



Doctoral Thesis

## Entwicklung und Anwendung eines Radioimmunoassays zum Nachweis von Aflatoxin B1 in Lebens- und Futtermitteln

**Author(s):**

Aeschbach, Andre P.

**Publication Date:**

1983

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000302086> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 7248

ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG EINES RADIOIMMUNOASSAYS  
ZUM NACHWEIS VON AFLATOXIN B1 IN LEBENS- UND FUTTERMITTELN

---

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines Doktors  
der Naturwissenschaften der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von: Andre P. Aeschbach  
dipl. sc. nat. ETH  
geboren: 1.11.1943  
von Reinach Aargau

angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent  
Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz, Korreferent

1983

## E ZUSAMMENFASSUNG

-----

Ein einfach durchführbarer Radioimmunoassay (RIA) zum Nachweis von Aflatoxin B1 wurde erarbeitet. Als Grundlage dienten 3 Publikationen zur Herstellung von Antikörpern gegen Aflatoxin B1 und ihrer Anwendung im RIA (Langone und Van Vunakis, 1976; Chu et al., 1977; Chu u. Ueno, 1977).

Dieser RIA wurde in der Anwendung bei natürlich kontaminierten Lebens- und Futtermitteln geprüft. Dabei wurde versucht, die Aufarbeitung der Proben so einfach wie möglich und dadurch zeitsparend durchzuführen, denn ein RIA hat gegenüber der Dünnschicht-Chromatographie, der heutigen Routine-Methode, nur einen Vorteil, wenn aufwendige Aufarbeitungs-Methoden umgangen werden können.

Aflatoxin ist wegen seines geringen Molekulargewichts (312) nicht immunogen; es muss zur Immunisierung an ein Trägermolekül, Bovine Serum Albumine (BSA) gebunden werden. Deshalb wurde zuerst über die Ketogruppe am Pentanonring des Aflatoxin-Moleküls eine Carboxylgruppe eingeführt (Aflatoxin-Oxim). Die Reinigung des Oxims erfolgte nach der zeitsparenden Umkristallisations-Methode (Langone und Van Vunakis, 1976). In einem zweiten Schritt wurde das Oxim dann über die Carboxylgruppe an die Aminogruppen des BSA gekoppelt. Pro Mol BSA konnten rund 14 Mol Aflatoxin-Oxim gebunden werden. Die Kopplungsreaktion wurde bezüglich pH optimiert. Somit konnte der totale Zeitaufwand zur Herstellung des Immunogens (BSA-Aflatoxin-Konjugat) von über 7 Tagen bei Chu und Ueno (1977) auf etwa die Hälfte reduziert und die Ausbeute auf praktisch 100 % gebracht werden.

Die Immunisierung erfolgte in der Kombination des Konjugats mit Freund'schem Adjuvans nach zwei unterschiedlichen Methoden. Die 'Einmal-Applikation' (Nieschlag, 1976) ergab niedrigere Titer als die 'Mehrfach-Applikation' (Dixon, 1975); später jedoch, nach mehrmaligen Booster-Injektionen über 20 Monate sanken die vorerst höheren Titer der Immunisierung nach Dixon auf das gleiche Niveau wie diejenigen der Immunisierung nach Nieschlag.

Zur Erarbeitung des RIA wurden zuerst die Immuno-Dialyse (Chu und Ueno, 1977) nachvollzogen und darauf verschiedene Methoden der Separierung von gebundenem und freiem Tracer untersucht (Ammoniumsulfat-Präzipitation, Adsorption mit Dextran-Kohle, Bindung an einen zweiten, gebundenen Antikörper). Alle Tests erfolgten vorerst parallel mit einem kommerziellen Tritium-Tracer und einem Jod-Tracer, der speziell für diese Untersuchungen vom Eidg. Institut für Reaktorforschung, EIR hergestellt wurde.

Da die Dialyse mit dem Jod-Tracer Schwierigkeiten (Adsorption am Dialyseschlauch) bereitete, und die drei anderen Separierungsmethoden sich für beide Tracer nur bedingt oder gar nicht eigneten, wurde eine Doppel-Antikörper-System entwickelt, das für beide Tracer anwendbar war. Der Jod-Tracer zeigte bezüglich Empfindlichkeit und Durchführung wesentliche

Vorteile. Wegen seiner ungenügenden Stabilität, die zur gegebenen Zeit jedoch nicht verbessert werden konnte, wurde später nur noch mit dem Tritium-Tracer weitergearbeitet.

Die Anwendung des RIA erfolgte zuerst mit Lebensmittelextrakten, hergestellt nach der BF-Methode ('AOAC-Methods'). Später wurde versucht durch direkte Bestimmung von Rohextrakten (Methanol, 55 %-ig) den Arbeitsaufwand zu verringern. Im Testansatz ergab sich somit ein Methanolgehalt von 18.3 % . Die Bindungskapazität der Antiseren wurde vorher unter den gleichen Bedingungen bestimmt; es ergab sich eine 2-3 mal geringere Antiserum-Gebrauchs-Verdünnung gegenüber dem Ansatz ohne Methanol. Das Test-System wurde bezüglich Empfindlichkeit nicht wesentlich beeinflusst.

Rohextrakte (filtriert oder zentrifugiert) von Erdnussprodukten, Mais-, Haselnuss- und Mandel-Proben ergaben verglichen mit Dünnschicht-Chromatographie (TLC) oder Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie (HPLC) recht gut übereinstimmende Resultate. Bei Futtermitteln, speziell bei sogenannten Mischfuttermitteln zeigten sich beim Ansatz mit Rohextrakten Probleme infolge Tracer-Absorption oder Aflatoxin vortäuschender Substanzen.

Mittels Kältefällung und/oder unter Anwendung der Minisäule SEP-PAK C 18 als einfache Aufarbeitung konnte die Beeinträchtigung der Bestimmungen reduziert, resp. eliminiert werden. Als Referenz dienten Parallel-Untersuchungen mit TLC und HPLC.

Total wurden 97 Lebensmittelproben und 124 Futtermittelproben getestet. Auf Grund der Resultate kann für die Anwendung dieses RIA bezüglich Aufarbeitung der Proben folgendes vorgeschlagen werden:

Für Lebensmittel wie Erdnussprodukte, Nuss-Arten und Getreide wird meistens die Aflatoxin-Bestimmung im filtrierten oder zentrifugierten Rohextrakt brauchbare Resultate liefern.

Andere Lebensmittelextrakte, z.B. von Fleisch, Käse und Milch müssen nach den üblichen Methoden aufgearbeitet werden.

Rohextrakte von Futtermitteln können, sofern es sich um reine Getreide oder Erdnuss-Bestandteile handelt, im allgemeinen ebenfalls direkt in den Test eingesetzt werden. Bei aus verschiedenen Produkten zusammengesetzten Futtermitteln kann eine einfache Reinigung des Rohextrakts mittels der Minisäule SEP-PAK C 18 eventuell vorhandene Tracer absorbierende Anteile eliminieren und zu akzeptablen Resultaten führen.

Sehr trübe Rohextrakte werden mit Vorteil in der Kälte (ca. minus 20 Grad C) gefällt und kalt filtriert; Tracer absorbierende Anteile können dadurch eventuell bereits ganz oder teilweise eliminiert werden.

Die Methode der Reinigung mittels Minisäule SEP-PAK C 18 wurde an 11 Futtermittel-Proben durchgeführt; auf Grund der sehr gut mit TLC übereinstimmenden Ergebnissen wäre es daher von Interesse, diese einfache Methode an einer grösseren Anzahl Proben auszutesten.

## F Summary

-----

A simple radioimmunoassay (RIA) for the detection of aflatoxin B1 (AF B1) has been developed. Three publications about the production of antibodies against AF B1 and their use in an RIA (Langone and Van Vunakis, 1976; Chu and Ueno, 1977; Chu et al., 1977) were used as basic literature. The RIA was tested on naturally contaminated food and feed-products. To shorten the time needed for the whole procedure, a preparation of the samples that was as simple as possible was attempted. This was important as RIAs only have an advantage over thin-layer-chromatography when complicated preparing-methods can be avoided.

Because of its low molecular weight (312) AF B1 is not immunogenic. To produce the effect of immunisation it must be coupled with a carrier-molecule. For this reason a carboxyle-group was introduced via the keto-group on the pentanon-ring (Oxime). The oxime was purified by the time-saving recrystallisation-method according to Langone and Van Vunakis (1976). In a second step the oxime was coupled with the aminogroups of bovine serum albumine (BSA) via the carboxyle-group. Per mol BSA 14 mol AF B1-oxime were bound. The optimal pH for this reaction was determined. Thus the total time needed for the preparation of the immunogen was reduced to about half of the original 7 days needed by Chu and Ueno (1977). Moreover the yield was increased to approximately 100 % .

Two different methods were used for the immunisation, for which the conjugate (AF B1-BSA) was combined with Freund-adjuvans. With the method using only one application (Nieschlag, 1976) lower titers were achieved than with the method using repeated application (Dixon, 1975). Later however, after repeated booster-injections continued over a period of 20 months, the initially higher 'Dixon'-titers diminished to the same level as the immunisation according to Nieschlag had achieved.

To develop the RIA, first immuno-dialysis according to Chu and Ueno (1977) was repeated. Then various methods for separating the bound and the free tracer (ammonium-sulphate precipitation, absorption with dextrane-charcoal, binding to a second, fixed antibody) were tested. All the tests were performed parallelly with both a tritium-tracer and an iodine-tracer, which has been specially prepared by the 'Eidgn. Institut für Reaktorforschung EIR' for these investigations. As there were some difficulties when using the iodine-tracer for dialysis (adsorption on the dialysis-tube) and as moreover the three other separation-methods were only relatively or not at all suitable for both tracers, a double-antibody-system was developed which could be used for both tracers. When using the iodine-tracer this test was more sensitive and simpler to perform. Due to its insufficient stability, which could, however, not be improved at that time, the tests were only continued with the tritium-tracer.

The RIA was first used on food-extracts prepared according to the BF-method ('AOAC-methods', Horwitz, 1975). Later on reduction of the work involved was attempted by directly testing the raw extracts (methanol 55 %). Thus the test-solution contained 18.3 % methanol. The binding-capacity of the antisera had been determined previously under the same conditions. This resulted in a 2-3 times lower antiserum-dilution as compared to the one without methanol. The sensitivity of the test-system was not greatly influenced.

The results achieved with raw extracts (filtered or centrifuged) from peanut-products and samples from maize, hazelnuts and almonds corresponded relatively well with those achieved with thin-layer-chromatography (TLC) or high-pressure-liquid-chromatography HPLC). Due to tracer absorption or aflatoxin-simulating substances there were some problems with the tests on the raw extracts of the feed-products, specially of the composed feeds. The impairment of the test-procedure could be reduced or even eliminated by a simple clean-up, i.e. precipitation by cooling and/or use of the minicolumn SEP-PAK C 18 . Parallel tests by TLC and HPLC were used as reference.

In total 97 food-samples and 124 feed-samples were tested. Due to the results achieved the following preparation of the samples for use in the RIA can be suggested:

For foods such as peanut-products and various kinds of nuts and cereals determination of Aflatoxin B1 in the filtered or centrifuged raw extract will mostly produce acceptable results.

Extracts from other foods such as meat, cheese and milk must be prepared according to usual methods.

Raw extracts of animal feed consisting only of cereal- or peanut-components can usually also be directly used for the test. With animal feed composed from various products, a simple cleaning-up of the raw extract using the minicolumn SEP-PAK C 18 will eliminate components which could absorb the tracer. In this way acceptable results can be achieved.

Extremely turbid raw extracts are preferably precipitated in the cold (about minus 20 degrees C) and filtered. In this way any components which could absorb tracer can be partly or totally eliminated.

The clean-up by minicolumn SEP-PAK C 18 was tested on 11 feed-samples. The results corresponded well to those achieved by TLC. It would be interesting to test this simple method on a larger number of samples.