Applications

Note 240 | August 2011

Technical Report

Zeitersparnis sowie bessere Reproduzierbarkeit durch Zentrifugation bei 30.000 x *g*

Heike Frerichs, Stephanie Max, Natalie Worku
Institut für Hygiene und Umwelt, Marckmannstrasse 129, 20539 Hamburg

Zusammenfassung

Die Optimierung von Arbeitsprotokollen kann zur Produktivitätssteigerung eines Labors erheblich beitragen. Zentrifugationsschritte nehmen in Probenaufbereitungen einen wesentlichen Zeitraum in Anspruch. Sie sind daher für Optimierungen besonders geeignet. In der Analyse von Tierarzneimittelrückständen konnte mit der Centrifuge 5430 R zusammen mit Eppendorf Safe-Lock Tubes bei 30.130 x *g* eine Zeitersparnis von bis zu 75 % erreicht werden. Zusätzlich zeigten die Messwerte eine verbesserte Reproduzierbarkeit gegenüber den Standardprotokollen.

Einleitung

In diesem Applikationsbericht werden typische Probenaufarbeitungen beschrieben, mit denen die Anwendung der Centrifuge 5430 R (Eppendorf) im Vergleich zu einer Laborzentrifuge eines anderen Herstellers geprüft werden sollte. Die zur Anwendung gekommenen Analysenvorschriften dienen dem Nachweis pharmakologisch wirksamer Substanzen (Tierarzneimittelrückstände) in tierischen Lebensmitteln per LC/MSMS (Flüssigkeitschromatographie, Tandem-Massenspektroskopie). Vorgestellt wird die Probenvorbereitung zum Nachweis der Metabolite von Nitrofuranen sowie von Sulfonamiden und Tetracyclinen. Es handelt sich hierbei um Substanzgruppen mit antibiotischer Wirksamkeit. Pro Experiment wurde immer nur ein Parameter verändert.

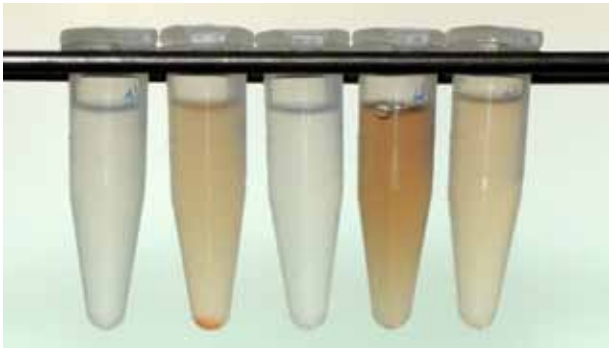

Abbildung 1: Die Verschiedenartigkeit der Matrices in der Analyse von Tierarzneimittelrückständen macht eine Optimierung der Probenaufbereitungen sinnvoll. Foto: T. Krenz.

Materialien und Methoden

Versuch I: Probenvorbereitung zum Nachweis von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Garnelen
Bei dieser Analysenvorschrift werden die Antibiotikarückstände mit einem Acetonitril/Wasser/Ameisensäure-Gemisch aus der homogenisierten Probe extrahiert, kurz zentrifugiert (3.220 x *g*), filtriert und auf 0,5 mL eingeengt. Anschließend wird mit einem Wasser/Acetonitril/Ameisensäure-Gemisch auf 3 g aufgefüllt und gut gemischt. Sodann erfolgt eine Zentrifugation bei 4 °C in 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tubes bei maximaler *g*-Zahl (Laborzentrifuge 1: 16.060 x *g*, Centrifuge 5430 R (Eppendorf): 30.130 x *g*) bis zur klaren Lösung.

Versuch IIa: Probenvorbereitung zum Nachweis von Nitrofuranmetaboliten in Muskelfleisch (gesalzener Hühnermuskel, dotierte Proben)
Bei der angewendeten Methode werden die vier Nitrofuranmetabolite 3-Amino-2-oxazolidinon (AOZ), 1-Aminohydantoin (AHD), 3-Amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-on (AMOZ) und Semicarbazid (SEM) mit 2-Nitrobenzaldehyd derivatisiert. Nach pH-Wert Einstellung werden die Derivate mit 20 mL Ethylacetat extrahiert, dann 15 min bei 3.220 x *g* zentrifugiert, der Überstand in ein Reagenzglas überführt und in einem Parallelverdampfer (Syncore, Büchi) zur Trocknung gebracht. Der Rückstand wird in 200 µL Methanol/Wasser gelöst und sorgfältig durchmischt. Diese Lösung wird in ein 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tube überführt und bei max. *g*-Zahl (Laborzentrifuge 1: 16.060 x *g*, Centrifuge 5430 R: 30.130 x *g*) bei 4 °C zentrifugiert, bis eine klare, mittlere Phase entnommen werden kann.

Versuch IIb: Vergleich der Datenreproduzierbarkeit
Die Lösemittelphase (aus Versuch IIa) wird nach 1 Stunde Zentrifugation bei 4 °C in ein Braunglas-Vial mit Mikroeinsatz pipettiert und per LC/MSMS (HP 1100 Agilent Technologies/Quattro Micro, Waters Corporation) gemessen. Die Trennung erfolgte über eine Luna C18-Säule (Fa. Phenomenex) (150 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße) mit Methanol/Ammoniumacetatpuffer als mobiler Phase (Flussrate: 0,2 mL/min, Injektionsvolumen 10 µL). Das LC/MSMS wurde im MRM-Modus (ESI pos.) betrieben, detektiert wurden folgende Übergänge: AOZ: m/z 236 >104; AMOZ: m/z 335>262; AHD: m/z 249 > 134; SEM: m/z 209>166. Die Reproduzierbarkeit der Konzentrationen der Nitrofuranmetaboliten wurde über den Vergleich der Variationskoeffizienten geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Versuch I: Nachweis von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Garnelen
Mittels Zentrifugation wird in dieser Probenaufarbeitung die Lösemittelphase von den festen Matrix-Bestandteilen getrennt, um sie nachfolgend auf Sulfonamide und Tetracycline untersuchen zu können. Abbildung 2 zeigt die Gefäße nach 15 sowie nach 60 min Zentrifugationszeit. (links: Laborzentrifuge 1) bzw. nach 15 min Zentrifugationszeit (rechts: Centrifuge 5430 R von Eppendorf).

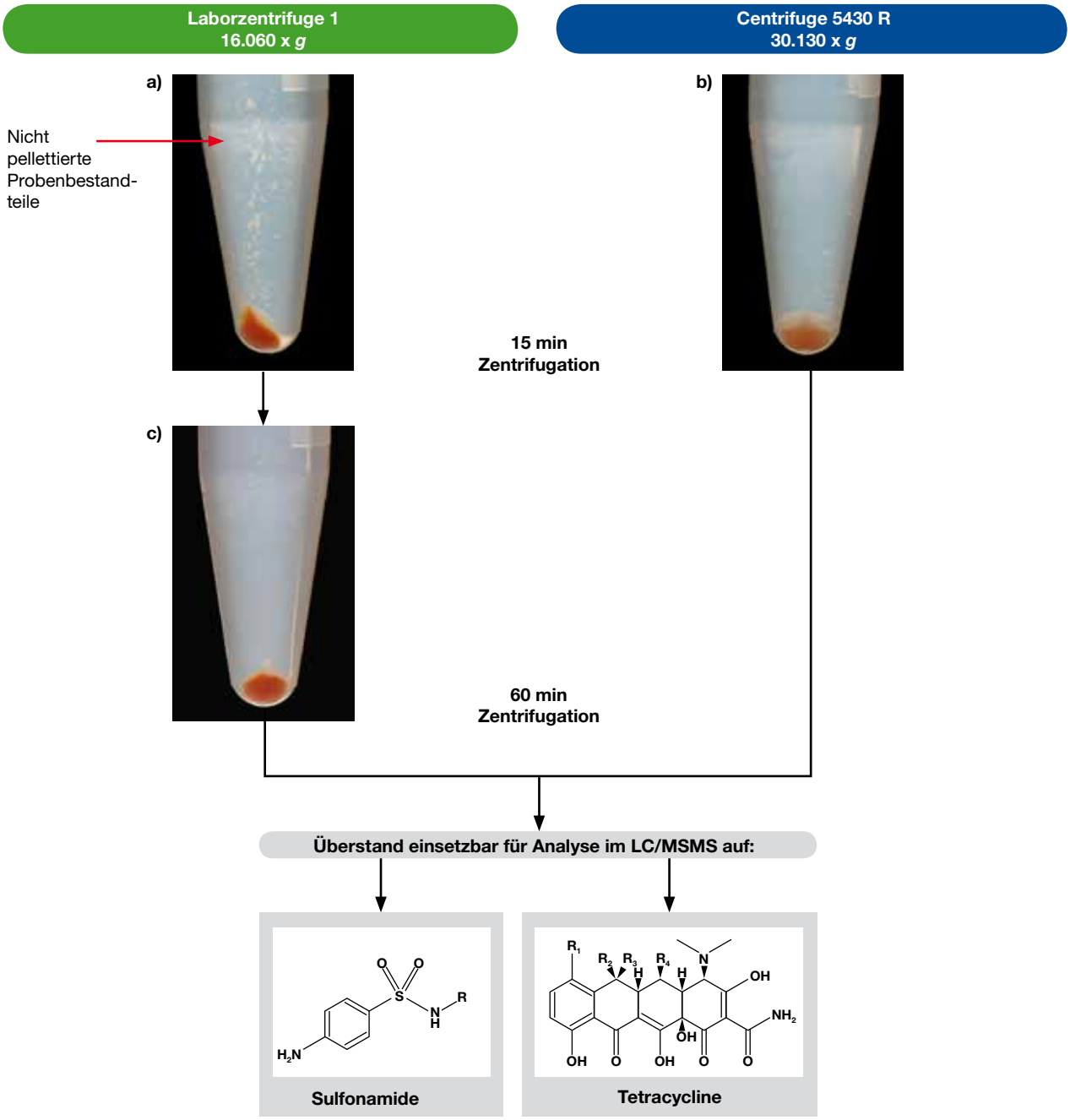

Abbildung 2: Matrix Garnele extrahiert nach Versuchsprotokoll I. Nach 15 min Zentrifugation mit Laborzentrifuge 1 (a) und Eppendorf Centrifuge 5430 R (b); nach 60 min Zentrifugation mit Laborzentrifuge 1 (c). Fotos: T. Krenz.

Bei der Matrix Garnele waren nach 15 Minuten Zentrifugationszeit bei 16.060 x *g* noch deutlich Matrixbestandteile im Gefäß zu erkennen (Abbildung 2a), die teilweise an der Wandung klebten und mit dem Pipettensog ins Messvial überführt würden. Dies kann zu Verunreinigungen nachfolgend eingesetzter Analysegeräte (z. B. LC/MSMS) beitragen und damit deren Wartungsaufwand erhöhen.
Die Centrifuge 5430 R lieferte bei 30.130 x *g* im gleichen Zeitraum bereits ein zufriedenstellendes Ergebnis (Abb. 2b). Der Überstand konnte hier direkt zur Analyse eingesetzt werden. Mit der Laborzentrifuge 1 (16.060 x *g*) war dagegen der Probenüberstand erst nach 60 min Zentrifugationszeit für die nachfolgende Analyse einsetzbar. Für die Probenmatrix Garnele konnte damit der Zeitaufwand des untersuchten Zentrifugationsschrittes um bis zu 75 % reduziert werden.

Versuch IIa: Probenvorbereitung zum Nachweis von Nitrofuranmetaboliten in Muskelfleisch (gesalzener Hühnermuskel, dotierte Proben)

Die Probenaufarbeitung von Versuch IIa beschreibt den finalen Zentrifugationsschritt vor der Analyse von Nitrofuranmetaboliten in gesalzenem Hühnermuskelfleisch. Man erkennt nach erfolgter Extraktion und Zentrifugation eine Lipidphase als oberste Schicht. In der Mitte befindet sich die zu analysierende Lösemittelphase. Am Boden des Reaktionsgefäßes sind die festen Matrixbestandteile in unterschiedlicher Kompaktheit pelletiert. Abbildung 3 zeigt für die Vergleichszentrifugen das Ergebnis nach 15 und nach 60 min (Laborzentrifuge 1) bzw. nach 15 min (Centrifuge 5430 R).

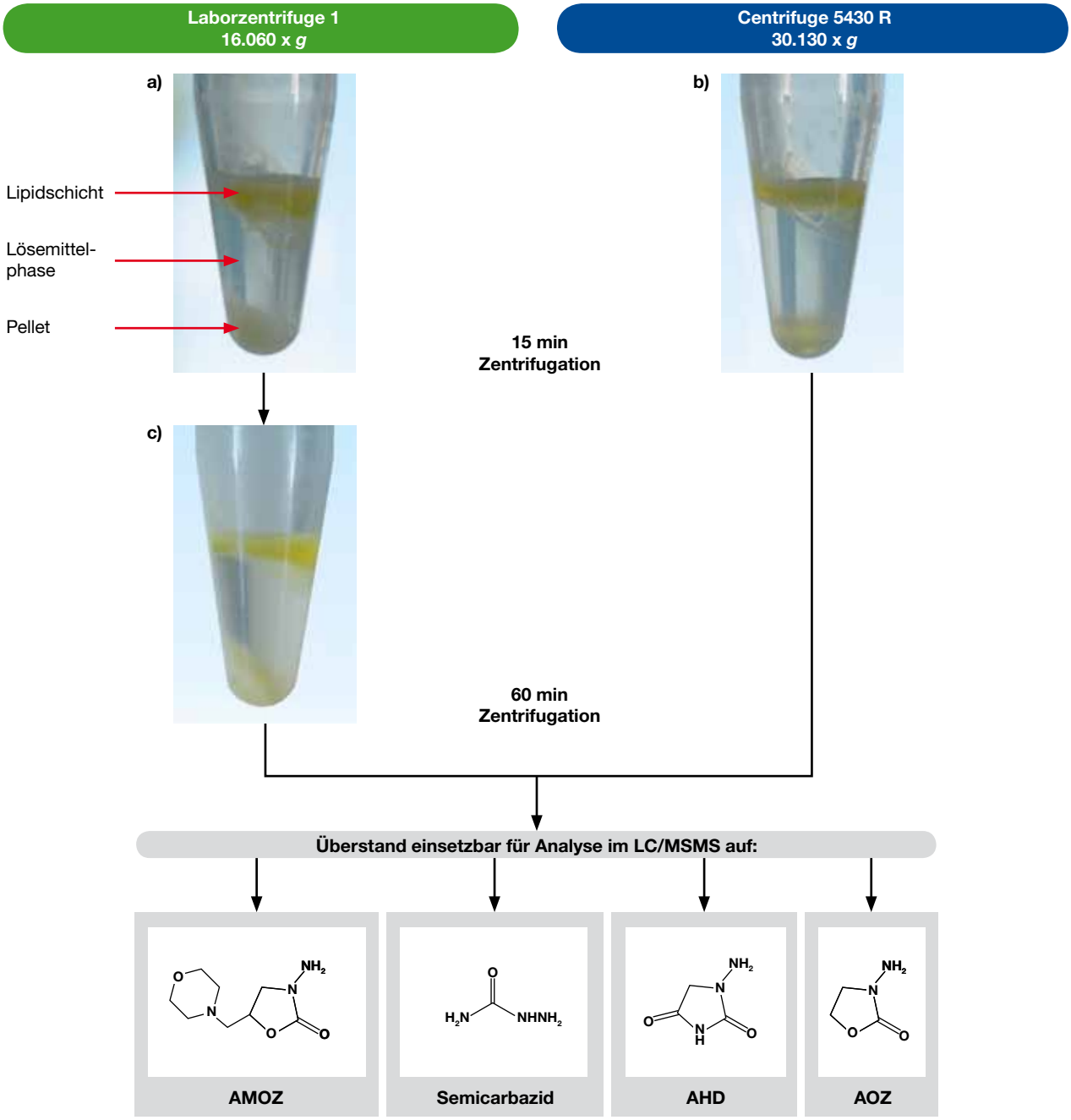

Abbildung 3: Matrix gesalzener Hühnermuskel extrahiert nach Versuchsprotokoll IIa. Nach 15 min Zentrifugation mit Laborzentrifuge 1 (a) und Eppendorf Centrifuge 5430 R (b); nach 60 min Zentrifugation mit Laborzentrifuge 1 (c). Fotos: T. Krenz

In der Centrifuge 5430 R (Abb. 3b) wurden die Matrixbestandteile in einem kompakteren und festeren Pellet angereichert. Nach nur 15 min konnte hier die mittlere Lösemittelphase entnommen werden, ohne Pelletbestandteile mit zu nehmen, die nachfolgend verwendete Analysegeräte (z. B. LC/MSMS) verunreinigen könnten. Dieser Schritt war in der Laborzentrifuge 1 erst nach 60 min Zentrifugationszeit möglich (Abb. 3c). Auch beim Versuch IIa konnte damit bei der analysierten Matrix die Zeit des untersuchten Zentrifugationsschrittes um bis zu 75 % reduziert werden.

Versuch IIb: Vergleich der Datenreproduzierbarkeit
Bis zur ausreichenden Trennung der Phasen dauerte in Versuch IIa die Zentrifugation mit der Laborzentrifuge 1 eine Stunde. Für den Vergleich der Reproduzierbarkeit wurden daher die Messwerte beider Zentrifugen nach dieser maximalen Zentrifugationsdauer (= 1 h) miteinander verglichen.

Mit dieser Versuchsdurchführung sollte geprüft werden, ob die qualitativ sichtbar bessere Phasentrennung der Centrifuge 5430 R bei 30.130 x *g* auch zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Analysedaten führt. Verglichen wurden die Peakflächen und durch Matrixstandardreihe ermittelte Parameterkonzentrationen. Betrachtet wurden hierbei in Vierfachbestimmung zwei getrennte Aufarbeitungen (A und B) einer Probe gesalzenen Hühnermuskelfleisches bezüglich der folgenden Wirkstoffmetabolite: 3-Amino-2-oxazolidinon (AOZ), 1-Aminohydantoin (AHD), 3-Amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-on (AMOZ) und Semicarbazid (SEM) (Anhang 1). Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde der Variationskoeffizient herangezogen, der bei reproduzierbareren Messwerten kleiner wird (Tab. 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung der Variationskoeffizienten aller vier, mit der gleichen Methode erfassten Metabolite (AOZ, AHD, AMOZ, SEM) nach Probenaufbereitung II; ermittelt für die Laborzentrifuge 1 bzw. für die Centrifuge 5430 R.

Metabolite	Aufarbeitung	Laborzentrifuge 1	Centrifuge 5430 R
		Variationskoeffizient [%]	
AOZ	A	14,4	5,6
	B	12,9	1,2
AMOZ	A	4,4	1,1
	B	6,0	1,9
AHD	A	5,5	3,8
	B	2,2	3,0
SEM	A	4,6	2,0
	B	4,3	3,4

Der Einsatz der Centrifuge 5430 R (30.130 x *g*) verbessert die Reproduzierbarkeit der Rückstandsgehalte der vier getesteten Antibiotika deutlich (einzige Ausnahme: Aufarbeitung B, Messung AHD). Der Variationskoeffizient liegt bei der Laborzentrifuge 1 bei 2,2 bis 14,4 %, bei der Centrifuge 5430 R zwischen 1,1 und 5,6 %.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die variierte Zentrifugation (alle anderen Aufarbeitungsschritte wurden mit identischem Gerät durchgeführt) nur einen von vielen Aufarbeitungsschritten darstellt, ist der Reproduzierbarkeitsgewinn erstaunlich.

Fazit

Das Eppendorf System aus der Centrifuge 5430 R und den 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tubes erlaubt die Zentrifugation bei 30.130 x *g*. In der Analyse von Tierarzneimittelrückständen bewirkte dieses System eine verbesserte Trennleistung. Zentrifugationszeiten konnten deshalb in verschiedenen Methodenprotokollen um bis zu 75 % verkürzt werden. Zusätzlich konnte die Reproduzierbarkeit der Daten verbessert werden. Es ist geplant, auch weitere Methoden/Protokolle mit der Centrifuge 5430 R und den 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tubes zu optimieren.

Anhang 1: Vergleich der Reproduzierbarkeit der Messwerte bei der Laborzentrifuge 1 und der 5430 R nach Probenaufarbeitung IIb.
Betrachtet wurden die Antibiotika-Metabolite AOZ, AHD, AMOZ und SEM in zwei getrennten Aufarbeitungen (A und B) einer Probe aus gesalzenem Hühnermuskel. (Konz. = Konzentration)

			Laborzentrifuge 1		Centrifuge 5430 R	
Substanz	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AOZ	A	1	2724	0,24	3591	0,31
	A	2	2851	0,30	3620	0,30
	A	3	2639	0,25	3676	0,34
	A	4	2593	0,33	3559	0,31
		Mittelwert	2702	0,28	3612	0,31
		Standardabweichung	113,3	0,04	49,7	0,02
		Variationskoeffizient [%]	4,2	**14,4**	1,4	**5,6**
Substanz	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AOZ	B	1	2937	0,27	3058	0,23
	B	2	2502	0,20	3060	0,24
	B	3	2898	0,27	3000	0,24
	B	4	2877	0,26	3037	0,23
		Mittelwert	2804	0,25	3039	0,23
		Standardabweichung	202,5	0,03	27,8	0,00*
		Variationskoeffizient [%]	7,2	**12,9**	0,9	**1,2**
Substanz	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AMOZ	A	1	1138	0,52	1191	0,49
	A	2	1152	0,53	1169	0,48
	A	3	1219	0,57	1198	0,49
	A	4	1111	0,54	1140	0,48
		Mittelwert	1155	0,54	1175	0,48
		Standardabweichung	45,9	0,02	26,1	0,01
		Variationskoeffizient [%]	4,0	**4,4**	2,2	**1,1**
Substanz	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AMOZ	B	1	1086	0,48	1038	0,38
	B	2	1122	0,53	937	0,40
	B	3	1112	0,50	881	0,39
	B	4	993	0,47	924	0,39
		Mittelwert	1078	0,49	945	0,39
		Standardabweichung	58,8	0,03	66,5	0,01
		Variationskoeffizient [%]	5,5	**6,0**	7,0	**1,9**

*rundungsbedingt

			Laborzentrifuge 1		Centrifuge 5430 R	
Metabolit	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AHD	A	1	1004	0,64	1341	0,67
	A	2	926	0,57	1409	0,67
	A	3	998	0,62	1267	0,62
	A	4	926	0,65	1262	0,64
		Mittelwert	964	0,62	1320	0,65
		Standardabweichung	43,4	0,03	69,6	0,02
		Variationskoeffizient [%]	4,5	**5,5**	5,3	**3,8**
Metabolit	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
AHD	B	1	957	0,58	1184	0,54
	B	2	996	0,60	1136	0,57
	B	3	977	0,60	1144	0,57
	B	4	960	0,61	1135	0,58
		Mittelwert	973	0,60	1150	0,57
		Standardabweichung	18,0	0,01	23,2	0,02
		Variationskoeffizient [%]	1,8	**2,2**	2,0	**3,0**
Metabolit	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
SEM	A	1	594	0,48	732	0,47
	A	2	608	0,47	742	0,49
	A	3	560	0,47	766	0,50
	A	4	531	0,43	766	0,49
		Mittelwert	573	0,46	752	0,49
		Standardabweichung	34,6	0,02	17,2	0,01
		Variationskoeffizient [%]	6,0	**4,6**	2,3	**2,0**
Metabolit	**Aufarbeitung**	**Einspritzung**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**	**Peakfläche**	**Konz. [µg/kg]**
SEM	B	1	619	0,47	676	0,41
	B	2	618	0,47	734	0,45
	B	3	591	0,45	708	0,44
	B	4	568	0,43	706	0,42
		Mittelwert	599	0,45	706	0,43
		Standardabweichung	24,4	0,02	23,7	0,02
		Variationskoeffizient [%]	4,1	**4,3**	3,4	**3,4**

Bestellinformationen

Beschreibung		Bestell-Nr.
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL	1000 Gefäße	0030 120.086
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, PCR clean	1000 Gefäße	0030 123.328
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, Biopur®	100 Gefäße	0030 121.589
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, DNA LoBind	250 Gefäße	0030 108.051
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, Protein LoBind	100 Gefäße	0030 108.116

Beschreibung	Bestell-Nr.
Centrifuge 5430 mit Folientastatur 30 x 1,5/2,0 mL aerosoldichtem Festwinkelrotor FA-45-30-11, 230 V/50–60 Hz	5427 000.216
Centrifuge 5430 mit Drehknöpfen 30 x 1,5/2,0 mL aerosoldichtem Festwinkelrotor FA-45-30-11, 230 V/50–60 Hz	5427 000.410
Centrifuge 5430 mit Folientastatur, ohne Rotor, 230 V/50–60 Hz	5427 000.011
Centrifuge 5430 mit Drehknöpfen, ohne Rotor, 230 V/50–60 Hz	5427 000.615
Centrifuge 5430 R (gekühlt) mit Folientastatur 30 x 1,5/2,0 mL aerosoldichtem Festwinkelrotor FA-45-30-11, 230 V/50–60 Hz	5428 000.015
Centrifuge 5430 R (gekühlt) mit Drehknöpfen 30 x 1,5/2,0 mL aerosoldichtem Festwinkelrotor FA-45-30-11, 230 V/50–60 Hz	5428 000.414
Centrifuge 5430 R (gekühlt) mit Folientastatur, ohne Rotor, 230 V/50–60 Hz	5428 000.210
Centrifuge 5430 R (gekühlt) mit Drehknöpfen, ohne Rotor, 230 V/50–60 Hz	5428 000.211
Rotor FA-45-24-11-HS, inkl. Rotordeckel, aerosoldicht, PTFE-beschichtet	5428 000.619

eppendorf
In touch with life

Your local distributor: www.eppendorf.com/worldwide
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland
Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: vertrieb@eppendorf.de · www.eppendorf.de
Eppendorf Austria GmbH · Ignaz Köck Straße 10 · 1210 Wien · Österreich
Tel: +43 1 89013 64-0 · Fax: +43 1 890 13 64-20 · E-mail: office@eppendorf.at · www.eppendorf.at
Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz
Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch · www.eppendorf.ch

Application Support Tel: +49 1803 666 789 (Preis je nach Tarif im Ausland; 9 ct/min aus dem dt. Festnetz; Mobilfunkhöchstpreis 42 ct/min)
E-mail: support@eppendorf.com

Phenomenex® und Luna® sind eingetragene Marken der Phenomenex, Inc. Syncore® ist eine eingetragene Marke von Büchi Labortechnik GmbH, eppendorf® und Biopur® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG.
Alle Rechte einschliesslich der Grafiken und Abbildungen vorbehalten. Copyright 2011 Eppendorf AG
Order no.: AA240WW 010/DE1/WEB/0811/NEUH