

	DIN EN ISO 19337	
ICS 07.120	Einsprüche bis 2024-07-17	
Entwurf		
Nanotechnologien – Eigenschaften von Arbeitssuspensionen von Nanoobjekten für In-vitro-Assays zur Bewertung der inhärenten Nanoobjekt-Toxizität (ISO 19337:2023); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 19337:2024 Nanotechnologies – Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity (ISO 19337:2023); German and English version prEN ISO 19337:2024 Nanotechnologies – Caractéristiques des suspensions de nano-objets utilisées pour les tests in vitro évaluant la toxicité inhérente aux nano-objets (ISO 19337:2023); Version allemande et anglaise prEN ISO 19337:2024 Anwendungswarnvermerk Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-05-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt. Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren. Stellungnahmen werden erbeten – vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm- Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben; – oder als Datei per E-Mail an nmp@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm- Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden; – oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin. Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen. Gesamtumfang 45 Seiten DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)		

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 19337:2023 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229 „Nanotechnologies“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 19337:2024 durch das Technische Komitee CEN/TC 352 „Nanotechnologies“ übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 062-08-17-03 UA „Gesundheits- und Umweltaspekte“ im DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 11885:2007	siehe	DIN EN ISO 11885:2009-09
ISO 13320:2020	siehe	DIN ISO 13320:2022-12
ISO 17294-1:2004*	siehe	DIN EN ISO 17294-1:2007-02*
ISO 17294-2:2016*	siehe	DIN EN ISO 17294-2:2017-01*
ISO 29701	siehe	DIN EN ISO 29701
ISO/TS 21362:2018	siehe	DIN CEN ISO/TS 21362:2021-07
ISO/TS 80004-2	siehe	DIN CEN ISO/TS 80004-2

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

* Zurückgezogen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 21362:2021-07, *Nanotechnologien — Analyse von Nanoobjekten mit Hilfe von Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung und zentrifugaler Feldflussfraktionierung (ISO/TS 21362:2018); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 21362:2021*

DIN CEN ISO/TS 80004-2, *Nanotechnologien — Fachwörterverzeichnis — Teil 2: Nanoobjekte: Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen*

DIN EN ISO 11885:2009-09, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von ausgewählten Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES) (ISO 11885:2007); Deutsche Fassung EN ISO 11885:2009*

DIN EN ISO 17294-1:2007-02, *Wasserbeschaffenheit — Anwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) — Teil 1: Allgemeine Anleitung (ISO 17294-1:2004); Deutsche Fassung EN ISO 17294-1:2006*

DIN EN ISO 17294-2:2017-01, *Wasserbeschaffenheit — Anwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) — Teil 2: Bestimmung von ausgewählten Elementen einschließlich Uran-Isotope (ISO 17294-2:2016); Deutsche Fassung EN ISO 17294-2:2016*

DIN EN ISO 29701, *Nanotechnologien — Endotoxinprüfung an Proben aus Nanomaterial für In-vitro-Systeme — Limulus-Amoebocyten-Lysat-Prüfung (LAL-Prüfung)*

DIN ISO 13320:2022-12, *Partikelgrößenanalyse — Laserbeugungsverfahren (ISO 13320:2020)*

– Leerseite –

**Nanotechnologien – Eigenschaften von Arbeitssuspensionen von Nanoobjekten für
In-vitro-Assays zur Bewertung der inhärenten Nanoobjekt-Toxizität
(ISO 19337:2023)**

Nanotechnologies – Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity (ISO 19337:2023)

Nanotechnologies – Caractéristiques des suspensions de nano-objets utilisées pour les tests in vitro évaluant la toxicité inhérente aux nano-objets (ISO 19337:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Abkürzungen	8
5 Eigenschaften und Messverfahren	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Stabilität der Arbeitssuspensionen	9
5.2.1 Allgemeines	9
5.2.2 Repräsentative Größenänderung von Sekundärpartikeln von Nanoobjekten	9
5.2.3 Konzentrationsänderung von Nanoobjekten	9
5.3 Konzentration von Metallionen	9
5.4 Konzentration der Bestandteile des Kulturmediums	10
5.4.1 Allgemeines	10
5.4.2 Proteine	10
5.4.3 Calcium	10
5.5 Kontamination	10
6 Prüfbericht	11
6.1 Allgemeines	11
6.2 Bezeichnung der Nanoobjekte und Angaben zur Herstellung	11
6.3 Zusammensetzung und metallische Elemente, die in der Nanoobjekt-Probe enthalten sind	11
6.4 Kulturmedium und Serum	11
6.5 Messergebnisse	11
6.6 Optionale Verfahren	12
Anhang A (normativ) Ablauf der Messungen	13
Anhang B (informativ) Messung und Bewertung der Stabilität	14
B.1 Allgemeines	14
B.2 Repräsentative Größenänderung von Sekundärpartikeln von Nanoobjekten	14
B.3 Konzentrationsänderung von Nanoobjekten	14
Anhang C (informativ) Messung von Metall-Ionen	15
C.1 Trennung von Ionen aus Partikeln	15
C.2 Messungen	15
C.2.1 Kriterien für die Auswahl des Verfahrens	15
C.2.2 Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	15
C.2.3 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	15
C.2.4 Atomabsorptions-Spektrometrie	15
C.2.5 Kolorimetrisches Verfahren	16
C.2.6 Ionenselektive Elektrode	16
Anhang D (informativ) Messung der Bestandteile des Kulturmediums	17
D.1 Proteine	17
D.2 Calcium	17
D.3 Andere Bestandteile	17
Anhang E (informativ) Kontamination	18
E.1 Allgemeines	18
E.2 Endotoxin	18
E.3 Mykoplasmen	18
Literaturhinweise	19

Bilder

Bild A.1 — Ablauf der Messungen	13
---	----

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 19337:2023 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229 „Nanotechnologies“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 352 „Nanotechnologien“ als prEN ISO 19337:2024 übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 19337:2023 wurde von CEN als prEN ISO 19337:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO keine Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229, *Nanotechnologies*, erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO/TS 19337:2016), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

- der „Messablauf“ wurde verbessert, wie in Bild A.1 dargestellt;
- der Status von Anhang A wurde von informativ zu normativ geändert;
- „5.2 Endotoxin“ wurde durch „5.5 Kontamination“ ersetzt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Bevor Nanoobjekte in den Markt eingeführt werden, sollten ihre möglichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sorgfältig bewertet werden.

In-vitro-Toxizitäts-Assays mit kultivierten Zellen werden häufig als Instrument für das Screening von Materialien auf mögliche gefährdende Eigenschaften verwendet. Die Prüfungen stellen wichtige Informationen für das Verständnis der Mechanismen biologischer Wirkungen bereit, die von den Materialien hervorgerufen werden. Allerdings erfordern Nanoobjekte im Hinblick auf die In-vitro-Toxizitäts-Assays besondere Überlegungen, da sie sich im Zellkulturmedium einzigartig verhalten. Beispielsweise können unmittelbar nach dem Einbringen von Nanoobjekt-Proben in das Kulturmedium die Nanoobjekte Veränderungen unterliegen in

- a) der ionischen Auflösung,
- b) der Coronabildung, oder
- c) der Aggregation/Agglomeration,

was zu einer Veränderung der Partikelgröße und Sedimentation führt. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, die oben genannten Phänomene bei der Klärung der Frage zu berücksichtigen, ob die beobachteten Effekte mit dem geprüften Nanoobjekt selbst oder mit unkontrollierten Quellen in Verbindung stehen, und um eine falsche Interpretation der Assay-Ergebnisse zu vermeiden. Beispielsweise können die Coronabildung, die Freisetzung von Metallionen aus den Nanoobjekten und Verunreinigungen (Rückstände aus dem Nanoobjekt-Syntheseprozess) einige In-vitro-Assays [1] beeinträchtigen und zu ungenauen Ergebnissen führen. Außerdem kann die Bildung von Agglomeraten und Aggregaten die Toxizität einer Suspension verändern. Es ist wichtig, die Eigenschaften der Suspension der zu prüfenden Nanoobjekte sorgfältig zu bewerten und zu beschreiben.

Daher ist die gründliche Charakterisierung der Arbeitssuspension vor und während der In-vitro-Toxizitäts-Assays hinsichtlich dieser Eigenschaften von entscheidender Bedeutung, um experimentelle In-vitro-Artefakte auszuschließen. In diesem Dokument wurden die wesentlichen Eigenschaften in Bezug auf diese drei Phänomene und die anwendbaren Messverfahren zusammengefasst. Auf der anderen Seite enthält dieses Dokument keine Strategie zur Auswahl der geeigneten Techniken aus den anwendbaren Messverfahren, da die Arbeitssuspensionen, die Nanoobjektproben für In-vitro-Toxizitäts-Assays enthalten, unterschiedliche Materialkomponenten, Konzentrationen und Größen aufweisen; daher hängt die geeignete Auswahl von den Prüfern ab. Die entsprechenden informativen Anhänge und die Liste der Verweisungen in den Literaturhinweisen sind in diesem Dokument enthalten, um die Prüfer bei der Auswahl geeigneter Verfahren zu unterstützen und die Auswahl der Charakterisierungsverfahren zu berücksichtigen, aber es werden auch optionale Verfahren in diesem Dokument angegeben. In Abschnitt 6 werden die Einzelheiten der Charakterisierungsverfahren beschrieben; so kann die Angemessenheit der Charakterisierung beurteilt werden.

Ziel dieses Dokuments ist es, dass zuverlässige Prüfergebnisse über die Toxizität von Nanoobjekten unter den interessierten Parteien wie Regulierungsbehörden, der allgemeinen Öffentlichkeit, Herstellern und Endanwendern ausgetauscht und kommuniziert werden können.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt die Eigenschaften von Arbeitssuspensionen von Nanoobjekten, die bei der Durchführung von In-vitro-Assays zur Bewertung der inhärenten Nanoobjekt-Toxizität zu berücksichtigen sind. Darüber hinaus werden in diesem Dokument anwendbare Messverfahren für diese Eigenschaften beschrieben.

Dieses Dokument gilt für Nanoobjekte und ihre Aggregate und Agglomerate mit einer Größe von mehr als 100 nm.

Das Dokument ist dafür vorgesehen, zu klären, ob beobachtete toxische Wirkungen von den geprüften Nanoobjekten selbst oder von unkontrollierten Quellen stammen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

ISO/TS 80004-2, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO/TS 80004-2 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Kulturmedium

wässrige Lösung der für das Zellwachstum erforderlichen Nährstoffe

3.2

Sekundärpartikel

Agglomerat/Aggregat aus Primärpartikel(n), Proteinen und anderen Komponenten des Mediums

3.3

Stabilität

Eigenschaften, die über einen bestimmten Zeitraum unter angegebenen oder vernünftigerweise zu erwartenden Lagerungs- und Verwendungsbedingungen für einen In-vitro-Toxizitäts-Assay unverändert bleiben

3.4

Arbeitssuspension

für einen In-vitro-Assay hergestellte Suspension, die ein *Kulturmedium* (3.1) und eine Nanoobjekt-Probe enthält

3.5

Kontamination

Spuren von extrinsischen Substanzen, die in den Nanoobjekt-Proben vorhanden sind und das Zellwachstum beeinflussen

4 Abkürzungen

AAS	Atomabsorptions-Spektrometrie (en: atomic absorption spectrometry)
BCA	Bicinchoninat-Säure (en: bicinchoninate acid)
BSA	Rinderserumalbumin (en: bovine serum albumin)
C-U/F	Ultrafiltration mit Unterstützung durch Zentrifugation (en: ultrafiltration assisted by centrifugation)
DLS	dynamische Lichtstreuung (en: dynamic light scattering)
AF4	asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (en: asymmetrical-flow field-flow fractionation)
ICP-AES	Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (en: inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (en: inductively coupled plasma mass spectrometry)
LAL	Limulus-Amoebocyten-Lysat (en: limulus amoebocyte lysate)
LD	Laserbeugung (en: laser diffraction)
LPS	Liposaccharide (en: liposaccharides)
MAT	Monozyten-Aktivierungstest (en: monocyte activation test)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction)
ppt	Teile je Billion (en: parts per trillion)
SLS	statische Lichtstreuung (en: static light scattering)
TFF	Tangentialflussfiltration (en: tangential flow filtration)
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff (en: total organic carbon)
U/F	Ultrafiltration (en: ultrafiltration)
UV-Vis	ultraviolett und sichtbar (en: ultraviolet-visible)

5 Eigenschaften und Messverfahren

5.1 Allgemeines

Um die Arbeitssuspension für In-vitro-Toxizitäts-Assays zu charakterisieren, müssen bestimmte Eigenschaften ermittelt werden, die Auswirkungen auf das geprüfte biologische System haben können. Arbeitssuspensionen für Einzeldosen müssen in zwei Proben aufgeteilt werden, eine für den Toxizitäts-Assay und eine weitere für Messungen der Eigenschaften. In Abschnitt 5 werden die nachstehend aufgelisteten wesentlichen Eigenschaften der Arbeitssuspensionen und die entsprechenden Messverfahren festgelegt:

- Stabilität der Arbeitssuspensionen;
- Konzentration der Metallionen;
- Konzentration der Bestandteile des Kulturmediums;
- Kontamination.

Die Messungen dieser Eigenschaften müssen für jede Dosis der Arbeitssuspensionen durchgeführt werden. Der Ablauf der Messungen muss dem Anhang A und Bild A.1 entsprechen.

5.2 Stabilität der Arbeitssuspensionen

5.2.1 Allgemeines

Die Stabilität der Arbeitssuspension ist eine wesentliche Eigenschaft, da sie sich direkt auf die Bedingungen des In-vitro-Assays in Bezug auf die Dosis der Nanoobjekte für die Zellen auswirkt [2],[3],[4]. Die Aggregation/Agglomeration und das schwerkraftbedingte Absetzen der Nanoobjekte sind wichtige Faktoren, die die Stabilität der suspendierten Nanoobjekte beeinflussen können. Die Stabilität der Suspension muss für zwei Eigenschaften bewertet werden, d. h. die relative Änderung der repräsentativen Größe der Sekundärteilchen der Nanoobjekte und die relative Konzentrationsänderung der Nanoobjekte in der Arbeitssuspension. Die Änderung der Größe der Sekundärpartikel von Nanoobjekten kann aus der Agglomeration kleinerer Partikel in den Kulturmedien resultieren. Die relative Konzentrationsänderung der Nanoobjekte kann sich aus dem schwerkraftbedingten Absetzen während eines In-vitro-Toxizitäts-Assays ergeben, wenn die für den In-vitro-Toxizitäts-Assay erforderliche Versuchsdauer berücksichtigt wird. Die Ergebnisse der Bewertung der Stabilität müssen in der Einheit Prozent über die Zeitspanne eines In-vitro-Toxizitäts-Assays ausgedrückt werden.

Als umfassende Anleitung für die Stabilität von Arbeitssuspensionen wird ISO/TR 13097 [5] empfohlen.

5.2.2 Repräsentative Größenänderung von Sekundärpartikeln von Nanoobjekten

Für die direkte Messung der repräsentativen Größenänderung von Sekundärpartikeln von Nanoobjekten muss ein geeignetes Verfahren aus DLS [3],[6], LD [7] und SLS [8] ausgewählt werden. Es können auch andere, in diesem Dokument nicht aufgeführte Verfahren verwendet und entsprechend den optionalen Verfahren in 6.6 dokumentiert werden.

Siehe Anhang B für Messungen.

5.2.3 Konzentrationsänderung von Nanoobjekten

Für die Messung der Konzentrationsänderung von Nanoobjekten, die in biologischen Medien suspendiert sind, muss ein geeignetes Verfahren aus der statischen Lichtstreuung [3],[6],[8], ICP-MS [9],[10],[11], UV-Vis-Absorption, Röntgentransmission[12] und der Analyse des gesamten organischen Kohlenstoffs [13] ausgewählt werden. Es können auch andere, in diesem Dokument nicht aufgeführte Verfahren verwendet und entsprechend den optionalen Verfahren in 6.6 dokumentiert werden.

Siehe Anhang B für Messungen.

5.3 Konzentration von Metallionen

Metallionen, die als Ergebnis der Auflösung von Nanoobjekt-Proben entstehen, können zur beobachteten Zelltoxizität beitragen. Die Konzentration von Metallionen in der Arbeitssuspension muss nach Abtrennung von Partikeln gemessen werden. Die Partikel können durch U/F, C-U/F TFF oder Zentrifugieren von der Ionenfraktion getrennt werden. Die Messung muss für alle metallischen Elemente erfolgen, die in der Nanoobjekt-Probe enthalten sind. Für die Messung der Metallionenkonzentrationen muss ein geeignetes Verfahren aus ICP-AES, ICP-MS, AAS und dem kolorimetrischen Verfahren ausgewählt werden. Es muss beachtet werden, dass viele Bestandteile in Kulturmedien wie Na und Cl bei einigen spektrometrischen Verfahren, insbesondere ICP-MS [14] – [16], die Metallanalyse beeinflussen können. Es können auch andere, in diesem Dokument nicht aufgeführte Verfahren verwendet und entsprechend den optionalen Verfahren in 6.6 dokumentiert werden. Die Messergebnisse von Konzentrationen müssen in der Einheit Molarität, Masse/Masse oder Masse/Volumen angegeben werden. Die Messungen können entfallen, wenn keine toxische Wirkung auf die Zellen in den Arbeitssuspensionen beobachtet wird. Siehe Anhang A für ein Beispiel für den Ablauf der Messungen.

Siehe Anhang C für Messungen.

5.4 Konzentration der Bestandteile des Kulturmediums

5.4.1 Allgemeines

Eine Nanoobjekt-Probe, die einem Kulturmedium zugesetzt wird, um eine Arbeitssuspension zu erzeugen, kann Bestandteile des Kulturmediums adsorbieren [1]. Diese Adsorption kann zu einer Stressexposition durch Nährmittelentzug für die Prüfzellen führen. Die Konzentration von Proteinbestandteilen und Calcium als Surrogat für die Nährstoffbestandteile im Lösemittel muss nach einer ausreichenden Zeitspanne nach der Zugabe der Nanoobjekt-Probe zum Nährmedium gemessen werden. Wenn andere Bestandteile des Kulturmediums als Protein und Calcium bekannt sind, die die Stabilität der Arbeitssuspension für In-vitro-Toxizitäts-Assays wesentlich beeinträchtigen können, muss auch die Konzentration dieser Bestandteile gemessen werden. Die Messungen können entfallen, wenn keine toxische Wirkung auf die Zellen in den Arbeitssuspensionen beobachtet wird. Siehe Anhang A für ein Beispiel für den Ablauf der Messungen.

Die Nanoobjekt-Probe im Kulturmedium muss unter den gleichen Bedingungen wie bei der In-vitro-Prüfung inkubiert werden. Nanoobjekte können den pH-Wert, die Osmolalität und andere wesentliche Eigenschaften des Kulturmediums beeinflussen.

5.4.2 Proteine

Für die Messung der Proteinkonzentration muss ein geeignetes Verfahren aus den Verfahren BCA, Bradford, Lowry, Ultraviolett, Brechungsindex und SLS in Verbindung mit dem AF4 [17],[18] ausgewählt werden. Wenn die Verfahren BCA [19], Bradford [20] oder Lowry [21] ausgewählt werden, muss die Proteinkonzentration im Lösemittel nach der Trennung von Partikeln aus der Arbeitssuspension gemessen werden. Die Ergebnisse der Messung der Proteinkonzentration müssen in der Einheit Masse/Volumen angegeben werden.

Siehe Anhang D für Messungen.

5.4.3 Calcium

Für die Messung der Calciumkonzentration muss ein geeignetes Messverfahren aus ICP-AES, ICP-MS, AAS und dem kolorimetrischen Verfahren ausgewählt werden. Die Ergebnisse der Messung der Calciumkonzentration müssen in der Einheit Molarität, Masse/Masse oder Masse/Volumen angegeben werden.

Siehe Anhang D für Messungen.

5.5 Kontamination

Kontamination kann eine Quelle zusätzlicher toxischer Wirkungen sein. Endotoxin und Mykoplasmen müssen mit geeigneten Verfahren bestimmt werden.

Die Messung von Endotoxinen ist mit der LAL-Prüfung (siehe ISO 29701), der chromogenen LAL-Prüfung [22], dem MAT [23], dem rekombinanten Faktor C-Test [24] und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit den Verfahren der Massenspektrometrie [25] möglich.

Die Kontamination mit Mykoplasmen ist eines der größten Probleme bei In-vitro-Assays. Mykoplasmen können durch PCR-basierte Verfahren [26], Kulturverfahren [27] und Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie [28] bestimmt werden.

Die Nanoobjekt-Probe muss aseptisch behandelt werden. Es muss bestätigt werden, dass keine Kontamination in der Vergangenheit vorlag, außer derjenigen, die in diesem Unterabschnitt beschrieben ist.

Siehe Anhang E für Messungen.