

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 53 (1962)

**Heft:** 2

  

**Artikel:** Der Einfluss einiger Lebensmittel- und Kosmetika-Farbstoffe auf die Aktivität der Bernsteinsäure-Oxydase

**Autor:** Sikorska, E. / Krauze, S.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982558>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 02.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Zu verschiedenen Malen wurden in Spezialkäsen quaternäre Ammonium-Ionen festgestellt, wobei die gefundenen Mengen von einigen Milligrammen bis zu 200 bis 300 Miligramm pro Kilo wechselten.

## **Der Einfluß einiger Lebensmittel- und Kosmetika-Farbstoffe auf die Aktivität der Bernsteinsäure-Oxydase**

Von *E. Sikorska* und *S. Krauze*

(Aus dem Laboratorium für Lebensmittel-Untersuchung des Staatlichen Instituts für Hygiene in Warschau)

Eine der Forschungsrichtungen auf dem Gebiet des schädlichen Einflusses mancher chemischer Verbindungen auf den Organismus stellt die Untersuchung ihrer Einwirkung auf isolierte Enzyme oder Enzymsysteme *in vitro* dar. Ergänzt man diese Versuche durch eine Bestimmung der Aktivität derselben Enzyme nach deren Isolierung aus zuvor mit schädlichen Verbindungen gefütterten Tieren, so kann man feststellen, ob die Wirkung dieser Verbindungen *in vivo* ihre Wirkung *in vitro* analog ist<sup>1-3</sup>.

Farbstoffe sind für den Organismus nicht gleichgültige Verbindungen. Die Hygieniker sind also bestrebt, ihre Einwirkung auf den Organismus kennenzulernen und ihre Anwendung bei Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen auf die am wenigsten schädlichen zu beschränken. Alle Untersuchungen zur Einwirkung der Farbstoffe auf die biologischen Prozesse erscheinen also äußerst notwendig. Die Bedeutung der Oxydations-Reduktions-Prozesse für das normale Funktionieren des Organismus unterliegt keinem Zweifel. Die Endverbrennungsprozesse im Gewebe, die im Krebszyklus verlaufen, sind für den Organismus Hauptenergiequelle. Eines der biokatalytischen Systeme dieses Zyklus ist das System der Bernsteinsäure-Oxydase. Bisher blieb dieses System wenig erforscht<sup>4</sup>. Wir hielten es darum für zweckmäßig, den Einfluß verschiedener Farbstoffe auf seine Aktivität zu untersuchen.

### Experimenteller Teil

Der Einfluß der folgenden 20 Farbstoffe auf die Aktivität der Bernsteinsäure-Oxydase wurde untersucht: 9 zur Zeit in Polen zur Färbung von Lebensmitteln zugelassener (Tartrazin, Neucoccin, Scharlach GN, Azorubin, Säuregelb, Indigotin, Brillantschwarz BN und Amaranth), 3 Xanthenfarbstoffe (Rhodamin B, Eosin, Erythrosin), 6 Triphenylmethanfarbstoffe (Lichtgrün SF gelblich, Malachitgrün, Patentblau V, Säurefuchsin, Fuchsin und Methylviolett) sowie Chrysoidin und Niagarablau.

Darüber hinaus wurde zum Vergleich auch der Effekt der Hydrochloride folgender Verbindungen untersucht: p-Phenylendiamin (pFDA), p-Toluyldiamin (pTDA), p-Aminophenol (pAF) sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthylamin ( $\alpha$ - und  $\beta$ -NA). Diese Substanzen sind Ausgangsprodukte bei der Synthese von Farbstoffen<sup>5</sup> und können als Endprodukte des Reduktionszerfalls der Azobindungen von Farbstoffen im Organismus auftreten<sup>6</sup>.

Die Bestimmung des Einflusses der oben genannten Verbindungen auf das System der Bernsteinsäure-Oxydase wurde durch Messen der Sauerstoffmenge durchgeführt, die von diesem System zur Oxydierung von bernsteinsaurem Natrium unter normalen Bedingungen und nach Zugabe der untersuchten Verbindungen zum reagierenden System verbraucht wurde. Der Vergleich der in beiden Fällen verbrauchten Sauerstoffmengen macht es möglich, sich über den Einfluß der untersuchten Verbindungen auf das analysierte Biokatalysatorensystem zu orientieren. Die verbrauchten Sauerstoffmengen gibt man als  $Q_{O_2}$  (die Anzahl von  $\mu$ l Sauerstoff, die von 1 mg des verwendeten trockenen Gewebes zur Oxydierung des Substrats innerhalb einer Stunde verbraucht wurde) an.

### Reagenzien

Wässrige Lösungen der untersuchten Verbindungen, 0,8 % und 0,08 %

Wässriges 5%iges Homogenat aus frischer Rattenleber

$1 \cdot 10^{-4}$  M Cytochrom c, nach der Methode von Keilin und Hartree<sup>7</sup> erhalten und spektrophotometrisch bestimmt<sup>8</sup>

0,5 M bernsteinsaures Natrium

$4 \cdot 10^{-4}$  M  $CaCl_2$

$4 \cdot 10^{-4}$  M  $AlCl_3$

0,1 M Phosphatpuffer, pH-7,4

Die Bestimmung wurde im Warburg-Apparat unter den von Umbreit<sup>9</sup> angegebenen Bedingungen durchgeführt.

In dem Hauptraum des Gefäßes im Warburg-Apparat befand sich das aus 1 ml Pufferlösung, 0,3 ml  $AlCl_3$ , 0,3 ml  $CaCl_2$ , 0,3 ml bernsteinsaurem Natrium und 0,4 ml Cytochrom c, 0,1 oder 0,2 ml Leberhomogenat zusammengesetzte reagierende System mit der zum Auffüllen der reagierenden Mischung auf 3 ml nötigen Menge Wasser. Im Mitteleinsatz des Gefäßes befand sich 0,2 ml 10-prozentiges NaOH. In die Versuchsgläschen wurden zuerst 0,25 oder 0,5 ml wässrige Lösung der untersuchten Verbindungen und dann erst die zum Auffüllen auf 3 ml erforderliche Wassermenge gegeben.

### Ergebnisse

Der Einfluß der untersuchten Verbindungen auf die Bernsteinsäure-Oxydase hängt von der Konzentration ab. Bei Mengen von 0,004 mg/mg Gewebe üben fast alle Farbstoffe keinen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch aus. Ausnahmen bilden Erythrosin, Methylviolett, Malachitgrün und Brillantschwarz BN.

Die untersuchten Amine weisen mit Ausnahme der Naphthylamine bei einer solchen Konzentration eine hemmende Wirkung auf (ca. 20 %). Diese ist besonders stark bei p-Aminophenol (92 % Hemmung) und wird bei steigender Konzentration dieser Verbindung schwächer.

Bei einer Konzentration von 0,4 mg/mg Lebergewebe zeigten überhaupt keinen Einfluß auf den Verlauf der Reaktion: Indigotin, Säuregelb und Chrysoidin. Interessant ist, daß Chrysoidin – wie die Untersuchungen Alberts<sup>15</sup> erwiesen haben – stark krebsbildende Eigenschaften besitzt. Eine Hemmung der Oxydation bis zu 20 % wurde bei Verwendung von Orangegelb, Tartrazin, Säurefuchsin und Patentblau V in dieser Konzentration beobachtet. Bei Zugabe von Niagarablau, Amaranth, Scharlach GN, Azorubin und Neucoccin verlief die Oxydation um 20 bis 50 % langsamer. Eine starke Hemmung der Reaktion verursachten die Xanthenfarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe und Brillantschwarz BN.

Das Verhalten der in dieser Konzentration (0,4 mg/mg Gewebe) verwendeten Amine war verschieden.  $\alpha$ -NA brachte die Reaktion vollkommen zum Stillstand.  $\beta$ -NA hemmte sie zu 60 %, pFDA zu 30 % und pTDA zu 58 %. Bei pAF dagegen betrug die Hemmung der Reaktion bei dieser Konzentration nur 8 %. Die mit pAF, pFDA und pTDA reagierenden Gemische änderten während der Bestimmung ihre Farbe. Bei Diaminen wurden sie rotbraun, bei pAF violett-schwarz. Der Effekt dieser Verbindungen kann also nicht nur von ihnen selbst, sondern auch von während der Reaktion aus ihnen entstehenden Produkten abhängen. Nach Zugabe von  $\beta$ -NA fällt aus dem reagierenden Gemisch ein weißer, kolloidaler Niederschlag aus. Die bei der oben genannten Konzentration erhaltenen Ergebnisse können also für diese Verbindung nicht maßgebend sein.

Zusätzliche Untersuchungen wurden an einem Bernsteinsäuresystem ohne Zusatz von Cytochrom c, also an einem System, das bedeutend langsamer atmet, durchgeführt. Sie zeigten, daß in diesem Falle die Farbstoffe in ähnlichem Ausmaß hemmend wirken, wie beim System mit Cytochrom c. Mit Rücksicht auf die mit großen Fehlermöglichkeiten verbundenen niedrigen Werte der einzelnen Manometerablesungen können diese Resultate jedoch nur als orientierende Ergebnisse angesehen werden.

Was die Amine anbetrifft, so beschleunigte pTDA den Sauerstoffverbrauch im System ohne Cytochrom c, dasselbe bewirkte pAF, jedoch in geringerem Maße.  $\alpha$ -NA hemmte das atmende System vollständig, pFDA und  $\beta$ -NA zeigten überhaupt keinen Einfluß.

Zwischen dem Gewicht der Leber einerseits und der Größe  $Q_{O_2}$  sowie dem Grad der Reaktionshemmung bestand keine Korrelation.

Die Ergebnisse sind ausführlich in Tabelle 1 wiedergegeben.

*Tabelle 1*  
*Der Einfluß der Farbstoffe auf das System der Bernsteinsäure-Oxydase*

Gruppe	Bezeichnung	Nummer nach Index 1956	Hemmung in Prozenten bei einer Konzentration von		
			0,004 mg/mg Gewebe mit Cytochrom c	0,4 mg/mg Gewebe	
				mit Cytochrom	ohne Cytochrom
Xanthen- Farbstoffe	Erythrosin	45 430	8	100	100
	Eosin	45 380	0	67	35
	Rhodamin B	45 170	0	58	40
Triphenylmethan- Farbstoffe	Methylviolett	42 535	16	100	100
	Malachitgrün	42 000	15	97	95
	Lichtgrün SF gelblich	42 095	0	100	100
	Fuchsin	42 510	0	100	90
	Säurefuchsin	42 685	0	17	0
	Patentblau V	44 055	0	7,5	0
Lebensmittel- Farbstoffe	Brillantschwarz BN	28 440	15	92	55
	Neucoccin	16 255	0	52	30
	Azorubin	14 720	0	39	30
	Amaranth	16 185	0	29	0
	Scharlach GN	14 815	0	38	0
	Orangegelb	15 985	0	12	0
	Säuregelb	13 015	0	0	0
	Tartrazin	19 140	0	14	0
	Indigotin	73 015	0	0	0
	Niagarablau	24 400	0	32	0
	Chrysoidin	11 270	0	0	0
Farbstoffamine:					
	$\alpha$ -Naphthylamin ( $\alpha$ -NA)		0	100	100
	p-Phenylendiamin (pFDA)		20	30	0
	p-Toluyldiamin (pTDA)		24	56	Steigerung der Aktivität auf 220 % 130 %
	p-Aminophenol (pAF)		92	8	

### Besprechung der Resultate

Die erhaltenen Ergebnisse scheinen auf das Bestehen bestimmter Beziehungen zwischen der chemischen Struktur der untersuchten Verbindung und ihrem

Einfluß auf die Bernsteinsäure-Oxydase hinzuweisen. Die Xanthenfarbstoffe hemmten den Sauerstoffverbrauch stark. Das größere Ausmaß der Hemmung bei Erythrosin als bei Eosin deutet darauf hin, daß die hemmende Wirkung beim Ersetzen des Broms durch Jod verstärkt wird. Andere Unterschiede in der chemischen Struktur bestehen zwischen diesen Farbstoffen nämlich nicht. Man kann annehmen, daß das Jod des Erythrosins auf die im Katalyseprozeß unbedingt notwendigen SH-Gruppen der Bernsteinsäure-Dehydrogenase einwirkt. Die von *Waliszewski*<sup>10</sup> an Mäusen durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß Erythrosin hämolytische Eigenschaften hat, lähmend auf das zentrale Nervensystem wirkt, wobei es zur Lähmung der hinteren Rumpfteile kommt. Verbindungen, die SH-Gruppen angreifen, können bekanntlich eine Hämolyse verursachen<sup>11-13</sup>. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß die Fähigkeit des Erythrosins sowohl zur Hämolyse wie auch zur Hemmung der Bernsteinsäure-Oxydase eng mit seinem möglichen Einfluß auf die SH-Gruppen verbunden ist.

Die Uebereinstimmung der bei den Triphenylmethanfarbstoffen erhaltenen Ergebnisse ist vollkommen. Alle diese Farbstoffe hemmten den Sauerstoffverbrauch im Bernsteinsäure-Oxydasesystem. Die bei Säurefuchsin und Patentblau V beobachtete bedeutend schwächere Hemmung dürfte darauf hinweisen, daß die Einführung von Sulfogruppen und das Entstehen einer Verbindung zwischen diesen und den Stickstoffatomen der NH<sub>2</sub>-Gruppen Ursache dieser Erscheinung ist.

Bei den übrigen Farbstoffen bestehen keine so klaren Beziehungen zwischen der chemischen Struktur und dem Einfluß auf das biologische System. Es scheint jedoch, daß der Hemmungseffekt größer ist, wenn ein Azofarbstoff Naphtalinringe besitzt, als es bei Benzolringen der Fall ist.

Sowohl die Zahl der Alkyle, Amine bzw. Sulfogruppen wie auch die Stelle der Substitution im Kern beeinflussen die Wirkung der Farbstoffe. Hierauf sind wahrscheinlich die Differenzen im Ausmaß der Hemmung der Bernsteinsäure-Oxydase zwischen Farbstoffen zurückzuführen, die so ähnlich gebaut sind, wie Neucoccin und Amaranth oder Scharlach GN und Orange gelb.

Worauf der stark hemmende Einfluß des Brillantschwarz BN beruht, ist schwer zu sagen. Es ist nicht klar, ob diese Erscheinung durch die Gegenwart zweier Azobindungen oder durch die Art und Anzahl der Substituenten oder auch dadurch hervorgerufen wird, daß diese Verbindung leicht zerfällt<sup>14</sup>. Ein anderer Farbstoff, Niagarablau, der ebenfalls zwei Azobindungen enthält, verursacht keine so starke Hemmung. Die beiden Farbstoffe sind jedoch in Hinsicht auf die Struktur nicht so weit ähnlich, daß man aus den erhaltenen Ergebnissen Schlußfolgerungen ziehen könnte, wo der Grund für die mengenmäßig unterschiedliche Wirkung dieser Farbstoffe zu suchen ist.

Mit dem Einfluß von Farbstoffen auf die Bernsteinsäure-Oxydase befaßte sich auch *Schormüller*<sup>4</sup>. Die von ihm erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den unsrigen qualitativ überein. Ein mengenmäßiger Vergleich ist jedoch nicht möglich, da er zu seinen Untersuchungen eine andere Enzymquelle und eine

andere Zusammensetzung der reagierenden Mischung verwendete. Bei den Untersuchungen *Schormüllers* zeigten Erythrosin und Brillantschwarz BN, ähnlich wie bei unseren Versuchen, eine 100%ige Hemmung der Reaktion. Eine stark hemmende Wirkung wiesen bei seinen Untersuchungen Tartrazin, Azorubin, Neucoccin und Orange gelb auf. Indigotin, das bei unseren Versuchen keinen Einfluß ausübte, hemmte bei *Schormüller* die Reaktion in 50%. Es ist verständlich, daß die Art der Ausführung der Bestimmungen und vor allem die Zusammensetzung der reagierenden Mischung die Ergebnisse entscheidend beeinflusst.

Die Konzentration der Farbstoffe hatte sowohl bei unseren Versuchen wie auch bei *Schormüller* entscheidende Bedeutung. Die von *Schormüller* verwendeten Konzentrationen, umgerechnet auf 1 mg Taubenbrustgewebe, stimmen mit den von uns gebrauchten Konzentrationen pro 1 mg Rattenlebergewebe vollkommen überein. Bei einer Konzentration von 0,004 mg/mg Gewebe waren fast alle untersuchten Farbstoffe inaktiv. Die Wirkung der Farbstoffe ist also von ihrer Menge im Organismus abhängig. Besonders gefährlich sind darum solche Farbstoffe, die sich im Organismus kumulieren können.

Die bei der Untersuchung der Amine erzielten Ergebnisse haben gezeigt, daß  $\alpha$ - und  $\beta$ -NA ähnliche Eigenschaften wie die Farbstoffe besitzen. Bei niedriger Konzentration beeinflussen sie die Reaktion nicht, bei hoher wirken sie stark hemmend. Bei pFDA und pTDA dagegen tritt der hemmende Einfluß bei beiden angewendeten Konzentrationen auf. Ungewiß ist aber leider, ob diese Eigenschaften ihnen selbst oder den Produkten ihrer Umwandlungen zuzuschreiben sind. Auffallend ist die Wirkung des pAF, das bei niedrigerer Konzentration die Reaktion beinahe vollständig hemmt, bei höherer fast gar keinen Einfluß auf sie ausübt. Die Steigerung der Aktivität des Bernsteinsäure-Oxydasesystems ohne Cytochrom c durch pTDA und pAF läßt vermuten, daß diese Verbindungen in gewissem Maße das Cytochrom c beim Uebertragen der Elektronen ersetzen können.

### Zusammenfassung

Der Einfluß von 9 wasserlöslichen, in Polen zur Färbung von Lebensmitteln zugelassenen und 11 kosmetischen Farbstoffen auf die Aktivität der Bernsteinsäure-Oxydase wurde untersucht. Die Bestimmungen wurden im Warburg-Apparat unter Verwendung eines aus bernsteinsäurem Natrium, Rattenleberhomogenat, Al- und Ca-Ionen, Cytochrom c und Phosphatpuffer mit pH-7,4 zusammengesetzten reagierenden Systems durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß die Wirkung der Farbstoffe von ihrer chemischen Struktur und von der Konzentration abhängt. Bei einer Konzentration von 0,004 mg/mg Gewebe zeigten Methylviolett, Malachitgrün, Erythrosin und Brillantschwarz BN geringe hemmende Eigenschaften. Bei einer Konzentration von 0,4 mg/mg Gewebe verursachten die Xanthenfarbstoffe (Rhodamin B bis 58%, Eosin bis 67%, Erythrosin bis 100%), die Triphenylmethanfarbstoffe (Malachitgrün, Lichtgrün SF gelblich, Fuchsin und Methylviolett bis 100%) sowie Brillantschwarz BN (92%) eine starke Hemmung der Oxydation des bernsteinsäuren Natriums. Niagarablau, Amaranth, Scharlach GN

Azorubin und Neucocccin hemmten den Verlauf der Reaktion im Bereich von 20 bis 50 %. Eine Hemmung der Oxydation des bernsteinsäuren Natriums unter 20 % verursachen: Orange gelb, Tartrazin, Säurefuchsin und Patentblau V. Keinen Einfluß auf die Aktivität der Bernsteinsäure-Oxydase zeigten: Indigotin, Säuregelb und Chrysoïdin.

### *Résumé*

Examen de l'effet de 9 colorants hydrosolubles autorisés en Pologne pour la coloration des denrées alimentaires et de 11 colorants pour produits cosmétiques sur l'oxydase de l'acide succinique. L'effet gênant observé dépend de la concentration et de la structure chimique du colorant; il est le plus fort pour l'érythrosine, le violet de méthyle, le vert malachite, le vert lumière SF jaunâtre, la fuchsine et le noir brillant BN. L'indigotine, le jaune acide et la chrysoïdine sont sans effet et les autres colorants examinés se situent entre ces 2 catégories.

### *Summary*

Examination of the effect of 9 water-soluble food dyes permitted in Poland and 11 cosmetic dyes upon the oxidase of succinic acid. Most of the dyes examined exert a more or less pronounced negative effect upon this enzyme.

### *Literatur*

- 1 *Bailie M. J., Christie G. S., Biochem. J.* **72**, 473 (1959).
- 2 *Hultin T., Arphenius A., Löw M., Magee P. N., Biochem. J.* **76**, 109 (1960).
- 3 *Ferber E., Magee P. N., Biochem. J.* **76**, 586 (1960).
- 4 *Schormüller J., Schulz W. B. Th., Z. Lebens. Unters. Forsch.* **108**, 9 (1958).
- 5 *Lazarew N. W., Wrednyje wieszczestwa w pomyslennosti, Leningrad 1954 C I.*
- 6 *Brodie B. B., J. Pharm. Pharmacol.* **8**, 1 (1956).
- 7 *Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J.* **39**, 289 (1945).
- 8 *Potter U. R., J. Biol. Chem.* **137**, 13 (1941).
- 9 *Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., Manometric Techniques, Minneapolis 1959.*
- 10 *Waliszewski T., Acta Pol. Pharm.* **9**, 127 (1952).
- 11 *Ball E. G., Biol. Bull.* **64**, 277 (1933).
- 12 *Williams M. M., Jacobs M. M., Biol. Bull.* **61**, 485 (1931).
- 13 *Schoeberl A., Stonder J., Heim L., Z. ges. exptl. Med.* **116**, 166 (1950).
- 14 *Saenz Lascano Ruiz I., Laroche C., Ann. Fals. Expert. Chim.* **53**, 581 (1960).
- 15 *Albert Z., Pol. Tyg. Lek.* **48**, 1565 (1954).