

**C.I. Basic Violet 3 (Kristallviolett)
(CAS-Nr.: 548-62-9)**

Vorbemerkungen:

Kristallviolett (C.I. Basic Violet 3, C.I. 42555, CASNr. 548-62-9) ist das Hexamethylderivat von Pararosanilin und Bestandteil des Farbstoffes Gentian Violet.

Kristallviolett ist synthesebedingt stets in größeren Mengen auch in Methylviolett, dem Pentamethylderivat von Pararosanilin (C.I. Basic Violet 1, C.I. 42535, CASNr. 8004-87-3 und 603-47-4) enthalten. Ein auf Methylviolett basierender Farbstoff ist z. B. Gentian Violet B.

Weiterhin können die unter diesen Bezeichnungen vermarkteten Farbstoffe verfahrensbedingt noch zu geringen Anteilen Michler's Keton enthalten (siehe hierzu EU-Dossier, Dez. 1994, BASF AG).

Bei Sichtung der Literatur ergab sich, dass Kristallviolett, Gentian Violet (oder Gentian Violet) und Methylviolett manchmal als verschiedene, in anderen Fällen als identische Farbstoffe angesehen wurden; eine ausreichende chemische Charakterisierung fehlt meist.

Bei der Zusammenstellung der Daten wurde der synonymen Verwendung der Farbstoffbezeichnungen (Gentian Violet, Kristallviolett, Methylviolett) Rechnung getragen; relevante Studien wurden zitiert.

Genotoxizität:

in-vitro:

Die Ergebnisse zur mutagenen und DNA-schädigenden Wirkung an bakteriellen Testsystemen sind uneinheitlich; bei einigen Untersuchungen interferierte die hohe Bakterientoxizität [1,2] mit der Erfassung der vorhandenen mutagenen Wirkung [3,4].

Punktmutationstests an Säugerzellen [4] verliefen negativ, jedoch führte Kristallviolett in allen Untersuchungen an Säugerzellen zu Chromosomen-aberrationen [5,6] .

An Hefen und Pilzen ist die Datenlage [7-9] in bezug auf erbgutverändernde Wirkungen uneinheitlich.

in-vivo:

Es liegen keine, heutigen Kriterien entsprechenden Prüfungen zur erbgutverändernden Wirkung in-vivo vor - alle in-vivo durchgeführten Prüfungen (SLRL-Tests an Drosophila [10], Schwesterchromatidenaustausch [11,12] an Hühnerembryonen (Cornell K-strain chicken), sowie ein Chromosomenaberrationstest an Knochenmarkzellen der Maus [11] mit bis zu 4wöchiger Substanzapplikation im Trinkwasser (berechnet wurde eine Aufnahme von 4 und 8 mg/kg /Tag)) ergaben keinen Hinweis auf eine erbgutverändernde Wirkung (das Knochenmark wurde erreicht; der Mitoseindex im Knochenmark war nach Substanzgabe vermindert).

Kanzerogenität:

Die beiden älteren (zitiert in NCTR 304 [13] und 338 [18]) an Ratten durchgeführten Langzeitstudien ((Kinosita (1940) [14] und Fitzhugh (1949) [15]) entsprechen in Durchführung und Dokumentation nicht heutigen Anforderungen; sie werden entsprechend von Littlefield et al. [13,18] als wenig valide zitiert und können somit nicht zur Bewertung von Kristallviolett herangezogen werden.

Bei der Studie von Kinosita [14] sind, wie in NCTR 304 [13] und NCTR 338 [18] angegeben, Papillome des Magens und eine adematöse Proliferation des hepatischen Gewebes nach wahrscheinlich oraler Verabreichung über 300 Tage aufgetreten.

Bei der Studie von Fitzhugh [15], bei der Ratten der Farbstoff in Dosierungen bis 1600 ppm über 2 Jahre verabreicht wurde, werden dosisabhängig aufgetretene neoplastische Knoten und dysplastische Herde in der Leber beschrieben, deren Ausprägung beim weiblichen Geschlecht stärker war.

Die mit Gentian Violet von Littlefield et al. an Ratten [16,18] und Mäusen [13,17] durchgeführten Studien zur krebserzeugenden Wirkung entsprechen annähernd heutigen Anforderungen.

Hierbei wurde Gentian Violet einer Reinheit (HPLC, bezogen auf den festen Farbstoff) von 99 % mit 1 % Methylviolett als Nebenkomponente geprüft.

Mit der F_{1a}-Generation Gentian Violet-behandelter Fischer F344 -Ratten [16,18] wurde eine Langzeitstudie in Dosierungen von 100, 300 und 600 ppm im Futter über die Dauer von 24 Monaten durchgeführt. Insgesamt wurden 570 weibliche und 570 männliche Ratten eingesetzt, nach 12 und 18 Monaten wurden je 15 männliche und 15 weibliche Ratten pro Gruppe (incl. Kontrollgruppen) getötet, die weiteren Ratten wurden nach 24 Monaten getötet (90 / Dosisgruppe und Geschlecht und 180 / Kontrollgruppe und Geschlecht. Alle getöteten oder vorzeitig verstorbenen Tiere wurden makroskopisch und mikroskopisch untersucht.

Bei der Futteraufnahme wurde kein signifikanter dosisabhängiger Unterschied zu den entsprechenden Kontrollen gesehen; die für weibliche F344-Ratten berechnete Substanzaufnahme (6/ 14 / 28 mg/kg bw./Tag) war leicht höher als die für männliche Tiere (5/ 12 / 23 mg/kg bw. /Tag).

F344-Ratte	Kontrolle (n[pro Geschlecht]=180)	100 ppm (n=90)	300 ppm (n=90)	600 ppm (n=90)	Histor. Kontroll- inzidenz (Bereich) ^{2,3}
Mortalität [% nach 24 Monaten]	* signifikant verändert gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$) ²) Haseman J.K. et al. (1996), Risk Analysis 16, 813-820 ³) Haseman J.K. (1983), Fund. Appl. Toxicol. 3, 1-9				
männlich	33	33	48 *	39	
weiblich	33	38	60 *	66 *	
[% Tumoren nach 24 Monaten]					
Leberzell- adenome					
männlich	0,5	2	3 *	4 *	3,3 (0 -8)
weiblich	0	1	2 *	1	0,7 (0 - 8)
Schilddrüse, Adenome + Adeno-karzinome					
männlich	1	5	3	9 *	14,5 (2-20)
weiblich	1	4	9 *	12 *	15 (2 - 18)
Hoden, maligne Mesotheliome	0	0	0	1	nach 18 Monaten: 0/ 0 / 7 / 7

Die Körpergewichte der männlichen und weiblichen Ratten der hohen Dosisgruppe blieben bereits ab der 5. Woche hinter den Kontrollen zurück. Nach 12 und 18 Monaten war das Körpergewicht der Ratten dieser Dosisgruppe um ca. 10 %, nach 24 Monaten um ca. 10 - 15 % gegenüber der Kontrolle reduziert.

Die Mortalität weiblicher und männlicher Tiere der Kontrollgruppen lag am Ende der Studie bei 33 %. Hingegen trat erhöhte Mortalität in beiden Geschlechtern bei der mittleren und hohen Dosisgruppe auf (w: 60 und 66 %; m: 48 und 39 %).

Alle F344-Ratten dieser Studie, auch die unbehandelten Kontrollgruppen, hatten am Ende der Studie eine im Vergleich zu historischen Kontrollen überdurchschnittlich hohe Inzidenz an mononukleärer Leukämie (0 / 100/ 300/ 600 ppm; w: 45/ 42 / 52/ 46 %; m: 58/ 73 / 77 / 57 %). Die historischen Kontrollraten für die F344-Ratte liegen bei ca. 20 % (Mittelwert) für weibliche und ca. 30 % für männliche Tiere (Chandra M. et al. (1992), Canc. Lett. 62, 49-56), über 194 NTP-Studien gibt Hasemann et al. (1996) (2) eine Inzidenz der Mittelwerte von 42 % bei weiblichen und 49 % bei männlichen F344-Ratten an.

Die Autoren diskutieren, dass die Mehrzahl der nicht-neoplastischen Veränderungen wahrscheinlich mit der mononukleären Leukämie in Zusammenhang steht; diese systemische Krankheit der Fischer Ratte kann nach Ausbreitung über die Blutbahn in den betroffenen Organen (Leber, Lunge, Hirn und Herz) zu reaktiven Parenchymveränderungen führen.

Die Inzidenzen der bei behandelten Ratten aufgetretenen Leberzelladenome liegen für beide Geschlechter im Bereich der publizierten historischen Kontrollwerte.

Der Anstieg der Tumorinzidenzen in der Schilddrüse nach 24 Monaten bei der höchsten Dosisgruppe in beiden Geschlechtern und bei der mittleren Dosis bei weiblichen Ratten fand im Bereich der MTD statt bzw. war die MTD bei den weiblichen F344-Ratten mit Bezug auf die hohe Mortalität überschritten, gleichwohl liegen die Inzidenzen noch im Bereich der publizierten historischen Kontrollwerte.

Eine mechanistische Abklärung zur Entstehung der Adenome und Adenokarzinome der Schilddrüse wurde im Bericht nicht vorgenommen. Wahrscheinlich stehen die Effekte an der Schilddrüse jedoch in Zusammenhang mit der besonderen Empfindlichkeit der Ratte gegenüber Störungen der Homöostase im T3/T4/TSH-Regelkreis.

Maligne Mesotheliome am Hoden, die nach 18 Monaten in den beiden hohen Dosisgruppen aufgetreten sind, wurden mit Bezug auf die geringe Inzidenz nach 24 Monaten von den Autoren als Spontanbefunde betrachtet.

Wie in obiger Tabelle dargestellt sind die Inzidenzen bei der F344-Ratte nach 24 Monaten in beiden Geschlechtern aufgetretenen Tumoren gering, und zwar statistisch signifikant von der mitgeführten Kontrolle, jedoch im Bereich der publizierten historischen Kontrollwerte.

Insgesamt wurden 720 B6C3F₁-Mäuse/Geschlecht eingesetzt. Gentian Violet wurde je 144 männlichen und 144 weiblichen B6C3F₁-Mäusen im Futter [13, 17] in Dosierungen von 100, 300 und 600 ppm über die Dauer von 24 Monaten verabreicht, wobei nach 12 und 18 Monaten je 24 Tiere/Geschlecht getötet wurden (in der Kontrolle 48 Tiere/Geschlecht) und die überlebenden Tiere (geplant: 96 /Geschlecht in den behandelten Gruppen und 192/ Geschlecht in den Kontrollgruppen) nach 24 Monaten getötet wurden. Alle getöteten oder vorzeitig verstorbenen Tiere wurden makroskopisch und mikroskopisch untersucht.

Bei Futterraufnahme und Körpergewichtszunahme wurde kein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Kontrollen gesehen; die für weibliche B6C3F₁-Mäuse berechnete Substanzaufnahme (15/ 36-39 / 71 mg/kg bw./Tag) war leicht höher als die für männliche Tiere (11-15/ 32-36 / 64-68 mg/kg bw. /Tag).

Nach 450 Tagen war die Mortalität der behandelten Tiere bei beiden Geschlechtern im Vergleich zur Kontrolle erhöht (statistisch signifikant bei den behandelten weiblichen Mäusen). Der Anstieg der Mortalität wird von den Autoren als toxischer Effekt von Gentian Violet diskutiert (=> MTD).

B6C3F ₁ -Maus	Kontrolle (n [pro Geschlecht] =192)	100 ppm (n=96)	300 ppm (n=96)	600 ppm (n=96)	Historische Kontroll- Inzidenz ¹⁾
Mortalität [% nach 24 Monaten]	* signifikant verändert gegenüber der Kontrolle (p < 0,05) * ² Bonferroni-Holm # signifikant verändert gegenüber der Kontrolle (p < 0,05), nachberechnet ¹⁾ Haseman J.K. et al. (1985), JNCI, Vol. 75, 975-984				
männlich	13	14	20	23	
weiblich	13	28 *	27 *	64 *	
[% Tumoren nach 24 Monaten]					
benigne hepatozelluläre Tumore					
männlich	10	15	22 #	38 #	0 - 44
weiblich	4	9	39 #	21 #	0 - 18
maligne hepatozelluläre Tumore					
männlich	15	17	18	35 *	8 - 32
weiblich	4	5	32 *	77 *	0 - 15
Adenome der Harterschen Drüse					
männlich	4	7	11	10	0 - 12
weiblich	4	12 * ²	20 *	16 *	0 - 6

Die Substanz führte bei B6C3F₁-Mäusen dosisabhängig nach 24 Monaten zu einer erhöhten Inzidenz an hepatozellulären Karzinomen, wobei das weibliche Geschlecht stärker betroffen war.

Die Inzidenz neoplastischer Leberveränderungen war beim weiblichen Geschlecht deutlich höher als beim männlichen, obwohl männliche B6C3F₁-Mäuse eine höhere Spontaninzidenz aufweisen.

Adenome der Harterschen Drüse (Tränendrüse) traten in beiden Geschlechtern auf, wobei die Inzidenzen bei behandelten weiblichen Tieren außerhalb der historischen Kontrolldaten liegen.

Die bei weiblichen Mäusen in Blase, Uterus, Ovarien und Vagina aufgetretenen Retikulumzell Sarkome (Typ A nach Dunn, 1954), deren Inzidenz nur in der höchsten Dosierung (600 ppm) statistisch signifikant erhöht war, können auf Basis der vorliegenden Daten nicht bewertet werden, da eine heute nicht mehr gebräuchliche Nomenklatur [21] und Organzuordnung eines systemischen Tumors verwendet wurde.

Alle Tumoren traten bei Mäusen am Ende der Lebenszeit auf; nach 12 bzw. 18 Monaten waren keine Tumoren nachweisbar. Die im Vergleich zur Kontrolle hohe Mortalität der behandelten weiblichen Mäuse, ist als Überschreitung der MTD, vor allem bei der hohen Dosisgruppe zu interpretieren.

Reproduktionstoxizität:

Fertilitätsbeeinträchtigung:

Abgesetzte männliche und weiblichen Ratten (F_0 -Generation), die zufällig auf die Dosisgruppen 100, 300 oder 600 ppm bzw. die Kontrollgruppe verteilt wurden, bekamen Gentian Violet über die Dauer von mindestens 80 Tagen im Futter verabreicht. Verpaart wurden Ratten der gleichen Dosisgruppe unter Vermeidung von Bruder-/Schwesterverpaarungen. Je 2 männliche und 2 weibliche Tiere wurden zufällig aus jedem Wurf (F_{1a} -Generation) für die chronische Studie [16,18] ausgewählt, wobei die F_{1a} -Tiere entsprechend der Dosisgruppe der Elterntiere weiter über die Dauer von bis zu 24 Monaten gefüttert wurden.

Es liegen keine spezifischen Angaben zu Fertilitätsparametern vor. Allerdings wurde entsprechend den zur Studie verfügbaren Angaben die Substanz über mindestens einen Spermio-genese-Zyklus verabreicht. Da keine fertilitätsmindernden Effekte aufgeführt sind und genügend Tiere für eine zufällige Verteilung von je 90 Tieren pro Geschlecht und Dosisgruppe zur Durchführung der Kanzerisierungsstudie erhalten wurden, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Substanz einen fertilitätsbeeinträchtigenden Effekt ausübt.

Weiterhin lässt sich aus den absoluten und relativen Hodengewichten kein dosisbezogener Substanzeffekt ableiten.

Entwicklungsschädigung:

Gentian Violet wurde an Gruppen, die mindestens 20 CD-Ratten umfassten, in Dosierungen von 2,5; 5 und 10 mg/kg bw. vom 6. bis 15. Trächtigkeitstag per Schlundsonde [19] verabreicht. Ab 5 mg/kg bw. war die Körpergewichtsentwicklung beeinträchtigt, bei 10 mg/kg bw. war das Körpergewicht reduziert, und es starben ca. 10 % (3/32) der Muttertiere, die Tiere der anderen Dosisgruppen überlebten bis zur Tötung am 20. Trächtigkeitstag.

Die dosisabhängig ausgeprägten klinischen Anzeichen für maternale Toxizität waren: Körpergewichtsverlust, erschwerte Atmung, Lethargie, Schwäche, Durchfälle, Tränenfluss und gesträubtes Fell.

Im Gegensatz zu den Nachkommen der 2,5 und 5 mg/kg bw. Gruppe bei denen keine Effekte auftraten, wurde bei den Nachkommen der 10 mg/kg bw. Gruppe im Bereich maternaler Toxizität eine signifikant erhöhte Inzidenz an Hydroureteren, Hydronephrosen und verkürzten Rippen (Variation) festgestellt - die Autoren des Berichtes kommen zum Schluss, dass die Effekte auf die Nachkommen in Zusammenhang mit der maternalen Toxizität stehen.

Weiterhin wurde im Bericht diskutiert, dass die gleichmäßige Verteilung der Befunde an Harnleiter und Niere über alle Dosisgruppen für eine entsprechende Prädisposition der CD-Ratte sprechen könnte.

Gentian Violet wurde auch an Kaninchen [20] untersucht, denen die Substanz vom 6. bis 19. Trächtigkeitstag in Dosierungen von 0,5 / 1 und 2 mg/kg per Schlundsonde verabreicht wurde. Dosisabhängige maternale Mortalität (ca. 7, 15 und 23 %) trat bei Tieren der Behandlungsgruppen auf. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Trend in bezug auf Fetotoxizität. Das Körpergewicht der behandelten Nachkommen war gegenüber den Kontrollen dosisabhängig reduziert. Missbildungen bzw. Variationen waren bei den Nachkommen nicht aufgetreten.

Fazit:

Genotoxizität:

Bei in-vitro Untersuchungen zeigte Kristallviolett überwiegend eine erbgutverändernde Wirkung. Die in-vivo durchgeführten Untersuchungen zur erbgutverändernden Wirkung waren alle negativ, jedoch wurden nicht sehr aussagekräftige Tests durchgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass sich in den vorliegenden in vivo-Genotoxizitätstests keine Hinweise auf eine erbgutverändernde Wirkung der Substanz ergeben, erfolgt gemäß den EU-Einstufungskriterien keine Einstufung (M: -).

Kanzerogenität:

Tumoren traten bei Ratten und Mäusen am Ende der Lebenszeit und im Bereich der MTD bzw. beim weiblichen Geschlecht von Ratten und Mäusen bei Dosierungen oberhalb der MTD auf.

Die Tumorzinzenzen bei F344-Ratten lagen im Bereich der publizierten historischen Kontrolldaten.

Die krebserzeugende Wirkung von Kristallviolett ist aufgrund der an der B6C3F₁-Maus und der F344-Ratte durchgeführten Studien ausreichend untersucht; wie oben dargestellt reichen die Ergebnisse aus den beiden vorliegenden Studien an Nagern für eine Einstufung der Substanz bezüglich der krebserzeugenden Wirkung in Kategorie 2 gemäß den EU-Einstufungskriterien nicht aus. Daher erfolgt gemäß den EU-Einstufungskriterien eine Einstufung in Kategorie 3 b (C: 3 b).

Reproduktionstoxizität/Fertilitätsbeeinträchtigung:

Es liegen keine entsprechenden Studien vor, allerdings ergaben sich aus den vorliegenden Daten zur Kanzerisierungsstudie keine Hinweise auf eine fruchtbarkeitsbeeinträchtigende Wirkung. Daher erfolgt gemäß den EU-Einstufungskriterien keine Einstufung (R_F: -).

Reproduktionstoxizität/Entwicklungsschädigung:

Effekte auf die Nachkommen treten nur im Bereich massiver maternaler Toxizität auf, daher ist die Substanz gemäß den EU-Einstufungskriterien nicht einzustufen (R_E: -).

Literatur:

- [1] Zeneca, unveröffentlichte Studie, CTL/L/6191, SI/94/0101, 14.12.94
- [2] Zeneca, unveröffentlichte Studie, CTL/L/6191, SI/94/0102, 14.12.94
- [3] TSCATS: OTS0571547, 8EHQ-1092-11619, DuPont Chem. (1992)
- [4] Aidoo A. et al. (1990), Terat. Carcin. Mut. 10, 449-462
- [5] Au W. et al. (1978), Mut. Res. 58, 269-276
- [6] Hsu T.C. et al. (1982), Mut. Res. 93, 185-193
- [7] Shanin M.M., Borstel R.C. (1978), Mut. Res. 53, 1-10
- [8] Zimmermann F.K. et al. (1984), Mut. Res. 133, 199-244
- [9] Nagai S. (1959), Science 130, 1188-1189
- [10] Woodruff R.C. et al. (1985), Environ.Mutagen. 7, 677-702
- [11] Au W. et al. (1979), Mut. Res. 66, 103-112
- [12] Bloom S.E. (1982), Cytogenetic Assays Environ. Mut., 137-159
- [13] NCTR Technical Report for Experiment No. 304, September 1984
- [14] Kinosita (1940), Yale J. Biol. Med. 12, 287-300 und zitiert in [13,18]
- [15] Fitzhugh (1949), unveröffentlichte Studie, FDA-files zitiert in [13,18]
- [16] Littlefield N.A., Gaylor D.W. (1989), Fd. Chem. Toxic. Vol . 27, 239-247
- [17] Littlefield N.A. et al. (1985), Fund. Appl. Toxicology 5, 902-912
- [18] NCTR Technical Report for Experiment No. 338, November 1988
- [19] NCTR(1982): Research Triangle Institute, RT81-GV
- [20] NCTR(1983): Research Triangle Institute, RB81-GV
- [21] Pattengale P.K. in Pathology of Tumors in Laboratory Animals, Vol. II (Turusov V.S. and U. Mohr(Eds.)), Tumors of the mouse, IARC Scientific Publications No. 111 (1994), IARC Lyon, France, 651-653.

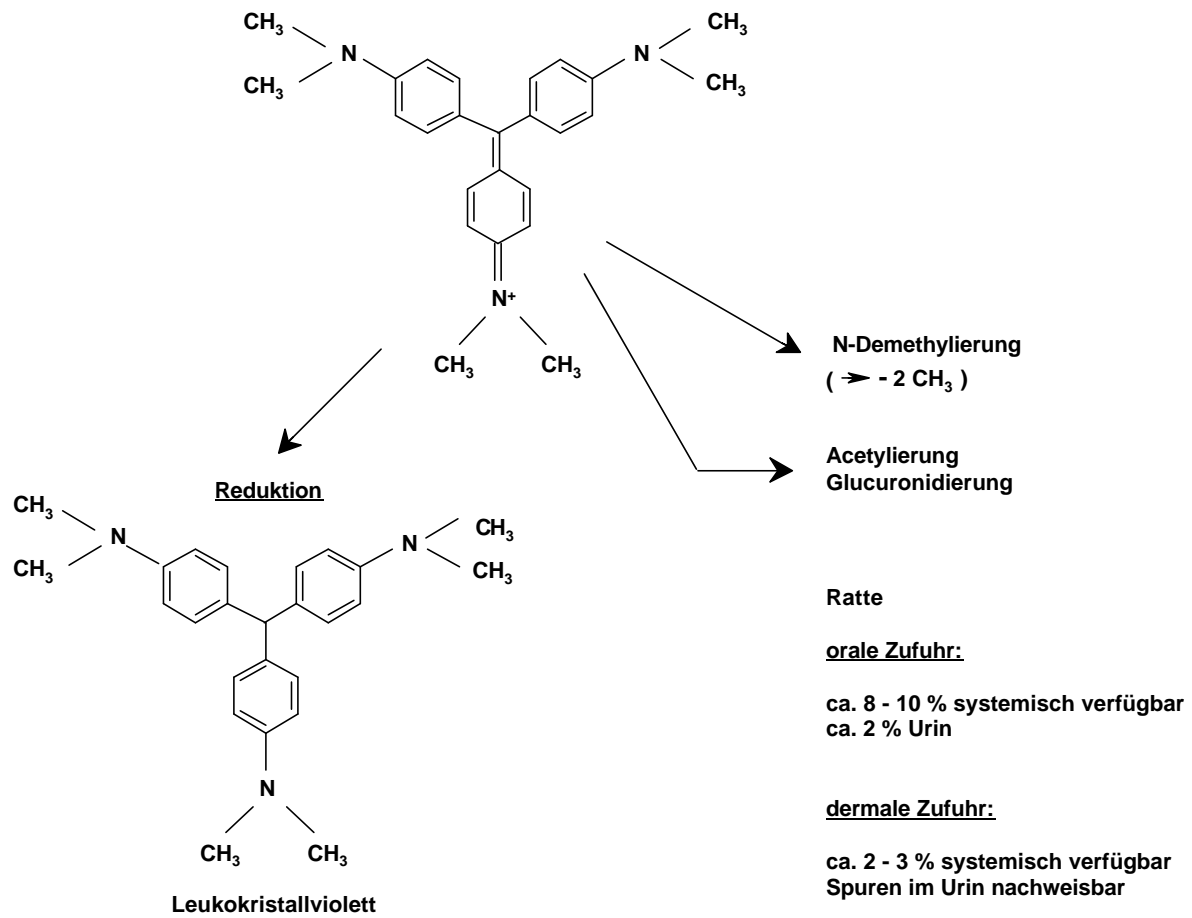
Kristallviolett (Cl.Basic Violet 3)

Übersicht zur Genotoxizität nach Endpunkten

In-vitro:

Mutationen	<u>Bakterielle Testsysteme:</u> Interferenz der mutagenen Wirkung mit Bakterientoxizität <u>Säugerzellsysteme:</u> negativ HPRT(CHO-K1-B4), GPT(CHO-AS52; -S9: negativ, +S9: fraglich) Interferenz mit Cytotoxizität
Chromosomenschäden	in allen getesteten zellulären Systemen (u.a. CHO, Humanlymphocyten, HeLa) führte Kristallviolett zu Chromosomenaberrationen bei Fehlen von S9-Mix; Interferenz mit Cytotoxizität. S9-reduziert die Aktivität
DNA-Schädigung/Reparatur	<u>Bakterielle Testsysteme:</u> uneinheitlich (Rec-Assay, Rosenkranz-Test)
In-vivo:	
Cytogenetik	Knochenmark der Maus während 4wöchiger Substanzgabe im Trinkwasser: negativ Hühnerembryo (Cornell K-strain): negativ
DNA-Schädigung	Nucleosidsedimentations-Test mit Lymphocyten B6C3F ₁ -Maus: negativ Hühnerembryo (Cornell K-strain): negativ
SLRL-Drosophila	negativ

Metabolismus von Kristallviolett



(Stand: Nov. 1998)