



Entwicklung eines markierungsfreien Biosensors zum Nachweis von Diclofenac in abwasserbelasteten Oberflächengewässern

Sabrina Rau¹ (sabrina.rau@uni-tuebingen.de), Norbert Scheibe² (norbert.scheibe@gmx.net), Urs Hilbig¹ (urs.hilbig@uni-tuebingen.de), Wolf von Tümpling² (wolf.vontuempling@ufz.de), Günter Gauglitz¹ (guenther.gauglitz@ipc.uni-tuebingen.de)

¹ Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen

² Abteilung Gewässeranalytik und Chemometrie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ

Zusammenfassung

Der zunehmende Einsatz von Diclofenac in der Humanmedizin sowie im Veterinärbereich führt dazu, dass dieser Wirkstoff oder seine Metabolite in deutschen Oberflächengewässern nahezu überall von wenigen ng L⁻¹ bis hin zu ca. 1 µg L⁻¹ nachgewiesen werden können. So gelangt Diclofenac durch menschliche oder tierische Ausscheidungen oder unsachgemäße Entsorgung indirekt oder direkt in die Oberflächengewässer, da es auch bei der Abwasserreinigung in Kläranlagen oftmals nur unvollständig entfernt wird [1].

Zur Einschätzung des damit verbundenen humantoxikologischen und ökotoxikologischen Risikopotentials sind geeignete qualitative und quantitative Nachweisverfahren erforderlich, die auch in komplexen Matrices sensitiv und selektiv die Substanzen bestimmen können. Gängige analytische Routinemethoden beispielsweise durch Derivatisierung und GC MS/MS- bzw. klassischer LC-MS/MS-Bestimmung sind kosten- und zeitintensiv. Deshalb wurde mittels der markierungsfreien Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RfS) ein direkt optischer Biosensor zur Quantifizierung des nichtsteroidalen Antirheumatikums Diclofenac in abwasserbelastetem Oberflächenwasser entwickelt. Da dieses Wasser aufgrund seiner Vielzahl an Bestandteilen eine komplexe Probenmatrix darstellt, wurde der Immunoassay zunächst im Hinblick auf Sensitivität, Selektivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit in Puffer und ultrafiltriertem entsalztem Wasser entwickelt und kalibriert. Die Validierung des Sensors erfolgte hierbei nicht nur durch die erfolgreiche Bestimmung von Wiederfindungsraten, sondern auch mit direkten Vergleichsmessungen der etablierten LC-MS/MS Methode. Am Beispiel von huminsäurehaltigen Wasserproben wurden Matrixeffekte untersucht. Aufgrund der optimierten Oberflächenmodifikation und Messroutine sind jetzt Messungen in Diclofenac belasteten Oberflächengewässern ohne Probenvorbereitung möglich.

Einführung

Neben Schadstoffen wie Industriechemikalien oder Pestiziden, können auch zunehmend pharmakologisch aktive Substanzen in der Umwelt, z.B. in Oberflächengewässern, nachgewiesen werden [2,3]. Diese können potentiell schon in geringen Konzentrationen zu nachhaltigen Veränderungen in aquatischen Ökosystemen führen. Langzeitstudien zum Einfluss dieser Schadstoffe auf die Umwelt liegen bisher nur

vereinzelt vor. Damit wird deutlich, dass ein intensives Monitoring zwingend erforderlich ist [4,5]. Die Europäische Union hat auf die Problematik der Existenz pharmakologisch aktiver Substanzen in Oberflächengewässern mit einer Änderung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie reagiert: 17-β-Östradiol, 17-α-Ethinylöstradiol und Diclofenac wurden als erste Arzneimittelstoffe in die Beobachtungsliste aufgenommen [6].

Diclofenac, ein nichtsteroidales Antirheumatikum, wird in großen Mengen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt, da es einerseits analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch wirkt [7] und andererseits preiswert herzustellen ist. Mittlerweile ist es deshalb in Spurenkonzentrationen in vielen Oberflächengewässern bis zu einer Konzentration von 1,2 µg L⁻¹ nachweisbar [8] und steht unter Verdacht Nierenschäden in Fischen hervorzurufen [9].

Um das toxikologische Risikopotential für den Menschen als auch für die aquatische Umwelt abzuschätzen, sind geeignete, im günstigsten Falle schnelle und preiswerte Nachweis- und Quantifizierungsmethoden notwendig.

Optische Biosensoren bieten viele Vorteile gegenüber konventionellen analytischen Methoden. So ist beispielsweise der Probenvorbereitungsaufwand als gering einzuschätzen und es besteht die Möglichkeit von Vor-Ort Messungen. Zum Nachweis von Diclofenac in Oberflächengewässern sind optische Biosensoren in der Literatur bisher aber kaum beschrieben [10]. Deshalb wurde mit Hilfe der markierungsfreien RfS ein Immunosensor entwickelt, um Diclofenac in belasteten Oberflächengewässern qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Dies auch vor dem Hintergrund, dass er deutlich schneller und kostengünstiger ist als ein System, das mit Markierungen arbeitet. Generell gilt aber, dass markierungsfreie optische Detektionsmethoden deutlich stärker von Matrixeffekten beeinflusst werden als solche, die mit Markierungen arbeiten [11,12].

Oberflächenwasser enthält eine Vielzahl von gelösten und partikulär gebundenen Substanzen sowie ungelöste Stoffe, die sowohl einzeln als auch in Kombination Matrixeffekte verursachen können.

Deshalb musste bei der Entwicklung des Immunosensors verstärkt auf die Reduzierung oder Vermeidung von Matrixeffekten durch optimierte Assaybedingungen geachtet werden.

Methoden

Die RIfS beruht auf dem Prinzip der Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten [11]. Hierfür wird der transparente Transducer von der Rückseite mit Weißlicht bestrahlt. An jeder Grenzschicht wird ein Teil des Lichts transmittiert und ein Teil reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen interferieren und bilden ein charakteristisches Interferenzspektrum. Auf der Oberfläche des Transducers befindet sich eine sensitive Schicht, welche mit der Erkennungsstruktur, z. B. einem Antikörper, in Wechselwirkung treten

kann. Dabei ändert sich sowohl der Brechungsindex n , als auch die physikalische Schichtdicke d dieser Schicht. Das Interferenzspektrum wird zu höheren Wellenlängen verschoben. Durch Verfolgung eines prominenten Punktes, z.B. eines Extrempunktes, kann aus dessen Verschiebung auf die Änderung der optischen Schichtdicke (Produkt aus physikalischer Schichtdicke und Brechungsindex) geschlossen werden (Abb. 1). Damit ist es möglich biomolekulare Interaktionen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu bestimmen

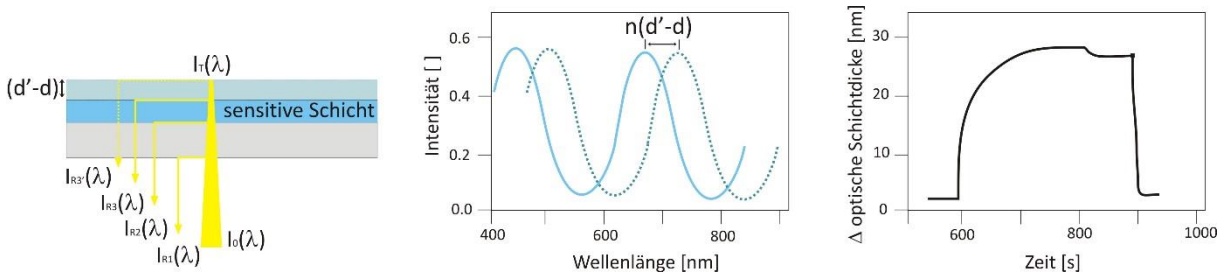


Abb. 1: Prinzip der RIfS: Verschiebung des Interferenzspektrums zu höheren Wellenlängen bei Wechselwirkungsvorgängen mit der sensitiven Schicht. Ein zeitabhängiges Bindungssignal wird erhalten (rechts).

Als Assayformat wurde der Bindungsinhibitionstest verwendet. Im Vergleich zu einem direkten Assay, können hierbei höhere Bindungssignale und somit ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhalten werden. Zudem ist die kovalente Anbindung von Antigen-Derivaten vorteilhaft, da eine Regeneration der Oberfläche ohne größere Probleme möglich wird. Der Sensor kann so mehrfach verwendet werden. Des Weiteren können durch geeignete Oberflächenmodifikationen unspezifische Wechselwirkungen von Matrixbestandteilen reduziert oder verhindert werden [11]. Die oben beschriebenen Anforderungen wurden mittels kovalenter Immobilisierung von Polyethylenglycol (PEG) und Aceclofenac auf dem Transducer erreicht. Die Oberfläche wurde mittels

Rasterkraftmikroskopie, Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen untersucht und charakterisiert.

Beim Bindungsinhibitionstest wird die Probe, welche den nachzuweisenden Analyten (Diclofenac) enthält, mit einer definierten Menge des Antikörpers 30 Minuten inkubiert und anschließend über die Oberfläche geleitet. Der Antikörper kann hierbei nur noch mit den noch freien Bindungsstellen an das auf der Oberfläche immobilisierte Diclofenac-Derivat (Aceclofenac) binden (Abb. 2). Demzufolge wird für eine niedrige Analyt-Konzentration in der Probe ein hohes und für eine hohe Analyt-Konzentration ein niedriges Messsignal erhalten.

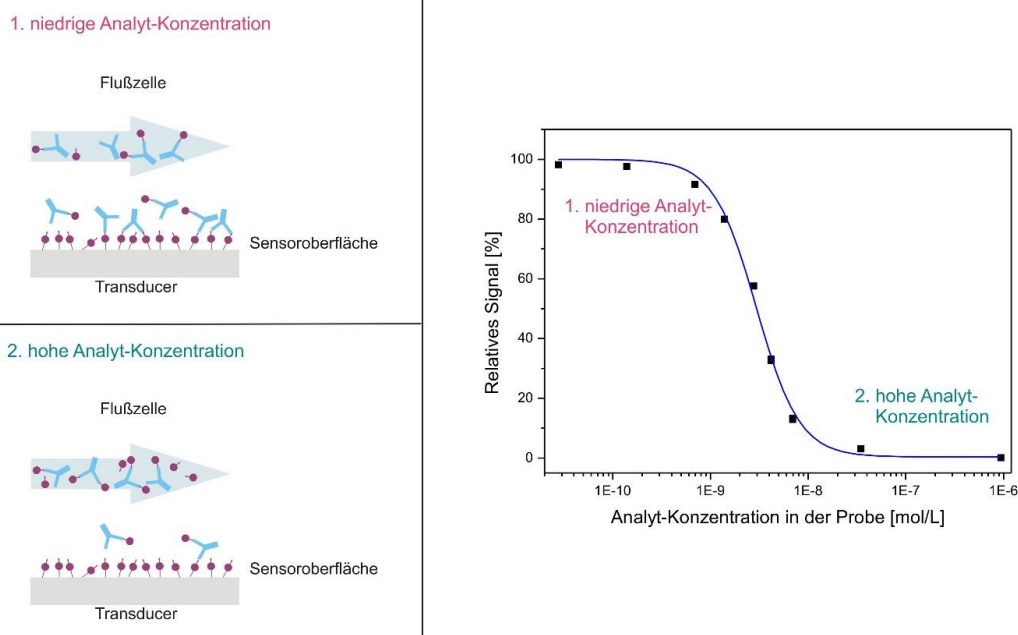


Abb. 2: Schematische Darstellung der Messung einer niedrigen (1) und einer hohen (2) Analyt-Konzentration. Die erhaltenen Bindungssignale sind umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration in der Probe (rechts).

Ergebnisse

Aufgrund der Vielzahl an Matrixbestandteilen in Flusswasser, welche potentiell mit dem Immunoassay interferieren können, wurde dieser zunächst in Puffer entwickelt und optimiert. Dabei wurde vor allem auf eine hohe Sensitivität des Immunoassays, eine hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit des Signals und auf eine gute Regenerierbarkeit der Oberfläche großer Wert gelegt.

Basierend auf diesen optimierten Bedingungen wurde der Immunoassay in Puffer kalibriert (Abb. 3) und eine Nachweisgrenze (LOD) von $0,284 \mu\text{g L}^{-1}$ sowie eine Bestimmungsgrenze (LOQ) von $0,493 \mu\text{g L}^{-1}$ erhalten.

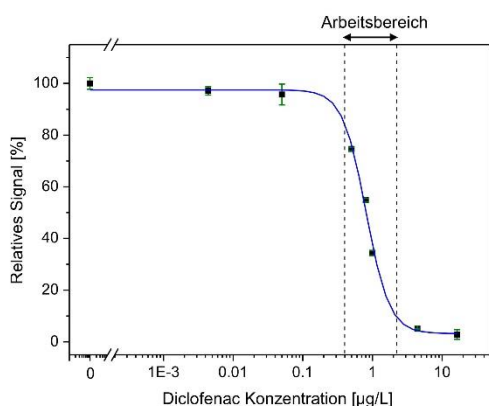


Abb. 3: Kalibrierkurve in Puffer (Dreifachmessungen)

Um die gemessene Kalibrierkurve zu validieren, wurden Wiederfindungsraten für vier Diclofenac Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,85 \mu\text{g L}^{-1}$) bestimmt. Diese lagen zwischen 93% und 112%, und somit im geforderten Bereich (AOAC International: 70 – 120%). Somit konnte nicht nur die Kalibrierkurve erfolgreich validiert, sondern auch die gute Inter-Chip Reproduzierbarkeit demonstriert werden.

Flusswasser ist eine komplexe Matrix, deren Bestandteile verschiedene Matrixeffekte verursachen können. Flusswasserbestandteile könnten z.B. die Analyt-Antikörper Wechselwirkung durch unspezifische Adsorption an einen der beiden Wechselwirkungspartner stören. Zudem könnte das Messsignal durch unspezifische Wechselwirkungen von Matrixbestandteilen mit der Oberfläche verfälscht werden und zusätzlich spezifische Wechselwirkungen der Erkennungsstruktur mit der Oberfläche verhindern. Der Immunoassay wird aus diesen Gründen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser kalibriert. Die Messroutine wurde hierfür geringfügig verändert, da Antikörper empfindliche Biomoleküle darstellen, die in Wasser als Probenmatrix möglicherweise nach einiger Zeit denaturieren. Die Validierung des Sensors erfolgte hier nicht nur durch die erfolgreiche Bestimmung von Wiederfindungsraten, sondern zudem durch Vergleichsmessungen mit einer bereits etablierten Methode zur Bestimmung von Diclofenac, der LC-MS/MS (Abb. 4).

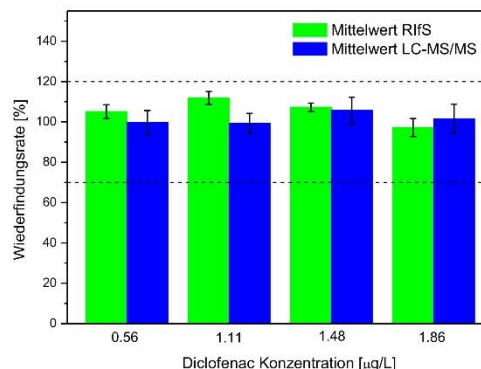


Abb. 4: Wiederfindungsraten in ultrafiltriertem entsalztem Wasser. Proben sowohl mittels RfS als auch mit LC-MS/MS gemessen.

Der Einfluss verschiedener Matrixbestandteile wie z.B. der von verschiedenen Huminsäure-Konzentrationen auf die Oberfläche, den Antikörper sowie auf den Analyt und somit auf die Analyt-Antikörper-Wechselwirkung wurde untersucht. Bis zu einer Huminsäure-Konzentration von $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ konnte kein Einfluss beobachtet werden. Somit ist der hier entwickelte Biosensor deutlich weniger anfällig für Matrixeffekte als andere optische Biosensoren [10]. Filtriertes Flusswasser verschiedener Flüsse wie z.B. der Nagold wurde mit verschiedenen Diclofenacmengen gespickt und die Konzentration gemessen. In allen nicht-gespickten Flusswasser-Proben war die Diclofenac-Konzentration unter der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der hier beschriebenen Methode. In allen Gewässerproben wurden gute Wiederfindungsraten erreicht (Abb. 5).

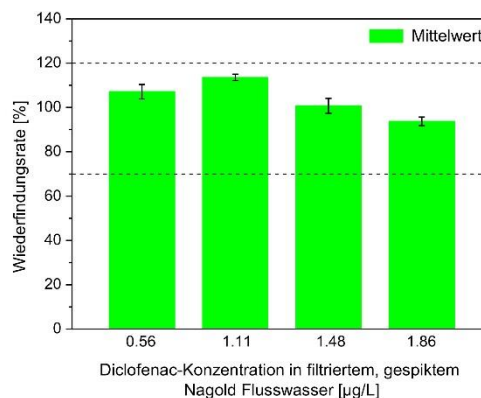


Abb. 5: Wiederfindungsraten in filtriertem, gespicktem Nagold Flusswasser. Es wurden vier Diclofenac Konzentrationen bestimmt ($0,56 \mu\text{g/L}$; $1,11 \mu\text{g/L}$; $1,48 \mu\text{g/L}$; $1,86 \mu\text{g/L}$)

Ausblick

Ein markierungsfreier optischer Biosensor zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diclofenac in belasteten Oberflächengewässern konnte erfolgreich entwickelt und etabliert werden. Da durch Optimierung der Oberflächenmodifikation und der Messroutine Matrixeffekte reduziert werden konnten, ist eine

Probenvorbereitung des Flusswassers bei dem hier entwickelten Immunosensors nicht notwendig. In weiteren Arbeiten soll mittels dieses Immunosensors Diclofenac direkt im Ablauf von Kläranlagen nachgewiesen und quantifiziert werden. Des Weiteren sollen die hierbei gewonnenen Erkenntnisse auf die Entwicklung weiterer Biosensoren zum Nachweis anderer nichtsteroidaler Antirheumatika in Oberflächengewässern übertragen werden.

Literatur

- [1] S. Wiegel et al., Pharmaceuticals in the River Elbe and its tributaries, *Chemosphere* 57, 107-126 (2004); doi: [org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.017](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.017)
- [2] D.W. Kolpin et al., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance, *Environ Sci Technol* 36, 1202-1211 (2002); doi: [10.1021/es011055j](https://doi.org/10.1021/es011055j)
- [3] M. Petrovic et al., Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data, *Anal Bioanal Chem* 378, 549-562 (2004); doi: [10.1007/s00216-003-2184-7](https://doi.org/10.1007/s00216-003-2184-7)
- [4] G.E. Swan et al., Toxicity of diclofenac to Gyps vultures, *Biol Lett* 2, 279-282 (2006); doi: [10.1098/rsbl.2005.0425](https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0425)
- [5] Q. Teng et al., Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells, *Aquat Toxicol* 130-131, 184-191 (2013); doi: [10.1016/j.aquatox.2013.01.011](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.011)
- [6] Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik (2013)
- [7] E.C. Ku et al., Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase, *Biochem Pharmacol* 24, 641-643 (1975)
- [8] T.A. Ternes, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research* 32 (11), 3245-3260 (1998); doi: [10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- [9] J. Schwaiger et al., Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout, *Aquat Toxicol* 68, 141-150 (2004); doi: [10.1016/j.aquatox.2004.03.014](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.014)
- [10] A. Deng et al., Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS, *Environ Sci Technol* 37, 3422-3429 (2003); doi: [10.1021/es0341945](https://doi.org/10.1021/es0341945)
- [11] S. Rau et al., Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) als neues Werkzeug zur Messung in komplexen Matrices bei niedriger Analytenkonzentration, *Anal Bioanal Chem* 402, 529-536 (2012); doi: [10.1007/s00216-011-5470-9](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5470-9)
- [12] G. Gauglitz, Direct detection in bioanalysis: an update, *Anal Bioanal Chem* 398, 2363-2372 (2010); doi: [10.1007/s00216-010-3904-4](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3904-4)

Dipl.-Chem. Sabrina Rau
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen

Tel.: 07071/29-78767

E-Mail: sabrina.rau@uni-tuebingen.de

Web: barolo.ipc.uni-tuebingen.de

Hinweis der Redaktion:

Frau Sabrina Rau wurde für die Präsentation ihrer Forschungsergebnisse auf dem 1. Forum Junger Umweltwissenschaftler 2013 in Blomberg mit dem Preis für den besten Vortrag ausgezeichnet.

Korrespondenzadresse