

# Vergleich von Eppendorf Tubes® 5.0 mL mit konischen 15 mL Gefäßen bezüglich sich herauslösender UV-absorbierender Substanzen (Leachables)

Natascha Weiß<sup>1</sup>, Frauke Gotzhein<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland;

<sup>2</sup>Universität Hamburg, Studiengang Molecular Life Sciences, Deutschland

## Zusammenfassung

Substanzen, die sich aus Kunststoff-Einmalartikeln herauslösen (Leachables), können einen Einfluss auf Experimente im Labor haben. Durch Erhitzen von Wasser in Reaktionsgefäßen und anschließender photometrischer Analyse lassen sich Stoffe, die im UV-Bereich absorbieren, einfach nachweisen. Solche Substanzen können z. B. DNA-Messungen verfälschen. Die vorliegende Application Note beschreibt die Untersuchung und den Vergleich von

Eppendorf Tubes 5.0 mL und konischen 15 mL Gefäßen entsprechend dieser Methode. Es wird so gezeigt, dass sich eine signifikante Menge an Leachables aus den verschiedenen 15 mL Gefäßen herauslöst. Bei Eppendorf Tubes (und einem Kontrollgefäß aus Glas) sind die Extinktionen dagegen so niedrig, dass photometrische Nachweismethoden nicht beeinträchtigt werden.

## Einleitung

Berichte zum Thema „Leachables“ (aus Kunststoff herauslösbare Substanzen) sind seit einigen Jahren insbesondere aus dem Bereich der Lebensmittelverpackungen und Getränkeflaschen bekannt [1, 2]. Im Jahr 2008 hat eine Veröffentlichung in der Science auf die Problematik im Bereich der Kunststoff-Einmalartikel im Labor aufmerksam gemacht. In dieser und weiteren Publikationen wurde der Einfluss verschiedener Additive, die sich aus Kunststoffgefäßen und Pipettenspitzen herauslösen können, auf die Aktivität in spezifischen Enzymassays herausgestellt [3, 4, 5, 6].

Auch Standardmethoden im Labor wie die photometrische Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen können durch „Leachables“ verfälscht werden. Mit einem einfachen Testsystem, das ein Erhitzen von Wasser in Reaktionsgefäßen

(mit laborüblichen Methoden) und einen anschließenden Absorptionsscan im UV-Bereich beinhaltet, konnte gezeigt werden, dass sich UV-absorbierende Substanzen aus Einmalartikeln herauslösen [7]. In dieser Veröffentlichung sowie in der Eppendorf Application Note 235 [8] wurde zudem gezeigt, dass durch Wasserproben aus Reaktionsgefäßen von Eppendorf keine signifikante Beeinträchtigung photometrischer Analysen erfolgte.

Die Experimente zu vorliegender Application Note wurden entsprechend dem oben genannten Test durchgeführt [7, 8]. Es sollten die Eppendorf Tubes 5.0 mL mit konischen 15 mL Gefäßen verschiedener Hersteller bezüglich des Herauslösenden UV-absorbierender Substanzen verglichen werden.

## Material und Methoden

Es wurden jeweils drei Eppendorf Tubes 5.0 mL und konische 15 mL Gefäße von vier verschiedenen Herstellern (B, C, F, V) mit je 1 mL Wasser (für die Molekularbiologie) befüllt und bei 90 °C\* für 30 min im Thermomixer® comfort inkubiert und währenddessen bei 600 rpm gemischt. Ähnliche Bedingungen findet man bei vielen Protokollen in der Probenvorbereitung, z. B. im Probenaufschluss. Danach wurden die Proben 10 min zur Abkühlung stehen gelassen. Die Proben wurden in UVetten im Eppendorf BioSpectrometer® über einen Bereich von 220 nm bis 340 nm gescannt und

aus den Extinktionen der drei Replikate jeweils die Mittelwerte gebildet sowie die Standardabweichung bestimmt. Die Extinktionen können als proportional zur Menge der sich herauslösenden Substanzen angesehen werden. Als Nullwert wurde nicht-inkubiertes Wasser eingesetzt. Als Kontrollwert diente Wasser, das in einem Glasgefäß inkubiert wurde. Die sich aus den Messwerten theoretisch ergebende Konzentration an dsDNA wurde aus der Extinktion bei der Wellenlänge 260 nm mit dem Faktor 50 µg/mL pro Extinktionseinheit berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

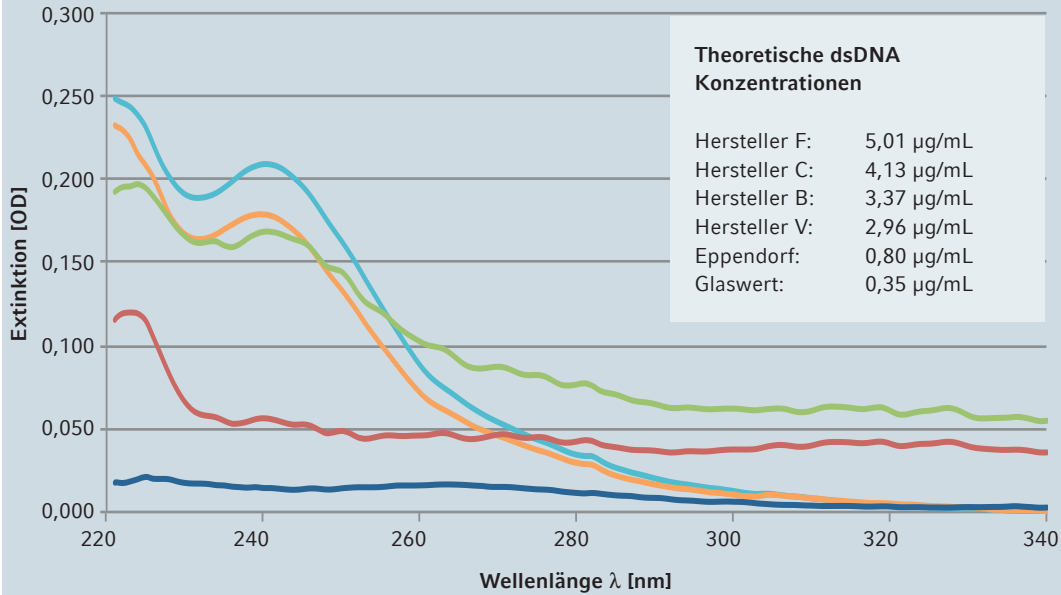
Abbildung 1 zeigt die Absorptionsspektren von Wasser, welches in verschiedenen Gefäßen bei 90 °C und Mischen bei 600 rpm für 30 min inkubiert wurde. Zusätzlich sind im eingefügten Kasten die Konzentrationen an dsDNA aufgeführt, die sich aus der Extinktion bei 260 nm theoretisch ergeben und damit fälschlicherweise als DNA interpretiert werden könnten. Eine Glaskontrolle wurde mit eingesetzt, da bei der zugrundeliegenden Versuchsanordnung keine signifikante Freisetzung UV-absorbierender Substanzen erfolgte [7].

Wie erwartet, sind auch hier mit dem Glasgefäß die niedrigsten Werte zu finden. Das Absorptionsspektrum von Wasser aus Eppendorf Gefäßen ist nur wenig höher als diese Kontrolle. Aus der Extinktion bei 260 nm ergibt sich eine theoretische Konzentration an dsDNA von 0,35 µg/mL für die Glaskontrolle und 0,81 µg/mL für die Eppendorf Tubes. Diese Werte befinden sich unterhalb der empfohlenen Messgrenze des BioSpectrometers mit einer Probenextinktion von 0,02–0,03 bzw. einer dsDNA Konzentration von 1,0–1,5 µg/mL [9]. Da Störgrößen wie Partikel, Trübungen oder Blasen in der Messlösung die Zuverlässigkeit des Ergebnisses bei sehr niedrigen Extinktionen stark beeinträchtigen, werden diese Daten als nicht aussagekräftig bezüglich des Herauslösen von Substanzen bewertet.

Signifikante Absorptionsspektren sind hingegen in allen Wasserproben erkennbar, die in den konischen 15 mL Gefäßen erhitzt wurden. Aus der Absorption bei 260 nm ergeben sich hier theoretische dsDNA Konzentrationen im Bereich von 2,31 µg/mL bis 5,01 µg/mL. Es wurde schon gezeigt, dass durch Methoden im Labor, bei denen die Proben temperatur erhöht wird (Inkubation, PCR, Zentrifugation, Ultraschallbehandlung), Stoffe aus dem Gefäßmaterial herausgelöst werden, die im UV-Bereich absorbieren [7, 8]. Das kann bei der photometrischen Analyse von Molekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen, die vor allem bei 260 nm und 280 nm durchgeführt werden, zu verfälschten höheren Messwerten führen. Bei niedrig konzentrierten Proben können diese Fehler nachfolgende Experimente beeinträchtigen. Zusätzliche Probleme kann die Variabilität des Fehlers bereiten. In Abbildung 2 ist ein Ausschnitt im Bereich von 230 nm bis 280 nm des gleichen Absorptionsscans dargestellt. Zusätzlich ist hier die Standardabweichung eingetragen. Die Werte aus den Wassermessungen der konischen 15 mL Gefäße zeigen deutliche Schwankungen, was darauf hinweist, dass sich die im Material enthaltenen Substanzen in unterschiedlichem Ausmaß herauslösen. So bleibt der Fehler nicht konstant bestehen, sondern variiert auch noch erheblich.

\* Die Einsatztemperatur der Eppendorf Tubes 5.0 mL liegt bei -86 °C bis 80 °C. Für die Inkubation bei 90 °C muss der Tube Clip 5.0 mL eingesetzt werden, um das Öffnen der Gefäße zu verhindern.

## Absorptionsscan von Wasser nach Inkubation bei 90 °C

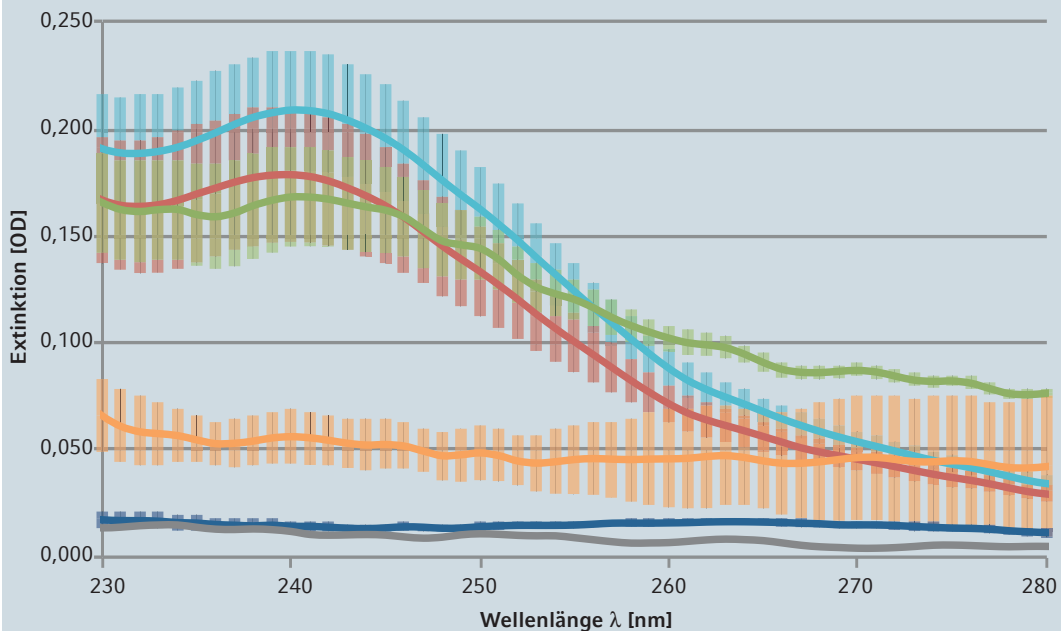


**Abbildung 1:**

Absorptionsspektren von Wasser nach Inkubation in Eppendorf Tubes 5.0 mL und konischen 15 mL Gefäßen anderer Hersteller bei 90 °C für 30 min.

- Hersteller C
- Hersteller B
- Hersteller F
- Hersteller V
- Eppendorf
- Glaswert

## Absorptionsscan von Wasser mit Standardabweichung



**Abbildung 2:**

Absorptionsspektren von Wasser mit der Standardabweichung im Bereich von 230 nm bis 280 nm.

- Hersteller C
- Hersteller B
- Hersteller F
- Hersteller V
- Eppendorf
- Glaswert

## Fazit

Die Daten dieser Application Note zeigen, dass sich unter Hitzeeinwirkung aus den getesteten konischen 15 mL Gefäßen UV-absorbierende Substanzen (Leachables) herauslösen, die entsprechende Analysen, wie die Quantifizierung von DNA, beeinträchtigen bzw. verfälschen können. Das neue Eppendorf Tube 5.0 mL zeigt nur eine minimal über der Kontrolle liegende Extinktion und stellt somit eine sehr gute Alternative für ein größervolumiges Gefäß dar, wenn

es darum geht, den Einfluss dieser Stoffe in sensitiven Methoden zu minimieren. Durch den zertifizierten Verzicht auf kritische Additive wie Gleitmittel, Biozide oder Weichmacher im Material und während der Produktion sind diese Gefäße für empfindliche Analysen sehr empfehlenswert. Das wurde auch schon für kleinere Tube-Formate von Eppendorf gezeigt [6, 7, 8].

## Literatur

- [1] Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009; 30:75–95.
- [2] Shotyk W, Krachler M, Chen B. Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. *J Environ Monit* 2006; 8:288–292.
- [3] McDonald GR, Hudson AL, Dunn SM, You H, Baker GB, Whittal RM, Martin JW, Jha A, Edmondson DE, Holt A., Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware. *Science* 2008; 322(5903):917.
- [4] Watson J, Greenough EB, Lett JE, Ford MJ, Drexler DM, Belcastro JV, Herbst JJ, Chatterjee M, Banks M. Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen* 2009; 14(5):566–572.
- [5] McDonald GR, Kozuska JL, Holt A. Bioactive Leachates from Lab Plastics. *G.I.T. Laboratory Journal Europe* 2009; 13:24–26.
- [6] Olivieri A, Degenhardt OS, McDonald GR, Narang D, Paulsen IM, Kozuska JL, Holt A, On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(6): 697–703
- [7] Lewis LK, Robson M, Vecherkina Y, Ji C, Beall G. Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes. *BioTechniques* 2010; 48(4) 297–302.
- [8] Application Note 235: Beeinflussung photometrischer Analysen durch aus Kunststoffgefäßen herausgelöste UV-absorbierende Substanzen (Leachables) ([www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de))
- [9] Bedienungsanleitung Eppendorf BioSpectrometer ([www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de))

**Bestellinformationen**

Bezeichnung	Bestell-Nr.
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf Quality, 200 Gefäße	0030 119.401
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 119.460
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Sterile, 200 Gefäße	0030 119.487
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf Biopur®, 50 Gefäße (einzeln verpackt)	0030 119.479
Eppendorf Protein LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 100 Gefäße	0030 108.302
Eppendorf DNA LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 108.310
Starter Pack Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 400 Gefäße, 2 Racks (je 16 Plätze), weiß, 8 Stück Universaladapter für Rotore mit Bohrung für 15 mL konische Gefäße	0030 119.380
Tube Clip 5.0 mL, 10 Stück, zur Fixierung des Deckels	0030 119.509
UVette®, Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, zertifiziert RNase-, DNA- und proteinfrei, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack, Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box, 200 Stück	0030 106.318
Eppendorf BioSpectrometer® basic, 230 V/50–60 Hz	6135 000.009

**Your local distributor: [www.eppendorf.com/contact](http://www.eppendorf.com/contact)**

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland · E-mail: [eppendorf@eppendorf.de](mailto:eppendorf@eppendorf.de) · [www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de)  
 Eppendorf Austria GmbH · 1210 Wien · Österreich · E-mail: [eppendorf@eppendorf.at](mailto:eppendorf@eppendorf.at) · [www.eppendorf.at](http://www.eppendorf.at)  
 Vaudaux-Eppendorf AG · Schweiz · E-mail: [vaudaux@vaudaux.ch](mailto:vaudaux@vaudaux.ch) · [www.eppendorf.ch](http://www.eppendorf.ch)

[www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

Eppendorf®, das Eppendorf Logo, Eppendorf Tubes®, Thermomixer®, Uvette®, Eppendorf Biopur® und Eppendorf BioSpectrometer® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG. Alle Rechte vorbehalten, inkl. Bilder und Grafiken. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.