

Probenvorbereitung mit dem Ultraschallhomogenisator - Einsatz im Analytiklabor nach Vergleich mit herkömmlicher Methode

S. Zellermann

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei
MV, Standort Neubrandenburg

H. Nusche

Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft, Nossen

K.Siebertz

TDCLAB Dr. Siebertz GmbH

Abstract

Die Methode ist für eine große Anzahl von Probenmatrices geeignet, hier wird vom vergleichenden Einsatz in der Probenvorbereitung für die Analytik von Lebensmitteln und Boden berichtet. Die Homogenisierung mit dem Ultraschallhomogenisator SONOPULS® der Firma Bandelin von Käse für die Nitrat- und Kochsalzanalytik sowie Frischkäse zu Analyse von Konservierungsstoffen ergab gute Ergebnisse mit geringerer Standardabweichung bei wesentlich geringerem Aufwand. In der Nitratbestimmung wurde mit der üblichen Verreibemethode verglichen. Der Aufwand der Probenvorbereitung ist insgesamt um einiges geringer, die Gefahr von Verlusten tritt nicht auf. Die Methode wurde validiert und in die Routineanalytik übernommen, nach und nach werden weitere Probenmatrices damit aufbereitet.

Die Extraktion von austauschbarem Magnesium aus Boden in CaCl_2 ist nach 10 s Ultraschallbehandlung vollständig erfolgt. Im sonst üblichen Überkopfschüttler wird dafür eine Stunde extrahiert. Der Ausbau der Versuche mit weiteren Böden und Analyten ist geplant.

1 Einleitung

Die Optimierung der Probenvorbereitung nimmt inzwischen einen äußerst wichtigen Status in Labor und Analytik ein.

Sehr häufig ist für die Vorbereitung der Analytik von Boden, Lebensmitteln, Futtermitteln u.ä. eine Homogenisierung der Matrix in Wasser oder Lösungsmitteln mit ggf. auch einhergehender Extraktion der zu untersuchenden Analyten aus der festen Probe in die Lösung not-

wendig. Auch Desagglomerieren oder Suspendieren können nötige Schritte sein.

Dafür werden verschiedenste Geräte und Methoden verwendet. Beispiele sind die Behandlung im Ultraschallbad sowie mit Rotor-Stator- oder Spalthomogenisatoren. Während bei ersterem der Energieeintrag nicht immer ausreichend ist, ist bei letzteren insbesondere ein sehr hoher Reinigungsaufwand nach jeder einzelnen Probenbehandlung notwendig.

Mittels sogenannter Ultraschallhomogenisatoren kann der Energieeintrag gegenüber dem Ultraschallbad um ein Vielfaches erhöht werden. In einer Lösung können Teilchengrößen nicht nur im μm -, sondern bis hin zum nm-Bereich erreicht werden, was zu höherer Effizienz und zu reproduzierbaren Analysenergebnissen führt. Auch geringste Probenmengen können behandelt werden. Die Reinigung nach der Probenbehandlung ist in Sekunden erledigt.

2 Einsatz eines Ultraschallhomogenisators für die Probenvorbereitung /Homogenisierung von Lebensmitteln

Der Einsatz eines Ultraschallhomogenisators als alternative, zeitsparende und unkompliziertere Methode in der Probenvorbereitung für Lebensmittel erschien vielversprechend. Es sollte somit geprüft werden, inwieweit die Methode wirklich praxistauglich ist. Besonders relevant für die Eignung ist die Prüfung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der anschließenden Analytik.

Folgende Ausstattung des Ultraschallhomogenisators wurde für die Versuche genutzt: Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2200; Hochfrequenzgenerator GM 2200 HF-Generator; Ultraschallwandler UW 2200 mit SH 213 G Boosterhorn; Kegelspitze KE 76; Lärmschutzbox LS 8; Distanzrohr

Anwendung der Ultraschallextraktion in der Nitratanalytik bei Käse

Die Bestimmung erfolgte in der herkömmlichen Methode nach ASU L01.00-36 - Bestimmung des Nitratgehaltes in Käse. Die Aufarbeitung erfolgt bei Anwendung dieser Methode folgendermaßen:

5 g homogenisierte Probe in eine Reibschale einwiegen, mit einigen Milliliter 50°C warmem Wasser zu einer milchigen Flüssigkeit verreiben. Die Flüssigkeit unter mehrmaligem Nachspülen in einem 50 ml-Maßkolben überführen und nach Abkühlen Auffüllen und filtrieren. Ein Aliquot des Filtrats in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben eintrocknen.

Die alternative Aufarbeitung mit dem Ultraschallhomogenisator erfolgt folgendermaßen:

5 g homogenisierte Probe in ein 50 ml Kunststoffzentrifugengefäß einwiegen, mit ca. 15 ml Wasser versetzen und für 2 min bei ca. 35% Leistung mit Ultraschall homogenisieren. Die Flüssigkeit unter mehrmaligem Nachspülen in einen 50 ml-Maßkolben überführen und nach Abkühlen auffüllen und filtrieren. Ein Aliquot des Filtrats in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben eintrocknen.



Abb. 1: Homogenisierung von Käse in Wasser mittels Ultraschallhomogenisator- vor und nach der Behandlung

Tab. 1: Vergleichende Messwerte der Nitratanalytik bei Käse

Aufarbeitung	Konventionell nach o.g. Methode	Mit Ultra- schallhomo- genisator
Anzahl Messwerte	7	10
Mittelwert [mg/kg]	28,73	28,96
Standardabweichung	0,85	0,98
Wiederholbarkeit	2,41	2,77
Erweiterte Messunsicherheit	1,71	1,96

Folgende Schlussfolgerungen können gezogen werden: Die erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar. Insbesondere durch das mehrfache Nachspülen bei der konventionellen Methode können Verluste beim Überführen in den Maßkolben auftreten. Dieser Vorgang erfordert auch viel direkte Handarbeit, die bei der Nutzung des Ultraschall-Homogenisators entfällt.

Probenvorbereitung für die Kochsalzbestimmung in Käse

Herkömmlich erfolgte die Probenvorbereitung für die Kochsalzbestimmung in Käse nach der Methode - Potentiometrische Bestimmung nach L03.00-11, Aufarbeitung nach 8.2.1. Dies bedeutet im Detail:

Ca. 1 g Probenmaterial in ein 100 ml Becherglas einwiegen, ca. 50 ml warmes dest. Wasser zugeben und mit dem Ultra-Turrax ca. 30 sec. mischen, Ultraturrax-Stab innen und außen gründlich mit Wasser nachspülen.

Die Aufarbeitung mit dem Ultraschallhomogenisator wurde folgendermaßen gewählt:

Ca. 1 g Probenmaterial in ein 100 ml Becherglas einwiegen, ca. 50 ml warmes dest. Wasser zugeben und 2 min bei ca. 35% Leistung mit Ultraschall homogenisieren, Sonotrode mit warmem Wasser abspülen

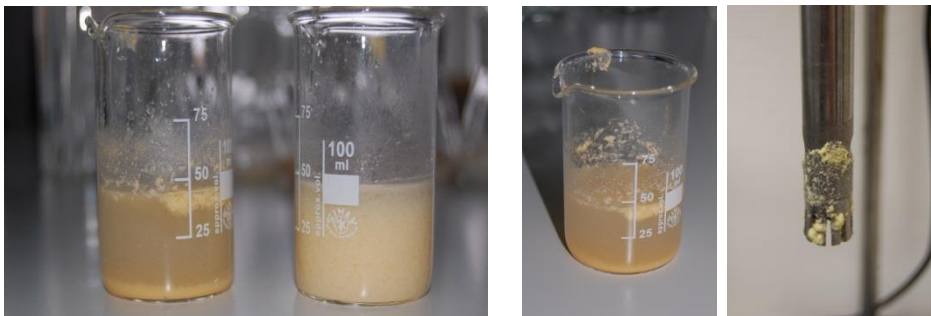


Abb. 2: Vergleichende Methoden der Kochsalzanalytik bei Käse (von links nach rechts a- Lösung nach Ultra-Turrax-Behandlung b- Lösung nach Ultraschallbehandlung c- Haftenbleiben von Probenmaterial im Inneren und Äußeren des Ultra-Turrax

Tab. 2: Vergleichende Messwerte der Kochsalzanalytik bei Käse

Aufarbeitung	Konventionell nach o.g. Methode	Mit Ultra- schallhomo- genisator
Anzahl Messwerte	8	8
Mittelwert [mg/kg]	1,748	1,729
Standardabweichung	0,0135	0,0089
Wiederholbarkeit	0,0382	0,0252
Erweiterte Messunsicherheit	0,0270	0,0178

Folgende Schlussfolgerungen konnten für den Vergleich der Methoden für die Kochsalzbestimmung in Käse gezogen werden:

Auch wenn der Mittelwert bei Anwendung des Ultraschallhomogenisators geringgradig unter dem der konventionellen Methode liegt, führt der Vergleich zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Bei der konventionellen Methode ist die Reinigung des Ultra-Turrax-Stabes durch das notwendige Zerlegen und wieder Zusammenbauen relativ aufwändig. Die Kegelspitze der Sonotrode muss dagegen nur abgespült werden.

Probenvorbereitung für die Analytik von Konservierungsstoffen in Frischkäse

Entsprechend der herkömmlichen Methode -Bestimmung des Sorbinsäuregehaltes in Frischkäse (HPLC-DAD) in Anlehnung an L00.00-09- erfolgte die Aufarbeitung folgendermaßen:

Ca. 1 g Probenmaterial wird direkt in einen 50 ml Maßkolben eingewogen, mit ca. 30 ml Extraktionslösung (Methanol:Wasser 40:60) am Kolbenhals anhaftende Probenreste in den Kolben spülen, anschließend 10 min bei 40°C im Ultraschallbad bei voller Leistung extrahieren, anschließend Kolben auf 20°C temperieren und mit Lösung auffüllen.

Die Aufarbeitung mittels Ultraschallhomogenisator erfolgte folgendermaßen:

Ca. 1 g Probe in ein 50 ml Becherglas (hohe Form) einwiegen mit 20 ml Extraktionslösung (Methanol:Wasser 40:60) versetzen und 2 min

bei ca. 35% Leistung mit dem Ultraschallhomogenisator extrahieren, anschließend Lösung in einen 50 ml Maßkolben überführen und Becherglas mit Extraktionslösung nachspülen, Kolben auf 20°C temperieren und mit Lösung auffüllen.

Tab. 3: Vergleichende Messwerte der Analytik von Konservierungsstoffen in Frischkäse

Aufarbeitung	Konventionell nach o.g. Methode	Mit Ultra- schallhomo- genisator
Anzahl Messwerte	8	8
Mittelwert [mg/kg]	931,3	967,1
Standardabweichung	0,6	0,4
Wiederholbarkeit	1,6	1,2

Bezüglich des Methodenvergleichs ergeben sich folgende Schlussfolgerungen für die Sorbinsäurebestimmung in Frischkäse:

Auch bei diesem Verfahren ist die Aufarbeitung mit dem Ultraschallhomogenisator einfacher. Der erhaltene Mittelwert liegt etwas über dem der konventionellen Methode. Als ursächlich können dabei die verbesserte Extraktionsleistung mit der Sonotrode zu sehen sein, aber auch möglicherweise an der Glaswand im Maßkolben anhaftende Probenreste bei der konventionellen Extraktion.

Weitere Einsatzmöglichkeiten

Erste Versuche wurden zur Extraktion für die Bestimmung von Staphylokokkenenterotoxinen durchgeführt. Dabei ist problematisch, dass eine hohe Einwaage mit relativ wenig Extraktionsmittel homogenisiert werden muss. Erste Ergebnisse zeigen, dass mit dem Ultraschallhomogenisator deutlich gleichmäßigere Extrakte erhalten werden, als wenn herkömmlich Ultraturax bzw. Stomacher genutzt werden.

Fazit

Auf Grund der guten Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse und des vorteilhaften Handlings mit dem Ultraschallhomogenisator wurde

die Methode für die ersten Aufarbeitungen bereits in die Routine übernommen. Folgende Vor- und Nachteile lassen sich zusammenfassen:

Tab. 4: Übersicht über beobachtete Vor- und Nachteile der Ultraschallmethode in der Probenvorbereitung für die Lebensmittelanalytik

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> •Das Handling mit der Sonotrode ist sehr einfach - es ist nur ein Eintauchen der Spitze notwendig. •Auch die Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion sind durch einfaches Abspülen und Abwischen möglich, das Gerät ist schnell wieder einsatzbereit. •Die Extraktion mit der Kegelspitze führt zu vergleichbaren und bei Sorbinsäure sogar zu höheren Ergebnissen. •Insgesamt besteht seitens der Mitarbeiter eine hohe Akzeptanz hinsichtlich der Nutzung dieses Gerätes. 	<ul style="list-style-type: none"> •Trotz Verwendung der Lärmschutzbox ist insbesondere bei Dauerbetrieb eine deutliche Lärmbelastung vorhanden, gegebenenfalls ist die Nutzung von weiterem Gehörschutz nötig. •Ein Verspritzen der Extrakte ist in Abhängigkeit von dem gewählten Extraktionsgefäß und der Energieleistung nicht immer zu vermeiden, es sollte auf möglichst hohe und schmale Gefäße zurückgegriffen werden. •Eine Erwärmung der Extrakte ist nicht in jedem Fall zu vermeiden und kann sich nachteilig auf die Analytik thermolabiler Substanzen auswirken.

Insbesondere bei der Aufarbeitung pastenartiger Lebensmittel wie Kochkäse, Ziehmarginen oder ähnlichen werden weitere Möglichkeiten geprüft.

3 Einsatz eines Ultraschallhomogenisators zur Extraktion von Magnesium in CaCl_2 aus Bodenproben

Ein Versuch sollte die Frage beantworten, ob ein Ultraschallhomogenisator die gleiche Menge eines Analyten in kürzerer Zeit extrahiert als die herkömmliche „Überkopf-Schüttelmethode“.

Bei dem hier beschriebenen Versuch habe ich mich auf den Parameter ‚pflanzenverfügbares Magnesium‘ beschränkt. Nach der Schacht-schabel-Methode wird Magnesium mit Calciumchlorid (CaCl_2) extrahiert.

Zur Verfügung stand der Ultraschallhomogenisator „SONOPLUS HD 2200“ mit der Sonotrode KE 76. Diese Sonotrode realisiert einen sehr hohen Energieeintrag in die Probe.

Es wurden 18 Kunststoffflaschen mit jeweils 10 g luftgetrocknetem, auf ≤ 2 mm gesiebt Boden und 100 ml CaCl_2 vorbereitet. Anschließend behandelten wir immer 3 Flaschen mit der gleichen Methode. Die Methoden untereinander unterschieden sich nur durch die Einwirkzeiten. Somit ergaben sich folgende Varianten:

- über Kopf schütteln - 1 Stunde
- Ultraschall – 10 Sekunden
- Ultraschall – 30 Sekunden
- Ultraschall – 1,5 Minuten
- Ultraschall – 2 Minuten
- Ultraschall – 2,5 Minuten

Nach der Extraktion wurden die Proben mit einem Continuous Flow Analysator (CFA) gemessen. Die ermittelten Messwerte zeigt Tabelle 1

Tab. 5: Messwerte der Bestimmung von pflanzenverfügbarem Magnesium in Boden

Methode/Zeit	1. Wert [mg/100 g]	2. Wert [mg/100 g]	3. Wert [mg/100 g]
über Kopf / 1 h	13,1	13,5	13,8
Ultraschall / 10 s	14,0	13,8	13,9
Ultraschall / 30 s	13,8	13,9	13,6
Ultraschall / 1,5 min	14,1	13,8	14,0
Ultraschall / 2 min	13,9	14,0	13,9
Ultraschall / 2,5 min	14,0	14,1	14,0

Die Messwerte zeigen, dass die Ultraschall-Extraktionsmethode zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Schon nach 10 Sekunden ist das austauschbare Magnesium extrahiert, welches mit der klassischen Überkopf-Schüttelmethode nach einer Stunde in Lösung ging. Ein-

schränkend muss gesagt werden, dass diese Aussage nur für den getesteten Boden gilt (mittlerer Boden, Löss). Bei Sand- oder Tonböden können zum Erreichen des Gleichgewichtes andere Zeiten notwendig sein.

Fazit

Die Extraktion mittels Ultraschall bietet großes Potential bei der Probenvorbereitung von Böden. Um jedoch allgemein gültige Aussagen zum Extraktionsvermögen zu treffen, müssen noch weitere Versuche mit verschiedenen Böden, Analyten und Extraktionsmitteln durchgeführt werden.

4 Gesamtfazit

Der Einsatz eines Ultraschallhomogenisators in der Probenvorbereitung führt bei den untersuchten Methodenvergleichen zu vergleichbaren Ergebnissen der anschließenden Analysen. Die Probenvorbereitung an sich läuft schneller, unkomplizierter ab. Ein Einsatz in der Routine ist somit sehr interessant. Die Ausweitung des Einsatzes auf weitere Methoden erscheint vielversprechend und wird in Angriff genommen.