

# Die Spitze des Eisbergs: Wie Pipettenspitzen das Versuchsergebnis beeinflussen. Teil 3: Nicht jede Spitze verträgt jede Behandlung

MURIEL ART, VINCENT DUFEY, ION GLIGOR, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES S.A., NAMUR, BELGIEN  
 ULRIKE GAST, LAURA KOCH, RONJA KUBASCH, EPPENDORF AG, HAMBURG

## Zusammenfassung

Die Pipettiergenauigkeit kann sich nach Autoklavieren von Pipettenspitzen einiger Hersteller verschlechtern. Für Pipettenspitzen von Eppendorf gilt das hingegen nicht. Wir beschreiben, welche Faktoren dazu führen, dass bei Eppendorf das Autoklavieren keinen negativen Einfluss nimmt und wie vermieden wird, dass „Leachables“ biologische Analysen stören. Ein MEA-Test (Mouse-Embryo Assay) beweist, dass sensible biologische Systeme durch Pipettenspitzen von Eppendorf nicht gestört werden.

## Einleitung

In den Teilen 1 und 2 dieser Serie (s. BioNews Nr. 44 und 45) haben wir gezeigt, dass Pipettenspitzen die Leistungsfähigkeit des Systems „Pipette und Spitze“ und damit auch das Pipettierergebnis beeinflussen. Es wurde beschrieben, dass dieser Einfluss vorrangig durch die Form und Produktionsqualität der Pipettenspitzen verursacht wird. Autoklavieren ist eine gängige Dekontaminationsmethode von Pipettenspitzen, stellt jedoch eine thermische Belastung dar. Es wurde deshalb mittels Kalibrierung geprüft, inwieweit das Autoklavieren Einfluss auf die Dosiergenauigkeit nimmt.

Seit einigen Jahren liefert die wissenschaftliche Literatur Hinweise, dass sogenannte Leachables, auch aus Pipettenspitzen, biologische Analysen beeinflussen [1, 2]. Beispiele sind enzymatische Bestimmungen, Photometrie und veränderte Wachstumsraten in der Zellkultur [3]. Eppendorf verwendet solche Additive nicht und belegt dies durch ein Zertifikat. Um einen experimentellen Beweis zu generieren, wurden Eppendorf-Spitzen mittels MEA bezüglich inhibitorischer Effekte auf die Entwicklung von Embryonen in frühen Stadien untersucht.

## Material und Methoden

Die Autoklavierung erfolgte gemäß Standardmethode [4]. Der Einfluss des Autoklavierens auf die Leistungsfähigkeit von Spitzen unterschiedlicher

Hersteller wurde mittels Kalibrierung mit Eppendorf Xplorer® Pipetten untersucht [4]. Der MEA-Test wurde von einem akkreditierten und FDA-registrierten Labor durchgeführt [4].

## Ergebnisse und Diskussion

Autoklavieren ist eine Standardmethode zur Dekontamination von Laborartikeln wie Pipettenspitzen. Entsprechend wird erwartet, dass es die Leistungsfähigkeit von Pipettenspitzen nicht beeinflusst. Abb. 1 zeigt jedoch, dass dies bei den Herstellern B, D, I sehr wohl der Fall war:

Zwar bestand vor dem Autoklavieren das System mit Spitzen dieser Hersteller noch die Kalibrierung. Nach dem Autoklavieren der Spitzen wurden jedoch die Fehlergrenzen für den systematischen Fehler bei 1 µL überschritten. Bei der Herstellung guter Spitzen wird der Einfluss des Autoklavierens bereits in der Konstruktionsphase berücksichtigt. Der Polypropylen-Typ (PP), die Form und die Oberflächenstruktur entscheiden, wie stark eine Spitze schrumpft und in welche Richtung dies geschieht.

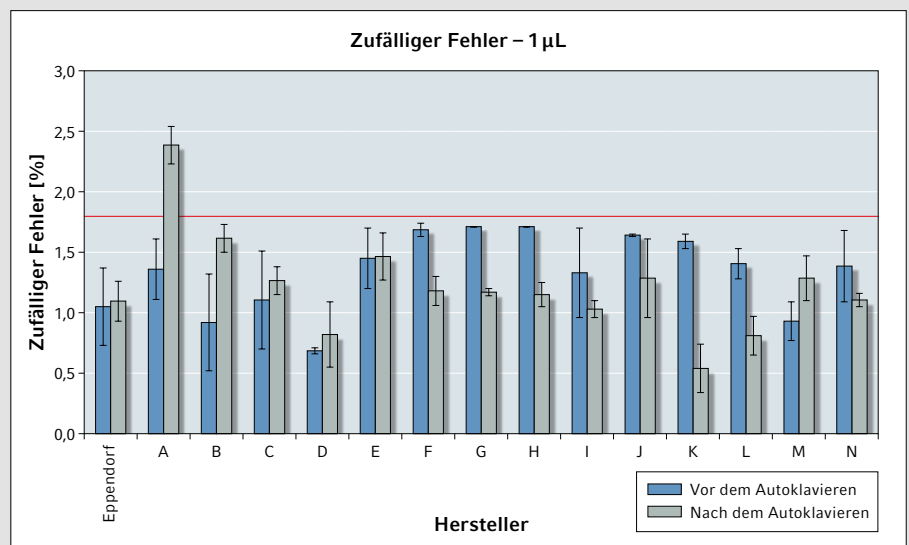
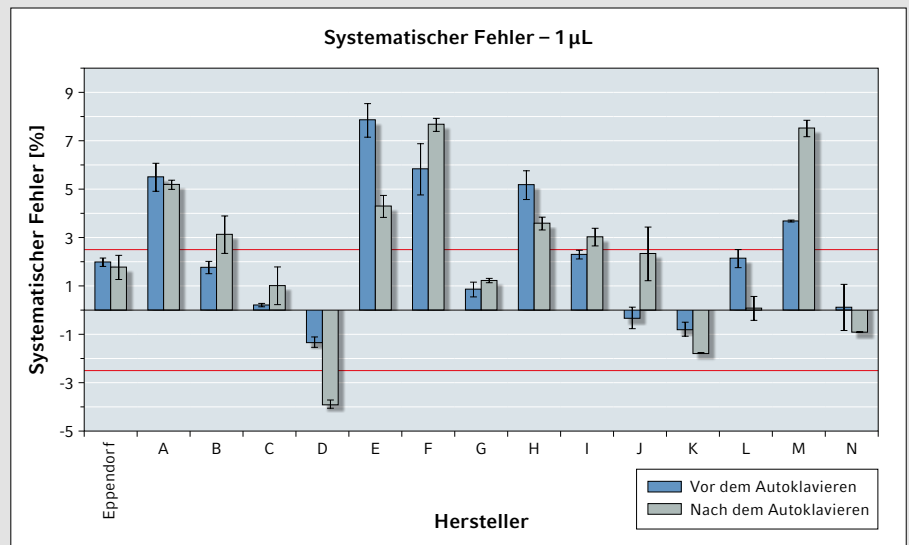


Abb. 1: Kalibrierergebnisse bei 1 µL mit nicht autoklavierten und autoklavierten 10 µL Spitzen. Die rote Linie weist jeweils die zulässigen Fehlergrenzen der Eppendorf Xplorer Pipette aus.

## Die Spitze des Eisbergs: Wie Pipettenspitzen das Versuchsergebnis beeinflussen. Teil 3: Nicht jede Spitze verträgt jede Behandlung

Ergebnisse für den MEA-Test mit Eppendorf-Spitzen			
Pipettenspitze	Extraktionsdauer		
	10 Pipettierungen	4 h ± 15 min	24 h ± 2 h
epT.I.P.S.® 2–200 µL Biopur® Batch-Nr. D158054Q	90 %	90 %	87 %
epT.I.P.S.® 50–1000 µL Biopur® Batch-Nr. D157726P	90 %	87 %	100 %

**Tabelle 1:** Ergebnisse des MEA-Tests mit epT.I.P.S. im Reinheitsgrad Biopur. Der Test ist bestanden, wenn Wachstum und Entwicklung mindestens 80% betragen.

Ein recyceltes Material enthält üblicherweise eine höhere Konzentration an Leachables, was die Produkteigenschaften verändert, so zum Beispiel das Schrumpfungsverhalten während des Autoklaviervorgangs. Aus diesen Gründen verwendet Eppendorf kein recyceltes Material, auch nicht von verworfenen Produkten.

Weiterhin verwendet Eppendorf Zusatzstoffe (Additive) nur mit größter Vorsicht. Generell benötigen Kunststoffe Additive, um zum Beispiel einer frühzeitigen Zersetzung vorzubeugen. Solche Additive sind unvermeidbar. Es gibt jedoch Additive wie Gleitmittel, Weichmacher und Biozide, die nur eingesetzt werden, um eine Produktion zu vereinfachen und damit schneller und billiger zu gestalten. Solche Additive sind vermeidbar – vorausgesetzt der Produzent verfügt über das entsprechende Know-how und erlaubt eine teurere Produktion.

Eppendorf-Pipettenspitzen werden aus hochreinem PP hergestellt. Das Material ist frei von Weichmachern, UV-Stabilisatoren, Latex, Antistatika, Gleitmitteln, Silikonen, Bisphenol A und Bioziden.

Embryonale Zellen sind sensitiv gegenüber beeinflussenden Molekülen wie Additiven im Kunststoff. Folglich sind sie ein guter Indikator für Toxizität durch Leachables. Wir haben keinen Einfluss durch Eppendorf-Pipettenspitzen auf das Wachstum von Embryos im 2-Zellstadium zu Blastozysten festgestellt (Tabelle 1).

### Fazit

Die Qualität der Produktion nimmt direkten Einfluss auf die Leistungsfähigkeit von Pipettenspitzen. Sie beginnt nicht erst mit der Verflüssigung des Kunststoffs, sondern bereits mit der Konstruktionsphase der Spitze. Es ist absolut notwendig, bereits dort nicht nur die Dosierung von Wasser, sondern verschiedene Verwendungszwecke und Methoden, wie zum Beispiel das Autoklavieren, zu berücksichtigen.

Der internationale Standard ISO 8655 [1] fordert eine Kalibrierung des Systems Pipette plus Tip, wenn Spitzen alternativer Hersteller verwendet werden. Ausgehend von unseren Ergebnissen empfehlen wir Laboratorien, die alternative Pipettenspitzen verwenden, auch mit autoklavierten Spitzen zu kalibrieren. Bei Eppendorf-Spitzen wurden keine negativen Einflüsse des Autoklavierens auf das Dosierergebnis festgestellt. Es ist keine zusätzliche Kalibrierung notwendig.

Ob Pipettenspitzen „leachen“, hängt vom Know-how des Produzenten und dessen Willen ab, die Produktionskosten nicht auf Kosten der Produkteigenschaften zu minimieren.



Eppendorf weist in einem Zertifikat aus, keine störenden Additive zu verwenden. Mit Recht: Es wurde gezeigt, dass die geprüften epT.I.P.S. ein empfindliches biologisches System nicht beeinflussen.

Im vierten und letzten Teil dieser Serie (BioNews Nr. 47) wird der Einfluss des Spitzenwechsels auf das Dosierergebnis beschrieben.

### Literatur

- [1] 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
- [2] Watson J, Greenough EB, Leet JE, Ford MJ, Drexler DM, Becastro 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):566-72
- [3] Grzeskowiak R, Gerke N: Eppendorf White Paper 26: Minimizing the influence of plastic consumables on the laboratory workflows. [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)
- [4] Art M, Dufey V, Gast U, Gligor I, Koch L, Kubasch R: Application Note 354: The Tip of the Iceberg: How Pipette Tips Influence Results. [www.eppendorf.com/appnote354](http://www.eppendorf.com/appnote354)
- [5] DIN EN ISO 8655:2002. Piston-operated volumetric apparatus. Beuth-Verlag, Berlin, Germany