

Toxikologische Prüfung direktziehender Haarfarbstoffe

CHR. GLOXHUBER*, M. POTOKAR, G. REESE
und P. FLEMMING

*Erweiterte Fassung eines Vortrags vor Mitgliedern der Farbstoff-Kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vor Kosmetik-Chemikern am 26. Februar 1970
in Darmstadt*

Synopsis—**Toxicological examination of direct hair dyes.** The general and topical tolerance of the direct hair dyes **1,4-diaminonitrobenzene**, **methyl violet**, **dispersion pigment Black**, and **1,4-diaminoanthraquinone** was determined. Experiments were carried out to determine the quantity of dye which could be absorbed under the **most unfavorable use conditions** during **hair dyeing**. On the basis of the **toxicity data** and the conceivable maximally absorbed amount of dye, it is concluded that these hair dyes are **toxicologically not objectionable**.

Die toxikologische Beurteilung eines Bestandteils eines kosmetischen Produkts muß davon ausgehen, wie häufig dieses zur Anwendung gelangt und welche Mengen des Stoffes unter praktischen Anwendungsbedingungen vom menschlichen Körper aufgenommen werden können. Diese Daten werden zu tierexperimentell ermittelten toxikologischen Befunden in Beziehung gesetzt (1). Die Anwendung von Haarfarbstoffen, wie sie nachfolgend diskutiert werden, erfolgt bei Tönungsfestigern und Tönungsspülungen etwa 14-tägig, im Falle der Tönungsshampoos in ca. vierwöchigen Intervallen.

1. Haarfestiger mit Farbstoff (Tönungsfestiger)

Auf das frisch gewaschene, feuchte Haar werden 10–20 ml des wäßrigen bzw. alkoholischen Präparates aufgetragen und dort belassen. Erfahrungsgemäß wird im Lauf der nächsten Tage ein Teil der Farbstoffe durch Abrieb wieder vom Haar entfernt. Bei der nächsten Haarwäsche wird der Rest fast vollständig ausgewaschen.

* Laboratorien der Henkel & Cie. GmbH, D-4 Düsseldorf, Postfach 1100

2. Tönungsshampoos

Durch Tönungsshampoos wird eine etwas intensivere und dauerhaftere Farbänderung der Haare erzielt. Es werden ca. 50–100 g des Produkts in Form creme- oder emulsionsförmiger Zubereitungen 10–20 min angewendet. Der Überschuß wird ausgespült oder ausshampooiert.

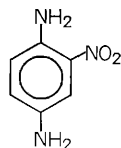
3. Tönungsspülungen

Behandlung des Haars im Anschluß an die Wäsche. 20–40 ml der wäßrigen Lösungen werden auf das noch feuchte Haar gebracht und nach ca. 3–10 min ab gespült.

Als Farbstoffe für die genannten Präparate werden in erster Linie verwendet:

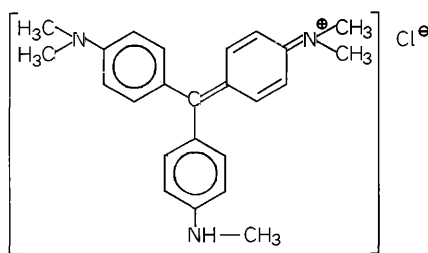
1. 1,4-Diaminonitrobenzol (sog. Haarrot)

Einsatzkonzentration: 0,1–1 %



2. Methylviolett

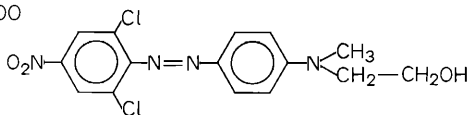
Einsatzkonzentration: 0,01–0,05 %



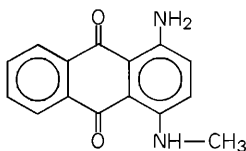
3. Dispersionsfarbstoff Schwarz (D.-Farbstoff Schwarz)

Einsatzkonzentration: 0,1–1 %. Bei diesem Färbemittel handelt es sich um ein handelsübliches Gemisch der Colour Index-Farbstoffe mit den nachstehenden chemischen Formeln. Die prozentuale Zusammensetzung ist nicht bekannt.

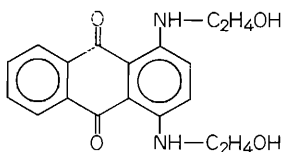
Nr. 11.100



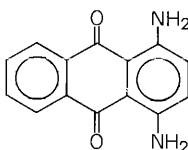
Nr. 61.105



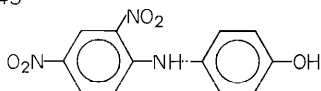
Nr. 62.500



Nr. 64.505

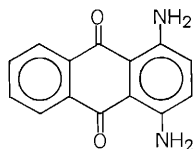


Nr. 10.345



4. 1,4-Diaminoanthrachinon

Einsatzkonzentration: 0,01–0,5%



Die untersuchten Farbstoffe entsprechen der allgemein in der Praxis verwendeten Qualität. Deren genaue Spezifikationen waren nicht erhältlich. Die *Abb. 1* zeigt Chromatogramme der untersuchten Farbstoffe. Danach

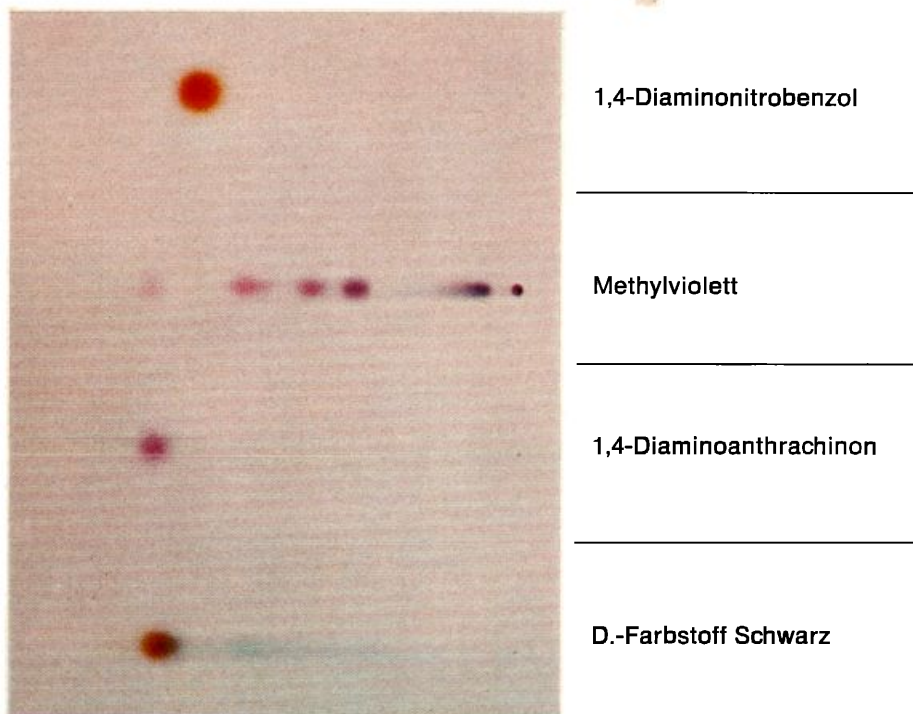


Abbildung 1

Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel (Machoroy, Nagel & Co.) Laufmittel: Butanol/Äthanol/Wasser = 9:1:1.

sind die Produkte 1,4-Diaminoanthrachinon und 1,4-Diaminonitrobenzol einheitlich. In dem Dispersionsfarbstoff Schwarz lassen sich verschiedene Komponenten erkennen. Auch Methylviolett erwies sich nicht als einheitlicher Farbstoff.

Ziel unserer Untersuchungen war es, Toxizitätsdaten dieser Stoffe zu ermitteln und Aufschlüsse über die maximal zur Resorption gelangenden Mengen zu erhalten*.

* Die toxikologische Prüfung dieser Haarfarbstoffe, die umfangreiche praktische Verwendung finden, zeigt die Schwierigkeiten, denen sich der prüfende Toxikologe gegenüber sieht, wenn an ihn die Frage nach der Verträglichkeit zusammengesetzter Produkte, wie hier im Falle des Dispersionsfarbstoffes Schwarz, gestellt wird. Während man bei toxikologischen Versuchen in der Regel die Einzelkörper untersucht, läßt es sich in solchen Spezialfällen nicht vermeiden, das Substanzgemisch zu prüfen. Dies gilt vor allem bei Farbstoffen, die nach färberischen Gesichtspunkten eingestellt wurden und deren exakte Zusammensetzung nicht bekannt ist.

UNTERSUCHUNGSMETHODEN

A. Toxikologische Untersuchungen

Die Prüfung der akuten Toxizitäten wurde an Gruppen von je 10 männlichen Wistar-Ratten vorgenommen, die ein mittleres Körpergewicht von 180 g aufwiesen. Die Verabreichung der Substanzen erfolgte mit der Schlundsonde in Form wäßriger Zubereitungen (Lösung bzw. Suspension). Das applizierte Flüssigkeitsvolumen betrug 2 ml/100 g Körpergewicht. Die Beobachtungsdauer erstreckte sich auf 8 Tage. Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte nach Litchfield-Wilcoxon (2). (Bei den Versuchstieren wurde auf eine etwaige Farbstoffausscheidung im Harn geachtet.)

Der cutanen Resorption der Farbstoffe wurde in einer weiteren Untersuchung nachgegangen. Diese Untersuchungen wurden an narkotisierten Ratten durchgeführt, die auf einem Operationstischchen fixiert waren. Die Haare wurden im Bereich des Bauches entfernt. Aus den Präparaten hergestellte 10% ige Zubereitungen wurden in dicker Schicht auf den enthaarten Bereich aufgetragen. Nach 3 Std wurden die Tiere auf Farbstoffausscheidungen geprüft.

Die Verträglichkeit bei wiederholter Aufnahme kleiner Dosen dieser Farbstoffe wurde an Gruppen von 10 männlichen und 10 weiblichen Wistar-Ratten studiert, denen ein Futter vorgesetzt wurde, das 500 ppm der Farbstoffe enthielt. Die Versuchsdauer betrug 13 Wochen. Eine gleich große unbehandelte Tiergruppe diente als Kontrolle. Bei den Versuchstieren wurden während der Applikationszeit Allgemeinbefinden und Körpergewicht beobachtet. Zu Versuchsbeginn und nach Abschluß der Applikationen wurden bei den Tieren Untersuchungen des Blutes (Hämoglobingehalt, Zahl der roten und weißen Blutzellen, Differentialblutbild, Ca, Blutzucker, Harnstoff), des Harns (pH-Wert, spezifisches Gewicht, Eiweiß, Zucker, Ketonkörper, Blut), der Leberfunktion (SAP, SGPT, SGOT) vorgenommen und miteinander verglichen. Nach Beendigung der Applikationen wurden die Versuchstiere getötet und sezirt, das Gewicht der wichtigsten Organe ermittelt und nachfolgende Organe einer histologischen Untersuchung unterzogen: Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge, Hoden (Ovar), Gehirn, Thymus, Nebenniere, Schilddrüse, Lymphknoten und Magen-Darm-Trakt.

Die Schleimhautverträglichkeit wäßriger Farbstoffzubereitungen wurde am Kaninchenaugen untersucht. Dazu wurden jeweils 2 Tropfen von 5% igen wäßrigen Zubereitungen von 1,4-Diaminonitrobenzol, D.-Farbstoff Schwarz und 1,4-Diaminoanthrachinon in den Bindehautsack eingeträufelt und im Anschluß daran die Tiere beobachtet. Von Methylviolett wurde eine 0,5% ige Lösung hergestellt, 2 Tropfen davon wurden in den Bindehautsack eingeträufelt und nach 15 sec wieder mit warmem Wasser ausgespült.

Zur Prüfung der Hautverträglichkeit wurden Versuche mit haarlosen Mäusen angestellt. Gruppen von je 5 Tieren wurden mit Methylviolett, D.-Farbstoff Schwarz und 1,4-Diaminonitrobenzol in 5%iger Zubereitung behandelt. Die Durchführung der Applikationen erfolgte in der Weise, daß wir diese Lösungen während einer Zeitdauer von 14 Tagen einmal täglich mit einem Glasstab am Rücken auftrugen. Hautverträglichkeitsprüfungen wurden außerdem an 7 Versuchspersonen mit 5%igen Zubereitungen im Patch-Test am Oberarm vorgenommen. Die Kontaktdauer betrug 3 Std. Die Beurteilung des Versuchsergebnisses wurde nach Pflasterabnahme und nach 24 Stdn vorgenommen.

B. Farbstoffresorption

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, welche Mengen der Farbstoffe im ungünstigsten Fall bei einer Haarbehandlung resorbiert werden können, wurden mit den Farbstoffen 1,4-Diaminonitrobenzol und Methylviolett *Modellbehandlungen* vorgenommen. Von einer Untersuchung des D.-Farbstoffes Schwarz und 1,4-Diaminoanthrachinon wurde wegen der Schwierigkeit des analytischen Nachweises abgesehen. Als Präparate wurden Tönungsmittel folgender Rezepturen verwendet:

Tönungsmittel A	0,5 Gew.-%	1,4-Diaminonitrobenzol
	3	„ Laurylpyridiniumchlorid
	96,5	„ Wasser
Tönungsmittel B	0,1 Gew.-%	Methylviolett
	3	„ Laurylpyridiniumchlorid
	96,9	„ Wasser

Beide Tönungsmittel wurden mit Ammoniak auf pH 9,5 eingestellt. Tönungsmittel A stellt eine rot gefärbte, Tönungsmittel B eine violett gefärbte Lösung dar. Die Anwendung erfolgte in der Weise, daß das Haar von je 5 weiblichen Versuchspersonen zunächst mit einem normalen Shampoo gewaschen und gespült wurde. Anschließend wurden 30 ml Tönungsmittel in das Haar einmassiert und 10 min lang bei Raumtemperatur dort belassen. Die ablaufende Farbstofflösung wurde in einer Schale aufgefangen, das Haar anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und die abgelaufene Flüssigkeit und das Spülwasser zur Konzentrationsbestimmung vereint. Zur Ermittlung der vom Haar aufgenommenen Farbstoffmengen wurden bei den Versuchspersonen einige Strähnen abgeschnitten und die aufgezogenen Farbstoffmengen nach Extraktion bestimmt. Zu dieser Bestimmung wurden die Haarsträhnen 15 Stdn bei 65% relativer Luftfeuchtigkeit und 20 °C ge-

trocknet. Anschließend wurden 100–600 mg viermal mit Eisessig 10 min unter Rückflußkühler extrahiert und der Farbstoffgehalt dieser Extrakte bei 472 bzw. 573 nm photometrisch bestimmt. Die Bestimmung der Farbstoffe in der wäßrigen Flüssigkeit erfolgte in der Weise, daß sie mit Äther bzw. Chloroform in einem Rotationsperforator extrahiert wurden. Diese Auszüge wurden eingedampft und als alkoholische Lösungen im Spektralphotometer gemessen. Aus der eingesetzten Farbstoffmenge und aus der Summe der in den Spülflüssigkeiten enthaltenen Farbstoffmengen sowie der auf dem Haar befindlichen Menge (geschätzte Haarmenge je Versuchsperson mindestens 50 g) wurde diejenige Farbstoffmenge ausgerechnet, die nicht mehr auffindbar war und unter ungünstigsten Umständen zur Resorption gelangt sein konnte.

ERGEBNISSE

Die Resultate unserer akuten Toxizitätsuntersuchungen sowie der Prüfungen auf Haut- und Schleimhautverträglichkeit sind in *Tabelle I* zusammengefaßt. Während wir bei den akuten Toxizitätsversuchen, in denen hohe Dosen der Farbstoffe mit der Schlundsonde verabreicht wurden, eine geringe

Tabelle I

Resultate der Untersuchungen über akute Toxizität, Hautresorption und Ausscheidung, Haut- und Schleimhautverträglichkeit

Präparat	Ratte, oral, LD ₅₀	Ausscheidung nach cutaner Applikation	Kaninchen- auge	haarlose Mäuse, cutan	Hautver- träglichkeit Mensch
1,4-Diamino- nitrobenzol	2,1 g/kg Farbstoff im Harn	10% ig 3 Stdn negativ	5% 1 × appliziert ohne Befund	5% 14 Tage ohne Befund	5% ig 7 Versuchspers. 3 Stdn ohne Befund
Methyl- violett*	1,0 g/kg Farbstoff im Harn	10% ig 3 Stdn negativ	0,5% 15 sec aus- spülen ohne Befund	10% 14 Tage ohne Befund	5% ig 7 Versuchspers. 3 Stdn ohne Befund
D.-Farbstoff Schwarz	> 5,0 g/kg Farbstoff im Harn	10% ig 3 Stdn negativ	5% 1 × appliziert ohne Befund	10% 14 Tage ohne Befund	5% ig 7 Versuchspers. 3 Stdn ohne Befund
1,4-Diamino- anthrachinon	> 5,0 g/kg Farbstoff im Harn	10% ig 3 Stdn negativ	5% 1 × appliziert ohne Befund	10% 14 Tage ohne Befund	5% ig 7 Versuchspers. 3 Stdn ohne Befund

* Vgl. (3), Kaninchen, oral, Dosis letalis minima 75 mg/kg bei Verabreichung an 10 Tagen; Maus, oral, LD₅₀ 0,105 g/kg.

Farbstoffausscheidung im Harn feststellen konnten, war eine solche nach cutaner Applikation selbst in hohen Dosierungen nicht zu beobachten. Die bei den Toxizitätstesten beobachteten Vergiftungserscheinungen waren uncharakteristisch.

Unsere Untersuchungen mit wiederholter Applikation ergaben, daß alle vier Farbstoffe bei einer Dosierung von 500 ppm im Futter ohne Krankheitserscheinungen vertragen werden. Der Verlauf der mittleren Körpergewichte der Versuchstiere ist in *Abb. 2* wiedergegeben. Auch bei den durchgeführten

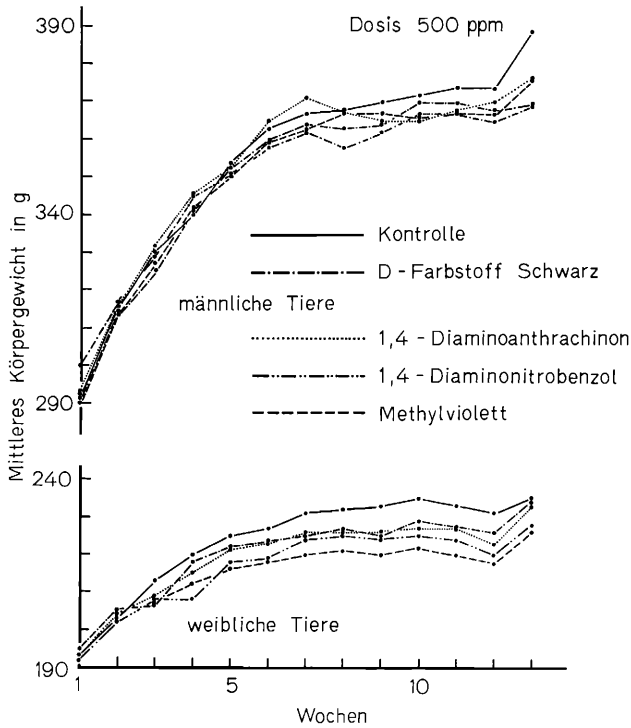


Abbildung 2

klinischen Untersuchungen des Blutes, des Harns und der Leberfunktion ergaben sich keine Hinweise auf pathologische Veränderungen. Alle zu prüfenden Substanzen wurden mit dem Harn ausgeschieden. Die Organ- gewichte der Versuchstiere lagen im Streubereich der Organe der Kontroll- tiere. Bei den histologischen Untersuchungen wurden mit Ausnahme der Milz der Versuchstiere, die mit 1,4-Diaminonitrobenzol (Haarrot) behandelt worden waren, keine von den Kontrollen abweichenden Veränderungen gefunden. Bei den männlichen Versuchstieren dieser Gruppe fand sich eine

leichte Aktivierung der Deckzellen der Milzkapseln; bei den weiblichen Tieren waren solche Veränderungen weniger deutlich. In der Pulpa der Milzen dieser Versuchstiere fand sich ferner eine leichte Vermehrung der Riesenzellen, bei den weiblichen Tieren etwas ausgeprägter als bei den männlichen. Insgesamt waren diese Veränderungen aber zu gering, um als substanzspezifisch beurteilt zu werden.

Unsere Beobachtungen zur Frage der unter ungünstigsten Verhältnissen beim praktischen Einsatz zur Resorption gelangten Farbstoffmengen sind in den *Tabellen II* und *III* zusammengefaßt.

Tabelle II

Ergebnisse der Untersuchungen über die maximale Resorption von 1,4-Diaminonitrobenzol

I Ver- suchs- person	II Haarrot- Angebot [mg]	III Haarrot im Wasch- wasser [mg]	IV geschätzte Haar- mindest- menge [g]	V Haarrot- Konzentra- tion auf Gesamthaar [mg]	VI Summe aus III + V [mg]	VII* Differenz aus II + VI [mg]
1	150	76	60	60	136	14
2	150	104	40	40	144	6
3	150	90	50	50	140	10
4	150	70	60	60	130	20
5	150	90	50	50	140	10
						Mittel: 12

* Nicht mehr auffindbare Menge

Tabelle III

Ergebnisse der Untersuchungen über die maximale Resorption von Methylviolett

I Ver- suchs- person	II Methyl- violett- Angebot [mg]	III Methyl- violett- im im Wasch- wasser [mg]	IV geschätzte Haar- mindest- menge [g]	V Methyl- violett- menge auf Gesamthaar [mg]	VI Summe aus III + V [mg]	VII* Differenz aus II + VI [mg]
1	30	8	50	14	22	8
2	30	7	50	14	21	9
3	30	16	50	14	30	0
4	30	14	50	14	28	2
5	30	17	40	11	28	2
						Mittel: 4

* Nicht mehr auffindbare Menge

Aus den in *Tabelle II*, Spalte 3 wiedergegebenen Resultaten ist ersichtlich, daß beim 1,4-Diaminonitrobenzol 6–20 mg nicht mehr nachweisbar waren. Diese Mengen könnten unter ungünstigsten Bedingungen zur Resorption gelangt sein. Bei Methylviolett lagen diese Werte zwischen 0–9 mg. Diese Resultate sind mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet, weil die Haarmengen der einzelnen Versuchspersonen nur nach der Art des Haarschnittes geschätzt werden konnten. Der Fehler dürfte aber 25% nicht überschreiten.

Besprechung der Versuchsergebnisse

In den von uns durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen erwiesen sich die geprüften Haarfarbstoffe bei den Prüfungen der akuten Toxizität als wenig toxisch; bei täglicher Verabreichung während 13 Wochen entsprachen 500 ppm im Futter einer verträglichen Dosierung. Diese Farbstoffkonzentration entspricht einer Tagesdosierung von ca. 30–50 mg/kg. In unseren Untersuchungen über die unter ungünstigsten Bedingungen maximal möglichen Aufnahmen ergaben im Falle des 1,4-Diaminonitrobenzols im Mittel 12 mg. Dieser Wert liegt in einer ähnlichen Größenordnung, wie sie Kiese und Rauscher (4) für p-Toluyldiamin gefunden haben. Aus diesen Grenzwerten errechnet sich eine mögliche Aufnahme von 1,4-Diaminonitrobenzol von 0,2 mg/kg Körpergewicht. Beim Methylviolett liegen die Verhältnisse noch günstiger. Hier wurde eine maximal mögliche mittlere Aufnahme von 4 mg, das entspricht ca. 0,08 mg/kg, gefunden. Vergleicht man diese Werte der gefundenen denkbaren, maximalen Resorption mit den ermittelten Toxizitätswerten, so zeigt sich ein Sicherheitsabstand zwischen Aufnahme und Grenze der Toxizität in der Größenordnung von 1 : 200 bzw. 1 : 500, wenn man unsere Werte der subakuten Toxizität zum Vergleich heranzieht. Wie bereits eingangs erwähnt, erfolgt die Anwendung der Präparate darüber hinaus aber nicht täglich, sondern in Abständen von einigen Wochen, so daß dadurch der Sicherheitsfaktor noch wesentlich vergrößert wird.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen über die lokale Verträglichkeit erwiesen sich alle Verbindungen mit Ausnahme des Methylviolett als gut schleimhautverträglich. Methylviolett wird in Konzentrationen < 0,5% bei kurzzeitiger Einwirkung von der Bindehaut des Auges störungslos vertragen. Diesem Befund kommt keine größere Bedeutung zu, weil Methylviolett in sehr geringen Mengen eingesetzt wird, und selbst für den Fall, daß Farbstofflösung in das Auge gelangt, wird diese durch den Tränenfluß sofort wieder fortgespült.

ZUSAMMENFASSUNG

Die direktziehenden Haarfarbstoffe, 1,4-Diaminonitrobenzol, Methylviolett, Dispersionsfarbstoff Schwarz (Gemisch der Farbstoffe Colour Index 11.000, 61.105, 62.500, 64.505 und 10.345) und 1,4-Diaminoanthrachinon wurden auf akute und subakute Toxizität untersucht. Auch wurden Versuche über die Schleimhaut- und Hautverträglichkeit angestellt. Weitere tierexperimentelle Untersuchungen befaßten sich mit der Hautresorption. Abschätzungen über die unter Anwendungsbedingungen maximal zur Resorption gelangenden Farbstoffmengen wurden mit den Farbstoffen 1,4-Diaminonitrobenzol und Methylviolett an weiblichen Versuchspersonen durchgeführt. Die Farbstoffe wurden in Form von Tönungsmitteln appliziert und die in Spülflüssigkeiten sich findenden und auf dem Haar fixierten Farbstoffmengen photometrisch bestimmt und von den eingesetzten Farbstoffmengen in Abzug gebracht. Die Gegenüberstellung dieser Werte mit Toxizitätsdaten ergibt eine günstige Beurteilung dieser Haarfarbstoffe.

LITERATUR

- (1) Gloxhuber, Chr., *J. Soc. Cosmetic Chemists* **21**, 313 (1970).
- (2) Litchfield, J. T., und Wilcoxon F., *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* **96**, 99 (1949).
- (3) Brock, N., und Erhardt, A., *Arzneimittel-Forsch.* **1**, 5 (1951).
- (4) Kiese, M., und Rauscher, E., *Toxicol. appl. Pharmacol.* **13**, 325 (1968).

Einfluß der Bindung von Kohlenhydraten an die Skleroproteine auf die Wasserbindung der Hornschicht

GÜNTER PADBERG*

Synopsis—Effect of the carbohydrate/scleroprotein interaction on water-binding by the horny layer. A part of the ϵ -amino groups of lysine of the scleroproteins in the horny layer is normally bound to carbohydrates. The examined carbohydrates, administered to the horny layer, are bound at different rates to additional free ϵ -amino groups of lysine. The increase in OH-groups in the scleroprotein treated in this way enhances their water-retaining capacity. The water-binding activity of the bound carbohydrates is, however, very different and depends on the structure of the carbohydrates. The water-retaining capacity of scrapings from the horny layer reaches a maximum after incubation with a special carbohydrate conversion complex (ZUK). This complex is very similar to the water-soluble neutral carbohydrate fraction (nKF) in the horny layer. As a result of the binding of carbohydrates to the horny layer, the increased water-retaining capacity is preserved even after exhaustive washing of the horny layer. This effect is different from that of other water-soluble substances of the horny layer. Therefore, ZUK can be expected to be capable of restoring and preserving the water-retaining capacity of the horny layer of in vivo experiments.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von Blank (1), Grüneberg und Szakall (2) sowie Jacobi (3) ist der Wassergehalt der Hornschicht für die normale Funktionsfähigkeit und Flexibilität der Hautoberfläche maßgebend. Diese Schicht muß etwa 10% Feuchtigkeit enthalten, um geschmeidig und widerstandsfähig zu sein. In dem Maße, in dem die Feuchtigkeit unter diesen Wert abfällt, verliert die Hornschicht diese Eigenschaft. Sie wird spröde, rau und kann sogar rissig werden. Diese Erscheinung ist hauptsächlich im Winter zu beobachten, wenn die relative Luftfeuchtigkeit in erwärmten Räumen sehr niedrig ist. Trockenheitserscheinungen werden ebenso in den Fällen beobachtet, in denen die Haut häufig gewaschen wird, ferner bei starker Sonneneinstrahlung, als konstitutionelle Eigenschaft und beim älteren Menschen. Wasserarme oder trockene Hornschicht läßt sich

* Byk Gulden Pharmazeutika, Institut für Pathologie und Toxikologie, D-2 Hamburg 70, Friedrich-Ebert-Damm 101.