

# 1 Einleitung

## 1.1 Technische und wirtschaftliche Bedeutung der Azofarbstoffe

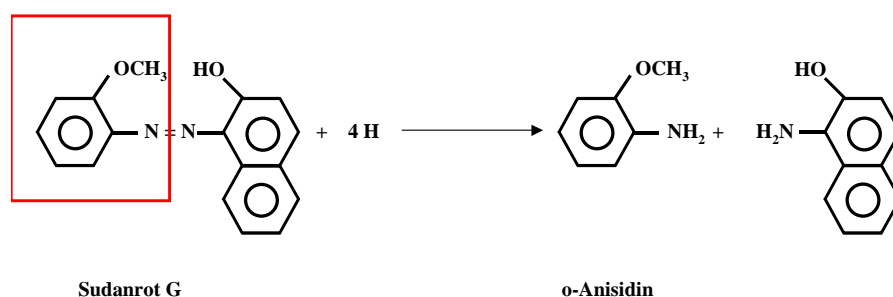
Azofarbstoffe gehören zu den am häufigsten verwendeten Farbmitteln. Weltweit sind etwa 2000 Vertreter der Substanzklasse registriert<sup>1</sup>. Sie sind kostengünstig im großtechnischen Maßstab zu produzieren und weisen eine hohe Farbintensität auf. Zahlreiche Vertreter der Azofarbstoffe sind sog. Direktfarbstoffe, d.h. sie sind in der Lage, Cellulose und andere organische Materialien zu färben, in dem eine wässrige Lösung dieser Farbstoff auf das zu färbende Material einwirkt.

## 1.2 Grundlegende chemische Struktur

Gemeinsames strukturelles Merkmal aller Azofarbstoffe ist die Azobindung, eine Doppelbindung zwischen zwei Stickstoffatomen, die wiederum jeweils mit einem aromatischen Kohlenstoff-Ring verknüpft sind. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung eines Systems konjugierter Doppelbindungen, das sich über die Azogruppe und die mit ihr verknüpften aromatischen Ringe erstreckt. Innerhalb dieses Systems sind die  $\pi$ -Elektronen delokalisiert und verursachen intensive Absorptionsbanden im Bereich des sichtbaren Lichts und damit die Färbung der Azofarbstoffe.

## 1.3 Reduktive Spaltung

Die Grundstruktur der Azofarbstoffe bedingt jedoch auch, dass sie durch reduktive Spaltung zu primären aromatischen Aminen gespalten werden können:



**Abb. 1** Beispiel eines Azofarbstoffs und seiner reduktiven Spaltung

Die hier aufgeführten vier Wasserstoff-Atome stehen stellvertretend für das reduzierende Agens, das zur Durchführung der Azospaltung erforderlich ist.

Die Reduktion kann auf nass-chemischen Weg, z.B. durch Einwirkung von Natriumdithionit<sup>2</sup>, aber auch auf enzymatischem Weg in biologischen Systemen (vgl. Ziffer 1.7.1) erfolgen.

#### **1.4 Potentielle toxikologische Risiken primärer aromatischer Amine**

Den wirtschaftlichen und technologischen Vorteilen der Azofarbstoffe steht bei etwa 500 Vertretern ein gravierender Nachteil entgegen. Bei deren reduktiver Spaltung werden solche primären aromatischen Amine freigesetzt, die als krebserregend bzw. erbgutschädigend bekannt sind oder z.B. aufgrund von Tierexperimenten in dem Verdacht stehen, eine entsprechende Wirkung zu haben<sup>1</sup>.

Für die Primärläsion bei der genotoxischen Wirkung bestimmter primärer aromatischer Amine wird in der Literatur folgender Mechanismus beschrieben<sup>3</sup>:

- die Oxidation des Amins zum Hydroxylamin,
- anschließende Konjugation mit Sulfat oder Acetat,
- Spaltung des Konjugats unter Bildung eines Nitreniumions,
- Reaktion des Nitreniumions unter Bildung eines DNA-Addukts.

87 % der primären aromatischen Amine entfalten eine entsprechende Wirkung. Als relativ untoxisch gelten Vertreter, die neben der Amino-Gruppe noch über ausgeprägte hydrophile Gruppen (z.B.  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) verfügen<sup>4</sup>.

In der folgenden Tabelle 1 sind die primären aromatischen Amine wiedergegeben, die in der Europäischen Union als erwiesenermaßen oder potentiell krebserregend eingestuft wurden<sup>5,6</sup>:

**Tab. 1****Als kanzerogen eingestufte primäre aromatische Amine**

Amin	Synonym	CAS-Nummer
4-Aminobiphenyl	4-Aminodiphenyl	92-67-1
Benzidin		92-87-5
4-Chlortoluidin		95-69-2
2-Naphtylamin		91-59-8
4-Amino-2',3-dimethylazobenzol	o-Aminoazotoluol	97-56-3
2-Amino-4nitrotoluol		99-55-8
4-Chloranilin	p-Chloranilin	106-47-8
4,4'-Diaminophenylmethan		101-77-9
3,3'-Chlorbenzidin		91-94-1
o-Dianisidin	3,3'-Dimethoxybenzidin	119-90-4
o-Tolidin	3,3'-Dimethylbenzidin	119-93-7
4,4'-Methylen-bis-(2-methyl-anilin)	3,3'-Dimethyl-4,4'-diamino-diphenylmethan	838-88-0
2-Methoxy-5-methyl-anilin	p-Kresidin	120-71-8
4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin)		
Bis-(4-aminophenyl)-ether	4,4'-Oxydianilin	101-80-4
4,4'-Diamino-diphenylsulfid	4,4'-Thiodianilin	139-65-1
o-Toluidin		95-53-4
2,4-Diaminotoluol	2,4-Toluylendiamin	95-80-7
2,4,5-Trimethylanilin		137-17-7
o-Anisidin	o-Methoxyanilin	90-04-0
4-Aminoazobenzen		60-09-3
2,4-Xylidin		95-68-1
2,6-Xylidin		87-62-7

**1.5 Exposition des Verbrauchers gegenüber Azofarbstoffen**

Azofarbstoffe finden u.a. Verwendung in Textilien, Leder und Kosmetika - Produkten, die unmittelbar mit der menschlichen Haut in Berührung kommen. Bei Verwendung in Kosmetika sind die Farbstoffe nicht an eine feste Matrix gebunden und wirken unmittelbar auf die menschliche Haut ein. Textilien und Lederwaren, die nach dem Stand der Technik gefärbt wurden, weisen nur eine geringfügige Abgabe von Farbstoff an die Umgebung („Bluten“) auf. Allerdings befindet sich auf dem Markt auch eine Anzahl von Produkten, die

nicht nach dem Stand der Technik gefärbt wurden und die bei Durchfeuchtung, z.B. durch Einwirkung von Schweiß oder Regenwasser, Farbstoffe, z.T. bis zur deutlichen Färbung der in Kontakt befindlichen Hautpartien freisetzen. Ein Grund dafür besteht in der gezielt angewandten Technik des „Überfärbens“, d.h. Leder oder Textilien werden mit einer größeren Menge Farbstoff behandelt, als diese dauerhaft zu binden vermögen, um vorübergehend einen intensiveren Farbeindruck und damit z.B. Wettbewerbsvorteile zu erzielen.

## **1.6 Rechtliche Situation**

Sowohl der deutsche Gesetzgeber als auch die Europäische Union haben auf das potentielle Gesundheitsrisiko bestimmter Azofarbstoffe reagiert. Die Verwendung von Azofarbstoffen, die bei reduktiver Spaltung eines der unter Nr. 1 bis 20 in Tab. 1 genannten Amine freisetzen können, dürfen nicht zur Färbung von Leder oder Textilien, die nicht nur vorübergehend mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen, verwendet werden. Entsprechende Gegenstände, die mit einem dieser Azofarbstoffe behandelt wurden, dürfen nicht in die EU eingeführt oder hier vermarktet werden.

Innerhalb dieser grundsätzlich sehr verbraucherfreundlichen Gesetzgebung existieren jedoch zwei entscheidende Lücken: zum einen erlaubt die Kosmetik-Verordnung<sup>7</sup> ausdrücklich die Verwendung von vier Azofarbstoffen, aufgeführt unter Nummer 1 bis 4 von Tab. 3 (siehe Ziffer 3.2), obwohl deren Spaltprodukte ebenfalls als potentiell krebserregend eingestuft wurden<sup>5, 6</sup>.

Zum anderen ist für Arbeits- und Dienstbekleidung das sog. „erneute Inverkehrbringen“ zulässig, d.h. Bekleidungsgegenstände, die sich einmal im Bestand eines Arbeits- oder Dienstgebers befinden oder von Mitarbeitern an diesen zurückgegeben werden, dürfen erneut an Mitarbeiter für Arbeit bzw. Dienst ausgegeben werden<sup>5</sup>. Diese Regelung betrifft nicht nur Polizei und Bundeswehr, sondern auch private Wirtschaftsunternehmen, in deren Beständen sich evtl. noch beachtliche Mengen an Bekleidung befinden, die vor 1998 erworben wurde und die möglicherweise mit den entsprechenden Azofarbstoffen behandelt wurde.

Außerdem werden aus wirtschaftlichen Gründen jährlich große Mengen an Textilien und Lederwaren aus Nicht-EU-Staaten importiert, in denen das Verwendungsverbot für die genannten Azofarbstoffe nicht gilt. Da die Kontrollen der Aufsichtsbehörden jeweils nur stichprobenartigen Charakter haben können, ist davon auszugehen, dass Bedarfsgegenstände, behandelt mit den in der EU verbotenen Farbstoffen weiter auf den Markt gelangen.

Somit ergibt sich für die staatlichen Verbraucherschutz-Institutionen die Notwendigkeit, der Problematik der Azofarbstoffe weiterhin Aufmerksamkeit zu widmen. Die folgende Arbeit geht mit der Frage nach der mikrobiellen Spaltung von Azofarbstoffen auf einen Aspekt ein, der zur Abschätzung des tatsächlichen Gesundheitsrisikos dieser Farbstoffe von signifikanter Bedeutung ist.

## **1.7 Möglichkeit der mikrobiellen Spaltung und Bedeutung für das von bestimmten Azofarbstoffen ausgehende Gesundheitsrisiko**

Die meisten Azofarbstoffe werden durch die gesunde menschliche Oberhaut nicht oder nur geringfügig resorbiert<sup>8, 9, 10</sup>. Ursache dafür sind vergleichsweise hohe Molekulargewichte, ein in wässriger Lösung häufig geladener und damit stark polarer Zustand und die ausgeprägte Affinität zu organischen Materialien. Azofarbstoffe werden in den verhornten Hautschichten des Stratum corneum gebunden, im Zuge der kontinuierlichen Abschilferung der verhornten Zellen werden die Farbstoffe schließlich von der Hautoberfläche des menschlichen Organismus entfernt, ohne dass sie auf lebende Zellen Einfluss nehmen konnten. Diese im Sinne des Gesundheitsschutzes optimistische Annahme gilt aber nur dann, wenn der Farbstoff nicht reaktiv zum Amin gespalten wird. Im Gegensatz zu den meisten Azofarbstoffen ist für primäre aromatische Amine die rasche Penetration durch die menschliche Haut belegt<sup>11, 12, 13, 14</sup>.

Somit stellt sich die Frage, ob auf der menschlichen Haut eine reduktive Spaltung von Azofarbstoffen zu primären aromatischen Aminen stattfinden kann. Die Bedingungen, wie sie zur vollständigen Spaltung der Farbstoffe mit dem Ziel des Nachweises ihrer Spaltprodukte angewandt werden, etwa eine Temperatur von 70 °C und ein Überschuss an Reduktionsmittel, z.B. Natriumdithionit, haben mit den Bedingungen auf der menschlichen Haut nichts gemeinsam.

### **1.7.1 Spaltung von Azofarbstoffen durch Azoreduktasen**

Gut dokumentiert ist, dass Azofarbstoffe auch unter physiologischen Bedingungen auf enzymatischem Weg gespalten werden können. Martin und Kennely<sup>15</sup> beschrieben 1985 die Spaltung von Azofarbstoffen durch anaerobe Bakterien der menschlichen Darmflora. Ghosh et al.<sup>16</sup> untersuchten 1989 die Spaltung mehrerer Azofarbstoffe durch zellfreie Extrakte des Darmbakteriums *Shigella dysenteriae*. Dabei wurde gezeigt, dass NADH und NADPH als reduzierende Coenzyme bei der Spaltung von Azofarbstoffen fungieren können. Das für die Azospaltung verantwortliche Enzym erwies sich als induzierbar, d.h. die Enzymaktivität in

den Extrakten war deutlich erhöht, wenn die Zellen, aus denen der Extrakt gewonnen wurde zuvor in Gegenwart eines Azofarbstoffs kultiviert worden waren.

Sugiura et al.<sup>17</sup> verwendeten für ihre Arbeiten 3 Bakterienstämme, die aus Boden- bzw. Abwasserproben isoliert worden waren: einen fakultativ anaeroben *Bacillus* sowie als aerobe Stämme einen *Xanthomonas* und einen *Pseudomonas*. Auch diese Untersuchungen bestätigten die Rolle der reduzierenden Coenzyme NADH und NADPH für den Verlauf der Azospaltung.

Auch eukaryontische Zellen, z.B. Hepatozyten der menschlichen Leber, sind zu reduktiver Spaltung von Azofarbstoffen in der Lage<sup>18</sup>.

Dagegen war über eine mögliche Azospaltung durch Bakterien der physiologischen Hautflora lange Zeit nur wenig bekannt. Zwar wurde bereits 1986 von Aldrich<sup>19</sup> die reduktive Spaltung von Azofarbstoffen durch Hautbakterien als mögliche Ursache für die Resorption <sup>14</sup>C-markierter Azofarbstoffe durch die Haut von Ratten angegeben. Collier et.al.<sup>20</sup> zeigten 1993, dass eine Spaltung von Azofarbstoffen während der Resorption durch die Haut warmblütiger Arten auftrat und zeigten, dass auch Enzyme in den eukaryontischen Zellen der Haut zur Azospaltung in der Lage waren. Allerdings waren bei diesen Versuchen die Farbstoffe in Aceton gelöst, wodurch das Stratum corneum vermutlich erst permeabel für die Azofarbstoffe wurde.

Eine azospaltende Aktivität von Hautbakterien wurde erst 1999 durch Platzek und Lang nachgewiesen<sup>21</sup>. Diese Ergebnisse bilden die wesentliche Grundlage für Materialien, Methoden und Zielstellungen der hier vorliegenden Arbeit.

## **1.8 Überblick über die Vorarbeiten und die darin dokumentierten Ergebnisse**

Im Zusammenhang mit den oben zitierten Arbeiten wurden an der Technischen Universität Berlin zahlreiche Bakterienstämme von der Haut gesunder Probanden isoliert und identifiziert. Es wurde ein standardisiertes Verfahren zur Anzucht und Vermehrung der Bakterien entwickelt. Wesentliche Schritte dieses Verfahrens sind die Anzucht in Vorkultur, Vermehrung in Hauptkultur, Ernte der Zellen durch Zentrifugation und deren erneutes Suspendieren in künstlicher Schweiß-Prüflösung. Die so aufbereiteten Zellsuspensionen wurden 24 Stunden mit dem Farbstoff Direkt Blau 14 inkubiert, die Ansätze wurden mittels Flüssigkeits-Extraktion aufgearbeitet und das Spaltprodukt o-Tolidin nachgewiesen und quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Bakterienstämme der physiologischen Hautflora den genannten Farbstoff abbauen und als Spaltprodukt das kanzerogene o-Tolidin freisetzen konnten. Hinsichtlich der Menge des freigesetzten Amins gab es jedoch beträchtliche Unterschiede.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Azospaltung induzierbar war, d.h. fand die Vorkultur bereits in Anwesenheit des Farbstoffs statt, so zeigten die Bakterien bei späteren Inkubationen eine erhöhte azospaltende Aktivität. Induzierbarkeit stellt bereits einen sehr deutlichen Hinweis dar, dass es sich bei der Reaktion um eine enzymatische Umsetzung handelt.

Ein gewisser Anteil des freigesetzten Amins unterlag einer weiteren Metabolisierung, z.B. durch Desaminierung und Einführung von Hydroxy-Gruppen. Entsprechende Spaltprodukte wurden nachgewiesen und massenspektroskopisch identifiziert.

Außerdem wurden Ansätze mit erhöhter Keimzahl aufbereitet und inkubiert, dabei führte eine Verdopplung der Keimzahl zu einer Verachtfachung der Freisetzung an o-Tolidin. Die Ursache für dieses extrem nichtlineare Verhalten blieb zunächst ungeklärt.