

Chimia 49 (1995) 222–225
 © Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
 ISSN 0009–4293

Nachweis kanzerogener Amine, die aus bestimmten Azofarbstoffen freigesetzt werden können

Petra Kralicek*

Abstract. Azoic dyes forming amines of MAK class (maximum working concentration) III A1 and A2 (Germany) under reductive conditions will be prohibited, according to the revised German ordinance on consumer goods 'Deutsche Bedarfsgegenstände-verordnung', from the summer 1995 on. Also textiles with such dyes will fall under the prohibition. The testing of textiles for the presence of such amines is, though, rather problematic, as material specific uncertainties may occur.

We present a new, respectively, improved detection method allowing to combine a conventional thin layer chromatography, with subsequent color detection and HPTLC, by means of an AMD (automatic multiple development) apparatus (made by CAMAG) and a scanner assessment.

Schon 1927 wurde der Zusammenhang zwischen Benzidin und Blasen-tumoren bei Arbeitern von *Oppenheimer* erkannt [3]. Die Azo-Farbstoffe selbst gerieten jedoch erst später in Verdacht, da zuerst die Spaltbarkeit der Azo-Gruppe in biologischen Systemen nicht erkannt wurde. Erst durch den Nachweis der Spaltbarkeit von Azo-Gruppen in biologischen Systemen wird auch die Wahrscheinlichkeit einer Einwirkung von kanzerogenen Arylaminen auf den Organismus realistischer [4].

Benzidin und Nachfolgeprodukte wie z.B. 3,3'-Dichlorbenzidin, 3,3'-Dimethylbenzidin und 3,3'-Dimethoxybenzidin wurden schliesslich schrittweise in die MAK-Liste (maximale Arbeitsplatzkonzentration) aufgenommen.

Eindeutig krebserregende Amine wurden in die MAK-Liste III A1 (Deutschland) eingestuft, und Amine, bei denen ein begründeter Verdacht auf ein krebserregendes Potential besteht, unter MAK III A2. Die sehr aktive Diskussion über Gesundheitsgefahren durch das Tragen von

1. Einleitung

Farben setzen Signale, sie unterstreichen die Persönlichkeit des Trägers. Bestimmte Farben waren über Jahrhunderte hinweg – u.a. aufgrund ihres Preises – nur einer kleinen Gruppe von Menschen vorbehalten. Neben sozialen Veränderungen war auch der zu Beginn des 19. Jahrhunderts durch *Jassmügger* (1818) erfundene Teerfarbstoff dafür verantwortlich, dass farbenfrohe Kleider erschwinglich wurden. Die folgenden Jahrzehnte waren gezeichnet durch eine stürmische Entwicklung im Bereich der Farbstoffe [1]. Doch dieser Vorteil für den 'kleinen Mann' barg auch eine Schattenseite, denn so manche Farbstoffe 'der ersten Generation' weisen ein hohes krebserregendes Potential auf. Insbesondere Arbeiter der farbverarbeitenden Industrie waren und sind u.U. noch davon betroffen [2].

Tab. 1. Die in der deutschen Bedarfsgegenständeverordnung unter Anlage 1 aufgeführten Amine

Name	CAS-Nr.
4-Aminodiphenyl	92-67-1
Benzidin	92-87-5
4-Chlor- <i>o</i> -toluidin	95-69-2
2-Naphthylamin	91-59-8
<i>o</i> -Aminoazotoluol	97-56-3
2-Amino-4-nitrotoluol	99-55-8
<i>p</i> -Chloranilin	106-47-8
2,4-Diaminoanisol	615-05-4
4,4'-Diaminodiphenylmethan	101-77-9
3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1
3,3'-Dimethoxybenzidin (<i>o</i> -Dianisidin)	119-90-4
3,3'-Dimethylbenzidin (<i>o</i> -Tolidin)	119-93-7
3,3'-Dimethyl- 4,4'-diaminodiphenylmethan	838-88-0
<i>p</i> -Kresidin	120-71-8
4,4'-Methylen-bis(2-chloranilin)	101-14-4
4,4'-Oxydianilin	101-80-4
4,4'-Thiodianilin	139-65-1
<i>o</i> -Toluidin	95-53-4
2,4-Toluyldiamin	95-80-7
2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7

*Korrespondenz: P. Kralicek
 Eidgenössische Materialprüfungs- und
 Forschungsanstalt
 Unterstrasse 11
 CH-9001 St. Gallen

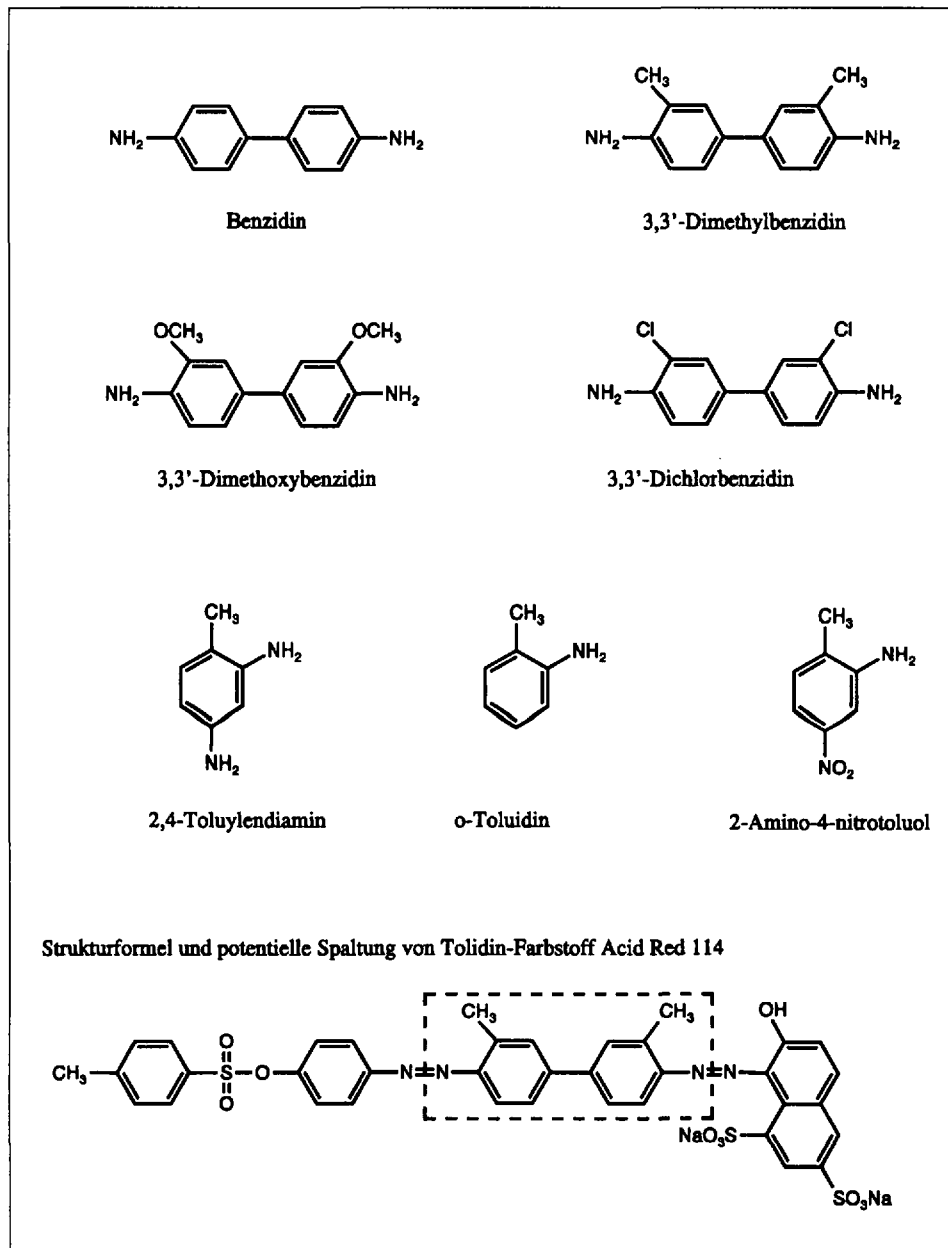


Fig. 1. Strukturformeln ausgewählter Amine sowie Strukturformel und potentielle Spaltung von Tolidin-Farbstoff Acid Red 114

Textilien, führte am 15.07.94 in Deutschland zu einer Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung. Demnach dürfen Azo-Farbstoffe, die durch Spaltung mindestens eines der zwanzig dort aufgeführten Amine bilden (Tab. 1) u.a. in Textilien – mit einer einjährigen Übergangsfrist – nicht mehr verarbeitet, bzw. die Fertigprodukte nicht mehr verkauft werden.

Anmerkung: Zu den Farbstoffen gehören Farbstoffe und Farbpigmente. Pigmente sind organische oder anorganische Farbstoffe die im Gegensatz zu Farbstoffen mit der Faser keine Bindung eingehen und nicht wasserlöslich sind. Die Bioverfügbarkeit der Pigmente ist aufgrund ihrer Unlöslichkeit immer noch nicht ausreichend abgeklärt. Deswegen ist nachfolgend immer nur von Farbstoffen die Rede.

In Europa reagierten auch Farbstoffhersteller auf die erwiesenen Gesundheits-

gefahren für Arbeiter. 1971 wurde die Produktion der eindeutig krebserregenden Azo-Farbstoffe von den wichtigsten europäischen Farbstoffherstellern eingestellt. Zudem werden in Deutschland keine Azo-Farbstoffe mehr hergestellt, die durch Spaltung Amine der MAK Klasse III A1 und A2 bilden können [5].

2. Problemstellung

Die Diskussion über das krebserregende Potential und auch die Änderung der deutschen Bedarfsgegenständeverordnung führten teilweise zu Verwirrungen, erstens weil die Umschreibung 'Azo-Farbstoffe', die unter reduktiven Bedingungen zu Aminen der MAK-Klasse III A1 und A2 gespalten werden können' gern auf 'Azo-Farbstoffe' verkürzt wird, und zweitens

weil ein Nachweis der Spaltprodukte nicht ganz unproblematisch ist.

Der Ausdruck 'Azo-Farbstoffe' umfasst eine sehr grosse Farbstoffgruppe – fast 70% aller organischen Farbstoffe sind Azo-Farbstoffe – deren wichtigste farbgebende(n) Molekülstruktur(en) (Chromophore) gleich sind (vgl. [5]). Die namengebenden Chromophore bei Azo-Farbstoffen sind sogenannte Azo-Gruppen, eine chemische Doppelbindung zwischen zwei Stickstoff-Atomen. Ein Gefahrenpotential entsteht, wenn der Farbstoff an dieser Azo-Gruppe in die oben aufgeführte Amine gespalten wird. Somit ist nicht jeder Azo-Farbstoff krebserregend, sondern nur bestimmte Individuen (Fig. 1).

Das zweite Problem ist der Nachweis der Spaltprodukte. Für den Nachweis selbst werden die verschiedensten chromatographischen Verfahren eingesetzt (HPLC, GC

und DC). Aus verschiedenen Gründen wurde für den vorliegenden Nachweis eine Kombination zwischen konventioneller Dünnschicht-Chromatographie mit anschließendem Farbnachweis und der HPTLC-Entwicklung mit Hilfe des AMD-Gerätes der Firma CAMAG (Fig. 2) mit einer Scanner-Auswertung gewählt.

Ein weiteres Problem ist die Nachweisgrenze der Amine, die aus dem Farbstoff eines gefärbten Textils stammen; oder mit anderen Worten: Liegt im Extrakt genug Farbstoff vor, um oben aufgeführte Amine nachweisen zu können? Denn anders als bei einer Benzidin-Bestimmung aus einer Chemikalie oder einem Farbstoff liegt ein gefärbtes Textil vor, bei dem im Normalfall der Farbstoff eine möglichst gute Bindung mit der Faser aufweisen soll. Folgende Probleme mussten also gelöst werden:

- Ideale Entfernung des Farbstoffs von der Faser und eventuell gleichzeitige Reduktion des Farbstoffs,
- Ermittlung des besten Lösungsmittels und der bestmöglichen Extraktion, da die Farbstoffentfernung im wässrigen Medium erfolgt,
- Ermittlung der Einflussfaktoren und eines geeigneten Lösungsmittelgemisches bei der konventionellen DC,
- Ermittlung des Gradienten beim AMD
- sowie die Ermittlung der Wiederfindungsrate.

Hierfür musste zuerst berechnet werden, wieviel Gewichtseinheiten Farbstoff die gefärbte Ware beinhaltet. Um dies ermitteln zu können, mussten verschiedene Unsicherheiten abgeklärt werden, z.B.: Wieviel Farbstoff wurde von der Faser aufgenommen? Diese Frage ist deswegen wichtig, weil nur wenige Farbstofftypen annähernd zu 100% aus der Flotte auf die

Faser ziehen. Oder wieviel Stellmittel enthält ein Gramm des betreffenden Farbstoffs? Zudem bestehen Färbungen immer aus mehreren verschiedenen Farbstoffen. In einer Mischung können jedoch die einzelnen Farbstoffe miteinander konkurrieren und damit gegenseitig die Farbstoffaufnahme beeinflussen.

3. Nachweisprinzip

3.1. Farbstoffextraktion/-reduktion

Das zu analysierende Gewebe wird kleingeschnitten und mit dest. Wasser versetzt im Wasserbad auf 75° (± 5°) erwärmt. Die Farbstoffreduzierung erfolgt schrittweise durch die Zugabe von Natriumdithionit.

Das Gewebebad wird angesäuert und der wässrige Auszug in einen Rundkolben gegeben. Der wässrige Auszug wird mit Natronlauge und Dichlormethan versetzt und extrahiert. Nach der Phasentrennung wird die Dichlormethanphase eingeeengt und eventuell – je nachdem, wann der Extrakt analysiert wird – getrocknet oder direkt analysiert.

3.2. Konventionelle DC-Analyse

Die Extrakte und die Referenzsubstanzen werden mit der TLC-Auftrageinheit (CAMAG) auf eine Kieselgel-60-Platte (Merck, Art. 5721) aufgesprüht, und die Platte wird in eine DC-Kammer gestellt (75 ml Dichlormethan/15 ml Acetonitril). Die fertig entwickelte Platte wird getrocknet und anschliessend mit NO_x im Exsikkator diazotiert. Danach wird die Platte mit einer α-Naphthol-Lösung (2% in EtOH) besprüht.

Die Farbentwicklung ist nach 10 min abgeschlossen (Fig. 3).

3.3. HPTLC-Analyse

Die Extrakte und die Referenzsubstanzen werden mit der TLC-Auftrageinheit (CAMAG) auf eine HPTLC-Kieselgel-60-Platte (Merck, Art. 5642) aufgesprüht. Die Platte wird in der AMD-DC-Kammer getrocknet und mit einem flachen Gradienten (Essigsäureethylester/Toluol) entwickelt. Die Platte wird anschliessend getrocknet und per Scanner bei 280 nm und bei 200 nm ausgemessen. Zusätzlich wird von den zu analysierenden Substanzen das UV-Spektrum (zwischen 200–400 nm) gemessen und mit den Spektren der Referenzsubstanzen verglichen.

4. Diskussion

Für die im ersten Schritt analysierten Reinsubstanzen Benzidin, *o*-Tolidin (3,3'-Dimethylbenzidin), *o*-Dianisidin (3,3'-Dimethoxybenzidin), 3,3'-Dichlorbenzidin, 2,4-Toluyldiamin, *o*-Toluidin und 2-Amino-4-nitrotoluol wurden Nachweisgrenzen zwischen 0.01 und 0.75 µg auf der DC-Platte ermittelt (Tab. 2 und 3).

Natriumdithionit erwies sich als bestes Reduktionsmittel, obwohl die Wiederfindungsraten der verwendeten Farbstoffe (nicht ausgefärbt) nicht über 52% liegen. Die Wiederfindungsraten konnten weder mit anderen Verfahren noch mit der Veränderung der Faktoren Menge (Natriumdithionit), Temperatur und Zeit verbessert werden. Das Problem liegt vermutlich weniger bei einer unvollständigen Reduktion, als bei der Tatsache, dass die meisten Farbstoffe nicht nur aus einem Farbstoff bestehen und zudem bis zu 50% Stellmittel enthalten können. (Die Stellmittelmengenangabe betrifft eher alte Farbstoffe, auf die jedoch für die Untersuchung zurückgegriffen werden musste.)

Doch selbst wenn die Reduktion nicht vollständig ist, reicht sie aus, um sehr geringe Mengen der gesuchten Amine nachzuweisen. Bezogen auf ausgewählte Farbstoffe wurde die theoretische Minimumsgrenze für die im Farbstoff vorhandenen, nachfolgend aufgeführten Amine – aufgrund der festgestellten Nachweisgrenzen der Reinsubstanzen, unter Einhaltung bestimmter Auftragebedingungen, eines theoretischen Molekulargewichts und einer Wiederfindungsrate von 100% – berechnet. Diese liegt für Benzidin, 3,3'-Dimethylbenzidin, 3,3'-Dimethoxybenzidin und 3,3'-Dichlorbenzidin bei 0,3 mg, für 2,4-Toluyldiamin bei 0,3 mg und für *o*-Toluidin bei 0,6 mg. Selbst bei einer Wiederfindungsrate von 10% – was nicht unrealistisch ist – bleibt die Nachweisgrenze annehmbar.

Tab. 2. Die unterste, sichtbare Grenze nach der Diazotierung und dem Besprühen mit α-Naphthol (konventionelle DC)

	Benzidin	3,3'-Dimethylbenzidin	3,3'-Dimethoxybenzidin
Nachweisgrenzen bei der konventionellen DC [µg]	0.05	0.05	0.05

Tab. 3. HPTLC Nachweisgrenzen

	Benzidin	3,3'-Dimethylbenzidin	3,3'-Dimethoxybenzidin
Wellenlänge [nm]	280	280	280
Nachweisgrenzen bei HPTLC [µg]	0.01	0.02	0.02

Alle zur Verfügung stehenden Farbstoffe wurden mit vier Konzentrationen (3, 2, 1 und 0.1%) ausgefärbt und konnten bei jeder Konzentration nachgewiesen werden.

In einem weiteren Schritt wurden die noch fehlenden Amine analysiert. Der Nachweis konnte auch für diese Amine problemlos angewendet werden. Die genaue Ermittlung der Nachweisgrenzen der Reinsubstanzen steht noch aus.

Insgesamt hat sich die Kombination der beiden Verfahren – konventionelle DC/Farbauswertung und AMD/Scannerauswertung – als sinnvoll erwiesen, da bestimmte Reinsubstanzen einen ähnlichen Aufbau aufweisen und die Verfahrenssicherheit durch die Kombination zunimmt.

Eingegangen am 10. Februar 1995

- [1] G. Hildenbrand, 'Chemie der Kunst- und Farbstoffe', 3. Aufl., Verlag Herder, 1984.
- [2] Bundesanstalt für Arbeitsschutz: Antworten auf die Enquête-Kommission, Thema 'Die Stoffe, aus denen unsere Kleider sind – Stoffströme in der textilen Bekleidungskette', 16.–17.03.1993, S. 252.
- [3] R. Oppenheimer, 'On Diseases of the urinary tract seen in workers of the chemical industrie', *Z. Urol. Chir.* **1927**, *21*, 336.
- [4] H.-G. Neumann, 'Einstufung von Azo-Farbstoffen in der MAK-Wert-Liste', Fachgespräch 'Azo-Farbstoffe in der Textilindustrie', 06.11.90, Bundesanstalt für Arbeitsschutz, Dortmund.
- [5] R.A. Moll, 'Die Toxikologie von Textilfarbstoffen – Sind farbige Textilien gesundheitlich unbedenklich?', *Mellinand* **1991**, *10*, 836.



Fig. 2. AMD Gerät der Firma CAMAG

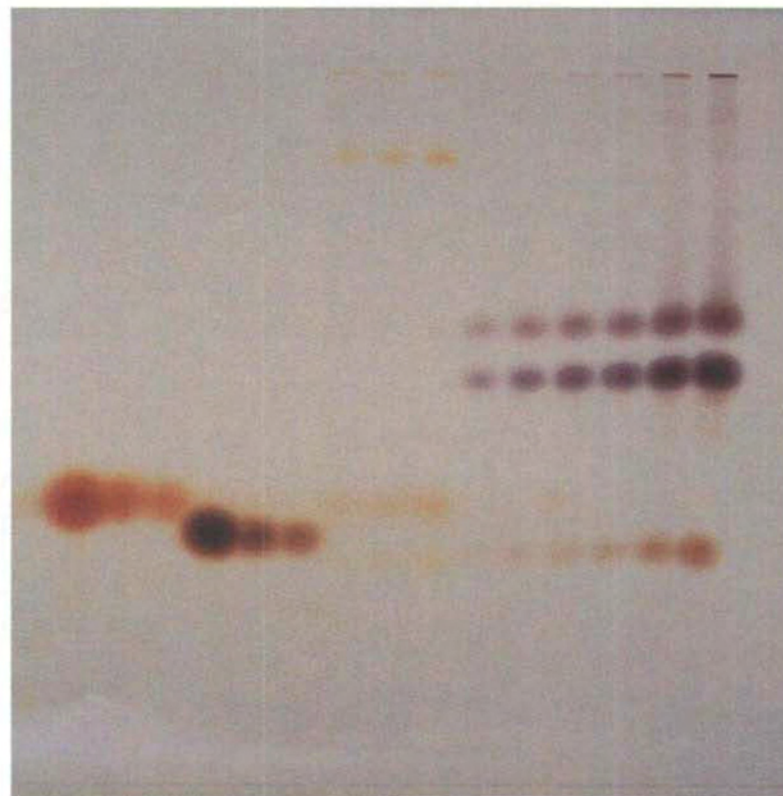


Fig. 3. Mit α -Naphthol-Lösung besprühte Platte