

Hautgängigkeit von Azofarbstoffen

Untersuchungen mittels des Franz'schen Diffusionszellmodells



Julia Goerigk, Eike M. Marek, Stephan Koslitz, Daniel Bury, Manigé Fartasch, Tobias Weiß, Thomas Brüning, Heiko U. Käfferlein

Azofarbstoffe, das heißt im Anwendungsmedium lösliche Azofarbmittel, stellen eine industriell wichtige Klasse an synthetischen Farbmitteln dar. Aufgrund einer nahezu unbegrenzten Variationsbreite der zu ihrer Synthese eingesetzten Komponenten, unter anderem aromatische Amine, ist eine große Farbstoffpalette zugänglich. Gerade aber die herstellungsbedingte Verwendung aromatischer Amine lässt den Einsatz von Azofarbstoffen kritisch erscheinen, da nach Exposition des Menschen der entsprechende Azofarbstoff im Körper wieder in das freie aromatische Amin gespalten werden kann. Insbesondere zur Relevanz der dermalen Exposition mit Azofarbstoffen liegen nur unzureichende Untersuchungen vor. Das IPA hat jetzt erstmals mit Hilfe des Franz'schen Diffusionszellmodells die Hautgängigkeit des Azofarbstoffes Solvent Red 24 untersucht.

Azofarbstoffe werden über eine Diazotierung von aromatischen Aminen und deren anschließende Kopplung mit einer geeigneten Komponente (in der Regel hydroxylierte oder sulfonierte Aromaten bzw. aromatische Amine) hergestellt. Über dieses Verfahren lässt sich ein großes Spektrum an Farbtönen, Anwendungs- und Echtheitseigenschaften erzielen. Azofarbstoffe finden dementsprechend breite industrielle Anwendung zur Färbung von Kunststoff- und Gummiprodukten, Holz, Papier, Leder, Lacken und Polituren, aber auch zur Färbung verbrauchernaher Produkte wie Textilfasern, Kosmetika und sogar Lebensmittel. Weitere Anwendungsbereiche sind Tätowiermittel (Tattoo Farbstoffe) sowie die Färbung von Flüssigkeiten zur Überprüfung von Undichtigkeiten und zur Kennzeichnung steuerbegünstigter Kraftstoffe.

Einsatz von Azofarbstoffen aus toxikologischer Sicht kritisch

Aus toxikologischer Sicht ist die herstellungsbedingte Verwendung von aromatischen Aminen, die aus produkttechnischer Sicht einen Zugang zu einer Vielzahl an lichtechten Farbstoffen erlaubt, kritisch zu hinterfragen. Durch enzymatisch katalysierte reduktive Spaltung des Azofarbstoffes sowohl auf und in der Haut als auch – nach Aufnahme – in der Leber des Menschen können wieder aromatische Amine freigesetzt werden (Slowicki et al. 2009; Käfferlein et al. 2009). Da einige aromatische Amine anerkanntermaßen krebserzeugend beziehungsweise krebverdächtig sind wird unter anderem durch die Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgemeinschaft empfohlen, „eine Gefährdung ex-

Kurz gefasst

ponierter Personen durch geeignete Schutzmaßnahmen dadurch zu verhindern, dass die Stoffe so gehandhabt werden, als ob sie eingestuft wären, wie es der kanzerogenen beziehungsweise kanzerogenitätsverdächtigen Aminkomponente entspricht“ (DFG 2017). Gleichzeitig kann durch Azofarbstoffe nachgewiesenermaßen auch eine allergische Kontaktdermatitis (Typ-IV-Reaktion, Ryberg et al. 2014) hervorgerufen werden. Ein diskutierter Zusammenhang zwischen dem bei Kindern gehäuftem Auftreten einer Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHS) und dem Konsum von mit Azofarbstoffen gefärbten Lebensmitteln (insbesondere Süßigkeiten), konnte dagegen wissenschaftlich nicht hinreichend belegt werden (McCann et al. 2007; BfR 2007). Dennoch müssen seit 2010 Lebensmittel, die bestimmte Azofarbstoffe enthalten, entsprechend gekennzeichnet werden (EU 2008). Um, je nach Anwendungsbereich, sinnvolle Schutzmaßnahmen zu etablieren, sind zunächst detaillierte Kenntnisse zu den jeweiligen Expositionspfaden beim Menschen (inhalativ, oral, dermal) notwendig.

Dermale Exposition von herausragender Bedeutung

Im Gegensatz zu den Anfängen in der Farbstoffindustrie, bei der es durch die händische Herstellung von Farbstoffformulierungen aus den jeweiligen Farbstoffpulvern noch zu einer beträchtlichen inhalativen Aufnahme kommen konnte, werden diese Prozesse heutzutage automatisiert und in geschlossenen Produktionsanlagen durchgeführt. Azofarbstoffe werden dementsprechend im Anschluss in der Praxis größtenteils bereits als Flüssigformulierungen zur Färbung eingesetzt. Auch wenn inhalative Expositionen in Einzelfällen immer noch von Bedeutung sein können (z.B. bei der Restauration von Möbeln, Lichtenstein et al. 2009) kommt heutzutage aufgrund der Verwendung von Flüssigformulierungen der Untersuchung einer möglichen dermalen Exposition die weitestgehende Bedeutung zu. Hierzu liegen gerade für die als kritisch anzusehenden Azofarbstoffe, das heißt im Anwendungsmedium lösliche Azofarbstoffe, wenige Untersuchungen vor. Aufgrund des lipophilen Charakters vieler Azofarbstoffe sind diese zusätzlich nicht in wässriger Lösung sondern vielfach in organischen Lösemitteln gelöst. Das Ausmaß einer möglichen Aufnahme des Azofarbstoffes durch die Haut kann damit nicht nur über die Konzentration des Farbstoffes und die Einwirkungsdauer auf der Haut sondern auch wesentlich vom Lösemittel selbst beeinflusst werden, so dass eine den spezifischen Expositionsumständen angepasste Untersuchung der Hautpenetration unter ggf. Berücksichtigung weiterer Faktoren (z.B. Hautschädigung) notwendig ist.

Ex-vivo-Untersuchungen zur Hautgängigkeit

Ein Farbstoff aus der Gruppe der „Euro-Marker“, der aktuell in Großbritannien zum Anfärben von unbesteuertem Kraftstoff (z.B. Agrardiesel) eingesetzt wird und nach Import in Deutschland vertrieben und genutzt werden kann, ist Sudan IV (C.I. Solvent Red 24, SR24). SR24 kann durch o.g. reduktive Spaltung in das aromatische Amin o-Toluidin gespalten werden, welches seitens der internationalen Krebsagentur der WHO (Baan et al. 2008) als kanzerogen für den Menschen eingestuft ist. Eine dermale Exposition von Beschäftigten, die Umgang mit markierten Kraftstoffen haben (z.B. beim

- Azofarbstoffe stellen eine industriell wichtige Klasse am synthetischen Farbstoffen dar.
- Aufgrund der Verwendung, wie auch der Freisetzung von aromatischen Aminen bei der Herstellung und dem Abbau von Azofarbstoffen, ist deren Einsatz kritisch zu hinterfragen.
- Bisher liegen noch wenige Untersuchungen zur dermalen Aufnahme von Azofarbstoffen vor.
- Mittels des Franz'schen Diffusionsmodells wurde die Hautgängigkeit des Azofarbstoffs Solvent Red 24 im IPA untersucht.
- Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zu aromatischen Aminen eine geringe Hautpenetration von Solvent Red 24.

Umfüllen und Betanken im Transport- und Agrarbereich), stellt einen möglichen Expositionspfad dar. Allerdings liegen derzeit keine Untersuchungen zur Hautresorption von SR24 vor. Daher wurde am IPA ein spezifisches Nachweisverfahren entwickelt, mit dem die dermale Penetration von SR24 unter Verwendung der Franz'schen Diffusionszelle, einem gängigen *Ex-vivo*-Modell zur Untersuchung der Hautpenetration potenziell krebserzeugender Gefahrstoffe, untersucht werden kann.

Nur geringe Hautpenetration

Das entwickelte Verfahren auf Basis der Hochleistungsflüssigchromatographie in Kombination mit einem Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD) erlaubt die Trennung von SR24 und dem internen Standard (Solvent Red 23) innerhalb von 2,5 Minuten und wurde nach gängigen analytischen Kriterien (u.a. die der DFG validiert (Goerigk et al. 2017)). Nach Optimierung der Franz'schen Diffusionszelle (Verwendung spezieller Donorkammern und Rezeptormedien) und der Probenvorbereitung erwies sich das Verfahren mit einer Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/L, Wiederfindungsraten im Bereich von 94 und 116 Prozent und analytischen Ungenauigkeiten <10 Prozent als ausreichend valide. Erste, OECD-richtlinienkonforme Untersuchungen zur dermalen Penetration von SR24 mithilfe der Franz'schen Diffusionszellen unter Verwendung standardisiert gewonnener und frischer exzidierte Schweinehaut zeigten, dass SR24 – im Vergleich zu primären Aminen – in äußerst geringen Mengen intakt die Haut durchdringt. Die Penetration verlief aufgrund des lipophilen Charakters sehr langsam und war deutlich abhängig von der eingesetzten Konzentration und dem Donormedium. So zeigten sich höhere Penetrationsraten bei höheren Donorkonzentrationen und bei Verwendung von Diesel im Vergleich zu Speiseöl als Lösemittel.

Fazit

Die am IPA durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das entwickelte Nachweisverfahren für SR24 erfolgreich zum *Ex-vivo*-

Nachweis einer Hautpenetration arbeitsplatzrelevanter lipophiler Azofarbstoffe angewandt werden kann. So kann unter anderem der Einfluss des Lösemittels auf die Hautpenetration des zu untersuchenden Gefahrstoffes beurteilt werden. Der Versuchsaufbau kann in weiteren Untersuchungen auch dazu genutzt werden, den möglichen Einfluss der Hautmikroflora sowie die enzymatische Aktivität von Hautzellen auf die Entstehung von o-Toluidin zu untersuchen. Zusätzlich können bei Bedarf weitere arbeits- und umweltmedizinisch relevante Azofarbmittel, wie sie zum Beispiel in der Textilindustrie Anwendung finden, auf ihre hautresorptiven Eigenschaften untersucht werden. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass im Falle von Azofarbstoffen nicht immer nur die potenziell kanzerogenen Eigenschaften sondern auch andere lokale oder systemische Effekte im Vordergrund einer toxischen Wirkung stehen können. Auch diese können maßgeblich durch die Bioverfügbarkeit über die Haut beeinflusst werden.

Die Autoren:

**Prof. Dr. Thomas Brüning, Dr. Daniel Bury,
Prof. Dr. Manigé Fartasch, Julia Goerigk,
Dr. Heiko U. Käfferlein, Stephan Koslitz,
Eike M. Marek, Dr. Tobias Weiß,**
IPA

Literatur

1. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Cogliano V on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes, and related exposures, *Lancet Oncol* 2008; 9: 322-323.
2. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Hyperaktivität und Zusatzstoffe – gibt es einen Zusammenhang? Stellungnahme Nr. 040/2007 des BfR, 13.09.2007.
3. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, Warner JO, Stevenson J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, *Lancet* 2007; 370: 1560-1567
4. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). MAK und BAT-Werte Liste, Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Wiley-VCH, Weinheim, 2017; 183
5. Europäische Union (EU). Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX:32008R1333>).
6. Goerigk J, Marek EM, Koslitz S, Brüning T, Käfferlein HU. Development of an analytical method to study the dermal penetration of sudan IV in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2017; 390: S91-S92
7. Käfferlein HU, Slowicki A, Brüning T. Azofarbmittel, Teil 2: Toxikologie und Regulatorische Aspekte. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 2009; 69: 423-430
8. Lichtenstein N, Quellmalz K, Bernards M, Buchholz R, Kraus W, Poppe M (2009) Freisetzung aromatischer Amine aus historischen Pulverbeizen der Jahre 1950 bis 1970 zur Färbung von Holz. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 2009; 69: 258-262
9. Ryberg K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Diepgen T, Foti C, Giménez-Arnau A, Gonçalo M, Goossens A, Johansen JD, Le Coz C, Maibach HI, Bruze M. Patch testing with a textile dye mix—a multicentre study. *Contact Dermatitis* 2014; 71: 215-223
10. Slowicki A, Käfferlein HU, Brüning T. Hautgängigkeit von Azofarbmitteln, Teil 1: – Eigenschaften, Aufnahme über die Haut und Metabolismus. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 2009; 69: 263-268