Die BG RCI ist seit 2010 Rechtsnachfolger der BG Chemie

BG RCI
Berufsgenossenschaft
Rohstoffe und chemische Industrie

TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNGEN

ISBN 0937-4248

BG RCI

Kurfürsten-Anlage 62 · 69115 Heidelberg
Telefon: 06221 5108-28451
E-Mail: toxikologischebewertungen@bgrci.de
Internet: www.bgrci.de/toxikologischebewertungen

TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG

Ausgabe 11/00
ISSN 0937-4248
redaktionell überarbeitete Ausgabe 01/05

1-(2,4-Dinitro-phenylazo)-2-naphthol (Pigment Orange 5)

Nr. 223

CAS-Nr. 3468-63-1

BG Chemie
Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie

Dieses Dokument enthält Einzelseiten im DIN A4-Format. Viele Drucker ermöglichen eine verkleinerte doppelseitige Ausgabe. Sie können so einen Ausdruck im DIN A5-Format (ähnlich wie die ursprünglichen TOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNGEN in Heftform zum Abheften in die Ringbuchordner) erstellen.

ISSN 0937-4248

Die Erstellung der TOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNGEN ist nach bestmöglicher Sorgfalt erfolgt, jedoch ist eine Haftung bei fehlerhaften Angaben oder Bewertungen ausgeschlossen.

© Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Heidelberg

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung, vorbehalten. Nachdrucke - auch auszugsweise - nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.

Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie
Postfach 10 14 80, 69004 Heidelberg
Telefon: 06221 523 (0) 400
E-Mail: praevention@bgchemie.de
Internet: www.bgchemie.de

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol

1 Zusammenfassung und Bewertung

Die Resorption von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol durch die menschliche Haut ist gering. Nach in vitro-Untersuchungen beträgt die Resorption aus Mineral- oder Rizinusöl- bzw. Creme-Rouge-Zubereitungen über 24 Stunden 0,007 oder 0,003 bzw. 0,006 % der applizierten Radioaktivität, aus Talkum weniger als 0,001 %.

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol ist akut gering toxisch (LD_{50} Ratte oral > 4640 bzw. > 15000 mg/kg Körpergewicht). Im Fütterungsversuch über 32 Tage bewirken hohe Konzentrationen von 2000 bis 25000 ppm (entsprechend ca. 133 bis 1667 mg/kg Körpergewicht) bei Ratten dosisabhängig eine retardierte Körpergewichtsentwicklung, Anämie und Leukozytose.

An der Kaninchenhaut wirkt 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol nicht reizend. Am Kaninchenauge werden 5prozentige Zubereitungen reaktionslos vertragen. Die unverdünnte Substanz zeigt sich am Kaninchenauge minimal reizend.

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wirkt an der Meerschweinchenhaut im Epikutantest nach Buehler nicht sensibilisierend.

Die chronische Verabreichung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0,025, 0,125 oder 1 % im Futter (entsprechend 12,5, 62,5 bzw. 500 mg/kg Körpergewicht/Tag) über 2 Jahre hat bei Beagle-Hunden zu einer retardierten Körpergewichtsentwicklung sowie in der hohen Dosierung zu Anämie und Organvergrößerungen (Schilddrüse, Leber, Milz) sowie Hautveränderungen geführt. Bei 0,125 % sind ebenfalls Schilddrüsenvergrößerung sowie erhöhte Lebergewichte beobachtet worden. In allen Dosisgruppen hat sich eine Bilirubinurie gezeigt.

In den von zahlreichen Untersuchergruppen als Standardplatteninkorporationstest, Präinkubationstest oder Spot-Test durchgeführten Salmonella/Mikrosomen-Untersuchungen hat sich 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an einem oder mehreren geprüften Salmonella typhimurium-Stämmen (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und TA 1538) ohne und mit metabolischer Akti-

vierung überwiegend als genmutagen erwiesen. An den Maus-Lymphoma-Zellen L5178Y und im HPRT-Test an V79-Zellen des Chinesischen Hamsters erzeugt 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol ohne und mit metabolischer Aktivierung keine Genmutationen. Im Chromosomenaberrationstest in vitro an V79-Zellen des Chinesischen Hamsters wirkt 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol ohne und mit metabolischer Aktivierung nicht klastogen. Im DNA-Repair-Test an primären Rattenhepatozyten erweist sich 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol als negativ. Dagegen rufen 5 µg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/ml, die nicht zytotoxisch wirken, bei 40minütiger Inkubation im Comet-Assay an primären Rattenhepatozyten DNA-Schäden hervor. In vivo verursacht 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an Knochenmarkzellen des Chinesischen Hamsters nach oraler Sondierung der maximal applizierbaren Dosis keine Chromosomenschädigungen. Trotz der positiven in vitro-Befunde im Salmonella/Mikrosomen-Test und im Comet-Assay ist 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Sinn der Bewertungskriterien der Gefahrstoffverordnung nicht als erbgutverändernd zu betrachten, da weitere in vitro-Teste an Säugerzellen und die in vivo durchgeführte Untersuchung zur Mutagenität negativ verlaufen sind.

In zwei in den 60er Jahren durchgeführten Langzeitfütterungsversuchen über > 2 Jahre an Ratten, die 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol mit dem Futter in Konzentrationen bis zu 1 % erhielten, ist eine erhöhte substanzbedingte Tumorinzidenz nicht berichtet worden. Auch nach 18monatiger dermaler Applikation von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an Mäusen sind keine erhöhten Tumorinzidenzen beobachtet worden. In einem späteren, in zwei Stufen durchgeführten Langzeitfütterungsversuch an Ratten, in dem den Tieren in der ersten Stufe mit dem Futter 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentrationen von 0,02, 0,05 und 0,1 % und in der zweiten Stufe 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentrationen von 1 % verabreicht worden sind, sind nur bei den weiblichen Tieren der 1 %-Gruppe, deren Lebern gleichzeitig ein Spektrum von toxischen und proliferativen Veränderungen aufgewiesen haben, vermehrt Leberzelladenome und einige wenige Leberzellkarzinome festgestellt worden. In den Lebern der männlichen Ratten, denen mit dem Futter 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol verabreicht worden ist, sind im Vergleich zu den Kontrollen weder vermehrt toxische oder proliferative noch vermehrt neoplastische Veränderungen gefunden worden. Dies spricht dafür, daß der beobachtete schwache tumorigene Effekt bei weiblichen Ratten nur durch hohe, für die

Leber toxische Dosen verursacht worden ist. Eine 2jährige Verfütterung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an Mäuse in Konzentrationen von 0,25 % und noch mehr von 1 %, einer 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentration, die nur bei den männlichen Mäusen zu einer geringgradig verminderten Körpergewichtszunahme und einer leicht erhöhten Mortalität geführt hatte, hat bei den männlichen, nicht aber bei den weiblichen Mäusen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Zunahme von hepatozellulären gut- und bösartigen Tumoren geführt. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol besitzt somit nach chronischer oraler Zufuhr in hohen Konzentrationen für weibliche Ratten bei gleichzeitig vorhandener Lebertoxizität und für männliche Mäuse eine schwache hepatokanzerogene Wirkung. Bei chronischer dermaler Applikation wirkt 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol hingegen für Mäuse nicht kanzerogen.

Bei Ratten und Kaninchen werden für 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol nach Applikation per Schlundsonde keine teratogenen Eigenschaften beschrieben. In einer 2-Generationenstudie an Ratten mit Applikation der Testsubstanz im Futter ist die Reproduktion nicht beeinflußt worden. Die vorliegenden Untersuchungen zur Reproduktionstoxizität lassen aufgrund mangelnder detaillierter Angaben in den Publikationen zum Versuchsaufbau nur eine eingeschränkte Bewertung zu.

Sensibilisierende Eigenschaften von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol sind in Untersuchungen am Menschen nicht nachgewiesen worden.

Summary and assessment

Absorption of 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol via the human skin is low. According to in-vitro studies, absorption from mineral oil, castor oil and cream blusher formulations over a period of 24 hours was 0.007, 0.003 and 0.006%, respectively, of the administered radioactivity, whereas absorption from talcum was less than 0.001%.

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol is of low acute oral toxicity (LD_{50} rat oral > 4640 and > 15000 mg/kg body weight, depending on the source of information). In a 32-day feeding study conducted in rats, high concentration levels in the range from 2000 to 25000 ppm (equivalent to approx. 133 to 1667 mg/kg body weight) dose-dependently caused retarded body weight development, anaemia and leukocytosis.

When applied to the skin of the rabbit, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol causes no irritation. In the rabbit eye, formulations containing 5% of the chemical are tolerated without any reaction. The undiluted substance causes minimal irritation to the rabbit eye.

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol has no sensitising effect on the guinea pig skin when tested in the epicutaneous test according to Buehler.

Chronic administration of 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol at concentration levels of 0.025, 0.125 or 1% (equivalent to 12.5, 62.5 and 500 mg/kg body weight/day) in the food of Beagle dogs for 2 years resulted in retarded body weight development, the high dose additionally causing anaemia and organ enlargement (thyroid gland, liver, spleen) as well as skin changes. At the 0.125% level, enlarged thyroid glands and increased liver weights were observed. All dose groups were found to have bilirubinaemia.

Numerous groups of investigators have tested 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol in Salmonella/microsome studies conducted as standard-plate incorporation tests, preincubation tests or spot tests in one or several test strains of Salmonella typhimurium (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 and TA 1538) in the absence and presence of metabolic activation and have predominantly found the chemical to be mutagenic. In L5178Y mouse lymphoma cells and in the HPRT test on V79 cells of the Chinese hamster, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol causes no gene mutations in the absence or presence of metabolic activation. In the in-vitro chromosome

aberration test in V79 cells of the Chinese hamster, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol is not clastogenic either in the absence or presence of metabolic activation. The DNA repair test on primary rat hepatocytes gives negative results for 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol. In contrast, at 5 µg/ml, a level that is not cytotoxic, a 40-minute incubation with 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol causes DNA damage in primary rat hepatocytes in the Comet assay. In vivo, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol causes no chromosomal damage to bone marrow cells of the Chinese hamster after the maximum dose that can be administered by oral gavage. Despite the positive in-vitro results obtained in the Salmonella/microsome assay and the Comet assay, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol should not be considered mutagenic in the sense of the evaluation criteria set forth in the German Hazardous Substances Ordinance ("Gefahrstoffverordnung"), since in-vitro tests on mammalian cells and the mutagenicity study conducted in vivo gave negative results.

In two long-term feeding studies from the 1960s which were carried out over a period of > 2 years, rats receiving 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol at concentrations of up to 1% were not reported to have shown any increase in substance-related tumour incidence. Similarly, no increased tumour incidences were seen in mice receiving dermal applications of 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol for 18 months. In a later, two-phase long-term feeding study in rats, in which the animals were given 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol in their feed at concentrations of 0.02, 0.05 and 0.1% during the first phase and 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol levels of 1% during the second phase, only the females of the 1% group, which at the same time exhibited a range of toxic and proliferative liver changes, were found to have an increase in hepatocellular adenomas and a small number of hepatocellular carcinomas. In the livers of the male rats that were given 1% 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol in their feed, increases were found neither in toxic or proliferative changes nor in neoplastic changes relative to controls. This suggests that the weak tumorigenic effect observed in female rats was caused only by high, hepatotoxic doses. When 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol was fed to mice at concentrations of 0.25% for 2 years and even more so at 1%, a concentration of 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol which resulted in slightly reduced body weight gain and slightly increased mortality only in the male mice, a significant, dose-dependent increase in benign and malignant hepatocellular tumours

was observed in the male mice but not in the females. Thus, following chronic oral administration at high concentration levels, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol has a weak hepatocarcinogenic potential in female rats and in male mice, the liver carcinogenicity in female rats being accompanied by hepatotoxicity. When applied chronically to the skin, 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol is, however, not carcinogenic to mice.

In rats and rabbits, no teratogenic properties have been reported for 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol following administration by oral gavage. In a 2-generation study in rats which were given the test substance in their feed, reproduction was not affected. The reproductive toxicity studies available are only of limited use for evaluation, because the publications lack details of the experimental setup.

No sensitising properties have been demonstrated for 1-(2,4-dinitrophenylazo)-2-naphthol in human studies.

2 Stoffname

2.1	Gebrauchsname	1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol
2.2	IUPAC-Name	1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol
2.3	CAS-Nr.	3468-63-1
2.4	EINECS-Nr.	222-429-4

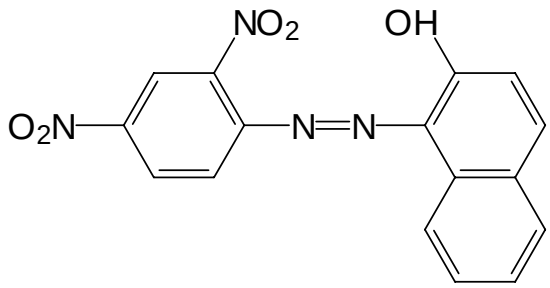
3 Synonyme, Trivial- und Handelsnamen

Brillant Tangerine 13030
C.I. Pigment Orange 5
C.I. 12075
Calcotone Orange 2R
Carnelio Red 2G
Chromatex Orange R
D & C Orange No. 17
Dainichi Permanent Red GG
Dinitraniline Orange
Dinitroaniline (Orange, Orange ND-204, Red)
1-[(2,4-Dinitrophenyl)azo]-2-naphthalenol
Fastona Red 2G
FD&C Orange No. 17
Graphtol Red 2GL
Hansa Orange RN
Hansa Rot GG
Helio Fast Orange (RN, RT, 3RN, 3RT)
Irgalite Fast Red 2GL
Irgalite Red (PV8, 2G, 2GW)
Isol Fast Red 2G
Japan Orange 203
Lake Red 2GL
Light Orange R
Lutetia Fast Orange R
Monolite Fast (Orange 2R; Paper Orange 2R, Red 2G)

2-Naphthol, 1-((2,4-dinitrophenyl)azo)-
Nippon Orange X-881
Oralith Red 2GL
11048 Orange
Orange No. 203
Orange Pigment X
Permanent Orange
Permanent Orange (DN Toner, GG, HD, Toner, Toner RA-5650)
Permanent Red GG
Permansa Orange
Permaton Orange XL 45-3015
Permatone Orange
Pigment Fast Orange
Pigment Orange 5
Segnale Light Orange (RN, RNG)
Siegle Orange 2S
Silopol Orange R
Silosol Orange RN
Siloton Orange RL
Syton Fast Red 2G
Tertropigment (Orange LRN, Red P2G)
Versal Orange RNL

4 Struktur- und Summenformel

4.1 Strukturformel



4.2 Summenformel $C_{16}H_{10}N_4O_5$

5 Physikalisch-chemische Eigenschaften

5.1	Molekularmasse, g/mol	338,30	
5.2	Schmelzpunkt, °C	319 > 300	(Kozuka et al., 1980) (Ciba-Geigy, 1990)
5.3	Siedepunkt, °C	-	
5.4	Dampfdruck, hPa	keine Information vorhanden	
5.5	Dichte, g/cm³	1,7	(Ciba-Geigy, 1990)
5.6	Löslichkeit in Wasser	unlöslich (Hart et al., 1986; Ciba-Geigy, 1990)	
5.7	Löslichkeit in organischen Lösemitteln	keine Information vorhanden	
5.8	Löslichkeit in Fett	keine Information vorhanden	
5.9	pH-Wert	7	(Ciba-Geigy, 1990)
5.10	Umrechnungsfaktor	1 ml/m³ (ppm) ≙ 13,81 mg/m³ 1 mg/m³ ≙ 0,07 ml/m³ (ppm) (bei 1013 hPa und 25 °C)	

6 Herstellung und Verwendung

6.1 Herstellung

Durch Azokupplung von 2,4-Dinitroanilin mit β-Naphthol (Hunger und Herbst, 1992; Hart et al., 1986).

6.2 Verwendung

Als Pigment in Anstrichmitteln und Druckfarben (Hunger und Herbst, 1992) sowie in Künstlerfarben (Orna und Pamer, 1985).

Als Färbemittel für Kosmetika und Pharmazeutika zur äußerlichen Anwendung wurde 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol aufgrund der schwachen hepatokanzerogenen Wirkung für männliche Mäuse und weibliche Ratten von der FDA (Food and Drug Administration, USA) verboten (FDA, 1988).

Auch in der Kosmetik-Verordnung der Bundesrepublik Deutschland vom Oktober 1997 wird der Stoff nicht mehr aufgeführt, da der wissenschaftliche Ausschuß Kosmetologie (SCC) der EU die Streichung des Stoffes wegen seiner schwachen kanzerogenen Wirkung und wegen seines mutagenen Potentials in vitro (Induktion von Rückmutationen bei Salmonella typhimurium) verfügt hat (BgVV, 1997; Kosmetik-Verordnung, 1997).

7 Experimentelle Befunde

7.1 Toxikokinetik und Metabolismus

Die Resorption von ^{14}C-markiertem 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (radiochemischer Reinheitsgrad 95 bis 96 %; keine Angaben zu Verunreinigungen) durch halbdicke Humanabdominalhaut (3 Patienten) wurde in vitro mit Hilfe einer Franz-Diffusionszelle bestimmt. Hierzu diente 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in einer 0,6prozentigen Mineral- oder Rizinusöl-, 0,6prozentigen Creme-Rouge- bzw. 5prozentigen Talkum-Zubereitung. Die Wiederfindungsrate der Prüfsubstanz in der Öl- bzw. Creme-Rouge-Zubereitung betrug 80 bis 90 % bzw. 40 bis 50 %; Angaben zur Wiederfindungsrate der Prüfsubstanz in der Talkum-Zubereitung lagen nicht vor. Als Lösungsvermittler in der Rezeptorphase (isotone Salzlösung, pH 7,6, 37 °C) diente Volpo 20 (Polyoxyethylenalkohol). Die Rezeptorphase wurde nach 4, 8 und 12 Stunden sowie danach in 12stündigen Abständen bis 48 Stunden nach Versuchsbeginn erneuert. Durch Waschen der Haut mit Toluol konnte der größte Teil der applizierten Prüfsubstanz entfernt werden, in allen Hautpräparaten ließ sich jedoch Radioaktivität nachweisen. Die Resorption von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol nach 24 Stunden aus Mineral- oder Rizinusöl bzw. Creme-Rouge-Zubereitung betrug 0,007, 0,003 bzw. 0,006 % der applizierten Radioaktivität, aus Talkum weniger als 0,001 % (Franz, 1983).

7.2 Akute und subakute Toxizität

Zur Prüfung der akuten oralen Toxizität erhielten 10 weibliche Wistar-Ratten (116 bis 132 g schwer) 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol als 25prozentige Lösung in Sesamöl einmal mittels Schlundsonde in der technisch höchstmöglichen Dosierung von 15000 mg/kg Körpergewicht. Die Nachbe-

obachtungszeit betrug 14 Tage. Es traten keine klinischen Symptome und keine Todesfälle auf. Die Körpergewichtsentwicklung war nicht beeinträchtigt. Die LD_{50} betrug somit mehr als 15000 mg/kg Körpergewicht (Hoechst, 1973 a).

In einer weiteren Untersuchung erhielten je 5 männliche und 5 weibliche Ratten (Tif.RAI; 160 bis 180 g schwer) 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol als 20prozentige wäßrige Suspension mit 2 % Carboxymethylcellulose einmal mittels Schlundsonde. Die Dosierungen betrugen 2150, 3170 und 4640 mg/kg Körpergewicht. Die Nachbeobachtungszeit belief sich auf 7 Tage. Es traten keine Todesfälle auf. An Symptomen wurden in allen Dosisgruppen Dyspnoe, Exophthalmus, gekrümmte Körperhaltung und gesträubtes Fell beobachtet. Nach höheren Dosen waren die Symptome ausgeprägter. Die Sektion ergab keine substanzbedingten Veränderungen. Die LD_{50} betrug somit > 4640 mg/kg Körpergewicht (Ciba-Geigy, 1974 a).

Die Prüfung der subakuten oralen Toxizität von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (Reinheitsgrad 97,0 %, Beimengungen: 1,5 % Talgfettpropylendiamin, 1,5 % Dimethylcocosfettaminoxid) erfolgte an Gruppen von je 10 männlichen und 10 weiblichen Wistar-Ratten (anfängliches Durchschnittsgewicht 92 bzw. 87 g) im Fütterungsversuch über 32 Tage. Die Konzentrationen wurden aufgrund der Ergebnisse eines 10tägigen Vorversuches, in dem eine 5prozentige Konzentration im Futter von den Tieren sehr schlecht aufgenommen wurde, festgelegt. Sie betrugen 0 (Kontrollen), 0,2, 1,0 bzw. 2,5 %, entsprechend 0, 2000, 10000 bzw. 25000 mg/kg Futter (ca. 0, 133, 667 bzw. 1667 mg/kg Körpergewicht). In der oberen Dosisgruppe (2,5 %) verendeten 7 männliche und 3 weibliche Tiere unter starkem Gewichtsverlust. Auch die Ratten der anderen Dosisgruppen zeigten dosisabhängig eine retardierte Körpergewichtsentwicklung. Nur bei den weiblichen Tieren der 0,2 %-Gruppe wurde keine Beeinträchtigung der Körpergewichtsentwicklung festgestellt. Die Untersuchung der hämatologischen Parameter ergab bei Versuchsende in allen drei Dosisgruppen dosisabhängig eine Verringerung der Erythrozytenzahl und des Hämoglobingehaltes sowie einen Anstieg der Leukozytenzahlen. Das Differentialblutbild ergab in den 1,0 und 2,5 %-Gruppen eine deutliche Erhöhung der Zahl der neutrophilen Granulozyten. Die Untersuchung des Harns war ohne Befund. Bei der makroskopischen und histopathologischen Untersuchung wurde bei den Tieren aller Versuchsgruppen ein geringgradig erhöhter Eisengehalt der Milz beobachtet. Andere, eindeutig substanzbedingte Veränderungen

wurden nicht gesehen (Hoechst, 1973 b). Ein no effect level konnte nicht ermittelt werden.

7.3 Haut- und Schleimhautverträglichkeit

Die Prüfung der primären Hautreizwirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol erfolgte gemäß dem „Appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics“ (1959) der US Association of Food and Drug Officials (AFDO) an je 3 männlichen und 3 weiblichen Russen-Kaninchen (1,5 bis 2 kg schwer) an der intakten und leicht skarifizierten geschorenen Flankenhaut. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurde als 50prozentige Zubereitung in Polyethylenglykol 400 okklusiv appliziert. Die Einwirkungszeit betrug 24 Stunden. Unmittelbar nach Patch-Entfernung und 72 Stunden später wurden die Befunde abgelesen und nach Draize bewertet. Die mittleren Reizwerte für Erythem- und Ödembildung lagen an der nicht skarifizierten Haut bei 0. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol erwies sich damit an der nicht skarifizierten Haut als nicht reizend. An der skarifizierten Haut erzeugte das Produkt unmittelbar nach Applikationsende bei 5/6 Kaninchen ein sehr leichtes Erythem und bei 2/6 Tieren ein sehr leichtes Ödem. 72 Stunden nach Applikationsende waren alle Kaninchen ohne Befund. Unter Einbeziehung der Befunde an der skarifizierten Haut ergab sich ein primärer Reizindex von 0,3, womit das Produkt von den Autoren als leicht reizend bewertet wurde (Ciba-Geigy, 1974 b). Nach heutigen Kriterien ist der Stoff aufgrund dieses Versuchsergebnisses als nicht reizend zu bewerten.

Weiterhin wurde die Hautreizwirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an der mechanisch enthaarten Haut von 6 Kaninchen (Gelb-Silber-Rasse) geprüft. Hierzu wurden je 0,5 ml einer 10- und 5prozentigen Verdünnung in Sesamöl täglich einmal, insgesamt 5mal auf die intakte Flankenhaut aufgebracht. Es konnten keine Reizerscheinungen beobachtet werden (Hoechst, 1973 c).

Die Prüfung der Hautverträglichkeit von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol erfolgte auch im Barail-Test mit intrakutaner Injektion von 0,02 ml 10-, 5-, 1-, 0,1-, 0,01- bzw. 0,001prozentiger Verdünnungen in Sesamöl in die mechanisch enthaarte Flankenhaut von je 6 Gelb-Silber-Kaninchen. Die Injektion der 10- und 5prozentigen Verdünnungen führte bei allen Kaninchen an den Injektionsstellen zu zentralen Nekrosen mit rotem Hof, die der 1pro-

zentigen Verdünnung zu Reaktionen unterschiedlicher Stärke (Rötung, starke Rötung, Schwellung, Nekrose). Alle niedrigeren Konzentrationen wurden reaktionslos vertragen. Nach den Autoren ist dieser empfindliche Test erst dann als positiv zu bewerten, wenn Konzentrationen von 10^{-3} und weniger noch zu deutlichen Reizerscheinungen führen (Hoechst, 1973 c).

Die Augenreizwirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurde gemäß „Appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics“ (1959) der US Association of Food and Drug Officials (AFDO) an je 3 männlichen und 3 weiblichen Russen-Kaninchen geprüft. Sie erhielten je 100 mg des Stoffes in den Konjunktivalsack instilliert. Bei 3 Kaninchen blieb das Auge ungespült und bei 3 Tieren wurde es etwa 30 Sekunden nach der Behandlung mit 10 ml lauwarmen Wassers gespült. 24 Stunden sowie 2, 3, 4 und 7 Tage nach der Behandlung wurden die Befunde erhoben und nach Draize bewertet. An Cornea und Iris der gespülten und ungespülten Augen waren zu keinem Befundungszeitpunkt Reizeffekte festzustellen, während sich für die Konjunktiven aufgrund der Befunde bei 2/3 Tieren mit ungespültem Auge 24 Stunden nach der Applikation ein Reizindex von 0,4 ergab. Die Befunde waren bereits 48 Stunden nach der Behandlung voll reversibel. Somit erwies sich 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol am Kaninchenauge nach den Autoren als minimal reizend (Ciba-Geigy, 1974 c). Nach heutigen Kriterien ist der Stoff aufgrund des Versuchsergebnisses als nicht reizend am Kaninchenauge zu bewerten.

Nach einmaliger Instillation von 0,1 ml einer 10- bzw. 5prozentigen Zubereitung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Sesamöl in den Bindehautsack des Kaninchens kam es durch die 10prozentige Verdünnung bei 3 der 6 eingesetzten Tiere zu einer 3 bis 7 Stunden anhaltenden leichten Rötung. Die 5prozentige Zubereitung wurde von 6 Kaninchen reaktionslos vertragen (Hoechst, 1973 c).

7.4 Sensibilisierende Wirkung

Die etwaige sensibilisierende Wirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (keine Angaben zum Reinheitsgrad) wurde an 10 männlichen Pirbright-White-Meerschweinchen (Anfangsgewicht 312 bis 390 g) im Epikutantest nach Buehler geprüft. 5 Tiere dienten als Kontrollen. In der Induktionsphase erhielten die Tiere je 0,5 ml einer 0,05prozentigen Zubereitung

in 2prozentigem Stärkeschleim, eine Konzentration, die in Vorversuchen als gerade noch primär reizend ermittelt wurde, innerhalb von 3 Wochen 9mal dermal. Bei allen so behandelten Tieren traten leichte Reizerscheinungen in Form von kaum wahrnehmbaren bis leichten Hautrötungen auf. Nach einem behandlungsfreien Intervall von 16 Tagen wurden einmal 0,5 ml einer primär nicht mehr reizenden 0,01prozentigen Zubereitung dermal appliziert und die Hautreaktion 6, 24 und 48 Stunden später abgelesen. Weder nach dieser noch nach einer zweiten Auslösebehandlung 48 Stunden nach der ersten ergaben sich Hinweise auf sensibilisierende Eigenschaften des Stoffes (Hoechst, 1982).

7.5 Subchronische und chronische Toxizität

Je 3 männliche und 3 weibliche Beagle-Hunde erhielten 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0,025, 0,125 bzw. 1 % über 2 Jahre im Futter verabreicht. Dies entsprach bei einem angenommenen Futterverbrauch (Trockenfutter) von 50 g/kg Körpergewicht/Tag 12,5, 62,5 bzw. 500 mg/kg Körpergewicht/Tag. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol führte bei allen behandelten Tieren zu einer retardierten Körpergewichtsentwicklung. Bei den Tieren, denen 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol verabreicht wurde, wurden Anämie und eine vergrößerte Schilddrüse, Leber und Milz sowie Veränderungen in der Haut festgestellt. In der 0,125 %-Gruppe wurden bei den weiblichen Tieren eine vergrößerte Schilddrüse und bei den männlichen Tieren erhöhte Lebergewichte beobachtet. Zudem ergaben sich leichte Effekte an der Haut. In allen Dosisgruppen zeigte sich eine Bilirubinurie. Histopathologische Veränderungen ließen sich nicht beobachten (keine weiteren Angaben; Hazleton, 1964 a). Ein no effect level konnte aus dieser Studie nicht abgeleitet werden.

7.6 Gentoxizität

7.6.1 In vitro

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurde in einer Reihe von Salmonella/Mikrosomen-Testen, durchgeführt als Standardplatteninkorporationstest, Präinkubationstest oder Spot-Test, an den Salmonella typhimurium-Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und TA 1538 mit und ohne metabo-

lische Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 oder PCB induzierter Ratten-, Hamster- oder Mäuseleber) auf genmutagene Eigenschaften geprüft (siehe Tabelle 1).

Anfang Tabelle 1

Tabelle 1. Salmonella/Mikrosomen-Teste mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol					
Testsystem	Geprüfter Konzentrationsbereich[1)] (µg/Platte)	Metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis[2)]		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
1. Salmonella/Mikrosomen-Test als Standardplatteninkorporationstest					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	50 - 500, Reinheitsgrad 95 %	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	positiv (TA 98, TA 100, TA 1537, TA 1538)	positiv (TA 98, TA 100, TA 1537, TA 1538)	Brown et al., 1979
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	0,2 - 400	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	positiv (TA 98, TA 1537)	positiv (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)	Muzzall und Cook, 1978, 1979
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	5 - 1000	S9-Mix aus mit PCB induzierter Leber (k.w.A.)	positiv (TA 98, TA 100)	positiv (TA 98, TA 100)	Miyagoshi et al., 1983
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	0,1 - 100	S9-Mix aus mit PCB induzierter Hamsterleber	positiv (TA 98)	positiv (TA 98)	Rojanapo et al., 1985
Salmonella typhimurium TA 98	0,1 - 100	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	negativ (TA 98)	positiv (TA 98)	Green und Pastewka, 1979, 1980
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	4 - 2500 (unkristallisiert)	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	negativ (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)	nicht geprüft	Hoechst, 1979
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	0,016 - 5000 (unkristallisiert)	ohne metabolisches Aktivierungssystem	nicht geprüft	positiv (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)	Hoechst, 1979
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	0,0064 - 10000	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	positiv (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538)	positiv (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538)	Hoechst, 1980
2. Salmonella/Mikrosomen-Test als Präinkubationstest					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	k.A.	S9-Mix mit Riboflavin (k.w.A.)	k.A.	positiv (TA 98)	Matsushima et al., 1978
Salmonella typhimurium TA 98	10 - 1000	S9-Mix (k.w.A.)	positiv (TA 98)	positiv (TA 98)	BFG, 1986 b
Salmonella typhimurium TA 98, TA 1535, TA 1538	10	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Mäuseleber	negativ	positiv (TA 98, TA 1538)	Milvy und Kay, 1978

Tabelle 1. Salmonella/Mikrosomen-Teste mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol					
Testsystem	Geprüfter Konzentrationsbereich[1] (µg/Platte)	Metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis[2]		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
3. Salmonella/Mikrosomen-Test als Spot-Test					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537	0,2 - 400	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber	positiv (TA 98, TA 1537)	positiv (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)	Muzzall und Cook, 1978, 1979
Salmonella typhimurium TA 98, TA 1535, TA 1538	10	S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Mäuseleber	negativ*	positiv* (TA 98, TA 1538)	Milvy und Kay, 1978
* In der Publikation werden die Ergebnisse für den Spot-Test und den Präinkubationstest (siehe oben) nicht getrennt dargestellt.					
4. Salmonella/Mikrosomen-Test ohne Angabe der Testvariante					
Salmonella typhimurium TA 98	0,01 - 1000	-	-	positiv (TA 98)	BFG, 1986 a

[1] sofern nicht angegeben, finden sich in den Publikationen keine Angaben zur bakteriotoxischen Wirkung sowie zum Reinheitsgrad der verwendeten Testsubstanz

[2] werden in den Publikationen Angaben gemacht, daß ein positives Testergebnis nur bei bestimmten Stämmen festgestellt wurde, werden diese genannt

k.(w.)A. keine (weiteren) Angaben

Ende Tabelle 1

Die eingesetzten Konzentrationen betrugen 0,01 bis 1000 µg/Platte. Ohne metabolische Aktivierung führte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol am Stamm TA 98 durchweg zu einer Erhöhung der Revertantenzahl. Positive Ergebnisse wurden auch an den Stämmen TA 100, TA 1537 und TA 1538 und von einer Arbeitsgruppe auch am Stamm TA 1535 (Muzzall und Cook, 1978, 1979) beobachtet. Mit metabolischer Aktivierung bewirkte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an den Stämmen TA 98, TA 100, TA 1537 und TA 1538 ebenfalls eine Erhöhung der Revertantenzahl, die jedoch weniger stark ausgeprägt war als ohne metabolische Aktivierung (Brown et al., 1979; Green und Pastewka, 1979, 1980; Matsushima et al., 1978; Milvy und Kay, 1978; Miyagoshi et al., 1983; Muzzall und Cook, 1978, 1979). 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol erwies sich somit im Salmonella/Mikrosomen-Test als eindeutig genmutagen.

An Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y) führte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0,65 bis 5,0 mg/ml nicht zu einer erhöhten Mutationsrate. Der Test wurde ohne und mit metabolischer Aktivierung durchgeführt (keine weiteren Angaben; Litton Bionetics, 1977).

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (technisch rein) wurde im HPRT-Test an V79-Zellen des Chinesischen Hamsters gemäß der OECD-Richtlinie Nr. 476 in zwei unabhängigen Versuchsreihen geprüft. Die Untersuchungen erfolgten ohne und mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber). Nach Vorversuchen, in denen sich die Substanz ab 250 µg/ml ohne metabolische Aktivierung und ab 750 µg/ml mit metabolischer Aktivierung als zytotoxisch erwies, wurden für die Hauptstudie als Konzentrationen ohne metabolische Aktivierung 50, 75, 100, 150 und 250 µg/ml und mit metabolischer Aktivierung 50, 100, 250, 500 und 750 µg/ml gewählt. Ohne metabolische Aktivierung waren Konzentrationen von 100 bis 250 µg/ml und mit metabolischer Aktivierung solche von 500 bis 750 µg/ml zytotoxisch. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol bewirkte keinen signifikanten Anstieg der Mutationsfrequenz und wirkte somit in diesem Testsystem nicht genmutagen (Hoechst, 1989 a).

An V79-Zellen des Chinesischen Hamsters wurde 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (technisch rein; Dispersion in DMSO) auf chromosomenschädigende Wirkung gemäß der OECD-Richtlinie Nr. 473 ohne und mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor 1254 induzierter Rattenleber) geprüft. Die Expositionszeit betrug 4 Stunden und die Auswertung erfolgte 7, 18 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Positivkontrollen wurden mit Ethylmethansulfonat bzw. Cyclophosphamid behandelt. Aufgrund von Vorversuchen zur Zytotoxizität wurden für den Hauptversuch ohne metabolische Aktivierung 200 (7 Stunden), 20, 100, 200, (18 Stunden) und 200 µg/ml (28 Stunden) eingesetzt. Für die Versuche mit metabolischer Aktivierung betrugen die Konzentrationen 600 (7 Stunden), 60, 300, 600 (18 Stunden) und 600 µg/ml (28 Stunden). 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol bewirkte in diesem Testsystem keine Chromosomenaberrationen (Hoechst, 1989 b).

Im autoradiographischen DNA-Repair-Test an primären Rattenhepatozyten erwies sich 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in einer Konzentration von 3×10^{-3} M als negativ (keine weiteren Angaben; Williams et al., 1989).

Mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurde ein Comet-Assay durchgeführt, der auf der Sichtbarmachung der DNA mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beruht. Einzelzellen werden in Agarose eingebettet, die Zellproteine entfernt und die DNA einer Elektrophorese unterzogen. Ungeschädigte DNA wandert aufgrund ihres großen Molekulargewichtes nur langsam im

elektrischen Feld. Geschädigte DNA erscheint dagegen im Mikroskop als ein kometenartiger Schweif, da die kleinen DNA-Fragmente zur Anode wandern. Das Ausmaß der Wanderung im elektrischen Feld ist proportional zur DNA-Schädigung. Der Comet-Assay wurde nach der Methode von Singh et al. (1988), die die Erfassung von Strangbrüchen, alkalilabilen Stellen und unkompletten Exzisions-Repair-Stellen ermöglicht, durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden frisch isolierte Hepatozyten von weiblichen, über Nacht nüchtern gehaltenen Wistar-Ratten verwendet. Die Inkubation mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol begann 2 Stunden nach der Isolierung der Hepatozyten. Eine Angabe über die analytische Reinheit ist in der Publikation nicht enthalten. Die Hepatozyten wurden in RPMI-Medium (keine weiteren Angaben) mit 1 % fetalem Kälberserum suspendiert und in der finalen Konzentration von 10^6 Zellen/ml mit 0, 1 und 5 µg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/ml in Form einer wäßrigen Suspension 40 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Mittels Trypanblau war vorher nachgewiesen worden, daß diese 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentrationen nicht zytotoxisch für die Hepatozyten waren. In der Konzentration von 5 µg/ml verursachte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol eine signifikante DNA-Schädigung. Dieser Effekt zeigte sich bis zum Ende der Inkubationszeit von 80 Minuten. Als Positivkontrolle diente das literaturbekannte Leberkanzerogen 2-Amino-3,8-dimethylimidazol(4,5-f)chinoxalin, das in der Konzentration von 2,13 µg/ml einen signifikanten DNA-Schaden hervorrief (Møller et al., 1998).

7.6.2 In vivo

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (technisch rein) wurde in vivo an Knochenmarkzellen des Chinesischen Hamsters auf chromosomenschädigende Wirkung gemäß der OECD-Richtlinie Nr. 475 geprüft. Die Tiere (Durchschnittsgewicht der Männchen 32,7 bzw. der Weibchen 29,9 g) erhielten die in einem Vorversuch (keine weiteren Angaben) bestimmte, maximal applizierbare Dosis von 5000 mg/kg Körpergewicht in Sesamöl zu zwei Teilapplikationen innerhalb von 2 Stunden per Schlundsonde. Positivkontrollen wurden mit Cyclophosphamid in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht behandelt. 12, 24 und 48 Stunden nach der Applikation wurden von je 5 männlichen und 5 weiblichen Hamstern nach Colcemid-Gabe das Femur-Knochenmark aufgearbeitet und 50 Metaphasen/Tier auf Aberrationen

untersucht. Die Tiere hatten einen rötlich verfärbten Kot und wiesen 12 Stunden nach der Applikation von 5000 mg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/kg Körpergewicht keine Vergiftungssymptome auf und überlebten bis zu den Tötungszeitpunkten. Anzeichen für zytotoxische Effekte in Form einer Verminderung des Mitoseindex wurden nicht beobachtet. Die Aberrationsraten exklusive und inklusive Gaps waren bei den männlichen und weiblichen Tieren zu allen Untersuchungszeitpunkten nicht erhöht. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wirkte somit unter diesen Versuchsbedingungen nicht klastogen (Hoechst, 1990).

7.7 Kanzerogenität

Die ersten Prüfungen von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol auf Kanzerogenität erfolgten in den 60er Jahren. Erneute Untersuchungen an Ratten und Mäusen wurden auf Verlangen der US-FDA in den 70er Jahren durchgeführt.

Untersuchungen in den 60er Jahren

Gruppen von jeweils 25 männlichen und 25 weiblichen CD-Charles-River-Ratten erhielten 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 0,025, 0,1 oder 1 % über 104 Wochen im Futter. Diese Konzentrationen entsprachen bei einem angenommenen Futterverbrauch von 100 g/kg Körpergewicht 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Tagesdosen von 0, 25, 100 oder 1000 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere der höchsten Dosisgruppe nahmen im Vergleich zur Kontrolle weniger an Körpergewicht zu. Außerdem wiesen die weiblichen Ratten dieser Dosisgruppe erhöhte Lebergewichte auf. Dosisabhängig wurden erniedrige Hämatokrit- und Hämoglobinwerte sowie erniedrigte Erythrozytenzahlen festgestellt. Der Bilirubinspiegel im Urin der Ratten war dosisabhängig erhöht. Bei den weiblichen Tieren der hohen Dosisgruppe wurden im Vergleich zur Kontrolle mehr Ratten mit nodulären Neoplasien in der Leber und hepatozellulären Karzinomen gefunden. Diese Erhöhungen waren jedoch nicht statistisch signifikant (keine weiteren Angaben; Hazleton, 1964 b).

In einem weiteren Versuch wurden nach Applikation von 0 (Kontrollen) und 80 ppm 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter (entsprechend ca. 5 mg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/kg Körpergewicht) über 26 Monate

bei Ratten keine substanzbedingten Veränderungen beschrieben (keine weiteren Angaben; Hazleton, 1966).

50 männlichen und 50 weiblichen CF1-Carworth-Mäusen wurden einmal wöchentlich jeweils 0,1 ml einer 1prozentigen 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Lösung über 26 Monate auf die Rückenhaut gepinselt. Hierbei ergaben sich keine Hinweise für eine kanzerogene Wirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (keine weiteren Angaben; Leberco, 1961).

Im Rahmen einer vergleichenden Prüfung von 14 verschiedenen Färbemitteln auf kanzerogene Wirkung mittels wiederholter dermaler Applikation an Mäusen wurde als „D&C Orange No. 17“ auch 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol untersucht. Die Studien erfolgten in drei Versuchsreihen, in die jeweils 4, 5 bzw. 5 Färbemittel einbezogen wurden. In jeder Versuchsreihe wurde je eine Vehikelkontrollgruppe, die mit dem Suspensionsmittel Wasser behandelt wurde, mitgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden außerdem Mäuse als Positivkontrolle mit 3,4-Benzpyren behandelt. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (Reinheitsgrad 97 %) wurde in der zweiten Versuchsreihe geprüft. Jede Färbemittel- und Vehikelkontrollgruppe sowie die 3,4-Benzpyren-Gruppe bestand aus jeweils 100 (50 männlichen und 50 weiblichen) ICR-Mäusen. Den Tieren wurden zweimal pro Woche 0,1 ml einer 1prozentigen wäßrigen Färbemittel-Suspension 18 Monate lang auf die geschorene Rückenhaut mit einer automatischen Spritze appliziert (entsprechend 1 mg/Tier; Applikationsfläche ca. 6 cm^2). Die insgesamt 300 (150 männliche und 150 weibliche) Mäuse der drei Vehikelkontrollen wurden in entsprechender Weise mit Wasser behandelt. Die 50 männlichen und 50 weiblichen Positivkontrolltiere wurden zweimal wöchentlich mit 0,1 ml einer Aceton-Lösung, die 10 µg 3,4-Benzpyren enthielt, dermal behandelt. Die Rückenhaut der Tiere wurde zu Beginn des Versuches sowie später je nach Bedarf geschoren. Das Verhalten aller Tiere und die Mortalität wurden täglich kontrolliert. Alle interkurrent verendeten oder in moribundem Zustand getöteten Mäuse sowie alle Tiere, die die 18monatige Versuchsperiode überlebten, wurden seziert und alle Hauptorgane, der Applikationsbereich sowie tumorverdächtige Gewebemassen in Formalin fixiert. Lichtmikroskopisch wurden von allen Tieren der Färbemittelgruppen, der 3,4-Benzpyren-Gruppe und von 27 weiblichen und 25 männlichen Vehikelkontrolltieren der Applikationsbereich und alle makroskopisch abnormen Gewebe und Organe nach HE-Färbung untersucht. Außerdem wurden von je 5 männlichen und 5 weiblichen, randomisiert ausgewählten, bis zum

Versuchsende lebenden Mäusen jeder Versuchs- und Vehikelkontrollgruppe Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse, Thymus, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Magen, Dünn- und Dickdarm, Harnblase, axillare Lymphknoten und Hoden, der Applikationsbereich und alle makroskopisch abnormal erscheinenden Gewebe lichtmikroskopisch untersucht.

Tabelle 2. 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (D&C Orange 17) Prüfung auf kanzerogene Wirkung an ICR-Mäusen, Tierzahl/Gruppe 50 männliche und 50 weibliche Tiere, zweimal wöchentliche dermale Applikation von je 0,1 ml einer 0,1prozentigen wäßrigen Suspension, Versuchsdauer 18 Monate

Versuchs-gruppe	Substanz	applizierte Gesamtdosis/Tier (Mittelwert)	mittlere Überlebenszeit (Tage)	% überlebende Mäuse (männlich und weiblich) nach Monaten			
				5	10	16	18
1	Wasser	13,2 ml	507	96	83	64	46
2	3,4-Benzpyren	0,97 mg	keine Angaben	95	85	0	0
7	Wasser	13,1 ml	469	98	84	67	48
10	1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	143,7 mg	489	98	92	65	50
13	Wasser	12,5 ml	449	95	87	61	44
die Daten der 13 anderen geprüften Färbemittel wurden nicht aufgeführt							

Die mittlere Überlebenszeit der mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol behandelten Mäuse war mit 489 Tagen größer als die von zwei der drei Wasserkontrollen, und bis zum Versuchsende (nach 18 Monaten) lebten in der 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe mit 50 % noch etwas mehr Tiere als in den drei Vehikelkontrollgruppen (46, 48 und 44 %). Extramedulläre Hämatopoese wurde in allen Versuchs- und Kontrollgruppen in vergleichbarer Häufigkeit gefunden. In den drei Vehikelkontrollgruppen betrug sie 13, 18 und 22 % und in der 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe 13 %. Akanthose, Hyperkeratose und Dermatitis wurden bei den Versuchstieren etwas häufiger als bei den Kontrollen festgestellt (keine weiteren quantitativen Angaben). Dies wurde von Carson (1984) auf den größeren Ektoparasitenbefall bei den mit den Färbemitteln behandelten Mäusen zurückgeführt (keine weiteren Angaben). Bei den Mäusen aller Gruppen wurden interstitielle Nephritis, Zystitis, Amyloidose und Bronchopneumonie festgestellt. Ein Zusammenhang mit den applizierten Färbemitteln ergab sich hierbei nicht. Die Häufigkeit benigner und maligner Tumoren entsprach bei den mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol behandelten Mäusen der der Vehikelkontrollen. Demgegenüber entwickelten sich bei 94/100

der mit 3,4-Benzpyren behandelten Mäuse im Applikationsbereich Hautläsionen nach einer durchschnittlichen Latenzzeit von 245 Tagen, und alle Tiere verendeten innerhalb von 16 Monaten (Angaben über die Art der Läsionen, die Häufigkeit und Art von Tumoren/Tier und Gruppe wurden nicht gemacht).

Tabelle 3. Tumorhäufigkeit

Versuchs-gruppe	Substanz	Männliche Mäuse mit Tumoren		Weibliche Mäuse mit Tumoren	
		Tierzahl	Tumorart	Tierzahl	Tumorart
1	Wasser	3 1	Leberzelladenom Neoplasma am Hinterbein	1 1	Mammazystadenokarzinom Lymphosarkom
2	3,4-Benzpyren	„bei 94 % der Mäuse entwickelten sich in dem behandelten Hautareal nach einer durchschnittlichen Latenzzeit von 245 Tagen typische makroskopische Hautveränderungen“ (keine weiteren Angaben)			
7	Wasser	1 1	Leberzelladenom s.c. anaplastisches osteogenes Sarkom	1	s.c. undifferenziertes Sarkom
10	1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	2 1 1	Leberzelladenom Hämangiosarkom am Hinterbein Talgdrüsenkarzinom	3 1 1 1	Mammakarzinom warzenähnliche Masse, Rückenhaut Hautpapillom Lymphosarkom
13	Wasser	4	Leberzelladenom	1	Adenom der Harderschen Drüse

1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wirkte somit nach wiederholter dermaler Applikation für ICR-Mäuse nicht kanzerogen (Hazleton, 1969; Carson, 1984).

Obwohl die zwei Fütterungsversuche an Ratten und die zwei dermalen Prüfungen an Mäusen keinen Hinweis für eine kanzerogene Wirkung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol erbracht hatten, kam die US-FDA zu dem Urteil, daß die Empfindlichkeit der durchgeführten Fütterungsversuche nach den neueren Standards für den Nachweis der Sicherheit von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol bei dessen Verwendung ungenügend ist und ordnete im Februar 1977 neue Fütterungsversuche an (FDA, 1986). Deshalb wurden nach den gültigen Prüfrichtlinien in Abstimmung mit der US-FDA ein weiterer chronischer Fütterungsversuch an Mäusen und eine kombinierte chronische Toxizitäts- und Kanzerogenitätsstudie mit in utero-Exposition an Ratten durchgeführt.

Untersuchungen in den späten 70er und den ersten 80er Jahren

Zwecks Prüfung auf kanzerogene Wirkung erhielten in einem Langzeitfütterungsversuch jeweils 60 männliche und 60 weibliche Charles-River-Albino-(CD)-Ratten 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0 (Kontrolle 1A), 0 (Kontrolle 1B), 0,02, 0,05 und 0,1 % mit dem Futter (entsprechend ca. 13, 33 bzw. 67 mg/kg Körpergewicht/Tag). In der verwendeten 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Charge mit einer Reinheit von 97 % waren nach Analysen der FDA (1986) 0,29 % Dinitroanilin und 0,7 % β-Naphthol enthalten. Nach einer Fütterungsperiode von mindestens 60 Tagen wurden die Tiere innerhalb jeder Versuchsgruppe im Verhältnis 1 : 1 gepaart. Während der Paarung, der Gestation sowie Laktations- und Aufzuchtperiode wurde die Substanzapplikation mit dem Futter kontinuierlich fortgesetzt und 21 Tage nach dem Wurf die Jungtiere von ihren Müttern abgesetzt, die Jungtiere jedes Wurfes separat gehalten und für 2 weitere Wochen mit Futter, das die entsprechende 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentration enthielt, gefüttert. Anschließend wurden in jeder Dosisgruppe durch Randomisierung aus jedem Wurf jeweils 2 männliche und 2 weibliche Ratten dieser F_1-Generation für die Langzeitstudie ausgewählt, so daß jede Versuchs- und Kontrollgruppe jeweils 70 männliche und 70 weibliche Ratten umfaßte. Die Tiere jeder Gruppe erhielten die entsprechende Diät während des gesamten chronischen Versuches und alle überlebenden Tiere/Geschlecht und Gruppe wurden nach 27 (Männchen) oder 28 (Weibchen) Monaten getötet und seziert. Je 10 Tiere/Geschlecht und Gruppe wurden bereits nach einer Versuchsperiode von 12 Monaten zur Erfassung eventueller chronisch-toxischer Effekte getötet und seziert. Während des ersten Versuchsjahres nahmen die männlichen Ratten der mittleren und hohen 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppen etwas weniger (nicht mehr als 5 %) an Körpergewicht zu als die mitgeführten Kontrolltiere. Während der restlichen Versuchszeit entsprach der Körpergewichtsverlauf aller männlichen und weiblichen Versuchsratten dem der Kontrollen. Abgesehen von einer Verfärbung der Felle der Versuchstiere durch 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurden bei den Versuchstieren keine substanzbedingten Veränderungen des Allgemeinzustandes, der Mortalität, der Hämatologie und Urinanalyse sowie der Augen festgestellt. Folgende Veränderungen klinisch-chemischer Parameter wurden als substanzbedingt beschrieben: Kreatininkonzentrationen bei allen Versuchstieren tiefer als der entsprechende Laborbasiskontrollwert, deutlich erniedrig-

te Kreatininkonzentrationen nach 24monatiger Versuchsdauer bei den männlichen Tieren aller und den weiblichen Ratten der höchsten Dosisgruppe, erhöhte Nüchternblutzuckerwerte bei den weiblichen Tieren der höchsten Dosisgruppe nach 12 Monaten, bei allen Männchen nach 18 Monaten sowie bei den männlichen und weiblichen Ratten der 0,1 %-Gruppe nach 24 Monaten. Die erhöhten relativen Lebergewichte, die die Männchen und Weibchen der 0,1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe aufwiesen, wurden als Hinweis betrachtet, daß die Leber ein Hauptzielorgan für 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol ist. Eine große Anzahl von neoplastischen und nicht neoplastischen Gewebeveränderungen wurden bei Versuchs- und Kontrolltieren in vergleichbarer Häufigkeit und Verteilung gefunden, die somit nicht als substanzbedingt zu betrachten waren (keine weiteren Angaben). Dagegen wiesen die weiblichen Ratten der hohen Dosisgruppe (0,1 %) signifikant vermehrt Tumoren des lymphoretikulären Systems (Lympho- und Retikulumzellsarkome sowie Leukosen) auf, ohne daß eine dieser individuellen Tumorarten allein betrachtet signifikant häufiger auftrat als bei den Kontrollen (siehe Tabelle 4; Bio/dynamics, 1982 a).

Tabelle 4. Häufigkeit von lymphoretikulären Tumoren bei den Ratten, die 0,1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol mit dem Futter über > 2 Jahre erhielten

Versuchsgruppe	Anzahl von Ratten mit lymphoretikulären Tumoren zur Gesamtzahl der untersuchten Tiere	
	männliche Tiere	weibliche Tiere
Kontrolle 1A	1/59	3/57
Kontrolle 1B	0/58	0/55
0,1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	1/60	7/55 (signifikant gegenüber den kombinierten weiblichen Kontrollen)
Für diese Untersuchungen wurden die nach 12monatiger Versuchsdauer getöteten Ratten nicht herangezogen, da die Tiere keine relevanten Tumorbefunde aufwiesen		

Nach Ansicht der FDA waren die in der Studie eingesetzten Dosierungen zu niedrig, und sie empfahl die Durchführung einer zusätzlichen Langzeitfütterungsstudie mit 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol (ca. 667 mg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/kg Körpergewicht/Tag) mit dem gleichen Versuchsdesign (in utero-Exposition). Es wurde nur eine Kontroll-

gruppe mit 70 männlichen und 70 weiblichen Ratten mitgeführt. Die Tiere der F_1-Generation erhielten ihr jeweiliges Futter über 26 (Männchen) bzw. 30 (Weibchen) Monate. Wie in dem ersten Versuch wurden je 10 Männchen und 10 Weibchen der Versuchs- und Kontrollgruppe nach 12 Monaten getötet und seziert. Der durchschnittliche Futterverbrauch der Ratten der 1 %- 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht und die Körpergewichtsentwicklung der Weibchen dieser Gruppe entsprach der der entsprechenden Kontrolltiere. Dagegen nahmen die männlichen Versuchsratten im Vergleich zu den Kontrollen weniger an Körpergewicht zu und waren bei Versuchsende im Mittel 18,5 % leichter als die Kontrolltiere. Abgesehen von einer Verfärbung des Fells der Tiere wiesen die Ratten der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe keine klinischen Veränderungen auf. Auch die klinisch-chemischen Untersuchungen ergaben außer einer Verfärbung des Urins keine substanzbedingten Veränderungen. Hämatologisch wurde bei den Versuchstieren zu fast allen Untersuchungszeitpunkten eine geringgradige bis statistisch signifikante Verminderung der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokritwertes und der Erythrozytenzahl, häufig zusammen mit einem Anstieg der Retikulozytenzahl, diagnostiziert. Ferner wurden bei den weiblichen Tieren der 1 %- 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe eine verstärkte Pigmentablagerung in der Milz und erhöhte Lebergewichte, wie sie auch bei den Ratten der 0,1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe gefunden wurden, festgestellt. Diese Lebergewichtserhöhungen und das gehäufte Auftreten von Pericholangitis bei den nach 12 Monaten getöteten Tieren der 1 %- Gruppe wurden als Indiz betrachtet, daß die Leber das Zielorgan für 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol ist. Bei den weiblichen Ratten, die kontinuierlich 30 Monate lang 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol mit dem Futter erhalten hatten, wurde eine signifikante Zunahme von benignen hepatozellulären Adenomen und neoplastischen Knoten festgestellt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Häufigkeit von Lebertumoren bei Charles-River-Albino-(CD)-Ratten nach Applikation von 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter über 26 (Männchen) bzw. 30 (Weibchen) Monate, Tierzahl bei Versuchsbeginn/Gruppe 70 männliche und 70 weibliche Ratten, Zwischentötung von 10 männlichen und 10 weiblichen Ratten/Gruppe nach 12monatiger Fütterungsperiode				
Versuchsgruppe	Anzahl von Ratten mit Lebertumoren zur Gesamtzahl der untersuchten Tiere			
	Adenome	Karzinome	Gesamttumorzahl	Untersucher
Männliche Ratten				
Kontrolle	1/56	0/56	1/56 (2 %)	Bio/dynamics
1 % 1-(2,4-Dinitrophenyl-azo)-2-naphthol	0/56	2/56	2/56 (4 %)	Bio/dynamics
Weibliche Ratten				
Kontrolle	1/52	2/52	3/52 (6 %)	Bio/dynamics
			3/70 (4 %)[1)]	FDA
1 % 1-(2,4-Dinitrophenyl-azo)-2-naphthol	18/59	4/59	21/59 (36 %)[2)]	Bio/dynamics
			21/70 (30 %)[1), 2)]	FDA
Historische Kontrolle (12 Gruppen), nur Prozentangabe, keine absoluten Zahlen			(9,4 %)	Bio/dynamics

[1)] die US-FDA hat alle lichtmikroskopisch auswertbaren Lebern, auch die der nach 12 Monaten getöteten Tiere, in die Beurteilung einbezogen
[2)] ein Tier hatte gleichzeitig ein Adenom und ein Karzinom

Die weiblichen Tiere der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe wiesen außerdem eine erhöhte Inzidenz proliferativer, nicht neoplastischer feingeweblicher Veränderungen in der Leber auf, die als eosinophile oder klare Zellfoci beschrieben wurden.

Tabelle 6. Häufigkeit von eosinophilen und klaren Leberfoci bei weiblichen Charles-River-Albino-(CD)-Ratten nach Applikation von 1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter über 30 Monate			
Versuchsgruppe	Anzahl von weiblichen Ratten mit Leberfoci zur Gesamtzahl der untersuchten Tiere		
	eosinophile Foci	klare Foci	Untersucher
Kontrolle	1/52	6/52	Bio/dynamics
1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	11/59	14/59	Bio/dynamics

Angaben, ob derartige Veränderungen auch bei männlichen Versuchsratten gefunden wurden, wurden nicht gemacht. Bei den behandelten weibli-

chen Tieren wurden außerdem im Vergleich zur Kontrolle vermehrt vakuolige Degeneration, Gallengangsproliferation, Pericholangitis und subakute, nicht eitrige Hepatitis gefunden (Bio/dynamics, 1982 a). Nach den lichtmikroskopischen Untersuchungen von Dr. Squire wiesen 27/52 Weibchen der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe, aber nur ein weibliches Kontrolltier Leberzellhypertrophie, zonale Nekrosen und degenerative Veränderungen auf (Anmerkung: aus den Befundbeschreibungen der CTFA (1983) ist nicht ersichtlich, ob die Befunde von Dr. Squire zusätzliche histopathologische Befunde darstellen oder ob es sich um abweichende Diagnosen von denen der Bio/dynamics-Pathologen handelt). Lichtmikroskopisch wurden bei den Tieren der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe im Gehirn eine nicht signifikant erhöhte Inzidenz von Gliomen und bei den weiblichen Versuchstieren ein im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle ebenfalls nicht signifikant erhöhtes Vorkommen von Fibroadenomen der Mamma festgestellt. Die in der vorangegangenen Rattenfütterungsstudie beobachtete erhöhte Inzidenz von lymphoretikulären Tumoren bei den weiblichen Ratten, die 0,1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter erhalten hatten, wurden in diesem Versuch, in dem die 10fach höhere 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Konzentration (1 %) mit dem Futter verabreicht wurde, nicht gesehen (CTFA, 1983; FDA, 1986).

- **Bewertung des zweiten Rattenfütterungsversuches mit 1 % „D&C Orange No. 17“ und des hepatokanzerogenen Potentials von „D&C Orange No. 17“ bei bestimmungsgemäßem Gebrauch für den Menschen durch die FDA und Aufhebung der „de minimis interpretation of the Delaney clause“ durch Gerichtsbeschluß**

Bei der Diskussion der Lebertumorbefunde dieses Versuches wurde betont, daß lediglich die benignen Leberzelladenome, nicht aber die Leberzellkarzinome signifikant vermehrt waren und dies nur bei weiblichen Ratten, deren Leber gleichzeitig ein Spektrum von toxischen und proliferativen Veränderungen aufwiesen. Dies spricht dafür, daß dieser tumorigene Effekt nur in hohen, für die Leber toxischen Dosen durch einen indirekten Mechanismus bedingt sein dürfte.

Eine solche Situation kann beim Menschen nicht auftreten, da diese nie gegenüber solchen hohen „D&C Orange No. 17“-Konzentrationen exponiert sein können. Unter der Annahme, daß eine Frau gleichzeitig Creme-

Rouge, Gesichtspuder und Nagellack, die alle die höchstmögliche Konzentration an „D&C Orange No. 17“ enthalten, extrem häufig täglich benutzt, beträgt die geschätzte Worst-Case-Resorption 0,015 bis 0,021 µg, eine Menge, die für eine Frau mit einem Gewicht von 53 kg einer Aufnahme von 0,00029 bis 0,00039 µg/kg Körpergewicht/Tag entspricht. Unter der Annahme einer täglichen Nahrungsaufnahme von ca. 1,5 kg würde dies in etwa äquivalent zu einer Aufnahme von 0,000010 bis 0,000014 ppm mit der Nahrung sein (CTFA, 1983). Auch nach Ansicht der FDA waren die Leberzellkarzinome allein betrachtet bei den weiblichen Ratten nicht signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Unter Hinweis auf einen Bericht der Interagency Regulatory Liaison Group von 1979 ist es gemäß der FDA jedoch erforderlich, bei der Auswertung eines derartigen Versuches die Häufigkeit maligner und benigner Leberzelltumoren kombiniert zu betrachten, da derartige Läsionen (neoplastische Nodules, Adenome und Karzinome) im Rahmen der Ausbildung von Neoplasmen gleichzeitig oder zeitlich aufeinanderfolgende Stadien darstellen können. Bei einer derartigen Auswertung erwies sich 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in einer Konzentration von 1 % für weibliche CD-Ratten nicht nur im Vergleich zu der mitgeführten, sondern auch im Vergleich zur historischen Kontrolle als schwach kanzerogen. Da 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol bei bestimmungsgemäßem Gebrauch auch oral aufgenommen werden kann, wäre in den USA für eine Risikobewertung die Delaney Clause anzuwenden. Das kalkulierte Risiko für den Menschen beim Gebrauch von „D&C Orange No. 17“ ist jedoch extrem niedrig. Deshalb entschied die FDA für die äußerliche Anwendung dieses Färbemittels die Delaney Clause unter Hinweis auf die „de minimis doctrine“ nicht anzuwenden, da die Gefahr bei äußerlicher Anwendung des Produktes in Arzneimitteln und Kosmetika mit 1 : 19 Milliarden extrem niedrig ist und damit das Produkt bei bestimmungsgemäßem Gebrauch für den Menschen als sicher betrachtet werden kann (FDA, 1986, 1987). Dieser Entscheid der FDA wurde 1988 durch einen Gerichtsbeschluß mit folgender Begründung wieder aufgehoben: „In sum we hold that the agency’s de minimis interpretation of the Delaney Clause of the Color Additive Amendments is contrary to law. The listing decisions for D&C Orange No. 17 and D&C Red No. 19 based on that interpretation must therefore be corrected“. Deshalb mußte „D&C Orange No. 17“ von der Liste der Färbemittel für Kosmetika und Pharmazeutika zur äußerlichen Anwendung in den USA gestrichen werden (FDA, 1988).

In einer Prüfung auf kanzerogene Wirkung im Langzeitfütterungsversuch an Charles-River-CD-1-Mäusen erhielten Gruppen zu je 60 männlichen und 60 weiblichen Charles-River-CD-1-Mäusen 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol in Konzentrationen von 0,025, 0,25 oder 1 % im Futter (entsprechend ca. 36, 360 oder 1460 mg 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol/kg Körpergewicht/Tag) 23 Monate (männliche Tiere) bzw. 25 Monate (weibliche Tiere) lang verabreicht. Die Substanzkonzentrationen waren aufgrund eines 90tägigen Vorversuches festgelegt worden (keine weiteren Angaben). Das eingesetzte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol hatte eine analytische Reinheit von 97 %. Nach Analysen der US-FDA enthielt das verwendete 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol noch 0,29 % 2,4-Dinitroanilin und 0,7 % β-Naphthol. Als Kontrollen dienten zwei unabhängige unbehandelte Gruppen aus je 60 männlichen und 60 weiblichen Charles-River-CD-1-Mäusen. Die männlichen Tiere der höchsten Dosisgruppe nahmen während des Versuches etwas weniger an Körpergewicht zu als die männlichen Kontrollmäuse. Die Körpergewichtsentwicklung aller anderen männlichen und der weiblichen Versuchstiere entsprach der der Kontrollen. Die Mortalität der männlichen Mäuse der mittleren und hohen 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Dosisgruppen war konzentrationsabhängig leicht, aber signifikant im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Dagegen war die Überlebensrate der weiblichen Versuchsmäuse bis auf die Tiere der 0,25 %-Gruppe nicht vermindert. Abgesehen von einer Verfärbung der Felle der Versuchsmäuse durch 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol wurden keine signifikanten behandlungsbedingten Effekte auf den allgemeinen Gesundheitszustand, den Futterverbrauch und die Häufigkeit palpierbarer Gewebemassen beobachtet. Bei den Mäusen der 1 %-Gruppe wurde während des Versuches des öfteren eine geringgradige, jedoch signifikante Verminderung der Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokritwertes und der Erythrozytenzahl, zumeist verbunden mit einem Anstieg der Retikulozytenzahl, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollwerten beobachtet. Lichtmikroskopisch wurde bei den Tieren aller 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppen eine dosisabhängig an Intensität zunehmende Ablagerung eines gelbbraunen Pigmentes in Gehirn, Rückenmark, Schilddrüse, Herz und Magen und bei denen der höchsten Dosisgruppe außerdem noch in Milz, Zäkum und Leber diagnostiziert. In den Gehirn- und Rückenmarkneuronen der männlichen und weiblichen Mäuse der 1 %-Gruppe wurde ferner vermehrt eine neuronale Basophilie festgestellt. Bei

der Mehrzahl der Versuchstiere wurde eine chronische Myokarditis diagnostiziert.

Tabelle 7. Häufigkeit von chronischer Myokarditis bei Charles-River-CD-1-Mäusen nach 23- (Männchen) bzw. 25- (Weibchen) monatiger Verabreichung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter		
Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere mit chronischer Myokarditis zur Gesamtzahl der untersuchten Mäuse	
	männliche Mäuse	weibliche Mäuse
Kontrollgruppe A	49/60	38/59
Kontrollgruppe B	57/60	44/59
0,025 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	46/58	33/58
0,25 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	39/60	31/60
1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	55/60	54/59

Die Inzidenz an hepatozellulären Tumoren (Adenome und Karzinome) war bei den männlichen Mäusen dosisabhängig signifikant erhöht. Bei den weiblichen Mäusen wurden nur in der 0,25 und der 1 %-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen mehr Lebertumoren (Adenome und Karzinome) diagnostiziert (siehe Tabelle 8).

Anfang Tabelle 8

Tabelle 8. Häufigkeit von hepatozellulären Adenomen und hepatozellulären Karzinomen bei Charles-River-CD-1-Mäusen nach 23- (Männchen) bzw. 25- (Weibchen) monatiger Verabreichung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter				
Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere mit Lebertumoren zur Gesamtzahl der untersuchten Mäuse			Untersucher
	Adenome	Karzinome	Gesamtzahl*	
Männliche Mäuse				
Kontrollgruppe A	8/60	6/60	11/60 (18 %)	Bio/dynamics
	7/60	3/60	10/60 (17 %)	Dr. Squire
			8/58 (14 %)	FDA
Kontrollgruppe B	6/60	4/60	9/60 (15 %)	Bio/dynamics
	5/60	2/60	7/60 (12 %)	Dr. Squire
			8/59 (14 %)	FDA
0,025 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	7/58	6/58	12/58 (21 %)	Bio/dynamics
			11/58 (19 %)	FDA
0,25 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	7/59	8/59	14/59 (23 %)	Bio/dynamics
			13/57 (23 %)	FDA

Tabelle 8. Häufigkeit von hepatozellulären Adenomen und hepatozellulären Karzinomen bei Charles-River-CD-1-Mäusen nach 23- (Männchen) bzw. 25- (Weibchen) monatiger Verabreichung von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter				
Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere mit Lebertumoren zur Gesamtzahl der untersuchten Mäuse			Untersucher
	Adenome	Karzinome	Gesamtzahl*	
1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	11/60	10/60	20/60 (33 %)	Bio/dynamics
	12/60	7/60	19/60 (32 %)	Dr. Squire
			19/56 (34 %)	FDA
Weibliche Mäuse				
Kontrollgruppe A	1/60	0/60	1/60 (2 %)	Bio/dynamics
Kontrollgruppe B	1/59	1/59	2/59 (3 %)	Bio/dynamics
0,025 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	2/60	0/60	2/60 (3 %)	Bio/dynamics
0,25 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	5/60	0/60	5/60 (8 %)	Bio/dynamics
1 % 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol	3/59	2/59	5/59 (8 %)	Bio/dynamics
* 3 männliche Tiere der Kontrollgruppe A und je ein männliches Tier in den weiteren Gruppen hatten gleichzeitig Adenome und Karzinome				

Ende Tabelle 8

In den verschiedenen Unterlagen über die Lebertumorhäufigkeit bei männlichen Mäusen (Pathology Report von Bio/dynamics, 1982 b; CTFA, 1983; histopathologische Beurteilung durch Dr. R.A. Squire (CTFA, 1983)) und der Stellungnahme der FDA (1986) finden sich leicht voneinander abweichende Tumorhäufigkeiten. Dies führte die FDA darauf zurück, daß von der FDA zur Beurteilung nur die Lebern herangezogen wurden, deren Gewebe nach Ansicht der Pathologen der FDA für eine lichtmikroskopische Untersuchung geeignet war. Andere signifikante neoplastische und nicht neoplastische feingewebliche Veränderungen wurden bei den Versuchsmäusen nicht festgestellt. Nach etwa 2jähriger Applikation von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol im Futter in Konzentrationen von 0,025, 0,25 oder 1 % an Charles-River-CD-1-Mäuse kam es in den zwei oberen Dosisgruppen bei den männlichen, nicht aber bei den weiblichen Tieren zu einer signifikanten dosisabhängigen Zunahme von hepatozellulären gut- und bösartigen Tumoren (Bio/dynamics, 1982 b; CTFA, 1983; FDA, 1986).

Diskussion der biologischen Signifikanz der Lebertumoren in dem Fütterungsversuch an Charles-River-CD-1-Mäusen: Von der CTFA (1983) wurde die biologische Relevanz der bei den männlichen CD-1-Mäusen ver-

mehrt aufgetretenen Lebertumoren mit den nachstehend aufgeführten Gründen angezweifelt: Lebertumoren werden bei vielen Mäusestämmen gehäuft aufgrund einer gleichzeitigen Retrovirusinfektion beobachtet. Bei den männlichen Mäusen traten vermehrt Lebertumoren nur in Verbindung mit schwerer Lebertoxizität in der höchsten Konzentrationsgruppe von 1 % auf, einer Konzentration, die über der maximal tolerierten Dosis von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol lag. Die Lebertumorhäufigkeit der männlichen Mäuse war nur gegenüber den mitgeführten Kontrolldaten statistisch signifikant erhöht, nicht aber im Vergleich zu Kontrollen von 7 Langzeitfütterungsversuchen mit anderen Stoffen an CD-1-Mäusen, die von der CTFA ebenfalls in Auftrag gegeben worden waren. In diesen Kontrollgruppen lag die Streuung der Häufigkeit von hepatozellulären Tumoren bei männlichen Mäusen zwischen 8,5 und 26,2 %. Die CTFA argumentierte, daß die Häufigkeit hepatozellulärer Tumoren bei den männlichen Mäusen in der höchsten 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe (1 %) nach der lichtmikroskopischen Nachuntersuchung der Leberschnitte durch Dr. Squire 31,7 % betrug. Damit war die Lebertumorhäufigkeit zwar signifikant erhöht ($p = 0,006$ im Fisher-Exakt-Test) im Vergleich zu der Inzidenz von 14,2 % in den zusammenfaßten zwei mitgeführten Kontrollgruppen A und B, jedoch nicht signifikant größer als die Streuung (8,5 bis 26,2 %) der Häufigkeit von Lebertumoren bei männlichen Kontrolltieren aus den 7 anderen Fütterungsversuchen. Aufgrund dieser hohen Spontanhäufigkeit von Lebertumoren bei männlichen CD-1-Mäusen dürften deshalb nach der CTFA die in dem Fütterungsversuch mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol vermehrt aufgetretenen Lebertumoren keine biologische Signifikanz besitzen (CTFA, 1983).

Anmerkung: Bei der Argumentation waren von der CTFA nur die von Dr. Squire bei seiner lichtmikroskopischen Untersuchung ermittelten Lebertumorhäufigkeiten verwendet worden. Seitens der FDA wurden für deren später durchgeführte lichtmikroskopische Befundung der Lebern des 2-Jahres-Fütterungsversuches an CD-1-Mäusen mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol nur die Lebern verwendet, deren Gewebe nach dem Urteil der Pathologen der FDA für eine Untersuchung geeignet waren (FDA, 1986). Dies ist die Erklärung für die unterschiedlichen Tierzahlen.

Tabelle 9. Anzahl der männlichen Mäuse der zwei Kontrollgruppen mit benignen Lebertumoren zur Gesamtzahl der untersuchten Kontrollmäuse				
Kontrollgruppen		Gesamtzahl		Untersucher
A	B	absolut	%	
11/60	9/60	20/120	16,7	Bio/dynamics
10/60	7/60	17/120	14,2	Dr. Squire
8/58	8/59	16/117	13,7	FDA

Diese Argumente der CTFA wurden von der US-FDA wie folgt widerlegt: In der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe kam es zu einer geringgradigen verminderten Körpergewichtszunahme, einer leicht erhöhten Mortalität und einer Gelbfärbung des Felles der Tiere. Andere biologisch relevante, auf die applizierte Substanz zurückzuführende Veränderungen wurden nicht beobachtet. Abgesehen von den Lebertumoren wurden bei den Tieren somit keine relevanten substanzbedingten Effekte gesehen. Die Todesfälle in der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe wurden nicht durch systemisch-toxische Effekte verursacht. Somit wurde in dem Versuch die maximal tolerierte Dosis von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol nicht überschritten. Das Argument, daß sehr viele Mäusestämme eine hohe spontane Lebertumorrate aufwiesen, trifft für die CD-1-Mäuse, die für diesen Versuch verwendet wurden, nicht zu, da dieser Mäusestamm im Vergleich zu den meisten Mäusestämmen eine niedrige Spontanrate von Lebertumoren besitzt. Dies zeigten die Daten von 16 Kontrollgruppen (> 900 männliche und > 900 weibliche Mäuse) dieses Mäusestammes, die der FDA (1986) von der CTFA 1983 zur Verfügung gestellt wurden.

Tabelle 10. Spontanhäufigkeit hepatozellulärer Adenome und hepatozellulärer Karzinome bei CD-1-Mäusen in Prozent (> 900 männliche und > 900 weibliche Tiere; gemäß FDA, 1986)			
	Karzinome (%)	Adenome (%)	Gesamt (%)
Männchen	9,65 ± 4,25	5,12 ± 3,92	ca. 15
Weibchen	0,63 ± 1,03	1,17 ± 1,21	ca. 2

Die Häufigkeit von hepatozellulären Tumoren (Adenome und Karzinome) bei den männlichen CD-1-Mäusen dieser Basiskontrolle betrug somit 15 % und lag damit im Bereich der zwei in dem Fütterungsversuch mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol mitgeführten Kontrollgruppen. Demgegenüber

hatten die männlichen Mäuse der 1 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe gemäß der Befundung von Bio/dynamics 33 % und gemäß der FDA-Auswertung 34 % und die der 0,25 %-1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Gruppe gemäß der Befundung von Bio/dynamics und der FDA 23 % gut- und bösartige Lebertumoren. Die Lebertumorhäufigkeit bei den männlichen mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol behandelten Mäusen war somit nicht nur gegenüber den im 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol-Fütterungsversuch mitgeführten Kontrollgruppen, sondern auch im Vergleich zu den Basiskontrolldaten dieses Mäusestammes erhöht. Die in dem Fütterungsversuch mit 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol an CD-1-Mäusen bei den männlichen Mäusen der mittleren und hohen Konzentration signifikant vermehrt und dosisabhängig aufgetretenen Leberzelladenome und Leberzellkarzinome wurden somit durch das den Tieren mit dem Futter verabreichte 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol verursacht (FDA, 1986).

7.8 Reproduktionstoxizität

Im Rahmen der Prüfung von 25 synthetischen Färbemitteln auf teratogene Wirkung an Ratten und Kaninchen mit zusätzlichen Kontrollgruppen und in einem 2-Generationsversuch an Ratten nach standardisierten Protokollen in 4 kommerziellen Auftragsinstituten wurde auch 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol untersucht.

In den Teratogenitätsversuchen an Ratten und Kaninchen erfolgte die Substanzapplikation mittels Schlundsonde während der Organogenese. Die eingesetzten Dosen basierten auf den höchsten no effect level-Werten, die in 2-Jahres-Fütterungsversuchen an Ratten und Hunden ermittelt worden waren. Substanzbedingte Skelett- bzw. Organmißbildungen wurden bei den Feten der während der Organogenese behandelten Muttertiere nicht diagnostiziert (keine weiteren Angaben in dem Kurzreferat; Burnett et al., 1974).

In dem 2-Generationsversuch wurde 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol den Ratten wie die anderen 24 Färbemittel im Futter verabreicht. Grundlage der applizierten Dosen waren in diesen Versuchen entweder das 1-, 10-, 30- bzw. 100fache des A.D.I. (acceptable daily intake) oder die in den Langzeitversuchen an Ratten und Hunden ermittelten „sicheren Dosen“. Auch die beim Menschen eingesetzten Färbemittelmengen wurden bei der

Festsetzung der Färbemittelkonzentration im Futter berücksichtigt. Angaben über die Dosierungen der einzelnen Färbemittel und damit auch über die von 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol fanden sich in dem vorliegenden Kurzreferat nicht. Die Dosen lagen jedoch stets unter 1000 mg/kg Körpergewicht. Das Reproduktionsverhalten der Ratten wurde bis zur F_{2b}-Generation durch die Verabreichung des Färbemittels nicht beeinflußt (keine weiteren Angaben in dem Kurzreferat; Pierce et al., 1974).

7.9 Wirkungen auf das Immunsystem

Keine Information vorhanden.

7.10 Neurotoxizität

Keine Information vorhanden.

7.11 Sonstige Wirkungen

Keine Information vorhanden.

8 Erfahrungen beim Menschen

In Patch-Testen wurden zwischen 1980 und 1985 insgesamt 365 Patienten, die an kosmetikbedingter Dermatitis (n = 166), fazialer Melanosis (n = 3) bzw. nicht kosmetikbedingter Dermatitis und Ekzemen (n = 196) litten, auf eine Sensibilisierung gegenüber 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol überprüft. Der Stoff wurde als 1prozentige Zubereitung appliziert. Die Reaktion fiel für alle Patienten sowie für eine Kontrollgruppe (n = 51) negativ aus (Itoh et al., 1986).

Bei 8 Patienten, die an durch Brilliant Lake Red R hervorgerufener Kontaktdermatitis litten, bestand keine Kreuzsensibilisierung zwischen 1-(2,4-Dinitrophenylazo)-2-naphthol und Brilliant Lake Red R (1-Phenylazo-2-hydroxy-3-naphthoesäure). Die geprüften Konzentrationen betrugen 1 % in Vaseline. Die Bewertung der Hautreaktion erfolgte nach ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) 24 Stunden nach Patch-Entfernung (Kozuka et al., 1980).

9 Einstufungen und Grenzwerte

Keine Information vorhanden.

10 Arbeitsmedizinische Empfehlungen

Allgemeine arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen in Anlehnung an die BG-Vorschrift „Arbeitsmedizinische Vorsorge“ (BGV A4, bisherige VBG 100).

Literatur

BFG (The BF Goodrich Company, Akron, Ohio)
Bioassay: Ames Salmonella/microsome - laboratory identification number: #41 - compound name: Orange 5
Bericht (1986 a)
NTIS/OTS 0540879

BFG (The BF Goodrich Company, Akron, Ohio)
Bioassay: Ames Salmonella/microsome - laboratory identification number: 33, 33A, 33D - compound name: Fanchon Orange 16 OD 5845
Bericht (1986 b)
NTIS/OTS 0540879

BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin)
schriftliche Mitteilung an die Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie vom 17.12.1997

Bio/dynamics
A long-term and toxicity/carcinogenicity study of 1% D&C Orange No. 17 in rats
CTFA Color Additive Master File No. 9, Entry 512 (1982 a)
zitiert in: Hart et al. (1986) und FDA (1986)

Bio/dynamics Inc.
A long-term feeding study with D&C Orange #17 in mice
Bericht, Project No. 77-1883 (1982 b)
im Auftrag der CTFA (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc.)

Brown, J.P., Dietrich, P.S., Bakner, C.M.
Mutagenicity testing of some drug and cosmetic dye lakes with the Salmonella/mammalian microsome assay
Mutat. Res., 66, 181 - 185 (1979)

Burnett, C.M., Agersborg, H.P.K., jr., Borzelleca, J.F., Eagle, E., Ebert, A.G., Pierce, E.C., Kirschman, J.C., Scala, R.A.
Teratogenic studies with certified colors in rats and rabbits
Toxicol. Appl. Pharmacol., 29, 121 (1974)

Carson, S.
Skin painting studies in mice with 14 FD&C and D&C colors: FD&C Blue No. 1, Red No. 3, and Yellow No. 5, D&C Red No. 7, Red No. 9, Red No. 10, Red No. 19, Red No. 21, Red No. 27, Red No. 31, Red No. 36, Orange No. 5, Orange No. 10, and Orange No. 17
J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol., 3 (4), 357 - 370 (1984)

Ciba-Geigy Ltd., Toxicology/Pathology, Switzerland
Acute oral LD_{50} of TK-11675 in the rat
unveröffentlichter Bericht, Project No. Siss 3788 (1974 a)

Ciba-Geigy Ltd., Toxicology/Pathology, Switzerland
Skin irritation in the rabbit after single application of TK 11675
unveröffentlichter Bericht, Project No. Siss 3788 (1974 b)

Ciba-Geigy Ltd., Toxicology/Pathology, Switzerland
Irritation of TK 11675 in the rabbit eye
unveröffentlichter Bericht, Project No. Siss 3788 (1974 c)

Ciba-Geigy, Pigments Division
Safety data sheet Irgalite Red 2GW (1990)

CTFA (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington DC, USA)
Final review and analysis of scientific studies and risk assessments supporting the safety of D&C Orange No. 17 for use in external cosmetic and drug products not subject to incidental ingestion (1983)

FDA (Food and Drug Administration)
Listing of D&C Orange No. 17 for use in externally applied drugs and cosmetics
Fed. Reg., 51, 28331 - 28346 (1986)

FDA (Food and Drug Administration)
Correction of listing of D&C Orange No. 17 for use in externally applied drugs and cosmetics
Fed. Reg. 52, 5061 - 5063 (1987)

FDA (Food and Drug Administration)
Revocation of regulations; D&C Red No. 19 and D&C Orange No. 17
Fed. Reg., 53, 26768 - 26770 (1988)

Franz, T.J.
Percutaneous absorption of D&C Orange No. 17 through human skin in vitro
Report, University of Washington (1983)
zitiert in: CTFA (1983), Hart et al. (1986)

Green, M.R., Pastewka, J.V.
Mutagenicity of some lipsticks and their dyes for Salmonella typhimurium TA 98
Environ. Mutagen., 1, 116 - 117 (1979)

Green, M.R., Pastewka, J.V.
Mutagenicity of some lipsticks and their dyes
J. Natl. Cancer Inst., 64, 665 - 669 (1980)

Hart, R.W., Freni, S.C., Gaylor, D.W., Gillette, J.R., Lowry, L.K., Ward, J.M., Weisburger, E.K., Lepore, P., Turturro, A.
Final report of the color additive scientific review panel
Risk Anal., 6, 117 - 154 (1986)

Hazleton Laboratories
Final report: two-year feeding study - dogs
CTFA Color Additive Master File No. 9, Entry 61 (1964 a)
zitiert in: Hart et al. (1986) und CTFA (1983)

Hazleton Laboratories
Final report: D&C Red No. 19, two-year dietary feeding - rats
CTFA Color Additive Master File No. 9, Entry 62 (1964 b)
zitiert in: Hart et al. (1986) und CTFA (1983)

Hazleton Laboratories
Final report: two-year dietary feeding - rats
CTFA Color Additive Master File No. 9, Entry 118 (1966)
zitiert in: Hart et al. (1986) und CTFA (1983)

Hazleton Laboratories
Final report: repeated dermal applications - mice
CTFA Color Additive Mater File No. 9, entry 190 (1969)
zitiert in: CTFA (1983) und Carson (1984)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Hansaorange RN 01, Op. 70 429 - Akute orale Toxizität an weiblichen SPF-Wistar-Ratten
unveröffentlichter Bericht Nr. 0135/73 (1973 a)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Hansaorange RN 01, CM 70 429 - 32-Tage-Fütterungsversuch
unveröffentlichter Bericht Nr. 0128/73 (1973 b)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Hansaorange RN 01, CM 70 429 - Prüfung auf Haut- und Schleimhautverträglichkeit
unveröffentlichter Bericht Nr. 0136/73 (1973 c)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Ames Test - Hansa Rot GG (unkristall.) 169/79
unveröffentlichter Bericht Nr. 523/79 (1979)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Ames-Test - Hansa-Rot GG
unveröffentlichter Bericht 63/80 A (1980)

Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Prüfung auf sensibilisierende Eigenschaften von Hansa-Rot GG (C.I. Pigment Orange 5, Charge 14763) an Meerschweinchen nach Buehler
unveröffentlichter Bericht Nr. 146/82 (1982)

Hoechst AG, Pharma Research Toxicology and Pathology
Hansa-Rot GG - Detection of gene mutations in somatic cells in culture - HGPRT-test with V79 cells
unveröffentlichter Bericht Nr. 89.1287 (1989 a)

Hoechst AG, Pharma Research Toxicology and Pathology
Hansa-Rot GG - Chromosome aberrations in vitro in V79 Chinese hamster cells
unveröffentlichter Bericht Nr. 89.1505 (1989 b)

Hoechst AG, Pharma Research Toxicology and Pathology
Evaluation of Hansa-Rot GG in the in vivo cytogenetic test in bone marrow cells of the Chinese hamster - chromosome analysis
unveröffentlichter Bericht Nr. 90.0741 (1990)

Hunger, K., Herbst, W.
Pigments, organic
in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry
5th ed., vol. A20, p. 371 - 413
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992)

Itoh, M., Ishihara, M., Hosono, K., Kantoh, H., Kinoshita, M., Yamada, K., Nishimura, M.
Results of patch tests conducted between 1978 and 1985 using cosmetic ingredients
Skin Res., 28, 110 - 119 (1986)

Kozuka, T., Tashiro, M., Sano, S., Fujimoto, K., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Nakaminami, G.
Pigmented contact dermatitis from azo dyes. I. Cross-sensitivity in humans
Contact Dermatitis, 6, 330 - 336 (1980)

Kosmetik-Verordnung vom 16. Dezember 1977 in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juni 1985, Anlage 3
Das Deutsche Bundesrecht, 776. Lieferung, März 1997

Leberco Laboratories
D&C Orange No. 17, D&C Red No. 7, D&C Red No. 9, and D&C Red No. 10,
Entry No. 35, Ref. 18, Item # 7
Report to Toilet Goods Association, New York (1961)
zitiert in: Hart et al. (1986)

Litton Bionetics
Mutagenicity evaluation of D&C Orange No. 17 in the mouse lymphoma assay, final report
CTFA Color Additive Master File No. 9, Entry 335 (1977)
zitiert in: Hart et al. (1986)

Matsushima, T., Teichmann, B., Sawamura, M., Sugimura, T.
Mutagenicity of azo-compounds - improved method for detecting their mutagenicities by the Salmonella mutation test
Mutat. Res., 54, 220 - 221 (1978)

Milvy, P., Kay, K.
Mutagenicity of 19 major graphic arts and printing dyes
J. Toxicol. Environ. Health, 4, 31 - 36 (1978)

Miyagoshi, M., Hayakawa, Y., Nagayama, T.
Studies on the mutagenicity of cosmetic azo-dyes
Eisei Kagaku, 29, 212 - 220 (1983)

Møller, P., Wallin, H., Grunnet, N., Risom, L., Knudsen, L.E.
DNA damage in isolated rat hepatocytes exposed to C.I. Pigment Orange 5 and C.I. Pigment Yellow 12 by the alkaline comet assay
Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 18, 9 - 16 (1998)

Muzzall, J.M., Cook, W.L.
Mutagenicity of cosmetic dyes using the Salmonella/mammalian microsome test
Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 78, 204 (1978)

Muzzall, J.M., Cook, W.L.
Mutagenicity test of dyes used in cosmetics with the Salmonella/mammalian-microsome test
Mutat. Res., 67, 1 - 8 (1979)

Orna, M.V., Pamer, T.
Artists' colors
in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry
5th ed., vol. A3, p. 143 - 149
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1985)

Pierce, E.C., Agersborg, H.P.K., jr., Borzelleca, J.F., Burnett, C.M., Eagle, E., Ebert, A.G., Kirschman, J.C., Scala, R.A.
Multi-generation reproduction studies with certified colors in rats
Toxicol. Appl. Pharmacol., 29, 121 - 122 (1974)

Rojanapo, W., Chutimataewin, S., Tepsuwan, A.
The Salmonella mutagenicity test of some lipsticks and identification of their mutagenic ingredients
Thai J. Toxicol., 1, 15 - 30 (1985)

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.
A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells
Exp. Cell Res., 175, 184 - 191 (1988)
zitiert in: Møller et al. (1998)

Williams, G.M., Mori, H., McQueen, C.A.
Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals
Mutat. Res., 221, 263 - 286 (1989)