



EVALUIERUNG UND ANWENDUNG NEUARTIGER ENZYMIMMUNOLOGISCHER VERFAHREN FÜR MUTTERKORNALKALOIDE IN LEBENSMITTELN

LYDIA ROLOFF

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2010

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 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 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. E. Usleber**

**Evaluierung und Anwendung neuartiger
enzymimmunologischer Verfahren für
Mutterkornalkaloide in Lebensmitteln**

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

eingereicht von

Lydia Roloff
Tierärztin aus Warburg

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
Prof. Dr. E. Petzinger**

Tag der Disputation: 20.04.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
2.	Schrifttum.....	6
2.1.	Allgemeines zu Ergotalkaloiden	6
2.2.	Chemische Eigenschaften und pharmakologische Wirkung der Ergotalkaloide	8
2.3.	Bewertung von Ergotalkaloiden und Risikoabschätzung hinsichtlich der tolerierbaren Tagesdosis.....	17
2.4.	Vorkommen von Mutterkorn und Ergotalkaloiden in Getreide und Getreideerzeugnissen sowie rechtliche Regelungen	18
2.5.	Nachweis von Ergotalkaloiden.....	20
2.5.1.	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	21
2.5.1.1.	HPLC und LC-MS/MS.....	21
2.5.2.	Immunologische Verfahren.....	22
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Materialien und Geräte.....	26
3.1.1.	Mykotoxine	26
3.1.2.	Puffer und Lösungen	26
3.1.3.	Immunreagenzien	27
3.1.4.	Chemikalien und Biochemika	27
3.1.5.	Geräte	30
3.1.6.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	31
3.1.7.	Probenmaterial	31
3.2.	Methoden.....	32
3.2.1.	Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden	33
3.2.1.1.	Herstellung und Überprüfung der Toxinstandards.....	33
3.2.1.2.	Herstellung und Überprüfung der Enzymkonjugate	33
3.2.1.2.1.	Herstellung der Ergocornin-Protein- bzw. Enzymkonjugate	35
3.2.1.2.2.	Überprüfung der Enzymkonjugate	37
3.2.1.3.	Immunisierung von Kaninchen	37
3.2.1.4.	Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters.....	38
3.2.1.5.	Überprüfung und Untersuchungen zur Optimierung des Testsystems für den Nachweis von Ergotalkaloiden.....	40

3.2.1.5.1.	Überprüfung verschiedener Immunreagenzien	40
3.2.1.5.2.	Bestimmung der Spezifität der EIAs zum Nachweis von Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin bzw. Ergocornin.....	41
3.2.2.	Untersuchung von Probenmaterialien	42
3.2.2.1.	Vorbereitung und Extraktion.....	42
3.2.2.2.	Untersuchung von Probenmaterialien mittels EIA.....	43
3.2.2.3.	HPLC-Analysen	44
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Antikörper gegen Ergotalkaloide	45
4.2.	Testsensitivität.....	45
4.3.	Testspezifität	51
4.4.	Entwicklung einer Schnellmethode zur Extraktion von Ergotalkaloiden	60
4.5.	Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests in künstlich kontaminierten Probenmaterialien (Getreide und Getreideerzeugnisse).....	61
4.6.	Validierung des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests.....	63
4.7.	Vorkommen von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln	72
5.	Diskussion	77
5.1.	Vorteile der Schnellmethode zur Extraktion.....	77
5.2.	Testspezifität	77
5.3.	Unspezifische Kreuzreaktionen beim Ergocornin-EIA.....	81
5.4.	Validierung des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests - bestimmbarer Konzentrationsbereich und Nachweisgrenze	82
5.5.	Zusammensetzung des Ergotalkaloidgehalts in Getreide und Getreideerzeugnissen des deutschen Marktes	83
5.6.	Untersuchungen zum Vorkommen von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln unter Verwendung des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest.....	85
6.	Zusammenfassung.....	89
7.	Summary	90

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillatum
AK	Antikörper
BAGKF	Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
BEE	Besondere Erntermittlung
BFEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
C	Kohlenstoff
CDI	Carbonyldiimidazol
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
EA	Ergotalkaloid
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
FD	Fluoreszenzdetektion
g	Schwerebeschleunigung
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Hemisuccinat
IAC	Immunoaffinity Column
Ig	Immunglobulin
k.A.	keine Angaben
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LC	Liquid Chromatographie
LOEL	Low Observed Effect Level
M	Mol
MS	Massenspektrometrie
Max	Maximalwert

max	maximal
Med	Median
Min	Minimalwert
mgr.	mittelgradig
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOEL	No Observed Effect Level
Nr.	Nummer
NWG	Nachweisgrenze
p.a.	pro analysi
PAK	Polyklonale Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline (Natriumphosphat-Puffer)
Pos	Positiv
RT	Raumtemperatur
SCX	Strong Cationic Exchange
STABW	Standardabweichung
TDI	Tolerable Daily Intake
TM	Trockenmasse
VK	Variationskoeffizient
Vol	Volumen
VO	Verordnung
v/v	Volume per Volume
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
90P	90stes Perzentil
$\bar{s}$	Standardabweichung
Syn.	Synonym

ZEBS

Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für
Umweltchemikalien des Bundesgesundheits-
amtes

$\bar{x}$

arithmetischer Mittelwert

1. Einleitung

Mykotoxine haben die Menschheit seit Beginn des organisierten Nahrungsmittelanbaus bedroht. Der Ergotismus, eine Krankheit, die nach Verzehr von Mutterkorn auftritt, wird bereits in der Bibel beschrieben (Gesellschaft für Mykotoxinforschung e. V., 2000).

Mutterkorn, das verfestigte Mycel des Pilzes *Claviceps purpurea* aus der Gruppe der Ascomyceten, siedelt auf über 400 Wirtspflanzen. Darunter befinden sich verschiedenste Gräser und Getreidearten. Bevorzugte Wirtspflanzen sind Roggen und Hybridroggen, aber auch in geringerem Maße andere Getreide wie zum Beispiel Weizen und Dinkel (LAVES, 2004b).

Verantwortlich für die stark giftige Wirkung des Mutterkorns sind eine Reihe von verschiedenen Alkaloiden, auch Ergot- oder Mutterkornalkaloide genannt, die als Amide der Lysergsäure identifiziert wurden und somit verwandt sind mit dem Rauschgift LSD (Lysergsäurediethylamid). Der Gehalt dieser giftigen Ergotalkaloide in Mutterkorn liegt durchschnittlich bei 0,2 %, kann aber auch bis zu 1 % der Trockenmasse ausmachen. So treten je nach Menge der Aufnahme von Ergotalkaloiden dosisabhängige Symptome wie Erbrechen, Durchfall, Krämpfe und Delirium auf. Im Extremfall sind Todesfälle möglich. Des Weiteren kann es nach Aufnahme von Mutterkorn zur Gefühllosigkeit der Gliedmaßen, zu epileptischen Anfällen und zu Zuständen der Verwirrtheit kommen (*Ergotismus convulsivus*, Kribbelkrankheit oder Krampfseuche). Beim *Ergotismus gangraenosus* (Mutterkornbrand oder Antoniusfeuer) wurden schon im Mittelalter Symptome wie Absterben und blutfreier Verlust von Extremitäten, „Brandigwerden“ oder Gangränbildung beobachtet und beschrieben. Ergotismus war im Mittelalter vermutlich eine verheerende, seuchenartig wirkende Erkrankung.

Obwohl durch die Verbesserung der landwirtschaftlichen Produktion derartig dramatische Intoxikationen heute in Mitteleuropa praktisch nicht mehr vorkommen, stellt insbesondere eine fortwährende Aufnahme von Ergotalkaloiden nach wie vor ein Problem dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zuverlässige und praktikable Methoden zum Routine-Nachweis von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln auf Getreidebasis zu erarbeiten, sowie die Belastung der genannten Lebensmittelgruppen mit diesen Toxinen in einer großen Probenzahl zu ermitteln. Darüber hinaus sollten empfindliche Routinetests für Ergotalkaloide in Konsummilch erarbeitet werden, um eine erste Abschätzung einer potentiellen Kontamination in diesem Bereich zu ermöglichen. An der Professur für Milchwissenschaften waren im Rahmen eines Forschungsprojektes Enzymimmuntests für Ergometrin, Ergotamin

und α -Ergocryptin entwickelt worden, die für Anwendungsstudien zur Verfügung standen. Darüber hinaus sollten in dieser Arbeit Antikörper gegen Ergocornin entwickelt werden und diese im Enzymimmuntest validiert werden.

2. Schrifttum

2.1. Allgemeines zu Ergotalkaloiden

Mutterkorn, das verfestigte Mycel des Pilzes *Claviceps purpurea*, kann auf allen Gräsern und damit auf allen Getreidearten vorkommen. Mutterkorn enthält in wechselnder Zusammensetzung eine Reihe von Alkaloiden, die eine die Gesundheit beeinträchtigende Wirkung aufweisen (Gesellschaft für Mykotoxinforschung e. V., 2000). So treten dosisabhängig Symptome wie Erbrechen, Durchfall, Herzkrämpfe und Delirium auf, im Extremfall sind Todesfälle möglich. Außerdem kann es zur Gefühllosigkeit von Gliedmaßen, zu epileptischen Anfällen und zur Verwirrtheit führen (*Ergotismus convulsivus*, Kribbelkrankheit oder Krampfseuche). Beim *Ergotismus gangraenosus* (Mutterkornbrand oder Antoniusfeuer) wurden schon im Mittelalter Symptome wie Absterben und blutfreier Verlust von Extremitäten, "Brandigwerden" oder Gangränbildung beschrieben (Roth et al., 1990; Urga et al., 2002).

Das Ergotalkaloidspektrum in *Claviceps purpurea* wird durch einfache Lysergsäureamide sowie die klassischen Ergopeptid-Alkaloide dominiert (Flieger et al., 1997). In anderen Spezies überwiegen dagegen deutlich andere Gruppen. Beispielsweise bildet *Aspergillus fumigatus* die sogenannten Clavine (Fumigaclavin A-C, Festuclavin), die an C8 eine Methylgruppe sowie zusätzliche Substituenten an C9 aufweisen. Daneben können durch Endophyten-Befall (*Neotyphodium coenophialum*) Ergotalkaloide bzw. Ergoline in zahlreichen Pflanzen aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) gebildet werden (Miles, 1998). Häufigere Toxinnachweise sind für das Genus *Festuca*, (z. B. *Festuca arundinacea*, dt. Rohr-Schwingel, engl. tall fescue) oder für das Genus *Lolium* (z. B. *Lolium perenne*, dt. deutsches Weidelgras, engl. perennial ryegrass) beschrieben worden. Einige Spezies von *Neotyphodium* bilden z. B. auch das Ergopeptid Ergovalin (Panaccione, 2005). In *Lolium*-Arten in Deutschland wurden zudem Alkaloide vom Lolitrem-Typ nachgewiesen (Oldenburg, 1997).

Da sich die Bedingungen der landwirtschaftlichen Produktion enorm verbessert haben, stellt nun nicht mehr die akute Intoxikation, sondern eher die kontinuierliche und chronische Aufnahme kleiner Mengen von Ergotalkaloiden nahe der therapeutisch effektiven Dosis ein Problem dar.

Die jährliche Ermittlung der Beschaffenheitsmerkmale bei Getreide durch die „Besondere Ernteterminnung (BEE)“ an der BAGKF (Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und

Fettforschung) nach dem Agrarstatistikgesetz (§ 47, Abs. 2 und 4) zeigt, dass vor allem Roggen, in geringerem Maße aber auch Weizen, mehr oder weniger stark mit Mutterkorn kontaminiert sind. Vor allem in Jahren, in denen im Vorsommer eine feuchtkühle Witterung herrscht, ist mit einem erhöhten Mutterkornbesatz zu rechnen.

Der Grund für die besonders hohe Anfälligkeit des Roggens kann damit erklärt werden, dass er im Gegensatz zu den Selbstbestäubern wie Weizen und Gerste eine Fremdbestäubung zur Fruchtbildung benötigt. Daher stehen die Blüten des Roggens wesentlich länger offen und eine Infektion, vor allem in nassen Jahren und bei niederliegenden Halmen, ist viel wahrscheinlicher (LAVES, 2004b). Zudem wird in Deutschland in den letzten Jahren im Hybridroggenanbau ein verstärkter Befall mit Mutterkorn festgestellt. Im Jahre 1998 war der Mutterkornbesatz beim Roggen im Saarland und Rheinland so gravierend, dass gebietsweise der Hybridroggen nicht geerntet werden konnte (Mielke, 2000).

Zugelassene Fungizide zur Bekämpfung von *Claviceps purpurea* auf den Feldern stehen nicht zur Verfügung. Als beste Methode wird die Züchtung widerstandsfähiger bzw. resistenter Getreidesorten angesehen (BBA, 1999). Allerdings ist damit in näherer Zukunft nicht zu rechnen. Daher dürften Mutterkornalkaloide als natürlich vorkommende Kontaminanten ein langfristiges Problem darstellen. In Futtergräsern stellt sich zudem die Frage einer Belastung mit Ergotalkaloiden durch Endophyten (Miles et al., 1996; Cagaš et al., 1999).

Bisher wird der Gehalt an Mutterkorn in Getreide ausschließlich über den Nachweis der Sklerotien bestimmt. In der Europäischen Union war lediglich für Roggen als Interventionsgetreide ein Grenzwert von 0,05 % Mutterkorn festgelegt. Obwohl Roggen seit 2004/2005 nicht mehr der Intervention unterliegt, wurde dieser Wert als inoffizieller *de facto* Qualitätsstandard beibehalten. Untersuchungen aus verschiedenen Ländern zeigten, dass der Gesamtalkaloidgehalt in Mutterkorn durchschnittlich bei 0,2 % (in Ausnahmefällen bis über 1 %) liegt. Rechnet man mit einem mittleren Ergotalkaloidgehalt von 0,2 %, so ergibt sich aus der bisherigen Regelung von 0,05 % Mutterkorn ein *de facto* tolerierter Gesamtalkaloidgehalt im Getreide von 1000 µg/kg (Wolff et al., 1988). Durch Reinigungs- und Verarbeitungsschritte wird dieser Gehalt in der Regel zwar deutlich reduziert, aber Kontaminationen von einigen 100 µg/kg sind nicht auszuschließen. Dies deckt sich mit neueren Daten der BAGKF im Rahmen der BEE. Untersuchungen aus der Schweiz (Baumann

et al., 1985) zeigten ebenfalls, dass Ergotalkaloide von mehreren 100 µg/kg in Speisegetreidekörnern nicht ungewöhnlich sind, vor allem in Roggen.

Zulässige Höchstmengen für Ergotalkaloide in Lebensmitteln oder Futtermitteln wurden bisher nicht festgelegt. Vor allem die Lebensmittelgruppen Speisegetreidekörner, Getreidemehle, Brot sowie Säuglings- und Kleinkindernahrung sind aufgrund der hohen Verzehrsmengen im Hinblick auf den Schutz des Verbrauchers vor diesen Toxinen wichtig. Untersuchungen mit repräsentativen Probenzahlen und vereinfachten Untersuchungsverfahren zur Belastung dieser Lebensmittelgruppen, vor allem der Säuglings- und Kleinkindernahrung, mit Ergotalkaloiden fehlen derzeit noch. Zum Übergang von Ergotalkaloiden in die Milch liegen teilweise widersprüchliche Angaben vor, bzw. ältere Literaturangaben wurden zunehmend angezweifelt. Schumann et al. (2009) konnten beispielsweise nach Verfütterung einer Ration mit Ergotgehalten von 500 - 620 µg/kg an Milchkühe keine Rückstände in Milch nachweisen, allerdings bei einer Nachweisgrenze von lediglich 5 µg/kg je Alkaloid.

Berichte aus den letzten Jahren über eine erhöhte Belastung insbesondere von Roggen mit Mutterkornalkaloiden führten daher jüngst zu einer intensivierten Diskussion über mögliche Gesundheitsrisiken für den Verbraucher und die Tiergesundheit. Besondere Erwähnung verdient hierbei eine Evaluation des Scientific Panels on Contaminants in the Food Chain. Bereits 2003 wies das frühere EU „Scientific Committee on Animal Nutrition“ darauf hin, dass Höchstmengen für Ergotalkaloide - anstatt einer Regulierung des Gehalts an Ergot-Sklerotien - zu bevorzugen wären. Am 22. Januar 2004 veröffentlichte das BfR eine Stellungnahme zu hoch mit Ergotalkaloiden belasteten Mehlen, in der die Festlegung von Höchstmengen empfohlen wird (BfR, 2004). Aber auch seitens der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wurden im Jahre 2005 Forderungen nach validierten Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtermitteln laut (Krska und Crews, 2008).

2.2. Chemische Eigenschaften und pharmakologische Wirkung der Ergotalkaloide

Das eigentliche toxische Prinzip der Mutterkornvergiftung stellen die sogenannten Ergotalkaloide dar. Diese leiten sich von der Lysergsäure ab. Da Lysergsäure in zwei isomeren Formen vorkommen kann, liegen auch die Ergotalkaloide jeweils in zwei Formen

vor, die mit den Namensendungen -in bzw. -inin unterschieden werden. Die Zusammensetzung des Gesamtalkaloidgehalts in den Sklerotien ist variabel.

Mutterkornalkaloide bzw. deren Grundgerüste können zudem synthetisch hergestellt werden (Mann und Barbey, 1995)

Die für die Entwicklung immunchemischer Verfahren wichtigen strukturellen Aspekte der Ergotalkaloide seien im Folgenden kurz dargestellt: chemisch leiten sich die Ergotalkaloide vom Ergolin ab, einem tetracyclischen, einen Indolring enthaltendes Ringsystem (Abbildung 1). Von diesem leiten sich zum einen die Clavine ab, die vor allem in *Aspergillus fumigatus* (z. B. Fumigaclavin) und in *Neotyphodium spp.* (z. B. Chanoclavin) vorkommen, zum anderen die einfachen Lysergsäureamid-Verbindungen (z. B. Ergometrin) sowie die komplexer aufgebauten Ergopeptide (z. B. Ergotamin). Die letzten beiden Gruppen werden dabei in unterschiedlicher Ausprägung sowohl vom klassischen Mutterkorn (*Claviceps spp.*) als auch von Endophyten (*Neotyphodium spp.*) gebildet.

Ergolin	
Lysergsäure (5 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-Methyl-9,10-didehydro-ergolin-8-carbonsäure D-(+)-6-Methyl-9,10-didehydro-ergolin-8-carbonsäure)	

Abbildung 1: Strukturformeln und Ringnummerierungssystem von Ergolin und der D(+)-Lysergsäure (8*R* 5*R*). Alle Ergotalkaloide weisen an C5 die *R*-Chiralität auf. Durch reversible Isomerisierung an C8 der Lysergsäure entsteht die Isolysergsäure. Die daraus abgeleiteten, pharmakologisch inaktiven Isomere der Ergotalkaloide (8*S* 5*R*) werden mit der Endung -inin bezeichnet. Durch Hydrierung der Doppelbindung zwischen C9 und C10 entsteht die Dihydro-Lysergsäure bzw. die entsprechenden Dihydro-Ergotalkaloide (Hofmann, 1964). Letztere sind pharmakologisch aktiv, besitzen jedoch teilweise andere Wirkungsstärke (Schiff, 2006).

Hinsichtlich der chemischen Struktur ist das Ergometrin (Syn. Ergonovin) eines der einfachsten Ergotalkaloide (Abbildung 2). Die Mehrzahl der in Getreide vorkommenden Ergotalkaloide gehört jedoch zur Gruppe der Ergopeptide. Nach Hofmann (1964) bestehen die Ergopeptide aus den Bausteinen L-Prolin, NH_3 , einer α -Ketosäure sowie einem variablen Peptid. In einer anderen Darstellungsweise ist die Substitution der Lysergsäure über ein Tripeptid definierbar (Tabelle 1). Dieses Tripeptid (Abbildung 3) erhöht die Molmasse im Vergleich zu Ergometrin (325,4 g/mol) auf fast das Doppelte (z. B. Ergotamin 581,7 g/mol) und ist im Hinblick auf die immunologischen Eigenschaften als Hapten von großer Bedeutung bzw. stellt die Hauptschwierigkeit bei der Herstellung gruppenspezifischer Antikörper dar.

Aus der Zusammensetzung dieses Tripeptids ergeben sich Wahrscheinlichkeiten für Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen eine Verbindung mit den jeweils anderen Verbindungen. Zum Beispiel dürfte die Anwesenheit bzw. das Fehlen des Phenylalanin-Rests

eine größere Auswirkung besitzen als der Austausch eines Valin-Rests durch einen Alanin-Rest. Eine entsprechende Sortierung der einzelnen Peptid-Ergotalkaloide, wie sie von uns aufgrund der bisher verfügbaren Literatur postuliert wurde, ist in Abbildung 4 dargestellt. Nicht dargestellt sind jeweils die dazugehörigen -inin Formen. Grundsätzlich ist die Stabilität der Ergotalkaloide in der -in Form im schwach sauren Milieu am höchsten, während im wässrigen Milieu und insbesondere im alkalischen Milieu eine rasche Umwandlung in die -inin Form stattfindet. Dies ist auch bei der Synthese der entsprechenden Immunreagenzien zu berücksichtigen.

Tabelle 1: Periodisches System der Ergotalkaloide (Ergopeptide), modifiziert nach Hofmann (1964).

Untergruppe	Alkaloid	Peptidteil besteht aus			Summenformel
Ergotamin- gruppe	Ergotamin	L-Prolin	α -Hydroxyalanin	L-Phenylalanin	C33H35N5O5
	Ergosin			L-Leucin	C30H37N5O5
	Ergovalin			L-Valin	C29H35N5O5
Ergotoxin- gruppe	Ergocristin		α -Hydroxyvalin	L-Phenylalanin	C35H39N5O5
	Ergocryptin			L-Leucin	C32H41N5O5
	Ergocornin			L-Valin	C31H39N5O5
Ergoxin- gruppe	Ergostin		α -Hydroxy- α - Aminobuttersäure	L-Phenylalanin	C34H37N5O5
	Ergoptin			L-Leucin	C31H39N5O5
	Ergonin			L-Valin	C30H37N5O5

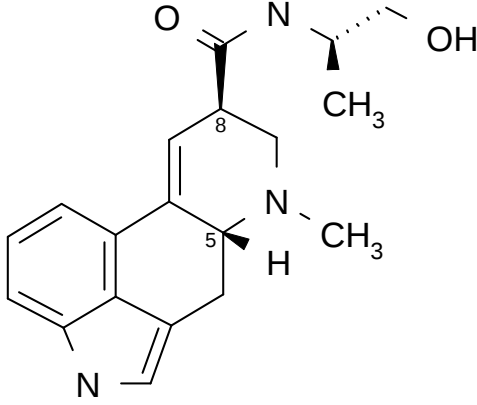
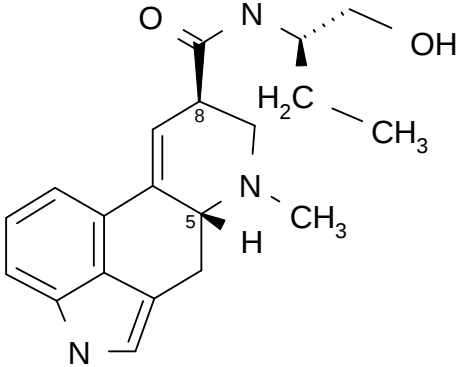
Ergometrin (Ergonovin, Ergobasin, D-Lysergsäure-beta-propanolamid)	
Methylergometrin (Methergin, Methylergobasin 9,10-didehydro-N-[1-(hydroxymethyl)- propyl]-D-lysergamid, Lysergsäure-beta- butanolamid)	

Abbildung 2: Strukturformeln von Ergometrin und Methylergometrin. Ergometrin wird im amerikanischen Sprachraum üblicherweise als Ergonovin bezeichnet, in älteren Arbeiten auch oft als Ergobasin. Durch Methylierung entsteht Methylergometrin, das bei grundsätzlich ähnlicher Wirkungsweise ca. 10-fach höhere Wirksamkeit als die Muttersubstanz aufweist.

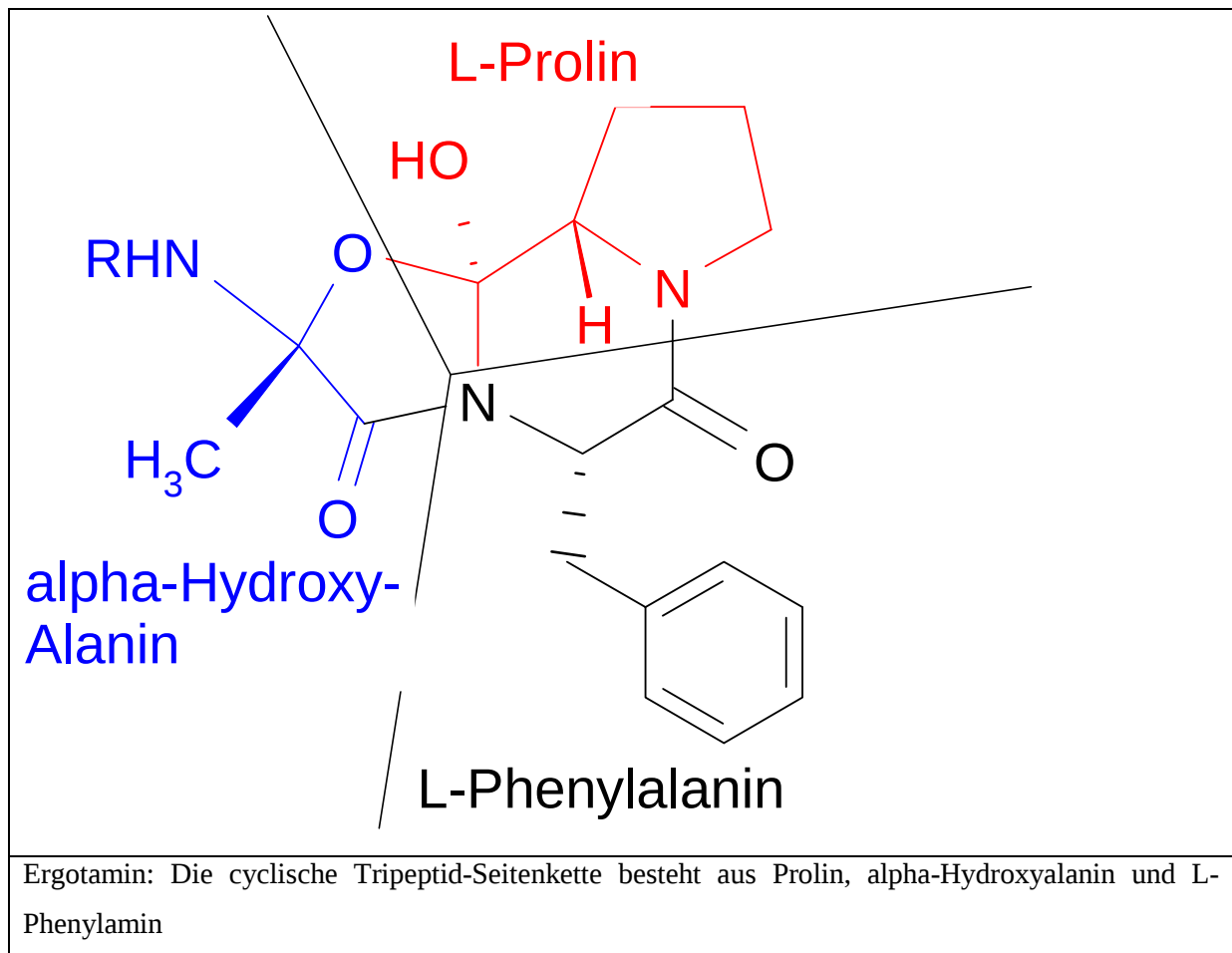
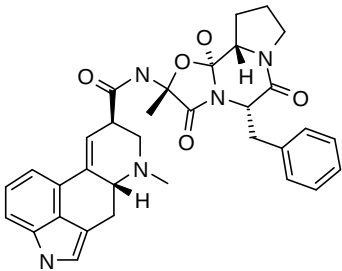
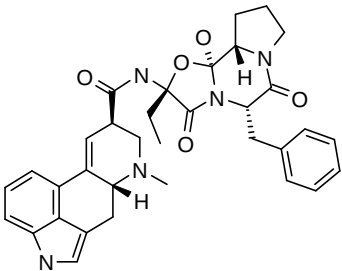
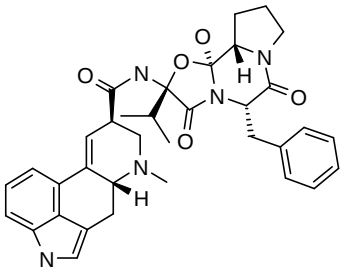
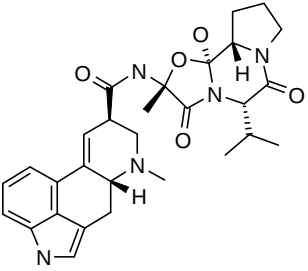
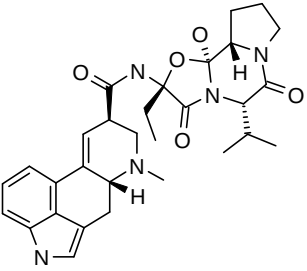
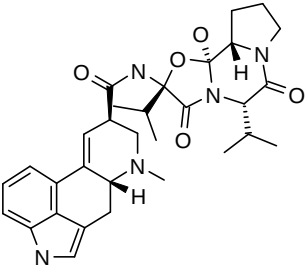


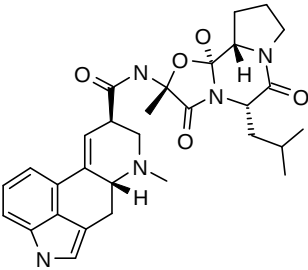
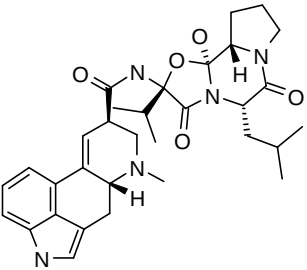
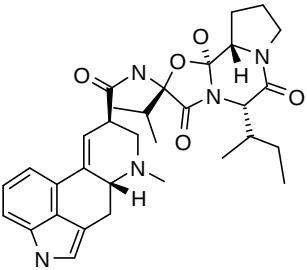
Abbildung 3: Beispiel für den Aufbau des cyclischen Tripeptids der Ergotalkaloide vom Peptidtyp. Die Synthese erfolgt durch die Enzyme Lysergylpeptidyl-Synthetase (LPS) 1 und LPS2 (Correia et al., 2003; Haarmann et al., 2005).

		
Ergotamin Pro Phe α H-Ala	Ergostin Pro Phe α H- α Aminobuttersäure	Ergocristin Pro Phe α H-Val

Gruppe 1: Phenylalanin-Typ

		
Ergovalin Pro Val α H-Ala	Ergonin Pro Val α H- α Aminobuttersäure	Ergocornin Pro Val α H-Val

Gruppe 2: Valin-Typ

		
Ergosin Pro Leu α H-Ala	alpha-Ergocryptin Pro Leu α H-Val	beta-Ergocryptin Pro Ile α H-Val

Gruppe 3: Leucin-Typ

Abbildung 4: Strukturen einiger Peptidalkaloide. Die Sortierung erfolgte in Gruppen nach der Aminosäurezusammensetzung der Tripeptid-Seitenkette, da diese erheblichen Einfluss auf die Kreuzreaktivität entsprechender Antikörper besitzen dürfte. Gleichzeitig ist so eine Abschätzung der vermutlichen Kreuzreaktionen für Ergotalkaloide möglich, für die keine Standardsubstanz verfügbar ist. Nicht dargestellt ist das zur Gruppe 3 gehörige Ergoptin (Pro Leu α H- α Aminobuttersäure), das zwischen Ergosin und alpha-Ergocryptin einzusortieren wäre. In der Gruppe 3 sind jeweils zwei Isomere Formen (α -Form Leucin – β -Form Isoleucin) möglich, dies sind jedoch mit Ausnahme von Ergocryptin synthetische Verbindungen (Komarova und Tolkachev, 2001).

Die toxikologische Datenlage zu den einzelnen Ergotalkaloiden stellt sich sehr unterschiedlich dar. Zu einigen Ergotalkaloiden, die auch therapeutisch genutzt werden, sind pharmakologisch wirksame Konzentrationen sowie die Folgen einer Überdosierung relativ gut bekannt. Dies betrifft Ergotamin, Ergometrin und teilweise den als „Dihydro-Ergotoxin“ bezeichneten Alkaloidmix aus Dihydroergocornin, Dihydroergocristin, Dihydro- α - und Dihydro- β -Ergocryptin (im Verhältnis 3:3:3:1). Die weltweite jährliche Produktion von Ergotalkaloiden für therapeutische Zwecke wird auf 5.000 - 8.000 kg geschätzt. Die Produktion erfolgt entweder über Fermentation oder über Inokulation von Feldgetreide und „Ernten“ des Mutterkorns (Schiff, 2006).

Am besten untersucht ist die Toxikologie von Ergotamin, das auch in der Humanmedizin seit langem beispielsweise in der Migränetherapie eingesetzt wird (Eadie, 2004; Forth et al., 2001). Als Präparate sind hier z. B. Dihydroergot[®] und Ergotonin[®] zu nennen, die beide den Wirkstoff Dihydroergotamin enthalten und bei Migräne bzw. Hypotonie eingesetzt werden. Ein weiteres Migränetherapeutikum auf Ergotaminbasis ist das Cafergot[®]. Bei milden bis mäßigen Migräneanfällen wurden mit Ergotamin-Präparaten bisher gute therapeutische Ergebnisse erzielt (Diener et al., 1999). Ergotamin wird oral in Dosen von 0,5-2 mg/Tag eingesetzt (Tfelt-Hansen et al., 2000), was beispielsweise bei einer Person mit 60 kg Körpergewicht einer therapeutischen Dosis von 0,008 - 0,033 mg/kg Körpergewicht entsprechen würde. Die maximale Tagesdosis oder die maximale wöchentliche Dosis von Ergotamin sollen jeweils 6 mg nicht überschreiten. Als generelle Nebenwirkungen einer Ergotamintherapie wurden Schwächegefühle in den Beinen und Muskelschmerzen oder Taubheitsgefühle in den Gliedmaßen genannt (Christopoulos et al., 2001). Cardiovasculäre Nebenwirkungen umfassen Bradycardie, koronare Vasokonstriktion sowie Ischämie (Novartis Pharma, 2007). Alternativ zu Ergotamin wird therapeutisch auch das bereit oben erwähnte synthetische 9,10-Dihydroergotamin eingesetzt, dessen vasokonstriktive Eigenschaften an Venen ähnlich, aber an Arterien deutlich schwächer sind als die des Ergotamins (Silberstein und McCrory, 2003; Saper und Silberstein, 2006). Ähnliche Unterschiede bezüglich vasokonstriktiver Eigenschaften zwischen Muttersubstanz und 9,10-Dihydro-Form wurde auch für die Ergotoxine festgestellt.

Die Einnahme von Ergotamin ist kontraindiziert bei Schwangeren, stillenden Müttern, bei Personen mit Erkrankungen des peripheren Gefäßsystems, koronaren Herzerkrankungen, Bluthochdruck sowie bei Personen mit Funktionsstörungen der Leber oder der Niere (Tfelt-Hansen et al., 2000). Kinder unter zwölf Jahren sollten Ergotamin-Präparate ebenfalls nicht einnehmen (Novartis Pharma, 2007).

Ergometrin wird vorwiegend intramuskulär in der Geburtshilfe zum Stoppen von Blutungen eingesetzt. Eine orale Anwendung scheint hier ungeeignet zu sein (de Groot, 1996). Lange Zeit wurde Ergometrin in der Geburtshilfe zur Austreibung der Frucht benutzt. Da jedoch durch häufig heftige, unkontrollierbare Muskelkontraktionen des Uterus vermehrt Todgeburten zu beobachten waren, beschränkt sich der Einsatz von Ergometrin nun in erster Linie auf die Blutstillung nach der Geburt (De Costa, 2002). Als Uterotonikum findet man in der Veterinär- bzw. Humanmedizin z. B. das Präparat Methergin[®], welches den Wirkstoff Methylergometrin enthält und nach Fehlgeburten sowie bei postpartalen Blutungen eingesetzt wird.

Des Weiteren werden einige Ergotalkaloide aufgrund ihrer dopaminergen Wirkungsweise als Antiparkinsonika eingesetzt. Zu nennen sind diesbezüglich z. B. Parlodel[®], mit dem enthaltenen Wirkstoff Bromocriptin, Dostinex[®], mit dem Wirkstoff Cabergolin und Cripa[®], welches den Wirkstoff Dihydroergocriptin aufweist.

Ein äußerst selten vorkommender, aber in seinen Konsequenzen sehr schwerwiegender Fehler in geburtshilflichen Kliniken ist die Verwechslung von Ergometrin und Vitamin K. Vitamin K wird Neugeborenen routinemäßig verabreicht. Die versehentliche Gabe von Ergometrin (0,1 - 0,5 mg i.m.) beim Neugeborenen führt innerhalb kurzer Zeit zu tonisch-klonischen Krämpfen und Atemstörungen, die unbehandelt tödlich sind. Da die Verwechslung in den publizierten Fällen zumeist sehr schnell bemerkt wurde, und in derartigen Fällen sofortige intensivmedizinische Behandlung zur Verfügung stand, wurden bisher jedoch kaum Todesfälle berichtet (Baum et al., 1996; Dargaville und Campbell, 1998).

Die Ergotalkaloide sind auch für Tiere schädlich (Porter, 1995; Huebner et al. 1999). Besonders empfindlich reagieren Sauen auf diese Toxine. Symptome wie Hypogalaktie, Sterilität, Metritiden, geringe Wurfgrößen sowie Aborte sind zu beobachten. Bei Ferkeln verursachen Mutterkornalkaloide vermindertes Wachstum (Kümmerer), Todgeburten, Verhungern und das Absterben der Akren (LAVES, 2004a). In der Milchviehhaltung kann das Verfüttern von mutterkornalkaloidhaltigen Futtermitteln zu einer Reduzierung der Milchleistung führen. Nachteilige Effekte auf die Produktivität in der Nutztierhaltung sind bereits ab einer Konzentration von 0,1 % Mutterkorn im Gesamtfutter (bezogen auf Frischgewicht) möglich (LAVES, 2004a).

Der als „Dihydro-Ergotoxin“ oder auch als „Hydergin“ bezeichnete Alkaloidmix aus vier Einzelsubstanzen (Dihydroergocornin, Dihydroergocristin, Dihydro- α - und Dihydro- β -Ergocryptin, Verhältnis 3:3:3:1) wird in der Geriatrie eingesetzt und ist in zahlreichen Präparaten verschiedener Hersteller auf dem Markt (Schiff, 2006). Die täglichen oralen Dosen liegen bei 2-5 mg, die beabsichtigte Wirkung liegt in der Therapie einer alterbedingten

cerebralen Insuffizienz (“anti-aging”). Im Gegensatz zu den Original-Alkaloiden fehlt bei den Dihydro-Toxinen die Doppelbindung zwischen C9 und C10 des Ergolinringes. Dadurch soll die vasokonstriktorische Aktivität herabgesetzt sein. Beschriebene Nebenwirkungen sind chronische Nasenverstopfung bei Langzeitanwendung, trockene Nase mit Schädigung der Nasenschleimhäute, Magen-Darm-Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen sowie Blutdruckabfall. Auch hier ist eine Einnahme während der Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert. Schlussfolgernd scheinen Wirkung und Wirksamkeit der wichtigsten Ergotalkaloide zwar verschieden zu sein, aber insgesamt auf einem ähnlichen Niveau. Im Hinblick auf feststellbare pharmakologische Wirkungen nach oraler Aufnahme bei Erwachsenen liegt die Dosis zwischen 0,5 mg und 1 mg. Da bei dieser Dosis bereits unerwünschte Nebenwirkungen möglich sind und da bei Kindern eine höhere Empfindlichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, sollte die Aufnahme des Menschen über die Nahrung in jedem Fall unter diesen Werten liegen. Insbesondere bei Kindern, bei schwangeren bzw. stillenden Frauen sowie bei Personen mit Kreislauferkrankungen ist von einer möglicherweise deutlich niedrigeren kritischen Dosis auszugehen.

2.3. Bewertung von Ergotalkaloiden und Risikoabschätzung hinsichtlich der tolerierbaren Tagesdosis

Schoch und Schlatter (1985) schätzen anhand der damals verfügbaren Literatur zu akuten Wirkungen die “no-toxic-effect” Konzentration für Ergotamin ab und gelangen (Bezugsgröße Person mit 60 kg) zu einem Wert von 0,1 mg/kg Körpergewicht. Bei einem Sicherheitsfaktor von 100 entspräche dies für Ergotamin einer tolerierbaren Tagesaufnahme (TDI) des Menschen von 1 µg/kg Körpergewicht. Die Autoren gehen davon aus, dass aufgrund der guten toxikologischen Datenlage dieser Sicherheitsfaktor nicht erforderlich sein dürfte. Diese Bewertung bezieht sich jedoch offensichtlich auf einen erwachsenen Konsumenten und berücksichtigt nicht, dass generell bereits deutliche Wirkungen von Ergotamin bei einer Dosis von 0,1 mg/kg Körpergewicht zu erwarten sind. Schoch und Schlatter (1985) schätzen weiterhin ab, dass bei einem Mutterkorngehalt im ungereinigten Getreide von 0,3 % die Aufnahme von Ergotalkaloiden über das Brot bei 1,6 µg/kg Körpergewicht und Tag liegen dürfte.

Zum Schutz vor einer Vergiftung mit Ergotalkaloiden wurden von Rice et al. (1998) Untersuchungen über die Wirksamkeit einer Impfung mit Protein-Ergotamin-Konjugaten an Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die parenterale als auch die orale Vakzination sowie auch die passive Immunisierung die klinischen und labordiagnostischen

Erscheinungen einer Vergiftung durch Ergotalkaloide bei den Versuchstieren abmildern konnten.

Untersuchungen zur subakuten Toxizität von Ergometrin-Maleat bei Ratten nach oraler Applikation wurden von Peters-Vollenberg et al. (1996) beschrieben. Hier wurde ein „no observed effect level“ (reduzierte Plasmagluconspiegel) von 1 mg/kg Körpergewicht und Tag ermittelt.

Für α -Ergocryptin liegen Untersuchungen zur chronischen Toxizität nach oraler Verfütterung an Ratten vor (Janssen et al., 2000a, 2000b). Hinsichtlich der allgemeinen toxikologischen Effekte sowie vielfältiger metabolischer und hormoneller Veränderungen durch α -Ergocryptin wurde eine unschädliche Dosis (NOAEL) von 4 mg/kg Futter, entsprechend einer mittleren Tagesaufnahme von 0,35 mg/kg Körpergewicht ermittelt. Die Autoren postulieren, dass die vielfältigen festgestellten Wirkungen dieses Ergotalkaloids durch eine Interaktion von α -Ergocryptin mit zentralnervösen dopaminergen Vorgängen ausgelöst werden. Bei einem Sicherheitsfaktor von 100 würde der TDI für α -Ergocryptin beim Menschen bei 3,5 μ g/kg Körpergewicht liegen und dürfte damit demjenigen für Ergotamin weitgehend entsprechen.

Oresanya et al. (2003) geben nach einem Fütterungsversuch bei Schweinen mit einem natürlich kontaminiertem Futter (Ergocristin, Ergotamin, Ergosine, Ergocryptin und Ergocornin) im Hinblick auf die durch Ergotalkaloide reduzierte, tägliche Futteraufnahme eine maximal tolerierbare Dosis von 1 mg Ergotalkaloide/kg Futter an.

2.4. Vorkommen von Mutterkorn und Ergotalkaloiden in Getreide und Getreideerzeugnissen sowie rechtliche Regelungen

Untersuchungen aus verschiedenen Ländern zeigten, dass der Gesamtalkaloidgehalt von Mutterkorn üblicherweise zwischen 0,1 % und 0,3 % (in Ausnahmefällen bis über 1 %) liegt (Dänicke und Mainka, 2006). Rechnet man mit einem mittleren Alkaloidgehalt von 0,2 %, so ergibt sich aus der bisherigen Regelung von 0,05 % Mutterkorn ein de facto tolerierter Gesamtalkaloidgehalt im Getreide von 1000 μ g/kg (Wolff et al., 1988). Durch Reinigungs- und Verarbeitungsschritte wird dieser Gehalt in der Regel zwar deutlich reduziert, aber Gehalte von einigen 100 μ g/kg im fertigen Erzeugnis sind nicht auszuschließen. Untersuchungen aus der Schweiz (Baumann et al., 1985) zeigten ebenfalls, dass Ergotalkaloidgehalte von mehreren hundert μ g/kg in Lebensmittelgetreide nicht ungewöhnlich sind, vor allem in Roggen. Höchstmengen für Mutterkornalkaloide in Lebens- oder Futtermitteln wurden bisher nicht festgelegt.

Im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart (Lauber et al., 2005) wurden 2003/2004 insgesamt 51 Proben (Roggenkörner/Roggenmehle) untersucht (Tabelle 2). In 2003 wurde eine erheblich höhere Ergotbelastung als in 2004 ermittelt, wobei vor allem in 2003 die Belastung biologischer Erzeugnisse geringer war.

Bisher wird der Gehalt an Mutterkorn in Getreide ausschließlich über den Nachweis der Sklerotien bestimmt. In der EU war lediglich für Interventionsgetreide ein Grenzwert von 0,05 % Mutterkorn festgelegt. Dieser Wert ist zwar seit einigen Jahren nicht mehr „offiziell gültig“, da Roggen aus der Intervention genommen wurde, stellt aber nach wie vor den Qualitätsstandard dar. In anderen Ländern liegen die tolerierten Werte für Mutterkorn ähnlich. Beispielsweise ist in der Schweiz für Brotgetreide ebenfalls ein Grenzwert von 0,05 % Mutterkorn festgelegt; für Getreide, das direkt zur Abgabe an den Verbraucher vorgesehen ist, liegt der Wert aber bei 0,02 % (Schweizerische Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln (Fremd- und Inhaltsstoffverordnung, FIV) in der Änderung vom 27. März 2002). Ähnlich wie in der EU gibt es auch in der Schweiz seit langem Bestrebungen, statt des toxikologisch wenig aussagefähigen - und im verarbeiteten Getreide nicht im relevanten Bereich nachweisbaren - Parameters “Mutterkorn”, den Gesamtalkaloidgehalt von Rohware bzw. verzehrsfertigen Lebensmitteln zu regeln. Weltweit gibt es derzeit jedoch keine direkten spezifischen Regelungen für Ergotalkaloide in Lebens- oder Futtermitteln.

Tabelle 2: Gesamtalkaloidgehalte sowie Mutterkornbesatz (berechnet) in Roggenmehlen und Roggenkörnern (biolog. und konvent. Anbau) der Ernte 2003 und 2004 (Lauber et al., 2005).

Anbauart	Probenzahl	Gesamtalkaloide Mittelwert $\pm$ s*[$\mu\text{g/kg}$]	Besatz** Mittelwert [%]	Gesamtalkaloide Median [$\mu\text{g/kg}$]	Maximaler Gehalt [$\mu\text{g/kg}$]
Ernte 2003					
Konventionell	18	1147 $\pm$ 947	0,06	850	3280
Biologisch	12	324 $\pm$ 430	0,02	196	1490
Summe	30	818 $\pm$ 874	0,04	414	3280
Ernte 2004					
Konventionell	15	281 $\pm$ 268	0,014	220	974
Biologisch	6	208 $\pm$ 168	0,010	256	363
Summe	21	260 $\pm$ 242	0,013	220	974

*Standardabweichung

**aus Gesamtalkaloidgehalt berechnet

Bürk et al. (2006) untersuchten 66 roggenhaltige Lebensmittelproben mittels LC-MS/MS nach der von Bockhorn et al. (2004) publizierten Methode. Der höchste Gehalt (Summenbelastung) in Roggenbrot lag bei 258 $\mu\text{g/kg}$, jedoch lagen nur drei von 21 Roggenbroten über 100 $\mu\text{g/kg}$. Roggenbrötchen und Pumpernickel waren nur gering belastet. Die Verteilung des Anteils der einzelnen Ergotalkaloide an der Summenbelastung in natürlich kontaminierten Materialien ist zwar relativ variabel. Vergleicht man jedoch verschiedene Literaturangaben, werden dennoch gewisse Trends erkennbar. Generell geht man in Mitteleuropa davon aus, dass auf Ergocristin mit durchschnittlich rund 30 % der höchste Anteil entfällt, gefolgt von Ergotamin (17 %), Ergometrin, Ergocryptin, Ergosin und Ergocryptin. Zu den anderen Verbindungen (Ergovalin, Ergostin und Ergonin) sind keine ausreichenden Informationen verfügbar. In Gräsern (Endophytenbefall) dürfte jedoch oft Ergovalin stark dominieren. Ergocornin dürfte im Durchschnitt jeweils ca. 4 - 5 % Anteil an der Summenbelastung haben. In keinem Fall ist mit der alleinigen Belastung mit einem einzelnen Alkaloid zu rechnen.

2.5. Nachweis von Ergotalkaloiden

Bezüglich des Nachweises von Ergotalkaloiden standen bisher chromatographische Verfahren im Vordergrund, wobei in der Literatur häufig HPLC-Verfahren mit Fluoreszenzdetektion beschrieben werden (Porter, 1995). Insbesondere in der Probenvorbereitung sind diese

Methoden sehr aufwändig und nicht nur in diesem Punkt als überarbeitungsbedürftig anzusehen. Des Weiteren werden LC-MS/MS Verfahren für Ergotalkaloide beschrieben, die jedoch keine breite Anwendung gefunden haben.

Problematisch ist derzeit die mangelnde Verfügbarkeit analytischer Standards, derzeit sind nur noch wenige Ergotalkaloide als Standardsubstanzen kommerziell verfügbar. Durch Standard-Austausch zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen wird in dieser Situation derzeit improvisiert, behelfsweise werden die anderen Alkaloide anhand ihrer Peakflächen qualitativ abgeschätzt, was im Hinblick auf die zu fordernde Richtigkeit der Ergebnisse als sehr kritisch anzusehen ist.

2.5.1. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

2.5.1.1. HPLC und LC-MS/MS

Im Bereich der Untersuchung von Lebensmitteln werden für Ergotalkaloide bisher ausschließlich chromatographische Verfahren eingesetzt. Dabei wurden in der Literatur überwiegend HPLC-Verfahren mit Fluoreszenzdetektion beschrieben, deren Anwendung zum Nachweis von Ergotalkaloiden z. B. auch in Schafsplasma erprobt wurde (Jaussaud et al., 1998). Diese Verfahren ermöglichen einen Nachweis der Einzelalkaloide im Konzentrationsbereich von ca. 1 µg/kg oder sogar leicht darunter, bei Wiederfindungsraten von > 90 % (Baumann et al., 1985; Klug et al., 1988; Wolff et al., 1988; Moubarak et al., 1996; Flieger et al., 1997). Allerdings sind diese Methoden insbesondere in der Probenvorbereitung sehr aufwändig und im Hinblick auf Fortschritte bei Extraktionsreinigungsmaterialien und die instrumentelle Leistungsfähigkeit als überarbeitungsbedürftig anzusehen. Eine Arbeitsgruppe im Rahmen des § 64 LFGB (Mykotoxine) beschäftigt sich daher seit einiger Zeit mit der Validierung eines HPLC-Routineverfahrens, das insbesondere im Hinblick auf die Probenvorbereitung vereinfacht wurde.

Die Entwicklung von LC-MS/MS Verfahren für Mutterkornalkaloide wurde in den letzten Jahren beschrieben (z. B. Shelby et al., 1997; Bockhorn et al., 2004; Bürk et al., 2006; Mohamed et al., 2006), diese Verfahren haben aber bisher noch keine breitere Anwendung gefunden.

Ebenfalls nicht routinemäßig im Einsatz zum Nachweis von Mutterkornalkaloiden ist die Elektrophorese. Eine weitere brauchbare, aber nur sehr selten genutzte Analysetechnik für Ergotalkaloide ist die Kapillarelektrophorese (Frach und Blaschke 1998).

2.5.2. Immunologische Verfahren

In den letzten Jahren wurden zahlreiche immunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen entwickelt. Die Immuntests sind im Gegensatz zu physikalisch-chemischen Verfahren einfacher und schneller durchführbar und hinsichtlich des apparativen Aufwandes kostengünstiger. Unterschieden werden kann zwischen radioimmunologischen, die kaum noch eingesetzt werden, und enzymimmunologischen Verfahren. In der Routineanalytik bereits erprobte Enzymimmuntests existieren für Aflatoxin, Ochratoxin A, Zearalenon, T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol, die Korrelation der enzymimmunologischen Verfahren (Enzymimmunoassay, EIA) mit physikalischen Verfahren (DC, HPLC) liegt dabei zwischen 0,93 und 0,99 (Märtlbauer et al., 1991; Lombaert, 2002). Vorteil der EIAs ist bei ausreichender Spezifität, die Möglichkeit zur quantitativen Detektion einzelner Trichothecene (Lombaert, 2002).

Mykotoxine sind niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht < 1000) und können dadurch nur im kompetitiven Testprinzip nachgewiesen werden. Das Prinzip besteht dabei in einer Konkurrenz von markiertem und freiem Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Zur Produktion spezifischer Antikörper gegen Ergotalkaloide wurden verschiedene Toxin-Proteinkonjugate synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

Beim **direkten kompetitiven EIA** sind die Antikörper direkt oder über Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, DASP) an ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dienen als Festphase. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit werden in einem Waschschrift die nicht gebundenen Reagenzien entfernt, bevor Substrat (Chromogen) zugegeben wird. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Somit besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Substratumsatz durch das enzymgebundene markierte Antigen und der Menge an freiem Antigen in der Probe.

Beim **indirekten kompetitiven EIA** wird Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dient als Festkörperphase. Die Probe wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert, dabei konkurrieren die freien Antigene der Probe mit denen der Festphase um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift (Entfernen

ungebundener Reagenzien) wird enzymmarkierter Antikörper (gegen die Immunglobuline der Tierart, von der die spezifischen Antikörper stammen) hinzugefügt, nach ausreichender Inkubation und einem weiteren Waschschrift wird Substrat (Chromogen) zugegeben. Der Substratumsatz durch das enzymgebundene Toxin-Konjugat ist wiederum umgekehrt proportional zur freien Antigenmenge der Probe.

Zusätzlich zu diesen Methoden, die als Mikrotiterplatten oder Röhrchentests konzipiert sind, wurden Teststreifenverfahren entwickelt, die ein noch schnelleres Screening der Proben auf verschiedene Mykotoxine zulassen. Monoklonale oder polyklonale Antikörper werden hierzu auf einer Teststreifenmembran aufgetragen, die in Verbindung mit dem entsprechenden Konjugat nach dem Prinzip des kompetitiven EIA reagieren. Die Farbintensität des Beschichtungspunktes wird visuell im Bezug auf die Negativkontrolle beurteilt (Schneider et al., 1991). In neueren Testsystemen konkurriert das auf dem Teststreifen immobilisierte Antigen-Konjugat mit dem freien Toxin der Probe um die Bindungsstellen des goldmarkierten Antikörpers der in den Teststreifen integriert ist. Bei einer toxinfreien Probe wandert der goldmarkierte Antikörper infolge von Kapillarkräften bis zum immobilisierten Konjugat, wird dort gebunden und bewirkt eine Verfärbung der Testbande, diese wird im Vergleich zu einer Kontrollbande ausgewertet (Rida®Quick DON, r-biopharm). Dieses Testsystem bietet nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Mykotoxinen und kann zur Vorselektion des Probenmaterials eingesetzt werden. Allerdings ist das beschriebene Testsystem für Ergotalkaloide noch nicht kommerziell erhältlich.

Methoden zur Entwicklung von immunochemischen Verfahren für einzelne Ergotalkaloide wurden von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben und zum Nachweis dieser Toxine in mit Endophyten befallenen Gräsern (*Festuca* sp., *Lolium* sp.) eingesetzt. Ihr Einsatz in der Lebensmittelanalytik wurde allerdings bisher noch nicht geprüft, die Antikörper selbst sind kommerziell nicht verfügbar. Versuche zur Erstellung von gruppenspezifischen Testsystemen oder von immunoaffinitätschromatographischen Reinigungsverfahren wurden bisher lediglich von Shelby et al. (1992) beschrieben. Mit dem von diesen Autoren beschriebenen Antikörper gegen Ergometrin (Shelby et al., 1991) konnte Ergometrin in einer orientierenden Untersuchung zwar in Konzentrationen von 10 ng/g in künstlich kontaminiertem Weizen nachgewiesen werden. Aufgrund der relativ geringen Kreuzreaktionen mit den anderen Alkaloiden (Tabelle 3) dürfte eine Erfassbarkeit in Konzentrationen unter 1 µg/g jedoch kaum

möglich sein. Kommerziell verfügbare ELISA-Tests für Ergot-Alkaloide in Lebensmitteln existieren bisher nicht.

Generell ist aufgrund der strukturellen Vielfalt innerhalb der Ergotalkaloide ein gruppenspezifischer Nachweis wahrscheinlich nur über solche Antikörper aussichtsreich, die gegen den Lysergsäure-Grundkörper gerichtet sind. Kandidaten für die Erstellung solcher Immuntests sind insbesondere Ergometrin und Lysergsäure. Ergometrin ist besser verfügbar und zudem mit weniger Auflagen im Umgang verbunden. Zur selektiven Erfassung einzelner Subgruppen insbesondere der Peptidergotalkaloide ist die Strukturähnlichkeit von Teilgruppen (Abbildung 4) zu berücksichtigen. In Tabelle 3 sind die angegebenen Kreuzreaktionen der bisher beschriebenen Immuntests für Ergotalkaloide zusammengestellt.

Tabelle 3: Sensitivität (Standardlösungen) und Spezifität der in der Literatur beschriebenen Anti-Ergot-Antikörper.

Alkaloid	Ergometrin ¹	Ergometrin ²	Ergotamin ³	Ergovalin ⁴	Lysergol ^{5, 6}	Dihydroergosin ⁷
Nachweisgrenze Hauptalkaloid	16 ng/ml	0,05 ng/ml	1 ng/ml	3-4 ng/ml	1 fg/ml	1 ng/ml
Relative Kreuzreaktion (%) mit						
Ergometrin	100	100	<1	<1	<1	k.A.
Ergometrinin	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ergotamin	7	<1	100	<1	<1	<1
Ergotaminin	k.A.	<1	29	k.A.	k.A.	k.A.
α-Ergocryptin	5	<1	<1	<1	<1	k.A.
α-Ergocryptinin	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
β-Ergocryptin	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
β-Ergocryptinin	k.A.	<1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ergocornin	k.A.	<1	<1	<1	<1	k.A.
Ergocorninin	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ergocristin	k.A.	<1	22	k.A.	<1	k.A.
Ergocristinin	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ergosin	k.A.	<1	2	<1	k.A.	k.A.
Ergosinin	k.A.	k.A.	3	k.A.	k.A.	k.A.
Andere	Ergovalin 20	Ergoptin <1	Ergoptin <1	Ergovalinin 90	Ergovalin <1	Dihydroergotamin
	Agroclavin 2	Festoclavin <1	Ergostin 27	Ergonin 5		
	Lysergol <1		Ergostinin 8			
			Festoclavin <1			
			Ergovalin <1			

1, Reddick et al. (1991); 2, Shelby und Kelley (1991); 3, Shelby et al. (1990); 4, Shelby et al. (1998); 5, Hill et al. (1994); 6, Schnitzius et al. (2001); 7, Molloy et al. (2003).

3. Material und Methoden

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Forschungsarbeit entwickelten bzw. verwendeten Materialien und Methoden beschrieben.

3.1. *Materialien und Geräte*

3.1.1. Mykotoxine

Ergonovin	(Sigma Chemie GmbH, E-7008)
Ergosin	(Bundesamt für Gesundheit (BAG), Bern, Schweiz)
Ergotamin D-tartrat	(Fluka Nr. 45510)
Ergocornin, >95 %	(Sigma Chemie GmbH, E-131)
α -Ergocryptin	(Sigma Chemie GmbH, E-5625)
β -Ergocryptin	(Bundesamt für Gesundheit (BAG), Bern, Schweiz)
Ergocristin	(Sigma Chemie GmbH, E-140)
Ergonovinin	(hergestellt aus Ergonovin)
Ergosinin	(hergestellt aus Ergosin)
Ergotaminin	(hergestellt aus Ergotamin)
Ergocorninin	(hergestellt aus Ergocornin)
α -Ergocryptinin	(hergestellt aus α -Ergocryptin)
β -Ergocryptinin	(hergestellt aus β -Ergocryptin)
Ergocristinin	(hergestellt aus Ergocristin)

3.1.2. Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)
0,2 mol/l Citratpuffer (mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂, pH 3,9)
1 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,4)
0,1 mol/l Natrium-Bicarbonatpuffer (pH 8,5)
0,9 % Natriumchloridlösung
0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 6,0)
0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (pH 7,3; PBS)

Enzymsubstrat-/Chromogenlösung:

Substratlösung für Meerrettichperoxidase (nach Gallati u. Pracht, 1985): 0,2 mol/l Citratpuffer (mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂, pH 3,9)

Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)

Gebrauchsfertig: 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und ein Teil Tetramethylbenzidinlösung

1 mol/l Schwefelsäure (H₂SO₄)

1 % bzw. 2 % Casein-PBS-Lösung (1 g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)

3 mol/l Natronlauge

3.1.3. Immunreagenzien

Die folgenden Immunreagenzien waren im Rahmen eines Forschungsprojektes an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität entwickelt worden und standen für die eigenen Arbeiten zur Verfügung.

Ergonovin-EIA:

Antikörper: polyklonal, Antiserum gegen Ergonovin (IgG-Rohfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: Ergonovin-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ergonovin-HS-HRP)

Ergotamin-EIA:

Antikörper: polyklonal, Antiserum gegen Ergotamin (IgG-Rohfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: Ergotamin-Natriumperjodat-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ergotamin-PJ-HRP)

α -Ergocryptin-EIA:

Antikörper: Ergotamin gekoppelt an Bovines Serumalbumin (Ergotamin-BSA), Antiserum gegen α -Ergocryptin (IgG-Rohfraktion, ungefällt)

Konjugat: Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Anti-Kan-Ig-HRP) von Dako Cytomation A/S, P-0217

3.1.4. Chemikalien und Biochemika

Soweit nicht anders angegeben, sind analysereine Chemikalien zu verwenden. Unter Lösung ist eine wässrige Lösung zu verstehen.

Das verwendete Wasser muss entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und von entsprechender Reinheit sein.

ELISA:

- 1.1 Spezifische polyklonale Antikörper gegen Ergometrin, Immunglobulinfraktion durch Ammoniumsulfatfällung gewonnen (Ergometrin AS Kan 29 Pool, gefällt)
- 1.2 Konjugat (Ergometrin gekoppelt an Meerrettichperoxidase nach Derivatisierung mittels Bernsteinsäureanhydrid = Ergometrin-HS-HRP)
- 1.3 „Enzymsubstrat/Chromogenlösung“ für ELISA
 - 1.3.1 Substratlösung für Meerrettichperoxidase: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H_2O_2
 - 1.3.2 Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung gelöst in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)
 - 1.3.3 Gebrauchsfertige Enzymsubstrat/Chromogenlösung wird kurz vor Gebrauch durch Mischen von 1.3.1 und 1.3.2 im Verhältnis 20:1 (v/v) in der benötigten Menge hergestellt
 - 1.3.4 Stopplösung für Farbreaktion (1 mol/l Schwefelsäure)
- 1.4 0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mmol/l Natriumchlorid)
- 1.5 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 6 (NaCl 6,79 g, KH_2PO_4 0,43 g, A. dest. ad 1 l). Bei 4 °C mehrere Wochen haltbar
- 1.6 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)
- 1.7 1 - bzw. 2%ige Casein-PBS-Lösung (1g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS, zehn Minuten auf Heizrührer, 500 upm, Lösung auf ca. 40 °C erhitzen)
- 1.8 Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)
- 1.9 Stabilisator-Lösung für Ergotalkaloide: 10 ml Ethylenglycol, 10 ml 1,2-Propandiol, 0,1 g Weinsäure auf 100 ml mit Ethanol/A. dest auffüllen (siehe Ware et al., 2000).
- 1.10 Ergometrin (Synonym Ergonovin, Sigma, E-7008), Ergotamin-D-tartrat (Fluka, 45510), und Ergocristin (Sigma, E-140)
 - 1.10.1 EA-Stammlösung
Die einzelnen EA (nach 1.9, nomineller Gehalt 1 mg) werden mit jeweils 1 ml Stabilisator-Lösung aufgelöst und bei -18 °C gelagert.
 - 1.10.2 EA-Standardlösungen für ELISA
Durch Verdünnung mit Stabilisator-Lösung wird eine Mischung von Ergometrin/Ergotamin/Ergocristin im Verhältnis 1:10:14 hergestellt.

Durch Verdünnung mit Acetonitril/PBS pH 6 (5:95; v/v) werden Standardlösungen mit folgenden Gesamt-EA-Gehalten hergestellt: 250 ng/ml; 50 ng/ml; 10 ng/ml; 2 ng/ml; 0,4 ng/ml; 0,08 ng/ml. Als Negativkontrolle (Blank, BLK) wird Acetonitril/PBS pH 6,0 (5/95; v/v) verwendet. Diese Standardlösungen sollten unmittelbar vor dem Untersuchungsgang hergestellt werden.

HPLC:

- 2.1 Acetonitril, gradient grade (z. B. Merck Nr. 1.00030)
- 2.2 Acetonitril, reinst (z. B. Merck Nr. 1.15500)
- 2.3 Ammoniumsulfat, p.a (z. B. Merck Nr. 1.01217)
- 2.4 di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei, p.a. (Na_2HPO_4) (z. B. Merck Nr. 1.06586)
- 2.5 di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$) (z. B. Merck Nr. 1.06575)
- 2.6 Ethylacetat, p.a. (z. B. Merck Nr. 1.09623)
- 2.7 Ethylenglycol, p.a. (z. B. Merck Nr. 1.09621)
- 2.8 Kaliumdihydrogenphosphat, p.a. (KH_2PO_4) (z. B. Merck Nr. 1.04877)
- 2.9 L(+)-Weinsäure, p.a. (z. B. Merck Nr. 1.1.00804)
- 2.10 Methanol, p.a. (z. B. Merck Nr. 1.06009)
- 2.11 Natriumchlorid p.a. (z. B. Merck Nr. 1.06404)
- 2.12 Natriumhydroxid, p.a. (z. B. Merck Nr. 1.06498)
- 2.13 Ortho-Phosphorsäure 85 %, reinst (z. B. Merck Nr. 1.00563)
- 2.14 1,2-Propandiol, zur Synthese (z. B. Merck Nr. 8.22324)
- 2.15 Ethanol absolut, reinst (z. B. Merck Nr. 1.00986)
- 2.16 PBS pH 7,2 (7,0 - 7,3) (phosphatgepufferte Kochsalzlösung: NaCl 6,79 g, Na_2HPO_4 1,47 g, KH_2PO_4 0,43 g, A. dest. ad 1 l). Bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.
- 2.17 PBS pH 6,0 (NaCl 6,79 g, KH_2PO_4 0,43 g, Aqua dest. ad 1 l). Bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.
- 2.18 2%ige di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat-Lösung: 2 g di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (2.5), A. dest ad 100 ml. Haltbar 1 Woche bei Raumtemperatur.
- 2.19 Stabilisator-Lösung für Ergotalkaloide nach Ware et al. (2000): 10 ml Ethylenglycol (2.7), 10 ml 1,2-Propandiol (2.14), 0,1 g Weinsäure (2.9) auf 100 ml mit Ethanol/A. dest auffüllen.
- 2.20 SCX-Säule zur Reinigung von Ergotalkaloiden in Probenextrakten: LiChrolut SCX Säule (40 - 63 μm) 200 mg 3 ml Standard PP-Röhrchen (Merck, 1.02016.0001)

- 2.21 Mischung von Standard-Ergotalkaloiden für HPLC. Durch Verdünnung mit Stabilisator (2.19) wird eine Mischung von Ergotalkaloiden in bekannter Konzentration hergestellt. Aus dieser Lösung sollte für jeden Untersuchungsgang eine neue Verdünnung angesetzt werden.
- 2.22 Extraktionslösung: 60 Volumenteile Acetonitril (2.2) werden mit 40 Volumenteilen PBS pH 6,0 (2.17) gemischt. Lagerung bei 4 °C.
- 2.23 Elutionsmittel für SCX: 50 Volumenteile Acetonitril (2.2) werden mit 50 Volumenteilen 2 % di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat-Lösung (2.18) gemischt. Lösung an jedem Untersuchungstag frisch ansetzen.
- 2.24 1 mol/l NaOH: 40 g Natriumhydroxid (2.12), A. dest ad 1.000 ml.
- 2.25 Zusammensetzung der mobilen Phasen für die Gradienten-HPLC:
- A. Acetonitril (2.1)
 - B. 0,01 % Ammoniumsulfat (2.3) in A. dest
 - C. Acetonitril/PBS pH 7,2 (50/50; v/v)

Diese Lösungen werden vor Gebrauch 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

3.1.5. Geräte

Vorzugsweise werden Glasgeräte verwendet. Bei der Verwendung von Kunststoffgefäßen sind diese auf Adsorption zu prüfen. Die folgenden Geräte und Hilfsmittel werden verwendet.

Moulinette	(Krups GmbH, Art. 724)
Getreidemühle 3600	(Perten Instruments GmbH)
Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Papierfaltenfilter	(Schleicher & Schuell, 5155506)
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic GmbH & Co. KG)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Mehrstellenrührgerät	(IKA® Werke GmbH & Co. KG)
pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Variable 12-Kanal-Pipette 10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Sepatech Varifuge RF	(Heraeus-Christ GmbH)

Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)
Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Laborota 4003)
Dialysierschläuche	(SERVA Electrophoresis GmbH)
ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)
ImmunoPlate MaxiSorp	(Nunc GmbH, 439454)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Software: RIDAWIN Version 1.38	(R-Biopharm AG, Darmstadt)

3.1.6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HPLC-Anlage (Dionex), bestehend aus:

Vorsäule: Discovery HS C18 (2 cm x 4 mm, 5 µm)	(Supelco, 568572-U)
Trennsäule: Discovery HS C18 (25 cm x 4 mm, 5 µm)	(Supelco, 568513-U)
Pumpenserie P 580	(DIONEX GmbH)
Probengeber Modell ASI 100/ ASI 100 T	(DIONEX GmbH)
Photodiode PDA 100 Array detector	(DIONEX GmbH)
Fluoreszenzdetektor RF 2000	(DIONEX GmbH)
Säulenthermostat STH 583	(DIONEX GmbH)
Datenauswertungssystem	(z. B. Chromeleon)
Fraktionkollektor 202	(Gilson SAS)
Fraktioncontroller 201-202	(Gilson SAS)
HPLC-Probenfläschchen mit inertem Kunststoffdeckel	(Merck, Nr. 548-3051)
Mikroeingänge 300 µl für 5.15	(Merck, Nr. SCER 150710)
Reaktionsgefäße, Safe-Lock	(Merck, Nr. 211-2130)

3.1.7. Probenmaterial

Im Zeitraum von 2005 bis 2007 wurden in mittelhessischen und überregionalen Läden (Supermärkte, Reformhäuser, Naturkostläden, Bäckereien) insgesamt 223 (Tabelle 4) verschiedene Lebensmittel auf Getreidebasis gekauft. Zusätzlich wurden zur Untersuchung von Konsummilch und Rohmilch auf Ergotalkaloide mittels EIA acht Proben Konsummilch im Einzelhandel gekauft und zehn Proben Tankmilch aus konventionellen landwirtschaftlichen Betrieben erworben und bis zur Untersuchung bei -18 °C gelagert. Die Proben wurden gemäß dem ADV-Kodierkatalog für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie Lebensmittelmonitoring (Katalog Nr. 3: Matrixkodes) gruppiert. Diese Codes sind in Fachkreisen als ZEBS-Codes bekannt. Im Folgenden wird daher die Bezeichnung ZEBS-Code verwendet.

Bei den Proben handelte es sich im Einzelnen um folgende Erzeugnisse und Produkte:

Speisegetreidekörner und Getreidemehle (Roggen, Weizen, Dinkel)

Brote (Roggenbrot, Roggenmischbrot, Weizenbrot, Weizenmischbrot)

Säuglings- und Kleinkindernahrung (Breie, Kinderkekse)

Konsummilch (Vollmilch 3,5 % Fett, pasteurisiert, homogenisiert)

Rohmilch

Tabelle 4: Produktgruppen und Anzahl der Proben.

Probenart	ZEBS-Code	n
Weizen- und Weizenmischbrot	17...	30
Roggen- und Roggenmischbrot	17...	30
Getreidemehle und Speisegetreidekörner	15...	118
Säuglings- und Kleinkindernahrung	48...	30
Polenta	16...	15
Milch	01...	18

3.2. Methoden

Für den gruppenspezifischen Nachweis von Ergotalkaloiden sowie für den Nachweis von Ergotamin und Ergocryptin wurden Methoden und Reagenzien verwendet, die im Rahmen eines Forschungsprojektes an der Professur für Milchwissenschaften entwickelt worden waren. Die für Vergleichsuntersuchungen eingesetzte HPLC-Methode war als hausinterne Methode an der Professur etabliert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zusätzlich ein enzymimmunologisches Verfahren zum Nachweis von Ergocornin entwickelt.

3.2.1. Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden

Bei dem im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelten und verwendeten „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) handelt es sich um ein quantitatives enzymimmunchemisches Verfahren im Mikrotitersystem zur Summenbestimmung des Gehalts an Ergotalkaloiden (EA) in Getreide, Getreidemehlen, Brot und Säuglings- und Kleinkindernahrung im Konzentrationsbereich (Summe der Ergotalkaloide) von $\geq 20 \mu\text{g/kg}$ (Brot $\geq 14 \mu\text{g/kg}$). Häufig wird synonym der Begriff Enzymimmuntest verwendet.

3.2.1.1. Herstellung und Überprüfung der Toxinstandards

Die Ergotalkaloid-Standards Ergometrin (Sigma E-7008), Ergotamin Tartrat (Fluka 45510), α -Ergocryptin (Sigma E-5625), Ergocornin (Sigma E-131) und Ergocristin (Sigma E-140) waren zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten kommerziell verfügbar. Kleinere Mengen von Ergosin (ca. $10 \mu\text{g}$) und β -Ergocryptin (ca. 10 mg) wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. O. Zoller (Bundesamt für Gesundheit, Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Ergosin war zudem am Institut mittels semipräparativer HPLC aus Mutterkorn isoliert worden und stand für die Untersuchungen zur Verfügung.

Die Epimere (-inin Formen) der oben angegebenen Ergotalkaloide wurden aus den entsprechenden -in Formen hergestellt. Dazu wurden jeweils 1 mg Alkaloid (Ergosin $0,5 \text{ mg}$) mit 1 ml Methanol aufgelöst und $40 \mu\text{l}$ Ammoniumhydroxid (25%ige wässrige Lösung) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Sekunden im Ultraschallbad gemischt und anschließend sieben Tage bei 37°C gelagert. Anschließend wurde der jeweilige Gehalt der -in und der -inin Form mittels HPLC bestimmt. Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität wurde die jeweilige -inin Form mittels semipräparativer HPLC abgetrennt und zur Vermeidung einer Rückumwandlung in die -in Form unmittelbar in den Immuntest eingesetzt. Die Quantifizierung dieser -inin Lösungen erfolgte parallel hierzu mittels HPLC.

3.2.1.2. Herstellung und Überprüfung der Enzymkonjugate

Zur Herstellung von Antikörpern wurden Ergometrin (Ergonovin), Ergotamin, Ergocornin und α -Ergocryptin ausgewählt. Diese Toxine standen zum einen in ausreichender Menge zur Verfügung, zum anderen repräsentierten sie jeweils alle immunologisch relevanten Teilgruppen (vergleiche Abbildung 2 und Abbildung 3), einfaches Lysergsäureamid, Phenylalanin-Typ, Valin-Typ, Leucin-Typ. Ergometrin stellte das aussichtsreichste Hapten für die Entwicklung gruppenspezifischer Antikörper dar. Bei den anderen drei Haptenen

wurde von der Annahme ausgegangen, dass aufgrund des Einflusses homologer Peptide in den Seitenketten jeweils Antikörper mit Teilspezifität für Ergotalkaloide erzielt werden können.

Zur Kopplung der Haptene Ergometrin, Ergotamin, Ergocornin, α -Ergocryptin und Ergocristin an Trägerproteine (Keyhole limpet hemocyanin, KLH; bovines Serumalbumin, BSA) bzw. an Meerrettichperoxidase (HRP) wurden mehrere Synthesereaktionen eingesetzt (Tabelle 5). Aufgrund des Reaktionsmechanismus war die Kopplungsstelle im Molekül dabei bei der Herstellung des Hemisuccinats klar definiert. Für die Reaktionsmechanismen unter Verwendung von Formaldehyd bzw. bei reduktiver Alkylierung kann die Aminogruppe des Indolrings B als wahrscheinlichste Kopplungsstelle angenommen werden. Für die Kopplung mittels Carbonyldiimidazol ist die Reaktion mit freien Hydroxylgruppen am wahrscheinlichsten.

Tabelle 5: Übersicht über sämtliche im Rahmen des Forschungsprojektes hergestellten Ergotalkaloid-Protein- bzw. Ergotalkaloid-Meerrettichperoxidase-Konjugate. Im Rahmen dieser Dissertation wurde schwerpunktmäßig mit Ergocornin gearbeitet.

Synthese- verfahren	Hapten-Konjugat				
	Ergometrin	Ergotamin	α -Ergocryptin	Ergocornin	Ergocristin
Mannich- Reaktion	<i>Ergometrin- KLH</i> Ergometrin- BSA	<i>Ergotamin- KLH</i> Ergotamin- BSA Ergotamin- HRP	<i>α-Ergocryptin- KLH</i> α -Ergocryptin- BSA	<i>Ergocornin- KLH</i> Ergocornin- BSA	-
Glutaraldehyd (GA)	-	Ergotamin- GA-HRP	α -Ergocryptin - GA-HRP	-	-
Reduktive Alkylierung mittels Perjodatmetho- de (Pj)	-	Ergotamin-Pj- HRP	α -Ergocryptin - Pj-HRP	Ergocornin-Pj- HRP	Ergocristin- Pj-HRP
Aktive Estermethode nach Herstellung des Hemisuccinats (HS)	Ergometrin- HS-HRP	Ergotamin- HS-HRP	-	-	-
Carbonyldiimi- dazol (CDI)	<i>Ergometrin- KLH</i> Ergometrin- CDI-HRP Ergometrin- BSA	<i>Ergotamin- KLH</i> Ergotamin- BSA Ergotamin- CDI-HRP	<i>α-Ergocryptin- KLH</i> α -Ergocryptin - BSA α -Ergocryptin- CDI-HRP	-	Ergocristin- CDI-BSA

KLH: Keyhole limpet hemocyanin

BSA: Bovines Serumalbumin

HRP: Meerrettichperoxidase

Konjugate in Kursivschrift wurden als Immunogene verwendet

3.2.1.2.1. Herstellung der Ergocornin-Protein- bzw. Enzymkonjugate

Im Folgenden sind die für *Ergocornin* eingesetzten Kopplungsreaktionen jeweils kurz beschrieben:

Kopplung an bovines Serumalbumin (BSA) mittels Mannich-Reaktion

Zur Kopplung von Ergocornin an BSA wurde die Formaldehydreaktion eingesetzt (Mannich-Kondensations-Reaktion). Dabei wurde die Kopplung einmal unter alkalischen Bedingungen in Natriumbicarbonatpuffer (pH 8,3) und einmal unter sauren Bedingungen in Acetatpuffer (pH 4,2) durchgeführt. Diese Ansätze werden im weiteren Verlauf als „BSA I“ bzw. „BSA II“ bezeichnet.

Für Ansatz BSA I wurde das Toxin in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und BSA-Lösung (in 1 ml 0,13 mol/l Bicarbonatpuffer, pH 8,3) zugegeben. Anschließend wurden 50 µl Formaldehyd (37 %) zugetropft, das Gemisch unter Rühren zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach gegen drei mal fünf Liter PBS (phosphate buffered saline = PBS, pH 7,2) dialysiert. Für die Durchführung von Ansatz BSA II wurde analog vorgegangen, lediglich BSA wurde in 800 µl Acetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,2) gelöst. Die verwendeten Mengenverhältnisse zwischen Toxin und Protein sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zur Kopplung von Ergocornin an BSA mittels Mannich-Reaktion verwendete Mengenverhältnisse zwischen Toxinstandard und Trägerprotein.

Toxin	Kopplung BSA I		Kopplung BSA II	
	Toxin	BSA	Toxin	BSA
Ergocornin	2 mg (3,2 µmol)	2 mg (32 nmol)	2 mg (3,2 µmol)	2 mg (32 nmol)

Kopplung an keyhole limpet hemocyanin (KLH) mittels Mannich-Reaktion

Die Kopplung von Ergocornin an das Protein KLH erfolgte ebenfalls mittels Formaldehydkopplung wie für BSA II beschrieben. Zur Kopplung an KLH wurden typischerweise 3 mg des Toxins in 100 µl DMSO gelöst. Hierzu wurden 15 mg KLH, gelöst in 2 ml Acetat-Puffer (0,1 ml/l, pH 4,2), zugegeben. Anschließend wurden tropfenweise 500 µl Formaldehyd (37 %) zugegeben, das Gemisch 16 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach drei mal zwei Stunden gegen PBS (je fünf Liter) dialysiert.

Herstellung weiterer enzymmarkierter Antigene (HRP-Konjugate)

Zur Überprüfung des Einflusses der Kopplungsmethode auf den direkten kompetitiven Enzymimmuntest erfolgten Experimente zur Kopplung von Ergocornin an HRP unter Verwendung weiterer Synthesereaktionen:

Reduktive Alkylierung: Bei dieser Kopplungsmethode wird im ersten Schritt HRP mittels Natriumperjodat aktiviert und anschließend das Toxin zugegeben. In einem typischen Reaktionsansatz wurden 12 mg HRP in 3 ml A. dest. gelöst, mit 0,6 ml 0,1 mol/l Natriumperjodatlösung versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dialyse gegen Natriumacetatpuffer (1 mmol/l, pH 4,4) wurde die aktivierte HRP-Lösung zu 2 mg Ergocornin zugegeben und der pH-Wert des Ansatzes mit 0,5 mol/l Natriumcarbonatlösung auf 7,5 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von eine Stunde bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über Nacht gegen PBS dialysiert. Angaben zu den verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zur Kopplung von Ergocornin an HRP verwendete Reagenzien und Mengenverhältnisse.

Toxin	Einwaage		
	Toxin	Protein	
<i>Reduktive Alkylierung</i> (<i>Perjodatkopplung, Pj</i>)		Perjodat	
Ergocornin	2 mg (3,1 µmol)	0,6 ml	12 mg (0,3 µmol)

3.2.1.2.2. Überprüfung der Enzymkonjugate

Zur Überprüfung der Toxin-Protein-Konjugate wurden spektrophotometrische Messungen (190 – 500 nm) durchgeführt. Hierzu wurden die Konjugate gegen Phosphatpuffer mit NaCl-Zusatz gemessen und der Proteingehalt anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden ermittelt. Anschließend erfolgte zur Bestimmung des gebundenen Toxingehalts eine weitere Messung der Konjugate gegen eine Proteinlösung mit der zuvor ermittelten Konzentration.

3.2.1.3. Immunisierung von Kaninchen

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern wurden mehrere Gruppen zu jeweils 2-3 Kaninchen mit den entsprechenden Toxin-KLH-Konjugaten (Tabelle 5) immunisiert. Hierzu wurden die Toxin-KLH-Konjugate mit PBS auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ml eingestellt und 0,5 ml mit 1,5 ml kompletten Freund'schen Adjuvants (Sigma, Taufkirchen)

emulgiert. Jedem zu immunisierenden Kaninchen wurden 2 ml der entsprechenden Emulsion durch intrakutane Injektion an je zehn Stellen pro Körperseite entlang der Wirbelsäule appliziert. Restimulierungen mit der gleichen Immunogenmenge und -zusammensetzung erfolgten in Abhängigkeit von der individuellen Serumtiterentwicklung, typischerweise in der 7.-11. Woche sowie erneut in der 25.-30. Immunisierungswoche. Zur Gewinnung ausreichender Antiserummengen wurden Immunisierungszeiten von mehr als einem Jahr gewählt. Blutentnahmen erfolgten alle zwei Wochen. Das Serum wurde durch Zentrifugation ($1.500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) abgetrennt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde jeweils eine Gruppe von drei Kaninchen mit Ergotamin-, Ergonovin- und Ergocryptin-KLH-Konjugaten immunisiert, sodass entsprechende Antiseren bereits zur Verfügung standen. Im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit wurde zudem eine Gruppe von drei Kaninchen mit demselben Verfahren wie bereits beschrieben mit Ergocornin-KLH-Konjugat immunisiert, um polyklonale Antikörper gegen Ergocornin zu gewinnen.

Um die Kaninchen eindeutig identifizieren bzw. das gewonnene Serum unmissverständlich beschriften zu können, wurden die Tiere mittels Ohrtätowierung mit einer Nummer versehen. So bedeutet im Folgenden z. B. K30/14, dass es sich hierbei um Serum von Kaninchen Nummer 30 handelt, das in der 14. Immunisierungswoche gewonnen wurde.

3.2.1.4. Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters

Die Überprüfung des Titerverlaufs erfolgte in zwei verschiedenen immunchemischen Testverfahren.

Im ersten, indirekten Testsystem wurden Mikrotiterplatten mit an BSA gekoppeltem Toxin als Festphasenantigen beschichtet (typischerweise 1:1.000 in Bicarbonatpuffer, pH 9,6; 0,05 mol/l). Nach Inkubation über Nacht bei RT wurden die Mikrotiterplatten mit 2 % Casein/PBS (0,01 mol/l PBS, pH 7,2) (200 μl /Kavität, 30 min) abgesättigt. Anschließend wurde durch einen Waschschrift unter Verwendung von NaCl-Tween-20-Lösung (0,15 mol/l) das ungebundene Material entfernt und das zu untersuchende Serum sowie Präimmunserum in Verdünnungsreihen (in PBS) auf die Platte pipettiert (100 μl /Kavität) und eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettichperoxidase (Dako, Hamburg), 1:1.000 in 1 % Casein/PBS verdünnt, auf die Platte pipettiert (100 μl /Kavität) und eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-

Lösung in 0,21 mol/l Citratpuffer, pH 3,9 mit Zusatz von 3,15 mmol/l H_2O_2) (100 μl /Kavität). Nach ca. 10 - 20 Minuten wurde die Immunreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 mol/l; 100 μl /Kavität) gestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Im zweiten, direkten Testsystem unter Verwendung von Toxin-HRP-Konjugaten wurden die Mikrotiterplatten mit Anti-Kaninchen-IgG (Dako, Hamburg) (10 $\mu\text{g/ml}$ in Bicarbonatpuffer; 100 μl /Kavität) beschichtet, über Nacht bei RT inkubiert und mit 2 % Casein/PBS abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurde das zu untersuchende Serum sowie Präimmunserum in Verdünnungsreihen (in PBS) sowie das entsprechende Toxin-HRP-Konjugat auf die Platte pipettiert (jeweils 50 μl /Kavität) und zwei Stunden inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung (100 μl /Kavität). Nach ca. 10 - 20 Minuten wurde die Immunreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450 nm bestimmt.

In Abbildung 5 ist der auf die beschriebene Weise überprüfte Titerverlauf eines Kaninchens dargestellt.

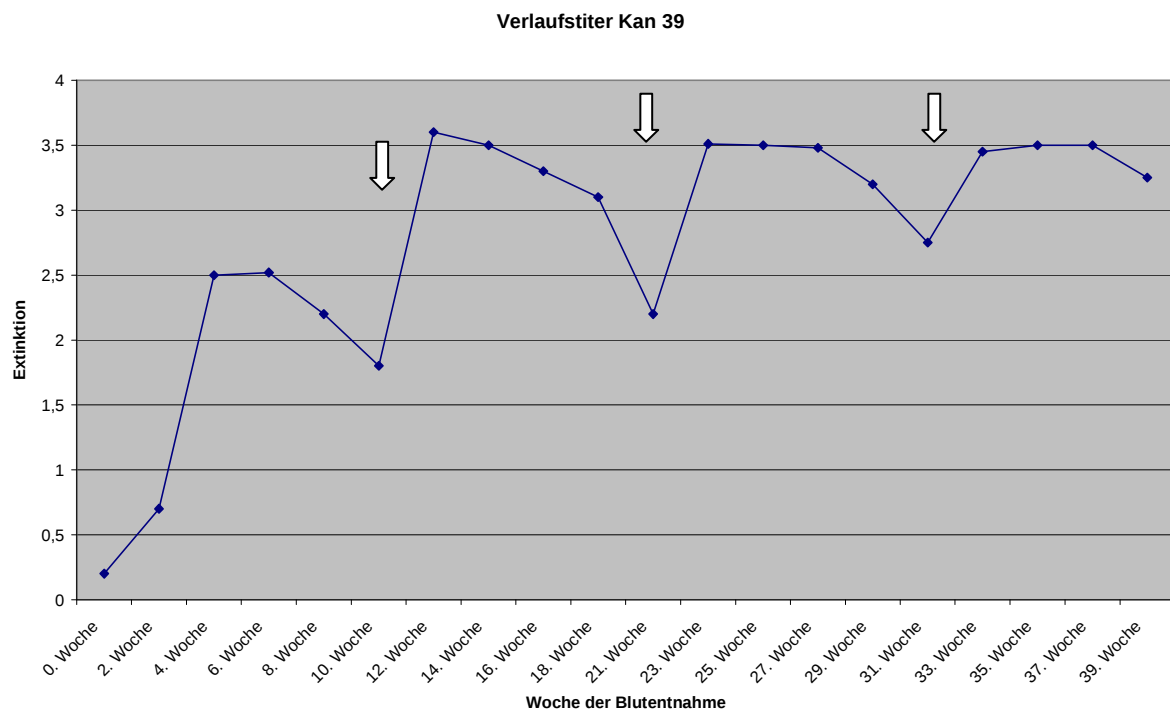


Abbildung 5: Titerverlauf von Kaninchen 39 über 39 Wochen; der Pfeil kennzeichnet jeweils den Zeitpunkt der Boosterung.

3.2.1.5. Überprüfung und Untersuchungen zur Optimierung des Testsystems für den Nachweis von Ergotalkaloiden

3.2.1.5.1. Überprüfung verschiedener Immunreagenzien

Mit geeigneten Antiseren wurden orientierend kompetitive EIAs erstellt, um schon während der laufenden Immunisierung Ergebnisse bezüglich Verwendbarkeit, Sensitivität und Spezifität der Antikörper gegen diese Mykotoxine zu erhalten. Hierzu wurden verschiedene direkte und indirekte EIAs mit verschiedenen Beschichtungen und Enzymkonjugaten getestet. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die getesteten Kombinationen. Da in der Regel mehrere verschiedene Seren zu testen waren, zumeist mehrere BSA- bzw. HRP-Konjugate prinzipiell geeignet waren und die Testbedingungen daher jeweils individuell modifiziert werden mussten, ergaben sich insgesamt weit mehr als 100 Testaufbauten für die Enzymimmuntests. Die BSA-Konjugate wurden jeweils im kompetitiven indirekten Testaufbau geprüft, die HRP-Konjugate jeweils im kompetitiven direkten Testaufbau.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Lösungsmittels zur Herstellung der Toxinstandardlösungen überprüft, wobei PBS mit einem pH-Wert von 7,3, PBS mit einem pH-Wert von 6,0 sowie 5 % Acetonitril-PBS (pH = 6,0) getestet wurden. Die beste Kombination (niedrigste 50%-Inhibitionsdosis) wurde zur weiteren Untersuchung von Probenmaterialien verwendet.

Tabelle 8: Übersicht über die zur Optimierung der Immunreagenzien getesteten Kombinationen aus Antiserum und markiertem Antigen. Diejenigen Kombinationen, die im Rahmen der tatsächlichen Untersuchung der Proben verwendet wurden, sind fett dargestellt.

Antiserum gegen	Markiertes Antigen (Hapten-Konjugat)									
	Ergometrin-		Ergotamin-		α -Ergocryptin-		Ergocornin-		Ergocristin	
	BSA	HRP	BSA	HRP	BSA	HRP	BSA	HRP	BSA	HRP
Ergometrin	X	X	-	X	-	X	-	-	-	-
Ergotamin	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X
α -Ergocryptin	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-
Ergocornin	X	X	X	-	X	-	X	X	-	-

X = geprüft

- = nicht geprüft

Direkter kompetitiver EIA (Doppelantikörperteknik): Mikrotiterplatten wurden mit Anti-Kaninchen-IgG (Dako, Hamburg; 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2 % Casein/PBS abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden jeweils im Vierfachansatz Toxinstandardlösungen zupipettiert (35 µl/Kavität). Anschließend wurden Antiserumlösung und Toxin-Enzymkonjugatlösung zupipettiert (jeweils 35 µl/Kavität). Nach einer Inkubation von zwei Stunden wurden die Platten gewaschen und Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zupipettiert. Nach 10 - 20 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Mit den in diesen Versuchen ermittelten optimalen Immunreagenzien wurden EIAs zum Nachweis von Ergometrin bzw. Ergotamin (direkte Beschichtung mit Antikörpern) evaluiert. Hierzu wurde zusätzlich eine Überprüfung des Einflusses des Lösungsmittels zur Herstellung der Toxinstandardlösungen durchgeführt: es wurden Aqua dest, PBS mit einem pH-Wert von 7,3, PBS mit einem pH-Wert von 6,0 sowie 5 % Acetonitril-PBS (pH = 6,0) getestet. Die beste Kombination (niedrigste 50%-Inhibitionsdosis) wurde zur weiteren Untersuchung von Probenmaterialien verwendet.

Indirekter kompetitiver EIA: Mikrotiterplatten wurden mit Lösungen der entsprechenden Toxin-Proteinkonjugate beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2 % Casein-PBS abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurde das jeweilige Antiserum sowie Toxinstandardlösung zupipettiert (jeweils 50 µl/Kavität, vier Kavitäten je Konzentration). Anschließend wurden die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugatlösung (1:1.000 in 1 % Casein/PBS, 100 µl/Kavität) zupipettiert und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten gewaschen und Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zupipettiert. Nach 10 - 20 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

3.2.1.5.2. Bestimmung der Spezifität der EIAs zum Nachweis von Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin bzw. Ergocornin

Im Verlauf der Testentwicklung wurde mehrfach orientierend die Spezifität, d. h. die Kreuzreaktionen der einzelnen Testsysteme mit anderen Ergotalkaloiden, geprüft. Zur endgültigen Prüfung der Testspezifität wurden die im Hinblick auf Testsensitivität

optimierten Immunreagenzien für Ergotamin (K32/14; Ergotamin-PJ-HRP) sowie für Ergometrin (K29/Pool 1; Ergometrin-HS-HRP) in direkten EIAs verwendet. Die Spezifitätsprüfung des Tests für α -Ergocryptin erfolgte im indirekten kompetitiven EIA unter Verwendung von Antiserum K34/12 und Ergotamin-BSA-I. Die Spezifitätsprüfung des Tests für Ergocornin erfolgte im indirekten kompetitiven EIA unter Verwendung von Antiserum K39/12 und α -Ergocryptin-BSA I.

Die Prüfung erfolgte unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Toxinstandards (Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocristin, Ergocornin, Ergosin, sowie die jeweiligen -inin Formen) in Maximalkonzentrationen von 10 μ g/ml (in 5 % Acetonitril-PBS, pH 6). Die Bereiche der Standardkonzentrationen der Referenzsubstanz betrugen für den Ergometrin-EIA 15 ng/ml - 0,005 ng/ml, für den Ergotamin-EIA 200 ng/ml - 0,064 ng/ml, für den α -Ergocryptin-EIA 100 ng/ml - 0,032 ng/ml sowie für den Ergocornin-EIA 1000 ng/ml - 1 ng/ml.

3.2.2. Untersuchung von Probenmaterialien

Nachdem die Entwicklung der EIA zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln abgeschlossen war (siehe Kapitel 3.2.1.), wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes zahlreiche Lebensmittelproben unter Verwendung des neuen Nachweisverfahrens auf den Gehalt an Mutterkornalkaloiden untersucht.

Der Umfang der Probenmaterialien wurde bereits in Kapitel 3.1.7 beschrieben. Neben der Untersuchung von 223 getreidehaltigen Lebensmitteln des deutschen Marktes und 18 Milchproben wurden einige Proben künstlich kontaminiert, um im Verlauf der Testentwicklung die Spezifität, d. h. die Kreuzreaktionen mit anderen Ergotalkaloiden zu prüfen.

3.2.2.1. Vorbereitung und Extraktion

Mehle wurden ohne weitere Vorbehandlung untersucht. Brot bzw. Brötchen wurden nach Ermittlung des Feuchtgewichtes getrocknet und anschließend zur Ermittlung des Trocknungsfaktors rückgewogen und in einer Moulinette gemahlen.

Zur Extraktion wurden fünf Gramm des gemahlenen Probenmaterials in ein Becherglas eingewogen, 25 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60/40; v/v) zugegeben und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät extrahiert (ca. 700 upm). Anschließend wurde das Extraktionsgemisch einige Minuten ohne Rühren stehen gelassen, bis sich der größte Teil der Feststoffe abgesetzt

hatte. Mittels einer Eppendorf-Pipette (1 ml oder 2 ml Einwegspitze) wurde ein Aliquot von ca. 2 ml des Extraktes aus Becherglas (oberen flüssigen Bereich verwenden, kann geringe Anteile von Feststoffen enthalten) in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (11.000 x g, 20 °C, vier Minuten). Zur Untersuchung im Enzymimmuntest wurde ein Volumenteil des Überstandes mit neun Teilen PBS (pH 6,0) verdünnt (= erste im Enzymimmuntest eingesetzte Extraktverdünnung). Der aus Extraktion und Extraktverdünnung resultierende Probenverdünnungsfaktor beträgt somit 50. Höhere Verdünnungen können bei stärker mit EA kontaminierten Probenmaterialien erforderlich sein und werden durch Mischung der ersten im Enzymimmuntest eingesetzten Verdünnungsstufe mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5/95; v/v) hergestellt (z. B. ein Teil Extraktverdünnung mit zwei Teilen Acetonitril/PBS, Probenverdünnungsfaktor 150).

Zur Untersuchung von Milch wurden alle Proben zu Anfang unverändert in den EIA eingesetzt. Des Weiteren wurden einige der 18 Proben durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min, 20 °C) entfettet bzw. mit β -Glucuronidase versetzt untersucht. Zur Untersuchung mit β -Glucuronidase wurden 25 ml Milch mit 25.000 Einheiten β -Glucuronidase zwei Stunden bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert und anschließend zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 20 °C). Das Fett wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die so vorbereitete Milch in den EIA eingesetzt. Weitere Verdünnungsstufen wurden mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5/95; v/v) hergestellt.

3.2.2.2. Untersuchung von Probenmaterialien mittels EIA

Zur Probenuntersuchung wurden ein kompetitiver direkter EIA für Ergotamin (K32/14; Ergotamin-PJ-HRP), ein kompetitiver direkter EIA für Ergometrin (K29/Pool; Ergometrin-HS-HRP) ein kompetitiver indirekter EIA für α -Ergocryptin (K34/12; Ergotamin-BSA I) sowie ein kompetitiver indirekter EIA für Ergocornin (K39/12; α -Ergocryptin-BSA I) verwendet.

Es wurden sowohl die Einflüsse von Probenmatrices als auch die erreichbare Wiederfindungsrate für Zusätze von Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin bzw. Ergocornin untersucht. Dabei sollte die Probenvorbereitung möglichst einfach in der Durchführung sein und insbesondere keine aufwändigen Extraktreinigungsschritte erforderlich sein.

Zur Entwicklung eines gruppenspezifischen Nachweises für Ergotalkaloide wurden aufgrund der Ergebnisse der Spezifitätstests prinzipiell die Reagenzien des Ergometrin-EIA verwendet. Zur Erstellung der Standardkurven in diesem als „Generic Ergot Alkaloid“ bezeichneten Test wurde ein Toxinmix aus Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin (1:10:14) verwendet. Dieser immunchemische Nachweis zur Summenerfassung der Ergotalkaloide wurde im Format einer § 64-LFGB-Methode detailliert beschrieben.

3.2.2.3. HPLC-Analysen

Zur Isolierung von Standardtoxin sowie zur Validierung der Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergotalkaloiden wurde an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität in Gießen im Rahmen dieses Forschungsprojektes eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion entwickelt und optimiert. Diese Methode wurde für den Nachweis von 14 Ergotalkaloiden in Getreide und Getreideerzeugnissen validiert und im Rahmen eines § 64-LFGB-Ringversuches erfolgreich geprüft.

Zur Validierung insbesondere des immunchemischen gruppenspezifischen Nachweises von Ergotalkaloiden wurden insgesamt 223 Proben aus dem Lebensmitteleinzelhandel bezogen und nach dem beschriebenen Verfahren untersucht. Ausgewählte Proben (n = 53) wurden parallel mit der an der Professur für Milchwissenschaften entwickelten HPLC-Methode untersucht und die Einzelalkaloide quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse des Enzymimmuntests und diejenigen der HPLC wurden miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Antikörper gegen Ergotalkaloide

Die Überprüfung der Syntheseprodukte aus der Kopplung von Ergotalkaloiden an Proteine und an HRP zeigte, dass mit allen Methoden Ergotalkaloide erfolgreich an Proteinträger gebunden wurden. Dies lässt jedoch noch keine definitiven Aussagen über die Verwendbarkeit solcher Konjugate als Immunogen oder im EIA (als markiertes Antigen) zu. Daher war es erforderlich, dass zur Ermittlung der optimalen Reagenzien umfangreiche immunchemische Studien unter Verwendung dieser hergestellten Konjugate durchgeführt wurden.

Nach Immunisierung von Kaninchen mit den mittels Carbonyldiimidazol hergestellten Ergotalkaloid-KLH-Konjugaten konnten nur für Ergometrin spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Weitere Immunisierungsreihen unter Verwendung von mittels Mannich-Reaktion hergestellten KLH-Konjugaten von Ergotamin, Ergocornin bzw. α -Ergocryptin ergaben in allen Fällen spezifische Immunantworten. Ein spezifischer Anti-Toxin Antikörpertiter in den Seren der immunisierten Tiere konnte sowohl im indirekten Testsystem als auch im direkten Testsystem (Doppelantikörpertechnik) unter Verwendung der Toxin-HRP-Konjugate nachgewiesen werden.

4.2. Testsensitivität

Bei der Überprüfung der hergestellten Toxin-Protein-Konjugate und Toxin-Enzymkonjugate in indirekten und direkten Testsystemen zeigte sich, dass nur einige der hergestellten Immunreagenzien die Etablierung Toxin-spezifischer Testsysteme ermöglichten, d. h., die Bindung an das markierte Antigen durch freies Toxin inhibiert werden konnte. Generell als gut geeignet erwiesen sich z. B. im Ergotamin-Test die mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Perjodat synthetisierten Toxin-Enzymkonjugate (Toxin-PJ-HRP). Die mit Hilfe von Glutaraldehyd hergestellten Toxin-HRP-Konjugate erwiesen sich aufgrund nicht ausreichender spezifischer Bindung an Antikörper als ungeeignet, daher wurden mit diesen Reagenzien keine weiteren Versuche durchgeführt. Anhand der erreichten Extinktionen des Nullwertes und der 50 % Inhibitionskonzentrationen im EIA wurde die praktische Eignung ermittelt und der weitere Einsatz im Test bestimmt. Dabei wurde ersichtlich, dass sich die verschiedenen Testvarianten sowohl im Hinblick auf die mögliche Verdünnung des Antiserums als auch auf die erreichbaren 50 % Inhibitionskonzentrationen zum Teil

dramatisch unterschieden. Für den Nachweis von Ergotamin lagen beispielsweise mögliche Arbeitsverdünnungen der Antiseren zwischen 1:500 bis 1:16.000 vor, die 50 %-Dosen unterschieden sich um einen Faktor von mehr als 100. Als ein weiterer, die Testsensitivität beeinflussender Faktor wurde das zur Herstellung von Toxinstandardlösungen für den EIA verwendete Lösungsmittel identifiziert. Weit stärker als dies für andere Tests für Mykotoxine bisher beobachtet wurde, wurde ein starker Einfluss auf die allgemeinen Testeigenschaften, insbesondere aber auf die Sensitivität der Standardkurve festgestellt. Am stärksten war dieser Effekt für Ergotamin und α -Ergocryptin ausgeprägt, je nach Lösungsmittel wurden um bis zu 50-fach „bessere“ oder „schlechtere“ Nachweisgrenzen erzielt, was sich in deutlichen Links- bzw. Rechtsverschiebungen der Standardkurve auf der Konzentrationsachse äußerte. Als optimales Lösungsmittel zur Herstellung von Toxinstandardlösungen sowie zur Verdünnung von Probenextrakten erwies sich phosphatgepufferte Kochsalzlösung, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,0 und mit einem Zusatz von 5 % Acetonitril (5 % Acetonitril-PBS pH 6). Dieses Lösungsmittel erwies sich auch als gut geeignet für den Nachweis im Ergocornin-EIA und scheint für alle Ergotalkaloide brauchbar zu sein.

Der im Hinblick auf Nachweisempfindlichkeit geeignetste Test war der kompetitive direkte Enzymimmuntest für Ergometrin (Abbildung 6). Für die weiteren Untersuchungen unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin wurde ein kompetitiver direkter EIA unter Verwendung des Antiserums K29/Pool (Immunogen Ergometrin-CDI-KLH) in Kombination mit Ergometrin-HS-HRP gewählt. In diesem EIA wurden für Ergometrin 50 %-Inhibitionskonzentrationen von ca. 0,1 ng/ml sowie Nachweisgrenzen (ca. 80 % B/B₀) für Ergometrin von ca. 30 (20-50) pg/ml festgestellt. Dieser Test ist somit das bisher empfindlichste Verfahren zum Nachweis eines Ergotalkaloids.

Das optimierte Testsystem für Ergotamin war ebenfalls ein kompetitiver indirekter Enzymimmuntest mit einer Nachweisgrenze im Bereich von ca. 0,2 (0,1-0,3) ng/ml (Abbildung 7). Für die Nachweise von α -Ergocryptin (Abbildung 8) bzw. von Ergocornin (Abbildung 9) waren die optimalen Testvarianten kompetitive indirekte Enzymimmuntests unter Verwendung heterologer Ergotalkaloid-Konjugate als Festphasenantigene. Die Nachweisgrenzen lagen hier etwas höher, für α -Ergocryptin bei ca. 1 ng/ml und für Ergocornin bei ca. 3 ng/ml.

Eine Übersicht über die für die vier Ergotalkaloide entwickelten, jeweils optimierten Enzymimmuntests ist in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Übersicht über die nach Testoptimierung etablierten kompetitiven enzymimmunchemischen Nachweisverfahren für Ergotalkaloide.

Nachweis von	Test- aufbau	Antikörper (Bezeichnung) gegen	Ergot-HRP- konjugat	Ergot-BSA Festphasen- antigen	Mittlere 50% Inhibitions- konzentration der Standard- kurve
Ergotalkaloiden gesamt (Gruppen- spezifischer Test, „Generic Ergot Alkaloid“)	direkt	Ergometrin (K29 Pool) 1:2000	Ergometrin- HS-HRP 1:2000	--	1,52 ng/ml
Ergometrin	direkt	Ergometrin (K29 Pool) 1:2000	Ergometrin- HS-HRP 1:2000	--	0,16 ng/ml
Ergotamin	direkt	Ergotamin (K32/14) 1:2000	Ergotamin-Pj- HRP 1:1000	--	0,55 ng/ml
α -Ergocryptin	indirekt	α -Ergocryptin (K34/12) 1:5000	--	Ergotamin- BSA I 1:1000	2,0 ng/ml
Ergocornin	indirekt	Ergocornin (K39/12) 1:2000	--	α -Ergocryptin- BSA I 1:500	8,7 ng/ml

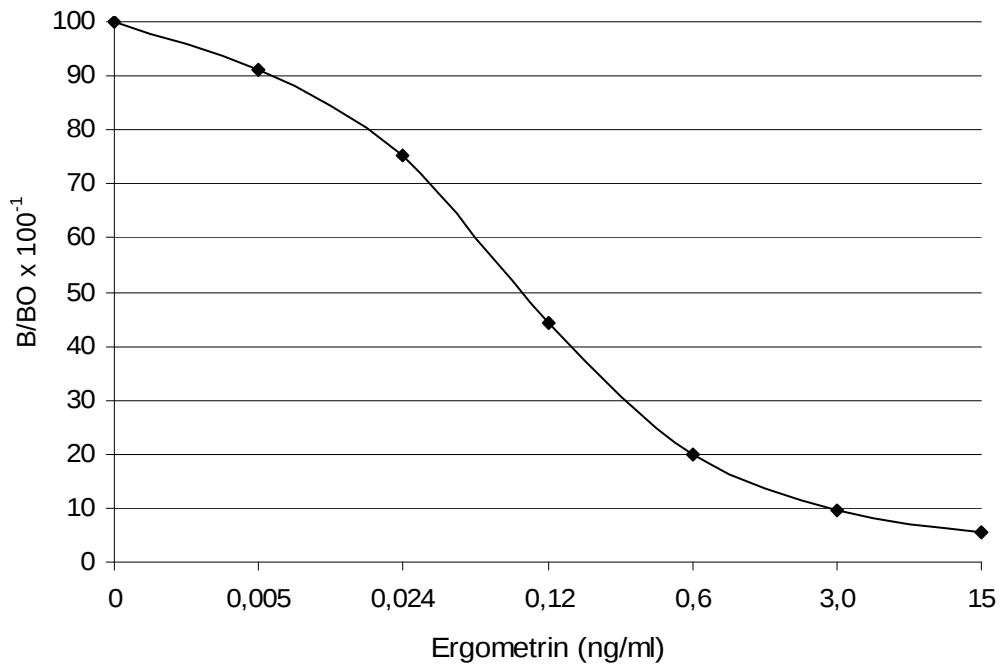


Abbildung 6: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von Ergometrin (Antiserum K29 Pool/Ergometrin-HS-HRP). Die mittlere 50%-Inhibitionskonzentration (Ergometrin) lag bei 0,16 ng/ml, die Nachweisgrenze (80 % B/B₀) bei 0,03 (0,02-0,05) ng/ml.

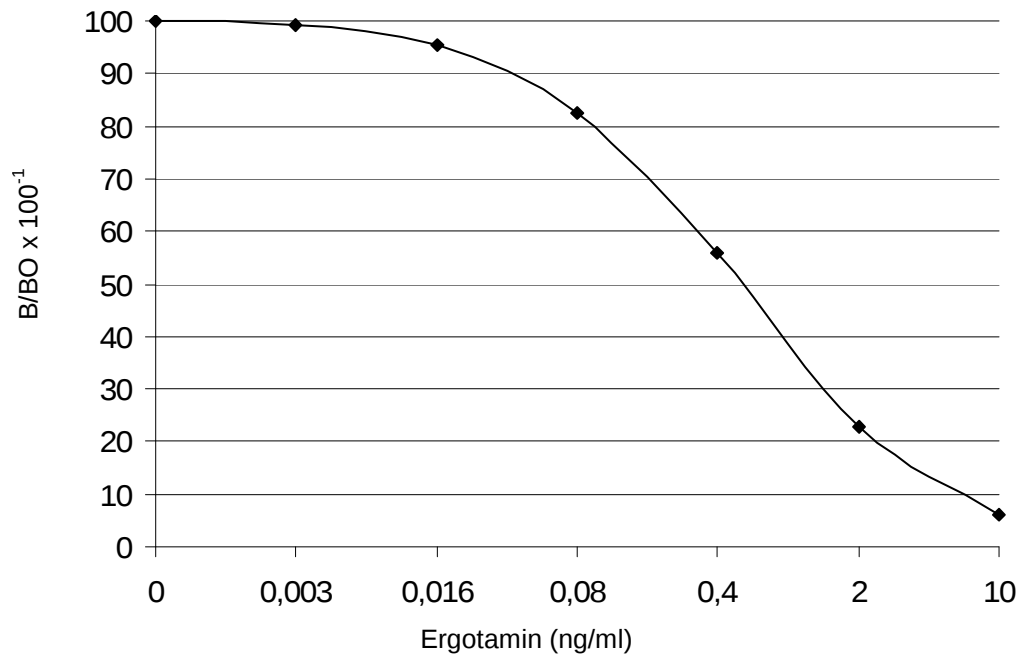


Abbildung 7: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von Ergotamin (Antiserum K32/14; Ergotamin-Pj-HRP). Die mittlere 50%-Inhibitionskonzentration (Ergotamin) lag bei 0,55 ng/ml, die Nachweisgrenze (80 % B/B₀) bei 0,2 (0,1-0,3) ng/ml.

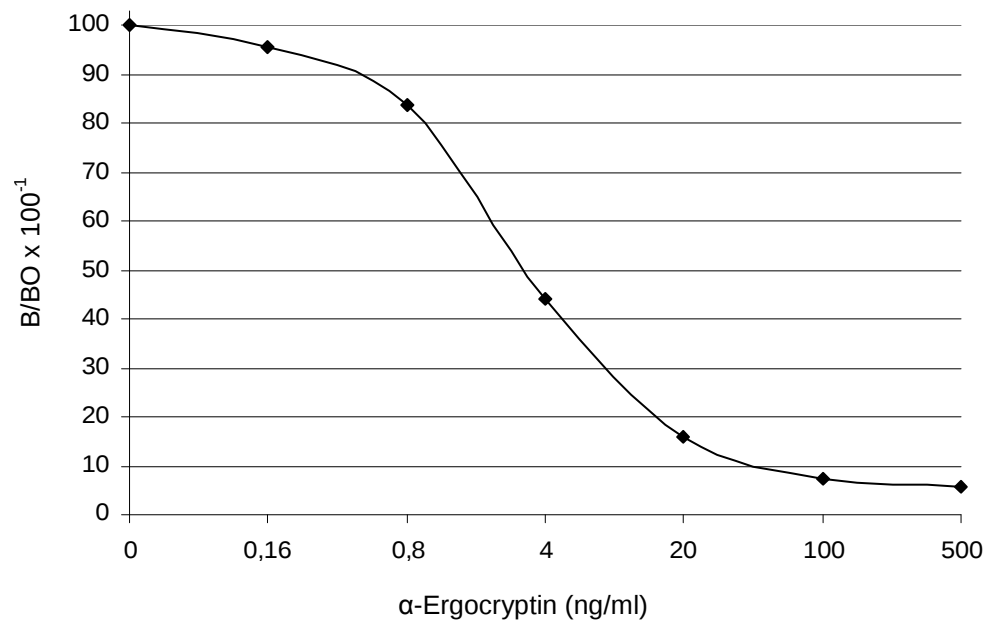


Abbildung 8: Typische Standardkurve des kompetitiven indirekten EIA zum Nachweis von α -Ergocryptin (K34/12; Ergotamin-BSA I). Die mittlere 50%-Inhibitionskonzentration (α -Ergocryptin) lag bei 2,0 ng/ml, die Nachweisgrenze (80 % B/B_0) bei 1 (0,5-2) ng/ml.

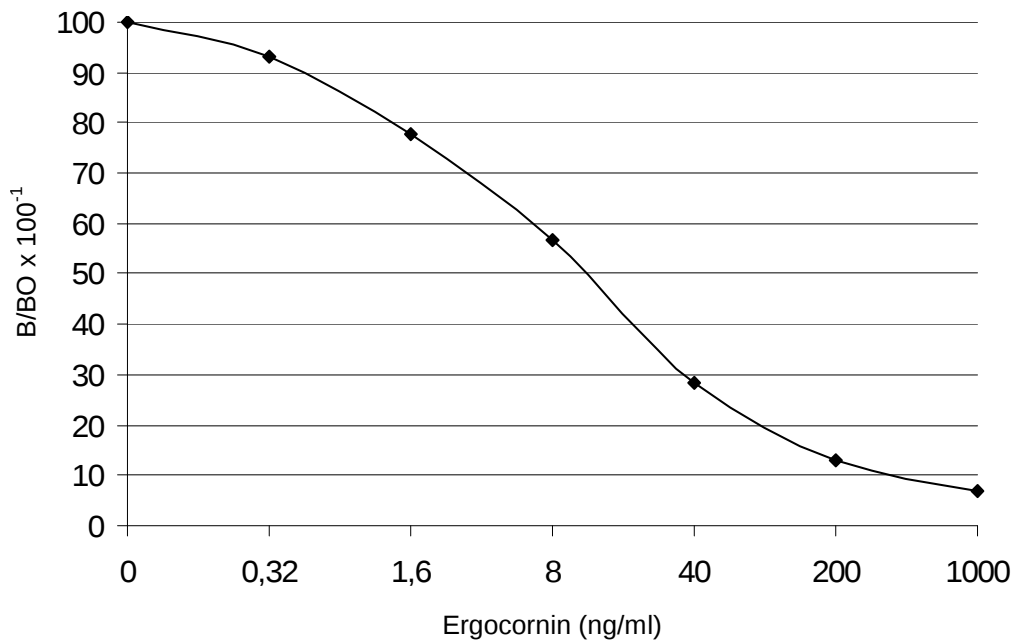


Abbildung 9: Typische Standardkurve des kompetitiven indirekten EIA zum Nachweis von Ergocornin (K39/12; α -Ergocryptin-BSA I). Die mittlere 50%-Inhibitionskonzentration (Ergocornin) lag bei 8,7 ng/ml, die Nachweisgrenze (80 % B/B₀) bei 2 (1-3) ng/ml.

4.3. Testspezifität

Zur Ermittlung der Testspezifität wurden diverse Untersuchungen mit den vier optimierten Testsystemen durchgeführt und dabei die relativen Kreuzreaktionen für 14 Ergotalkaloide (sieben -ine und sieben -inine) ermittelt.

Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Untersuchungen ist in Tabelle 10 dargestellt.

Zur Veranschaulichung der in Tabelle 10 dargestellten Werte sind in Abbildung 10 für Ergometrin, in Abbildung 13 für Ergotamin, in Abbildung 15 für α -Ergocryptin und in Abbildung 17 für Ergocornin die individuellen Struktur-Kreuzreaktivitäts-Beziehungen für jedes Testsystem dargestellt.

Die absoluten Reaktivitäten der -inin Form jedes Ergotalkaloids im Verhältnis zur jeweiligen -in Form sind in Abbildung 11, Abbildung 14, Abbildung 16 und Abbildung 18 sowie die relativen Reaktivitäten in Abbildung 12 dargestellt, bezogen auf die „Ergomix“-Standardlösung.

Tabelle 10: Zusammenstellung der ermittelten relativen Kreuzreaktionen für 14 Ergotalkaloide (7 -ine und 7 -inine) in den EIAs für Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin. Zum Vergleich sind die im gruppenspezifischen Nachweis von Ergotalkaloiden „Generic Ergot Alkaloid“ erhaltenen 50 %-Inhibitionskonzentrationen dieser Alkaloide angegeben. Für jedes Toxin wurden Standardkurven im entsprechenden Enzymimmunttest erstellt und die zur halbmaximalen Bindung (50 % Inhibition) führende Konzentration ermittelt.

Alkaloid	Molekular- gewicht (g/mol)	„Generic Ergot Alkaloid“ EIA		Ergometrin-EIA		Ergotamin-EIA		α -Ergocryptin-EIA		Ergocornin-EIA	
		50 %-Inhibition (ng/ml)	50 %-Inhibition (ng/ml)	50 %-Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %-Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %-Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %-Inhibition (ng/ml)	KR (%)
Ergometrin	325,4	0,19	0,16	100	0,008	3790	0,008	10000	0,01	>1000	<1
Ergosin	533,7	35,9	26,7	1	0,09	554	0,09	21,6	8,58	>1000	<1
Ergocornin	561,7	17,3	12,9	2,1	0,048	1109	0,048	68,3	2,86	8,7	100
α -Ergocryptin	575,7	51,2	47,9	0,7	0,16	344	0,16	2	100	253	3,35
β -Ergocryptin	575,7	21,8	9,6	2,9	0,044	1230	0,044	18,4	10,9	41,1	21,7
Ergotamin	581,5	5,6	4,1	7	100	0,55	100	560,3	0,4	>1000	<1
Ergocristin	609,7	16,3	11,1	2,7	10,9	5,3	10,9	103,6	2	>1000	<1
Ergometrinin	325,4	42,9	12,5	1,28	0,024	1273	0,024	1885	0,06	1417	0,36
Ergosinin	533,7	130,3	156	0,17	1,01	50	1,01	17,6	10,5	248	3,33
Ergocorninin	561,7	204	202	0,14	0,03	2044	0,03	88	2,22	5	174
α -Ergocryptinin	575,7	1047,6	1445	0,01	0,03	2162	0,03	20	10	125	6,79
β -Ergocryptinin	575,7	916,1	921	0,03	0,1	553	0,1	18,2	11	3,7	241
Ergotaminin	581,5	38,3	29,3	1	68,8	0,8	68,8	239,6	0,8	417	2,2
Ergocristinin	609,7	214,8	177	0,05	5,3	9,9	5,3	135	1,4	1340	0,6

Ergometrin 100 %	Ergometrinin 1,28 %

Ergotamin 7,0 %	Ergotaminin 1,0 %	<i>Ergostin</i> 2-7 %	<i>Ergostinin</i> 0,05-1 %	Ergocristin 2,7 %	Ergocristinin 0,05 %

<i>Ergovalin</i> >2,1 %	<i>Ergovalinin</i> >0,14 %	<i>Ergonin</i> >2,1 %	<i>Ergoninin</i> >0,14 %	Ergocornin 2,1 %	Ergocorninin 0,14 %

Ergosin 1,0 %	Ergosinin 0,17 %	<i>α-Ergocryptin</i> 0,7 %	<i>α-Ergocryptinin</i> 0,01 %	β-Ergocryptin 2,9 %	β-Ergocryptinin 0,03 %

Abbildung 10: Relative Kreuzreaktionen in Relation zur chemischen Struktur von Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten Enzymimmunttest unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin. Werte im Fettdruck beruhen auf experimenteller Bestimmung, Werte in *Kursivschrift* für weitere Alkaloide (Standards nicht verfügbar) wurden aufgrund der Ergebnisse der experimentellen Bestimmungen geschätzt.

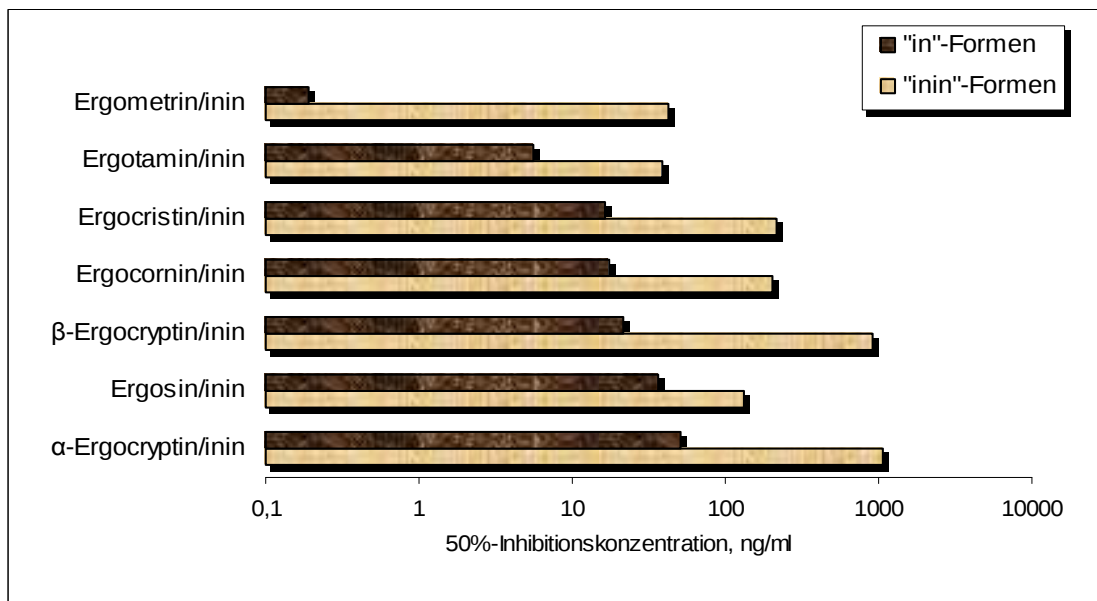


Abbildung 11: Vergleich der Erfassbarkeit der -inin Form und der -in Form eines Ergotalkaloids für die 14 geprüften Ergotalkaloide im gruppenspezifischen Testsystem für Ergotalkaloide (Generic Ergot Alkaloide, Ergometrin-Antikörper). Als Maß wurde jeweils die 50%-Inhibitionskonzentration der für jedes Alkaloid erstellten Standardkurve verwendet.

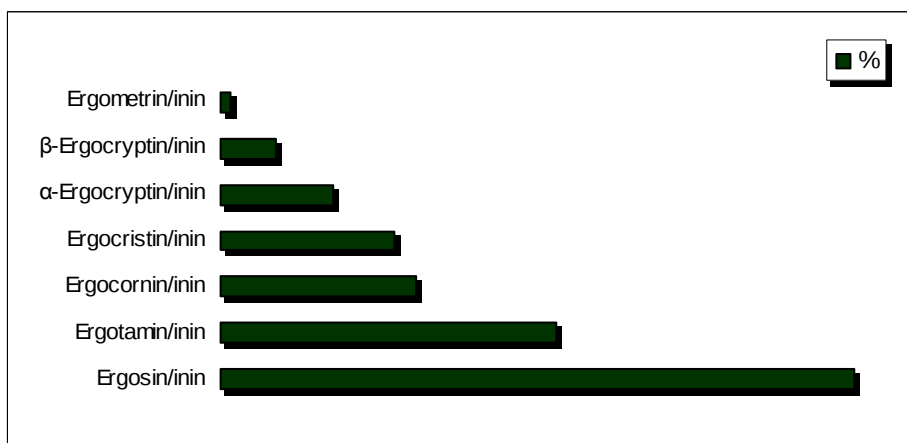


Abbildung 12: Relation der Kreuzreaktivität der -inin Form und der -in Form eines Ergotalkaloids für die 14 geprüften Ergotalkaloide im gruppenspezifischen Testsystem für Ergotalkaloide („Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmunttest, Ergometrin-Antikörper). Die Kreuzreaktivität der -inin Form ist hierbei als Prozentsatz in Bezug auf die -in Form desselben Ergotalkaloids ausgedrückt.

Ergometrin 0,008 %	Ergometrinin 0,024 %

Ergotamin 100 %	Ergotaminin 68,8 %	<i>Ergostin</i> <i>10,9-100 %</i>	<i>Ergostinin</i> <i>5,3-68,8 %</i>	Ergocristin 10,9 %	Ergocristinin 5,3 %

<i>Ergovalin</i> <i>>0,048 %</i>	<i>Ergovalinin</i> <i>>0,03 %</i>	<i>Ergonin</i> <i>>0,048 %</i>	<i>Ergoninin</i> <i>>0,03 %</i>	Ergocornin 0,048 %	Ergocorninin 0,03 %

Ergosin 0,09 %	Ergosinin 1,01 %	α-Ergocryptin 0,16 %	α-Ergocryptinin 0,03 %	β-Ergocryptin 0,044 %	β-Ergocryptinin 0,1 %

Abbildung 13: Relative Kreuzreaktionen in Relation zur chemischen Struktur von Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten Enzymimmuntest unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergotamin. Werte im Fettdruck beruhen auf experimenteller Bestimmung, Werte in *Kursivschrift* für weitere Alkaloide (Standards nicht verfügbar) wurden aufgrund der Ergebnisse der experimentellen Bestimmungen geschätzt.

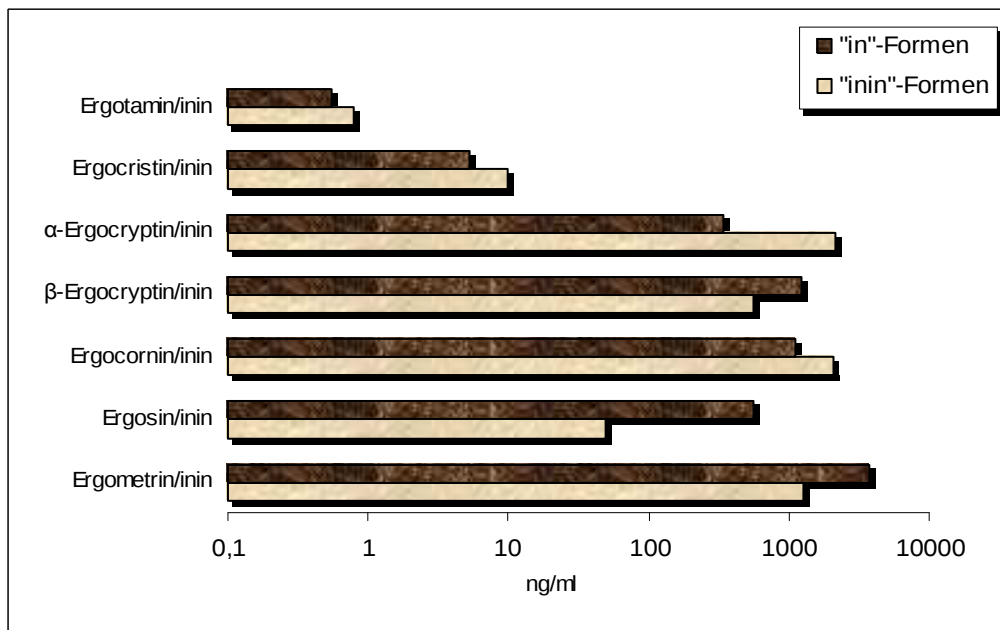
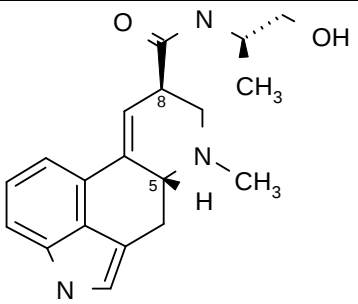
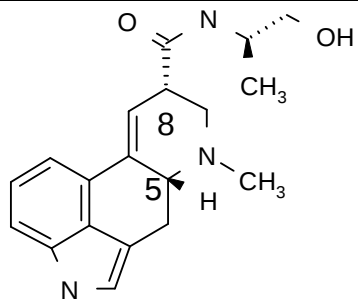
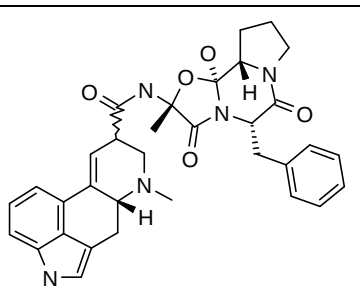
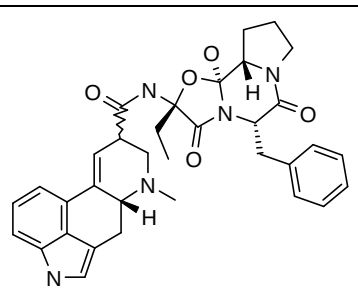
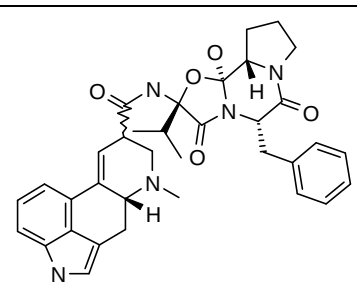
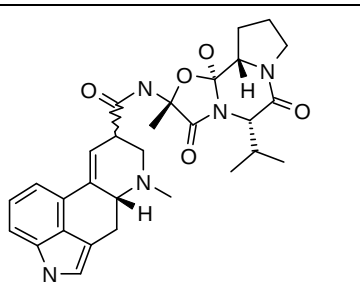
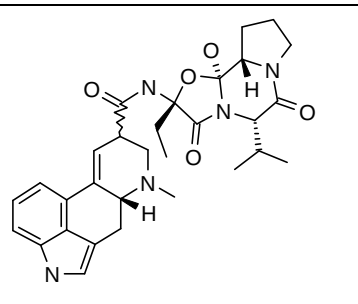
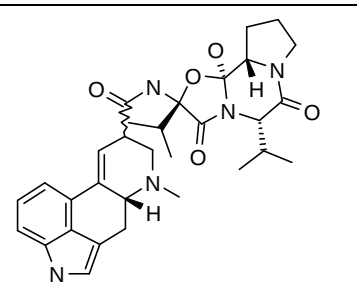


Abbildung 14: Vergleich der Erfassbarkeit der -inin Form und der -in Form eines Ergotalkaloids für die 14 geprüften Ergotalkaloide im Testsystem für Ergotamin. Als Maß wurde jeweils die 50 %-Inhibitionskonzentration der für jedes Alkaloid erstellten Standardkurve verwendet.

	
Ergometrin 0,01 %	Ergometrinin 0,06 %

					
Ergotamin 0,4 %	Ergotaminin 0,8 %	<i>Ergostin</i> <i>0,4-2 %</i>	<i>Ergostinin</i> <i>0,8-1,4 %</i>	Ergocristin 2,0 %	Ergocristinin 1,4 %

					
<i>Ergovalin</i> <1 %	<i>Ergovalinin</i> <1 %	<i>Ergonin</i> <3 %	<i>Ergoninin</i> <2 %	Ergocornin 2,9 %	Ergocorninin 2.2 %

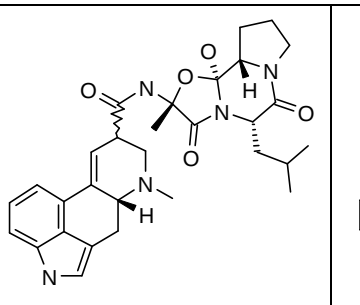
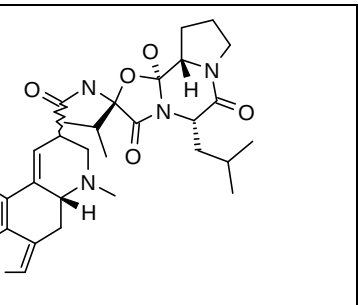
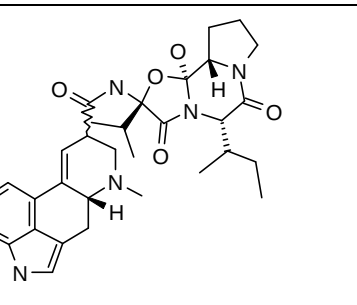
					
Ergosin 0.09 %	Ergosinin 1.01 %	α-Ergocryptin 100 %	α-Ergocryptinin 10.0 %	β-Ergocryptin 10.9 %	β-Ergocryptinin 11.0 %

Abbildung 15: Relative Kreuzreaktionen in Relation zur chemischen Struktur von Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten Enzymimmunttest unter Verwendung von Antikörpern gegen α -Ergocryptin. Werte im Fettdruck beruhen auf experimenteller Bestimmung, Werte in *Kursivschrift* für weitere Alkaloide (Standards nicht verfügbar) wurden aufgrund der Ergebnisse der experimentellen Bestimmungen geschätzt.

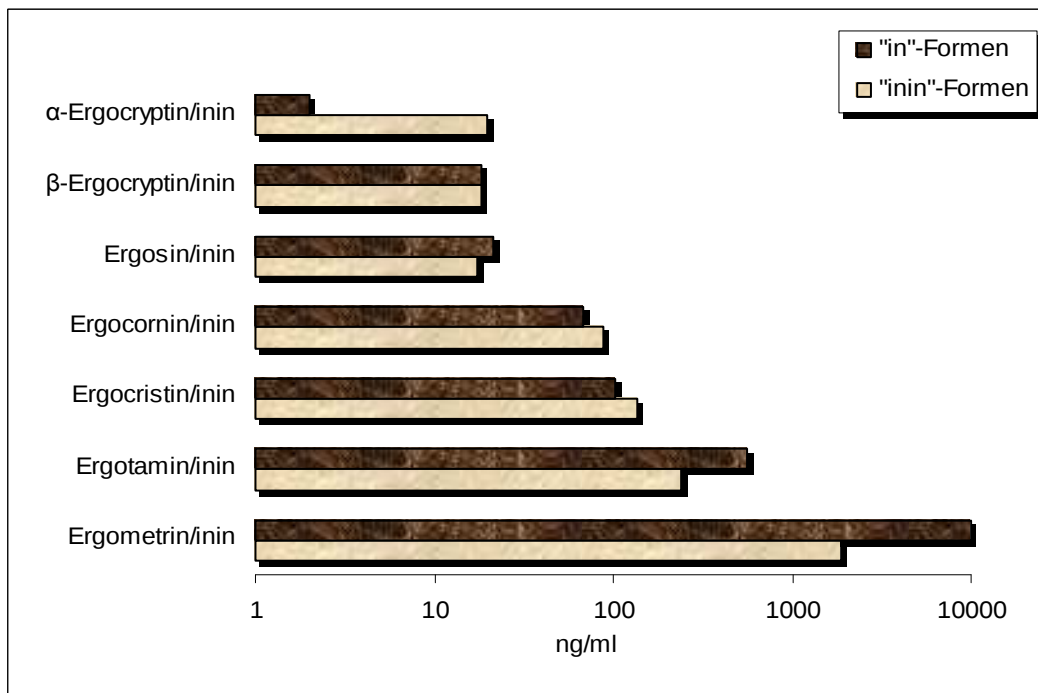
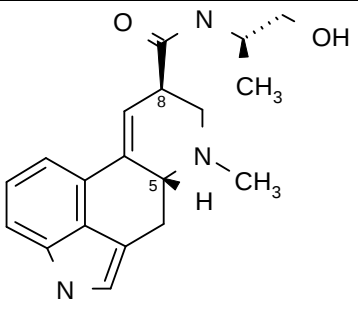
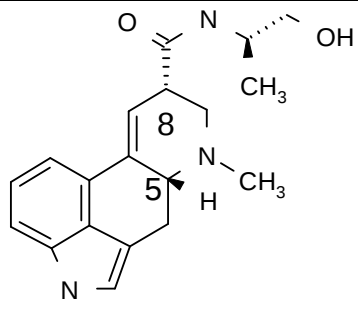
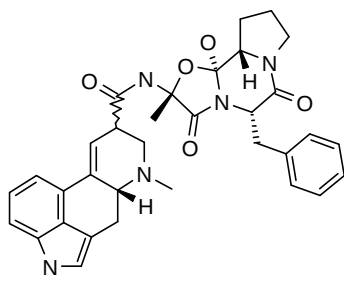
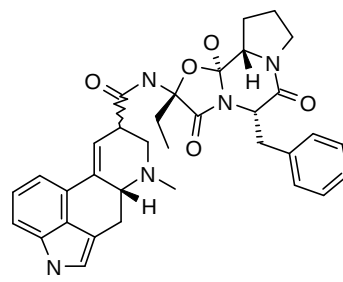
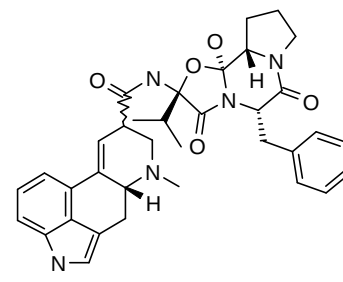
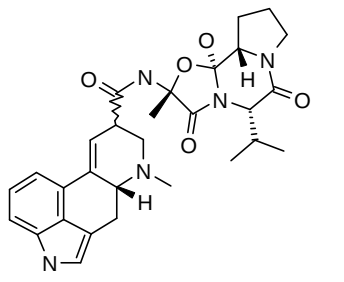
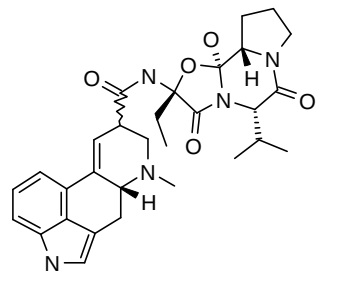
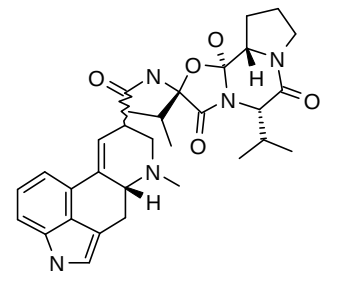


Abbildung 16: Vergleich der Erfassbarkeit der -inin Form und der -in Form eines Ergotalkaloids für die 14 geprüften Ergotalkaloide im Testsystem für α -Ergocryptin. Als Maß wurde jeweils die 50 %-Inhibitionskonzentration der für jedes Alkaloid erstellten Standardkurve verwendet.

	
Ergometrin <1 %	Ergometrinin <1 %

					
Ergotamin <1 %	Ergotaminin 2,2 %	<i>Ergostin</i> <1 %	<i>Ergostinin</i> 0,6-2,2 %	Ergocristin <1 %	Ergocristinin 0,6 %

					
Ergovalin >1 %	Ergovalinin >3,3 %	Ergonin >1 %	Ergoninin >3,3 %	Ergocornin 100 %	Ergocorninin 174 %

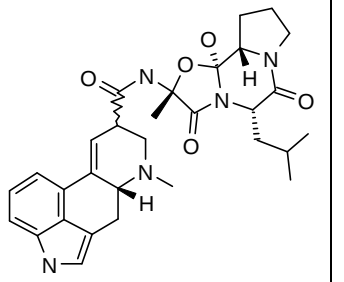
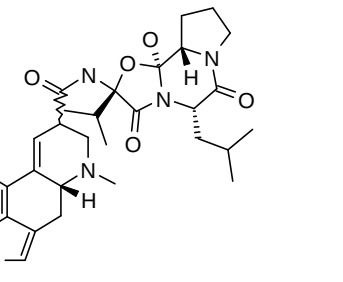
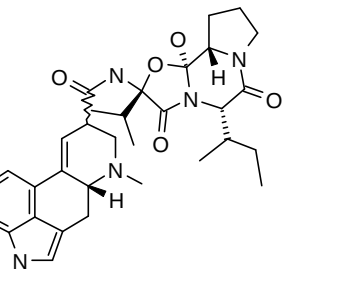
					
Ergosin <1 %	Ergosinin 3.3 %	α-Ergocryptin 3.4 %	α-Ergocryptinin 6.8 %	β-Ergocryptin 21.7 %	β-Ergocryptinin 241 %

Abbildung 17: Relative Kreuzreaktionen in Relation zur chemischen Struktur von Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten Enzymimmunttest unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergocornin. Werte im Fettdruck beruhen auf experimenteller Bestimmung, Werte in *Kursivschrift* für weitere Alkaloide (Standards nicht verfügbar) wurden aufgrund der Ergebnisse der experimentellen Bestimmungen geschätzt.

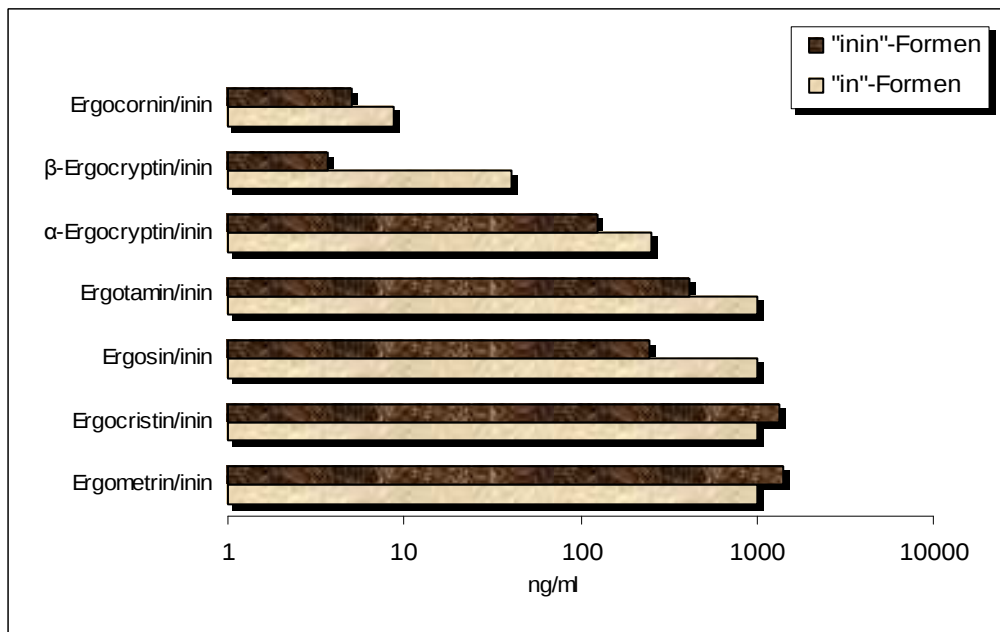


Abbildung 18: Vergleich der Erfassbarkeit der -inin Form und der -in Form eines Ergotalkaloids für die 14 geprüften Ergotalkaloide im Testsystem für Ergocornin. Als Maß wurde jeweils die 50 %-Inhibitionskonzentration der für jedes Alkaloid erstellten Standardkurve verwendet.

4.4. Entwicklung einer Schnellmethode zur Extraktion von Ergotalkaloiden

Ein wesentlicher Vorteil von Enzymimmuntests ist die Tatsache, dass sehr oft weitgehend auf eine Reinigung eines Probenextrakts verzichtet werden kann, vorausgesetzt die Testempfindlichkeit ist ausreichend hoch. Dann können Störeinflüsse durch Probenmatrixeinträge durch Verdünnung des Rohextrakts eliminiert werden.

Die in Kapitel 3.2.2.1. beschriebene Methodik der Probenvorbereitung wurde bei verschiedenen Getreiden und Getreideerzeugnissen einschließlich Brot geprüft und für geeignet befunden.

Damit ist das in dieser Arbeit entwickelte Probenvorbereitungsverfahren mit Abstand das einfachste und schnellste für Ergotalkaloide und benötigt insbesondere keine Festphasenextraktion, wie dies beispielsweise für chromatographische Verfahren erforderlich ist.

4.5. Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests in künstlich kontaminierten Probenmaterialien (Getreide und Getreideerzeugnisse)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests wurden Proben mit zuvor negativem Toxinbefund künstlich mit einer definierten Toxinmenge kontaminiert und anschließend enzymimmunologisch untersucht. Die rechnerische Nachweisgrenze des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin und der „Ergomix“-Standardlösungen lag bei 20 µg/kg. Für Brot ergab sich sogar eine rechnerische Nachweisgrenze von 14 µg/kg, da hier der Wasserverlust durch die Trocknung eine Konzentration des Probenmaterials ergab.

Die rechnerischen Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests für Ergotamin, α -Ergocryptin bzw. Ergocornin lagen bei ca. 4 µg/kg, 20 µg/kg bzw. bei 120 µg/kg.

Die Ergebnisse der Experimente zur Wiederfindung von Ergometrin, Ergotamin bzw. α -Ergocryptin im jeweiligen Testsystem in künstlich mit dem entsprechenden Ergotalkaloid kontaminierten Probenmaterialien sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die Ergebnisse für Ergometrin beziehen sich dabei auf den Ergometrin-Enzymimmuntest unter Verwendung von Ergometrin-Standardlösungen für die Standardkurve. Über diese drei Tests hinweg wurde eine Wiederfindung von zumeist 70-120 % (Mittelwert 93 %) ermittelt, bei Variationskoeffizienten von 5-27 % (Mittelwert 11 %). Damit befand sich die Wiederfindung im üblichen Bereich und sogar etwas besser, als dies für Ergotalkaloide als typisch anzusehen ist. Die Reproduzierbarkeit lag im Rahmen der üblicherweise mittels Enzymimmuntests erzielbaren Werte.

Tabelle 11: Wiederfindung von Ergometrin, Ergotamin bzw. α -Ergocryptin in künstlich kontaminierten Roggen- bzw. Weizenmehlproben nach Bestimmung im Ergometrin-, Ergotamin- bzw. α -Ergocryptin-EIA.

EIA-Test/ Kontamination mit	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)	n
Ergometrin	10	74	7,4	3
	50	73	8,2	3
	200	73	6,8	3
Ergotamin	100	94	7,6	5
	200	112	6,2	5
	300	85	8	3
	500	110	17,6	3
α -Ergocryptin	100	124	27,2	5
	200	149	23,7	5
	300	79	6,9	3
	500	60	5,4	3

Ganz anders verhielt sich das Testsystem für Ergocornin. Hier konnten keine Proben mit Ergocornin-negativem Befund ermittelt werden, die sich für eine künstliche Kontamination geeignet hätten. Alle Proben ergaben bereits ohne Zusatz von Ergocornin Messwerte im Enzymimmuntest von $>100 \mu\text{g/kg}$, teilweise sogar über $1.000 \mu\text{g/kg}$. Derart hohe Werte traten auch für Weizen- und Dinkelmehle auf, was als extrem unwahrscheinlich erschien.

Untersuchungen zur Wiederfindung von Ergocornin in künstlich kontaminierten Probenmaterialien sowie die Ergebnisse einer Überprüfung der Proben ohne Ergocornin-Zusatz sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Untersuchungen zur Wiederfindung von Ergocornin in künstlich kontaminierten Probenmaterialien sowie Ergebnisse einer Überprüfung der Proben ohne Ergocornin-Zusatz mittels Generic Ergot Alkaloid Enzymimmuntest und mittels HPLC.

Probenart	Messwert der Probe ohne Ergocornin- Zusatz nach Bestimmung im Ergocornin Enzymimmuntest (µg/kg)	Summe Ergotalkaloide „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest (µg/kg)	Summe Ergotalkaloide HPLC (µg/kg)	Ergo- cornin- Zusatz (µg/kg)	Wieder- findung (%)
Weizenmehl Type 405	253	10	4	100	105,7
Roggenmehl Type 997	1361	381	--	100	-174,1
Roggenmehl Type1150	1181	186	108	100	-654,2
Dinkelkörner	529	10	4	100	187,4
Dinkelvoll- kornmehl	3137	133	50	100	-1240,1
Weizenmehl Type 550	267	57	47	200	311,1
Weizenvoll- kornmehl	1486	10	--	200	171,5
Weizenvoll- kornmehl	2214	281	158	200	-62,2
Roggenkörner	548	10	--	200	199,8
Roggenmehl Type 997	1404	222	--	200	295,0

4.6. Validierung des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests

Aus praktischer Sicht heraus kam dem gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Testsystem besondere Bedeutung zu. Daher wurde dieses Testsystem umfangreich validiert. Eine charakteristische Standardkurve des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests ist in Abbildung 19 dargestellt.

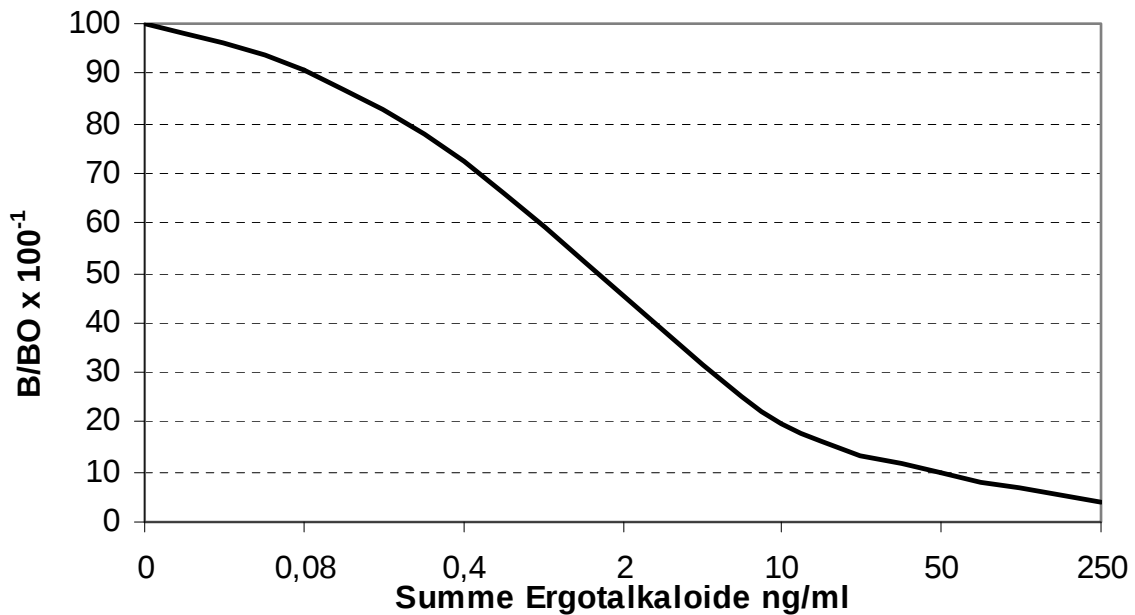


Abbildung 19: Charakteristische Standardkurve des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests unter Verwendung von Ergometrin-Antikörpern (K29 Pool), Ergometrin-HS-HRP und einer als „Ergomix“ bezeichneten Standardlösung (Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Konzentrationsverhältnis von 1:10:14). Die Extinktion des toxischen Leerwerts (B_0) liegt typischerweise bei 1-1,5 Extinktionseinheiten. Die Nachweisgrenze der Standardkurve ($B/B_0 \times 100$) liegt zumeist bei 0,2 ng/ml, höchstens bei 0,4 ng/ml. Die 50 %-Inhibitionsdosis der Standardkurve liegt bei ca. 1,6 mg/ml. Die Variationskoeffizienten für Mehrfachbestimmungen der Ergomix-Standardkonzentrate ($n = 4$) liegen üblicherweise bei $< 10 \%$.

Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests wurde anhand von Mehrfachuntersuchungen überprüft. Diese Mehrfachuntersuchungen künstlich und natürlich kontaminierter Probenmaterialien zeigten, dass das Untersuchungsverfahren bei einem breiten Spektrum von Probenarten reproduzierbare Ergebnisse lieferte (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen natürlich bzw. künstlich (durch Vermischung mit gemahlenem Mutterkorn) mit Ergotalkaloiden kontaminierter Proben. Bestimmung des Gesamtergotalkaloidgehalts mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmunttest.

Probenmaterial	Messwert Ergotalkaloide (µg/kg) Replikat					$\bar{x}$	$\bar{s}$	VK
	1	2	3	4	5	µg/g	µg/g	%
Weizenvollkornmehl	330	224	281	228	297	272	46	17
Weizenmehl Type 405	50	60	52	45	69	55	9	17
Weizenmehl Type 405	<20	<20	<20	<20	<20	--	--	--
Roggenvollkornschrot	159	178	182	188	136	169	21	13
Roggenvollkornschrot	535	542	520	500	571	534	26	5
Roggenkörner	<20	<20	<20	<20	<20	--	--	--
Dinkelvollkornmehl	166	164	250	143	142	173	45	26
Dinkelvollkornmehl	76	47	82	86	56	69	17	25
Dinkelkörner	<20	<20	<20	<20	<20	--	--	--
Weizenmischbrot	150	147	180	132	146	151	18	12
Roggenbrot	63	80	71	57	63	67	9	13
Weizenbrot	<14	<14	<14	<14	<14	--	--	--
Säuglings- und Kleinkindernahrung	31	25	43	31	23	31	8	26
Säuglings- und Kleinkindernahrung	<20	<20	<20	<20	<20	--	--	--
Säuglings- und Kleinkindernahrung	<20	<20	<20	<20	<20	--	--	--
Roggenvollkornmehl*	847	1007	723	828	777	836	107	13
Roggenvollkornmehl*	2344	2410	2110	2368	2293	2305	117	5

* Künstlich mit Mutterkorn kontaminiert

Aufgrund des Probenextraktions- und Verdünnungsfaktors von 50 ergibt sich anhand des quasilinearen Bereichs der „Ergomix“-Standardkurve (80 % B/B_0 bis 20 % B/B_0 , entsprechend 0,2-0,4 ng/ml bis ca. 10 ng/ml; Abbildung 19) ein bestimmbarer Konzentrationsbereich für Gesamtergotalkaloide zwischen 10 µg/kg und ca. 500 µg/kg.

Außerdem wurde zur Validierung des „Generic Ergot Alkaloid“ Tests eine Vergleichsuntersuchung mit HPLC durchgeführt. Die mittels HPLC und ELISA bestimmte Gesamtbelastung mit Ergotalkaloiden in 50 ausgewählten Lebensmittelproben (Erzeugnisse aus Dinkel, Roggen, Weizen) ist in Tabelle 14 zusammengestellt. Diese

Vergleichsuntersuchung des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest mit HPLC-FLD ergab eine hervorragende Übereinstimmung der Ergebnisse (Abbildung 20).

Tabelle 14: Ergotalkaloidgehalte in 50 ausgewählten Lebensmittelproben aus dem Einzelhandel (Bestimmung mittels HPLC-FLD und ELISA).

Proben-Nr	Probentyp	EA-Gehalt, µg/kg mittels HPLC	EA-Gehalt, µg/kg mittels ELISA
1554	Dinkelkörner Speisegetreide	4,0	10
1640	Dinkelkörner Speisegetreide	7,0	10
1638	Dinkelmehl 1050	6,5	21
1637	Dinkelmehl 1050	18,1	26
1628	Dinkelmehl 630	4,6	10
1629	Dinkelmehl 630	10,6	27
1555	Dinkelmehl Vollkorn	3,1	10
1636	Dinkelmehl Vollkorn	29,0	49
1627	Dinkelmehl Vollkorn	49,5	133
1625	Dinkelmehl Vollkorn	145,3	244
1210	Roggenkörner Speisegetreide	9,8	10
1204	Roggenkörner Speisegetreide	124,7	251
1208	Roggenvollkornschrot	151,8	249
1454	Roggenvollkornschrot	527,2	534
1212	Roggenmehl Type 1150	19,7	51
1206	Roggenmehl Type 1150	53,7	85
1455	Roggenmehl Type 1150	84,2	160
1404	Roggenmehl Type 1150	96,2	93
1471	Roggenmehl Type 1150	96,6	182
1407	Roggenmehl Type 1150	107,6	186
1411	Roggenmehl Type 1150	150,5	235
1230	Roggenmehl Type 1150	1552,7	1912
1233	Roggenmehl Type 997	26,6	53
1226	Roggenmehl Type 997	156,5	240
1529	Roggenbrot	44,0	106
1588	Roggenbrot	157,6	165
1461	Roggenmischbrot	35,3	34
1468	Roggenmischbrot	35,5	65
1467	Roggenmischbrot	47,3	102
1458	Roggenmischbrot	49,1	42
1463	Roggenmischbrot	74,8	72
1459	Roggenmischbrot	81,0	63
1460	Roggenvollkornbrot	19,2	7
1620	Roggenvollkornbrot	34,8	24
1469	Roggenvollkornbrot	41,4	46
1462	Roggenvollkornbrot	66,8	28
1619	Roggenvollkornbrot	104,8	89
1387	Weizenmehl Type 1050	8,0	10
1360	Weizenmehl Type 1050	8,5	37
1388	Weizenmehl Type 1050	20,9	57
1213	Weizenmehl Type 1050	28,7	33
1205	Weizenmehl Type 1050	45,2	48
1371	Weizenmehl Type 405	3,9	10
1368	Weizenmehl Type 405	10,5	10
1365	Weizenmehl Type 405	10,9	10
1366	Weizenmehl Type 405	14,8	10
1369	Weizenmehl Type 405	46,6	57
1361	Weizenmehl Type 550	2,6	10
1591	Weizenmischbrot	151,8	177
1400	Weizenvollkornmehl	157,5	281

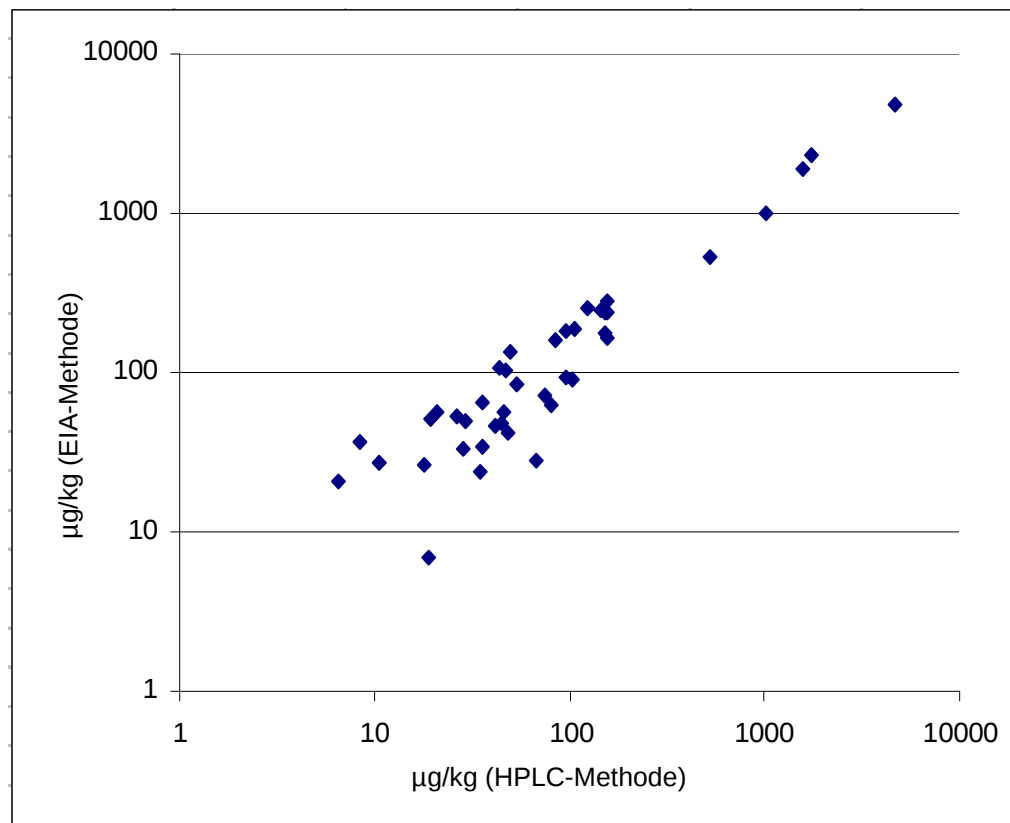


Abbildung 20: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung zwischen gruppenspezifischem Enzymimmuntest für Ergotalkaloide („Generic Ergot Alkaloid“) und HPLC-FLD anhand natürlich mit Ergotalkaloiden kontaminierten Probenmaterialien (Speisegetreide, Mehle; Brot; n = 42). Die Untersuchungen wurden jeweils nach den beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Geradengleichung der linearen Regression lautet $y = 1,0599x + 36,397$. Das Bestimmtheitsmaß betrug $r^2 = 0,9881$. Elf weitere Proben, die nach HPLC-Analyse Gesamtalkaloidgehalte zwischen 2,5 µg/kg und 15 µg/kg enthielten, ergaben ein negatives Ergebnis (< 20 µg/kg bzw. < 14 µg/kg (Brot)) im Enzymimmuntest.

Über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg ergab der Enzymimmuntest Messwerte, die in 31 Fällen über und in zehn Fällen unter dem der HPLC-Ergebnisse lagen. Generell wies der Enzymimmuntest eine Tendenz zur Überschätzung des Toxingehalts auf, die im Mittel zu 60 % höheren Ergebnissen führte. Dabei war die Abweichung im niedrigen Konzentrationsbereich (< 100 µg/kg) etwas höher, ab Konzentrationen von 100 µg/kg lag die durchschnittliche Überschätzung bei lediglich 37 % (Abbildung 21).

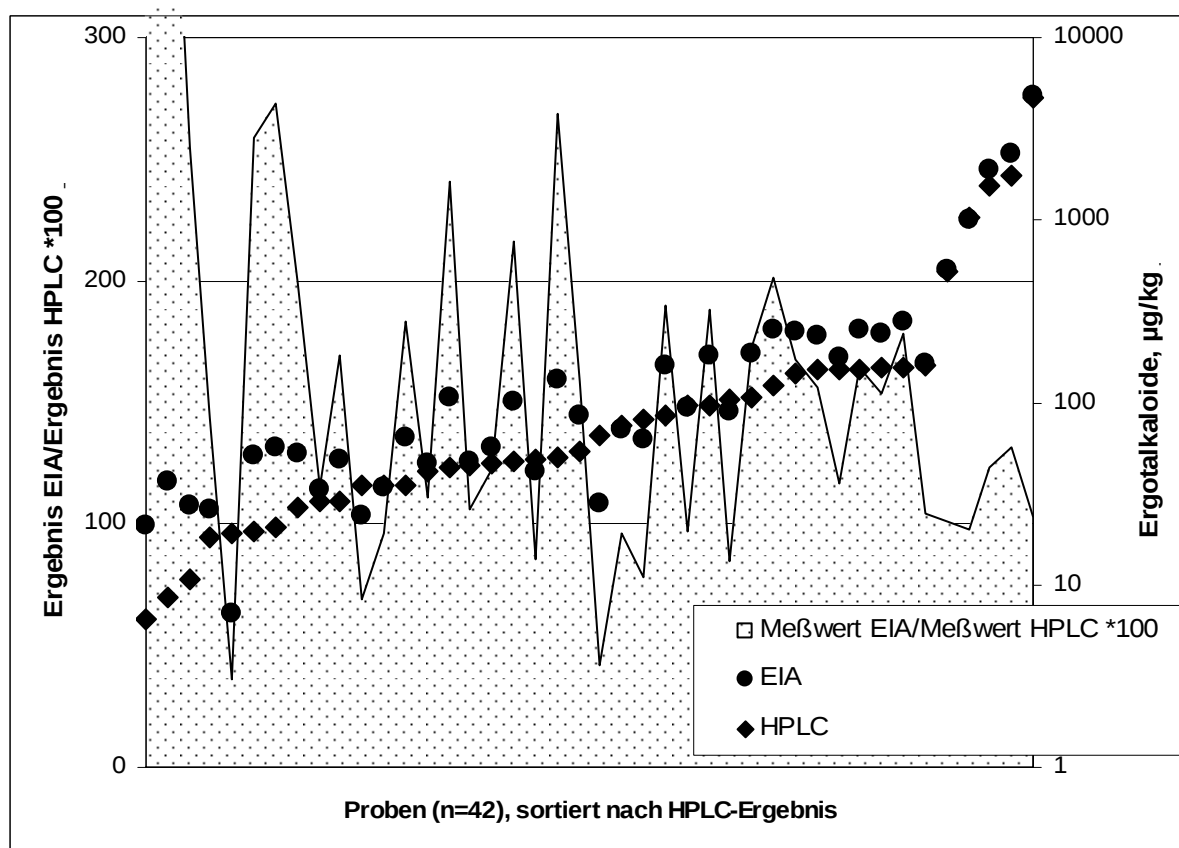


Abbildung 21: Prozentualer Anteil einer Über- oder Unterschätzung des Gesamtergotalkaloidgehalts nach Bestimmung mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest für 42 Lebensmittelproben (n = 42; HPLC als Referenzmethode). Idealerweise sollte der Quotient Messwert EIA/Messwert HPLC multipliziert mit 100 den Wert 100 ergeben. Peaks über 100 hinaus zeigen eine Überschätzung, Täler unter 100 zeigen eine Unterschätzung des Gesamtalkaloidgehalts durch den Enzymimmuntest (linke y-Achse). Zum Vergleich sind jeweils die Ergebnisse des Enzymimmuntests und der HPLC dargestellt (rechte y-Achse). Im Konzentrationsbereich unter 100 µg/kg ergab der Enzymimmuntest Messwerte von durchschnittlich 169-93 % des HPLC-Ergebnisses, im Konzentrationsbereich zwischen 100 µg/kg und 5.000 µg/kg lag der entsprechende Wert bei 137-36 %. Über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg ergab der Enzymimmuntest in 32 Proben eine Überschätzung, in zehn Proben eine Unterschätzung des Gesamtergotalkaloidgehalts.

Zusätzlich wurden im Rahmen der Validierung Untersuchungen zu den relativen Anteilen der „-in“ und „-inin“ Form in den Proben durchgeführt.

Den relativen Anteil der 14 Ergotalkaloide in den 50 ausgewählten Proben zeigt Tabelle 15.

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der relativen Anteile der „-in“ und „-inin“ Form der sieben untersuchten Ergotalkaloide in Speisegetreide und Getreideerzeugnisse sowie in Brot sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.

Tabelle 15: Verteilungsmuster der Ergotalkaloide in Speisegetreide und Getreideerzeugnissen (n = 50).

Ergotalkaloid	Prozentualer Anteil am Gesamtergotalkaloidgehalt							
	$\bar{x}$	$\bar{s}$	VK (%)	Minimal	25stes Perzentil	Median	75stes Perzentil	Maximal
Ergotamin	13,5	4,5	33,4	1,9	11,1	13,9	16,1	24,4
Ergotaminin	11,0	6,7	60,6	0,8	7,2	9,7	13,0	32,5
Ergocristin	8,9	5,1	57,8	1,3	4,3	8,3	11,0	21,0
Ergocristinin	9,5	5,3	55,4	1,2	6,5	8,6	13,0	24,7
Ergometrin	11,1	9,3	83,7	0,9	5,0	7,8	12,3	37,8
Ergometrinin	4,4	4,2	93,7	0,4	1,9	3,3	5,8	24,2
Ergocornin	8,5	5,1	60,5	0,4	5,2	7,4	9,6	29,5
Ergocorninin	6,3	4,6	73,1	0,3	3,7	5,3	8,4	28,1
Ergosin	7,5	4,3	56,9	0,4	5,5	7,3	8,6	25,9
Ergosinin	4,1	1,8	44,0	0,8	3,0	4,0	5,2	8,6
α -Ergocryptin	3,7	2,2	59,9	0,5	1,9	3,4	4,7	9,6
α -Ergocryptin	4,2	2,3	55,5	0,4	2,4	4,3	5,9	10,2
β -Ergocryptin	3,5	2,4	67,8	0,1	2,0	3,2	4,0	10,2
β -Ergocryptin	3,7	2,9	80,3	0,0	1,5	2,9	5,5	13,5

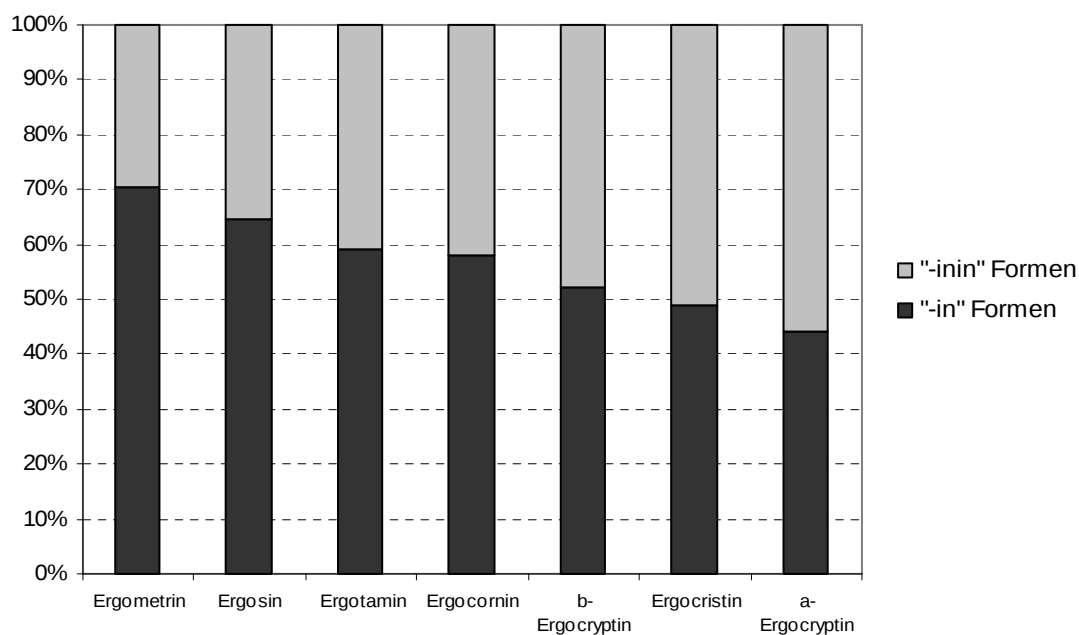


Abbildung 22: Relativer Anteil der „-in“ und „-inin“ Form der sieben untersuchten Ergotalkaloide in Speisegetreide und Getreideerzeugnissen (Medianwerte, n = 50).

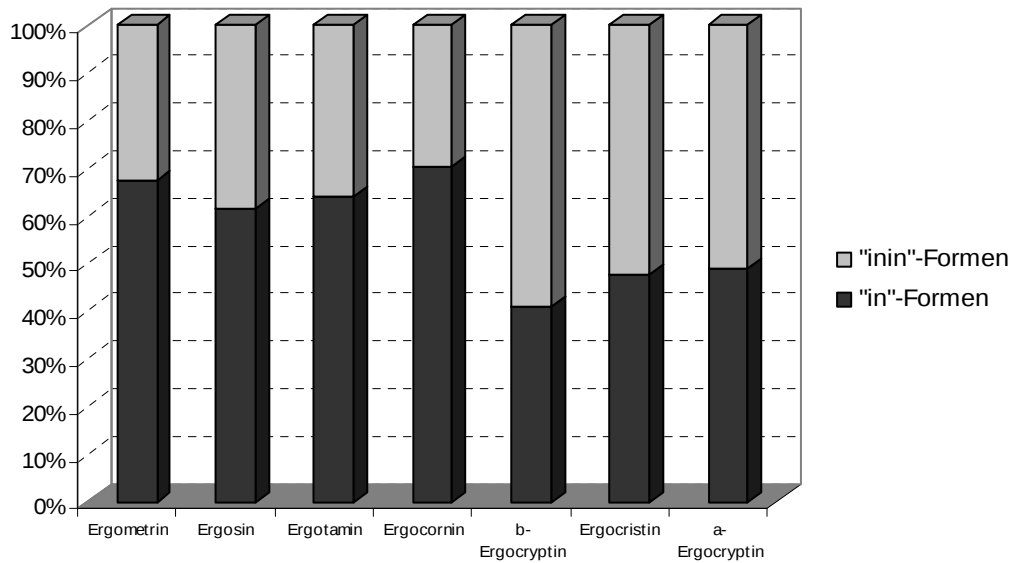


Abbildung 23: Relativer Anteil der „-in“ und „-inin“ Form der sieben untersuchten Ergotalkaloide in Brot (Medianwerte, 13 Roggenbrote, ein Weizenmischbrot).

Abbildung 24 zeigt den Prozentuellen Anteil der verschiedenen Ergotalkaloid in verschiedenen Getreidesorten bzw. in Brot.

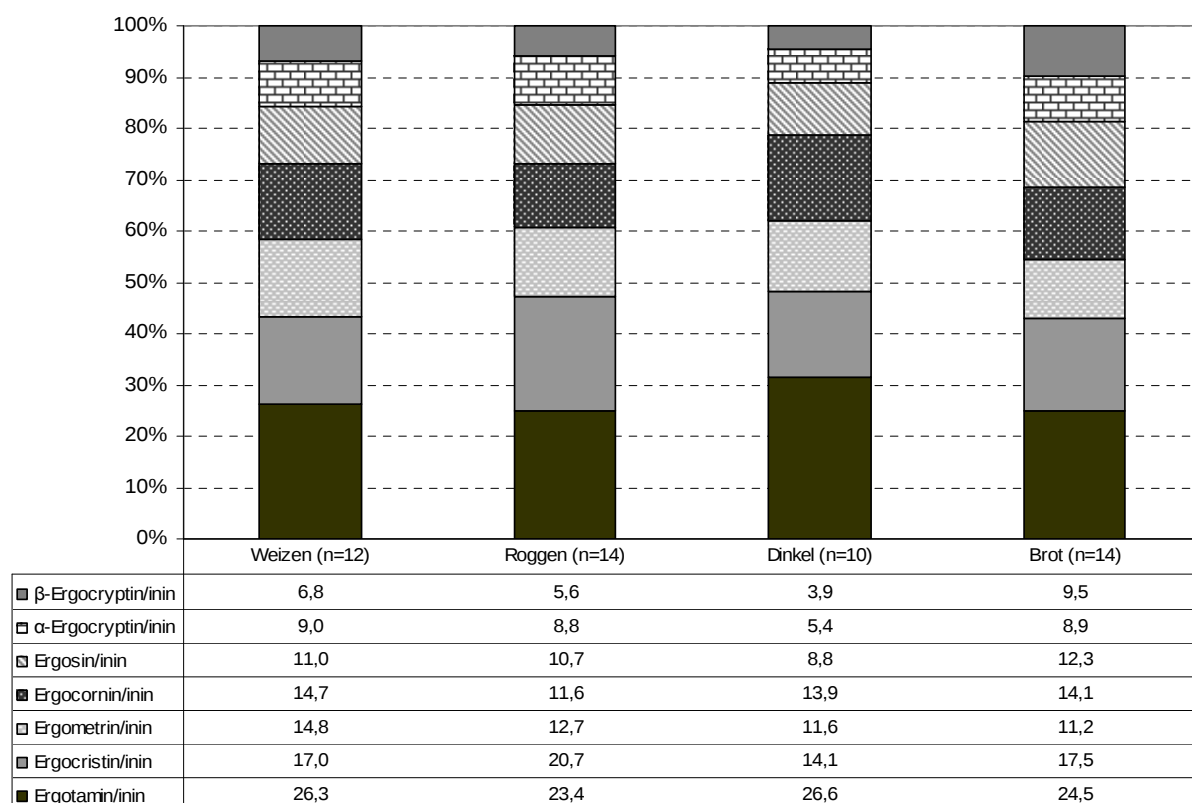


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der verschiedenen Ergotalkaloide (Medianwerte, jeweils „-in“- und „-inin“-Formen) in verschiedenen Getreiden bzw. in Brot (Roggen-, Roggenmisch-, Weizenmischbrot).

4.7. Vorkommen von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln

Die Ergebnisse der mittels „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest untersuchten Getreide- und Getreideerzeugnisproben sind in Tabelle 16 dargestellt. Abbildung 25 zeigt die Häufigkeit des Vorkommens von Ergotalkaloiden in verschiedenen Lebensmittelgruppen sowie die jeweiligen Medianwerte für den mittels Enzymimmuntest ermittelten Gesamtalkaloidgehalt. Eine graphische Darstellung der Probenergebnisse, sortiert nach Gesamtalkaloidgehalt, ist in Abbildung 26 dargestellt. Tabelle 17 zeigt über verschiedene Konzentrationsbereiche hinweg einen Vergleich der Ergebnisse des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests und der HPLC-Bestimmung für 53 Lebensmittelproben, wobei die Probeneinteilung in Kategorien entsprechend dem Ergebnis der HPLC-Bestimmung entspricht.

Ergotalkaloide konnten in keiner der untersuchten Milchproben nachgewiesen werden, so dass sich keine Hinweise auf eine Kontamination von Milch mit diesen Mykotoxinen bzw. ihren Glucuroniden zeigten. Diese Ergebnisse sind konsistent mit publizierten Ergebnissen früherer Untersuchungen. Auch hier konnten, selbst nach intravenöser Applikation, keine Ergotalkaloidübergänge in die Milch festgestellt werden (Schumann, 2007; Durix, 1999).

Tabelle 16: Mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmunttest nachgewiesene Ergotalkaloidgehalte in Getreide und Getreideerzeugnissen aus dem deutschen Einzelhandel 2006/2007 (n=223).

Probenart	Matrix-Code(s)	n	n positiv	% positiv	Ergotalkaloidgehalt, µg/kg						
					$\bar{x}$	Median	Min.	Max.	90 P	95 P	99 P
Roggen (Speisegetreide, Mehl)	150201; 160302; 160108; 160104; 160103	30	23	77	223	152	10*	1912	401	548	1520
Weizen (Speisegetreide, Mehl)	150101; 160304; 160120; 160116; 160113; 160112	58	16	28	23	10	10*	281	47	57	163
Dinkel (Speisegetreide, Mehl)	150103; 160134; 160133; 160131	30	12	40	31	10	10*	244	55	99	212
Roggen-, Roggenvollkornbrot**	170200; 170204	11	10	91	65	68	7*	165	106	136	159
Roggenmischbrot**	170305	19	17	90	52	45	7*	105	100	102	105
Weizen-, Weizenvollkornbrot**	170101; 170106	11	1	9,1	7,7	7,0	7*	15	7	11	14
Weizenmischbrot**	170301	19	16	84	44	35	7*	177	70	82	158
Säuglings- und Kleinkindernahrung	480104; 480207	30	2	6,7	11	10	10*	28	10	17	26
Maisgrieß (Polenta)	160204	15	0	0	10	10	10*	10	10	10	10

*entspricht der Hälfte der Nachweisgrenze (Getreideerzeugnisse 20 µg/kg; Brot 14 µg/kg); ** Angabe bezogen auf das verzehrfertige Produkt;
Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; 90 P: 90stes Perzentil; 95 P: 95stes Perzentil; 99 P: 99stes Perzentil; aus statistischen Gründen wurden bei allen Berechnungen negative Proben mit der halben Nachweisgrenze gewertet.

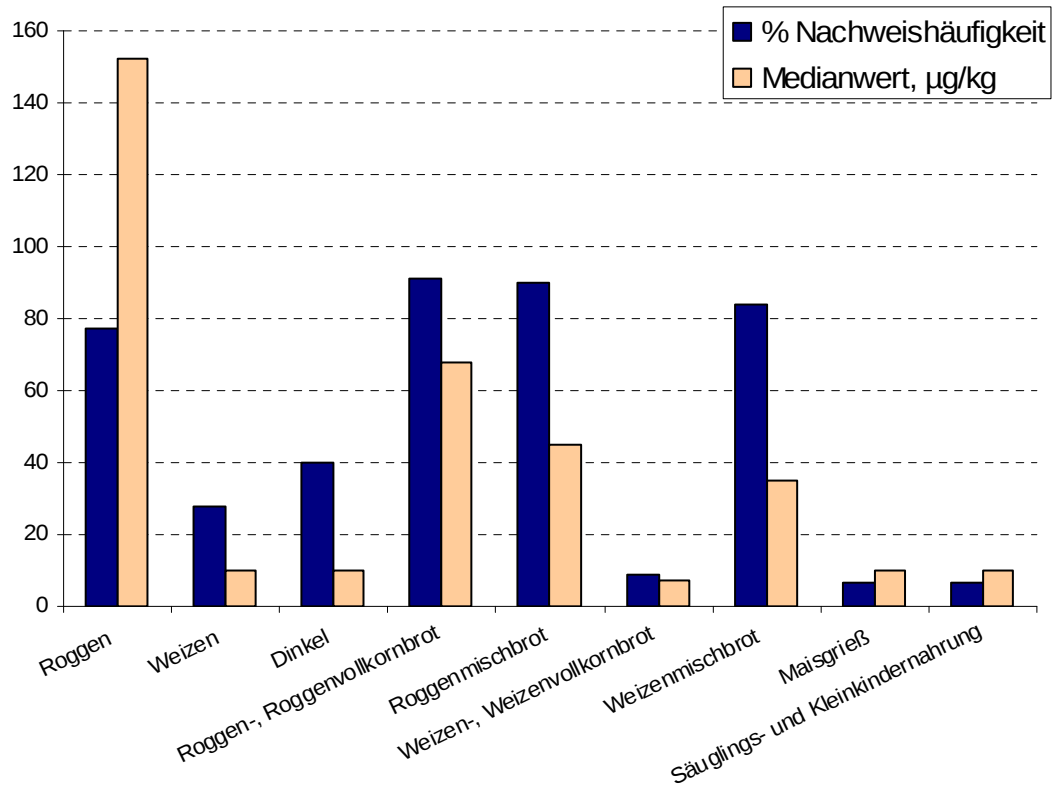


Abbildung 25: Prozentuale Nachweishäufigkeit und Medianwert der Belastung mit Ergotalkaloiden in Speisegetreide und Getreideerzeugnissen. Bestimmung mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmunttest.

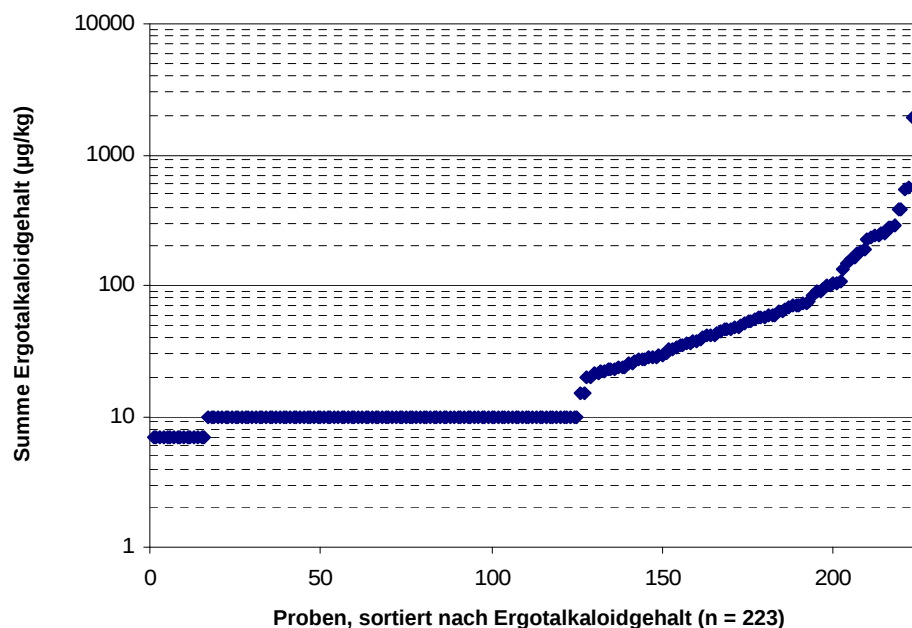


Abbildung 26: Sortierung der untersuchten Proben nach ihrem Ergotalkaloidgehalt. Nur ein sehr kleiner Anteil (überwiegend Roggenmehle sowie einzelne Roggenbrote) wies erhöhte (>100 µg/kg) Toxingehalte auf.

Tabelle 17: Vergleich der Ergebnisse des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests und der HPLC-Bestimmung für 53 Lebensmittelproben, Probeneinteilung in Kategorien entsprechend dem Ergebnis der HPLC-Bestimmung. Zahlen im Fettdruck entsprechen Proben, die mit beiden Methoden der gleichen Belastungskategorie zugeordnet wurden.

Ergebnis HPLC, µg/kg	Ergebnis Generic Ergot Alkaloid Enzymimmuntest, µg/kg					
	< 20	20 – < 50	50 – < 100	100 – < 200	200 – 400	> 400
<20	13	4	1	–	–	–
20 – < 50	–	7	4	3	–	–
50 – <100	–	1	4	2	–	–
100 – < 200	–	–	1	3	6	–
200 – 400	–	–	–	–	–	–
> 400	–	–	–	–	–	5

5. Diskussion

5.1. Vorteile der Schnellmethode zur Extraktion

Ein wesentlicher Vorteil von Enzymimmuntests ist die Tatsache, dass sehr oft weitgehend auf eine Reinigung eines Probenextrakts verzichtet werden kann, vorausgesetzt die Testempfindlichkeit ist ausreichend hoch. Dann können Störeinflüsse durch Probenmatrixeinträge durch Verdünnung des Rohextrakts eliminiert werden.

Nach mehreren orientierenden Vorversuchen zeigte sich, dass als Extraktionsmittel 10 % Acetonitril in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei einem pH-Wert des Puffers von 7,2-7,3, wie dies für andere Mykotoxine durchaus üblich ist, nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führt. Eine Extraktion mit Methanolgemischen ergab ebenfalls keine brauchbaren Ergebnisse. Unter Verwendung einer schwach sauren PBS-Lösung (pH 6,0) mit Zusatz von 60 % Acetonitril konnte eine effiziente und reproduzierbare Extraktion verschiedener Probenmaterialien erreicht werden.

Damit ist das in dieser Arbeit entwickelte Probenvorbereitungsverfahren mit Abstand das einfachste und schnellste für Ergotalkaloide und benötigt insbesondere keine Festphasenextraktion, wie dies beispielsweise für chromatographische Verfahren erforderlich ist.

5.2. Testspezifität

Ein für die praktische Anwendung wesentlicher Faktor ist – neben der Testsensitivität – die Testspezifität. Die Testspezifität besagt, welche Ergotalkaloide außer dem eigentlichen (als immunogen verwendeten) Alkaloid miterfasst werden. Aufgrund der Vielzahl von Testsystemen und zu testenden Verbindungen gestalteten sich diese Experimente als sehr aufwändig. Zudem mussten zur Überprüfung der Reaktivität der -inine diese Isomere jeweils synthetisiert werden und vom jeweiligen -in abgetrennt bzw. in Reinform dargestellt werden. Zur Vermeidung der Rückisomerisierung wurden die mittels HPLC isolierten -inine jeweils unverzüglich in den Enzymimmuntests eingesetzt.

Eine Zusammenstellung der für die 14 Ergotalkaloide in den vier optimierten Testsystemen erhaltenen Ergebnisse findet sich in Tabelle 10 (siehe Kapitel 4.3).

Die Darstellung der individuellen Struktur-Kreuzreaktivitäts-Beziehungen für jedes Testsystem (Abbildung 10, Abbildung 13, Abbildung 15, Abbildung 17) ermöglicht, aus den experimentell ermittelten Kreuzreaktivitäten auf die wahrscheinliche Kreuzreaktivität von weiteren Ergotalkaloiden, die als Standardtoxin nicht verfügbar waren, zu schließen. Dies

könnte für die praktische Anwendung von Interesse sein, da aufgrund des Fehlens von Toxinstandards auch mit allen anderen Untersuchungsverfahren, z. B. mit HPLC, nicht alle Ergotalkaloide identifizierbar sind. Dies betrifft z. B. alle Alkaloide der Ergoxingruppe, die die Aminosäure α -Amino- α -Hydroxybuttersäure (Vergleiche Tabelle 1 bzw. Abbildung 4) enthalten. Für diese Gruppe (Ergostin, Ergoptin, Ergonin) sind keine Standards verfügbar. Aber auch Ergovalin, zu dessen natürlichem Vorkommen in Gräsern mit Endophytenbefall sehr viel - und in Getreide als Folge von *Claviceps*-Befall sehr wenig - bekannt ist, fällt darunter.

Zum Beispiel steht das Alkaloid Ergostin als Toxin vom Phenylalanin-Typ zwischen Ergotamin (Alanin) und Ergocristin (Valin). Da der Substituent α -Amino- α -Hydroxybuttersäure in ihrem Einfluss auf die Antigen-Antikörperreaktion (Affinität) zwischen Alanin und Valin stehen dürfte, besteht somit eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die relative Kreuzreaktion von Ergostin in einem Testsystem für Ergometrin (Abbildung 10) zwischen derjenigen von Ergotamin (7 %) und der von Ergocristin (2,7 %) und damit bei 2-7 % liegt.

Abbildung 10 zeigt, dass das Testsystem unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin, das eine einfache Lysergsäureamidverbindung darstellt, zwar deutlich am empfindlichsten mit dem homologen Ergometrin reagiert (Nachweisgrenze ca. 0,03 ng/ml). Jedoch werden in diesem Testsystem auch alle anderen Ergotalkaloide im sehr niedrigen Konzentrationsbereich miterfasst, die Nachweisgrenzen (80 % B/B₀) für Standardlösungen weiterer wichtiger -in-Ergotalkaloide liegen im unteren ng/ml-Bereich (Ergotamin bzw. β -Ergocryptin: ca. 1 ng/ml, Ergocristin: ca. 3 ng/ml, Ergocornin: ca. 4 ng/ml, Ergosin: ca. 10 ng/ml, α -Ergocryptin: ca. 15 ng/ml). Auch alle anderen (nicht verfügbaren) Ergotalkaloide in der -in Form müssten aufgrund ihrer Strukturmerkmale ebenfalls in diesem Bereich erfasst werden können. Möglicherweise könnten auch weitere einfache Lysergsäureamide (z. B. Ergin) oder sogar die Chanoclavine in diesem Test reagieren, aufgrund der Nichtverfügbarkeit entsprechender Standards ist dies aber nicht abschätzbar. Die -inin-Ergotalkaloide werden von den Anti-Ergometrin-Antikörpern ebenfalls miterfasst, jedoch zumeist um einen Faktor von ca. 10-100 in höheren Konzentrationen (Abbildung 11). Das bedeutet letztlich, dass das Testsystem für Ergometrin mit Präferenz den Lysergsäurerest der -in-Form der Ergotalkaloide erkennt, aber auch den Isolysergsäurerest der entsprechenden -inine, wenn auch schlechter.

Diese Bestimmung der Einzeltroxine kann bei einem gruppenspezifischen Testsystem jedoch für die reale Probenuntersuchung nur orientierenden Charakter haben, da natürlich kontaminiertes Probenmaterial stets eine Mischung mehrerer Ergotalkaloide enthält. Da diese Toxine hinsichtlich ihrer kompetitiven Eigenschaften im Enzymimmuntest additiv wirken, können somit mehrere Ergotalkaloide in Konzentrationen von jeweils unterhalb ihrer individuellen Erfassbarkeit dennoch in ihrer Summe ein deutlich positives Messergebnis liefern. Da bei derartigen Phänomenen zahlreiche Kombinationen möglich sind, ist eine Überprüfung der Testeigenschaften nur anhand von Realproben im Vergleich zu einer Einzelbestimmung mittels HPLC sinnvoll. Dies wird im Weiteren in dieser Dissertation beschrieben. Grundsätzlich hat das Testsystem unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin das Potential, für einen gruppenspezifischen Nachweis von Ergotalkaloiden in natürlich kontaminiertem Probenmaterial eingesetzt zu werden. Die höhere Empfindlichkeit für Ergometrin würde jedoch stets zu einer deutlichen quantitativen Unterschätzung des tatsächlichen Toxingehalts führen, wenn Ergotamin für die Standardkurve verwendet würde. Zudem weisen die Standardkurven für verschiedene Toxine nicht absolut parallelen Verlauf auf, so dass es im unteren bzw. oberen Quantifizierungsbereich gegenläufige Abweichungen geben könnte. Zur Kompensation dieser Effekte wurde daher, auch unter Berücksichtigung der in der Realität vorherrschenden Ergotalkaloide, im Weiteren eine Mischung mehrerer Ergotalkaloide (Ergomix) entwickelt und anhand von Praxisproben getestet. Dieser „Toxinmix“, der die Ergotalkaloide Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin in einem Verhältnis von 1:10:14 enthält, stellt in Verbindung mit den Immunreagenzien für Ergometrin die Basis des als „*Generic Ergot Alkaloid*“ bezeichneten Enzymimmuntests dar.

Bei Betrachtung der Struktur-Kreuzreaktivitäts-Beziehungen für den Enzymimmuntest zum Nachweis von Ergotamin (Abbildung 13) zeigt sich, wie auch für die anderen Ergopeptid-Enzymimmuntests, dass die Tripeptid-Seitenkette erheblichen Einfluss auf die Reaktivität besitzt. So reagiert das einfache Ergotalkaloid Ergometrin praktisch nicht mehr. Dagegen besteht bei diesem Testsystem nur ein geringer Unterschied zwischen der Reaktivität der -in Form und der -inin Form eines Ergotalkaloids, wie die erhebliche Kreuzreaktivität von Ergotaminin (68 %) zeigt (Abbildung 14). Die einzig weitere festgestellte Kreuzreaktivität im relevanten Bereich bestand mit Ergocristin. Aufgrund der Strukturähnlichkeit kann jedoch gefolgert werden, dass der Ergotamin-Test sehr starke Kreuzreaktivität von mindestens 10 % und möglicherweise sogar bis zu 100 % mit Ergostin besitzen müsste. Toxine vom Valin-Typ bzw. vom Leucin-Typ reagieren dagegen erst in nicht mehr relevanten Konzentrationen. Aufgrund der Struktur-Kreuzreaktivitätsbeziehungen könnten zwar Ergovalin und Ergonin

geringfügig höhere Kreuzreaktivität aufweisen, wahrscheinlich aber ebenfalls erst im nicht mehr relevanten Konzentrationsbereich von ca. 1 µg/ml. Der Enzymimmuntest für Ergotamin ist somit als teilspezifisch für die drei Ergotalkaloide des Ergotamin-Typs anzusehen. Da Ergotamin und Ergocristin sehr oft die dominierende Fraktion im Bezug auf den Gesamtalkaloidgehalt von Roggen darstellen, erschien eine weitere Anwendungsprüfung dieses Tests trotz des eingeschränkten Erfassbarkeitsspektrums als sinnvoll.

Die Antikörper gegen α -Ergocryptin unterschieden Strukturen (Abbildung 15) interessanterweise bereits innerhalb der Ergocryptine deutlich, wobei die beta-Form sowie die -inin Form des alpha- und beta-Ergocryptins jeweils nur ca. 10 % Kreuzreaktivität im Vergleich zu alpha-Ergocryptin aufwiesen. Isomerisierungen sowohl des Typs Leucin-Isoleucin als auch des Typs Lysergsäure-Isolysergsäure reduzieren somit die Kreuzreaktivität gleich stark (Abbildung 16). In diesem Testsystem scheint zudem der Valin-Substituent eine erhebliche Bedeutung für die Antikörperbindung zu haben, wie zwar schwächeren (und wenig praxisrelevanten), aber immer noch relativ deutlichen Kreuzreaktionen mit Ergocristin und Ergocornin, bei nur noch minimaler Kreuzreaktivität mit Ergosin (oder z. B. auch Ergotamin), zeigen. Die nur minimale Kreuzreaktivität von Ergotamin in diesem Testsystem ist insbesondere auch deshalb bemerkenswert, als Ergotamin-BSA als markiertes Festphasen-Antigen verwendet wurde. Generell erkennt dieser Test zudem die -inin Form vieler Alkaloide sogar besser als die entsprechende -in Form. Erhebliche Kreuzreaktionen mit Ergotalkaloiden, für die keine Standards verfügbar waren, sind aufgrund dieser Ergebnisse nicht zu erwarten. Obwohl der Enzymimmuntest für α -Ergocryptin nur eingeschränkt als praxistauglich angesehen wurde, erschien eine orientierende Anwendungsüberprüfung sinnvoll, um Hinweise auf möglicherweise weitere (und eventuell bisher unbekannte) Alkaloide zu erhalten.

Das Testsystem für Ergocornin wurde als letztes der vier Testsysteme etabliert, insbesondere um auch die Toxine des Valin-Typs spezifisch nachweisen zu können. Im Hinblick auf die Testspezifität (Abbildung 17) wies dieser Enzymimmuntest, der auf der Basis von α -Ergocryptin-BSA als Festphasen-Antigen arbeitet, einige Besonderheiten auf. So wurden in diesem Testsystem alle -inin Formen besser erkannt als die zugehörigen -ine (Abbildung 18). Zudem wurden Toxine vom Isoleucin-Typ sehr gut erfasst, die höchste Sensitivität in diesem Enzymimmuntest wurde sogar für das β -Ergocryptinin ermittelt. Dies ist wahrscheinlich durch die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Valin- und dem Isoleucin-Substituenten bedingt. Da auch für die einen Alanin-Substituenten enthaltenden -inine Ergotaminin und

Ergosinin deutliche Kreuzreaktivität ermittelt wurde, scheint diese Substitution weniger gravierende Auswirkungen zu haben als die Isoform der Lysergsäure. Hieraus kann gefolgert werden, dass Ergovalinin und Ergoninin (und möglicherweise auch deren -in Formen) in diesem Testsystem starke Kreuzreaktivität besitzen dürften. Obwohl auch dieser Test im Hinblick auf das Kernziel, die Entwicklung einer praktikablen Methodik für Ergotalkaloide, nur eingeschränkt geeignet erschien, wurde auch dieser Ansatz orientierend weiterverfolgt. Dies insbesondere deshalb, weil aufgrund des ungewöhnlichen Reaktivitätsmusters eine Erfassung bisher weniger gut charakterisierter Ergotalkaloide am wahrscheinlichsten erschien.

Zusammenfassend ergab sich im Hinblick auf die theoretische Praxistauglichkeit der entwickelten Enzymimmuntests unter Berücksichtigung von Testsensitivität und Testspezifität folgende Reihenfolge:

1. Ergometrin als „Generic Ergot Alkaloid“ EIA
2. Ergotamin
3. α -Ergocryptin und Ergocornin

5.3. Unspezifische Kreuzreaktionen beim Ergocornin-EIA

Wie in Kapitel „Nachweisgrenzen der Enzymimmuntests in künstlich kontaminierten Probenmaterialien“ bereits beschrieben, kam es bei der Feststellung der Nachweisgrenzen von Ergotalkaloiden im Ergocornin-EIA zu unspezifischen Kreuzreaktionen. Eine Überprüfung der zur Feststellung der Nachweisgrenzen verwendeten geringbelasteten bzw. künstlich kontaminierten Proben mittels des Generic Ergot Alkaloid Enzymimmuntests sowie teilweise mittels HPLC ergab zumeist nur geringe Gehalte an Ergotalkaloiden und (nach HPLC) kaum Ergocornin. Dementsprechend ergab ein Zusatz von Ergocornin in Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/kg}$ zu diesen Proben nach Bildung der Differenz (Messwert mit Zusatz – Messwert ohne Zusatz) kaum Unterschiede, teilweise sogar deutlich „negative“ Wiederfindungen (Tabelle 12). Da bei Messwerten von über 1.000 $\mu\text{g/kg}$ eine hohe Probenverdünnung möglich war, waren unspezifische Probenmatrixeinflüsse eher unwahrscheinlich. Dies lässt den Schluss zu, dass der Ergocornin-Enzymimmuntest mit einer in Getreide sehr weit verbreiteten Substanz reagiert, über deren Identität bisher jedoch noch keine Klarheit herrscht. Da diese Substanz möglicherweise sehr stark „kreuzreagiert“, könnten bereits sehr geringe Konzentrationen diese „falsch-positiven“ Messwerte verursachen. Aufgrund des Spezifitätsmusters dieses Enzymimmuntests ist es nicht völlig ausgeschlossen, dass auch ein bisher unbekanntes, jedoch stark kreuzreagierendes Ergotalkaloid für diese Befunde verantwortlich ist.

Weitergehende Untersuchungen zur Klärung dieser Frage erscheinen vor allem aus wissenschaftlicher Sicht von Interesse. Als Analysensystem zur Bestimmung von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln ist der Ergocornin Enzymimmuntest derzeit als ungeeignet anzusehen.

5.4. Validierung des gruppenspezifischen „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests - bestimmbarer Konzentrationsbereich und Nachweisgrenze

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Untersuchung zur Wiederfindung von Ergotalkaloiden und unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse durch möglicherweise untypisch hohe Probenmatrixeinflüsse wurde aufgrund der Ergebnisse der Validierungsuntersuchungen als untere Nachweisgrenze für den Gesamtergotalkaloidgehalt ein Wert von 20 µg/kg festgelegt. Für die Untersuchung von Brot liegt dieser Wert bei 14 µg/kg. Dies resultiert in einem Probenmesswert, der in etwa dem 70 %-Inhibitionswert der „Ergomix“-Standardkurve entspricht.

Eine Nachweisgrenze für den Gesamtergotalkaloidgehalt von 20 µg/kg erscheint im Hinblick auf die toxikologische Relevanz als ausreichend, zudem wird auch mit anderen Verfahren keine wesentlich bessere Sensitivität für die Summenbelastung mit Ergotalkaloiden erreicht. Zur Absicherung der Messergebnisse sowie bei zu erwartenden Ergotalkaloidgehalten von mehr als 200 µg/kg ist eine Untersuchung höher verdünnter Probenextrakte empfehlenswert. Für solche höher verdünnten Probenextrakte kann auf Sicherheitsfaktoren verzichtet werden und der Messbereich der Standardkurve bis 80 % voll ausgenutzt werden.

Im Rahmen der Vergleichsuntersuchungen des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntests mit HPLC-FLD war die Evaluierung im Konzentrationsbereich von unter 100 µg/kg (Summenbelastung) auch für HPLC-Methoden problembehaftet, da bei 14 Einzelkomponenten die Gehalte einiger Ergotalkaloide, insbesondere der -inin Formen, oft im Bereich der Nachweisgrenze angesiedelt sind. Für sehr hoch belastetes Probenmaterial (500-5.000 µg/kg), in dem alle Einzelkomponenten mittels HPLC gut quantifizierbar sind, ergaben HPLC und Enzymimmuntest praktisch identische Werte (Abweichung Enzymimmuntest +11 %). Bei einem beliebigen cut-off für die Gesamtbelastung mit Ergotalkaloiden im Konzentrationsbereich ab 100 µg/kg ist demnach nur mit einem geringen Anteil nicht verwertbarer, d. h. deutlich zu hoher Messergebnisse zu rechnen (Tabelle 17).

Von besonderer Bedeutung für einen Routineeinsatz ist zudem, dass im Enzymimmuntest keine falsch-negativen Ergebnisse auftraten, d. h. die Anwesenheit von Ergotalkaloiden im Konzentrationsbereich über der Nachweisgrenze wurde stets korrekt detektiert. Damit scheint der gruppenspezifische „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest als quantitativer Screeningtest zur Bestimmung von Ergotalkaloiden in Getreide und Getreideerzeugnissen (einschließlich Brot) gut geeignet zu sein.

5.5. Zusammensetzung des Ergotalkaloidgehalts in Getreide und Getreideerzeugnissen des deutschen Marktes

Die Daten, die im Rahmen der Validierung des Enzymimmuntests mittels HPLC-FLD gewonnen wurden, ergaben zugleich interessante Informationen bezüglich der Zusammensetzung der einzelnen Ergotalkaloide in Lebensmitteln des deutschen Marktes. Diese Zusammensetzung bzw. die Variabilität der Zusammensetzung ist gleichermaßen für die Bewertung der Enzymimmuntests und die Risikoabschätzung für Ergotalkaloide im Hinblick auf den Verbraucherschutz von Interesse.

Die mittels HPLC und ELISA bestimmte Gesamtbelastung mit Ergotalkaloiden in 50 ausgewählten Lebensmittelproben (Erzeugnisse aus Dinkel, Roggen, Weizen) sind in Tabelle 14 zusammengestellt. Hierbei ist zu betonen, dass es sich nicht um ein repräsentatives Probenmaterial handelte. Vielmehr wurden diese Proben aus mehr als 200 Proben nach Bestimmung mittels „Generic Ergot Alkaloid“ ausgewählt, um für die Vergleichsuntersuchungen (Evaluierung des Enzymimmuntests) möglichst den kompletten Konzentrationsbereich abzudecken. Nichtsdestotrotz zeigen bereits diese Daten, die eine der bisher umfangreichsten Untersuchungen dieser Art darstellen dürften, dass Roggen aus dem deutschen Einzelhandel durchaus beachtliche Gehalte an Ergotalkaloiden aufweisen kann. Zudem finden sich auch in Weizen und Dinkel vereinzelt Ergotalkaloide in nicht vernachlässigbaren Konzentrationen. Insbesondere die Befunde für Dinkel sind bemerkenswert, da bisher keine entsprechenden Hinweise auf eine Belastung dieses Getreides publiziert wurden. Die Tatsache, dass selbst bei einem relativ bescheidenen Probenumfang bereits Brote mit Ergotalkaloidgehalten von über 100 µg/kg gefunden wurden, weist darauf hin, dass zumindest gelegentlich Roggenmehl mit sehr hohen Ergotalkaloidgehalten verarbeitet wird, da nach verschiedenen Literaturangaben durch den Backprozess eine

„Reduktion“ des Ergotalkaloidgehalts um ca. 50 % (bis über 90 %) beschrieben wurde (Scott et al., 1982; Wolff und Ocker, 1985; Baumann et al., 1985).

Den relativen Anteil der 14 Ergotalkaloide in diesen Proben zeigt Tabelle 15. Hieraus wird ersichtlich, dass die Zusammensetzung des Gesamtergotalkaloidgehalts im Extremfall über einen sehr weiten Bereich variieren kann. Beispielsweise lag der festgestellte minimale Anteil von Ergotamin bei 1,9 %, in einer anderen Probe dagegen betrug der Anteil von Ergotamin 24,4 %. Diese Variabilität verändert sich auch dann nicht, wenn jeweils die Isomerenpaare, d. h. die -in Form und die -inin Form, eines Ergotalkaloids zusammengefasst werden. Jedoch ergaben sich in einem mittleren Bereich, der durch das 25ste und das 75ste Perzentil begrenzt wird, insgesamt wesentlich stabilere Verhältnisse, die vom Mittelwert bzw. vom Medianwert nur noch wenig abwichen. Insgesamt bestätigten die eigenen Ergebnisse die Befunde von Baumann et al. (1985) weitgehend. Allerdings fanden diese Autoren nach Untersuchung von 22 Weizenmehlen und sechs Roggenmehlen, dass Ergocristin zumeist gegenüber Ergotamin dominierte. Andere Autoren gaben ebenfalls Ergocristin und Ergotamin als die zwei wichtigsten Ergotalkaloide in Roggen, Weizen sowie in Triticale an (z.B. Scott et al., 1992; Fajardo et al., 1995). An dritter Stelle folgt zumeist Ergocryptin. Da Baumann et al. (1985) nicht zwischen α -Ergocryptin und β -Ergocryptin differenzierten, sind diese Angaben praktisch identisch mit den eigenen Ergebnissen für diese vier Verbindungen. Auch die Befunde für Ergometrin, Ergocornin und Ergosin stimmen überein. Generell befinden sich die eigenen Ergebnisse im Bereich der Angaben in der bisherigen Literatur (Dänicke und Mainka, 2006).

Generell überwogen in Bezug auf die Ergotalkaloid-Gesamtbelastung in allen Erzeugnissen die Lysergsäureformen der Ergotalkaloide (-in Formen) gegenüber den Isolysergsäureisomeren (-inin Formen). Allerdings wurden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ergotalkaloiden festgestellt. Während beispielsweise für Ergometrin die -in Form mit über 70 % dominierte, war für α -Ergocryptin im Median der Anteil der -inin Form sogar höher als derjenige der -in Form (Abbildung 22). Diese Ergebnisse bestätigen sowohl hinsichtlich des Anteils der -inine als auch hinsichtlich der Ergotalkaloid-Reihenfolge in Bezug auf absteigenden -inin-Anteil die Angaben von Baumann et al. (1985) für Mehle und Brot aus der Schweiz. Für Brot wurde tendenziell ein etwas höherer Anteil der -inin-Formen festgestellt als für Mehle. Dies galt jedoch nicht für alle Ergotalkaloide und einen wesentlichen Unterschied zu den Mehle gab es nicht (Abbildung 23). Baumann et al. (1985) berichteten nach Backexperimenten über eine stärkere Verschiebung hin zu den -inin Formen,

hatten aber lediglich die Krume von Broten untersucht, während in der vorliegenden Untersuchung ein repräsentativer Teil des ganzen Brotes untersucht worden war. Da zudem eine Rückumwandlung der -inin Form in die -in Form erfolgt, insbesondere im sauren Milieu wie es typischerweise im Magen gegeben ist, könnte diese Isomerisierung ohnehin nicht als Detoxifizierung gewertet werden. Die Untersuchungen von Fajardo et al. (1995) deuten zudem darauf hin, dass die Brotkrume deutlich höhere Ergotalkaloidgehalte aufweisen kann als die Brotkruste.

Bei getrennter Betrachtung der verschiedenen Getreidearten (Roggen, Weizen, Dinkel) sowie von Brot (13 Roggen- bzw. Roggenmischbrote sowie ein Weizenmischbrot) ergaben sich keine gravierenden Unterschiede bezüglich des relativen Anteils der einzelnen Ergotalkaloide (-in Form und -inin Form). Ergotamin, Ergocristin, Ergometrin und Ergocornin deckten jeweils 60-70 % der Gesamtbelastung ab, wobei auf Ergotamin allein rund ein Viertel des Gesamtgehalts entfiel (Abbildung 24).

5.6. Untersuchungen zum Vorkommen von Ergotalkaloiden in Lebensmitteln unter Verwendung des „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest

Die Tatsache, dass mit Ausnahme der Arbeit von Scott et al. (1992) alle bisher publizierten Untersuchungen zum Vorkommen von Ergotalkaloiden in Getreide und Getreideerzeugnissen Gesamtprobenzahlen von deutlich unter 100 aufweisen (zumeist sogar nur 20-40), basiert wohl darauf, dass die Analytik dieser Toxine sehr aufwändig ist. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten gruppenspezifischen Nachweis war erstmals ein analytisches Werkzeug verfügbar, mit dem auch größere Probenzahlen relativ problemlos untersucht werden können. Die Validität der Ergebnisse konnte zudem durch Vergleichsuntersuchungen mit HPLC demonstriert werden. Daher wurden bis zum Abschluss dieser Arbeit im Jahr 2006 bis Frühjahr 2007 insgesamt 223 Lebensmittel auf ihren Ergotalkaloidgehalt untersucht. Dies war gleichzeitig eine der bisher umfangreichsten Untersuchungen auf Ergotalkaloide überhaupt. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 16.

Die Daten zeigen, dass Roggen und daraus hergestellte Erzeugnisse mit Medianwerten von 45 - 152 µg/kg mit deutlichem Abstand die höchsten Ergotalkaloidgehalte aufwiesen. In einem Roggenmehl konnten Gehalte bis fast 2 mg/kg nachgewiesen werden; der Befund (wie für auch insgesamt mehr als 50 weitere ausgewählte Proben) für diese Probe wurde mittels HPLC bestätigt. Ein Vergleich zwischen Roggenmehlen und Roggenbroten zeigte, dass die

Ergotalkaloidgehalte in diesen Matrices nur ca. 40 % betrugten (Abbildung 25). Eine direkte Zuordnung Mehl-Brot war in dieser Untersuchung nicht möglich. Die geringeren Gehalte im Brot können zum größten Teil jedoch bereits durch den Wassergehalt der Brote (ca. 30 %) begründet werden. Insgesamt sprechen die Befunde daher eher gegen eine starke Reduktion des Ergotalkaloidgehalts durch den Backprozess um 80 - 90 % wie von Scott et al. (1982) beschrieben, sondern entsprechen eher den Angaben von Wolff und Ocker (1985) bzw. Wolff et al. (1988), die nur eine ca. 50%ige Reduktion ermittelten. Die Arbeiten von Fajardo et al. (1995) zeigten sogar, dass zumindest bei kürzer gebackenen Broten die Reduktion des Ergotalkaloidgehalts minimal war. Generell sind die Angaben zur möglichen Reduktion des Ergotgehalts teilweise widersprüchlich und die zugrundeliegenden Arbeiten könnten möglicherweise auch von analytischen Problemen überlagert worden sein.

Die festgestellte, abgestufte Reihenfolge der Ergotalkaloid-Belastung, Roggenbrot > Roggenmischbrot > Weizenmischbrot > Weizenbrot reflektiert die sinkenden Roggenanteile bzw. die insgesamt deutlich niedrigeren Toxingehalte in Weizen und Weizenerzeugnissen.

Bisher noch nicht beschrieben wurde die in dieser Untersuchung festgestellte Belastung von Dinkel (*T. aestivum subsp. spelta* L.) und Dinkelerzeugnissen, die sich auf einem ähnlichen Niveau bewegte wie diejenige von Weizen. Mit Medianwerten im Bereich der Nachweisgrenze und Maximalwerten für Ergotalkaloide von ca. 250 µg/kg lagen zwar auch die Extremgehalte für Weizen und Dinkel deutlich unter denjenigen von Roggen, sind aber im Hinblick auf die Aufnahme dieser Toxine zumindest bei größeren Mengen nicht vernachlässigbar.

Legt man für Roggenbrot, Roggenmischbrot und Weizenmischbrot einen mittleren Gehalt an Ergotalkaloiden von 50 µg/kg zugrunde, so resultiert hieraus für diese Produktgruppe, bei einer Verzehrsmenge von 100 g, eine Aufnahme von 5 µg Ergotalkaloiden. Bei Verwendung des 90sten Perzentils der Ergotalkaloidgehalte (ca. 100 µg/kg) ergäbe sich eine Aufnahme von 10 µg. Diese Abschätzung entspricht exakt den Berechnungen von Baumann et al. (1985) für die Schweiz.

Nicht berücksichtigt ist hierbei jedoch die Ergotaufnahme über Mehle, Speisegetreide und andere Erzeugnisse. Zudem sind möglicherweise auch andere Getreideerzeugnisse, z. B.

Müslierzugnisse, die in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt wurden, ebenfalls mit Ergotalkaloiden belastet.

In dieser Untersuchung wurden orientierend auch 15 Maisgrießproben auf Ergotalkaloide untersucht, da über eine mögliche Belastung dieser Getreideart nichts bekannt ist. Allerdings kann Mais z. B. mit dem Alkaloidbildner *Claviceps gigantea* befallen sein, theoretisch besteht zudem ein Kontaminationsrisiko über Unkrautbewuchs im Maisanbau, insbesondere mit Zypergräsern, die mit *Claviceps cyperi* befallen sind. Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben wiesen Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze des Enzymimmuntests auf. Allerdings ergab eine Probe einen schwach positiven Messwert (ca. 70% B/B₀ x 100).

Zwei der 30 untersuchten getreidehaltigen Säuglings- und Kleinkindernahrungsmittel enthielten Ergotalkaloide in Konzentrationen von maximal 28 µg/kg. Lombaert et al. (2002) berichteten (in der einzigen vergleichbaren Studie) für Kleinkindernahrungsmittel des Kanadischen Marktes (n = 363) eine höhere Belastungshäufigkeit und teilweise noch höhere Belastungen mit Ergotalkaloiden (maximal 108 µg/kg). Diese Befunde sind im Hinblick auf die unbekannte Wirkungsweise einer Ergotalkaloidaufnahme bei Kleinkindern zu sehen und begründen die Notwendigkeit weitergehender Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen, dass sich hinsichtlich des Niveaus der Belastung von Roggen und daraus hergestellten Lebensmitteln im Vergleich zu früheren Untersuchungen nicht viel geändert hat. Die Aufnahme von Ergotalkaloiden dürfte in einer Größenordnung liegen, die bei ca. 1 % der üblicherweise therapeutisch eingesetzten Dosen (z. B. Ergotamin 1 mg/Tag) liegt. Da für eine Dosis von weniger als 1 mg/Tag nicht notwendigerweise das völlige Fehlen jeglicher Wirkung konstatiert werden kann und da für Kinder eine relativ höhere Aufnahme gegeben ist, sollte auf eine Reduktion hingearbeitet werden. Insbesondere sollten die vereinzelt auftretenden Spitzenbelastungen (Abbildung 26), die bei üblichen Verzehrsmengen bereits an eine therapeutisch wirksame Dosis heranreichen, gekappt werden.

Mit der Entwicklung eines gruppenspezifischen enzymimmunchemischen Nachweises für Ergotalkaloide, dem als „Generic Ergot Alkaloid“ Test bezeichneten Verfahren, wurde eine analytische Lücke zwischen der Bestimmung des Mutterkorns im ungereinigten Getreide und aufwändigen physikalisch-chemischen Verfahren (z. B. HPLC-FLD) geschlossen. Mit diesem Enzymimmuntest kann auf einfache und schnelle Weise der Gesamtergotalkaloidgehalt in

Rohware, in Lebensmitteln und in Futtermitteln bestimmt werden. Damit ist eine wesentliche Verbesserung der analytischen Möglichkeiten für die Routinekontrolle gegeben und somit eine Stärkung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sowie der Futtermittelsicherheit.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt den Nachweis von Mutterkornalkaloiden (Ergotalkaloiden) auf immunchemischer Basis. Hierzu wurden polyklonale Antikörper gegen verschiedene Ergotalkaloide eingesetzt bzw. hergestellt. Als Referenzmethode zur Methodenprüfung sowie zur Prüfung des Toxinspektrums in Lebensmitteln wurde eine HPLC-Analytik für 14 Ergotalkaloide eingesetzt (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocornin, Ergosin sowie die sieben korrespondierenden -inin-Isomere). Unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin (Ergonovin), Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin wurden kompetitive Enzymimmuntests erstellt und charakterisiert. Die Nachweisgrenzen dieser Tests für das entsprechende Alkaloid lagen bei 0,03 ng/ml (Ergometrin), 0,2 ng/ml (Ergotamin), 1 ng/ml (α -Ergocryptin) bzw. 3 ng/ml (Ergocornin). Bezüglich der Testspezifität zeigte sich, dass im Testsystem für Ergometrin alle 14 Ergotalkaloide erfassbar waren, während die anderen drei Testsysteme jeweils nur mit Teilgruppen kreuzreagierten. Auf der Basis der Antikörper gegen Ergometrin wurde ein gruppenspezifischer Nachweis für Ergotalkaloide etabliert und validiert. Mit diesem „Generic Ergot Alkaloid“ Enzymimmuntest konnte die Summenbelastung dieser Toxine in Getreide und Getreiderzeugnissen mit einer Nachweisgrenze von 20 μ g/kg (Brot 14 μ g/kg) bestimmt werden. Durch Vergleichsuntersuchungen mit HPLC anhand natürlich kontaminierter Probenmaterialien konnte die Anwendbarkeit dieses Testsystems demonstriert werden. Unter Verwendung des Generic Ergot Alkaloid Enzymimmuntests wurden 223 getreidehaltige Lebensmittel des deutschen Marktes untersucht. Roggen und daraus hergestellte Lebensmittel waren am häufigsten belastet (77-91 %), die Medianwerte des Gesamtergotalkaloidgehalts lagen zwischen 45 μ g/kg und 152 μ g/kg. Weizen und daraus hergestellte Erzeugnisse waren seltener und in niedrigeren Konzentrationen belastet (9-28 %, Medianwerte <Nachweisgrenze). In Dinkel und Dinkelmehl waren Ergotalkaloide ebenfalls nachweisbar, jedoch in geringen Konzentrationen. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren (Generic Ergot Alkaloid Enzymimmuntest) eignet sich somit zum einfachen, schnellen und empfindlichen Routinenachweis von Ergotalkaloiden in Getreide und verarbeiteten Lebensmitteln.

7. Summary

This thesis describes the detection of ergotalkaloids based on immunochemical methods using polyclonal antibodies against ergot alkaloids.

A high performance liquid chromatography procedure for 14 ergot alkaloids (ergometrine, ergotamine, ergocristine, α -ergocryptine, β -ergocryptine, ergocornine, ergosine as well as their corresponding inine-epimers) was used as the reference method to validate the immunochemical method and to test the toxin spectrum in foods.

Using antibodies against ergometrine (ergonovine), ergotamine, α -ergocryptine and ergocornine competitive enzyme immunoassays were established and validated.

The limit of detection of these assays was 0.03 ng/ml for ergometrine, 0.2 ng/ml for ergotamine, 1 ng/ml for α -ergocryptine and 3 ng/ml for ergocornine, respectively.

Concerning the specificity of the immunoassays, the results demonstrated that the testing system for ergometrine could detect all of the 14 ergot alkaloids, whereas the other three systems cross reacted only with some of the 13 other ergot alkaloids.

Adapted from the antibodies against ergometrine, a group specific method for the determination of ergot alkaloids was established and validated.

Using this “Generic Ergot Alkaloid” enzyme immunoassay the exposure of the alkaloid toxins in cereals and products of cereals could be determined at a limit of detection of 20 μ g/kg (in bread: 14 μ g/kg).

The applicability of this immunochemical method could be demonstrated by comparative tests using high performance liquid chromatography with naturally contaminated samples.

Furthermore, the Generic Ergot Alkaloid enzyme immunoassay was applied to analyze 223 grain-containing foods of the German market. Rye and products from rye were found to be contaminated most frequently (77-91 %), the medians of the total amount of ergot alkaloids were arranged between 45 μ g/kg and 152 μ g/kg. Wheat and products from wheat were found to be contaminated rarely, namely both quantitative (9-28 %) and qualitative (medians < the limit of detection). In spelt and in flour from spelt ergot alkaloids could be detected, but the concentration of these alkaloids was very low.

Therefore, the Generic Ergot Alkaloid enzyme immunoassay is suitable for a simple, quick and sensitive every day analysis of ergot alkaloids in cereals and grain-containing foods.

Literaturverzeichnis

Baum, C.R., P.L. Hilpert und V.K. Bhutani (1996): Accidental administration of an ergot alkaloid to a neonate. *Pediatrics* 98, 457 - 458.

Baumann, U., H.R. Hunziker und B. Zimmerli (1985): Mutterkornalkaloide in schweizerischen Getreideprodukten. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 76, 609 - 630.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (1999): Biologische Bundesanstalt prüft Widerstandsfähigkeit des Roggens.

<http://www.bba.de/mitteil/presse/99123001.htm>

Bockhorn, I. und H. Drinda (2004): Untersuchung von Mutterkornalkaloiden mit LC-MS/MS in Getreideprodukten des Handels. Tagungsband 26. Mykotoxin-Workshop, 17. - 19. Mai 2004, Herrsching, p. 51.

Bundesinstitut für Risikobewertung (2004): Mutterkornalkaloide in Roggenmehl. Stellungnahme vom 22. Januar 2004.

http://www.bfr.bund.de/cm/208/mutterkornalkaloide_in_roggenmehl.pdf

Bürk G., W. Höbel und A. Richt (2006): Ergot alkaloids in cereal products. Results from the Bavarian Health and Food Safety Authority. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 437 - 442.

Cagaš B., M. Flieger und J. Olšovská (1999): Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Grass & Forage Science* 54, 365 - 370.

Christopoulos, S., A. Szilagyi und S.R. Kahn (2001): Saint-Antony's Fire. *The Lancet* 2001, 358: 1694.

Correia, T., N. Grammel, I. Ortel, U. Keller und P. Tudzynski (2003): Molecular cloning and analysis of the ergopeptide assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry & Biology* 10, 1281 - 1292.

De Costa, C. (2002): St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. The Lancet 2002, 359: 1768 - 1770.

Dänicke, S. und S. Mainka (2006): Mutterkorn. In: Flachowski, G. (Hrsg.) Möglichkeiten der Dekontamination von „Unerwünschten Stoffen nach Anlage 5 der Futtermittelverordnung (2006). Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 294, BMELV/FAL, Braunschweig, S. 116 - 130.

Dargaville, P.A. und N.T. Campbell (1998): Overdose of ergometrine in the new-born infant: Acute symptomatology and long-term outcome. J. Paediatr. Child Health 34, 83 - 89.

Diener, H.C., H. Kaube und V. Limmroth (1999): Antimigraine drugs. J. Neurol. 246, 515 - 519.

Durix, A., P. Jaussaud, P. Garcia, Y. Bonnaire und S. Bony (1999): Analysis of ergovaline in milk using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. of chromatography 729, 255 - 263.

Eadie, M.J. (2004): Ergot of rye - the first specific for migraine. Journal of Clinical Neuroscience 11, 4 - 7.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General (2003): Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on undesirable substances in feed. Adopted on 20 February 2003.

European Food Safety Authority (2005): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on the request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal 225, 1 - 27.

Fajardo, J.E., J.E. Dexter, M.M. Roscoe und T.W. Nowicki (1995): Retention of ergot alkaloids in wheat during processing. Cereal Chem. 72, 291 - 298.

Flieger, M., M. Wurst und R. Shelby (1997): Ergot alkaloids - sources, structures and analytical methods. Folia Microbiol. 42, 3 - 30.

Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann und K. Starke (2001): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8.Auflage 2001, Urban & Fischer-Verlag, p. 197 - 199.

Frach, K. und G. Blaschke (1998): Separation of ergot alkaloids and their epimers and determination in sclerotia by capillary electrophoresis. J. of chromatography 808, 247 - 252.

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V. (2000): Mykotoxine – Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen.

Groot de, A.N.J.A. (1996): The role of oral (methyl)ergometrine in the prevention of postpartum haemorrhage. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 69, 31 - 36.

Haarmann T., C. Machoda, Y. Lübke, T. Correia, C.L. Schardl, D.G. Panaccione und P. Tudzynski (2005): The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. Phytochemistry 66, 1312 - 1320.

Hill, N.S, F.N. Thomson, D.L. Dawe und J.A. Stuedemann (1994): Antibody binding of circulating ergot alkaloids in cattle grazing tall fescue. A. J. Vet. 55, 419 - 424.

Hofmann A. (1964): Die Mutterkornalkaloide. Vom Mutterkorn zum LSD - Die Chemie der Mutterkornalkaloide. Reprint der Originalausgabe, 2. Auflage 2006. Nachtschatten Verlag, Solothurn, 218 p.

Huebner, H.J., S.L. Lemke, S.E. Ottinger, K. Mayura und T.D. Phillips (1999): Molecular characterization of high affinity, high capacity clays for the equilibrium sorption of ergotamine. Food Addit Contam. 4, 159 - 171.

Janssen, G.B., R.B. Beems, G.J. Speijers und H.P. van Egmond (2000a): Subacute toxicity of α -ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 1. general toxicological effects. Food Chem. Toxicol. 38, 679 - 688.

Janssen, G.B., R.B. Beems, G.J. Speijers und H.P. van Egmond (2000b): Subacute toxicity of α -ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 2. metabolic and hormonal changes. Food Chem. Toxicol. 38, 689 - 695.

Jaussaud, P., A. Durix, B. Videmann, A. Vigie, S. Bony (1998): Rapid analysis of ergovaline in ovine plasma using high-performance liquid chromatography with fluometric detection. Journal of Chromatography A 815, 147 – 153.

Klug, C., W. Baltes, W. Krönert und R. Weber (1988): Methode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, 108 - 113.

Komarova, E.L. und O.N. Tolkachev (2001): The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 1. Classification and chemistry of ergot peptides. Pharmaceutical Chemistry Journal 35, 504 - 513.

Krska, R. und C. Crews (2008): Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: A review. Food Addit Contam. 25, 722 - 731.

Lauber, U., R. Schnauffer, M. Gredziak und Y. Kiesswetter (2005): Analysis of rye grains and rye meals for ergot alkaloids. Mycotoxin Research 21, 258 - 262.

Lombaert, G.A., P. Pellaers, V. Roscoe, M. Mankotia, R. Neil und P.M. Scott (2002): Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. Food Addit. Contamin. 20, 494 - 504.

Mann, J., S. Barbey (1995): A novel approach to the skeletons of the ergot alkaloids and secoergolines. Tetrahedron, Vol. 51, No. 46, 12763 - 12774.

Miles, C.O., G.A. Lane, M.E. di Menna, I. Garthwaite, E.L. Piper, O.J.-P. Ball, G.C.M. Latch, J.M. Allen, M.B. Hunt, L.P. Bush, F.K. Min, I. Fletcher und P.S. Harris (1996): High levels of ergonovine and lysergic acid amide in toxic *Achnatherum inebrians* accompany infection by an Acremonium-like endophytic fungus. J. Agric. Food Chem. 44, 1285 - 1290.

Miles, C.O., M.E. di Menna, S.W.L. Jacobs, I. Garthwaite, G.A. Lane, R.A. Prestidge, S.L. Marshall, H.H. Wilkinson, C.L. Schardl, O.J.-P. Ball, G.C.M. Latch (1998): Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 601 - 606.

Mielke, H. (2000): Studien über den Pilz *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne unter Berücksichtigung der Anfälligkeit verschiedener Roggensorten und der Bekämpfung des Erregers. Mitt. aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.

Mohamed, R., E. Gremaud, J. Richoz-Payot, J.-C. Tabet und P.A. Guy (2006): Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1114, 62 - 72.

Molloy, J.B., C.J. Moore, A.G. Bruyeres, S.A. Murray and B.J. Blaney (2003): Determination of dihydroergosine in sorghum ergot using an immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3916 - 3919.

Moretti, M.E., A. Lee und S. Ito (2000): Which drugs are contraindicated during breastfeeding? Practice guidelines. *Can. Family Physician* 46, 1753 - 1757.

Moubarak, A.S., E.L. Piper, Z. B. Johnson und M. Flieger (1996): HPLC method for detection of ergotamine, ergosine, and ergine after intravenous injection of a single dose. *J. Agric. Food Chem.* 44, 146 - 148.

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (2004a): Mutterkornvorkommen in Futtergetreide.

http://www.laves.niedersachsen.de/master/C25091682_L20_D0_I826_h1.html

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (2004b): Untersuchung von Mutterkornalkaloiden in Getreideerzeugnissen.

http://www.laves.niedersachsen.de/master/C38200763_N1245_L20_D0_I826.html

Novartis Pharma (2007): Cafergot®. Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®. 3 p.

Oldenburg, E. (1997): Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass and Forage Sci.* 52, 425 - 431.

Oresanya, T.F., J.F. Patience, R.T. Zijistra, A.D. Beaulieu, D.M. Middleton, B.R. Blakley und D.A. Gillis (2003): Defining the tolerable level of ergot in the diet of weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 493 - 500.

Panaccione, D.G. (2005): Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 9 - 17.

Petters-Volleberger, G.W.M., R.B. Beems und G.J.A. Speijers (1996): Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats. *Food Chem. Toxicol.* 34, 951 - 958.

Porter, J.K. (1995): Analysis of endophyte toxins: Fescue and other grasses toxic to livestock. *J. Anim. Sci.* 73, 871- 880.

Reddick, B.B., K.D. Gwinn, B.J. Savary und M.H. Collins-Shepard (1991): Development of an immunoassay for detection of ergoline alkaloids in tall fescue. *Tennessee Farm and Home Science* 160, 78 - 81.

Rice, R.L., D.J. Blodgett, G.G. Schurig, W.S. Swecker, C.D. Thatcher, D.E. Eversole (1998): Oral and parenteral vaccination of mice with protei-ergotamine conjugates and evaluation of protection against fescue toxicosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 61, 305 – 316.

Roth, L., H. Frank und K. Kormann (1990): Giftpilze – Pilzgifte. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg, 182 - 183.

Saper, J.R. und S.D. Silberstein (2006): Pharmacology of dihydroergotamine and evidence for efficacy and safety in migraine. *Headache* 46, 171 - 181.

Silberstein S.D. und D.C. McCrory (2003): Ergotamine and Dihydroergotamine: History, Pharmacology and Efficacy. *Headache* 43, 144 - 166.

Schiff, P.L. (2006): Ergot and its alkaloids. Am. J. Pharm. Education 70, Article 98.

Schnitzius, J.M., N.S. Hill, C.S. Thompson und A.M. Craig (2001): Semiquantitative determination of ergot alkaloids in seed, straw, and digesta samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Diagn. Invest. 13, 230 - 237.

Schoch, U. und C. Schlatter (1985): Gesundheitsrisiken durch Mutterkorn in Getreide. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 76, 631 - 644.

Schumann, B. (2007): Effects of ergot on health and performance of ruminants and carry over of the ergot alkaloids into edible tissue. Diss med vet, Hannover 2007.

http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/schumannb_ss07.html

Schumann, B., Lebzien P., Ueberschär K.-H., Dänicke, S (2009): Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ergot alkaloid metabolism and carry over into milk. Mol. Nutr. Food Res. 53, 931 - 938.

Scott, P.M. und G.A. Lawrence (1982): Losses of ergot alkaloids during making of bread and pancakes. J. Agric. Food Chem. 30, 445 - 450.

Scott, P.M., G.A. Lombaert, P. Pellaers, S. Bacler und J. Lappi (1992): Ergot alkaloids in grain foods sold in Canada. J. AOAC Int. 75, 773 - 779.

Shelby, R.A. (1996): Detecting ergot alkaloids by immunoassay. In: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. Beier, R.C. und L.H. Stanker (Hrsg.), ACS Symposium Series 621. American Chemical Society, Washington, DC, S. 231 - 242.

Shelby, R.A., R.C. Bridgman, F.T. Smith und V.R. Atigadda (1998): Determination of ergovaline in tall fescue by a specific monoclonal antibody. Food Agric. Immunol. 10, 339 - 347.

Shelby, R.A. und V.C. Kelly (1991): An immunoassay for ergotamine and related alkaloids. J. Agric. Food Chem. 38, 1130 - 1134.

Shelby, R.A. und V.C. Kelly (1991): Detection of ergot alkaloids in tall infected fescue by competitive immunoassay with a monoclonal antibody. Food Agric. Immunol. 3, 169 - 177.

Shelby, R.A., und V.C. Kelly (1992): Detection of ergot alkaloids from *Claviceps* species in agricultural products by competitive ELISA using a monoclonal antibody. J. Agric. Food Chem. 40, 1090 - 1092.

Shelby, R.A., J. Olšovská, V. Havlicek und M. Flieger (1997): Analysis of ergot alkaloids in endophyte-infected tall fescue by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 45, 4674 - 4679.

Tfelt-Hansen, P., P.R. Saxena, C. Dahlof, J. Pascual, M. Lainez, P. Henry, H.C. Diener, J. Schoenen, M.D. Ferrari und P.J. Goadsby (2000): Ergotamine in the acute treatment of migraine - A review and European consensus. Brain 123, 9 - 18.

Urga, K., A. Debella, Y. W/Medihn, A. N, A. Bayu und W. Zewdie (2002): Laboratory studies on the outbreak of gangrenous ergotism associated with consumption of contaminated barley in Arsi, Ethiopia. Ethiop. J. Health Dev. 16, 317 - 323.

Ware, M.G., G. Price., L. Carter und R. Eitenmiller (2000): Liquid chromatographic preparative method for isolation of ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk. J. AOAC Int. 83, 1395 - 1399.

Wolff, J. und H.D. Ocker (1985): Einfluß des Backprozesses auf den Gehalt des Mutterkornalkaloids Ergometrin. Getreide, Mehl und Brot 39, 110 - 113.

Wolff, J., C. Neudecker, C. Klug und R. Weber (1988): Chemische und toxikologische Untersuchungen in Mehl und Brot. Z. Ernährungswiss. 27, 1 - 22.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas sowie für sein unermüdliches Interesse und seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. V. Curtui danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung und die vielen Anregungen während meiner Labortätigkeit im Rahmen dieser Arbeit und insbesondere für die intensive Zusammenarbeit bei der Durchführung der chromatografischen Analysen.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften für die stets gewährte Hilfe bei der praktischen Durchführung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau R. Stumpf, ohne deren geduldigen Einsatz mein reibungsloses Fortkommen bei der Laborarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Schwestern sowie meinem Mann für die Geduld und Toleranz während dieser Zeit herzlich danken.

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.

Lydia Roloff



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5591-2



9 783835 519539 1 2