Pfropfpolymerisation von Vinylmonomeren auf Kollagen unter Mitwirkung von Cer^{IV}-Ionen *

Herrn Professor Dr. W. Graßmann zum 70. Geburtstag gewidmet

Von K. Pandu Ranga Rao, K. Thomas Joseph und Y. Nayudamma

Verschiedene Vinylmonomere sind auf Kollagen mit Hilfe von Cer^{IV}-Ionen als Starter gepfropft worden. Der Pfropfungsgrad wird von Temperatur, Zeit, Konzentration der Monomeren, Cer-Ionen-Konzentration usw. beeinflußt. Die Konzentration an Monomeren und Katalysatoren sind dabei besonders wichtige Faktoren. Auch die Diffusionsgeschwindigkeit des Monomeren in das kollagene Fasergeflecht scheint ebenfalls ein wichtiger Faktor zu sein, der den Grad der Pfropfung beeinflußt; er ist abhängig von dem Quellungszustand des Kollagens. Gequollenes und lösliches Kollagen nimmt mehr Monomere auf als unlösliches.

Différents monomères de vinyle ont été tamponnés sur collagène à l'aide d'ions de Cer^{IV} comme starter (amorce). Le degré de tampon est influencé par la température, le temps, la concentration des monomères, la concentration des ions etc. La concentration en monomères et en catalyseurs sont ici des facteurs particulièrement importants. La diffusion des monomères dans le réseau de fibres collagènes paraît également être un facteur important, qui influence le degré de tamponnage; il dépend de l'état de gonflement du collagène. Du collagène gonflé et soluble absorbe plus de monomère que l'insoluble.

Varios monómeros vinílicos han sido injertados sobre el colágeno con ayuda de iones $cerio^{IV}$ como agente iniciador. El grado de inserción viene influenciado por la temperatura, tiempo, concentración de monómeros, concentración de iones cerio, etc. Son factores especialmente importantes la concentración de monómeros y de catalizadores. Tambien la velocidad de difusión del monómero en el tejido fibroso colagénico parece ser un factor importante, que influye asimismo sobre el grado de inserción; depende del estado de hinchamiento del colágeno. El colágeno hinchado y soluble absorbe más monómero que el colágeno insoluble.

When collagen is copolymerised with vinyl monomeres by ceric ion, the resulting products contain an appreciable amount of the polymer even after extraction of the product with the appropriate solvents for the homopolymer. Grafting could not however be proved simply by extraction because crosslinked or intertangled high molecular weight homopolymer may still remain in the collagen. A final proof of grafting can be obtained through the detection of amino acid and groups in the graft isolated by an acid hydrolysis of the graft copolymer. In the present study the grafted collagen was hydrolysed with 6 n HCl and the graft was isolated and treated with Ninhydrin reagent which gave the characteristic blue colour normally associated with the presence of amino acids. The presence of amino acids could also be further confirmed through the detection of dinitrophenylated amino groups in the isolated graft. The dinitrophenylated graft was separated on thin layer chromotograms and the yellow colour of the graft on the plate indicated that dinitrophenylation has taken place, thus confirming the presence of attached amino acids to the graft.

* Aus der englischen Sprache übersetzt von E. Heidemann

The results obtained with soluble tropocollagen also show that actual grafting has taken place. It is well known that when neutral tropocollagen solutions are warmed to 35–37° C fibrils are formed and these newly formed fibrils redissolve when the precipitate is kept at 2° C. When tropocollagen was however grafted with acrylamide, fibrils were still formed on warming to 37° C but these fibrils showed no tendency to redissolve on cooling. This shows that the redispersion property of the tropocollagen was impaired probably by attachment of the polyacrylamide to the tropocollagen molecule.

Analysis of the heat precipitated collagen after grafting also showed the presence of polyacrylamide polymer in the precipitate. Different vinyl monomers have been grafted on collagen using ceric^{IV} ion as the initiator. The influence of different factors such as temperature, time, monomer concentration, ceric ion concentration etc., on the content of graft has been investigated. The concentration of monomer and catalyst are important factors influencing the percent graft. The rate of diffusion of the monomer into the collagen also appears to be an important factor affecting the degree of grafting and this factor is dependent upon the state of the collagen; swollen and solubilised collagen grafted more of the monomers than the insoluble collagen.

Im Laufe der letzten zehn Jahre haben verschiedene synthetische Polymere dem Leder auf seinen traditionellen Märkten Konkurrenz gemacht. Diese Herausforderung zwingt zu Forschungsarbeit, um die Position des Leders zu stärken und neue Anwendungsgebiete für tierische Häute zu finden. Leder mit neuen Eigenschaften können möglicherweise dadurch geschaffen werden, daß das Kollagen chemisch modifiziert wird.

Es wurde von Blowin schon früher vorgeschlagen, Vinylmonomere auf natürliche und synthetische Polymere mit Hilfe von chemischen Startern oder mit Hilfe von Strahlung aufzupfropfen, um die Eigenschaften dieser Grundpolymere zu verändern[1]. Auch eine Pfropfpolymerisation von Vinylmonomeren auf Seide, Stärke, Wolle usw. wurde schon ziemlich intensiv untersucht, wobei die Reaktion ebenfalls chemisch oder durch Strahlung ausgelöst wurde[2–6]. Vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit ist jedoch der Pfropfung von Monomeren auf Kollagenfaser gewidmet worden. Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, um das Kollagen durch Pfropfpolymerisation mit verschiedenen Vinylmonomeren zu modifizieren. Man sollte erwarten, daß die Eigenschaften des Kollagens mit denen der synthetischen Polymeren kombiniert werden.

Beim Pfropfen von Vinylresten auf Kollagen kann man ebenfalls chem. Verbindungen und energiereiche Strahlung als Starter anwenden. Wir haben für eine erste Untersuchung zunächst Cer-Ionen als Starter gewählt. Das Redoxpotential von Cer^{IV}-Salzen, besonders in Alkohol, ist schon von anderer Seite katalytisch zur Polymerisation bzw. zum Pfropfen von Vinylmonomeren ausgenutzt, und Kinetik und Mechanismus dieser Reaktion sind studiert worden[7,8,10,11].

Ergebnisse von Modellversuchen zeigten den Mechanismus der Vinylrestpfropfung auf Cellulose mit Hilfe von Cer^{IV}-Salzen. Dabei ist die Pfropfreaktion durch freie Radikale entweder am α-Kohlenstoffatom des primären Alkohols oder am α-Kohlenstoffatom des 1,2-Glykols der Glukoseeinheit[9] in Gang gekommen. Der gleiche Mechanismus wird auch bei der Pfropfung von Kollagen mit Cer-Ionen erwartet. Kollagen enthält nämlich alkoholische Gruppen an Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Cer^{IV}-Ionen bilden reversible Komplexe mit Alkoholen und Glykolen, wobei die Dissoziation dieser Komplexe ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist[7]. Im Falle der Alkohole ist der Startmechanismus der Reaktion folgendermaßen zu formulieren:

$$Ce^{IV} + R-CH_2OH \overset{K}{\rightleftharpoons} B \xrightarrow{K_D} Ce^{III} + H^+ + \dot{R}CHOH \quad (\text{bzw. } RCH_2O\cdot)$$

Darin ist B ein Zeichen für den Cer^{IV}-Alkohol-Komplex, und RCHOH ist das freie Radikal.

Der Vorgang kann als eine Oxydation mit Cer-Ionen aufgefaßt werden. Auf einem reduzierenden Mittel erfolgt ein Elektronenübergang unter Bildung eines freien Radikals[7,10,11]. Wenn das reduzierende Mittel ein polymeres Molekül ist wie Cellulose oder Kollagen und die Oxydation in Gegenwart von Vinylpolymeren durchgeführt wird, wird ein freies Radikal auf dem polymeren Molekül erzeugt, an welcher Stelle die Polymerisation in Gang kommt. Ein vorläufiger Bericht über unsere Untersuchungen ist schon erschienen[12]. Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen sind:

PAN	–	Polyacrylnitril
PAA	–	Polyacrylamid
PMMA	–	Polymethylmethacrylat
AN	–	Acrylnitril
AA	–	Acrylamid
MMA	–	Methylmethacrylat
CAN	–	Cer-Ammoniumnitrat

Experimentelles

Material:

Unlösliches Kollagen wurde in Form von Hautpulver vom Mittelspalt einer Büffelhaut entnommen. Da ein gleichmäßiges Ausgangsmaterial in einer Menge, die ausreichend war, für die gesamte Untersuchung erforderlich war, wurde eine große Menge hergestellt, und es wurden alle Experimente mit Kollagen der gleichen Herkunft durchgeführt. Lösliches Kollagen wurde von Kalbshaut gewonnen, wie von Hörmann und Hafter[12a] beschrieben. Cer-Ammoniumnitrat (pro Analyse) wurde aus dem Handel bezogen, die Vinylmonomeren wurden vor Gebrauch destilliert.

Pfropfpolymerisation

Alle Pfropfversuche wurden in Stickstoffatmosphäre bei Zimmertemperatur ausgeführt. 100 ccm Lösungsmittel wurden auf 0,05 Mol Durchschnittsaminosäurerestgewicht von Kollagen benutzt. Die Monomerkonzentration war 0,1 Mol, und die Startermenge betrug

5 ml von 0,1 Mol Cer-Ammoniumnitrat in 1 n Salpetersäure. Die Reaktion lief über eine festgesetzte Zeit. Nach der Pfropfung wurde unumgesetztes Monomeres mit destilliertem Wasser herausgewaschen, und die locker gebundenen Homopolymeren wurden durch Extraktion des Produktes für 72 h bei Zimmertemperatur mit geeigneten Lösungsmitteln abgetrennt. Der nach Extraktion verbleibende Rückstand wurde dann auf Stickstoffgehalt, Arginin und Hydroxyprolin untersucht. Der Gesamtstickstoff wurde mit Hilfe der Kjeldahlmethode bestimmt. Für die Bestimmung von Hydroxyprolin und Arginin wurde das Kollagen für 18 h in 6 n Salzsäure bei 105° hydrolysiert, wobei die Bestimmung von Hydroxyprolin nach Neumann und Logan[14] und Arginin nach der Methode von Macpherson[13] durchgeführt wurde. Aus diesen Werten wurde der Kollagengehalt des gepfropften Produktes berechnet.

Feststellung der Pfropfung

Alsdann war eindeutig festzustellen, daß eine chemische Bindung zwischen Kollagen und dem Vinylmonomeren und keine Mischung zwischen Copolymeren und Kollagen besteht. Hierfür sind folgende Kriterien maßgebend:

1. Eine Pfropfung bestätigt sich erst auf Grund einer Analyse des Pfropfpolymeren nach dessen Säurehydrolyse. Dazu wurde eine Probe des Pfropfproduktes von 1,0 g in 6 n Salzsäure im Wasserbad für 3 h hydrolysiert, wobei die aufgepfropften nichtkollagenen Anteile abgespalten werden. Sie werden durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus dem Hydrolyseansatz isoliert. Das isolierte Produkt wurde dann mit Ninhydrin behandelt, wobei die charakteristische blaue Farbe für die Gegenwart von Aminosäuren spricht.

2. Ein weiterer Beweis für die Gegenwart von Aminosäureendprodukten in den nach Hydrolyse isolierten Pfropfprodukten wurde dadurch erhalten, daß die anhaftenden Aminosäuren bzw. Peptide als Dinitrophenylderivate nachgewiesen wurden. Hierfür wurden 0,2 g eingewogen und nach der Methode von Sanger[21] dinitrophenyliert. Zum Vergleich wurde als Blindversuch eine Mischung aus Kollagen und Homopolymeren hydrolysiert und das Polymere unter gleichen Bedingungen dinitrophenyliert. Das dinitrophenylierte Pfropfprodukt wurde dann mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Hierfür wurden 20 x 20 cm Glasplatten mit Silikagel G (Merck) benutzt, die Platten in aufsteigender Technik in Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 1) entwickelt. Die Polymeren blieben an der Auftragsstelle, während die begleitenden Verunreinigungen schneller liefen und abgetrennt werden konnten. Die gelbe Farbe des Pfropfproduktes auf der Platte zeigt an, daß eine Dinitrophenylierung stattgefunden hat, womit sich die Gegenwart von an die aufgepfropften aliphatischen Reste gebundenen Aminosäuren bestätigt. Wenn das Homopolymere jedoch als Blindversuch in Mischung mit Kollagen unter identischen Bedingungen dinitrophenyliert wurde, so entstand kein gelbes Produkt.

Ergebnisse und Diskussion

Feststellung der Reaktivität des Monomeren

In einer vorhergehenden Untersuchung der durch Cer^{IV}-Ionen in Gang gebrachten Pfropfpolymerisation auf Kollagen wurden verschiedene Monomere benutzt, um die höchste relative Reaktivität bei der Pfropfung festzustellen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In allen Fällen wurden die Homopolymeren durch eine Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln (PAN mit Dimethylformamid, PMMA mit Dichloräthan und PAA mit heißem Wasser oder N,N-Dimethylformamid-Essigsäuremischung 1 : 1) beseitigt. Diese Voruntersuchungen zeigen an, daß polare Monomere wie AN, AA und MMA sehr gut gepfropft werden können. Der aufgepfropfte Anteil war am größten im Falle von MMA. Dies mag an einer stärkeren Bildung von Homopolymeren im Falle von AN und AA liegen. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs und gewisser Aminosäuren im Kollagen-MMA sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1 Cer^{IV}-katalysierte Aufpfropfung von Vinylmonomeren auf Kollagen (Reaktionszeit 3 Stunden bei Zimmertemperatur) [a]

Art des modifizierten Kollagens	Aminosäure	g/100 g	% Kollagen im Pfropfprodukt	Pfropfgrad in % [b]
PAN-Kollagen	Arginin	5,35	62,15	60,87
	Hydroxyprolin	7,75	56,62	
PAA-Kollagen	Arginin	6,81	79,14	26,36
	Hydroxyprolin	7,81	57,82	
PMMA-Kollagen	Arginin	4,10	48,00	108,3
	Hydroxyprolin	5,00	37,00	

a In jedem Experiment wurden 5 x 10 Mol/l Cer-Ammoniumnitrat in 1 n HNO_3 eingesetzt; ferner 0,05 Mol Aminosäuredurchschnittsgewicht des Kollagens und 0,1 Mol des Monomeren, verteilt in 100 ml wäßrigem N,N-Dimethylformamid (1 : 1; Wasser : DMF), ausgenommen 100 ml Wasser im Fall von MMA.

b berechnet aus dem Argininwert unter der Annahme, daß Arginin zu 8,4% im Kollagen vorliegt.

Tabelle 2 Bestimmung des Gesamtstickstoffs und bestimmter Aminosäuren im Kollagen-MMA-Propfpolymeren

	g/100 g	% Kollagen im Pfropfprodukt
Gesamtstickstoff	8,8	49,6
Arginin	4,1	48,0
Hydroxyprolin . .	5,0	37,0

Aus Tab. 2 kann man entnehmen, daß der Kollagengehalt, errechnet aus Arginin und Gesamtstickstoff, in vernünftigen Grenzen übereinstimmt, während die Oxyprolinbestimmung immer zu niedrige Werte gibt. Bei der Pfropfung von Vinylmonomeren auf Kollagen

werden die Aliphatenreste an gewisse Aminosäuren durch -C-C-Bindung gebunden. Wenn das Produkt jedoch mit Salzsäure hydrolysiert wird, so bleiben die Aminosäuren, an welchen die aliphatischen Pfropfprodukte hängen, noch nach Abspaltung an den aliphatischen Kohlenwasserstoffketten und können mit diesen zusammen aus dem Hydrolysat entfernt werden. Die zu niedrigen Werte im Kollagengehalt, die nach Analyse von Hydroxyprolin und Umrechnung auf Kollagen erhalten werden, zeigen an, daß einige der aliphatischen Pfropfprodukte an den Hydroxyprolinresten haften. Da verschiedene experimentelle Faktoren, wie z. B. Monomerkonzentration, Starterkonzentration, Zeit und Temperatur usw. den Prozeß der Copolymerisation beeinflussen, wurde zunächst der Einfluß der Copolymerisation systematisch untersucht.

Einfluß der Konzentration des Katalysators

Der Einfluß der Konzentration von CAN beim Pfropfen von MMA auf Kollagen ist in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3 Einfluß der Katalysatorkonzentration auf die Pfropfung von MMA auf Kollagen (Reaktionszeit 3 Stunden bei Zimmertemperatur) [a]

Katalysatorkonzentration Mol/l	Pfropfgrad in % [b]
$2{,}5 \times 10^{-3}$	119,90
$5{,}0 \times 10^{-3}$	62,00
$1{,}0 \times 10^{-2}$	29,17

a In jedem Ansatz wurden 0,5 Mol Monomer/l und 0,25 Mol Durchschnittsaminosäurerestgewicht in Kollagen pro l Wasser eingesetzt.
b Aus Stickstoff nach Kjeldahl.

Man kann feststellen, daß die maximale Menge der Aufpfropfung mit MMA erreicht wurde, wenn die CAN-Konzentration $2{,}5 \times 10^{-3}$ Mol/l betrug. Bei höheren Konzentrationen nahm der Grad der Aufpfropfung deutlich ab. Die Menge an Homopolymeren stieg mit der Katalysatorkonzentration von $2{,}5 \times 10^{-3}$ bis 1×10^{-2} Mol/l an. Dies liegt daran, daß Ce^{IV}-Ionen auch die Abbruchreaktion einleiten. Bei niedriger Ce^{IV}-Ionenkonzentration stehen sie nicht für die Abbruchreaktion[15] zur Verfügung, da der größte Teil bei der Radikalentstehung verbraucht wird. Der Pfropfungsgrad hängt nicht nur von der Anzahl der Seitenketten, sondern auch von ihrem Molekulargewicht ab, welches naturgemäß mit steigender Starterkonzentration abnimmt. Dieses ist u. a. die Ursache für einen Abfall in der prozentualen Pfropfung bei zunehmender Starterkonzentration.

Einfluß der Monomerkonzentration

Der Einfluß der Monomerkonzentration auf die Pfropfung von MMA wurde in einer Reihe von Polymerisationen ermittelt, bei denen die Konzentration des Monomeren von 0,5–2 Mol/0,25 Mol Durchschnittsaminosäurerestgewichten von Kollagen/l betrug. Diese Resultate sind in Abb. 1 dargestellt.

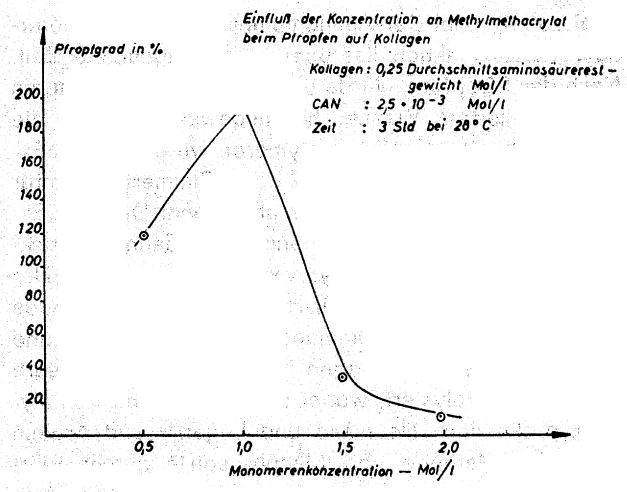


Abbildung 1

Aus dieser Abbildung kann man entnehmen, daß in dem Maße, wie der Monomerengehalt ansteigt, ein Anstieg in der prozentualen Pfropfung im Anfangsstadium erfolgt und schließlich einen Maximumwert erreicht. Danach fallen die Werte bemerkenswert schnell bei gleichzeitig zunehmender Bildung von Homopolymeren ab. Bei höherer Konzentration verbleibt eine große Menge von freien Monomeren in der Reaktionsmischung. Die Reaktionen, welche als Konkurrenzreaktionen in der Lösung auftreten, sind die »Bindung« und »Disproportionierung« des Polymethylmethacrylatmakroradikals. Wenn die Konzentration des Poly-MMA-Makroradikals ansteigt, so steigt neben der Bindungsgeschwindigkeit auch die Geschwindigkeit der Disproportionierung. Dabei ist die Geschwindigkeit der Disproportionierung gegenüber der Bindung an das Kollagenmolekül zunehmend im Vorteil. Das liegt auch daran, daß die Geschwindigkeit der Diffusion von Monomeren in dem Maße eingeschränkt wird, wie sich das gebildete Polymere ablagert, welches natürlich besonders schnell wächst, wenn die Konzentration des Monomeren hoch ist.

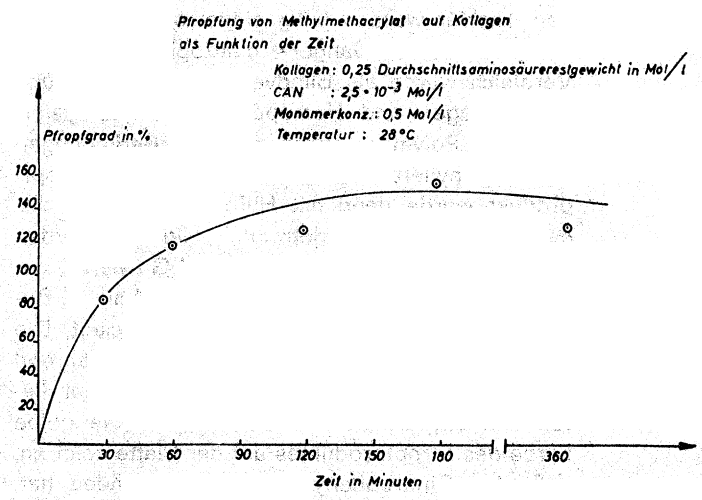


Abbildung 2

Einfluß der Reaktionszeit

Das Pfropfen von MMA als Funktion der Zeit ist in Abb. 2 dargestellt. Man kann sehen, daß die Geschwindigkeit des Pfropfens mit der Zeit ansteigt. Zunächst nimmt in dem Maße, wie die Polymerisation fortschreitet, die Geschwindigkeit ab, wobei ein maximaler Pfropfzustand schon recht bald (in ungefähr 3 Stunden) erreicht wird

Einfluß der Temperatur auf die Reaktion

Tab. 4 zeigt die Beziehung zwischen der prozentualen Pfropfung und der Temperatur.

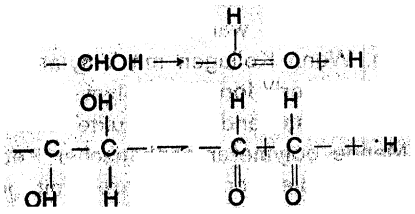
Tabelle 4 Einfluß der Temperatur auf die Pfropfung von MMA auf Kollagen (Reaktionszeit 3 Stunden) [a]

Temperatur 0° C	Pfropfgrad in % [b]
28	159,6
40	158,1
50	143,2

a In jedem Fall wurden 2,5 x 10^{-3} Mol CAN/l in 1 n HNO_3 zusammen mit 0,25 Mol Durchschnittsaminosäurerestgewicht an Kollagen eingesetzt.

b Aus N_2-Analyse nach Kjeldahl.

Man sieht, daß in dem untersuchten Temperaturbereich von 28–50° keine nennenswerte Änderung in der prozentualen Pfropfung festzustellen ist. Die prozentuale Pfropfung nimmt oberhalb 40° langsam ab. Da Kollagen oberhalb 50° langsam abgebaut wird, wurde der Einfluß der Temperatur oberhalb von 50° nicht untersucht. Der Abfall in der prozentualen Pfropfung bei Temperaturen oberhalb 40° kann folgendermaßen erklärt werden. Freie Radikale, entstanden durch Eliminierung von Wasserstoffatomen, werden in Aldehyde[16] umgewandelt und dies um so schneller, je höher die Temperatur ist.



Somit führt ein Anstieg der Temperatur zu einem Anstieg in der Geschwindigkeit der Zerstörung der freien Radikale und damit zu einem Abfall in dem Polymerisationsgrad.

Ein anderer Gesichtspunkt, welcher die Pfropfung von Monomeren auf Kollagen beeinflussen mag, kann die Geschwindigkeit der Diffusion der Monomeren in das Kollagen sein. Da gequollenes bzw. lösliches Kollagen zugänglicher für Monomeres und Katalysator ist, wurden Pfropfexperimente an unlöslichem Kollagen, das mit Hilfe der Nishihara-Technik (mit α-Amylase), wie sie Steven[17] beschreibt, innerlich gespalten wurde, durchgeführt. Die Technik besteht aus einer Behandlung des unlöslichen Kollagens mit α-Amylase und einem Inlösungbringen des behandelten Kollagens in einem großen Volumen von 0,2 m Essigsäure. Die Pfropfexperimente wurden unter Verwendung dieser Lösung in der gleichen Weise wie bei unlöslichem Kollagen ausgeführt. Die Resultate sind in Tab. 5 dargestellt.

Tabelle 5 Ce^{IV}-katalysierte Pfropfung von Vinylmonomeren auf unlösliches und lösliches Kollagen (Reaktionszeit 3 Stunden bei Zimmertemp.) [a]

Monomeres	unlösliches Kollagen		lösliches Kollagen	
	% Kollagen im Pfropfprodukt	% Pfropfgrad	% Kollagen im Pfropfprodukt	% Pfropfgrad
AN	62,15	60,87	56,90	75,75
AA	79,14	26,36	36,63	177,5

a In jedem Fall wurden 5 x 10^{-3} Mol CAN pro Liter in 1 n HNO_3 zusammen mit 0,1 Mol Monomeren und 0,05 Mol Durchschnittsaminosäurerestgewicht an Kollagen in 100 ml wäßrigem DMF eingesetzt (DMF : H_2O = 1 : 1).

b Berechnet aus der Argininanalyse.

Man kann erkennen, daß der prozentuale gepfropfte Anteil im Falle löslichen Kollagens viel größer ist als im Falle unlöslichen Kollagens. Der Einfluß von Quellungsmitteln auf die Geschwindigkeit bei gequollenen Fasern und Filmen kann gut als eine schnellere Geschwindigkeit der Diffusion der Monomeren zu den aktiven Zentren innerhalb der gequollenen Fasern interpretiert werden. Es scheint demnach ziemlich sicher zu sein, daß ein ähnlicher Mechanismus bei der gegenwärtigen Versuchsanordnung besteht. Es steht fest, daß eine zunehmende Menge von Quellungsmitteln und Wasser in der Pfropflösung zu einer Pfropfung tiefer innerhalb der Fasern führt und daß die Ablagerung von gepfropften Polymeren mehr oder weniger tief im Fasergeflecht damit gesteuert werden kann. Eine Arbeit, die dies herausstellen soll, ist im Gang, wobei die Ablagerung der gepfropften Kohlenwasserstoffe im Kollagenmolekül elektronenmikroskopisch untersucht wird. Man kann aus den Ergebnissen schließen, daß in mit MMA gepfropftem Kollagen mit Hilfe von CAN die Konzentration des Monomeren und des Katalysators und der Einfluß des Quellungsmittels Faktoren sind, die den Pfropfgrad wesentlich beeinflussen. Unter diesen experimentellen Bedingungen sind die niedrigen Konzentrationen von MMA und CAN am günstigsten, da ja große Konzentrationen von MMA eine Homopolymerisation begünstigen und ein hoher CAN-Gehalt die Pfropfung verzögert.

Pfropfen auf Tropokollagen

Um noch einen weiteren Beweis für eine tatsächlich stattfindende Pfropfung zu erbringen, schien es auch naheliegend, einige Experimente mit Tropokollagen in Lösung zu machen. Hierfür wurde ein Monomer ausgewählt, dessen Homopolymere nach der Pfropfung in Lösung bleiben. Acrylamid eignet sich hierfür besonders gut.

Eine 0,1%ige Lösung von Tropokollagen in 0,1 n Essigsäure wurde unter den gleichen Bedingungen gepfropft, wie sie bei unlöslichem Kollagen angewendet wurden. Nach der Pfropfung wurde die viskose Lösung erschöpfend gegen 0,1 n Essigsäure dialysiert. Die Neigung, Fasern abzuscheiden, wurde bei diesem gepfropften Kollagen im Vergleich zu unbehandeltem Kollagen untersucht.

Faserabscheidung

Lösliches Kollagen in kalter, neutraler Salzlösung scheidet beim Erwärmen auf 37° Fibrillen in Gestalt eines steifen Gels ab. Wenn die fibrillären Abscheidungen sofort nach ihrer Bildung wieder auf 2° abgekühlt werden, so findet eine Wiederauflösung des Kollagens statt. Bedingungen, welche die Wasserstoffbindung begünstigen, begünstigen auch die Bildung von Fibrillen, während solche, die die Wasserstoffbrücken sprengen, die Nichtabscheidung des Kollagens begünstigen. Die Faserbildung wurde in einer Versuchsanordnung, ähnlich der von Gross und Kirk[18] beschriebenen, untersucht und gemessen. 4 ccm eines kalten, gepfropften Tropokollagens (Acrylamidtropokollagen) wurden in Lösung mit 0,4 ccm 1 n Natronlauge, 0,35 ccm einer 2 m Kochsalzlösung und 2,25 ccm Phosphatpuffer (pH 7) gemischt. Alles wurde dann bei 37° inkubiert. Die zunehmende Trübung wurde in einem Klett-Summerson-Kolorimeter mit einem Grünfilter vermessen. Die Blindversuche mit unbehandeltem Tropokollagen wurden unter gleichen Bedingungen ausgeführt.

Auch die Wiederauflösung wurde untersucht, indem die trüben gelierten Substanzen in ein Eiswasserbad gebracht wurden und das Klarwerden nach verschiedenen Zeiten vermessen wurde. Die Veränderungen wurden in Abständen von 1/2 h in einem Zeitintervall gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

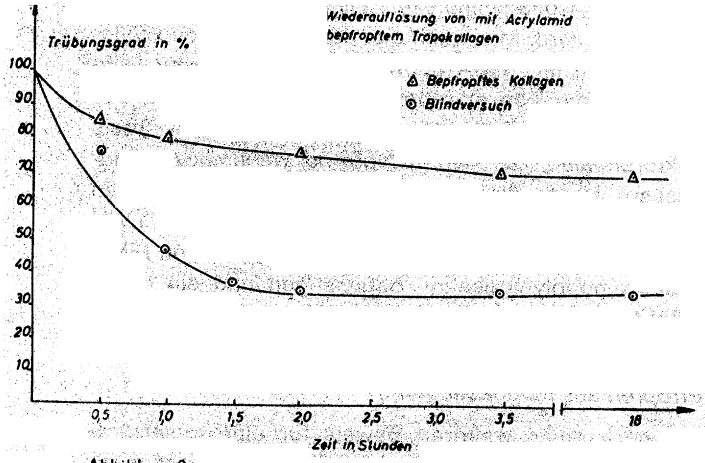


Abbildung 3

Hexosereste von Tropokollagen als mögliche Haftpunkte von Aufpfropfungen

Kollagen enthält kleine Mengen (0,5%) von Kohlehydraten. Beim Aufpfropfen von Vinylmonomeren auf Kollagen unter Mitwirkung von Ce^{IV}-Ionen stellt man sich, wie oben schon ausgeführt, vor, daß die Startreaktion von freien Radikalen am Kollagenmolekül ausgelöst wird, was ein Ablösen von Wasserstoffatomen vom Kohlenstoffatom, das die Hydroxylgruppen trägt, zur Voraussetzung hat. Daher ist es möglich, daß diese Hexosereste auch als Haftpunkte für Pfropfreaktionen von Vinylmonomeren an Kollagen wirken. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde der Kohlenhydratgehalt des gepfropften Kollagens nach einer Hydrolyse mit 0,5 n Schwefelsäure über 5 h bestimmt. Die Hexosen im Hydrolysat wurden mit der Phenolsulfonsäuremethode[19] und der Anthronmethode[20] bestimmt, aber es wurde kein signifikanter Abfall im Hexosengehalt beobachtet. Diese Ergebnisse besagen, daß eine kleine Anzahl von Hexoseresten im Kollagen zwar vorhanden, aber nicht an dem Pfropfpunkt der Vinylmonomeren beteiligt ist.

Es wurden ferner Versuche gemacht, um die Molekulargewichte der aufgepfropften Monomeren zu bestimmen, nachdem sie durch Säurehydrolyse abgetrennt wurden. Überraschenderweise konnte Polymethylmethacrylat (PMMA) nur zur Quellung, nicht aber zur Auflösung in 1-2,-Dichloräthan gebracht werden. Ob dies an einer unvollständigen Hydrolyse des Kollagens liegt, die wir uns so erklären, daß durch Säure noch eine Nachkondensation von Aminosäureresten mit PMMA katalysiert wird, oder ob es daran liegt, daß gelegentlich mehr als eine Methylmethacrylatestergruppe an einer Aminosäure haftet, kann nicht bestimmt und entschieden werden. Auf jeden Fall ist die Unlöslichkeit ein weiterer Beweis für die Haftung von PMMA-Ketten an Kollagen.

Es wurden schließlich Versuche gemacht, das Kollagenkettengerüst mit Enzymen, wie z. B. Pepsin und Trypsin, so weit zu hydrolysieren, daß sie löslich waren, aber die Produkte, die nach Anwendung dieser Technik isoliert wurden, waren ebenfalls unlöslich in Dichloräthan. Wenn Kollagen mit Vinylmonomeren in Gegenwart von Ce^{IV}-Ionen kopolymerisiert wird, so enthalten die entstehenden Produkte eine ganz erhebliche Menge polymerer aliphatischer Ketten, auch nachdem vorher die Homopolymeren mit geeigneten Lösungsmitteln beseitigt wurden. Das Aufpfropfen konnte damit jedoch nicht ganz schlüssig bewiesen werden, und zwar deshalb, weil quervernetzte oder sonstwie verharzte hochmolekulare Homopolymere schließlich auch noch im Kollagenmolekül zurückgehalten werden können. Eine endgültige Beweisführung über tatsächlich stattgefundene Pfropfung konnte nur dadurch erhalten werden, daß Aminosäureendgruppen nach einer vorhergehenden Säurehydrolyse des Pfropfproduktes nachgewiesen werden können. Bei der gegenwärtigen Untersuchung wurde dazu stets mit 6 n HCl hydrolysiert, die Pfropfpolymeren wurden abgetrennt, und mit Ninhydrinreagens wurde die Anwesenheit von Aminosäuren an den aliphatischen Ketten nachgewiesen. Der zweite Nachweis erfolgte durch

Markierung der Aminosäuren als DNP-Derivate. Die dinitrophenylierten Pfropfpolymeren wurden mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie abgetrennt und nachgewiesen.

Die Ergebnisse, die mit löslichem Tropokollagen erhalten wurden, zeigen ebenfalls, daß tatsächlich eine Pfropfung stattgefunden hat. Es ist gut bekannt, daß, wenn neutrale Tropokollagenlösungen auf 35–37° erwärmt werden, sich Fibrillen abscheiden und diese neu geformten Fibrillen sich dann schließlich wieder auflösen, wenn man auf 2° abkühlt. Wenn Tropokollagen jedoch mit Acrylamid bepfropft wurde, so wurden noch Fibrillen gefunden. Diese Fibrillen zeigten jedoch keine Tendenz zum Wiederauflösen, worüber die Abb. 3 Auskunft gibt. Das zeigt, daß die Wiederlösefähigkeit der Tropokollagenmoleküle wahrscheinlich durch das Anhaften des Polyacrylamids gestört wird. Eine Analyse des warm gefällten Kollagens nach dem Pfropfen zeigt auch die Anwesenheit von Polyacrylamidpolymeren im Gefällten.

Das Infrarotspektrum der polymeren Bestandteile, die nach der Säurehydrolyse des Kollagenpolyacrylamidcopolymerisats gefunden wurden, deutet ebenfalls darauf hin, daß tatsächlich eine Pfropfung stattgefunden hat. Immer, wenn das Produkt ein Pfropfprodukt ist, zeigt das Infrarotspektrum neben denen der aliphatischen Kohlenwasserstoffbestandteile typische Banden von Aminosäureresten. Im Falle von Mischungen aus Kollagen mit Homopolymeren zeigen die isolierten Produkte das Spektrum des Homopolymeren allein, da ja das Kollagen vollständig nach der Hydrolyse beseitigt wurde. Auf diese Weise wurden die Infrarotspektren einer Anzahl von Polymeren geprüft, bei denen die Vorprodukte nach Hydrolyse abgetrennt wurden.

Die Arbeit, die wir hier vorgelegt haben, stellt eine erste Orientierung dar, speziell, um den Einfluß der Ce^{IV}-Ionen auf die Pfropfreaktionen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, daß Monomere wie Acrylnitril, Acrylamid, Methylmethacrylat usw. tatsächlich auf Kollagen gepfropft werden können. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um die Art und das Ausmaß der Aufpfropfung festzustellen. Das ist vor allem notwendig, um kollagene Materialien zu erhalten, die einen technischen Zweck erfüllen können. In dieser Richtung wird weitergearbeitet.

Unser Dank gilt Professor M. Santappa, University of Madras, für Diskussion, ebenfalls den Herren von der Cyanamid India Ltd. für das Acrylamid, das in dieser Untersuchung benutzt wurde.

Diese Forschung wurde zum Teil durch eine Förderung durch das US-Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nr. P. L. 480, finanziert.

Literaturverzeichnis

1 F. A. Blowin, N. J. Morris und Jr. Arthur, J. C. Text. Res. J. **36**, 4 (1966)
2 H. Yasuda, J. A. Wray und V. Stannett, J. Polymer Sci., Part C, **2**, 387 (1963)
3 R. Y. M. Hung, B. Immergut, E. H. Immergut und W. H. Rapson, J. Polymer Sci., Part A, **1**, 1257 (1963)
4 V. Stannett, K. Araki, J. A. Gervasi und S. W. Meleskey, J. Polymer Sci., Part A, **3**, 3763 (1963)
5 C. E. Brockway und K. B. Moser, J. Polymer Sci., Part A, **1**, 1025 (1963)
6 R. J. E. Cumberbirch und J. R. Hoker, J. S. D. & C. **82**, 59 (1966)
7 G. Mino und S. Kaizerman, J. Polymer Sci. **31**, 242 (1958)
8 Zoila Reyes, C. E. Rist und C. R. Russel, J. Polymer Sci., Part A, **4**, 1031 (1966)
9 T. Iwakura, Y. Kurosaki und N. Nakabayashi, Paper presented at the International Symposium of Macromolecular Chemists, Paris, July 1–6 (1963)
10 F. R. Duke und A. A. Forest, J. Am. Chem. Soc. **71**, 2790 (1949)
11 F. R. Duke und R. F. Bremer, J. Am. Chem. Soc. **73**, 5179 (1951)
12 K. Pandu Ranga Rao, K. Thomas Joseph und Y. Nayudamma, Leath. Sci. **14**, 73 (1967)
12a R. Hafter und H. Hörmann, Z. physiol. chem. **330**, 169 (1963)
13 H. T. Macpherson, Biochem. J. **40**, 470 (1946)
14 R. E. Neuman und M. A. Logan, J. Biol. Chem. **184**, 299 (1950)
15 Leo Neimo und Hannes Sithola, Paper and Timber **47**, Nr. 6, 369–379 (1965)
16 Y. Iwakura, T. Kurosaki, K. Uno und Y. Imai, J. Polymer Sci., Part C, **4** (1963)
17 F. S. Steven, Ann. Rhem. Dis. **23**, 300 (1964)
18 J. Gross und D. Kirk, J. Biol. Chem. **233**, 355 (1958)
19 Michel Dubois, K. A. Gilles, K. Hamilton, P. A. Rebers und F. Smith, Anal. Chem. **28**, 350 (1956)
20 T. A. Scott und E. H. Melvin, Anal. Chem. **25**, 1656 (1953)
21 Sanger, Biochem. J. **39**, 507 (1945)
22 R. L. Cleland und W. H. Stockmayer, J. Polymer Sci. **17**, 473 (1955)

14. Schuhmusterschau vom 28. 4. bis 1. 5. 1968 in Padua

Vom 28. April bis 1. Mai 1968 erwartet die 14. Schuhmusterschau – Lederwaren, Rohstoffe, Zubehör – Käufer aus fünf Kontinenten. In ihrem bebilderten Prospekt, den die Veranstalter für die Interessenten herausgebracht haben, gibt die Messeleitung bekannt, daß in Padua die Modelle für die Herbst- und Wintersaison beschlossen werden.

Sie weist ferner darauf hin, daß auf venezianischem Boden über 800 Produktionsstätten, darunter auch etwa 150 Gerbereien, die auf eine langjährige Tradition zurückblicken können, den guten Ruf des eleganten italienischen Schuhs begründet haben. Im Jahr 1967 sei über ein Fünftel der italienischen Schuhausfuhr auf venezianischem Gebiet hergestellt worden. 26 Millionen Personen in vielen Ländern der Welt und 28 Millionen Italiener trügen venezianische Schuhe. Im Jahr 1967 stieg die Schuhausfuhr aus Norditalien um 13% gegenüber dem Vorjahr an.

Bei der 14. Schuhmusterschau in Padua hat die Zahl der Aussteller auf das Doppelte gegenüber 1967, auf 400, zugenommen, die auf einer Fläche von 10 000 Quadratmetern Käufer aus der ganzen Welt erwarten.

Für Geschäftsabschlüsse steht das Schuhgeschäftszentrum (Centro Affari Calzatura) zur Verfügung. Der Katalog kann kostenlos angefordert werden, ebenso wird Gelegenheit gegeben, auf Wunsch Produktionsbetriebe zu besuchen.

Die Veranstalter erwähnen noch die Weiträumigkeit des 14 Schuhsalons, die es erlaube, in Ruhe Verhandlungen zu führen, und die günstige Jahreszeit, die zu einer Reise nach Italien verlocke.

Auch fast 100 Hersteller von Handtaschen und Reiseartikeln stellen erstmals ihre Erzeugnisse aus. Für ausländische Besucher stehen außerdem ein Verzeichnis von Geschäftsangeboten, Dolmetscher, Übersetzer und Sekretärinnen zur Verfügung. Nähere Auskünfte sind über E. A. Fieradi Padova, Via N. Tommaseo 59, zu erhalten. St.