

Ochratoxin-A-Bestimmung in Wein mittels eines ICP-MS-basierten Immunoassays

Charlotte Giesen, Norbert Jakubowski, Ulrich Panne und Michael G. Weller

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Berlin

Ochratoxin A

Ochratoxine sind Mykotoxine, die von den Schimmelpilzen *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium verrucosum* als sekundäre Stoffwechselprodukte gebildet werden. Ochratoxin A (OTA) ist das am häufigsten vorkommende Ochratoxin und auch das gesundheitsschädlichste. Die Strukturformel ist aus Abbildung 1 ersichtlich. Die genannten Schimmelpilze wachsen auf Lebensmitteln und sind daher unter anderem in Wein, Bier, Kaffee, Getreide, Gewürzen und Milchprodukten zu finden.^[1]

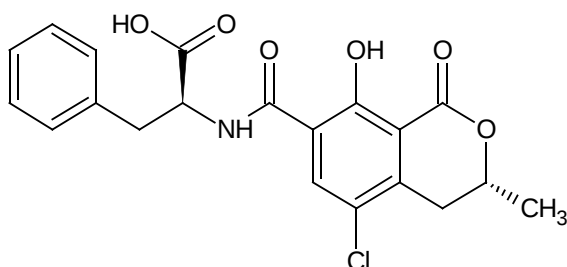


Abbildung 1: Ochratoxin A (OTA)

Aus diesem Grund hat die EU Grenzwerte für OTA in Lebensmitteln erlassen^[2,3], der Grenzwert für Wein beträgt $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Um diese Grenzwerte zu überwachen, ist eine empfindliche und spezifische Analytik notwendig. Hauptsächlich wird diese Analytik mittels LC-MS durchgeführt. Mit dieser Methode werden Nachweisgrenzen zwischen $0.002 - 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ erreicht.^[4] Ein Nachteil ist allerdings die aufwändige Probenvorbereitung, welche die Extraktion von OTA und eine Aufreinigung der Proben beinhaltet.^[5] Immunoassays kommen hingegen ohne diese Probenvorbereitung aus und können für die empfindliche Detektion von Analyten in verschiedenen biologischen Matrices verwendet werden. Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ist eine Multielementmethode und wird für die Ultraspurenanalytik eingesetzt. Sie zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Präzision sowie einen großen linearen dynamischen Bereich aus. Die Probe wird in einem $7000 - 10\,000 \text{ K}$ heißen Argonplasma atomisiert und ionisiert. Durch den Einsatz von geeigneten Markierungen, meist durch Verwendung von Metallen, können mit dieser Methode auch Biomoleküle detektiert werden.^[6]

Kompetitiver Immunoassay zur Bestimmung von OTA in Wein

Wir haben in dieser Arbeit Sekundärantikörper eingesetzt, die mit 40-nm-Gold-Nanopartikeln konjugiert sind. Hierdurch kann eine hohe Signalverstärkung erreicht werden, da ein Antikörper auf diese Weise mit etwa $3,5 \times 10^6$ Goldatomen markiert ist. Wir wollten daher die Leistungsfähigkeit eines ICP-MS-basierten Immunoassays einem klassischen Immunoassay mit photometrischer Detektion gegenüberstellen.^[7]

Der Immunoassay wird in einer transparenten 96-er Mikrotiterplatte durchgeführt. Beim kompetitiven Format, dargestellt in Abbildung 2 und 3, wird ein OTA-BSA-Konjugat an die Oberfläche gebunden. Danach werden alle möglicherweise noch freien reaktiven Stellen auf der Oberfläche mit 0.1 % Casein geblockt. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Analyten und dem monoklonalen anti-OTA-Antikörper. Nach einem Waschschrift wird der sekundäre Antikörper zugegeben, welcher mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe von 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 als Substrat erfolgt eine Enzymreaktion mit blauer Färbung, die durch Zugabe von H_2SO_4 gestoppt wird. Die Lösung wird daraufhin gelb und die Mikrotiterplatte kann bei 450 nm in einem Absorptionsspektrometer ausgelesen werden.

Für die ICP-MS Detektion ist der sekundäre Antikörper mit Gold-Nanopartikeln (40 nm) konjugiert. Nach einem Waschschrift, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wird ein 20 % iges $HCl:HNO_3$ (3:1) – Gemisch verwendet, um die Gold-Nanopartikel von der Oberfläche zu lösen. Danach folgt die Detektion mittels ICP-MS.

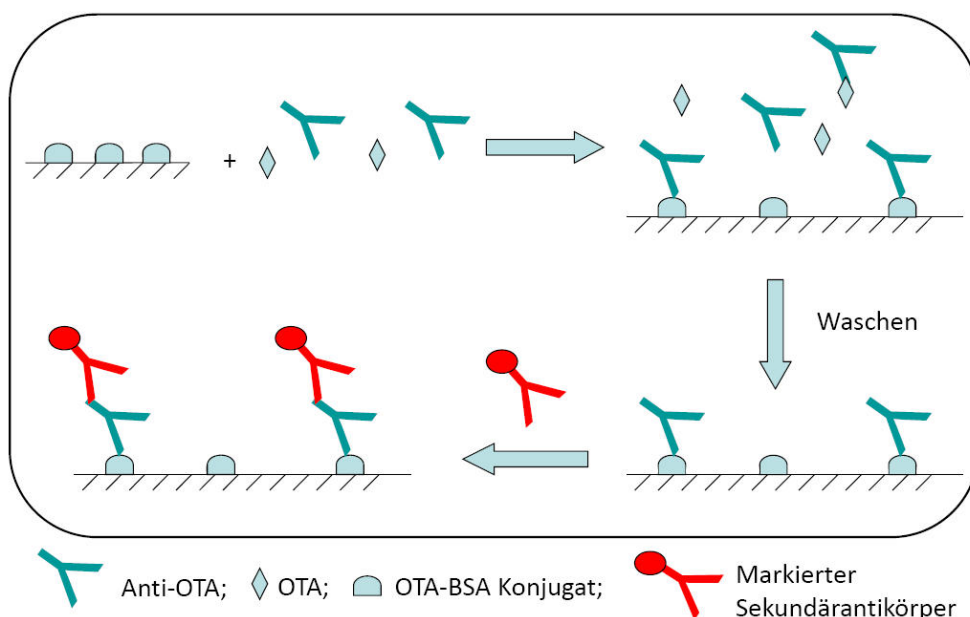


Abbildung 2: Kompetitiver Immunoassay I. OTA-BSA-Konjugat wird an der Oberfläche gebunden. Der Inkubation mit Analyt (hier OTA) und anti-OTA folgt ein Waschschrift, bei dem ungebundener Antikörper entfernt wird. In einem weiteren Inkubationsschritt wird der Sekundärantikörper eingeführt, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist.

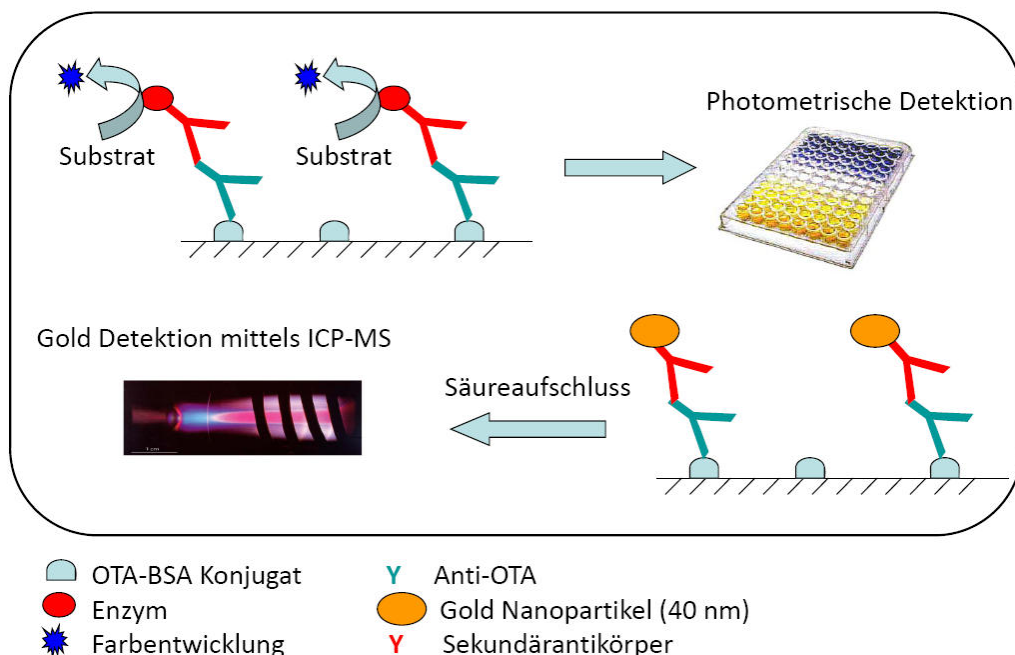


Abbildung 3: Kompetitiver Immunoassay II. Photometrische Detektion: Durch Zugabe von TMB und H_2O_2 als Substrat wird eine blaue Farbreaktion ausgelöst, die durch Abstoppen mit H_2SO_4 in gelb umschlägt. ICP-MS Detektion: Durch ein $HCl:HNO_3$ - Säuregemisch werden die Gold-Nanopartikel aufgelöst.

Für die Auswertung der Standardkurve in Abbildung 4 wird der sogenannte 4-Parameter-Fit angewandt:

$$y = \frac{(A - D)}{(1 + \frac{x}{C})^B} + D$$

Hierbei beschreibt der Parameter A die obere Asymptote, D die untere Asymptote, C den Wendepunkt und damit die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} und B die Steigung am Punkt C . Der Kurvenverlauf ist sigmoidal.

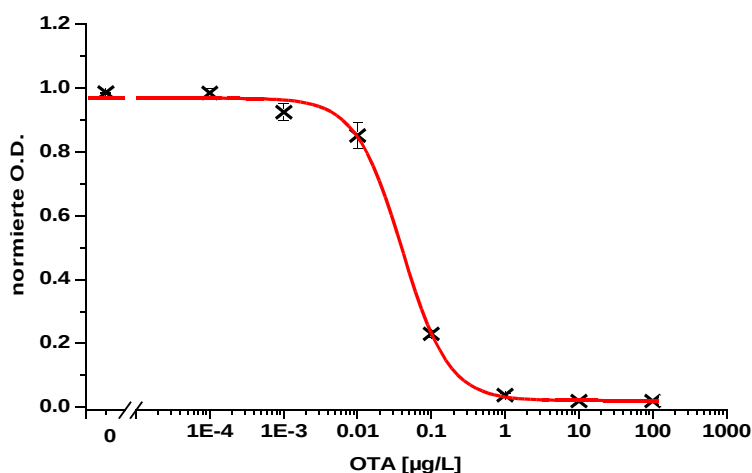


Abbildung 4: OTA Standardkurve nach dem 4-Parameter-Fit.

Vergleich ICP-MS Detektion mit photometrischer Detektion

Wir haben einen Immunoassay zur OTA-Detektion in Wein entwickelt und die klassische photometrische Detektion mit der ICP-MS-Detektion verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 und 6 zusammengefasst. Dabei entfällt eine aufwändige Probenvorbereitung, wie es zum Beispiel bei der LC-MS-Analytik der Fall ist. Der Wein wird lediglich in einem geeigneten Puffermedium aufgenommen und mit dem monoklonalen anti-OTA inkubiert. Die Nachweisgrenzen beider Detektionsmethoden liegen bei $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ und wurden mit der 3 s Methode bei 85 % Signalintensität bestimmt. Aufgrund des sigmoidalen Kurvenverlaufs ist die Fehlerverteilung der Standardkurve heteroskedastisch. Der Quantifizierungsbereich wurde daher mit dem Präzisionsprofil nach Ekins^[8] ermittelt, wobei ein relativer Fehler der Kurve von 40 % toleriert wurde. Der Quantifizierungsbereich des Immunoassays liegt für beide Detektionsmethoden zwischen $0,01 - 1 \text{ g L}^{-1}$. Anhand der sehr ähnlichen Präzision der Messergebnisse und der Nachweisgrenze von $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ wird deutlich, dass die Detektionsmethode – vorausgesetzt, sie ist empfindlich genug - nur einen geringen Anteil an der Leistungsfähigkeit eines Immunoassays hat. Hier spielen vor allem die Qualität des Antikörpers und die biochemischen Reaktionen während des Assays eine große Rolle.

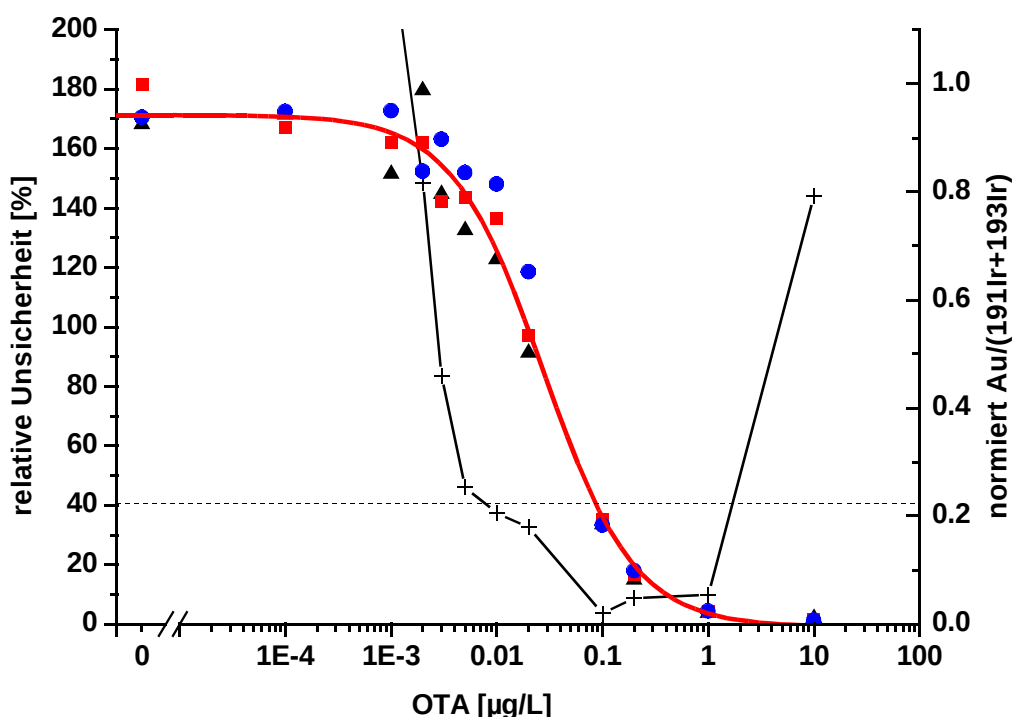


Abbildung 5: OTA Standardkurve (rote Linie) und Präzisionsprofil (schwarze Linie) nach Ekins^[8], ICP-MS-Detektion. Abbildung aus C. Giesen *et al.*^[7] (mit freundlicher Genehmigung von JAAS)

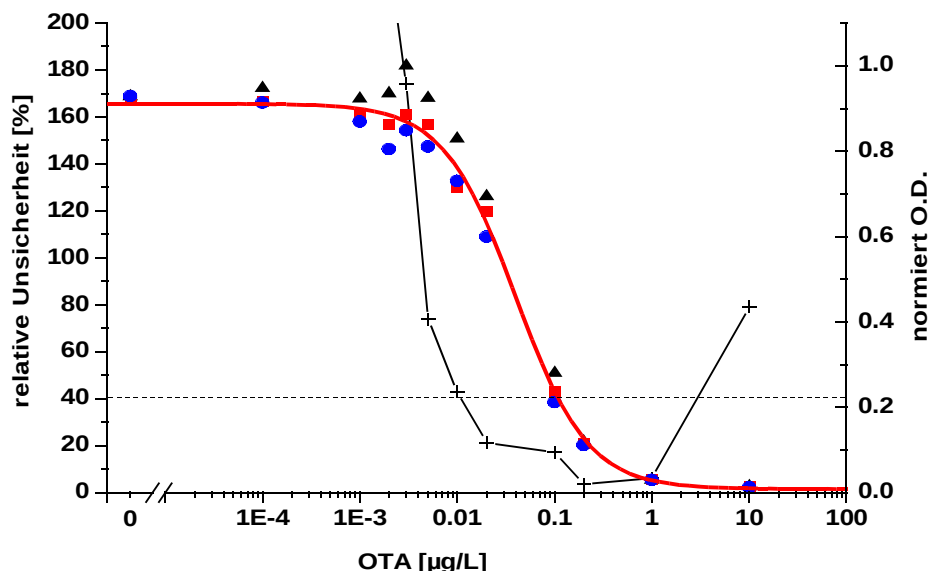


Abbildung 6: OTA Standardkurve (rote Linie) und Präzisionsprofil (schwarze Linie) nach Ekins^[8], Photometrische Detektion. Abbildung aus C. Giesen *et al.*^[7] (mit freundlicher Genehmigung von JAAS)

	ICP-MS [µg L ⁻¹]	Photometrie [µg L ⁻¹]	Verdünnung	Verdünnung in
Weißwein, n=6				
Dotiert mit 82 ± 14 µg L⁻¹				
OTA	128 ± 9	128 ± 7	1:1000	100 mM Tris / 0,1 % Casein, pH 7,5
	97 ± 8	108 ± 5	1:1000	Matrix angepasster Standard
Referenzmaterial, Gehalt 0,60 ± 0,14 µg L⁻¹				
OTA	0,78 ± 0,12	1,13 ± 0,05	1:20	100 mM Tris / 0,1 % Casein, pH 7,5
Referenzmaterial, Dotiert mit 205 ± 14 µg L⁻¹				
OTA	280 ± 27	298 ± 22	1:1000	100 mM Tris / 0,1 % Casein, pH 7,5
	174 ± 29	190 ± 26	1:2000	100 mM Tris / 0,1 % Casein, pH 7,5

Tabelle 1: Bestimmung von OTA in Wein mit ICP-MS und Photometrie. N = 4, Unsicherheitsbudget 95 % Vertrauensintervall.

Ergebnisse der Bestimmung von OTA in Wein sind in Tabelle 1 gezeigt. Dazu wurde ein Weißwein ohne natürliches OTA aufgestockt und in 100 mM Tris / 0,1 % Casein, pH 7,5 verdünnt. Hier lag die Wiederfindungsrate bei 156 % für beide Detektionsmethoden. Durch den Einsatz von matrixangepassten Standards verbesserte sich die Wiederfindungsrate auf 118 % für die ICP-MS-Detektion und auf 132 % für die photometrische Detektion. Des Weiteren wurde der OTA Gehalt in einem Referenzmaterial von der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen Rotwein mit einem natürlichen OTA Gehalt von $0,60 \pm 0,14 \mu\text{g L}^{-1}$. Mit der ICP-MS-Detektion ergab sich ein Wert von $0,78 \pm 0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ und mit der photometrischen Detektion $1,13 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$. Da das im Wein enthaltene OTA natürlichen Ursprungs war, könnte die Überbestimmung durch andere Ochratoxin-Spezies hervorgerufen worden sein, welche durch

den Antikörper nicht von OTA unterschieden werden konnten. Der Rotwein wurde ebenfalls aufgestockt und in zwei Verdünnungen gemessen. Mit der ICP-MS-Detektion wurde bei einer Verdünnung von 1:1000 eine Wiederfindungsrate von 137 % ermittelt, mit der photometrischen Detektion wurden 145 % bestimmt. Durch eine höhere Verdünnung von 1:2000 konnten Matrixeffekte minimiert werden und eine Wiederfindungsrate von 85 % für die ICP-MS und 93 % für die photometrische Detektion erreicht werden.

Anhand dieser Ergebnisse und dem Vergleich von ICP-MS-Detektion mit photometrischer Detektion wird deutlich, dass die Detektionsmethode nur einen geringen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit eines Immunoassays hat und dass die biochemischen Reaktionsschritte eine entscheidende Rolle spielen.

Wir haben eine leistungsfähige und schnelle Methode für die OTA-Bestimmung in Wein entwickelt^[7] und zwar innerhalb der von der EU festgelegten Grenzwerte. Die weitere Anwendung dieses Immunoassays auch für andere Matrices wie Kaffee oder Getreide ist denkbar. Der Einsatz von ICP-MS, die bekannt ist für ihre Multiplexfähigkeit, würde es ermöglichen, mehrere Analyten mittels unterschiedlicher metallmarkierter Antikörper gleichzeitig in einem Immunoassay zu bestimmen, was mit der konventionellen Methode bisher nicht möglich ist.

Danksagung

Wir danken Prof. Duck-Hwa Chung, Südkorea, für die Bereitstellung des monoklonalen Antikörpers und der Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Schneider, BAM, für die Bereitstellung von technischen Ressourcen und Unterstützung bei der Entwicklung des Immunoassays. Wir danken außerdem Dr. Matthias Koch, BAM, für die Bereitstellung der Realproben.

Literatur

- [1] H. A. Clark and S. M. Snedeker, *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 2006, **9**, 265-296.
- [2] D. 1881/2006, *Official Journal of the European Union*, 19 December 2006.
- [3] D. 105/2010, *Official Journal of the European Union*, 5 February 2010.
- [4] L. Monaci and F. Palmisano, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, **378**, 96–103.
- [5] E. Gonzalez-Penas, C. Leache, M. Viscarret, A. P. de Obanos, C. Araguas and A. L. de Cerain, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1025**, 163-168.
- [6] A. Prange and D. Proefrock, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, **23**, 432-459.
- [7] C. Giesen, N. Jakubowski, U. Panne and M. G. Weller, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, **25**, 1567 – 1572. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2010/JA/c0ja00009d>
- [8] R. P. Ekins, *Ligand Quarterly*, 1981, **4**, 33-44.