

Marc Machnik

**Aufreinigung und Konzentrierung anaboler
Steroide mittels der
Immunoaffinitätschromatographie**

Doktorarbeit / Dissertation

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 1999 Diplom.de
ISBN: 9783832424664

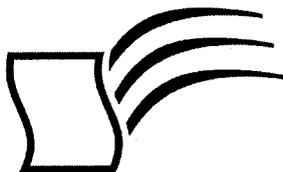
Marc Machnik

**Aufreinigung und Konzentrierung anaboler Steroide
mittels der Immunoaffinitätschromatographie**

Marc Machnik

Aufreinigung und Konzentrierung anaboler Steroide mittels der Immunoaffinitätschromatographie

Dissertation
an der Deutschen Sporthochschule Köln
Prüfer Prof. Dr. W. Schänzer
Institut für Biochemie
Oktober 1999 Abgabe



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

Hermannstal 119 k
22119 Hamburg

agentur@diplom.de
www.diplom.de

ID 2466

Machnik, Marc: Aufreinigung und Konzentrierung anaboler Steroide mittels der Immunoaffinitätschromatographie / Marc Machnik - Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 2000
Zugl.: Köln, Sporthochschule, Dissertation, 1999

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR
Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg 2000
Printed in Germany



Diplomarbeiten Agentur

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit

Ihr Team der *Diplomarbeiten Agentur*

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey –
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —————

Hermannstal 119 k —————
22119 Hamburg —————

Fon: 040 / 655 99 20 —————
Fax: 040 / 655 99 222 —————

agentur@diplom.de —————
www.diplom.de —————

Erster Referent: Herr Prof. Dr. W. Schänzer

Zweiter Referent: Frau PD. Dr. P. Platen

Vorsitzender des Promotionsausschusses: Herr Prof. Dr. W. Menke

Prüfer im Hauptfach Biochemie: Herr Prof. Dr. W. Schänzer

Prüfer im Nebenfach Trainings-
und Bewegungslehre: Herr Prof. Dr. J. Mester

Tag der mündlichen Prüfung : 11. Februar 2000

Ich versichere an Eides Statt, daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen angefertigt habe; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht.



Marc Machnik

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Theoretischer Teil	3
2.1 Theorie der Immunaффinitätschromatographie	3
2.2 Antikörper und Antigene	12
2.2.1 Das Immunsystem.....	12
2.2.2 Struktur von Antikörpern.....	13
2.2.3 Herstellung von Antikörpern.....	15
2.2.4 Isolierung von Antikörpern	16
2.2.5 Charakterisierung von Antikörpern	17
2.2.6 Immobilisierung von Antikörpern.....	21
2.2.7 Herstellung von Steroid-Protein-Konjugaten.....	25
2.2.8 Charakterisierung von Steroid-Protein-Konjugaten	29
2.2.9 Immunisierung von Versuchstieren.....	32
2.3 Einfluß der IAC-Prozedur auf die Analyse	33
3 Experimenteller Teil	34
3.1 Herstellung der Antigene	34
3.1.1 Epimethyltestosteron-3-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin.....	35
3.1.2 Epimethyltestosteron-3-carboxymethyloxim-Keyhole Limpet Hemocyanin ..	40
3.1.3 Stanozolol-17-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin	41
3.1.4 Stanozolol-17-carboxymethyloxim-Keyhole Limpet Hemocyanin	42
3.1.5 Stanozolol-4-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin	43

3.2	Reinigung und Charakterisierung der Antigene.....	46
3.2.1	Reinigung der Antigene.....	46
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
3.2.3	Bestimmung des Steroid/Protein-Molekülverhältnisses.....	48
3.3	Gewinnung und Immobilisierung der Antikörper.....	49
3.3.1	Immunsierung der Versuchstiere und Isolierung der Antikörper.....	49
3.3.2	Immobilisierung der Antikörper.....	50
3.4	Untersuchungen zur Charakterisierung der IAC-Säulen.....	51
3.4.1	Probenaufarbeitung und IAC-Prozedur für anabole Steroide.....	51
3.4.2	Bestimmung von Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der IAC-Methode.....	53
3.4.3	Bestimmung der dynamischen Säulenkapazität.....	54
3.4.4	Bestimmung der Kreuzreaktivität der IAC-Säulen.....	55
3.4.5	Regenerierbarkeit und Langzeitstabilität der IAC-Säulen.....	56
3.5	Versuche zur Erhöhung der Säulenkapazität.....	56
3.5.1	Erhöhung des Gelvolumens.....	56
3.5.2	Variation des Trägermaterials und der Antikörperdichte.....	57
3.5.3	Variation der Inkubationsbedingungen.....	58
3.5.4	Variation der Elutionsbedingungen.....	59
3.6	Meßinstrumente und Geräteparameter.....	60
3.6.1	GC-MS-Bedingungen.....	60
3.6.2	GC-FID-Bedingungen.....	61
3.6.3	HPLC-DAD-Bedingungen.....	62
3.6.4	GC/HRMS-Bedingungen.....	63
4	Ergebnisteil.....	65
4.1	Synthese und Charakterisierung der Antigene.....	65
4.1.1	Epimethyltestosteron-3-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin.....	65
4.1.2	Epimethyltestosteron-3-carboxymethyloxim-Keyhole Limpet Hemocyanin..	70
4.1.3	Stanozolol-17-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin.....	77
4.1.4	Stanozolol-17-carboxymethyloxim-Keyhole Limpet Hemocyanin.....	80
4.1.5	Stanozolol-4-carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin.....	81

4.2 Charakterisierung der IAC-Säulen.....	86
4.2.1 Eigenschaften der Anti-Methyltestosteronsäulen	87
4.2.2 Eigenschaften der Anti-Epimethyltestosteronsäulen.....	94
4.2.3 Eigenschaften der Anti-Stanozolol-17-CMO-Säulen.....	101
4.2.4 Eigenschaften der Anti-Stanozolol-4-CMO-Säule	101
4.2.5 Regenerierbarkeit und Langzeitstabilität der IAC-Säulen.....	103
4.3 Versuche zur Erhöhung der Säulenkapazität	104
4.3.1 Erhöhung des Gelvolumens.....	104
4.3.2 Variation des Trägermaterials	105
4.3.3 Variation der Inkubationsbedingungen	110
4.3.4 Variation der Elutionsbedingungen.....	112
4.4 Einfluß der IAC-Prozedur auf die Analyse	114
4.4.1 Einfluß der Biomatrix auf die Säulenkapazität.....	114
4.4.2 Beurteilung der Abreicherung endogener Substanzen	117
4.4.3 Evaluation des optimalen Probenvolumens.....	120
4.4.4 Fallbeispiele mit realen Proben	122
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	129
6 Anhang	133
Teil A: Berechnungen und Formeln.....	133
Teil B: Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen.....	137
Teil C: Auflistung der Chemikalien	141
Teil D: Liste der Abbildungen und Tabellen	144
Teil E: Literaturverzeichnis.....	149
Danksagungen.....	164
Lebenslauf.....	165

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Im Jahre 1925 gelang den Wissenschaftlern H. Sachs und A. Klopstock erstmals die Produktion von Antikörpern, die fähig waren, spezifisch mit Steroidmolekülen zu reagieren [1]. Sie immunisierten Kaninchen mit einer Mixtur aus Cholesterin und porcinem Serum und erhielten Cholesterin-spezifische Antisera.

Erlanger et al. (1957) verfolgten diesen Ansatz weiter und koppelten niedermolekulare Verbindungen (Haptene), die per se nicht imstande waren, eine Immunantwort im Organismus auszulösen, an Trägerproteine und impften die entstandenen Hapten-Protein-Konjugate Säugetieren ein [2]. Diese Entwicklung von Erlanger bedeutete den Einstieg in eine neue Technologie, der Gewinnung von Antikörpern mit beliebig wählbarer antigener Spezifität.

1975 wurde von Brooks [3] vorgeschlagen, die nach Erlangers Methode herstellbaren Antikörper für radioimmunologische Verfahren zum Nachweis von anabolen Steroiden in der Dopinganalytik einzusetzen. Durch den hohen Prozentsatz sowohl falsch positiver wie auch falsch negativer Ergebnisse konnten sich diese Radioimmunoassay-Systeme (RIA) nicht durchsetzen. Heute spielen in der Dopinganalytik Enzymimmunoassays (EIA) eine Rolle für den Nachweis von Peptidhormonen, wie Follikel stimulierendes Hormon (FSH) [4], luteinisierendes Hormon (LH) [4] und humanes Chorion Gonadotropin (hCG) [5]. Auch für die Isolierung von rekombinantem humanem Wachstumshormon (hGH, human Growth Hormone) [6] und Erythropoietin (Epo) [7] könnten in Zukunft immunologische Verfahren eingesetzt werden. Methoden zur Unterscheidung von endogenen und exogenen Peptidhormonen mit Hilfe von Antikörpern sind in der Erforschung [8]. Im Bereich der Pferdeanalytik werden kommerzielle Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA-Kits) als Screening-Prozedur für synthetische Kortikosteroide eingesetzt [9].

Bei der Analyse von anabolen androgenen Steroidhormonen wird ausschließlich die Gaschromatographie (GC) in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) verwendet [10,11]. Die Weiterentwicklung dieses Verfahrens führte zu der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry), die zum Nachweis kleinster Substanzmengen geeignet ist, so daß die Einnahme verbotener Medikamente sehr lange zurückverfolgt werden kann [12].

Ein Problem bei der GC/MS-Analyse biologischer Proben bildet die Koelution endogener Substanzen, die während des gaschromatographischen Prozesses nicht von der gesuchten Substanz getrennt werden und gleichzeitig in den massenspezifischen Detektor gelangen. Dadurch wird ein eindeutiger Nachweis der gesuchten Dopingsubstanz unmöglich.

Zielsetzung

Im Rahmen der Probenvorbereitung sollen die zu analysierenden Substanzen angereichert und Störsubstanzen entfernt werden.

Ziel ist es, einen Extrakt zu erhalten, der frei von Interferenzen ist und die gesuchten Substanzen in detektierbaren Mengen enthält.

Mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie (IAC) [13,14], bei der ebenfalls auf die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zurückgegriffen wird, ergibt sich die Möglichkeit, Substanzen im Spurenbereich (pg - ng) aus komplexen biologischen Medien zu isolieren und aufzukonzentrieren. Dabei wird die Spezifität und Selektivität ausgenutzt, mit der die an einer Festphase gebundenen Antikörper exakt definierte Molekülstrukturen (Epitope) erkennen und *reversibel* binden [15]. Die gesuchte Substanz kann so von störenden Einflüssen aus der Biomatrix separiert werden.

Durch den Einsatz der GC-HRMS-Technologie in Verbindung mit der IAC (IAC-GC/HRMS) ist zu erwarten, daß die Einnahme anaboler Steroide länger zurückverfolgt werden kann als bei herkömmlichen Aufarbeitungsverfahren mit unspezifischen Extraktionsverfahren.

In der vorliegenden Arbeit soll die Anwendung der IAC als Reinigungsschritt für anabole Steroide verbessert werden. Die Zielsetzungen lassen sich in zwei Schwerpunkte gliedern.

- Produktion spezifischer Antikörper über die Synthese von Steroid-Protein-Konjugaten und Herstellung von IAC-Säulen zur Isolierung sowie Reinigung von Langzeitmetaboliten der am häufigsten mißbrauchten Anabolika.
- Charakterisierung der Säulen und Beurteilung der routinemäßigen Anwendbarkeit.

Hierbei soll anhand von realen Proben die Validität der IAC-GC/HRMS-Methode im Vergleich zum herkömmlichen Aufreinigerungsverfahren für anabole Substanzen ohne IAC-Prozedur [10,11] beurteilt werden.

2. Theoretischer Teil

2.1. Theorie der Immunoaffinitätschromatographie (IAC) [16]

Bei den heute zur Verfügung stehenden modernen Methoden der instrumentellen Analytik, wie z.B. der GC/HRMS, kommt der Probenaufarbeitung eine wichtige Rolle zu. Die Nachweisgrenze einer Analyse wird nicht nur durch die instrumentellen Parameter bestimmt, sondern mit steigender Empfindlichkeit des Meßgerätes durch die Reinigungsgüte des Analyten [17].

Mit Hilfe von Extraktionsmitteln wird versucht, den Analyt von Störsubstanzen zu befreien. Hierbei kommen sowohl Flüssig- wie auch Festphasenextraktionssysteme (SPE = Solid Phase Extraction) zum Einsatz [10,11,18]. Die Leistungsfähigkeit von Extraktionen ist aber begrenzt, da Substanzen nicht aufgrund ihrer chemischen Strukturmerkmale, sondern aufgrund ihrer Lösungseigenschaften zum Extraktionsmittel getrennt werden. Eine Weiterentwicklung der Festphasenextraktion ist die Technik der Affinitätschromatographie, die zuerst von Cuatrecasas (1968) angewandt wurde [19]. Das Prinzip affinitätschromatographischer Verfahren beruht auf der nicht kovalenten Wechselwirkung zweier Reaktionspartner, bei denen der eine als Ligand an die stationäre Phase gebunden wird. Der zweite Reaktionspartner ist die Analysesubstanz, die sich komplementär zur Struktur des Liganden verhalten muß, um den spezifischen Ligand-Analyt-Komplex zu bilden. Weitergehende Betrachtungen zur Affinitätschromatographie finden sich in [20,21].

Ein Spezialfall der Affinitätschromatographie ist die Immunoaffinitätschromatographie (IAC), bei der Antikörpermoleküle auf einer Festphase immobilisiert werden [14,22]. Ihr Einsatz hat ursprünglich in der klinischen Chemie begonnen, um Makromoleküle aus biologischen Proben zu separieren und zu charakterisieren [23]. Heute gewinnt die IAC an Bedeutung, wenn Substanzen in komplexen Gemischen vorliegen. Bei ihrer Isolierung bleibt die biologische Aktivität der Substanz erhalten [24]. Diese Eigenschaft hat den Einsatz der IAC-Methode auch für präparative Fragestellungen vorangetrieben [25,26]. In der Biotechnologie werden viele Produkte aus Zellkulturüberständen mittels immunoaffinitätschromatographischer Verfahren aufkonzentriert und gereinigt [27].

In der vorliegenden Arbeit wird die Methode der IAC als ein Probenaufarbeitungsschritt zur Extraktion anaboler Steroide aus Urin eingesetzt. Danach folgte die Analyse der Steroide, bei der die Gaschromatographie in Verbindung mit der HRMS verwendet wurde (Abb. 2.1).

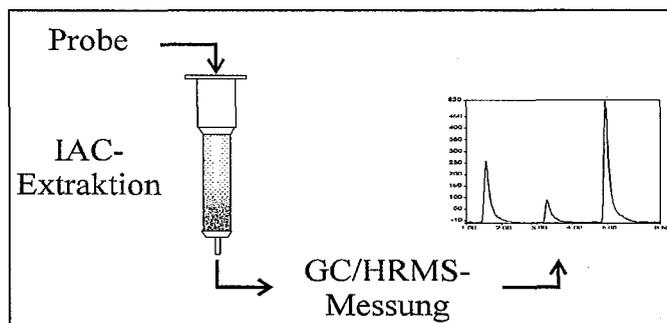
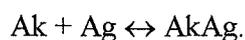


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Probenbehandlung bei der IAC-GC/HRMS-Methode

Grundlage der Immunoaffinitätschromatographie ist die reversible Reaktion:



Nach Phillips [28] bilden die folgenden Wechselwirkungen die Basis für die Entstehung des Antikörper-Antigen-Komplexes (AkAg):

1. Ionische Wechselwirkung
2. Wasserstoff-Brücken-Bindung
3. Hydrophobe Wechselwirkung
4. Van der Waals-Kräfte

Die Annäherung von Antikörper (Ak) und komplementärem Antigen (Ag) ist mit der Enzym-Substrat-Paarung vergleichbar. Antikörper besitzen jedoch an ihren Antigenbindenden Fragmenten (F_{ab}) eine weitaus größere Strukturvariabilität und dadurch eine höhere „Substratspezifität“.

Arevalo et al. [29] gelang mittels kristallographischer Strukturaufklärung die molekulare Annäherung einer Progesteron-Antikörper-Komplexbildung dreidimensional darzustellen.

Nur das Molekül, das sich exakt in die dreidimensionale Struktur der Bindungstasche einfügt, wird auch erkannt und gebunden [15]. Leichte Strukturänderungen bewirken große Unterschiede in der Bindungsstärke oder sogar die Dissoziation zwischen Antigen und Antikörper. Diese Eigenschaft wird in der Immunoaffinitätschromatographie ausgenutzt:

Das Probenmaterial wird mit den Festphasen-Antikörpern in Kontakt gebracht unter Bedingungen, die die Annäherung des Antigens in die Bindungsstelle unterstützen. Durch Änderung der äußeren Bedingungen (Variation des pH-Wertes, Änderung der Polarität durch Salz- oder apolare Lösungsmittelgradienten, Einsatz von denaturierenden Eluenten, wie Detergentien oder Verwendung von chaotropen Salzen, Erhöhung der Temperatur) kommt es zur Konformationsänderung in der 3-D-Struktur der Antikörper und dadurch zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen Antigen und Antikörper [30,31]. Dabei können sich die intermolekularen Wechselwirkungen so weit verringern, daß die gebundene Substanz aus der Bindungsstelle freigesetzt wird.

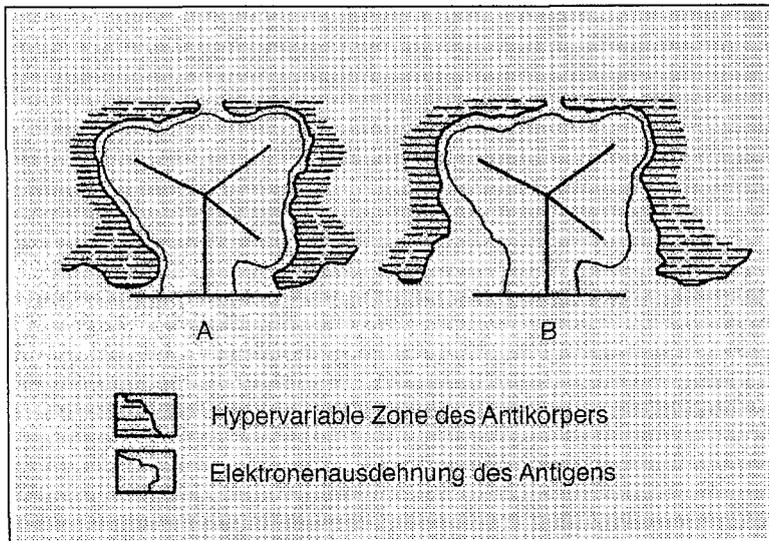


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Annäherung von Antigen und Antikörper.

A: Gute Übereinstimmung in der dreidimensionalen Konformation

→ starke Bindung.

B: Schlechte Übereinstimmung in der dreidimensionalen Konformation

→ schwache Bindung.

Die Dissoziation von Steroid-Antikörper-Komplexen wird erreicht durch eine Erhöhung des organischen Lösungsmittelanteils im Elutionssolvens [32]. Eine Auswahl einiger Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen und deren Wirkung auf das Bindungsverhalten von Testosteron gegenüber Antikörpern wurde von G. Giraudi und C. Baggiani untersucht [31]. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß alle getesteten Wasser/Lösungsmittelgemische - Methanol (MeOH), Ethanol (EtOH), 1-Propanol, 2-Propanol, t-Butanol, Ethylenglykol, 2-Methoxyethanol, 2-Butoxyethanol, Dioxan - mit steigendem Lösungsmittelanteil eine progressive Inhibition der Steroid-Antikörper-Wechselwirkung verursachen.

Die Kurven in Abb. 2.3 geben den Einfluß der Konzentration einiger Lösungsmittel auf das Dissoziationsverhalten von Antikörper und Antigen wieder. Einige Lösungsmittel (MeOH, t-Butanol) bewirken bei geringer Konzentration noch keine Dissoziation von Antikörper und komplementärem Antigen.

Dieser in der Kurve als Anfangsplateau zu erkennende Konzentrationsbereich kann für Spülschritte ausgenutzt werden, um schwach gebundene unspezifische Substanzen, z.B. endogene Steroide, zu denen der Antikörper eine gewisse Bindungsaffinität aufweist, von der Säule zu spülen, während das spezifische Antigen erst bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen von der Säule eluiert.

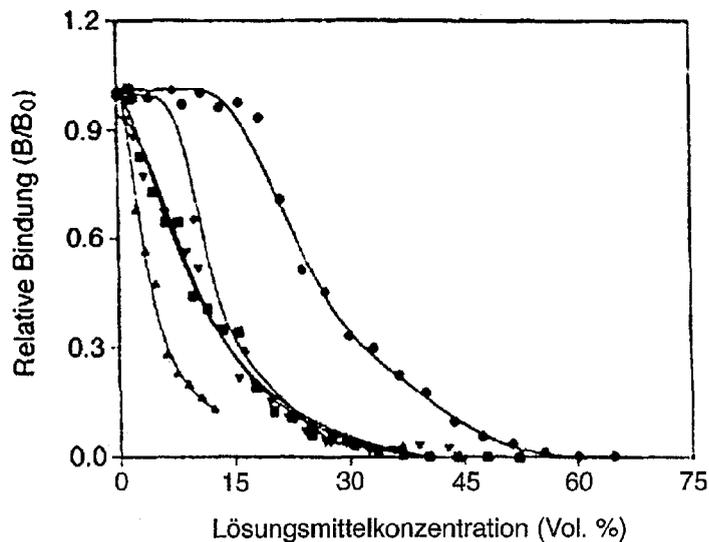


Abb. 2.3 Verhalten der Antikörper-Testosteron-Wechselwirkung bei Inkubation mit einigen Lösungsmitteln unterschiedlicher Konzentration. MeOH (●), t-Butanol (◆), EtOH (■), 2-Propanol (▼), 1-Propanol (▲). Entnommen aus [31].

Abweichend von diesem Verhalten zeigten Tetrahydrofuran (THF) und Acetonitril bei niedriger Konzentration einen Anstieg der relativen Bindung gefolgt von dem progressiven Verlauf der Inhibierung. Eine bestimmte Konzentration an organischem Lösungsmittel kann die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper positiv beeinflussen [31]. Durch Anlagerung der unpolaren Lösungsmittel an die hydrophoben Regionen des Steroids wird ein Teil der Wassermoleküle aus der Hydrathülle des Steroids verdrängt.