

6. Diskussion

6.1 Ziel dieser Arbeit

Zur Zeit werden Penicillinrückstände in Lebensmitteln vornehmlich mit Hilfe von mikrobiologischen Verfahren nachgewiesen. Da diese Verfahren keine quantitativen Aussagen erlauben und auch keine Identifizierung der verschiedenen Wirkstoffe ermöglichen, müssen rückstandspositive Proben mit einem physikalisch-chemischen Verfahren weiter analysiert werden. Dazu wird in den meisten Fällen die HPLC eingesetzt. Auch ein leistungsfähiges GC-Verfahren wurde veröffentlicht. Allen Methoden ist jedoch ein aufwendiges Verfahren zur Isolierung der Analyten aus der Matrix gemeinsam. Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe der Immunaffinitätschromatographie ein automatisierbares Verfahren zur Rückstandsanalytik aller veterinärmedizinisch relevanten Penicilline zu entwickeln, das den Aufwand zur Rohextraktreinigung wesentlich verringert.

Das zu entwickelnde Verfahren kann die mikrobiologischen Tests als „Screening-Verfahren“ nicht ersetzen, vielmehr sind diese unverzichtbar, um das Probenaufkommen auf β -Lactam-Antibiotika zu untersuchen.

6.2 Immunogensynthese

Zur Entwicklung dieses Verfahrens war es notwendig, Antikörper zu erhalten, die mehrere Penicilline gleichzeitig erkennen können. Da Penicilline allein in der Regel nur eine schwache Immunantwort bewirken, mußte das Hapten an ein Trägerprotein gebunden werden, um die Immunogenität zu verstärken.

Daher wurden an das Immunogen folgende Forderungen gestellt:

- antigene Determinante sollte das Grundgerüst der Penicilline, die 6-Aminopenicillansäure (6-APA) sein.
- diese war so an das Trägerprotein zu binden, daß der Thiazolidinring mit der Carboxylfunktion nach außen gerichtet ist,
- der β -Lactamring sollte erhalten bleiben.

Durch Bindung der Aminofunktion der 6-APA an das Protein werden die o.g. Bedingungen erfüllt. Um zu vermeiden, daß das Hapten durch das Trägerprotein abgeschirmt wird und nur schlecht vom Immunsystem erkannt wird, wurde ein Spacer zwischen Hapten und Protein eingesetzt. Der Spacer mußte eine Carboxylfunktion besitzen, damit die Aminofunktion der 6-APA acyliert werden konnte, außerdem war eine weitere funktionelle Gruppe notwendig, um an das Trägerprotein zu binden. Dazu wurde die Azidfunktion gewählt, da diese unter schonenden Bedingungen (pH 7,2, Eiskühlung) bei UV-Bestrahlung ein reaktives Nitren bildet, das unspezifisch mit dem Protein reagiert. So konnte der empfindliche β -Lactam-Ring erhalten werden.

Diese Voraussetzungen konnten mit 4-Azidobenzoesäure als Spacer erfüllt werden. Ein durch zusätzliche Methylengruppen gegenüber dem Benzoessäurederivat verlängerter Spacer durfte nicht gewählt werden, da der Spacer ansonsten eine zu hohe Ähnlichkeit mit Benzylpenicillin aufgewiesen

hätte. Eine Überbetonung eines bestimmten Penicillins bei der Spezifität der Antikörper sollte aber vermieden werden.

Der heterobifunktionelle Spacer wurde synthetisiert, indem 4-Aminobenzoesäure diazotiert und anschließend mit Natriumazid nucleophil substituiert wurde (Kap. 2.2). Nach Umsetzung der Carboxylfunktion zum Säurechlorid wurde durch Reaktion mit der Aminofunktion der 6-APA ein Amid erhalten (Kap. 2.3 und 2.4). Die direkte Umsetzung der Säure mit dem Amin unter Zuhilfenahme von Chlorameisensäurebutylester war nicht erfolgreich, da die Azidfunktion verloren ging.

Die Zwischenstufen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie sowie der Infrarot- und Protonen-Kernresonanz-Spektroskopie charakterisiert. Die Zwischenprodukte zeigten in der DC keine Verunreinigungen und entsprachen von den Spektren her den Erwartungen.

Als TrägerproteinedientendasHämocyaninderSchlüssellocknapfschnecke(keyholelimpethemocyanin, KLH) und Ovalbumin (OVA). Mit beiden war aufgrund der phylogenetischen Distanz ein hoher Antikörpertiter beim Kaninchen zu erwarten. Die Legehennen sollten nur mit dem KLH-Konjugat behandelt werden, da von Ovalbumin bei Hühnern keine starke Immunogenität erwartet wurde.

Die Charakterisierung der Immunogene in Bezug auf die Belegungsdichte stellte sich als sehr problematisch heraus. Der Penicillinanteil an den Proteinen ließ sich nicht direkt bestimmen (Kap. 2.7). Eine Methode, die in Zukunft Erfolg bringen könnte, ist die Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisations-Massenspektroskopie (MALDI-MS). Aufgrund von gerätetechnischen Schwierigkeiten konnten im Laufe dieser Arbeit jedoch keine brauchbaren Daten mit dieser Methode erhalten werden. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, daß sich eine Molekulargewichtszunahme durch die Haptenkopplung bei KLH aufgrund seiner Größe nicht mit MALDI-MS analysieren läßt. Die Belegungsdichte wurde schließlich indirekt durch Bestimmung des nicht-gekoppelten 6-APA-Derivates mittels HPLC bestimmt sowie aus der Abnahme der Azid-spezifischen Absorption bei 267 nm berechnet. Dabei wurde allerdings vorausgesetzt, daß der durch das UV-Licht zersetzte Azid-Anteil vollständig an das Protein gebunden hat und nicht durch Umlagerung verloren ging. Die hergestellten Immunogene enthielten danach 95 - 114 µg 6-Aminopenicillansäure/mg Protein. Für die Reaktionsausbeute war es unerheblich, in welcher Verdünnung die Proteinlösung vorlag. Ein von Berger [79] hergestelltes Benzylpenicillin-Immunogen enthielt nur rund 0,6 µg Hapten/mg KLH, Keppeler [101] band rund 100 µg Benzylpenicillin/mg Protein, Parker [99] erhielt eine Haptendichte von 123 µg/mg. Andere Autoren machen keine Angaben. Die Haptendichte im Immunogen scheint ein maßgeblicher Faktor für die erfolgreiche Immunisierung zu sein. Eine möglichst hohe Belegungsdichte des Trägerproteins ist vorteilhaft, da die antigenen Determinanten des Trägers durch das Hapten abgeschirmt werden. Eine zu hohe Konzentration kann hingegen zur Immuntoleranz führen, so daß keine Antikörper mehr gebildet werden [57]. Es wird in der Literatur jedoch weder für Ovalbumin noch für KLH berichtet, in welchem Bereich die optimale Haptendichte liegt.

Eine abschließende Beurteilung des Immunogens erlaubte erst der Tierversuch, wobei die gelungene Induktion von Antikörpern mit den gewünschten Kreuzreaktivitäten die Tauglichkeit des Immunogens bewies.

Aus der Literatur ist bekannt, daß β -Lactame durch UV-Licht gespalten werden können [151]. Salavka et al. zeigten, daß Penicilline nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm mit einem elektrochemischen Detektor detektiert werden können, während diese Eigenschaft ohne Bestrahlung nicht vorhanden ist

[45].

Wie die Ergebnisse der späteren Untersuchungen zur Spezifität der resultierenden Antikörper zeigen (Kap. 4.2.1.2.2 und 4.3.1.1.2), scheint eine UV-lichtbedingte Veränderung der 6-APA unter den gewählten Bedingungen der photochemischen Kopplung nicht stattgefunden zu haben.

Die Veränderungen des β -Lactam-Ringes durch UV-Licht sind stark lösungsmittel- und substituentenabhängig [151], außerdem war damit zu rechnen, daß die Lichtintensität durch die hohe Proteinkonzentration in der Lösung so stark abgeschwächt wurde, daß zwar eine Nitrenbildung erfolgte, die Intensität für eine Veränderung der Penicilline aber nicht ausreichend war.

6.3 Immunisierung der Tiere und Titerentwicklung

Es wurden Kaninchen und Legehennen immunisiert. Es standen 3 Kaninchen und 5 Legehennen zur Verfügung. Als Immunogen für die Kaninchen dienten sowohl das KLH-Konjugat und die OVA-Konjugate. Die Legehennen wurden nur mit dem KLH-Konjugat immunisiert, da ein Ovalbumin-Konjugat dem Immunsystem des Huhns möglicherweise nicht fremd genug ist, um einen hohen Antikörpertiter zu verursachen. Polson et al. [128] berichten, daß eine starke Immunantwort bei Legehennen nur mit Immunogenen zu erzielen sind, die größer als 150 kDa sind. Diese Voraussetzung ist mit KLH als Trägerprotein erfüllt, Ovalbumin dagegen wäre unabhängig von dem oben beschriebenen Einwand zu klein.

Die Literaturangaben über die Nebenwirkungen von Immunisierung mit komplettem Freundschem Adjuvans bei Legehennen sind widersprüchlich. Einerseits wird berichtet, daß bei Legehennen geringere Nebenwirkungen auftreten als bei Kaninchen [112, 129], andererseits findet man auch Berichte über ausgedehnte Entzündungen an den Injektionsstellen [130]. In eigenen Versuchen wurde nach der Immunisierung mit komplettem Freundschem Adjuvans festgestellt, daß die Futteraufnahme der Tiere um rund 50 % zurückging, außerdem wurden große Entzündungsherde im Injektionsbereich gefunden. Nach Immunisierung mit inkomplettem Freundschem Adjuvans traten diese Nebenwirkungen nicht mehr auf.

Die Antikörpertiter in den *Kaninchenseren* wurden mit einem Radioimmunoassay ermittelt. Die verwendeten Immunogene verursachten keine hohen Titer. Die gemessenen Werte lagen zwischen 50 und 180, wobei das KLH-Immunogen einen höheren Titer als die Ovalbumin-Immunogene lieferte (Kap. 4.2.1.2.1). Auch andere Arbeitsgruppen konnten nur geringe Titer mit Penicillinimmunogenen erzielen [z.B. 102, 193]. Ein direkter Vergleich von Meßwerten ist allerdings nicht möglich, da die verwendeten Meßsysteme und Titerdefinitionen unterschiedlich sind. Die Tatsache, daß KLH als Trägerprotein höhere Antikörpertiter liefern kann als andere Proteine, ist ebenfalls bekannt [79, 194]. Der Versuch, über Variationen im Immunisierungsschema die Titer zu erhöhen, war nicht erfolgreich (Kap. 3.2). Strategie dieses Versuches war, die Immunisierungsinjektionen für längere Zeit auszusetzen und später erneut zu beginnen. Diese Maßnahme kann nach Erfahrung der Arbeitsgruppe von Prof. B. Hoffmann, Ambulatorische und Geburtshilfliche Veterinärklinik der Universität Gießen, die das Immunisierungsschema vorgeschlagen hat, zum Erfolg führen. Die Titer blieben unverändert niedrig. Ein hoher Antikörpertiter ist aber keine zwingende Voraussetzung für die Brauchbarkeit eines Serums,

bei genügend hohem Titer könnte aber gegebenenfalls auf eine Affinitätschromatographische Reinigung verzichtet werden. Ist die Konzentration an spezifischen Antikörpern in der immobilisierten Proteinfraction zu gering, können keine befriedigenden Säulenkapazitäten erzielt werden.

Die Untersuchungen an den *Eidottern* zeigten, daß der zur Kontrolle der Kaninchenserum herangezogene RIA nicht zur Titerbestimmung der anti-6-APA-Antikörper in *Eidottern* geeignet ist. Der Hapten-Antikörper-Komplex ist vermutlich so schwach, daß er bei der Fällung der Proteine sowohl mit Ammoniumsulfat als auch mit Aceton und Polyethylenglykol sofort dissoziiert. Möglicherweise stören auch die Lipoproteine die Fällung. An dieser Stelle bewährte sich ein ELISA, mit dem alle Titer- und Spezifitätsuntersuchungen in den *Eidottern* durchgeführt wurden.

Wie bei den Kaninchen wurde auch bei den Legehennen nur ein geringer Antikörpertiter erzeugt. Die am 84. Tag gemessenen Titer waren im Serum und im Dotter vergleichbar niedrig (Kap. 4.3.1.1.1). Die einzelnen Hühner reagierten über den Immunisierungszeitraum mit individuell recht unterschiedlichem Titerverlauf. Auch Rosol et al. [195] zeigten in ihren Untersuchungen, daß Legehennen bei gleichartiger Behandlung sehr unterschiedlich reagieren können. Sie immunisierten drei Hennen mit einem synthetischen Peptid, wobei zwei Hennen nach der zweiten Immunisierung am 40. Tag bereits Antikörper bildeten, während das dritte Huhn erst nach der sechsten Injektion nach fast einem Jahr eine Reaktion zeigte. Wegen dieser individuell sehr unterschiedlichen Reaktion ist es generell bei der Entwicklung von Antikörpern ratsam, möglichst viele Tiere heranzuziehen. Es zeigte sich, daß die Verwendung von 5 Tieren ein guter Kompromiß war, um bei vertretbarem Aufwand aussagekräftige Resultate und geeignete Antikörper zu erhalten.

Rosol et al. [195] zeigten auch, daß nach jeder Injektion ein Ansteigen des Titers zu beobachten war. In den eigenen Untersuchungen ließ sich dagegen bei keinem Huhn ein Zusammenhang zwischen den Zeitpunkten der Immunisierungsinjektionen und Titerentwicklung erkennen. Es konnte auch kein „Biorhythmus“ festgestellt werden, wie er von Schade et al. [129] beschrieben wurde.

Ein Ansatz zur Erhöhung der Antikörpertiter könnte ein höherer Anteil an Hapten im Immunogen sein. Stehen größere Mengen an Antiserum zur Verfügung, ist deren Brauchbarkeit jedoch nicht von einem hohen Titer abhängig. Vielmehr können durch eine Affinitätschromatographische Isolierung der spezifischen Antikörper an einer Haptensäule hochspezifische und hochkonzentrierte Immunglobuline gewonnen werden.

Bei den in dieser Arbeit erzielten Antikörpertitern war eine Affinitätschromatographische Reinigung und Konzentrierung der Antikörper unverzichtbar, um Immunaффinitätssäulen mit ausreichender Kapazität zu erhalten.

6.4 Spezifität der Seren und Dotter

Bis zum Aussetzen der Immunisierung entwickelten alle drei *Kaninchen* Seren mit einer breiten Spezifität. Alle getesteten Penicilline (Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und 6-Aminopenicillansäure) wurden von den Antikörpern erkannt. Mit dem Cephalosporin Cephalexin reagierten die Seren dagegen nicht. Es

wurden also Antiseren erzeugt, die der Zielvorstellung entsprachen. Nach der Wiederaufnahme der Immunisierungsinjektionen wurden aber anti-Benzylpenicillin-Antikörper erhalten, die für den vorgesehenen Zweck nicht mehr geeignet waren. Interessant erscheint, daß alle drei Tiere eine gleichartige Reaktion zeigten. Stark individuelle Reaktionen wie bei den Legehennen konnten nicht beobachtet werden. Vaitukaitis et al. [196] berichten von einem ähnlichen Phänomen: bei der Immunisierung von Kaninchen mit Untereinheiten des Hormons HCG (human chorionic gonadotropin) verloren die Seren nach der Boosterinjektion ihre Spezifität, ohne daß grundlegende Zusammenhänge bekannt sind.

Die Entwicklung der Antikörper bei den *Legehennen* war nicht nur bezüglich des Titers, sondern auch bezüglich der Spezifität von Tier zu Tier unterschiedlich. Während vier Tiere Antikörper mit zufriedenstellender Kreuzreaktivität zu den betrachteten Penicillinen lieferten, waren die Kreuzreaktivitäten der Antikörper von Tier 79 über den gesamten Immunisierungszeitraum nur gering.

Bei Tier 15 zeigte sich eine interessante Entwicklung: Zu Beginn der Immunisierungsphase stieg der Antikörpertiter in den Dottern stark an. Diese Antikörper waren jedoch spezifisch für 6-Aminopenicillansäure und zeigten nur geringe Kreuzreaktivitäten zu den anderen Penicillinen. Im weiteren Verlauf sank der Titer wieder ab, während die Kreuzreaktivitäten ab einem bestimmten Zeitpunkt zunahm (Kap. 4.3.1.1.2).

Sowohl die Antikörper der Kaninchenserum als auch diejenigen aus den Dottern reagierten nicht mit dem Cephalosporin Cephalexin. Cephalexin besitzt die gleiche Seitenkette wie Ampicillin. Letzteres enthält jedoch ein System aus einem kondensierten β -Lactam- und einem Thiazolidinring. Cephalexin hat statt des Thiazolidinrings einen sechsgliedrigen Dihydrothiazin-Ring. Dieser Befund zeigt, daß der Thiazolidinring ein wichtiges Epitop bei der Haptenerkennung ist. Andererseits ist auch das Vorhandensein des β -Lactamrings wichtig, da auch ein Derivat mit geöffnetem β -Lactamring von den Antikörpern nicht erkannt wurde.

Auch Benzoesäure wurde von den aviären Antikörpern nicht erkannt. Dieses wurde getestet, da der verwendete Spacer ein Benzoesäurederivat war. Dies läßt sich so interpretieren, daß der Spacer durch das Trägerprotein abgeschirmt wurde, andererseits wird dadurch auch die Notwendigkeit des Spacers bestätigt. Bei direkter Kopplung der 6-Aminopenicillansäure an das Trägerprotein wäre dieses zum großen Teil durch das Protein abgeschirmt worden und wäre vom Immunsystem vermutlich nicht erkannt worden.

Auffällig hingegen ist die unerwartete und derzeit nicht erklärbare hohe Reaktivität der aviären Antikörper gegen Ovalbumin, die aus einer Kreuzreaktivität oder einer unspezifischen Reaktion resultieren kann. Man muß daher auch eine unspezifische Reaktion diskutieren, die auch mit anderen in Lebensmittelextrakten vorkommenden Proteinen auftreten könnte. Ein Deproteinierungsschritt vor der immunaffinitätschromatographischen Extraktreinigung scheint daher unverzichtbar.

Die Untersuchungen zeigen, daß das hergestellte Immunogen sehr gut geeignet ist, um in Legehennen und Kaninchen multispezifische Antikörper zu induzieren. Die Kreuzreaktivitäten der erhaltenen Antikörper für die veterinärmedizinische relevanten Penicilline sind so hoch, daß diese von den Antikörpern gut erkannt und gebunden werden.

6.5 Isolierung und Reinigung der Antikörper

Die Isolierung der Antikörper aus den *Kaninchenseren* erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung bei 50 % Sättigung. Durch dieses unspezifische Verfahren wurde lediglich die Globulinfraktion gewonnen. Da sich nach der Immunisierungspause die Spezifität der Antiseren unerwartet veränderte (Kap. 4.2.1.2.2), standen von den geeigneten Seren nur wenige Milliliter zur Verfügung, die zum Teil schon durch die aufwendigen, aber notwendigen Vortests verbraucht wurden. Auf eine affinitätschromatographische Reinigung mußte daher verzichtet werden.

Bei der Isolierung von Antikörpern aus *Eidottern* müssen die Lipoproteine des Dotters abgetrennt werden. Die Fällung mit Polyethylenglykol erlaubt die gleichzeitige Isolierung der Globuline und die Abtrennung der Lipoproteinfraktion. Nach Entfernen des Fällungsreagenzes durch Ultrafiltration waren die Antikörper bereits um den Faktor 375 gegenüber dem Dotter angereichert.

Die affinitätschromatographische Reinigung der Polyethylenglykolfraktion an immobilisierter 6-Aminopenicillansäure erwies sich als leistungsfähiges Verfahren zur Gewinnung spezifischer Immunglobuline, mit dem eine Anreicherung um den Faktor 3250 gegenüber dem Eidotter und um den Faktor 9 gegenüber der Polyethylenglykol-Fällung erzielt werden konnte.

Die gute Funktion der Haptensäule zeigt, daß die Kopplungsbedingungen, unter denen 6-Aminopenicillansäure an das Trägermaterial gebunden wurden (pH 8,3 über Nacht bei Raumtemperatur), nicht zu einer umfangreichen Spaltung des β -Lactamringes geführt haben. In diesem Fall hätten die mit dieser Säule isolierten Antikörper eine Spezifität für ein Penicilloyl-Derivat zeigen müssen, die jedoch nicht festgestellt wurde.

Der affinitätschromatographische Reinigungsschritt hat noch einen anderen Effekt: Bei der Immunitätschromatographie darf im Gegensatz zum ELISA die Assoziationskonstante der Antikörper nicht zu hoch sein, um den Analyten wieder eluieren zu können. Die affinitätschromatographische Reinigung der Antikörper ist daher auch als Selektionsschritt zu betrachten, bei dem diejenigen Antikörper, die eine zu hohe Assoziationskonstante aufweisen, nicht mehr von der Haptensäule eluiert werden und so von den spezifischen Antikörpern mit geringerer Assoziationskonstante getrennt werden.

Die Elution der spezifischen Antikörper von der Haptensäule erfolgte in zwei Fraktionen, von denen nur die erste Fraktion verwendet wurde. Die zweite Fraktion hatte ein um den Faktor 10 schwächeres Bindungsvermögen für Benzylpenicillin und 6-Aminopenicillansäure als die erste Fraktion.

Aus ungefähr 75 g Dotterprotein konnten 0,7 mg Antikörper isoliert werden, das entspricht einem Anteil von 0,9 mg spezifischer Antikörper pro 100 g Dotter.

Durch die Reinigung der Antikörper traten geringfügige Verschiebungen bei der Spezifität besonders für Benzylpenicillin auf, die die Eignung der Antikörper jedoch nicht verminderten.

Andieser Stelle zeigte sich, daß die Konzeption zur Immunogensynthese richtig war, um multispezifische Antikörper sowohl in Kaninchen als auch in Legehennen gegen Penicilline zu erzeugen. Die Isolierung und Reinigung der Antikörper aus Eidotter war erfolgreich. Es stellte sich allerdings auch heraus, daß die affinitätsgereinigten spezifischen Antikörper nur bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (in PBS) stabil waren. In PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert verloren Sie innerhalb weniger Tage ihre Aktivität. Aus der Literatur ist bekannt, daß aviäre

Antikörper physikalisch und chemisch instabiler sind als mammäre Antikörper [119, 121]. Über ihre Lagerstabilität liegen jedoch bezüglich der Lagerbedingungen nur unvollständigen Daten vor [122]. Aufgrund dieser Erfahrungen sollte für künftige Studien auf die Affinitätsreinigung der Antikörper verzichtet werden und stattdessen die gesamte Immunglobulinfraktion eingesetzt werden. Dieses setzt jedoch einen hohen Antikörpertiter im Eidotter voraus.

6.6 Herstellung und Leistungsfähigkeit der Affinitätssäulen

Die Ammoniumsulfatfraktion aus den *Kaninchenseren* wurde über den Kohlenhydratanteil an das hydrazidaktivierte synthetische Polymer-Trägermaterial Affi-Prep[®] Hz gebunden. Damit war sichergestellt, daß die Antigenbindungsstellen nicht durch eine ungünstige Kopplungsausrichtung durch das Trägermaterial blockiert wurden und optimal ausgenutzt werden konnten. Es wurde eine Säule mit 13,9 mg Globulin/ml Säulenbett gewonnen, die eine Kapazität für Benzylpenicillin von 10 ng/ml Gel besaß. Eine zweite Säule, die über den gleichen Kopplungsmechanismus mit einer Agarosebasis hergestellt wurde, enthielt 1,7 mg Globulin in einem ml Säulenbett bei einer Kapazität von 5 ng Benzylpenicillin. Auffällig war, daß die Bindungskapazität der Säulen nicht proportional mit der Proteindichte stieg. Dies ist dadurch zu erklären, daß sich bei einer zu hohen Proteindichte die Antikörper gegenseitig blockieren oder durch andere in der Globulinfraktion enthaltene, ebenfalls immobilisierte Proteine sterisch gehindert werden. Die Antigenbindungsstellen eines Antikörpers sind also durch die Nähe zu einem anderen Antikörper oder Protein teilweise nicht mehr zugänglich für den Analyten.

Über eine in die Untersuchungen einbezogene, von Usleber und Märtlbauer zur Verfügung gestellte Immunaффinitätssäule lagen keine Angaben über die Antikörperdichte vor. Sie war mit cyanbromidaktivierter Sepharose hergestellt. Die Antikörper waren also ungerichtet an die Matrix gebunden. Die Säule hatte eine Kapazität von 2,9 µg Cloxacillin/ml Säulenbett.

Für die geringen Säulenkapazitäten ist der im Serum festgestellte geringe Antikörpertiter verantwortlich. Es wurden zwar fast 14 bzw. 11 mg Globuline auf der Säule immobilisiert, der penicillinspezifische Anteil ist jedoch sehr gering, so daß die Bindungskapazität ebenfalls gering ist.

Bei der Immobilisierung der *aviären Antikörper* wurde festgestellt, daß sich diese nicht so einfach an einen Träger binden lassen wie Säugetierantikörper. Die Kopplung der affinitätsgereinigten Immunglobuline an Azlacton-aktiviertes Polymermaterial und an cyanbromidaktivierte Sepharose brachte nicht die gewünschten Resultate, die erhaltenen Säulen zeigten kein Bindungsvermögen für Benzylpenicillin.

Wurden dagegen die Antigenbindungsstellen der affinitätsgereinigten Immunglobuline mit Phenoxy-methylpenicillin blockiert, bevor die Immobilisierung vorgenommen wurde, konnte eine Affinitätssäule mit 2,5 mg IgY/ml Säulenbett bei einer Kapazität von rund 2 µg Benzylpenicillin/ml Gel gewonnen werden. Diese Möglichkeit der gerichteten Immobilisierung wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Eine unter den gleichen Bedingungen, allerdings unter Verwendung der mit Polyethylenglykol gefällten und nicht affinitätsgereinigten Proteinfraction hergestellte Säule hatte bei einer Proteindichte

von 3,3 mg/ml Gel eine Kapazität von nur 79 ng Benzylpenicillin.

Offenbar wurden die aviären Antikörper bevorzugt an ihren Antigenbindungsstellen an den Träger immobilisiert. Bei Serumantikörpern ist bekannt, daß die Aminofunktionen der Antigenbindungsstellen eine andere Säurekonstante aufweisen und damit unter den Bedingungen der Immobilisierung reaktiver sind als die übrigen Aminofunktionen [62]. Die aviären Antikörper werden in der Literatur dagegen wenig berücksichtigt. Über die strukturellen Unterschiede zwischen IgG und IgY wurde bereits in Kapitel 1.5.3.2 berichtet. Ob diese Unterschiede eine stärkere Verschiebung der Säurekonstante der terminalen Aminogruppen verursachen kann, wird in der Literatur nicht erwähnt, ist aber aufgrund der geschilderten Befunde nicht auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit, die aviären Antikörper ohne Beeinträchtigung der Antigenbindungsstellen zu immobilisieren, ist die Kopplung über Aldehydfunktionen, die durch Oxidation der Kohlenhydratreste im F_c-Teil generiert werden können, an ein Hydrazid-aktiviertes Trägermaterial. Dieses Verfahren wurde zur Immobilisierung der Serumantikörper durchgeführt. Bei den aviären Antikörpern wurde auf einen derartigen Versuch verzichtet, da dieses Verfahren einen zusätzlichen Oxidationsschritt beinhaltet, der möglicherweise die gegenüber IgG unstabilere Immunglobuline aus den Dottern schädigen könnte.

Da in einer Affinitätssäule maximal 500 - 600 µl Gel eingesetzt werden können, damit das benötigte Elutionsvolumen nicht zu hoch für ein automatisiertes Verfahren wird, kann mit dem Material auf der Basis der affinitätsgereinigten Antikörper eine Säulenkapazität von 1,2 µg erhalten werden. Eine Säule mit der immobilisierten Polyethylenglykolfraktion hätte eine Kapazität von weniger als 50 ng Benzylpenicillin. Während eine Kapazität von 1,2 µg für die automatische Rohextraktreinigung mit anschließender HPLC auch bei Vorkommen von zwei Penicillinen nebeneinander ausreichend sind, ist eine Kapazität von 50 ng zu gering (Kap. 4.2.3.2).

Hier werden die Vorteile der Gewinnung von spezifischen Antikörpern mittels Affinitätschromatographie bei Ausgangsmaterialien mit geringem Antikörpertiter deutlich. Durch die Verwendung von anti-6-APA-Antikörpern konnte die Säulenkapazität um den Faktor 25 gegenüber der Gesamtproteinfraktion gesteigert werden.

Die *Lebendauer* der Affinitätssäulen auf der Basis von aviären Antikörpern war im Gegensatz zur Kapazität nicht zufriedenstellend. Die Säulen waren nur drei bis vier Tage haltbar, wobei die Leistungsfähigkeit nicht durch die Analysenzyklen abnimmt, sondern bereits bei der Lagerung bei 4 °C. Schon zu einem früheren Zeitpunkt der Untersuchungen zeigte sich, daß die affinitätsgereinigten Immunglobuline in PBS bei 4 °C nur wenige Tage lagerfähig sind, während die in PBS gelöste Polyethylenglykolfraktion mindestens mehrere Wochen stabil ist. Die komplexe Matrix des Eidotters, die durch die Affinitätsreinigung entfernt wird, wirkt offenbar stabilisierend für die Antikörper. Es ist ein oft beobachteter Effekt, daß empfindliche Moleküle in einer komplexen Matrix stabiler sind, als in isolierter und gereinigter Form. Bei gereinigten Enzymen beispielsweise wird oft ein Protein (meist bovines Serumalbumin) oder Zucker zugegeben, um das Enzym zu stabilisieren. Shimizu et al. [197] berichten, daß aviäre Antikörper in Anwesenheit von hohen Konzentrationen (30 - 50 %) Saccharose oder Invertzucker gegenüber Hitze, Säure und Druck stabilisiert werden. In den eigenen Untersuchungen ließen sich die affinitätsgereinigten Antikörper erst bei -20 °C in PBS über längere Zeit (mindestens 2 Monate) lagern. Eine Stabilisierung der Antikörper durch die Immobilisierung trat nicht ein.

6.7 Analytik von Penicillinrückständen in Lebensmitteln

Zur Automatisierung von immunaffinitätschromatographischer Extraktreinigung und qualitativer und quantitativer Analyse per HPLC war die Affinitätssäule in ein komplettes Analysensystem zu integrieren. Die im Eluat der Affinitätschromatographie enthaltenen Penicilline waren an einer Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) anzureichern, bevor sie flüssigchromatographisch analysiert werden konnten, da die Konzentration im Eluat nicht hoch genug war.

Kritischer Punkt bei der Verknüpfung von Affinitätssäule und Festphasenextraktion war der bei der Festphasenextraktion aufgebaute Rückdruck von rund 10 bar. Dieser kam zustande durch die Kapillarwege sowie durch die zur Festphasenextraktion verwendete Kartusche, die ein RP-18-Material mit einer Korngröße von 5 µm enthielt. Bei Verwendung von Agarose oder anderen nicht druckstabilen Materialien in der IAC-Säule mußte deshalb die Apparatur aus zwei unabhängigen Teilsystemen zusammengestellt werden. Das erste Teilsystem wird nur mit geringem Druck betrieben und enthält die Immunaffinitätssäule, der zweite, unter hohem Druck stehende Teil enthält die SPE und die HPLC. Bei Verwendung von druckstabilen Trägermaterialien bei der Immunaffinitätschromatographie kann auf die Trennung verzichtet werden. Dann ist es aber Voraussetzung, daß das Probenaufgabesystem den hohen Druck aufbauen kann. Dieses war jedoch in dieser Arbeit nicht gegeben.

Zum Betrieb der Immunaffinitätssäule mußte ein Aufgabesystem mit einem Mindestvolumen von 5 ml verwendet werden. Dieses wurde mit einem Dilutor bewerkstelligt, der sowohl die Puffer als auch die Proben aufgegeben hat.

Zum Betrieb der Festphasenextraktion diente eine Gradientenpumpe, die das Konditionieren, die Probenaufgabe und das Regenerieren der Kartusche mittels Stufengradienten übernahm.

Die HPLC-Trennung erfolgte isokratisch, wobei die Probenaufgabe durch mechanisches Zuschalten der SPE-Kartusche in den Kreislauf erfolgte.

Zur Detektion diente ein UV-Detektor, der auf 230 nm für Milch und Muskel, auf 300 nm für Leber eingestellt wurde. Für die Detektion bei 300 nm war zusätzlich eine photochemische Nachsäulenderivatisierung (Bestrahlung bei 254 nm) erforderlich.

Mit der so zusammengestellten Apparatur wurde mit Standardlösungen ein Variationskoeffizient von 3 % für Cloxacillin bei einer auf Lebensmittelproben umgerechneten Konzentration vom 30 µg/kg erzielt. Die Wiederfindungsrate lag bei 68 %, wobei der Verlust sowohl bei der Immunaffinitätschromatographie als auch bei der Festphasenextraktion möglich ist.

Zur Aufgabe auf die IAC wird ein Probenrohextrakt benötigt. Dieser wurde aus *Milch* mittels Ultrafiltration hergestellt. Ein Ausschlußvolumen von 30 kDa hat sich als ausreichend erwiesen. Die Wiederfindungsraten für die Isoxazolylpenicilline lagen bei der EG-Höchstmenge von 30 µg/kg zwischen 62 und 90 % für die einzelnen Wirkstoffe bei einem Variationskoeffizienten von 9 %.

Tyczkowska et al. [190] stellten Adsorptionsverluste bei Benzylpenicillin von bis zu 50 % bei der Ultrafiltration von Milch fest und verdünnten die Milch daher vor der Filtration mit einem Gemisch aus Aceton, Methanol und Wasser. Dieses Gemisch führte in eigenen Untersuchungen zu Störungen im Chromatogramm. Die festgestellten Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Tyczkowska et al. verwendeten eine Ultrafiltrationsmembran mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa, während sich in dieser Arbeit ein Ausschlußvolumen von 30 kDa als ausreichend erwies. Die größere Porenweite

könnte zu einer Verminderung der Adsorptionsverluste führen. Außerdem arbeiteten Tyczkowska et al. mit dem gegenüber Aufarbeitungsverlusten empfindlicheren Benzylpenicillin, während in dieser Arbeit die robusteren Isoxazolylicilline untersucht wurden.

Bei der Extraktion von *Muskelfleisch* zeigte sich, daß mit rein wäßrigen Extraktionsmitteln nur geringe Ausbeuten zu erzielen sind. Da vor der Immunaффinitätschromatographie der Extrakt stark verdünnt wird, ist selbst bei einem Anteil von 50 % organischem Lösungsmittel bei der Extraktion nicht mit einer Schädigung der Antikörper zu rechnen.

Die Extraktion aus Rindermuskel und *Rinderleber* wurde mit 2 x 5 ml Acetonitril/Natriumchloridlösung (1 + 1) vorgenommen. Durch die Verdünnung der Extrakte mit PBS (250 µl auf 10 ml für Muskelfleisch und 500 µl auf 10 ml für Leber) verringerte sich der Anteil an organischem Lösungsmittel vor dem Auftrag auf die Immunaффinitätsäule auf 1,25 % bei Muskelfleisch bzw. 2,5 % bei Leber. Die Isoxazolylicilline wurden mit diesem Gemisch bei der EG-Höchstmenge von 300 µg/kg zu 54 %, 66 % bzw. 89 % aus Muskel und zu 60 % bzw. 65 % aus Leber mit einem Variationskoeffizienten von jeweils 1,5 % (Muskel) bzw. 6,5 % (Leber) extrahiert. Die klaren Extrakte eigneten sich zum direkten Einsatz in der IAC.

Die bei der Analyse der Penicilline aus Muskelfleisch festgestellten großen Unterschiede in der Wiederfindungsrate lassen sich dadurch erklären, daß nur Cloxacillin als wichtigster Vertreter der untersuchten Penicilline ausführlich untersucht wurde. Für die anderen beiden Penicilline lagen daher zu wenige Daten vor.

Die höhere Wiederfindungsrate bei der Untersuchung der Lebensmittel gegenüber der Wiederfindungsrate bei Standards zeigt, daß diese Untersuchungen nur modellhaften Charakter besitzen und noch vertieft werden müssen.

Betrachtet man die Blindwerte, die von Ausgangsmaterialien verschiedener Herkunft gewonnen wurden, fällt auf, daß diese nicht gleich aussehen. In keinem Fall traten jedoch Störungen auf, die die Erkennung und Quantifizierung eines der Penicilline störten.

Bei der Detektion bei 230 nm trat bei etwa 16,5 min ein Störpeak auf, auf dessen abfallender Flanke das Dicloxacillin eluiert. Bei der Detektion bei 300 nm nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung eluierte ein Störpeak in direkter Nachbarschaft zum Cloxacillin nach rund 14 min. Diese Peaks hatten ihre Ursache im verwendeten Acetonitril, das durch Destillation von technischem Acetonitril über Kaliumcarbonat erhalten wurde. Sie traten nur bei der HPLC auf, wenn die Analysenlösung vorher auf der Festphasenkartusche angereichert wurde. Die Signale ließen sich bei Verwendung von Acetonitril eines anderen Herstellers (Acetonitril zur HPLC) vermeiden. Probleme mit der Reinheit von Acetonitril bei der Verwendung in der HPLC sind aus der Literatur bekannt. Sie haben ihre Ursache in der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Reinigungsverfahren [198].

Die Untersuchungen zeigten, daß die verwendete Apparatur das vollautomatische Abarbeiten eines Probenrohextraktes erlaubte. Sollen mehrere Probenextrakte nacheinander automatisch analysiert werden, sind an der Anlage einige Modifikationen vorzunehmen. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten: Ein einfacher Weg ist die Erweiterung der Anlage um ein Schaltventil mit mehreren Eingängen und einem Ausgang, wie es bereits zur Pufferumschaltung am Dilutor verwendet wurde. Damit kann der

Probeneingang auf mehrere Eingänge erweitert werden.

Eine anderer Weg ist der Einbau eines Autosamplers mit einem Probenaufgabevolumen von 5 ml. Dieser würde den Dilutor ersetzen. Vorteil dieser Variante ist, daß eine Verschleppung von einer Probe zur anderen ausgeschlossen ist, da ein Autosampler entsprechende Spülroutinen beherrscht. Die jetzige Version mit Dilutor, Schaltventil und längeren Teflonzuleitungen erlaubt einen automatischen Spülvorgang nur mit hohem Aufwand.

6.8 Vergleich mit bisherigen Methoden

Bislang beinhalteten physikalisch-chemische Verfahren zur Rückstandsanalytik von Penicillinen in Lebensmitteln zeit- und materialaufwendige Arbeitsschritte zur Reinigung der Rohextrakte und zur Konzentrierung der Analyten. Boison et al. stellten ein HPLC-Verfahren für Gewebe [35] und Milch [199] vor, mit dem im Gegensatz dazu Benzylpenicillin relativ schnell und mit geringem Materialaufwand mittels HPLC analysiert werden kann. Allerdings ist das von Meetschen und Petz vorgestellte GC-Verfahren [39, 41] das einzige vom Bundesgesundheitsamt akzeptierte Routineverfahren zur Rückstandsanalytik von Penicillinen in Lebensmitteln [200] und soll hier mit dem automatisierten Verfahren mit immunaffinitätschromatographischer Rohextraktreinigung verglichen werden.

Die automatisierte Verknüpfung von Immunaffinitätschromatographie und HPLC hat eine erhebliche Zeit- und Lösungsmittelersparnis zur Folge. Die Abbildung 6-1 zeigt einen Vergleich des Zeitaufwandes zwischen der in dieser Arbeit entwickelten automatisierten Methode mit immunaffinitätschromatographischer Extraktreinigung und der gaschromatographischen Methode nach Meetschen [201]. Während bei der GC-Methode das Ergebnis für eine 1 Analyse erst nach über 11 Stunden vorliegt, sind mit der automatisierten Methode nur rund 2,5 Stunden nötig, wobei knapp die Hälfte des Zeitbedarfs vom automatisierten Teil der Methode benötigt werden. Der Zeitbedarf für sechs Analysen (drei Proben, eine Blindprobe und zwei Standards) liegt bei 16,25 Stunden, da die Analysen teilweise parallel durchgeführt werden können und der Zeitbedarf sich nicht addiert. Für die gleiche Analysenreihe werden mit der automatisierten Methode nur 4 Stunden benötigt. Auch im Lösungsmittelverbrauch unterscheiden sich die beiden Methoden sehr stark (Abb. 6-2). Während die gaschromatographische Methode mehr als 80 ml halogenierte organische Lösungsmittel verbraucht, kommen solche Lösungsmittel bei der automatisierten Methode nicht zum Einsatz. Auch der Verbrauch nichthalogener Lösungsmittel ist bei der automatisierten Methode wesentlich geringer. Dabei ist der im Kreislauf geführte HPLC-Eluent mit einbezogen unter der Voraussetzung, daß mit einem Liter 100 Analysen durchgeführt werden.

Außerdem ist zu beachten, daß ein manuelles Verfahren mit einer Vielzahl von Arbeitsschritten eine äußerst erfahrene Arbeitskraft erfordert, wogegen mit einem automatisierten Verfahren eine bessere Reproduzierbarkeit zu erwarten ist.

Die Gegenüberstellung der beiden Verfahren zeigt, daß mit dem in dieser Arbeit gezeigten Ansatz die Entwicklung eines automatisierten Verfahrens mit Immunaffinitätschromatographie für eine routinemäßige, sowohl zeit- als auch materialsparende und genaue Penicillinanalytik möglich ist.

Die zur Analytik benötigte Apparatur stellt zunächst eine hohe Investition dar, angesichts der

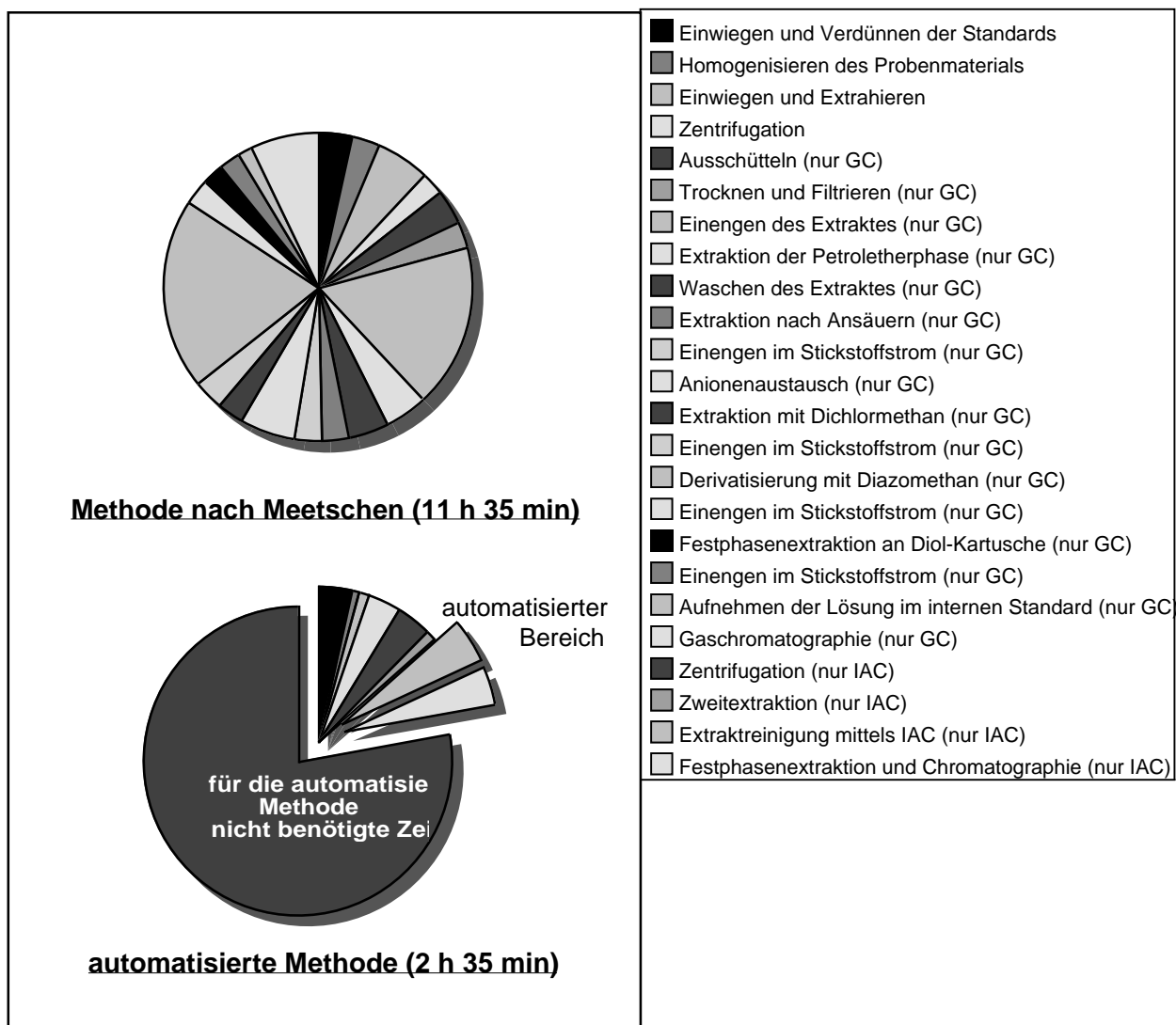


Abb. 6-1: Vergleich des Zeitaufwandes der GC-Methode und der automatisierten Methode (1 Analyse)

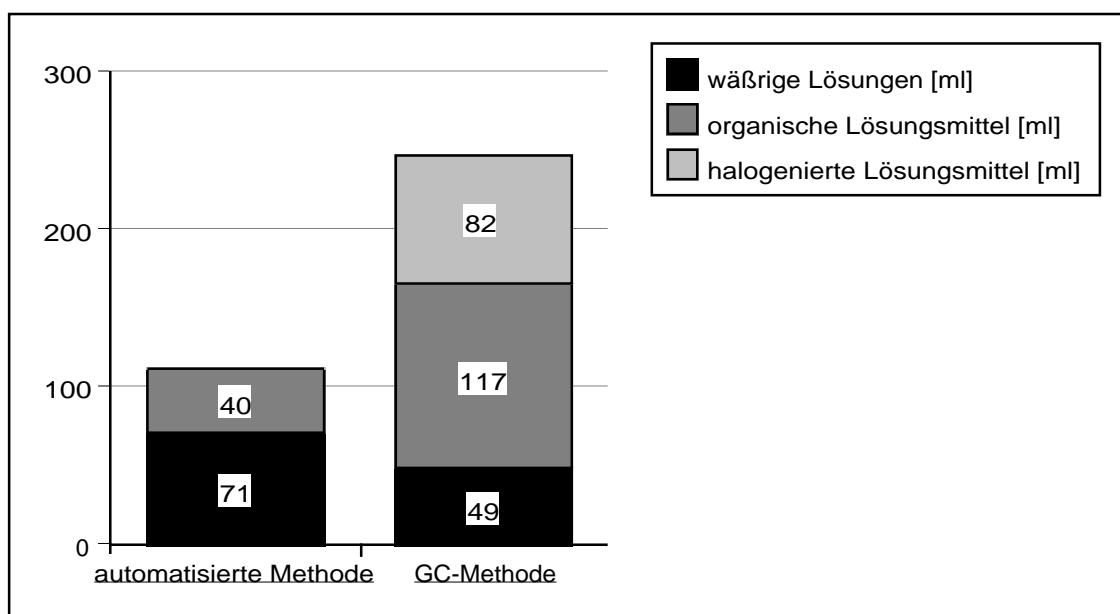


Abb. 6-2: Vergleich des Lösungsmittelverbrauchs der automatisierten Methode mit immunaffinitätschromatographischer Extraktreinigung und der GC-Methode

Ersparnisse an Lösungsmitteln und Arbeitskraft macht sich diese Investition jedoch schnell wieder bezahlt.

Ein Nachteil der immunaffinitätschromatographischen Methode ist, dass sich keine spektroskopische Bestätigung anschließt. Eine LC-MS-Kopplung ist zur Zeit noch zu aufwendig für die Routineanalytik. Hier liegt die Stärke des GC-Verfahrens, die eine Bestätigung mittels Massenspektroskopie einschließt. Denkbar ist hier eine off-line-Kopplung der Immunaffinitätschromatographie als Verfahren zur Rohextraktreinigung mit der GC-MS zur Quantifizierung und Bestätigung. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß die Extraktion der Penicilline aus dem Eluat der Immunaffinitätschromatographie in ein zur Methylierung geeignetes organisches Lösungsmittel bei den Mengen- und Konzentrationen, die im Eluat vorliegen, maximal zu 50 % gelingt.

6.9 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die direkte Untersuchung von entfetteter Milch nach Immunaffinitätschromatographie ohne Ultrafiltration zeigte, daß trotz der sehr spezifischen Antigen-Antikörperreaktion auf eine Entproteinierung nicht verzichtet werden konnte. Abbildung 6-3 zeigt ein Chromatogramm, daß bei der direkten Untersuchung von entfetteter Milch erhalten wurde. Zu viele Matrixbestandteile konnten nicht abgetrennt werden, so daß sie im Chromatogramm als Störungen auftraten. Für diese Störungen können sowohl derzeit nicht erklärbare Kreuzreaktivitäten oder unspezifische Reaktionen verantwortlich sein.

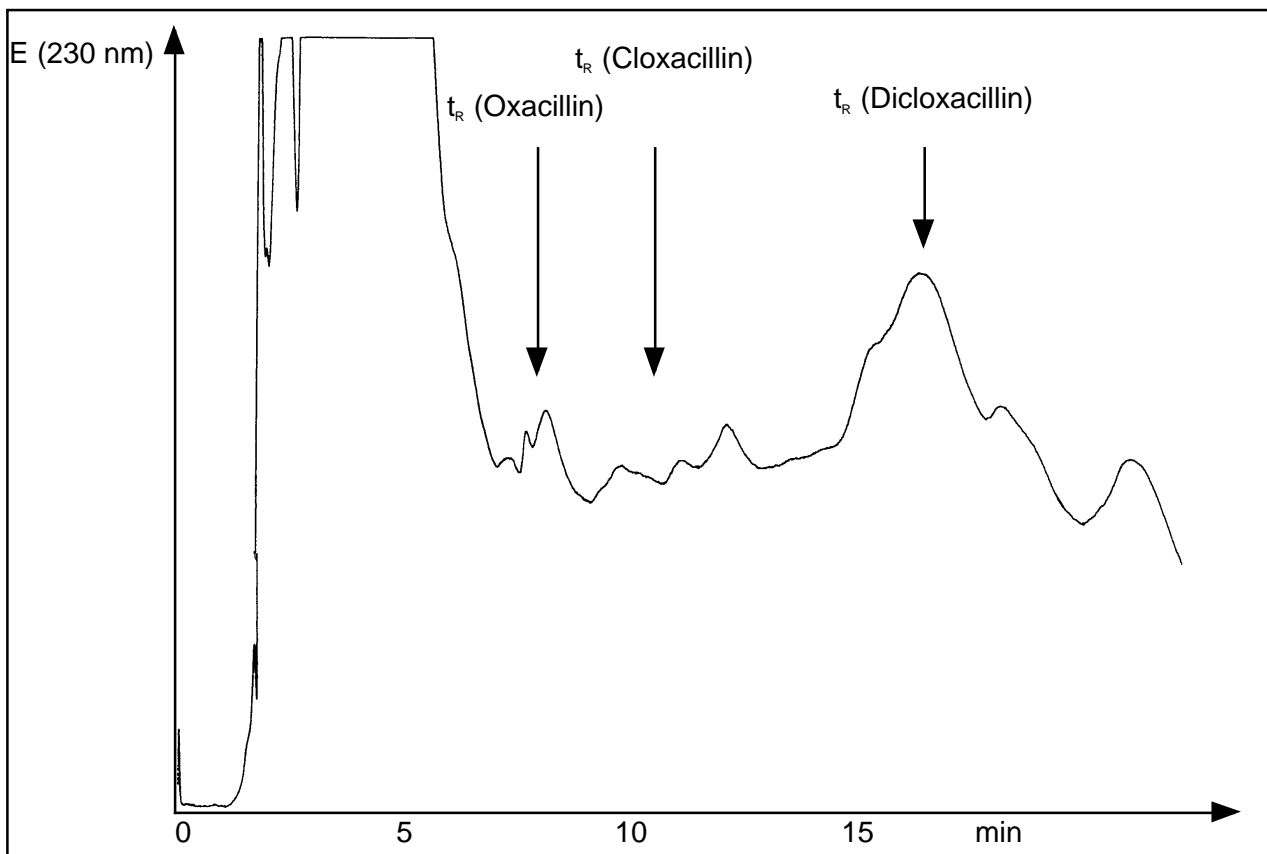


Abb. 6-3: entfettete Milch, Blindprobe **ohne Ultrafiltration**; Detektion: UV 230 nm

Auch wiederholte Waschschriffe vor der Elution konnten die Störungen nicht beseitigen.

Ein immunaffinitätschromatographisches Verfahren kann anschließend an einen rückstandspositiven Screening-Test zur Bestätigung, Identifizierung und Quantifizierung Verwendung finden, wobei ein on-line-Verfahren mit HPLC-Trennung mit einem Massenspektrometer zur spektroskopischen Bestätigung komplettiert werden sollte. Es ist jedoch auch möglich, an die immunaffinitätschromatographische Extraktreinigung off-line eine GC-MS-Untersuchung anzuschließen. Dabei ist allerdings die Extraktion der Analyten aus dem Elutionspuffer der Immunaffinitätschromatographie in ein organisches Lösungsmittel, in dem die Methylierung stattfindet, ein kritischer Schritt. Untersuchungen haben gezeigt, daß bei den im Elutionspuffer vorliegenden Mengen und Konzentrationen maximal 50 % der Penicilline extrahiert werden konnten.

Die Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens ist zur Zeit durch die mangelnde Verfügbarkeit der Immunaffinitätssäulen begrenzt. Ein nächster Schritt muß daher sein, monoklonale Antikörper mit vergleichbaren Eigenschaften herzustellen, so daß über eine längere Zeit große Mengen gleichartiger Antikörper zur Verfügung stehen. Die Antikörperherstellung kann auf der Grundlage des vorgestellten Immunogens erfolgen. Ein Immunogen mit verschiedenen Penicillinen als antigene Determinanten ist nur für die Herstellung polyklonaler Seren geeignet. Für monoklonale Antikörper darf jedoch nur eine Determinante vorhanden sein, da jede zusätzliche Determinante eigene Antikörperklone hervorruft.

Sollen polyklonale Antikörper verwendet werden, haben aviäre Antikörper den Vorteil, im gleichen Zeitraum in großen Mengen verfügbar zu sein, als Kaninchenantikörper [112], wobei allerdings durch die starke individuelle Reaktion der Legehennen geeignete Antikörper erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Beginn der Immunisierung verfügbar sein können. Die Literatur gibt keine Hinweise zur Verwendung von aviären Antikörpern zur Immunaffinitätschromatographie, bisher wurden diese ausschließlich zum Aufbau von ELISAs eingesetzt.

Spezifische aviäre Antikörper dürfen nach den hier erzielten Resultaten nicht affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. In der Literatur finden sich keine Hinweise zur Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Eidotter, so daß hier noch ein erheblicher Bedarf an weiteren Untersuchungen besteht. Denkbar ist der konsequente Zusatz von Zucker mit einer Konzentration von 50 % bei allen Schritten der Antikörperisolierung und Reinigung sowie bei der anschließenden Immunaffinitätschromatographie der Lebensmittelextrakte. Zucker haben gegenüber den zur Stabilisierung von Antikörpern ebenfalls in Frage kommenden Proteinen den Vorteil, daß sie bei der Immobilisierung der Antikörper nicht stören würden. Proteine würden wie die Antikörper ebenfalls immobilisiert werden, so daß ein großer Teil der Bindungsstellen am Trägermaterial blockiert würde.

Durch einen höheren Antikörpertiter in den Eidottern könnten Immunaffinitätssäulen mit genügend hoher Bindungskapazität zu erhalten werden, ohne daß eine affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörper erforderlich wäre. Ansatzpunkt dazu kann sein, ein Immunogen mit wesentlich höherer Belegungsdichte zu synthetisieren.

In jedem Fall ist es empfehlenswert, vor der Immobilisierung der aviären Antikörper die Bindungsstellen mit einem Penicillin, das keine Aminofunktionen enthält, zu blockieren. Auch bei Verwendung von Serumantikörpern sollte dieses Verfahren zu einer gerichteten Immobilisierung führen, so daß vergleichbare Ergebnisse wie bei der Immobilisierung an einen Hydrazid-aktivierten Träger erzielt werden sollten. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß ein zusätzlicher Oxidations- und Dialyseschritt

überflüssig ist.

Es war angestrebt, eine Multimethode zu entwickeln, die es erlaubt, mehrere Pencilline gleichzeitig zu analysieren. Da in dieser Arbeit für eine on-line-Kopplung mit der HPLC nur eine Säule für die Isoxazolympenicilline zur Verfügung stand, konnte dieser Aspekt nicht weiter verfolgt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die in der veterinärmedizinischen Praxis häufige Kombination eines Isoxazolympenicillins mit einem amphoteren Penicillin (Ampicillin oder Amoxicillin). Die Analyse derartiger Kombinationen ist jedoch erst möglich, wenn Immunaффinitätschromatographie-säulen mit entsprechenden Antikörpern zur Verfügung stehen.