

m-Phenylendiamin

(CAS-NR.: 108-45-2)

und m-Phenylendiamin-Dihydrochlorid

(CAS-NR.: 541-69-5)

Es liegt eine ausführliche toxikologische Bewertung von m-Phenylendiamin (MPD) und m-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (MPD2HCl) vor, auf die im folgenden Bezug genommen wird [1]. MPD und sein Dihydrochlorid sind Methämoglobinbildner; sie wirken nicht reizend an Haut und Auge. MPD kann in toxischen Mengen auch über die Haut aufgenommen werden [1].

Genotoxizität:

MPD ist im Ames-Test nur bei metabolischer Aktivierung mutagen. Im Test auf mitotische Rekombination an Hefe ist MPD mit und ohne Zusatz von S9-Mix inaktiv. Im UDS-Test an isolierten Rattenhepatozyten zeigte MPD (0,054-108 µg/ml) keine DNA-schädigende Wirkung und die Inkubation von isolierter Lambda-DNA bzw. von Rattenembryo-Lungenzellen oder HeLa-Zellen mit MPD (27 µg/ml) führte zu keiner Bildung von DNA Strangbrüchen. In verschiedenen Chromosomenaberrationstesten in vitro zeigt MPD ohne Zusatz von S9-Mix eine chromosomenschädigende Wirkung; in Gegenwart von S9-Mix war MPD meist inaktiv. Ein Zelltransformationstest mit 8-tägiger Inkubation von Embryozellen des Syrischen Goldhamsters mit maximal 5 µg MPD/ml verlief zunächst positiv, der Wiederholungsversuch war jedoch negativ [1].

Die Inkubation von Humanlymphozyten mit 125-500 µg/ml (ohne S9-Mix) bzw. mit 1250-5000 µg/ml (mit S9-Mix) führte zu einer erhöhten Chromosomenaberrationsrate [2]. Auch mit Hilfe des Comet-Assays konnte eine DNA-Schädigung nach 4-stündiger Inkubation von Humanlymphozyten mit 1-25 mM (108-2700 µg/ml) MPD nachgewiesen werden; die vorherige Zugabe eines pflanzlichen Metabolisierungssystems führte zu einer Verringerung des Effekts [3].

Im Mikronucleus-Test wirkte MPD nach oraler Gabe sowohl bei Mäusen (max. 1 x 50 mg MPD/kg KGW [2] bzw. max. 2 x 65 mg MPD/kg KGW [4]) als auch bei Ratten (2 x 300 mg MPD2HCl = 2 x 180 mg MPD/kg KGW) [5] nicht clastogen im Knochenmark. Demgegenüber wird über eine dosisabhängige Zunahme der Mikronuclei im Knochenmark von männlichen Swiss-Mäusen (10 Tiere/Dosis) nach zweimaliger i.p.-Injektion im 24-stündigen Abstand von je 50-500 mg MPD (83 % rein; keine Angaben zu Verunreinigungen)/kg KGW bei gleichzeitiger dosisabhängiger zytotoxischer Wirkung berichtet (Aufarbeitungszeitpunkt: 6 Stunden nach der 2. Injektion). Die Dosis von 2 x 1000 mg/kg KGW wirkte bei allen Tieren letal [6].

Mehrere Dominant-Letal-Tests an Ratten mit i.p.-Verabreichung verliefen negativ. Ein UDS-Test in vivo an Mäusen (50 bzw. 100 mg MPD/kg KGW i.p.) erbrachte kein deutlich positives Resultat in den Keimzellen: 0,5 bzw. 1,0 Grains/Zellkern im Vergleich zu 0,4-0,6 Grains/Zell-kern in der Kontrolle [1]. Nach einmaliger oraler Gabe von 200 mg/kg KGW wurde zwar bei Swiss-Mäusen eine ca. 80%ige Hemmung der testikulären DNA-Synthese festgestellt [7]; dieser Effekt ist jedoch offensichtlich lediglich durch die toxische Wirkung der Substanz bedingt (Senkung der Körpertemperatur) und daher bezüglich der Genotoxizität von OPD als Artefakt anzusehen [13]. Die eingesetzte Dosis lag außerdem wohl bereits im akut toxischen Bereich (LD₅₀ oral, Ratte: 152-325 mg/kg KGW) [1].

Nach einmaliger dermaler Applikation (okklusiv) von 300 mg/kg KGW wurde bei männlichen Wistar-Ratten am Ende der 24-stündigen Einwirkzeit eine deutliche MPD-Bindung an die Leber- und Nieren-DNA, nicht jedoch an die Harnblasen-DNA, beobachtet [8].

Im Fellfleckentest an der Maus führte MPD nach einmaliger i.p.-Verabreichung von 5 bzw. 15 mg/kg KGW zu keiner Veränderung der Fleckenhäufigkeit im Vergleich zur Kontrolle [2].

Nach einmaliger oraler Gabe von 0,5 mmol (=54 mg) MPD/kg KGW konnten bei weiblichen Wistar-Ratten Hämoglobinaddukte nachgewiesen werden [9].

Kanzerogenität:

Es liegen Studien zur Frage der kanzerogenen Wirkung von MPD mit verschiedenen Applikationsarten vor [1]:

Die 18-monatige Verabreichung von MPD2HCl mit dem Futter führte bei CD-Ratten (max. 78 mg MPD/kg KGW/Tag) sowie bei CD-1 Mäusen (max. 342 mg MPD/kg KGW/Tag) zu keiner erhöhten Tumorinzidenz.

Auch in einer 2-Jahres-Studie mit Trinkwasser-Applikation hatte MPD2HCl weder bei Fischer 344-Ratten (max. 24 mg MPD/kg KGW/Tag) noch bei BDF1-Mäusen (max. 32,4 mg MPD/kg KGW/Tag) eine kanzerogene Wirkung.

In einer weiteren Studie an B6C3F₁-Mäusen mit MPD-Verabreichung im Trinkwasser (max. ca. 40 mg/kg KGW/Tag) für 78 Wochen, gefolgt von einer 5-7wöchigen Nachbeobachtungszeit, ergaben sich keine Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung der Substanz.

Die dermale Applikation von maximal 1 mg MPD in Aceton, dreimal wöchentlich für 24 Monate (120 mg/kg KGW/Woche; durchschnittlich ca. 17 mg/kg KGW/Tag), hatte bei C3H-Mäusen keinen Einfluss auf die Tumorinzidenzen im Vergleich zur Kontrolle.

Die Implantation von MPD-Kristallen (in Kollodium-Hülle) in die Harnblase (alle 1-2 Monate; Dosis nicht genannt) führte bei Ratten innerhalb von 125 Tagen zu leichten papillomatösen Veränderungen in der Harnblase; Harnblasen-Tumoren traten jedoch nicht auf.

Es liegen zwei Kanzerogenese-Studien an Ratten mit subkutaner Applikation vor, in denen über die substanzbedingte Bildung von lokalen Tumoren an der Injektionsstelle berichtet wird: In der einen Studie erhielten je 5 Wistar-King-Ratten über einen Zeitraum von ca. 5-17 Monaten an jedem 2. Tag eine subkutane Injektion von 0 (Wasser-Kontrolle), 9 oder 18 mg MPD/kg KGW bzw. von 12 oder 24 mg MPD2HCl (entsprechend 7,2 bzw. 14,4 mg MPD)/ kg KGW). Jeweils bei 1/5 Tieren der 9 mg MPD/kg-Gruppe und der 24 mg MPD2HCl-Gruppe trat nach 11- bzw. nach 5-monatiger Behandlung ein Fibrosarkom an der Injektionsstelle auf. Aufgrund der geringen Anzahl der eingesetzten Tiere lässt sich aus dem Ergebnis dieser Studie keine konkrete Aussage zur Frage der kanzerogenen Wirkung von MPD ableiten [1].

In der anderen Studie erhielten Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts über einen Zeitraum von 24 Monaten einmal wöchentlich eine subkutane Injektion von 0; 8,33 bzw. 25 mg MPD (in Erdnussöl)/kg KGW (entsprechend ca. 1,2 bzw. 3,6 mg/kg KGW/Tag). Anschließend wurden die Tiere bis zum spontanen Tod weitergehalten bzw. im moribunden Zustand getötet. Aussehen, Verhalten und Mortalität blieben unbeeinflusst; die Körpergewichtszunahme war nur bei den männlichen Tieren der beiden Dosisgruppen um ca. 7,6 % erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle. Es traten dosisabhängig vermehrt maligne Tumoren an der Injektionsstelle auf bei gleichzeitiger deutlicher Abnahme der Zahl der malignen Mammatumoren (siehe Tabelle 1: Tumorzinzidenzen bei Sprague-Dawley-Ratten nach subkutaner Injektion von m-Phenylendiamin (einmal wöchentlich über 2 Jahre) [1,10]

Lokalisation	Öl-Kontrolle		8,33 mg/kg		25 mg/kg	
	m	w	m	w	m	w
Zahl der Tiere mit malignen Tumoren						
Auge					1	
Gehörgang			1			
Gehirn		1	1	1		1
Hypophyse			2	1	1	3
Leber		1			2	
Magen			1			
Mamma	1	13		8		4
Nebenniere			1			
Bauchhöhle			1			
Pankreas					1	
subkutan			1			
Injektionsstelle	6	1	10	2	15	7
Schilddrüse	1	3	1	5	4	3
Muskel					1	
Uterus				1		2
sonstige	1	2	1	1		1
Summe maligne	9	21	20	19	25	21

Lokalisation	Öl-Kontrolle		8,33 mg/kg		25 mg/kg	
	m	w	m	w	m	w
Zahl der Tiere mit benignen Tumoren						
Hypophyse	3	16	7	9	3	3
Leber		1			1	1
Magen		1	1			
Mamma		18		15		16
Nebenniere	1	1	2	1	1	
Pankreas	4		1		1	
subkutan	4		1		3	
Injektionsstelle	3			2	1	
Schilddrüse	5	4				1
Uterus		1		1		2
sonstige		2		1		
Summe benigne	20	44	12	29	10	23
Gesamt-Tumorrare	29	65	32	48	35	44

Reproduktionstoxizität:

Je 7-9 Sprague-Dawley-Ratten erhielten vom 6.-15. Tag der Trächtigkeit tägliche orale Gaben von 0; 45; 90 bzw. 180 mg MPD (gelöst in Propylenglykol)/kg KGW mit der Schlundsonde. Am 20. Tag der Trächtigkeit wurden die Tiere getötet und die Feten eingehend untersucht. Die Körpergewichtszunahme der Muttertiere war nur in der 180 mg/kg-Gruppe signifikant erniedrigt; klinische Vergiftungssymptome oder Todesfälle traten nicht auf. Bei den Tieren der 180 mg/kg-Gruppe war die Zahl der Resorptionen nur marginal und nicht signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen (siehe nachfolgende Tabelle).

Dosis	Anzahl Muttertiere	Anzahl Implantationen	Anzahl Resorptionen
Kontrolle	22	257 (11,7/Muttertier)	11 (0,5/Muttertier)
45 mg/kg	9	115 (12,8/Muttertier)	8 (0,9/Muttertier)
90 mg/kg	8	107 (13,4/Muttertier)	9 (1,1/Muttertier)
180 mg/kg	7	97 (13,9/Muttertier)	11 (1,6/Muttertier)

Die Zahl der Implantationen/Muttertier, das Fetengewicht, das anteilige Verhältnis von männlichen und weiblichen Feten sowie die Inzidenz an fetalen Anomalien entsprachen den Kontrolldaten [1].

Je 25 trächtige OFA(DS)SPF-Ratten erhielten vom 6.-15. Tag der Trächtigkeit tägliche orale Gaben mit der Schlundsonde von 0; 10; 30 bzw. 90 mg MPD (gelöst in Wasser)/kg KGW und wurden am 20. Tag der Trächtigkeit getötet. Bei einigen Tieren der 90 mg/kg-Gruppe war in der 2. Versuchswoche der Urin dunkel gefärbt und bei 7 Tieren dieser Gruppe trat eine leichte Blaufärbung der Mundschleimhäute auf. 6 Tiere dieser Gruppe starben vor Versuchsende, die restlichen Tiere erholten sich rasch nach dem Absetzen der MPD-Behandlung. Bei den Tieren der 30 mg/kg- und der 90 mg/kg-Gruppe waren die Körpergewichtszunahme und der Futterverbrauch signifikant

erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle. Signifikante Unterschiede hinsichtlich folgender reproduktionstoxikologischer Parameter wurden im Vergleich zur Kontrolle nur in der 90 mg/kg-Gruppe gefunden: Mittleres Plazentagewicht, Zahl der Würfe mit lebenden Jungtieren, Gesamtzahl der lebenden Jungtiere, Zahl der lebenden Jungtiere pro Wurf und mittleres Jungtiergewicht erniedrigt; Zahl der Totalresorptionen, Gesamtzahl der fröhrtoten und spärtoten Feten, Anteil der Muttertiere mit geringfügig veränderten Feten und Inzidenz geringfügig missgebildeter Feten erhöht. Gravierende Missbildungen wurden nicht gefunden [1].

Aus den vorliegenden Dominant-Letal-Testen an Ratten (Dosierung: max. 100 mg/kg KGW/ Woche i.p.) ergeben sich keine Hinweise auf eine reproduktionstoxische Wirkung von MPD [1]. Im UDS-Test an der Maus mit i.p.-Applikation von 100 mg/kg KGW wurde in den männlichen Keimzellen keine deutlich erhöhte DNA-Reparatursynthese gemessen [1]. Nach oraler Gabe von 200 mg MPD/kg KGW kam es bei Swiss-Mäusen zu einer ca. 80%igen Hemmung der testikulären DNA-Synthese [7], wahrscheinlich bedingt durch die Senkung der Körpertemperatur [13]; die Dosis lag wohl auch bereits im akut toxischen Bereich [1].

Sensibilisierung:

MPD hat in einigen Fällen eine schwache hautsensibilisierende Wirkung bei Meerschweinchen gezeigt [1]. Positiv verlief auch ein Ear Swelling Test an CBA/J-Mäusen nach Vitamin A-Vorbehandlung und mit i.p.-Injektion von mit MPD behandelten Milzzellen und Provokation durch Pinselung mit 1%iger MPD-Lösung [11]. Mit Hilfe eines modifizierten Lymphozyten-Transformationstests konnte nach Sensibilisierung von Meerschweinchen mit p-Phenylendiamin im Maximierungstest eine Kreuzreaktion u.a. auch mit m-Phenylendiamin nachgewiesen werden [12].

Beim Menschen gibt es einige Berichte über den Nachweis einer Hautsensibilisierung gegenüber MPD bei gleichzeitig vorliegender Sensibilisierung gegenüber p-Phenylendiamin [1].

Fazit:

Genotoxizität:

m-Phenylendiamin zeigt nur im Ames-Test und nur in Gegenwart von S9-Mix eine genotoxische Wirkung in vitro; in anderen in vitro-Genotoxizitätstesten ist MPD inaktiv. In mehreren Mikronucleus-Testen (Knochenmark) ist die Substanz nach oraler Gabe ebenfalls inaktiv. In einem Mikronucleus-Test mit i.p.-Injektion zeigt MPD zwar eine dosisabhängige clastogene Wirkung, allerdings lässt die geringe Reinheit des Prüfmusters vermuten, dass Verunreinigungen das Ergebnis entscheidend beeinflussen könnten. Ein in vivo-UDS-Test an den Keimzellen von männlichen Mäusen mit i.p.-Applikation erbrachte kein deutlich positives Resultat, ein Fellfleckentest an der Maus sowie ein Dominant-Letal-Test an der Ratte mit i.p.-Gabe verliefen negativ. Die dermale Exposition von Ratten führt jedoch zur Bindung von MPD an die Leber- und Nieren-DNA. Daher erfolgt gemäß den EU-Einstufungskriterien insgesamt eine Einstufung als erbgutverändernd Kategorie 3.

Kanzerogenität:

Während MPD in chronischen Studien mit oraler Gabe bzw. mit Verabreichung im Trinkwasser keine Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung erbrachten, kam es nach wiederholter subkutaner Injektion bei Ratten zu einer erhöhten Inzidenz an malignen Tumoren an der Einstichstelle bei gleichzeitiger Abnahme der Inzidenz der Mammatumoren. Aufgrund der negativ verlaufenen Studien an Ratte und Maus mit arbeitsplatzrelevanterer Exposition erfolgt gemäß den EU-Einstufungskriterien keine Einstufung als kanzerogen (C.: -).

Reproduktionstoxizität/Fertilität:

MPD führte in den vorliegenden Dominant-Letal-Testen an Ratten zu keiner Beeinträchtigung der männlichen Fertilität. Die bei der Maus nach oraler Gabe von 200 mg MPD/kg KGW beobachtete ca. 80%ige Hemmung der testikulären DNA-Synthese sowie die nach i.p.-Injektion von maximal 100 mg MPD/kg KGW festgestellte geringfügig erhöhte UDS-Rate in den Keimzellen bleiben unberücksichtigt, da die Dosierung in beiden Fällen bereits im Bereich der LD50 lag. Insgesamt ergibt sich damit gemäß den EU-Einstufungskriterien keine Einstufung (R_F: -)

Reproduktionstoxizität/Entwicklung

In den vorliegenden Studien an trächtigen Ratten kommt es erst im Bereich maternaler Toxizität zu fetotoxischen Effekten sowie zu einer geringfügigen Zunahme von fetalen Missbildungen. Gemäß den EU-Einstufungskriterien erfolgt daher keine Einstufung (R_E: -)

Sensibilisierung:

m-Phenylendiamin hat sich sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen als schwach hautsensibilisierend erwiesen. Gemäß den EU-Einstufungskriterien erfolgt daher eine Einstufung als hautsensibilisierend (R 43).

Literatur:

- [1] Henschler, D.(Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-zinische Begründung von MAK-Werten: m-Phenylendiamin. VCH, Weinheim (1992)
- [2] Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung: Untersuchungen zur Mutagenität von m-Phenylendiamin (CAS-Nr.: 108-45-2).Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsvorhaben 116 06 092 im Auftrag des Umweltbundesamtes (1992)

- [3] Plewa, M.J., Wagner, E.D., Yu, T.-W., Anderson, D.: Genotoxicity of m-phenylene-diamine and 2-aminofluorene in Salmonella typhimurium and human lymphocytes with and without plant activation. Environ. Molec. Mutagen. 26, 171-177 (1995)
- [4] Woodruff, K.M.: Mouse bone marrow micronucleus assay of meta-phenylenediamine. Haskell Laboratory, unveröffentlicher Bericht Nr. HLR 759-90 vom 09.01.1991 an DuPont
- [5] Kemper, F.H., Lüpke, N.P.: Toxikologische Charakterisierung von aromatischen Amino-, Hydroxi- und Nitroverbindungen insbesondere als Inhaltsstoffe von Oxidationshaarfarben (2. Auflage; Münster, 1981), Seite 1-6
- [6] Misra, R.: Clastogenic potential testing of some hair dye components by the bone marrow micronucleus analysis. Cytologia 57, 149-154 (1992)
- [7] Seiler, J.P.: Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens. Preliminary results in the validation of a novel short term test. Mutat. Res. 46, 305-310 (1977)
- [8] Lam, H.R., Bisgaard, H.C.: Percutaneous absorption, biotransformation, retention and excretion of 1,3-diaminobenzene in the rat. Fd. Chem. Toxic. 27, 741-749 (1989)
- [9] Zwirner-Baier, I., Kordowich, F.-J., Neumann, H.-G.: Hydrolyzable hemoglobin adducts of polyfunctional monocyclic N-substituted arenes as dosimeters of exposure and markers of metabolism. Environ. Health Perspect. 102 (Suppl. 6), 43-45 (1994)
- [10] Steinhoff, D., Dycka, J.: Vergleichende Kanzerogenese-Versuche mit 2,4-Toluylen-diamin, 2,4/2,6-Toluylendiamin 80/20, m-Phenylendiamin, o-Toluidin, p-Toluidin, 4,4'-Diaminodiphenylmethan, Benzidin bei subkutaner Applikation an Ratten. Bayer AG, unveröffentlicher Bericht Nr. 10682 vom 06.07.1981
- [11] Kalish, R.S., Wood, J.A.: Sensitization of mice to paraphenylenediamine and structurally-related compounds: adjuvant effects of vitamin A supplementation. Contact Dermatitis 33, 407-413 (1995)
- [12] Li, Q., Inagaki, H., Masayasu, M.: Evaluation of cross-sensitization among dye-intermediate agents using a modified lymphocyte transformation test. Arch. Toxicol. 70, 414-419 (1996)
- [13] Donatsch, P., Gürtler, J., Matter, B.E.: Critical appraisal of the 'Mouse Testicular DNA-Synthesis Inhibition Test' for the detection of mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 92, 265-273 (1982).

Stand: November 1996