



Dissertation

Titel der wissenschaftlichen Arbeit

„Entwicklung einer immunanalytischen Methode für
die Probenvorbereitung von Deoxynivalenol und
Zearalenon in Lebens- und Futtermitteln“

Verfasserin

Mag. rer. nat. Christina Böhm

Angestrebter akademischer Titel

Doktorin der Naturwissenschaften

Wien, Juli 2009

Matrikelnummer: 9947042

Studienkennzahl: 474

Dissertationsgebiet: Lebensmittelchemie

Betreuer: Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag

Studienrichtung: Ernährungswissenschaften

Danksagung

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl und Univ. Prof. Gerhard Sontag für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei wissenschaftlichen Problemen.

Bedanken möchte ich mich auch bei O. Univ. Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa und dem Institut für Ernährungswissenschaften für die Zulassung zu meinem Doktoratsstudium.

Dem österreichischen Fond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung FWF möchte ich für die finanzielle Unterstützung (FWF Projekt L98-N19) danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mich während der ganzen Ausbildungszeit unterstützt und gefördert haben.

Weiters danke ich meinem Freund, der mir während meines Doktoratsstudiums unterstützend zur Seite stand.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden, die mich auf meinem Weg begleitet haben, recht herzlich für die Unterstützung bedanken.

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode (IUF) für die Probenvorbereitung der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in diversen Matrices beschrieben. Das entwickelte Verfahren vereint die spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen mit der Methode der Ultrafiltration. Im Gegensatz zu konventionellen Probenvorbereitungsmethoden für Mykotoxine werden bei der IUF die Antikörper nicht immobilisiert, sondern direkt dem Probenextrakt zugesetzt.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Produktion polyklonaler Antikörper gegen DON und ZON in Kaninchen. Die Tiere wurden in bestimmten Zeitabständen immunisiert. Nach ein paar Tagen wurde den Tieren Blut entnommen, um den Fortschritt der Immunisierung zu beobachten. Trotz wiederholter Immunisierung zeigte das Blut der Tiere nur einen geringen Anstieg der Konzentration der DON- bzw. ZON-Antikörper. Deshalb wurden zusätzlich Hühner gegen DON und ZON immunisiert. Im Gegensatz zu den Kaninchen wurde hier nicht das Blut der Tiere für die Bestimmung des Antikörpertiters herangezogen, sondern das Eigelb. Auch hier konnte nach wiederholter Immunisierung der Tiere mit den Antigenen kein erhöhter Antikörperspiegel erzeugt werden. Da die Antikörperproduktion sowohl in den Kaninchen als auch in den Hühnern nicht funktioniert hat, wurde für die Entwicklung der IUF ein monoklonaler Antikörper herangezogen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und anschließenden Optimierung einer IUF-Methode für den Nachweis von DON und ZON. Zuerst wurden alle Parameter hinsichtlich größtmöglicher Sensitivität im Standardversuch optimiert. Nach erfolgreichem Abschluss der Standardversuche wurden Untersuchungen mit realen Proben unternommen. Die abschließenden Validierungen der IUF wurden für DON mit einem zertifizierten Referenzmaterial (Maisemehl), und für ZON durch Zusatz des Analyten zu ZON-freiem Weizenmehl durchgeführt. Die Wiederfindungen für DON lagen bei 93% für eine Konzentration von $474 \pm 30 \mu\text{g/kg}$. Für ZON lagen die Wiederfindungen zwischen 86 und 100 % für einen Arbeitsbereich von 25 bis $400 \mu\text{g/kg}$. Die Ergebnisse der Validierung zeigten, dass die IUF den Anforderungen an eine Analysenmethode in der EU entspricht [EG Nr. 2005/38].

Abstract

In this work a method for the sample preparation for the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in various matrices was developed utilizing immunoultrafiltration (IUF). This procedure is based on the specificity of the antigen-antibody interaction and ultrafiltration. Contrary to the conventional sample preparation method for mycotoxins the antibodies are not immobilized.

The first part of this work describes the polyclonal antibody production for DON and ZON in rabbits. After predefined intervals the rabbits were immunized and their blood was analyzed to scan the progress of the immunization procedure. Although the immunization was repeated the analysis of the blood showed only a marginal rise of the DON- and ZON-antibody concentration. For this reason chicken were immunized for DON and ZON. Contrary to the determination of antibodies in rabbits not the blood of the chicken is analyzed but the egg yolk. Analyzing the yolk no significant rise of the antibody concentration was observed. Since the antibody production in rabbits and chicken failed, monoclonal antibodies were utilized for the method development of the IUF.

The second part of the work describes the development and subsequent parameter optimization for the sensitive detection of DON and ZON. The method validation for DON was processed applying certified reference material (maize meal). The method validation for ZON was carried out by adding ZON to ZON-free matrix.

The recovery rate for DON was 93% for a concentration of 474 ± 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. For ZON the recovery rates ranged between 86 and 100% for a working range between 25 to 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

The results of the method validation demonstrate that the IUF-method performs the requirements of an analytical method in the EU [EG Nr. 2005/38].

Abkürzungen

15-ADON	15-Acetyl-deoxynivalenol
3-ADON	3-Acetyl-deoxynivalenol
ACN	Acetonitril
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
a_w	Wasseraktivität
CAS	Chemical Abstracts Service
DAS	4,15-Diacetoxyscirpenol
DON	Deoxynivalenol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU	Europäische Union
F_{ab}	Fragment Antigen bindend
F_c	Fragment crystalline
FCA	komplettes Freundsches Adjuvans
FIA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
FLD	Fluoreszenzdetektor
GC-ECD	Gas Chromatography – Electron Capture Detector
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-FLD	High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence Detector
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet Detector
HRP	Horse Radish Peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IAS	Immunaффinitätssäulchen
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IgY	Immunglobulin Y
IUF	Immunultrafiltration
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilodalton
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LTE	Leukotrien
mAk	monoklonaler Antikörper
MAS	15-Monoacetoxy-scirpenol
MS	Massenspektrometer
OTA	Ochratoxin A
PEG	Polyethylenglycol
SCF	Scientific Committee on Food
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
Sp.	Species
TDI	tolerierbare tägliche Aufnahme
UV	ultravioletter Bereich des Lichts
VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
ZON	Zearalenon
α -ZOL	α -Zearalenol

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>EINLEITUNG</i>	9
1.1	Schimmelpilze	9
1.2	Feldpilze	9
1.2.1	Fusarien sp.	9
1.2.1.1	Trichothecene.....	10
1.2.1.2	Typ A-Trichothecene	12
1.2.1.3	Typ B-Trichothecene	12
1.2.1.3.1	Deoxynivalenol (DON)	13
1.2.1.3.2	Chemische und physikalische Eigenschaften von DON.....	13
1.2.1.3.3	Wirkungsweise von DON.....	14
1.2.1.4	Zearalenon (ZON).....	15
1.2.1.4.1	Chemische und physikalische Eigenschaften	15
1.2.1.4.2	Wirkungsweise von ZON	16
1.2.2	Claviceps sp.	17
1.2.2.1	Mutterkornalkaloide.....	17
1.3	Lagerpilze	18
1.3.1	Aspergillus sp.....	18
1.3.1.1	Aflatoxine	18
1.3.2	Aspergillus sp. und Penicillium sp.....	19
1.3.2.1	Ochratoxin A.....	19
2	<i>ZIELSETZUNG</i>	21
3	<i>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</i>	22
3.4	Immunanalytik	22
3.4.1	Antigen.....	22
3.4.2	Adjuvanzien	22
3.4.3	Antikörper	23
3.4.4	Antikörperklassen	24
3.4.5	Produktion von polyklonalen Antikörpern.....	25
3.4.6	Produktion von IgY.....	25
3.4.7	Produktion monoklonaler Antikörper	26
3.4.8	Titerbestimmung	27
3.4.9	Isolierung und Reinigung der Antikörper	28
3.4.10	Reinigung polyklonaler und monoklonaler Säugerantikörper.....	28
3.5	Photometrie	29
3.5.1	Spektralphotometrische Proteinbestimmung.....	31
3.6	Chromatographische Methoden	32
3.6.1	Reversed-Phase Chromatographie (Umkehrphasenchromatographie).....	36
3.6.2	Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur	37
3.6.2.1	Detektoren.....	37
3.6.2.2	UV-Detektor	38
3.6.2.3	Fluoreszenzdetektor	39
4	<i>PROBENVORBEREITUNG</i>	40
4.1	Ultrafiltration	42
4.2	Immunultrafiltration	42
5	<i>BISHER IN DER LITERATUR ERWÄHNT E IMMUNULTRAFILTRATIONS-METHODEN</i>	44
6	<i>EXPERIMENTELLER TEIL</i>	46
6.1	Produktion von polyklonalen IgG in Kaninchen	46

6.1.1	Immunogenherstellung.....	46
6.1.2	Immunsierung der Kaninchen	47
6.1.3	Titerbestimmung des Kaninchenserums	47
6.1.4	Ermittlung der Bindungskapazität des Kaninchenserums	49
6.1.5	Isolierung der IgG mit einer Protein A Säule.....	49
6.1.6	Isolierung der IgG aus Kaninchenserum mittels Caprylsäure-/Ammonium-sulfatfällung	50
6.1.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten IgG.....	51
6.2	Erzeugung polyklonaler IgY in Hühnern	52
6.2.1	Immunogenherstellung.....	52
6.2.2	Immunsierung der Hühner	52
6.2.3	IgY – Isolierung aus dem Eidotter	53
6.2.4	Titerbestimmung von Hühnereiern	53
6.3	Chromatographische Bestimmung von DON mittels HPLC-UV	55
6.3.1	Chromatographische Bedingungen	55
6.3.2	Herstellen einer DON – Standardlösung aus einem Lyophilisat	56
6.3.3	Erstellen einer Kalibrationsgeraden für DON mit beiden HPLC-Systemen	57
6.4	Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von DON.....	58
6.4.1	Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit (IUF) und Untersuchung der Beständigkeit	58
6.4.2	Untersuchung der Membranadsorption.....	59
6.4.3	Testen des “Cut-offs“	59
6.4.4	Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers	60
6.4.5	Optimierung der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur.....	61
6.4.6	Wahl des Elutionsmittels.....	61
6.4.7	Optimierung des Elutionsvolumens	62
6.4.8	Testen der Methode unter optimierten Bedingungen auf deren Reproduzierbarkeit.....	62
6.4.9	Anwendung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von DON in Mais	63
6.4.9.1	Extraktion.....	63
6.4.9.2	Probenaufarbeitung und Bestimmung.....	63
6.4.9.3	Vergleich der Probenaufarbeitung mittels Immunaffinitätschromatographie und Immunultrafiltration	64
6.4.9.4	Validierung der IUF-HPLC-UV-Methode mittels eines Mais-Referenzmaterials.....	65
6.5	Chromatographische Bestimmung von ZON mittels HPLC-FLD	66
6.5.1	Chromatographische Bedingungen	66
6.5.2	Erstellen einer Kalibration für das HPLC-System	67
6.5.3	Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung	67
6.5.3.1	Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit	67
6.5.3.2	Untersuchung der Membranadsorption.....	67
6.5.3.3	Adsorptionsverhalten von ZON an diversen Materialien der Auffanggefäße.....	68
6.5.3.4	Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die unspezifische Membranadsorption....	68
6.5.3.5	Bestimmung der Bindungskapazität der monoklonalen Antikörper	69
6.5.3.6	Inkubationsversuche mit mAk ₁ und Guanidinhydrochlorid.....	69
6.5.4	Anwendung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von ZON aus Mais	70
6.5.4.1	Extraktion.....	70
6.5.4.2	Probenaufarbeitung und Bestimmung.....	70
6.5.5	Anwendung der Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von ZON in Weizen	71
6.5.5.1	Extraktion.....	71
6.5.5.2	Optimierung der Inkubationszeit von mAk ₂	71
6.5.5.3	Testen der Immunultrafiltrationsmethode mit mAk ₁	72
6.5.5.4	Testen der Immunultrafiltrationsmethode mit mAk ₂ und einer Weizenprobe	73
6.5.5.5	Analyse des natürlich kontaminierten Weizens	74
6.5.5.6	Validierung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für Weizenmehl.....	75
7	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	77
7.1	Produktion polyklonaler Antikörper	77
7.1.1	Titerbestimmung der DON-Antikörper in den Kaninchenserum	77

7.1.2	Titerbestimmung der ZON-Antikörper der Kaninchenserum.....	78
7.1.3	Bindung von DON an Antikörper	79
7.1.4	Isolierung der IgG mittels Protein A Säule	80
7.1.5	Isolierung der IgG aus den Kaninchenserum mittels Caprylsäure/Ammonium-sulfatfällung ..	81
7.1.6	Titerbestimmung der anti-DON-IgY im Dotter	82
7.1.7	Titerbestimmung der anti-ZON-IgY im Dotter	83
7.2	Bestimmung von DON mittels HPLC-UV	84
7.2.1	Erstellen von Kalibrationsgeraden mit beiden HPLC-Systemen.....	84
7.3	Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode.....	86
7.3.1	Probenvorbereitung zur Analyse von DON	86
7.3.1.1	Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit	86
7.3.1.2	Untersuchung der Beständigkeit der Immunultrafiltrationseinheiten gegenüber organischen Lösungsmitteln.....	86
7.3.1.3	Unspezifische Membranadsorption.....	87
7.3.1.4	Testen des “Cut-offs“	88
7.3.1.5	Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers	88
7.3.1.6	Optimierung der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur.....	89
7.3.1.7	Wahl des Elutionsmittels und Ermittlung des Elutionsvolumens	90
7.3.1.8	Reproduzierbarkeit der IUF-Methode im Standardversuch	90
7.4	Analyse von DON in Mais	91
7.4.1	Gespikter Maisextrakt	91
7.4.2	Natürlich kontaminierter Mais	91
7.4.3	Validierung der IUF-HPLC-UV-Methode mittels eines Mais-Referenzmaterials	93
7.5	Bestimmung von ZON mittels HPLC-FLD	96
7.5.1	Erstellen von Kalibrationsgeraden mit den HPLC-Systemen	96
7.6	Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode.....	98
7.6.1	Unspezifische Membranadsorption.....	98
7.6.2	Verringerung der unspezifischen Membranadsorption	98
7.6.3	Adsorptionsverhalten von ZON an diversen Materialien.....	100
7.6.4	Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers	100
7.6.5	Elutionsversuche mit mAk ₁ und Guanidinhydrochlorid	101
7.7	Analyse von ZON	102
7.7.1	Mais.....	102
7.7.2	Weizen	104
7.7.2.1	Optimierung der Inkubationszeit.....	104
7.7.2.2	Vergleich der Immunultrafiltrationsmethode bei Verwendung von mAk ₁ und mAk ₂	104
7.7.2.3	Kontaminierter Weizen	105
7.7.2.4	Validierung der IUF-HPLC-FLD-Methode mit Weizenmehl und mAk ₂	106
8	RESÜMEE	109
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	112
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	113
11	ANHANG.....	114
12	LITERATURVERZEICHNIS	118

1 EINLEITUNG

1.1 Schimmelpilze

Schimmelpilze leben aerob, besitzen kein Chlorophyll und sind somit nicht zur Photosynthese fähig. Zur Deckung ihres Kohlenstoff- und Energiebedarfs benötigen sie organische Verbindungen, die sie ihrer Umwelt entziehen. Die meisten Schimmelpilze gedeihen saprophytisch oder parasitär, d.h. sie leben sowohl von abgestorbenen wie auch von lebenden Organismen [Mücke W., Lemmen Ch.].

Im Laufe ihres Wachstums produzieren viele Schimmelpilze sogenannte Mykotoxine.

Dabei handelt es sich um giftige Substanzen, die während der Metabolisierung der Substrate sekundär gebildet und an die Umgebung abgegeben werden. Zumeist werden Mykotoxine von Vertretern der Deuteromyceten (Fungi imperfecti) und der Ascomyceten (Schlauchpilze) gebildet [Mücke W., Lemmen Ch.].

Mykotoxine haben nicht nur eine geradezu faszinierende Vielfalt von chemischen Strukturen, sondern auch außerordentlich unterschiedliche Wirkungen auf den menschlichen und tierischen Organismus. Die bedeutendsten Toxinbildner befinden sich unter den Aspergillen, Claviceps, Penicillien und den Fusarien. Damit Schimmelpilze wachsen und Mykotoxine produziert werden, bedarf es zwei wesentlicher Faktoren, nämlich einer bestimmten Temperatur und Feuchtigkeit. Auf Grund dieser Faktoren wurde von Christensen eine Unterteilung der Mykotoxinproduzenten in zwei Gruppen vorgenommen, den Feld- und den Lagerpilzen [Council for Agricultural Science and Technology]. Zu den Feldpilzen gehören die Vertreter der Gruppe der Fusarien und Claviceps. Aspergillen und Penicillien entstehen während der Lagerung [Council for Agricultural Science and Technology].

1.2 Feldpilze

1.2.1 Fusarien sp.

Die Art *Fusarium* zählt zu den größten und komplexesten Arten. Dieser Genus ist auf der ganzen Welt zu finden. Die Sporen des pathogenen Erregers kommen häufig auf landwirtschaftlichen Nutzflächen und als Saprophyt auf Kulturpflanzen vor. Als Pflanzenschädling befällt er vor allem die Ähren verschiedener Getreidearten z.B. Weizen und Mais, und verursacht große Ernteeinbußen. Diese Ährenfusariose ist eine weltweit auftretende Krankheit des Getreides, die während der Blütezeit entsteht. Das

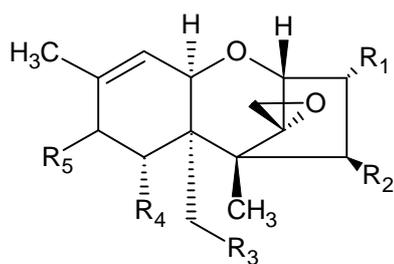
erste sichtbare Symptom dieser Pilzinfektion ist das Ausbleichen einzelner Ährchen oder ganzer Ährenstufen. Es entstehen Kümmerkörner oder die Kornbildung unterbleibt ganz, obwohl ausgebleichene Ährchen nicht infiziert sein müssen. Später folgt dann die Bildung von rosa- bis rotfarbenen Deckspelzen und bei verstärktem Pilzbefall kann es zu einer Schwarzfärbung der Körner kommen [Sutton, J.C.].

Wird das Anbaugelände über längere Zeit nicht bewirtschaftet, überleben die Sporen geraume Zeit in Form von eingedickten Hyphen auf organischen Überresten im Boden. Auf Grund dieser Eigenschaft überstehen sie auch mehrere Monate ohne den Anbau diverser Kulturpflanzen. Beim nächsten Anbau von Getreide können die Sporen erneut wachsen und sich vermehren. Deshalb wurde die Verbreitung der *Fusarium* sp. in Zusammenhang mit diversen Pflanzen beobachtet [Esser K., Bennett J.W.].

1.2.1.1 Trichothecene

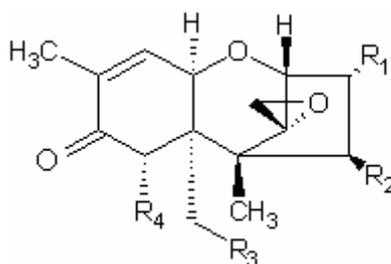
Die am weitesten verbreitete Gruppe der Fusarientoxine sind die Trichothecene. Sie kommen häufig in der moderaten Klimazone der nördlichen Hemisphäre vor. Es existieren rund 150 verschiedene Trichothecene mit einer sesquiterpenoiden Struktur. Alle besitzen den für die Toxizität verantwortlichen Epoxyring. Man kann die Trichothecene in vier Gruppen (A-D) unterteilen. Typ A-Trichothecene besitzen keine Carbonylgruppe an der Position C-8, während die B-Trichothecene eine besitzen. Die Gruppe der Typ C-Trichothecene besitzt einen zweiten Epoxyring und die D-Trichothecene haben eine makrozyklische Struktur. Typ A- und B- sind weit verbreitet, wogegen die Typ C- und D-Trichothecene zwar eine höhere Toxizität besitzen, aber nur selten vorkommen [Krska R., Baumgartner S., Josephs R.].

Meist ist eine Kontamination mit Fusarientoxinen unumgänglich, da Fusarien im Erdreich natürlich vorkommen [Edwards S.G.].



A-Trichothecene

	MG	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Neosolaniol	382	OH	OAc	OAc	H	OH
HT-2 Toxin	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Toxin	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Triol	382	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Tetraol	298	OH	OH	OH	H	OH
Scirpentriol	282	OH	OH	OH	H	H
15-Monoacetoxy-scirpenol (MAS)	324	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxyscirpenol (DAS)	366	OH	OAc	OAc	H	H



B-Trichothecene

	MG	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxynivalenol	294	OH	H	OH	OH
3-Acetyl-DON	338	OAc	H	OH	OH
15-Acetyl-DON	338	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH
Fusarenon-X	354	OH	OAc	OH	OH

1.2.1.2 Typ A-Trichothecene

Die wichtigsten Vertreter der Typ A-Trichothecene sind das T-2 Toxin und das HT-2 Toxin, weiters zählen noch das T-2 Triol, T-2 Tetraol, Diacetoxyscirpenol, Monoacetoxyscirpenol, Scirpentriol und Neosolaniol zu dieser Gruppe [Langseth W., Rundberget T.]. Die Produzenten der Typ A-Trichothecene sind *F. equiseti*, *F. poae* und *F. sporotrichoides*, welche hauptsächlich in Mais, Hafer, Gerste und Weizen vorkommen. Im Vergleich zu den anderen Trichothecenen besitzt das T-2 Toxin die höchste Toxizität. Sein LD₅₀-Wert bei oraler Aufnahme, getestet an Ratten und Schweinen, liegt zwischen 4 und 7 mg/kg Körpergewicht. Im Vergleich zu anderen Mykotoxinen wie z.B. Aflatoxin B₁ (5 mg/kg Körpergewicht, oral) und Deoxynivalenol (46 mg/kg Körpergewicht, oral) besitzt es eine relativ hohe akute Toxizität [Josephs R.D., Derbyshire M., Stroka J., Emons H., Anklam E.].

Die Typ A-Trichothecene sind auf Grund ihrer fehlenden Ketogruppe auf der Position C-8 weniger polar als die B-Trichothecene. Weiters fehlen ihnen die Chromophore, um sie mittels UV-VIS Spektroskopie detektieren zu können. Deshalb müssen sie vor der Analyse mittels HPLC derivatisiert (z.B. p-Nitrobenzoylchlorid) werden. Für die Analyse von Typ A-Trichothecenen wird überwiegend GC-ECD, GC-MS oder HPLC-MS verwendet [Berthiller F., Schuhmacher R., Buttinger G., Krska R.]. Eine sehr sensitive und selektive Methode zur Bestimmung von A-Trichothecenen stellt der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) dar, seine Spezifität beruht auf der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper [Krska R., Baumgartner S., Josephs R.].

1.2.1.3 Typ B-Trichothecene

Zur Gruppe der B-Trichothecene zählen das Deoxynivalenol, 3-Acetyl-deoxynivalenol (3-ADON), 15-Acetyl-deoxynivalenol (15-ADON), Nivalenol und Fusarenon X. Den am häufigsten vorkommenden Vertreter stellt jedoch das Deoxynivalenol (DON) dar. Die B-Trichothecene haben auf der Position C₈ eine Carbonylgruppe, welche für die Absorption von Licht im niedrigen UV-Bereich verantwortlich ist [Krska R., Baumgartner S., Josephs R.].

1.2.1.3.1 Deoxynivalenol (DON)

DON wird von *F. graminearum* und *F. culmorum* gebildet und kommt hauptsächlich in den gemäßigten Breiten von Europa und den USA vor [Magan N.]. Man findet es großteils in Mais, Weizen und Gerste, weniger häufig jedoch in Hafer, Reis, Roggen, Hirse und Triticale. Ein Mykotoxin, das sehr häufig mit DON gemeinsam in Produkten wie Mais, Gerste und Weizen gefunden wird, ist Zearalenon (ZON), da beide von denselben Fusarien Stämmen (*F. graminearum* und *F. culmorum*) gebildet werden. *F. graminearum* und *F. culmorum* sind sehr bekannte Pflanzenpathogene, die Ährenfusariose in Weizen und in Mais eine Kolbenfusariose hervorrufen. In beiden Fällen kommt es zu einem Absterben der gesunden Körner, indem sie zu faulen beginnen [Papst C., Zellner J., Ventaratnam S., Eder J.]. Das Auftreten dieser Erkrankungen steht im engen Zusammenhang mit der hohen Luftfeuchtigkeit während der Blütezeit. Meist kommt es bei Temperaturen um die 25°C und bei einer Wasseraktivität (a_w) von größer 0,88 zu einem vermehrten Wachstum von *F. graminearum*, wohingegen *F. culmorum* bei 21°C und einem a_w Wert von größer 0,87 einen deutlichen Wachstumsschub erfährt [Magan N.].

1.2.1.3.2 Chemische und physikalische Eigenschaften von DON

DON ist ein tetrazyklisches Sesquiterpen, das einen Epoxydring auf der Position 12 besitzt. Es ist ein farbloses, kristallines Molekül, dessen Schmelzpunkt bei 153°C liegt. Es löst sich in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln [Krska R., Szente E.].

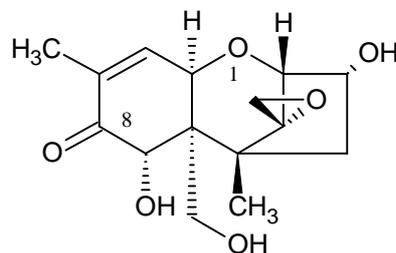


Abbildung 1: Strukturformel von Deoxynivalenol

Formel: $C_{15}H_{20}O_6$

Molekulargewicht: 296,32 g/mol

IUPAC-Name: 12,13-epoxy-3 α , 7 α , 15-trihydroxytrichothec-9-en-8-one

CAS: 51481-10-8

1.2.1.3.3 Wirkungsweise von DON

DON wird auf Grund seiner toxischen Wirkung bei Versuchstieren auch Vomitoxin genannt. Auf der zellulären Ebene verhindert DON die Proteinsynthese im Ribosom. Es bindet an die 60 S Untereinheit des Ribosoms und beeinträchtigt die Aktivität der Peptidyltransferase, weiters besitzt es zytotoxische Effekte [Rotter B., Perlusky D.B., Pestka J.J.]. Besonders sensitiv reagieren Monogastrier (z.B. Schweine) auf mit DON kontaminiertes Futter [Rotter B., Perlusky D.B., Pestka J.J.]. Symptome einer Vergiftung (Gewichtsverlust und Erbrechen des Futters) wurden bei Schweinen beobachtet und dokumentiert. Auf Grund des Erbrechens wird vermutet, dass es zu Interaktionen mit den serotonergen und dopaminergen Rezeptoren im Bereich der Area postrema kommt [Fioramonti J., Dupuy C., Dupuy J., Bueno L.].

Wiederkäuer sind relativ unempfindlich gegen DON, da sie Mikroorganismen besitzen, die DON zu dem unschädlichen Produkt De-epoxy-DON metabolisieren können [Rotter B., Perlusky D.B., Pestka J.J.].

Auf Grund der toxischen Effekte von DON wurden Höchstgehalte für Deoxynivalenol [Tab. 1] in Lebensmitteln festgelegt. Weiters hat das Scientific Committee on Food (SCF) einen Wert für die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) von DON erstellt (1µg/kg Körpergewicht/Tag) [EG Nr. 856/2005].

Produkt	Höchstgehalt [µg/kg]
Andere unverarbeitete Getreide als Hartweizen, Hafer und Mais	1250
Unverarbeiteter Hartweizen und Hafer	1750
Unverarbeiteter Mais	1750
Getreidemehl, einschließlich Maismehl, Maisgrütze und Maisschrot	750
Brot, feine Backwaren, Kekse, Getreidesnacks und Frühstückscerealien	500
Teigwaren (trocken)	750
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	200

Tabelle 1: Höchstmengenangaben für DON in Lebensmitteln [EG Nr. 1126/2007]

1.2.1.4 Zearalenon (ZON)

Zearalenon ist ein östrogenwirksames, nichtsteroidales Mykotoxin, das von verschiedenen Vertretern der Gattung *Fusarium*, hauptsächlich von *F. graminearum* und *F. culmorum*, gebildet wird [SCF].

ZON tritt in den gemäßigten Klimaregionen von Amerika, Europa und Asien auf und kommt gemeinsam mit anderen Trichothecenen in diversen Getreidearten vor [Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J.]. ZON tritt besonders bei niedrigen Temperaturen und einem hohen Feuchtigkeitsanteil vermehrt in Maiskulturen auf [Martins M.L., Martins H.M.].

1.2.1.4.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Zearalenon ist ein nichtsteroidales Makrolid der Resorcylsäure. Es ist ein weißes, kristallines Pulver, dessen Schmelzpunkt bei 164-165°C liegt. ZON ist ein apolares Molekül, das sich in wässrigen alkalischen Lösungen und organischen Lösungsmitteln löst. Es ist sowohl während der Lagerung als auch während der Verarbeitung stabil, und hält hohen Temperaturen stand [The Merck Index].

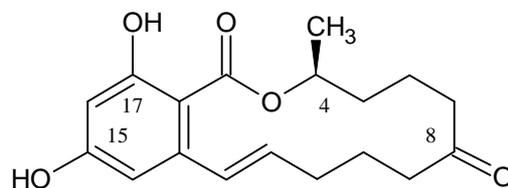


Abbildung 2: Strukturformel von Zearalenon

Formel: $C_{18}H_{22}O_5$

Molekulargewicht: 318,36 g/mol

IUPAC-Name: [S-(E)]-3,4,5,6,9,10-Hexahydro-14,16-dihydroxy-3-methyl-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)-dion

CAS: 17924-92-4

1.2.1.4.2 Wirkungsweise von ZON

Unter den verschiedenen ZON-Derivaten, die von *Fusarium* sp. produziert (α -Zearalenol (α -ZOL), β -Zearalenol, α -Zearalanol, β -Zearalanol, und Zearalanon) werden, konnten nur ZON und α -ZOL in natürlich kontaminierten Getreide und Futtermitteln detektiert werden [Urraca J.L., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C.].

ZON und die Metabolite α - und β -Zearalenol können durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum körpereigenen Östradiol an den Östrogenrezeptor binden [Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Dell'Aquila M.E., Minoia P., Visconti A.]. Die Bindungsaffinität von α -ZOL ist 3-4 Mal so hoch wie für ZON [De Saeger S., Sibanda L., Van Peteghem C.].

Auf Grund der östrogenen Wirkung in Säugern beeinträchtigt ZON die Empfängnis, die Ovulation, die fötale Entwicklung und die Überlebenschancen von Neugeborenen. Weiters bewirkt es eine Veränderung der Fortpflanzungsorgane von Nutz- und Versuchstieren [Fink-Gremmels J., Malekinejad H.].

Besonders in weiblichen Säugern kommt es zu Symptomen, wie Entzündung der Vulva, Vergrößerung der sekundären Geschlechtsmerkmale, zu einem Prolaps des Rektums und der Vagina, Vergrößerung des Uterus, pathologischen Veränderungen der Eierstöcke und Verlust des Appetits [Čonková E., Laciaková A., Kováč G., Seidel H.].

Bei Ebern kann ZON zu einer Atrophie der Hoden und infolge dessen zur Verweiblichung führen [Martins M.L., Martins H.M.].

ZON wurde von der IARC als nicht karzinogen für Menschen eingestuft [IARC].

Auf Grund der östrogenen Wirkung wurde von der EU sowohl ein TDI von 0,2 μ g/kg Körpergewicht/Tag [Tab. 2], als auch eine Verordnung für die zulässigen Höchstmengen von ZON in Lebensmitteln erlassen [EG Nr. 1126/2007].

Produkt	Höchstgehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Raffiniertes Maisöl	400
Unverarbeiteter Mais außer solchem, der zur Verarbeitung durch Nassmahlen bestimmt ist	350
Für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmter Mais, Snacks und Frühstückscerealien auf Maisbasis	100
Unverarbeitetes Getreide außer Mais	100
zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide, Getreidemehl	75
Brot (einschließlich Kleingebäck), feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückscerealien, außer Mais-Snacks und Frühstückscerealien auf Maisbasis	50
Getreidebeikost (außer Getreidebeikost auf Maisbasis) und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	20
Verarbeitete Lebensmittel auf Maisbasis für Säuglinge und Kleinkinder	20

Tabelle 2: Höchstmengenangaben für ZON in Lebensmitteln [EG Nr. 1126/2007]

1.2.2 *Claviceps sp.*

1.2.2.1 Mutterkornalkaloide

Mutterkorn bzw. die darin enthaltenen Alkaloide (Ergot- oder Mutterkornalkaloide) sind vermutlich die seit längstem bekannten Mykotoxine. Nach dem Befall mit *Claviceps purpurea* (Mutterkornpilz) werden von bestimmten Getreidearten statt Körnern schwarzviolette Sklerotien (dicht zusammengewachsene Hyphen) gebildet. Von dieser Art des Befalls wurde erstmals 600 v. Chr. berichtet. Im Mittelalter wurden weitere Ausbrüche des "Sankt Antonius Feuers" dokumentiert. Diese Bezeichnung entstand auf Grund der Vergiftungssymptome (Konvulsionen, Halluzinationen und Gangrän), welche zu einem starken Kribbeln führten. Heutzutage kommt es beim Menschen kaum noch zu

Vergiftungen mit Mutterkornalkaloiden, da man die Sklerotien mit modernen Siebtechniken leicht entfernen kann [Weidenbörner M.].

1.3 Lagerpilze

Zu den Lagerpilzen zählen Vertreter der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*.

1.3.1 Aspergillus sp.

1.3.1.1 Aflatoxine

Aflatoxine wurden zum ersten Mal entdeckt, als über 100000 Truthähne durch den Konsum von verschimmeltem Erdnussmehl starben. Aus chemischer Sicht sind die Aflatoxine Difuranocumarin-Derivate. Zu den bedeutendsten Aflatoxinen zählen Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁. Die Buchstaben B und G erhielten die Aflatoxine, weil sie unter UV Einstrahlung blau bzw. grüngelb fluoreszieren. Die Indexzahlen geben den Grad der Toxizität an (1>2). Das „M-Aflatoxin“ wurde zuerst aus der Milch von Kühen isoliert, die mit aflatoxinhaltigem Futtermittel gefüttert wurden – das „M“ steht sowohl für Milch als auch für das englische Wort „metabolism“, da das Aflatoxin B₁ nach der oralen Aufnahme zu Aflatoxin M₁ metabolisiert wird [Weidenbörner M.].

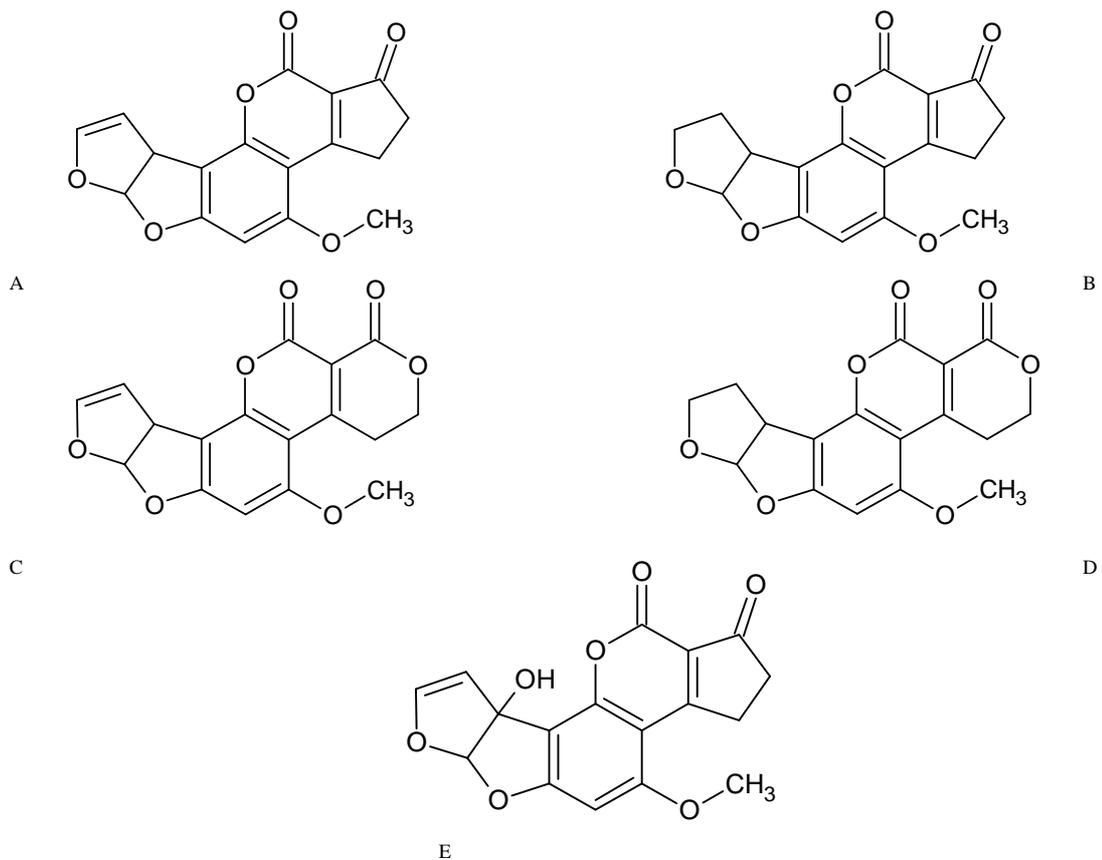


Abbildung 3: A-Aflatoxin B₁, B-Aflatoxin B₂, C-Aflatoxin G₁, D-Aflatoxin G₂, E-Aflatoxin M₁

Aflatoxine werden von der Gattung *Aspergillus* (A.) produziert, speziell von *A. flavus* und *A. parasiticus*, welche bevorzugt bei höherem Feuchtigkeitsgehalt und höheren Temperaturen wachsen. Die Aflatoxine gehören zu den stärksten natürlich vorkommenden Kanzerogenen. Bei akuten und chronischen Vergiftungen mit Aflatoxinen treten hauptsächlich Schädigungen der Leber auf, wobei die Toxizität in der Reihenfolge B₁>G₁>B₂>G₂ abnimmt [Mücke W., Lemmen Ch.].

1.3.2 *Aspergillus sp. und Penicillium sp.*

1.3.2.1 Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) wird in wärmeren Regionen von *Aspergillus sp.* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. terreus*) und in gemäßigten Breiten von *Penicillium verrucosum* gebildet [Rosa C.A.R., Magnoli C.E., Fraga M.E., Dalcero A.M. Santana D.M.N.]. Ochratoxin A besitzt eine Iso-Cumarin Struktur, die mit Phenylalanin amidiert ist. OTA wird weltweit auf landwirtschaftlichen Produkten wie z.B. Getreide, Erdnüssen,

Paranüssen und Kaffee gefunden. OTA ist ein starkes Nephrotoxin. Im menschlichen Organismus wird OTA an Plasmaproteine gebunden und in den Nieren und der Leber akkumuliert [Mücke W., Lemmen Ch.].

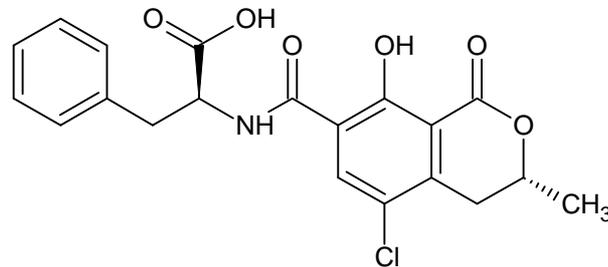


Abbildung 4: Ochratoxin A

Auf Grund seiner nativen Fluoreszenz kann OTA mittels HPLC-FLD [Rosa C.A.R., Magnoli C.E., Fraga M.E., Dalcerro A.M. Santana D.M.N.] analysiert werden. Auch ELISA [Usleber E., Dietrich R., Schneider E., Märtlbauer E.] und LC-MS werden für die Bestimmung von OTA verwendet [Zöllner P., Meyer-Helm B.].

2 ZIELSETZUNG

Wegen ihrer Toxizität und dem vermehrten Auftreten in Lebens- und Futtermitteln erlangten Mykotoxine in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Aus diesem Grund ist es wichtig, sensitive und zuverlässige Methoden zur Bestimmung dieser Toxine zu entwickeln. In den letzten Jahren hat sich auf dem Gebiet der Lebens- und Futtermittelsicherheit in Bezug auf Mykotoxine einiges verändert. Es wurden vermehrt Kontrollen durchgeführt und Gesetzesvorschläge zur Höchstmengenverordnung erstellt (Deoxynivalenol und Zearalenon: 1.7.2007/ Commission Direktive 2005/38/EC).

Die bisherigen analytischen Verfahren zur Probenaufreinigung sind jedoch häufig kostenintensiv und benötigen viel Zeit. Um diesen Aufwand zu verringern, galt es, eine neue Probenvorbereitungsmethode zu entwickeln. Diese Methode sollte selektiv, sensitiv, einfach zu handhaben und kostengünstig sein.

Ziel dieser Arbeit war, diesen Anforderungen gerecht zu werden, und eine immunochemische Probenvorbereitungsmethode (Immunfiltration in Kombination mit der Ultrafiltration gekoppelt mit HPLC/UV bzw. FLD) zur Bestimmung von DON und ZON in Lebens- und Futtermitteln, zu entwickeln, zu optimieren und zu etablieren.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.4 Immunanalytik

Die Immunanalytik beruht auf der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper.

3.4.1 Antigen

Ein Antigen löst in einem Organismus die Bildung von Antikörpern aus. Bei niedermolekularen Substanzen ist es fast unmöglich, eine Immunantwort auszulösen. Substanzen mit einem Molekulargewicht von kleiner 1500 Da werden auch Haptene genannt. Da diese Moleküle auf Grund ihrer Größe ungenügende Immunogenität aufweisen, muss man sie kovalent an Carriermoleküle koppeln. Als Carrier kommen z.B. Albumine (bovines Serumalbumin, Ovalbumin, Keyhole limpet hemocyanin), Polyaminosäuren, inerte Träger wie Agarose, Sepharose, Mikropartikel und Membranen zum Einsatz. Durch die Kopplung an ein größeres Molekül kann das Hapten nach der Injektion mit einem Adjuvans auch die gewünschte Antikörperproduktion im Versuchstier auslösen [Rehm H.].

3.4.2 Adjuvantien

Das Adjuvans bewirkt im weitesten Sinne eine Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort. Durch seinen Zusatz kann die einzusetzende Menge an Antigen und die Zahl der Applikationen reduziert werden. Es wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher Adjuvantien beschrieben, wobei die richtige Auswahl über den Erfolg einer Immunisierung entscheidet [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

Der Klassiker für die Primärimmunisierung ist das "Komplette Freund'sche Adjuvans" (FCA). Es wurde 1948 von Freund in New York beschrieben und enthält in abgewandelter Form Paraffinöl, Mannose-Monooleat als Emulgator sowie abgetötete Tuberkulosebakterien (*Mycobacterium tuberculosis*). Neben dem FCA kommt das "Inkomplette Freund'sche Adjuvans" (FIA) zur Anwendung. Es enthält keine *Mycobacterien* und wirkt dadurch weniger stark stimulierend als FCA. Der Zusatz von abgetöteten Bakterien oder deren Fragmente wirkt ganz allgemein stark stimulierend auf das Immunsystem. Weil FCA eine starke Wirkung besitzt und dem Tier Qualen bereitet,

wird es nur eingeschränkt verwendet. FCA kommt erst zum Einsatz, wenn mit gemäßigteren Alternativadjuvanzen keine Immunisierungserfolge erzielt werden [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

3.4.3 Antikörper

Antikörper sind lösliche globuläre Proteine, die im Blutplasma zirkulieren. Die Immunglobuline (Ig) werden in 5 Antikörper-Hauptklassen (IgG, IgA, IgD, IgE, IgM) unterteilt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen schweren Polypeptidketten kann man die einzelnen Ig erkennen. Nach Art der Herstellung werden monoklonale und polyklonale Antikörper (Ak) unterschieden. Erstere werden von identischen Plasmazellen produziert, letztere von unterschiedlichen. Allgemein besitzen alle Ig eine Struktur aus 2 leichten und 2 schweren Polypeptidketten. Diese Ketten werden durch interchenare (=zwischen zwei Ketten wirkende) Disulfidbrücken verknüpft und bilden in ihrer räumlichen Anordnung eine Struktur, die einem Y ähnelt. Daneben gibt es noch intrachenare Disulfidbrücken, die verschiedene Abschnitte innerhalb einer Kette kovalent miteinander verknüpfen.

Mit Hilfe von verschiedenen Substanzen (Proteasen, β -Mercaptoethanol, Harnstoff) kann man die Ig in ihre einzelnen Fragmente spalten. β -Mercaptoethanol und Harnstoff spalten die intrachenaren Disulfidverknüpfungen und man erhält die leichten und die schweren Ketten des Antikörpers. Das Enzym Papain spaltet den Antikörper in ein F_c (Fragment crystalline) und zwei F_{ab} (Fragment Antigen bindend). Pepsin spaltet den Antikörper in ein F_c und ein $F_{(ab)_2}$. Die F_c -Fragmente aller Antikörper sind nahezu gleich, wohingegen die Antigen bindenden Fragmente der einzelnen Antikörper stark variieren. Besondere Bedeutung kommt den Domänen der Aminotermini der F_{ab} -Fragmente zu. Sie bilden die variable Region der Antikörper. Diese Regionen sind nicht alle gleich variabel, so zeigen einige Segmente (jeweils 3 der leichten und 3 der schweren Ketten) eine deutlich höhere Variabilität. Diese werden als hypervariable Region bezeichnet, und stellen die eigentlich strukturellen Sequenzen zur Gestaltung der Antigen-Bindungsstelle (=Paratop) dar [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.; Aigner A., Neumann S.].

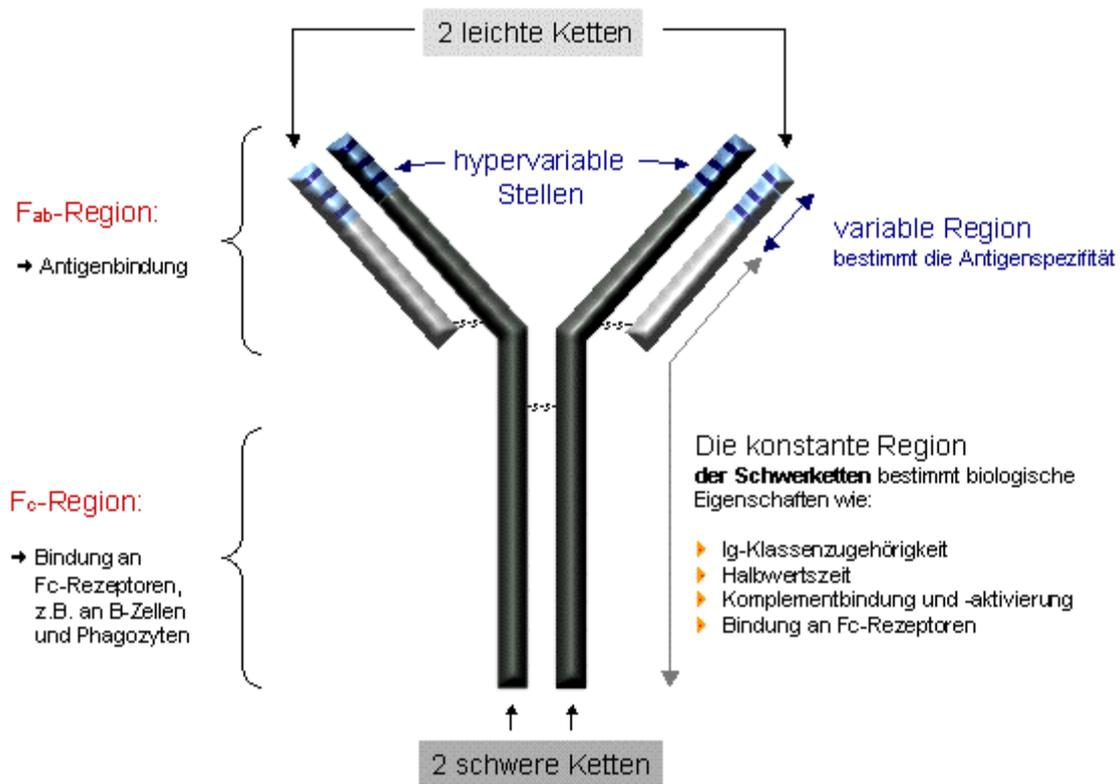


Abbildung 5: Schematische Abbildung eines Immunglobulins

(www.hal-allergie.de/allergieinfosanti.htm)

3.4.4 Antikörperklassen

Nach Auslösen einer Immunreaktion tritt im Plasma von Säugetieren das IgM als erster Antikörper in Erscheinung. Es stellt damit die zeitlich am frühesten einsetzende humorale Antwort dar. In sehr viel höherer Konzentration kommt IgG im Blutplasma vor. Aus diesem Grund wurde es auch als erstes und am besten untersucht. IgA findet man sowohl im Plasma und als sezerniertes Molekül in diversen Körpersekreten. Über IgD und IgE weiß man vom funktionellen Standpunkt her wenig, außer dass das IgE vermutlich an allergischen Reaktionen beteiligt ist.

Das bisher nicht erwähnte IgY (=Yolk, Eidotter) besitzt eine gesonderte Stellung, und kommt in geringen Mengen im Serum und vermehrt im Eidotter von Vögeln und Reptilien, sowie Amphibien vor. In seiner Struktur unterscheidet es sich vom Säugetier IgG nur durch eine vierte Domäne im F_c Bereich anstelle der hier üblichen drei Domänen. Weiters besitzt das IgY keine "hinge Region" und ist daher in seiner Flexibilität stärker eingeschränkt als das IgG [Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A.].

3.4.5 Produktion von polyklonalen Antikörpern

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper geht man von einer gezielten Immunisierung mit einem Antigen aus. Hierzu wird einem Säugetier, häufig Maus, Kaninchen oder Ziege, nach einem festgelegten Immunisierungsschema das jeweilige Antigen in die Blutbahn oder in ein Gewebe injiziert. Dadurch kommt es zur Expansion und Differenzierung von B-Zellen. Beim ersten Kontakt mit der Fremdsubstanz entsteht eine Primärantwort, bei der überwiegend IgM Antikörper produziert werden. Wird der Organismus ein weiteres Mal (nach einigen Wochen) mit demselben Antigen in Kontakt gebracht, dann findet eine Sekundärreaktion statt, die sich durch eine viel schnellere Immunantwort auszeichnet und Booster Effekt genannt wird. Bei dieser Verstärkungsreaktion werden durch eine schnellere Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Zelloberfläche ausgesuchte B-Gedächtniszellen aktiviert. Schon nach Verabreichung relativ kleiner Antigenmengen wird in dieser Phase eine rasche und umfangreiche Produktion spezifischer Antikörper eingeleitet. Dabei kommt es zu einem drastischen Anstieg der IgG Konzentration. Mittels Titerbestimmung kann man erkennen, ob schon genügend polyklonale Antikörper im Versuchstier produziert wurden. Bei ausreichender Menge kann man sie aus dem Blut isolieren [Löffler G., Petrides P.E.].

3.4.6 Produktion von IgY

Das Immunsystem von Vögeln, im speziellen von Hühnern, unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der Säugetiere. Sie besitzen ebenfalls T-Zellen, die im Thymus reifen, nur die B-Zellen werden in einem anderen Kompartiment gebildet, nämlich der Bursa Fabricius. Auch hier sind die B-Zellen für die Produktion von Immunglobulinen verantwortlich. Als erstes werden die IgM gebildet, die die gleichen Funktionen haben wie die der Säugetier IgM. Auch IgA wird vom Immunsystem produziert, und in verschiedene Körperflüssigkeiten sezerniert. IgY ist wie das IgG aufgebaut, es kommt in hoher Konzentration im Serum vor, jedoch gibt es einen wesentlichen Unterschied bei der Gewinnung der Antikörper. Hierfür muss man dem Tier nicht unbedingt Blut entnehmen, man kann sie ganz einfach aus den Eiern gewinnen. IgA und IgM werden mit Proteinen in geringen Mengen ins Eiweiß transferiert, wohingegen die IgY mittels Rezeptor in großen Mengen ins Eigelb exportiert werden. Dies hat den Vorteil, dass bei der Gewinnung von polyklonalen IgY einfach mehrere Eidotter gesammelt werden können.

Weiters müssen die IgY nicht durch spezielle Methoden von den anderen Immunglobulinen getrennt werden, da diese durch Abscheiden des Eiweisses einfach entfernt werden können. Mittels Titerbestimmung kann man auch hier den Gehalt an Antikörpern bestimmen [Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A.; Schade R., Behn I., Erhard M., Hlinak A., Staak C.].

3.4.7 Produktion monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper werden von Immunzellen sezerniert, die von einer einzigen B-Zelle abstammen. Deshalb sind sie jeweils nur gegen ein bestimmtes Epitop (Antigendeterminante) eines Antigens gerichtet. Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert, und mit Myelomzellen fusioniert. Dies ist notwendig, da die antikörperproduzierenden Lymphozyten in Kulturen nur wenige Wochen überleben. Durch die Fusionierung entstehen Zellhybride (Hybridome), die unsterblich sind. Die Fusion von Zellen wird durch Zugabe von Polyethylenglycol gesteigert. Nur wenige der fusionierten Zellen bilden auch Antikörper. Um diese Antikörper zu selektionieren, müssen die Hybridoma durch Klonieren vereinzelt und vermehrt werden. Danach werden die Klone getestet und weiter kloniert [Koolmann J., Röhm K.H.].

Eine weitere Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist die Ascites-Technik. Dabei werden die Hybridomazellen in die Bauchhöhle einer Maus injiziert. Die Mäuse werden sozusagen mit Krebszellen infiziert. Die Ascites-Technik ist äußerst effektiv, aber auf Grund der invasiven Schädigung des Tieres in vielen Ländern untersagt [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

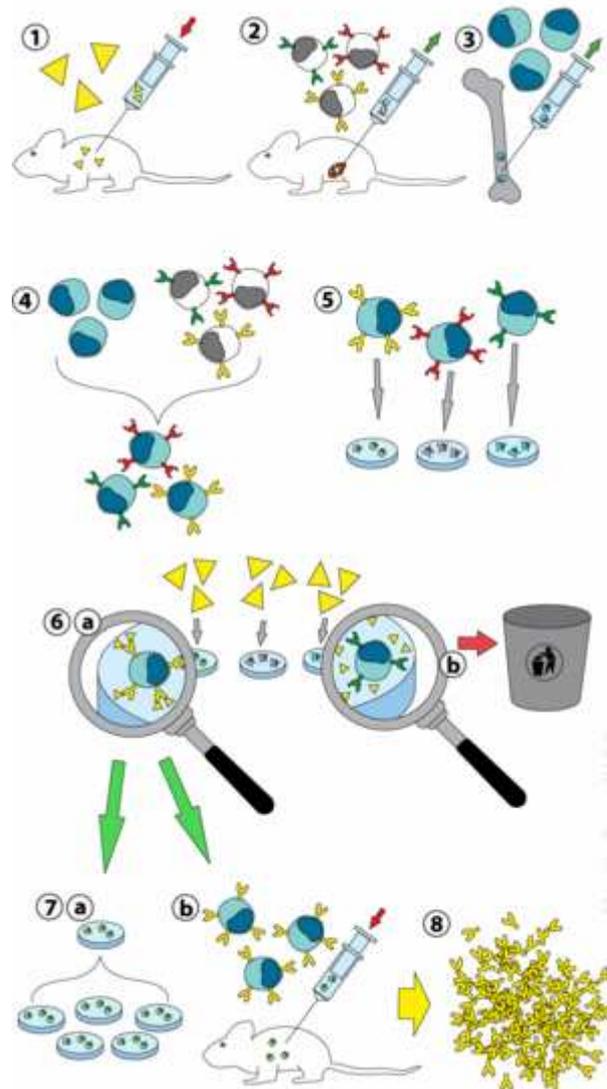


Abbildung 6: Schematische Abbildung der Produktion von monoklonalen Antikörpern, 1-Immunisierung, 2-B-Lymphozyten aus der Milz, 3-Myelomzelle, 4-Zellfusionierung, 5-Hybridomzelllinie, 6-Wechselwirkung Antigen-Antikörper, 7a-Zellkultur, 7b-Produktion monoklonaler Antikörper in einer Maus, 8-Antikörper (<http://de.wikipedia.org>)

3.4.8 Titerbestimmung

Nach der Immunisierung wird eine Titerbestimmung durchgeführt. Dies ist ein Verfahren zur Konzentrationsbestimmung der produzierten Antikörper. Prinzipiell handelt es sich um einen direkten Immunoassay. Der erste Schritt besteht darin, das Antigen an die Mikrotiterplatte zu "coaten". Sie besteht aus Polystyrol und eignet sich aufgrund ihrer hohen Bindungskapazität besonders gut für Proteine. Die Art der Bindung ist pH unabhängig, da sie hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Deshalb werden zum "Coaten" auch verschiedene Puffersysteme verwendet z.B. PBS (pH=7,4)

oder Natriumcarbonatpuffer (pH=9,6). Man "coated" üblicherweise durch Zugabe von 50-200 µl Coating-Puffer inklusive Antigen je Kavität und inkubiert bei 2-8°C für 10-18 Stunden. Die Mikrotiterplatte wird anschließend gewaschen, um alle nicht gebundenen Antigene zu entfernen. Im nächsten Schritt werden freie Proteinbindungsstellen abgeblockt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden. So können zum Blocken BSA oder Casein verwendet werden. Nach dem Blocken findet ein weiterer Waschschrift statt und danach wird der zu untersuchende Antikörper aus dem Serum oder Eidotter hinzu gegeben. Nach einer Stunde wird nochmal gewaschen und der sekundäre Antikörper aufgetragen. Dieser bindet an den F_c-Teil des ersten Antikörpers, und ist in den meisten Fällen enzymmarkiert (kann auch mit einem radioaktiven Isotop markiert sein). Der zweite Antikörper wird zur Detektion verwendet. Die Enzymaktivität wird mittels colorimetrisch nachweisbarer Substrate bestimmt. Dabei entsteht ein färbiges Produkt, das durch Zugabe eines Stoppreagens über einen längeren Zeitraum stabil ist. Die Ergebnisse können dadurch sowohl visuell als auch photometrisch ermittelt werden [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

3.4.9 Isolierung und Reinigung der Antikörper

Im Falle von polyklonalen Antikörpern muss man das entsprechende Serum des Versuchstiers aufreinigen. Monoklonale Antikörper werden aus dem Überstand der entsprechenden Zellkultur bzw. Ascites entnommen [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

IgY können aus dem Eigelb von Hühnereiern, aber auch aus dem Serum von Hühnern isoliert werden. So vielfältig die Arten von Antikörpern sind, so vielfältig sind auch deren Aufreinigungsmethoden. Die Aufreinigung von Proteinen (Ig) ist immer ein Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute. Viele Reinigungsschritte bedeuten eine geringere Ausbeute [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

3.4.10 Reinigung polyklonaler und monoklonaler Säugerantikörper

Zuerst werden durch Aussalzung die Proteine präzipitiert. Die Grundlage dieses Verfahrens ist eine Erhöhung der Ionenstärke, um dadurch die Hydrathülle der Proteine zu stören. Die Proteine fallen dadurch aus und der Niederschlag kann einfach

abzentrifugiert und anschließend in einem geringeren Volumen wieder gelöst werden. Die häufigste Variante des Aussalzens ist die mit Ammoniumsulfat. Der Vorteil besteht darin, dass man keine speziellen Geräte benötigt. Da sich jedoch auch Salze in der Lösung befinden, und diese bei nachfolgenden Chromatographieschritten stören können, muss man sie mittels Dialyse entfernen [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.]. Eine weitere Methode zur Entfernung von Proteinverunreinigungen ist die Fällung mittels Caprylsäure im saurem Medium. Hierbei bleiben die Immunglobuline in Lösung. Caprylsäure wird langsam unter ständigem Rühren zugegeben. Danach wird die Lösung abzentrifugiert und die im Überstand verbleibenden Antikörper auf pH 7 gebracht. Den einfachsten, jedoch teuersten Weg der Immunglobulinreinigung stellt die Affinitätschromatographie dar. Hierfür werden bakterielle Proteine (Protein A oder G) an einer Gelmatrix immobilisiert [Aigner A., Neumann S.]. Protein A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus* mit einem Molekulargewicht von 35-50 kDa. Immobilisiertes Protein A bindet spezifisch die Fc-Region von Immunglobulin-Molekülen vieler Säugetierspezies. Die Protein A-Affinitätschromatographie ist eine einfache und schnelle Aufreinigungsmethode (Binden-Waschen-Eluieren-Neutralisieren), mit der die meisten Nicht-IgG-Kontaminanten entfernt und sehr gute Reinheiten erzielt werden können [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

3.5 Photometrie

Photometrische Methoden beruhen auf der Messung der Lichtabsorption im Bereich sichtbarer (VIS-) und ultravioletter (UV-) Strahlung durch Materialien in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Da die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im UV- und sichtbaren Bereich zur Anregung von Elektronen führt, wird sie auch als Elektronenspektroskopie bezeichnet. Dieses Verfahren dient zur Charakterisierung und Quantifizierung von anorganischen und organischen Substanzen.

Beim Durchtritt von elektromagnetischer Strahlung (Licht) durch eine Lösung wird deren Intensität durch Absorption verringert [Schwedt G.].

Bougouer-Lambert-Beer stellten fest, dass es einen Zusammenhang zwischen der Schichtdicke, der Absorption von Licht und der Konzentration eines Stoffes gibt. Diese Abhängigkeiten findet man im Lambert-Beerschen-Gesetz:

$$E = \varepsilon c d = \log \frac{I_0}{I}$$

E : Extinktion (Absorbance)

ε : molarer Extinktionskoeffizient in l/mol cm

c : Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/l

d : Schichtdicke der Küvette in cm

I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts

I : Intensität des Lichts nach Durchlaufen der Schichtdicke d

Gültigkeit dieses Gesetzes:

Nur bei monochromatischem Licht

Nur bei verdünnten Lösungen

Aufbau des Photometers

Der prinzipielle Aufbau eines Spektralphotometers umfasst eine Strahlungsquelle, einen Monochromator, den Probenraum, ein Detektionssystem und eine Auswerteeinheit.

1. Strahlungsquelle

Als Lichtquelle wird für den UV-Bereich eine Deuterium-Lampe, für den VIS-Bereich eine Wolframlampe verwendet.

2. Monochromator

Zur Erzeugung des monochromatischen Lichts wird das zunächst polychromatische Licht an Prismen oder Gittern zerlegt.

3. Probenbehälter

Zur optischen Spektroskopie werden geeignete Probenbehälter benötigt, die man als Küvetten bezeichnet. Sie bestehen für den UV-Bereich aus Quarz, für den visuellen Bereich aus Glas oder Kunststoff.

4. Detektor

Zur Detektion verwendet man Photozellen oder Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Die Photozelle besteht aus einer Kathode, aus der durch auftreffende Photonen Elektronen herausgeschlagen werden. Diese verursachen im freien Raum zwischen der Kathode und einer auf hoher positiver Spannung liegenden

Anode einen Stromfluss. Da die Photozelle nur geringe Ausbeuten liefert, werden meist SEV verwendet. Dieser enthält mehrere Elektroden zwischen Kathode und Anode. Die frei werdenden Elektronen gelangen zur ersten Elektrode und schlagen Sekundärelektronen heraus, die ihrerseits zu einer weiteren Elektrode gelangen und dort wieder Sekundärelektronen erzeugen. Durch diese Vervielfachung von Elektronen kommt es zu einer Stromverstärkung um einen Faktor von 10.000 – 10.000.000 [Otto M.].

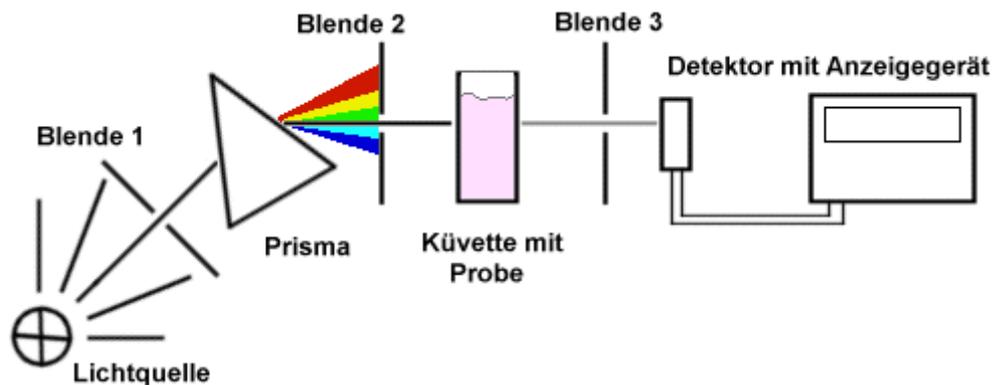


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Einstrahlphotometers
(<http://www.elhardt.de/matthias/chemie/photometer/Photometer.htm>)

3.5.1 Spektralphotometrische Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinlösungen (Antikörper) kann direkt photometrisch bestimmt werden. Die einfachste Methode ist die Messung der Extinktion bei 280 nm, die im Wesentlichen durch den Gehalt an aromatischen Aminosäuren, Tryptophan und Tyrosin verursacht wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Protein zerstörungsfrei analysiert werden kann. Der Nachteil besteht darin, dass die Methode wenig sensitiv und relativ störanfällig ist. Der Vergleich der Extinktion von gleich konzentrierten Proteinlösungen bei 280 nm zeigt, dass sich typische Standardproteine deutlich in ihrer Absorption unterscheiden:

Protein [c]=1 mg/ml	Extinktion bei 280 nm
Hühnerovalbumin	0.7
Rinderserumalbumin	0.63
Hühnerlysozym	2.65
Rinderimmunglobulin	1.38

Nukleinsäuren mit einer starken Absorption bei 260 nm stören die Messung, diese Störung kann durch die Messung bei zwei Wellenlängen teilweise korrigiert werden [Layne E.].

$$c_{\text{Protein}} [mg \times ml^{-1}] = 1.55 \times A_{280nm} - 0.76 \times A_{260nm}$$

$A_{260nm,280nm}$: Absorbance (Extinktion)_{260nm, 280nm}

Mit dieser Methode werden ausschließlich aufgereinigte Antikörper analysiert, da alle weiteren Bestandteile das Ergebnis verfälschen würden.

3.6 Chromatographische Methoden

Die Chromatographie ist ein Trennprozess, bei dem das Probengemisch zwischen stationärer und mobiler Phase verteilt wird. In der Chromatographie werden Substanzgemische in der mobilen Phase weiterbefördert. Die Einzelsubstanzen werden unterschiedlich stark von der stationären Phase zurückgehalten. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen der Probe, der stationären Phase und der mobilen Phase werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich schnell weitertransportiert und können somit voneinander getrennt werden. Die Komponenten, die von der stationären Phase zurückgehalten werden, bewegen sich nur langsam durch die Trennsäule. Demgegenüber wandern die Komponenten, die nur schwach von der stationären Phase zurückgehalten werden, schneller. Aufgrund unterschiedlicher Retentionseigenschaften trennen sich die Probenkomponenten in diskrete Banden auf, die sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden können.

Als Maß für die Tendenz, sich bevorzugt in der einen oder anderen Phase aufzuhalten, dient der Verteilungskoeffizient K :

$$K_x = \frac{c_{stat}}{c_{mob}}$$

c_{stat} : Konzentration des Stoffes X in der stationären Phase

c_{mob} : Konzentration des Stoffes X in der mobilen Phase

oder der Retentionsfaktor k :

$$k_x = \frac{n_{stat}}{n_{mob}}$$

n_{stat} : Anzahl der Mole des Stoffes X in der stationären Phase bei Gleichgewicht

n_{mob} : Anzahl der Mole des Stoffes X in der mobilen Phase bei Gleichgewicht

Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im betreffenden chromatographischen System verschiedene Verteilungskoeffizienten und daher auch verschiedene Retentionsfaktoren haben [Skoog D.A., Leary J.J.].

Die Substanzen, die in den Detektor transportiert werden, werden vom Schreiber als Gaußkurven registriert. Die Signale nennt man Peaks, ihre Gesamtheit Chromatogramm. Über die Peaks erhält man qualitative und quantitative Informationen der zu untersuchenden Mischung.

Qualitativ Retentionszeit, ist die Zeit, welche vom Einspritzen der Probe bis zum Erscheinen des Signalmaximums im Detektor verstreicht. Zur Identifikation eines Peaks kann man daher die jeweilige Reinsubstanz injizieren und die Retentionszeiten vergleichen. Die Retentionszeit einer Komponente ist bei gleichen chromatographischen Bedingungen stets gleich groß [Meyer V.R.].

Quantitativ Sowohl die Fläche wie auch die Höhe des Peaks sind proportional zur Konzentration des Analyten. Wenn verschiedene Lösungen genau bekannter Konzentration eingespritzt werden, die zugehörigen Flächen oder Höhen bestimmt und eine Kalibrierkurve gezeichnet wird, kann man aus dem Signal der unbekannt Probe deren Konzentration bestimmen [Meyer V.R.].

Mit Hilfe eines Chromatogramms kann man verschiedene Angaben über die Güte der Trennung und der Säule machen.

t_0 : Totzeit der Trennsäule; ist die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um die Trennsäule zu durchwandern

$$t_0[s] = 0,03 \frac{d_c^2 L_c}{F}$$

d_c : Innendurchmesser der Säule [mm]

L_c : Säulenlänge [mm]

F : Volumenstrom der mobilen Phase [ml/min]

t_R : Retentionszeit; ist die Zeit, die von der Injektion des Analyten bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht.

Als quantitatives Maß für die Effizienz einer chromatographischen Säule werden häufig zwei Ausdrücke verwendet, und zwar die *Bodenhöhe H* und die *Zahl der theoretischen Böden N*. Die Effizienz nimmt mit steigender Bodenzahl und abnehmender Bodenhöhe zu [Meyer V.R.].

$$N = \frac{L}{H} = 2\pi \left(\frac{h_p \times t_R}{A_p} \right)^2$$

H : Bodenhöhe

L_c : Säulenlänge

N : Zahl der theoretischen Böden

h_p : Peakhöhe

A_p : Peakfläche

$$H = \frac{L_c}{N}$$

Die Güte der Trennung zweier Substanzen ist durch die *Auflösung* R definiert. Die Auflösung zweier benachbarter Peaks ist definiert durch den Quotienten aus dem Abstand der beiden Peakmaxima voneinander; d.h. der Differenz der beiden Retentionszeiten t_R , und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basispeakbreiten w [Meyer V.R.].

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1\frac{1}{2}} + w_{2\frac{1}{2}}}$$

$w_{\frac{1}{2}}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks

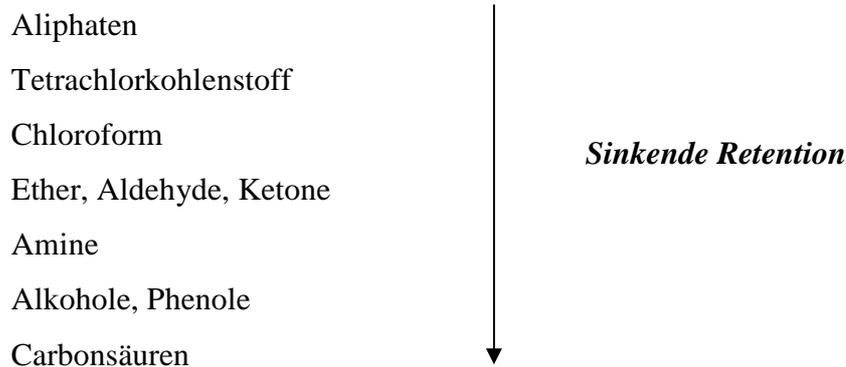
Bei einer Auflösung von 1 sind die Peaks nicht vollständig voneinander getrennt, doch erkennt man die beiden Komponenten. Für die quantitative Analyse ist eine Auflösung von 1 in der Regel zu wenig. Es ist notwendig, Basislinientrennung zu erreichen, also z.B. $R=1,5$ [Skoog D.A., Leary J.J.].

3.6.1 *Reversed-Phase Chromatographie (Umkehrphasenchromatographie)*

Bei der Reversed-Phase Chromatographie ist im Gegensatz zur Normalphasen-Chromatographie die stationäre Phase apolar und die mobile Phase polar. Als Trägermaterial werden hauptsächlich Kieselgel oder synthetische Polymere verwendet. Die typischen Kieselgeloberflächen enthalten SiOH-Gruppen, die mit Hilfe von Organochlorsilanen zu Siloxanen reagieren und deren R eine Alkylgruppe oder eine substituierte Alkylgruppe (C₈, C₁₈) ist [Meyer V.R.].

Die Oberfläche der stationären Phase ist stark apolar. Wasser kann diese hydrophoben Gruppen nicht benetzen und in keinerlei Wechselwirkung mit ihnen treten. Es ist daher die schwächste aller mobilen Phasen und eluiert die Proben am langsamsten. Je größer der Wassergehalt des Eluenten ist, desto länger sind die Retentionszeiten.

Substanzen werden von der Umkehrphasen-Oberfläche umso stärker retentiert, je weniger sie in Wasser löslich, d.h. je unpolarer sie sind [Meyer V.R.].



Als mobile Phase verwendet man meist Gemische von Wasser oder von wässrigen Puffermischungen mit verschiedenen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln. Je apolarer die Lösungsmittel sind, umso stärker eluierend wirken sie.

Methanol < Acetonitril < Ethanol < Isopropanol < Dimethylformamid < n-Propanol < Dioxan < Tetrahydrofuran

3.6.2 Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur

Eine HPLC-Apparatur besteht aus Vorratsgefäßen für die mobilen Phasen, einer oder mehrerer Pumpen (Hochdruckpumpen), einem Autosampler zur Injektion einer großen Zahl von Proben, einer analytischen Trennsäule (RP C₈, C₁₈), dem Detektor und einer Auswerteeinheit [Abb. 8].

Im Folgenden sollen nur die Detektoren näher besprochen werden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

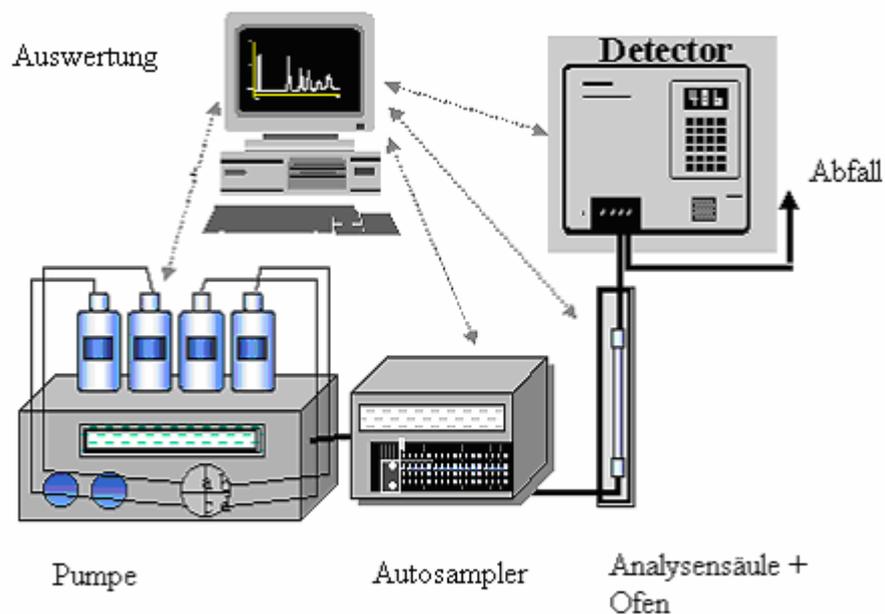


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (<http://www.forumsci.co.il/HPLC/system.gif>)

3.6.2.1 Detektoren

Der Detektor ist das letzte Glied in der instrumentellen HPLC. Er misst die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase und wandelt diese in ein elektrisches Signal um. Die Ansprüche an einen Detektor ändern sich mit der zu untersuchenden Probe. Im Allgemeinen sollte ein Detektor jedoch eine hohe Selektivität, ein niedriges Basislinienrauschen, eine niedrige Nachweisgrenze und einen großen linearen Messbereich besitzen [Meyer V.R.].

3.6.2.2 UV-Detektor

Der UV-Detektor wird häufig verwendet, weil er günstig in der Anschaffung ist, und einen großen linearen Messbereich besitzt. Weiter ist er relativ unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen und kann auch bei Gradientenelution eingesetzt werden.

Er registriert Substanzen, die ultraviolette Licht absorbieren [Meyer V.R.].

Ein Maß für die Fähigkeit der Lichtabsorption ist der *molare Extinktionskoeffizient* ϵ . Aromaten besitzen einen vergleichsweise hohen Extinktionskoeffizient, während Ketone einen kleinen aufweisen. Wie stark der Lichtstrahl beim Durchtritt durch die Detektorzelle abgeschwächt wird, hängt vom molaren Extinktionskoeffizient, von der *Konzentration* c der Substanz und von der *Länge der Zelle* d ab [Meyer V.R.].

$$E = \epsilon \times c \times d$$

E : Extinktion

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient in L/mol cm

c : Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/L

d : Schichtdicke der Durchflusszelle in cm

Die mobile Phase soll so gewählt werden, dass sie kein Licht absorbiert. Die Höhe der Peaks ist abhängig von der Konzentration der eluierten Substanz und von ihrem molaren Extinktionskoeffizient. Stoffe mit einem großen molaren Extinktionskoeffizient ergeben größere Peaks, als solche mit einem kleinen. Weil die Größe des Signals von der durchstrahlten Schichtdicke d abhängt, sind die Durchflusszellen in UV – Detektoren möglichst lang, ca. 10 mm. Um das Volumen klein zu halten, sind sie sehr dünn. Das Licht tritt in Längsrichtung durch die Zelle. Mit Hilfe eines Gitters wird die gewünschte Lichtwellenlänge in den Strahlengang gebracht. Vor der Zelle, durch die die mobile Phase fließt, ist ein Plättchen aus Quarzglas angebracht, das einen kleinen Teil des Lichtes auf die Referenz Fotodiode reflektiert, während der größere Anteil der Lichtintensität durch Plättchen und Zelle auf die Messfotodiode trifft. Die Detektorzelle hat eine optimierte Geometrie, um die Basislinienschwankungen niedrig zu halten.

Als Lichtquellen dienen hauptsächlich Deuteriumlampen, aber auch Quecksilberdampflampen, Cadmium-, Zink- und Wolframlampen werden verwendet [Meyer V.R.].

3.6.2.3 Fluoreszenzdetektor

Grundlage der Fluoreszenz ist die Absorption von Photonen durch z.B. nicht substituierte aromatische Kohlenwasserstoffe, Moleküle mit Ringstrukturen und hochkonjugierten Doppelbindungsstrukturen. Anschließend wird ein Großteil der Energie in Form von Licht größerer Wellenlänge abgegeben. Die Wellenlängenzunahme im Vergleich zur Absorption wird als Stoke'sche Verschiebung bezeichnet. Dieser Energieverlust entsteht durch Zusammenstöße der angeregten Moleküle mit anderen Molekülen. Die *Fluoreszenzquantenausbeute* ϕ ist das Verhältnis der Zahl der Moleküle die fluoreszieren, zur Gesamtzahl der angeregten Moleküle. Die *Fluoreszenzintensität* I_F , die senkrecht zum Anregungsstrahl gemessen wird, hängt von folgenden Parametern ab:

$$I_F = \phi I_0 \varepsilon c d$$

I_F : Fluoreszenzintensität

ϕ : Fluoreszenzquantenausbeute

ε : molarer Extinktionskoeffizient in L/mol cm

c : Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/L

d : Schichtdicke der Durchflusszelle in cm

Der Fluoreszenzdetektor, bei dem eine etwa 10-20 μ l große Zelle vom Primärstrahl durchstrahlt wird, zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität im Vergleich zum UV-Detektor aus. Allerdings ist sein linearer Messbereich kleiner als jener des UV-Detektors [Camman K.]

4 PROBENVORBEREITUNG

Einer der wichtigsten Schritte bei der Bestimmung von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln ist die Probenvorbereitung. Sie dient der Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen und ermöglicht dadurch eine störungsfreie quantitative Analyse. Leistungsfähige Cleanup-Methoden vereinfachen die Analytik und tragen wesentlich zum Erhalt richtiger Analysenergebnisse bei [Schwedt G.].

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Einblick in die meist verwendeten Probenvorbereitungsmethoden in der Analytik von DON und ZON gegeben werden.

Die Affinitätschromatographie ist eine Probenvorbereitungsmethode, die zum ersten Mal vor 30 Jahren zum Einsatz kam. Sie beruht auf dem Prinzip der molekularen Erkennung von Analyten. Dieses Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniert auf der Basis, dass ein sogenannter "Binder" einen gegen ihn gerichteten Analyten ("Target") erkennt und an sich bindet. Sowohl Binder oder Target können immobilisiert werden. Meist wird einer der beiden kovalent an ein Polymer gebunden und in eine Säule gepackt. Der zu untersuchende Analyt wird in gelöster Form am Säulenbeginn aufgegeben, und während er die Säule passiert, vom Binder erkannt und gebunden. Die am häufigsten verwendete Form der Affinitätschromatographie ist die Immunaффinitätschromatographie. Bei dieser Methode wird ein immobilisierter Antikörper für die Isolierung eines Antigens verwendet [Wilchek M., Miron T.].

Auf Grund ihrer Selektivität werden die Immunaффinitätssäulen gerne für die Probenvorbereitung von DON [Cahill L.M., Kruger S.C., McAlice B.T., Ramsey C.S., Prioli R., Kohn B.] und ZON [Kruger S.C., Kohn B., Ramsey C.S., Prioli R.] eingesetzt.

Eine weitere Probenvorbereitungsmethode, die häufig angewandt wird, ist die Festphasenextraktion (SPE). Bei dieser Methode kommt es auf Grund von unterschiedlichen Adsorptionsverhalten der Analyte zu einer Abtrennung der Matrixbestandteile. Festphasenextraktionen werden hauptsächlich in kleinen Säulen durchgeführt. Die feste Phase besteht aus einem oder mehreren Adsorbentien. Als Adsorptionsmaterial werden häufig Kieselgel, Aluminiumoxid und spezielle Gele verwendet. Die Probenlösung wird am Säulenbeginn aufgegeben und durch die feste Phase (Sorbens) geleitet. Bei diesem Schritt reichert sich der Analyt auf dem Sorbensbett

an und der Rest der Probenlösung passiert die Säule. Anschließend wird durch ein geeignetes Lösungsmittel der Analyt vom Sorbens heruntergelöst [Schwedt G.].

Eine auf SPE basierende Methode für die Probenvorbereitung von Trichothecenen wurde zum ersten Mal 1986 veröffentlicht. Dabei wurden kleine Säulen mit Aktivkohle/Aluminiumoxid gefüllt. Der Probenextrakt wurde unter Einfluss von Vakuum aufgegeben. Anschließend wurde das Säulchen gewaschen und der Probenextrakt eluiert. Die A- und B-Trichothecene wurden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und mittels UV-Licht detektiert. Diese multifunktionellen Säulchen wurden fortan als Mycosep Säulchen bezeichnet [Romer T.R.].

Ein weiteres Verfahren, das zur Probenvorbereitung von Mykotoxinen (ZON) eingesetzt wird, ist die Flüssig-Flüssig Extraktion [Krska R.]. Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion wird das Abtrennen gelöster Stoffe aus flüssigen Extraktionsgütern durch flüssige Extraktionsmittel verstanden. Das Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit des extrahierenden Stoffes in zwei flüssigen Phasen. Hierbei kann es sich sowohl um einen Feststoff wie auch um einen flüssigen Stoff handeln. Voraussetzung muss nur sein, dass sich dieser Stoff in dem Lösungsmittel besser löst als in der Flüssigkeit, in der er ursprünglich gelöst ist [Schwedt G.].

4.1 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist ein Verfahren, das zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Makromolekülen (meist Proteinen) verwendet wird. Hierfür werden Membranen mit einer gewissen Porengröße (Cut-off) für die Filtration verwendet. Dieser "Cut-off" wird definiert als die minimale Molekülmasse eines globulären Moleküls, welche durch die Membran zurückgehalten wird. Die Moleküle werden durch Anlegen von Druck oder durch die Zentrifugalkraft durch die Membran filtriert [Cooper G.T.].

4.2 Immunultrafiltration

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren angewendet, bei dem die Eigenschaften der Ultrafiltration mit der Selektivität der Antigen-Antikörper-Bindung vereint werden. Dabei werden geringe Mengen Antikörper zu einer Probenlösung hinzugefügt. Die eingesetzten Antikörper reagieren mit den in der Probenlösung enthaltenen Antigenen durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Dadurch wird die Abtrennung des niedermolekularen Analyten verhindert. Um unspezifisch gebundene Matrixkomponenten zu entfernen, folgt ein Waschschrift. Durch die Zugabe von organischem Lösungsmittel wird der Antigen-Antikörper-Komplex dissoziiert. Da der Antikörper nur einmal verwendet wird, können drastische Elutionsbedingungen angewendet werden, die zu einer irreversiblen Denaturierung der Antikörper führen. Die Abtrennung erfolgt durch Abzentrifugieren der Lösung, wobei der denaturierte Antikörper durch den Filter zurückgehalten wird, und das Antigen mit dem organischen Lösungsmittel den Filter passieren kann. Das organische Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und das Antigen anschließend in mobiler Phase aufgenommen und kann direkt mittels HPLC und geeignetem Detektor analysiert werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrem geringen Antikörperverbrauch sowie in ihrer Schnelligkeit und Einfachheit [Morais S., Maquieira Á., Puchades R.].

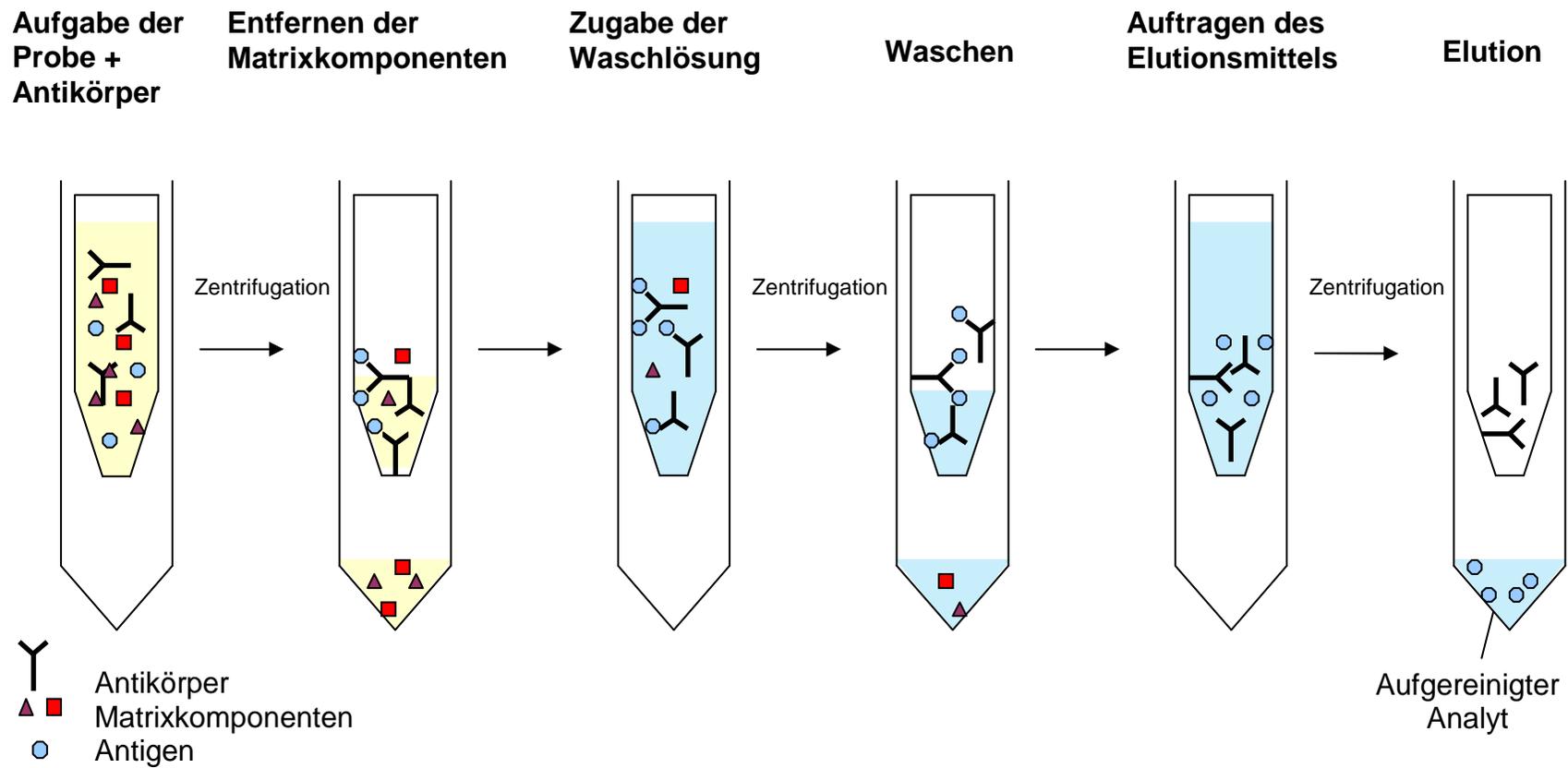


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Immunultrafiltration

5 BISHER IN DER LITERATUR ERWÄHNTE IMMUNULTRAFILTRATIONS-METHODEN

Bis jetzt wurden nur wenige Probenvorbereitungsmethoden basierend auf Immunultrafiltration veröffentlicht. Einige wichtige sind hier angeführt.

Im Falle der von Morais et al. publizierten Methode wurde für den Pestizidnachweis in Wasser die Immunultrafiltration mit einem kompetitiven ELISA direkt gekoppelt. Auf eine Filtermembran aus Polyvinylidendifluorid wurden Antikörper aufgetragen und durch passive Adsorption gebunden. Die freien Stellen wurden geblockt und anschließend wurde die Probe aufgetragen. Danach wurden die freien Bindungsstellen der Antikörper mit enzymmarkierten Antigenen versetzt, und nach Aufgabe des Substrats und Stoppen der Enzymreaktion photometrisch detektiert. Basierend auf dieser Methode konnte sowohl eine Aufkonzentrierung um einen Faktor 13 als auch eine Nachweisgrenze von 4,75 ng/L erreicht werden. Auf Grund der Kopplung der IUF mit dem ELISA konnte auch erheblich Zeit eingespart werden [Morais S., Maquieira Á., Puchades R.].

Westcott et al. entwickelten eine "Screening Methode" für Leukotrien E4 in menschlichem Urin, bei der eine Probenvorbereitung mittels IUF in Kombination mit einem ELISA angewandt wurde. Für den Nachweis wurden monoklonale Antikörper (anti-LTE 4) mit einem geringen Volumen des Urins vermischt und inkubiert. Die Lösung wurde in eine Centricon Filtereinheit mit einer Porengröße von 10 kDa überführt und 30 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Nicht gebundene Matrixbestandteile (kleiner 10 kDa) wurden beim folgenden Waschschrift abgetrennt. Danach wurde der Filtereinsatz aus dem Röhrchen entnommen und in umgekehrter Richtung in eine neue Einheit überführt. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch Zentrifugation vom Filter entfernt und mit Methanol dissoziiert. Der präzipitierte Antikörper wurde durch Zentrifugieren von der LTE4 haltigen Lösung abgetrennt. Der verbleibende Überstand wurde eingengt und in PBS gelöst. Anschließend konnte die LTE4 Konzentration mittels Sandwich ELISA bestimmt werden. Die Ergebnisse waren identisch mit den Werten, die mit der präparativen HPLC-Aufreinigung und anschließendem Immunoassay erhalten wurden [Westcott J.Y., Sloan S., Wenzel S.E.].

Haasnot et al. entwickelten ein immunchemisches Screeningverfahren zur Bestimmung von Salbuterol (β -Agonist) in Rinderurin. Dazu wurde der Urin in der IUF-Einheit mit einem

verdünnten Antiserum von einem Kaninchen versetzt. Die Filtermembran wurde anschließend gewaschen und die Lösung zentrifugiert. Der auf dem Filter verbliebene Antigen-Antikörperkomplex wurde durch Zugabe von Methanol und verdünnter Essigsäure zerstört. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Filtrat evaporiert und der Rückstand in PBS aufgenommen.

Der gereinigte β -Agonist wurde mittels ELISA quantifiziert. Diese Daten wurden mit einem ELISA ohne Probenvorbereitung verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass der IUF-ELISA sechs Mal sensitiver ist als der ursprüngliche ELISA ohne Probenvorbereitung. Auch im Vergleich mit GC-MS schnitt der IUF-ELISA mit ähnlich guten Werten ab [Haasnoot W., Kemmers-Voncken A., Samson D.].

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Produktion von polyklonalen IgG in Kaninchen

Im Folgenden wird die Immunisierung von Kaninchen zur Produktion von polyklonalen IgG genauer beschrieben.

6.1.1 Immunogenherstellung

Verwendete Reagenzien:

Immunogen: DON-BSA (DON gebunden an bovines Serumalbumin)

ZON-CMO-BSA (Zearalenon über Carboxymethyloxim an bovines Serumalbumin gekoppelt)

Um DON- und ZON-Antikörper herstellen zu können, bedarf es einer Immunisierung mit DON und ZON. Da beide auf Grund ihres niedrigen Molekulargewichtes nicht geeignet sind, um eine Immunantwort im Versuchstier auszulösen, wurden sie an ein Carriermolekül gekoppelt erworben. DON war an bovines Serumalbumin (DON-BSA) gebunden, und ZON war mittels Carboxymethyloxim an bovines Serumalbumin gekoppelt (ZON-CMO-BSA). Beide Immunogene lagen in lyophilisierter Form vor. Bevor sie in die Kaninchen injiziert wurden, mussten sie noch in Lösung gebracht werden. Hierfür wurden die Immunogene (je 5 mg, lyophilisiert) in 5 ml isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) gelöst und anschließend kräftig geschüttelt.

Zur Lösung wurden 5 ml des Adjuvans (= Gerbu – LQ), welches für Kleintiere geeignet ist, hinzugegeben. Das Adjuvans enthielt Nanolipidpartikel, GMDP (ein löslicher Zellwandbestandteil des *Lactobacillus bulgaricus*) und Cimetidin, welches als zusätzlicher Stimulator für das Immunsystem fungierte. Um eine homogene Lösung des Gerbu-Adjuvans und der Immunogenlösung zu erhalten, wurde die Lösung gevortext. Die erhaltene Suspension wurde aliquotiert und bei -18°C gelagert. Bei der Immunogenherstellung wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

6.1.2 Immunisierung der Kaninchen

Für die Immunisierung wurden acht weiße, weibliche Neuseeländer Hybridkaninchen von der Familie Schitkowitz (Niederösterreich) gekauft, die in 2 Gruppen unterteilt wurden:

- 1) DON-Gruppe á 4 weibliche Kaninchen (D₁-D₄)
- 2) ZON-Gruppe á 4 weibliche Kaninchen (Z₁-Z₄)

Die Kaninchen, die in Bodenhaltung mit Einstreu gehalten wurden, hatten ein Alter von 3 Monaten erreicht und wogen im Durchschnitt 2-2,5 kg. Um die Tiere unterscheiden zu können, wurden sie an verschiedenen Stellen rasiert. Vor jeder Immunisierung wurden die Tiere gewogen und einer Blutabnahme unterzogen, um feststellen zu können, ob sie sich gut weiterentwickelt haben, oder ob die verabreichten Immunogene das natürliche Wachstum einschränkten. Die Immunisierung wurde von Dr. Elisabeth Wagner am Institut für Ernährung der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

Einen Tag vor der 1. Immunisierung (Grundimmunisierung) wurde den Tieren Blut entnommen, welches als Nullserum (frei von DON- und ZON-Antikörpern) für die folgenden Titerbestimmungen dienen sollte.

Um genügend Antikörper zu produzieren, musste ein gewisses Immunisierungsschema erstellt und eingehalten werden. Dieses Schema sah jeweils 6 Wochen Wartezeit zwischen Immunisierung und Boosterung sowie zwischen den Boosterungen vor. Normalerweise würde der Abstand zwischen den Boosterungen 4 Wochen betragen, da es sich bei den Immunogenen aber um niedermolekulare Antigene (Haptene) handelte, wurde ein 6 Wochenintervall vereinbart. Bei jeder Immunisierung wurde den Tieren 1 ml (0,5 mg Antigen) der Immunogen-Gerbu-Lösung subcutan injiziert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde den Kaninchen Blut für die Titerbestimmung abgenommen und als Serum bei -20°C aufbewahrt.

6.1.3 Titerbestimmung des Kaninchenserums

Verwendete Reagenzien:

Coating Antigen: DON-ConA [c]=0,5 mg/ml
 ZON-ConA [c]=0,5 mg/ml

Coatingpuffer: Carbonat-Bicarbonatpuffer, pH=9,6
1,59 g Na₂CO₃
2,93 g NaHCO₃
wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst.

PBS-Tween[®] 20

PBS mit 2% Casein

Goat-Anti-Rabbit IgG HRP [c]=0,8 mg/ml

Tetramethylbenzidinlösung (TMB)

Schwefelsäure 3 M

Für die Ermittlung der Antikörperkonzentration im Kaninchenserum wurde eine Titerbestimmung durchgeführt. Für diese wurde eine Mikrotiterplatte, bestehend aus 96 Kavitäten, verwendet. Die einzelnen Kavitäten wurde mit 100 µl des verdünnten Coating-Antigens (Verdünnung des Coating-Antigens 1:1000 mit Coatingpuffer) versetzt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Konzentration an Coating-Antigen betrug 50 ng/well. Am nächsten Tag wurde die Titerplatte mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen mit einer 2% igen Caseinlösung für eine Stunde geblockt. Dabei wurde die Platte auf einen Horizontalschüttler gestellt, um sicher zu gehen, dass sich das Casein gleichmäßig verteilt. Danach wurde die Platte mit PBS-Tween 20 (5 mal 300 µl/well) gewaschen und mit dem verdünnten Kaninchenserum (100 µl/well) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion wurde ein Goat-Anti-Rabbit HRP (Meerrettichperoxidase) markierter Antikörper, der 1:10.000 verdünnt (je 200 µl/well) war, aufgegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur am Horizontalschüttler. Anschließend wurde Tetramethylbenzidin (200 µl/well) als Substrat für das Enzym hinzugegeben, um eine Färbung zu erreichen. Bei diesem Schritt dauerte die Inkubation nur etwa 15 Minuten, danach wurde eine Blaufärbung sichtbar. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 50 µl einer 3 M Schwefelsäurelösung/Kavität hinzupipettiert. Das Produkt färbte sich gelb, und der Titer konnte durch Messung der Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenreader ermittelt werden.

6.1.4 Ermittlung der Bindungskapazität des Kaninchenserums

Verwendete Reagenzien:

70 ng DON/ml H₂O_{dd} (Standard)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

1 ml der Standardlösung wurde mit 1 ml des nach dem Schlachten gewonnenen Serums des Kaninchens D₃ versetzt und bei 3.200 g und 23°C für 15 min in der IUF-Einheit zentrifugiert. Zum Waschen der Filtermembran wurden 2 ml H₂O_{dd} aufgegeben und unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Anschließend wurde mit 2 ml 80% ACN eluiert. Die Lösung wurde 30 min bei 3.200 g abzentrifugiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt und anschließend in 1 ml H₂O_{dd} aufgenommen. 100 µl wurden in die HPLC-Apparatur 1 injiziert.

6.1.5 Isolierung der IgG mit einer Protein A Säule

Verwendete Reagenzien:

Bindungspuffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer, 3 M NaCl, pH=7
2,4 g NaH₂PO₄
175,32 g NaCl
wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst und mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH=7 eingestellt

Elutionspuffer: 100 mM Natriumcitratpuffer, pH=3
21,41 g Mononatriumcitrat [HOC(COONa)(CH₂COOH)₂]
wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst und mit Eisessig auf pH=3 eingestellt

Tris-HCl-Puffer: 1M Tris-HCl Puffer, pH=9
12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (C₄H₁₁NO₃)
wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst und mit 0,1 M Natronlauge auf pH=9 eingestellt

Das tiefgekühlte Serum wurde auf Zimmertemperatur gebracht. Verwendet wurden die Sera der geschlachteten Kaninchen der DON-Reihe (D₁, D₃, D₄). Es wurde 1 ml des jeweiligen Serums in einen Dialyseschlauch gefüllt und gegen einen Liter Bindungspuffer (20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH=7) für eine Stunde dialysiert. Da das Serum nach der Dialyse immer noch trüb war, wurde es für 5 min bei 1.580 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein 0,45 µm Spritzenvorfilter gedrückt und auf die Protein A Säule aufgetragen. Diese wurde zuvor mit 5 ml H₂O_{dd} gewaschen, um das Konservierungsmittel (Ethanol) zu entfernen und mit 5 ml Elutionspuffer gespült. Zum Equilibrieren wurde die Protein A Säule mit 10 ml Bindungspuffer gespült. Das filtrierte und dialysierte Serum (~1 ml) wurde auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer gespült und anschließend wurde je 5 x 1 ml Elutionspuffer aufgetragen, um die IgG von der Säule zu eluieren. Das Eluat (1 ml des gereinigten IgG) wurde mit 100 µl Tris-HCl-Puffer versetzt. Es wurden 5 Fraktionen gesammelt und die Proteinkonzentration wurde mittels des Photometers bestimmt (siehe 3.5.1).

6.1.6 Isolierung der IgG aus Kaninchenserum mittels Caprylsäure-/Ammonium-sulfatfällung

Verwendete Reagenzien:

Acetatpuffer: 60 mM Natrium-Acetatpuffer, pH=4,5
 4,92 g CH₃COONa
 werden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst
 der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

PBS 10-fach konzentriert: 7,8 g NaH₂PO₄
 62,3 g Na₂HPO₄
 42,5 g NaCl
 wurden eingewogen und in 500 ml H₂O_{dd} gelöst.

1N Natriumhydroxid-Lösung: 20 g NaOH-Plätzchen wurden in einen 500 ml Messkolben überführt und mit H₂O_{dd} versetzt, bis sie sich gelöst haben und danach wurde der Messkolben mit H₂O_{dd} bis zur Markierung aufgefüllt.

Caprylsäure

Amberlite-Ionenaustauscherharz

Ammoniumsulfat 98%

PBS

Diese Methode diente zur Isolierung von IgG aus den Kaninchenseren. Durch Zugabe von Caprylsäure (Oktansäure) im sauren Milieu werden Albumin und andere Nicht-IgG Proteine ausgefällt. Ammoniumsulfat bewirkt die Aggregation der Immunglobuline und eignet sich zur Antikörperaufreinigung besonders gut, weil es in Konzentrationen über 0,5 M die biologische Aktivität empfindlicher Proteine nicht beeinträchtigt [McKinney M.M., Parkinson A.].

1 ml Serum wurde mit 4 ml Acetatpuffer versetzt und unter Rühren wurde mit einer Pasteurpipette 100 µl Caprylsäure tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde 30 Minuten gerührt und anschließend ~30 Minuten bei 2.100 g zentrifugiert. Das Pellet, das Albumin und andere nicht IgG Proteine enthielt, wurde verworfen.

In eine leere Glassäule wurde ein Filter aus Papier gelegt. Anschließend wurde sie mit ~ 2 g Amberlite-Ionenaustauscherharz gefüllt. Der Überstand wurde aufgebracht und mit einer Spritze durch die Säule gepresst. Das Eluat wurde in einem Zentrifugationsröhrchen aufgefangen und mit 10-fach konzentriertem PBS im Verhältnis 10:1 versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Danach wurde die Lösung mit Eis gekühlt und 0,277 g Ammoniumsulfat/ml Lösung zugesetzt. Anschließend wurde für 30 Minuten gerührt und die Lösung bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wurde bei 2.100 g 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das entstandene IgG-Pellet in ~200 µl PBS gelöst. Die Suspension, wurde zur Entfernung der Salze (Ammoniumsulfat) gegen einen Liter PBS dialysiert.

Anschließend wurde das Volumen ermittelt und die Konzentration der Proteine photometrisch bestimmt.

6.1.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten IgG

In Quarzküvetten wurden je 3 ml PBS vorgelegt und 30-100 µl der isolierten IgG-Lösung zugegeben. Die Extinktion wurde bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über die in 3.5.1 angeführte Formel berechnet [Layne E.].

6.2 Erzeugung polyklonaler IgY in Hühnern

Zusätzlich sollten polyklonale IgY aus Hühnereiern gewonnen werden.

6.2.1 Immunogenherstellung

Verwendete Reagenzien:

Immunogen: DON-BSA (DON gebunden an bovines Serumalbumin)

ZON-CMO-BSA (ZON über Carboxymethyloxim an bovines Serumalbumin gekoppelt)

Die beiden Immunogene (je 5 mg, lyophilisiert) wurde in 5 ml isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) gelöst. Anschließend wurde stark geschüttelt, um sicher zu gehen, dass die Immunogene sich vollständig lösen. Danach wurden zu 250 µl der jeweiligen DON- und ZON-NaCl Lösung je 250 µl des kompletten Freund Adjuvans (bestehend aus Parafinöl, Mannose-Monooleat als Emulgator und dem inaktiven Mycobacterium tuberculosis) hinzupipettiert und gevortext, bis eine homogene Lösung entstand. Dieses Gemisch wurde für die Grundimmunisierung verwendet. Für die Boosterung wurden 250 µl der jeweiligen DON- und ZON-NaCl Lösung mit je 250 µl des inkompletten Freund Adjuvans vermischt und dem Tier injiziert.

6.2.2 Immunisierung der Hühner

Für die Immunisierung wurden zwei Legehühner der Rasse Derco-braun (30-40 Wochen alt, gekauft von Heindl Co., Wien) verwendet. Beide Hühner wurden in Käfigen gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Wasser und Futter. Weiters wurde darauf geachtet, dass sie einen 16 h Tag und konstante Temperaturen ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) hatten. Die Immunisierung wurde am Department für Biochemie und Zellbiologie der Universität Wien von Ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Marcela Hermann durchgeführt. Je ein Huhn wurde für die Immunisierung mit DON-BSA und eines für die Immunisierung mit ZON-CMO-BSA gehalten. Für die Grundimmunisierung und die Boosterinjektionen wurde den Hühnern je 0,5 ml des Immunogengemisches (250 µg Immunogen) in den Brustmuskel (musculus pectoralis) injiziert. Der Abstand von der Grundimmunisierung zur ersten Boosterung betrug zwei

Wochen. Es folgten weitere Boosterinjektionen im Abstand von je einem Monat. Vor der Grundimmunisierung der Tiere wurden Eier gesammelt, welche für die Bestimmung des Nulltiters verwendet wurden. Dies diente dazu, einen eventuellen Erfolg der Immunisierung beobachten zu können.

6.2.3 IgY – Isolierung aus dem Eidotter

Verwendete Reagenzien:

Puffer: pH=7,5
 33,2 g Na₂HPO₄
 2,62 g NaH₂PO₄
 116,90 g NaCl
 wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst.

Für die Titerbestimmung wurden die Eier 7 Tage nach jeder Immunisierung gesammelt und untersucht. Um festzustellen, ob die Immunisierung den gewünschten Erfolg erzielt hat, wurden die Eier nach jeder Immunisierung mit dem Nulltiter verglichen. Hierfür wurden die Eidotter sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen, um sie vom Eiweiß zu trennen. Anschließend wurde die Perivittelinmembran (Membran, die den Dotter umgibt) entfernt und die Dotter mit dem gleichen Volumen an Puffer (Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄/NaCl-pH=7,5) vermischt. Um den Dotter im Puffer homogen zu lösen, wurde 15 Min gerührt. Danach wurden die Lösungen für 15 min bei 4°C und 29.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde über 4 Lagen Zellstoff filtriert und für die Titerbestimmung verwendet. Das Präzipitat wurde verworfen.

6.2.4 Titerbestimmung von Hühnereiern

Verwendete Reagenzien:

Coating Antigen: DON-ConA [c]=0,5 mg/ml
 ZON-ConA [c]=0,5 mg/ml

Coatingpuffer: Carbonat-Bicarbonatpuffer, pH=9,6
1,59 g Na₂CO₃
2,93 g NaHCO₃
wurden in einem Liter H₂O_{dd} gelöst.

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonsäure)-Lösung (ABTS)

SDS (99%)

Rabbit-Anti-Chicken IgY HRP [c]=1 mg/ml

Eine 96-well Titerplatte wurde mit 50 ng Coating-Antigen (ZON/DON) in 200 µl Coatingpuffer (Carbonat-Bicarbonatpuffer)/well über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte 5 mal je 300 µl/well mit PBS-Tween 20 gewaschen. Das Blocken der freien Bindungsstellen erfolgte mit 300 µl einer 2% igen Caseinlösung. Nach einer Stunde wurde die Mikrotiterplatte sorgfältig mit PBS-Tween 20 gewaschen und mit 100 µl der verdünnten Dotter Lösung (1:500-1:4000 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die freien IgY durch Waschen mit PBS-Tween 20 entfernt. Danach wurden 200 µl einer mit Meerrettichperoxidase markierten Rabbit-Anti-Chicken IgY Lösung (1:10.000 mit PBS) auf die Platte aufgetragen. Nach der Inkubation wurde die Platte abermals gewaschen und mit 200 µl Substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonsäure)) für 15 Min inkubiert. Zum Schluss wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1% SDS (Sodium dodecyl sulfat) gestoppt. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader gemessen.

6.3 *Chromatographische Bestimmung von DON mittels HPLC-UV*

6.3.1 *Chromatographische Bedingungen*

Für die Bestimmung von DON wurden 2 HPLC-Systeme verwendet:

HPLC-System 1: Das System setzte sich aus einer Gradientenpumpe (Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump), einem Injektionsventil von Rheodyne (Modell 7125) mit einer 100 µl Injektionsschleife, einem Säulenofen (Merck-Hitachi 655 A-52) und einem UV-Detektor (Merck-Hitachi UV Detektor L-4000) zusammen. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Stratos LC Software von Polymer Laboratories Ltd (Version 3.0).

Getrennt wurde DON von anderen Verbindungen in einer analytischen Säule der Firma Phenomenex - Synergi 4u Polar-RP, die eine Länge von 250 mm, einen Innendurchmesser von 4,6 mm und eine Partikelgröße von 4 µm aufwies. Als Vorsäule wurde eine Kartusche von Phenomenex mit einem C18 Material, einer Länge von 4 mm und einem Innendurchmesser von 3 mm vorgeschaltet, um eventuelle Verunreinigungen von der analytischen Säule abzuhalten.

Als mobile Phase wurde Acetonitril/Methanol/bidestilliertes Wasser (5:5:90, v/v/v), verwendet, die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Mit Hilfe dieser Apparatur wurden hauptsächlich die Vorversuche durchgeführt.

HPLC-System 2: Dieses bestand aus einer isokratischen Pumpe (Shimadzu LC-9A) und einem Autosampler (Merck-Hitachi AS-2000) mit einer 100 µl Injektionsschleife. DON wurde mittels UV-Detektor (Shimadzu SPD-6A) bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert. Die anschließende Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Stratos LC Software (Version 3.0) von Polymer Laboratories Ltd.

Getrennt wurde DON von anderen Substanzen mit einer ACE 3-RP Aqua Säule, die eine Länge von 150 mm und einen Innendurchmesser von 2,1 mm und eine Partikelgröße von 3 µm aufwies. Die Säule war mit einer Kartusche von Phenomenex mit einem C18 Material und einer Länge von 4 mm und einem Innendurchmesser von 3 mm gekoppelt.

Als mobile Phase wurde Acetonitril/H₂O_{dd} (7:93, v/v) verwendet, die mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min durch die Säule gepumpt wurde.

6.3.2 Herstellen einer DON – Standardlösung aus einem Lyophilisat

Der DON-Standard lag in lyophilisierter Form mit einem Nettogewicht von 5 mg vor. Bevor der Standard geöffnet wurde, wurde er auf Raumtemperatur gebracht, um mögliche hygroskopische Wechselwirkungen zu minimieren. Anschließend wurde das Lyophilisat mit wenig ACN vermengt und in einen 5 ml Messkolben überführt. Das Fläschchen, in dem der Standard in kristalliner Form vorlag, wurde mehrfach mit geringen Volumina ACN gespült, bis der Miniskus der Flüssigkeit unterhalb der Markierung des 5 ml Messkolbens lag. Der Messkolben wurde vorsichtig mit ACN bis zur Markierung aufgefüllt und DON durch eine 15 minütige Behandlung im Ultraschallbad vollständig gelöst. Die Sollkonzentration der Standardlösung liegt lt. Hersteller (Biopure) bei $100,9 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$.

Anschließend wurde die Standardlösung auf eine Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ mit ACN verdünnt und photometrisch überprüft. Dazu wurde 1 ml der verdünnten Standardlösung ($20 \mu\text{g/ml}$) in eine Quarzküvette überführt und die Extinktion bei 218 nm gemessen.

Die Berechnung erfolgte wie angegeben:

$$c(\mu\text{g} / \text{ml}) = A \times m \times 1000 / \varepsilon \times d$$

A = Absorbance (Extinktion) bei 218 nm

m = Molekulargewicht (296,3 g/mol)

ε = molarer Extinktionskoeffizient von DON in ACN [$6825 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$]

d = Länge des Weges durch die Küvette (cm)

$$c = 0,4669 \times 296,3 \times 1000 / 6825$$

$$c = 20,27 \mu\text{g/ml}$$

Die DON-Standardlösung wurde aliquotiert (~1 ml) und bei -18°C gelagert. Für die Herstellung von weiteren Verdünnungen für Analysenzwecke wurde immer ein Aliquot aufgetaut und dementsprechend verdünnt [Krska R., Szente E.].

6.3.3 Erstellen einer Kalibrationsgeraden für DON mit beiden HPLC-Systemen

Die DON-Standardlösung (20 µg/ml) wurde mit destilliertem Wasser auf Konzentrationen zwischen 50 ng/ml – 1 µg/ml verdünnt Aliquote in beide HPLC-Systeme injiziert. Kalibriergeraden wurden erstellt, indem die Peakfläche gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Die Kalibration erfolgte in regelmäßigen Abständen, wobei die Beständigkeit der Lösung überprüft wurde.

6.4 Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von DON

6.4.1 Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit (IUF) und Untersuchung der Beständigkeit

In den nachfolgenden Versuchen wurden drei unterschiedliche Filtrationseinheiten verschiedener Hersteller auf ihre Beständigkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln überprüft.

a. Vivaspin (Sartorius)

Füllvolumen: 2 ml

Membranfläche: 1,2 cm²

Cut-off: 30.000 Da

Material:

Membran: Polyethersulfon

Filtrationskörper: Polypropylen

Auffanggefäß: Polycarbonat



b. VectaSpin™ Micro (Whatman)

Füllvolumen: 0,4 ml

Membranfläche: 0,28-0,34 cm²

Cut-off: 12.000 Da

Material:

Membran: Cellulose-Triacetat

Filtrationskörper: keine Angaben

Auffanggefäß: keine Angaben



c. Amicon® Ultra-4 (Millipore)

Füllvolumen: 4 ml

Membranfläche: 12,62 cm²

Cut-off: 30.000 Da

Material:

Membran: Low binding regenerated Cellulose

Filtrationskörper: Co-polymer

Styren/Butadien

Auffanggefäß: Polypropylen



Abbildung 10: a-Vivaspin Filtrationseinheit (<http://www.sartorius.de/index.php?id=2436>), b-VectaSpin™ Micro (<http://www.whatman.com/products/?pageID=7.26.339>), c-Amicon® Ultra-4 (<http://www.millipore.com>)

Verwendete Reagenzien:

ACN
MeOH

In die unterschiedlichen Immunultrafiltrationseinheiten (Vivaspin, VectaSpin™ Micro, Amicon® Ultra-4) wurden die maximalen Füllvolumina an 80-100% ACN/H₂O_{dd} oder an reinem Methanol eingefüllt. Die IUF-Einheiten wurden dann 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend die Lösungsmittel abzentrifugiert. Die IUF-Einheiten wurden auf ihre Veränderungen (Durchlässigkeit, Beständigkeit der Membran, Verfärbungen des Kunststoffes) infolge der Einwirkung der Lösungsmittel untersucht.

Für die weiteren Untersuchungen wurde ausschließlich die IUF-Einheiten Amicon® Ultra-4 (Millipore) verwendet.

6.4.2 Untersuchung der Membranadsorption

Verwendete Reagenzien:

~55 ng DON/ml H₂O_{dd}

In die IUF-Einheiten von Millipore wurden 4 ml der 55 ng/ml DON-Standardlösung eingefüllt. Die Lösung wurde 30 min bzw. 60 min bei Raumtemperatur in der IUF-Einheit stehen gelassen, und anschließend abzentrifugiert. 100 µl des Filtrats wurden in die HPLC-Apparatur injiziert. Um die Ausbeute bestimmen zu können, wurde auch die DON-Standardlösung direkt injiziert.

6.4.3 Testen des “Cut-offs“

Verwendete Reagenzien:

~70 ng DON/ml H₂O_{dd}

monoklonale DON-Antikörper [c]=1 mg/ml

Dafür wurde 1 ml einer ~70 ng/ml DON-Standardlösung, 100 µl monoklonale DON-Antikörper und 2,9 ml H₂O_{dd} in die IUF-Einheit mit einer Membran “Cut-off“ von 30 kDa,

50 kDa und 100 kDa pipettiert und bei 23°C und 3.200 g für 25 min zentrifugiert. Gewaschen wurde die Immunultrafiltrationseinheit mit 4 ml H₂O_{dd}. Der Antigen-Antikörperkomplex wurde durch Zugabe von 4 ml ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) dissoziiert. Das Antigen befand sich nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 23°C und 3.200g nach 25 min im Eluat. Das Eluat wurde eingengt und mit mobiler Phase auf 1 ml aufgefüllt, mittels HPLC-UV untersucht und die Konzentration des Antigens rechnerisch ermittelt.

6.4.4 Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers

Verwendete Reagenzien:

70 ng DON/ ml H₂O_{dd}

150 ng DON/ ml H₂O_{dd}

300 ng DON/ ml H₂O_{dd}

500 ng DON/ ml H₂O_{dd}

750 ng DON/ ml H₂O_{dd}

1000 ng DON/ ml H₂O_{dd}

1250 ng DON/ ml H₂O_{dd}

monoklonale DON-Antikörper [c]=1 mg/ml

Zu je 400 µl mAk wurden 1 ml DON-Standardlösung (70, 150, 300, 500, 750, 1000 bzw. 1250 ng DON/ml H₂O_{dd}) in die IUF-Einheit (Amicon[®] Ultra-4) hinzugegeben.

Danach wurden die Lösungen abzentrifugiert (23°C, 3.200g, 15 min) und der Antigen-Antikörperkomplex mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Innenteil der IUF-Einheit wurde herausgenommen und in ein 15 ml Greiner Röhrchen gesteckt. DON wurde mit 4 ml 80% ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) 20 min bei 23°C und 3.200 g durch die Membran filtriert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt und mit mobiler Phase auf 1 ml aufgefüllt und mittels HPLC-UV analysiert.

6.4.5 Optimierung der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur

Verwendete Reagenzien:

monoklonale DON-Antikörper (c=1 mg/ml)

~70 ng DON/ml H₂O_{dd}

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

0,1 ml mAk-Lösung, 2,9 ml H₂O_{dd} und 1 ml DON-Standardlösung (~70 ng/ml H₂O_{dd}) wurden in die IUF-Einheit (Amicon[®] Ultra-4) pipettiert und gevortext. Die IUF-Einheiten wurden 0, 15, 30 oder 60 min bei RT bzw. 0, 15, 30 oder 60 min bei 36°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung bei 23°C und 3.200 g 20 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt. Die Membran wurde mit 2 ml H₂O_{dd} gewaschen und 10-20 min bei 23°C und 3.200 g zentrifugiert. Der Innenteil der IUF-Einheit wurde herausgenommen und in ein 15 ml Greiner Röhrchen gesteckt. DON wurde mit 4 ml 80% ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) 20 min bei 23°C und 3.200 g durch die Membran filtriert. Das Filtrat wurde im Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand in 1 ml mobiler Phase aufgenommen.

6.4.6 Wahl des Elutionsmittels

Verwendete Reagenzien:

monoklonale DON-Antikörper (c=1 mg/ml)

~70 ng DON/ml H₂O_{dd}

ACN

H₂O_{dd}

Aus Vorversuchen war bekannt, dass ACN sich besser für die Dissoziation des Antigen-Antikörperkomplexes eignet als Methanol. Deshalb wurden die weiteren Versuche mit ACN durchgeführt.

In mehrere IUF-Einheiten wurde 1 ml der DON-Standardlösung mit 100 µl mAk vermischt. Die Röhrchen wurden für 10 min bei 3200 g abzentrifugiert und mit 1 ml H₂O_{dd} gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Danach wurde 1 ml Lösungsmittel mit steigendem Anteil

an ACN (20-100 %) in die IUF-Einheiten hinzugefügt und jeweils 10 min zentrifugiert. 100 µl des jeweiligen Eluats wurden in die HPLC-Apparatur injiziert und die ermittelte Konzentration mit jener der DON-Standardlösung verglichen. An Hand der Wiederfindung wurde die ideale Zusammensetzung des Elutionsmittels ermittelt.

6.4.7 Optimierung des Elutionsvolumens

Verwendete Reagenzien:

monoklonale DON-Antikörper (c=1 mg/ml)

~70 ng DON/ml H₂O_{dd}

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

0,1 ml einer 1 mg/ml mAk-Lösung, 2,9 ml H₂O_{dd} und 1 ml DON-Standardlösung (~70 ng DON/ml H₂O_{dd}) wurden in die IUF-Einheit pipettiert und gevortext. Die Lösung wurde 10 min bei RT und 3.200 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt. Die IUF-Einheit wurde mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen und bei RT und 3.200 g 10-20 min zentrifugiert. Der Innenteil der IUF-Einheit wurde herausgenommen und in ein 15 ml Greiner Röhrchen gesteckt. DON wurde mit 1, 2, 3 oder 4 ml ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) aus dem Ag-Ak-Komplex freigesetzt, die Lösung bei 23°C und 3.200 g 10-20 min durch die Membran zentrifugiert und ACN im Stickstoffstrom bei 30°C entfernt. Der Rückstand wurde in 1 ml mobiler Phase aufgenommen.

6.4.8 Testen der Methode unter optimierten Bedingungen auf deren Reproduzierbarkeit

Verwendete Reagenzien:

monoklonale DON-Antikörper (c=1 mg/ml)

~70 ng DON/ml H₂O_{dd}

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

0,1 ml einer 1 mg/ml mAk-Lösung wurden mit 2,9 ml H₂O_{dd} und 1 ml des DON-Standards (~70 ng DON/ml H₂O_{dd}) in die IUF-Einheit gegeben und gevortext. Anschließend wurde die

Lösung für 20 min bei 24°C und 3.200 g abzentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt, die Membran mit 0,5 ml H₂O_{dd} gewaschen und 10 min bei 23°C und 3.200 g zentrifugiert. Nach dem Austausch des Auffanggefäßes wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit 4 ml ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) dissoziiert und 20 min bei 23°C und 3.200 g abzentrifugiert. Dieser Ansatz wurde 3 Mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Methode sicher zu stellen.

6.4.9 Anwendung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von DON in Mais

6.4.9.1 Extraktion

1 kg einer vorgemahlten Maisprobe wurde mit einer Rotormühle (Pulverisette Analysette Laborette) gemahlen. Das eingesetzte Sieb besaß eine Porengröße von 0,5 mm. Das so erhaltene Maismehl wurde anschließend aliquotiert und bei -18°C gelagert. Für die einzelnen Versuche wurde die Probe auf Raumtemperatur gebracht.

5 g Maisprobe (Maismehl) wurden eingewogen, mit 40 ml H₂O_{dd} versetzt und für 30 min gerührt. Die Lösung wurde anschließend dekantiert und auf zwei Zentrifugenbecher (V=30 ml) aufgeteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 23°C und 15.770 g für 10 min. Der Überstand wurde durch eine Borosilikatnutsche (Porosität 5 = 1-1,6 µm Porengröße) weiter filtriert. Um eine Verstopfung der IUF-Membran zu vermeiden, wurde die Lösung zusätzlich durch ein Membranfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtriert und dann erst ein Aliquot (1 ml) des Filtrats in die IUF-Einheit eingefüllt.

6.4.9.2 Probenaufarbeitung und Bestimmung

Verwendete Reagenzien:

Maismehl

monoklonale DON-Antikörper (c=1 mg/ml)

700 ng DON/ml H₂O

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

5 g einer Maisprobe wurden mit 40 ml H₂O_{dd} versetzt und für 30 min mittels Magnetrührer gerührt. Der Extrakt wurde bei 23°C und 15.770 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit einer Borosilikatnutsche (Porosität 5 = 1-1,6 µm Porengröße) vorfiltriert, um größere Matrixbestandteile abzutrennen. Anschließend wurde das Filtrat durch ein Membranfilter (Porengröße: 0,22µm) filtriert, um sicher zu gehen, dass es die IUF-Membran nicht verstopft. 700 ng DON wurden zu 10 ml Filtrat zugesetzt, und anschließend wurde davon 1 ml entnommen und gemeinsam mit 400 µl mAk-Lösung und 600 µl H₂O_{dd} in die IUF-Einheit gegeben. Das Gemisch wurde für ein paar Sekunden gevortext und dann bei 23°C und 3.200 g 15 min lang zentrifugiert. Um niedermolekulare Matrixbestandteile zu entfernen, wurde die IUF-Membran mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen. Die Waschlösung wurde durch Zentrifugieren der IUF-Einheit bei 23°C und 3.200 g für 25 min entfernt. Nach dem Austausch des originalen Zentrifugenröhrchens gegen ein 15 ml Greiner Röhrchen wurde mit 2 ml ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) und Zentrifugation bei 23°C und 3.200 g für 25 min eluiert. Anschließend wurde das Filtrat bei 30°C im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in H₂O_{dd} resuspendiert, in einen 1 ml Messkolben transferiert und unter Nachwaschen des Greinerröhrchens mit H₂O_{dd} bis zur Ringmarkierung aufgefüllt. Die Lösung wurde gevortext. Es wurden 100 µl des Filtrats in das HPLC-System 2 injiziert.

6.4.9.3 Vergleich der Probenaufarbeitung mittels Immunaффinitätschromatographie und Immunultrafiltration

1. Immunaффinitätschromatographie

Verwendete Reagenzien:

Polyethylenglycol (MG=8000)

H₂O_{dd}

5 g Maismehl wurden eingewogen, mit 1 g Polyethylenglycol 8000 (PEG) versetzt und in 20 ml H₂O_{dd} gelöst. Die Lösung wurde 5 Minuten gerührt und über einen Faltenfilter filtriert.

Die käuflich erworbenen Immunaффinitätssäulchen (DONtest™ HPLC, Vicam) wurden auf die Festphasenextraktionsapparatur (Visiprep, Millipore) gesetzt und durch die Einwirkung der Schwerkraft wurde die Aufbewahrungslösung vor Gebrauch entfernt. Anschließend wurde 1 ml des Filtrats auf ein Immunaффinitätssäulchen (IAS) aufgetragen und mit Hilfe der Schwerkraft durch die Säule befördert. Das Säulchen wurde mit 5 ml H₂O_{dd} gewaschen. Für die Elution von DON wurde 1 ml Methanol verwendet.

Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingeeengt und der Rückstand in 300 µl H₂O_{dd} gelöst. Davon wurden 50 µl in das HPLC-System 2 injiziert.

2. Immunultrafiltration

Die genaue Durchführung ist im Abschnitt 6.4.9.2. beschrieben. Der Rückstand des bis zur Trockene eingeeengten Eluats wurde wie bei den Immunaффinitätssäulchen beschrieben, in 300 µl H₂O_{dd} gelöst. Davon wurden 50 µl in das HPLC-System 2 injiziert.

6.4.9.4 Validierung der IUF-HPLC-UV-Methode mittels eines Mais-Referenzmaterials

Verwendete Reagenzien:

Zertifiziertes Referenzmaterial, Mais ($c_{\text{DON}}=474\pm 30$ µg/kg) von Biopure (Tulln)

ACN

H₂O_{dd}

Es wurden 5 g Maisprobe (Referenzmaterial) eingewogen, mit 40 ml H₂O_{dd} versetzt und für 30 min gerührt. Die Lösung wurde anschließend dekantiert und auf zwei Zentrifugenbecher (V=30 ml) aufgeteilt und bei 23°C und 15.770 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Borosilikatnutsche filtriert. Danach wurde der Extrakt durch ein Membranfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtriert.

Die weitere Aufarbeitung mittel IUF-Methode erfolgte wie in Abschnitt 6.4.9.2. beschrieben. Dieser Vorgang wurde an vier aufeinander folgenden Tagen wiederholt und die Reproduzierbarkeit als auch die Wiederfindung der Methode ermittelt.

6.5 *Chromatographische Bestimmung von ZON mittels HPLC-FLD*

6.5.1 *Chromatographische Bedingungen*

Für die chromatographische Bestimmung von ZON wurden ein HPLC-System und 2 verschiedene analytische Säulen verwendet

HPLC-System: Das System bestand aus einer Gradientenpumpe (Merck-Hitachi L-6200 intelligent Pump), einem Injektionsventil von Rheodyne (Modell 7125) mit einer 100 µl Injektionsschleife, einem Säulenofen (Merck-Hitachi 655 A-52) und einem Fluoreszenz-Detektor (Merck-Hitachi F-1080). Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 330 nm und die Emissionsintensität wurde bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. Ausgewertet wurde mit der Stratos LC Software von Polymer Laboratories Ltd. Version 3.0.

Säule 1: Mit dieser Säule wurden hauptsächlich Vorversuche durchgeführt. Bei der analytischen Säule vom Typ ACE-3 C18 RP handelte es sich um eine Reversed Phase Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm, einer Länge von 150 mm und einem Innendurchmesser von 2,1 mm. Als mobile Phase wurde zu Beginn ein Gemisch aus Acetonitril/ H₂O_{dd} (48:52, v/v) verwendet. Später wurde die Zusammensetzung des Eluens auf Acetonitril/H₂O_{dd} (40:60, v/v) geändert.

Säule 2: Hypersil-BDS C18 – diese Säule wies eine Partikelgröße von 5 µm und eine Länge von 150 mm mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm auf. Als mobile Phase wurde Acetonitril/H₂O_{dd} (40:60, v/v), verwendet.

Als Vorsäulensystem wurde ein Kartuschenhalter mit einer C18 Cartridge von der Firma Phenomenex (genaue Angaben siehe unter 6.3.1) verwendet, um eine eventuelle Verunreinigung der Säule durch Realproben zu verringern.

6.5.2 Erstellen einer Kalibration für das HPLC-System

Die ZON-Standardlösung (104,4 µg/ml) wurde mit ACN/ H₂O_{dd} (15:85, v/v) so verdünnt, dass Konzentrationen zwischen 5 ng/ml und 150 ng/ml erhalten wurden. Die Kalibration wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt und zwischendurch die Stabilität der ZON-Lösungen überprüft.

6.5.3 Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung

6.5.3.1 Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit

Da sich die Amicon[®] Ultra-4 IUF Einheit beständig gegenüber ACN und Methanol erwiesen hat (siehe Vorversuche DON), wurde sie auch für die Probenvorbereitung von ZON verwendet.

6.5.3.2 Untersuchung der Membranadsorption

Verwendete Reagenzien:

100 ng ZON/ml H₂O_{dd}

Es wurde je 1 ml der 100 ng ZON/ml H₂O_{dd} Standardlösung in die 3 IUF-Einheiten (Amicon[®] Ultra-4) pipettiert und dann die Lösung in der 1. IUF-Einheit sofort, in der 2. IUF-Einheit nach 30 min und in der 3. IUF-Einheit nach 60 min bei Raumtemperatur (25°C) zentrifugiert (3.200 g für 10 min). Danach wurden 100 µl des Filtrats in das HPLC-System injiziert.

Das Filtrat wurde mittels HPLC-FLD analysiert.

Um die Wiederfindung zu bestimmen, wurde auch die Standardlösung (100 ng ZON/ml H₂O_{dd}) injiziert und die beiden Messwerte verglichen.

6.5.3.3 Adsorptionsverhalten von ZON an diversen Materialien der Auffanggefäße

Für diesen Versuch wurden die drei gängigsten Materialien getestet, die bei der Immunultrafiltration als Auffangbehälter zum Einsatz kamen. Dafür wurde 1 ml einer 100 ng ZON/ml H₂O_{dd}-Standardlösung in drei Gefäße unterschiedlichen Materials pipettiert. Eines war ein konisches Glasvial mit einem Füllvolumen von 15 ml, das zweite war ebenfalls ein konischer Behälter (Greiner Röhrchen aus Polypropylen), und das dritte war der Auffangbehälter der Amicon[®] Ultra 4 IUF. Die ZON-Konzentration der Lösungen wurde jeweils nach einer Inkubationsdauer von 40 min untersucht.

In einem zweiten Ansatz wurde die Standardlösung in den Gefäßen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden untersucht. Die Analyseergebnisse wurden mit jenen der direkt injizierten Standardlösung verglichen.

6.5.3.4 Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die unspezifische Membranadsorption

Verwendete Reagenzien:

1000 ng ZON/ml H₂O_{dd}

ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (10:90, v/v)

H₂O_{dd}

Um die Wechselwirkung von ZON mit der Immunfiltrationsmembran zu minimieren bzw. auszuschalten, wurde ZON in 10% bzw. 15% ACN/H₂O_{dd} (v/v) in die Immunultrafiltrationseinheit einbracht.

Dazu wurden 100 µl einer ZON-Standardlösung (1000 ng/ml) mit 900 µl 10% bzw. 15% ACN/H₂O_{dd} (v/v) vermischt. Die Lösung wurde zentrifugiert (3.200 g für 10 min) und dann die Membran mit 1 ml 10% bzw. 15% ACN/H₂O_{dd} (v/v) gewaschen. Zum Eluieren von adsorbiertem ZON wurden 2 ml ACN eingesetzt.

Zwischen der Aufgabe, dem Waschschrift und der Elution erfolgte immer ein Zentrifugationsschritt und jedes einzelne Filtrat wurde mittels HPLC-FLD untersucht.

6.5.3.5 Bestimmung der Bindungskapazität der monoklonalen Antikörper

Verwendete Reagenzien:

mAk₁ (ZEN-1.1.3.27.21) (c=11,68 mg/ml)

mAk₂ (ZEN-2.1.2.4.9) (c=8,32 mg/ml)

ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

Es wurden zwei unterschiedliche Klone des ZON-Ak auf deren Bindungsspezifität bezüglich ZON untersucht. Für diese Versuche wurden je 100 µl eines 1000 ng/ml ZON-Standards in die IUF-Einheit pipettiert und mit je 50 µl mAk (ZEN-1.1.3.27.21 bzw. ZEN-2.1.2.4.9) vermischt und mit ACN/ H₂O_{dd} (15:85, v/v) auf 4 ml aufgefüllt. Anschließend wurde ohne Inkubation bei 25°C und 3.200 g für 15 min zentrifugiert. Zum Waschen wurden 4 ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) eingesetzt und abzentrifugiert. Eluiert wurde 2-mal mit je 3-4 ml ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v).

6.5.3.6 Inkubationsversuche mit mAk₁ und Guanidinhydrochlorid

Verwendete Reagenzien:

200 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

mAk₁ (ZEN-1.1.3.27.21) (c=11,68 mg/ml)

Guanidinhydrochlorid (6 M)

150 µl mAk₁ wurden mit 1 ml ZON-Standardlösung (200 ng/ml) in die IUF-Einheit pipettiert und die Lösung abzentrifugiert. Es wurde mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen. Bei der Elution wurden je 4 ml Guanidinhydrochlorid in die Filtrationseinheiten gefüllt und sofort, nach 15 min, 30 min oder 60 min abzentrifugiert. Während der Inkubation mit dem Elutionsmittel standen alle IUF-Einheiten auf einem Vortex. Es wurden je 100 µl aus dem Eluat in die HPLC-Apparatur injiziert.

6.5.4 Anwendung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von ZON aus Mais

6.5.4.1 Extraktion

1 kg einer Maisprobe wurde mit einer Rotormühle gemahlen. Das eingesetzte Sieb besaß eine Porengröße von 0,5 mm. Das Maismehl wurde anschließend abgepackt und bei -18°C gelagert. Für die Extraktion wurde die Probe auf Raumtemperatur gebracht. 5 g Probe wurden mit 20 ml Acetonitril/Wasser (60:40, v/v) vermengt und eine Stunde mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wurde auf folgende Arten weiter verarbeitet:

1. Herabsetzung der Acetonitrilkonzentration durch Abdampfen:

10 ml des Extrakts wurden in einen 250 ml Rundkolben überführt und bei 30°C am Rotavapor eingengt. Die verbleibende Lösung wurde in einen 10 ml Messkolben transferriert und mit ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) aufgefüllt. Da immer noch Schwebstoffe in der Lösung waren, wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Ein Aliquot (1 ml) des Extrakts wurde danach auf die IUF-Einheit aufgetragen.

2. Herabsetzung der Acetonitrilkonzentration durch Verdünnung:

1 ml des Filtrats wurde mit 4 ml PBS verdünnt und auf die IUF-Einheit aufgegeben.

6.5.4.2 Probenaufarbeitung und Bestimmung

Verwendete Reagenzien:

Maismehl

mAk₁ (ZEN-1.1.3.27.21) (c=11,68 mg/ml)

2000 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (60:40, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

Guanidinhydrochloridlösung (6 M)

Das Filtrat wurde in der IUF-Einheit mit 50 µl mAk₁ und 4 ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) vermischt und zentrifugiert. Die IUF-Einheit wurde zwei Mal mit 4 ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) gewaschen und wieder für je 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde mit 4 ml 6 M Guanidinhydrochloridlösung zweimal eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC-FLD analysiert.

Parallel zu dem Versuch wurde 1 ml ZON-Standardlösung (2000 ng/ml) mit 4 ml PBS verdünnt und auf die IUF-Einheit aufgegeben, mit 50 µl mAk₁ vermischt und zentrifugiert. Die IUF-Einheit wurde zwei Mal mit 4 ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) gewaschen und die Lösung für je 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde mit 4 ml 6 M Guanidinhydrochloridlösung zweimal eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC-FLD analysiert.

6.5.5 Anwendung der Immunultrafiltrationsmethode für die Probenvorbereitung von ZON in Weizen

6.5.5.1 Extraktion

5 g Weizenmehl wurden mit 20 ml ACN/H₂O_{dd} (60:40, v/v) eine Stunde gerührt. Anschließend wurde der Extrakt mittels eines Faltenfilters filtriert und wie unter Punkt 1 bzw. 2 angeführt, weiterverarbeitet.

1. Herabsetzung der Acetonitrilkonzentration durch Abdampfen:

Je nach Anzahl der Versuche wurden 5 ml des Filtrats in einen 5 ml Messkolben überführt und bei ~30°C im Stickstoffstrom eingengt. Der im Messkolben verbleibende Anteil wurde mit H₂O_{dd} bis zur Markierung aufgefüllt und anschließend kurz gevortext. 1 ml der Lösung wurde auf die IUF-Einheit aufgetragen.

2. Herabsetzung der Acetonitrilkonzentration durch Verdünnung:

1 ml des filtrierten Extrakts wurden entnommen und mit 4 ml PBS verdünnt und auf die IUF-Einheit aufgetragen.

6.5.5.2 Optimierung der Inkubationszeit von mAk₂

Verwendete Reagenzien:

Weizenmehl

5000 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

mAk₂ (ZEN-2.1.2.4.9) (c=8,32 mg/ml)

ACN/H₂O_{dd} (60:40, v/v)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

12,5 g Weizenprobe wurden mit 1 ml ZON-Standardlösung (5000 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)) und 49 ml ACN/H₂O_{dd} (60:40, v/v) vermengt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde der Extrakt über ein Faltenfilter filtriert und danach im Stickstoffstrom eingengt. Der Rückstand wurde mit H₂O_{dd} auf das ursprüngliche Volumen (50 ml) aufgefüllt. Danach wurden mehrere Ansätze mit je 1 ml des Extrakts und 50-100 µl mAk₂ in die IUF-Einheit eingefüllt. Zwei der Mischungen wurden sofort, eine nach 15 min, eine nach 30 min und eine nach 60 min zentrifugiert. Während der Inkubation wurden die IUF-Einheiten mittels Vortex geschüttelt. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde immer bei 25°C und 3.200 g mehrere Minuten zentrifugiert. Für die Elution wurden 4 ml ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) verwendet. Die Eluate wurden im Stickstoffstrom auf < 1 ml in einem Messkolben eingengt und anschließend mit ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) wieder bis zur Marke aufgefüllt. Ein Aliquot wurde in die HPLC-Apparatur injiziert.

6.5.5.3 Testen der Immunultrafiltrationsmethode mit mAk₁

Verwendete Reagenzien:

Weizenmehl

5000 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

mAk₁ (ZEN-1.1.3.27.21) (c=11,68 mg/ml)

Guanidinhydrochlorid (6 M)

H₂O_{dd}

Die Extraktion der Weizenprobe wurde wie in Kapitel 6.5.5.1 beschrieben durchgeführt. Der vorbereitete Extrakt wurde zu je 1 ml auf die IUF-Einheiten aufgetragen und mit 150 µl mAk₁ vermengt.

Anschließend wurde die Lösung bei 25°C und 3.200 g 30 min zentrifugiert und dann die IUF-Einheit mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen. Beim letzten Schritt, der Elution, wurde die IUF-Einheit mit 4 ml 6 M Guanidinhydrochloridlösung befüllt und eine Stunde geschüttelt. Wieder wurde wie vorher beschrieben zentrifugiert und ein zweites Mal 4 ml der Guanidinhydrochloridlösung in die Einheit gegeben. Diese Lösung wurde jedoch sofort abzentrifugiert. Von den so erhaltenen Eluaten wurden je 100 µl in die HPLC-Apparatur injiziert, die Konzentration von ZON ermittelt und anschließend die Wiederfindung in Bezug auf den ZON-Standard bestimmt.

Die Probe wurde mehrmals in ungespikter und 2 Mal in gespikter Form (400 ng/g Probe) analysiert.

6.5.5.4 Testen der Immunultrafiltrationsmethode mit mAk₂ und einer Weizenprobe

Verwendete Reagenzien:

Weizenmehl

5000 ng ZON/ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v)

mAk₂ (ZEN-2.1.2.4.9) (c=8,32 mg/ml)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

Die Extraktion der Weizenprobe wurde wie in Kapitel 6.5.5.1 beschrieben durchgeführt. Der vorbereitete Extrakt wurde zu je 1 ml auf die IUF-Einheiten aufgetragen und mit 50 µl mAk₂ vermischt und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abzentrifugiert und die IUF-Einheit mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen. Die Lösung wurde bei 25°C und 3.200 g je 30 min zentrifugiert. Die Elution erfolgte in 2 Schritten mit je 4 ml ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v). Beide Eluate wurden im Stickstoffstrom eingeengt und in je 1 ml ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) aufgenommen und separat in die HPLC-Apparatur injiziert.

Die Probe wurde mehrmals in ungespikter und 2 Mal in gespikter Form (400 ng/g Probe) analysiert.

6.5.5.5 Analyse des natürlich kontaminierten Weizens

Die Extraktion von ZON aus dem Weizenmehl erfolgte wie in Kapitel 6.5.5.1 beschrieben. Da nicht bekannt war, ob die Probe kontaminiert war oder nicht, wurde sie sowohl mit der Immunultrafiltrationsmethode als auch mit einer kommerziell erhältlichen IAC (ZearaStar™, Romer Labs) aufgearbeitet und dann mit HPLC-FLD analysiert.

1. Immunaффinitätschromatographie

Verwendete Reagenzien:

PBS

Methanol

H₂O_{dd}

Die Probenextraktion und die Probenvorbereitung sind in Kapitel 6.5.5.1. beschrieben. Die Immunaффinitätssäulchen wurden auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde die in den Säulen enthaltene Aufbewahrungslösung durch Anlegen eines Unterdrucks entfernt. 1 ml des Extrakts wurde auf die IAC-Säulchen aufgegeben und unter dem Einfluss der Schwerkraft durchfließen lassen. Anschließend wurde mit 20 ml H₂O_{dd} gewaschen. Das Wasser wurde durch Anlegen eines Unterdrucks vollkommen entfernt und ZON durch Aufgabe von 3 ml Methanol eluiert. Methanol wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml ACN/H₂O (15:85, v/v) aufgenommen. 100 µl davon wurden in die HPLC-Apparatur injiziert.

2. Immunultrafiltration

Verwendete Reagenzien:

mAk₁ (ZEN-1.1.3.27.21) (c=11,68 mg/ml)

mAk₂ (ZEN-2.1.2.4.9) (c=8,32 mg/ml)

ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

Guanidinhydrochloridlösung (6 M)

Die Probenextraktion und die Probenvorbereitung wurden bereits unter Punkt 6.5.5.1. Beschrieben. Der Extrakt (10 ml) wurde einige Sekunden gevortext und je ein Aliquot von 1 ml auf die IUF-Einheit aufgetragen. Zu einer IUF-Einheit wurden 150 µl mAk₁, zur anderen 50 µl mAk₂ zugesetzt. Beide Lösungen wurden 30 min bei 25°C und 3.200 g zentrifugiert. Es wurde mit 4 ml H₂O_{dd} gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Bei der Elution wurden in die IUF-Einheit, die mit dem mAk₁ versetzt worden war, 4 ml Guanidinhydrochloridlösung pipettiert und für eine Stunde geschüttelt. Bei der IUF-Einheit, der mAk₂ zugesetzt worden war, wurden 4 ml ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) aufgetragen und die Lösung sofort abzentrifugiert. In beiden Fällen wurde eine zweite Elution mit denselben Lösungen durchgeführt. Die Eluate wurde mittels HPLC-FLD analysiert (100 µl Injektionsvolumen).

6.5.5.6 Validierung der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode für Weizenmehl

Verwendete Reagenzien:

Weizenmehl

mAk₂ (ZEN-2.1.2.4.9) (c=8,32 mg/ml)

125 ng ZON/ ml ACN/H₂O (15:85, v/v)

250 ng ZON/ ml ACN/H₂O (15:85, v/v)

500 ng ZON/ ml ACN/H₂O (15:85, v/v)

2000 ng ZON/ ml ACN/H₂O (15:85, v/v)

ACN/H₂O (60:40, v/v)

ACN/H₂O (80:20, v/v)

H₂O_{dd}

Da es kein zertifiziertes Referenzmaterial für ZON in Weizen gibt, wurde zur Absicherung der Ergebnisse Weizenmehl mit unterschiedlichen Standardkonzentrationen versetzt.

5 g Probe wurden jeweils mit 1 ml der angeführten Standardlösungen und 19 ml Acetonitril/Wasser (60:40, v/v) vermengt und eine Stunde gerührt. Anschließend wurden die festen Bestandteile abfiltriert. 5 ml des Filtrats wurden in einen Messkolben überführt und im Stickstoffstrom eingeeengt. Der Messkolben wurde mit H₂O_{dd} bis zur Markierung aufgefüllt und anschließend nach dem unter Abschnitt 6.5.5.4 angeführten Schema weiter vorgegangen.

Alle Validierungsversuche wurden ausschließlich mit dem mAk₂ durchgeführt. Jede gespikete Probe wurde innerhalb eines Tages viermal analysiert

7 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

7.1 Produktion polyklonaler Antikörper

Für die Entwicklung einer immunanalytischen Probenvorbereitungsmethode zum Nachweis von DON und ZON wurde versucht, die dafür benötigten Antikörper selbst herzustellen. Dazu wurden je 8 Kaninchen und 2 Hühner in regelmäßigen Intervallen immunisiert, und die Antikörperbildung in den Versuchstieren mittels Titerbestimmung verfolgt.

7.1.1 Titerbestimmung der DON-Antikörper in den Kaninchenserum

Kaninchen eignen sich auf Grund ihrer Größe, ihrer relativ langen Lebenserwartung (5-8 Jahre), ihrer einfachen Haltung und Blutabnahme, der verfügbaren Menge an Blut und der damit verbundenen Produktion an Antiserum bestens für die Produktion von polyklonalen Antikörpern [Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen-800.116-3.02].

Die Tiere wurden sowohl durch subcutane Injektionen mit dem Ag (gesamt 0,5 mg) an mehreren Körperstellen grundimmunisiert, als auch geboostert. Diese Menge entspricht der durchschnittlichen Dosis für die Verabreichung eines Ag [Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen-800.116-3.04]. Diese Art der Immunisierung ist als eine der gängigsten beschrieben [Hanly W.C., Artwohl J.E., Bennett B.T.].

Wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben, hatten die Kaninchen ein Alter von 3 Monaten erreicht, bevor sie das erste Mal immunisiert wurden. Laut Harlow und Lane sollte man Kaninchen keinesfalls früher immunisieren, da es sonst Einbußen in der Antikörperproduktion geben kann [Hanly W.C., Artwohl J.E., Bennett B.T.]. Der Verlauf der Immunisierung bzw. der Antikörperproduktion ist in Abbildung 11 ersichtlich. Nach der Grundimmunisierung wurde ein Anstieg der DON-Ak im Serum bemerkt, der nach der zweiten Immunisierung (1. Boosterung) geringfügig einbricht, um nach der 2. Booster Injektion nochmals anzusteigen. Normalerweise sollte die Ak-Konzentration im Serum nach der Primärimmunisierung nach ein paar Tagen bis zu 2 Wochen ansteigen und anschließend wieder abfallen. Wenn man jedoch Boosterinjektionen danach durchführt, sollte die Immunantwort um ein Vielfaches ansteigen [Howard G.C., Bethell D.R.]. In Abbildung 11 ist die Primärantwort sichtbar, leider wurde jedoch auch nach wiederholter Boosterung keine Sekundärantwort beobachtet. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Immunisierung nicht im gewünschten Ausmaß verlaufen ist.

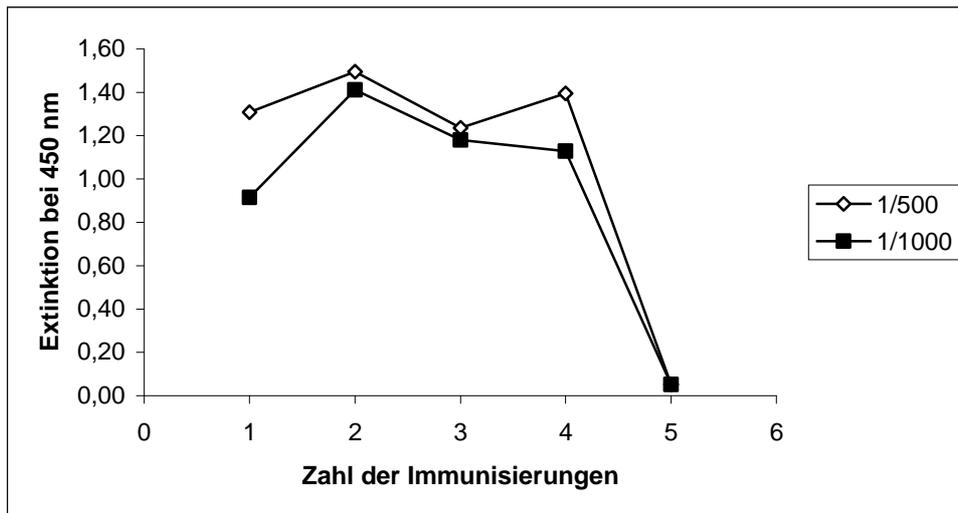


Abbildung 11: Mittelwert der Titerbestimmung der Kaninchenserum unterschiedlicher Verdünnung

Abbildung 11 stellt den durchschnittlichen Verlauf der Immunisierung der 4 Kaninchen der DON-Reihe dar.

7.1.2 Titerbestimmung der ZON-Antikörper der Kaninchenserum

Bei der Titerbestimmung der Kaninchenserum konnte man ebenfalls einen Anstieg nach der ersten Immunisierung beobachten. Dieser war jedoch nur von kurzer Dauer, denn schon bei der dritten Immunisierung war ein Abfall der Antikörperkonzentration bemerkbar.

Der Immunisierungsverlauf in Abbildung 12 wurde für die Kaninchen der ZON-Reihe erstellt, und zeigt, dass die Immunisierung weniger erfolgreich als bei DON verlaufen ist.

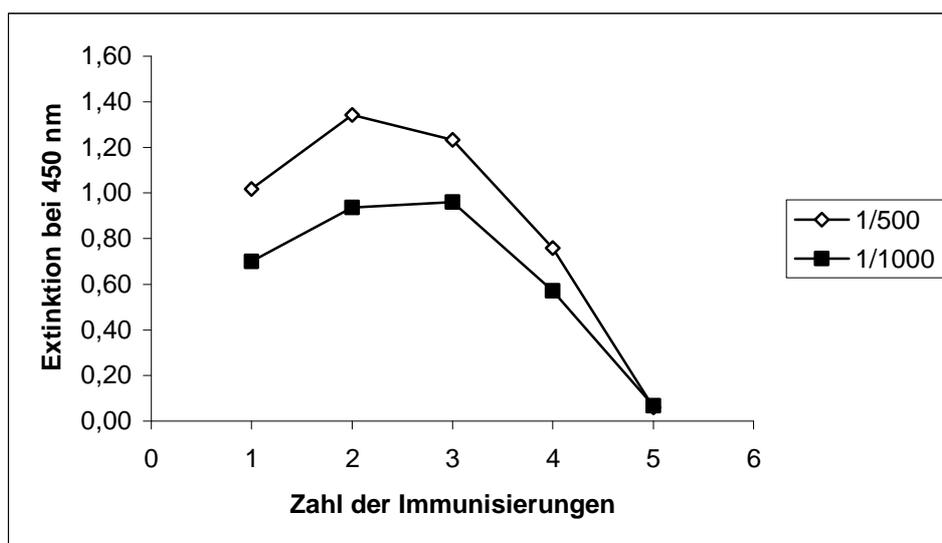


Abbildung 12: Mittelwert der Titerbestimmung der Kaninchenserum unterschiedlicher Verdünnung

Warum es bei der Immunisierung nicht zu dem gewünschten Anstieg der Antikörperkonzentration gekommen ist, konnte nicht geklärt werden. Eine erfolgreiche Immunisierung hängt von verschiedenen Faktoren (Auswahl der Tierart, Menge an Antigen, das injiziert wird, von der Injektionsart, von der Häufigkeit der Immunisierung usw.) ab [Hanly W.C., Artwohl J.E., Bennett B.T.].

7.1.3 Bindung von DON an Antikörper

Wie aus dem Verlauf der beiden Titerbestimmungen ersichtlich wurde, kam es nach der 4. Boosterung zu einem Abfall der Antikörperkonzentration. Auf Grund dieser Tatsache wurden die Kaninchen ausgeblutet, und das Blut gesammelt und aufbereitet. Da nun genug Serum zur Verfügung stand, wurden Untersuchungen mit einem Kaninchenserum (Kaninchen Nr. 3 der DON-Reihe), das eine höhere Immunantwort zeigte als die anderen, durchgeführt.

Ein Aliquot des nach der Schlachtung erhaltenen Serums des Kaninchens D₃ wurde, bevor es aufgereinigt wurde, mittels Immunultrafiltrations auf seine Bindungskapazität hinsichtlich DON untersucht. Dabei wurde das Serum einmal in unverdünnter, 1:5 bzw. 1:10 verdünnter Form mit 70 ng DON in die IUF-Einheit pipettiert (siehe Abschnitt 6.1.4). Nach dem Waschen wurde DON mit 80 % ACN eluiert.

Am besten wurde DON an die im Serum vorliegenden Antikörper im unverdünnten Zustand (44 %) gebunden. Mit zunehmender Verdünnung (1:5 und 1:10) nahm das Ausmaß des

gebundenen Anteils auf 37 % bzw. 17 % ab. Alle Versuche wurden als Einzelbestimmungen durchgeführt.

7.1.4 Isolierung der IgG mittels Protein A Säule

Für die Aufreinigung der Kaninchenserum (DON-Reihe: D₁, D₂, D₃) wurde eine Protein A Säule verwendet. 1 ml des Kaninchenserums wurde auf die Säule aufgetragen. Die Durchführung erfolgte nach dem Prinzip: Binden-Waschen-Eluieren-Neutralisieren. Das bedeutet, dass nach der Aufgabe des Serums die darin enthaltenen Immunglobuline G an das Säulenmaterial gebunden wurden. Danach wurden die weiteren Serumbestandteile durch einen Waschschrift entfernt. Mit Hilfe eines Natriumcitratpuffers (pH=3) wurden die gebundenen Immunglobuline fraktionsweise (1 ml) von der Säule eluiert. Da Antikörper im sauren Milieu nicht stabil sind, wurde durch Zugabe (100 µl) eines alkalischen Lösungsmittels das Eluat neutralisiert. Anschließend wurden 30 – 100 µl von der isolierten IgG-Lösung aus den einzelnen Fraktionen (4 Fraktionen mit je 1,1 ml) mit PBS auf 1 ml aufgefüllt, um die Proteinkonzentration photometrisch zu ermitteln. Die Säule wurde nach jeder Probe mit PBS regeneriert (die genaue Durchführung ist im Abschnitt 6.1.5 beschrieben). Die photometrische Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben.

Kaninchenserum nach der Schlachtung	Proteinkonzentration [mg/ml]
D ₁	9,4
D ₃	11,8
D ₄	9,4

Tabelle 3: Ergebnisse der Proteinbestimmung in den Sera nach der Aufreinigung mittels Protein A Säule

Die in Tabelle 3 angegebenen Proteinkonzentrationen in mg/ml setzen sich aus der Summe der Proteinkonzentration der 4 Fraktionen dividiert durch deren Volumina zusammen. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich sind die Proteinkonzentrationen relativ hoch.

Dennoch kann man keine exakten Rückschlüsse auf die Konzentration der DON-Ak machen, da mittels Protein A Säule alle im Serum vorhandenen Immunglobuline G unabhängig ihrer Antigenspezifität gebunden werden [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.].

Um einen Vergleich hinsichtlich der Proteinkonzentration machen zu können, wurden die Seren auch noch mittels Caprylsäure/Ammoniumsulfatfällung aufgereinigt und die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt.

7.1.5 Isolierung der IgG aus den Kaninchenseren mittels Caprylsäure/Ammoniumsulfatfällung

Die Isolierung der IgG erfolgt in zwei Stufen. In der ersten Stufe werden Albumin und die meisten Serumproteine, ausser IgG, mit Caprylsäure ausgefällt. In der zweiten Stufe werden die Immunglobuline mittels Ammoniumsulfat präzipitiert [McKinney M. M., Parkinson A.].

Das Ammoniumsulfat bewirkt, dass es zwischen den Ionen (NH_4^+ und SO_4^{2-}) und den Proteinen zu einer Konkurrenz um die freien Wassermoleküle kommt. Durch die Zugabe höherer Konzentrationen von Ammoniumsulfat bleiben für die Proteine nicht mehr genügend Wassermoleküle zur Ausbildung einer intakten Hydrathülle übrig. Die Folge davon ist, dass die Proteine auf Grund ihrer verminderten Löslichkeit ausfallen [Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.]. Durch die anschließende Zentrifugation werden die ausgefällten Proteine von der Lösung abgetrennt und als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens sichtbar. Die darauf folgende Dialyse des gelösten Niederschlages dient zur Entfernung des Ammoniumsulfats. Im Anschluss an die Dialyse wurde das Volumen der Proteinlösung ermittelt und danach die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (genaue Durchführung siehe unter 6.1.6).

Kaninchenserum nach der Schlachtung	Proteinkonzentration [mg/ml]
D ₁	3,00
D ₃	13,97
D ₄	11,39

Tabelle 4: Ergebnisse der Proteinbestimmung in den Sera nach der Aufreinigung mittels Caprylsäure/Ammoniumsulfatfällung

Die Proteinkonzentrationen in Tabelle 4 sind ähnlich den Werten, die nach der Isolierung mittels Protein A Säule [Tab. 3] erhalten wurden.

7.1.6 Titerbestimmung der anti-DON-IgY im Dotter

Da die Antikörperproduktion im Kaninchen nicht besonders erfolgreich verlaufen war, wurde ein 2. Versuch unternommen. Diesmal wurden anstelle von Kaninchen Hühner für die Immunisierung herangezogen. Die Immunisierung von Hühnern und die Antikörperproduktion im Ei zählen zu den alternativen Methoden. Sie beeindrucken durch eine unblutige Antikörpergewinnung und eine höhere Antikörperausbeute [Schade R., Hlinak A.].

Es wurde je ein Huhn/Mykotoxin (DON bzw. ZON) in regelmäßigen Abständen immunisiert. Die Eier wurden sieben Tage nach der Immunisierung gesammelt und für die Titerbestimmungen verwendet. Ab diesem Zeitpunkt sollten vermehrt Antikörper in den Eidottern auftreten [Schade R., Behn I., Erhard M., Hlinak A., Staak C.]. Abbildung 13 zeigt die Entwicklung der IgY in Abhängigkeit vom Grad der Immunisierung und der Verdünnung. Bei der Untersuchung der Eidotter wurde der erste Antikörperanstieg nach der 4. Immunisierung (3. Booster) bemerkt. Dieser Anstieg war jedoch nur bei einer Verdünnung von 1:500 deutlich sichtbar. Die fehlende Primärantwort und die erst spät einsetzende Sekundärantwort deuten auf eine schwache Immunreaktion hin. Daher wurden keine weiteren Versuche unternommen.

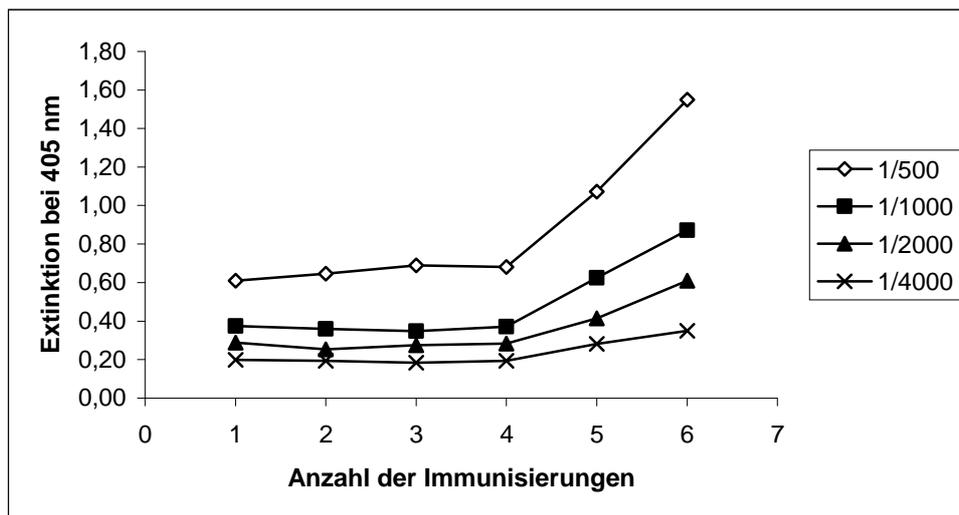


Abbildung 13: Titerbestimmung des DON-Antikörpers im Hühnerei bei unterschiedlichen Verdünnungen

7.1.7 Titerbestimmung der anti-ZON-IgY im Dotter

Die Immunisierung mit ZON verlief ähnlich wie beim Kaninchen, jedoch weniger erfolgreich als bei DON. Auch hier wurde ein geringer Anstieg der Antikörperkonzentration nach der 4. Immunisierung festgestellt. Dieser war jedoch sehr gering und konnte nur bei der stärksten Verdünnung (1/4000) kaum noch erkannt werden [Abb. 14].

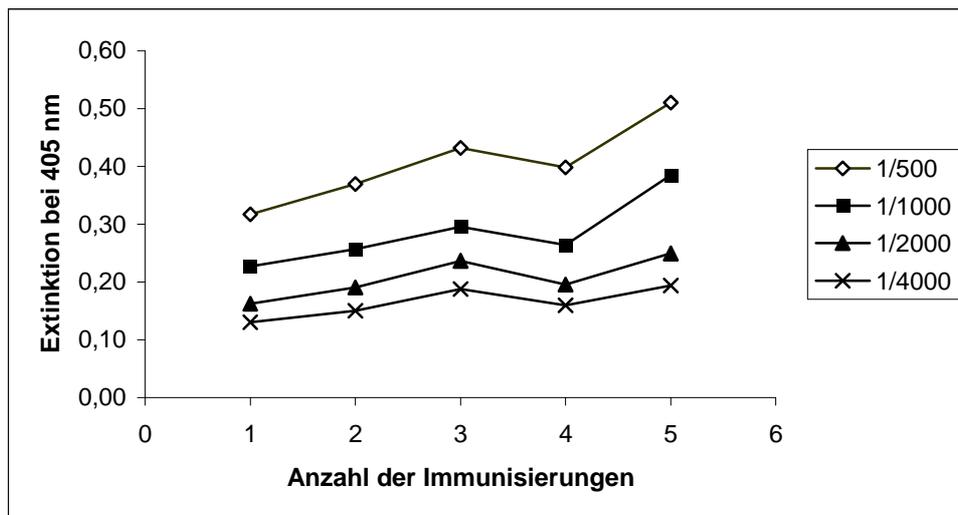


Abbildung 14: Titerbestimmung des ZON-Antikörpers im Hühnerei bei unterschiedlichen Verdünnungen

Beide Immunisierungen haben nicht den gewünschten Verlauf gezeigt, erst durch mehrfache Boosterung wurde ein geringer Anstieg des Titers erreicht. Auf Grund des atypischen Verlaufs der Immunisierung wurden keine weiteren Versuche unternommen.

7.2 Bestimmung von DON mittels HPLC-UV

Für eine Bestimmung von DON in Lebens- und Futtermitteln war es zuerst erforderlich, Kalibrierfunktionen für beide HPLC-Methoden zu erstellen, mit deren Hilfe nach der Immunultrafiltration DON quantitativ erfasst werden konnte.

7.2.1 Erstellen von Kalibrationsgeraden mit beiden HPLC-Systemen

Für die Kalibrierung wurden DON-Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 50 ng/ml - 1 µg/ml hergestellt und in die HPLC-Systeme injiziert.

Durch Auftragen der erhaltenen Peakflächen A [mV.s] gegen die zugehörigen Konzentrationen c [ng/ml] der jeweiligen DON-Standardlösung wurden die Kalibriergeraden erhalten [Abb. 15 und 16].

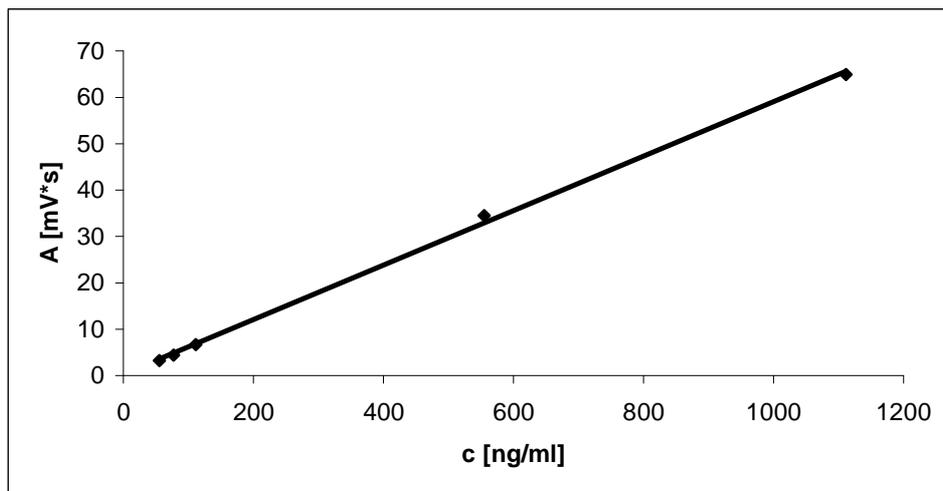


Abbildung 15: Repräsentative Kalibriergerade für DON für das HPLC-System 1

Die Gleichung der Kalibrierfunktion lautet: $y = 0,0588x + 0,3089$

Der Korrelationskoeffizient beträgt: $R^2 = 0,9989$

LOD: 49 ng/ml

LOQ: 199 ng/ml

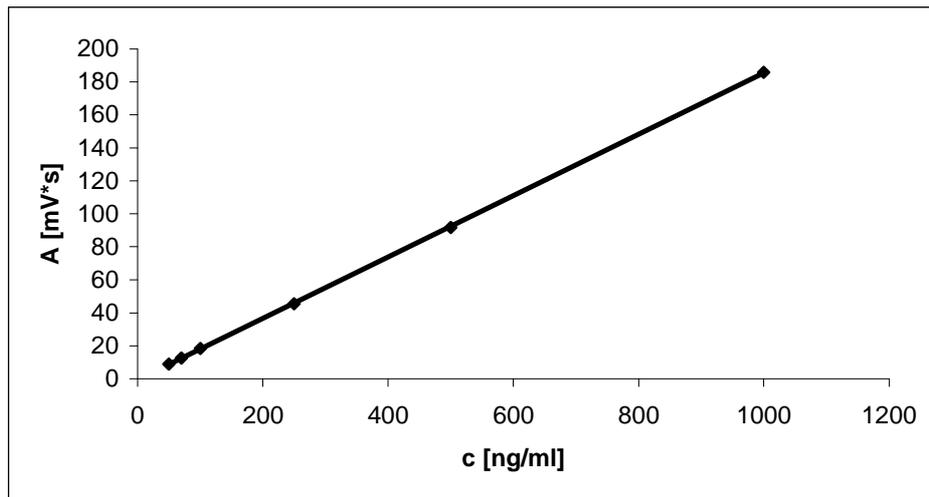


Abbildung 16: Repräsentative Kalibriergerade für DON für das HPLC-System 2

Die Gleichung der Kalibrierfunktion lautet: $y = 0,1859x - 0,5623$

Der Korrelationskoeffizient beträgt: $R^2 = 0,9999$

LOD: 7 ng/ml

LOQ: 25 ng/ml

7.3 Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode zur Aufarbeitung von DON und ZON in Lebens- und Futtermitteln. Für die weiteren Versuche wurde ein käuflich erworbener monoklonaler Antikörper verwendet, da die Produktion der polyklonalen Antikörper (Kaninchen, Huhn) nicht erfolgreich war.

7.3.1 Probenvorbereitung zur Analyse von DON

7.3.1.1 Auswahl der Immunultrafiltrationseinheit

Es gibt eine Vielfalt an Immunultrafiltrationseinheiten (IUF) auf dem Markt, die sich hinsichtlich ihrer Größe, der Art des Filtrationskörpers und ihrer Membranspezifikation unterscheiden. Aus dieser Fülle an Angeboten wurden drei IUF-Einheiten ausgewählt und auf ihre Eigenschaften geprüft. Nähere Angaben zu den IUF-Einheiten sind im Abschnitt 6.4.1 hinterlegt.

7.3.1.2 Untersuchung der Beständigkeit der Immunultrafiltrationseinheiten gegenüber organischen Lösungsmitteln

Da die Elution des Antigens bzw. die Zerstörung des Ag-Ak-Komplexes durch Einsatz eines organischen Lösungsmittels erfolgt, sollte die Beständigkeit der IUF-Einheiten gegenüber organischen Lösungsmitteln getestet werden.

Die Einheiten wurden mit 80-100% ACN/H₂O_{dd} Gemischen und reinem Methanol befüllt. Die Lösungsmittel wurden für 20 min in der IUF-Einheiten inkubiert und danach abzentrifugiert.

Die IUF-Einheit vom Typ Vivaspin (Sartorius) zeigte eine weißliche Verfärbung des Filtrationskörpers bei der Inkubation mit ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v). Bei Methanol wurde derselbe Effekt sichtbar.

Bei der VectaSpin™ Micro - IUF-Einheit (Whatman) wurde nach der Inkubation (20 min) mit ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) ein Riss in der Filtermembran festgestellt. Reines Methanol konnte auch nach mehrfachem Zentrifugieren die Membran nicht passieren.

Die Amicon® Ultra-4 IUF-Einheit war sowohl gegenüber 100% Methanol als auch gegenüber 80-100% ACN/H₂O_{dd} beständig. Selbst nach mehrstündiger Inkubation zeigten sich keine Veränderungen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche mit der IUF-Einheit Amicon® Ultra-4 durchgeführt.

7.3.1.3 Unspezifische Membranadsorption

Um eine unspezifische Adsorption von DON an der IUF-Membran ausschließen zu können, wurde 1 ml einer 55 ng/ml DON-Standardlösung in eine IUF-Einheit pipettiert und unterschiedlich lange inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden mit 0, 30 und 60 Minuten festgesetzt. Danach wurde die Lösung abzentrifugiert, die Konzentration von DON im Filtrat mit jener der Standardlösung verglichen und die Wiederfindung von DON berechnet. Abbildung 17 zeigt, dass es ohne Inkubation zu keinerlei Wechselwirkung zwischen DON und der IUF-Membran kam, während bei 30 und 60 minütiger Inkubation eine unspezifische Adsorption von DON feststellbar war. Nach 30 min wurden 1,5 % und nach 60 min 3 % des aufgegebenen DON unspezifisch adsorbiert.

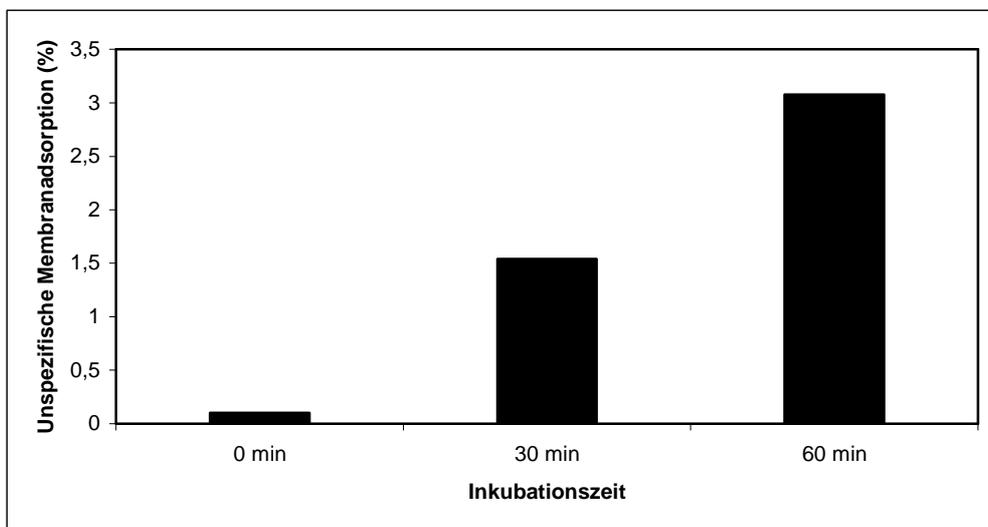


Abbildung 17: Adsorption von DON an der Filtermembran

7.3.1.4 Testen des “Cut-offs“

Die Ausschlussgrenze bzw. “Cut-off“ der IUF-Membran wird üblicherweise in Form des “molecular weight cut-off“ (Einheit: Dalton) angegeben. Er wird definiert als die kleinste Molekülmasse eines Proteins, welche durch die Membran zurückgehalten wird. Diese muss niedriger sein als das Molekulargewicht des Antikörpers (150 kDa), um einen Verlust des Antikörpers zu vermeiden, jedoch so groß, dass DON durchdiffundieren kann. Deshalb wurden Amicon[®] Ultra-4 IUF-Einheiten mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen (“Cut-offs“: 30, 50, 100 kDa) getestet. Alle drei lagen laut Hersteller deutlich unter dem Molekulargewicht des Antikörpers. Um jedoch sicherzustellen, dass dies auch in der Praxis der Fall ist, wurden die oben angeführten IUF-Einheiten unter gleichen Bedingungen getestet und die Wiederfindung von DON im Eluat bestimmt [Tab. 5]. Die genaue Durchführung wird in Abschnitt 6.4.3 beschrieben.

		Wiederfindung	
Cut-off	Anzahl der Versuche	Mittelwert (%)	RSD (%)
30 kDa	n=4	66,34	3,70
50 kDa	n=4	70,31	6,54
100 kDa	n=4	24,87	5,40

Tabelle 5: Mittelwert der Wiederfindung von DON und relative Standardabweichung im Eluat abhängig von der Membranausschlussgröße

Wie Tabelle 5 zeigt, liefert die IUF-Einheit mit einem “Cut-off“ von 30 kDa ein ähnlich gutes Ergebnis wie die mit 50 kDa. Nur die Amicon[®] Ultra-4 IUF mit einer 100 kDa Membran ist für die Probenvorbereitung von DON nicht geeignet. Der Verlust an DON ist vermutlich auf die Inhomogenität der Porengröße zurückzuführen, was zur Folge hat, dass ein gewisser Anteil des Ag-Ak-Komplexes die Membran passiert.

Da die IUF-Einheit mit einem “Cut-off“ von 50 kDa eine gute Wiederfindung aufwies, wurden die weiteren Versuche mit dieser Membran durchgeführt.

7.3.1.5 Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers

Für die Bestimmung der Bindungskapazität des monoklonalen DON-Ak (mAk) wurden zu einer konstanten Menge an monoklonalen Antikörpern (400 µl) steigende Mengen an DON

(70 – 1250 ng) hinzugegeben. Nach der Dissoziation des Ag-Ak-Komplexes wurde die Konzentration des DON-Standards im Eluat in Relation zur Konzentration des eingesetzten DON-Standards gesetzt. Der gebundene Anteil (%) ist in Abbildung 18 in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge graphisch dargestellt.

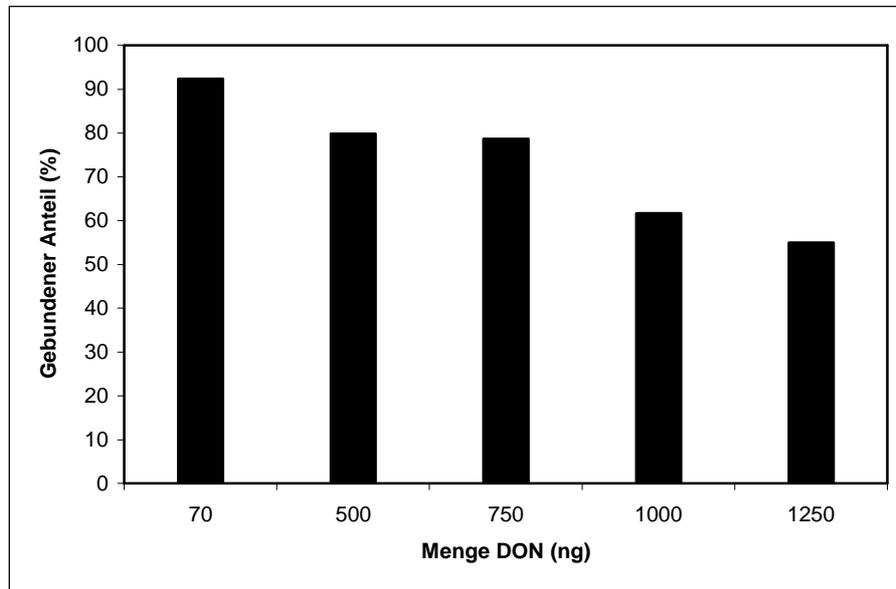


Abbildung 18: Gebundener Anteil (%) bei steigender Menge an DON

Um einen gebundenen Anteil von > 90 % zu erhalten, sollten zu 400 µl mAk (400 ng) nicht mehr als 70 ng DON hinzugegeben werden.

7.3.1.6 Optimierung der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur

Es ist bekannt, dass die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper relativ langsam ist. Aus diesem Grund wurden 70 ng DON mit 100 µg des mAks versetzt und das Eluat nach sofortiger Zentrifugation bzw. nach 15, 30 und 60 minütiger Inkubation auf DON untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf die Antigen-Antikörperbindung bei Raumtemperatur und bei 36°C studiert.

Die besten Ergebnisse wurden ohne Inkubationszeit bei Raumtemperatur erzielt.

7.3.1.7 Wahl des Elutionsmittels und Ermittlung des Elutionsvolumens

Der gebildete Antigen-Antikörperkomplex, der durch die Membran zurückgehalten wurde, musste im nächsten Schritt dissoziiert werden, um DON zu eluieren und mittels HPLC-UV bestimmen zu können. Da die mobile Phase der HPLC-Anlage 1 aus ACN/Methanol/Wasser (9:9:82, v/v/v) bestand, bot sich als Elutionsmittel Acetonitril, Methanol oder Mischungen von Acetonitril/Wasser bzw. Methanol/Wasser an. In Vorversuchen hatte sich Acetonitril als das bessere Elutions-/Dissoziationsmittel herausgestellt. Um den Elutions-/Dissoziationsvorgang zu optimieren, wurden verschiedene Acetonitril/Wasser-Mischungen (ACN/H₂O_{dd}, 10-80 %, v/v) verwendet und die Wiederfindung von DON in der Elutionslösung untersucht [Abb. 19]. Mit ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) wurde auch der Einfluss des Elutionsvolumens auf die Wiederfindung getestet. Die höchste Wiederfindung wurde mit ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v) erhalten. Die besten Ergebnisse wurden mit 4 ml erzielt.

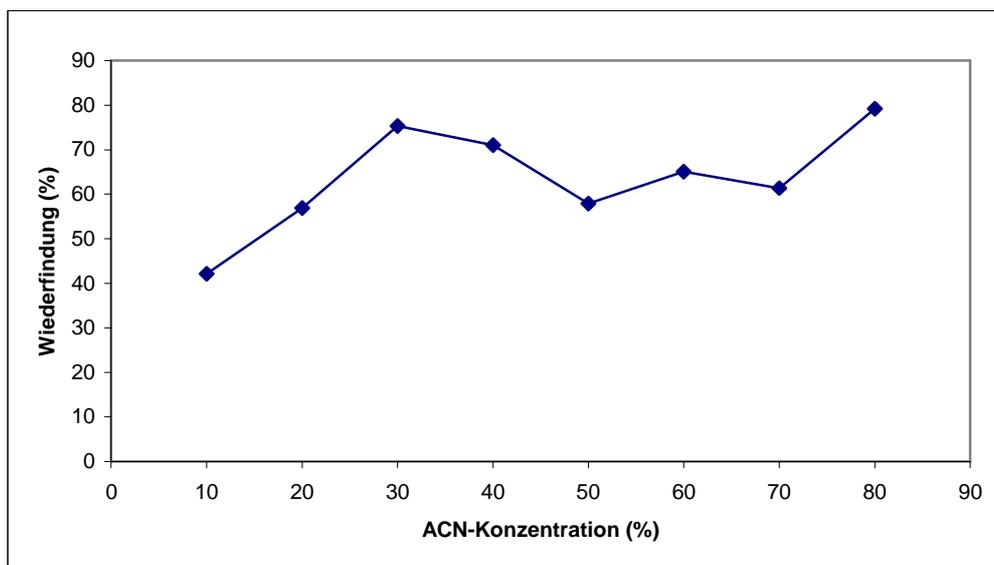


Abbildung 19: Wiederfindung von DON im Eluat in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung

7.3.1.8 Reproduzierbarkeit der IUF-Methode im Standardversuch

Um sicher zu gehen, dass die gewählten Bedingungen optimal waren, wurde die entwickelte Methode auf ihre Reproduzierbarkeit getestet. Hierfür wurden 4 Versuche parallel unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dafür wurde 100 µl des mAk mit 2,9 ml H₂O_{dd} und 1 ml

des ~70 ng/ml DON-Standards in die 4 IUF-Einheiten gegeben und gevortext. Gewaschen wurde mit 0,5 ml H₂O_{dd}. Die Elution erfolgte mit 4 ml ACN/ H₂O_{dd} (80:20, v/v). Zwischen der Aufgabe, dem Waschprozess und der Elution des Antigens wurde zentrifugiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingeeengt, in 1 ml mobiler Phase aufgenommen und in die HPLC-Anlage injiziert.

Der Mittelwert der Wiederfindung betrug 78,5 % [Tab. 6]. Die geringe Standardabweichung von 1,8 % zeigte, dass die Methode gut reproduzierbar ist.

Anzahl der Versuche	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
n = 4	78,5	1,8

Tabelle 6: Wiederfindung von DON unter den optimierten Bedingungen im Standardversuch

7.4 Analyse von DON in Mais

7.4.1 Gespikter Maisextrakt

Maismehl wurde, wie im Abschnitt 6.4.9.2 beschrieben, extrahiert und dem Extrakt DON (70 ng/ml) zugesetzt. Ein Aliquot des Extraktes wurde der Immunultrafiltration unterworfen und dabei eine Wiederfindung von DON von 90 % festgestellt. Im nächsten Schritt wurde daher natürlich kontaminierter Mais untersucht.

7.4.2 Natürlich kontaminierter Mais

Um die Effizienz der entwickelten Immunultrafiltrationsmethode feststellen zu können, wurde für die Aufarbeitung einer natürlich kontaminierten Maisprobe neben der IUF-Methode auch die Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Dazu wurden beide Methoden soweit wie möglich aneinander angepasst [Abb. 20].

Entsprechend der Vorschrift für die Extraktion von DON und der nachfolgenden IAC wird vom Hersteller der IAC-Säulchen die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) empfohlen [Instruction Manual-DONtest™ HPLC]. Dieses würde jedoch die Poren der Filtermembran der IUF-Einheit verstopfen, deshalb musste bei der Probenextraktion in der IUF-Einheit darauf verzichtet werden.

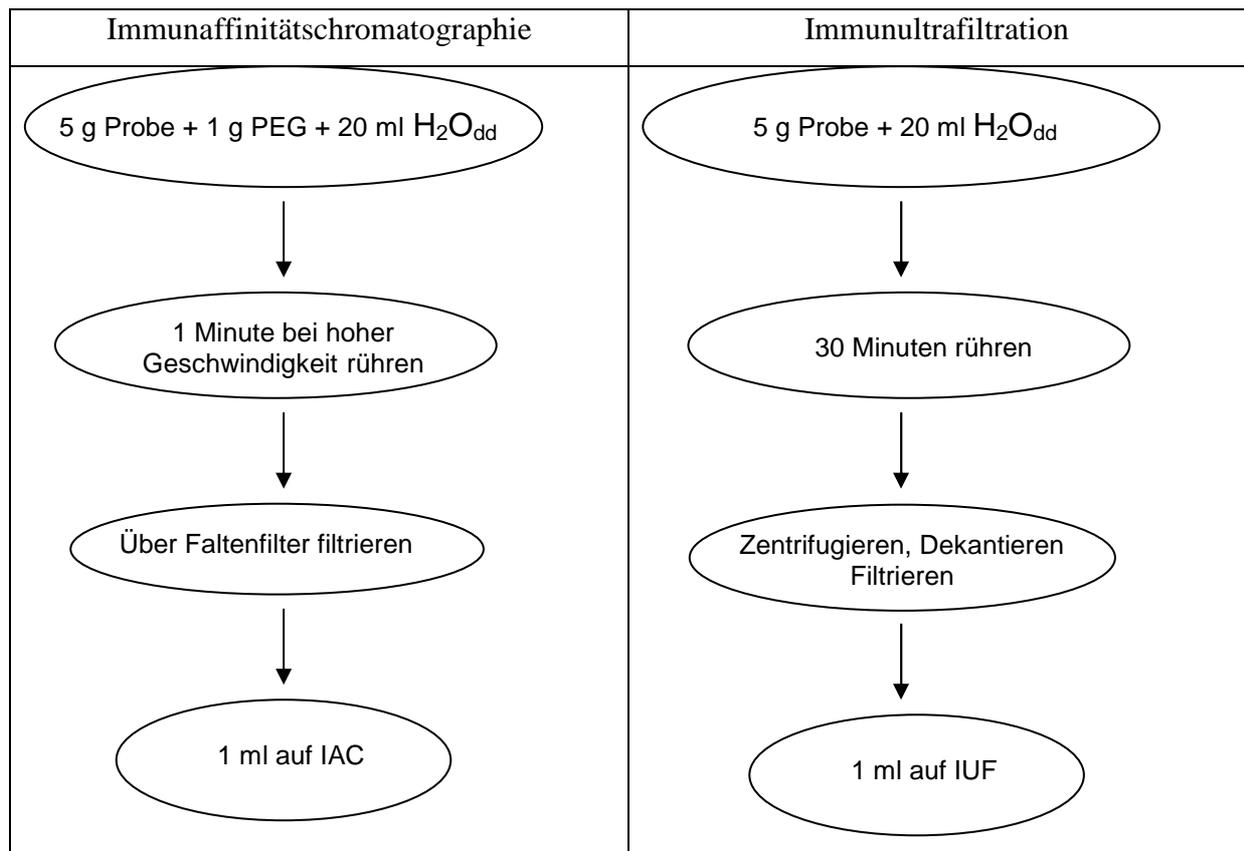


Abbildung 20: Vergleich der Extraktion von DON aus Mais

Die Durchführung der IAC und der IUF erfolgte so einheitlich wie möglich. Im ersten Schritt wurde 1 ml Extrakt aufgetragen anschließend wurden das Immunaффinitätschromatographiesäulchen und die IUF-Einheit mit 5 ml H₂O_{dd} gewaschen. Bei der IAC wurde mit 3 ml reinem Methanol, bei der Immunultrafiltration mit 2 ml ACN/H₂O_{dd} (80:20, v/v) eluiert. Beide Eluate wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 300 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Davon wurden 50 µl in die HPLC-Apparatur 1 injiziert.

Sowohl mit der IAC-Methode als auch mit der IUF-Methode wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

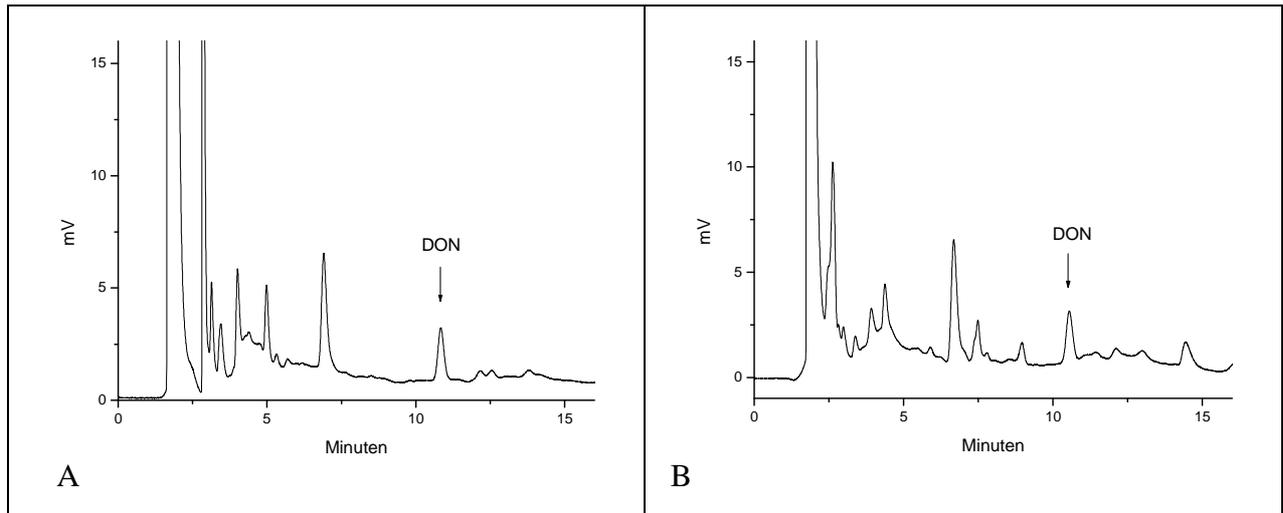


Abbildung 21: Chromatogramme der Maisextrakte. A-Probenvorbereitung mittels IUF, B-Probenvorbereitung mittels IAC

Abbildung 21 zeigt eindrucksvoll, dass mit der Immunultrafiltrationsmethode die Matrix ebenso effektiv abgetrennt werden kann, wie mittels IAC. Die quantitative Bestimmung bestätigt dieses Ergebnis [Tab. 7] und zeigt, dass die im Rahmen der Dissertation entwickelte IUF-Methode ähnliche Werte wie die IAC-Methode liefert.

Methode	Mittelwert von DON [ng/g]	Standardabweichung [ng/g]	Wiederfindung (%)
IAC	223,61	7,71	79,80
IUF	218,77	5,71	78,07

Tabelle 7: Übersicht über die Mittelwerte (n=2) der DON-Konzentrationen, der Standardabweichung und der Wiederfindung

7.4.3 Validierung der IUF-HPLC-UV-Methode mittels eines Mais-Referenzmaterials

Als zertifiziertes Referenzmaterial wurde ein Maismehl von der Firma Biopure mit einer DON Konzentration von $474 \pm 30 \mu\text{g/kg}$ verwendet. Die Probe wurde mittels IUF-HPLC-UV mehrmals an einem Tag als auch an verschiedenen Tagen untersucht. Es sollte an Hand der erzielten Ergebnisse überprüft werden, wie sorgfältig gearbeitet wurde.

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, wurden je 4 Untersuchungen des zertifizierten Referenzmaterials innerhalb eines Tages durchgeführt. Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Wiederfindung von DON sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

	DON [ng/g]	Mittelwert [ng/g]	Standardabweichung [ng/g]	RSD (%)	Wiederfindung (%)
Tag 1	455,4 512,63 506,18 485,95	490,04	25,74	5,25	103,38
Tag 2	462,28 467,88 424,41 459,27	453,46	19,69	4,34	95,67
Tag 3	343,94 457,12 447,65 382,24	407,74	54,01	13,25	86,02
Tag 4	390,42 446,36 402,47 410,64	412,47	24,07	5,84	87,02

Tabelle 8: Ergebnisse der Intraday-Validierung

Um zu überprüfen, ob die Leistungskriterien der entwickelten IUF-HPLC-UV-Methode den Anforderungen der EU-Richtlinie für Analysemethoden entsprechen, wurde eine Interday-Validierung durchgeführt [EG Nr. 2005/38]. Entscheidend für die Leistungskriterien der Methode sind die ermittelte relative Standardabweichung (RSD), die Wiederfindung und der Konzentrationsbereich der zu untersuchenden Probe (zertifiziertes Referenzmaterial). Die RSD wurde aus den unter Wiederholbarkeitsbedingungen (d. h. dieselbe Probe, derselbe Prüfer, dasselbe Gerät, dasselbe Labor, kurze Zeitspanne) ermittelten Ergebnissen berechnet [EG Nr. 2005/38].

Für die Interday-Validierung werden die Ergebnisse über 4 Tage zusammengefasst.

Anzahl der Versuche	Mittelwert [ng/g]	Standardabweichung [ng/g]	RSD (%)	Wiederfindung (%)
n = 12	440,93	45,87	10,40	93,02

Tabelle 9: Ergebnisse der Interday-Validierung

Bei der von uns untersuchten Probe handelte es sich um ein Maismehl mit einer Konzentration an DON von $474 \pm 30 \mu\text{g/kg}$. Vergleicht man den Mittelwert der Analysen aus Tabelle 9 mit denen in Tabelle 10, würde der Konzentrationsbereich $> 100\text{—}\leq 500$ liegen. Wird jedoch auch die Standardabweichung hinzugezogen, überschneidet sich der Wert mit der Konzentrationsangabe 2.

Vergleicht man die RSD- und Wiederfindungswerte aus Tabelle 9 mit denen aus Tabelle 10, erkennt man, dass die entwickelte IUF-HPLC-UV-Methode alle Leistungskriterien für eine EU-Analysenmethode [Tab. 10], für die Bestimmung von DON, erfüllt.

Konzentrationsbereich der Probe ng/g	Deoxynivalenol	
	RSD (%)	Wiederfindung (%)
$> 100\text{—}\leq 500$	≤ 20	60—110
> 500	≤ 20	70—120

Tabelle 10: Leistungsmerkmale für die Bestimmung von DON [EG Nr. 2005/38]

Die Nachweisgrenze (LOD) der Methode liegt bei 74 ng/ g Mais, die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei 244 ng/ g Mais.

7.5 Bestimmung von ZON mittels HPLC-FLD

Von Interesse war auch, ob sich die Immunultrafiltrationsmethode in Kombination mit HPLC-FLD für die Bestimmung von ZON eignet.

7.5.1 Erstellen von Kalibriergeraden mit den HPLC-Systemen

Es wurden sowohl mit dem HPLC-System mit Säule 1 als auch mit Säule 2 Kalibrierfunktionen erstellt, dazu siehe Abschnitt 6.5.1. Für die Kalibrierung wurden ZON-Standardlösungen zwischen 5 ng/ml und 150 ng/ml verwendet.

Durch Auftragen der erhaltenen Peakflächen A [mV*s] gegen die zugehörigen Konzentrationen c [ng/ml] der jeweiligen ZON-Standards wurden die Kalibriergeraden erhalten [Abb. 22 und 23].

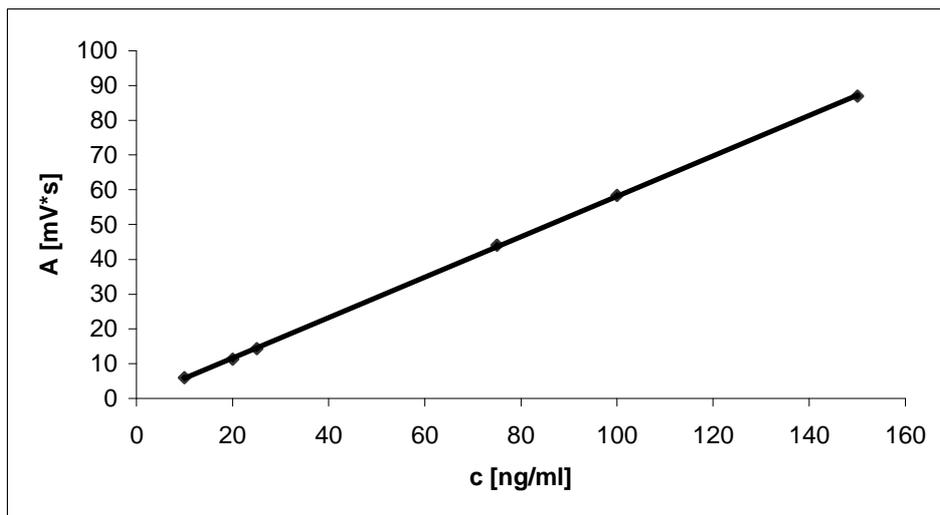


Abbildung 22: Repräsentative Kalibriergerade für ZON mit Säule 1

Die Gleichung der Kalibrierfunktion lautet: $y = 0,5814x + 0,0080$

Der Korrelationskoeffizient beträgt: $R^2 = 0,9999$

LOD: 2 ng/ ml

LOQ: 6 ng/ml

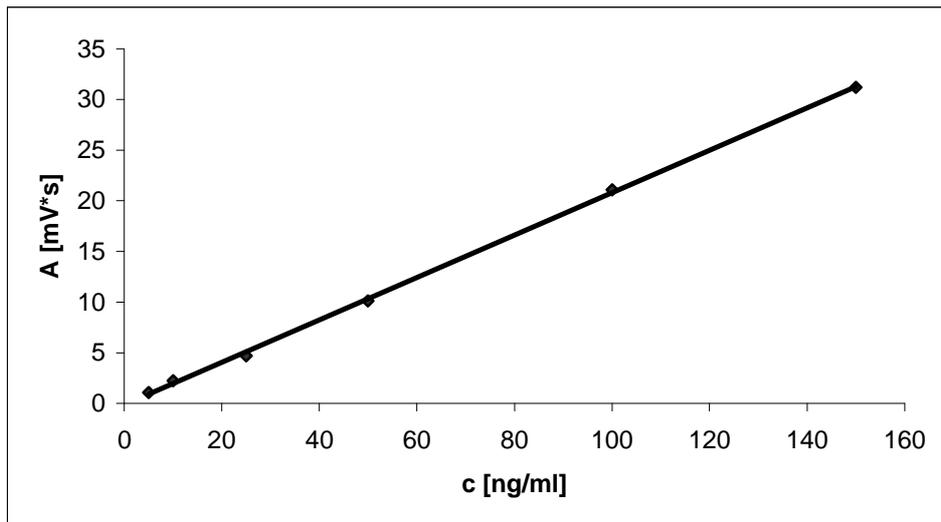


Abbildung 23: Repräsentative Kalibriergerade für ZON mit Säule 2

Die Gleichung der Kalibrierfunktion lautet: $y = 0,2093x - 0,1244$

Der Korrelationskoeffizient beträgt: $R^2 = 0,9995$

LOD: 4 ng/ ml

LOQ: 14 ng/ml

7.6 Entwicklung einer Immunultrafiltrationsmethode

Die Materialbeständigkeit der Amicon[®] Ultra-4 IUF hinsichtlich organischer Lösungsmittel war bereits bei der Entwicklung der IUF-Methode für DON untersucht worden. Da die Anforderungen für die Probenvorbereitung von ZON ähnlich sind, waren keine weiteren Versuche erforderlich.

7.6.1 Unspezifische Membranadsorption

Um die Adsorption von ZON an der Filtermembran der Amicon[®] Ultra-4 zu testen, wurde eine wässrige ZON-Standardlösung (100 ng ZON/ml H₂O_{dd}) auf die Einheit aufgetragen, und 0, 15 und 30 Minuten inkubiert. Die abzentrifugierten Lösungen wurden anschließend mittels HPLC-FLD analysiert. ZON konnte in keinem der Eluate nachgewiesen werden, was auf eine vollständige Adsorption von ZON an der Membran schließen lässt. Aus diesem Grund mussten Versuche zur Verringerung der unspezifischen Membranadsorption durchgeführt werden.

7.6.2 Verringerung der unspezifischen Membranadsorption

Eine Möglichkeit, die unspezifische Adsorption von ZON an der Membran zu verringern besteht darin, die ZON-Lösung in einem ACN/H₂O_{dd}-Gemisch in die IUF einzubringen. Der Acetonitrilanteil darf dabei 15 % nicht überschreiten, da sonst die Gefahr besteht, dass die Affinität des Antikörpers gegenüber ZON stark herabgesetzt wird.

Um die Auswirkungen auf die unspezifische Membranadsorption von ZON (100 ng/ml) in H₂O_{dd} einer 10 bzw. 15 % ACN/ H₂O_{dd}-Mischung verfolgen zu können, wurden sämtliche Lösungen (Aufgabe-, Wasch- und Elutionslösung) auf ZON mittels HPLC-FLD untersucht. Der Aufgabe von ZON in 10 bzw. 15 % ACN/ H₂O_{dd} folgte ein Waschschriff mit denselben Lösungsmitteln. Der letzte Schriff (Elution) wurde bei allen drei Versuchen mit reinem Acetonitril durchgeführt.

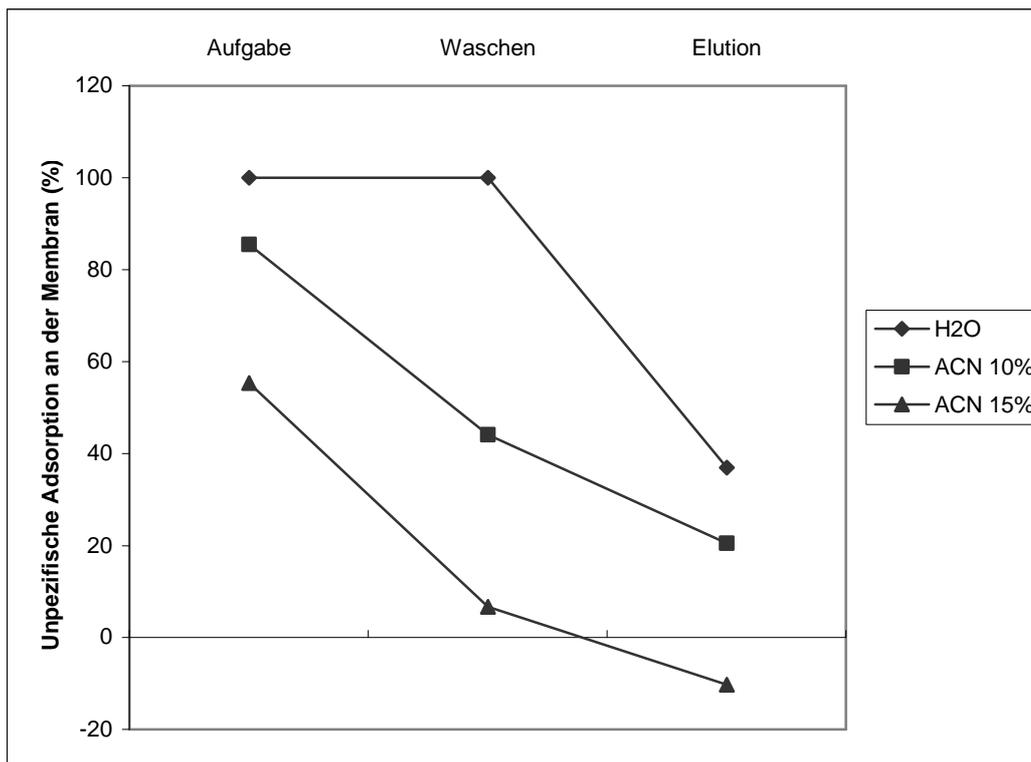


Abbildung 24: Einfluss der Aufgabelösung auf die unspezifische Membranadsorption

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, kam es bei der Aufgabe von ZON in H₂O_{dd} zu einer vollständigen Adsorption an die Filtermembran, mit ACN konnte ZON nur zu 60 % von der Membran eluiert werden. Schon bei geringen Konzentrationen von ACN in der Aufgabelösung konnte die Adsorption verringert werden. Die Wiederfindung von ZON wurde verteilt über die einzelnen Schritte (Aufgabe, Waschen, Elution) summiert. Daraus geht hervor, dass, um eine unspezifische Adsorption zu minimieren, eine ACN/H₂O_{dd} (15:85, v/v) Lösung für die Aufgabe von ZON verwendet werden muss.

	Summe der Wiederfindungen (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
H ₂ O	69,32		
H ₂ O	56,85	63,09	8,82
ACN 10%	74,79		
ACN 10%	84,22	79,51	6,67
ACN 15%	111,39		
ACN 15%	109,19	110,29	1,56

Tabelle 11: Summe der Wiederfindungen der Aufgabe-, Wasch- und Elutionsfraktionen

7.6.3 Adsorptionsverhalten von ZON an diversen Materialien

Dieser Versuch sollte sicherstellen, dass man weder bei der Immunultrafiltration noch bei anderen Aufarbeitungsschritten Konzentrationsabnahmen wegen einer Adsorption von ZON an den verwendeten Gefäßen erhält. 1 ml einer ZON-Standardlösung (100 ng/ml H₂O_{dd}) wurde in ein konisches Glasgefäß mit einem Füllvolumen von 15 ml, in ein Greiner Röhrchen mit denselben Dimensionen, und in das Auffanggefäß der Amicon Ultra-4 Immunultrafiltrationseinheit pipettiert. Diese Lösungen wurden nach 40 min und nach 24 Stunden auf deren ZON-Konzentration untersucht.

Material	Inkubationszeit	Adsorption (%)
Glas	40 Minuten	0,5
Greiner Röhrchen (PP)	40 Minuten	3,6
Amicon Auffanggefäß (PP)	40 Minuten	4,0
Glas	24 Stunden	-
Greiner Röhrchen (PP)	24 Stunden	10,8
Amicon Auffanggefäß (PP)	24 Stunden	11,7

Tabelle 12: Adsorption von ZON in Abhängigkeit vom Material

Wie aus der Tabelle 12 ersichtlich ist, wurde innerhalb von 40 min keine nennenswerte Adsorption von ZON an den getesteten Materialien beobachtet.

7.6.4 Bestimmung der Bindungskapazität des Antikörpers

Es wurden monoklonale ZON-Antikörper aus 2 unterschiedlichen Klonen zur Verfügung gestellt. Die Antikörperlösung mit der Aufschrift ZEN-1.1.3.27.21 (mAk₁) wies laut Hersteller eine Konzentration von 11,68 mg/ml auf. Der zweite Klon ZEN-2.1.2.4.9 (mAk₂) hatte eine Konzentration von 8,32 mg/ml.

Um die Bindungskapazität der Antikörper zu ermitteln, wurden zwei Versuchsreihen in Immunultrafiltrationseinheiten durchgeführt. Jede der IUF-Einheiten wurde mit 100 ng ZON in ACN/H₂O (15:85, v/v) beschickt, entweder mAk₁ oder mAk₂ zugesetzt und die Lösung zentrifugiert. Gewaschen wurde mit 4 ml ACN/H₂O (15:85, v/v). Die Dissoziation des Antigen-Antikörperkomplexes wurde in der 1. Versuchsreihe mit ACN/H₂O (80:20, v/v) und in der 2. Versuchsreihe mit 100 % ACN vorgenommen.

Die Ergebnisse in Tabelle 13 sind ohne vorhergehende Optimierungsversuche erzielt worden. Dabei erwies sich mAk₂ als besser geeignet als mAk₁. Trotzdem wurden weitere

Optimierungsschritte mit dem 1. Antikörper durchgeführt, da mAk₂ nur in geringen Mengen vorlag.

Antikörper	Anzahl der Versuche	Elutionsmittel	Gebundener Anteil (Mittelwert: %)	Standardabweichung (%)
mAk ₁	n=2	80% ACN	63,98	4,61
mAk ₁	n=3	100% ACN	44,76	7,87
mAk ₂	n=2	80% ACN	95,96	14,56
mAk ₂	n=2	100% ACN	76,93	0,72

Tabelle 13: Untersuchung der Bindungskapazität der monoklonalen Antikörper

Auf Grund der niedrigeren Wiederfindungen von ZON nach der Elution vom mAk₁ wurde der Schluss gezogen, dass die Elution unvollständig war, da laut Hersteller Angabe der mAk₁ sowohl in einer höheren Konzentration vorlag als auch eine höhere Affinität zu ZON, als der mAk₂, aufwies.

7.6.5 Elutionsversuche mit mAk₁ und Guanidinhydrochlorid

Wie in Tabelle 13 ersichtlich, war die an mAk₁ gebundene Menge an ZON bei weitem geringer als jene, die durch mAk₂ gebunden wurde. Deshalb wurde nochmals Rücksprache mit dem Hersteller gehalten, um exakte Auskünfte über die Eigenschaften des Antikörpers zu erhalten. Laut Hersteller sollte der mAk₁ eine sehr hohe Affinität zu ZON haben. Deshalb wurde vermutet, dass die Ergebnisse aus Tabelle 13 auf Grund der unzureichenden Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes so niedrig waren. Um die Dissoziation zu steigern, wurde der Antigen-Antikörperkomplex auf der Membran unterschiedlich lange dem Denaturierungsmittel Guanidinhydrochlorid ausgesetzt, um ZON mit diesem zu eluieren. Der freigesetzte Anteil von ZON lag trotz 60 minütiger Inkubation nur bei ~55%, diese Elutionsmethode stellte daher keine Verbesserung zur Elution mit ACN dar [Abb. 25].

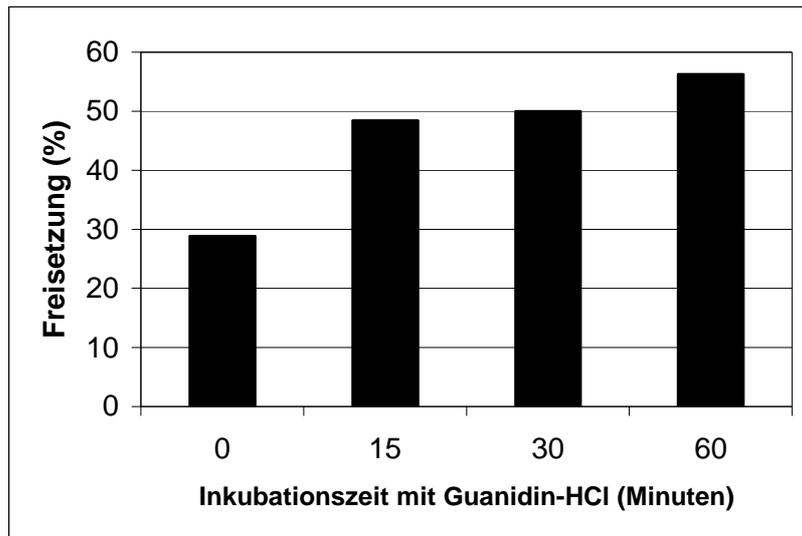


Abbildung 25: Freisetzung von ZON mittels Guanidinhydrochlorid

Wie man aus der oberen Abbildung erkennt, konnte die Freisetzung (Dissoziation) nur minimal erhöht werden. Darum wurden Versuche durchgeführt, bei denen ein zweites Mal mit Guanidinhydrochlorid eluiert wurde, jedoch wurde nur bei der ersten Elution 60 min gewartet. Durch Einführung des 2. Elutionsschrittes konnten die freigesetzte Menge auf bis zu 80 % erhöht werden

7.7 Analyse von ZON

7.7.1 Mais

Aus Vorversuchen war bekannt, dass beide mAKs nur eine ACN-Konzentration von 15 % aushalten, ohne denaturiert zu werden. Daher wurde die Probenextraktion auf 2 unterschiedliche Vorgangsweisen vorgenommen [Abb. 26]. 5 g gemahlener Mais wurde mit 20 ml ACN/H₂O_{dd} (60:40, v/v) und mit 2000 ng ZON versetzt. Die Mischung wurde für eine Stunde gerührt und anschließend filtriert. Dann wurde der Extrakt in 2 Teile geteilt.

Zum einen wurden 10 ml Extrakt in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und anschließend der Rückstand in 10 ml 15 % ACN- H₂O_{dd} aufgenommen. 1 ml der Lösung wurde auf die IUF-Einheit aufgetragen.

Der andere Teil des Extrakts (10 ml) wurde mit PBS 1:5 verdünnt und auf die IUF-Einheit aufgegeben.

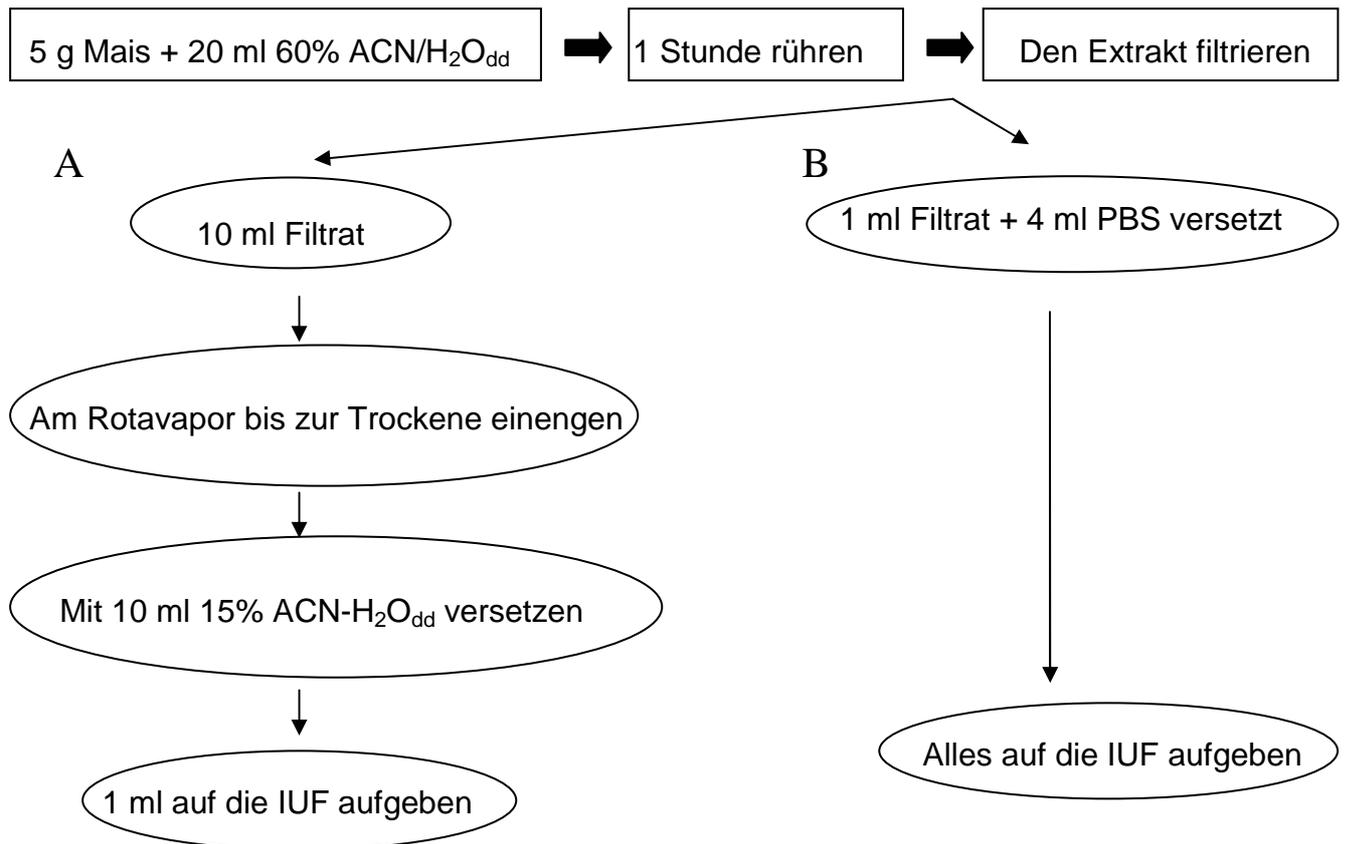


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für Mais

Die Ergebnisse, die mit beiden Methoden erzielt wurden, waren wenig zufriedenstellend. Deshalb wurden weitere Versuche mit den gleichen Aufarbeitungsmethoden (Abdampfen bzw. Verdünnen) durchgeführt, bei denen jedoch der ZON-Standard erst nach der Extraktion bzw. nach der Filtration zugesetzt wurde. Die Ergebnisse, die bei diesen Versuchen erzielt wurden, sind in Tabelle 14 angeführt.

	Anzahl der Versuche	Probenaufarbeitungs- verfahren	Mittelwert der Wiederfindung (%)	Standardab- weichung (%)
Standardzugabe nach der Extraktion	n=6	A	80,74	15,47
	n=3	B	72,56	2,73
Standardzugabe vor der Extraktion	n=9	A	34,73	3,28
	n=3	B	42,68	8,87

Tabelle 14: Vergleich der Probenaufarbeitung A und B und des Einflusses des Zeitpunkts der Standardzugabe

Auf Grund der in Tabelle 14 angeführten Ergebnisse wurde der Schluss gezogen, dass die Maismatrix ZON stark bindet und ZON nicht vollständig extrahiert werden kann.

7.7.2 Weizen

7.7.2.1 Optimierung der Inkubationszeit

Weizenmehl wurde mit ZON (400 ng/g) versetzt und extrahiert. Anschließend wurde je 1 ml des Extraktes mit 50 μ l mAk₂ versetzt und sofort bzw. nach 15, 30 oder 60 Minuten zentrifugiert. Aus der Versuchsreihe geht hervor, dass durch eine 30 minütige Inkubation die an Antikörper gebundene ZON Menge stark ansteigt [Abb. 27].

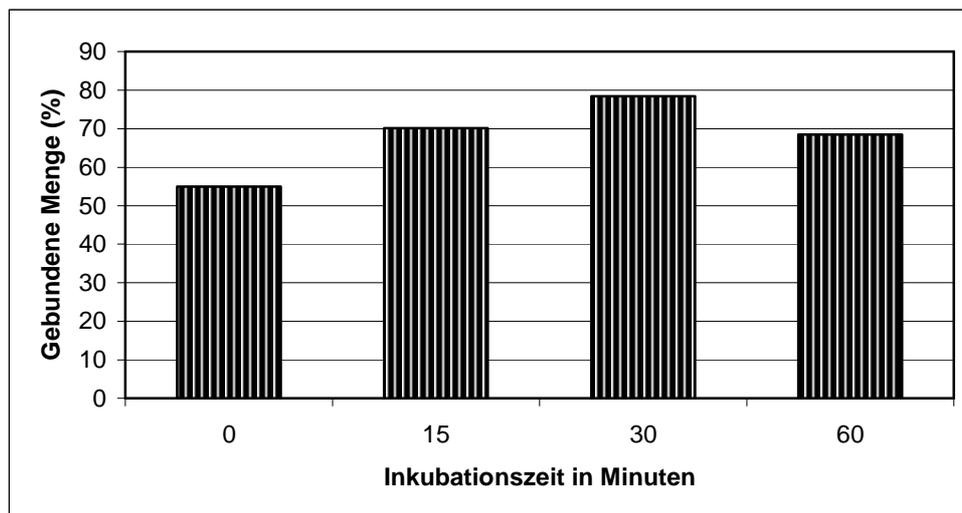


Abbildung 27: Erhöhung der gebundenen Menge an ZON durch eine längere Inkubation von Ag und Ak

7.7.2.2 Vergleich der Immunultrafiltrationsmethode bei Verwendung von mAk₁ und mAk₂

Um festzustellen, welcher der beiden Antikörper für die weiteren Versuche geeigneter ist, wurden beide unter den für sie optimierten Bedingungen eingesetzt. Die Probe (Weizenmehl) wurde mit ZON gespickt und nach der in Abschnitt 6.5.5.1 angeführten Methode extrahiert. Anschließend wurde wie in Tabelle 14 angeführt die Probenvorbereitung mittels IUF durchgeführt.

	mAk ₁	Inkubationszeit	mAk ₂	Inkubationszeit
Aufgabe	1 ml Extrakt + 150 µl [1752 µg] Antikörper	-	1 ml Extrakt + 50 µl [416 µg] Antikörper	30 min
Waschen	4 ml Wasser	-	4 ml Wasser	-
1. Elution	4 ml 6 M Guanidinhydrochlorid	60 min	4 ml 80% ACN	-
2. Elution	4 ml 6 M Guanidinhydrochlorid	-	4 ml 80% ACN	-

Tabelle 15: Optimale Bedingungen für die Immunultrafiltration unter der Verwendung von mAk₁ und mAk₂

Es wurden pro mAk je 2 Wiederholungen der IUF-HPLC-FLD-Methode unter den optimierten Bedingungen durchgeführt, und die Wiederfindung durch Vergleich mit der verwendeten Standardlösung berechnet.

Antikörper	Wiederfindung (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
mAk ₁	82,9	91,7	12,4
mAk ₁	100,5		
mAk ₂	73,9	85,8	16,8
mAk ₂	97,7		

Tabelle 16: Wiederfindung von ZON mit mAk₁ und mAk₂

Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, ist die Wiederfindung in Hinblick auf die Weizenmatrix besser als bei der Maismatrix, was bestätigt, dass die Matrix eine entscheidende Rolle bei der Probenvorbereitung spielt.

Abschließend sollte die Verwendbarkeit der entwickelten IUF-HPLC-FLD Methode an einem natürlich kontaminierten Weizen getestet werden.

7.7.2.3 Kontaminierter Weizen

Um die Leistung der entwickelten IUF-HPLC-FLD Methode beurteilen zu können, wurde der ZON Gehalt des natürlich kontaminierten Weizens auch mit der IAC-HPLC-FLD Methode bestimmt. Für die IUF-Methode wurden beide Antikörper eingesetzt.

Methode	Anzahl der Versuche	Mittelwert (ng/g)	Standardabweichung (ng/g)
IAC-HPLC-FLD	n=2	84,16	9,84
mAk ₁ (IUF-HPLC-FLD)	n=2	103,67	0,54
mAk ₂ (IUF-HPLC-FLD)	n=6	79,70	9,39

Tabelle 17: Konzentration von ZON im natürlich kontaminierten Weizen

Da es sich hier um kein Referenzmaterial handelte, wurde der durchschnittliche ZON-Gehalt des Weizens, aus den mit der IAC und der IUF-Methode (mAk₂) erhaltenen Konzentrationen berechnet, dabei ergab sich eine ZON-Konzentration von 80,7 ng/g (Mittelwert der Einzelwerte).

7.7.2.4 Validierung der IUF-HPLC-FLD-Methode mit Weizenmehl und mAk₂

Um die Wiederholbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde dem natürlich kontaminierten Weizen ZON zugesetzt. Dazu wurden unterschiedliche Spikelevels gewählt, um die Grenzwerte der EU-Kontaminanten Verordnung abzudecken [EG Nr. 1126/2007].

Innerhalb eines Tages wurde eine Weizenprobe (mit ZON gespikt) in 4 fach Bestimmung durchgeführt. In Tabelle 17 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen innerhalb eines Tages angegeben.

Spikelevel	Einzelwert [ng/g]	Mittelwert [ng/g]	Standardabweichung [ng/g]	RSD (%)	Wiederfindung (%)
400 ng/g	417,56	431,51	50,08	11,61	86,26
	444,70				
	491,71				
	372,07				
100 ng/g	173,89	159,97	24,73	15,46	82,04
	123,44				
	166,25				
	176,29				
100 ng/g	163,00	183,68	15,94	8,68	100,19
	201,79				
	186,12				
	183,83				
50 ng/g	124,39	127,43	25,74	20,20	93,89
	161,85				
	124,01				
	99,46				
50 ng/g	139,41	135,06	4,82	3,57	96,35
	139,02				
	131,38				
	130,42				
25 ng/g	105,09	92,79	15,23	16,41	86,56
	88,84				
	72,90				
	104,32				

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der ZON-Konzentration

Um zu überprüfen, ob die entwickelte IUF-HPLC-FLD Methode den Anforderungen für Analysenmethoden in der EU entspricht, wurden die Spikeversuche mit 50 ng/g und 100 ng/g, die an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Diese Untersuchung ist mit einer Interday-Validierung vergleichbar.

Konzentration [ng/g]	Anzahl der Versuche	Mittelwert [ng/g]	Standardabweichung [ng/g]	RSD (%)	Wiederfindung (%)
100 ng/g	n=8	171,83	23,06	13,42	91,12
50 ng/g	n=8	131,24	17,62	13,43	95,12

Tabelle 19: Interday-Validierung

Da beide Konzentrationsbereiche aus Tabelle 19 erforderlich sind, erfolgt die Beurteilung der Methode nach den Werten, die in der 2. Zeile der Tabelle 20 angegeben sind. Mit einem RSD

von 13,4 % liegen die Validierungsdaten unterhalb des RSD-Wertes der EU. Auch die Wiederfindung liegt innerhalb des Bereiches für die Anforderungen an eine Analysenmethode.

Konzentrationsbereich der Probe ng/g	Zearalenon	
	RSD (%)	Wiederfindungsrate (%)
≤ 50	≤ 40	60—120
> 50	≤ 25	70—120

Tabelle 20: Anforderungen der EU an eine Analysenmethode für ZON [EG Nr. 2005/38]

Der LOD der Methode liegt bei 7 ng/ g Weizen, der LOQ bei 27 ng/ g Weizen.

8 RESÜMEE

Die Immunultrafiltration wurde als eine Alternative zu der bisher vorherrschenden Immunaффinitätschromatographie (IAC) entwickelt. Diese Methode sollte die gleiche Sensitivität sowie die gleiche Selektivität aufweisen wie die IAC. Es kommt bei beiden Methoden zum Einsatz von Antikörpern mit einem Unterschied. In der Immunaффinitätschromatographie wird ein Gelbett verwendet, an das die Antikörper immobilisiert werden, wohingegen bei der Immunultrafiltration die Antikörper direkt der Probenlösung zugesetzt werden können.

Als großes Problem erwies sich die Antikörperproduktion in Labortieren. Obwohl für die Mykotoxine DON und ZON je vier Hybridkaninchen immunisiert und geboostert wurden, konnten keine spezifischen polyklonalen Antikörper hergestellt werden. Ein Unsicherheitsfaktor war die geringe Erfahrung in der Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern. Aus diesem Grund wurde ein zweiter Versuch für die Erzeugung von polyklonalen Antikörpern unternommen. Diesmal wurden Hühner der Rasse Derco braun immunisiert, und zwar je eines pro Mykotoxin. Die Immunisierung wurde von einer Person durchgeführt, die auf diesem Gebiet Erfahrung hatte. Es wurde für die Immunisierung das gleiche Antigen (DON gebunden an bovines Serumalbumin und Zearalenon über Carboxymethyloxim an bovines Serumalbumin gekoppelt) verwendet.

Leider konnten auch hier keine geeigneten Antikörper hergestellt werden. Es können nur Mutmaßungen in Bezug auf das Scheitern der Antikörperproduktion angestellt werden, da hier zu viele Faktoren einen Einfluss auf den erfolgreichen Verlauf einer Antikörperproduktion haben.

In Folge dessen wurden geeignete monoklonale Antikörper für die Entwicklung der Immunultrafiltrationsmethode herangezogen. Die monoklonalen Antikörper haben den Vorteil, dass sie beliebig oft geklont werden können, und so der Vorrat nie aufgebraucht wird. Der einzige Nachteil, den monoklonale Antikörper besitzen, ist, dass sie sehr teuer in ihrer Produktion und Anschaffung sind.

Für die Entwicklung der Immunultrafiltrationsmethode wurde zuerst nach einer passenden Filtrationseinheit gesucht. Es wurden drei gängige Ultrafiltrationseinheiten mit unterschiedlichen Membranspezifikationen gekauft.

Die erste Filtereinheit war von der Firma Whatman und besaß ein Füllvolumen von 0,4 ml. Die Membran bestand aus Cellulosetriacetat und hatte eine Porengröße von 12 kDa.

Die zweite Einheit wurde von dem Hersteller Sartorius bezogen und wies ein Füllvolumen von 2 ml und einen Membran "Cut-off" von 30 kDa auf. Das Material der Membran bestand aus Polyethersulfon.

Die letzte Ultrafiltrationseinheit kam vom Hersteller Millipore und besaß mit 4 ml das größte Füllvolumen. Die Ausschlussgrenze der Membran lag bei ebenfalls 30 kDa und war eine "low binding regenerated Cellulose".

Diese drei Filtereinheiten wurden im Hinblick auf die Anforderungen an die Membran getestet. Zuerst wurden Inkubationsversuche mit den gängigsten Lösungsmitteln (Acetonitril und Methanol) unternommen. Unter diesen Extrembedingungen für die Filtermembran ging ein eindeutiger Sieger hervor, die Einheit von Millipore. Alle anderen wiesen Veränderungen an der Membran oder dem Filtrationskörper auf.

Anschließend wurden erste Versuche mit den Mykotoxinstandards unternommen. Danach wurde der käuflich erworbene monoklonale DON-Antikörper auf seine Bindungseigenschaften an das Mykotoxin Deoxynivalenol untersucht.

Nach Optimierung der Bedingungen im Standardversuch wurde ein nicht kontaminiertes Maismehl mit DON versetzt und mit der Immunultrafiltrationsmethode aufgearbeitet. Die Wiederfindung lag bei 90 %.

Trotz der hohen Wiederfindung musste die Methode noch dem Vergleich mit kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäulen standhalten. Von der Selektivität waren beide Methoden sehr gut. Im Ablauf erwies sich die IUF jedoch als wesentlich einfacher, da man hier nur den Antikörper in eine Filtereinheit gibt und mit dem Probenextrakt versetzt. Bei der Immunaффinitätssäule muss man zuerst die Antikörper an ein Trägermaterial immobilisieren. Dieser Schritt ist sehr kritisch, und entscheidet über die Affinität der Antikörper und die Bindungskapazität der Säule.

Zum Schluss wurde die IUF-Methode noch mittels eines Referenzmaterial auf ihre Wiederholbarkeit untersucht. Auch hier erwies sich die Methode als zuverlässig.

Die gleichen Versuche wurden auch mit der IUF-Methode für die Aufreinigung von ZON durchgeführt. Hier zeigten sich jedoch die ersten Probleme bei der Aufreinigung von gespiktem Maismehl. Trotz unterschiedlichster Extraktionsverfahren konnte in keiner untersuchten Maisprobe ZON nachgewiesen werden. Daher wurde der Schluss gezogen, dass der ZON-Antikörper eine zu große Interaktion mit der Matrix eingeht. Um dieses zu bestätigen, wurden weitere Versuche statt mit Mais mit Weizen unternommen. Trotz niedriger Wiederfindung bei den ersten Versuchen konnte die Methode so weit optimiert werden, dass die Wiederfindung von ZON 90 % betrug.

Dies zeigte deutlich, dass nicht jeder Antikörper für jede Matrix einsetzbar ist.

Da die Immunultrafiltrationsmethode für beide Analyten (DON und ZON) den Anforderungen an eine Analysenmethode in der EU entsprach, könnte man sie in einem Routinelabor zu Probenvorbereitung von DON und ZON aus diversen Matrices einsetzen.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel von Deoxynivalenol	13
Abbildung 2: Strukturformel von Zearalenon	15
Abbildung 3: A-Aflatoxin B ₁ , B-Aflatoxin B ₂ , C-Aflatoxin G ₁ , D-Aflatoxin G ₂ , E-Aflatoxin M ₁	19
Abbildung 4: Ochratoxin A	20
Abbildung 5: Schematische Abbildung eines Immunglobulins	24
Abbildung 6: Schematische Abbildung der Produktion von monoklonalen Antikörpern, 1- Immunisierung, 2-B-Lymphozyten aus der Milz, 3-Myelomzelle, 4-Zellfusionierung, 5- Hybridomzelllinie, 6-Wechselwirkung Antigen-Antikörper, 7a-Zellkultur, 7b-Produktion monoklonaler Antikörper in einer Maus, 8-Antikörper (http://de.wikipedia.org)	27
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Einstrahlphotometers (http://www.elhardt.de/matthias/chemie/photometer/Photometer.htm)	31
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (http://www.forumsci.co.il/HPLC/system.gif)	37
Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Immunultrafiltration	43
Abbildung 10: a-Vivaspin Filtrationseinheit (http://www.sartorius.de/index.php?id=2436), b- VectaSpin™ Micro (http://www.whatman.com/products/?pageID=7.26.339), c- Amicon® Ultra-4 (http://www.millipore.com)	58
Abbildung 11: Mittelwert der Titerbestimmung der Kaninchenserum unterschiedlicher Verdünnung	78
Abbildung 12: Mittelwert der Titerbestimmung der Kaninchenserum unterschiedlicher Verdünnung	79
Abbildung 13: Titerbestimmung des DON-Antikörpers im Hühnerei bei unterschiedlichen Verdünnungen	82
Abbildung 14: Titerbestimmung des ZON-Antikörpers im Hühnerei bei unterschiedlichen Verdünnungen	83
Abbildung 15: Repräsentative Kalibriergerade für DON für das HPLC-System 1	84
Abbildung 16: Repräsentative Kalibriergerade für DON für das HPLC-System 2	85
Abbildung 17:	87
Abbildung 18: Gebundener Anteil (%) bei steigender Menge an DON	89
Abbildung 19: Wiederfindung von DON im Eluat in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung	90
Abbildung 20: Vergleich der Extraktion von DON aus Mais	92
Abbildung 21: Chromatogramme der Maisextrakte. A-Probenvorbereitung mittels IUF, B- Probenvorbereitung mittels IAC	93
Abbildung 22: Repräsentative Kalibriergerade für ZON mit Säule 1	96
Abbildung 23: Repräsentative Kalibriergerade für ZON mit Säule 2	97
Abbildung 24: Einfluss der Aufgabelösung auf die unspezifische Membranadsorption	99
Abbildung 25: Freisetzung von ZON mittels Guanidinhydrochlorid	102
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für Mais	103
Abbildung 27: Erhöhung der gebundenen Menge an ZON durch eine längere Inkubation von Ag und Ak	104

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Höchstmengenangaben für DON in Lebensmitteln [EG Nr. 1126/2007].....	14
Tabelle 2: Höchstmengenangaben für ZON in Lebensmitteln [EG Nr. 1126/2007]	17
Tabelle 3: Ergebnisse der Proteinbestimmung in den Sera nach der Aufreinigung mittels Protein A Säule.....	80
Tabelle 4: Ergebnisse der Proteinbestimmung in den Sera nach der Aufreinigung mittels Caprylsäure/Ammoniumsulfatfällung	81
Tabelle 5: Mittelwert der Wiederfindung von DON und relative Standardabweichung im Eluat abhängig von der Membranausschlussgröße.....	88
Tabelle 6: Wiederfindung von DON unter den optimierten Bedingungen im Standardversuch	91
Tabelle 7: Übersicht über die Mittelwerte (n=2) der DON-Konzentrationen, der Standardabweichung und der Wiederfindung	93
Tabelle 8: Ergebnisse der Intraday-Validierung	94
Tabelle 9: Ergebnisse der Interday-Validierung	94
Tabelle 10: Leistungsmerkmale für die Bestimmung von DON [EG Nr. 2005/38]	95
Tabelle 11: Summe der Wiederfindungen der Aufgabe-, Wasch- und Elutionsfraktionen	99
Tabelle 12: Adsorption von ZON in Abhängigkeit vom Material	100
Tabelle 13: Untersuchung der Bindungskapazität der monoklonalen Antikörper	101
Tabelle 14: Vergleich der Probenaufarbeitung A und B und des Einflusses des Zeitpunkts der Standardzugabe	103
Tabelle 15: Optimale Bedingungen für die Immunultrafiltration unter der Verwendung von mAk ₁ und mAk ₂	105
Tabelle 16: Wiederfindung von ZON mit mAk ₁ und mAk ₂	105
Tabelle 17: Konzentration von ZON im natürlich kontaminierten Weizen.....	106
Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der ZON-Konzentration	107
Tabelle 19: Interday-Validierung	107
Tabelle 20: Anforderungen der EU an eine Analysenmethode für ZON [EG Nr. 2005/38] .	108

11 ANHANG

Verwendete Reagenzien und Gegenstände

ABTS-Lösung, [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)], Sigma-Aldrich
Acetonitril, HPLC Gradient Grade, VWR
Ammoniumsulfat, Sigma-Aldrich
Anti-DON monoklonale Antikörper in PBS, Zheng Zhong Ming (Singapur)
Anti-ZON monoklonale Antikörper in PBS, Zheng Zhong Ming (Singapur)Biopure
Casein, Sigma
Deoxynivalenol, Biopure
Dialyseschlauch (cut-off 12-14 kDa), Medicell International
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, 99,5%, Roth
Dinatriumhydrogenphosphatdodekahydrat, Fluka
DON-BSA, Biopure
DON-Con A, Biopure
Gerbu – LQ, Gerbu Biochemicals
Goat-Anti-Rabbit IgG -HRP, Pierce
Guanidinhydrochlorid, Sigma
Immunaффinitätssäulchen-DON, Vicam
Immunaффinitätssäulchen-ZON, Romer Labs
Methanol, HPLC Gradient Grade, VWR
Natriumacetat-Trihydrat, Sigma
Natriumcarbonat, Sigma
Natriumchlorid, 99,5%, Sigma
Natriumcitrat, Sigma
Natriumdihydrogenphosphat, Merck
Natriumdodecylsulfat, Serva
Natriumhydrogencarbonat, Merck
Natriumhydrogenphosphat, Sigma
Natriumhydroxid Plätzchen, Merck
Natriumphosphat, Sigma
Octansäure (Caprylsäure), Merck
PBS, Fluka
PBS-Tween® 20, Sigma

Polyethylenglykol, Fluka
Protein A Säulen, Amersham
Anti-IgY Antikörper Rabbit-Anti-Chicken IgY- HRP, Pierce
Rabbit-anti-chicken IgY-HRP, Pierce
Stickstoff verdichtet 5.0, Linde
Tetramethylbenzidin-Lösung, Sigma
Tris-HCl, Sigma
Zearalenon, Biopure
Zertifiziertes Referenzmaterial (Mais), Biopure
ZON-Con A, Biopure
ZON-CMO-BSA, Biopure

Filtrationseinheiten

Amicon® Ultra-4, regenerierte Cellulose, 30 kDa, Millipore
Amicon® Ultra-4, regenerierte Cellulose, 50 kDa, Millipore
Amicon® Ultra-4, regenerierte Cellulose, 100 kDa, Millipore
Vecta Spin Micro, Cellulose Triacetat, 12 kDa, Whatman
Vivaspin 6, Polyethersulfon, 30 kDa, Sartorius

Verwendete Geräte

Heizmodul	Reacti Therm, Pierce
Magnetrührgerät	Tokyo Kagakusangyo, Co, LTD, MS-16 B
Mikrotiterplatten	Millipore, Cytoplate CFCP N96 10
Mikrotiterplattenreader	Biorad, Modell 450
Mikrotiterplattenwasher	Biorad, Modell Novapath washer
Mühle	Pulverisette Analysette Laborette, Fritsch
Photometer	Thermo Spectronic, Modell Genesys 10 UV
Rotationsverdampfer	Büchi, Modell R-114
Wasserbad	Büchi, Modell B-480
Waage	Sartorius, TE 214S
Ultrazentrifuge	Kendro Labs Products, Modell Servall RC5B Plus
Vortex	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Modell VF2
Zentrifugen	Sigma, Modell 4 K 10 Eppendorf, Modell 5810 R Beckman Avanti 30

HPLC-Systeme

HPLC-System 1:

Gradientenpumpe	Merck-Hitachi, L-6200
Injektionsblock	Rheodyne mit einer 100 µl Injektionsschleife
Vorsäule	Phenomenex, ODS
Säule	Phenomenex, Synecri 4µ Polar-RP Thermo Electron, Hypersil-BDS C18 Aberdeen, ACE-3 C18 RP
Säulenofen	Merck-Hitachi, 655 A-52
UV-Detektor	Merck-Hitachi, L-4000
Fluoreszenzdetektor	Merck-Hitachi, F-1080

HPLC-System 2:

Autosampler	Merck-Hitachi, AS-2000
Injektionsschleife	Upchurch Scientific, 100 µl PEEK tubing
Isokratische Pumpe	Shimadzu, Modell LC-9A
Vorsäule	Phenomenex, ODS
Säule	Aberdeen, ACE 3-RP Aqua
UV-Detektor	Shimadzu, SPD-6A

12 LITERATURVERZEICHNIS

Aigner A., Neumann S., Immunchemie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1997, 1-10, 39-40

Berthiller F., Schuhmacher R., Buttinger G., Krska R., Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1062, 209-216

Cahill L.M., Kruger S.C., McAlice B.T., Ramsey C.S., Prioli R., Kohn B., Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1999, 859, 23-28

Cammann K., Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 2001, 11-16

Council for Agricultural Science and Technology, Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems, 2003, 139, 18

Čonková E., Laciaková A., Kováč G., Seidel H., Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases, *The Veterinary Journal*, 2003, 165, 214–220

Cooper G.T., Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin, 1980, 360-363

De Saeger S., Sibanda L., Van Peteghem C., Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 487, 137-143

Edwards, S.G., Influence of agricultural practices on Fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins, *Toxicology Letters*, 2004, 153, 29–35.

Esser K., Bennett J.W., The Mycota, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2002, 11.Auflage, 217-240

EU, Verordnung (EG) Nr. 856/2005 der Kommission von 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Fusarientoxine

EU, Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission von 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen

EU, Richtlinie 2005/38/EG der Kommission von 2005 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysenmethoden für die amtliche Kontrolle des Gehalts an Fusarientoxinen in Lebensmitteln

Fink-Gremmels J., Malekinejad H., Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone, Animal Feed Science and Technology, 2007, 137, 326–341

Fioramonti J., Dupuy C., Dupuy J., Bueno L., The mycotoxin, deoxynivalenol, delays gastric emptying through serotonin-3-receptors in rodents, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1993, 266, 1255-1260

Haasnoot W., Kemmers-Voncken A., Samson D., Immunofiltration as sample clean up for the immunochemical detection of β -agonists in urine, The Analyst, 2002, 127, 87-92

Hanly W.C., Artwohl J.E., Bennett B.T., Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in mammals and poultry, ILAR Journal, 1995, 37, 1-20

Howard G.C., Bethell D.R., Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press, USA, 2000, 31-51

IARC (International Agency for Research on Cancer), Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1993, Vol. 56, 397-444

Instruction Manual-DONtest™ HPLC, www.vicam.com

Josephs R.D., Derbyshire M., Stroka J., Emons H., Anklam E., Trichothecenes: reference materials and method validation, *Toxicology Letters*, 2004, 153, 123-132

Koolmann J., Röhm K.H., Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998, 288

Krska R., Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals, *Journal of Chromatography A*, 1998, 815, 49-50

Krska R., Baumgartner S., Josephs R., The state-of-the-art in the analysis of type-A and B-Trichothecene mycotoxins in cereals, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 371, 285-299

Krska R., Josephs R., The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 369, 469-476

Krska R., Szente E., Purity Assessment of Commercially Available Crystalline Deoxynivalenol, *Journal of AOAC International*, 2004, 87, 4, 909-919

Kruger S.C., Kohn B., Ramsey C.S., Prioli R., Rapid Immunoaffinity-Based Method for Determination of Zearalenone in Corn by Fluorometry and Liquid Chromatography, *Journal of AOAC International*, 1999, 82, 1364-1368

Langseth W., Rundberget T., Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures, *Journal of Chromatography A*, 1998, 815, 103-121

Layne E., Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Methods in Enzymology*, 1957, 3, 447-454

Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1998, 1059-1071

Luttman W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D., Der Experimentator: Immunologie Elsevier GmbH, München, 2004, 1-47

Magan N., Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies, Mycopathologia, 2006, 162, 245-253

Martins M.L., Martins H.M., Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*, Food Chemistry, 2002, 79, 315–318

McKinney M.M., Parkinson A., A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid, Journal of Immunological Methods, 1987, 96, 271-278

Meyer V.R., Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA, Weinheim, 9.Auflage, 2004, 15-53

Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Dell'Aquila M.E., Minoia P., Visconti A., Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries, Reproductive Biology and Endocrinology, 2006, 4, 62

Morais S., Maquieira Á., Puchades R., Immunofiltration: A Methodology for Preconcentration and Determination of Organic Pollutants, Analytical Chemistry, 1999, 71, 1905-1909

Mücke W., Lemmen Ch., Schimmelpilze, ecomed Medizin, Landsberg am Lech, 2004, 14-24; 85-110

Otto M., Analytische Chemie, VCH-Verlags GesmbH, Weinheim, 1995, 153-166

Papst C., Zellner J., Venkataratnam S., Eder J., Fusarium-Problematik bei Körnermais (Zea Mays L.), Gesunde Pflanzen, 2007, 59, 7-16

Rehm H., Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum, Heidelberg, 2002, 155-158

Romer T.R., Use of Small Charcoal/Aluminium Cleanup Columns in Determination of Trichothecene Mycotoxins in Food and Feed, Journal of AOAC, 1986, 69, 699-703

Rosa C.A.R., Magnoli C.E., Fraga M.E., Dalcero A.M. Santana D.M.N., Occurrence of Ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil, Food Additives and Contaminants, 2004, Vol. 21, No. 4, 358-364

Rotter B., Perlusky D.B., Pestka J.J., Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin), Journal of Toxicology and Environmental Health, 1996, 48, 1-34

SCF (Scientific Committee on Food), Opinion on Fusarium toxins, Part 2: Zearalenone, European Commission, 2000, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf

Schade R., Behn I., Erhard M., Hlinak A., Staak C., Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2001, 7-62

Schade R., Hlinak A., Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects, ALTEX, 1996, 5-9

Schwedt G., Analytische Chemie, Georg Thieme Verlag, 1995, 68-74, 223-235

Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen, Blutentnahme bei Labornagetieren und Kaninchen zu Versuchszwecken (800.116-3.02)

Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen, Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren (800.116-3.04)

Skoog D.A., Leary J.J., Instrumentelle Analytik, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1996, 630-644

Sutton, J.C., Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*, Canadian Journal of Plant Pathology, 1982, 4, 195-209

The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 1996, Merck & Co. Inc., New Jersey, 1730-1731

Urraca J.L., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C., Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, Analytica Chimica Acta, 2004, 524, 175-183

Usleber E., Dietrich R., Schneider E., Märtlbauer E., Immunochemical Method for Ochratoxin A, Mycotoxin Protocols, 2001, 157, 81-91

Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A., IgY: clues to the origins of modern antibodies, Immunology Today, 1995, Vol. 16, 392-398

Weidenbörner M., Lebensmittelmykologie, Behr's Verlag GmbH & Co, Hamburg, 1998, 41-57

Westcott J.Y., Sloan S., Wenzel S.E., Immunofiltration Purification for Urinary Leukotriene E4 Quantitation, Analytical Biochemistry, 1997, 248, 202-210

Wilchek M., Miron T., Thirty years of affinity chromatography, Reactive and Functional Polymers, 1999, 41, 263-268

Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J., Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin, Food and Chemical Toxicology, 2007, 45, 1-18

Zöllner P., Meyer-Helm B., Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1136, 123-169

Persönliche Daten

Name Christina Maria Böhm
Geboren 4. Jänner 1981 in Oberwart

Schulbildung

Volksschule 1987- 1991, Bad-Tatzmannsdorf
Hauptschule 1991-1995, Oberschützen
Evangelisches Oberstufen Realgymnasium 1995-1999, Oberschützen

Diplomstudium

Studium der Ernährungswissenschaften Oktober 1999 – Jänner 2005
Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie Mai – August 2004

Doktoratsstudium

Doktoratsstudium zum Thema:
„Entwicklung einer immunanalytischen Methode
für die Probenvorbereitung von Deoxynivalenol
und Zearalenon in Lebens- und Futtermitteln“ seit Mai 2005
am Institut für Analytische Chemie und
Lebensmittelchemie der Universität Wien