

DIN EN 16418

ICS 85.060

**Papier und Pappe –
Bestimmung der Zytotoxizität von wässrigen Extrakten unter
Verwendung einer metabolisch kompetenten Hepatom-Zelllinie (HepG2);
Deutsche Fassung EN 16418:2014**

Paper and board –

Determination of the cytotoxicity of aqueous extracts using a metabolically competent hepatoma cell line (HepG2);

German version EN 16418:2014

Papier et carton –

Détermination de l'effet cytotoxique d'extraits aqueux en utilisant une lignée cellulaire d'hépatome possédant des enzymes du métabolisme (cellules HepG2);

Version allemande EN 16418:2014

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16418:2014) 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“, dessen Sekretariat vom SFS (Finnland) gehalten wird.

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) im DIN.

Für die in Abschnitt 2 zitierten Europäischen Normen wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zweck-Anforderungen und Prüfungen*

Deutsche Fassung

Papier und Pappe —
Bestimmung der Zytotoxizität von wässrigen Extrakten unter
Verwendung einer metabolisch kompetenten Hepatom-Zelllinie
(HepG2)

Paper and board —
Determination of the cytotoxicity of aqueous extracts using
a metabolically competent hepatoma cell line (HepG2)

Papier et carton —
Détermination de l'effet cytotoxique d'extraits aqueux en
utilisant une lignée cellulaire d'hépatome possédant des
enzymes du métabolisme (cellules HepG2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 8. Februar 2014 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-CENELEC 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, 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, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Zelllinie	8
6.1 Generieren des Zellstamms	8
6.2 Erhaltung des Zellstamms	8
6.3 Lagerung des Zellstamms	9
7 Lebensmittelsimulantien für die Prüfung	9
8 Reinigung der Labor-Glasgeräte	9
8.1 Reinigungs-Flüssigkeiten für Labor-Glasgeräte	9
8.2 Reinigungsverfahren für Labor-Glasgeräte	9
9 Ausrüstung	10
9.1 Ausrüstung für den Migrationstest	10
9.2 Zellkulturausrüstung	10
9.3 Ausrüstung für die Zytotoxizitätsprüfung	10
10 Probenvorbereitung	11
10.1 Allgemeines	11
10.2 Papier und Pappe, vorgesehen für den Feuchtekontakt	11
11 Zytotoxizitäts-Prüfung	11
11.1 Kurzbeschreibung	11
11.2 Allgemeines	11
11.3 Zell-Beimpfung	12
11.4 Probenvorbereitung	12
11.5 Behandlung der Zellkultur	12
11.6 Vorbereitung der Chromatographiefolie	13
11.7 Kinetik der Uridin-Aufnahme in die Zell-RNS	13
11.8 Messung der RNS-Synthese	14
12 Angabe der Ergebnisse	15
12.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse	15
12.2 Berechnung der prozentualen RNS-Synthese und der Gültigkeit des Versuchs	15
12.2.1 Allgemeines	15
12.2.2 Referenzprobe	15
12.2.3 Negativkontrollprobe	16
12.2.4 Positivkontrollprobe	16
12.2.5 Prüfprobe	16
13 Interpretation der Ergebnisse	16
13.1 Ergebnisse der Referenzprobe	16
13.2 Ergebnisse der Positivkontrollprobe	16
13.3 Ergebnisse der Prüfprobe	17
14 Präzision	17
15 Prüfbericht	17

Anhang A (informativ) 96-Well-Plattenkonfiguration.....	18
Anhang B (informativ) Arbeitsablauf des Zytotoxizitätstests zur RNS-Syntheseratehemmung	19
Anhang C (informativ) Validierung der beiden Verfahren (Option A und B).....	21
Literaturhinweise	22

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16418:2014) 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 Oktober 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2014 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist 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, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für die Laboruntersuchung des potentiellen zytotoxischen Effekts von Lebensmittelkontaktmaterialien aus Papier oder Pappe, spezifisch unter Verwendung der HepG2-Zelllinie, fest.

Im Vergleich zur EN 15845 [1] repräsentieren HepG2-Zellen besser den oralen Kontakt des Menschen mit Xenobiotika aufgrund des Vorhandenseins von Phase I, II und III –Stoffwechselenzymen in den Zellen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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

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 1 zum Begriff: 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.

3.2

Wasserextrakt

Referenzwasser, welches in Kontakt mit Papier oder Pappe gebracht wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe EN 645 oder EN 647.

3.3

Negativkontrollwasser

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

3.4

Positivkontrollwasser

1) Kaliumdichromat-Lösung (CAS 7778-50-9), 2,5 mg/l Lösung wird mit Referenzwasser frisch hergestellt und anschließend durch Filtration durch einen 0,22 µm Filter sterilisiert. Lösung wird bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt

sowie

2) eine Stammlösung aus 2 mg/ml Benzo[a]pyren-Lösung (CAS 50-32-8), welche in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert wird, welche vor Verwendung 1 000-fach in Referenzwasser zu verdünnen ist.

3.5

Referenzprobe

Kulturmedium, hergestellt mit Referenzwasser aus 3.1

3.6

Prüfprobe

Kulturmedium, hergestellt mit Referenzwasser aus 3.2

3.7

Negativkontrollprobe

Kulturmedium, entweder hergestellt mit Negativkontrollwasser (3.3) allein, oder mit 0,1 % DMSO (falls Benzo[a]pyren als Positivkontrolle verwendet wird)

3.8

Positivkontrollprobe

Kulturmedium, hergestellt aus Positivkontrollwasser aus 3.4

3.9

Prüfmaterial

eine festgelegte Menge Papier oder Pappe, welche zufällig aus einer Charge als Probematerial ausgewählt wurde

4 Kurzbeschreibung

Das in diesem Dokument beschriebene Prüfverfahren ist dazu vorgesehen, den zytotoxischen Effekt von Wasserextrakten, welcher aus Lebensmittelkontaktmaterialien für wässrige Lebensmittel, die für die menschliche Ernährung vorgesehen sind, hergestellt wurden, zu bewerten. Durch die Untersuchung wird der Einfluss des Wasserextrakts auf die RNS (Ribonukleinsäure)-Syntheserate bewertet, indem die Aufnahme eines radioaktiven Tracers (tritiertes Uridin) in menschlichen Zellen (HepG2) gemessen wird.

Die zu prüfenden Lebensmittelkontaktpapier- oder pappemuster werden, wie in Abschnitt 10 beschrieben, in Wasser extrahiert.

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 und/oder Benzo[a]pyren, hergestellt aus der Stammlösung nach 3.4 und wie in 11.4.4 beschrieben, werden 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 $7,4 \pm 0,1$ betragen. Der pH-Wert ist mittels steriler NaOH (oder HCl)-Lösung einzustellen.

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. Fertige Medien mit Additiven und Seren sollten bei 4 °C nicht länger als zwei Wochen gelagert werden.