

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung
von Deoxynivalenol und Zearalenon
aus Lebensmitteln, Futtermitteln und Umweltproben**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Christa Füreder
Matrikel-Nummer:	0303200
Studienrichtung:	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuerin/Betreuer :	Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag

Wien, Februar 2009

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei **Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl** und **Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerhard Sontag** für die kompetente, herzliche und umfassende Betreuung meiner Diplomarbeit bedanken.

Mein Dank gilt weiters Frau Dr. Heidi Schwarz, die mir durch ihr Wissen und ihre Hilfsbereitschaft im Bereich der Massenspektrometrie eine große Hilfe war, sowie meiner Arbeitsgruppe für die Hilfestellungen und die vielen humorvollen Stunden.

Danke auch Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Razzazi-Fazeli vom Department für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Gesundheitswesen, Institut für Ernährung an der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die von ihm erhaltenen Futtermittelproben.

Ich möchte mich bei meiner Familie, besonders bei meiner Schwester, aber auch bei meinen Freunden bedanken, die mir in so mancher schweren Stunde eine sehr große Unterstützung waren.

Mein Dank gilt weiters meinen Studienkolleginnen Beate, Karo und Sigi, die meine Studienzeit positiv bereicherten.

Ich möchte mich auch bei meinem Arbeitgeber dem Krankenhaus der Barmherzigen Brüder (Wien) und im speziellen bei der Stationsleitung der Neurologie Herrn Reich für das Entgegenkommen in der Dienstplangestaltung bedanken.

INHALT

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	- 13 -
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	- 15 -
2.1	Mykotoxine	- 15 -
2.2	Allgemeiner Überblick	- 16 -
2.3	Deoxnivalenol	- 19 -
2.3.1	Bildung und Vorkommen	- 19 -
2.3.2	Chemische und physikalische Eigenschaften von DON	- 19 -
2.3.3	Toxikokinetik von Trichothecenen	- 21 -
2.3.4	Toxizität von DON	- 22 -
2.4	Zearalenon	- 24 -
2.4.1	Bildung und Vorkommen	- 24 -
2.4.2	Chemische und physikalische Eigenschaften von ZON	- 24 -
2.4.3	Toxikokinetik von ZON	- 26 -
2.4.4	Toxizität von ZON	- 27 -
3	PROBENVORBEREITUNGSMETHODEN ZUR BESTIMMUNG VON DON UND ZON	- 28 -
3.1	Allgemeine Probenaufarbeitungsmethoden	- 29 -
3.2	Auf AG-AK Wechselwirkungen basierende Probenauf- arbeitungsmethoden	- 30 -
3.2.1	Aufbau von Antikörpern	- 30 -
3.2.1.1	Polyklonale Antiseren	- 31 -
3.2.1.2	Monoklonale Antikörper	- 32 -
3.2.2	Immunfiltration	- 33 -
3.2.3	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	- 33 -
3.2.3.1	Immobilisierung von Antikörpern mittels der Sol-Gel-Methode	- 34 -
3.2.3.2	Herstellung von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen (Sol-Gel IAS)	- 35 -
3.2.3.3	Eigenschaften von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen	- 36 -

4	INSTRUMENTELLE ANALYSENMETHODEN ZUR BESTIMMUNG VON DON UND ZON	- 38 -
4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	- 38 -
4.1.1	Der chromatographische Trennvorgang	- 39 -
4.1.2	Auswertung eines Chromatogrammes	- 40 -
4.1.3	Das HPLC-System	- 42 -
4.1.3.1	UV-Detektor	- 45 -
4.1.3.2	Fluoreszenzdetektor	- 46 -
4.1.3.3	Massenspektrometrischer Detektor	- 47 -
5	MATERIAL UND METHODEN	- 51 -
5.1	Reagenzien	- 51 -
5.2	Geräte	- 51 -
5.2.1	HPLC-Apparatur	- 51 -
5.2.1.1	DON-Bestimmung (HPLC-System 1)	- 51 -
5.2.1.2	ZON-Bestimmung (HPLC-System 2)	- 52 -
5.2.1.3	LC-MS (HPLC-System 3)	- 52 -
5.2.1.4	On-line-Kopplung (HPLC-System 4)	- 53 -
5.2.2	Sonstige Geräte	- 53 -
5.2.3	Sonstige Gegenstände	- 54 -
5.3	Proben	- 55 -
5.4	Probenaufarbeitung	- 55 -
5.4.1	Homogenisieren	- 55 -
5.4.2	Extraktion von DON aus Lebensmitteln, Futtermitteln und Bodenproben	- 56 -
5.4.3	Extraktion von DON und ZON aus Lebens- und Futtermitteln	- 56 -
5.4.4	Extraktion von ZON aus Bodenproben	- 56 -
5.4.5	Spikeversuche	- 57 -
5.5	Immunaффinitätschromatographie	- 58 -
5.5.1	Antikörper	- 58 -
5.5.2	Herstellung von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen	- 58 -
5.5.2.1	Herstellung des Hydrolysats	- 58 -
5.5.2.2	Herstellung der IAS	- 58 -
5.5.3	Probenaufgabe	- 59 -

5.5.3.1 DON-IAS	- 59 -
5.5.3.2 DON-ZON-IAS	- 60 -
5.5.3.3 ZON-IAS	- 60 -
5.6 HPLC	- 61 -
5.6.1 Herstellung von DON- und ZON-Standardlösungen	- 61 -
5.6.2 Bestimmung von DON mittels HPLC-UV-Detektion (HPLC-System 1)	- 61 -
5.6.3 Bestimmung von ZON mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion (HPLC-System 2)	- 61 -
5.6.4 LC-MS (HPLC-System 3)	- 62 -
6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	- 63 -
6.1 HPLC	- 63 -
6.1.1 Erstellung von Kalibrierfunktionen von DON und ZON	- 63 -
6.2 Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Lebensmitteln	- 66 -
6.2.1 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil	- 66 -
6.2.2 Elution mit ACN	- 69 -
6.2.3 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Maisanteil	- 71 -
6.2.4 Anwendbarkeit der DON-ZON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil	- 73 -
6.2.5 LC-MS Messung einer mit DON und ZON gespiketen Lebensmittelprobe mit hohem Weizenanteil	- 77 -
6.2.6 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Babynahrung	- 80 -
6.2.7 Anwendbarkeit der DON-ZON IAS auf Babynahrung	- 82 -
6.3 Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Futtermitteln	- 86 -
6.3.1 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Maisproben	- 86 -
6.3.2 Anwendbarkeit der DON-ZON IAS auf Schlempe	- 88 -
6.4 Anwendbarkeit der Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Umweltproben	- 93 -
6.4.1 Bestimmung von DON in Bodenproben	- 93 -
6.4.2 Bestimmung von ZON in einer Bodenprobe	- 95 -
6.4.3 Bestimmung von DON in einer Wasserprobe	- 97 -
6.4.4 Bestimmung von ZON in einer Wasserprobe	- 99 -

6.5	Versuche zur on-line Kopplung von Sol-Gel IAS mit der HPLC	- 102 -
7	SCHLUSSBETRACHTUNG	- 107 -
8	ZUSAMMENFASSUNG	- 109 -
9	SUMMARY	- 110 -
10	LITERATURVERZEICHNIS	- 111 -
11	CURRICULUM VITAE	- 117 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Mykotoxine, die entlang der Nahrungskette eine wichtige Rolle spielen</i>	17 -
Tabelle 2: <i>Gradientenelution im LC-MS System mit H₂O_{BD} (A) und ACN (B) als mobile Phase.</i> ...	
.....	62 -
Tabelle 3: <i>ESI- und Ionenfalleneinstellungen zur Detektion von DON und ZON mittels LC-MS.</i> ...	
.....	62 -
Tabelle 4: <i>Produktübersicht</i>	66 -
Tabelle 5: <i>Wiederfindung für DON in gespiketen Lebensmitteln.</i>	68 -
Tabelle 6: <i>Konzentration von DON in den gesammelten Fraktionen. Elutionsmittel: 100% ACN.</i>	
<i>Spikelevel 5 000 ng DON/g Weizenprobe.</i>	70 -
Tabelle 7: <i>Wiederfindungen von DON in 4 mL Elution (100% ACN).</i>	70 -
Tabelle 8: <i>Wiederfindung für DON in einem Lebensmittel mit hohem Maisanteil</i>	72 -
Tabelle 9: <i>Übersicht über die verwendeten Lebensmittel.</i>	73 -
Tabelle 10: <i>Wiederfindung für DON in mit DON und ZON gespiketen Lebensmitteln mit hohem Weizenanteil</i>	75 -
Tabelle 11: <i>Wiederfindung für ZON in mit DON und ZON gespiketen Lebensmitteln mit hohem Weizenanteil</i>	76 -
Tabelle 12: <i>Quantitative Bestimmung von DON und ZON in einer Cluster-Mandel-Nuss Probe mittels LC-MS (HPLC-System 3).</i>	79 -
Tabelle 13: <i>Wiederfindung für DON in mit DON gespiketen Babykeksen.</i>	81 -
Tabelle 14: <i>Übersicht über die analysierte Babynahrung.</i>	82 -
Tabelle 15: <i>Wiederfindung für DON und ZON in Babynahrungsproben.</i>	85 -
Tabelle 16: <i>Wiederfindung für DON in einer Maisprobe.</i>	88 -
Tabelle 17: <i>Wiederfindungen einer mit DON und ZON gespiketen und natürlich kontaminierten Schlempeprobe.</i>	91 -
Tabelle 18: <i>Wiederfindung von DON in zwei mit DON gespiketen Bodenproben</i>	94 -
Tabelle 19: <i>Wiederfindung von ZON in einer mit ZON gespiketen Bodenprobe.</i>	96 -
Tabelle 20: <i>Wiederfindung von DON in einer mit DON gespiketen Wasserprobe</i>	98 -
Tabelle 21: <i>Wiederfindung von ZON in einer mit ZON gespiketen Wasserprobe</i>	99 -
Tabelle 22: <i>Ergebnisse einer mit unterschiedlichen ACN Konzentrationen versetzten, mit ZON gespiketen Wasserprobe.</i>	100 -
Tabelle 23: <i>Übersicht der Ventileinstellungen während der Analyse mit dem on-line HPLC System.</i>	103 -
Tabelle 24: <i>Retentionszeit von ZON in Abhängigkeit von der mobilen Phase und der Ventilumschaltzeit</i>	102 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Chemische Struktur von Deoxynivalenol (DON)</i>	20 -
Abbildung 2: <i>Chemische Struktur von Zearalenon (ZON) und seinen Metaboliten [aus SCF, 2000]</i>	25 -
Abbildung 3: <i>Schematische Darstellung der linearen Struktur eines Immunglobulin-Moleküls in Y-Form [aus AIGNER und NEUMANN, 1997]</i>	30 -
Abbildung 4: <i>Prinzip der Sol-Gel Methode</i>	35 -
Abbildung 5: <i>Das Chromatogramm und seine Kenngrößen [aus BÖCKER, 1997]</i>	40 -
Abbildung 6: <i>Schema einer HPLC-Apparatur [aus MEYER, 2004]</i>	43 -
Abbildung 7: <i>Bauprinzip eines UV-Detektors [aus MEYER, 2004]</i>	45 -
Abbildung 8: <i>Prinzip eines Fluoreszenzdetektors [aus MEYER, 2004]</i>	46 -
Abbildung 9: <i>Blockdiagramm eines Massenspektrometers</i>	48 -
Abbildung 10: <i>Ablauf der Herstellung einer Sol-Gel Immunaффinitätssäule</i>	59 -
Abbildung 11: <i>Kalibrierfunktion für DON (HPLC-System 1)</i>	64 -
Abbildung 12: <i>Kalibrierfunktion für ZON (HPLC-System 2)</i>	64 -
Abbildung 13: <i>Kalibrierfunktion für DON (HPLC-System 3)</i>	65 -
Abbildung 14: <i>Kalibrierfunktion für ZON (HPLC-System 3)</i>	65 -
Abbildung 15: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von gespiketem Knäckebrot, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe</i>	67 -
Abbildung 16: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Weizenmehlextrakts, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe, 1. Fraktion. ...</i>	69 -
Abbildung 17: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von gespiketen Cornflakes, Spikelevel 500 ng DON/g Probe</i>	71 -
Abbildung 18: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Clusters-Mandel-Nuss, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe</i>	74 -
Abbildung 19: <i>Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts von Corny-Snack, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe. .</i>	74 -
Abbildung 20: <i>Chromatogramm (HPLC-System 3) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe</i>	77 -

Abbildung 21: Massenspektrum für DON (EIC, m/z=295) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.	- 76 -
Abbildung 22: Massenspektrum für ZON (EIC, m/z=317) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.	- 76 -
Abbildung 23: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Babykeksen, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe.....</i>	- 80 -
Abbildung 24: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Kinderzwieback, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe...</i>	- 83 -
Abbildung 25: <i>Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts von Babybrei, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.....</i>	- 83 -
Abbildung 26: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Maisextrakts, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe.....</i>	- 87 -
Abbildung 27: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts der ungespiketen Schlempe.</i>	- 90 -
Abbildung 28: <i>Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts der ungespiketen Schlempe.</i>	- 89 -
Abbildung 29: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Schlempe, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe....</i>	- 90 -
Abbildung 30: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von einer Bodenprobe, Spikelevel 500 ng/g Probe.....</i>	- 94 -
Abbildung 31: <i>Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts einer Bodenprobe (Probe 1), Spikelevel 50 ng/g Probe.....</i>	- 96 -
Abbildung 32: <i>Chromatogramm (HPLC-System 1) der aufgearbeiteten Wasserprobe, Spikelevel 100 ng/mL Probe.....</i>	- 98 -
Abbildung 33: <i>Chromatogramm (HPLC-System 2) der aufgearbeiteten Wasserprobe, Spikelevel 100 ng/mL Probe.....</i>	- 101 -
Abbildung 34: <i>Schema des on-line HPLC-Systems (HPLC-System 4).....</i>	- 102 -

Abkürzungen

AK	Antikörper
ACN	Acetonitril
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
DON	Deoxynivalenol
EIC	Extracted Ion Current
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Electro Spray Ionisation
FAB	Fast atom bombardment
FD	Felddesorption
FL	Fluoreszenz
GC	Gaschromatographie
H ₂ O _{BD}	Wasser, bidestilliert
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IAS	Immunaффinitätssäule
Ig	Immunglobulin
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphate buffered saline
ppm	Parts per million
RP-HPLC	Reversed Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
S	Standardabweichung
TLC	Thin layer chromatography, Dünnschichtchromatographie
TMOS	Tetramethoxysilan
TOF	Time-of-flight
t _R	Retentionszeit

v/v	Volumen/Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZON	Zearalenon

1 Einleitung und Zielsetzung

Laut Schätzungen der *Food and Agriculture Organization* (FAO) sind weltweit etwa 25% aller Lebensmittel mit Mykotoxinen kontaminiert. Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Die Kontamination mit Mykotoxinen kann auf allen Stufen der Getreideproduktion, d.h. vom Anbau des Getreides bis zu dessen Lagerung, erfolgen.

Fusarien gehören zu den wichtigsten Toxin bildenden Schimmelpilzen unserer Breiten. Zu den bedeutendsten Mykotoxinen, die von dieser Gattung produziert werden, zählen das zu den B-Trichothecenen gehörende Deoxynivalenol (DON) und das meistens zugleich gebildete Zearalenon (ZON). DON und ZON werden vorwiegend von den Schimmelpilzen *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* produziert. Zu den häufig mit DON kontaminierten Getreidearten zählen Weizen, Mais, Gerste, Hafer und Roggen [SCF, 2002]. In Europa weisen besonders Mais aber auch Weizen, Hafer und Sojabohnen hohe ZON Konzentrationen auf [ZINEDINE et al., 2007; EFSA, 2004].

Die Höhe der Mykotoxinkonzentration kann sehr unterschiedlich sein. Feuchtwarme Witterung während der Blühperiode des Getreides, die Bodenbearbeitung sowie die Fruchtfolge haben einen Einfluss auf die Produktion der Fusariantoxine.

Zur Bestimmung der Mykotoxingehalte in Lebensmitteln wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt. Trotz des Einsatzes selektiver Trenntechniken und empfindlicher Detektoren ist die Bestimmung von Spuren von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln in vielen Fällen nur möglich, wenn zuvor das zu analysierende Mykotoxin angereichert und störende Matrixkomponenten entfernt werden.

Eine der selektivsten und leistungsfähigsten Probenvorbereitungsmethoden ist die Immunaффinitätschromatographie (IAC). Man nutzt dabei die starke Wechselwirkung zwischen Antikörpern und Antigenen aus. Die Immobilisierung

des Antikörpers erfolgt in den meisten Fällen durch kovalente Bindung an ein festes Trägermaterial. Diese herkömmliche Immobilisierungsmethode bringt jedoch einige Nachteile mit sich. Sie führt häufig zu einer Konformationsänderung der Antikörper, welche wiederum die Affinität der Antikörper zum Analyten herabsetzt.

In der Arbeitsgruppe von Frau *Cichna-Markl* wird die Sol-Gel Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen verwendet. Die Biomoleküle werden dabei in den Poren einer Glasmatrix eingeschlossen [CICHNA-MARKL, 2007]. Diese Immobilisierungsmethode ist wesentlich weniger arbeitsintensiv als die kovalente Immobilisierung. Da die Sol-Gel Immunaффinitätssäulen (IAS) mehrmals wiederverwendet werden können, ist die Probenaufarbeitung mit Sol-Gel IAS ökonomischer als die Verwendung von herkömmlichen Immunaффinitätssäulen. Weiters können Sol-Gel IAS ohne Zusatz eines Bakteriostatikums einige Monate lang gelagert werden.

Im Rahmen einer Dissertation wurde eine auf der Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie basierende Probenvorbereitungsmethode zur gleichzeitigen Isolierung von DON und ZON entwickelt [BRENN-STRUCKHOFOVA, in Vorbereitung].

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, Sol-Gel IAS auf ihre Anwendbarkeit zur Aufarbeitung von verschiedenen Lebensmitteln zu untersuchen. Weiters sollte die Anwendbarkeit der Sol-Gel IAS zur Isolierung von DON und ZON aus Schlempe überprüft werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich bei Schlempe um eine äußerst schwierig aufzuarbeitende Matrix handelt.

In einer aktuellen Publikation wurde darauf hingewiesen, dass eventuell auch Umweltproben mit Mykotoxinen belastet sein können [BUCHELI et al., 2008]. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu prüfen, ob Sol-Gel IAS auch zur Isolierung von DON und ZON aus Wasser- und Bodenproben eingesetzt werden können.

Weiters sollten im Rahmen der Diplomarbeit Vorversuche durchgeführt werden, um die Möglichkeit der on-line Kopplung von Sol-Gel IAS mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zu untersuchen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, welche aufgrund ihrer vielfältigen chemischen Strukturen sehr unterschiedliche Auswirkungen auf den tierischen und menschlichen Organismus haben können. Die Funktion der Mykotoxine für die Schimmelpilze ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise schützt die Toxinbildung den Schimmelpilz vor natürlichen Feinden.

Es ist oft schwer, eine klare Abgrenzung zwischen Mykotoxinen und anderen Sekundärmetaboliten, welche als Antibiotika bezeichnet werden, zu treffen, da viele Mykotoxine antibiotisch aktiv sind (z.B. Citrinin), aber auch Antibiotika toxische Nebenwirkungen aufweisen können (z.B. Streptomycin) [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Mykotoxine werden entweder am Feld oder während der Produktion, dem Transport, der Verarbeitung oder bei der Lagerung von Lebensmitteln gebildet. Sie werden häufig in der späten Wachstumsphase auf nährstoffreichem Substrat gebildet und verbleiben entweder in den Myzelien und Sporen oder werden an das umliegende Substrat abgegeben. Viele physikalische Faktoren wie Temperatur, Feuchte, Zeit, pH-Wert und Atmosphäre haben einen Einfluss auf die Toxinbildung. Die Gefahr der Toxinbildung ist umso größer, je höher die Feuchtigkeit der Lageratmosphäre ist und je länger der Verschimmelungsprozess in Futter- und Lebensmitteln anhält [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

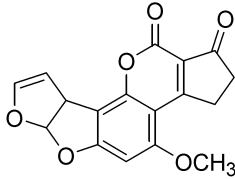
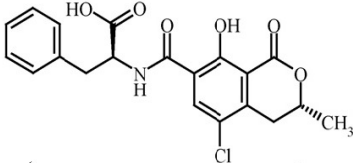
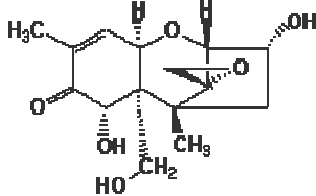
2.2 Allgemeiner Überblick

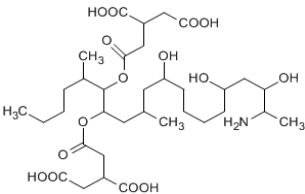
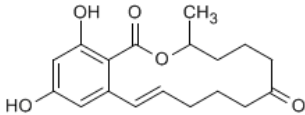
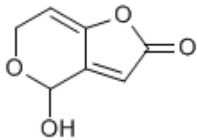
Derzeit sind etwa 200 Schimmelpilzarten, welche unter bestimmten Bedingungen Toxine bilden können, bekannt. Die bedeutendsten Mykotoxinproduzenten sind unter den *Aspergillen*, *Fusarien* und *Penicillien* zu finden, welche die Toxine *Aflatoxin*, *Fumonisin*, *Ochratoxin*, *Trichothecene* (*Deoxynivalenol/Nivalenol*), *Patulin* und *Zearalenon* bilden [KUMAR et al., 2008].

Eine einfache Einteilung der Mykotoxine nach Art und Vorkommen ist in Tabelle 1 zu finden.

Die Mykotoxine *Deoxynivalenol* (DON) und *Zearalenon* (ZON) werden detaillierter in den Kapiteln 2.3 und 2.4 beschrieben.

Tabelle 1: Mykotoxine, die entlang der Nahrungskette eine wichtige Rolle spielen.

Mykotoxin	Schimmelpilz	Struktur	Vorkommen	Wirkung
Aflatoxine (B ₁ , B ₂ , M ₁ , M ₂ , G ₁ , G ₂)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	 Aflatoxin B ₁	fettreiche pflanzliche Produkte, Futtermittel, Milch	hepatotoxisch
Ochratoxine	<i>Aspergillus</i> - und <i>Penicillium</i> -Arten	 Ochratoxin A	Futtermittel, Fleisch, Milch	nephrotoxisch, hepatotoxisch
Trichothecene	<i>Fusarien</i> -Arten	 Deoxynivalenol	Getreide, Futtermittel	dermatotoxisch, neurotoxisch, hämorrhagisch, teratogen, immunsuppressiv

Fumonisine	<i>Fusarium moliniforme</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	 Fumonisin B₁	Mais	nephrotoxisch, hepatotoxisch
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	 Zearalenon	Getreide	mutagen, wahrscheinlich kanzerogen
Patulin	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium patulum</i>	 Patulin	braunfaules Obst, Apfelsaft bzw. andere Obstsäfte	antibiotische Aktivität

2.3 Deoxynivalenol

2.3.1 Bildung und Vorkommen

Trichothecene werden bevorzugt von *Fusarium*-Arten, aber auch unter anderem von Vertretern der Gattung *Stachybotrys* gebildet und umfassen mehr als 180 strukturverwandte Sesquiterpene. Die genannten Pilze infizieren häufig Getreide wie Weizen, Gerste oder Mais sowie deren landwirtschaftliche Produkte [PESTKA, 2007]. Die Mykotoxine T-2-Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Scirpentriol, Neosolaniol, Deoxynivalenol (DON, Vomitin), Nivalenol und Fusarenon X sind häufig auf natürlichen Substraten zu finden. Kaltes feuchtes Wetter begünstigt den Erntebefall und die Toxinbildung. *Fusarium*-Pilze sind Ähren- und Feldpilze und können einerseits das Getreide in der Keimphase befallen, wo sie ihre Toxine während der Reifung im Korninneren produzieren, andererseits können die Mykotoxine erst während einer unsachgemäßen Lagerung gebildet werden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

DON, auch als Vomitin bezeichnet, ist das häufigste in sehr hohen Konzentrationen (ppm Bereich) von *F. graminearum* und *F. culmorum* gebildete Mykotoxin. *F. graminearum* wächst optimal bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wasseraktivität über 0,88. Die ideale Temperatur für das Wachstum von *F. culmorum* liegt bei 21 °C, die Wasseraktivität sollte höher als 0,87 sein. Die geographische Verteilung der zwei Arten scheint mit der Temperatur zu korrelieren [JECFA, 2001].

2.3.2 Chemische und physikalische Eigenschaften von DON

Chemisch gesehen zählen alle Trichothecene zu den tetracyklischen Sesquiterpenen und weisen ein 12, 13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystem auf. „Einfache“ Trichothecene haben eine tetracyklische Struktur mit einem Epoxid-

Ring, makrozyklische Trichothecene enthalten ein weiteres großes Ringsystem [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Trichothecene können auf Grund ihrer charakteristischen funktionellen Gruppen in vier Klassen (A bis D) eingeteilt werden. Typ A Trichothecene haben Isovaleryl-, Wasserstoff- oder Hydroxylgruppen an der C₈ Position (z.B. T-2 Toxin). Typ B Trichothecene besitzen eine Carbonylgruppe an der C₈ Position (z.B. DON). Die Struktur von DON ist in Abbildung 1 dargestellt. Typ C Trichothecene sind durch eine zweite Epoxid-Gruppe an C₇ und C₈ charakterisiert. Typ D Trichothecene, oder auch makrozyklische Trichothecene genannt, haben einen Ring mit zwei oder drei Estergruppen, der die C-Atome C₄ und C₁₅ miteinander verbindet (z.B. Satratoxin G) [PESTKA, 2007].

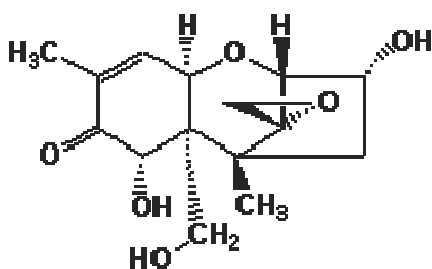


Abbildung 1: Chemische Struktur von Deoxynivalenol (DON).

Kurzformen:	DON, Vomitin
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₀ O ₆
Molare Masse:	296,3 g/mol
CAS-Nummer:	51481-10-8

Deoxynivalenol kristallisiert zu farblosen, nadelförmigen Kristallen und hat einen Schmelzbereich von 151-153 °C. DON absorbiert ultraviolette Strahlung (UV) mit kurzer Wellenlänge, jedoch ist das UV-Spektrum von DON nicht charakteristisch. Da DON zum Typ B der Trichothecene gehört, ist es in Wasser und in polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril und Ethylacetat löslich. DON ist in organischen Lösungsmitteln stabil, Ethylacetat

und Acetonitril (ACN) sind die für eine Langzeitaufbewahrung am besten geeigneten Lösungsmittel [JECFA, 2001].

Trichothecene sind bis zu einer Temperatur von 120 °C stabil, die Stabilität lässt bei Temperaturen ab 180 °C nach. Sie zerfallen innerhalb von 30 bis 40 min bei 210 °C [JECFA, 2001].

Verschiedene Studien zeigen, dass Lebensmittelverarbeitungsprozesse sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Anwesenheit von Mykotoxinen haben. Temperaturen von 160 °C und höher sowie die Anwesenheit von Glukose führen zu einer drastischen Mykotoxinreduktion in Nahrungsmitteln [BULLERMAN und BIANCHINI, 2007].

2.3.3 Toxikokinetik von Trichothecen

Trichothecene, welche über kontaminierte Nahrungsmittel aufgenommen werden, gelangen in den Gastrointestinaltrakt und werden zu toxischen Metaboliten umgewandelt [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

In Schweinen beträgt die Plasma-Eliminationshalbwertszeit für DON vier Stunden [SCHLATTER, 2004]. Trichothecene sind lipophile und amphipatische Moleküle und können dadurch besonders leicht in das Cytoplasma der Zellen gelangen, wo sie die ribosomale Proteinsynthese hemmen. Die Epoxid-Gruppe ist der reaktive Teil des Moleküls und wird bei der kovalenten Bindung an SH-Gruppen eines Rezeptors der 60-S-Einheiten geöffnet [MÜCKE und LEMMEN, 2004]. DON und dessen Metabolite werden zu 65% über die Faeces und zu 25% über den Urin ausgeschieden [SCHLATTER, 2004].

2.3.4 Toxizität von DON

Nach derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen haben die Trichothecene eine dermatotoxische, neurotoxische, hämorrhagische, teratogene und immunsuppressive Wirkung [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Die erhebliche Toxizität von DON liegt in der Hemmung der Proteinsynthese. Durch die Bindung an den Ribosomen kommt es zu einer Störung der RNA- und DNA-Synthese, welche sich durch eine Schädigung im Bereich der Zellmembran äußert. Weiters kann dies zu einer Apoptose im Bereich des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes führen. Studien haben gezeigt, dass DON das Immunsystem beeinträchtigen kann [SCF, 2002].

Die akute und subakute Toxizität von DON äußert sich bei Tieren in Form von Erbrechen, einer Reduktion der Futtermittelaufnahme, Gewichtsverlust und Durchfall. Erbrechen und Anorexie werden durch Irritationen des serotonergen Systems im Zentralnervensystem oder an den peripheren Serotoninrezeptoren ausgelöst [SCHLATTER, 2004].

Bereits geringe Dosen von 50 bis 200 µg DON/kg Körpergewicht können bei Schweinen zum Erbrechen führen. Die Aufnahme von höheren DON Dosen steht im Zusammenhang mit Veränderungen des Gewebes und der Bildung von Nekrosen im Bereich des Gastrointestinaltraktes, des Knochenmarks und des lymphatischen Systems [SCHLATTER, 2004].

Eine akute DON Intoxikation beim Menschen kann sich innerhalb von 30 min in Form von Übelkeit, Diarrhoe, Unterleibsschmerzen, Kopfschmerzen, Schwindel und Fieber äußern und ist nur schwer von einer durch eine mikrobielle Infektion mit *Bazillus cereus* hervorgerufene gastrointestinale Erkrankung zu unterscheiden. In Verbindung mit *F. graminearum* konnten akute Intoxikationen in China, Indien und Japan beobachtet werden [JECFA, 2001].

Verschiedene *in-vitro* Kurzzeitstudien an Tieren weisen auf eine gentoxische und karzinogene Wirkung von DON hin. Bei *in-vivo* Langzeitstudien an Tieren

wurden jedoch verschiedene, nicht miteinander vergleichbare Ergebnisse erzielt, da die einzelnen Studien sehr unterschiedlich aufgebaut waren. Epidemiologische Studien an Menschen können ebenfalls nur auf eine kanzerogene Wirkung von DON hinweisen, diese aber nicht bestätigen [MA und GUO, 2008].

DON ist im Zusammenhang mit chronischen Krankheiten wie Ösophaguskrebs, Magenkrebs, Leberkrebs und einer Form der Osteoarthritis untersucht worden. Ein direkter Zusammenhang mit der chronischen Aufnahme von DON und der Entstehung dieser Krankheiten kann nur vermutet werden [JECFA, 2001].

Auf Grund der toxischen Wirkung von DON setzten das *European Commission Scientific Committee on Food* (SCF) und das *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) Grenzwerte für DON in Lebens- und Futtermitteln fest.

Zur Berechnung des DON Höchstwerts wurden die Ergebnisse eines zweijährigen Fütterungsversuchs an Mäusen herangezogen. Der NOEL (No Observed Effect Level) wurde mit 100 µg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt. Unter Einberechnung eines Sicherheitsfaktors von 100 wurde schließlich ein TDI (Tolerable Daily Intake) von 1 µg/kg Körpergewicht berechnet, das heißt, dass es bei einer täglichen DON Aufnahme von 1 µg/kg Körpergewicht nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft zu keiner Schädigung des Immunsystems, des Wachstums oder der Reproduktion kommt [SCHLATTER, 2004; JECFA, 2001].

2.4 Zearalenon

2.4.1 Bildung und Vorkommen

Zearalenon (ZON), früher auch als F2-Toxin bezeichnet, wird von verschiedenen *Fusarium*-Arten gebildet. Die Hauptproduzenten von ZON bilden zu meist auch die Mykotoxine Nivalenol und Deoxynivalenol [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

F. graminearum, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* und *F. semitectum* sind Bodenpilze, welche besonders in kühl-gemäßigten Klimazonen vorkommen. *Fusarium graminearum* gilt als einer der Hauptproduzenten von ZON und infiziert weltweit fast alle Getreidearten bereits auf dem Feld. Die Toxinproduktion erfolgt entweder vor oder nach der Ernte am noch unbehandelten und nicht getrockneten Erntegut. In Europa ist besonders Mais mit hohen ZON Konzentrationen belastet, aber auch Weizen, Hafer und Sojabohnen sowie deren Produkte weisen teils hohe ZON Werte auf [ZINEDINE et al., 2007; EFSA, 2004].

ZON und die epimeren Metabolite α - und β -Zearalenol sind die wichtigsten östrogen wirksamen Mykotoxine, welche von Schweinen, Schafen und Rindern mit dem kontaminierten Futtermittel aufgenommen werden und auch unverändert in die Milch von Kühen übergehen können [MÜCKE und LEMMEN, 2004; ZINEDINE et al., 2007].

2.4.2 Chemische und physikalische Eigenschaften von ZON

ZON ist ein Makrolid sowie ein Resorcylsäure-Derivat und wird als 3,4,5,6,9,10-Hexahydro-14,16-dihydroxy-3-methyl-1*H*-2-benzoxacyclotetradecin-1,7(8*H*)-dion bezeichnet [SCF, 2000].

In Säugetieren erfolgt eine Reduktion der Ketogruppe an der C₇ Position, wodurch die stereoisomeren α- und β-Metabolite gebildet werden. [ZINEDINE et al., 2007]. Abbildung 2 zeigt die chemische Struktur von ZON und dessen Metabolite.

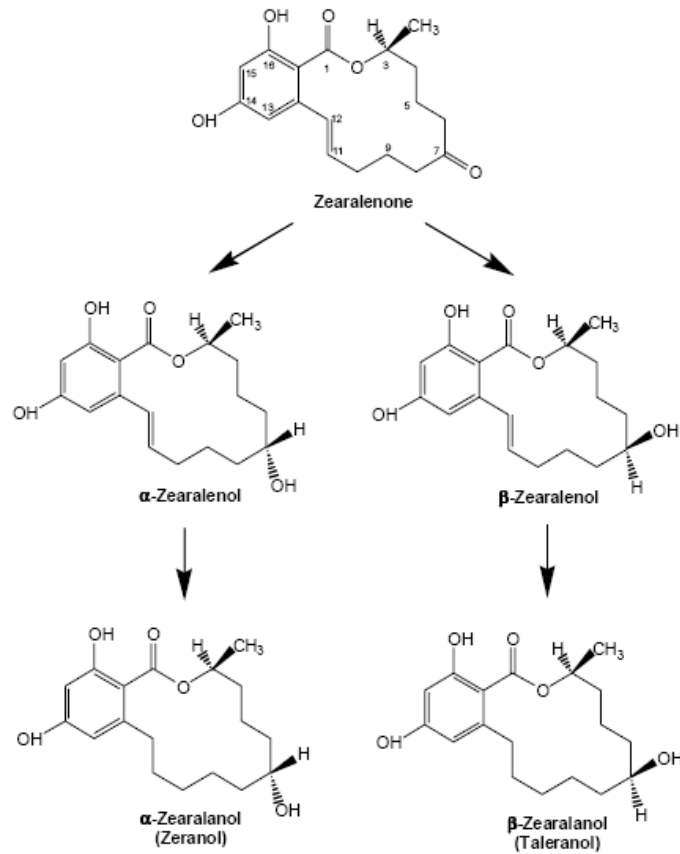


Abbildung 2: Chemische Struktur von Zearalenon (ZON) und seinen Metaboliten [aus SCF, 2000].

Kurzformen:	ZON, ZEA, F2-Toxin
Summenformel:	C ₁₈ H ₂₂ O ₅
Molare Masse:	318,36 g/mol
CAS-Nummer:	17924-92-4

ZON ist eine weiße, kristalline Substanz mit einem Schmelzbereich von 164 - 165 °C, das UV-Absorptionsmaximum von ZON liegt bei 236 nm. ZON ist in Wasser nicht löslich, jedoch gut löslich in alkalischen, wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln (z.B. Acetonitril, Methanol, Ethanol, Aceton) [EFSA, 2004].

ZON ist eine sehr stabile Verbindung, die sich während der Lagerung nicht verändert. Verarbeitungsprozesse wie das Kochen zerstören es kaum, beim Mahlen von Getreide kommt es zu einer Aufkonzentrierung in der Glutenfraktion [SCF, 2000].

Extrusionsprozesse zur Herstellung von Cerealien und Snacks, bei denen hohe Temperaturen in Kombination mit einem hohen Druck eingesetzt werden, bewirken eine deutliche Reduktion von Zearalenon [BULLERMAN und BIANCHINI, 2007].

2.4.3 Toxikokinetik von ZON

In den einzelnen Spezies wird ZON sehr unterschiedlich metabolisiert. So wird ZON nach oraler Aufnahme von Schweinen und Menschen sehr rasch absorbiert, und kann dann durch Konjugation mit Glucuronsäure in den Intestinalzellen in die stereoisomeren α - und β -Metabolite umgewandelt werden [ZINEDINE, 2007; KUIPER-GOODMAN et al., 1987].

Die Höhe der Absorptionsraten ist jedoch auf Grund der starken biliären Exkretion nicht leicht festzustellen. Die Absorption scheint aber bei Ratten, Hasen und beim Menschen hoch zu sein [SCF, 2000].

Bei Ratten und Mäusen passiert ZON nach der biliären Exkretion den entero-hepatischen Kreislauf. Bei Schweinen und Hasen erfolgt die Ausscheidung durch den Urin. Auch beim Menschen wird eine überwiegende Ausscheidung durch den Urin vermutet [SCF, 2000].

2.4.4 Toxizität von ZON

ZON ist ein Mykotoxin mit geringer akuter Toxizität. Der LD₅₀ Wert bei der Maus liegt bei einer oralen Aufnahme zwischen 2 000 und 20 000 mg/kg Körpergewicht [ZINEDINE, 2007].

ZON und dessen Metabolite sind keine Steroide, sie können aber an intrazelluläre Östrogenrezeptoren von Uterus, Hypothalamus und Hypophyse binden. Die dadurch verursachte östrogene Wirkung kann vor allem in juvenilen Tieren zu Symptomen wie Hyperöstrogenismus, verbunden mit Uterushypertrophie, Entzündungen im Genitalbereich und Fertilitätsstörungen, führen [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

ZON hat vor allem bei Ratten und Schweinen eine teratogene Wirkung, welche sich durch Störungen der Knochenneubildung äußert [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Die Auswirkung einer ZON Exposition auf den Menschen ist noch nicht vollständig geklärt. In manchen Regionen wird bei Mädchen eine frühzeitige Entwicklung der weiblichen Brust (Thelarche) beobachtet [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Das *Scientific Committee on Food* (SCF) und das *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) der Europäischen Union kamen zu dem Entschluss, zur Berechnung der Höchstmengen an ZON in Lebensmitteln jene experimentell ermittelte Dosis heranzuziehen, welche keine hormonellen Effekte in Schweinen oder in anderen empfindlichen Spezies auslöst. In einem 15-Tage-Fütterungsversuch an Schweinen wurden ein LOED (Lowest Observed Effect Level) von 200 µg/kg Körpergewicht und ein NOEL (No Observed Effect Level) von 40 µg/kg Körpergewicht erhalten. Nach Einberechnung eines sehr hohen Sicherheitsfaktors von 200 wurde ein vorübergehender TDI (Tolerable Daily Intake) von 0,2 µg/kg Körpergewicht bestimmt. Der TDI wurde auf Grund der sehr unterschiedlichen Datenlage zeitlich begrenzt [SCF, 2000].

3 Probenvorbereitungsmethoden zur Bestimmung von DON und ZON

Die Analyse von DON und ZON beginnt mit der Probenahme. Es folgt das Homogenisieren der Probe, die Extraktion und die Aufreinigung der Probe. Danach werden die Analyte entweder mit einer instrumentellen Methode oder einer Screeningmethode bestimmt.

Dass die Auswahl einer geeigneten Analysenmethode eine wichtige Rolle spielt, zeigen die Ergebnisse eines Interlaborversuchs zur Bestimmung von DON und ZON in landwirtschaftlichen Produkten [JOSEPHS et al., 2001]. An dieser Studie nahmen 28 Labors aus zwölf unterschiedlichen Ländern teil. Sie sollte Informationen über die neuesten DON und ZON Analysenmethoden liefern und unterstützte den Wissens- und Erfahrungsaustausch zwischen den Teilnehmern. Acht unterschiedlich mit DON- und ZON-Standardlösungen gespikete, natürlich kontaminierte, und „blank“ Weizen- und Maisproben wurden von den Labors untersucht. Die Trennung und Quantifizierung wurde mittels GC (Gaschromatographie), HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie), TLC (Dünnschichtchromatographie) und ELISAs (enzyme linked immunosorbent assays) durchgeführt. Zur Bestimmung von ZON wurden die Proben in acht Labors mittels der Flüssig-Flüssig-Extraktion, in einem Fall mittels Festphasenextraktion und in zehn Labors mittels der Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgte in 18 Labors mit HPLC und Fluoreszenzdetektion (FLD), ein Labor entschied sich für die HPLC-MS-Detektion, fünf Teilnehmer wählten den ELISA als Methode, weitere zwei Laboratorien wendeten die TLC an und ein Labor entschied sich für die GC-MS zur Bestimmung von ZON.

18 Studienteilnehmer analysierten DON, wobei die Extraktion in einem Labor mit reinem Wasser und in 15 Labors mit Wasser und Acetonitril, Methanol oder Polyethylenglycol 8000 durchgeführt wurde. Die Proben wurden mit Hilfe der Festphasenextraktion oder mittels MycoSepTMSäulchen aufgereinigt. Zwei

Labors entschieden sich für die Immunaффinitätschromatographie (IAC) als Probenaufarbeitungsmethode. Die Bestimmung von DON erfolgte entweder mittels GC-ECD (electron capture detection) (fünf Labors), GC-MS (zwei Labors), HPLC-UV (sechs Labors), HPLC-FLD (ein Labor) oder mit einem ELISA (vier Labors).

Die Variationskoeffizienten der von den verschiedenen Labors produzierten DON-Konzentrationen lagen zwischen 32 und 38%. Mit ELISAs wurden signifikant höhere DON-Konzentrationen ermittelt als mittels HPLC oder GC. Die Variationskoeffizienten der von den verschiedenen Teilnehmern produzierten ZON-Konzentrationen betrugen 28 bis 41%. Die Abweichungen in den Analyseergebnissen wurden auf die unterschiedlich durchgeführten Bestimmungsmethoden zurückgeführt. Natürlich kontaminierte Proben bereiteten generell größere Schwierigkeiten als gespikete Proben [JOSEPHS et al., 2001]

3.1 Allgemeine Probenaufarbeitungsmethoden

Die verschiedenen Probenaufarbeitungsmethoden dienen der Aufkonzentrierung der Analyte und der Entfernung von Matrixkomponenten.

DON ist sehr polar, darum werden meist bidestilliertes Wasser oder neutrale Pufferlösungen als Extraktionsmittel eingesetzt. Zur Extraktion von ZON eignen sich organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Ethylacetat und Methanol.

Bei der **Flüssig-Flüssig-Extraktion** werden gelöste Stoffe aus einer Lösung durch Ausschütteln mit einer zweiten, nicht mischbaren Flüssigkeit entfernt. Mit Hilfe eines Scheidetrichters werden die beiden Phasen getrennt. Durch Wiederholen des Ausschüttelns wird eine hohe Effizienz erreicht [MORTIMER und MÜLLER, 2003].

Um Matrixbestandteile abzutrennen, wird häufig die Methode der **Festphasen-Extraktion** angewendet. Der Extrakt wird auf eine Glas- oder Kunststoffsäule aufgegeben, welche mit einem geeigneten Sorbensmaterial gepackt ist. Störende Matrixbestandteile werden durch Waschen der Säule entfernt. Der Analyt verbleibt in der Säule und wird im Anschluss mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Säule eluiert [OTTO, 2000].

3.2 Auf AG-AK Wechselwirkungen basierende Probenaufarbeitungsmethoden

3.2.1 Aufbau von Antikörpern

Antikörper (AK), auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten zusammengesetzt. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die Struktur ähnelt einer Y-Form (siehe Abbildung 3).

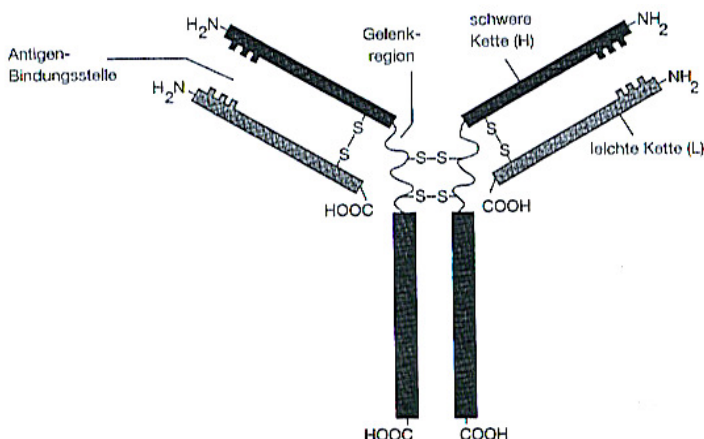


Abbildung 3: Schematische Darstellung der linearen Struktur eines Immunglobulin-Moleküls in Y-Form [aus AIGNER und NEUMANN, 1997].

Die leichten und schweren Ketten lassen sich in weitere strukturelle Untereinheiten, die sogenannten Domänen, unterteilen. Sie bestehen aus ca. 110 Aminosäuren und sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich. Das N-terminale Ende des Y-förmigen Moleküls bildet die variable Region der leichten bzw. schweren Kette, an der die Bindung mit dem Antigen erfolgt. Die außerordentliche Vielfalt der Aminosäuresequenzen in der variablen Region führt zur hohen Spezifität der Antigenbindungsstelle am Antikörper. Es können daher nur bestimmte Antigene nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ binden [AIGNER und NEUMANN, 1997].

Auf Grund der schweren Ketten werden Immunglobuline in fünf Hauptklassen unterteilt. Sie haben neben ihrer unterschiedlichen Struktur auch sehr verschiedene chemische, physikalische und biologische Eigenschaften bzw. Funktionen:

Immunglobulin A (IgA) wird im Plasma und in Körpersekreten nachgewiesen und soll das Eindringen von Antigenen verhindern. Die Funktion von Immunglobulin D (IgD) und Immunglobulin E (IgE) ist noch nicht vollständig geklärt, gesichert ist die Beteiligung von IgE an allergischen Reaktionen. Immunglobulin G (IgG) ist die am besten untersuchte Antikörperklasse. IgG zirkulieren in höheren Konzentrationen frei im Blut. Immunglobulin M (IgM) wird im Verlauf einer Immunantwort als erstes produziert [AIGNER und NEUMANN, 1997].

3.2.1.1 Polyklonale Antiseren

Antigene besitzen einen oder mehrere immunogene Bereiche, diese werden als Epitope oder auch antigene Determinanten bezeichnet. Jedes einzelne Epitop kann eine Antikörper-Bildung hervorrufen, das heißt, es können gegen ein Antigen mehrere Antikörper gebildet werden. Polyklonale Immunogenität bedeutet, dass in einem Tier jedes einzelne Epitop mehrere antikörperbildende

Zellen aktiviert. Das Serum des entsprechenden Tieres weist daher ein Gemisch verschiedener Antikörper, welche gegen eine Substanz gerichtet sind, auf (wird als polyklonales Antiserum bezeichnet) [AIGNER und NEUMANN, 1997].

Durch aktive Immunisierung des Versuchstiers (meist Kaninchen, Ziege oder Schaf) werden unterschiedliche B-Lymphozyten aktiviert. Es findet eine Primärimmunisierung statt, in der vorwiegend IgM Immunglobuline gebildet werden. Nach einer erneuten Injektion des Antigens wird die viel rascher einhergehende Sekundärreaktion ausgelöst. Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion an der Zelloberfläche werden B-Gedächtniszellen aktiviert. Auf diese Weise kann durch Verabreichung kleiner Antigenmengen eine umfangreiche Produktion von spezifischen Antikörpern angeregt werden [AIGNER und NEUMANN, 1997].

3.2.1.2 Monoklonale Antikörper

Mittels Hybridomtechnik erzeugte monoklonale Antikörper stammen aus genetisch identischen Immunzellen und weisen, sofern diese aus einem Ansatz stammen, die gleichen Eigenschaften auf.

In diesem Verfahren werden Myelomzellen mit B-Zellen bzw. Plasmazellen verschmolzen. Dabei entstehen mehrkernige Hybridzellen (Hybridome). Myelomzellen besitzen zwei für diese Technik sehr wichtige Fähigkeiten. Zum einen lassen sie sich unbegrenzt teilen, zum anderen können sie Antikörper produzieren. Für die *in-vitro*-Produktion von Antikörpern sind ausschließlich Tochterzellen, die die Merkmale beider Elternzellen tragen, geeignet. Durch eine nachfolgende Selektion des richtigen Zellklons aus dem polyklonalen Zellgemisch erhält man eine Reinkultur, die die gewünschten Antikörper produziert [AIGNER und NEUMANN, 1997].

3.2.2 Immunfiltration

In unserer Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer Diplomarbeit eine Immunfiltrationsmethode zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von ZON in Mais entwickelt. Bei der Immunfiltration werden Antikörper in Lösung eingesetzt, d.h. es erfolgt keine Immobilisierung der Antikörper an ein festes Trägermaterial. Die Probelösung und die Antikörper werden miteinander versetzt, während einer Inkubationszeit findet die Antigen-Antikörperreaktion statt. Nicht gebundene Komponenten werden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Es folgt ein Waschschriff, um unerwünschte Matrixkomponenten abzutrennen. Der Analyt wird mit Hilfe eines geeigneten Elutionsmittels durch erneutes Zentrifugieren eluiert und befindet sich dann im Filtrat [PALLE, 2007].

3.2.3 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) ist eine leistungsfähige Probenvorbereitungsmethode, bei der man sich ebenfalls die Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern zu nutze macht. Im Unterschied zur Immunfiltration wird der AK an ein festes Trägermaterial gebunden. Mittels der IAC können Proben aufgereinigt und der Analyt gleichzeitig aufkonzentriert werden. Diese Methode der Probenvorbereitung umfasst nur wenige Schritte:

Ein Probenaliquot wird auf die Immunaффinitätssäule (IAS) aufgebracht, es folgt ein Waschschriff, um nicht gebundene Matrixkomponenten zu entfernen. Die Elution des Analyten erfolgt durch Änderungen der Reaktionsbedingungen (z.B. durch Änderung des pH-Werts oder Änderung des Lösungsmittels), wodurch der Analyt aus dem Antigen-Antikörper-Komplex freigesetzt wird [CICHNA-MARKL, 2007].

Cahill et al., 1999 beschrieben eine einfache, auf der IAC basierende Methode zur Isolierung und Quantifizierung von DON in Weizen. Es wurden Weizenproben mit Wasser extrahiert, der Extrakt zweimal filtriert und das Filtrat auf eine DON-IAS aufgegeben. Es folgte ein Waschschrift zur Abtrennung ungewünschter Matrixbestandteile, DON wurde mit Methanol eluiert. Es wurden 28 natürlich kontaminierte und mit DON gespikete Weizenproben mittels HPLC und UV-Detektion analysiert. Die Absicherung der Analysenergebnisse erfolgte mittels GC-ECD (electron capture detection). Die Analysenergebnisse, welche mittels HPLC ermittelt wurden, korrelierten gut mit denen, welche mittels GC-ECD erhalten wurden ($R = 0,982$). Die Nachweisgrenze für DON lag bei $0,10 \mu\text{g/g}$, der Mittelwert der Wiederfindungen lag bei 90%, die relative Standardabweichung betrug 8,3%.

3.2.3.1 Immobilisierung von Antikörpern mittels der Sol-Gel-Methode

Die Immobilisierung der Antikörper ist ein kritischer Schritt der Immunaффinitätschromatographie. Die Immobilisierungsreaktion darf zu keiner Veränderung der Antikörper führen, das heißt, es darf keine Konformationsänderung oder Denaturierung des Bioliganden erfolgen. Das „Ausbluten“ des Antikörpers muss verhindert werden, da das Säulenmaterial sonst instabil ist. Eine sehr schonende und einfach anwendbare Immobilisierungsmethode ist der Einschluss des Antikörpers in einem porösen Sol-Gel Glas [CICHNA-MARKL, 2007].

Die Sol-Gel Immobilisierung ist gegenüber der bisher häufig angewendeten kovalenten Bindung von Biomolekülen an ein Trägermaterial eine sehr preisgünstige und weniger arbeits- und zeitintensive Methode. Das Risiko der Konformationsänderung des Bioliganden ist auf Grund der milden Bedingungen minimiert [CICHNA-MARKL, 2007].

3.2.3.2 Herstellung von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen (Sol-Gel IAS)

Zur Herstellung der Sol-Gel Glasmatrix werden meist Alkoxysilane (z.B. Tetramethoxysilan) verwendet, welche unter saurer oder alkalischer Hydrolyse ein wässriges Sol (eine Suspension kolloider Teilchen) bilden. Diesem Sol wird eine definierte Menge an in Puffer gelösten Antikörpern beigemischt. Die einsetzenden Kondensationsreaktionen führen zu einer Quervernetzung der Hydrolyseprodukte und ein viskoses Gel wird gebildet. Im Laufe der Reaktion verdampft das Lösungsmittel und das Sol-Gel Glas, in dessen Poren die Antikörper eingeschlossen sind, entsteht [CICHNA-MARKL, 2007].

In Abbildung 4 ist das Reaktionsprinzip der Sol-Gel Glasherstellung dargestellt.

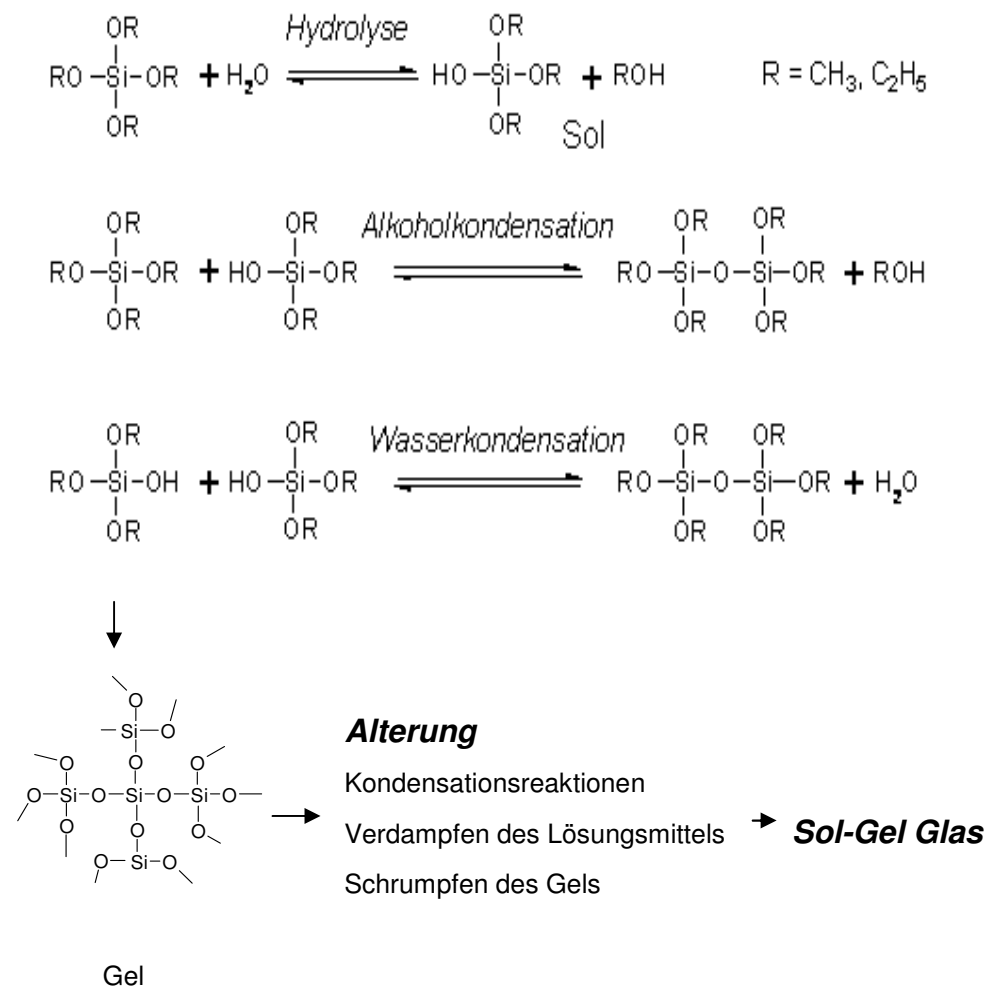


Abbildung 4: Prinzip der Sol-Gel Methode.

Über die Dauer des Alterungsprozesses des Gels kann die Porengröße der Glasmatrix auf die Proteingröße abgestimmt werden. Auf Grund der engen Poren können die Sol-Gel IAS ohne Bakteriostatikum gelagert werden [CICHNA-MARKL, 2007].

3.2.3.3 Eigenschaften von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen

Es gibt bestimmte Faktoren, die einen Einfluss auf die Qualität von Sol-Gel IAS haben:

Die **Bindungskapazität** von Sol-Gel IAS ist vor allem von der Menge der in der Säule eingeschlossenen Antikörper abhängig, daher kann diese durch Erhöhung der Antikörpermenge meist verbessert werden [CICHNA-MARKL, 2007].

Brenn-Struckhova et al. entwickelten 2007 eine selektive Probenaufarbeitungsmethode, bei der Sol-Gel IAS zur Isolierung von DON aus Lebens- und Futtermitteln eingesetzt wurden. Aus Versuchen mit DON-Standardlösungen wurde eine Bindungskapazität für DON von 1 000 ng/mg Anti-DON-AK ermittelt. Bei den Versuchen mit Realproben betrug die Bindungskapazität dieser Säulen für DON nur mehr 500 ng/mg Anti-DON AK. Um hohe Wiederfindungsraten zu erzielen, wurden daher für Versuche mit Realproben Säulen mit einer größeren Antikörpermenge verwendet [BRENN-STRUCKHOFOVA et al., 2007]

Die **Selektivität** einer Sol-Gel IAS hängt von der Kreuzreaktivität des Antikörpers ab, aber auch vom Ausmaß der unspezifischen Bindung von Matrixkomponenten an der Glasmatrix. In vielen Fällen können unspezifisch gebundene Verbindungen durch Zugabe einer geringen Menge eines

organischen Lösungsmittels (z.B. ACN) zur Waschlösung entfernt werden [CICHNA-MARKL, 2007].

Die Porengröße des Sol-Gel Glases hat einen wesentlichen Einfluss auf die **Stabilität** der IAS. Wie bereits erwähnt, kann die Größe der Poren durch die Dauer des Alterungsprozesses während der Herstellung auf die Größe des Bioliganden abgestimmt werden. Studien zeigen, dass im Fall von Antikörpern eine optimale Porengröße dann erreicht ist, wenn 50% der ursprünglichen Masse der Sol-Gel Matrix im Laufe der Kondensationsreaktionen verloren gegangen ist [CICHNA-MARKL, 2007].

Sol-Gel IAS zeichnen sich durch eine gute **Lagerfähigkeit** aus. *Brenn-Struckhova et al.* stellten fest, dass Sol-Gel IAS 19 Wochen lang in PBS gelagert werden konnten, ohne dass die Wiederfindung für DON herabgesetzt wurde. Wurden bereits sehr häufig verwendete IAS, mit denen nur noch niedrige Wiederfindungsraten für DON erzielt wurden, 20 Wochen bei 4 °C in PBS gelagert, so konnten die Wiederfindungsraten für DON deutlich verbessert werden [BRENN-STRUCKHOFOVA et al., 2007].

Kommerziell erhältliche IAS können auf Grund der sehr drastischen Elutionsbedingungen nicht mehrmals verwendet werden. *Brenn-Struckhova et al.* zeigten, dass die Sol-Gel IAS durch die Auswahl eines geeigneten Elutionsmittels (ACN:H₂O, 40:60, v/v) bis zu 20 mal **wiederverwendet** werden können [BRENN-STRUCKHOFOVA et al., 2007].

.

4 Instrumentelle Analysemethoden zur Bestimmung von DON und ZON

Die Methoden zur Bestimmung von DON und ZON lassen sich in zwei große Kategorien unterteilen:

Zum einen werden sehr häufig „instrumentelle Analysen“ mittels Gaschromatographie (GC) [KOTAL et al., 1999] oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender UV-Detektion [CAHILL et al., 1999; MATEO et al., 2002], Fluoreszenzdetektion (FLD) [KLÖTZEL et al., 2005] oder massenspektrometischer Detektion (MS) [RAZZAZI-FAZELI et al., 2003; BISELLI und HUMMERT, 2005] durchgeführt. Zum anderen kommen häufig aufgrund ihrer einfachen und schnellen Durchführung Radio- (RIAs) und Enzymimmunoassays (enzyme linked immunosorbent assays, ELISAs) zum Einsatz [KOCH, 2004].

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Chromatographie ist ein physikalischer Trennprozess, bei welchem die Trennung durch Verteilung der Substanzen zwischen einer stationären (unbeweglichen) und einer mobilen (beweglichen) Phase erfolgt.

Die stationäre Phase ist eine feste oder aus flüssigkeitsbelegten Trägern bestehende Oberfläche, an der die mobile Phase im chromatographischen Bett vorbeiströmt [MEYER, 2004].

4.1.1 Der chromatographische Trennvorgang

Eine Mischung aus verschiedenen Komponenten wird in das chromatographische System eingebracht. Die mobile Phase durchströmt die stationäre Phase. Der Trennvorgang ist eine Abfolge vieler Adsorptions- und Desorptionsschritte. Stoffe, die sich bevorzugt in der mobilen Phase aufhalten, wandern schneller durch das Trennsystem als solche, die sich vermehrt in der stationären Phase aufhalten [MEYER, 2004].

Der *Verteilungskoeffizient* (K) ist ein Maß für die bevorzugte Tendenz eines Stoffes, sich in der mobilen oder in der stationären Phase aufzuhalten [MEYER, 2004]. Er wird durch folgende Gleichung definiert:

$$K = \frac{C_{stat}}{C_{mob}}$$

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

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

Um eine Trennung der in einer Mischung enthaltenen Substanzen zu gewährleisten, müssen die einzelnen Komponenten unterschiedliche Verteilungskoeffizienten aufweisen [MEYER, 2004].

Aufgrund der Mobilitätsunterschiede können die einzelnen Probenkomponenten zeitverzögert eluiert werden. Wird am Ende einer Trennstrecke ein Detektor angebracht, so kann das Auftreten der Analyte erfasst und mit einem entsprechenden Auswerteprogramm die erhaltenen Signale in Form von unterschiedlichen Peaks aufgezeichnet werden. Das daraus resultierende Chromatogramm (siehe Abbildung 5) liefert qualitative und quantitative Informationen [SKOOG und LEARY, 1996].

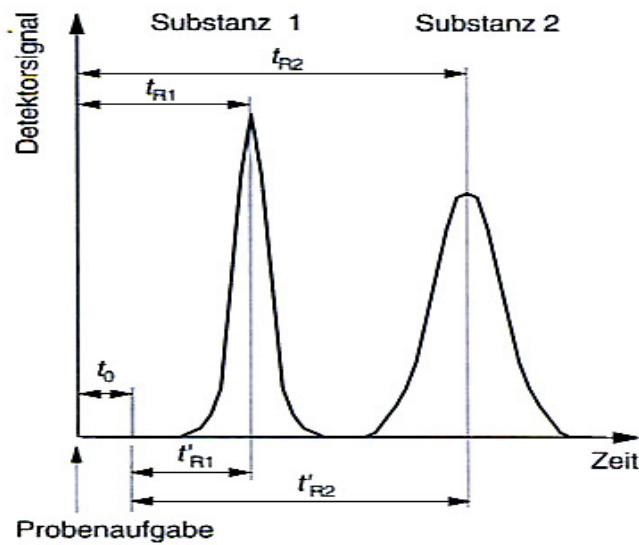


Abbildung 5: Das Chromatogramm und seine Kenngrößen [aus BÖCKER, 1997]. t_0 : Totzeit des Systems; t_R : Brutto-Retentionszeit; t'_R : Netto-Retentionszeit.

4.1.2 Auswertung eines Chromatogrammes

Qualitative Auswertung

Anhand der *Retentionszeit* (t_R) wird die qualitative Auswertung durchgeführt. Die Retentionszeit definiert jene Zeit, die ein Analyt nach der Injektion bis zum Erreichen des Detektors benötigt. Eine Komponente weist bei gleichbleibenden chromatographischen Bedingungen immer die gleiche Retentionszeit auf. Sie ist abhängig von der Länge der Trennsäule, dem Durchmesser der Säule, der Temperatur, der Zusammensetzung und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten in einer Säule kann auch durch den *Kapazitätsfaktor* (k') beschrieben werden. Dieser ist im Unterschied zur Retentionszeit unabhängig von den Säulendimensionen und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k' : Kapazitätsfaktor der Substanz

t_R : Retentionszeit der Substanz

t_0 : Retentionszeit des Lösungsmittels; entspricht der Zeit, die die mobile Phase zum Durchfließen des Trennsystems benötigt

Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung erfolgt über die Peakfläche oder die Peakhöhe. Beide sind proportional zur Konzentration des Analyten. Ob die Höhe oder die Fläche zur Auswertung herangezogen wird, hängt von der Peaksymmetrie und der Auflösung ab. Die Peakhöhe soll dann zur Auswertung herangezogen werden, wenn sich Peakpaare überlappen, das heißt, wenn diese nicht basisliniengetrennt sind.

Die *Auflösung* (R) zweier Peaks wird durch folgende Gleichung definiert:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2}$$

t_{R1} : Retentionszeit der Substanz 1

t_{R2} : Retentionszeit der Substanz 2

W_1 : Basisbreite des Peaks der Substanz A

W_2 : Basisbreite des Peaks der Substanz B

Bei einer Auflösung von 1,5 sind zwei Peaks annähernd von einander basisliniengetrennt. Durch Verlängerung der Säule kann die Auflösung verbessert werden. Durch diese Maßnahme wird die Anzahl der Trennstufen

erhöht und somit eine bessere Trennung des Substanzgemisches gewährleistet [SKOOG und LEARY, 1996; MEYER, 2004].

Mit der *Bodenzahl* (N) (= Trennstufenzahl) und der *Bodenhöhe* (H) lässt sich die Effizienz einer chromatographischen Säule beschreiben. Beide Kennzahlen stehen mit der Länge der Säule (L) wie folgt im Zusammenhang:

$$N = L/H$$

Die Effizienz der Säule nimmt mit steigender Bodenzahl (Zahl der theoretischen Böden) und abnehmender Bodenhöhe zu [SKOOG und LEARY, 1996].

Die *Bodenhöhe* (H) (= Trennstufenhöhe) ist das Verhältnis zwischen der Verbreiterung der Peaks und der Retentionszeit. Sie entspricht jener Strecke der Säule, in der sich das chromatographische Gleichgewicht völlig einstellt [SCHWEDT, 1994; MEYER, 2004].

4.1.3 Das HPLC-System

Von allen chromatographischen Verfahren ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) die am häufigsten eingesetzte Trenntechnik. Bei der HPLC wird die mobile Phase mit Hilfe einer Pumpe durch das Trennsystem befördert. Es werden zumeist Kurzhub-Kolbenpumpen eingesetzt, die einen konstanten, pulsationsfreien Lösungsmittelfluss gewährleisten [MEYER, 2004].

Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC-Apparatur, wobei die einzelnen Komponenten individuell zusammengesetzt werden können.

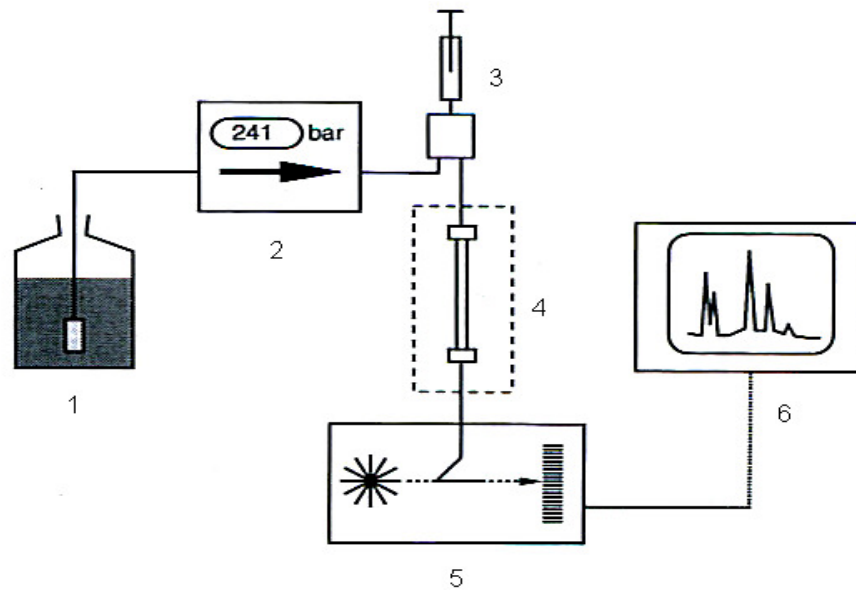


Abbildung 6: Schema einer HPLC-Apparatur [aus MEYER, 2004]. 1. Gefäß mit mobiler Phase, 2. Pumpe, 3. Probenaufgabe, 4. Säule, 5. Detektor, 6. Auswertesystem.

Die Säule

Die Trennsäule ist die wichtigste Komponente des Systems. Sie ist meist in einen Thermostaten eingebaut, wodurch temperaturkontrollierte Trennvorgänge gewährleistet werden. Die aus Stahl bestehenden Säulen haben einen Innendurchmesser von 2 bis 5 mm und eine Länge von 5 bis 30 cm. Im Inneren der Säule befindet sich das Adsorbens, welches meistens aus porösen Partikeln mit kleiner Korngröße zusammengesetzt ist.

Das Phasensystem

In der HPLC werden zwei verschiedene Phasensysteme unterschieden. In der Normalphasenchromatographie besteht die stationäre Phase aus einem polaren Material (z.B. Kieselgel), während die mobile Phase unpolar ist (z.B. Chloroform, Dichlormethan).

Die weitaus häufigere, und auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase-HPLC, RP-HPLC) besteht aus einer eher unpolaren stationären und einer polaren mobilen Phase. Die unpolare stationäre Phase besteht meist aus Siloxanen, an denen unterschiedlich lange Alkylgruppen (8 C-Atome: C₈ RP 8; 18 C-Atome: C₁₈ RP 18) chemisch gebunden sind. Für die mobile Phase werden polare Lösungsmittel wie Wasser, Methanol oder Acetonitril in verschiedenen Volumsverhältnissen (v/v) verwendet [MEYER, 2004].

In der RP-HPLC wird häufig eine Gradientenelution durchgeführt. Besonders bei der Analyse von komplexen Mischungen werden unter isokratischen Bedingungen breite, schlecht aufgetrennte Peaks erhalten, welche die Interpretation der Chromatogramme erschweren. Bei einer Gradientenelution wird die Lösungsmittelzusammensetzung so variiert, dass stark retentierte Substanzen in kürzerer Zeit eluiert und gut aufgelöste Chromatogramme erhalten werden [MEYER, 2004].

Der Detektor

Der Detektor erfasst durch unterschiedliche Messtechniken die eluierten Substanzen am Ende der Säule und wandelt die registrierten Veränderungen der Zusammensetzung der mobilen Phase in elektrische Signale um, welche an ein Auswertesystem weitergeleitet werden. Konzentrationsabhängige Detektoren erfassen Konzentrationsunterschiede und leiten ein Signal, welches proportional zur Probenkonzentration ist, weiter. Stoffstromabhängige Detektoren erzeugen ein zur Anzahl der Probenmoleküle (pro Zeiteinheit) proportionales Signal [MEYER, 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit kamen sowohl ein UV-Detektor, ein Fluoreszenzdetektor als auch ein massenspektrometrischer Detektor zum Einsatz.

4.1.3.1 UV-Detektor

Der UV-Detektor ist ein universeller Detektor, er erfasst alle Substanzen, die ultraviolette Licht absorbieren.

Die Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchtritt durch die Detektorzelle hängt von der *Konzentration* (c) der Substanz, von ihrem *molaren Extinktionskoeffizienten* (ϵ) und von der *Länge der Zelle* (d) ab. Das Produkt aus den drei Größen ist die *Extinktion* (E):

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Der *molare Extinktionskoeffizient* (ϵ) ergibt sich aus den photochemischen und photophysikalischen Eigenschaften der absorbierenden Substanz [MEYER, 2004].

Der Aufbau eines UV-Detektors ist in Abbildung 7 dargestellt.

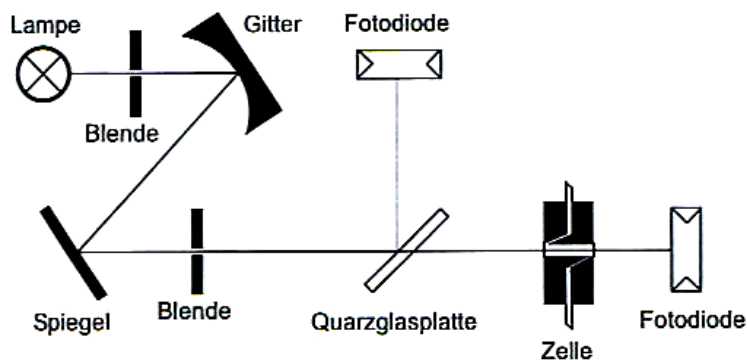


Abbildung 7: Bauprinzip eines UV-Detektors [aus MEYER, 2004].

Über ein Gitter kann nur Licht mit einer gewissen Wellenlänge in den Strahlengang gelangen. Über Spiegel und Blendensysteme gelangt der Strahl zur Quarzglasplatte, wo ein kleiner Teil des Lichts auf eine Referenz-Fotodiode reflektiert wird. Der größte Teil des Strahls wird durch die Zelle zur Fotodiode geleitet [MEYER, 2004].

4.1.3.2 Fluoreszenzdetektor

Die Empfindlichkeit eines Fluoreszenzdetektors ist bis zu tausendmal höher als die eines UV-Detektors. Der Fluoreszenzdetektor ist selektiv und erfasst nur fluoreszierende Substanzen. Licht mit einer bestimmten Wellenlänge wird auf die Zelle gestrahlt und das emittierte Licht mit größerer Wellenlänge senkrecht zur Einstrahlrichtung durch die Fotodiode aufgefangen [Meyer, 2004].

Das Bauprinzip eines Fluoreszenzdetektors ist in Abbildung 8 dargestellt.

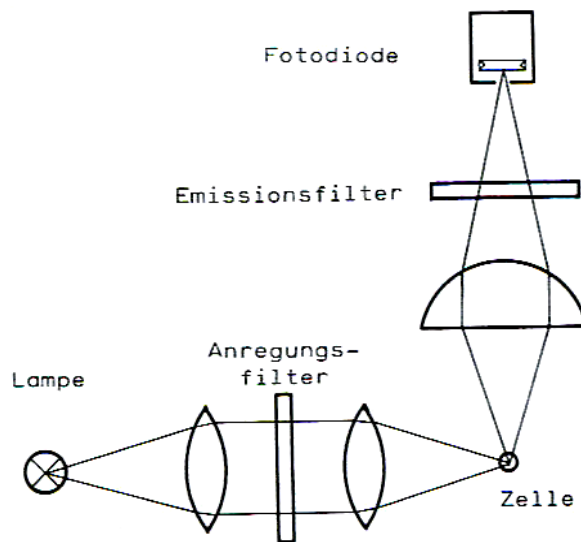


Abbildung 8: Prinzip eines Fluoreszenzdetektors [aus MEYER, 2004].

Gemessen wird die Fluoreszenzintensität (I_F), die durch folgende Gleichung im Zusammenhang mit der Konzentration des Analyten steht:

$$I_F = k \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d$$

I_F : Intensität der Fluoreszenz

k : Fluoreszenzausbeute

I_0 : Intensität des eingestrahltten Lichts

ϵ , c , d : siehe Lambert-Beer-Gesetz (Kapitel 4.1.3.1)

4.1.3.3 Massenspektrometrischer Detektor

Theoretische Grundlagen

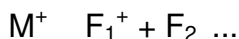
Ein Massenspektrometer erzeugt aus einer Probe einen gasförmigen Ionenstrahl, dieser wird nach dem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt, wodurch ein entsprechendes Massenspektrum entsteht. Mit Hilfe eines Massenspektrometers können qualitative und quantitative Analysen von Einzelsubstanzen oder von Substanzgemischen durchgeführt werden. Die erhaltenen Massenspektren liefern Informationen über die Struktur, über die relative Häufigkeit (Konzentration) und über die molekularen Massen des gemessenen Analyten [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Ionen sind positiv oder negativ geladene Atome oder Moleküle. Als Ionenstrom werden alle in einer Zeiteinheit gebildeten Ionen bezeichnet. Durch die Summe der Ionenströme erhält man den Totalionenstrom (TI) [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Durch Ionisierung der Analyte werden je nach Ionisierungsmethode unterschiedliche Arten von Ionen gebildet:

a) Ionisierung durch Elektronenstoß Ionisation (EI):

Durch Herausschlagen eines Elektrons entstehen positiv geladene Molekülionen und viele positiv geladene oder neutrale Fragmentionen.

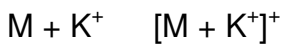
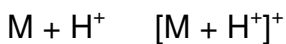


Fragmentionen entstehen, wenn einem Molekül über das Ionisierungspotential hinaus weiter Energie zugeführt wird und dadurch ein Molekül in Bruchstücke

zerfällt. Fragmentationen werden bei der EI in großer Anzahl gebildet und können wichtige Strukturinformationen liefern.

b) Ionisierung durch Oberflächen-, Spray- und Laserdesorptionsverfahren:

Bei diesen Techniken lagern sich an ein Molekül ein oder mehrere Protonen oder Kationen (Na^+ , K^+) an.



Durch diese sehr milden Ionisierungsmethoden entstehen keine oder nur sehr wenige Fragmentationen [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Apparative Grundlagen

Das Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus fünf Teilen (siehe Abbildung 9):

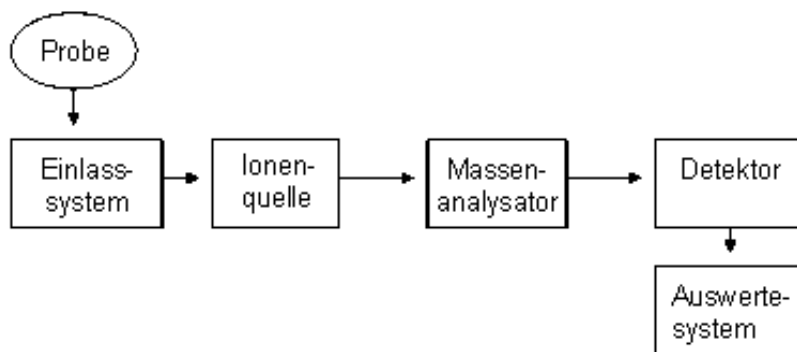


Abbildung 9: Blockdiagramm eines Massenspektrometers.

Das Einlasssystem

Eine Probe kann auf drei verschiedene Arten in das Massenspektrometer eingebracht werden. Eine unpolare bis mäßig polare Probe bis zu einer Molmasse von 1 000 g/mol wird vor der Ionisation verdampft. Polare Proben mit einer Molmasse von 2 500 g/mol (bei FAB: Desorption/Ionisation durch Fast-Atom-Bombardment) bis zu 1 000 000 g/mol (bei MALDI: Matrix assisted laser desorption/ionisation) werden aus einer kondensierten Phase in die Gasphase übergeführt. Handelt es sich um eine zu analysierende Probelösung, kann diese mittels Spray-Verfahren zerstäubt werden, wodurch am Ende dieses Sprayvorganges das Analytmolekül in völlig desolvatisiertem Zustand vorliegt [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Die Ionenquelle

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein Electrospray Interface verwendet. Bei der Elektro Spray Ionisation (ESI) wird aus der Probenlösung in einem elektrischen Feld am Ende der Sprühkapillare ein Flüssigkeitskonus gebildet. Entsprechend der Polung der Spraynadel liegen durch Ansammlung von Ionen positiv oder negativ geladene Tröpfchen vor. Die Anzahl der Ladungen, die ein Molekül trägt, ist vor allem von dessen Größe abhängig [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Der Massenanalysator

Die in der Ionenquelle gebildeten Ionen werden aus der Ionenquelle über eine Potentialdifferenz zum Massenanalysator hin beschleunigt. In einem Massenanalysator werden die gebildeten Ionen nach dem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Zur Trennung der Ionen stehen Magnetfeldgeräte, Flugzeit-Massenanalysatoren, Quadrupol-Analysatoren und Ionenfallen zur Verfügung [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer hatte eine Ionenfalle als Massenanalysator eingebaut.

Ionenfallen, oder auch Ioneneinfanganalysatoren genannt, sind sehr robuste und kostengünstige Massenanalysatoren. Durch die bestimmte Anordnung der Elektroden sowie durch Anlegung einer Hochfrequenzspannung kreisen Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert in geschlossenen Bahnen. Wird die Hochfrequenzspannung erhöht, werden schwere Ionen stabilisiert, die leichten Ionen werden in ihrer Bahn abgelenkt und an den Elektroden entladen. Durch kontinuierliche Veränderung der Elektrodenspannung können die Ionen nacheinander aus der „Falle“ entlassen werden [SKOOG und LEARY, 1996].

Die *Auflösung* (R) ist die wichtigste Größe zur Beschreibung der Leistungsfähigkeit eines Massenanalysators. Ionenstrahlen unterschiedlicher Masse, welche sich nicht oder nur wenig überlappen, können getrennt von einander registriert werden [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005]:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

m : Masse

Δm : Massendifferenz

Der Detektor

Im Detektor erfolgt die Umwandlung des Ionenstrahls in ein elektrisches Signal, welches an das Auswertesystem weitergeleitet wird. Es gibt verschiedene Arten von Detektoren, wobei der Elektronenvervielfacher am besten für gängige Analysen geeignet ist [SKOOG und LEARY, 1996]. Das Signal ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich proportional zur Konzentration des Analyts.

5 Material und Methoden

5.1 Reagenzien

Acetonitril, HPLC Gradient Grade (VWR)

Anti-DON Antikörper, in PBS (Singapur)

Anti-ZON Antikörper, in PBS (Singapur)

Deoxynivalenol, in ACN (Biopure)

Dinatriumhydrogenphosphat, p.A. (Merck)

H₂O bidestilliert

Methanol, HPLC Gradient Grade (VWR)

Natriumdihydrogenphosphat, p.A. (Merck)

Natriumchlorid, p.A. (Merck)

Stickstoff verdichtet, Standardqualität, technisch (Air Liquide Austria GmbH)

Salzsäure, rauchend, 37%, p.A. (Merck)

Tertramethoxysilan, p.A. (Fluka)

Zearalenon (Biopure)

5.2 Geräte

5.2.1 HPLC-Apparatur

5.2.1.1 DON-Bestimmung (HPLC-System 1)

Pumpe: Hitachi L-7100 (Merck)

Säule: Synergri 4u Polar RP, 80Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm
(Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Vorsäule: C 18, 4.0 mm x 3.0 mm (Phenomenex)

Säulenthermostat:	Model bfo-04 dt (W.O. electronics, Langenzersdorf, Österreich)
Detektor:	UV-Detektor, Hitachi L-4200 (Merck)
Auswertesystem:	McDacq Software (Bischoff, Leonberg, Deutschland)

5.2.1.2 ZON-Bestimmung (HPLC-System 2)

Pumpe:	Hitachi L-6200 (Merck)
Säule:	ACE 3 C18, 150 x 3 mm, 3 µm, 100 Å (Advanced Chromatography Technologies)
Vorsäule:	C 18, 4.0 mm x 3.0 mm (Phenomenex)
Säulenthermostat:	Hitachi column oven 655 A-52 (Merck)
Detektor:	FL-Detektor, Hitachi L-4000 (Merck)
Auswertesystem:	Stratos Software (Polymer Laboratories GmbH, Deutschland)

5.2.1.3 LC-MS (HPLC-System 3)

Entgaser:	Hewlet Packard Series 1100
Pumpe:	Hewlet Packard Series 1100
Autosampler:	Hewlet Packard Series 1100
Dosierschleife:	30 µl
Säule:	ACE 3 C18, 150 x 2 mm, 3 µm, 100 Å (Advanced Chromatography Technologies)
Detektor:	UV-Detektor, Agilent VDW G1314A
MS:	Bruker Daltonics HTC Plus

Ionenquelle:	ESI
N ₂ -Versorgung:	Dominick Hunter – Nitrox-UHPLCMS 18
Pressluft:	Junair
Vacuumpumpe:	Edwards 18
Auswertesystem:	Bruker Daltonics

5.2.1.4 On-line-Kopplung (HPLC-System 4)

Pumpe A:	Hitachi Elite LaChrom L-2130 (VWR)
Pumpe B:	Hitachi Elite LaChrom L-2130 (VWR) VICI (Valco Instruments Co. Inc.) (VWR)
Kartusche für IAS:	25 x 4 mm (Merck)
Analytische-Säule:	ACE 3 C18, 150 x 2 mm, 3 µm, 100 Å (Advanced Chromatography Technologies)
Säulenthermostat:	Hitachi column oven L-2300 (VWR)
Detektor:	FL-Detektor, Hitachi L-2485 (VWR) UV-Detektor, Hitachi L-2400 (VWR)
Auswertesystem:	EZ chrom Elite

5.2.2 Sonstige Geräte

Analysenwaage:	Sartorius, TE 214S
Festphasen- extraktionsapparatur:	Millipore, Sep-Pak, Waters Vacuum Manifold
Kugelmühle:	Retsch, MM 2 000

Magnetrührgerät:	Tokyo Kagakusngyo, Co, LTD, MS-16 B
Pipetten:	Gilson, 20-200 µL Eppendorf, 100-1 000 µL Eppendorf, 1 000-5 000 µL
Schüttler:	IKA, MTS 4 electronics
Vakuumpumpe:	Millipore
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex Super RX103H
Zentrifugen:	Sigma, Modell 4 K 10, 5 500 rpm Rotor, Einsätze für 15 mL Zentrifugenröhrchen Eppendorf, Modell 5424, 10 000 rpm Rotor, Einsätze für 1,5 mL Eppendorfgefäße

5.2.3 Sonstige Gegenstände

Achatreibschale
Bechergläser
Blaubandfilter
Borosilicatglasfritte, Porosität 5
Eppendorfaufsatz 50 mL
Eprouvetten
Erlenmeyerkolben
Fritten
Hamiltonspritze
Millipore, Amicon[®] Ultra-4 Filtrationseinheit, regenerierte Cellulose, 50 kDa
Nylon 66 Membran (Porengröße: 0,45 µm x 47 mm)
Parafilm
Pasteurpipetten
Rührkern

Saugflasche

Kunststoffsäulchen: Länge: 6 cm , Durchmesser: 1 cm

Schwarzbandfilter

Vials 1,5 mL

Zentrifugenröhrchen 15 mL

5.3 Proben

Die verwendeten Lebensmittelproben wurden in lokalen Supermärkten gekauft. Die Futtermittel Schlempe und Mais wurden von Prof. Razzazi-Fazeli vom Department für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Gesundheitswesen, Institut für Ernährung an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, zur Verfügung gestellt. Die Bodenproben stammten aus einem Überschwemmungsgebiet in Oberösterreich. Die Wasserproben wurden aus einem Donauarm bei Klosterneuburg gezogen.

5.4 Probenaufarbeitung

5.4.1 Homogenisieren

Die im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Proben wurden vor der Extraktion je nach Konsistenz in einer Kugelmühle oder mit einem Mörser zerkleinert.

5.4.2 Extraktion von DON aus Lebensmitteln, Futtermitteln und Bodenproben

5 g der homogenisierten Probe wurden mit 40 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{BD}}$ versetzt. Die Probensuspension wurde 10 min gerührt. Danach wurden 20 mL der Suspension 10 min bei 4 000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Borosilicat Fritte (Porosität 5) filtriert. Trübe Lösungen wurden nicht durch eine Borosilicat Fritte, sondern durch ein Blaubandfilter filtriert und danach 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert.

5.4.3 Extraktion von DON und ZON aus Lebens- und Futtermitteln

25 g der homogenisierten Probe wurden in einen 250 mL Erlenmeyerkolben eingewogen. Die Probe wurde mit 100 mL Acetonitril:Wasser (60:40, v/v) versetzt und der Kolben mit Parafilm luftdicht verschlossen. Zum Lichtschutz wurde der Kolben mit Alufolie umwickelt. Die Probensuspension wurde eine Stunde am Schüttler extrahiert. Anschließend wurde die Lösung durch ein Blaubandfilter filtriert.

5.4.4 Extraktion von ZON aus Bodenproben

Es wurden 5 g der Probe eingewogen, mit 20 mL Acetonitril:Wasser (60:40, v/v) versetzt. Die Probensuspension wurde eine Stunde unter Lichtausschluss am Schüttler extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde durch ein Blaubandfilter filtriert.

5.4.5 Spikeversuche

Zur Ermittlung der Wiederfindung in Lebensmitteln, Futtermitteln, Boden- und Wasserproben wurden Spikeversuche mit DON und ZON durchgeführt:

Lebensmittel und Futtermittel:

Spikelevel für DON:	500 ng DON/g Probe 5 000 ng DON/g Probe
Spikelevel für ZON:	50 ng ZON/g Probe 100 ng ZON/g Probe
Spikelevel für DON und ZON:	500 ng DON/g Probe <u>und</u> 50 ng ZON/g Probe 5 000 ng DON/g Probe <u>und</u> 100 ng ZON/g Probe

Die homogenisierten, eingewogenen Proben wurden gespiket und wie in Kapitel 5.4.2 und 5.4.3 beschrieben extrahiert. Je nach Spikelevel wurden 5 mL (niedriger Spikelevel) oder 1 mL (hoher Spikelevel) des Filtrats auf die IAS aufgegeben.

Bodenproben:

Die eingewogene Bodenprobe (5 g) wurde mit DON (500 ng/g Probe) oder ZON (50 ng/g Probe) gespiket und eine halbe Stunde stehen gelassen. Danach erfolgte die Extraktion wie in Kapitel 5.4.4 beschrieben. 5 mL des filtrierten Extrakts wurden auf die IAS aufgegeben.

Wasserproben:

20 mL der Wasserprobe wurden mit DON (100 ng/mL) oder ZON (100 ng/mL) gespiket und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung durch eine Nylon-Membran (Porengröße: 0,45 µm x 47 mm) filtriert. 5 mL des Filtrats wurden auf die IAS aufgegeben.

5.5 Immunaффinitätschromatographie

5.5.1 Antikörper

Die Antikörper stammten aus Singapur und wurden in Fraktionen à 0,5 mL PBS gelagert. Die Konzentrationen der Anti-DON AK Lösung betrug 4 mg/mL, die der Anti-ZON AK Lösung 2 mg/mL.

5.5.2 Herstellung von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen

Im Rahmen der Diplomarbeit kamen drei verschiedene Sol-Gel IAS zum Einsatz. Es wurden IAS, in welche 2 mg Anti-DON AK gebunden waren (DON-IAS), solche in welche 1 mg Anti-ZON AK eingeschlossen waren (ZON-IAS) und solche, in denen 2 mg Anti-DON AK und 1 mg Anti-ZON AK immobilisiert waren (DON-ZON IAS), verwendet.

5.5.2.1 Herstellung des Hydrolysats

Zur Herstellung des Hydrolysats wurden 0,2 mL 0,04 M HCl, 0,75 mL H₂O_{BD} und 3,4 mL TMOS (Tetramethoxysilan) in ein Becherglas pipettiert. Das Becherglas wurde geschwenkt und mit Parafilm luftdicht verschlossen. Das Hydrolysat wurde für 30 min unter Eiskühlung ins Ultraschallbad gestellt.

5.5.2.2 Herstellung der IAS

Um DON- bzw. ZON-IAS herzustellen, wurde in ein Becherglas, das zuvor abgewogen worden war, 0,5 mL der entsprechenden AK-Lösung und 0,5 mL Hydrolysat pipettiert.

Wurden DON-ZON-IAS hergestellt, so mussten die AK-Lösungen mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit auf ein Volumen von 0,25 mL reduziert werden. Danach wurden beide Lösungen zum Hydrolysat pipettiert.

Im Anschluss wurde das Becherglas geschwenkt und erneut abgewogen. Das Becherglas wurde bei Zimmertemperatur offen stehen gelassen. Sobald das Gemisch 50% seines Gewichtes verloren hatte, wurde das entstandene Glas in

einer Achatreibschale gemahlen. Das gemahlene Sol-Gel Glas wurde in eine 3 mL Kunststoffsäulche gefüllt, in welche zuvor eine Fritte eingelegt worden war. Die Säule wurde mit 20 mL PBS gespült. Nach dem Entfernen eventuell entstandener Luftblasen mit Hilfe eines Spatels (durch Aufwirbeln) wurde eine Fritte auf die Glasmatrix gesetzt. Die Säulen wurden mit einem Plastikstopfen verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Schritte der Sol-Gel IAS Herstellung sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

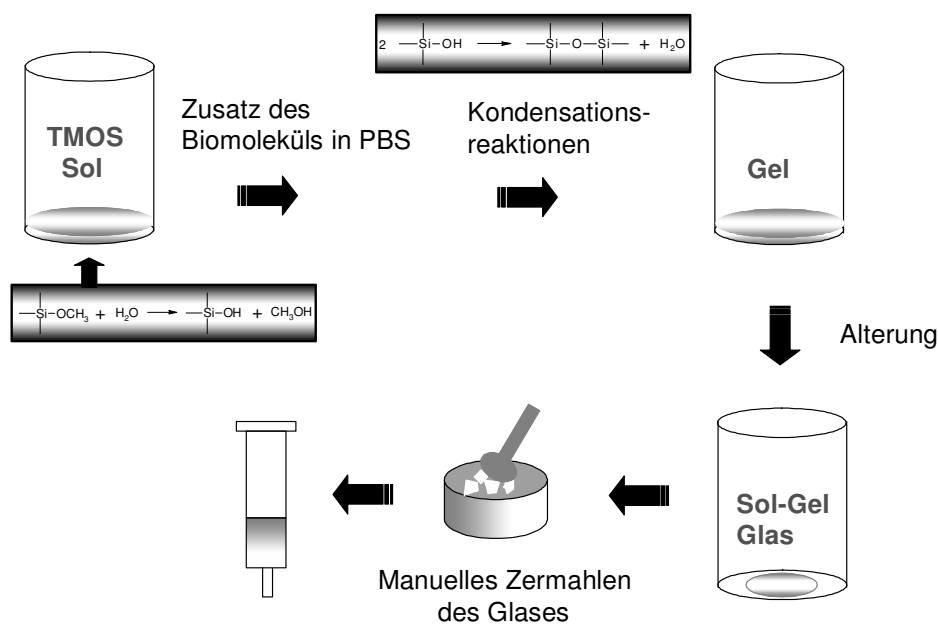


Abbildung 10: Ablauf der Herstellung einer Sol-Gel Immunaффinitätssäule.

5.5.3 Probenaufgabe

5.5.3.1 DON-IAS

Im Fall von ungespiketen Proben wurden 5 mL des filtrierten Extrakts (Lebensmittel- Futtermittel und Bodenproben) bzw. 5 mL der filtrierten Wasserprobe auf die DON-IAS aufgegeben.

Im Fall von niedrig gespiketen Lebensmittel-, Futtermittel und Bodenproben (Spikelevel 500 ng DON/g Probe) wurden 5 mL und von hoch gespiketen

Proben (Spikelevel 5 000 ng/g) 1 mL des filtrierten Extrakts auf die DON-IAS aufgegeben. Von gespiketen Wasserproben (Spikelevel 100 ng/mL) wurden 5 mL des Filtrats aufgegeben. Die Aufgabegeschwindigkeit betrug jeweils 0,5 mL/min. Danach wurde die Säule mit 10 mL MeOH:H₂O_{BD} (10:90, v/v) gewaschen und DON mit 4 mL ACN:H₂O_{BD} (40:60, v/v) eluiert.

ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Eluat mit H₂O_{BD} auf 5 mL aufgefüllt. Die IAS wurde mit 20 mL PBS regeneriert.

5.5.3.2 DON-ZON-IAS

Um die Retention von DON und ZON in der DON-ZON-IAS zu garantieren, durfte der Anteil an ACN im Extrakt 3% (v/v) nicht übersteigen. Da die gemeinsame Extraktion von DON und ZON mit ACN:Wasser (60:40, v/v) durchgeführt wurde, musste der erhaltene Probenextrakt verdünnt werden. Bei ungespiketen Proben bzw. bei einem niedrigen Spikelevel (500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe) wurde 1 mL des filtrierten Extrakts mit PBS auf 50 mL verdünnt. Bei einem hohen Spikelevel (5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe) wurden 0,5 mL des filtrierten Extrakts mit PBS auf 25 mL verdünnt.

Der verdünnte Extrakt wurde mit Hilfe eines Eppendorfaufsatzes drucklos auf die DON-ZON-IAS aufgebracht. Danach wurde die Säule mit 5 mL MeOH:H₂O_{BD} (10:90, v/v) gewaschen und DON und ZON mit 4 mL ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom entfernt und das Eluat anschließend auf 5 mL mit H₂O_{BD} aufgefüllt. Die IAS wurde danach mit 20 mL PBS regeneriert.

5.5.3.3 ZON-IAS

Um die Retention von ZON in der IAS zu ermöglichen, wurde 1 mL des Probenextrakts mit PBS auf 50 mL verdünnt. Im Fall von ungespiketen und gespiketen Bodenproben (Spikelevel 100 ng/g) wurden 5 mL des verdünnten Extrakts auf die ZON-IAS aufgegeben. Bei ungespiketen und gespiketen

Wasserproben wurden 5 mL der filtrierten Probe aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 mL MeOH:H₂O_{BD} (10:90, v/v) gewaschen und ZON mit 4 mL ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) eluiert. ACN wurde im Stickstoffstrom weggeblasen und das Endvolumen mit H₂O_{BD} auf 5 mL eingestellt. Die IAS wurde mit 20 mL PBS regeneriert.

5.6 HPLC

5.6.1 Herstellung von DON- und ZON-Standardlösungen

DON- bzw. ZON-Standardlösungen wurden durch Verdünnung einer DON-Urlösung (100 µg/mL) und einer ZON-Urlösung (100 µg/mL) mit Wasser hergestellt. Die Konzentrationen der DON-Lösungen lagen im Bereich von 25 bis 1 000 ng/mL, die der ZON-Lösungen im Bereich von 1 bis 600 ng/mL.

5.6.2 Bestimmung von DON mittels HPLC-UV-Detektion (HPLC-System 1)

Das Injektionsvolumen betrug 100 µL. Als mobile Phase wurde ACN:MeOH:H₂O_{BD} im Verhältnis 10:10:80 (v/v/v) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL pro Minute. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die Auswertung wurde mit der McDACq Software durchgeführt.

5.6.3 Bestimmung von ZON mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion (HPLC-System 2)

Es wurden jeweils 100 µL Aliquote der Standard- bzw. Probelösungen injiziert. Als mobile Phase wurde ACN:H₂O_{BD} im Verhältnis 45:55 (v/v) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,4 mL pro Minute. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und

einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Die Auswertung wurde mit der Stratos Software durchgeführt.

5.6.4 LC-MS (HPLC-System 3)

Das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Es wurde eine Gradientenelution durchgeführt (siehe Tabelle 2), die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase wurde auf 0,4 mL/min eingestellt. Die Einstellungen der ESI und der Ionenfalle sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mittels der Software Bruker Daltonics.

Tabelle 2: Gradientenelution im LC-MS System mit H_2O_{BD} (A) und ACN (B) als mobile Phase.

t [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
5	90	10
13	20	80
17	20	80

Tabelle 3: ESI- und Ionenfalleneinstellungen zur Detektion von DON und ZON mittels LC-MS.

Parameter	DON und ZON
Kapillare	+4 200V
End Plate Offset	-500V
Nebulizer [psi]	40
Dry Gas [L/min]	10
Dry Temp [°C]	300
Polarity	Negativ
Smart Target	25 000
Max.Accu Time [ms]	20
Scan [m/z]	100-400

6 Ergebnisse und Diskussion

Die in der vorliegenden Diplomarbeit angewendeten Immunaффinitätschromatographiemethoden wurden von *Fr. Brenn-Struckhoferova* im Rahmen ihrer Dissertation entwickelt. Sie stellte Sol-Gel IAS her, in welche entweder 2 mg Anti-DON AK, 1 mg Anti-ZON AK oder 2 mg Anti-DON AK und 1 mg Anti-ZON AK gemeinsam eingeschlossen wurden. Sie optimierte die Aufgabe-, Wasch-, und Elutionsbedingungen und entwickelte außerdem HPLC-Methoden zur Bestimmung von DON und ZON. Die entwickelten Methoden wurden auf ihre Anwendbarkeit zur Bestimmung von DON und ZON in Weizen, Mais und Vollkornnudeln getestet [BRENN-STRUCKHOFOVA, in Vorbereitung].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Anwendbarkeit der Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie zur Aufarbeitung von weiteren Lebensmittelmatrizes, Futtermitteln sowie Umweltproben zu testen.

6.1 HPLC

6.1.1 Erstellung von Kalibrierfunktionen von DON und ZON

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden DON- bzw. ZON-Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (siehe Kapitel 5.6.1). Aliquote der DON-Lösungen wurden in die HPLC-Systeme 1, 2 und 3 injiziert und die erhaltenen Peakflächen ermittelt. Die HPLC Bedingungen sind in den Kapiteln 5.6.2, 5.6.3 und 5.6.4 zusammengefasst.

Die erhaltenen Peakflächen [mV.s] wurden gegen die Konzentrationen c [ng/mL] aufgetragen. In den Abbildungen 11 bis 14 sind typische Kalibrierfunktionen für DON und ZON dargestellt.

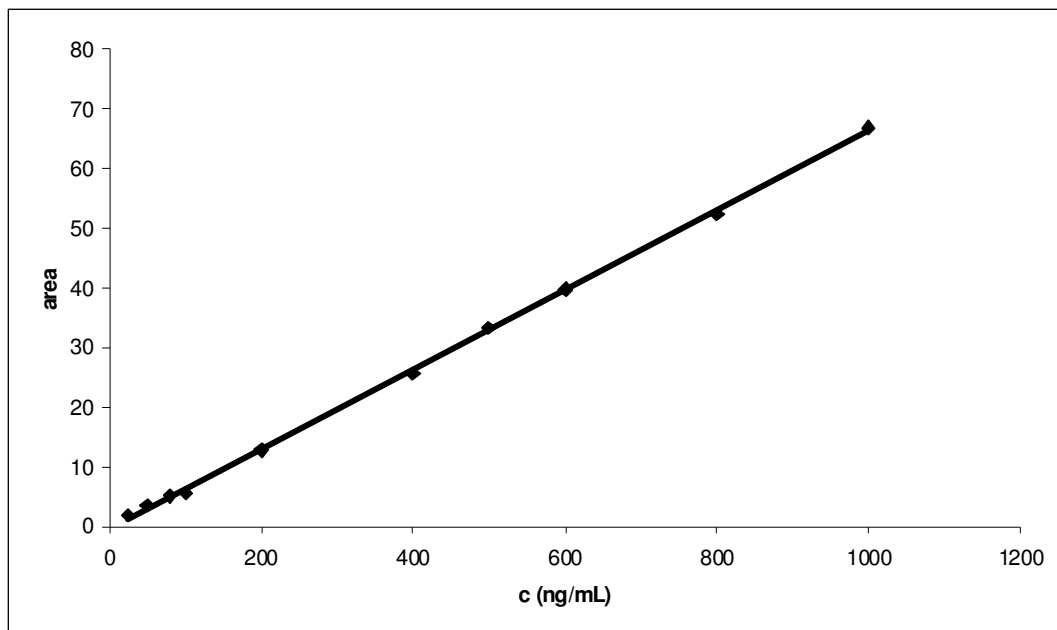


Abbildung 11: Kalibrierfunktion für DON (HPLC-System 1).

Gleichung: $y = 0,0665x - 0,2697$, Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9995$

Die Nachweisgrenze (Signal/Rauschen = 3) für DON betrug 18 ng/mL.

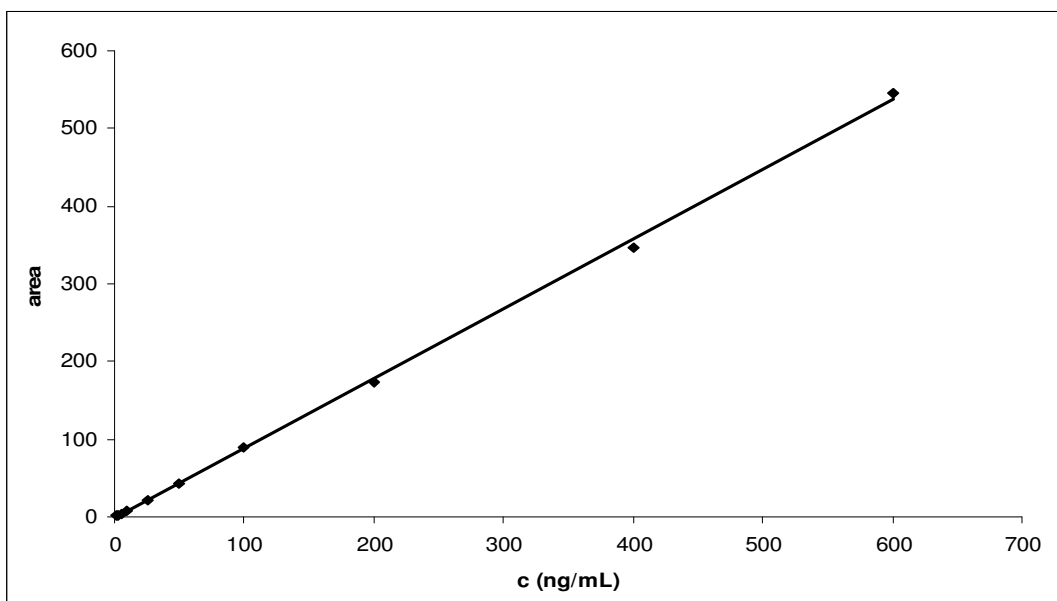


Abbildung 12: Kalibrierfunktion für ZON (HPLC-System 2).

Gleichung: $y = 0,8960x - 1,0776$, Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9993$

Die Nachweisgrenze (Signal/Rauschen = 3) für ZON betrug 1,9 ng/mL.

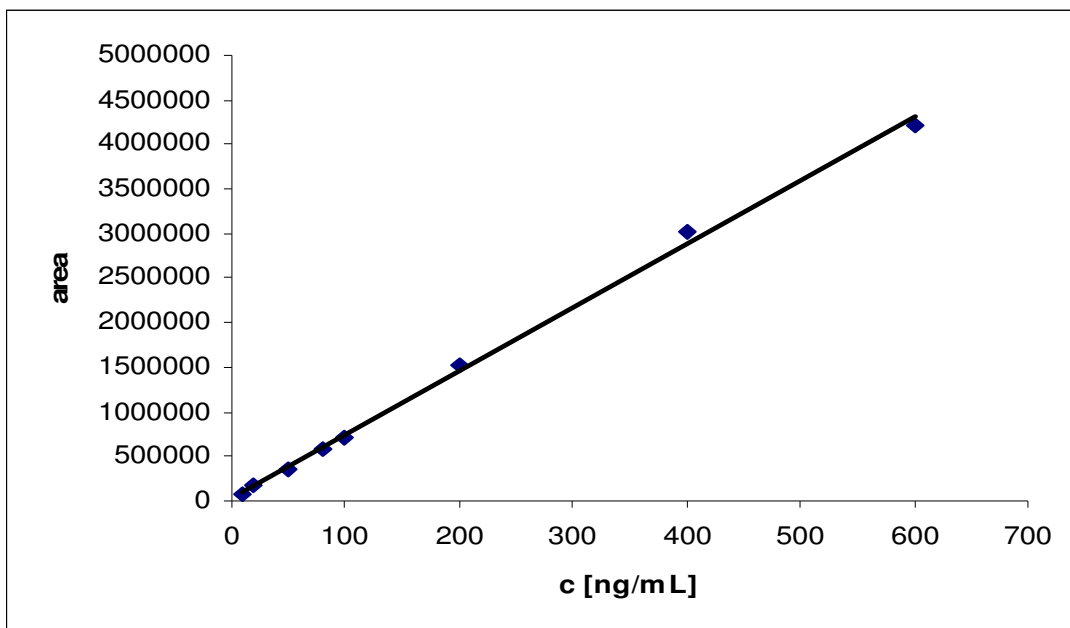


Abbildung 13: Kalibrierfunktion für DON (HPLC-System 3).

Gleichung: $y = 7142,2x + 30404$, Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9978$

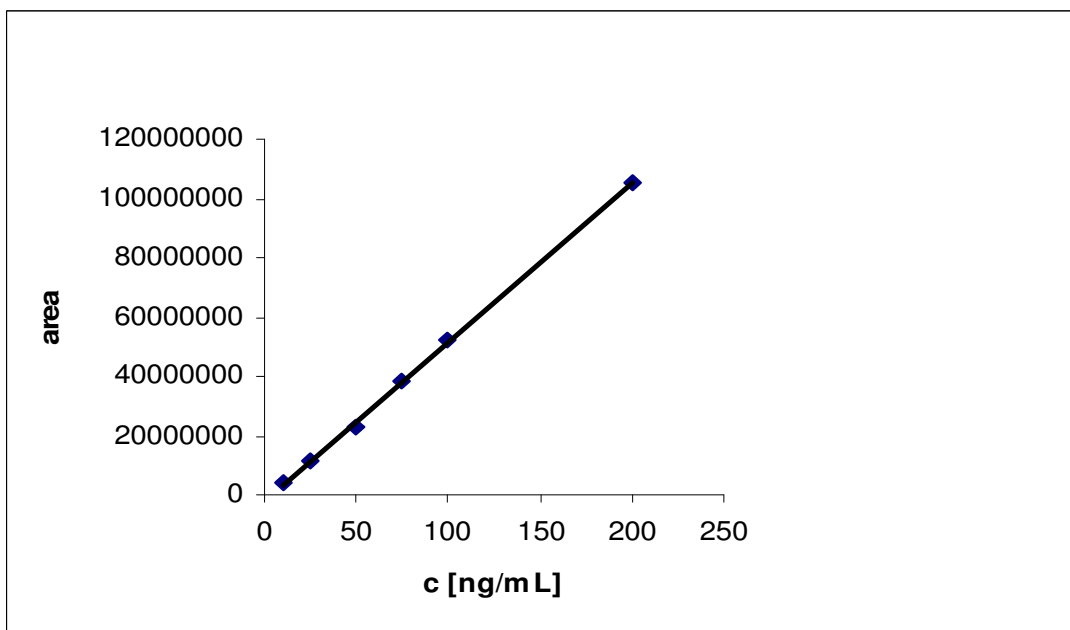


Abbildung 14: Kalibrierfunktion für ZON (HPLC-System 3).

Gleichung: $y = 536030,5x - 1935398,3$, Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9993$

Die Nachweisgrenzen (Signal/Rauschen = 3) lagen für DON und ZON bei 4 ng/mL.

6.2 Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Lebensmitteln

Ein großer Teil meiner Arbeit beschäftigte sich mit der Überprüfung der Anwendbarkeit von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen zur Probenvorbereitung von Lebensmitteln. Es wurden Lebensmittel ausgewählt, welche einen hohen Weizen- oder einen hohen Maisanteil besaßen.

Ich testete Immunaффinitätssäulen (IAS), in welche 2 mg Anti-DON AK und solche, in welche 2 mg Anti-DON AK und 1 mg Anti-ZON AK eingeschlossen worden waren, auf ihre Selektivität und ermittelte die Wiederfindungsraten für DON bzw. für DON und ZON in gespiketen Proben. Die Herstellung der IAS ist im Kapitel 5.5.2 beschrieben.

6.2.1 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil

Als Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil wurden Knäckebrot, Vollkorncornflakes und Vollkornteigwaren (siehe Tabelle 4) verwendet. Bei der Analyse der ungespiketen Proben konnte in keiner der Matrices DON nachgewiesen werden. Die homogenisierten Lebensmittelproben wurden anschließend mit 500 ng DON/g Probe bzw. 5 000 ng DON/g Probe gespiket. Nach der Extraktion mit Wasser und der Zentrifugation des Extraktes wurden Aliquote des Überstands auf vier bzw. fünf DON-IAS aufgetragen (siehe Kapitel 5.4.2 und 5.5.3.1). Je 100 µL der erhaltenen Eluate wurden in das HPLC-System 1 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2).

Tabelle 4: *Produktübersicht*

Produkt	Weizenanteil
Vollkornfleckerl	67% Hartweizengrieß
Knäckebrot Weizen	100% Weizenmehl
Cluster-Mandel-Nuss mit Vollkorn	63% Vollkornweizen

Selektivität der Methode

Ein erhaltenes Chromatogramm ist in Abbildung 15 zu sehen.

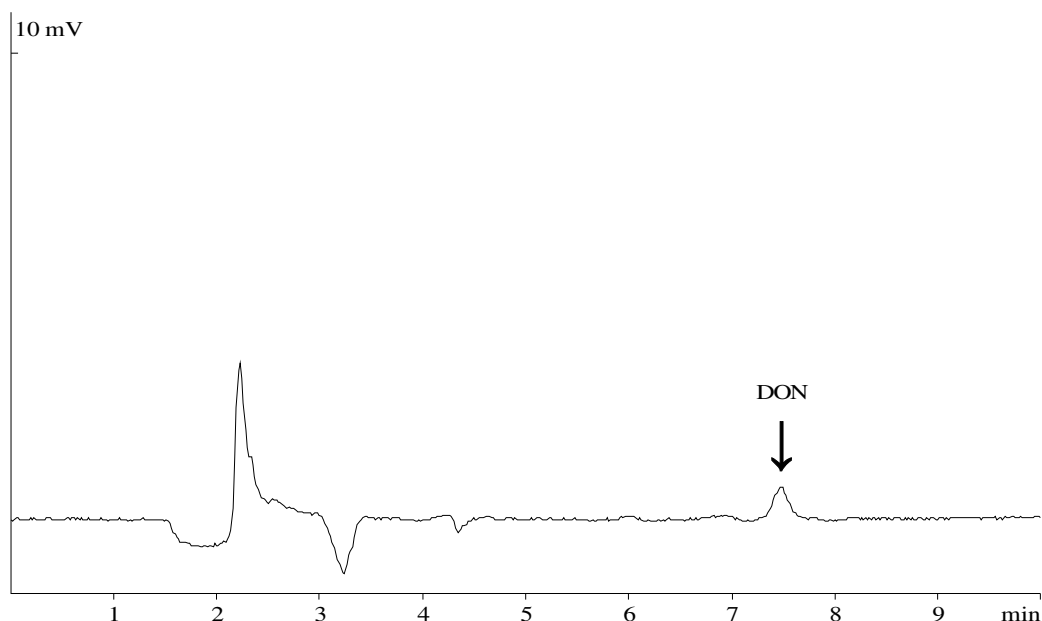


Abbildung 15: *Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von gespiketem Knäckebrot, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe.*

Die Chromatogramme der Probeneluat waren frei von jeglichen Störpeaks. Sie bestätigen die hohe Selektivität der Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie als Probenvorbereitungsmethode für Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil.

Ermittlung der Wiederfindung

In Tabelle 5 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (S) der Wiederfindungsraten aus jeweils vier bzw. fünf Bestimmungen zusammengefasst.

Tabelle 5: Wiederfindung für DON in gespiketen Lebensmitteln.

Matrix	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Clusters	500	532	107	0,52
		530		
		533		
		535		
		537		
	5 000	4290	86	0,58
		4332		
		4258		
		4314		
		4318		
Knäckebrot	500	431	89	2,42
		446		
		465		
		446		
		449		
	5 000	4136	80	3,12
		4122		
		3768		
		3902		
		4026		
Vollkornnudeln	500	534	102	3,09
		502		
		506		
		501		
	5 000	4624	94	4,29
		4471		
		4741		
		4980		

Die Tabelle 5 zeigt, dass bei beiden Spikelevels für alle Matrices gute Wiederfindungsraten ($\geq 80\%$) erzielt wurden.

Die Nachweisgrenze der Analysenmethode für DON betrug in Clusters 135 ng/g Probe, in Knäckebrot 162 ng/g Probe und in Vollkornnudeln 141 ng/g Probe.

6.2.2 Elution mit ACN

Bei kommerziell erhältlichen IAS wird die Elution des Analyten üblicherweise mit 100% ACN oder 100% MeOH durchgeführt. Für unsere Sol-Gel IAS werden ACN/Wasser Mischungen verwendet, da die Säulen für mehrere Aufarbeitungsschritte verwendet werden sollen. Im folgenden Versuch sollte jedoch geprüft werden, ob die Elution im Prinzip mit 100% ACN durchgeführt werden kann.

Dazu wurde eine Weizenmehlprobe mit DON (5 000 ng/g Probe) gespiket. Nach der Extraktion mit Wasser und der Zentrifugation des Extraktes wurden 1 mL-Aliquote des Überstands auf vier DON-IAS aufgebracht. Nach dem Waschschrift erfolgte die Elution von DON mit 4 mL 100% ACN. Das Eluat wurde in einer Fraktion zu 2 mL und zwei Fraktionen zu je 1 mL gesammelt (Tabelle 6).

Obwohl nach dem Einengen der Eluate im Stickstoffstrom und dem Auffüllen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{BD}}$ eine leichte Trübung festgestellt wurde, wurden Aliquote von 100 μL in das HPLC-System 1 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2).

Ein repräsentatives Chromatogramm ist in der Abbildung 16 dargestellt. Man sieht, dass trotz der Trübung des Eluats ein gaußförmiger Peak erhalten wurde.

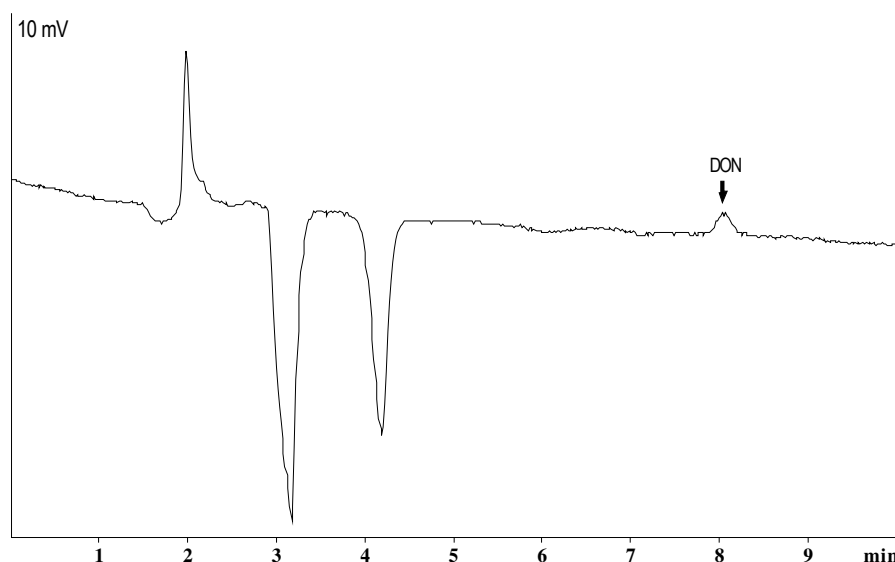


Abbildung 16: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Weizenmehlextrakts, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe, 1. Fraktion des Eluats der IAS.

Tabelle 6: *Konzentration von DON in den gesammelten Fraktionen. Elutionsmittel: 100% ACN, Spikelevel 5 000 ng DON/g Weizenprobe.*

Säule	1. Fraktion [2 mL]	2. Fraktion [1 mL]	3. Fraktion [1 mL]
	Gefundene Konzentration [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]
1	3525	614	0
2	4109	419	0
3	4359	160	0
4	4399	189	0

Tabelle 6 zeigt, dass DON nur jeweils in den ersten beiden Fraktionen der Eluate nachgewiesen werden konnte. In Tabelle 7 sind die gefundenen Gesamtkonzentrationen an DON und die Wiederfindungen in Prozent angegeben.

Tabelle 7: *Wiederfindung von DON in 4 mL Eluat (100% ACN).*

Säule	Gefundene Konzentration [ng/g]	Wiederfindung [%]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
1	4139	83	89	4,11
2	4528	91		
3	4519	90		
4	4588	92		

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass die DON-IAS mit ACN eluiert werden können und dass ein Elutionsvolumen von 3 mL 100% ACN ausreicht, um DON zu eluieren.

6.2.3 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Maisanteil

Als nächstes sollte die Anwendbarkeit der DON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Maisanteil geprüft werden. Dazu wurden Cornflakesproben mit 90% Maisanteil aufgearbeitet. Die Analyse der ungespiketen Probe zeigte, dass es sich um eine nicht kontaminierte Probe handelte. Daraufhin wurde die homogenisierte eingewogene Lebensmittelprobe mit 500 ng DON/g Probe bzw. 5 000 ng DON/g Probe gespiket. Nach der Extraktion mit Wasser und der Zentrifugation des Extraktes wurde der Überstand auf vier DON-IAS aufgetragen (siehe Kapitel 5.4.2 und 5.5.3.1). Aliquote der erhaltenen Eluate wurden in das HPLC-System 1 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

Ein Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts von gespiketen Cornflakes (Spikelevel 500ng/g) ist in Abbildung 17 dargestellt.

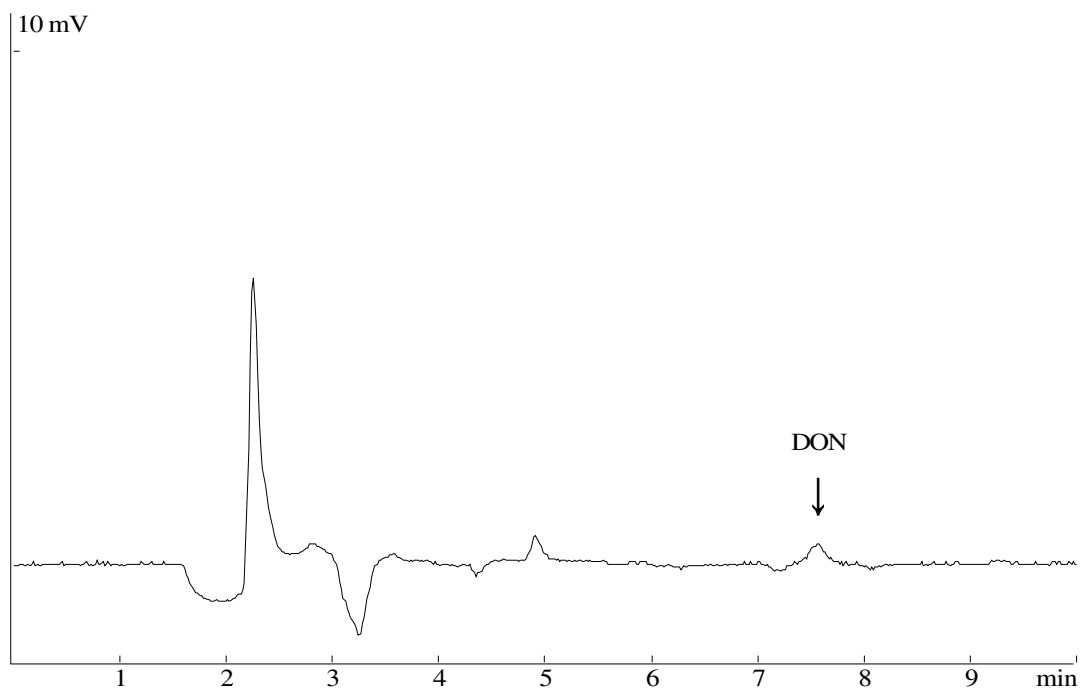


Abbildung 17: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von gespiketen Cornflakes, Spikelevel 500 ng DON/g Probe.

Das Chromatogramm demonstriert die effiziente Entfernung von Matrixkomponenten mit der DON-IAS.

Ermittlung der Wiederfindung

Die mit vier DON-IAS erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: *Wiederfindung für DON in einem Lebensmittel mit hohem Maisanteil.*

Matrix	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Cornflakes	500	431	86	0,85
		437		
		427		
		430		
	5 000	4316	86	1,15
		4318		
		4323		
		4269		

Tabelle 8 zeigt, dass sowohl beim niedrigen als auch beim hohen Spikelevel der Mittelwert der Wiederfindung 86% betrug. Die niedrigen Standardabweichungen der Wiederfindung demonstrieren die hohe Reproduzierbarkeit der Methode.

Die Nachweisgrenze der Analysemethode für DON in Cornflakes betrug 167 ng/g.

6.2.4 Anwendbarkeit der DON-ZON-IAS auf Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil

Zur Herstellung von DON-ZON-IAS wurden Anti-DON AK und Anti-ZON AK in das Sol-Gel Glas eingeschlossen (siehe Kapitel 5.5.2). Mit Hilfe dieser Säulen ist es möglich, DON und ZON in einem Aufarbeitungsschritt zu isolieren und gemeinsam zu eluieren.

Als Proben wurden Lebensmittel mit einem hohen Weizenanteil verwendet. Die Lebensmittelproben sind in der Tabelle 9 aufgelistet. Bei der Analyse der ungespiketen Proben konnte in keiner der Matrices DON oder ZON nachgewiesen werden. Die homogenisierten Proben wurden daher mit DON und ZON (500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe; bzw. 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe) gespiket.

Die Extraktion von DON und ZON erfolgte mit ACN:H₂O_{BD} (60:40, v/v). Aufgrund dieser hohen ACN Konzentration war es nicht möglich, den Probenextrakt direkt auf die DON-ZON-IAS aufzugeben. Der Extrakt musste daher verdünnt werden (siehe Kapitel 5.5.3.2). Zur gemeinsamen Elution von DON und ZON wurde ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) verwendet. Aliquote der Eluate wurden in die HPLC-Systeme 1, 2 und 3 injiziert (siehe in den Kapiteln 5.6.2 bis 5.6.4).

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Lebensmittel.

Produktname	Weizenanteil
Nuss-Müsli, aus ökolog. Landwirtschaft	35% Weizenvollkornflocken
Cluster-Mandel-Nuss, mit Vollkorn	63% Vollkornweizen
Corny-Snack, Schoko/Banane	13% Weizen

Selektivität der Methode

Die hohe Selektivität der Probenvorbereitungsmethode konnte durch die erhaltenen Chromatogramme (siehe Abbildung 18 und 19) bestätigt werden.

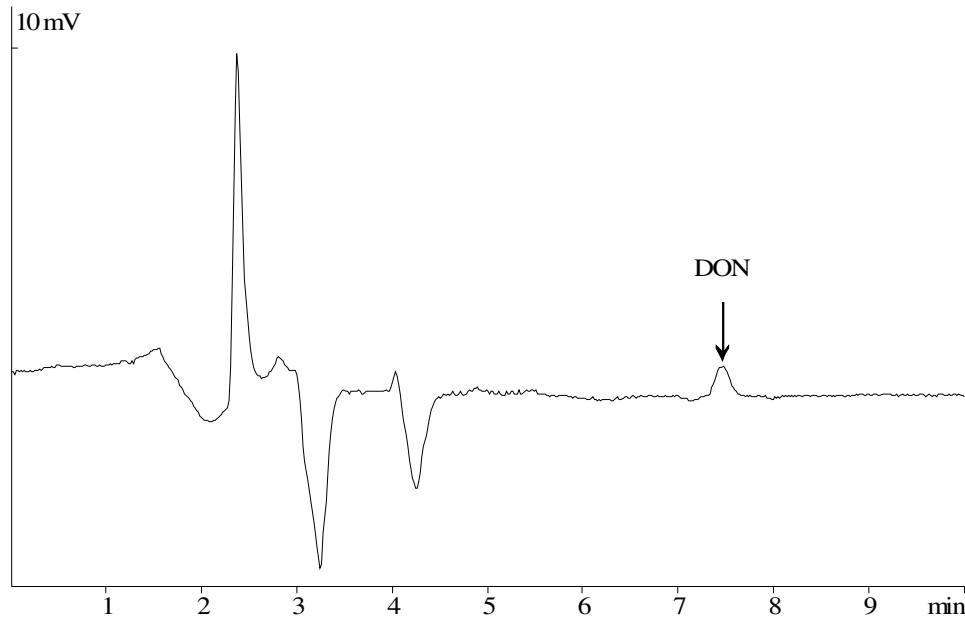


Abbildung 18: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Clusters-Mandel-Nuss, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe.

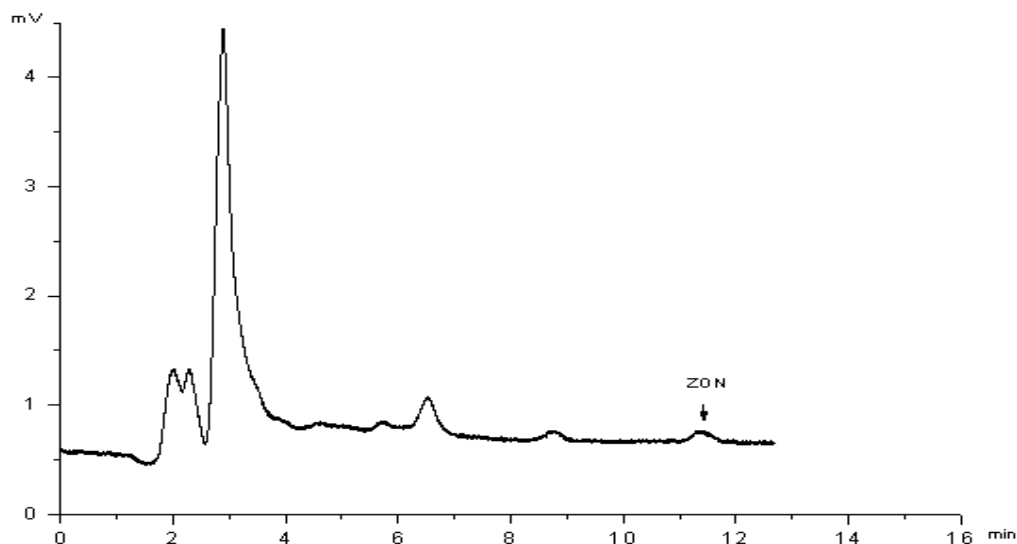


Abbildung 19: Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts von Corny-Snack, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

Aus den gefundenen DON- und ZON-Konzentrationen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindung für DON und ZON berechnet (siehe Tabelle 10 und 11).

Tabelle 10: *Wiederfindung für DON in mit DON und ZON gespiketen Lebensmitteln mit hohem Weizenanteil.*

Matrix	Spikelevel DON [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Clusters	500	508	103	1,65
		521		
		509		
		524		
	5 000	3628	73	1,02
		3621		
		3732		
		3647		
Corny	500	477	97	4,09
		471		
		513		
		471		
	5 000	3569	72	0,70
		3600		
		3653		
		3603		
Müsli	500	439	81	6,31
		377		
		398		
		3087	56	9,75
	5 000	3075		
		2237		

Die Nachweisgrenze für DON lag in Clusters bei 350 ng/g Probe, in Corny bei 371 ng/g Probe und im Müsli bei 444 ng/g Probe.

Tabelle 11: Wiederfindung für ZON in mit DON und ZON gespiketen Lebensmitteln mit hohem Weizenanteil.

Matrix	Spikelevel ZON [ng/g]	Gefundene Konzentrationen [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Clusters	50	51	103	3,44
		50		
		53		
		53		
	100	99	100	1,33
		98		
		100		
Corny	50	101	111	2,97
		56		
		56		
		53		
	100	56	100	1,18
		101		
		100		
Müsli	50	98	103	1,52
		101		
		52		
		52		
	100	51	104	1,12
		50		
		106		
		103		
		104		

Die Nachweisgrenzen der Analysenmethode für ZON betrug in Clusters 36 ng/g Probe, in Corny 33 ng/g Probe und im Müsli 36 ng/g Probe.

Beim niedrigen Spikelevel lagen die Wiederfindungsraten für DON zwischen 81 und 103%, wobei hingegen für die höher gespiketen Proben nur Wiederfindungsraten von 56 bis 73% erhalten wurden. Im Unterschied dazu waren die Ergebnisse für ZON sehr gut. Bei beiden Spikelevels wurden Wiederfindungsraten um 100% erhalten.

6.2.5 LC-MS Messung einer mit DON und ZON gespiketen Lebensmittelprobe mit hohem Weizenanteil

Zur Absicherung der mittels HPLC-UV und HPLC-FL Detektion erhaltenen Ergebnisse wurde eine mit DON und ZON gespikete Cluster-Mandel-Nuss Probe (Spikelevel 500ng DON/g Probe bzw. 50 ng ZON/g Probe oder 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe) aufgearbeitet (siehe Kapitel 5.4.3 und 5.5.3.2) und mittels LC-MS (HPLC-System 3) (siehe Kapitel 5.6.4) im negativen Modus analysiert.

Selektivität der Methode

In Abbildung 20 ist ein repräsentatives Chromatogramm eines mit DON und ZON gespiketen Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss im Scan-Modus zu sehen.

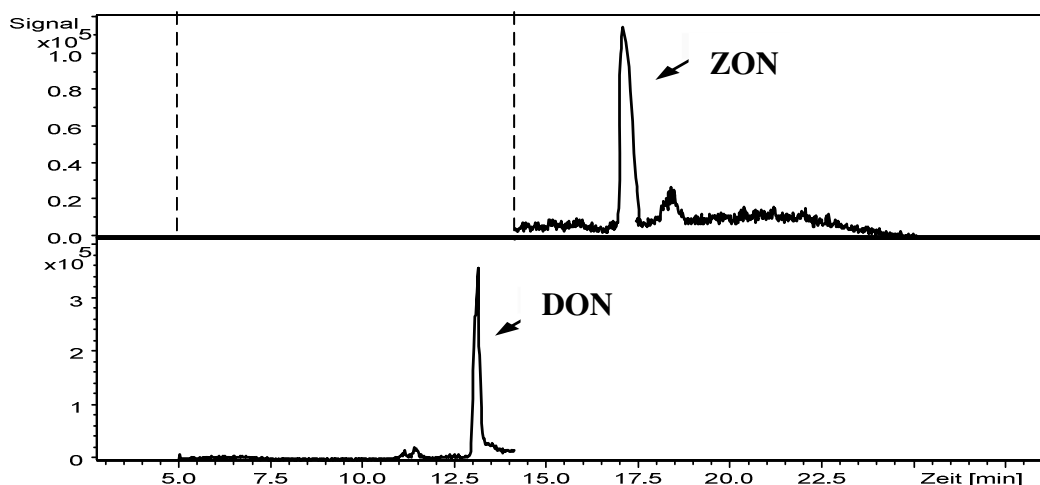


Abbildung 20: Chromatogramm (HPLC-System 3) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

Abbildung 21 und 22 zeigen die Massenspektren für DON und ZON. Das Hauptsignal $[M-H]^-$ von DON lag bei m/z 295 und von ZON bei m/z 317, bei den restlichen Signalen handelte es sich um Fragmentationen von DON und ZON.

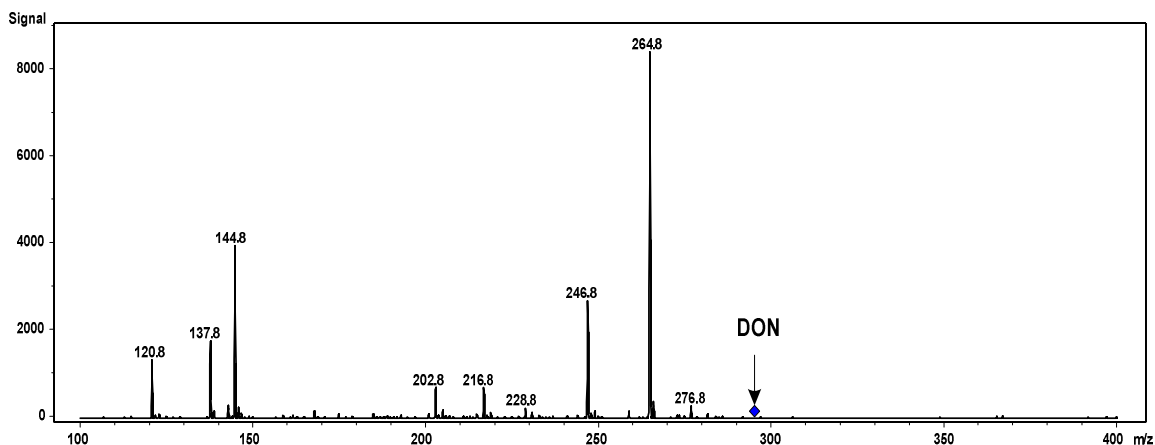


Abbildung 21: Massenspektrum für DON (EIC, $m/z=295$) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

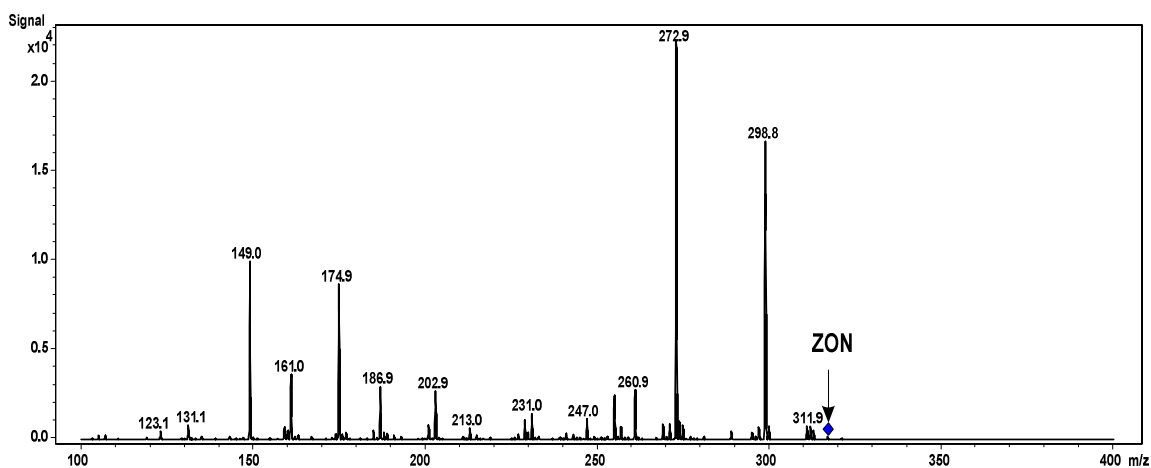


Abbildung 22: Massenspektrum für ZON (EIC, $m/z=317$) eines aufgearbeiteten Extrakts von Cluster-Mandel-Nuss, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

An Hand der Retentionszeiten (t_R DON: 12,6 min; t_R ZON: 17,4 min) und der molekularen Massen $[M-H]^-$ von DON ($m/z=295$) und ZON ($m/z=317$) konnte eine exakte Identifizierung der beiden Verbindungen erfolgen.

Ermittlung der Wiederfindung:

Die quantitativen Ergebnisse der LC-MS Messungen sind in Tabelle 12 A und B zusammengefasst.

Tabelle 12: *Quantitative Bestimmung von DON und ZON in einer Cluster-Mandel-Nuss Probe mittels LC-MS (HPLC-System 3).*

A. DON

Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Wiederfindung [%]	Mittelwert Wiederfindung [%]
500	484	97	96
	480	96	
5 000	4986	100	100
	5005	100	

B. ZON

Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Wiederfindung [%]	Mittelwert Wiederfindung [%]
50	51	102	103
	52	105	
100	125	125	123
	120	120	

Die Wiederfindung für DON lag bei 100%, für ZON wurde eine etwas höhere Wiederfindung erhalten.

Die Nachweisgrenze der Analysenmethode für DON lag bei 83 ng/g Probe und für ZON bei 78 ng/g Probe. Somit konnte durch die LC-MS Messungen die hohe Leistungsfähigkeit und Selektivität der Sol-Gel IAS als Probenvorbereitungsmethode bestätigt werden.

6.2.6 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Babynahrung

Die europäische Gesetzgebung sieht im Bezug auf die Höchstmenge von DON in Babynahrung (200 µg/kg in verarbeiteten Säuglings- und Kindernahrungsprodukten) eine sehr strenge Regelung vor [R-BIOPHARM, 2007; STROKA et al., 2006]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Babykekse analysiert, um die Selektivität der IAC, die Wiederfindung und die Nachweisgrenze der Methode zu bestimmen.

Bei der vorangegangenen Analyse der ungespiketen Probe konnte DON nicht nachgewiesen werden. Die Probe wurde daraufhin homogenisiert, eingewogen, gespiket (Spikelevel 500 ng DON/g Probe oder 5 000 ng DON/g Probe) extrahiert und der Extrakt anschließend auf die DON-IAS aufgebracht. Die Durchführung ist in den Kapiteln 5.4.2 und 5.5.3.1 beschrieben. Aliquote von 100 µL wurden in das HPLC-System 1 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

In Abbildung 23 ist das Chromatogramm eines aufgearbeiteten Extrakts von mit 5 000 ng DON/g gespiketen Babykeksen zu sehen.

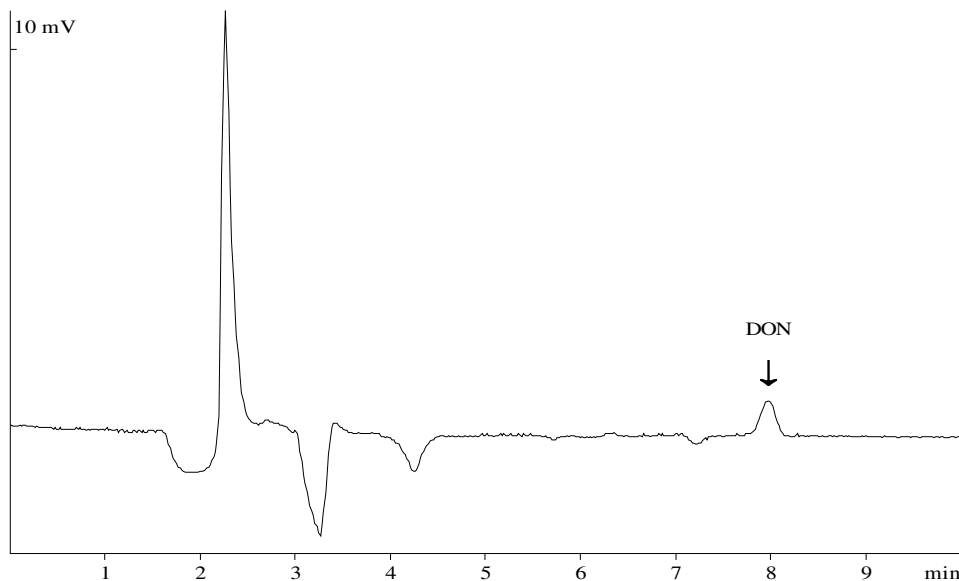


Abbildung 23: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Babykeksen, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe.

Das Chromatogramm ist frei von Peaks von störenden Matrixkomponenten und demonstriert die hohe Selektivität der Aufarbeitung mit der DON-IAS.

Ermittlung der Wiederfindung

Die Extrakte der gespikten Probe wurden auf je vier DON-IAS aufgetragen. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungsraten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: *Wiederfindung für DON in mit DON gespiketen Babykekzen.*

Matrix	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentrationen [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Babykekse	500	493	98	0,93
		490		
		490		
		500		
	5 000	4834	96	0,50
		4815		
		4839		
		4784		

Der Mittelwert der Wiederfindung für DON betrug beim niedrigen Spikelevel 98% und beim hohen Spikelevel 96%.

Als Nachweisgrenze der Analysenmethode wurde für DON in Babykekzen 147 ng/g Probe ermittelt.

6.2.7 Anwendbarkeit der DON-ZON IAS auf Babynahrung

Gemäß der europäischen Gesetzgebung beträgt die Höchstmenge für ZON in verarbeiteten Säuglings- und Kindernahrungsprodukten 20 µg/kg [R-BIOPHARM, 2007; STROKA et al., 2006]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 14 angegebenen Produkte analysiert, um die Anwendbarkeit der DON-ZON IAS zur Aufarbeitung von Babynahrung prüfen zu können.

Bei der Analyse der ungespiketen Babynahrungsproben konnte DON oder ZON nicht nachgewiesen werden. Ich arbeitete homogenisierte, mit DON und ZON (500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe; bzw. 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe) gespikete Babynahrungsmittel auf. Die Extraktion wurde mit ACN:H₂O_{BD} (60:40, v/v) durchgeführt (siehe Kapitel 5.4.3). Nach dem Verdünnen des Probenextrakts wurde ein Aliquot auf die DON-ZON IAS aufgetragen und beide Analyte gemeinsam mit ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) (siehe Kapitel 5.5.3.2) eluiert. Aliquote wurden in das HPLC-System 1 und 2 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2 und 5.6.3).

Tabelle 14: Übersicht über die analysierte Babynahrung.

Produktname	Weizenanteil
Aptamil-Milch-Getreidebrei	31,5% Weizengrieß
Babykekse	34% Weizenmehl
Milupa-Kinderzwieback	72,2% Weizenmehl

Selektivität der Methode

Die erhaltenen Chromatogramme (siehe Abbildung 24 und 25) zeigen die hohe Selektivität der DON-ZON IAS.

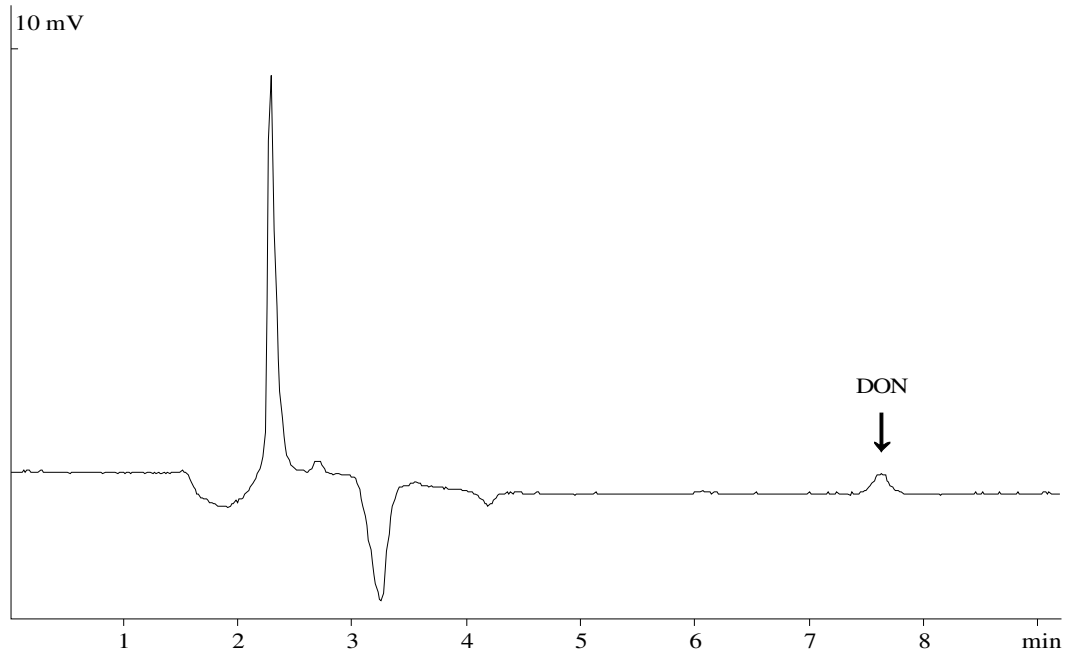


Abbildung 24: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Kinderzwieback, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

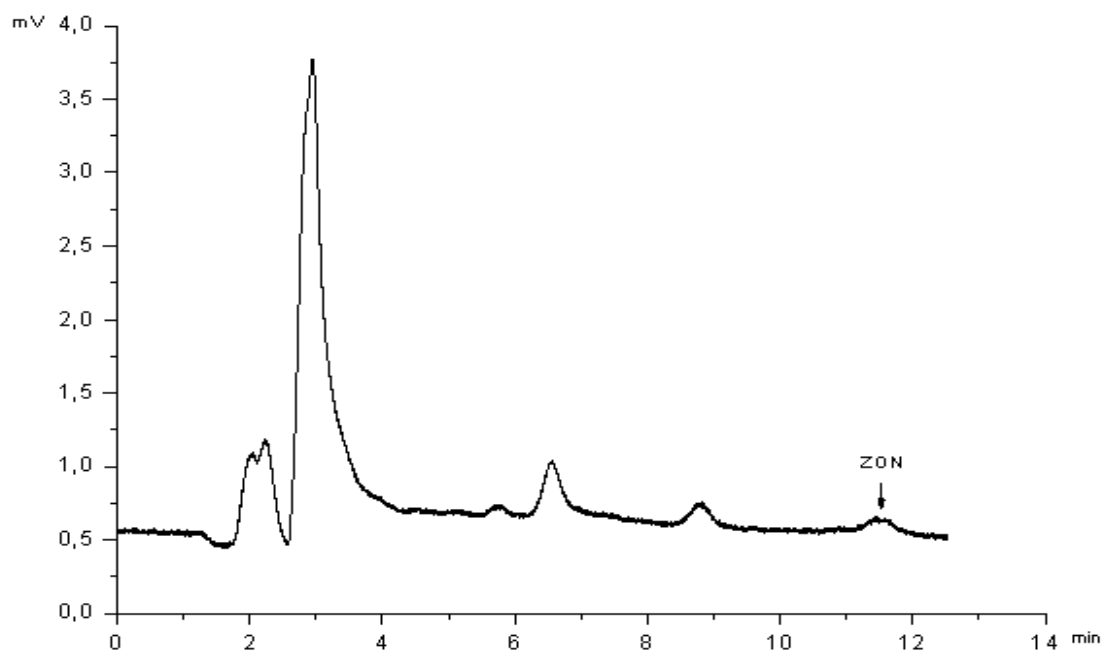


Abbildung 25: Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts von Babybrei, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

Die Tabelle 15 fasst die gefundenen Konzentrationen, die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungsraten von mit DON und ZON gespiketen (Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe; bzw. 5 000 ng DON/g Probe und 100 ng ZON/g Probe) und mittels vier DON-ZON IAS aufgearbeiteten Babynahrungsproben.

Bei einem Spikelevel von 500 ng DON/g Probe wurden Wiederfindungsraten von $\geq 95\%$ erzielt. Bei dem höheren Spikelevel (5 000 ng DON/g Probe), welcher um einen Faktor 25 höher lag als die in Babynahrung erlaubte Höchstmenge (200 ng DON/g), wurden jedoch nur Wiederfindungsraten von 64 bis 68% erhalten. Für ZON wurden sowohl beim niedrigen (Spikelevel 50 ng ZON/g Probe) als auch beim hohen Spikelevel (100 ng ZON/g Probe) sehr hohe Wiederfindungen erhalten (86 bis 100%).

Die Nachweisgrenzen der Analysenmethode für DON betrug im Milch-Getreidebrei 379 ng/g Probe und im Kinderzwieback 363 ng/g Probe.

Die Nachweisgrenzen für ZON lagen im Milch-Getreidebrei bei 34 ng/g und im Kinderzwieback bei 39 ng/g Probe. Die Nachweisgrenzen der Analysenmethode für DON überschritten die somit gesetzlich festgelegte Höchstmenge von 200 µg DON/kg in verarbeiteten Säuglings- und Kindernahrungsprodukten. Um die Analysenmethoden an Babynahrungsprodukten anwenden zu können, müsste die Nachweisgrenze für DON weiter gesenkt werden, indem ein größeres Aliquot des Extrakts auf die IAS aufgegeben wird.

Tabelle 15: Wiederfindung für DON und ZON in mit DON und ZON gespiketen Babynahrungsproben.

Matrix	Spikelevel DON [ng/g]	Gefundene Konzentration DON [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung DON [%]	S Wiederfindung [%]	Spikelevel ZON [ng/g]	Gefundene Konzentration ZON [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung ZON [%]	S Wiederfindung [%]
Milch- Getreide- brei	500	482	95	2,16	50	54	109	1,09
		465				54		
		467				55		
		486				54		
	5 000	3225	64	0,42	100	102	103	1,80
		3185				103		
		3177				102		
		3201				106		
Kinder- zwieback	500	491	99	1,09	50	44	86	2,48
		502				43		
		494				41		
	5 000	3403	68	1,82	100	104	99	1,01
		3424				102		
		3441				103		
		3244				102		

6.3 Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Futtermitteln

Als Futtermittel wurde sowohl eine Maisprobe als auch Schlempe analysiert. Schlempe ist als schwierig zu analysierende Probenmatrix bekannt. Trockenschlempe ist ein Nebenprodukt der Biokraftstofferzeugung und wird auf Grund seines hohen Proteingehaltes häufig als Futtermittel eingesetzt. Schlempe aus Mais oder Getreide weist einen durchschnittlichen Rohproteingehalt von 31% auf [AGES, 2005]. Trockenschlempe ist jedoch sehr häufig mit hohen Gehalten an Mykotoxinen belastet, welche durch die Verfütterung an die Tiere weiter in die Nahrungskette des Menschen gelangen können.

6.3.6 Anwendbarkeit der DON-IAS auf Maisproben

Bei der Analyse der ungespiketen Maisprobe konnten weder DON noch ZON nachgewiesen werden.

Ich arbeitete eine gespikete (Spikelevel 500 ng DON/g Probe oder 5 000 ng/g Probe) Maisprobe mit vier DON-IAS auf (siehe Kapitel 5.4.2 und 5.5.3.1) und injizierte 100 µL-Aliquote der Eluate in das HPLC-System 1 (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

Ein Chromatogramm der mit einer DON-IAS aufgearbeiteten Maisprobe ist in Abbildung 26 dargestellt.

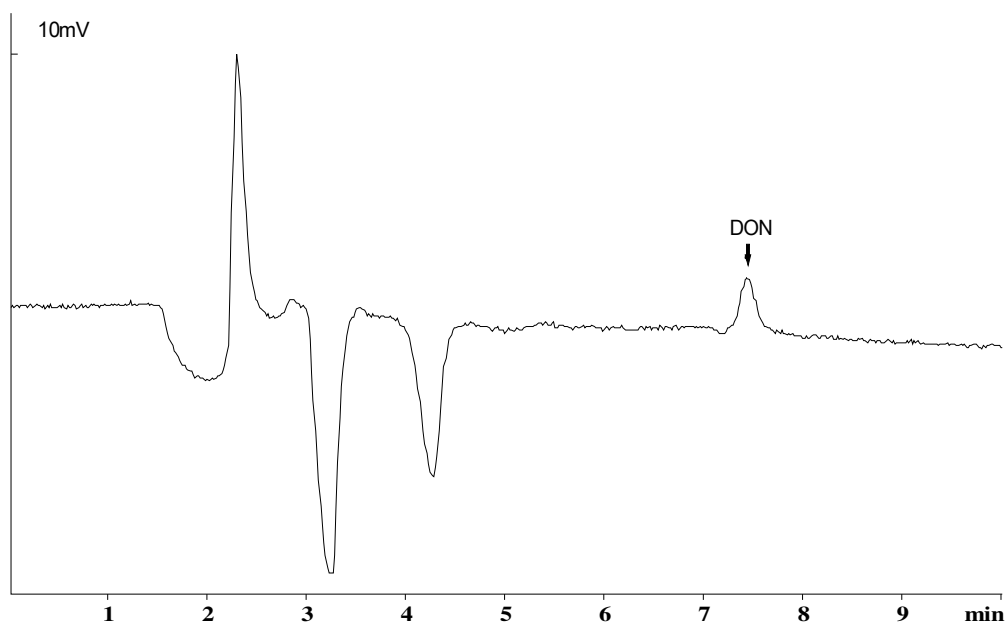


Abbildung 26: *Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Maisextrakts, Spikelevel 5 000 ng DON/g Probe.*

Die erhaltenen Chromatogramme waren frei von störenden Matrixpeaks.

Ermittlung der Wiederfindung

In Tabelle 16 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungsraten für die mit vier DON-IAS aufgearbeitete Maisprobe zusammengefasst.

Tabelle 16: Wiederfindung für DON in einer Maisprobe.

Matrix	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
Mais	500	461	91	1,01
		452		
		452		
		461		
	5 000	4576	93	3,41
		4479		
		4665		
		4879		

Die Wiederfindung für DON war bei beiden Spikelevels $\geq 91\%$. Die niedrigen Standardabweichungen von 1,0 und 3,4% demonstrieren die hohe Reproduzierbarkeit der Methode.

Die Nachweisgrenze für DON in der Maisprobe betrug 158 ng/g.

6.3.7 Anwendbarkeit der DON-ZON IAS auf Schlempe

Die Ergebnisse der Analyse der ungespiketen Schlempe wiesen auf eine Kontamination mit DON und ZON hin.

Ich führte Spikeversuche (Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe) mit einer homogenisierten Schlempeprobe durch. Die Extraktion von DON und ZON erfolgte mit ACN:H₂O_{BD} (60:40, v/v) (siehe Kapitel 5.4.3). Aliquote des Probenextrakts wurden auf vier DON-ZON IAS aufgebracht und anschließend wurden DON und ZON mit ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v), wie in Kapitel 5.5.3.2 beschrieben, eluiert. Aliquote der Eluate wurden in die HPLC-Systeme 1 und 2 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2 und 5.6.3).

Selektivität der Methode

An Hand der erhaltenen Chromatogramme konnte die hohe Selektivität der Methode bestätigt werden (siehe Abbildung 27, 28 und 29).

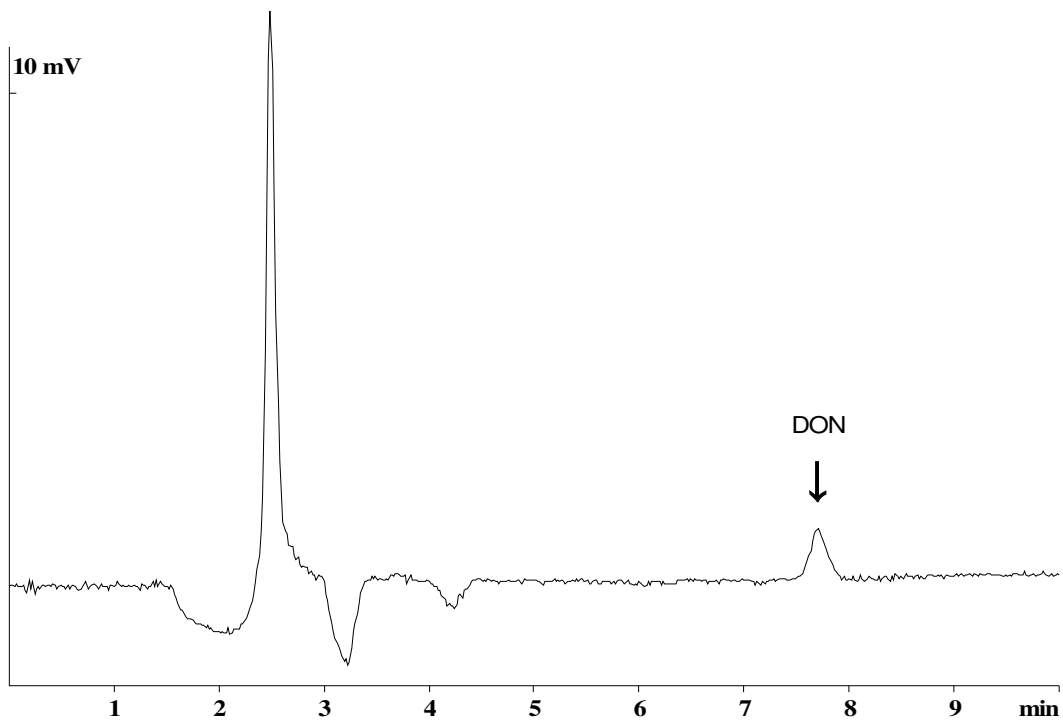


Abbildung 27: *Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts der ungespiketen Schlempe.*

Trotz der komplexen Probenmatrix wiesen die Chromatogramme keine Peaks von störenden Matrixkomponenten auf.

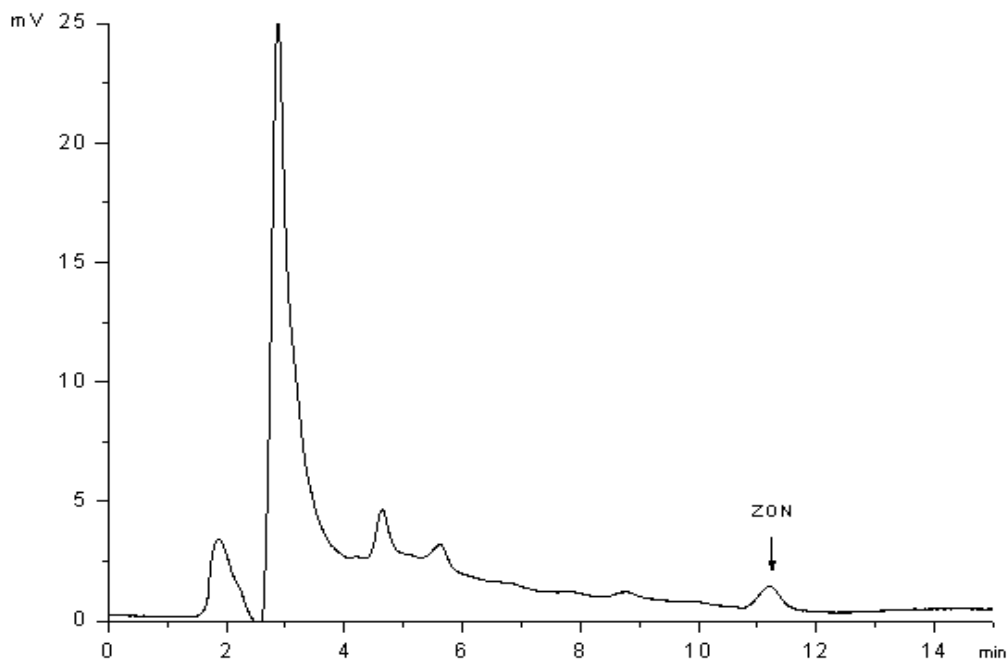


Abbildung 28: Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts der ungespiketen Schlempe.

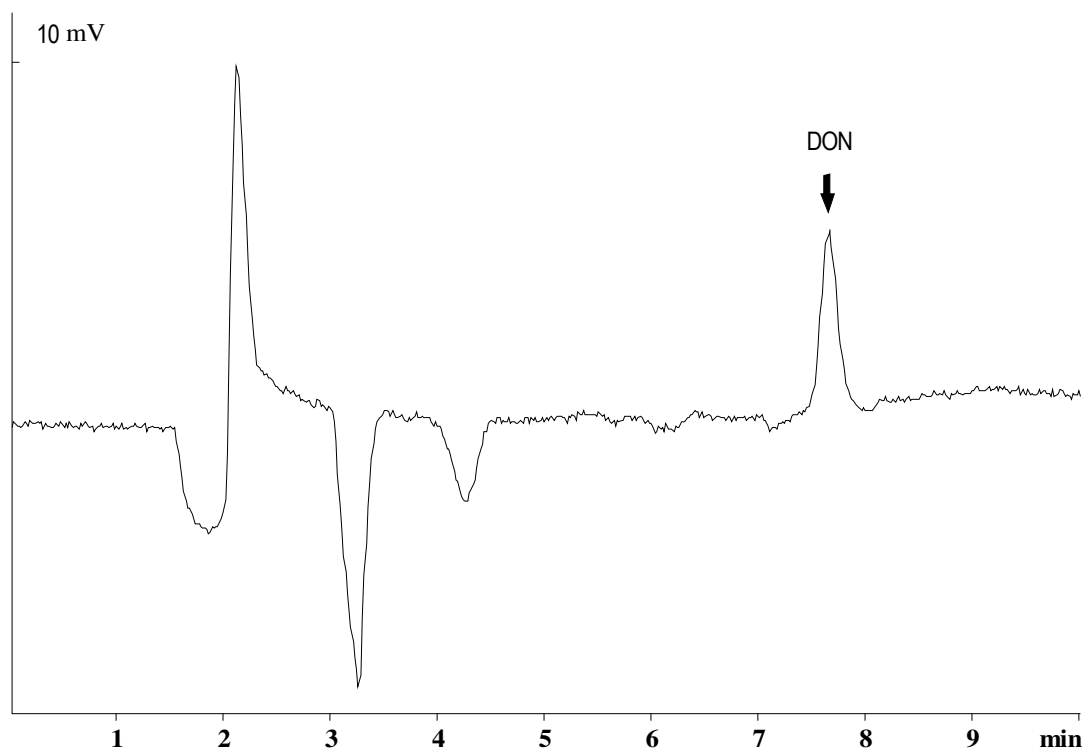


Abbildung 29: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von Schlempe, Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

In Tabelle 17 A und B sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindung zusammengefasst, die bei der Analyse der mit DON und ZON gespiketen (Spikelevel 500 ng DON/g Probe und 50 ng ZON/g Probe) Schlempeprobe ermittelt wurden.

Tabelle 17: *Wiederfindung in einer mit DON und ZON gespiketen, natürlich kontaminierten Schlempeprobe.*

A. DON

Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
0	1785	-	-
500	2658	97	3,40
	3097		
	3060		
	2279		
	3124		
	3601		
	3537		

B. ZON

Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Mittelwert Wiederfindung [%]	S Wiederfindung [%]
0	337	-	-
50	320	141	23
	449		
	481		
	387		
	402		
	528		
	542		

Die kontaminierte Probe war stark mit DON und ZON belastet. Bei der Bestimmung von DON konnten gute Ergebnisse erzielt werden, der Mittelwert der Wiederfindung betrug 97%. Die Wiederfindungsraten für ZON waren zu hoch und streuten stark. Die Standardabweichung der Wiederfindung war viel höher als bei den vorangegangenen Versuchen mit Lebensmittelproben. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Analysemethode zur Bestimmung von ZON in Schlempe nicht geeignet ist und daher modifiziert werden müsste.

6.4 Anwendbarkeit der Sol-Gel IAS zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von DON und ZON in Umweltproben

Seit langem wird in der Mykotoxinanalytik das Hauptaugenmerk auf mit Mykotoxinen belastete Lebensmittel und Futtermittel gelegt. Erst vor kurzem wurde auf die Problematik der Mykotoxine als Mikrokontaminanten in Wasser hingewiesen. Mykotoxine können durch landwirtschaftliche Nutzung des Bodens in angrenzende Gewässer gelangen [BUCHELI et al., 2008].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit der Sol-Gel IAS zur Isolierung von DON und ZON aus Boden- und Wasserproben getestet.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit DON-IAS und ZON-IAS. Die Herstellung der Säulen ist in dem Kapitel 5.5.2 beschrieben.

6.4.6 Bestimmung von DON in Bodenproben

Die verwendeten Bodenproben stammten aus einem Überschwemmungsgebiet (Probe 1) und von einem Ackerboden (Probe 2) in Oberösterreich. Da die Proben im Frühjahr gezogen wurden und der Boden noch nicht bearbeitet worden war, lag die Vermutung nahe, dass es sich um nicht kontaminierte Proben handelte. Dies konnte durch die Analyse der ungespiketen Proben bestätigt werden.

Die Bodenproben wurden mit DON gespiket (500 ng/g), eine halbe Stunde stehen gelassen und im Anschluss wie Lebensmittel extrahiert (siehe Kapitel 5.4.2). Aliquote der Extrakte wurden auf zwei DON-IAS aufgetragen (siehe Kapitel 5.5.3.1) und die Eluate im Anschluss mittels des HPLC-Systems 1 analysiert (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

Abbildung 30 zeigt das Chromatogramm einer gespiketen und aufgearbeiteten Bodenproben.

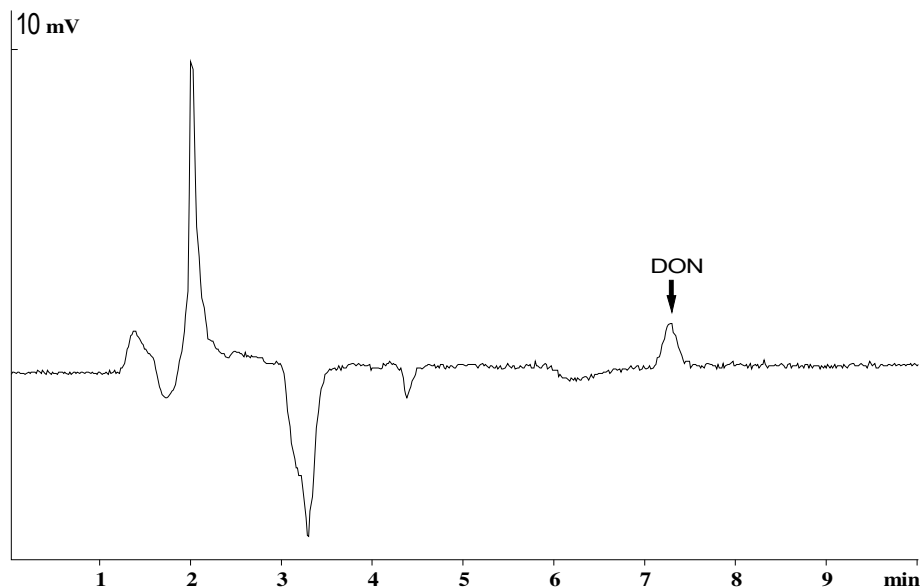


Abbildung 30: Chromatogramm (HPLC-System 1) eines aufgearbeiteten Extrakts von einer Bodenprobe, Spikelevel 500 ng/g Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

Die erhaltenen Analysenergebnisse für DON in den gespiketen Bodenproben sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Wiederfindung von DON in zwei mit DON gespiketen Bodenproben

Probe	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Wiederfindung [%]	Mittelwert [%]
1	500	302	60	62
		314	63	
2	500	251	50	52
		271	54	

Die Wiederfindung für DON in den beiden Bodenproben lag nur zwischen 50 und 63%. Eine Ursache für die niedrigen Ausbeuten könnte sein, dass DON an den Bodenpartikeln adsorbiert wurde.

6.4.7 Bestimmung von ZON in einer Bodenprobe

Zur Bestimmung von ZON wurde die Bodenprobe aus dem Überschwemmungsgebiet (Probe 1) verwendet. Die vorangegangene Analyse der ungespiketen Probe bestätigte die Vermutung, dass die Bodenprobe kein ZON enthielt. Die eingewogene Probe wurden mit ZON gespiket (Spikelevel 50 ng/g Probe) und eine halbe Stunde stehen gelassen. Die Probe wurde danach extrahiert und auf drei ZON-IAS aufgetragen (siehe Kapitel 5.4.4 und 5.5.3.3). ZON wurde mit ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) eluiert. Je 100 µL wurden in das HPLC-System 2 injiziert (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

Auch die für ZON erhaltenen Chromatogramme waren frei von störenden Matrixpeaks. Ein bei der Analyse erhaltenes Chromatogramm ist in Abbildung 31 dargestellt.

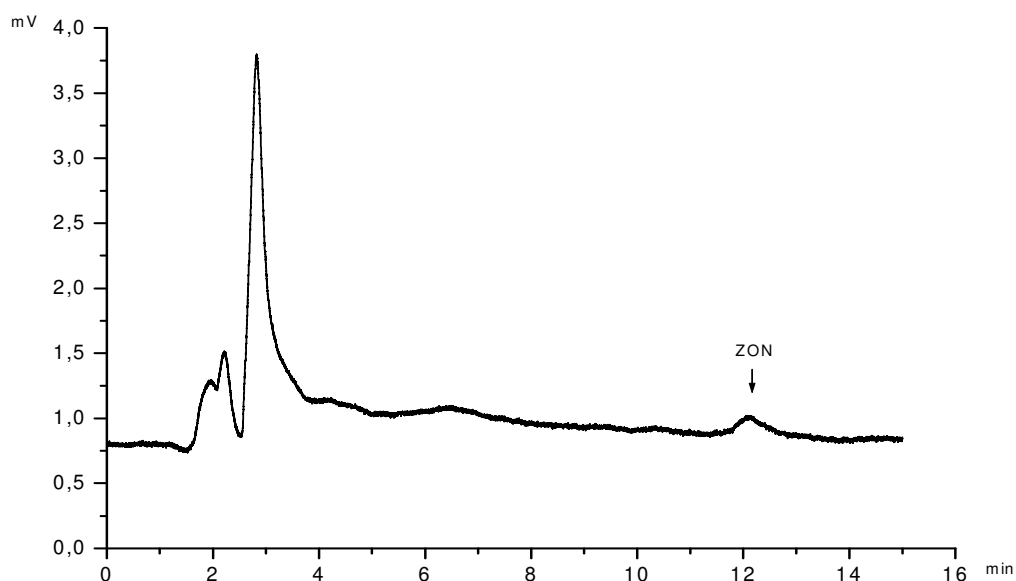


Abbildung 31: Chromatogramm (HPLC-System 2) eines aufgearbeiteten Extrakts einer Bodenprobe (Probe 1), Spikelevel 50 ng/g Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

Die erhaltenen Wiederfindungsraten für ZON, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Wiederfindung von ZON in einer mit ZON gespiketen Bodenprobe.

Probe	Spikelevel [ng/g]	Gefundene Konzentration [ng/g]	Wiederfindung [%]	Mittelwert [%]	S [%]
1	50	17,78	18	16	1,53
		16,36	16		
		15,32	15		

Der Mittelwert der Wiederfindung betrug nur 16%. Da die mit Hilfe einer Standardlösung getestete Bindungskapazität der IAS bei 90% lag, könnte eine

Adsorption von ZON an Bodenpartikel als Ursache für die niedrige Wiederfindung in Betracht gezogen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode, so wie sie für Lebensmittel entwickelt und optimiert wurde, nicht ohne Modifikation auf Bodenproben anwendbar ist.

6.4.8 Bestimmung von DON in einer Wasserprobe

Die verwendete Wasserprobe stammte aus einem Seitenarm der Donau und wurde in Klosterneuburg gezogen. Vorangegangene Analysen der ungespiketen Probe zeigten, dass sie nicht mit DON belastet war. Die Wasserprobe wurde mit 100 ng/mL DON gespiket (siehe Kapitel 5.4.5), eine Stunde stehen gelassen, filtriert (Nylon-Membran, Porengröße 0,45 µm x 47 mm) und ein Aliquot auf die DON-IAS aufgebracht. Die Bestimmung der Konzentration von DON im Eluat erfolgte mittels des HPLC-Systems 1 (siehe Kapitel 5.6.2).

Selektivität der Methode

Eines der bei der Analyse der Wasserprobe erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 32 zu sehen. Das Chromatogramm demonstriert die hohe Selektivität der IAS bei der Aufarbeitung von Wasserproben.

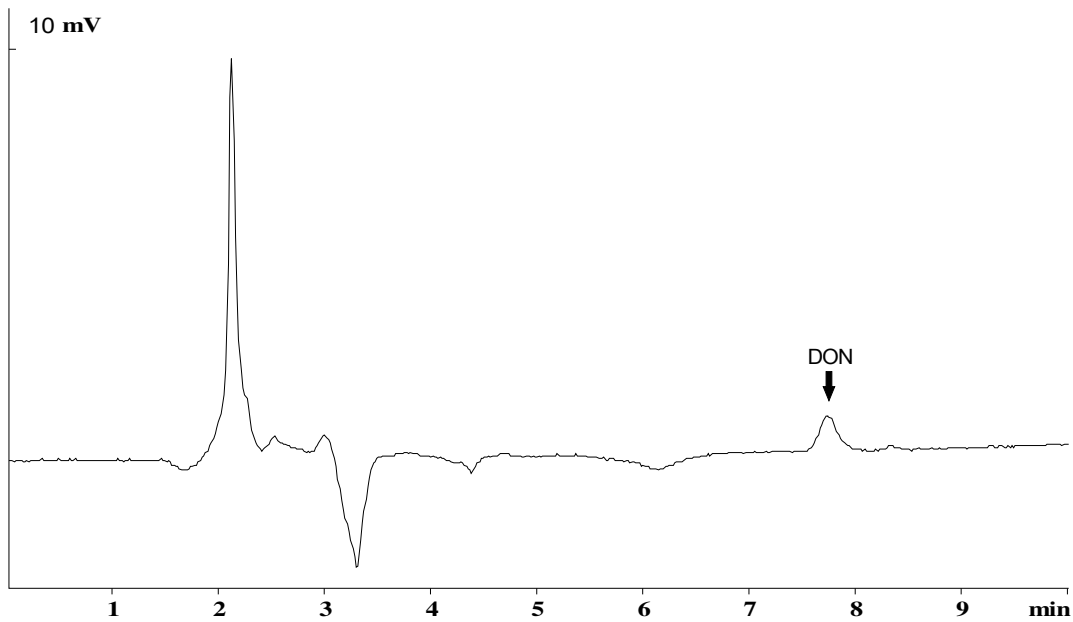


Abbildung 32: Chromatogramm (HPLC-System 1) der aufgearbeiteten Wasserprobe, Spikelevel 100 ng/mL Probe.

Ermittlung der Wiederfindung

Die Wiederfindung für DON sind in Tabelle 20 aufgegeben.

Tabelle 20: Wiederfindung von DON in einer mit DON gespiketen Wasserprobe.

Probe	Spikelevel [ng/mL]	Gefundene Konzentration [ng/mL]	Wiederfindung [%]	Mittelwert [%]	S [%]
1	100	92,97	93	88	8,66
		78,19	78		
		92,64	93		

Die Wiederfindung (siehe Tabelle 20) lag zwischen 78 und 93%. Der Mittelwert der Wiederfindung betrug 88%. Die angewendete Methode ist daher zur Bestimmung von DON in Wasserproben geeignet.

6.4.9 Bestimmung von ZON in einer Wasserprobe

Bei der Analyse der ungespiketen Wasserprobe wurde ZON nicht nachgewiesen. Die Probe wurde mit ZON (100 ng/mL) gespiket, eine Stunde stehen gelassen (siehe Kapitel 5.4.5), durch eine Nylon-Membran (Porengröße 0,45 µm x 47 mm) filtriert, ein Aliquot auf drei ZON-IAS aufgebracht (siehe Kapitel 5.5.3.3) und das Eluat mit dem HPLC-System 2 analysiert (siehe Kapitel 5.6.3). Dabei wurden eine Wiederfindung von nur 13% erzielt (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: *Wiederfindung von ZON in einer mit ZON gespiketen Wasserprobe.*

Probe	Spikelevel [ng/mL]	Gefundene Konzentration [ng/mL]	Wiederfindung [%]	Mittelwert [%]	S [%]
1	100	12,67	13	13	0,29
		13,14	13		
		13,19	13		

Die niedrigen Ausbeuten könnten durch Adsorption von ZON an der Gefäßwand oder an Schwebepartikel im Wasser während der Inkubation verursacht worden sein. Um der Ursache für die niedrige Wiederfindung auf den Grund zu gehen, wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt:

Es wurden zu drei gespiketen Wasserproben (100 ng/mL) unterschiedliche Mengen an ACN zugesetzt und diese anschließend für eine Stunde stehen gelassen. Die Proben wurden danach durch ein Blaubandfilter filtriert und

Aliquote des Filtrats in das HPLC-System 2 injiziert (siehe Kapitel 5.6.3). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 22 zu sehen.

Tabelle 22: *Ergebnisse einer mit unterschiedlichen ACN Konzentrationen versetzten, mit ZON gespiketen Wasserprobe.*

ACN [%]	Spikelevel [ng/mL]	Gefundene Konzentration [ng/mL]	Wiederfindung [%]
0	100	82,98	83
5	100	94,40	94
10	100	95,23	95

Bei dieser Versuchsserie war die Wiederfindung für ZON hoch. Dass ZON an die Gefäßwand oder an Schwebepartikel adsorbiert wurde, konnte nicht bestätigt werden, da auch bei der Probe, der kein ACN zugesetzt worden war, eine hohe Wiederfindung für ZON ermittelt wurde. Bei diesen Versuchen wurden die Proben durch ein Blaubandfilter filtriert, bei der ersten Versuchsreihe jedoch durch eine Nylon-Membran (Porengröße 0,45 µm x 47 mm). Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass ZON an die Nylon-Membran adsorbiert worden war.

Eine nachfolgende Untersuchung mit einer ZON-Standardlösung (100 ng/mL), welche durch eine Nylon-Membran filtriert und ein Aliquot des Filtrats direkt in das HPLC-System 2 injiziert wurde, bestätigte den Verdacht. In diesem Fall war die erhaltene Wiederfindung von ZON niedrig.

Selektivität der Methode

Ein Chromatogramm einer mit ZON gespiketen, durch ein Blaubandfilter filtrierten und mit einer ZON-IAS aufgearbeiteten Wasserprobe ist in Abbildung 33 dargestellt.

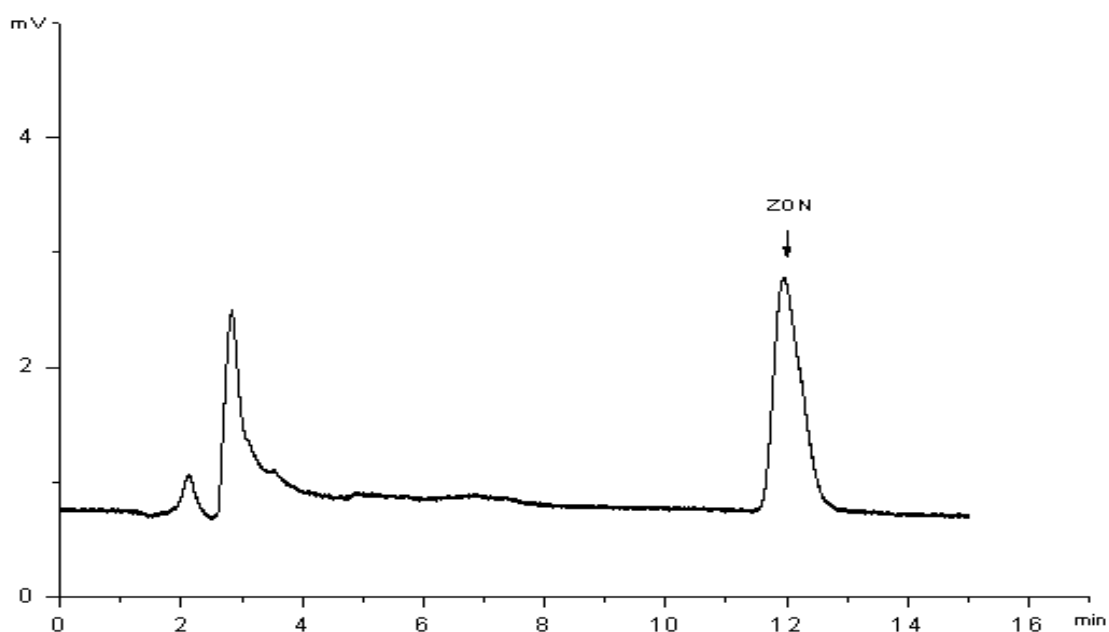


Abbildung 33: Chromatogramm (HPLC-System 2) der aufgearbeiteten Wasserprobe, Spikelevel 100 ng/mL Probe.

Das erhaltene Chromatogramm zeigt die hohe Effizienz der IAC-Methode, Matrixkomponenten zu entfernen.

Die erhaltenen Ergebnisse für DON und ZON bestätigen, dass sich Wasserproben sehr gut mittels der Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie aufarbeiten lassen.

6.5 Versuche zur *on-line* Kopplung von Sol-Gel IAS mit der HPLC

Sol-Gel IAS werden meistens *off-line* zur Probenaufarbeitung eingesetzt. Die Schwierigkeit der *on-line* Kopplung der Sol-Gel IAS liegt in der geringen Druckstabilität des Sol-Gel Glases. *Cichna et al.* haben jedoch gezeigt, dass die *on-line* Kopplung mit der HPLC im Prinzip möglich ist [CICHNA et al., 2001].

Am Ende der Diplomarbeit wurde mit einer neuen HPLC-Methodenentwicklung begonnen. Das Ziel war, mit einem *on-line*-gekoppelten HPLC-System eine selektive Probenaufarbeitung mittels Sol-Gel Immunaффinitätssäulen durchzuführen, und gleichzeitig mit Hilfe von nachgeschalteten UV- und einem Fluoreszenzdetektoren die Bestimmung von DON und ZON in einem Analysenschritt zu ermöglichen. Diese Methode sollte eine große Vereinfachung und eine wesentliche Zeitersparnis mit sich bringen.

In Abbildung 34 ist das *on-line* HPLC-System 4 schematisch dargestellt.

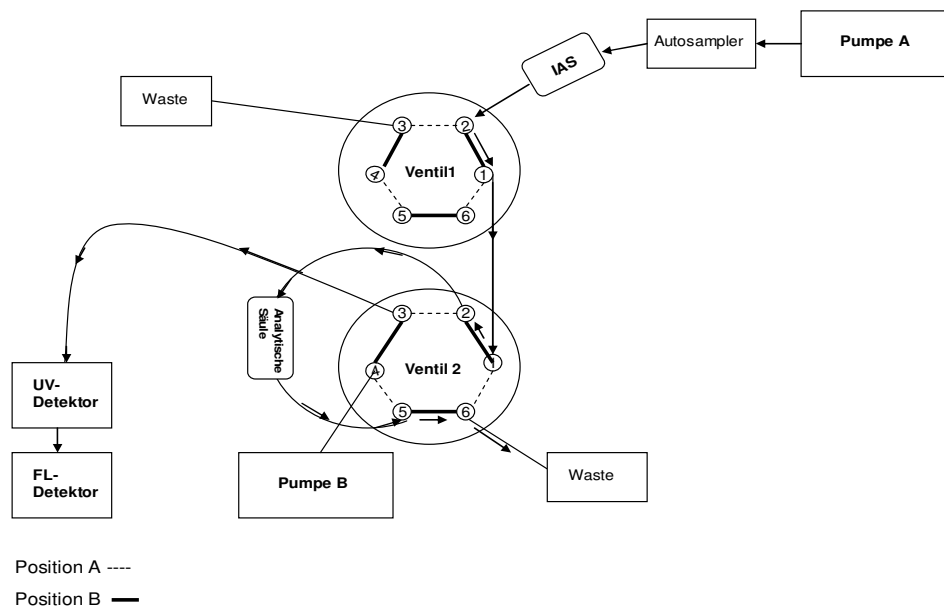


Abbildung 34: Schema des *on-line* HPLC-Systems (HPLC-System 4).

Das System umfasste 2 Pumpen. Die Pumpe A förderte die mobile Phase zur Immunaффinitätssäule, mit dieser Pumpe sollte die Probenaufgabe, das Waschen und die Elution der IAS erfolgen. Der Analyt sollte nach der Elution von der IAS in der analytischen Säule retentiert werden. Die Pumpe B transportierte den Analyten von der analytischen Säule in die beiden Detektoren.

Das System war mit zwei Ventilen ausgestattet. Durch die jeweilige Ventilstellung (Position A, Position B) konnte die Fließrichtung der mobilen Phase gesteuert werden.

Eine Übersicht über die Ventilstellungen während eines Messvorganges ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Übersicht der Ventilstellungen während der Analyse mit dem on-line HPLC System.

Ablauf	Ventil	Ventilposition
Aufgabe der Probe auf die IAS. Der Analyt soll in der IAS retentiert werden, Matrixkomponenten gelangen in den Waste. Pumpe B equilibriert die analytische Säule.	1	A
	2	A
Elution des Analyten: Eluat gelangt von der IAS auf die analytische Säule.	1	B
	2	B
Regeneration der IAS mit PBS. Der Analyt gelangt von der analytischen Säule in die Detektoren.	1	A
	2	A

In *off-line* Versuchen wurde zur Elution von DON bzw. ZON ACN:H₂O_{BD} (40:60, v/v) bzw. ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) verwendet. In den ersten Versuchen zur on-line Kopplung musste geprüft werden, ob die Analyte unter diesen Bedingungen vollständig in der analytischen Säule retentiert werden können. Dazu wurde die IAS aus dem System entfernt und durch eine Kapillare ersetzt. Die Versuche wurden mit einer ZON-Standardlösung (400 ng/mL) durchgeführt. Bei der

analytischen Säule handelte es sich um eine ACE 3 C18, 150 x 2 mm, 3 µm. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 0,4 mL/min, die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

In der Versuchsreihe wurde unterschiedlich lang mit der Pumpe A der Analyt auf die analytische Säule transportiert, nach einer bestimmten Zeit Ventil 2 umgeschaltet und mit Pumpe B der Analyt von der analytischen Säule in die Detektoren transportiert. Als mobile Phase wurden sowohl ACN:H₂O_{BD} (45:55, v/v) als auch ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) getestet.

In Tabelle 24 sind die angewendeten Bedingungen und die dabei erhaltenen Retentionszeiten für ZON zusammengefasst.

Tabelle 24: *Retentionszeit von ZON in Abhängigkeit von der mobilen Phase und der Ventilumschaltzeit.*

Mobile Phase (v/v) ACN:H ₂ O _{BD} :	Ventilumschaltzeit (Ventil 2) [min]	Elutions- volumen [mL]	t _R ZON [min]
45:55	12	4,8	21,26
45:55	14	5,6	22,72
45:55	15	6,0	24,33
45:55	16	6,4	26,20
45:55	20	8,0	-
50:50	8	3,2	12,57
50:50	10	4,0	15,53
50:50	12	4,8	18,33

Die Tabelle zeigt, dass bis zu einer Ventilumschaltzeit von 16 min (entspricht einem Elutionsvolumen von 6,4 mL) mit ACN:H₂O_{BD} (45:55, v/v) ZON in der analytischen Säule retentiert werden konnte. Wurde das Ventil erst nach 20 min umgeschaltet (entspricht einem Elutionsvolumen von 8 mL), wurde kein

ZON-Peak erhalten. Wurde als mobile Phase ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) verwendet, so konnte noch bei einer Ventilumschaltzeit von 12 min (Elutionsvolumen von 4,8 mL) ein ZON-Peak erhalten werden.

Aus den Simulationsversuchen kann geschlossen werden, dass ZON in der analytischen Säule retentiert wird, wenn zur Elution von der IAS 6,4 mL ACN:H₂O_{BD} (45:55, v/v) oder 4,8 mL ACN:H₂O_{BD} (50:50, v/v) verwendet werden.

Aus zeitlichen Gründen musste die Methodenentwicklung in dieser Phase abgebrochen werden.

7 Schlussbetrachtung

Die Immunaффinitätschromatographie ist eine der leistungsfähigsten Methoden zur Isolierung von Analyten aus komplexen Probenmatrizes. Sie basiert auf den selektiven Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Antigenen.

Die Herstellung von Immunaффinitätssäulen, insbesondere die Immobilisierung der Antikörper, ist ein kritischer Schritt, weil darauf geachtet werden muss, dass die Tertiärstruktur der Antikörper nicht verändert wird. Eine schonende Methode zur Immobilisierung von Antikörpern ist die Sol-Gel Methode, bei der die Antikörper in den Poren einer Glasmatrix eingeschlossen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte die Eignung von Sol-Gel Immunaффinitätssäulen (IAS) zur Isolierung der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) aus Lebensmitteln, Futtermitteln und Umweltproben geprüft werden. Dazu wurden die Proben mit bestimmten Mengen an DON bzw. ZON gespiket, mit verschiedenen Sol-Gel Immunaффinitätssäulen aufgearbeitet und die Wiederfindung der Mykotoxine in den Eluaten bestimmt. Die verwendeten Säulen enthielten entweder 2 mg Anti-DON AK (DON-IAS), 1 mg Anti-ZON AK (ZON-IAS) oder 2 mg Anti-DON AK und 1 mg Anti-ZON AK (DON-ZON-IAS). Die Bestimmung der Konzentration von DON erfolgte mittels HPLC-UV, die von ZON mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

Die verwendeten Immunaффinitätssäulen zeichneten sich durch eine hohe Selektivität aus, alle Chromatogramme, die durch Injektion der aufgearbeiteten Proben erhalten wurden, waren frei von störenden Matrixpeaks.

Bei der Aufarbeitung von weizen- und maishältigen Lebensmittelproben wurden sowohl für DON als auch für ZON hohe Wiederfindungsraten erhalten.

Zu hohe Wiederfindungsraten (Mittelwert 141%) wurden bei der Isolierung von ZON aus Schlempe, einem proteinreichen Futtermittel, gefunden. Die für die Aufarbeitung von Lebensmitteln entwickelte Analysenmethode müsste daher modifiziert werden, um sie auf Schlempe anwenden zu können. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aufarbeitung von Schlempe häufig Probleme bereitet.

Bei den im Rahmen der Arbeit analysierten Umweltproben handelte es sich um zwei Bodenproben aus Oberösterreich und eine Wasserprobe aus dem Donauarm bei Klosterneuburg. Im Fall der Bodenproben wurden sowohl für DON (Wiederfindungsraten zwischen 52 und 62%) als auch für ZON (Wiederfindungsraten zwischen 15 und 18%) schlechte Ergebnisse erzielt. Eine mögliche Ursache ist die Adsorption der Mykotoxine an Bodenpartikel. Die angewendete Analysenmethode ist daher nicht geeignet, um die Konzentration von ZON in Bodenproben zu bestimmen.

Im Unterschied zu den festen Proben musste die Wasserprobe nicht extrahiert, sondern nur filtriert werden. Wurde zur Filtration eine Nylon-Membran verwendet, lag die Wiederfindung für DON zwischen 78 und 93%, für ZON betrug sie jedoch nur 13%. Wurde die Wasserprobe anstatt durch die Nylonmembran durch ein Blaubandfilter filtriert, lag die Wiederfindungsrate für ZON zwischen 83 und 95%. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die niedrige Wiederfindung durch eine Adsorption von ZON an die Nylonmembran verursacht worden war, was dann auch experimentell bestätigt werden konnte.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden auch Vorversuche zur *on-line* Kopplung von Sol-Gel IAS mit der HPLC durchgeführt. Aus Zeitgründen wurden jedoch nur wenige Versuche gemacht, in denen die Elution von ZON von der Immunaффinitätssäule simuliert wurde und die Retentionszeit in der analytischen Säule bestimmt wurde. Diese Versuche reichen nicht aus, um beurteilen zu können, ob die DON- bzw. ZON-IAS *on-line* mit der HPLC gekoppelt werden können oder nicht.

8 Zusammenfassung

Mykotoxine sind toxische sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Zu den in unseren Breiten am häufigsten vorkommenden Mykotoxinen zählen die Fusariantoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON), sie kontaminieren vor allem Weizen, Mais, Gerste, Hafer und Roggen. Trotz des Einsatzes selektiver Trenntechniken und empfindlicher Detektionsmethoden kommt der Probenvorbereitung in der Mykotoxinanalytik eine große Bedeutung zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit von DON-, ZON- und DON-ZON Immunaффinitätssäulen zur Aufarbeitung von Lebensmitteln, Futtermitteln, Boden- und Wasserproben geprüft. Dazu wurden die Proben mit bestimmten Mengen an DON und/oder ZON gespiket und die Mykotoxine aus den Proben extrahiert. DON wurde mit Wasser, ZON bzw. DON und ZON mit ACN:Wasser (60:40, v/v) extrahiert. Wässrige Extrakte konnten direkt auf die Immunaффinitätssäule aufgegeben werden, Extrakte mit einer ACN Konzentration von 60% mussten vorher verdünnt werden. Die quantitative Bestimmung in den Eluaten erfolgte mittels HPLC-UV (DON) bzw. HPLC und Fluoreszenzdetektion (ZON). Bei der Aufarbeitung von Lebensmittelproben (Vollkornteigwaren, Knäckebrot, Cornflakes, Müsli, Kekse, Zwieback, Getreidebrei) wurden sowohl für DON als auch für ZON hohe Wiederfindungen erzielt. Die Isolierung von ZON aus Schlempe, einem proteinreichen Futtermittel, bereitete Probleme. Obwohl die Chromatogramme keine störenden Matrixpeaks enthielten, wurden zu hohe Wiederfindungen (Mittelwert 141%) erhalten. Niedrige Wiederfindungen wurden hingegen bei der Analyse von Bodenproben erzielt, für DON lagen sie zwischen 52 und 62%, für ZON zwischen 15 und 18%. Wahrscheinlich sind diese Ergebnisse auf eine Adsorption der Mykotoxine an Bodenpartikel zurückzuführen. Bei der Analyse einer gespiketen Wasserprobe lag die Wiederfindung für DON zwischen 78 und 93%, für ZON betrug sie jedoch nur 13%. Wurde die Wasserprobe anstatt durch eine Nylonmembran durch ein Blaubandfilter filtriert, lag die Wiederfindungsrate für ZON zwischen 83 und 95%.

9 Summary

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of molds. In temperate zones, the most common mycotoxins are deoxynivalenol (DON) und zearalenone (ZON), both produced by *Fusarium* species. Fusarium toxins are frequently detected in wheat, maize, barley, oat and rye.

In spite of the use of selective separation methods and sensitive detection methods sample preparation plays an important role in mycotoxin analysis.

The aim of the diploma thesis was to investigate the applicability of DON-, ZON- and DON-ZON immunoaffinity columns to the clean-up of food, feed, soil and water samples. After spiking the samples with known amounts of DON and/or ZON the mycotoxins were extracted from the samples. DON was extracted from solid samples with water, ZON as well as DON and ZON with ACN:water (60:40, v/v). In contrast to aqueous extracts which could be directly loaded to the immunoaffinity columns, extracts containing 60% ACN had to be diluted before loading them to the columns. Quantitative determination of DON and ZON was carried out with HPLC-UV and HPLC with fluorescence detection, respectively.

Clean-up of food samples (wholemeal pasta, crisp bread, cornflakes, cereals, cookies, zwieback, milk wheat mash) resulted in high recoveries for both DON and ZON. Isolation of ZON from draff, a feed known to be rich in proteins, was problematic. Although the chromatograms did not contain interfering matrix peaks, the recovery was too high (mean 141%). Poor recoveries were obtained in the analysis of soil samples. For DON, the recovery was in the range from 52 to 62%, the recovery for ZON was found to be only 16%. We assume that these results were caused by adsorption of the mycotoxins to soil particles. In the case of a water sample, the recovery for DON was in the range from 78 to 93%. However, for ZON the recovery was only 13%. We found out, that the poor recovery was caused by absorption to the nylon membrane which was used to filter the water sample before loading it to the immunoaffinity column. This problem could be solved by replacing the nylon membrane by a blue ribbon filter. In this case, recovery was found to be between 83 und 95%.

10 Literaturverzeichnis

AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH), BOKU (Universität für Bodenkultur Wien). Machbarkeitsstudie zur Auslobung „gentechnikfrei“ und Vermeidung von GVO bei Lebensmittel aus tierischer Erzeugung. AGES, November 2005, 1-272.

AIGNER A, NEUMANN S. Immunchemie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; Jena, 1997; 4-28.

BISELLI S, HUMMERT C. Development of a multicomponent method for fusarium toxins using LC-MS/MS and its applications during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. Food Add. Contam. 2005; 22: 752-760.

BÖCKER J. Chromatographie. Vogel Verlag, Würzburg, 1997; 41.

BRENN-STRUCKHOFOVA Z, Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung.

BRENN-STRUCKHOFOVA Z, CICHNA-MARKL M, BÖHM C, RAZZAZI-FAZELI E. Selective sample cleanup by reusable sol-gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples. Anal.Chem. 2007; 79: 710-717.

BUCHELI T D, WETTSTEIN F E, HARTMANN N, ERBS M, VOGELGSANG S, FORRER H-R, SCHWARZENBACH R P. Fusarium mycotoxins: overlooked aquatic micropollutants. J. Agric. Food Chem. 2008; 56: 1029-1034.

BUDZIKIEWICZ H, SCHÄFER M. Massenspektrometrie. WILEY-VCH Verlag GmbH & KGaA, Weinheim, 2005; 5-64.

BULLERMAN L. B, BIANCHINI A. Stability of mycotoxins during food processing. Int. J. F. Microb. 2007; 119: 140-146.

CAHILL L. M, KRUGER S. C, MCALICE B. T, RAMSEY C. S, PRIOLI R, KOHN B. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. J. Chromatogr. A 1999; 859: 23-28.

CICHNA-MARKL M. Selektive Extraktion mit Sol-Gel immobilisierten Biomolekülen. LC GC Ausgabe in deutscher Sprache, Juni 2007; 8-14.

CICHNA-MARKL M, MARKL P, KNOPP D, NIESSNER R. On-line coupling of sol-gel-generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 2001; 919: 51-58.

DOMINIK A, STEINHILBER D. Instrumentelle Analytik. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2002; 141-149.

EFSA, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a requested from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. The EFSA journal 2004; 89: 1-35.

JECFA, 2001: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>
(Zugriff: 28. August 2008)

JOSEPHS R. D, SCHUHMACHER R, KRSKA R. International interlaboratory study for the determination of the fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. Food Addit. Contam. 2001, 18: 417-430.

KLÖTZEL M, SCHMIDT S, LAUBER U, THIELERT G, HUMPF H.-U. Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia* 2005, 62: 41-48

KOCH P. State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicol. Let.* 2004, 153: 109-112.

KOTAL F, HOLADOVA K, HAJŠLOVA J, POUŠTKA J, RADOVA Z. Determination of trichothecenes in cereals. *J. Chromatogr. A* 1999, 830: 219-225.

KUIPER-GOODMAN T, SCOTT M, WATANABE H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenon. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 1987, 7: 253-306.

KUMAR V, BASU M. S, RAJENDRAN T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop protection* 2008; 27: 891-905.

MA Y Y, GUO H. W. Mini-review of studies on the carcinogenicity of deoxynivalenol. *Environ. Tox. Pharm.* 2008, 25: 1-9.

MATEO J J, MATEO R, HINOJO M. J, LLORENS A, JIMENEZ M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *J. Chromatogr. A* 2002, 955: 245-256.

MEYER R V. Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, 9. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH KGaA, Weinheim, 2004; 4-49; 54-164.

MORTIMER C, MÜLLER U. Chemie, Das Basiswissen der Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003; 9-10.

MÜCKE W, LEMMEN C. Schimmelpilze (ecomed Medizin). Verlagsgruppe

Hüthig Jehle Rehm GmbH, Landsberg am Lech, 2004; 84-114; 129-130.

OTTO M. Analytische Chemie, 2. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000; 9-21.

PALLE M. Immunfiltration als Probenaufreinigungsschritt bei der Bestimmung von Zearalenon in Futtermitteln, Diplomarbeit, Universität Wien, 2007.

PESTKA J. J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal Feed Science and Technology 2007; 137: 283-298.

RAZZAZI-FAZELI E, BÖHM J, JARUKAMJORN K, ZENTEK J. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2003; 796: 21-33

R-BIOPHARM RHÔNE LTD. Current EU mycotoxin legislation, 2007.

SCF: EUROPEAN COMMISSION: SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD
SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final 27 February 2002. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, 2002.

SCF: EUROPEAN COMMISSION: SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD
SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins. Part 2: zearalenone (ZEA), 22 June 2000.

SCHLATTER J. Toxicity data relevant for hazard characterization. Toxicology Letters 2004; 153: 83-89.

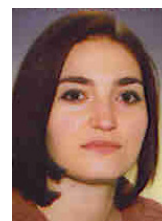
SCHWEDT G. Chromatographische Trennmethode. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1994: 20-24.

SKOOG D. A, LEARY J. J. Instrumentelle Analytik. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996: 455-472; 623-629.

STROKA J, DERPHYSHIRE M, MISCHKE C, AMBROSIO M, KROEGER K, ARRANZ I, SIZOO E, EGMOND H. Liquid chromatographic determination of deoxynivalenol in baby food and animal feed: interlaboratory study. J. AOAC International 2006; 89: 1012-1020.

ZINEDINE A, SORIANO J. M, MOLTÓ J. C, MANES J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food Chem. Tox. 2007; 45:1-18.

11 CURRICULUM VITAE



Persönliche Daten

Name	Christa Füreder
Geburtsdatum	24. Mai 1977
Geburtsort	Linz, Österreich
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig
Adresse	Wehlistraße 59/11/10 A-1200 Wien
E-mail	christa.fuereder@gmx.at
Mobil	+43 664 4514736

Schulbildung

1983 -1991	Volksschule St. Ulrich/i.M., Hauptschule Neufelden
1991 -1994	Bundesfachschule für wirtschaftl. Berufe Rohrbach

Aus- und Weiterbildung

1994 -1997	Allgem. Krankenpflegeschule LKH Rohrbach
2001 - 2003	Berufsreifeprüfung in Wien (berufsbegleitend absolviert)
ab 10/2003	Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien Schwerpunkt: Lebensmittelproduktion und – technologie Diplomarbeitstitel: „Sol-Gel Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung von Deoxynivalenol und Zearalenon aus Lebensmitteln, Futtermitteln und Umweltproben“, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, Universität Wien

Beruflicher Werdegang

seit 10/1997	beschäftigt als Diplomierte Gesundheits- und Krankenschwester im Krankenhaus der Barmherzigen
--------------	---

Brüder 1020 Wien 2002 - 2003 Stellvertretende
Stationsleitung der Neurologie

Berufspraxis

- 03/2008 – 02/2009 Tutorin, Lebensmittelanalytisches Praktikum für Chemiker
Tutorin, Lebensmittelanalytisches Praktikum für
Ernährungswissenschaftler
- 05/2008 28. bis 30. Mai 2008: Posterpräsentation
Lebensmittelchemikertage: „Anwendbarkeit von Sol-Gel
Immunaффinitätssäulen zur Probenvorbereitung bei der
Bestimmung von Deoxynivalenol in komplexen
Lebensmitteln“
- 10/2007 – 04/2008 Im Rahmen meiner Diplomarbeit Mitarbeit in der
Arbeitsgruppe von Fr. Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-
Markl am Institut für Analytische Chemie und
Lebensmittelchemie, Universität Wien (HPLC Methoden zur
Analyse von DON und ZON, Massenspektrometrische
Methoden zur Analyse von DON und ZON)
- 12/2006 - 02/2007 Praktikum im Bereich Qualitätsmanagement/Qualitäts-
sicherung in der Firma Landhof GesmbH Co KG in Linz
- 08/2006 Praktikum Hygiene Institut d. Med. Uni Wien/Lebensmittel-
hygiene
- 02/2006 Praktikum AKH Wien, Klinische Abteilung für
Endokrinologie. u. Stoffwechsel
- 01/2006 AKE – nutritionday, AKH Wien

Kenntnisse und Fähigkeiten

Englisch in Wort und Schrift
IT Microsoft Office (Excel, Word, Power Point), Stratos
Führerschein B

Hobbies Laufen, Radfahren, Wandern, Yoga, Lesen, Freunde