

**ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG
ENZYMIMMUNOLOGISCHER VERFAHREN
ZUM NACHWEIS VON ALTERNARIOL**

Yvonne Christine Ackermann

**INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen**



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFBENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

**Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer
Verfahren zum Nachweis von Alternariol**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Yvonne Christine Ackermann

Tierärztin aus Landau

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber
Prof. Dr. Sybille Mazurek

Tag der Disputation: 17.02.2014

Für
Erna, Helmut und Oma Lina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Allgemeines zu Mykotoxinen	2
2.2	Bedeutung und Vorkommen der Gattung <i>Alternaria</i>	3
2.2.1	Allgemeines zu <i>Alternaria</i> -Spezies	4
2.2.2	Vorkommen von <i>Alternaria</i> -Spezies	4
2.2.3	<i>Alternaria</i> -Toxine	8
2.2.3.1	Toxizität von <i>Alternaria</i> -Extrakten.....	8
2.3	Charakterisierung von Alternariol	10
2.3.1	Erstbeschreibung	10
2.3.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften.....	10
2.3.3	Biologische Eigenschaften	11
2.3.3.1	Toxizität	11
2.3.3.2	Weitere Eigenschaften	12
2.3.4	Bildung, Vorkommen und Metabolismus.....	12
2.3.4.1	Alternariol-bildende Schimmelpilze	12
2.3.4.2	Biosynthese von Alternariol	13
2.3.4.3	Totalsynthese von Alternariol.....	15
2.3.4.4	Vorkommen in pflanzlichen Produkten	16
2.3.4.5	Vorkommen von Alternariol in der Umwelt sowie carry-over in Lebensmittel tierischen Ursprungs	22
2.3.4.6	Metabolismus von Alternariol	22
2.4	Verfahren zum Nachweis von Alternariol	23
2.4.1	Extraktion und Reinigung	23
2.4.2	Detektion und Quantifizierung von Alternariol	26
2.4.2.1	Dünnschichtchromatographie	26
2.4.2.2	Gaschromatographie	26
2.4.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	27
2.4.2.4	Immunologische Nachweisverfahren.....	33
2.4.2.4.1	Enzymimmunologische Verfahren	33
2.5	Rechtliche Regelungen	34

3	Material und Methoden	35
3.1	Materialien und Geräte.....	35
3.1.1	Chemikalien und Biochemika.....	35
3.1.2	Mykotoxine	36
3.1.3	Immunreagenzien.....	36
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	37
3.1.5	Nährmedien.....	37
3.1.6	Geräte und Sonstiges.....	38
3.1.7	Probenmaterial	39
3.2	Methodik	40
3.2.1	Herstellung der Immunreagenzien	40
3.2.1.1	Herstellung der Alternariol-Konjugate	40
3.2.1.1.1	Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol	40
3.2.1.1.2	Derivatisierung von Alternariol	41
3.2.1.1.2.1	Durchführung der Derivatisierung	42
3.2.1.1.2.2	Überprüfung und Charakterisierung der Derivate	42
3.2.1.1.3	Kopplung mittels Formaldehyd	43
3.2.1.1.4	Kopplung mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol	44
3.2.1.1.5	Überprüfung und Charakterisierung der mittels Formaldehyd bzw. 1,1'- Carbonyldiimidazol hergestellten Konjugate.....	45
3.2.1.1.6	Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat	45
3.2.1.1.6.1	Herstellung eines Alternariol-BSA-HRP-Konjugates	46
3.2.1.1.6.2	Überprüfung der Konjugatfraktionen.....	47
3.2.1.2	Gewinnung spezifischer Antikörper (polyklonale-Anti-Alternariol-Antikörper).....	47
3.2.1.2.1	Immunisierung	47
3.2.1.2.2	Serumgewinnung	48
3.2.1.2.3	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs und Ermittlung optimaler Immunreagenzien.....	48
3.2.1.2.4	Aufbereitung der Antiseren.....	49
3.2.1.3	Monoklonale-Anti-Alternariol-Antikörper	50
3.2.2	Acetylierung von Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen.....	50
3.2.3	Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests mit pAk-AOH....	50

3.2.3.1	Überprüfung der Anwendbarkeit der Alternariol-HRP-Konjugate	51
3.2.3.2	Auswahl geeigneter Kombinationen von Antiserum zu Alternariol-BSA-HRP-Konjugat.....	51
3.2.3.3	Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Beschichtung mit Antiserum)	52
3.2.3.4	Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Doppelantikörpertechnik)	53
3.2.4	Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit pAk-AOH (pAk-EIA)	53
3.2.4.1	Durchführung	53
3.2.4.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	54
3.2.5	Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit mAk-AOH (mAk-EIA)	55
3.2.5.1	Durchführung	55
3.2.5.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	56
3.2.6	Charakteristika der indirekten Testsysteme	58
3.2.6.1	Ermittlung der Sensitivität der Testsysteme	58
3.2.6.2	Ermittlung der Spezifität der Testsysteme	58
3.2.7	Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol	59
3.2.7.1	Erarbeitung einer geeigneten Probenvorbereitung.....	59
3.2.7.2	Bestimmung der Wiederfindung und der Reproduzierbarkeit.....	60
3.2.7.3	Durchführung und Auswertung der EIAs zum Nachweis von Alternariol.....	60
3.2.7.4	Immunchemischer Nachweis von Alternariol in Lebensmitteln.....	61
3.2.7.4.1	Nachweis von Alternariol in Getränken.....	61
3.2.7.4.2	Nachweis von Alternariol in Obst und Gemüse bzw. daraus hergestellter Erzeugnisse	61
3.2.7.5	Nachweis von Alternariol in <i>Alternaria</i> -Myzelextrakten nach kultureller Anreicherung.....	63
3.2.7.6	Vergleich der Ergebnisse des indirekten kompetitiven EIAs mit pAk- bzw. mAk- AOH.....	63
3.2.8	Untersuchung mittels HPLC	63
3.2.8.1	Probenuntersuchung.....	64

4	Ergebnisse	66
4.1	Herstellung der Immunreagenzien	66
4.1.1	Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol	66
4.1.2	Derivatisierung von Alternariol mittels Bernsteinsäureanhydrid	67
4.1.3	Herstellung und Überprüfung der Konjugate	67
4.1.4	Gewinnung spezifischer Antiseren	71
4.1.4.1	Immunisierungsverlauf	71
4.2	Entwicklung eines kompetitiven direkten EIAs.....	72
4.3	Entwicklung von zwei indirekten EIAs mit poly- bzw. monoklonalen Antikörpern	73
4.3.1	Optimierung des Testsystems mit polyklonalen Antikörpern (pAk-EIA)	73
4.3.2	Optimierung des Testsystems mit monoklonalen Antikörpern (mAk-EIA).....	75
4.3.3	Sensitivität und Reproduzierbarkeit.....	78
4.3.4	Spezifität	78
4.4	Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol	80
4.4.1	Probenvorbereitung	80
4.4.2	Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	82
4.4.3	Bestimmung von Alternariol in Lebensmitteln.....	86
4.4.3.1	Apfelerzeugnisse	87
4.4.3.2	Erdbeerkonfitüre	88
4.4.3.3	Tomatenprodukte	89
4.4.3.4	Weißwein	89
4.4.4	Bestimmung von Alternariol in Tomaten	92
4.4.5	Nachweis des Alternariol-Bildungsvermögen eines <i>Alternaria</i> -Stammes auf Malzextraktagar und in Hefeextrakt-Glucose-Bouillon mittels EIA	93
4.5	Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol- Konzentrationen	93
4.6	Untersuchung mittels HPLC	94
4.6.1	Methodenvergleich von EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol	94
4.6.1.1	Untersuchung der HPLC-Fractionen	97

5	Diskussion	99
5.1	Antikörper gegen Alternariol und Entwicklung enzymimmunchemischer Nachweisverfahren.....	99
5.2	Anwendbarkeit des pAk- bzw. mAk-EIAs	101
5.3	Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol- Konzentrationen	104
5.4	Methodenvergleich von EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol	105
5.5	Vorkommen von Alternariol in verschiedenen Lebensmitteln.....	105
5.6	Abschätzung der Gefährdung des Verbrauchers durch Alternariol belastete Lebensmittel.....	108
 6	 Zusammenfassung	 110
 7	 Summary	 112
 8	 Literaturverzeichnis	 114
 9	 Abkürzungsverzeichnis	 141

1 Einleitung

Alternariol ist ein Mykotoxin, das von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria*, insbesondere von *A. alternata*, gebildet wird. Aufgrund seiner chemischen Struktur gehört Alternariol zur Gruppe der Dibenzopyron-Derivate (KING und SCHADE, 1984).

Eine Kontamination mit Alternariol wurde in einer Vielzahl von pflanzlichen Produkten, wie zum Beispiel Getreide, Obst, Gemüse und den daraus hergestellten Produkten, nachgewiesen. In neueren Studien wurden zytotoxische, genotoxische, mutagene und estrogenartige Wirkungen von Alternariol aufgezeigt (LEHMANN *et al.*, 2006; BRUGGER *et al.*, 2006; PFEIFFER *et al.*, 2007a; TAN *et al.*, 2008; FEHR *et al.*, 2009). Da eine Risikoabschätzung für den Verbraucher aufgrund der unzureichenden Datenlage zurzeit nicht möglich ist (BfR, 2003), besteht ein Bedarf an einfachen und empfindlichen Screeningtests für Alternariol.

Der Nachweis von Alternariol in Lebens- und Futtermitteln erfolgt derzeit ausschließlich mit physikalisch-chemischen Methoden, vor allem mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Diese Methoden sind sehr zeit- und arbeitsaufwendig, benötigen geschultes Untersuchungspersonal und teure Geräte. Daher eignen sich diese Methoden nur bedingt zum Einsatz als Routineverfahren mit einem großen Probendurchsatz.

Im Gegensatz dazu sind enzymimmunologische Verfahren einfach und schnell durchzuführen und eignen sich daher besonders zum Screening größerer Probenzahlen. Weitere Vorteile dieser Verfahren sind die meist sehr einfache Probenaufbereitung und die hohe Nachweisempfindlichkeit. Deshalb wird mittlerweile eine Reihe von enzymimmunologischen Tests in der Routineanalytik von Mykotoxinen eingesetzt (USLEBER *et al.*, 1992; DIETRICH *et al.*, 1995; LIESENER *et al.*, 2010; LATIF, 2010; GROSS *et al.*, 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Gewinnung von Antikörpern gegen Alternariol, die Entwicklung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Alternariol sowie die Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Testsysteme anhand von natürlich und künstlich kontaminierten Proben.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines zu Mykotoxinen

Eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Toxinen wird durch Schimmelpilze, Algen, Pflanzen, Tiere und Bakterien produziert. Abhängig von ihrem Ursprung werden diese als Mykotoxine, Phycotoxine, Phytotoxine, Zootoxine und bakterielle Toxine bezeichnet (VAN EGMOND, 2004). Aufgrund ihrer Toxizität für Mensch und Tier ist die Kontamination von Lebens- und Futtermittel mit diesen Toxinen von großem Interesse. Nach Schätzungen der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen) sind bis zu 25 % der Weltproduktion von Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen kontaminiert (MÜCKE und LEMMEN, 2004). Angesichts der weiten Verbreitung sowie der Toxizität der Mykotoxine wurden diese von der World Health Organization (WHO) als eine der wesentlichen Quellen, für die von Lebensmitteln verursachten Erkrankungen, charakterisiert (WHO, 2002). Bis heute sind mehr als 400 verschiedene Mykotoxine bekannt, welche von über 350 Spezies gebildet werden (BRÄSE *et al.*, 2009).

Mykotoxine sind im Allgemeinen relativ kleine organische Moleküle, welche sich als sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen beschreiben lassen. Die natürliche Funktion vieler Mykotoxine ist nicht vollständig verstanden. Während manche dieser Metaboliten schädlich auf andere, konkurrierende Mikroorganismen wirken (BRÄSE *et al.*, 2009), helfen Mykotoxine von bestimmten parasitären Schimmelpilzen den Wirtsorganismus zu besiedeln (THOMMA, 2003). Bei Mensch und Tier können diese Toxine unter anderem zu akut-toxischen, karzinogenen, mutagenen, teratogenen, immuntoxischen und estrogenen Effekten führen (VAN EGMOND, 2004; COULOMBE, 1993; WEIDENBÖRNER, 1999). Zu den zurzeit bedeutendsten Mykotoxinen gehören die Aflatoxine, Ochratoxin A, Patulin, Fumonisine, Zearalenon und einige Trichothecene (VAN EGMOND, 2004). Eine weitere Gruppe sind die *Alternaria*-Toxine, bei denen aber, aufgrund der insgesamt unbefriedigten Datenlage, eine fundierte Risikobewertung derzeit nicht möglich ist (BfR, 2003).

2.2 Bedeutung und Vorkommen der Gattung *Alternaria*

Die Gattung *Alternaria* wurde mit *A. alternata* (ursprünglich *A. tenuis*) erstmals durch Nees im Jahre 1817 beschrieben (ROTEM, 1998). Seit dieser Zeit wurden mindestens vier unterschiedliche taxonomische Systeme zur Identifizierung von *Alternaria*-Spezies entwickelt. Dies führte dazu, dass viele Spezies mit verschiedenen Synonymen benannt werden (KWAŚNA, 1992). Aktuell wird die Gattung *Alternaria* der Klasse der Dothideomycetes in der Abteilung der Ascomycetes (Schlauchpilze) zu geordnet (KÜCK *et al.*, 2009). KWAŚNA und KOSIAK (2003) beschreiben *Lewia avenicola* Spezies *nova* als die teleomorphe (geschlechtliche Hauptfruchtform) Form der *Alternaria*-Spezies. Allerdings hat sich dies bisher nicht in der Taxonomischen Einteilung der Alternarien allgemein durchgesetzt.

Angaben zur Gesamtzahl an Spezies innerhalb der Gattung *Alternaria* variieren je nach Autor von 100 bis 300 (PANIGRAHI, 1997; KÜCK *et al.*, 2009). Diese unterschiedlichen Angaben sind auch auf die nicht einheitliche Taxonomie der Alternarien zurückzuführen. *A. alternata* ist die am häufigsten vorkommende Spezies innerhalb der Gattung *Alternaria* (LOGRIECO *et al.*, 2009). Weitere häufig vorkommende Spezies sind *A. solani*, *A. brassicae*, *A. brassicola*, *A. dauci* und *A. porri* (ROTEM, 1998). Die meisten *Alternaria*-Spezies sind entweder Saprophyten, die auf abgestorbenem Pflanzenmaterial leben, oder parasitär lebende Pflanzenpathogene, wie zum Beispiel *A. dauci*, die die „Möhrenschwärze“ bei Karotten verursacht (BUSER *et al.*, 2008). Diese pflanzenpathogenen *Alternaria*-Spezies können große wirtschaftliche Schäden verursachen, da sie Feldfrüchte oder schon geerntetes Obst und Gemüse befallen und somit schädigen. Des Weiteren synthetisieren verschiedene *Alternaria*-Spezies diverse Metaboliten, wobei insbesondere *A. alternata* eine Vielzahl an toxischen Metaboliten produzieren kann. Diese können Futter- und Lebensmittel kontaminieren und nachteilige Wirkungen auf Mensch und Tier haben (BOTTALICO und LOGRIECO, 1998; BARKAI-GOLAN, 2008).

2.2.1 Allgemeines zu *Alternaria*-Spezies

Charakteristisch für die Gattung *Alternaria* ist eine dunkelbraune bis schwarze Färbung des filzartigen Myzels und der Konidien. Die dunkle Färbung wird durch Melanin verursacht. Die Konidien sind zur Spitze hin kegelförmig verengt, haben Längs- und Quersepten und liegen einzeln oder in Ketten vor. Leicht zu verwechseln sind die Konidien von *Alternaria* mit den Konidien der Gattungen *Stemphylium* Wallroth und *Ulocladium* Preuss (PITT und HOCKING, 2009; BOTTALICO und LOGRIECO, 1998). Die genauen Unterscheidungsmerkmale können zum Beispiel in „Fungi and Food Spoilage“ (PITT und HOCKING, 2009) nachgelesen werden.

2.2.2 Vorkommen von *Alternaria*-Spezies

Alternaria-Spezies kommen ubiquitär vor (BOTTALICO und LOGRIECO, 1998). Sie sind häufig in der Luft, im Erdboden (POZZI *et al.*, 2005), auf Pflanzen (SOLFRIZZO *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 2007; ALY *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2009) und somit auch auf landwirtschaftlichen Produkten als Feld- und Lagerpilze zu finden. Da die Gattung *Alternaria* sehr viel frei verfügbares Wasser zum Wachsen benötigt, befallen die *Alternaria*-Spezies vor allem Obst und Gemüse (siehe Tabelle 1). Bei optimalen Wachstumsbedingungen können aber auch Getreide und andere pflanzliche Erzeugnisse infiziert werden (siehe Tabelle 2, PANIGRAHI, 1997; BOTTALICO und LOGRIECO, 1998).

Aber nicht nur aus pflanzlichen Produkten, sondern auch aus tierischen Matrices, wie zum Beispiel Viertelgemelksproben, Blauschimmelkäse, Schinken und Frühstücksfleisch, wurden *Alternaria*-Spezies isoliert (ISMAIL und ZAKY, 1999; SUTIC *et al.*, 1972; COSTA *et al.*, 1993; HAYALOGLU und KIRBAG, 2007). Auch auf Bedarfsgegenständen, wie zum Beispiel Weinkorken, wurden *Alternaria*-Spezies gefunden (CENTENO und CALVO, 2002). Darüber hinaus wurden bei Untersuchungen von Innenschimmel in Wohnräumen *Alternaria*-Spezies nachgewiesen (NIELSEN *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass *Alternaria*-Spezies und somit potentielle Toxinbildner auf vielen unterschiedlichen Substraten vorkommen können.

Tabelle 1: Vorkommen von *Alternaria*-Spezies in Früchten und Gemüse

Produktgruppe	Produkt	<i>Alternaria</i> -Spezies	Herkunft der Proben	Referenz
Früchte	Äpfel	<i>A. alternata</i>	Spanien, Argentinien	VIÑAS <i>et al.</i> , 1992; ROBIGLIO und LOPEZ, 1995
	Äpfel	<i>A. mali</i>	keine Angaben	SLIFKIN und SPALDING, 1970
	Blaubeeren	<i>Alternaria</i> sp.	USA	STINSON <i>et al.</i> , 1980
	Mandarinen	<i>A. alternata</i>	Spanien	LOGRIECO und VISCONTI, 1990
	Melonen	<i>A. cucumerina</i>	USA (Florida)	JACKSON und WEBER, 1959
	Weintrauben	<i>A. alternata</i>	Tschechien, Argentinien	OSTRÝ <i>et al.</i> , 2007; ROMERO <i>et al.</i> , 2005
	Zitrusfrüchte	<i>A. citrii</i>	USA	STINSON <i>et al.</i> , 1981
	Ackerbohnen	<i>Alternaria</i> sp.	Polen	ZAKRZEWSKA, 1991
	Auberginen	<i>A. alternata</i>	keine Angabe	VIJAYALAKSHMI und RAO, 1988
	Karotten	<i>A. radicina</i>	Niederlande	SOLFRIZZO <i>et al.</i> , 2004b
Gemüse	Kidney-Bohnen	<i>A. alternata</i>	Kanada	SANCHIS <i>et al.</i> , 1988
	Oliven	<i>A. alternata</i>	Italien	VISCONTI <i>et al.</i> , 1986
	Schwarze Bohnen	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>	Argentinien	CASTILLO <i>et al.</i> , 2004
	Tomaten	<i>A. alternata</i>	Ägypten	HASAN, 1995
	Tomaten	<i>A. tenuissima</i>	Dänemark, Spanien	ANDERSEN und FRISVAD, 2004
	Tomaten	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. longipes</i>	Argentinien	POSE <i>et al.</i> , 2004

Tabelle 2: Vorkommen von *Alternaria*-Spezies in Getreide, Ölsaaten und Futtermitteln

Produktgruppe	Produkt	<i>Alternaria</i> -Spezies	Herkunft der Proben	Referenz
Getreide	Fingerhirse	<i>A. alternata</i>	Indien	ANSARI und SHRIVASTAVA, 1990
	Gerste	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. brassicicola</i>	USA	BRUCE <i>et al.</i> , 1984
	Mais	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. radicina</i>	Argentinien	TORRES <i>et al.</i> , 1998
	Mais	<i>Alternaria</i> sp.	Argentinien	ROIGÉ <i>et al.</i> , 2009
	Maissilage	<i>Alternaria</i> sp.	Argentinien	ROIGÉ <i>et al.</i> , 2009
	Roggen	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. brassicae</i>	USA	BRUCE <i>et al.</i> , 1984
	Roggen	<i>A. alternata</i>	Polen	GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA <i>et al.</i> , 1989
	Sorghumhirse	<i>A. alternata</i>	USA, Indien	SAUER <i>et al.</i> , 1978; ANSARI und SHRIVASTAVA, 1990
	Sorghumhirse	<i>A. alternata</i> , <i>A. infectoria</i>	Australien	WEBLEY <i>et al.</i> , 1997
	Weizen	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. cheiranthi</i> , <i>A. raphani</i>	USA	BRUCE <i>et al.</i> , 1984
	Weizen	<i>A. alternata</i>	Polen, China	GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA <i>et al.</i> , 1989; LI und YOSHIZAWA, 2000

Fortsetzung Tabelle 2:

Produktgruppe	Produkt	<i>Alternaria</i> -Spezies	Herkunft der Proben	Referenz
Getreide	Weizen	<i>A. tenuissima</i>	Russland	GANNIBAL <i>et al.</i> , 2007
	Weizen	<i>A. alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. mali</i> <i>A. arborescens</i> , <i>A. gaisen</i>	Argentinien	PATRIARCA <i>et al.</i> , 2007
Ölsaaten	Weizen	<i>Alternaria</i> sp.	Argentinien	ROIGÉ <i>et al.</i> , 2009
	Winterweizen	<i>Alternaria</i> sp.	Deutschland	MÜLLER <i>et al.</i> , 2002
	Rapssaaten	<i>A. alternata</i>	Spanien	VIÑAS <i>et al.</i> , 1994
	Sonnenblumenkerne	<i>A. alternata</i>	Südafrika	DACERO <i>et al.</i> , 1997, POZZI <i>et al.</i> , 2005
	Futterweizen	<i>A. alternata</i> , <i>A. infectoria</i>	Australien	WEBLEY <i>et al.</i> , 1997
Futtermittel	Getreidefutter für Hühner	<i>Alternaria</i> sp.	Argentinien	NAICKER <i>et al.</i> , 2007
	Hafer	<i>A. alternata</i>	Südafrika	SACCHI <i>et al.</i> , 2009
	Luzerne	<i>Alternaria</i> sp.	Frankreich	NAICKER <i>et al.</i> , 2007
	Ölsaatenpellets	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>	Südafrika	LANIER <i>et al.</i> , 2009
	Weidegras	<i>Alternaria</i> sp.	Südafrika	NAICKER <i>et al.</i> , 2007

2.2.3 *Alternaria*-Toxine

Bisher wurden 125 verschiedene Sekundärmetaboliten für *Alternaria*-Spezies beschrieben (PANIGRAHI, 1997). Die am häufigsten untersuchten Toxine sind Alternariol, Alternariolmonomethylether, Altenuen, Altertoxin-I, -II und -III sowie Tenuazonsäure (LOGRIECO *et al.*, 2009). Diese Mykotoxine werden vor allem von *A. alternata*, aber auch von anderen Spezies wie zum Beispiel *A. solani* und *A. tenuissima* gebildet (BARKAI-GOLAN, 2008). Die genannten Mykotoxine können in drei Strukturklassen eingeteilt werden. Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen gehören zu den Dibenzopyron-Derivaten, Altertoxin-I, -II und -III gehören zu den Perylen-Derivaten und Tenuazonsäure ist ein Tetramicacid-Derivat (KING und SCHADE, 1984). In der Abbildung 1 ist eine Auswahl von Dibenzopyron-Derivaten dargestellt.

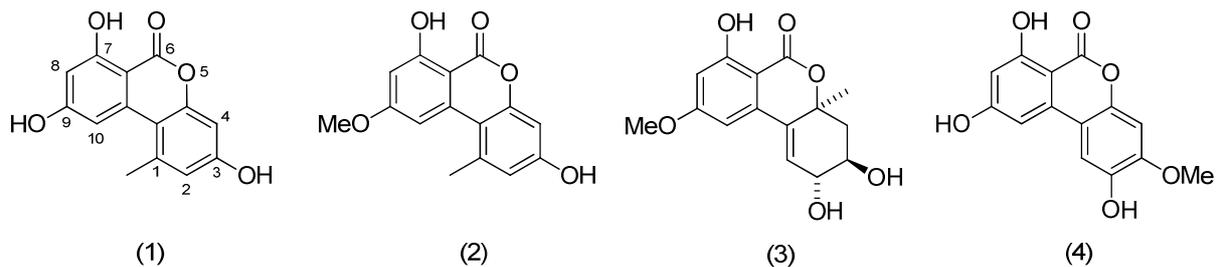


Abbildung 1: Darstellung einiger von Alternarien gebildeten Dibenzopyron-Derivate: Alternariol (1), Alternariolmonomethylether (2), Altenuen (3) und Altenuisol (4).

2.2.3.1 Toxizität von *Alternaria*-Extrakten

Literaturangaben zur akuten Toxizität von *Alternaria*-Toxinen beziehen sich meist auf Extrakte von Schimmelpilzkulturmaterial. Die Extrakte können daher auch weitere unbekannte Mykotoxine enthalten, die möglicherweise additiv oder synergistisch wirken und somit die Toxizität erhöhen (BRUCE *et al.*, 1984; ZAJKOWSKI *et al.*, 1991; PERO *et al.*, 1973).

Zur Untersuchung der akuten Toxizität wurden Fütterungsversuche an Ratten und Hühnern (CHRISTENSEN *et al.*, 1968; DOUPNIK und SOBERS, 1968; SAUER *et al.*, 1978;

COMBINA *et al.*, 1999) sowie Versuche mittels intraperitonealer Injektionen an Mäusen durchgeführt (SLIFKIN und SPALDING, 1970). Hierzu wurden verschiedene *Alternaria*-Kulturextrakte in unterschiedlichen Mengen verwendet. Diese Versuche führten bei 30 % bis 78 % der Tiere zum Tod. Darüber hinaus wurden von Schädigungen an Magen, Darm, Leber und Niere berichtet. SAUER *et al.* (1978) fanden Hinweise, dass vor allem Tenuazonsäure und Alertoxin-I für die akute Toxizität der Extrakte verantwortlich sind. Dies wurde auch durch Studien von ZAJKOWSKI *et al.* (1991) und VISCONTI *et al.* (1992) mittels *Artemia-salina*-Test bestätigt.

Für *Alternaria*-Kulturextrakte wurden auch zytotoxische Wirkungen in HeLa-Zellen festgestellt. Eine Extrakt-Konzentration von 5 µg/ml führte zu einer starken Hemmung des Zellwachstums und 20 µg/ml führten zum Tod aller Zellen (SLIFKIN und SPALDING, 1970). Von SCHRADER *et al.* (2001) wurde die mutagene Wirkung eines *A. alternata*-Extraktes im Ames-Test gezeigt. SCHWARZ *et al.* (2012) beschrieben genotoxische Effekte für zwei *A. alternata*-Kulturextrakte. Die Ergebnisse der Studie zeigten jedoch, dass die genotoxischen Effekte nicht durch Alternariol, Alternariolmonomethylether oder Tenuazonsäure ausgelöst wurden, sondern dass zwei noch nicht identifizierten Substanzen die DNA-Strangbrüche verursacht haben.

Anfang der 60er Jahre wurden epidemiologische Studien über das Vorkommen von Speiseröhrenkrebs im Norden von China durchgeführt. Auch in der Region Linxian wurde eine erhöhte Inzidenz von Speiseröhrenkrebs festgestellt (YANG, 1980). Dies wurde unter anderem mit einer erhöhten Vorkommenshäufigkeit von *A. alternata* in Weizen in dieser Region in Verbindung gebracht. Diese Vermutung führte zu intensiveren Studien über das Vorkommen und die biologische Aktivität von *A. alternata*. DONG *et al.* (1987) untersuchten Extrakte eines *A. alternata*-Stammes, welcher aus Getreide aus Linxian isoliert wurde. Die Extrakte dieser Schimmelpilzkultur zeigten bei einer Hamsterzelllinie (V97) direkte mutagene Wirkung, in Mausfibroblasten verursachten sie morphologische Veränderungen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass *A. alternata*-Toxine ein ätiologischer Faktor für Speiseröhrenkrebs in dieser Region sein könnten. Auch ZHEN *et al.* (1991) zeigten, dass Extrakte von *A. alternata*-Isolaten aus Getreide aus Linxian mutagen waren. Diese Extrakte verursachten Schäden an prokaryotischer, tierischer und menschlicher DNA.

2.3 Charakterisierung von Alternariol

2.3.1 Erstbeschreibung

RAISTRICK *et al.* (1953) untersuchten den Extrakt von zwei *A. alternata*-Stämmen. Dieser Extrakt verfärbte sich nach einer Reaktion mit ethanolischer Eisenchloridlösung violett. Verantwortlich für diese Farbreaktion waren unter anderem zwei Substanzen, die RAISTRICK *et al.* aus dem Extrakt isolierten und Alternariol bzw. Alternariolmonomethylether nannten. Diese zwei Substanzen waren die ersten beschriebenen Dibenzopyron-derivate, die aus einem Schimmelpilz isoliert wurden (FREEMAN, 1965).

2.3.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Alternariol kristallisiert in Ethanol als farblose Nadeln und sublimiert bei hohem Vakuum bei 250 °C (RAISRICK *et al.*, 1953). Bei Bestrahlung mit UV-Licht (Ultraviolett-Licht; 366 nm) fluoresziert Alternariol blau (WITTKOWSKI *et al.*, 1983).

Nachfolgend sind einige wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften von Alternariol aufgeführt: (Angaben nach: SCOTT, 2001; SCHROEDER und COLE, 1977).

Summenformel:	C ₁₄ H ₁₀ O ₅
Chemische Bezeichnung:	3,7,9-trihydroxy-1-methyl-6 <i>H</i> -dibenzo(<i>b,d</i>)pyran-6-one
Molekulargewicht:	258 g/mol
maximale Absorption in Methanol:	256 nm
Schmelzpunkt:	350 °C

Alternariol ist unter anderem gut in Aceton, Dichlormethan, Ethanol, Ether, Methanol, Tetrahydrofuran, kalter wässriger Natronlauge, kalter wässriger Natriumcarbonatlösung und konzentrierter Schwefelsäure löslich (SCHADE und KING, 1984).

2.3.3 Biologische Eigenschaften

2.3.3.1 Toxizität

Bezüglich der akuten Toxizität von Alternariol sind nur recht wenige Daten verfügbar. PERO *et al.* (1973) konnten mittels intraperitonealer Injektion bei Mäusen eine mittlere letale Dosis von über 400 mg/kg Körpergewicht feststellen. Im *Artemia salina*-Test liegt nach Schätzungen von PANIGRAHI und DALLIN (1994) die mittlere letale Dosis für Alternariol bei 100 µg/ml. Dies zeigt, dass die akute Toxizität von Alternariol sehr gering ist (OLSEN und VISCONTI, 1988; OSTRÝ, 2008).

Im Gegensatz dazu konnten zytotoxische Wirkungen von Alternariol gegenüber Epidermoidkarzinomzelllinien, der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und Maus Lymphoblasten in einem Konzentrationsbereich von 1,7–6 µg/ml nachgewiesen werden (TAN *et al.*, 2008; PERO *et al.*, 1973; ALY *et al.*, 2008). LEHMANN *et al.* (2006) zeigten, dass Alternariol den Zellzyklus beeinflusst und dadurch die Zellproliferation hemmt.

Darüber hinaus stellten PERO *et al.* (1973) bei Mäusen fest, dass subkutan verabreichtes Alternariol ab 100 mg/kg fetotoxisch wirkte. Im Gegensatz dazu führten Alternariol-Injektionen (1 mg/Ei) in den Dottersack von Hühnereiern weder zu fetotoxischen noch zu teratogenen Reaktionen der Embryonen (GRIFFIN und CHU, 1983).

Untersuchungen zur Mutagenität von Alternariol wurden unter der Verwendung verschiedener *Salmonella typhimurium*-Stämme und eines *Escherichia coli*-Stammes durchgeführt. Die bisher veröffentlichten Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Einige Untersuchungen zeigten, dass Alternariol nicht oder nur schwach mutagen ist (SCOTT und STOLTZ, 1980; DAVIS und STACK, 1994; SCHRADER *et al.*, 2001), während andere Untersuchungen die Mutagenität von Alternariol deutlich nachwiesen (ZHEN *et al.*, 1991; SCHRADER *et al.*, 2006). Kürzlich konnte in zwei verschiedenen Testsystemen mit Säugetierzellen übereinstimmend das mutagene Potential von Alternariol gezeigt werden (BRUGGER *et al.*, 2006).

Auf molekularer Ebene werden vor allem genotoxische Effekte für die mutagenen Wirkung von Alternariol beschrieben. Die Ergebnisse von Genotoxizitätsstudien zeigten, dass Alternariol in Säugetierzellen zu einer Induktion von Mikrokernen führt (LEHMANN *et al.*,

2006) und DNA-Strangbrüche verursacht (LIU *et al.*, 1992; PFEIFFER *et al.*, 2007a; FEHR *et al.*, 2009). FEHR *et al.* (2009) beschrieben als mögliche Ursache für die DNA-Strangbrüche eine Interaktion zwischen Alternariol und der Topoisomerase I bzw. II (Enzym, das für die Topologie von DNA-Molekülen verantwortlich ist).

Im Hinblick auf die Frage, ob Alternariol Speiseröhrenkrebs verursachen kann, zeigten die Untersuchungen von LIU *et al.* (1992), dass Alternariol zu einer Proliferation in humanem fetalem Speiseröhrenepithel führen und dort Onkogene aktivieren kann.

2.3.3.2 Weitere Eigenschaften

Alternariol weist antibakterielle Wirkungen auf, beispielsweise führte das Toxin ab Konzentrationen von 60 µg/Platte zu einer Hemmung im *Bacillus mycoides*-Test (PERO *et al.*, 1973). Ab 5 µg/g Kulturmedium wurde das Wachstum grampositiver Bakterien gehemmt (FREEMAN, 1965).

TIEMANN *et al.* (2009) zeigten, dass Alternariol im niedrigen µM-Bereich die Progesteron-Sekretion von kultivierten Schweine-Granulosazellen spezifisch hemmt. LEHMANN *et al.* (2006) untersuchten die estrogenartige Wirkung von Alternariol und zeigten, dass Alternariol ca. 0,01 % der estrogenen Wirkung von 17β-Estradiol besitzt. Im Gegensatz dazu konnte WOLLENHAUPT *et al.* (2008) in endometriellen Zellen des Schweins keine estrogenartige Wirkung von Alternariol feststellen.

2.3.4 Bildung, Vorkommen und Metabolismus

2.3.4.1 Alternariol-bildende Schimmelpilze

Die aus lebensmittelhygienischer Sicht wichtigsten Alternariol-Produzenten dürften die *Alternaria*-Spezies sein. Die am häufigsten als Alternariol-Bildner beschriebene Spezies ist *A. alternata* (LOGRIECO *et al.*, 2009). *A. alternata* ist auf vielen Obst- und Gemüsesorten ein wichtiger Verderbniserreger. Weitere *Alternaria*-Spezies werden ebenfalls häufig von pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen und können Alternariol bilden, beispielsweise

A. brassicae, *A. brassicicola*, *A. citri*, *A. solani* und *A. tenuissima* (BOTTALICO und LOGRIECO, 1998).

Eine Alternariol-Synthese wurde auch für Schimmelpilzspezies außerhalb der Gattung *Alternaria* beschrieben. ANDERSEN und FRISVAD (2004) isolierten von einer mit Schimmel befallenen Tomate *Botrytis cinera*. Nach Anzucht auf Hefe-Extrakt-Sucrose-Agar konnte Alternariol in der Kultur nachgewiesen werden. In Ungarn wurde 2007 von TÓTH *et al.* aus Weizen *Pithomyces chartarum* isoliert. Alle Isolate produzierten unter anderem Alternariol. TAN *et al.* (2009) zeigten, dass auch *Stagonospora nodorum* Alternariol bilden kann.

Interessanterweise wurde aber auch die Bildung von Alternariol durch endophytische Pilze und Flechten beschrieben. TAN *et al.* (2008) isolierten von einer Mangrove von der Küste des Südchinesischen Meeres einen endophytischen Pilz (Nr. 2240) und zeigten, dass dieser Alternariol bildet. Am Ufer der Ostsee wurde *Phomopsis* sp. von Salz-Steinklee und *Acremonium* von Spitzwegerich isoliert. Für beide endophytischen Pilze wurde eine Alternariol-Bildung beschrieben (DAI *et al.*, 2005; HUSSAIN *et al.*, 2007). Aber nicht nur in Kulturen endophytischer Pilze wurde Alternariol nachgewiesen, sondern auch, wie eine Studie von TANAHASHI *et al.* (2003) zeigte, in Kulturen der Flechte *Graphis cognata*.

2.3.4.2 Biosynthese von Alternariol

Wie viele andere Mykotoxine, zum Beispiel Aflatoxine, Ochratoxine oder Zearalenon, kann Alternariol der Naturstoffklasse der Polyketide zugeordnet werden (BRÄSE *et al.*, 2009). Als Polyketide werden Naturstoffe bezeichnet, deren Biosynthese über den so genannten Polyketidweg verläuft (STAUNTON und WEISSMAN, 2001). Hierbei koppeln spezielle Enzymkomplexe (Polyketid-Synthasen) Coenzym A-aktivierte Acyl-Gruppen zu Polyketonen. In darauf folgenden Schritten sorgen weitere Enzyme (wie zum Beispiel Carboxylasen, Zyklasten, Dehydrogenasen, Aromatasen) für die strukturelle Vielfalt der Polyketide. Alternariol ist ein Heptaketid und besteht somit aus sieben Acyl-Einheiten (Abbildung 2).

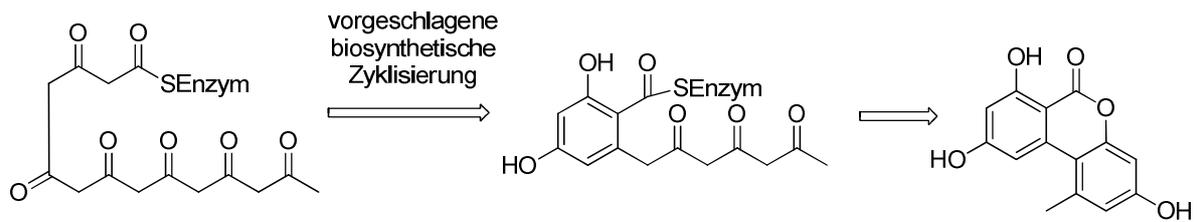


Abbildung 2: Vorgeschlagene Biosynthese für Alternariol.

Die Biosynthese von Alternariol in *A. alternata* findet vor allem in der späten exponentiellen Wachstumsphase statt (SÖDERHÄLL *et al.*, 1978). HÄGGBLOM (1987) zeigte, dass die Bildung von Alternariol nicht nur in den Hyphen, sondern auch in den neu gebildeten Konidien stattfindet. Die Fähigkeit zur Toxinproduktion kann bei verschiedenen Stämmen einer Spezies sehr unterschiedlich sein. So produzierten unter gleichen Laborbedingungen unterschiedliche *A. alternata*-Stämme, die aus Getreide isoliert wurden, Alternariol in Konzentrationen zwischen 22 mg/kg und 2400 mg/kg (ZAJKOWSKI *et al.*, 1991). Außerdem ist die Biosynthese von Alternariol von verschiedenen äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel Temperatur und Nährmedium, abhängig. Unter anderem wurde Reis als ein gutes natürliches Substrat beschrieben (BURROUGHS *et al.*, 1976; CHULZE *et al.*, 1994). *A. alternata* produziert Alternariol bei Temperaturen zwischen 5 °C und 35 °C, wobei die optimale Temperatur bei 25–28 °C liegt (MAGAN *et al.*, 1984; HASAN, 1995). MAGAN *et al.* (1984) berichteten, dass eine Alternariol-Synthese bevorzugt bei a_w -Werten (Wasseraktivität) des Nährmediums zwischen 0,90 und 0,98 stattfindet.

Unter Lichteinfluss wurde die Alternariol-Synthese von *A. alternata* unter Laborbedingungen gehemmt, wobei das Myzelwachstum nicht beeinflusst wurde (SÖDERHÄLL *et al.*, 1978; HÄGGBLOM und NIEHAUS, 1987). Weitere Möglichkeiten, die Alternariol-Synthese zu hemmen, liegen in der Nährstoffversorgung von *A. alternata*. Eine Zugabe von Stickstoff in Form von Natriumnitrat, der sehr wahrscheinlich die Bildung von wichtigen Enzymen im Polyketidweg inhibiert oder die Zugabe von Cerulenin, das die Fettsäuresynthese hemmt, wurden hier genannt (ORVEHED *et al.*, 1988; HILTUNEN und SÖDERHÄLL, 1992).

2.3.4.3 Totalsynthese von Alternariol

In den letzten Jahrzehnten beschrieben mehrere Autoren Methoden zur chemischen Totalsynthese von Alternariol (HARRIS und HAY, 1977; SÓTI *et al.*, 1977; LEEPER und STAUNTON, 1984; ABELL *et al.*, 1986; KANAKAM *et al.*, 1990). Die ersten Arbeiten verwendeten biomimetische Synthesen, welche Rückschlüsse auf die Biosynthese zuließen (HARRIS und HAY, 1977; LEEPER und STAUNTON, 1984). Kürzlich beschrieben KOCH *et al.* (2005) einen interessanten synthetischen Zugang, bei dem eine Suzuki-Kupplung als Schlüsselschritt Anwendung findet (MIYAURA und SUZUKI, 1995). Eine Zusammenfassung der Synthese ist in Abbildung 3 dargestellt. Diese Totalsynthese verläuft über sieben Stufen und erzeugt Alternariol in akzeptablen Mengen (BRÄSE *et al.*, 2009).

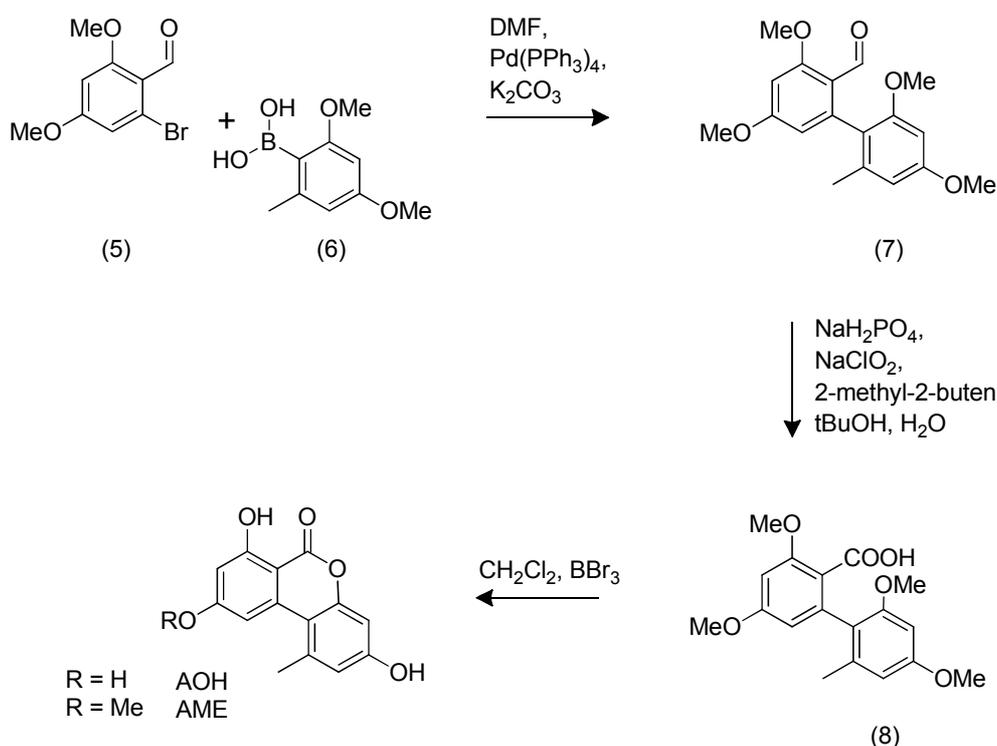


Abbildung 3: Ausschnitt aus der Totalsynthese von Alternariol nach KOCH *et al.*, 2005. Die Palladium-katalysierte Suzuki-Kupplung des Aldehyds (5) mit der Organoboronsäure (6) erzeugt dabei ein Biphenylaldehyd (7). Durch die darauf folgende Oxidation entsteht eine Biphenylcarbonsäure (8) und die abschließende Demethylierung führt zu einer isolierbaren Mischung von Alternariol und Alternariolmonomethylether.

2.3.4.4 Vorkommen in pflanzlichen Produkten

Da *Alternaria*-Spezies fast weltweit verbreitet sind (ROTEM, 1998) und da der Befall von pflanzlichen Lebensmitteln mit Alternarien sowohl während des landwirtschaftlichen Anbaus, als auch nachfolgend bei der Lagerung erfolgen kann (STINSON *et al.*, 1980), wurde Alternariol in relativ vielen Lebensmitteln nachgewiesen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über Alternariol-Konzentrationen in untersuchten Lebensmitteln, wobei bei diesen Lebensmitteln kein sichtbarer Verderb zu erkennen war. In Gemüse und Früchten, die sichtbare Anzeichen eines Befall mit *Alternaria* oder eines Verderbs aufwiesen, waren die gefundenen Alternariol-Gehalte wesentlich höher. In Tomaten mit schwarzen Läsionen an der Oberfläche konnte ein Alternariol-Gehalt von bis zu 5,3 mg/kg nachgewiesen werden (STINSON *et al.*, 1981). Außerdem wurde in Äpfeln, die einen Befall mit *Alternaria* zeigten, Alternariol-Konzentration von 58,8 mg/kg gefunden (STINSON *et al.*, 1981). Auch in Mandarinen und Oliven konnten Alternariol-Mengen im mg/kg-Bereich nachgewiesen werden (VISCONTI *et al.*, 1986; LOGRIECO und VISCONTI, 1990). Nicht nur in Lebensmitteln, sondern auch in Futtermitteln wurde Alternariol entdeckt. Eine Übersicht über untersuchte Futtermittel ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Tabellen 3 und 4 zeigen, dass Alternariol in vielen Produkten in einer Konzentration von bis zu 10 µg/kg vorkommt. Darüber hinaus wurden auch Alternariol-Konzentrationen von weit über 100 µg/kg zum Beispiel in Tomatenmark oder Sonnenblumenkernen gefunden.

Die Verteilung der Alternariol-Konzentration innerhalb eines Produktes in Abhängigkeit vom Befall wurde in verschiedenen Studien untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass sich die höchsten Alternariol-Konzentrationen im Bereich der Schadstelle befinden und dann mit zunehmendem Abstand zu der Läsion abnehmen (HASAN, 1995; ROBIGLIO und LOPEZ, 1995). MAGNANI *et al.* (2007) zeigten, dass Mandarinen die sichtbar mit der *Alternaria*-Braunfleckenkrankheit befallen waren, nur in der äußeren Flavedoschicht (Exokarp, orangefarbene Haut) Alternariol-Konzentrationen bis 17,4 µg/kg enthielten. In der inneren Albedoschicht (Mesokarp, weiße Haut) konnte kein Alternariol nachgewiesen werden.

Weitere Erkenntnisse über die Relevanz einer Belastung von Lebensmitteln mit Alternariol können auch durch Stabilitätsstudien erhalten werden. COMBINA *et al.* (1999) untersuchten den Einfluss von Wärmebehandlungen auf Alternariol in Sonnenblumenmehl und zeigten, dass Alternariol gegenüber Temperaturen von 100 °C für 90 min in einer feuchten Umgebung

stabil ist. Erst Temperaturen von 121 °C und damit verbunden erhöhter Druck führten nach einer Erhitzungsdauer von 30 min zu einer 50%igen Abnahme der Alternariol-Konzentration.

SIEGEL *et al.* (2010) untersuchten, ob der Alternariol-Gehalt in Weizenmehl durch den Backvorgang reduziert werden kann. Erst bei Temperaturen von 230 °C und einer Erhitzungsdauer von 60 min konnte eine geringe Abnahme des Alternariol-Gehaltes beobachtet werden. Dies zeigt, dass der Alternariol-Gehalt des Mehles nicht durch einen normalen Backvorgang reduziert wird (SIEGEL *et al.*, 2010). Auch führte eine Erhitzung von kontaminiertem Apfelsaft auf 80 °C für 20 min nicht zu einer Reduktion von Alternariol (SCOTT und KANHERE, 2001b). Im Gegensatz dazu berichteten SOLFRIZZO *et al.* (2005), dass bei der Herstellung von Karottensaft aus künstlich kontaminierten Karotten der Alternariol-Gehalt um über 98 % reduziert werden konnte. Welcher der Bearbeitungsschritte zu der Reduktion führte, wurde nicht beschrieben. Insgesamt weisen die bisher publizierten Studien also darauf hin, dass eine übliche technologische Bearbeitung von Lebensmitteln nicht zu einer wesentlichen Reduktion des Alternariol-Gehaltes führt.

Tabelle 3: Vorkommen und Gehalte von Alternariol in pflanzlichen Lebensmitteln

Probenmatrix	n	n pos.	pos. (%)	Alternariol ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)			Nachweissystem	NWG ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	BG ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	Referenz
				Med.	MW	Max.				
Apfelprodukte	18	0	0	---	---	---	HPLC	10	k.A.	WITTKOWSKI <i>et al.</i> , 1983
Apfelsaft	4	k.A.	75	0,17	k.A.	0,22	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Apfelsaft	7	0	0	---	---	---	HPLC	1,6	k.A.	DELGADO <i>et al.</i> , 1996
Apfelsaft	11	9	82	0,88	1,2	2,4	HPLC-MS/MS	0,01–0,08	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003
Apfelsaft	8	3	38	2,2	2,7	5,0	HPLC	k.A.	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 1997
Apfelsaftkonzentrat	32	17	53	k.A.	k.A.	5,42	HPLC	1,6	k.A.	DELGADO und GÓMEZ-CORDOVÉS, 1998
Cranberrysaft	5	1	20	---	---	0,4	HPLC	0,4	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Erbsen	84	0	0	---	---	---	HPLC-FL	3,0	8,0	KRÁLOVÁ <i>et al.</i> , 2006
Gemüsesaft	1	1	100	---	k.A.	7,82	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Glühwein	2	2	100	2,38	k.A.	2,7	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Himbeersaft	1	1	100	---	---	0,84	HPLC-MS/MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003
Karotten*	266	0	0	---	---	---	HPLC	5	k.A.	SOLFRIZZO <i>et al.</i> , 2004a
Karottenprodukte	87	0	0	---	---	---	HPLC	5	k.A.	SOLFRIZZO <i>et al.</i> , 2005
Mandarinen	4	2	50	3,1	3,1	3,7	HPLC-MS/MS	0,13	0,5	MAGNANI <i>et al.</i> , 2007
Orangensaft	2	2	100	0,20	k.A.	0,24	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Pfirsichnektar	1	0	0	---	---	---	HPLC-MS/MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003

Fortsetzung Tabelle 3:

Probenmatrix	n	n pos.	pos. (%)	Alternariol ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)		Nachweissystem	NWG ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	BG ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	Referenz	
				Med.	MW					Max.
Pflaumensaft	1	1	100	---	5,5	HPLC-MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	
Preiselbeernektar	1	1	100	---	5,6	HPLC-MS/MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	
Preiselbeersaft	1	0	0	---	---	HPLC-MS/MS	0,74	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	
Rotwein	5	5	100	4,5	k.A.	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009	
Rotwein	1	1	100	---	1,9	HPLC-MS/MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	
Rotwein	24	15	63	1,9	3,2	HPLC	0,8	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 2006	
Sonnenblumenkerne	20	k.A.	20	933	1070	TLC	50	k.A.	DACERO <i>et al.</i> , 1997	
Sonnenblumenkerne	50	37	74	k.A.	k.A.	TLC	k.A.	k.A.	TORRES <i>et al.</i> , 1993	
Schwarzer Johannisbeer-Saft	1	0	0	---	---	HPLC-MS/MS	0,31	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	
Tomatenprodukte	10	0	0	---	---	HPLC	30–100	k.A.	WITTKOWSKI <i>et al.</i> , 1983	
Tomatenprodukte	80	0	0	---	---	HPLC	5,0	k.A.	MOTTA DA und SOARES, 2001	
Tomatenmark	80	5	6	347	2219	HPLC	1	5	TERMINIELLO <i>et al.</i> , 2006	
Tomatensaft	2	2	100	1,26	k.A.	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009	
Traubenmost	13	0	0	---	---	HPTLC	k.A.	1,5	OSTRÝ <i>et al.</i> , 2007	
Traubensaft	5	5	100	0,11	k.A.	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009	
Traubensaft	1	1	100	---	1,6	HPLC-MS/MS	< 1	k.A.	LAU <i>et al.</i> , 2003	

Fortsetzung Tabelle 3:

Probenmatrix	n	n pos.	pos. (%)	Alternariol (µg/kg bzw. µg/l)			Nachweissystem	NWG (µg/kg bzw. µg/l)	BG (µg/kg bzw. µg/l)	Referenz
				Med.	MW	Max.				
Traubensaft (rot)	10	3	30	0,47	1,1	2,3	HPLC	0,4	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Traubensaft (weiß)	4	0	0	---	---	---	HPLC	0,4	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Wein	13	0	0	---	---	---	HP TLC	k.A.	1,5	OSTRÝ <i>et al.</i> , 2007
Weißwein	6	6	100	1,13	k.A.	7,59	SIDA, HPLC-MS/MS	0,03	0,09	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Weißwein	23	2	9	1,3	1,3	1,5	HPLC	0,8	k.A.	SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Winterweizen	56	16	29	k.A.	5,7	22,1	HP TLC	k.A.	5	OSTRÝ <i>et al.</i> , 2005
Winterweizen	158	0	0	---	---	---	HPLC-FL	50	k.A.	MÜLLER <i>et al.</i> , 2002

* = 45 der 266 Karotten wiesen Anzeichen für Verderb auf
n = Anzahl der Proben
n pos. = Anzahl positiver Proben
pos. (%) = prozentualer Anteil der positiven Proben
Med. = Median
MW = Mittelwert
Max. = Maximum
NWG = Nachweisgrenze
BG = Bestimmungsgrenze
k.A. = keine Angabe

HPLC = high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
SIDA = stable isotope dilution assay (Isotopenverdünnungsanalyse)
FL = Fluoreszenzdetektion
MS = Massenspektrometrie
MS/MS = Tandemmassenspektrometrie
TLC = thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
HP TLC = high performance thin layer chromatography (Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie)

Tabelle 4: Vorkommen und Gehalte von Alternariol in Futtermitteln

Probenmatrix	n	n pos.	pos. (%)	Alternariol ($\mu\text{g/kg}$)			Nachweis-system	NWG ($\mu\text{g/kg}$)	BG ($\mu\text{g/kg}$)	Referenz
				Med.	MW	Max.				
Mais	48	3	6	20,3	19	25	HPLC-MS/MS*	k.A.	0,7–60,6*	MONBALIU <i>et al.</i> , 2010
Ölsaatenpellets	50	2	4	k.A.	18	19	HPLC-MS*	10	20	LANIER <i>et al.</i> , 2009
Rapsschrot	30	2	7	68	68	81	HPLC-FL	15	50	NAWAZ <i>et al.</i> , 1997
Soja	4	0	0	---	---	---	HPLC-MS/MS*	k.A.	0,7–60,6	MONBALIU <i>et al.</i> , 2010
Sonnenblumen-kernschrot	22	18	82	135	180	570	HPLC-FL	15	50	NAWAZ <i>et al.</i> , 1997
Weizen	30	0	0	---	---	---	HPLC-MS/MS*	k.A.	0,7–60,6*	MONBALIU <i>et al.</i> , 2010

* = Multi-Mykotoxin-Analysemethode
n = Anzahl der Proben
n pos. = Anzahl positiver Proben
pos. (%) = prozentualer Anteil der positiven Proben
Med. = Median
MW = Mittelwert
Max. = Maximum
NWG = Nachweisgrenze
BG = Bestimmungsgrenze
k.A. = keine Angabe
HPLC = high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
FL = Fluoreszenzdetektion
MS = Massenspektrometrie
MS/MS = Tandemmassenspektrometrie

2.3.4.5 Vorkommen von Alternariol in der Umwelt sowie carry-over in Lebensmittel tierischen Ursprungs

Alternaria-Spezies kommen auch als Innenschimmel in Wohnräumen vor. Wurden diese *Alternaria*-Spezies auf Tapete oder anderes zellulosehaltiges Material überimpft, bildeten fast alle Stämme Alternariol (REN *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 1999). Eine natürlich verschimmelte Wandtapete enthielt Alternariol in einer Konzentration von 38 µg/kg (VISHWANATH *et al.*, 2009).

Auch aus einem marinen Schwamm (*Axinella tenudigatata*) des Indischen Ozeans konnte ein *A. alternata*-Stamm isoliert werden, in dessen Ethylacetatextrakt unter anderem Alternariol nachgewiesen wurde (TEUSCHER, 2005).

Über ein mögliches carry-over von Alternariol aus Futtermitteln in Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie zum Beispiel Milch, Eier und Fleisch, liegen bisher keine Studien vor.

2.3.4.6 Metabolismus von Alternariol

Der Metabolismus von Alternariol im Säugetierorganismus wurde bisher als oxidativer und konjugativer Abbau beschrieben. PFEIFFER *et al.* (2007b) konnten zeigen, dass der oxidative Abbau von Alternariol in Anwesenheit von Cytochrom P450-Monooxygenase in Lebermikrosomen von Ratten, Schweinen und Menschen zu vier Metaboliten führt. Diese sogenannten Katechole entstehen alle durch aromatische Hydroxilierung von Alternariol. Weitere Untersuchungen (PFEIFFER *et al.*, 2008) bestätigten diese Ergebnisse und identifizierten eine Monooxygenase, die sich vor allem im extrahepatischen Gewebe, wie Lunge, Ösophagus, Uterus und Prostata befindet, als aktivste Monooxygenase im Alternariol-Metabolismus. Zudem konnte eine Methylierung der Alternariol-Metabolite durch die Katechol-O-Methyltransferase beobachtet werden (PFEIFFER *et al.*, 2007b). PFEIFFER *et al.* (2009) untersuchten auch den konjugativen Metabolismus von Alternariol in Leber- und Darmmikrosomen von Ratten, Schweinen und Menschen. Alternariol wurde in hohen Umsatzraten zu zwei Glucuroniden umgesetzt. Die hohe Aktivität der Leber- und Darmmikrosomen deutet auf eine starke Glucuronidierung von oral aufgenommenem Alternariol während der Darm- und Leberpassage hin. Auch die Inkubation von

Präzisionsgewebeschnitten einer Rattenleber mit Alternariol führte zu hydroxylierten Alternariol-Metaboliten. Dies zeigte, dass die Hydroxylierung auch *in vivo* möglich ist. Denn bei diesem Modell wurden die Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband belassen (PFEIFFER *et al.*, 2007b). Erwähnenswert ist auch, dass Untersuchungen des oxidativen Metabolismus von Alternariolmonomethylether ergaben, dass ein Teil des Alternariolmonomethylethers zu Alternariol demethyliert wird (PFEIFFER *et al.*, 2007b). Diese Demethylierung wird auch von OLSEN und VISCONTI (1988) beschrieben.

Der *in vivo* Metabolismus von Alternariol wurde bisher – soweit bekannt – nicht untersucht. Auch gibt es bisher keine Daten zur Verteilung von Alternariol und seinen Metaboliten in Organen.

2.4 Verfahren zum Nachweis von Alternariol

2.4.1 Extraktion und Reinigung

Bei der Extraktion von Alternariol aus verschiedenen Matrices ist die geringe Wasserlöslichkeit des Toxins zu berücksichtigen. Alternariol wird daher meist mit organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Dichlormethan, Methanol, Acetonitril oder Ethylacetat aus Lebens- und Futtermitteln extrahiert (SCOTT, 2001). Für die meisten physikalisch-chemischen Nachweisverfahren ist eine weitere Aufreinigung des „Rohextraktes“ notwendig. Hierzu werden beispielsweise Festphasenextraktionsverfahren unter Verwendung von Festphasenmaterialien wie zum Beispiel Aminopropylen und C18-Materialien durchgeführt. Eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Extraktions- und Reinigungsverfahren ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für Alternariol aus verschiedenen Probenmatrices

Probenmatrix	Extraktion von Alternariol	Anreicherung von Alternariol bzw. Aufreinigung des Rohextraktes (Säulenmaterial, Elutionsmittel)	Referenz
Getränke	entfällt	Festphasenextraktion (RP 18-Material, Acetonitril)	ASAM <i>et al.</i> , 2009
Ölkuchen	Methanol/Wasser (80/20, v/v) mit 0,5 % Essigsäure	Festphasenextraktion (RP-Material, Methyl- <i>tert</i> -buthyl-ether/Methanol (90/10, v/v))	LANIER <i>et al.</i> , 2009
Wein, Traubensaft, Cranberrysaft	entfällt	(NH ₂ -Säule, Eisessig/Methanol (1/100, v/v))	SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Sonnenblumenkerne	1. Methanol 2. 10%ige Ammonium-sulfat-Lösung 3. Chloroform	Festphasenextraktion (RP 18-Material, Essigsäure/Acetonitril (1/100, v/v))	POZZI <i>et al.</i> , 2005
Karotten	Acetonitril/Methanol/Wasser (45/10/45, v/v/v; pH 3,0)	Festphasenextraktion (RP 18-Material, Eisessig/Acetonitril (1/100, v/v))	SOLFRIZZO <i>et al.</i> , 2004a
Tomatenmark	entfällt	Festphasenextraktion (SPE-Säule, Essigsäure/Methanol (1/100, v/v))	FENTE <i>et al.</i> , 1998
Weizen, Hirse	1. Methanol 2. 20%ige Ammonium-sulfatlösung 3. Dichlormethan	Festphasenextraktion (Kieselgelsäule)	WEBLEY <i>et al.</i> , 1997
Apfelsaft	entfällt	1. Festphasenextraktion (RP 18-Material, Essigsäure/Acetonitril (1/100, v/v)) 2. Einengen, lösen mit Ethylacetat 3. Festphasenextraktion (Aminopropyl-SPE-Säulen, Ameisensäure/Acetonitril (1/100, v/v))	DELGADO <i>et al.</i> , 1996

Fortsetzung Tabelle 5:

Probenmatrix	Extraktion von Alternariol	Anreicherung von Alternariol bzw. Aufreinigung des Rohextraktes (Säulenmaterial, Elutionsmittel)	Referenz
Himbeeren, Tomaten, Getreide	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ethylacetat 2. 5%ige Natriumhydrogencarbonatlösung 3. Einengen, lösen mit Chloroform 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aufreinigung (Kieselgelsäule, Methanol/Chloroform (1/9)) 2. Einengen, lösen in Dichlormethan 	MATYSIK und GIRYN, 1996
Äpfel	<ol style="list-style-type: none"> 1. pH-Wert 2,0 (mittels Salzsäure) Chloroform/Ethanol (4/1, v/v) 2. Einengen, lösen mit Methanol 	entfällt	VIÑAS <i>et al.</i> , 1992
Mandarinen	<ol style="list-style-type: none"> 1. Salzsäure 2. Chloroform/Ethanol (4/1, v/v) 3. Einengen, lösen mit Methanol 	entfällt	LOGRIECO und VISCONTI, 1990
Getreide	Methanol	Aufreinigung (Kieselgur-Säule)	GRABARKIEWICZ-SZCZEŚNA <i>et al.</i> , 1989 VISCONTI <i>et al.</i> , 1986
Olivenöl	<ol style="list-style-type: none"> 1. Methanol/Wasser/<i>n</i>-Hexan/ Salzsäure (60/40/60/1, v/v/v/v) 2. <i>n</i>-Hexan 3. Chloroform 	entfällt	
Fruchterzeugnisse	Dichlormethan	Aufreinigung (Kieselgel-Säule, Methanol/Ethylacetat (1/9, v/v))	WITTKOWSKI, <i>et al.</i> , 1983
Getreide	<ol style="list-style-type: none"> 1. Methanol 2. 20 % Ammoniumsulfat/Hexan (60/30, v/v) 3. Dichlormethan 4. Einengen, lösen mit Benzol/Acetonitril (98/2, v/v) 	entfällt	SEITZ und MOHR, 1976

SPE = solid-phase-extraction (Festphasenextraktion)

2.4.2 Detektion und Quantifizierung von Alternariol

Umfangreiche Übersichten über verschiedenen Nachweisverfahren für Alternariol wurden von SCHADE und KING (1984), SCOTT (2001), BARKAI-GOLAN und PASTER (2008) sowie von OSTRÝ (2008) veröffentlicht. Im Folgenden wird ein Überblick über die momentan zur Verfügung stehenden Nachweismethoden gegeben.

2.4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die ersten Methoden, die zum Nachweis von Alternariol angewendet wurden, basierten vor allem auf der Dünnschichtchromatographie (SCHADE und KING, 1984; SCOTT, 2001). Die nachzuweisende Substanz wird auf eine Platte, die mit der stationären Phase beschichtet ist (zum Beispiel Kieselgel), aufgetragen. Diese Platte wird nun in eine Kammer gestellt, deren Boden mit Fließmittel bedeckt ist. Das Fließmittel wird allein durch Kapillarkräfte entlang der stationäre Phase transportiert. Die Detektion der somit aufgetrennten Analyten erfolgt entweder durch die Eigenfarbe, die UV-Aktivität oder die Fluoreszenzaktivität der aufgetrennten Substanzen. Haben die nachzuweisenden Substanzen keine dieser Eigenschaften, müssen geeignete Färbereagenzien eingesetzt werden, um die Substanzen detektierbar zu machen (CHRISTIAN, 2004).

Einen guten Überblick über die verwendeten mobilen und stationären Phasen sowie die verwendete Detektion gibt der Übersichtsartikel von SCHADE und KING (1984). Aufgrund der geringen Sensitivität und Selektivität (SEITZ *et al.*, 1975; VISCONTI *et al.*, 1986; MATYSIK und GIRYN, 1996) werden zum jetzigen Zeitpunkt meist andere chromatographischen Methoden zum Nachweis von Alternariol eingesetzt.

2.4.2.2 Gaschromatographie

Vor allem in den 70er und 80er Jahren wurde die Gaschromatographie (GC) zum Nachweis von Alternariol beschrieben (PERO *et al.* 1971; KELLERT *et al.* 1984). Als Detektoren

wurden hierfür Flammenionisationsdetektoren (FID) sowie die Massenspektrometer beschrieben. Bei der GC ist die mobile Phase gasförmig. Deshalb muss die Probe verdampfbar sein und darf sich dabei nicht zersetzen. Das Trägergas (zum Beispiel Wasserstoff oder Helium) transportiert die Probe entlang der stationären Phase, die sich in einer Säule befindet. Die Auftrennung der Probe in ihre einzelnen Bestandteile erfolgt durch die unterschiedliche Polarität und Dampfdrücke der Gasmoleküle. Mit einem Detektor wird der Austrittszeitpunkt der verschiedenen Bestandteile am Säulenende gemessen. Ein FID kann Analyten mit oxidierbarem Kohlenstoff messen. Die einzelnen Bestandteile werden in einer Knallgasflamme ionisiert, dadurch fließt ein messbarer Strom. Wird zur Detektion die Massenspektrometrie (MS) verwendet, werden die aufgetrennten Bestandteile durch Energiezufuhr in Ionen umgewandelt und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionen werden nun im Massenanalysator aufgrund ihres „Masse zu Ladungsverhältnisses“ getrennt und von einem Detektor detektiert (CHRISTIAN, 2004).

Alternariol ist aufgrund seiner chemischen Struktur im relevanten Temperaturbereich nicht flüchtig, weshalb die beschriebenen Verfahren eine vorhergehende Derivatisierung der Hydroxygruppen einsetzen (KELLERT *et al.*, 1984). Der Einsatz von Trimethylsilyl-derivaten von Alternariol zum gaschromatographischen Nachweis von Alternariol wurde erstmals von PERO *et al.* (1971) beschrieben. KELLERT *et al.* (1984) konnten mit GC-MS eine Nachweisgrenze von 20 mg/kg in Obst- und Gemüseerzeugnissen erreichen. Eine weitere Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid wurde von SCOTT *et al.* (1997) beschrieben. Aufgrund der zeitaufwendigen Probenvorbereitung und der notwendigen Derivatisierung wurde die GC fast vollständig von der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ersetzt (SCOTT, 2001).

2.4.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC als Trennverfahren kann mit verschiedenen Detektionssystemen kombiniert werden, zum Beispiel mit UV-Detektion, Fluoreszenz-Detektion (FL) und in neueren Zeiten immer häufiger mit massenspektrometrischer Detektion. Hierbei wird ein Probenextrakt in einer mobilen Phase (Fließmittel) unter Druck entlang einer stationären Phase gepumpt. Aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären Phase verweilen manche Stoffe länger in der Säule als andere und es kommt zur Auftrennung der einzelnen Bestandteile. Konzentrationsabhängige Detektoren bestimmen nun die Anzahl der Teilchen im Fließmittel,

indem sie physikalische Eigenschaften der einzelnen Substanzen messen und diese Informationen in elektrische Signale umwandeln. Der UV-Detektor kann alle Verbindungen detektieren, die im UV-Bereich Licht absorbieren. Der FL-Detektor kann nur Verbindungen detektieren, die zur Fluoreszenz angeregt werden können. Die Verbindung wird mit einer bestimmten Anregungswellenlänge bestrahlt, absorbiert das Licht und emittiert sofort ein längerwelliges Licht (fluoreszieren), welches vom Detektor gemessen wird. Die FL-Detektion hat aufgrund der Emissionsmessung eine höhere Empfindlichkeit als die UV-Detektion und misst selektiv Verbindungen, die durch eine bestimmte Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Bei der elektrochemischen (EC) Detektion können leicht oxidier- und reduzierbare Substanzen nachgewiesen werden. Durch das Eluat wird Strom geleitet. An den Elektrodenoberflächen wird der Analyt umgesetzt und der entstehende Stromfluss gemessen. Die MS kann als Detektionsverfahren bei der HPLC genauso wie bei der GC eingesetzt werden. Mit einer HPLC/MS kann meist eine höhere Empfindlichkeit als mit den zuvor genannten Detektoren erreicht werden (CHRISTIAN, 2004).

In den Tabellen 6 und 7 sind publizierte HPLC-Verfahren mit UV- oder FL-Detektion zusammengefasst. Viele dieser Verfahren können durch die Wahl einer geeigneten Wellenlänge auch gleichzeitig mehrere *Alternaria*-Toxine nachweisen (OZCELIK *et al.*, 1990; NAWAZ *et al.*, 1997; MOTTA DA und SOARES, 2000). Mittels UV- und FL-Detektion konnten Nachweisgrenzen für Alternariol von 1–2 µg/kg erreicht werden (DELGADO *et al.*, 1996; FENTE *et al.*, 1998; SCOTT und KANHERE, 2001a). PALMISANO *et al.* (1989) zeigten, dass Alternariol elektrochemisch aktiv ist und im unteren ng-Bereich mittels LC-EC (Flüssigkeitschromatographie mit EC-Detektion) nachgewiesen werden kann.

Aufgrund von erreichbaren niedrigen Nachweisgrenzen sowie aufgrund des möglichen Einsatzes als Multi-Mykotoxin-Methode wird die HPLC-MS/MS immer häufiger verwendet. Hierbei beschreibt MS/MS die so genannte Tandemmassenspektrometrie, bei der zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet werden. SCOTT *et al.* (2006) konnten mit einer HPLC-MS/MS Methode eine Nachweisgrenze von unter 0,01 µg/l für Wein und Obstsäfte erreichen. Eine weitere HPLC-MS/MS Methode wurde von MAGNANI *et al.* (2007) für den Nachweis von Alternariol und Alternariolmonomethylether in Mandarinen, mit einer Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/kg, beschrieben. Besonders interessant sind mit HPLC-MS/MS durchführbare Multi-Mykotoxin-Methoden, die viele unterschiedliche

Mykotoxine, unter anderem auch Alternariol, in einem Analysegang nachweisen können (SULYOK *et al.*, 2007; SPANJER *et al.*, 2008; MAVUNGU DI *et al.*, 2009; MONBALIU *et al.*, 2009; VISHWANATH *et al.*, 2009; MONBALIU *et al.*, 2010).

Eine Erhöhung der Nachweissicherheit und Quantifizierbarkeit von Alternariol mittels HPLC-MS/MS wird durch den Einsatz stabiler Isotopen erreicht. Bei einer Isotopenverdünnungsanalyse (SIDA, stable isotope dilution assay) werden isotopenmarkierte Substanzen (Indikator) in einer bekannten Konzentration der zu untersuchenden Probe zugesetzt. Die markierte Substanz unterscheidet sich nur physikalisch, aber nicht chemisch von der nicht markierten Substanz. Aus dem im Massenspektrometer gemessenen Isotopenverhältnis lässt sich nun der Gehalt des zu bestimmenden Analyten ermitteln. Matrixeinflüsse spielen dabei im Gegensatz zur herkömmlichen MS/MS-Analyse kaum noch eine Rolle. ASAM *et al.* (2009) synthetisierten deuteriertes Alternariol und deuterierten Alternariolmonomethylether. Die isotopenmarkierten Mykotoxine wurden dann zum Nachweis von Alternariol und Alternariolmonomethylether mittels HPLC-MS/MS in Getränken eingesetzt. Für Alternariol (Alternariolmonomethylether) lag die Nachweisgrenze bei 0,03 µg/kg (0,01 µg/kg) und die Bestimmungsgrenze bei 0,09 µg/kg (0,03 µg/kg).

Tabelle 6: Anwendung hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Methoden mit UV-Detektion zum Nachweis von Alternariol

Probenmatrix	Stationäre Phase	Mobile Phase	RT Alternariol (min)	λ (nm)	Leistungsparameter für Alternariol			weitere nachweisbare Toxine	Referenz
					NWG ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	BG ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	WF (%)		
Wein	ODS, 150 x 4,6 mm, 5 μm	1 % Phosphorsäure/Methanol (30/70, v/v)	16,0	254	0,8	k.A.	95		SCOTT <i>et al.</i> , 2006
Karotten	C-18, 150 x 4,6 mm, 5 μm	Acetonitril/0,027 mol/l Natriumdihydrogenphosphat (25/75, v/v) (0 - 3,5 min) Acetonitril/0,027 mol/l Natriumdihydrogenphosphat (50/50, v/v) (3,5 - 20 min)	9,8	256, 279, 345	5	k.A.	72 - 84	TeA, ATX-I, AME	SOLFRIZZO <i>et al.</i> , 2004a
Apfelsaft	RP-Säule ODS-2, 250 x 4,6 mm, 5 μm	Acetonitril/1 % wässrige <i>ortho</i> -Phosphorsäure/Methanol (20/30/50, v/v/v)	6,0	254	0,5 - 1,0	k.A.	79	AME	SCOTT und KANHERE, 2001a
Tomatenprodukte	Spherisorb ODS-2, 250 x 5 mm	Wasser/Methanol (20/80, v/v) mit Zinksulfat (300 mg/l)	k.A.	250	k.A.	5	84	AME	MOTTA DA und SOARES, 2000
Tomatenmark	Spherisorb ODS-2, 250 x 4,6 mm, 5 μm	Methanol/Wasser (32/68, v/v) angesäuert mit Phosphorsäure auf pH 3,0	k.A.	254	k.A.	k.A.	k.A.	AME	FENTE <i>et al.</i> , 1998
Weizen und Sorghumhirse	RP-Säule	Wasser/Methanol (30/70, v/v)	k.A.	257	k.A.	10	61	AME, ATX-I	WEBLEY <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 7: Anwendung hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Methoden mit FL-Detektion zum Nachweis von Alternariol

Probenmatrix	Stationäre Phase	Mobile Phase	RT Alter- nariol (min)	Ex/EM (nm)	Leistungsparameter für Alternariol			Referenz
					NWG (µg/kg bzw. µg/l)	BG (µg/kg bzw. µg/l)	WF (%)	
Flachsfaser, Leinsamen und Erbsen	LiChroCART 100 RP-C18, 250 x 4,0 mm, 5 µm	Methanol/Wasser Zweikomponenten- gradient	k.A.	252/408	3	8	85	KRÁLOVÁ <i>et al.</i> , 2006
Obst	ODS-AQ, 150 x 4,6 mm, 3 µm	Acetonitril/Wasser/Essig- säure (50/50/1, v/v/v)	4,4	335/440	100	k.A.	78	TOURNAS und STACK, 2001
Weizen	RP-Säule, CLC- ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm	Wasser/Methanol (20/80, v/v) mit Zinksulfat (300 mg/l)	k.A.	253/415	50	k.A.	71	LI und YOSHIZAWA, 2000
Rapsschrot und Sonnen- blumenschrot	ODS-UG5	Phosphatpuffer/Methanol/ Acetonitril (angesäuert) Dreikomponentengradient	30,0	253/415	k.A.	50	61 - 109	NAWAZ <i>et al.</i> , 1997
Apfelsaft	C 18, 250 x 3,2, 5 µm	Methanol/1 % wässrige Phosphorsäurelösung/ Acetonitril (4/4/2, v/v/v)	k.A.	330/430	k.A.	k.A.	82	SCOTT <i>et al.</i> , 1997
Tomaten- mark	Spherisorb ODS, 250 x 4,6 mm, 2,5 µm	Methanol/Wasser (32/68, v/v) angesäuert mit Phosphorsäure auf pH 3,0	8,3	330/430	2	k.A.	77 - 99	FENTE <i>et al.</i> , 1998
Weizen	Spherisorb ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm	0,2 M Ammoniumacetat (pH 5,9)/Methanol (30/70, v/v)	k.A.	315/430	k.A.	k.A.	k.A.	MAGAN <i>et al.</i> , 1984

RT = Retentionszeit
k.A. = keine Angabe

Ex/Em = Excitation/Emission
NWG = Nachweisgrenze

BG = Bestimmungsgrenze
WF = Wiederfindung

2.4.2.4 Immunologische Nachweisverfahren

Die immunologischen Nachweisverfahren können in enzymimmunologischen Verfahren und radioimmunologischen Verfahren unterteilt werden, wobei letztere kaum noch Anwendung finden. In den letzten Jahren wurden zahlreiche enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen entwickelt. (USLEBER *et al.*, 1992; DIETRICH *et al.*, 1995; LIESENER *et al.*, 2010; LATIF, 2010). Zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten an der vorliegenden Arbeit waren noch keine immunologischen Verfahren für Alternariol beschrieben worden.

2.4.2.4.1 Enzymimmunologische Verfahren

Der ursprünglich von ENGVAL und PERLMANN (1971) geprägte Begriff ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wird heute häufig durch den allgemeineren Ausdruck EIA (enzyme immunoassay) ersetzt. Kommerziell erhältliche EIAs sind unter anderem für Aflatoxine, Ochratoxin A, Trichothecene, Zearalenon und Fumonisine verfügbar (SCOTT, 1995). EIAs sind sehr selektiv und sensitiv, einfach und schnell durchzuführen sowie kostengünstig (SCOTT, 1995; TURNER *et al.*, 2009).

Mykotoxine sind niedermolekulare Substanzen und müssen daher mit einem kompetitiven EIA nachgewiesen werden. Beim kompetitiven EIA konkurrieren freies und markiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen.

Der kompetitive EIA kann in den direkten und indirekten EIA unterteilt werden. Beim kompetitiven direkten EIA sind eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörper direkt oder über Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik; MÄRTLBAUER, 1988) an ein Trägermaterial (meist Mikrotiterplatte) gebunden und dienen als Festkörperphase. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Antikörperbindungsstellen. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Reagenzien mit einem Waschschritt entfernt und dann Substrat zugegeben. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Deshalb ist der durch das gebundene Enzymkonjugat katalysierte Substratumsatz umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen in der Probe. Im direkten EIA kann die Inkubation

der Antikörper mit freiem und mit enzymmarkiertem Antigen entweder simultan (gleichzeitig) oder konsekutiv (nacheinander, durch Waschschrift getrennt) erfolgen.

Beim kompetitiven indirekten EIA wird ein Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dient als Festkörperphase. Die Probe wird gemeinsam mit einer begrenzten Menge spezifischer Antikörper inkubiert.

Kürzlich wurde von BURKIN und KONONENKO (2011) ein indirekter EIA mit polyklonalen Antikörpern (pAk) zum Nachweis von Alternariol beschrieben. Der EIA wurde zur Untersuchung von Futtermitteln eingesetzt und findet Alternariol ab einer Konzentration von 20 µg/kg. Auch die Entwicklung von Immunoaffinitätsäulen wäre ein großer Vorteil für den Nachweis von Alternariol mittels UV- und FL-Detektion, da durch die selektive Aufreinigung Interferenzen reduziert werden könnten (SCOTT, 2004).

2.5 Rechtliche Regelungen

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es, weder auf nationaler noch internationaler Ebene, Richt- und Grenzwerte bezüglich des Gehaltes an *Alternaria*-Toxinen in Lebens- und Futtermitteln (FAO, 2004; LOGRIECO *et al.*, 2009). Dies lässt sich vor allem auf die unzureichende Datenlage zurückführen. Deshalb werden verschiedentlich weitere Untersuchungen zur Belastung von Lebens- und Futtermittel sowie zur toxikologischen Bewertung der *Alternaria*-Toxine gefordert (BfR, 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton reinst	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.15500)
Bovines Serumalbumin	(Sigma-Aldrich Inc., A-0281)
Bernsteinsäureanhydrid	(Sigma-Aldrich Inc., 239690)
1,1'-Carbonyldiimidazol	(Merck KGaA, 8.02301)
Casein-Natriumsalz	(Sigma-Aldrich Inc., C-8654)
Citronensäure-Monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
Caseinpepton, pankreat.	(Merck KGaA, 7213)
4-(Dimethylamino)-pyridin	(Merck KGaA, 8.20499)
Dimethylsulfoxid	(Sigma-Aldrich Inc., 472301)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Essigsäureanhydrid	(Merck KGaA, 1.00042)
Ethylacetat	(Merck KGaA, 1.09623)
Formaldehydlösung (37 %)	(Merck KGaA, 1.04003)
Freundsches Adjuvans (komplett)	(Sigma-Aldrich Inc., F-5881)
Glucose monohydrat	(Merck KGaA, 8342)
Hefeextrakt	(Oxoid GmbH, LP 0021)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	(Merck KGaA, 1.05021)
keyhole limpet hemocyanin	(Merck KGaA, 374805)
Meerrettichperoxidase	(Roche Diagnostics GmbH, 10814407001)
Methanol, für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®	(Merck KGaA, 1.06007)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumacetat (wasserfrei)	(Merck, KGaA, 1.06264)
Natriumborhydrid	(Sigma-Aldrich Inc., 214362)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)

Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Natriumperjodat	(Sigma-Aldrich Inc., S-1878)
N-Hydroxysuccinimid	(Sigma-Aldrich Inc., 56480)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	(Sigma-Aldrich Inc., D-80002)
N,N-Dimethyl-Formamid	(Sigma-Aldrich Inc., D-8654)
Schwefelsäure (95–97 %)	(Merck KGaA, 100731)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma-Aldrich Inc., T-2885)
Tween [®] 20	(Sigma-Aldrich Inc., P-1379)
Wasserstoffperoxid (30 %)	(Merck KGaA, 1.07209)

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen mindestens p.a.-Qualität.

3.1.2 Mykotoxine

Altenuen (aus <i>Alternaria</i> -Spezies)	(Sigma-Aldrich Inc., A-4437)
Alternariol (aus <i>Alternaria</i> -Spezies)	(Sigma-Aldrich Inc., A-1312)
Alternariolmonomethylether (aus <i>Alternaria alternata</i>)	(Sigma-Aldrich Inc., A-3171)
Tenuazonsäure-Kupfersalz (aus <i>Alternaria alternata</i>)	(Sigma-Aldrich Inc., T-3408)

3.1.3 Immunreagenzien

Anti-Kaninchen-IgG	(Sigma-Aldrich Inc., R-2004)
Schwein Anti-Kaninchen Immunglobulin-HRP-Konjugat	(Dako Deutschland GmbH, P0217)
Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin-HRP-Konjugat	(Dako Deutschland GmbH, P0161)
Monoklonale-Anti-Alternariol-Antikörper, Klon-Nr. AOL-KLH I ÜS 4G4	(Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig- Maximilians-Universität München)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Bicarbonatpuffer (pH 9,6):	0,05 mol/l
Casein/PBS I:	1 %, 2 % und 3 %
Citratpuffer (pH 3,9):	0,21 mol/l Citronensäure- monohydrat 3,15 mmol/l Wasserstoffperoxid
Natriumacetatpuffer (pH 4,2):	0,1 mol/l
Natriumacetatpuffer (pH 4,5):	1 mmol/l
phosphatgepufferte (0,014 mol/l) Salzlösung (pH 7,4) (PBS I):	0,014 mol/l Phosphatpuffer 0,12 mol/l Natriumchlorid
phosphatgepufferte (0,027 mol/l) Salzlösung (pH 7,4) (PBS II):	0,027 mol/l Phosphatpuffer 0,012 mol/l Natriumchlorid
Schwefelsäure:	1 mol/l
Substratlösung:	20 Teile Citratpuffer 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung
Tetramethylbenzidinlösung:	1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethyl- benzidin in: 9 Teile Methanol 1 Teil Aceton
Waschlösung:	0,15 mol/l Natriumchlorid 0,025 % Tween [®] 20

3.1.5 Nährmedien

Malzextrakt-Agar	(Oxoid Deutschland GmbH)
Hefeextrakt-Glucose-Bouillion:	Caseinpepton, pankreat. 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 5 g/l Glucose monohydrat 5 g/l

3.1.6 Geräte und Sonstiges

Photometer:

Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil [®] 10 mm	(Hellma GmbH und Co. KG)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

Vorsäule:	LiChrospher [®] RP-18 (5 µm) 4 x 4 mm	(Merck KGaA, 1.50957.0001)
	Discovery [®] HS C18 (5 µm) 20 x 4 mm	(Supleco, 568572-U)
Säule:	LiChrospher [®] RP-18 (5 µm) 125 x 4 mm	(Merck KGaA, 1.50943.0001)
	Discovery [®] HS C18 (5 µm) 250 x 4 mm	(Supleco, 565513-U)
Pumpenserie P 580		(Dionex Corporation)
Probengeber Modell ASI 100		(Dionex Corporation)
Photodiode Array detector PDA 100		(Dionex Corporation)
Fluoreszenzdetektor RF-2000		(Dionex Corporation)
Säulenthermostat STH 585		(Dionex Corporation)
202 Fraction Collector		(Gilson ABIMED)
Fractions Controller 201-201		(Gilson, ABIMED)
Chromeleon [®] Software Version 6.70		(Dionex Corporation)

Gelchromatographie:

Chromatographiergerät Biologie LP	(BIO-RAD Laboratories, Inc.)
Gelfiltrationssäule	(BIO-RAD Laboratories, Inc.)
Fraktionssammler Modul 2110	(BIO-RAD Laboratories, Inc.)
LP Data View Version 1.01	(BIO-RAD Laboratories, Inc.)

Enzymimmuntests:

EIA Reader Sunrise	(Tecan Deutschland GmbH)
Software: Ridasoft Win V1.38	(R-Biopharm GmbH)
Software: Magellan V6.6	(Tecan Deutschland GmbH)
Mikrotiterplatten MaxiSorp [™] (96 Kavitäten)	(Nunc A/S)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)

Sonstiges:

Dialyseschläuche 6 mm	(Serva Electrophoresis GmbH, 44104)
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic GmbH & Co. KG)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
Kern Waage FKB	(Kern + Sohn GmbH)
Mehrstellenrührgerät RO 15 power	(IKA [®] Werke GmbH & Co. KG)
Papierfaltenfilter 595 ½ , Ø 125 mm/90 mm	(Schleicher + Schuell Micro Science GmbH)
pH-Indikatorstäbchen 0–6,0	(Merck KGaA, 1.09531)
pH-Indikatorstäbchen 5,0–10	(Merck KGaA, 1.09533)
pH-Meter inoLab level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Sartorius Waage Master Pro LA 230 SV	(Sartorius AG)
Stickstoff 5.0 (Air Liquide Deutschland GmbH)	
Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
Variable Pipetten 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl	(Eppendorf AG)
Variable 12-Kanal-Pipetten 10–100 µl, 30–300 µl	(Eppendorf AG)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Wasserbad GFL	(Gesellschaft für Labortechnik GmbH)
Zentrifuge 5415C	(Eppendorf AG)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Thermo Fischer Scientific)

3.1.7 Probenmaterial

Im Zeitraum von 2008–2010 wurden insgesamt 126 Lebensmittelproben (Tabelle 8) im deutschen Einzelhandel, vorwiegend im Raum Hessen, gekauft. Bei den Proben handelte es sich um pflanzliche Erzeugnisse und daraus hergestellte Produkte. Alle Proben wurden in Angebotsform und anonym erworben.

Tabelle 8: Anzahl der Proben

Probenart	n
Apfelmus	10
Apfelsaft	44
Tomate	7
Tomatenketchup	18
Tomatenmark	10
Tomatensaft	16
Weißwein	11
Erdbeerkonfitüre	10

n = Anzahl der Proben

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der Immunreagenzien

3.2.1.1 Herstellung der Alternariol-Konjugate

Alternariol wirkt aufgrund seines geringen Molekulargewichtes (258,23 g/mol) *per se* nicht immunogen (Hapten). Deshalb muss Alternariol an ein Trägermolekül gekoppelt werden. Die Toxin-Makromolekül-Verbindung kann nun als Immunogen wirken und die Bildung spezifischer Antikörper induzieren. Hierfür wurde Alternariol an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt. Zur Überprüfung der Antikörpertiter sowie zur Entwicklung und Optimierung kompetitiver EIAs wurden weitere Toxin-Protein-Konjugate bzw. Toxin-Enzym-Konjugate hergestellt. Hierfür wurden verschiedene Kopplungsmethoden verwendet.

3.2.1.1.1 Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol

Die Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol erfolgte mittels HPLC und UV-Spektroskopie. Das in kristalliner Form vorliegende Alternariol wurde für beide Analysemethoden in Methanol gelöst. Die HPLC-Analyse erfolgte unter Verwendung einer C₁₈-„Reverse-Phase“-Säule (125 x 4,5 µm). Als mobile Phase wurde Methanol und A. dest. (0 min: Methanol/A. dest., 55/45; 20 min: Methanol/A. dest., 80/20) eingesetzt. Die

Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 1 ml/min bei einer Temperatur von 25 °C. Die Bestimmung mittels UV-Detektor erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 500 nm.

Die Berechnung des molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Verwendung der Schichtdicke der Küvette (1 cm), der eingesetzten Alternariol-Konzentration und des Absorptionsmaximums von Alternariol (256 nm) mit folgender Formel:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

mit ε = molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient in $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
E = Extinktion bei 256 nm
d = Schichtdicke der Küvette in cm
c = Konzentration der Lösung in mol/l

Zur Bestimmung wurden sechs Messungen in einem Konzentrationsbereich von 1,5 $\mu g/ml$ bis 5 $\mu g/ml$ Alternariol in Methanol durchgeführt und dann der Mittelwert berechnet. Die Stabilität von Alternariol-Standardlösungen mit Konzentrationen von 10 $\mu g/ml$ bzw. 1 mg/ml wurde mittels UV-Spektroskopie in einem Zeitraum von sechs Monaten mehrmals überprüft. Die Standardlösungen wurden bei -18 °C gelagert.

3.2.1.1.2 Derivatisierung von Alternariol

Alternariol besitzt keine zur direkten gerichteten Kopplung an Proteine nutzbaren, spezifische und funktionelle Gruppen. Es wurde daher versucht, durch Derivatisierung mit Bernsteinsäureanhydrid eine reaktive Carboxylgruppe einzuführen (siehe Abbildung 4).

Das zur Derivatisierung verwendete Bernsteinsäureanhydrid reagiert unter Öffnung seiner zyklischen Struktur mit einer Hydroxy-Gruppen des Alternariols. Dadurch wird eine terminale Carboxygruppe eingeführt. Die Einführung dieser Carboxygruppe, als reaktive Gruppe, ist notwendig, um nach Zugabe von N-Hydroxysuccinimid einen aktiven Ester als

reaktives Zwischenprodukt zu gewinnen. Dieser reagiert dann in einem zweiten Schritt mit freien Aminogruppen des Proteins.

3.2.1.1.2.1 Durchführung der Derivatisierung

Im ersten Ansatz wurde 1,95 mg Bernsteinsäureanhydrid in 500 μ l Pyridin gelöst und mit 1 mg Alternariol vermischt (molares Verhältnis Alternariol zu Bernsteinsäureanhydrid: 1 zu 5). Die Mischung wurde 1 h bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. In einem zweiten Ansatz wurden 8 mg Bernsteinsäureanhydrid in 300 μ l Pyridin gelöst und ebenfalls mit 1 mg Alternariol vermischt (molares Verhältnis von Alternariol zu Bernsteinsäureanhydrid: 1 zu 20). Diese Mischung wurde 3 h bei 100 °C erhitzt. Zur Reinigung der Derivate wurden die Reaktionsansätze unter Stickstoff abgedampft, die Rückstände in jeweils 1 ml A. dest. aufgenommen und mit 1 ml Ethylacetat extrahiert.

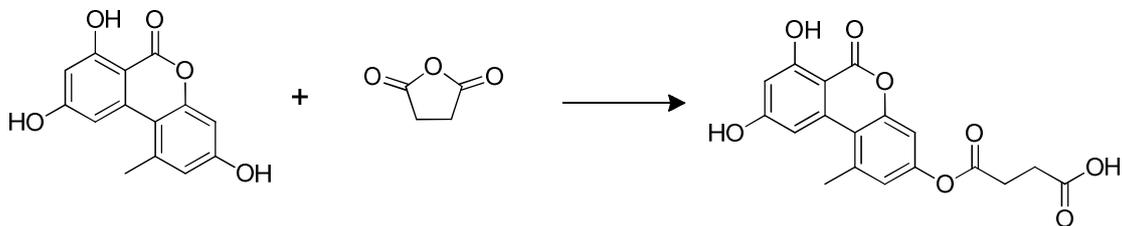


Abbildung 4: Reaktionsschema einer möglichen Derivatisierung von Alternariol mit Bernsteinsäureanhydrid zu Alternariol-Hemisuccinat. Die Reaktion ist auch mit anderen phenolischen Hydroxygruppen denkbar.

3.2.1.1.2.2 Überprüfung und Charakterisierung der Derivate

Die Überprüfung der Derivatisierung erfolgte mittels HPLC unter den in 3.2.1.1.1 angegebenen Bedingungen. Hierzu wurde ein Teil (2 μ l) der Ethylacetatphase mit 248 μ l Methanol gemischt und davon 20 μ l (entspricht 128 ng Alternariol im ersten und 160 ng Alternariol im zweiten Ansatz) auf die HPLC aufgetragen. Die so erzeugten Chromatogramme und Spektren wurden mit denen des Alternariols verglichen.

3.2.1.1.3 Kopplung mittels Formaldehyd

Zur Herstellung des Immunogens wurde Alternariol mittels der Mannich-Kondensations-Reaktion (MANNICH und KRÖSCHE, 1912) an KLH gebunden. Des Weiteren wurde zur Herstellung eines Festphasen-Antigens für den kompetitiven indirekten EIA Alternariol an BSA (bovines Serumalbumin) gekoppelt. Als Kopplungsreagenz wurde in beiden Fällen Formaldehydlösung (FA) verwendet. Die Kopplung (Abbildung 5) erfolgt dabei über eine Methylenbrückenbildung zwischen Hydroxygruppen und freien Aminogruppen des Trägerproteins, zum Beispiel an die Seitenkette des Lysins.

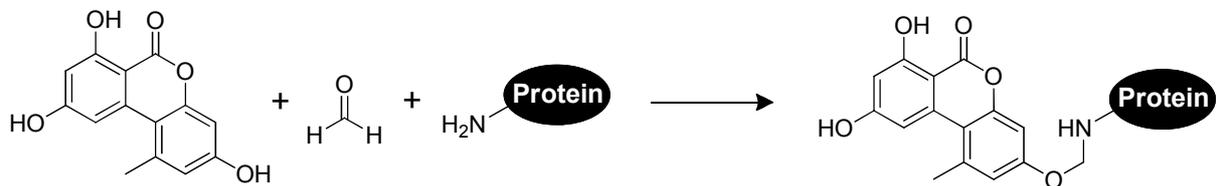


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer möglichen Kopplungsreaktion von Alternariol an ein Trägerprotein mittels Formaldehydlösung. Die Reaktion ist auch mit anderen phenolischen Hydroxygruppen denkbar.

Zur Herstellung des Immunogens wurden Alternariol und KLH in einem molaren Verhältnis von 1000:1 eingesetzt. Hierzu wurde 1,3 mg Alternariol ($\sim 5 \mu\text{mol}$) mit 100 μl DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und mit 15 mg KLH ($\sim 5 \text{nmol}$), gelöst in 2 ml Natrium-Acetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2), gemischt. Zu dieser Mischung wurden 500 μl FA zugetropft. Der Ansatz wurde 16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Abtrennung nicht gebundener niedermolekularer Bestandteile wurde der Kopplungsansatz dreimal gegen 6 l PBS I (phosphatgepufferte (0,014 mol/l) Salzlösung, pH 7,4) dialysiert und anschließend bei -18 °C gelagert. Auf analoge Weise wurde Alternariol an BSA bzw. an HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt. In Tabelle 9 sind die eingesetzten Substratmengen zusammengefasst. Die mittels FA hergestellten Alternariol-Konjugate werden im Folgenden als AOH-FA-KLH, AOH-FA-BSA und AOH-FA-HRP bezeichnet.

Tabelle 9: Eingesetzte Konzentrationen der Reaktionspartner zur Kopplung von Alternariol an Makromoleküle unter Verwendung von Formaldehydlösung

Alternariol		Makromolekül			Formaldehyd 37%ig (ml)	molares Verhältnis Alternariol: Makromolekül
Menge (mg)	DMSO (ml)	Bezeichnung	Menge (mg)	0,1 mol/l Natrium-Acetatpuffer (ml)		
1,3	0,1	KLH	15,0	2,0	500	1000:1
3,0	-	BSA	39,8	3,0	300	20:1
0,1	-	HRP	0,76	0,76	50	20:1

DMSO = Dimethylsulfoxid
 KLH = keyhole limpet hemocyanin
 BSA = bovines Serumalbumin
 HRP = Meerrettichperoxidase

3.2.1.1.4 Kopplung mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol

Zur Herstellung weiterer Toxin-Konjugate wurde Alternariol mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) jeweils an KLH, HRP und BSA gekoppelt (XIAO *et al.*, 1995). Bei dieser Reaktion reagiert das CDI mit der Hydroxygruppe des Alternariols zum Carbamat. Dieses ermöglicht in einem zweiten Schritt die Reaktion mit Aminogruppen des jeweiligen Proteins (Abbildung 6).

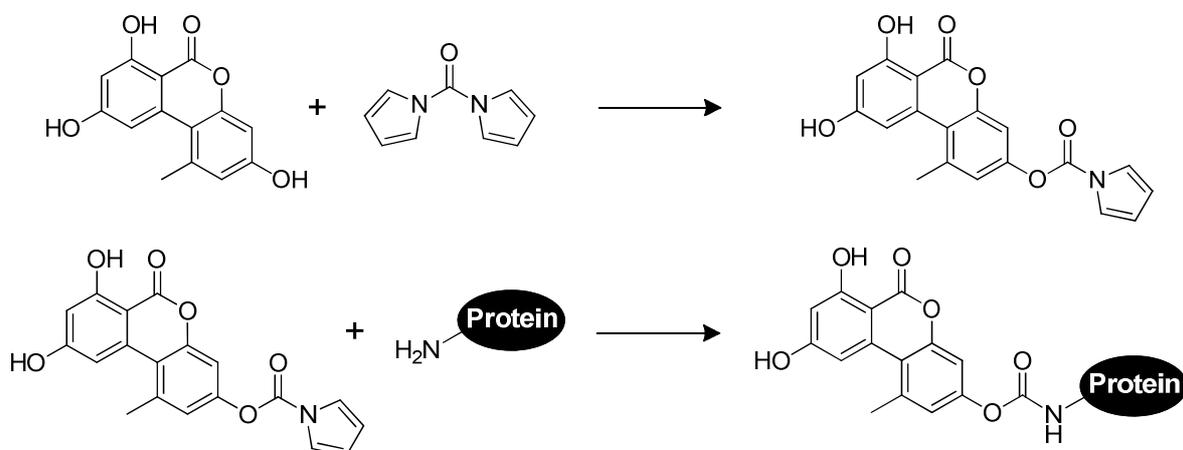


Abbildung 6: Schematische Darstellung der möglichen Kopplung von Alternariol an das Trägerprotein unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol.

Alternariol, CDI und KLH wurden in einem molaren Verhältnis von 1000:10000:1 eingesetzt. Hierzu wurden 8,1 mg CDI (50 μmol) mit 1,3 mg Alternariol (5 μmol) in 100 μl DMSO gelöst und 30 min bei Raumtemperatur langsam gerührt. Anschließend wurde dieser Ansatz tropfenweise zu 15 mg KLH (5 nmol), gelöst in 1 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,1 mol/l, pH 8,42), zugegeben. Der Kopplungsansatz wurde 24 h unter Lichtausschluss gerührt und anschließend dreimal gegen 6 l PBS I dialysiert. Das Immunogen wurde bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Auf analoge Weise wurde Alternariol an BSA bzw. an HRP gekoppelt. In Tabelle 10 sind die eingesetzten Substratmengen aufgelistet. Die mittels CDI hergestellten Alternariol-Konjugate werden im Folgenden als AOH-CDI-KLH, AOH-CDI-BSA und AOH-CDI-HRP bezeichnet.

3.2.1.1.5 Überprüfung und Charakterisierung der mittels Formaldehyd bzw. 1,1'-Carbonyldiimidazol hergestellten Konjugate

Die qualitative Überprüfung der hergestellten Alternariol-Konjugate (3.2.1.1.3 und 3.2.1.1.4) erfolgte mittels UV-Differenzspektren. Hierzu wurden UV-Spektren (190–500 nm) äquimolarer Mengen des Toxin-Protein-Konjugates bzw. des Toxin-Enzym-Konjugates und des entsprechenden unmodifizierten Proteins bzw. Enzyms gemessen. Das berechnete Differenzspektrum wurde mit dem Spektrum von Alternariol verglichen. Eine Quantifizierung des Protein- bzw. Enzymgehaltes und des Alternariol-Gehaltes erfolgte photometrisch mit Hilfe der passenden Kalibriergeraden. Diese wurde durch Messung der Extinktion bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums (256 nm) erstellt.

3.2.1.1.6 Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat

Mit der zweistufigen reduktiven Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat (WILSON und NAKANE, 1976) wurde AOH-FA-BSA (3.2.1.1.3) an HRP gekoppelt. Bei dieser Methode reagieren Aldehydgruppen mit Aminogruppen. Da Alternariol keine Aminogruppe besitzt, musste die Reaktion mit AOH-FA-BSA durchgeführt werden. Die Aldehydgruppen werden durch Perjodatoxidation im Kohlenhydratanteil des Glycoproteins

HRP gebildet (aktivierte Peroxidase). Die aktivierte Peroxidase reagiert nun mit Aminogruppen des BSAs unter Ausbildung von Schiff'schen Basen. Diese werden mit Natriumborhydrid in stabile sekundäre Amine überführt.

Tabelle 10: Eingesetzte Substratmengen zur Kopplung von Alternariol an Makromoleküle mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol

Alternariol		Makromolekül			CDI (mg)	Molares Verhältnis Alternariol: CDI: Makromolekül
Menge (mg)	DMSO (ml)	Bezeichnung	Menge (mg)	0,1 mol/l NaHCO ₃ (ml)		
1,3	0,1	KLH	15	1,0	8,1	1000:10000:1
1,0	0,1	BSA	12,8	1,0	6,3	20:200:1
1,0	0,1	HRP	7,8	1,0	6,3	20:200:1

DMSO = Dimethylsulfoxid
 NaHCO₃ = Natriumhydrogencarbonat
 KLH = keyhole limpet hemocyanin
 BSA = bovines Serumalbumin
 HRP = Meerrettichperoxidase
 CDI = 1,1'-Carbonyldiimidazol

3.2.1.1.6.1 Herstellung eines Alternariol-BSA-HRP-Konjugates

Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach der beschriebenen Methode von WÖRNER (1990). HRP (4 mg) wurde in 1 ml A. dest. gelöst und mit 0,2 ml frisch angesetzter 0,1 mol/l Natrium-meta-perjodatlösung versetzt und dadurch aktiviert. Es erfolgte ein Farbumschlag von rotbraun nach grün. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zweimal gegen 6 l Natriumacetatpuffer (1 mmol/l, pH 4,5) dialysiert. Zu der aktivierten HRP-Lösung wurde 1 ml AOH-FA-BSA gegeben und der pH-Wert sofort mit 20 µl Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l) auf 9,5 eingestellt. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 0,1 ml frisch angesetzter Natriumborhydridlösung (4 mg/ml A. dest.) gestoppt und eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert.

Zur Abtrennung nicht gekoppelter Bestandteile, insbesondere ungebundener Peroxidase, wurde eine gelchromatographische Reinigung des AOH-FA-BSA-HRPs durchgeführt. Zur Aufreinigung wurde eine Sephacryl S-200-HR-Säule, der Größe 60 x 1,6 cm und einem Gelbettvolumen von 120 ml, eingesetzt. Als Fließmittel wurde PBS I verwendet. Das

Kopplungsprodukt wurde auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,1 ml/min eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml.

3.2.1.1.6.2 Überprüfung der Konjugatfraktionen

Der Kopplungserfolg wird mit Hilfe der Reinheitszahl überprüft. Die Reinheitszahl gibt das Verhältnis des Gesamtproteingehaltes (Extinktion bei 280 nm) zum Peroxidasegehalt (Extinktion bei 403 nm) an. Die Konjugat-Fraktionen wurden im UV-Spektrophotometer (190–500 nm) gemessen und anhand der Extinktionswerte die jeweilige Reinheitszahl bestimmt. Die Konjugatfraktionen, die sowohl hohe absolute Proteingehalte als auch Reinheitszahlen über 0,68 aufwiesen, wurden in einem modifizierten direkten EIA (siehe 3.2.3.1) mit einer doppelten Austitration überprüft.

3.2.1.2 Gewinnung spezifischer Antikörper (polyklonale-Anti-Alternariol-Antikörper)

3.2.1.2.1 Immunisierung

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol (pAk-AOH) wurden mit den hergestellten KLH-Konjugaten (3.2.1.1.3 und 3.2.1.1.4) jeweils drei Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Charles River, Kiblegg) nach der Methode von NIESCHLAG *et al.* (1975) immunisiert. Die Immunogene wurden in PBS I gelöst und mit drei Volumenteilen kompletten Freundschens Adjuvans emulgiert. Zur Grundimmunisierung wurde jedem Kaninchen 2 ml Emulsion *intracutan* an der seitlichen Brustwand, auf ca. 20 Stellen verteilt, appliziert. Die Restimulierungen erfolgten intramuskulär nach den in Tabelle 11 angegebenen Zeiten. Hierfür wurde die gleiche Konzentration und Zusammensetzung des Immunogens, wie für die Grundimmunisierung, verwendet.

Die Tiere wurden entsprechend der Versuchsreihenfolge mit den Nummern K 1 bis K 6 bezeichnet.

Die durchgeführten Immunisierungen erfolgten unter Einhaltung tierschutzrechtlicher Bestimmungen nach Anzeige an die zuständige Behörde (Kenn-Nr. 265; Az: V 54-19 c 20/15 c GI 18/5).

Tabelle 11: Immunisierungsschema

Kaninchen	Immunogen	Grund- immunisierung KLH (µg/Tier)	Restimulierung	
			KLH (µg/Tier)	Zeit (Woche)
1, 2, 3	AOH-FA-KLH	250	250	7
			250	13
			250	32
4, 5, 6	AOH-CDI-KLH	500	-	-

KLH = keyhole limpet hemocyanin

AOH-FA-KLH = Alternariol-KLH-Konjugat gekoppelt mittels Formaldehyd

AOH-CDI-KLH = Alternariol-KLH-Konjugat gekoppelt mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol

3.2.1.2.2 Serumgewinnung

Ab der vierten Woche nach der Grundimmunisierung wurde den K 1-6 im zweiwöchigen Abstand aus der *Arteria auricularis rostralis* Blut entnommen. Das Serum wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (3000 x g, 15 min bei 4 °C) gewonnen.

3.2.1.2.3 Kontrolle des Immunisierungsverlaufs und Ermittlung optimaler Immunreagenzien

Die Titerbestimmung der gewonnenen Antiseren erfolgte in einem enzymimmunologischen Testsystem. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit AOH-FA-BSA-Konjugat gelöst in Bicarbonatpuffer in einer Konzentration von 12 µg/ml bzw. mit AOH-CDI-BSA-Konjugat gelöst in Bicarbonatpuffer in einer Konzentration von 8 µg/ml beschichtet (100 µl/Kavität) und 24 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platten wurden ausgeschlagen, 30 min mit 2 % Casein/PBS I abgesättigt (200 µl/Kavität), dreimal mit

Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen. Danach wurden von jedem Antiserum Verdünnungsreihen in PBS I im Doppelansatz pipettiert (100 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation unter leichter Bewegung (Taumler) erfolgten ein erneuter Waschschrift und die Zugabe von Enzymkonjugat-Lösung (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP) in einer Konzentration von 1,3 µg/ml in PBS I (100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und dann Enzymsubstrat-Chromogenlösung in die Kavitäten pipettiert (100 µl/Kavität). Nach 15 min wurde die Enzymreaktion mit Schwefelsäure (1 mol/l) abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab. Zum Vergleich wurden jeweils Präimmunsereen mituntersucht.

Für die weitere Entwicklung der EIAs wurden nur die Seren der K 1–3 verwendet.

Die gewonnenen Antiseren der K 1–3 wurden über den gesamten Immunisierungsverlauf auf ihre spezifische Empfindlichkeit für Alternariol geprüft. Hierzu wurde der in 3.2.1.2.3 beschriebene indirekte EIA modifiziert. Verdünnungsreihen der zu testenden Antiseren in PBS I (50 µl/Kavität) wurden jeweils mit und ohne Toxinzusatz (50 µl/Kavität, 1 µg/ml Alternariol in 10 % Methanol/PBS I bzw. nur 10 % Methanol/PBS I) inkubiert. Für die weiteren Versuche wurden diejenigen Antiseren gewählt, die bei hoher Antiserumverdünnung noch ausreichend hohe Extinktionswerte (0,8–1,2 Einheiten) für den alternariol-freien Ansatz ergaben und den größten Extinktionsunterschied zwischen toxfreiem und toxinhaltigem Ansatz aufwiesen. Einzelsereen jedes Tieres mit ähnlich hoher Testempfindlichkeit bei entsprechender Serumverdünnung wurden gepoolt, portioniert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.2.1.2.4 Aufbereitung der Antiseren

Ein Teil der ausgewählten Antiseren gegen Alternariol wurden nach der Methode von HEBERT *et al.* (1973) mit Ammoniumsulfat gefällt und gegen PBS I (3 x 6 l) dialysiert. Die gefällten Antiseren wurden in kleinen Portionen bei -18 °C aufbewahrt.

3.2.1.3 Monoklonale-Anti-Alternariol-Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk) gegen Alternariol (mAk-AOH) waren unter Verwendung des in den eigenen Arbeiten hergestellten Immunogens AOH-FA-BSA (3.2.1.1.3) am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München hergestellt worden und wurden freundlicherweise für eigene weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Acetylierung von Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen

Aliquote der Toxinstandards Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen wurden analog zu einem von USLEBER und MÄRTLBAUER (1998) beschriebenen Acetylierungsverfahren acetyliert. Zunächst wurde das Lösungsmittel (Methanol) durch Abdampfen entfernt und der Rückstand in Acetonitril gelöst. Jeweils 100 µl der Toxinlösung (2 mg/ml) wurden mit 900 µl Acetylierungsreagenz (4 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin und 20 µl Essigsäureanhydrid pro ml Acetonitril) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Mischung 1:20 mit PBS II (phosphatgepufferte (0,027 mol/l) Salzlösung, pH 7,4) versetzt. Die Toxinstandards (10 µg/ml) wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.3 Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests mit pAk-AOH

Zu Beginn der Entwicklung des kompetitiven direkten EIAs wurden die verschiedenen Alternariol-HRP-Konjugate in einem EIA auf ihre Anwendbarkeit überprüft. Dann wurden die optimalen Konzentrationskombinationen von Antiserum und Alternariol-HRP ermittelt. Mit den ermittelten optimalen Kombinationen wurden Alternariol-Standardkurven (Konzentrationsbereich 2 ng/ml–5 µg/ml) in verschiedenen Testanordnungen erstellt. Der Extinktionswert des toxfreien Ansatzes wurde dabei gleich 100 % gesetzt (B_0) und die den jeweiligen Toxinkonzentrationen entsprechenden Extinktionswerte (B) als Prozentwert dieses „Leerwertes“ ausgedrückt (B/B_0). Die Tests wurden orientierend mit dem gefälltem Antiserum (3.2.1.2.4) des K 2 (Woche 35) durchgeführt.

3.2.3.1 Überprüfung der Anwendbarkeit der Alternariol-HRP-Konjugate

Die Überprüfung des AOH-FA-HRP-Konjugates (3.2.1.1.3) und des AOH-CDI-HRP-Konjugates (3.2.1.1.4) erfolgte mit einem direkten EIA. Hierfür wurden die Platten mit Anti-Kaninchen-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer pH 9,6; 100 µl/Kavität) beschichtet und 24 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 2 % Casein/PBS I 30 min abgesättigt und gewaschen. Danach folgte die simultane Zugabe von AOH-FA-HRP-Konjugat bzw. AOH-CDI-HRP-Konjugat (1:50–1:1600 in 1 % Casein/PBS I; 50 µl/Kavität) und gefälltem Antiserum (1:1000–1:8000 in PBS I; 50 µl/Kavität). Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgten ein weitere Waschschrift und die Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Die Reaktion wurde nach 10–20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Überprüfung der aufgrund der Reinheitszahl ausgewählten AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat-Fraktionen (3.2.1.1.6.2) erfolgte mit einer veränderten Testanordnung. Die Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Antiserum (1:200–1:25600 in Bicarbonatpuffer pH 9,6; 100 µl/Kavität) beschichtet und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 2 % Casein/PBS I 30 min abgesättigt und gewaschen. Die AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat-Fraktionen wurden jeweils in verschiedenen Verdünnungen (1:100–1:24000 in PBS I, 50 µl/Kavität) simultan mit Alternariol (1 µg/ml in 10 % Methanol/PBS I; 50 µl/Kavität) bzw. 10 % Methanol/PBS I (50 µl/Kavität) 2 h inkubiert. Die weitere Testdurchführung erfolgte analog zu der Überprüfung der AOH-FA-HRP-Konjugate bzw. AOH-CDI-HRP-Konjugate.

Die folgenden Optimierungen wurden nur noch mit den ausgewählten AOH-FA-BSA-HRP-Fraktionen durchgeführt.

3.2.3.2 Auswahl geeigneter Kombinationen von Antiserum zu AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat

Zur Ermittlung der optimalen Verdünnungen von Antiserum und Konjugat wurde ein direkter simultaner EIA (3.2.3.3) durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit den jeweiligen gefällten Antiseren in Verdünnungsstufen beschichtet (1:200–1:25600 in Bicarbonatpuffer pH 9,6).

Freie Proteinbindungsstellen der Platten wurden mit 2 % Casein/PBS I (200 µl/Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Verdünnungsreihen ausgewählter AOH-FA-BSA-HRP-Fraktionen (1:100–1:24300 in PBS I) wurden mit Alternariol-Standardlösung (1 µg/ml in 10 % Methanol/PBS I) und im Vergleich dazu mit 10 % Methanol/PBS I 2h inkubiert. Für die weitere Prüfung im direkten EIA wurden diejenigen Kombinationen ausgewählt, die in ausreichend hohen Verdünnungen zu Extinktionen von ca. 0,8–1,2 Einheiten für den toxischen Ansatz führten und gleichzeitig den größten Extinktionsunterschied (B/B_0) zwischen toxischem (B_0) und toxischem Ansatz (B) aufwiesen.

3.2.3.3 Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Beschichtung mit Antiserum)

Zur Durchführung des direkten simultanen EIAs wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungen gefälltem Antiserum (3.2.1.2.4) gegen Alternariol in einem Verdünnungsbereich von 1:1000 bis 1:3000 beschichtet (in Bicarbonatpuffer pH 9,6; 100 µl/Kavität) und anschließend 24 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Freie Proteinbindungsstellen der Platten wurden mit 2 % Casein/PBS I (200 µl/Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten wurden 50 µl Alternariol-Standard (in 10 % Methanol/PBS I) und 50 µl AOH-FA-BSA-HRP in verschiedenen Verdünnungen (1:100–1:200 in PBS I) in die Kavitäten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer Waschschrift, um ungebundene Reaktionspartner zu entfernen. Danach wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben, die Farbreaktion nach 10–20 min durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.3.4 Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Doppelantikörpertechnik)

Mikrotiterplatten wurden mit Anti-Kaninchen-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität) beschichtet und 24 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit 2 % Casein/PBS I abgesättigt und gewaschen. Danach folgten die simultane Zugabe von gefälltem Antiserum (verdünnt in PBS I), Alternariol-Standard (verdünnt in 10 % Methanol/PBS I) und Alternariol-BSA-HRP-Konjugat (verdünnt in PBS I), von jeweils 35 µl pro Kavität. Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgten ein weiterer Waschschrift und die Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Die Reaktion wurde nach 10–20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

In einer Modifikation dieses Verfahrens wurde in weiteren Versuchen eine konsekutive Testanordnung geprüft. Auf mit Anti-Kaninchen-IgG beschichteten Platten wurde zunächst gefälltes Antiserum gegen Alternariol (100 µl/Kavität) auf die Platte pipettiert und 1 h inkubiert. Danach wurde die Platte gewaschen und durch Zugabe von 2 % Casein/PBS I abgesättigt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Alternariol-Standard und AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat (je 50 µl/Kavität) zugegeben und 2 h inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu der oben beschriebenen Testanordnung.

3.2.4 Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit pAk-AOH (pAk-EIA)

3.2.4.1 Durchführung

Für die Durchführung eines kompetitiven indirekten EIAs mit pAk-AOH (pAk-EIA) wurden Mikrotiterplatten mit AOH-FA-BSA bzw. AOH-CDI-BSA (verdünnt in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet und danach 24 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die beschichteten Platten wurden ausgeschlagen und mit 2 % Casein/PBS I (200 µl/Kavität) abgesättigt, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde in jede Kavität 50 µl einer Antiserumverdünnung in PBS I pipettiert. Zu der Antiserumverdünnung wurde 50 µl Alternariol-Standard in 10 %

Methanol/PBS I bzw. nur 10 % Methanol/PBS I (als Negativprobe) pipettiert und die Platte unter leichter Bewegung 1 h inkubiert. Nach viermaligem Waschen zum Entfernen ungebundener Reagenzien wurde als Enzymkonjugat Anti-Kaninchen-IgG-HRP zugegeben (1,3 µg/ml in PBS I; 100 µl/Kavität). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h und einem Waschschrift (viermal waschen) wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 15 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 ml/Kavität) abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.4.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Um die Nachweisempfindlichkeit des Testsystems zu verbessern, wurden zuerst die optimalen Konzentrationen an AOH-FA-BSA bzw. AOH-CDI-BSA und gepooltem Antiserum gegen Alternariol, in einer Modifikation der unter 3.2.4.1. beschriebenen Methode, ermittelt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Alternariol-BSA-Verdünnungen (siehe Tabelle 12) beschichtet. Nach Blockierung von freien Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS I und einem Waschschrift zum Entfernen von ungebundenem Festphasenantigen, wurden Antiserumverdünnungen (siehe Tabelle 12) simultan mit Alternariol-Standardlösung in 10 % Methanol/PBS I und im Vergleich dazu nur 10 % Methanol/PBS I inkubiert. Das Enzymkonjugat wurde in einer Konzentration von 0,43 µg/ml zugegeben. Abbildung 7 zeigt die hierfür verwendete Plattenbelegung.

Für die weitere Optimierung wurden die Kombinationen ausgewählt, die bei möglichst hohen Verdünnungen zu Extinktionen von 0,8–1,2 Einheiten im toxinfreien Ansatz führten und gleichzeitig den größten Extinktionsunterschied zwischen toxinfreiem (B_0) und toxinhaltigem Ansatz (B) aufwiesen.

Mit den ermittelten optimalen Kombinationen wurden verschiedene Standardkurven für Alternariol in 10 % Methanol/PBS I auf mit AOH-FA-BSA beschichteten Platten erstellt. Zusätzlich wurde noch die optimale Konzentration des Anti-Kaninchen-IgG-HRP für den EIA mit dem Antiserum des K 3 gegen Alternariol ermittelt. Dazu wurden Alternariol-Standardkurven im Konzentrationsbereich von 6 pg/ml bis 100 ng/ml erstellt, wobei die Konzentration des Anti-Kaninchen-IgG-HRP variiert wurde.

In weiteren Experimenten wurde geprüft, ob die Zusammensetzung des Lösungsmittels für die Alternariol-Standardverdünnungen Einfluss auf die Testsensitivität hat. Hierzu wurden Alternariol-Standardkurven in folgenden Lösungsmitteln erstellt: 1. 10 % Methanol/PBS I, 2. PBS I, 3. PBS II und 4. 5 % Acetonitril/PBS I.

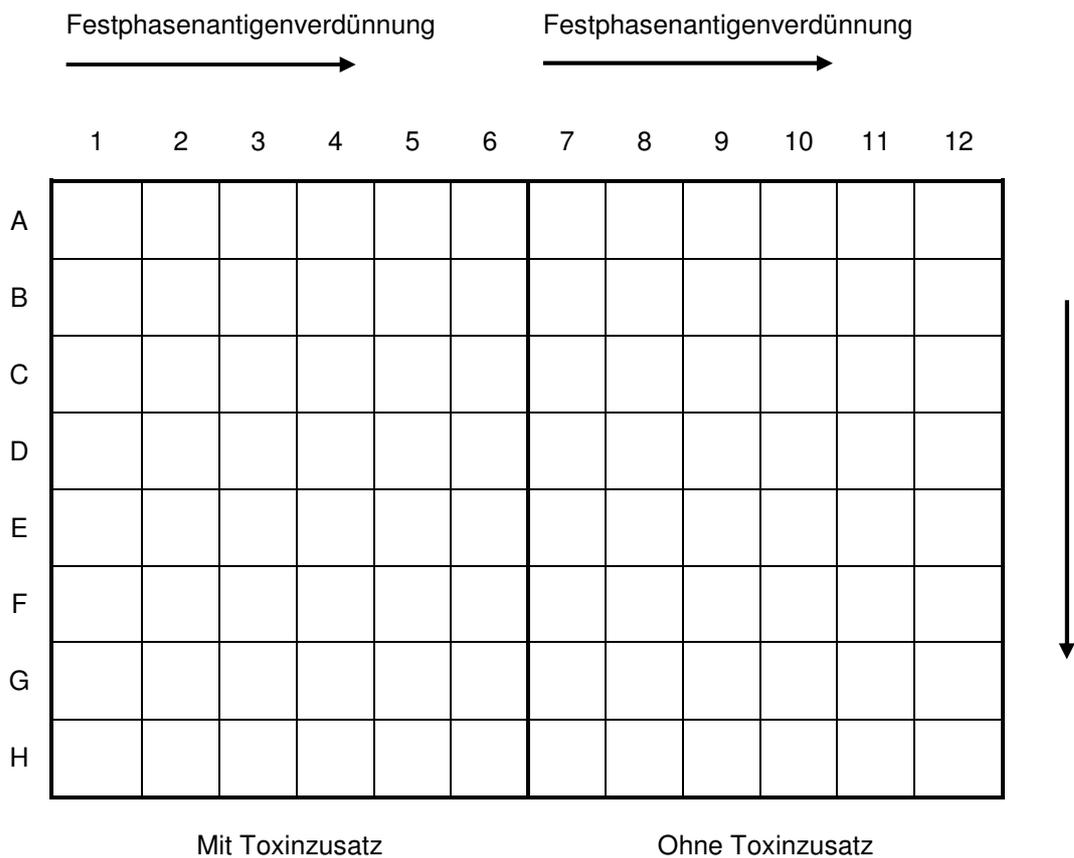


Abbildung 7: Plattenbelegung zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien durch doppelte Austitration von Festphasenantigenen (Alternariol-BSA) gegen Antiserum.

3.2.5 Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit mAk-AOH (mAk-EIA)

3.2.5.1 Durchführung

Zur Durchführung eines kompetitiven indirekten EIAs mit mAk-AOH (mAk-EIA) wurden Mikrotiterplatten mit AOH-FA-BSA bzw. AOH-CDI-BSA (verdünnt in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet und 24 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

inkubiert. Dann wurden die Platten ausgeschlagen, mit 3 % Casein/PBS I (200 µl/Kavität) abgesättigt und erneut 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten wurde in jede Kavität 50 µl der mAk-AOH verdünnt in PBS I und 50 µl Alternariol-Standard in PBS II pipettiert. Als Negativprobe wurde zu den mAk-AOH PBS II ohne Toxin pipettiert und danach die Platte unter leichter Bewegung 1 h inkubiert. Nach viermaligem Waschen zum Entfernen ungebundener Reagenzien wurde als Enzymkonjugat Anti-Maus-Immunglobulin-HRP zugegeben (verdünnt in 1 % Casein/PBS I; 100 µl/Kavität) und die Platte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer 1 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (viermal waschen) wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben und die Farbreaktion nach ca. 15 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Tabelle 12: Getestete Konzentrationen von Festphasenantigen und Verdünnungen der Antiseren gegen Alternariol zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests mit pAk-AOH

Festphasenantigen	BSA-Konzentration (µg/ml in Bicarbonatpuffer)	Verdünnungsbereich der pAk-AOH-Pools (K 1-3)
AOH-FA-BSA	0,75–24	1:100–1:218700
AOH-CDI-BSA	1–32	1:100–1:218700

BSA = bovines Serumalbumin
 pAk-AOH = polyklonale Antikörper gegen Alternariol
 AOH-FA-BSA = Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels Formaldehyd
 AOH-CDI-BSA = Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol
 K 1-3 = Kaninchen 1-3

3.2.5.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Zur Optimierung der Testempfindlichkeit wurden zuerst die geeigneten Konzentrationen an AOH-FA-BSA bzw. AOH-CDI-BSA (siehe 3.2.1.1.3 und 3.2.1.1.4) und des mAk-AOH ermittelt. Dazu wurde die unter 3.2.5.1 dargestellte Methode modifiziert. Die Mikrotiterplatten wurden mit Verdünnungsreihen des jeweiligen Festphasenantigens (Konzentrationen siehe Tabelle 13) beschichtet und über Nacht inkubiert. Nach Absättigen, Waschen und Trockenschlagen der Platten wurden Verdünnungsreihen der mAk-AOH

(Konzentrationen siehe Tabelle 13) pipettiert. Zu den mAk-AOH wurde Alternariol-Standardlösung (verdünnt in PBS II, Konzentration 1 ng/ml) bzw. nur PBS II zugegeben und 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Enzymkonjugatlösung (650 ng/ml) in die Kavitäten pipettiert. Abbildung 7 zeigt die verwendete Plattenbelegung.

Für die weitere Optimierung wurden die Kombinationen ausgewählt, die bei möglichst hohen Verdünnungen zu Extinktionen von 0,8–1,2 Einheiten im toxisfreien Ansatz führten und gleichzeitig den größten Extinktionsunterschied (B/B_0) zwischen toxisfreiem (B_0) und toxishaltigem (B) Ansatz aufwiesen.

Zusätzlich wurde noch die optimale Konzentration des Anti-Maus-Immunglobulin-HRP ermittelt. Dazu wurden Alternariol-Standardkurven im Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 10 ng/ml erstellt, wobei die Konzentration des Anti-Maus-Immunglobulin-HRP variiert wurde.

Tabelle 13: Konzentrationen von Festphasenantigenen und Verdünnungen der monoklonalen Antikörper gegen Alternariol zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests

Festphasenantigen	BSA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$ in Bicarbonatpuffer)	Verdünnungsbereich der mAk-AOH
AOH-FA-BSA	0,01–30	1:250–1:32000
AOH-CDI-BSA	0,01–40	1:250–1:32000

BSA = bovines Serumalbumin
 mAk-AOH = monoklonale Antikörper gegen Alternariol
 AOH-FA-BSA = Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels Formaldehyd
 AOH-CDI-BSA = Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol

3.2.6 Charakteristika der indirekten Testsysteme

3.2.6.1 Ermittlung der Sensitivität der Testsysteme

Die Testempfindlichkeit wurde anhand des 50 %-Wertes der Alternariol-Standardkurve sowie der Nachweisgrenze bestimmt. Die Nachweisgrenze entsprach derjenigen Alternariol-Konzentration, welche die Bindung der Festphasenantigene an die Antikörper um 20 % reduzierte und damit einen Extinktionswert von 80 % des Nullwertes ergab.

3.2.6.2 Ermittlung der Spezifität der Testsysteme

Zur Ermittlung der Spezifität muss die Kreuzreaktivität der Antikörper mit strukturverwandten Substanzen geprüft werden. Dafür wurden Kompetitionsversuche mit den strukturverwandten *Alternaria*-Toxinen Altenuen und Alternariolmonomethylether durchgeführt. Die Kreuzreaktivität von Tenuazonsäure wurde ebenfalls getestet.

Im pAk-EIA wurden Standardkurven im Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 10 µg/ml (Altenuen und Alternariolmonomethylether) und 165 pg/ml bis 9,7 µg/ml (Tenuazonsäure) unter den in 3.2.4.2 optimierten Bedingungen erstellt und ihre 50 %-Dosis graphisch ermittelt.

Zur Bestimmung der Spezifität des mAk-EIAs wurden Standardkurven (im Konzentrationsbereich von 17 pg/ml bis 1 µg/ml) mit den oben genannten *Alternaria*-Toxinen mit der unter 3.2.5.2 ermittelten optimierten Methode erstellt. Die Kreuzreaktion mit Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen nach durchgeführter Acetylierung (3.2.2) wurde ebenfalls überprüft.

Hierbei beschreibt die relative Kreuzreaktion die Eigenschaft des spezifischen Antikörpers neben Alternariol [A] auch andere Substanzen [X] zu binden. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion erfolgte mit der ermittelten 50 %-Dosis nach folgender Formel:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50\% \text{ Dosis [A]}}{50\% \text{ Dosis [X]}} \cdot 100$$

Die 50 %-Dosen wurden zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte in nmol/l umgerechnet.

3.2.7 Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol

Die Überprüfung der Anwendbarkeit erfolgte anhand von künstlich und natürlich kontaminierten Proben (n = 126) und beschränkte sich auf die kompetitiven indirekten Verfahren mit pAK-AOH bzw. mAK-AOH.

3.2.7.1 Erarbeitung einer geeigneten Probenvorbereitung

Zur Ermittlung einer geeigneten Probenvorbereitung wurden zwei verschiedene Methoden getestet und die bearbeiteten Proben dann im pAk- bzw. mAk-EIA eingesetzt. Als einfaches und schnelles Verfahren wurde Probenverdünnung mit verschiedenen Lösungsmitteln (PBS I, PBS II, 10 % Methanol/PBS I, 5 % Acetonitril/PBS I) getestet. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Probenverdünnungen teilweise noch zentrifugiert bzw. filtriert.

Bei dem zweiten getesteten Verfahren wurden die Proben 1:10 mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Der pH-Wert der Ansätze wurde gemessen und auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Die Extrakte wurden dann zur Aufreinigung zentrifugiert bzw. filtriert. Ein Aliquot des Filtrates bzw. des Überstandes wurde mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat extrahiert. Zur Bestimmung der notwendigen Extraktionsschritte wurde eine erschöpfende Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde der Überstand mit Ethylacetat mehrmals ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden getrennt aufgearbeitet, wobei die Extrakte jeweils als einzelne Proben im pAk-EIA eingesetzt wurden.

3.2.7.2 Bestimmung der Wiederfindung und der Reproduzierbarkeit

Die Anwendbarkeit der Probenvorbereitung und des pAk- bzw. mAk-EIAs wurden mit Hilfe der Wiederfindungsraten von Alternariol und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurden natürlich mit Alternariol kontaminierte Proben mehrfach analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden in künstlich mit Alternariol kontaminierten Probenmaterialien bestimmt. Hierzu wurden die Proben abgewogen und dann wurde direkt das Alternariol in einem Konzentrationsbereich von 1 µg/kg bis 10 µg/kg zugesetzt. Anschließend wurden die Proben extrahiert, jeweils in beide EIAs eingesetzt und mit der nicht künstlich kontaminierten Probe verglichen.

3.2.7.3 Durchführung und Auswertung der EIAs zum Nachweis von Alternariol

Die Proben wurden mit den optimierten EIAs (pAk- bzw. mAk-EIA) untersucht. Zur automatisierten Auswertung der EIAs erfolgte die Belegung der Mikrotiterplatten nach einem standardisierten Pipettierschema. Zur Auswertung wurden die ermittelten Extinktionswerte der einzelnen Standardkonzentrationen in Prozentwerte umgerechnet ($\text{Extinktionswert Standard (B)} / \text{Extinktionswert Leerwert (B}_0) \times 100$) und in einer Kalibriergeraden (kubische Splinefunktion) dargestellt. Anhand dieser Kalibriergeraden wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Alternariol-Konzentration der jeweiligen Probe berechnet. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte unter der Verwendung der Software Ridawin bzw. Magellan. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen wurden bei der Auswertung der Probenmesswerte nur Werte berücksichtigt, die in Extinktionswerten von mehr als 30 % und weniger als 80 % des toxischen Ansatzes (B/B_0) resultierten, da dieser Bereich dem quasi-linearen Bereich der Standardkurve entspricht.

Zur Beurteilung der Untersuchungsergebnisse wurden die Proben einer Probenmatrix in eine Gruppe zusammengefasst. Es wurden nur Proben als positiv gewertet und in die Auswertung miteinbezogen, die gleich oder oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Wurden Mehrfachuntersuchungen einer Probe durchgeführt, wurde der Mittelwert zur weiteren Auswertung verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, das Minimum, das Maximum, der Median (50. Perzentil) und das 90. Perzentil herangezogen.

3.2.7.4 Immunchemischer Nachweis von Alternariol in Lebensmitteln

Die Vorbereitung der Lebensmittelproben erfolgte nach den erarbeiteten Verfahren nach 3.2.7.1. Die entsprechenden Verdünnungen der Proben und des Alternariol-Standards wurden zur Verwendung im mAk- bzw. pAk-EIA in PBS II angelegt.

3.2.7.4.1 Nachweis von Alternariol in Getränken

Die Proben wurden 1:10 mit PBS II verdünnt und dann direkt und in weiteren Verdünnungen im mAk- bzw. pAk-EIA eingesetzt.

3.2.7.4.2 Nachweis von Alternariol in Obst und Gemüse bzw. daraus hergestellter Erzeugnisse

Apfelmus:

In ein Becherglas wurde 1 g Apfelmus eingewogen und mit 10 ml PBS II verdünnt. Die Probe wurde 10 min gerührt und dann 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann unverdünnt und in weiteren Verdünnungen direkt im mAk- bzw. pAk-EIA eingesetzt.

Tomaten:

Die Tomaten wurden makroskopisch auf typische Anzeichen eines *Alternaria*-Spezies-Befall untersucht. Tomaten, die keine Anzeichen eines *Alternaria*-Spezies-Befall aufwiesen, wurden zerkleinert. Anschließend wurden 5 g der Probe mit 50 ml 70 % Methanol/PBS II verdünnt. Der Ansatz wurde mit 3 mol/l Natronlauge (~ 40 µl) auf pH 7,0 eingestellt, das Gemisch 30 min auf dem Magnetrührer gerührt und über einen Faltenfilter filtriert. Ein Aliquot des Filtrates (2 ml) wurde mit 2 ml A. dest. und 3 ml Ethylacetat in ein Schraubdeckelreagenzglas pipettiert, 1 min auf dem Vortexgerät gemischt und dann zentrifugiert (4000 rpm, 10 min bei 20 °C). Die obere Phase wurde in einen 10 ml Spitzkolben überführt, die untere Phase erneut mit 3 ml Ethylacetat versetzt, 1 min gemischt und dann wieder 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde zu der ersten Extraktionsphase in den Spitzkolben überführt und dann am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml PBS II aufgenommen, auf dem Vortexgerät gemischt und 5 min im Ultraschallbad gelöst. Der

Extrakt wurde unverdünnt und in weiteren PBS II Verdünnungen im mAk- bzw. pAk-EIA eingesetzt.

Tomaten, die typische Anzeichen eines *Alternaria*-Spezies-Befalls aufwiesen, wurden bis zu vier Wochen bei 20 °C gelagert, um dadurch eine weitere Verschimmelung zu provozieren. Die Untersuchung der verschimmelten Tomaten erfolgte analog zu der Untersuchung der „frischen“ Tomaten.

Zur Differenzierung der Schimmelpilze der Tomatenproben wurde je eine kleine Teilprobe einer befallenen Stelle direkt auf Malzextrakt-Agar bebrütet. Nach 7-tägiger Inkubation bei 25 °C wurden die Schimmelpilze anhand des Koloniehautus (zum Beispiel Farbe) und des mikroskopischen Sporenbildes (Konidienform, Septierung) auf Gattungsebene identifiziert.

Um das Toxinbildungsvermögen des Schimmelpilzes beurteilen zu können, wurde ein Teil der Sporen wie unter 3.2.7.5 beschrieben, im EIA eingesetzt.

Tomatenketchup:

Die Untersuchung von Tomatenketchup erfolgte in leicht modifizierter Form zu der Untersuchung „frischer“ Tomaten. Bei der Untersuchung von Ketchup wurden 50 ml 70 % Methanol/PBS II unter Rühren sehr langsam zugegeben, um eine bessere Vermischung zu erreichen. Der Ansatz wurde nicht filtriert, sondern zentrifugiert (3000 rpm, 15 min bei 20 °C). Die Extraktion erfolgte dann analog zur Untersuchung von Tomaten. Der Extrakt wurde im pAk-EIA unverdünnt und im mAk-EIA ab einer 1:5 Verdünnung eingesetzt.

Tomatenmark:

Die Bestimmung des Alternariol-Gehaltes in Tomatenmark erfolgte analog zu der Untersuchung von Tomatenketchup in leicht modifizierter Form. Der Ansatz wurde nicht nur zentrifugiert, sondern auch über ein Papierfaltenfilter filtriert. Der Extrakt wurde im pAk-EIA unverdünnt und mAk-EIA ab einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

Erdbeerkonfitüre:

Die Erdbeerkonfitüre wurde mit dem Pürrierstab homogenisiert. Die Untersuchung wurde analog zu der Untersuchung von „frischen“ Tomaten durchgeführt. Der Extrakt wurde unverdünnt und in weiteren PBS II Verdünnungen im mAk- bzw. pAk-EIA eingesetzt.

3.2.7.5 Nachweis von Alternariol in *Alternaria*-Myzelextrakten nach kultureller Anreicherung

Ein kultivierter *Alternaria*-Stamm wurde auf Malzextrakt-Agar sowie in Hefeextrakt-Glucose-Bouillion angezchtet und sieben Tage im Brutschrank bei 25 °C bebrütet. Danach wurde zwischen 5 mg und 10 mg Myzel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1 ml Methanol extrahiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 rpm, 4 min bei 20 °C) und dann der Überstand 1:10 mit PBS II verdünnt im mAk- bzw. pAk-EIA eingesetzt.

3.2.7.6 Vergleich der Ergebnisse des indirekten kompetitiven EIAs mit pAk- bzw. mAk-AOH

Zum Vergleich der Ergebnisse des pAk- bzw. mAk-EIAs wurden für die verschiedenen Probenmatrices jeweils der Zusammenhang der Ergebnisse mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten (r) und der linearen Regression ($y = m \cdot x + b$) bestimmt. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden auch der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, der Median, das Minimum, das Maximum und das 90. Perzentil betrachtet.

3.2.8 Untersuchung mittels HPLC

Zur Überprüfung der EIA Ergebnisse wurden Proben mit hohen Alternariol-Konzentrationen in der HPLC nach einer modifizierten Methode nach SMEDSGAARD (1997) untersucht. Die Kalibriergerade für Alternariol und Alternariolmonomethylether wurde anhand der berechneten Peakfläche für Standardlösungen (Toxin in Methanol) durch lineare Korrelation erstellt. Die Nachweisgrenze wurde über das dreifache Signal-Rauschverhältnis und die Bestimmungsgrenze über das neunfache Signal-Rauschverhältnis bestimmt. Die Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Proben erfolgte unter Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors.

3.2.8.1 Probenuntersuchung

Die Proben wurden analog zu den beschriebenen Methoden für die EIA-Untersuchung extrahiert, mit der Modifikation, dass der abgedampfte Rückstand mit der mobilen Phase (Acetonitril/A. dest., 15/85) aufgenommen wurde. Teilweise wurde der Rückstand auch in geringeren Mengen Acetonitril/A. dest. gelöst, um den Toxingehalt aufzukonzentrieren. Der Probenextrakt wurde anschließend in der HPLC vermessen.

HPLC-Analysebedingungen (modifiziert, nach SMEDSGAARD, 1997):

Stationäre Phase:	Trennsäule HS C18 (5 µm) 250 x 4 mm mit Vorsäule HS C18 (5 µm) 20 x 4 mm
mobile Phase:	Acetonitril/A. dest. (mit 0,1 g Ammoniumsulfat/l)
Gradient:	0 min: Acetonitril/A. dest. 15/85 40 min: Acetonitril/A. dest. 100/0 45 min: Acetonitril/A. dest. 100/0 50 min: Acetonitril/A. dest. 15/85 51 min: Acetonitril/A. dest. 15/85
Säulentemperatur:	40 °C
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Detektion:	UV/DAD (Diodenarraydetektor), Quantifizierungswellenlängen: 256 nm und 340 nm Fluoreszenz (Excitation: 253 nm, Emission: 415 nm)

Die Retentionszeiten von Alternariol und Alternariolmonomethylether in der Probe wurden mit den Standards verglichen. Die Quantifizierung der Toxine erfolgte durch die erzeugte Peakfläche. Hierfür wurde eine Kalibriergerade mittels Toxinstandard erstellt. Die Berechnung des Toxingehaltes erfolgte unter Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors.

Zur Untersuchung in der HPLC wurden nur Proben ausgewählt, die einen Alternariol-Gehalt über 8 µg/kg in den EIAs aufwiesen. Als Negativkontrolle wurden Proben verwendet, in

denen Alternariol im EIA nicht nachweisbar war. Es wurden eine Tomatenmark- und sieben Tomatenproben untersucht. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine Tomatenmarkprobe vor der Extraktion künstlich mit Alternariol versetzt (100 ng/g).

Die Tomatenmarkproben wurden zusätzlich noch fraktioniert (Fraktionszeit 1 min). Von diesen Fraktionen wurden drei Fraktionen ausgewählt, die um den Zeitpunkt der Retentionszeit von Alternariol (15,9 min) gesammelt wurden. Diese Fraktionen wurden im mAk- bzw. pAk-EIA untersucht. Um einen möglichst geringe Probenverdünnung zu ermöglichen, wurden je 300 µl einer Fraktion unter Stickstoff abgedampft und dann mit 150 µl PBS II gelöst (Faktor 0,5). Alle Proben wurden unverdünnt und in weiteren PBS II Verdünnungen eingesetzt. Zur Überprüfung der Fraktionierung wurde zusätzlich die künstlich kontaminierte Tomatenmarkprobe in beiden EIAs untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Immunreagenzien

4.1.1 Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol

Die chromatographische Überprüfung der Alternariol-Standardlösung mittels UV-Detektor zeigte einen Alternariol-Peak bei einer Retentionszeit von 6,8 min sowie einen kleinen Alternariolmonomethylether-Peak bei 14,2 min (Abbildung 8). Die mittels DAD (Diodenarraydetektor) gemessenen UV-Spektren zeigten die typischen Absorptionsmaxima von Alternariol bei 256, 288, 300 und 340 nm (Abbildung 8). Die Messung der Alternariol-Standardlösung in Methanol ergab einen mittleren molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten von $4,8 \pm 0,3 \cdot 10^4 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 256 nm. Die Überprüfung der Stabilität zeigte, dass sich im Verlauf von sechs Monaten das UV-Spektrum der 10 $\mu\text{g/ml}$ und 1 mg/ml Alternariol-Lösung nicht veränderte. Dies deutet darauf hin, dass Alternariol als methanolische Lösung ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ bei -18°C für mindestens sechs Monate stabil ist.

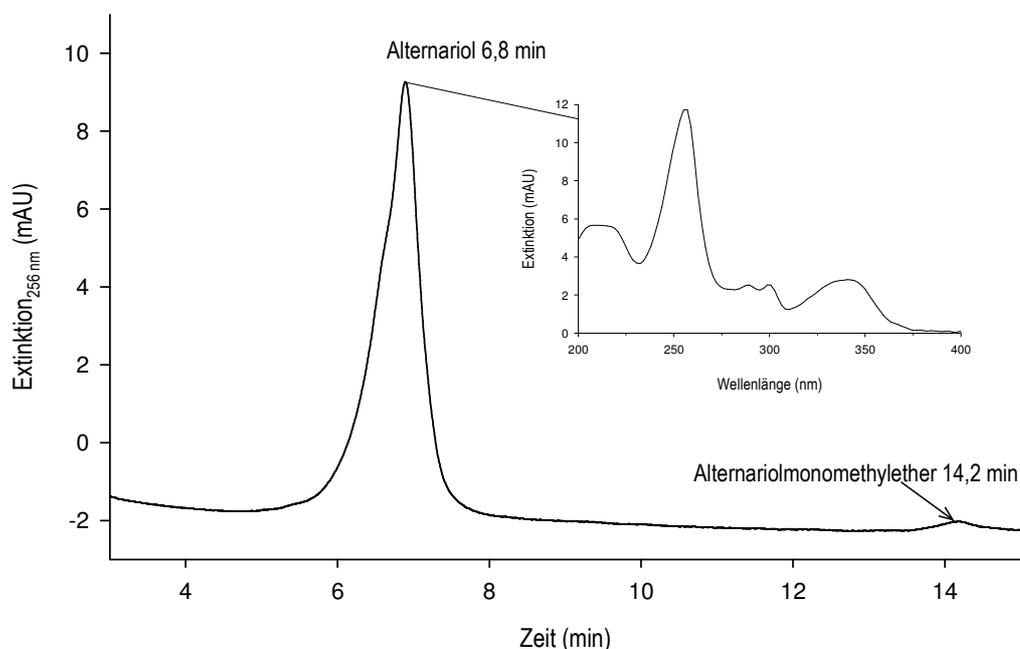


Abbildung 8: Chromatogramm (UV-Detektion) und UV-Spektrum einer 1 $\mu\text{g/ml}$ Alternariol-Standardlösung in Methanol.

4.1.2 Derivatisierung von Alternariol mittels Bernsteinsäureanhydrid

Um Alternariol mittels der aktiven Estermethode an Proteine binden zu können, muss eine reaktive Carboxygruppe eingeführt werden. Die Einführung solch einer reaktiven Carboxygruppe in Alternariol war in beiden Derivatisierungsansätzen nicht erfolgreich. Bei der Umsetzung von Alternariol mit Bernsteinsäureanhydrid entstand nicht das gewünschte Alternariol-Hemisuccinat. Beim chromatographischen Vergleich des reinen Alternariols mit dem ersten Derivatisierungsansatz waren die Retentionszeiten (6,8 min) in den Chromatogrammen identisch und die Spektren zeigten keine Veränderungen. Im zweiten Ansatz, mit verlängerter Reaktionszeit und Einsatz einer größeren Menge Bernsteinsäureanhydrid, zeigte sich im Chromatogramm zusätzlich ein breiter, flacher Peak bei 4,6 min. Das UV-Spektrum dieses Peaks hat nur noch ein Maximum bei 256 nm. Dies lässt vermuten, dass dieser Peak einem Zerfallsprodukt von Alternariol entspricht.

Der Peak der in beiden Chromatogrammen der Derivatisierungsansätze bei einer Retentionszeit von 14 min zu sehen ist, entspricht einer „Verunreinigung“ des Alternariol-Standards mit Alternariolmonomethylether. Die Abbildung 9 zeigt die Chromatogramme von Alternariol und des 2. Derivatisierungsansatzes, in Abbildung 9 ist auch das UV-Spektrum von Alternariol bei 6,8 min und das Spektrum des ersten Peaks (4,6 min) des 2. Derivatisierungsansatzes zu sehen.

4.1.3 Herstellung und Überprüfung der Konjugate

Da zum Zeitpunkt der Kopplung der Proteinkonjugate noch keine Methoden zur Herstellung von Alternariol-Proteinkonjugaten beschrieben worden waren, wurden verschiedene Kopplungsmethoden getestet. Die qualitative photometrische Überprüfung der mittels CDI bzw. FA hergestellten Konjugate belegte, dass Alternariol erfolgreich an die Proteine BSA und KLH gekoppelt wurde. Dagegen war in beiden Differenzspektren der HRP-Konjugate (AOH-CDI-HRP, AOH-FA-HRP) kein deutliches Maximum bei 256 nm zu erkennen. Hier war der Erfolg der Kopplung fraglich. In den Abbildungen 10, 11 und 12 sind beispielhaft die UV-Spektren für AOH-FA-BSA, AOH-FA-KLH und AOH-CDI-HRP sowie die reinen Protein- und die daraus resultierenden Differenzspektren dargestellt.

Eine quantitative Bestimmung des Protein- und Alternariol-Gehaltes ergab mittlere Kopplungsraten von 2 Mol Alternariol zu 1 Mol BSA bei der Kopplung mittels FA und 7 Mol Alternariol zu 1 Mol BSA bei der Kopplung mittels CDI. Die Kopplungsrate von AOH-CDI-KLH lag bei 400 Mol Alternariol zu 1 Mol KLH. Bei dem AOH-FA-KLH-Konjugat war eine quantitative Bestimmung nicht möglich, da das sehr trübe Reaktionsgemisch die UV-Messung verfälschte. Deshalb wurde der Proteingehalt für die weitere Verwendung abgeschätzt, indem ein Kopplungserfolg von 50 % angenommen wurde. Der Proteingehalt des AOH-FA-HRP-Konjugates bzw. des AOH-CDI-HRP-Konjugates wurde aufgrund des fraglichen Kopplungserfolges nicht berechnet. Die Proteingehalte der BSA- und KLH-Konjugate werden in Tabelle 14 aufgezeigt.

Die Überprüfung des mittels reduktiver Alkylierung hergestellten AOH-FA-BSA-HRP-Konjugates erfolgte nach gelchromatographischer Aufreinigung, mittels der UV-Spektroskopie. Drei Fraktionen wiesen eine Reinheitszahl (Verhältnis Gesamtprotein zu HRP) über 0,68 sowie hohe absolute Proteingehalte auf.

Tabelle 14: Proteingehalt der Immunogene und Festphasenantigene

Kopplungsprodukt	Proteingehalt (mg/ml)
AOH-FA-KLH	2,5
AOH-CDI-KLH	5,0
AOH-FA-BSA	12
AOH-CDI-BSA	8,0

KLH = keyhole limpet hemocyanin
 BSA = bovines Serumalbumin
 AOH = Alternariol
 FA = gekoppelt mittels Formaldehyd
 CDI = gekoppelt mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol

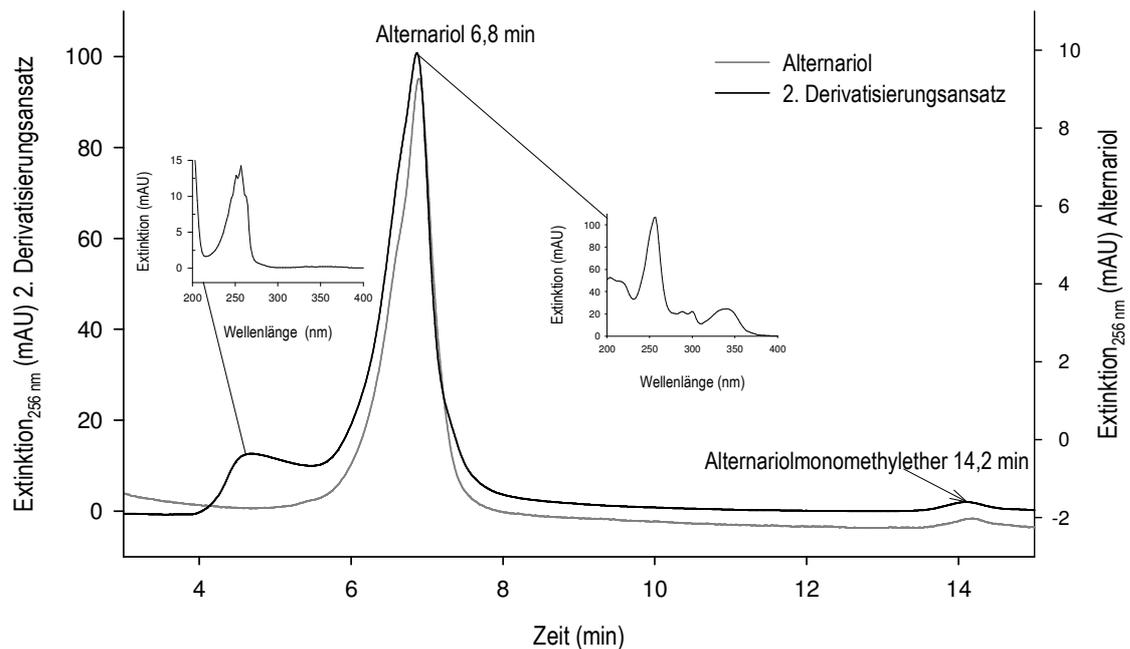


Abbildung 9: Vergleich der Chromatogramme (UV-Detektion bei 256 nm) von Alternariol (1 µg/ml in Methanol) und des 2. Derivatisierungsansatzes sowie UV-Spektren der Peaks des 2. Derivatisierungsansatzes.

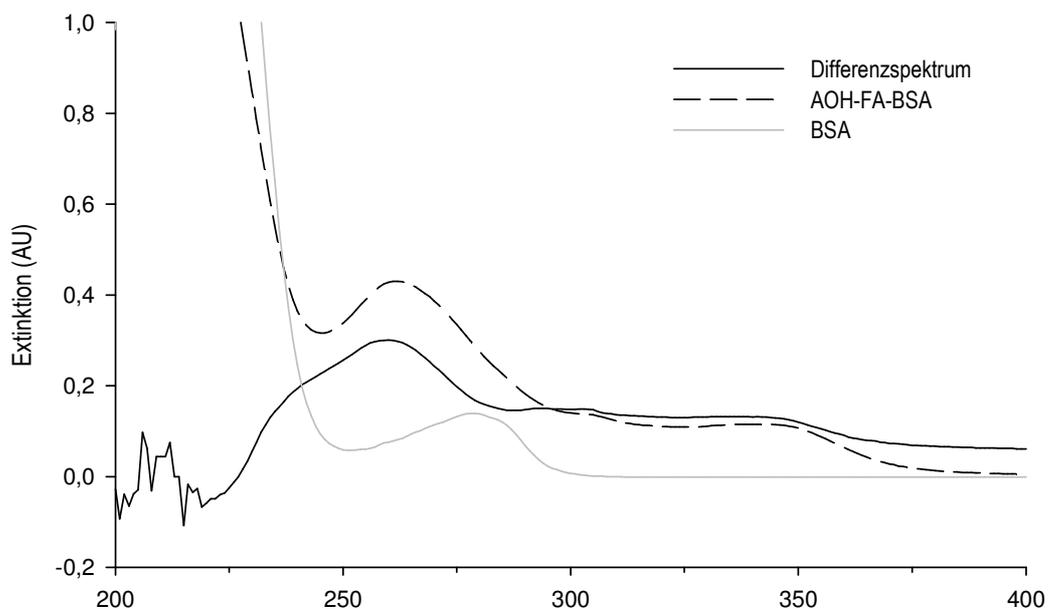


Abbildung 10: Vergleich der UV-Spektren für Alternariol-BSA gekoppelt mit Formaldehyd (1:40 in PBS I) und BSA-Reinprotein (300 µg/ml in PBS I) sowie das daraus berechnete Differenzspektrum.

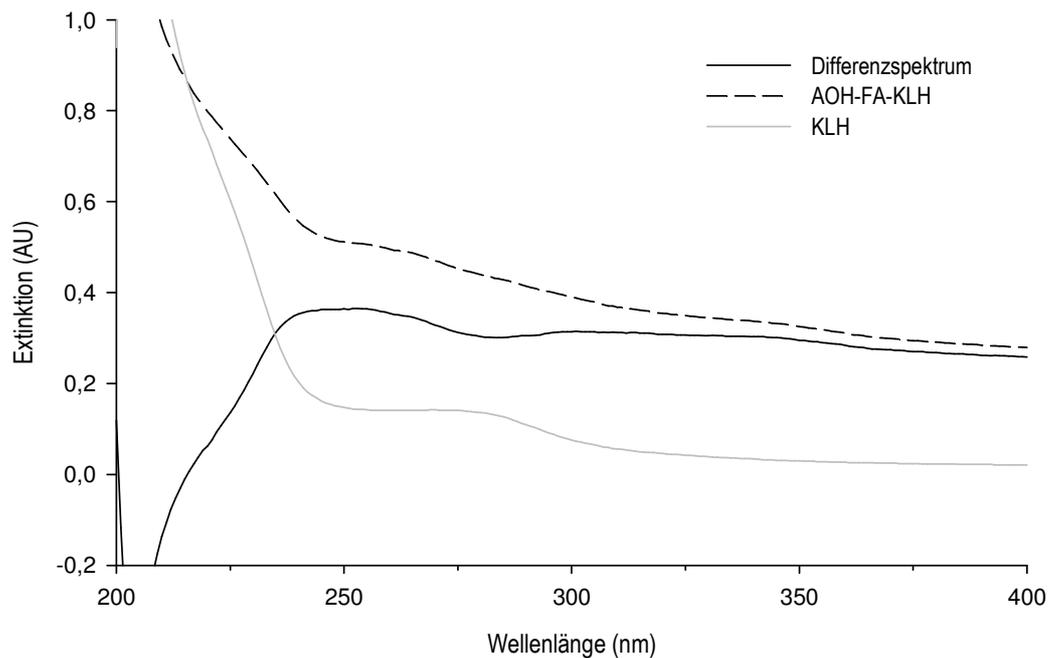


Abbildung 11: Vergleich der UV-Spektren für Alternariol-KLH gekoppelt mit Formaldehyd (1:20 in PBS I) und KLH-Reinprotein (125 µg/ml in PBS I) sowie das daraus berechnete Differenzspektrum.

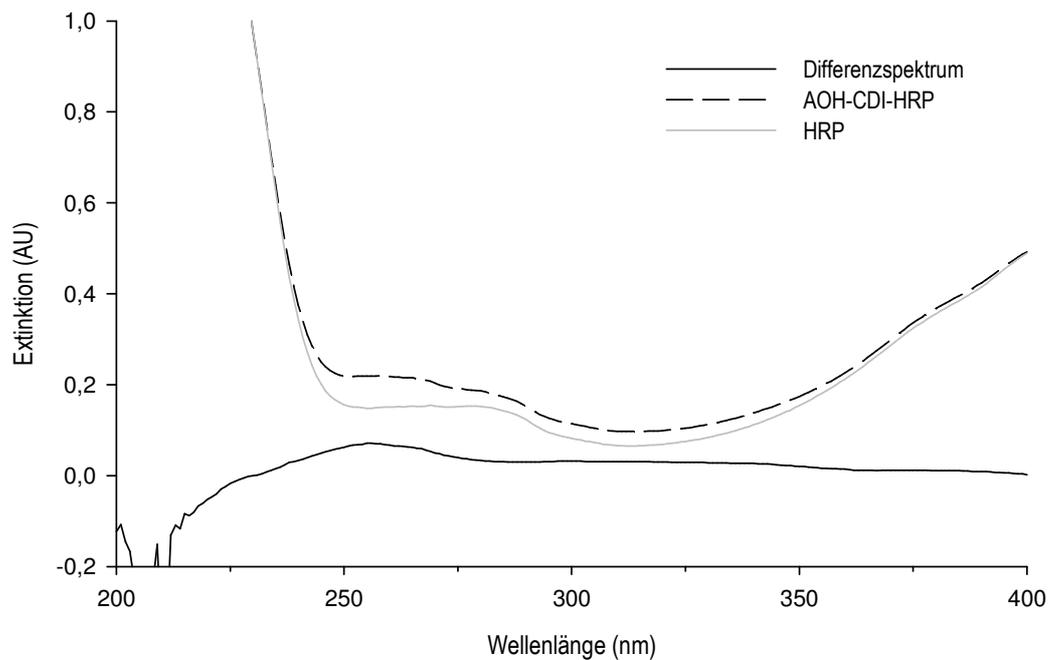


Abbildung 12: Vergleich der UV-Spektren für Alternariol-HRP gekoppelt mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (1:10 in PBS I) und HRP-Reinprotein (275 µg/ml in PBS I) sowie das daraus berechnete Differenzspektrum.

4.1.4 Gewinnung spezifischer Antiseren

4.1.4.1 Immunisierungsverlauf

Die Immunisierung mit AOH-FA-KLH führte bei K 1–3 zu einer spezifischen Immunantwort. Bereits ab der vierten Woche konnten pAk-AOH nachgewiesen werden. K 1 reagierte auf jede Restimulierung mit einem deutlichen Titeranstieg und wies auch insgesamt den höchsten Antikörpertiter (1:1400000) auf. K 2 und K 3 zeigten nach der ersten und dritten Restimulierung einen Anstieg. Abbildung 13 zeigt den gesamten Titerverlauf der K 1–3. Der abgebildete Titerverlauf wurde im modifizierten indirekten EIA, beschichtet mit AOH-FA-BSA, gemessen. Die Überprüfung der Alternariol-Antiseren (K 1–3) nach 3.2.1.2.3 ergab, dass alle Seren die zwischen der 8. und 41. Woche gewonnen wurden, große Extinktionsunterschiede bei relativ hohen Serumverdünnungen zeigten. Da die einzelnen Seren in einer ausreichend großen Menge vorhanden waren, wurden nur die besten Seren gepoolt, um eine möglichst große Empfindlichkeit des zu entwickelten EIAs zu erreichen.

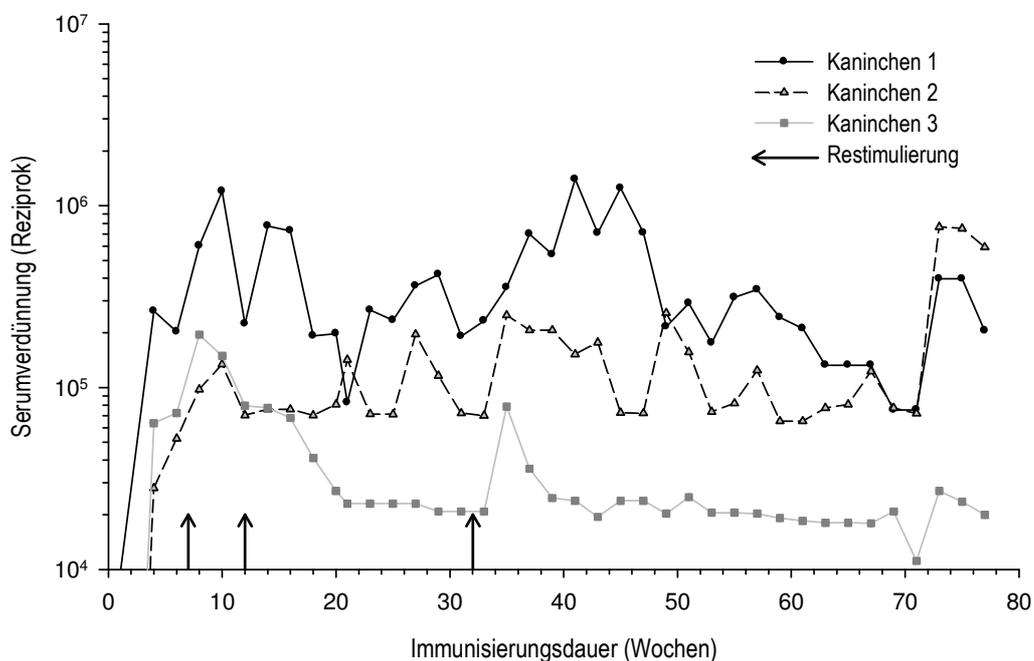


Abbildung 13: Relative Antiserumtiter der mit Alternariol-KLH (gekoppelt mit Formaldehyd) immunisierten Kaninchen K 1-3 nach Überprüfung im kompetitiven Testsystem unter Verwendung von Alternariol-BSA (gekoppelt mit Formaldehyd) als Festphasenantigen.

Bei den K 4-6 wurde AOH-CDI-KLH für die Immunisierung verwendet. Dieses Immunogen führte zu keiner nachweisbaren, spezifischen Immunantwort. Deshalb wurden alle weiteren Versuche nur noch mit den Antiseren von K 1-3 durchgeführt.

4.2 Entwicklung eines kompetitiven direkten EIAs

Von den drei hergestellten Alternariol-HRP-Konjugaten wurde nur für das mittels reduktiver Alkylierung hergestellte AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat eine ausreichende kompetitive Inhibition durch freies Alternariol festgestellt. Die zwei besten Fraktionen (Fraktion 22 und 23) des AOH-FA-BSA-HRPs wurden mittels Austitration ausgewählt. Das AOH-FA-HRP-Konjugat bzw. das AOH-CDI-HRP-Konjugat führten nach Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogenlösung zu keinem Substratumsatz.

In einem weiteren Schritt wurden unter Verwendung eines modifizierten direkten simultanen EIA (3.2.3.2) die optimalen Konzentrationen des gefällten Antiserums (K 2, Woche 35) und des AOH-FA-BSA-HRP-Konjugates ermittelt. Für das Antiserum wurde ein Verdünnungsbereich von 1:1000 bis 1:3000 und für das AOH-FA-BSA-HRP-Konjugat (Fraktion 22, 23) Verdünnungen von 1:100 und 1:200 als die bestmöglichen Kombinationen festgestellt.

Zur weiteren Optimierung wurden Alternariol-Standardkurven mit verschiedenen Testanordnungen erstellt. Die direkte Beschichtung mit Antiserum (3.2.3.3) führte zu starken unspezifischen Farbreaktionen, so dass die Extinktion bei den höchsten getesteten Alternariol-Konzentrationen (5 µg/ml) nicht unter 25 % des Leerwertes sank. Auch die verwendete Doppelantikörpertechnik mit simultaner Zugabe der Reagenzien (3.2.3.4) führte zu einer starken unspezifischen Farbreaktion. Die Extinktion sank nicht unter 30 % des Leerwertes. Die besten Ergebnisse wurden mit einem EIA unter der Verwendung einer modifizierten Doppelantikörpertechnik (3.2.3.4) erzielt. Als optimale Kombination zeigten sich bei dieser Testanordnung eine Verdünnung des Antiserums von 1:2000 und eine Verdünnung des Konjugates (Fraktion 23) von 1:200. Die Alternariol-Standardkurven, die mit dieser Kombination erstellt wurden, zeigten nur minimale unspezifische Farbreaktionen. Die maximal durch Alternariol-Standardlösung erzielbare Inhibition resultierte in Extinktionswerten von 0,15 Einheiten. Der auswertbare semilineare Bereich der Alternariol-

Standardkurve lag zwischen 30 % und 70 % relativer Extinktion. Die 50 %-Dosis lag bei 36 ng/ml und die Nachweisgrenze (70 %-Wert) lag bei 17 ng/ml (Abbildung 14).

Aufgrund der, im Vergleich zu den entwickelten indirekten Testsystemen (4.3), schlechten Testsensitivität wurde jedoch das kompetitive direkte Testsystem nicht weiter optimiert.

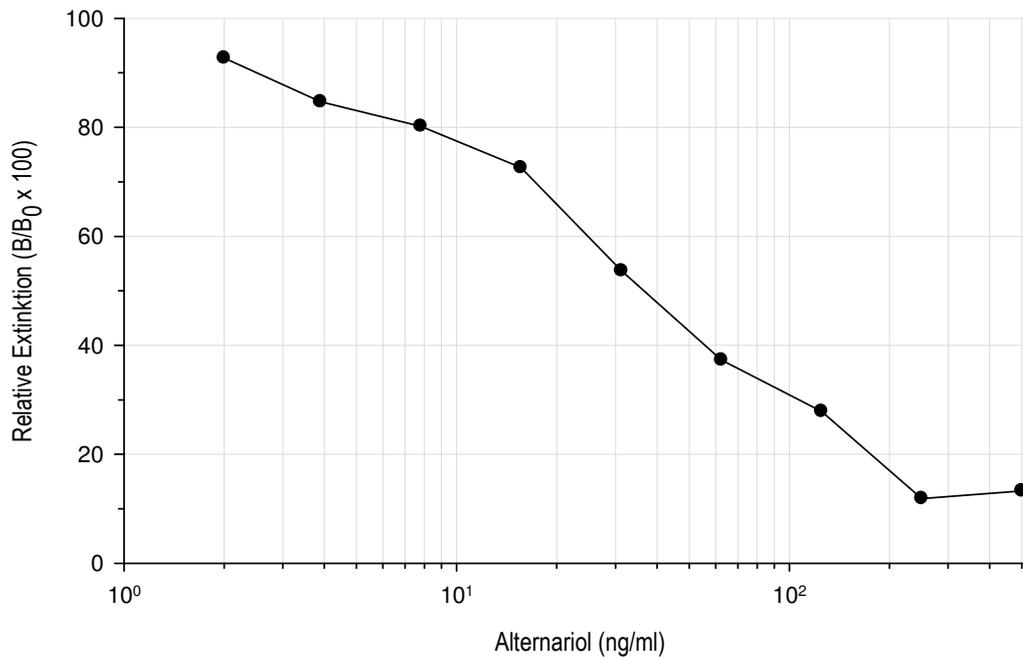


Abbildung 14: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für Alternariol unter Verwendung einer modifizierten Doppelantikörpertechnik (3.2.3.4).

4.3 Entwicklung von zwei indirekten EIAs mit poly- bzw. monoklonalen Antikörpern

4.3.1 Optimierung des Testsystems mit polyklonalen Antikörpern (pAk-EIA)

Um einen möglichst sensitiven EIA zu entwickeln, wurden das beste Konjugat und die besten Antisera ausgewählt sowie deren optimalen Verdünnungen ermittelt. Die Überprüfung der hergestellten Alternariol-BSA-Konjugate ergab, dass bei Verwendung des AOH-CDI-BSA-Konjugates nur minimale Extinktionsunterschiede zwischen toxinhaltigem und toxfreiem Ansatz (3.2.4.2) erreicht werden konnte. Bei Verwendung des AOH-FA-BSA-Konjugates konnte mit allen Serumpoolen der K 1-3 gute Ergebnisse im Hinblick auf die in (3.2.4.2)

genannten Kriterien erzielt werden. Die größten Extinktionsunterschiede zwischen toxinfreiem (B_0) und toxinhaltigem Ansatz (B) konnte bei allen Pools der K 1–3 im Verdünnungsbereich zwischen 1:1000 und 1:9000 und bei einer AOH-FA-BSA-Konjugat Verdünnung von 1:8000 (1,5 $\mu\text{g/ml}$ BSA) nachgewiesen werden.

Unter Verwendung der optimalen Kombinationen der Immunreagenzien wurden Standardkurven für Alternariol im kompetitiven indirekten Testsystem (3.2.4.1) erstellt. Unter Verwendung der Serumpools von K 2 und K 3 wurden ähnliche 50 %-Dosen der Alternariol-Standardkurve im pg/ml-Bereich erreicht. Der Serumpool von K 1 zeigte eine 5 bis 10fach schlechtere Sensitivität (50 %-Dosis $> 1 \text{ ng/ml}$). Mit Alternariol-Konzentrationen von 100 ng/ml konnten in Kombination mit dem Serumpool von K 3 vergleichsweise niedrige unspezifische Farbreaktionen von 5–10 % B/B_0 im Vergleich zu K 2 (15–20 % B/B_0) erreicht werden. Aus diesem Grund wurde für die weitere Optimierung des EIAs der Antiserumpool von K 3 ausgewählt.

Weitere Optimierungsversuche ergaben, dass eine rechnerische Konzentration von 433 ng/ml des Anti-Kaninchen IgG-HRP (Verdünnung 1:1000) am Besten geeignet war, um innerhalb von 10 min nach Zugabe der Enzymsubstrat-Chromogenlösung Extinktionswerte von 1,0 Einheiten im toxinfreien Ansatz zu erzielen.

Mit der Kombination der in Tabelle 15 aufgelisteten Immunreagenzien konnte eine optimale Testsensitivität des kompetitiven indirekten EIAs erreicht werden. Daher wurde diese Kombination als Standard-EIA (pAk-EIA) für die weitere Untersuchung von Alternariol in Lebensmitteln etabliert. In Abbildung 15 ist eine typische Alternariol-Standardkurve zu sehen.

In Abbildung 16 sind Alternariol-Standardkurven in 10 % Methanol/PBS I, 5 % Acetonitril/PBS I, PBS I und PBS II dargestellt. Ein Einfluss der verschiedenen getesteten Lösungsmittel auf die Testsensitivität konnte nicht festgestellt werden.

4.3.2 Optimierung des Testsystems mit monoklonalen Antikörpern (mAk-EIA)

Die Überprüfung der Alternariol-BSA-Konjugate zeigte, dass das AOH-CDI-BSA-Konjugat nur bei Verwendung sehr niedriger Verdünnungen (1:250-1:500) zu Extinktionsunterschieden zwischen toxinhaltigem und toxfreiem Ansatz führte. Dagegen führte die Verwendung von AOH-FA-BSA-Konjugat auch bei hohen Verdünnungen zu guten Ergebnissen. Als optimal zeigte sich die Beschichtung mit AOH-FA-BSA in einer Konzentration von 240 ng/ml (Verdünnung 1:50000) in Kombination mit einer mAk-AOH Verdünnung zwischen 1:1000 und 1:4000. Mit diesen Kombinationen konnten die größten Extinktionsunterschiede zwischen toxfreiem und toxinhaltigem Ansatz nachgewiesen werden.

Die mit diesen Kombinationen erstellten Alternariol-Standardkurven wiesen 50 %-Inhibitionsdosen in einem Bereich zwischen 0,06 ng/ml und 0,11 ng/ml auf. Auch führten alle geprüften Kombinationen zu einer fast vollständigen kompetitiven Inhibition durch die Alternariol-Standardlösung (10 ng/ml). Das beste Ergebnis wurde bei der Verwendung einer Beschichtung mit AOH-FA-BSA-Konjugat (Verdünnung 1:50000) und einer Verdünnung der mAk-AOH von 1:2000 erzielt. Bei Verwendung dieser Kombination wurden nach einer Reaktionszeit der Enzymsubstrat-Chromogenlösung von 15 min Extinktionswerte von 1,3 Einheiten im toxfreien Ansatz erzielt.

Die optimale Kombination der Immunreagenzien (Tabelle 15) führte zu einem sehr sensitiven Enzymimmuntest. Daher wurde dieser Testaufbau als Standardverfahren (mAk-EIA) für die Quantifizierung von Alternariol mittels mAk-AOH in Lebensmitteln verwendet. In Abbildung 15 ist eine typische Standardkurve für dieses Testsystem zu sehen.

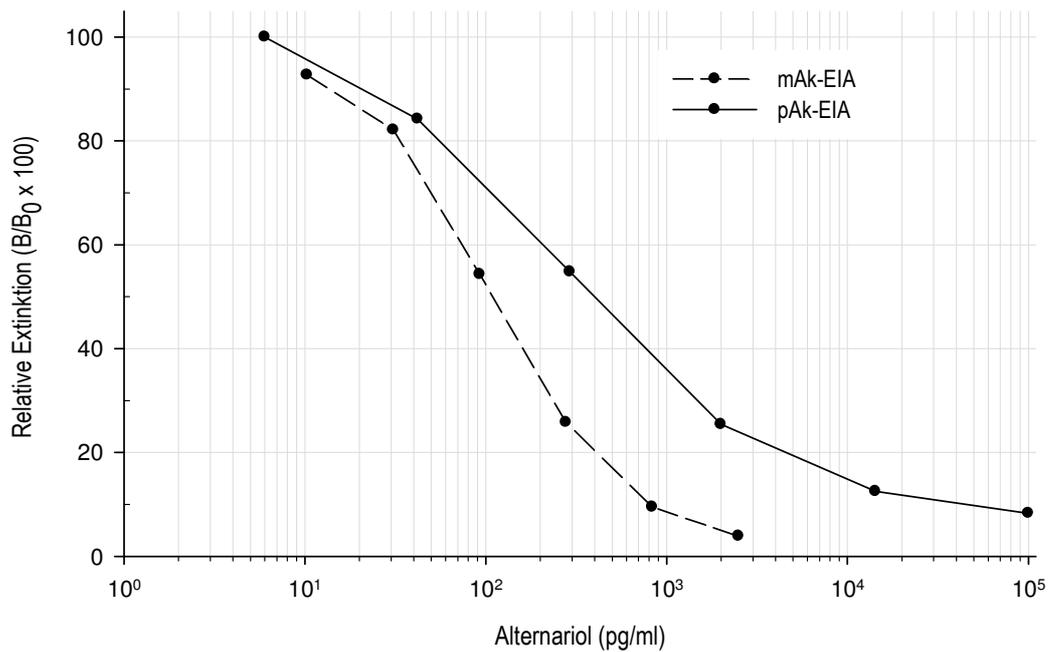


Abbildung 15: Typische Alternariol-Standardkurven des kompetitiven indirekten pAk und mAk-EIAs.

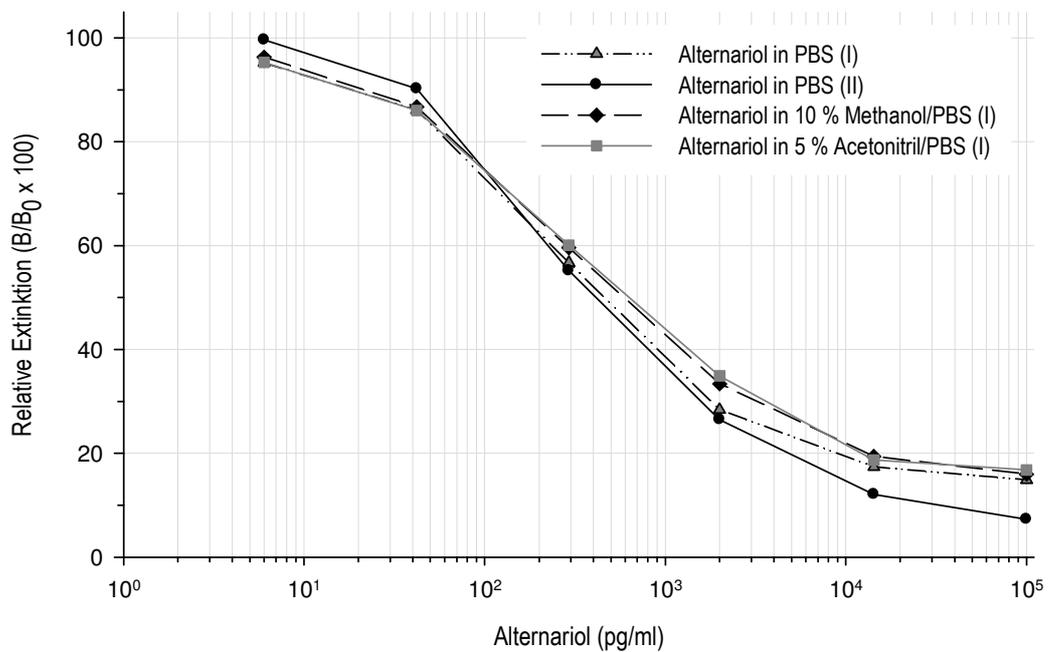


Abbildung 16: Alternariol-Standardkurven verdünnt in verschiedenen Lösungsmitteln im kompetitiven indirekten pAk-EIA.

Tabelle 15: Optimierte Testparameter für den kompetitiven indirekten pAk- bzw. mAk-EIA zum Nachweis von Alternariol

Test-system	Festphasenantigen (in Bicarbonatpuffer)		Konz.- bereich von Alternariol (pg/ml PBS II)	Antiserum (in PBS I)		Enzymkonjugat			
	Bezeichnung	Konz. (ng/ml)		Immunogen	Verdünnung	Bezeichnung	Verdünnung	Lösungs- mittel	HRP- Konz. (ng/ml)
pAk- EIA	AOH-FA-BSA	1500	6–100000	AOH-FA-KLH	1:3000	Anti-Kan.- IgG-HRP	1:3000	PBS I	433
mAk- EIA	AOH-FA-BSA	240	10,3–2500	AOH-FA-KLH	1:2000	Anti-Maus- IgG-HRP	1:2000	1 % Casein/PBS I	650
pAk-EIA	= EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol								
mAk-EIA	= EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol								
Anti-Kan.-IgG-HRP	= Polyklonale Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline mit Meerrettichperoxidase gekoppelt								
Anti-Maus-IgG-HRP	= Polyklonale Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline mit Meerrettichperoxidase gekoppelt								
BSA	= bovines Serumalbumin								
FA	= Formaldehyd (Manich-Kondensations-Reaktion)								
KLH	= keyhole limpet hemocyanin								
Konz.	= Konzentration								
PBS I	= phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (0,014 mol/l)								
PBS II	= phosphate buffered saline, Phosphatpuffer (0,027 mol/l)								

4.3.3 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Die Überprüfung der beiden eingesetzten indirekten Testverfahren auf Basis von pAk-AOH und mAk-AOH ergab die in Tabelle 16 zusammengefassten Charakteristika. Die Variationskoeffizienten für die Replikate ($n = 4$) der einzelnen Alternariol-Standardkurven-Konzentrationen lagen in beiden Testsystemen fast immer unter 10 %.

4.3.4 Spezifität

Die Überprüfung der Spezifität des als Standardverfahren festgelegten pAk-EIAs (K 3) bzw. mAk-EIAs ergab die in Tabelle 17 aufgeführten Kreuzreaktionen mit anderen *Alternaria*-Toxinen bzw. *Alternaria*-Toxinen nach Acetylierung. Die relative Kreuzreaktion der Antikörper gegen Alternariol mit den getesteten Substanzen lag in beiden EIAs unter 1 %. Beide Testsysteme sind also sehr spezifisch für Alternariol.

Die Antiserumpools von K 1 und K 2 zeigten relative Kreuzreaktionen unter 1 % für Alternariolmonomethylether. Für Altenuen konnte eine minimale Kreuzreaktion mit dem Antiserum von K 1 erzielt werden (2,1 %).

Tabelle 16: Charakteristika des kompetitiven indirekten EIAs mit polyklonalen bzw. monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

Vergleichsgröße	pAk-EIA	mAk-EIA
Messbereich (pg/ml) (30–80 % B/B ₀ x 100)	6–100000	10,3–2500
Mittelwert (pg/ml) der 50 % Dosis	408	108
Standardabweichung (pg/ml) der 50 % Dosis	74	17
Variationskoeffizient (%) der 50 % Dosis	18,2	15,4
Min.–Max. (pg/ml) der 50 % Dosis	280–581	74,6–139
Mittelwert (pg/ml) der NWG	59	35,1
Standardabweichung (pg/ml) der NWG	16	6,91
Variationskoeffizient (%) der NWG	26,2	19,8
Min.–Max. (pg/ml) der NWG	30,4–96,1	21,7–47,8
Anzahl der Standardkurven	40	30
Auswertungszeitraum	12 Monate	6 Monate

pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol
mAk-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol
Min. = Minimum
Max. = Maximum
NWG = Nachweisgrenze

Tabelle 17: Relative Kreuzreaktionen des polyklonalen Antiserumpools (K 3) bzw. des monoklonalen Antiserums gegen Alternariol mit anderen *Alternaria*-Toxinen

Toxin	Kreuzreaktion (%)	
	pAk-EIA	mAk-EIA
Alternariol nach Acetylierung	0,6	0,1
Alternariolmonomethylether	0,2	0,9
Alternariolmonomethylether nach Acetylierung	< 0,01	< 0,01
Altenuen	0,4	0,03
Altenuen nach Acetylierung	< 0,01	< 0,01
Tenuazonsäure	< 0,01	< 0,01

pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol
mAk-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

4.4 Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol

4.4.1 Probenvorbereitung

Für alle flüssigen Probenmaterialien (Getränke) zeigte sich, dass eine Verdünnung der Probenmatrices ausreichend war, um störende Matrixeinflüsse in den EIAs fast vollständig zu vermeiden. Die Proben wurden mit PBS II verdünnt. Vorversuche hatten gezeigt, dass der pH-Wert vieler Proben im sauren Bereich lag und dass mit PBS II ein annähernd neutraler pH-Wert erreicht werden konnte. So wurde ein optimales Milieu für die Antikörper geschaffen.

Das Apfelmus musste nach Verdünnung noch zentrifugiert werden, um potentiell störende Schwebepartikel aus der Suspension zu entfernen. Alle anderen Probenmatrices (Tomaten, Tomatenprodukte und Erdbeerkonfitüre) mussten in mehreren Schritten aufgereinigt werden. Nach orientierenden Vorversuchen zeigte sich, dass 70 % Methanol/PBS II am besten für die Extraktion von Alternariol geeignet war. Durch die Erhöhung des pH-Wertes der Lösung auf

pH 7 mit 3 mol/l Natronlauge wurde die Extraktion noch verbessert. Ein weiterer Bearbeitungsschritt (Zentrifugation, Filtration) war je nach Probenmatrix nötig. Danach folgte eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat. Die erschöpfende Extraktion zeigte, dass ein zweimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat ausreichend war, um das Alternariol in die organische Phase zu überführen (Abbildung 17). Der eingeeengte Rückstand konnte problemlos in PBS II gelöst werden. Dies wurde durch die Überprüfung der Wiederfindung gezeigt. Dadurch wurden für beide Varianten der Probenaufarbeitung im Bezug auf das Lösungsmittel identische Lösungen erzeugt. Für die Durchführung des EIAs ist dies ein Vorteil, da somit nur eine Alternariol-Standardkurve in PBS II für die Untersuchung unterschiedlicher Probenmatrices angelegt werden muss.

Der gelöste Rückstand konnte im pAk-EIA teilweise unverdünnt eingesetzt werden. Im mAk-EIA war sehr häufig eine höhere Verdünnung des gelösten Rückstandes nötig, um Probenmatrixeinflüsse zu vermeiden. In der Tabelle 18 sind die minimal erforderlichen Verdünnungen der Extrakte aufgezeigt, mit denen eine störungsfreie Untersuchung im EIA möglich war. Der minimale Verdünnungsfaktor ist das Produkt aus dem Faktor der Probenvorbereitung und der minimal nötigen Verdünnung des Extraktes. In Tabelle 18 sind auch die um den Verdünnungsfaktor korrigierten Nachweisgrenzen aufgelistet. Zur Vereinfachung der weiteren Auswertung sowie unter der Berücksichtigung eines zusätzlichen Sicherheitsfaktors für die Variabilität der Probenmatrix wurde für die Proben eine Nachweisgrenze von 1 µg/kg bzw. 1 µg/l für beide EIAs festgelegt. Nur für Tomatenmark musste eine höhere Nachweisgrenze von 2 µg/kg festgesetzt werden, da im mAk-EIA eine höhere Verdünnung notwendig war.

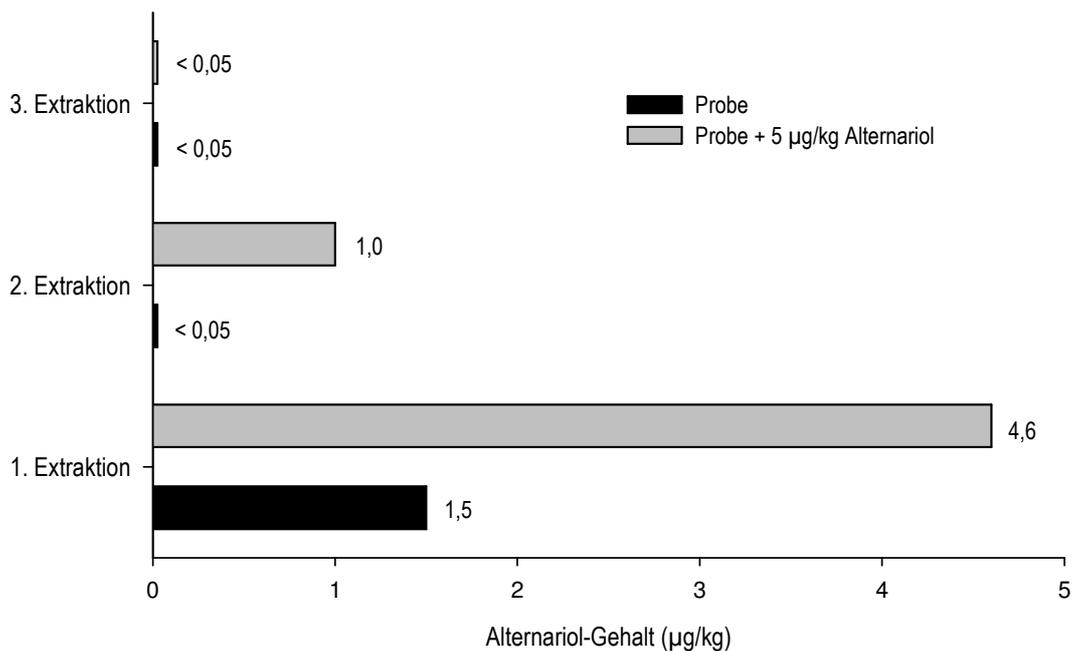


Abbildung 17: Mittels pAk-EIA bestimmte Alternariol-Gehalte der einzelnen Ethylacetatphasen nach der Durchführung einer erschöpfenden Extraktion einer natürlich kontaminierten Tomatenketchupprobe sowie derselben Probe nach Zusatz von 5 µg/kg Alternariol.

4.4.2 Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse der Versuche zur Wiederfindung von Alternariol in den verschiedenen Probenmatrices sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die mittlere Wiederfindung bezogen auf alle Probenmatrices lag beim pAk-EIA zwischen 60 % und 98 % und beim mAk-EIA zwischen 43 % und 80 %.

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit ergab für die verschiedenen Probenmatrices die in Tabelle 20 und 21 zusammengefassten Ergebnisse. Ein Vergleich zeigte, dass die Variationskoeffizienten des mAk-EIAs im Durchschnitt minimal höher lagen als im pAk-EIA. Deutlich war in beiden EIAs die Abhängigkeit von der Probenmatrix zu erkennen. Die Variationskoeffizienten für Apfelmus bei Mehrfachuntersuchungen lagen bei 5,6 % (pAk-EIA) bzw. bei 7,2 % (mAk-EIA). Apfelmus zeigte damit in beiden EIAs die beste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Im Gegensatz dazu war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Apfelsaft und Tomatenketchup mit Variationskoeffizienten über 15 %

deutlich schlechter. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Variationskoeffizienten stets unter 21 % lagen, mit Ausnahme des Apfelsaftes im mAk-EIA (30 %). Dies zeigt, dass der pAk- bzw. der mAk-EIA zusammen mit der angewendeten Probenvorbereitung zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Tabelle 18: Notwendige Verdünnungen der Extrakte mit PBS II sowie daraus resultierende Verdünnungsfaktoren und Nachweisgrenzen für die einzelnen Probenmatrices im pAk- und mAk-EIA

Probenmaterial	Minimale Verdünnung des Extraktes		Minimaler Verdünnungsfaktor		Nachweisgrenze ($\mu\text{g/kg}$)	
	pAk-EIA	mAk-EIA	pAk-EIA	mAk-EIA	pAk-EIA	mAk-EIA
Apfelmus	unv.	1:2	10	20	0,59	0,70
Apfelsaft	1:1,5	unv.	15	10	0,89	0,35
Erdbeerkonfitüre	1:2	1:2	10	10	0,59	0,35
Tomate	unv.	unv.	5	5	0,30	0,18
Tomatenketchup	unv.	1:5	5	25	0,30	0,88
Tomatenmark	unv.	1:10	5	50	0,30	1,8
Tomatensaft	unv.	unv.	10	10	0,59	0,35
Weißwein	unv.	unv.	10	10	0,59	0,35

pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol
 mAk-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol
 unv. = unverdünnt

Tabelle 19: Wiederfindung von Alternariol in künstlich kontaminierten Proben mittels pAk- und mAk-EIA

Probenmatrix	EIA	Alternariol-Zusatz ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$)	Wiederfindung von Alternariol		n
			Mittelwert (%)	Variationskoeffizient (%)	
Apfelmus	pAk-EIA	2–10	60	16	23
	mAk-EIA	3–10	43	20	14
Apfelsaft	pAk-EIA	5–10	82	23	16
	mAk-EIA	1–2	47	28	14
Erdbeerkonfitüre	pAk-EIA	1–2	83	30	16
	mAk-EIA	2–10	61	35	16
Tomate	pAk-EIA	2–5	77	18	9
	mAk-EIA	2–5	75	19	8
Tomatenketchup	pAk-EIA	2–5	92	20	15
	mAk-EIA	2–5	66	26	16
Tomatenmark	pAk-EIA	5–10	76	15	15
	mAk-EIA	5–10	56	22	10
Tomatensaft	pAk-EIA	1–10	78	27	17
	mAk-EIA	1–4	61	15	15
Weißwein	pAk-EIA	2–5	98	11	11
	mAk-EIA	1–2	80	15	10

n = Anzahl der künstlich kontaminierten Proben einer Probenmatrix
pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol
mAK-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

Tabelle 20: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen mittels pAk-EIA von natürlich mit Alternariol kontaminierten Proben

Probenmatrix	Alternariol ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)					Mittelwert ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Standard- abweichung ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Variations- koeffizient (%)
	Replikate							
Apfelmus	2,0	2,1	1,9	2,1	2,2	2,0	0,11	5,6
Apfelsaft	2,1	2,1	2,3	3,1	2,7	2,5	0,44	18
Erdbeerkonfitüre	1,3	1,2	---	---	1,1	1,2	0,1	8,3
Tomate	9,8	8,3	6,7	---	---	8,3	1,6	19
Tomatenketchup	1,2	1,4	1,7	2,1	1,6	1,6	0,34	21
Tomatenmark	5,6	5,6	6,7	5,5	6,5	6,0	0,56	9,4
Tomatensaft	3,3	3,5	2,6	3,4	2,6	3,1	0,4	14
Weißwein	1,3	1,5	1,0	1,3	1,1	1,2	0,18	15

* die Werte lagen minimal unter der Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/kg}$ und konnten deshalb nicht gewertet werden

Tabelle 21: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen mittels mAk-EIA von natürlich mit Alternariol kontaminierten Proben

Probenmatrix	Alternariol ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)					Mittelwert ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Standard- abweichung ($\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$)	Variations- koeffizient (%)
	Replikate							
Apfelmus	7,6	8,3	8,2	8,3	9,3	8,3	0,6	7,2
Apfelsaft	2,3	4,6	2,5	3,2	4,3	3,4	1,0	30
Erdbeerkonfitüre	1,3	1,5	1,5	1,5	2,1	1,6	0,29	18
Tomate	11	7,5	8,6	9,0	---	9,0	1,4	15
Tomatenketchup	1,5	1,9	1,4	2,1	1,8	1,7	0,26	15
Tomatenmark	7,3	5,6	8,6	6,8	6,2	6,9	1,2	17
Tomatensaft	1,9	2,9	2,7	2,3	2,5	2,5	0,38	15
Weißwein	1,3	1,1	1,0	1,3	1,2	1,2	0,12	10

4.4.3 Bestimmung von Alternariol in Lebensmitteln

Die Besprechung der Ergebnisse in diesem Kapitel bezieht sich auf alle Proben, mit Ausnahme der Tomatenproben. Ein Teil dieser Tomatenproben zeigten schon beim Kauf typische Anzeichen eines *Alternaria*-Befalls. Die Tomaten wurden dann gelagert, um ein Schimmelpilzwachstum und somit eine Toxinproduktion zu fördern. Die Ergebnisse der Tomatenproben wurden aus diesem Grund getrennt bewertet.

Die Untersuchung verschiedener pflanzlicher Lebensmittel (n = 119) zeigte eine häufige Belastung mit Alternariol (46 % im pAk-EIA, 75 % im mAk-EIA), wobei die Alternariol-Konzentration der positiven Proben fast immer zwischen 1 µg/kg und 9 µg/kg bzw. µg/l lag (Tabelle 22). Nur im Tomatenmark wurde mit Alternariol-Gehalten von 13 µg/kg eine höhere Belastung festgestellt. Die Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil der Alternariol-positiven Proben und die Abbildung 19 die mittlere Alternariol-Belastung in den einzelnen Probenmatrices.

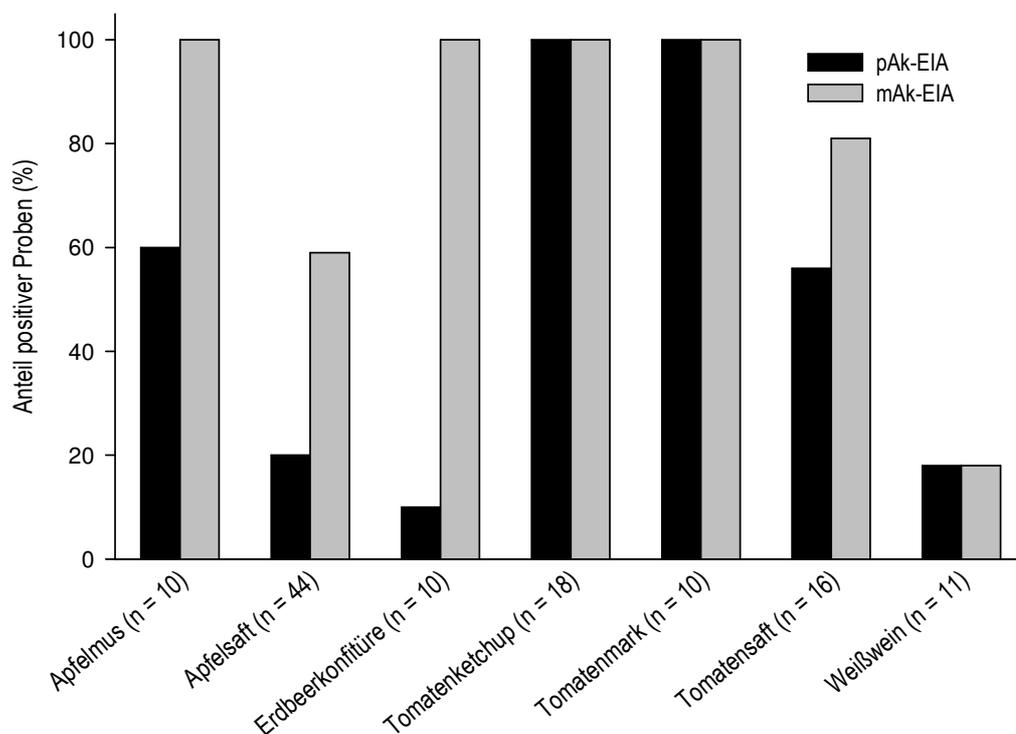


Abbildung 18: Prozentualer-Anteil der Alternariol-positiven Proben (\geq Nachweisgrenze) in den untersuchten Lebensmitteln.

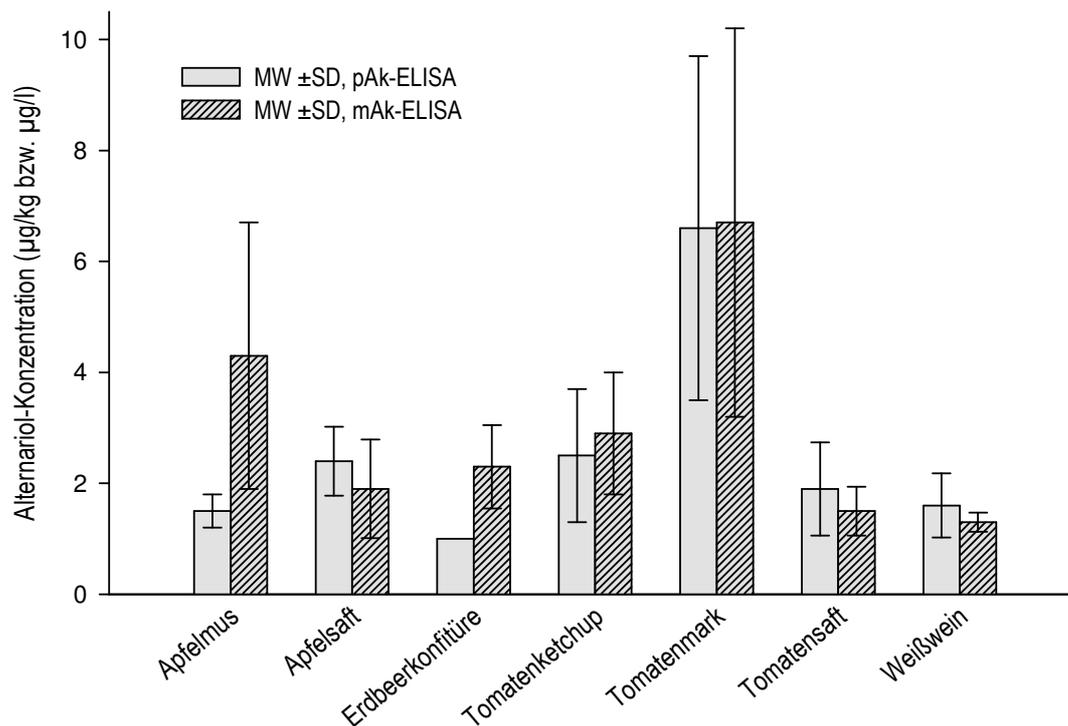


Abbildung 19: Alternariol-Konzentrationen in den positiven Proben.

4.4.3.1 Apfelerzeugnisse

Die Untersuchung von Apfelerzeugnissen (n = 54) ergab 28 % Alternariol-positive Proben im pAk-EIA mit einem Median von 2,0 µg/kg bzw. µg/l und einem 90. Perzentil von 2,9 µg/kg bzw. µg/l. Im mAk-EIA waren 67 % der Proben positiv mit einem Median von 1,7 µg/kg bzw. µg/l und einem 90. Perzentil von 4,3 µg/kg bzw. µg/l. Das Apfelmus war prozentual häufiger als der Apfelsaft mit Alternariol belastet (Tabelle 22, Abbildung 18). Das Apfelmus mit der höchsten Alternariol-Konzentration zeigte im mAk-EIA einen Wert von 8,7 µg/kg. Diese Probe hatte auch im pAk-EIA die höchste Alternariol-Konzentration (2,0 µg/kg). In beiden untersuchten Negativkontrollen (gekochte Äpfel und selbst hergestelltes Apfelmus) war kein Alternariol nachweisbar.

Die untersuchten Apfelsäfte (n = 39) und Apfelnektare (n = 5) wurden mit unterschiedlichen Verfahren hergestellt. Die unterschiedliche Alternariol-Belastung ist in Abbildung 20 dargestellt. Die naturtrüben Säfte waren deutlich häufiger mit Alternariol belastet, als die

gefilterten Säfte. In den nach ökologischen Richtlinien produzierten Apfelsäften konnte häufiger Alternariol nachgewiesen werden als in den konventionell hergestellten Säften. Wobei zu beachten ist, dass vier der sechs ökologisch hergestellten Apfelsäfte, auch naturtrübe Säfte waren.

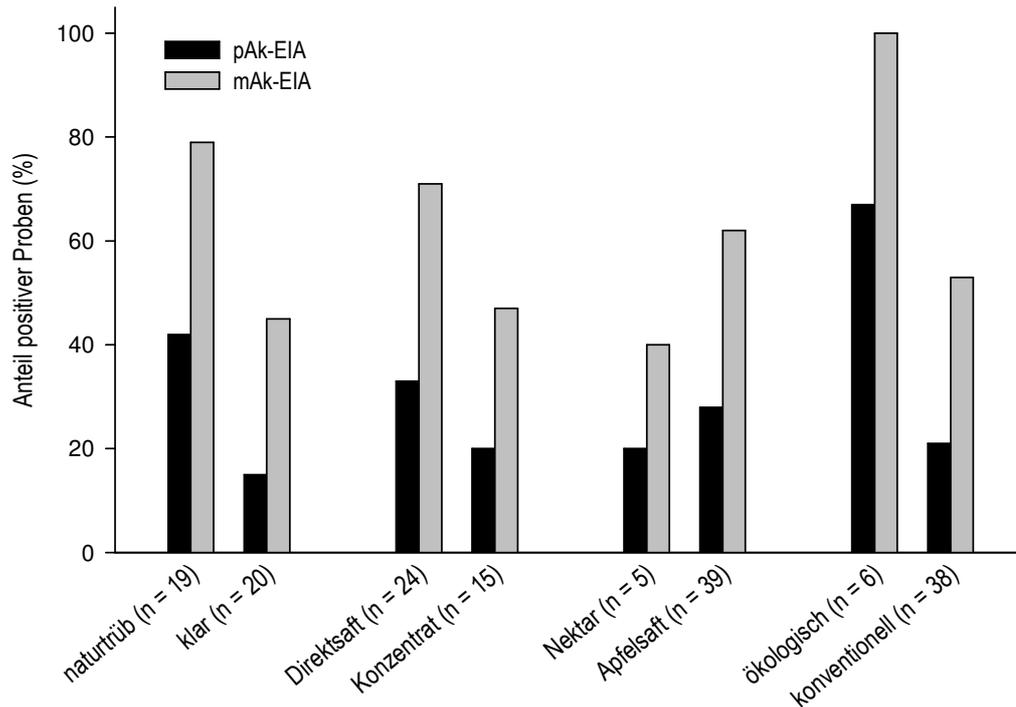


Abbildung 20: Prozentualer Anteil Alternariol-positiver Proben in Apfelsaft unterschiedlicher Herstellungsart.

4.4.3.2 Erdbeerkonfitüre

Die Untersuchung von Erdbeerkonfitüre (n = 10) ergab eine positive Probe im pAk-EIA und 100 % positive Proben im mAk-EIA (Tabelle 22). Die positive Probe im pAk-EIA zeigte einen Alternariol-Gehalt von 1 µg/kg, also genau die Nachweisgrenze für das Testverfahren. Der Maximalwert im mAk-EIA lag bei 3,9 µg/kg.

4.4.3.3 Tomatenprodukte

Die Alternariol-Bestimmung in Tomatenprodukten ($n = 44$) zeigte eine häufige Belastung der Proben. Im pAk-EIA waren 84 % der Proben positiv, im mAk-EIA 93 %. Der Median lag bei 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$ im pAk-EIA und bei 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$ im mAk-EIA. Beim Vergleich der Belastungshäufigkeit mit Alternariol von ökologisch und konventionell hergestellten Tomatenprodukten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 21). Die höchste Belastung innerhalb der Tomatenprodukte wurde mit 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (pAk- und mAk-EIA) im Tomatenmark gefunden. In allen untersuchten Tomatenmarkproben ($n = 10$) wurde Alternariol nachgewiesen, mit einem Median von 5,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im pAk-EIA bzw. 5,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im mAk-EIA. Das Tomatenmark war einfach, zweifach bzw. dreifach konzentriert und wurde in Deutschland bzw. Italien produziert. Zwei der Tomatenmarkproben waren ökologische Produkte. Aufgrund der geringen Probenanzahl konnten keine signifikanten Unterschiede in der Alternariol-Belastung in den Tomatenmarkproben bezogen auf das Herstellungsland oder die Produktionsart festgestellt werden. Auch alle untersuchten Tomatenketchupproben zeigten eine Alternariol-Belastung (pAk-EIA 100 %, mAk-EIA 100 %). Das Tomatenketchup zeigte aber im Vergleich zu Tomatenmark geringere Alternariol-Konzentrationen (Tabelle 22). Die Negativkontrolle (selbst hergestelltes Tomatenketchup) war in beiden EIAs negativ. Tomatensaft war prozentual am wenigsten belastet (pAk-EIA 56 %, mAk-EIA 81 %) und zeigte auch die geringste Alternariol-Belastung im Vergleich zu den anderen Tomatenprodukten.

4.4.3.4 Weißwein

Die Untersuchung von Weißwein ($n = 11$) zeigte, dass zwei Proben (18 %) mit einem Median von 1,6 $\mu\text{g}/\text{l}$ (pAk-EIA) bzw. 1,3 $\mu\text{g}/\text{l}$ (mAk-EIA) belastet waren (Tabelle 22). Die Weißweine waren aus Deutschland, Italien und Frankreich, wobei die zwei belasteten Weine, ein Landwein und ein Rivaner, in Deutschland gekeltert wurden.

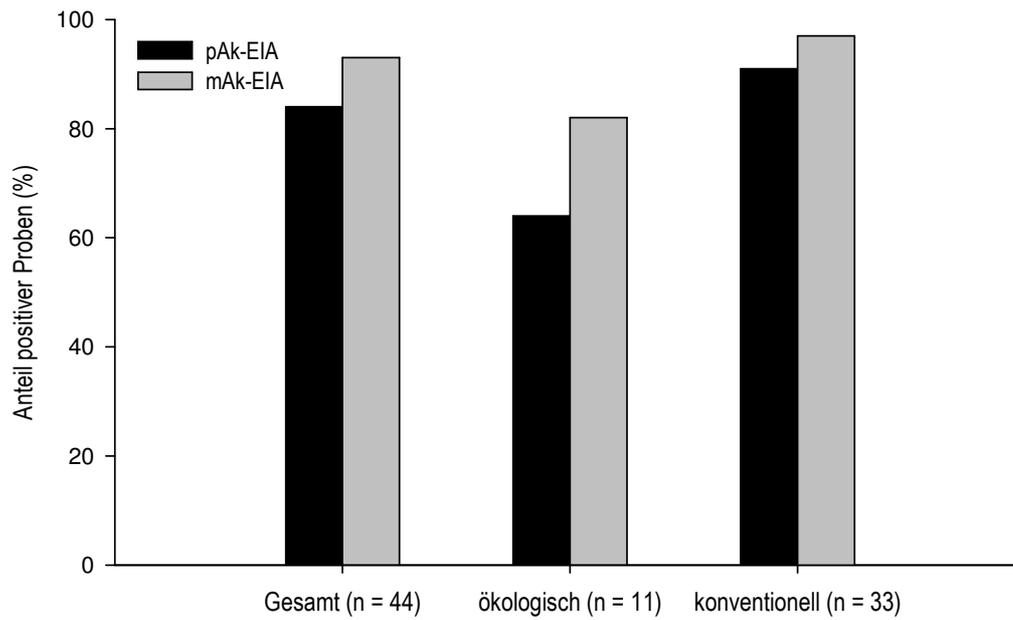


Abbildung 21: Vergleich der Anzahl der Alternariol-positiven Tomatenprodukte aus ökologischer und konventioneller Produktionsweise im pAk- und mAk-EIA.

Tabelle 22: Mittels pAk- und mAk-EIA ermittelte Alternariol-Belastung in Lebensmitteln

Probenmatrix	EIA	n/n positive	positive (%)	Alternariol $\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$						r
				MW	$\pm\text{SD}$	Med	Min	Max	90. P	
Apfelmus	pAk-EIA	10/6	60	1,5	0,3	1,4	1,2	2,0	1,9	0,658
	mAk-EIA	10/10	100	4,3	2,4	3,6	1,8	8,7	7,6	
Apfelsaft	pAk-EIA	44/9	20	2,4	0,62	2,2	1,7	3,5	3,3	0,606
	mAk-EIA	44/26	59	1,9	0,89	1,6	1,1	4,2	3,5	
Erdbeerkonfitüre	pAk-EIA	10/1	10	---	---	---	1,0	1,0	---	---
	mAk-EIA	10/10	100	2,3	0,75	2,3	1,3	3,9	2,9	
Tomatenketchup	pAk-EIA	18/18	100	2,5	1,2	2,2	1,0	5,0	4,3	0,495
	mAk-EIA	18/18	100	2,9	1,1	2,9	1,4	4,6	4,4	
Tomatenmark	pAk-EIA	10/10	100	6,6	3,1	5,7	3,1	13	10	0,925
	mAk-EIA	10/10	100	6,7	3,5	5,8	2,6	13	12	
Tomatensaft	pAk-EIA	16/9	56	1,9	0,84	1,6	1,1	3,1	2,9	0,641
	mAk-EIA	16/13	81	1,5	0,44	1,2	1,0	2,4	2,1	
Weißwein	pAk-EIA	11/2	18	1,6	0,58	1,6	1,2	2,0	1,9	---
	mAk-EIA	11/2	18	1,3	0,17	1,3	1,2	1,4	1,4	

n = Anzahl der Proben
 MW = Mittelwert
 SD = Standardabweichung
 Med = Median
 Min = Minimum

Max = Maximum
 90. P = 90. Perzentil
 r = Korrelationskoeffizient
 pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol
 mAk-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

4.4.4 Bestimmung von Alternariol in Tomaten

In Gießen und Umgebung wurden in einem Zeitraum von 6 Monaten in Supermärkten Tomatenproben gekauft. Ein Teil dieser Tomaten zeigte typische Merkmale eines *Alternaria*-Spezies-Befalls, schwärzliche, lederartige, leicht eingesunkene Flecken (BOTTALICO und LOGRIECO, 1998) mit zum Teil konzentrischer Zonierung (Abbildung 22). Zur Provokation des Schimmelpilzwachstums und möglicherweise der Alternariol-Bildung wurden die Tomaten bis zu vier Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Im Laufe dieser Lagerung kam es teilweise zu einer Vergöberung der vom Schimmel betroffenen Stelle. Die Untersuchung der Tomatenextrakte ergab, dass alle Tomatenproben mit deutlich schwarzen Verfärbungen, die teilweise bis ins Innere des Fruchtfleisches sichtbar waren, Alternariol in Konzentrationen über 10 µg/kg enthielten. In einer Tomatenprobe, die nach sieben Tagen Lagerung nur äußerliche, stecknadelkopfgroße, schwarze Flecken aufwies, konnte kein Alternariol nachgewiesen werden. Auch in den Tomaten, die keine typischen Anzeichen für einen *Alternaria*-Befall zeigten, wurde kein Alternariol nachgewiesen. Die gefundenen Alternariol-Gehalte sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Die Anzucht und mikroskopische Überprüfung einiger aus natürlich infizierten Tomaten gewonnenen Isolate auf Malzextraktagar bestätigte eine Kontamination mit *Alternaria*-Spezies. Ein typisch schwarzes Schimmelpilzwachstum und typische Konidienformen (Abbildung 22) konnten für die betroffenen Proben nachgewiesen werden. Die Untersuchung der auf dem Malzextraktagar gewachsenen Sporen und des Myzels im EIA zeigte deutlich die Fähigkeit der Spezies zur Alternariol-Bildung. Die nachgewiesenen Alternariol-Gehalte mittels pAk-EIA bzw. im mAk-EIAs lagen bei über 350 µg/g Myzel.



Abbildung 22: Bild links: Typische Anzeichen für einen Befall mit *Alternaria*-Spezies.; Bild mitte: Verfärbung des Fruchtfleisches durch Kontamination mit *Alternaria*-Spezies.; Bild rechts: typische *Alternaria*-Sporen (mehrkammerig, dickwandig, bräunliche Färbung).

4.4.5 Nachweis des Alternariol-Bildungsvermögen eines *Alternaria*-Stammes auf Malzextraktagar und in Hefeextrakt-Glucose-Bouillon mittels EIA

Um das Alternariol-Bildungsvermögen zu testen und auch zur Prüfung der Anwendbarkeit der EIAs in Kulturmaterial, wurde ein kultivierter *Alternaria*-Stamm auf Malzextraktagar und in Hefeextrakt-Glucose-Bouillon angezüchtet. Die Untersuchung des Myzels (Malzextraktagar) ergab eine Alternariol-Konzentration von 23 µg/g (pAk-EIA) bzw. 25 µg/g (mAk-EIA). In der Hefeextrakt-Glucose-Bouillon konnte kein Alternariol nachgewiesen werden.

4.5 Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol-Konzentrationen

Zum Vergleich der mittels pAk- bzw. mAk-EIA gemessenen Alternariol-Gehalte wurden statistische Kennwerte verwendet. Zum einen wurden statistische Lagemaße (Median, Mittelwert) und Streuungsmaße (Standardabweichung, Variationskoeffizient) und zum anderen der lineare Zusammenhang der Ergebnisse bestimmt. Der Korrelationskoeffizient (r) aller untersuchten Proben, mit Ausnahme der Tomatenproben, lag bei $r = 0,787$. Dies zeigt einen hohen linearen Zusammenhang der Ergebnisse (Abbildung 23 (F)). Der lineare Zusammenhang der im pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol-Gehalte ist für die einzelnen Probenmatrices in Abbildung 23 dargestellt. Die Korrelation der Ergebnisse von Weißwein bzw. von Erdbeerkonfitüre konnten aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben nicht berechnet werden.

Mit der Berechnung des Korrelationskoeffizienten kann nur eine Aussage über den linearen Zusammenhang, aber keine Aussage über die Übereinstimmung der gemessenen Werte getroffen werden. Die Abbildung 23 zeigt am Beispiel der Probenmatrix Apfelmus, dass trotz eines Korrelationskoeffizienten von 0,658, die Konzentrationen der gefundenen Alternariol-Gehalte nicht übereinstimmen. Die Ergebnisse sind zwar linear voneinander abhängig, aber nicht gleich. Die Unterschiede der gemessenen Alternariol-Konzentration in den Apfelmusproben wurden auch beim Vergleich der Mittelwerte bzw. der Mediane deutlich. Im pAk-EIA wurde ein Mittelwert von 1,5 µg/kg (Median 1,4 µg/kg) und im mAk-EIA von 4,3 µg/kg (Median 3,6 µg/kg) ermittelt. Diese großen Unterschiede der mittels pAk- bzw. mAk-EIA gemessenen Alternariol-Konzentrationen der Einzelproben konnte nur bei

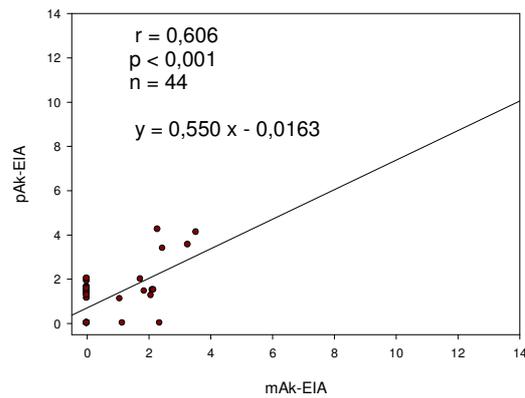
Apfelmus und Erdbeerkonfitüre beobachtet werden, wobei beide Probenmatrices im mAk-EIA die höheren Alternariol-Gehalte aufwiesen.

4.6 Untersuchung mittels HPLC

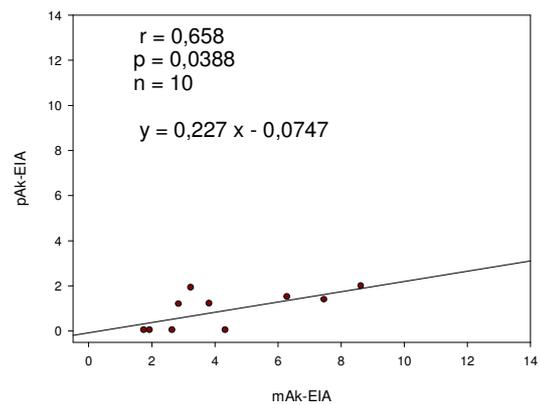
Zur Überprüfung der Ergebnisse der EIAs wurden einige ausgewählte Proben parallel mittels HPLC untersucht. Für reines Alternariol und reinen Alternariolmonomethylether ergaben sich in der HPLC eine Nachweisgrenze von 6 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 18 ng/ml. Die Nachweisgrenze der HPLC-Methode war also deutlich höher als die der EIAs. Die Nachweisgrenze für Tomaten und Tomatenmark lag unter Berücksichtigung des Probenextraktionsfaktors bei 15 µg/kg und die Bestimmungsgrenze bei 45 µg/kg. In Abbildung 24 ist ein typisches Chromatogramm für Alternariol und Alternariolmonomethylether dargestellt. Die Retentionszeit für Alternariol lag bei 15,9 min und für Alternariolmonomethylether bei 22,3 min. Die Überprüfung der HPLC-Methode unter Verwendung einer künstlich mit Alternariol kontaminierten Tomatenmarkprobe ergab eine Wiederfindungsrate von 102 %.

4.6.1 Methodenvergleich zwischen EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol

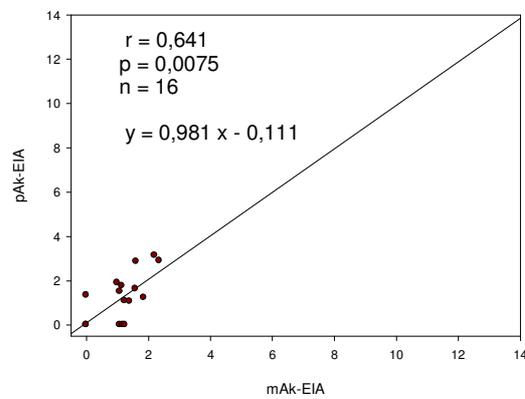
Aufgrund der relativ hohen Nachweisgrenze (15 µg/kg) der HPLC-Methode und der relativ geringen Alternariol-Belastung der Proben war ein Vergleich der EIAs mit der HPLC Methode schwierig. Insgesamt wurden sieben Tomatenproben und eine Tomatenmarkprobe in allen drei Testsystemen untersucht. In Tabelle 23 sind Ergebnisse der verschiedenen Analysemethoden im Vergleich dargestellt. Abbildung 25 zeigt ein typisches Chromatogramm einer belasteten Tomatenprobe. Die HPLC-Ergebnisse konnten die EIA-Ergebnisse einer hochbelasteten Tomatenprobe bestätigen. Der Alternariol-Gehalt der restlichen Proben lag, wie erwartet, unter der Nachweisgrenze der HPLC-Methode.



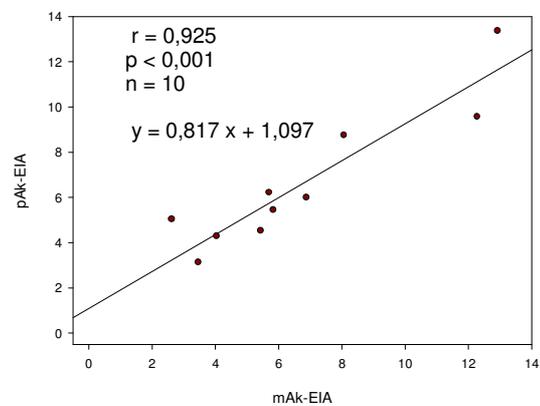
A



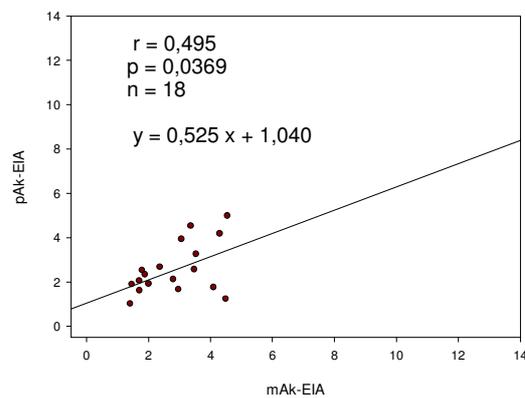
B



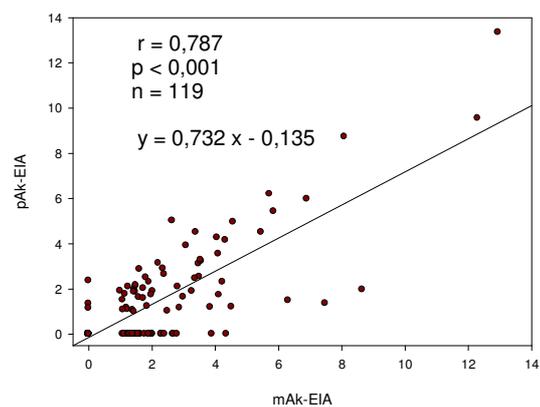
C



D



E



F

Abbildung 23: Vergleich der Korrelation der Ergebnisse des pAk- und mAk-EIAs zum Nachweis von Alternariol ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l}$) in Apfelsaft (A), Apfelmus (B), Tomatensaft (C), Tomatenmark (D), Tomatenketchup (E) sowie aller untersuchte Proben (F (A–E sowie Erdbeerkonfitüre und Weißwein)). Dargestellt sind der Korrelationskoeffizient (r), der Signifikanzwert (p) und die Anzahl der mittels pAk- bzw. mAk-EIA untersuchten Proben (n).

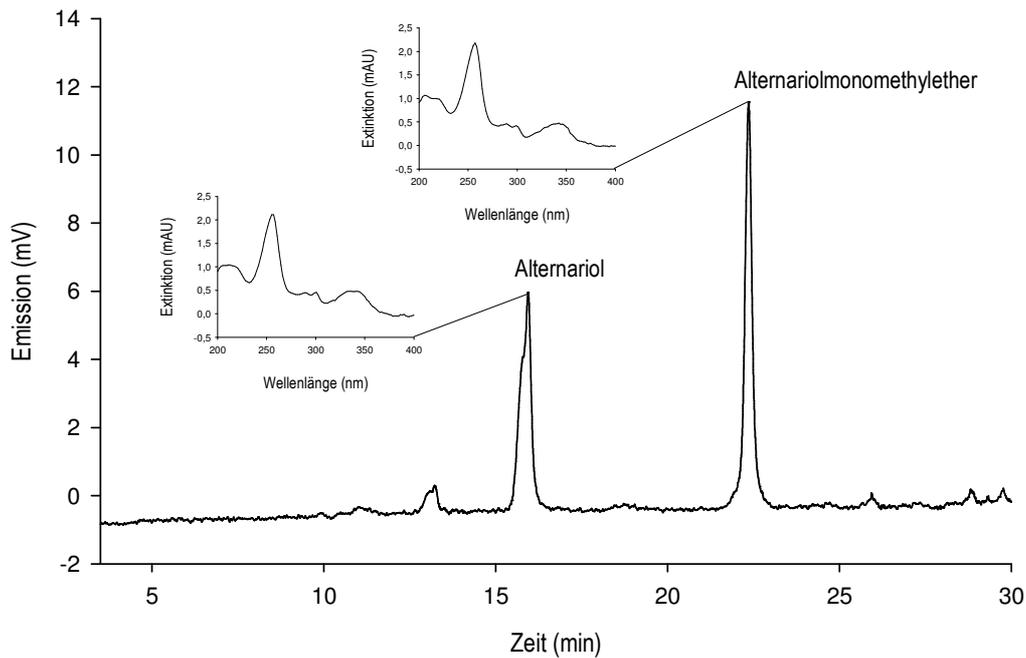


Abbildung 24: Typisches HPLC-Chromatogramm (Fluoreszenz-Detektion: Excitation: 253 nm, Emission: 415 nm) eines Alternariol-Alternariolmonomethylether-Standards (5 ng absolut).

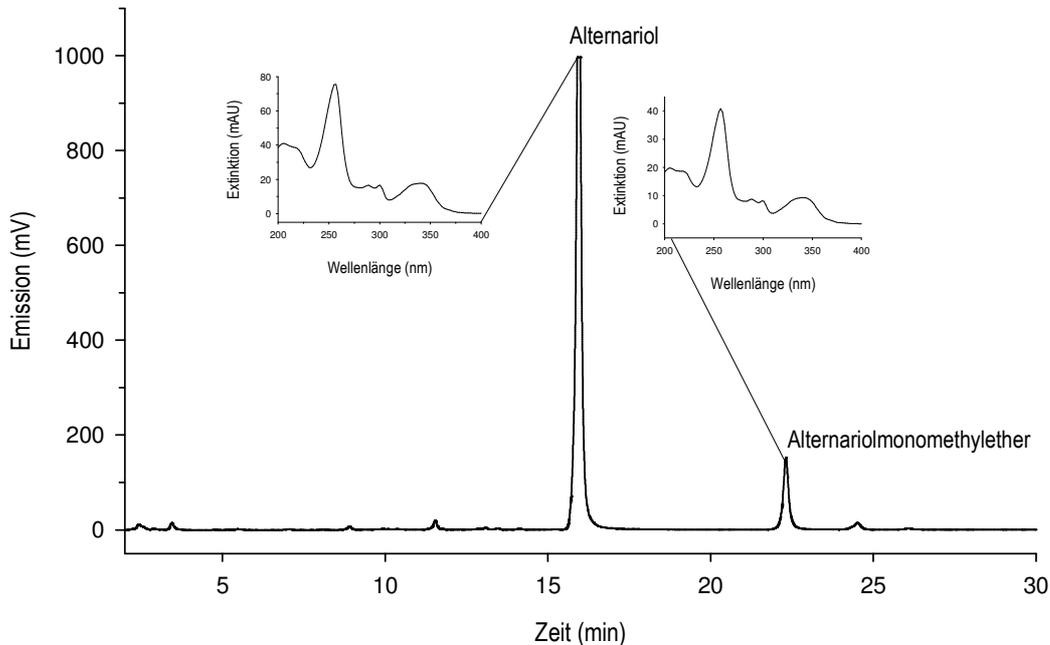


Abbildung 25: Chromatogramm (Fluoreszenz-Detektion: Excitation: 253 nm, Emission: 415 nm) einer natürlich mit *Alternaria*-Spezies infizierten Tomatenprobe, die nach dem Kauf vier Wochen bei Raumtemperatur gelagert wurde. Es wurde ein Alternariol-Gehalt von 53 mg/kg und ein Alternariolmonomethylether-Gehalt von 5,2 mg/kg nachgewiesen.

Tabelle 23: Vergleich der EIA und der HPLC-Ergebnisse für die Probenmatrix „Tomate“

Probenmatrix	Anzeichen eines <i>Alternaria</i> Befalls ^a	Alternariol Gehalt (µg/kg)			HPLC ^c	AME Gehalt (µg/kg) HPLC ^c
		EIA ^b				
		pAk-EIA	mAk-EIA	Mittelwert		
Tomate	-	< 1,0	< 1,0	-	< 15	< 15
Tomate	++	8,3	9,0	8,6	< 15	< 15
Tomate	+	< 1,0	< 1,0	-	< 15	< 15
Tomate	-	< 1,0	< 1,0	-	< 15	< 15
Tomate	++	11	15	13,0	< 15	< 15
Tomate	-	< 1,0	< 1,0	-	< 15	< 15
Tomate	+++	41000	33000	37000	53000	5200
Tomatenmark	^d	8,7	8,1	8,4	< 15	< 15

^a schwarze Flecken auf der Oberfläche: (+) 1–2 mm groß; (++) 2–10 mm groß; (+++) >10 mm groß

^b Nachweisgrenze = Bestimmungsgrenze: 1 µg/kg (Tomatenmark: 2 µg/kg)

^c Nachweisgrenze: 15 µg/kg, Bestimmungsgrenze: 45 µg/kg

^d keine Angabe möglich

EIA = Enzymimmuntest

pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol

mAk-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

AME = Alternariolmonomethylether

4.6.1.1 Untersuchung der HPLC-Fractionen

Um die Ergebnisse der EIAs weiter abzusichern, wurden die mobilen Phasen der HPLC-Eluate der Tomatenmarkprobe sowie der künstlich kontaminierten Tomatenmarkprobe aufgefangen (1 min/Fraktion). Drei, anhand ihrer Retentionszeit ausgewählte Fraktionen (Retentionszeit von Alternariol 15,9 min) wurden in beide EIAs eingesetzt. In Tabelle 24 sind die Alternariol-Konzentrationen dieser Fraktionen aufgelistet. In Fraktion 16 wurde, wie erwartet, jeweils die höchste Alternariol-Konzentration nachgewiesen. Da von dem Probenextrakt nur 50 µl in die HPLC injiziert wurden, lag die absolute Alternariol-Menge der künstlich kontaminierten Probe bei 5 ng. In den Fraktionen 15–17 wurden im pAk-EIA 67 % und im mAk-EIA 80 % des künstlich zugesetzten Alternariols wieder gefunden.

Tabelle 24: Alternariol-Konzentrationen (ng/ml) in den einzelnen HPLC-Eluat-Fractionen verschiedener Probenextrakte

Probe	Fraktions- nummer	Alternariol in ng/ml	
		pAk-EIA	mAk-EIA
Tomatenmark	15	0,07	0,04
Tomatenmark	16	0,8	0,6
Tomatenmark	17	0,06	0,06
neg. Tomatenmark + 100 ng/ml Alternariol ^a	15	n.n.	n.n.
neg. Tomatenmark + 100 ng/ml Alternariol ^a	16	2,83	3,8
neg. Tomatenmark + 100 ng/ml Alternariol ^a	17	0,7	0,5

^a eine rechnerische Endkonzentration von 5 ng/ml Alternariol wurde in die HPLC injiziert

pAk-EIA = EIA mit polyklonalen Antikörpern gegen Alternariol

mAK-EIA = EIA mit monoklonalen Antikörpern gegen Alternariol

5 Diskussion

Alternaria ist eine weltweit verbreitete Schimmelpilzgattung, die unter anderem die Mykotoxine Alternariol, Alternariolmonomethyl ether, Alternuene und Tenuazonensäure bildet. In den letzten Jahren nahm das wissenschaftliche Interesse an diesen *Alternaria*-Toxinen zu. Die EFSA (European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) förderte im Rahmen eines Projektes (BATTILANI *et al.*, 2009; “Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants”) eine Datenzusammenstellung über *Alternaria*-Toxine. Hierbei wurde deutlich, dass weitere Daten zum Vorkommen dieser Toxine benötigt werden, um die Gefährdung des Verbrauchers abschätzen zu können. Deshalb sind einfache und schnell durchführbare Methoden zum Nachweis von *Alternaria*-Toxinen nötig, um eine große Anzahl von Proben untersuchen zu können.

Die bisher zum Nachweis von Alternariol und anderen *Alternaria*-Toxinen verwendeten physikalisch-chemischen Methoden benötigen teure Geräte, speziell ausgebildetes Personal und haben einen hohen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Dagegen sind enzymimmunologische Methoden schnell und einfach durchzuführen. Derartige Methoden waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht beschrieben worden. Daher beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung von EIAs zum Nachweis von Alternariol.

5.1 Antikörper gegen Alternariol und Entwicklung enzymimmunochemischer Nachweisverfahren

Anfängliche Versuche zielten auf eine Kopplung von Alternariol an Proteine mittels der aktiven Estermethode ab. Hierzu wurde Alternariol derivatisiert. Da Alternariol drei Hydroxygruppen besitzt, kann eine Derivatisierung theoretisch an einer dieser drei Gruppen stattfinden bzw. auch an mehreren Hydroxygruppen gleichzeitig. Um eine Derivatisierung an mehreren Hydroxygruppen zu vermeiden, wurde in einem ersten Ansatz nur wenig Bernsteinsäureanhydrid (molares Verhältnis Alternariol zu Bernsteinsäureanhydrid: 1 zu 5) verwendet und die Erhitzungsdauer auf 30 min beschränkt. Nach Überprüfung dieses Ansatzes mittels HPLC konnte keine Derivatisierung nachgewiesen werden. Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz die Bernsteinsäureanhydridmenge vervierfacht und die Erhitzungsdauer auf 3 h erhöht. Im Chromatogramm dieses Ansatzes war vor dem

Alternariol-Peak, ein kleiner flacher Peak zu sehen. Das Spektrum dieses Peaks zeigte im Vergleich zu Alternariol signifikante Unterschiede. Diese lassen sich vermutlich auf ein Zerfallsprodukt von Alternariol zurückführen. Die Einführung einer Carboxygruppe, wie bei der Derivatisierung erwünscht, würde das Spektrum nicht in diesem Maße verändern. Die Änderung der spektroskopischen Eigenschaften von Alternariol im zweiten Ansatz ist vermutlich auf die verlängerte Reaktionszeit zurückzuführen. Die Umsetzung von Alternariol mit Bernsteinsäureanhydrid ergab also nicht das gewünschte Alternariol-Hemisuccinat. Eine Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden.

Im Gegensatz hierzu erwies sich die direkte Kopplung von Alternariol mittels FA als einfach und effizient. Die zur Immunisierung verwendeten Alternariol-KLH-Konjugate wurden mittels FA (MANNICH und KRÖSCHE, 1912) bzw. mittels CDI (XIAO *et al.*, 1995) synthetisiert. Auch die Alternariol-BSA und Alternariol-HRP-Konjugate wurden mit diesen beiden einfach durchzuführenden Synthesereaktionen hergestellt. Die Überprüfung mittels UV-Spektrometrie zeigte für die KLH- und BSA-Konjugate die für Alternariol typischen Absorptionsmaxima, während bei den HRP-Konjugaten kein Maximum bei 256 nm sichtbar war. Deshalb wurde eine weitere Methode zur Kopplung von Alternariol an HRP ausgetestet. Unter Verwendung der reduktiven Alkylierung (WILSON und NAKANE, 1976; WÖRNER, 1990) konnte AOH-FA-BSA an HRP gebunden werden. Der Einsatz des AOH-FA-BSA-HRP-Konjugates im direkten EIA konnte den Kopplungserfolg belegen.

Das AOH-FA-KLH-Immunogen wurde erfolgreich zur Herstellung von pAk-AOH und mAk-AOH verwendet. Das AOH-FA-BSA-Konjugat konnte erfolgreich als Festphasenantigen im EIA eingesetzt werden. Dies zeigt, dass die Kopplung mittels FA zur Herstellung von Alternariol-Protein-Konjugaten sehr gut geeignet ist. Auch BURKIN und KONONENKO (2011) verwendeten zur Kopplung von Alternariol an BSA, Ovalbumin und Gelatine erfolgreich FA.

Im Gegensatz dazu war die direkte Kopplung von Alternariol mit CDI nicht erfolgreich. Die hergestellten Konjugate konnten weder zur Immunisierung noch als Immunreagenzien im EIA eingesetzt werden, obwohl die Überprüfung mittels UV-Spektroskopie eine erfolgreiche Kopplung der Protein-Konjugate AOH-CDI-BSA und AOH-CDI-KLH vermuten ließ. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Kopplung mittels CDI zu räumlich abgeschirmten Alternariol im Alternariol-Protein-Komplex führt. In diesem Fall können keine Antikörper

gegen Alternariol oder nur gegen ein kleines frei zugängliches Alternariol-Fragment gebildet werden. Dies würde auch erklären, dass der Einsatz des AOH-CDI-BSA als Festphasenantigen in Kombination mit den pAk-AOH bzw. mAk-AOH nicht erfolgreich war. Die Antikörper hätten aufgrund der räumlichen Anordnung des BSA um Alternariol keinen Platz, um an das Antigen zu binden.

Bei der Erstellung der EIAs wurden verschiedene direkte und ein indirektes Verfahren mit den pAk-AOH getestet. Das indirekte Verfahren zeigte eine deutlich bessere Empfindlichkeit für Alternariol als die direkten Verfahren. Deshalb wurde, obwohl der direkte EIA Vorteile durch die einfachere Durchführung bietet, der Schwerpunkt der Arbeit auf die Optimierung des indirekten Verfahrens gelegt. Auch für die mAk-AOH war das indirekte Verfahren die Methode der Wahl.

Alle drei Kaninchen (K 1-3), die mit AOH-FA-KLH immunisiert wurden, lieferten spezifische Antiseren gegen Alternariol. Um einen möglichst sensitiven Test zu entwickeln, wurden nur jeweils die besten Seren eines Tieres gepoolt. Nach Erstellung von Alternariol-Standardkurven mit verschiedenen Antiserum- und Konjugatverdünnungen zeigte sich, dass mit den Antiseren von K 2 und 3 die besten 50 %-Dosen erreicht wurden. Für die weitere Testoptimierung wurde der Serumpool von K 3 ausgewählt, da bei diesen Antiseren bei einer maximalen Alternariol-Konzentration eine fast vollständige Unterdrückung des Messsignals erreicht werden konnte ($B/B_0 < 10\%$). Denn je geringer die unspezifische Farbreaktion ist, desto größer wird der auswertbare semilineare Bereich der Standardkurve und damit auch der Quantifizierungsbereich des EIAs.

Die pAk-AOH des Antiserumpools von K 3 bzw. die mAk-AOH jeweils in Kombination mit dem AOH-FA-BSA-Konjugat ermöglichten die Entwicklung von zwei empfindlichen kompetitiven indirekten Testsystemen.

5.2 Anwendbarkeit des pAk- bzw. mAk-EIAs

In beiden etablierten indirekten kompetitiven Enzymimmuntests konnten jeweils reproduzierbare Standardkurven für Alternariol erstellt werden. Es erwies sich als vorteilhaft, nach der ersten Inkubation die Platten gründlich (viermal) zu waschen. Dadurch konnten die Intra-assay-Variationskoeffizienten der Replikate der Alternariol-Standardkurve bzw. der

Proben auf unter 10 % reduziert werden. Der semilineare Messbereich lag in einem Bereich von 30 % und 80 % ($B/B_0 \times 100$). Damit konnte für den mAk-EIA eine Nachweisgrenze von 35 pg/ml und für den pAk-EIA eine Nachweisgrenze von 59 pg/ml erreicht werden. Kürzlich veröffentlichten BURKIN und KONONENKO (2011) die Entwicklung eines indirekten EIAs mit pAk gegen Alternariol. Dieser EIA hat eine Nachweisgrenze von 400 pg/ml und ist somit deutlich unempfindlicher, als die beiden hier beschriebenen Testsysteme.

Die relative Kreuzreaktion des pAk- bzw. mAk-EIAs lagen für die getesteten Substanzen (Alternariolmonomethylether, Altenuen und Tenuazonsäure) jeweils unter 1 %. Der mAk-EIA zeigte eine schwache relative Kreuzreaktion mit Alternariolmonomethylether von 0,9 %. Dies bedeutet, dass im mAk-EIA Alternariolmonomethylether ab einer Konzentration von 3,9 $\mu\text{g/l}$ in einer Standardlösung sowie ab 111 $\mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$ Probenmaterial nachgewiesen werden kann. Für die praktische Anwendung dürfte dies jedoch nur von geringer Bedeutung sein.

Alternariolmonomethylether unterscheidet sich nur an C-9 von Alternariol (Abbildung 1). Da der mAk-EIA eine geringe Kreuzreaktivität mit dem Etherderivat hat, kann vermutet werden, dass der Antikörper räumlich sehr nah an C-9 mit einer hohen Affinität an Alternariol bindet. Der Antikörper kann in diesem Bereich aber auch an Alternariolmonomethylether binden, aber nur mit einer relativ geringeren Affinität, da zum Beispiel die Methylgruppe die Bindung räumlich zu behindern scheint. Dies wird noch dadurch bestätigt, dass auch Altenuen, aber jedoch viel schwächer von dem mAk-AOH gebunden wird. Altenuen ist durch den Verlust des Aromaten nicht mehr planar. Dies könnte die Bindung in die Bindungstasche des Antikörpers weiter erschweren. Einschränkend muss hier jedoch berücksichtigt werden, dass die Reinheit der verwendeten Standardtoxine bei maximal 95 % liegt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass zum Beispiel Verunreinigungen des Altenuenstandards mit Alternariol zu diesen Messwerten beigetragen haben.

Altenuisol unterscheidet sich am C-1, C-2 und C-3 von Alternariol, hat aber wie Alternariol auch an C-9 eine Hydroxygruppe. Deshalb wäre es sehr interessant, die Kreuzreaktion des mAk-EIAs mit Altenuisol zu testen. Dies war bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, da Altenuisol bisher nicht im Handel erhältlich war.

Die geringere Kreuzreaktion des pAk-EIAs mit Alternariolmonomethylether und Altenuen könnte dadurch erklärt werden, dass einige Antikörper im polyklonalen Serum mit dem

gleichen Epitop des Antigens wie der mAk-AOH reagieren. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein Großteil der gebildeten Antikörper an ein Epitop, das das C-9 Kohlenstoffatom beinhaltet, bindet und nur ein geringer Anteil der Antikörper bindet zum Beispiel im Bereich des C-6 Kohlenstoffatoms. Dieser Bereich ist in den getesteten Dibenzopyron-Derivaten identisch. So könnte die geringe Kreuzreaktion mit Alternariolmonomethylether erklärt werden. Sehr wahrscheinlich treffen beide Möglichkeiten gemeinsam zu. Sobald Altenuisol im Handel erhältlich ist, sollte auch die Kreuzreaktion im pAk-EIA getestet werden.

Aus den eben genannten Vermutungen kann eine weitere Hypothese abgeleitet werden. Sehr wahrscheinlich führte die Kopplung mittels FA in den meisten Fällen zu einer Bindung des KLH an die Hydroxygruppe des C-3 oder C-7 Kohlenstoffatoms. Denn eine Bindung an die Hydroxygruppen von C-9 hätte zu einer viel größeren Kreuzreaktion mit Alternariolmonomethylether führen müssen.

Für alle untersuchten Probenmatrices, außer Tomatenmark im mAk-EIA, konnten unter Berücksichtigung der notwendigen minimalen Verdünnungsfaktoren rechnerisch ermittelte Nachweisgrenzen zwischen 0,3 µg/kg und 0,9 µg/kg bzw. µg/l erreicht werden. Der Extrakt des Tomatenmarkes musste, um störende Matrixeinflüsse im mAk-EIA zu minimieren, mindestens 1:10 verdünnt werden. Dadurch ergab sich für das Tomatenmark im mAk-EIA eine rechnerisch ermittelte Nachweisgrenze von 1,8 µg/kg. Obwohl der mAk-EIA fast doppelt so empfindlich ist wie der pAk-EIA, führten die meist nötigen höheren Verdünnungen der Proben im mAk-EIA dazu, dass beide Systeme eine annähernd ähnliche Sensitivität haben. Deshalb wurde, um die Auswertung zu vereinfachen und unter Berücksichtigung der Variabilität der Probeneinflüsse, für beide EIAs die Nachweisgrenze für Tomatenmark auf 2 µg/kg und für die restlichen Probenmatrices auf 1 µg/kg bzw. µg/l festgelegt. Damit liegen die Nachweisgrenzen beider Testsysteme im unteren µg/kg-Bereich und sind mit empfindlichen HPLC-Methoden vergleichbar (DELGADO *et al.*, 1996; FENTE *et al.*, 1998; KRÁLOVÁ *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2006). Ein Nachteil dieser HPLC-Methoden ist die notwendige aufwendige Aufreinigung der Rohextraktes. SCOTT *et al.* (2006) beschreiben eine HPLC-MS/MS Methode für Wein und Fruchtsäfte mit der Alternariol-Gehalte bis 0,01 µg/l nachgewiesen werden können. Dafür müssen die Proben aber über Säulen aufgereinigt werden, während bei den in dieser Arbeit entwickelten EIA-Methoden nur eine Verdünnung von Wein und Säften notwendig ist. Auch die für die EIAs notwendige Flüssig-Flüssig-Extraktion von „festen“ Lebensmitteln ist im Vergleich zu anderen publizierten

Extraktions- und Aufreinigungsmethoden (DELGADO *et al.*, 1996; FENTE *et al.*, 1998; POZZI *et al.*, 2005) einfach und kostengünstig durchführbar. Die Nachweisgrenze des von BURKIN und KONONENKO (2011) entwickelten EIA liegt für Getreide bei 20 µg/kg. Bisher wurde die in dieser Arbeit verwendete Flüssig-Flüssig-Extraktion nur für Obst- und Gemüseprodukte getestet, aber sie ist mit großer Wahrscheinlichkeit auch für Getreide anwendbar. Für zukünftige Untersuchungen wäre die Entwicklung einer Immunoaffinitätschromatographie mit mAk-AOH eine sinnvolle Ergänzung.

Die mittlere Wiederfindung von Alternariol bezogen auf alle Probenmatrices lag beim pAk-EIA zwischen 60–98 % und beim mAk-EIA zwischen 43–80 %. Die Variabilität der Wiederfindung innerhalb einer Probenmatrix ist auf die verschiedenen Zusammensetzungen der Proben zurückzuführen. Die Wiederfindungsraten zeigen, dass mit beiden EIA-Methoden eine quantitative Analytik von Alternariol durchführbar ist.

Auch die Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen von natürlich mit Alternariol kontaminierten Proben zeigen die gute Reproduzierbarkeit der beiden Testsysteme. Der Variationskoeffizient der Mehrfachuntersuchungen lag immer unter 31 %.

5.3 Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol-Konzentrationen

Beim Vergleich der Ergebnisse mit statistischen Kenngrößen, wie zum Beispiel Mittelwert oder Median, ist die Übereinstimmung der Ergebnisse gut. Die Korrelation der Ergebnisse der beiden Testsysteme ist nur mittelmäßig. Dies ist meist auf die niedrigen Alternariol-Gehalte in der Nähe der Nachweisgrenze zurückzuführen. Proben mit höheren Alternariol-Gehalten zeigen eine bessere Korrelation der Ergebnisse. Eine Ausnahme hiervon ist das Apfelmus. Hier findet der mAk-EIA auch im höheren Konzentrationsbereich meist größere Alternariol-Belastungen als im pAk-EIA. Dies lässt vermuten, dass der mAk-EIA nicht nur Alternariol, sondern auch Alternariol-Analoga nachweist. Hier könnte es sich zum Beispiel um das *Alternaria*-Toxin Altenuisol handeln. Dass dieses Alternariol-Analogon, ein natürlich im Apfelmus vorkommender Inhaltsstoff ist, konnte durch eine selbst hergestellte Negativkontrolle mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die kreuzreagierende Substanz könnte zum Beispiel auch ein Alternariol-Derivat sein, welches durch den Herstellungsprozess entstanden ist. Wobei auch bei kaltgeriebenem Apfelmus

(keine Erhitzung) im mAk-EIA höhere Alternariol-Konzentrationen als im pAk-EIA gefunden wurden. Auch eine Kreuzreaktion mit acetyliertem Alternariol konnte ausgeschlossen werden, da Alternariol, Alternariolmonomethylether und Alternuen auch nach durchgeführter Acetylierung eine Kreuzreaktion $\leq 0,1$ im mAk-EIA zeigten. Um die kreuzreagierende Substanz bzw. Substanzen im mAk-EIA zu identifizieren, wären weitere Untersuchungen der Proben mit anderen Methoden, wie zum Beispiel LC-MS, sinnvoll.

5.4 Methodenvergleich von EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol

Die Nachweisgrenze der verwendeten HPLC-Methode lag bei 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Deshalb konnte die Übereinstimmung von Ergebnissen nur bei Proben mit hohem Alternariol-Gehalt überprüft werden. Alternariol-Konzentrationen über 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurden nur in einer Tomatenprobe gefunden. Die Untersuchung dieser Tomatenprobe in beiden EIAs und mittels HPLC wurde mit dem gleichen Extrakt durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen gut überein.

Zur weiteren Validierung der beiden enzymimmunchemischen Testsysteme wurde eine Fraktionierung einer Tomatenmarkprobe mittels HPLC durchgeführt. Obwohl zur Retentionszeit von Alternariol (15,9 min) kein Peak im Chromatogramm der Tomatenmarkprobe zu sehen war, konnten für die entsprechenden Eluats-Fractionen im pAk- und im mAk-EIA eine kreuzreagierende Substanz nachgewiesen werden. Dies und die gut übereinstimmenden HPLC und EIA Ergebnisse der Tomatenprobe zeigen, dass beide EIAs Alternariol und nicht ein Alternariol-Analoga nachweisen.

5.5 Vorkommen von Alternariol in verschiedenen Lebensmitteln

Alternariol war in fast allen untersuchten pflanzlichen Produkten mit einer hohen Häufigkeit (46 % pAk-EIA, 75 % mAk-EIA) nachzuweisen. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein (LAU *et al.*, 2003; SCOTT *et al.*, 2006; ASAM *et al.* 2009). In der vorliegenden Untersuchung wurden Alternariol-Gehalte bis zu 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in pflanzlichen Lebensmitteln gefunden. Diese Probenmaterialien zeigten keinen sichtbaren

Schimmelpilzbefall oder Verderb. In sichtbar verschimmelten Tomaten wurden dagegen Alternariol-Gehalte bis zu 41 mg/kg gefunden.

Die Untersuchung von Tomatenmark und Tomatenketchup zeigte, dass 100 % der untersuchten Proben Alternariol in einer Konzentration zwischen 1 µg/kg und 13 µg/kg enthielten. Auch die untersuchten Tomatensaftproben waren häufig Alternariol-positiv. Die mittlere Alternariol-Belastung war im Tomatenmark am höchsten (pAk-EIA 6,6 µg/kg, mAk-EIA 6,7 µg/kg) und im Tomatensaft am niedrigsten (pAk-EIA 1,9 µg/l, mAk-EIA 1,5 µg/l). Dies ist durch die Aufkonzentrierung des Tomatenmarkes erklärbar. Insgesamt waren eine große Anzahl der untersuchten Tomatenprodukte (pAk-EIA 84 %, mAk-EIA 93 %) Alternariol-positiv. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass in gemäßigten und feuchten Klimazonen *Alternaria* einer der Hauptverderber von Tomaten ist (ANDERSEN und FRISVAD, 2004; LOGRIECO *et al.* 2003). Die Ergebnisse stimmen mit Studien von ASAM *et al.* (2009) überein, der in zwei Tomatensäften Alternariol im Bereich von 0,52–1,99 µg/kg fand. Dagegen untersuchten DA MOTTA und SOARES (2001) 80 Tomatenprodukte, fanden aber kein Alternariol. Die Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode lag aber auch bei 5 µg/kg und somit war kein Alternariol-Nachweis im sehr niedrigen µg/kg-Bereich möglich.

Tomaten, die einen sichtbaren Befall von *Alternaria* aufwiesen, zeigten eine hohe Alternariol-Belastung (im mg/kg-Bereich). Dies zeigt, dass eine einzige mit *Alternaria* infizierte Tomate ausreicht, um eine ganze Charge eines Tomatenproduktes mit Alternariol zu kontaminieren. Der Nachweis von Alternariol in Tomatenprodukten könnte deshalb auch als Indikator für das verwendete Rohmaterial eingesetzt werden (TERMINIELLO *et al.*, 2006). Die mittels EIA in den Tomaten gefundenen Alternariol-Gehalte, stimmen mit Ergebnissen anderer Studien überein. STINSON *et al.* (1981) fanden zwischen 0,3–5,3 mg/kg Alternariol in natürlich infizierten Tomaten und BOTTALICO und LOGRIECO (1998) wiesen bis zu 600 mg/kg in inokulierten Tomaten nach. Auch der mittels HPLC ermittelte hohe Alternariolmonomethylether-Gehalt in einer Tomatenprobe stimmt mit Untersuchungen von BOTTALICO und LOGRIECO (1998) überein. BOTTALICO und LOGRIECO (1998) berichteten von einer Alternariolmonomethylether-Kontamination von bis zu 100 mg/kg.

A. tenuissima und die *A. arborescens* sind häufig für einen Schimmelpilzbefall von Äpfeln verantwortlich (ANDERSEN und THRANE, 2006). Dies erklärt auch, dass Alternariol und Alternariolmonomethylether die hauptsächlich vorkommenden *Alternaria*-Toxine in Äpfeln

und daraus hergestellten Produkten sind (STINSON *et al.*, 1981; VIÑAS *et al.*, 1992). Die in dieser Arbeit untersuchten Apfelerzeugnisse enthielten wie die Tomatenerzeugnisse Alternariol im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich, wobei die Apfelprodukte (pAk-EIA 28 %, mAk-EIA 67 %) nicht ganz so häufig belastet waren. Die in Apfelprodukten mittels EIA ermittelten Alternariol-Gehalte stimmen mit denen aus anderen Berichten überein. SCOTT *et al.* (1997) fanden bis zu $5 \mu\text{g}/\text{l}$ Alternariol in drei von acht Apfelsaftproben. LAU *et al.* (2003) berichteten von $0,57\text{--}2,4 \mu\text{g}/\text{l}$ Alternariol in Apfelsaft (82 % positive Proben). Auch DELGADO und GÓMEZ-CORDOVÉS (1998) fanden Alternariol in ähnlichen Konzentrationen. Niedrigere Alternariol-Gehalte ($0,16\text{--}0,22 \mu\text{g}/\text{l}$) wurden von ASAM *et al.* (2009) nachgewiesen.

Die Untersuchung von Apfelsäften verschiedener Herstellungsarten zeigte eine häufigere Belastung von naturtrüben im Gegensatz zu klaren Säften. Zur Herstellung des klaren Saftes wird der Apfelsaft gefiltert und dadurch Schwebstoffe entfernt. Es wäre möglich, dass sich Alternariol im sauren Milieu des Apfelsaftes an die Schwebstoffe bindet und dadurch teilweise herausgefiltert wird. In ökologisch hergestellten Apfelsäften war auch eine höhere Alternariol-Belastung zu erkennen. Doch ist dieses Ergebnis vorsichtig zu werten, da vier der sechs untersuchten Säfte auch naturtrübe Säfte waren.

Die Untersuchung von Weißwein mittels EIA zeigte, dass 18 % der untersuchten Proben mit Alternariol belastet waren (Maximalwert $1,5 \mu\text{g}/\text{l}$). Diese im Vergleich zu Apfel- und Tomatenprodukten eher geringe Belastung ist interessant, da Trauben nach Literaturangaben ein gutes Substrat für das Wachstum von *A. alternata* und die Alternariol-Produktion sind. Interessanterweise wächst *A. alternata* auf inokulierten Trauben sogar bei Kühlschranktemperatur und kann auch bei diesen Temperaturen Alternariol und Alternariolmonomethylether bilden (TOURNAS und STACK, 2001). Alternariol ist auch in Weißwein stabil (SCOTT und KANHERE, 2001b). Aus diesen Gründen ist die relativ geringe Belastungshäufigkeit von Weißwein zwar überraschend, entspricht jedoch den Daten von SCOTT *et al.* (2006). Diese Autoren untersuchten 23 Weißweine und vier weiße Traubensäfte und konnten in zwei Proben $1,1 \mu\text{g}/\text{l}$ bzw. $1,5 \mu\text{g}/\text{l}$ Alternariol nachweisen. Dagegen berichtete ASAM *et al.* (2009), dass von sechs Proben, alle Proben Alternariol enthielten. Der Nachweis dieser häufigeren Alternariol-Belastung kann auf die niedrige Nachweisgrenze dieser Methode ($0,01 \mu\text{g}/\text{l}$) zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung von Erdbeerkonfitüre sind vorsichtig zu bewerten, da die gefundenen Alternariol-Gehalte in beiden Testsystemen sehr von einander abweichen. Im mAk-EIA ergaben alle Proben ein positives Ergebnis (1,3-2,8 µg/kg), während im pAk-EIA lediglich eine Probe positiv war (1 µg/kg) und weitere zwei Proben Extinktionen knapp unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen. Zur Untersuchung von Erdbeerkonfitüre oder Erdbeeren liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine anderen Ergebnisse vor. SÜLYÖK *et al.* (2007) untersuchten eine sichtbar verschimmelte Konfitüre und fanden eine Alternariol-Konzentration von 14 µg/kg. Prinzipiell scheint eine Alternariol-Belastung von Konfitüren also möglich zu sein. Wobei sich dann die Frage stellt, ob die Alternariol-Bildung erst nach der Verarbeitung stattgefunden hat oder ob das Alternariol durch belastete Früchte in die Konfitüre gelangte. Letzteres erscheint wahrscheinlicher, da MAGAN *et al.* (1984) berichteten, dass eine Alternariol-Synthese bevorzugt bei a_w -Werten (Wasseraktivität) des Nährmediums zwischen 0,90 und 0,98 stattfindet. In den untersuchten Konfitüren der vorliegenden Arbeit waren die Konfitüren ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall. Somit wurde das Toxin sehr wahrscheinlich durch kontaminierte Früchte in die Konfitüre eingebracht. Diese erstmalig durchgeführte Untersuchung zeigt, dass Alternariol in Erdbeerkonfitüre vorkommt und somit auch zu einer ständigen Kontamination des Verbrauchers führen kann.

5.6 Abschätzung der Gefährdung des Verbraucher durch Alternariol belastete Lebensmittel

Da mit hohen Toxinwerten von Alternariol nur bei hochgradig und sichtbar verschimmeltem Obst und Gemüse zu rechnen ist, scheint die Gefahr, dass Verbraucher große Mengen an Alternariol aufnehmen, eher gering. Aber die Verarbeitung von pflanzlichen Erzeugnissen, die möglicherweise hoch mit Alternariol belastet sind, kann zu einer Kontamination von Lebensmitteln führen. Die Verarbeitung einzelner hoch belasteter Tomaten oder Äpfel würde auch die niedrige, aber häufige Alternariol-Belastung von Tomaten- und Apfelprodukten erklären. Daten über die Stabilität von Alternariol während der Verarbeitung und in den fertigen Erzeugnissen sind nur im geringen Umfang vorhanden. Alternariol zeigt sich als sehr stabil in Sonnenblumenmehl, Apfelsaft und Weißwein, sogar bei erhöhten Temperaturen von 80–100 °C (COMBINA *et al.*, 1999; SCOTT und KANHERE, 2001b; SIEGEL *et al.*, 2010). Das häufige Vorkommen von Alternariol in pflanzlichen Lebensmitteln kann ein Risiko für den Verbraucher darstellen, allerdings ist hierzu die Datenlage, im Hinblick auf die Toxizität,

unzureichend. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren 75 % (mAk-EIA) bzw. 46 % pAk-EIA der untersuchten Proben mit Alternariol im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich belastet. Die tägliche Aufnahme von Früchten und daraus hergestellten Produkten liegt in Deutschland pro Person bei 500 g und für Gemüse und Gemüseprodukten bei 235 g pro per Person (MRI, 2008). Deshalb kann eine regelmäßige Aufnahme von Produkten, die mit Alternariol belastet sind, angenommen werden. Dies bedeutet für den Verbraucher eine langfristige Exposition mit Alternariol, allerdings in einem sehr geringen Konzentrationsbereich. In wie weit diese Exposition mit Alternariol eine Gefährdung für Mensch und Tier darstellt, ist noch nicht hinreichend geklärt, da Angaben zur biologischen Aktivität oft widersprüchlich sind. Die akute Toxizität von Alternariol wird zwar als gering eingestuft (PERO *et al.* 1973; FEHR, 2009). Neuere Studien zeigen jedoch, dass Alternariol mutagene, zytotoxische, genotoxische und estrogenartige Wirkungen hat (LEHMANN *et al.* 2006, BRUGGER *et al.* 2006; PFEIFFER *et al.*, 2007a; TAN *et al.*, 2008; FEHR *et al.*, 2009). Das Vorkommen von Alternariol kann auch ein Indikator für das Vorkommen von weiteren *Alternaria*-Toxinen sein, wie zum Beispiel Alternariolmonomethylether, Tenuazonsäure oder Alertoxine (POSE *et al.*, 2004; SCOTT *et al.*, 2006). Die akute Toxizität und Mutagenität von *Alternaria*-Extrakten ist deutlich höher als von Alternariol alleine (HAMILTON *et al.*, 1968; SLIFKIN und SPALDING, 1970; DONG *et al.*, 1987; ZHEN *et al.*, 1991). Darüber hinaus ist ein synergistischer Effekt zwischen Alternariol und Alternariolmonomethylether bekannt (PERO *et al.* 1973).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Alternariol und somit sehr wahrscheinlich auch andere *Alternaria*-Toxine mit großer Häufigkeit in pflanzlichen Produkten vorkommen. Alternariol wird zwar nur in geringen Konzentrationen gefunden, aber durch die langfristige Aufnahme von Alternariol und anderen *Alternaria*-Toxinen besteht ein Gefahren-Potential für den Verbraucher. Deshalb ist die weitere Untersuchung von Lebensmitteln auf Alternariol und anderen *Alternaria*-Toxinen mit schnellen und einfachen Screening-Methoden, wie zum Beispiel mit den hier beschriebenen EIAs wichtig, um die Gefahr für Mensch und Tier richtig einschätzen zu können.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Anwendung von zwei Enzymimmuntests zum Nachweis von Alternariol auf der Basis polyklonaler- bzw. monoklonaler Antikörpern gegen dieses Mykotoxin (pAk- bzw. mAk-EIA).

Zur Herstellung von Alternariol-Protein-Konjugaten wurde Alternariol mittels der Mannich-Kondensations-Reaktion an keyhole limpet hemocyanin (KLH) bzw. an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppelt. Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen mit Alternariol-KLH immunisiert. Die Überprüfung der gewonnenen Antiseren zeigte, dass alle Tiere spezifische Antikörper gegen Alternariol bildeten. Unter Berücksichtigung der Spezifität und Sensitivität wurden die geeignetsten Antiseren für die weitere Testentwicklung verwendet. Parallel hierzu wurden unter Verwendung des in dieser Arbeit hergestellten Immunogens an der LMU München monoklonale Antikörper gegen Alternariol produziert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Mit beiden Testsystemen konnte Alternariol im unteren pg/ml-Bereich nachgewiesen werden.

Zur Entwicklung eines kompetitiven direkten EIAs wurde Alternariol-BSA mittels reduktiver Alkylierung an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Unter der Verwendung eines Anti-Alternariol-Antiserums und des Alternariol-BSA-HRP-Konjugates konnte ein Testsystem erstellt werden, das den Nachweis von Alternariol mit einer Nachweisgrenze von 17 ng/ml erlaubte.

Für die Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs wurde das mittels Mannich-Kondensationsreaktion hergestellte Alternariol-BSA-Konjugat eingesetzt. Unter der Verwendung von polyklonalen bzw. monoklonalen Antikörpern konnten zwei indirekte EIAs etabliert werden. Mit einer mittleren Nachweisgrenze der Alternariol-Standardkurven von $35 \pm 6,9$ pg/ml (mAk-EIA) und 59 ± 16 pg/ml (pAk-EIA) sind beide Tests sehr empfindlich für Alternariol. Zur Bestimmung der Spezifität der beiden enzymimmunologischen Verfahren wurden die Kreuzreaktionen anderer *Alternaria*-Toxine getestet. Beide EIAs sind spezifisch für Alternariol, die relativen Kreuzreaktionen mit anderen *Alternaria*-Toxinen (Altenuen, Alternariolmonomethyl ether und Tenuazonsäure) liegen unter 1 %.

In einer ersten Anwendungsstudie wurden Proben ausgesuchter Lebensmittelgruppen mit den beiden indirekten EIAs untersucht. Die 119 analysierten Proben setzten sich aus Apfelsaft (n = 44), Apfelmus (n = 10), Erdbeerkonfitüre (n = 10), Tomatenketchup (n = 18), Tomatenmark (n = 10), Tomatensaft (n = 16) und Weißwein (n = 11) zusammen. Die Proben wurden entweder mit phosphatgepuffertes Kochsalzlösung verdünnt und direkt analysiert (Apfelsaft, Wein, Tomatensaft) oder durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgereinigt. Die Nachweisgrenze für Alternariol in Tomatenmark betrug 2 µg/kg, in allen anderen Probenmatrices konnte eine Nachweisgrenze von 1 µg/kg bzw. µg/l erreicht werden. Die mittleren Wiederfindungsraten von Alternariol in künstlich kontaminierten Proben im Konzentrationsbereich von 1–10 µg/kg lagen bei 43–80 % (mAk-EIA) bzw. bei 60–98 % (pAk-EIA). Ein hoher Prozentsatz der Proben (mAk-EIA 75 %, pAk-EIA 46 %) ergab positive Ergebnisse für Alternariol. Die nachgewiesenen Alternariol-Konzentrationen lagen zwischen 1–9 µg/kg, in Tomatenmark wurden etwas höhere Alternariol-Gehalte festgestellt (13 µg/kg). Bei der Untersuchung von sichtbar mit Schwärzepilzen befallenen Tomaten konnten Alternariol-Konzentrationen bis 37 mg/kg nachgewiesen werden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden indirekten EIAs war akzeptabel und korrelierte auch mit durchgeführten HPLC-Analysen.

Die in dieser Arbeit entwickelten Testsysteme ermöglichen somit einen schnellen und einfachen Nachweis von Alternariol im niedrigen µg/kg-Bereich und eignen sich daher gut als Routineverfahren zum Nachweis von Alternariol in Lebensmitteln.

7 Summary

The present study describes the development and application of two enzyme immunoassays for the detection of alternariol with monoclonal (mAb) and polyclonal (pAb) antibodies, respectively (mAb-EIA and pAb-EIA).

For synthesis of the alternariol-protein-conjugate, alternariol was linked to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as well as to bovine serum albumin (BSA) by the Mannich condensation reaction. Moreover, polyclonal antibodies were produced in rabbits by immunisation with alternariol-KLH-conjugate. The characterisation of the produced antisera showed, that all rabbits produced specific antibodies against alternariol. The antisera with the best sensitivity and specificity were used to establish an enzyme immunoassay. In parallel, the Alternariol-KLH-conjugate was used to generate monoclonal antibodies (LMU München), which were provided for this work. EIAs from both antibodies (mAb and pAb) were highly sensitive for alternariol with a detection limit in the low pg/ml-range.

To develop a competitive direct EIA, alternariol-BSA was coupled to horseradish peroxidase (HRP) by applying reductive alkylation. In combination with an anti-alternariol-antisera this alternariol-BSA-HRP-conjugate achieved a detection limit of 17 ng/ml for alternariol.

The same alternariol-BSA-conjugate was used to develop a competitive indirect EIA with polyclonal as well as monoclonal antibodies. Both EIAs were highly sensitive, with detection limits of 35 ± 6.9 pg/mL (mAb-EIA) and 59 ± 16 pg/mL (pAb-EIA), respectively. To determine the specificity of these two indirect EIAs, the cross-reactivities with other *Alternaria*-mycotoxins (altenuene, alternariolmonomethylether and tenuazonicacid) were tested. Both EIAs are very specific for alternariol with cross-reactivities less than 1%.

For application studies samples of certain categories of food were examined with both indirect EIAs. The 119 analysed samples consisted of apple juice (n = 44), applesauce (n = 10), strawberry jam (n = 10), tomato ketchup (n = 18), tomato paste (n = 10), tomato juice (n = 16) und white wine (n = 11). Sample materials were either analysed directly after dilution with phosphate buffered saline (apple juice, wine, tomato juice), or purified by liquid-liquid-extraction. A detection limit of 1 µg/kg was demonstrated for all sample materials beside tomato paste, where 2 µg/kg were achieved. Mean recoveries of alternariol at spiking levels of 1–10 µg/kg were 43–80% in mAb-EIA, and 60–98% in pAb-EIA, respectively. A high

percentage (75 % in mAb-EIA, 46 % in pAb-EIA) of all samples was positive for alternariol. Standard alternariol values were in the range of 1-9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the highest concentration in tomato paste (13 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tomatoes with black mold spots contained very high alternariol concentrations up to 37 mg/kg . The overall consistency of both indirect EIAs was acceptable and the EIAs results correlated very well with those obtained by the HPLC.

Both EIAs developed in this study allow a fast and easy detection of alternariol in the low $\mu\text{g}/\text{kg}$ range. Therefore, both tests are suitable for the routine analysis of alternariol in food samples.

8 Literaturverzeichnis

ABELL, C., B.D. BUSH und J. STAUNTON (1986):

Biomimetic syntheses of the polyketide fungal metabolites alternariol and rubrofurasin:
Models for cyclisation reactions catalysed by polyketide synthase enzymes
J. Chem. Soc., Chem Commun. **1**, 15–17

ALY, A.H., R.A. EDRADA-EBEL, I.D. INDRIANI, V. WRAY, W.E.G. MÜLLER, F. TOTZKE, U. ZIRRGIEBEL, C. SCHÄCHTELE, M.H.G. KUBBUTAT, W.H. LIN, P. PROKSCH und R. EBEL (2008):

Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalese*
J. Nat. Prod. **71**, 972–980

ANDERSEN, B. und J.C. FRISVAD (2004):

Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes
J. Agric. Food Chem. **52**, 7507–7513

ANDERSEN, B. und U. THRANE (2006):

Food-borne funghi in fruit and cereals and their production of mycotoxins
In: Hocking, A.D., J.I. Pitt, R.A. Samson und U. Thrane (Hrsg.): Advances in food mycology.
Reihe: Advances in experimental medicine and biology Vol 571
Springer, New York; 137–152

ANSARI, A.A. und A.K. SHRIVASTAVA (1990):

Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, India
Food Addit. Contam. **7**, (6), 815–820

ASAM, S., K. KONITZER, P. SCHIEBERLE und M. RYCHLIK (2009):

Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages
J. Agric. Food Chem. **57**, 5152–5160

BATTILANI, P., L.G. COSTA, A. DOSSENA, M.L. GULLINO, R. MARCHELLI, G. GALAVERNA, A. PIETRI, C. DALL'ASTA, P. GIORNI, D. SPADARO und A. GUALLA (2009):

Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants

(Scientific/technical report submitted to EFSA, CFP/EFSA/CONTAM/2008/01)

<http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/doc/24e.pdf> (13.03.2011)

BARKAI-GOLAN, R. (2008):

Alternaria mycotoxins

In: Barkai-Golan, R und N. PASTER (Hrsg.): Mycotoxins in fruits and vegetables

Elsevier, San Diego, USA; 185-203

BARKAI-GOLAN, R. und N. PASTER (2008):

Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1

World Mycotoxin Journal **1** (2), 147–159

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2003):

Stellungnahme des BfR vom 30. Juli 2003: *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln

http://www.bfr.bund.de/cm/208/alternaria_toxine_in_lebensmitteln.pdf (13.03.2011)

BOTTALICO, A. und A. LOGRIECO (1998):

Toxigenic *Alternaria* species of economic importance

In: Sinha, K.K. und D. Bhatnagar (Hrsg.): Mycotoxins in agriculture and food safety

Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong; 65–108

BRÄSE, S., A. ENCINAS, J. KECK und C.F. NISING (2009):

Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites

Chem. Rev. **109**, 3903–3990

BRUCE, V.R., M.E. STACK und P.B. MISLIVEC (1984):

Insidence of toxic *Alternaria* species in small grains from the USA

J. Food Sci. **49**, 1626–1627

BRUGGER, E.-M., J. WAGNER, D.M. SCHUMACHER, K. KOCH, J. PODLECH, M. METZLER und L. LEHMANN (2006):

Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells
Toxicol. Lett. **164** (3), 221–230

BURKIN, A.A. und G.P. KONONENKO (2011):

Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agriculture products contamination
Appl. Biochem. Microbiol. **47** (1), 72–76

BURROUGHS, R., L.M. SEITZ, D.B. SAUER und H.E. MOHR (1976):

Effect of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*
Appl. Environ. Microbiol. **31** (5), 685–690

BUSER, H.P., W. HELLER und SANDHOFTEAM (2008):

Anfälligkeit einiger Karottensorten auf *Alternaria dauci*
Der Gemüsebau **2**, 23–24

CASTILLO M.D., H.H.L. GONZÁLEZ, E.J. MARTÍNEZ, A.M. PACIN und S.L. RESNIK (2004):

Mycoflora and potential for mycotoxin production of freshly harvested black bean from the Argentinean main production area
Mycopathologia **158**, 107–112

CENTENO, S. und M.A. CALVO (2002):

Mycotoxins produced by fungi isolated from wine cork stoppers
Pakistan J. Nutr. **1** (6), 267–269

CHRISTENSEN, C.M., G.H. NELSON, C.J. MIROCHA und F. BATES (1968):

Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi
Cancer Res. **28**, 2293–2295

CHRISTIAN, G.D. (2004):

Analytical chemistry

Wiley, USA; 555-642

CHULZE, S., A. TORRES, A. DALCERO und M. COMBINA (1994):

Production of alternariol and alternariol monomethyl ether in natural substrates in comparison with semisynthetic culture medium

Mycotoxin Res. **10**, 79–84

COMBINA, M., A. DALCERO, E. VARSAVSKY, A. TORRES, M. ETCHEVERRY, M. RODRIGUEZ und H. GONZALEZ QUINTANA (1999):

Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour

Mycotoxin Res. **15**, 33–38

COULOMBE, R.A. (1993):

Biological action of mycotoxins

J. Dairy Sci. **76** (3), 880-891

COSTA, E.O., C.R. GANDRA, M.F. PIRES, S.D. COUTINHO, W. CASTILHO und C.M. TEIXEIRA (1993):

Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil

Mycopathologia **124**, 13–17

DACERO, A.M., M. COMBINA, M. ETCHEVERRY, E. VARSAVSKY und M.I. RODRIGUEZ (1997):

Evaluation of *Alternaria* and its mycotoxins during ensiling of sunflower seeds

Nat. Toxins **5**, 20–23

DAI, J., K. KROHN, D. GEHLE, I. KOCK, U. FLÖRKE, H.-J. AUST, S. DRAEGER, B. SCHULZ und J. RHEINHEIMER (2005):

New oblongolides isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Melilotus dentata* from the shores of the Baltic Sea

Eur. J. Org. Chem. **18**, 4009–4016

DAVIS, V.M. und M.E. STACK (1994):

Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*

Appl. Environ. Microbiol. **60** (10), 3901–3902

DELGADO, T., C. GÓMEZ-CORDOVÉS und P.M. SCOTT (1996):

Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. A **731**, 109–114

DELGADO, T. und C. GÓMEZ-CORDOVÉS (1998):

Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates

J. Chromatogr. A **815**, 93–97

DIETRICH, R., E. SCHNEIDER, E. USLEBR und E. MÄRTLBAUER (1995):

Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins

Nat. Toxins **3**, 288–293

DONG, Z., G. LIU, Z. DONG, Y. QIAN, Y. AN, J. MIAO und Y. ZHEN (1987):

Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China

Carcinogenesis **8** (7), 989–991

DOUPNIK, B. JR. und E.K. SOBERS (1968):

Mycotoxycosis: Toxicity to chicks of *Alternaria longipes* isolated from tobacco

Appl. Microbiol. **16** (10), 1596–1597

EGMOND VAN, H.P. (2004):

Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe

Anal. Bioanal. Chem. **378**, 1152–1160

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry **8**, 871–874

EU-KOMMISSION (2002):

Safe organic vegetables and vegetable products by reducing risk factors and sources of fungal
contaminants throughout the production chain: the carrot - *Alternaria* mode

In: D'Amario, R., I. de Froidmont-Görtz, J. Lucas (Hrsg.): Fifth framework programme,
Quality of life and management of living resources, Project synopses, Key action 1 – food,
nutrition and health, 274–277

<http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/ka1/ka1-volume1.pdf> (13.03.2011)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004):

Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003

Food and Nutrition Paper 81

Food and Agriculture Organizations of the United Nations, Rome, Italy

<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM> (13.03.2011)

FEHR, M., G. PAHLKE, J. FRITZ, M.O. CHRISTENSEN, F. BOEGE, M. ALTEMÖLLER,
J. PODLECH und D. MARKO (2009):

Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform

Mol. Nutr. Food Res. **53**, 441–451

FENTE, C.A., J. JAIMEZ, B.I. VÁZQUEZ, C.M. FRANCO and A. CEPEDA (1998):

Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-
performance liquid chromatography with fluorescence detection

Analyst **123**, 2277–2280

FREEMAN, G.G. (1965):

Isolation of alternariol and alternariol monomethyl ether from *Alternaria dauci* (Kühn) groves
and skolko

Phytochem. **5**, 719–725

GANNIBAL, P.B., S.S. KLEMSDAL und M.M. LEVITIN (2007):

AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts

Eur. J. Plant Pathol. **119**, 175–182

GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA, J., J. CHELKOWSKI und P. ZAJKOWSKI (1989):

Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in the grain and chaff of cereals

Mycotoxin Res. **5**, 77–80

GRIFFIN, G.F. und F.S. CHU (1983):

Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay

Appl. Environ. Microbiol. **46** (6), 1420–1422

GROSS, M., V. CURTUI, Y. ACKERMANN, H. LATIF und E. USLEBER (2011):

Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products

J. Agric. Food Chem. **59** (23), 12317–12322

HÄGGBLOM, P. (1987):

De novo synthesis of alternariol in conidia of *Alternaria alternata*

J. Gen. Microbiol. **133**, 3527–3529

HÄGGBLOM, P. und W.G. NIEHAUS (1987):

The effect of different wavelengths of light on polyketide metabolism in *Alternaria alternata*

Exp. Mycol. **11**, 150–153

HAMILTON, P.B., G.B. LUCAS und R.E. WELTY (1968):

Mouse toxicity of fungi of tobacco

Appl. Microbiol. **18** (4), 570–574

HARRIS, T.M. und J.V. HAY (1977):

Biogenetically modeled syntheses of heptaacetate metabolites. Alternariol and lichexanthone

J. Am. Chem. Soc. **99** (5), 1631–1637

HASAN, H.A.H. (1995):

Alternaria mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: Conditions and regulation of their production

Mycopathologia **130**, 171–177

HAYALOGLU, A.A. und S. KIRBAG (2007):

Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese

Int. J. Food Microbiol. **115**, 376–380

HEBERT, G.A., P.L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera

Appl. Microbiol. **25** (1), 26–36

HEISLER, E.G., J. SICILIANO, E.E. STINSON, S.F. OSMAN und D.D. BILLS (1980):

High-performance liquid chromatographic determination of major mycotoxins produced by *Alternaria* molds

J. Chromatogr. **194**, 89–94

HILTUNEN M. und K. SÖDERHÄLL (1992):

Inhibition of polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin

Appl. Environ. Microbiol. **58** (3), 1043–1045

HUSSAIN, H., K. KROHN, Z. ULLAH, S. DRAEGER und B. SCHULZ (2007):

Bioactive chemical constituents of two endophytic fungi

Biochem. Syst. Ecol. **35**, 898–900

ISMAIL, M.A. und Z.M. ZAKY (1999):

Evaluation of the mycological status of luncheon meat with special reference to aflatoxigenic moulds and aflatoxin residues

Mycopathologia **146**, 147–154

JACKSON, C.R. und G.F. WEBER (1959):

Morphology and taxonomy of *Alternaria cucumerina*

Mycologia **51** (3), 401–408

KANAKAM, C.C., N.S. MANI und G.S.R. SUBBA RAO (1990):

Synthesis based on cyclohexadienes: Part 4. Novel synthesis of the 6-Aryl-2,4-dimethoxybenzoates. Alternariol and methyl trimethylaltenusin

J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1**, 2233–2237

KELLERT, M., W. BLAAS und M. WITTKOWSKI (1984):

Gas-chromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von *Alternaria*-Toxinen in Obst- und Gemüseerzeugnissen

Fresenius Z. Anal. Chem. **318** (6), 419–424

KING, A.D. und J.E. SCHADE (1984):

Alternaria toxins and their importance in food

J. Food Prot. **47** (11), 886–901

KOCH, K., J. PODLECH, E. PFEIFFER und M. METZLER (2005):

Total synthesis of alternariol

J. Org. Chem. **70**, 3275–3276

KRÁLOVÁ, J., J. HAJŠLOVÁ, J. POUSTKA, M. HOCHMAN, M. BJELKOVÁ und L. ODSTRČILOVÁ (2006):

Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: Monitoring pilot study

Czech J. Food Sci. **24** (6), 288–296

KÜCK, U., M. NOWROUSIAN, B. HOFF und I. ENGH (2009):

Schimmelpilze – Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung

Springer Verlag, Berlin; 27–29

KWAŚNA, H. (1992):

Ecology and nomenclature of *Alternaria*

In: Chelkowski, J. und A. Visconti (Hrsg.): *Alternaria – Biology, plant diseases and metabolites*

Elsevier, Amsterdam; 63–100

KWAŚNA, H. und B. KOSIAK (2003):

Lewia avenicola sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*

Mycol. Res. **107** (3), 371–376

LANIER, C., N. HEUTTE, E. RICHARD, V. BOUCHART, P. LEBAILLY und D. GARON (2009):

Mycoflora and mycotoxin production in oilseed cakes during farm storage

J. Agric. Food Chem. **57**, 1640–1645

LATIF, H. (2010):

Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of the mycotoxin fumigaclavine A

Diss. med. vet. Gießen

LAU, B.P.-Y., P.M. SCOTT, D.A. LEWIS, S.R. KANHERE, C. CLÉROUX und V.A. ROSCOE (2003):

Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages

J. Chromatogr. A **998**, 119–131

LEEPER, F.J. und J. STAUNTON (1984):

Biomimetic syntheses of polyketide aromatics from reaction of an orsellinate anion with pyrones and a pyrylium salt

J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1**, 1053–1059

LEHMANN, L., J. WAGNER und M. METZLER (2006):

Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells
Food Chem. Toxicol. **44**, 398–408

LI, F.-Q und T. YOSHIZAWA (2000):

Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China
J. Agric. Food Chem. **48**, 2920–2924

LIESENER, K., V. CURTUI, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2010):

Mycotoxins in horse feed
Mycotoxin Res. **26**, 23–30

LIU G.-T., Y.-Z. QIAN, P. ZHANG, W.-H. DONG, Y.-M. QI und H.-T. GUO (1992):

Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer
Chin. Med. J. **105** (5), 394–400

LOGRIECO, A. und A. VISCONTI (1990):

Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins
Plant Dis. **74** (6), 415–417

LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, G. MULÉ, A. MORETTI und G. PERRONE (2003):

Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some mediterranean crops
Eur. J. Plant Pathol. **109**, 645–667

LOGRIECO, A., A. MORETTI und M. SOLFRIZZO (2009):

Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks
World Mycotoxin Journal **2** (2), 129–140

MÄRTLBAUER, E.P. (1988):

Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren für den Nachweis von Mykotoxinen
(Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene) in Lebensmitteln
Diss. med. vet. München

MAGAN, N., G.R. CAYLEY und J. LACEY (1984):

Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain

Appl. Environ. Microbiol. **47** (5), 1113–1117

MAGNANI, R.F., G.D. DE SOUZA und E. RODRIGUES-FILHO (2007):

Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of alternaria brown spot

J. Agric. Food Chem. **55**, 4980–4986

MANNICH, C. und W. KRÖSCHE (1912):

Über ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin

Arch. Pharm. **250**, 647–667

MATYSIK, G. und H. GIRYN (1996):

Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *Alternaria* mycotoxins

Chromatographia **42** (9/10), 555–558

MAVUNGU DI, J.D., S. MONBALIU, M.-L. SCIPPO, G. MAGHUIN-ROGISTER, Y.-J. SCHNEIDER, Y. LARONDELLE, A. CALLEBAUT, J. ROBBENS, C. VAN PETEGHEM und S. DE SAEGER (2009):

LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements

Food Addit. Contam. **26** (6), 885–895

MIYAURA, N. und A. SUZUKI (1995):

Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds

Chem. Rev. **95**, 2457–2483

MONBALIU, S., C. VAN POUCKE, C. VAN PETEGHEM, K. VAN POUCKE, K. HEUNGENS und S. DE SAEGER (2009):

Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis

Rapid Commun. Mass Spectrom. **23**, 3–11

MONBALIU, S., C. VAN POUCKE, C. DETAVERNIER, F. DUMOULIN, M. VAN DE VELDE, E. SCHOETERS, S. VAN DYCK, O. AVERKIEVA, C. VAN PETEGHEM und S. DE SAEGER (2010):

Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method

J. Agric. Food. Chem. **58**, 66–71

MOTTA DA, S. und L. M. VALENTE SOARES (2000):

A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products

Braz. J. Microbiol. **31**, 315–320

MOTTA DA, S. und L. M. VALENTE SOARES (2001):

Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid

Food Addit. Contam. **18** (7), 630–634

MRI (Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel) (2008):

Lebensmittelverzehr der bundesdeutschen Bevölkerung nach Geschlecht und Altersgruppen.

In: Nationale Verzehrsstudie II (NVSII), Ergebnisbericht, Teil 2

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Karlsruhe; 29–91.

MÜCKE, W. und C. LEMMEN (2004):

Mykotoxikosen – Vergiftungen durch Schimmelpilze

In: Mücke, W. und C. Lemmen (Hrsg.), Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen

Ecomed-Biowissenschaften, Landsberg am Lech; 84

MÜLLER M., G. VON DER WAYDBRINK, M. PETERS, K. UMANN und W. SEYFARTH (2002):

Belastung von Winterweizen mit *Alternaria*-Mykotoxinen im Land Brandenburg

Mycotoxin Res. **18** (2), 217–220

NAICKER, D., G.J. MARAIS, H. VAN DEN BERG und M.G. MASANGO (2007):
Some fungi, zearalenone and other mycotoxins in chicken rations, stock feedstuffs, lucerne
and pasture grasses in the communal farming area of Rhenosterkop in South Africa
Jl. S. Afr. Vet Ass. **78** (2), 69–74

NAWAZ, S., K.A. SCUDAMORE und S.C. RAINBIRD (1997):
Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: I. determination of *Alternaria* mycotoxins
in oilseed rape meal and sunflower seed meal
Food Addit. Contam. A **14** (3), 249–262

NIELSEN, K.F., S. GRAVESEN, P.A. NIELSEN, B. ANDERSEN, U. THRANE und J.C.
FRISVAD (1999):
Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials
Mycopathologia **145**, 43–56

NIESCHLAG, E., H.K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):
Production of steroid antisera in rabbits
In: Cameron, E.H.D., S.G. Hillier und K. Griffiths (Hrsg.): Stereoid immunoassays.
Proceedings of the fifth Tenovus Workshop 1974
Alpha Omega Publ., Cardiff; 87–96

OLSEN, M. und A. VISCONTI (1988):
Metabolism of alternariol monomethyl ether by porcine liver and intestinal mucosa *in vitro*
Toxicol. in Vitro **2** (1), 27–29

ORVEHED, M., P. HÄGGBLOM und K. SÖDERHÄLL (1988):
Nitrogen inhibition of mycotoxin production by *Alternaria alternata*
Appl. Environ. Microbiol. **54** (10), 2361–2364

OSTRÝ, V., J. ŠKARKOVÁ, J. NEDELNIK, J. RUPRICH, H. und MORAVCOVA (2005):
Occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in
year 2003
Mycotoxin. Res. **21** (1), 23–25

OSTRÝ, V., J. ŠKARKOVÁ, I. PROCHÁZKOVÁ, A. KUBÁTOVÁ, F. MALÍŘ und J. RUPRICH (2007):

Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine

Czech. Mycol. **59** (2), 241–254

OSTRÝ, V. (2008):

Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs

World Mycotoxin Journal **1** (2), 175–188

OZCELIK, S., N. OZCELIK und L.R. BEUCHAT (1990):

Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography

Int. J. Food Microbiol. **11**, 187–194

PALMISANO, F., P.G. ZAMBONIN, A. VISCONTI und A. BOTTALICO (1989):

Determination of *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs by gradient elution liquid chromatography with electrochemical detection

Chromatographia **27**, (9/10), 425–430

PANIGRAHI, S. und S. DALLIN (1994):

Toxicity of the *Alternaria* spp. metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-I, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp (*Artemia salina* L) larvae

J. Sci. Food Agric. **66**, 493–496

PANIGRAHI, S. (1997):

Alternaria toxins

In: D´Mello, J.P.F. (Hrsg.): Handbook of plant and fungal toxicants

CRC Press, Boca Raton; 319–337

PATRIARCA, A., M.P. AZCARATE, L. TERMINIELLO und V.F. PINTO (2007):

Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat

Int. J. Food Microbiol. **119**, 219–222

PERO, R.W., R.G. OWENS und D. HARVAN (1971):

Gas and thin-layer chromatographic methods for analysis of the mycotoxins altenuene, alternariol, and alternariol monomethyl ether

Anal. Biochem. **43**, 80–88

PERO, R.W., H. POSNER, M. BLOIS, D. HARVAN und J.W. SPALDING (1973):

Toxicity of metabolites produced by the “*Alternaria*”

Environ. Health Perspect. **4**, 87–94

PFEIFFER, E., S. ESCHBACH und M. METZLER (2007a):

Alternaria toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*

Mycotoxin Res. **23** (3), 152–157

PFEIFFER, E., N.H. SCHEBB, J. PODLECH und M. METZLER (2007b):

Novel oxidative *in vitro* metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether

Mol. Nutr. Food Res. **51**, 307–316

PFEIFFER, E., B. BURKHARDT, M. ALTEMÖLLER, J. PODLECH und M. METZLER (2008):

Activities of human recombinant cytochrom P450 isoforms and human hepatic microsomes for the hydroxylation of *Alternaria* toxins

Mycotoxin Res. **24** (3), 117–123

PFEIFFER, E., C. SCHMIT, B. BURKHARDT, M. ALTEMÖLLER, J. PODLECH und M. METZLER (2009):

Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether *in vitro*: chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms

Mycotoxin Res. **25** (1), 3–10

PITT, J.I. und A.D. HOCKING (2009):

Fungi and food spoilage

Springer, Dordrecht; 60–64

POSE, G., V. LUDEMANN, J. SEGURA und V. FERNÁNDEZ PINTO (2004):

Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by Blackmold in Argentina

Mycotoxin Res. **20** (2), 80–86

POZZI, C.R., R. BRAGHINI, J.R.P. ARCARO, P. ZORZETE, A.L.M. ISRAEL, I.O. POZAR, S. DENUCCI und B. CORRÊA (2005):

Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazillian sunflower from sowing to harvest

J. Agric. Food Chem. **53**, 5824–5828

QIN, J.-C., Y.-M. ZHANG, L. HU, Y.-T. MA und J.-M. GAO (2009):

Cytotoxic metabolites produced by *Alternaria* No. 28, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo bilboa*

Nat. Prod. Commun. **4** (11), 1473–1476

RAISTRICK, H., C.E. STICKINGS und R. THOMAS (1953):

Studies in the biochemistry of micro-organisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*

Biochem. J. **55** (3), 421–433

REN, P., D.G. AHEARN und S.A. CROW JR. (1998):

Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles

J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **20**, 53–54

ROBIGLIO, A.L. und S.E. LOPEZ (1995):

Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina

Int. J. Food Microbiol. **24**, 413–417

ROIGÉ, M.B., S.M. ARANGUREN, M.B. RICCIO, S. PEREYRA, A.L. SORACI und M.O. TAPIA (2009):

Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina

Rev. Iberoam. Micol. **26** (4), 233–237

ROMERO, S.M., R.M. COMERIO, G. LARUMBE, A. RITIENI, G. VAAMONDE und V.FERNÁNDEZ PINTO (2005):

Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina

Int. J. Food Microbiol. **104**, 43–49

ROTEM, J. (1998):

The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Phathogenicity

The Amerian Phytophathological Society, Minnesota, USA

SACCHI, C., H.H.L. GONZÁLEZ, L.E. BROGGI, A. PACIN, S.L. RESNIK, G. CANO und D. TAGLIERI (2009):

Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina

Anim. Feed Sci. Technol. **152**, 330–335

SANCHIS, V., P.M. SCOTT und J.M. Farber (1988):

Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from red kidney beans

Mycopathologia **104**, 157–162

SAUER, D.B., L.M. SEITZ, R. BURROUGHS, H.E. MOHR, J.L. WEST, R.J. MILLERET und H.D. ANTHONY (1978):

Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest

J. Agric. Food Chem. **26** (6), 1380–1383

SCHADE, J.E. und A.D. KING JR. (1984):

Analysis of the major *Alternaria* toxins

J. Food Prot. **47** (12), 978–995

SCHRADER, T.J., W. CHERRY, K. SOPER, I. LANGLOIS und H.M. VIJAY (2001):
Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames
Salmonella test

Teratog. Carcinog. Mutagen. **21**, 261–274

SCHRADER, T.J., W. CHERRY, K. SOPER und I. LANGLOIS (2006):

Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin
mutagenicity in vitro

Mutat. Res. **606**, 61–71

SCHROEDER, H.W. und R.J. COLE (1977):

Natural occurrence of alternariols in discolored pecans

J. Agric. Food Chem. **25** (1), 204–206

SCHWARZ; C.; M. KREUTZER und D. MARKO (2012):

Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the
genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice

Toxicoll. Lett. **214**, 46-52

SCOTT, P.M. und D.R. STOLTZ (1980):

Mutagens produced by *Alternaria alternata*

Mutat. Res. **78**, 33–40

SCOTT, P.M. (1995):

Mycotoxin methodology

Food Addit. Contam. **12** (3), 395–403

SCOTT, P.M., D. WEBER und S.R. KANHERE (1997):

Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins

J. Chromatogr. A **765**, 255–263

SCOTT, P.M. (2001):

Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins

J. AOAC Int. **84** (6), 1809–1817

SCOTT, P.M. und S.R. KANHERE (2001a):

Chromatographic method for *Alternaria* toxins in apple juice

In: Trucksess, M.W. und A.E. Pohland (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology*, Vol 157: *Mycotoxins Protocols*

Humana Press Inc., Totowa; 225–234

SCOTT, P.M. und S.R. KANHERE (2001b):

Stability of *Alternaria* toxins in fruit juices and wine

Mycotoxin Res. **17**, 9–14

SCOTT, P.M. (2004):

Other mycotoxins

In: Magan, N. und M. Olsen (Hrsg.): *Mycotoxins in food – Detection and control*

CRC Press, Boca Raton; 406–440

SCOTT, P.M., G.A. LAWRENCE und B.P.-Y. LAU (2006):

Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins (2006):

Mycotoxin Res. **22**, 142–147

SEITZ, L.M., D.B. SAUER, H.E. MOHR, R. BURROUGHS und J.V. PAUKSTELIS (1975):

Metabolites of *Alternaria* in grain sorghum. Compounds which could be mistaken for zearalenone and aflatoxin

J. Agric. Food Chem. **23** (1), 1–4

SEITZ, L.M. und H.E. MOHR (1976):

Analysis of *Alternaria* metabolites by high-pressure liquid chromatography

Anal. Biochem. **70**, 224–230

SIEGEL, D., M. FEIST, M. PROSKE, M. KOCH und I. NEHLS (2010):

Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking

J. Agric. Food Chem. **58**, 9622–9630

SLIFKIN, M.K. und J. SPALDING (1970):

Studies of the toxicity of *Alternaria mali*

Toxicol. Appl. Pharmacol. **17**, 375–386

SMEDSGAARD, J. (1997):

Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures

J. Chromatogr. A **760**, 264–270

SÖDERHÄLL, K., E. SVENSSON und T. UNESTAM (1978):

Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*

Appl. Environ. Microbiol. **36** (5), 655–657

SOLFRIZZO, M., A. DE GIROLAMO, C. VITTI und A. VISCONTI (2004a):

Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots

J. AOAC. Int. **87** (1), 101–106

SOLFRIZZO, M., C. VITTI, A. DE GIROLAMO, A. VISCONTI, A. LOGRIECO und F.P. FANIZZI (2004b):

Radicinols and radicinin phytotoxins produced by *Alternaria radicina* on carrots

J. Agric. Food Chem. **52**, 3655–3660

SOLFRIZZO, M., A. DE GIROLAMO, C. VITTI, K. TYLKOWSKA, J. GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA, D. SZOPIŃSKA und H. DORNA (2005):

Toxicogenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants

Food Addit. Contam. **22** (4), 302–308

SÓTI, F., M. INCZE, M. KAJTÁR-PEREDY, E. BAITZ-GÁCS, L. IMRE und L. FARKAS (1977):

Synthese des Alternariols und des Alternariol-9-methylethers

Chem. Ber. **110**, 979–984

SPANJER, M.C., P.M. RENSEN und J.M. SCHOLTEN (2008):

LC-MS/MS multi method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs

Food Addit. Contam. **25** (4), 472–489

STAUNTON, J. und K.J. WEISSMAN (2001):

Polyketide biosynthesis: a millennium review

Nat. Prod. Rep. **18**, 380–416

STINSON, E.E., D.D. BILLS, S.F. OSMAN, J. SICILIANO, M.J. CEPONIS und E.G. HEISLER (1980):

Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries

J. Agric. Food Chem. **28**, 960–963

STINSON, E.E., S.F. OSMAN, E.G. HEISLER, J. SICILIANO und D.D. BILLS (1981):

Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons

J. Agric. Food. Chem. **29**, 790–792

SULYOK, M., R. KRŠKA und R. SCHUHMACHER (2007):

A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples

Anal. Bioanal. Chem. **389**, 1505–1523

SUTIC, M., J.C. AYRES und P.E. KOEHLER (1972):

Identification and aflatoxin production of molds isolated from country cured hams

Appl. Microbiol. **23** (3), 656–658

TAN, N., Y. TAO, J. PAN, S. WANG, F. XU, Z. SHE, Y. LIN und E.B.G. JONES (2008):

Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240

Chem. Nat. Compd. **44** (3), 296–300

TAN, K.-C., R.D. TRENGOVE, G.L. MAKER, R.P. OLIVER und P.S. SOLOMON (2009):
Metabolite profiling identifies the mycotoxin alternariol in the pathogen *Stagonospora nodorum*

Metabolomics **5**, 330–335

TANAHASHI, T., Y. TAKENAKA, N. NAGAKURA und N. HAMADA (2003):
6*H*-Dibenzo[*b,d*]pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis* spp.
and their biosynthetic origin

Phytochemistry **62**, 71–75

TERMINIELLO, L., A. PATRIARCA, G. POSE und V.FERNÁNDEZ PINTO (2006):
Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean
tomato puree

Mycotoxin Res. **22** (4), 236–240

TEUSCHER, F. (2005):

Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen des
Indischen und Pazifischen Ozeans

Diss. rer. nat. Düsseldorf

THOMMA, B.P.H.J. (2003):

Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite

Mol. Plant Pathol. **4** (4), 225–236

TIEMANN, U., W. TOMEK, F. SCHNEIDER, M. MÜLLER, R. PÖHLAND und J.
VANSELOW (2009):

The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect progesterone
synthesis in porcine granulosa cells *in vitro*

Toxicol. Lett. **186**, 139–145

TORRES, A., S. CHULZE, E. VARSAVASKY und M. RODRIGUEZ (1993):

Alternaria metabolites in sunflower seeds. Incidence and effect of pesticides on their
production

Mycopathologia **121**, 17–20

TORRES, A., H.H.L. GONZÁLEZ, M. ETCHEVERRY, S.L. RESNIK und S. CHULZE (1998):

Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize

Food Addit. Contam. **15** (1), 65–60

TÓTH, B., M. CSŐSZ, J. DIJKSTERHUIS, J.C. FRISVAD und J. VARGA (2007):

Pithomyces chartarum as a pathogen of wheat

J. Plant Pathol. **89** (3), 405–408

TOURNAS, V.H. und M.E. STACK (2001):

Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria alternata* grown on fruits at various temperatures

J. Food Prot. **64** (4), 528–532

TURNER, N.W., S. SUBRAHMANYAM und S.A. PILETSKY (2009):

Analytical methods for determination of mycotoxins: A review

Anal. Chim. Acta **632**, 168–180

USLEBER, E. und E. MÄRTLBAUER (1998):

A limited survey of cereal foods from the German market for *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins)

Arch. Lebensmittelhyg. **49** (2), 42–45

USLEBER, E., V. RENZ, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1992):

Studies on the application of enzyme immunoassays for the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone

J. Vet. Med. B **39**, 617–627

VIJAYALAKSHMI, M. und A.S. RAO (1988):

Toxin production by *Alternaria alternata* pathogenic to brinjal (*Solanum Melongena* L.)

Curr. Sci. **57** (3), 150

VIÑAS, I., J. BONET und V. SANCHIS (1992):

Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples

Lett. Appl. Microbiol. **14**, 284–287

VIÑAS, I., J. PALMA, S. GARZA, A. SIBILIA, V. SANCHIS und A. VISCONTI (1994):

Natural occurrence of aflatoxin and *Alternaria* mycotoxins in oilseed rape from Catalonia (Spain): Incidence of toxigenic strains

Mycopathologia **128**, 175–179

VISCONTI, A., A. LOGRIECO und A. BOTTALICO (1986):

Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives - their production and possible transfer into the oil

Food Addit. Contam. **3** (4), 323–330

VISCONTI, A., A. SIBILIA und C. SABIA (1992):

Alternaria alternata from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings

Mycotoxin Res. **8**, 9–16

VISHWANATH, V., M. SULYOK, R. LABUDA, W. BICKER und R. KRŠKA (2009):

Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Anal. Bioanal. Chem. **395**, 1355–1372

WATANABE, I., M. KAKISHIMA, Y. ADACHI und H. NAKAJIMA (2007):

Potential mycotoxin productivity of *Alternaria alternata* isolated from garden trees

Mycotoxins **57** (1), 3–9

WEBLEY, D.J., K.L. JACKSON, J.D. MULLINS, A.D. HOCKING und J.I. PITT (1997):

Alternaria toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995–1996 Australian harvest

Aust. J. Agric. Res. **48**, 1249–1255

WEIDENBÖRNER, M. (1999):

Lebensmittel Mykologie

Behr's Verlag, Hamburg; 41-43

WHO (World Health Organization) (2002):

Food Safety Programme – 2002

WHO Global strategy for food safety: safer food for better health

http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy_en.pdf (13.03.2011)

WILSON, M.B. und P.K. NAKANE (1976):

The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation

J. Immunol. Methods **12**, 171–181

WITTKOWSKI, M., W. BALTES, W. KRÖNERT und R. WEBER (1983):

Bestimmung von *Alternaria*-Toxinen in Obst- und Gemüseerzeugnissen

Z. Lebensm. Unters. Forsch. **177**, 447–453

WÖRNER, W (1990):

Kopplung von Peroxidase

In: Peters, J.H. und H. Baumgarten (Hrsg.): Monoklonale Antikörper

Springer Verlag, Berlin; 294–296

WOLLENHAUPT, K., F. SCHNEIDER und U. TIEMANN (2008):

Influence of alternariol (AOH) on regulator proteins of cap-dependent translation in porcine endometrial cells

Toxicol. Lett. **182**, 57–62

XIAO, H., J.R. CLARKE, R.R. MARQUARDT und A.A. FROHLICH (1995):

Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays

J. Agric. Food. Chem. **43**, 2092–2097

YANG, C.S. (1980):

Research on esophageal cancer in China: a review

Cancer Res. **40**, 2633-2644

ZAJKOWSKI, P., J. GRABARKIEWICZ-SZCĘSNA und R. SCHMIDT (1991):

Toxicity of mycotoxins produced by four *Alternaria* species to *Artemia salina* larvae

Mycotoxin Res. **7**, 11–15

ZAKRZEWSKA, E. (1991):

The occurrence of *Fusarium* and *Alternaria* on faba bean seed

Mykotoxin Res. **7**, 16–18

ZHEN, Y.Z., Y.M. XU, G.T. LIU, J. MIAO, Y.D. XING, Q.L. ZHENG, Y.F. MA, T. SU,
X.L. WANG, L.R. RUAN, J.F. TIAN, G. ZHOU und S.L. YANG (1991):

Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an
area of high incidence of oesophageal cancer – Linxian, China

In: O'Neill, I.K., J. Chen und H. Bartsch (Hrsg.): Relevance to human cancer of *N*-Nitroso
compounds, tobacco smoke and mycotoxins

International Agency for Research on Cancer, Lyon; 253–257

9 Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
AOH-FA-BSA-HRP	Alternariol-HRP-Konjugat gekoppelt mittels Natriumperjodat
AOH-CDI-BSA	Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels CDI
AOH-CDI-HRP	Alternariol-HRP-Konjugat gekoppelt mittels CDI
AOH-CDI-KLH	Alternariol-KLH-Konjugat gekoppelt mittels CDI
AOH-FA-BSA	Alternariol-BSA-Konjugat gekoppelt mittels FA
AOH-FA-HRP	Alternariol-HRP-Konjugat gekoppelt mittels FA
AOH-FA-KLH	Alternariol-KLH-Konjugat gekoppelt mittels FA
a_w -Wert	Wasseraktivität
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	bovines Serumalbumin
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
DAD	Diodenarraydetektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Elektrochemisch
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittel-sicherheit
EIA	enzyme immunoassay, Enzymimmuntest
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, Enzymimmuntest
FA	Formaldehydlösung (37%ig)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FID	Flammenionisationsdetektion
FL	Fluoreszenz
GC	Gaschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
K	Kaninchen
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LC	liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie

mAk	monoklonale Antikörper
mAK-AOH	monoklonale-Anti-Alternariol-Antikörper
mAk-EIA	kompetitiver indirekter Enzymimmunttest mit mAk-AOH zum Nachweis von Alternariol
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
pAK	polyklonale Antikörper
pAk-AOH	polyklonale-Anti-Alternariol-Antikörper
pAk-EIA	kompetitiver indirekter Enzymimmunttest mit pAk-AOH zum Nachweis von Alternariol
PBS I	phosphatgepufferte (0,014 mol/l) Salzlösung, pH 7,4
PBS II	phosphatgepufferte (0,027 mol/l) Salzlösung, pH 7,4
SIDA	stable isotope dilution assay, Isotopenverdünnungsanalyse
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung sowie sein unermüdliches Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. V. Curtui danke ich herzlich für die gründliche Einarbeitung und die hervorragende Betreuung zu Beginn der Arbeit.

Ich danke der Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung (Ismaning, Deutschland) für die finanzielle Unterstützung.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Frau Margit Kessler, Frau Renate Stumpf und Frau Christa Zeidler für die tatkräftige Unterstützung und dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, insbesondere meinen ehemaligen Kollegen Herrn Dr. Hadri Latif, Frau Isabell Theis und Frau Dr. Madeleine Groß für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Meike Hammer für die Unterstützung bei der Covergestaltung. Herrn Manfred Schramm danke ich für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit. Herrn Stephan C. Hammer danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, die chemischen Tipps, die Motivation und die immer gewährte Unterstützung sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei Bärbel, Frank und Reinhard sowie bei meinen Freunden für die Unterstützung und ihr Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Yvonne Ackermann

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

ACKERMANN, Y., V. CURTUI, R. DIETRICH, M. GROSS, H. LATIF, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2011):

Widespread occurrence of low levels of Alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies

J. Agric. Food Chem. **59** (12), 6360–6368

ACKERMANN, Y., V. CURTUI, R. DIETRICH, M. GROSS, H. LATIF, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2010):

Nachweis von Alternariol in Lebensmitteln: Eine vergleichende Studie mit mono- und polyklonalen Antikörpern

51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: **28.09.-1.10.2010**, 118

ACKERMANN, Y., V. CURTUI, R. DIETRICH, M. GROSS, H. LATIF, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2010):

Comparative immunochemical assessment of alternariol in food using monoclonal and polyclonal antibodies

32. Mycotoxin-Workshop Lyngby (Dänemark), 14.-16.06.2010, Conference Abstracts **32**, 77

ACKERMANN, Y., V. CURTUI und E. USLEBER (2009):

Immunochemical assessment of alternariol in food

31. Mykotoxin-Workshop Münster, 15.-17.06.2009, Conference Abstracts **31**, 56

ACKERMANN, Y., V. CURTUI und E. USLEBER (2008):

Entwicklung eines Enzymimmuntests zum Nachweis von Alternariol

49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: **29.09.-2.10.2008**, 196

ACKERMANN, Y., V. CURTUI und E. USLEBER (2008):

Development of an enzyme immunoassay for alternariol

30. Mycotoxin-Workshop, Utrecht (Niederlande), 28.04-30.04.2008, Conference Abstracts

30, 49



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6135-7



9 17 8 3 8 3 5 19 6 1 3 5 7