

Moderne Probenvorbereitung mit Ultraschallhomogenisatoren

Praxistest für Lebensmittel und Gewebe

C. Wunder, S. Zellermann und K. Siebertz

Die bisher angewandte Methode für das Homogenisieren von biologischen Proben durch mechanische Zerkleinerung wurde mit dem alternativ möglichen Einsatz eines Ultraschallhomogenisators verglichen. Bei beiden Methoden wurden gute Reproduzierbarkeiten erzielt, in Einzelfällen konnte eine augenscheinlich vollständigere Extraktion mittels Ultraschall erzielt werden. Ein großer Vorteil der Ultraschallhomogenisierung ist die leichte Handhabung und die schnelle Reinigung der Ultraschallsonotrode (Arbeitsspitze), weshalb die Ultraschallhomogenisierung in die Routine übernommen wird.

Einleitung

Die Zerkleinerung/ Homogenisierung von biologischen Proben für die Vorbereitung der Analytik erfolgt traditionell sehr häufig mit einem mechanischen Verkleinerungsstab. Es handelt sich um eine etablierte und in sich ausgereifte Methode. Das Betreiben des Gerätes erfordert jedoch einen hohen Zeitaufwand für das Montieren und Demontieren und insbesondere für die Reinigung, Ver-

schleppungen von Probenmaterial im Inneren können nicht in jedem Fall ausgeschlossen werden. Die Homogenisierung mittels eines glatten Ultraschallstabs wird als alternative Methode angeboten und verwendet. Ultraschall wird in Wissenschaft und Technik für die vielfältigsten Anwendungen eingesetzt. Neben den bereits sehr verbreiteten Ultraschallbädern können mit Ultraschallhomogenisatoren besonders hohe Energiedichten in das Medium übertragen werden (bis zu 1500 W/cm^2 gegenüber $1-5 \text{ W/cm}^2$). Das Homogenisieren, Emulgieren, Suspendieren, Desagglomerieren verschiedenster Substanzen, das Beschleunigen chemischer Reaktionen oder das Aufschließen von Zellen sind im Bereich der Probenvorbereitung und -aufbereitung erprobte Einsatzgebiete.

Ultraschallhomogenisatoren sollen mit höherer Effizienz arbeiten, oft reproduzierbarere Ergebnisse liefern und nicht zuletzt wesentlich leichter zu reinigen sein. Auch geringste Probenmengen sollen schnell, kostengünstig und reproduzierbar aufbereitet werden. Mit den hier gezeigten Untersuchungen sollte in der Praxis geprüft werden, ob objektivierbare, qualitative Unterschiede der Homogenisierung an sich, bezüglich des Handlings und der Reproduzierbarkeit der

nachfolgenden Analysen im Vergleich der beiden Methoden existieren.

Methoden

Die Ultraschall-Homogenisierung erfolgte mit dem Gerät Sonopuls HD 3100 bzw. HD 2200 der Firma Bandelin. Als Sonotroden dienten die Mikrospitze MS 73 und Kegelspitze KE 76. Teilweise wurden den Proben Glaskugeln zugesetzt und die Proben während der Behandlung gekühlt.

Homogenisierung in der Lebensmittelüberwachung

Insbesondere pastenartige, fetthaltige Lebensmittel sind konventionell schwierig aufzuarbeiten. Die Ultraschallhomogenisierung wurde daher an Frischkäse bzw. Schmelzkäse für drei nachgängige repräsentative Bestimmungen mit der jeweiligen konventionellen Methode der Homogenisierung verglichen.

Nitratgehalt: Vergleich mit Reibschale

Zur Bestimmung des Nitratgehaltes in Käse nach dem Xylenolverfahren (L 01.00-36) wurden jeweils 5 g Probe mittels einer Reibschale mit warmem Wasser verrieben bzw. 2 min. mittels US-Homogenisator in 15 ml Wasser behandelt. Die erhaltenen Analysenergebnisse (8 Messwerte) sind vergleichbar sowohl hinsichtlich der absoluten Werte als auch hinsichtlich der Standardabweichung.

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.

Chloridgehalt: Vergleich mit einem mechanischen Dispergierstab

Zur Bestimmung des Chloridgehaltes in Käse mittels Potentiometrie wurde ca. 1 g Probenmaterial in 50 ml Wasser überführt und mit einem mechanischen Dispergier-



Abb. 1: Homogenisierung von Frischkäse. links = mechanischer Dispergierstab / rechts = Ultraschall

Tab. 1: Ergebnisse der Homogenisierung von Gehirn, Leber und Lunge.

	Ultraschall	Mechanischer Dispergierstab
Handhabung	Leichte Handhabung	Kompliziertes Zusammenbauen
	schnelle Reinigung	umständliche Reinigung nur durch Auseinanderbauen
Homogenisierung	Starker Temperaturanstieg bei längerer Beschallung ohne Eisbad	Keine Temperaturerhöhung
	Gewebe wie Leber und Lunge werden nur ansatzweise zerkleinert	Allgemein gute mechanische Zerkleinerung, Probleme bei stark bindegewebshaltigem Material
Bei flüssigerem Geweben wie Gehirn leichte und schnelle Homogenisierung		
	Mikroskopisch feinere Homogenisierung	Mikroskopisch gröbere Homogenisierung
Eingelagerte Substanzen	Substanz- und materialabhängige Konzentrationsunterschiede	
	Gute Reproduzierbarkeit	Gute Reproduzierbarkeit

stab sowie mit dem Ultraschallhomogenisator behandelt. Optisches Ergebnis siehe Abbildung 1. 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 mechanischen Dispergierstabes durch das notwendige Zerlegen und wieder Zusammenbauen relativ aufwändig. Die US-Sonotrode muss dagegen nur abgespült werden.

Sorbinsäuregehalt:

Vergleich mit Ultraschallbad

Zur Bestimmung des Sorbinsäuregehaltes in Frischkäse (HPLC-DAD) in Anlehnung an L00.00-09 wurde 1g Probe mit Extraktionslösung (Methanol/Wasser) versetzt und 10 min im Ultraschallbad bei 40 °C bzw. 2 min mittels Ultraschallhomogenisator vor dann gleicher Weiterverarbeitung behandelt.

Auch bei diesem Verfahren ist die Aufarbeitung mit dem Ultraschallhomogenisator einfacher. Der erhaltene Mittelwert (8 Messwerte) liegt etwas über dem der konventionellen Methode. Ursächlich ist dabei die verbesserte Extraktionsleistung mit der US-Sonotrode zu sehen.

Fazit

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 Ultraschall-Kegelspitze führt zu vergleichbaren Ergebnissen. Es sollten tendenziell möglichst hohe und schmale Gefäße verwendet werden, um eventuelles Verspritzen, abhängig von der eingestellten Energieleistung, zu vermei-

den. Trotz Verwendung einer Lärmschutzbox ist insbesondere bei Dauerbetrieb eine deutliche Lärmbelastung vorhanden, gegebenenfalls ist die Nutzung von weiterem Gehörschutz nötig. Insgesamt besteht seitens der Mitarbeiter aber eine hohe Akzeptanz hinsichtlich der Nutzung dieses Gerätes. Es wurde direkt zur Nutzung in die Routine überführt.

Es werden weitere Anwendungsmöglichkeiten geprüft, z.B. die Herstellung von Extrakten für die Bestimmung von Staphylokokkenenterotoxinen. Die bisherige Methode ist problematisch, weil eine hohe Einwaage mit relativ wenig Extraktionsmittel homogenisiert werden muss. Erste Ergebnisse zeigen, dass der Ultraschallhomogenisator deutlich gleichmäßigere Extrakte liefert als ein mechanischer Dispergierstab bzw. Stomacher.

Gewebeproben in der forensischen Toxikologie

Werden Organproben (Gehirn, Leber und Lunge) in der forensischen Toxikologie auf das Vorhandensein von Arznei- oder Betäubungsmitteln untersucht, werden routinemäßig die Organe Gehirn, Leber und Lunge eingesetzt, wobei diese dann vorab homogenisiert werden müssen. In der Routine wird 1 g Organ eingewogen und anschließend mit 4 ml KH_2PO_4 -Puffer (pH 6,0) versetzt. Bisher wurden die Organproben mit einem Ultraturax homogenisiert, in der vorliegenden Studie sollte die Homogenisierung mittels Ultraschallhomogenisator verglichen werden. Im Detail wurde das Handling, die makroskopischen und mikroskopischen Bilder sowie die nachgängigen Analysenwerte der untersuchten Inhaltsstoffe bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Ultraschall (US) 30 s, Ultraschall 180 s, mechanischer Dispergierstab (UT) 45 s, US/UT je 30 s) betrachtet.

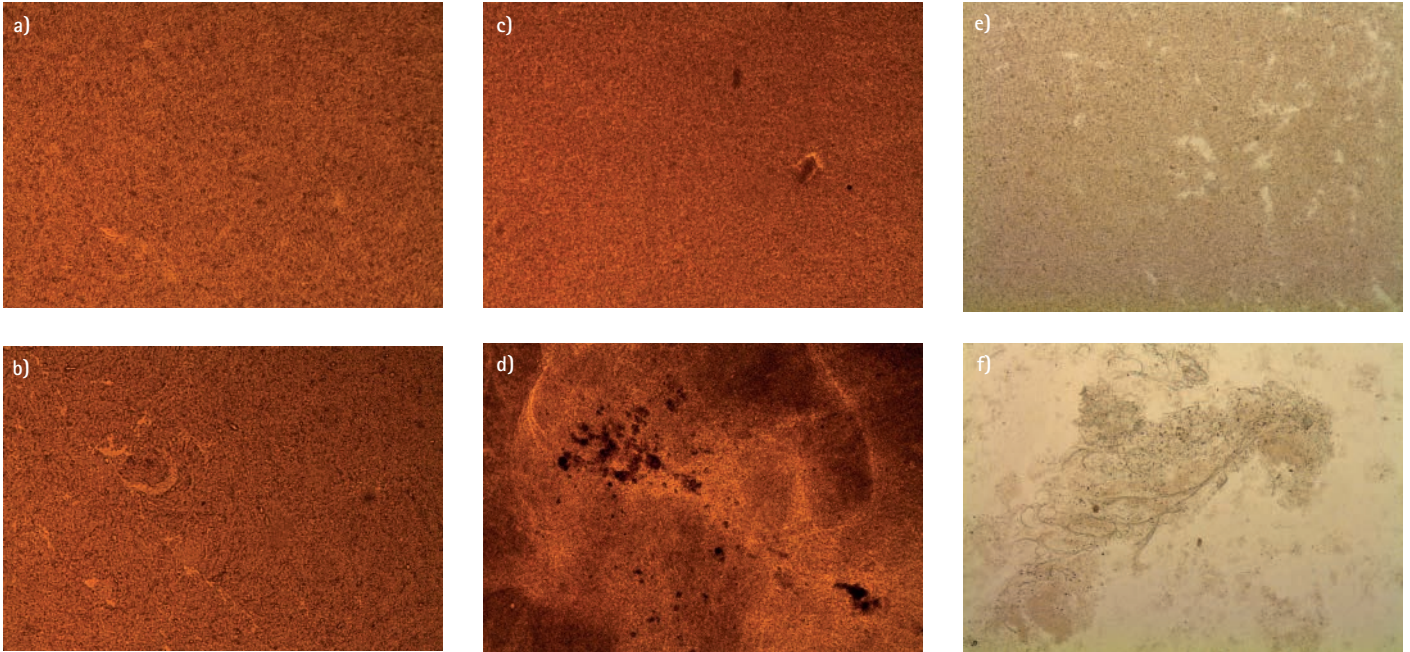


Abb. 2: oben: Ultraschall: a) Gehirn-Ultraschall 180 Sek. auf Eis; c) Leber-Ultraschall 180 Sek. auf Eis; e) Lunge-Ultraschall 30 Sek. unten: mechanischer Dispergierstab: b) Gehirn; d) Leber; f) Lunge.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 als Übersicht zusammengefasst.

Bei der makroskopischen und mikroskopischen Betrachtung führten für das relativ weiche Organ Gehirn beide Methoden zum gleichen Ergebnis der vollständigen Auflösung. Für die festeren Organe Lunge und Leber wurde gegenläufig beobachtet, dass makroskopisch der UT zum besseren Erfolg führte, denn mit Ultraschall verblieb ein nicht aufgelöstes Reststück in der Lösung, mikroskopisch jedoch ist eine wesentlich feinere Auflösung zu erkennen (siehe Abb. 2).

In der nachfolgenden Analytik wurden repräsentativ die Werte von Fentanyl und Bromazepam sowie 6-MAM, Morphin und Codein betrachtet. Bei beiden Methoden wurden gute Reproduzierbarkeiten erzielt. Es gibt substanz- und gewebespezifische Ergebnis-Unterschiede, wobei die Ultraschallhomogenisierung im Vergleich zu einem mechanischen Dispergierstab sowohl schlechtere als auch bessere Ergebnisse liefert. Die erhebliche Temperaturerhöhung bei längerdauernder Beschallung ohne Eiskühlung von bis zu 20°C (vom Hersteller wird allerdings auch eine Kühlung mittels Eisbad empfohlen) führt erstaunlicherweise auch bei der hydrolyseempfindlichen Substanz Monoacetylmorphin nicht zu Problemen, sodass der Temperatureinfluss nicht von erheblicher Bedeutung sein kann. Nichtsdestotrotz wird erwogen, zur Sicherheit im Eisbad zu arbeiten. Insgesamt sind die Ergebnisse der Ultraschallhomogenisierung vergleichbar mit denen des mechanischen Dispergierstabes. Aufgrund dessen wäre der Einsatz der Ultraschallhomo-

genisierung in der Praxis gut vorstellbar und kann als Ersatz der mechanischen Gewebezerkleinerung (mechanischer Dispergierstab) dienen. Ein großer Vorteil der Ultraschallhomogenisierung ist die leichte Handhabung und die schnelle Reinigung des Ultraschallstabes. Die Übernahme der Ultraschallmethode in die Routine findet aktuell statt.

Schlussfolgerungen für den praktischen Einsatz eines Ultraschallhomogenisators

Insgesamt überwiegen im Vergleich der Ultraschallhomogenisierung zu konventionellen Methoden nach Ansicht der Praxisanwender die Vorteile gegenüber den Nachteilen und es besteht eine hohe Akzeptanz im Labor, sodass die Methoden nach den Praxistests in beiden Anwendungsbereichen in die Routine übernommen werden. Diese Anwendungen können generell als beispielhaft für andere Probenmatrices angesehen werden.

Durch den Einsatz verschiedener Sonotrodenformen in verschiedenen Größen bei unterschiedlichen Amplituden und Energiedichten sowie unterschiedlich langen Beschallungszeiten bestehen sehr viele Möglichkeiten, die Methode für die Anforderungen an die jeweilige Matrix usw. anzupassen. Durch die mögliche Verwendung von Mikrospitzen (beispielsweise auch Anwendung im Eppendorf-Cap möglich) sind auch sehr kleine Probenmengen gut zu behandeln.

Eine Sammlung zu bewährten Anwendungen in der Praxis liegt vor.

Der individuelle Test der Geräte ist in jedem Fall möglich, entweder im eigenen Labor oder in Anwender-/Fortbildungsseminaren mit eigenen Proben.

Danksagung

Die Autoren danken der Firma Bandelin electronic, die für die Vergleichstests probeweise einen Sonopuls-Ultraschallhomogenisator zur Verfügung stellte.

Autorinnen

Dr. Cora Wunder¹, Susanne Zellermann²,
Dr. Kirsten Siebertz³

¹ Institut für Rechtsmedizin, Abt. Forensische Toxikologie, Frankfurt,

² Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, MV Standort Neubrandenburg,

³ TDCLab Dr. Siebertz GmbH

KONTAKT |

Dr. Kirsten Siebertz
Geschäftsführende Gesellschafterin
TDCLab Dr. Siebertz GmbH
Nidderau
k.siebertz@tdclab.de
www.tdclab.de