

1.9 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, das die zeit- und materialaufwendigen Probenvorbereitungen bei bisher üblichen Verfahren zur Rückstandsanalyse von Tierarzneimitteln entscheidend verkürzt. Dazu sollte die Immunaффinitätschromatographie eingesetzt werden. Durch geeignete Konzeption eines Immunogens sollten durch Immunisierung von Kaninchen und Legehennen geeignete Antikörper gewonnen werden, die eine Spezifität gegen alle veterinärmedizinisch relevanten Penicilline aufweisen. Die Alternative, für jedes Penicillin ein eigenes Immunogen herzustellen und mehrere verschiedene Antiseren zu erzeugen, erschien zu aufwendig. Als Hapten wurde daher das Grundgerüst der Penicilline, die 6-Aminopenicillansäure, gewählt, die mit intaktem β -Lactamring über die Aminofunktion an den Träger gekoppelt werden sollte. So wurde das kondensierte Ringsystem aus β -Lactam- und Thiazolidinring zur antigenen Determinante. Eine Kopplung über die Carboxylfunktion hätte zur Folge gehabt, daß der β -Lactamring mit der Aminofunktion vom Immunsystem erkannt würde. Die Aminofunktion ist aber bei Penicillinen substituiert, so daß der β -Lactamring durch den Substituenten abgeschirmt wird. Es ist daher zu erwarten, daß Penicilline nicht von in dieser Art erzeugten Antikörpern erkannt werden. Diese Hypothese wird durch die Resultate von Märtlbauer et al. [53] untermauert: Die Arbeitsgruppe induzierte mit einem Cloxacillin-Humanserumalbumin-Konjugat Antikörper in Kaninchen. Diese zeigten Kreuzreaktivitäten gegenüber Oxacillin und Dicloxacillin, während andere Penicilline von den Antikörpern nicht erkannt wurden. Antigene Determinante war also nicht der β -Lactamring, sondern die Isoxazolylgruppe.

Um zu vermeiden, daß das Hapten vom Trägerprotein abgeschirmt wird, sollte die Kopplung über einen Spacer erfolgen. Ein schonendes Kopplungsverfahren sollte den möglichst weitgehenden Erhalt des empfindlichen β -Lactamringes sichern.

Zur Herstellung eines solchen Immunogens mußte zunächst ein geeignetes Syntheseverfahren gefunden werden. Abschließend sollte das Immunogen bezüglich der Belegungsdichte des Trägerproteins mit dem Hapten charakterisiert werden.

Nach Charakterisierung und Isolierung der mit dem Immunogen erhaltenen Antikörper aus Kaninchen- und Eidotter war das Ziel, diese an einen wasserunlöslichen Träger zu immobilisieren und in Form von Immunaффinitätschromatographiesäulen zur Probenvorbereitung einzusetzen. Dieser in der Rückstandsanalytik entscheidende Schritt kann im Idealfall so auf einen Extraktions- und Deproteinierungsschritt mit anschließender Immunaффinitätschromatographie beschränkt werden.

Aus wirtschaftlichen Gründen war bei der Auswahl der Chromatographiebedingungen darauf zu achten, daß die Säule regeneriert und mehrfach verwendet werden konnte.

Das Eluat aus der Immunaффinitätschromatographie sollte abschließend nach automatisierter Anreicherung im HPLC-System mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion analysiert werden. Der automatische Ablauf hat zum einen den Vorteil der Zeitersparnis, außerdem ist zu erwarten, daß ein automatisiertes Verfahren mit wenigen Schritten reproduzierbarer arbeitet, als ein Verfahren mit vielen Einzelschritten, die alle manuell ausgeführt werden müssen.