

## Forschung

### Freisetzung aromatischer Amine aus Azofarbstoffen in Textilien durch Hautbakterien

T. Platzek (BgVV) und Chr. Lang (Institut für Mikrobiologie und Genetik, TU Berlin)

#### Einleitung

Azofarbstoffe sind die wichtigsten Farbstoffe zum Färben von Bekleidungstextilien. Etwa 2/3 der heute verwendeten Textilfarbstoffe gehören zur Substanzklasse der Azofarbstoffe<sup>1</sup>. Azofarbstoffe sind charakterisiert durch die Azogruppe R - N = N - R. Sie werden durch Kupplung einfach oder mehrfach diazotierter Arylamine hergestellt und können unter reduktiven Bedingungen zu aromatischen Aminen abgebaut werden. Auch im Stoffwechsel können sie zu den entsprechenden aromatischen Aminen gespalten werden<sup>2,3,4,5,6,7</sup>. Bei einigen dieser Farbstoffe entstehen bei der Spaltung krebserzeugende Amine. Neben den löslichen Farbstoffen gibt es schwer lösliche Azopigmente, die unter bestimmten Bedingungen ebenfalls in krebserzeugende Amine gespalten werden können.

Die bei der Spaltung von Azofarbstoffen und Azopigmenten entstehenden aromatischen Amine sind in der Regel erheblich besser in der Lage, durch die Haut zu penetrieren. Deshalb ist für die gesundheitliche Beurteilung solcher Stoffe die Frage einer möglichen Spaltung auf der menschlichen Haut von großer Bedeutung<sup>8</sup>.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß wasserlösliche Direktfarbstoffe, besonders gründlich wurde Direktblau 14 (**DB 14**) untersucht, von typischen Hautbakterien reduktiv gespalten werden. Es war außerdem festgestellt worden, daß es sich bei der Spaltfähigkeit gegenüber **DB 14** nicht um eine singuläre Eigenschaft eines bestimmten Stammes handelt, sondern daß mehrere Hautbakterien-Isolate dieses Potential besitzen<sup>9,10</sup>. In diesem Jahr war nun zu untersuchen, inwieweit lipophile Farbstoffe ebenfalls von diesen typischen Hautbakterien spaltbar sind und inwieweit auch gefärbte Textilien von den Bakterien als Substrat für die Azospaltung verwendet werden. Als Modellschubstanz wurde der Azofarbstoff Dispersionsorange 3 (**DO 3**) in die Experimente eingeführt. Bei diesem Farbstoff wird ein sensibilisierendes Potential angenommen<sup>11,12,13</sup>.

#### Methodik

Cellitonechtorange GR (Disperse Orange 3, Solvent Orange 9, C.I.-Nr. 11005, CAS-Nr. 730-40-5, ca. 95 % Farbstoffgehalt,  $\lambda$ -max: 443 nm) wurde von der Fa. Aldrich (36,479-7) bezogen. Die erwarteten Spaltprodukte 4-Nitroanilin (**4-NA**, p-Nitranilin, CAS-Nr. 100-01-6, Fa. Merck: p.A. (822292), ca. 98 %, M=138,12 g/mol;  $\lambda$ -max: 380 nm) und p-Phenylendiamin (**PPD**, p-Phenylendiamin Dihydrochlorid, 1,4-Diaminobenzol Dihydrochlorid, CAS-Nr. 624-18-0, Fa. Aldrich (13,769-3), ca. 99 %, M=181,07 g/mol,  $\lambda$ -max: 194 und 210 nm) wurden ebenfalls kommerziell erworben.

Die chemisch-reduktive Spaltung wurde nach der Methode § 35 LMBG 82.02-2 (1998) durchgeführt (Untersuchung von Bedarfsgegenständen. Nachweis der Verwendung bestimmter Azofarbstoffe aus textilen Bedarfsgegenständen). **DO 3** wurde in citratgepufferter

wässriger Lösung (pH 6) bei 70 °C in einem geschlossenen Gefäß mit Natriumdithionit umgesetzt. Die Details der Bakterienkultivierung sowie der Analytik wurden bereits publiziert <sup>10</sup>.

### Inkubation im Schweißsimulans

Der Ansatz wurde im 37 °C Schüttelwasserbad (f=40) für einen Zeitraum von 4 bis 24 h inkubiert. Die Reaktion wird im Eisbad gestoppt, die Proben werden bis zur Aufarbeitung im Eis gehalten bzw. bei -20°C gelagert.

### Verwendete Bakterienstämme

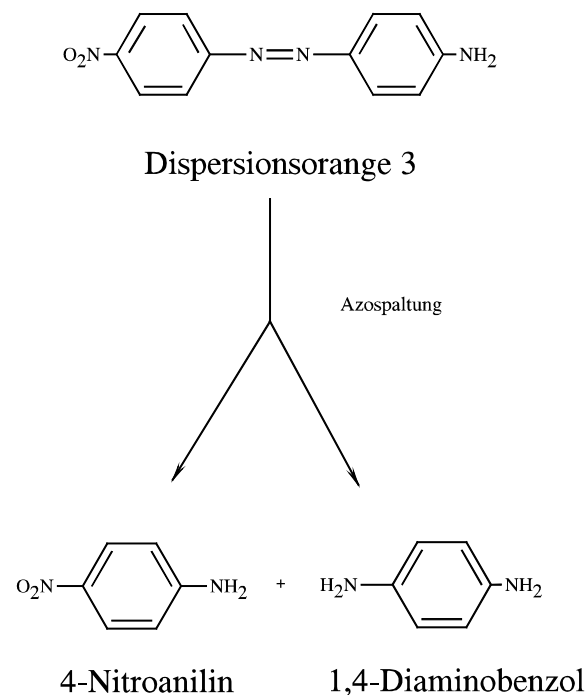
Für die Versuche wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

*Staphylococcus aureus* TU 5-3, *Staphylococcus aureus* St-0411, *Staphylococcus aureus* St-0201, *Staphylococcus epidermidis* DSM 22044, *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798, *Micrococcus luteus* Mi-0301, *Micrococcus luteus* Mi-0503, *Micrococcus luteus* Mi-0702 (Stammnummern des Instituts für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, TU Berlin).

## Ergebnisse

### 1. Chemische Spaltung von DO 3

In Vorversuchen wurde **DO 3** mit Natriumdithionit chemisch-reduktiv gespalten. Dabei wurden die erwarteten Spaltprodukte **PPD** und **4-NA** HPLC-analytisch nachgewiesen (siehe Formelschema).



**Abbildung 1:** Azospaltung von Dispersionsorange 3

### 2. Experimente mit Bakterien

Bei Experimenten zur perkutanen Absorption von Phenylendiaminen bei Hunden war festgestellt worden, daß ein erheblicher Teil des **PPD** während des Experiments oxidiert wird <sup>16</sup>. Wegen dieser Empfindlichkeit gegenüber oxydierenden Agenzien wurde zunächst die Stabi-

lilität der beiden erwarteten Spaltprodukte **PPD** und **4-NA** unter den üblichen Inkubationsbedingungen untersucht (24 h, 28 °C, pH 6,8, Stamm *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798).

Die Wiederfindungsrate von **PPD** nach 24 h im Ansatz mit Bakterien beträgt 5.4 %. Deshalb ist **PPD** für eine Quantifizierung der Spaltungsreaktion nicht geeignet. **4-NA** ist etwas stabiler, die Wiederfindungsrate beträgt unter den selben Bedingungen 36 %. Damit erschienen uns diese Versuchsbedingungen auch nur bedingt geeignet für eine quantitative Analyse der Azospaltung durch die Bakterien. Aus diesem Grund wurden nun zum einen Untersuchungen in einem Zweiphasensystem, zum anderen Experimente mit einer verkürzten Inkubationszeit durchgeführt. In dem Zweiphasensystem (organisches Lösemittel / Schweißlösung) sollte das entstehende Produkt in eine für die Bakterien nicht zugängliche (organische) Phase überführt werden, wovon eine größere Stabilität des Produkts erwartet wurde. Das System führte jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg. Als alternativer Ansatz wurde die Inkubationszeit mit den Bakterien von 24 h auf wenige Stunden reduziert. Unter diesen Bedingungen wurden folgende Wiederfindungsraten gemessen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Wiederfindung der untersuchten aromatischen Amine nach Inkubation in Bakterien-haltiger Schweißlösung

Substanz	Wiederfindungsrate (in %)				
	Zeit	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>PPD</b>		58	51	67	44
<b>4-NA</b>		67	67	66	63

Aus diesen Daten ist ersichtlich, daß das Produkt **4-NA** über den gemessenen Zeitraum in einer konstanten Rate wiedergefunden wird. Somit ist die Stabilität des Produkts über einige Stunden als ausreichend zu betrachten. Im Gegensatz dazu wird von PPD schon nach 2 Stunden deutlich weniger wiedergefunden. In den weiteren Experimenten wurde deshalb auf eine quantitative Auswertung der Bildungsrate von **PPD** verzichtet und die quantitative Analyse der Azospaltung auf das **4-NA** bezogen. In Folgeexperimenten mit 4-stündiger Inkubationszeit wurde wiederholt eine Wiederfindungsrate von 60 - 90 % für 4-NA gefunden, so daß wir diese Zeit als vernünftigen Untersuchungszeitraum angesehen haben und in den meisten Folgeexperimenten benutzt haben.

### 3. Kinetik der DO 3-Spaltung mit Stämmen der Art *Staphylococcus epidermidis*

Für die Untersuchungen der Kinetik der Umsetzung wurden die Stämme *Staphylococcus epidermidis* DSM 22044 und DSM 1798 eingesetzt, die sich in den Voruntersuchungen als geeignet erwiesen hatten und die in vivo einen großen Anteil der Hautflora ausmachen. Die Beobachtungen wurden über den Zeitraum 1 bis 6 Stunden durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

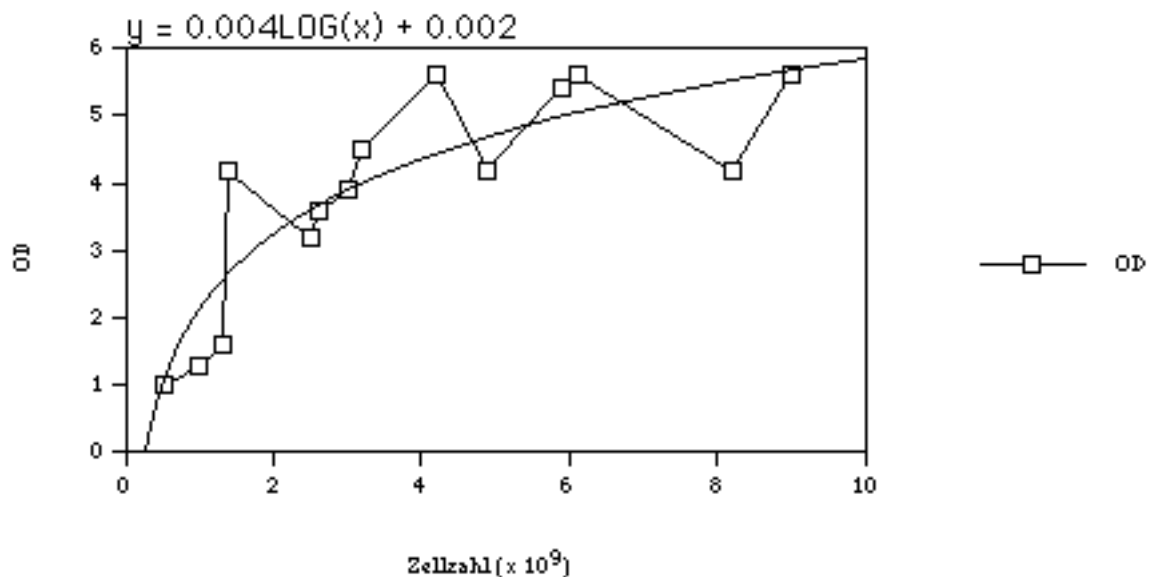
**Tabelle 2:** Umsetzung von **DO 3** durch *St. epidermidis* DSM 22044 in jeweils 1 h

In 1 h gebildetes 4-Nitroanilin (µg)	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
<b>Stunde 0 - 1</b>	19	37	11	13
<b>Stunde 1 - 2</b>	21	18	6	43
<b>Stunde 2 - 3</b>	27	48	33	46
<b>Stunde 3 - 4</b>	-	-	69	74
<b>Stunde 4 - 5</b>	27	31	47	38

#### 4. Abhängigkeit der Aminbildungsrate von der Anzuchtdichte der Bakterienkultur

Die Bakterienstämme, die in allen Versuchen nach der Standardmethode angezogen worden waren (ST I-Medium, Vorkultur für 3 Tage, Hauptkultur für 2 Tage) zeigten eine Schwankung der Anzuchtdichte zwischen 1 bis  $9 \times 10^9$  Zellen pro ml. Um vergleichende Aussagen zu den Versuchen machen zu können, werden üblicherweise die Umsatzraten rechnerisch auf eine konstante Zellzahl bezogen (hier:  $1 \times 10^9$  Zellen).

Es wurde nun untersucht, ob es möglich ist, die Zellzahl in den Versuchsansätzen über die on-line Vermessung der optischen Dichte (OD) der Kultur bei 610 nm zu standardisieren. Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen der OD der Kultur und der nachträglich bestimmten Zellzahl der selben Kultur (Stamm DSM 22044).



**Abbildung 2:** Korrelation zwischen der optischen Dichte bei 610 nm und der ausgezählten Zellzahl

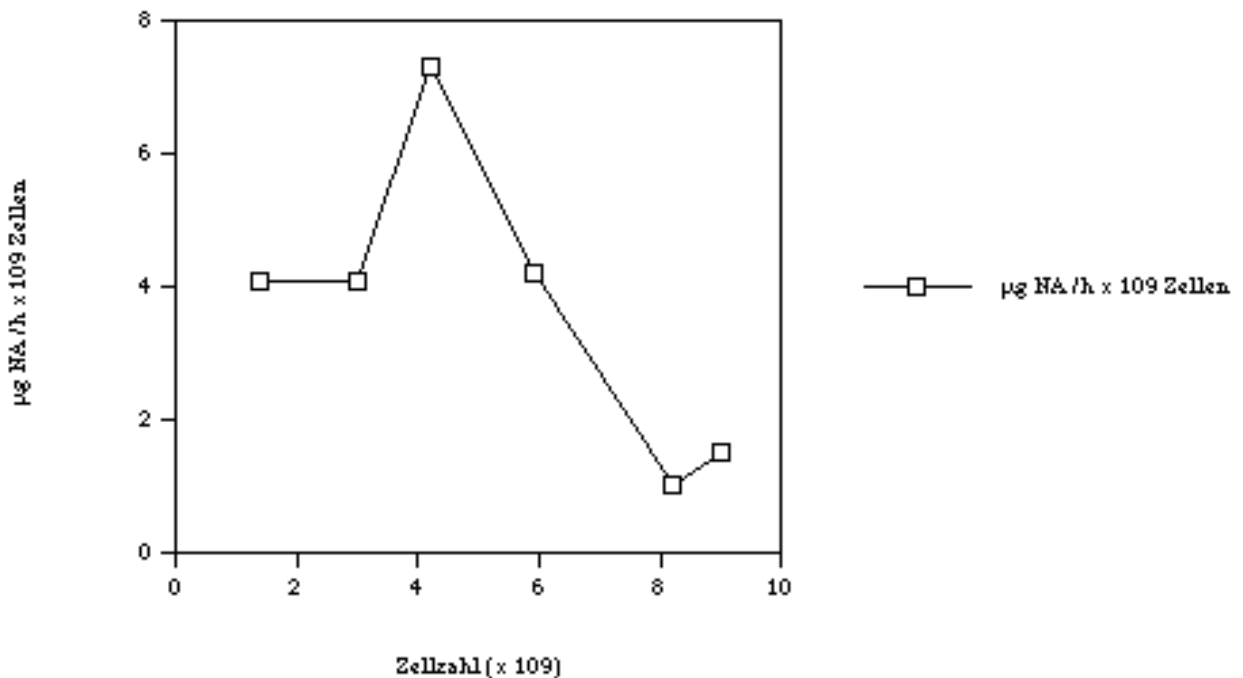
Die Korrelation entspricht am ehesten einer logarithmischen Funktion und die optische Dichte kann möglicherweise an Hand der angegebenen Formel in die Zellzahl umgerechnet werden. Da Bakterienkulturen verschiedener Dichten in den Versuchen eingesetzt worden waren, ergab sich die Frage, ob diese Unterschiede sich auch in einer unterschiedlichen Aminbildungsrate widerspiegeln. In Tabelle 3 sind die Daten verschiedener Versuche zusammengefaßt.

**Tabelle 3:** Korrelation zwischen Aminbildungsrate und Zellzahl der Kultur

Versuch	Stamm	Zellzahl $\times 10^9$	4-NA ( $\mu\text{g} / \text{h}$ )	4-NA ( $\mu\text{g} /$ $\text{h} \times 10^9$ )
Tex2	22044	1,4	5,8	4,1
1a	22044	3,0	12,4	4,1
1b	22044	4,2	30,8	7,3
4	22044	5,9	24,5	4,2
1	22044	8,2	8,0	0,98
6	22044	9,0	13,7	1,5

6	1798	1,4	12,7	9,0
1	1798	20	15,3	0,77

Abbildung 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten für Stamm 22044. Hier wird deutlich, daß es offensichtlich eine Korrelation zwischen der Anzuchtdichte und der Umsetzungsaktivität der Bakterien gibt: bei sehr hohen Anzuchtdichten zeigen die Zellen eine deutlich geringere Spaltungaktivität.



**Abbildung 3:** Korrelation zwischen der Zelldichte und der Bildungsrate von **4-NA**

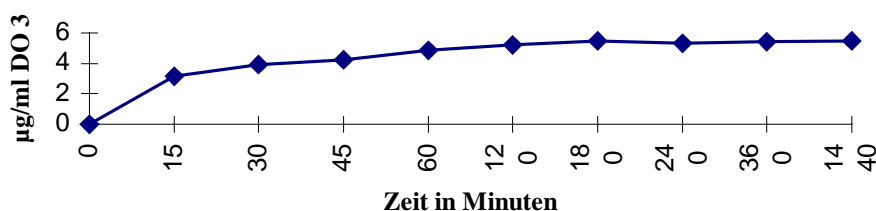
### 5. Migration des Farbstoffs aus gefärbten Textilien

Vom Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen (DWI) wurden uns folgende definiert gefärbte Textilien zur Verfügung gestellt:

Färbungen von Polyamidgewebe (PA), Polyestergewebe (PES) und Acetatgewebe mit Cibacet Orange 2R-01 200 % mit jeweils 0,5 % und 2 % **DO 3**. Anhang 1 enthält die vom DWI zur Verfügung gestellten textilchemischen Spezifikationen.

Die Ablösung des Farbstoffes vom Trägermaterial ist nach kurzer Zeit fast vollständig erfolgt, wie in Abbildung 4 am Beispiel von mit 2 % **DO 3** gefärbtem Polyamid gezeigt ist. Man kann somit davon ausgehen, daß die Bakterien praktisch die gesamte Inkubationszeit (von 4 h) zur Umsetzung nutzen können.

9 cm<sup>2</sup> 2 % DO 3 gefärbter Polyamidträger und seine DO 3 Abgabe in Schweißlösung über 24 h colorimetrisch bestimmt



**Abbildung 4:** Zeitlicher Verlauf der Abgabe von DO 3 aus Polyamid 2 % in Schweißlösung (colorimetrisch).

## 6. Umsetzung der gefärbten Textilien mit Bakterien

Bei diesem Versuchsteil wurde der Stamm DSM 22044 verwendet. Jeweils 9 cm<sup>2</sup> gefärbtes Textil wurden für 4 h unter den üblichen Bedingungen in Schweißlösung inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Das Material Polyester fällt für einen Vergleich der beiden Versuche aus, da keine meßbare Aminbildung erfolgte. Die Migrationsrate des Farbstoffs ist bei diesem Material auch vergleichsweise gering (jeweils 0,7 % bei 0,5 % und 2 % Färbung).

**Tabelle 4:** Vergleich der Migration von **DO 3** und der Bildung von **4-NA** aus gefärbten Textilien, Angaben sind Mittelwerte aus je 3 Versuchen

Gefärbtes Textil (% DO 3)	4-NA (Bildung in µg)	DO 3 (Migration in µg)
0,5 % Polyamid	2,1	1,32
2 % Polyamid	6,3	5,35
0,5 % Acetat	0,9	1,52
2 % Acetat	2,5	1,96

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß auch bei gefärbten Textilien eine Spaltung des Farbstoffs erfolgen kann. Hier spielt wahrscheinlich die Migration (Auswaschbarkeit, Ausbluten) des Farbstoffs eine wesentliche Rolle für die Umsetzung.

Im Standardansatz wurden 1,8 mg **DO 3** im Bakterienassay mit *S. epidermidis* 22044 inkubiert; theoretisch müßten bei 100%igem Umsatz 1,1 mg 4-Nitroanilin entstehen. Eine Betrachtung auf molarer Ebene ergibt, daß zwischen 9 und 13 % der ausgewaschenen Farbstoffmenge von den Bakterien umgesetzt wurden:

Bei einem 2 % gefärbten Polyamidstoff von 9 cm<sup>2</sup>, 0,1 g schwer, wurde colorimetrisch nach 4 h eine Auswaschung (Migration) von 107 µg **DO 3** ermittelt, das sind 5,4 % des Farbstoffs. Theoretisch würden bei einer 100%igen Spaltung 61 µg **4-NA** daraus entstehen, wir finden nach einer 4-stündigen Inkubation im Bakterienassay im Mittelwert 6,6 µg **4-NA**, das sind ca. 11 %.

Bei einem 0,5 % gefärbten Polyamidstoff von 9 cm<sup>2</sup>, 0,1 g schwer, wurde colorimetrisch nach 4 h eine Auswaschung (Migration) von 27 µg **DO 3** ermittelt, das sind 5,4 % des Farbstoffs. Theoretisch würden bei einer 100%igen Spaltung 15 µg 4-Nitroanilin daraus entste-

hen, wir finden nach einer 4-stündigen Inkubation im Bakterienassay im Mittelwert 1,9 µg wieder, das sind ca. 13 %.

Bei einem 2 % gefärbten Acetatstoff von 9 cm<sup>2</sup>, 0,15 g schwer, wurde colorimetrisch nach 4 h eine Auswaschung (Migration) von 39 µg **DO 3** ermittelt, das sind 1,3 % des Farbstoffs. Theoretisch würden bei einer 100%igen Spaltung 22 µg 4-NA daraus entstehen, wir finden nach einer 4-stündigen Inkubation im Bakterienassay im Mittelwert 3,5 µg wieder, das sind ca. 9 %.

Bei einem mit 0,5 % gefärbten Acetatstoff von 9 cm<sup>2</sup>, 0,15 g schwer, wurde colorimetrisch nach 4 h eine Auswaschung (Migration) von 27 µg **DO 3** ermittelt, das sind 3,6 % des Farbstoffs. Theoretisch würden bei einer 100%igen Spaltung 15 µg 4-NA daraus entstehen, wir finden nach einer 4-stündigen Inkubation im Bakterienassay im Mittelwert 1 µg wieder, das sind ca. 6 %.

Die toxikologische Relevanz dieser Ergebnisse ist zur Zeit noch nicht abschließend einzuschätzen. Es muß jedoch erwähnt werden, daß die ermittelten Migrationsraten des Farbstoffs ungewöhnlich hoch sind. Die Farbechtheit von **DO 3** auf Polyamid und Acetat ist sehr(!) schlecht, das läßt sich dem in der Anlage beigefügten Protokoll des DWI über die Echtheiten entnehmen.

### **Ausblick und weitere Planung**

In den durchgeführten Versuchen konnten wir zeigen, daß die Azospaltung des lipophilen Farbstoffs **DO 3** mit recht guter Effizienz von verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt wird. Speziell untersucht, da physiologisch relevant, wurde das Hautbakterium *Staphylococcus epidermidis*. Durch Verkürzung der Inkubationszeit von 24 h auf 4 h konnten die zunächst vorhandenen Probleme mit der quantitativen Bestimmung, die auf der Instabilität der Reaktionsprodukte beruhen, teilweise gelöst werden.

Die Umsetzungsrate ist auch abhängig von der Inkubationszeit, und die stündliche Umsetzungsrate ist bei einer Inkubation von 3-4 h am höchsten. Weiterhin sinkt die Umsetzungsaktivität der Zellen, wenn die Hauptkultur zum Zeitpunkt der Ernte eine zu große Zelldichte erreicht hat.

Bei der Untersuchung von gefärbten Textilien konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch hier eine Umsetzung des Farbstoffs zum aromatischen Amin **4-NA** stattfindet. In Parallelexperimenten wurde die Freisetzung der Farbstoffe untersucht. Die Bakterien haben unter unseren Versuchsbedingungen etwa einen Anteil von 10 % des Farbstoffs gespalten, der in parallelen Experimenten migriert war.

Auf der Grundlage der nun vorliegenden Ergebnisse ist es möglich, mit Hilfe der charakterisierten Bakterienstämme weitere Farbstoffe mit der etablierten Standardmethodik zum einen auf ihre Spaltbarkeit zu testen, zum andern können physiologische Bakterienmischungen eingesetzt werden sowie auch Isolate von Probanden untersucht werden.

## Literatur

**Enquete-Kommission "Schutz des Menschen und der Umwelt"** des 12. Deutschen Bundestages (Hrsg.) Die Industriegesellschaft gestalten - Perspektiven für einen nachhaltigen Umgang mit Stoff- und Materialströmen. Economica Verlag GmbH, Bonn (1994).

**Chung, K. T.**, The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* **114**, 269-281 (1983).

**Chung, K. T., C. E. Cerniglia**, Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **277**, 201-220 (1992).

**Bos, R. P., J. P. Koopman, J. L. G. Theuws, H. M. Kennis u. P.T. Henderson**, Appearance and reappearance of mutagens in urine from rats after oral administration of direct brown 95, due to coprophagy. *Toxicology* **39**, 85-92 (1986).

**Lynn, R. K., D. W. Donielson, A. M. Ilias, J. M. Kennish, K. Wong u. K. W. Matthews**, Metabolism of bisazobiphenyl dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethylbenzidine or 3,3'-dimethoxybenzidine to carcinogenic aromatic amines in the dog and rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 248-258 (1980).

**Bartsch, H.**, Metabolic Activation of Aromatic Amines and Azo Dyes. *IARC Sci. Publ.* **40**, 13-13 (1981).

**Levine, W. G.**, Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug. Metab. Rev.* **23**, 253-309 (1991).

**Specht, K., T. Platzek**, Mittel zum Färben und Ausrüsten von Textilien - Anmerkungen zu gesundheitlichen und analytischen Aspekten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **91**, 352-359 (1995).

**Platzek, T., U.-S. Gi, C. Lang, W. Baltes**, Azo dyes are split into aromatic amines by human skin bacteria in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol (Suppl.)* **356**, R62 (1997).

**Platzek, T., C. Lang, G. Grohmann, U.-S. Gi u. W. Baltes**, Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Human Experimental Toxicology* **18**, 552-559 (1999).

**Hatch, K. L., H.I. Maibach**, Textile dye dermatitis. *J. Amer. Acad. Dermatol.* **32**, 631-639 (1995).

**Platzek, T.**, Wie groß ist die gesundheitliche Gefährdung durch Textilien wirklich? *Melliand Textilberichte* **77**, 774-8 (1996).

**Platzek, T.**, Gesundheitsgefährdung durch Bekleidungstextilien. *Bundesgesundheitsblatt* **40**, 238-40 (1997).

**Kiese, M., M. Racher, E. Rauscher**, The absorption of some phenylenediamines through the skin of dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **12**, 495-507 (1968).