



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Entwicklung einer immunologischen Multianalytmethode zur  
Detektion von Mykotoxinen in Getreide**

**Susanna Oswald**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grads eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Lukas Hintermann  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner  
2. Univ.-Prof. Dr. Stephan A. Sieber

Die Dissertation wurde am 29.08.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.10.2013 angenommen.



## Danksagung

*Diese Arbeit entstand in der Zeit vom September 2010 bis August 2013 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Die Arbeit wurde durch ein Projekt des AiF (FEI) (AiF 381 ZN) gefördert.*

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, das äußerst interessante Projekt in sehr gut ausgestatteten Laboratorien durchführen zu können. Besonders möchte ich mich für das Vertrauen und den geschätzten Freiraum in der Forschung bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für seine intensive Betreuung während der gesamten Doktorarbeit, sowie für sein Vertrauen und die Möglichkeit, das Forschungsprojekt selbst organisieren zu dürfen.

Danken möchte ich meinen Projektpartnern Dr. Richard Dietrich sowie Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer vom Lehrstuhl *Hygiene und Technologie der Milch* der Ludwig-Maximilians-Universität München, die durch die Bereitstellung von Antikörpern und Mykotoxin-Konjugaten einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Martina Kirsch (Rosenmühle Landshut) für die Führung durch die Rosenmühle, die mir einen Einblick in den Arbeitsablauf einer modernen Getreidemühle ermöglichte, sowie für das Bereitstellen mehrerer natürlich DON-belasteter Getreideproben.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. W. Lübbe (R-Biopharm) für den Erhalt zertifizierter Getreideproben und Herrn R. Weißhaupt (Heimatsmühle) für natürlich kontaminierte Realproben.

Dr. T. Westermair und Dr. P. Walser (muva Kempten) danke ich für die LC-MS Analyse DON-belasteter Getreideproben.

Dr. Ekkehard Weber vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich sehr für die Produktion und Reinigung monoklonaler OTA-Antikörper.

Bei Herrn Helmut Krause vom Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München bedanke ich mich für die zahlreichen Aufnahmen von MALDI-Spektren.

Danken möchte ich des Weiteren Dr. Matthias Koch von der Bundesanstalt für Materialwirtschaft und -prüfung in Berlin (BAM) für die Bereitstellung des *cis*-ZEA-Isomer Standards.

Sehr herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen Xaver Karsunke, Michael Pschenitza, Maria Hübner, Klaus Wutz, Anna-Cathrine Neumann und Jimena Saucedo-Friebe für ihre große Unterstützung im Labor und die gute Atmosphäre am Arbeitsplatz. Außerdem gilt mein besonderer Dank Sebastian Wohlfahrt, Leonie Kertess, Ulrike Kahl, Christian Fetzer, Leon Serc, Christian Schmid und Alexander Barthel für die Unterstützung im Labor.

Für das Korrigieren der Arbeit möchte ich mich besonders bei Michael Pschenitza, Maria Hübner und Henrike Bladt bedanken. Des Weiteren danke ich meinen Kollegen und Kolleginnen Dr. Christoph Haisch, Dr. Michael Seidel, Susanna Mahler, Christine Sternkopf, Christoph Berger, Dr. Clemens Helmbrecht, Gerhard Pappert, Johannes Schmid, Maria Knauer, Sandra Lengger, Agathe Szkola, Benedikt Grob und Dr. Thomas Baumann, sowie allen hier nicht namentlich Erwähnten.

Mein ganz besonderer und liebevoller Dank gilt meinen Eltern und meinem Ehemann, die mir stets uneingeschränkte Unterstützung und Zuspruch in allen Phasen der Arbeit gaben.

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.**

**Oswald S., X. Karsunke, R. Dietrich, E. Märtlbauer, R. Niessner, D. Knopp;** Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6405-6415.



# **Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>Einleitung und Problemstellung.....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>5</b>
1	Mykotoxine .....	6
1.1	Vorkommen und Bedeutung .....	6
1.2	Aflatoxine .....	7
1.3	Ochratoxine .....	10
1.4	Deoxynivalenol .....	11
1.5	Fumonisine .....	13
1.6	Zearalenon .....	15
1.7	T-2 und HT-2 Toxine .....	17
2	Analytik von Mykotoxinen .....	18
2.1	Probennahme, Probenvorbereitung und Extraktion .....	19
2.2	Instrumentelle Verfahren.....	23
2.3	Immunoanalytische Methoden .....	25
3	Auswertung von Immunoassays.....	31
4	Mikroarraytechnologie .....	32
4.1	Oberflächenchemie und Spotting .....	34
4.2	Chemilumineszenzreaktion .....	36
5	Antikörper .....	36
5.1	Typen und Strukturen von Antikörpern .....	37
5.2	Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern .....	39
<b>III</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>43</b>
1	Messungen mittels Multiplex-Mikroarray.....	44
1.1	Chipherstellung .....	44
1.2	Synthese von Toxin-Konjugaten .....	45
1.3	Untersuchung der Kreuzreaktivitäten.....	48
1.4	Testentwicklung am MCR 3.....	50
1.4.1	Chipherstellung - Vergleich verschiedener Immobilisierungsstrategien .....	51
1.4.2	Regenerierbarkeit des Mikroarrays .....	55
1.4.3	Erstellen von Toxin-Kalibrierungen mittels kompetitiven Immunoassays .....	60
1.4.4	Mehrtages-Studie (interday study) .....	66
1.4.5	Messung von dotierten Proben .....	70

1.4.6	Validierung mittels Quantifizierung von Realproben .....	74
1.4.7	Messungen mit ZEA.....	83
2	Optimierung der Probenvorbereitung (Extraktion) .....	90
3	Herstellung monoklonaler Ochratoxin A - spezifischer Antikörper .....	96
3.1	Synthese des OTA-Glycin-Protein-Immunoogens.....	97
3.2	Immunisierung und Screening der Zellkulturüberstände .....	101
3.3	Charakterisierung der erhaltenen Antikörper .....	105
4	Qualitative und quantitative Bestimmung von Ochratoxin A in Wein .....	110
4.1	Weißwein.....	110
4.2	Rotwein .....	116
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>121</b>
<b>V</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>127</b>
1	Geräte und Materialien .....	128
1.1	Geräte .....	128
1.2	Software.....	130
1.3	Antikörper und Antigene.....	130
1.4	Getreide-/ Weinproben und Referenzmaterialien.....	132
1.5	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	135
1.6	Pufferlösungen.....	139
2	Standardprozeduren .....	142
2.1	Herstellung der Mykotoxin-Stammlösungen .....	142
2.2	Synthese von Hapten-Derivaten .....	143
2.2.1	Synthese von AFB2-CMO und AFB1-CMO .....	143
2.2.2	Synthese von ZEA-CMO und ZAN-CMO.....	143
2.2.3	Synthese von 3-AcDON-HS .....	144
2.3	Kupplungssynthesen von Hapten-Derivaten an Peptid- und Aminolinker .....	145
2.3.1	Arbeitsvorschrift für Aminolinker.....	145
2.3.2	Arbeitsvorschrift für Festphasensynthese .....	146
2.4	HRP-Markierung eines Primärantikörpers .....	150
2.5	Messungen am Chip-Reader (MCR 3).....	150
2.5.1	Herstellung der Mikroarray-Chips .....	150
2.5.2	Immobilisierung der Toxine und Toxinkonjugate (Spotting) .....	153

2.5.3	Messung mit MCR 3 .....	154
2.6	Probenvorbereitung .....	155
2.6.1	Probenvorbereitung und Extraktion von Getreideprodukten .....	155
2.6.2	Herstellung und Extraktion von dotierten Proben und Referenzproben .....	156
2.6.3	Probenvorbereitung und Extraktion von Weinen .....	157
2.7	Vernichtung der Mykotoxine .....	158
2.8	Synthese vom OTA-Immunogen.....	158
2.8.1	Synthese von Ochratoxin A mit Glycin-Linker .....	158
2.8.2	Herstellung des OTA-Gly-BSA Immunogens .....	159
2.9	Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten .....	159
2.10	Immunisierungsprotokoll für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern..	160
2.11	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .....	161
2.11.1	Allgemeine Durchführung eines indirekt nichtkompetitiven ELISA.....	161
2.11.2	Allgemeine Durchführung eines indirekt kompetitiven ELISA.....	161
2.11.3	Optimierung der Coating- und Antikörperkonzentration .....	162
2.11.4	Kreuzreaktivitätstest .....	163
2.12	Oberflächenplasmonenresonanzmessungen .....	164
<b>VI</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>165</b>
<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>171</b>

# **I Einleitung und Problemstellung**

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von verschiedenen pflanzenpathogenen Schimmelpilzgattungen, die in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommen können und nicht vollständig aus diesen entfernbar sind. Hinsichtlich ihrer Entstehung wird zwischen Toxinen, die bereits in der Vegetationsperiode auf dem Feld und v.a. zum Zeitpunkt der Blüte gebildet werden (sog. „Feld-Pilze“, z.B. *Fusarien*), und denjenigen, die nach der Ernte aufgrund unsachgemäßer Lagerung im Erntegut entstehen, unterschieden (sog. „Lager-Pilze“, z.B. *Aspergillen* und *Penicillien*). Mykotoxine sind von hoher toxikologischer Relevanz und verursachen sowohl akute als auch chronische Erkrankungen bei Mensch und Tier. Als Konsequenz sind in der Europäischen Union Grenzwerte für Mykotoxine in Getreide- und Getreideprodukten sowie anderen Lebensmitteln festgelegt (siehe Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 und 1126/2007). Die derzeitigen Höchstmengen in getreidehaltigen Lebensmitteln betragen 2-5 µg/kg für Aflatoxine, 3 – 5 µg/kg für Ochratoxin A, 500 – 1750 µg/kg für Deoxynivalenol, 50 – 350 µg/kg für Zearalenon und 800 – 4000 µg/kg für Fumonisine (Mais und Maiseerzeugnisse). Für T-2/HT-2 Toxin sind Grenzwerte avisiert. Für Säuglinge und Diabetiker sind zum Teil deutlich niedrigere Werte in Nahrungsmitteln festgelegt.

Für die Einhaltung dieser Grenzwerte ist die Entwicklung schnellerer, einfacherer und kostengünstigerer Verfahren im Vergleich zu den Routinemethoden wie LC-MS/MS zum Nachweis der o.a. Mykotoxine unter Praxisbedingungen von entscheidender Bedeutung. Als schnelle Screening-Verfahren haben sich bisher Enzymimmuntests auf dem Gebiet der Mykotoxin-Analytik etabliert. Sensitivität, Spezifität, Untersuchungsdauer und Kosteneffektivität repräsentieren die klassischen Vorteile dieser analytischen Verfahren. Allerdings sind den üblichen kommerziellen Testdesigns (Mikrotiterplatten-Verfahren bzw. membranbasierte Schnelltests) im Hinblick auf die parallele Untersuchung mehrerer Analyten enge Grenzen gesetzt. Auch die Analysedauer von 25 min bis zu 180 min ist unter Praxisbedingungen nicht mit einer effizient organisierten Analyse und Beurteilung von Anlieferungspartien kompatibel.

Ziel der Forschungsarbeit ist die Entwicklung, Optimierung und Validierung eines auf immunologischen Prinzipien basierenden Multi-Analyt-Verfahrens, das den parallelen, quantitativen und kostengünstigen Nachweis aller sechs in Getreide und Getreideprodukten mit einem Höchstwert belegten Mykotoxine bzw. Mykotoxin-Gruppen innerhalb von 10 – 12 min (inkl. Extraktion 20 – 25 min) ermöglicht. Als Mikroarray-System soll mit dem am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC) entwickelten *Munich Chip Reader 3* (MCR 3) gearbeitet werden.

Diese Problemstellung erfordert zunächst die Synthese und Charakterisierung geeigneter Mykotoxinkonjugate, die Chipherstellung, sowie die Immobilisierung der Toxine auf den modifizierten Chip-Oberflächen. Dabei soll des Weiteren der Einfluß von Linkern auf die Signalintensität untersucht werden. Dazu sollen Peptid- bzw. Aminlinker als Abstandhalter von Mykotoxinen zur Oberfläche dienen.

Für einen kostengünstigen und somit wirtschaftlich nutzbaren Biosensor steht die Regenerierbarkeit (Wiederverwendung des Chips) im Vordergrund. Daher müssen die Assays in Hinblick auf regenerierbare Chips optimiert und der Einfluss von Getreidematrizes untersucht werden. Die anschließende qualitative und quantitative Analyse erfolgt dabei mit einem Mikroarray basierend auf Chemilumineszenz-Detektion und beruht auf dem indirekt kompetitiven Enzym-Linked Immunosorbent Assay Prinzip. Dabei sollen alle festgelegten Mykotoxin-Grenzwerte mit der jeweiligen erstellten Kalibrierung erfasst werden.

Des Weiteren steht auch die Extraktion im Fokus, denn Ziel ist es eine Extraktionsmethode zu entwickeln, mit der möglichst alle Mykotoxine gleichzeitig aus der Probe gewonnen werden können. Dabei sei zu bedenken, dass diese sehr herterogene chemische Eigenschaften besitzen. Es soll im Rahmen dieser Arbeit ein aktuelles Problem der Wirtschaft mit der am besten geeigneten Technik gelöst werden.

Ein weiterer wesentlicher Teil dieser Arbeit fokussiert auf Studien zu geeignetem Einsatz der vorhandenen Antikörper, sowie die Komplettierung der Antikörperpalette gegen Mykotoxine, insbesondere Ochratoxin A. Dies erfolgt in Zusammenarbeit mit Dr. R. Dietrich, Ludwig-Maximilians-Universität und Dr. E. Weber, Universität Halle. Monoklonale Ochratoxin A-Antikörper sollen mit der Hybridomtechnik hergestellt werden. Zudem stehen Robustheit, Sensitivität und Spezifität der Antikörper im Zentrum der Charakterisierungsstudien.



## **II Theoretische Grundlagen**

# 1 Mykotoxine

## 1.1 Vorkommen und Bedeutung

In der Wissenschaft werden Organismen nach wie vor in das Fünf-Reiche-System, das von R. H. Whittaker 1969 vorgeschlagen wurde, eingeteilt. Pilze bilden dabei als *Regnum Fungi* neben den Pflanzen, Tieren, Protisten (eukaryontische Lebewesen) und Prokaryonten ein eigenständiges Reich. Es sind etwa 120.000 Pilzarten bekannt, die wiederum in Ständerpilze, Schlauchpilze, Jochpilze und imperfekte Pilze gruppiert sind. Die meisten Schimmelpilze fallen in die letztere Gruppe und werden als Mikroorganismen des „täglichen Lebens“ bezeichnet. Sie tragen zur Humusbildung und Mineralisierung durch Zersetzung organischer Komponenten bei (Biodegradation). Sie sind daher ein fester Bestandteil im Boden und essenziell für den Stoffkreislauf der Welt (Mücke, 2004).

Im sekundären Stoffwechsel von Schimmelpilzen können sog. Mykotoxine als Produkt, bevorzugt auf nährstoffreichen Substraten gebildet werden. Die wichtigsten Mykotoxinproduzenten sind die Pilzgattungen *Aspergillen*, *Penicillien*, *Alternarias* und *Fusarien* (Blout, 1961; Vaclavik, 2010). Der Name Mykotoxin ist eine Kombination aus dem griechischen Wort „mykes“ (Pilz) und dem lateinischen „toxicum“ (Gift). Um Mykotoxine produzieren zu können, benötigen Schimmelpilze eine Temperatur von etwa 25 – 30 °C, sowie vorzugsweise ein feuchtwarmes Klima wie in subtropischen und tropischen Gebieten (Bennett, 2003; Cervino, 2008). Deshalb sind toxische Nahrungsmittel in Europa oftmals importierte Ware. Eine Kontamination der Lebensmittel mit den Toxinen kann bereits auf den Feldern oder bei der Lagerung, sowie beim Transport auftreten. Ist ein Gut einmal befallen, so ist es aufgrund der hohen Säure- und Hitzebeständigkeit schwierig, die Mykotoxine zu zerstören (Czeh, 2012; Bondarenko, 2012; Cervino, 2008). Der Pilzbefall wird zwar durch moderne Anbau- und Lagerungsmethoden verringert, jedoch kann eine vollständige Vermeidung der Toxinbildung nicht erreicht werden (Lee, 2004; Biselli, 2006). Nach Schätzung der *Food and Agriculture Organization* (FAO) sind weltweit 25 % der Lebensmittel mit Schimmelpilzen befallen und 20 % des Getreides in der EU mit Mykotoxinen kontaminiert (FAO, 2003; Mücke, 2004). Die in unseren Breitengraden am häufigsten vorkommenden Mykotoxine sind Aflatoxine, Ochratoxin A, Citrinin, Patulin, Fusarientoxine, Deoxynivalenon und Zearalenon. Es handelt sich um relativ kleine Moleküle sog. Haptene (200 – 1000 Da) mit sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen (Turner, 2009). Diese gehören zu den am meisten untersuchten Toxinen, denn von den ca. 400 chemisch verwandten Metaboliten stellen sie die größte Gefahr für

die Gesundheit von Mensch und Tier dar (Cole, 1989). Das dabei entstehende Krankheitsbild wird als Mykotoxikose bezeichnet. Diese kann von Hautreizungen bis hin zur Organschädigung und Krebsbildung führen (Hussein, 2001; Bennett, 2003). Die Europäische Union hat daher gesetzliche Höchstmengen für Mykotoxine mit den Verordnungen (EG) Nr. 1881/2006 und Nr. 1126/2007 in bestimmten Lebensmitteln festgelegt. Zusätzlich gelten innerhalb der EU länderspezifische Höchstmengen, die sich je nach den Ernährungsgewohnheiten verschiedener Bewohner in Grenzwert und Lebensmitteln unterscheiden (D-Höchstmengenverordnung 2006; van Egmont, 2007). In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den Aflatoxinen, Ochratoxin A, Fumonisin B1, Deoxynivalenol, Zearalenon und T-2 bzw. HT-2 Toxinen, weshalb im nachfolgenden jedes einzelne Mykotoxin näher besprochen wird.

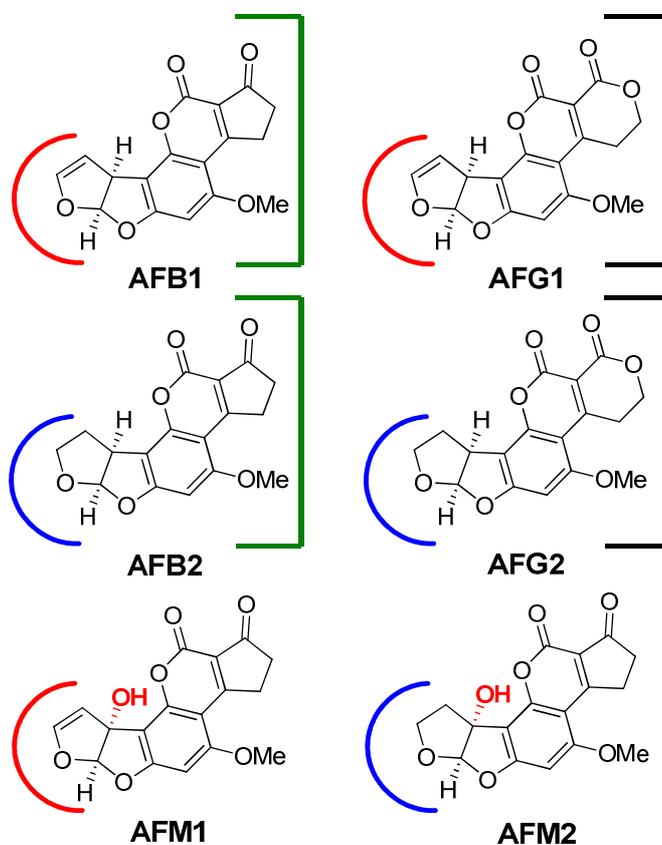
## 1.2 Aflatoxine

Die Entdeckung von Mykotoxinen begann im Jahr 1960 mit dem Massensterben von über 100.000 Truthähnen und Enten in Großbritannien. Bei genaueren Untersuchungen des Futtermittels zeigte sich ein Befall von Schimmelpilzen der Art *Aspergillus flavus*, woraufhin das Toxin als Aflatoxin (AF) bezeichnet wurde (Blount, 1961). Diese Entdeckung hatte zur Folge, dass in den 60er bis zur Mitte der 70er Jahre die Mykotoxinforschung intensiv verfolgt wurde und diese Zeit daher als „Mykotoxin-Goldrausch“ bezeichnet wurde. In den darauffolgenden Jahren kam es immer wieder zu neuen Krankheitsfällen. So starben Kinder in einem taiwanesischen Dorf, die AF-haltigen Reis konsumierten und auch in Kenia starben Menschen an den Folgen von Aflatoxikose (Ling, 1967).

Die Hauptproduzenten der AF sind *Aspergillus flavus*, der die Aflatoxine B1 und B2 synthetisiert, so wie *Aspergillus parasiticus*, der das gesamte Spektrum (AFB1, B2, G1 und G2) bildet. Bei *Aspergillus flavus* kann nur die Hälfte der Kulturstämme AF bilden, aber diejenigen Stämme, die das Mykotoxin synthetisieren, produzieren bis zu  $10^6$  µg/kg d.h.  $10^6$  µg Toxin pro ein kg Getreide (Cotty, 1994). Hohe AF-Gehalte werden oft in fettreichen Lebensmitteln tropischer Länder nachgewiesen (Shephard, 2008). Am häufigsten befallene Lebensmittel sind Erdnüsse, Schalenfrüchte, Trockenfrüchte, Getreide, Gewürze, Mais, Kaffee und Bohnen (Urusov, 2010; Prieto-Simon, 2012). AF sind überwiegend in Importware vorhanden und daher bleiben Lebensmittel in unseren Breitengraden weitgehend verschont.

AF sind Difuranocumarine bestehend aus einem heterozyklischen Grundgerüst aus fünf Ringen. Bisher sind 20 strukturell ähnliche Substanzen bekannt, wobei sechs als Kontaminanten

von pflanzlichen Lebensmitteln bekannt sind (Cervino, 2007). Die AFB1, G1 und M1 sind Dihydrofuranofurane, während es sich bei den AFB2, G2 und M2 um Tetrahydrofuranofurane handelt (Abbildung 1).



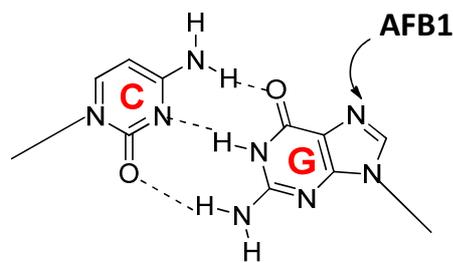
**Abbildung 1:** Strukturen von AFB1, B2, G1, G2, M1 und M2 mit Farbkodierung.

Die Namensgebung beruht auf der Fluoreszenzfarbe. Unter UV-Licht fluoreszieren B1 und B2 blau, G1 und G2 grün (Bennett, 2003). Die AFM1 und M2 wurden als Hydroxyderivate in Milch von Kühen und Schafen gefunden und werden daher als Milchttoxine bezeichnet (Mücke, 2004). Dies verdeutlicht zudem die Relevanz von Mykotoxinen in der Nahrungskette.

AF sind hepatotoxische Mykotoxine und wirken akut toxisch, immunsuppressiv, mutagen, teratogen und karzinogen (Hussein, 2001). AFB1 ist das toxischste Karzinogen und kann bei kurzzeitiger Aufnahme hoher Konzentrationen zu Leberschäden bis hin zum Leberversagen führen. Die letale Dosis ( $LD_{50}$ ) von AF liegt bei 1 – 10 mg/kg Körpergewicht, weshalb sie von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als Karzinogen I eingestuft wurden (Lee, 2004; Kolosova, 2006).

Nach der oralen Aufnahme des Toxins tritt es über den Magen-Darmtrakt in die Leber und dringt hier auch in den Zellkern ein. Die AFB1 und G1 werden durch Oxidation der Doppelbindung des äußeren Furanrings zu hochreaktiven 8,9-Epoxiden. Dieses Epoxid alkyliert die

Nukleinsäure an der DNA-Base  $N^7$ -Guanin, wodurch ein Defekt bei der DNA-Reparatur entsteht. Dies führt wiederum zu Fehlern bei der DNA-Replikation, was die Tumorentstehung prädisponiert. Die orale Aufnahme von AFB1 ruft eine Mutation am Codon 249 im Tumorsuppressor p53 hervor. Die ungesättigten AFB2, G2 und M2 bilden kein Epoxid, AFB2 wird aber vom Organismus zum Teil in AFB1 umgewandelt (Mücke, 2004; Summer, 2007).



**Abbildung 2:** Wirkmechanismus von AFB1: Alkylierung der Guanin-Base durch das aktive Epoxid-AFB1.

Um Schutz für Konsumenten gegen eine Aflatoxikose zu bieten, wurden in vielen Staaten weltweit gesetzliche Grenzwerte festgeschrieben. Tabelle 1 fasst die durch AFB1, B2, G1 und G2 betroffenen Lebensmittel und deren gesetzliche Höchstmengen zusammen.

**Tabelle 1:** Die gesetzlichen Höchstmengen für AF in Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung EG Nr. 1881/2006.

Lebensmittel	AF	Höchstgehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
		B1	Summe (B1, B2, G1 und G2)	M1
Getreide	zum direkten Verzehr	2	4	-
	Rohware <sup>1</sup>	2	4	-
Mais	zum direkten Verzehr	2	10	-
	Rohware <sup>1</sup>	5	10	-
Erdnüsse	zum direkten Verzehr	2	4	-
	Rohware <sup>1</sup>	8	15	-
Trockenfrüchte	zum direkten Verzehr	2	4	-
	Rohware <sup>1</sup>	5	10	-
Rohmilch	wärmebehandelt	-	-	0.05
	Säuglingsmilch	-	-	0.025

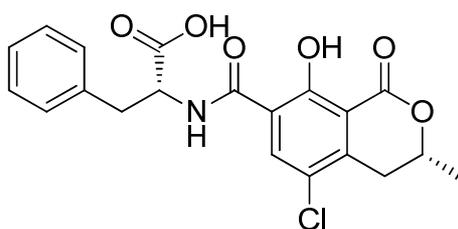
<sup>1</sup> Rohware, unverarbeitet, die Produkte müssen vor ihrem Verzehr bzw. Verwendung einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden. Verwendung als Lebensmittelzusatz.

### 1.3 Ochratoxine

Initiiert durch die *Turkey-X-Disease* im Jahr 1960 wurden weitere Mykotoxine, nämlich die Ochratoxine kurz nach der Entdeckung der AF in Südafrika entdeckt (Van der Merwe, 1965). Der dabei gefundene Pilz *Aspergillus ochraceus* befällt häufig Getreide, Erdnüsse und Gemüse und spielt daher auch eine große Rolle in unseren Breitengraden (Pohland, 1982; Harwig, 1983; Lee, 2000). Dies zeigte sich auch in den Jahren 1957 – 1958, als aufgrund von kontaminiertem Getreide und Gemüse eine Vielzahl von Menschen in Rumänien, Bulgarien und dem ehemaligen Jugoslawien an Nierenleiden erkrankte. Das Phänomen wurde als *Balkan Endemic Nephropathy* (BEN) bekannt. Dabei enthielten 6.5 % der erhaltenen Blutproben 3 – 5 mg/g Serum Ochratoxin A (OTA; Hult, 1982).

Die Gruppe der Ochratoxine sind strukturell verwandt mit Iso-Cumarinen, die mit Phenylalanin amidiert sind. Das toxischste und damit das bekannteste Toxin ist das chlorierte OTA (Abbildung 3). Ebenso oft wird das Ochratoxin B, die chlorfreie Variante von den Schimmelpilzen gebildet. Häufig begleitet sind Ochratoxine von Citrinin, Penicillinsäure und Patulin, jedoch konnte ein simultanes Vorkommen von OTA und AF bisher nicht gezeigt werden (Mücke, 2004).

Die wesentlichen Produzenten von OTA sind *Aspergillus* und *Penicillium*, die einen großen Toleranzbereich besitzen (pH, Temperatur). Die häufigsten betroffenen Lebensmittel sind Getreide, Nüsse, Trockenfrüchte, Kaffee und Gewürze. Aber auch Wein und Bier sind befallen (Ratola, 2006; Anfossi, 2012; Ameacutetzqueta, 2012).



**Abbildung 3:** Struktur von OTA.

Nach oraler oder inhalativer Aufnahme wird OTA rasch im Blutplasma aufgenommen und gelangt über den Blutstrom vor allem in Niere, Leber, Muskeln und das Fettgewebe. Dabei besitzt das Mykotoxin eine hohe Affinität zu Serumalbumin, was u.a. zu einer langen Halbwertszeit im Körper führt und eine Anreicherung in der Nahrungskette (*carry over*) ermöglicht. Substanzen mit einer höheren Affinität zu Serumalbumin, z.B. Aspartam, können das Toxin verdrängen und somit aus dem Körper waschen (Mücke, 2004). Die genaue meta-

bolische Aktivierung ist momentan noch unklar. Bekannt ist, dass OTA kanzerogene, nephrotoxische und immunsuppressive Wirkungen auf Säugetiere hat. Allerdings konnte OTA in nahezu allen Humanblutseren in Deutschland nachgewiesen werden (Rosner, 2000). Die letale Dosis von OTA liegt bei 10 mg/kg Körpergewicht. Deshalb hat 1993 die IARC OTA als Karzinogen 2 B eingestuft.

Für die Lebensmittelindustrie hat dies gesetzliche Grenzwerte zur Folge. In Tabelle 2 sind die gesetzlichen Höchstmengen für OTA zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Die gesetzlichen Höchstmengen für OTA in Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung EG Nr. 1881/2006.

Lebensmittel	OTA	Höchstgehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Getreide	zum direkten Verzehr	3
	Rohware <sup>1</sup>	5
Getrocknete Weintrauben	zum direkten Verzehr	10
	Rohware <sup>1</sup>	-
Wein	zum direkten Verzehr	2
	Rohware <sup>1</sup>	-
Kaffee	zum direkten Verzehr	5
	Rohware <sup>1</sup>	10
Getreidebeikost	Diätetische Lebensmittel	0.50
	Säuglingsnahrung	0.50

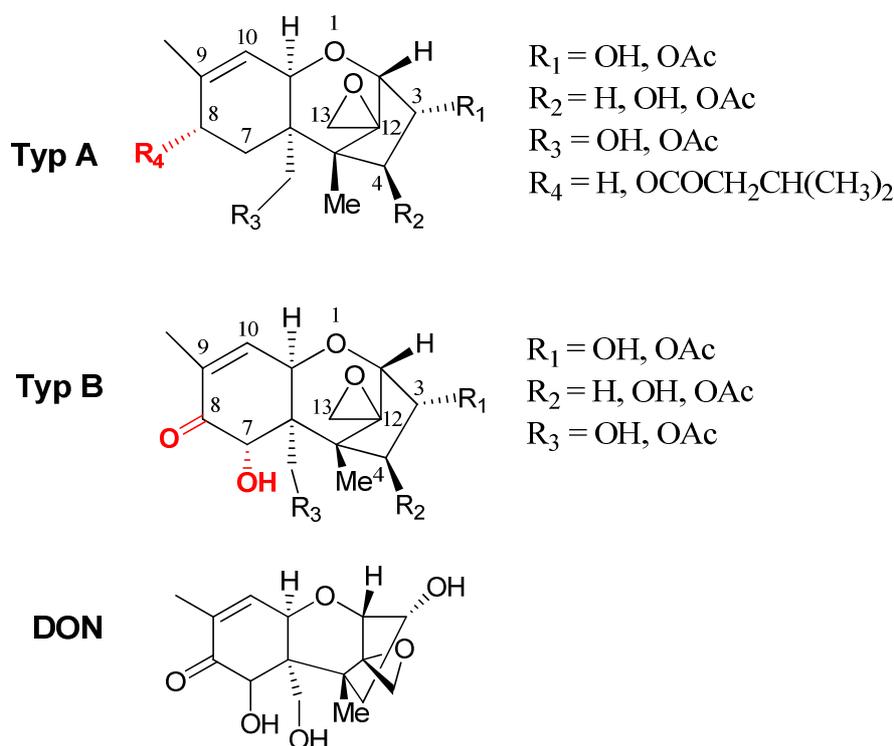
<sup>1</sup> Rohware, unverarbeitet, die Produkte müssen vor ihrem Verzehr bzw. Verwendung einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden.

#### 1.4 Deoxynivalenol

Die Pilzgattung *Fusarium* ist einer der wichtigsten Toxin-Produzenten in feucht-gemäßigtem Klima und bildet ein großes Spektrum an toxischen Substanzen mit sehr unterschiedlichen Strukturen. Dazu zählen Trichothecene, Fumonisine, Fusarin C, Zearalenon, Moniliformin und Butenolid (Smith & Moss, 1985). Trichothecene wurden erstmals 1949 aus dem Pilz *Trichothecium roseum* gewonnen, um anschließend als Antibiotika eingesetzt zu werden (Freeman, 1949). In den darauffolgenden Jahren konnten die Strukturen isoliert und mehr oder weniger allen Trichothecen-Derivaten toxische Wirkungen zugeschrieben werden. Aus

diesem Grund war der weitere Einsatz als Antibiotika hinfällig. Bis heute umfasst die Gruppe der Trichothecene ca. 170 Substanzen (Grove, 1988 & 1993).

Trichothecene werden dabei in die zwei Gruppen Typ A und Typ B unterteilt. Alle zeigen als chemische Grundstruktur ein tetrazyklisches Sesquiterpensystem, für das eine Doppelbindung zwischen C9 und C10 sowie ein Epoxidring an C12 und C13 charakteristisch sind. Bei Deoxynivalenol (DON) handelt es sich um 3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on und es wird zum Typ B gruppiert. Typ B ist durch eine Ketogruppe am C8 Atom gekennzeichnet, wie in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Grundgerüste für Trichothecene des Typs A und Typ B, sowie die Struktur von DON.

DON wird überwiegend von *Fusarium graminearum* und teilweise von *Fusarium culmorum* gebildet (Richard, 2007). Kritisch für eine Infektion ist die Zeit der Blüte, die durch feuchtwarmes Klima weiter begünstigt wird (Suty, 1996). Daneben bleiben die Sporen der Schimmelpilze über lange Zeit lebensfähig und können bei unsachgemäßer Lagerung, Transport und Verarbeitung erneut auskeimen und Mykotoxine bilden (Bennett und Richard, 1996). Deshalb darf nur Erntegut mit einem Wassergehalt von max. 14 % eingelagert werden, notfalls muss es vorgetrocknet werden. Getreide ist das am häufigsten mit Fusarientoxinen belastete Lebensmittel und davon sind wiederum Mais und Weizen am höchsten kontaminiert. So hat das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) DON vor allem in

Mais (in 89 % aller Proben) und Weizen (61 %) nachgewiesen. Die Verfütterung von mit DON kontaminiertem Getreide wird mit Emesis, Futterverweigerung und Wachstumsdepression bei Tieren, insbesondere bei Schweinen und Hunden in Verbindung gebracht. Diese Effekte sind vermutlich durch eine Beeinflussung der serotonergen Wirkungen im zentralen Nervensystem oder durch periphere Wirkungen auf den Serotoninrezeptor zu erklären. Weiterhin inhibiert DON die DNA, RNA und die Proteinbiosynthese auf ribosomaler Ebene und weist hämolytische Wirkungen gegenüber Erythrozyten auf (Rotter, 1996). Die entscheidenden Wirkungen von DON sind seine allgemeine Toxizität und Immuntoxizität, wobei bisher keine Hinweise auf Kanzerogenität und/oder Mutagenität gefunden wurden (Iverson, 1995). Als weitere Effekte zeigen sich ein übermäßiges Sprudeln bei Bier, verursacht durch kontaminiertes Malz sowie mangelhafte Ergebnisse beim Backen durch kontaminiertes Weizenmehl. Eine Einschätzung der Toxizität mittels NOAEL (*No observable adverse effect level*) ist daher möglich und variiert zwischen 0.040 – 0.375 mg/kg bw/day. In Tabelle 3 sind die gesetzlichen Höchstmengen für DON zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Die gesetzlichen Höchstmengen für DON in Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung EG Nr. 1881/2006 und Nr.1126/2007.

Lebensmittel	DON	Höchstgehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
<b>Mais, Hafer, Hartweizen</b>	zum direkten Verzehr	750
	Rohware <sup>1</sup>	1750
<b>Getreide<sup>2</sup></b>	zum direkten Verzehr	1250
	Rohware <sup>1</sup>	750
<b>Brot</b>	zum direkten Verzehr	500
	Rohware <sup>1</sup>	-
<b>Getreidebeikost</b>	Säuglingsnahrung	200

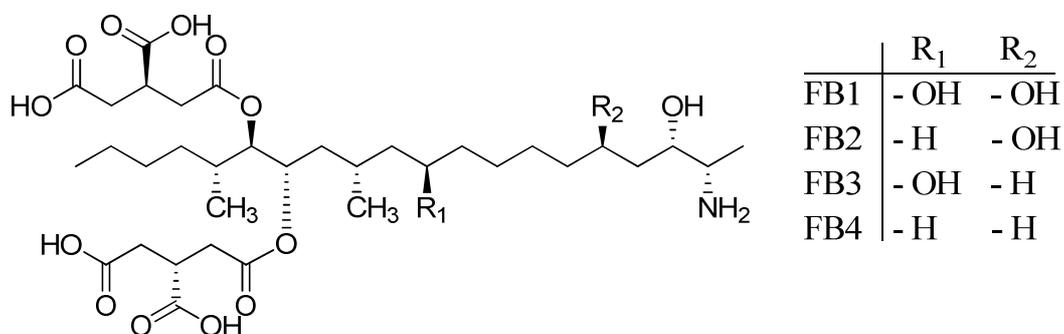
<sup>1</sup> Rohware, unverarbeitet, die Produkte müssen vor ihrem Verzehr bzw. Verwendung einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden.

<sup>2</sup> Ohne Mais, Hafer und Hartweizen.

## 1.5 Fumonisine

Fumonisine konnten 1988 erstmals aus *Fusarium moniliforme*-Kulturen, welche auf Mais wuchsen, isoliert und schließlich charakterisiert werden. Fumonisine werden durch die Schimmelpilze *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum*,

*Fusarium nygamai* und *Alternaria alternata* produziert (Gelderblom, 1988; Bezuidenhout, 1988; Li, 2012). Fumonisine kommen in vier verschiedenen Formen, Fumonisin B1, B2, B3 und B4 vor (Abbildung 5), wobei Fumonisin B1 und B2 (FB1/B2) die am häufigsten vorkommenden Vertreter sind.



**Abbildung 5:** Strukturen von FB1, B2, B3 und B4.

Die FB1-Produktion in *Fusarium verticillioides* beginnt erst nach etwa zwei Wochen und nimmt nach 13 Wochen wieder ab. Das Wachstum dieser Schimmelpilze tritt bevorzugt bei 20 – 25 °C auf Mais auf, kann aber auch auf anderen Getreidearten vorkommen (Alberts, 1990). Fumonisine ähneln Strukturmolekülen in Membranen, den sog. Sphingosinen und Sphingolipiden, und hemmen somit deren Biosynthese, die bis hin zur Apoptose der Zellen führen kann (Mücke, 2004). FB1 ist ein potentielles Nierengift und steht im Verdacht, Speiseröhrenkrebs auszulösen. In Regionen mit überdurchschnittlich hohen Krebsraten, wie in Südafrika in den 70er Jahren (Marasas, 1981), Nordostitalien oder China (Chu, 1994), wurden sehr hohe Konzentrationen an Fumonisin in Maismehl und Maisgrütze festgestellt (Peraica, 1999). Neben chronischen Erkrankungen wie Dünndarmentzündung können auch akute Krankheitsbilder auftreten. Beispielhafte Fälle ereigneten sich in 27 Dörfern in Indien. Hier wurden durch den Verzehr von ungesäuertem Brot, welches aus verschimmelter Hirse oder Mais hergestellt wurde, Symptome wie Bauchschmerzen, Magenknurren und Durchfall hervorgerufen; diese verschwanden jedoch wieder vollständig (Bhat, 1997).

In einer EU-weiten gemeinsamen Studie (EU - SCOOP, 2003) konnte gezeigt werden, dass 46 % aller Getreideproben mit FB1, 42 % mit FB2 und 36 % mit FB3 belastet waren, während bei den Maisproben die Kontamination an FB1 66 % betrug. In Tabelle 4 sind die gesetzlichen Höchstmengen für FB1 und B2 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Die gesetzlichen Höchstmengen für FB1 und FB2 in Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung EG Nr. 1881/2006 und Nr.1126/2007.

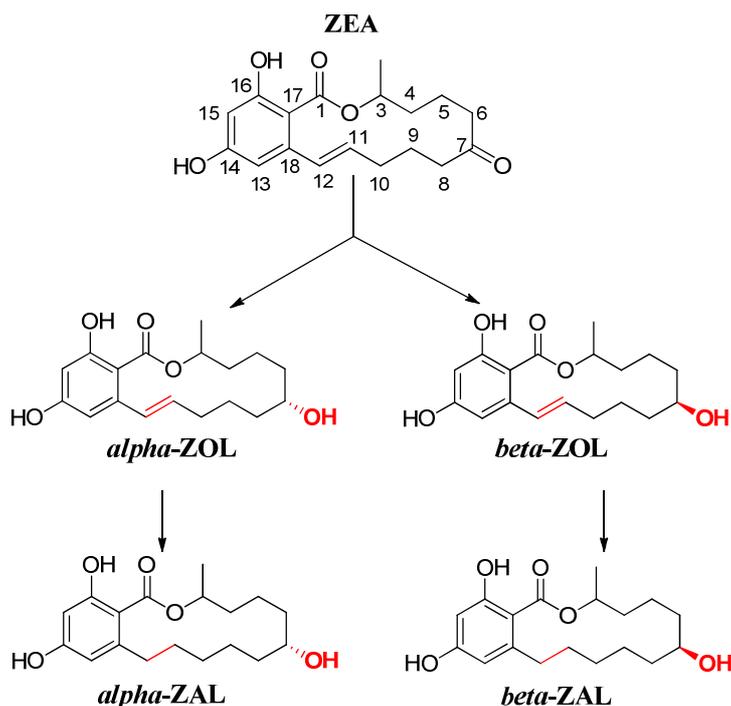
Lebensmittel	Summe aus FB1 und FB2	Höchstgehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Mais	zum direkten Verzehr	1000
	Rohware <sup>1</sup>	4000
Frühstückscerealien, Snacks auf Maisbasis	zum direkten Verzehr	800
Getreidebeikost	Säuglingsnahrung	200

<sup>1</sup> Rohware, unverarbeitet, die Produkte müssen vor ihrem Verzehr bzw. Verwendung einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden.

## 1.6 Zearalenon

Ein weiteres Fusariumtoxin ist das Zearalenon (ZEA), das in befallenen Mais mit der Pilzart *Gibberella zeae* 1962 erstmals entdeckt wurde (Stob, 1962). ZEA und seine Derivate gehören zur Gruppe der makrozyklischen Resorcylsäurelactone und werden typischerweise von Pilzstämmen der Spezies *Fusarium graminearum* oder *Fusarium culmorum* gebildet. ZEA wird häufig mit DON in Getreideproben nachgewiesen. Es ist meistens in Mais und Maisprodukten zu finden. Da aber die Sporen der Fusarienstämmen ubiquitär sind, treten Kontaminationen auch bei anderen Getreidearten auf. Dabei besteht die Gefahr, dass diese unverändert in die Milch von Kühen übergehen (*carry over*). ZEA und seine Derivate sind die wichtigsten Mykotoxine mit östrogenen Wirkung. ZEA kann durch Biotransformation im Körper in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol (ZOL) überführt werden (Abbildung 6; Richardson, 1984; Miles, 1996; Gaumy, 2001).

ZEA bindet an intrazelluläre Östrogenrezeptoren von Uterus, Hypothalamus und Hypophyse. Einige Experimente zeigten vor allem bei weiblichen Tieren den Symptomkomplex des Hyperöstrogenismus sowie Fertilitätsstörungen (Mücke, 2004). Es wurde zudem beobachtet, dass eine Steigerung des Wachstums durch die Hormonwirkung erfolgte, weshalb es bis 1989 als Wachstumsförderer für die Rinderzucht eingesetzt wurde (EU, 1988; Winssinger, 2007). Langzeitstudien konnten keine teratogene Wirkung nachweisen, allerdings wurde eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit erkannt (CONTAM, 2004). Des Weiteren wurde eine kanzerogene Wirkung in Ratten festgestellt, dennoch stufte die IARC das ZEA als nicht krebserregend in Kategorie 3 ein (Fink-Gremmels, 1994).



**Abbildung 6:** Strukturen von ZEA und seine Metaboliten  $\alpha$ -/ $\beta$ - ZOLund  $\alpha$ -/ $\beta$ -ZAL (Richardson, 1984).

In einer Studie der EU wurde veröffentlicht, dass 32 % aller Getreideproben mit ZEA belastet waren, während bei den Maisproben allein sogar 79 % der Proben messbare Gehalte aufwiesen (EU - SCOOP, 2003). Die festgelegten Höchstmengen für ZEA sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Die gesetzlichen Höchstmengen für ZEA in Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung EG Nr. 1881/2006 und Nr.1126/2007.

Lebensmittel	ZEA	Höchstgehalt [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
<b>Getreide</b>	zum direkten Verzehr	75
	Rohware <sup>1</sup>	1000
<b>Mais<sup>2</sup></b>	zum direkten Verzehr	100
	Rohware <sup>1</sup>	350
<b>Brot</b>	zum direkten Verzehr	50
<b>Getreidebeikost</b>	Säuglingsnahrung	20

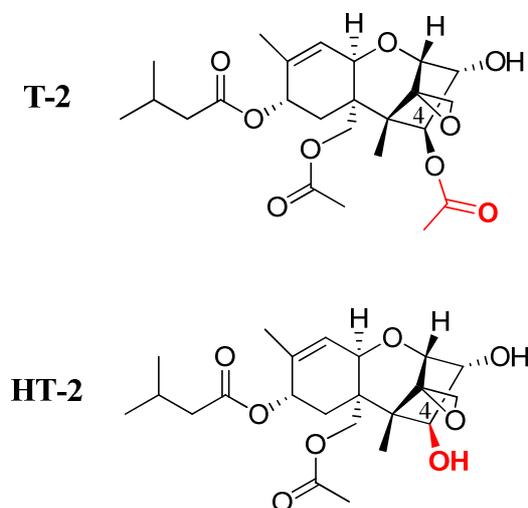
<sup>1</sup> Rohware, unverarbeitet, die Produkte müssen vor ihrem Verzehr bzw. Verwendung einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden.

<sup>2</sup> Mais, Maiscerealien und Snacks auf Maisbasis.

## 1.7 T-2 und HT-2 Toxine

Auf die T-2 und HT-2 Toxine wurde erstmals im Jahr 1981 als potenzielle Gefährdungsquelle für Mensch und Tier aufmerksam gemacht. Bewohner einiger Dörfer in Laos, Kambodscha und Vietnam litten nach dem Fall von gelbem Regen an Bluthusten, Benommenheit, Ohnmacht und Reizungen der Haut. Analysen zeigten, dass es sich dabei um Trichothecene des Typs A handelte, und die Substanz wurde als T-2 Toxin identifiziert. In Zeiten des Kalten Krieges spekulierten die USA, dass die ehemalige Sowjetunion biologische Waffen eingesetzt und getestet habe. Dies wird häufig als *Yellow Rain Controversy* bezeichnet (Seagrave, 1983; Wannemacher, 1997). Das T-2 Toxin spielt bis heute eine wichtige Rolle bei Untersuchungen, Forschung und Entwicklung von biologischen Waffen (Paterson, 2006). Als größere Gefährdung wurde allerdings die Kontamination von Lebensmitteln festgestellt.

T-2 Toxin und HT-2 Toxin zeigen wie in Kapitel II. 1.4 beschrieben als chemische Grundstruktur ein tetrazyklisches Sesquiterpensystem und gehören zu den Fusariumtoxinen (Abbildung 7). Sie unterscheiden sich durch die Substitution am C4-Atom: T-2 Toxin trägt dort eine Acetylgruppe, während HT-2 Toxin eine Hydroxylgruppe aufweist.



**Abbildung 7:** Struktur von T-2 und HT-2 Toxinen.

Hauptproduzenten sind dabei die Pilzgattungen *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* und *Fusarium tricinctum* (Medina, 2010). Am häufigsten befallen sind Hafer, Weizen, Roggen, Mais und Reis. Untersuchungen der Lebensmittel- und Umweltforschung haben gezeigt, dass Hafer das am meisten kontaminierte Getreide ist, gefolgt von Mais, aber in deutlich geringeren Konzentrationen (Meister, 2007). Der Wirkmechanismus von T-2 Toxin liegt in der Inhibierung der Proteinbiosynthese speziell der Peptidyltransferase, indem es an die

ribosomale RNA bindet und somit die Zellen zerstört (Müller, 1996). Eine davon verursachte Krankheit ist die sog. alimentäre toxische Aleukie (ATA), die durch Verminderung der Leukozytenanzahl im Blutplasma, Schädigung des Knochenmarkes und Nekrosen der Haut gekennzeichnet ist (Ler, 2006). Durch die schnelle Umwandlung von T-2 Toxin in das HT-2 Toxin werden beide überwiegend als ein Parameter angegeben (Summe aus T-2 und HT-2 Toxinen), wobei T-2 Toxin eine höhere akute Toxizität, sowie hämatotoxische und immuntoxische Effekte aufweist (Molinelli, 2008). Das *Scientific Committee for Food* (SCF) hat 2001 die Toxizität bewertet und für die Summe von T-2 und HT-2 Toxin ein TDI (*Tolerable Daily Intake*) von 0.06 µg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt. Gesetzliche Grenzwerte in Lebensmitteln sind zwar von der EU vorgeschlagen, aber noch nicht festgelegt (EU-Empfehlung der Kommission, 2006).

## 2 Analytik von Mykotoxinen

Beruhend auf der Tatsache, dass die meisten Mykotoxine schon in geringen Konzentrationen eine toxische Wirkung zeigen, wird eine sensitive und zuverlässige analytische Methode benötigt. Eine Analysemethode wird dabei nach Richtigkeit, Selektivität, Reproduzierbarkeit, Robustheit und Nachweisvermögen beurteilt. Die Herausforderung für die Mykotoxinanalytik in Lebensmitteln ist zum einen die Notwendigkeit, niedrige Nachweisgrenzen zu erzielen, die eine Quantifizierung innerhalb der gesetzlichen Höchstmengen erlauben. Zum anderen werden ein hoher Probendurchsatz, wenige Arbeitsschritte und eine Vor-Ort-Analytik gewünscht, um die Wirtschaftlichkeit zu garantieren. Steigende Nahrungsproduktion und schnelle Weiterverarbeitung verlangen kurze Analysezeiten. Ziel ist es, ein möglichst schnelles und wenig kostenintensives Routineverfahren zu entwickeln. Herausforderung dabei ist die Nutzung nur einer Methode für die Detektion aller relevanten Mykotoxine, da eine hohe Heterogenität bzgl. der Toxinstrukturen und somit der chemischen und physikalischen Eigenschaften vorliegt (Turner, 2009). Des Weiteren stellt sich eine repräsentative Probennahme oft schwierig dar. Zudem muss auf die verschiedenen Matrizes eingegangen werden. Die Analytik umfasst somit die Probennahme, Probenvorbereitung, Extraktion, Probenaufreinigung sowie die Detektions- bzw. Trenntechniken (Biselli, 2006).

Eine Analysemethode kann nicht alle gewünschten Kriterien erfüllen, weshalb eine Vielzahl an Analysetechniken zum Einsatz kommen. Eine häufig verwendete Methode in der Lebensmittelanalytik besteht z.B. in der Kombination von Immunoassays zu Screeningzwecken

(Voruntersuchung), um die positiven Proben anschließend mit validierten chromatographischen Verfahren mit beispielsweise massenspektrometrischer Detektion zu quantifizieren. Im Folgenden wird auf die relevanten Teilbereiche der Mykotoxinanalytik in Lebensmitteln, speziell in Getreide eingegangen.

## 2.1 Probennahme, Probenvorbereitung und Extraktion

Die durch die *Probennahme* verursachte Variabilität stellt bei der Mykotoxinanalytik den größten Unsicherheitsfaktor dar. Die Verteilung der Mykotoxine kann sehr heterogen sein, wodurch es punktuell zu sehr hohen bzw. sehr geringen Belastungen kommt. Es werden hohe Anforderungen an die Probennahmen gestellt, damit die entnommene Probe repräsentativ ist. Besonders problematisch bei der Analytik von Mykotoxinen, die durch Lagerpilze gebildet werden (AFB1 und OTA), ist die Tatsache, dass ein Großteil der Lebensmittel unkontaminiert vorliegen kann, während einige wenige Stellen stark betroffen sein können (sog. *hotspots*; Whitaker, 1993; Whitaker, 1999). Getreide auf dem Feld dagegen wird meist großflächig von *Fusarien*-Stämmen befallen, was wiederum zu einer homogenen Verteilung führt (Hart, 1998; Whitaker, 2000; Pitt, 2013). Darüber hinaus kann die Toxinverteilung auch innerhalb des einzelnen Korns inhomogen sein. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise im Falle von DON gerade die äußeren Schichten der Getreidekörner die höchsten Belastungen aufweisen (Rios, 2009). Aus diesen Gründen müssen all diese Aspekte bei den Probennahmen berücksichtigt werden. Im Allgemeinen muss eine Vielzahl von Stichproben genommen werden, da die Toxine in einer Charge inhomogen verteilt sind. Um falsch negative Befunde zu vermeiden, ist es daher entscheidend, das Probennahmeverfahren sehr genau zu regeln. Daher wurde von der EU-Kommission die Richtlinie Nr. 401/2006 zur Probennahme erlassen.

Ziel bei der *Probenvorbereitung* ist die Herstellung einer homogenen Laborprobe aus mehreren Einzelproben. Aus diesen wird eine Sammelprobe hergestellt, die anschließend homogenisiert wird. Bei Getreide wird die Sammelprobe getrocknet, zerkleinert bzw. gemahlen, wodurch eine vollständige Homogenisierung erreicht wird. Da dies die Größe einer Laborprobe überschreitet, wird in einem weiteren Schritt eine kleine Teilprobe entnommen. Aus Kosten- und Zeitgründen wird nur ein Aliquot im Labor weiterverarbeitet (Biselli, 2006). Dazu werden die zu analysierenden Stoffe aus der Probe extrahiert. Es gibt hierbei unzählige Möglichkeiten eine Extraktion durchzuführen. Die Anforderungen liegen hier vor allem in guten Wiederfindungsraten, geringem Lösungsmittelverbrauch, sowie dessen optimaler Zu-

sammensetzung (organische Phase/Wasser) und einem minimalen Zeitbedarf. Das Zerkleinern, Extrahieren und die Teilprobennahme wird zusammengefasst als Probenvorbereitung bezeichnet und trägt neben der vorangegangenen Probennahme zur Variabilität der Mykotoxinanalytik bei (Whitaker, 2000; Biselli, 2006).

Die *Extraktion* der Mykotoxine aus den Lebens- und Futtermitteln spielt eine zentrale Rolle und soll deshalb näher besprochen werden. Die wenigsten analytischen Methoden ermöglichen eine Detektion von Mykotoxinen aus den Rohextrakten. Lebensmittelmatrizes müssen meist weitgehend entfernt werden, da sie sonst zu einer Störung bei der Detektion führen können (Bennett, 2003; Moise, 2009; Turner, 2009). Um mögliche Störsubstanzen in Lebensmitteln näher zu erläutern, wird kurz auf die Matrixbestandteile in den sieben Hauptgetreidearten (Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Roggen und Weizen) eingegangen. Die einzelnen Getreidearten haben eine ähnliche Zusammensetzung, können aber je nach Art und Sorte leicht variieren. Grundsätzlich besteht Getreide aus 70 % Kohlenhydraten, 6 – 16 % Proteinen, 2 – 7 % Lipiden und 2 – 5 % Mineralien. Die einzelnen Bestandteile sind dabei unterschiedlich verteilt. So befindet sich im Mehlkörper fast die gesamte Stärkemasse, 70 % der Proteine und 30 % der Mineralien, während die Schalenschicht überwiegend aus Kohlenhydraten aufgebaut ist (Klingler, 1995).

Eine Extraktion kann in Anwesenheit von zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen (Flüssig-Flüssig-Extraktion, *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) oder in Anwesenheit einer flüssigen und einer festen Phase (Flüssig-Fest-Extraktion, *Liquid-Solid Extraction*, LSE) erfolgen. Dabei sollten bei optimalen Bedingungen, z.B. bzgl. der Polarität des Lösungsmittels, pH-Wert, Temperatur und Dauer der Extraktion, Analyt und Matrixkomponenten mit ähnlichen Eigenschaften nach Erreichen eines Gleichgewichtes in das Extraktionsmittel übergehen. Ein optimales Extraktionsverfahren beinhaltet in der Regel ein Extraktionsmittelgemisch, das einen Kompromiss darstellt zwischen möglichst geringen Mengen an störenden Begleitstoffen (Matrixeffekten) und zugleich eine hohe Löslichkeit des Analyten sicherstellt (Biselli, 2006). Somit kommt es zu einer effektiveren Anreicherung des Analyten, während störende Matrixsubstanzen entfernt werden können. Problematisch bei einer Extraktion ist das Lösen von mehreren Analyten unterschiedlicher Polarität. Mykotoxine besitzen sehr unterschiedliche Strukturen und haben daher einen breiten Polaritätsbereich. Dies hat zur Folge, dass es kein für alle Analyten gleichermaßen optimales Lösungsmittel gibt. In Tabelle 6 sind die gängigsten Extraktionsmethoden für AF, OTA, ZEA, FB1 und DON speziell im Hinblick auf Immunoassays zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der gängigen Extraktionsmittel für AF, OTA, ZEA, FB1 und DON speziell im Hinblick auf Immunoassays.

<b>AF</b>			
<b>Matrix</b>	<b>Methode</b>	<b>Extraktionsmittel</b>	<b>Referenz</b>
Getreide, Futtermittel	ELISA	70/30 Methanol/Wasser (v/v)	RIDASCREEN Afla, R-Biopharm
Getreide	ELISA	60/40 ACN/Wasser (v/v)	Ad'anyi, 2007
Getreide, Futtermittel	Lateral Flow Dipstick	80/20 Methanol/Wasser (v/v)	Delmulle, 2005
Getreide, Futtermittel	ELISA	80/20 Methanol/Wasser (v/v)	DIN EN 14123
<b>OTA</b>			
Getreide, Futtermittel	ELISA	25/75 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Puffer/DCM	RIDASCREEN OTA, R-Biopharm
Getreide	ELISA	60/40 ACN/Wasser (v/v)	Ad'anyi, 2007
Getreide, Futtermittel	ELISA	80/20 Methanol/Wasser (v/v)	DIN EN 14123
<b>ZEA</b>			
Getreide, Futtermittel	ELISA	70/30 Methanol/Wasser (v/v)	RIDASCREEN ZEA, R-Biopharm
Hafer,	ELISA	60/40 Methanol/Wasser (v/v)	Tanaka, 1995
<b>FB1</b>			
Getreide, Futtermittel	ELISA	70/30 Methanol/Wasser (v/v)	RIDASCREEN FB1, R-Biopharm
Mais	CL-Biosensor	PBS	Mirasol, 2012
Getreide, Bohnen	HPLC	25/25/50 ACN/Methanol/Wasser (v/v/v)	Scott, 1999
<b>DON</b>			
Getreide, Futtermittel	ELISA	Wasser	RIDASCREEN DON, R-Biopharm
Getreide	aokinmycontrol <sup>®</sup>	Wasser	Aokin
Getreide	Bayer	70/30 Methanol/Wasser (v/v)	Bayer
Getreide	ELISA	10 % Methanol/Wasser (v/v)	Ji, 2011
Getreide	ELISA	10.5 % ACN/Wasser (v/v)	Schneider, 2000

Eine weitere Herausforderung der Toxinanalytik besteht darin, dass die Mykotoxine nicht isoliert in der Getreidepflanze vorliegen. Sie liegen meist in Vakuolen oder gebunden in Biopolymeren vor, da sie durch ein pflanzeneigenes Enzym in polare Verbindungen umgewandelt werden (Berthiller, 2009). Dies kann vor allem bei immunanalytischen Methoden zur Verfälschung von Ergebnissen führen, indem die Antikörper die enzymatisch umgesetzten Mykotoxinderivate nicht mehr spezifisch binden oder durch sog. Kreuzreaktivitäten die Messergebnisse beeinflusst werden. Daher ist zu beachten, dass für natürlich kontaminierte Realproben eine deutlich längere Extraktionsdauer als für dotierte Proben erforderlich ist, weshalb bei der Methodenoptimierung am Ende immer eine Überprüfung mit zertifizierten (am besten natürlich kontaminierten) Referenzmaterialien erfolgen sollte (Trenholm, 1985).

Je nach *Trenn- und Detektionsmethode* müssen die Lebensmittelproben vorbereitet bzw. aufgereinigt werden, da die Substanzen möglicherweise bei der Detektion des Analyten interferieren. Rohextrakte, die Begleitstoffe enthalten, machen den zusätzlichen Schritt der *Probenaufreinigung* vor einer physikochemischen Trennung und Detektion unerlässlich. Dazu gehören instrumentelle Messmethoden meist basierend auf chromatographischen Systemen. Dagegen ist für Antikörper-basierte Schnelltests eine Aufreinigung meist nicht erforderlich. Eine der bekanntesten Aufreinigungsmethoden ist die Verwendung von Immunoaffinitätsäulen (*Immunoaffinity Columns*, IAC). Es handelt sich dabei um Trennsäulen, bestehend aus z.B. Agarosegel in Phosphat-Puffer, auf denen Mykotoxin-spezifische Antikörper gebunden sind. Durch Zugabe des Rohextraktes werden die Toxine als Antigen an die monoklonalen Antikörper (mAk) gebunden, während die Störsubstanzen eluiert werden. Nach mehreren Waschschritten werden die Mykotoxine z.B. mit organischen Lösungsmitteln von den mAk eluiert (Zheng, 2009). Eine weitere Methode ist die Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction*, SPE). Hierfür existieren unterschiedlichste Sorptionsmaterialien, allerdings kommen überwiegend die konventionellen Techniken der Umkehrphase (z.B. C8, C18) oder Normalphase zum Einsatz (Zheng, 2009). Neuere Entwicklungen stellen die kommerziell erhältlichen MycoSep<sup>®</sup> Säulen dar. Diese ermöglichen beispielsweise für Trichothecene eine schnelle Aufreinigung (30 s), ohne dass ein zeitaufwändiger Waschschriff benötigt wird. Störsubstanzen werden fast vollständig von diesen Säulen zurückgehalten, während Trichothecene nicht an das Packungsmaterial adsorbieren. Dies macht sie zu den zurzeit am häufigsten eingesetzten kommerziellen Säulen für die Probenaufreinigung speziell für DON (Krska, 2001). Vielversprechend sind zusätzlich Forschungen im Bereich der molekularen Prägung von *Polymernanopartikeln* (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP). Dazu wird ein Polymer um den Analyten, der als Templat dient, synthetisiert. Nach dem Herauswaschen

besitzt das Polymer sowohl funktionelle Gruppen als auch eine dreidimensionale Struktur komplementär zum eingebauten Templat-Molekül (Biselli, 2006).

Nachteile all dieser Probenaufreinigungsmethoden sind die entstehenden Kosten und die benötigte Zeit, wodurch die Wirtschaftlichkeit der Methoden in Frage gestellt wird. Zudem können meist nur strukturell ähnliche Toxingruppen gleichzeitig angereichert werden. Daher soll in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die ohne Aufreinigung auskommt.

## **2.2 Instrumentelle Verfahren**

Die gängigsten Methoden in der Mykotoxinanalytik sind instrumentelle/chromatographische Verfahren, wie z.B. Gaschromatographie und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. All diesen Trenn- und Detektionsmethoden gemeinsam ist die Probenaufreinigung mittels IAC, SPE oder MIP. Diese Verfahren sind meist zeitaufwendig, teuer und es wird geschultes Personal benötigt. Sie sind jedoch nach wie vor die am meisten validierten Methoden in der Qualifizierung und Quantifizierung von Mykotoxinen (Moises, 2009; Maragos, 2009).

### Dünnschichtchromatographie (*Thin Layer Chromatography*, TLC)

Die traditionellste Detektionstechnik für Mykotoxine ist die Dünnschichtchromatographie. Sie besitzt den Vorteil, dass aufgrund der 2-dimensionalen Chromatogramme keine Probenreinigung notwendig ist. Ein weiterer Vorteil liegt in dem geringen materiellen Aufwand und entsprechenden Kosten, sowie in der einfachen Identifizierung durch UV/Vis- bzw. Fluoreszenz-Detektion (Betina, 1976; Ciesla, 2009). Nachteilig dagegen ist, dass die Quantifizierung oft schlecht reproduzierbar ist. Deshalb wird die TLC meist nur zu Screening-Zwecken eingesetzt.

### Gaschromatographie (GC)

Die GC kann für die Identifizierung und Quantifizierung von Mykotoxinen in Lebensmittelproben verwendet werden. Die Gaschromatographie ist meist kombiniert mit der Flammenionisations- (FID), Elektroneneinfang- (*Electron Capture*, ECD), Fourier-Transformations-Infrarot- (FTIR) und massenspektrometrischen (MS) Detektion (Onji, 1998; Hoerger, 2009). Die GC wird vor allem für Analyten eingesetzt, die aufgrund schwacher optischer Eigenschaften bei optischen Detektionsmethoden zu hohe Nachweisgrenzen liefern würden und findet

daher vor allem für Trichothecene Anwendung. Nachteil dieser Methode ist, dass die meisten Mykotoxine schwer flüchtig sind und daher einer Derivatisierung unterzogen werden müssen (Scott, 1995). So kann z.B. OTA nicht direkt in der GC gemessen werden. Die Detektion von OTA nach einer Derivatisierung wurde mehrfach veröffentlicht (Jiao, 1992). Um eine Trennung der Mykotoxine zu erreichen, hat sich dabei die Silanisierung der Hydroxylgruppen als geeignet herausgestellt (Hoerger, 2009). Diese Methode ist zudem stark von der Probenmatrix beeinflusst, weshalb Routinelabors andere Methoden bevorzugen.

### Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography*, LC) und Massenspektrometrie (MS)

Die bekannteste Flüssigkeitschromatographie-Methode ist die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Bei der HPLC werden zur Trennung und Anreicherung meist Säulen mit Umkehrphasen verwendet. Die Detektion erfolgt überwiegend mit UV- und Fluoreszenz-Detektoren, die von der Anwesenheit von Chromophoren abhängen, weshalb OTA und AF direkt identifiziert und quantifiziert werden können (Turner, 2009). Die Kombination mit LC-UV oder Fluoreszenz (FL) -Detektion ermöglicht nur bedingt eine multianalytfähige Technik und setzt stets eine Aufreinigung mit IACs voraus. Eine neuere Entwicklung dabei ist die Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), die aufgrund der Verwendung kleinerer Partikel eine bessere Auflösung erreicht. Neben der hohen Trennleistung und den geringen Nachweisgrenzen liegt der Vorteil der HPLC/UPLC darin, dass beide mit Multi-Detektionssystemen, wie z.B. MS, kombiniert werden können. Durch den Einsatz von MS/MS-Techniken mit Dreifachquadrupol-Analysatoren im SRM-Modus (*Selected Reaction Monitoring*) ist die Selektivität ausreichend hoch, um Toxine direkt in den Lebensmittelrohextrakten zu quantifizieren. Außerdem wird der Durchsatz, sowie die Selektivität verbessert. Aus diesen Gründen handelt es sich bei den meisten Routineverfahren um massenspektrometrische Detektionstechniken, wie LC/MS und LC/MS/MS (Ates, 2013). Dies führt zur Möglichkeit der parallelen Detektion mehrerer Analyten. So wurde schon von der parallelen Messung von bis zu 87 Analyten gleichzeitig mittels LC/MS berichtet (Krska, 2007; Jackson, 2012; Warth, 2012). Die dabei häufigste Ionisierungsquelle ist die Elektron-Spray-Ionisation (ESI) und ebenso die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*, APCI; Hajslova, 2011; Prella, 2013). Lebensmittelrohextrakte stellen beim direkten Messen ohne Aufreinigung ein Problem in der LC/MS dar, daher müssen i.d.R. matrixabhängige Kalibrierungen vorgenommen werden, andernfalls sind solche Methoden nur als halbquantitative Screening-Tests geeignet (Cervino, 2009). Eine gute

Alternative zur multiplexen Anwendung ohne Probenaufreinigung stellen die sog. *dilute and shoot* Methoden bei der LC-MS/MS dar (Shephard, 2011; Al-Taher, 2013).

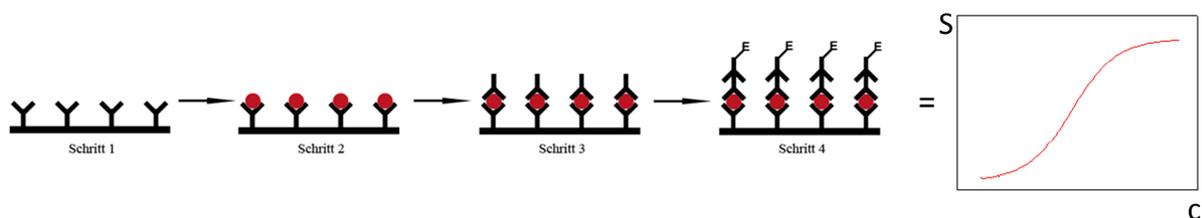
### 2.3 Immunoanalytische Methoden

Die oben genannten Messmethoden sind i.A. relativ zeit- und kostenaufwendig. So wird in der Mykotoxinanalytik nach schnelleren und einfacheren Methoden gesucht, um die Lebensmittel auf ihren Toxingehalt zu testen. Diesen Anforderungen entsprechen vor allem immunoanalytische Methoden. Hierbei binden spezifische Antikörper, die selbst bei komplexen Proben selektiv sind und somit eine Detektion ermöglichen, an die Analyten in der Probe (Cammann, 2001; Knopp, 2004). Die gängigsten Techniken sind Enzym-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs), Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA), Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) und elektrochemische Sensoren.

#### Enzym-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

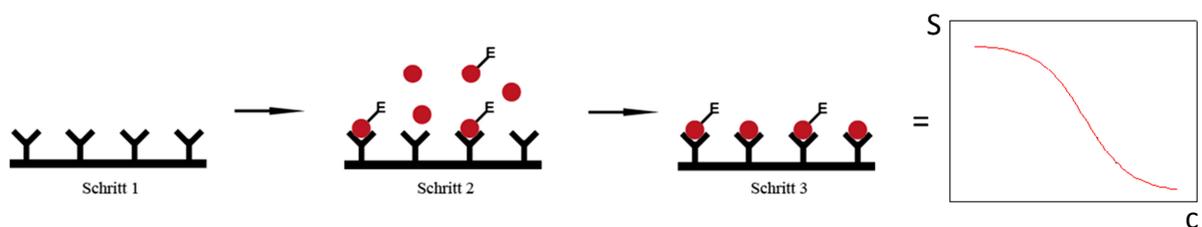
ELISAs bieten eine ökonomische Alternative zu anspruchsvollen instrumentellen Methoden wie z.B. der Flüssigkeitschromatographie und wurden erstmals von Engvall & Perlmann 1971 entwickelt. Das Prinzip beruht auf dem spezifischen Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die Vorteile des ELISAs liegen in hoher Spezifität, Sensitivität, Schnelligkeit und Kostenersparnis. Eine parallele Messung mehrerer Proben wird durch die Vielzahl von Kavitäten (normalerweise 96-wells) ermöglicht (Cammann, 2001; Biselli, 2006). Entscheidend bei der Methode ist die Möglichkeit, in Gegenwart der Matrix quantifizieren zu können, ohne eine vorangehende Probenaufreinigung durchführen zu müssen. Ein Nachteil des Enzymimmunoassays ist die Notwendigkeit, die Stabilität der biologischen Komponenten (Antikörper, Enzyme) sicherzustellen. Antikörperlösungen können z.B. mit Azid stabilisiert werden, was aber u.a. bei dem Enzym Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) wegen einer Inhibierungsreaktion nicht möglich ist (Kolosova, 2006). Die Detektion erfolgt über einen Enzymtracer, der eine chemische Reaktion katalysiert, die über eine optische Messung (Absorption, Fluoreszenz, Chemilumineszenz) quantifiziert wird. Der ELISA kann in verschiedenen Formaten durchgeführt werden. Abhängig von den Eigenschaften des Antigens (Makromolekül oder Hapten, Anzahl an Epitopen) können drei Methoden angewendet werden, Sandwich, indirekter und direkter ELISA.

Beim Sandwich-ELISA werden zunächst spezifische Antikörper an der Oberfläche der Kavitäten über Adsorption immobilisiert. Nach Zugabe des Analyten (Antigen) bindet dieser an die freien Bindungsstellen am Antikörper. Ein zweiter Primärantikörper bildet nun einen Sandwich-Komplex. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines enzymmarkierten Antikörpers (Sekundärantikörper, siehe Abbildung 8). Dieser bindet an den konstanten Teil des Primärantikörpers (oft Maus-Antikörper), da dieser vom Sekundärantikörper (oft Pferd-Anti-Maus-Antikörper) erkannt wird. Als weitere Option kann auch der zweite Primärantikörper markiert werden. Dies kann zum einen Arbeitsschritte und Kosten sparen, zum anderen ist allerdings eine Abnahme der Affinität zum Analyten oftmals beobachtet worden. Beim Sandwich-ELISA können nur ausreichend große Analyten, die min. zwei Epitope aufweisen, untersucht werden, weshalb diese Technik bei der Mykotoxinanalyse keine Rolle spielt.



**Abbildung 8:** Darstellung eines direkten Immunoassays (Sandwich-ELISA); (1) Immobilisierung der Antikörper; (2) Zugabe der Antigene (rot); (3) Zugabe der Primärantikörper; (4) Zugabe der enzymmarkierten Sekundärantikörper und Detektion mittels Enzymreaktion.; S = Signal, c = Konzentration.

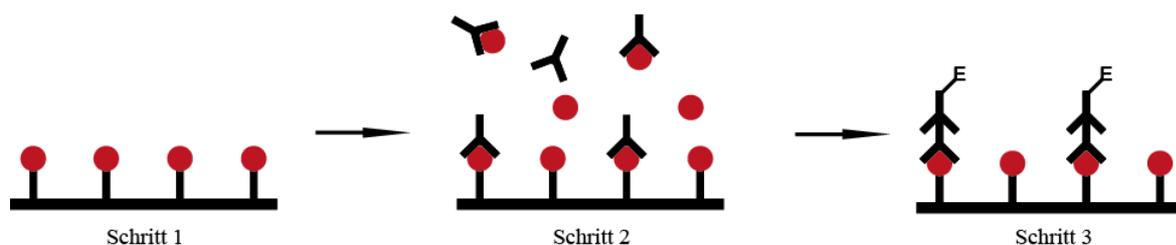
Analog zum Sandwich-ELISA wird bei der direkten Methode ein Primärantikörper an der Oberfläche gebunden. Hierbei werden die in der Analyse enthaltenen Antigene zusammen mit enzymmarkierten Antigenen über die immobilisierten Antikörper geleitet. Da weniger Antikörper als Antigene vorhanden sind, kommt es zur Konkurrenz um die verfügbaren Bindungsstellen. Der Nachweis erfolgt mittels einer Enzymreaktion (siehe Abbildung 9). Das direkt-kompetitive Format ermöglicht die Untersuchung von kleinen Molekülen, setzt allerdings enzymmarkierte Analyt-Analoga voraus.



**Abbildung 9:** Vereinfachte Darstellung eines direkt-kompetitiven Immunoassays; (1) Immobilisierung der Antikörper; (2) Zugabe des Analyten, sowie der markierten Antigene (rot); (3) Detektion mittels Enzymreaktion; S = Signal, c = Konzentration.

Für die Bestimmung von Mykotoxinen eignet sich besonders das indirekt kompetitive Format. Beim indirekten Enzymimmunoassay wird das Antigen an eine Festphase gebunden. Bei kleinen Molekülen wird generell ein Analyt-Protein-Konjugat zur Immobilisierung auf Oberflächen eingesetzt, das adsorptiv an die Kavitäten der MTP binden kann (Knopp, 2004; Cammann, 2008).

Die noch nicht belegte Oberfläche wird mit einer Proteinlösung geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Dann wird ein Gemisch aus Kalibrierlösung oder Probe (Toxin) und Analyt-spezifischen Antikörpern zugegeben. Da die Antikörper nur in einer bestimmten Konzentration vorhanden, also limitiert sind, kommt es zur Konkurrenz der Antikörper-Bindungsstellen zwischen den immobilisierten Analyten und den freien Toxinen. Je nachdem wie viel freies Toxin vorliegt, binden mehr oder weniger Antikörper an die immobilisierten Mykotoxine. Wie bei den anderen ELISA-Formaten, erfolgt die Detektion über einen enzymmarkierten Sekundärantikörper (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Vereinfachte Darstellung eines indirekt kompetitiven Immunoassays; (1) Immobilisierung des Antigens; (2) Zugabe der Antigene (Analyt; rot) und Primärantikörper (Kompetition); (3) Zugabe der Sekundärantikörper und Detektion mittels Enzymreaktion.

Inzwischen gibt es eine breite Vielfalt an ELISA-Methoden, die sowohl polyklonale IgG- und IgY-Antikörper, als auch monoklonale Antikörper nutzen (Mills, 1990; Usleber, 1991). Die ELISAs gelten heute als schnelle Nachweismethoden, die v.a. als Vorscreening in der Lebensmittelindustrie genutzt werden. Daher sind viele ELISA-Kits für Mykotoxine kommerziell erhältlich (R-Biopharm, Neogen, Bioo Scientific, etc.).

#### Weitere immunoanalytische Methoden

Basierend auf der Antigen-Antikörper-Bindung finden in der Mykotoxinanalytik häufig Methoden Anwendung, die keinen instrumentellen Aufwand benötigen und somit eine Vor-Ort-Analytik ermöglichen. Für solche „Feldanalysen“ haben sich sog. Teststreifen (*Lateral Flow Dipsticks*) etabliert. Diese basieren auf dem Prinzip des klassischen ELISAs. Die Immuno-

reagenzien sind auf dem immunochromatographischen Teststreifen räumlich voneinander getrennt. Dieser besteht aus einem Proben-, sowie einem Konjugat-Streifen, einer Membran, einem Absorbent-Streifen und einer Haftfolie. Nach Zugabe eines Rohextraktes binden freie Antigene (z.B. Mykotoxine) spezifisch an die meist Gold-markierten Antikörper. Aufgrund von Kapillarkräften wandern die Antigen-Antikörper-Komplexe zusammen mit sekundären Antikörpern (als Kontrolle) zum Konjugat-Streifen. Dort sind Antigene immobilisiert und nur wenn freie Antikörper-Bindungsstellen vorhanden sind, reichern sie sich dort an. Dabei entsteht eine Farbentwicklung, die visuell auf die Anwesenheit des Antigens (indirekte Proportionalität) schließen lässt. Diese Methode kann allerdings noch nicht zur exakten Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden und ist daher semiquantitativ (Tang, 2009; Basova, 2010; Lattanzio, 2012).

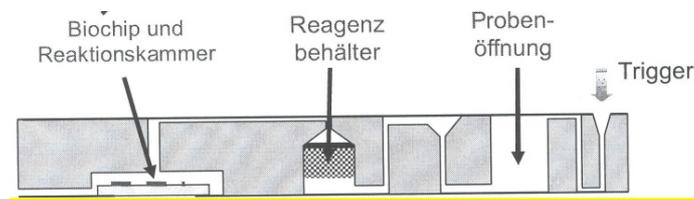
Die bisher beschriebenen Immunoassays müssen in der Regel alle manuell ausgeführt werden. Der Nachteil ist, dass die Validierung solcher Systeme oft Schwierigkeiten bereitet, da sie oftmals personenabhängig und somit subjektiv sind.

### Biosensoren

Die neuesten Forschungen bewegen sich in Richtung Miniaturisierung und Automatisierung und somit zu den Biosensoren. Dabei sollen automatisierte, empfindlichere und reproduzierbare Auslesetechniken in die Entwicklung integriert und die Quantifizierung mehrerer Analyten gleichzeitig ermöglicht werden. Biosensoren zeichnen sich durch einfache Handhabung, Robustheit und schnelle Probenvorbereitung aus. Bekannte Technologien sind Oberflächenplasmonenresonanz, kinetischer Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay, Elektrochemilumineszenz- und piezoelektrische Sensoren sowie Mikroarrays (Zheng, 2006).

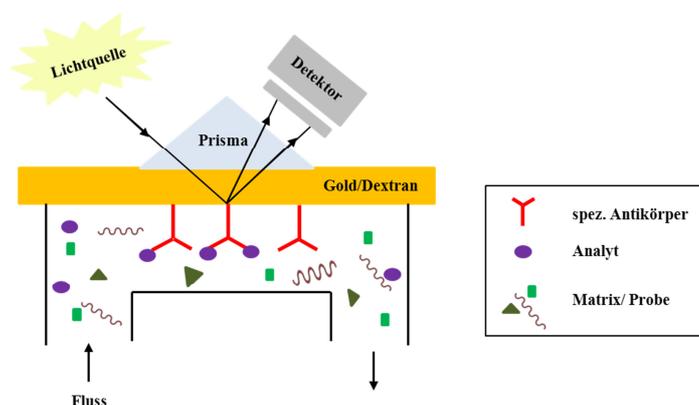
Ein nicht multianalytfähiger erhältlicher Biosensor ist der kinetische Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (*aokinmycontrol*<sup>®</sup> kits, Fa. Aokin AG). Basierend auf dem kompetitiven ELISA-Format (in Lösung) werden die Analyten mit Fluorophoren markiert (*Tracer*) und anschließend detektiert. Für Lebensmittelproben wie Getreide werden für die Messung je nach Analyten SPE- oder IAC-Säulen vorangestellt (Lippolis, 2011). Dagegen ermöglicht der Bayer Quality Analyzer eine parallele Analyse von vier Mykotoxinen. Grundlage für die Detektion stellt die planare Lichtleiter-Technologie (*Planar Waveguide*, PWG) dar. In dem indirekt kompetitiven Assay werden die Analyt-Derivate auf einem PWG-Biochip immobilisiert. Dieser ist in eine Plastikkartusche (Bayer-Micro-Labs) eingebettet. In eine Probenöffnung (Abbildung 11) wird die zu untersuchende Probe aufgetragen. Durch Luftdruck

wird der Extrakt zur Kammer mit den Reagenzien, den Fluoreszenz-markierten Antikörpern geleitet und gemischt, wodurch eine Konkurrenz stattfindet. Die Reaktionslösung wird über erneuten Luftdruck auf den Biochip geleitet und anschließend analysiert (Tittelmeier, 2013).



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung eines Biosensors von Bayer (*Bayer Quality Analyzer*) basierend auf indirekt kompetitivem ELISA-Format.

Eine weitere Methode, die eine schnelle Detektion mehrerer Analyten ermöglicht, ist die sog. Oberflächenplasmonenresonanz. Bei Biosensoren, die auf SPR basieren, wird eine dünne Goldschicht zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes (z.B. ein Glasprisma und eine Flüssigkeit, die den Analyten enthält) verwendet. Bei der SPR wird das Medium mit dem höheren Brechungsindex (Glasprisma) mit parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht bestrahlt. Dabei findet bei Einfallswinkeln, die größer als der kritische Einfallswinkel sind, eine Totalreflexion des Lichts statt, wobei die elektromagnetische Feldkomponente des Lichts in die Goldfolie eindringt und dort ein sog. evaneszentes Feld entsteht (Abbildung 12). Durch die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit den Elektronen der Goldoberfläche beginnen diese kollektiv zu schwingen und es entstehen die sog. Oberflächenplasmonen. Dabei ist die Wellenlänge der Oberflächenplasmonen sehr stark von der Brechzahl des zur Goldfolie benachbarten Mediums (immobilisierten Rezeptors) abhängig. Die wellenlängenabhängige Detektion basiert auf der Änderung des Reflexionswinkels des eingestrahlichten Lichts in Abhängigkeit des effektiven Brechungsindex der sensitiven Schicht (Hodnik, 2009; Dorokhin, 2011).



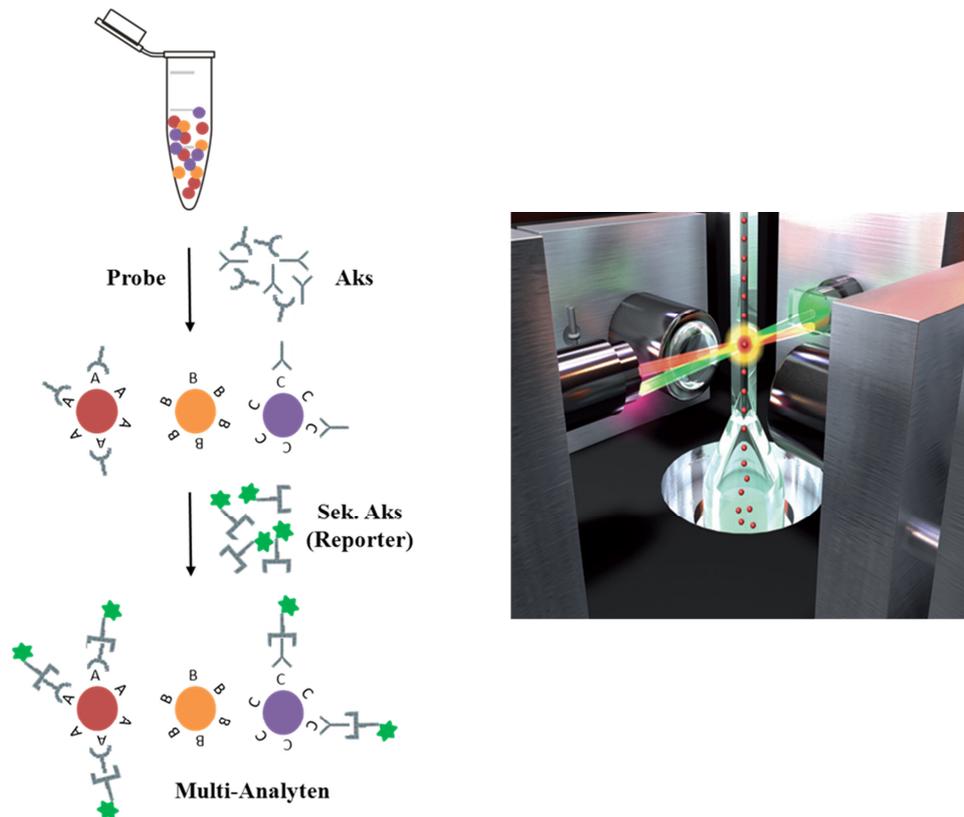
**Abbildung 12:** Darstellung eines Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Biosensors am Beispiel des direkten ELISA-Formats.

SPR-Geräte werden z.B. vom Unternehmen GE Healthcare in mehreren Varianten kommerziell vertrieben. Dabei wird das indirekt kompetitive ELISA-Format für Mykotoxine eingesetzt. Eine Mischung aus Antikörpern und Antigenen wird über den Chip geleitet. Dabei erfolgt eine Konkurrenz zwischen den freien Antigenen und den auf der Goldfolie immobilisierten Antigenen um die Bindungsstelle des Antikörpers. Durch die Antikörperbindung ändert sich die Bindungsdichte auf der Oberfläche und somit auch der Reflexionswinkel des eingestrahlten Lichts. Die Verwendung des direkten ELISA-Formats in Kombination mit SPR wurde ebenfalls beschrieben (Fitzpatrick, 2004; Raz; 2009).

SPR wird in der Biochemie eingesetzt, um kinetische Parameter bei Wechselwirkungen zwischen Molekülen zu bestimmen. Sie ist aber auch für die Quantifizierung von Substanzen geeignet. Der größte Vorteil von SPR liegt darin, dass die Interaktionen von Molekülen in Echtzeit (*real-time*) bestimmt werden können, und dass es sich um eine markierungsfreie Methode handelt (Hodnik, 2009). Der Nachteil liegt darin, dass bei Einsatz von Realproben sehr hohe Hintergrundsignale generiert werden. Unspezifische Bindungen können von spezifischen nicht unterschieden werden, da SPR labelfrei arbeitet.

Als letzte Entwicklung soll hier die xMap-Technologie von Luminex (Austin, United States) näher erläutert werden. Diese Methode kombiniert den Einsatz von Mikrobeads mit einem Durchflusszytometer. Bei den *beads* handelt es sich um carboxylierte Polystyrol- „Mikrokugeln“, die mit zwei verschiedenen Fluorophoren eingefärbt sind. Dies ermöglicht je nach Verhältnis der beiden Fluorophore bis zu 100 unterscheidbare Mikrobeads. Auf diesen können nun über diverse Kopplungstechniken verschiedenste biologische Reagenzien (DNA, Proteine, Antikörper, Polysaccharide, etc.) gebunden werden.

Zur Quantifizierung wird im Durchflusszytometer ein roter Laser (635 nm) zur Anregung eingesetzt und die entstehende Emission detektiert (zwischen 645 nm und 669 nm). Anschließend wird mittels eines grünen Lasers ein Reporter-Signal zur Quantifizierung gemessen. So wurden bereits sechs Mykotoxine parallel in Lebensmitteln untersucht. Der Assay ist in Abbildung 13 dargestellt. Die *beads* werden mit den Primärantikörpern und Lebensmittelrohextrakten gemischt (Konkurrenz), nach einem Waschschrift wird ein Sekundärantikörper markiert mit Phycoerythrin (als Reporter) hinzugegeben und im Durchflusszytometer analysiert (Peters, 2011).



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der *xMap*-Technologie von Luminex. (links) Kompetitiver Assay mit Mikrobeads gefärbt mit zwei Fluorophoren; (rechts) Durchflusszytometer.

### 3 Auswertung von Immunoassays

Zur Auswertung der Daten werden von den erhaltenen Messergebnissen vom MTP-Auslesegerät die jeweiligen Mittelwerte, sowie die zugehörigen Standardabweichungen bestimmt. Mittels des Programmes Origin werden die Messdaten gefittet. Dazu wird die Absorption halblogarithmisch gegen die Toxinkonzentration aufgetragen. Für den Fit wird die nachfolgende sigmoidale Funktion verwendet (Berkson, 1944).

$$Y = \frac{(A_1 - A_2)}{\left[1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p\right]} + A_2 \quad (1)$$

Y = Absorption

A<sub>1</sub> = maximale Absorption

X = Analytkonzentration

A<sub>2</sub> = minimale Absorption

X<sub>0</sub> = Testmittelpunkt

p = Steigung am Testmittelpunkt

Um gegebenenfalls die Analytkonzentration  $X$  bestimmen zu können, muss Gleichung 1 nach  $X$  aufgelöst werden:

$$X = \left( \sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{Y - A_2}} - 1 \right) \cdot X_0 \quad (2)$$

Die „goldene Regel“ bei analytischen ELISA-Methoden ist, dass Daten von unterschiedlichen Mikrotiterplatten nur schlecht direkt miteinander verglichen werden können, da die Wiederholpräzision von ELISAs oft nur mäßig ist. Ursache dafür ist, dass die Bedingungen, z.B. Temperatur, Verdünnungen, etc., nicht genau konstant gehalten werden können. Deshalb werden auf jeder MTP Kalibrierstandards mitgeführt. Die untere Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LOD) lässt sich durch den höchsten Messpunkt der Kalibrierkurve abzüglich der dreifachen Standardabweichung des Blindwerts (Blk) berechnen (siehe Gleichung 3).

$$\text{LOD} = \bar{x}_{\text{Blk}} - 3 \cdot s_{\text{Blk}} \quad (3)$$

## 4 Mikroarraytechnologie

Mikroarrays sind moderne molekularbiologische Messsysteme, die eine Multianalyse ermöglichen können. Dabei bedeutet *mikro* klein und *array* frei übersetzt „Anordnung in einem Raster“. Bei dem Mikroarraychip handelt es sich um einen planaren Träger, der aus Glas, Plastik oder Silizium hergestellt ist und auf dem makroskopisch kleine Spots angeordnet sind (Weller, 1999).

Die Spots können dabei aus Antigenen, Antikörpern, DNA, RNA und weiteren biologischen Rezeptoren bestehen. Deshalb werden Mikroarrays auch als Biochips bezeichnet. Die sog. Fängermoleküle werden durch kovalente Wechselwirkung meist irreversibel auf der Oberfläche gebunden. Aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen der Biomoleküle können die zugegebenen Analytmoleküle in Lösungen zu den einzelnen gespotteten Substanzen diffundieren und binden. So wird beispielweise bei der Verwendung von Antikörpern (als Fängermolekül) das Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays angewandt.

Auf diese Weise wird somit ein Multi-Analyt-Verfahren mit den Eigenschaften eines herkömmlichen ELISAs erhalten. Das Auslesen des Mikroarrays erfolgt anschließend über Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, elektrochemische oder Oberflächenplasmonenresonanz-

Messungen. Grundsätzlich wird zwischen Durchfluss- und Nicht-Durchfluss-Mikroarrays unterschieden (Seidel, 2008).

Im Vergleich zu den klassischen immunologischen Methoden können mit den Mikrosports hohe Dichten erreicht werden und es zeigte sich auch, dass die Detektion sensitiv ist. Zudem werden die zu immobilisierenden Analyten kovalent und spezifisch gebunden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass viele Analyten gleichzeitig bestimmt werden können. Daraus ergeben sich weitere Vorzüge: Die Analysezeit verkürzt sich bei einer parallelen Messung um ein Vielfaches, wodurch wiederum die Kosten verringert werden. Aus diesen Gründen werden Mikroarrays in vielen Bereichen der Medizin, der Lebensmittelchemie und der Umweltanalytik als Screening-Verfahren eingesetzt (Feng, 2004; Sashwati, 2006; Rich, 2008).

Ein Beispiel für ein Chip-basierende Plattform stellt der *Munich Chip Reader dritter Generation* (MCR 3) dar. Bei dem MCR 3 handelt es sich um eine Weiterentwicklung des bereits mehrfach veröffentlichten *PASA*-Systems (Paralleler Affinitäts-Sensor-Array) (Weller, 1999; Fall, 2003; Knecht, 2004). Bei dem Biosensor werden Spots auf einer Glasoberfläche (Mikroarray-Chip) mit zwei Flusszellen immobilisiert. Da es sich um regenerierbare Chips handelt, soll während des Regenerationszyklus der einen Flusszelle, mit der zweiten Flusszelle gemessen werden.

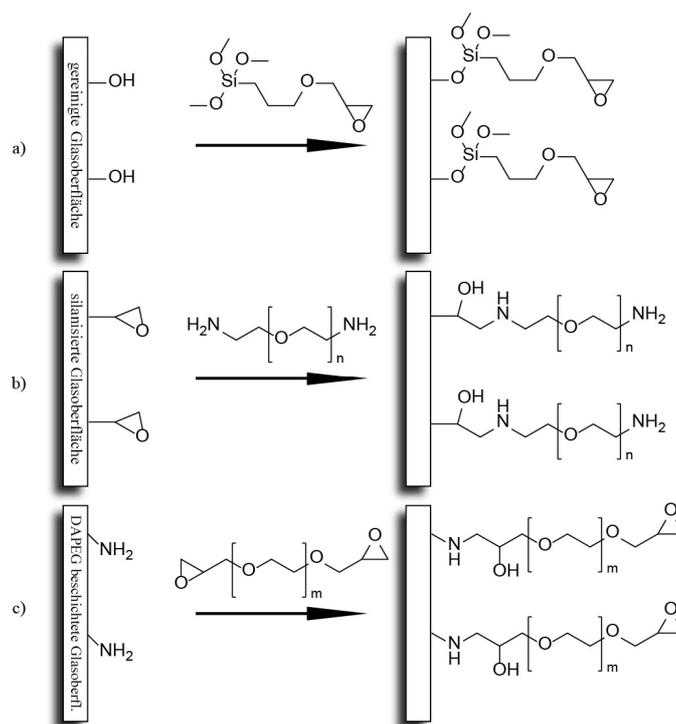
Mit dieser Plattform wurden bereits unterschiedlichste Mikroarray-Formate publiziert. Der dabei gängigste Mikroarray basiert auf der Immobilisierung von Antikörpern als Fänger-moleküle (Antikörper-Mikroarray) auf der Chip-Oberfläche. Auf diese Weise kann eine Quantifizierung von Bakterien oder Viren im Sandwich-Format erfolgen (Langer, 2011 und 2012). Nachteil dabei ist, dass dieser Mikroarray nicht wiederverwendbar ist, sondern nur für Einmalmessungen bestimmt ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung von Hapten-Mikroarrays. Für kleine Moleküle stellt dieses Format die häufigste Detektionsmethode dar. Dabei wird durch die Immobilisierung der Haptene ein indirekt kompetitiver Immunoassay möglich, der sich durch hohe Sensitivität und eine mögliche Regenerierbarkeit auszeichnet. Verwendung fand dies in Untersuchungen von Antibiotika in Milch (Kloth, 2009) und in Honig (Wutz, 2011), sowie von Pestiziden (Schuetz, 1999) in Lebensmittel- und Wasserproben. Auch in der Mykotoxinanalytik wurde bereits OTA in Kaffee untersucht (Sauceda-Friebe, 2011). Von DNA-Mikroarrays wird gesprochen, wenn einzelsträngige DNA-Fragmente (sog. Sonden) auf den Träger aufgebracht werden. Durch Zugabe von (mit HRP oder Fluoreszenzfarbstoffen) markierten komplementären Nukleinsäuren hybridisieren diese mit der Sonde und können mittels der Markierung identifiziert werden (Lemarchan, 2004; Donhauser, 2011). Als

weiteres Format soll hier noch der Zell-Mikroarray erwähnt werden. Dieser ermöglicht ein Screening geeigneter Antikörper, um Oberflächenantigene *in vivo* zu testen (Pappert, 2010). So wurden beispielsweise Antikörper in Hinblick ihrer Affinität zu PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; Karsunke, 2011) bestimmt.

### 4.1 Oberflächenchemie und Spotting

Die Oberfläche eines Mikroarrays muss vielen Anforderungen genügen. Dazu gehören Ebenheit, Uniformität, Effizienz und Haltbarkeit (Wolter, 2008). So haben sich Oberflächen aus Kunststoff, wie Polystyrol (PS; Feng, 2004) oder Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS; Seidel, 2003), Silikon (Nijdam, 2007) oder Nitrozellulose für die Adsorption von Antikörpern als geeignet herausgestellt. Aufgrund zu hoher Hintergrundsignale und fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist die Verwendung dieser Oberflächen für manche analytischen Untersuchungen ungeeignet. Daher hat sich der Einsatz von Glasobjektträgern durchgesetzt. Wichtig bei der Beschichtung der Glasoberfläche ist, dass das Fängermolekül dauerhaft an die Oberfläche gebunden ist und sich andererseits keine anderen Biomoleküle unspezifisch anlagern. Weiterhin haben sich besonders Glasoberflächen als gute Trägermaterialien herausgestellt, die sowohl hohe physikalische als auch chemische Stabilität aufweisen. Außerdem kann die Oberfläche durch Silanisierungsreaktionen gut modifiziert werden.

Der Glasträger wird zunächst gereinigt und mit Laugen oder Säuren aktiviert. Als Silanisierungsreagenz wird 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) verwendet. Bei der Silanisierung reagiert das Silan mit den Hydroxylgruppen, so dass die Glasoberfläche mit aktiven Epoxiden beschichtet wird. Nach dieser Aktivierung entsteht eine hydrophobe Oberfläche, die den Nachteil besitzt, dass Proteine unkontrolliert binden können. Dies wird durch eine weitere Reaktion mit Diamino-Polyethylenglycol-Molekülen (DAPEG) verhindert. Das Diamin greift dabei nukleophil am Epoxid an. Durch das entstehende hydrophile Netzwerk kann die unspezifische Bindung zum Teil unterbunden werden. Weiter wird vermutet, dass die langen Ketten sowie die hohe Entropie zu einer sterischen Abstoßung führen. Um nun das Fängermolekül kovalent an die Oberfläche binden zu können, werden terminale Epoxidgruppen an die freien Amino-PEG-Linker eingeführt. Hierfür werden Diepoxid-PEGs (Epoxy-PEG) verwendet. Die terminale Epoxidfunktion ermöglicht einen nukleophilen Angriff durch das zu immobilisierende Hapten-Peptid oder Hapten-Amin. Dies ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Herstellung von Epoxy-PEG beschichteten Glasoberflächen; a) Beschichtung mit GOPTS, b) Beschichtung mit DAPEG, c) Beschichtung mit Epoxy-PEG.

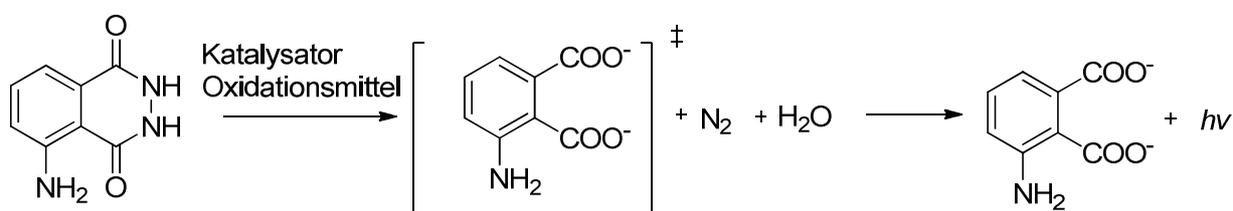
Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit besteht in der Nutzung von Di-(*N*-succinimidyl)carbonat (DSC), das an die DAPEG-Schicht bindet. Dabei entsteht eine aktivierte Carbonsäure (über die NHS-Gruppe), die ein freies Amin kovalent binden kann.

Für die Herstellung von reproduzierbaren Strukturen auf den Mikroarrays werden Robotersysteme eingesetzt. Für das Immobilisieren der Antigene auf der aktivierten Epoxidschicht sind prinzipiell zwei Arten von Spotting gängig: *contact printing* und *non-contact printing* (Barbulovic-Nad, 2006).

Beim *Non-contact printing* werden die Reagenzien als freifliegende Tropfen mittels piezoelektrischen (Butler, 2001; Hughes, 2001), thermischen oder magnetischen Pumpen oder Druckpuls (Gutmann, 2004) auf der Oberfläche abgesetzt. Zu dieser Methode gehören u.a. Photolithographie- (Pirring, 1996), Elektrospray- (Moerman, 2001; Kim, 2005) und Inkjet-Technologie (Okamoto, 2000; Allain, 2004). Die zweite Methode ist das *contact printing*. Hierbei hat eine Kapillare (Georger, 2001) bzw. eine Nadel (Wang, 2003) direkten Kontakt mit der Oberfläche. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Reproduzierbarkeit der gedruckten Spots und in der einfachen Handhabung. Ein Nachteil ist die zeitaufwendige Herstellung der Spots, bedingt durch den langsamen Durchsatz. Methoden, die mit *non-contact printing* arbeiten, führen häufig zur Bildung von Satellitenspots, zudem können Proteine hierbei leichter denaturieren (Barbulovic-Nad, 2006).

## 4.2 Chemilumineszenzreaktion

Die Chemilumineszenzreaktion stellt in der Analytischen Chemie eine gute Detektionsmöglichkeit dar. Der Vorteil liegt darin, dass keine Anregung durch eine externe Lichtquelle benötigt wird und somit keine Hintergrundemission entsteht. Bei der Chemilumineszenz wird ein Molekül bzw. ein Atom durch eine chemische Reaktion elektronisch angeregt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand kann dabei entweder Energie in Form von Licht im ultravioletten, sichtbaren oder im nahen infraroten Bereich emittiert werden. Außerdem kann die Energie an ein anderes Molekül weitergegeben werden, das anschließend luminesziert (Garcia-Campana, 2007). Die Chemilumineszenzreaktion ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Darstellung der Chemilumineszenzreaktion.

Der limitierende Faktor der Chemilumineszenz ist lediglich die sehr geringe Quantenausbeute der Chemilumineszenzreaktion (Lowry, 2008). Das Emissionsspektrum von Luminol besitzt ein Maximum bei 425 nm und liegt somit am Rande des sichtbaren Lichtspektrums (Takahashi, 1977; Roswell, 1978). Die Reaktion kann durch eine Vielzahl von Katalysatoren beschleunigt werden. Der komplexe Mechanismus sowie die Stöchiometrie sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Nakamura, 1998; Rodriguez-Lopez, 2001; Hiner, 2002).

## 5 Antikörper

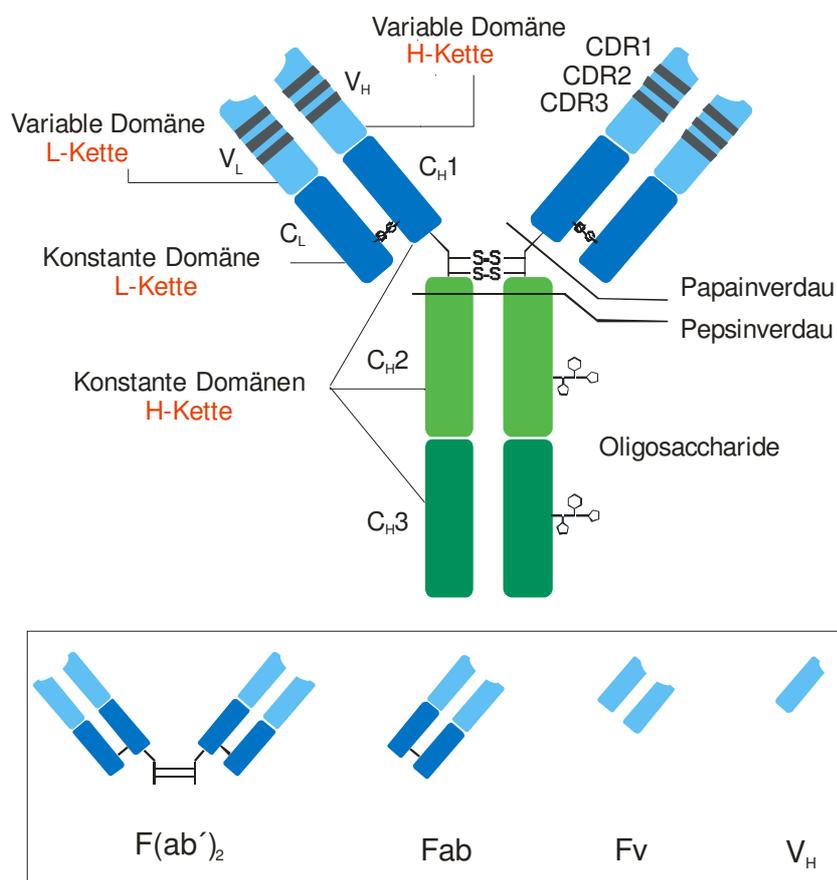
Antikörper werden zu der Klasse der Globulin-Proteine gezählt und von B-Lymphozyten (Plasmazellen) gebildet. Sie spielen eine zentrale Rolle in Wirbeltierorganismen, indem sie körperfremde Substanzen, z.B. Krankheitserreger, Makromoleküle, ganze Zellstrukturen oder auch körpereigene Zellen, wie krankhaft veränderte (Krebszellen) oder fälschlich als fremd eingestufte (Autoimmunität) erkennen und binden. Der entstehende Antigen-Antikörper-

Komplex basiert nicht auf kovalenten Bindungen, sondern u.a. auf ionischen,  $\pi$ - $\pi$ - oder polaren Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Dieser Komplex kann z.B. durch Komplementaktivierung von Antikörpern im Anschluss von Phagozyten erkannt und durch Phagozytose zerstört werden (Winter, 1991). Die Bindung des Antigens an membrangebundene B-Zell-Rezeptoren führt zur Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten. Dies erfolgt dadurch, dass gebundene Antigene in kurze Fragmente zerlegt und von T-Helferzellen erkannt werden, die wiederum die B-Zelle zur Teilung und Differenzierung anregen. So entstehen Plasmazellen aus B-Plasmazellen, die freie Antikörper produzieren, diese sezernieren und ermöglichen somit eine schnelle Bekämpfung der eingedrungenen Antigene. Diese Differenzierung hat zudem zur Folge, dass durch hohe Mutationsraten selektive und daher vielfältigere Antikörper gebildet werden (Tonegawa, 1983). Auch bei Abwesenheit des Antigens bleiben die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten erhalten und bilden dadurch ein immunologisches Gedächtnis, das bei erneutem Eindringen des Antigens eine schnelle Immunantwort sicherstellt (Prinzip der Impfprophylaxe; Ahmed, 1996). Dabei kann jedes Wirbeltier theoretisch  $10^8 - 10^9$  verschiedenartige Antikörper besitzen (Di Noia, 2007).

## 5.1 Typen und Strukturen von Antikörpern

Antikörper sind Immunoglobuline (Ig) und werden in die fünf verschiedenen Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM eingeteilt. Mengenmäßig spielt IgG die größte Rolle im Wirbeltier. In Abbildung 16 (oben) ist der schematische Aufbau eines IgG gezeigt. Dabei besteht der IgG aus je zwei identischen schweren Polypeptidketten H (*Heavy*, ca. 55 kDa) und zwei identischen leichten Ketten L (*Light*, ca. 22 kDa), die zusammen eine Y-ähnliche Struktur bilden und über reduktionsempfindliche Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die leichte Kette ist aus einer konstanten ( $C_L$ ) und einer variablen ( $V_L$ ) Domäne aufgebaut, hingegen besteht die schwere Kette aus drei konstanten ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ) und einer variablen ( $V_H$ ) Domäne. Jede Domäne besteht aus zwei antiparallelen  $\beta$ -*Sheets* ( $\beta$ -Faltblattstruktur), die intramolekular ebenfalls über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die variable Region setzt sich dabei aus  $V_H$  und  $V_L$  zusammen, wobei an die hypervariable Regionen (*Complementary Determining Region*, CDR) die Antigenbindung erfolgt. Die Antigenbindestelle wird als Paratop, die Stelle des Antigens, an die der Antikörper bindet, als Epitop bezeichnet. Da das IgG zwei variable Regionen enthält und somit eine Bindungsverstärkung (Avidität) besitzt, wird die Fähigkeit, zwei Antigene zu binden, als Multivalenz bezeichnet. Die Paratop-Epitop-Wechselwirkungen bestehen aus verschiedenen Bindungsanteilen. Neben elektrostati-

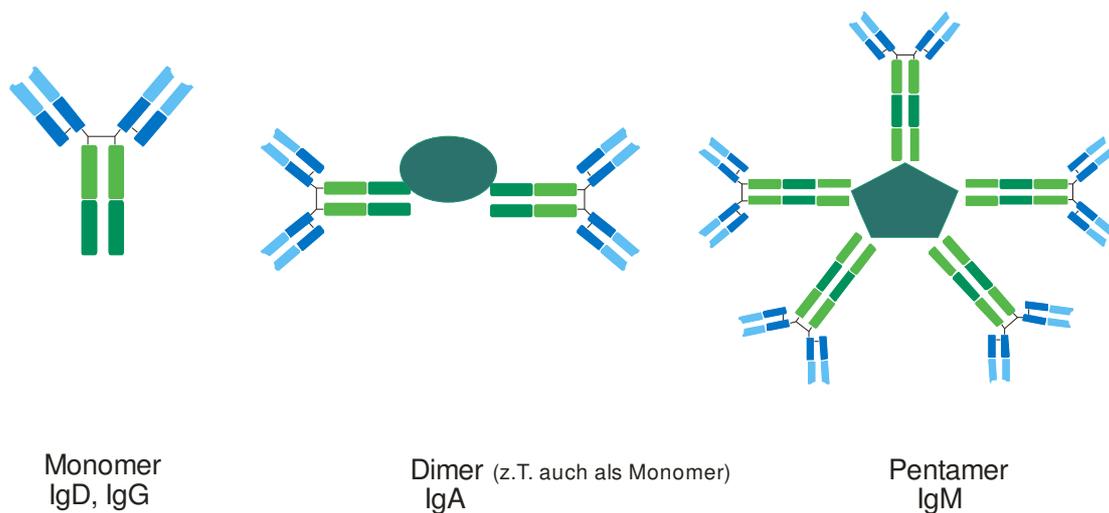
schen sind auch Dipol-Dipol- und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu berücksichtigen. Außerdem hat die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungsstärke. Ebenso muss die Verdrängung von Wassermolekülen und der damit einhergehende Entropiegewinn berücksichtigt werden (Roitt, 2006).



**Abbildung 16:** (Oben) Schematische Abbildung eines Immunglobulins des Typs IgG. C: konstante Region; V: Variable Region; H: schwere Kette, L: leichte Kette, CDR: hypervariable Regionen (*Complementary Determining Region*). (Unten) Schematische Darstellung von Antikörperfragmenten. Fab: Antigenbindendes Fragment; Fv: variables Fragment; V<sub>H</sub>: variables Fragment der schweren Kette.

Antikörper können durch den Einsatz von Enzymen gespalten werden (Abbildung 16, unten). So führt der Verdau durch Pepsin zu einem (Fab)<sub>2</sub>-Fragment (Smith, 1990), während Papain zu zwei Fab-Fragmenten und einem kompletten Fc-Fragment führt. Dies findet auch Einsatz bei sog. humanisierten Antikörpern, die therapeutisch angewendet werden. Dazu wird nach dem Pepsin-Verdau der Fc-Teil eines Tieres durch den des Menschen ersetzt und wieder mit dem variablen Teil verknüpft. Dies ermöglicht, den modifizierten Antikörper in einen Menschen zu injizieren, und eine abgeschwächte Immunantwort auszulösen.

Die Klassen der Immunglobuline unterscheiden sich in der konstanten Region der H-Kette, die als  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , oder  $\gamma$  bezeichnet werden. So besitzen IgGs und IgAs drei  $C_H$ -Domänen, während IgMs und IgEs vier  $C_H$ -Domänen besitzen (Abbildung 17). Die L-Ketten sind dagegen homolog und lediglich in die zwei Untergruppen  $\kappa$  und  $\lambda$  eingeteilt. Diese können sich mit allen schweren Ketten zu Isotypen verbinden, die sich jedoch in ihrer Effektorfunktion unterscheiden (Honjo, 2002; Manis, 2002).



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der verschiedenen Antikörperklassen und ihrer supramolekularen Struktur. Die Dimere und Pentamere sind über ein cysteinreiches *Joining Peptide* (olive-grün) untereinander verknüpft.

Beim Auslösen einer Immunreaktion werden zuerst IgM-Antikörper (als Pentamere) gebildet, nach ca. zehn Tagen steigt der Titer des Monomers des Typs IgG im Serum signifikant an (Isotypenwechsel). Antikörper der Klassen IgD, IgE (ebenfalls monomer) und IgA (dimer oder monomer) werden mit gleicher Spezifität produziert. Für immunologische und immunanalytische Verfahren ist dennoch nur der IgG-Typ von Bedeutung, da hier die Konzentration im Serum gegenüber den anderen Klassen um den Faktor 100 - 100000 erhöht ist. Ein weiterer Vorteil bei der Nutzung der IgGs liegt in deren Wasserlöslichkeit, die im Vergleich zu IgMs deutlich erhöht ist, was zudem eine Handhabung *in vitro* deutlich vereinfacht.

## 5.2 Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern

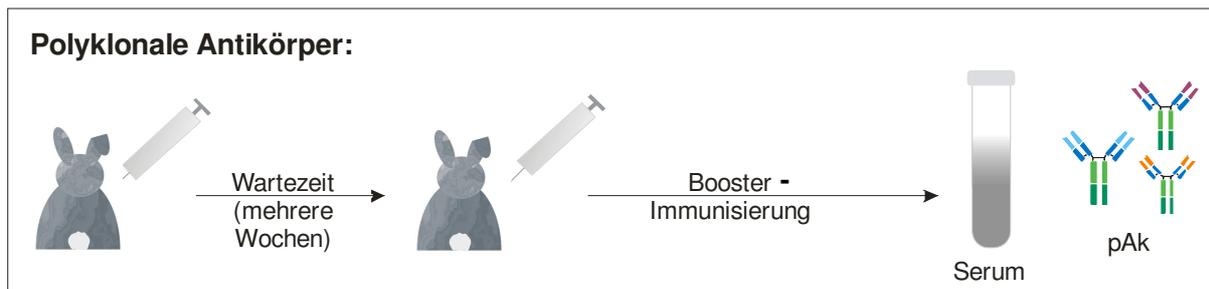
Die Gewinnung von Antikörpern für den therapeutischen (z.B. Schutzimpfung) und industriellen (z.B. Immunoassays, Biosensoren) Einsatz stellt nach wie vor eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Die Herstellung kann dabei polyklonal oder monoklonal erfolgen.

Dabei wird unter polyklonal die Gesamtheit der im Serum vorhandenen Antikörper mit bestimmter Spezifität (gegen ein Antigen) verstanden.

Um generell Antikörper zu gewinnen, muss eine Immunantwort ausgelöst werden. Im Allgemeinen erfolgt dies durch körperfremde, makromolekulare Strukturen mit Molekülmassen  $> 5$  kDa (Lottspeich, 2006). Kleinere Moleküle müssen daher an einen makromolekularen Träger (*Carrier*), meist ein Trägerprotein wie bovines oder humanes Serumalbumin (BSA, HSA), Ovalbumin (OVA) oder Hämocyanin (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH) gekuppelt werden (Li, 2010). Bei einer Immunreaktion werden auf diese Weise von verschiedenen B-Zellen Antikörper gebildet, die jeweils eine andere Sensitivität und Spezifität aufweisen. Diese Antikörper sind in ihrem konstanten Teil zwar identisch, unterscheiden sich jedoch in ihren variablen Regionen (Lottspeich, 2006). Dadurch variieren die Affinitäten zum Antigen, die durch die Sequenz und die räumliche Anordnung der Schleifen in den CDRs bestimmt werden. Ebenso können sich die Epitope des Antigens, die erkannt und gebunden werden, von Antikörper zu Antikörper unterscheiden (spez. bei Makromolekülen). Die Antikörper werden von Zellklonen verschiedener B-Zelllinien produziert, weshalb sie als polyklonal bezeichnet werden.

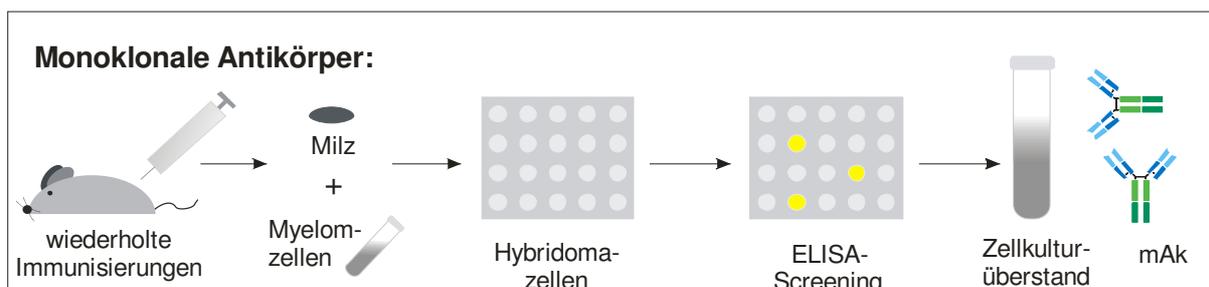
Bei der polyklonalen Gewinnung werden üblicherweise größere Wirbeltiere wie Hasen, Ziegen oder Pferde verwendet, die eine ausreichend große Menge an Serum liefern können. Bei der Immunisierung werden zum einen die zeitliche Funktionsweise des jeweiligen Wirt-immunsystems (Immunantwort) sowie die Wiederholungen der Immunisierungen optimiert. Zum anderen müssen die physiologischen Voraussetzungen bei der Menge des verabreichten Immunogens berücksichtigt werden. Das Serum des Wirtstiers kann ohne oder auch mit vorheriger Affinitätsanreicherung wie z.B. Protein-A/G-Säulen verwendet werden (Bjorck, 1984). Der schematische Verlauf der Herstellung ist in Abbildung 18 dargestellt.

Vorteil der polyklonalen Antikörper (pAk) ist die vergleichsweise schnelle, einfache und kostengünstige Herstellung. Zudem werden sie aufgrund der verschiedenartigen Paratope der Antikörper und damit der Fähigkeit, das Antigen über unterschiedliche Epitope zu binden, als hoch robust in immunoanalytischen Methoden angesehen. Daneben jedoch ist ein pAk an ein einzelnes Wirtstier gebunden, wodurch zum einen ein erhöhter Bedarf häufig nicht gedeckt werden kann, da die gewonnenen Mengen in der Regel konstant klein sind (geringe Serumkonzentrationen), und zum anderen die Produktion mit dem Tod des Tieres beendet ist. Diese Punkte begrenzen den Einsatz von pAk speziell für analytische Methoden und fördern daher die Entwicklung und Produktion monoklonaler Antikörper (mAk).



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Herstellung von pAk.

Aus diesem Grund wurde erstmals 1975 von Köhler und Milstein die sog. Hybridomtechnik entwickelt, mit der Antikörper unabhängig vom Wirtstier zu jedem Zeitpunkt gewonnen werden können (Köhler, 1975). Dabei werden nach einer Immunisierung von Mäusen (die am häufigsten verwendeten Wirtstiere) bei ausreichend hohem Titer an gebildeten Antikörpern die Milz entnommen. Die daraus gewonnenen B-Lymphozyten werden in einem Poly(ethylenglycol)-Medium mit Myelomzellen (Tumorzellen) zu sogenannten Hybridomzellen fusioniert. Anschließend werden die fusionierten Zellen in einem Medium aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) selektiert. Durch das Auftragen auf die MTP werden die Fusionszellen vereinzelt und diejenigen, die Antikörper produzieren (positive Zellen), in größerem Maßstab kultiviert. Als Zellkulturüberstand (ZKÜ) wird das Medium, in das die produzierten Antikörper sezerniert werden, bezeichnet. Die ZKÜ werden zum Screening und zu einer ersten Charakterisierung der Affinitäten herangezogen. Geeignete mAk werden weiterführend kultiviert, mehrmals rekloniert und der Antikörper über Affinitätsanreicherung aufgereinigt (Bailon, 2000). Die Hybridomzellen können nun schockgefroren (mit flüssigem Stickstoff) und somit für unbestimmte Zeit gelagert werden. Aufgrund ihres Tumorzellencharakters sind sie praktisch „unsterblich“ und können *in vitro* kultiviert werden, wodurch mit ihnen eine unbegrenzte Antikörpermenge produziert werden kann. In Abbildung 19 ist die Herstellung von mAk nach der Hybridomtechnik dargestellt.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Herstellung von mAk.

Monoklonale Antikörper besitzen alle neben dem konstanten Teil auch exakt dieselbe variable Region. Aufgrund dieser chemisch einheitlichen Struktur und Bindungsfähigkeit des Antigens (und der damit verbundenen molekularen Charakterisierung mittels Massenspektrometrie, Röntgenstrukturanalyse, etc.) hat sich der Einsatz von mAk speziell in analytischen Methoden, wie ELISA, Teststreifen etc. durchgesetzt. Obwohl die Produktion schwieriger, langwieriger und wesentlich teurer als die Produktion von polyklonalen Seren ist, sind mAk die heute meistverwendeten Antikörper.

## **III Ergebnisse und Diskussion**

## 1 Messungen mittels Multiplex-Mikroarray

### 1.1 Chipherstellung

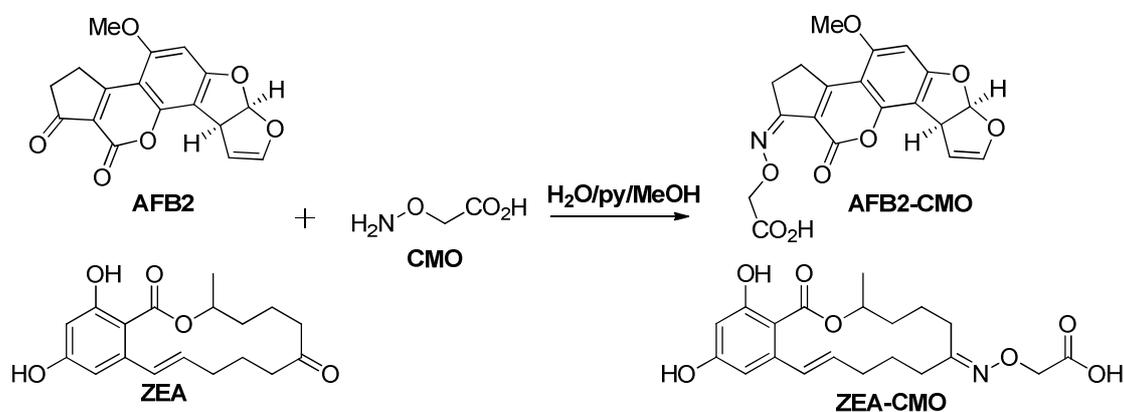
Für eine schnelle und parallele Detektion von Mykotoxinen sollte das am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie entwickelte System, der sog. *Munich Chip Reader der 3ten Generation* (MCR 3), eingesetzt werden. Für die Modifizierung von Glasobjektträgern wurden die vielfach veröffentlichten Standardprozeduren verwendet (Wolter, 2007; Saucedo-Friebe, 2011; Karsunke, 2011). Als gute Trägermaterialien stellten sich besonders Glasoberflächen heraus, da diese sowohl hohe physikalische als auch chemische Stabilität aufwiesen und die Oberflächen durch Silanisierung gut modifiziert werden konnten.

Der Glasträger wurde zunächst mit einem Tensid (Hellmanex) gründlich gereinigt und in Säurebädern aktiviert. Als Silanisierungsreagenz wurde 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) verwendet. Hierbei reagiert das Silan mit der Hydroxyloberfläche, so dass die Glasoberfläche mit aktiven Epoxiden terminiert wird. Dabei hat sich gezeigt, dass eine einstündige Inkubation nicht zur vollständigen Belegung mit GOPTS führt (Karsunke, 2011), weshalb in dieser Arbeit eine Beschichtungsdauer von drei Stunden zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung gewählt wurde (Elbs, 2003; Kloth, 2009). Bei der Silanisierung entsteht eine hydrophobe Oberfläche, an der Proteine unspezifisch binden können. Durch Zugabe von Diaminopolyethylenglykol (DAPEG) entsteht ein hydrophiles Netzwerk, das die Bindung von Wassermolekülen an der Oberfläche ermöglicht und somit unerwünschte Ablagerungen verhindert. Als weitere Möglichkeit wurde bei einigen Versuchen anschließend eine Epoxy-PEG Schicht zur Aktivierung eingesetzt.

Für die Herstellung regenerierbarer Mikroarray-Chips wurde das indirekte ELISA-Format genutzt. Dazu wurden die entsprechenden Mykotoxine bzw. Toxin-Derivate kovalent an der modifizierten Chip-Oberfläche gebunden. Die Immobilisierung der Antikörper (sog. direkter ELISA) wurde zum einen aufgrund der deutlich eingeschränkten Regenerierbarkeit (Deaktivierung einzelner Ak) und zum anderen wegen der benötigten Sensitivität bereits zu Beginn der Arbeit ausgeschlossen. Für die Anbringung der Toxine wurden zudem verschiedene Oberflächenaktivierungsmechanismen sowie der Einsatz von unterschiedlichen Linkern untersucht. In dieser Arbeit sollten Aflatoxin B1 (AFB1), Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA), Fumonisin B1 (FB1), Deoxynivalenol (DON) und T-2 bzw. HT-2 Toxin innerhalb der gesetzlichen Nachweisgrenzen qualitativ und quantitativ in Getreide bestimmt werden.

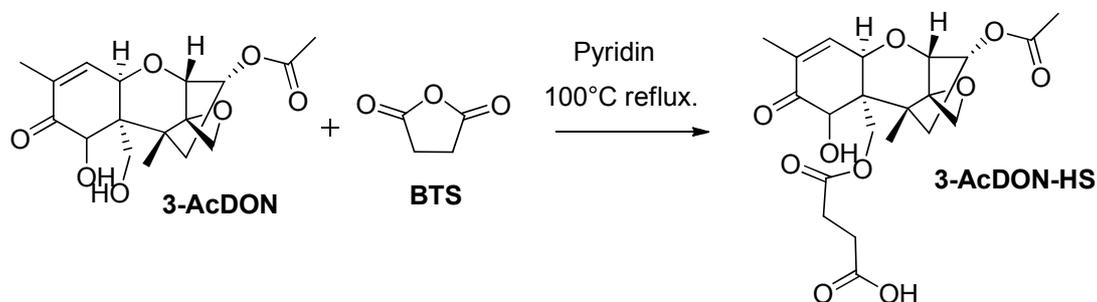
## 1.2 Synthese von Toxin-Konjugaten

Für das kovalente Anbringen der Mykotoxine mussten im Vorfeld entsprechende Derivate erstellt werden. Dabei sei erwähnt, dass die Toxin-Derivat-Synthesen möglichst einfach (wenige Stufen) sein sollten, um die Handhabung der toxischen Substanzen (mg-Mengen) auf ein Minimum zu reduzieren. Konkret wurden bei ZEA und AFB1 und B2 die Ketogruppen mit Methylcarboxylamin (CMO) funktionalisiert. Dazu wurde CMO im Überschuss zum Toxin in H<sub>2</sub>O/Pyridin/Methanol-Gemisch (1/1/4, v/v/v) gegeben und für vier Stunden refluxiert. Nach Aufreinigung der Produkte mittels HPLC-UV/Vis enthielten die so derivatisierten Toxine eine Säurefunktion (Cervino 2007 und 2009). Die Synthese ist in Abbildung 20 zusammengefasst.



**Abbildung 20:** Synthese von AFB2 und ZEA zur Einführung einer Säurefunktion CMO; Produkte: AFB2-CMO, ZEA-CMO.

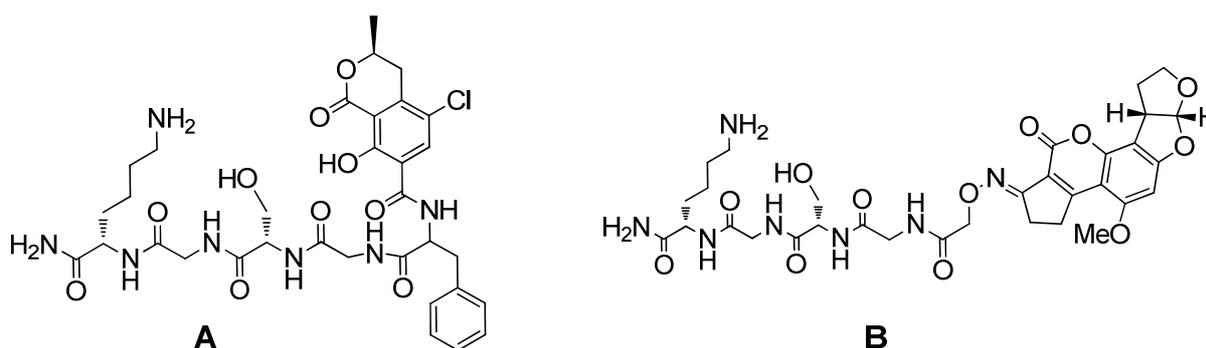
DON besitzt mehrere Hydroxylgruppen, weshalb sich eine Umsetzung mit Succinylanhydrid (Bernsteinsäureanhydrid, BTS) als eine etablierte Methode anbot (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Umsetzung von 3-Acetyl-DON (3-AcDON) mit BTS zur Einführung einer Carbonsäuregruppe; Produkt: 3-Acetyl-DON-Hemisuccinyl (3-AcDON-HS).

Hierbei wurde das 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-AcDON) in Pyridin und mit einem Überschuss an BTS für vier Stunden refluxiert (Usleber, 1991). 3-AcDON wurde gewählt, da die Hydroxylgruppe am C3-Atom mit einer Acetylgruppe geschützt ist und somit die Bildung von zwei unterschiedlichen Produkten verhindert. Die Synthese von T-2 Toxin erfolgte analog, wurde aber von Dr. R. Dietrich, LMU zu Verfügung gestellt.

Im Fall von OTA und FB1 sind bereits funktionelle Gruppen vorhanden. So enthält OTA bereits eine Säuregruppe und FB1 sowohl mehrere Säuregruppen als auch eine Aminogruppe, was eine weitere Umsetzung erspart. Zunächst war geplant, mittels Festphasen-Peptidsynthese geeignete wasserlösliche Mykotoxin-Peptid-Konjugate für die kovalente Immobilisierung auf Epoxy-PEG-funktionalisierten Glaschips herzustellen. Für die Synthese der linearen Peptide wurde die von R. B. Merrifield 1963 entwickelte Festphasenpeptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS) verwendet (Barany, 1978; Kroll, 1997). Nach dieser Methode wurde das Peptid schrittweise vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Hierzu wurden die säurefunktionalisierten Mykotoxine OTA, AFB2-CMO, ZEA-CMO und DON-HS mit einem Peptidlinker umgesetzt. Als Linker wurde hierbei ein lineares Glycin-Serin-Glycin-Lysin-Peptid (lys-gly-ser-gly-) synthetisiert (Abbildung 22). Dabei sollte das Serin durch seine Hydroxylgruppen die Hydrophilie des Linkers erhöhen und die Immobilisierung über die terminale Aminogruppe des Lysins erfolgen. Diese Synthese ist bereits aus Vorarbeiten bekannt (Sauceda, 2011; Karsunke, 2011). Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Die Detektion mittels UV-Detektor erfolgte beim jeweiligen Absorptionsmaximum des Toxins.

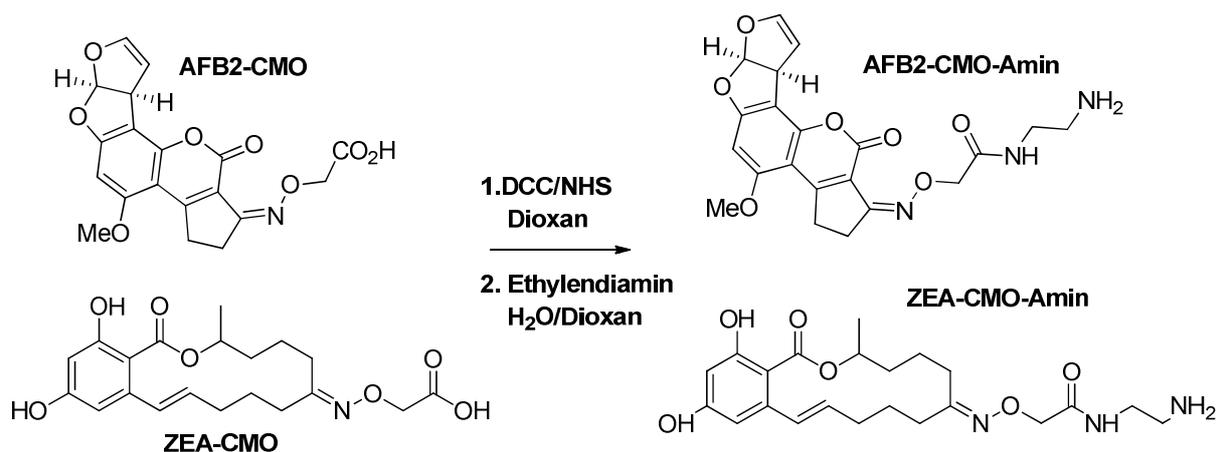


**Abbildung 22:** Strukturen der synthetisierten Toxin-Peptide am Beispiel von A) OTA-gly-ser-gly-lys; B) AFB2-CMO-gly-ser-gly-lys.

Diese Mykotoxin-Peptid-Konjugate hatten sich im Vorfeld für AF und OTA als vorteilhaft erwiesen (Sauceda-Friebe, 2011b). Deutlich komplizierter erwies sich jedoch die Synthese entsprechender Verbindungen mit 3-AcDON, da diese jeweils zu geringe Ausbeuten lieferten.

Alternativ wurde neben der Peptidkupplung ein kürzerer Linker, der Ethylendiaminlinker, eingesetzt und untersucht.

Dazu wurden die Toxin-CMO-Derivate in möglichst wenig Dioxan gelöst und mittels Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zu den entsprechenden Aktivestern umgesetzt. Diese wurden dann in eine Lösung (Dioxan/Wasser) mit Ethylendiamin im Überschuss hinzugegeben, wodurch eine endständige Aminogruppe eingeführt werden konnte. Die Synthese ist in Abbildung 23 zusammengefasst.



**Abbildung 23:** Derivatisierung von AFB<sub>2</sub>-CMO und ZEA-CMO über eine Säuregruppe zur Einführung eines terminalen Amins.

Bei 3-AcDON-HS erfolgte die Kupplung mit Ethylendiamin analog zum AFB<sub>2</sub>-CMO bzw. ZEA-CMO. Die jeweiligen Produkte wurden mittels Massenspektrometrie gekoppelt an Elektrospray-Ionisation (ESI-MS) untersucht. Probleme traten nur im Fall von DON auf, bei dem die gewünschte Masse des Produktes 3-AcDON-HS-Amin nicht gefunden wurde. Die Vorstufe zur Säure (3-AcDON-HS) konnte aber analytisch bestätigt werden und ist in Abbildung 24 dargestellt. Ein möglicher Grund könnte in der Probenaufbearbeitung liegen. DON gehört zu den hydrophilen Mykotoxinen und durch die Einführung einer Säurefunktion bzw. Aminlinkers wird diese chemische Eigenschaft weiter verstärkt, weshalb die Wahl der Lösungsmittelzusammensetzung bei der Probenaufarbeitung (Ausschütteln mit Wasser und DCM) eine zentrale Rolle spielen könnte.

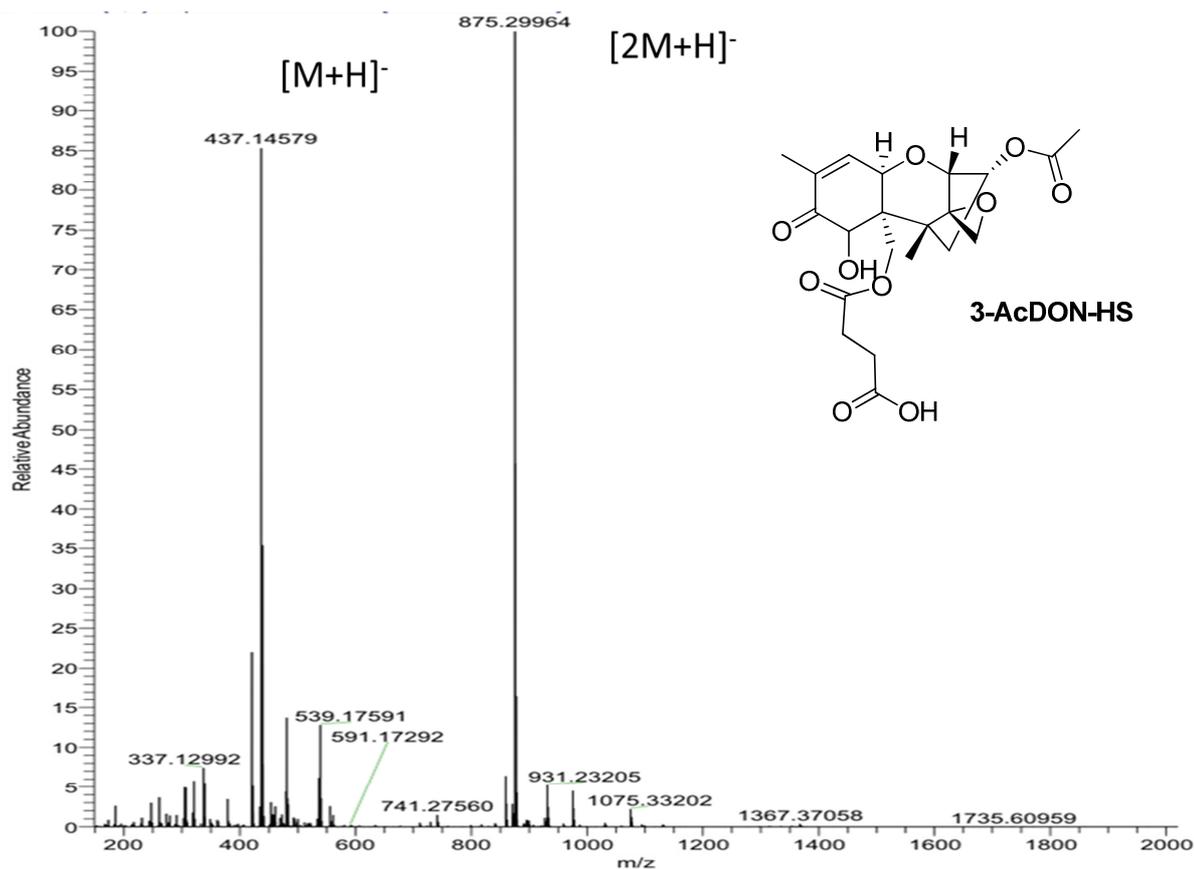


Abbildung 24: ESI-MS-Spektrum des 3-AcDON-HS nach der ersten Synthesestufe.

### 1.3 Untersuchung der Kreuzreaktivitäten

Voraussetzung für einen multiplexen Mikroarray und die damit verbundene parallele Detektion, ist die hohe Spezifität der Antikörper, die nicht mit chemisch ähnlichen Substanzen reagieren sollen. Daher galt es, die Kreuzreaktivität (KR) der einzelnen Antikörper zu den jeweiligen anderen Analyten zu untersuchen. Hierzu wurde ein klassischer indirekt kompetitiver ELISA verwendet. Dabei wurde stets ein Toxin gekoppelt an ein Protein, meist *Bovines Serum Albumin* (BSA), als Konjugat zur Beschichtung der Oberfläche verwendet. Es wurde die Mikrotiterplatte (MTP) mit AFB1-BSA-Konjugat beschichtet und dann für die Kompetition spaltenweise AFB1-, OTA-, DON- und FB1-Verdünnungen mit dem anti-AFB1-Antikörper 1F2 hinzugegeben. Die KR des Antikörpers gegen AFB1 wurde als 100 % angesetzt, da dies zur Immunisierung verwendet wurde. Des Weiteren wurden je eine Platte mit DON-BSA, FB1-BSA und OTA-BSA beschichtet und die jeweiligen Antikörper auf KR untersucht. In Tabelle 7 sind die dabei erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die KR der AFB1, B2, G1 und G2 wurden bereits im Vorfeld bestimmt.

**Tabelle 7:** Kreuzreaktivitäten aller verwendeten Antikörper bestimmt mit indirektem ELISA.

Antigen	Kreuzreaktivität [%]				
	anti-AFB1 1F2	anti-OTA 5G9	anti-DON 1H8	anti-FB1 1H4	anti-T-2 2E7
AFB1	100	0	0	0	0
AFB2	103	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AFG1	78	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AFG2	57	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
OTA	0	100	0	0	0
DON	0	0	100	0	0
FB1	0	0	0	100	0
T-2 Toxin <sup>1</sup>	0	0	0	0	100
HT-2 Toxin <sup>1</sup>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	15

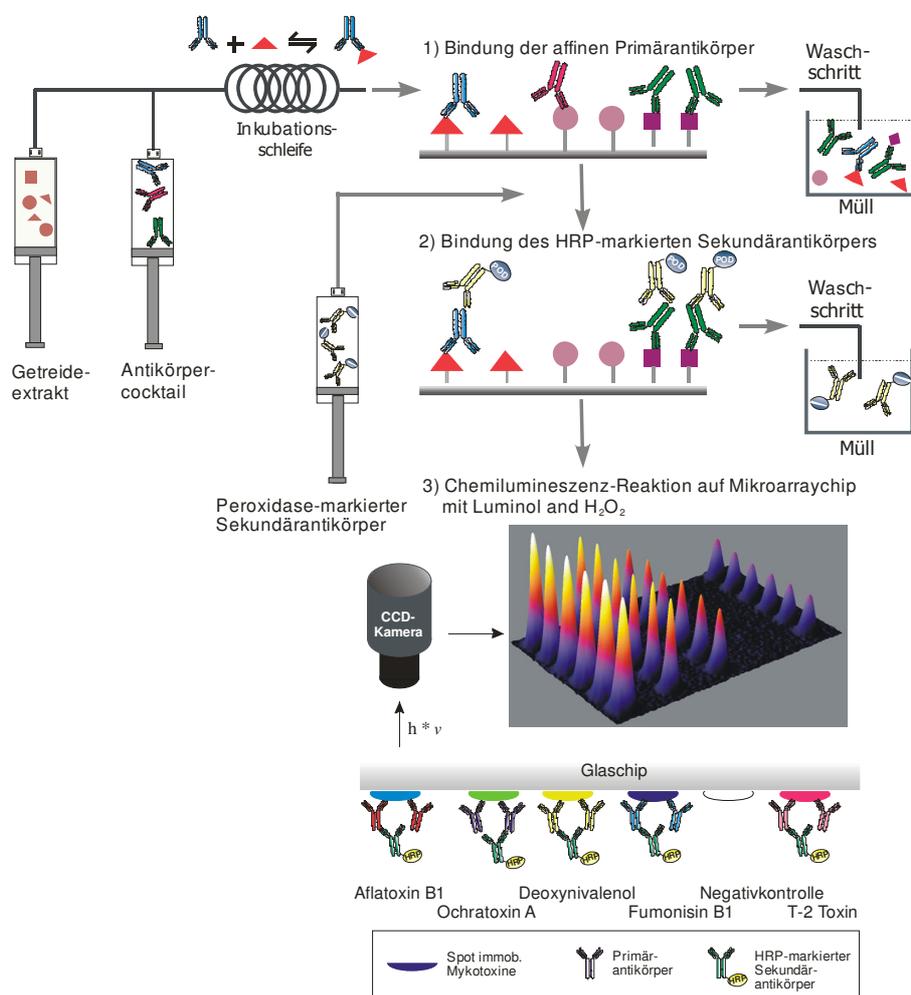
<sup>1</sup> von Dr. R. Dietrich, LMU

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit besaß der mAk 1F2 (anti-AFB1) eine Reaktivität von 103 % zu AFB2. AFG1 und AFG2 besitzen dagegen einen Lactonring anstelle eines Pentanon-Ringes, wodurch die Affinität des Ak auf 78 % bei AFG1 und auf 57 % bei AFG2 sank. Eine Kreuzreaktivität gegenüber OTA, DON, FB1 und T-2 Toxin lag nicht vor. Auch bei den Antikörpern 5G9 (anti-OTA), 1H8 (anti-DON), 1H4 (anti-FB1) und 2E7 (anti-T-2 Toxin) war keine KR messbar, was die Herstellung eines Mikroarray-Chip zur parallelen Detektion mit diesen mAk ermöglicht.

In späteren Experimenten erfolgte die KR-Bestimmung von anti-T2 Toxin-mAk 2E7 auf dem Mikroarray. Hierbei wurde T-2 Toxin-HS immobilisiert und je mit T-2 bzw. HT-2 Toxin-Standards kalibriert. Dabei ergaben sich für HT-2 Toxin eine KR von 14.2 %, wobei T-2 Toxin als 100 % festgelegt wurde. Dieser Wert ist somit mit den Ergebnissen aus dem klassischen ELISA (15 %) nahezu identisch und zeigt die Vergleichbarkeit des Durchfluss-Mikroarrays zu den klassischen ELISAs auf der MTP.

### 1.4 Testentwicklung am MCR 3

Das Testen des Mykotoxin-Mikroarrays erfolgte mit dem am Institut für Wasserchemie entwickelten *Munich Chip Reader 3* (MCR 3). Das Messprinzip in dieser Arbeit basiert, analog dem MTP-Test, auf dem indirekten ELISA-Format, das sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv durchgeführt werden kann. Sämtliche benötigten Reagenzien werden automatisiert über den Mikroarray-Chip geleitet und das Messsignal, das durch eine Meerrettichperoxidase-katalysierte Reaktion erzeugt wird, mittels einer CCD-Kamera ausgelesen. Der Test ist schematisch in Abbildung 25 dargestellt.



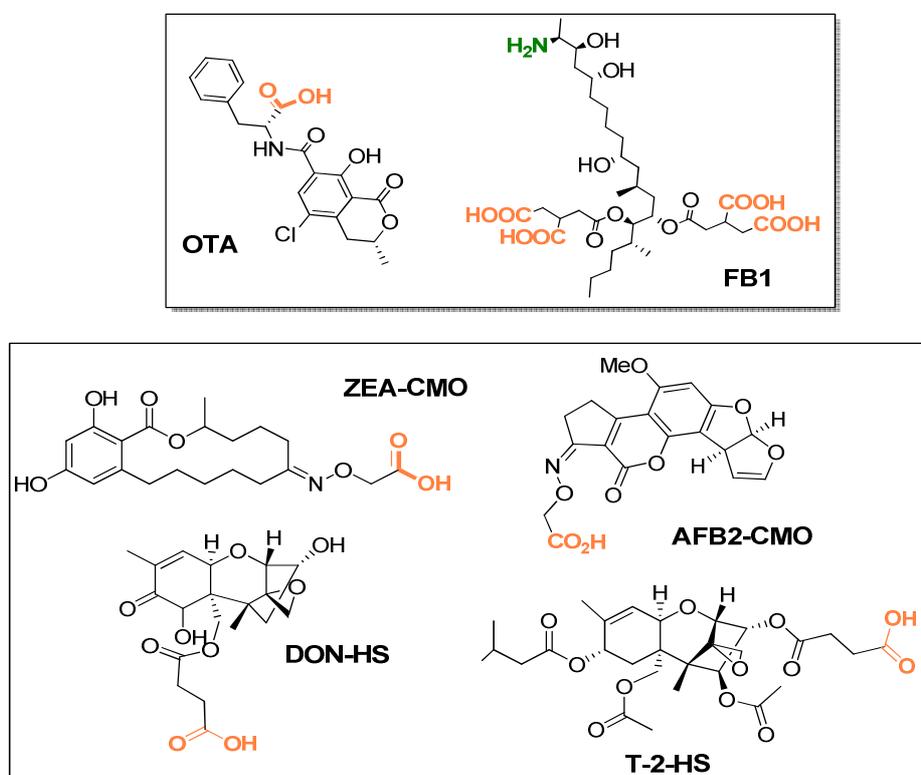
**Abbildung 25:** Schematische Darstellung des indirekt kompetitiven Assays auf dem MCR 3.

Die erhaltenen Text-Dateien wurden mit der Software *Spot Image Processor 0.4* (SIP 0.4, Karsunke Softwarebüro, Wolnzach, Germany) ausgewertet (siehe Kapitel V. 2.5.3). Für die Messung wurde das bereits in Vorarbeiten optimierte Programm eingesetzt, das für eine Messung 11 min benötigt (Sauceda-Friebe, 2011, Karsunke, 2011).

### 1.4.1 Chipherstellung - Vergleich verschiedener Immobilisierungsstrategien

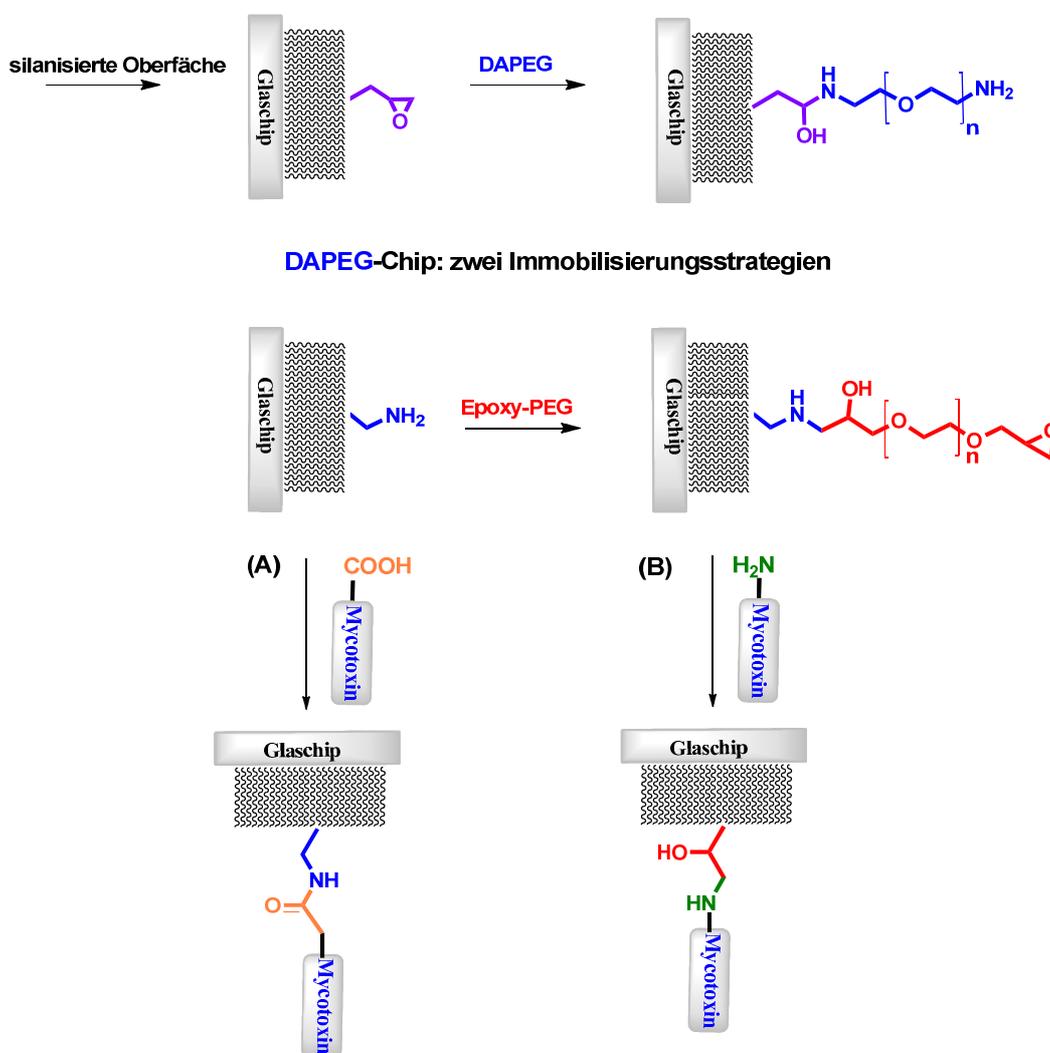
Für die Herstellung eines Mikroarrays wurden zwei Immobilisierungsstrategien genauer untersucht. Entscheidend bei der Anbringung der einzelnen Toxine sollte eine möglichst kovalente Bindung auf der derivatisierten Oberfläche sein, womit sich eine Voraussetzung für die Wiederverwendbarkeit der Chips ergibt. Wie in Kapitel III. 1.1 beschrieben, wurden bisher Epoxy-PEG-aktivierte Chips eingesetzt, um anschließend Mykotoxin-Peptide über terminale Aminogruppen zu binden (Sauceda-Friebe, 2011b). Diese Konjugate hatten sich im Vorfeld für AF und OTA als vorteilhaft erwiesen. Deutlich komplizierter erwies sich jedoch die Synthese entsprechender Verbindungen mit DON bzw. 3-AcDON (siehe Kapitel II. 1.2).

Werden nun die einzelnen Mykotoxine bzw. Mykotoxin-Konjugate, wie in Abbildung 26 dargestellt, genauer betrachtet, zeigt sich, dass OTA und FB1 als koppelbare Funktionalitäten Säuregruppen besitzen. Dagegen wurden ZEA und AFB2 bzw. DON und T-2 Toxin bei der ersten Synthesestufe über die Ketogruppe mit CMO bzw. über die Hydroxylgruppe mittels Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert, also ebenfalls reaktive Carbonsäuregruppen eingeführt.



**Abbildung 26:** Molekulare Strukturen der Mykotoxine. (Oben) OTA und FB1; (Unten) derivatisierte Toxine: ZEA, DON, AFB2 und T-2 Toxin.

Daher ergab sich die Überlegung, die Toxine bzw. Toxin-Derivate alternativ über die Säurefunktion an der modifizierten Oberfläche zu immobilisieren und somit den zweiten Syntheseschritt einzusparen (Anbringung einer terminalen Aminogruppe). Wie in Abbildung 27 aufgezeigt, wurde die PEGylierung der Chip-Oberfläche bereits nach Aufbringung der DAPEG-Schicht abgeschlossen, und die Toxine (FB1, OTA) bzw. Toxinderivate (AFB1/AFB2-CMO, ZEA-CMO, DON-HS, T-2 Toxin-HS) über Carboxylfunktionen als Aktivester gebunden (Abbildung 27, A). Im Vergleich dazu wurden bisher die Toxin-Peptide über die Aminogruppe auf der Epoxy-PEG-Schicht immobilisiert (Abbildung 27, B). Dabei sei erwähnt, dass OTA und FB1 auch ohne Aminogruppen direkt auf die Epoxy-PEG-Schicht gebunden haben. Vermutet wird, dass die Immobilisierung auch hier über die Carboxylgruppen erfolgte.

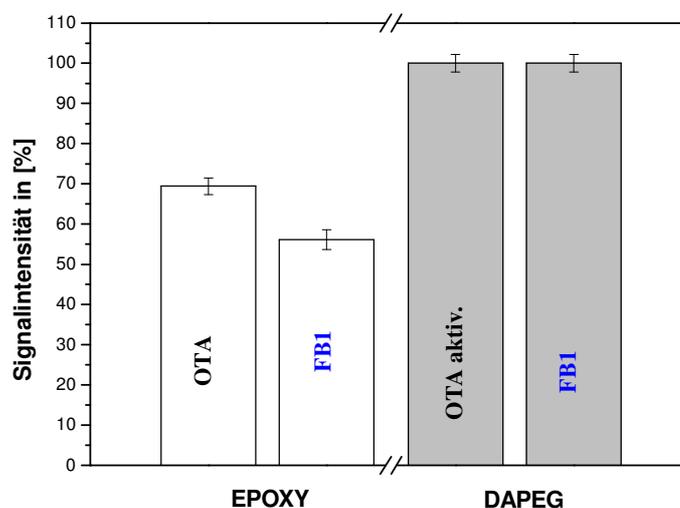


**Abbildung 27:** Modifizierter Glaschip mit (A) DAPEG-Oberfläche und Immobilisierung der Toxine über Carbonsäure; (B) Epoxy-PEG-aktivierte Oberfläche und Immobilisierung über Aminogruppen.

Für die Immobilisierung der säurefunktionalisierten Mykotoxine wurde zunächst ein Aktiv-Spottingpuffer, bestehend aus 69 % Carbonat-Puffer, 30 % DMSO, 1 % Glycerol und zusätzlich mit 10 Äq. (bzgl. Mykotoxin) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 10 Äq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 50  $\mu$ L DIPEA hergestellt. Die Mykotoxine wurden anschließend in den entsprechenden Konzentrationen verdünnt und für drei Stunden bei Raumtemperatur und 100 rpm inkubiert.

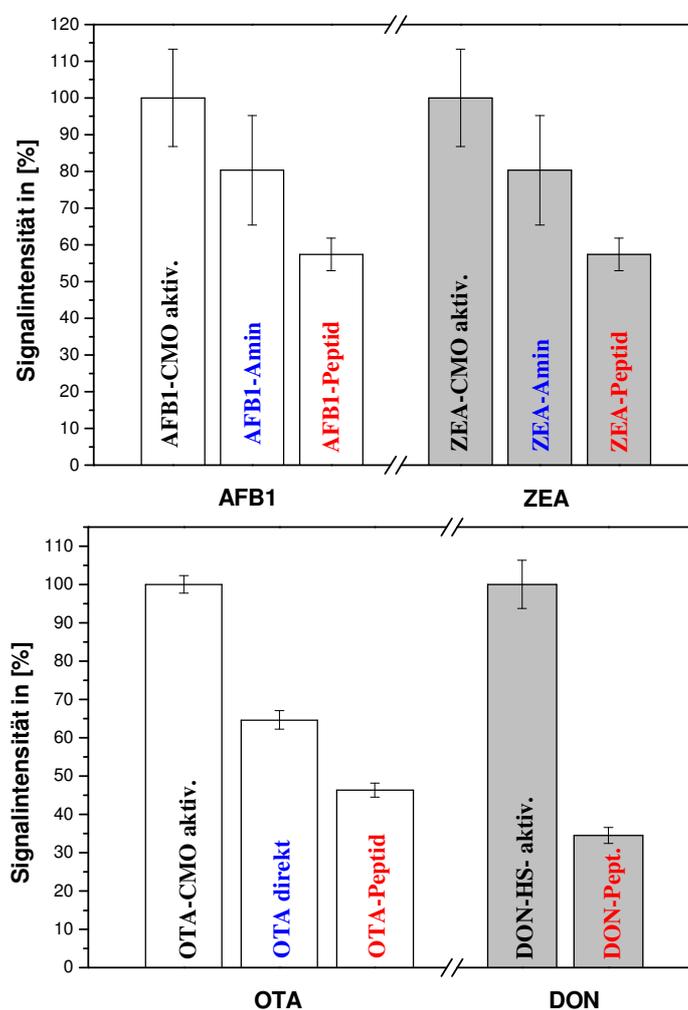
Die Toxine bzw. Toxin-Konjugate wurden mit der *Solid-Pin-Technik* unter Verwendung eines *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer* bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer Temperatur von 15 °C auf die modifizierte Chip-Oberfläche aufgespottet. Dabei taucht beim automatisierten Kontaktverfahren eine Stahlnadel (SN12, Arrayit) in die jeweilige Toxin-Lösung ein, nimmt ein Volumen von 5 nL auf und setzt den Tropfen an einer vorher definierten Stelle auf dem Glaschip ab.

Vorteil bei Verwendung dieser neuen Immobilisierungsstrategie (Abbildung 27, A) ist, neben der direkten Zeit- und Kostenersparnis, der Erhalt signifikant höherer Messsignale. Des Weiteren wird durch punktuelle Aktivierung (nicht ganzer Chip, sondern Aktivierung der Analyten) die Anlagerung von unerwünschten Substanzen während der Inkubationszeit vermieden, sowie eine anschließende Deaktivierung eingespart. In Abbildung 28 sind die Signalintensitäten von FB1 und OTA auf der Epoxy-PEG-Schicht (direkte Bindung) und auf der DAPEG-Oberfläche dargestellt. OTA wurde als Aktivester immobilisiert, während FB1 auf beiden Oberflächen direkt gebunden wurde. Eine Säureaktivierung von FB1 wurde aufgrund einer *intra/inter*-Polymerisation mit der in der eigenen Molekülstruktur vorhandenen Aminogruppe ausgeschlossen.



**Abbildung 28:** Vergleich der Signalintensität von OTA und FB1 auf DAPEG- und Epoxy-PEG-Oberfläche (n = 6, s = 1).

Des Weiteren wurde in Betracht gezogen, dass durch die Anbindung der Toxine über einen „Abstandshalter“ (z.B. Peptide, Amine, aliphatische *Spacer*, etc.) ein höheres Signal erzeugt werden kann. Die Überlegung dabei war, dass die Analyten flexibler und leichter erreichbar für die Antikörper sind. Zudem konnte bei SPR-Biosensoren eine Verbesserung der Signalstärke durch Einführen von Linkern gezeigt werden (Wu, 2002; Yuan, 2009). In Abbildung 29 sind die Signalintensitäten der jeweiligen Toxine bei linkerfreier oder Anbindung über einen kurzen Linker an die Chip-Oberfläche dargestellt. Dabei wurden unter konstanten Bedingungen (Spotting-Konz. und Ak-Konz.) die Signale vom Toxin-Peptid (Toxin-gly-ser-gly-lys) und Toxin mit Ethylendiaminlinker (auf Epoxy-PEG-Schicht) mit den Toxin-Aktivesterkopplungen (auf DAPEG-Schicht) verglichen.



**Abbildung 29:** Vergleich der Signalintensitäten von Toxinen gebunden an ein Peptid bzw. Amin auf einer Epoxy-PEG- und als Aktivester auf der DAPEG-Oberfläche (n = 6, s = 1).

Die höchsten Signalintensitäten wurden wider Erwarten bei den Toxinen mit dem geringsten Abstand zur Oberfläche erhalten. So zeigten die jeweiligen Peptide, gefolgt von den Aminen

auf der Epoxy-PEG-Oberfläche eine niedrigere Signalstärke als die säureaktivierten Toxine auf der DAPEG-Schicht. OTA wurde zusätzlich ohne Aktivierung auf der DAPEG-Oberfläche immobilisiert. Dabei konnte dennoch ein Signal höher als das jeweilige Peptid erzeugt werden. Es sei darauf hingewiesen, dass das generierte Signal von DON-Peptid nur geringfügig vom Hintergrund unterscheidbar war und erst die Aktivierung des DON-HS-Konjugates eine ausreichende Signalintensität für die weiterführenden Experimente lieferte.

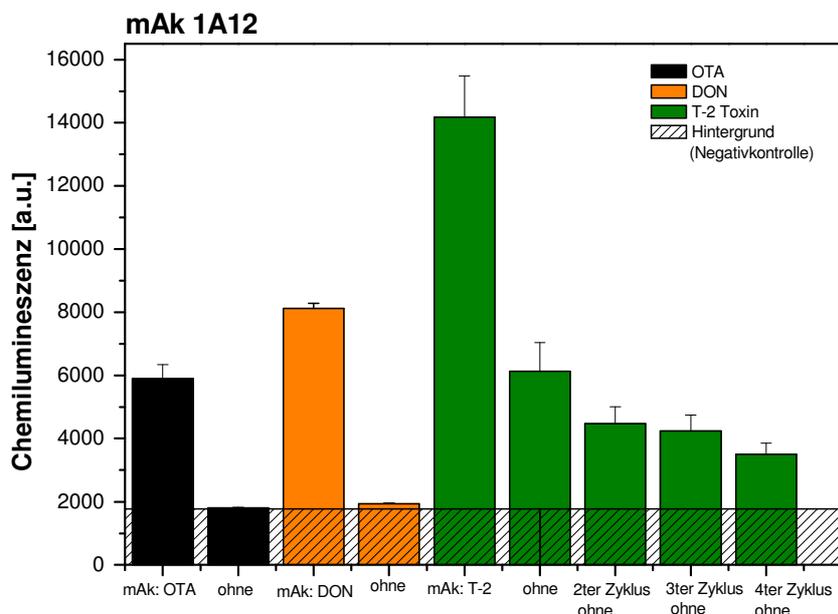
#### **1.4.2 Regenerierbarkeit des Mikroarrays**

Für eine profitable Analysemethode ist es notwendig, möglichst geringe Kosten zu erzeugen. Da die Herstellung der Chips sowie die einzelnen Synthesen der Analyten sehr zeitaufwändig sind, sollten die Glaschips regenerierbar, also wiederverwendbar sein. Dies ermöglicht des Weiteren den Einsatz von nicht speziell geschultem Personal und verbessert somit die Wirtschaftlichkeit dieser Methode. Bisher sind regenerierbare Chips nur bei SPR-Biosensoren bekannt (Tudos, 2003; van der Gaag, 2003).

Durch Regenerationsexperimente sollte zusätzlich die Signalstabilität als Ausdruck einer stabilen (kovalenten) Immobilisierung der Mykotoxine auf der Chip-Oberfläche untersucht werden. Die entscheidenden Kriterien waren die vollständige Entfernung der an die Mykotoxine gebundenen Primärantikörper, ohne dabei die kovalent gebundenen Toxine zu entfernen bzw. strukturell zu verändern, und als Weiteres, die Verhinderung eines *biofouling*s (Anlagerung von Matrixbestandteilen) auf der Oberfläche, die zur Beeinträchtigung der Antikörpererkennung führen können. Als Regenerationslösung wurde ein Glycin-HCl-Puffer (pH 3.0) mit 0.1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt. Das Messprogramm benötigte für einen Zyklus 11 min.

Im ersten Teil dieses Kapitels stand die Selektion eines Ak gegen das T-2 Toxin mit passender Regenerierbarkeit im Vordergrund. Für die restlichen Mykotoxine waren bereits geeignete Ak zur Verfügung gestellt. Dafür wurden in PBS nicht-kompetitive Zyklen (Bestimmung des maximalen Chemilumineszenz-Signals als Maß für eine unbelastete Probe) für OTA, DON und T-2 Toxin gemessen. Für T-2 Toxin standen vier Zellkulturüberstände (ZKÜ) 1A12, 2E7, 3F5 und 3H4 zur Verfügung. Für die Untersuchung des Regenerationsverhaltens wurde für jeden ZKÜ ein eigener Chip verwendet. Auf dem modifizierten Chip waren OTA, DON-HS und T-2 Toxin-HS immobilisiert. Dabei wurden jeweils vier Messungen mit den mAk anti-

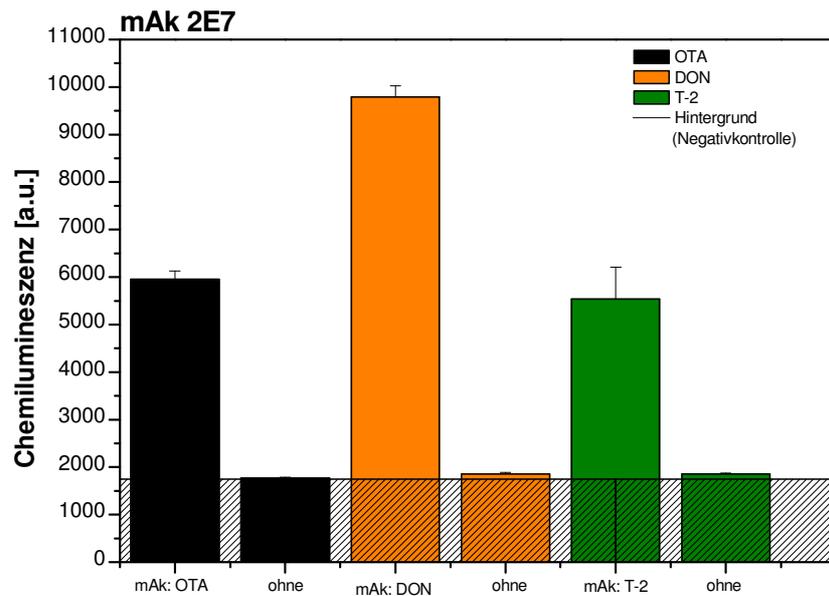
OTA, anti-DON und anti-T-2 Toxin parallel durchgeführt. Anschließend wurde nur Casein ohne Antikörper über den Chip geleitet, was kein Signal erwarten lässt, wenn vollständige Desorption bzw. Regenerierung vorliegt. In Abbildung 30 sind die Signalintensitäten von OTA, DON und T-2 Toxin nach den ersten Messungen mit mAk 1A12 gegen T-2 Toxin dargestellt.



**Abbildung 30:** Vergleich: Regenerationsverhalten der mAk von OTA, DON und T-2 Toxin 1A12 (n = 6, s = 1), mAk: Signal nach Zyklus mit Ak, ohne: Signal nach Zyklus ohne Ak.

Es zeigte sich, dass bei ZKÜ 1A12 im Vergleich mit OTA und DON bei gleicher Konzentration das höchste Signal generiert wurde. Allerdings konnte der mAk 1A12 unter den Regenerationsbedingungen von pH 3.0 mit 0.1 % SDS auch nach vier Messungen (ohne Zusatz von Ak) nicht vollständig von dem an der Oberfläche gebundenen Analyten entfernt werden. Im Vergleich dazu konnte bei den Toxinen OTA und DON bereits nach der ersten Regeneration kein Signal mehr detektiert werden. Der Einsatz des mAk 1A12 für den regenerierbaren Chip war daher ungeeignet. Das gleiche Verhalten, aber mit deutlich niedrigerem Signal (es ist zu bedenken, dass die Absolutwerte nicht von Chip zu Chip übertragbar sind) zeigte auch der mAk 3F5 und ist somit ebenfalls für diese Zielstellung nicht verwendbar.

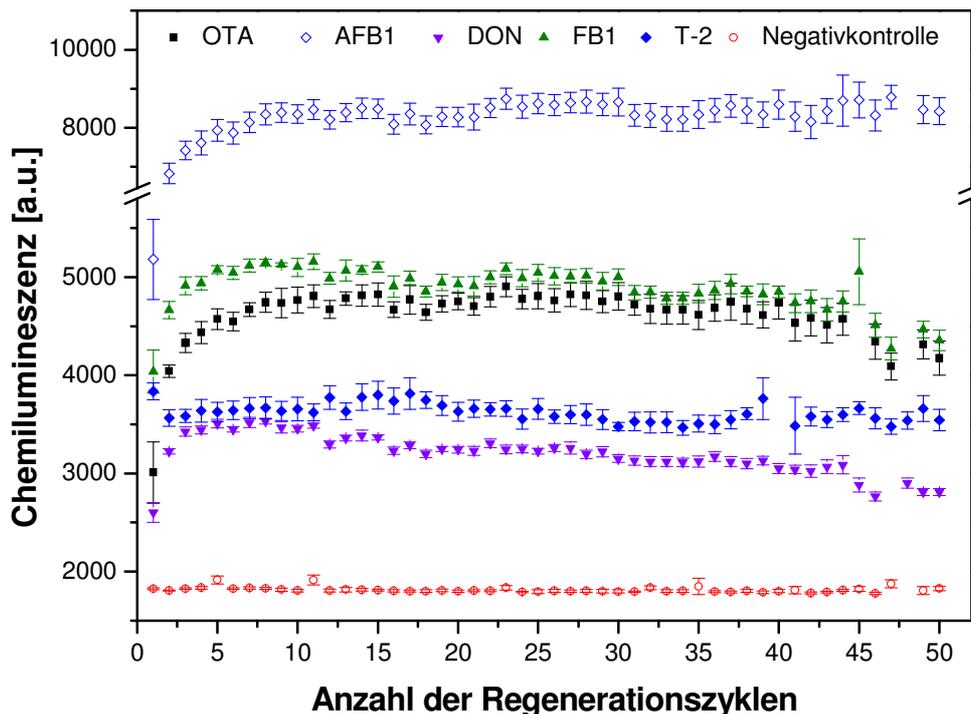
Die ZKÜ 3H4 und 2E7 zeigten dagegen das gewünschte Regenerationsverhalten, also kein Signal nach der ersten Regeneration. Der ZKÜ 3H4 führte bei den Regenerationsmessungen grundsätzlich zu einem deutlich niedrigeren Signal, das minimal vom Hintergrund zu unterscheiden war, und wurde daher nicht weiter verwendet. In Abbildung 31 ist das Regenerationsverhalten von OTA, DON und ZKÜ 2E7 dargestellt.



**Abbildung 31:** Vergleich: Regenerationsverhalten der mAk von OTA, DON und T-2 Toxin 2E7 (n = 6, s = 1), mAk: Signal nach Zyklus mit Ak, ohne: Signal nach Zyklus ohne Ak.

Das beste Regenerationsverhalten wurde dabei bei den ZKÜ gefunden, die ein deutlich geringeres Signal hervorriefen und somit wahrscheinlich eine geringere Affinität aufwiesen. Je höher die Affinität, desto stärker die Bindung zwischen Antikörper und Analyten, und umso schlechter scheint die Regenerierbarkeit. Für die Herstellung von regenerierbaren Chips müssen daher alle verwendeten Ak einzeln getestet und genau untersucht werden. Für FB1 standen zwei mAk (1H4 und 2E5) zur Verfügung, die beide ein geeignetes Regenerationsverhalten zeigten.

Mit den entsprechenden Antikörpern (für FB1 mAk 1H4) erfolgten nun 50 aufeinanderfolgende (automatisierte) nicht-kompetitive Zyklen mit 20 % Methanol in PBS. Es wurde dabei das Regenerationsverhalten von AFB1, OTA, FB1, DON und T-2 Toxin parallel untersucht. Dabei lag die Streuung (Standardabweichung über alle 50 Zyklen) unter 11 % und die Verluste des Signals bei 1 – 11 %. Dies zeigte, dass die hergestellten Mikroarray-Chips wiederverwendbar sind. Zusätzlich wurden 50 Messungen in Hafer-, Weizen-, Maismehl- und Maispolenta-Extrakt (20 % Methanol) durchgeführt, um einen Einfluss von möglichen Matrixbestandteilen oder ein sog. *biofouling* zu untersuchen. In Abbildung 32 sind die 50 Messungen in Weizenmatrix dargestellt. Zu erkennen ist, dass die erste Messung stets niedrigere Werte lieferte und damit die Vermutung nahelegt, dass der Mikroarray-Chip offenbar eine kurze Inkubationsphase (evtl. Quellen der PEG-Schicht) benötigt.



**Abbildung 32:** Untersuchung der Regenerierbarkeit des Mykotoxin-Chips in 20 % Methanol in Weizenmatrix als *Blank* ( $n = 6$ ,  $s = 1$ ).

Bei dem Einsatz von Weizenmatrix lag die Streuung über die 50 Zyklen (Messung 1 wird außer Acht gelassen)  $\leq 9\%$ . Dies ermöglicht nun den Mittelwert (MW) der Signalintensitäten der ersten drei Messungen (2, 3 und 4) mit denen der letzten drei (48, 49 und 50) zu vergleichen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigten immer noch Signalintensitäten von 84 – 103 % für alle Mykotoxine in Weizenmatrix (AFB2: 103 %, OTA: 98 %, DON: 84 %, FB1: 90 % und T-2 Toxin: 97 %). Für die anderen Matrices lagen die Signalverluste mit  $\leq 18\%$  im gleichen Bereich bei einer Streuung der 50 Blankmessungen von  $\leq 11\%$ . In Tabelle 8 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Dabei wurden stets der MW aus den Blankmessungen 2, 3 und 4 mit den MW der letzten 3 Messungen (48, 49 und 50) in Bezug gestellt.

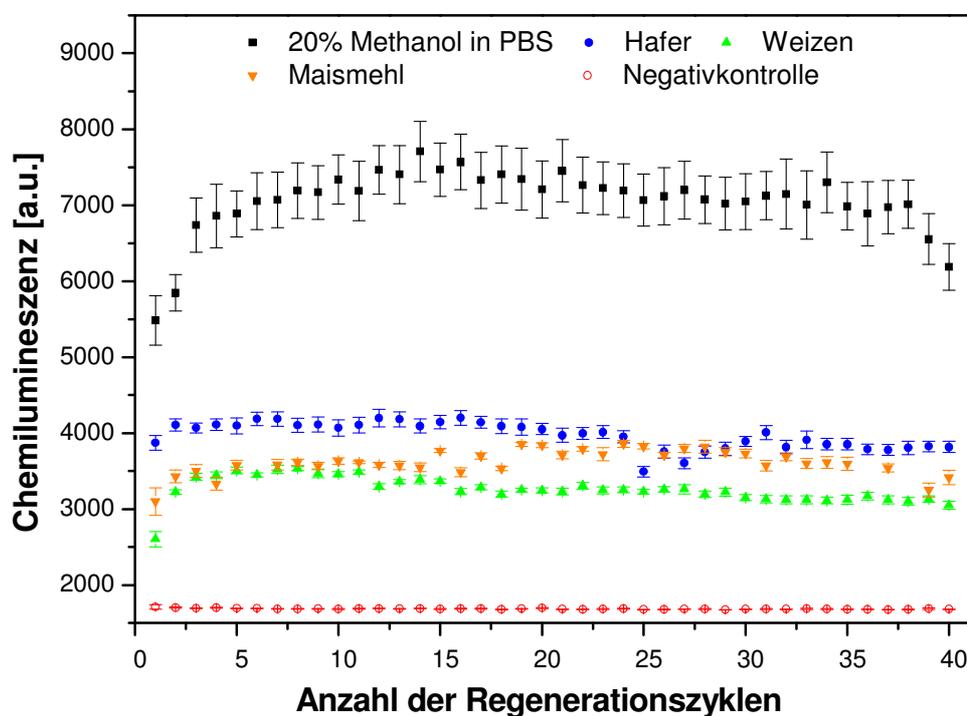
Beim Vergleich verschiedener Matrices war somit kein Unterschied in der Signalstabilität zu beobachten. So zeigte OTA nach 50 Messungen durchschnittlich ein Signal von  $96.55 \pm 1.80\%$ . Der daraus resultierende prozentuale Fehler lag mit 1.87 % für immunologische Methoden sehr niedrig (normalerweise  $\sim 10 - 20\%$ ). Bei AFB1 war das Signal in verschiedenen Matrices bei  $102.14 \pm 8.87\%$  mit einem Fehler von 8.70 %, DON und FB1 zeigten einen rel. Fehler von 7.08 % und 5.14 %. T-2 Toxin hat mit 11.70 % die größte Abweichung, die durch die hohen Signale von 118.65 % bei Hafer und Maismehl zu erklären sind.

**Tabelle 8:** Vergleich der Signale nach 50 nicht-kompetitiven Zyklen in verschiedenen Matrices bei paralleler Messung.

Toxin	Chemilumineszenz-Signal nach 50 Zyklen <sup>1</sup> [%]					
	Aktivester	20 % Methanol in PBS	Hafer	Weizen	Maismehl	Maispolenta
AFB1		111.33	93.97	102.84	92.30	110.27
OTA		95.23	96.49	98.23	94.36	98.46
DON		96.25	92.41	84.42	85.96	99.53
FB1 nicht aktiviert		98.95	87.67	90.22	96.92	96.47
T-2 Toxin		99.99	118.85	97.06	118.65	93.15

<sup>1</sup> MW(Messung 48,49,50)/MW(Messung 2,3,4)\*100 %

In Abbildung 33 sind die verschiedenen Matrixeinflüsse auf das Regenerationsverhalten bzw. die Signalintensität anhand von DON über 40 Zyklen dargestellt.



**Abbildung 33:** Vergleich des Regenerationsverhaltens von DON in verschiedenen Matrices (n = 6, s = 1).

Allerdings wurde ein deutlicher Einfluss der „Getreidematrix“ als solche auf die Signalintensität festgestellt. So zeigte z.B. DON bei 20 % Methanol in PBS ein Signal von 7000 a.u.,

während beim Messen mit Matrix Werte von ca. 3500 a.u. zu beobachten waren. Dieser Einfluss konnte auch bei den anderen Mykotoxinen beobachtet werden. Es bestätigt somit die Notwendigkeit, Matrix-Kalibrierungen für die Quantifizierung von Realproben zu erstellen.

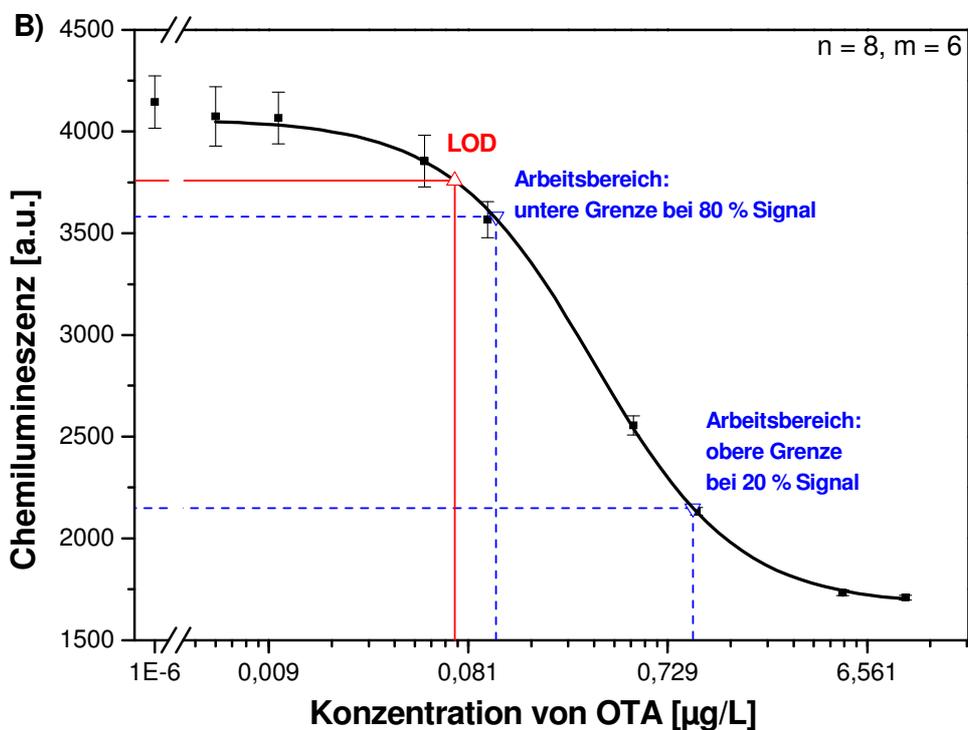
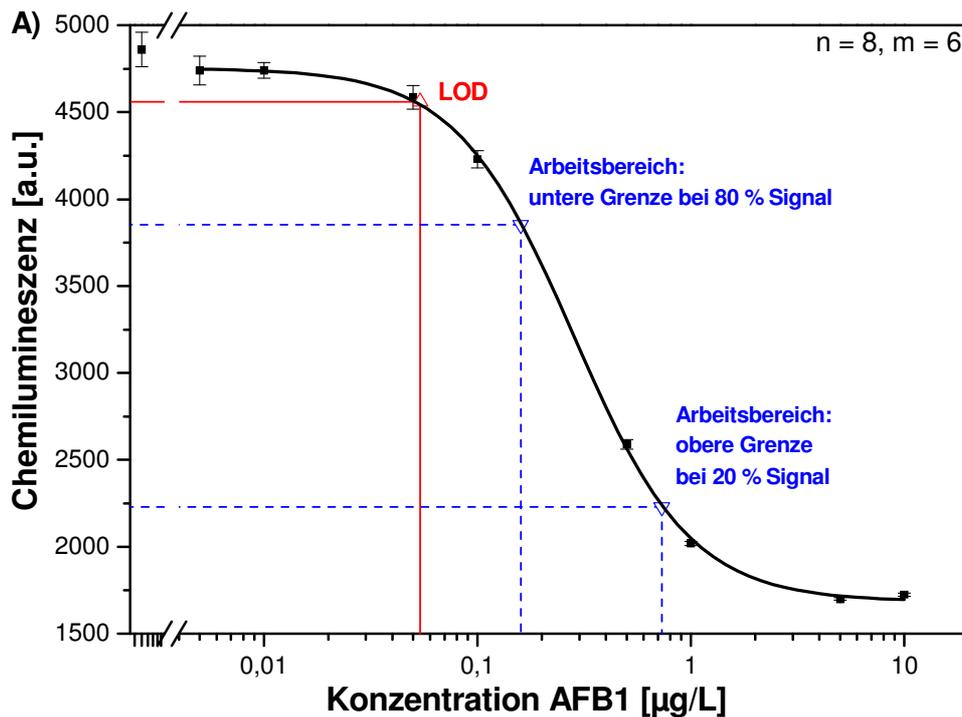
#### 1.4.3 Erstellen von Toxin-Kalibrierungen mittels kompetitiven Immunoassays

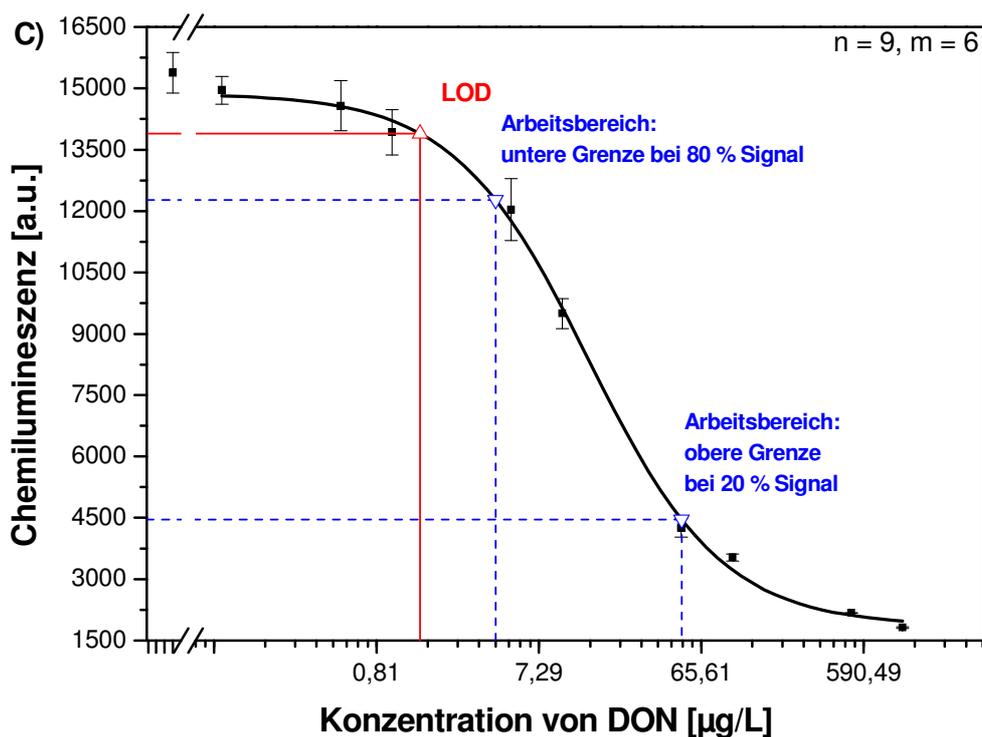
Nachdem die Signalstabilität der immobilisierten Mykotoxine sichergestellt wurde, konnten mittels indirekt kompetitiven Immunoassays erste Kalibrierungen erstellt werden. Hierzu wurden die Verdünnungen für die Kalibrierung nicht mit 20 % Methanol in PBS, sondern mit 20 % Methanol in Hafermatrix erstellt, da nur so eine spätere Quantifizierung von aufgestockten Proben oder natürlich kontaminierten Realproben ermöglicht wird. Ein gewisser Anteil an Methanol muss wegen der unpolaren Mykotoxine zugesetzt werden, um eine vollständige Löslichkeit zu garantieren. Haferschmelzflocken haben sich dabei in Vorversuchen als optimal erwiesen, um auch Proben anderer Getreidearten zu analysieren.

Die Erstellung von Kalibrierlösungen erfolgte wie in Kapitel V. 2.6.1 beschrieben. Die Standards für die Kalibrierungen enthielten folgende Konzentrationen:

- AFB1/OTA: 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1.0, 5.0 und 10.0 µg/L
- DON/T-2 Toxin: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 500.0 und 1000.0 µg/L
- FB1: 0.5, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0, 200.0, 500.0 und 1000.0 µg/L
- HT-2 Toxin: 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 500.0, 1000.0 und 2000.0 µg/L

Es sei darauf hingewiesen, dass durch die Extraktion sowie durch den zweiten Verdünnungsschritt auf 20 % Methanol ein Verdünnungsfaktor von 16 erhalten wurde. Dies führte zu der Schwierigkeit, die ohnehin niedrigen Grenzwerte von AF und OTA von 2.00 – 4.00 µg/kg bzw. 5.00 µg/kg zu erfassen. Daraus leiten sich Werte (*Limits of Quantification*, LOQ) von 0.25 µg/L und 0.31 µg/L für die Kalibrierungen ab, die mit möglichst affinen Antikörpern erreicht werden müssen. Die erhaltenen Kalibrierkurven für AFB1, OTA und DON sind in Abbildung 34 dargestellt.



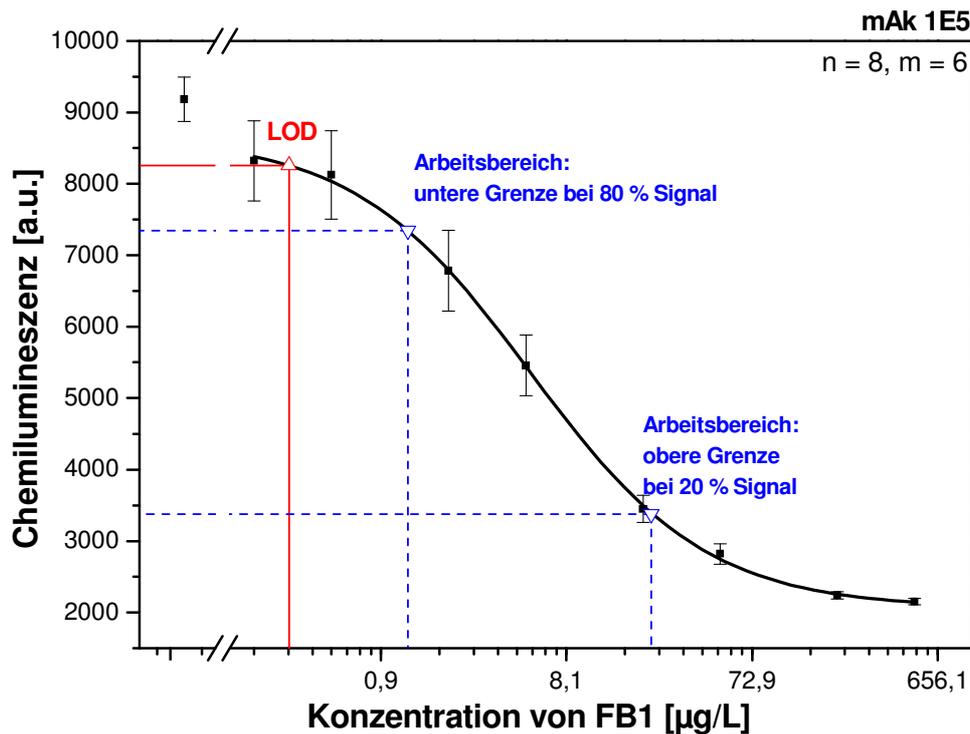


**Abbildung 34:** Kalibrierungen in Hafermatrix für (A) AFB1, (B) OTA und (C) DON, mit berechneter Nachweisgrenze (LOD) und Arbeitsbereich ( $n = 9 - 8$ ;  $m = 6$ ,  $s = 1$ ).

Bei den erhaltenen Parametern lag somit für AFB1 die Nachweisgrenze bei  $0,05 \mu\text{g/L}$  bzw. bei  $0,86 \mu\text{g/kg}$  (nach Einbeziehen des Verdünnungsfaktors) und für OTA bei  $0,07 \mu\text{g/L}$  bzw.  $1,12 \mu\text{g/kg}$ . Die Testmittelpunkte (bei 50 %) mit  $5,45 \mu\text{g/kg}$  für AFB1 und  $5,15 \mu\text{g/kg}$  ermöglichen somit eine Quantifizierung für die Summe der AF und OTA innerhalb der gesetzlichen Grenzwerte. Da der LOD bei AFB1 bei  $0,86 \mu\text{g/kg}$  lag, ergab sich ebenso die Möglichkeit den Grenzwert von AFB1 mit  $2,00 \mu\text{g/kg}$  zu erfassen. Als Arbeitsbereich wurde das Intervall zwischen 80 % und 20 % der oberen Asymptote gewählt. Es wird davon ausgegangen, dass in diesem Bereich eine lineare Abhängigkeit der halblogarithmischen Fitkurve vorliegt. Die Arbeitsbereiche erstreckten sich dabei von  $2,56 - 11,61 \mu\text{g/kg}$  für AFB1 und von  $1,72 - 15,42 \mu\text{g/kg}$  für OTA.

DON und FB1 liegen mit den Höchstmengen von  $750 - 1750 \mu\text{g/kg}$  bzw.  $400 - 4000 \mu\text{g/kg}$  deutlich höher als OTA und AFB1. Für DON wurde eine Nachweisgrenze von  $23,35 \mu\text{g/kg}$  mit einem Testmittelpunkt von  $228,25 \mu\text{g/kg}$  erreicht. Der Arbeitsbereich lag bei  $64,80 - 804,04 \mu\text{g/kg}$ .

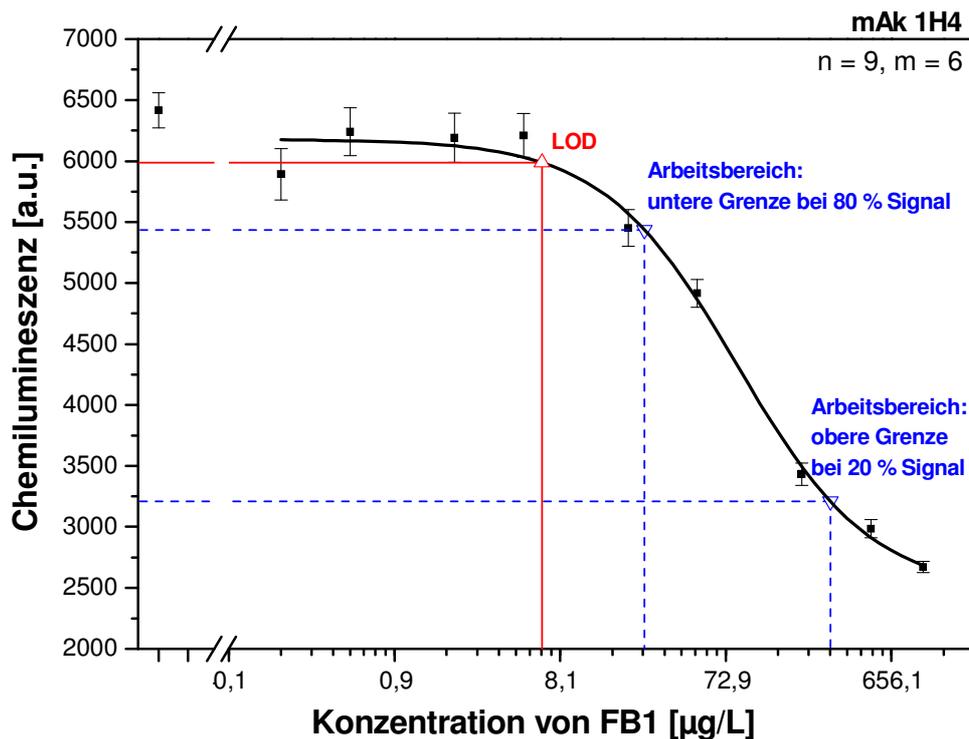
In Abbildung 35 ist die erzeugte Kalibrierkurve in Hafermatrix von FB1 mit  $m\text{Ak } 1\text{E}5$  dargestellt.



**Abbildung 35:** Kalibrierkurve von FB1 mit mAk 1E5, erzeugt in Hafermatrix, mit berechneter Nachweisgrenze (LOD) und Arbeitsbereich ( $n = 8$ ,  $m = 6$ ,  $s = 1$ ).

Für FB1 wurde zunächst der mAk 1E5 zur Kalibrierung eingesetzt. Dabei ergab sich eine Nachweisgrenze von  $0,30 \mu\text{g/L}$  bzw.  $4,84 \mu\text{g/kg}$  und ein Testmittelpunkt von  $5,27 \pm 0,58 \mu\text{g/L}$  bzw.  $84,29 \pm 9,28 \mu\text{g/kg}$ . Da der Arbeitsbereich bei  $19,80 - 354,24 \mu\text{g/kg}$  war, lag sogar der niedrigste Grenzwert von  $400 \mu\text{g/kg}$  außerhalb des messbaren Bereichs der Kalibrierkurve. Um weiterhin mit nur einer Messung die parallele Quantifizierung aller fünf Mykotoxine zu ermöglichen, war eine weitere Verdünnung der Probe keine Option. Weitere Verdünnungen hätten theoretisch noch sensitivere Kalibrierungen, speziell bei OTA und AFB1 ermöglicht, dies schien aber mit den vorhandenen mAk grenzwertig. Daher wurde durch Erhöhung von Ak- und Hapten-Spotting-Konzentration versucht, eine Verschiebung der Kalibrierung zu höheren FB1-Konzentrationen zu erreichen.

Allerdings war der gewünschte Effekt im Vergleich zu den Mehrkosten (durch Verbrauch an Ak und FB1) minimal, so dass ein weiterer Antikörper, nämlich 1H4, für die Kalibrierung eingesetzt und charakterisiert wurde. In Abbildung 36 ist die erhaltene Kalibrierung mit mAk 1H4 in Hafermatrix dargestellt.

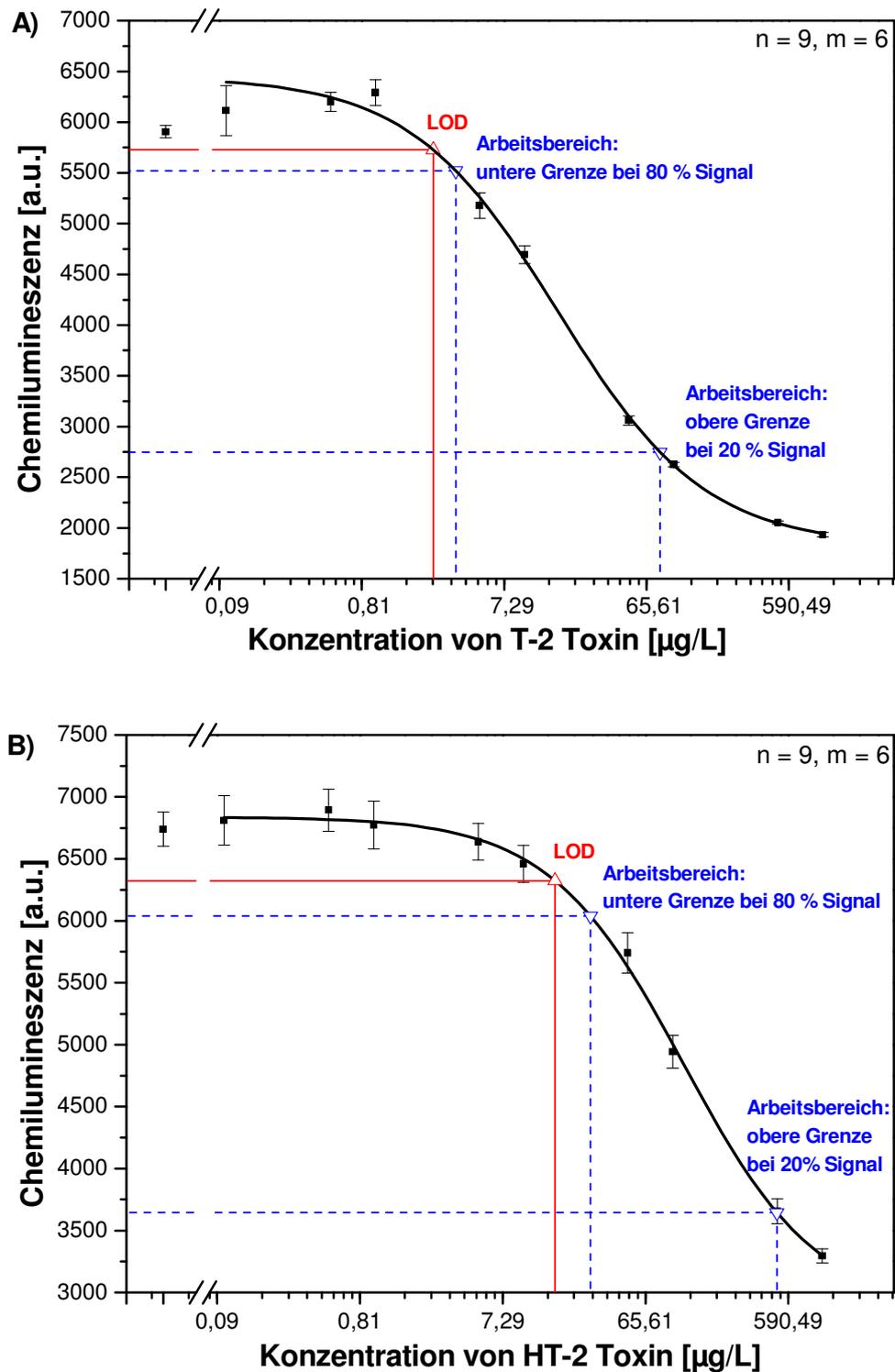


**Abbildung 36:** Kalibrierkurve von FB1 mit mAk 1H4, erzeugt in Hafermatrix, mit berechneter Nachweisgrenze (LOD) und Arbeitsbereich (n = 9, m = 6, s = 1).

Dabei zeigte sich eine deutlich geringere Affinität des Antikörpers zu FB1. So lag die Nachweisgrenze bei 9.92 µg/L bzw. 159.02 µg/kg, der Testmittelpunkt bei 38.13 µg/L bzw. 610.16 µg/kg und der Arbeitsbereich bei 168.02 – 2215.84 µg/kg. Der mAk 1H4 hatte im Gegensatz zu 1E7 eine 7-fach geringere Sensitivität und war somit für unser Testsystem und die geplante Applikation optimal.

Zur Untersuchung und Charakterisierung von mAk 2E7 gegen T-2 Toxin wurden zunächst Kalibrierungen mit T-2-Standards und mit HT-2-Standards hergestellt (Abbildung 37).

Für T-2 Toxin ergab sich eine Nachweisgrenze von 2.44 µg/L bzw. 39.02 µg/kg und ein Testmittelpunkt von 16.72 µg/L bzw. 267.54 µg/kg. Der Arbeitsbereich erstreckte sich somit von 55.29 – 1294.50 µg/kg. Im Vergleich dazu lagen die Nachweisgrenze von HT-2 Toxin mit 256.00 µg/kg, sowie der Testmittelpunkt mit 1891.01 µg/kg bei deutlich höheren Konzentrationen. Der Arbeitsbereich erstreckt sich von 450.17 – 7943.55 µg/kg. Der mAk 2E7 zeigte somit eine deutlich höhere Affinität gegenüber T-2 Toxin als gegenüber HT-2 Toxin. Letzteres unterscheidet sich in einer fehlenden Acetylgruppe am C4-Atom (siehe Kapitel II 1.7).



**Abbildung 37:** Kalibrierkurve (A) von T-2 Toxin und (B) von HT-2 Toxin mit mAk 2E7 (1:5000), erzeugt in Hafermatrix mit berechneter Nachweisgrenze (LOD) und Arbeitsbereich ( $n = 9, m = 6, s = 1$ ).

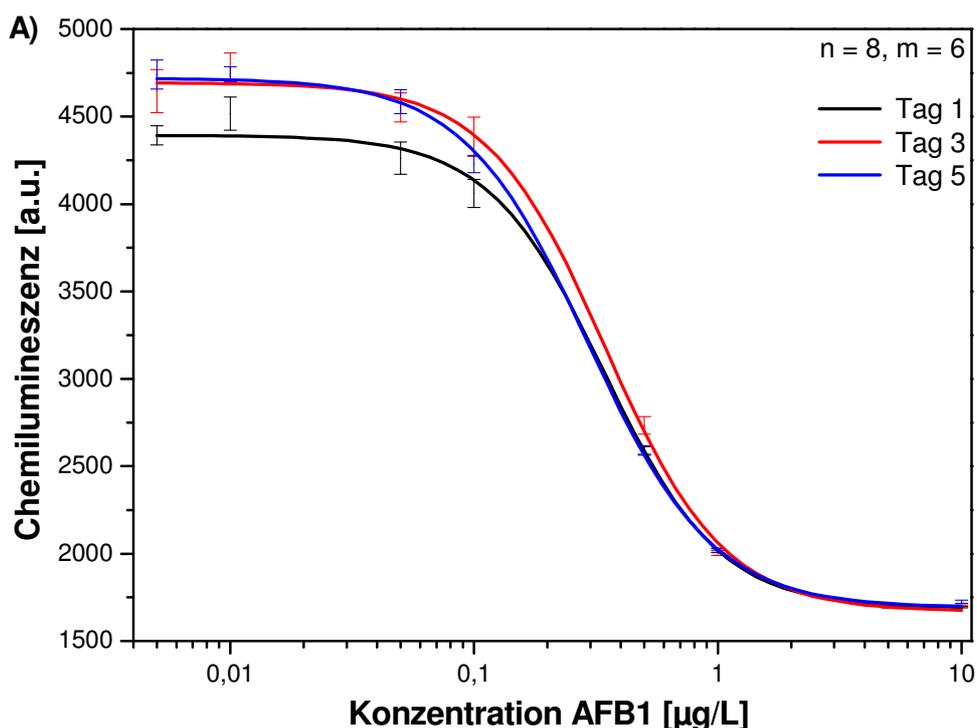
Erstrebenswert wäre es, einen Antikörper einzusetzen, der für die Quantifizierung der Summe von T-2 und HT-2 Toxinen geeignet ist. Für die Fusarientoxine T-2 und HT-2 Toxin sind bis-

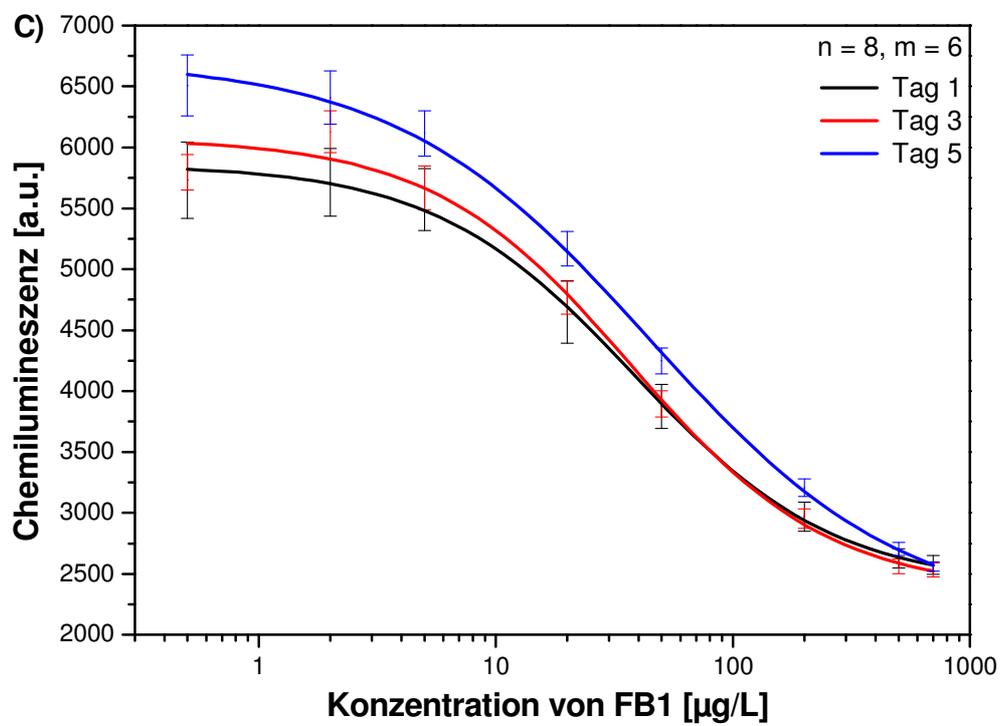
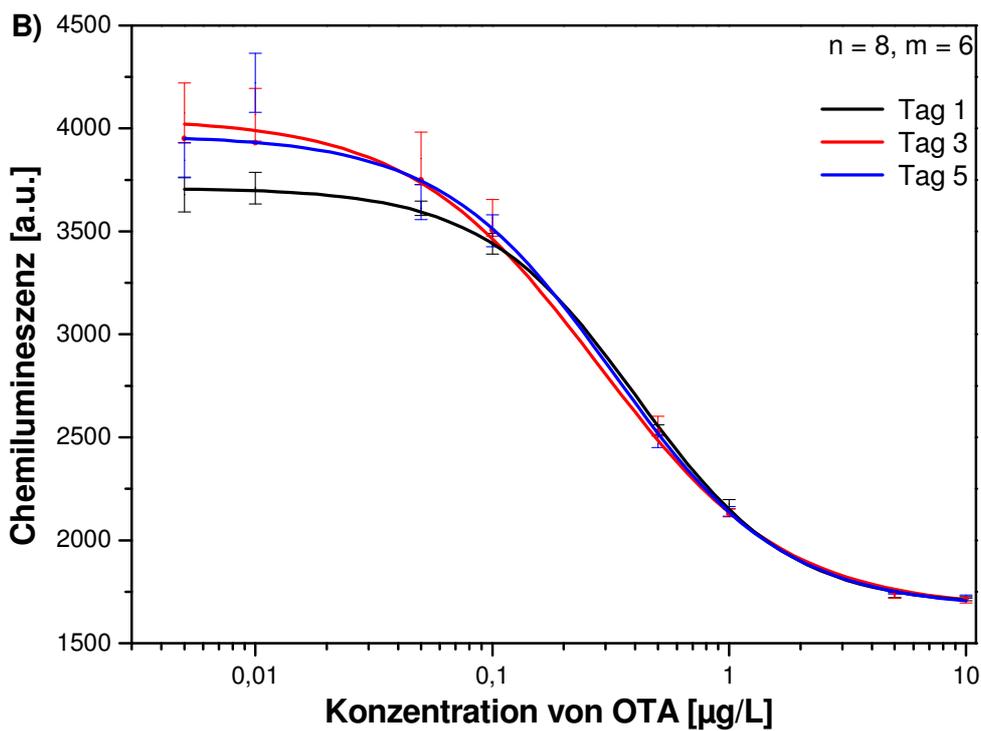
her noch keine gesetzlichen Grenzwerte vorgegeben, wobei allerdings eine Empfehlung der Kommission zur Reduzierung der Toxine in Getreide vorliegt (EU, Empfehlung der Kommission, 2006). Aus den erhaltenen Werten konnte zusätzlich die Kreuzreaktivität (KR), wie in Kapitel III. 1.3 beschrieben, bestimmt werden. HT-2 Toxin wurde aufgrund zu geringer KR (15 %) des vorhandenen mAk nicht weiter untersucht.

In den nachfolgenden Versuchen wurde für T-2 Toxin eine höhere Ak-Verdünnung von 1:10000 gewählt, was eine Verschiebung der Kalibrierparameter zur Folge hatte. Daher lagen die Nachweisgrenze der erhaltenen Kurve bei 27.10 µg/kg, der Testmittelpunkt bei 201.09 µg/kg und der Arbeitsbereich im Intervall von 51.72 – 781.83 µg/kg.

#### 1.4.4 Mehrtages-Studie (interday study)

Nachdem die Kalibrierungen für jeden Analyten bzgl. Spotting- und mAk-Konzentration optimiert wurden, wurde anschließend die Robustheit der Methode getestet. Hierfür wurden innerhalb einer Woche drei Kalibrierungen erstellt (Mehrtages-Studie). Dabei wurden die Chips von derselben Chip- sowie Spotting-Charge eingesetzt. Die Extrakte und Kalibrierverdünnungen wurden je separat und frisch hergestellt (an jedem Messtag). Die Kalibrierkurven sind in Abbildung 38 dar.





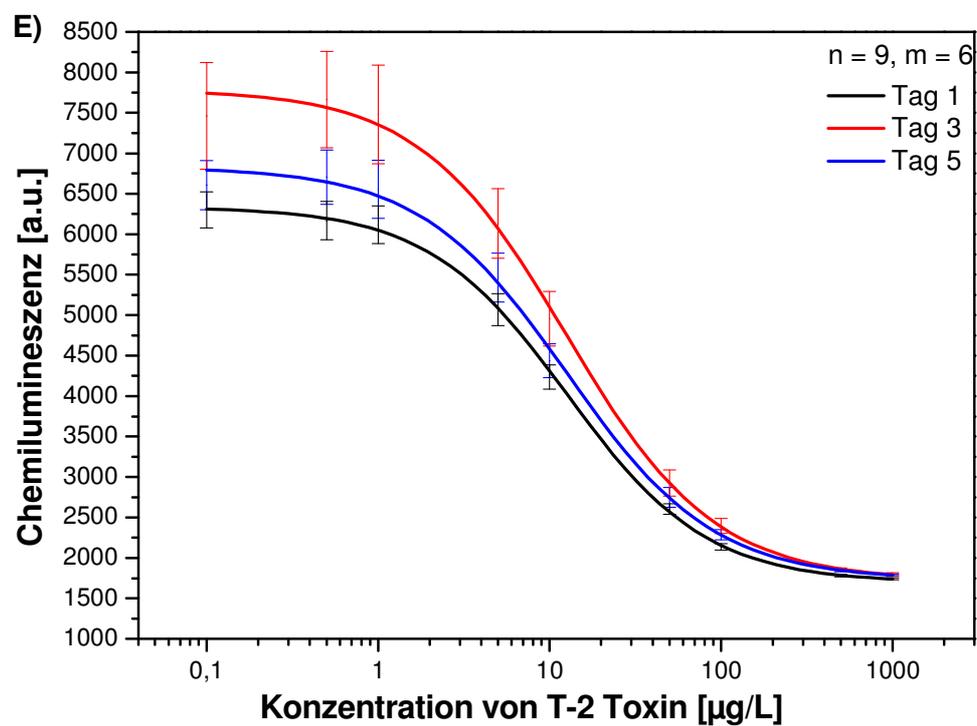
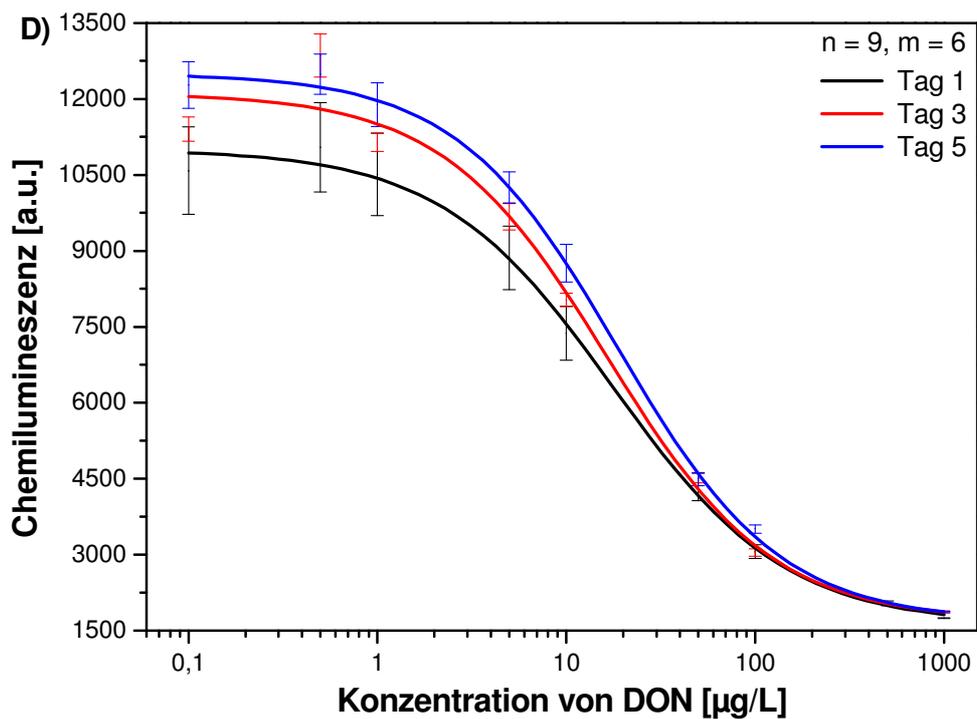


Abbildung 38: Mehrtages-Studie für (A) AFB1, (B) OTA, (C) FB1, (D) DON und (E) T-2 Toxin (n = 8 – 9, m = 6, s = 1).

Es handelt sich dabei um nicht normierte Chemilumineszenz-Signale. Sämtliche Kalibrierkurven zeigten relativ geringe Unterschiede in den maximalen Absorptionen (< 13 %). Dabei

wurden für AFB1 und OTA die geringsten Abweichungen festgestellt. Es fiel auf, dass bei allen vier Mykotoxinen die oberen Asymptoten am Tag ,1‘ am niedrigsten ausfielen, während sie an den Tagen ,3‘ und ,5‘ weitgehend deckungsgleich waren. Ein möglicher Grund für diese Abweichung könnte darin liegen, dass die am Tag ,1‘ gemessenen Chips direkt nach dem Waschen (Desorption von nicht gebundenen Analyten nach 24 h Inkubation) eingesetzt wurden, während die Chips von Tag ,3‘ und ,5‘ im Exsikkator gelagert wurden. Hier wäre somit zu prüfen, ob eine gewisse Lagerzeit (2 – 3 Tage) vor der Analyse zu vergleichbareren Absolutsignalen führt. Die nahezu identischen Signale von Tag ,3‘ und ,5‘, speziell bei OTA und AFB1, lassen schlussfolgern, dass die Chips eine Woche lagerbar sind. Für eine genaue Charakterisierung der Vergleichbarkeit müssen die einzelnen Kurvenparameter, wie in Tabelle 9 zusammengefasst, genauer betrachtet werden.

**Tabelle 9:** Vergleich der Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ) und der Arbeitsbereiche der Kalibrierungen aus der Mehrtages-Studie von AFB1, OTA, FB1 und DON (Interassay-Standardabweichung,  $n = 3$ ,  $s = 1$ ).

	Tag 1	Tag 3	Tag 5	MW
<b>AFB1</b>				
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	5.5	5.5	4.7	<b>5.2 <math>\pm</math> 0.5</b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	2.6 – 11.6	2.5 – 12.0	2.1 – 10.6	<b>2.4 <math>\pm</math> 0.3 – 11.4 <math>\pm</math> 0.7</b>
<b>OTA</b>				
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	5.2	5.2	5.4	<b>5.2 <math>\pm</math> 0.2</b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	1.7 – 15.9	1.7 – 15.4	1.9 – 15.1	<b>1.8 <math>\pm</math> 0.1 – 15.5 <math>\pm</math> 0.4</b>
<b>FB1</b>				
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	612.4	610.2	711.8	<b>644.8 <math>\pm</math> 58.5</b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	159.4 – 2353.3	168.1 – 2215.8	123.7 – 3096.3	<b>150.4 <math>\pm</math> 23.1 – 2555.1 <math>\pm</math> 473.7</b>
<b>DON</b>				
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	282.7	287.9	299.0	<b>289.9 <math>\pm</math> 8.3</b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	66.0 – 1209.9	75.6 – 1097.1	76.2 – 1173.1	<b>72.6 <math>\pm</math> 5.7 – 1160.1 <math>\pm</math> 57.5</b>
<b>T-2 Toxin</b>				
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	201.1	199.9	201.1	<b>200.7 <math>\pm</math> 0.7</b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	51.7 – 781.8	50.9 – 785.6	55.1 – 734.4	<b>52.6 <math>\pm</math> 2.2 – 767.3 <math>\pm</math> 28.6</b>

<sup>1</sup> Linearer Bereich: 80 – 20 % - Signal

Für AFB1 lagen die Standardabweichungen für den IC<sub>50</sub>-Wert sowie für die untere Grenze des Arbeitsbereiches bei 10 % bzw. 13 %. Mit 6 % lag die Abweichung der oberen Grenze des linearen Bereiches geringfügig niedriger. Die Streuung resultiert v.a. aus der niedrigeren Asymptote des Tages ‚1‘. Bei OTA lagen alle Standardabweichungen unter 6 %, wobei der Wert am IC<sub>50</sub> mit 4 % sehr niedrig war und somit eine hohe Reproduzierbarkeit zeigte. FB1 dagegen hatte deutlich höhere Abweichungen von 15 % bei der unteren Grenze bzw. 19 % bei der oberen Grenze des Arbeitsbereiches. Der Grund hierfür lag an der Kalibrierkurve am Tag ‚5‘, die sich in der oberen und unteren Asymptote, sowie in der Lage des Arbeitsbereiches von den anderen zwei Kurven etwas unterscheidet. Bei DON waren die Standardabweichungen für den IC<sub>50</sub>-Wert mit 3 % und der unteren/oberen Grenze des Arbeitsbereiches von 8 % und 5 % ebenfalls sehr klein. Die Mehrtages-Studie zeigte bei T-2 Toxin die geringsten Standardabweichungen. So lag der rel. Fehler für den oberen und unteren Arbeitsbereich unter 4 % und für den IC<sub>50</sub>-Wert von  $200.67 \pm 0.67 \mu\text{g/kg}$  bei unter 1 %.

Dieser Vergleich verdeutlicht die hohe Reproduzierbarkeit der Methode. Zudem lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine Kalibrierung pro Chipcharge bzw. Spotting-Charge ausreichen sollte, und damit ein höherer Probendurchsatz ermöglicht wird. Durch automatisierte Chipherstellung unter Reinraumbedingungen sollten noch deutlich bessere Vergleichbarkeiten erreicht werden.

#### 1.4.5 Messung von dotierten Proben

Um die Methode hinsichtlich ihrer quantitativen Analysefähigkeit zu untersuchen, mussten verschiedene Realproben hergestellt und untersucht werden. Für die Kalibrierung wurde Hafermatrix eingesetzt und zunächst selbst aufgestockte Proben verschiedener Matrices (Hafer-schmelzflocken, Weizenmehl, Roggenmehl und Maispolenta) hergestellt (genaue Beschreibung siehe Kapitel V. V2.6.2). Dabei wurde stets eine *Blank*-Probe (d.h. nicht dotierte Probe) gemessen, um evtl. spezifische Matrixeinflüsse, die bei der Auswertung mit der Kalibrierung zu einer Erhöhung oder Senkung von Mykotoxin-Kontaminationen aufgrund von Signaldifferenzen führen können, auszuschließen. Die Proben wurden so dotiert, dass die Mykotoxin-konzentration um den gesetzlichen Grenzwert bzw. darunter oder darüber lag. Zudem sollte untersucht werden, ob mit einer Hafermatrix-Kalibrierung auch andere Getreideproben quantifiziert werden können (wie in Vorarbeiten bereits mittels indirektem ELISA auf MTP untersucht). Die Proben wurden wie bei der Mehrtages-Studie an drei verschiedenen Tagen frisch

hergestellt, extrahiert und gemessen. Nach Extraktion mit Methanol /Wasser (80/20; v/v) und Verdünnung mit PBS wurden die Wiederfindungsraten (WF) bestimmt, die in Tabelle 10 zunächst für die AF und OTA aufgeführt sind (Karsunke, 2011).

**Tabelle 10:** Vergleich der WF von dotierten Proben mit AF und OTA, bestimmt mit MCR 3 (m = 3, s = 1; Karsunke, 2011).

Matrix	AF			OTA		
	Dotierte Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Gefundene Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	WF [%]	Dotierte Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Gefundene Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	WF [%]
Hafer	0	< 0.9	-	0	< 1.1	-
Hafer	1	1.4 $\pm$ 0.7	<b>140 <math>\pm</math> 70</b>	3	2.6 $\pm$ 0.8	<b>87 <math>\pm</math> 27</b>
Hafer	6	4.3 $\pm$ 0.8	<b>72 <math>\pm</math> 13</b>	7	6.4 $\pm$ 0.7	<b>91 <math>\pm</math> 10</b>
Hafer	6*	7.9 $\pm$ 1.9	<b>132 <math>\pm</math> 32</b>	-	-	-
Weizen	0	< 0.9	-	0	< 1.1	-
Weizen	1	1.5 $\pm$ 0.8	<b>150 <math>\pm</math> 80</b>	3	3.1 $\pm$ 0.8	<b>103 <math>\pm</math> 27</b>
Weizen	6	5.2 $\pm$ 0.5	<b>87 <math>\pm</math> 8</b>	7	8.4 $\pm$ 3.6	<b>120 <math>\pm</math> 51</b>
Weizen	6*	7.7 $\pm$ 0.9	<b>128 <math>\pm</math> 15</b>	-	-	-
Roggen	0	< 0.9	-	0	< 1.1	-
Roggen	1	1.6 $\pm$ 0.7	<b>160 <math>\pm</math> 70</b>	3	3.6 $\pm$ 0.8	<b>120 <math>\pm</math> 27</b>
Roggen	6	4.6 $\pm$ 0.9	<b>77 <math>\pm</math> 15</b>	7	7.0 $\pm$ 0.8	<b>100 <math>\pm</math> 11</b>
Roggen	6*	6.9 $\pm$ 1.2	<b>115 <math>\pm</math> 20</b>	-	-	-

\*: AFB1, B2, G1 und G2 zu je 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dotiert

Die Ergebnisse zeigen, dass alle *Blank*-Proben als solche identifiziert wurden und somit kein getreidespezifischer Einfluss zu beobachten war. Die Konzentrationen lagen unterhalb der Arbeitsgrenze bzw. dem LOD und konnten somit nicht bestimmt werden. Bei den Realproben mit 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  für AFB1 wurden WF von 140 – 160 % gefunden. Diese Überbestimmung kann dadurch erklärt werden, dass die Werte unterhalb der Arbeitsgrenze von 2.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lagen, aber aufgrund des LODs von 0.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  noch bestimmt werden konnten. Bei den aufgestockten Realproben mit 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  AFB1 lag die WF im Bereich zwischen 72 – 87 % und für Proben mit

6 µg/kg für die Summe aller AF lagen die WF zwischen 115 – 132 %. Bei OTA lagen alle WF bei 87 – 120 % und waren somit im typischen Bereich von immunologischen Analysemethoden. In Tabelle 11 sind die bestimmten WF von FB1 und DON zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Vergleich der WF von dotierten Proben mit FB1 und DON, bestimmt mit MCR 3 (m = 3, s = 1).

Matrix	FB1			DON		
	Dotierte Konz. [µg/kg]	Gefundene Konz. [µg/kg]	WF [%]	Dotierte Konz. [µg/kg]	Gefundene Konz. [µg/kg]	WF [%]
Hafer	0	< 159.0	-	0	< 23.4	-
Hafer	800	588 ± 103	<b>74 ± 13</b>	400	268 ± 2	<b>67 ± 0</b>
Hafer	1000	718 ± 71	<b>72 ± 7</b>	750	592 ± 286	<b>79 ± 38</b>
Weizen	0	< 159.0	-	0	< 23.4	-
Weizen	800	444 ± 68	<b>55 ± 8</b>	400	315 ± 25	<b>79 ± 6</b>
Weizen	1000	642 ± 7	<b>64 ± 1</b>	750	1171 ± 151	<b>147 ± 17</b>
Roggen	0	< 159.0	-	0	< 23.4	-
Roggen	800	565 ± 68	<b>71 ± 8</b>	400	230 ± 49	<b>58 ± 13</b>
Roggen	1000	689 ± 93	<b>69 ± 10</b>	750	586 ± 29	<b>78 ± 4</b>
Maispolenta	0	< 159.0	-	0	< 23.4	-
Maispolenta	800	637 ± 110	<b>80 ± 14</b>	400	259 ± 24	<b>65 ± 6</b>
Maispolenta	1000	740 ± 113	<b>74 ± 13</b>	750	502 ± 54	<b>67 ± 7</b>

Bei DON und FB1 zeigten die Wiederfindungsraten, mit Ausnahme einer Weizenprobe (147 %) bei DON, deutliche Unterbestimmungen. So waren die WF bei FB1 von 55 – 80 % in einem ähnlichen Bereich wie die WF von DON mit 58 – 79 %. Da diese beiden Mykotoxine zu den wasserlöslichen, also polaren Substanzen gehören, können sie mit der 80/20 (Methanol/Wasser, v/v) Methode offenbar nicht vollständig aus den Getreideproben herausgelöst werden (siehe Kapitel II 2.1). Diese Unterbestimmungen werden daher auf die Extraktionsmethode zurückgeführt.

Da für T-2 Toxine noch keine festgelegten Grenzwerte existieren, wurden zur Dotierung von Proben Konzentrationen gewählt, die unterhalb bzw. oberhalb des Testmittelpunktes lagen. In Tabelle 12 sind die erhaltenen Werte dargestellt.

**Tabelle 12:** Zusammenfassung der WF von dotierten Proben mit T-2 Toxin, bestimmt mit MCR 3 ( $m = 3, s = 1$ ).

Matrix	T-2 Toxin		
	Dotierte Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Gefundene Konz. [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	WF [%]
Hafer	0	< 27.01	-
Hafer	200	206 $\pm$ 37	<b>103 <math>\pm</math> 19</b>
Hafer	500	520 $\pm$ 120	<b>104 <math>\pm</math> 24</b>
Weizen	0	< 27.01	-
Weizen	200	142 $\pm$ 9	<b>71 <math>\pm</math> 4</b>
Weizen	500	355 $\pm$ 20	<b>71 <math>\pm</math> 6</b>
Roggen	0	< 27.01	-
Roggen	200	210 $\pm$ 35	<b>105 <math>\pm</math> 17</b>
Roggen	500	373 $\pm$ 154	<b>74 <math>\pm</math> 31</b>
Maispolenta	0	< 27.01	-
Maispolenta	200	182 $\pm$ 3	<b>91 <math>\pm</math> 2</b>
Maispolenta	500	472 $\pm$ 136	<b>95 <math>\pm</math> 28</b>

Die erhaltenen WF lagen bei T-2 Toxin mit 71 – 105 % in einem akzeptablen Bereich. Die niedrigsten WF von 71 % wurden dabei bei den Weizenproben erhalten und könnten somit auf einen speziellen Matrixeinfluss auf den Assay bzw. den mAk 2E7 zurückgeführt werden. Diese Vermutung eines Einflusses der Getreidematrix ist nur für T2-Toxin beobachtet und müsste weiter untersucht werden, um z.B. Einflüsse aus der Probenvorbereitung auszuschließen.

Grundsätzlich kann gesagt werden, dass die verschiedenen Getreidematrizes kaum einen erkennbaren Einfluss auf den Assay besaßen und somit alle zu richtigen Ergebnissen führten. Dies konnte u.a. an den mitgeführten *Blank*-Proben gezeigt werden und bestätigt somit, dass eine Kalibrierung mit Haferschmelzflocken eingesetzt werden kann, um auch andere Getreidematrizes zu analysieren.

#### 1.4.6 Validierung mittels Quantifizierung von Realproben

Zur Validierung der Methode wurden neben den selbst aufgestockten Proben weitere, natürlich kontaminierte Realproben untersucht. Es wurden in vorangegangenen Arbeiten zwei zertifizierte Weizenproben für OTA bestimmt. Die *Blank*-Probe ( $\leq 0.6 \mu\text{g/kg}$ ) wurde als solche identifiziert und die WF der zweiten Probe ( $2.7 \pm 1 \mu\text{g/kg}$ ) lag bei  $89 \pm 37 \%$  (Karsunke, 2011). Aufgrund einer neuen Immobilisierungsstrategie, wurden diese Proben nochmals, sowie eine weitere (Trilogy<sup>®</sup> Reference Materials, *R-Biopharm*) gemessen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Bestimmung der OTA-Konzentration in zertifizierten Getreideproben mit dem MCR 3 ( $m = 3 - 6, s = 1$ ).

Matrix	Zertifizierte OTA-Konz. [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Gefundene Konz. [ $\mu\text{g/kg}$ ]	WF [%]
Weizen	blk	$\leq \text{LOD}$	-
Weizen	$2.70 \pm 1.0$	$2.55 \pm 0.15$	<b><math>94.29 \pm 6.02</math></b>
Weizen	$3.2 \pm 0.60$	$5.37 \pm 0.40$	<b><math>167.85 \pm 7.46</math></b>

Die Weizenprobe mit einem zertifizierten Wert von  $3.20 \pm 0.60 \mu\text{g/kg}$  wurde deutlich überbestimmt ( $167.85 \pm 7.46 \mu\text{g/kg}$ ). Dies würde zu einer Grenzwertentscheidung ( $\text{MRL} = 5.00 \mu\text{g/kg}$ ), d.h. einem falsch positiven Ergebnis führen. Aufgrund vorangegangener Ergebnisse wird jedoch ein Einfluss der Matrix auf das Detektionssystem ausgeschlossen. Die *Blank*-Probe wurde auch bei diesem System als nicht belastete Probe analysiert. Für die Weizenprobe mit  $2.70 \pm 1.0 \mu\text{g/kg}$  OTA-Gehalt wurde eine WF von  $94 \pm 6 \%$  bestimmt.

Des Weiteren wurden von *R-Biopharm* (Darmstadt, Deutschland) fünf zertifizierte Getreideproben mit DON-Belastung zur Verfügung gestellt. Die am MCR 3 erhaltenen Konzentrationen sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die dabei erhaltenen WF lagen mit  $86 - 91 \%$

in einem guten Bereich und bestätigten, wie bei den dotierten Proben, den Trend zur Unterbestimmung.

**Tabelle 14:** Bestimmung der DON-Konzentration in zertifizierten Getreideproben mit dem MCR 3 ( $m = 3, s = 1$ ).

<b>Matrix</b>	<b>Zertifizierte DON-Konz. [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<b>Gefundene Konz. [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<b>WF [%]</b>
Weizen	1400 $\pm$ 100	1223.15 $\pm$ 18.00	<b>87.33 <math>\pm</math> 1.53</b>
Weizen	$\leq$ 100	32.42 $\pm$ 7.30	-
Weizen	400 $\pm$ 100	342.74 $\pm$ 36.46	<b>85.67 <math>\pm</math> 9.45</b>
Hafer	$\leq$ 100	$\leq$ 23.35	-
Hafer	500 $\pm$ 100	452.15 $\pm$ 43.11	<b>90.67 <math>\pm</math> 8.50</b>

Darüber hinaus wurden zwei natürlich mit DON kontaminierte Proben von der Heimatsmühle untersucht. Bei der einen Probe handelte es sich um ein hochbelastetes Muster (2580  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), was einen zusätzlichen Verdünnungsschritt zur Folge hatte. Dafür wurde eine Verdünnung von 20 % Methanol in Hafermatrix eingesetzt, denn nur so konnte eine gleichbleibende Matrixzusammensetzung für die Quantifizierung sichergestellt werden. Dabei resultierte eine WF von 136 %, wobei hier noch eine weitere Verdünnung nötig wäre, da sich der erhaltene Wert an der oberen Grenze des Arbeitsbereiches befindet. Die zweite Probe war eine *Blank*-Probe und wurde auch als solche identifiziert.

Zusätzlich zu den zertifizierten Realproben wurde für DON eine *Inter-Labor*-Untersuchung durchgeführt. Dazu wurden mehrere Weizenproben von der Rosenmühle Landshut zur Verfügung gestellt (als Korn und gemahlen) und mit unterschiedlichen Methoden (MCR 3, MTP-ELISA, aokinmycontrol<sup>®</sup> Test, LC-MS) in verschiedenen Labors (IWC, LMU, Rosenmühle Landshut, *muva* Kempten) analysiert. Für die Kalibrierung mit dem MCR 3 wurde, wie bereits erwähnt, Hafermatrix eingesetzt. Somit lagen für jede Probe vier Vergleichsmesswerte vor. Jeweils drei Messwerte wurden mit Antikörper-basierten Tests bestimmt, allerdings mit völlig verschiedenen Testformaten. Diese waren der Durchfluss-Chemilumineszenz-ELISA mit dem MCR 3, ein kompetitiver MTP-ELISA (Dr. Dietrich, LMU; *in-house* entwickelter Immunoassay; beide Labors haben den gleichen anti-DON Antikörper verwendet), ein ki-

netischer Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (Rosenmühle Landshut, mit kommerziell erhältlichem aokinmycontrol<sup>®</sup> Spectrometer FP470) sowie ein chromatographisches Analyssystem mit massenspektrometrischer Detektion (muva Kempten, mit Agilent 1100 series LC/6300 SL ion trap MS und Verwendung von U-[<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]-DON als internem Standard). Alle beteiligten Einrichtungen haben eigene, intern erprobte Extraktionen der Weizenproben durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15:** Zusammenfassung der erhaltenen DON-Konzentrationen aus den *Inter-Labor*-Untersuchungen, bestimmt mit LC/MS, aokinmycontrol<sup>®</sup>, MCR 3 und MTP-ELISA (EIA).

Matrix	DON - Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]				MW [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
	LC-MS (n = 3)	Aokin (n = 1)	MCR 3 (n = 6)	EIA (n = 2)	
Weizenkorn 1	270 $\pm$ 23	647	487 $\pm$ 57	517 $\pm$ 12	<b>480 <math>\pm</math> 156 (33%)</b>
Weizenkorn 2	2542 $\pm$ 190	1843	1485 $\pm$ 47	1475 $\pm$ 184	<b>1836 <math>\pm</math> 501 (27%)</b>
Weizenkorn 3	1300 $\pm$ 79	958	518 $\pm$ 158	890 $\pm$ 89	<b>891 <math>\pm</math> 283 (32%)</b>
Weizenkorn 4	536 $\pm$ 32	886	561 $\pm$ 71	520 $\pm$ 82	<b>626 <math>\pm</math> 174 (28%)</b>
Weizenkorn 5	404 $\pm$ 31	428	346 $\pm$ 44	282 $\pm$ 43	<b>365 <math>\pm</math> 65 (18%)</b>
Weizenkorn 6	813 $\pm$ 83	421	312 $\pm$ 60	548 $\pm$ 226	<b>524 <math>\pm</math> 216 (41%)</b>
Weizenkorn 7	99 $\pm$ 10	347	223 $\pm$ 44	255 $\pm$ 17	<b>231 <math>\pm</math> 103 (44%)</b>
Weizenkorn 8	650 $\pm$ 35	582	627 $\pm$ 104	910 $\pm$ 119	<b>692 <math>\pm</math> 148 (21%)</b>
Weizen gemahlen 1	74	80	52 $\pm$ 12	n.b.	<b>70</b>
Weizen gemahlen 2	134	40	107 $\pm$ 34	n.b.	<b>80</b>
Weizen gemahlen 3	86	120	41 $\pm$ 15	n.b.	<b>48</b>

Ungeachtet einiger Ausreißer wurden ähnliche Messwerte erhalten. Probe ‚2‘ wurde einheitlich als positive Probe (DON-Gehalt über dem MRL = 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) analysiert. Mit Ausnahme der MCR 3-Messung, wurde Probe ‚3‘ von allen anderen Methoden ebenfalls als ‚positiv‘ bewertet. Weitere singuläre MRL-Überschreitungen wurden mittels aokinmycontrol<sup>®</sup>, LC-MS und dem EIA für die Proben ‚4‘, ‚6‘ und ‚8‘ beobachtet, konnten jedoch nicht mit dem

MCR 3 bestätigt werden. Bei der Weizenproben ,1‘ wurden im Vergleich zur chromatographischen Methode mit den immunologischen Techniken etwa doppelt so hohe DON-Werte bestimmt. Auffallend dabei ist, dass alle drei mit einem prozentualen Fehler um 15 % sehr nahe beieinander lagen. Eine Erklärung könnte hierbei ein erhöhter Matrixeinfluss auf die jeweiligen verwendeten immunologischen Methoden (Antikörper) sein oder aber auch ein negativer Einfluss auf die LC-MS-Messung. Beim Vergleich der Mittelwerte der drei Antikörper-basierten Methoden ergeben sich generell Abweichungen von < 31 %, die bei Einbeziehung des chromatographischen Verfahrens teilweise deutlich größer sind (Proben ,6‘ 41 %; ,7‘ 44 %; ,1‘ 33 %). Bei Weizen ,7‘ wurde dagegen im Vergleich zu den LC-MS-Ergebnissen mit den immunologischen Methoden stets eine eindeutige Überbestimmung der DON-Menge festgestellt. So lag die relative Abweichung zwischen den immunologischen Methoden bei 23 %, während unter Berücksichtigung der LC-MS-Daten dieser Wert 44 % erreichte. Die Ursachen für die Abweichungen zwischen den vier Methoden sind u.a. in der Extraktion (z.B. Verwendung von Wasser beim Aokin-Test bzw. des Gemischs Methanol/Wasser 60/40 (v/v) beim MTP-ELISA und 80/20 (v/v) beim MCR 3) und der Extrakt-Aufbereitung (z.B. Verwendung eines SPE-Cleanups beim Aokin-Test bzw. eines Cleanups bei der LC-MS) zu finden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die bereits beschriebene herausragende Bedeutung des Extraktionsmittels. Obwohl sich bei der Bestimmung der WF sowohl bei den dotierten Proben als auch bei den natürlich kontaminierten Realproben gezeigt hat, dass eine Extraktion mit 80/20 (Methanol/Wasser, v/v) für AF und OTA sehr gut geeignet ist, führte diese Extraktionsmethode jedoch bei **FB1** und **DON** zu einer Unterbestimmung der Proben. So ergab sich die Überlegung, einen Extraktionsfaktor zu bestimmen, mit dem die Verluste beim Herauslösen dieser Toxine aus dem Getreide korrigiert werden können.

Die Bedingungen dabei waren zum einen, dass natürlich kontaminierte Proben gemessen wurden, die mit einer bereits validierten Analysemethode (aokinmycontrol<sup>®</sup>) bestimmt wurden. Zum anderen sollten sich die Toxin-Konzentrationen über den gesamten Arbeitsbereich erstrecken. So konnten zunächst für DON die Proben aus der *Inter-Labor*-Studie herangezogen werden, wodurch der erste Punkt der natürlich kontaminierten Proben erfüllt werden konnte. Ebenso wichtig für die Bestimmung des Extraktionskorrekturfaktors ( $E_F$ ) war das Vorliegen von ausreichend Messdaten. Da die dotierten Proben im Vergleich zu den Referenzproben das gleiche Verhalten (Unterbestimmung) lieferten, konnten diese zur Berechnung herangezogen werden und deckten zudem den gesamten Arbeitsbereich ab. Dabei wurden für

die Berechnung 40 Werte einbezogen (19 natürlich kontaminierte Proben; 21 aufgestockte Proben), die mit 7 verschiedenen Chips bzw. an 7 verschiedenen Tagen gemessen wurden. Der erhaltene WF-Mittelwert (bestimmt mit MCR 3) dieser 40 Proben und der daraus resultierende Extraktionskorrekturfaktor sind in der nachfolgenden Gleichung wiedergegeben.

$$\bar{x}_{EF} = 68.3 \pm 12.7 \% \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$E_F = 100 \% / \bar{x}_{EF} = 1.46 \quad (\text{Gleichung 2})$$

$\bar{x}_{EF}$  = Mittelwert über alle Messpunkte ( $s = 1$ ),  $E_F$  = Extraktionskorrekturfaktor

Der ermittelte  $E_F$  für DON betrug somit 1.46. Für FB1 wurden 40 Messungen zur Berechnung verwendet und somit ergab sich ein  $E_F$  von 1.54. In Tabelle 16 sind die erhaltenen DON Konzentrationen, unter (A) nicht-normiert und unter (B) multipliziert mit dem Korrekturfaktor, zusammengefasst.

Die relativen *Inter-Labor*-Fehler bei den immunologischen Methoden lagen unter Einbeziehung der nicht-normierten MCR 3-Werte mit 13 – 31 % recht hoch. Durch die Normierung der erhaltenen DON-Mengen sanken die Standardabweichungen unerheblich bzw. nicht signifikant auf 12 – 28 %. Die MCR 3 - Methode ist bezogen auf DON mit den beiden anderen immunologischen Methoden vergleichbar, was u.a. in den geringeren prozentualen Fehlern resultiert. Bei den gemahlten Proben ,1‘ bis ,3‘ konnten mittels EIA (LMU) aufgrund zu hoher Matrixinterferenzen keine Werte ermittelt werden.

**Tabelle 16:** Zusammenfassung der erhaltenen DON-Konzentrationen aus den *Inter-Labor-*Untersuchungen (Oben) mit nicht-normierten Werten beim MCR 3 und (Unten) mit normierten Werten  $E_F = 1.46$ ; MW aus den immunologischen Methoden.

Matrix	DON-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]				MW <sup>1</sup>		
	LC-MS	Aokin	MCR 3	EIA	[ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
<b>Weizenkorn 1</b>	270	647	487	517	550	$\pm 85$	(15 %)
<b>Weizenkorn 2</b>	2542	1843	1485	1475	1601	$\pm 210$	(13 %)
<b>Weizenkorn 3</b>	1300	958	518	890	788	$\pm 237$	(30 %)
<b>Weizenkorn 4</b>	536	886	561	520	656	$\pm 201$	(31 %)
<b>Weizenkorn 5</b>	404	428	346	282	352	$\pm 73$	(21 %)
<b>Weizenkorn 6</b>	813	421	312	548	427	$\pm 119$	(28 %)
<b>Weizenkorn 7</b>	99	347	223	255	275	$\pm 64$	(23 %)
<b>Weizenkorn 8</b>	650	582	627	910	706	$\pm 178$	(25 %)
<b>Weizen gemahlen 1</b>	74	80	52	n.b.	-		
<b>Weizen gemahlen 2</b>	134	40	107	n.b.	-		
<b>Weizen gemahlen 3</b>	86	120	41	n.b.	-		

Matrix	DON-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]				MW <sup>1</sup>		
	LC-MS	Aokin	MCR 3	EIA	[ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
<b>Weizenkorn 1</b>	270	647	711	517	625	$\pm 99$	(16 %)
<b>Weizenkorn 2</b>	2542	1843	2168	1475	1892	$\pm 347$	(19 %)
<b>Weizenkorn 3</b>	1300	958	756	890	868	$\pm 103$	(12 %)
<b>Weizenkorn 4</b>	536	886	819	520	742	$\pm 195$	(26 %)
<b>Weizenkorn 5</b>	404	428	505	282	405	$\pm 113$	(28 %)
<b>Weizenkorn 6</b>	813	421	456	548	479	$\pm 66$	(14 %)
<b>Weizenkorn 7</b>	99	347	326	255	309	$\pm 48$	(16 %)
<b>Weizenkorn 8</b>	650	582	915	910	802	$\pm 191$	(24 %)
<b>Weizen gemahlen 1</b>	74	80	76	n.b.	-		
<b>Weizen gemahlen 2</b>	134	40	156	n.b.	-		
<b>Weizen gemahlen 3</b>	86	120	60	n.b.	-		

<sup>1</sup> MW aus immunologischen Methoden

Die nun auf LC-MS bezogenen WF mit MCR 3 werden mittels eines Korrekturfaktors  $E_F = 1.46$  erhöht. Siehe dazu die Zusammenfassung in Tabelle 17.

**Tabelle 17:** Zusammenfassung der erhaltenen DON-Konzentrationen und berechneten WF mit nicht normierten und normierten Werten ( $E_F = 1.46$ ) am MCR 3.

Matrix	DON-Konz. (LC-MS) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	MCR 3 nicht normiert		MCR 3 normiert $E_F = 1.46$	
		DON-Konz.	WF	DON-Konz.	WF
		[ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	[%]
<b>Weizenkorn 1</b>	270	487 $\pm$ 57	<b>180 <math>\pm</math> 21</b>	711 $\pm$ 83	<b>263 <math>\pm</math> 31</b>
<b>Weizenkorn 2</b>	2542	1485 $\pm$ 47	<b>58 <math>\pm</math> 2</b>	2168 $\pm$ 69	<b>85 <math>\pm</math> 3</b>
<b>Weizenkorn 3</b>	1300	518 $\pm$ 158	<b>40 <math>\pm</math> 12</b>	756 $\pm$ 231	<b>58 <math>\pm</math> 18</b>
<b>Weizenkorn 4</b>	536	561 $\pm$ 71	<b>105 <math>\pm</math> 13</b>	819 $\pm$ 104	<b>153 <math>\pm</math> 19</b>
<b>Weizenkorn 5</b>	404	346 $\pm$ 44	<b>86 <math>\pm</math> 11</b>	505 $\pm$ 64	<b>125 <math>\pm</math> 16</b>
<b>Weizenkorn 6</b>	813	312 $\pm$ 60	<b>38 <math>\pm</math> 7</b>	456 $\pm$ 88	<b>56 <math>\pm</math> 11</b>
<b>Weizenkorn 7</b>	99	223 $\pm$ 44	<b>225 <math>\pm</math> 44</b>	326 $\pm$ 64	<b>329 <math>\pm</math> 65</b>
<b>Weizenkorn 8</b>	650	627 $\pm$ 104	<b>96 <math>\pm</math> 16</b>	915 $\pm$ 152	<b>141 <math>\pm</math> 23</b>
<b>Weizen gemahlen 1</b>	74	52 $\pm$ 12	<b>70 <math>\pm</math> 16</b>	76 $\pm$ 18	<b>103 <math>\pm</math> 24</b>
<b>Weizen gemahlen 2</b>	134	107 $\pm$ 34	<b>80 <math>\pm</math> 25</b>	156 $\pm$ 50	<b>117 <math>\pm</math> 37</b>
<b>Weizen gemahlen 3</b>	86	41 $\pm$ 15	<b>48 <math>\pm</math> 17</b>	60 $\pm$ 22	<b>70 <math>\pm</math> 25</b>

In Bezug zu den LC-MS-Ergebnissen ergaben sich somit für den MCR 3 nach der Korrektur für Weizenkorn ,2‘, ,3‘, ,5‘ und ,6‘, sowie für die gemahlene Weizen nun WF von 56 – 125 %. Für Weizenkorn ,1‘ lag mit 263 % eine deutliche Überstimmung vor. Für Weizenkorn ,4‘ und ,8‘ fiel die Überbestimmung mit 141 – 153 % etwas geringer aus. Weizen ,7‘ wird außer Acht gelassen, da vermutet wird, dass der LC-MS-Wert von 99  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nicht der tatsächlichen Konzentration entspricht (evtl. Fehler in der Probenvorbereitung oder Matrixeffekt).

Durch die Normierung konnten die WF erhöht werden (vgl. vor Normierung: Weizenkorn ,2‘, ,3‘, ,5‘ und ,6‘, sowie Weizen gemahlen bei 38 – 86 %; Weizen ,1‘ bei 180 %; Weizen ,4‘ und ,8‘ bei 96 – 105 %).

Für FB1 wurden die dotierten Proben mit dem Korrekturfaktor multipliziert, die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18:** Zusammenfassung der erhaltenen FB1-Konzentrationen und berechneten WF mit nicht normierten und normierten Werten ( $E_F = 1.54$ ) am MCR 3.

Matrix	FB1-Dotiert [µg/kg]	MCR 3 nicht normiert		MCR 3 normiert $E_F = 1.54$	
		FB1-Konz. [µg/kg]	WF [%]	FB1-Konz. [µg/kg]	WF [%]
Hafer	800	660 ± 40	82 ± 5	1013 ± 60	127 ± 8
Hafer	1000	758 ± 48	76 ± 5	1173 ± 74	117 ± 8
Weizen	800	491 ± 44	61 ± 5	753 ± 68	94 ± 8
Weizen	1000	639 ± 39	64 ± 4	988 ± 60	99 ± 6
Roggen	800	587 ± 50	73 ± 6	902 ± 77	113 ± 9
Roggen	1000	627 ± 35	63 ± 3	973 ± 72	97 ± 5
Maispolenta	800	735 ± 47	92 ± 6	1136 ± 72	142 ± 9
Maispolenta	1000	577 ± 37	58 ± 4	895 ± 57	90 ± 6
Maismehl	800	485 ± 33	61 ± 4	753 ± 51	94 ± 6
Maismehl	1000	666 ± 47	67 ± 5	1034 ± 72	103 ± 8

Bei FB1 konnten nun WF von 90 – 142 % anstelle der WF ohne den Korrekturfaktor von 58 – 92 % berechnet werden. Der Faktor führte somit, wie bei DON, zur Erhöhung der Konzentrationswerte, d.h. der Reduzierung von Unterbestimmungen.

Des Weiteren wurden Messungen zur Darstellung eines Multiplexen-Mikroarrays durchgeführt. Zertifizierte Proben, die mit allen fünf Mykotoxinen gleichzeitig kontaminiert und analysiert wurden, konnten nicht erworben werden. Neu erhältlich ist zwar eine kontaminierte referenzierte Weizenprobe mit DON, Nivalenol und ZEA, die aber für unseren entwickelten Chip keinen Mehrwert bringt (Köppen, 2013), da nur DON quantifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden die vorher genannten zertifizierten Proben von *R-Biopharm* herangezogen. Dabei wurden alle sechs Proben nicht nur auf die DON-Konzentrationen untersucht (die Werte dienen zugleich als Kontrolle), sondern auf alle fünf Mykotoxine gleichzeitig (pa-

rallel) analysiert. In Tabelle 19 sind die dabei erhaltenen Werte dargestellt. Zusätzlich wurden DON und FB1 jeweils mit dem Extraktions-Korrekturfaktor  $E_F$  korrigiert.

**Tabelle 19:** Ergebnisse des parallelen Multiplex-Assays anhand von zertifizierten Getreideproben (nur für DON) von *R-Biopharm* ( $m = 3, s = 1$ ).

Matrix	Referenzmaterial	Gefundene Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]				
		DON	OTA	T-2 Toxin	FB1	AFB1
Weizen	<b>1400 ± 100</b>	1223.15 ± 18.00	≤ 1.12	≤ 40.00	≤ 159.02	
		<b>1785.80 ± 26.28</b>	(0.48 ± 0.31)	34.50 ± 2.65	41.88	≤ 0.86
Weizen	≤ 100	≤ 23.35	2.54 ± 0.19	44.47 ± 18.56	≤ 159.02	
		(34.30 ± 8.25)			49.09	≤ 0.86
Weizen	<b>400 ± 100</b>	342.74 ± 36.40	2.32 ± 0.45	48.55 ± 17.25	≤ 159.02	
		<b>500 ± 53.14</b>			58.50	≤ 0.86
Hafer	≤ 100	≤ 23.35	1.68 ± 0.24	≤ 40.00	≤ 159.02	
		(11.59)			87.57	≤ 0.86
Hafer	<b>500 ± 100</b>	452.15 ± 43.11	2.31 ± 0.19	45.34 ± 18.36	≤ 159.02	
		<b>660.14 ± 62.91</b>			109.10	≤ 0.86

$E_F(\text{DON}) = 1.46$

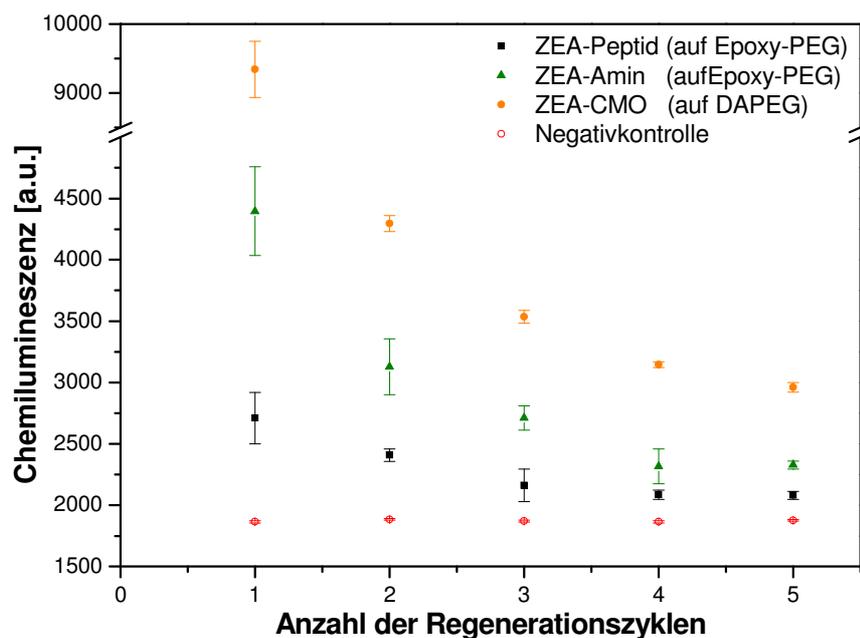
$E_F(\text{FB1}) = 1.54$

Die WF für DON lagen nach Einbeziehen des Korrekturfaktors bei 125 – 132 % (vor Normierung bei 86 – 90 %). In diesem Fall führte bei DON die Einbeziehung des Korrekturfaktors zu zu einer leichten Überbestimmung. Alle Proben wurden mit dem MCR 3 als AF-frei ( $\leq \text{LOD}$ ) analysiert. OTA lag zwar mit max. 2.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  unter dem gesetzlichen Grenzwert (5.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), wurde allerdings in allen sechs Proben nachgewiesen. Die erhaltenen Konzentrationen von T-2 Toxin lagen bei 34.50 – 48.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dabei sei darauf hingewiesen, dass hier nur die Mengen an T-2 Toxin bestimmt wurden, der tatsächliche Gehalt an HT-2/T-2 Toxin kann diesen Wert überschreiten und verdeutlicht daher die Notwendigkeit eines gesetzlich festgelegten Grenzwertes, der beide Toxine umfasst. FB1 wurde stets unterhalb der Nachweisgrenze bestimmt. Die gemessenen Proben wurden nur bezüglich ihres DON-Gehaltes zertifiziert und liefern daher keine Aussage über die Belastung anderer Mykotoxine.

Dieses Experiment verdeutlicht dennoch die Möglichkeit, mehrere Mykotoxine parallel zu untersuchen.

#### 1.4.7 Messungen mit ZEA

Für einen vollständigen Getreide-Mykotoxin-Chip sollte auch ZEA immobilisiert werden. Hierbei gab es bereits bei Vorarbeiten Schwierigkeiten im Regenerationsverhalten. So sank das CL-Signal nach nur fünf Messungen bis nahezu auf die Negativkontrolle ab. Chemische Veränderungen wie Oxidation oder Reduktion von funktionellen Gruppen wurden bereits ausgeschlossen (Karsunke, 2011). Das ZEA wurde zu Beginn mittels eines Peptids (lys-gly-ser-gly-Hapten) auf der Oberfläche immobilisiert. Um Einflüsse durch die Bindung und den Linker auf die Reaktionskinetik auszuschließen, wurde des weiteren ZEA über ein Amin an die Epoxy-PEG- bzw. als Aktivester (ZEA-CMO) an die DAPEG-Oberfläche gebunden. Eine Verbesserung des Regenerationsverhaltens konnte so jedoch nicht erreicht werden (Abbildung 39). Zusätzlich wurden neben dem von der LMU erhaltenen monoklonalen Antikörper 1B11 auch kommerziell erworbene Antikörper von der Fa. Aokin (aokin-anti ZEA) und 11C9 von der Fa. *Antibodies-online* getestet. Es sei dabei darauf hingewiesen, dass alle Antikörper über ein Immunogen hergestellt wurden, das über die Carbonylgruppe am C6 (siehe Kapitel II. 1.6) an ein Protein gebunden wurde (Nachfrage beim Hersteller).

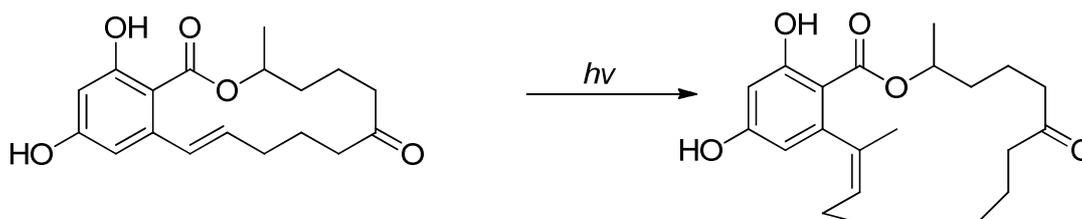


**Abbildung 39:** Regenerationsverhalten von ZEA-Peptid und ZEA-Amin auf der Epoxy-PEG- und von ZEA-CMO als Aktivester auf der DAPEG-Oberfläche (n = 5, m = 6, s = 1).

Eine Desorption von der Chip-Oberfläche oder eine Deaktivierung des Analyten durch eines der eingesetzten Reagenzien wäre eine mögliche Ursache für den Signalabfall. Daher wurden die Chips 24 h in den für den MCR 3 eingesetzten Reagenzien bzw. Lösungsmitteln auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden diese, sowie ein nicht vorinkubierter Chip (Referenzchip) am MCR 3 gemessen und die jeweils ersten Signalintensitäten miteinander verglichen. Bei einer Einwirkung auf den Analyten, die zu einer Inaktivierung führt, oder bei einer nicht kovalenten Bindung des Analyten auf der Chip-Oberfläche, sollte das Anfangssignal deutlich niedriger bzw. gar nicht vorhanden sein. Es zeigte sich jedoch kein nennenswerter Unterschied. Zusätzlich wurde ein kinetischer Effekt am MCR 3 ausgeschlossen, indem dort ohne Zugabe des Primärantikörpers zehn Messungen gefahren wurden und im Anschluss erneut ein vergleichbar hohes Signal wie beim Referenzchip erzeugt werden konnte.

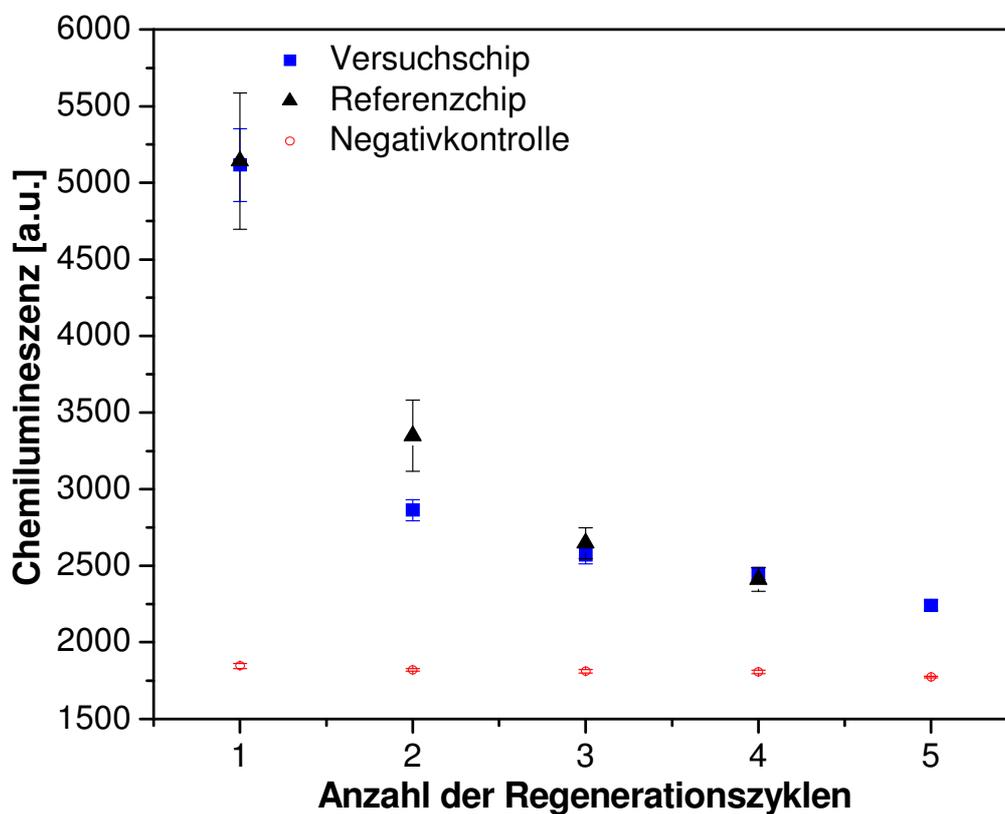
Eine weitere Überlegung bestand darin, dass evtl. der eingesetzte Primärantikörper nicht vom Analyten abgelöst wird, d.h. der Regenerationspuffer ungeeignet ist, um den Antikörper zu denaturieren und vom Analyten zu trennen. So wurden nach dem ersten Zyklus (Messung mit anschließender Regeneration) die CL-Reagenzien über den Chip geleitet. Sollte der Sekundärantikörper noch am Primärantikörper gebunden sein, so führt das zu einem Signal. Da es nicht der Fall war, wurde nach einem weiteren Zyklus zunächst Sekundärantikörper über den Chip gepumpt, damit dieser bei vorhandenem Primärantikörper, diesen erkennt und erneut bindet. Beim Zusatz der CL-Substanzen ergab sich allerdings wieder kein Signal. Um nun eine Denaturierung des konstanten Teils des Primärantikörpers auszuschließen (sek. Ak erkennt ihn dann nicht), wurde der mAk mit HRP direkt markiert. Die direkte HRP-Markierung liefert den Vorteil, dass pro mAk eine durchschnittliche HRP-Bindung von 1:4 erreicht wird und somit auch bei einer Denaturierung ein Signal erzeugt werden sollte. Da dies nicht zutrifft, konnte eine irreversible Bindung des Antikörpers zum ZEA ausgeschlossen werden.

Eine weitere Idee zur Erklärung des Regenerationsverhaltens und somit die Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, war eine genauere molekulare Betrachtung. ZEA besitzt zwischen den C11- und C12-Atomen eine Doppelbindung (Kapitel II 1.6), die bekanntlich durch Licht isomerisieren kann. Die natürliche Form von festen ZEA in Lebensmitteln ist die *trans*-Form (Richardson, 1985). Bisher konnte nur das *trans*-Isomer von unterschiedlichen *Fusarien*-Stämmen isoliert werden, was auf einen hohen Isomer-spezifischen Biosyntheseweg schließen lässt. Durch ultraviolettes Licht kann eine Isomerisierung zur *cis*-Form eintreten (Abbildung 40). Die Isomerisierungsrate von *trans*- zur *cis*-Form ist neben der Einstrahlungsenergie und Reaktionszeit (Bestrahlung) abhängig von den Lösungsmitteln (Köppen, 2012).



**Abbildung 40:** Isomerisierung durch ultraviolettes Licht von *trans*-ZEA zu *cis*-ZEA.

Der erste Schritt bestand nun darin, die Kreuzreaktivität der vorhandenen Antikörper hinsichtlich der *cis*-Form zu überprüfen. Das *cis*-ZEA-Isomer als Standard wurde freundlicherweise von der Bundesanstalt für Materialwirtschaft und -prüfung in Berlin (BAM, Dr. Michael Koch) zur Verfügung gestellt.



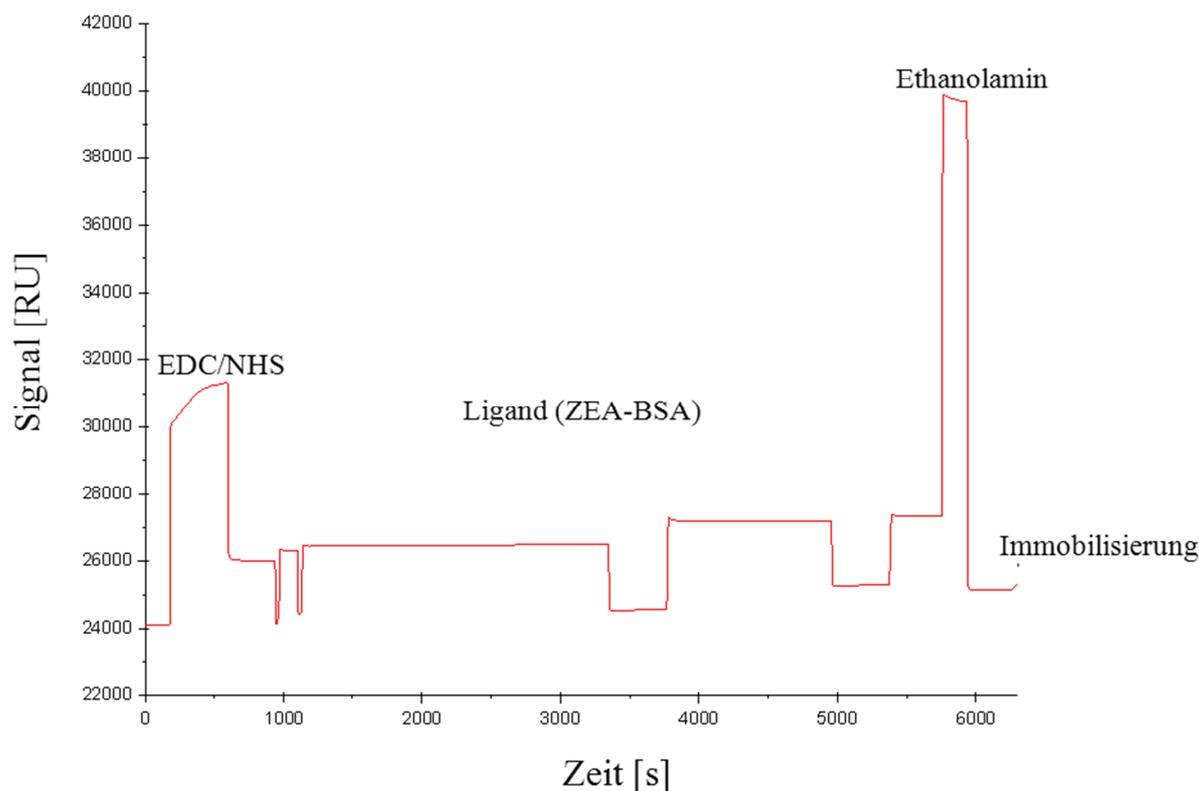
**Abbildung 41:** Vergleich der Signale beim Referenzchip und Versuchschip (vorherig fünfmal messen ohne CL-Reagenzien); ( $n = 5$ ,  $m = 6$ ,  $s = 1$ ).

Dabei wurde mittels des klassischen ELISAs auf der MTP mit Standards aus *trans*-ZEA und *cis*-ZEA eine KR von  $\leq 5\%$  bestimmt (für 1B11 und aokin-Antikörper). Ob nun die hohe Lichtdichte auf den Spots wirklich zu einer Isomerisierung führt, weshalb nach dem ersten Signal ein starker Abfall erfolgt, sollte folgendermaßen getestet werden. Ein Referenzchip

wurde direkt fünfmal am MCR 3 gemessen. Bei einem weiteren Chip (Versuchschip) wurden dagegen bei den ersten fünf Messungen die CL-Reagenzien (Luminol und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durch deionisiertes Wasser ersetzt. Auf diese Weise sollte der Assay ganz normal mit Konkurrenz und Regeneration verlaufen, nur die Detektion mittels des Chemilumineszenz-Signals sollte unterdrückt werden. Als nächstes wurden mit dem Versuchschip fünf Messungen mit den CL-Reagenzien durchgeführt und das entstehende CL-Signal am Anfang mit dem des Referenzchips verglichen. Trotz bereits erfolgten fünf Messungen (ohne Signal) war die erste Signalintensität vergleichbar hoch mit der des Referenzchips, auch der anschließende Abfall zeigte keine Veränderung (Abbildung 41).

Für einen eindeutigen Beweis sollte eine alternative Methode herangezogen werden. Dabei lag nahe, dass die etablierte SPR-Methode, die ebenfalls auf dem immunologischen Testprinzip basiert, verwendet wird. Bei dieser Methode wird der Analyt auf eine mit Gold bedampfte Glasplatte immobilisiert (Unterseite). Von der anderen Seite wird monochromatisches Licht in einem bestimmten Winkel unter Totalreflexion eingestrahlt. SPR tritt dabei zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex in Form von leitenden Schichten auf. Bei einem bestimmten Einstrahlwinkel (SPR-Winkel) kommt es zur Anregung von Oberflächenplasmonen, die über die Goldschicht in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex übertragen werden. Ändert sich nun die Belegungsdichte auf der Goldfolie (z.B. durch Bindung eines Antikörpers), führt dies zu einem anderen Brechungsindex des Mediums, was wiederum zur Änderung der Resonanzbedingung führt. Bei dieser Methode wird also die Probe nicht direkt mit Licht bestrahlt und somit sollte eine Isomerisierung von *cis*- in *trans*-ZEA nicht erfolgen (Attridge, 1991). Daher sollte nach dieser Theorie die Messung am SPR regenerierbar sein.

Für die SPR-Messung wurde das Gerät von Biacore X100 im indirekten ELISA-Format mit dem Chip CM 5 bei einer Flussrate von  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  verwendet. Zur Immobilisierung wurde ZEA-BSA-Konjugat eingesetzt, da dieses eine hohe Molmasse besitzt und somit eine Änderung des SPR-Winkels bei seiner Immobilisierung bewirkt. Zunächst wurde die mit Carboxydextran derivatisierte Oberfläche mit EDC und NHS aktiviert. Anschließend wurde der Ligand schrittweise über den Chip geleitet. Nach Deaktivierung mit Ethanolamin wurde eine Immobilisierung von 1074 RU erreicht (Abbildung 42).

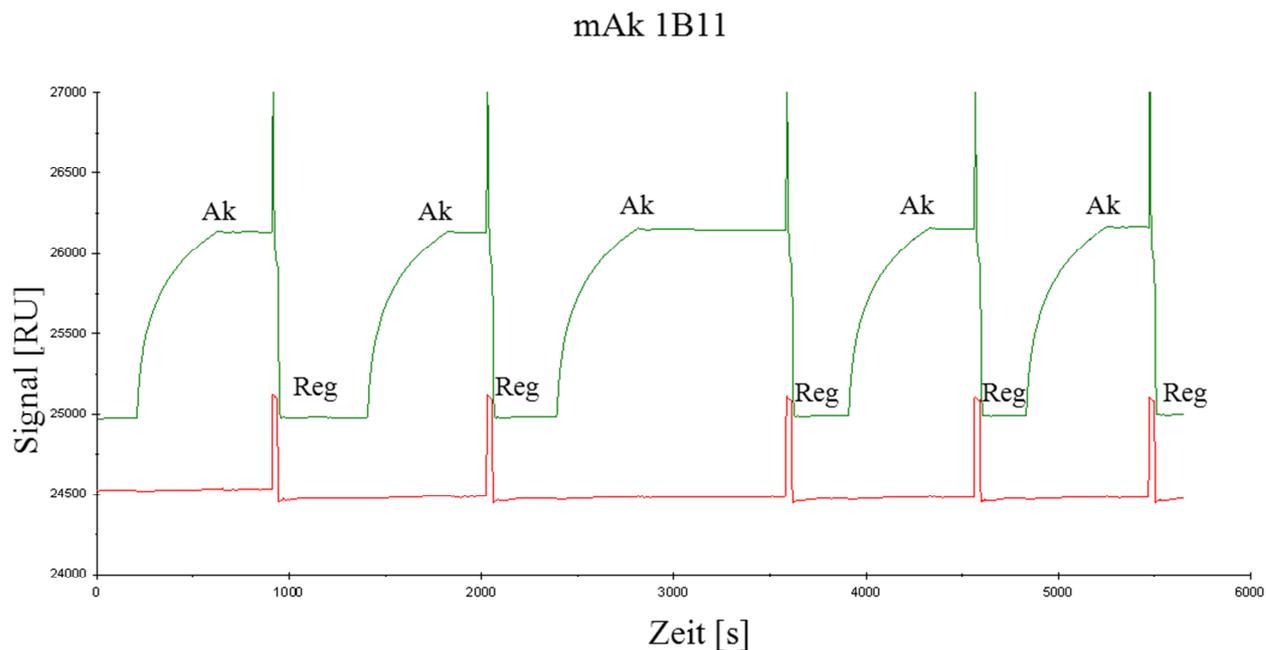


**Abbildung 42:** Beispiel einer *online*-Chipherstellung in drei Schritten: Aktivierung mit EDC / NHS, Immobilisierung des ZEA-BSA-Konjugates und Deaktivierung mit Ethanolamin.

Als nächstes wurde der Antikörper 1B11 für 7 min über den Chip geleitet und nach einer kurzen Dissoziationsphase mit Regenerationspuffer wieder heruntergespült. Dies wurde fünfmal wiederholt. In Abbildung 43 ist das Sensorgramm dargestellt.

Es zeigte sich, dass nach jedem Zyklus eine vollständige Denaturierung bzw. Abwaschen des Antikörpers vom immobilisierten ZEA-BSA erreicht wird, und somit eine erneute Bindung eines weiteren Antikörpers im nächsten Zyklus ermöglicht wurde. Dabei sank das Signal nach der Regeneration stets auf die  $1074 \pm 50$  RU, was der Immobilisierung entsprach. Die Referenzzelle zeigte zudem, dass keine adsorptiven Bindungen auf der Chip-Oberfläche stattfanden. Die Referenzzelle wurde auf dieselbe Art wie Flusszelle 1 mit EDC und NHS aktiviert und anschließend direkt mit Ethanolamin deaktiviert.

Dieses Experiment wurde ebenso mit dem aokin-anti ZEA Antikörper ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) auf demselben Chip durchgeführt, wobei dieser 4 min über den Chip geleitet wurde, da bereits die Sättigung erreicht wurde. In Tabelle 20 sind die dabei erhaltenen Werte zusammengefasst.



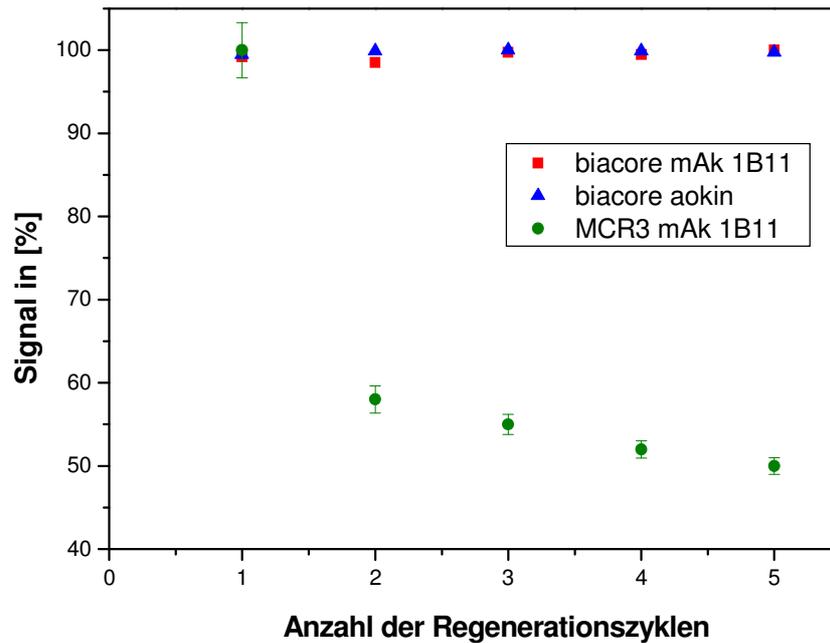
**Abbildung 43:** Fünf Zyklen (Bsp. hier mit mAk 1B11): Bindung des Antikörpers und anschließende Regeneration (grün) für immobilisierte Zelle, (rot) für Referenzzelle.

**Tabelle 20:** Zusammenfassung der Signalintensitäten nach Bindung von 1B11 und aokin-anti-ZEA-Antikörper an ZEA-BSA, ermittelt mit SPR-Methode.

mAk	MW [RU]	STABW	[%]
<b>1B11</b>	1156.56	6.71	0.58
<b>Aokin</b>	648.52	1.15	0.18

Dabei ist zu erkennen, dass die Bindungen der Antikörper beim SPR mit einem relativen Fehler von  $\leq 1\%$  sehr vergleichbar und stabil sind. Zur Verdeutlichung des Regenerationsverhaltens wurden die erhaltenen Signale beider Methoden normiert und aufgetragen (Abbildung 44).

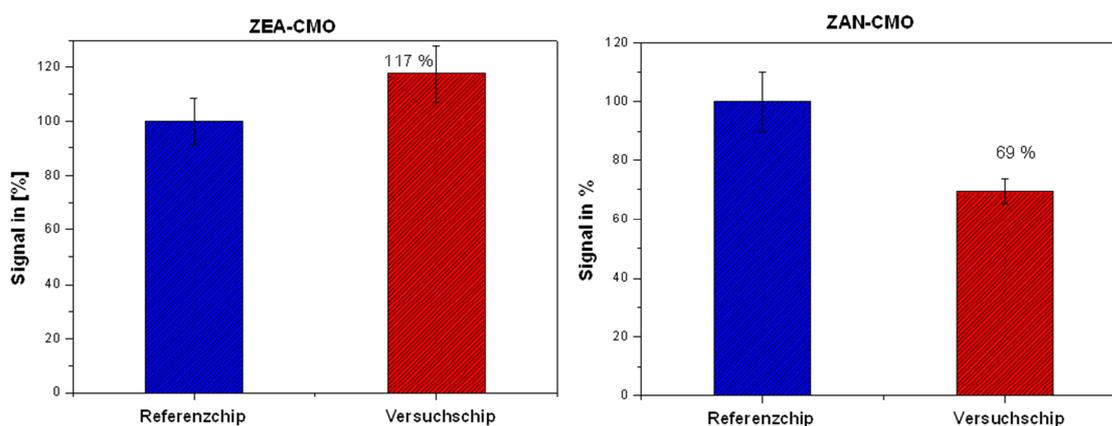
Es wird deutlich, dass mit der SPR-Methode eine gute Regenerierbarkeit gefunden wird, während beim MCR 3 aufgrund der Lichtexposition ein starker Signalabfall zu beobachten ist.



**Abbildung 44:** Vergleich des Regenerationsverhaltens von ZEA gemessen mit der SPR-Methode und MCR 3 ( $n = 5$ ,  $m = 6$ ,  $s = 1$ ).

Aufgrund dieser Ergebnisse folgte nun die Überlegung, ein ZEA-Derivat zu immobilisieren. Dabei sollte das ZAN-Derivat, welches sich nur durch das Fehlen der Doppelbindung unterscheidet, eingesetzt werden. Der mAk 1B11 besitzt dabei eine KR von 26 %. Das synthetisierte ZAN-CMO wurde als Aktivester auf der DAPEG-Oberfläche immobilisiert und im Anschluss am MCR 3 untersucht. Wider Erwarten kam es zum Signalabfall nach den ersten Messungen. Eine Isomerisierung konnte in diesem Fall nicht stattfinden. Um auf einen eindeutigen Einfluss durch das Licht wie bei ZEA schließen zu können, wurde wie bei ZEA vorgegangen. Ein Referenzchip wurde direkt fünfmal am MCR 3 gemessen. Der Versuchschip wurde zunächst fünfmal ohne CL-Reagenzien und anschließend fünfmal mit CL-Reagenzien gemessen. Die dabei mit dem Referenzchip verglichenen Signale sind in Abbildung 45 dargestellt.

Während bei ZEA-CMO keine signifikante Absenkung des Signals nach fünf Messungen (ohne CL-Reagenzien) zu beobachten war, ist dagegen ein Abfall beim ZAN-Versuchschip erkennbar. Eine mögliche Erklärung hierbei könnte sein, dass durch die fehlende Doppelbindung das ZEA-Molekül seine starre Struktur verliert und sich evtl. durch die Lösungsmittel, Temperatur- oder pH-Wert-Einflüsse umfaltet, so dass der Antikörper es schlechter erkennt.



**Abbildung 45:** Vergleich der ersten Messung vom Referenzchip und Vergleichschip ( $n = 3$ ,  $s = 1$ ). (links) ZEA (rechts) ZAN.

Um den gewünschten Multiplex-Mykotoxin-Chip herstellen zu können, muss an alternativen Lösungswegen gearbeitet werden. So könnte z.B. eine Herstellung eines anti-*cis*-ZEA-Antikörpers bei der Regeneration helfen. Für einen Assay müsste dazu ein *cis*-ZEA-Konjugat an die Oberfläche immobilisiert werden. Dieses sollte aufgrund des Gleichgewichts, das durch die hohe Lichtdichte in Richtung *cis*-Form verschoben ist, zu einer stabilen Regeneration führen. Zusätzlich muss bedacht werden, dass bei einer Extraktion das ZEA zunächst in *trans*-Form vorliegt (Köppen, 2012). Daher müsste in der Probe durch Einwirkung von Licht eine Umwandlung zu *cis* erfolgen. Vorstellbar wäre z.B. eine kurze Belichtung der Probe mit einer Lichtlampe, wobei hier genauere Untersuchungen bzgl. Dauer, Intensität und Auswirkung auf die anderen Mykotoxine stattfinden müssten.

## 2 Optimierung der Probenvorbereitung (Extraktion)

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit lag in der Optimierung der Probenvorbereitung. Für den parallelen Nachweis der Mykotoxine sollte, wenn möglich, ein einheitliches Probenaufbereitungsverfahren entwickelt werden. Zudem sollte dieser ohne größeren Aufwand (z.B. durch Nutzung von IAC- bzw. SPE-Säulen) und mit geringstmöglichen Kosten erfolgen. Aus experimentellen Vorarbeiten (Karsunke, 2011) hat sich eine Mischung von 80 % Methanol in 20 % Wasser mit anschließender Verdünnung (mit PBS) auf 20 % Methanol-Gehalt als praktikabel erwiesen.

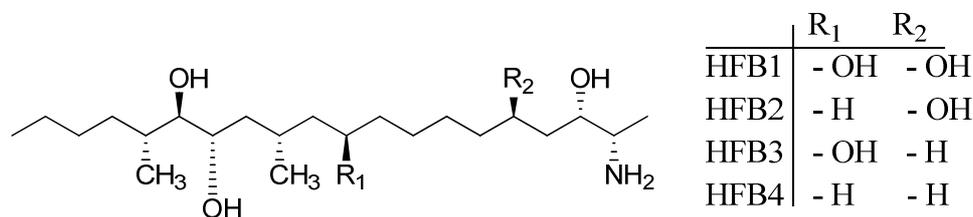
So wurden verschiedene Getreideproben mit den Mykotoxinen AFB1 und OTA dotiert und mittels einer Haferkalibrierung mit dem MCR 3 analysiert (Tabelle 21). Die dabei erhaltenen WF lagen im Mittel bei  $84 \pm 7 \%$  für AFB1 und bei  $110 \pm 23 \%$  für OTA. Diese Ergebnisse bestätigten die Eignung der Lösungsmittelzusammensetzung für lipophile Toxine.

**Tabelle 21:** Zusammenfassung der erhaltenen WF dotierter Proben von AFB1 und OTA bei einer Extraktion mit 80/20 (Methanol/Wasser, v/v); bestimmt mit MCR 3 (m = 6, s = 1).

AFB1-Dotiert [µg/kg]	WF [%]	OTA-Dotiert [µg/kg]	WF [%]
Hafer 0	≤ LOD	Hafer 0	≤ LOD
Hafer 3	78 ± 0	Hafer 3	102 ± 13
Hafer 6	93 ± 3	Hafer 7	77 ± 13
Weizen 0	≤ LOD	Weizen 0	≤ LOD
Weizen 3	78 ± 1	Weizen 3	135 ± 6
Weizen 6	89 ± 5	Weizen 7	106 ± 9
Mais 0	≤ LOD	Mais 0	n.b.
Mais 3	n.b.	Mais 3	n.b.
Mais 6	60 ± 2	Mais 7	n.b.
Roggen 0	≤ LOD	Roggen 0	≤ LOD
Roggen 3	75 ± 2	Roggen 3	132 ± 21
Roggen 6	88 ± 3	Roggen 7	-

DON und FB1 sind aber im Gegensatz zu den obigen Toxinen polar und somit besonders gut in Wasser löslich. Wie bereits in Kapitel III. 1.4.5 beschrieben, führt diese Eigenschaft zur Unterbestimmung. Aus diesem Grund wurden im Nachfolgenden die besten Extraktionsbedingungen für DON und FB1 untersucht, um im Anschluss eine Probenvorbereitungsmethode für alle Mykotoxine zu entwickeln. Dabei muss zusätzlich bedacht werden, dass unterschiedliche Parameter, wie z.B. pH-Wert, Ionen-Stärke oder Temperatur eine entscheidende Rolle spielen können. So wurde bereits über unterbestimmte WF bei FB1 berichtet (Dall'Asta, 2009). Dabei hat sich gezeigt, dass bei der Extraktion Fumonisine hydrolysieren

können und je nach Temperatur auch abgebaut werden können. Die dabei entstehenden Produkte (Abbildung 46) sind dennoch nach wie vor toxisch, können aber z.B. von spezifisch hergestellten Antikörpern gegen FB1 nicht mehr erkannt werden.



**Abbildung 46:** Hydrolyse-Produkte von Fumonisin.

Für die Optimierung der Probenvorbereitung wurden BioWeizen-Proben mit unterschiedlichsten Lösungsmittelzusammensetzungen extrahiert und dotierte Proben mittels klassischem indirektem ELISA untersucht. Dabei sollte der Wasseranteil erhöht und die damit einhergehende Auswirkung auf die WF untersucht werden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22:** Zusammenfassung der erhaltenen WF für DON und FB1 bei Einsatz verschiedener Extraktionsmittel, bestimmt mit indirekt kompetitivem MTP-ELISA (m = 3, s = 1).

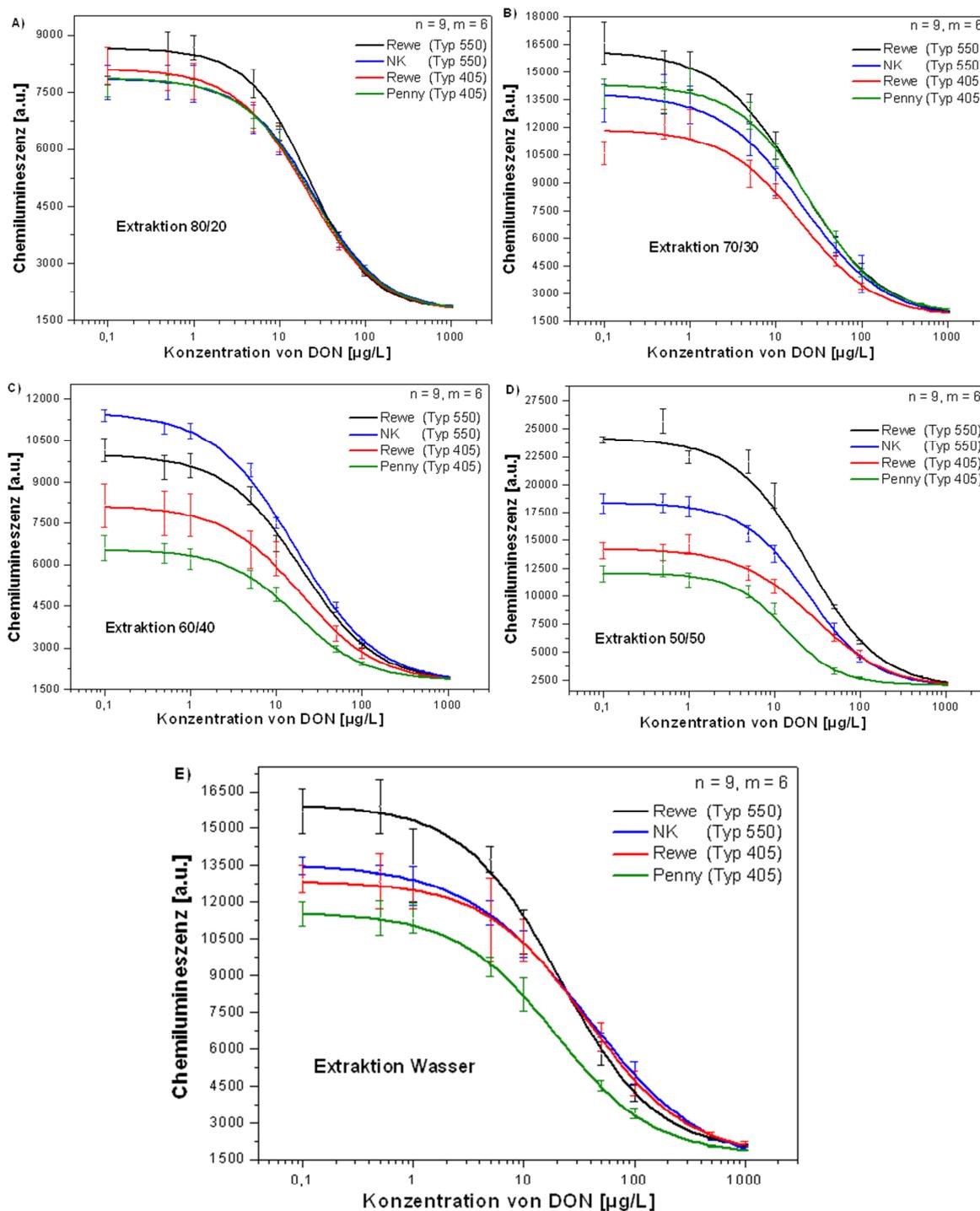
DON-Dotiert [µg/kg]	WF [%]			
	80/20 Methanol/Wasser	20/80 Methanol/Wasser	H <sub>2</sub> O + NaCl	H <sub>2</sub> O - NaCl
70	138	79	105	96
100	101	96	79	105
200	69	98	72	101
750	180	71	80	104
<b>MW</b>	122 ± 48 (39 %)	86 ± 13 (15 %)	84 ± 14 (17 %)	<b>102 ± 4 (4 %)</b>
FB1-Dotiert [µg/kg]	WF [%]			
	80/20 Methanol/Wasser	20/80 Methanol/Wasser	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + 0.01 % F.a. <sup>1</sup>
350	-	88	102	82
650	-	-	96	84
700	54	106	112	-
100	53	133	97	99
<b>MW</b>	54 ± 1 (1 %)	109 ± 23 (21 %)	<b>102 ± 7 (7 %)</b>	88 ± 9 (11 %)

<sup>1</sup> Ameisensäure (*Formic acid*)

WF von 102 % konnten sowohl für FB1 als auch für DON bei der Extraktion mit Wasser bestimmt werden. Wichtig dabei ist, dass die zunehmend mitextrahierten löslichen Matrixkomponenten dazu führten, dass die Proben vor dem Filtrieren zusätzlich abzentrifugiert werden mussten. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass bei DON die WF bei der Wasserextraktion ohne NaCl zwischen 96 und 105 % lagen; wurde dagegen NaCl zugesetzt, lagen die Werte mit 72 – 105 % etwas niedriger. Eine Erklärung ist, dass durch die Zugabe des Salzes die Ionenstärke der wässrigen Phase erhöht wird und somit Proteine und Aminosäuren ausfallen bzw. zum Teil denaturieren. Die in diesem Fall entstehende Überbestimmung bei der 80/20-Extraktion könnte mit der einstündigen Inkubation des mAk und die damit entstehenden Interferenzen mit diversen Matrixkomponenten erklärt werden (vgl. MCR 3 nur eine Minute). Die Extraktion mit Wasser hat sich somit als die beste Methode für das vollständige Herauslösen von DON und FB1 aus Getreide erwiesen. Allerdings haben diese Ergebnisse nur einen orientierenden Charakter und sollten daher im Nachfolgenden auf den MCR 3 übertragen und untersucht werden.

Für Untersuchungen am MCR 3 wurden im Anschluss je zwei Weizenproben des Typs 550 und zwei des Typs 405 mit 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 (Methanol/Wasser, v/v) und nur mit Wasser (0/100, Methanol /Wasser, v/v) extrahiert und wie in Kapitel V. V2.6.1 beschrieben, Kalibrierlösungen hergestellt. Für jedes Lösungsmittelgemisch wurden für die vier Weizenproben Chips von derselben Charge verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In Abbildung 47 sind die jeweils erzeugten Kalibrierkurven dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass insbesondere die oberen Asymptoten trotz derselben Getreideart mit steigendem Anteil an Wasser als Extraktionsmittel einen zunehmenden Unterschied aufweisen. Während bei der 80/20-Extraktion max. 700 a.u. Differenz vorliegen, die als normale Abweichung von Chip zu Chip beobachtet wird, zeigt beispielsweise die 60/40-Extraktion einen Unterschied von über 1000 a.u. zwischen den Weizen des Typs 550, und sogar ein doppeltes Signal zum Weizen des Typs 405 (6000 vs. 12000 a.u.). Die erhaltenen Kalibrierparameter sind dabei als MW der einzelnen Extraktionsmittel in Tabelle 23 zusammengefasst.



**Abbildung 47:** Darstellung der Kalibrierkurven bei Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln; (A) 80/20 (Methanol/Wasser, v/v); (B) 70/30 (Methanol/Wasser, v/v); (C) 60/40 (Methanol/Wasser, v/v); (D) 50/50 (Methanol/Wasser, v/v) und (E) Wasser.

**Tabelle 23:** Zusammenfassung der Kurvenparameter von je vier Weizenkalibrierungen (Typs 550 und 405) bei unterschiedlichen Extraktionsmitteln (m = 4, s = 1).

	80/20 Methanol/H <sub>2</sub> O	70/30 Methanol/H <sub>2</sub> O	60/40 Methanol/H <sub>2</sub> O	50/50 Methanol/H <sub>2</sub> O	Wasser
IC <sub>50</sub> [µg/kg]	378.9 ± 32.1	396.0 ± 46.0	287.0 ± 5.89	357.2 ± 80.9	455.3 ± 152.6
LB <sup>1</sup> [µg/kg]	111.4 ± 9.8 –	81.6 ± 17.1 –	77.2 ± 18.8 –	102.5 ± 17.3 –	99.5 ± 27.1 –
	1291.5 ± 143.1	1440.1 ± 56.7	1203.9 ± 19.2	1273.4 ± 486.6	2124.9 ± 980.3

<sup>1</sup>Linearer Bereich: 80 – 20 % - Signal

Bei Betrachtung der Grenze des oberen Messbereichs (20 % des Signals) wird deutlich erkennbar, dass bei einem Anteil von 80 % bis einschließlich 60 % Methanol mit einem rel. Fehler von 11 % eine Vergleichbarkeit der Werte vorliegt. Dies gilt genauso für die IC<sub>50</sub>-Werte, die eine max. prozentuale Abweichung von 12 % aufweisen. Beim unteren Messbereich (80 % des Signals) war bereits bei einer Extraktion mit 70/30 mit 21 % ein deutlicher Unterschied erkennbar (Ursache liegt in den Absolutsignalen). Ein eindeutiger Bruch konnte bei einem 50/50-Verhältnis mit bis zu 38 % Abweichung in Bezug auf die Kurvenparameter beobachtet werden. Somit konnten Kalibrierkurven, trotz derselben Getreideart, nicht miteinander verglichen werden. So unterscheiden sie sich bei der 50/50- (Methanol/Wasser, v/v) und Wasser-Extraktion nicht nur in der oberen Asymptote, sondern auch in der Lage des Arbeitsbereiches und somit auch in den IC<sub>50</sub>-Werten (rel. Fehler von 23 % und 34 %). Diese Ergebnisse zeigten, dass mitextrahierte organische Komponenten, vermutlich in erster Linie Proteine, zu inakzeptablen Matrixinterferenzen bei der Chip-basierten Methode führten.

Um dennoch eine Aussage hinsichtlich der Extrahierbarkeit der Mykotoxine machen zu können, wurden in einem weiteren Experiment mit unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen dotierte Proben auf dem MCR 3 untersucht. Hierbei war wichtig, dass die Kalibrierung sowie die Proben stets ein und dieselbe Matrix (BioWeizen Typ 550) war. Es wurde der Wasseranteil schrittweise erhöht und die WF bestimmt (Tabelle 24).

Es zeigte sich, dass bereits bei einer Extraktion von 60/40 (Methanol/Wasser, v/v) eine Erhöhung der Wiederfindungsrate von  $92.2 \pm 8.4$  % bei 20/80 auf  $97.3 \pm 10.8$  % erreicht werden kann. Bei Extraktion mit reinem Wasser konnte wie beim klassischen ELISA Test auf der MTP eine WF von sogar  $109.0 \pm 18.7$  % bestimmt werden. Aber genauso konnte ein Trend hinsichtlich der rel. Fehler beobachtet werden. So steigt mit zunehmendem Wasseranteil die Ungenauigkeit von 6 % auf 17 %.

**Tabelle 24:** Zusammenfassung der bei unterschiedlichen Extraktionsmitteln erhaltenen WF (MCR 3), der dotierten Proben ( $m = 6$ ,  $s = 1$ ).

DON-Dotiert [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	WF [%]				
	80/20 Methanol/ $\text{H}_2\text{O}$	70/30 Methanol/ $\text{H}_2\text{O}$	60/40 Methanol/ $\text{H}_2\text{O}$	20/80 Methanol/ $\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$
70	$84.8 \pm 22.3$	$89.8 \pm 19.4$	$99.4 \pm 22.3$	$102.2 \pm 6.7$	$\leq \text{LOD}$
200	$95.1 \pm 10.4$	$82.1 \pm 16.6$	$89.8 \pm 12.8$	$105.3 \pm 11.5$	$125.0 \pm 19.9$
400	$85.8 \pm 13.2$	$92.4 \pm 7.2$	$89.8 \pm 6.3$	$85.5 \pm 5.7$	$113.5 \pm 9.0$
750	$82.4 \pm 9.7$	$86.6 \pm 5.9$	$85.0 \pm 8.5$	-	$88.5 \pm 22.4$
MW	<b><math>87.0 \pm 5.6</math> (6 %)</b>	<b><math>87.7 \pm 5.9</math> (7 %)</b>	<b><math>92.2 \pm 8.4</math> (9 %)</b>	<b><math>97.3 \pm 10.8</math> (11 %)</b>	<b><math>109.0 \pm 18.7</math> (17 %)</b>

Diese Ergebnisse zeigen zwar, dass mit steigendem Wasseranteil bei der Extraktion die WF steigt, aber zugleich wird die Oberfläche stärker belastet (siehe steigende rel. Fehler), was auf Kosten der Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen geht. Zusätzlich verhindert bereits die Extraktion mit 60/40 die Messung unterschiedlicher Getreidematrizes mit nur einer Kalibrierkurve (wegen der Absolutsignale) und scheidet daher auch aus wirtschaftlichen Erwägungen aus. Zudem wird deutlich, dass stets genaue Untersuchungen auf den jeweiligen Analysegeräten notwendig sind. Eine reine Übertragung von klassischen ELISA auf den Durchfluss-Chemilumineszenz-Array ist nicht immer möglich. In den durchgeführten Experimenten wurden alle Proben mit der Standardmethode 80/20 (Methanol/Wasser) extrahiert.

### 3 Herstellung monoklonaler Ochratoxin A - spezifischer Antikörper

Für die Herstellung eines multiplexen Mikroarrays werden für alle verwendeten Mykotoxine monoklonale Antikörper benötigt. So konnten neben dem an unserem Institut bereits entwickelten anti-AFB1-Antikörper 1F2 (Cervino, 2008) zusätzlich von Dr. Dietrich (Lehrstuhl für Milch und Hygiene) erhaltene anti-ZEA-, anti-FB1-, anti-T-2- und anti-DON-Antikörper eingesetzt werden. Um spätere Vertriebshindernisse, wie Lizenzgebühren etc., zu umgehen, sollte in dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen OTA mit ausreichender Sensitivität für die Quantifizierung innerhalb der gesetzlichen Grenzwerte hergestellt werden.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgte mittels Hybridomzelltechnik nach KÖHLER und MILSTEIN (Köhler, 1975). Dazu wurden die synthetisierten Immunogene dem Partner (Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt, der die Immunisierung der Mäuse, die Fusionierung der Immunzellen (B-Zellen) mit Myelomzellen, das Primärscreening und die Kultivierung der selektierten Hybridomzellen durchführt.

### 3.1 Synthese des OTA-Glycin-Protein-Immunogens

OTA ist als Hapten zu klein, um in einem Säugetier eine Immunreaktion auslösen zu können. Für die Generierung von OTA-Antikörpern ist daher eine Bindung an ein Trägerprotein notwendig. Beim Träger sollte darauf geachtet werden, dass es sich um ein möglichst ‚körperfremdes‘ Protein im immunisierten Säugetier handelt, da in diesem Fall eine ausreichend starke Immunantwort zu erwarten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) als Fremdprotein verwendet. Für die kovalente Bindung des OTA-Moleküls an BSA wurde zusätzlich ein kurzer Linker (Glycin) eingeführt. Dieser soll gewährleisten, dass durch den räumlichen Abstand zur Proteinoberfläche die Spezifität der produzierten Antikörper erhöht wird. Bisher in der Literatur veröffentlichte Antikörper zeigten  $IC_{50}$ -Werte für OTA von 0.32 ng/mL bis hin zu 1.2 ng/mL (Kawamura, 1989; Gyöngyösi-Horvath 1996; Cho, 2005; Liu, 2008). Diese wurden alle durch direkte Kopplung an ein Trägerprotein ohne Linker gewonnen.

Zunächst erfolgte daher die Synthese des OTA-Glycin (OTA-Gly). Dazu wurde OTA mit Glycinbenzylester-Tosylat (H-Gly-OBzl p-Tosylat) über Aktivierung der Säuregruppe umgesetzt. Anschließend konnte die Abgangsgruppe (Benzyl) über Palladium auf Aktivkohle entfernt werden, wie in Abbildung 48 dargestellt.

Das Produkt wurde anschließend mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), gekoppelt an einem UV-Vis Detektor, aufgereinigt und analytisch mittels ESI-MS nachgewiesen (Abbildung 49).

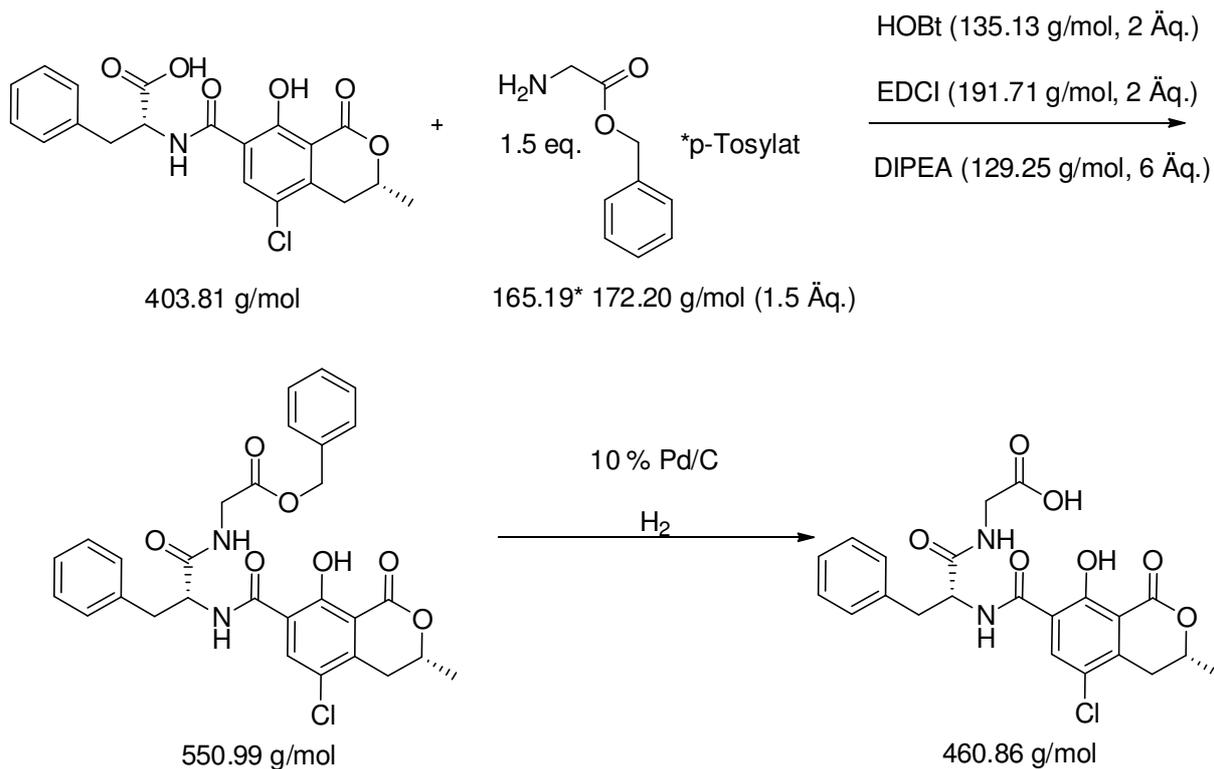


Abbildung 48: Synthese von OTA mit Glycinbenzylester-Tosylat zu OTA-Glycin.

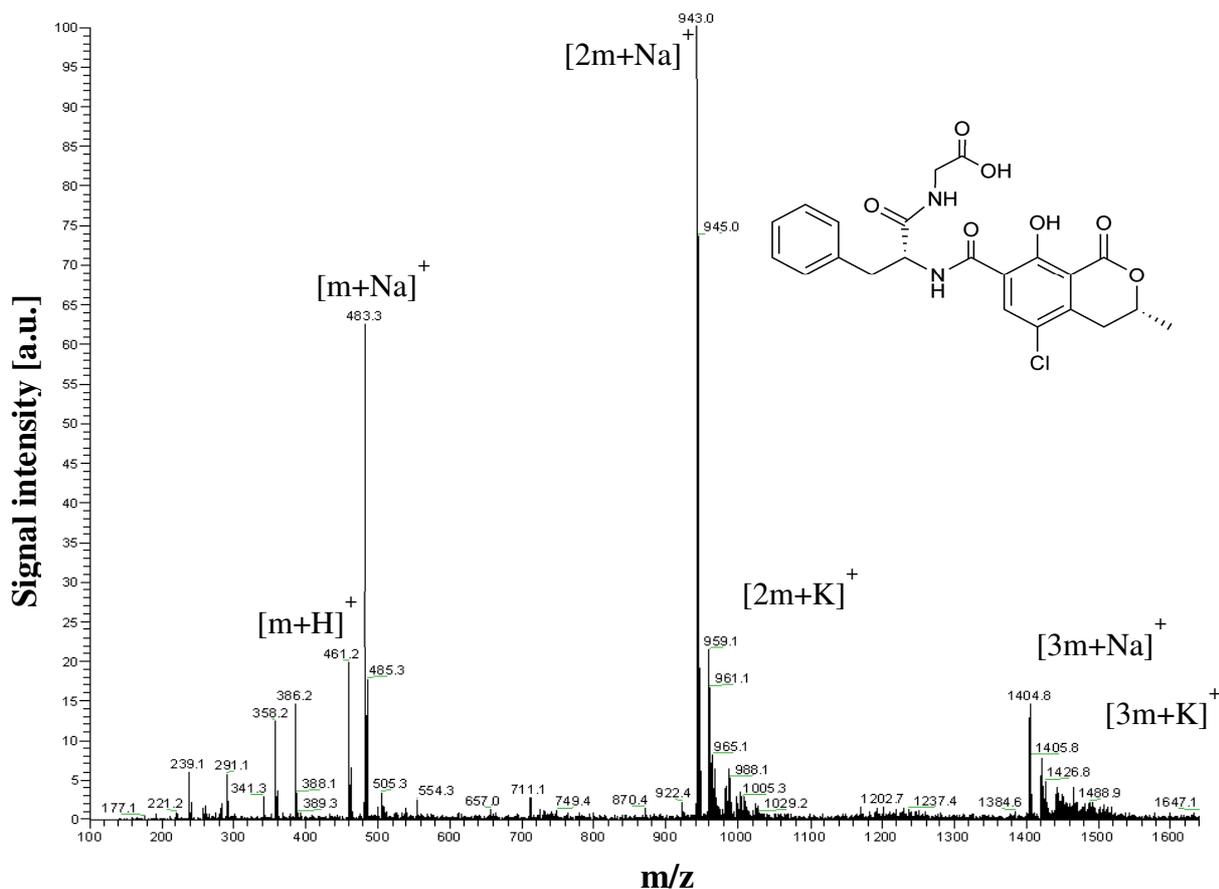


Abbildung 49: ESI-MS-Spektrum des OTA-Glycin-Produktes.

Im nächsten Schritt erfolgte die kovalente Kopplung des OTA-Glycin-Konjugates an BSA mittels der Carbodiimid-Methode. Hierzu wurde die Carboxylgruppe des Glycins mittels DCC und NHS in Dioxan aktiviert. BSA (0.13 mM) wurde in 0.71 mM Natriumhydrogencarbonat (pH 7.5) gelöst, um anschließend den NHS-Ester hinzu zu tropfen. Da das OTA-Glycin weniger wasserlöslich ist, musste tröpfchenweise Dioxan hinzugegeben werden, um ein Ausfallen zu vermeiden. Die Reinigung erfolgte über Dialyse gegen deionisiertes Wasser. Die einfachste Kontrolle, ob OTA an das Protein gekoppelt ist, sind Untersuchungen mit dem traditionellen ELISA. Hierfür wurde das Immunogen als Coating eingesetzt. Ergibt sich bei der Verwendung eines kommerziell erhältlichen Antikörpers (gegen OTA) eine Kalibrierkurve, so ist sichergestellt, dass OTA gebunden wird. Für eine genaue Bestimmung der durchschnittlichen Kopplungsdichten wurde Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) verwendet. Die Massenspektren sind in Abbildung 50 dargestellt.

Aus den Massenverschiebungen ließen sich somit durchschnittliche Substitutionsraten von 8 bzw. 18 OTA/BSA berechnen. Des Weiteren wurden zwei Immunogene mit Kopplungsdichten von 4 bzw. 7.5 hergestellt. Die Anzahl der OTA-Moleküle pro BSA variierte deutlich. Grund war hierfür, dass das Verhältnis von eingesetztem BSA zu konstanter OTA-Konzentration erhöht wurde. So führte eine höhere Konzentration an BSA zu geringeren Substitutionsraten.

Auf ähnliche Weise wurden auch weitere Hapten-Konjugate für die Beschichtung von MTP hergestellt. Allerdings wurde hier auf einen Linker verzichtet. Auf diese Weise wurden OTA-OVA, OTA-TG und auch AFB1-BSA sowie ZEA-BSA synthetisiert. Hierbei erfolgte ein Nachweis der Hapten-Kopplung nur mittels klassischem ELISA.

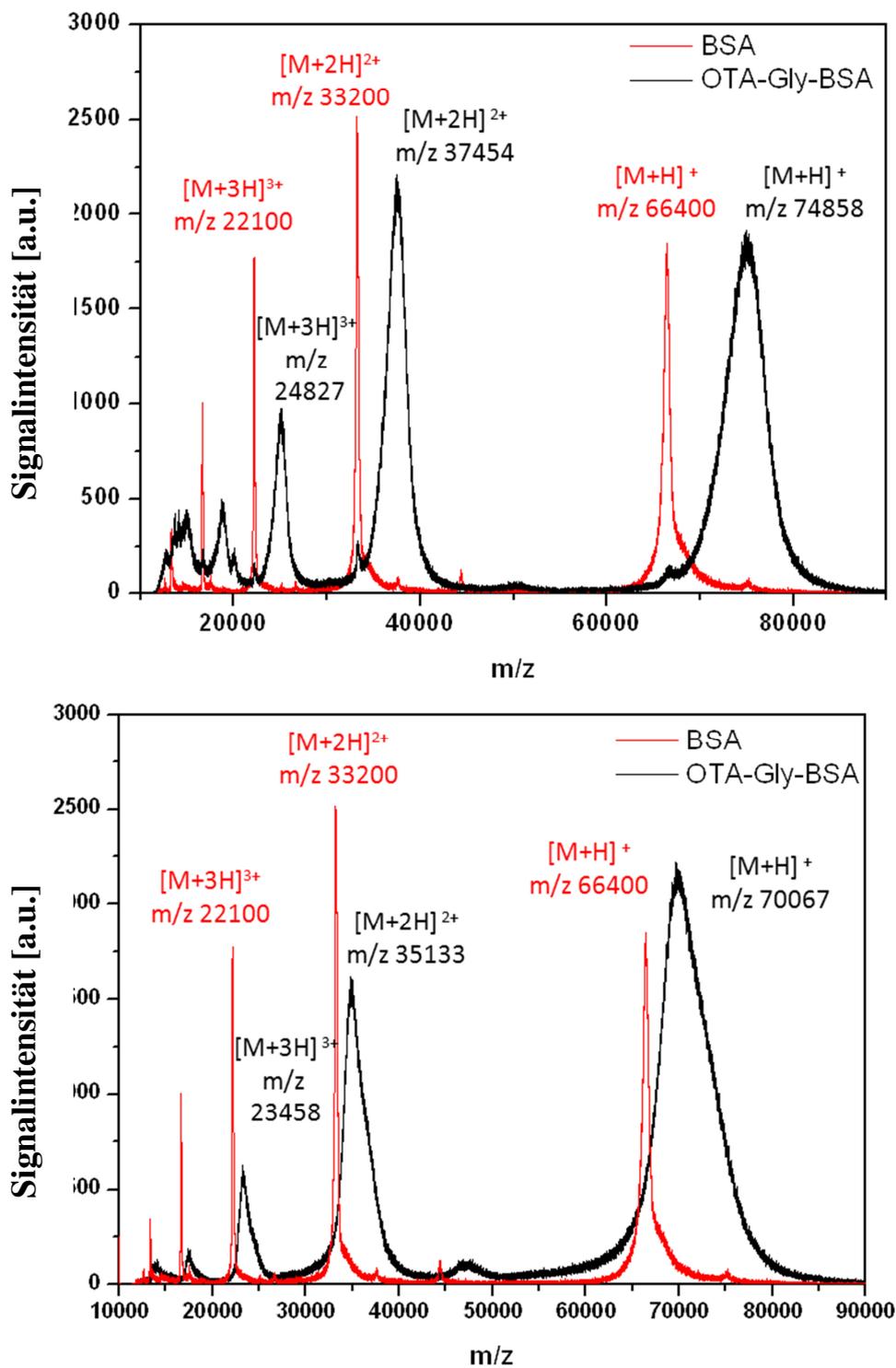


Abbildung 50: MALDI-TOF-MS-Spektren von OTA-Gly-BSA mit einer durchschnittlichen Kopplungsdichte von 18 (oben) und 8 (unten).

### 3.2 Immunisierung und Screening der Zellkulturüberstände

Die Immunisierung, Fusionierung sowie das erste Vorscreening erfolgte am Institut für Physiologische Chemie in Halle bei Herrn Dr. E. Weber. In der folgenden Arbeit wird zwischen der ersten Immunisierung (1I) und der zweiten Immunisierung (2I) unterschieden, dabei wurden bei 1I sieben Mäuse und bei 2I fünf Mäuse immunisiert.

Bei der ersten Immunisierung mit den Immunogenen 8 bzw. 18 wurden 10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse mit 25 µg einer OTA-Gly-BSA in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) und 300 µL komplettem Freund'schem Adjuvans immunisiert. Dies wurde nach 5 und 7 Wochen in unvollständigem Freund'schem Adjuvans wiederholt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Titer. Titer sind Maßangaben für die Verdünnungen von Antikörpern, die gerade noch eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion ergeben. Der Titer ist somit der Kehrwert der Serumverdünnung. Lag dieser über  $10^5$  wurden die Mäuse mit 30 µg jeweils vier Tage und ein Tag vor der Fusionierung hyperimmunisiert. Die Milzzellen wurden mit Myelomzellen unter Zugabe von Polyethylenglykol hybridisiert und anschließend einzelne Aliquote ausplattiert. Die restlichen Fusionszellen wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und später weiter untersucht. Die erhaltenen Zellen wurden durch wiederholtes Verdünnen vereinzelt und anschließend mittels indirekten nicht-kompetitivem ELISA auf OTA spezifische Antikörper untersucht (Mesci, 2007; Cervino, 2008; Wang, 2009).

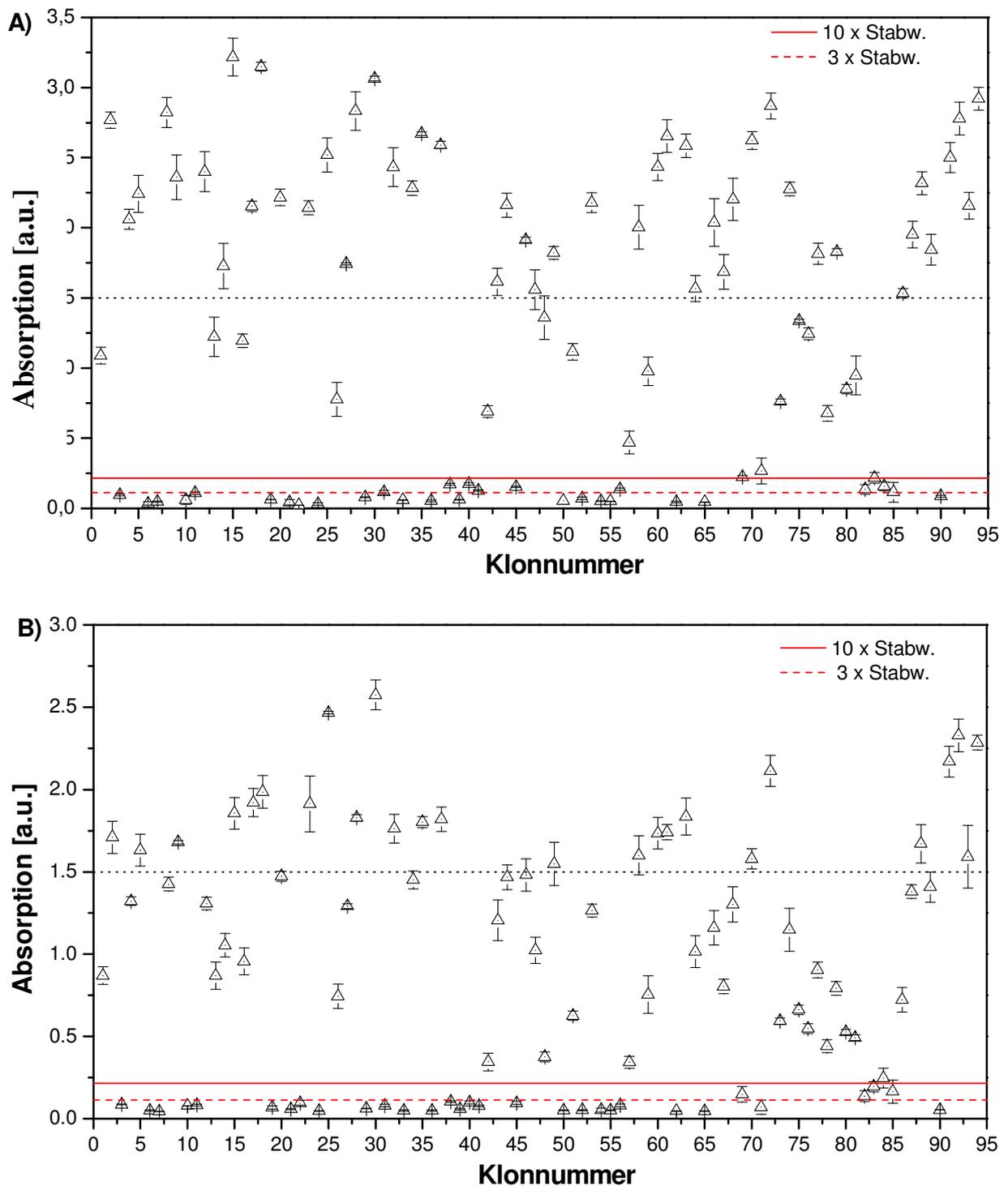
Bei der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse mit demselben Immunisierungsprotokoll behandelt. Es wurde dabei festgestellt, dass der Titer von  $10^5$  bei dieser Immunisierung deutlich schneller erreicht wurde, was durch die bessere Löslichkeit der Immunogene erklärt werden könnte.

In einem Vortest wurden 148 Klone (94 aus der ersten Immunisierung und 54 aus der zweiten) von etwa 4000 Klonen ausgewählt. In diesem Vorscreening am Institut für Physiologische Chemie wurde eine Zellkulturüberstandsverdünnung von 1:2 bei der ersten Immunisierung und von 1:10 bei der zweiten Immunisierung verwendet. Dies ließ zwar eine hohe Anzahl von falsch positiven Klonen vermuten (vor allem bei der 1:2 Verdünnung), es konnte dadurch jedoch vermieden werden, dass positive Klone übersehen wurden. Um allerdings Kreuzreaktivitäten zum BSA-Protein von vornherein auszuschließen, wurde für das Screening bereits das OTA-OVA-Konjugat zur Beschichtung der MTP verwendet. Um ein Optimum der Screening-Aussagekraft bei gleichzeitiger Vollständigkeit der Detektion zu gewährleisten, wurde eine Zellkulturüberstands-Verdünnung von 1:50 festgelegt. Zusätzlich wurde im Ver-

gleich eine Verdünnung 1:100 untersucht, um festzustellen, ob sich der Anteil an falsch positiven ZKÜ erhöht. Zum anderen wird somit der nachfolgende Schritt, die genaue Charakterisierung, durch Festsetzen der Verdünnungsstufe erleichtert. In Abbildung 51 sind die Screeningergebnisse im Vergleich von 1:50 und 1:100 der ersten Immunisierung auf der MTP dargestellt. Um Fehler auszuschließen, wurde jeder ZKÜ als Triplikat bestimmt und zusätzlich eine Positivkontrolle (mit monoklonalen Antikörper 5G9) mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet und dessen Mittelwert plus dreifacher bzw. zehnfacher Standardabweichung als Schwellenwert für positive bzw. negative Klone eingesetzt. Zusätzlich wurden die positiven Proben aufgrund ihres jeweiligen Absorptionswertes anhand einer für jede Platte individuell festgelegten Zuordnungsgrenze in zwei Gruppen eingeteilt. ZKÜ mit sehr hohen Werten wurden in den weiterführenden Experimenten in einer geringeren Konzentration (Verdünnung 1:100 bzw. 1:300) eingesetzt, während Klone mit niedrigeren Absorptionen mit Verdünnungen von 1:50 bzw. 1:100 untersucht wurden.

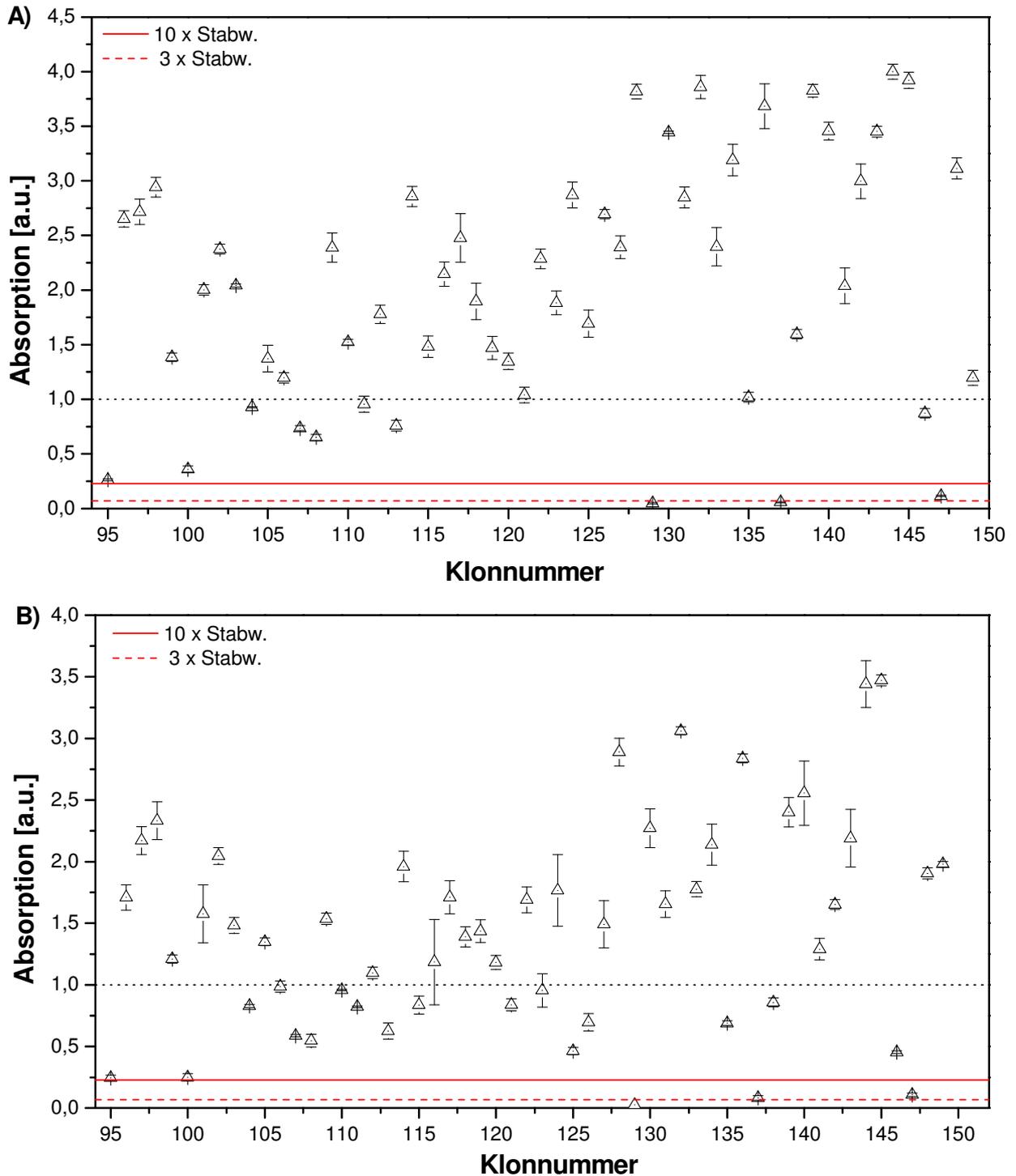
Es zeigte sich, dass sich bei der 1:50-Verdünnung der Klone im Vergleich zur 1:100-Verdünnung höhere Absorptionen von bis zu 3.4 a.u. ergaben. Bei der niedrigeren Verdünnung wurden 29 Klone eindeutig als negativ bestimmt, während drei Klone im Bereich der Negativkontrolle plus zehnfacher Standardabweichung lagen. Dagegen wurden bei der niedrigeren Konzentration 31 Klone als falsch negativ und ein Klon als potentiell negativ bestimmt. In Summe ergaben sich somit bei beiden Verdünnungen 32 negative Klone. Anhand der Zuordnungsgrenze beim 1:50-Screening konnten 15 Klone in eine Gruppe mit niedrigen Verdünnungen eingeteilt werden, diese unterschieden sich dennoch stark von den negativen ZKÜ. Bei Betrachtung der höheren Verdünnungen wurde deutlich, dass 1:100-Verdünnungen ebenfalls zur Einteilung in zwei Gruppen führen und ausreichend Signal ergeben. Dabei wurden 32 Klone zu der Gruppe der 1:100 Verdünnung gezählt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Verdünnung von 1:100 zu keinen falsch negativen Aussagen führt, sondern zudem eine bessere Abschätzung der Verdünnungen mit ausreichender Absorption für nachfolgende Charakterisierungen ermöglicht



**Abbildung 51:** Darstellung der Screenings der ersten Immunisierung mittels indirekt nicht-kompetitivem ELISA ( $m = 3$ ,  $s = 1$ ); (A) Serumverdünnung von 1:50 (B) Serumverdünnung von 1:100 bei einer OTA-OVA-Beschichtung (1:5000). Negativkontrollen plus deren dreifacher bzw. zehnfacher Standardabweichung (- - - bzw. — Linien) als Schwellenwerte. (- - -) Zuordnungsgrenze zur Einteilung der positiven Proben.

In Abbildung 52 sind die Ergebnisse der zweiten Immunisierung dargestellt. Die dabei erhaltenen 54 Klone stammen aus einem Vorscreening mit der Verdünnung 1:10. Die Klone wurden mit den Nummern 94 bis 148 gekennzeichnet.



**Abbildung 52:** Darstellung der Screenings der zweiten Immunisierung mittels indirekt nicht-kompetitivem ELISA ( $m = 3$ ,  $s = 1$ ); (A) Serumverdünnung von 1:50 (B) Serumverdünnung von 1:100 bei einer OTA-OVA-Beschichtung (1:5000). Negativkontrollen plus deren dreifacher bzw. zehnfacher Standardabweichung (- - - bzw. — Linien) als Schwellenwerte. (- - -) Zuordnungsgrenze zur Einteilung der positiven Proben.

Es ergaben sich bei der zweiten Immunisierung deutlich weniger negative Klone, was durch die bereits höhere Verdünnung beim Vorscreening (1:10 vgl. 1:2) erklärt wird. Bei beiden Verdünnungen wurden 5 Klone ausgeschlossen. Im Vergleich zur ersten Immunisierung wurden hier deutlich höhere Absorptionen erreicht. Eine mögliche Ursache liegt in der Verwendung von Immunogenen mit niedrigeren Kopplungsdichten (4 und 7.5), was durch die bedingte höhere Wasserlöslichkeit zu höherer Antikörperproduktion in den Mäusen führen könnte.

Bei zukünftigen Screeningversuchen sollte von Beginn an eine höhere Klonverdünnung gewählt werden, um deutlich weniger falsch positive (durch eventuelle Adsorptionen auf den MTP) Klone zu erhalten. Ein weiterer Vorteil liegt auch in der Einsparung von weiteren Arbeitsschritten, da im Vorfeld schon eine bessere Abschätzung der positiven Klonverdünnungen für die Affinitätsbestimmungen erfolgt.

Zusätzlich wurden bei 69 Klonen aus der ersten Immunisierung Untersuchungen zu Matrixeinflüssen unternommen. Dazu wurden ZKÜ nicht in PBS, sondern direkt in 20 % Methanol-haltigem Haferextrakt verdünnt und analog gescreent. Es sollte sichergestellt werden, dass Antikörper, die durch Matrixbestandteile gehemmt werden, auch als negativ ausselektiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch keinerlei Unterschied zu denen in Abbildung 51 und Abbildung 52, weshalb eine vollständige Hemmung der Antikörper durch die Getreidematrix ausgeschlossen und daher nicht weiter untersucht wurde.

### 3.3 Charakterisierung der erhaltenen Antikörper

Beim ZKÜ-Screening gelten Klone, die eine Kompetition gegenüber OTA zeigen als richtig positiv. Daher wurden alle 114 positiven Klone hinsichtlich ihrer Affinität untersucht. Dabei eignet sich auch hier das indirekt kompetitive ELISA Format (Friguet, 1985). Für die Charakterisierung wurden auf der MTP von links nach rechts die Konzentrationen des ZKÜ sowie des Coating-Konjugats (OTA-OVA) gegeneinander variiert (*Checkerboard*-Titration). So konnte innerhalb eines breiten Konzentrationsspektrums eine Abschätzung des minimalen Testmittelpunkts ( $IC_{50}$ ) erfolgen und ein Optimierungsbereich bestimmt werden. Dabei wurden die ZKÜ in einer Verdünnung von 1/50 bis 1/8100 und das Coating-Antigen (Konzentration der Stammlösung 1.00 mg/mL) von 1/5000 bis 1/50000 eingesetzt. Auf diese Weise wurden alle falsch positiven Klone ermittelt. Zusätzlich wurden alle Klone mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $> 12 \mu\text{g/L}$  aufgrund ihrer unzureichenden Affinität aussortiert, da bei ZKÜ mit höheren Test-

mittelpunkten eine Verbesserung der Assay-Sensitivität durch Optimierung der Assay-Bedingungen (relevanter Bereich: < 1 µg/L) nicht möglich ist. Zusätzlich wurden auch Klone mit IC<sub>50</sub>-Werten unterhalb von 12 µg/L ausgeschlossen, wenn sie ungünstige Fit-Eigenschaften aufwiesen und somit nicht weiter optimiert werden konnten.

Bei der ersten Immunisierung ergaben sich somit 16 Klone und bei der zweiten Immunisierung 6 Klone, die keine Kompetition zeigten und somit als falsch positiv deklariert wurden. Alle 21 ZKÜ sind in Tabelle 25 mit den minimalen IC<sub>50</sub>-Werten und den jeweiligen Verdünnungen dargestellt.

**Tabelle 25:** Zusammenfassung der ZKÜ mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren und den dabei erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werten. (links) Immunisierung 1 (rechts) Immunisierung 2.

Positive ZKÜs		IC <sub>50</sub> [µg/L]	ZKÜ Verd.	OTA-OVA Verd.
1.	1A3	10.2	1:50	1:5000
7.	23G2	3.0	1:300	1:10000
14.	1E10	8.7	1:50	1:10000
46.	4E10	7.2	1:300	1:20000
47.	4H5	10.4	1:300	1:5000
49.	1G8	3.1	1:300	1:5000
58.	2H5	4.0	1:100	1:5000
60.	5F6	11.7	1:100	1:10000
64.	10F4	10.8	1:50	1:5000
80.	2B2	10.1	1:300	1:5000
81.	3H7	10.6	1:300	1:5000

Positive ZKÜs		IC <sub>50</sub> [µg/L]	ZKÜ Verd.	OTA-OVA Verd.
3.	12A6	6.2	1:300	1:10000
6.	19A9	10.7	1:300	1:10000
7.	19A12	11.1	1:100	1:5000
8.	12G1	8.2	1:300	1:10000
15.	20H1	10.0	1:100	1:5000
16.	20H9	12.0	1:100	1:5000
18.	14G8	11.0	1:300	1:5000
22.	21H7	10.6	1:300	1:5000
23.	18C9	10.9	1:300	1:5000
25.	17F4	4.7	1:300	1:5000

Nach der Abschätzung der Affinitäten der Antikörper zeigten ZKÜ 23G2 (Nr. 7) und 1G8 (Nr. 49) die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte. Bei der zweiten Immunisierung lag der sensitivste Antikörper mit 4.7 µg/L (Nr. 25) deutlich unter den anderen (6 – 12 µg/L). Die aus den Einfachbestimmungen positiven ZKÜ wurden durch Dreifachbestimmungen weiter charakterisiert, um die Schwankungen einzelner Werte durch Mittelwertbildung zu minimieren und durch Mehrfachmessung die Testmittelpunkte genauer zu bestimmen. Der jeweilige Optimierungsbereich eines Zellkulturüberstands konnte mit Hilfe der Ergebnisse der Einfachbestimmungen durch Ermittlung der Bedingungen mit dem niedrigsten Testmittelpunkt in Verbindung mit einer geeigneten Absorption gut abgeschätzt werden. Die nach der Optimierung erhaltenen minimalen IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 26 dargestellt.

Die ZKÜ 1G8 und 23G2 aus der ersten Immunisierung sind mit ihrem IC<sub>50</sub>-Wert von 1.8 µg/L bzw. 2.6 µg/L am sensitivsten. Da für unsere Applikation aber ein Testmittelpunkt von 0.3 µg/L benötigt wird, um den gesetzlichen Grenzwert von 5 µg/kg in Getreide messen zu können, reichen diese nicht aus.

**Tabelle 26:** Zusammenfassung der im indirekt kompetitiven ELISA erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte und die maximalen Absorptionen. (links) aus der zweiten Immunisierung (rechts) aus der ersten Immunisierung.

Positive ZKÜs		$IC_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	Absorption [a.u.]
1.	1A3	11.4	0.9
7.	23G2	2.6	0.09
14.	1E10	7.3	0.5
46.	4E10	4.7	0.6
47.	4H5	22.5	0.6
49.	1G8	1.8	0.5
58.	2H5	11.5	0.4
60.	5F6	7.1	0.55
64.	10F4	-	-
80.	2B2	11.0	0.3
81.	3H7	-	-

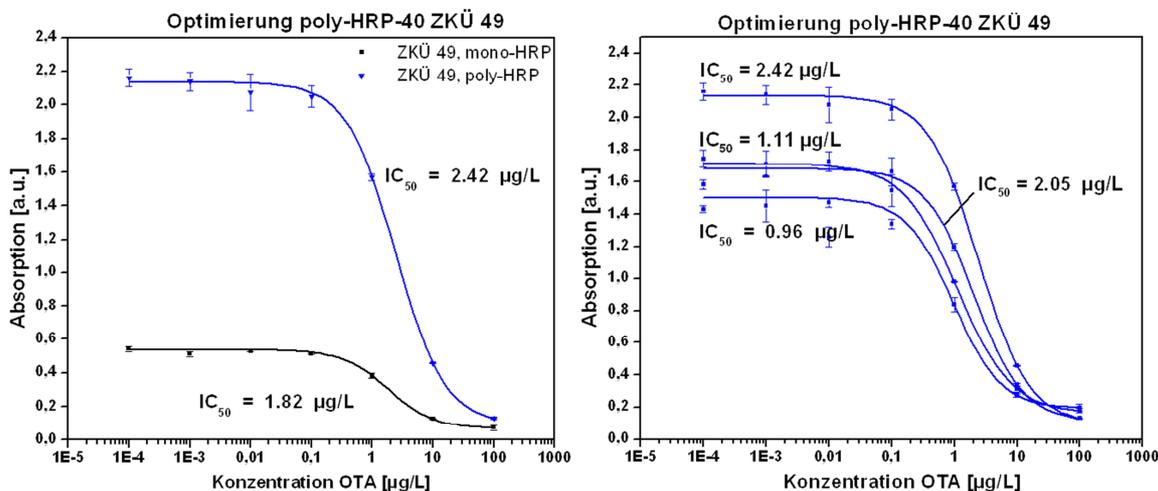
Positive ZKÜs		$IC_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	Absorption [a.u.]
3.	12A6	4.6	0.2
6.	19A9	9.4	0.12
7.	19A12	8.6	0.12
8.	12G1	7.1	0.96
15.	20H1	10.0	0.10
16.	20H9	11.2	0.2
18.	14G8	6.4	0.55
22.	21H7	9.8	0.13
23.	18C9	10.1	0.11
25.	17F4	5.4	0.25

Eine weitere Verdünnung der Reaktionspartner (ZKÜ bzw. Coating-Antigen) wurde ausgeschlossen. Stattdessen kam ein *poly*-HRP-markierter Sekundärantikörper zum Einsatz, der bei gleicher Bindung am Coating-Antigen ein höheres Messsignal erwarten ließ und damit eine weitere Reduzierung der Antigen- bzw. Antikörper-Konzentrationen ermöglichen könnte. Im Test wurde statt dem *oligo*-HRP-markiertem Pferd-anti-Maus-IgG, bei dem ein Verhältnis von HRP zu Antikörper von 3.3:1 angegeben ist, ein *poly*-HRP-40-markierter Ziege-anti-Maus-IgG mit einem Enzym/Antikörper-Verhältnis von 20:1 verwendet (Vector, 2011; Senova, 2011). Anhand des ZKÜ 1G8 (Nr. 49) (Verdünnung 1/500; Coating-Antigen-Verdünnung 1/10000) wurde die Annahme bestätigt, d.h. eine Erhöhung der Absorption um ca. 1.5 a.u. festgestellt (Abbildung 53, links). Allerdings konnte durch eine weitere Verdünnung der Reaktionspartner nur eine um den Faktor von ca. zwei gesteigerte Assay-Sensitivität erhalten werden (neuer  $IC_{50}$  = 0.96  $\mu\text{g/L}$ ; Abbildung 53, rechts). Eine noch weitere (entscheidende) Verbesserung der Assay-Performance kann aus gegenwärtiger Sicht nur durch Erhalt eines noch affineren Antikörpers erreicht werden.

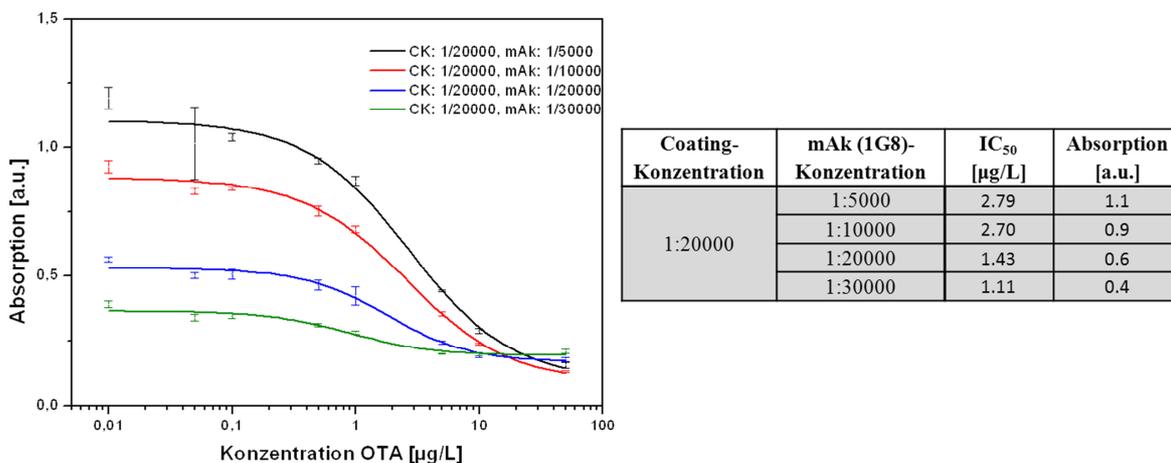
Zur weiteren Assay-Optimierung wurden daneben die Antikörper 1G8 (Nr. 49) und 23G2 (Nr. 7) mit Protein-A/G-Misch(affinitäts)säulen gereinigt, um eventuell vorhandene störende Begleitstoffe zu entfernen.

Die gereinigten Antikörper wurden mittels indirekt kompetitivem ELISA untersucht. Hierbei wurde zunächst die Beschichtungskonzentration mit OTA-BSA mit 1/20000 konstant gehalten, während die Antikörperkonzentrationen von 1/5000 bis 1/30000 spaltenweise (je Triplikate) verdünnt wurden. Der Antikörper 23G2 (Nr. 7) zeigte nach der Aufreinigung keinerlei Verbesserung des Testmittelpunktes, dieser lag bei 3.6  $\mu\text{g/L}$ , zuvor bei 2.6  $\mu\text{g/L}$ . Die entspre-

chenden ELISA-Kalibrierkurven für 1G8 (ZKÜ 49), sowie die erreichten minimalen IC<sub>50</sub>-Werte sind in Abbildung 54 dargestellt, wobei mit 1.1 µg/L der niedrigste Testmittelpunkt erreicht wurde.



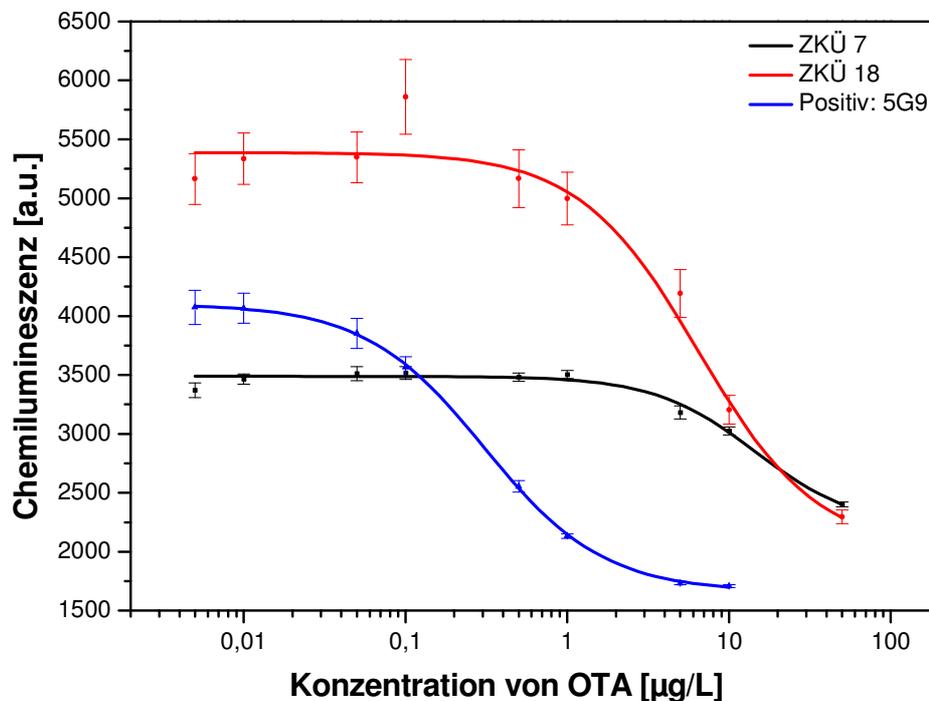
**Abbildung 53:** (links) Vergleich von *oligo*- und *poly*-HRP- Sekundärantikörper im ELISA mit ZKÜ 1G8 (Nr.49); (rechts) ELISA-Optimierung mit ZKÜ 1G8 (Nr.49); (m = 7, n = 3, s = 1).



**Abbildung 54:** Darstellung (links) der im indirekt kompetitiven ELISA erhaltenen Kalibrationskurven (m = 8, n = 3, s = 1); (rechts) die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte und Absorptionen.

Als letzter Charakterisierungsschritt wurden die Antikörper auf unserem Messsystem, dem MCR 3, untersucht. Antikörper können aufgrund des Durchflussarrays andere Eigenschaften und Sensitivitäten aufweisen als auf den stationären MTP-ELISA. Die Spotting-Konzentration von OTA betrug 0.55 mg/mL und die Antikörper-Konzentrationen betragen

0.2 mg/mL. Für jede Kalibrierung wurde stets ein Chip verwendet und zum Vergleich der Antikörper 5G9 als Positivkontrolle gemessen (Gyöngyösi-Horvath, 1996). In Abbildung 55 sind die erhaltenen Kalibrierkurven zusammengefasst.



**Abbildung 55:** Vergleich der erhaltenen Kalibrierkurven auf dem MCR 3 ( $m = 8$ ,  $n = 6$ ,  $s = 1$ ) von den gereinigten mAk 1G8 (Nr. 49), 23G2 (Nr. 7) und 5G9 als Positivkontrolle.

Die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte lagen im Vergleich zu der Positivkontrolle von 5G9 von  $0.2 \mu\text{g/L}$  bei deutlich höheren Werten von  $14.2 \mu\text{g/L}$  für 23G2 (Nr. 7) und bei  $6.1 \mu\text{g/L}$  für 1G8 (Nr. 49).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse konnte nicht gezeigt werden, ob das Anbringen eines Linkers zum Protein bei Immunogenherstellung zu sensitiveren Antikörpern führt. Entscheidender scheint ein Kompromiss zwischen Löslichkeit des Immunogens und hoher Kopplungsdichte zu sein.

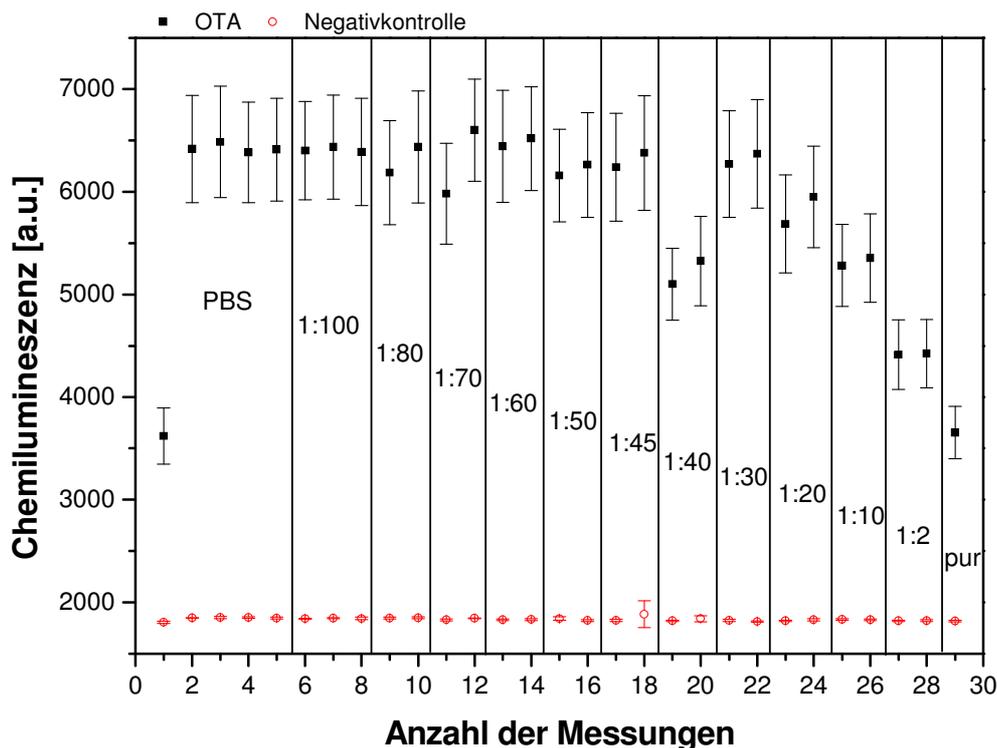
## 4 Qualitative und quantitative Bestimmung von Ochratoxin A in Wein

OTA tritt sehr häufig in geringen Mengen in verschiedenen Konsumgütern der Lebensmittelindustrie auf. Wie bereits in Kapitel II 1.3 erwähnt, sind die Hauptproduzenten von OTA *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium viridactum* (Pohland, 1982). Neben den diversen Getreidearten befallen diese, speziell der Schimmelpilz *Aspergillus carbonarius* auch häufig Traubenstöcke (Mendez-Vilas, 2009). Dies erfordert eine erhöhte Kontrolle von OTA in Weinprodukten. Die festgelegten Grenzwerte liegen für Weine bei 2.00 µg/L. Im nächsten Abschnitt wird die Entwicklung und Optimierung eines OTA-Assays speziell für Weinmessungen erläutert. Die Herstellung der Mikroarrays und der Programmablauf erfolgte analog zu den Mykotoxinassays in Getreide (siehe Kapitel III. 1.4).

### 4.1 Weißwein

Die Regenerierbarkeit eines OTA-Chips spielt eine wichtige Rolle bei der Herstellung einer wirtschaftlich nutzbaren Analysemethode. Die Untersuchung der Weißweinmatrix auf der Oberfläche war grundlegender Bestandteil der Entwicklung eines Mikroarrays. Hierfür wurde ein Chip mehrmals mit unterschiedlichen Wein-PBS-Verdünnungen als *Blank*-Matrix gemessen. Jede Messung erfolgte zwei- bis dreimal, um ein Gleichgewicht auf der Oberfläche zu erhalten. Die erhaltenen Signale bei Weißwein (WW) sind dabei in Abbildung 56 dargestellt.

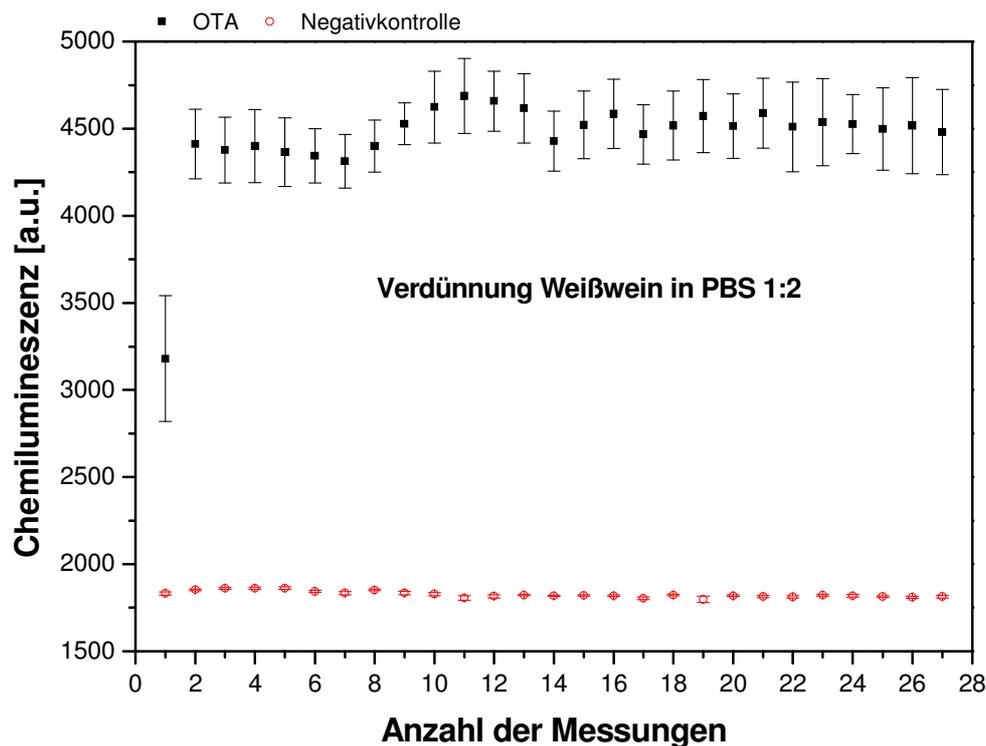
Es ist zu beobachten, dass sämtliche Verdünnungsverhältnisse von 1:100 bis zu 1:30 konstant hohe Chemilumineszenz-Signale zeigten. Ausnahme dabei ist die Verdünnung 1:35 (Wein zu PBS), wobei hier von einem Fehler bei der Durchführung des Experiments auszugehen ist. Mit sinkender Verdünnungsstufe von 1:20 bis zur Messung des reinen Weins (pur) fallen die Intensitäten der Signale bis 54 % (bezogen auf PBS-Messungen) ab. Dies zeigt einen relativ deutlichen Matrixeinfluss des reinen WW auf die Mikroarray-Oberfläche. Dennoch reicht die Signalintensität von 3500 a.u. für eine Kalibrierung aus. Durch den zunehmenden Anteil von Wein befinden sich höhere Mengen von organischen Substanzen in der *Blank*-Matrix, die mit den zugegebenen Antikörpern wechselwirken und zu unspezifischen Bindungen (Blocken der mAk) führen können. Diese Stoffe können sich aber auch auf der Oberfläche des Chips absetzen, weshalb ebenfalls weniger Antikörper mit dem immobilisierten OTA binden können.



**Abbildung 56:** Untersuchung der Matrixeinflüsse von WW auf das Signal des OTA-Chips (Verdünnungsexperiment,  $n = 6$ ,  $s = 1$ ).

Ein weiterer Grund für den Abfall der Chemilumineszenz-Intensität kann der steigende Anteil von Ethanol sein. Der enthaltene Alkohol könnte mit einem Teil der mit auf der Oberfläche gebundenen Antikörper interagieren und so diese wieder lösen, was zu einer geringeren Signalintensität führt. Außerdem können die variablen Teile des Antikörpers durch den Alkohol denaturiert werden, was dazu führt, dass einige der Antikörper mit dem Analyten keinen Analyt-Antikörper-Komplex bilden können. Trotzdem wird auch bei hohen Weinkonzentrationen eine relativ gute Signalintensität erreicht. Um eine Schädigung der Oberfläche durch längerfristige Einwirkung von Wein auszuschließen, wurden 27 aufeinander folgende Messungen mit einer 1:2-Verdünnung (Wein/PBS, v/v) durchgeführt (Abbildung 57).

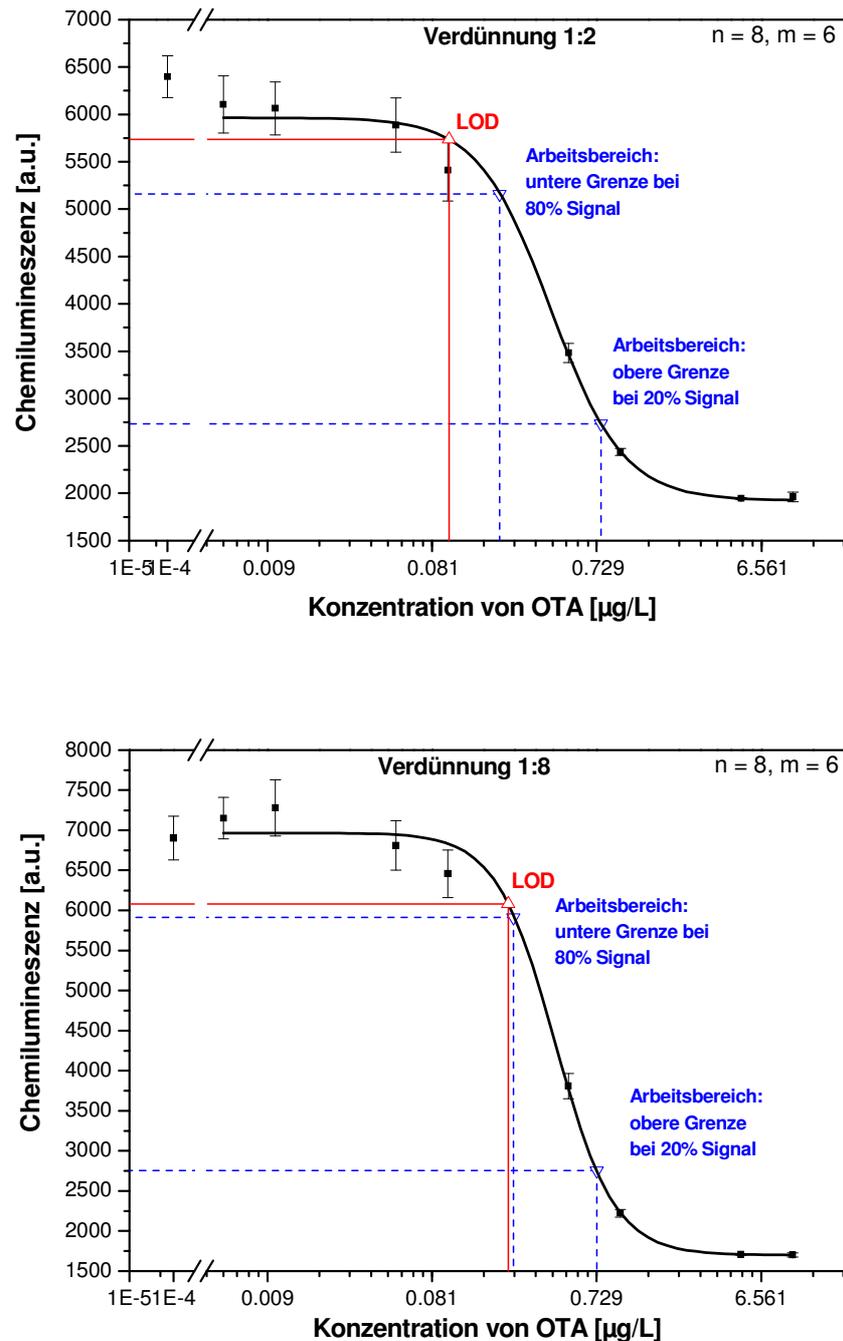
Zu beobachten ist, dass wie beim Getreide-Chip, die erste Messung ein deutlich geringeres Signal lieferte. Auch hier sollten stets drei Messungen zur Gleichgewichtseinstellung durchgeführt werden. Die Streuung von Messung 2 bis 27 lag mit 2.62 % sehr niedrig und die Intensität am Ende war bei 106.01 %. Die Weinmatrix spielt selbst bei der sehr geringen Verdünnung von 1:2 eine relativ geringe Rolle bzgl. einer dauerhaften Inaktivierung des Chips. Wenn es zu Wechselwirkungen mit der Mikroarrayoberfläche kommt, so werden diese Bestandteile bei jeder Regeneration des Chips offenbar wieder entfernt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine Kalibrierung erstellt werden.



**Abbildung 57:** Untersuchung der Regenerierbarkeit von WW mit einer Verdünnung von 1:2 auf den OTA-Chips ( $n = 6$ ,  $s = 1$ ).

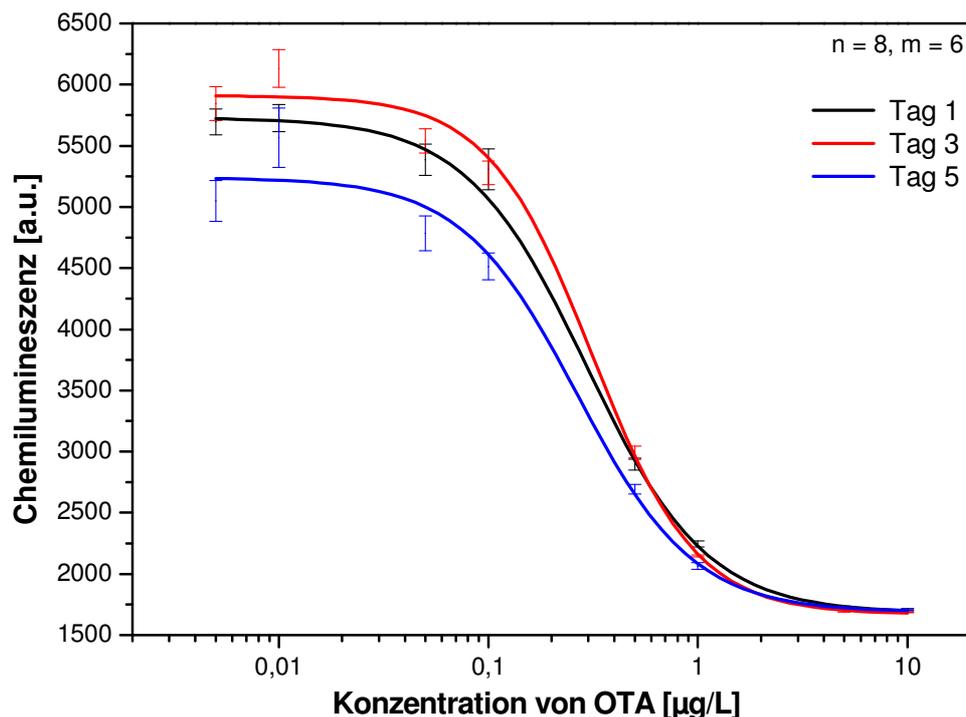
Um eine möglichst sensitive Methode zu erhalten, wurde eine Kalibrierung mit dem WW in einer 1:2-Verdünnung mit PBS durchgeführt. Dabei wurde bei den Kalibriermessungen eine andere Chipcharge verwendet, was eine Änderung des Absolutsignals zur Folge hatte. Es wurde ein Arbeitsbereich von  $0.20 - 0.77 \mu\text{g/L}^*$  (\*in verdünntem Wein) erhalten. Nach Einberechnung des Verdünnungsfaktors ergaben sich Werte von  $0.40 - 1.54 \mu\text{g/L}$ . Der Testmittelpunkt von  $0.39 \mu\text{g/L}^*$  verschob sich zu  $0.79 \mu\text{g/L}$  und die Nachweisgrenze lag bei  $0.34 \mu\text{g/L}$ . Diese Ergebnisse zeigten die hohe Sensitivität der Methode. In Hinblick auf den in der EU festgesetzten Grenzwert von  $2.00 \mu\text{g/L}$  OTA in Weißwein (WW), ist der hier durchgeführte Test zu nachweisstark, weshalb für die Messung von Realproben diese noch weiter verdünnt werden können. Dazu wurde eine Verdünnung von 1:8 (WW/PBS, v/v) gewählt. In Abbildung 58 sind beide Kalibrierungen dargestellt.

Durch die Verdünnung 1:8 konnte somit ein Arbeitsbereich von  $0.24 - 0.73 \mu\text{g/L}^*$  und ein Testmittelpunkt von  $0.42 \mu\text{g/L}^*$  erreicht werden. Nach Multiplizierung des Verdünnungsfaktors von 8 ergaben sich somit ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $3.37 \mu\text{g/L}$ , mit einem Arbeitsbereich von  $1.95 - 5.82 \mu\text{g/L}$  und einem LOD  $1.14 \mu\text{g/L}$ .



**Abbildung 58:** Kalibrierkurven von OTA in WW (Oben) 1:2 und (Unten) 1:8, mit berechneten Nachweisgrenzen (LOD) und Arbeitsbereichen ( $n = 8, m = 6, s = 1$ ).

Als nächstes wurde eine Mehrtages-Studie durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Analysemethode zu überprüfen. Dafür wurden an drei Tagen innerhalb einer Woche jeweils die gleichen Messungen durchgeführt und die jeweiligen WW-Standards für die Kalibrierung neu erstellt (Abbildung 59).



**Abbildung 59:** Mehrtages-Studie für OTA in WW mit Verdünnung 1:8 ( $m = 8$ ,  $n = 6$ ,  $s = 1$ ).

Die oberen Asymptoten zeigen einen Unterschied auf, während die unteren nahezu identisch sind. Die erhaltenen Kurvenparameter sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Der Testmittelpunkt befand sich bei  $2.46 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$  und wies eine Abweichung von 6 % auf. Die untere Grenze des linearen Bereichs hat dabei den größten Fehler von 13 % ( $1.08 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$ ), der durch die Abweichung der oberen Asymptoten zu erklären ist. Die obere Grenze war bei  $5.61 \pm 0.25 \mu\text{g/L}$  (4 %). Dies zeigt die hohe Reproduzierbarkeit des OTA-Chips.

**Tabelle 27:** Vergleich der Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ) und der Arbeitsbereiche der Kalibrierungen aus der Mehrtages-Studie von OTA in WW (Interassay-Standardabweichung,  $n = 3$ ,  $s = 1$ , Verdünnung 1:8).

	OTA			
	Tag 1	Tag 3	Tag 5	MW
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g/kg}$ ]	2.35	2.62	2.42	<b><math>2.46 \pm 0.14</math></b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g/kg}$ ]	0.94 – 5.86	1.22 – 5.59	1.09 – 5.37	<b><math>1.08 \pm 0.14</math> – <math>5.61 \pm 0.25</math></b>

<sup>1</sup> Linearer Bereich: 80 – 20 % - Signal

Für eine weitere Charakterisierung der Methode wurden an drei verschiedenen Tagen dotierte Proben hergestellt. Genutzt wurden zwei WW-Sorten, mit je einer *Blank*-Probe, einer Probe

unterhalb des Grenzwertes, einer auf dem Grenzwert sowie zwei Proben oberhalb. Zur Kalibrierung wurde WW1 eingesetzt. Zum Vergleich wurden dieselben Proben und Kalibrierstandards mittels klassischen ELISA auf der MTP untersucht. In Tabelle 28 sind die dabei erhaltenen WF beider Methoden zusammengefasst.

**Tabelle 28:** WW-Kalibrierung mit WW1: Vergleich der WF von dotierten WW-Proben mit OTA bestimmt mit MCR 3 ( $m = 6$ ,  $1 = s$ ) und ELISA ( $m = 3$ ,  $1 = s$ ); Mittelwert (MW) mit Interassay-Standardabweichung ( $m = 3$ ,  $1 = s$ ).

MCR 3					
Probe	OTA-Dotiert [ $\mu\text{g/L}$ ]	WF [%]			
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	MW
WW1	blk	-	-	-	-
	1	109 $\pm$ 16	134 $\pm$ 16	139 $\pm$ 30	<b>127 <math>\pm</math> 16</b>
	2	92 $\pm$ 8	111 $\pm$ 6	105 $\pm$ 13	<b>103 <math>\pm</math> 10</b>
	4	163 $\pm$ 12	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 10	<b>121 <math>\pm</math> 36</b>
	6	154 $\pm$ 8	105 $\pm$ 57	119 $\pm$ 12	<b>126 <math>\pm</math> 25</b>
WW2	blk	-	-	-	-
	1	110 $\pm$ 12	97 $\pm$ 25	109 $\pm$ 23	<b>105 <math>\pm</math> 7</b>
	2	100 $\pm$ 8	102 $\pm$ 5	99 $\pm$ 13	<b>100 <math>\pm</math> 2</b>
	4	103 $\pm$ 4	99 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 9	<b>101 <math>\pm</math> 2</b>
	6	126 $\pm$ 5	68 $\pm$ 63	-	<b>97 <math>\pm</math> 41</b>
ELISA					
Probe	OTA-Dotiert [ $\mu\text{g/L}$ ]	WF [%]			
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	MW
WW1	blk	-	-	-	-
	1	93 $\pm$ 16	123 $\pm$ 12	90 $\pm$ 8	<b>102 <math>\pm</math> 18</b>
	2	75 $\pm$ 14	89 $\pm$ 6	60 $\pm$ 6	<b>75 <math>\pm</math> 15</b>
	4	95 $\pm$ 11	74 $\pm$ 2	82 $\pm$ 8	<b>84 <math>\pm</math> 11</b>
WW2	blk	-	-	-	-
	1	-	127 $\pm$ 20	51 $\pm$ 55	<b>89 <math>\pm</math> 53</b>
	2	-	55 $\pm$ 33	56 $\pm$ 4	<b>56 <math>\pm</math> 0.7</b>
	4	-	63 $\pm$ 6	43 $\pm$ 10	<b>53 <math>\pm</math> 14</b>

Der OTA-Mikroarray wies beim WW1 eine leichte Überbestimmung auf, die WF lagen bei 103 – 127 %. So zeigten die Proben, dotiert mit 1.00  $\mu\text{g/L}$ , stets die höchsten WF-Werte. Diese lagen mit der aufgestockten Konzentration außerhalb des Arbeitsbereiches, was zu unge-

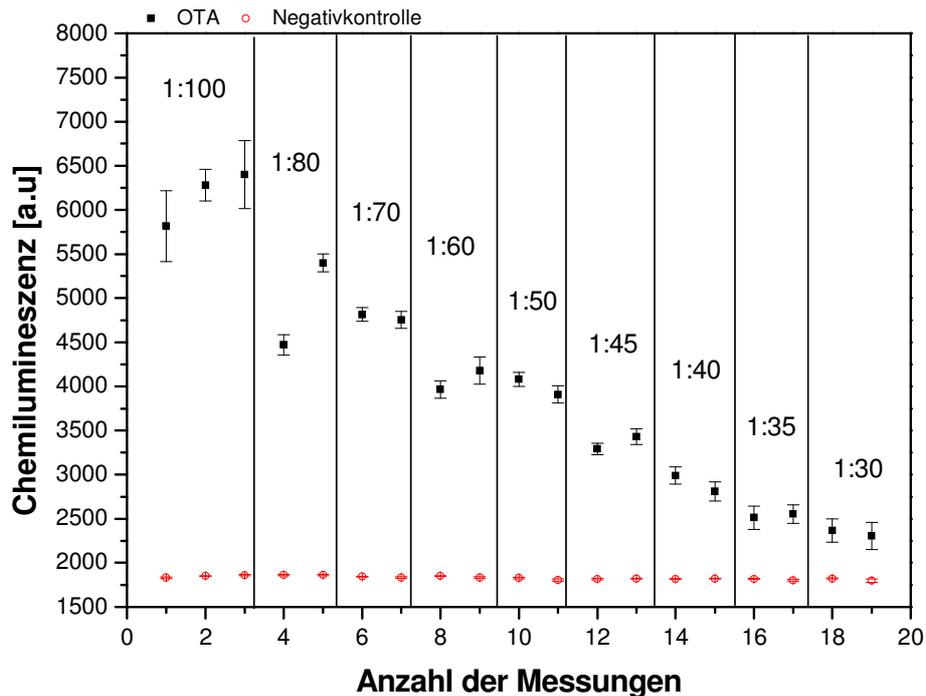
nauerer Quantifizierung führen kann. Dennoch wurden alle erhaltenen Konzentrationen kleiner 2.00  $\mu\text{g/L}$  gemessen und lieferten somit das richtige Ergebnis. Entscheidend für eine gute Reproduzierbarkeit sind geringe Varianzen zwischen den einzelnen Tagen. So zeigten Proben, dotiert mit 1.00  $\mu\text{g/L}$  und 2.00  $\mu\text{g/L}$ , einen Fehler  $\leq 12\%$ . Die WF der WW2-Proben lagen bei 97 – 105 % und erwiesen somit die Möglichkeit unterschiedliche WW mit einer Kalibrierung zu untersuchen.

Im Vergleich zum MCR 3 waren die WF von WW1 mit dem klassischen ELISA bei 75 – 102 %. Die Proben mit 6.00  $\mu\text{g/L}$  konnten nicht gemessen werden, da sie außerhalb des Arbeitsbereiches lagen. Durch die bei der Mehrtages-Studie erhaltenen Parameter, lag dieser bei  $0.90 \pm 0.21$  bis  $4.55 \pm 0.63$   $\mu\text{g/L}$ , mit einem Testmittelpunkt von  $1.52 \pm 0.34$   $\mu\text{g/L}$ . Die WW2-Proben waren stets unterbestimmt mit 53 – 89 %. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der MTP-ELISA anfälliger auf Matrixeinflüsse war als der Durchfluss-Assay (auf dem MCR 3). Ein Grund könnte in der deutlich längeren, einstündigen Inkubationszeit auf der MTP liegen.

## 4.2 Rotwein

Die wesentlichen Bestandteile von Weinen sind neben Ethanol (8.0 – 16.5 %), vor allem Zucker und Säuren (Apfelsäure, Weinsäuren, etc.). Der größte Unterschied zwischen WW und Rotwein (RW) besteht in den Inhaltsstoffen Phenolen (Tannine und Farbstoffe), die für die Farbe, Geruch und Textur verantwortlich sind. Dabei enthält RW bis sechsmal so viele Phenole wie WW. Dies führt zu der Problematik, dass RW-Matrix auf dem Mikroarray-Chip einen deutlich größeren Effekt aufweist als WW-Matrix. Daher werden stets auch bei den etablierten Referenzmethoden, meist HPLC-FLD, kostenintensive Aufreinigungsschritte durch SPE, IAC, etc. vorgeschaltet (Mao, 2013).

Im Versuch wurden zunächst, wie beim WW in Kapitel III. 4.1, verschiedene Verdünnungen von RW/PBS nacheinander über den Chip geleitet. Es wurden stets zwei Messungen von jeder Verdünnung durchgeführt. In Abbildung 60 sind die jeweiligen Signalintensitäten dargestellt.

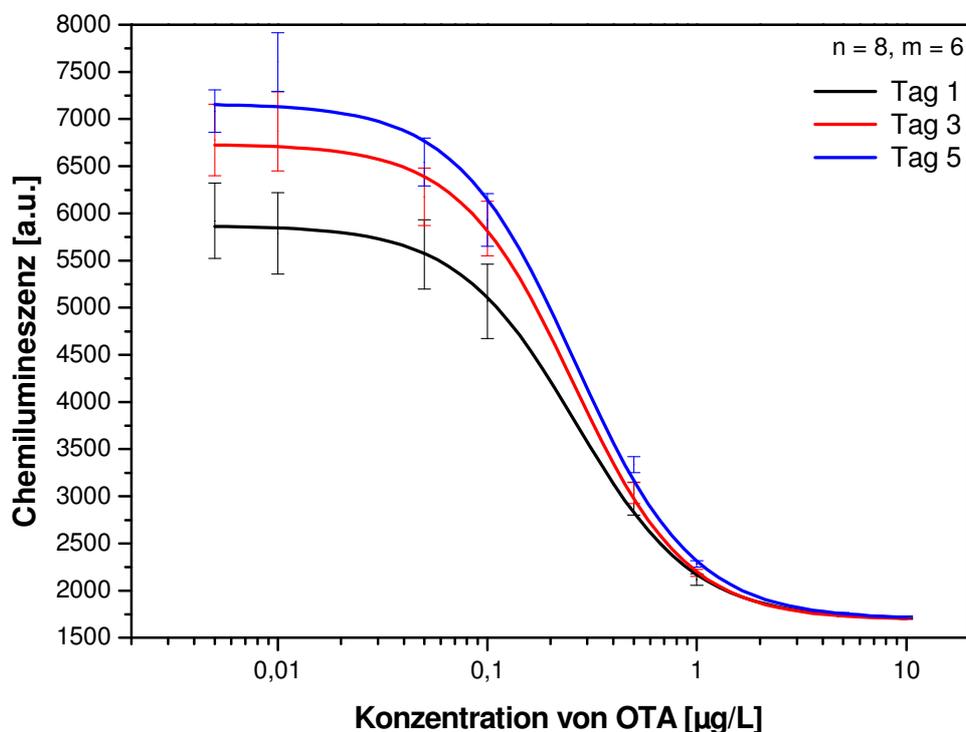


**Abbildung 60:** Untersuchung der Matrixeinflüsse von RW auf das Signal des OTA-Chips (Verdünnungsexperiment,  $n = 6$ ,  $s = 1$ ).

In einer vorangegangenen Messung einer 1:2-Verdünnung von RW und PBS konnte kein Signal detektiert werden. Ein zu hoher OTA-Gehalt als mögliche Erklärung, konnte aufgrund des ebenfalls fehlenden Signals der Positivkontrolle (DNT) ausgeschlossen werden. Daher lag die Vermutung nahe, dass ein Matrixeinfluss vorliegt. So zeigte eine zunehmende Verdünnung des RW eine Verbesserung des Intensitätsverhältnisses von Spot und Hintergrund. Da alle Messungen auf einem Chip erfolgten, konnte mit einem leichten Signalverlust gerechnet werden. PBS-Messungen zeigten allerdings eine Regenerierbarkeit von 50 Messungen (siehe auch Kapitel III. 1.4.2), weshalb ein starker Einfluss der Matrix als Hauptursache festgehalten wurde. Weitere Messungen mit Verdünnungen von 1:45 zeigten bereits nach sechs Messungen ein kaum unterscheidbares Signal zum Hintergrund, eine 1:60-Verdünnung erlaubte immerhin 20 Messungen (mit exponentiellen Abfall). Hohe Verdünnungen von über 1:60 machen es nicht möglich, OTA im Bereich von  $2.00 \mu\text{g/L}$  zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurde eine Aufarbeitung der RW-Matrix in Betracht gezogen.

Als geeignet hat sich dabei die Behandlung im Ultraschallbad mit dem Zusatz von Chloroform/NaCl-Lösung gesättigt (60:40, v/v) und anschließende Trennung der Phasen herausgestellt. Durch Abrotieren wurde das für Ak schädliche Chloroform entfernt und der Rückstand mit einer 1:8-Verdünnung (RW-Extrakt/20 % Methanol in PBS) gelöst. Nach einigen Regene-

rationsmessungen hatte sich das Signal als stabil erwiesen, woraufhin Kalibrierungen in einer Mehrtages-Studie aufgenommen wurden (Abbildung 61).



**Abbildung 61:** Mehrtages-Studie für OTA in RW mit Verdünnung 1:8 nach Aufarbeitung (m = 8, n = 6, s = 1).

Wie beim WW unterscheiden sich die oberen Asymptoten im Absolutsignal, während die Lage der Arbeitsbereiche vergleichbar ist. In Tabelle 29 sind die erhaltenen Kurvenparameter aufgelistet.

**Tabelle 29:** Vergleich der Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ) und der Arbeitsbereiche der Kalibrierungen aus der Mehrtages-Studie von OTA in RW (Interassay-Standardabweichung, n = 3, s = 1, Verdünnung 1:8).

	OTA			
	Tag 1	Tag 3	Tag 5	MW
$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	2.11	2.11	2.29	<b><math>2.17 \pm 0.10</math></b>
$LB^1$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	0.86 – 5.17	0.90 – 4.92	0.99 – 5.31	<b><math>0.92 \pm 0.07</math> – <math>5.13 \pm 0.20</math></b>

<sup>1</sup> Linearer Bereich: 80 – 20 % - Signal

Die ermittelten Testmittelpunkte lagen mit einer maximalen Abweichung von 5 %, mit Werten von  $2.17 \pm 0.10 \mu\text{g/L}$ , sehr nahe zusammen und sollten somit eine sehr gute Messung in diesem Bereich erlauben. Die Lage der unteren Arbeitsgrenze zeigte mit einem Bereich von  $0.92 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$  einen äußerst geringen Fehler von 7 %. Die obere Grenze war bei  $5.13 \pm 0.20 \mu\text{g/L}$ .

Zusätzlich wurden hier Proben mit Konzentrationen von  $1.00 \mu\text{g/L}$  bzw.  $3.00 \mu\text{g/L}$  OTA hergestellt, die im Arbeitsbereich liegen und somit zuverlässig gemessen werden sollten. Auch wurden die Kalibrierungen (RW1) und die exakt selben Proben mit dem klassischen ELISA gemessen (Tabelle 30).

**Tabelle 30:** RW-Kalibrierung mit RW1: Vergleich der WF von dotierten Weinproben mit OTA bestimmt mit MCR 3 ( $m = 6, 1 = s$ ) und ELISA ( $m = 3, 1 = s$ ); Mittelwert (MW) mit Interassay-Standardabweichung ( $m = 3, 1 = s$ ).

MCR 3					
Probe	OTA-Dotiert [ $\mu\text{g/L}$ ]	WF [%]			MW
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	
RW1	blk	-	-	-	-
	1	89 $\pm$ 46	82 $\pm$ 18	63 $\pm$ 180	78 $\pm$ 13
	3	90 $\pm$ 19	79 $\pm$ 7	82 $\pm$ 6	84 $\pm$ 6
RW2	blk	-	-	-	-
	1	137 $\pm$ 56	53 $\pm$ 23	80 $\pm$ 21	90 $\pm$ 43
	3	97 $\pm$ 27	76 $\pm$ 6	97 $\pm$ 7	90 $\pm$ 12
WW1	blk	-	-	-	-
	1	201 $\pm$ 76	123 $\pm$ 17	-	162 $\pm$ 55
	3	110 $\pm$ 36	99 $\pm$ 7	-	105 $\pm$ 8
ELISA					
Probe	OTA-Dotiert [ $\mu\text{g/L}$ ]	WF [%]			MW
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	
RW1	blk	-	-	-	-
	1	-	84 $\pm$ 12	76 $\pm$ 31	80 $\pm$ 6
	3	-	68 $\pm$ 7	65 $\pm$ 31	67 $\pm$ 2
RW2	blk	-	-	-	-
	1	-	55 $\pm$ 17	39 $\pm$ 18	47 $\pm$ 11
	3	-	32 $\pm$ 5	19 $\pm$ 52	26 $\pm$ 10

Die durchschnittlichen WF lagen mit 78 – 90 % bei RW in einem sehr guten Bereich. Auffallend ist, dass die Proben mit einer OTA-Konzentration von 3.00 µg/L bessere WF und deutlich kleinere Schwankungen lieferten. Dies kann durch die „zentrale“ Lage der Probe im linearen Messbereich erklärt werden. Die 1.00 µg/L Probe liegt dagegen an der Grenze des linearen Bereiches, wodurch sich kleinere Schwankungen einer Messung viel stärker auf die errechnete Konzentration auswirken. Dieser Sachverhalt ist bei beiden (RW1 und 2) 1.00 µg/L-Proben zu beobachten. Der Unterschied zu den WW liegt in der relativ komplexen Probenvorbereitung und führt daher u.U. eher zu Ausreißern in den Messungen.

Bei den RW2-Proben fielen die im Vergleich zu den RW1-Proben größeren Schwankungen während der dreitägigen Messungen auf (bis 48 %). Die durchschnittlichen WF bei RW2 waren jedoch mit 90 % sehr gut. Diese im Vergleich zu den RW1-Proben besseren WF überraschen, da die Kalibrierungen ebenfalls in RW1 durchgeführt wurden.

Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Beide RW zeigen vor jeglicher Behandlung ein sehr ähnliches Matrixverhalten bzw. durch die Probenvorbereitung werden alle störenden Matrixfaktoren beseitigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bestimmung von OTA in RW mit der hier verwendeten Extraktionsmethode sehr zufriedenstellende WF liefert und möglicherweise auch (viele) verschiedene RW mit nur einer Kalibrierung gemessen werden könnten. Des Weiteren wurden WW1-Proben mit 1.00 und 3.00 µg/L gemessen, dabei führte die 1.00 µg/L-Probe zu einer Überbestimmung von  $162 \pm 55$  %, während für die 3.00 µg/L die WF bei  $105 \pm 8$  % lag.

Die MTP-ELISA Messungen ergaben dagegen WF beim RW1 von 67 – 80 % mit sehr geringen Schwankungen unter 7 %, was durch die Gleichgewichtseinstellung zu erklären ist. Die RW2 Proben dagegen führten zu deutlich niedrigeren Werten (26 und 47 %) und bestätigen die Notwendigkeit bei klassischen MTP für jede Matrix eigene Kalibrierungen zu erstellen. Vergleichend mit den erhaltenen Ergebnissen mit dem klassischen MTP-ELISA, ist die Quantifizierung von OTA in WW und RW möglich und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Sie stellt somit eine gute, schnelle und einfache Alternativmethode dar.

Bei allen getesteten Weinproben (WW und RW) wurden *Blank*-Proben, d.h. keine zudosierte OTA-Mengen, gemessen (siehe Tabelle 28 und 30). Diese wurden stets als *Blanks* ( $\leq$  LOD) bestimmt und enthielten somit keine messbaren und relevanten OTA-Mengen.

## **IV Zusammenfassung und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es, einen regenerierbaren Mikroarray-basierten, indirekt kompetitiven ELISA mit Chemilumineszenz-Detektion für die parallele Detektion von sechs relevanten Mykotoxinen in Getreide zu entwickeln. Im Vordergrund stand die Entwicklung einer Methode, mit der eine qualitative und quantitative Bestimmung möglich ist. Dabei sollte zum einen die Bestimmung in Lebensmittelrohextrakten erarbeitet werden, um somit zusätzliche Arbeitsschritte und damit Kosten zu sparen. Zum anderen sollte eine Sensitivität erreicht werden, die eine Quantifizierung im Bereich der gesetzlichen Höchstgrenzen ermöglicht. Als Plattform wurde der am Institut für Wasserchemie der TU München entwickelte *Munich Chip Reader 3ter Generation* (MCR 3) eingesetzt.

Mykotoxine werden als Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen gebildet und sind aufgrund ihrer akuten Toxizität, Immunosuppressivität, Mutagenität, Teratogenität und Kanzerogenität bekannt. In dieser Arbeit wurden vor allem die Mykotoxine Aflatoxin B1, B2, G1 und G2, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Fumonisin B1, T-2/HT-2 Toxine und Zearalenon untersucht. Diese werden überwiegend von *Aspergillus*-, *Penicillium*, und *Fusarium*-Stämmen produziert und befallen häufig Getreide. Aufgrund ihrer hohen Toxizität wurden gesetzliche Höchstgrenzen festgelegt. Die vorgeschriebene Höchstmenge in getreidebasierten Lebensmitteln, die zum direkten Verzehr gedacht sind, liegen beispielsweise bei Aflatoxin B1 bei 2 µg/kg, für die Summe aller Aflatoxine bei 4 µg/kg bzw. bei Ochratoxin A bei 5 µg/kg, und stellen somit die niedrigsten Grenzwerte für alle in dieser Arbeit verwendeten Mykotoxine dar. Dagegen liegen diese bei Fumonisin B1 in Mais bzw. Getreide zum direkten Verzehr bei 1000 µg/kg, bei Deoxynivalenol bei 750 µg/kg und für Zearalenon bei 75 µg/kg. T-2/HT-2 Toxine wurden 2001 bezüglich ihrer Toxizität vom *Scientific Committee for Food* (SCF) bewertet und für die Summe von T-2/HT-2 Toxin ein TDI (Tolerable Daily Intake) von 0.06 µg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt. Gesetzliche Grenzwerte in Lebensmitteln sind zwar von der EU vorgeschlagen, aber noch nicht festgelegt (EU-Empfehlung der Kommission, 2006).

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Immobilisierung der Mykotoxine auf dem vorbehandelten Glaschip untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Signalsteigerung bei direkter Kupplung der Mykotoxine über eine bereits vorhandene oder synthetisierte Carbonsäure-Gruppe auf dem PEGylierten Glaschip gegenüber der Verwendung von Linkern (Peptiden, Ethylendiamin) auf der Epoxy-PEG-Schicht. Die entsprechenden Mikroarray-Chips, mit Ausnahme von ZEA, konnten mindestens 50-fach regeneriert, also wiederverwendet werden. Dies galt auch beim Einsatz von unterschiedlichen Getreidematrizes, wodurch ein *biofouling* oder adsorptive Anlagerung von Matrixbestandteilen auf der Chip-Oberfläche aus-

geschlossen werden konnten. Ferner wurden Kalibrationskurven für AFB1, OTA, DON, FB1 und T-2 Toxin erstellt, die eine Bestimmung dieser Toxine im MRL-relevanten Bereich nach geeigneter Verdünnung der Probenextrakte ermöglichen. Die Messzeit für eine Probe betrug dabei lediglich 12 min. Bei einer parallelen Kalibrierung lagen die Nachweisgrenzen für Aflatoxine in Hafermatrix bei 0.9 µg/kg, für Ochratoxin A bei 1.1 µg/kg, für Deoxynivalenol bei 23.3 µg/kg und für Fumonisin B1 bei 159.0 µg/kg. Die Arbeitsbereiche lagen für die Aflatoxine bei 2.6 – 11.6 µg/kg, für OTA bei 1.7 – 15.4 µg/kg, für Deoxynivalenol bei 64.8 – 804.0 und für FB1 bei 168.0 – 2215.9 µg/kg. Der eingesetzte Antikörper für T-2/HT-2 Toxin zeigte eine Kreuzreaktivität (KR) von  $\leq 15\%$  zu HT-2 Toxin, weshalb nur eine Quantifizierung mit T-2 Toxin durchgeführt werden konnte. Die Nachweisgrenze lag für das T-2 Toxin bei 39.0 µg/kg und der Arbeitsbereich erstreckte sich von 55.3 – 1294.5 µg/kg. Mehrtages-Studien zeigten zudem die hohe Reproduzierbarkeit und Robustheit der neuen Methode. Zur Quantifizierung verschiedener Getreideproben wurden zunächst aufgestockte Proben (Hafer, Weizen, Roggen und Mais) untersucht und Wiederfindungen (WF) von 82 – 120 % für Ochratoxin A, 75 – 131 % für Aflatoxin B1, 58 – 83 % für Deoxynivalenol, 55 – 80 % für Fumonisin B1 und 71 – 105 % für T-2 Toxin bestimmt. Zu Validierungszwecken wurden im Anschluss natürlich kontaminierte Referenzproben gemessen. Die WF lagen für Deoxynivalenol für fünf Proben (Weizen und Hafer) mit 86 – 91 % und für Ochratoxin A mit 94 – 168 % in einem guten Bereich.

Als problematisch bei der Entwicklung des Multiplexen-Mykotoxin-Chips zeigte sich die Regenerierbarkeit des Zearalenons. Hier war bereits nach vier Messungen ein rapider Signalabfall zu beobachten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die CL-Reaktion eine Umwandlung des *trans*- in ein *cis*-Zearalenon erfolgt. Diese Form konnte aber nicht mehr vom Antikörper erkannt werden ( $\leq 5\%$  KR), weshalb dies zu einer Abnahme des Signals führte. Um dieses Problem zu lösen, muss an alternativen Lösungswegen gearbeitet werden. So könnte z.B. eine Herstellung eines anti-*cis*-Zearalenon-Antikörpers bei der Regeneration helfen. Hierbei müsste ein *cis*-Zearalenon-Konjugat an die Oberfläche immobilisiert werden. Dieses sollte aufgrund des Gleichgewichts, das durch die hohe Lichtdichte in Richtung *cis*-Form verschoben ist, zu einer stabilen Regeneration führen. Zusätzlich muss bedacht werden, dass bei einer Extraktion das Zearalenon zunächst die *trans*- in die *cis*-Form photochemisch überführt werden müsste. Vorstellbar wäre z.B. eine kurze Belichtung der Probe mit einer geeigneten Lichtquelle, wobei hier genauere Untersuchungen stattfinden müssten.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit lag in der Optimierung der Probenvorbereitung. Für den parallelen Nachweis der Mykotoxine sollte ein einheitliches Probenaufbereitungsverfahren ohne größeren Aufwand (z.B. ohne Nutzung von IAC- bzw. SPE-Säulen) entwickelt werden. Die Schwierigkeit dabei lag in den sehr heterogenen Eigenschaften der Mykotoxine, so sind Fumonisin B1 und Deoxynivalenol aufgrund ihrer Polarität wasserlöslicher als die anderen. In Voruntersuchungen mittels klassischen ELISAs zeigte sich zwar, dass ein höherer Anteil an Wasser (als Methanol) bzw. nur Wasser bei der Extraktion der beiden Mykotoxine zu besseren WF führte. In weiterführenden Experimenten stellte sich aber heraus, dass diese Extraktionsmethode nicht auf den Mikroarray übertragen werden konnte. Durch den höheren Wasseranteil im Extraktionsmittel wurden organische Komponenten, vermutlich in erster Linie Proteine, mitextrahiert und führten zu inakzeptablen Matrixinterferenzen bei der Chip-basierten Methode. Daher hat sich für die weiteren Messungen stets eine Mischung von 80 % Methanol in 20 % Wasser mit anschließender Verdünnung (mit PBS) auf 20 % Methanol-Gehalt als praktikabel erwiesen.

Zusätzlich sollte ein hauseigener monoklonaler Antikörper gegen Ochratoxin A hergestellt werden. Dabei wurde das Mykotoxin über eine eingeführte Glycin-Gruppe an das *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Protein gebunden und zur Immunisierung eingesetzt. Dazu wurden in einem Vorscreening am Institut für Physiologische Chemie der MLU-Halle-Wittenberg aus 4000 Klonen 148 Klone ausgesucht und anschließend in dieser Arbeit charakterisiert (unter definierten Ausschlußbedingungen). Dabei zeigten zwei Klone (1G8 und 23G2) auf der Mikrotiterplatte (MTP) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1.8  $\mu\text{g/L}$  bzw. 2.6  $\mu\text{g/L}$  die höchste Sensitivität. Kalibrierungsversuche am MCR 3 zeigten eine Erhöhung der Testmittelpunkte bis auf 14.2  $\mu\text{g/L}$  für 23G2 und 6.1  $\mu\text{g/L}$  für 1G8. Da für unsere Applikation aber ein Testmittelpunkt von 0.3  $\mu\text{g/L}$  benötigt wird, um den gesetzlichen Grenzwert von 5  $\mu\text{g/kg}$  in Getreide messen zu können, reichen diese nicht aus.

Des Weiteren wurde eine Methode für die Quantifizierung von Ochratoxin A in Wein entwickelt. OTA tritt sehr häufig in geringen Mengen in verschiedenen Konsumgütern der Lebensmittelindustrie auf. Neben den diversen Getreidearten befällt der Schimmelpilz *Aspergillus carbonarius* auch häufig Traubenstöcke (Mendez-Vilas, 2009). Die festgelegten Grenzwerte liegen für Weine bei 2.00  $\mu\text{g/L}$ . Eine Chip-Regenerierbarkeit mit Weißwein (WW) - Proben war ohne weitere Verdünnungen gegeben, während Rotwein (RW) zur Zerstörung der Oberfläche führte. Daher wurde neben der Verdünnung der Proben ein Extraktionsschritt für RW vorgeschaltet, wodurch eine Regenerierbarkeit gegeben war. Die im Anschluss erstellten

Kalibrierungen ergaben somit eine Nachweisgrenze von 1.1 µg/L für WW und 0.8 µg/L für RW. Der Arbeitsbereich lag bei 1.9 – 5.8 µg/L für WW und 0.9 – 5.1 µg/L für RW und ermöglichte somit eine Bestimmung von Ochratoxin A im MRL-relevanten Bereich. Selbstdotierte Proben unterschiedlicher Weinsorten ergaben WF von 103 – 127 % beim WW und 78 – 90 % beim RW. Im Vergleich dazu waren die mit klassischem ELISA bestimmten WF deutlich niedriger. Bei allen untersuchten Weinproben (WW und RW) wurden zunächst nicht dotierte Proben gemessen. Diese wurden stets als *Blanks* ( $\leq$  LOD) bestimmt und enthielten somit keine messbaren und somit relevanten OTA-Mengen.

In dieser Arbeit war es somit möglich, einen Biosensor für die parallele Bestimmung relevanter Mykotoxine in Getreide innerhalb der gesetzlichen MRLs zu entwickeln. Diese robuste Methode ermöglicht durch einfache und kostengünstige Probenaufbereitung/-vorbereitung und schnelle Analysezeit einen hohen Probendurchsatz, wodurch eine Anwendung in der Praxis (z.B. in Getreidemühlen) sinnvoll erscheint.



# **V Experimenteller Teil**

## **1 Geräte und Materialien**

### **1.1 Geräte**

#### **ELISA**

Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Schüttler Easyshaker EAS 2/4 (SLT, Crailsheim)

Schüttler MS1 Minishaker (IKA Labortechnik, Staufen)

Waschautomat ELx 405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

#### **LC/MS**

Exactive (Thermo Scientific, Bremen)

Säulenofen HotDog 5090 (ProLab, Reinach, Schweiz)

Spritzenpumpe Fusion HT (ThermoScientific, Bremen)

Surveyor Autosampler PlusLite (Finnigan, Bremen)

Surveyor MS PumpPlus (Finnigan, Bremen)

#### **MALDI-TOF**

Ultraflex TOF/TOF, N2-Laser, 337 nm, positiv Modus (Bruker-Daltonics, Bremen)

#### **Mikroarrays**

Glasspritze SGE, 1 mL, Luer Lock (SGE, Melbourne, Australia)

Mikroarray-Spotter BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer (Bio-Rad, München)

Munich Chip Reader 3 (GWK Präzisionstechnik, München; und R-Biopharm AG, Darmstadt)

Stahlnadel Solid Pin SNS12 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)

#### **Oberflächenplasmonenresonanz**

Biacore X100 (GE Healthcare, Freiburg)

**Semipräparative HPLC**

Analytische HPLC-Säule Gemini C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 x 4.6 mm ID (Phenomenex, Torrance, USA)

Entgaser ERC-3415 $\alpha$  (ERC Inc., Saitama, Japan)

Fraktionssammler INTEE (280.6008.76, Polymer Laboratories, Shropshire, Großbritannien)

Hochdruck Gradientenpumpe (L-6200 $^\circ$ , Merck, Darmstadt)

PC-Einsteckkarte LC421 (Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH, Weyhe-Leeste)

Sechs-Wege-Ventil (7725, Rheodyne, Rohnert Park, USA)

Semipräparative HPLC-Säule Gemini C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 10 mm ID (00F-4435-N0, Phenomenex, Torrance, USA)

UV-Detektor L-4250 (Merck, Darmstadt)

**Synthese**

Rotationsverdampfer RE 111 (Büchi, Flawil, Schweiz)

Schlenk-Apparatur: Hochvakuumpumpe RC 5 (Vacuubrand, Wertheim)

**Sonstiges**

Gefriertrocknung Alpha 1-4 LSC (Christ, Osterode am Harz)

Gravierstift MICROMOT 50/E (Proxxon, Niersbach)

Kaffeemühle FD 9206 (Bosch, Stuttgart)

Mixer II A10 (IKA Labortechnik, Staufen)

Mixer T25 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

pH/Leitfähigkeits-Messgerät Multi 3401 (WTW, Weilheim)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Rührer (MR 3002 S, Heidolph, Kelheim, Deutschland)

Trockenschrank 20 – 250  $^\circ\text{C}$  (Memmert, Büchenbach)

Ultraschallbad Sonorex Super RK106 (Bandelin, Berlin)

UV/Vis-Spektrometer DU 650 (Beckman, Fullerton, USA)

Vortexer TopMix FB1 5024 (Fisher Scientific, Schwerte)

Vortexer TopMix Fisherbrand 15024 (Novodirect, Kehl)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Zentrifuge Universal 30F (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen)

## 1.2 Software

Auswertesoftware SIP 0.4 (Karsunke Softwarebüro, Wolnzach)

AVIS V.F. (MSB di F. Cavicchio, Ravenna, Italien)

Biacore X100 Control Software 1.1 und Evaluation Software 1.1 (GE Healthcare, Freiburg)

Exactive Tune (ThermoScientific, Bremen)

Fusion Instrument Control (Perkin Elmer, Waltham, USA)

Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall)

LabView 8.2 (National Instruments, Austin, USA)

Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)

Xcalibur (ThermoScientific, Bremen)

## 1.3 Antikörper und Antigene

Monoklonaler Antikörper gegen Aflatoxine 1F2 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Deoxynivalenol 1H8 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

Monoklonaler Antikörper gegen Fumonisin B1 1E5 und 1H4 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

Monoklonaler Antikörper gegen Ochratoxin A (Soft Flow Biotechnology, Gödöllő, Ungarn)

Monoklonaler Antikörper gegen T-2/HT-2 Toxin 2E7 und 1A12 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

Monoklonaler Antikörper gegen Trinitrotoluol (Strategic Diagnostics, Newark, USA)

Monoklonaler Antikörper gegen Zearalenon 1B11 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

Monoklonaler Antikörper gegen Zearalenon AB-01-01 (Aokin, Berlin)

Monoklonaler Antikörper gegen Zearalenon 11C9 (Antibodies-online, Aachen)

Pferd Anti-Maus Antikörper IgG, HRP-markiert, affinitätsgereinigt (Axxora, Lörrach)

Ziege Anti-Maus Antikörper IgG, (H+L)-PolyHRP40, affinitätsgereinigt (Senova, Weimar)

Zellkulturüberstände mit monoklonalen Antikörper gegen T-2/HT-2 Toxin 1A12, 3F5, 2E7 und 3H4 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

### **Mykotoxine**

3-Acetyldeoxynivalenol, fest, 99.4 % (32927, Sigma-Aldrich, Steinheim)

3-Acetyldeoxynivalenol, fest, 99.4 % (B-MYC0340-C, LGC Standards, Wesel)

Aflatoxin B1, fest (32754, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin B2, fest (A9887, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin G1, fest (A0138, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin G2, fest (A0263, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Deoxynivalenol, fest (D0156, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Deoxynivalenol, fest, 99.4 % (B-MYC0320-C, LGC Standards, Wesel)

Fumonisin B1, fest (32936, Sigma-Aldrich, Steinheim; CDX-00006305-005, LGC Standards, Wesel)

Fumonisin B1, in Acetonitril/Wasser (1:1), 99 % (B-MYC0400-2, LGC Standards, Wesel)

HT-2 Toxin, flüssig in Acetonitril, 99 % (B-MYC0560-1, LGC Standards, Wesel)

Ochratoxin A, fest (O1877, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ochratoxin A, fest, 99.5 % (B-MYC0490-C, LGC Standards, Wesel)

T-2 Toxin, flüssig in Acetonitril, 99 % (B-MYC0540-1, LGC Standards, Wesel)

Zearalanon, fest (Z0167, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zearalenon, fest (Z2125, Sigma-Aldrich, Steinheim)

### **Toxin-Konjugate**

Folgende Konjugate für die Beschichtung der MTP sowie Ausgangsmaterial für das *Spotten* auf den modifizierten Glaschips wurden vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim geliefert.

Deoxynivalenol-Hemisuccinat (DON-HS)

Deoxynivalenol-BSA (DON-BSA)

Fumonisin B1-BSA (FB1-BSA)

HT-2- Hemisuccinat (HT-2-HS)

T-2-Hemisuccinat (T-2-HS)

Zearalenon-GA (ZEA-GA)

## **1.4 Getreide-/ Weinproben und Referenzmaterialien**

### **Lebensmittelproben**

Bio Weizen Typ 550 (0302161-B1279, Heimatsmühle, Aalen)

Bio Weizenmehl Typ 550 (0302161-B1279, Heimatsmühle, Aalen)

Hafer Schmelzflocken, *Babynahrung* (4000540002508, Kölln Flocken, Elmshorn)

Maismehl (4005009000491, Gut&Gerne, Bio Zentrale GmbH, Stubenberg)

Maismehl, Baktat (30801, BAK, Kardesler GmbH, Mannheim)

Maispolenta (4039057402327, BioGourment, Bad Grönenbach)

Naturkind (Weizen)mehl Typ 550 (4305399021008, Heimatsmühle, Aalen)

Roggenmehl Typ 997 (4305399020803, Naturkind, Mülheim a. d. Ruhr)

Rosen-(Weizen)mehl Typ 405 (4002457000172, Rosenmühle, Landshut)

Rosen-(Weizen)mehl Typ 550 (4002457001261, Rosenmühle, Landshut)

Unserweizen Typ 812 (4022621000029, Unser Land GmbH, Fürstenfeldbruck)

Weizenmehl Typ 405, Penny (22953698, Pfälzische Mühlenwerke)

#### Kontaminierte Proben mit DON:

- *Proben von der Heimatsmühle GmbH & Co.*

HM-Probe 1 Weizen-Vollkornmehl      niedrig kontaminiert

HM-Probe 2 Weizenmehl                      2580 µg/kg

- *Proben aus der Rosenmühle von Landshut (aokinmycontrol<sup>®</sup>-Methode gemessen):*

<b>Weizen gemahlen 1</b>	Typ 550	Inhalt: 80 µg/kg
<b>Weizen gemahlen 2</b>	Typ 550	Inhalt: 40 µg/kg
<b>Weizen gemahlen 3</b>	Typ 1050	Inhalt: 120 µg/kg
<b>Weizenkorn 1</b>		Inhalt: 647 µg/kg
<b>Weizenkorn 2</b>		Inhalt: 1843 µg/kg
<b>Weizenkorn 3</b>		Inhalt: 958 µg/kg
<b>Weizenkorn 4</b>		Inhalt: 886 µg/kg
<b>Weizenkorn 5</b>		Inhalt: 428 µg/kg
<b>Weizenkorn 6</b>		Inhalt: 421 µg/kg
<b>Weizenkorn 7</b>		Inhalt: 347 µg/kg
<b>Weizenkorn 8</b>		Inhalt: 582 µg/kg

#### **Referenzmaterialien**

Zertifiziertes Referenzmaterial BCR-471 Ochratoxin A (< 0.6 µg/kg) in Weizen (IRMM, Geel, Belgien)

Zertifiziertes Referenzmaterial Ochratoxin A (2.7 ± 1.0 µg/kg) in Weizen (003006, Biopure, Tulln, Österreich)

**Zertifiziertes Referenzmaterial von *R-Biopharm*:**

D-W-156 Deoxynivalenol ( $< 400 \pm 100 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

D-W-158 Deoxynivalenol ( $< 1400 \pm 100 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

D-W-100 Deoxynivalenol ( $< 100 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

D-B-500 Deoxynivalenol ( $< 100 \mu\text{g/kg}$ ) in Hafer (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

D-W-510 Deoxynivalenol ( $500 \pm 100 \mu\text{g/kg}$ ) in Hafer (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

O-W-805 Ochratoxin A ( $3.2 \pm 0.6 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

Z-W-ND Zearalenon ( $< 50 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

Z-W-3303 Zearalenon ( $98.3 \mu\text{g/kg}$ ) in Weizen (Trilogy® Reference Materials, R-Biopharm AG, Darmstadt)

**Weinproben**

Weißwein 1

Pinot Grigio del Veneto, 2010, Italien, 12.5% vol (43882960, Centor-Warenhandels GmbH, Köln)

Weißwein 2

Trebbiano d'Abruzzo, 2011, Italien, 11.5% vol (22930378, Peter Mertes KG Weinkellerei, Bernkastel-Kues)

Rotwein 1

Cabernet Sauvignon, 2011, Chile, 12.5% vol (43882656, Global Wines GmbH & Co. KG, Köln)

## Rotwein 2

Shiraz / Cabernet Sauvignon, 2011, Australien, 13.0% vol (21590887, Centor-Warenhandels GmbH, Köln)

### 1.5 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

#### Materialien

Biacore X100: BIA Maintenance Kit (BR-1006-66, GE Healthcare, Freiburg)

HBS-EP<sup>+</sup> Puffer (BR-1008-26, GE Healthcare, Freiburg)

Plastik-Vials PP, 1.5 mL (BR-1002-87, GE Healthcare, Freiburg)

Rubber Caps (BR-1004-11, GE Healthcare, Freiburg)

Sensor Chip CM5 (BR-1000-14, GE Healthcare, Freiburg)

Einmalspritze, 1 mL (H.999.1, Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze, 10 mL (0058.1, Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze, 5 mL (0057.1, Roth, Karlsruhe)

Einmal-Kanüle, 0.90 x 40 mm (C721.1, Roth, Karlsruhe)

Einmal-Kanüle, 0.80 x 120 mm (C630.1, Roth, Karlsruhe)

Eppendorf Pipetten (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 5 mL, Multikanalpipette 20 – 300 µL) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Faltenfilter 210 mm (531 – 021, Macherey-Nagel, Düren)

Färbeeinsatz PP (2291.1, Roth, Karlsruhe)

Färbeschale TPX (2290.1, Roth, Karlsruhe)

Handschuhe, Nitril (P778.1, Roth, Karlsruhe)

Klebefolie ARcare 90106, Akryl Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, Irland; Laserzuschnitt durch A.L.L. Lasertechnik, München)

Kunststoffträger, PMMA (Sahlberg, Feldkirchen; gefräst am IWC, München)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, niedrige Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 384-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (788161, Greiner, Frickenhausen)

Multi-Reaktionsgefäße 0.65 mL (7060.1, Roth, Karlsruhe)

Parafilm (H666.1, Roth, Karlsruhe)

Pasteurpipetten (4522, Roth, Karlsruhe)

Petrischalen Glas (0690.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen:

- Mikrospitzen, 0,1 – 10  $\mu$ L (K138.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Pipettenspitzen, 0,5 – 5 mL (Brand, Wertheim, Deutschland)

- Pipettenspitzen blau, 100 – 1000  $\mu$ L (2679.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Universalspitzen, 1 – 200  $\mu$ L (B007.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Probefläschchen, 4 mL (E155.1, Roth, Karlsruhe)

Reaktionsgefäße 1.5 mL (4190.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser, 10 mL (X655.1, Roth, Karlsruhe)

Verschlussfilm für Mikrotiterplatten (EN76.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 50 mL, unsteril (AN78.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 15 mL, unsteril (AN76.1, Roth, Karlsruhe)

ZipTip, C<sub>4</sub> Pipettenspitzen (Millipore, Molsheim, Frankreich)

### **Chemikalienliste**

Aceton, *Laboratory Reagent* (179973, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Acetonitril, *HPLC grade* (34998, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Acetonitril, *LC-MS grade* (34967, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ameisensäure, *p.a. for MS* (94318, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Bernsteinsäure (Invitrogen, Karlsruhe)

1,1'-Carbonyldiimidazol (21860, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Carboxymethoxylaminhydrochlorid (C13408-IG, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Diaminopolyethylenglykol, M~2000 g/mol (XTJ 502, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)  
Dichlormethan, *for peptide synthesis* (66738, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
2,4-Dihydroxybenzoesäure (37530, Fluka, Buchs)  
*N,N'*-Diisopropylethylamin (496219, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dikaliumhydrogenphosphat (60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N,N'*-Dimethylformamid, Biotech grade 99 % (494488, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N,N'*-Dimethylformamid, *zur Analyse* (1.0650.2500, Merck, Darmstadt)  
Dimethylsulfoxid (41647, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dioxan, (296309, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Essigsäure (320099, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Ethylendiamindihydrochlorid (195804, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N*- $\alpha$ -Fmoc-glycin (04-12-1001, Novabiochem, Darmstadt)  
*N*- $\alpha$ -Fmoc- $\epsilon$ -t-boc-L-Lysin (04-12-1026, Novabiochem, Darmstadt)  
*N*- $\alpha$ -Fmoc- $\epsilon$ -t-butyl-*O*-L-Serin (04-12-1033, Novabiochem, Darmstadt)  
3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (50040, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Glycin (33226, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
1-Hydroxybenzotriazol (54802, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N*-Hydroxysuccinimid (56480, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumdihydrogencitrat (60214, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumdihydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumsorbat (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Lightning-Link<sup>TM</sup> HRP Conjugation Kit (701-0030, Innova Biosciences, Cambridge)  
Luminollösung, *für Chemilumineszenz Assay* (1859678, Pierce, Rockford)  
Meerrettichperoxidase (814393, Roche, Basel, Schweiz)

2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)

Methanol, *LC-MS grade* (34966, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Methanol (65548, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumazid (S2002, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumcarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumchlorid (13565, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumdodecylsulfat (71728, Fluka, Buchs)

Natriumhydrogencarbonat (K28996729, Merck, Darmstadt)

NovaPEG Rink Amide Resin (01-64-0473, Novabiochem, Darmstadt)

Palladium, 10 w % auf Aktivkohle (205699, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Pikrylsulfonsäure, 1 % in DMF (92824, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Piperidin (80640, Flucka, Buchs)

Polyethylenglycol 1500 (Roche, Mannheim)

Polyethylenglycoldiamin 200 Da Fa. (XTJ-502, Huntsman, Deggendorf)

Polyethylenglykoldiglycidylether 526 Da (Diepoxy-PEG, 475696, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Rinderserumalbumin (A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Salzsäure, rauchend 37 % (84422, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Salzsäure, ~ 4.0 M (84435, Fluka, Buchs)

Schwefelsäure, 95 – 98 % (435589, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stickstoff 5.0 (Air Liquide, München)

Tergazyme, *enzyme detergent* (Z273287-1EA, Sigma-Aldrich, Steinheim)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, (T2885, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Triethylamin (90340, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Trifluoressigsäure (91707, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Triisopropylsilan (92095, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Trizma® Base, (T62200, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)

Wasserstoffperoxid, 30 % (95321, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Wasserstoffperoxidlösung, für Chemilumineszenz Assay (1859679, Pierce, Rockford)

## 1.6 Pufferlösungen

Für sämtliche Puffer wurde UV-Licht-vorbehandeltes Reinstwasser (deionisiertes Wasser) verwendet (Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185; Millipore).

### Blocklösung ELISA (1 % Casein)

1 g Casein

PBS, ad 100 mL

Die Lösung wird auf 90 °C erhitzt, anschließend auf 25 °C abgekühlt und durch einen Faltenfilter filtriert.

### Blocklösung MCR 3 (0.5 % Casein)

0.5 g Casein

PBS, ad 100 mL

Die Lösung wird auf 90 °C erhitzt, anschließend auf 25 °C abgekühlt und durch einen Faltenfilter filtriert.

### Coatingpuffer ELISA, Mikroarray (pH 9.6)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59 g

NaHCO<sub>3</sub>, 2.93 g

NaN<sub>3</sub>, 0.2 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

### Phosphatpuffer (PBS, pH 7.6)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.36 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12.2 g

NaCl, 8.5 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

### **Regenerationspuffer**

Glycin, 15.01 g

NaCl, 11.7 g

Sodium dodecyl sulphat (SDS), 2 g

Deionisiertes Wasser, ad 2000 mL, mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH-Wert 3.0 einstellen.

### **Stopplösung ELISA (5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mL

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

### **Substratlösung ELISA**

Substratpuffer, 25 mL

TMB-Stammlösung, 500 µL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%), 100 µL

### **Substratpuffer ELISA (pH 3.8)**

Kaliumdihydrogencitrat, 46.04 g

Kaliumsorbitat, 0.10 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

### **Spotting-Puffer (Mikroarray)**

Coating Puffer, 690 µL

DMSO, 300 µL

Glycerin, 10 µL

**Spotting-Puffer-aktiviert (Mikroarray)**

Coating Puffer, 690  $\mu$ L

DMSO, 300  $\mu$ L

Glycerin, 10  $\mu$ L

1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 7.00 mg

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), 8.00 mg

DIPEA, 50  $\mu$ L

**Spüllösung (Mikroarray)**

Tergazyme, 4 g

Deionisiertes Wasser, ad 200 mL

**TMB-Stammlösung ELISA**

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 375 mg

DMSO, 30 mL

**TRIS/HCl-Puffer 3 M Mikroarray (pH 8.5)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 363.42 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

**Waschpufferkonzentrat ELISA**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.17 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 73.16 g

$\text{NaCl}$ , 52.6 g

Tween 20, 30 mL

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

## **Waschpuffer ELISA (pH 7.6)**

Waschpufferkonzentrat, 42 mL

Deionisiertes Wasser, ad 2500 mL

## **2 Standardprozeduren**

### **2.1 Herstellung der Mykotoxin-Stammlösungen**

Die Stammlösungen von 1000 µg/L für AF und OTA, 100000 µg/L für DON und für 150000 µg/L für FB1 und ZEA wurden folgendermaßen hergestellt:

Für alle vier AF wurden 5 mL Methanol in einen 10-mL-Kolben vorgelegt. Anschließend wurden 81.9 µL AFB1 (122.1 µg/mL), 58.1 µL AFB2 (172.1 µg/mL), 66.6 µL AFG1 (164.9 µg/mL) und 80.8 µL AFG2 (123.7 µg/mL) in je einen Kolben pipettiert und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt. Die Stammlösungen wurden lichtdicht verpackt und bei 4 °C gelagert.

Für OTA und DON wurden je 3 mL Methanol in einem 5-mL-Kolben vorgelegt und 34.4 µL OTA (145.45 µg/mL) bzw. 500 µL DON (1000 µg/mL) hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Kolben mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt.

Für ZEA und FB1 wurden je 1.5 mg abgewogen und in einen mit bereits 3 mL Methanol vorgelegten Kolben überführt und anschließend auf 10 mL mit Methanol aufgefüllt. Zudem wurden Standardkonzentrationen von 140000 µg/L und 122000 µg/L hergestellt.

Für die T-2 und HT-2 Toxine wurden Stammlösungen von 10000 µg/L hergestellt. Dazu wurden 298.2 µL der T-2-Lösung (100.6 µg/mL) bzw. 295.3 µL der HT-2-Lösung (101.6 µg/mL) in 1 mL Methanol pipettiert und im Anschluss auf 3 mL aufgefüllt.

## 2.2 Synthese von Hapten-Derivaten

### 2.2.1 Synthese von AFB2-CMO und AFB1-CMO

Die Synthese erfolgte nach einer bekannten Methode (Cervino, 2007). 30 mg (0.274 mmol, 8.6 Äq.) O-(Coarboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorid wurden in einen 50 mL Kolben mit Rührfisch vorgelegt. Es wurden 10 mg (0.032 mmol, 1 Äq.) AFB2 in 12 mL Methanol/Wasser/Pyridin (4/1/1, v/v/v) zugegeben und 3 h bei 85 °C refluxiert. Die ursprünglich farblose Lösung begann dabei gelb zu fluoreszieren. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 5 mL DCM aufgenommen. Anschließend wurde mit 15 mL 5 % Essigsäure gewaschen, wobei sich die DCM-Phase dunkelgrün färbte. Die organische Phase wurde abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Für die Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der schwarze Rückstand in 4 mL Acetonitril (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA) (2/1, v/v) aufgenommen und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Injektionen gereinigt. Als mobile Phase diente Acetonitril und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Acetonitril und wurde innerhalb von 10 min auf 90 % Acetonitril angehoben. Anschließend wurde er 10 min bei 90 % Acetonitril gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 360 nm. Das Produkt wurde bei ca. 10 – 14 min aufgefangen und das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt. Es wurden 9.0 mg (0.023 mmol, Ausbeute: 73 %) Produkt erhalten. Auf analoge Weise wurden 12.0 mg (0.031 mmol, Ausbeute: 97 %) von AFB1-CMO hergestellt.

AFB2-CMO:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 388.10319$  (100%),  $m/z = 389.10646$  (21%)

AFB1-CMO:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 386.08780$  (100%),  $m/z = 387.09113$  (21%)

### 2.2.2 Synthese von ZEA-CMO und ZAN-CMO

9.6 mg ZEA (0.030 mmol, 1 Äq.) wurden in 10 mL H<sub>2</sub>O/Pyridin/ Methanol (1/1/4, v/v/v) gelöst. Anschließend wurden 19.8 mg O-(Coarboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorid (CMO, 0.181 mmol, 6 Äq.) zum Reaktionsgemisch hinzugefügt und bei 95 °C für 10 h refluxiert. Die Lösungsmittel wurden mittels Rotationsverdampfer und Hochvakuum vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde fünfmal mit 1.5 mL Wasser und 1 – 2 mL DCM extrahiert.

Nach erneuter Extraktion der Wasserphase mit DCM wurde die organische Phase vollständig am Rotationsverdampfer und Hochvakuum entfernt.

Der Rückstand wurde in 3 mL Acetonitril (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA) (2/1, v/v) aufgenommen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Als mobile Phase diente Acetonitril und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Acetonitril und wurde innerhalb von 10 min auf 90 % Acetonitril angehoben. Anschließend wurde er 10 min bei 90 % Acetonitril gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 220 nm. Die Flussrate betrug dabei 3.6 mL/min. Das Produkt wurde bei 27 – 29 min aufgefangen und das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt. Es wurden 11.0 mg (0.028 mmol, Ausbeute: 94 %) eines weißen Feststoffes erhalten. Bei der Umsetzung von ZAN (0.016 mmol, 1 Äq.) mit 10.3 mg CMO (0.094 mmol, 6 Äq.) wurden auf analoge Weise 4.9 mg (0.012 mmol, Ausbeute: 80 %) von ZAN-CMO hergestellt.

ZEA-CMO:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 392.1704$  (100 %),  $m/z = 393.17335$  (23 %)

ZAN-CMO:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 394.18620$  (100 %),  $m/z = 395.18934$  (23 %)

### 2.2.3 Synthese von 3-AcDON-HS

Zu 5 mg 3-AcDON (0.015 mmol, 1 Äq.) wurden mittels eines Septums 300  $\mu$ L Pyridin hinzugefügt. Die Lösung wurde in einen 25 mL Rundkolben mit 29.0 mg Succinylanhydrid (0.300 mmol, 20 Äq.) in 800  $\mu$ L Pyridin (trocken) überführt. Die Reaktionslösung wurde bei 100°C für 4 h refluxiert. Dabei entstand eine leicht braun-schwarze Flüssigkeit. Das Pyridin wurde anschließend mittels Argonstrom und Hochvakuum vollständig entfernt.

Das weiße Rohprodukt wurde in 4 mL DCM aufgenommen und viermal mit je 4 mL Wasser mit 5 % Essigsäure (v/v) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit DCM gegenextrahiert. Die organische Phase wurde zum Schluss einmal mit reinem dest. Wasser extrahiert. Nachdem die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und am Hochvakuum vollständig entfernt wurden, konnte der Rückstand in 4 mL Acetonitril (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA; 2/1, v/v) aufgenommen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden. Als mobile Phase diente Acetonitril und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Acetonitril mit einer Flussrate von 3.6 mL/min und wurde innerhalb von 10 min auf 90 % Acetonitril angehoben. Anschließend wurde er 10 min bei 90 % Acetonitril gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 220 nm. Das Produkt wurde bei 12 – 14 min aufgefan-

gen und das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt. Es wurden 5.9 mg (0.013 mmol, Ausbeute: 91 %) eines weißen Feststoffes erhalten.

3-AcDON-HS:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 439.15914$  (100 %),  $m/z = 440.16230$  (24 %)

3-AcDON-HS:  $[M-H]^-$ :  $m/z = 437.14562$  (100 %),  $m/z = 438.14892$  (24 %)

## 2.3 Kupplungssynthesen von Hapten-Derivaten an Peptid- und Aminolinker

### 2.3.1 Arbeitsvorschrift für Aminolinker

#### Aktivierung der Carbonsäuren mit DCC und NHS

Für die Einführung einer terminalen Aminogruppe an das Mykotoxin erfolgte zunächst eine Aktivierung der Carbonsäure zum NHS-Ester, der anschließend für die Kupplung des Amins genutzt werden konnte. Der eingeführte Linker sollte zum einen möglichst kurz sein und zum anderen zur Bindung auf dem Biochip dienen, weshalb eine endständige Aminogruppe benötigt wurde. Aus diesem Grund wurde das Ethylendiamin eingesetzt.

Hierzu wurden 10.0 mg AFB2-CMO (0.026 mmol) in 600  $\mu$ L Dioxan (trocken) gelöst. Die Lösung färbte sich gelb. 3.6 mg NHS (0.031 mmol, 1.2 Äq.) und 6.4 mg DCC (0.031 mmol, 1.2 Äq.) wurden in je 100  $\mu$ L Dioxan gelöst und zur AFB2-CMO-Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss auf dem Schüttler für 20 h durchmischt, dabei fiel der *N,N*-Dicyclohexylharnstoff als farblose Kristalle aus.

Die Reaktionslösung, in der sich weiße Kristalle gebildet haben, wurde in ein Eppendorf-Cap überführt, das Gläschen mit Dioxan nachgespült, und bei 6000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Die Aktivierung von AFB1-CMO, ZEA-CMO und ZAN-CMO erfolgte analog zu AFB2-CMO.

#### Kupplung mit Ethylendiamin-dihydrochlorid

34.4 mg Ethylendiamin-dihydrochlorid (0.025 mmol, 10 Äq.) wurden in 600  $\mu$ L Wasser (mit 1M NaOH-Lösung auf pH 9.0 eingestellt) gelöst. Eine äquivalente Menge Dioxan wurde hinzugefügt. Unter Rühren wurde der AFB2-CMO-Aktivester langsam hinzu getropft. Bei Vertrübung oder Ausflockung der Reaktionslösung wurden ein paar Tröpfchen Wasser hinzugeben. Die orange-braune Reaktionslösung wurde über Nacht lichtdicht bei RT gerührt.

Die Lösung wurde mit 5 % Essigsäure in Wasser und DCM extrahiert. Die Lösungsmittel wurden mittels Rotationsverdampfer und Hochvakuum vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 mL Acetonitril (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA; 2/1, v/v) aufgenommen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Als mobile Phase diente Acetonitril und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Acetonitril mit einer Flussrate von 3.6 mL/min und wurde innerhalb von 10 min auf 90 % Acetonitril angehoben. Anschließend wurde er 10 min bei 90 % Acetonitril gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 220 nm. Das Produkt wurde bei 14 – 15 min aufgefangen und das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt. Es wurden 5.7 mg (0.013 mmol, Ausbeute: 48 %) eines weißen Feststoffes erhalten. Die Ausbeuten von ZEA- bzw. ZAN-CMO-Amin lagen bei 78 %. Das Produkt wird mittels ESI-MS analytisch kontrolliert.

AFB2-CMO-Amin:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 430.15987$  (100 %),  $m/z = 431.16270$  (24 %)

AFB1-CMO-Amin:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 428.14220$  (100 %),  $m/z = 429.14747$  (22 %)

ZAN-CMO-Amin:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 436.24410$  (100 %),  $m/z = 437.24760$  (24 %)

ZEA-CMO-Amin:  $[M+H]^+$ :  $m/z = 434.22724$  (100 %),  $m/z = 435.23015$  (26 %)

### 2.3.2 Arbeitsvorschrift für Festphasensynthese

Für die Immobilisierung der OTA- und AFB1-Haptene auf der silanisierten Glasoberfläche, wurde neben den Aminolinkern auch ein Peptidlinker eingeführt. Das Peptid enthielt die Sequenz Hapten-gly-ser-gly-lys. Die Kopplung des Mykotoxins an den Peptidlinker erforderte eine Carboxylfunktion am Hapten. Bei OTA ist diese bereits vorhanden. Im Falle des AFB2 wurde das in Kapitel III. 2.2.1 beschriebene AFB2-CMO für die Peptidsynthese verwendet. Ziel war es, eine stärkere kovalente Bindung zwischen Ligand und der Oberfläche zu bekommen. Dies wurde mit dem Peptid über eine kovalente Bindung des Lysins mit der Epoxidschicht realisiert.

Für die Festphasensynthese wurde die Stickstoff-Methode eingesetzt. Hierfür wurde das Harz in eine Fritte gegeben und diese über einen PVC-Schlauch an eine Stickstoffbombe verbunden. Für die Lösungen wurde des Weiteren ein Auffangbehälter eingebaut.

Für das Peptid wurden 0.36 g Harz mit der maximalen Belegungsdichte von 0.44 mmol/g eingesetzt. Auf die daraus errechnete Harzmenge von 0.16 mmol bezogen sich die nachfolgenden Mengenangaben in Tabelle 31 in Äquivalenten.

**Tabelle 31:** Mengenangaben der eingesetzten Reagenzien.

Substanzen	Mw [mg/mmol]	mmol	Menge [mg]	Äquivalente
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.5	0.8	373.1	5
Fmoc-Gly-OH (x 2)	297.3	0.8	236.8	5
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4	0.8	305.3	5
HBTU	379.3	0.8	296.0	4.9
DIPEA	129.2 ( $\rho = 0.7$ )	1.6	205.9 (= 277.3 $\mu$ L)	10

Alle Reaktionsschritte fanden bei RT statt und die Ausbeute für die Synthese wurde als 100 % angenommen. In Tabelle 32 sind die einzelnen Syntheseschritte zum Aufbau des Peptids zusammengefasst.

**Tabelle 32:** Übersicht der einzelnen Syntheseschritte zum Aufbau des Peptids.

Schritt	Beschreibung	Lösungsmittel
1	Quellen des Harzes	DMF
2	Aminosäurekupplung	HBTU/DIPEA/DMF
3	Waschen	DMF
4	TNBS-Test	10 % DIPEA/DMF
5	Fmoc-Entschützung	20 % Piperidin in DMF
6	TNBS-Test	10% DIPEA/DMF
7	Wiederholung von 2 – 4 bis zum Aufbau der gesamten Sequenz	-
8	Kupplung des Toxins	HBTU/DIPEA/DMF
9	Abspaltung des Peptids vom Harz	5 % TFA, 2.5 % Wasser, 2.5 % TIS

### **Kupplung der ersten Aminosäure mit HBTU**

Eine Lösung aus 5.0 Äq. Aminosäurederivat, 277.4 µL DIPEA (5.0 Äq.) in 2.7 mL DMF wurde hergestellt. Wenn nötig wurde die Aminosäure vor der Zugabe zum Harz im Ultraschallbad gelöst. 296.0 mg HBTU (4.9 Äq.) wurden zu der Aminosäurelösung gegeben. Nach 2 min wurde diese Lösung zu dem aufgequollenen Harz gegeben und 45 min lang mit sanftem Stickstoffstrom durchmischt. Es wurde fünfmal mit DMF gewaschen.

### **Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe**

Zum Harz wurden 8 mL 20 % Piperidin in DMF gegeben und 20 min mit Stickstoffstrom durchspült. Anschließend wurde die Fritte mehrmals mit DMF gewaschen.

### **Aminosäurekupplung mittels der HBTU-Methode**

Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde zu dem in DMF gewaschenen Harz eine Lösung von je 5.0 Äq. Aminosäurederivat, 1.7 mL DMF, 277.0 µL DIPEA (10.0 Äq.) in einer vorinkubierten Lösung von 10.0 Äq. HBTU in 1 mL DMF hinzugefügt. Die Fritte wurde 45 min mit Stickstoffstrom durchspült und anschließend mit DMF gewaschen.

Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde diese Methode bis zur gewünschten Sequenz wiederholt.

### **TNBS-Test**

Nach jeder Kupplungsreaktion und Fmoc-Entschützung wurde der TNBS-Test durchgeführt, um sicherzustellen, dass die gewünschte Kupplung bzw. Fmoc-Entschützung vollständig abgelaufen war.

Mit einer Glaspipette wurden einige Harz-Körnchen herausgenommen und in ein Eppendorf-Cap überführt. Zu dem Harz wurden zwei Tröpfchen von 10 % DIPEA in DMF und TNBS-Reagenz gegeben. Nach 30 s wurde die Farbentwicklung betrachtet. Rotfärbung bedeutete dabei, dass freie Aminogruppen vorhanden waren (positiv) und weiß deutete darauf hin, dass alle Aminogruppen besetzt wurden (negativ). Zeigte der Test nicht das gewünschte Ergebnis, musste die Kupplung bzw. die Entschützung wiederholt werden.

### **Kupplung der Haptene an das Harz**

0.029 mmol (1 Äq.) des Haptens wurden in 3 mL DMF gelöst und anschließend wurden 54.2 mg (0.14 mmol, 5 Äq.) HBTU zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf das Harz gegeben und 2 h unter Stickstoffeintrag durchmischt. Anschließend wurde die überstehende Lösung abgelassen und das Harz wurde je dreimal mit 3 mL DMF, DCM und Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Harz im Hochvakuum in der Chromatographiesäule getrocknet.

### **Abspaltung des Peptids vom Harz**

Das über Nacht im HV getrocknete Harz wurde zunächst mit einer 10 Vol%- TFA-Lösung von 4.8 mL DCM, 0.13 mL H<sub>2</sub>O, 0.13 mL TIS und 1.00 mL TFA, für 10 min versetzt. Diese Abspalllösung wurde anschließend langsam in einem Spitzkolben abgetropft. Analog dazu wurde dann eine 5 Vol%-TFA-Lösung (4.5 mL DCM, 0.13 mL TIS und 0.13 mL TFA) und zuletzt eine 95 Vol%-TFA-Lösung (0.13 mL TIS und 4.8 mL TFA) über das Harz geleitet und langsam abgetropft. Das Harz wurde anschließend nochmals mit der 95 Vol%-TFA-Lösung gewaschen. Die Lösungsmittel werden aus der Abspalllösung mittels sanftem Stickstoffstrom verdampft.

### **Aufreinigung**

Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurden zu dem in 1 mL Wasser und 0.1 % TFA gelösten Produkt 1 mL einer 20 % Methanol mit 0.1 %-TFA gegeben. Für die Injektion der 20- $\mu$ L-Probe wurde ein manuelles Sechs-Wege-Ventil mit einer Injektionschleife von 2 mL verwendet. Als Lösungsmittel wurden Wasser mit 0.1 Vol% TFA und Methanol mit 0.1 Vol% TFA eingesetzt. Es wurde die UV-Absorption bei 240 nm detektiert. Der Elutionsgradient sah wie folgt aus: 2 min 10 %-Methanol, bis 37 min auf 90 %-Methanol, bis 42 min auf 10 %-Methanol und bis 45 min auf 10 %-Methanol gehalten. Die Lösemittel der Fraktionen wurden unter Hochvakuum vollständig entzogen. Eine vollständige Qualitätskontrolle erfolgte mittels ESI-MS.

## 2.4 HRP-Markierung eines Primärantikörpers

Für weitere Untersuchungen wurde der anti-ZEA mAk 1B11 mittels einem Lightning-Link™ HRP-Conjugation-Kit (Innova Biosciences) mit Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) markiert. Die Kupplung dabei erfolgte über die Aminogruppen, weshalb ein Amino-freier Puffer verwendet werden musste. Hierzu wurde ein Verhältnis von mAk zu HRP von 1 zu 5 verwendet. Zu dem in 100 µL PBS gelösten mAk 1B11 (0.5 mg/mL) wurden 10 µL des LL-Modifier Substrates hinzugegeben und intensiv durchmischt. Die Antikörperlösung wurde zu den 500 µg LL-HRP pipettiert, durchmischt und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. 30 min vor dem Gebrauch wurden 10 µL des LL-Quenchers hinzugegeben.

## 2.5 Messungen am Chip-Reader (MCR 3)

### 2.5.1 Herstellung der Mikroarray-Chips

Die Glaschips wurden zur Kennzeichnung zunächst mit einem Graviergerät an der rechten unteren Ecke fortlaufend nummeriert.

### Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche

Zur Reinigung der Glaträger wurden die Chips in einen Färbereinsatz gegeben und anschließend in einem Färbekasten mit 200 mL Millipore Wasser und 4 mL Hellmanex-Lösung gelegt. Sie wurden 1 h im Ultraschallbad behandelt und über Nacht auf dem Schüttler mit leichter Schüttelbewegung bei RT inkubiert. Die Chips wurden erneut 1 h ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die Träger mit den Chips fünfmal mit je 200 mL destilliertem Wasser gereinigt. Dazu wurde das Wasser in den Färbekasten gefüllt und der Einsatz mit gleichmäßigen Bewegungen auf und ab geführt. Die Chips wurden kurz in Methanol eingetaucht, beidseitig gründlich und gleichmäßig im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und visuell kontrolliert.

Für die Aktivierung der Oberfläche, um möglichst viele Hydroxylgruppen zu erhalten, wurden die Chips in 200 mL einer frisch zubereiteten methanolischen Salzsäure-Lösung (1:1, v/v) gestellt und für 1 h im Schüttler inkubiert. Der Einsatz wurde gründlich mit 2 L destilliertem Wasser gespült und anschließend 1 h in Schwefelsäure bei RT geschüttelt. Nach erneutem

Spülen mit deionisiertem Wasser wurden die Chips in Methanol gelegt und anschließend mit Stickstoff vollständig getrocknet.

### **Silanisierung mit GOPTS**

In eine Petrischale wurden pro Chip zwei Schnappdeckel eingelegt und darauf wurden die Chips mit der markierten Seite nach unten aufgelegt. Auf die Glasoberfläche wurden 600 µL GOPTS pipettiert und ein zweiter Chip wurde mit der Gravierung nach oben als Sandwich aufgelegt. Die Petrischale wurde verschlossen und 3 h bei RT inkubiert, danach wurden die Sandwiches händisch getrennt und für jeweils 15 min in Ethanol, Methanol und erneut Ethanol im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips wurden mit Stickstoff trocken geblasen und 5 min bei 98 °C erhitzt.

### **Belegung mit PEG**

Das Diamino-PEG wurde in einem Becherglas bei 98 °C geschmolzen. Die silanisierten Glaschips wurden mit der unbeschichteten Seite in eine Petrischale gelegt und zügig mit 1 mL flüssigem PEG übergossen und mit einem weiteren Chip belegt. Die Chip-Sandwiches wurden für 15 h bei 98 °C in den Trockenschrank gestellt.

Die heißen Chips wurden zügig getrennt, in den Trägereinsatz gestellt, sofort in die Färbeschalen mit deionisiertem Wasser gegeben und 15 min bei RT im Ultraschallbad gereinigt. Der Einsatz mit den Chips wird mit deionisiertem Wasser gründlich gespült, zweimal für 15 min im Ultraschallbad gereinigt, danach die Chips mit Stickstoff vollständig getrocknet und visuell kontrolliert. Die Chips wurden bis zum Gebrauch im Exsikkator gelagert.

### **Aktivierung mit Epoxy-PEG-Chips**

Für das Immobilisieren der Toxin-Peptide bzw. der Toxin-Ethylendiamin-Linker auf der Chip-Oberfläche, erfolgt eine Aktivierung der Chip-Oberfläche mit Epoxy-PEG. Die Chips wurden in eine Petrischale gelegt und jeweils mit 600 µL Poly(ethylenglycol)diglycidylether (Epoxy-PEG) übergossen. Ein weiterer Chip wurde als Sandwich, möglichst blasenfrei, aufgelegt. Die Petrischale wurde verschlossen und bei 98 °C für 15 h inkubiert. Die Chips wurden händisch getrennt und in Methanol gespült. In eine Färbeschale wurden 200 mL Methanol gefüllt, der Trägereinsatz mit den Chips eingestellt und 15 min im Ultraschallbad behandelt.

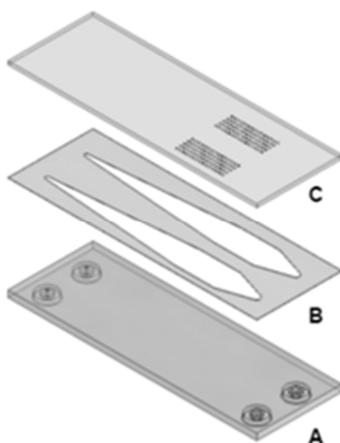
Anschließend wurde das organische Lösungsmittel ausgetauscht und erneut 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips wurden mit Stickstoff getrocknet und visuell auf Schlieren untersucht. Anschließend erfolgte die Immobilisierung der Toxin-Derivate auf der modifizierten Chip-Oberfläche.

### Deaktivierung der Chip-Oberfläche

200 mL Tris-HCl-Puffer wurden in die Färbeschale mit den Chips hinzugefügt und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde ausgetauscht und weitere 15 min ins Ultraschallbad gegeben. Dabei wurden die endständigen, noch freien Epoxy-Gruppen auf der Oberfläche durch eine nukleophile Addition in basischem Milieu zu Hydroxylgruppen umgesetzt und inaktiviert. Die Haltbarkeit der Chips wurde damit verlängert. Die Chips wurden anschließend gründlich mit Wasser gewaschen, mit Stickstoff vollständig getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

### Fertigstellung der Chips für die Messungen am MCR 3

Auf einem Polycarbonatträger wurde eine doppelseitig klebende Folie befestigt (Abbildung 62). Diese Folie besaß Einschnitte, die bei dem fertigen Chip die Flusszelle bildeten. Vier vorhandene Löcher dienten dazu, dass die verschiedenen Lösungen über den Chip gepumpt werden konnten. Der getrocknete Glaschip (entweder Epoxy-aktiviert oder DAPEG behandelt, mit immobilisierten Toxinderivaten) wurde dann auf die Folie geklebt und mit einer Presse möglichst blasenfrei befestigt.



**Abbildung 62:** Schematische Darstellung der Chip-Fertigstellung. (A) Polycarbonatträger, (B) Klebefolie (C) modifizierter und gespotteter Glaschip.

## 2.5.2 Immobilisierung der Toxine und Toxinkonjugate (Spotting)

### Mykotoxine mit Peptidlinker

Die Chips wurden im BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer Temperatur von 15 °C mittels *solid pin contact printing* gespottet. Die eingesetzten Konjugate (AFB1-CMO-Peptid, OTA-Peptid und ZEA-Peptid) hatten eine Konzentration von je 1 mg/mL in 97.5 % Coating-Puffer, 10 % DMSO und 2.5 % Glycerin (Spottingpuffer). Das OTA-Antigen besaß die Konzentrationen von 0.55 mg/mL und 1.00 mg/mL und die Positiv-Kontrolle (DNT) eine Konzentration von 1 mg/mL. Die Toxinlösungen und Positiv-/Negativ (Spotting-Puffer)-Kontrolle wurden in eine 384-Well-MTP vorgelegt. Die Chips und die MTP wurden in den BioOdyssey Calligrapher von *BioRad* eingelegt. Bei der Nadel handelte es sich um eine SNS12 *stealth solid pin* von der Firma *ArrayIt*, mit einem Auftragsvolumen von 5.1 nL. Dabei wurde zunächst immer eine Toxinlösung auf alle Chips in sechsfachen Replikaten gespottet und nach einem fünffachen Waschschrift das nächste Toxin immobilisiert. Nach dem Spotten wurden die Chips für 24 h bei RT in Petrischalen gelagert.

### Mykotoxine mit Aminolinker

Die Immobilisierung der Mykotoxine mit Aminolinker erfolgte analog zu jenen mit Peptidlinkern. Die *Spotting*-Konzentrationen betragen dabei für ZEA-CMO-Amin 2.0 mg/mL, ZAN-CMO-Amin 2.0 mg/mL und AFB1-CMO-Amin 1.0 mg/mL.

### Mykotoxine als HOBt-Aktivester

Für die direkte Immobilisierung wurden zunächst 7.00 mg HOBt (0.052 mmol) und 8.00 mg EDC (0.052 mmol) in 690 µL Carbonat-Puffer, 300 µL DMSO, 10 µL Glycerol und 50 µL DIPEA gelöst (notfalls kurz in Ultraschallbad behandelt). In diesen Spottingpuffer(-aktiviert) wurden die Mykotoxine mit endständiger Säure (OTA, FB1, DON-HS, ZEA-CMO, AFB1-CMO und T-2-HS) in Konzentrationen von 0.55 mg/mL, 1.00 mg/mL, 4 mg/mL, 2.00 mg/mL und 0.77 mg/mL und in Eppendorf-Caps 3 h bei RT inkubiert. Das Anbinden der so gebildeten Aktivester an die modifizierte Chip-Oberfläche erfolgte wie oben bei den Peptidlinkern beschrieben.

### 2.5.3 Messung mit MCR 3

Für die Messung am MCR 3 wurden 0.5 % Casein in PBS (w/v) als Laufpuffer, 20 % Methanol in PBS als Waschpuffer und PBS als Storepuffer verwendet (Karsunke, 2011). Der nachstehende Ablauf soll einen Assay an der hinteren Flusszelle erläutern (siehe auch Tabelle 33): Im ersten Schritt wurde 1 mL 0.5 % Casein mit einer Flussrate von 500  $\mu\text{L/s}$  über den Chip geleitet. Anschließend wurden je 500  $\mu\text{L}$  Probe und 500  $\mu\text{L}$  Antikörper-Lösung mit einer Flussrate von 60  $\mu\text{L/s}$  in einen Inkubationsschlauch gepumpt. Dazu wurden die Antikörper anti-OTA 5G9 (1.00 mg/mL, 1:5000), anti-AFB1 1F2 (1.00 mg/mL, 1:15000), anti-FB1 1H4 (0.37 mg/mL, 1:4000), anti-DON (0.72 mg/mL, 1:3000) und anti-T-2 Toxin 2E7 (1.00 mg/mL, 1:10000) in 0.5 % Casein verdünnt. Mit einer Flussrate von 100  $\mu\text{L/s}$  wurde die Proben/Antikörper-Mischung mittels 1 mL Laufpuffer über den Chip geführt. Nach einem Waschschrift mit 2000  $\mu\text{L}$  Laufpuffer und einer Flussrate von 500  $\mu\text{L/s}$  wurde 1 mL Sekundär-Ak über den Chip geleitet. Davon hatten 200  $\mu\text{L}$  eine Flussrate von 100  $\mu\text{L/s}$  und 800  $\mu\text{L}$  eine Flussrate von 10  $\mu\text{L/s}$ . Nach erneutem Waschen mit 2000  $\mu\text{L}$  Laufpuffer (500  $\mu\text{L/s}$ ), wurden 400  $\mu\text{L}$  Chemilumineszenz-Lösung mit einer Flussrate von 150  $\mu\text{L}$  auf den Chip gegeben. Der Fluss wurde gestoppt und die CCD-Kamera nahm für 60 s. ein Bild auf. Nach der Detektion erfolgte ein intensiver Regenerationszyklus und ein Waschprogramm. Es wurde ein Gesamtvolumen von 22.5 mL benötigt, dazu gehörte der Regenerationspuffer, 20 % Methanol in PBS und Wasser. In Tabelle 33 ist das Assay-Programm zusammengefasst.

Die Mikroarraychips wurden am MCR 3 ausgelesen. Die generierten Text-Dateien wurden mit der Software Spot Image Processor 0.4 (SIP 0.4, Karsunke Softwarebüro, Wolnzach, Germany) ausgewertet. Für die Auswertung der Chips wurden 5 x 5 Pixel um jedes Spotmaximum integriert. Dies entspricht einer realen Fläche von 0.04  $\text{mm}^2$  auf der Chip-Oberfläche.

**Tabelle 33:** MCR 3-Assay-Programm mit einer Gesamtzeit von 11 min für eine automatisierte Probenbestimmung.

	<b>Flusszelle hinten</b>	<b>Geschwindigkeit, Pumpen</b>
1)	1 mL Casein	500 µL/s; P4
2)	200 µL Probe in die	100 µL/s; P2
3)	500 µL Probe + 500 µL Prim. Ak	60 µL/s; P2, P1
4)	1 mL Casein	100 µL/s; P2
5)	2 mL Casein	500 µL/s; P4
6)	200 µL Sek. Ak	100 µL/s; P0
7)	800 µL Sek. Ak	10 µL/s; P0
8)	2 mL Casein	500 µL/s; P4
9)	400 µL Substratlösung	150 µL/s; P3
10)	2 x 1mL Spülpuffer	250 µL/s; P2
11)	2 x 1mL Storepuffer	250 µL/s; P2
12)	2 x 1mL Spülpuffer	250 µL/s; P2
13)	5 x 2 x 60 µL Reg.puffer	10 µL/s; P5
14)	3 x 2 x 60 µL Reg.puffer	10 µL/s; P5
15)	5 x 300 µL Reg.puffer (davon 5 x 100 µL immer hin und her)	500 µL/s; P5 100µ/l/s; P5
16)	3 x 500 µL Spülpuffer	500 µL/s; P5
17)	1.5 mL Storepuffer	500 µL/s; P5
18)	2 x 1.5 mL Spülpuffer	500 µL/s; P5

## 2.6 Probenvorbereitung

### 2.6.1 Probenvorbereitung und Extraktion von Getreideprodukten

Die eingesetzten Produkte wurden im Handel in Mengen von je 1 kg erworben und gründlich homogenisiert.

Es wurden 25 g Hafer- bzw. Weizen-Blindproben in einem Becherglas abgewogen. Zur Extraktion wurden 5 g Kochsalz sowie 20 mL deionisiertes Wasser und 80 mL Methanol (80 % Methanol) zugesetzt und mit dem Stabmixer 5 min homogenisiert. Währenddessen wurde das Becherglas im Eisbad gekühlt, um Lösungsmittelverluste zu minimieren. Nach dem Filtrieren mittels eines Faltenfilters wurden 20 mL des Rohextraktes mit 60 mL PBS in der Verdünnung 1:4 (v/v, 20 % Methanol) hergestellt. Im Anschluss wurde die Lösung in einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen an AFB<sub>1</sub>, OTA, DON, FB<sub>1</sub> oder T-2/HT-2 To-

xine aufgestockt. Am MCR 3 wurde die Kalibrierung mit allen oben genannten Toxinen durchgeführt. Diese Extraktion wurde als Standard(-extraktions-)methode bezeichnet.

Für die Optimierung von geeigneten Extraktionsmitteln wurden zu den 25 g Blindprobe, 5 g Kochsalz, zusätzlich 100 mL folgender Lösungsmittelzusammensetzungen hinzugegeben:

- a) 80:20 Methanol/Wasser (v/v)
- b) 70:30 Methanol/Wasser (v/v)
- c) 60:40 Methanol/Wasser (v/v)
- d) 20:80 Methanol/Wasser (v/v)
- e) Wasser (mit und ohne 5 g Kochsalz)

Die den Proben b – e wurde nach der Extraktion bei 4500 U/min und 20 °C 15 min zentrifugiert und der Überstand anschließend mittels Faltenfilters filtriert. Zur anschließenden Verdünnung nach der Extraktion von 1:4 (v/v, 20 % Methanol) wurden PBS, 3.33 % (a), 6.70 % (b), 9.99 % (c), 13.33 % bzw. 20.00 % (d) Methanol in PBS, sowie 26.67 % (e) Methanol in PBS eingesetzt. Bei Ausflockung wurden die Proben erneut mit einem Faltenfilter filtriert.

Für die Herstellung der Kalibrierreihe wurden eine OTA- und AFB1-Stammlösung von 1000 µg/L, FB1-Stammlösung von 122000 µg/L, eine DON-Stammlösung von 100000 µg/L sowie Stammlösungen von je 10000 µg/L von T-2 bzw. HT-2 Toxin verwendet. Zur Verdünnung wurde der 20-%-Methanol-Hafer-Extrakt eingesetzt. Für AFB1 und OTA wurden Kalibrierlösungen von 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 und 10 µg/L verwendet, während für DON Konzentrationen von 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 und 500 µg/L und für FB1 von 0.5, 2, 5, 20, 50, 200, 500 und 700 µg/L eingesetzt wurden. T-2 bzw. HT-2 Toxine wurden in Verdünnungen von 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 500.0 und 1000.0 µg/L verwendet.

### **2.6.2 Herstellung und Extraktion von dotierten Proben und Referenzproben**

Für die Bestimmung von dotierten Proben wurden je 5 g Hafer, Weizen, Roggen und Mais abgewogen und mit den jeweiligen Toxinen in definierten Konzentrationen aufgestockt. Die Zugabe zur Probenmatrix erfolgte nach Lösen der Mykotoxine in 1 mL Methanol. Die Lösemittel wurden anschließend über Nacht im Abzug verdampft. Für die Bestimmung der Wie-

derfindungsraten wurden je 5 g der dotierten Getreideproben mit 1 g Kochsalz, 4 mL Wasser und 16 mL Methanol versetzt und im Eisbad für 2 min mit dem Stabmixer gemixt (Standardextraktionsmethode). Dann wurde rasch abfiltriert und im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert. Vor der Messung wurden dann jeweils 1 mL Rohextrakt mit 3 mL PBS verdünnt (20 % Methanol). Dotierte Proben, die zur Untersuchung der optimalen Extraktionsmittel eingesetzt wurden, wurden mit den entsprechenden Lösungen extrahiert, mit denen auch die Kalibrierung erfolgte.

Für die Dotierung der Proben wurden für DON ausgehend von der methanolischen Stammlösung von je 100000 µg/L Aliquote von 3.5, 5.0, 10.0 bzw. 37.5 µL, für AFB1 und OTA ausgehend von einer Stammlösung von 1000 µg/L Aliquote von 5.0, 15.0, 30.0 bzw. 35.0 µL, für FB1 (Stammlösung von 140000 µg/L) Aliquote von 21.7 µL und 27.2 µL und für T-2 Toxin (50000 µg/L) von 5.0, 20.0, 50.0 µL in 1 mL Methanol hergestellt.

Die verwendeten Referenzproben und natürlich belasteten Realproben wurden analog zu den dotierten Proben extrahiert und auf 20 % Methanol verdünnt.

### **2.6.3 Probenvorbereitung und Extraktion von Weinen**

Die eingesetzten Weinproben wurden im Handel zu 0.75 L erworben.

#### **Weißwein (WW)**

10 mL WW wurden mit 70 mL PBS versetzt (Verdünnung 1:8, WW/PBS, v/v). Im Anschluss wurde die Lösung in einer Verdünnungsreihe mit 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 und 10 µg/L mit OTA (Stammlösung 1:1000) aufgestockt.

Für die Herstellung der dotierten Proben wurden 5 mL WW mit den jeweiligen OTA-Konzentrationen versetzt und im Anschluss mit PBS 1:8 verdünnt.

#### **Rotwein (RW)**

Zu 5 mL der RW wurden 10 mL NaCl-Lösung und 15 mL Chloroform zugesetzt, die Proben 30 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 5 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden getrennt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Kolben ans Hochvakuum angeschlossen. Am nächsten Tag wurde der Rückstand in 5 mL

20 % Methanol in PBS-Puffer aufgenommen und davon 1 mL in 7 mL PBS-Puffer verdünnt (Verdünnung 1:8). Für die Verdünnungen der Kalibrierreihe wurde eine OTA-Stammlösung von 1000 µg/L verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen waren analog zum WW.

Für die Herstellung der dotierten Proben wurden jeweils zu 5 mL RW die entsprechenden OTA-Konzentrationen hinzugefügt. Die Probenaufarbeitung erfolgte dann analog zu oben.

### 2.7 Vernichtung der Mykotoxine

Nach den Messungen wurden die mit den Mykotoxinen aufgestockten Getreideproben mit einem äquivalenten Volumen an 10 %iger Natriumhypochlorit-Lösung für mindestens 12 h dekontaminiert.

### 2.8 Synthese vom OTA-Immunogen

Für die Immunisierung wurde das Hapten OTA an Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) gekoppelt. Für die kovalente Bindung des OTA-Moleküls an BSA wurde zusätzlich ein kurzer Linker (Glycin) eingeführt. Dieser sollte gewährleisten, dass durch den räumlichen Abstand zur Proteinoberfläche die Spezifität der produzierten Antikörper erhöht wird.

#### 2.8.1 Synthese von Ochratoxin A mit Glycin-Linker

Zunächst erfolgte die Synthese des OTA-Glycin (OTA-Gly). Dazu wurden 5 mg OTA (0.013 mmol) in 200 µL trockenem THF gelöst und mittels Septum-Technik (Cervino, 2009) in einen Kolben überführt. Das gelblich fluoreszierende Gemisch wurde im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde über 1 h eine Kopplungslösung bestehend aus 3.4 mg HOBt (0.025 mmol, 2 Äq.), 4.75 mg EDCI (0.024 mmol, 2 Äq.) in 200 µL THF hinzugegeben. Nach 30 min Rühren wurde die Reaktionslösung auf RT gebracht. 6.28 mg (0.0019 mmol, 1.5 Äq.) von Glycinbenzylester-Tosylat (H-Gly-OBzl p-Tosylat) wurden in 200 µL THF mit 25 µL DIPEA (0.075, 6 Äq.) gelöst und zum Aktivester hinzugefügt und 24 h unter Lichtabschluss gerührt. Anschließend wurde die Abgangsgruppe (Benzyl) über Palladium auf Aktiv-

kohle entfernt. Dazu wurde die Reaktionslösung im Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit Ethylacetat gelöst. Nach Extraktion mit 5 % Natriumcarbonat, wurde die organische Phase mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und einrotiert. Nach vollständiger Trocknung unter Hochvakuum wurde der Rückstand in Methanol gelöst und in einen Kolben mit Palladium auf Aktivkohle 24 h reduziert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Methanol über einer mit *Celite* gefüllten Fritte. Das Produkt wurde analytisch mittels ESI-MS nachgewiesen.

### 2.8.2 Herstellung des OTA-Gly-BSA Immunogens

5 mg des OTA-Glycins wurden in 1 mL trockenem Dioxan gelöst (12.4 mM). Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  NHS (0.29 M) und 250  $\mu\text{L}$  DCC (0.19 M) zur Reaktionslösung in einem 25-mL-Kolben gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss bei 100 rpm 24 h lang geschüttelt. Das Nebenprodukt *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff (farblose Kristalle) kristallisierte dabei aus. Die Lösung wurde bei 4000 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand von 1.18 mL wurde in 1000  $\mu\text{L}$  BSA in Kopplungspuffer (0.13 mM) bei 0 °C gegeben. Die trübe Lösung wurde anschließend 3 h bei RT und 100 rpm geschüttelt. Die Suspension wurde mittels Dialyse (Cellulose Membran, 21 mm) gegen Wasser gereinigt und anschließend aliquotiert und lyophilisiert.

Die Kopplungsdichte wurde über MALDI-TOF-MS bestimmt. Hierzu wurde das erhaltene Produkt mit C4-Säulen (ZipTip) entsalzt. Es wurden 25  $\mu\text{L}$  Probe (5 – 10 mg/mL) zehnmal mit ZipTips aufgezogen, anschließend zweimal mit Wasser (0.1 % TFA) gewaschen und zuletzt mit 1.5  $\mu\text{L}$  Matrix (gesättigte Zimtsäure, 0.1 % TFA) eluiert. Die Immunogene wurden mit der Matrix auf ein Aluminium-Target gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet. Als Referenz wurde BSA (je 10 mg/mL) in PBS eingesetzt.

## 2.9 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten

Für die Bestimmung mit dem MTP-ELISA wurden weitere Mykotoxin-Konjugate eingesetzt. Hierzu wurden für OTA neben dem BSA auch noch Ovalbumin (OVA-Konjugat) hergestellt. Die Synthese erfolgte analog zu Kapitel V. 2.8.2 Die hergestellten Konjugate wurden mittels ELISA getestet. Analog wurde ZEA-BSA hergestellt.

## 2.10 Immunisierungsprotokoll für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper sollte mittels der Hybridomzelltechnik nach KÖHLER und MILSTEIN (Köhler, 1975) erfolgen. Dazu wurden die synthetisierten Immunogene dem Partner (Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt, der die Immunisierung der Mäuse, die Fusionierung der Immunzellen (B-Zellen) mit Myelomzellen, das Primärscreening und die Kultivierung der selektierten Hybridomzellen durchführte.

Zwölf 10 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit 25 µg einer OTA-Gly-BSA in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) und 300 µL komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Die Kopplungsdichten wurde mittels MALDI auf durchschnittlich 4,0, 7,5, 8,0, 18,0 Moleküle OTA-Gly pro Molekül BSA bestimmt. Die Immunisierungen wurden nach fünf und sieben Wochen mit je 25 µg OTA-Gly-BSA in unvollständigem Freund'schen Adjuvans wiederholt. Jeweils vier Tage bzw. ein Tag vor der Fusionierung wurden die Mäuse mit 30 µg OTA-Gly-BSA in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) hyperimmunisiert. Für die Fusionierung wurden  $1.5$  bis  $2.2 \times 10^8$  Zellen der Krebszelllinie P3X63Ag8/653 mit Polyethylenglykol 1500 vermengt. Die fusionierten Zellen wurden drei Wochen lang in einem RPMI-basierten HAT-Selektionsmedium (mit 400 µM Aminopterin, 100 µM Hypoxantin und 16 µM Thymidin) inkubiert und anschließend eine Woche in einem HAT-Medium kultiviert. Zuletzt ließ man die Zellen in RPMI-1640-Medium mit Rinderinsulin (5 mg/L), 10 % fötalem Kälberserum, Gentamicin (80 mg/L), Glucose (2.5 g/L), HEPES (4.77 g/L), L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol (1 mM), Natriumpyruvat (50 mg/L) und Bernsteinsäure (65 mg/L) wachsen. In einem Vortest wurden 148 Klone von etwa 4000 Klonen in einem indirekten nichtkompetitivem ELISA ausgewählt. In diesem Vorscreening, die am Institut für Physiologische Chemie in Halle durchgeführt wurden, wurde eine Zellkulturüberstandsverdünnung von 1:2 bis 1:10 verwendet. Dies ließ zwar eine hohe Anzahl von falsch positiven Klonen vermuten, es konnte dadurch jedoch vermieden werden, dass positive Klone übersehen wurden. Um allerdings Kreuzreaktivitäten zum BSA-Protein von vornherein auszuschließen, wurde für das Screening bereits das OTA-OVA-Konjugat (1 mg/mL, Verdünnung 1:5000) zur Beschichtung der MTP verwendet.

## **2.11 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

### **2.11.1 Allgemeine Durchführung eines indirekt nichtkompetitiven ELISA**

Die MTP wurden mit Hapten-Konjugat-Lösung in diversen Verdünnungen in Coatingpuffer beschichtet (100 µL/well). Als Konjugatverdünnungen (Stammlösung: ~ 1 mg/mL) wurden für das gesamte Screening 1:10000 und 1:5000 eingesetzt. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Nach dem Waschen mit Waschpuffer (PBST) wurde die MTP für 1 h mit 1 % Casein in PBS (w/v, 300 µL/well) auf dem Schüttler geblockt. Nach der Inkubationszeit und dem erneuten Waschen wurden je 100 µL der verdünnten Zellkulturüberstände (1:50 und 1:100) in Triplikaten auf die MTP gegeben. Es wurde für 1 h bei 100 rpm inkubiert und nach dem Waschen wurde der Sekundärantikörper anti-Maus-IgG (1:8000, 100 µL/well) hinzugegeben und 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Farbreaktion. Die Substratlösung wurde auf die MTP pipettiert (100 µL/well). Nach ausreichender Farbstärke bzw. maximal 40 min wurde mit 5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Wasser (100 µL/well) die Farbentwicklung gestoppt. Mittels MTP-Reader wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **2.11.2 Allgemeine Durchführung eines indirekt kompetitiven ELISA**

Die MTP wurde mit den entsprechenden Coating-Konjugat-Lösungen in diversen Verdünnungen in Coating-Puffer beschichtet (100 µL/well). Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Nach dem Waschen mit Waschpuffer, wurde die MTP für 1 h mit 1 % Casein in PBS (w/v, 300 µL/well) auf dem Schüttler geblockt. Nach der Inkubationszeit und dem erneuten Waschen wurden zuerst die Toxin-Lösungen (50 µL/well) und dann die Antikörperlösungen (50 µL/well) auf die MTP pipettiert. Es wurde für 1 h bei 100 rpm inkubiert und nach dem Waschen wurde der Sekundärantikörper anti-Maus-IgG (1:8000, 100 µL/well) hinzugegeben und 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Farbreaktion. Die Substratlösung wurde auf die MTP pipettiert (200 µL/well). Nach ausreichender Farbstärke bzw. maximal 40 min wurde mit 5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Wasser (100 µL/well) die Farbentwicklung gestoppt. Mittels MTP-Reader wurden die Platten bei 450 nm gemessen. Zu beachten war, dass bei einem ELISA zwei MTP nicht direkt miteinander verglichen werden konnten und somit die Kalibrierkurve immer für jede Messung neu auf der Platte enthalten sein musste.

### 2.11.3 Optimierung der Coating- und Antikörperkonzentration

Für die Testung der Extraktionsbedingungen sowie die generelle Untersuchung von Matrixeinflüssen auf die eingesetzten Antikörper, mussten zunächst die optimalen Bedingungen für die MTP gefunden werden. Mit Hilfe des indirekt kompetitiven Formats wurden die optimale Antikörper-Konzentration und Coating-Konjugat-Konzentration ermittelt. Auf je einer MTP wurden dabei OTA, AFB1, FB1 und DON optimiert. In Tabelle 34 sind die Verdünnungsschemata der Beschichtungs- und Antikörper-Konzentrationen sowie die eingesetzten Konzentrationen wiedergegeben.

**Tabelle 34:** Optimierung der Coating-Konjugat- und Antikörperverdünnungen (Jiao, 1992).

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Verdünnung von CK</b>	$1/n^2x$	$1/nx$	$1/x$	$1/n^2x$	$1/nx$	$1/x$	$1/n^2x$	$1/nx$	$1/x$	$1/n^2x$	$1/nx$	$1/x$
<b>Verdünnung von Ak</b>	$1/y$	$1/y$	$1/y$	$1/my$	$1/my$	$1/my$	$1/my$	$1/my$	$1/my$	$1/m^2y$	$1/m^2y$	$1/m^2y$

Reihe	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>AFB1 bzw. OTA [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
<b>FB1 [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	0.2	0.5	2	5	20	50	200	500
<b>DON [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	0.1	0.5	1	5	10	50	100	500
<b>ZEA [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10

Für die Antikörper 1F2 (anti-AFB1), 5G9 (anti-OTA), 1H8 (anti-DON), 1H4 (anti-FB1) und 1B11/Aokin (anti-ZEA) sowie für die Konjugate AFB1-BSA, OTA-BSA, FB1-BSA, DON-BSA und ZEA-BSA galten folgenden Parameter:  $x = 10000$ ,  $y = 5000$ ,  $n = 2$  und  $m = 2$ .

Aufgrund bester Testmittelpunkte und ausreichender Absorption, haben sich als optimale Bedingungen folgende Konzentrationen herausgestellt:

AFB1-BSA:	1:20000	1F2:	1:20000
OTA-BSA/OVA:	1:10000	5G9:	1:5000
FB1-BSA:	1: 5000	1H4:	1:5000
DON-BSA:	1:10000	1H8:	1:5000
ZEA-BSA:	1:10000	1B11/Aokin:	1:10000/1:5000

#### 2.11.4 Kreuzreaktivitätstest

Diese Methode diente dazu, Antikörper auf ihre relative Affinität bezüglich strukturell ähnlicher Analyten zu untersuchen. Besonders die parallele Detektion aller sechs Mykotoxine auf dem Mikroarray, erforderte das Ausschließen eventueller Kreuzreaktionen. Hierbei wurde zunächst die Kreuzreaktivität des Antikörpers 1F2 gegenüber AFB2, AFG1 und AFG2 auf der MTP untersucht.

Für den Antikörper 1F2 (anti-AFB1) wurde eine Coating-Verdünnung von 1:20000 und eine Antikörper-Verdünnung von 1:20000 verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Punkt 2.11.2. Dafür wurden die Coating-Konzentration und die Ak-Konzentration konstant gehalten, während die verschiedenen AF-Antigene als Kalibrierungslösung zugesetzt wurden. Der erhaltene  $IC_{50}$ -Wert für die AFB2, G1 und G2 wurde durch den  $IC_{50}$ -Wert für AFB1 geteilt und in Prozent angegeben. Da als Immunogen AFB1 eingesetzt wurde, wurde dieser Wert als 100 % gesetzt.

Für die Kreuzreaktivitätsbestimmung der Antikörper zu den jeweils anderen Toxinen wie AFB1, OTA, DON, FB1 und T-2/HT-2 Toxine wurden die unter 2.11.3 bestimmten Verdünnungen verwendet. Die Berechnung der Kreuzreaktivität erfolgte ebenfalls durch Division der  $IC_{50}$ -Werte. Zu dem indirekten kompetitiven ELISA wurden die Antigene in 20 % Methanol in PBS zugesetzt.

Für die Untersuchung der Affinität der anti-ZEA-Antikörper 1B11 und Aokin wurde ebenfalls mittels *trans*- und *cis*-Standards die Kreuzreaktivität untersucht.

## 2.12 Oberflächenplasmonenresonanzmessungen

Alle SPR-Messungen wurden im indirekten ELISA-Format mit dem Sensorchip CM 5 durchgeführt. Es wurde stets bei 25 °C und einer Flussrate von 10 µL/min und mit HBS EP+ (pH 7.4) als Laufpuffer gemessen.

### Immobilisierung von ZEA-BSA-Konjugat

Zur Aktivierung der Oberfläche des CM-5-Chips wurde eine frisch hergestellte 1:1-Mischung aus EDC (0.4 M) und NHS (0.1 M) 7 min über die Flusszelle geleitet. Anschließend wurde eine 0.01-mg/mL-Lösung von ZEA-BSA-Konjugat, gelöst in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 5.0) schrittweise (in Summe 15 min) über den Chip gespült, bis eine Sättigung an der Oberfläche erreicht wurde. Der Goldchip wurde mit 10 M Ethanolamin 4 min deaktiviert. Die Referenzflusszelle wurde wie die Messzelle aktiviert, aber es erfolgte keine Immobilisierung eines Liganden. Die aktiven Stellen wurden mit 10 M Ethanolamin 4 min deaktiviert. Die Chips wurden bei 4 °C in HBS EP+ Puffer gelagert. Vor der nächsten Anwendung wurde der Chip mit destilliertem Wasser gespült und im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

### Durchführung von Regenerationsmessungen

Für die Regenerationsmessungen wurden die anti-ZEA-Antikörper 1B11 (Prof. Märtlbauer, LMU) und der erworbene mAk aokin-anti-ZEA von Fa. Aokin getestet. Dazu wurden je 0.02 mg/mL mAk in HBS EP+ Puffer hergestellt. Der mAk 1B11 wurde 7 min über den Chip geleitet, während eine Sättigung beim aokin-anti-ZEA-mAk nach 4 min erreicht wurde. Zuletzt wurde der Regenerationspuffer 30 sek. (100 mM Glycin, 100 mM NaCl, 0.1 % SDS, pH 3.0) über den Chip geleitet. Dies wurde mehrere Zyklen wiederholt.

## **VI Abkürzungsverzeichnis**

3-AcDON	3-Acetyl-Deoxynivalenol
a.u.	<i>Arbitrary Units</i> (willkürliche Einheit)
AFB1, B2, G1, G2	Aflatoxin B1, B2, G1, G2
AF	Aflatoxin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APCI	Ionisation bei Atmosphärendruck, <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>
Äq.	Äquivalent
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCD	Digitalkamera <i>Charge Coupled Device</i>
CK	Coating-Konjugat
CL	Chemilumineszenz
CMO	Carboxymethoxyloxim
CV	Variationskoeffizient <i>Coefficient of Variation</i>
Da	Dalton
DAPEG	Diaminopolyethylenglykol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dest.	Destilliert
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DON	Deoxynivalenol
DSC	Di-( <i>N</i> -succinimidyl)carbonat
DTT	Dinitrotoluol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

---

E <sub>F</sub>	Extraktionskorrekturfaktors
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EU	Europäische Union
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Fab	Antigen bindendes Fragment
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FB1	Fumonisin B1
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
Fv	Variables Fragment <i>Fragment Antigen Binding</i>
FZ	Flusszelle
GC	Gaschromatographie
GOPTS	3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan
GPC	Gelpermeationschromatographie
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin-Medium
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium- Hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol-hydrat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HT	Hypoxanthin/Thymidin-Medium
IAE	Immunoaffinitätsextraktion
IAC	Immunoaffinitätssäulen <i>Immunoaffinity Columns</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC <sub>50</sub>	Testmittelpunkt
Ig	Immunglobulin
IUPAC	<i>Union of Pure and Applied Chemistry</i>

IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der TU München
KLH	Schlüsselloch-Schnecken-Hämocyanin <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
KR	Kreuzreaktivität
LC	Flüssigchromatographie <i>Liquid Chromatography</i>
LD <sub>50</sub>	Mittlere letale Dosis
LGL	Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LM	Lösungsmittel
LOD	Nachweisgrenze <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze <i>Limit of Quantification</i>
m	Anzahl der Mehrfachmessungen
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MCR 3	Munich Chip Reader 3ter Generation
min	Minute
MIP	<i>Molecular Imprinted Polymer</i>
MRL	<i>Maximum Residue Limits</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
M <sub>w</sub>	Molekülmasse
n	Anzahl der Messpunkte einer Kalibrierung

---

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NOAEL	<i>No Observable Adverse Effect Level</i>
OTA	Ochratoxin A
OVA	Ovalbumin
PAH`s	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
pAk	Polyklonaler Antikörper
PASA	Paralleler Affinitätssensorarray <i>Parallel Affinity Sensor Array</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
RIA	Radioimmunoassay
RM	Zertifiziertes Referenzmaterial
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute <i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Refractive Units</i>
s	Standardabweichung
SCF	<i>Scientific Committee for Food</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPPS	Festphasensynthese <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
SPR	Oberflächenplasmomonenresonanz <i>Surface Plasmon Resonance</i>
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TDI	<i>Tolerable Daily Intake</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Thyroglobulin

Tis	Triisopropylamin
TLC	Dünnschichtchromatographie <i>Thin Layer Chromatography</i>
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
ü.N.	Über Nacht
UPLC	Ultra-Performance Flüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenverhältnis
V <sub>H</sub>	Variabler Teil der schweren Kette <i>Variable Heavy Chain</i>
Vis	Sichtbarer Bereich des Lichts
w/v	Masse zu Volumen-Verhältnis
WHO	Weltgesundheitsorganisation <i>World Health Organization</i>
ZAL	Zearalanol
ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZOL	Zearalenol

## **VII Literaturverzeichnis**

- Ad'anyi N.**, Levkovets I. A., Rodriguez-Gil S., Ronald A., V'aradi M., Szendr'o I., Development of immunosensor based on OWLS technique for determining aflatoxin B1 and ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 797-802.
- Ahmed R.**, Gray D., Immunological memory and protective immunity: understanding their relation, *Science* **1996**, *272*, 54-60.
- Alberts J. F.**, Gelderblom W. C., Thiel P. G., Marasas W. F., van Schalkwyk D. J., Behrend Y., Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by fusarium moniliforme, *Appl. Environ. Microb.* **1990**, *56*, 1729-1733.
- Al-Taher F.**, Banaszewski K., Jackson L., Zweigenbaum J., Ryu D., Cappozzo J., Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2378-2384.
- Ameacutezqueta S.**, Schorr-Galindo S., Murillo-Arbizu M., Gonzaacutelez-Pentildeas E., Loacuteppez de Cerain A., Guiraud J. P., OTA-producing fungi in foodstuffs: a review, *Food Control* **2012**, *26*, 259-268.
- Anfossi L.**, Giovannoli C., Giraudi G., Biagioli F., Passini. C., Baggiani C., A lateral flow immunoassay for the rapid detection of ochratoxin A in wine and grape must, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11491-11497.
- Ates E.**, Mittendorf K., Stroka J., Senyuva H., Determination of fusarium mycotoxins in wheat, maize and animal feed using online clean-up with high resolution mass spectrometry, *Food Addit. Contam. A* **2013**, *30*, 156-165.
- Attridge J. W.**, Daniels P. B., Deacon J. K., Robinson G. A., Davidson G. P., Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay, *Biosens. Bioelectron.* **1991**, *6*, 201-214.
- Bailon P.**, Affinity chromatography: methods and protocols, *Humana Press*, Totowa N. J. **2000**.
- Barany G.**, Kneib-Cordonier N., Mullen D. G., Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report, *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1987**, *30*, 705-739.
- Basova E.**, Goryacheva I., Rusanova T., Burmistrova N. A., Dietrich R., Märtlbauer E., Detavernier C., van Peteghem C., De Saeger S., An immunochemical test for rapid screening of zearalenone and T-2 toxin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 55-62.

- Bennett G. A.,** Richard J. L., Influence of processing on fusarium mycotoxins in contaminated grains, *Food Technol.* **1996**, *50*, 235-238.
- Bennett J. W.,** Klich M., Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia, *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497-516.
- Berkson J.,** Application of the logistic function to bio-assay, *J. Am. Stat. Assoc.* **1944**, *39*, 357-365.
- Berthiller F.,** Schumacher R., Adam G., Krska R., Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1243-1252.
- Betina V.,** Systematic analysis of mycotoxins by thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. Libr.* **1976**, *116*, 141-151.
- Bezuidenhout S. C.,** Gelderblom W. C. A., Gorst-Allman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spiteller G., Vleggaar R., Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from fusarium moniliforme, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1988**, 743-745.
- Bhat R. V.,** Shetty P. H., Amruth R. P., Sudershan R. V., A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins, *Clin. Toxicol.* **1997**, *35*, 249-255.
- Biselli S.,** Analytische Methoden für die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine, *J. Verbr. Lebensm.* **2006**, *1*, 106-114.
- Bjorck L.,** Kronvall G., Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent, *J. Immunol.* **1984**, *133*, 969-974.
- Blout W. P.,** Turkey "X" disease, *Turkeys* **1961**, *61*, 55-58.
- Bondarenko A. P.,** Eremin S. A., Determination of zearalenone and ochratoxin A mycotoxins in grain by fluorescence polarization immunoassay, *J. Anal. Chem.* **2012**, *67*, 790-794.
- Cammann K.** (Hrsg.), Instrumentelle Analytische Chemie, *Verlag Heidelberg* **2001**, Heidelberg.
- Cervino C.,** Asam S., Rychlik M., Knopp D., Niessner R., Use of isotope-labeled aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of foods, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1873-1879.

- Cervino C.**, Knopp D., Weller M. G., Niessner R., Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates, *Molecules* **2007**, *12*, 641-653.
- Cervino C.**, Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung von Aflatoxinen in Lebensmitteln, *Dissertationsschrift*, Technische Universität München **2009**.
- Cervino C.**, Weber E., Knopp D., Niessner R., Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies, *J. Immunol. Meth.* **2008b**, *329*, 184-193.
- Cho Y. J.**, Lee D. H., Kim D. O., Min W. K., Bong K. T., Lee G. G., Seo J. H., Production of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application to immunochromatographic assay, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8447-8451.
- Chu F. S.**, Li G. Y., Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer, *Appl. Environ. Microb.* **1994**, *60*, 847-852.
- Ciesla L.**, Waksmundzka-Hajnos M., Two - dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1035-1052.
- Cole R. J.**, Cox R. H., Handbook of toxic fungal metabolites, *Academic Press* **1981**, New York.
- CONTAM** (Gremium für Kontaminationen in der Lebensmittelkette), Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on are quest from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed, *EAFS Journal* **2004**, *89*, 1-35.
- Cotty P. J.**, Bayman P., Egel D. S., Elias K. S., Agriculture, aflatoxins and aspergillus, In: Powell K. A., Renwick A., Peberdy J. F. (Ed.), The genus aspergillus, *Plenum Press* **1994**, New York.
- Czeh A.**, Mandy F., Feher-Toth S., Torok L., Mike Z., Koszegi B., Lustyk G. J., A flow cytometry based competitive fluorescent microsphere immunoassay (CFIA) system for detecting up to six mycotoxins, *Immunol. Methods* **2012**, *384*, 71-80.
- Dall'Asta C.**, Mangia M., Berthiller F., Molinelli A., Sulyok M., Schuhmacher R., Krska R., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R., Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1335-1345.

- De Costa C.**, St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine, *Lancet* **2002**, *359*, 1768-1770.
- Di Noia J. M.**, Neuberger M. S., Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 1-22.
- Donhauser S. C.**, Niessner R., Seidel M., Sensitive quantification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Campylobacter jejuni* by combining stopped polymerase chain reaction with chemiluminescence flow-through DNA microarray analysis, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3153-3160.
- Dorokhin D.**, Haasnoot W., Franssen M. C. R., Zuilhof H., Nielen M. W. F., Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3005-3011.
- Elbs M.**, Brock R., Determination of binding constants on microarrays with confocal fluorescence detection, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4793-4800.
- EU**, Collection of occurrence data of fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states, *Reports on task for scientific cooperation (SCOOP)* **2003**, Report of experts participating in Task 3.2.10.
- EU**, Empfehlung der Kommission (EU) zur Prävention und Reduzierung von Fusarientoxinen in Getreide und Getreideprodukten, **2006/583**.
- EU**, Höchstmengen Mykotoxine EU, Verordnung (EG) Nr. 1126/ **2007**.
- EU**, Höchstmengen Mykotoxine EU, Verordnung (EG) Nr. 1881/ **2006**.
- EU**, Rat der Europäischen Gemeinschaft, Rat zum Verbot des Gebrauchs von bestimmten Stoffen mit hormonaler Wirkung im Tierbereich, **1988**, Richtlinie 88/146/EWG.
- EU**, Verordnung Nr. 401/2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln, *Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften*, **2006**.
- Fall B. I.**, Eberlein-König B., Behrendt H., Niessner R., Ring J., Weller M. G., Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in human serum, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 556-562.
- FAO**, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed **2003**, *Food and Agriculture Organization* **2002**.

- Feng Y.**, Ke X., Ma R., Chen Y., Hu G., Liu F., Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases, *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 416-422.
- Fink-Gremmels J.**, Mykotoxine in der Ätiologie humaner Erkrankungen, *Ernährungs-umschau* **1994**, *41*, 226-229.
- Fitzpatrick B.**, O'Kennedy R., The development and application of a surface plasmon resonance-based inhibition immunoassay for the determination of warfarin in plasma ultrafiltrate, *J. Immunol. Methods* **2004**, *291*, 11-25.
- Freeman G. G.**, Morrison R. I., Some metabolic products of trichothecium roseum link, *Biochem. J.* **1948**, *43*(2):xxiii.
- Friguet B.**, Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E., Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **1985**, *77*, 305-319.
- Garcia-Campana A. M.**, Lara F. J., Trends in the analytical applications of chemiluminescence in the liquid phase, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 165-169.
- Gaumy J. L.**, Bailly J. D., Burgat V., Guerre P., Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale, *Revue Méd. Vét.* **2001**, *152*, 3, 219-234.
- Gelderblom W. C.**, Jaskiewicz K., Marasas W. F., Thiel P. G., Horak R. M., Vleggaar R., Kriek N. P., Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by fusarium moniliforme, *Appl. Environ. Microb.* **1988**, *54*, 1806-1811.
- Grove J. F.**, Macrocyclic trichothecenes, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 429-448.
- Grove J. F.**, Non-macrocyclic trichothecenes, *Nat. Prod. Rep.* **1988**, *5*, 187-209.
- Gyöngyösi-Horvath A.**, Barna-Vetro I., Solti L., A new monoclonal antibody detecting ochratoxin A at the picogram level, *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *22*, 103-105.
- Hajslova J.**, Zachariasova M., Cajka T., In: Zweigenbaum J. (ed.), Mass spectrometry in food safety: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* **2011**, *747*, 233-258, Humana Press, New York.
- Hart L. P.**, Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year, *Plant Disease* **1998**, *82*, 625-630.

- Harwig J.**, Kuiper-Goodman T., Scott P. M., Microbial food toxicans: ochratoxins, In: M. Reichgel (Ed.): Handbook of foodborne diseases of biological origin. *CRC Press* **1983**, Boca Raton, FL.
- Hiner A. N. P.**, Raven E. L., Thorneley R. N. F., Garcia-Canovas F., Rodriguez- Lopez J. N., Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 27-34.
- Hodnik V.**, Anderluh G., Toxin detection by surface plasmon resonance. *Sensor* **2009**, *9*, 1339-1354.
- Hoerger C.**, Schenzel J., Strobel B., Bucheli T., Analysis of selected phytotoxins and mycotoxins in environmental samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1261-1289.
- Honjo T.**, Kinoshita K., Muramatsu M., Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 165-196.
- Hult K.**, Plesina R., Habazin - Novak V., Radic B., Coevic S., Ochratoxin A in human blood and balkan endemic nephropathy, *Arch. Toxicol.* **1982**, *51*, 313-321.
- Hussein H. S.**, Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology* **2001**, *167*, 101-134.
- Iverson F.**, Amstrong C., Nea E., Truelove J., Fernie S., Scott P. M., Stapley R., Hayward S., Gunner S., Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice, *Teratogen. Carcin. Mut.* **1995**, *15*, 283-306.
- Jackson L. C.**, Kudupoje M. B., Yiannikouris A., Simultaneous multiple mycotoxin quantification in feed samples using three isotopically labeled internal standards applied for isotopic dilution and data normalization through ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 2697-2713.
- Ji F.**, Li H., Xu J., Shi J., Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol (DON), *Toxins* **2011**, *3*, 968-978.
- Jiao Y.**, Blaas W., Ruhl C., Weber R., Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1992**, *595*, 364-367.

- Karsunke X. Y. Z.**, Entwicklung immunoanalytischer Methoden zur Detektion von niedermolekularen toxischen Verbindungen in Lebensmitteln, *Dissertationsschrift*, Technische Universität München, **2011**.
- Karsunke X. Y. Z.**, Niessner R., Seidel M., Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 1623-1630.
- Kawamura O.**, Sato S., Kajil H., Nagayama S., Ohtani K., Chiba K., Ueno Y., A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies, *Toxicon* **1989**, 27, 887-897.
- Klingler R. W.**, Grundlagen der Getreidetechnologie, *BEHR's Verlag* **1995**, Hamburg.
- Kloth K.**, Entwicklung eines regenerierbaren Mikroarray-Chips zur simultanen Detektion von 13 Antibiotika in Milch, *Dissertationsschrift*, Technische Universität München, **2009**.
- Knecht B. G.**, Strasser A., Dietrich R., Märtlbauer E., Niessner R., Weller M. G., Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 646-654.
- Knopp D.**, Niessner R., Biomonitoring based on immunological principles, In: Twardowska T., Allen H. E., Kettrup A. A. F., Lacy W. J. (Ed.): Solid waste: assessment, monitoring and remediation. *Elsevier Science B.V.* **2004**, Amsterdam.
- Köhler G.**, Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **1975**, 256, 495-497.
- Köppen R.**, Riedel J., Proske M., Drzymala S., Rasenko T., Durmaz V., Weber M., Koch M., Photochemical trans-/cis-isomerization and quantitation of zearalenone in edible oils, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 11733-11740.
- Köppen R.**, Bremser W., Rasenko T., Koch M., Development and certification of a reference material for fusarium mycotoxins in wheat flour, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 4755-4763.
- Kolossova A. Y.**, Shim W.-B., Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 286-294.

- Kroll** F. E. K., Morphy R., Rees D., Gan D., Resin-immobilised benzyl and aryl vinyl sulfones: new versatile traceless linkers for solid-phase organic synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8573-8576.
- Langer** V., Hartmann G., Niessner R., Seidel M., Rapid quantification of bioaerosols containing *L. pneumophila* by Coriolis (R) air sampler and chemiluminescence antibody microarrays, *J. Aerosol. Sci.* **2012**, *48*, 46-55.
- Langer** V., Niessner R., Seidel M., Stopped-flow microarray immunoassay for detection of viable *E. coli* by use of chemiluminescence flow-through microarrays, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1041-1050.
- Lattanzio** V. M. T., Nivarlet N., Lippolis V., Gatta S. D., Huet A.-C., Delahaut P., Granier B., Visconti A., Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of fusarium mycotoxins in cereals, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *718*, 99-108.
- Lee** H. B., Magan N., Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain, *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *61*, 11-16.
- Lee** N. A., Wang S., A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio and soybeans, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2746-2755.
- Lemarchand** K., Masson L., Brousseau R., Molecular biology and DNA microarray technology, *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, *30*, 145-172.
- Lengger** S., Nießner R., Seidel M., Krankheitserreger im Wasser - Anreichern und Nachweisen, *Nachrichten aus der Chemie* **2012**, *60*, 1208-1212.
- Ler** S. G., Lee F. K., Gopalakrishnakone P., Trends in detection of warfare agents detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 Toxin, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1133*, 1-12.
- Li** Q., Rodriguez L. G., Fransworth D. F., Gildersleeve J. C., Effects of hapten density on the induced antibody repertoire, *Chem. Bio. Chem.* **2010**, *11*, 1686-1691.
- Li** Y., Liu X., Lin Z., Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs, *Food Chem.* **2012**, *132*, 1549-1554.

- Ling** K. Wan J. J., Wu R., Tung T. G., Lin S. S., Lin T. M., Intoxication possibly caused by aflatoxin B1 in the mouldy rice in Shvangshih township, *J. Formosan Med. Assoc.* **1967**, *66*, 729.
- Lippolis** V., Pascale M., Valenzano S., Pluchinotta V., Baumgartner S., Krska R., Visconti A., A rapid fluorescence polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins in wheat, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 2561-2571.
- Liu** B. H., Tsao Z. J., Wang J. J., Yu F. Y., Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7029-7035.
- Lottspeich** F., Engels J. W., Bioanalytik, *Elsevier Spektrum, Akad. Verl.*, München, **2006**.
- Lowry** M., Fakayode S. O., Geng M. L., Baker G. A., Wang L., McCarroll M. E., Patonay G., Warner I. M., Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4551-4574.
- Manis** J. P., Tian M., Alt F. W., Mechanism and control of class-switch recombination, *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 31-39.
- Mao** J. F., Lei S. R., Yang X. F., Xiao D., Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with core-shell particles, *Food Control* **2013**, *32*, 505-511.
- Maragos** C. M., Biosensors for mycotoxin analysis: recent developments and future prospects, *World Mycotox. J.* **2009**, *2*, 221-238.
- Marasas** W., Wehner F., van Rensburg S., Schalkwyk D., Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern africa, *Phytopathology* **1981**, *71*, 792-796.
- Medina** A., Valle-Algarra F. M., Jiménez M., Magana N., Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media, *J. Chromatogr. B* **2006**, *79*, 1003-1010.
- Meister** U., Hoth S., T2-, HT2-Toxine in Getreide – ein Problem, *Präsentation zur 58. Tagung der Getreidechemie*, Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V. **2007**.
- Mendez-Vilas** A., Current research topics in applied microbiology and microbial biotechnology, *World Scientific* **2009**.

- Mesci A.**, Carlyle J. R., A rapid and efficient method for the generation and screening of monoclonal antibodies specific for cell surface antigens, *J. Immunol. Meth.* **2007**, *323*, 78-87.
- Miles C. O.**, Erasmuson A. F., Wilkins A. L., Towers N. R., Smith B. L., Garthwaite I., Scathill B. G., Hansen R. P., Ovine metabolism of zearalenone to  $\alpha$ -zearalanol (zeranol), *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3244-3250.
- Mills E. N. C.**, Alcook S. M., Lee H. A., Morgan M. R. A., An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization procedures, *Food Agric. Immunol.* **1990**, *3*, 109-118.
- Mirasoli M.**, Buragina A., Dolci L. S., Simoni P., Anfossi L., Giraudi G., Roda A., Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 283-287.
- Moises S. S.**, Schäferling M., Toxin immunosensors and sensor array for food quality control, *Bioanal. Rev.* **2009**, *1*, 73-104.
- Molinelli A.**, Grossalber K., Fuhrer M., Baumgartner S., Sulyok M., Krska R., Development of qualitative and semi-quantitative immunoassay-based rapid strip tests for the detection of T-2 toxin in wheat and oat, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2589-2594.
- Mücke W.**, Lemmen C., Schimmelpilze – Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, *Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm* **2004**, Landsberg am Lech.
- Müller G.**, Weber H., Mikrobiologie der LM – Grundlagen, *Behr's Verlag* **1996**, 251-254.
- Mykotoxin** - Höchstmengenverordnung, *Digitalverlag GmbH* **2006**, Bonn.
- Nakamura M.**, Nakamura S., One- and two-electron oxidations of luminol by peroxidase systems, *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *24*, 537-544.
- Okamoto T.**, Suzuki T., Yamamoto N., Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 438-41.
- Onji Y.**, Aoki Y., Tani N., Umebayashi K., Kitada Y., Dohi Y., Direct analysis of several fusarium mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography - mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 59-65.
- Pappert G.**, Immunomagnetische Anreicherung von Mikroorganismen und ihre bioanalytische Quantifizierung, *Dissertationsschrift*, Technische Universität München, **2010**.

- Paterson** R. R. M., Fungi and fungal toxins as weapons, *Mycol. Res.* **2006**, *110*, 1003-1010.
- Peraica** M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M., Toxic effects of mycotoxins in humans, *B. World Health Organ.* **1999**, 754-766.
- Peters** J., Bienenmann-Ploum M., De Rijk T., Haasnoot W., Development of a multiple flow-cytometric microsphere immunoassay for mycotoxins and evaluation of its application in feed, *Mycotox. Res.* **2011**, *27*, 63-72.
- Pitt** J. I., Taniwaki M. H., Cole M. B., Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives, *Food Control* **2013**, *32*, 205-215.
- Pohland** A. E., Schuller P. L., Steyn P. S., Egmond H. P., Physicochemical data for some selected mycotoxins, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2219-2284.
- Prelle** A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. L., A new method for detection of five alternaria toxins in food matrices based on LC-APCI-MS, *Food Chem.* **2013**, *140*, 161-167.
- Prieto-Simon** B., Karube I., Saiki H., Sensitive detection of ochratoxin A in wine and cereals using fluorescence-based immunosensing, *Food Chem.* **2012**, *135*, 1323-1329.
- Prof. Dr. Summer** K. H., Toxikologie-Skript, Technische Universität München **2007**.
- Ramos** A. J., Labernia N., Marin S., Sanchis V., Magan N., Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by strains of aspergillus ochraceus on a barley extract medium and on barley grains, *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *44*, 133-140.
- Ratola** N., Barros P., Simoes T., Cerdeira A., Venancio A., Alves A., Worldwide interlaboratory study on the determination of ochratoxin A in different wine type samples, *Talanta* **2006**, *70*, 720-731.
- Raz** S. R., Bremer M. G, Haasnoot W., Norde W., Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7743-7749.
- Rich** V. I., Konstantinidis K., De Long E. F., Design and testing of 'genome-proxy' microarrays to profile marine microbial communities, *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 506-521.
- Richard** J. L., Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – a overview, *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3-10.

- Richardson** K. E., Hagler W. M. Jr., Hamilton P. B., Bioconversion of  $\alpha$ -[<sup>14</sup>C]zearalenol and  $\beta$ -[<sup>14</sup>C]zearalenol into [<sup>14</sup>C]Zearalenone by fusarium roseum 'gibbosum', *Appl. Environ. Microb.* **1984**, 47, 1206-1209.
- Richardson** K. E., Hagler W. M. Jr., Mirocha C. J., Production of zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol, and  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalanol by fusarium spp. in rice culture, *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 5, 862-866.
- Rios** G., Pinson-Gadais L., Abecassis J., Zakhia-Rosis N., Lullien-Pellerin, V., Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and fusarium level in durum wheat grains, *J. Cereal. Sci.* **2009**, 49, 387-392.
- Rodriguez-Lopez** J. N., Lowe D. J., Hernandez-Ruiz J., Hiner A. N. P., Garcia-Canovas F., Thorneley R. N. F., Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11838-11847.
- Roitt** I. M., Delves P. J., Roitt`s essential immunology (Hrsg.), *Blackwell Publishing*, Malden, **2006**.
- Rosner** H., Rohrman B., Peiker G., Ochratoxin A in human serum, *Arch. Lebensmittelhygiene* **2000**, 51, 104-107.
- Roswell** D. F., White E. H., The chemiluminescence of luminol and related hydrazides, *Methods Enzymol.* **1978**, 17, 409-423.
- Rotter** B. A., Prelusky D. B., Pestka J. J., Toxicology of deoxynivalenol (Vomitoxin), *J. Toxicol.* **1996**, Environ. Health 48, 1-34.
- Sashwati** R., Chandan K. S., cDNA microarray screening in food safety, *Toxicol.* **2006**, 221, 128-133.
- Sauceda-Friebe** J. C., Immunoanalytical determination of mycotoxin in food with an automated instrumental platform, *Dissertation*, Technische Universität München, **2011**.
- Sauceda-Friebe** J. C., Karsunke X. Y. Z., Vazac S., Biselli S., Niessner R., Knopp D., Regenerable immuno-biochip for screening ochratoxin A in green coffee extract using an automated microarray chip reader with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* **2011b**, 689, 234-242.

- Schneider** L., Pichler H., Krska R., An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 367, 98-100.
- Schuetz** A. J., Winklmaier M., Weller M. G., Niessner R., Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 363, 625-631.
- Scott** P. M., Lawrence G. A., Lombaert G. A., Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans, *Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 946-950.
- Scott** P. M., Mycotoxin methodology, *Food Addit. Contam.* **1995**, 12, 395-403.
- Seagraves** S., Gelber Regen – Der Terror chemischer Kriegsführung, *Universitas Verlag*, **1983**, München.
- Seidel** M., Niessner R., Automated analytical microarrays: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1521-1544.
- SENOVA** GmbH, Einführung in die PolyHRP Technologie, **2011**.
- Shephard** G. S., Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 2468-2477.
- Shephard** G. S., Berthiller F., Burdaspal P., Crews C., Jonker M. A., Krska R., MacDonald S., Malone B., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., van Egmond H. P., Whitaker T. B., Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010, *World Mycotox J.*, **2011**, 4:3, 2421.
- Smith** C. J., Evolution of immunoassays. In: Development and application of immunoassays for food analysis, Rittenberg (Hrsg.), *Elsevier Applied Science* **1990**, London.
- Smith** J. E., Moss M. O., Mykotoxins – formation, analysis and significance, *John Wiley & Sons Ltd.* **1985**, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Stob** M., Baldwin R. S., Tuite J., Andrews F. N., Gillette K. G., Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*, *Nature* **1962**, 196, 1318.
- Sulyok** M., Krska R., Schuhmacher R. A., Liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 1505-1523.

- Suty A.**, Mauler-Machnik A., Courbon R., New findings on the epidemiology of fusarium ear blight on wheat and its control with tebuconazole. In: Proceedings of the Brighton crop protection conference, *Pests and Diseases* **1996**, 2, 511-516.
- Takahashi D. M.**, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection, *J. Chromatogr.* **1977**, 131, 147-156.
- Tanaka T.**, Teshima R., Ikebuchi H., Sawada J., Ichinoe M., Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone in barley and job's-tears, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 946-950.
- Tang D.**, Saucedo J. C., Lin Z., Ott S., Basova E., Goryacheva I., Biselli S., Lin J., Niessner R., Knopp D., Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 514-518.
- Tittlemier S. A.**, Roscoe M., Drul D., Blagden R., Kobialka C., Chan J., Gaba D., Single laboratory evaluation of a planar waveguide-based system for a simple simultaneous analysis of four mycotoxins in wheat, *Mycotoxin. Res.* **2013**, 29, 55-62.
- Tonegawa S.**, Somatic generation of antibody diversity, *Nature* **1983**, 302, 575-581.
- Trenholm H. L.**, Warner R. M., Prelusky D. B., Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products deoxynivalenol (vomitoxin), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, 68, 645-649.
- Tudos A. J.**, Lucas-van den Bos E. R., Stigter E. C. A., Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5843-5848.
- Turner N. W.**, Subrahmanyam S., Piletsky S. A., Analytical methods for determination of mycotoxins: a review, *Anal. Chim. Acta* **2009**, 632, 168-180.
- Urusov A. E.**, Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review), *Appl. Biochem. Microbiol.* **2010**, 46, 276-290.
- Usleber E.**, Märtlbauer E., Dietrich R., Terplan G., Direct enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 2091-2095.

- Vaclavik L.**, Zachariasova M., Hrbek V., Hajslova J., Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry, *Talanta* **2010**, 82, 1950-1957.
- van der Gaag B.**, Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., van Osenbruggen T., Koopal K., Biosensors and multiple mycotoxin analysis, *Food Control* **2003**, 14, 251-254.
- van der Merwe K. J.**, Steyn P. S., Fourie L., de Scott B., Theron J. J., Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh., *Nature* **1965**, 205, 1112-1113.
- van Egmont H. P.**, Schothorst R. C., Jonker M. A., Regulations relating to mycotoxins in food – perspectives in a global and European context, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 147-157.
- VECTOR Labs Inc.**, Peroxidase horse anti-mouse IgG antibody, *Data sheet* **2011**.
- Wang Y.**, Wei D., Yang Y., Xing W., Li Y., Deng A., Development of a highly sensitive and monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of sudan I in food samples, *Talanta* **2008**, 80, 8202-8209.
- Wannemacher R.**, Wiener S. L., In: Medical aspects of chemical and biological warfare, trichothecene mycotoxins, eds. Sidell F. R., Takafuji E. T., Franz D. R., Office of the Surgeon General, Department of Army, United States of America, Washington, DC, **1997**, 655-676.
- Warth B.**, Parich A., Atehnkeng J., Bandyopadhyay H., Schuhmacher R., Sulyok M., Krska R., Quantitation of mycotoxins in food and feed from burkina faso and mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 9352-9363.
- Weller M. G.**, Schuetz A. J., Winklmaier M., Niessner R., Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 393, 29-41.
- Whitaker T. B.**, Dowell F. E., Hagler W. M., Giesbrecht F. G., Wu J., Variability associated with sampling, sample preparation, and chemical testing for aflatoxin in farmer`s stock peanuts, *J. AOAC. Int.* **1993**, 77, 107-116.

- Whitaker** T. B., Hagler W. M., Giesbrecht F. G., Johansson A. S., Sampling, sample preparation and analytical variance associated with testing wheat for deoxynivalenol, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **2000**, 83, 1285-1292.
- Whitaker** T. B., Hagler W. M., Giesbrecht F. G., Performance of sampling plans to determine aflatoxin in farmer`s stock peanut lots by measuring high-risk-grade components, *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 264-270.
- Winssinger** N., Barluenga S., Chemistry and biology of resorcylic acid lactones, *Chem. Commun.* **2007**, 22, 22-36.
- Winter** G., Milstein C., Man-made antibodies, *Nature* **1991**, 349, 293-299.
- Wolter** A., Antikörper-Mikroarrays für die Analyse von Mikroorganismen im Trinkwasser, *Dissertationsarbeit*, Technische Universität München, **2008**.
- Wolter** A., Niessner R., Seidel M., Preparation and characterization of functional PEG surfaces for the use of antibody microarrays, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4529-4537.
- Wu** Y., Mitchell J., Cook C., Main L., Evaluation of progesterone-ovalbumin conjugates with different length linkers in enzyme-linked immunosorbant assay and surface plasmon resonance-based immunoassay, *Steroids* **2002**, 67, 565-572.
- Wutz** K., Niessner R., Seidel M., Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays, *Microchim. Acta* **2011**, 173, 1-9.
- Yuan** J., Deng D., Lauren D. R., Aguilar M. I., Yinqi W., Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages, *Anal. Chim. Acta.* **2009**, 656, 63-71.
- Zheng** M. Z., Richard J. L., Binder J., A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins, *Mycopathologia* **2006**, 161, 261-273.