

DIN EN 15845

ICS 07.100.30; 67.250

**Papier und Pappe –
Bestimmung der Zytotoxizität von wässrigen Extrakten;
Deutsche Fassung EN 15845:2010**

Paper and board –
Determination of the cytotoxicity of aqueous extracts;
German version EN 15845:2010

Papier et carton –
Détermination de la cytotoxicité des extraits aqueux;
Version allemande EN 15845:2010

Gesamtumfang 21 Seiten

Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15845:2010) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 172 „Faserstoff, Papier und Pappe“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird. Entscheidendes Gremium innerhalb des CEN/TC 172 ist die WG 12 „Messung der Zytotoxizität“, die unter dem Vorsitz Finnlands steht.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 074-02-01 AA „Chemisch-technologische Prüfverfahren für Papier, Pappe, Faserstoff und Chemiezellstoff“ im Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa).

Deutsche Fassung

Papier und Pappe — Bestimmung der Zytotoxizität von wässrigen Extrakten

Paper and board — Determination of the cytotoxicity of aqueous extracts

Papier et carton — Détermination de la cytotoxicité des extraits aqueux

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 11. Dezember 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
6 Zelllinie	7
6.1 Generieren des Zellstamms	7
6.2 Zellstamm erhalten	7
6.3 Zellstamm lagern	7
7 Lebensmittelsimulantien für die Prüfung	8
8 Labor-Glasgeräte reinigen	8
8.1 Reinigungs-Flüssigkeiten für Labor-Glasgeräte	8
8.2 Reinigungsverfahren für Labor-Glasgeräte	8
8.3 Alternatives Reinigungsverfahren	9
9 Ausrüstung	9
9.1 Ausrüstung für den Migrationstest	9
9.2 Zellkulturausrüstung	9
9.3 Ausrüstung für die Zytotoxizitätsprüfung	10
10 Probenvorbereitung	10
10.1 Allgemeines	10
10.2 Papier und Karton, vorgesehen für den Feuchtkontakt	11
11 Zytotoxizitäts-Prüfung	11
11.1 Kurzbeschreibung	11
11.2 Allgemeines	11
11.3 Probenvorbereitung	11
11.4 Vorbereitung der Vergleichsprobe, Kontrollprobe und Positivkontrollprobe	12
11.5 Inkubation der Zellen aus der Monoschicht-Kultur	12
11.6 Vorbereitung der Chromatographiefolie	13
11.7 Kinetik der Uridin-Aufnahme in die Zell-RNS	13
12 Angabe der Ergebnisse	14
12.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse (für jedes Röhrchen zu erstellen)	14
12.2 Berechnung der prozentualen RNS-Synthese und der Gültigkeit des Versuchs	14
13 Interpretation der Ergebnisse	16
13.1 Ergebnisse der Referenzprobe	16
13.2 Ergebnisse der Positivkontrollprobe	16
13.3 Ergebnisse der Versuchsprobe	17
14 Präzision	17
15 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Pyrodestilliertes Wasser	18
Literaturhinweise	19

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15845:2010) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 172 „Faserstoff, Papier und Pappe“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juli 2010, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2010 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für die Laboruntersuchung des potentiellen zytotoxischen Effekts von Papier- oder Pappematerialien fest. Dieses Verfahren dient dazu, den Feuchtkontakt mit Lebensmittelsimulantien zu beurteilen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 645, *Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln — Herstellung eines Kaltwasserextraktes*

EN 647, *Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln — Herstellung eines Heißwasserextraktes*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Referenzwasser

gereinigtes Wasser oder pyrodestilliertes Wasser, welches als Referenz bei zytotoxischen Untersuchungen verwendet wird

3.2

gereinigtes Wasser

Leitungswasser, das folgenden Bearbeitungsschritten unterzogen werden sollte: Vorfiltrierung, Umkehr-Osmose, Filterung durch Aktivkohlepulver (Adsorption) und Mischbett-Ionenaustauscherharzen (Demineralisierung), Ultrafiltration (Molekulargewichts-Trenngrenze bei 10 kDa) und UV-Photooxidation

ANMERKUNG Alternativ kann auch jede andere Reinigungs-Prozedur verwendet werden, die Wasser von HPLC-Qualität hervorbringt (Widerstand > 18,0 MΩ/cm, gesamt organisch gebundener Kohlenstoff < 3 ppb, keine Mikroorganismen) oder Wasser der Qualität 1 oder 2 nach EN ISO 3696.

3.3

pyrodestilliertes Wasser

Wasser, wie in Anhang A beschrieben, welches zur Aufrechterhaltung der Zelllinie sowie zur Reinigung der Labor-Glasgeräte verwendet wird

3.4

Wasserextrakt

Referenzwasser, welches in Kontakt mit Papier oder Pappe gebracht wurde.

ANMERKUNG Siehe EN 645 oder EN 647 mit äquivalenten Modifizierungen

3.5

Kontrollwasser

Referenzwasser, welches unter den gleichen Bedingungen wie der Wasserextrakt behandelt wurde, jedoch ohne dem Kontakt mit Papier oder Pappe ausgesetzt gewesen zu sein

3.6

Positivkontrolle

Kaliumdichromat-Lösung (CAS 7778-50-9), 5 mm Lösung, frisch herstellt aus Referenzwasser

3.7

Durchschnittsprobe

Nährmedium präpariert mit Wasserextrakt, festgelegt in 3.4

3.8

Prüfmaterial

eine oder mehrere Komponenten, oder eine spezifizierte Menge Papier oder Pappe, welche zufällig aus einer Charge als Probenmaterial ausgewählt wurde

4 Kurzbeschreibung

Das in diesem Dokument beschriebene Prüfprotokoll ist dazu vorgesehen, den zytotoxischen Effekt von Substanzen zu bewerten, die aus Lebensmittelkontaktpapieren und -pappen in wässrige Lebensmittel für die menschliche Ernährung migrieren. Das benutzte Lebensmittelsimulanz ist Wasser, wie in den Abschnitten 7 und 10 beschrieben. Durch die Untersuchung wird der Einfluss des Wasserextrakts auf die RNS (Ribonukleinsäure)-Syntheserate bewertet, indem die Aufnahme eines radioaktiven Tracers (tritiertes Uridin) in menschliche Zellen (HeLA S3) gemessen wird.

Die zu testenden Lebensmittelkontaktpapier- oder -pappemuster werden wie in Abschnitt 10 beschrieben dem Extraktionswasser ausgesetzt.

Die Extrakte werden anschließend einer zytotoxischen Bewertung unterzogen und die erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen einer nicht-zytotoxischen Kontrollprobe verglichen (gereinigtes Wasser, bei dem die RNS-Syntheserate als optimal angesehen wird und daher willkürlich auf 100 % festgesetzt wird). Kaliumdichromat, wie in 11.4.3 beschrieben, wird als Positivkontrolle eingesetzt.

5 Reagenzien

5.1 Flüssiger Szintillant für die Bestimmung der Tritium-Anzahl auf trockenen Filtern

5.2 Nährmedien

Der pH-Wert aller zu verwendenden Nährmedien muss $7,2 \pm 0,1$ betragen. Der pH-Wert kann mittels steriler NaOH (oder HCl)-Lösung eingestellt werden.

5.2.1 Nährmedium — Qualität und Lagerung

Alle Nährmedien, Fötusseren und Lösungen, die für Zellkulturen benutzt werden, müssen steril und von ausreichend hoher Qualität sein, um optimales Zellwachstum sicherzustellen (siehe 12.2).

Sie müssen nach den Herstellerangaben, soweit vorhanden, gelagert werden.