

# Vergleich von Zytotoxizitäts- und Leaching-Effekten der epT.I.P.S.<sup>®</sup> BioBased und epT.I.P.S. Standard

JANA SCHMIDT, EPPENDORF SE, HAMBURG; ESTELLE DEBOEVER, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES S.A., NAMUR, BELGIEN  
JEAN-FRANÇOIS HOET, MURIEL ART, EPPENDORF CORE TEST LAB, NAMUR, BELGIEN

## Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die neuen Eppendorf epT.I.P.S. BioBased Pipettenspitzen (aus biobasiertem Rohmaterial) mit den epT.I.P.S. Standard (aus fossilen Rohstoffen) verglichen.

Es zeigten sich für die getesteten Parameter keine Unterschiede zwischen den Pipettenspitzen. Dies indiziert, dass nachhaltigeres, biobasiertes Material aus erneuerbaren Rohstoffen dieselben Eigenschaften besitzt wie jenes aus fossilen Quellen.

## Einleitung

Eine Pipette und eine Pipettenspitze bilden ein System, welches für präzise Ergebnisse jeder Labortätigkeit, die Flüssigkeitstransfers beinhaltet, sorgt. Während die Pipette über Jahre verwendet werden kann, gehört die Plastikspitze zu den Einwegartikeln, welche zum Aufkommen von Laborabfall beitragen und in dem Streben nach mehr Nachhaltigkeit und einem verringerten Einsatz fossiler Rohstoffe zu berücksichtigen sind.

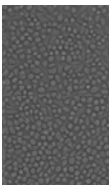
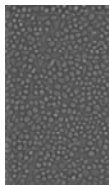
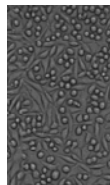
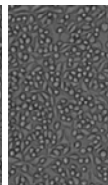
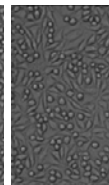
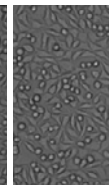
Eppendorf Tubes<sup>®</sup> waren die ersten Laboreinwegartikel aus biobasiertem Material und ein Wegbereiter für weitere nachhaltige Laborutensilien. Ihnen folgen nun die epT.I.P.S. BioBased Pipettenspitzen. Diese sind aus mindestens 90 % erneuerbaren Rohstoffen gefertigt und senken so signifikant den Einsatz an fossilen Rohstoffen, die zur Herstellung der Produkte verwendet werden.

Diese Studie vergleicht epT.I.P.S. BioBased und epT.I.P.S. Standard (jeweils in der Reinheit Biopur<sup>®</sup>) hinsichtlich der Parameter Zytotoxizität und Leaching, um zu prüfen, ob die neue Rohstoffquelle vergleichbare Eigenschaften wie das Standardmaterial zeigt. Bezüglich des Leachings wurden auch Mitbewerberspitzen untersucht.

## Material und Methoden

### Material

- > epT.I.P.S. BioBased Biopur, Reloads, 2–200 µL
- > epT.I.P.S. Standard Biopur, Racks, 2–200 µL
- > Filterlose, vorsterilisierte 200 µL-Spitzen von Mitbewerbern

Extraktionsbedingungen	37 °C 30 min		37 °C 72 h		50 °C 24 h	
	Standard	BioBased	Standard	BioBased	Standard	BioBased
Replikate	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
Morphologie						

**Abb. 1:** Evaluation der Morphologie von L929-Zellen nach Anwachsen in Medium, das gemäß ISO 10993 mit Pipettenspitzen vorinkubiert wurde. Eine Wertung unter 2 steht für nicht-zytotoxisches Material. Sowohl epT.I.P.S. BioBased als auch epT.I.P.S. Standard zeigen keinen zytotoxischen Effekt auf die murinen Fibroblasten

Für eine vollständige Beschreibung der eingesetzten Materialien und Methoden siehe [Application Note 477](#).

## Zytotoxizitäts-Assay

### Vorbereitung des Flüssigextraktes

Die untersuchten Pipettenspitzen wurden zerschnitten und in Extraktionsgefäße in einem 3 cm<sup>2</sup>/mL-Verhältnis mit komplettem Medium (4 mM MEM Glutamin, 100 UI/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 10 % FBS) überschichtet. Gemäß der ISO-Standards 10993-5:2009 und 10993-12 waren die Extraktionsbedingungen 37 °C für 72 h und wurden um Extrakte bei 50 °C für 24 h und 37 °C für 30 min ergänzt. Die Extrakte wurden nach der Inkubation für die Kultur von murinen L929-Fibroblasten eingesetzt (N = 3).

### Zellviabilität – Morphologie

L929-Zellen wurden in komplettem Medium (ATCC<sup>®</sup>, 30-2003) kultiviert (5 % CO<sub>2</sub>) und anschließend mit Hilfe von 25 % Trypsin/EDTA verdaut, um Einzelzell-Suspensionen zu erhalten. Nach der Inaktivierung des Trypsin-EDTA wurden die Zellen gesammelt und in frischem Medium verdünnt, um eine Zelldichte von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/mL zu erzielen. Nach 48 h wurde die Zellmorphologie untersucht, und Parameter wie Ablösung, Zelllyse und Vakuolisierung wurden unter Beachtung der ISO 10993-Standards bewertet.

### Zellviabilität – MTT-Assay

Nach Bewertung der Morphologie wurde das Medium durch 50 µL/Well MTT-Lösung (1 mg/mL) ersetzt. Die Zellen wurden 2 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die Absorption der Kultur bei 570 nm zeigte dann die Viabilität dieser an, da nur intakte, metabolisch aktive Zellen den gelben MTT-Farbstoff in das violette Abbauprodukt umwandeln können. Als Referenz dienten Zellen, die in unbehandeltem Medium angezogen wurden.

## Leaching

In einem Glasröhrchen wurde eine Pipettenspitze mit 8 mL 99,9 % Ethanol p.a. vollständig überschüttet. Es wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und in einem 45°-Winkel in einem Inkubator bei 60 °C unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. 200 µL des Ethanols wurden nach einem definierten Zeitintervall direkt in eine Eppendorf UVette<sup>®</sup> überführt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Als Referenz diente Ethanol p.a., der analog ohne Pipettenspitze inkubiert wurde (N = 3).

## Ergebnisse und Diskussion

### Zytotoxizität

Murine L929-Zellen wurden in Medium angezogen, welches zuvor gemäß des ISO-Standards 10993 mit den untersuchten Pipettenspitzen inkubiert wurde. Die Morphologie der Kulturen wurde qualitativ bewertet (Abb. 1).

## Vergleich von Zytotoxizitäts- und Leaching-Effekten der epT.I.P.S.<sup>®</sup> BioBased und epT.I.P.S. Standard

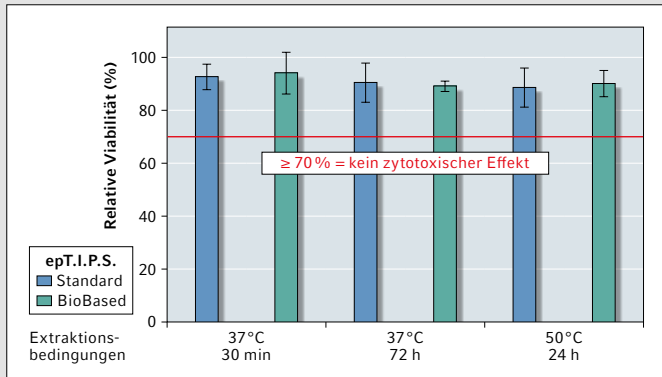


Abb. 2: Relative Viabilität von L929-Zellen im MTT-Assay gemäß ISO 10993. Ein Wert über 70 % zeigt, dass keine Zytotoxizität vom untersuchten Material ausgeht. Sowohl epT.I.P.S. BioBased als auch epT.I.P.S. Standard zeigen keinen zytotoxischen Effekt

Hierbei steht die Bewertung 0 für keine Auffälligkeiten und Werte größer 2 für zytotoxische Effekte. Der MTT-Assay wurde als quantitativer Parameter für die Viabilität der Zellen verwendet (Abb. 2).

Eine relative Viabilität von über 70 % steht für ein nicht-zytotoxisches Material. In beiden Fällen zeigten sich somit keine zytotoxischen Effekte der Pipettenspitzen. Es ließen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Pipettenspitzen-Typen ausmachen.

### Leaching-Effekte

Im Vergleich zu Reaktionsgefäßen sind Pipettenspitzen nur kurz im Kontakt mit der Probe. Trotzdem ist die Sorge bezüglich sich aus dem Plastik lösender Stoffe („Leachables“), gerade bei der Handhabung von organischen Lösungsmitteln, groß. Deshalb wurden die Spitzen, sowie vergleichbare Produkte von Mitbewerbern, in Ethanol inkubiert und photometrisch auf Leachables untersucht. Klassischerweise absorbieren diese unspezifisch im UV-Bereich. Da bei 260 nm und 280 nm auch biochemische Analytik (DNA- bzw. Protein-Quantifizierung) durchgeführt wird, sind diese sog. Leaching-Effekte hier besonders störend.

Bei beiden Varianten der getesteten epT.I.P.S. lösten sich selbst nach 24 h Inkubation nur geringe Mengen an Leachables. Für vergleichbare Pipettenspitzen von Mitbewerbern zeigten sich bereits nach 1 h Inkubation für beide untersuchten Wellenlängen deutlich erhöhte Leachable-Effekte (Abb. 3).

### Fazit

Unter Beachtung der ISO 10993-5:2009 („Prüfungen auf In-Vitro Zytotoxizität“) und der ISO 10993-12 („Probenvorbereitung und Referenzmaterialien“) Standards wurde die Materialzytotoxizität der Eppendorf epT.I.P.S. BioBased im Vergleich zu epT.I.P.S. Standard untersucht. Weder die fossilbasierten noch die biobasierten Materialien induzierten morphologische Veränderungen oder Beeinträchtigungen der Zellviabilität. Auch die Untersuchung von Leaching-Effekten bei Kontakt mit organischem Lösungsmittel zeigte für beide Spitzentypen vergleichbar niedrige Werte, wohingegen Mitbewerberprodukte deutlich höhere Effekte zeigten.

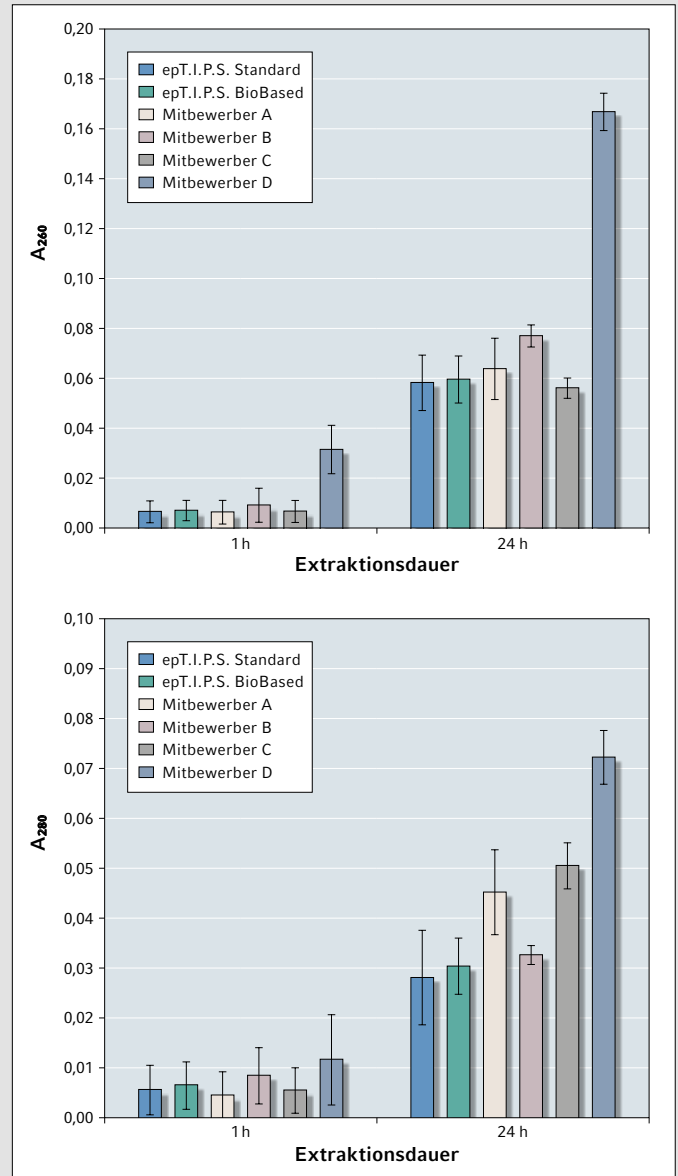


Abb. 3: Absorption von ethanolschen Pipettenspitzen-Extrakten bei 260 nm (oben) und 280 nm (unten) zur unspezifischen Detektion von Leachables. epT.I.P.S. zeigen geringste Absorptionswerte, Mitbewerber A–D deutlich höhere Absorptionswerte

Es konnte bestätigt werden, dass sowohl das Standard- als auch das biobasierte Material von Eppendorf hervorragende Eigenschaften für biochemische Anwendungen liefert und auch im Vergleich zum Wettbewerb hervorsteht.

Download der kompletten [Application Note 477](#)

### Literatur

- [1] [www.iscc-system.org](http://www.iscc-system.org)
- [2] Grzeskowiak *et al.*, [Eppendorf Application Note 470](#)

Die Eppendorf SE behält sich das Recht vor, ihre Produkte und Dienstleistungen jederzeit zu ändern. Diese Application Note kann ohne Vorankündigung geändert werden. Wenngleich größte Sorgfalt darauf verwendet wurde, die Richtigkeit und Vollständigkeit dieser Informationen zu gewährleisten, übernimmt die Eppendorf SE keine Haftung für eventuelle Fehler oder Schäden, die sich aus der Anwendung oder dem Gebrauch dieser Informationen ergeben. Die Heranziehung von Application Notes allein kann das Lesen und Einhalten der jeweils aktuellen Version der Bedienungsanleitung nicht ersetzen.