

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

1 **Verfahren zur Bestimmung von Androstenon-Gehalten in
Fettgeweben**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von
Androstenon-Gehalten in Fettgeweben sowie eine Vorrich-
tung zur Durchführung dieses Verfahrens.

10 5 α -Androst-16-en-3-on, das für den Geschlechtsgeruch des
Ebers verantwortlich ist und einen intensiv urinartigen
Geruch aufweist, wird im Fettgewebe der Tiere angerei-
chert. Diese Anreicherung im Fett ist unabhängig von der
anatomischen Lage des Fettgewebes und betrifft gleicher-
maßen z.B. subkutanes Fett (Speck), intermuskuläres Fett,
15 intramuskuläres Fett und Organfett. Damit entsteht das
erhebliche Problem, daß Fleisch von Ebern, insbesondere
beim Erwärmen im Rahmen der Zubereitung, einen sensorisch
äußerst störenden Uringeruch verursachen kann. Anderer-
seits zeigen Eber aufgrund der anabolen Wirkung der neben
20 Androstenon ebenfalls im Hoden gebildeten Hormone erheb-
liche Wachstumsvorteile. Die Zulassung der Ebermast
innerhalb der EG verlangt nach einer Untersuchungsmög-
lichkeit, um routinemäßig solche Eber zu entdecken und
aussondern zu können, bei denen, aufgrund fortgeschrit-
teter Pubertätsentwicklung, die Geschlechtsgerucheinlage-
25 rung im Fett bereits ein sehr hohes Niveau erreicht hat.
Als noch tolerierbarer Grenzwert für den Androstenon-
Gehalt werden derzeit 0,5 μ g/g Fettgewebe diskutiert.

30 Zwar sind bisher schon zuverlässige Meßverfahren, insbe-
sondere auf enzymimmunologischer Basis, zur Bestimmung
von Androstenon im Fettgewebe bekannt, jedoch lassen die
bekannten Verfahren allenfalls stichprobenartige Labor-
Untersuchungen, keinesfalls jedoch eine kontinuierliche
Kontrolle parallel zum Schlachtband aufgrund des sehr
35 hohen Zeitbedarfs der Analysen zu.

1

Aufgabe der Erfindung ist es, die bekannten Meßverfahren so weit zu verbessern, daß diese in einer wesentlich kürzeren Zeit durchzuführen sind und möglichst auch in einem technisch einfachen, automatisierbaren Verfahren angewendet werden können.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs beschriebenen Art erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Bestimmungsverfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Verflüssigung einer Fettgewebeprobe durch Erwärmen auf eine vorgegebene Temperatur im Bereich von 45 bis 60°C;
- 15 b) Mischen einer definierten Menge des flüssigen Fetts mit einem wasserlöslichen Lösemittel für das Androstenon bei der Temperatur des flüssigen Fetts;
- 20 c) Abkühlen der Fett/Lösemittelmischung auf eine vorgegebene Temperatur, bei der wesentliche Anteile des im Lösemittel gelösten Fetts einerseits aus der Lösung ausgeschieden werden und andererseits jedoch der überwiegende Teil des in der Lösemittelphase gelösten Androstenon im Lösemittel gelöst verbleibt;
- 25 d) Entnahme einer definierten Menge der androstenonhaltigen Lösemittelphase und Verdünnung in einem vorgegebenen Verhältnis mit einer für das verwendete Nachweisverfahren verträglichen wäßrigen Pufferlösung;
- 30 e) Ermittlung des Androstenon-Gehalts der Lösemittel-/Pufferlösungsphase mittels an sich bekannter kompetitiver immunologischer Nachweisreaktionen.

35 Ein besonders geeignetes Nachweisverfahren stellt das

1 Meßverfahren, das aus der Publikation von R. Claus, G.
Mahler und E. Münster in "ARCHIV FÜR LEBENSMITTEL-
HYGIENE", Jahrgang 39, Heft 4/1988, Seiten 87-90, bekannt
wurde, dar. Auf diese Beschreibung des kompetitiven immu-
5 nologischen Meßverfahrens wird hiermit vollinhaltlich
Bezug genommen.

Das genannte immunologische Meßverfahren beruht darauf,
daß in einem Testsystem eine definierte Menge spezifi-
10 scher, gegen die zu messende Substanz (hier das Andro-
stenon) erzeugter Antikörper vorgelegt wird. Zur besseren
Handhabung der Antikörper werden diese auf einer Aufnah-
meplatte, insbesondere einer Mikrotiterplatte, immobili-
siert. Die so vorbereitete Aufnahmeplatte wird mit einem
15 enzymmarkierten Androstenon und der das freie, zu be-
stimmende Androstenon enthaltenden, lösemittelhaltigen
Pufferlösung inkubiert. Nach Ablauf der vorgegebenen
Inkubationszeit wird dekantiert und die Aufnahmeplatte
von nicht an die Antikörper gebundenem Androstenon be-
20 freit.

Der Anteil an enzymmarkiertem Androstenon, der an den
immobilisierten Antikörpern gebunden an der Aufnahmeplat-
te vorliegt, hängt direkt von dem Anteil an freiem Andro-
25 stenenon ab, der in der lösemittelhaltigen Pufferlösung
vorhanden war. Die nach dem eben beschriebenen Verfah-
rensschritt meßbare Enzymaktivität resultiert von den an
den Antikörpern gebundenen enzymmarkierten Androstenon-
Anteilen und ist damit ein Maß, in welchem Umfang das
30 enzymmarkierte Androstenon durch freies, durch die löse-
mittelhaltige Pufferlösung eingeführtes Androstenon ver-
drängt worden ist.

Anhand von bekannten enzymatischen Reaktionen, beispiels-
35 weise anhand von enzymatischen Oxidations- oder Reduk-

1 tionsreaktionen mit Farbstoffen, läßt sich dann eine
leicht meßbare Größe für das Vorhandensein von enzym-
markiertem Androstenon auf der Aufnahmeplatte erhalten.

5 Im Detail ist diese Methode noch anhand eines Beispiels
weiter unten erläutert.

Selbstverständlich kommen auch alternative kompetitive
immunologische Nachweisreaktionen für das erfindungs-
10 gemäße Verfahren in Frage.

Für die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens in
automatisierten Meßanlagen, die parallel zum Schlachtband
betrieben werden können, ist maßgebend, daß ein Minimum
15 an Probenaufbereitungsschritten verwendet wird und daß
insbesondere langwierige Trocknungs-, Einengungs- oder
sonstige Destillationsschritte vermieden sind.

Das Vermeiden solcher Schritte fördert auch die Verläß-
20 lichkeit des Verfahrens, da die Androstenone neben ihrer
extrem guten Fettlöslichkeit auch eine relativ hohe
Flüchtigkeit besitzen, weshalb zum einen möglichst bei
niedrigen Temperaturen gearbeitet wird und zum anderen
eine Methode, die Trocknungs- und Destillationsschritte
25 vermeidet, die Verläßlichkeit der Analyseergebnisse
steigert.

Vorzugsweise wird das Lösemittel so ausgewählt, daß es
neben guten Löseeigenschaften für das nachzuweisende
30 Androstenon im Temperaturbereich von ca. 20 bis 60°C
einen Temperaturkoeffizienten für die Fettlöslichkeit
aufweist, welcher größer ist als der Temperaturkoeffi-
zient für die Androstenon-Löslichkeit in diesem Tempera-
turbereich. Dies erlaubt durch einen Abkühlungsschritt
35 nach der Mischung der flüssigen Fettprobe mit dem Löse-

1 mittel in dem Lösemittel gelöste Fettanteile effektiv
abzuscheiden, so daß später bei dem Schritt der Mischung
der Lösemittelphase mit der wäßrigen Pufferlösung im
wesentlichen keine Abscheidung von Fetttröpfchen oder
5 allgemein einer Fettphase mehr beobachtet wird. Gleich-
zeitig bleibt aber bei der Abkühlung der Mischung das im
Lösemittel vorhandene gelöste Androstenon in der Lösung
erhalten und steht somit für die spätere Nachweisreaktion
zur Verfügung.

10

Damit möglichst wenig Störungen mit der späteren im
Nachweisreaktionssystem verwendeten Enzymreaktion auf-
treten, sollte das Lösungsmittel vorzugsweise allenfalls
einen geringen Einfluß auf die Enzymaktivität haben.

15

Ferner ist erwünscht, daß das Lösemittel kaum Einfluß auf
die Antigen/Antikörperreaktionen des Nachweisreaktions-
systems aufweist, um die Selektivität und Empfindlichkeit
des Nachweissystems nicht zu vermindern.

20

Als besonders geeignete Lösemittel haben sich methanol-
haltige Lösemittel erwiesen, und es hat sich überraschen-
derweise herausgestellt, daß insbesondere reines Methanol
vorzüglich für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet
25 ist. Überraschenderweise nimmt das in den Folgeschritten
weiterverschleppte Methanol kaum Einfluß auf die Enzym-
aktivität im Nachweisreaktionssystem und läßt auch das
Antigen/Antikörperreaktionssystem im wesentlichen unbe-
einflußt.

30

Dies trifft insbesondere dann zu, wenn das Mischungs-
verhältnis der flüssigen Fettprobe zum Lösemittel im Be-
reich von 1:10 bis 0,1:10 (Volumenverhältnisse) gewählt
wird. Der angegebene Bereich des Mischungsverhältnisses
35 von flüssiger Fettprobe zu Lösemittel stellt sicher, daß

1 zum einen ausreichend Fettphase zur Extraktion des Andro-
stenons zur Verfügung steht, so daß im Folgeschritt mit
ausreichend geringen Lösungsmittelphasenanteilen gearbei-
tet werden kann. Selbstverständlich hängen die Grenzen,
5 innerhalb derer die Erfindung praktikabel ist, nicht
unwesentlich von der Wahl des Lösungsmittels ab und
selbstverständlich darüberhinaus auch von der Wahl des
Nachweisreaktionssystems.

10 Als besonders gut geeigneter Arbeitsbereich hat sich ein
Mischungsverhältnis von flüssiger Fettprobe zu Lösungs-
mittel im Bereich von 0,2:10 bis 0,5:10 erwiesen.

Ein weiterer wichtiger Schritt im Hinblick auf die mög-
liche Störung bzw. Beeinflussung von enzymatischen Reak-
tionen bzw. von immunologischen Reaktionen ist das Ver-
hältnis der Verdünnung der Lösungsmittelphase mit der
15 Pufferlösung. Dies wird bevorzugt im Volumenverhältnis von
20:80 bis 5:95 vorgenommen, da so zum einen sicherge-
stellt ist, daß nicht zuviel Lösungsmittel in das Reak-
tionsmedium eingeschleppt wird, in dem dann die Antigen-
/Antikörperreaktion stattfindet, und zum anderen ist
sichergestellt, daß ausreichend Androstenon für die
Konkurrenzsituation mit dem enzymmarkierten Androstenon
20 zur Verfügung steht, so daß letztendlich die geforderte
Nachweisgrenze eingehalten werden kann.

Insbesondere im Hinblick auf den Verdünnungsschritt wird
bereits beim Abkühlungsschritt die Endtemperatur der
30 Probe nach der Abkühlung so gewählt, daß das zunächst
während dem Vermischen mit der flüssigen Fettprobe in dem
Lösemittel gelöste Fett in einem solchen Umfang aus dem
Lösemittel abgeschieden wird, daß im nachfolgenden Ver-
dünnungsschritt (Schritt d)) eine im wesentlichen fett-
phasenfreie Lösung erhalten wird. Falls bei dieser Mi-
35

1 schung von Lösemittel und wäßriger Pufferlösung eine Aus-
scheidung einer Fettphase in größerem Ausmaß vorkommen
sollte, ist zu gewärtigen, daß dieser Vorgang die späte-
ren Nachweisreaktionen, insbesondere auch die photo-
5 metrische Bestimmung der Enzymaktivität, hindert.

Das bereits zuvor in Einzelheiten beschriebene Nachweis-
verfahren für Androstenone, das in der Veröffentlichung
in "ARCHIV FÜR LEBENSMITTELHYGIENE" 1988, Seiten 87-90,
10 veröffentlicht ist, wurde insbesondere in einem Punkt
modifiziert, nämlich in der Temperatur, bei der die immo-
bilisierten Antikörper mit dem enzymmarkierten und freien
Androstenon inkubiert werden.

15 Das im Schritt e) des erfindungsgemäßen Verfahrens bevor-
zugte Nachweisverfahren läßt sich durch folgende Schritte
charakterisieren:

(1) daß eine Aufnahmeplatte mit einem Antikörperserum be-
20 schichtet wird und die Antikörper an der Aufnahmeplatte
immobilisiert werden, wobei die Antikörper spezifisch mit
Androstenonen, insbesondere 5 α -Androst-16-en-3-on, rea-
gieren;

25 (2) daß die immobilisierten Antikörper mit einer defi-
nierten Menge eines enzymmarkierten Androstenons und mit
einem vorgegebenen Volumen der in Schritt d) erhaltenen
lösemittelhaltigen Pufferlösung bei einer Temperatur von
ca. 42 bis 48°C, vorzugsweise bei ca. 45°C, für eine vor-
30 gegebene Zeitspanne gleichzeitig inkubiert werden;

(3) daß das nichtgebundene enzymmarkierte und freie
Androstenon entfernt und die beschichtete Aufnahmeplatte
gewaschen wird;

35 (4) daß eine ein Substrat enthaltende Pufferlösung auf

1 die Aufnahmeplatte gegeben wird, wobei das Substrat mit dem Markerenzym eine Enzymreaktion eingeht;

5 (5) daß die Enzymreaktion für eine vorbestimmte Zeitspanne bei einer vorgegebenen Temperatur durchgeführt wird und danach mit einem geeigneten Reaktionsmittel abgestoppt wird; und

10 (6) daß der Reaktionsumsatz der enzymatischen Reaktion, vorzugsweise photospektrometrisch, bestimmt wird.

Hier hat sich herausgestellt, daß entgegen der früheren Praxis, bei der diese Inkubation bei 37°C vorgenommen wurde, trotz der hohen Flüchtigkeit des Androstenons eine
15 bedeutend höhere Temperatur Anwendung finden kann, nämlich in einem Temperaturbereich von ca. 42 bis 48°C. Vorzugsweise wird eine Temperatur von ca. 45°C eingehalten, bei der unter den vordefinierten Voraussetzungen bei ausreichender Nachweissicherheit eine minimale Zeitspanne
20 für das Inkubieren benötigt wird.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß aufgrund der fehlenden Trennschritte und aufgrund der sorgfältigen Auswahl des verwendeten Lösemittels, mit der Möglichkeit dieses bis in die Antigen-
25 /Antikörperreaktionssysteme zu verschleppen, die Weiterverarbeitungen der einzelnen Lösungen und Flüssigkeitsgemische allein durch Pipettieren möglich wird. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, den Transport, das Vermischen und Trennen von Phasen etc. auf Pipettierschritte
30 zu beschränken, die leicht automatisierbar sind. Darüber hinaus fallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nur geringste Mengen an zu entsorgenden flüssigen Abfallstoffen und Abwässern an. Diese sind außerdem ohne besondere Vorkehrungen zu verwerten und beispielsweise dem
35

1 Abwasserkanal zuzuführen.

Eine geeignete Vorrichtung zur automatisierten Durch-
führung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist durch eine
5 an sich bekannte programmierbare und temperierbare Pipet-
tiervorrichtung gegeben, welche zusätzlich mit einer
heizbaren Probeneingangsstation ausgerüstet ist, welche
die eingangsseitige Fettgewebeprobe aufnimmt und bei der
gewünschten Temperatur verflüssigt.

10 Die Pipettiervorrichtung ist mit mehreren Probeaufnahme-
vorrichtungen, insbesondere Mikrotiterplatten, ausge-
rüstet und führt die Verfahrensschritte b), c) und d)
sowie gegebenenfalls die zusätzlichen Schritte 2, 3, 4
15 und 5 des Probenaufbereitungsverfahrens sowie des Nach-
weisverfahrens unter Einhaltung definierter Temperatur-
bedingungen und Zeitdauern für die einzelnen Verfahrenss-
chritte durch.

20 Ausgangsseitig wird die Pipettiervorrichtung mit einer
Meßvorrichtung zur direkten oder indirekten Bestimmung
einer den Androstenon-Gehalt der Fettgewebeprobe reflek-
tierenden Meßgröße ausgerüstet.

25 Eine Kalibrierung der Meßergebnisse erfolgt vorzugsweise
unter Durchführung der für die zu untersuchende Probe
vorgesehenen Verfahrensschritte bei identischen Bedingun-
gen, jedoch unter Verwendung von Schweineschmalz mit
definiert zugegebenen Androstenon-Anteilen. Damit lassen
30 sich alle vorrichtungseigenen und verfahrenstypischen
Parameter und Fehler ausgleichen, da der Probengehalt
nachfolgend aufgrund der mit der Eichsubstanz erhaltenen
Meßkurve ermittelt wird.

35 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer

1 Aufnahmeplatte, auf welcher eine definierte Menge gegen
Androstenon spezifische Antikörper immobilisiert ist, zur
Aufnahme der in Schritt d) des erfindungsgemäßen Verfah-
rens erhaltenen androstenonhaltigen Probe zusammen mit
5 einem enzymmarkierten Androstenon und zur anschließenden
Durchführung der kompetitiven Nachweisreaktion gemäß
Schritt e) des erfindungsgemäßen Verfahrens. Bevorzugt
ist dabei die Verwendung einer Aufnahmeplatte, die als
Mikrotiterplatte ausgebildet ist.

10 Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete kompeti-
titive immunologische Nachweisreaktion hat den Vorteil
einer extrem hohen Spezifität für die zu messende Sub-
stanz. Allerdings sind für den ungestörten Ablauf dieser
15 Nachweisreaktionen physiologische Reaktionsbedingungen
sicherzustellen, weshalb den vorgeschalteten Aufarbei-
tungs- und Reinigungsschritten erhebliche Bedeutung
zukommt. Diese Verfahrensschritte müssen einerseits die
zu messende Substanz aus der biologischen Matrix (hier
20 Fettgewebe) isolieren und dabei sicherstellen, daß durch
die leichte Flüchtigkeit von Androstenon keine Verluste
an zu messender Substanz eintreten. Andererseits muß
gewährleistet sein, daß keine Kontaminationen in das
Nachweisreaktionssystem verschleppt werden (z.B. Reagen-
25 zien-Reste, Lipide aus der Probe, etc.), die geeignet
sind, unphysiologische Situationen zu schaffen oder aber
in sonstiger Weise das Meßsystem, insbesondere auch die
bevorzugt verwendete photometrische Bestimmung des Reak-
tionsergebnisses, zu stören. Das erfindungsgemäße Ver-
30 fahren schafft nun ein völlig neues Verfahren zur Proben-
extraktion und -reinigung mit dem Vorteil, daß Andro-
stenon trotz seiner lipophilen Eigenschaften aus der
Fettgewebeprobe in das wäßrige Meßsystem transferiert und
gleichzeitig Kontaminationen mit störenden Lipiden sowie
35 Androstenon-Verluste aufgrund dessen Flüchtigkeit

1 vermieden werden.

Als am besten geeignet hat sich im wesentlichen reines
5 Methanol als Lösemittel für die Extraktion aus der Fett-
gewebeprobe erwiesen. Nach Abkühlen des zunächst auf die
Temperatur der flüssigen Fettgewebeprobe aufgeheizten
Methanols erniedrigt sich die Löslichkeit der kontaminie-
10 renden Lipide, die als Fetttröpfchen den Boden des Rea-
genzgefäßes, insbesondere des Reagenzglas, sedimentie-
ren bzw. an der Glasoberfläche adsorbieren. Ein aliquoter
Teil der fettpartikelfreien abgekühlten Methanolphase
wird mit einem darauf abgestimmten Volumen eines wäßrigen
15 Testpuffersystems verdünnt. Dieses Gemisch kann erfin-
dungsgemäß direkt in das enzymimmunologische Mikrotiter-
system überführt werden.

Zur Erzielung besonders verlässlicher Werte ist insbeson-
dere auch eine exakte Abstimmung zwischen den Volumina an
20 flüssigem Fett, warmem Methanol sowie die Relation des
aliquoten Teils des abgekühlten Methanols zur Testpuffer-
lösung von besonderer Bedeutung. Nur durch die sorgfälti-
ge Abstimmung aller Volumina ist gewährleistet, daß die
noch in gewissen Mengen in das Nachweisreaktionssystem
25 gelangenden Lipid- und Methanolanteile unter den gewähl-
ten Bedingungen den Ablauf der immunologischen als auch
der enzymatischen Folgereaktion nicht stören.

Dies ist besonders wichtig bei einem anzustrebenden
30 Grenzwert von 0,5 µg/g bis 0,7 µg/g Fettgewebe. Aufgrund
des neuen, erfindungsgemäßen Verfahrens und hier insbe-
sondere durch die neue Art der Aufbereitung der Fettgewe-
beprobe ist im Gegensatz zu allen anderen bekannten Auf-
arbeitungs- und Isolierungsverfahren von nachzuweisenden
Substanzen (einschließlich Androstenon) aus Geweben gesi-
35 chert, daß sämtliche Schritte mit Hilfe von Pipettier-

1 vorgängen durchführbar sind. Dadurch werden einerseits
insbesondere die zeitaufwendige Evaporation von Lösemit-
teln oder Zentrifugationsschritte vermieden und anderer-
seits der Einsatz von prozeßgesteuerten Pipettierauto-
5 maten bzw. kommerziell verfügbaren Mikrotiterbausteinen
ermöglicht.

Die Überprüfung des erfindungsgemäßen Meßverfahrens an
einem Tag (Prüfung auf Intraassay-Varianz) bzw. an mehre-
10 ren Tagen (Interassay-Varianz) ergab die in Tabelle 1 an-
gegebenen Werte. Es sei in diesem Zusammenhang insbeson-
dere auf die Varianzen im Bereich der Nachweisgrenze von
0,5 µg/g Fettgewebe hingewiesen, die bei 15 % (Inter-
assay-Varianz) bzw. bei 10 % (Intraassay-Varianz) liegen.

15 Die Meßergebnisse gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren
wurden mit Messungen gemäß dem bekannten Standard-Test-
verfahren (Referenzmethode gemäß "ARCHIV FÜR LEBENSMIT-
TELHYGIENE" 1988, Seite 87-90) verglichen, und es ergab
20 sich eine sehr hohe Übereinstimmung der Meßwerte gemäß
dem erfindungsgemäßen Schnelltest oder Schnellverfahren
mit denen des Referenzverfahrens ($r = 0,96$; $p < 0,0001$).
Die Mittelwerte aller 124 gemessenen Proben betragen 0,72
µg/g Fettgewebe für das Referenzverfahren bzw. 0,71 µg/g
25 gemäß dem Schnelltest.

30

35

1

TABELLE 1

Präzision und Intra- bzw. Interassay-Variations-
koeffizienten (VK) der Androstenonmessung im Fett

5

Fettproben mit Zusätzen von Androstenon (µg/g)	Intraassay (n = 14)		Interassay (n = 10)	
	Mittelwert	VK	Mittelwert	VK
0,1	0,09	12 %	0,09	20 %
0,2	0,23	9 %	0,23	14 %
0,5	0,54	10 %	0,44	15 %
0,75	0,88	8 %	0,72	9 %
1,0	1,14	11 %	1,08	8 %
1,5	1,64	14 %	1,67	16 %

15

Biologische Proben	Intraassay (n = 16)		Interassay (n = 12)	
	Mittelwert	VK	Mittelwert	VK
Nr. 1	0,22	8 %	0,23	19 %
Nr. 2	0,42	9 %	0,48	15 %
Nr. 3	0,88	9 %	0,88	12 %

20

Mittlerer Intraassay-VK: 10 %

Mittlerer Interassay-VK: 14 %

25

TABELLE 2

Praktikabilität

Verfahren	Probendurchsatz je Stunde
konventionell (nicht automatisierbar!) (Claus et al. 1988)	25
erfindungsgemäßes Verfahren (manuell)	75
erfindungsgemäßes Verfahren (automatisiert)	540

35

1

Tabelle 2 zeigt den Zeitvorteil, der durch die erfindungsgemäße Methode gegenüber der bekannten Referenzmethode erzielt wird. Während mit der Referenzmethode maximal 25 Proben/h bearbeitet werden können, erlaubt das erfindungsgemäße neue Bestimmungsverfahren selbst bei manueller Ausführung die Bearbeitung von ca. 75 Proben/h. Bei Verwendung eines vollautomatisierten Meßverfahrens läßt sich der Probendurchsatz dramatisch steigern, beispielsweise mit bekannten Pipettierautomaten auf mehr als 500 Proben/h.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren im einzelnen erläutert, einschließlich einer ins einzelne gehenden Erläuterung eines bevorzugten Nachweismeßsystems.

Schema 1: Probenextraktion und Reinigung zur automatisierbaren Messung von 5 α -Androst-16-en-3-on ("Geschlechtsgeruch") im Fettgewebe von Schweinen (Schritte 1 - 4 beinhalten die Probenverarbeitung, Schritte 5 - 10 die immunologische Messung).

Schritt 1: ca. 2 g Fettgewebe in der Mikrowelle erwärmen: 4 min bei 180 W

Schritt 2: 25 μ l verflüssigtes Fett so abpipettieren, daß keine Abkühlung entsteht und homogenisieren in 1 ml Methanol

Schritt 3: Abkühlen auf Raumtemperatur, nach einigen Minuten abpipettieren von 100 μ l und verdünnen mit 900 μ l Puffer (0,04 M Natriumphosphat; 0,15 M NaCl; 0,02 % Thimerosal; 0,1 % BSA; pH 7,3)

35

1 Schritt 4: 100 µl dieses methanolischen Puffers in einen
Reaktionsnapf der Mikrotiterplatte pipettieren (beschich-
tet mit 150 µl Antiserum 1 : 4.000 gegen Androstenon-3-
5 CMO-BSA)

Schritt 5: Zugabe von Androstenon-3-CMO-HRP (12 ng/25 µl
Puffer)

10 Schritt 6: Inkubation: 30 min bei 45°C

Schritt 7: Abkippen, waschen der Platte mit Detergens
(6x)

15 Schritt 8: Addition von 150 µl Substratpuffer

Schritt 9: Enzymreaktion: 15 min bei 15 - 20°C

20 Schritt 10: Abstoppen der Reaktion mit H₂SO₄, messen der
Extinktion bei 450 nm

Zu Schritt 4: Herstellung des Antiserums

1. Antigensynthese

25 5α-Androstenon ist als Steroid zu klein, um die Bildung
von Antikörpern im Organismus zu induzieren. Daher muß
eine chemische Kopplung an ein großes Trägerprotein
(Rinderserumalbumin = BSA) erfolgen, damit 5α-Androstenon
als Antigen erkannt wird. Für die Antigensynthese werden
100 mg Androstenon in Ethanol gelöst und nach Zugabe von
30 150 mg O-Carboxymethyl-hydroxylamin bei pH 12 vier Stun-
den unter Rückfluß gekocht. Die Isolierung des entstan-
denen 3-Oximderivats (Androstenon-3-CMO) erfolgt nach dem
Ansäuern auf pH 1 durch seine Präzipitation (der Über-
stand wird verworfen).
35

1 Für die Kopplung des Oximderivats an BSA werden 49,5 mg
Androstenon-3-CMO zusammen mit 58 mg Carbodiimid in 1,5
ml Dioxan gelöst. Nach 35 min bei Raumtemperatur werden
5 44,2 mg Rinderserumalbumin in Puffer (0,04 M Na-Phosphat,
0,15 M NaCl, 0,02 % (w/v) Thimerosal, pH 7,2) tropfen-
weise dazugegeben. Nach 24 h bei Raumtemperatur wird das
Produkt dialysiert, anschließend lyophilisiert (Ausbeute:
ca. 79 mg Androstenon-3-CMO-BSA).

10 2. Immunisierung und Gewinnung des Antiserums

Dazu werden weibliche Kaninchen mit Androstenon-3-CMO-BSA
immunisiert. Dabei werden jeweils 2 mg des Antigens in
1 ml Wasser aufgenommen und mit 1 ml komplettem Freund's
15 Adjuvant vermischt (Emulsion), und in 0,5 ml Portionen
verteilt auf vier Injektionsstellen (2 x subkutan, 2 x
intramuskulär) verabreicht. Die Injektionen werden alle 3
Wochen wiederholt, bis sich eine ausreichende Menge Anti-
körper gebildet hat. Die Bestimmung der Antikörpermenge
erfolgt unter Standardbedingungen. Dabei wird eine
20 Verdünnungsreihe des Serums in Puffer erstellt und die
Verdünnung ermittelt, die noch 50 % einer standardisier-
ten Menge radioaktiv markiertes 5 α -Androstenon bindet.

25 3. Isolierung der Immunglobulin G(IgG)-Fraktion aus dem Antiserum

Antikörper gegen 5 α -Androstenon-3-CMO-BSA sind Bestand-
teil der IgG-Fraktion des Blutes und müssen für den
beschriebenen enzymimmunologischen Test selektiv isoliert
werden.

30 Dazu wird die IgG-Fraktion durch Zusatz von 180 mg Ammo-
niumsulfat zu 1 ml Antiserum präzipitiert. Nach 4 h bei
Raumtemperatur wird das Präzipitat abzentrifugiert und
nach dem Verwerfen des Überstandes in 5 ml Phosphatpuffer
35 (siehe 1.) gelöst und gegen Wasser dialysiert. Mit dieser

- 1 IgG-Fraktion (Volumen 10 ml) werden nach entsprechender
Verdünnung die Vertiefungen der Mikrotiterplatten
beschichtet.
- 5 **Zu Schritt 5: Synthese des Androstenon-Enzymkonjugates**
Beim verwendeten Enzymimmunoassay wird 5 α -Androstenon-CMO
an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Vom Steroid-
derivat werden 1 mg in 1 ml Dimethylformanid gelöst und
nach Zugabe von 6,25 μ l Methylmorpholin 4 min bei 0°C
10 gerührt. Nach Temperaturerniedrigung auf -15°C werden
6,25 μ l Isobutylchloroformat addiert, nach weiteren 3 min
20 mg HRP in 2 ml Wasser gelöst. Die Reaktion erfolgt bei
pH 8,0 eine Stunde bei -15°C, anschließend nochmals 2 h
bei 0°C. Nach Zugabe von 10 mg NaHCO₃ erfolgt eine Dialy-
15 se gegen Wasser (24 h), anschließend wird das Produkt
lyophilisiert und über Sephadex G-25 gereinigt. Das
Enzymkonjugat (MW ca. 44.000) eluiert mit dem Ausschluß-
volumen der Säule (Proteine > 25.000 werden ausgeschlos-
sen) und wird somit von niedermolekularen Substanzen
20 abgetrennt (Puffersystem siehe 1.).

Anschließend erfolgt die Bestimmung der Konjugatkonzen-
tration pro ml durch Proteinbestimmung mit HRP als Eich-
kurve. Durch Verdünnung mit Puffer erfolgt die Einstel-
25 lung der Konjugatkonzentration für den Test (z.B. 12
ng/25 μ l, siehe Schema 1, Schritt 5).

Zu Schritt 7: Detergens

0,02 % (v/v) Tween 80 in Wasser (bidest.)

30

Zu den Schritten 8 - 10: Nachweis des gebundenen Enzyms

Nach dem Abkippen und Waschen der Platte mit Detergens
(0,05 % (v/v) Tween 80, in Wasser) erfolgt die Zugabe von
Substratpuffer, bestehend aus 0,1 M Natriumacetat,
35 0,004 % (v/v) H₂O₂, 0,01 % (w/v) 3,3',5,5'-Tetramethyl-

1 benzidin, pH 5.

Nach 15minütiger Inkubation bei 15 - 20°C wird die Reaktion durch Addition von 25 µl 4 N Schwefelsäure abge-
5 stoppt (Schritt 10), woran sich die optische Messung des abhängig von der Enzymmenge gebildeten Farbstoffes anschließt.

10

15

20

25

30

35

1

P A T E N T A N S P R Ü C H E

- 5 1. Verfahren zur Bestimmung von Androstenon-Gehalten in Fettgeweben, welches folgende Schritte umfaßt:
- a) Verflüssigung einer Fettgewebeprobe durch Erwärmen auf eine vorgegebene Temperatur im Bereich von 45 bis 60°C;
 - b) Mischen einer definierten Menge des flüssigen Fetts mit einem wasserlöslichen Lösemittel für das Androstenon
 - 10 bei der Temperatur des flüssigen Fetts;
 - c) Abkühlen der Fett/Lösemittelmischung auf eine vorgegebene Temperatur, bei der wesentliche Anteile des im Lösemittel gelösten Fetts einerseits aus der Lösung ausgeschieden werden und andererseits jedoch der überwie-
 - 15 gende Teil des in der Lösemittelphase gelösten Androstenon im Lösemittel gelöst verbleibt;
 - d) Entnahme einer definierten Menge der androstenonhaltigen Lösemittelphase und Verdünnung in einem vorgegebenen Verhältnis mit einer für das verwendete Nachweis-
 - 20 verfahren verträglichen wäßrigen Pufferlösung;
 - e) Ermittlung des Androstenon-Gehalts der Lösemittel-/Pufferlösungsphase mittels an sich bekannter kompetitiver immunologischer Nachweisreaktionen.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösemittel neben guten Löseeigenschaften für das nachzuweisende Androstenon im Temperaturbereich von ca. 20 bis ca. 60°C einen Temperaturkoeffizienten für die Fettlöslichkeit aufweist, der größer ist als der Temperaturkoeffizient in diesem Temperaturbereich für die Andro-
- 30 stenon-Löslichkeit.
- 35 3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösemittel allenfalls geringen Einfluß auf die gegebenenfalls in dem Nachweisreaktionssystem

- 1 verwendeten Enzyme aufweist.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
3, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösemittel Antigen/An-
5 tikörperreaktionen des Nachweisreaktionssystems allen-
falls geringfügig beeinflusst.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß
das Lösemittel bis zu 100 Vol.% Methanol umfaßt.
- 10 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
5, dadurch gekennzeichnet, daß das Mischungsverhältnis der
flüssigen Fettprobe zum Lösemittel im Bereich von 0,1:10
bis 1:10 (V/V) gewählt wird.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß
das Mischungsverhältnis im Bereich von 0,2:10 bis 0,5:10
gewählt wird.
- 20 8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verdünnung der Löse-
mittelpphase mit Pufferlösung im Volumenverhältnis von
20:80 bis 5:95 vorgenommen wird.
- 25 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
8, dadurch gekennzeichnet, daß beim Abkühlungsschritt die
Endtemperatur der Probe so gewählt wird, daß das gelöste
Fett in einem solchen Umfang aus dem Lösemittel abge-
30 schieden wird, daß im nachfolgenden Verdünnungsschritt d)
eine im wesentlichen fettphasenfreie Lösung erhalten
wird.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1
bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt e)
25 (1) eine Aufnahmeplatte mit einem Antikörperserum

- 1 beschichtet und die Antikörper an der Aufnahmeplatte
immobilisiert werden, wobei die Antikörper spezifisch mit
Androstenonen, insbesondere 5α -Androst-16-en-3-on, rea-
gieren;
- 5 (2) die immobilisierten Antikörper mit einer definierten
Menge eines enzymmarkierten Androstenons und mit einem
vorgegebenen Volumen der in Schritt d) erhaltenen
lösemittelhaltigen Pufferlösung bei einer Temperatur von
ca. 42 bis 48°C, vorzugsweise bei ca. 45°C, für eine
10 vorgegebene Zeitspanne gleichzeitig inkubiert werden;
- (3) das nichtgebundene enzymmarkierte und freie Andro-
stenon entfernt und die beschichtete Aufnahmeplatte
gewaschen wird;
- (4) eine ein Substrat enthaltende Pufferlösung auf die
15 Aufnahmeplatte gegeben wird, wobei das Substrat mit dem
Markerenzym eine Enzymreaktion eingeht;
- (5) die Enzymreaktion für eine vorbestimmte Zeitspanne
bei einer vorgegebenen Temperatur durchgeführt wird und
danach mit einem geeigneten Reaktionsmittel abgestoppt
20 wird; und
- (6) der Reaktionsumsatz der enzymatischen Reaktion,
vorzugsweise photospektrometrisch, bestimmt wird.
11. Vorrichtung zur automatisierten Durchführung eines
25 Verfahrens gemäß einem oder mehreren der voranstehenden
Ansprüche
mit einer heizbaren Probeneingangsstation zur Aufnahme
und Verflüssigung der Fettgewebeprobe;
mit einer temperierbaren, programmierbaren Pipettivor-
30 richtung mit mehreren Probenaufnahmevorrichtungen zur
Durchführung der Verfahrensschritte b), c) und d) gemäß
einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 sowie gegebe-
nenfalls der zusätzlichen Schritte (2), (3), (4) und (5)
gemäß Anspruch 10; und
35 mit einer Meßvorrichtung zur direkten oder indirekten

- 1 Bestimmung einer den Androstenon-Gehalt der Fettgewebe-
probe reflektierenden Meßgröße.
- 5 12. Verwendung einer Aufnahmeplatte, auf welcher eine
definierte Menge gegen Androstenon spezifische Antikörper
immobilisiert ist, zur Aufnahme der in Schritt d) des
Verfahrens gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
9 erhaltenen androstenonhaltigen Probe zusammen mit einem
10 enzymmarkierten Androstenon und zur anschließenden
Durchführung der kompetitiven Nachweisreaktion gemäß
Schritt e) des Verfahrens nach einem oder mehreren der
Ansprüche 1 bis 10.
- 15 13. Verwendung der Aufnahmeplatte nach Anspruch 12, da-
durch gekennzeichnet, daß die Aufnahmeplatte als Mikro-
titerplatte ausgebildet ist.

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati Application No
 PCT/EP 93/02350

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 G01N33/74 G01N33/543 G01N33/03 G01N33/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 5 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARCHIV FÜR LEBENSMITTELHYGIENE vol. 39, no. 4 , July 1988 , HANNOVER, DE pages 87 - 90 R. CLAUS, G. MAHLER UND E. MÜNSTER 'Determination of the boar steroid 5a-androst-16-en-3-one in adipose tissue of pigs with a rapid microtitre plate enzyme-immunoassay (MTE)' cited in the application see the whole document --- -/--	1-13

 Further documents are listed in the continuation of box C.

 Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 1993

Date of mailing of the international search report

30. 12. 93

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Doepfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 93/02350

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 85, no. 21, 22 November 1976, Columbus, Ohio, US; abstract no. 158023, KAUFMANN, G.; RITTER, F.; SCHUBERT, K. 'Quantitative determination of the boar taint substance 5.alpha-androst-16-en-3-one in fat' page 386 ; see abstract & J. STEROID BIOCHEM. vol. 7, no. 8 , 1976 pages 593 - 597	1-10
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 7, 14 August 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 55921, EDELHÄUSER, MANFRED 'A method for the rapid determination of the boar taint steroid androstenone [in the adipose tissue of swine]' page 608 ; see abstract & DTSCH. LEBENSME.-RUNDSCH. vol. 85, no. 3 , 1989 pages 80 - 84	1-10
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7 July 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 4049, KAUFMANN,G.; SCHUBERT,K. 'Method for determination of the odorous substance 5.alpha-androst-16-en-3-one in boar fat' page 368 ; see abstract & NAHRUNG vol. 19, no. 1 , 1975 pages K5 - K6	1-10
A	--- JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY vol. 38, no. 1 , January 1990 , WASHINGTON US pages 331 - 335 MOHAMED M. ABOUZIED ET AL. 'Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for C19-delta16-Steroids in Sera of Boar Pigs' -----	1-13

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 5 G01N33/74 G01N33/543 G01N33/03 G01N33/12		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 5 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>ARCHIV FÜR LEBENSMITTELHYGIENE Bd. 39, Nr. 4, Juli 1988, HANNOVER, DE Seiten 87 - 90 R. CLAUSS, G. MAHLER UND E. MÜNSTER 'Determination of the boar steroid 5α-androst-16-en-3-one in adipose tissue of pigs with a rapid microtitre plate enzyme-immunoassay (MTE)' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. Dezember 1993		30. 12. 93
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Doepfer, K-P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 85, no. 21, 22. November 1976, Columbus, Ohio, US; abstract no. 158023, KAUFMANN, G.; RITTER, F.; SCHUBERT, K. 'Quantitative determination of the boar taint substance 5.alpha-androst-16-en-3-one in fat' Seite 386 ; siehe Zusammenfassung & J. STEROID BIOCHEM. Bd. 7, Nr. 8 , 1976 Seiten 593 - 597</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 7, 14. August 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 55921, EDELHÄUSER, MANFRED 'A method for the rapid determination of the boar taint steroid androstenone [in the adipose tissue of swine]' Seite 608 ; siehe Zusammenfassung & DTSCH. LEBENSM.-RUNDSCH. Bd. 85, Nr. 3 , 1989 Seiten 80 - 84</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7. Juli 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 4049, KAUFMANN,G.; SCHUBERT,K. 'Method for determination of the odorous substance 5.alpha-androst-16-en-3-one in boar fat' Seite 368 ; siehe Zusammenfassung & NAHRUNG Bd. 19, Nr. 1 , 1975 Seiten K5 - K6</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY Bd. 38, Nr. 1 , Januar 1990 , WASHINGTON US Seiten 331 - 335 MOHAMED M. ABOUZIED ET AL. 'Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for C19-delta16-Steroids in Sera of Boar Pigs'</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13