peroxodisulfat sowie biologisch / chemisch mit dem Baylase<sup>®</sup> RP-System entfärbt. Durch die Anwendung der RP-LC-MS sollen sowohl die Hydrolysate als auch die oxidativ entstandenen Abbauprodukte chromatographisch getrennt und untersucht werden. Der Einsatz der Massenspektrometrie erlaubt die vorläufige Charakterisierung der Abbauprodukte ohne die zeitintensive Herstellung von Vergleichssubstanzen. Für die sichere Identifizierung der Produkte durch weitere strukturanalytische Verfahren müssen geringe Mengen an Zwischenprodukten mit Hilfe präparativer chromatographischer Methoden isoliert werden. In einer vergleichenden Gegenüberstellung der Ergebnisse des oxidativen Abbaus von verschiedenen Farbstoffen mit Peroxodisulfat einerseits und dem Baylase<sup>®</sup> RP-System andererseits sollen typische Abbaureaktionen gefunden werden, die auf strukturell ähnlich gebaute Farbkörper übertragbar sind.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchung einer möglichen Sekundärbelastung durch das Oxidationsverfahren

Einige chlorierte Aromaten, insbesondere das unter dem Namen „Seveso-Gift“ bekannt gewordene 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin und polychlorierte Biphenyle, besitzen ein hohes umweltschädigendes Potential. Die Entstehung derartiger Stoffe in chloridhaltigem, farbigem Abwasser durch das Oxidationsverfahren und eine damit verbundene Aufgiftung ist unerwünscht. Chlorid ist in fast allen Färbereiabwässern enthalten und kann infolge des hohen Redoxpotentials der verwendeten Oxidationsmittel zu Chlor oder Hypochlorit umgesetzt werden. Eine Chlorierung aromatischer Verbindungen während des oxidativen Abbaus von Farbstoffen konnte im Vorfeld der Untersuchungen nicht ganz ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung einer solchen Sekundärbelastung eignet sich die Modellsubstanz  $\alpha$ -Naphthol, da diese dem Naphtholgrundkörper vieler Farbstoffe entspricht. Die Untersuchungen wurden bei pH 11 bzw. pH 2 durchgeführt. Reinstwasser wurde mit  $0,1 \text{ g L}^{-1}$   $\alpha$ -Naphthol und  $5 \text{ g L}^{-1}$  NaCl versetzt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Peroxodisulfat. Die entstandenen Oxidationsprodukte wurden mit Dichlormethan extrahiert und mittels GC-MS untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei pH 11 keine chlorierten Produkte entstehen. Neben dem Hauptprodukt Salizylsäure wurden Benzoesäure, Phthalsäure und Phthalaldehydsäure gefunden (siehe Abbildung 8).

Bei einem Ausgangs-pH-Wert von 2 wurden dagegen zum Teil hochchlorierte Produkte gebildet (Abbildung 9). Somit empfiehlt sich bei einer oxidativen Entfärbung von Abwasser mit Peroxodisulfat in Anwesenheit von Chlorid das Arbeiten bei einem pH-Wert, der sicher im basischen Bereich verbleibt. Da durch die Reaktion von Peroxodisulfat im basischen Milieu Protonen freigesetzt werden, muss eine entsprechende Menge an Base vor Reaktionsbeginn zugesetzt werden. Bewährt hat sich die Zugabe von 10 molarer NaOH, da das für die Neutralisation der entstehenden Säure einzusetzende Volumen in Bezug auf das Gesamtvolumen gering ist. Verdünnungseffekte können somit vernachlässigt werden. Bei Einhaltung dieser Maßnahmen ist gewährleistet, dass der pH-Wert nicht unter einen Wert von 11 fallen kann, so dass die Generierung von chlorierten aromatischen Verbindungen nicht zu erwarten ist.

In Bezug auf die Abbaureaktion der Farbstoffhydrolysate hat der Basezusatz keinen Einfluss. Untersuchungen haben ergeben, dass sich die Hydrolysate nahezu gleich gut oxidativ entfärben lassen und ein Mehraufwand an Oxidationsmittel nicht notwendig ist.

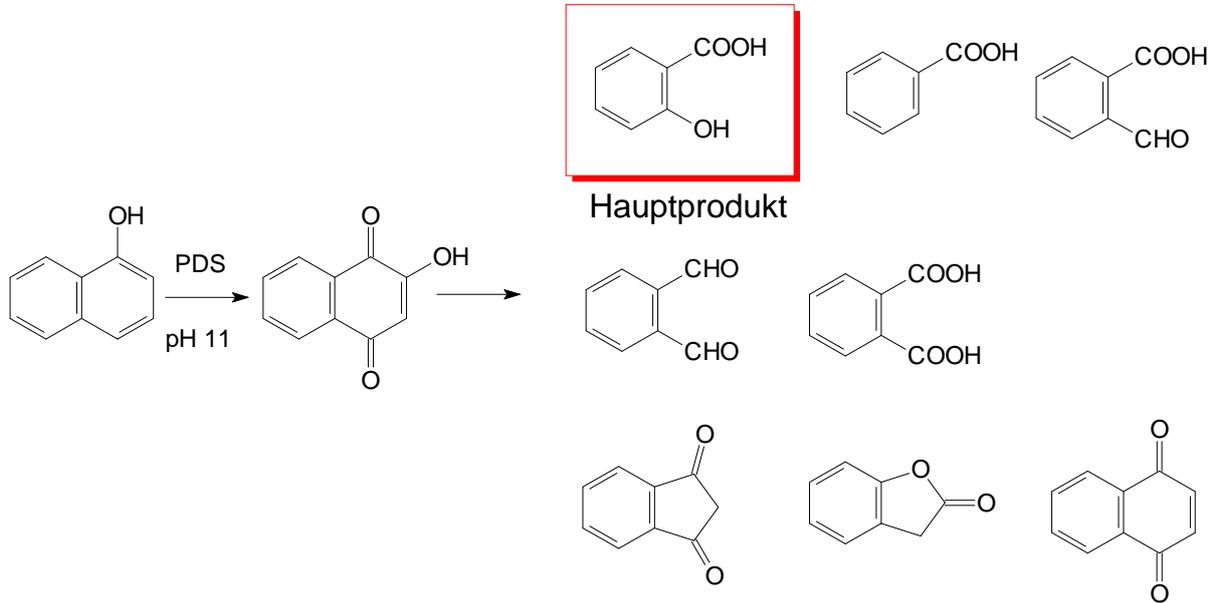


Abbildung 8: Oxidation von  $\alpha$ -Naphthol mit Peroxodisulfat bei pH 11

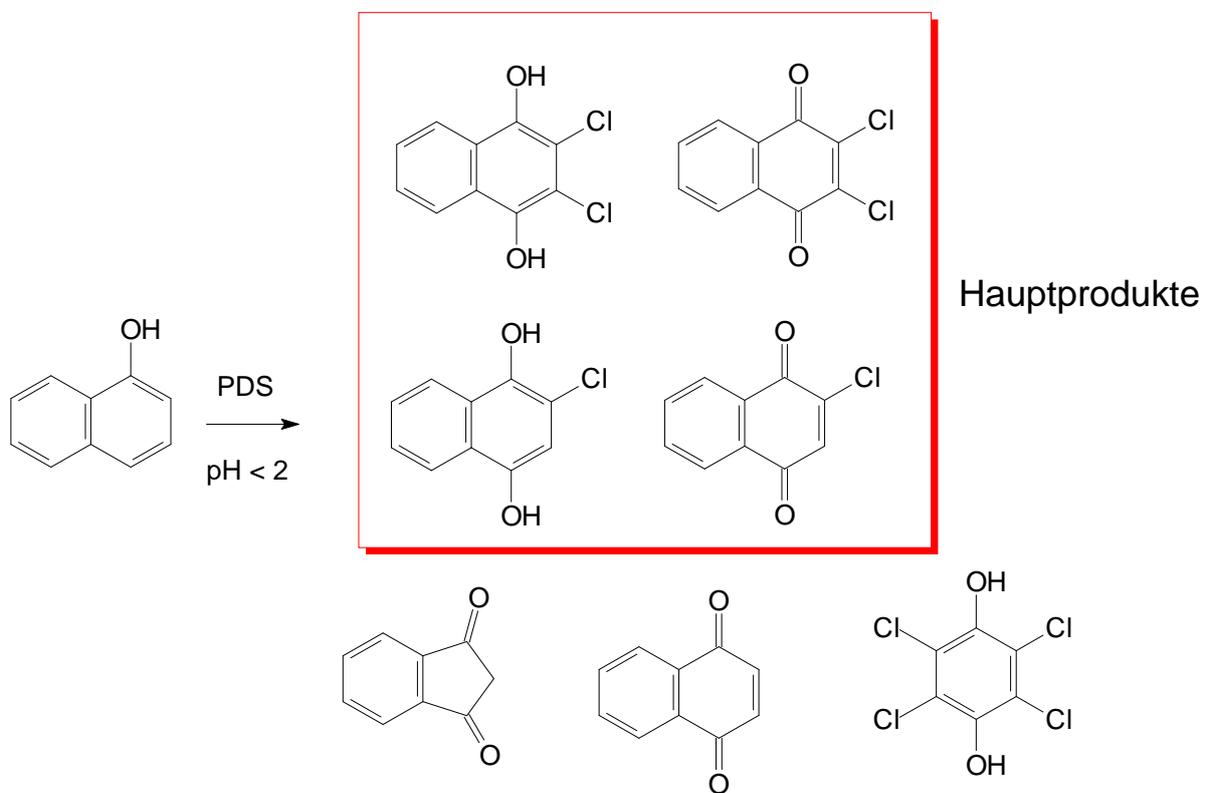


Abbildung 9: Oxidation von  $\alpha$ -Naphthol mit Peroxodisulfat bei pH 2

## 4.2 Auswahl und Hydrolyse der Reaktivfarbstoffe

Gemeinsam mit dem Farbstoffhersteller DyStar erfolgte die Auswahl von sieben Reaktivfarbstoffen, die hinsichtlich eines oxidativen Abbaus untersucht werden sollten. Folgende Punkte wurden hierbei berücksichtigt:

- industriell häufig verwendete Chromophorklassen
- unterschiedliche Chromophorklassen
- verschiedene Reaktivgruppen

	Chromophor	Schwermetall	Reaktivgruppe	Nuance
A	Phthalocyanin	Kupfer	Vinylsulfon	Türkis
B	Formazan	Kupfer	Fluorheterocyclus	Blau
C	Disazo (+)	-	2 * Vinylsulfon	Marine
D	Monoazo (+) ++)	-	Vinylsulfon	Gelb
E	Anthrachinon (+) ++)	-	Chlortriazin	Blau
F	Monoazo (+) ++)	-	Vinylsulfon	Rot
G	Triphendioxazin	-	2 * Chlortriazin	Blau

+) Trichromie (KKV); ++) Trichromie (Druck)

**Tabelle 4: Ausgewählte Reaktivfarbstoffe**

Von den ursprünglich ausgewählten sieben Farbstoffen wurden in dieser Arbeit nur drei näher untersucht. Die Gründe liegen bei zwei Farbstoffen in unzureichenden Hydrolysevorschriften. In einem Fall führte schon die Hydrolyse zu einer Entfärbung (Farbstoff G), in einem anderen verlief sie unvollständig (Farbstoff A). Bei Farbstoff B bestand die Handelsware aus einer Vielzahl von Einzelverbindungen, so dass eine eindeutige Zuordnung und Identifizierung der oxidativen Abbauprodukte schwierig erschien. Zu Farbstoff E sind Informationen zu Abbauprodukten im Abschlussbericht des OXITEX-Projekts zu finden<sup>[73]</sup>.

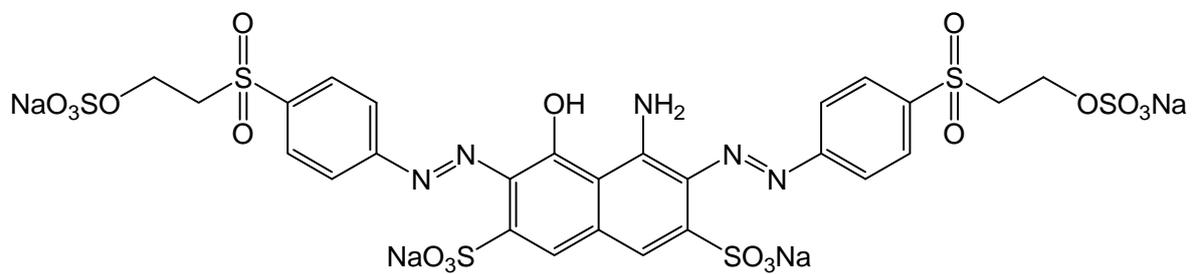
Bei den drei in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffen handelt es sich um industriell sehr häufig eingesetzte Azofarbstoffe (siehe Tabelle 5). Im Folgenden werden die untersuchten Farbkörper mit ihren Arbeitsnamen benannt: Marine C, Gelb D und Rot F.

Farbstoff	Chromophor	Reaktivgruppe	Color Index
Marine C	Disazo +)	2* Vinylsulfon	Reactive Black 5
Gelb D	Monoazo +) ++)	Vinylsulfon	Reactive Orange 96
Rot F	Monoazo +) ++)	Vinylsulfon	Reactive Red 35

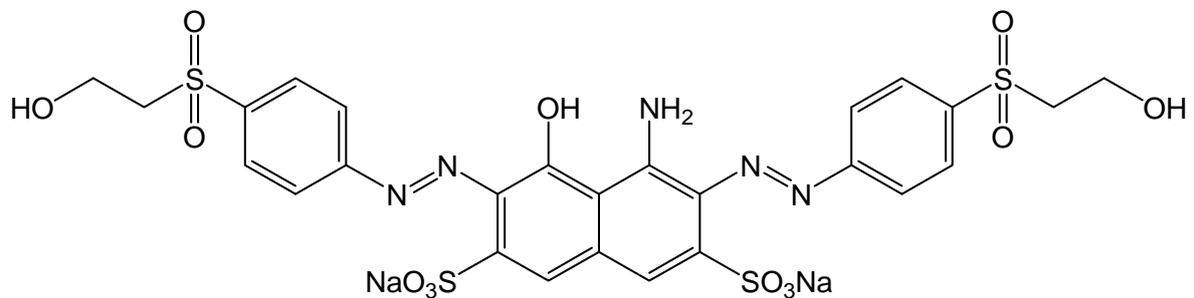
+ ) Trichromie (KKV); ++ ) Trichromie (Druck)

**Tabelle 5: Untersuchte Farbstoffe**

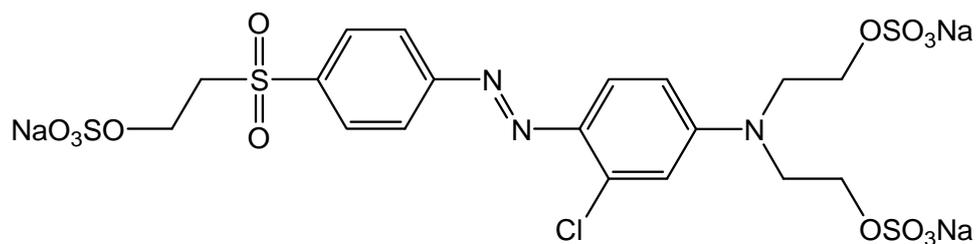
Die Strukturen der Handelswaren und der entstehenden Hydrolysate der Farbstoffe Marine C, Gelb D, und Rot F sind nachfolgend gezeigt (Abbildung 10):



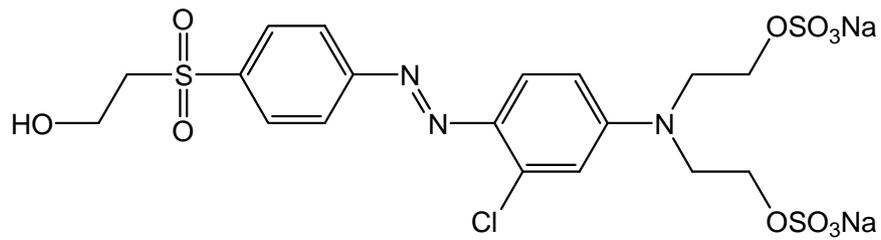
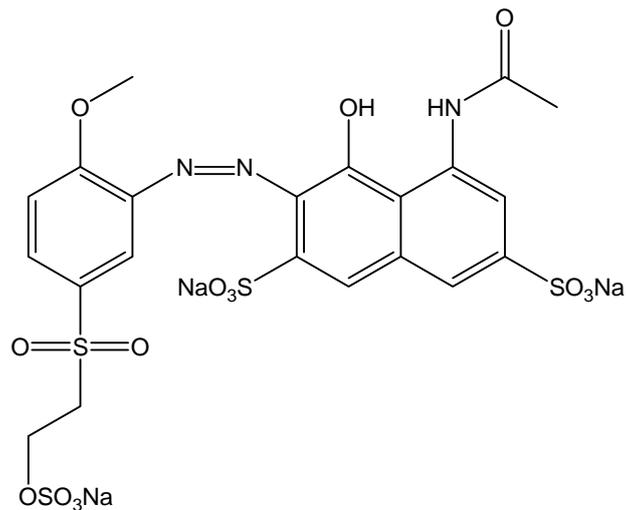
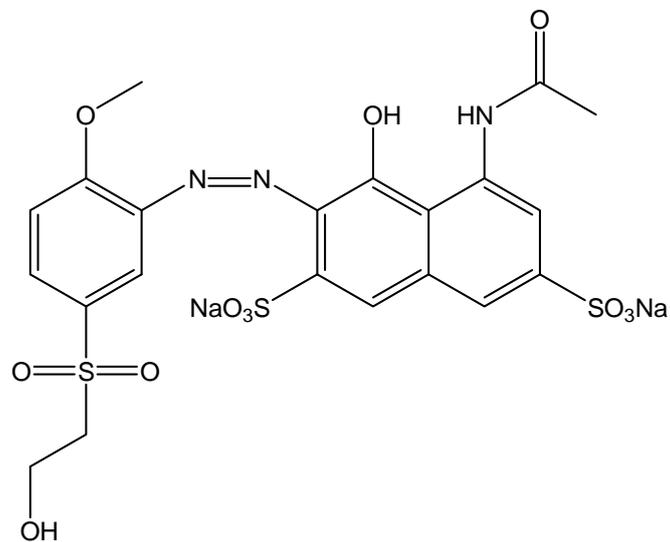
**Marine C Handelsware**



**Marine C Hydrolysat**



**Gelb D Handelsware**

**Gelb D Hydrolysat****Rot F Handelsware****Rot F Hydrolysat****Abbildung 10: Chemische Struktur der untersuchten Farbstoffe**

Wie weiter oben erwähnt, liegen die Farbstoffe im Abwasser der Färberei in hydrolysierten Form vor. Aus diesem Grund wurden zur Herstellung von definierten Modellabwäs-

sen in Anlehnung an den textilen Färbeprozess Hydrolysevorschriften ausgearbeitet mit dem Ziel, die Farbstoffe möglichst schonend (das heißt, ohne Generierung von Nebenprodukten) und vollständig in die Hydrolysatform zu überführen.

Die Hydrolyse erfolgte mit Hilfe eines Mikrowellenofens (Abbildung 11) <sup>[202]</sup> und ist im experimentellen Teil genauer beschrieben.



**Abbildung 11: Labormikrowellensystem ETHOSplus der Firma MLS GmbH und PTFE Druckgefäß**

Die Kontrolle auf Vollständigkeit der Hydrolysereaktion erfolgte durch LC-DAD-Messungen, indem in bestimmten Zeitabständen Proben aus der Reaktionslösung entnommen wurden. Zum Abbruch der Hydrolysereaktion wurden die Proben sofort mit 1 molarem Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 7 - 7,5 eingestellt und auf Temperaturen von nicht mehr als 4 °C gekühlt.

### **4.3 Flüssigchromatographie (LC)**

Wie bereits weiter oben dargelegt, entsteht bei der oxidativen Entfärbung der Farbstoffhydrolysate ein komplexes Produktgemisch, das sich über einen breiten Polaritätsbereich erstreckt. Die chromatographische Trennung aller in diesem Gemisch enthaltenen Komponenten-

ten ist mit einer LC-Methode nicht möglich. Für eine umfassende Untersuchung sind deshalb unterschiedliche Verfahren notwendig (siehe Abbildung 12).

Der mittelpolare bis polare Bereich kann unter Verwendung von schwachen Ionenpaarreagenzien mit der LC(RP)-QToF-Technik analysiert werden. Als Ionenpaarreagenz wurde Ammoniumacetat verwendet, das im Vergleich zu anderen Ionenpaarreagenzien weniger lipophil ist, aber dennoch eine Retardierung auf der stationären Phase bewirkt. Aufgrund der relativ hohen Flüchtigkeit und der geringen Oberflächenaktivität des Ammoniumacetats stellt sich kein unerwünschter Memoryeffekt ein, wie dieser bei Verwendung der klassischen Ionenpaarreagenzien, z.B. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat auftritt. Ein weiterer Vorteil des Ammoniumacetats ist, dass es bei der Ionisierung die Funktion eines Hilfsreagenzes übernimmt.

Sehr polare Verbindungen wie z.B. kleinere Alkyl- und Arylsulfonsäuren oder anorganische Salze entziehen sich jedoch unter den zuvor genannten Bedingungen einer chromatographischen Trennung. Diese Komponenten können mit Hilfe der Ionenchromatographie (IC) separiert werden, die zu einer weiteren Komponentenaufklärung in Auftrag gegeben wurde [76]. Da sich diese Untersuchungen allerdings auf Proben beziehen, die mit Ozon behandelt wurden, werden sie in dieser Arbeit nicht weiter erwähnt. Weitere externe Untersuchungen nach Behandlung der Proben mit Peroxodisulfat betreffen hochauflösende NMR-Messungen (700 MHz) (siehe Kapitel Kernresonanzmagnetische Messungen und Anhang).

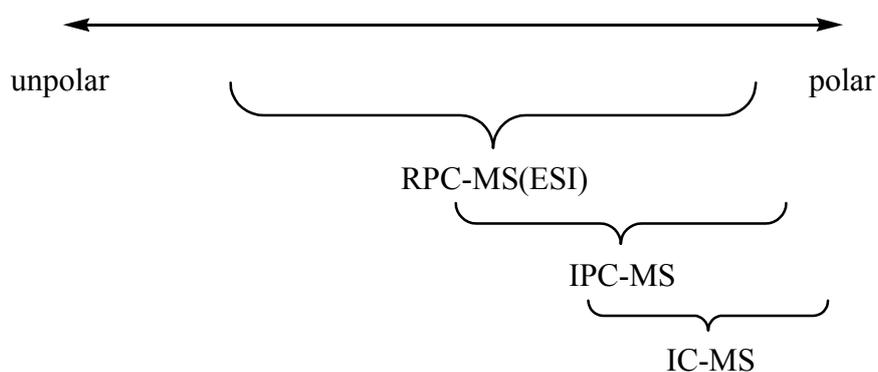


Abbildung 12: LC-Analysenverfahren in Abhängigkeit von der Polarität

#### 4.4 Festphasenextraktion (SPE-Anreicherung)

Zur Steigerung des Nachweisvermögens der LC-MS-Analytik wurde die SPE (Solid Phase Extraction)-Anreicherung angewandt. Bei dieser Methode werden Kartuschen verwendet, die poröse Kieselgel-Partikel mit spezieller Oberflächenmodifikation enthalten. An

diesen Partikeln werden die Analytmoleküle abhängig von ihrer Polarität bzw. Struktur unterschiedlich stark adsorbiert. Durch geeignete Auswahl der mit verschiedenen Oberflächenfunktionalitäten kommerziell erhältlichen SPE-Kartuschen können die Analyten gezielt zurückgehalten und somit angereichert werden.

In der Praxis wird ein definiertes Volumen an Probelösung durch die zuvor konditionierte SPE-Kartusche geleitet. Während das Lösungsmittel durch die Kartusche hindurchläuft, werden die Analytmoleküle an der Kartuschenfüllung festgehalten. Es folgt ein Ausspülen der Analyten aus der Kartusche mit einer geringen Menge eines Lösungsmittels von hoher Elutionskraft.

Für die Anreicherung der Reaktivfarbstoffhydrolysate und deren Abbauprodukte hat sich in Vorversuchen die Verwendung von Phenylphasen vom Typ VARIAN Bond Elut<sup>®</sup> PH bewährt. Die Analytmoleküle können an der Phenylphase durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen adsorbiert werden, die Polarität ist vergleichbar mit der einer C8-Phase<sup>[203]</sup>. Es adsorbieren vorwiegend die mittelpolaren bis polaren Verbindungen an der Phase, wohingegen die sehr polaren bis salzartigen Komponenten nicht retardiert werden. Mit diesem Verfahren lassen sich, abhängig vom eingesetzten Farbstoff, Anreicherungen um den Faktor fünf bis fünfzig erreichen.

## **4.5 Entfärbung mit Peroxodisulfat**

### 4.5.1 Entfärbungsverfahren

Die Oxidation der Hydrolysatlösungen mit Peroxodisulfat erfolgte, wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, in einem Mikrowellengerät (siehe Abbildung 11). Unter Verwendung der für jeden Farbstoff optimalen Heiztemperatur von 100 °C wurde das Farbstoffhydrolysat eine Stunde unter starkem Rühren entfärbt. Nach dem Abkühlen wurden die Gefäße vorsichtig geöffnet, um das oxidierte Produkt zu entnehmen.

Bei der Entfärbung wurde der pH-Wert durch Zugabe von 10 molarer Natronlauge zur Vermeidung der Entstehung von chlororganischen Verbindungen konstant gehalten (vgl. Kapitel 4.2). Die Farbstoffkonzentration entspricht den Werten der Hydrolyse. Nachfolgend sind die Bedingungen der Entfärbungsexperimente im Labor aufgelistet:

- 
- pH-Wert: 11,5 - 12,0
  - Farbstoffkonzentration: 1 [g L<sup>-1</sup>] bzw. 2 [mL L<sup>-1</sup>] für flüssige Handelswaren
  - Temperatur 90 - 100 °C
  - 16,6 µL 10 molare NaOH pro 100 µL Peroxodisulfatlösung (c = 200 g L<sup>-1</sup>)

#### 4.5.2 Optimierung der Oxidationstemperatur

Den Hydrolysaten der zu untersuchenden Farbstoffe wurde zur Ermittlung der effektivsten Heiztemperatur die jeweils gleiche Menge an Natriumperoxodisulfatlösung zugesetzt, und die Proben wurden 30 min im Mikrowellenofen bei Temperaturen von 70 bis 130 °C (in Abständen von 10 °C) gehalten. Die Restfarbigkeit der verbleibenden Lösung stellt einen einfachen Schnelltest für die Wirksamkeit der Behandlung dar. Die Effektivität des Peroxodisulfates ist für die untersuchten Farbstoffe bei einer Temperatur von 100 °C am höchsten.

#### 4.5.3 Ermittlung der erforderlichen Menge Peroxodisulfat gemäß Anhang 38 der Abwasserverordnung

Zu 25 mL Hydrolysat (c = 1 g L<sup>-1</sup> für Marine C und Rot F bzw. c = 2 mL L<sup>-1</sup> für Gelb D) wurden unterschiedliche Volumina an Peroxodisulfatlösung (c = 200 g L<sup>-1</sup>) gegeben und die Proben für 30 min in einem Mikrowellenofen erhitzt. Anhand der Durchsichtsfarbzahlen wurde überprüft, bei welchem zugesetzten Volumen an Peroxodisulfat die Anforderungen des Anhangs 38 der AbwV erfüllt waren (siehe Kapitel Rechtliche Bestimmungen). Hierbei ergab sich für jeden Farbstoff ein recht unterschiedlicher Bedarf an Oxidationsmittel (Tabelle 6).

Die untersuchten Farbstoffe liegen in Form ihrer Handelswaren vor, also Gemische des Farbkörpers mit Hilfs- und Stellmitteln. Bei diesen Stellmitteln handelt es sich größtenteils um salzartige Verbindungen wie z.B. Natriumchlorid, welches bei der Oxidation mit Peroxodisulfat im Basischen nicht angegriffen wird (vgl. Kapitel 4.1). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Verbrauch des Oxidationsmittels auf einen direkten Abbau des Farbkörpers zurückzuführen ist.

Farbstoff	Einwaage Handelsware pro Liter	Farbstoffgehalt in Handelsware	Stoffmengenkonz. Farbstoffhydrolysol. <sup>a)</sup>	Stoffmengenkonz. der PDS-Lösung <sup>b)</sup>	Notwendiges molares Verhältnis Farbstoffhydrolysol. / PDS <sup>c)</sup>
Marine C	1.000 mg	79,0 %	1,06 mM	840 mM	1 : 20
Gelb D	2.000 µL	10,5 %	0,36 mM	840 mM	1 : 18
Rot F	1.000 mg	45,0 %	0,75 mM	840 mM	1 : 13

**Tabelle 6: Verbrauch an Peroxodisulfat für die einzelnen Farbstoffhydrolysate**

- a) Annahme einer vollständig verlaufenden Hydrolyse
- b) 200 g Peroxodisulfat pro Liter Wasser
- c) Nach Anhang 38 der AbwV sind Grenzwerte (Durchsichtsfarbzahlen) für die Einleitung einzuhalten. Diese werden bei Behandlung der Farbstoffhydrolysate mit PDS bei 100 °C im jeweiligen molaren Verhältnis erreicht.

Um die gesetzlich geforderte Farbigekeit des gereinigten Abwassers, die einer gewichteten Farbzahl von  $5,5 \text{ m}^{-1}$  entspricht, zu erreichen, ist für einige der untersuchten Farbstoffe ein hoher Aufwand an Oxidationsmittel erforderlich. Es bedarf eines bis zu 20 fachen Überschusses an Peroxodisulfat, um die gesetzlichen Grenzwerte zu unterschreiten. Insbesondere verläuft die Verringerung der gelben Restfarbigekeit, die auf zahlreiche Bruchstücke der Farbstoffmoleküle mit einer Absorption bei 436 nm zurückzuführen ist, nur sehr langsam.

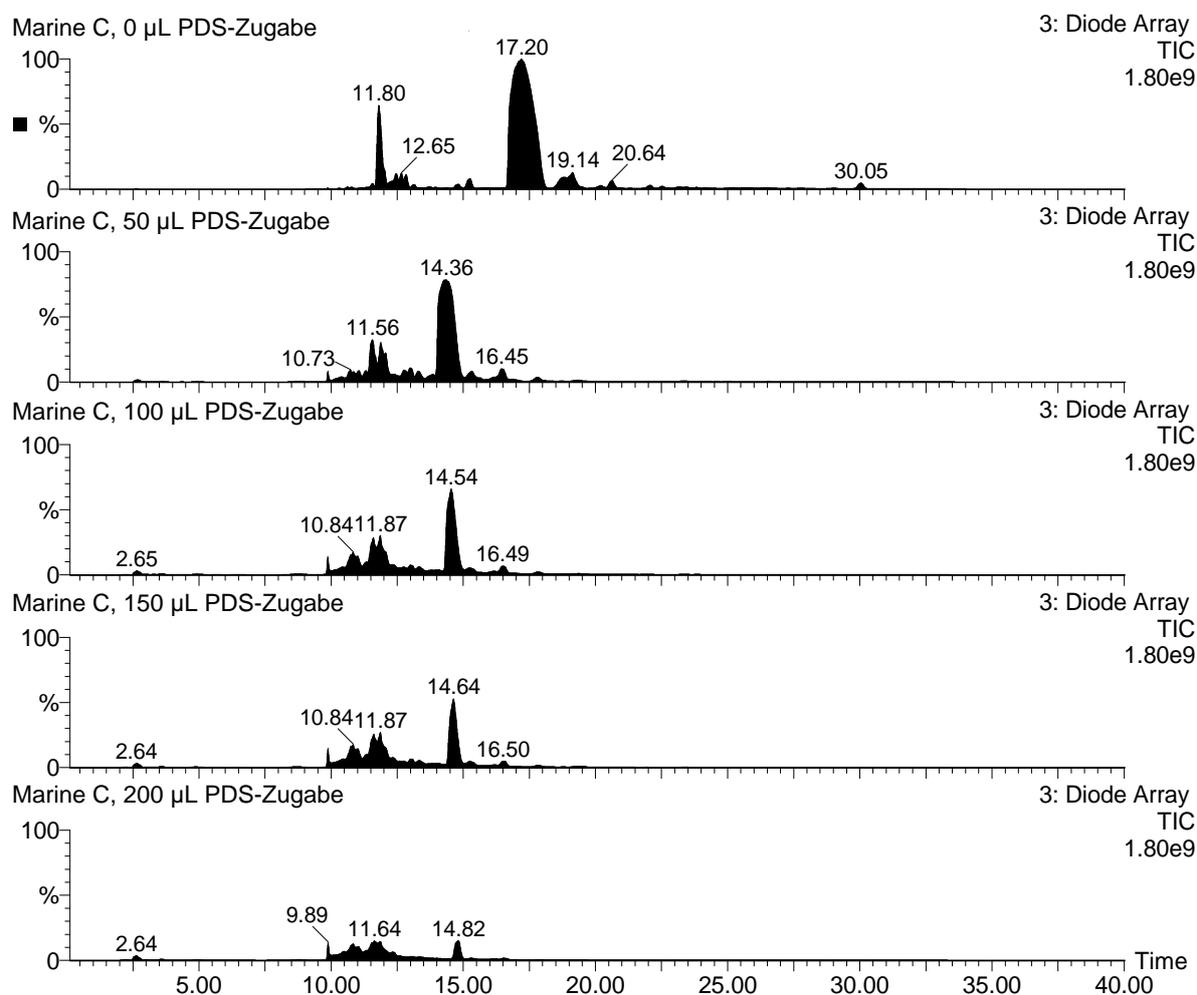
#### 4.5.4 Entfärbung von Marine C mit Peroxodisulfat

Neben der Fragestellung des ökologischen Nutzens einer oxidativen Entfärbung ist für den textilveredelnden Betrieb besonders die ökonomische Betrachtung von hoher Relevanz. Ein Entfärbungsvorgang ist betriebswirtschaftlich nur dann akzeptabel, wenn sowohl der zeitliche Aufwand als auch die Mengen der notwendigen Chemikalien für die Entfärbungsreaktion so gering wie möglich gehalten werden können. Die Optimierung des Einsatzes von Chemikalien bzw. zeitbestimmender Prozessparameter haben in der Praxis höchste Priorität. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass den gesetzlichen Anforderungen an ein Abwasser Genüge getan wird. Eine vollständige Entfärbung ermöglicht andererseits eine Wiederverwendung des oxidativ behandelten Abwassers. Die Farbstoffe müssen hierbei nicht mineralisiert werden. Es reicht aus, dass die farblosen Abbauprodukte bei der Wiederverwendung des behandelten Abwassers keinen Einfluss auf die anderen Textilveredlungsmittel haben.

Der Verlauf der oxidativen Entfärbung des Hydrolysats von Marine C mit Peroxodisulfat (PDS) wurde nach HPLC-Trennung mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors (DAD) verfolgt. In Abbildung 13 sind die DAD-Chromatogramme der Hydrolysatlösungen vor und

nach Behandlung mit zunehmenden Volumina von Peroxodisulfatlösung dargestellt. Zur Aufkonzentrierung der Edukte und Abbauprodukte wurden 18 mL Lösung mittels SPE-Anreicherung auf 1,5 mL, also insgesamt um den Faktor 12, angereichert.

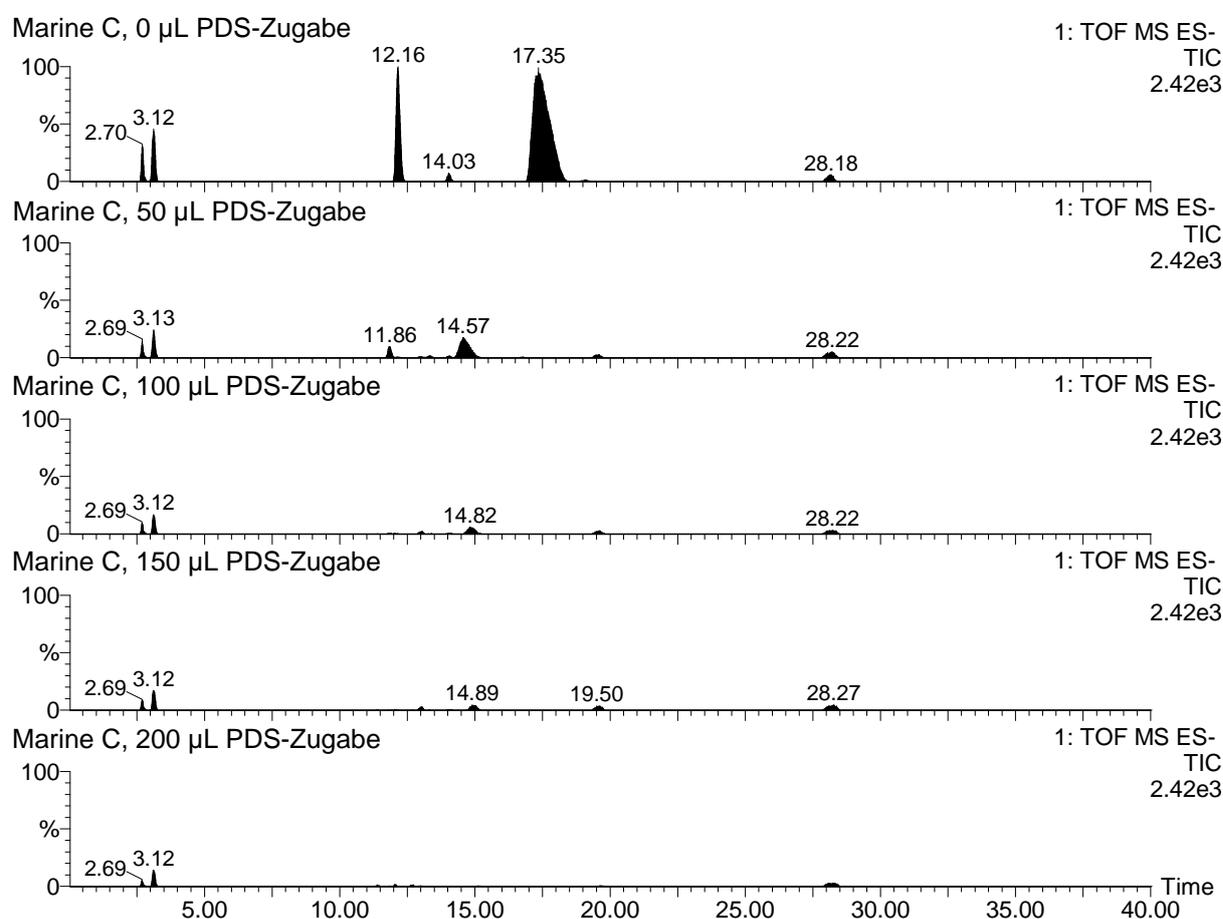
Zu erkennen ist, dass bereits durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Peroxodisulfatlösung, bezogen auf 25 mL Hydrolysatlösung des Farbstoffs, die Hauptkomponente bei  $t_R = 17,20$  min vollständig und eine kleinere Komponente bei  $t_R = 11,80$  min deutlich abgebaut werden. Das ebenfalls große Signal bei  $t_R = 14,36$  min weist auf ein Zwischenprodukt hin, das bei fortschreitender Oxidation wieder verschwindet. Mit einer Absorption bei 578 nm verursacht die Hauptkomponente ( $t_R = 17,20$  min) eine deutliche Färbung des Abwassers. Das intensive Signal, das nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Peroxodisulfatlösung zu sehen ist, besitzt ein Absorptionsmaximum bei 345 nm. Dadurch ist die Probe deutlich geringer gefärbt.



**Abbildung 13: DAD-Chromatogramme von Marine C Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten**

Durch Zugabe größerer Volumina an PDS-Lösung werden auch die Nebenkomponenten fast vollständig abgebaut. Bei einer Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung, bezogen auf 25 mL

Hydrolysatlösung, sind die farbigen Verbindungen zu mehr als 95 % abgebaut. Der Entfärbungsgrad liegt somit deutlich über dem im Anhang 38 der Abwasserverordnung geforderten Wert. Die y-Achsen sind in Abbildung 13 zur besseren Vergleichbarkeit festgehalten worden. In Abbildung 14 sind exemplarisch die Total-Ionen-Ströme (TIC) der fünf im ESI-negativ Modus vermessenen Proben des Farbstoffs Marine C nach SPE-Anreicherung dargestellt. Entsprechend den DAD-Chromatogrammen findet sich oben die Probe des Hydrolysats mit starken Signalen bei 17,35 und 12,16 Minuten. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Peroxodisulfatlösung zur Probe des Hydrolysats und Reaktion in der Mikrowelle weist das darunter befindliche Chromatogramm deutlich geringere Signalintensitäten auf.



**Abbildung 14: TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten**

Die im Hydrolysat sichtbaren Hauptsignale sind bei festgehaltener Skalierung nicht mehr zu erkennen. Bei  $t_R = 14,57$  min erscheint ein neuer Stoff, welcher bei zunehmenden Mengen an Peroxodisulfat (siehe Chromatogramme darunter) schnell wieder abgebaut wird. Es handelt sich hierbei um ein Zwischenprodukt, das im unbehandelten Hydrolysat nicht nachweisbar ist. Nach Behandlung der Hydrolysatlösung mit 200  $\mu\text{L}$  PDS sind fast keine

Signale mehr zu beobachten, der oxidative Abbau ist nahezu vollständig, was mit den DAD-Chromatogrammen in Abbildung 13 übereinstimmt. Polare Produkte wie Salze oder kurzkettige organische Säuren ( $t_R = 2,69; 3,12$  min) treten trotz der SPE-Anreicherung nur in geringen Konzentrationen auf.

Die ausführliche Auswertung der einzelnen, in Abbildung 14 gezeigten Läufe findet sich in Tabelle 7. Sortiert nach aufsteigenden Massen sind alle nachgewiesenen Edukte und Produkte mit ihrer Retentionszeit und den ermittelten Peakflächen bei unterschiedlichen Mengen an Oxidationsmittel aufgelistet. Zur besseren Übersicht ist die Spalte mit den Werten des Hydrolysats, also ohne Zugabe von Oxidationsmittel, gelb unterlegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass größere Flächenwerte und damit größere Konzentrationen an Inhaltsstoffen nur im unbehandelten Hydrolysat auftauchen. Acht Signale mit deutlich unterschiedlicher Intensität sind zu beobachten, von denen schon nach der ersten Zugabe von PDS-Lösung sieben nicht mehr im Analysengemisch nachweisbar sind. Hervorzuheben ist dieses Verhalten besonders bei den intensivsten Signalen, die den hydrolysierten Farbkörpern zuzuordnen sind (742 Da bzw. 370,5 Da). Der Farbstoff Marine C wird offensichtlich sehr effektiv durch Peroxodisulfat angegriffen. Ab einem molaren Hydrolysat / PDS-Verhältnis von ca. 1 : 7,5 ist die Totalmineralisation des Farbstoffs zu erwarten.

Retentionszeiten [min]	Masse	Peakflächen				
		vor Behandlung mit PDS	nach Behandlung mit PDS (840 mM) zugesetzte Volumina und sich ergebendes, molares Farbstoffhydrolysat / PDS-Verhältnis			
		Hydrolysat	50 $\mu$ L [1 : 1,5]	100 $\mu$ L [1 : 3,0]	150 $\mu$ L [1 : 4,5]	200 $\mu$ L [1 : 6,0]
13,07	201 Da	0	25	68	144	15
14,03	242 Da	193	45	26	19	3
11,85	263,5 Da	0	164	17	0	0
12,16	264,5 Da	1090	0	0	0	0
14,57	369,5 Da	0	538	223	43	12
17,35	370,5 Da	3650	0	0	0	0
15,57	402,5 Da	6	0	0	0	0
12,16	410,5 Da	4	0	0	0	0
16,78	461,5 Da	0	20	2	0	0
19,12	462,5 Da	4	0	0	0	0
11,81	528 Da	0	104	6	0	0
12,16	530 Da	1550	0	0	0	0
14,57	740 Da	0	521	110	39	2
17,35	742 Da	5800	0	0	0	0

**Tabelle 7: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach der PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS**

Abbauprodukte treten, wie schon beschrieben, zu keinem Zeitpunkt in hohen Konzentrationen auf. Einzig das schon erwähnte Signal bei  $t_R = 14,57$  min weist größere Flächen auf. Hierbei handelt es sich um eine Verbindung der Masse 740 Da bzw. 369,5 Da als doppelt geladene Spezies, die durch den formalen Verlust von zwei Wasserstoffen am hydrolysierten Farbkörper entsteht. Weitere Abbauprodukte erscheinen nur in geringeren Mengen und werden überwiegend sofort nach dem Entstehen wieder abgebaut. Nur das Signal bei  $t_R = 13,07$  min durchläuft ein Maximum nach Zugabe von 150  $\mu\text{L}$  Oxidationslösung, nimmt aber bei größeren Mengen an PDS auch schnell wieder ab.

Nach der quantitativen Betrachtung der Edukte und Abbauprodukte erfolgt eine qualitative Untersuchung. Da die Technik des verwendeten Massenspektrometers eine hohe Massengenauigkeit ermöglicht, können unter Verwendung von Phosphorsäure als internem Standard mit Korrekturfunktion und gleichzeitig guten Kenntnissen des Farbkörpers und seiner Chemie die gefundenen Massen einer Summenformel zugeordnet werden. Durch die Umrechnung der aus dem TIC erhaltenen Rohmassen mit den aus dem Lockspraykanal erhaltenen Daten der Phosphorsäure ergibt sich eine Präzisionsmasse, die, bei entsprechender Einstellung des Massenspektrometers, eine Abweichung zum theoretischen Wert einer Summenformel von weniger als 5 ppm ausweist. Tabelle 8 führt alle in Tabelle 7 vorkommenden Massen erneut auf. Der ermittelten Präzisionsmasse ist eine Summenformel und somit eine theoretische Masse zugeordnet. Die vierte Spalte der Tabelle zeigt die Differenz zwischen theoretischer Masse und der Präzisionsmasse. Die Abweichung der ermittelten Masse vom theoretischen Wert liegt in allen Fällen besser als die für eine hohe Sicherheit notwendigen 5 ppm; der größte Unterschied beträgt 3,8 ppm. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Verlässlichkeit der zugeordneten Summenformeln hoch ist.

Besonders bei schweren Molekülen besteht das Problem, dass es sehr viele Kombinationen von Summenformeln gibt, die das Kriterium einer Abweichung kleiner als 5 ppm erfüllen. Ohne die Kenntnis der Ausgangsverbindungen, hier also der Farbkörper, kann alleine mit Hilfe der Massenspektrometrie keine Strukturaussage getroffen werden. Da im vorliegenden Fall umfangreiche Kenntnisse über den Farbstoff als Handelsware und in der hydrolysierten Form vorliegen, können den Präzisionsmassen aufgrund logischer Schlussfolgerungen (Plausibilitätsbetrachtungen) Summenformeln, in einigen Fällen Strukturen (siehe unten), zugewiesen werden.

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
201,0219	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S	201,0222	-1,5
242,0489	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> NS	242,0487	0,8
263,4882	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	263,4882	0,0
264,4950	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	264,4960	-3,8
369,5010	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub> N <sub>5</sub> S <sub>4</sub>	369,5009	0,3
370,5085	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> N <sub>5</sub> S <sub>4</sub>	370,5088	-0,8
402,4908	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>15</sub> N <sub>5</sub> S <sub>5</sub>	402,4897	2,7
410,4880	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>16</sub> N <sub>5</sub> S <sub>5</sub>	410,4872	1,9
461,5119	C <sub>34</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> N <sub>5</sub> S <sub>5</sub>	461,5106	2,8
462,5172	C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub> N <sub>5</sub> S <sub>5</sub>	462,5185	-2,8
527,9826	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	527,9842	-3,0
529,9980	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	529,9998	-3,4
740,0099	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub> N <sub>5</sub> S <sub>4</sub>	740,0097	0,3
742,0243	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> N <sub>5</sub> S <sub>4</sub>	742,0254	-1,5

**Tabelle 8: Abbauprodukte von Marine C nach PDS-Behandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Mit Hilfe der erhaltenen Summenformeln besteht die Möglichkeit, ein vereinfachtes Abbauschema für den oxidativen Abbau des Farbstoffs Marine C mit Peroxodisulfat aufzustellen. Ausgehend von der Struktur des Hydrolysats können verschiedene Strukturen postuliert werden, von denen einige als spekulativ anzusehen sind. Für exakte Strukturaussagen ist das Heranziehen weiterer strukturanalytischer Methoden, z.B. der hochauflösenden Kernresonanz-Spektroskopie unumgänglich. Hierbei besteht allerdings das Problem, dass die vorliegenden Abbauprodukte nur in verschwindend geringen Mengen vorliegen. Selbst die Anreicherung mittels Festphasenextraktion ist für eine erfolgreiche NMR-Messung nicht ausreichend. Alternativ zu einer solchen Anreicherung besteht die Möglichkeit der Isolierung von Substanzen durch präparative HPLC. Hierbei handelt es sich um ein zeitaufwändiges Verfahren, welches bei den Abbauprodukten nur geringe Mengen liefert, die ausschließlich an einem sehr leistungsfähigen NMR-Gerät vermessen werden können. Im später gezeigten oxidativen Abbau des Farbstoffs Gelb D mit Peroxodisulfat wurde nach präparativer HPLC die Vermessung der gewonnenen Substanzen auf einem 700 MHz NMR-Gerät in einem externen Labor durchgeführt<sup>[204]</sup>. Die Ergebnisse hierzu werden weiter unten dargelegt.

Anhand der vorliegenden Daten können gesicherte Strukturaussagen getroffen werden. Literaturdaten belegen, dass der Farbstoff Marine C unter dem Namen C.I. Reactive Black 5 oder Remazol Black 5 relativ gut untersucht ist<sup>[205-209]</sup>. In Hinblick auf den Abbau und die hierbei entstehenden Produkte gibt es hingegen nur wenige Studien. Insbesondere massenspektrometrische Untersuchungen sind selten<sup>[210,211]</sup>. Es lassen sich jedoch Strukturen finden,

die mit den in Abbildung 15 gezeigten postulierten Strukturen übereinstimmen. So haben *Pham et al.* ebenfalls den Verlust von zwei Wasserstoffen am Hydrolysatkörper und Ausbildung einer 2*H*-Naphtho-[1,8-*cd*]-isoxazol Ringstruktur mit der Masse 740 Da beschrieben [210]. Ebenso stellen *Conneely et al.* die Ausbildung desselben Strukturgerüsts nach Durchführung von MS<sup>n</sup>-Experimenten fest [211].

Die Spaltung der Azobrücke mit der damit verbundenen Ausbildung zweier Bruchstücke gilt als gut untersucht [212]. Jedoch fehlt auch hier häufig die Bestimmung der entstandenen Fragmente.

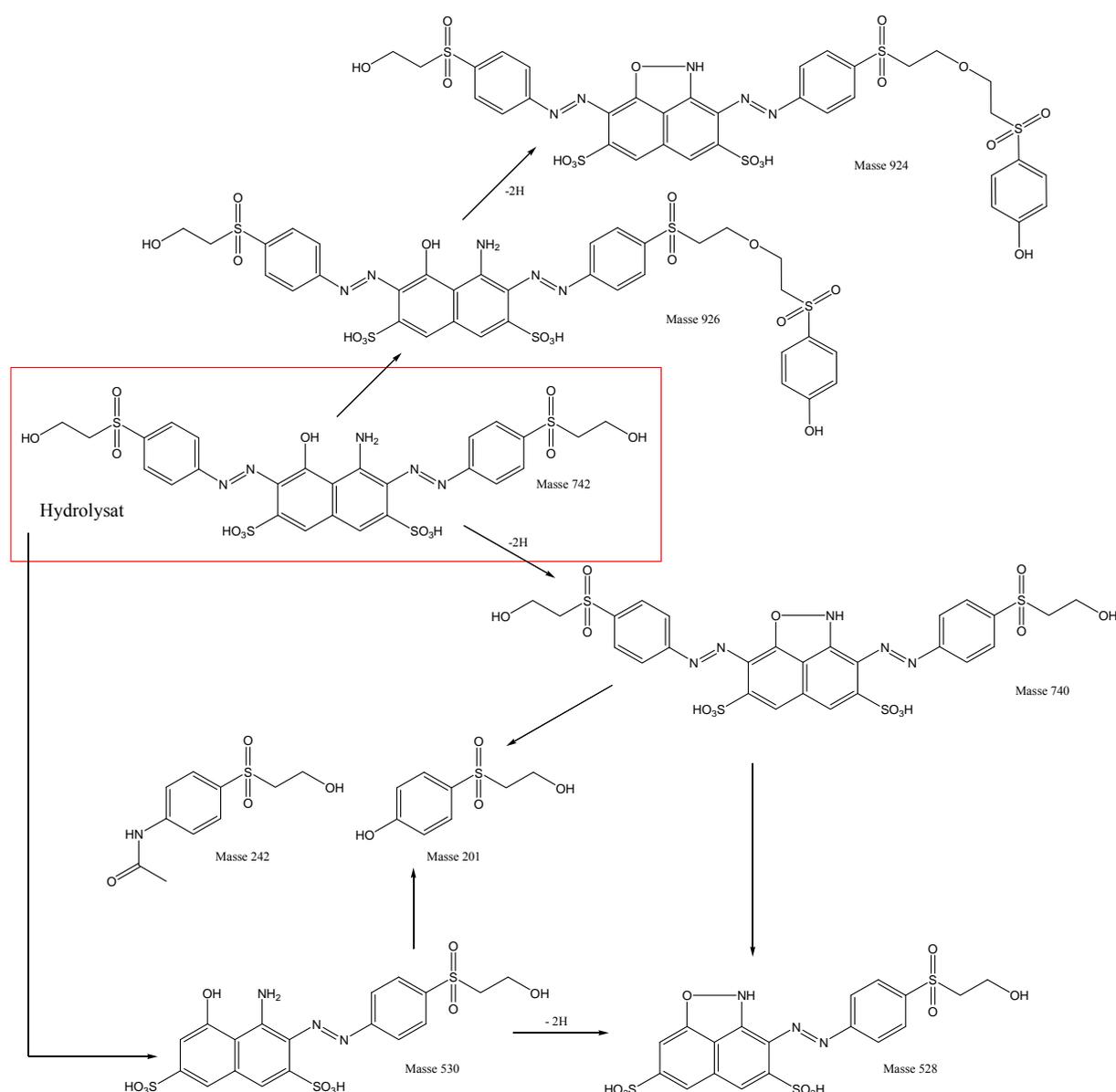


Abbildung 15: Abbauschema für Marine C Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat

Die Gruppe um *Pham* hat die Strukturen mit den Massen 530 Da, 242 Da sowie 201 Da nachgewiesen. Neu ist die unten aufgeführte Struktur mit der Masse 528 Da, deren Erklärung jedoch keine Schwierigkeiten bereitet. Der Entstehungsmechanismus dieser Struktur verhält sich analog zur Beziehung von Masse 742 Da zu Masse 740 Da. Neu und in ihrer dargestellten Form nicht belegt sind die Strukturen mit den Massen 926 Da sowie 924 Da. Der Übergang zwischen den beiden Fragmenten entspricht dem schon mehrfach beobachteten Verlust von zwei Wasserstoffen. Die Massenzunahme dieser Moleküle lässt sich nur durch die Zusammenlagerung zweier Fragmente erklären. Das Auftreten dieser Spezies ist nur in sehr geringen Mengen und ausschließlich nach Zugabe kleiner Mengen an PDS-Lösung zu beobachten. Es besteht somit die Möglichkeit, dass das Farbstoffhydrolysat mit Fragmenten der Masse 201 Da die unten dargestellte Etherstruktur ausbildet.

#### 4.5.5 Entfärbung von Gelb D mit Peroxodisulfat

Analog der Untersuchungen mit Peroxodisulfat am Farbstoff Marine C wurde ein definiertes Volumen des Farbstoffs Gelb D verwendet und mit PDS-Lösung versetzt. Die Behandlung erfolgte in 50  $\mu$ L Schritten von 0 bis 200  $\mu$ L an zugegebener Oxidationslösung pro 25 mL Farbstoffhydrolysat. Da sich Gelb D sehr gut mit den verwendeten SPE-Kartuschen anreichern lässt, können durch deren Verwendung insgesamt 50 mL behandelte Probe auf ein Volumen von 1,5 mL reduziert werden. Das entspricht einer Aufkonzentrierung um den Faktor 33.

Die mittels HPLC-DAD durchgeführte Reaktionskontrolle ist in Abbildung 16 gezeigt. Durch die starke Anreicherung des Farbstoffs ist die HPLC-Säule überladen, was an den DAD-Signalen bei  $t_R = 17,55$  min zu erkennen ist. Die Peakform bei den unbehandelten oder nur schwach behandelten Proben ist nicht optimal. Allerdings kann erwartet werden, dass durch die Probenanreicherung ebenfalls die Abbauprodukte aufkonzentriert werden und deren Detektion somit erleichtert wird. Im Hinblick auf eine direkte Vergleichbarkeit der TIC-Chromatogramme bezüglich des Abbaus ist die y-Achse in ihrer Höhe festgehalten. In der unbehandelten Probe, diese entspricht dem hydrolysierten Farbstoff, lässt sich ein sehr intensives Signal bei von  $t_R = 17,55$  min nachweisen, ein weiteres, mittelgroßes Signal liegt bei  $t_R = 25,23$  min. Hinzu kommen eine Anzahl kleiner Signale. Nach Zugabe von 50  $\mu$ L Oxidationslösung ist die Intensität des Hauptsignals verringert, aber noch stark. Das mittelgroße Signal bei  $t_R = 25,23$  min ist komplett verschwunden. Neu hinzugekommen ist ein deutliches

Signal bei  $t_R = 28,31$  min. Der Peak bei  $t_R = 19,81$  min scheint auf den ersten Blick ebenfalls neu, er könnte jedoch auch unter dem großen Hauptsignal verborgen gewesen sein. Das Absorptionsspektrum gibt hierzu weitere Informationen. In der Hydrolysatprobe kann an dieser Position ein Absorptionsmaximum bei 447 nm registriert werden. Die mit PDS behandelte Probe weist hier ein Absorptionsmaximum bei 473 nm auf, das um den Faktor zehn intensiver ist. Es handelt sich demnach um ein neues Produkt. Bei Zugabe größerer Mengen an Peroxodisulfat stellt sich schnell eine deutliche Entfärbung ein. Mit 200  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung ist nahezu kein Signal mehr detektierbar, lediglich bei Retentionszeiten um elf Minuten ist noch ein schwaches Signal zu erkennen, dessen Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich liegt. Die Probe ist nicht mehr farbig und entspricht den Anforderungen des Anhangs 38.

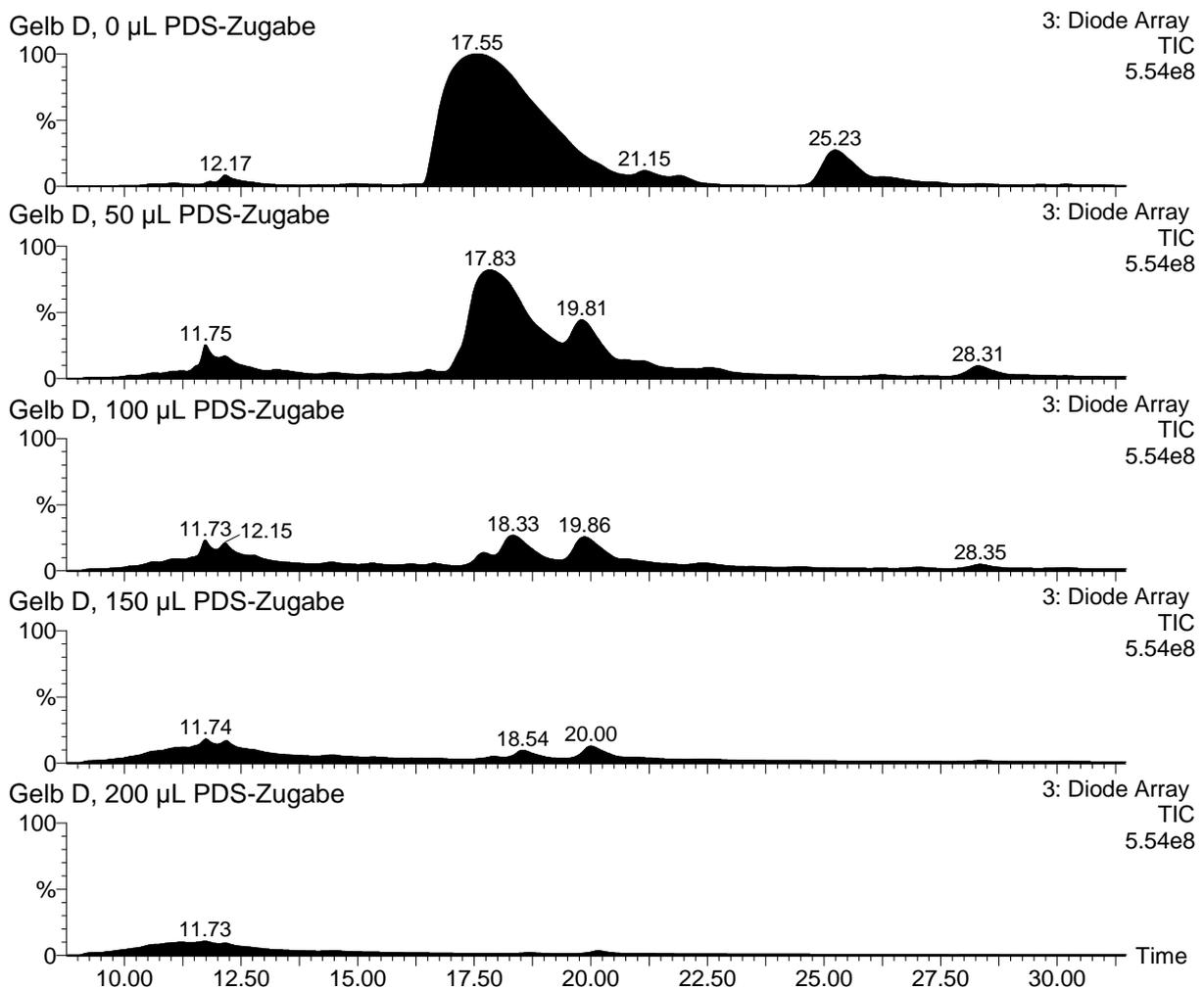
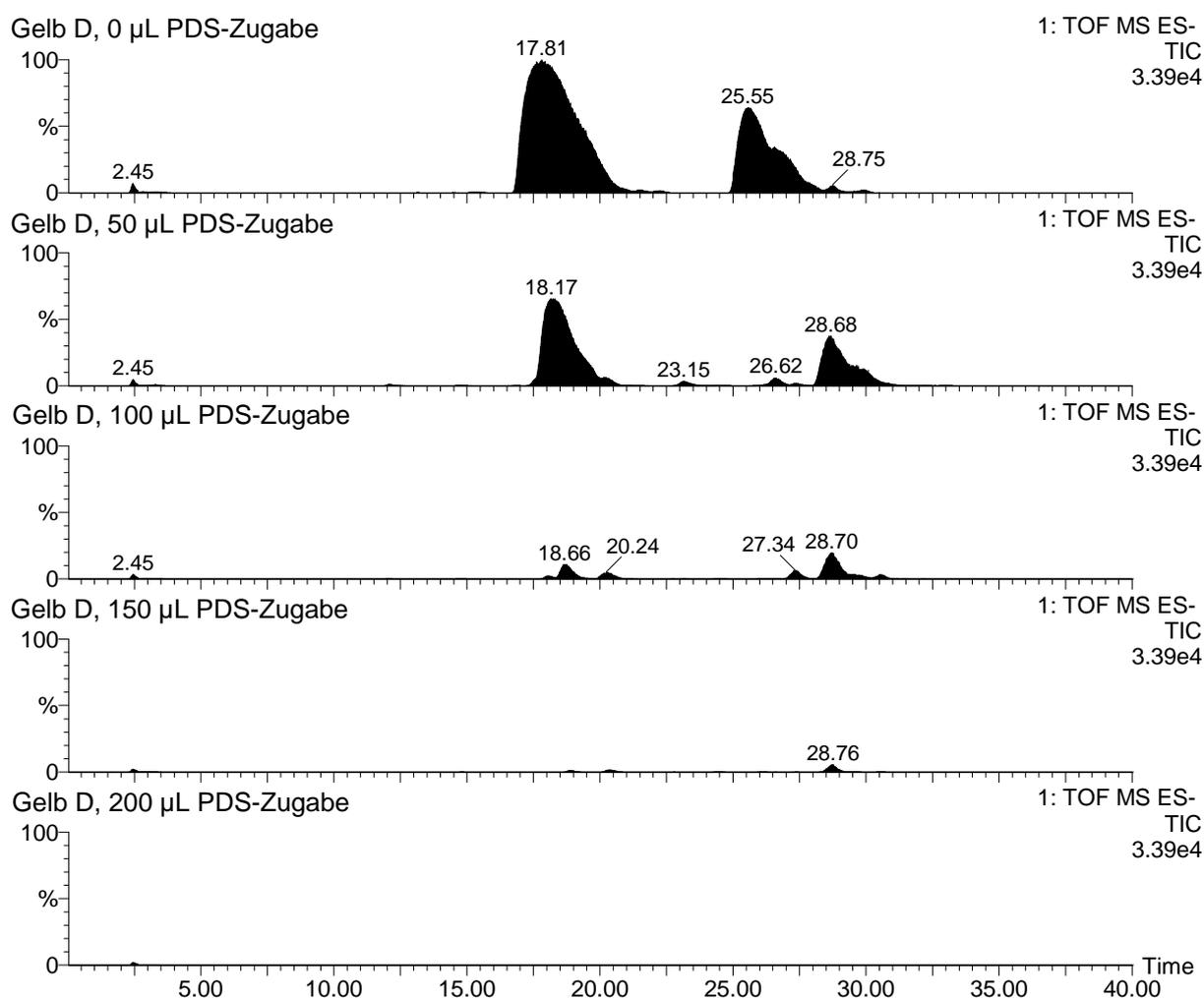


Abbildung 16: DAD-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat mit zunehmender Menge an zugesetzter Peroxodisulfatlösung; 50 mL SPE-Anreicherung, y-Achsen festgehalten

Die in Abbildung 17 dargestellten Total-Ionen-Ströme (TIC) der massenspektrometrischen Untersuchung liefern ein entsprechendes Bild. Es lässt sich, bedingt durch den Transport der Analyten, eine zeitliche Differenz zwischen Dioden Array Detektor und Massenspektrometer von etwa 0,4 Minuten beobachten. Ein Wert, der auch bei den anderen Messungen auftritt. Die zum hydrolysierten Farbstoff gehörenden Komponenten werden schnell abgebaut. Die mittelgroße Komponente reagiert wesentlich schneller auf die Zugabe des Oxidationsmittels und ist bei Zugabe von 150  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung so gut wie nicht mehr detektierbar.

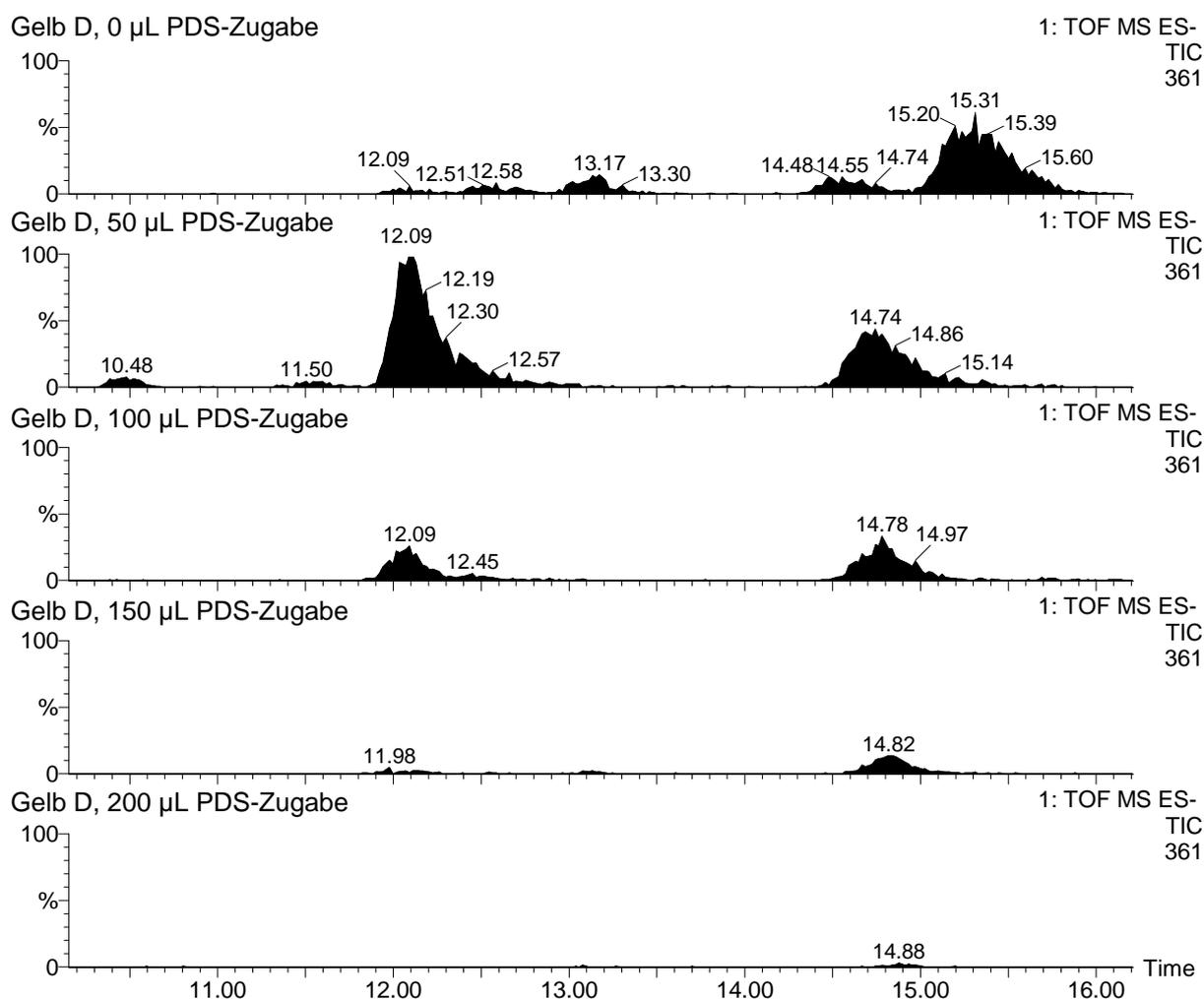


**Abbildung 17: TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; ESI-negativ Modus; SPE-Anreicherung, y-Achsen festgehalten**

Der Aufbau einer Substanz bei  $t_R = 28,68$  min ist deutlich zu erkennen. Das im DAD-Chromatogramm intensive Signal bei  $t_R = 19,81$  min besitzt allerdings nicht die entsprechende Größe. Zu beobachten ist lediglich ein schwacher Peak bei etwa 20 Minuten, bei dem es sich um eine Spezies handeln dürfte, die sich unter den gewählten Bedingungen nur schlecht ionisieren lässt. Nach der Behandlung mit 200  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung ist im Massenspek-

trometer nur noch das Rauschen des Untergrundes zu detektieren. Auch im hochpolaren Bereich sind keine Signale mehr zu beobachten.

Bei entsprechender Verstärkung werden im Untergrund der einzelnen Chromatographieläufe (Abbildung 17) zahlreiche kleine Signale sichtbar, die Abbauprodukten zuzuordnen sind. In Abbildung 18 sind die Ausschnitte zwischen 10 und 16 Minuten dargestellt. Die y-Achse ist für einen direkten Vergleich festgehalten worden, die maximale Höhe beträgt hierbei 361 Counts, was etwa einem Prozent der Darstellung in Abbildung 17 entspricht.



**Abbildung 18:** TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; ESI-negativ Modus; SPE-Anreicherung; Vergrößerung des Ausschnitts zwischen 10 und 16 Minuten

Am Beispiel der Komponente mit einer Retentionszeit von  $t_R = 12,09$  min ist zu sehen, wie Produkte kurzfristig aufgebaut, aber ebenso schnell wieder abgebaut werden. Die Intensität der Signale zeigt an, dass die Produkte lediglich in Spuren vorliegen. Dies bedeutet, dass die Reaktivität der Produkte gegenüber dem Oxidationsmittel oder einer daraus gebildeten reaktiven Spezies von gleicher Größe ist wie die des Farbstoffhydrolysats.

Die genaue Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen findet sich in der nachstehenden Tabelle 9. Wie schon aus den vorhergehenden Chromatogrammen zu vermuten war, weisen die Signale, die dem hydrolysierten Farbkörper zuzuordnen sind (siehe gelb unterlegte Spalte) teilweise sehr große Intensitäten auf; das Limit für eine lineare Detektion ist hierbei erreicht bzw. überschritten.

Retentionszeiten [min]	Masse	Peakflächen					organ. Chlor
		vor Behandlung mit PDS	nach Behandlung mit PDS (840 mM) zugesetzte Volumina und sich ergebendes, molares Farbstoffhydrolysat / PDS-Verhältnis				
		Hydrolysat	50 µL [1 : 2,3]	100 µL [1 : 4,7]	150 µL [1 : 7,0]	200 µL [1 : 9,3]	
11,90	201 Da	0	18	0	0	0	Nein
15,69	216,5 Da	0	6	11	0	0	Ja
12,51	230,5 Da	29	0	0	0	0	Ja
12,09	238,5 Da	122	742	130	20	0	Ja
13,17	242 Da	98	2	0	0	0	Nein
20,23	260,5 Da	2	44	47	11	0	Ja
17,94	292,5 Da	44000	15200	924	73	2	Ja
14,86	294 Da	118	135	181	103	12	Ja
21,58	300,5 Da	0	55	71	10	3	Ja
21,44	314,5 Da	358	17	0	0	0	Ja
16,56	418 Da	0	171	6	0	0	Ja
17,15	434 Da	0	8790	212	79	7	Ja
28,68	462 Da	4480	80100	26500	4340	16	Ja
17,47	478 Da	0	1990	7850	289	0	Ja
31,97	504 Da	33	4	0	0	0	Ja
25,55	506 Da	213000	34300	1600	95	0	Ja
17,60	522 Da	0	781	754	122	5	Ja
12,58	542 Da	18	0	0	0	0	Ja
21,54	550 Da	773	153	0	0	0	Ja
17,81	586 Da	242000	96700	8130	614	2	Ja
16,77	602 Da	4	5700	5450	1020	47	Ja
21,50	630 Da	851	75	0	0	0	Ja

**Tabelle 9: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS**

Es lässt sich feststellen, dass nahezu alle Produkte entweder direkt aus dem Hydrolyseprozess oder aus einer sehr frühen Phase der Oxidation stammen. Es lassen sich zum Teil die gleichen Abbauprodukte nachweisen wie bei Marine C. Es handelt sich im Einzelnen um die Produkte mit den Massen 201 und 242 Da. Die im Fall von Gelb D Hydrolysat vorliegenden Konzentrationen sind jedoch sehr klein im Vergleich mit denen von Marine C. Diese beiden Produkte weisen den Verlust des organischen Chlors auf. Bei allen anderen Pro-

dukten kann anhand des Chlorisotopenmusters das Vorhandensein des Halogens sicher nachgewiesen werden. Ausgehend von der Ergebnissen der Tabelle 9 lässt sich interpolieren, dass ab einem molaren Farbstoffhydrolysat / PDS-Verhältnis von 1 : 10 die Totalmineralisation des Farbstoffs vorliegt.

Die tabellarische Darstellung des TIC-Chromatogramms lässt vermuten, dass bei  $t_R = 28,68$  min eine neue Substanz entstanden oder zumindest in ihrer Konzentration deutlich angestiegen ist. Die Betrachtung der DAD-Spektren stützt diese These durch unterschiedliche Absorptionsmaxima zwischen Hydrolysat und oxidiertes Probe an gleicher Stelle. Die genaue Auswertung zeigt, dass zu dieser Zeit ein Abbauprodukt mit der Masse 462 Da erscheint. Dieses ist schon in detektierbaren Mengen in der hydrolysierten Probe vorhanden; durch die oxidative Behandlung steigt die Konzentration im ersten Schritt allerdings um den Faktor 18 an. Hierbei handelt es sich um ein Zwischenprodukt, welches aufgrund seiner hohen Konzentration isoliert und mittels NMR analysiert wurde (siehe Kapitel 4.5.6: Kernresonanzmagnetische Untersuchungen).

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
201,0228	$C_8H_{10}O_4S$	201,0222	3,0
216,4905	$C_{14}H_{14}O_7N_3S_2Cl$	216,4903	0,9
230,5070	$C_{16}H_{18}N_3O_7S_2Cl$	230,5059	4,8
238,5040	$C_{16}H_{18}O_8N_3S_2Cl$	238,5034	2,5
242,0499	$C_{10}H_{13}NO_4S$	242,0487	5,0
260,5179	$C_{18}H_{22}O_9N_3S_2Cl$	260,5165	5,4
292,4975	$C_{18}H_{22}O_{11}N_3S_3Cl$	292,4974	0,3
294,0219	$C_{10}H_{14}NO_5S_2Cl$	294,0203	5,4
300,4963	$C_{18}H_{22}O_{12}N_3S_3Cl$	300,4949	4,7
314,5115	$C_{20}H_{26}O_{12}N_3S_3Cl$	314,5105	3,2
417,9938	$C_{14}H_{14}O_6N_3S_2Cl$	417,9935	0,7
433,9874	$C_{14}H_{14}O_7N_3S_2Cl$	433,9884	-2,3
462,0188	$C_{16}H_{18}N_3O_7S_2Cl$	462,0197	-1,9
478,0137	$C_{16}H_{18}O_8N_3S_2Cl$	478,0146	-1,9
504,0316	$C_{18}H_{20}O_8N_3S_2Cl$	504,0302	2,8
506,0456	$C_{18}H_{22}O_8N_3S_2Cl$	506,0459	-0,6
522,0409	$C_{18}H_{22}O_9N_3S_2Cl$	522,0408	0,2
541,9765	$C_{16}H_{18}O_{10}N_3S_3Cl$	541,9780	-2,8
550,0706	$C_{20}H_{26}O_9N_3S_2Cl$	550,0721	-2,7
586,0025	$C_{18}H_{22}O_{11}N_3S_3Cl$	586,0027	-0,3
601,9968	$C_{18}H_{22}O_{12}N_3S_3Cl$	601,9976	-1,3
630,0287	$C_{20}H_{26}O_{12}N_3S_3Cl$	630,0289	-0,3

**Tabelle 10: Abbauprodukte von Farbstoff Gelb D Hydrolysat: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Insgesamt bestätigt sich die Tatsache, dass durch vermehrte Zugabe an Oxidationsmittel der Farbstoff sehr weit abgebaut wird und letztendlich nahezu keine Bruchstücke mit den gegebenen Analysenmethoden nachweisbar sind. Gefundene Teilstücke kommen nur in geringsten Mengen vor, die nahe an der Nachweisgrenze liegen.

Die mit Hilfe des Lock-Spray-Verfahrens ermittelten Präzisionsmassen und die Zuordnungen zu den Summenformeln finden sich in Tabelle 10. Danach ist es gelungen, für alle in Tabelle 9 aufgelisteten Hydrolyse- und Abbauprodukte eine Summenformel mit hoher Sicherheit zu ermitteln.

Bei nahezu allen ermittelten Summenformeln liegen die Abweichungen zwischen Präzisionsmasse und theoretischer Masse besser als die für eine sichere Aussage notwendigen 5 ppm. Lediglich die Massen 260,5 Da und 294 Da sind um 0,4 ppm zu hoch. Bei der Masse 260,5 Da handelt es sich um eine doppelt geladene Spezies. Geht man von der Molekülmasse 522 Da aus, so ergeben sich formal die Abspaltung von  $\text{SO}_3$  aus dem Farbstoffhydrolysat und die Anlagerung eines Sauerstoffatoms. Die vorgeschlagene Struktur kann als wahrscheinlich betrachtet werden. Anders verhält es sich mit dem Produkt der Masse 294 Da, das schon bei den Untersuchungen desselben Farbstoffs mit Ozon gefunden wurde<sup>[76]</sup>. Summenformel und Struktur dieses Produkts sind eher spekulativer Art.

Ausgehend von den vorstehenden Ergebnissen lässt sich die Behandlung von Gelb D Hydrolysat mit Peroxodisulfat ein vereinfachtes Abbauschema darstellen, welches in Abbildung 19 gezeigt ist.

Die Untersuchungen stützen sich auf die gefundenen und strukturell zugeordneten Hydrolyseprodukte. Der Weg vom hydrolysierten Farbkörper durch Abspaltung kleiner Bruchstücke oder Anlagerung eines Sauerstoffs an die Azobrücke (Der Beweis der Anlagerung des Sauerstoffs an dieser Stelle erfolgt für das Produkt der Masse 478 Da im nachfolgenden Kapitel Kernresonanzmagnetische Untersuchungen) hin zu Produkten, deren chromophores System noch vollständig erhalten ist, lässt sich gut verfolgen.

Als Bruchstücke aus der Spaltung der Azobrücke können in dieser Arbeit nur drei Spezies aufgeführt werden, von denen sich bei zweien eine strukturelle Aussage machen lässt. Zu nennen sind hier einerseits das aus der Literatur bekannte 4-(2-Hydroxy-ethansulfonyl)-phenol mit der Masse 201 Da<sup>[210]</sup>, sowie das N-[4-(2-Hydroxy-ethansulfonyl)-phenyl]-acetamid mit der Masse 242 Da. Beide Produkte wurden auch schon bei den Untersuchungen des strukturell ähnlichen Marine C beobachtet. Im hier vorliegenden Fall sind die Konzentrationen sehr gering. Durch die starke Anreicherung jedoch sollten die Abbauprodukte in Mengen gefunden werden, die für weitere Untersuchungen ausreichend sind. Diese Ver-

mutung konnte nicht bestätigt werden, was einerseits auf ein tatsächliches Fehlen der Abbauprodukte zurückzuführen wäre oder sich andererseits durch Diskriminierungseffekte in der Ionenquelle des Massenspektrometers erklären ließe, insbesondere dann, wenn Spurenstoffe neben Hauptbestandteilen bestimmt werden sollen.

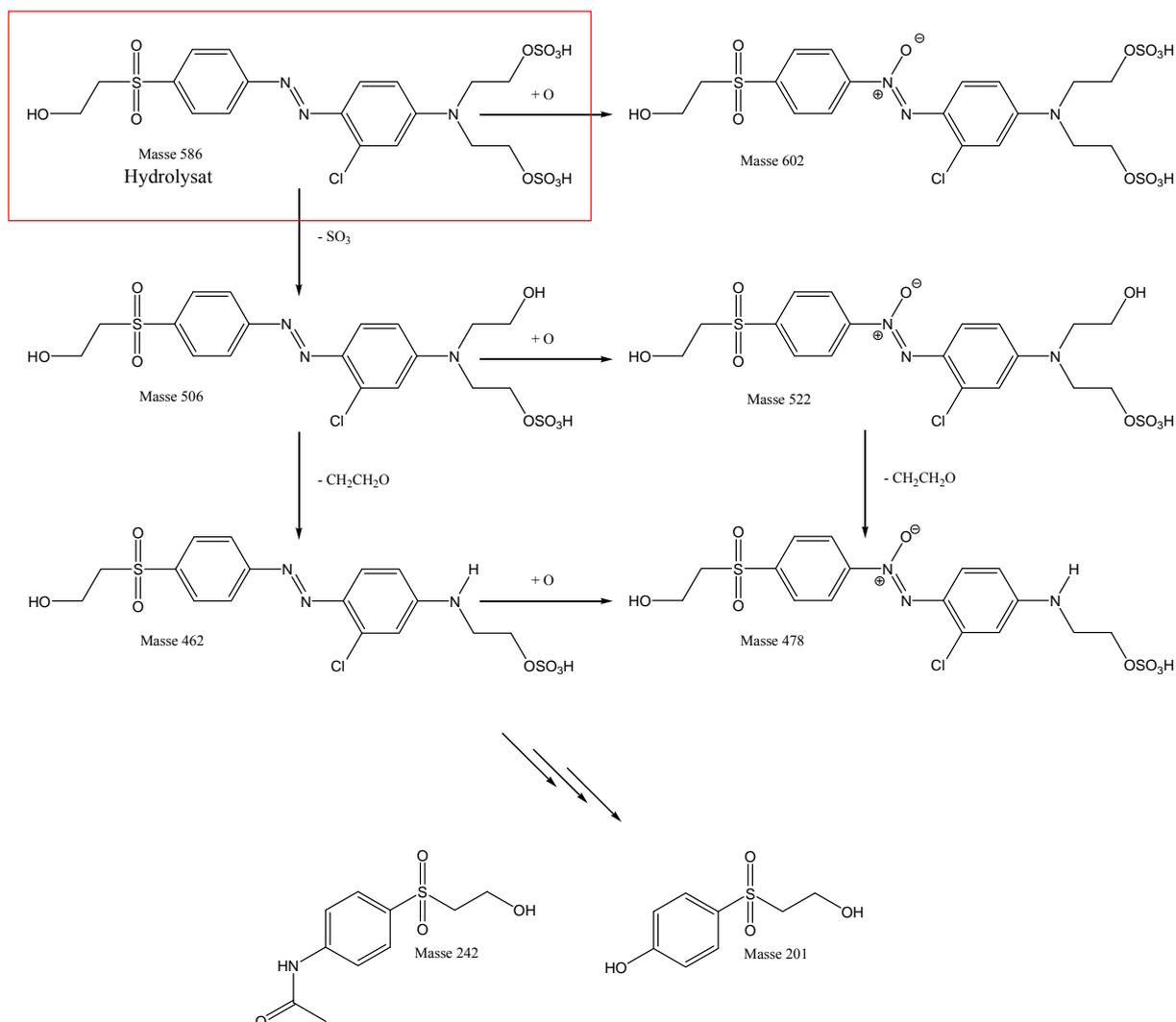


Abbildung 19: Abbauschema von Gelb D Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat

#### 4.5.6 Kernresonanzmagnetische Untersuchungen

Die analytische Technik der Massenspektrometrie liefert gute Informationen über die Masse, unter besonderen Bedingungen auch über die molekulare Zusammensetzung eines Teilchens. Es werden jedoch keine Informationen über genaue Verknüpfungen der Atome untereinander erhalten. Hinweise können hier lediglich MS-MS Experimente liefern, allerdings auch nur in einem beschränkten Rahmen.

Um genauere Informationen über die Molekülstruktur zu erhalten, bietet sich eine Untersuchung mit der NMR-Spektroskopie an, die, falls ausreichend Substanz zur Verfügung steht, sehr gute Informationen über den Aufbau eines Teilchens liefert. Das Probenmaterial ist im Fall der Abbauprodukte der Farbstoffe gleichzeitig das größte Problem, da diese nur in äußerst geringen Mengen vorkommen.

Etwas entschärft wurde das Problem durch die Möglichkeit der Vermessung der Substanzen auf einem 700 MHz-Gerät, das Messungen bei geringer Konzentration ermöglicht. Zum Erreichen der notwendigen Konzentration der zu messenden Substanzen wurde die semipräparative HPLC eingesetzt. Auf diesem Weg konnten verschiedene Abbauprodukte in bis zu 100 µg Substanz rein dargestellt werden. Diese Menge reicht aus, um auf einem 700 MHz NMR-Gerät ein Protonenspektrum aufzunehmen. Kohlenstoffspektren sind nur bei entsprechend langer Messzeit erhältlich.

Die präparative Anreicherung und anschließende hochauflösende NMR-spektroskopische Untersuchung konnte aus Zeit- und Kostengründen nur für Gelb D (C.I. Reactive Orange 96) durchgeführt werden, da die Grundstruktur des Farbkörpers relativ leicht zu analysieren ist.

Die Spektren sowie die tabellarischen Zuordnungen der Messungen sind im Anhang (Kapitel 7.1) wiedergegeben. Insgesamt konnten fünf Substanzen isoliert und analysiert werden. Hierbei handelt es sich bei den Edukten um den hydrolysierten Farbkörper mit der Masse 586 Da sowie die Anlagerung eines Sauerstoffatoms an das Hydrolysat, woraus sich rechnerisch die Masse 602 Da ergibt. Bei den Zwischenprodukten konnten die Substanzen der Masse 462 Da und 478 Da strukturell aufgeklärt werden; als fortgeschrittene Abbaustufe findet sich das Molekül mit der Masse 201 Da. Ein Vergleich mit den entsprechenden massenspektrometrischen Peakflächen (Tabelle 9) zeigt, dass die isolierten Stoffe die größten Konzentrationen bei den Edukten und Produkten aufweisen. Aus den Erkenntnissen der NMR-Aufnahmen sind diese Mengen gerade ausreichend für die Vermessung mit einem hochauflösenden Gerät. Produkte, die in noch geringeren Konzentrationen auftreten, lassen sich kernresonanzmagnetisch nur mit sehr viel größerem Anreicherungsaufwand analysieren.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des hydrolysierten Farbkörpers mit der Masse 586 Da entspricht den Erwartungen. Die aus der reaktiven Vinylsulfongruppe durch Anlagerung von Wasser entstehende Hydroxyethansulfonyl-Gruppe ist aufgrund der starken Hochfeldverschiebung der entsprechenden Protonen zu erkennen. Die weiteren  $^1\text{H}$ -Resonanzen entsprechen den üblichen Verschiebungswerten für aliphatische und aromatische Protonen.

Ebenso zeigt das Kohlenstoffspektrum keine auffälligen Shifts, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der hydrolysierte Farbkörper in der erwarteten Form vorliegt.

Interessant ist die Auswertung des Moleküls mit Masse 602 Da. Aus dem Protonenspektrum geht hervor, dass es nach Anlagerung des Sauerstoffatoms nicht zur Ausbildung einer weiteren Hydroxygruppierung kommt. Wird die Bildung eines Peroxids ausgeschlossen, so kann die Anlagerung nur an einem der beiden Stickstoffatome der Azobrücke stattgefunden haben. Die Analyse zeigt, dass die Protonen, die in direkter Nachbarschaft zur Azobrücke liegen, im Vergleich zum hydrolysierten Farbkörper, deutlich tieffeldverschoben sind. Durch den besonders starken Einfluss auf eines der Protonen, gekennzeichnet mit Nummer 14 in der Abbildung 44, kann angenommen werden, dass der Sauerstoff an dem Stickstoff der Azobrücke angelagert wurde, die der 2-Hydroxyethansulfonyl-phenyl-Gruppe benachbart ist. Die räumliche Nähe zwischen Sauerstoff und dem Proton mit Nummer 14 führt zu einer großen Tieffeldverschiebung. Die Auswirkungen wären bei einer Positionierung des Sauerstoffs an der anderen Seite der Azobrücke geringer. Der Rest des Moleküls entspricht den Erwartungen.

Die Struktur des Produktes mit der Masse 462 Da weist den Verlust eines der Schwefelsäureethylester-„Arme“ auf. Gleichzeitig wird die Bildung eines sekundären Amins mit entsprechender Tieffeldverschiebung des Protons beobachtet. Die restlichen Werte ähneln denen des hydrolysierten Farbkörpers. Auch bei dieser Probe war die Vermessung des Kohlenstoffspektrums aufgrund der zu geringen Konzentration nicht möglich.

Die Anlagerung eines Sauerstoffatoms an das Produkt der Masse 462 Da bzw. der Verlust einer Schwefelsäureethylester Funktion an der Struktur mit 602 Da liefert ein weiteres isoliertes Produkt. Die Argumentation für die strukturelle Zusammensetzung ergibt sich durch Kombination der Erkenntnisse aus den zuvor beschriebenen Molekülen. Der Sauerstoff muss ebenfalls an dem Stickstoff der Azobrücke angelagert sein, die der 2-Hydroxyethansulfonyl-phenyl-Gruppe benachbart ist, die Werte des Protonen-NMRs sind, im Vergleich zur Masse 602 Da, nahezu identisch.

Durch den Bruch der Azobrücke bildet sich die, auch später immer wieder beschriebene, Masse 201 Da aus. Die Protonenwerte entsprechen denen des hydrolysierten Farbkörpers. Obwohl es sich bei dieser Substanz um ein relativ stabiles Zwischenprodukt handelt, reichen auch hierbei die Mengen nicht für ein Kohlenstoffspektrum aus. Allerdings kann in allen Fällen anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums eine sichere Zuordnung getroffen werden.

## 4.5.7 Entfärbung von Rot F mit Peroxodisulfat

Die oxidative Entfärbung des Farbstoffs Rot F mit Peroxodisulfatlösung verlief analog der von Marine C. Nach Hydrolyse der Handelsware wurden unterschiedliche Volumina von PDS-Lösung (40 bis 200  $\mu\text{L}$  mit einer Konzentration von 200  $\text{g L}^{-1}$ ) zu 25 mL Farbstofflösung (mit einer Konzentration von 1  $\text{g L}^{-1}$ ) gegeben und im Mikrowellenofen entfärbt. Da sich der Farbstoff Rot F und die gebildeten Abbauprodukte relativ gut auf den verwendeten SPE-Kartuschen anreichern lassen, konnte das Volumen von 28 mL Reaktionslösung auf 1,5 mL verringert werden. Auf diese Weise werden die Substanzen um einen Faktor von 18 bis 19 aufkonzentriert.

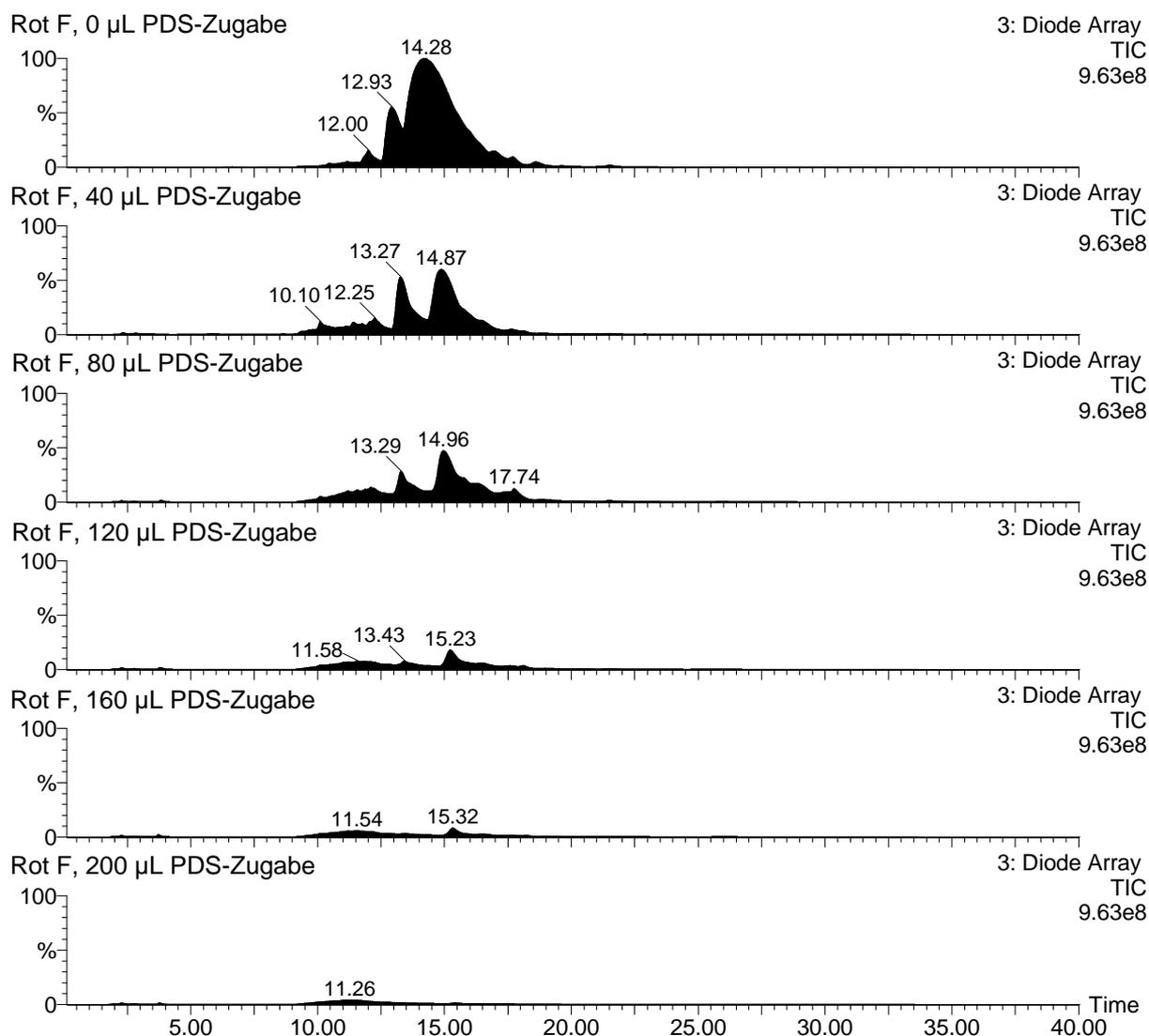


Abbildung 20: DAD-Chromatogramme von Rot F Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Der Verlauf der Entfärbungsreaktionen wurde anhand des Dioden-Array-Signals des HPLC-Detektors kontrolliert. Abbildung 20 oben zeigt das Chromatogramm der hydrolysierten, sonst aber unbehandelten Probe. Darunter folgen die oxidativ abgebauten Proben mit steigenden Zusätzen an Peroxodisulfat. Die Form der Signale speziell im Fall des unbehandelten Hydrolysats rührt von einer Überladung der Säule her. Folglich müssten die Parameter der Anreicherung oder der Probenaufgabe auf die Säule soweit geändert werden, dass eine Überladung nicht mehr auftritt. Bei dieser Vorgehensweise würden aber die Signale der in deutlich geringeren Konzentrationen auftretenden Abbauprodukte noch kleiner werden. Da diese Stoffe jedoch das Ziel der Untersuchungen sind, wurde die Überladung durch das Hydrolysat in Kauf genommen.

Nach Zugabe einer Menge von 200  $\mu\text{L}$  Peroxodisulfat bezogen auf 25 mL Hydrolysatlösung ist im DAD-Spektrum nahezu kein Signal mehr erkennbar. Das bedeutet, dass die oxidierte Probe so gut wie keine Färbung mehr aufweist. Der oxidative Abbau der Substanzen ist soweit fortgeschritten, dass die gesetzlichen Anforderungen des Anhangs 38 als erfüllt angesehen werden können.

Bei Betrachtung der Chromatogramme fällt auf, dass im Vergleich zu Marine C der Farbstoff Rot F eine etwas größere Stabilität gegenüber dem Oxidationsmittel besitzt. Die Hauptkomponenten bei etwa 13 min und 14 min verlieren zwar an Intensität, nicht aber im gleichen Ausmaß wie bei Marine C. Durch das Festhalten der y-Achsenkalierung ist ein direkter Vergleich der Chromatogramme gegeben, so dass aus den Signalhöhen und -größen eine direkte qualitative Aussage über den Abbaugrad gemacht werden kann. Leichte zeitliche Verschiebungen ergeben sich aus dem Überladungszustand der Säule und entsprechen den üblichen Werten in der HPLC. Ein Blick auf die Absorptionsspektren zeigt deutlich, dass es sich bei den zeitlich leicht verschobenen Signalen um die gleichen Substanzen handelt. Es wird aus den Chromatogrammen nicht erkennbar, ob sich im Verlauf der Behandlung neue Substanzen bilden, da keine eindeutig erkennbaren, neuen Signale erscheinen. Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten gibt hierüber mehr Aufschluss.

Die Untersuchung des Abbaus über den Total-Ionen-Strom (TIC) des Massenspektrometers liefert zusätzliche Daten und Informationen. Abbildung 21 zeigt analog die Darstellung der Chromatogramme; oben das unbehandelte Hydrolysat und darunter die Ergebnisse des Abbaus nach Zugabe unterschiedlicher Volumina an Peroxodisulfatlösung. Für die bessere Vergleichbarkeit der untereinander stehenden Chromatogramme in Bezug auf den Abbaugrad ist die y-Achse erneut festgehalten. Der geringe zeitliche Unterschied in den Retentionszeiten in Abbildung 20 und Abbildung 21 ergibt sich aus dem Aufbau der Messanord-

nung. Die auf der HPLC-Säule getrennten Substanzen passieren zunächst den Dioden-Array-Detektor und gelangen von dort aus ins Massenspektrometer. Dieser Transport zwischen den beiden Detektoren benötigt etwa eine halbe Minute. In den DAD-Chromatogrammen nicht zu erkennen sind die Signale bei einer Retentionszeit von ca. zwei Minuten, die im TIC deutlich hervortreten. Hierbei handelt es sich einerseits um die polaren, salzartigen Verbindungen, die schon als Stellmittel dem Farbstoff nach der technischen Synthese zugesetzt werden, andererseits um stark polare Abbauprodukte wie niedermolekulare Carbonsäuren und anorganische Salze. Diese mit der Totzeit der HPLC-Säule eluierenden Verbindungen absorbieren nicht im untersuchten Bereich des UV-DA-Detektors der HPLC und werden somit nicht angezeigt. Das Massenspektrometer registriert den Strom der hochpolaren Substanzen; aufgrund der geringen Molekülgröße sind allerdings keine strukturellen Aussagen über die Inhaltsstoffe möglich.

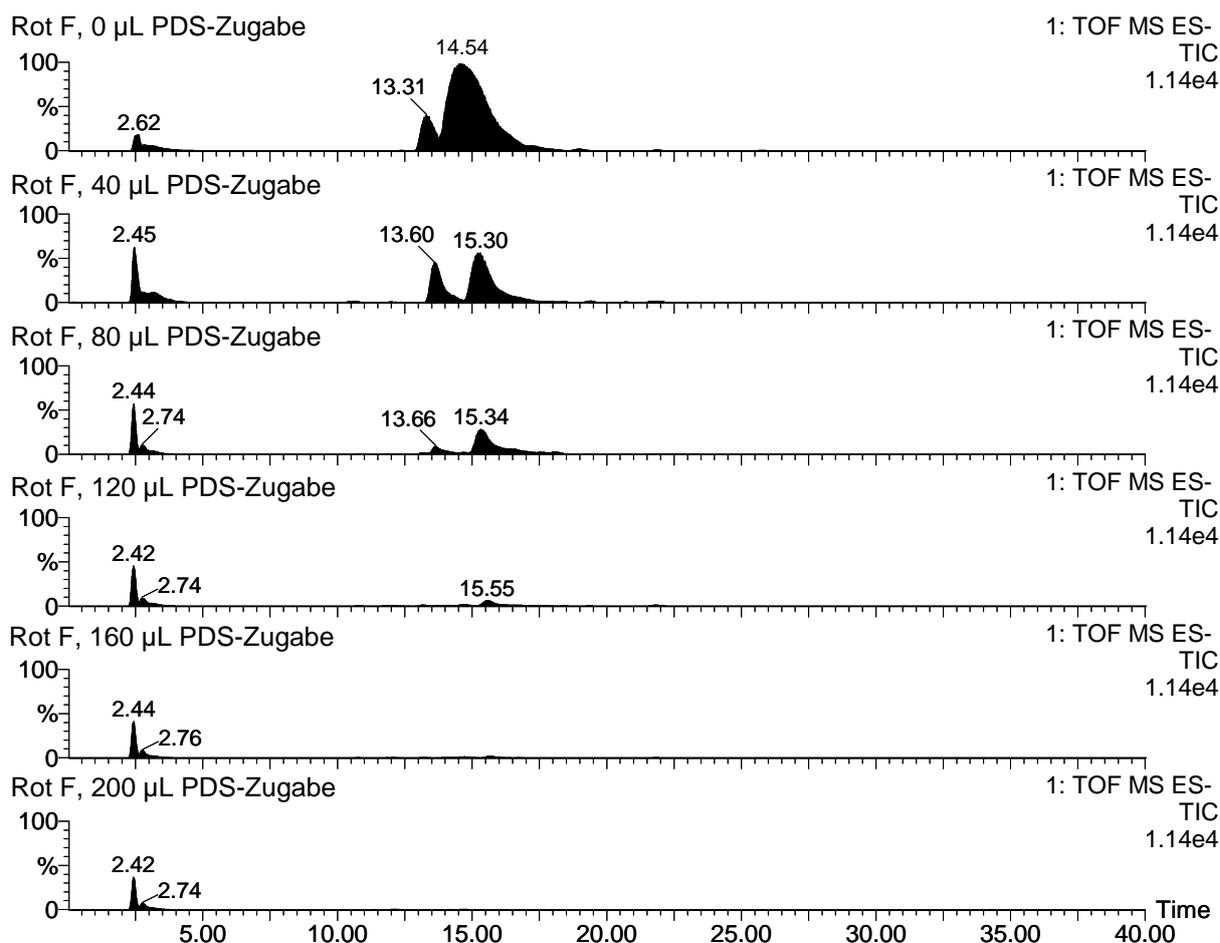


Abbildung 21: TIC-Chromatogramme von Rot F Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

In Analogie zu den Chromatogrammen in Abbildung 20 lässt sich das Verschwinden der beiden Hauptsignale mit  $t_R = 13,31$  min bzw.  $t_R = 14,54$  min feststellen. Das Auftreten größerer Mengen an Abbauprodukten wird jedoch nicht beobachtet. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung ist, bis auf die salzartigen Verbindungen, nahezu kein Ionenstrom detektierbar, die Farbstofflösungen sind annähernd vollständig abgebaut.

In Tabelle 11 befindet sich die genaue Auswertung der einzelnen massenspektrometrischen Läufe. Die Auswertung der Total-Ionen-Spuren erlaubt Aussagen über die Mengen und Konzentrationen der vorliegenden Abbauprodukte. Wie sich schon aus den DAD- und TIC-Spuren der oben stehenden Abbildungen zu erkennen ist, besitzt Rot F gegenüber Marine C eine etwas größere Persistenz. Die Totalmineralisation ist ab einem molaren Farbstoffhydrolysat / PDS-Verhältnis von ca. 1 : 9 zu erwarten.

Retentionszeiten [min]	Masse	Peakflächen					
		Hydrolysat	nach Behandlung mit PDS (840 mM) zugesezte Volumina und sich ergebendes, molares Farbstoffhydrolysat / PDS-Verhältnis				
			vor Behandlung mit PDS	40 $\mu\text{L}$ [1 : 0,9]	80 $\mu\text{L}$ [1 : 1,8]	120 $\mu\text{L}$ [1 : 2,7]	160 $\mu\text{L}$ [1 : 3,6]
12,20	201 Da	0	45	119	227	168	156
13,45	231 Da	0	12	575	797	443	120
13,94	279,5 Da	779	1080	443	43	0	0
13,60	286,5 Da	19	6	4	0	0	0
19,33	291,5 Da	221	0	0	0	0	0
15,06	300,5 Da	12650	5500	1680	718	198	4
13,94	332,5 Da	64	0	0	0	0	0
13,09	558 Da	73	0	0	0	0	0
13,94	560 Da	22100	11100	2010	60	0	0
13,60	574 Da	4	2	0	0	0	0
19,33	584 Da	467	0	0	0	0	0
15,06	602 Da	37480	20300	7850	1770	350	3
13,94	666 Da	91	4	0	0	0	0

**Tabelle 11: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach der PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS**

Ein intermediärer Anstieg der Konzentration ist bei drei Substanzen zu beobachten. Bei der Spezies mit der Masse 279,5 Da handelt es sich um ein doppelt geladenes Molekül, das die Masse 560 Da besitzt. Letzteres ist bereits im unbehandelten Hydrolysat in großen Mengen vorhanden und wird bei Zugabe von größeren Mengen Oxidationsmittel kontinuierlich abgebaut. Dass es kurzfristig zu einer Erhöhung der Konzentration dieser doppelt geladenen Spezies kam, war nicht zu erwarten und ist möglicherweise auf eine Ungenauigkeit in

der Messung bzw. in der Auswertung zurückzuführen. Bei den Substanzen mit  $t_R = 12,20$  min (201 Da) bzw.  $t_R = 13,45$  min (231 Da) handelt es sich um Abbauprodukte, die nur in geringen stationären Konzentrationen auftreten. Bei Zugabe von 120  $\mu\text{L}$  PDS-Lösung erreichen beide Substanzen ein Maximum. Weitere Abbauprodukte sind nicht zu beobachten. Alle zusätzlichen in Tabelle 11 aufgeführten Spurenstoffe sind auf das Hydrolysat zurückzuführen.

In Tabelle 12 sind die ermittelten Präzisionsmassen und die Zuordnung zu einer Summenformel dargestellt. Durch die hohe Massengenauigkeit des Spektrometers ist es auch im Fall des Farbstoffs Rot F und daraus gebildeter Abbauprodukte gut möglich, eine solche Zuordnung zu treffen. Die Kenntnis der Ausgangsstruktur und Analogien zum Abbau anderer Farbstoffe erlauben die Vorhersage von typischen Reaktionen bei der oxidativen Behandlung, aus denen dann auf Zusammensetzung und Struktur der Produkte geschlossen werden kann. Für alle in Tabelle 11 aufgeführten Substanzen wurde eine Summenformel bestimmt; die Abweichung von theoretischer Masse und Präzisionsmasse beträgt überwiegend  $< 5$  ppm. Lediglich bei der Masse 291,5 Da liegt die Abweichung geringfügig höher. Da es sich bei diesem Molekül um eine doppelt geladene Spezies basierend auf der Masse 584 Da handelt und diese wiederum direkt der reaktiven Form des Farbstoffs zugeordnet werden kann, ist die dargestellte Summenformel als sicher anzusehen. Die Abweichungen lassen keinen Trend erkennen.

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
201,0222	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$	201,0222	0,0
231,0333	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_5\text{S}$	231,0327	2,6
279,5013	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$	279,5013	0,0
286,4921	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{S}_3$	286,4909	4,2
291,5028	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$	291,5013	5,1
300,5060	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{S}_3$	300,5065	-1,7
332,4869	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{14}\text{N}_3\text{S}_4$	332,4875	-1,8
557,9971	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$	557,9947	4,3
560,0102	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$	560,0104	-0,4
573,9899	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{S}_3$	573,9896	0,5
584,0086	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$	584,0104	-3,1
602,0190	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{S}_3$	602,0209	-3,2
665,9800	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{14}\text{N}_3\text{S}_4$	665,9828	-4,2

**Tabelle 12: Abbauprodukte von Rot F nach PDS-Behandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Über den Farbstoff Rot F, in der Literatur unter den Namen Remazol Brilliant Red 5B oder auch C.I. Reactive Red 35 beschrieben, ist bislang wenig veröffentlicht worden <sup>[213,214]</sup>.

Zum oxidativen Abbau oder anderweitigen Abbaureaktionen des Farbkörpers lassen sich keine Informationen finden. Ein direkter Vergleich der eigenen Ergebnisse ist somit nicht möglich. Jedoch lassen sich Analogieschlüsse aus ähnlichen Farbstoffen wie dem bereits beschriebenen Marine C (Reactive Black 5) ziehen. Der Farbstoffgrundkörper ist in beiden Fällen sehr ähnlich, bei Marine C handelt es sich um eine Disazo- und bei Rot F um eine Monoazo-Verbindung. Ferner liegt der Naphtholgrundkörper, die so genannte H-Säure, bei Rot F in einer acetylierten Form vor. Weitere Unterschiede bestehen in der Anfügung einer Methoxygruppe an der Reaktivankerseite und einer metaständigen Positionierung des Ankers zur Azobrücke. Diese Unterschiede sind bei der Vorhersage von Abbaustrukturen auf Basis der Erkenntnisse von Reactive Black 5 jedoch nur von geringer Bedeutung.

Basierend auf Tabelle 12 und den Kenntnissen über die Struktur des Farbstoffkörpers können für einige Hydrolyse- und Abbauprodukte Strukturen vorgeschlagen werden. Eine Übersicht der so ermittelten Molekülstrukturen findet sich in Abbildung 22. Die nur im Hydrolysat auftretende Masse von 584 Da entspricht der Reaktivform des Farbstoffs mit einer Vinylsulfonankergruppe. Dieses ist gleichzeitig ein Indiz dafür, dass die Hydrolyse nicht vollständig abgelaufen ist. Im Vergleich zum Hydrolysat, dem die Masse 602 Da entspricht, liegen noch etwa 5 % des Farbstoffs mit einem Vinylsulfonanker vor.

Ausgehend vom Hydrolysat ist der Verlust der Acetylgruppe zu beobachten, so dass ein Molekül der Masse 560 Da entsteht. In Analogie zu den Ergebnissen von Marine C und den Publikationen von *Pham* und *Conneely* kann man bei dem Produkt mit der Masse 558 Da von einem Verlust zweier Wasserstoffe und der Ausbildung einer schon beschriebenen Isoxazol-Ringstruktur ausgehen <sup>[210,211]</sup>. Von dieser Struktur aus gelangt man, wahrscheinlich über mehrere nicht nachgewiesene Schritte zu den bereits beschriebenen Bruchstücken mit der Masse 201 Da und mit 231 Da. Es ist unwahrscheinlich, dass die Masse 201 Da strukturell mit dem Produkt von Marine C identisch ist, da hierbei der 2-Hydroxy-ethansulfonyl-Rest sowie die Azobrücke paraständig am Phenylring angeordnet sind. Bei Rot F ist die Stellung der beiden Phenylliganden metaständig, in para-Position befindet sich die Methoxygruppe. Um die gleiche Struktur wie bei Marine C zu erhalten, müsste die Methoxygruppe durch OH substituiert werden. An der ehemaligen Position der Azobrücke müsste ferner kein neuer Substituent zu finden sein. Die Abspaltung der Methoxygruppe bei gleichzeitiger Umwandlung der Azobrücke zu einer Hydroxylgruppe ist wahrscheinlicher, so dass sie metaständig zur hydrolysierten Ankergruppe angeordnet wäre. Hierfür gibt es allerdings keinen Beweis, da das Substitutionsmuster mittels ESI-Massenspektrometrie nicht ermittelt werden kann. Aus diesem Grund wird die OH-Gruppe in ihrer Position in Abbildung 22 nicht genau definiert.

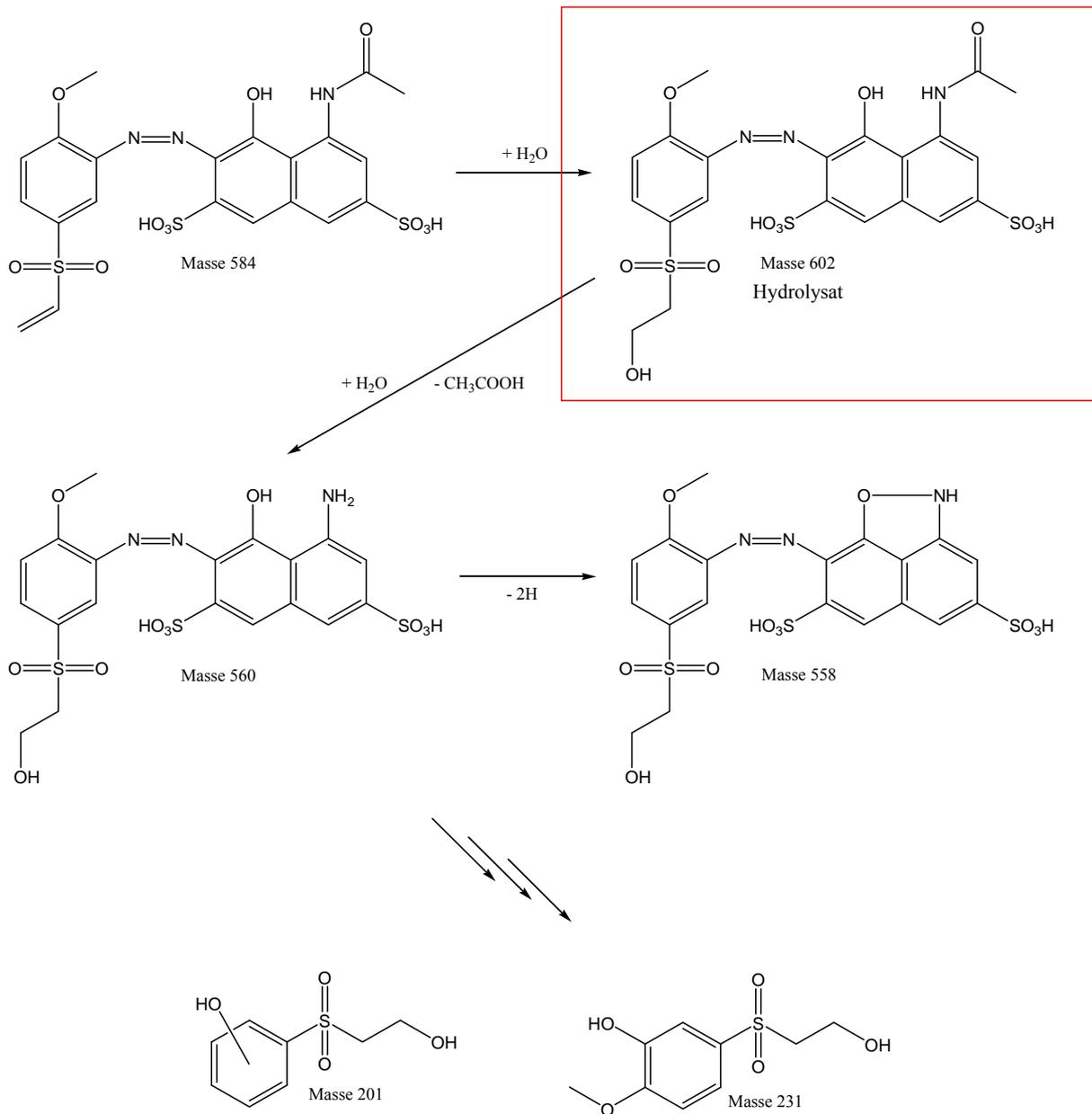


Abbildung 22: Abbauschema von Rot F Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat

## **4.6 Entfärbung mit Baylase® RP**

### 4.6.1 Entfärbungsverfahren

Das Baylase® RP-System (LANXESS AG, Leverkusen) besteht aus zwei Komponenten, dem Enzym Baylase® RP und einem Prozessregulator, Baylase® Assist RP 01. Das System wird in der Textilfärberei eingesetzt, um den sehr zeit- und energieintensiven Auswaschprozess nach einer Baumwollreaktivfärbung zu verkürzen. Dieses geschieht über eine Entfärbung der Waschflotte in Gegenwart des gefärbten Textils. Die entfärbende Wirkung des Enzymsystems beschränkt sich dabei auf das im Waschwasser befindliche Farbstoffhydrolysat, der auf der Faser fixierte Farbstoff wird nicht angegriffen. Auf diese Weise gelingt es, die Anzahl der normalerweise benötigten Spülbäder deutlich zu reduzieren.

Genauere Angaben über die Zusammensetzung des Baylase® RP-Systems wurden vom Hersteller nicht gemacht. Das Mengenverhältnis der Komponenten Baylase® RP und der Baylase® Assist RP 01 liegt bei 1:4 (v/v). Zur Behandlung eines Liters eines Farbstoffhydrolysats mit den unten angegebenen Konzentrationen werden 250 µL Baylase® RP sowie 1.000 µL Baylase® Assist RP 01 benötigt.

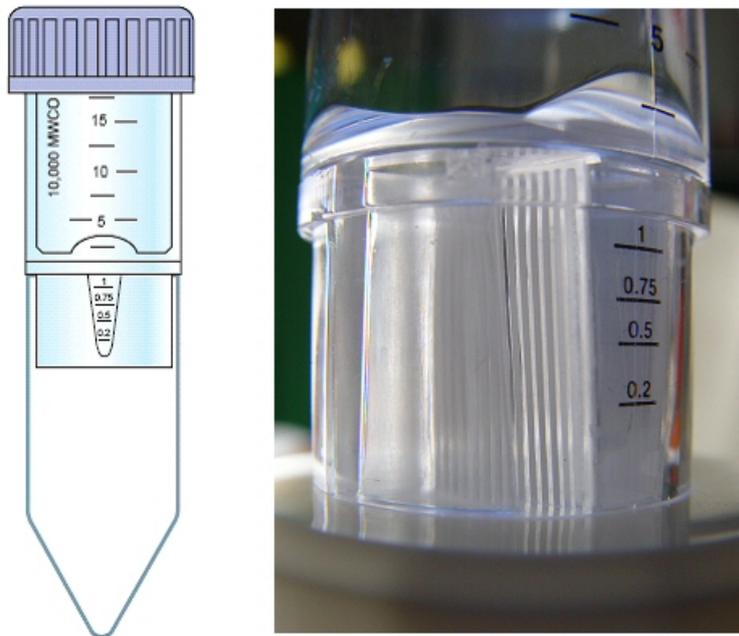
Durch Variation der Einwirkzeit des Enzyms (Probennahme nach 0, 10 und 20 Minuten sowie nach 24 Stunden) kann der Farbstoffumsatz verändert werden, was auch zu Änderungen in der Zusammensetzung der Zwischen- bzw. Abbauprodukte führen kann.

### 4.6.2 Aufarbeitung der Proben – Entfernung des Enzyms

Nachdem die Farbstoffhydrolysate mit dem Baylase® RP-System entfärbt wurden, enthalten die Proben noch das Enzym. Um später eine verlässliche Aussage über die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (Kinetik) zu ermöglichen, muss die Gesamtreaktion gestoppt und das Enzym quantitativ aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Hierdurch kann gleichzeitig gewährleistet werden, dass die Analytik mittels LC-MS ohne Störungen durch das Enzym ablaufen kann.

Die Abtrennung des Enzyms mittels Festphasenextraktion und dabei in einem Arbeitsschritt die Probe anzureichern ist nicht möglich, da das Enzym auch im Eluat der verwendeten SPE-Kartusche vorliegt. Bei der Membranfiltration wird die Probe mittels einer Zentrifuge durch eine Membran gepresst, die in verschiedenen Porengrößen erhältlich ist. Getestet wur-

den Membranen (Abbildung 23), die für Moleküle kleiner als 3.000, 5.000 und 10.000 Dalton durchlässig sind. Experimente haben ergeben, dass bei einer 10.000 Da Membran kleine Mengen des Enzyms durch diese Membran gelangen können. Geringe Enzymmengen stören die LC-MS-Analytik nicht, allerdings verfälschen sie die Ergebnisse bei den kinetischen Untersuchungen. Versuche mit 3.000 Da und 5.000 Da Membranen führten zu dem Ergebnis, dass das Enzym quantitativ zurückgehalten wird. Allerdings wurden auch Teile des Farbstoffs bzw. der Abbauprodukte an der Membran abgetrennt. Ein weiterer Nachteil besteht in der nur einmaligen Verwendung dieser Membranen und den damit verbundenen Kosten. Speziell bei der Vorbereitung einer großen Zahl von Proben ist dies ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Auch die Zeit zwischen Probennahme und Abtrennung des Enzyms ist zu berücksichtigen. Zur Verarbeitung größerer Probenmengen müssen die Proben gesammelt werden, bis die Abtrennung mit einer gekühlten Zentrifuge vorgenommen werden kann. Trotz der Lagerung der Proben bei 0 °C kann eine Weiterreaktion der Substanzen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.



**Abbildung 23: Membranen zur Abtrennung des Enzyms**

Als gleich gut geeignet erweist sich eine großflächige Membran aus gleichem Material und mit gleicher Trennleistung. Ein solcher Aufbau ist in Abbildung 24 gezeigt. Die Lösung wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe transportiert, eine Membran wird von der Lösung überströmt und lässt die gereinigte Probe passieren. Eine Mehrfachverwendung der Membran ist möglich. Vorteilhaft ist auch die Möglichkeit des direkten Einsatzes nach der Probennahme. Nach der Lagerung auf Eis kann das Enzym zeitnah entfernt werden, was insbesondere für kinetische Untersuchungen günstig ist.



**Abbildung 24: Peristaltikpumpe und Membran zur Enzymabtrennung**

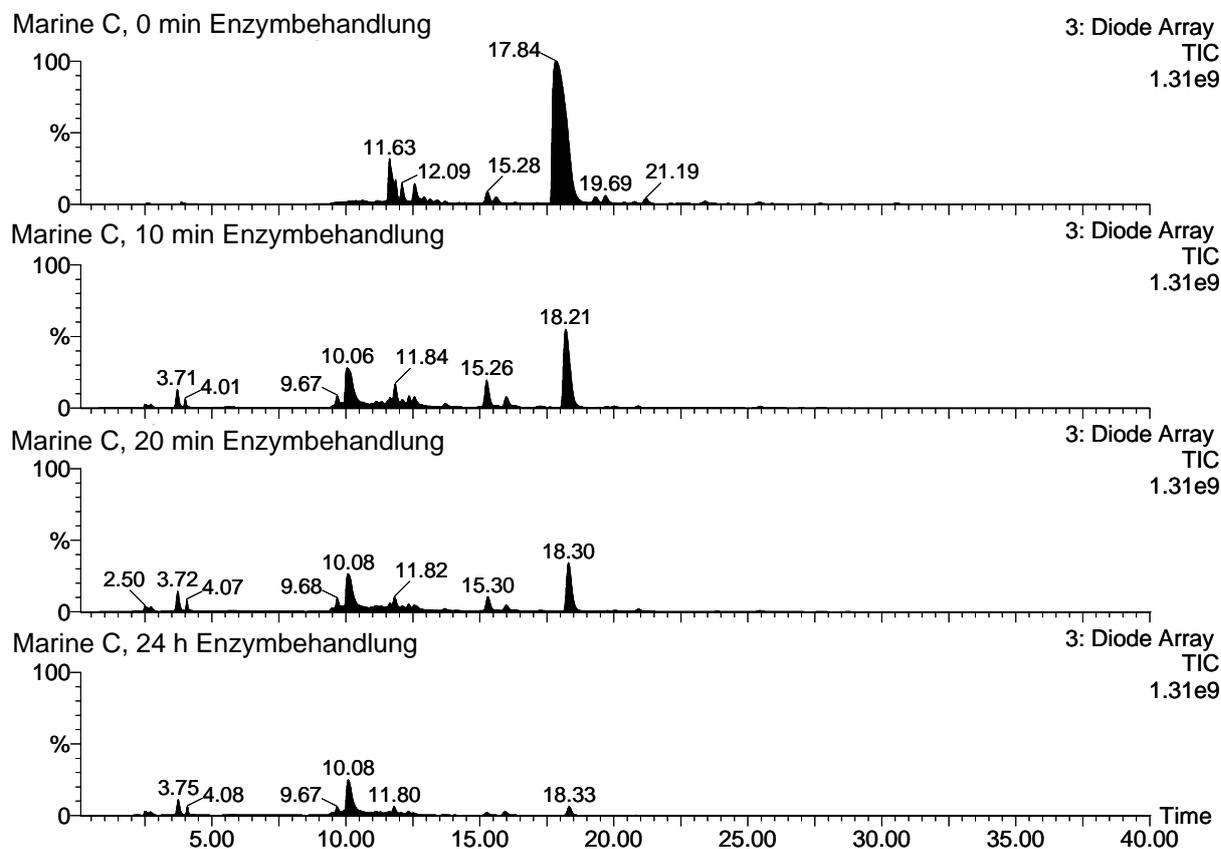
Speziell durch den Einsatz geringerer Konzentrationen an Farbstoff ist auch bei einer enzymatischen Oxidation nur mit geringen Mengen an Zwischen- und Abbauprodukten zu rechnen. Daher wurde analog der Oxidationsverfahren mit Peroxodisulfat ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Die Festphasenextraktion führt bei einer Verwendung von 50 mL anzureichernder Probe zu einer um den Faktor 33 angereicherten Lösung.

### 4.6.3 Entfärbung von Marine C mit Baylase<sup>®</sup> RP

Im Gegensatz zur oxidativen Entfärbung der Farbstoffe mit Peroxodisulfat, bei der aufgrund des geschlossenen Versuchsaufbaus unterschiedliche Entfärbungsstufen durch unterschiedliche Mengen an Oxidationsmittel erreicht werden konnten, besteht bei der enzymatischen Entfärbung die Möglichkeit der kontinuierlichen Beobachtung. Es handelt sich um ein offenes System, aus dem in definierten Zeitabständen Proben entnommen werden können. Die Konzentration an Enzym- bzw. Assistlösung bleibt hierbei konstant, soweit diese Stoffe nicht selbst einem oxidativen Abbau unterliegen. Für kinetische Untersuchungen wurden insgesamt vier Proben vor der Behandlung (0 min) sowie nach 10 und 20-minütiger und schließlich nach 24-stündiger Behandlung gezogen.

Im Reaktionsgemisch beträgt die Farbstoffkonzentration  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Diese Konzentration ist um den Faktor 10 niedriger als bei der chemischen Oxidation. Da anzunehmen war, dass daher auch die Abbauprodukte in einer ca. zehnfach geringeren Konzentration vorliegen, war eine intensive Anreicherung der Produkte vorzunehmen. Nach Abtrennung des Enzyms mittels Membranfiltration erfolgte die Aufkonzentrierung mit Hilfe einer SPE-Kartusche.

50 mL des Hydrolysats bzw. der enzymatisch behandelten Lösungen wurden jeweils angereichert. Nach Einengen auf die typische HPLC-Vial-Menge von 1,5 mL entspricht das einer Aufkonzentrierung etwa um den Faktor 33.



**Abbildung 25: DAD-Chromatogramme von Marine C vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten**

Die anschließenden chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen entsprechen in ihrer Art der zum oxidativen Abbau mit Peroxodisulfat beschriebenen Vorgehensweise. Die Effizienz und der Fortschritt des Entfärbvorgangs werden erneut mittels der DAD-Chromatogramme der HPLC betrachtet. Abbildung 25 zeigt die vier vermessenen Lösungen mit festgehaltener y-Achse für den direkten Vergleich. Zu beobachten ist, dass sich im Gegensatz zu der oxidativen Behandlung des Farbstoffs Marine C mit Peroxodisulfat keine vollständige Entfärbung des Hydrolysats einstellt. Das intensive Signal bei  $t_R = 17,84$  min im Hydrolysat ist in Spuren auch noch nach 24-stündiger Behandlungszeit festzustellen. Mehrere Abbauprodukte lassen sich schon aus dem DAD-Chromatogrammen erahnen. Bei  $t_R = 10,08$  min und  $t_R = 11,84$  min werden deutlich Signale sichtbar, die im unbehandelten Hydrolysat so nicht feststellbar sind. Ferner sind bei einer Retentionszeit von etwa vier Minuten eine Anzahl von salzartigen, polaren Verbindungen zu beobachten. Nach der Behandlungszeit von 24 Stunden erscheint die Probe stark entfärbt. Die Komponente bei

$t_R = 10,08$  min ist zwar in größeren Mengen vorhanden, durch ihre Absorption bei 222 nm trägt sie jedoch nicht zu einem farblichen Eindruck der Probe bei. Die gesetzlichen Anforderungen des Anhangs 38 können nach 24-stündiger Enzymbehandlung als erfüllt angesehen werden.

Die genauere Untersuchung der Abbauprodukte erfolgte über die massenspektrometrische Detektion und Betrachtung der Total-Ionen-Ströme. Abbildung 26 zeigt den relevanten Polaritätsbereich der zu erwartenden Produkte. Der Bereich bis zehn Minuten ist den sehr polaren Verbindungen vorbehalten, die hauptsächlich im so genannten Salzpeak bei etwa vier Minuten detektiert werden. Eine genaue Analyse der in diesem Bereich detektierten Stoffe ist beispielsweise mit der Ionenchromatographie möglich. Entsprechende Experimente, exemplarisch an ozonierten Proben durchgeführt, haben zur Aufklärung einiger Komponenten geführt, die als kurzketzige Carboxylate und als Sulfat, Phosphat oder Nitrat ermittelt wurden <sup>[76]</sup>. Da das hier verwendete Massenspektrometer keine Informationen über die Zusammensetzung des Salzpeaks liefern kann, wird dieser Bereich in den entsprechenden Chromatogrammen ausgeblendet.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse entsprechen im Großen und Ganzen den Vermutungen, die schon aus den DAD-Chromatogrammen abgeleitet werden konnten. Der hydrolysierte Farbstoff baut sich bei der enzymatischen Behandlung nur relativ langsam ab. Auch hier ist der direkte Vergleich durch die festgehaltene y-Achse möglich. Die Abbaugeschwindigkeit und Effektivität ist nicht mit der Leistung der chemischen Oxidation durch PDS vergleichbar. Führt man die Reaktion allerdings mit einem großen Überschuss an Enzym und Assist durch, so ist eine spontane Entfärbung der Farbstofflösung zu beobachten. Feststellbar ist hauptsächlich ein neues Signal bei etwa  $t_R = 12,80$  min. Dieses entspricht dem neuen Signal im DAD bei  $t_R = 11,84$  min. Der Zeitunterschied der Signale im DAD der HPLC und im ToF-Massenspektrometer beträgt somit knapp eine Minute. Die zu Beginn der Darstellung sehr hoch liegende und bis zu einer Retentionszeit von ca. dreizehn Minuten abfallende Basislinie ergibt sich aus dem verwendeten Gradientenprogramm der HPLC. Nach 24-stündiger Enzymbehandlung sind auch im TIC nur noch Spuren von Abbauprodukten feststellbar. Lediglich bei  $t_R = 12,74$  min wird noch ein deutliches Signal detektiert. Insgesamt wurde der Farbstoff Marine C deutlich durch das Baylase<sup>®</sup> RP-System abgebaut.

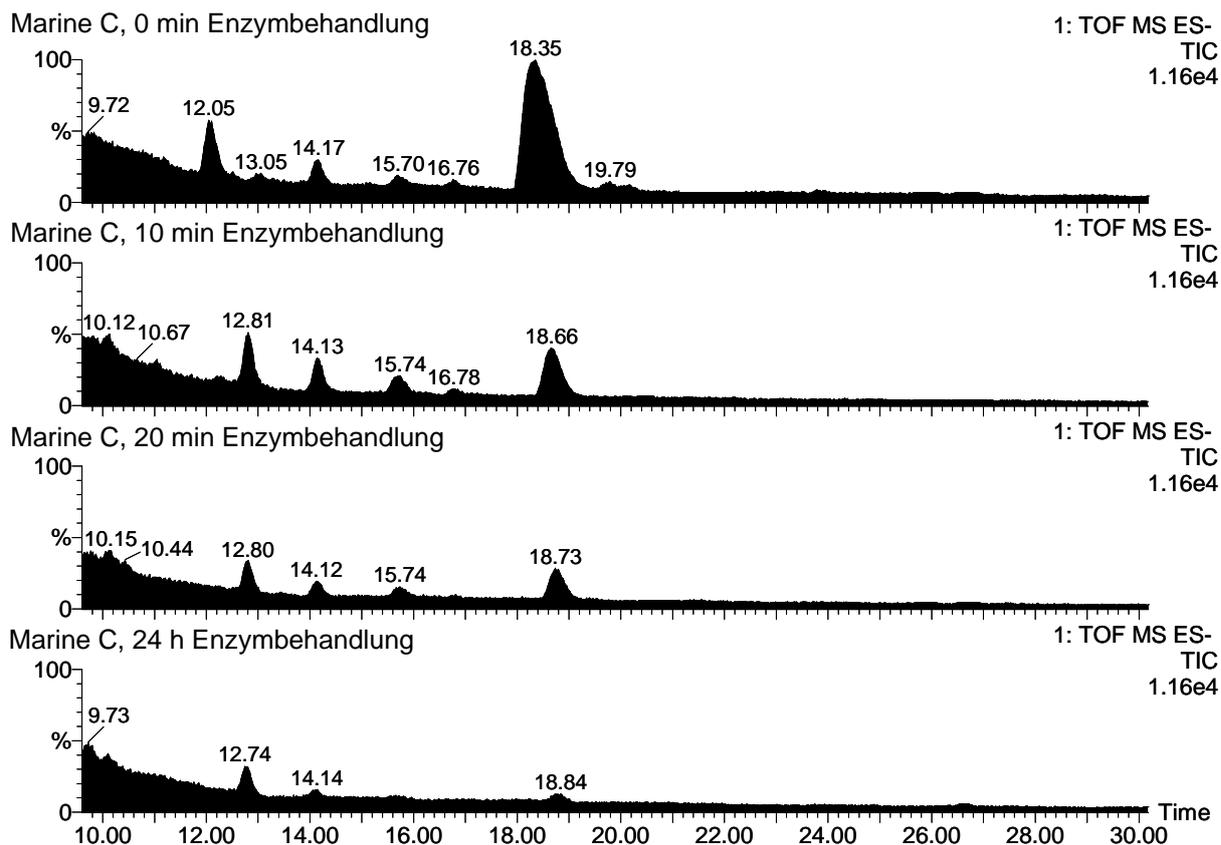


Abbildung 26: TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Die genaue Auswertung der massenspektrometrischen Daten ist in der nachstehenden Tabelle 13 zusammengefasst. Auffällig ist, dass im Vergleich zum Abbau des Farbstoffs Marine C mit Peroxodisulfat wesentlich mehr Zwischen- und Abbauprodukte feststellbar sind. Nach der Reaktion mit dem Enzym werden 27 Edukte und Produkte gefunden. Aus den Abbildungen 25 und 26 lässt sich dieser Sachverhalt noch nicht erkennen. Erst die genaue Untersuchung aller Signale zeigt die Vielfalt der Produkte. Die Peakflächen sind nicht annähernd so groß wie die beim Abbau mit PDS. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine zehnmal kleinere Farbstoffmenge verwendet wurde. Auch wenn die SPE-Anreicherung bei geringeren Farbstoffmengen etwas effektiver ist, so verbleibt immer noch ein Konzentrationsunterschied um den Faktor acht im Vergleich von PDS- und Baylase® RP-Abbau.

Im Gegensatz zur chemischen Oxidation ist bei der enzymatischen Behandlung eine Vielzahl neuer Stoffe feststellbar, von denen die meisten Abbauprodukte sind. Speziell die auch bei der chemischen Oxidation beobachtbare Masse 201 Da tritt bei der enzymatischen Behandlung nach einer Zeit von zehn Minuten mit großer Konzentration auf, wird danach aber wieder abgebaut. Andere Substanzen, wie die der Masse 230 Da, bauen sich hingegen im Laufe der Behandlung ständig weiter auf. Wie nicht anders zu erwarten, sind die hohen

Massen des Hydrolysats hauptsächlich vor und zu Beginn der enzymatischen Behandlung zu beobachten. Nach längerer Reaktionszeit dominieren die kleinen Bruchstücke. Auch nach einer 24-stündigen Reaktionszeit können größere stationäre Konzentrationen an Produkten gefunden werden. Eine Totalmineralisation ist, unter den hier gewählten Einsatzparametern, mit Baylase® RP nicht möglich.

Retentionszeit [min]	Masse	Peakfläche vor und nach enzymatischer Reaktion			
		Hydrolysat	10 min	20 min	24 h
16,39	118 Da	0	0	36	66
10,19	134 Da	0	0	34	188
12,28	200 Da	0	234	270	318
12,81	201 Da	0	1710	1030	930
16,91	207 Da	225	637	507	415
19,90	212 Da	0	226	142	64
19,90	216 Da	0	32	32	38
12,74	217 Da	0	127	140	0
19,87	230 Da	0	94	312	504
14,14	242 Da	178	1140	780	514
15,74	246 Da	0	280	220	213
12,39	263,5 Da	714	269	51	39
12,05	264,5 Da	360	0	0	0
12,19	271,5 Da	88	0	0	0
15,74	318 Da	0	0	51	79
23,87	361,5 Da	45	0	0	0
15,74	369,5 Da	199	166	154	34
18,73	370,5 Da	2800	1470	830	280
18,76	378,5 Da	62	30	17	17
15,83	402,5 Da	36	0	0	0
12,39	410,5 Da	80	0	0	0
19,89	462,5 Da	48	0	0	0
12,08	528 Da	226	0	0	0
12,05	530 Da	116	0	0	0
18,36	546 Da	30	0	0	0
15,74	740 Da	103	85	65	18
18,76	742 Da	1430	780	339	197

**Tabelle 13: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung**

Die Auswertung der in Tabelle 13 aufgeführten Massendaten führt unter Zuhilfenahme der Massenkorrektur und der sich daraus ergebenden Präzisionsmasse zu Summenformeln der einzelnen Verbindungen. Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, können allen erhaltenen Präzisionsmassen molekulare Zusammensetzungen zugewiesen werden. Bei nahezu allen ermittelten Präzisionsmassen zeigt der Vergleich mit der theoretischen Masse eine Abweichung kleiner

5 ppm. Eine Ausnahme stellt die Masse 378,5 Da dar, die eine geringfügige Erhöhung um 1,6 ppm zeigt. Hierbei handelt es sich um die doppelt geladene Spezies der Masse 758 Da, die dem hydrolysierten Farbstoff mit Anlagerung eines Sauerstoffatoms entspricht. Aus diesem Grund ist die Verlässlichkeit der angegebenen Summenformel relativ hoch. Deutliche Unterschiede sind bei den Massen 118 und 134 Da mit 16,1 bzw. 11,9 ppm zu beobachten. Diese Abweichungen sind aber nicht unbedingt ein Indiz für eine falsche Zuordnung der molekularen Zusammensetzung.

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
118,0424	$C_6H_5N_3$	118,0405	16,1
134,0371	$C_6H_5ON_3$	134,0355	11,9
200,0384	$C_8H_{11}O_3NS$	200,0382	1,0
201,0220	$C_8H_{10}O_4S$	201,0222	-1,0
207,0116	$C_{10}H_8O_3S$	207,0116	0,0
212,0027	$C_8H_7O_4NS$	212,0018	4,2
216,0332	$C_8H_{11}O_4NS$	216,0331	0,5
217,0166	$C_8H_{10}O_5S$	217,0171	-2,3
230,0121	$C_8H_9O_5NS$	230,0123	-0,9
242,0491	$C_{10}H_{13}O_4NS$	242,0487	1,7
246,0065	$C_8H_9O_6NS$	246,0073	-3,3
263,4889	$C_{18}H_{15}O_{10}N_3S_3$	263,4882	2,7
264,4970	$C_{18}H_{17}O_{10}N_3S_3$	264,4960	3,8
271,4844	$C_{18}H_{15}O_{11}N_3S_3$	271,4856	-4,4
318,0551	$C_{14}H_{13}O_4N_3S$	318,0549	0,6
361,5022	$C_{26}H_{23}O_{12}N_5S_4$	361,5035	-3,6
369,5013	$C_{26}H_{23}O_{13}N_5S_4$	369,5009	1,1
370,5094	$C_{26}H_{25}O_{13}N_5S_4$	370,5088	1,6
378,5087	$C_{26}H_{25}O_{14}N_5S_4$	378,5062	6,6
402,4878	$C_{26}H_{25}O_{15}N_5S_5$	402,4897	-4,7
410,4864	$C_{26}H_{25}O_{16}N_5S_5$	410,4872	-1,9
462,5183	$C_{34}H_{33}O_{16}N_5S_5$	462,5185	-0,4
527,9858	$C_{18}H_{15}O_{10}N_3S_3$	527,9842	3,0
530,0014	$C_{18}H_{17}O_{10}N_3S_3$	529,9998	3,0
545,9968	$C_{18}H_{17}O_{11}N_3S_3$	545,9947	3,8
740,0070	$C_{26}H_{23}O_{13}N_5S_4$	740,0097	-3,6
742,0236	$C_{26}H_{25}O_{13}N_5S_4$	742,0254	-2,4

**Tabelle 14: Abbauprodukte von Marine C nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Da sich eine solche Abweichung aus der Division von theoretischer Masse durch die ermittelte Präzisionsmasse ergibt, führen gerade bei leichten Molekülen mit geringen Molmassen Unterschiede schon auf den letzten Nachkommastellen zu relativ hohen Differenzen.

So ergibt ein Unterschied von 0,0010 Da zwischen theoretischer Masse und Präzisionsmasse bei einem Molekül der Masse 100 Da eine Abweichung von 10 ppm. Die gleiche Abweichung führt bei einem Molekül der Masse 500 Da lediglich zu einer Abweichung von 2 ppm. Besonders bei kleinen Massenwerten ist ein Abweichungswert in ppm kritisch betrachten, ein striktes Einhalten der „5 ppm Grenze“ ist vielfach nicht möglich und kann zu falschen Rückschlüssen führen.

Der Vergleich zwischen der oxidativen Abbaumethode mit Peroxodisulfat und dem enzymatischen Abbau liefert eine erstaunlich unterschiedliche Anzahl an nachweisbaren Abbauprodukten. Hervorzuheben ist, dass bei der enzymatisch katalysierten Entfärbung fast allen auftretenden Massen entsprechende Summenformeln zuzuordnen sind. Dies stellt einen erweiterten Beitrag zur Kenntnis der Abbauprodukte des Farbstoffs Marine C dar.

Anhand der Erkenntnisse, die bereits aus dem Abbau des Farbstoffs Marine C mit Peroxodisulfat gewonnen wurden, und den neu gefundenen Produkten, die in Tabelle 14 aufgeführt sind, kann man zu einem wesentlich umfangreicheren Abbauschema gelangen. Einige der in Abbildung 27 dargestellten Verbindungen wurden bereits beim Peroxodisulfatabbau gefunden, zum Beispiel der hydrolysierte Farbstoff mit der Masse 742 Da und das Produkt des Wasserstoffverlusts mit 740 Da. Ferner wurden die Produkte mit den Massen 924 und 926 Da, die aus der Kondensation des hydrolysierten Farbstoffs mit dem Produkt der Masse 201 Da entstehen, die ersten Abbaustufen mit 530 und 528 Da sowie die kleinen Bruchstücke 242 und 201 Da nachgewiesen. Darüber hinaus kann eine Vielzahl neuer Abbauprodukte identifiziert werden. Aus der Literatur bekannt<sup>[210]</sup>, aber bei den durchgeführten chemischen Abbaureaktionen mit PDS nicht aufgetreten, ist das Produkt mit der Masse 200 Da. In seiner Struktur ist es der Masse 201 Da sehr ähnlich; es handelt sich um das direkte Spaltungsprodukt der Azobrücke ohne Einführung der OH-Funktion. Die ermittelten Konzentrationen sind zwar geringer als bei dem Produkt der Masse 201 Da, jedoch durchaus nicht im Spurenbereich. Weiterhin ist in der Literatur die massenspektrometrische Untersuchung des Bruchstücks 207 Da, der H-Säure entsprechend, beschrieben<sup>[215-218]</sup>. *Pham* et al. diskutierten bislang als einzige das Auffinden dieser Struktur im Anschluss an einen oxidativen Entfärbungsprozess.

Bisher sind die Strukturen mit den Massen 246 Da, 230 Da, 217 Da und 216 Da nicht in der Literatur erwähnt. Es handelt sich hierbei um Derivate, beziehungsweise Vorläuferstrukturen der Massen 200 und 201 Da. Die Ausbildung einer Nitrofunktionalität ist unter den gegebenen oxidativen Bedingungen sehr wahrscheinlich. Die Bildung von 2-(4-Nitro-benzol-sulfonyl)-ethanol mit der Masse 230 Da wurde bei enzymatischen Entfärbungsreaktionen

schon von Yan beobachtet und mittels NMR-Untersuchungen belegt <sup>[219]</sup>. Die Masse 246 Da ist somit auch sehr gut erklärbar; es handelt sich hierbei um die Anlagerung einer OH-Gruppe an den aromatischen Ring. Bei den Verbindungen 216 und 217 Da verhält es sich ähnlich. Beide Strukturen lassen sich durch die Anlagerung von OH-Gruppen jeweils an die Moleküle 200 bzw. 201 Da deuten.

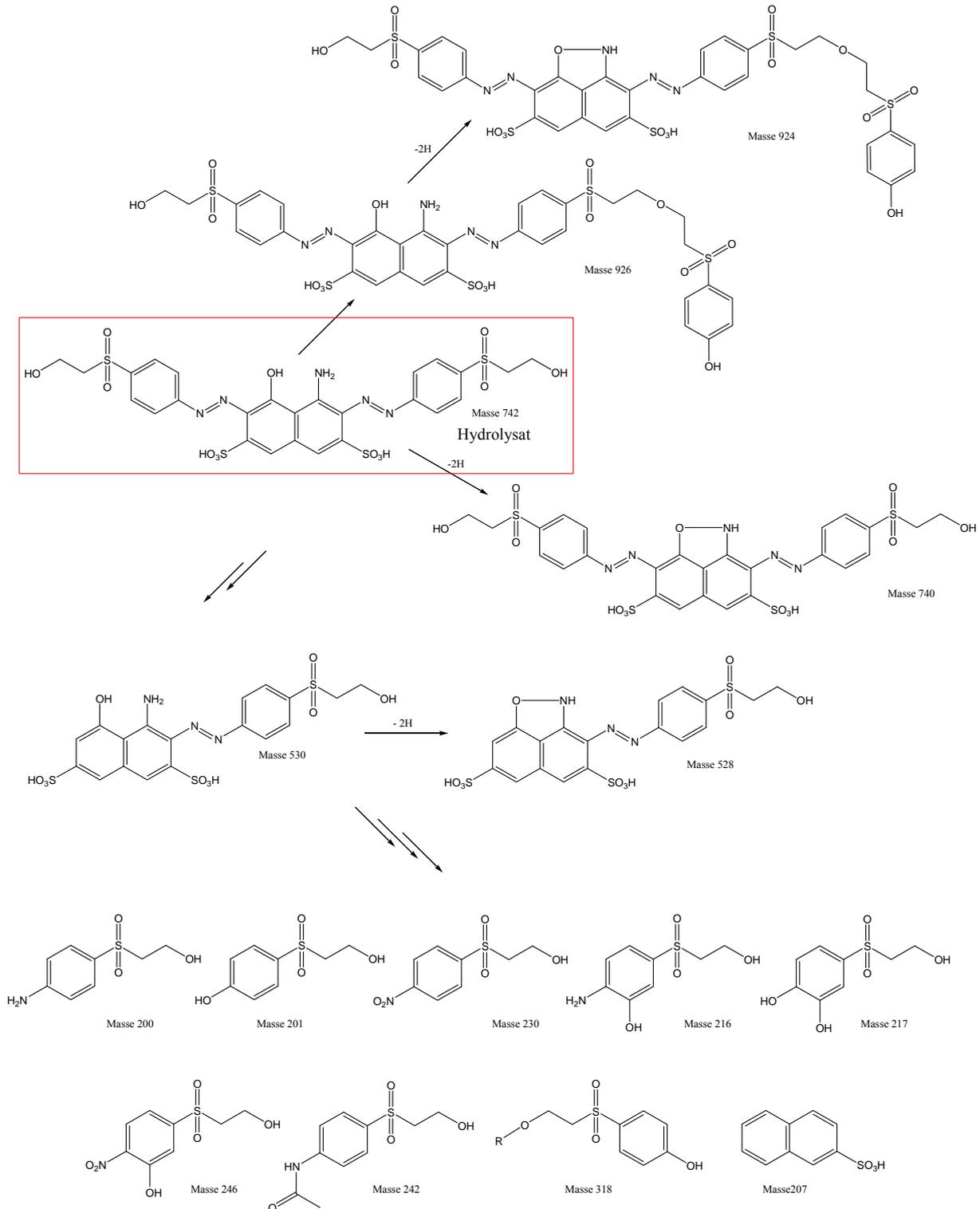


Abbildung 27: Abbauschema für die Behandlung von Marine C mit Baylase® RP

## 4.6.4 Entfärbung von Gelb D mit Baylase® RP

Da es sich bei Gelb D um eine flüssige Zusammensetzung (10 % Farbstoff, 10 % Salze und 80 % Wasser) handelt, sind die Mengenverhältnisse anders als bei dem schwarzen oder roten Farbstoff. Wurden bei den pulverförmigen Färbeprodukten  $100 \text{ mg L}^{-1}$  verwendet, so betrug die Menge bei Gelb D  $200 \mu\text{L L}^{-1}$ . Untersucht wurden die Proben ohne enzymatische Behandlung (Hydrolysat) und nach Reaktionszeiten von 10 bzw. 20 min und nach 24 Stunden. Die Aufkonzentrierung erfolgte analog der Vorgehensweise bei dem Farbstoff Marine C mit enzymatischer Reaktion und lieferte Proben, die etwa um den Faktor 33 angereichert waren. Die Entfärbefeffizienz ergab sich aus den DAD-Chromatogrammen der HPLC. Die Ergebnisse sind mit festgehaltener y-Achse zum direkten Intensitätsvergleich in Abbildung 28 dargestellt. Die beiden Hauptsignale der hydrolysierten Probe mit Retentionszeiten von  $t_R = 19,14 \text{ min}$  und  $t_R = 26,74 \text{ min}$  reagieren nach Zugabe von Enzym- und Assistenzlösung deutlich ab. Das zweite Signal ist nach zehn Minuten Einwirkzeit fast vollständig verschwunden, das erste ist deutlich reduziert. Es baut sich klar eine neue Komponente bei  $t_R = 15,91 \text{ min}$  auf. Dieses Produkt ist nicht identisch mit dem Hydrolysat-signal bei  $t_R = 15,72 \text{ min}$ , da sich die Absorptionsspektren deutlich unterscheiden.

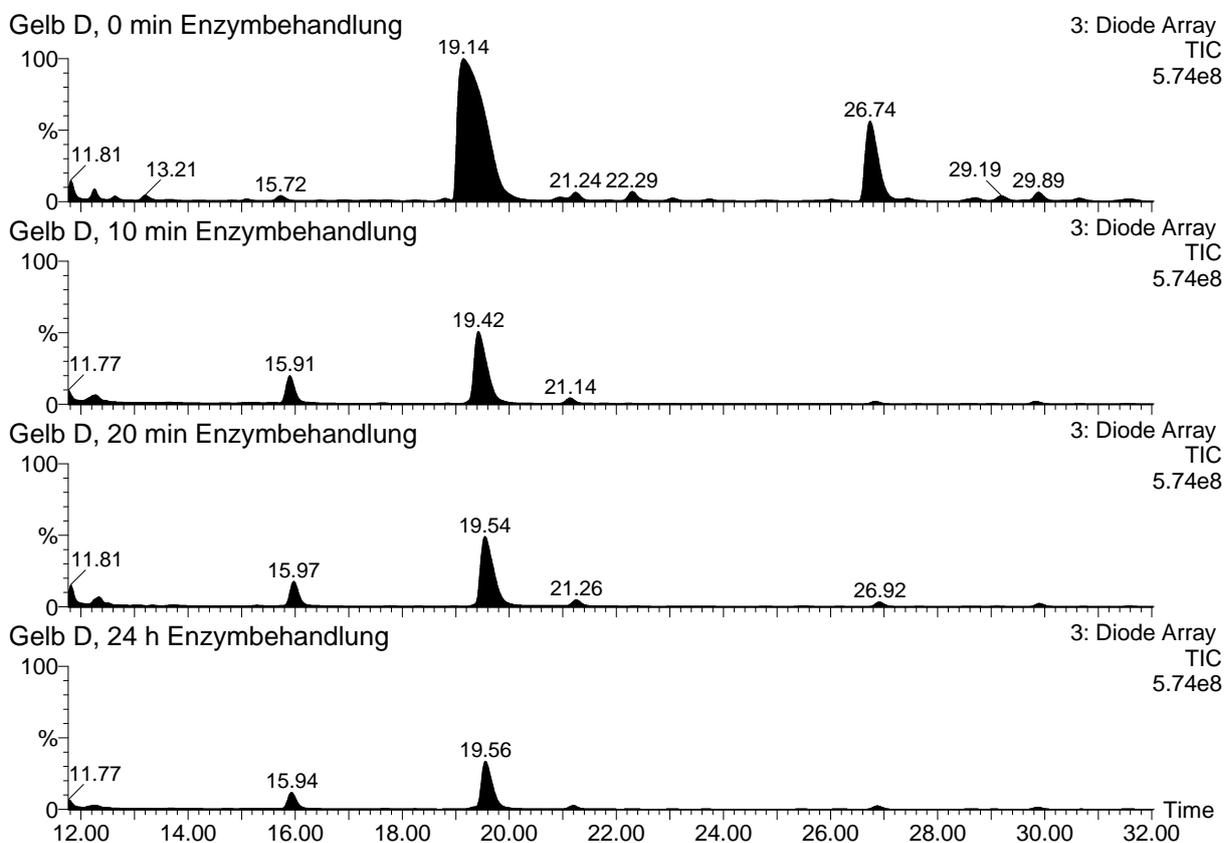


Abbildung 28: DAD-Chromatogramme von Gelb D vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Die TIC-Spuren der massenspektrometrischen Untersuchung liefern weitergehende Informationen zu den Edukten des Hydrolysats und entstandenen Produkten der enzymatisch behandelten Proben. Abbildung 29 ähnelt den oben stehenden DAD-Chromatogrammen, auch hier nehmen die beiden Hauptkomponenten des Hydrolysats in ihrer Intensität ab. Das intensivere Signal bei  $t_R = 19,60$  min ist auch nach einer 24-stündigen Behandlung mit Enzym nicht vollständig verschwunden. Die gesetzlichen Anforderungen des Anhangs 38 werden im Fall dieses Farbstoffs nicht erfüllt. Der zeitliche Unterschied zwischen Dioden-Array-Detektion und massenspektrometrischer Detektion liegt mit etwa einer halben Minute im Rahmen der bereits gemachten Beobachtungen. Das Auftreten neuer Signale in den Chromatogrammen der behandelten Proben ist nicht feststellbar. So treten die in den DAD-Chromatogrammen bei  $t_R = 15,72$  min gefundenen Signale nicht in den TIC-Chromatogrammen auf. Offensichtlich sind die entsprechenden Stoffe nicht mittels Elektrospray im negativen Modus ionisierbar.

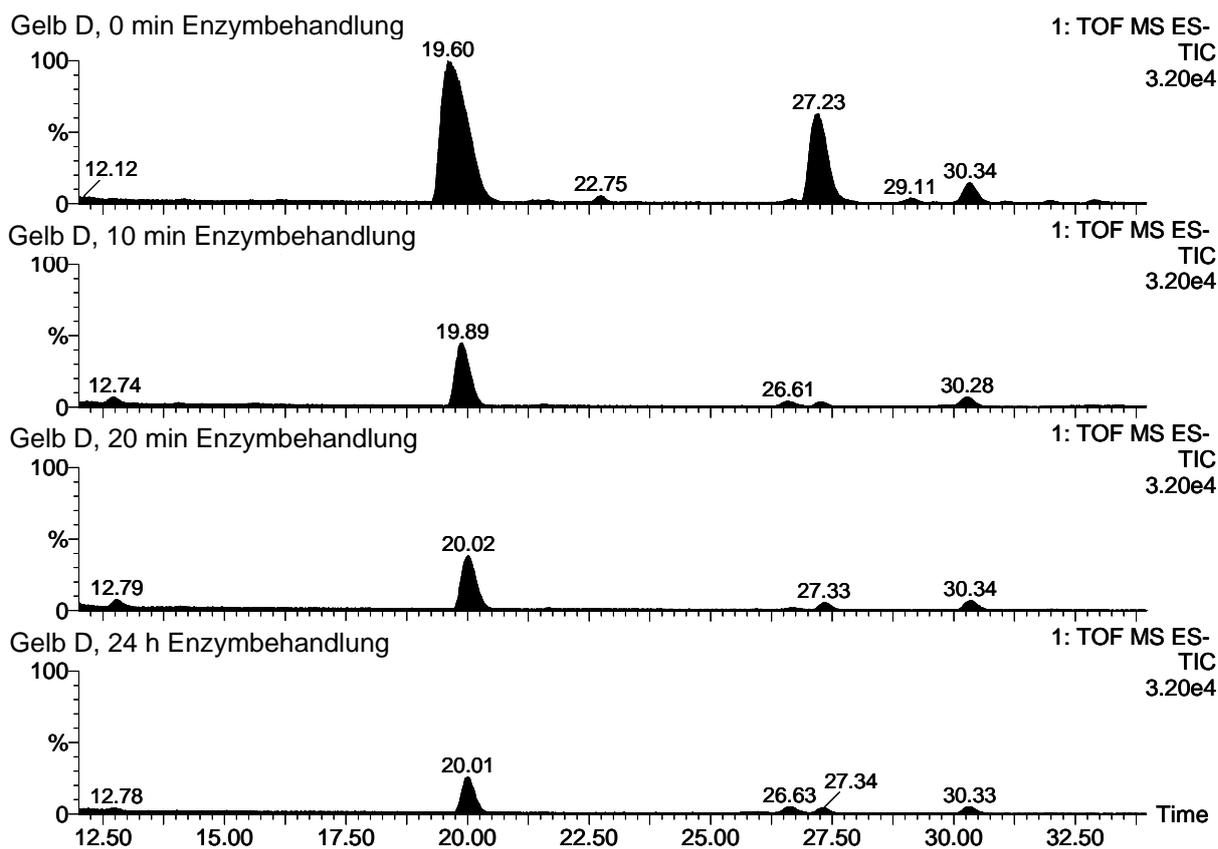


Abbildung 29: TIC-Chromatogramme von Gelb D vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Die flüchtige Betrachtung der TIC-Spuren lässt den Schluss zu, dass das Produktspektrum des enzymatischen Abbaus von Gelb D nicht komplex ist. Es lassen sich nur wenige Signale beobachten, so dass nur von wenigen Produkten auszugehen ist. Bei genauerer Be-

trachtung, insbesondere der kleinen Signale im massenspektrometrischen Untergrund, wird deutlich, dass neben den Edukten eine Vielzahl von Abbauprodukten vorliegt. Die Behandlung mit dem Baylase® RP-System liefert insgesamt 33 Signale, deutlich mehr als die Behandlung mit Peroxodisulfat. Die einzelnen Werte sind in der nachstehenden Tabelle 15 aufgeführt.

Retentionszeit [min]	Masse	org. Chlor	Peakfläche vor und nach enzymatischer Reaktion			
			Hydrolysat	10 min	20 min	24 h
11,92	200 Da	Nein	0	363	0	0
12,65	201 Da	Nein	56	470	530	430
20,02	212 Da	Nein	0	127	174	292
19,74	216 Da	Nein	0	0	38	93
12,74	217 Da	Nein	0	0	0	46
19,74	230 Da	Nein	0	0	22	40
19,60	230,5 Da	Ja	492	72	23	53
12,65	238,5 Da	Ja	150	39	17	53
14,10	242 Da	Nein	269	220	107	95
15,85	246 Da	Nein	0	82	105	115
21,67	260,5 Da	Ja	39	0	0	0
19,65	266 Da	Ja	0	66	89	0
27,23	283,5 Da	Ja	42	0	0	0
19,97	292,5 Da	Ja	10400	2440	1460	297
22,80	295 Da	Ja	0	56	89	10
21,67	300,5 Da	Ja	21	14	0	0
19,55	309 Da	Ja	0	98	160	23
22,75	314,5 Da	Ja	453	0	0	0
15,70	318 Da	Nein	0	57	88	178
19,55	339 Da	Ja	0	73	160	8
30,34	462 Da	Ja	3120	1400	1330	1240
32,00	478 Da	Ja	0	36	0	0
19,60	488 Da	Ja	960	184	177	175
31,97	504 Da	Ja	305	119	104	111
19,60	506 Da	Ja	12400	2650	1580	800
25,97	520 Da	Ja	0	0	29	0
21,67	522 Da	Ja	117	66	43	40
29,17	550 Da	Ja	545	0	0	0
27,23	568 Da	Ja	30	0	0	0
19,60	586 Da	Ja	15300	3210	2000	1800
19,60	602 Da	Ja	75	57	38	8
19,60	608 Da	Ja	116	35	15	23
22,75	630 Da	Ja	284	0	0	0

**Tabelle 15: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Gelb D vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung**

Nahezu sämtliche Substanzen mit hoher Molekülmasse enthalten organisches Chlor, was sich gut anhand des Chlorisotopenmusters belegen lässt. Lediglich die relativ weit abgebauten Stoffe haben das Chloratom verloren. Schon die hydrolysierte Probe weist eine Vielzahl von Signalen auf, die sich im Laufe der Abbaureaktion in ihrer Konzentration verringern, aber nicht komplett entfernt werden. Der Aufbau großer Produktmengen ist, wie schon bei den vorherigen Untersuchungen, nicht feststellbar. Einzig das Bruchstück mit der Masse 201 Da baut sich in seiner Konzentration merklich auf, klingt allerdings nach 24 Stunden Reaktionszeit auch wieder ab. Mehrere Produkte durchlaufen kurzfristig ein Maximum, so zum Beispiel die Stoffe mit den Massen 200 Da, 266 Da oder auch 295 Da; diese werden nach längerer Behandlungszeit ebenfalls wieder abgebaut. Es werden jedoch auch Produkte beobachtet, die in ihrer Menge ständig zunehmen, wie zum Beispiel die mit den Massen 212 Da, 216 Da oder auch 246 Da. Die nach 24 h vorliegenden Konzentrationen sind aber sehr gering.

Für alle in der vorstehenden Tabelle aufgelisteten Signale können Summenformeln vorgeschlagen werden. Diese finden sich in Tabelle 16 und weisen zu einem großen Teil Abweichungen von weniger als 5 ppm zwischen theoretischer Masse und der experimentell ermittelten Präzisionsmasse auf. Das Molekül mit der Masse 200 Da wurde schon bei Marine C beobachtet, bei einem Vergleich der beiden Farbstoffstrukturen stellt sich heraus, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das gleiche Produkt handelt. Trotz der etwas zu hohen Abweichung kann die Summenformel als gesichert angesehen werden. Die Masse 300,5 Da ist die doppelt geladene Spezies von 602 Da, die eindeutig bestimmt ist. Hieraus ergibt sich automatisch die Richtigkeit der Summenformel, so dass die zu hohe Abweichung vernachlässigt werden kann. Gleiches gilt für das Bruchstück mit der Masse 314,5 Da, das auf die Masse 630 Da zurückgeht. Lediglich die Substanz mit einem Gewicht von 295 Da ist in ihrer elementaren Zusammensetzung fragwürdig, wenn nur die massenspektrometrischen Daten zugrunde gelegt werden. Jedoch kann auch diese Substanz als gesichert betrachtet werden, da Yan im Rahmen ihrer Arbeiten die Struktur mittels NMR aufgeklärt hat<sup>[219]</sup>. Nahezu alle nach der oxidativen Behandlung mit Peroxodisulfat gefundenen Stoffe erscheinen auch beim enzymatischen Abbau. Auffällig ist allerdings das Fehlen der Masse 434 Da, welche sich im Rahmen der PDS-Behandlung von Gelb D als eines der wichtigsten Zwischenprodukte herausstellte und in signifikant großen Konzentrationen in der Reaktionslösung vorlag. Nicht einmal Spuren dieses Moleküls sind nach der Behandlung mit Baylase<sup>®</sup> RP zu beobachten. Insgesamt hat sich das Produktbild des Farbstoffs Gelb D durch die Anwendung des Enzyms vergrößert. Das Erstellen eines möglichen Abbauweges wird durch die neuen Informationen erleichtert.

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
200,0393	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> NS	200,0382	5,5
201,0219	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S	201,0222	-1,5
212,0018	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> NS	212,0018	0,0
216,0321	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> NS	216,0331	-4,6
217,0164	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> S	217,0171	-3,2
230,0125	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> NS	230,0123	0,9
230,5064	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	230,5059	2,2
238,5028	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	238,5034	-2,5
242,0484	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> NS	242,0487	-1,2
246,0079	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> NS	246,0073	2,4
260,5153	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	260,5165	-4,6
265,9879	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> NSCl	265,9890	-4,1
283,4928	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	283,4921	2,5
292,4980	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	292,4974	2,1
294,9775	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S <sub>3</sub> Cl	294,9792	-5,8
300,4967	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	300,4949	6,0
309,0329	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub> S <sub>3</sub> Cl	309,0312	5,5
314,5126	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	314,5105	6,7
318,0548	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub> S	318,0549	-0,3
339,0067	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> N <sub>2</sub> S <sub>3</sub> Cl	339,0050	5,0
462,0189	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	462,0197	-1,7
478,0128	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	478,0146	-3,8
488,0352	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	488,0353	-0,2
504,0320	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	504,0302	3,6
506,0450	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	506,0459	-1,8
520,0254	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	520,0252	0,4
522,0402	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	522,0408	-1,1
550,0724	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl	550,0721	0,5
567,9925	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	567,9921	0,7
586,0021	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	586,0027	-1,0
601,9987	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	601,9976	1,8
607,9828	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> ClNa	607,9846	-3,0
630,0306	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Cl	630,0289	2,7

**Tabelle 16: Edukte und Abbauprodukte von Gelb D nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Das resultierende Abbauschema, welches in Abbildung 30 dargestellt ist, weist, speziell auf der Seite der Hydrolyseprodukte, in der oberen Hälfte der Darstellung, viele Übereinstimmungen mit dem Schema aus der Peroxodisulfatbehandlung auf. Neu hinzugekommen ist die Struktur mit der Masse 568 Da, bei der es sich um die reaktive Vinylsulfonform des Farbstoffs handelt. Diese Substanz ist nur in Spuren in der enzymatisch unbehandelten Probe zu finden und zeigt, dass der Hydrolyseprozess nicht vollständig abgeschlossen war. Auf der Seite der Abbauprodukte gibt es eine Vielzahl von neuen Substanzen, die bei der

chemischen Behandlung nicht beobachtet werden konnten. Nach der Baylase<sup>®</sup> RP-Reaktion war es möglich, von zwölf Produkten Strukturinformationen zu erhalten.

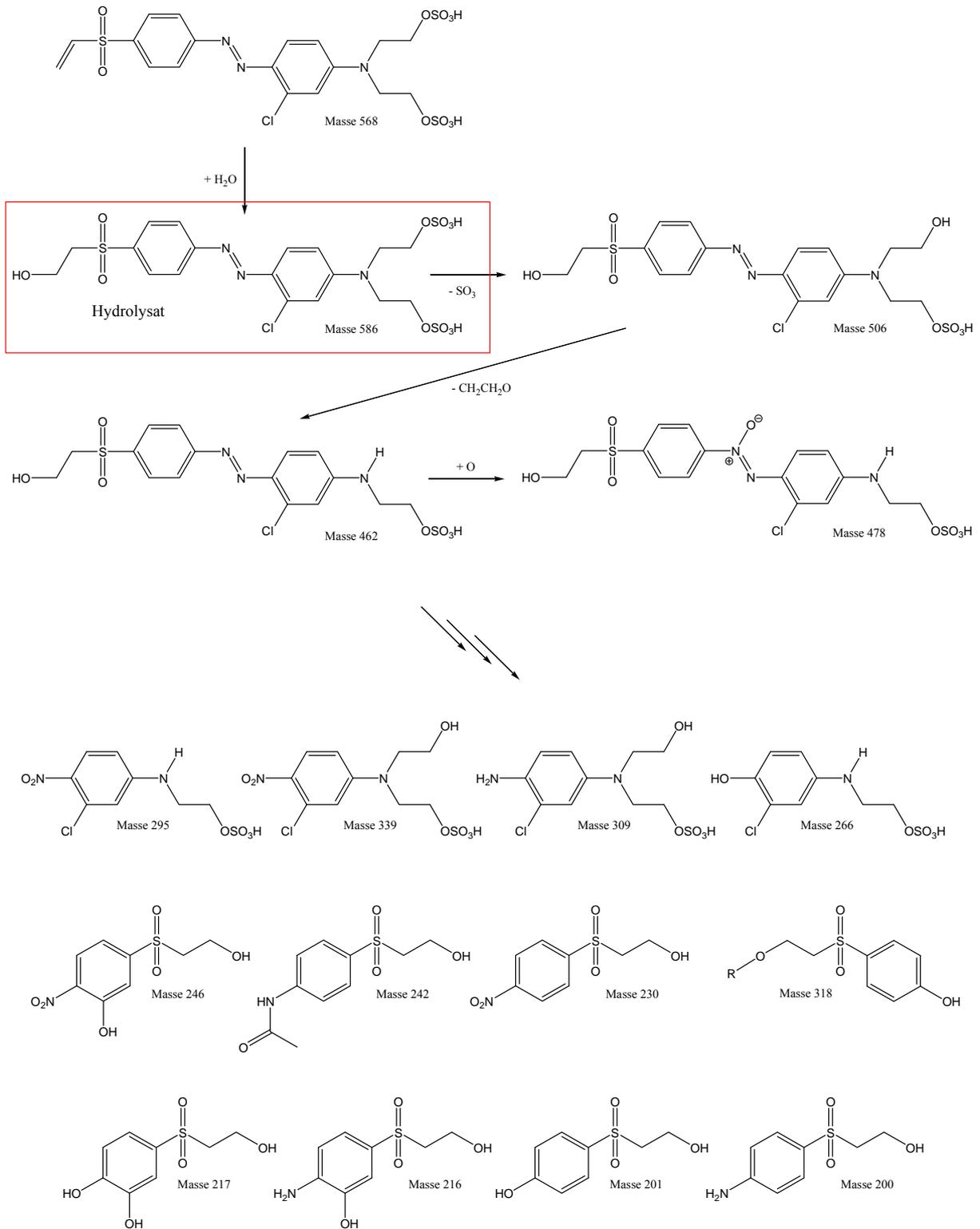


Abbildung 30: Abbauschema für die Behandlung von Gelb D mit Baylase<sup>®</sup> RP

Wie schon bei anderen Farbstoffen beobachtet, tritt an die Stelle der Azobrücke zunächst eine Aminfunktion. Belegt werden kann dieses bei den Produkten mit den Massen 309 Da, 216 Da sowie 200 Da. Durch Oxidation der Aminfunktion können formal die entsprechenden Nitro-Verbindungen gebildet werden. Dieser Zusammenhang wurde bereits beim Baylase<sup>®</sup> RP-Abbau des Farbstoffs Marine C vermutet; schon dort ließen sich die aminhaltigen Bruchstücke mit den Massen 200 Da und 216 Da sowie die zugehörigen Nitro-Verbindungen detektieren. Da die beiden Farbstoffe in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, ist ein solcher Befund zu erwarten. Weiterhin lässt sich das schon bei Marine C gefundene Ergebnis bestätigen, dass an der früheren Azobrücke eine OH-Gruppe eingeführt wird. Als Beispiel sei auf das Produkt der Masse 201 Da hingewiesen, das in größeren Konzentrationen vorliegt. Interessant ist ferner das Produkt mit der Masse 242 Da, bei dem die Amingruppe vermutlich acetyliert wurde.

#### 4.6.5 Entfärbung von Rot F mit Baylase® RP

Der enzymatische Abbau von Rot F verläuft analog dem von Marine C. Der hydrolysierte Farbstoff wurde mit Enzym- und Assistlösung versetzt, nach 10 Minuten, 20 Minuten und 24 Stunden wurden jeweils Proben gezogen und das Enzym mittels Membranfiltration entfernt. Anschließend wurden 50 mL der jeweiligen Probenlösung durch SPE-Anreicherung auf 1,5 mL eingengt, was einer Aufkonzentrierung um den Faktor 33 entspricht.

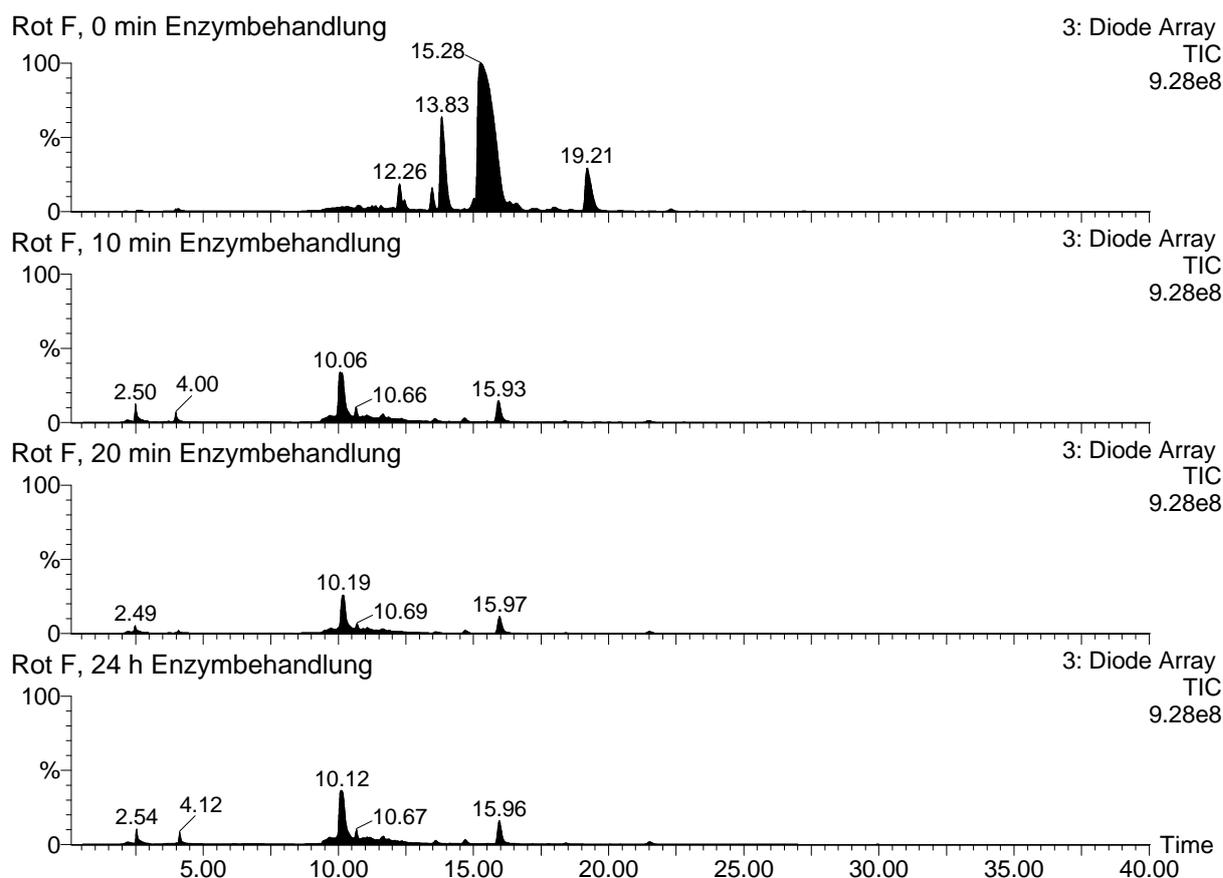


Abbildung 31: DAD-Chromatogramme von Rot F vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Die aus den anschließenden flüssigchromatographischen Untersuchungen der Proben erhaltenen Chromatogramme finden sich in Abbildung 31. Das Chromatogramm des Hydrolysats (0 min) zeigt intensive Hauptsignale bei  $t_R = 13,83$  min und  $t_R = 15,28$  min sowie zwei in ihrer Intensität kleinere Signale bei den Retentionszeiten 12,26 min und 19,21 min. Schon nach einer Behandlungszeit mit dem Enzym von zehn Minuten ist von den im Hydrolysat vorhandenen Signalen nichts mehr zu erkennen. Neue Signale können beobachtet werden, speziell salzartige, polare Verbindungen zwischen  $t_R = 2,50$  und  $t_R = 4,00$  min und ein intensiveres Signal bei  $t_R = 10,06$  min. Die Vermutung, dass es sich bei dem Signal mit  $t_R = 15,93$  min um

Reste der nicht vollständig abgebauten Hydrolysatkomponente handelt, kann durch das Absorptionsspektrum widerlegt werden.

Nach 24-stündiger Behandlung ist die Farbigkeit der Lösung größtenteils beseitigt. Die im DAD erzeugten Signale weisen keine Absorption im sichtbaren Bereich auf, sind also für die Farbbewertung gemäß Anhang 38 nicht relevant. Die Probe entspricht den gesetzlichen Anforderungen an die Restfarbigkeit.

Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten ermöglicht weitergehende Aussagen über die Art der Edukte und Abbauprodukte. Der chromatographisch relevante Bereich des TIC von 10 bis etwa 30 Minuten ist in Abbildung 32 gezeigt. Die Hauptkomponenten des Hydrolysats sind, entsprechend den Daten des DAD, bereits nach zehn Minuten effektiv abgebaut; es liegen nur noch Spuren des hydrolysierten Farbstoffs vor. Bei längeren Behandlungszeiten ist das Hydrolysat vollständig entfernt. Neue Substanzsignale werden bei  $t_R = 10,61$  min,  $t_R = 11,08$  min sowie  $t_R = 12,70$  min registriert.

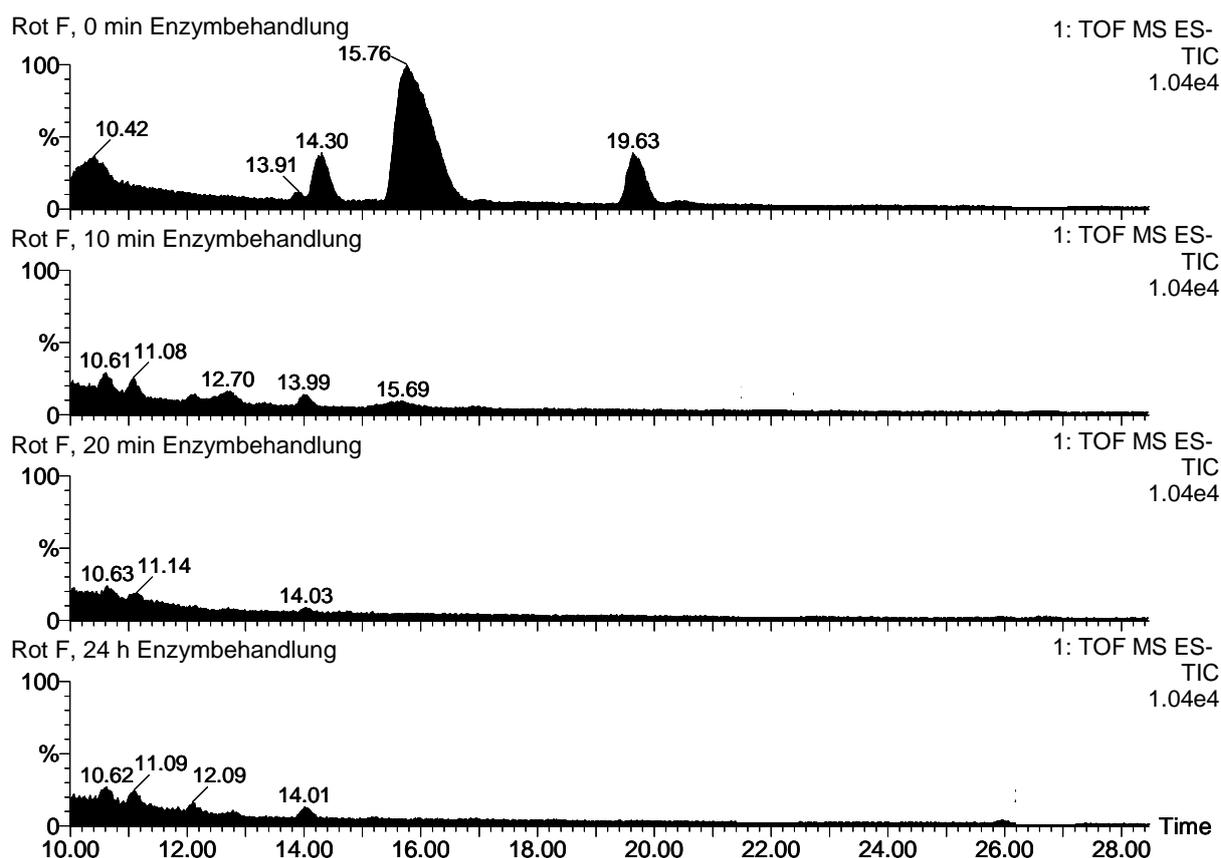


Abbildung 32: TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten

Die umfassende Auswertung der einzelnen chromatographischen Signale und ihrer zugehörigen Flächen findet sich in Tabelle 17. Die aufgeführten Substanzen treten entweder im unbehandelten Hydrolysat oder aber nach Einwirkung des Enzyms auf. Eine Ausnahme bildet

das Produkt mit der Masse 200 Da, das sowohl in der oxidativ unbehandelten, als auch in den abgebauten Proben auftritt. Die Ergebnisse in der Tabelle unterscheiden sich von den Resultaten der Peroxodisulfatbehandlung des gleichen Farbstoffs. Die klare Aufteilung in Edukt-signale vor und ausschließlich Produktsignale nach der enzymatischen Reaktion ist bei der PDS-Behandlung nicht erkennbar, die Übergänge sind fließender. Ferner besteht, ähnlich wie in den Fällen von Marine C und Gelb D nach Enzymbehandlung, ein Unterschied in der Quantität der gefundenen massenspektrometrischen Signale. Es lassen sich hierbei insgesamt 29 Substanzen detektieren. Die Intensitäten der Signale sind geringer als nach der Peroxodisulfatbehandlung, was, wie schon bei Marine C beschrieben, auf die um den Faktor zehn kleinere Menge an verwendetem Farbstoff zurückzuführen ist.

Das Auftreten der Masse 200 Da schon in der unbehandelten Probe war nicht zu erwarten, da es sich um ein Abbauprodukt handelt (vgl. Kapitel 4.6.3 Ergebnisse Farbstoff Marine C). Daraus lässt sich ableiten, dass während der Hydrolysereaktion des Farbstoffs Rot F schon eine geringe Zersetzung stattfindet. Dieses Abbauprodukt wurde bei der Behandlung mit Peroxodisulfat nicht festgestellt, da dessen Ionisierung und anschließende Detektion wahrscheinlich durch die anderen, in wesentlich höheren Konzentrationen vorkommenden Produkte, diskriminiert wurde.

Abbauprodukte der enzymatischen Behandlung von Rot F treten, trotz Anreicherung, nicht in signifikant großen Konzentrationen auf. Verglichen mit dem hydrolysierten Farbstoff handelt es sich lediglich um wenige Prozente der Gesamtintensität. Fast alle Stoffe bauen sich im Verlauf der Reaktion kurzfristig auf und nehmen dann in ihrer Konzentration wieder ab. Einzig das Signal mit der Masse 246 Da verhält sich anders und nimmt mengenmäßig bis zum Ende der Reaktion zu. Hervorzuheben ist, dass die Produkte relativ kleine Massen besitzen. Das größte nachgewiesene Produkt besitzt die Masse 348 Da. Die genauere Untersuchung der Abbauprodukte in Bezug auf ihre Summenformel und ihre chemische Struktur gibt weitere Aufschlüsse.

Retentionszeit [min]	Masse	Peakfläche vor und nach enzymatischer Reaktion			
		Hydrolysat	10 min	20 min	24 h
15,23	200 Da	62	27	23	19
12,70	201 Da	0	294	284	273
21,92	230 Da	0	68	73	84
14,01	231 Da	0	542	508	495
21,92	246 Da	0	495	532	669
11,09	269 Da	0	733	642	617
12,09	270 Da	0	462	442	427
17,06	270,5 Da	23	0	0	0
14,30	279,5 Da	479	0	0	0
12,70	286,5 Da	77	0	0	0
19,63	291,5 Da	847	0	0	0
15,76	300,5 Da	4500	0	0	0
15,76	308,5 Da	37	0	0	0
14,30	331 Da	95	0	0	0
13,91	332,5 Da	257	0	0	0
15,69	348 Da	0	86	56	32
15,76	373 Da	294	0	0	0
15,76	375 Da	354	0	0	0
15,76	376 Da	108	0	0	0
17,06	542 Da	197	0	0	0
13,10	558 Da	58	0	0	0
14,30	560 Da	2230	0	0	0
12,70	574 Da	32	0	0	0
14,30	576 Da	47	0	0	0
19,63	584 Da	2380	0	0	0
15,76	602 Da	11400	0	0	0
15,76	618 Da	101	0	0	0
15,76	624 Da	15	0	0	0
13,91	666 Da	137	0	0	0

**Tabelle 17: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung**

In Tabelle 18 findet sich die Zuordnung der ermittelten Präzisionsmassen zu den theoretischen Massen und die sich ergebende elementare Zusammensetzung der Substanzen. Alle 29 in Tabelle 17 aufgeführten Präzisionsmassen besitzen nur geringe Abweichungen zur theoretischen Masse. Lediglich bei zwei Werten wird die geforderte Grenze von 5 ppm um 0,7 bzw. 0,6 ppm überschritten. In einem Fall handelt es sich um ein doppelt geladenes Teilchen der Masse 666 Da, so dass die Verlässlichkeit der molekularen Zusammensetzung trotz größerer Abweichung hoch ist. Die Abweichungen zwei weiterer Präzisionsmassen liegen genau bei 5 ppm, alle weiteren Unterschiede sind geringer als der Grenzwert. Es ist kein

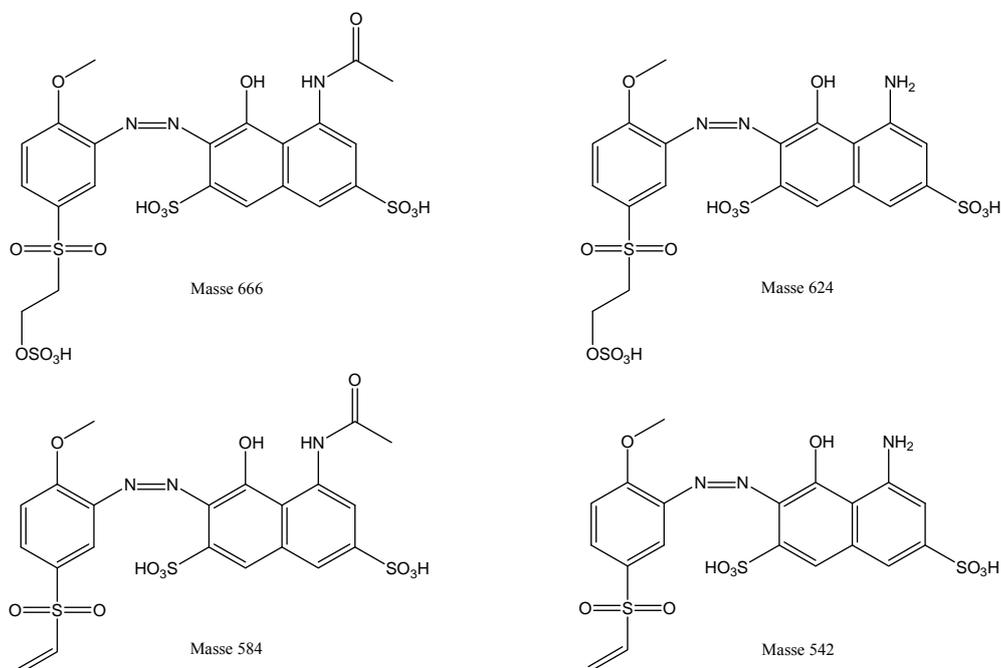
Trend der einzelnen Abweichungen in eine bestimmte Richtung zu erkennen, zu beobachten ist eine statistische Verteilung um den Nullwert (Abweichung gleich 0 ppm).

Präzisionsmasse [Da]	Zuordnung der Summenformel	theoretische Masse [Da]	Abweichung in ppm
200,0392	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> NS	200,0382	5,0
201,0227	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S	201,0222	2,5
230,0124	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> NS	230,0123	0,4
231,0330	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> S	231,0327	1,3
246,0073	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> NS	246,0073	0,0
269,0247	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub> S	269,0232	5,6
270,0083	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> NS	270,0073	3,7
270,4966	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	270,4960	2,2
279,5020	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	279,5013	2,5
286,4917	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	286,4909	2,8
291,5020	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	291,5013	2,4
300,5069	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	300,5065	1,3
308,5029	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	308,5040	-3,6
330,9693	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	330,9695	-0,6
332,4894	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub> N <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	332,4875	5,7
348,0669	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub> S	348,0654	4,3
372,9813	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	372,9801	3,2
374,9864	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	374,9857	1,9
375,9811	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub> NS <sub>2</sub>	375,9797	3,7
542,0004	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	541,9998	1,1
557,9967	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	557,9947	3,6
560,0096	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	560,0104	-1,4
573,9874	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	573,9896	-3,8
576,0024	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	576,0053	-5,0
584,0110	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	584,0104	1,0
602,0222	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	602,0209	2,2
618,0153	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	618,0159	-1,0
624,0059	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub> S <sub>3</sub> Na	624,0029	4,8
665,9800	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub> N <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	665,9828	-4,2

**Tabelle 18: Edukte und Abbauprodukte von Rot F nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus**

Das Abbauschema der enzymatischen Reaktion von Rot F bestätigt die mit Marine C gemachten Erfahrungen. Einige der in Abbildung 34 dargestellten Moleküle wurden bereits im Rahmen der PDS-Untersuchungen gefunden, so zum Beispiel die reaktive Vinylsulfonform von Rot F mit der Masse 584 Da, die sich daraus ergebende Hydrolysatform mit der Masse 602 Da, die deacetylierte Variante mit dem Verlust von 42 Masseneinheiten sowie die erneute Ausbildung des Isoxazolringes bei Verlust zweier Wasserstoffatome. Neu auf der Seite der Edukte sind die in geringen Spuren vorhandenen Verbindungen der Handelsware

mit der Masse 666 Da sowie in deacetylierter Form mit der Masse 624 Da (Abbildung 33). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Hydrolysereaktion nicht vollständig verlaufen ist. Diese Signale sind erst bei geringerer Hydrolysatkonzentration beobachtbar, wodurch die These untermauert wird, dass Spurenstoffe in Anwesenheit von Komponenten mit hoher Konzentration diskriminiert werden.



**Abbildung 33: Hauptkomponenten von Rot F Handelsware**

Bei der Ermittlung weiterer Strukturen und dem Abgleich der Daten aus Tabelle 17 fällt auf, dass es sich bei den Massen 376 Da, 375 Da, 373 Da sowie 331 Da um Stoffe aus der hydrolysierten, oxidativ aber nicht behandelten Probe handelt. Es liegen Derivate der als Grundkörper fungierenden H-Säure vor, teils in acetylierter Form, teils deacetyliert, mit und ohne Ausbildung des Isoxazolringes. Die Deacetylierung und auch die Bildung eines Isoxazols ist unter den Hydrolysebedingungen denkbar, der komplette Bruch der Azobrücke allerdings nicht. Es scheint demnach so zu sein, dass die Handelsware nicht umgesetzte H-Säure enthält, welche im Laufe der Hydrolysereaktion ebenfalls chemisch verändert wird. Von hier aus finden dann die ersten Abbaureaktionen zu kleineren Bruchstücken der H-Säure statt. So bilden sich unter Verlust von  $\text{SO}_2$  die Strukturen der Massen 270 und 269 Da aus, unterscheidbar nur anhand des Restes der ehemaligen Azobrücke ( $\text{NH}_2$  bzw.  $\text{OH}$ ).

Schon von der PDS-Behandlung von Rot F sind ferner die Bruchstücke mit den Massen 201 und 231 Da bekannt. Die exakte Zuordnung der Position der OH-Gruppe im Fall des Bruchstücks mit der Masse 201 Da ist nicht möglich, da diese an der Stelle der Azobrücke (metaständig zur Sulfonylgruppe) oder der Methoxygruppe (paraständig zur Sulfonylgruppe)

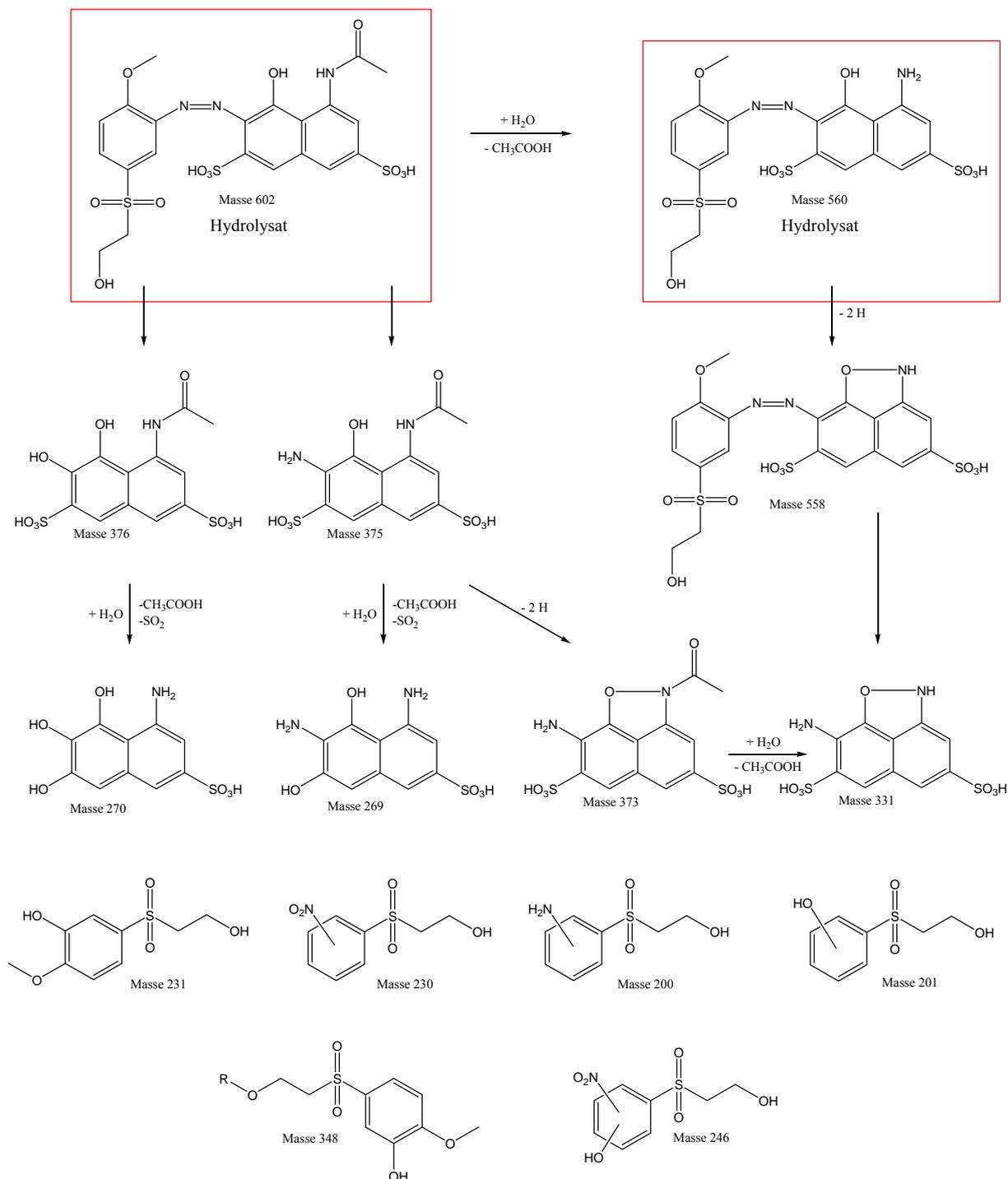


Abbildung 34: Abbauschema für die Behandlung von Rot F mit Baylase® RP

auftreten kann. Die meta-Position ist chemisch zwar wahrscheinlicher, da es aber keinen Beweis in Form von NMR-Untersuchungen gibt, wird der OH-Gruppe keine definierte Position zugewiesen. Die Produkte mit den Massen 246, 230 sowie 200 Da sind bereits von den Marine C-Untersuchungen bekannt. Das 2-(4-Amino-benzosulfonyl)-ethanol (Masse 200 Da) ist bereits als Abbauprodukt von Marine C in der Literatur beschrieben <sup>[210]</sup>.

#### **4.7 Vergleich Peroxodisulfat- vs. Baylase® RP-Behandlung**

Während die Anwendung von Peroxodisulfat der oxidativen Entfärbung des gesamten Abwassers dient, wird das enzymatisch oxidative System Baylase® RP zur so genannten „Echtheitswäsche“ eingesetzt. Im Vordergrund steht hierbei eine Behandlung des gefärbten Textils zu einem Zeitpunkt, an dem die Hauptmenge des Farbstoffhydrolysats bereits fixiert ist. Technisch ist die Entfärbung des Gesamt-Abwassers bei der enzymatisch oxidativen Behandlung ohne Bedeutung. Diese von der Anwendung her sehr unterschiedliche Zielrichtung der beiden oxidativen Entfärbeverfahren hat Unterschiede in der Farbstoffkonzentration zur Folge. Insbesondere das Abwasser aus Waschprozessen dunkler Färbungen enthält ca.  $1 \text{ g L}^{-1}$  Hydrolysat. Baylase® RP wird im letzten Drittel des Waschprozesses angewendet. Dort ist die Hydrolysatkonzentration kleiner als  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ .

Die chemische Reaktion verläuft bei der enzymatischen Oxidation anfangs sehr rasch, beschränkt sich allerdings zunächst nur auf den „entfärbenden Schritt“, der Zerstörung des chromophoren Systems, und ist abhängig von dem chemischen Aufbau der Farbstoffe. Während Rot F als Hydrolysat schnell abgebaut wird, reagieren Gelb D und Marine C wesentlich langsamer. Der in Abbildung 6 (Kapitel 2.6) dargestellte Mechanismus der enzymatischen Reaktionsfolge lässt eine langsamere, aber kontinuierliche Geschwindigkeit erwarten.

Peroxodisulfat bringt einen sehr schnellen Abbau des Farbstoffgrundkörpers und der Zwischenprodukte. Die im Laborversuch durch den Zerfall von Peroxodisulfat hervorgerufene Erzeugung von Hydroxylradikalen ist ein sehr schneller und effektiver Prozess, bei dem innerhalb kürzester Zeit ausreichend hohe Radikalkonzentrationen zur Verfügung stehen. Bei einem entsprechenden Verhältnis von Farbstoff und Peroxodisulfat erfolgt innerhalb weniger Minuten eine völlige Entfärbung, die den Anforderungen an die Restfarbigkeit eines Abwassers gemäß Anhang 38 entspricht. Eine vollständige Entfärbung wird bei Verwendung des Baylase® RP-Systems meistens erst nach 24 Stunden erreicht. Auch die Verwendung größerer Mengen an Enzym und Assist liefert keine Entfärbungsgeschwindigkeiten, die mit der PDS-Behandlung vergleichbar sind. Baylase® RP greift den kovalent auf der Faser gebundenen Farbstoff nicht an, entfernt aber durch die Zerstörung des chromophoren Systems die Farbigkeit von hydrolysierten oder ungebundenen Farbkörpern. Die Einwirkungszeit des Enzyms ist gering, bei Rollenkufenwaschmaschinen mit mehreren Abteilen beträgt die effektive Verweilzeit des Textils in dem mit Baylase® RP versetzten Abteil durchschnittlich zehn Sekunden. Danach wird das Textil in das nächste Waschabteil geführt, wo andere Badbedingungen herrschen, die die Wirksamkeit des Enzyms unterbinden. Durch den Einsatz des

biologischen Systems im Waschprozess kann, speziell bei problematischen Marinefärbungen, ein zweiter Waschgang in der Maschine vermieden werden. Für den Veredler bedeutet das die Einsparung von Energie und Wasser, aber vor allem Prozesszeit.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Art und Zahl der gefundenen Abbauprodukte. Bei der enzymatischen oxidativen Entfärbung entsteht ein wesentlich größeres Spektrum an Produkten, eine mechanistische Aufklärung des Farbstoffabbaus wird hierdurch erleichtert. Weiterführende, in dieser Arbeit nicht dargestellte Untersuchungen des oxidativen Abbaus von Reaktivfarbstoffen in höheren Konzentrationen ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), die ebenfalls mit dem Enzym durchgeführt wurden, zeigten, dass es sich nicht um einen Baylase-spezifischen Effekt handelt. Die Menge der gefundenen Abbauprodukte bei höheren Farbstoffkonzentrationen sinkt und ist in Art und Anzahl den Strukturen aus dem chemischen Abbau mit Ozon oder Peroxodisulfat ähnlich. Es scheint sich somit mehr um Diskriminierungseffekte bei den massenspektrometrischen Untersuchungen zu handeln. Vermutlich werden bei Vorhandensein großer Mengen einer Substanz andere, in geringen Konzentrationen auftretende Stoffe, bei der Ionisation unterdrückt; sie gehen somit im Rauschen der Basislinie unter. Weitergehende Untersuchungen mit Variationen der Farbstoffkonzentration und Einsatz von Peroxodisulfat oder Baylase<sup>®</sup> RP könnten diese These stützen.

## 4.8 Kinetik

### 4.8.1 Chemische Oxidation mit Peroxodisulfat

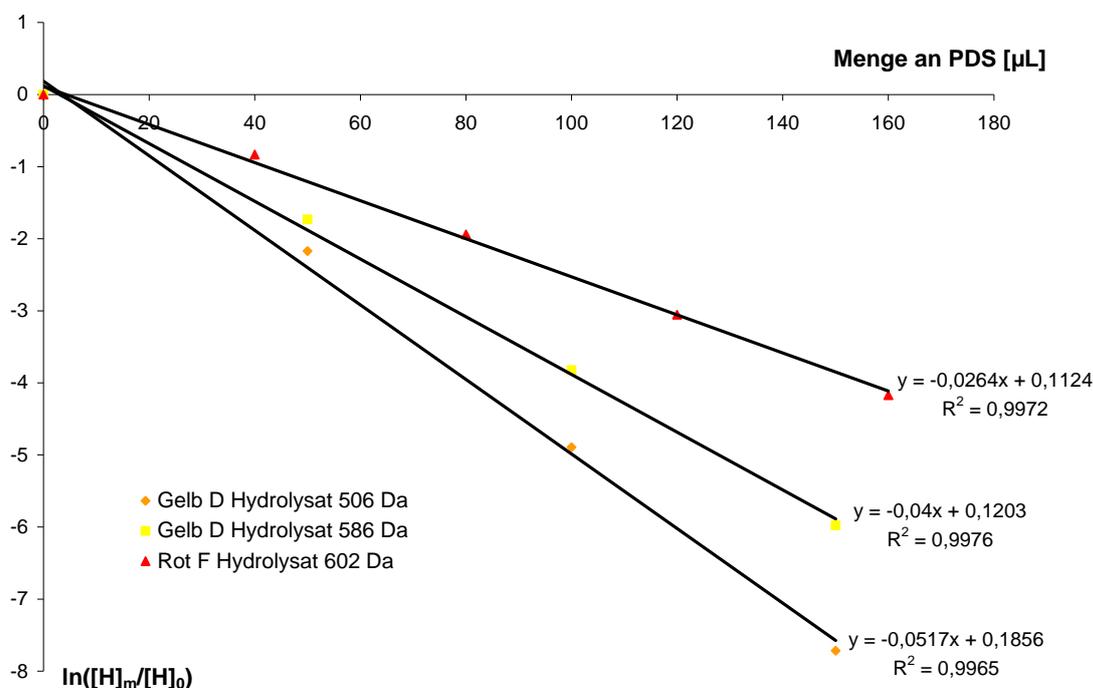
Die Kinetik des Peroxodisulfats ist gut untersucht, allerdings nicht im Zusammenhang mit dem oxidativen Farbstoffabbau<sup>[220-228]</sup>. Wie weiter vorne beschrieben (Kapitel 2.4.3 Peroxodisulfat), zerfällt Peroxodisulfat zunächst in Sulfat-Radikale, die allerdings in basischer Lösung zu Hydroxylradikalen abreagieren.

Aufgrund des Versuchsaufbaus, welcher eine Reaktion der Probe in einem verschlossenen Gefäß bei hohem Druck und Temperaturen nahe des Siedepunktes von Wasser vorschreibt, ist eine fortwährende Probennahme nicht möglich. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Variation der Zeit (z.B. kürzere Behandlungsphasen in der Mikrowelle) keine aussagekräftigen Ergebnisse bringt. Peroxodisulfat benötigt für einen schnellen Zerfall eine Temperatur von größer  $80 \text{ °C}$ . Allerdings beginnt die Reaktion schon beim Aufheizen des Systems. Nach Erreichen der vorgesehenen Temperaturen läuft die Reaktion rasch ab, so dass eine Probennahme in kurzen Abständen praktisch nicht durchführbar war und daher keine

verlässlichen Proben zu erhalten waren. Es wurde daher eine Variation der Menge an Peroxodisulfat bei gleicher Reaktionszeit (60 Minuten) vorgenommen, die eine Aussage über das Verhalten des Farbstoffhydrolysats in Gegenwart von PDS ermöglichte.

Zu diesem Zweck betrachtet man die aus einem Chromatogramm erhaltenen Flächenwerte des Hydrolysats nach Reaktion mit einer definierten Menge an PDS ( $[H]_m$ ) und setzt diese ins Verhältnis mit der Signalintensität einer unbehandelten Probe (Hydrolysatsignal  $[H]_0$ ).

Die in Abbildung 35 zu sehende graphische Auftragung des Ausdrucks  $\ln([H]_m/[H]_0)$  gegen die Menge an zugesetztem Oxidationsmittel  $m$  weist für die wichtigsten Hydrolysatsignale der Farbstoffe Gelb D und Rot F einen linearen Zusammenhang auf. Es besteht somit ein exponentielles Abbauverhalten des Oxidationsmittels Peroxodisulfat gegenüber den hydrolysierten Farbkörpern.



**Abbildung 35: Konzentrationsänderung der wichtigsten HydrolysatkompONENTEN**

Lediglich Farbstoff Marine C lässt sich auf diese Weise nicht untersuchen, da schon bei einer sehr geringen Menge an Oxidationsmittel das Hydrolysat zu Zwischen- und Endprodukten umgesetzt wird.

Die Ergebnisse dieser Auftragung ähneln einer kinetischen Untersuchung, bei der einer der Reaktionspartner (PDS) in einem großen Überschuss, der andere Partner nur in

geringen Konzentrationen an der Reaktion teilnimmt (Hydrolysat), also einer pseudo-ersten-Ordnung.

#### 4.8.2 Chemische Oxidation mit dem Baylase<sup>®</sup> RP-System

Biologisch aktive Makromoleküle (Enzyme) haben die Fähigkeit, Reaktionspartner spezifisch zu binden, ohne dass sich die Natur der Partner dadurch verändert. Der Verbrauch von Substrat und die Bildung von Produkten sind Möglichkeiten, um die Geschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen zu messen. Hält man weitere Bedingungen konstant, so ist die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion sowohl abhängig von der Menge an vorhandenem, aktiven Enzym, als auch von der Menge des Substrates. Die Erhebung der Enzymaktivität erfolgt durch Messung des Substratverbrauchs in der Einheit  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Testbedingungen, wie zum Beispiel die Art des Puffers, sowie dessen Konzentration, pH-Wert, Konzentration des Substrates oder die Reaktionstemperatur sollen sich hierbei im idealen Bereich befinden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen nimmt mit steigender Substratkonzentration zwar zu, es liegt jedoch keine direkt proportionale Beziehung vor. Vielmehr strebt bei konstanter Enzymmenge die Geschwindigkeit gegen ein Maximum.

Die Berechnung der maximalen Geschwindigkeit ist aufgrund der asymptotischen Annäherung kompliziert. In der Regel wird als Bezugspunkt die Substratkonzentration bei semi-maximaler Geschwindigkeit gewählt. Diese Konzentration entspricht vom Zahlenwert der *Michaelis*-Konstanten  $K_M$  und damit im einfachsten Fall der Dissoziationskonstanten eines Enzym-Substrat-Komplexes <sup>[229]</sup>.

Die Forscher *Michaelis* und *Menten* stellten im Jahr 1913 die Theorie auf, dass ein Substrat und ein Enzym in einem ersten Schritt einen Komplex bilden und alsdann in ein Produkt sowie das Enzym in seiner ursprünglichen Form zerfallen <sup>[230]</sup>. Enzymreaktionen können mathematisch nach der *Michaelis-Menten*-Gleichung analysiert werden.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Die Michaelis-Konstante  $K_M$  beschreibt die Neigung eines Enzyms sich an ein Substrat zu binden. Niedrige  $K_M$ -Werte besagen, dass das Enzym eine hohe Affinität zum Sub-

strat besitzt. Geringe Substratmengen reichen in diesem Fall zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit aus. Umgekehrt bedeutet ein hoher  $K_M$ -Wert eine geringe Bindungsaffinität zwischen Substrat und Enzym. Hohe Konzentrationen sind hierbei zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erforderlich.

Gemäß den Angaben aus der Literatur folgen viele enzymkatalysierte Entfärbungsreaktionen dem Mechanismus nach *Michaelis* und *Menten*, wobei verschiedene Farbstoffe in unterschiedlicher Stärke von den verwendeten Enzymen in Gegenwart von Oxidationsmitteln entfärbt werden<sup>[173,190,231-233]</sup>.

Über wasserlösliche Porphyrinringsysteme von Manganasen als Katalysatoren für die Entfärbung von Azofarbstoffen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid wurde in Publikationen häufig berichtet, so dass der Mechanismus der Entfärbung als vollständig aufgeklärt bezeichnet werden kann<sup>[231,232]</sup>. Die Entfärbung der verwendeten Farbstoffe C.I. Acid Orange 7, C.I. Acid Orange 33, sowie C.I. Acid Orange 52 hängt von der Struktur des Mangan-Porphyrinringsystems ab und kann durch zugegebene Liganden wie Imidazol stark beschleunigt werden<sup>[231]</sup>. Es handelt sich um bimolekulare Reaktionen, wobei der Farbstoff als Substrat mit dem Porphyrin-System als Katalysator in Gegenwart von  $H_2O_2$  reagiert.

Laccasen und Peroxidasen werden ebenfalls zur Entfärbung von Azofarbstoffen eingesetzt, wobei jedoch *Soares* et al. in ihrer Untersuchung nur bei einem von vier eingesetzten Disazo-Farbstoffen eine Entfärbung in Gegenwart von Enzymen nachweisen konnten<sup>[171]</sup>. Die Geschwindigkeit der Reaktion wurde auch hier mit Hilfe der *Michaelis-Menten*-Kinetik mathematisch nachvollzogen.

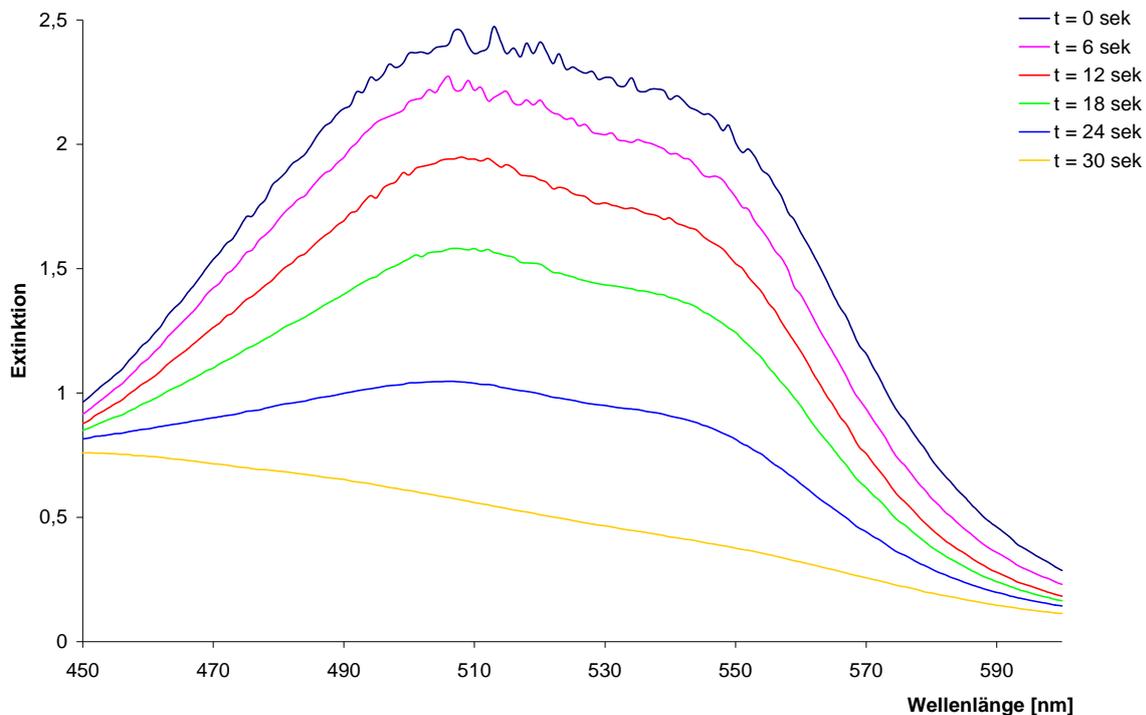
Ein Einsatz von Mediatoren, die häufig zur Reaktionsbeschleunigung oder Effektivitätssteigerung eingesetzt werden, führte in dieser Studie zu keinem Ergebnis. Das eingesetzte N-Hydroxybenzotriazol hatte keinen Effekt auf die Laccase-Katalyse, Violursäure hemmte die Entfärbungsreaktion. Dieses Regulationsprinzip konnte jedoch nicht mit Hilfe der *Michaelis-Menten*-Kinetik als kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung erklärt werden.

Eine ebenfalls hyperbolische Kinetik wurde von *Miksanová* et al. beschrieben, die in ihrer Untersuchung den Entfärbungsmechanismus von Remazol Brilliant Blue R durch Meerrettichperoxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid darstellten<sup>[173]</sup>.

Die Untersuchung des vorliegenden Baylase<sup>®</sup> RP-Systems im Hinblick auf eine *Michaelis-Menten*-Kinetik ist schwierig, da es sich um ein Mehrkomponentengemisch aus Baylase<sup>®</sup> RP und Baylase<sup>®</sup> Assist RP 01 handelt, welches für sich ebenfalls aus mehreren Stoffen besteht. Die Überprüfung der Kinetik benötigt die Variation der Konzentration aller

an der Reaktion beteiligten Partner, was aufgrund der vorliegenden fertigen Mischung nicht möglich ist.

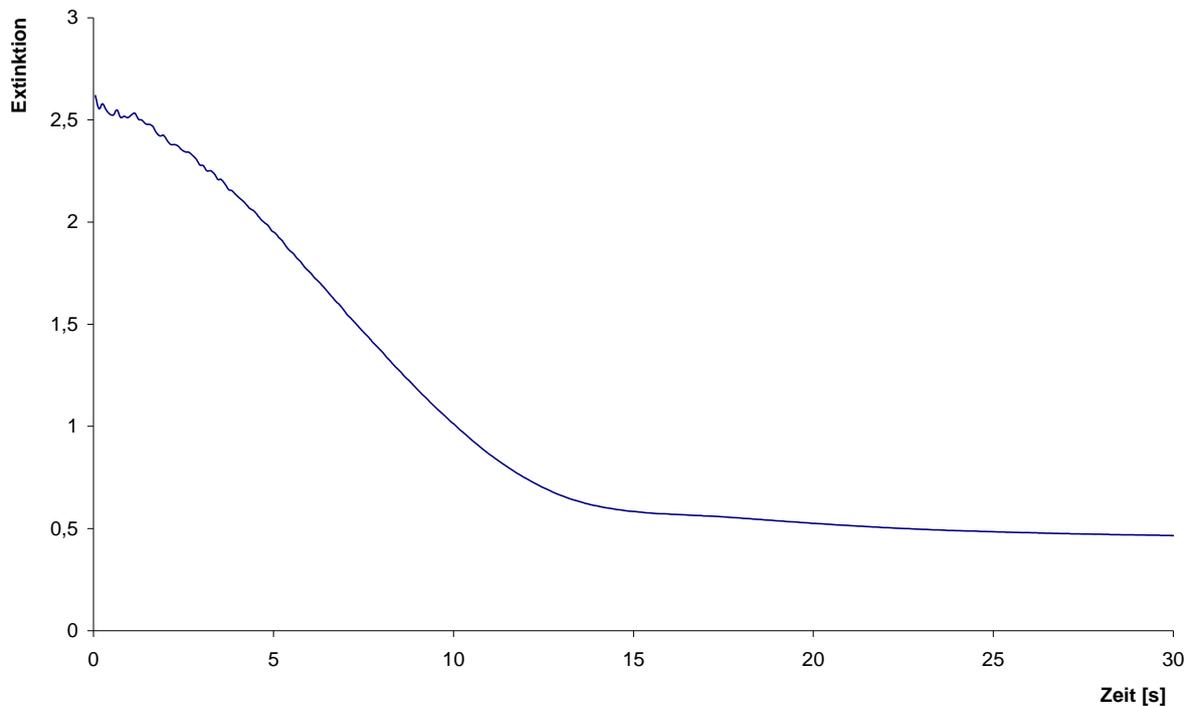
Es bot sich daher die Bestimmung der Enzymaktivität und eine Quantifizierung der Umsatzrate an. Die Aktivität eines Enzyms ist ein Maß dafür, wie schnell ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird. Die Größe als solche hängt von der Menge des Enzyms und von seiner Effizienz ab, so dass es vorteilhaft ist, normierte Größen zu verwenden; diese sollen hier eingeführt werden. Die Einheit der Enzymaktivität U ist wie folgt definiert: Eine Einheit von U entspricht der Enzymaktivität, welche die Umwandlung von 1 Mikromol Substrat pro Minute unter genau festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert. Die eigentlich offizielle SI-Einheit ist das Katal (kat), welche jedoch bis heute nur in seltenen Fällen verwendet wird ( $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ U}$ ).



**Abbildung 36: Abnahme der Extinktion von Rot F Hydrolysat mit der Zeit in Gegenwart von Baylase® RP im Wellenlängenbereich von 450 bis 600 nm**

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde am Beispiel von Rot F, einem schnell mit dem Baylase® RP-System reagierenden Farbstoff dargelegt. Zunächst wurde der Abbau des Farbstoffs in kurzen Zeitintervallen untersucht. Hierfür wurde 1 mL Farbstoffhydrolysat ( $c = 1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) Rot F mit den entsprechenden Mengen an Enzym ( $0,25 \mu\text{L}$ ) und Assist ( $1 \mu\text{L}$ ) versetzt und die Spektren im Bereich von 450 bis 600 nm in kurzen Zeitintervallen aufgenommen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 36 zu sehen.

Für die Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit des Abbaus wird der Versuch mit gleichen Parametern wiederholt, die Messung der Abnahme der Extinktion erfolgt kontinuierlich bei der festgelegten Wellenlänge von 516 nm (Maximum in Abbildung 36). Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.



**Abbildung 37: Abnahme der Extinktion von Rot F Hydrolysate mit der Zeit bei 516 nm in Gegenwart von Baylase® RP (0,25 µL Enzym in 1 mL Hydrolysatlösung)**

Die für das Verständnis der Ermittlung der nachstehenden Größen (Enzymaktivität, spezifische Aktivität und Volumenaktivität) notwendigen Rechnungen sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 7.2). Rechnerisch ergab sich aus den durchgeführten Experimenten eine Aktivität des im Baylase® RP-Systems verwendeten Enzyms von 3,4 U. Durch Bestimmung des Proteingehaltes der verwendeten Enzymmenge (0,25 µL), für die sich nach *Bradford* ein Wert von 3,6 µg Protein ergab <sup>[234]</sup>, ließ sich rechnerisch die spezifische Aktivität des Baylase® RP-Systems Fall Rot F Hydrolysat ermitteln. Es ergab sich ein Wert von 940 U mg<sup>-1</sup> Protein. Dieser Wert ist vergleichbar mit den spezifischen Aktivitäten von Meerrettich-Peroxidasen, die Werte von 2 – 5.000 U mg<sup>-1</sup> Protein aufweisen <sup>[235,236]</sup>. Aus diesem Wert wird ersichtlich, dass der Farbstoff Rot F sich sehr gut mittels des Baylase® RP-Systems abbauen lässt. Bei Farbstoffen mit einer kleineren enzymatischen Umsatzrate, wie zum Beispiel dem Farbstoff Marine C, liegt die spezifische Enzymaktivität im Rahmen der „durchschnittlichen“ Enzyme.

Neben der spezifischen Aktivität kann auch die Enzymaktivität eines bestimmten Volumens an Enzymlösung, die so genannte Volumenaktivität des Enzyms, berechnet werden<sup>[237]</sup>. Rechnerisch ergab sich eine Volumenaktivität von ca.  $13.700 \text{ U mL}^{-1}$ . Hierbei handelt es sich um einen sehr hohen Wert, der sich durch die sehr gute Abbaubarkeit des Farbstoffs Rot F erklären lässt und im Verhältnis zu durchschnittlichen Substrat/Enzymkomplexen um mehrere Zehnerpotenzen höher liegt<sup>[237]</sup>. Andere Substrate (Farbstoffe) reagieren mit Baylase<sup>®</sup> RP deutlich langsamer und haben entsprechend geringere spezifische Aktivitäten bzw. Volumenaktivitäten.

#### 4.9 Typische Abbaureaktionen

Eine Zusammenfassung der bisher besprochenen Abbaureaktionen der untersuchten Farbstoffe mittels chemischer bzw. enzymatischer Oxidation dient der Darstellung von Analogien und möglichen Vorhersagen zum Abbauverhalten strukturell ähnlicher Farbstoffe.

Die untersuchten Farbstoffe gehören allesamt zur Klasse der Azofarbstoffe. Die Größe des chromophoren Systems und somit die resultierende Farbigekeit ist abhängig von der Tatsache, dass die Azobrücke (bzw. Azobrücken bei Mehrfachazofarbstoffen wie Marine C) intakt ist. Sobald die Farbigekeit reduziert oder unter die Grenzwerte des Anhangs 38 gefallen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Azobrücke nicht mehr vorliegt. Die Analyse der gefundenen Abbauprodukte zeigt, dass an die Stelle der Azobrücke häufig eine OH-Funktionalität rückt. Als Beispiel sei die bei allen Farbstoffen beobachtete Masse 201 Da genannt, die dem 4-(2-Hydroxy-ethansulfonyl)-phenol entspricht. Es handelt sich offensichtlich um eine relativ stabile Endstruktur, was gut an den Peakflächen in den entsprechenden Tabellen zum Abbau der einzelnen Farbstoffe zu erkennen ist. Als Vorstufe des Abbauproduktes mit der Masse 201 Da ist das 2-(4-Amino-benzolsulfonyl)-ethanol mit der Masse 200 Da denkbar, das jedoch nicht in allen Fällen zu detektieren war. Demnach ist auch unter oxidativen Bedingungen im Verlauf der Spaltung der Azobrücke die Ausbildung einer Aminfunktionalität möglich, die durch schnelle Weiterreaktion in eine Hydroxylgruppe umgewandelt wird (siehe Abbildung 38). OH-Gruppen scheinen zunächst einmal relativ stabil gegenüber einem weiteren Abbau zu sein. Von dieser Stufe aus erfolgt dann der mit der vorliegenden Analytik nicht beobachtbare weitere Abbau hin zu kurzkettigen Carbonsäuren, Salzen und letztendlich zur Totalmineralisation zu Wasser und Kohlendioxid. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch schon von *Krull et al.* beschrieben<sup>[212]</sup>.

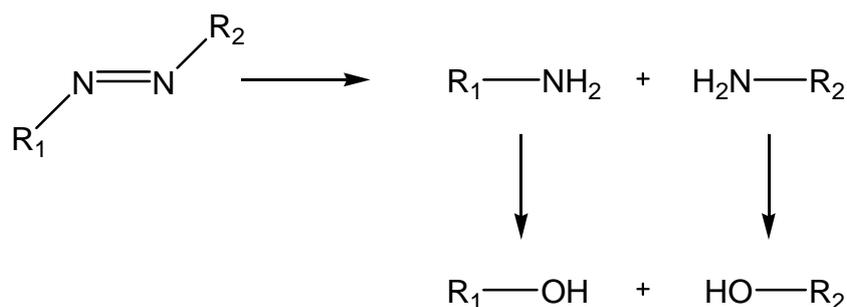


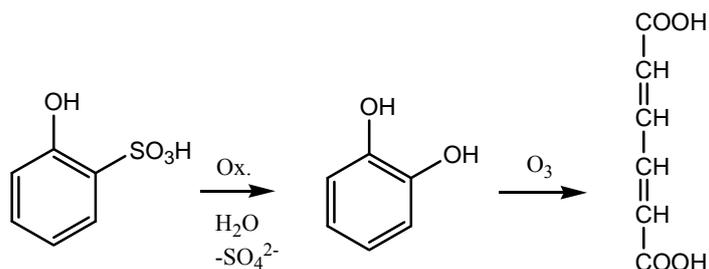
Abbildung 38: Schematischer oxidativer Abbau einer Azobrücke

Im Fall des Farbstoffs Gelb D und bei einem Abbauprodukt von Rot F konnte die Bildung einer Nitro-Gruppe an der Stelle der Azobrücke beobachtet werden. Erklärbar ist dieser Befund mit der stark oxidativen Wirkung des Peroxodisulfats und auch des Systems Wasserstoffperoxid / Baylase<sup>®</sup> RP. Betrachtet man als Vorstufe der Nitroverbindung ein aromatisches Amin, so ändert sich die Oxidationsstufe des Stickstoffs von  $-III$  auf  $+V$ .

Speziell im Fall des oxidativen Abbaus mit Baylase<sup>®</sup> RP, welcher zahlreiche Abbauprodukte liefert, können die Spaltprodukte der Azobrücke von beiden Seiten nachgewiesen werden. Bei Marine C war die H-Säure allerdings schon so weit abgebaut, dass sich nur noch die Naphthalinsulfonsäure beobachten ließ. Bei Rot F konnten mehrere Spaltprodukte sowohl mit OH- als auch mit NH<sub>2</sub>-Funktionalität nachgewiesen werden.

Bei Farbstoffen, die die H-Säure als Teil ihres Chromophors besitzen, war immer wieder die Ausbildung eines Isoxazolringes durch den Verlust zweier Wasserstoffe feststellen. Diese auch in der Literatur beschriebene Reaktion zeigte sich sowohl bei Marine C als auch bei Rot F mehrfach <sup>[210]</sup>.

Die Spaltung von Sulfonsäure- und Sulfatester-Gruppen wurde ebenfalls bei den untersuchten Farbstoffen beobachtet. Auch hier wurden an den Stellen, an denen die Säurefunktionen vorlagen, Hydroxylgruppen eingeführt. Die Spaltung von Sulfonsäuren hat Gähr im Rahmen seiner Dissertation untersucht (siehe Abbildung 39) <sup>[238]</sup>. Es handelt sich hierbei zwar um Studien mit Ozon, allerdings ist die reaktive Spezies, im Falle von Ozon, Peroxodisulfat und auch dem im Assistenten vorhandenen Wasserstoffperoxid das Hydroxylradikal. Es sind somit Analogieschlüsse zwischen den erhaltenen Ergebnissen und den Literaturdaten möglich.

Abbildung 39: Abbau von Phenolsulfonsäure über das Zwischenprodukt Brenzcatechin <sup>[238]</sup>

Weiterhin wird in mehreren Fällen die Molekülmasse der Farbstoffhydrolysate oder deren Abbauprodukte um 44 Da reduziert. Formal handelt es sich hier um die Abspaltung von  $C_2H_4O$ . Dieses Strukturelement ist in allen Reaktivfarbstoffen mit einem oder mehreren Vinylsulfonankern enthalten.

#### **4.10 Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte Reaktivfarbstoffe untersucht. Die Auswahl, die mit dem Hersteller abgestimmt wurde, sollte ein möglichst breites Spektrum von derzeit verwendeten Vertretern dieser Farbstoffklasse erfassen. Darüber hinaus sollten unterschiedliche chromophore Systeme und unterschiedliche Reaktivankergruppen berücksichtigt werden. Die aus den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse lassen zwar Analogieschlüsse an ähnlichen Farbkörpern zu, da die Zahl der in der Praxis verwendeten Farbstoffe aber sehr groß ist, kann die vorliegende Arbeit nur als ein Einstieg in diese Thematik betrachtet werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das Wissen im Hinblick auf den oxidativen Abbau weiter zu vergrößern und mehr Sicherheit bei den Vorhersagen möglicher Zerfalls- bzw. Abbauprodukte zu erhalten. Speziell zu der Gruppe der Anthrachinonfarbstoffe und noch mehr bei den Phthalocyaninen liegen noch sehr wenige Daten vor, so dass weitergehende Untersuchungen notwendig sind.

Neben den bereits erwähnten Reaktivfarbstoffen, die gut wasserlöslich sind, werden von Textilveredlern weitere Farbstoffklassen zum Färben eingesetzt, die nur eine geringe oder keine Wasserlöslichkeit aufweisen. In einem an das OXITEX-Projekt <sup>[76]</sup> anschließenden Folgeprojekt (REDUCOL) sollen indigoide Farbstoffe, Dispersionsfarbstoffe und Küpenpigmente auf ihre Abbaubarkeit untersucht werden. Die geringe Wasserlöslichkeit setzt einen zweistufigen Prozess voraus, indem durch eine reduktive, elektrochemische Reaktion die Farbkörper in wasserlösliche Bruchstücke zerlegt werden. Diese werden über eine Membran in eine Nachbarkammer gebracht, in der anschließend eine chemische Oxidation, zum Beispiel mit Ozon, stattfindet.

Verfahren zur Entfärbung von Farbstoffen sind dann sinnvoll, wenn sich dadurch ein Recycling des Wassers ermöglichen lässt. Dies kann jedoch nur in der Praxis erprobt werden. Im Falle des Baylase<sup>®</sup> RP-Systems erfolgte der Einsatz in einem Textilbetrieb, der Baumwollgewebe semikontinuierlich färbt. Die gesetzten Ziele (Einsparung von Waschmaschinen-

durchläufen und damit Einsparung von Energie, Wasser und vor allem Zeit) wurden durchweg erreicht. Der Betrieb setzt das System mittlerweile dauerhaft ein.

Die Praxiseinführung von Peroxodisulfat als chemische Entfärbungsmethode gestaltet sich schwieriger. Bei einem Einsatz wird verhältnismäßig viel PDS benötigt, so dass das Verfahren kostenintensiv ist. Ferner kommt es durch die Zugabe der Chemikalie zu einer Aufsalzung der Lösung. Zweckmäßiger wäre die katalytische *in-situ* Generierung von Peroxodisulfat aus bereits im Wasser vorhandenem Sulfat. Ein Anlagenhersteller hatte zu diesem Zweck einen kleinen Reaktor in einem Textilbetrieb errichtet. Die Darstellung von Peroxodisulfat aus vorhandenen Ressourcen ist jedoch aufgrund eines noch nicht ausgereiften Katalysators im zeitlichen Rahmen des Projektes nicht vollständig gelungen<sup>[239]</sup>.

Die gewonnenen analytischen Daten beziehen sich größtenteils auf mittelpolare Produkte. Aufgrund der verwendeten analytischen Methode ist die Aufklärung der polaren Abbauprodukte nicht möglich. Für ein weiteres Verständnis der Abbauvorgänge wäre die Kenntnis der polaren Stoffe hilfreich. Zu diesem Zweck müsste eine IC-MS-Kopplung etabliert werden, die exakt auf diese Fragestellung abgestimmt ist. Vorhandene Lücken bei der Aufklärung der Farbstoffbruchstücke könnten dadurch geschlossen werden.

Letztlich wäre eine tiefgehende Untersuchung des gefundenen massenspektrometrischen Diskriminierungseffektes interessant. Die Frage, ob bei einem Einsatz von größeren Farbstoffmengen Abbauprodukte, die in kleinen Konzentrationen vorliegen, unterdrückt und somit nicht detektiert werden können, ist besonders für den Analytiker relevant.

## 5. Zusammenfassung

Der konstant hohe Anteil an Baumwolle bei Bekleidungstextilien führt dazu, dass Reaktivfarbstoffe die mengenmäßig bedeutendste Farbstoffklasse sind. In der Reaktivfärberei beträgt die Fixierrate der Farbstoffe nur etwa 70 und 95 %. Die zurückbleibenden Farbstoffhydrolysate beeinträchtigen die guten Nassechtheiten. Sie werden daher in einem aufwändigen Waschprozess aus dem Textil entfernt, was gleichbedeutend mit einem hohen Wasser-, Energie- und Zeitbedarf ist. Die damit verbundene hohe Farbigkeit des Abwassers steht einer direkten Wiederverwendung im Veredlungsprozess und auch einer Einleitung in die Kanalisation im Wege. Dies macht eine Entfärbung der anfallenden Abwässer notwendig. Bei einem ausreichenden Entfärbungsgrad ist die prozessnahe Wiederverwendung bei Waschprozessen in der Veredlung möglich. Bei dieser Form der Wasserkreislaufschließung kann zumindest ein Teil der notwendigen Chemikalien, Energie und Zeit zurückgewonnen werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die oxidative Entfärbung von ausgewählten Reaktivfarbstoffen. Sie umfasst den chemisch oxidativen Abbau mit Peroxodisulfat und eine enzymatisch katalysierte Umsetzung mit Wasserstoffperoxid. Hierzu stand eine Auswahl an Reaktivfarbstoffen, die nach handelsüblichen Chromophoren und Ankergruppen getroffen wurde, in Form der Handelsware mit genauer Angabe der Zusatzmittel zur Verfügung. Drei dieser Farbstoffe mit den Arbeitsnamen Marine C, Gelb D, und Rot F wurden zu umfangreichen Untersuchungen der gebildeten Zwischen- und Endprodukte eingesetzt.

Da die Farbstoffe nach dem Veredlungsprozess im Abwasser als Hydrolysate vorliegen, wurden zunächst Hydrolysevorschriften ausgearbeitet. In Anlehnung an den Färbeprozess war es möglich, die reaktiven Ankergruppen ohne Veränderung bzw. Zerstörung des chromophoren Systems schonend der Hydrolyse zu unterziehen.

Das Standardredoxpotential von Peroxodisulfat ist abhängig vom pH-Wert der Lösung und ausreichend groß, um Chlorid zu Chlor bzw. Hypochlorit zu oxidieren. Zu Beginn dieser Arbeit war daher die Frage zu klären, ob und inwieweit die Oxidation in Anwesenheit von Chlorid als häufig anzutreffenden Bestandteil von Farbbädern bzw. Waschwässern zu einer möglichen Sekundärbelastung mit chloraromatischen Verbindungen führt. Dazu wurde 1-Naphthol als Modellsubstanz mit überschüssigem Chlorid einer oxidativen Behandlung unterzogen. Bei einem pH von 11 und darüber wurden Ergebnisse erhalten, die als unkritisch einzustufen sind. Zusätzlich zu den Abbauprodukten der Oxidation waren keine chlororganischen Verbindungen nachweisbar. Anders stellten sich die Ergebnisse im sauren Milieu dar. Es konnte eine Vielzahl von chlorierten organischen Verbindungen nachgewiesen werden.

Um eine Sekundärbelastung auszuschließen, wird empfohlen, den oxidativen Abbau mit Peroxodisulfat im stark basischen Bereich durchzuführen. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher mit Zugabe einer äquimolaren Menge (bezogen auf die bei der Reaktion des Peroxodisulfats entstehenden Protonen) an Natronlauge durchgeführt.

Nach erfolgter Oxidation lagen die Zwischenprodukte nur in kleinen Konzentrationen vor. Für den sicheren Nachweis wurde daher ein Festphasenextraktions-Verfahren vorgestellt, über das eine Anreicherung und eine Fraktionierung in mittelpolare und polare Abbauprodukte vorgenommen wurde. Mit der Umkehrphasen-Chromatographie und der UV/VIS-Diodenarray-Detektion bzw. der Massenspektrometrie (LC-QToF mit ESI) konnten die mittelpolaren Produkte charakterisiert werden. Auf der Grundlage von Präzisionsmassen, die in den meisten Fällen mit Abweichungen  $\leq 5$  ppm vom theoretischen Wert bestimmt wurden (W-Modus und Phosphorsäure als interner Standard), konnten in Verbindung mit Plausibilitätsbetrachtungen Strukturvorschläge gemacht werden. Diese wurden teilweise durch NMR-Untersuchungen ( $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR) von isolierten Abbauprodukten (präparative HPLC) abgesichert.

Die oxidative Behandlung der Hydrolysate führte zu Zwischenprodukten mit kleinen stationären Konzentrationen. Nur in Ausnahmefällen wurde beobachtet, dass die Weiterreaktion eines Intermediates gegenüber dem Hydrolysatabbau deutlich langsamer war und sich ein Produkt, zumindest kurzfristig, in seiner Konzentration aufbauen konnte.

Nach Unterschreitung der im Anhang 38 der Abwasserverordnung geforderten Grenzwerte von  $7 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 436 \text{ nm}$ ),  $5 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 525 \text{ nm}$ ) und  $3 \text{ m}^{-1}$  ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ) ließen sich die Hydrolysate nicht mehr nachweisen. Die gebildeten mittelpolaren Intermediate waren ebenfalls nur noch in Spuren detektierbar. Es lagen hauptsächlich sehr polare niedermolekulare Carboxylate und zum Teil Mineralisierungsprodukte wie Sulfat, Nitrat oder Chlorid vor.

Die auf MS- und NMR-Daten beruhenden Strukturen der Zwischenprodukte ermöglichen im Hinblick auf die Abbauwege folgende Verallgemeinerungen:

- Spaltung der Azobrücke und Einführung von OH-, NH<sub>2</sub>- oder NO<sub>2</sub>-Gruppen an dieser Stelle
- Verlust der Sulfatester- und Sulfonsäuregruppen
- Abspaltung von Hydroxyethylgruppen
- Ausbildung von Isoxazolverbindungen bei geeigneter Grundstruktur

Der Vergleich der untersuchten Oxidationsmethoden zeigte wichtige Unterschiede auf. Peroxodisulfat erwies sich als sehr effektiv in der Entfärbung von Farbstoffhydrolysaten. Die komplette Entfärbung auch stark gefärbter Proben konnte innerhalb weniger Minuten erreicht werden. Der Abbau mit dem Baylase<sup>®</sup> RP-System verläuft deutlich langsamer; die Entfärbung kann hier bis zu Stunden dauern. Der Grund ist in den unterschiedlichen Abbauwegen zu sehen, die auf radikalischen bzw. enzymatischen Mechanismen beruhen.

In der Zahl ihrer Abbauprodukte unterscheiden sich die beiden oxidativen Methoden ebenfalls deutlich. Trotz Verwendung einer zehnfach höheren Menge an Farbstoff konnten bei der Oxidation mit Peroxodisulfat nur wenige Abbauprodukte detektiert werden. Bei Verwendung des enzymatischen Systems zeigte sich eine Vielzahl von Produkten, anhand derer sich sehr gut der Zerfallsweg des Farbkörpers nachvollziehen ließ. Untersuchungen mit Baylase<sup>®</sup> RP bei größeren Farbstoffkonzentrationen (ca. 1 g L<sup>-1</sup>) zeigten, dass auch hier, wie bei der Behandlung mit Peroxodisulfat, die Zahl der Produkte signifikant reduziert ist. Es ist möglich, dass nicht nur die verwendete Oxidationsmethode sondern auch die Farbstoffkonzentration und damit verbundene Diskriminierungseffekte bei der Ionisierung für die geringe Anzahl von nachgewiesenen Oxidationsprodukten verantwortlich sind.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Hydrolyse der Reaktivfarbstoffe

Die Hydrolyse erfolgte mit Hilfe eines Mikrowellenofens, bei dem anhand eines Messensors die Temperatur schnell und sehr genau eingestellt werden kann. Durch die Verwendung eines integrierten Magnetrührers ist eine kontinuierliche Homogenisierung der Proben gewährleistet. Der pH-Wert des in Reinstwasser (Millipore-Wasser) gelösten Farbstoffes (Konzentration:  $1 \text{ g L}^{-1}$  bzw.  $2 \text{ mL L}^{-1}$  für den gelösten Farbstoff Gelb D) wurde mit  $1 \text{ M NaOH}$  auf die in Tabelle 19 angegebenen Werte eingestellt. Die hier und im Laufe der Arbeit angegebenen Farbstoffmengen für die Hydrolyse beziehen sich stets auf den Einsatz von Handelsware des Herstellers.

Reaktivfarbstoff	Temperatur	pH	Reaktionszeit
Schwarz C	$80 \text{ }^\circ\text{C}$	12,0	1 h
Gelb D	$80 \text{ }^\circ\text{C}$	12,0	2 h
Rot F	$80 \text{ }^\circ\text{C}$	12,0	2 h

Tabelle 19: Bedingungen der Hydrolyse

### 6.2 Oxidation der Reaktivfarbstoffe mit Peroxodisulfat

In ein druckfestes und inertes Gefäß aus Teflon wurden  $25 \text{ mL}$  Farbstoffhydrolysat ( $c = 1 \text{ g L}^{-1}$  für Marine C und Rot F bzw.  $c = 2 \text{ mL L}^{-1}$  für Gelb D) pipettiert und mit einem bestimmten Volumen an Peroxodisulfatlösung ( $c = 200 \text{ g L}^{-1}$ ) versetzt. Zur besseren Durchmischung wurde ein Rührkern zugegeben und das Gefäß druckdicht verschlossen.

### 6.3 Oxidation der Reaktivfarbstoffe mit dem Baylase<sup>®</sup> RP-System

In einem  $500 \text{ mL}$  Dreihalskolben wurden  $350 \text{ mL}$  einer Farbstoffhydrolysatlösung ( $c = 100 \text{ mg L}^{-1}$  für Marine C, und Rot F bzw.  $c = 200 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  für Gelb D) bei einer Temperatur von  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgelegt und mit einem  $1 \text{ molaren}$  Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Nach Zugabe von vier Teilen Baylase<sup>®</sup> Assist RP 01 Lösung wurde eine Minute gerührt und dann ein Teil Baylase<sup>®</sup> RP Enzymlösung in den Kolben gegeben. Zu diesem Zeit-

punkt setzte die Reaktion ein. Jeweils 100 mL der Lösung wurden entnommen und direkt auf Eis gelagert, um die Reaktion zu verlangsamen und möglichst zu stoppen.

## 6.4 Geräteparameter

### *Einstellungen Massenspektrometer (W-Modus)*

Capillary Voltage	2,50 kV
Cone Voltage	40 V
RF Lens	20 V
Source Temp.	95 °C
Desolvation Temp.	180 °C
Cone Gas Flow	50 L h <sup>-1</sup>
Desolvation Gas Flow	500 L h <sup>-1</sup>
Tof Voltage	10,15 kV
MCP-Voltage	2.800 V
Start Mass	50,0 Da
End Mass	700,0 Da bzw. 950,0 Da (abhängig vom untersuchten Farbstoff)

### *Einstellungen HPLC*

Flow	0,800 mL min <sup>-1</sup>
Stop Time	30,0 °C
Sample Temperature	4,0 °C
Degasser	Continuous
Eluent A	H <sub>2</sub> O mit 25 mM Ammoniumacetat
Eluent B	H <sub>2</sub> O / Acetonitril (70/30) mit 25 mM Ammoniumacetat
Eluentenprogramm	

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
8	100	0
30	0	100
33	100	0

**Tabelle 20: Eluentenprogramm HPLC für Farbstoffanalyse**

### *Einstellungen Dioden Array Detektor*

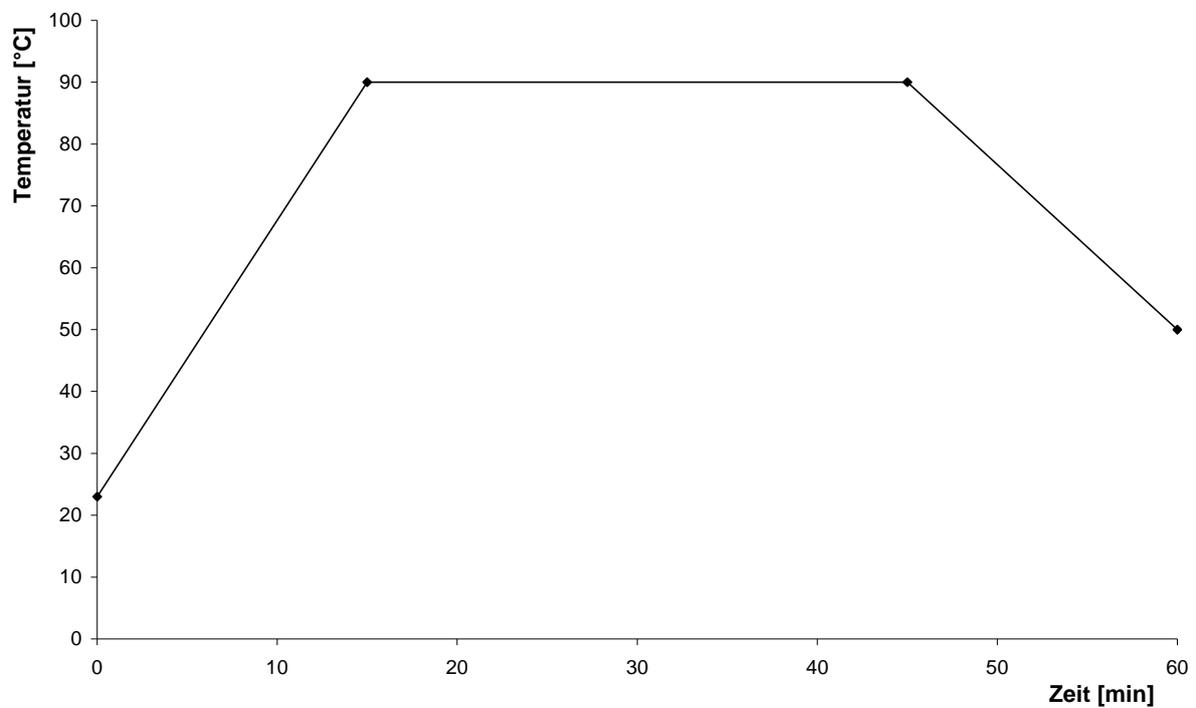
Start Wavelength	200 nm
End Wavelength	650 nm
Resolution	1.2 nm
Sampling Rate	1.0 Spektren s <sup>-1</sup>

## Experimenteller Teil

---

### *Einstellungen Mikrowelle*

Stirring	maximal
Heizzeit auf Reaktionstemp.	in 15 min
Halten der Reaktionstemp.	30 min bei Oxidation bzw. 120 min bei Hydrolyse
Abkühlen von Reaktionstemp.	innerhalb 15 min ohne Heizleistung



**Abbildung 40: Heizprofil der Mikrowelle am Beispiel einer Oxidation mit PDS**

## 7. Anhang

### 7.1 NMR-Daten von Gelb D Hydrolysat und daraus entstandener Abbauprodukte

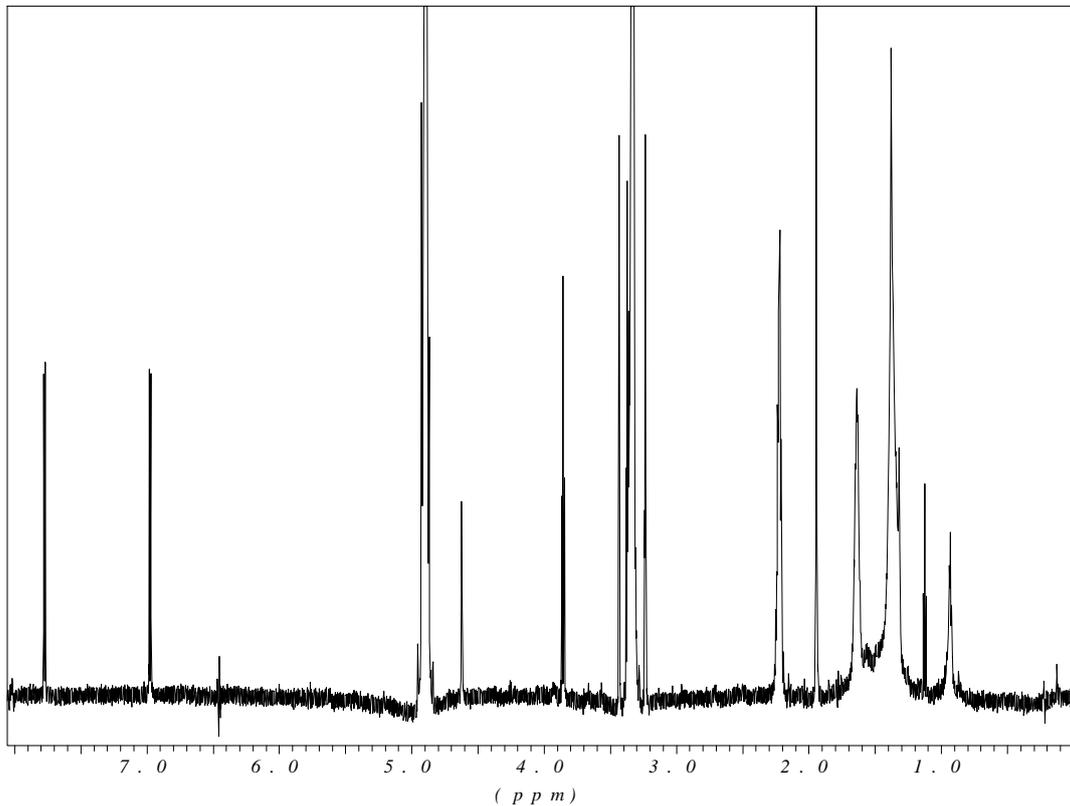
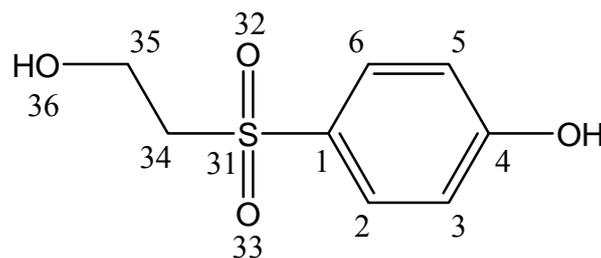


Abbildung 41:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 201 Da



Auswertung:

Atomnummer	$^1\text{H}$ Shift [ppm]	Integral	Multiplizität* [Hz]
2 und 6	7,77	2	ps-d (8,8)
3 und 5	6,98	2	ps-d (8,8)
34	3,37	2	t (6,4)
35	3,85	2	t (6,4)

Tabelle 21: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 201 Da

\*: d: Dublett, dd: doppel Dublett, ps-d: pseudo-Dublett höherer Ordnung, t: Triplet, b: breites Signal, ü: durch Signalüberlagerung nicht erkennbar.

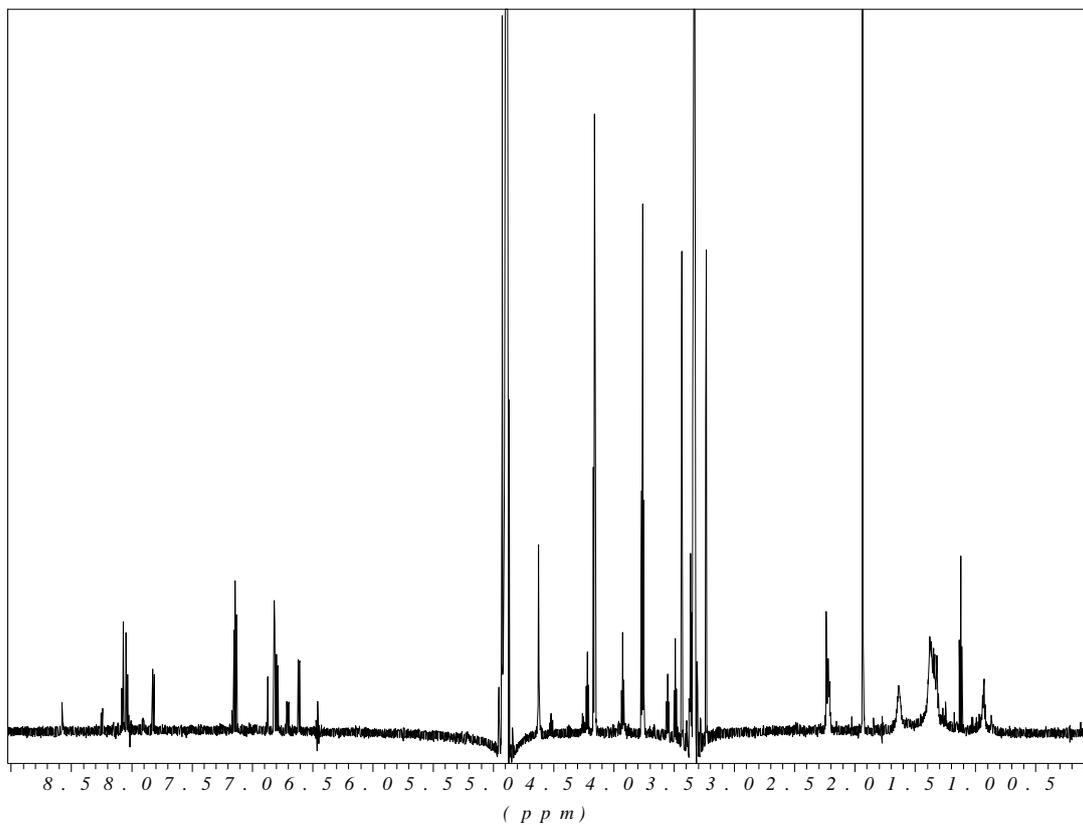
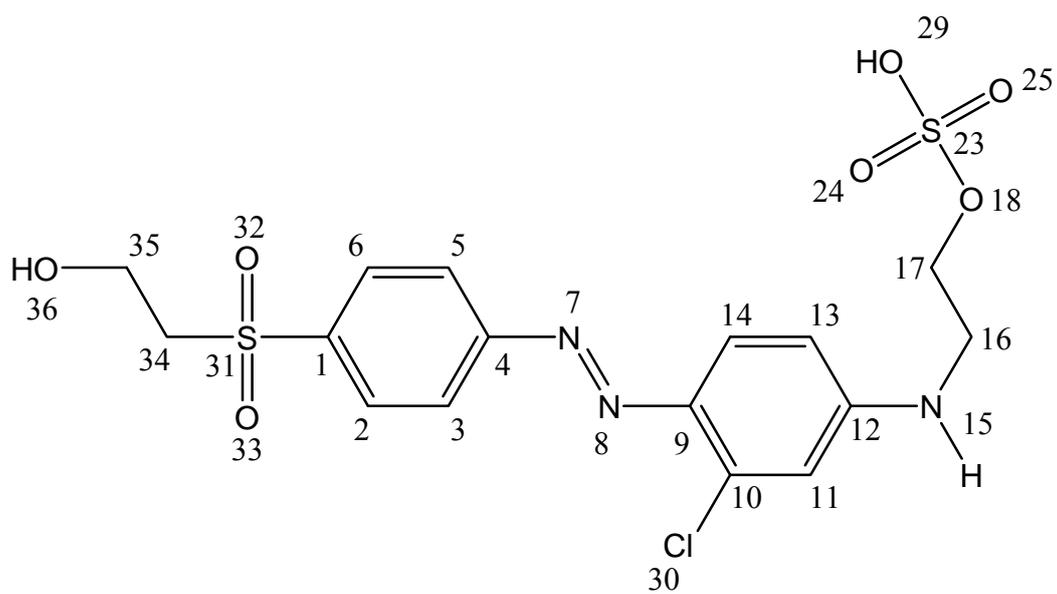


Abbildung 42:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 462 Da

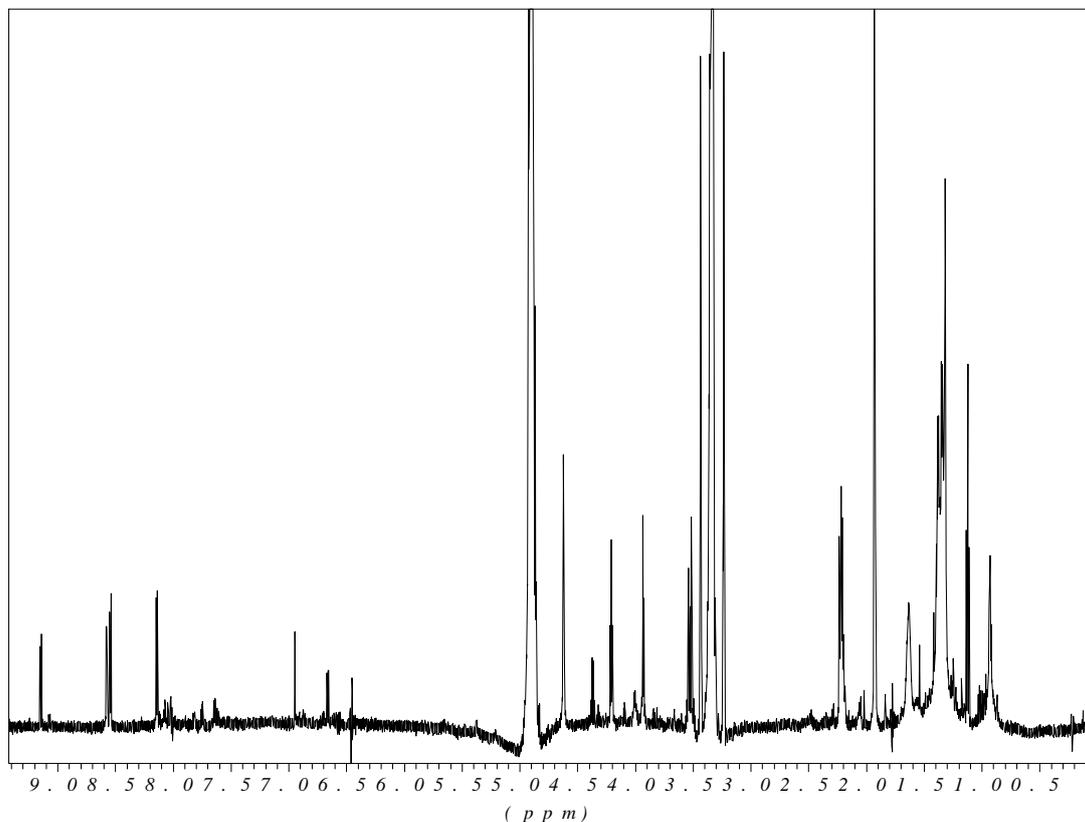


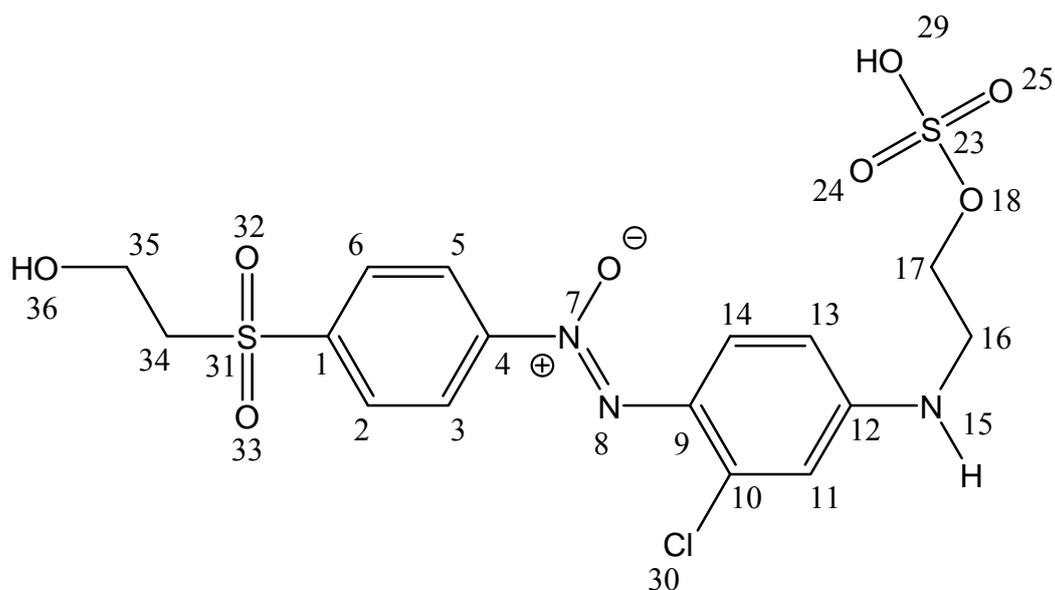
Auswertung:

Atomnummer	$^1\text{H}$ Shift [ppm]	Integral	Multiplizität*
2 und 6	8,07	2	ps-d (8,6)
3 und 5	8,04	2	ps-d (8,6)
11	6,87	1	d (2,4)
13	6,70	1	dd (9,1/2,4)
14	7,82	1	d (9,1)
15	8,57	1	b
16	3,55	2	t (5,6)
17	4,22	2	t (5,6)
34	3,37	2	t (6,4)
35	3,85	2	t (6,4)

Tabelle 22: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 462 Da

\*: d: Dublett, dd: doppel Dublett, ps-d: pseudo-Dublett höherer Ordnung, t: Triplet, b: breites Signal, ü: durch Signalüberlagerung nicht erkennbar.

Abbildung 43:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 478 Da



Auswertung:

Atomnummer	$^1\text{H}$ Shift [ppm]	Integral	Multiplizität* [Hz]
2 und 6	8,14	2	ps-d (8,8)
3 und 5	8,55	2	ps-d (8,8)
11	6,95	1	d (2,7)
13	6,66	1	dd (9,3/2,7)
14	9,14	1	d (9,3)
15	8,58	1	b
16	3,54	2	t (5,7)
17	4,21	2	t (5,7)
34	3,52	2	t (6,0)
35	3,93	2	t (6,0)

Tabelle 23: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 478 Da

\*: d: Dublett, dd: doppel Dublett, ps-d: pseudo-Dublett höherer Ordnung, t: Triplet, b: breites Signal, ü: durch Signalüberlagerung nicht erkennbar.

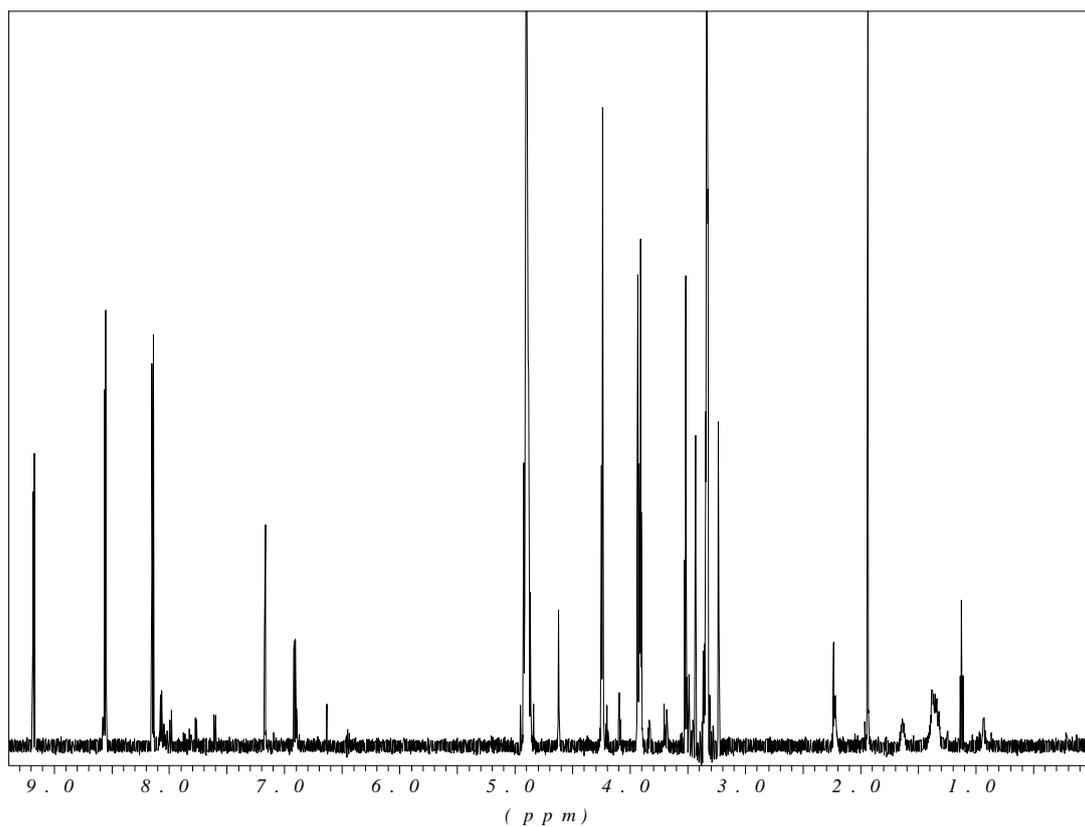
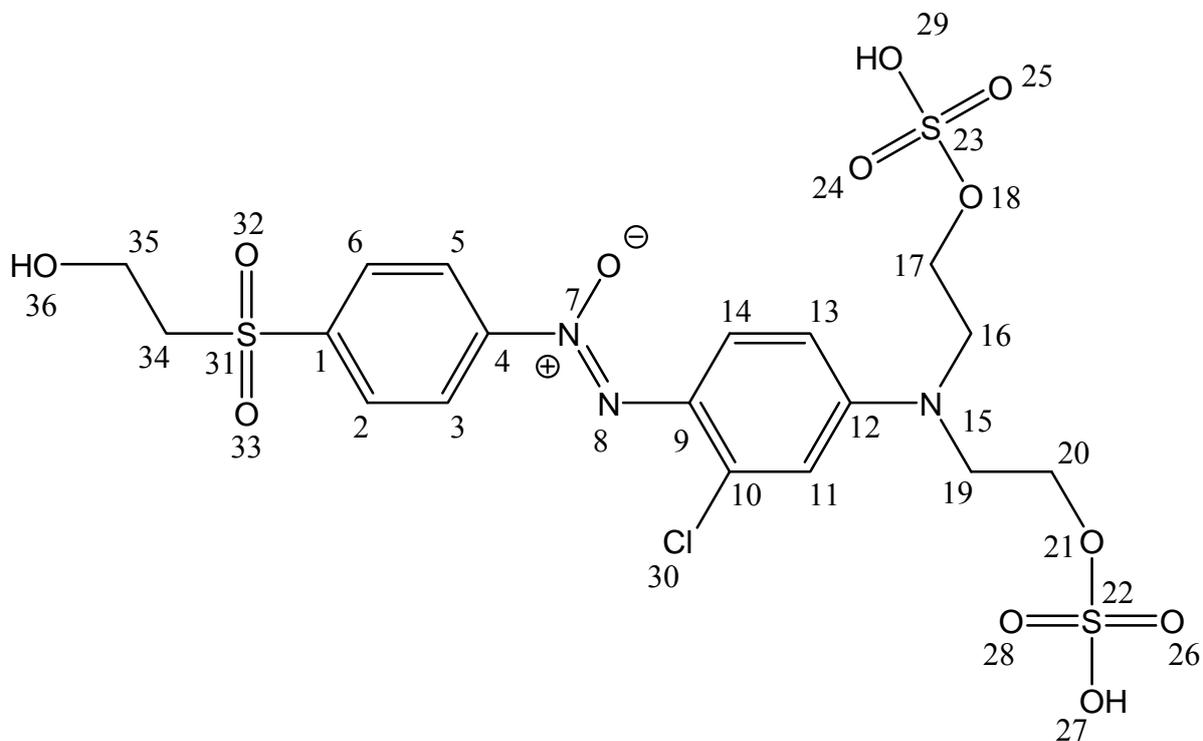


Abbildung 44:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 602 Da

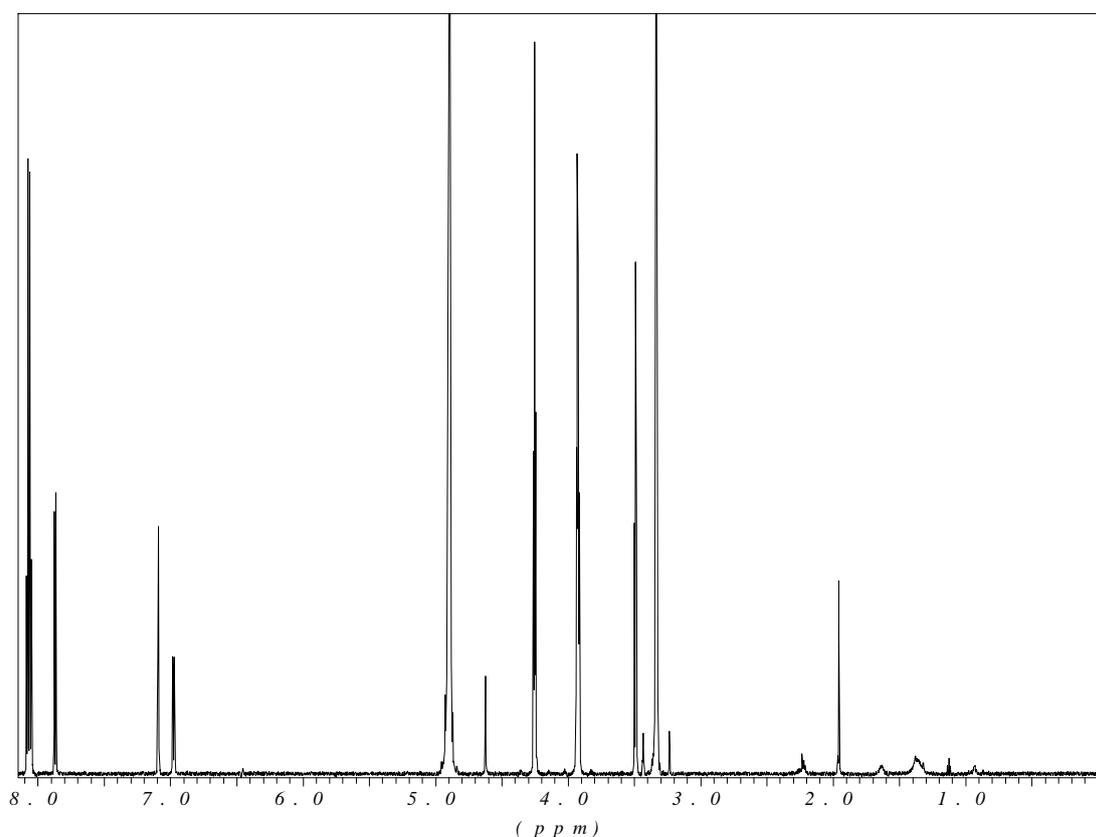


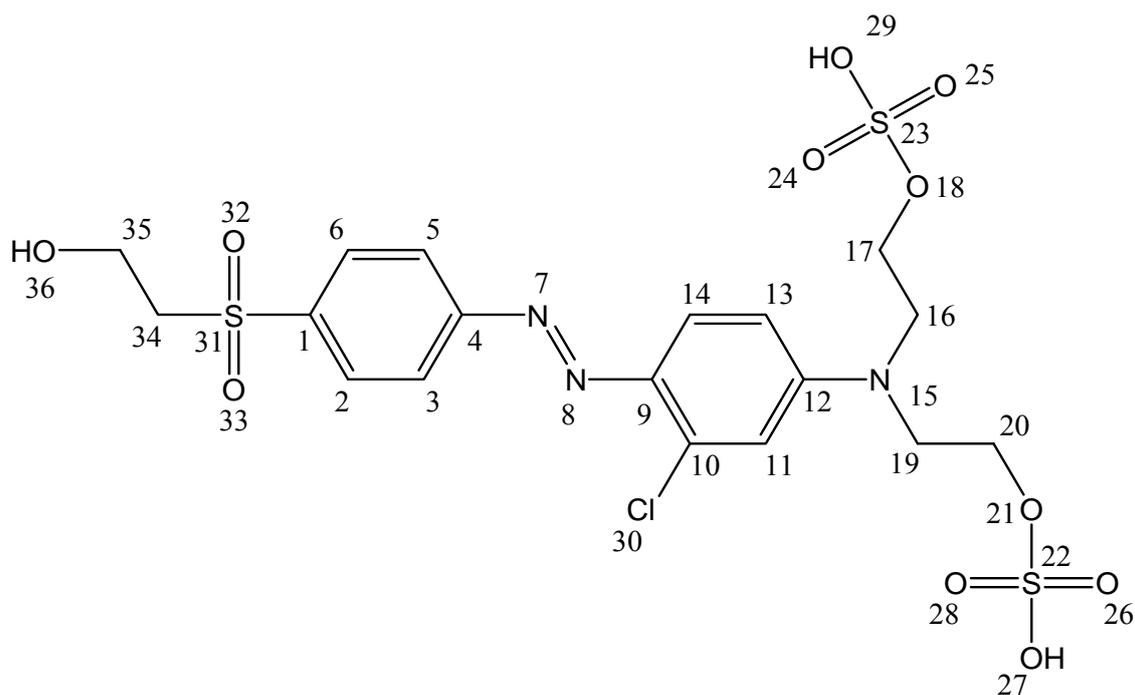
Auswertung:

Atomnummer	$^1\text{H}$ Shift [ppm]	Integral	Multiplizität* [Hz]
2 und 6	8,14	2	ps-d (8,8)
3 und 5	8,56	2	ps-d (8,8)
11	7,17	1	d (3,0)
13	6,91	1	dd (9,5/3,0)
14	9,18	1	d (9,5)
16 und 19	3,91	4	t (6,0)
17 und 20	4,24	4	t (6,0)
34	3,51	2	t (6,1)
35	3,93	2	t (6,1)

Tabelle 24: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 602 Da

\*: d: Dublett, dd: doppel Dublett, ps-d: pseudo-Dublett höherer Ordnung, t: Triplet, b: breites Signal, ü: durch Signalüberlagerung nicht erkennbar.

Abbildung 45:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Hydrolysats von Gelb D mit der Masse 586 Da



Auswertung:

Atomnummer	<sup>1</sup> H Shift [ppm]	Integral	Multiplizität* [Hz]	<sup>13</sup> C Shift [ppm]
1	-	-	-	139,7
2 und 6	8,08	2	ps-d (8,6)	129,0
3 und 5	8,05	2	ps-d (8,6)	122,5
4	-	-	-	156,4
9	-	-	-	139,0
10	-	-	-	140,0
11	7,09	1	d (2,8)	111,7
12	-	-	-	152,5
13	6,98	1	dd (9,4/2,8)	111,0
14	7,87	1	d (9,4)	118,3
16 und 19	3,93	4	ü	49,9
17 und 20	4,25	4	t (6,0)	64,4
34	3,49	2	t (6,2)	58,0
35	3,93	2	ü	55,3

Tabelle 25: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 586 Da

\*: d: Dublett, dd: doppel Dublett, ps-d: pseudo-Dublett höherer Ordnung, t: Triplet, b: breites Signal, ü: durch Signalüberlagerung nicht erkennbar.

Anmerkung: Die Signale der OH-Gruppen tauschen mit dem H<sub>2</sub>O aus der Probe aus und werden nicht separat gefunden.

## 7.2 Bestimmung der Enzymaktivität

### Konzentration Farbstoffhydrolysat

Verwendete Menge Handelsware (Rot F):	1000 mg L <sup>-1</sup>
Realer Anteil an Farbstoff in Handelsware:	45 %
Reale verwendete Menge Farbstoff:	450 mg L <sup>-1</sup>
Molare Masse von Rot F Hydrolysat:	602 g mol <sup>-1</sup>
Sich ergebende Konzentration von Rot F Hydrolysat:	$7,5 \cdot 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup>

### Bestimmung von $\epsilon_{516\text{ nm}}$

Küvettenlänge:	1 cm
Gemessene Extinktion:	2,5
Konzentration Farbstoff:	$7,5 \cdot 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup>
Berechnung nach Lambert-Beer ergab für $\epsilon_{516\text{ nm}}$ :	$3,3 \cdot 10^3$ L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

Für eine Lösung mit der Konzentration von 1 mol L<sup>-1</sup> in einer Küvette mit der Schichtdicke von 1 cm ergäbe sich – zumindest rechnerisch – ein Extinktionswert von  $E = 3,3 \cdot 10^3$ . Bezogen auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  ergäbe sich ein Extinktionswert von  $E = 3,3$ .

### Bestimmung der Enzymaktivität U

Mit der Definition, dass ein enzymatischer Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute einem U entspricht, folgt, dass die Abnahme der Extinktion von Rot F Hydrolysat um 3,3 Einheiten in einer Minute ( $\Delta E \text{ min}^{-1} = 3,3 \text{ min}^{-1}$ ) ebenfalls einem U entspricht.

Experimentell wurde für Rot F Hydrolysat eine Abnahme der Extinktion von  $\Delta E = 11,3$  pro Minute bestimmt (vgl. Abbildung 37, maximale Steigung der Extinktions-Zeit-Kurve). Daraus folgt, dass die Aktivität der zugegebenen Menge an Enzym (0,25  $\mu\text{L}$ ) bei 3,4 U lag.

### Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms ( $\text{U mg}^{-1}$ )

Die Methode nach Bradford ergab einen Proteingehalt von 3,6  $\mu\text{g}$  in 0,25  $\mu\text{L}$  Enzymlösung, somit entsprechen 3,6  $\mu\text{g}$  insgesamt 3,4 U, was einer spezifischen Enzymaktivität von 940  $\text{U mg}^{-1}$  entspricht.

Bestimmung der Volumenaktivität (U mL<sup>-1</sup>)

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$

mit  $\Delta E \text{ min}^{-1}$  = maximale Enzymgeschwindigkeit als Änderung der Extinktion pro Minute (11,3 min<sup>-1</sup>)  
 V = Volumen des Ansatzes (1 mL)  
 $\varepsilon$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient Rot F bei 516 nm (3,3 mL  $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  
 d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)  
 v = Volumen zugegebenes Enzym (0,25  $\mu\text{L}$ )

Sich ergebende Volumenaktivität: 13.700 U mL<sup>-1</sup>

**7.3 Materialien**Geräte**Mikrowellengerät:**

MLS Mikrowellen Laborsystem ETHOSplus, Steuerungs- und Auswertungssoftware Easy-wave 3.54, MLS GmbH, Leutkirch, Deutschland

**HPLC-System:**

Waters 2690 Trennmodul, Waters 2996 Photo Dioden Array Detektor, UV-VIS-Detektor Merck Hitachi L-7420, Steuerungs- und Auswertungssoftware Millennium<sup>32</sup> Version 3.05, Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA

**LC-MS:**

Waters 2690 Trennmodul, Waters 2996 Photo Dioden Array Detektor, Micromass Q-ToF Ultima<sup>TM</sup> API (kalibriert mit Phosphorsäure) Steuerungs- und Auswertungssoftware MassLynx 3.5, Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA

**Peristaltik-Pumpe:**

Masterflex<sup>®</sup> L/S<sup>TM</sup> Economy Drive, Cole Parmer Instrument Company, Barrington, IL, USA

**Speed Vac:**

Jouan RC 10-22 mit Kryostat RCT 90, Jouan S.A., St. Herblain, Frankreich

**Zentrifuge:**

Beckman-Coulter<sup>TM</sup> Allegra<sup>TM</sup> 25R Centrifuge mit Swing Bucket, Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

**NMR-Gerät:**

Bruker 700 UltraShield<sup>TM</sup> mit kryogenem TXI-Probenkopf, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland

**Photometer:**

Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrometer mit Win UV Vers. 2.00, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Probenbearbeitung

**HPLC-Säulen:**

Phenomenex<sup>®</sup> Prodigy 5  $\mu$  ODS(3) 100 Å, 250x10 mm, Aschaffenburg, Deutschland

Macherey-Nagel CC250/4 Nucleodur C18 Pyramid 5  $\mu$ , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

**Trennmembranen Enzym:**

Vivascience Vivaflow 50, 10.000 MWCO PES, Vivascience GmbH, Hannover, Deutschland

Vivascience Vivaspin 20 mL Concentrator, 10.000 MWCO PES, Vivascience GmbH, Hannover, Deutschland

**Probenanreicherung Festphase:**

Varian Bond Elut-PH, 1.000 mg, 6 mL, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien:

- Acetonitril LiChrosolv<sup>®</sup> Hypergrade, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Wasser MilliQ Synthesis A10, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
- Natriumperoxodisulfat p.a., Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Baylase<sup>®</sup> RP + Baylase<sup>®</sup> Assist RP 01, LANXESS Deutschland GmbH, Leverkusen, Deutschland
- 1-Naphthol p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

AbwV	Abwasser-Verordnung
AOX	adsorbierbare organische Halogenverbindungen
APCI	atmospheric-pressure chemical ionisation
APLI	atmospheric-pressure laser ionisation
API	atmospheric-pressure ionisation
APPI	atmospheric-pressure photo ionisation
ATBS	[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)]
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSB <sub>5</sub>	biologischer Sauerstoffbedarf nach fünf Tagen
C.I.	Color Index
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DFZ	Durchsichtsfarbzahl
DOC	dissolved organic carbon
ESI	electrospray ionisation
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
EU	Europäische Union
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	Meerrettich Peroxidase
Hz	Hertz
IC	Ionenchromatographie
ICR	Ionenzyklotronresonanz
KKV	Kalt-Klotz-Verweil Verfahren
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
LC	Flüssigkeits-Chromatographie
M	Molar
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
MCP	multi channel plate
MS	Massenspektrometrie

MWCO	molecular weight cut off
NMR	nuclear magnetic resonance
ODS	octa decyl sulfat
p.a.	pro analysi
PDS	Peroxodisulfat
PES	Polyethersulfon
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
RP	reversed phase
SAK	spektraler Absorptionskoeffizient
S.I.	Système International d'unités
S <sub>N</sub>	nukleophile Substitution
SPE	solid phase extraction
TIC	total ion current
Tof	time of flight
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TRGS	technische Regeln für Gefahrstoffe
U	Unit (enzymatische)
UV/Vis	ultraviolett / sichtbar
v <sub>max</sub>	maximale Geschwindigkeit
VwV	Verwaltungs-Vorschrift

## 7.5 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau eines Reaktivfarbstoffs.....	5
Abbildung 2: Typische Reaktivanker.....	6
Abbildung 3: Nukleophile Substitution zur Bindung von Reaktivfarbstoffen an Cellulosefasern.....	7
Abbildung 4: Nukleophile Addition zur Bindung von Reaktivfarbstoffen an Cellulosefasern	8
Abbildung 5: Criegee-Mechanismus der Ozonolyse .....	12
Abbildung 6: Schematischer Verlauf des Abbaus von Farbstoffen mit einem Enzym / Mediator-System.....	23
Abbildung 7: QToF-Massenspektrometer der Firma Micromass .....	26
Abbildung 8: Oxidation von $\alpha$ -Naphthol mit Peroxodisulfat bei pH 11 .....	30
Abbildung 9: Oxidation von $\alpha$ -Naphthol mit Peroxodisulfat bei pH 2.....	30
Abbildung 10: Chemische Struktur der untersuchten Farbstoffe.....	33
Abbildung 11: Labormikrowellensystem ETHOSplus der Firma MLS GmbH und PTFE Druckgefäß .....	34
Abbildung 12: LC-Analysenverfahren in Abhängigkeit von der Polarität .....	35
Abbildung 13: DAD-Chromatogramme von Marine C Hydrolysat vor und nach PDS- Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	39
Abbildung 14: TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	40
Abbildung 15: Abbauschema für Marine C Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat .	44
Abbildung 16: DAD-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat mit zunehmender Menge an zugesetzter Peroxodisulfatlösung; 50 mL SPE-Anreicherung, y-Achsen festgehalten.....	46
Abbildung 17: TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS- Behandlung; ESI-negativ Modus; SPE-Anreicherung, y-Achsen festgehalten	47
Abbildung 18: TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS- Behandlung; ESI-negativ Modus; SPE-Anreicherung; Vergrößerung des Ausschnitts zwischen 10 und 16 Minuten.....	48
Abbildung 19: Abbauschema von Gelb D Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat....	52
Abbildung 20: DAD-Chromatogramme von Rot F Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten.....	55

---

Abbildung 21: TIC-Chromatogramme von Rot F Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	57
Abbildung 22: Abbauschema von Rot F Hydrolysat bei Behandlung mit Peroxodisulfat .....	61
Abbildung 23: Membranen zur Abtrennung des Enzyms .....	63
Abbildung 24: Peristaltikpumpe und Membran zur Enzymabtrennung.....	64
Abbildung 25: DAD-Chromatogramme von Marine C vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	65
Abbildung 26: TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	67
Abbildung 27: Abbauschema für die Behandlung von Marine C mit Baylase® RP .....	71
Abbildung 28: DAD-Chromatogramme von Gelb D vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	72
Abbildung 29: TIC-Chromatogramme von Gelb D vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	73
Abbildung 30: Abbauschema für die Behandlung von Gelb D mit Baylase® RP.....	77
Abbildung 31: DAD-Chromatogramme von Rot F vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	79
Abbildung 32: TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach Enzymbehandlung; mit SPE-Anreicherung; y-Achsen sind festgehalten .....	80
Abbildung 33: Hauptkomponenten von Rot F Handelsware .....	84
Abbildung 34: Abbauschema für die Behandlung von Rot F mit Baylase® RP .....	85
Abbildung 35: Konzentrationsänderung der wichtigsten Hydrolysatkomponenten .....	88
Abbildung 36: Abnahme der Extinktion von Rot F Hydrolysat mit der Zeit in Gegenwart von Baylase® RP im Wellenlängenbereich von 450 bis 600 nm .....	91
Abbildung 37: Abnahme der Extinktion von Rot F Hydrolysat mit der Zeit bei 516 nm in Gegenwart von Baylase® RP (0,25 µL Enzym in 1 mL Hydrolysatlösung)....	92
Abbildung 38: Schematischer oxidativer Abbau einer Azobrücke.....	94
Abbildung 39: Abbau von Phenolsulfonsäure über das Zwischenprodukt Brenzcatechin .....	94
Abbildung 40: Heizprofil der Mikrowelle am Beispiel einer Oxidation mit PDS.....	102
Abbildung 41: <sup>1</sup> H-NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 201 Da .....	103
Abbildung 42: <sup>1</sup> H-NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 462 Da .....	104

---

Abbildung 43: $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 478 Da .....	105
Abbildung 44: $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Peroxodisulfatproduktes von Gelb D mit der Masse 602 Da .....	107
Abbildung 45: $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Hydrolysats von Gelb D mit der Masse 586 Da.....	108

## 7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen beobachteter Farbe und des absorbierten Anteils des Lichtes.....	3
Tabelle 2: Grenzwerte der Spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK).....	9
Tabelle 3: Normalpotentiale verschiedener Oxidationsmittel bei 25 °C.....	10
Tabelle 4: Ausgewählte Reaktivfarbstoffe.....	31
Tabelle 5: Untersuchte Farbstoffe.....	32
Tabelle 6: Verbrauch an Peroxodisulfat für die einzelnen Farbstoffhydrolysate.....	38
Tabelle 7: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach der PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS.....	41
Tabelle 8: Abbauprodukte von Marine C nach PDS-Behandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	43
Tabelle 9: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Gelb D Hydrolysat vor und nach PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS.....	49
Tabelle 10: Abbauprodukte von Farbstoff Gelb D Hydrolysat: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	50
Tabelle 11: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach der PDS-Behandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung. In eckigen Klammern findet sich das molare Verhältnis von hydrolysiertem Farbstoff zu PDS.....	58
Tabelle 12: Abbauprodukte von Rot F nach PDS-Behandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	59
Tabelle 13: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Marine C vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung.....	68
Tabelle 14: Abbauprodukte von Marine C nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	69

---

Tabelle 15: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Gelb D vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung.....	74
Tabelle 16: Edukte und Abbauprodukte von Gelb D nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	76
Tabelle 17: Umfassende Auswertung der TIC-Chromatogramme von Rot F vor und nach der Enzymbehandlung; ESI-negativ-Modus; SPE-Anreicherung.....	82
Tabelle 18: Edukte und Abbauprodukte von Rot F nach Enzymbehandlung: Präzisionsmassen, Summenformeln, Abweichung von den theoretischen Massen in ppm; ESI-negativ-Modus.....	83
Tabelle 19: Bedingungen der Hydrolyse.....	100
Tabelle 20: Eluentenprogramm HPLC für Farbstoffanalyse .....	101
Tabelle 21: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 201 Da....	103
Tabelle 22: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 462 Da....	105
Tabelle 23: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 478 Da....	106
Tabelle 24: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 602 Da....	108
Tabelle 25: Zuordnung der NMR-Daten zu der entsprechenden Molekülstruktur 586 Da....	109

## 8. Literatur

- <sup>1</sup> L.A. Hütter; Wasser und Wasseruntersuchung. Laborbücher Chemie, Verlag Salle + Sauerländer, 6. erweiterte und aktualisierte Auflage, (1994).
- <sup>2</sup> S. Gäb; Vorlesung Wasserchemie, BU-Wuppertal, (2003).
- <sup>3</sup> Bundesverband der deutschen Gas- und Wasserwirtschaft, BGW-News, Kurz notiert: Trinkwasserpreise. 30. Juni 2005.
- <sup>4</sup> K. Bellefontaine, J. Lohaus, M. Willms, T. Herkner, M. Schmitz, H. Herbst, H. Stepkes; Marktdaten Abwasser 2003 – Ergebnisse der gemeinsamen Umfrage zur Abwasserentsorgung der Deutschen Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (ATV-DVWK) und dem Bundesverband der deutschen Gas- und Wasserwirtschaft (BGW), (2004).
- <sup>5</sup> H. Schönberger; Zur Abwasserfrage der Textilveredlungsindustrie, Fortschrittsberichte. Reihe 15 Umwelttechnik, Nr. 196, zugl. Dissertation, Technische Universität Berlin, VDI-Verlag, Düsseldorf (1998).
- <sup>6</sup> R. Krull; Produktionsintegrierte Behandlung industrieller Abwässer zur Schließung von Stoffkreisläufen. In: Schriftenreihe des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig, Dietmar C. Hempel (Hrsg.), Band 15, zugl. Habilitationsschrift, Technische Universität Braunschweig, FIT-Verlag für Innovation und Technologietransfer, Paderborn (2003), ISBN 3-932252-20-9.
- <sup>7</sup> I. Holme; Cotton dyeing and finishing to 2000 and beyond. *International Dyer*, 182(3), (1997), S. 32-41.
- <sup>8</sup> J. Pierce; Colour in textile effluents – the origins of the problem. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 110(4), (1997), S. 131-133.
- <sup>9</sup> V. Oles, W. Hellmann, D. Lazar; Abwasseraufbereitungskosten in der Textilveredlungsindustrie. *Melliand Textilberichte*, 76(9), (1995), S. 720-723.
- <sup>10</sup> K. Jedele; Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Weitergehende Abwasserreinigung. Leistungssteigerung bestehender Abwasserreinigungsanlagen. 58. Siedlungswasserwirtschaftliches Kolloquium. Forschungs- und Entwicklungsinstitut für Industrie- und Siedlungswasserwirtschaft sowie Abfallwirtschaft e.V. Stuttgart. Band 78, (1983), S. 123-136.
- <sup>11</sup> Sandoz AG; Sicherheitsdatenblätter.
- <sup>12</sup> Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer. AbwV Anhang 38 Textilherstellung, Textilveredlung, (2004), BGBl. I. S. 1155-1157.
- <sup>13</sup> E. Breitmaier, G. Jung; Organische Chemie – Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, 5. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, (2005), S. 709.
- <sup>14</sup> Normenausschuss Wasserwesen im Deutschen Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 7887, (1994).
- <sup>15</sup> W.R. Pötsch; Der erste Reaktivfarbstoff schon 1895? *Melliand Textilberichte* 77(5), (1996), S. 334.
- <sup>16</sup> G. Ebner, D. Schelz; Textilfärberei und Farbstoffe. Springer Verlag, (1989), S. 226.
- <sup>17</sup> P. Rys, H. Zollinger; Leitfaden der Farbstoffchemie. VCH Weinheim, (1970).
- <sup>18</sup> H. Zollinger; Color Chemistry – Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 3. Auflage, WILEY-VCH Weinheim, (2003).
- <sup>19</sup> Römpp, Römpp Chemielexikon. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Bd. 5, (1995), S. 3804.

- 20 H. Tappe, W. Helmling, P. Mischke, K. Rebsamen, U. Reiher, W. Russ, L. Schläfer, P. Vermehren; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6<sup>th</sup> Edition; (2001); Online Version Bibliothek BU-Wuppertal.
- 21 M. Czychowski, G. Prümm; Wasserrecht Nordrhein-Westfalen. 11. Auflage, Deutscher Gemeinde Verlag, Köln, (2003).
- 22 Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Länderarbeitsgemeinschaft Wasser, Mindestanforderungen an Abwassereinleitungen - § 7a Wasserhaushaltsgesetz – Textilherstellung, Textilveredlung: Hinweise und Erläuterungen zu Anhang 38 der Abwasserverordnung. Bundesanzeiger, 56(9a), (2004), S. 1-54.
- 23 K. Müller, H. Schönberger; Der Anhang 38 zur Abwasserverordnung. Melliand Textilberichte, 83(4), (2002), S. 256-261.
- 24 R.A. Moll; Die Toxikologie von Textilfarbstoffen - Sind farbige Textilien gesundheitlich unbedenklich? Melliand Textilberichte, 72(10), (1991), S. 836-840.
- 25 International Agency for Research on Cancer - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7, Lyon, Frankreich, (1987), S. 56-74.
- 26 USA Chemical Regulation Reporter 11-23-90.
- 27 USA Chemical Regulation Reporter – National toxicology program draft report abstracts on Long-term carcinogenesis testing for six chemicals. Vol. 14, 15.03.1991, S. 1779-1784.
- 28 § 3 in Verbindung mit Anlage 1 Ziffer 7 der Bedarfsgegenständerverordnung. In der Fassung der Bekanntmachung vom 23. Dezember 1997 (BGBl. 1998 I S. 5), zuletzt geändert durch Art. 1 Zehnte ÄndVO v. 8.12.2004 (BGBl. I. S. 3307).
- 29 Mitteilung XXIV der Senatskommission zur Prüfung gesundheitlicher Arbeitsstoffe, (1988), S. 70.
- 30 TRGS 900 Beschluss des Ausschusses vom 09.11.1988, Punkt 3.
- 31 § 5 (5) in Verbindung mit Anhang II Nr. 1 der Gefahrstoffverordnung (BGBl. I S. 3758), geändert durch Art. 2 Neunte ÄndVO v. 23.12.2004 (BGBl. I. S. 3855).
- 32 F.W. Küster; Rechentafeln für die chemische Analytik / Küster ; Thiel. Bearbeitet von Alfred Ruland; 105. Auflage; Berlin, New York; de Gruyter (2002)
- 33 Y. Kuji, T. Kato, S. Matsumaru; Dyeing Plant Effluent Treatment. Japan Kokai 74 98,055, (1974). In: Chemical Abstracts, Nr. 84477k, Vol. 83, (1975), S. 345.
- 34 A. Ikehata; Dye Works Wastewater Decolorization Treatment Using Ozone. Proc. 1<sup>st</sup> International Symposium on Ozone for Water and Wastewater Treatment, International Ozone Institute, Waterbury, Connecticut (1975), S. 688-711.
- 35 N.N.; Ozone-Carbon Dye-Waste Treatment, Textile Industries, 138(10), (1974), S. 43-45.
- 36 E.H. Snider, J.J. Porter; Ozone Treatment of Dye Waste. Journal Water Pollution Control Federation, 46(5), (1974), S. 886-894.
- 37 E.H. Snider, J.J. Porter; Ozone Destruction of Selected Dyes in Wastewater. American Dyestuff Reporter, 63(8), (1974), S. 36-48 und S. 60.
- 38 U. Reicherter, H. Sontheimer; Untersuchungen zur Anwendung von Ozon bei der Wasser- und Abwasseraufbereitung. Vom Wasser, 41, (1973), S. 369-380.
- 39 K.R. Dietrich; Kombination physikalisch-chemischer Verfahren zur Abwasserreinigung mit der Ozonbehandlung, Chemiker-Zeitung, 100(2), (1976), S. 68-71.

- 40 C. Gottschalk, J.A. Libra, A. Saupe; Ozonation of water and waste water. Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2000).
- 41 M.S. Harakeh, M. Butler; Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. *Ozone - Science and Engineering*, 6(4), (1985), S. 235-243.
- 42 R.-J. Becker, G. Lapresa, D.C. Hempel; Aufarbeitung von Wasser: Desinfektion wässriger Lösungen durch Ozon. *Chemie, Anlagen und Verfahren*, 26(1), (1993), S. 72-74.
- 43 G. Lapresa, G. Bünning, J.-T. Franz, D.C. Hempel; Vitalität von Mikroorganismen nach Ozonwirkung. *Bioscope*, 2(3), (1994), S. 26-28.
- 44 G. Bünning, D.C. Hempel; Vital-Fluorochromization of Microorganisms Using 3',6'-Diacetylfluorescein to Determine Damages of Cell Membranes and Loss of Metabolic Activity by Ozonation. *Ozone - Science & Engineering*, 18(2), (1996), S. 173-181.
- 45 M. Sunder; Oxidation grundwasserrelevanter Spurenverunreinigungen mit Ozon und Wasserstoffperoxid im Rohrreaktor. In: D.C. Hempel (Hrsg.), *ibvt-Schriftenreihe Band 1*, zugl. Dissertation, Universität-GH Paderborn, FIT-Verlag für Innovation und Technologietransfer, Paderborn (1996).
- 46 M. Sunder, D.C. Hempel; Oxidation of tri- and perchlorethane an aqueous solution with ozone and hydrogen peroxide in a tube reactor. *Water Research*, 31(1), (1997), S. 33-40.
- 47 M. Matsui, T. Kimura, T. Nambu, K. Shibata, Y. Takase; Reaction of water soluble dyes with ozone. *Journal of the society of dyers and colourists*, 100(4), (1984), S. 125-127.
- 48 M. Tzitzis, D.V. Vayenas, G. Lyberatos; Pretreatment of textile-industry wastewaters with ozone. *Water Science and Technology*, 29(9), (1994), S. 151-160.
- 49 P. Otto, M. Hemmi, R. Krull, D. C. Hempel; Partielle Ozonisierung recalcitranter Azofarbstoff Spaltprodukte zur Initiierung der biologischen Abbaubarkeit. *gwf Wasser/Abwasser*, 139(9), (1998), S. 579-585.
- 50 L. Lepri, F. Masi, C. Lubello, P. Verlicchi, R. Valeri, L. Ciatti, P. Dettori, L. Masotti; Water reuse in Prato (Italy). In: *Proc. 2<sup>nd</sup> International Conference Advanced Wastewater Treatment, Recycling and Reuse*, Mailand, 14-16 September (1998), S. 821-829.
- 51 M. Schmitt, D.C. Hempel; Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit durch Vorbehandlung mit Ozon. *Korrespondenz Abwasser*, 40, (1993), S. 1469-1475.
- 52 C. H. Möbius, D. Cordier, A. Helble, R. Kaulbach, M. Cordes-Tolle; Elimination persistenter Verbindungen in biologisch gereinigtem Abwasser mit Ozon und weitergehender biologischer Reinigung. *gwf, Wasser/Abwasser*, 137, (1996), S. 646-651.
- 53 A. Saupe, U. Wiesmann; Abbau von nitroaromatischen Xenobiotika durch Ozonierung und biologischer Nachbehandlung. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 24(3), (1996), S. 118-126.
- 54 M. Stern, E. Heinzle, O.M. Kut, K. Hungerbühler; Removal of substituted pyridines by combined ozonation / fluidized bed biofilm treatment. *Water Science and Technology*, 35(4), (1997), S. 329-335.
- 55 J.C. Jochimsen, M.R. Jekel; Partial oxidation effects during the combined oxidative and biological treatment of separated streams of tannery wastewater. *Water Science and Technology*, 35(4), (1997), S. 337-345.
- 56 S. Liakou, S. Pavlou, G. Lyberatos; Ozonation of azo dyes. *Water Science and Technology*, 35(4), (1997), S. 279-286.
- 57 K.T. Yong, J.N. Wu, S. Andrews; Heterogeneous catalytic ozonation of aqueous reactive dye. *Ozone – Science and Engineering*, 27(4), (2005), S. 257-263.

- 58 R. Tosik; Dyes color removal by ozone and hydrogen peroxide: Some aspects and problems. *Ozone – Science and Engineering*, 27(4), (2005), S. 265-271.
- 59 A.P. Mathews, K.K. Panda, S. Ananthi, K. Padmanabhan; Mass transfer and oxidation kinetics in an *in situ* ozone generator. *Water Science and Technology*, 49(4), (2004), S. 19-24.
- 60 W.J. Weber; *Physiochemical processes for water quality control*. Chapter 8, Chemical Oxidation, Wiley-Interscience Wiley & Sons, New York, (1972).
- 61 J. Staehelin, J. Hoigné; Reaktionsmechanismus und Kinetik des Ozonzerfalls in Wasser in Gegenwart organischer Stoffe. *Vom Wasser*, 61, (1983), S. 337-348.
- 62 R. Criegee; Ozon. *Chemiker-Zeitung*, 99(3), (1975), S. 138-141.
- 63 J. Weiss; Investigations on the radical HO<sub>2</sub> in solution. *Transactions of the Faraday Society*, 31, (1935), S. 668-681.
- 64 P.S. Bailey; *Ozonation in Organic Chemistry*. Volume II, Academic Press, Inc., New York, (1982).
- 65 C. von Sonntag; Degradation of aromatics by Advanced Oxidation Processes in water remediation: some basic considerations. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, 45(2), (1996), S. 84-91.
- 66 G.V. Buxten, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross; Critical Review of Rate Constants for Oxidation of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals (OH<sup>•</sup>/O<sup>•-</sup>) in Aqueous Solutions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17, (1988), S. 513-886.
- 67 F. Gähr, F. Hermanutz, W. Oppermann; Ozonation – an important technique to comply with new German laws for textile treatment. *Water Science and Technology*, 30(3), (1994), S. 255-263.
- 68 J. Rudolph; AOX-Eliminierung und AOX-Produktion bei der Ozonierung. *Korrespondenz Abwasser*, 40, (1993), S. 1298-1306.
- 69 V. Wagner, A. Kettrup; Betrachtungen zu HOV und Oxidationsverfahren. In: ATV-DVWK (Hrsg.), *Halogenorganische Verbindungen ATV-DVWK-Schriftenreihe*, Band 18, Sektion 3 – Eliminierung von HOV aus Abwasser, Hennef (2000), S. 251-256.
- 70 C. Jonas, O. Leitzke; AOX-Elimination und Entfärbung in Industrieabwässern. In GVC (Hrsg.), *Preprints 1. Colloquium Prozessintegrierter Umweltschutz*, „Abwässer der Textilindustrie und Wollverarbeitung“, Bremen, 13-15 September 1993, S. 279-292.
- 71 G. Schulz, H. Herlinger, F.U. Gähr, Th. Lehr; Oxidativer Abbau von Farbstoffen durch Ozon. *Textil Praxis International*, 47(11), (1992), S. 1055-1062.
- 72 E. Gilbert; Chemische Vorgänge bei der Ozonanwendung. *Internationales Symposium Ozon und Wasser*, Berlin (1977), S. 226-232.
- 73 M. Schellenträger, M. Constapel, S. Gäb, J.M. Marzinkowski; Abschlussbericht zum BMBF-Verbundprojekt OXITEX (Förderkennzeichen 0339938), *Innovatives Prozesswasserrecycling durch gezielte oxidative Entfärbung von Färbereiabwasser, gestützt durch den Nachweis der chemischen Abbauprodukte und deren Wirkung auf die Veredlungsprozesse*. Bergische Universität Wuppertal, (2004).
- 74 G. Mascolo, A. Lopez, A. Bozzi, G. Tiravanti; By-products formation during the ozonation of the reactive dye Uniblu-A. *Proc. 15<sup>th</sup> World Congress of the International Ozone association*, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, Vol. II, (2001) S. 236-244.
- 75 M. Matsui, K. Shibata, H. Muramatsu; Ozone fading of dyes. *Ozone in water and wastewater treatment Vol. 1*, 11<sup>th</sup> Ozone World Congress, 29.08-03.09.1993, San Francisco, USA, (1993), S. S-7-87-S-7-90.

- 76 M. Schellenträger, M. Constapel, S. Gäb, J.M. Marzinkowski; Oxidativer Abbau von Reaktivfarbstoffen – Chemische Analyse der Abbauprodukte. *Melliand Textilberichte*, 86(7/8), (2005), S. 562-567.
- 77 W.S. Perkins, C.G. Namboudri, W.K. Walsh; Source reduction of Pollutants from Textile Processing Waste Water. *National Textile Center Annual Report – College of Textiles, North Carolina State University*, (1994), S. 29-38.
- 78 G. Ruppert, R. Bauer; UV-O<sub>3</sub>, UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-TiO<sub>2</sub> and the photo-fenton reaction - comparison of advanced oxidation processes for wastewater treatment. *Chemosphere* 28(8), (1994), S. 1447-1454.
- 79 R. Lall, R. Mutharasan, Y.T. Shah, P. Dhurjati; Decolorization of the Dye, Reactive Blue 19, Using Ozonation, Ultrasound, and Ultrasound-Enhanced Ozonation. *Water Environment Research*, 75(2), (2003), S. 171-179.
- 80 U. Rott, R. Minke; Innerbetriebliche Aufbereitung von Abwässern und Wiederverwertung in der Textilveredlungsindustrie (TVI). In: *Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover (Hrsg.), 5. Hannoversche Industrieabwassertagung*, (1994), S. 213-244.
- 81 K.-E. Köppke; Bildung und Zerstörung von AOX bei der oxidativen Abwasserbehandlung – ein Verfahrensblick. *Korrespondenz Abwasser*, 40, (1993), S. 62-67.
- 82 R. Minke, U. Rott; Prozesswasserrückgewinnung und Abwasservorbehandlung bei der Garnveredlung. In *GVC (Hrsg.) Preprints Colloquium produktionsintegrierte Wasser-/Abwassertechnik – „Nachhaltige Produktion in der Textilveredlung“ und „Membrantechnik“*, Bremen 2001, B129-B141.
- 83 M. Pitroff, K.H. Gregor; Entfärbung von Textilabwasser durch UV-Bestrahlung mit Wasserstoffperoxid. *Melliand Textilberichte*, 73(6), (1992), S. 526-529.
- 84 F.-Y. Yu, C.-W. Li, S.-F. Kang; Color, dye and DOC removal, and acid generation during fenton oxidation of dyes. *Environmental Technology*, 26(5), (2005), S. 537-544.
- 85 K. Selvam, M. Muruganandham, M. Swaminathan; Enhanced heterogeneous ferrioxalate photo-fenton degradation of reactive orange 4 by solar light. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 89(1), (2005), S. 61-74.
- 86 K.H. Gregor; Oxidative Entfärbung von Textilabwässern mit Wasserstoffperoxid. *Melliand Textilberichte*, 71(12), (1990), S. 976-979.
- 87 U. Sewekow; Behandlung von reaktivfarbigen Abwässern mit Wasserstoffperoxid/Eisen-(II)-sulfat. *Melliand Textilberichte*, 74(2), (1993), S. 153-157.
- 88 W.G. Kuo; Decolorizing dye wastewater with fenton's reagent. *Water Research*, 26(7), (1992), S. 881-886.
- 89 S.H. Lin, C.F. Peng; A continuous Fenton's process for treatment of textile wastewater. *Environmental Technology*, 16(7), (1995), S. 693-699.
- 90 I. Arslan, I.A. Balcioglu; Degradation of commercial reactive dyestuffs by heterogenous and homogenous advanced oxidation processes: a comparative study. *Dyes and Pigments*, 43(2), (1999), S. 95-108.
- 91 W. Marte, M. Meyer, U. Meyer; Oxidative Behandlung von Textilabwasser nach dem ORCAN-Verfahren. *Melliand Textilberichte*, 85(1-2), (2004), S. 74-78.
- 92 W. Marte; Erfahrungen mit der Oxidation von Restflotten und Flottenkonzentraten. *Tagungsband Stuttgarter Kolloquium 2004 – Industrieabwasser und Textilveredlung*, (2004), S. 34-36.
- 93 W. Hirner, H. Blenke; *Verfahrenstechnik* 11(5), (1977), S. 297-303.

- 94 F.J. Rivas, F.J. Beltran, J.F. Garcia-Araya, V. Navarrete, O. Gimeno; Co-oxidation of p-hydroxybenzoic acid and atrazine by the Fenton's like system Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Hazardous Materials*, 91(1-3), (2002), S. 143-157.
- 95 Europäische Kommission / EUROPEAN IPPC Bureau, Best Available Techniques Reference Document for the Textiles Industry, August 2002, von der Kommission angenommen am 11./12. November 2002.
- 96 H. Reissig, R. Jentsch, R. Fischer; Untersuchung zum Abbau von Farbstoffen der textilveredelnden Industrie mittels UV-Strahlung und Ozon bzw. Wasserstoffperoxid. *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, (2. Symposium Industrieabwasser vom 30./31. Mai 1991), 125, (1991), S. 275-304.
- 97 M. Lindner, D. Bahnemann, B. Hirthe, W.-D. Griebler; Neue Katalysatoren zur photokatalytischen Abwasserreinigung. *Wasser Luft & Boden*, Band 11-12, (1994), S. 38-44.
- 98 W. Sebb, J. Lange; Entfärbung von Reaktivfarbstoffen - Ein neues Verfahren mit Persulfaten. *Textilveredlung*, 34(7/8), (1999), S. 10-16.
- 99 A. Liebau; Zur oxidativen Entfernung von Wasserschadstoffen mit Peroxodisulfaten. Dissertation Universität Halle-Wittenberg (1992).
- 100 H. Matschiner, A. Liebau, W. Thiele; Oxidativer Abbau von Wasserschadstoffen mit Peroxodisulfaten. *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser*, 4. Symposium Industrieabwasser vom 28. - 29. Oktober 1993. Sonderdruck 146, (1994), S. 335-350.
- 101 J. Lange; Entfärben von Färbereiabwasser. FuE-Projekt Reg.-Nr. 56/98 BMWi, Sächsisches Textilforschungsinstitut e.V., Chemnitz (1998).
- 102 J. Lange; Verringerung der Abwasserbelastung durch technologische Optimierungen. *Textilveredlung*, 36(7/8), (2001), S. 19-28.
- 103 Normenausschuss Wasserwesen im Deutschen Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 11905-1, (1998).
- 104 M. Peter, H.K. Rouette; Grundlagen der Textilveredlung: Handbuch der Technologie, Verfahren und Maschinen. 13., überarbeitete Auflage, Deutscher Fachverlag GmbH, Frankfurt am Main, (1989), S. 470-473.
- 105 A.F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg; Lehrbuch der anorganischen Chemie. 101. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, (1995), S. 528.
- 106 M.A. Salem, A.H. Gemeay, S.A. El-Daly; Oxidation kinetics and fluorescence quenching of Coumarin-1 Laser dye with peroxodisulfate. *Monatshefte für Chemie*, 29(8/9), (1996), S. 867-874.
- 107 K.H. Gregor; Aufbereitung und Wiederverwendung von Färbereiabwässern. *Melliand Textilberichte*, 79(9), (1998), S. 643-646.
- 108 H.-J. Förster, J. Lange; Reinigung und Wiederverwendung von Prozessabwasser. *Textilveredlung*, 38(5/6), (2003), S. 8-14.
- 109 J.E.B. McCallum, S.A. Madison, S. Alkan, R.L. Depinto, R.U.R. Wahl; Analytical Studies on the Oxidative Degradation of the Reactive Textile Dye Uniblue A. *Environmental Science and Technology*, 34(24), (2000), S. 5157-5164.
- 110 K.M.M. Krishna Prasad, K.P. Subhashchandran; Silver Ion Catalysed Oxidation of Phenosafranine by Peroxodisulfate – Catalytic Kinetic Determination of Micro Amounts of Silver. *Asian Journal of Chemistry*, 4(4), (1992), S. 715-725.
- 111 H.-J. Förster; Mitteilungen auf den halbjährlichen OXITEX Meilenstein Meetings, (2004).

- <sup>112</sup> M. Schellenträger; Diplomarbeit: Untersuchung ausgewählter Reaktivfarbstoffe: Charakterisierung, Hydrolyse, Oxidation der Hydrolysate mit Peroxodisulfat und RP-HPLC der Oxidationsprodukte. Bergische Universität Wuppertal, (2002).
- <sup>113</sup> M.G. Olthof, W.W. Eckenfelder; Color Removal from pulp and paper wastewaters by coagulation. *Water Research*, 9(10), (1975), S. 853-856.
- <sup>114</sup> M.M. Naim, Y.M. El Abd; Removal and recovery of dyestuffs from dyeing wastewaters. *Separation and Purification Methods*, 31(1), (2002), S. 171-228.
- <sup>115</sup> A. Hövelmann, S.C. Bidinger, A. Linder; Kostengünstige Entfärbung von Textilfärberei-Abwässern mittels Fällung – Ergebnisse von Versuchen. *Textil Praxis International*, 48, (1993), S. 507-509.
- <sup>116</sup> R.A. Fattouh; Über die Reinigung der Abwässer einiger englischer Bleichereien, Färbereien und Druckereien, *Gesundheits-Ingenieur*, 24(18), (1901), S. 298-299.
- <sup>117</sup> F.R. Preuß; Beiträge zur Abwasserbehandlung in kleinen Textilveredlungsbetrieben. Dissertation Technische Universität Dresden, (1974).
- <sup>118</sup> R. Scharf; Untersuchungen über die Wirkung von Färbereiabwässern und deren Inhaltsstoffen auf Vorfluterorganismen, dargestellt am Spreeoberlauf. Dissertation an der Karl-Marx-Universität Leipzig, (1965).
- <sup>119</sup> C. Allegre, M. Maisseu, F. Charbit, P. Moulin; Coagulation-flocculation-decantation of dye house effluents: concentrated effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 116(1-2), (2004), S. 57-64.
- <sup>120</sup> S.H. Lin, W.Y. Liu; Continuous treatment of textile water by ozonation and coagulation. *Journal of Environmental Engineering - ASCE*, 120(2), (1994), S. 437-446.
- <sup>121</sup> V.A. Kozhanov, N.A. Klimenko, S.S. Zulfikarov, V.V. Malyarenko; Removal of Active Bright-Red 5CX Dye by the Cation-Exchange Flocculation from Aquatic System. *Khimiya i Tekhnologiya Vody*, 13(6), (1991), S. 534-537.
- <sup>122</sup> G. Schulz, D. Fiebig, H. Herlinger; Entfernung von Reaktivfarbstoff-Hydrolysaten aus Teilabwasserströmen durch Fällungs-/Flockungsreaktion - Teil I: Anwendungstechnische Aspekte. *Textilveredlung*, 23(12), (1988), S. 445-448.
- <sup>123</sup> A. Riefe; Waste Treatment of soluble azo acid, direct and reactive dyes using sodium hydrosulfite reduction pre-treatment followed by carbon adsorption. *American Association of Textile Chemists and Colorists, AATCC International Conference and Exhibition Book of Papers (North Carolina: AATCC, 1990)*, S. 201-204.
- <sup>124</sup> J.L. Garcia-Heras, C.F. Forster; Treating bleaching effluent for suspended solids and color. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry Journal*, 72(9), (1989), S. 199-206.
- <sup>125</sup> J.I. Garrote, M. Bao, P. Castro, M.J. Bao; Treatment of Tannery Effluents by a two step Coagulation/Flocculation process. *Water Research*, 29(11), (1995), S. 2605-2608.
- <sup>126</sup> J. Fettig, H. Ratnaweera; Influence of dissolved organic-matter on coagulation/flocculation of waste water by alum. *Water Science and Technology*, 27(11), (1993), S. 103-112.
- <sup>127</sup> L. Vrale, R.M. Jorden; Rapid Mixing in Water Treatment. *Journal of the American Water Works Association*, 63(1), (1971), S. 52-58.
- <sup>128</sup> H.E. Hudson Jr.; Evaluation of Plant Operating and Jar-Test Data. *Journal of the American Water Works Association*, 65(5), (1973), S. 368-375.
- <sup>129</sup> R.D. Letterman, J.K. Quon, R.S. Gemmill; Influence of Rapid-Mix Parameters on Flocculation. *Journal of the American Water Works Association*, 65(11), (1973), S. 716-722.

- <sup>130</sup> J.R. Bratby; Interpreting laboratory results for the design of rapid mixing and flocculation systems. *Journal of the American Water Works Association*, 73(6), (1981), S. 318-325.
- <sup>131</sup> V.A. Mhaisalkar, R. Paramasivam, A.G. Bhole; Optimizing physical parameters of rapid mix design for coagulation-flocculation of turbid waters. *Water Research*, 25(1), (1991), S. 43-52.
- <sup>132</sup> H. Schönberger, U. Kaps; Reduktion der Abwasserbelastung in der Textilindustrie. Umweltbundesamt, Forschungsbericht 102 06 511, (1994) UBA-FB 93-143.
- <sup>133</sup> W. Höhn; Methoden der Minimierung, Wiederverwendung und Reinigung von textilen Abwässern. (1998), S. 1-27.
- <sup>134</sup> G.M. Shaul, T.J. Holdsworth, C.R. Dempsey, K.A. Dostal; Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, 22(1-2), (1991), S. 107-119.
- <sup>135</sup> U. Pagga, D. Brown; The degradation of dyestuffs. Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation test. *Chemosphere*, 15(4), (1986), S. 479-491.
- <sup>136</sup> T. Zimmermann, F. Gasser, H.G. Kulla, T. Leisinger; Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaption to growth on azo dyes. *Archives of Microbiology*, 138(1), (1984), S. 37-43.
- <sup>137</sup> M.F. Coughlin, B.K. Kinkle, P.L. Bishop; Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. *Chemosphere*, 46(1), (2002), S. 11-19.
- <sup>138</sup> U. Zissi, G. Lyberatos; Partial degradation of p-aminobenzene by a defined mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), (2001), S. 49-54.
- <sup>139</sup> T.-H. Kim, C. Park, J. Lee, E.-B. Shin, S. Kim; Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process-chemical coagulation-electrochemical oxidation). *Water Research*, 36(16), (2002), S. 3979-3988.
- <sup>140</sup> R. Ganesh; Fate of azo dyes in sludges. *Water Research*, 28(6), (1994), S. 1367-1376.
- <sup>141</sup> C.F. Shen, S.R. Guiot; Long-term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(6), (1996), S. 611-620.
- <sup>142</sup> U. Zietz; Die Entstehung des unerwünschten Blähschlammes beim Belebungsverfahren. *gfw Wasser Abwasser*, 137(4), (1996), S. 215-220.
- <sup>143</sup> R. Schulze-Rettmer, K. Helle, P. Metzen; Neue Erkenntnisse über die anaerobe Vorbehandlung von Abwasser der Textilindustrie. In GVC (Hrsg.), Preprints Colloquium produktions-integrierter Umweltschutz – Abwässer der Textilindustrie, Wollverarbeitung und Nahrungsmittelindustrie, Bremen, (1997), B119-B134.
- <sup>144</sup> S. Blümel, M. Kudlich, A. Stolz; Mögliche Strategien für den mikrobiellen Abbau sulfonierter Azofarbstoffe. In Schriftenreihe des SFB 193 der Technischen Universität Berlin (Hrsg.), Nr. 9, Treatment of wastewaters from textile processing / Behandlung von Abwässern der Textilveredlung, Berlin, (1997), S. 189-210.
- <sup>145</sup> R. Walker, R. Gingell, D.F. Murrells; Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis* – I. Optimization of Assay Conditions. *Xenobiotica*, 1(3), (1971), S. 221-229.
- <sup>146</sup> W. Haug, A. Schmidt, B. Nörtemann, D.C. Hempel, A. Stolz, H.-J. Knackmuss; Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), (1991), S. 3144-3149.
- <sup>147</sup> W. Delée, C. O'Neill, F.R. Hawkes, H. M. Pinheiro; Anaerobic treatment of textile effluents: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73(4), (1998), S. 323-335.

- 148 Y. Urushigawa, Y. Yonezawa; Chemico-Biological Interactions in Biological Purification System II. Biodegradation of Azocompounds by Activated Sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(2), (1977), S. 214-218.
- 149 E.S. Yoo, J. Libra, L. Adrian; Mechanism of decolorisation of azo dyes in anaerobic mixed culture. *Journal of Environmental Engineering*, 127(9), (2001), S. 844-849.
- 150 M. Hemmi, R. Krull, D.C. Hempel; Developing a Sequenced Batch Process for the biological and chemical purification of residual dyehouse liquors. In *Schriftenreihe des SFB 193 der Technischen Universität Berlin (Hrsg.)*, Nr. 9, Treatment of wastewaters from textile processing / Behandlung von Abwässern der Textilveredlung, Berlin, (1997), S. 211-227.
- 151 C. Yatome, T. Ogawa, D. Koga, E. Idaka; Biodegradability of Azo and Triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 97(4), (1981), S. 166-169.
- 152 F. Gähr, T. Lehr; Verbesserung der anaeroben Abbaubarkeit von hochbelasteten Teilströmen aus der Textilveredlungsindustrie. In *GVC (Hrsg.)*, Preprints Colloquium produktions-integrierter Umweltschutz – Abwässer der Textilindustrie, Wollverarbeitung und Nahrungsmittelindustrie, Bremen, (1997), D41-D47.
- 153 A. Stolz; Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), (2001), S. 69-80.
- 154 D. Brown, P. Laboureur; The aerobic biodegradability of primary aromatic-amines. *Chemosphere*, 12(3), (1983), S. 405-414.
- 155 K.-T. Chung, G.E. Fulk, M. Egan; Reduction of Azo Dye by Intestinal Anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(3), (1978), S. 558-562.
- 156 R.A. Moll; Azofarbstoffe zwischen Gesetzgebung und Ökosiegel, *Melliand Textilberichte*, 76(11), (1995), S. 993-995.
- 157 T. Zimmermann, H.G. Kulla, T. Leisinger; Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry*, 129(1), (1982), S. 197-203.
- 158 R.F. Johnson, A. Zenhausen, H. Zollinger; in: *Kirk-Othmer-Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 8, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, (1993), S. 542-838.
- 159 C. O'Neill, A. Lopez, S. Esteves, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes, S. Wilcox; Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operation on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), (2000), S. 249-254.
- 160 D.P. Barr, S.D. Aust; Pollutant Degradation by White Rot Fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 138, (1994), S. 49-72.
- 161 A. Paszczynski, M.B. Pasti, S. Goszczynski, D.L. Crawford, R.L. Crawford; New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(5), (1991), S. 378-384.
- 162 H. Horitsu, M. Takada, E. Idaka, M. Tomoyeda, T. Ogawa; Degradation of p-Aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4, (1977), S. 217-224.
- 163 P. Simon, in: *Plant Peroxidase Newsletters*. Rochat/Baumann-Imprimerie Nationale, Genf, (1993).
- 164 N. Duran, E. Esposito; Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B – Environmental* 28(2), (2000), S. 83-99.

- 165 S. Pedersen, N.K. Lange, A.M. Nissen; Novel Industrial Enzyme Applications. *Annals of the New York Academy of Science*, 750, (1995), S. 376-390.
- 166 K. Tatsumi, S. Wada, H. Ichikawa; Removal of Chlorophenols from Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(1), (1996), S. 126-130.
- 167 P. Peralta-Zamora, E. Esposito, R. Pelegrini, R. Grotto, J. Reyes, N. Duran; Effluent Treatment of Pulp and Paper, and Textile Industries using Immobilized Horseradish Peroxidase. *Environmental Technology*, 19, (1998), S. 55-63.
- 168 J.E. Sealey, A.J. Ragauskas; Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7-8), (1998), S. 422-426.
- 169 J.E. Sealey, A.J. Ragauskas, T.J. Elder; Investigations into Laccase-Mediator Delignification of Kraft Pulps. *Holzforschung*, 53(5), (1999), S. 498-502.
- 170 R. Bourbonnais, M.G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, S. Borneman; Reactives of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), (1997), S. 4627-4632.
- 171 G.M.B. Soares, M.T. Pessoa de Amorim, R. Hrdina, M. Costa-Ferreira; Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry*, 37(6), (2002) S. 581-587.
- 172 D.K. Belsare, D.Y. Prasad; Decolorization of the effluent from the bagasse-based pulp mills by white-rot fungus, *Schizophyllum commune*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, (1988), S. 301-304.
- 173 M. Miksanová, J. Hudecek, J. Páca, M. Stiborová; To the mechanism of horseradish peroxidase-mediated degradation of a recalcitrant dye Remazol Brilliant Blue R. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 66(4), (2001), S. 663-675.
- 174 G.M.B. Soares, M.T. Pessoa de Amorim, M. Costa-Ferreira; Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology*, 89, (2001), S. 123-129.
- 175 T. Wuhmann, K. Mechsner, T. Kappeler; Investigation on Rate - Determining Factors in the Microbial Reduction of Azo Dyes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9, (1980), S. 325-338.
- 176 X. Du, H. Liu; Relationship between the molecular structure of azo-dyes and their biodegradability. *Huanjing Huaxue*, 10(6), (1991), S. 12-18.
- 177 T. Kamidate, T. Shibata, H. Watanabe, M. Morita; Effects of Oxidation Potential of Azo Dyes on Peroxidase-Hydrogen Peroxide Bleaching System. *Nihon-Yuka-Gakkaishi – Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 48(5), (1999), S. 497-499.
- 178 J. Karam, J.A. Nicell; Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(2), (1997), S. 141-153.
- 179 R. Bourbonnais, M.G. Paice; Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* Laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(6), (1992), S. 823-827.
- 180 J.E. Sealey, T.M. Runge, A.J. Ragauskas; Biobleaching of kraft pulps with Laccase and hydroxybenzotriazole. *TAPPI Pulping Conference: 1997 Biological Sciences Symposium: Proceedings*, San Francisco, CA, October (1997), S. 339-342.
- 181 M.G. Paice, I.D. Reid, R. Bourbonnais, F.S. Archibald, L. Jurasek; Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor* during Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), (1993), S. 260-265.

- 182 A. Potthast, T. Rosenau, C.-L. Chen, J.S. Gratzl; Selective Enzymatic Oxidation of Aromatic Methyl Groups to Aldehydes. *Journal of Organic Chemistry*, 60(14), (1995), S. 4320-4321.
- 183 A. Muheim, A. Fiechter, P.J. Harvey, H.E. Schoemaker; On the Mechanism of Oxidation of Non-Phenolic Lignin Model Compounds by the Laccase-ATBS Couple. *Holzforschung*, 46(2), (1992), S. 121-126.
- 184 R. Bourbonnais, M.G. Paice, D. Leech, B. Freiermuth; Reactivity and mechanism of Laccase mediators for pulp delignification. *TAPPI Pulping Conference: 1997 Biological Sciences Symposium: Proceedings*, San Francisco, CA, October (1997), S. 335-338.
- 185 H.P. Call, I. Mücke; Minireview: History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially Laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process). *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), (1997), S. 163-202.
- 186 J. Sealey, A.J. Ragauskas; Residual lignin studies of laccase delignified kraft pulps. *Fourth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Stresa, Italien, Sept (1996), S. 171-179.
- 187 K. Poppius-Levlin, W. Wang, M. Ranua, M.-L. Niku-Paavola, L. Viikari; Biobleaching of chemical pulps by Laccase/mediator systems. *TAPPI Pulping Conference: 1997 Biological Sciences Symposium: Proceedings*, San Francisco, CA, October (1997), S. 327-333.
- 188 K. Li, H. Bermek, K.-E.L. Eriksson; A new technique for screening of laccase-mediators. *TAPPI Pulping Conference: Biological Sciences Symposium Proceedings*, San Francisco, CA, October (1997), S. 349-353.
- 189 C. Crestini, D. Argyropoulos; The Early Biodegradation Pathways of Residual Kraft Lignin Model Compounds with Laccase. *Conference Proceedings 9<sup>th</sup> International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Montreal, Canada, June 9-12 (1997), S. 20-1 bis 20-5.
- 190 F. Xu, J.J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H.-J.W. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte, P. Schneider; Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed Oxidation of N-Hydroxy Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), (2000), S. 2052-2056.
- 191 J. Sealey, A.J. Ragauskas; Investigation of Laccase/N-Hydroxybenzotriazole delignification of kraft pulp. *Journal of wood chemistry and technology*, 18(4), (1998), S. 403-416.
- 192 M.P. Balogh; Commercialization of LC-MS 1987-1997: A successful decade in Review. *LC-GC International*, November (1997), S. 728-737.
- 193 W.M.A. Niessen, J. van der Greef; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker Verlag, (1992).
- 194 M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice; Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics*, 49(5), (1968), S. 2240-2249.
- 195 E.C. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, K.D. Haegele, M.G. Horning, R.N. Stillwell; Atmospheric-Pressure Ionization (API) Mass-Spectrometry - Solvent-Mediated Ionization of Samples Introduced in Solution and in a Liquid Chromatograph Effluent Stream. *Journal of Chromatographic Science*, 12(11), (1974), S. 725-729.
- 196 J.A. Syage, M.D. Evans, K.A. Hanold; Photoionization mass spectrometry. *American Laboratory*, 32(24), (2000), S. 24-29.
- 197 M. Constapel, M. Schellenträger, O.J. Schmitz, S. Gäb, K.J. Brockmann, R. Giese, Th. Benter; Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(3), (2005), S. 326-336.

- 198 S. Droste, M. Schellenträger, M. Constapel, S. Gäb, M. Lorenz, K.J. Brockmann, Th. Benter, D. Lubda, O.J. Schmitz; A Silica-based Monolithic Column in capillary HPLC and CEC coupled with ESI-MS or ES-APLI-MS. *Electrophoresis*, 26(21), (2005), S. 4098-4103.
- 199 Waters Produktinformation Micromass<sup>®</sup> Q-ToF Ultima<sup>™</sup> API Mass Spectrometer, (2004).
- 200 J.-C. Wolff, C. Eckers, A.B. Sage, K. Giles, R. Bateman; Accurate mass Liquid Chromatography/Mass Spectrometry on Quadrupole Orthogonal Acceleration Time-of Flight Mass Analyzers Using Switching between Separate Sample and Reference Sprays. 2. Applications Using the Dual-Electrospray Ion Source. *Analytical Chemistry*, 73(11), (2001), S. 2605-2612.
- 201 J.R. Delaeter; Atomic Weights of the Elements 1989. *Pure and Applied Chemistry*, 63(7), (1991), S. 975-990.
- 202 Produktinformation MLS-Mikrowellengeräte, ETHOSplus Mikrowellengerät, (2002).
- 203 VARIAN Produktinformation zu Bond Elut<sup>®</sup> SPE Kartuschen, Bond Elut<sup>®</sup> PH, (2005).
- 204 U. Wollborn, Bayer Industry Services, Leverkusen, Deutschland; persönliche Mitteilung. (2004).
- 205 A. Mohey El-Dein, J.A. Libra, U. Wiesmann; Kinetics of decolorization and mineralization of the azo dye Reactive Black 5 by hydrogen peroxide and UV light. *Water Science and Technology*, 44(5), (2001), S. 295-301.
- 206 I.S. Choi, U. Wiesmann; Effect of Chemical Reaction and Mass Transfer on Ozonation of the Azo Dyes Reactive Black 5 and Reactive Orange 96. *Ozone - Science & Engineering*, 26(6), (2004), S. 539-549.
- 207 A. Mohey El-Dein, J.A. Libra, U. Wiesmann; Mechanism and kinetic model for the decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by hydrogen peroxide and UV radiation. *Chemosphere*, 52(6), (2003), S. 1069-1077.
- 208 C. Wang, A. Yediler, D. Lienert, Z. Wang, A. Kettrup; Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere*, 52(7), (2003), S. 1225-1232.
- 209 A. Aris, P.N. Sharratt; Fenton oxidation of reactive black 5: Effect of mixing intensity and reagent addition strategy. *Environmental Technology*, 25(5), (2004), S. 601-612.
- 210 T.L.H. Pham, W. Rotard, A. Preiss, M. Elend; Möglichkeiten und Grenzen der LC-MS bei der Analyse von Farbstoffmetaboliten. *LC/MS Tagung in Berlin*, als lose Handzettel, (2001), S. 1-15.
- 211 A. Conneely, S. McClean, W.F. Smyth, G. McMullan; Study of the mass spectrometric behaviour of phthalocyanine and azo dyes using electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(22), (2001), S. 2076-2084.
- 212 R. Krull, D.C. Hempel; Treatment of dyehouse liquors in a biological sequencing batch reactor with recursive chemical oxidation. *Water Science and Technology*, 44(5), (2001), S. 85-92.
- 213 M.E. Dzhanchashvili, V.M. Anisimov, O.N. Karpukhin, G.E. Krichevskii; Efficiency of forming singlet oxygen during irradiation of solutions of active dyes. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR / Division of chemical science*, 28(6), (1979), S. 1286-1290.
- 214 M.K. Vijayendra, V.V. Hadimuni, B.R. Venugopal, K. Srinath, N. Kalavathi, H.B. Radha; Comparative dyeing studies of reactive dyes and conventional direct and acid dyes on silk. *Colourage, Special Supplement on BTRA / Colourage Seminar on Reactive Dyes*, 28. September 1991, S. 31-38.
- 215 M.C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló; Solid-Phase Extraction Procedure of Polar Benzene- and Naphthalenesulfonates in Industrial Effluents Followed by Unequivocal Determination with Ion-Pair Chromatography/Electrospray-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 71(13), (1999), S. 2586-2593.

- 216 G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr; Analysis of sulfonated Compounds by ion-exchange high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 912(1), (2001), S. 53-60.
- 217 T. Storm, T. Reemtsma, M. Jeckel; Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial wastewater. *Journal of Chromatography A*, 854(1-2), (1999), S. 175-185.
- 218 M.C. Alonso, D. Barceló; Tracing polar benzene- and naphthalenesulfonates in untreated industrial effluents and water treatment works by ion-pair chromatography-fluorescence and electrospray-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 400 special issue, (1999), S. 211-231.
- 219 W. Yan; persönliche Mitteilung, (2004).
- 220 D.O. Mártire, M.C. Gonzalez; Kinetik Evidence for the Reaction of  $O^{\cdot-}$  Radical Ions and Peroxodisulfate in Alkaline Aqueous Solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*, 30(7), (1998), S. 491-496.
- 221 P. Neta, R.E. Huie, A.B. Ross; Rate Constants for Reactions of Inorganic Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(3), (1988), S. 1027-1284.
- 222 G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross; Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals ( $\cdot OH/\cdot O$ ) in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2), (1988), S. 513-886.
- 223 C. George, H. El Rassy, J.-M. Chovelon; Reactivity of Selected Organic Compounds (VOCs) Toward the Sulfate Radical ( $SO_4^{\cdot-}$ ). *International Journal of Chemical Kinetics*, 33(9), (2001), S. 539-547.
- 224 P. Barzaghi, H. Herrmann; A mechanistic study of the oxidation of phenol by  $OH/NO_2/NO_3$  in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4(15), (2002), S. 3669-3675.
- 225 M.A. Brusa, M.S. Churio, M.A. Grella, S.G. Bertolotti, C.M. Previtali; Reaction volume and reaction enthalpy upon aqueous Peroxodisulfate dissociation:  $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$ . *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(10), (2000), S. 2383-2387.
- 226 C.T. Aravindakumar, M.N. Schuchmann, B.S.M. Rao, J. von Sonntag, C. von Sonntag; The reactions of cytidine and 2'-deoxycytidine with  $SO_4^{\cdot-}$  revisited. Pulse radiolysis and product studies. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(2), (2003), S. 401-408.
- 227 G.V. Buxton, G.A. Salmon, J.E. Williams; The Reactivity of Biogenic Monoterpenes towards  $OH^{\cdot}$  and  $SO_4^{\cdot-}$  Radicals in De-Oxygenated Acidic Solution. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 36(2), (2000), S. 111-134.
- 228 Farhataziz, A.B. Ross; Selected Specific Rates of Reactions of Transients from Water in Aqueous Solution. III. Hydroxyl Radical and Perhydroxyl Radical and Their Radical Ions. *National Standard Reference Data Service - National Bureau of Standards*, 59, (1997), S. 1-113.
- 229 G. Henninger; *Enzymatische Katalyse: Eine Einführung in die chemischen Grundlagen*. Boehringer Mannheim GmbH (1989).
- 230 L. Michaelis, M.L. Menten; Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, (1913), 49, S. 333-369.
- 231 M. Nango, T. Iwasaki, Y. Takeuchi, Y. Kurono, J. Tokuda, R. Oura; Peroxide Decoloration of Azo Dyes Catalyzed by Polyethylene Glycol-Linked Manganese Halogenated Porphyrins. *Langmuir*, 14(12), (1998), S. 3272-3278.
- 232 J. Tokuda, R. Ohura, T. Iwasaki, Y. Takeuchi, A. Kashiwida, M. Nango; Decoloration of Azo Dyes by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Water-Soluble Manganese Porphyrins. *Textile Research Journal*, 69(12), (1999), S. 956-960.

- 
- <sup>233</sup> E. Rodriguez, M.A. Pickard, R. Vasquez-Duhalt; Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology*, 38(1), (1999), S. 27–32.
- <sup>234</sup> M.M. Bradford; A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), (1976), S. 248-254.
- <sup>235</sup> J.S. Shindler, R.E. Childs, W.G. Bardsley; Peroxidase from human cervical mucus. The isolation and characterisation. *European Journal of Biochemistry*, 65(2), 1976, S. 325-331.
- <sup>236</sup> A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csoregi, G. Bautista Ardila, I.Y. Sakharov, I.G. Gazaryan; Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosensors & Bioelectronics*, 15(9-10), (2000), S. 491-497.
- <sup>237</sup> H. Mattenheimer; *Die Theorie des enzymatischen Tests*. Boehringer Mannheim GmbH, (1976).
- <sup>238</sup> F.U. Gähr; *Oxidativer Abbau von Reaktivfarbstoffhydrolysaten durch Ozon*, Dissertation Universität Stuttgart, (1992).
- <sup>239</sup> H.J. Förster; EUT Eilenburger Elektrolyse und Umwelttechnik GmbH, persönliche Mitteilung, (2004).