

Inhalt

1. Einführung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Eigenschaften der Penicilline	3
1.2.1 Chemisch-physikalische Eigenschaften der Penicilline	3
1.2.1.1 Strukturen der Penicilline	3
1.2.1.2 Chemisch-physikalische Daten	3
1.2.1.3 Reaktivität und Stabilität	5
1.2.2 Penicilline als Tierarzneimittel	6
1.2.2.1 Anwendung und Nutzen	6
1.2.2.4 Präparate	6
1.2.4 Stabilität in Lebensmitteln	6
1.2.5 Rückstände in Lebensmitteln	7
1.3 Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Penicillinrückständen	8
1.4 Rückstandsanalytik der Penicilline	9
1.4.1 Strategien zur Rückstandsanalytik	9
1.4.2 Qualitative Schnelltests	9
1.4.3 Chemisch-physikalische Verfahren	11
1.4.3.1 Probenvorbereitung: Extraktion und Extraktreinigung	11
1.4.3.2 Derivatisierung, Chromatographie und Detektion	11
1.4.4 Immunaффinitätschromatographie	12
1.4.4.1 Prinzip der Immunaффinitätschromatographie	12
1.4.4.2 Antikörper - Bildung und Struktur	14
1.4.4.3 Anforderungen an das Trägermaterial	16
1.4.4.4 Aktivierung des Trägermaterials	17
1.4.4.5 Ungerichtete Immobilisierung	18
1.4.4.6 Gerichtete Immobilisierung	21
1.5 Immunogensynthese	23
1.5.1 Immunogene zur Gewinnung von anti-Penicillin-Antikörpern	23
1.5.2 Methoden zur Kopplung von Haptenen an Trägerproteine	24
1.5.3 Antikörperquellen	26
1.5.3.1 Antikörper aus Säugetieren	26
1.5.3.2 Aviäre Antikörper	26
1.6 Immunisierung der Versuchstiere	28
1.7 Charakterisierung polyklonaler Antikörper	28
1.8 Isolierung von Antikörpern	30
1.8.1 Antikörper aus Kaninchenserum	30
1.8.2 Antikörper aus Eidotter	31
1.9 Zielsetzung	33

2. Immunogensynthese und -analytik	34
2.1 Der Syntheseweg	34
2.2 Synthese von p-Azidbenzoesäure	34
2.3 Synthese von p-Azidbenzoylchlorid	36
2.4 Synthese von p-Azidbenzoylpenicillin	37
2.5 Direkte Kopplung von Azidbenzoesäure an 6-APA	37
2.6 Photochemische Kopplung	39
2.7 Bestimmung der Belegungsdichte	39
2.8 Zusammenstellung der Syntheseergebnisse	42
3. Immunisierung der Versuchstiere	43
3.1 Auswahl der Versuchstiere	43
3.2 Immunisierung der Kaninchen	43
3.3 Immunisierung der Legehennen	43
4. Charakterisierung, Gewinnung und Reinigung der Antikörper	45
4.1 Allgemeiner Ablauf der Antikörperisolierung	45
4.2 Antikörper aus Kaninchenserum	46
4.2.1 Charakterisierung der Kaninchenserum	46
4.2.1.1 Immunblot (Western-Blot)	46
4.2.1.2 Radioimmunoassay (RIA)	48
4.2.1.2.1 Bestimmung des Titers	48
4.2.1.2.2 Ermittlung der Spezifität	49
4.2.2 Gewinnung der Antikörper aus Kaninchenserum	52
4.2.3 Immobilisierung der Serumantikörper	52
4.2.3.1 Immobilisierungsverfahren und Materialien	52
4.2.3.2 Kapazität der IgG-Säulen	53
4.3 Antikörper aus Eidotter	54
4.3.1 Charakterisierung der Dotterantikörper	54
4.3.1.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	54
4.3.1.1.1 Titerentwicklung	54
4.3.1.1.2 Spezifität der Antikörper	56
4.3.1.2 Radioimmunoassay	59
4.3.2 Gewinnung von Immunglobulin Y aus den Eidottern	59
4.3.2.1 Isolierung der aviären Antikörper	59
4.3.2.2 Affinitätsreinigung von Immunglobulin Y mittels einer Haptensäule	60
4.3.2.2.1 Herstellung des Haptensorbens	60
4.3.2.2.2 Immunaффinitätschromatographie am Haptensorbens	61
4.3.2.3 Überprüfung der Wirksamkeit der Antikörperreinigung	61
4.3.3 Immobilisierung der aviären Antikörper	64
4.3.3.1 Immobilisierungsverfahren und Materialien	64
4.3.3.2 Kapazität der IgY-Säulen	65
4.3.3.3 Lebensdauer der IgY-Säulen	66

5. Einbindung der Immunaффinitätschromatographie in ein on-line-Verfahren für Penicillinrückstände	67
5.1 Charakterisierung der verwendeten Affinitätssäule	67
5.2 Einbindung der Immunaффinitätssäule in ein hochdruckflüssigchromatographisches Verfahren	68
5.3 Nachweis von Penicillinrückständen in Lebensmitteln	69
5.3.1 Das Dotieren der Matrices	69
5.3.2 Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Bestimmungsverfahrens	69
5.3.3 Nachweis von Penicillinrückständen in Milch	69
5.3.4 Nachweis von Penicillinen in Rindermuskel	73
5.3.5 Nachweis von Penicillinrückständen in Rinderleber	74
6. Diskussion	80
6.1 Ziel dieser Arbeit	80
6.2 Immunogensynthese	80
6.3 Immunisierung der Tiere und Titerentwicklung	82
6.4 Spezifität der Seren und Dotter	83
6.5 Isolierung und Reinigung der Antikörper	85
6.6 Herstellung und Leistungsfähigkeit der Affinitätssäulen	86
6.7 Analytik von Penicillinrückständen in Lebensmitteln	88
6.8 Vergleich mit bisherigen Methoden	90
6.9 Schlußfolgerungen und Ausblick	92
7.1 Zusammenfassung	95
7.2 Abstract	97
8. Arbeitsvorschriften	98
8.1 Reagenzien, Lösungsmittel	98
8.2 Lösungen und Puffer	101
8.3 Laborgeräte	104
8.3.1 Allgemeine Laborgeräte	104
8.3.2 Technische Laborgeräte	104
8.3.3 Geräte für die Spektroskopie und Chromatographie	105
8.4 Synthese des 6-APA-Immunogens	106
8.4.1 Darstellung von p-Azidobenzoessäure	106
8.4.2 Synthese von p-Azidobenzoylchlorid	107
8.4.3 Darstellung von p-Azidobenzoylpenicillin	108
8.4.4 Photochemische Kopplung	109
8.5 Radioimmunoassay zur Titer- und Spezifitätsbestimmung	110
8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	111
8.7 Immunblot	113
8.8 ELISA (Indirect Antigen Coated Plate (IACP) ELISA)	114

8.9 Isolierung von Immunglobulin G	115
8.10 Isolierung von IgY	116
8.11 Präparation des Haptensorbens	117
8.12 Bestimmung von 6-Aminopenicillansäure	117
8.13 Affinitätsreinigung von Immunglobulin Y	118
8.14 Immobilisierung von Antikörpern an Cyanbromid-Sepharose	118
8.15 Ermittlung der Säulenkapazitäten	119
8.16 Dotieren der Matrices	120
8.16.1 Dotieren von Milch	120
8.16.2 Dotieren von Rindermuskel und Rinderleber	120
8.17 Extraktion der Penicilline aus Lebensmitteln	121
8.17.1 Extraktion der Penicilline aus Milch	121
8.17.2 Extraktion der Penicilline aus Rindermuskel	121
8.17.3 Extraktion der Penicilline aus Rinderleber	122
8.18 Immunaffinitätschromatographie von Lebensmittelextrakten	122
9. Literaturverzeichnis	123
Anhang I	132
1. Bestimmung des Molekulargewichtes der Polyethylenglykolfraktion	132
2. Bestimmung von 6-Aminopenicillansäure	133
4. Programmierung des Dilutors	137
5. Programmierung des Controllers L-5000	138
Anhang II	140
1. Abbildungsverzeichnis	140
2. Tabellenverzeichnis	141
3. Abkürzungsverzeichnis	142
4. Verwendete Hard- und Software	144