

## 4. Ergebnisse

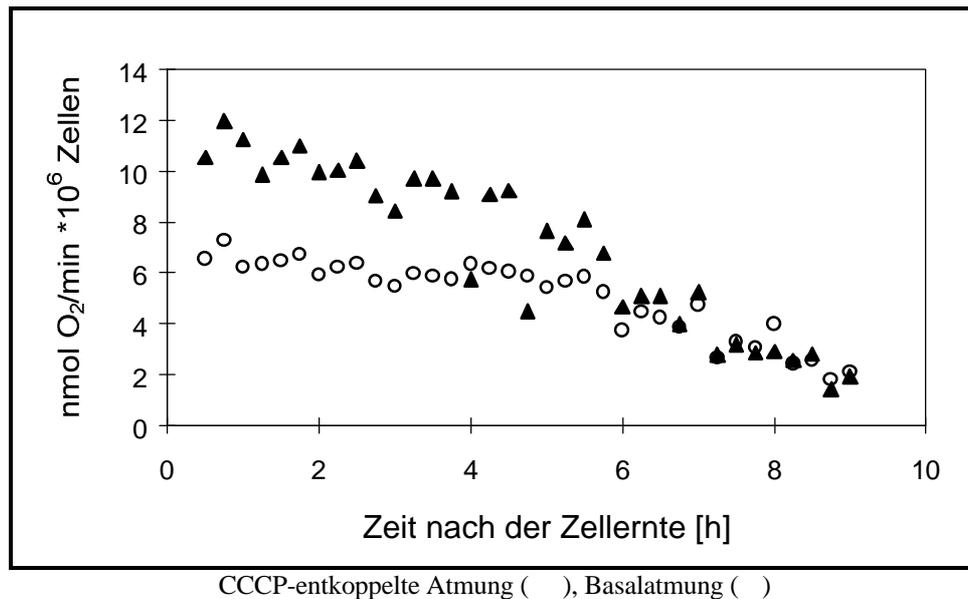
### 4.1. Atmungsprofil der HaCaT-Zellen

Für die Güte des Keratinozytenatmungstests ist die Aktivität der HaCaT-Zellatmung entscheidend. Diese kann und muß man anhand des Atmungsprofils bestimmen. Dazu sind innerhalb jeder Meßreihe nach ca. 30 bis 60 Minuten Kontrollmessungen durchzuführen.

Die zeitliche Veränderung der Zellatmung sind in Abbildungen 9 und 10 dargestellt. Dazu wurden die HaCaT-Zellen geerntet, aus dem Zellverband gelöst und in einer Suspension aus Einzelzellen im Eisbad gekühlt aufbewahrt, so daß sich die Stoffwechselfvorgänge verlangsamen. Je  $10^6$  Zellen wurden pro Messung ohne Probenzugabe verwendet.

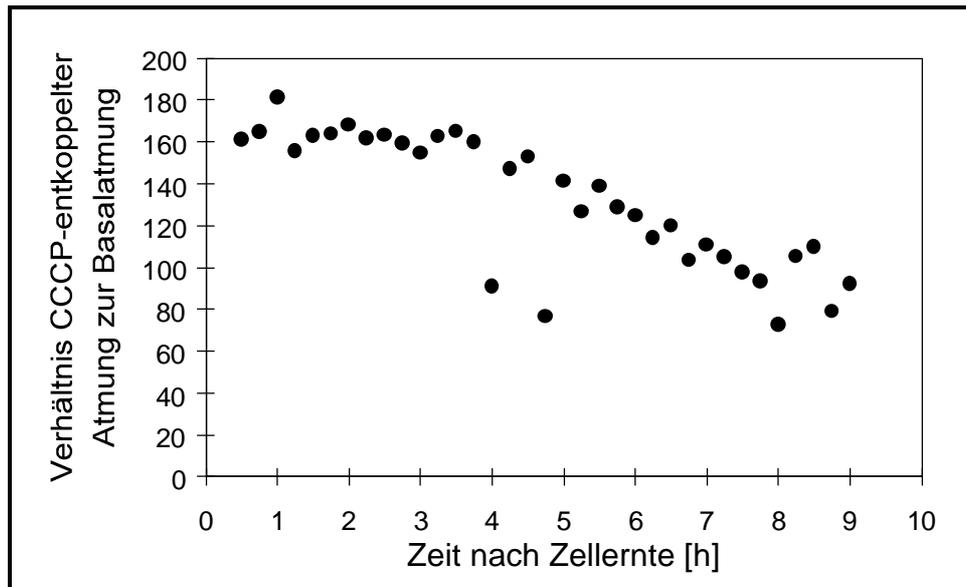
Erst sechs Stunden nach der Zellernte sinkt sowohl die Basal- als auch die CCCP-entkoppelte Atmung stärker als bis zu diesem Zeitpunkt. Die Abnahme des Basalatmungswertes ist hierbei geringer als bei der entkoppelten Atmung. Dafür ist vor allem die höhere Empfindlichkeit der entkoppelten Atmung gegenüber Störungen und die durch den Luftkontakt bewirkte Erhöhung des pH-Wertes des  $\text{CO}_2$ -Puffers der Zellsuspension verantwortlich. Ebenfalls ist denkbar, daß die Lebensfähigkeit der Zellen durch mechanische Einflüsse wie Schütteln o.ä. beeinträchtigt wird.

**Abbildung 9:** Die HaCaT-Zellen liegen nach der Zellernte in einer Suspension aus Einzelzellen vor. Bei einer Lagertemperatur von ca. 4°C verlangsamen sich die Stoffwechselforgänge, aber auch die Zellatmung läßt langsam nach. Die Abbildung 9 zeigt die zeitabhängige Abnahme von Basal- und CCCP-entkoppelter Atmung nach der Zellernte.



Für die Qualität der Atmungsmessung ist neben der Abnahme der Zellatmung das Verhältnis der CCCP-entkoppelten Atmung zur Basal-Atmung (Abbildung 9) sehr wichtig. Durch den Entkoppler CCCP wird erreicht, daß die HaCaT-Zellen mit ihrer maximalen Kapazität atmen. Gibt es keinen oder nur einen geringen Unterschied zwischen Basal- und entkoppelter Atmung, sind die Zellen durch äußere Einflüsse gestreßt. Liegt der Wert der entkoppelten Atmung im Bereich von 120 – 160 % der Basal-Atmung ist eine Aussage über die Wirkung eines Textilextraktes bzw. eines Schadstoffes auf die entkoppelte Atmung möglich.

**Abbildung 10:** Das Verhältnis der CCCP-entkoppelten Atmung zur Basalatmung (100 %) liegt bei intakten HaCaT-Zellen oberhalb 120 %. Durch die langsame Abnahme der Zellatmung nach der Ernte verändert sich auch das Verhältnis von entkoppelter zur Basalatmung. Die Abbildung 10 zeigt die Veränderung dieses Verhältnisses in Abhängigkeit von der Zeit nach der Zellernte.



Deutlich wird, daß erst ab einer Meßzeit von 6 Stunden die entkoppelte Atmung stark zurückgeht. Bis zu 6 Stunden nach der Zellernte ist somit die Messung der Einflüsse von Schadstoffen sowohl auf die Basal- als auch auf die CCCP-entkoppelte Atmung möglich. Danach sind nur noch Einflüsse der Probe auf die Basalatmung meßbar. Diese Meßergebnisse müssen jedoch durch Wiederholungsmessungen bestätigt werden. Nach 8 Stunden ist der Wert der entkoppelten Atmung teilweise sogar kleiner als der Wert der Basalatmung. Weitere Messungen zu diesem Zeitpunkt ergeben keine auswertbaren Ergebnisse. Generell lassen sich mit einer Zellsuspension durchschnittlich 15 - 25 Messungen durchführen.

## **4.2. Untersuchung von Textilproben im Keratinozytenatmungstest**

### **4.2.1. Textilproben der Firma Klaus Steilmann GmbH & Co. KG**

Siebenunddreißig Textilien (S01 – S37) mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und verschiedenen Farben sowie Mustern wurden von der Firma Steilmann für den Keratinozytenatmungstest zur Verfügung gestellt. Über die Auswahl, die Behandlung, Ausrüstung und Herkunft der Textilproben wurden aus betriebstechnischen Gründen keine Angaben gemacht.

Es sollten die schädigenden Auswirkungen dieser Textilien mittels Keratinozytenatmungstest untersucht werden.

Außerdem wurden drei Textilproben (S38 – S40) untersucht, die bei der Firma Steilmann negativ aufgefallen sind, nähere Angaben über Art und Weise wurden nicht mitgeteilt.

#### **4.2.1.1. Voruntersuchung (S01 – S37)**

**Bei hohen Probenanzahlen sind Voruntersuchungen sinnvoll, da vermutlich nur einige Textilproben atmungshemmend wirken, so daß nur in diesen Fällen die Aufnahme einer genauen Dosis-Wirkungskurve notwendig ist.**

Zur Voruntersuchung wurden mindestens Doppelwerte der Atmungshemmung bei einer Konzentration von 10.000 ppm aufgenommen. Abweichungen von 10 - 20 % sind dabei durchaus tolerierbar.

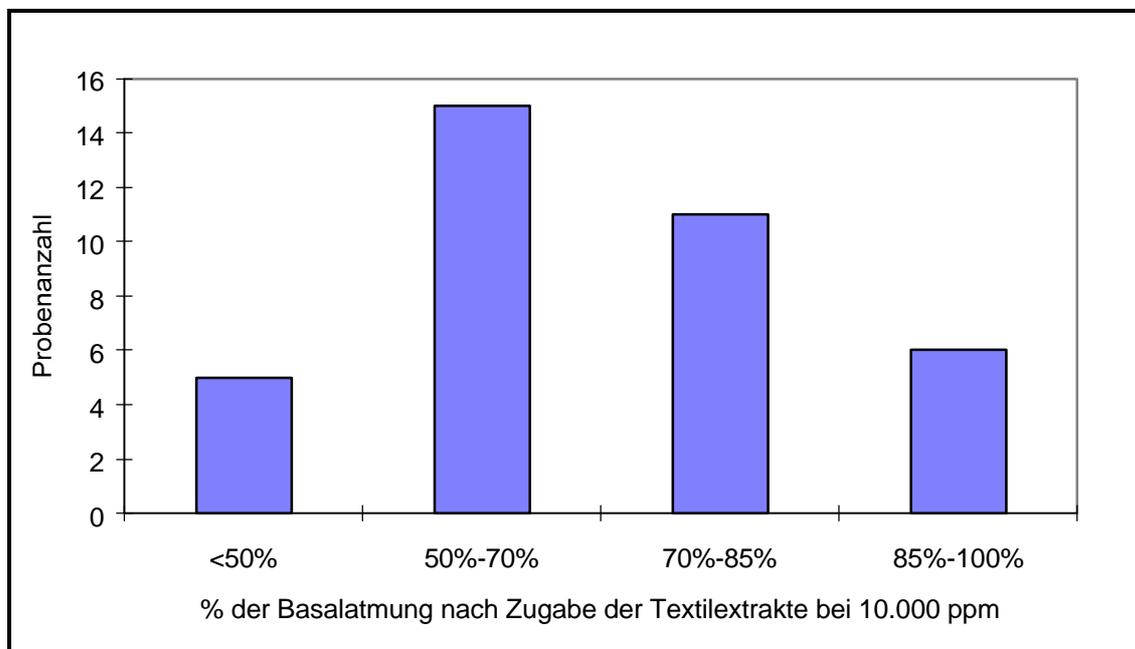
Tabelle 1: Ergebnisse der Voruntersuchung der Textilextrakte S01 – S37 bei 10000 ppm

Nr.	Artikelnr.	Farbe	Zusammensetzung	% der Basalatmung (Mittelwerte)
S01	11710	310	67 % Polyester, 33 % Wolle	49
S02	11710	710	100 % Baumwolle	58
S03	2050	1	100 % Leinen	43
S04	458	1	100 % Baumwolle	92
S05	7092	65	82 % Polyester, 18 % Wolle	74
S06	4675	7	100 % Baumwolle	40
S07	202	1	100 % Baumwolle	52
S08	347	1	100 % Baumwolle	70
S09	2080	1	60 % Viskose, 40 % Cupro	88
S10	7674	1	57 % Polyester, 43 % Polynosic	46
S11	11710	220	100 % Baumwolle	64
S12	31035	61	75 % Viskose, 25 % Polyester	61
S13	3057	grün- beige	100 % Viskose	28
S14	22910	1	100 % Viskose	58
S15	7560		55 % Polyester, 45 % Schurwolle	71
S16	11710	840	100 % Baumwolle	61
S17	475	4	50 % Baumwolle, 50 % Modal	88
S18	16419	406	60 % Wolle, 35 % Polyurethan, 5 % andere Fasern	74
S19	3047	5	100 % Viskose	92
S20	31205	55		96
S21	4715	1	70 % Polyester, 30 % Polyurethan	58
S22	4677	4		73
S23	31165	68	100 % Viskose	58
S24	16429	schwarz	75 % Wolle, 25 % Polyamid	50
S25	208	1	100 % Baumwolle	77
S26	3118	5	45 % Viskose, 33 % Polyester, 22 % Leinen	64
S27	11710	640	100 % Baumwolle	114
S28	11710	210	100 % Baumwolle	84
S29	2103	1	100 % Viskose	53
S30	2112	1	85 % Viskose, 15 % Leinen	66
S31	1223	großes Karo	55 % Acetat, 45 % Viskose	55
S32	2060	1	78 % Viskose, 22 % Leinen	78
S33	4752	4		72
S34	7561	51	80 % Baumwolle, 18 % Polyamid, 2 % Elasthan	82
S35	4681			74
S36	11710	800	100 % Baumwolle	76
S37	2225	4	70 % Viskose, 30 % Leinen	66

Das Ergebnis der Voruntersuchungen bestätigte die unterschiedlich starke Wirkung der Textilextrakte auf die Atmung der Keratinozyten.

Aufgrund ihrer Wirkung lassen sich die Proben in vier Kategorien einteilen: keine Hemmung (nach Extraktzugabe zeigten die Zellen eine Atmung von 85 – 100 % der Basalatemung), geringe Hemmung (70 – 85 %), geringe bis mittelmäßige Hemmung (50 – 70 %) und mittelmäßige Hemmung (< 50 %). Bei der Konzentration von 10.000 ppm zeigte keine der gemessenen Extrakte eine starke Hemmung (< 10 %).

Abbildung 11: Einteilung der Proben S01 – 37 nach ihrer Hemmwirkung bei 10.000 ppm



Eine Konzentration von 10.000 ppm als Halbhemmungskonzentration liegt an der Grenze zwischen mittelmäßiger und geringer Belastung der Probe. Lag bei dieser Konzentration der Wert der Basalatemung unter 70 %, so ist die Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve zur genauen Toxizitätsbestimmung erforderlich.

Anhand des Diagramms (Abb. 11) kann man erkennen, daß sechs Textilproben (S04, S09, S17, S19, S20, S27) die Basalatemung nicht hemmen. Die relativ geringe Hemmung der Basalatemung auf bis zu 85 % kann auch daran liegen, daß durch die Lagerung der Zellen

nach der Ernte im Eisbad, diese geschädigt werden und damit die Schädigung nicht unbedingt durch die Textilextrakte ausgelöst wird.

Die Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve bzw. Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ist in solchen Fällen nicht möglich. Weitere elf Proben (S05, S15, S18, S22, S25, S28, S32, S33, S34, S35, S36) hemmten die Basalatmung kaum. Zur Sicherheit wurde der  $IC_{50}$ -Wert dennoch bestimmt.

Fünfzehn Extrakte hemmten die Basalatmung gering bis mittelmäßig (S02, S07, S08, S11, S12, S14, S16, S21, S23, S24, S26, S29, S30, S31, S37), weitere fünf sogar mittelmäßig bis stark (S01, S03, S06, S10, S13). Diese sind wahrscheinlich mittelmäßig belastet. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde zur Abklärung bestimmt.

Generell lassen sich anhand der Voruntersuchung der Extrakte S01 bis S37 mehrere Aussagen treffen. Die Textilien sind in ihrer Schadwirkung abgestuft. Bei den Proben, welche die Basalatmung auf 50 - 70 % bzw. < 50 % hemmten, sind genaue Ermittlungen der Dosis-Wirkungskurven bzw. des  $IC_{50}$ -Wertes erforderlich, um Hinweise auf eine mögliche Belastung zu erhärten oder zu entkräften. Eine weitere Untersuchung der unbelasteten Proben im Keratinozytenatmungstest mit einer Hemmung von weniger als 15 % ist nicht notwendig. Damit konnte durch die Voruntersuchung die hohe Probenanzahl mit geringem Aufwand eingegrenzt und Voraussagen über die Größenordnung der Halbhemmungskonzentration des Textilextraktes getroffen werden.

#### **4.2.1.2. Die Halbhemmungskonzentrationen ( $IC_{50}$ -Werte) und die Ergebnisse der GC-MS-Screening-Analyse der Textilextrakte S01 – S37**

Die Tabellen 2 - 6 zeigen zusammenfassend die  $IC_{50}$ -Werte der Basal- und entkopplerstimulierten Atmung sowie die mittels GC-MS analysierten Inhaltsstoffe der Textilextrakte.

Die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte resultiert aus der Annahme von quasi-ppm (siehe Material und Methoden). Die Annahme beruht auf der Hypothese, daß sich die Gesamtmenge der Textilprobe bzw. der Inhaltsstoffe in dem Extrakt gelöst hat.

Tabelle 2: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal-/CCCP-entkoppelten Atmung; Ergebnisse der GC-MS-Analyse der Extrakte S01 - S08

Textilextrakt	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08
IC <sub>50</sub> -Wert [ppm] (Basalatmung)	9000 ± 500	10000 ± 500	8000 ± 1100	> 16700	25000 ± 7000	5000 ± 1400	9000 ± 400	15000 ± 400
IC <sub>50</sub> -Wert [ppm] (CCCP-entkoppelte Atmung)	5000 ± 500	7000 ± 500	7000 ± 700	> 16700	9000 ± 1100	2100 ± 1000	7300 ± 400	11000 ± 800
Komponente	Komponentenmenge bezogen auf 100 ml Textilextrakt							
Paraffin-Kohlenwasserstoffe (Kettenlänge: C <sub>20</sub> - C <sub>35</sub> )	25 mg	50 mg	30 mg	50 mg	30 mg	50 mg	50 mg	30 mg
Alkohole, Carbonsäure-, Fettsäureester (Kettenlänge: C <sub>15</sub> - C <sub>18</sub> )	25 mg	50 mg	10 mg	50 mg	30 mg	10 mg	50 mg	30 mg
Carbonsäuren (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	50 µg	100 µg		100 µg	100 µg		100 µg	50 µg
Naphthalendicarbonsäuren			30 mg			50 mg		
Alkohole, Ketone (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	10 µg	20 µg	10 µg	50 µg	50 µg	100 µg	50 µg	50 µg
verschiedene Phthalsäureester	500 µg	200 µg	500 µg	100 µg	300 µg	300 µg	300 µg	100 µg
Pentadisäure-methyl- bis(methylpropyl)ester	100 µg							
Caprolactam (Identifizierung unsicher)	0,5 µg							
Phenol	0,1 µg	0,2 µg				0,25 µg	0,75 µg	12 µg
o-Chloranilin	0,1 µg							
Dibutylformamid	0,1 µg							
Arylamine			10 µg					
4-Chlor-3-methylphenol					0,55 µg			
Tributylphosphat						50 µg		
Kresole							0,3 µg	5,75 µg

Tabelle 3: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal-/CCCP-entkoppelten Atmung; Ergebnisse der GC-MS-Analyse der Extrakte S09 - S16

Textilextrakt	S09	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	> 16700	7500 ± 800	15000 ± 1300	17000 ± 2200	2300 ± 200	14000 ± 700	24000 ± 800	40000 ± 2500
IC <sub>50</sub> -Wert (CCCP-entkoppelte Atmung)	25000 ± 800	2600 ± 400	9400 ± 800	3600 ± 1000	800 ± 120	6900 ± 600	14000 ± 500	18000 ± 1000
Komponente	Komponentenmenge bezogen auf 100 ml Textilextrakt							
Paraffin-Kohlenwasserstoffe (Kettenlänge: C <sub>20</sub> - C <sub>35</sub> )	50 mg	30 mg	50 mg	50 mg	50 mg	40 mg	50 mg	50 mg
Alkohole, Carbonsäure-, Fettsäureester (Kettenlänge: C <sub>15</sub> - C <sub>18</sub> )	50 mg	30 mg	10 mg	10 mg	50 mg	40 mg	50 mg	30 mg
Carbonsäuren (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	50 µg	30 µg			50 µg	50 µg	50 µg	
Naphthalendicarbonsäuren			40 mg	30 mg				
Alkohole, Ketone (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	20 µg	50 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	100 µg
verschiedene Phthalsäureester	200 µg	350 µg	500 µg	500 µg	100 µg	300 µg	300 µg	250 µg
Pentadisäure-methyl- bis(methylpropyl)ester						50 µg		
Caprolactam (Identifizierung unsicher)						0,5 µg		
Phenol	0,6 µg				0,1 µg	0,1 µg		
o-Chloranilin						0,1 µg		
4-Chlor-3-methylphenol	0,2 µg				0,25 µg			
Kresole	1,25 µg							

Tabelle 4: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal-/CCCP-entkoppelten Atmung; Ergebnisse der GC-MS-Analyse der Extrakte S17 – S24

Textilextrakt	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	20000 ± 3200	36000 ± 3000	20000 ± 2200	28000 ± 2200	9900 ± 800	26000 ± 4000	7800 ± 1000	7600 ± 700
IC <sub>50</sub> -Wert (CCCP-entkoppelte Atmung)	15000 ± 400	15000 ± 800	23000 ± 7500	20000 ± 3600	6000 ± 800	15000 ± 1400	4500 ± 700	3500 ± 900
Komponente	Komponentenmenge bezogen auf 100 ml Textilextrakt							
Paraffin-Kohlenwasserstoffe (Kettenlänge: C <sub>20</sub> - C <sub>35</sub> )	75 mg	50 mg	50 mg	75 mg	50 mg	30 mg	50 mg	50 mg
Alkohole, Carbonsäure-, Fettsäureester (Kettenlänge: C <sub>15</sub> - C <sub>18</sub> )	30 mg	25 mg	45 mg	20 mg	50 mg	30 mg	40 mg	50 mg
Carbonsäuren (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )					30 µg	100 µg	150 µg	50 µg
Alkohole, Ketone (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	750 µg	250 µg	300 µg	30 µg	20 µg	120 µg	150 µg	150 µg
verschiedene Phthalsäureester	450 µg	200 µg	150 µg	500 µg	300 µg	200 µg	200 µg	300 µg
Naphthalendicarbonsäuren				30 mg				25 mg
Caprolactam (Identifizierung unsicher)					0,5 µg			
Phenol						0,1 µg		
Arylamin				5 µg				
4-Chlor-3-methylphenol						0,25 µg		0,3 µg

Tabelle 5: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal-/CCCP-entkoppelten Atmung; Ergebnisse der GC-MS-Analyse der Extrakte S25 – S32

Textilextrakt	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32
IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	13000 ± 1100	18000 ± 3000	> 16700	> 16700	3000 ± 300	7400 ± 650	10000 ± 500	26000 ± 3000
IC <sub>50</sub> -Wert (CCCP-entkoppelte Atmung)	4200 ± 1600	5100 ± 900	> 16700	> 16700	400 ± 100	6500 ± 6900	9100 ± 500	14000 ± 1600
Komponente	Komponentenmenge bezogen auf 100 ml Textilextrakt							
Paraffin-Kohlenwasserstoffe (Kettenlänge: C <sub>20</sub> - C <sub>35</sub> )	50 mg	40 mg	100 mg	50 mg	40 mg	50 mg	75 mg	40 mg
Alkohole, Carbonsäure-, Fettsäureester (Kettenlänge: C <sub>15</sub> - C <sub>18</sub> )	50 mg	40 mg	100 mg	20 mg	35 mg	50 mg	10 mg	40 mg
Carbonsäuren (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	50 µg	20 µg	25 µg			5 µg		30 µg
Alkohole, Ketone (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	30 µg	30 µg	45 µg	30 µg	50 µg	75 µg	100 µg	10 µg
verschiedene Phthalsäureester	150 µg	250 µg	300 µg	300 µg	450 µg	450 µg	300 µg	300 µg
Naphthalendicarbonsäuren				30 mg	40 mg		40 mg	
Caprolactam (Identifizierung unsicher)								1 µg
Phenol							0,25 µg	0,1 µg
4-Chlor-3-methylphenol	0,15 µg					0,3 µg		
Tributylphosphat							150 µg	
o-Chloranilin								0,1 µg

Tabelle 6: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal-/CCCP-entkoppelten Atmung; Ergebnisse der GC-MS-Analyse der Extrakte S33 – S37

Textilextrakt	S33	S34	S35	S36	S37			
IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	10300 ± 600	25000 ± 2000	27000 ± 2000	23000 ± 1000	18000 ± 1600			
IC <sub>50</sub> -Wert (CCCP-entkoppelte Atmung)	7000 ± 500	12000 ± 1500	12000 ± 1000	12000 ± 1100	8000 ± 900			
Komponente	Komponentenmenge bezogen auf 100 ml Textilextrakt							
Paraffin-Kohlenwasserstoffe (Kettenlänge: C <sub>20</sub> - C <sub>35</sub> )	75 mg	50 mg	50 mg	100 mg	50 mg			
Alkohole, Carbonsäure-, Fettsäureester (Kettenlänge: C <sub>15</sub> - C <sub>18</sub> )	100 mg	50 mg	50 mg	100 mg	50 mg			
Carbonsäuren (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )			75 µg	100 µg	50 µg			
Alkohole, Ketone (Kettenlänge ca. C <sub>8</sub> )	50 µg	50 µg	20 µg	150 µg	50 µg			
verschiedene Phthalsäureester	300 µg	100 µg	300 µg	200 µg	250 µg			
Naphthalendicarbonsäuren	50 µg							
Caprolactam (Identifizierung unsicher)			1 µg					
Phenol			0,1 µg	0,4 µg				
4-Chlor-3-methylphenol	0,2 µg		0,1 µg		0,25 µg			
Tributylphosphat								
o-Chloranilin								
Kresole				0,2 µg				

Durch die IC<sub>50</sub>-Werte sind Aussagen auf den Grad der Belastungen von Textilproben möglich. Hier lassen sich ebenfalls vier Gruppen unterscheiden: nicht, gering, mittelmäßig und stark hemmend.

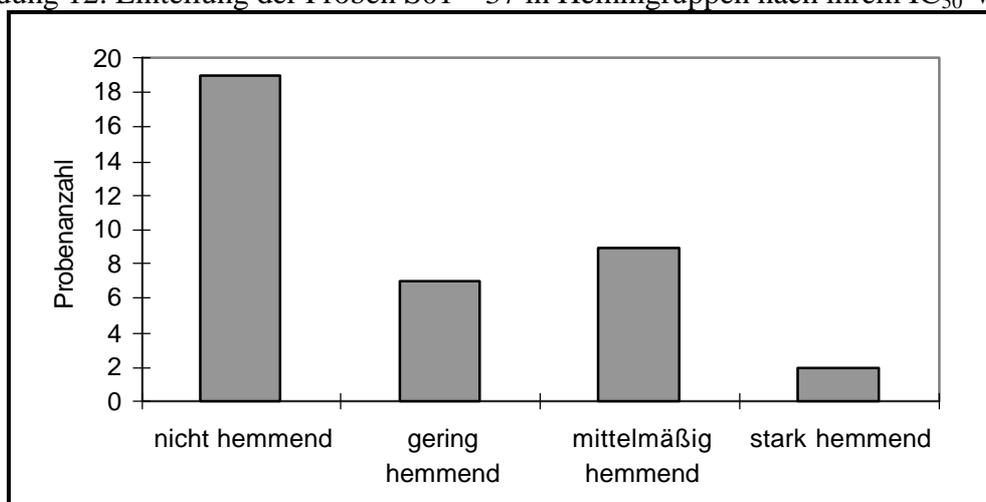
Kriterium für die Einstufung ist in erster Linie der IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung. Der IC<sub>50</sub>-Wert der CCCP-entkoppelten Atmung ist im Gegensatz dazu empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen, zeigt deshalb größere Schwankungen. Außerdem sagt die Beeinflussung der Basalatmung etwas über die gesamte Bandbreite und nicht nur über Teilbereiche der Atmungskette aus.

Die IC<sub>50</sub>-Werte der Basalatmung von 19 Proben (S04, S05, S09, S12, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S22, S26, S27, S28, S32, S34, S35, S36, S37) liegen oberhalb des Meßbereiches von 16700 ppm. Deshalb kann ein großer Teil der von der Firma Steilmann bereitgestellten Proben als nicht atmungsschädigend angesehen werden.

Eine gering hemmende Wirkung auf die Basalatmung wiesen sieben der Textilextrakte (S02, S08, S11, S14, S25, S31, S33) auf. Ihr IC<sub>50</sub>-Wert liegt zwischen 10000 und 16700 ppm. Neun Extrakte (S01, S03, S06, S07, S10, S21, S23, S24, S30) zeigten IC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 4000 bis 10000 ppm und damit eine mittelmäßige Hemmung im Keratinozytenatmungstest.

Nur zwei (S13, S29) der 37 Textilproben erwiesen sich mit einem IC<sub>50</sub>-Wert unterhalb von 4000 ppm als stark belastet. Da jedoch keine Angaben darüber gemacht wurden, wie repräsentativ die Auswahl der Textilproben von der Firma Steilmann ist, lassen sich keine Schlußfolgerungen über die Güte der Steilmann-Textilien ziehen.

Abbildung 12: Einteilung der Proben S01 – 37 in Hemmgruppen nach ihrem IC<sub>50</sub>-Wert



Ein Zusammenhang zwischen Material und Belastung ist nicht eindeutig erkennbar. Etwa ein Drittel der Steilmann-Proben bestehen zu 100 % aus Baumwolle. Diese 12 Textilproben sind z. T. mittelmäßig, gering und nicht hemmend. Ebenfalls verschiedene Hemmstufen wurden bei den Textilextrakten mit Viskose-, Polyester- und Wollgemischen ermittelt. Die Tabelle 7 zeigt die unterschiedliche Hemmgruppenzugehörigkeit der Textilextrakte je nach Zusammensetzung (eine Textilie mit gemischter Zusammensetzung kann zu verschiedenen Gemischen zählen)

Tabelle 7: Hemmung der Basalatmung nach Textilzusammensetzung

Gesamtzahl	Zusammensetzung	nicht hemmend	gering hemmend	mittelmäßig hemmend	stark hemmend
12	100 % Baumwolle	6	3	3	-
8	Viskosegemisch	3	3	2	-
8	Polyestergemisch	3	2	3	-
5	Wollgemisch	3	-	2	-
5	100 % Viskose	1	1	1	2
2	Baumwollgemisch	2	-	-	-
1	100 % Leinen	-	-	1	-
1	100 % Polyester	-	1	-	-

Auffällig ist, daß die stark hemmenden Extrakte aus dem gleichen Textilmaterial (Viskose) gewonnen wurden. Da jedoch die Ergebnisse der anderen Textilien aus reiner

Viskose eine mittelmäßige bis keine Hemmung zeigten, kann die Ursache für die starke Hemmung nicht ausschließlich im Material liegen. Wahrscheinlicher ist, daß bei der Veredlung dieser beiden Viskosetextilien die starke Belastung entstanden ist.

#### 4.2.1.3. Untersuchung der negativ aufgefallenen Textilproben S38 – S40

Drei Textilproben wurden von der Firma Steilmann mußten als belastet eingestuft. Die Probe S40 zum Beispiel rief bei einigen Textilarbeitern Kopfschmerzen hervor. Genauere Details wurden jedoch hier ebenso wie bei den Proben S38 und S39 nicht genannt. Es zeigte sich, daß die IC<sub>50</sub>-Werte dieser Proben deutlich niedriger liegen als die der anderen Steilmann-Proben. Bei Material oder Farbe konnte äußerlich keine Auffälligkeit festgestellt werden. Auch die GC/MS-Analyse zeigte keine auffälligen Verbindungen.

Tabelle 8: Die IC<sub>50</sub>-Werte der Proben S38 – S40

Nr.	Artikelnr.	Farbe	Zusammensetzung	IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Wert (entkopp. Atmung)
S38	70	schwarz	85% Viskose, 15% Leinen	350 ± 80 ppm	44 ± 22 ppm
S39	150/58	senf	100% Wolle	83 ± 16 ppm	160 ± 30 ppm
S40	16132	camel	100% Wolle	3400 ± 440 ppm	7200 ± 1100 ppm

#### 4.2.1.4. Säulenchromatografische Trennung des Extraktes S40

Der Textilextrakt S40 ist eine der drei Textilproben, deren Wirkung auf die Keratinozytenatmung besonders stark war im Vergleich zu den anderen Textilien der Firma Steilmann. Ausgehend von der Vermutung, daß diese stark hemmende Wirkung der Keratinozytenatmung auf eine bestimmte Substanz zurückzuführen ist, wurde dieser Textilextrakt säulenchromatografisch getrennt. Im ersten Trennungsschritt wurde eine Blight-Dyer-Extraktion in anorganische Oberphase und organische Unterphase

vorgenommen. Die organische Unterphase enthielt den Hauptteil der Hemmaktivität mit dem wesentlich geringeren IC<sub>50</sub>-Wert und wurde einer Grobauftrennung mittels Kieselgelsäule in fünf Fraktionen unterworfen. In weiteren Schritten sollte die Fraktion, welche die stärkste Hemmwirkung auf die Kerationozytenatmung zeigte, weiter aufgetrennt werden. Jedoch schon nach der ersten Auftrennung in fünf Fraktionen zeigte keine dieser Fraktionen mehr eine starke Atmungshemmung. Gegenüber den Hemmwirkungen des gesamten Textilextraktes spiegelte sich in den Fraktionen nur ein Bruchteil der ursprünglichen Hemmung wieder. Wurden die Fraktionen wieder vereinigt, so konnte die Hemmwirkung der organischen Unterphase nach der Blight-Dyer-Extraktion von S40 fast wieder hergestellt werden.

Tabelle 9: Die IC<sub>50</sub>-Werte der Probe S40 nach Trennung durch Blight-Dyer-Extraktion und Säulenchromatografie

<b>Fraktion</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert (entkopp. Atmung)</b>
S40: ungetrennter Textilextrakt	7500 ppm
S40 BD-O: Oberphase nach der Blight-Dyer-Extraktion	19200 ppm
S40 BD-U: Unterphase nach der Blight-Dyer-Extraktion	9200 ppm
S40 100: Fraktion 1 der Unterphase	92000 ppm
S40 200: Fraktion 2 der Unterphase	94000 ppm
S40 300: Fraktion 3 der Unterphase	95000 ppm
S40 400: Fraktion 4 der Unterphase	94000 ppm
S40 500: Fraktion 5 der Unterphase	98000 ppm
S40 100-500: Summe der Fraktionen 1-5	23100 ppm

Dieses bemerkenswerte Ergebnis läßt deutlich auf Kombinationswirkungen von mehreren Substanzen schließen, die in den unterschiedlichen Fraktionen enthalten sind. Da die angenommene Vermutung von einer einzigen Substanz als Ursache der starken Hemmwirkung widerlegt wurde, sind keine weiteren Trennungen der Fraktionen vorgenommen worden.

#### 4.2.2. Textilproben der Firma Lenzing AG

Die Firma Lenzing aus Österreich übersandte einige Textilproben zur Untersuchung im Keratinozytentest. Diese weltweit bekannte Textilfirma entwickelte eine neue Faserart: Lyocell. Die Basis der Faser ist Zellulose, als Lösungsmittel dient N-Methylmorpholin-N-oxid (NMMO). Die Herstellung der neuen Zellulosefaser Lyocell ist weniger giftig als die herkömmliche Viskoseherstellung, damit kann Lyocell als neue Öko-Textilie gehandelt werden. Aber auch andere Verbrauchereigenschaften wie Farbechtheit und gute Tragbarkeit zeichnen die Lyocell-Faser aus. Diese verbesserten Eigenschaften werden nach der eigentlichen Faserproduktion durch spezielle Behandlungen der Faser erreicht.

Die Textil- bzw. Faserproben (L01 bis L15) sind Proben, die aus verschiedenen Herstellungsstufen von der Rohware bis zur fertig ausgerüsteten und gewaschenen Textilie entnommen wurden. Damit lassen sich Aussagen über die Belastung der Fasern bei den jeweiligen Behandlungsschritten treffen. Zusätzlich können Vergleiche der fertigen Textilfaser mit anderen Textilien vorgenommen werden. Von Interesse war auch der Vergleich der österreichischen (L05) mit den japanischen (L03, L04) Qualitäten.

Weiterhin sollte der Einfluß des Avivierens auf die Schadwirkung der Textilien gemessen werden. Dieser spezielle Schritt der Textilveredlung soll erreichen, daß sich der Stoff nicht zu schnell abreibt. Dafür wurden zwei identische Lyocellproben, einmal mit Avivage (L16) und ohne Avivage (L17) behandelt, getestet.

Es wurden 15 verschiedene Textilfasern der Firma Lenzing im Keratinozytentest untersucht. Diese Proben stammen aus unterschiedlichen Herstellungs- und Bearbeitungsstufen im Textilveredlungsprozeß. Anhand der  $IC_{50}$ -Werte lassen sich sehr gut die schädigenden Einflüsse der einzelnen Bearbeitungsschritte bei der Textilveredlung aufzeigen.

Tabelle 10: IC<sub>50</sub>-Werte der Lyocell-Fasern der Firma Lenzing

Textilprobe	Behandlung	IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Wert (entkopp. Atmung)
L01	Nadelfilz, Rohware	900 ± 470 ppm	770 ± 400 ppm
L02	Rohware	8600 ± 4000 ppm	3500 ± 1500 ppm
L03	japanische Qual.	6400 ± 450 ppm	2700 ± 400 ppm
L04	japanische Qual.	5800 ± 520 ppm	2600 ± 700 ppm
L05	österreichische Qual.	3400 ± 800 ppm	1700 ± 400 ppm
L06	reaktivgefärbt	22000 ± 3000 ppm	8600 ± 1500 ppm
L07	enzymbehandelt	20000 ± 1400 ppm	10500 ± 1600 ppm
L08	aviviert	7400 ± 800 ppm	2100 ± 360 ppm
L09	ausgerüstet	7800 ± 1100 ppm	2300 ± 500 ppm
L10	pigmentgefärbt	11000 ± 2200 ppm	9100 ± 3000 ppm
L11	ungefärbt	>18300 ppm	>18333 ppm
L12	gefärbt	>18300 ppm	>18333 ppm
L13	speziell ausgerüstet	10000 ± 1100 ppm	8700 ± 1200 ppm
L14	speziell ausgerüstet	>18300 ppm	>18300 ppm
L15	gewaschen (5mal)	>18300 ppm	>18300 ppm
L16	mit Avivage	>18300 ppm	>18300 ppm
L17	ohne Avivage	>18300 ppm	>18300 ppm

Als stark atmungshemmend zeigte sich der Nadelfilz (L01) der Lyocell-Fasern. Bei der chemischen Umwandlung der Zellulose mittels NMMO verbleiben offenbar viele Rückstände in der Ware. Dies machte sich im Keratinozytenatmungstest bemerkbar. Die Probe L01 wies den kleinsten IC<sub>50</sub>-Wert innerhalb der Lyocell-Proben und damit die größte Atmungshemmung auf. Bei dieser Probe handelt es sich noch nicht um fertiges Gewebe, sondern lediglich um das wattea nicht auf der Haut getragen wird, hat dieses Ergebnis für den Verbraucher keine Bedeutung.

Die Rohware (L02), die Textilproben der japanischen (L03, L04) und der österreichischen Qualität (L05) wiesen IC<sub>50</sub>-Werte auf, die um eine Größenordnung höher war als der IC<sub>50</sub>-Wert des Nadelfilzes (L01). Diese vier Proben jedoch wirken immer noch mittelmäßig hemmend. Die ausgerüstete Textilie der österreichischen Qualität besitzt im Vergleich bei der Basalatmung als dem ausschlaggebenden IC<sub>50</sub>-Wert den kleinsten Wert. Gegenüber den japanischen Qualitäten wirkt die österreichische Qualität also stärker hemmend, liegt aber in der gleichen Größenordnung.

Betrachtet man die Proben L06 – L10, so lassen sich die Schweregrade der Hemmungen, welche die Textilextrakte hervorrufen, der jeweiligen Textilbehandlung bzw. -veredlung zuordnen. Gegenüber den japanischen Qualitäten liegt der IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung bei der reaktivgefärbten Lyocellfaser (L06) der österreichischen Qualität um eine Größenordnung höher. Die reaktivgefärbte Probe L06 war somit nicht belastet.

Durch die Enzymbehandlung von Probe L07 verändert sich der IC<sub>50</sub>-Wert sowohl der Basal- als auch der der entkopplerstimulierten Atmung kaum. L07 hatte im Vergleich zu L06 einen etwas geringeren IC<sub>50</sub>-Wert, dennoch können beide als nicht hemmend angesehen werden.

Im darauffolgenden Behandlungsschritt wurde die Textilie aviviert. Diese avivierte Probe L08 wirkt gegenüber der enzymbehandelten L07 stärker hemmend. Deutlich wird dies im Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte, besonders bei der entkopplerstimulierten Atmung steigt die Atmungshemmung auf etwa das Dreifache an.

Nach der Behandlung mit Avivage erfolgte eine Ausrüstung der Faser. Der IC<sub>50</sub>-Wert dieser Probe L09 zeigte kaum veränderte Werte gegenüber der Probe L08. Durch diese Ausrüstung wurde zwar eine Veränderung der Textilfaser erreicht, die aber keinen Einfluß auf den Keratinozytenatmungstest hatte.

Nach der Pigmentfärbung verringerte sich die Belastung. Der IC<sub>50</sub>-Wert der pigmentgefärbten Probe L10 lag höher als der der ausgerüsteten Probe L09.

Im Vergleich der beiden Proben L11 (ungefärbt) und L12 (gefärbt) ließen sich keine Unterschiede feststellen. Die IC<sub>50</sub>-Werte sowohl der Basal- als auch der entkoppelten Atmung lagen bei beiden Proben oberhalb des Meßbereiches von 18300 ppm. Diese beiden Proben zeigten keine Belastungen, die sich mit dem Keratinozytenatmungstest feststellen ließen.

L13 und L14, beide Proben speziell ausgerüstet, konnten anhand ihrer IC<sub>50</sub>-Werte im Grad der Belastung deutlich unterschieden werden. Während L14 als unbelastet eingestuft wurde, zeigte sich bei L13 eine mittelmäßige Hemmung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10000 ± 1100 ppm (Basalatmung). Da die Firma Lenzing AG jedoch keine näheren Angaben zu eingesetzten Chemikalien machte, ließ sich dieser Effekt nicht näher zuordnen.

Positiv ist, daß die fünfmal gewaschene Textilprobe L15 keinerlei Hemmung hervorrief. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag oberhalb 10000 ppm und wird als nicht auffällig betrachtet. Dadurch wurde gezeigt, daß die Belastungen, die bei der Herstellung und Behandlung der Lyocell-Fasern auftreten, bei der gewaschenen fertigen Textilie nicht mehr vorhanden sind.

Zwei identische Textilproben wurden einmal mit und einmal ohne Avivage behandelt und für die Untersuchungen im Keratinozytenatmungstest bereitgestellt. Offenbar interessierte sich die Lenzing AG besonders für den Vergleich vor und nach der Behandlung. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Basalatmung lagen bei beiden Proben oberhalb von 18300 ppm. Man kann nicht feststellen, daß die Probe mit Avivage (L16) stärker hemmt als die Probe ohne Avivage (L17). Beide Proben können als unbelastet betrachtet werden.

Allgemein liegen die Belastungen der 17 Lyocell-Proben mit mittelmäßiger bis geringer Atmungshemmung im gleichen Bereich der anderen im Keratinozytenatmungstest geprüften Textilien. Einzige Ausnahme bildet die Proben L01 mit sehr starker Belastung. Allerdings ist diese Faser-Probe auch nicht als tragfähige Textilie anzusehen, da es sich noch um Rohware handelt.

#### **4.2.3. Textilproben der Firma ecb ONLINE Analystechnik GmbH**

**Die Firma ecb ONLINE Analystechnik GmbH, die selbst analytische Messungen an Textilien vornimmt und Kooperationspartner in diesem Projekt ist, stellte mehrere Textilproben für die Messung im Keratinozytenatmungstest zur Verfügung.**

##### **4.2.3.1. Die Textilproben O01, O02, O03**

Über die Herkunft und Zusammensetzung dieser drei Textilien wurden keine näheren Angaben gemacht. Die Dosis-Wirkungskurven wurden von Basal- und entkopplerstimulierter Atmung ermittelt.

Tabelle 11: IC<sub>50</sub>-Werte der Textilextrakte O01, O02 und O03

<b>Textilprobe</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert (Basalatmung)</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert (entkopp. Atmung)</b>
O01	10600 ± 1400 ppm	—
O02	21800 ± 2400 ppm	9100 ± 1100 ppm
O03	4300 ± 370 ppm	3200 ± 750 ppm

Zwischen diesen drei Textilextrakten sind deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Atmungshemmung zu verzeichnen. Während die Probe O02 mit einem sehr hohen IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung und mit einem mittleren IC<sub>50</sub>-Wert der entkoppelten Atmung als kaum hemmend angesehen werden kann, ist die Probe O03 deutlich stärker belastet. Dies wird auch im Vergleich mit den IC<sub>50</sub>-Werten anderer Textilproben bestätigt.

Der IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung kann oberhalb von einem Konzentrationsmaximum von 16700 ppm nicht mehr gemessen, aber durch Korrelation relativ genau bestimmt werden, so konnte der IC<sub>50</sub>-Werte der Basalatmung der Probe O02 ermittelt werden.

Die IC<sub>50</sub>-Werte sowohl der Basal- als auch der CCCP-entkoppelten Atmung des Textilextraktes O03 liegen im Grenzbereich zwischen mittelmäßiger und starker Atmungshemmung. Der Textilextrakt O01 zeigt geringe Belastung. Aufgrund stark schwankender Werte konnte hier keine Dosis-Wirkungskurve für die entkopplerstimulierte Atmung erstellt werden.

#### **4.2.3.2. Die Textilproben O04, O05**

Zwei weitere Proben, schwarze Baumwollsocken der Firma Hennes & Mauritz, die wir von der Firma ONLINE zur Analyse bekamen, sollten untersucht werden. Die Textilien wurden von den Verbrauchern reklamiert, weil sie hautreizende Reaktionen auslösten.

Zwar ist die chemische Analyse und der Keratinozytenatmungstest nicht aussagekräftig genug für die Erfassung solcher Symptome, jedoch sollte die allgemein schädigende Wirkung der Textilien untersucht werden.

Die Dosis-Wirkungskurven konnten nur von den Basalatmungswerten ermittelt werden, weil einzelne Meßpunkte bei der entkoppelten Atmung große Streuungen aufwiesen.

Selbst für die Basalatmung schwankten im Bereich der erwarteten IC<sub>50</sub>-Werte (30 – 80 %) die Meßergebnisse stark.

Tabelle 12: IC<sub>50</sub>-Werte der Textilextrakte O04, O05

<b>Textilprobe</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert (Basalatmung)</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert (entkopp. Atmung)</b>
O04	1050 ± 210 ppm	—
O05	3800 ± 560 ppm	—

Die Probe O04 ist etwas stärker belastet und hemmt dadurch mehr als O05. Im Vergleich zu anderen Textilien aber sind diese Proben als mittelmäßig belastet anzusehen.

Eine Besonderheit dieser beiden Textilextrakte gegenüber anderen untersuchten Proben ist, daß der Anteil des Antimycin A-gehemmten Sauerstoffverbrauchs relativ hoch ist. Bei allen anderen Textilien lag der Anteil der sauerstoffverbrauchenden Prozesse, die nicht zur Zellatmung gehören, unterhalb von 10 – 20 %. Der durch Antimycin A hemmbare Sauerstoffverbrauch der Extrakte O04 und O05 dagegen betrug bis zu 80 % des Gesamtsauerstoffverbrauchs. Offenbar sind in den Proben O04 und O05 Substanzen enthalten, die einen externen Sauerstoffverbrauch verursachen. Hierin kann auch die Ursache für die relativ hohen Schwankungen der einzelnen Meßpunkte liegen.

#### 4.2.3.3. Die Textilproben O08 - O11

Alle vier Textilproben O08 - O11 enthalten Kathon<sup>®</sup>. Dies ergab eine von der Firma ONLINE durchgeführte GC/MS-Analyse. Kathon<sup>®</sup> ist ein Gemisch aus 2-Methyl-, 5-Chlor-2-methyl- oder 2-Octyl-4-isothiazol-3-on und wirkt biozid. Farben, Muster und Zusammensetzungen der Proben sind unterschiedlich.

Tabelle 13: Kennnummer, Material, Farbe und IC<sub>50</sub>-Wert der Proben O08 – O011

<b>Textilprobe</b>	<b>Kennnummer</b>	<b>Material</b>	<b>Farbe</b>	<b>IC<sub>50</sub>-Wert</b>
O08	A 1108106	synthetisch	braun/beige	>16700 ppm
O09	A 1306 105	synthetisch	dunkelbraun	>16700 ppm
O10	A 2207202	Wolle	schwarz/blau/gelb	>16700 ppm
O11	A 2208202	Baumwolle	hellblau/bunt	>16700 ppm

Eine exakte Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes der Extrakte O08 – O11 war nicht möglich, da dieser oberhalb einer Konzentration von 16700 ppm liegt. Die Textilextrakte sind als nicht atmungshemmend anzusehen.

#### **4.2.4. Die Teppichproben**

Um die Atmungshemmung pyrethroidhaltiger Textilproben zu untersuchen, wurden Teppichproben verwendet. Die ausgewählten Proben bestehen größtenteils aus Wolle, da vor allem bei der Konservierung dieses Materials Pyrethroide Verwendung finden. Die Fasern wurden von der Unterlage (Schaumstoff o.ä.) getrennt, da nur diese Fasern selbst mit der menschlichen Haut in Berührung kommen. Die Teppichproben stammen vorwiegend aus Berliner Baumärkten.

Die GC/MS-Analyse ergab, daß alle Teppichextrakte bis auf eine Ausnahme (T14) das Pyrethroid Permethrin enthalten. Besonders hoch ist die Konzentration in den Proben T05 und T11. Hier war bereits durch das Bundesumweltamt eine erhöhte Permethrinkonzentration nachgewiesen worden.

Die Teppichextrakte wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (10000 und 15000 ppm). Entgegen den Erwartungen wurden bei keiner der beiden, im Vergleich zu den Textilextrakten, relativ hohen Konzentrationen eine nennenswerte Hemmung der Zellatmung beobachtet. Dies gilt sowohl für die Basalatmung als auch für die entkoppelte Atmung. Die Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven erübrigte sich daher.

Tabelle 14: Herkunft, Zusammensetzung, Permethringehalt und Atmungshemmung der Teppichextrakte

Probe	Herkunft; Bezeichnung	Zusammen- setzung	Permethringehalt		% der Basalatmung bei		% der entkopp. Atmung bei 15000 ppm
			[mg/m <sup>2</sup> ]	[mg/kg]	10000 ppm	15000 ppm	
T01	Stinnes, Steglitz	100 % Wolle	88,30	37,90	122	72	75
T02	Domäne, Marienfelde „Cordoba“	100 % Wolle	546,86	251,06	104	79	54
T03	Domäne, Marienfelde „Melines“	100 % Wolle	855,63	414,85	75	71	51
T04	Domäne, Marienfelde „Dakar“	100 % Wolle	68,17	33,28	92	94	80
T05	Domäne, Marienfelde „Sidon“	100 % Wolle	2722,49	1030,04	71	81	65
T07	Wand & Boden, Adenauer Platz	unbekannt	22,52	11,09	77	80	72
T08	Wand & Boden, Adenauer Platz	unbekannt	26,79	8,57	93	89	77
T09	Wand & Boden, Adenauer Platz	unbekannt	176,87	72,79	104	94	84
T10	Wand & Boden, Adenauer Platz	100 % Wolle	29,27	13,23	71	89	78
T11	Umweltbundesamt (Dr. Lepom)	unbekannt	19166,60	8747,62	98	98	86
T12	Privat	unbekannt	131,70	58,2	104	96	88
T13	Teppichland Berlin	unbekannt	33,43	18,2	90	88	81
T14	Privat	unbekannt	0	0	83	94	84

### **4.3. Untersuchung von Substanzen im Keratinozytenatmungstest**

#### **4.3.1. Arylamine**

Ob Arylaminverbindungen außer ihrer vermutlich karzinogenen und mutagenen Wirkung auf den menschlichen Organismus auch eine Hemmung der Zellatmung verursachen, sollte im Keratinozytenatmungstest geklärt werden. Dazu wurden zwanzig Arylamine, die zum Teil nur in importierten Textilien nachgewiesen werden konnten, ausgewählt und die Dosis-Wirkungskurven erstellt.

Die zwanzig Vertreter der Arylamine zeigten unterschiedliche Ergebnisse bei der Atmungshemmung der HaCaT-Zellen. Ihre  $IC_{50}$ -Werte lagen im Bereich von 100  $\mu$ M bis oberhalb 5000  $\mu$ M. Fünf Substanzproben zeigten eine starke Hemmung der Basalatmung ( $IC_{50}$ -Wert: 100 - 500  $\mu$ M), weitere zehn Arylamine eine mittelmäßige Hemmung ( $IC_{50}$ -Wert: 500 - 5000  $\mu$ M) und die letzten fünf eine geringe Hemmung ( $IC_{50}$ -Wert: > 5000  $\mu$ M). Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sind den Tabellen 15 - 19 zu entnehmen.

Tabelle 15: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Arylamine

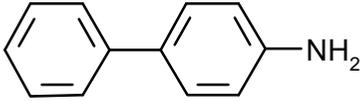
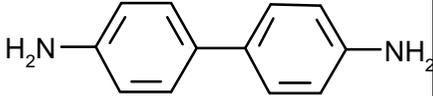
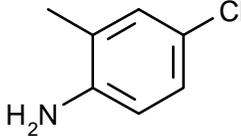
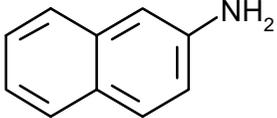
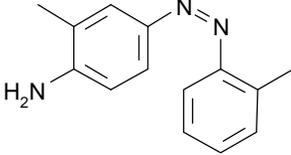
Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
1	4-Aminobiphenyl		260 ± 30 μM	280 ± 30 μM
2	Benzidin		4400 ± 650 μM	2600 ± 470 μM
3	4-Chlor-o-toluidin		530 ± 50 μM	530 ± 60 μM
4	2-Naphtylamin		4800 ± 650 μM	4600 ± 520 μM
5	o-Aminoazotoluol		290 ± 170 μM	1400 ± 1200 μM

Tabelle 16: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Arylamine

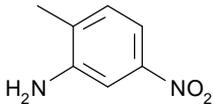
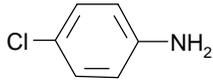
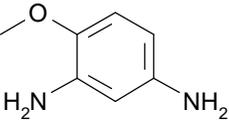
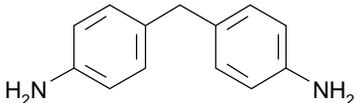
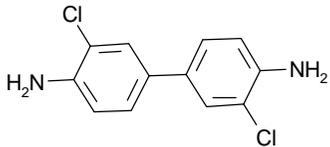
Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
6	2-Amino-4-nitrotoluol		2000 ± 190 μM	1100 ± 190 μM
7	p-Chloranilin		21100 ± 1300 μM	16500 ± 1050 μM
8	2,4-Diaminoanisol		> 3500 μM	—
9	4,4'-Diaminodiphenylmethan		1800 ± 190 μM	1550 ± 120 μM
10	3,3'-Dichlorbenzidin		370 ± 90 μM	200 ± 50 μM

Tabelle 17: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Arylamine

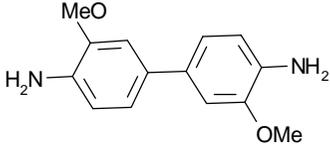
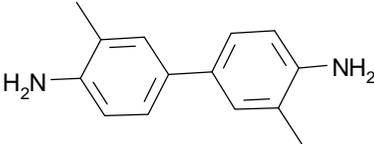
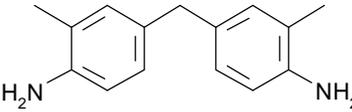
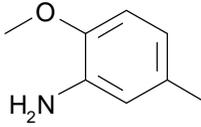
Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
11	3,3'-Dimethoxybenzidin		1420 ± 110 μM	—
12	3,3'-Dimethylbenzidin		1100 ± 90 μM	670 ± 140 μM
13	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan		1700 ± 660 μM	430 ± 200 μM
14	p-Kresidin		11500 ± 1100 μM	8300 ± 800 μM

Tabelle 18: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Arylamine

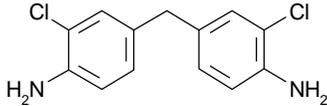
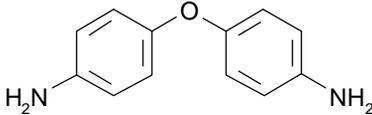
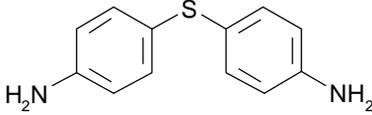
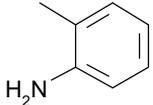
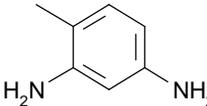
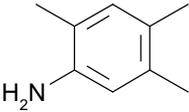
Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
15	4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin)		150 ± 35 μM	120 ± 20 μM
16	4,4'-Oxydianilin		1900 ± 200 μM	—
17	4,4'-Thiodianilin		1200 ± 230 μM	800 ± 240 μM
18	o-Toluidin		14000 ± 2100 μM	4100 ± 2100 μM
19	2,4-Toluyldiamin		> 10000 μM	> 3333 μM

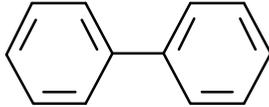
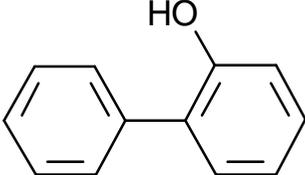
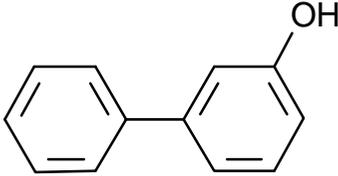
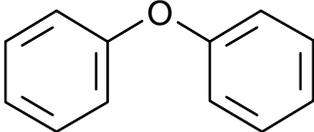
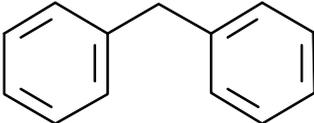
Tabelle 19: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Arylamine

Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
20	2,4,5-Trimethylanilin		9300 ± 770 μM	7300 ± 1000 μM

### 4.3.2. Biphenyle

Im Keratinozytenatmungstest zeigte sich die hemmende Wirkung der fünf untersuchten verwandten Biphenylverbindungen leicht abgestuft, jedoch in der gleichen Größenordnung. Alle untersuchten Substanzen hemmten die Atmung sehr stark ( $IC_{50}$ -Wert: 100 - 500  $\mu$ M). Am geringsten toxisch innerhalb dieser Verbindungsreihe ist das Biphenyl-3-ol. Die Tabelle 20 zeigt die  $IC_{50}$ -Werte der untersuchten Biphenyle.

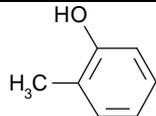
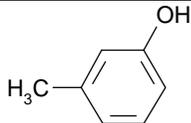
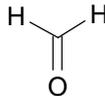
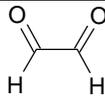
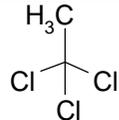
Tabelle 20: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung der Biphenyle

Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatmung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
1	Biphenyl		117 ± 12 μM	128 ± 14 μM
2	Biphenyl-2-ol		154 ± 5 μM	131 ± 13 μM
3	Biphenyl-3-ol		234 ± 42 μM	158 ± 21 μM
4	Biphenylether		108 ± 8 μM	143 ± 25 μM
5	Biphenylmethan		117 ± 6 μM	102 ± 10 μM

### 4.3.3. Weitere Substanzen

Außer den Arylaminen und Biphenylen wurden noch weitere Substanzen getestet: o-Kresol, m-Kresol, p-Kresol, Formaldehyd, Glyoxal, 1,1,1-Trichlorethan und Permethrin. Die hier gemessenen Werte sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: IC<sub>50</sub>-Werte der Basal- und der CCCP-entkoppelten Atmung weiterer Substanzen

Nr.	Substanz	Strukturformel	IC <sub>50</sub> -Werte (Basalatumung)	IC <sub>50</sub> -Werte (entkopp. Atmung)
1	o-Kresol		2,25 ± 0,38 mM	1,11 ± 0,14 mM
2	m-Kresol		1,62 ± 0,23 mM	0,77 ± 0,20 mM
3	p-Kresol		> 17 mM	> 17 mM
4	Formaldehyd		1,27 ± 0,09 mM	0,68 ± 0,1 mM
5	Glyoxal		62,8 ± 4,4 mM	17,2 ± 4,2 mM
6	1,1,1-Trichlorethan		900 ± 150 µM	720 ± 110 µM
7	Permethrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	70 µM	75µM

#### **4.4. Weitere Proben im Keratinozytenatmungstest**

Neben den Textilextrakten und Reinsubstanzen sollten noch weitere Proben geprüft werden. Diese Tests waren insbesondere notwendig um zeigen zu können, daß der Keratinozytenatmungstest auch für Untersuchungen nichttextiler Proben gut geeignet ist. Dabei wurde ein breites Spektrum unterschiedlichster Herkunft, wie Hydrosalin als Schwimmbadzusatz, verschiedene Kosmetikinhaltsstoffe, Abwasserproben, Softener Printpasta, und ein Kinderbuchextrakt untersucht.

##### **4.4.1. Der Schwimmbadzusatz Hydrosalin**

Die Dosis-Wirkungskurve von Hydrosalin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,03 Vol % bis 1,7 Vol % bestimmt. Da bei dieser flüssigen Probe kein Molekulargewicht oder andere Angaben bekannt sind, wird der IC<sub>50</sub>-Wert und die anderen Konzentrationen in Vol % angegeben. Hydrosalin zeigte seine hemmende Wirkung nicht sofort nach Zugabe in die Meßkammer, sondern erst nach 3 Minuten erreichte die Hemmung einen konstanten Wert und konnte abgelesen werden. Der IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung beträgt 0,64 Vol %, der Wert der CCCP-entkoppelten Atmung 0,42 %. Trotz der Zugabe von bis zu 1,7 Vol % Hydrosalin gelang es nicht, die Basalatmung auf über 90 % zu hemmen. Die maximale Hemmung der CCCP-entkoppelten Atmung betrug hier ca. 80 %.

##### **4.4.2. Kosmetikinhaltsstoffe**

Fünf Kosmetikinhaltsstoffe, über deren Herkunft bzw. chemische Zusammensetzung der Hersteller keine Angaben machte, wurden im Keratinozytenatmungstest geprüft. Die Proben (CG 26-1130, CG 29-0535, CG 31-0460, CGF-C 1607/4, CGF-C 2089) mußten wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit in Methylglycol gelöst werden.

Methylglycol selbst beeinflusst bis zu einer Endkonzentration von < 3 Vol % die Atmungsmessung nicht. Bei höheren Konzentrationen ist mit einer Beeinflussung der Elektrode zu rechnen.

Die Voruntersuchungen bei einer Probenkonzentration von jeweils 100 µM erbrachten aufgrund starker Schwankungen keine klaren Aussagen bezüglich der Hemmwirkung. Die Dosis-Wirkungskurven ließen sich von keiner Probe ermitteln, da die Ergebnisse ebenfalls sehr stark schwankten und teilweise widersprüchlich waren. Außerdem waren die Proben in Methylglycol zu gering löslich, so daß in keinem Fall eine vollständige Atmungshemmung erzielt werden konnte, was für exakte Bestimmungen der IC<sub>50</sub>-Werte erforderlich gewesen wäre. Ein anderes Lösungsmittel konnte aufgrund der Toxizität gegenüber den Keratinozyten nicht verwendet werden. Der Keratinozytenatmungstest lieferte für diese Kosmetikinhaltsstoffe keine auswertbaren Ergebnisse.

#### **4.4.3. Abwasserproben**

Einundzwanzig verschiedene Abwasserproben bzw. unterschiedlich behandelte Abwasserproben wurden untersucht. Es handelte sich dabei um Abwasser aus einer Gerberei, das von einer Arbeitsgruppe der TU Berlin entnommen und untersucht wurde. Auffällig war der strenge Geruch aller Proben.

Die Konzentrationsangaben dieser Proben werden aufgrund fehlender Angaben in Vol % gemacht. Jede Abwasserprobe wurde jeweils bei einer Konzentration von 8 Vol % und 14 Vol % getestet. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Hemmwirkung der Abwasserproben auf die Basalatmung

Abwasserprobe	% der Basalatmung (Probenkonzentration: 8 Vol %)	% der Basalatmung (Probenkonzentration: 14 Vol %)	Hemmwirkung
66.004	81	-	(--)
66.14	33	19	(++)
66.24	71	65	(-)
66.34	63	64	(-)
66.44	81	66	(-)
66.54	79	79	(-)
66.006	85	78	(-)
66.06	81	59	(-)
66.16	93	75	(-)
66.26	94	94	(--)
66.36	75	59	(-)
66.46	67	45	(+)
66.56	94	73	(-)
66.18	96	66	(-)
66.28	89	78	(-)
66.38	68	-	(-)
66.48	50	54	(-)
66.110	92	76	(-)
66.210	79	73	(-)
66.310	74	65	(-)
66.410	71	48	(-)

keine Hemmung (--); geringe Hemmung (-); mittlere Hemmung (+); starke Hemmung (++)

Der überwiegende Teil der Abwasserproben zeigte eine geringe Hemmwirkung auf die Basalatmung, nur zwei Proben wiesen so gut wie keine Atmungshemmung auf. In diesen Fällen war die Aufnahme vollständiger Dosis-Wirkungskurven unnötig. Zwei Abwasserproben (66.14; 66.46) hingegen hemmten die Basalatmung mehr als 50 %.

Die Probe 66.14 (unbehandelte Gerbereiabwasserprobe) weist im Vergleich zu den anderen Abwasserproben eine besonders starke Hemmung auf. Von dieser Probe wurde die Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Sie ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von 2,0 Vol %. Durch Zugabe der Wirkstoffe Oligomycin, CCCP und Antimycin A zeigte sich eine selektive Wirkung des unbehandelten Abwassers auf das Elektronentransfersystem, wohingegen die ATP-Synthese unbeeinflusst bleibt.

#### 4.4.4. Softener und Printpasta

Zwei Proben, die von der Firma ecb ONLINE Analystechnik GmbH zur Verfügung gestellt wurden, beinhalten Zusatzstoffe, die bei der Textilveredlung eingesetzt werden: Softener (O06) und Printpasta (O07).

**Die Herkunft und die chemische Zusammensetzung sind unbekannt. Die Proben wurden zum Teil unverdünnt und mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt eingesetzt. Soweit erkennbar, vermischten sich Meßmedium und die zugesetzten dickflüssigen Proben gut.**

Die Proben O06 und O07 hemmten sowohl die Basalatmung als auch die CCCP-entkoppelte Atmung. Bei der Wirkung auf die CCCP-entkoppelte Atmung konnte jedoch aufgrund der starken Streuung der Meßpunkte kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Selbst nach mehrmaliger Wiederholung ließen sich keine verbesserten Werte erzielen.

Tabelle 23: IC<sub>50</sub>-Werte der Basalatmung von Probe O06 und O07

Probe	IC <sub>50</sub> -Wert (Basalatmung)
O06 (Softener)	0,08 Vol%
O07 (Printpasta)	0,1 Vol%

#### 4.4.5. Buch-Extrakt

Das Kinderbuch „Wörterbuch für Grundschul Kinder“ mit einem orangefarbenem Plastikumschlag sollte im Keratinozytenatmungstest geprüft werden. Ein Querschnitt des Buches, das heißt sowohl Umschlag als auch Seiten mit Druck und Bildern, wurde für die Extraktion nach DIN 54020 verwendet.

Die maximale Konzentration, die bei der Messung eingesetzt werden konnte, betrug 16700 ppm. Die Basalatmung wurde dabei um höchstens 15% gehemmt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Inhaltsstoffe des Buches, die sich bei der Extraktion

gelöst haben, in diesen Konzentrationen keine schädigenden Auswirkungen auf die Atmung der Zellen haben. Man kann den IC<sub>50</sub>-Wert der Basalatmung auf ungefähr 37000 ± 50000 ppm abschätzen. Da man jedoch aus meßtechnischen Gründen in diesem Konzentrationsbereich nicht messen kann, ist keine genaue Aussage möglich.

Empfindlicher gegenüber der Basalatmung ist die entkopplerstimulierte Atmung. Hier wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 6500 ± 3900 ppm ermittelt. Weil relativ wenig Meßpunkte vorliegen, scheint die Standardabweichung auch sehr groß. Trotzdem können die Inhaltsstoffe dieses Buches als nicht hemmend im Keratinozytenatmungstest eingestuft werden.

#### 4.5. Vergleich mit anderen Biotests

##### 4.5.1. Textilextrakte

Um genauere Aussagen treffen zu können wurden verschiedene Textilextrakte parallel zum Keratinozytenatmungstest auch im Leuchtbakterien- und Daphnientest untersucht.

Tabelle 24: IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werte einiger Textilproben im Keratinozytenatmungs-, Leuchtbakterien- und Daphnientest

Probe	IC <sub>50</sub> -Wert des Keratinozytenatmungstests (Basalatmung)	EC <sub>50</sub> -Wert des Leuchtbakterientests	EC <sub>20</sub> -Wert des Daphnientests
S38	44 ppm	11700	2200
S39	< 1700 ppm	55000	16700
S40	7200 ppm	>50000	8300
11s	80000 ppm	31200	12500
12s	22000 ppm	10000	16700
Jurichem rot	8500 ppm	>50000	-
Jurichem mittelblau	14000 ppm	>50000	16700
Kittel neg.	7500 ppm	10500	25000
Kittel pos.	9000 ppm	16200	16700

(\*) Beim Daphnientest bezieht sich der EC<sub>20</sub>-Wert auf die Konzentration, bei der nach Testablauf von 24 h 20% der Daphnien schwimmunfähig sind.

Die Leuchtbakterien- und Daphnientests wurden am LFU Schönwalde von Frau Dr. Knöpke durchgeführt

#### 4.5.2. Biphenyl-2-ol

Auch in anderen Biotestverfahren läßt sich die schädigende Wirkung von Biphenyl-2-ol nachweisen. In der Tabelle 24 sind IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werte von Biphenyl-2-ol der verschiedenen Biotests aufgelistet.

Tabelle 25: IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Werte von Biphenyl-2-ol in verschiedenen Biotests

<b>IC<sub>50</sub>-Wert des Keratinocytenatmungstests (Basalatmung)</b>	<b>EC<sub>50</sub>-Wert des Leuchtbakterientests</b>	<b>EC<sub>20</sub>-Wert des Daphnientests</b>
154 µM	18 µM	16 µM

<sup>(\*)</sup> Beim Daphnientest bezieht sich der EC<sub>20</sub>-Wert auf die Konzentration, bei der nach Testablauf von 24 h 20% der Daphnien schwimmunfähig sind. Die Leuchtbakterien- und Daphnientests wurden am LFU Schönwalde von Frau Dr. Knöpke durchgeführt