

Azofarbstoffe und deren Hautgängigkeit beim Menschen

Literaturstudie



BGFA-Report 2
Februar 2009

Impressum

BGFA-Report

Ausgabe 2

1. Auflage, Februar 2009

Herausgeber

BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin
der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
Institut der Ruhr-Universität Bochum

Gestaltung

Bernd Naurath

Titelbild

Gleb Vinnikov Fotolia.com

Bildnachweis

Vereinigung der Metall-Berufsgenossenschaften
(www.vmbg.de) (S. 19)

Heiko Käfferlein (S. 7, 11), (S. 21 unter Verwendung
des Bildes „Haut2pur.png“ aus der freien Enzyklopädie
Wikipedia. Dieses Bild steht unter der GNU-Lizenz für
freie Dokumentation. Der Urheber dieses Bildes ist
Fisch1917).

Druck

Druckzentrum Ruhr-Universität Bochum, Bochum

ISSN

ISSN 1867-9358

Kontakt

BGFA

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

D-44789 Bochum

Telefon: (0234) 302-4501

Fax: (0234) 302-4505

E-Mail: oeff@bgfa.de

Internet: www.bgfa.de

Impressum

Literaturstudie

Azofarbstoffe und deren Hautgängigkeit beim Menschen

Erstellt durch

BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung

Institut der Ruhr-Universität Bochum

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

D-44789 Bochum

Tel.: +49 234 3024 501

Fax.: +49 234 3024 505

E-Mail: bgfa@bgfa.ruhr-uni-bochum.de

Beteiligte Wissenschaftler

(in alphabetischer Reihenfolge)

Prof. Dr. Thomas Brüning

Dr. Heiko U. Käfferlein

Agnes Slowicki

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Allgemeine Einleitung zu Azofarbstoffen	7
2.1	Struktur und Eigenschaften	7
2.2	Herstellung, Verwendung und Überwachung in Endprodukten	7
2.3	Aufnahme und Metabolismus	9
2.4	Akute und chronische Toxizität beim Menschen	11
2.4.1	Kontaktallergien	12
2.4.2	Tumorerkrankungen	13
2.4.2.1	Allgemeine Betrachtungen.....	13
2.4.2.2	Arbeitsplatzspezifische Betrachtungen	14
3	Erkenntnisse zur Hautgängigkeit von Azofarbstoffen	19
3.1	Aufbau und Funktion der menschlichen Haut.....	19
3.2	Transport von Fremdstoffen in die und innerhalb der Haut.....	19
3.3	Metabolische Spaltung von Azofarbstoffen auf der Haut.....	20
3.4	Beschleunigte Aufnahme durch Lösungsmittel-Koexposition	22
3.5	Experimentelle Ansätze zur Ermittlung der Hautgängigkeit.....	23
4	Schlussfolgerungen	24
	Abkürzungsverzeichnis	25
	Literatur	26
	Impressum	2

1 Zusammenfassung

Azofarbstoffe sind synthetisch aus aromatischen Aminen hergestellte Farbstoffe und Pigmente, die für die Einfärbung von verschiedensten Substraten (zum Beispiel Wolle, Seide, Holz, Papier, Öle, Fette, etc.) geeignet sind. Sie bilden die größte Gruppe der Farbstoffe (~1000 weltweit) und lassen sich in **lösliche Azofarbstoffe** sowie im Anwendungsmedium **unlösliche Azopigmente** unterteilen. Lösliche Azofarbstoffe werden zusätzlich in wasserlösliche (hydrophile) und fettlösliche (lipophile) Azofarbstoffe unterteilt. Die generelle Einteilung in „im Anwendungsmedium lösliche Azofarbstoffe“ und „unlösliche Azopigmente“ ist aus toxikologischer Sicht äußerst wichtig. Lösliche Azofarbstoffe sind über die Lunge, den gastrointestinalen Trakt (GIT) als auch die Haut bioverfügbar, das heißt werden vom Körper des Menschen aufgenommen. Unlösliche Azopigmente können dagegen nur über die Lunge oder den GIT in den Körper des Menschen gelangen. Die bisher beim Menschen beschriebenen toxischen Effekte nach Exposition gegenüber Azofarbstoffen (allergische Kontaktdermatitis, Harnblasenkrebs) deuten zudem darauf hin, dass vor allem die Freisetzung von aromatischen Aminen und nicht die Azofarbstoffe selbst für die toxischen Effekte verantwortlich sind. Dazu müssen im Körper des Menschen jedoch die notwendigen biologischen Voraussetzungen für eine reduktive Spaltung des Azofarbstoffes vorliegen. Letztere sind nur gegeben, wenn das entsprechende Azofarbstoffe löslich und damit für eine enzymatische Spaltung überhaupt zugänglich ist. Dementsprechend wurden toxische Effekte beim Menschen bisher auch ausschließlich nach Exposition gegenüber löslichen Azofarbstoffen, jedoch nicht gegenüber unlöslichen Azopigmenten beschrieben.

Lösliche Azofarbstoffe können beim Menschen erwiesenermaßen eine allergische Kontaktdermatitis erzeugen. Inwiefern lösliche Azofarbstoffe Tumoren beim Menschen induzieren können, ist abhängig von ihrem Potenzial, im Körper Stoffwechselprodukte – in erster Linie aromatische Amine – zu generieren, welche über einen direkten oder indirekten Mechanismus Krebs induzieren können. In der Literatur liegen Erkenntnisse vor, die zeigen, dass vor allem diejenigen löslichen Azofarbstoffe ein krebserzeugendes Potenzial beim Menschen besitzen, die bei der reduktiven Spaltung der Azobindung erwiesenermaßen humankarzinogene aromatische Amine (unter anderem 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl sowie Benzidin und dessen Derivate) freisetzen können. Da es aufgrund der Vielzahl der Verbindungen unmöglich ist, eine genauere Differenzierung durchzuführen, empfiehlt die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft alle Azofarbstoffe (das heißt einschließlich der unlöslichen Azopigmente) so zu handhaben, als ob sie eingestuft wären, wie es der karzinogenen beziehungsweise karzinogenverdächtige Aminkomponente entspricht.

Im Vergleich zum Nagetier besitzt der Mensch eine Haut mit einer schlechteren Permeabilität des unveränderten löslichen Azofarbstoffes. Untersuchungen zeigen, dass lösliche Azofarbstoffe auf der Haut durch bakterielle Spaltung der Azobindung in lösliche, größtenteils polare Metaboliten umgesetzt werden können, die über die Haut der exponierten Person aufgenommen und im Harn ausgeschieden werden. Quantitative Aussagen zur Umsetzung sowie zur anschließenden Resorption über die Haut und der Natur der entstehenden Metaboliten können aus den bisher veröffentlichten Resultaten jedoch nicht gezogen werden und erfordern dementsprechend eine Einzelfallprüfung der individuellen Gegebenheiten. Dazu muss entweder die zur Verfügung stehende Literatur für den entsprechenden löslichen Azofarbstoff ausgewertet und auf den spezifischen Fall angewandt werden oder – falls diese Daten nicht vorhanden sind – orientierende experimentelle Untersuchungen im Labor durchgeführt werden. Wesentliche Verfahren zu einer ersten Evaluierung der Hautgängigkeit von Azofarbstoffen und aromatischen Aminen sind dabei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* etabliert und bekannt, wurden aber noch nicht im Zusammenhang mit einer spezifischen Exposition gegenüber Azofarbstoffen untersucht. Im Gegensatz zu löslichen Azofarbstoffen ist aufgrund ihrer Unlöslichkeit für Azopigmente weder eine Hautgängigkeit (sowohl passiv oder aktiv) als auch eine Zersetzung in freie aromatische Amine auf der Haut anzunehmen.

Nach der Bereitstellung von fertig einsetzbaren Azofarbstoffzubereitungen Mitte der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts steht aus präventivmedizinischer Sicht an heutigen Arbeitsplätzen hauptsächlich der Aufnahmeweg über die Haut und den GIT sowie durch Azofarbstoffe hervorgerufene allergische Erkrankungen im Vordergrund. Aufgrund des zusätzlichen Anwendungsverbots (siehe TRGS 614) beziehungsweise des freiwilligen Verzichts vieler Hersteller auf die Verwendung von löslichen Azofarbstoffen auf Basis karzinogener Amine (unter anderem auch der Druck- und Textilindustrie) mit Beginn der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts und einer Latenzzeit von bis zu 40 Jahren bei Harnblasenkrebs ist aus retrospektiver Sicht mit keinem wesentlichen Anstieg an azofarbstoffinduzierten Harnblasenkrebsfällen in Zukunft zu rechnen. Eine Ausnahme stellen Arbeitsplätze dar, an denen entweder Restaurationsarbeiten (unter anderem Schleifarbeiten an Möbeln) durchgeführt werden oder Umgang mit markiertem Mineralöl besteht. In beiden Fällen ist noch eine vorwiegend inhalative beziehungsweise dermale Exposition gegenüber karzinogenen aromatischen Aminen möglich, die per se einer Einzelfallprüfung bedarf. Diese Einzelfallprüfung sollte sowohl das verwendete Azofarbstoffe, seine Verunreinigung mit dem unveränderten aromatischen Amin sowie die Untersuchung des Expositionsprofils und die Höhe der Exposition umfassen.

2 Allgemeine Einleitung zu Azofarbstoffen

2.1 Struktur und Eigenschaften

Azofarbstoffe sind synthetisch hergestellte Farbstoffe und Pigmente und definieren sich chemisch über die Azo-Gruppe ($R_1-N=N-R_2$) [1]. Die chromophore Gruppe wird durch konjugierte Doppelbindungen gebildet, welche eine Delokalisation der π -Elektronen erleichtert [2]. Auf diese Weise wird von einer Verbindung ein bestimmter Teilbereich des sichtbaren Spektrums von 400-800 nm absorbiert. Das menschliche Auge nimmt den nicht absorbierten, gestreuten und reflektierten Anteil des Spektrums wahr und sieht die entsprechende Komplementärfarbe des absorbierten Lichtes [3].

Unter dem Begriff Azofarbstoff versteht man dabei die im Anwendungsmedium löslichen Azofarbstoffe, die zusätzlich in hydrophile (das heißt wasserlösliche) und lipophile (das heißt fettlösliche) Azofarbstoffe unterteilt werden. Unter dem Begriff Azopigment versteht man die im Anwendungsmedium unlöslichen organischen Azofarbstoffe. Eine weitere weit verbreitete Einteilung berücksichtigt die Art der Bindung an das Trägermaterial und wird in anionische (‘direct’ beziehungsweise ‘acid’), kationische (‘basic’) und nicht-ionische Azofarbstoffe (‘disperse’) durchgeführt. Für eine einheitliche Nomenklatur beziehungsweise eindeutige internationale Bezeichnung für Azofarbstoffe kann der seit 1925 durch die „British Society of Dyers and Colourists“ und die „American Association of Textile Chemists and Colorists“ herausgegebene und weltweit gültige Colour Index (CI) herangezogen werden. In der Praxis wird dieser jedoch kaum angewandt, so dass für ein und dasselbe Azofarbstoff oft eine Vielzahl unterschiedlicher Handelsnamen (zum Beispiel je nach Hersteller) vorliegt. Als Beispiel kann der Azofarbstoff „Amaranth“ genannt werden, für den es insgesamt 80 verschiedene Handelsnamen gibt [4].

Azofarbstoffe besitzen zum größten Teil eine lineare Struktur, auch wenn die Azobindung durch die Elektronenpaare an jedem der Stickstoffatome leicht abgewinkelt ist [5]. Weiterhin sind sie durch eine planare Konfiguration und eine Präferenz zum trans-Isomer gekennzeichnet [6]. Die Azo-

gruppe ist das Element mit den höchsten elektronegativen Eigenschaften im Molekül [7] und zieht unter Bildung einer Azoxygruppe gerne Elektronen, zum Beispiel aus Sauerstoff (O_2) an [4]. Die hohe Elektronegativität der Azogruppe ist auch dafür verantwortlich, dass ein Azofarbstoff nach Aufnahme in den Organismus in einem ersten Schritt reaktiv in die entsprechenden aromatischen Amine gespalten werden kann.

2.2 Herstellung, Verwendung und Überwachung in Endprodukten

Die Herstellung von Azofarbstoffen erfolgt über eine Diazotierung von aromatischen Aminen zu den entsprechenden Diazoverbindungen und deren anschließende Kupplung mit einer geeigneten Kupplungskomponente, zumeist weiteren aromatischen Aminen zum fertigen Azofarbstoff (**Abbildung 1**) [3]. Abhängig von den Ausgangsstrukturen der aromatischen Amine und Kupplungskomponenten und deren Seitengruppen können die Farbeigenschaften sowie die Löslichkeit und die pH-Eigenschaften der Azofarbstoffe nahezu beliebig beeinflusst werden. Wegen der einfachen, meist in Wasser verlaufenden Synthese und der nahezu unbegrenzten Variationsbreite bei der Wahl der Diazo- und Kupplungskomponenten, ist die Erstellung einer außerordentlich großen Vielfalt von Azofarbstoffen möglich, welche für die Einfärbung von verschiedensten Substraten geeignet sind. Ein breites Spektrum von Farbtönen, Anwendungs- und Echtheitseigenschaften wird somit erreicht.

Als erstes Azofarbstoff wurde 1861 *p*-Aminoazobenzol (‘Anilinelb’) synthetisiert. Weitere Azofarbstoffe auf Anilinbasis (‘IndigoFarbstoffe’) wurden großtechnisch seitens der BASF-AG für die Textilindustrie hergestellt. Dazu gehörte Mohnrot (1878) und Benzopurpurin, dessen rote Farbe gegen Säuren widerstandsfähig war. Viele der Azofarbstoffe färbten Textilien ohne vorheriges Beizen. 1885 wurde das erste blaue Azofarbstoff angemeldet. Bis zum Ersten Weltkrieg wurden synthetische Farbstoffe fast ausschließlich in Deutschland hergestellt. Im weiteren Verlauf weiteten sich die Produktionsstätten auf die

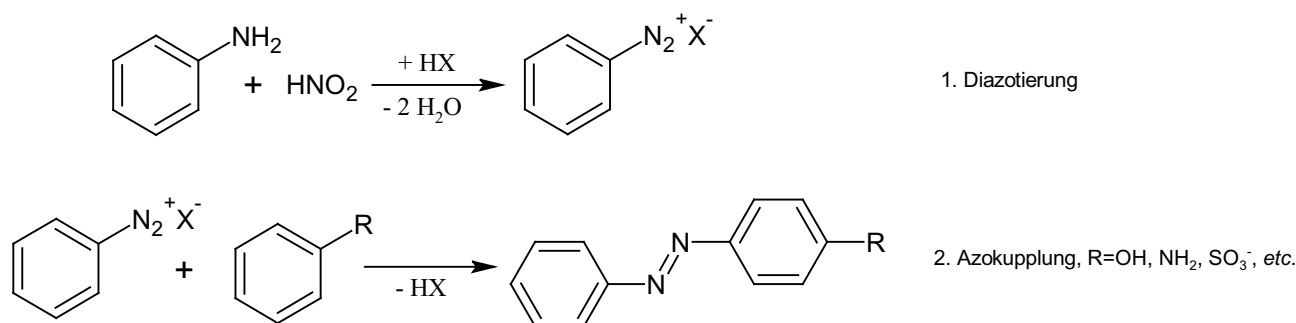


Abbildung 1 Herstellung von Azofarbstoffen in einer zweistufigen Reaktion mittels einer Diazotierung aromatischer Amine und einer anschließenden Azokupplung mit unterschiedlichen aktivierten Kupplungskomponenten (zum Beispiel Phenolen, aromatischen Aminen, Sulfonsäuren, etc.). Die Reaktion findet vor dem Hintergrund der schnellen Zersetzung des Diazoniumsalzes bei niedriger Temperatur und *in-situ*, das heißt ohne Isolierung des Zwischenproduktes, statt.

ganze Welt aus und der Einfluss Europas ging drastisch zurück. Im Jahre 1996 schließlich besaß West-Europa einen Anteil von lediglich ca. 18% an der Produktion von Textilfarbstoffen mit weiter fallenden Produktionsanteilen [8].

Azofarbstoffe jeglicher Art sind seit über 100 Jahren in Gebrauch [4, 9] und kommen weltweit in Lebensmitteln, Fetten, Holz, Papier, Kosmetikprodukten [10], Textilien (natürliche und künstliche Fasern) und Leder [11] sowie in Tattoofarbstoffen [10], Plastik- und Gummiprodukten, Pharmazeutika, Insektiziden (Chlordimeform), Farben, Lacken, Polituren, Holzbeizen, Druckerpatronen und Färbungslösungen in chemischen Laboratorien vor. Zu bemerken ist, dass rund 50% aller Farbstoffe in der Textilindustrie eingesetzt werden. Azofarbstoffe repräsentieren nach Anzahl und Produktionsmenge die größte Gruppe aller synthetischen Farbstoffe. Sie schließen etwa 70% aller auf dem Markt befindlichen organischen Farbstoffe ein und stammen heute vorwiegend aus China, Indien, Korea, Taiwan und Argentinien [3]. Chen et al. schätzen, dass insgesamt ca. 1000 Azofarbstoffe weltweit im Umlauf sind, wovon 500 potenziell kanzerogene Eigenschaften besitzen. Die Zahlen variieren zwischen den verschiedenen Autoren, wobei für Deutschland keine genauen Daten vorliegen [1, 12].

Saure beziehungsweise **anionische Azofarbstoffe** (´acid dyes´ beziehungsweise ´anionic dyes´) werden hauptsächlich zum Färben von tierischen Fasern – vor allem Wolle- und Polyamidfasern aus wässrigen Lösungen in der Textilindustrie eingesetzt. Außerdem werden sie zur Färbung von Leder, Papier, Jute, Stroh, eloxiertem Aluminium, Insektiziden, Düngemitteln, Kunststoffen, Holzbeizen, Klarlacken, Lasuren, Kosmetika, aber auch von Nahrungsmitteln und Getränken verwendet. Bei 90% aller gefärbten Ledererzeugnisse werden saure Azofarbstoffe verwendet. Bei sauren Azofarbstoffen handelt es sich um hydrophile, das heißt wasserlösliche Azofarbstoffe. Sie enthalten einen oder mehrere ionische Substituenten, vor allem Sulfonsäuregruppen. Die Bezeichnung saures Azofarbstoff leitet sich vom Färbeprozess ab, da sie in saurer Lösung auf das Trägermaterial aufgebracht werden. **Basische** beziehungsweise **kationische Azofarbstoffe** (´basic dyes´ beziehungsweise ´cationic dyes´) dienen vor allem zur Färbung von Polyacrylnitril-Fasern und anionisch modifizierten Polyester-Fasern. Weitere Anwendungsgebiete sind die Papier- und Lederfärbung, sowie die Herstellung von Flexodruckfarben, Kugelschreiberpasten und Stempelfarben. Basische Azofarbstoffe weisen Amino-Gruppen auf, die teilweise mit Alkylgruppen substituiert sein können und deren freies Elektronenpaar mit in die Resonanz und damit die Farbgebung des Azofarbstoffes einbezogen ist. **Direktfarbstoffe oder substantive Azofarbstoffe** (´direct dyes´) werden vor allem zur Färbung von Baumwollgeweben, aber auch zur Färbung von Papier und Leder verwendet. Außerdem finden sie breite Anwendung zur Färbung von zahlreichen anderen Materialien wie Tinte, Wasserfarben, Holzbeizen, Druckfarben, Kunstharz, regenerierter Zellulose, Zellglas und Kosmetika wie Haarfarben

und Seife. Substantive Azofarbstoffe sind zunächst wasserlösliche Azofarbstoffe, deren lang gestreckte Moleküle sich unter anderem in den Hohlräumen der Makromoleküle der Zellulose einlagern. Dort aggregieren sie und sind im Anschluss kaum mehr auswaschbar. **Dispersionsfarbstoffe** enthalten keine ionischen Funktionen, sondern hydrophobe Gruppen wie -OR, -NR₂, -NO₂ oder -CN, die oft auch zur Bildung von Wasserstoffbrücken beitragen. Dementsprechend lösen sich diese Farbstoffe nur wenig in Wasser und gehören somit mehr zu den lipophilen Azofarbstoffen. Farbstoffe mit diesen Eigenschaften eignen sich besonders zum Färben hydrophober Fasern wie Polyester oder Acetylcellulose. Sie werden aus wässriger Dispersion auf die Faser gezogen und haften dort wahrscheinlich infolge von Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol- und Van der Waals-Kräften zwischen Faser und Farbstoff. **Reaktivfarbstoffe** stellen eine der modernsten Färbemethoden für Gewebe dar. Dabei reagieren Farbstoff und Faser unter Knüpfung einer kovalenten Bindung. Reaktivfarbstoffe sind insbesondere zum Färben von Cellulose, Wolle und Polyamid geeignet.

Unabhängig vom verwendeten Azofarbstoff steht in der Zwischenzeit beim Färbeprozess die Färbung ohne vorheriges Beizen des Gewebes im Vordergrund. Die Beizenfärbung selbst hat nur noch geringfügige technologische Bedeutung. Bei diesem Färbeprozess wird auf dem Gewebe mit Hilfe hydrolysierbarer Salze ein Metallhydroxid gefällt, welches mit sauren Farbstoffen Farblacke bildet. Umgekehrt können auch die Polyphenole der Gerbstoffe auf der Gewebeoberfläche ausgefällt werden (´sauer beizen´). Derart präparierte Gewebe binden basische Farbstoffe und das Verfahren wird hauptsächlich zur Färbung von Wolle verwendet, in geringerem Ausmaß auch für Seide, Nylon, Leder, Pelze, Papier und eloxiertem Aluminium. Schließlich wird beim Färbeprozess auch zwischen Farbpigment und Farbstoff unterschieden. Farbpigmente dringen nicht ins Innere der Faser vor. Sie werden mit Hilfe eines Bindemittels auf der Oberfläche des textilen Flächengebildes fixiert. Das Bindemittel ist meist eine wässrige Dispersion von Mischpolymeren, welche nach einer Hitzebehandlung vernetzen und so die Pigmente einbetten. Die chemische Konstitution der Pigmente ist äußerst vielfältig. Sie reicht von einfachen Salzen von Azofarbstoffen bis zu Phthalocyanin- und Anthrachinonverbindungen.

Aufgrund der potenziellen kanzerogenen Eigenschaften einer Vielzahl von Azofarbstoffen ist deren Einsatz weltweit in den vergangenen Jahren stark eingeschränkt worden, insbesondere bei denjenigen Azofarbstoffen, die beim Menschen eindeutig krebserzeugende aromatische Amine als Komponenten enthalten (unter anderem Benzidin [Bz], 2-Naphtylamin [2-NA] und 4-Aminobiphenyl [4-ABP]). Insgesamt gibt es jedoch keine weltweit einheitlichen Richtlinien, welche Azofarbstoffe angewandt werden dürfen, welche komplett verboten sind und welche begrenzt unter bestimmten Auflagen und Eigenschaften eingesetzt werden dürfen. Jedes Land hat für einzelne Azofarbstoffe eigene Richtlinien entwickelt. Vor diesem Hintergrund

wird diesbezüglich auch die Einfuhr von Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen, vor allem aus asiatischen Ländern, überwacht und Ergebnisse dieser Überwachung führen – falls nötig – zu entsprechenden Anpassungen der Gesetze zum Schutz des Verbrauchers [13].

Für Deutschland stellt sich die Situation im Moment so dar, dass für den Verbraucher die Verwendung und das Inverkehrbringen von Azofarbstoffen im Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände sowie im Futtermittelgesetzbuch und der Kosmetikverordnung geregelt wird (übergeordnet auch durch entsprechende EU-Basisverordnungen wie der 2002/61/EG [14]). Am Arbeitsplatz gelten die Bestimmungen der TRGS 614 („Verwendungsbeschränkungen für Azofarbstoffe, die in krebserzeugende aromatische Amine gespalten werden können“). Sie bilden – je nach Anwendung – den gemeinsamen Rechtsrahmen (mit Ausnahme von Haarfarben). Die Richtlinien verbieten die Verwendung von als gefährlich gekennzeichneten Azofarbstoffen sowie das Inverkehrbringen bestimmter mit solchen Stoffen gefärbter Gebrauchs- und Lebensmittelerzeugnisse. Zurzeit trifft dies auf 22 aromatische Amine zu. Außerdem gibt die EU-Richtlinie eine Obergrenze von 30 ppm für die Freisetzung potenziell krebserzeugender aromatischer Amine aus Azofarbstoffen an. Falls mehr als 30 ppm der gelisteten aromatischen Amine im Fertigerzeugnis oder in gefärbten Teilen freigesetzt werden können, dürfen diese in Textil- und Ledererzeugnissen, die mit der menschlichen Haut oder der Mundhöhle direkt und längere Zeit in Berührung kommen können, nicht verwendet werden. Die gleichen Rahmenbedingungen gelten für neu synthetisierte Azofarbstoffe, die vor ihrer Marktzulassung gemäß Anhang VII der EU Richtlinie 67/548/EWG auf Mutagenität und Kanzerogenität mittels *in-vitro*-Nachweisverfahren getestet werden müssen. Im Regelfall werden ein bakterieller und ein nicht bakterieller Test ohne und mit metabolischer Aktivierung vor der Zulassung eingefordert. Da die im bakteriellen Ames-Test eingesetzten Stämme an *Salmonella typhimurium* keine effiziente Azoreduktase enthalten, wird der bakterielle Ames Test in der Grundstufe mit einer speziell für Azofarbstoffe entwickelten Methodenmodifikation nach Prival & Mitchell durchgeführt [15]. Eine Prüfung von krebserzeugenden Eigenschaften im Langzeittiersuch erfolgt in der Regel erst nach positiven Ergebnissen aus Kurzzeittests [3].

Neben der industriellen Anwendung und der in diesen Bereichen potenziellen beruflichen Exposition geraten Azofarbstoffe aufgrund ihrer schweren Abbaubarkeit teilweise auch über die Abwasseranlagen in die Umwelt. Vor allem die in der Textilindustrie eingesetzten Azofarbstoffe bestehen aufgrund ihrer Sulfatgruppen zu ca. 60-70% aus wasserlöslichen (hydrophilen) Azofarbstoffen und gelangen direkt über das Abwasser in die Umwelt, da ein vollständiger Abbau lediglich im anaeroben Milieu möglich ist [9].

2.3 Aufnahme und Metabolismus

Während die unlöslichen Azopigmente lediglich über die Lunge und den gastrointestinalen Trakt (GIT) vom Körper aufgenommen und aufgrund ihrer Unlöslichkeit nicht in aromatische Amine gespalten werden können, werden lösliche Azofarbstoffe neben der Lunge und GIT zusätzlich auch über die Haut aufgenommen. Aufgrund ihrer Löslichkeit können aus ihnen durch reduktive enzymatische Spaltung darüber hinaus bereits vorher (auf der Haut) oder nachher (nach Aufnahme über Lunge, GIT und/oder Haut) in der Leber aromatische Amine freigesetzt werden. Im Folgenden werden daher in erster Linie die Aufnahme und der Metabolismus von löslichen Azofarbstoffen diskutiert. In Abhängigkeit vom Umgang, von der Form und der Löslichkeit der Azofarbstoffe kann die Aufnahme sowohl inhalativ (Staub oder Aerosol), dermal als auch oral erfolgen, wobei die Aufnahme über den GIT und die Haut überwiegt. Durch Schweiß und Reibung kommt es bei letzterem Aufnahmeweg zunächst zu einer Elution von Farbstoffen aus körpernah getragenen gefärbten Textilien, welche im Anschluss entweder in Ausgangsform oder chemisch verändert (zum Beispiel in Form von Stoffwechselprodukten) über die Haut aufgenommen werden können. Eine besondere Form der Aufnahme bestand in der Vergangenheit an spezifischen Arbeitsplätzen, an denen bis Mitte der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts Zubereitungen von Azofarbstoffen aus den entsprechenden Farbpulvern hergestellt wurden. Hier konnte es zu einer nicht zu unterschätzenden Aufnahme des Pulvers über die Lunge kommen. Aber auch heutzutage können vereinzelt noch inhalative Expositionen auftreten: bei Restaurationsarbeiten (zum Beispiel alter Möbel) und beim Umgang mit markiertem Mineralöl (siehe TRGS 614).

Die Resorption – speziell die Resorption über die Haut und den GIT – ist zusätzlich abhängig von der Molekularen Masse und der Polarität des betreffenden Azofarbstoffes. Beispielsweise sind Polymere schwer und auf unterschiedliche Weisen resorbierbar, wohingegen alle Moleküle mit einer Molekülmasse <300 Da nahezu komplett durch aktive Transportmechanismen beziehungsweise Diffusion resorbiert werden. Die Pharmaindustrie bedient sich der Tatsache, dass bei einem polymerischen Azo-Produkt die Azogruppe aufgrund ihrer schwereren beziehungsweise verzögerten Resorption erst im GIT oder speziell im Colon reduziert wird und dort im Anschluss spezifisch wirken kann (zum Beispiel Sulfazalazin). Bei entzündlichen Darmerkrankungen ist die Resorption von Azofarbstoffen zusätzlich erhöht beziehungsweise beschleunigt [4]. In Tierversuchen wurde nach gleichzeitiger Einnahme von Antibiotika wie Neomycin oder Tetracyclin ebenfalls eine gesteigerte Resorption von Azofarbstoffen beobachtet [4, 16]. Insgesamt können jedoch keine allgemeingültigen Aussagen über die Aufnahme und das Ausmaß der Aufnahme von Azofarbstoffen getroffen werden, so dass für jeden Umgang mit diesen Stoffen eine spezifische Expositions- und Risikoabschätzung erfolgen muss.

In Fäzes wird nur wenig der aufgenommenen unveränderten Azofarbstoffe wieder ausgeschieden, sodass davon ausgegangen werden muss, dass Azofarbstoffe größtenteils metabolisiert und über den Harn ausgeschieden werden. Hier ist zwischen der Aufnahme über den GIT und über die Haut zu unterscheiden. Bei der Aufnahme über die Haut werden die löslichen Azofarbstoffe teilweise durch Mikroorganismen auf der Haut reduziert (siehe Kapitel 3). Im Anschluss werden die Metaboliten resorbiert, welche in die Leber gelangen und dort weiter umgesetzt werden [17]. Zusätzlich können die Azofarbstoffe – insbesondere im Falle lipophiler, das heißt fettlöslicher Azofarbstoffe – unverändert über die Haut aufgenommen und erst im Anschluss in der Leber metabolisiert werden. Teilweise ist diese jedoch nicht komplett, so dass ein Teil des Farbstoffes auch wieder in unveränderter Form aus dem Körper gelangt. Nach oraler Aufnahme von Azofarbstoffen findet eine ähnliche Spaltung und Resorption der Metabolite beziehungsweise Resorption des unveränderten Azofarbstoffes im GIT statt. Letzteres gilt insbesondere für wasserlösliche (hydrophile) Azofarbstoffe mit einer bereits zu Beginn vorhandenen erhöhten Polarität, welche – vor allem in Lebensmittelfarben – durch die strukturelle Einführung einer oder mehrerer Sulfatgruppen erreicht wird. Derartige Azofarbstoffe werden aufgrund ihrer erhöhten Polarität schneller ausgeschieden. Ähnlich wie auf der Haut, sind im Gegensatz dazu nicht polare, das heißt lipophile Farbstoffe schneller unverändert resorbierbar und werden erst in der Leber weiter metabolisiert [18].

Nach der Resorption im Körper werden Azofarbstoffe zu einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen metabolisiert, unter anderem über instabile Hydrazo-Zwischenprodukte (R-NH-NH-R') zu freien aromatischen Aminen reduziert [4]. Dies geschieht durch verschiedene Reduktasen sowohl im GIT [19] als auch in der Leber [20]. Dabei werden durch das Cytochrom P450-System hydrophile Substanzen bereits teilweise im GIT und lipophile Substanzen vor allem auf mikrosomaler Ebene in der Leber metabolisiert. [21 – 24] Die Reduktion erfolgt im GIT dabei durch Bakterien der Darmflora. [25 – 29]. Obwohl sich eine gute Assoziation zwischen den Eigenschaften bakterieller Azoreduktasen in anaeroben Darmbakterien der Ratte und des Menschen beobachten lässt, ist eine Übertragbarkeit von Ergebnissen zur Aufnahme und Metabolismus von Azofarbstoffen aus Tierversuchen auf den Menschen nur bedingt möglich. Dies liegt größtenteils an der unterschiedlichen intestinalen Flora zwischen Tier und Mensch [30]. Mittels DNA-Microarray-Analysen konnten 17 aus 40 Bakterien im GIT bestimmt werden, die reduzierende Eigenschaften für Azofarbstoffe aufweisen [26], wobei auch die Bakterien der physiologischen Hautflora eine Reduktaseaktivität besitzen (siehe Kapitel 3). Zwischen den bakteriellen und den mikrosomalen Reduktasen sind Unterschiede erkennbar [31] Die Voraussetzung, dass ein Azofarbstoff an eines der mikrosomalen Cytochrom P450-Proteine der Leber binden kann oder von mischfunktionellen Oxidasen reduziert werden kann, ist das Vorhandensein einer

elektronenreichen Gruppe in *para*-Stellung zu der Azogruppe. Zudem wird zwischen gegenüber Sauerstoff (O₂) und Kohlenmonoxid (CO) unempfindlichen I-Substraten ('*Insensitiv*') und empfindlichen S-Substraten ('*Sensitiv*') unterschieden [2]. Bei Bakterien wurden zwei Reduktase Systeme identifiziert: Auf der einen Seite ein anaerobes monomeres Flavin-freies Reduktase System, welches ein NADPH oder NADH bindendes Motiv am *N*-Terminus besitzt sowie sulfatierte Azofarbstoffe abbauen kann. Auf der anderen Seite ein polymeres Flavin abhängiges Reduktase System, welches sowohl aerob und anaerob reduzieren kann und derzeit noch strukturell untersucht wird.

Nach inhalativer oder dermalen Aufnahme findet in der Leber zunächst eine Oxidation des Azofarbstoffes statt, ohne die Azobindung reaktiv zu spalten. Im Falle einer Aufnahme über den GIT kann jedoch auch zunächst die Azobindung gespalten werden und die anschließende Oxidation in der Leber verläuft am entsprechend gebildeten freien aromatischen Amin. Die Oxidation besteht im Wesentlichen aus der *C*- und *N*-terminalen Hydroxylierung beziehungsweise der *N*-terminalen oxidativen Demethylierung. Die *N*-terminale Hydroxylierung an endständigen primären oder sekundären Aminogruppen mit der nachfolgenden Phase-II-Reaktion (Veresterung mit Glucuronsäure, Bildung von Acetaten und Sulfaten) macht das Molekül wasserlöslich [32]. Nur so kann es über die Galle in den Darm oder über die Harnblase ausgeschieden werden. Die Estergruppen können unter Bildung des sehr reaktiven Nitreniumions in der Harnblase abgespalten werden und dann mit einer nukleophilen Gruppe der Erbsubstanz DNA im Blasenepithel reagieren (dieser Metabolismuspfad entspricht einem genotoxischen Mechanismus der Kanzerogenität). Das Nitreniumion ist auch ein möglicher Metabolit nach einer Demethylierung von Aminogruppen. Auf diese Art verstoffwechselbare Azofarbstoffe können auch ohne Freisetzung der zu Grunde liegenden aromatischen Amine krebserzeugend wirken. Letzteres ist für das Leberkanzerogen Dimethylaminobenzol nachgewiesen [33]. Die auf diesem Wege aus weniger wasserlöslichen Farbstoffmolekülen in der Leber entstandenen hoch wasserlöslichen Glucuronsäurederivate können nach ihrem Transport über die Galle in den Darm dem für wasserlösliche Azofarbstoffe typischen und bereits erläuterten Stoffwechselweg (reduktive Spaltung durch anaerobe Darmbakterien) unterliegen. Da das Nitreniumion beziehungsweise seine acetylierte Form beim Menschen vorwiegend erst in der Harnblase entsteht, zeigen aromatische Amine eine Organspezifität hinsichtlich ihrer kanzerogenen Wirkung. Wurde bei der Azofarbstoffherstellung das Kupplungsprodukt chemisch weiter umgesetzt, zum Beispiel durch entmethylierende Kupferung, entsteht bei der Rückspaltung ein unterschiedliches aromatisches Amin als das ursprünglich in der Synthese eingesetzte Amin als Diazokomponente. Es erscheint daher bei der Bewertung der Toxizität von Azofarbstoffen sinnvoll, nicht nur vom eingesetzten Amin, sondern insbesondere vom Endprodukt der Synthese auszugehen.

Neben dem GIT und der Leber wurden Azoreduktasen auch in der Niere [34], Placenta [35] und der Haut [36] gefunden. So können geringere Mengen kanzerogen wirksamer Derivate auch in anderen Organen des Menschen entstehen. Im Tierversuch ist Blasenkrebs daher nicht die einzige und auch nicht eine typische Tumorform, die mit einer Exposition gegenüber aromatischen Aminen und Azofarbstoffen verknüpft ist. Azofarbstoffe auf Basis des Benzidins rufen unter anderem in der Ratte weitaus häufiger Leberkarzinome hervor. Diese Ergebnisse sind aber nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar, da unter anderem Ergebnisse zeigen, dass der Abbau von Fremdstoffen in der Lunge, der Haut und der Leber nicht nur zwischen Tier und Mensch sondern auch untereinander innerhalb einer Spezies signifikant unterschiedlich ist [37]. Die fehlende Übereinstimmung in den primären Zielorganen (fehlende Organotropie) zwischen Mensch und Tier wurde auch bei anderen Kanzerogenen beobachtet, so dass heutzutage davon ausgegangen wird, dass eine auf Kanzerogenität im Tierversuch positiv getestete Substanz prinzipiell auch als Humankanzerogen anzusehen ist, selbst wenn vom Zielorgan im Tierversuch nicht notwendigerweise auch auf das entsprechende Zielorgan beim Menschen geschlossen werden kann. **Abbildung 2** zeigt die Metabolisierung von „Sunset Yellow“, einem derzeit als Lebensmittelfarbstoff eingesetzten Azofarbstoff, von welchem keine kanzerogenen Eigenschaften bekannt sind.

2.4 Akute und chronische Toxizität beim Menschen

Moll et al. stellten im Tierversuch an Ratten nach oraler Applikation bei 82% der Azofarbstoffe eine LD_{50} von >5.000 mg/kg Körpergewicht fest. Bei zwölf Azofarbstoffen betrug die LD_{50} zwischen 25 und 200 mg/kg [38]. Zusätzlich können Azofarbstoffe aufgrund reaktiver Substituenten oder extremer pH-Werte lokal reizende Eigenschaften besitzen und beim Kontakt mit dem ungeschützten Auge das Augengewebe (Kornea, Conjunctiva) bleibend oder langanhaltend verfärben. Informationen über eine akute Toxizität von Azofarbstoffen beim Menschen existieren nicht [39]. Darüber hinaus ist die systemische Toxizität von Azofarbstoffen nach dermalen Applikation geringer als nach oraler Applikation. Insgesamt sind beim Menschen keine akuten Vergiftungserscheinungen durch das Tragen von Bekleidung, die mit Azofarbstoffen gefärbt wurden, zu erwarten. Demgegenüber ist eine Gefährdung von Menschen nicht auszuschließen, die in Färbetrieben mit Farbstoffmengen von mehreren Kilogramm umgehen. Auch die orale Aufnahme, insbesondere bei Kleinkindern, darf in der Risikoabschätzung nicht außer Acht gelassen werden, da ständiger Mundkontakt mit gefärbten Textilien oder anderen farbstoffhaltigen Produkten (zum Beispiel in Nahrungsmitteln) eine höhere Gesamtbelastung verursachen kann und sich der Körper noch in der Entwicklungsphase befindet. In diesem Zusammenhang wurde auch eine mögliche Assoziation zwischen pädiatrischer MCS

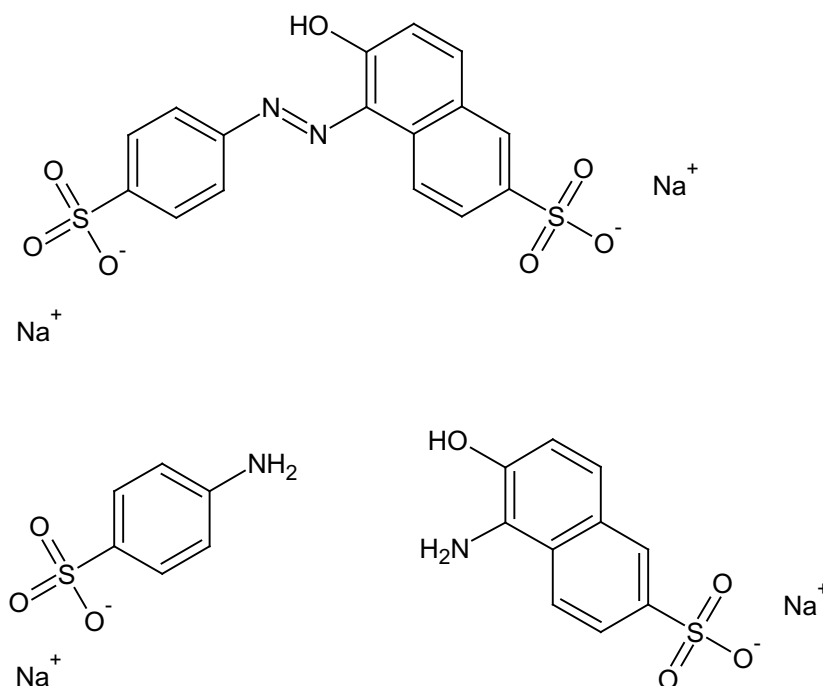


Abbildung 2 Metabolismus von Sunset Yellow. Die Präsenz von zwei Sulfonsäuregruppen erhöht die Löslichkeit des Azofarbstoffes und sorgt für dessen schnelle Eliminierung aus dem Körper, einerseits in unveränderter Form, andererseits auch nach Spaltung der Azogruppierung in die entsprechenden aromatischen Amine.

und azofarbstoffhaltigen Lebensmittelzusatzstoffen beschrieben [40]. Hinsichtlich der chronischen Toxizität sind nach Exposition gegenüber Azofarbstoffen in erster Linie Kontaktallergien und Tumorerkrankungen zu berücksichtigen.

2.4.1 Kontaktallergien

Azofarbstoffe können Dermatitis erzeugen [41 – 44]. 1-2% der allergischen Kontaktdermatitiden (ACD) in Deutschland haben Textilien als Ursache [45]. Diese sind zu 2/3 mit Azofarbstoffen und zu 1/3 mit Anthrachinonen angefärbt [11, 41, 46]. Die Inzidenz der durch Textilfarbstoff induzierten ACD variiert zwischen den Ländern, der Patientenprobe, der Anzahl der getesteten Farbstoffe im Patchtest und liegt insgesamt zwischen 1,0 und 15,9%. Dazu wurden 61 Fälle und 17 Reports zwischen 1985 und 1995 analysiert [47]. Insgesamt verursachten 49 Farbstoffe eine Sensibilisierung. Davon sind die meisten Dispersionsfarbstoffe und haben die Eigenschaft einer guten Hautpenetration. Doch auch Basic-, Acid- und Direktfarbstoffe sowie Anilinverbindungen beziehungsweise *p*-Phenylendiamin können sich in einer feuchten Umgebung aus der Kleidung lösen, eine ACD verursachen und somit hautsensibilisierende Eigenschaften zur Folge haben [41]. Der Pathomechanismus einer ACD entspricht im Falle von Azofarbstoffen einer immunologischen Reaktion vom Typ IV nach Gell und Coombs. Ein bestimmter als Antigen wirkender Azofarbstoff ruft über eine zellvermittelte Immunreaktion eine Sensibilisierung hervor, die im Anschluss zur Bildung von Antikörpern führt und bei erneuter Exposition zur Ausprägung einer allergischen Reaktion führt. Zusätzlich gibt es diverse Faktoren, die bei der Sensibilisierung eine Rolle spielen. Dazu gehören die individuellen Verhaltensgewohnheiten die bei einer Exposition zu unterschiedlich hohen Mengen pro Fläche, Dauer und Intensität des Kontaktes und unterschiedlichen Lokalisationen führen. Darüber hinaus hängt die Reaktion von der Eindringtiefe in die Haut, der Hautgesundheit, der Zusammensetzung des Produktes sowie weiterer chemischer und physikalischer Eigenschaften des Azofarbstoffes ab. Bei Produkten mit Azofarbstoffen, die auf der Haut Anwendung finden, unter anderem Tattoofarbstoffe oder Kosmetika ist zusätzlich immer auf die mögliche Entstehung von toxischen Verbindungen aufgrund von Photoreaktionen mit UV-Strahlung zu achten. Bei der Ausbildung einer Kontaktallergie scheint dabei das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Detoxifizierung von Azofarbstoffen durch Hautenzyme entscheidend für das immunogene Potenzial zu sein [48, 49, 50]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vor allem Metabolite und nicht die Azofarbstoffe selbst für die Ausbildung einer ACD verantwortlich sind.

Bei der Betrachtung einer ACD als Endpunkt einer toxischen Wirkung von Azofarbstoffen liegt aufgrund des direkten Kontaktes mit der Haut als auch aufgrund der täglichen Nahrungsaufnahme der Fokus auf der Verwendung von Azofarbstoffen im Lebensmittel- und Textilbereich sowie im Kosmetikbereich. Die Verwendung wird hierbei über das Lebensmittel- sowie

Gebrauchsgegenständegesetz als auch die Kosmetikverordnung geregelt. Die Richtlinien fokussieren sich jedoch auf das kanzerogene Potenzial und beinhalten keine Aussagen hinsichtlich des vermuteten allergenen Potenzials. Dies ist insofern problematisch, da unter anderem in Lebensmitteln in Europa zwar keine Azofarbstoffe auf Basis kanzerogener Amine eingesetzt werden dürfen, der Einsatz anderer Azofarbstoffe jedoch nicht verboten und der Wirkmechanismus der ACD mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Freisetzung aromatischer Amine *per se* zurückzuführen ist. Weiterhin kann aus Ländern außerhalb der europäischen Union Importware nach Deutschland gelangen, die potenziell allergene aber auch krebserzeugende Azofarbstoffe beinhalten. Sollte ein gehäuftes Vorkommen von potenziell allergenen und kanzerogenen Azofarbstoffen in Importware festgestellt werden, ist in Zukunft – ähnlich wie bereits bei Gewürzen aus dem asiatischen Raum praktiziert und durchgeführt – mit einer entsprechenden Verordnung der EG zu rechnen. Dies ist im Bereich der Textilverarbeitung bereits zum jetzigen Zeitpunkt erkennbar. Da in der Textilindustrie Arbeiter nahezu ausschließlich mit neuen Kleidungsstücken umgehen, aus denen weit mehr Farben freigesetzt werden können (Effekt des ´Ausblutens´) als von bereits getragenen und mehrfach gewaschenen Textilien und dementsprechend potenziell stärker gefährdet sind als Konsumenten, haben sich die zuständigen Behörden der EU-Mitgliedstaaten in der jüngeren Vergangenheit intensiv mit den Arbeitsplatzbedingungen in Färbereien beschäftigt. Ergebnis der Untersuchungen war vor allen Dingen eine geringe Akzeptanz der den Arbeitern zur Verfügung gestellten persönlichen Schutzmaßnahmen und das daraus resultierende Problem der Hautsensibilisierung nach Exposition gegenüber Azofarbstoffen beim Färben und bei der Weiterverarbeitung (Transport, Verpacken) gefärbter Kleidungsstücke [51].

Neben dem direkten Kontakt mit der Haut kann auch eine Inhalationsexposition zu einer Sensibilisierung führen, die sich als Asthma manifestiert. Vor allem Reaktivfarbstoffe besitzen ein atemwegssensibilisierendes Potenzial [3]. Ein Reaktivfarbstoff beziehungsweise dessen Metabolit fungiert dabei im Organismus als Hapten und reagiert mit Amino- und Sulfhydrylgruppen von Proteinen (zum Beispiel Serumalbumin) unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Dies führt zur Bildung eines Antigens. Die immunologische Reaktion ist hier Immunglobulin E (IgE) vermittelt und entspricht einer Typ I Reaktion. Messbar ist dieses Phänomen unter anderem mittels des ´Local Lymph Node Assay´ (LLNA) oder des ´Mouse Ear Swelling Test´ (MEST) [52, 53]. Eine positive Sensibilisierungsreaktion konnte zum Beispiel gegenüber *Solvent Red* bei Meerschweinchen gezeigt werden [46]. Falls ein anfänglich nicht immunogener Stoff bei dem Test immunogen erscheint, so sollte sowohl das Ausgangsmolekül als auch der Metabolit allein im LLNA untersucht werden. Durch eine Variation der Endpunkte erlauben es die beiden genannten Testverfahren auch nur leichte Sensibilisierungen zu detektieren und unklare Ergebnisse einzuordnen [54, 55].

2.4.2 Tumorerkrankungen

2.4.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Seit 1895 ist der Zusammenhang zwischen beruflicher Exposition gegenüber aromatischen Aminen und der Entstehung von Harnblasenkrebs bekannt. Rehn stellte seinerzeit bei Beschäftigten zur Herstellung von Fuchsin (einem Farbstoff auf Basis des Anilins) in den Farb-Fabriken Höchst das Auftreten von Harnblasenkrebs fest [56]. Im Verlauf der folgenden 30 Jahre entstand ein Katalog von Risikostoffen, der nach Gründung der Berufsgenossenschaften in den Anerkennungskatalog für die Berufserkrankung Harnblasenkrebs (Krankheitsgruppe 1301) einging. Hier sind vor allem Azofarbstoffe von Bedeutung, die aus krebserzeugenden aromatischen Aminen der Kategorie 1 (bekanntermaßen krebserzeugend beim Menschen) oder 2 (bekanntermaßen krebserzeugend im Tierversuch) hergestellt werden. Die meisten Azofarbstoffe enthielten dabei das kanzerogene Benzidin oder Verunreinigungen mit dessen Derivaten (unter anderem 3,3'-Dichlorbenzidin, DCB) [57]. Vor allem Arbeiter in der Farbenindustrie waren dabei in der Vergangenheit einer höheren Konzentration an diesen Farbstoffen ausgesetzt. Die Aufnahme in den Körper konnte dabei sowohl durch Inhalation als auch über die Haut, jedoch seltener durch Verschlucken erfolgen. Das Risiko hing in hohem Maße von den Arbeitsbedingungen und potenzieller Verunreinigungen des Azofarbstoffes mit den Ausgangsaminen ab.

Zahlreiche Tierversuche wurden in der Zwischenzeit durchgeführt, um eine mögliche Kanzerogenität von Azofarbstoffen generell und deren Metaboliten zu untersuchen. Dabei konnten Unterschiede zwischen Azopigmenten und Azofarbstoffen nachgewiesen werden. Nach oraler Gabe von drei gereinigten Diaryl Pigmenten auf Basis von Dichlorbenzidin (DCB) und 3,3'-Dimethylbenzidin (DMB) an Ratten und Mäusen mit Konzentrationen von 0,1-0,9% in der Nahrung, konnten bereits 1978 durch Leuschner keine signifikanten Zusammenhänge zwischen einer Tumorentstehung und der Behandlung festgestellt werden [58]. Die Autoren begründeten die Ergebnisse damit, dass die Pigmente nach oraler Verabreichung nicht resorbiert wurden, und so auch nicht zu DCB oder DMB metabolisiert werden konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von der Arbeitsgruppe um Sagelsdorff et al. im Jahre 1996 berichtet, welche damit die Ergebnisse von Leuschner nahezu 20 Jahre vorher bestätigen konnten [59]. Zusätzlich konnte Leuschner auch keine krebserzeugende Wirkung von DCB bis zu einem Verunreinigungsanteil von 20 ppm in den Farbpigmenten feststellen. Hierzu wurden experimentell verunreinigte Farbpigmente untersucht. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls an Beschäftigten bestätigt werden, die direkten beruflichen Umgang mit DCB besaßen. Studien an Arbeitern aus England und den USA, die für 35 Jahre DCB verwendeten, wiesen keine erhöhte Tumorzinzidenz oder -sterblichkeit auf [60, 61]. Die Versuchsergebnisse zu DCB konnten zu einem späteren Zeitpunkt ein weiteres Mal bestätigt werden. Hierzu wurde die Ausscheidung von Pigment Gelb

12 (DCB basiertes Azopigment) und Direct Black 38 (Benzidin basierter Azofarbstoff) im Tierversuch an Hamstern vergleichend gegenübergestellt. Es ließen sich nach oraler Einzelgabe von Pigment Gelb 12 keine der antizipierten Metabolite bis zu 8 Tage nach Exposition im Urin nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte nach Gabe von Direct Black 38 in der gleichen Versuchsreihe sowohl Benzidin als auch Monoazetylbenzidin, Diazetylbenzidin, 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und alkalische, wasserlösliche Konjugate des Benzidins und 4-ABP innerhalb der ersten acht Stunden nach Verabreichung im Harn nachgewiesen werden. Ausgewählte Urinproben der behandelten Tiere wurden im Anschluss positiv mittels Ames-Test auf ihr mutagenes Potenzial getestet. Die Ergebnisse bestätigen kein mutagenes und kanzerogenes Potenzial für Pigment Gelb 12, während Direct Black 38 eindeutig als mutagen und potenzielles Kanzerogen angesehen werden muss [62, 63]. Auch heute werden noch DCB-haltige Farbpigmente, unter anderem Pigment Gelb 12, bei orangenen, braunen und gelben Tönen in der Textilindustrie, Druckindustrie sowie bei Bedarfsgegenständen eingesetzt, da es für diese keine wirkliche Alternative mit identischen ästhetischen Eigenschaften gibt. Aus den nichtkanzerogenen Eigenschaften der Azopigmente kann nicht auf die biologische Nichtverfügbarkeit der entsprechenden Amine geschlossen werden. Letztere kann daher aus den vorliegenden Untersuchungen nicht als absolut angesehen werden. Nach oraler Aufnahme ist auch bei Pigmenten die Freisetzung geringer Mengen krebserzeugender aromatischer Amine nicht auszuschließen, wobei nicht das Pigment selbst gespalten wird, sondern das Amin aus der Umsetzung der Monoazoverbindung herrührt, welches als lösliche Verunreinigung enthalten sein kann. Die potenzielle Bildung aus der Monoazoverbindung ist jedoch nicht automatisch mit der Entstehung von Harnblasentumoren gleichzusetzen.

Im Gegensatz zu DCB gibt es für 3,3'-Dimethoxybenzidin (DMoB) nur Untersuchungen *in vitro* jedoch keine epidemiologischen Studien. Diese zeigen, dass im Vergleich zu nichtexponierten Kontrollzellen aufgrund höherer DNA-Strangbruchraten – insbesondere in Harnblasenmukozellen – und damit eines höheren genotoxischen Potenzials DMoB als potenziell kanzerogener Stoff angesehen werden muss [64].

Inwiefern Azofarbstoffe Tumoren beim Menschen induzieren können, ist letztendlich einerseits abhängig von ihrer Löslichkeit (Azopigmente vs. Azofarbstoffe), andererseits von ihrem Potenzial im Körper Stoffwechselprodukte zu generieren, welche über einen direkten oder indirekten Mechanismus Krebs induzieren können (vorwiegend Harnblasenkrebs beim Menschen und Lebertumoren im Tierversuch). Die tumorinduzierende Wirkung wird stark durch den Vorgang der reduktiven Spaltung der Azogruppe beziehungsweise eventuell vorhandener reaktiver Aminogruppen in der Seitenkette der Azofarbstoffe beeinflusst. Zugleich ist bei der früheren Herstellung von Azofarbstoffen eine Verunreinigung der Farben mit den Ausgangsstoffen, unter anderem aromatische Amine zu berücksichtigen. Andererseits

ist nicht notwendigerweise eine Spaltung in freie Amine notwendig – wie das Beispiel „Buttergelb“ zeigt, bei der die Spaltung der Azogruppe eine Detoxifizierung darstellt. Insgesamt liegen keine aktuellen Studien in ausreichender Anzahl aus wichtigen angewandten beruflichen Zweigen wie der Druck-, der Leder-, der Lebensmittelindustrie oder dem Friseurhandwerk vor, die ein kanzerogenes Potenzial von Azofarbstoffen beim Menschen belegen. Jedoch gibt es eine Vielzahl an Studien zu Kollektiven ehemals exponierter Beschäftigter sowohl aus Industrie- als auch aus Entwicklungsländern, die einen klaren Zusammenhang zwischen einer Exposition gegenüber Azofarbstoffen auf Basis von Benzidin (Bz), 2-Naphthylamin (2-NA) und 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und Harnblasenkrebs belegen. Aufgrund fehlender oder ungenauer Erfassung der Exposition ist jedoch keine Dosis-Wirkungsbeziehung aus den Studien ableitbar beziehungsweise ab welchen Konzentrationen Harnblasentumoren auftreten.

Unabhängig der Unterschiede in der Bioverfügbarkeit zwischen Azopigmenten und Azofarbstoffen ist die Elektronendichte um die Azobindung entscheidend für deren Reduktion. Amino- und Hydroxygruppen in *o*-Stellung sowie Sulfonsäure- und Carboxylgruppen im Molekül stimulieren die Bildung von aromatischen Aminen und die Reduktion der Azogruppe. Dagegen hemmen geladene funktionelle Gruppen oder Gruppen in *p*-Stellung zur Azogruppe die Bildung aromatischer Amine. In Mutagenitätsstudien erwiesen sich vor allem basische Azofarbstoffe und Azofarbstoffe mit einer freien *p*-Amino-Gruppe als stärker erbgutverändernd als andere Verbindungen aus dieser Substanzklasse. Eine Verschiebung der Aminogruppe auf die *o*- oder *m*- Position senkte hingegen die Mutagenität signifikant. Ähnliches Verhalten bei Strukturverwandtschaften ließ darauf schließen, dass auch andere, hier noch nicht getestete Azofarbstoffe mutagene Eigenschaften besitzen [39]. Kritisch muss angemerkt werden, dass die Genotoxizität von Azofarbstoffen in der großen Mehrheit der untersuchten Beispiele im Routine Ames-Test ohne Zugabe spezieller metabolischer Aktivierungssysteme nicht nachweisbar ist. Der Zusatz von chemischen reduzierenden Verbindungen, anaeroben Darmbakterien oder anaeroben Leberhomogenisaten verbessert zwar die Aussagekraft, dennoch ist der Wert der bakteriellen Prüfung lediglich in einer ersten groben Einschätzung des mutagenen Potenzials eines Farbstoffes zu sehen und es können keine Aussagen zur Kanzerogenität gezogen werden. Nach Brown et al. hat sich die Korrelation zwischen der Sensitivität als auch Spezifität in vielen Studien als unzuverlässig erwiesen [18]. Zudem reduzieren Verunreinigungen in technischen Farbstoffen den Korrelationsgrad und die Aussagekraft dieser Screening-Tests.

2.4.2.2 Arbeitsplatzspezifische Betrachtungen

Die **Herstellung und Weiterverarbeitung von Azofarbstoffen** erfolgt heute größtenteils in geschlossenen Systemen, so dass eine Exposition gegenüber den Ausgangs- und Endprodukten der Synthese nur bei bestimmten Arbeitsschritten wie zum Beispiel Installationen, Befüllung und Reinigung der Kessel und Chargenziehen auftreten kann. Vorwiegend erfolgt bei diesen Arbeitsschritten eine Exposition über die Haut und die Atemwege. Dabei ist die Belastung gegenüber den Azofarbstoffen bei der Herstellung als höher anzusehen als bei der Weiterverarbeitung, da hier höhere Konzentrationen am Arbeitsplatz auftreten [65]. Obwohl für Arbeitsplätze der großen Hersteller von einer weitgehenden Einhaltung der internen arbeitshygienischen und persönlichen Schutzvorschriften ausgegangen werden kann, hat ein Bericht der EU 1997 gezeigt, dass eine entsprechende Prüfung der Eignung von empfohlener persönlicher Schutzkleidung sowie deren letztendlicher Anwendung durch den Beschäftigten selten stattgefunden hat. Auch fehlten meist persönliche Messungen sowie Mess- und Monitoringdaten, um die Wirksamkeit der Schutzmaßnahmen adäquat beurteilen zu können. Mittels gezielter initiiertes Messprogramme wurden dabei seitens der EU-Überwachungsbehörden große Diskrepanzen zwischen nominalen und realen Schutzfaktoren festgestellt [51].

Benzidin (Bz) und seine Derivate wurde in der Vergangenheit insbesondere bei der Herstellung und Weiterverarbeitung von Azofarbstoffen am besten untersucht. Die Herstellung von Azofarbstoffen auf Basis von Bz und dessen Derivate wurde Anfang der 70er Jahre jedoch von nahezu allen westlichen Herstellern aufgrund der potenziell kanzerogenen Eigenschaften dieser Materialien eingestellt, obwohl lange Zeit die Lehrmeinung bestand, dass Azofarbstoffe, auch wenn sie unter Verwendung von kanzerogenen aromatischen Aminen als Kupplungskomponenten hergestellt worden waren, selbst keine krebserzeugende Wirkung besitzen. Dies wurde mit der fehlenden Bioverfügbarkeit der krebserzeugenden Amine aus den Farbstoffen begründet. Innerhalb der letzten Jahre wurde die Betrachtung jedoch auf Basis tierexperimenteller Untersuchungen und deren Verifizierung beim Menschen im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen differenzierter. In der Zwischenzeit geht man davon aus, dass beim Menschen Azofarbpigmente in der Tat nicht beziehungsweise nur in vernachlässigbar geringen Mengen aromatische Amine freisetzen können, während Azofarbstoffe in die entsprechenden aromatischen Amine gespalten werden können. Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass auch nach Azopigmentexposition freie aromatische Amine im Harn exponierter Beschäftigter nachgewiesen werden können. So stellte Akiyama 1970 fest, dass bei Arbeitern einer Pigment Fabrik mit Exposition gegenüber Pigment Gelb 12 im Harn DCB nachgewiesen werden konnte [66]. Inwiefern dies tatsächlich auf eine reduktive Spaltung des Azopigmentes oder auf eine Verunreinigung mit unverändertem

DCB zurückzuführen war, wurde nicht weiter untersucht. Mit einem strukturverwandten Pigmentfarbstoff (Pigment Gelb 13) konnten keine Metabolite an DCB im Harn von Nagern und Primaten nachgewiesen werden und der Stoff erwies sich als nicht kanzerogen [67]. Diese Ergebnisse wurden später durch Hatfield in einem Kollektiv von DCB-Pigment-exponierten Arbeitern bestätigt. Der wahrscheinliche Aufnahmeweg war dabei eine Inhalation des Pigments in Puderform. Mit spezifischen Methoden konnten keine Metaboliten im Harn der untersuchten Personen festgestellt werden [68]. Insgesamt ist damit der Nachweis von DCB-Metaboliten durch Akiyama im Jahre 1970 entweder auf eine Verunreinigung mit reinem DCB oder auf die Anwendung unspezifischer Messverfahren zurückzuführen. Im Gegensatz dazu publizierten Case und Mitarbeiter 1954 im Bereich der Herstellung und Weiterverarbeitung von Azofarbmitteln eine Untersuchung an britischen Arbeitern in der Farbstoffproduktion, die ehemals gegen 2-NA exponiert waren und ein ca. 200-fach erhöhtes Harnblasenkarzinomrisiko zeigten [69]. Auch wurde in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts ein vermehrtes Auftreten von Blasenkrebs in Japan unter ostasiatischen Manuskriptschreibern und Kimonofärbern beim Umgang mit Azofarbstoffen beobachtet [70, 71]. 1980 wies Lowry im Urin von Arbeitern aus Fabriken, in denen Farbstoffe auf Basis des Bz hergestellt wurden Bz und Monoazetyl-Bz im Harn der Beschäftigten nach [72]. Acht Jahre später konnten diese Ergebnisse durch Dewan und Mitarbeitern bestätigt werden [73]. Aufgrund der Verlagerung von Farbstoffproduktionen in Länder der Dritten Welt und der teilweise dort immer noch enormen Bedeutung von Azofarbmitteln auf Basis von Bz und dessen Derivaten in Klein- und Mittelbetrieben sind auch Untersuchungen aus Entwicklungsländern publiziert. Bi et al. publizierte hierzu eine Untersuchung an nahezu 2.000 chinesischen Arbeitern mit potenzieller Exposition gegenüber Bz. Die Autoren beschreiben eine Risikoerhöhung einer Harnblasenkrebskrankung in der Weiterverarbeitung von Azofarbmitteln auf Basis von Bz um den Faktor 20 im Vergleich zu der erwarteten Inzidenz an Blasen Tumoren in diesem Kollektiv. Eine potenziell synergistische Wirkung zwischen der beruflichen Bz-Exposition und den Rauchgewohnheiten wurde ebenfalls durch die Autoren beschrieben [74]. Die genannten Einzeluntersuchungen lassen einen Zusammenhang zwischen der Anwendung von Azofarbstoffen auf Basis kanzerogener aromatischer Amine und Harnblasenkrebs wahrscheinlich werden. Insgesamt ist jedoch kritisch anzumerken, dass bei der Betrachtung eines potenziellen Krebsrisikos bei der Herstellung und Weiterverarbeitung von Azofarbmitteln generell immer eine Verunreinigung mit dem freien aromatischen Amin als kausales Agens der Erkrankung berücksichtigt werden muss und nicht notwendigerweise allein das hergestellte Azofarbmittel *per se*. Bei der Herstellung und Weiterverarbeitung von Azofarbmitteln ist als Hauptexpositionspfad die Inhalation anzunehmen, da sowohl die Ausgangssubstanzen als auch die fertigen Azofarbmittel pulverförmig waren und erst später Mitte der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts im Zuge von Schutzmaßnahmen in Lösungen und Formulierungen abgefüllt wurden. Hierbei

fand eine drastische Reduktion der Exposition statt, wobei die Reduktion der Exposition über die Inhalation teilweise durch Verspritzen und dementsprechenden Hautkontakt mit den entsprechenden Formulierungen kompensiert wurde.

Entsprechend der oben genannten Untersuchungen im Bereich der Herstellung von Azofarbmitteln auf Basis der kanzerogenen aromatischen Amine Bz, 2-NA und 4-Aminobiphenyl (4-ABP) stuft die IARC auch die Tätigkeit als **Maler und Lackierer** als krebserregend ein, sofern sie in der Vergangenheit Umgang mit derartigen Stoffen hatten. Diese Einstufung der IARC konnte Ende der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts in zwei großen Studien von Chen et al. [75] und Steenland et al. [76] bestätigt werden. In Deutschland zeigte eine klinisch-basierte Studie ebenfalls ein höheres Risiko für diese Berufsgruppe an Harnblasenkarzinom zu erkranken, wobei das relative Risiko für die Gesamtgruppe der Maler nur schwach erhöht war (1,25), während es für die Gruppe der Spritzlackierer bei 2,88 lag [77]. In der Literatur gibt es keine Untersuchungen, welche Expositionspfade bei Malern und Lackierern vorliegen. Im Gegensatz zur Herstellung und Weiterverarbeitung ist beim Auftragen von Farben aber grundsätzlich mit einer Kontamination der Hand- und Armflächen zu rechnen, sofern keine ausreichenden persönlichen Schutzmaßnahmen (zum Beispiel das Tragen von Handschuhen) getroffen wurden. Expositionen waren vor dem Hintergrund der geringen Lichtechtheit von Azofarbmitteln im Außenbereich darüber hinaus nur für Malerarbeiten mit bunten Produkten im Innenbereich wahrscheinlich.

Nachdem die IARC diejenigen Azofarbmittel als kanzerogen eingestuft hatte, welche auf Basis der aromatischen Amine Bz, 2-NA und 4-ABP hergestellt wurden, konzentrierten sich in den folgenden Jahren eine Reihe von Arbeiten auf den Einfluss toxifizierender und detoxifizierender Enzyme auf die Entstehung von Harnblasenkrebs nach Exposition gegenüber Azofarbmitteln. Bereits aus vorangegangenen aber auch aktuellen Studien zur Exposition gegenüber aromatischen Aminen wurde der Verdacht geäußert, dass metabolisierende Enzyme Einfluss auf das Krankheitsgeschehen nehmen würden [78 – 81]. Dies betraf vor allem Genpolymorphismen der *N*-Acetyltransferasen (NAT) und der Glutathion-*S*-transferasen (GSTs). Die berufsbezogenen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Azofarbmitteln und Berufen mit einem höheren Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken wurde 1998 durch Golka und Mitarbeitern publiziert [82] und bestätigte teilweise die bereits im Vorfeld bekannten Daten. Insgesamt stehen vor allem Azofarbstoffe im Verdacht, einen Einfluss an der Pathogenese von Harnblasenkarzinomen zu besitzen, die kanzerogene aromatische Amine freisetzen können. Bei der Studie handelte es sich um eine Fall/Kontrollstudie unter Berücksichtigung des Phänotyps der *N*-Acetyltransferase-2 (NAT2), in der alle beteiligten Personen einer Berufsanamnese mittels Fragebogen unterzogen wurden. Die Ergebnisse wurden adjustiert nach dem jeweiligen Rauchverhalten. Das Risiko für Harnblasenkarzinome war sowohl bei Malern, bei Friseuren und bei Arbeitern im Holzverarbeitenden Gewerbe erhöht. Alle

erkrankten Personen, die mit Azofarbstoffen in ihren jeweiligen Berufen in Kontakt kamen, hatten ihre Berufsausbildung vor 1960 begonnen. Die dabei durchgeführten Arbeiten umfassten das Anrühren der Farbe mit pulverförmigen Farbstoffen, mechanisches Entfernen von alten Lackschichten und das Auftragen von Farben mit der Wickeltechnik. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Personen, die in früheren Dekaden Azofarbstoffen ausgesetzt waren, bis zum Ende des vorigen Jahrhunderts einem höheren Risiko unterliegen konnten, an Harnblasenkrebs zu erkranken [83]. Die Überrepräsentation der langsamen Acetylierer bei erkrankten Arbeitern und vor allem der Berufsgruppe der Maler wurde auch in weiteren Studien beobachtet, die generell früher karzinogenen aromatischen Aminen ausgesetzt waren [84, 85]. Die Ergebnisse zeigen auf, dass aus den verwendeten Azofarbstoffen auf Basis der kanzerogenen Amine (insbesondere Bz) die entsprechenden aromatischen Amine im menschlichen Organismus freigesetzt werden mussten.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass der langsame Acetyliererstatus keinen Risikofaktor *per se* sondern lediglich einen modulierenden Faktor auf die Entstehung von Harnblasenkarzinomen ausübt. Entscheidend bleibt die Dauer und Höhe der vorangegangenen Exposition. Inwiefern dies auch für weitere Genpolymorphismen eine Rolle spielt, zum Beispiel in Genen, die im Stoffwechsel von aromatischen Aminen von Bedeutung sind, ist derzeit unklar. In einer chinesischen Arbeit von Lin et al. fand sich, wie in den vorherigen Studien zur *NAT2*, ein höheres Harnblasenkarzinomrisiko für Beschäftigte, die ehemals gegenüber aromatischen Aminen und/oder Azofarbstoffen exponiert waren. Jedoch konnten keine positiven wie negativen Assoziationen mit Genpolymorphismen der Glutathion-S-transferasen *GSTM1* und *GSTT1* festgestellt werden [86]. Im Gegensatz dazu konnte ein höheres Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken, bei ehemals Beschäftigten der Textilfarbenindustrie in China festgestellt werden, welche eine homologe Mutation im Gen der UDP-Glucuronyltransferase 2B7 (*UGT2B7*) aufweisen [87]. Die Beteiligung dieses Gens am Metabolismus des Bz in der Leber konnte ebenfalls *in vitro* belegt werden. Da der Polymorphismus vorwiegend bei Asiaten und nicht bei Kaukasierern auftritt, könnte er vor allem in asiatischen Populationsstudien einen tatsächlichen Einfluss auf das Risiko besitzen.

Im Gegensatz zu Malern und Lackierern gibt es nur wenige Untersuchungen aus den Bereichen der **Druckindustrie** hinsichtlich eines höheren Blasenkrebsrisikos. Myslak und Bolt nennen in Ihrer Übersichtsarbeit die Berufsgruppe des Druckers, bei denen einzelne epidemiologische Studien eine erhöhte Inzidenz von Blasenkarzinomen gezeigt haben [88]. Einige der genannten Studien wurden dabei jedoch nicht nach dem Rauchstatus, einem bekannten Risikofaktor für Harnblasenkrebs, adjustiert [89]. In einer Fall-Kontroll-Studie zum Risiko von Harnblasenkrebs wurde durch Claude et al. ein relatives Risiko von 3.0 bei Personen gefunden, die zu einem beliebigen Zeitpunkt ihres

beruflichen Lebens in der Druckindustrie angestellt waren („ever-employed“) [77]. Allerdings konnte keine Abhängigkeit von der Beschäftigungsdauer und damit eine potenzielle „Dosis-Wirkungsbeziehung“ festgestellt werden. Dies war begründet in der geringen Gesamtanzahl an jemals in diesem Industriezweig beschäftigten Personen, die an der Studie teilgenommen hatten. Zusätzlich blieben die verursachenden Agenzien im Dunkeln und es konnte nur ein generell höheres Risiko beim Umgang mit Lacken und Farben (relatives Risiko von 1,52) jedoch kein substanzspezifisch höheres Risiko ermittelt werden. Die Autoren spekulierten über die Verwendung von Farben auf Basis von Bz und 2-NA. Diese Form der Spekulation war insofern begründet, da kurz zuvor im Jahre 1986 Bz als Humankarzinogen identifiziert werden konnte [90] und der Einsatz von Farbstoffen auf Basis von Bz und Bz-Derivaten zu diesem Zeitpunkt bekannt war auch wenn keine genaueren Angaben zum Druckverfahren oder der verwendeten Farbsysteme ermittelt werden konnten. Neben der Fall-Kontrollstudie von Claude et al. konnten in der Vergangenheit bei weiteren Fall-Kontrollstudien ähnliche Ergebnisse erzielt werden, das heißt es bestand ein höheres Risiko an Harnblasenkrebs in der Druckindustrie zu erkranken, jedoch konnten keine Dosis-Wirkungsbeziehung oder gar substanzspezifische Effekte nachgewiesen werden [91, 92]. Gleichzeitig muss jedoch angemerkt werden, dass neuere Fall-Kontrollstudien, unter anderem von Gaertner et al. kein signifikant erhöhtes Risiko für Harnblasenkrebs bei Druckern erkennen lassen [93].

Die generelle Schwäche von Fall-Kontrollstudien lediglich einzelne Berufsgruppen mit einem erhöhten Krebsrisiko jedoch keine verursachenden Substanzen identifizieren zu können, ist bekannt. Die genannten Fall-Kontrollstudien können deshalb insgesamt weder als generelle Begründung für ein erhöhtes Harnblasenkrebsrisiko im Druckbereich herangezogen werden (im Falle eines „positiven Zusammenhangs“) noch als Beweis für dessen Fehlen (im Falle eines „negativen Zusammenhangs“). Sie können jedoch (im Falle positiver Zusammenhänge) die Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen, zum Beispiel im Rahmen von Kohortenstudien oder experimentellen Arbeiten zu denjenigen Azofarbstoffen, die in der Vergangenheit im Druckbereich eingesetzt wurden. Hier sollten speziell die verwendeten Druckverfahren und Farbsysteme Berücksichtigung finden, die auch tatsächlich eingesetzt wurden. Da aufgrund einer Selbstverpflichtungserklärung der Hersteller von Druckfarben keine Rohstoffe mehr eingesetzt werden, die als giftig oder krebserzeugend gelten [94], kommt der Betrachtung von Harnblasenkrebs in der Druckindustrie derzeit ein rein retrospektiver Charakter zu. Die im Bereich der Buch- und Offsetfarben eingesetzten Farbstoffe waren dabei nahezu alle Pigmente, die als nicht löslich im Anwendungsmedium eingeschätzt werden und dementsprechend keine aromatischen Amine freisetzen können. Einige Druckfarbpigmente wurden im Rahmen der fünften Verordnung zur Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung [95] vom Hersteller vom Markt genommen. Dabei

handelt es sich um Pigment Red 8, 22 und 23. Die als Ausnahme eingesetzten löslichen Farbstoffe im Zeitungsdruck waren keine Azofarbstoffe, sondern Triphenylmethanfarbstoffe (zum Beispiel CI Basic Violet 3 oder Viktoria-Blau). Die eingesetzten Farbstoffe in Druckfarben für den Flexo- und Verpackungsdruckbereich unterschieden sich je nach Jahrzehnt der Verwendung deutlich. Dabei kamen vor allem basische Farbstoffe, unter anderem Basic Yellow 37 oder Basic Blue 7 zum Einsatz, bei denen es sich jedoch nicht um Azofarbstoffe handelte. In späterer Zeit wurden dann zunehmend andere Farben verwendet, von denen lediglich Basic Orange 2 (Chrysoidin) ein Azofarbstoff auf Basis von Anilin war und als Kanzerogen der Kategorie 3 durch die EU eingestuft war (Substanz, die Anlass zur Sorge gibt, kanzerogen zu sein aufgrund mangelnder Datenlage jedoch nicht abschließend eingeordnet werden kann). Insgesamt gibt es keinen Hinweis auf die Verwendung von Azofarbstoffen auf Basis der kanzerogenen Amine 4-ABP, 2-NA und Bz. Es gibt derzeit auch keine Hinweise, dass in der Vergangenheit (beziehungsweise Gegenwart) lösliche Azofarbstoffe auf Basis des *o*-Toluidin eingesetzt wurden, welches kürzlich seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft als Humankanzerogen in die Kategorie 1 eingestuft wurde. *o*-Toluidin ist jedoch Ausgangsstoff für die Synthese des Azofarbstoffes Solvent Red 24, welches bis Ende der 80er Jahre und in einer Konzentration von bis zu 3 ppm zum Anfärben von Waschmitteln benutzt wurde. Damit fand der Stoff zu Reinigungszwecken über Umwege (als Hilfsstoff) Eingang in die Druckindustrie, zum Beispiel gelöst in Trichlorethylen. Jedoch ist vor dem Hintergrund der geringen Konzentrationen des Farbstoffes, der notwendigen Spaltung des Farbstoffes in *o*-Toluidin und der dann im Vergleich zu 4-ABP, 2-NA und Bz äußerst geringen kanzerogenen Wirkung von *o*-Toluidin insgesamt von keiner Gefährdung für den Anwender derartig gefärbter Waschmittel in der Vergangenheit auszugehen.

Im Bereich der **Textilindustrie** gibt es mit Ausnahme von Färbern keine Daten hinsichtlich eines höheren Blasenkrebsrisikos. Die bereits erwähnte dermale Exposition von Azofarbstoffen durch das Tragen von gefärbten Textilien wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Zur Abschätzung des Krebsrisikos sollte der inneren Expositions-dosis die ermittelte kanzerogene Dosis des auslösenden Agens gegenübergestellt werden. Während einzelne Daten zu Azofarbstoffen in Textilien vorliegen, gibt es jedoch keine Untersuchungen zur aufgenommenen Dosis. Vor dem Hintergrund des Verbotes von Azofarbstoffen auf Basis der kanzerogenen Amine Bz, 2-NA und 4-ABP in Europa beziehungsweise deren Kontrolle und Regulation bei der Einfuhr von Textilien aus Drittländern außerhalb der Europäischen Union ist ein erhöhtes Risiko einer Harnblasenkrebs-erkrankung nach Tragen von gefärbter Kleidung nicht zu erwarten. Der Anteil freier, nicht ionisch oder kovalent an die Textilfaser oder Leder gebundener Moleküle des Farbstoffes und verunreinigender aromatischer Amine im Produkt wird darüber hinaus durch Waschen weitgehend beseitigt. Damit entfällt diese Expositions-

quelle zumindest für den Endverbraucher. Untersuchungen zur Klärung eines erhöhten Harnblasenkrebsrisikos in der Textilindustrie sind nicht zu erwarten vor dem Hintergrund des bereits lange bestehenden Verbots des Einsatzes von Azofarbstoffen auf Basis kanzerogener aromatischer Amine.

Bei der Weiterverarbeitung von Farbstoffen ist der Hautkontakt bei den potenziell exponierten Arbeitnehmern in Textilfärbereien bedeutend, während der Gefährdung von Arbeitnehmern über den inhalativen Expositionsweg meist dadurch begegnet wird, dass Farbstoffe von den Herstellern zunehmend nicht mehr in Pulverform sondern als Granulat oder in Lösung der weiterverarbeitenden Industrie angeboten werden. In der Vergangenheit waren hier insbesondere Arbeitnehmer in Färbereien beim Einwiegen und Mischen von Farbstoffpulver sowie beim Färben und Bedrucken der Textilien hohen Expositionen ausgesetzt. Für das Einwiegen und Mischen von Farbstoffen in Pulverform wurden in den USA 8 Stunden-Messungen an entsprechenden Arbeitsplätzen durch die EPA durchgeführt und ergaben Raumluftkonzentrationen im Bereich von 0.007 bis 0.56 mg/m³ [96]. Unter Zuhilfenahme von Modellrechnungen nach dem 'Technical Guidance Document' (TGD) der europäischen Kommission können Expositionen bei verschiedenen Tätigkeiten am Arbeitsplatz abgeschätzt werden [97]. Beim Färben mit pastösen beziehungsweise pulvrigen Farbstoffen beträgt der Schätzwert 1-5 mg/cm² Hautoberfläche/Tag, beim Einwiegen und Mischen bis zu 5 mg/m³ Umgebungsluft/Tag, während die Inhalationsexposition bei Granulatformulierungen vernachlässigbar ist. Vergleicht man letzteren Wert mit den von der US-EPA veröffentlichten gemessenen Konzentrationen, so erkennt man, dass die Berechnung im Simulationsmodell die tatsächlich gemessenen Expositionsdosen überschätzt (5 mg/m³ der EU vs. 0,56 mg/m³ der EPA als höchsten gemessenen Wert). Mit den begrenzten Basisdaten zur Exposition – sowohl auf Basis der Luftwerte als auch der gemessenen Metabolitenkonzentrationen im Harn – kann derzeit das zusätzliche Krebsrisiko für einen Beschäftigten am Arbeitsplatz bei einer Exposition über acht Stunden nicht abgeschätzt werden.

Eine weitere potenzielle Ursache, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln, bei welcher berufliche und außerberufliche Einflüsse verschmelzen, stellt die Verwendung permanenter Haarfarben im **Friseurhandwerk** dar. Seit längerer Zeit wird vermutet, dass Friseure beruflich gegenüber Substanzen exponiert waren, die Krebs erzeugen können. Im Gegensatz dazu wurde der Verdacht für den privaten Gebrauch durch die IARC entkräftigt [98]. Erste Anhaltspunkte bot eine Fall-Kontroll-Studie aus den Jahren 1987- 1996 aus Kalifornien (USA), bei der Patienten mit Harnblasenkrebs und gesunde Personen mittels eines Fragebogens untersucht wurden. Man stellte fest, dass das Risiko für Frauen mit der Dauer und Häufigkeit der Exposition mit permanenten Haarfarben stieg. Das höchste Risiko ergab sich jedoch für die Berufsgruppe der männlichen Friseure und

Barbiere [99]. Spätere Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die Assoziation zwischen einer Blasenkrebserkrankung und dem Gebrauch von Haarfarben besonders bei langsamen Acetylierern ausgeprägt ist [100]. Im Gegensatz dazu ergab eine weitere große Studie der American Cancer Society keinen Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Haarfarben und der Mortalität an Blasenkrebs, wobei vor dem Hintergrund der guten Behandlungsmöglichkeiten für Harnblasenkrebs in frühen Stadien die Erfassung der Mortalität anstelle der Inzidenz eine wesentliche Schwäche der Studie darstellte [101]. Eine europäische Studie fand weder für Friseure noch beim persönlichen Gebrauch von Haarfärbemitteln ein erhöhtes Blasenkrebsrisiko [102, 103]. Diese Meinung vertreten ebenso europäische Hersteller von Haarfarben [104]. Insgesamt ist auf Basis der vorliegenden Studien ein Zusammenhang zwischen einer beruflichen oder privaten Nutzung von permanenten Haarfarben und der Entstehung von Harnblasenkarzinomen nicht gesichert.

3 Erkenntnisse zur Hautgängigkeit von Azofarbstoffen

3.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Der Aufbau der menschlichen Haut ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Die Haut besteht von außen nach innen aus der **(1) Epidermis** (Oberhaut) bestehend aus *Stratum corneum*, *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum*, *Stratum basale* **(2) Dermis** (Lederhaut) bestehend aus *Stratum papillare* und *reticulare* und der darunter liegenden **(3) Subcutis** (Unterhaut). Als zelluläre Bestandteile befinden sich in der Epidermis Keratinozyten und Melanozyten und in der Dermis Fibroblasten, Langerhans Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und Sebozyten. Die Haut bildet eine physikalische und biochemische Barriere gegenüber Fremdstoffen, um eine potenziell gefährliche Absorption und Penetration von Gefahrstoffen zu verhindern. An der Haut stellt die Epidermis – genauer gesagt

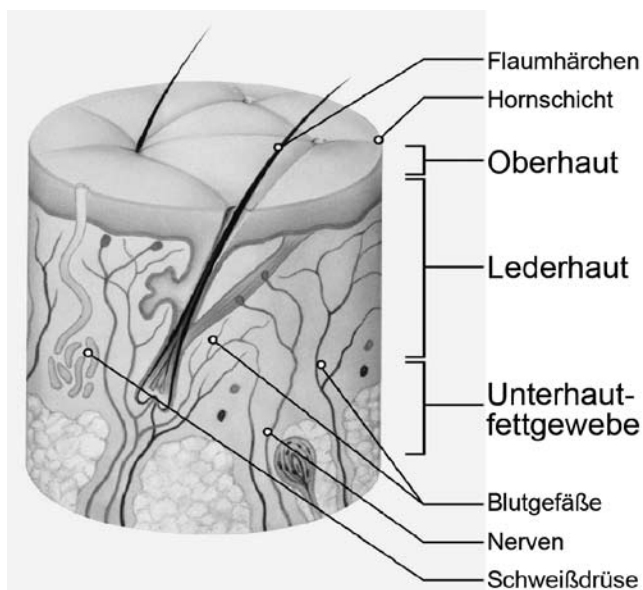


Abbildung 3 Aufbau der menschlichen Haut;

das *Stratum corneum* und das *Stratum granulosum* – die entscheidende Zellschicht für diese Prozesse dar. Des Weiteren gibt es eine zweite Barriere, welche aus fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, Transportproteinen und mit dem Transport assoziierten Proteinen besteht [105]. Zusätzlich gibt es eine lipophile Matrix, die die Diffusion verhindert. Darüber hinaus muss die Mikrozirkulation der Haut berücksichtigt werden, da über Blut- und Lymphgefäße die Ausbreitung potenzieller Fremdstoffe und deren Metabolite aus der Dermis und Subcutis in tiefere Kompartimente erfolgt. Die größte Zahl der bisher durchgeführten Untersuchungen *in vitro* ließen diese Einflüsse außer Acht.

3.2 Transport von Fremdstoffen in die und innerhalb der Haut

Als eigenes Organ besitzt die Haut auch ihr eigenes metabolisierendes und wirkstofftransportierendes System. In ihr sind eine Reihe unterschiedlichster Proteine exprimiert, die am Metabolismus von exogenen und endogenen niedermolekularen Stoffen beteiligt sind (unter anderem Cytochrome P450, CYP450) und mit dem Transport von Fremdstoffen assoziierte Proteine, unter anderem *P*-Glykoproteine (PGPs), weitere multi-drug-resistance Proteine (MRPs) und sogenannte lungenresistente Proteine (LRPs) [106]. Dabei ist die Konzentration dieser Proteine in Keratinozyten größer als in Monozyten, Lymphozyten oder Fibroblasten. Dennoch sollte beim Betrachten des Transportes und der Metabolisierung von Gefahrstoffen das Zusammenspiel aller Zellen in der Haut berücksichtigt werden und keine Beschränkung auf die Keratinozyten beziehungsweise die Epidermis stattfinden. In der Haut befindet sich darüber hinaus das Azoreduktasesystem im Zytosol und im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Der Vorgang der Azospaltung erfolgt dort sehr schnell [107]. Die Cytochrome P450 sind für den oxidativen Abbau zuständig. PGPs sind ATP-abhängige Membranproteine, welche auch den MRPs zugeordnet werden können, da sie verantwortlich für das beschleunigte Entfernen von Stoffen aus der Zelle sind. Eine Expression dieser Proteine liegt nicht nur in der Haut sondern in nahezu jedem Epithelgewebe vor, unter anderem auch im GIT, in der Leber, in der Niere und im Reproduktionssystem. Aufgrund der im Epithel und Endothel meist apikal oder luminalwärts lokalisierten Proteine, wird für sie eine sekretorische und detoxifizierende Funktion vermutet. Die MRP sind vor allem für den Transport zuständig, wobei MRP1 und MRP2 wichtig für den transmembranären Transport von Glutathion-*S*-Konjugaten sind. Letztere können nach Spaltung von Azofarbstoffen in die entsprechenden aromatischen Amine und Glucuronidierung entstehen. Dies ist wichtig für die Elimination dieser Produkte auf zellulärer Ebene. Die Bedeutung von Transportproteinen für die Stabilität und Funktionsfähigkeit der Haut lässt sich auch daran erkennen, dass zum Beispiel Mutationen im *MRP6* Gen das Krankheitsbild des *Pseudoxanthoma elasticum* hervorrufen können. Die Krankheit beeinflusst beziehungsweise zerstört die elastischen Strukturen der Haut [108]. LRPs befinden sich im Zytoplasma und vermitteln einen bidirektionalen Transport zwischen Nukleus und Zytoplasma. Studien haben eine hohe Expression von LRP und in Keratinozyten nachgewiesen und die fehlerhafte Expression dieser Proteine wurde als wichtiges Element bei der Entstehung von Melanomen erkannt [109].

Der Prozess des Transportes von Fremdstoffen über die Haut kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Beide Phasen werden vorrangig durch die genannten Transportproteine beeinflusst, da zunächst ein Transport in die Zelle und im Anschluss wieder

aus ihr heraus erforderlich ist. Die erste Phase ist die Penetration des Stoffes, welcher im Anschluss mittels CYP450 oxidativ verstoffwechselt wird. Im Falle von freigesetzten aromatischen Aminen aus Azofarbstoffen stellt dieser Schritt eine Toxifizierung dar. Im Verlauf dieses Metabolismus kann eine akute Kontaktdermatitis (ACD) die Folge einer allergischen Reaktion auf einen dieser Metaboliten sein [105]. In der zweiten Phase werden die Produkte mittels Epoxidhydrolasen, Transferasen und Reduktasen metabolisiert, so dass diese wasserlöslicher werden und über den Harntrakt aus dem menschlichen Körper eliminiert werden können. Neben den Proteinen, die für den interzellulären Transport von Azofarbstoffen beziehungsweise aromatischen Aminen zuständig sind, wurden zusätzlich auch organische anionische Transportproteine (OATPs) in Keratinozyten gefunden, die für den intrazellulären Transport wichtig sind [105].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wesentliche physiologische Transport und Metabolismusvorgänge in der Haut bekannt sind, diese aber noch nicht im Zusammenhang mit einer spezifischen Exposition gegenüber Azofarbstoffen auf molekularbiologischer Ebene untersucht wurden.

3.3 Metabolische Spaltung von Azofarbstoffen auf der Haut

Die Haut ist mit einer physiologischen bakteriellen Flora besiedelt, die sich gleichfalls in den Haarfollikeln, sowie im Infundibulum der Drüsen befindet. Die Besiedlung variiert altersabhängig über mehrere Zehnerpotenzen zwischen 6×10^2 und $2 \times 10^{11}/\text{cm}^2$. Es lässt sich eine Einteilung in aerobe (Staphylokokken, Mikrokokken) und anaerobe Bakterien (Propionibakterien) vornehmen.

Platzek et al. zeigten in Untersuchungen *in vitro*, dass hydrophile Azofarbstoffe bereits innerhalb von einer Stunde Inkubationszeit von Bakterien der physiologischen Hautflora reduziert werden können. Beim Abbau vom häufig in der Textilindustrie benutzten Direct Blue 14 entsteht dabei unter anderem das potenziell kanzerogene *o*-Tolidin [110]. Ein ähnliches Experiment wurden von Collier et al. durchgeführt [1]. Dabei wurden ebenfalls unterschiedliche und radioaktiv markierte Azofarbstoffe epikutan *in vitro* auf die Haut von behaarten Sencar Mäusen, haarlosen Meerschweinchen und menschlicher Haut appliziert. Es wurde einerseits die Permeabilität, andererseits die Reduktion der Stoffe untersucht. Im Vergleich untereinander ließ sich für den Menschen eine schlechtere Permeabilität dieser Stoffe im Gegensatz zur Haut bei Nagern feststellen. Darüber hinaus wurden Azofarbstoffe mit geladenen Seitengruppen, zum Beispiel Sulfonsäuregruppen, schlechter resorbiert als ungeladene Azofarbstoffe. Am Ende der Versuche verblieben trotz intensiver Waschungen Reste der Azofarbstoffe an der menschlichen Haut. Dies wurde seitens der Autoren mit einer Anhaftung an den Haaren begründet. Genauere Angaben zu

den verwendeten Häuten (Dicke, Haardichte) wurden seitens der Autoren nicht gemacht. Die Untersuchungen zeigten dennoch, dass Azofarbstoffe auf und in der Haut zu hydrophilen Metaboliten umgesetzt werden, die im Anschluss über den Harn ausgeschieden werden können. Einer der wichtigsten Voraussetzungen ist dabei die Löslichkeit des Azofarbstoffes selbst, da die Bakterien zur mikrobiellen Reduktion eine wässrige, das heißt gelöste Form des Azofarbstoffes benötigen. Damit ist die Spaltung in aromatische Amine auf der Haut hauptsächlich für hydrophile Azofarbstoffe und kaum für unlösliche Azopigmente gegeben. Lösliche lipophile Azofarbstoffe werden wie hydrophile Azofarbstoffe ebenfalls über die Haut aufgenommen, jedoch zumeist in unveränderter Form. Die Spaltung in freie, potenziell kanzerogene aromatische Amine findet daher erst innerhalb der Haut oder zu einem späteren Zeitpunkt in der Leber statt. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass bei der Metabolisierung der Azofarbstoffe die zytosolischen und die im endoplasmatischen Retikulum befindlichen Reduktasen beteiligt sind. Im Detail wurde festgestellt, dass zuerst eine Hydroxylierung am Ring im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Anschluss der Diffusion ins Zytosol eine *N*-Acetylierung erfolgte. Die Reduktionsaktivität in den einzelnen Kompartimenten wurde gemessen, wobei Solvent Yellow 7 im Zytosol reduziert und Sudan I im Zytosol und im ER zu gleichen Teilen reduziert wurde. Der lipophile Farbstoff wurde mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei allen Spezies aufgenommen. Die humane Haut war nach 24 Stunden insgesamt am wenigsten durchlässig. Die Aktivität des CYP450 Systems für die erste Hydroxylierungsreaktion war folgendermaßen: Sencar Maus > Meerschweinchen > Mensch. Diese Ergebnisse untermauern die interindividuelle Aktivität des mikrosomalen Systems, die gleichfalls durch Storm et al. festgestellt werden konnte [111]. Es bestand jedoch kein Unterschied innerhalb einer Spezies. Die auch von anderen Autoren festgestellten Einflussfaktoren für die anschließende Reduzierung durch Leberenzyme waren Wasserlöslichkeit und das Vorhandensein von elektronenziehenden Gruppen [112] (siehe auch Kapitel 2.3). Ein weiterer Versuch *in vivo* an Ratten und Kaninchen durch Aldrich et al. mittels zweier radioaktiv markierter Azofarbstoffe zeigte ebenfalls, dass im Anschluss Radioaktivität im Harn gemessen werden konnte. Auch diese Farbstoffe waren dabei nach kutaner Applikation der entsprechenden dermalen Mikroflora ausgesetzt und mussten aufgrund der Messergebnisse in polare und renal ausscheidbare Metabolite umgesetzt worden sein [113].

Eine anaerobe Situation der Haut kann ursächlich dafür sein, dass Prozesse wie eine oxidative Biotransformation und Glykolyse nur limitiert ablaufen können und dafür die Azoreduktion beim Abbau dominiert, wobei freie Radikale gebildet werden [114]. Aufgrund der Ergebnisse von Collier et al. ist jedoch wichtig anzumerken, dass zunächst auch eine Hydroxylierung stattfinden kann, wobei polare Metabolite auf der Haut entstehen sowie in diese diffundieren und erst in der Leber die Azoreduktion zu den freien aromatischen Aminen stattfinden kann. Dies führt dazu, dass im Harn andere aromatische Amine als die

ursprünglich bei der Synthese des Azofarbstoffes eingesetzten Verbindungen auftreten und diese nicht mit den routinemäßig angewandten analytischen Verfahren erfasst werden können. Dies hat zur unmittelbaren Folge, dass ein Nichtnachweis von aromatischen Aminen im Harn nicht gleichzusetzen ist mit einer fehlenden Metabolisierung des Azofarbstoffes zu freien aromatischen Aminen in der Haut oder Leber. Zusammenfassend muss aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass

sowohl hydrophile als auch lipophile Azofarbstoffe über die Haut aufgenommen werden können. Hydrophile Azofarbstoffe werden dabei relativ zu den lipophilen Azofarbstoffen zu einem größeren Anteil bereits auf der Haut bakteriell in aromatische Amine gespalten beziehungsweise zu polaren Metaboliten oxidiert, während lipophile Azofarbstoffe eher unverändert aufgenommen werden und erst in der Haut beziehungsweise Leber verstoffwechselt werden (**Abbildung 4**).

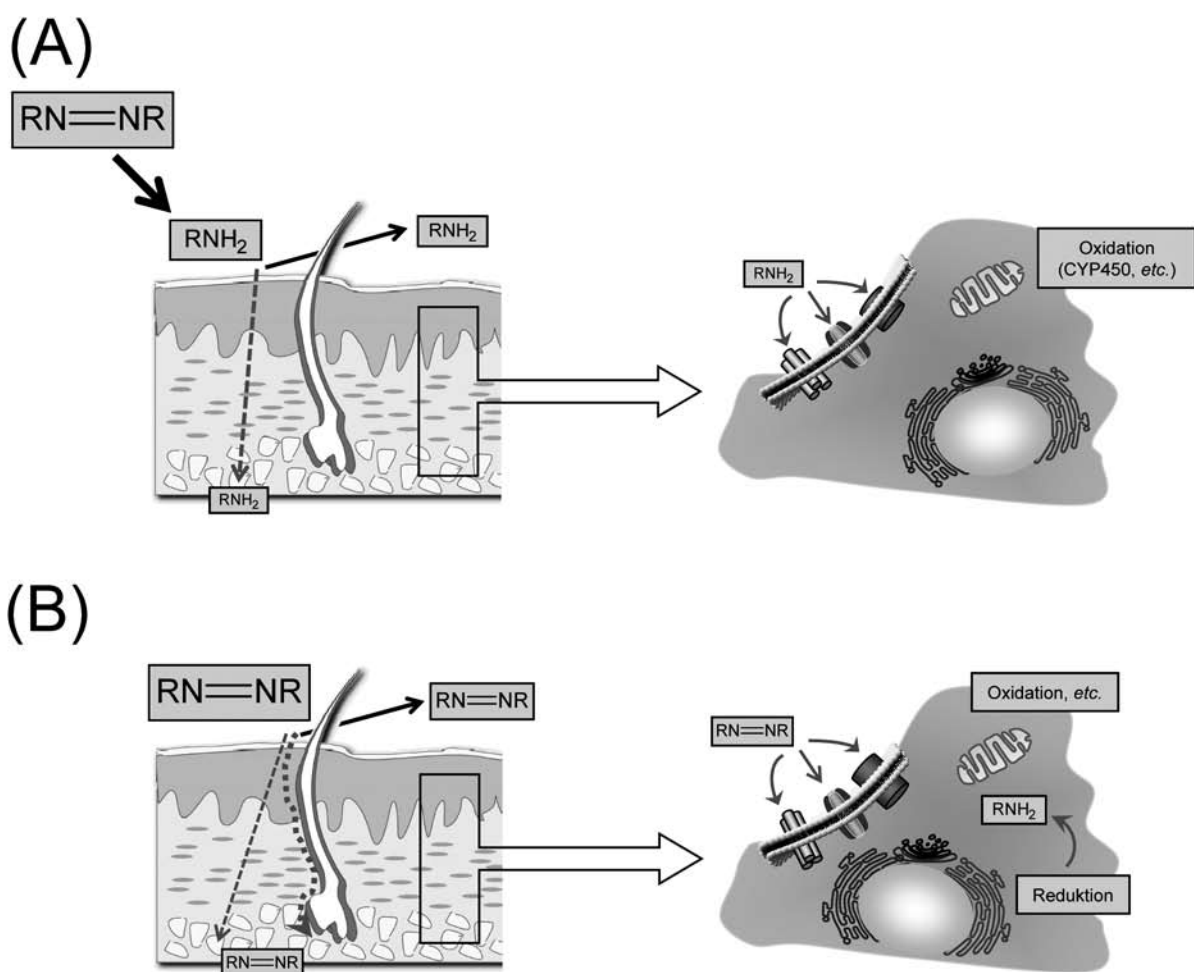


Abbildung 4 Die Abbildung zeigt die Hauptaufnahme- und Metabolismuswege von (A) hydrophilen und (B) lipophilen Azofarbstoffen (vergleiche dazu auch Text in den Kapiteln 3.2 und 3.3).

(A) Hydrophile Azofarbstoffe können bereits auf der Oberfläche der Haut durch die mikrobielle Umgebung in aromatische Amine zersetzt werden. Die freigesetzten aromatischen Amine können über die Haut aufgenommen, das heißt resorbiert werden. Nach dem Transport in die Zelle (zum Beispiel Keratinozyten) findet dort unter anderem im Zytosol oder den Mitochondrien eine Oxidation durch mischfunktionelle Oxidasen (CYP450) u.a. in N-Hydroxylamine und N-Nitrosoverbindungen statt. Analoge Reaktionen finden auch in der Leber statt, wenn das freie aromatische Amin in die tieferen Hautschichten und über den Blutkreislauf dorthin gelangt.

(B) Lipophile Azofarbstoffe werden wie andere fettliebende Substanzen (und im Gegensatz zu hydrophilen Azofarbstoffen) überwiegend unverändert entweder direkt über die Haut oder durch Diffusion an der Haarwurzel entlang aufgenommen. Erst nach dem Transport des unveränderten Farbstoffes in die Zelle (zum Beispiel Keratinozyten) - spätestens jedoch in der Leber - wird unter anderem im Zytosol oder am endoplasmatischen Retikulum der Farbstoff reaktiv in die freien aromatischen Amine gespalten. Erst im Anschluss finden entsprechende Oxidationsreaktionen wie unter (A) beschrieben statt.

Quantitative Aussagen zur Umsetzung sowie zur anschließenden Resorption über die Haut und der Natur der entstehenden Metaboliten können aus den bisher veröffentlichten Resultaten jedoch nicht gezogen werden. Dies muss individuell aufgrund der vorhandenen Datenlage interpretiert werden oder – falls keine Daten vorhanden sind – in experimentellen Arbeiten untersucht werden. Weitere Daten zur Hautgängigkeit von Azofarbstoffen außerhalb des beruflichen Sektors wurden vor allem im Zusammenhang mit einer möglichen Exposition des Endverbrauchers über gefärbte Kleidungsstücke generiert. Die durchschnittliche Konzentration an Farbstoffen (unabhängig von ihrer Natur) in Kleidungsstücken beträgt zwischen 0,25% bei hellen und 3,5% bei dunklen Farbtönen. Bei Reaktivfarbstoffen kann die Konzentration bis zu 9% betragen. Lederprodukte enthalten – je nach Farbton – zwischen 0,5 bis 7,0% Farbstoff [3]. Weiterhin ist die dermale Exposition neben dem Farbstofftyp abhängig vom Textilmaterial, dem Farbstoffgehalt und der Echtheit der Färbung. Eine Exposition des Verbrauchers gegenüber Farbstoffen findet statt, wenn der Farbstoff oder das Pigment vom Substrat auf die Haut migriert. Dies ist vor allem der Fall, wenn es durch Schweiß und Reibung zu einer Elution von Farbstoffen aus körpernah getragenen Textilien kommt. Für die Abschätzung eines eventuell bestehenden Risikopotenzials ist es daher maßgeblich, ob das betreffende Kleidungsstück hautnah oder hautfern getragen wird. Versuche auf Schweißechtheit von gefärbten Textilien sowie die Bestimmung von Migrationsfaktoren im Tragesimulator wurden durch Platzek et al. durchgeführt, um Anhaltspunkte für realistische dermale Expositionsdosen zu erhalten. Mit einer dermalen Exposition von 1-10 µg/kg wird eine Belastung des Menschen von 1 mg/d angenommen [110]. Zudem werden Farbstoffe auf Basis von aromatischen Aminen aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften leichter über die Haut aufgenommen als andere Farbstoffe. Durch die 'Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers' (ETAD) wurde aus der freigesetzten Farbstoffmenge die dermale Exposition abgeschätzt. Sie betrug bis zu 0,7 µg/cm² bei einer Freisetzungsrate von 0,4 mg/Trageereignis und einem Migrationsfaktor von 0,18% [115]. In einem dynamischen Hautmodell ergaben sich Werte der dermalen Exposition bis zu 1,1 µg/cm². Das Waschmodell zur Simulation der Aufnahme von Farbstoffen aus mehrfach getragener und gereinigter Kleidung zeigte eine Abnahme der Freisetzung bei Zunahme der Waschprozeduren. Eine Betrachtung auf molarer Ebene ergab, dass zwischen 9 und 13% der freigesetzten Menge von der Mischflora der Haut umgesetzt wird [11]. Insgesamt hängt das Ausmaß der Hautpenetration von den chemisch-physikalischen Eigenschaften, unter anderem der Molekülgröße, -form, -ladung und dem Löslichkeitsverhalten des Farbstoffes ab. Farbstoffe in Ionenform können nach von der ETAD beauftragten Messungen die Hautbarriere um Zehnerpotenzen weniger gut überwinden als ungeladene Moleküle. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit denjenigen von Collier et al. [1]. Bei der Annahme einer 100-prozentigen Hautresorption (100-facher Wert der als realistisch angenommenen maximalen Durchdringungsrate) ergäbe

sich aus den von der ETAD erhobenen Freisetzungsraten eine innere Belastung von ca. 0,01 bis 7 µg Farbstoff/kg Körpergewicht pro Trageereignis. Aus dieser Farbstoffdosis könnte im ungünstigsten Fall eine quantitative (=100-prozentige) Spaltung zu aromatischen Aminen resultieren. Dies ist jedoch aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Metaboliten von Azofarbstoffen sehr unwahrscheinlich. Schätzungen zufolge beträgt die Rate der tatsächlich abgespaltenen Amine 25 bis 30% [116]. Der Arbeitskreis „Textilien“ des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin geht aufgrund der bisherigen Erkenntnisse bei Farbstoffen von einem mittleren Freisetzungsgrad von 0.1% pro Tag aus [117]. Trotz der insgesamt niedrigen Permeations- und Metabolisierungsraten ist die Forderung nach einem Einsatzverzicht von Azofarbstoffen verbreiteter Bestandteil der Lieferbedingungen von Bekleidungsherstellern, unabhängig von den Anforderungen an besondere Öko-Standards. Zusätzlich wird eine Wasch-, Wasser-, Reib-, Schweiß- beziehungsweise Speichellechtheit (insbesondere für Säuglingstextilien) gefordert.

Die möglichen Gefährdungen und Risiken durch die Verwendung von Azofarbstoffen in Kosmetikprodukten sind im Gegensatz zu Textilien nicht untersucht, wobei aufgrund der häufigen Verwendung von Make-up bei TV-Moderatoren die Verwendung von Azofarbstoffen in Kosmetika verdächtigt wurde, für die festgestellten höheren DNA-Schäden und Reproduktionseinschränkungen bei weiblichen Beschäftigten verantwortlich zu sein [118]. Die Aussagen waren jedoch hoch spekulativ und konnten nicht weiter verifiziert werden. Es ist anzumerken, dass derzeit in der Kosmetikverordnung keine Azofarbstoffe auf Basis kanzerogener aromatischer Amine Anwendung in Deutschland finden. Es liegen keine Daten zu den Gehalten in Importen aus der Europäischen Union oder außereuropäischen Staaten vor. Vereinzelt werden Azopigmente in Tattoos eingesetzt. Diese Pigmente können bei der laserchirurgischen Entfernung zu freien aromatischen Aminen zersetzt werden [119, 120].

3.4 Beschleunigte Aufnahme durch Lösungsmittel-Koexposition

Kofaktoren, zum Beispiel die Beschleunigung einer Permeation von Azofarbstoffen im Beisein anderer Substanzen oder spezifischer Hauteigenschaften ist wenig untersucht. Sasaki et al. stellten an Rattenhaut *in vitro* fest, dass es durchaus einen „beschleunigenden“ ('enhancing') Effekt bei dem transdermalen Transport verschiedener Azofarbstoffe gibt, unter anderem bei Sudan III, einem wasserlöslichen Azofarbstoff [121]. Inwiefern die Kofaktoren dabei den Transport des unveränderten Azofarbstoffes oder seiner auf der Haut entstandenen Stoffwechselprodukte unterstützte wurde von den Autoren nicht untersucht. Farbpigmente können aufgrund ihrer geringen Löslichkeit als biologisch inert angesehen werden, so dass sie dermal nicht beziehungsweise nur in vernachlässigbar geringen Konzentrationen resorbiert werden. Während Farbstoffe mittels

einer über Schweiß- oder bei Säuglingen speichelinduzierten Elution freigesetzt und resorbiert werden können, ist dieser Mechanismus für Pigmente nicht relevant. Zwischenprodukte aus dem Metabolismus oder Verunreinigungen (zum Beispiel Monoazoverbindungen) können löslich sein und mittels Lösungsmitteln besser resorbiert werden. Die verschiedenen Lösemittel humanen (Speichel, Schweiß) beziehungsweise ´synthetischen´ Ursprungs (Körperpflegeprodukte und die in ihnen enthaltenen Lösemittel-, Duft- und Konservierungsstoffe) sollten jedoch in Zukunft näher untersucht werden und zwar spezifisch für diejenigen Azofarbstoffe, die derzeit noch Anwendung in Lebensmitteln, Kosmetika und Bedarfsgegenständen finden. Dies sollte unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Einflusses der Hautgesundheit beziehungsweise Hautschädigung durchgeführt werden.

3.5 Experimentelle Ansätze zur Ermittlung der Hautgängigkeit

Es wurden in den letzten Jahren mehrere neue Techniken für *in vitro* als auch *in vivo* Studien zur Penetration und Metabolismus von Fremdstoffen in der Haut entwickelt. Auf der Grundlage des von Bronaugh et al. entwickelten flow-through-diffusion Modells der Haut [122, 123], konnten Storm et al. ihre Untersuchungen *ex vivo* an der behaarten Haut der Sencar Maus, der unbehaarten Haut des Meerschweinchens und des Menschen durchführen [111]. Fuchs et al. benutzten eine Penetrationskammer (LG-1083), welche es ihnen ermöglichte, eine Dermisfläche von 0,785 cm² gegenüber 3,2 mL Flüssigkeit zu exponieren [114]. Ziel hierbei ist die Quantifizierung des Transfers durch die Haut unter Gebrauchsbedingungen. Dabei wird empfohlen, menschliche Haut oder Schweinehaut zu verwenden. Neben der durch die Haut in eine Rezeptorflüssigkeit penetrierten Menge, wird auch der Substanzanteil als potenziell systemisch verfügbar und damit resorbierbar angesehen, der in der Epidermis und Dermis vorgefunden wird. Nur die Substanzanteile im *Stratum corneum* werden als nicht resorbiert betrachtet. Für Haarfarben wird empfohlen, die Hautresorption mit 2-5 mg/cm² zu untersuchen. Im Falle von Permanenthaarfarben sind 20 mg/cm² zu untersuchen, wobei die für die Anwendung typische Kontaktzeit gewählt werden sollte. Im Falle der Haarfarben wird von 590 cm² exponierter Fläche ausgegangen.

Anstelle echter Haut in Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* wurden durch Höller et al. auch sogenannte Hautäquivalente aus autologen Keratinozyten (unter anderem aus Haarfollikeln gezüchtet), Fibroblasten und angereicherten Zellkulturmedien hergestellt. Erste histologische und immunfluoreszenzchemische Untersuchungen bestätigten die Annahme, dass diese synthetisch hergestellten Hautäquivalente der humanen Haut sehr ähnlich sind [124]. Diese Ergebnisse schaffen damit die Grundlage für die Herstellung von Allografts der Haut. Es sind viele Variationen möglich, die es erlauben – je nach zu Grunde

liegender Fragestellung oder Hypothese – verschiedene Zellen einsetzen, zum Beispiel kann die azelluläre Dermis von Schweinen oder Menschen genommen sowie Keratinozyten oder Fibroblasten aus der Zellkultur hinzugefügt werden [125, 126]. Yang et al. untersuchten an einem derartigen Modell die Produktion von mehreren proinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel IL-1 α , um so das toxische Potenzial von Chemikalien einzuordnen [127]. Ein Vorteil dieser Hautmodelle ist, dass sie für akute Zytotoxizitätstests angewendet werden können, bevor entsprechende chronische Versuche im Niedrigdosisbereich am Tiermodell stattfinden. Somit können auch unnötige Tierversuche vermieden werden.

Die bisherigen 2D Hautmodelle wurden auf ihre Anwendung *in vivo* ausgeweitet. Viele Arbeitsgruppen bedienen sich einer chorioallantoischen Membran oder einer Rückenkammer in der Hautfalte für die Untersuchung ihrer individuell zusammengestellten Allograft Konstrukte [128]. Die Versuche werden meist an der Maus, Ratte oder am Hamster durchgeführt, wobei der Versuchsaufbau an letzterer Spezies bereits 1980 durch Endrich et al. beschrieben wurde und seit fast 30 Jahren in Gebrauch ist [129]. Hierzu werden Titankammern chirurgisch implantiert und besitzen ein Fenster, so dass ausgewählte Hautareale *in vivo* unter Verwendung unterschiedlicher Fragestellungen gezielt im Tierversuch untersucht werden können. Eine weitere 3D Kammer wurde durch Eriksson et al. etabliert, in welcher vor allem die lokale Applikation von Fremdstoffen *in vivo* durchgeführt werden konnte. Die transparenten, runden und flexiblen Eigenschaften der Kammer begünstigen dabei die Untersuchung [130]. Bei den 3D Verfahren stellt darüber hinaus weiterhin die kutane Mikrodialyse eine Möglichkeit dar, minimalinvasiv die Konzentration im Extrazellulärraum der Dermis an Mensch und Tier zu messen [131]. So konnte unter anderem die perkutane Absorption von 4-Chloranilin an der Ratte getestet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass dieser Stoff die Haut penetriert und in den systemischen Kreislauf gelangen kann. Zugleich wird er teilweise bei der Passage durch die Haut zu 4-Chloracetanilid metabolisiert [132]. Als wichtigste nichtinvasive Methode am Menschen lässt sich jedoch der transepidermale Wasserverlust (TEWL) zur Messung der Barrierefunktion der Haut durchführen. Der TEWL kann als indirekte Messung benutzt werden, um Hautirritationen zu untersuchen, die zum Beispiel durch physikalisch und chemische Effekte hervorgerufen werden und eine Erhöhung der TEWL zur Folge haben [133]. Er ist ein wichtiger Indikator für den Zustand der Haut. Andererseits lassen sich mit ihm keine Rückschlüsse über das Migrationsverhalten und den Hautmetabolismus von Fremdstoffen ziehen.

4 Schlussfolgerungen

In Deutschland sind die Verwendung und das Inverkehrbringen von Azofarbstoffen im Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände sowie im Futtermittelgesetzbuch und der Kosmetikverordnung geregelt. Die Richtlinien sind strikt und verbieten die Verwendung sowie das Inverkehrbringen gefärbter Gebrauchs- und Lebensmittelerzeugnisse auf Basis von derzeit 22 aromatischen Aminen einschließlich derjenigen, die erwiesenermaßen als Humankarzinogene und karzinogen im Tierversuch eingestuft sind. Außerdem gibt die EU-Richtlinie eine Obergrenze von 30 ppm für die Freisetzung potenziell krebserzeugender aromatischer Amine aus Azofarbstoffen an. Die gleichen Rahmenbedingungen gelten für neu synthetisierte Azofarbstoffe, die vor ihrer Marktzulassung gemäß Anhang VII der EU Richtlinie 67/548/EWG auf Mutagenität und Karzinogenität mittels *in-vitro* Nachweisverfahren getestet werden müssen. Vor dem Hintergrund dieser Verbotsregelungen, strikten Kontrollen und auch des freiwilligen Verzichts vieler Hersteller auf die Verwendung von Azofarbstoffen auf Basis karzinogener Amine (unter anderem auch der Druck- und Textilindustrie) mit Beginn der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts sowie einer Latenzzeit von bis zu 40 Jahren bei Harnblasenkrebs ist in Zukunft aus retrospektiver Sicht mit keinem wesentlichen Anstieg an azofarbstoffinduzierten Harnblasenkrebs zu rechnen. Dies schließt das vereinzelte Auftreten derartiger Fälle jedoch nicht kategorisch aus. Dieses gilt vor allem für diejenigen Bereiche, in denen Restaurationsarbeiten an Gebrauchsgegenständen durchgeführt wurden, die vormals mit Azofarbstoffen (vor allem denjenigen mit karzinogenen aromatischen Aminbestandteilen) behandelt wurden. In diesen Fällen bedarf es einer individuellen Betrachtung in Abhängigkeit des verwendeten Farbstoffes, dessen Verunreinigung mit dem unveränderten aromatischen Amin, der Dauer der Tätigkeiten sowie insbesondere der Arbeitsplatzbedingungen mit besonderem Schwerpunkt auf der Untersuchung der unter diesen Bedingungen potenziell vorherrschenden Aufnahmewege. Dabei ist neben der Inhalation von Stäuben auch die Aufnahme über die Haut zu berücksichtigen, insbesondere der ungeschützte Kontakt mit hydrophilen wie lipophilen Azofarbstoffen, da diese über die Haut aufgenommen werden können beziehungsweise bereits auf der Haut durch bakterielle Spaltung in die entsprechenden Amine überführt werden können. Quantitative Aussagen zur Umsetzung sowie zur anschließenden Resorption der aromatischen Amine über die Haut und der Natur der entstehenden Metaboliten können dabei nur individuell getroffen werden. Dazu muss entweder die zur Verfügung stehende Literatur für den entsprechenden Azofarbstoff ausgewertet und auf den spezifischen Fall angewandt werden oder – falls diese Daten nicht vorhanden sind – orientierende experimentelle Untersuchungen im Labor durchgeführt werden. Hierzu kann angemerkt werden, dass wesentliche Verfahren zu einer ersten Evaluierung der Hautgängigkeit von Azofarbstoffen und aromatischen Aminen sowohl *in vitro* (zum Beispiel Franz-Kammer) als auch *in vivo* (zum Beispiel Mikrodialyse) bekannt sind, diese aber – bis auf wenige Ausnahmen mit aromatischen Aminen (134, 135) – noch nicht auf Azofarbstoffe angewandt wurden. Ähnliches gilt für die phy-

siologischen Prozesse des Transportes und der Metabolisierung von Azofarbstoffen in der Haut. Die wesentlichen Transport- und Metabolismusvorgänge in der Haut sind bekannt, wurden aber noch nicht im Zusammenhang mit einer spezifischen Exposition gegenüber Azofarbstoffen auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Insgesamt wird das Ausmaß der durchzuführenden Untersuchungen und des Forschungsbedarfes in Zukunft sich aus präventionsmedizinischer Sicht auf diejenigen Azofarbstoffe fokussieren müssen, für die heutzutage noch eine Exposition angenommen werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

2-NA	2-Naphthylamin
4-ABP	4-Aminobiphenyl
ACD	Allergische Kontaktdermatitis
ATP	Adenosintriphosphat
Bz	Benzidin
CI	Colour Index
WHO	World Health Organization
O ₂	Sauerstoff
CO	Kohlenmonoxid
CYP450	Cytochrom P450 Monooxygenase-System
Bz	Benzidin
DCB	3,3'-Dichlorbenzidin
DMB	3,3'-Dimethylbenzidin
DMoxB	3,3'-Dimethoxybenzidin
EG	Europäische Gemeinschaft
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETAD	Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
GIT	Gastrointestinaltrakt
GST	Glutathion-S-Transferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgE	Immunoglobulin E
Da	Dalton
LLNA	ˆLocal Lymph Node Assayˆ
LRPs	Lungenresistente Proteine
MEST	ˆMouse Ear Swelling Testˆ
MRPs	Multi-drug-Resistance Proteine
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NADH	reduziertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NAT	N-Acetyltransferase
OATPs	Organische Anionische Transportproteine
PGPs	P-Glykoproteine
TEWL	Transepidermale Wasserverlust

Literatur

1. Collier SW et al., Reduction of azo dyes during *in vitro* percutaneous absorption, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118: 73-79 (1993).
2. Levine WG et al., Multiple mechanisms in hepatic microsomal azoreduction, *Xenobiotica* 22: 1111-1120 (1992).
3. Häusler G et al., Azofarbstoffe in Leder und Textilien. R-159 Reports alte Serie, Band 159 (1999).
4. Combes RD und Haveland-Smith RB, A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes, *Mutat. Res.* 98: 101-248 (1982).
5. Allman R, *The Chemistry of the Hydrazo, Azo, and Azoxy Groups, Structural Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 23-52 (1975).
6. Clark NG, *The Shapes of Molecules*, Murray Publishers (1977).
7. Happer DAR und Vaughan J, *The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups, Part I. Directing and activating effects*, Wiley VCH, Weinheim, 225-258 (1975).
8. Reisch MS, Asian textile dyes makers are a growing power in a changing market. *Chem. Eng. News*, 10-12 (1996).
9. Chung KT und Cerniglia CE, Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships, *Mutat. Res.* 277: 201-20 (1992).
10. Platzek T, *Cosmetic colorants. Toxicology and Regulation*, BGG 48: 76-83 (2005).
11. Platzek T, *Textilfarbstoffe – Regulation und experimentelle Studien. Ein Beitrag zu Exposition, Metabolismus und Allergien*, BGG 44: 695-704 (2001).
12. *Jahresbericht 2005, Überwachung von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen, Kosmetika und Futtermitteln*. Ministerium für Ernährung und ländlichen Raum (2005).
13. 2005/402/EG, Entscheidung der Kommission vom 23. Mai 2005 über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich Chilis, Chilierzugnissen, Kurkuma und Palmöl (2005).
14. Richtlinie 2002/61/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 19. Juli 2002 zur 19. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates betreffend Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Azofarbstoffe), *ABl. Nr. L 243*: 15 (2002).
15. Prival MJ und Mitchell VD, Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9, *Mutat. Res.* 97: 103-116 (1982).
16. Radomski JL und Mellinger TJ, The absorption, fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes, FD&C Red No. 2, FD&C Red No. 4, and FD&C Yellow No. 6, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 136: 259-266 (1962).
17. Huang MT et al., Rat liver cytosolic azoreductase: purification and characterization, *J. Biol. Chem.* 254: 3930-3934 (1979).
18. Brown MA und DeVito SC, Predicting azo dye toxicity, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 23: 249-324 (1993).
19. Manning BW et al., Metabolism of the benzidine-based azo dye Direct Black 38 by human intestinal microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 10-15 (1985).
20. Martin CN und Kennelly JC, Rat liver microsomal azoreductase activity on four azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethylbenzidine or 3,3'-dimethoxybenzidine, *Carcinogenesis* 2: 307-32 (1981).
21. Zbaida S et al., Studies on the mechanism of reduction of azo dye carcinogens by rat liver microsomal cytochrome P-450, *Chem. Biol. Interact.* 69: 61-71 (1989).
22. Zbaida S und Levine WG, Characteristics of two classes of azo dye reductase activity associated with rat liver microsomal cytochrome P450, *Biochem. Pharmacol.* 40: 2415-2423 (1990).
23. Lubet RA, Biological effects of the Sudan dyes. Role of the Ah cytosolic receptor, *Biochem Pharmacol.* 32: 3053-3058 (1983).
24. Bos RP, Metabolism of benzidine-based dyes and the appearance of mutagenic metabolites in urine of rats after oral or intraperitoneal administration, *Toxicology* 31: 271-282 (1984).
25. Chung KT et al., Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes, *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 558-562 (1978).
26. Chung KT et al., The reduction of azo dyes by the intestinal microflora, *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 175-190 (1992).
27. Chung KT et al., The mutagenicity of methyl orange and metabolites produced by intestinal anaerobes, *Mutat. Res.* 58: 375-379 (1978).

28. Cerniglia CE, Metabolism of benzidine and benzidine-congener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacterium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1224-1229 (1982).
29. Cerniglia CE, Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethyl-benzidine and 3,3'-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria, *Carcinogenesis* 3: 1255-1260 (1982).
30. Wilkins TD, Microbiological Considerations in Interpretation of Data Obtained With Experimental Animals, Banbury report 7, *Gastrointestinal Cancer: Endogenous Factors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 3-9 (1981).
31. Ryan AJ et al., Bacterial azo reduction: a metabolic reaction in mammals, *Nature* 219: 854-855 (1968).
32. Huang MT, Rat liver cytosolic azoreductase. Electron transport properties and the mechanism of dicumarol inhibition of the purified enzyme, *J. Biol. Chem.* 254: 11223-11227 (1979).
33. Mueller GC und Miller JA, The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazo-benzene by rat liver: reactivation of carbon dioxide-treated homogenates by riboflavin-adenine dinucleotide, *J. Biol. Chem.* 185: 145-154 (1950).
34. Fouts JR et al., Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 120: 291-300 (1957).
35. Juchau MR et al., Studies on reduction of azo-linkages in human placental homogenates, *Biochem. Pharmacol.* 17: 1969-1979 (1968).
36. Pannatier A, The skin as a drug-metabolizing organ, *Drug Metab. Rev.* 8: 319-343 (1978).
37. Rettie AE, Major differences between lung, skin and liver in the microsomal metabolism of homologous series of resorufin and coumarin ethers, *Biochem. Pharmacol.* 35: 3495-3500 (1986).
38. Moll RA, Die Toxikologie von Textilfarbstoffen, Sind farbige Textilien gesundheitlich unbedenklich? *Melliand Textilberichte* 10: 836-840 (1991).
39. Shaw IC, Risk assessment for diazo textile dyes – The risk of cancer caused by textiles and leather goods coloured with azo-dyes – A study for European Commission Directorate-General III (1997).
40. Inomata N, Multiple chemical sensitivities following intolerance to azo dye in sweets in a 5-year-old girl, *Allergol. Int.* 55: 203-205 (2006).
41. Hatch KL und Maibach HI, Textile dye dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 32: 631-639 (1995).
42. Seidenari S, Sensitization to disperse dyes in a patch test population over a five-year period, *Am. J. Contact Dermat.* 13: 101-107 (2002).
43. Pratt M und Taraska V, Disperse blue dyes 106 and 124 are common causes of textile dermatitis and should serve as screening allergens for this condition, *Am. J. Contact Dermat.* 11: 30-41 (2000).
44. Hausen BM, Contact allergy to disperse blue 106 and blue 124 in black „velvet“ clothes, *Contact Dermatitis* 28: 169-173 (1993).
45. Bauer A et al., Contact allergy to textile dyes, *Akt. Dermatol.* 30: 23-27 (2004).
46. Sailstad DM, Evaluation of an azo and two anthraquinone dyes for allergic potential, *Fundam. Appl. Toxicol.* 23: 569-577 (1994).
47. Kimber I et al., Thresholds of contact sensitization from disperse dyes in textiles, *Contact Dermatitis* 52: 295 (2005).
48. Kawakubo Y et al., N-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 150-155 (2000).
49. Basketter DA et al., The role of P4501A in the activation of prohapten in skin sensitization, *J. Invest. Dermatol.* 106: 915 (1996).
50. Sieben S et al., Characterization of T-cell responses to fragrances, an investigation of T-cell responses to fragrances using peripheral blood, mononuclear cells and T-cells from skin lesions of fragrance-allergic patients, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172: 172-178 (2001).
51. European and E.I. Commission Joint Research Centre, European Chemicals Bureau, Danish Environmental Protection Agency, 2nd Workshop on Risk Assessment, Theory and Practice on Human Health; Copenhagen 28.-29, (1997).
52. Betts CJ, Potency and risk assessment of a skin-sensitizing disperse dye using the local lymph node assay, *Contact Dermatitis* 52: 268-272 (2005).

53. Stahlmann R, Sensitizing potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay, *Toxicology* 219: 113-123 (2006).
54. Ehling G, An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 1st round, *Toxicology* 212: 60-68 (2005).
55. Ehling G, An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 2nd round, *Toxicology* 212: 69-79 (2005).
56. Rehn L, Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern, *Arch. Klin. Chir.* 5: 588-600 (1895).
57. Boeniger M, Carcinogenicity and Metabolism of Azo Dyes, Especially those Derived from Benzidine, Technical Report No. 80-119, 88 (1980).
58. Leuschner F, Carcinogenicity studies on different diarylide yellow pigments in mice and rats, *Toxicol. Lett.* 2: 253-260 (1978).
59. Sagelsdorff P et al., Lack of bioavailability of dichlorobenzidine from diarylide azo pigments: molecular dosimetry for hemoglobin and DNA adducts, *Carcinogenesis* 17: 507-514 (1996).
60. Gerarde HW, Industrial experience with 3,3'-Dichlorobenzidine: an epidemiological study of a chemical manufacturing plant, *J. Occup. Med.* 16: 322-344 (1974).
61. MacIntyre I, Experience of tumors in a British plant handling 3,3'-dichlorobenzidine, *J. Occup. Med.* 17: 23-26 (1975).
62. NCI/NIH, Bioassay of diarylanilide yellow 12 for possible carcinogenicity, Publication No. 78-830 (1978).
63. Nony CR, Metabolism studies of an azo dye and pigment in the hamster based on analysis of the urine for potentially carcinogenic aromatic amine metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 4: 132-140 (1980).
64. Martelli A, DNA damage induced by 3,3'-dimethoxybenzidine in liver and urinary bladder cells of rats and humans, *Toxicol. Sci.* 53: 71-76 (2000).
65. Golka K et al., The causes of urinary bladder cancer and possibilities of prevention, *Urologe A* 45: 361-368 (2006).
66. Akiyama T, The Investigation on the manufacturing plant of organic pigment, *Jikei. Med. J.* 17: 1-9 (1970).
67. Mondino A, Absence of dichlorobenzidine in the urine of rats, rabbits and monkeys treated with C.I. pigment yellow 13, *Med. Lav.* 69: 693-697 (1978).
68. Hatfield TR, Urine monitoring of textile workers exposed to dichlorobenzidine-derived pigments, *J. Occup. Med.* 24: 656-658 (1982).
69. Case RAM et al., Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry, *Br. J. Ind. Med.* 11: 75-104 (1954).
70. Yoshida O et al., Bladder cancer in workers of the dyeing industry, *Igaku No Ayumi* 79: 421-422 (1971).
71. Yoshida O, *Jpn. J. Urol.* 64: 707 (1973).
72. Lowry LK, Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes, *Toxicol. Lett.* 7: 29-36 (1980).
73. Dewan A et al., Benzidine and its acetylated metabolites in the urine of workers exposed to Direct Black 38, *Arch. Environ. Health* 43: 269-272 (1988).
74. Bi W et al., Mortality and incidence of bladder cancer in benzidine-exposed workers in China, *Am. J. Ind. Med.* 21: 481-489 (1992).
75. Chen R und Seaton A, A Meta-analysis of painting exposure and cancer mortality. *Cancer Detect Prev.* 22: 53353-53359 (1998).
76. Steenland K und Palu S, Cohort mortality study of 57 000 painters and other Union members: a 15 year update, *Occup. Environ. Med.* 56: 315-21 (1999).
77. Claude J et al., Occupation and risk of cancer of the lower urinary tract among men. A case-control study, *Int. J. Cancer* 41: 371-379 (1988).
78. Hayes RB, *N*-acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers, *Carcinogenesis* 14: 675-678 (1993).
79. Golka K et al., *N*-acetyltransferase 2 and glutathione-*S*-transferase μ (GSTM1) in bladder cancer patients in an area of former coal, iron and steel industries, *Toxicol. Lett.* 88: 17 (1996).
80. Golka K, *N*-Acetyltransferase 2 (NAT2) and glutathione-*S*-transferase micro (GSTM1) in bladder-cancer patients in a highly industrialized area, *Int. J. Occup. Environ. Health* 3: 105-110 (1997).

81. Golka K, Occupational and non-occupational risk factors in bladder cancer patients in an industrialized area located in former East-Germany, *Aktuelle Urol.* 36: 417-422 (2005).
82. Golka K et al., Elevated bladder cancer risk and occupational exposure to azo dyes, *Toxicol. Lett.*, 95 (Suppl. 1): 90 (1998).
83. Myslak ZW et al., Tumors of the urinary bladder in painters: A case-control study, *Am. J. Ind. Med.* 19: 705-713 (1991).
84. Bethwaite P et al., Cancer risks in painters: study based on the New Zealand Cancer Registry, *Br. J. Ind. Med.* 47: 742-746 (1990).
85. Golka K, *N*-acetyltransferase 2 phenotype in painters with bladder cancer and controls, *Ann. Acad. Med. Singapore* 30: 464-467 (2001).
86. Lin GF et al., Dependence of p53 protein expression on GSTM1 and GSTT1 polymorphism in benzidine-exposed workers of the Shanghai dye industry, *Arch. Toxicol.* 75: 544-548 (2001).
87. Lin GF, An association of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C802T (His268Tyr) polymorphism with bladder cancer in benzidine-exposed workers in China, *Toxicol. Sci.* 85: 502-506 (2005).
88. Myslak ZW und Bolt HM, Berufliche Exposition gegenüber Azofarbstoffen und Harnblasenkarzinom-Risiko, *Zbl. Arbeitsmed.* 38: 310-321 (1988).
89. Reza Najem G et al., Life-time occupation, smoking, caffeine, saccharine, hair dyes and bladder carcinogenesis, *Int. J. Epidemiol.* 11: 212-217 (1982).
90. Meigs JW et al., Bladder tumor incidence among workers exposed to benzidine: a thirty-year follow-up, *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 1-8 (1986).
91. Vineis P und Magnani C, Occupation and bladder cancer in males: a case-control study, *Int. J. Cancer* 35: 599-606 (1985).
92. Schoenberg JB et al., Case-control study of bladder cancer in New Jersey. I. Occupational exposures in white males, *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 973-981 (1984).
93. Gaertner RR et al., A case-control study of occupational risk factors for bladder cancer in Canada, *Cancer Causes Control* 15: 1007-1019 (2004).
94. Verband der Druckfarbenindustrie im Verband der Mineralfarbenindustrie. Ausschlussliste für Druckfarben und zugehörige Produkte (2006), 4. überarbeitete Ausgabe, ersetzt die Ausgaben von 2001 und 1995
95. Bundesgesetzblatt Teil I, Fünfte Verordnung zur Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung, 796 (1997).
96. U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Office of Toxic Substances, Textile Dye Weighing Monitoring Study, EPA Report No. 560/5-90-009 (1990).
97. ECSC-EC-EAEC, Technical Guidance Document (TGD) in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing Substances, Parts I-IV (1996).
98. IARC, Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants, some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* 57, WHO, Lyon (1993).
99. Gago-Dominguez M, Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk, *Int. J. Cancer* 91: 575-579 (2001).
100. Gago-Dominguez M, Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P4501A2 and *N*-acetyltransferases 1 and 2, *Carcinogenesis* 24: 483-489 (2003).
101. Henley SJ und Thun MJ, Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk, *Int. J. Cancer* 94: 903-906 (2001).
102. Kogevinas M, Occupation and bladder cancer among men in Western Europe, *Cancer Causes Control* 14: 907-914 (2003).
103. Czene K et al., Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels, *Int. J. Cancer* 105: 108-112 (2003).
104. Nohynek GJ, Toxicity and human health risk of hair dyes, *Food Chem. Toxicol.* 42: 517-543 (2004).
105. Baron JM und Merk HF, Drug metabolism in the skin, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 1: 287-291 (2001).
106. Baron JM, Expression of multiple cytochrome P450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 116: 541-548 (2001).

107. Collier SW et al., Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118: 73-79 (1993).
108. Schulz V et al., Novel mutations in the ABCC6 gene of German patients with pseudoxanthoma elasticum, *Hum. Biol.* 77: 367-384 (2005).
109. Schadendorf D et al., Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma, *Am. J. Pathol.* 147: 1545-1552 (1995).
110. Platzek T, Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria *in vitro*, *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 552-559 (1999).
111. Storm JE, Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity, *Fundam. Appl. Toxicol.* 15: 132-141 (1990).
112. Shargel L et al., Relationship between azo dye structure and rat hepatic azoreductase activity, *J. Pharm. Sci.* 73: p. 161-164 (1984).
113. Aldrich FD et al., Excretion of radioactivity from rats and rabbits following cutaneous application of two ¹⁴C-labeled azo dyes, *J. Toxicol. Environ. Health* 18: 347- 355 (1986).
114. Fuchs J et al., Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates, *J. Invest. Dermatol.* 93: 633-640 (1989).
115. Anliker R und Steinle D, Prevention of risks in the use and handling of colorants, *JSDC* 104: 377-384 (1988).
116. LCG, The risk of cancer caused by textiles and leather goods coloured with azo-dyes, a study for European Commission Directorate-General III (1997).
117. Platzek T, Wie groß ist die gesundheitliche Gefährdung von Textilien wirklich? *Melliand Textilberichte Sonderdruck* (1996).
118. Kucerova M et al., The possible mutagenic effect of the occupation of TV announcer, *Mutat. Res.* 192: 59-63 (1987).
119. Vasold R et al., Tattoo pigments are cleaved by laser light-the chemical analysis *in vitro* provide evidence for hazardous compounds, *Photochem. Photobiol.* 80: 185-190 (2004).
120. Bäumlner W et al., Q-switch laser and tattoo pigments: first results of the chemical and photophysical analysis of 41 compounds, *Lasers Surg. Med.* 26: 13-21 (2000).
121. Sasaki H et al., Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on the transdermal penetration of sulfaguanidine, aminopyrine, and sudan III, *J. Pharmacol. Dyn.* 13: 200- 205 (1990).
122. Bronaugh RL et al., In vitro percutaneous absorption of a hydrophobic compound through viable hairless guinea pig skin, *Toxicol. Lett.* 9: 24 31 (1989).
123. Bronaugh RL et al., Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 534-543 (1989).
124. Hoeller D et al., An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts for dermatopharmacological and dermatotoxicological studies or transplantation purpose, *Arch. Dermatol. Res.* 293: 75 (2001).
125. Tang LL, Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 57: 215-218 (2007).
126. Medalie DA et al., Evaluation of acellular human dermis as a dermal analog in a composite skin graft, *Asaio J.* 42: M455-462 (1996).
127. Yang EK et al., Assessment of toxic potential of industrial chemicals using a cultured human bioartificial skin model: production of interleukin 1 α and hydroxyeicosatetraenoic acids, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13: 246-257 (2000).
128. Laschke MW, Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes, *Tissue Eng.* 12: 2093-2104 (2006).
129. Menger MD et al., Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber, *Eur. Surg. Res.* 34: 83-91 (2002).
130. Eriksson E und Vranckx J, Wet wound healing: from laboratory to patients to gene therapy, *Am. J. Surg.* 188: 36-41 (2004).
131. Schnetz E und Fartasch M, Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin - A promising tool for future research? *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 165-174 (2001).
132. El Marbough L et al., In vivo study of percutaneous absorption of 4-chloroaniline using microdialysis in the rat, *Arzneimittelforschung* 50: 1033-1036 (2000).

133. Barel AO und Clarys P, Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter, *Skin Pharmacol.* 8: 186-195 (1995).
134. Kenyon SH et al., Percutaneous penetration and genotoxicity of 4,4'-methylenedianiline through rat and human skin in vitro, *Toxicology* 196: 65-75 (2004).
135. Lüersen L et al., Penetration of β -naphthylamine and *o*-toluidine through human skin in vitro, *Arch. Toxicol.* 80: 644-646 (2006).

**BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der
Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung**

Institut der Ruhr-Universität Bochum

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

44789 Bochum

Telefon: +49 (0)234/ 302-4501

Fax: +49 (0)234/ 302-4505

E-Mail: bgfa@bgfa.de

Internet: <http://www.bgfa.de>