



# Aromatische Amine

## Neue Erkenntnisse zur Hautgängigkeit des Alterungsschutzmittels N-Phenyl-2-Naphthylamin

Tobias Weiß, Stephan Koslitz, Eike Marek, Gerhard Schlüter, Manigé Fartasch, Heiko Udo Käfferlein, Thomas Brüning

N-Phenyl-2-Naphthylamin (P2NA; CAS 135-88-6) wurde bis in die 1990er Jahre als Alterungsschutzmittel teilweise in Schmierfetten und Ölen, in Treibstoffen, in Kühlschmierstoffen, in Formulierungen zur Gummiregenerierung in der Druckindustrie sowie bei der Herstellung von Gummiprodukten eingesetzt. Insbesondere in den 1950er und 1960er Jahren war P2NA herstellungsbedingt nicht unerheblich mit dem humankanzerogenen aromatischen Amin 2-Naphthylamin (2NA) verunreinigt. Darüber hinaus steht das P2NA in Verdacht, selbst kanzerogen zu wirken, indem es im Organismus in Teilen zum 2NA verstoffwechselt wird. Derzeit ist P2NA von der MAK-Kommission in Kanzerogenitätskategorie 3B (krebsverdächtig) eingestuft. Vor diesem Hintergrund wurde am IPA wissenschaftlich untersucht, inwieweit über Hautkontakte relevante Mengen an P2NA in den Körper aufgenommen werden können.

Berufliche Expositionen gegenüber P2NA bestanden in Deutschland bis in die 1980er Jahre im Wesentlichen im Bereich der Gummiindustrie. Dort wurde P2NA dem Rohgummi in der sogenannten Mischerei als Alterungsschutzmittel zugesetzt. Arbeitnehmer in der Mischerei aber auch aus anderen Bereichen einer Gummifabrik waren daher häufig gegenüber P2NA-haltigen Stäuben exponiert. Dies führte zu einer inhalativen Exposition aber auch zu einer Ablagerung der P2NA-haltigen Stäube auf der Haut.

Dabei ergeben sich bei beruflichem Umgang mit P2NA zwei wesentliche Aspekte:

1. P2NA war herstellungsbedingt mit dem humankanzerogenen aromatischen Amin 2-Naphthylamin (2NA) verunreinigt. Die Größenordnung der Verunreinigung lag zwischen 1000 mg/kg (1960) und 3 mg/kg (ab 1980) (DGUV 2014). Beim Hautkontakt zu Arbeitsstoffen, die P2NA enthielten, ergab sich somit auch eine dermale Exposition gegenüber der 2NA-Kontaminante, da dieser Stoff sehr gut durch die Haut penetriert.
2. Nach neueren Erkenntnissen wird P2NA nach Aufnahme in den Körper zu geringem Anteil (ca. 0,5%) zum 2NA verstoffwechselt (Weiß et al. 2013A). Das über eine Stoffwechselkaskade aus dem P2NA durch Dephenylierung freigesetzte 2NA kann somit zusätzlich zur inneren Gesamtbelastung mit 2NA beitragen.

Während jedoch 2NA bekanntermaßen gut hautgängig ist, legten *In-vitro*-Experimente an humaner, zuvor eingefrorener Haut mittels

Franz-Kammer nahe, dass P2NA nicht dermal aufgenommen wird (Lüersen et al. 2005). Vor diesem Hintergrund wurde bislang davon ausgegangen, dass berufliche Expositionen an entsprechenden Arbeitsplätzen in der Gummiindustrie im Wesentlichen durch die 2NA-Verunreinigung des P2NA geprägt waren (DGUV 2014). Dabei ging man davon aus, dass die Exposition gegenüber der 2NA-Verunreinigung dermal und inhalativ erfolgte, eine inhalative Exposition gegenüber P2NA in der Regel aber nicht maßgeblich zur 2NA-Gesamtexposition beitrug. Allerdings war das von Lüersen et al. 2005 verwendete analytisch-chemische Verfahren nicht empfindlich genug, um auch noch sehr geringe Mengen an aufgenommenen P2NA-Konzentrationen im Rezeptormedium der Franz-Kammer erfassen zu können, die aufgrund der hohen kanzerogenen Potenz des P2NA-Metaboliten 2NA unter Umständen noch von gesundheitlicher Relevanz sein können (Weiß et al. 2013B). So schließen auch die Autoren in einer späteren Publikation (Wellner et al. 2008) nicht aus, dass eine dermale Exposition gegenüber P2NA zu einer wenn auch geringen Aufnahme in den Körper führen kann.

### Projekt untersucht Hautgängigkeit von P2NA

Vor dem Hintergrund der letztlich unklaren Datenlage zur Hautgängigkeit des P2NA sowie den neueren Erkenntnissen zur Dephenylierung des P2NA zum 2NA wurde am IPA ein Forschungsprojekt durchgeführt, das qualitätsgesichert mit hochempfindlichen und spezifischen analytisch-chemischen Verfahren überprüfen sollte, ob und in welcher Höhe P2NA durch die Haut penetriert. Da

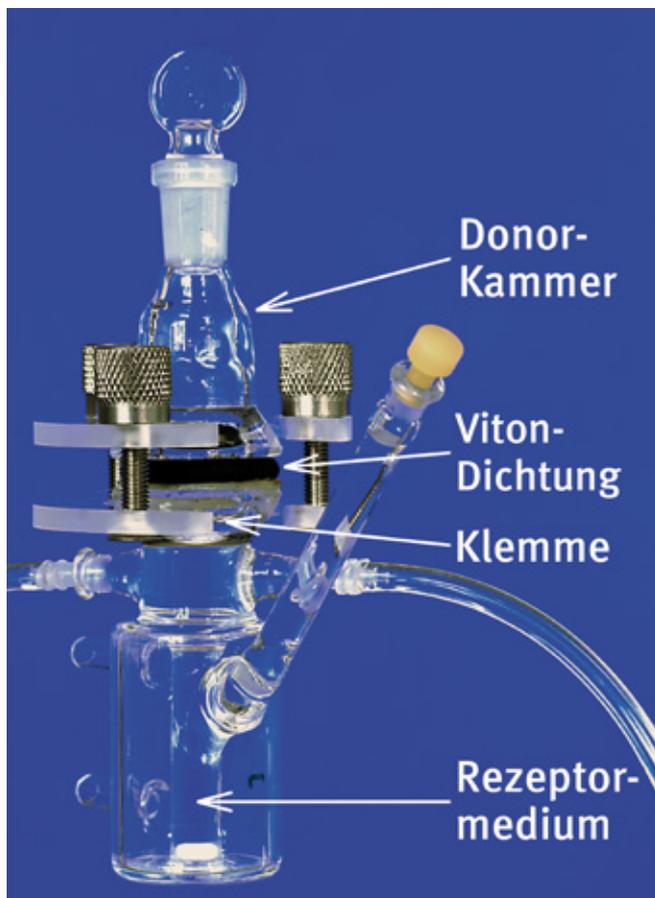


Abb. 1: Aufbau der Diffusionszelle nach Franz

aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und des vergleichsweise hohen Wasser/Octanol-Verteilungskoeffizienten des P2NA davon ausgegangen werden kann, dass sich die Substanz möglicherwei-

### Statische und dynamische Hautpenetrationsuntersuchungen

Bei der Diffusionszelle nach Franz handelt es sich um eine vielseitig eingesetzte Methode zur Bestimmung der dermalen Penetration und Absorption von chemischen Gefahrstoffen *in vitro*. Die in der OECD-Prüfrichtlinie 428 beschriebene Methode gilt dabei als Standardmethode. Allgemein unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Franz-Diffusionszellen: statische und dynamische Zellen. Im ersten Fall wird das Rezeptormedium während des Diffusionsversuchs nicht kontinuierlich erneuert, während im letzteren Fall – den sogenannten Durchflusszellen – über ein Pumpsystem während des Versuchs kontinuierlich frisches Rezeptormedium zu- und abgeführt wird. In zahlreichen Publikationen werden die dynamischen Durchflusszellen als geeigneter angesehen.

se auch in den Hautschichten anreicht beziehungsweise sich dort ein Reservoir bildet (Wilschut et al. 1995; Yourick et al. 2004), sollte zudem untersucht werden, ob sich P2NA in einzelnen Hautschichten nachweisen lässt.

Ein geeignetes *In-vitro*-Verfahren zur Untersuchung der Hautgängigkeit ist das Franz-Kammer-Modell (Abb. 1). Für die Penetrationsexperimente wurde am Tag der Untersuchung frisch gewonnene Haut von Schweineohren eingesetzt, die von einem lokalen Schlachthof bezogen wurde. Der frischen Schweinehaut wurde der Vorzug vor eingefrorener Schweinehaut beziehungsweise eingefrorener Humanhaut gegeben, da einerseits modifizierende Effekte durch das Einfrieren von Haut nicht vollständig auszuschließen sind (Harrison et al. 1984; Nielsen et al. 2013) und andererseits frische Humanhaut, beispielsweise aus Operationen, kaum regelmäßig verfügbar ist. Zusätzlich ermöglichte die Nutzung eines sogenannten Dermatoms (Abb. 3) die Herstellung von Hautmaterial mit reproduzierbaren Hautdicken von einem Millimeter Schnitttiefe.

### Franz-Kammer-Modell

Unter Einhaltung der OECD-Prüfrichtlinie 428 wurde die statische wie dynamische Franz-Kammer (► Infokasten) mit frischer, dermatomierter Schweinehaut bestückt und gemäß studienspezifischer Anforderungen optimiert und validiert. Dazu zählte der Diffusionszellenaufbau, die Zusammensetzung der Donor- und Rezeptormedien sowie die Applikationsdauer (1 bzw. 48 Stunden). Für die Untersuchungen wurden als Donorlösungen jeweils Mischungen aus 95 Prozent physiologischer Kochsalzlösung und 5 Prozent Ethanol sowie aus 96 Prozent Dichlormethan und 4 Prozent Corn-Oil mit jeweils einem P2NA-Gehalt von 5 mg/l genutzt. Als Rezeptorlösung diente eine fünfprozentige Lösung von Rinderalbumin in physiologischer Kochsalzlösung. Die Quantifizierung von P2NA wurde im Rezeptormedium, im *Stratum corneum*, der restlichen Epidermis

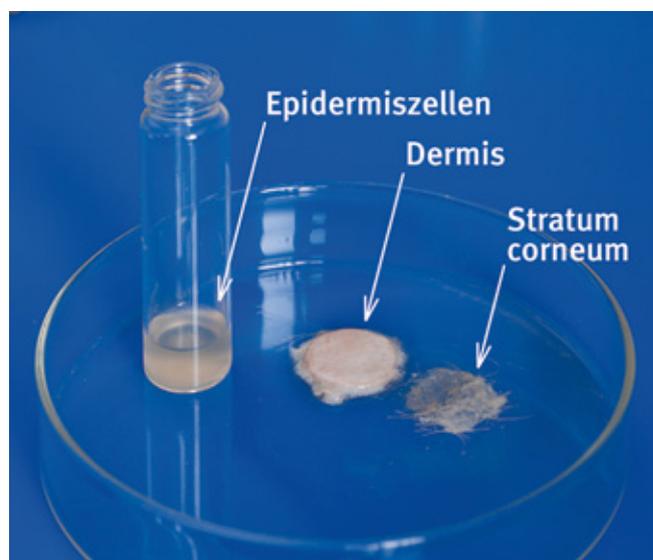


Abb. 2: Trennung dreier Hautkompartimente mittels einprozentiger Trypsinlösung.



Abb. 3: Gewinnung von Schweineohrhaut

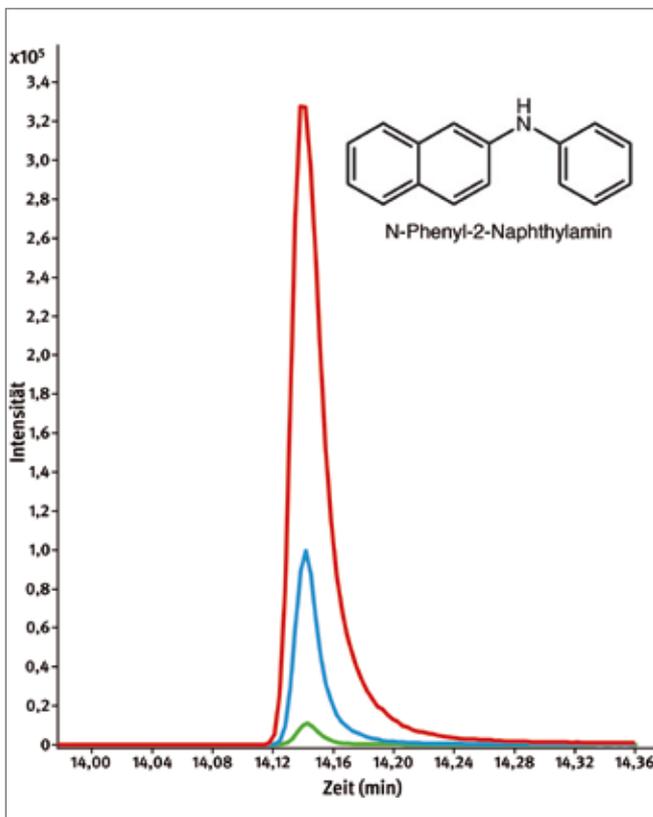


Abb. 4: Chromatogramm einer Realprobe (statisch, 48 Stunden Exposition) nach 1 Stunde (grün), 18 Stunden (blau) und 48 Stunden (rot).

und der Dermis (Abb. 2) durchgeführt. Der Nachweis von P2NA erfolgte unter Verwendung eines neu entwickelten hoch sensitiven analytischen Verfahrens (GC-MS/MS inkl. Standardisierung mittels isotopenmarkiertem P2NA-d7 als internem Standard). Typische Chromatogramme aus der Analyse des Franz-Kammer-Rezeptormediums sind Abb. 4 zu entnehmen.

#### P2NA penetriert die Haut

Für die P2NA-Formulierung wurde bei dynamischer Versuchsdurchführung nach OECD mit der wässrigen P2NA-Donorlösung ein mittlerer maximaler Flux von  $0,013 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  ermittelt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass P2NA durch die Haut penetriert. Die kumulativ penetrierte Menge nach 48 Stunden betrug  $0,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , die Wiederfindung im Rezeptormedium 32 Prozent. Die Zeit nach der die Substanz erstmals die untersuchten Hautschichten penetriert hatte, betrug rund 2,5 Stunden. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich bei gleicher Applikationskonzentration mit der Dichlormethan-haltigen Donorlösung ermitteln (max. Flux:  $0,014 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ; kumulativ penetrierte Menge:  $0,45 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; Wiederfindung: 56%). In den untersuchten Hautschichten fanden sich nicht zu vernachlässigende Mengen an P2NA. Verglichen mit den innerhalb von 48 Stunden in das Rezeptormedium penetrierten Mengen fand sich bei wässriger Applikation in den Hautschichten noch einmal eine etwa halb so große Menge an P2NA. Bei Applikation in Dichlormethan lag die in den Hautschichten verbliebene Menge bei etwa 1/10 der in das Rezeptormedium penetrierten Menge. Es muss somit nach den nunmehr vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass auch an Arbeitsplätzen, an denen eine inhalative Exposition weitge-

hend auszuschließen ist, jedoch intensive Hautkontakte bestanden (z.B. beim Umgang mit P2NA-haltigen Schmierfetten und -ölen oder beim Gummituchregenerieren in der Druckindustrie (Lichtenstein et al. 2013, DGUV 2014)), eine dermale Aufnahme von P2NA vorlag. Vor diesem Hintergrund wurde eine tierexperimentelle Folgestudie an Minischweinen initiiert, in der geprüft wird, inwieweit es unter arbeitsplatztypischen Gegebenheiten auch *in-vivo* zu einer relevanten Aufnahme von P2NA kommen kann. Daten aus dieser ergänzenden Studie werden im Jahr 2015 erwartet. Nach Vorliegen dieser Ergebnisse wird die Bedeutung der Penetrationsuntersuchungen für die Situation an Arbeitsplätze mit dermale Kontakt gegenüber P2NA, insbesondere auch im Hinblick auf eine mögliche Depotwirkung in der Haut, besser abschätzbar sein.

Die Autoren:

Prof. Dr. Thomas Brüning, Prof. Dr. Manigé Fartasch,  
Dr. Heiko Udo Kätterlein, Stephan Koslitz, Eike Marek,  
Prof. Dr. Gerhard Schlüter, Dr. Tobias Weiß  
IPA

Beitrag als PDF



## Literatur

- DGUV: DGUV-Report 1/2014 „Aromatische Amine“ Eine Arbeitshilfe in Berufskrankheiten-Ermittlungsverfahren. 2014; 3. aktualisierte Auflage des BK-Reports 1/2009
- Harrison SM, Barry BW, Dugard PH: Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 1984; 36: 261-262
- Lichtenstein N, Bernards M, Quellmalz K, Dettbarn G, Pucknat U, Tigler A, Seidel A: 2-Naphthylamin als Verunreinigung in alten Schmierfetten - Mögliche dermale Belastung im Sinne der Berufskrankheit 1301? *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 2013; 73: 197-201
- Lüersen L, Wellner T, Angerer J, Drexler H, Korinth G: Investigation of the penetration of aromatic amines through the human skin *in vitro*. Poster presentation. International Conference on Occupational and Environmental Exposures of Skin to Chemicals, Stockholm 2005
- Marek EM, Koslitz S, Weiß T, Fartasch M, Kätterlein HU, Brüning T: Untersuchung der dermalen Penetration von lipophilen Substanzen am Beispiel N-Phenyl-2-Naphthylamin. Poster 54. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM), Dresden 2014
- Nielsen JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA: Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent *in vitro* percutaneous penetration. *Skin Pharmacol Physiol* 2011; 24:93-102
- OECD: Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Environment Directorate. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment 428; 2004
- Weiß T, Bolt HM, Schlüter G, Koslitz S, Taeger D, Welge P, Brüning T: Metabolic dephenylation of the rubber antioxidant N-phenyl-2-naphthylamine to carcinogenic 2-naphthylamine in rats. *Arch Toxicol* 2013A; 87:1265-72
- Weiß T, Bolt HM, Schlüter G, Koslitz S, Taeger D, Welge P, Brüning T: Verstoffwechslung aromatischer Amine - Neue Erkenntnisse zur metabolischen Dephenylierung von N-Phenyl-2-Naphthylamin zum humankanzergen 2-Naphthylamin. *IPA-Journal* 2013B; 1: 12-14
- Wellner T, Lüersen L, Schaller KH, Angerer J, Drexler H, Korinth G: Percutaneous absorption of aromatic amines - a contribution for human health risk assessment. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1960-8
- Wilschut A, ten Berge WF, Robinson PJ, McKone TE: Estimating skin permeation: The validation of five mathematical skin permeation models. *Chemosphere* 1995; 30: 1275-96
- Yourick JJ, Koenig ML, Yourick DL, Bronaugh RL: Fate of chemicals in skin after dermal application: does the *in vitro* skin reservoir affect the estimate of systemic absorption? *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195: 309-320