

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Entwicklung, Optimierung und Validierung
eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen
Disruptors
17 α -Ethinylestradiol

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Christian Schneider
aus Troisdorf

Bonn 2005

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Christian Schneider
aus Troisdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.2005

Entwicklung, Optimierung und Validierung
eines Immunoassays zur sensitiven Detektion
des endokrinen Disruptors
17 α -Ethinylestradiol

Gutachter: Prof. Dr. Heinz F. Schöler
Institut für Umwelt-Geochemie
Universität Heidelberg

PD Dr. Rudolf J. Schneider
Institut für Pflanzenernährung
Universität Bonn

meinen Eltern

Kapitel 1. Allgemeine Einleitung	11
1.1. Grundlagen.....	11
1.1.1. Endokrine Disruptoren in der aquatischen Umwelt	11
1.1.2. Immunoassays	13
1.2. Methodenentwicklung.....	16
1.2.1. Enzymimmunoassays	16
1.2.1.1. Assayformate	16
1.2.1.2. Auswertung.....	19
1.2.1.3. Selektivität	21
1.2.1.4. Sensitivität	22
1.2.1.4.1. Das Massenwirkungsgesetz im ELISA	23
1.2.1.4.2. Affinitätslimitierung	25
1.2.1.4.3. Kenndaten	27
1.3. Motivation und Ziel der Arbeit	31
1.4. Material und Methoden	33
1.4.1. Pufferlösungen.....	33
1.4.2. Etablierung des Estradiol-Modellsystems	35
1.4.2.1. Synthese des Tracers: 3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)estratrien-6-on- (carboxymethyloxim)-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamid (Bio-LC E2)	35
1.4.2.2. Untersuchungen zur Bio-LC E2 Konzentration	35
1.4.2.3. Optimierung der Bio-LC E2 Inkubationszeit	35
1.4.2.4. Untersuchungen zu Konzentration und Inkubationszeit des Streptavidin-Peroxidase Konjugats.....	36
1.4.2.5. Untersuchungen zum Blockingmittel	36
1.4.3. Entwicklung der Ethinylestradiol-Assays	36
1.4.3.1. Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern.....	36
1.4.3.2. Tracersynthesen	37
1.4.3.2.1. Synthese von 3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-17ethinylestratrien-6-on- (carboxymethyloxim)-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamid (Bio-LC EE2).....	37
1.4.3.2.2. Kopplung von 3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-17ethinylestratrien-6-on- (carboxymethyloxim) an Meerrettichperoxidase (EE2-POD).....	38
1.4.3.3. Verdünnung von Antikörper und Tracer bzw. Antikörper und Biotinderivat.....	39
1.4.3.3.1. Checkerboard-Titration	39
1.4.3.3.2. Immunchemische Charakterisierung des Bio-LC EE2 Derivats	39
1.4.3.4. Untersuchungen zur Kreuzreaktivität des Antiserums	40
1.4.3.5. Untersuchungen zu Matrixeffekten	40
1.4.3.6. Untersuchungen zu organischen Lösungsmitteln	40
1.4.4. Differenzierung und Optimierung der EE2 Assays	41
1.4.4.1. Bio-LC EE2 ELISA.....	41
1.4.4.1.1. Studien zur Signalamplifikation	41
1.4.4.2. EE2 ELISA	41
1.4.4.3. EE2 CLEIA.....	42

1.4.5.	Feldstudie	43
1.4.5.1.	Probennahme	43
1.4.5.2.	Anreicherungsmethode	45
1.4.5.3.	Referenzmessungen	46
1.5.	Ergebnisse	47
1.5.1.	Das Estradiol-Modellsystem	47
1.5.1.1.	Tracersynthese	47
1.5.1.2.	Testentwicklung	47
1.5.1.3.	Blocking	49
1.5.1.4.	Modifiziertes Assay-Protokoll	49
1.5.1.5.	Kenndaten	50
1.5.2.	Aufbau der Ethinylestradiol-Assays	51
1.5.2.1.	Tracersynthesen	51
1.5.2.1.1	Bio-LC EE2	51
1.5.2.1.2	EE2 ELISA und CLEIA	53
1.5.2.2.	Kreuzreaktivitäten	53
1.5.2.3.	Matrixeffekte	55
1.5.2.4.	Lösemitteleffekte	56
1.5.3.	Bio-LC EE2 ELISA	58
1.5.3.1.	Affinitätslimit	58
1.5.3.2.	Studien zur Signalamplifikation	59
1.5.3.3.	Kenndaten	60
1.5.4.	EE2 ELISA	62
1.5.4.1.	Affinitätslimit	62
1.5.4.2.	Kenndaten	64
1.5.5.	EE2 CLEIA	65
1.5.5.1.	Kenndaten	68
1.5.6.	Feldstudie	70
1.5.6.1.	Anreicherungsmethode	70
1.5.6.2.	Messwerte	71
1.6.	Diskussion	75
1.6.1.	Immunoassays	75
1.6.2.	Feldstudie	79
1.6.3.	Signifikanz	80

Kapitel 2. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for Ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative.....	83
2.1. Introduction	84
2.2. Experimental.....	85
2.2.1. Reagents and Materials.....	85
2.2.2. HPLC	85
2.2.3. NMR spectroscopy	86
2.2.4. Mass spectrometry	86
2.2.5. Synthesis of 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-17 α -ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamide	86
2.2.6. Bio-LC EE2 ELISA.....	87
2.2.6.1. Antisera Production	87
2.2.6.2. Optimized ELISA Procedure.....	87
2.2.6.3. Cross Reactivity Determination.....	87
2.2.6.4. Effects of Organic Solvents and Humic Acid on the ELISA	88
2.3. Results and discussion	89
2.3.1. Synthesis of 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-17 α -ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamide	89
2.3.2. Characteristics of the Bio-LC EE2 ELISA.....	89
2.3.2.1. Optimization of Assay Conditions	90
2.3.2.2. Cross Reactivities	90
2.3.2.3. Stability Tests	92
Kapitel 3. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment.....	93
3.1. Introduction	96
3.2. Materials and methods.....	97
3.2.1. Reagents and Materials.....	97
3.2.2. Antisera production	97
3.2.3. Preparation of enzyme conjugates.....	97
3.2.4. ELISA procedures	98
3.2.5. Cross-Reactivity Determination	98
3.2.6. Water Samples	99
3.2.7. Sample Preparation and Preliminary Analysis	100
3.3. Results and Discussion	101
3.3.1. Immunoassays	101
3.3.2. Water Samples.....	102
3.4. Conclusion	105

Kapitel 4. Direct sub ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay	107
4.1. Introduction.....	108
4.2. Materials and methods	109
4.2.1. Reagents and Materials	109
4.2.2. Preparation of enzyme conjugate.....	109
4.2.3. Immunoassay procedures.....	110
4.2.4. Cross-Reactivity Determination.....	111
4.2.5. Matrix Interference	111
4.2.6. Water Samples	111
4.2.7. Sample preparation	112
4.2.8. LC-MS/MS Procedure	112
4.3. Results and discussion	113
4.3.1. Assay Optimization.....	113
4.3.2. Specificity of the Antiserum	114
4.3.3. Matrix Interference	115
4.3.4. Water Samples	115
4.4. Conclusion.....	117
Kapitel 5. Literatur	119

Abkürzungsverzeichnis

4PL	4-parametric logistic equation, 4-Parameter-Funktion	LOQ	limit of quantitation, Bestimmungsgrenze
A	Parameter A der 4PL	MS	Massenspektrometer
B	Parameter B der 4PL	NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
B ₀	Blindwert	NOEC	no observed effect concentration, Effektschwelle
Bio-LC	ε-Biotinylaminocapronamide	OD	optische Dichte
BSA	bovine serum albumin, Rinderserum Albumin	PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
C	Parameter C der 4PL	POD	Peroxidase
CLEIA	Chemilumineszenz Enzymimmunoassay	ppt	parts per trillion
CMO	Carboxymethyloxim	RIA	Radioimmunoassay
CR	cross reactivity, Kreuzreaktivität	RLU	relative light unit
CV	coefficient of variation, Variationskoeffizient	RPM	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
D	Parameter D der 4PL	RT	Raumtemperatur
DMA	Dimethylacetamid	S/N	signal-to-noise ratio, Signal- Rausch Verhältnis
DMF	Dimethylformamid	SPE	solid phase extraction, Festphasenextraktion
E1	Estron	SPR	surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonresonanz
E2	17β-Estradiol	STP	sewage treatment plant, Kläranlage
EE2	17α-Ethinylestradiol	TBABH	Tetrabutylammoniumborhydrid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	TBS	tris buffered saline, Tris-Puffer
GC	Gaschromatographie	TLC	thin layer chromatography, Dünnschichtchromatographie
Gluc	Glucuronid	TMB	Tetramethylbenzidin
HA	humic acid, Huminsäure	Y	Signalstärke
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie	Y _N	normierte Signalstärke
LOD	limit of detection, Nachweisgrenze		

Abstract

This thesis deals with the analysis of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the aquatic environment. The study was focused on the development and optimization of enzyme immunoassays (ELISAs) for the direct quantitation of EE2 at a concentration range of 1 - 10 ng/L. The optimization of the ELISAs relied on the concept of affinity limitation. Affinity limitation describes the observation that an improvement of assay sensitivity with hapten immunoassays is restricted by intrinsic properties of the antibody itself.

After the first studies using an established ELISA for estradiol three new ELISAs for EE2 were developed. Each of these assays employed the same polyclonal antiserum.

For the first assay (Bio-LC EE2 ELISA) a new biotinylated EE2 derivative was synthesized and used as tracer. In this assay a conjugate of peroxidase and streptavidin acted as enzyme label. The binding of this enzyme conjugate relied on the biotin-streptavidin interaction with the biotin moiety of the tracer. Measurements were performed photometrically, using a substrate based on tetramethylbenzidine and hydrogenperoxide.

For the second assay (EE2 ELISA) a conjugate of EE2 and peroxidase was synthesized and used directly as tracer. For measurements the same photometric detection as employed in the Bio-LC EE2 ELISA was used. Compared to the first assay, introduction of the EE2 ELISA simplified the protocol and reduced the expenditure of time from 120 to 70 minutes.

Optimization of the EE2 ELISA lead to the development of the third assay, the EE2 CLEIA. For achieving improved assay sensitivities, dilutions of the antibody were raised from 1:50,000 (EE2 ELISA) to 1:200,000 (EE2 CLEIA), dilutions of the tracer from 1:50,000 to 1:500,000, respectively. Loss of signal intensities due to these lowered concentrations required the substitution of the photometric measurement by a chemiluminescence based detection. This enabled further optimizations of assay sensitivity and reduced the expenditure of time for measurement of a typical set of 24 samples to 40 minutes.

Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) as well as the analytical range of these three assays are:

Bio-LC EE2 ELISA: LOD 2.6 ng/L / LOQ 21 ng/L / analytical range 0.025 – 55 μ g/L

EE2 ELISA: LOD 0.5 ng/L / LOQ 6.0 ng/L / analytical range 0.004 – 130 μ g/L

EE2 CLEIA: LOD 0.2 ng/L / LOQ 1.4 ng/L / analytical range 0.8 –100 ng/L

These assays are currently among the four most sensitive assays for EE2. Introduction of EE2 CLEIA facilitated for the first time the direct detection of EE2 at ecotoxicologically relevant concentrations.

Apart from improving assay sensitivity a thorough study regarding selectivity and stability was conducted. Eleven hormones, including the derivatives estrone and estradiol frequently occurring in environmental samples, were used for characterizing the selectivity. Typical cross reactivities were below 0.3 %. Lower selectivities were observed for conjugates of EE2 at ring position 3 (glucuronides: 17-22 % and sulfates: 34-37 %). This can be explained by the steric requirements of the BSA conjugate used during the immunization.

Stability of the ELISAs against matrix interference was studied using commercially available humic acids. The Bio-LC EE2 ELISA appeared to be susceptible to this interference and had to be regarded as not stable. In contrast the EE2 ELISA and EE2 CLEIA, respectively, exhibited a very robust behaviour and enabled reliable determinations of EE2 even in the presence of elevated concentrations of humic acid.

In addition to assay development and optimization an established SPE (solid phase extraction) method was modified and improved. Using a neutral pH for sample enrichment and employing washing steps with organic solvents significantly lowered the matrix content of the extracts.

Usability of both, EE2 ELISA and EE2 CLEIA, was examined in a field study including eight samples from surface waters and twelve final effluent samples of sewage treatment plants. Results were validated using a reference method based on LC-MS/MS (LOD 1.0 ng/L). The median concentration for surface waters was 0.6 ng/L, effluent samples had a median concentration of 1.3 ng/L. Due to the elevated limit of detection of the reference method, LC-MS/MS measurements frequently lead to (false-)negative results.

With this thesis the limit of detection for a direct measurement of EE2 in water samples could be established for the first time at 0.2 ng/L. In parallel consumption of resources could be significantly reduced. 24 samples can be measured within 40 minutes at costs per sample of only 1.20 €. These new immunoassays enable an economically efficient and very sensitive determination of EE2, yielding the possibility for a routine monitoring of EE2 in the aquatic environment.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analytik von 17 α -Ethinylestradiol (EE2) in der aquatischen Umwelt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei in der Entwicklung und Optimierung von Enzym-Immunoassays (ELISAs) zur direkten Bestimmung des Analyten im Konzentrationsbereich von 1 - 10 Nanogramm pro Liter. Eine zentrale Rolle spielte hierbei das Modell der Affinitätslimitierung nach dem die Verbesserung der Assaysensitivität bei Haptenimmunoassays durch die Bindungsstärke des Antikörpers selbst begrenzt ist.

Nach Modellstudien an einem etablierten Estradiol-Immunoassay wurden drei neue ELISAs für EE2 entwickelt. In jedem dieser EE2 Assays wurde das gleiche polyklonale Antiserum verwendet.

Für den ersten Assay (Bio-LC EE2 ELISA) wurde ein biotinyliertes Ethinylestradiolderivat synthetisiert und im ELISA als Tracer verwendet. Durch Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und Ausnutzung der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung wurde anschließend Peroxidase an den Biotin-Tracer gebunden. Als Substrat wurde ein Tetramethylbenzidin/H₂O₂-System verwendet, die Detektion erfolgte photometrisch.

Im zweiten Assay (EE2 ELISA) wurde ein direktes Enzymkonjugat des EE2 mit Meerrettichperoxidase synthetisiert. Dieses fungierte im EE2 ELISA als Tracer. Die Detektion erfolgte auch hier photometrisch. Im Vergleich zum Bio-LC EE2 ELISA wurde im EE2 ELISA das Protokoll vereinfacht und der Zeitbedarf konnte von 120 auf 70 Minuten reduziert werden.

Der dritte Assay (EE2 CLEIA) leitete sich unmittelbar vom EE2 ELISA ab, es wurde das gleiche Enzymkonjugat verwendet. Zur weiteren Sensitivitätssteigerung wurde die Antikörperverdünnung von 1:50.000 (EE2 ELISA) auf 1:200.000 (EE2 CLEIA), und die Tracerverdünnung von 1:50.000 (EE2 ELISA) auf 1:500.000 (EE2 CLEIA) erhöht. Bedingt durch die deutlich geringeren Konzentrationen von Antikörper und Tracer wurde ein Substratwechsel zu einem Chemilumineszenz-System durchgeführt. Dies ermöglichte eine weitere Verbesserung der Sensitivität und führte zudem zu einer Vereinfachung der Messung. Eine typische Messung von 24 Realproben mit dem Chemilumineszenzassay (EE2 CLEIA) dauert nur noch 40 Minuten.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD bzw. LOQ), sowie die Messbereiche der drei Assays betragen:

Bio-LC EE2 ELISA: LOD 2,6 ng/L / LOQ 21 ng/L / Messbereich 0,025 – 55 μ g/L

EE2 ELISA: LOD 0,5 ng/L / LOQ 6,0 ng/L / Messbereich 0,004 – 130 μ g/L

EE2 CLEIA: LOD 0,2 ng/L / LOQ 1,4 ng/L / Messbereich 0,8 – 100 ng/L

Diese drei Assays gehören damit zu den derzeit vier empfindlichsten Immunoassays für die Bestimmung von EE2. Mit Hilfe des EE2 CLEIA konnten erstmalig direkte Messungen im ökotoxikologisch relevanten sub ppt-Bereich realisiert werden.

Neben der Steigerung der Assaysensitivität wurde eine umfassende Studie zur Selektivität und Stabilität der Assays durchgeführt. Zur Untersuchung der Selektivität dienten elf

Steroidhormone bzw. Hormonderivate, darunter die häufig in Umweltproben vorliegenden Substanzen Estron und Estradiol. Das EE2-Antiserum zeigte hierbei ein extrem selektives Bindungsverhalten bezüglich EE2. Typische Kreuzreaktivitäten, beispielsweise für Estron und Estradiol, lagen zwischen 0,1 und 0,3 %. Nennenswerte Kreuzreaktivitäten traten lediglich für Konjugate des EE2 an der Ringposition drei auf (Glucuronsäureaddukte: 17-22 % und Sulfate: 34-37 %). Dies steht in Zusammenhang mit der Struktur des für die Immunisierung verwendeten BSA Konjugats des EE2.

Die Matrixstabilität der ELISAs wurde anhand eines kommerziellen Huminsäurepräparates untersucht. Der Bio-LC EE2 ELISA erwies sich als störungsanfällig und nicht stabil bezüglich der verwendeten Huminsäure. Im Gegensatz dazu zeigte der EE2 ELISA und EE2 CLEIA ein robustes Verhalten und ermöglichten auch in Gegenwart erhöhter Huminsäurekonzentrationen die zuverlässige Bestimmung des EE2.

Zusätzlich zu Aufbau und Optimierung der ELISAs wurde, ausgehend von bekannten Verfahren, eine SPE-Methode (solid phase extraction) zur Anreicherung und Aufreinigung von Wasserproben modifiziert und weiterentwickelt. Der wesentliche Vorteil der neuen Methode besteht in der geringeren Belastung der Extrakte durch Matrixkomponenten. Dies wurde ermöglicht durch die Verwendung eines neutralen pH-Werts zur Anreicherung der Proben und der Einbeziehung spezieller Waschschriffe mit organischen Lösungsmitteln zur Entfernung der Huminstoffe.

Abschließend wurde die Praxistauglichkeit des EE2 ELISA und EE2 CLEIA im Rahmen einer Feldstudie untersucht und durch den Vergleich zu einem Referenzlabor validiert. Insgesamt wurden acht Proben aus Fließgewässern und zwölf Proben aus Kläranlagenabläufen gemessen. Für die Flussproben ergab sich eine Mediankonzentration von 0,6 ng/L und für die Proben aus Kläranlagenabläufen von 1,3 ng/L. Die Ergebnisse der Referenzmessungen (LC-MS/MS, LOD 1,0 ng/L) führten, bedingt durch die zu hohe Nachweisgrenze, meist zu (falsch-)negativen Befunden.

Durch die vorliegende Arbeit konnte die Nachweisgrenze zur direkten Bestimmung von EE2 in Wasserproben (Oberflächenwasser und Kläranlagenablauf) erstmalig auf bis zu 0,2 ng/L abgesenkt werden. Gleichzeitig ist es gelungen, die Materialkosten für eine solche Bestimmung auf ca. 1,20 € zu reduzieren und die parallele Messung von 24 Proben in 40 Minuten zu ermöglichen. Es wurden somit die Grundlagen für eine sensitive und zugleich kosteneffiziente Routinemethode zur Bestimmung von EE2 in der aquatischen Umwelt geschaffen.

Veröffentlichungen

Die vorliegende Dissertation beinhaltet die folgenden Veröffentlichungen.

Kapitel 2

Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2004). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids* **69**(4): 245.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden von C. Schneider initiiert und gemeinschaftlich von C. Schneider, H. F. Schöler und R. J. Schneider geplant. Alle experimentellen Arbeiten, sowie die Auswertung der Ergebnisse, wurden von C. Schneider durchgeführt. Das Manuskript wurde von C. Schneider geschrieben.

Kapitel 3

Hintemann, T., Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2005). Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Res zur Veröffentlichung eingereicht*.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden in Zusammenarbeit von C. Schneider und T. Hintemann konzipiert und gemeinschaftlich von T. Hintemann, C. Schneider, H. F. Schöler und R. J. Schneider geplant. Die Entwicklung des EE2 ELISA lag in der Verantwortung von C. Schneider, der E2 ELISA wurde von T. Hintemann entwickelt. Wasserproben wurden gemeinsam von C. Schneider und T. Hintemann genommen, Festphasenanreicherungen wurden von C. Schneider durchgeführt. E2 Messungen wurden von T. Hintemann durchgeführt, EE2 Messungen von C. Schneider. Die Auswertung der Daten wurde gemeinschaftlich von C. Schneider und T. Hintemann durchgeführt. Das Manuskript wurde von C. Schneider geschrieben.

Kapitel 4

Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2005). Direct sub ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence ELISA. *Anal Chim Acta* **551**(1-2): 92.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden von C. Schneider initiiert und gemeinschaftlich von C. Schneider, H. F. Schöler und R. J. Schneider geplant. Alle experimentellen Arbeiten, mit Ausnahme der Referenzmessungen, wurden von C. Schneider durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse lag in der Verantwortung von C. Schneider. Das Manuskript wurde von C. Schneider geschrieben.

Kapitel 1. Allgemeine Einleitung

1.1. Grundlagen

1.1.1. Endokrine Disruptoren in der aquatischen Umwelt

„Endokrine Disruption“, „hormonelle Störungen“, „Verweiblichung“ – Begriffe, die in den letzten Jahren für Aufregung in der Öffentlichkeit sorgten und deren Bedeutung für Mensch und Tier in Politik und Wissenschaft kontrovers diskutiert wird. Phrasen wie „Falschspieler im Hormonhaushalt“ oder „Medikamenten-Cocktail im Trinkwasser“ verunsichern den Laien (Stone 1994). Doch welche wissenschaftlichen Fakten stehen hinter den Schlagworten? Gemeint ist stets die Wirkung von Substanzen, die über die Interaktion mit dem endokrinen System Störungen reproduktionsbiologischer Funktionen verursachen können.

In Deutschland sind endokrine Disruptoren spätestens seit den 1970ern ein Thema der öffentlichen Diskussion. Am 18. Juni 1973 befasste sich sogar der Deutsche Bundestag mit dem Verbleib empfängnisverhütender Hormone in der Umwelt. Der Abgeordnete Burkhard Hirsch konfrontierte in jener Fragestunde den parlamentarischen Staatssekretär Heinz Westphal mit britischen Befunden zum Vorliegen endokriner Disruptoren im Trinkwasser. Westphal beschied Hirsch, die Bundesregierung sähe "vorerst keinen Anlass Erwägungen anzustellen" (Deutscher Bundestag 1973).

Drei Jahrzehnte später identifizierten Gutendorf und Westendorf über 50 Verbindungen endokriner Wirksamkeit (Gutendorf et al. 2001). Die Mehrheit der Stoffe entfaltete hierbei eine estrogenere Wirkung. Estradiol und seine Metabolite Estron und Estriol wurden bereits in Europa (Desbrow et al. 1998; Belfroid et al. 1999; Ternes et al. 1999; Sole et al. 2000), Nordamerika (Ternes et al. 1999) und Asien (Oh et al. 2000) in kommunalen wie in industriellen Abwässern nachgewiesen. Estradiol zeigt ein scheinbar ubiquitäres Vorkommen in anthropogen beeinflussten Gewässern. Der Wirkstoff der Anti-Baby-Pille Ethinylestradiol wird weniger häufig und in deutlich geringeren Konzentrationen als Estradiol und seine Metabolite gefunden. Die mittleren Konzentrationen von Ethinylestradiol im Abfluss von Kläranlagen in Deutschland, der Schweiz, England, Italien, Holland und in USA liegen durchschnittlich zwischen 0,5 und 3 ng/L, bzw. liegen unterhalb der Nachweisgrenze (Desbrow et al. 1998; Routledge et al. 1998; Belfroid et al. 1999; Spengler et al. 1999; Ternes et al. 1999; Baronti et al. 2000; Johnson et al. 2000; Kuch et al. 2000; Adler et al. 2001; Huang et al. 2001; Xiao et al. 2001; Aerni et al. 2004; Pawlowski et al. 2004a). Im Abfluss kanadischer Kläranlagen wurden mittlere Ethinylestradiol-Konzentrationen von 9 ng/L gemessen (Ternes et al. 1999). Abseits der Kläranlagen konnte Ethinylestradiol in Oberflächengewässern nur in wenigen Proben nachgewiesen werden. In einigen Untersuchungen wurden hierbei Werte von bis zu 4,3 ng/L erreicht (Stumpf et al. 1996; Belfroid et al. 1999; Adler et al. 2001), meist lagen die Konzentrationen aber unterhalb der Nachweisgrenze (Belfroid et al. 1999; Adler et al. 2001; Huang et al. 2001; Xiao et al. 2001). Obwohl die gemessenen Konzentrationen von Ethinylestradiol insgesamt sehr gering ausfallen, sind sie dennoch von Bedeutung für die aquatische Umwelt. Untersuchungen zum endokrinen Potential der verschiedenen Wirkstoffe

schreiben dem Kontrazeptivum Ethinylestradiol die höchste endokrine Wirksamkeit zu und geben die minimale Konzentration zur Induktion endokriner Effekte in Regenbogenforellen mit 0,1 ng/L an (Sumpter et al. 1994). Diese Konzentration liegt aber um den Faktor 1000 unter dem in den 90er Jahren viel diskutierten Trinkwassergrenzwert für mindertoxische Stoffe von 0,1 µg/L. Im Zusammenhang mit diesen geringen Wirkkonzentrationen wird Ethinylestradiol sogar mit toxischen Tributylzinnverbindungen verglichen (Tyler et al. 1998). Obgleich Ethinylestradiol in Oberflächengewässern biologisch abgebaut wird (Jürgens et al. 2002), ist es aufgrund des kontinuierlichen Eintrags durch Kläranlagenabläufe in jenen Gewässern als pseudopersistent anzusehen (Sumpter et al. 2005).

Der Eintrag in die Umwelt beruht weitestgehend auf der medizinischen Anwendung von Ethinylestradiol als Bestandteil der Anti-Baby-Pille. Ein denkbarer – illegaler – Einsatz des Steroids als Wachstumspromotor in der Viehzucht (Gleixner et al. 1997) erscheint im Vergleich zur weitverbreiteten Anwendung der Anti-Baby-Pille als Kontrazeptivum nicht relevant. Im Körper wird Ethinylestradiol analog zum natürlichen Sexualhormon Estradiol über Hydroxylierung, Oxidation, sowie die Bildung von Sulfaten und Glucuroniden metabolisiert. Details sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

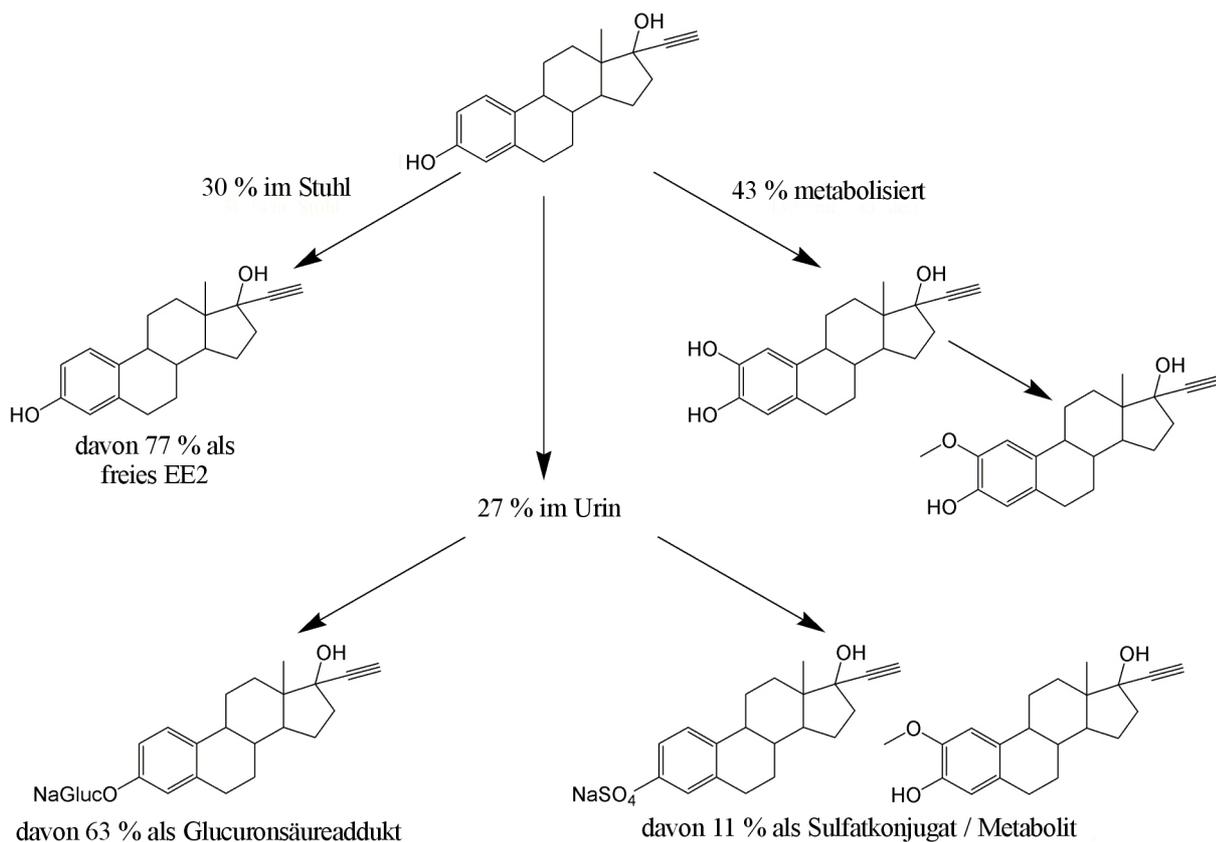


Abbildung 1.1: Metabolisierung von Ethinylestradiol.

Nach Johnson und Williams (2004) verbleiben nach Spaltung der Konjugate im Kanalsystem 40 % der ursprünglichen Tagesdosis als freier Wirkstoff im Abwasser erhalten. Basierend auf einer Tagesdosis von ca. 35 µg Ethinylestradiol und einem Anteil von 8,5 % der Bevölkerung (entsprechend 17 % der weiblichen Bevölkerung) der mit Hilfe der Anti-Baby-Pille verhütet,

führt dies zu einer Fracht von ca. 11 µg freies Ethinylestradiol pro Person und Tag. Hierbei ist bereits berücksichtigt, dass die Anti-Baby-Pille bei normaler Anwendung nur während drei Wochen des vierwöchigen Menstruationszyklus verwendet wird.

Demnach wird deutlich, dass Ethinylestradiol ausschließlich in Spurenkonzentrationen im Wasser auftreten kann und somit besondere Anforderungen an die zur Analytik verwendete Methodik gestellt werden.

Für Untersuchungen im Bereich unterhalb von 1 ng/L kommen bislang lediglich apparativ aufwendige massenspektrometrische Verfahren in Frage, wie beispielsweise GC-MS oder HPLC-MS. Für die routinemäßige Detektion des Ethinylestradiols sind diese auf Chromatographie und Massenspektrometrie basierenden Verfahren nicht geeignet, da sie mit vergleichsweise hohem Zeit- und Kostenaufwand verbunden sind (Aufwand mindestens ein Arbeitstag pro Probe, Kosten um die 200 Euro pro Probe) und zudem hohe Anforderungen an die Qualifikation des Operators stellen. Deutlich besser für Routineanwendungen eignen sich hingegen Immunoassays, die mit geringerem Zeit- und Kostenaufwand verbunden sind und geringere Anforderungen an die Qualifikation des Operators stellen. Desweiteren eröffnen Immunoassays die Möglichkeit zur direkten Messung unbehandelter Proben (d.h. Proben müssen nicht angereichert bzw. gereinigt werden) und Eliminieren somit eine Quelle potentieller Artefakte, wie sie im Bereich der konventionellen instrumentellen Analytik besteht.

1.1.2. Immunoassays

Immunoassays machen sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze. Für Immunoassays werden polyklonale oder monoklonale Antikörper in der Regel durch Immunisierung von Wirbeltieren mit einem Antigen gewonnen.

Polyklonale Antikörper werden von mehreren Populationen verschiedener Zellen eines mit einem Antigen immunisierten Tieres erzeugt. Sie stellen eine Mischung von Antikörpern dar, welche unterschiedliche Epitope (Bindungsstellen) eines Antigens erkennen.

Monoklonale Antikörper werden von einer Population identischer Plasmazellen (einem sogenannten Klon) synthetisiert. Sie sind also vollständig homogen und erkennen alle nur ein Epitop eines Antigens (Wild 2001).

Niedermolekulare Substanzen (wie z.B. Steroide) allein sind nicht antigen wirksam, d.h. sie lösen keine Immunreaktion, und damit auch keine Antikörperproduktion, aus. Erst durch die Kopplung an ein Makromolekül als Träger erlangen sie antigene Eigenschaften.

Den Grundstein für die Entwicklung von Immunoassays legte 1900 Paul Ehrlich mit seiner Seitenkettentheorie. Dabei wies er die Existenz von Zelloberflächenrezeptoren nach, die, einmal ins Blut abgegeben, Bakterientoxine neutralisieren können. 1907 führte Arrhenius erste Arbeiten zur quantitativen Immunchemie durch. Yalow und Berson entwickelten 1959 in den USA den ersten Radioimmunoassay, für den Rosalyn Yalow 1977 den Nobelpreis erhielt. 1960 entwickelte Ekins die Theorie der Bindungstests, die erstmalig quantitative Beschreibungen der Assays ermöglichte. Es folgte mit Einführung des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) durch Engvall und Perlmann 1971 der erste Test, der die radioaktive Detektion

durch eine photometrische Messung ersetzt (Arrhenius 1907; Landsteiner 1933; Yalow et al. 1959; Ekins 1960; Engvall et al. 1971).

Seither wurden zahlreiche weitere immunologische Testverfahren beschrieben und angewendet. Prinzipiell können alle Immunoassays nach folgenden Kriterien unterschieden werden:

- **Kompetitive bzw. nicht-kompetitive Assays**
Im kompetitiven System wird die Konkurrenzreaktion eines markierten Analyten (Tracer) mit dem Analyten der Probe um die in begrenzter Anzahl vorhandenen Antikörperbindungsstellen gemessen. Das Prinzip ähnelt hierbei einer Inhibierungsreaktion bezüglich der Bindungsstellen. Entsprechend zeigen zugehörige Kalibrationskurven eine negative Steigung und die Signalintensität ist damit invers proportional zur Analytkonzentration der Probe. Im nicht-kompetitiven System liegen Antikörperbindungsstellen im Überschuss vor, es werden unmittelbar die besetzten Bindungsstellen gemessen. Signalintensität und Analytkonzentration zeigen einen direkt proportionalen Zusammenhang, entsprechende Kalibrationskurven verlaufen mit positiver Steigung. Basierend auf den unterschiedlichen Mechanismen kompetitiver und nicht-kompetitiver Assays ergeben sich entsprechend unterschiedliche Optimierungsstrategien. Beispielsweise werden im kompetitiven System maximale Empfindlichkeiten mit möglichst hohen Antikörperverdünnungen erzielt, d.h. mit möglichst limitierter Anzahl von Bindungsstellen. Umgekehrt führt im nicht-kompetitiven System eine erhöhte Anzahl an Bindungsstellen zu verbesserter Empfindlichkeit.
- **Art der Markierung**
Immunoassays können auch anhand der Markierung des Analyten im Tracer unterschieden werden. Im Detail ist hierbei noch zwischen der Verwendung verschiedener Detektionsmethoden bei identischer Markierung zu unterscheiden. Isotopenmarkierte Derivate von Analyten waren historisch betrachtet die ersten Label. Besondere Bedeutung kommt hierbei ^3H , ^{14}C und ^{125}I zu. Die Verwendung radioaktiver Analytderivate hat den Vorteil, keine strukturellen oder elektronischen Veränderungen des Tracers, bezogen auf den eigentlichen Analyten, zu generieren, so dass abweichende Affinitäten von Tracer und Analyt ausgeschlossen werden können. Diese als Radioimmunoassays (RIA) bezeichneten Assays können allerdings nur in (Strahlen-) Kontrollbereichen angewendet werden und haben heute nur noch in Spezialfällen Bedeutung. Es überwiegt die Verwendung enzymatischer Label, insbesondere die direkte Konjugation des Analyten mit Meerrettichperoxidase oder mit alkalischer Phosphatase. Zur Detektion dieser Enzymlabel stehen chromogene, fluorogene und Chemilumineszenz-basierte Substratsysteme zu Verfügung. Besonders weite Verbreitung hat die Kombination von Meerrettichperoxidase und Tetramethylbenzidin-basierten chromogenen Substraten gefunden. Assaysysteme ohne Markierung des Analyten können auf Grundlage der Oberflächenplasmon-resonanzmethodik realisiert werden (Gillis et al. 2002; Wu et al. 2002), sie sind derzeit aber nur gering verbreitet.
- **Homogene bzw. heterogene Assays**
Die Unterscheidung homogener bzw. heterogener Assays bezieht sich auf die Phasen fest oder flüssig, in denen die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes stattfindet.

Homogene Assays finden dabei typischerweise vollständig in Lösung statt. Bei heterogenen Assays ist ein Reaktionspartner an einer Oberfläche immobilisiert, so dass die eigentliche Wechselwirkung in der fest-flüssig Grenzschicht stattfindet. Hierbei kann weiterhin unterschieden werden zwischen direkten und indirekten Verfahren, wobei entweder der Antikörper (direkt) oder das Antigen (indirekt) immobilisiert werden.¹

Der wesentliche Vorteil von Immunoassays liegt darin, dass sie schnell und leicht anwendbar sowie kostengünstig sind, und mit ihnen im Gegensatz zur konventionellen Analytik große Probenmengen in kürzester Zeit untersucht und ausgewertet werden können. Eine aufwendige Vorbereitung der Proben entfällt zumeist, und es ist nur ein geringes Probenvolumen nötig. Außerdem lassen sich Immunoassays teilweise zur "Vor-Ort-Analytik" einsetzen, so dass ein aufwendiger Transport von Proben entfällt. Des Weiteren sind diese Testverfahren leicht automatisierbar. Kommerzielle Bedeutung haben Immunoassays im Bereich der medizinischen Diagnostik, speziell in der klinischen Chemie und der Immunologie erlangt. Automatisierte Assays ermöglichen hier eine ökonomische Bestimmung verschiedener Parameter in kürzester Zeit. Ein Vorteil, der mit instrumentellen Methoden nicht erreicht werden kann. Ein weiterer Vorteil ist das einfache Messprinzip der Immunoassays. Für die Durchführung von Enzym-Immunoassays sind nur wenige, kaum störanfällige Geräte notwendig. Die verwendeten Reagenzien sind zudem meist nicht toxisch und stellen keine Umweltgefahr dar.

¹ Vereinzelt wird auch die Bezeichnung homologer bzw. heterologer Assay verwendet. Dies dient der Beschreibung strukturell gleich- oder verschiedenartiger Tracer, bezogen auf die chemische Struktur, des zur Gewinnung der Antikörper verwendeten Immunogens. Relevant kann diese Differenzierung bei Beschreibung der Selektivitäten des Antikörpers werden, beispielsweise wenn eine ausgeprägte Bindung des Antikörpers an Synthesestufen des Tracers auftritt, vgl. Tabelle 1.14.

1.2. Methodenentwicklung

1.2.1. Enzymimmunoassays

1.2.1.1. Assayformate

In der vorliegenden Arbeit werden vier Immunoassays entwickelt. Es handelt sich bei allen Assays um kompetitive, heterogene (direkte) Enzymimmunoassays (ELISA), die unter nicht-Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden. Unterschiede bestehen in der Art der Markierung, direktes Enzymkonjugat im Vergleich zu einem biotinylierten Derivat des Ethinylestradiol (bzw. Estradiol im Fall des Modellsystems), sowie in der Art des verwendeten Substratsystems. Hier erfolgt ein Vergleich von chromogener Detektion des Labels und Chemilumineszenzmessung.

Zur Unterscheidung der Assays werden die folgenden Bezeichnungen verwendet:

Bio-LC E2 ELISA:	Modellsystem basierend auf einem Estradiol-Antikörper, biotinyliertes Estradiol als Marker, chromogene Detektion.
Bio-LC EE2 ELISA:	biotinyliertes Ethinylestradiol als Marker, chromogene Detektion, detailliert beschrieben in Kapitel 2.
EE2 ELISA:	direktes Enzymkonjugat ² als Marker, chromogene Detektion, detailliert beschrieben in Kapitel 3.
EE2 CLEIA:	direktes Enzymkonjugat als Marker, Chemilumineszenzmessung, detailliert beschrieben in Kapitel 4.

Abbildung 1.2 zeigt das zur Derivatisierung des Ethinylestradiol verwendete Biotin. Biotin wurde erstmals 1936 im Rahmen der Vitaminforschung gemeinsam mit dem Glycoprotein Avidin aus Hühnereiweiß isoliert (Kögl et al. 1936).

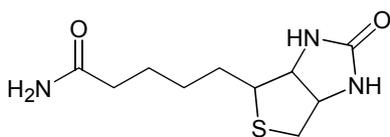


Abbildung 1.2: Biotin.

Die Wechselwirkung des Proteins Avidin mit seinem Liganden Biotin stellt die stärkste bekannte nichtkovalente Bindung mit einer Dissoziationskonstante in der Größenordnung von 10^{-15} M dar. Selbst die sehr starke Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und seinem zugehörigen Antigen mit einer typischen Dissoziationskonstante von ca. 10^{-9} M wird noch deutlich übertroffen. 1963 wurde ein zweites Bindungsprotein von Biotin aus dem Bakterium

² Die Bezeichnung direktes Enzymkonjugat beschreibt die Bindung des Ethinylestradiols an die Peroxidase. Im Unterschied zum Bio-LC EE2 Assay wurde das Ethinylestradiol hier direkt mittels Amidkopplung an das Enzym gebunden.

Streptomyces avidinii isoliert, das Streptavidin (Bayer et al. 1990). Streptavidin zeigt analog zu Avidin eine Dissoziationskonstante von 10^{-15} M, weist aber Unterschiede in der Proteinstruktur auf. Insbesondere liegen im Streptavidin, anders als im Avidin, keine Zuckerseitenketten vor. Basierend auf der hohen Biotin-Avidin-, bzw. Biotin-Streptavidin-Affinität wurde eine Vielzahl neuer biochemischer Techniken entwickelt. Erste Anwendungen im Bereich der Immunoassays gehen hierbei auf Arbeiten von Avrameas zurück (1979). Häufig ersetzen Biotinsysteme in diesen Assays die konventionellen Enzymkonjugate. Das heißt, die Rolle des Enzymtracers wird von einem biotinylierten Derivat des Analyten übernommen, der mit dem eigentlichen Analyten um die Antikörperbindungsplätze konkurriert. Das zur Signalgenerierung notwendige Enzym wird in einem zusätzlichen Schritt mittels Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen an das Derivat gebunden (vgl. Abbildung 1.3). In Abbildung 1.3 und Abbildung 1.4 sind Unterschiede im Ablauf des Bio-LC EE2 ELISA im Vergleich zu EE2 ELISA und CLEIA verdeutlicht³.

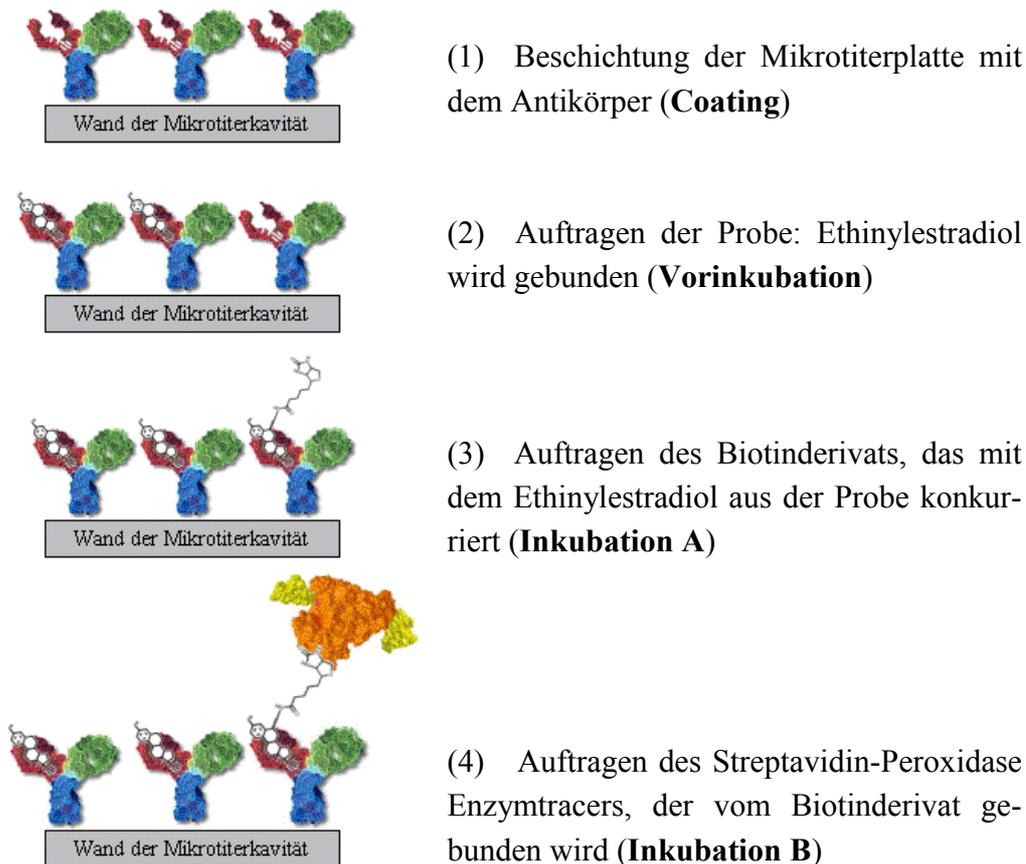


Abbildung 1.3: Messablauf im Bio-LC EE2 ELISA. In Schritt drei ersetzt das Biotinderivat des Analyten den Enzymtracer. In Folge zu Schritt vier erfolgt die Zugabe des Substrates und die photometrische Messung. Überschüssige Reagenzien werden jeweils nach den Schritten eins, drei und vier entfernt.

³ Das Protokoll des Bio-LC E2 Modelassays ähnelt wesentlich dem Bio-LC EE2 ELISA und ist nicht gesondert dargestellt.

Im Vergleich zu konventionellen ELISAs zeigen Biotinsysteme verschiedene Vorteile. Eine Inhibierung des Enzymtracers durch Enzym-schädigende Bestandteile der Proben wird ausgeschlossen, da Proben ausschließlich mit dem Biotinderivat und nicht mit dem Enzym in Kontakt kommen. Biotinsysteme eröffnen die Möglichkeit zur Signalamplifikation, d.h. durch Wahl geeigneter Streptavidin-Konjugate können mehrere Enzyme an ein Derivat des Analyten gebunden werden (Grumbach et al. 1995).

Im System des EE2 ELISA bzw. CLEIA (vgl. Abbildung 1.4) wird direkt ein Enzymkonjugat als Tracer verwendet. Nach Zugabe der zu analysierenden Substanz und des Enzymtracers konkurrieren beide Stoffe um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift zum Entfernen ungebundener Substanzen und anschließender Zugabe des Substrats wird dieses vom Enzymtracer oxidiert. In Abhängigkeit des verwendeten Substratsystems kommt es in der ELISA-Variante zur Entwicklung eines Farbstoffes, der photometrisch bestimmt werden kann. Als Messgröße dient die dimensionslose optische Dichte (OD) vgl. Gleichung 1.1.

$$OD = \log \frac{I_0}{I}$$

Gleichung 1.1: Definition der optischen Dichte OD. Der Quotient I_0 zu I beschreibt das Verhältnis der ein- zur austretenden Lichtintensität

Im Unterschied zur Absorption wird bei Bestimmung der optischen Dichte nur eine relative Messung der Schwächung des Lichtstrahls durchgeführt. Absorptionskoeffizienten, molare Konzentrationen, sowie die durchstrahlte Schichtdicke werden nicht berücksichtigt. Häufig findet auch der Begriff Extinktion Verwendung als Synonym für die Beschreibung der optischen Dichte.

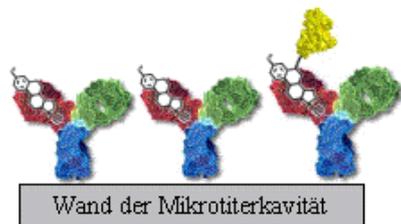
Im Falle des CLEIA kommt es zu einer Chemilumineszenzreaktion, deren Lichtintensität gleichfalls photometrisch gemessen wird.



(1) Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem Antikörper (**Coating**)



(2) Auftragen der Probe: Ethinylestradiol wird gebunden (**Vorinkubation**)



(3) Auftragen des Enzymtracers, der mit dem Ethinylestradiol aus der Probe konkurriert (**Inkubation**)

Abbildung 1.4: Messablauf im EE2 ELISA und EE2 CLEIA. In Folge zu Schritt drei erfolgt die Zugabe des Substrates und die Messung. Überschüssige Reagenzien werden jeweils nach Schritt eins und Schritt drei entfernt.

Der verwendete Enzymtracer besteht aus einem Konjugat von Ethinylestradiol mit Meerrettichperoxidase, als Substrat kommen Tetramethylbenzidin bzw. Luminol zum Einsatz.

1.2.1.2. Auswertung

Unabhängig vom verwendeten Assayformat bilden die Kalibratoren einer ELISA-Messung eine sigmoidale Kalibrationskurve⁴. Im Fall einer photometrischen Messung erhält man als Messwert die optische Dichte (OD). Chemilumineszenzmessungen führen zu einer relativen Lichtintensität (RLU) in Abhängigkeit von der Analytkonzentration. Eine exemplarische Kalibrationskurve ist in Abbildung 1.5 gezeigt.

⁴ In kommerziellen ELISA-Kits wird häufig eine lineare Kalibrierfunktion beschrieben. Dies ist meist durch eine ungenügende Anzahl von Kalibratoren bedingt, die lediglich den pseudolinearen mittleren Abschnitt der sigmoidalen Kurve widerspiegeln. Vereinzelt wird auch die Anwendung von Linearisierungsmethoden, wie z.B. der logit/log Transformation, empfohlen. Derartige Auswertungen sind aus verschiedenen Gründen fragwürdig, und werden in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

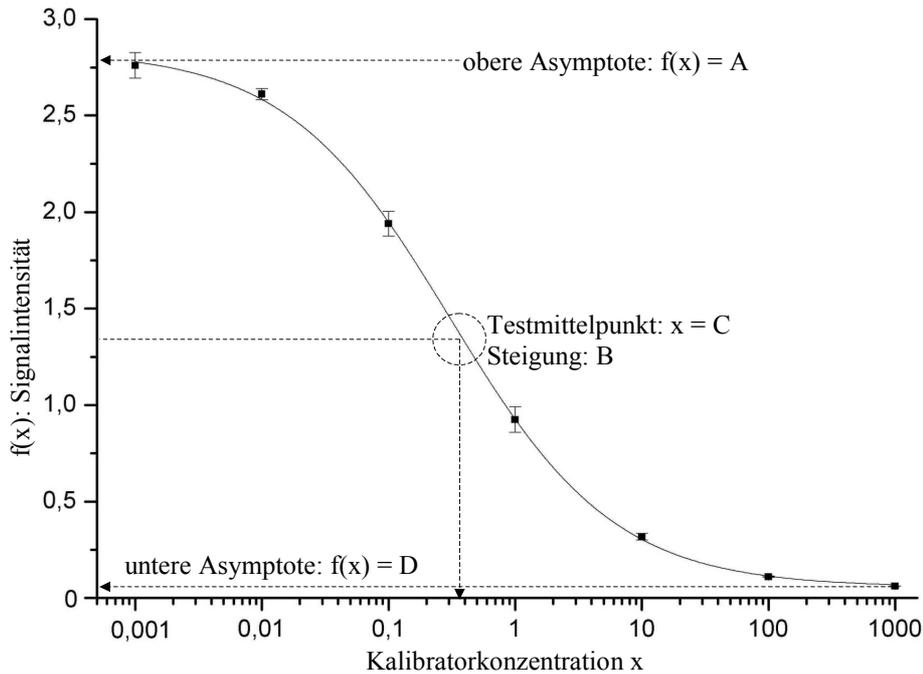


Abbildung 1.5: Kalibrationskurve für einen kompetitiven ELISA bei photometrischer Messung.

Die Anpassung der Kalibrationskurve an die Messwerte erfolgt über die sogenannte 4-Parameter-Funktion nach Rodbard (Dudley et al. 1985) (Gleichung 1.2).

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

A – obere Asymptote
 B – Steigung im Testmittelpunkt
 C – Testmittelpunkt
 D – untere Asymptote

Gleichung 1.2: 4-Parameter-Funktion.

Im einzelnen kommen den Parametern verschiedene physikalische Bedeutungen zu. Parameter A beschreibt als obere Asymptote den Messwert bei infinitesimal kleiner Kalibratorkonzentration. Parameter B beschreibt den Steigungswert der Funktion im Testmittelpunkt der Kurve, physikalisch steht der Parameter B in Zusammenhang mit den beteiligten Antikörperpopulationen. Im Falle monoklonaler Antiseren wird üblicherweise ein B-Wert von 1 erzielt, synthetische Mischungen monoklonaler Seren sowie polyklonale Seren zeigen hiervon abweichende B-Werte. Als Verallgemeinerung der 4-Parameter-Funktion kann Gleichung 1.3 zur Beschreibung mehrerer Antikörperpopulationen aufgestellt werden.

$$f^{mix}(x) = \sum_1^n x_n \cdot f_{a^n}$$

Gleichung 1.3: 4-Parameter-Funktion für Mischungen individueller Antikörperpopulationen. f^{mix} ist die Linearkombination der einzelnen Kalibrationskurven, n beschreibt die Anzahl der Populationen, x_n ist der Anteil der einzelnen Population am Gesamtserum, f_{a^n} entspricht Gleichung 1.2 für die einzelnen Populationen.

Eine detaillierte Diskussion zu Parameter B findet sich auch bei Schütz et al (1999). Der Testmittelpunkt selbst wird durch Parameter C beschrieben, der Wert entspricht einer Konzentra-

tionsangabe auf der Abszisse. Parameter C kann als Maß für die Sensitivität eines Assays verwendet werden. Für den Sonderfall, dass Parameter D gegen Null strebt, nähert sich Parameter C dem häufig in biologischen Inhibierungsassays verwendeten EC50-Wert an. Parameter D beschreibt in Analogie zu Parameter A als untere Asymptote das Verhalten bei maximaler Kalibratorkonzentration.

Es ist zu beachten, dass im Falle nicht-kompetitiver Assays Parameter A und D vertauscht sind, d.h. A beschreibt dann die untere Asymptote, D entsprechend die obere.

Die drei hier vorgestellten ELISAs für Ethinylestradiol unterscheiden sich jeweils im verwendeten Substratsystem (Tetramethylbenzidin oder Luminol) wie auch im verwendeten Tracer (direktes Enzymkonjugat oder biotinyliertes Analytderivat). Zur besseren Vergleichbarkeit werden die zugehörigen Kalibrationskurven daher normiert:

$$Y_N = \frac{Y}{A} * 100$$

Gleichung 1.4: Normierungsfunktion. Y_N ist die normierte optische Dichte bzw. die normierte relative Lichtintensität, Y ist die gemessene optische Dichte bzw. die gemessene relative Lichtintensität, A ist der Parameter zur Beschreibung der oberen Asymptote aus Gleichung 1.2.

Diese Art der Normierung zwingt die Kalibrationskurven zu konvergentem Verhalten im Bereich minimaler Kalibratorkonzentration, beeinflusst jedoch nicht das Kurvenverhalten im Bereich höherer Konzentrationen. Dies ermöglicht einen Vergleich der nicht-spezifischen Bindung in den unterschiedlichen Assays. Unter nicht-spezifischer Bindung versteht man die Adsorption des Tracers an das Material der Mikrotiterkavität, meist Polystyrol. Diese Wechselwirkung führt zu einer Art "Sockel" der Kurve bei hohen Kalibratorkonzentrationen und verengt den Messbereich. Im Vergleich zu anderen Normierungen, beispielsweise der sogenannten B/B₀-Methode (basierend auf einzelnen Blankmesswerten), ist das hier verwendete Verfahren weniger anfällig für Messfehler, da zur Bestimmung von Parameter A die Gesamtheit der Kalibratormesswerte verwendet wird.

1.2.1.3. Selektivität

Die Selektivität eines Immunoassays ist ein entscheidendes Kriterium für dessen Anwendbarkeit. Das pauschale Argument, Immunoassays würden tendenziell zu falsch positiven Ergebnissen führen, kann an Hand einer Diskussion der Selektivität des betreffenden Assays differenzierter betrachtet und meist entkräftet werden.

Im Zusammenhang der Selektivität eines Immunoassays ist zu unterscheiden zwischen "shared reactivity" und eigentlicher "cross reactivity" (Berzofsky et al. 1981). "shared reactivity" beschreibt das Phänomen, dass unterschiedliche Antikörperpopulationen eines polyklonalen Serums verschiedene Affinitäten bezüglich eines Analyten haben. Unter eigentlicher "cross reactivity" versteht man die Querempfindlichkeit (Kreuzreaktivität) eines Antikörpers für verschiedene Analyten. Schechter und Berzofskys Unterscheidung dieser beiden Mechanismen ist besonders im Vergleich von mono- und polyklonalen Seren von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit ist mit Kreuzreaktivität stets die mittlere Querempfindlichkeit

des Assays gemeint⁵. Zur Berechnung der molaren Querempfindlichkeit wird das Verfahren von Abraham verwendet (1969). Hierbei wird der Quotient der C-Werte (mol/L) der Referenzsubstanz und der zu testenden Substanz gebildet. Dieser Quotient beschreibt die prozentuale Querempfindlichkeit bezogen auf die Referenz (vgl. Gleichung 1.5).

$$CR = \frac{C_{\text{Referenz}}}{C_{\text{Test}}} * 100 \%$$

Gleichung 1.5: Berechnung der Kreuzreaktivität CR. C_{Referenz} ist die EE2 Konzentration im Testmittelpunkt, C_{Test} ist die Konzentration der kreuzreagierenden Testsubstanz im zugehörigen Testmittelpunkt.

Über die eigentliche Kreuzreaktivität der Antikörper hinaus ist das Verhalten des Assays gegenüber Matrixbestandteilen einer Realprobe bedeutsam für die Selektivität. Unter Matrixbestandteilen versteht man eine Vielzahl verschiedener Stoffklassen. Bezogen auf die meist sehr geringen Analytkonzentrationen einer Realprobe liegt diese Matrix stets im Überschuss vor. Abhängig von Zusammensetzung und Konzentration der Matrixbestandteile kann es zu Beeinträchtigungen des Assays kommen. Es ist bekannt, dass die Bindung des Antikörpers an Huminstoffe zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (Ruppert et al. 1992). Typische, besonders häufig in Wasserproben vorliegende Huminstoffe sind makromolekulare Verbindungen wie die Humin- und Fulvinsäuren. Denkbar ist auch, dass es zu einer teilweisen Erkennung gebundener Rückstände kommt. In Analogie zur Bindung eines Antikörpers an Rückstände von gebundenen Pestiziden (Jahn et al. 1999) könnte dieser Effekt eventuell auch bei Hormonen auftreten.⁶

Untersuchungen zu Selektivitätseinbußen aufgrund von Matrixeffekten werden in dieser Arbeit mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Huminstoffen durchgeführt. Hierbei wird anhand von Kalibratoren, die in einer Verdünnungsreihe der Huminstoffe gemessen werden, der Einfluss auf die Kalibrationskurve charakterisiert. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die hier verwendete Huminsäure zwar Ähnlichkeit mit Huminstoffen aus Realproben hat, mit diesen jedoch nicht identisch ist.

1.2.1.4. Sensitivität

Zentrale Anforderung an die hier vorgestellte Assayentwicklung ist die Ermöglichung besonderer Messempfindlichkeit im Konzentrationsbereich unterhalb von 1 ng/L. Von besonderer Bedeutung ist daher eine Auseinandersetzung mit den der Sensitivität zu Grunde liegenden Mechanismen. Im folgenden Abschnitt werden insbesondere die Kinetik des Systems, Prinzipien der Optimierung, sowie typische Kenndaten zur Beschreibung der Sensitivität betrachtet. Abschließend werden einzelne abweichende Verfahren diskutiert und ihre Schwächen aufge-

⁵ In einem chromatophischen Analyseverfahren entspräche diese Kreuzreaktivität der Peaküberlappung zweier Analyten.

⁶ Gebundene Rückstände könnten im Rahmen der Abwasserreinigung prinzipiell durch die Adsorption von Hormonen an Belebtschlammflocken gebildet werden.

zeigt. Die hier dargelegten Gleichungen und Rechnungen basieren auf Literaturangaben (Zettner 1973; Zettner et al. 1974) und nur in Ausnahmefällen auf eigenen Experimenten. Es erscheint allerdings sinnvoll, mit Betrachtungen zur Thermodynamik der Antikörper-Antigen Wechselwirkung zu beginnen, um einen tieferen Einblick in die Thematik optimierter Immunoassays zu gewinnen.

1.2.1.4.1 Das Massenwirkungsgesetz im ELISA

Die nachfolgenden Betrachtungen beruhen auf der vereinfachenden Annahme einer Formal-Kinetik des Immunoassays. Das heißt, dass eventuelle Grenzflächeneffekte an der Phasengrenze fest-flüssig vernachlässigt werden. Folglich sind alle aufgeführten Gleichgewichtskonstanten und kinetischen Konstanten lediglich formale Konstanten. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass alle Reaktionen einer Kinetik 1. Ordnung folgen. Als dritte Randbedingung wird angenommen, dass die Antikörper ein monovalentes Bindungsverhalten zeigen. Diese Annahmen finden sich auch häufig in Standardwerken zu Immunoassays und ermöglichen eine vereinfachte Berechnung der ELISA Kinetik (Wild 2001). Abbildung 1.6 und Gleichung 1.6 zeigen die wichtigsten Reaktionsgleichungen und die zugehörigen Formal-Konstanten.

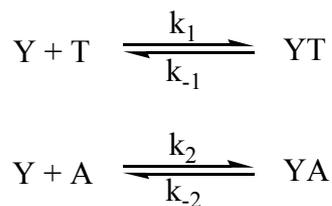


Abbildung 1.6: ELISA-Reaktionsgleichungen. Y steht für den Antikörper, T für den Tracer und A für den Analyten. YT und YA sind die jeweiligen Antikörper-Tracer bzw. Antikörper-Analyt Komplexe.

$$K_T = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[YT]}{[Y][T]}$$

$$K_A = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[YA]}{[Y][A]}$$

Gleichung 1.6: Formal-Konstanten der ELISA-Reaktion. K_T und K_A sind die Gleichgewichtskonstanten bezogen auf den Tracer T und den Analyten A. k_1 ist die Assoziationskonstante des Tracers, k_2 entsprechend die Assoziationskonstante des Analyten. k_{-1} und k_{-2} sind die entsprechenden Dissoziationskonstanten.

Die Gleichgewichtskonstanten K_T und K_A werden unterschieden, da sich die Assoziationskonstanten von Tracer und Analyt, sowie die zugehörigen Dissoziationskonstanten jeweils unterscheiden. Identität von K_T und K_A könnte nur im Falle identischer Liganden vorliegen, dies ließe sich jedoch allenfalls in einem Label-freien Assay realisieren, beispielsweise mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzmethode. Die beiden Gleichgewichtskonstanten beschreiben das für alle Immunoassays entscheidende Kriterium von gebundenem zu freiem Antikörper und Analyt (bzw. Tracer). Häufig findet man in der Literatur auch den Begriff "Affinitätskonstante" zur Beschreibung dieser Gleichgewichtskonstante. Hohe

Affinitätskonstanten bilden die Grundlage für Immunoassays von maximaler Sensitivität. Typische Affinitätskonstanten für Immunoassays liegen in der Größenordnung von 10^{-9} M. Leider ist die theoretisch bedeutsame Affinitätskonstante praktisch schwierig zu bestimmen. Dies trifft insbesondere auf polyklonale Seren zu, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden. Obgleich heute neben klassischen Bindungstests auch die erwähnten SPR-Techniken verfügbar sind, können keine eindeutigen Affinitätskonstanten polyklonaler Seren bestimmt werden. Die Ursache ist in der heterogenen Zusammensetzung dieser Seren zu sehen, da Antikörperpopulationen hoher Affinität neben Populationen mittlerer oder geringer Affinität vorliegen. Dies führt zu einer mittleren Affinität, welche allerdings nur bedingt die Situation unter Testbedingungen beschreibt. Exemplarisch ist dies in der nachfolgenden Scatchard-Auswertung ersichtlich (Ezan et al. 1991). Gleichung 1.7 zeigt die Herleitung des Scatchard-Plots, Abbildung 1.7 verdeutlicht die Situation heterogener Affinitäten.

$$K = \frac{[YA]}{[Y][A]} \quad \text{und} \quad [YA] = x$$

$$K = \frac{x}{([A]_0 - x)([Y]_0 - x)} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{x}{[A]_0 - x} = K[Y]_0 - Kx$$

bzw.

$$\frac{\text{Analyt}^{\text{gebunden}}}{\text{Analyt}^{\text{frei}}} = -K \cdot \text{Analyt}^{\text{gebunden}} + K[Y]_0$$

Gleichung 1.7: Herleitung des Scatchard-Plots aus dem Massenwirkungsgesetz. X ist die Reaktionslaufzahl, A_0 und Y_0 sind die Anfangskonzentrationen von Analyt und Antikörper.

Bei einer Auftragung des Quotienten $\text{Analyt}^{\text{gebunden}} / \text{Analyt}^{\text{frei}}$ gegen $\text{Analyt}^{\text{gebunden}}$ erhält man theoretisch die Gerade der Steigung $-K$ mit dem Abszissenabschnitt $K[Y]_0$. Im Falle polyklonaler Seren treten hier jedoch gekrümmte Kurven auf, die sich aus den überlagerten Scatchard-Plots der individuellen Antikörperpopulationen ergeben.

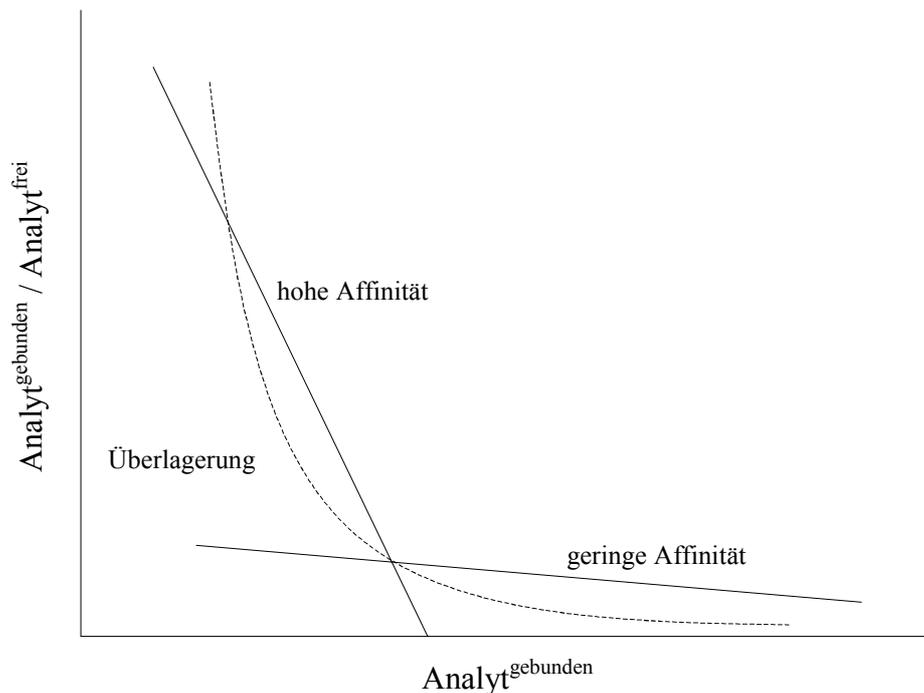


Abbildung 1.7: Vereinfachter Scatchard-Plot eines polyklonalen Serums.

Die zur Berechnung des Scatchard-Plots verwendete Umformung des Massenwirkungsgesetzes impliziert bereits die Strategie zur Sensitivitätsoptimierung kompetitiver Immunoassays. Entscheidend für den Quotienten gebundener zu freier Analyt sind die Faktoren Affinitätskonstante K und Antikörperkonzentration Y_0 .

Maximale Sensitivität wird im Falle eines möglichst kleinen Quotienten erzielt. Anschaulich entspricht dies einer Gleichgewichtslage, die bereits auf minimale Änderungen der Analytkonzentration reagiert. Gleichung 1.7 verdeutlicht, dass die Gleichgewichtslage durch die Affinitätskonstante und die Antikörperkonzentration gesteuert werden kann. Während die Affinitätskonstante eine integrale Eigenschaft des Antikörpers ist, kann die Konzentration variiert und die Sensitivität optimiert werden. Eine sehr umfassende Diskussion des Zusammenhangs von Kinetik und Sensitivität findet sich bei Ekins, hier wird auch umfassend auf den Effekt der Affinitätslimitierung eingegangen (1989; 1990).

1.2.1.4.2 Affinitätslimitierung

Mit dem Begriff Affinitätslimitierung wird die Beobachtung beschrieben, dass die Verbesserung der Assaysensitivität mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers durch die Bindungsstärke des Antikörpers selbst begrenzt ist, das heißt unterhalb einer bestimmten Grenzkonzentration führt zusätzliches Verdünnen des Antiserums zu keiner weiteren Verbesserung der Sensitivität. In Analogie zur Reduktion der Antikörperkonzentration führt auch die Verdünnung des Tracers über den gleichen Effekt zu einer Grenzkonzentration, unterhalb derer keine zusätzliche Verbesserung der Sensitivität mehr möglich ist. In Abbildung 1.8 ist

das Verhalten der Sensitivität als Funktion der Tracer- und Antikörperkonzentration dargestellt.

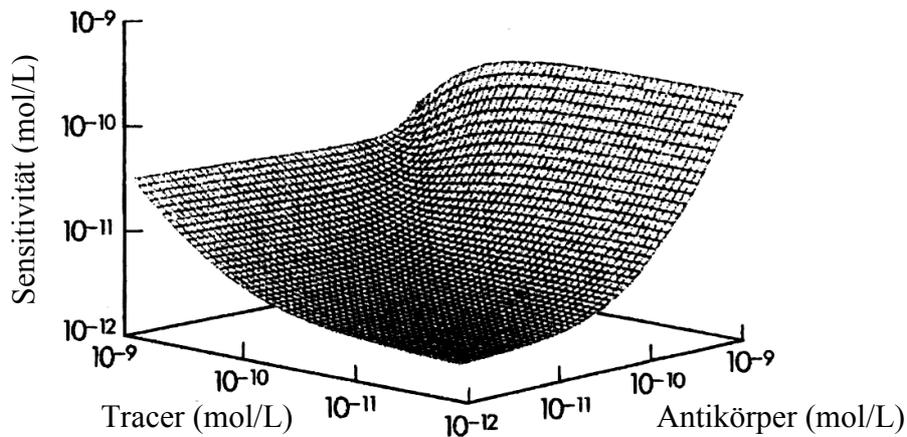


Abbildung 1.8: Affinitätslimitierung der Assaysensitivität. Die maximale Sensitivität wird ab einer Konzentration des Tracers und Antikörpers von ca. 10^{-11} mol/L erzielt.⁷

Im Zusammenhang mit der Affinitätslimitierung ist ein kurzer Exkurs zu unterschiedlichen Detektionsmethoden und Labelsystemen angebracht. Teilweise finden sich in der Literatur und in den Applikationen kommerzieller Assayanbieter Angaben zu Substraten, die die Sensitivität des beschriebenen Immunoassays verbessern würden. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Art und Weise der Signalgenerierung keinen Einfluss auf die Sensitivität des Assays haben kann. Lediglich unter der Bedingung, dass aufgrund zu geringer Signalintensität der affinitätslimitierte Bereich nicht erreicht werden kann, ist eine weitere Optimierung der Assaysensitivität durch Wechsel zu einem Label höherer Detektierbarkeit möglich.

Obgleich die Modelle und theoretischen Grundlagen zur Thermodynamik der Reaktionen zwischen Antikörper und Analyt, bzw. Antikörper und Tracer sich in Bezug auf Assaybedingungen und Verdünnung der einzelnen Assaykomponenten als hilfreich erwiesen haben, sind sie doch abhängig von stark vereinfachten Annahmen hinsichtlich der Assaykinetik. Neben den beschriebenen Randbedingungen werden mögliche Konkurrenzreaktionen zur Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ignoriert. Ein typisches Beispiel dieser parallel ablaufenden Prozesse ist das Phänomen nicht-spezifischer Bindung des Tracers an die Oberfläche der Reaktionsgefäße.

Die eigentliche Optimierung des Immunoassays muss daher experimentell durchgeführt werden. Die Kenntnis der Modelle erleichtert hierbei wesentlich die Festlegung der optimalen Reaktionsbedingungen. Eine Optimierung der Assaysensitivität mittels des Konzeptes der

⁷ Bildnachweis: The Immunoassay Handbook, Nature Publishing Group, New York 2001, Seite 23.

Affinitätslimitierung ermöglicht es auch ohne Kenntnis von Affinitätskonstanten und absoluter Konzentrationen, eine maximale Sensitivität zu erzielen.

1.2.1.4.3 Kenndaten

Zur Beschreibung der Immunoassaysensitivität haben sich verschiedene Konzepte unterschiedlicher Eignung und Güte etabliert. Ein unmittelbar vom Immunoassay abgeleitetes Kriterium ist der Testmittelpunkt des Assays, beschrieben als Parameter C aus Gleichung 1.2. Parameter C basiert auf der Gesamtheit aller Kalibrationsmesswerte und beschreibt sehr gut die Lage der Kalibrationskurve auf der Konzentrationsachse. Dies ermöglicht dem erfahrenen Anwender eine direkte Bewertung des dargestellten Assays. Eine andere Definition von Sensitivität beruht auf der Angabe des Signal-Rausch-Verhältnisses. Diese Beschreibung der Nachweisgrenze leitet sich ab von Kaisers spektrochemischen Arbeiten aus den 1960ern (Kaiser 1966) und hatte ursprünglich keinen Bezug zu sigmoiden Kalibrationskurven. In neueren Arbeiten zur Definition von Nachweisgrenzen, sowie im offiziellen Kompendium der IUPAC zur analytischen Nomenklatur, wird dieses Verfahren deutlich kritisiert⁸ (IUPAC 1998; Currie 1999). Obgleich umstritten, hat diese Methode dennoch, als Bestandteil einer DIN-Methode (DIN V 38415-2, 1995), Eingang in die Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren gefunden und ist als Quasi-Standard für Kenndaten zur Sensitivität etabliert. In der vorliegenden Arbeit werden entsprechend obiger DIN-Richtlinie die Nachweisgrenze (LOD) als dreifacher Signal-Rauschabstand und die Bestimmungsgrenze (LOQ) als zehnfacher Signal-Rauschabstand berechnet.

Bedeutsamer als die Definition von Sensitivität mit Hilfe eines simplen Sicherheitsabstandes zwischen tatsächlichem Signal und Hintergrundrauschen sind Kenntnisse zur Fehlerbehaftung der einzelnen Konzentrationsmessungen. Im Unterschied zu linearen Kalibrationskurven, wie sie meist in chromatographischen Analyseverfahren vorliegen, kann allerdings an einer gekrümmten Kalibrationskurve der normalverteilte Fehler des Signals nicht unmittelbar in einen Fehler der Konzentration übertragen werden. Die Transformation der Messwerte durch die 4-Parameterfunktion in Konzentrationswerte bedingt eine heteroskedastische⁹ Fehlerverteilung der Konzentrationswerte, d.h. es liegt eine "schiefe" Verteilung der Fehler vor. Ausgehend von vergleichbaren Fehlerbetrachtungen hat Ekins seine Arbeiten zur Sensitivität von Immunoassays im Allgemeinen und zur Berechnung von Präzisionsprofilen im Speziellen entwickelt (1981).

⁸ " L_D [L_D bezeichnet hier die Nachweisgrenze] is not defined, however, simply as a fixed coefficient (2, 3, etc.) times the standard deviation of a pure solution background. To do so can be extremely misleading." Zitiert nach Currie et al. 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Anal Chim Acta* **391**: 105.

⁹ Statistisch korrekt beschreibt Heteroskedastizität das Auftreten einer heterogenen Varianzverteilung; d.h. die Streuungen der Varianzen mehrerer Stichproben um den jeweiligen Gruppenmittelwert ist verschiedenen Grundgesamtheiten zugehörig.

Für den Fehler in der Konzentration gilt, dass er proportional der Standardabweichung der Signalmessung ist und von der Steigung der Kalibrationskurve abhängt (vgl. Gleichung 1.8). Der Zusammenhang zur Kalibrationskurve bedingt die Transformation des Vertrauensbereiches.

$$\Delta c \sim s \quad \text{und} \quad \Delta c \sim \frac{dY}{dc_{EE2}}$$

Gleichung 1.8: Proportionalität des Fehlers der Konzentration (Δc) und der Standardabweichung des Signalwertes (s). Hierbei kann s auch dargestellt werden als erste Ableitung der Kalibrationskurve.

Für die 4-Parametergleichung (Gleichung 1.2) ergibt sich die erste Ableitung zu:

$$\frac{dY}{dc_{EE2}} = \frac{B(D-A)}{C} \cdot \left(\frac{C}{c_{EE2}}\right)^{1-B} \cdot \left(1 + \left(\frac{c_{EE2}}{C}\right)^B\right)^{-2}$$

Gleichung 1.9: 1. Ableitung zu Gleichung 1.2, c_{EE2} entspricht hierbei x .

Der relative Fehler der bestimmten Konzentration, dessen Verlauf über die Konzentrationsachse als Präzisionsprofil bezeichnet wird, ergibt sich dann durch die Berechnung der Stützpunkte nach Gleichung 1.10.

$$\Delta c = \frac{s}{c_{EE2} \cdot dY / dc_{EE2}} \cdot 100\%$$

Gleichung 1.10: Berechnung des Präzisionsprofils nach Ekins et al. (1981).

In Abbildung 1.9 sind exemplarisch die relative Standardabweichung s (in Prozent) und das Präzisionsprofil einer typischen Kalibrationskurve dargestellt.

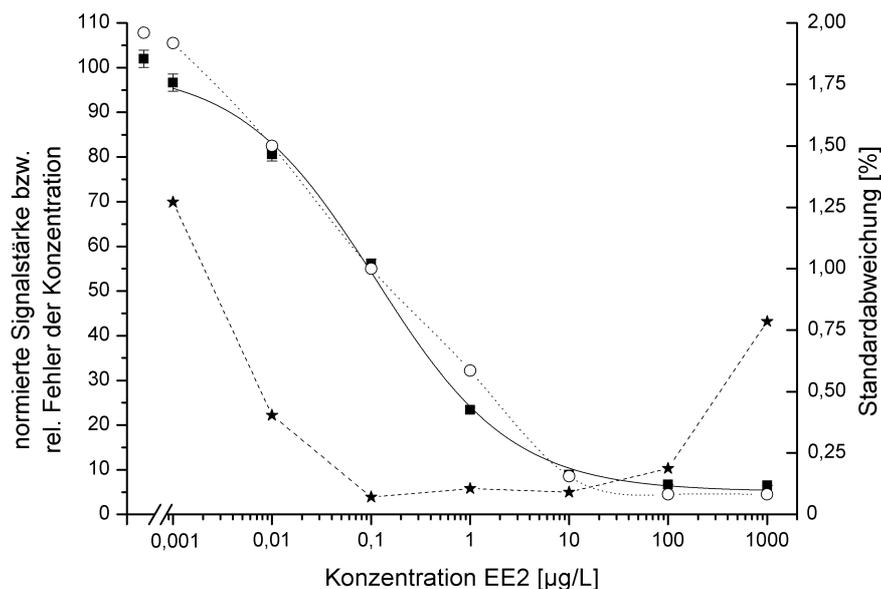


Abbildung 1.9: Beispiel eines Präzisionsprofils (gestrichelte Linie, Sterne) überlagert mit der zugehörigen Kalibrationskurve (durchgezogene Linie, Quadrate) und den jeweiligen Standardabweichungen (gepunktete Linie, Kreise).

Im hier gezeigten Beispiel wird die typische Form eines Präzisionsprofils deutlich. Vergleichsweise hohe relative Fehler liegen im niedrigen Konzentrationsbereich vor, gefolgt von einem abgeflachten breiteren Abschnitt kleiner Fehler, übergehend in einen zweiten Abschnitt größerer Fehler im Bereich der höheren Konzentrationen. Durch Wahl eines Schwellwertes für den relativen Fehler, beispielsweise 20 %, kann der Messbereich festgelegt, und an der zugehörigen Kalibrationskurve abgelesen werden.

Der wesentliche Vorteil des Präzisionsprofils liegt in der Möglichkeit über den Schwellenwert des Fehlers eine Irrtumswahrscheinlichkeit für das Messergebnis anzugeben. Als Ergänzung zur Beschreibung der Sensitivität mittels Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird in dieser Arbeit der Messbereich (analytical range) der Assays angegeben.

Neben den drei vorgestellten Konzepten zur Beschreibung der Assaysensitivität finden sich in der Literatur teilweise deutlich abweichende Methoden zur Definition der Sensitivität. Überwiegend basieren diese anderen Konzepte schlicht auf falschen Modellen, beispielsweise auf der Berücksichtigung des Steigungsparameters zur Beschreibung der Sensitivität (Yalow et al. 1973; Wu et al. 2002). Teilweise kann aber auch eine gezielte Schönung der Assaysensitivität in Betracht gezogen werden. Typisch sind hierbei Angaben zur Sensitivität anhand willkürlich festgelegter relativer Signalintensitäten (Goda et al. 2003; Hirobe et al. 2003) aber auch die Vermischung mit empirischen Werten wie der sogenannten Horwitz-

Regel¹⁰, die zu einer Aufweichung der konservativen Sensitivitätsberechnung nach Ekins führt (Tschmelak et al. 2004a, b). Hierbei werden die Grenzen des Präzisionsprofils nicht mit Hilfe eines maximal tolerierbaren Fehlers festgelegt, sondern über die beiden Schnittpunkte von Präzisionsprofil und Horwitz-Kurve. Bedingt durch die Form der Horwitz-Kurve führt dies zu einer Absenkung der unteren Grenze des Messbereichs. Anschaulich betrachtet rutscht die untere Grenze in den oberen asymptotischen Bereich der Kalibrationskurve. Kritisch betrachtet kann eine solche Korrekturrechnung nur als nicht seriös angesehen werden.

¹⁰ Bei wiederholter Analyse eines Referenzmaterials oder dotierten Materials darf der Variationskoeffizient (CV, coefficient of variation) zwischen Laboratorien unter Reproduzierbarkeitsbedingungen den mit der Horwitz-Gleichung berechneten Wert nicht überschreiten. Diese Gleichung lautet: $CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$; dabei ist C der Massenanteil als Zehnerpotenz. Für Analytkonzentrationen unterhalb von 100 µg/L führt die Horwitz-Gleichung allerdings zu inakzeptabel hohen Werten. Zitiert nach Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft vom 12.8.2002 European Commission (2002). Commission Decision of 12 August 2002. Official Journal. **L 221**: 8.

1.3. Motivation und Ziel der Arbeit

Bei der Bewertung der Umweltrelevanz natürlicher und synthetischer Estrogene stellt Ethinylestradiol die hormonell aktivste Verbindung dar und ist bereits in Konzentrationen von 0,1 ng/L wirksam (Sumpter et al. 1994).

Konzentrationsbestimmungen im unteren ppt-Bereich, bzw. im sub ppt-Bereich¹¹, werden bislang ausschließlich mit apparativ aufwendigen massenspektrometrischen Verfahren durchgeführt, beispielsweise mit GC-MS oder HPLC-MS. Eine routinemäßige Detektion des Ethinylestradiols wird wegen des vergleichsweise hohen Zeit- und Kostenaufwands dieser Verfahren derzeit nicht durchgeführt. Da die Sensitivität selbst modernster Tandem-MS Methoden für eine direkte Messung des Ethinylestradiols nicht ausreichend ist, erfordern alle GC-MS und HPLC-MS Verfahren eine vorgeschaltete Aufkonzentrierung der Proben. Für einen Datensatz von beispielsweise 100 Wasserproben ergäbe sich mit einem optimierten LC-MS/MS Protokoll und einer typischen SPE-Anreicherung der Proben eine Messzeit von rund 4 Tagen (Zühlke et al. 2005). Routinemessungen lassen sich mit diesen Methoden kaum rechtfertigen und eine ökonomische Durchführung der Bestimmung des Ethinylestradiols erscheint daher unmöglich.

Für eine solche Routine des Nachweises von Ethinylestradiol in Umweltproben ist ein alternatives Messverfahren erforderlich, das zum einen eine wesentlich höhere Sensitivität (von wenigen Nanogram pro Liter) besitzt und zum anderen auch deutlich effizienter durchzuführen ist.

Beide Kriterien können grundsätzlich durch den Einsatz speziell optimierter Immunoassays erfüllt werden, die mit deutlich geringerem Zeit- und Kostenaufwand eine Konzentrationsmessung im sub ppt-Bereich ermöglichen.

Derzeit verfügbare Immunoassays für Ethinylestradiol sind jedoch nicht, oder nur bedingt für eine empfindliche Bestimmung von EE2 in Umweltproben geeignet. Meist wurden diese Assays für medizinische Anwendung entwickelt und sind für Konzentrationsmessungen in Körperflüssigkeiten optimiert (Warren et al. 1974; Fotherby et al. 1981; Agasan et al. 1994; Fitzpatrick et al. 2003; R-Biopharm 2003). Die bekannten Assays zur Bestimmung von Ethinylestradiol in Wasserproben besitzen keine akzeptablen Nachweisgrenzen (Coille et al. 2002; JapanEnviro Chemicals 2003). Diese Assays erfordern für die Bestimmung des Analyten eine zusätzliche Aufkonzentrierung der Proben und sind für Routinemessungen entsprechend ungeeignet.

¹¹ Der untere ppt-Bereich umfaßt die Konzentration von 1-10 ng/L. Als sub ppt-Bereich werden entsprechend geringere Konzentrationen, unterhalb von 1 ng/L bezeichnet.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung, Optimierung und Validierung von Immunoassays zur empfindlichen Bestimmung des endokrinen Disruptors 17 α -Ethinylestradiol in Wasser.

Um Bestimmungen im ökotoxikologisch relevanten sub ppt-Bereich zu realisieren, musste die Nachweisgrenze der Assays drastisch abgesenkt werden, um eine direkte Messung des Ethinylestradiols ohne zusätzliche Aufkonzentrierung zu ermöglichen.

Unter dem Gesichtspunkt eines möglichen Routineeinsatzes der Assays wurde zudem ein möglichst einfacher Ablauf der Messung angestrebt. Im Vergleich zu etablierten Methoden sollte dadurch eine wesentliche Vereinfachung und Beschleunigung der Hormonbestimmung erreicht werden.

Die Optimierung der Analysemethode orientierte sich an der späteren Anwendung im Umweltbereich. Dabei erschien vor allem eine mögliche Beeinträchtigung der Assays durch störende Komponenten der Probenmatrix als relevant. Die entwickelten Immunoassays wurden daher insbesondere hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber Huminstoffen charakterisiert. Ein weiterer Aspekt der Optimierung war die Untersuchung der Selektivität der Immunoassays. Da in komplexen Matrices, wie beispielsweise dem Ablauf einer Kläranlage stets eine Mischung verschiedener Analyte, speziell auch verschiedener Steroidhormone vorliegt, war eine hohe Selektivität für Ethinylestradiol bedeutsam für die Anwendbarkeit der Assays.

Ziel der Untersuchungen war zudem die Erprobung der Praxistauglichkeit der entwickelten Immunassays. In einer Feldstudie wurde dazu das Verhalten der Assays gegenüber den Matrices verschiedener Realproben getestet. Die Proben wurden in mehreren Fließgewässern und den Abläufen verschiedener Kläranlagen entnommen, die Ergebnisse wurden dabei durch ein Referenzverfahren (LC-MS/MS) validiert.

1.4. Material und Methoden

1.4.1. Pufferlösungen

Für die Durchführung der Immunoassays werden verschiedene Puffer benötigt. Zum Ansetzen der Lösungen wird stets Reinstwasser¹² verwendet. Die im folgenden aufgeführten Mengenangaben beziehen sich stets auf ein Volumen von 500 mL. Die Angaben der ersten Spalte beschreiben einfach konzentrierte Gebrauchslösungen, die zweite Spalte enthält Angaben für eine höher konzentrierte Vorratslösung.

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wird der Antikörper im sogenannten Coating-Puffer verdünnt:

Tabelle 1.1: Coating-Puffer pH 9,6. Lagerung der Gebrauchslösung bei RT, Lagerung der Vorratslösung bei 4°C.

Konzentration	1x	10x
Na ₂ CO ₃	0,80 g	7,95 g
NaHCO ₃	1,47 g	14,65 g
NaN ₃	0,10 g	1,0 g

Zum Auswaschen der Kavitäten und Entfernung überschüssiger Reagenzien wird ein tensidhaltiger Phosphatpuffer verwendet. Im folgenden wird dieser Waschpuffer als PBS 1¹³ bezeichnet. Da von diesem Puffer ein großes Volumen benötigt wird, empfiehlt es sich, ein Konzentrat, z.B 60-fach, anzusetzen.

Tabelle 1.2: PBS 1 – Wasch-Puffer pH 7,6. Lagerung bei 4 °C.

Konzentration	60x
KH ₂ PO ₄	2,95 g
Kaliumsorbat	32,66 g
Tween 20	15 mL

Die Antikörper-Tracer Wechselwirkung ist in einem physiologischen Assay-Puffer optimal. Dieser Puffer wird hier mit dem Kürzel PBS 2 bezeichnet.

¹² Reinstwasser ist deionisiertes Wasser, welches mit Hilfe einer Milli-Q Anlage zusätzlich gereinigt wurde (inklusive UV-Bestrahlung und Filtration durch 0,2 µm).

¹³ PBS steht für phosphate buffered saline.

Tabelle 1.3: PBS 2 – Assay-Puffer pH 7,6. Lagerung der Gebrauchslösung bei RT¹⁴.

Konzentration	1x	5x
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,78 g	3,90 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	6,23 g	31,15 g
NaCl	4,25 g	21,25 g

In Anlehnung an PBS 2 wird die Bindung des biotinylierten Ethinylestradiols an das Streptavidin-Peroxidase Konjugat ebenfalls in einem physiologischen Puffer durchgeführt. Dieser PBS 3 leitet sich vom Assay-Puffer PBS 2 ab und enthält zusätzlich 0,5 % TweenTM 20. Durch diesen Zusatz wird die nicht-spezifische Bindung des Konjugats gemindert.

Der für Substratreaktion benötigte Puffer basiert auf einer Citratlösung:

Tabelle 1.4: Citratlösung pH 4,0. Lagerung bei 4 °C

KH ₂ -Citrat	25,59 g
Kaliumsorbat	0,05 g

Der eigentliche Substratpuffer basiert auf einer Lösung von stabilisiertem Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid in Citratlösung (Frey et al. 2000).

Das TMB wird in Gegenwart von Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH) in Dimethylacetamid (DMA) gelöst. Das Hydrid verhindert eine vorzeitige Oxidation des TMBs, das polare aprotische Lösungsmittel DMA verhindert eine Ausfällung des TMB bei langer Lagerung. In gemischter Form ist die Stabilität der Lösung auf wenige Stunden begrenzt, getrennt sind die Komponenten über Monate haltbar. In Tabelle 1.5 ist die Zusammensetzung der TMB-Lösung aufgeführt; Tabelle 1.6 beschreibt die Mischungsverhältnisse der drei Komponenten.

Tabelle 1.5: Stabilisierte TMB-Lösung.

TMB	9,86 g
TBABH	2,11 g
DMA	1000 mL

Tabelle 1.6: Substrat-Puffer.

Citratlösung	21,0 mL
Wasserstoffperoxid ¹⁵	8,3 µL
TMB-Lösung	540,0 µL

Zur Lagerung des Tracers EE2 POD (direktes Enzymkonjugat) wird ein kommerzieller Puffer verwendet (GuardianTM, Perbio). Die Lagerung des Serums erfolgt in Gegenwart von 0,1 % Natriumazid. Sowohl Tracer als auch Serum werden bei 4 °C gelagert.

¹⁴ Bei Lagerung von PBS 2 bei 4 °C kommt es zur reversiblen Fällung der Phosphate.

¹⁵ Perhydrol, 30 %ig.

1.4.2. Etablierung des Estradiol-Modellsystems

Das Estradiol-Modellsystem ist ein kompetitiver Immunoassay, basierend auf einem Antikörper der von der Arbeitsgruppe Meyer (Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt wurde (Meyer et al. 1990). Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde in einer Vorstudie der neue Bio-LC E2 ELISA entwickelt. Hierbei konkurriert das Estradiol der Probe (bzw. des Standards) mit einem synthetisierten Molekül, bestehend aus dem Steroidgerüst des Analyten, sowie einem mittels einer Brücke gebundenem Biotinmolekül, um die Bindungsplätze des Antikörpers. Das biotinylierte Derivat des Analyten geht eine zweite Wechselwirkung mit dem Protein Streptavidin ein und bindet dieses unter den gewählten Bedingungen irreversibel. Das Streptavidin selbst ist wiederum an Meerrettichperoxidase gekoppelt und ermöglicht so die Umsetzung eines geeigneten Substrates.

1.4.2.1. Synthese des Tracers:

3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)estratrien-6-on-(carboxymethyloxim)-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamid (Bio-LC E2)

Die Synthese erfolgte mittels Aktivesterverfahren nach Tiefenauer et al. (1990). Zur Aufreinigung wurde eine quasi-präparative HPLC-Methode ebenfalls nach Tiefenauer mit nachfolgender Koevaporation durch Toluol und abschließender Membranfiltration verwendet. Die Ausbeute betrug 65 %. Bedingt durch die geringe Ansatzgröße (6,3 μ mol) wurden keine NMR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung durchgeführt.

1.4.2.2. Untersuchungen zur Bio-LC E2 Konzentration

Die Optimierung der Bio-LC E2 Konzentration im Modellsystem erfolgte hinsichtlich erzielter Testmittelpunkte und Signalintensität. Hierzu wurden Kalibrationskurven des Analyten im Konzentrationsbereich von 1 ng/L bis 1 mg/L, bezogen auf die E2 Kalibratoren, bei verschiedenen Bio-LC E2 Konzentrationen ermittelt. Die Bio-LC E2 Konzentrationen wurden von 2,5 pmol/mL bis 1 nmol/mL variiert, die Inkubationszeit des Bio-LC E2 betrug 30 Minuten. Testmittelpunkte und Signalintensitäten ergeben sich aus der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard (Gleichung 1.2).

1.4.2.3. Optimierung der Bio-LC E2 Inkubationszeit

Die Optimierung der Bio-LC E2 Inkubationszeit im Modellsystem erfolgte gleichfalls hinsichtlich erzielter Testmittelpunkte und Signalintensitäten. Hierzu wurden, ähnlich zur Untersuchung der Konzentration des Bio-LC E2, Kalibrationskurven des Analyten im Konzentrationsbereich von 1 ng/L bis 1 mg/L unter Variation der Inkubationsdauer des Bio-LC E2 aufgenommen. Die Konzentration des Bio-LC E2 betrug 100 pmol/mL, die übrigen Testparameter wie Konzentrationen weiterer Reagenzien und entsprechende Inkubationszeiten wurden konstant gehalten.

1.4.2.4. Untersuchungen zu Konzentration und Inkubationszeit des Streptavidin-Peroxidase Konjugats

Im Biotin-Streptavidin-System sind die erzielten Extinktionswerte auch von der verwendeten Konzentration, sowie der Inkubationszeit des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats (SA/HRP) abhängig. Zur Optimierung von Konzentration und Inkubationszeit wurden Experimente mit Konzentrationen von 1 bis 4 ng/ μ L und Inkubationszeiten von 15 bzw. 30 Minuten durchgeführt.

1.4.2.5. Untersuchungen zum Blockingmittel

Das von Meyer et al. verwendete Protokoll sieht einen Blockingschritt mit Rinderserumalbumin (BSA) vor¹⁶. Hierbei wird die Mikrotiterplatte nach der Beschichtung mit Antikörpern mit Albumin nachbeschichtet, um die nicht-spezifische Bindung von Meerrettichperoxidase an die Wand aus Polystyrol zu verhindern. Es wurde untersucht, ob das verwendete BSA, Fraktion V, durch preisgünstigere Alternativen ersetzt werden kann. Hierzu wurden Immunoassays mit einer Blockingzeit von 30 Minuten bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (20 °C und 37 °C). Als Blockingmittel kamen jeweils verschiedene Konzentrationen von BSA, Casein und Fisch-Gelatine zum Einsatz.

1.4.3. Entwicklung der Ethinylestradiol-Assays

Die drei Immunoassays Bio-LC EE2 ELISA, EE2 ELISA sowie EE2 CLEIA basieren auf gemeinsamen Immunokomponenten. In allen drei Assays wird das gleiche Antiserum verwendet. Im Bio-LC EE2 ELISA liegt zwar ein unterschiedliches Enzymsystem vor, die Signaldetektion anhand photometrischer Messung ist allerdings zum EE2 ELISA übereinstimmend. Die Varianten EE2 ELISA und CLEIA wiederum leiten sich vom gleichen Tracer ab, verwenden jedoch verschiedene Substratsysteme (Tetramethylbenzidin oder Luminol). Der CLEIA stellt hierbei eine Weiterentwicklung des ELISA dar.

Im folgenden sind grundlegende Arbeiten zum Aufbau und zur Entwicklung der drei EE2 Assays dargelegt. Eine Differenzierung der drei Systeme erfolgt erst im Rahmen der weitergehenden Optimierung.

1.4.3.1. Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern

Zur Gewinnung von Antiseren wurden zwei Kaninchen mit einem Proteinkonjugat des Ethinylestradiols (EE2) immunisiert. Das Konjugat wurde käuflich erworben, bei den Kaninchen handelt es sich um "New Zealand White rabbits". Die gesamte Antikörperproduktion wurde vom Anbieter "Eurogentec" durchgeführt und folgte einem Standardprotokoll.

¹⁶ Prof. H.H.D. Meyer, persönliche Mitteilung.

Tabelle 1.7: Standardimmunisierungsprotokoll. Vor Beginn der Immunisierung werden zur Bestimmung des bereits vorhandenen IgG-Titers Präimmunseren entnommen und dienen im Rahmen der Immunisierung als Negativkontrolle zu den Proben die am Tag 38, 66 und 87 der Immunisierung entnommen werden. Injektionen des Proteinkonjugats in Mischung mit Freund's Adjuvantien erfolgen zu den mit X gekennzeichneten Terminen.

Tag	0	14	28	38	56	66	87
Injektion	X	X	X		X		
Blutung	2 mL			2 mL		20 mL	50 mL

Zur Kontrolle des Immunisierungsfortschritts wurde ein direkter Immunoassay durchgeführt, d.h. das bereits zur Immunisierung verwendete Proteinkonjugat von Ethinylestradiol wurde zur Beschichtung von Mikrotiterplatten verwendet; Die in den Blutproben enthaltenen Antikörper binden entsprechend ihrer Konzentration an das Proteinkonjugat und werden mittels eines käuflich erworbenen Antikörper-Peroxidase Konjugats, welches an Kaninchen-Antikörper bindet, detektiert.

1.4.3.2. Tracersynthesen

1.4.3.2.1 Synthese von 3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-17ethinylestratrien-6-on-(carboxymethyloxim)-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamid (Bio-LC EE2)

Die Synthese folgte dem Protokoll eines biotinylierten Estradiolderivats nach Tiefenauer et al. (1990). Zur Aufreinigung wurde eine neue präparative HPLC-Methode entwickelt, da das von Tiefenauer beschriebene HPLC-Protokoll nicht für die hier verwendete Ansatzgröße von 52 μ mol geeignet ist. Hierzu wurde eine HPLC (Perkin-Elmer ISS200) umgebaut und ein eigener post-column Split für den Eluenten konstruiert. Zur Elution wurde ein Gemisch von Acetonitril und Wasser verwendet, jeweils mit Ammoniak auf pH 9 titriert. Die Elution folgte einem Gradientenprofil mit einer Flussrate von 7 mL/min über eine präparative Prodigy ODS Säule (10 μ m, 250 mm x 21.2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg). Schritt 0: 25% Acetonitril für 5 Minuten / Schritt 1: 25-40% Acetonitril für 8 Minuten (Steigung: 1) / Schritt 2: 60-100% Acetonitril für 12 Minuten (Steigung: 1) / Schritt 3: 100% Acetonitril für 10 Minuten / Gesamtlaufzeit: 35 Minuten mit anschließender Equilibrierung mit 25 % Acetonitril für 10 Minuten. Das Injektionsvolumen betrug stets 250 μ L des Reaktionsgemisches. Bedingt durch die Eigenkonstruktion des Splits und das höhere Säulenvolumen ergab sich ein Totvolumen der umgebauten HPLC von 49 mL. Das Reaktionsprodukt eluierte nach einer Retentionszeit von 11,5 Minuten. Ein zweiter Peak bei 17 Minuten konnte nicht identifiziert werden. Das Reaktionsprodukt wurde unter vermindertem Druck vom Eluenten befreit, zeigte jedoch signifikante Verunreinigungen durch Abbauprodukte des C18-Materials, das sich im Eluenten gelöst hat. Zur Isolierung des Reaktionsprodukts wurde das Säulenmaterial mehrmals mit Methanol gewaschen, abschließend das Methanol unter vermindertem Druck evaporiert. Das braune Reaktionsprodukt zeigte eine ölartige Konsistenz. Man erhielt 19,99 mg, entsprechend einer Ausbeute von 52 %.

Zur Strukturaufklärung wurden NMR- und massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zur Verwendung im Immunoassay wurde eine Stammlösung in Methanol ange-
setzt ($c = 10 \mu\text{mol/mL}$).

NMR-Spektroskopie: ^1H -NMR: *Bruker AM 300* MHz, ^{13}C -NMR: *Bruker AM 300 75* MHz; Die NMR-Spektren wurden bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (^1H -/ ^{13}C -NMR) als Standard. Für die ^1H -/ ^{13}C -NMR-Spektroskopie diente das verwendete Lösungsmittel (für ^1H -NMR dessen undeuterierter Restgehalt) als interner Standard. Als Lösungsmittel wurde d_4 -MeOH verwendet. Massenspektren: FAB-positiv Modus: Concept 1H der Firma *Kratos* mit *m*-Nitrobenzylalkohol (mNBA) als Matrix.

1.4.3.2.2 Kopplung von 3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-17ethinylestratrien-6-on-(carboxymethyloxim) an Meerrettichperoxidase (EE2-POD)

Die Kopplung an Meerrettichperoxidase (POD) erfolgte in Analogie zu einer von Munro et al. (1984) publizierten Synthese für entsprechende Konjugate des Progesterons. Das EE2 Derivat (0,958 mg) wurde in Gegenwart von $0,4 \mu\text{L}$ *N*-Methylmorpholin in $50 \mu\text{L}$ *N,N*-Dimethylformamid (DMF) bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ unter Schutzgas aktiviert. Nach dreiminütigem Rühren wurde die Lösung tropfenweise zu einer POD-Lösung (2,5 mg) in einem Gemisch bestehend aus $25 \mu\text{L}$ Wasser und $15 \mu\text{L}$ DMF bei ebenfalls $-15\text{ }^\circ\text{C}$ pipettiert. Die rötliche Lösung wurde über eine Stunde gerührt und langsam auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt, das Rühren wurde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ für zwei weitere Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz vollständig auf eine mit TBS-Puffer (pH 7,5; 0,1 M Tris; 0,15 M NaCl) konditionierte Sephadex G-25 Säule gegeben. Zur Eluation wurde gleichfalls der TBS-Puffer verwendet. Es wurden Fraktionen zu je 4 Tropfen in einer Mikrotiterplatte gesammelt; die Identifikation des Konjugats erfolgte photometrisch anhand der Absorption der Peroxidase bei 405 nm (vgl. Abbildung 1.10). Zur Stabilisierung wurde eine 1:1 Mischung des Konjugats mit kommerziell erworbenem Stabilisierungspuffer (GuardianTM, Perbio) verwendet.

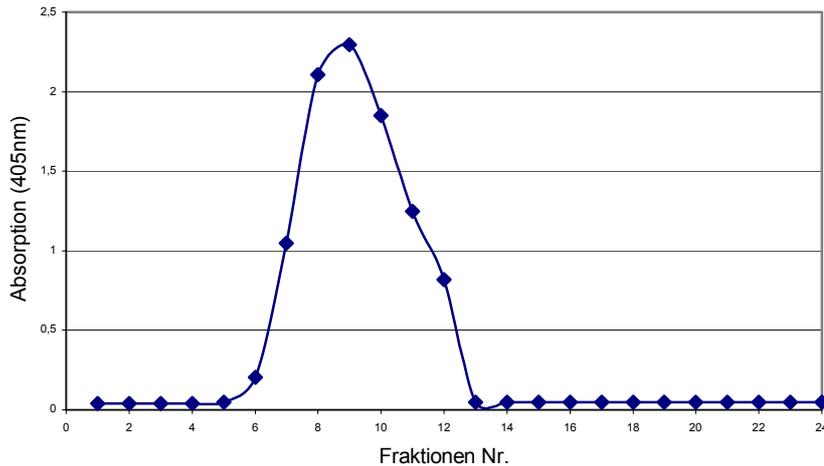


Abbildung 1.10: Gelchromatographie des POD-Konjugats von Ethinylestradiol. Die Ordinate ist in Einheiten relativer optischer Dichte skaliert. Konditionierung mit 200 mL Tris-Puffer, Probe: 1,1 mL Konjugat, Elution mit Tris-Puffer, RT, Fraktionierung: 4 Tropfen pro Kavität (ca. 200 μ L).

1.4.3.3. Verdünnung von Antikörper und Tracer bzw. Antikörper und Biotinderivat

1.4.3.3.1 Checkerboard-Titration

Es wurde eine sogenannte Checkerboard-Titration durchgeführt, um geeignete Verdünnungen von Antikörper und Tracer (EE2-POD) zu ermitteln. Hierbei wurde entlang der einen Kante der Mikrotiterplatte der Antikörper, entlang der sich anschließenden Kante der Tracer in abgestuften Verdünnungen aufgetragen. Es resultierte daraus ein schräg über die Platte verlaufender Gradient der Reaktionskomponenten, der es leicht ermöglichte, eine geeignete Kombination der Verdünnungen zu wählen. Als Kriterium diente das Erreichen eines möglichst hohen Extinktionswertes bei möglichst starker Verdünnung beider Reagenzien. Als Ausgangspunkt für folgende Experimente ergab sich eine Antikörperverdünnung von 1:50.000 und eine Verdünnung des Enzymkonjugats von 1:25.000.

1.4.3.3.2 Immunchemische Charakterisierung des Bio-LC EE2 Derivats

Zur Beschreibung des Bio-LC EE2 Derivats wurde zusätzlich zur strukturellen Charakterisierung mittels NMR und Massenspektrometrie eine Untersuchung mittels ELISA durchgeführt. Da die Verdünnung des Antiserums anhand der vorhergehenden Titration abgeschätzt werden konnte, wurde keine Checkerboard-Titration durchgeführt, sondern direkt vollständige Kalibrationskurven aufgenommen. Die Antikörperverdünnung betrug hierbei 1:20.000 (200 μ L pro Kavität, Beschichtung über Nacht), Ethinylestradiol diente als Standard (100 μ L pro Kavität, Vorinkubationszeit: 30 Minuten), Bio-LC EE2 selbst wurde in den Konzentrationen 1,0 und 0,5 pmol/mL eingesetzt (jeweils 100 μ L pro Kavität, Inkubationszeit: 30 Minuten). Das Streptavidin-Peroxidase Konjugat wurde in der Konzentration 1 ng/ μ L eingesetzt (Inkubationszeit: 15 Minuten), die Entwicklungszeit der Substratreaktion betrug 15 Minuten.

1.4.3.4. Untersuchungen zur Kreuzreaktivität des Antiserums

Es wurde eine umfassende Studie zur Charakterisierung der Kreuzreaktivitäten des Antiserums durchgeführt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der einzelnen zu untersuchenden Stoffe in Wasser angesetzt. Mit Ausnahme des zur Immunisierung verwendeten BSA-Konjugates wurde von allen kreuzreagierenden Stoffen zuvor eine methanolische Stammlösung angesetzt, und diese anschließend weiter verdünnt. Der Methanolgehalt innerhalb der Verdünnungsreihen lag bei höchstens 0,25 %. Zur Berechnung der molaren Kreuzreaktivität wurde Gleichung 1.5 angewendet.

Im einzelnen wurden die folgenden Substanzen untersucht: Estron, Estradiol (E2), Estriol (E3), E2-3-Glucuronid, E2-3-Sulfat, E2-17-Sulfat, E2-17-Glucuronid, EE2-3-Glucuronid, EE2-3-Sulfat, EE2-17-Glucuronid, EE2-6-CMO (Edukt der Tracersynthese), EE2-6-CMO:BSA-Konjugat (Immunogen).¹⁷

1.4.3.5. Untersuchungen zu Matrixeffekten

Die Beeinflussung der drei EE2 Assays durch Matrixkomponenten wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Huminsäure (Carl Roth, Karlsruhe) untersucht. Hierzu wurden Standardreihen von Ethinylestradiol in Lösungen verschiedener Huminsäuregehalte erstellt und im Bio-LC EE2 sowie EE2 Assay untersucht. Eine gesonderte Untersuchung im EE2 CLEIA wurde nicht durchgeführt, da mögliche Wechselwirkungen mit Matrixkomponenten einer Probe lediglich Antikörper und Enzym betreffen, nicht aber das Substratsystem. Die Huminsäurekonzentrationen variierten zwischen 0,2 und 10 mg/L. Es ist zu beachten, dass Huminstoffe aus Realproben ein zu der hier verwendeten Huminsäure abweichendes Verhalten zeigen können. Diese spezielle Huminsäure wurde jedoch schon häufiger als Modellsubstanz zur Charakterisierung von Matrixeffekten verwendet (Deng et al. 2003).

1.4.3.6. Untersuchungen zu organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel können als Eluent während einer Probenaufarbeitung oder als Solvent im Rahmen einer Probenanreicherung in einer Immunoassayanalyse auftreten. Da die Antikörper-Antigen-Bindung auch vom Medium der Reaktion beeinflusst wird, ist es von Bedeutung den Einfluss organischer Lösungsmittel zu quantifizieren. Hierzu wurde der Einfluss von Aceton, Acetonitril und Methanol auf den Bio-LC EE2 sowie EE2 Assay untersucht. In Anlehnung an die Studie zu Matrixeffekten wurde auch hier der EE2 CLEIA nicht gesondert untersucht. Im Einzelnen wurde eine Standardverdünnungsreihe von EE2 in wässrigen Mischungen unterschiedlicher Lösemittelgehalte untersucht. Der Gehalt der Lösungsmittel lag zwischen 5 und 40 %.

¹⁷ Die zur Beschreibung der Metabolite von Estradiol und Ethinylestradiol verwendete Nomenklatur berücksichtigt die Position des Substituenten am Steroidgrundgerüst. Position 3 befindet sich am Ring A (unten links), Position 17 im Ring D (oben rechts). An beiden Positionen sind im nativen E2, bzw. EE2 die Hydroxygruppen gebunden.

1.4.4. Differenzierung und Optimierung der EE2 Assays

Ausgehend von den durch Checkerboard-Titration und immunochemischer Charakterisierung des biotinylierten EE2 Derivats ermittelten Konzentrationen für Antikörper und Tracer (EE2 POD bzw. Bio-LC EE2) wurden weiterführende Untersuchungen zur Verbesserung des Testmittelpunkts C unternommen. Die Strategie dieser Optimierung ist an den Grundsätzen der Affinitätslimitierung orientiert, d.h. eine stärkere Verdünnung von Antikörper und Tracer geht mit einer verbesserten Sensitivität einher.

1.4.4.1. Bio-LC EE2 ELISA

Die Optimierung des Bio-LC EE2 ELISA wurde unter der Bedingung vordefinierter Inkubationszeiten durchgeführt. Ziel dieses Vorgehens war es, eine eventuelle Automatisierung des Assays mit Hilfe einer Pipettierstation zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung dieser Vorgabe wurden alle Inkubationszeiten auf 30 Minuten festgelegt.

Die optimale Konzentration des Bio-LC EE2 Derivats wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt, die Konzentration des Derivats wurde hierbei von 250 bis 0,001 pmol/mL variiert. Die Antikörperverdünnung betrug stets 1:50.000, bei einem Volumen von 200 µL pro Kavität. Das Volumen der Ethinylestradiolstandards und das Volumen der Bio-LC EE2 Lösung waren stets 100 µL pro Kavität. Das Streptavidin-Peroxidase Konjugat hatte eine Konzentration von 50 ng/mL und wurde entsprechend der Antikörperbeschichtung mit einem Volumen von 200 µL pro Kavität verwendet. Analog betrug das Volumen der Substratlösung nach Frey und Mitarbeitern (2000) ebenfalls 200 µL pro Kavität.

1.4.4.1.1 Studien zur Signalamplifikation

Im Bio-LC EE2 ELISA wurden unterschiedliche Enzymkomplexe zur Signalamplifikation verwendet. Der an das Biotin bindende Enzymkomplex, bestehend aus Streptavidin und Peroxidase, wurde hierbei ersetzt durch einen Komplex, bestehend aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (Vectastain Elite ABC KitTM, Vectorlab). Dies führt zu einer höheren Enzymdichte pro Molekül biotinylierten Ethinylestradiols und somit zu einem verstärkten Signal (Hsu et al. 1981).

Der amplifizierte Assay wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Antikörper 1:50.000, 200 µL pro Kavität, Beschichtung über Nacht, Standards 100 µL pro Kavität, 30 Minuten Vorinkubation, biotinyliertes EE2 0,025 pmol/mL, 100 µL pro Kavität, 5 Minuten Inkubation, Vectastain Elite ABC KitTM 40 µL pro mL PBS 3 (entsprechend der Herstellerempfehlung), 200 µL pro Kavität, 30 Minuten Inkubation, TMB-Substrat 200 µL pro Kavität, 30 Minuten Entwicklung.

1.4.4.2. EE2 ELISA

Die Optimierung des EE2 ELISA verlief in zwei Schritten. Zunächst wurden in Anlehnung an den Bio-LC EE2 ELISA alle Inkubationszeiten auf 30 Minuten festgelegt. Unter diesen Bedingungen wurde über eine Verdünnungsreihe des Tracers der affinitätslimitierte Bereich des EE2 ELISA definiert. Die Randbedingungen dieser Studie sind sehr ähnlich zur Optimierung des Bio-LC EE2 ELISA. Die Verdünnung des Antiserums wurde auf 1:50.000 festgelegt, das

Volumen pro Kavität betrug zunächst 100 μL , Standards wurden mit einem Kavitätenvolumen von 100 μL für 30 Minuten vorinkubiert. Das Volumen der Tracerlösung betrug 100 μL pro Kavität. Unterschiedlich zum Bio-LC EE2 System können hier jedoch keine absoluten Konzentrationen angegeben werden, stattdessen werden relative Verdünnungen, bezogen auf das aufgereinigte Produkt der Tracersynthese, angegeben (vgl. Abbildung 1.10). Für die Substratreaktion wurde auch hier das TMB-System in der Variante nach Frey verwendet (2000).

Der zweite Schritt der Optimierung des EE2 ELISA verlief unabhängig von etwaigen Restriktionen der Inkubationszeit und war auf die manuelle Anwendung des Assays ausgerichtet. Es wurde zunächst die Inkubation des Tracers von 30 auf 10 Minuten verkürzt und das Volumen der Antikörperverdünnung auf 200 μL pro Kavität erhöht. Mit Hinblick auf eine spätere Messung angereicherter Proben wurde zusätzlich das Medium der Kalibratoren von 100 % wässrig auf eine 5 %ige Methanollösung in Wasser umgestellt. Im Rahmen einer Festphasenextraktion werden die angereicherten Proben meist mit Hilfe eines organischen Lösungsmittel eluiert. Entsprechend enthalten diese Extrakte einen bestimmten Anteil Lösungsmittel, beispielsweise 5 % bei einer 1:20 Verdünnung des reinen Methanolextrakts.

1.4.4.3. EE2 CLEIA

Ausgehend vom EE2 ELISA mit zehnminütiger Tracerinkubation wurden mit Hilfe eines Luminol-Substrates (Supersignal femtoTM, Perbio) chemilumineszenzbasierte Messungen an einem Lumineszenzphotometer durchgeführt. Mit dem Ziel der Sensitivitätssteigerung wurden hierbei wesentliche Veränderungen am Protokoll des EE2 ELISA vorgenommen. Insbesondere die Verdünnungen von Antikörper und Tracer wurden in Anlehnung an die in Abbildung 1.8 aufgezeigten Trends deutlich erhöht. Die Antikörperverdünnung wurde auf 1:200.000 erhöht, die Verdünnung des Tracers von 1:50.000, über 1:250.000 auf 1:500.000. Ergänzend zur direkten Entwicklung des EE2 CLEIA wurden begleitende Untersuchungen mit dem EE2 ELISA durchgeführt. In einer vereinfachten Studie zum Affinitätslimit wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf Nachweisgrenze und Signalstärke erfasst. Hierzu wurde bereits die stärkere Antikörperverdünnung von 1:200.000 verwendet, jedoch noch die herkömmliche Tracerverdünnung von 1:50.000 und das TMB-basierte Substrat des EE2 ELISA. Die Inkubationszeit des Tracers wurde von zehn Minuten auf bis zu drei Stunden variiert. Ausgehend von diesen Experimenten wurden Vergleichsmessungen der Substratsysteme auf Luminol bzw. TMB-Basis durchgeführt und die Detektion anschließend vollständig auf Chemilumineszenz umgestellt. Es folgte die beschriebene schrittweise Verdünnung des Tracers auf 1:500.000, die letztendlich zur Entwicklung des EE2 CLEIA führte.

Der EE2 CLEIA wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Antikörper 1:200.000, 200 μL pro Kavität, Beschichtung über Nacht, Standards 100 μL pro Kavität, 10 Minuten Vorinkubation, Tracer 1:500.000, 100 μL pro Kavität, 10 Minuten Inkubation, Substrat 200 μL (nach Herstellerempfehlung). Lumineszenzmessungen wurden vor der Substratzugabe (Blankwert der Platte), unmittelbar danach und nach einer Inkubationszeit von drei Minuten durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Differenz von dritter zu erster Messung verwendet. Für die Durchführung dieser Messungen war es notwendig weiße

Mikrotiterplatten zu verwenden, transparente Platten sind aufgrund unerwünschter Streueffekte für Lumineszenzmessungen nicht geeignet.

1.4.5. Feldstudie

Der EE2 ELISA und EE2 CLEIA wurden im Rahmen einer Feldstudie untersucht. Hierzu wurden Wasserproben aus Oberflächengewässern und Kläranlagenabflüssen genommen und ihr Gehalt an EE2 mit Hilfe der beiden Immunoassays sowie einem etablierten instrumentellen Verfahren (LC-MS/MS) (Zühlke et al. 2004) bestimmt.

1.4.5.1. Probennahme

Die Probennahme erfolgte im Januar und Februar 2005, in der Region Bonn sowie im nördlichen Teil von Rheinland-Pfalz. Die Proben wurden in braunen Glasflaschen transportiert und bei 4 °C gelagert. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben wurde am Folgetag durchgeführt, die maximale Lagerdauer der Proben betrug 24 h.

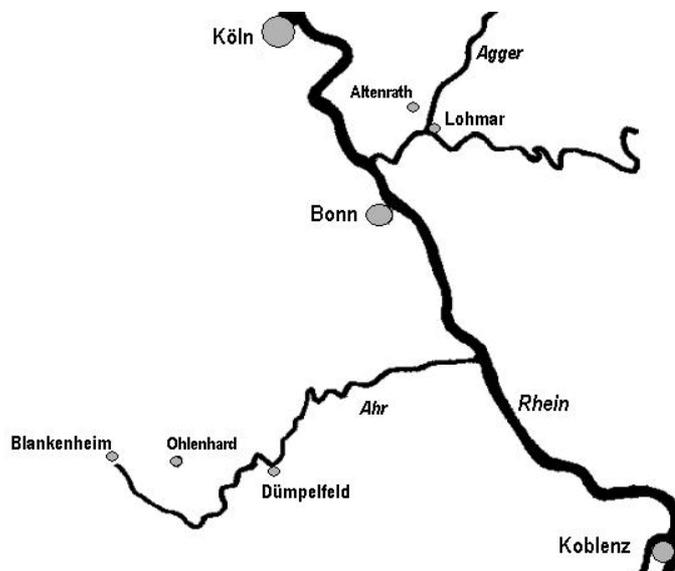


Abbildung 1.11: Kartenausschnitt der Probennahmeorte.

Oberflächenwasser wurde in Stichproben aus den Flüssen Rhein (bei Bonn), Agger (bei Lohmar) und Ahr (bei Blankenheim sowie Dümpelfeld) entnommen. Jede der Probennahmestellen ist anthropogen beeinflusst, meist durch einleitende Kläranlagen in unmittelbarer Nähe. Eine Ausnahme bildet die Stichprobe aus Blankenheim, die sehr quellnah, allerdings innerhalb der Stadt genommen wurde.

Die beprobten Kläranlagen spiegeln sowohl ländliche, als auch städtische Einzugsgebiete wider. Eine städtische Ausprägung mit geringem industriellen Anteil liegt in den vier Kläranlagen der Stadt Bonn vor (vgl. Tabelle 1.8). Eher landwirtschaftlich beeinflusst sind die Kläranlage Dümpelfeld, Blankenheim, Ohlenhard und Altenrath (Tabelle 1.9).

Tabelle 1.8: Details zu den Kläranlagen der Stadt Bonn. *Das Einzugsgebiet der Anlage Duisdorf hat eine eher ländliche Ausprägung. Nur 42 % des Abwassers stammen aus Bonn selbst, 58 % werden aus angrenzenden, landwirtschaftlich geprägten Gemeinden eingeleitet.

	Bad Godesberg	Beuel	Duisdorf	Salierweg
Typ	mechanisch-biologisch	mechanisch-biologisch	mechanisch-biologisch	mechanisch-biologisch
Einwohner-Gleichwerte	110.000	72.000	30.000	307.000
Abwasseranfall [m ³ Tag ⁻¹]	31.995	17.118	9.445	66.324
Einzugsgebiet	städtisch	städtisch	ländlich*	städtisch
Reinigungsprozesse				
Mechanisch	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung Sandfang Ölabscheider
Biologisch	Belebtschlamm	Belebtschlamm	Belebtschlamm	Belebtschlamm
P-Fällung	ja	ja	ja	ja

Tabelle 1.9: Details der ländlich geprägten Kläranlagen.

	Altenrath	Blankenheim	Dümpelfeld	Ohlenhard
Typ	Pflanzenklär-anlage	mechanisch-biologisch	mechanisch-biologisch	Klärteiche
Einwohner-Gleichwerte	150	4.500	12.000	150
Abwasseranfall [m ³ Tag ⁻¹]	12	3.200	3.500	21
Einzugsgebiet	ländlich	ländlich	ländlich	ländlich
Reinigungsprozesse				
Mechanisch	Siebung	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung
Biologisch	Belüftung	Belebtschlamm	Belebtschlamm	Belüftung saisonale Entleerung
P-Fällung	keine	keine Angaben	keine	keine

Unterschiede bestehen auch in der Bauart der einzelnen Kläranlagen. Die Anlagen Ohlenhard und Altenrath sind Pflanzenkläranlagen, wobei erstere in Form eines Klärteiches ohne Bewuchs betrieben wird, in Altenrath hingegen ein möglichst dichter Bewuchs mit Schilfgras (*Phragmites australis*) angestrebt ist. Die Anlagen in Bonn, Blankenheim und Dümpelfeld sind konventionelle dreistufige Kläranlagen.

1.4.5.2. Anreicherungsverfahren

Für Messungen mit dem EE2 ELISA wurden je 500 mL einer Wasserprobe mittels Festphasenextraktion angereichert. Die verwendete Anreicherungsverfahren basiert auf zwei literaturbekannten Protokollen (Quintana et al. 2004; Zühlke et al. 2005):

Tabelle 1.10 Protokoll der SPE-Methode zur Anreicherung der Wasserproben.

1. Filtrieren der Proben durch Papier-Faltenfilter
2. Filtrieren der Proben durch Glasfaserfilter (GF 8)
3. Einstellen von pH 7, Portionieren der Proben in 500 mL Aliquots, Versetzen mit 2,5 mL Methanol,
4. SPE Säulen (Strata X, Phenomenex) konditionieren mit 2 × 4 mL Methanol und 2 × 4 mL MilliQ-Wasser / Methanol (0,5 %)
5. Durchsaugen der Proben mit angelegtem Unterdruck von 650 mbar (5,5 mL/min), Abstimmen der einzelnen Säulen aufeinander
6. Nachspülen der Probengefäße mit 10 mL deionisiertem Wasser
7. Waschen der Säulen bei 650 mbar Unterdruck
 - a) 2 × 5 mL Methanol / MilliQ-Wasser (1:1)
 - b) 2 × 5 mL Aceton / MilliQ-Wasser (1:2)
 - c) 2 × 5 mL Hexan
8. Trocknen der Säulen unter Stickstoff
9. Elution mit 2 × 3,5 mL Methanol
10. Abblasen des Methanols mit Stickstoff über einem Wasserbad (40 °C)
11. Aufnehmen in 500 µL Hexan / Aceton (65:35, v/v)
12. Adsorptionschromatographie der Lösung aus 11. an 500 mg Silicagelsäulen, Säulen vorher mit 2,5 mL Hexan / Aceton (65:35, v/v) konditionieren; Reagenzglas mit 8 mL Hexan / Aceton (65:35, v/v) nachspülen und kurzzeitig in Ultraschallbad, diese 8 mL ebenfalls eluieren
13. Eindampfen der Lösung mit Stickstoff über einem Wasserbad
14. Aufnehmen in 500 µL Methanol und Einlagerung bei 4° C

Im Rahmen der Anreicherung wurde eine Aufkonzentration um den Faktor 1000 erzielt, zur Durchführung der ELISA Messung wurde dieser rein methanolische Extrakt allerdings 1:20 auf einen 5%igen Methanolgehalt verdünnt. Entsprechend betrug die "Netto"-Anreicherung 50. Die Extrakte wurden jeweils unmittelbar vor der Messung mit Reinstwasser verdünnt.

Die Wiederfindung der Anreicherungsverfahren wurde mit Hilfe dotierter Proben bestimmt. Einzelne Proben wurden hierzu aliquotiert und mit 3, 6 bzw. 9 ng/L EE2 dotiert. Die dotierten Proben wurden mit einfacher Wiederholung je Dotierungsstufe angereichert und gemessen, ebenso wurde die originale Probe ohne EE2-Zusatz behandelt. Aus den Werten jeder Dotierungsstufe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Über die Mittelwer-

te wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei eine Gewichtung der Mittelwerte abhängig von ihren Fehlern vorgenommen wurde.

1.4.5.3. Referenzmessungen

Referenzmessungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn durchgeführt. Die verwendete LC-MS/MS Methode stellt eine Adaptation bereits beschriebener Verfahren dar (Zühlke et al. 2005). Zur Messung der einzelnen Proben wurde stets ein Aliquot von 500 mL verwendet, die Aufarbeitung dieser Proben wurde gleichfalls vom Referenzlabor durchgeführt. Nach Korrektur der Messwerte mit Hilfe der Surrogatstandards d₄-Estron und d₄-Estradiol ergab sich, basierend auf einem Signal-Rauschverhältnis von drei, die Nachweisgrenze von EE2 zu 0,3 ng/L.

1.5. Ergebnisse

1.5.1. Das Estradiol-Modellsystem

1.5.1.1. Tracersynthese

Die Synthese des Bio-LC E2 Derivates konnte sehr gut reproduziert werden. Die nur befriedigende Ausbeute von 64,9 % war auf Nebenreaktionen mit Luftfeuchtigkeit, die aufgrund nicht eingesetzter Schutzgastechnik die Reaktion beeinträchtigte, sowie die aufwendige Aufreinigung mittels HPLC und Membranfiltration, zurückzuführen. Die Charakterisierung des Bio-LC E2 Derivates erfolgte im Rahmen des Immunoassays, strukturanalytische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

1.5.1.2. Testentwicklung

Die Untersuchungen zur optimalen Konzentration des Bio-LC E2 bezüglich akzeptabler Extinktionswerte im Bereich von OD = 1 und geringer Testmittelpunkte als Maß für die Nachweisempfindlichkeit führte erwartungsgemäß zu einem Kompromiss zwischen optischer Dichte und Testmittelpunkt.

Details zu den Untersuchungen sind in Abbildung 1.12 dargestellt.

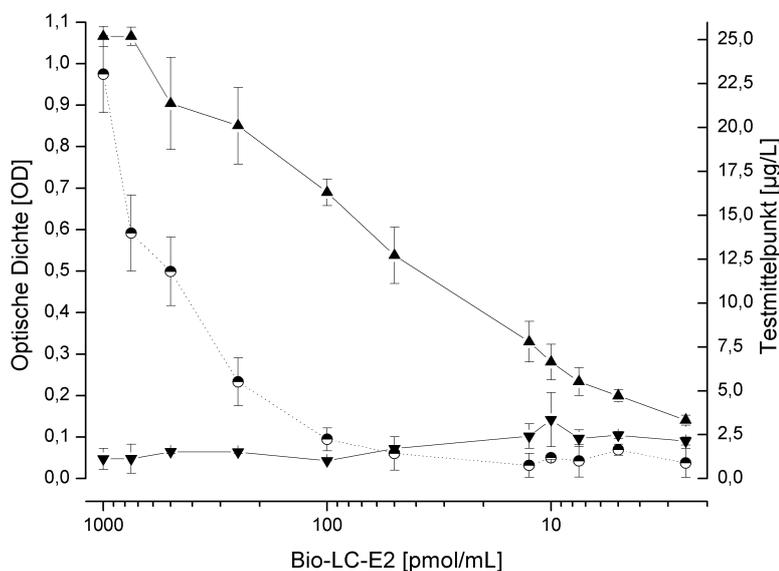


Abbildung 1.12: Abhängigkeit der Signalintensität [OD] und des Testmittelpunkts von der Bio-LC E2 Konzentration. Alle Kalibrationskurven wurden durch mehrfache Replikate auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten erhalten, die Messpunkte jeder einzelnen Kurve wurden stets dreifach bestimmt. Alle Konzentrationen weiterer Reagenzien, sowie alle Inkubationszeiten wurden konstant gehalten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen den Parametern der zugehörigen Kalibrationskurven (Parameter A, maximale OD dargestellt durch aufrechte Dreiecke; Parameter D, minimale OD dargestellt durch umgekehrte Dreiecke; Parameter C, Testmittelpunkt dargestellt durch halbgefüllte Kreise).

Es wird deutlich, dass mit geringer werdender Konzentration des Bio-LC E2 Derivates die Extinktionswerte stark abfallen. Die erzielten Testmittelpunkte zeigen einen asymptotischen

Verlauf und streben gegen das sogenannte Affinitätslimit des Antikörpers. Das Affinitätslimit ist eine intrinsische Eigenschaft des Antikörpers, welche aus der Bindungskonstante bezüglich Estradiol resultiert. Die Konzentration von 100 pmol/mL bildet einen guten Kompromiss zwischen Extinktionswerten und Nachweisempfindlichkeit in Form des Testmittelpunkts. Der Testmittelpunkt nimmt hier den Wert von $2,2 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ an.

Zusätzlich zu den verwendeten Konzentrationen ist die Inkubationszeit des Bio-LC E2 ein entscheidender Parameter für den Immunoassay. Neben rein praktischen Erwägungen einer zügigen Testabwicklung beeinflusst eine verkürzte Inkubationszeit über die Reaktionskinetik die Parameter Extinktionsmaxima und Testmittelpunkt. Im hier verwendeten Testformat findet im entscheidenden Reaktionsschritt eine Konkurrenz des Estradiols mit dem synthetisierten Bio-LC E2 um die limitierten Antikörperbindungsstellen statt. Nachteilig an einer Verkürzung der Inkubationszeit sind die damit verbundenen Verluste an Signalintensität.

In Abbildung 1.13 ist der Einfluss der Inkubationszeit auf die erzielten Signalintensitäten und Testmittelpunkte dargestellt. Die Konzentration des Bio-LC E2 betrug stets 100 pmol/mL.

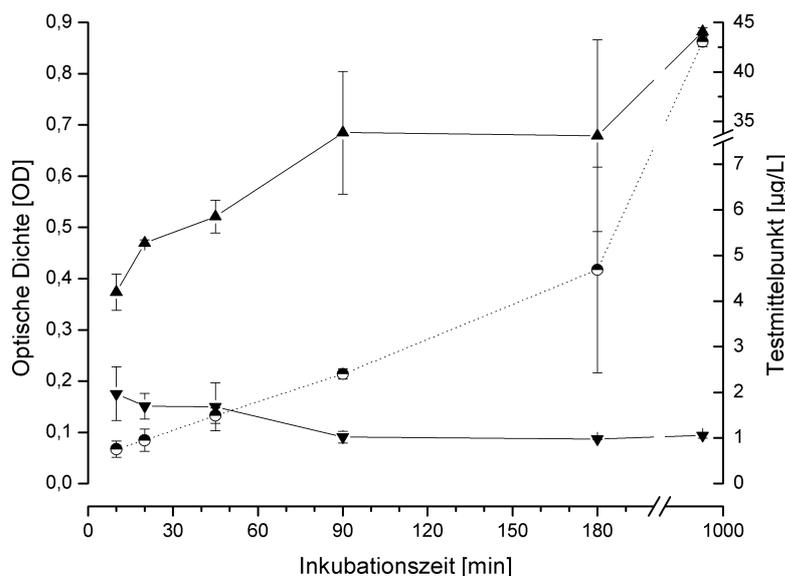


Abbildung 1.13: Abhängigkeit der Signalintensität und des Testmittelpunkts von der Inkubationszeit des Bio-LC E2. Für folgende Inkubationszeiten wurden Kalibrationskurven aufgenommen: 10, 20, 45, 90, 180, 720 (alle Angaben in Minuten). Alle Kalibrationskurven wurden mindestens doppelt auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten bestimmt, die Messpunkte jeder einzelnen Kurve wurden stets dreifach bestimmt. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen den Parametern der zugehörigen Kalibrationskurven (Parameter A, maximale OD dargestellt durch aufrechte Dreiecke; Parameter D, minimale OD dargestellt durch umgekehrte Dreiecke; Parameter C, Testmittelpunkt dargestellt durch halbgelbte Kreise).

Die Messwerte der in Abbildung 1.12 und Abbildung 1.13 dargestellten Experimente ergeben sich aus der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard (Gleichung 1.2).

Das im Rahmen der Substratreaktion benötigte Enzym Meerrettichperoxidase wurde im Biotin-Testsystem mittels eines Enzymkonjugats, bestehend aus Meerrettichperoxidase und Streptavidin, an das Bio-LC E2 Derivat gebunden. Hierbei werden zwei Wechselwirkungen unterschieden. Zum einen bindet das Streptavidin spezifisch an den Biotinteil des Bio-LC E2 Moleküls, zum anderen kam es, evtl. aufgrund vorhandener Zuckerseitenketten des Streptavidins, zu unspezifischer Bindung an das Polystyrol der Mikrotiterplatte. Es wurde untersucht in welchem Ausmaß eine Erhöhung der Konzentration des Enzymkonjugats zu einer Erhöhung der maximalen Extinktion führt. Als Bezugswert wurde die Konzentration 1 ng/μL gewählt, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Als Messwert diente die Differenz von maximaler zu minimaler Extinktion im Test. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Konzentration um 100 bzw. 200 % lediglich zu einer Verbesserung des Messwerts um 12 % führte. Dies lässt sich durch die Absättigung der Biotin-Bindungsstellen erklären. Weiterhin wurde der Einfluss der Inkubationszeit (15 bzw. 30 Minuten) untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich nach 30 Minuten eine deutlich erhöhte Hintergrundabsorption (minimaler Extinktionswert), parallel hierzu kam es allerdings auch zu einer Erhöhung des maximalen Extinktionswertes, so dass bei Betrachtung der Differenz der beiden Extrema eine Inkubation von 30 Minuten die besseren Ergebnisse lieferte.

1.5.1.3. Blocking

Das Originalprotokoll von Meyer et al. beinhaltet einen Blockingschritt zur Hemmung nicht-spezifischer Bindung. Die vorhergehenden Experimente mit Streptavidin-Konjugaten verdeutlichten die Notwendigkeit dieses Blockings, um ein möglichst geringes Hintergrundsignal zu erhalten. Es wurden daher Untersuchungen zur Optimierung des Blockings durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine 1%ige Caseinlösung (Casein in Phosphatpuffer) zu einem deutlich besseren Blockingeffekt im Vergleich zu Rinderserumalbumin und Fisch-Gelatine führte. Nachteilige Effekte auf die Testempfindlichkeit wurden bei Fisch-Gelatine beobachtet, spielten bei Casein und Albumin allerdings keine Rolle. Eine Erhöhung der Caseinkonzentration zeigte keine zusätzliche Verbesserung. Das Blocking verlief effizienter, wenn die Inkubation bei 37 °C durchgeführt wurde.

1.5.1.4. Modifiziertes Assay-Protokoll

Nach Abschluss der Modellexperimente im Estradiolsystem und Berücksichtigung der Arbeiten von Meyer et al. ergab sich folgender Ablauf für den Estradiol-Immunoassay unter Verwendung biotinylierten Estradiols. Mit Ausnahme von Schritt 1 und 2 wurden alle Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 1.11: Assay-Protokoll des Bio-LC E2 ELISA. Nicht aufgeführt ist die Vorbeschichtung der Mikrotiterplatte mit sekundärem Anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:1000 in Coating-Puffer; 200µL; Inkubation: 12h; Temperatur: 20°C). Dies war notwendig, da der eigentliche Estradiol-Antikörper selbst nur eine schwache Bindung an die Platte ausbildete.

1. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
2. Nachbeschichtung der Mikrotiterplatte mit 1%iger Caseinlösung in PBS 1; 200µL; Inkubation: 30 Minuten; Temperatur: 37°C
3. Waschen und Dekantieren (Ausklopfen) der Mikrotiterplatte
4. Zugabe des Antikörpers Anti-E2 von Meyer et al. gelöst in 0,1%iger Caseinlösung in PBS 1; 200 µL; Verdünnung: 1:200.000; Inkubation 60 Minuten
5. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
6. Zugabe der Estradiol-Standards; 40 µL; Inkubation: 30 Minuten
7. Zugabe von Bio-LC E2, $c = 0,1 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 200 µL, gelöst in PBS 1 mit 0,1% Casein; Inkubation: 30 Minuten
8. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
9. Zugabe des Streptavidin-Peroxidase Konjugats, gelöst in PBS 1 mit 0,1% Casein; $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$; 200 µL; Inkubation: 30 Minuten
10. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
11. Zugabe von je 200 µL Substratlösung, Inkubation: 30 Minuten,
12. Zugabe von je 50 µL 1 M Schwefelsäure

1.5.1.5. Kenndaten

Zur Beschreibung der analytischen Kenndaten des Bio-LC E2 Modellassays wurde eine repräsentative Kalibrationskurve verwendet. Der analytische Bereich der Kalibrationskurve wurde mit Hilfe des zugehörigen Präzisionsprofils bei einem Variationskoeffizienten (X_{CV}) von 20 % berechnet.

Tabelle 1.12: Analytische Kenndaten des Bio-LC E2 ELISA.

Nachweisgrenze	8,6 ng/L
Bestimmungsgrenze	73,1 ng/L
Messbereich	0,01 – 1,24 µg/L

Die einzelnen Kenndaten sind in Tabelle 1.12 aufgeführt, Berechnungsgrundlage ist die in Abbildung 1.14 dargestellte Kalibrationskurve mit dem entsprechenden Präzisionsprofil.

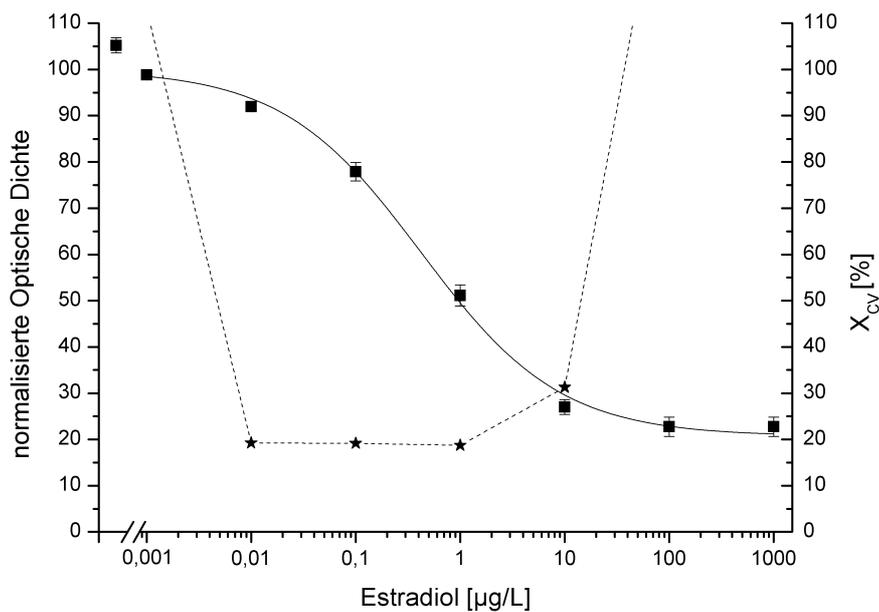


Abbildung 1.14: Kalibrationskurve und Präzisionsprofil des Bio-LC E2 ELISA.

Der Modellassay erreicht einen Messbereich von drei Größenordnungen, das Präzisionsprofil zeigt eine entsprechend breit ausgeprägte Form.

1.5.2. Aufbau der Ethinylestradiol-Assays

1.5.2.1. Tracersynthesen

1.5.2.1.1 Bio-LC EE2

Die nur befriedigende Ausbeute der Synthese von 52 % war auf Hydrolysereaktionen des aktivierten Steroids, die aufgrund nicht vorhandener Schutzgastechnik die Reaktion beeinträchtigten, zurückzuführen. Nachteilig für die Ausbeute wirkte sich auch die aufwendige Aufreinigung des Reaktionsansatzes aus. Bedingt durch das auf 250 µL begrenzte Injektionsvolumen kam es des weiteren zu zeitlichen Verzögerungen der chromatographischen Aufreinigung. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass es im noch nicht aufgereinigten Ansatz zu Zersetzungsreaktionen kam. Ein höheres Injektionsvolumen konnte nicht realisiert werden, da hierzu ein kompletter Austausch der Hauptplatine innerhalb der HPLC notwendig wäre.

Auswertung der NMR-Spektren:

¹H-NMR, CD₃OD, 300 MHz

δ 7,31 (d, J = 2,8 Hz, 1 H, 4-H), 7,13 (d, J = 8,5 Hz, 1 H, 1-H), 6,74 (dd, J = 8,5 ; 2,8 Hz, 1 H, 2-H), 4,64 (s, 2 H, oxim), 4,43 (pseudo-dd, J = 7,8; 5,1 Hz, 1 H, bio), 4,24 (dd, J = 7,9 ; 4,5 1 H, bio), 3,18 (m, 1 H, SC-H), 3,13 (m, 2 H, NCH₂), 2,87 (dd, J=12,7 ; 5,1 Hz 1 H, SCH^a), 2,82 (s, 1 H, 17-Alkin), 2,65 (d, J=12,7 , 1 H, SCH^b), 2,3 – 2,1 (m, 6 H), 2,0 – 1,9 (m, 3 H), 1,8 – 1,3 8 (m, 20 H) 0,81 (s, 3 H, 18-Methyl)

¹³C-NMR, CD₃OD, 75 MHz (¹H entkoppelt)

δ 176.1, 173.7, 170.4, 169.9, 166.2, 165.0, 157.4, 135.1, 132.1, 126.9, 118.7, 111.7, 80.3, 73.8, 63.5, 61.7, 57.1, 51.2, 42.7, 41.1, 40.3, 40.0, 39.3, 37.0, 36.9, 35.2, 33.7, 31.8, 30.9, 30.1, 29.8, 29.6, 27.5, 27.0, 26.5, 23.8, 22.2, 13.3 ppm

Auswertung des Massenspektrums:

Tabelle 1.13: Zuordnung der MS-Fragmente.

m/z	Zuordnung der Ionen	m/z	Zuordnung der Ionen
759,3	Molekülion + Natrium	563,3	Molekülion - (Methyl, Ethinyl, beide Hydroxygruppen, Harnstoff, Steroid D-Ring))
737,4	Molekülion	329,1	Ethinylestradiol-6-Oxim + Natrium
679,4	Molekülion - Harnstoff	307,1	Ethinylestradiol-6-Oxim
663,5	Molekülion - (Methyl, Ethinyl, beide Hydroxygruppen)	234,0	Biotin + Natrium
621,3	Molekülion - (Methyl, Ethinyl, eine Hydroxygruppe, Harnstoff)	312,0	Biotin

Die Synthese basierte auf der Aktivierung des Steroids für 3 Minuten bei -15°C unter Verwendung von Isobutylchloroformat als Abgangsgruppe des aktivierten Steroids (Munro et al. 1984). In einer Variation dieses Verfahrens zur Biotinylierung von Estradiol (Tiefenauer et al. 1990) wurde die Aktivierung bei erhöhten Temperaturen durchgeführt. Das Steroid wurde hierbei für 30 Minuten bei 8°C mit Isobutylchloroformat umgesetzt. Allerdings verdeutlichten die Voruntersuchungen im Estradiolsystem, dass es vorteilhaft ist, die schonendere Methode bei -15°C vorzuziehen und so eine einfache kinetische Kontrolle des Aktivierungsschrittes zu ermöglichen.

Die immunchemische Charakterisierung des biotinylierten Ethinylestradiols beschränkte sich auf die Messung von Kalibrationskurven unter Verwendung von Bio-LC EE2 in den Konzentrationen 0,5 und 1,0 pmol/mL (siehe hierzu auch Abbildung 1.19). Die Eignung von Bio-LC EE2 als Tracer konnte bestätigt werden.

1.5.2.1.2 EE2 ELISA und CLEIA

Die Kopplung von Peroxidase (POD) an das 6-CMO Derivat des EE2 leitete sich von der Kopplung von Progesteronderivaten an POD ab (Munro et al. 1984). Unterschiedlich zur Synthese und Aufarbeitung des biotinylierten EE2 wurde das Konjugat hier nicht in Reinform isoliert, sondern lediglich von niedermolekularen Edukten abgetrennt. Die gelchromatographische Trennung kann zu einer Mischung freier POD und gekoppelter POD führen. Allerdings war unter den gewählten Reaktionsbedingungen von einer quantitativen Kopplung des EE2 an die POD auszugehen. Von den sechs Lysinresten der POD stehen aufgrund sterischer Restriktionen drei für die Ausbildung von Amidbindungen mit dem EE2 Derivat zur Verfügung, ein Kopplungsverhältnis von 3:1 erscheint damit sehr plausibel (Carlsson et al. 1978; Claassen et al. 1985; Moroder et al. 1987). Unter Berücksichtigung von Ansatzgröße und chromatographischer Trennung konnte die Konzentration des Enzymkonjugats mit $5,7 \times 10^{-2}$ mM angegeben werden, d.h., dass sich die Angabe relativer Verdünnungen im Rahmen der Assay-Optimierung stets auf diese Größe bezieht.

1.5.2.2. Kreuzreaktivitäten

Die Immunoassays binden ausgesprochen spezifisch Ethinylestradiol. Für die meisten endogenen Stoffe treten ausschließlich vernachlässigbare Kreuzreaktivitäten auf (CR < 0.5 %, vgl. Tabelle 1.14). Wesentliche Kreuzreaktivitäten lagen lediglich für Metabolite des EE2 vor, die an der Hydroxyfunktion in Position 3 konjugiert sind: EE2-3-SO₄ und EE2-3-Glucuronid zeigten Kreuzreaktivitäten von 37 und 17 % im Bio-LC EE2 Assay sowie 22 und 34 % im EE2 ELISA. Die Bindung des EE2-6-Carboxymethyloxims (EE2-6-CMO), einer Synthesestufe des Immunogens, war annähernd identisch zur Bindung des eigentlichen Analyten EE2. Dies verdeutlichte, dass ausschließlich das Steroidgerüst gebunden, die Oximfunktionalität hingegen deutlich diskriminiert wurde. Das vollständige Immunogen zeigte eine sehr hohe Affinität zum Antikörper, die entsprechende Kreuzreaktivität ist um den Faktor 4000 größer als die des EE2. Dies kann über eine teilweise Erkennung des Trägerproteins durch den Antikörper erklärt werden.

Anhand der Kreuzreaktivitäten von Immunogen, sowie Oximderivat, wurde zweifelsfrei deutlich, dass der Antikörper keine Brückenbindung zeigt¹. Die bevorzugte Bindung des Immunogens und die geringeren Selektivitäten hinsichtlich der an Position 3 konjugierten EE2 Metaboliten verdeutlichten eine defiziente Erkennung dieser Verbindungen durch den Antikörper. Dies ist erklärbar durch den sterischen Anspruch des im Rahmen der Immunisierung verwendeten EE2-BSA Konjugats. Die räumliche Nähe des Trägerproteins, gebunden mittels der Oximbrücke an Position 6, zur Hydroxygruppe an Position 3 behindert eine gute Diskriminierung der Sulfate und Glucuronide an Position 3 des Ethinylestradiols. (Der Antikörper ist an dieser Stelle „blind“.) Im Gegensatz hierzu traten exzellente Kreuzreaktivitäten zu der weiter entfernten Hydroxygruppe in Position 17 auf (CR < 0,5 %). Diese Kreuzreaktivitäten stimmen mit Ergebnissen von Agasan et al. überein, die bei Verwendung eines ähnlichen Immunogens vergleichbare Selektivitäten hinsichtlich der 3- und 17-Sulfate des EE2 beschreiben (Agasan et al. 1986).

Tabelle 1.14: Übersicht der Kreuzreaktivitäten. Angegeben ist die molare Kreuzreaktivität in Prozent bezogen auf Ethinylestradiol. Die Selektivität im EE2 CLEIA wurde exemplarisch für Estron und Estradiol bestimmt und beträgt 0,1 bzw. 0,2 %.

	Bio-LC EE2 ELISA	EE2 ELISA
Estron	< 0,1	< 0,1
Estradiol (E2)	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,03
Estriol	< 0,1	< 0,1
E2-3-Glucuronide	0,4	0,5
E2-3-SO ₄	< 0,1	2 ± 0,85
E2-17-SO ₄	< 0,1	< 0,1
E2-17-Glucuronide	< 0,1	< 0,1
EE2-3-Glucuronide	17 ± 0,11	22 ± 1
EE2-3-SO ₄	37 ± 4,3	34 ± 1,7
EE2-17-Glucuronide	< 0,1	0,4 ± 0,05
EE2-6-CMO	99 ± 6,7	/
Immunogen	435000 ± 69000	/

Die Kreuzreaktivität eines Immunoassays ist eine intrinsische Eigenschaft des Antiserums, bedingt durch die sterischen Gegebenheiten der Antikörperbindungstasche. Tabelle 1.14 verdeutlicht, dass die erzielte Selektivität der Assays tatsächlich unabhängig vom verwendeten Enzymsystem ist. In Analogie hierzu sind Kreuzreaktivitäten natürlich auch unabhängig vom verwendeten Substratsystem, da die nachgegliederte Substratreaktion nicht vom Antikörper beeinflusst ist. Entsprechende Selektivitäten im EE2 CLEIA wurden daher nur exemplarisch für Estradiol und Estron bestimmt. Die hierbei erzielten Kreuzreaktivitäten von 0,2 und 0,1 % stimmten, wie erwartet, sehr gut mit den Werten der beiden anderen Assays überein.

1.5.2.3. Matrixeffekte

Der Effekt zunehmender Huminstoffkonzentration auf den Bio-LC EE2 ELISA und den EE2 ELISA ist in Abbildung 1.15 und Abbildung 1.16 dargestellt.

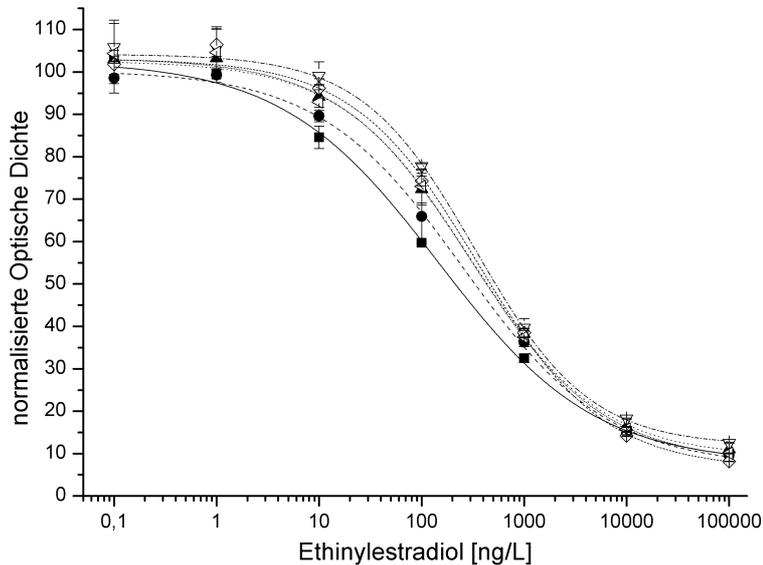


Abbildung 1.15: Gradueßer Einfluss kommerzieller Huminsäure auf den EE2 ELISA. Reinstwasser (durchgezogene Linie, gefüllte Quadrate), 0,2 mg/L Huminsäure (gestrichelte Linie, gefüllte Kreise), 0,5 mg/L Huminsäure (gepunktete Linie, gefüllte Dreiecke), 1,0 mg/L Huminsäure (punktgestrichelte Linie, ungefüllte umgekehrte Dreiecke), 5,0 mg/L Huminsäure (eng gestrichelte Linie, ungefüllte Rauten), 10,0 mg/L Huminsäure (eng gepunktete Linie, ungefüllte gedrehte Dreiecke).

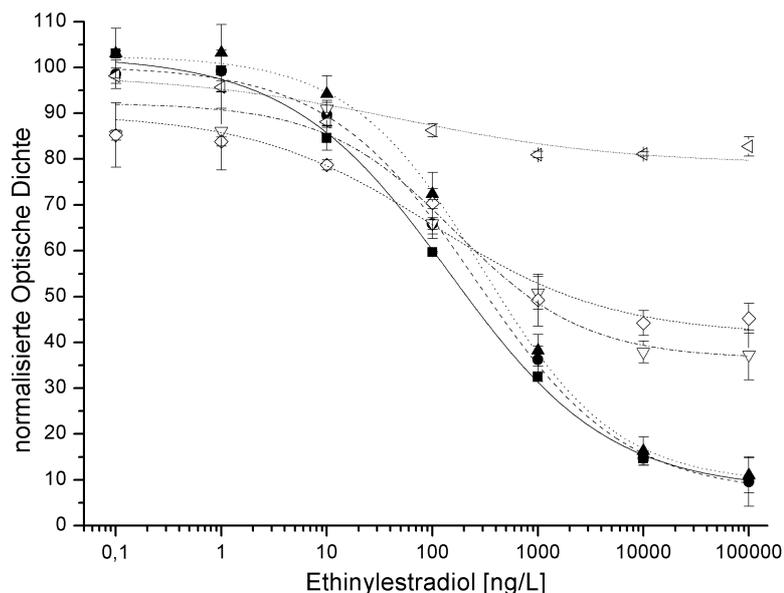


Abbildung 1.16: Gradueßer Einfluss kommerzieller Huminsäure auf den Bio-LC EE2 ELISA. Reinstwasser (durchgezogene Linie, gefüllte Quadrate), 0,2 mg/L Huminsäure (gestrichelte Linie, gefüllte Kreise), 0,5 mg/L Huminsäure (gepunktete Linie, gefüllte Dreiecke), 1,0 mg/L Huminsäure (punktgestrichelte Linie, ungefüllte umgekehrte Dreiecke), 5,0 mg/L Huminsäure (eng gestrichelte Linie, ungefüllte Rauten), 10,0 mg/L Huminsäure (eng gepunktete Linie, ungefüllte gedrehte Dreiecke).

Auffällig ist das unterschiedliche Verhalten des Bio-LC EE2 ELISAs und des EE2 ELISAs. Mit zunehmender Matrixbelastung wurde im Bio-LC EE2 System eine exakte Quantifizierung unmöglich, da sich die sigmoide Kurvenform nicht mehr vollständig ausbildete. Der EE2 ELISA hingegen zeigte ein robustes Verhalten und wurde weniger stark von der Modellsubstanz beeinträchtigt. Offensichtlich wird das im Bio-LC EE2 System verwendete biotinylierte Ethinylestradiol wesentlich stärker von der Huminsäure gestört als das direkte Enzymkonjugat im EE2 ELISA. Über den molekularen Mechanismus dieser Störung kann auf der Basis der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Huminsäuren stellen eine komplexe Mischung unterschiedlicher Kohlenwasserstoffe, mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen dar (Croue et al. 2003). Hier liegt eine Kombination verschiedener Effekte vor, die zudem eine Abhängigkeit von der Analytkonzentration zeigt.

1.5.2.4. Lösemittelleffekte

Zur Quantifizierung von Lösemittelleffekten ist in Abbildung 1.17 und Abbildung 1.18 der Einfluss von Aceton, Acetonitril und Methanol auf den Testmittelpunkt des EE2 ELISA und des Bio-LC EE2 ELISA gezeigt.

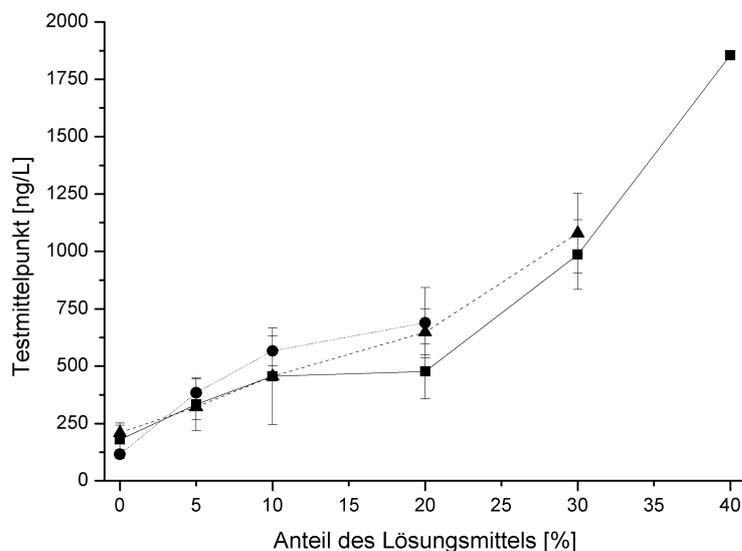


Abbildung 1.17: Einfluss organischer Lösungsmittel auf den EE2 ELISA. Methanol (durchgezogene Linie, Quadrate), Aceton (gestrichelte Linie, Kreise), Acetonitril (gepunktete Linie, Dreiecke).

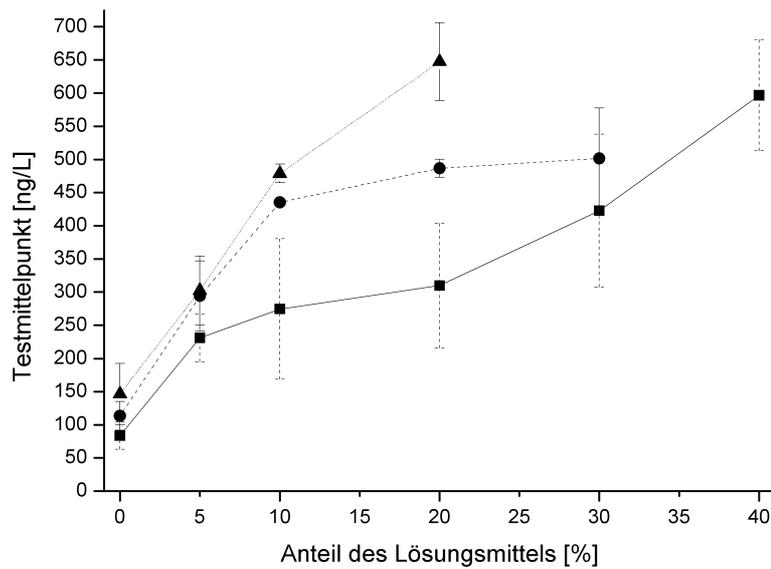


Abbildung 1.18: Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Bio-LC EE2 ELISA. Methanol (durchgezogene Linie, Quadrate), Aceton (gestrichelte Linie, Kreise), Acetonitril (gepunktete Linie, Dreiecke).

Der Kurvenverlauf zeigte eine wesentliche Beeinträchtigung beider Testsysteme durch die organischen Lösungsmittel. Parallel zu den dargestellten Verlusten der Empfindlichkeit wurde eine verminderte Extinktion beobachtet, d.h. die Gegenwart der Lösungsmittel vermindert die Empfindlichkeit und schränkt gleichzeitig den Messbereich ein.

1.5.3. Bio-LC EE2 ELISA

1.5.3.1. Affinitätslimit

Die Verdünnungsreihe des biotinylierten EE2 Derivats führte wie erwartet in einen affinitätslimitierten Bereich der Assaysensitivität. In Abbildung 1.19 ist der Verlauf der Extinktionswerte und Testmittelpunkte dargestellt, die einzelnen Messwerte korrespondieren mit den Parametern der zugehörigen Kalibrationskurven.

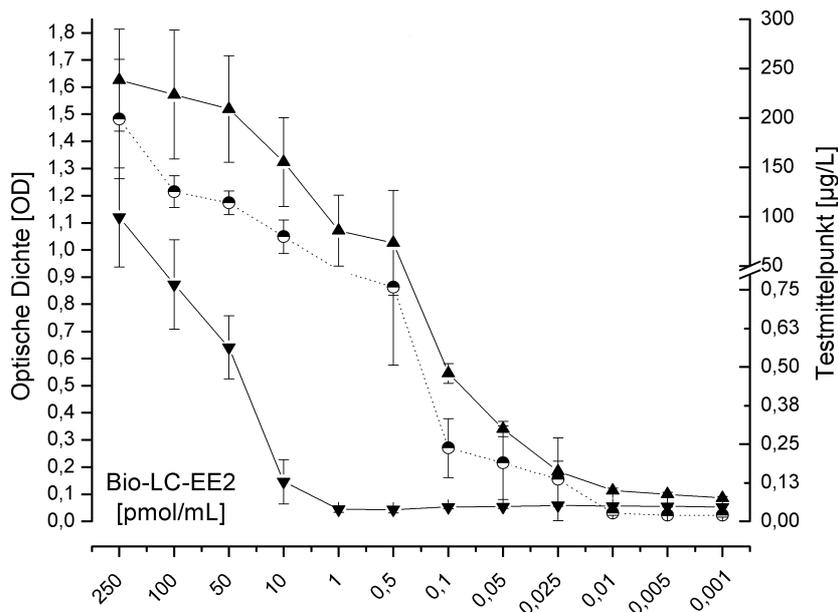


Abbildung 1.19: Verdünnungsreihe des Bio-LC EE2 Derivats. Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung, bei stets dreifach bestimmten Werten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen den Parametern der zugehörigen Kalibrationskurven (Parameter A, maximale OD dargestellt durch aufrechte Dreiecke; Parameter D, minimale OD dargestellt durch umgekehrte Dreiecke; Parameter C, Testmittelpunkt dargestellt durch halbgefüllte Kreise).

Es wird deutlich, dass Tracerkonzentrationen oberhalb von 10 pmol/mL sich sehr negativ auf den Wert der minimal erreichten Extinktion auswirkten. Die minimale Extinktion entspricht Parameter D der 4-Parameterfunktion (vgl. Gleichung 1.2) und beschreibt die nicht-spezifische Bindung des Tracers. Erst unterhalb dieses Schwellenwertes der Tracerkonzentration wurden akzeptable und gleichbleibend geringe Werte für Parameter D erzielt. Unterschiedlich zum Verhalten der minimalen Extinktion verläuft der Trend der maximalen Extinktion. Hier tritt eine beständige Abnahme des Messwertes mit geringer werdender Tracerkonzentration auf. Die maximale Extinktion steht in unmittelbarem Zusammenhang zur Konzentration des Antikörper-Tracer-Komplexes (siehe auch Gleichung 1.6). Abnehmende Tracerkonzentrationen führen entsprechend direkt zu kleineren Konzentrationen und somit zu kleineren Extinktionswerten. Eine zu starke Verdünnung des Tracers bedingt entsprechend verschwindend geringe Extinktionswerte. In Abbildung 1.19 tritt dies unterhalb von 0,025 pmol/mL auf. Der Verlauf der Sensitivität, dargestellt anhand der Testmittelpunkte, weist eine sehr gute Übereinstimmung zum Modell der

Affinitätslimitierung auf (vgl. Abbildung 1.8). Der limitierte Bereich wurde bei einer Tracerkonzentration von 0,01 pmol/mL erreicht, weitergehende Verdünnungen führten nicht mehr zu gesteigerter Sensitivität. Da der Übergang von 0,025 auf 0,01 pmol/mL nur geringe Verbesserungen bezüglich der Sensitivität bewirkte, jedoch mit weiteren Verlusten der maximal erzielten Extinktion verbunden war, wurde eine Bio-LC EE2 Konzentration von 0,025 pmol/mL für den Bio-LC EE2 ELISA festgelegt.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der festgelegten Inkubationszeit von 30 Minuten ergibt sich folgendes Assay-Protokoll.

Tabelle 1.15: Bio-LC EE2 Assay-Protokoll. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit einer Serumverdünnung von 1:50.000 und einem Volumen von 200 µL pro Kavität erfolgt über Nacht bei 25 °C und 65 % Luftfeuchte auf einem Platteninkubator mit 700 rpm (rounds per minute). Zum Waschen werden ein automatisches Waschgerät und der Waschpuffer PBS 1 verwendet. Die Standardreihe des EE2 umfasst den Konzentrationsbereich von 0,001-1000 µg/L, der Bio-LC EE2 Tracer hat eine Konzentration von 0,025 pmol/mL in PBS 2, das Streptavidin-Peroxidase Konjugat von 50 ng/mL in PBS 3.

1. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
2. Zugabe von je 100 µL Standard bzw. Probe, Inkubation für 30 Minuten
3. Zugabe von je 100 µL Bio-LC EE2 , Inkubation für 30 Minuten
4. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
5. Zugabe von je 200 µL Streptavidin-Peroxidase Konjugat, Inkubation für 30 Minuten
6. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
7. Zugabe von je 200 µL Substratlösung, Inkubation für 30 Minuten
8. Zugabe von je 50 µL 1 M Schwefelsäure

1.5.3.2. Studien zur Signalamplifikation

Die Verwendung des kommerziellen "Vectastain Elite ABC Kits" ermöglichte eine Signalmessung bei reduzierter Tracerinkubation (biotinyliertes EE2). Ohne Amplifikation war es zuvor nicht möglich, Kalibrationskurven zu einer Inkubationszeit von 5 Minuten aufzunehmen. Diese Verkürzung führte zu einer Verschiebung der Kalibrationskurve zu geringeren Konzentrationen, deutlich ersichtlich am C-Wert von 316 ng/L im Vergleich zu 857 ng/L bei einer Inkubation von 30 Minuten. Parallel zur Steigerung des Signalwertes kam es zu einer verstärkten nicht-spezifischen Bindung des Enzymkomplexes an das Polystyrol der Mikrotiterplatte. Dies bedingt den relativen Anstieg des Parameters D von 30 auf 40 % im amplifizierten Assay. In Abbildung 1.20 ist dies deutlich erkennbar.

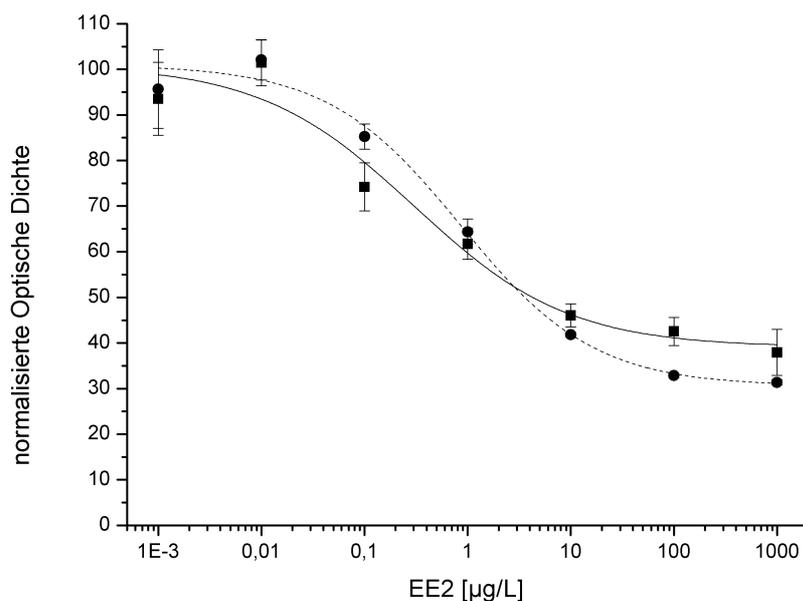


Abbildung 1.20: Vergleich einer konventionellen Kalibrationskurve des Bio-LC EE2 ELISA (gestrichelte Linie, Kreise), mit einer amplifizierten Messung bei gleichzeitig verkürzter Tracerinkubation (durchgezogene Linie, Quadrate).

1.5.3.3. Kenndaten

Die Berechnung der analytischen Kenndaten zum Bio-LC EE2 ELISA basiert auf den Daten einer repräsentativen Kalibrationskurve. Bezogen auf die entsprechende Berechnung in Kapitel 2 stellt dies eine leichte Abweichung der Berechnungsgrundlage dar. Dort wird eine sogenannte Masterkurve errechnet, diese stellt die theoretische Überlagerung mehrerer Kalibrationskurven dar. Leider ermöglicht die Berechnung einer Masterkurve aber nicht mehr die Angabe eines Präzisionsprofils nach Ekins. Im Vergleich zu den analytischen Kenndaten der Masterkalibrationskurve zeigt die Berechnung anhand einer typischen Kalibrationskurve verbesserte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, sowie einen breiteren Messbereich (vgl. Tabelle 1.16). Der analytische Bereich der Kalibrationskurve wurde mit Hilfe des Präzisionsprofils bei einem Variationskoeffizienten (X_{CV}) von 20 % bestimmt (vgl. Abbildung 1.21).

Tabelle 1.16: Kenndaten des Bio-LC EE2 ELISA.

	Kalibrationskurve	Masterkurve
Nachweisgrenze	2,6 ng/L	14,0 ng/L
Bestimmungsgrenze	20,7 ng/L	583,4 ng/L
Messbereich	0,025 – 54,8 µg/L	0,022 – 1,2 µg/L

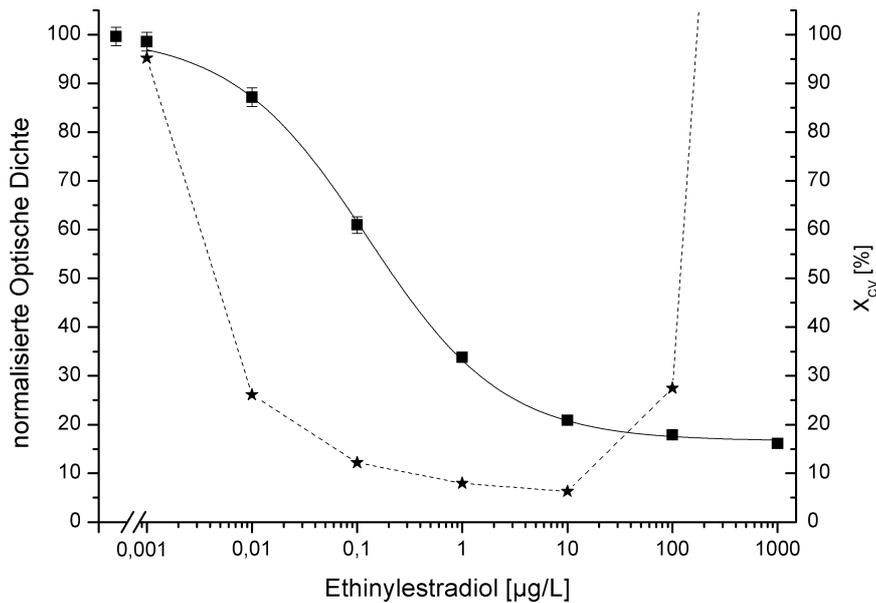


Abbildung 1.21: Repräsentative Kalibrationskurve des Bio-LC EE2 ELISA (durchgezogene Linie, Quadrate) mit zugehörigen Präzisionsprofil (gestrichelte Linie, Sterne).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der zwei Berechnungsvarianten können leicht mit Hilfe der verschiedenartigen Standardabweichungen der Kalibrations- und der Masterkurve erklärt werden. Im Falle der einzelnen Kalibrationskurve entsprechen die Standardabweichungen direkt den tatsächlichen Schwankungen der jeweiligen Messwiederholungen. Zur Berechnung der Masterkurve werden diese einzelnen Standardabweichungen jedoch mit der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aufsummiert, hierbei errechnet sich der Gesamtfehler durch die Wurzel der Summe quadrierter Einzelfehler (vgl. Gleichung 1.11).

$$\Delta y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \Delta x_i^2} \quad \begin{array}{l} \Delta y - \text{Gesamtfehler} \\ \Delta x - \text{Einzelfehler} \end{array}$$

Gleichung 1.11: Gauß'sche Fehlerfortpflanzung, additive Form.

Durch Bildung dieser Quadratsumme kommt es zu einer wesentlichen Steigerung des Gesamtfehlers im Vergleich zum Einzelfehler. Da für die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf die Standardabweichungen der Blankmessungen zurückgegriffen wird, zeigt die Masterkurve entsprechend schlechtere Kenndaten. Der analytische Bereich der Masterkurve wurde definiert als der Abschnitt zwischen 80 und 40 % der normierten Optischen Dichte; für den analytischen Bereich der Einzelkurve wurde das Präzisionsprofil berechnet und ein maximaler Variationskoeffizient der Konzentration (X_{CV}) von 20 % als akzeptabel betrachtet. Zur Berechnung des Präzisionsprofils ist die Kenntnis der einzelnen Standardabweichungen zu jeder Konzentrationsstufe erforderlich. Bei Erstellung einer Masterkalibrationskurve können die zugehörigen Standardabweichungen mittels der Gauß'schen Fehlerfort-

pflanzung verrechnet werden. Dieser neue, gekoppelte Fehler unterscheidet sich aber formal von der individuellen Standardabweichung, die zur Profilrechnung benötigt wird.

Obgleich die Verwendung einer Masterkalibrationskurve zur Berechnung der analytischen Kenndaten eher nachteilig ist, bzw. eine vermeintlich geringere Sensitivität suggeriert, ist für den Anwender ein anderer Vorteil mit der Masterkurve verbunden. Die Masterkurve beschreibt sehr anschaulich die Sensitivität eines Assays durch ihre Lage auf der Konzentrationsachse. Die Verrechnung mehrerer Kalibrationskurven ermöglicht hierbei die Beschreibung einer laborinternen durchschnittlichen Leistungsfähigkeit, die bewusst auf die Auswahl einer besonders "schönen" Kurve, etwa für eine Publikation, verzichtet.

1.5.4. EE2 ELISA

1.5.4.1. Affinitätslimit

Die Optimierung der Sensitivität bei festgelegter Tracerinkubation von 30 Minuten führte zu einer Affinitätslimitierung des EE2 ELISA bei einer Tracerverdünnung von 1:50.000 (vgl. Abbildung 1.22).

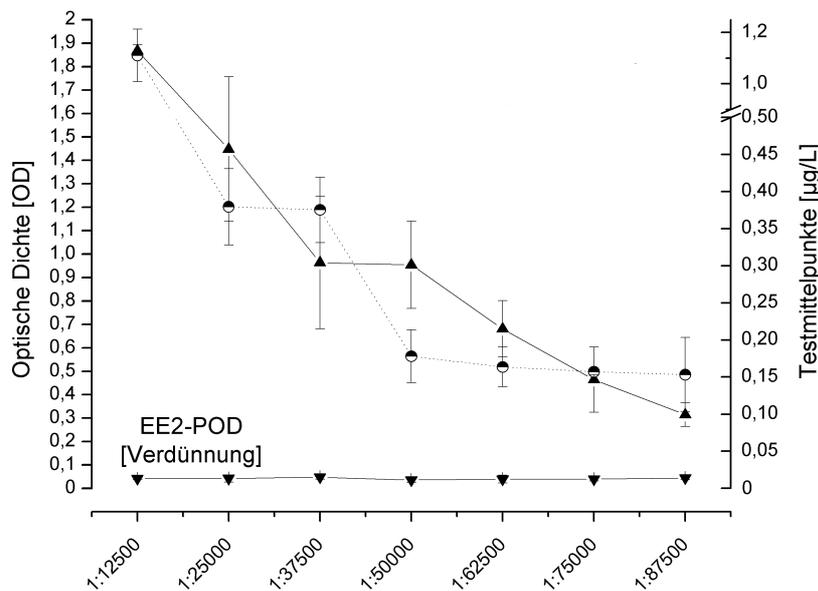


Abbildung 1.22: Verdünnungsreihe des Peroxidase-Tracers (EE2-POD). Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung, bei stets dreifach bestimmten Werten. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen den Parametern der zugehörigen Kalibrationskurven (Parameter A, maximale OD dargestellt durch aufrechte Dreiecke; Parameter D, minimale OD dargestellt durch umgekehrte Dreiecke; Parameter C, Testmittelpunkt dargestellt durch halbgefüllte Kreise).

Wie erwartet führte die zunehmende Verdünnung des Tracers zu einer Abnahme der maximalen Signalintensität bei gleichzeitiger Verbesserung der Sensitivität. Oberhalb einer Verdünnung von 1:50.000 blieb die Assaysensitivität unverändert, es traten lediglich Verluste der Signalstärke auf. Hier kommt es zur Limitierung der Sensitivität. Der Verlauf von maxi-

maler Extinktion und Testmittelpunkten gleicht den Ergebnissen des Bio-LC EE2 ELISA (vgl. Abbildung 1.19). Unterschiedlich zum Verhalten des Bio-LC EE2 Tracers verhielt sich die minimale optische Dichte im EE2 ELISA. Die Werte bleiben auch bei kleinen Tracerverdünnungen, beispielsweise bei 1:12.500, sehr gering, was mit einer sehr schwachen nicht-spezifischen Bindung des Tracers korrespondiert.

Im zweiten Optimierungsschritt wurde der EE2 ELISA für manuelle Messungen angereicherter Proben weiterentwickelt. Hierzu wurde die Tracerinkubationszeit verkürzt, die Anzahl der Antikörperbindungsplätze erhöht (doppeltes Volumen der Antikörperlösung) und das Medium der Kalibratoren auf einen 5 %igen Methanolgehalt umgestellt.

Ziel der verkürzten Inkubation war es, den Tracer im Vergleich zum Analyten in der Konkurrenzreaktion um Antikörperbindungsplätze kinetisch zu benachteiligen und eine zusätzliche Sensitivitätssteigerung zu erzielen.¹⁸ In Analogie zur Verdünnungsreihe des Tracers bedingt auch die Verkürzung der Inkubationszeit eine Abnahme der Signalintensität. Zur Kompensation dieser Signalverluste wurde parallel im Beschichtungsschritt des ELISA ein Volumen von 200 µL der Antikörperlösung verwendet. Dies ermöglichte eine Ausnutzung des oberen Bereichs der Mikrotiterkavitäten, wodurch eine gesteigerte Zahl von Antikörperbindungsstellen bereitgestellt wurde. Entsprechend zu Gleichung 1.6 führt eine Erhöhung der Konzentration an Bindungsstellen zu einer gegenläufigen Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung komplexierter Tracermoleküle. Letztendlich konnte so keine signifikante Verbesserung der Sensitivität erreicht werden, allerdings konnte das Protokoll des EE2 ELISA leicht gestrafft werden. Die Verwendung der methanolischen Kalibratoren wurde für die Anwendung des Assays zur Messung organischer Probenextrakte notwendig.

Für den EE2 ELISA ergibt sich somit das folgende Assay-Protokoll:

Tabelle 1.17: EE2 ELISA Assay-Protokoll. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit einer Serumverdünnung von 1:50.000 und einem Volumen von 200 µL pro Kavität erfolgt über Nacht bei 25 °C und 65 % Luftfeuchte auf einem Platteninkubator mit 700 rpm. Zum Waschen werden ein automatisches Waschgerät und der Waschpuffer PBS 1 verwendet. Die Standardreihe des EE2 umfasst den Konzentrationsbereich von 0,001-1000 µg/L in Gegenwart von 5 % Methanol. Der EE2-POD Tracer hat eine Verdünnung von 1:50.000 in PBS 2.

1. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
2. Zugabe von je 100 µL Standard bzw. Probe, Inkubation für 30 Minuten
3. Zugabe von je 100 µL EE2-POD, Inkubation für 10 Minuten
4. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
5. Zugabe von je 200 µL Substratlösung, Inkubation für 30 Minuten
6. Zugabe von je 50 µL 1 M Schwefelsäure

¹⁸ Grundlage dieser Methode ist, dass der Assay unter nicht-Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt wird, was auf alle Immunoassays dieser Arbeit zutrifft.

1.5.4.2. Kenndaten

Die Berechnung der analytischen Kenndaten des EE2 ELISA leitet sich von der in Abbildung 1.23 gezeigten typischen Kalibrationskurve ab. Für diese Kurve wurden Kalibratoren mit einem Methanolgehalt von 5 % verwendet.

Tabelle 1.18: Analytische Kenndaten des EE2 ELISA, basierend auf methanolischen Kalibratoren (5 %).

Nachweisgrenze	0,5 ng/L
Bestimmungsgrenze	6,0 ng/L
Messbereich	0,004 – 128,4 µg/L

Der Messbereich wurde analog zum Bio-LC EE2 ELISA mit Hilfe eines Präzisionsprofils bei einem maximalen Variationskoeffizienten (X_{CV}) von 20 % bestimmt.

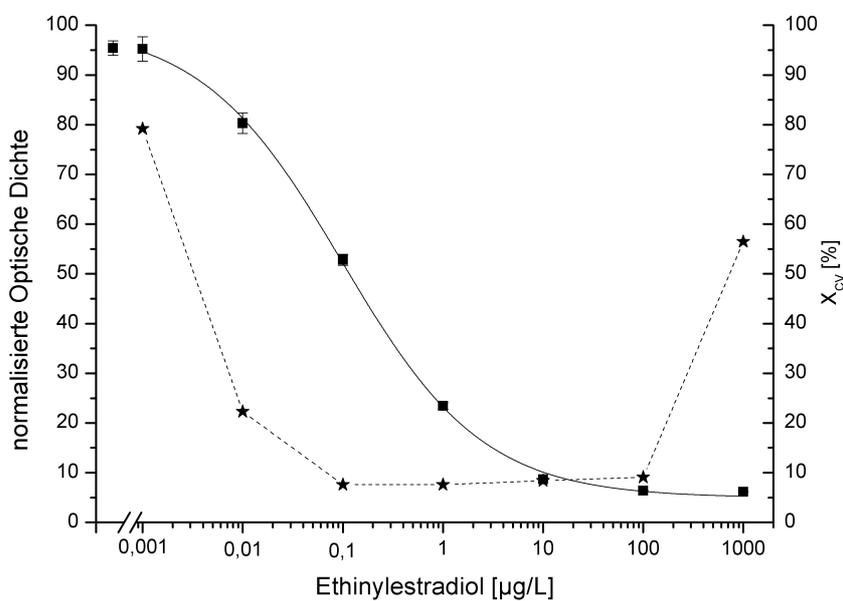


Abbildung 1.23: Repräsentative Kalibrationskurve des EE2 ELISA. Kalibratoren (5 % Methanol).

Das Profil hat eine ausgeprägt breite Form, was sich im vergleichsweise weiten Messbereich von 4 ng/L bis 128 µg/L widerspiegelt. Nachweis- und Bestimmungsgrenze zeigen bereits sehr gute Sensitivitäten, entsprechende Werte anderer Assays zur Bestimmung von EE2 in der aquatischen Umwelt werden übertroffen (Coille et al. 2002; Goda et al. 2003).

1.5.5. EE2 CLEIA

Der EE2 CLEIA ist eine Weiterentwicklung des EE2 ELISA unter Ausnutzung der Chemilumineszenzdetektion. Im Rahmen der Entwicklung dieses neuen Assays wurde besonderer Wert auf den exemplarischen Charakter der Optimierung gelegt. Ausgangspunkt der Optimierung war ein modifiziertes EE2 ELISA Protokoll (Antikörperverdünnung 1:200.000, Tracerverdünnung 1:50.000) welches noch mit photometrischer Detektion arbeitete. In Abbildung 1.24 sind Ergebnisse zur Variation der Tracerinkubationszeit dargestellt, aufgenommen mit Hilfe des modifizierten EE2 ELISAs.

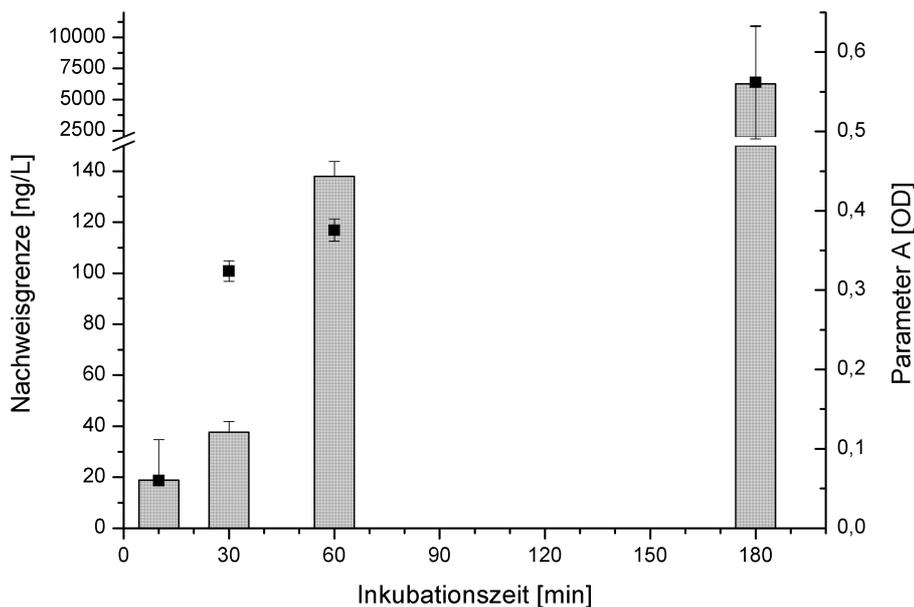


Abbildung 1.24: Variation der Tracerinkubationszeit. Die grauen Balken zeigen den Einfluss der Inkubationszeit (linke Achse) auf die Nachweisgrenze, schwarze Quadrate auf Parameter A (rechte Achse). Parameter A ist in Einheiten der Optischen Dichte (OD) angegeben.

Es wird deutlich, dass der Einfluss der Tracerinkubationszeit auf Sensitivität und Signalstärke identisch zum Einfluss von Konzentration bzw. Verdünnung ist (vgl. Abbildung 1.19 und Abbildung 1.22). Dies steht in Einklang mit Modellen zu diffusionslimitierten Reaktionen im heterogenen Immunoassay (Stenberg et al. 1986). Hiernach verarmt die fest-flüssig Grenzschicht rasch an Tracermolekülen und die Neubildung des Antikörper-Tracer-Komplexes wird allein von der zeitabhängigen Diffusion der Tracermoleküle in die Grenzschicht gesteuert. Das heißt, dass über die Inkubationszeit somit die für Sensitivität und Signalintensität relevante Konzentration des Antikörper-Tracer-Komplexes gesteuert werden kann. Eine zehnmünütige Inkubationszeit führte im modifizierten EE2 ELISA zu einem extremen Verlust der Signalintensität und bildete den Grenzfall photometrischer Messbarkeit in diesem System. Vergleichsmessungen der beiden Substrate auf TMB- bzw. Luminolbasis wurden unter diesen Grenzbedingungen durchgeführt. Ziel der Messung war es, aufzuzeigen, dass die Sensitivität durch das Massenwirkungsgesetz und die Kinetik der Immunokomponenten (Antikörper und

Tracer) bedingt wird und nicht abhängig vom Messprozess ist. Es wurden mehrere Kalibrationskurven aufgenommen und die Sensitivität mittels Berechnung der Testmittelpunkte verglichen. Aus jeweils drei einzelnen Messungen ergab sich im photometrischen System ein mittlerer Testmittelpunkt von 42 ± 12 ng/L und im Lumineszenzsystem von 34 ± 8 ng/L. Der Unterschied von 8 ng/L stellt eine vernachlässigbare Abweichung der C-Werte dar. Da die Testmittelpunkte an der logarithmisch skalierten Konzentrationsachse abgelesen werden (vgl. Abbildung 1.5) führen hier schon leichte Abweichungen im Protokoll eines Assays, beispielsweise Pipettierungenauigkeiten, zu Abweichungen im Testmittelpunkt.

Ein unmittelbarer Vergleich der Kalibrationskurven zu beiden Substratsystemen war nur bedingt möglich. In Abhängigkeit der verwendeten Normierung wurden verschiedene Aspekte der Assayentwicklung deutlich. Für den Vergleich in Abbildung 1.25 wurde die in Gleichung 1.4 beschriebene Normierung auf den Parameter A verwendet. Entgegen obigen Ausführungen entsteht hier der Eindruck, die beiden Kalibrationskurven seien keineswegs identisch, zeigten vielmehr ein deutlich unterschiedliches Verhalten.

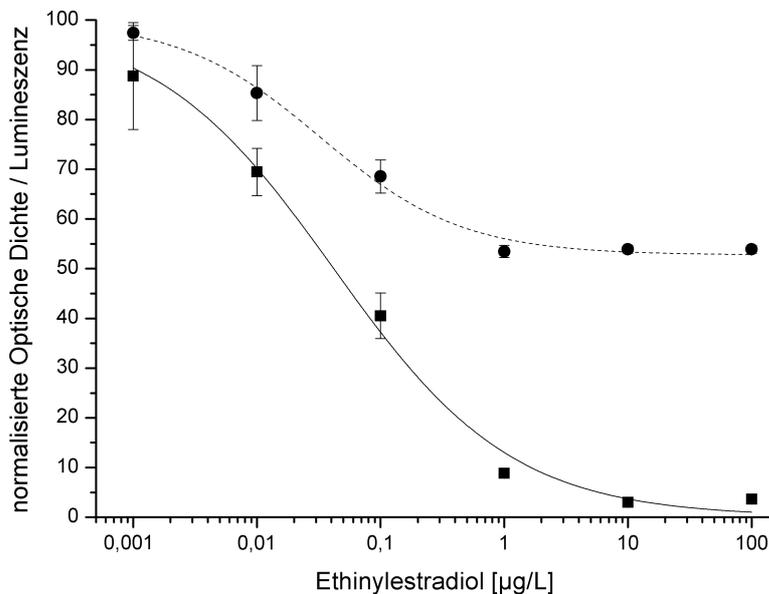


Abbildung 1.25: Vergleich von photometrischer (gestrichelte Linie, Kreise) und Chemilumineszenzmessung (durchgezogene Linie, Quadrate). Antikörperverdünnung 1:200.000, Tracerverdünnung 1:50.000, Tracerinkubation 10 Minuten. Testmittelpunkt der photometrischen Messung: 32 ng/L, Testmittelpunkt der Chemilumineszenzmessung 42 ng/L. Die Rohdaten wurden entsprechend Gleichung 1.4 normiert.

Besonders die wesentlich verschobene untere Asymptote der photometrischen Messung steht scheinbar im Widerspruch zur Identität der Kurven. Hier ist es jedoch entscheidend, auf welche Weise die zugehörigen Rohdaten zur Normierung verrechnet werden. Der Referenzwert für diese Normierung ist Parameter A der zugehörigen Kalibrationskurve, errechnet aus den jeweiligen Rohdaten. Die Rohdaten wurden unter Bedingungen generiert, die im photometrischen System dem Grenzfall der Messbarkeit entsprechen; d.h. der Gradient der Signalintensität, abgeleitet nach der Kalibratorkonzentration, ist ausgesprochen gering; die obere (entsprechend Parameter A) und die untere Asymptote (entsprechend Parameter D)

nähern sich daher einander sehr stark an. Durch Normierung dieser Rohdaten auf Parameter A wird Parameter D dem entsprechend angehoben und es bildet sich eine Art Sockel unterhalb der Kurve aus. Rechnerisch kann dieser Sockel durch eine Normierung auf die Differenz von A zu D eliminiert werden, vgl. Gleichung 1.12.

$$Y_N = \frac{Y - D}{A - D} * 100$$

Gleichung 1.12: Alternative Normierungsfunktion.

Hierdurch werden die Kalibrationskurven zu einem kongruenten Verlauf im Bereich minimaler und maximaler Konzentrationen gezwungen (Weller et al. 1992). Angewendet auf die Rohdaten aus Abbildung 1.25, führt dies zu einem annähernd identischen Kurvenverlauf, vgl. Abbildung 1.26.

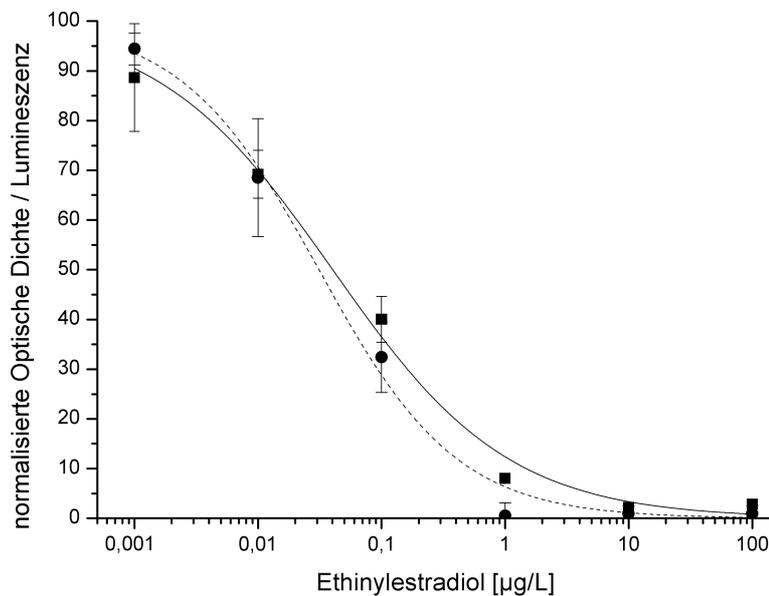


Abbildung 1.26: Analogon zu Abbildung 1.25. Die Rohdaten wurden entsprechend Gleichung 1.12 normiert, Sensitivitäten und Testmittelpunkte werden von der alternativen Normierung nicht beeinflusst.

Diese Art der Normierung wird zur detaillierten Beschreibung des EE2 CLEIA im Kapitel 4 dieser Arbeit verwendet.

Zur weiteren Optimierung des EE2 CLEIA wurde die Verdünnung des Tracers auf bis zu 1:500.000 erhöht und mit diesen Bedingungen das EE2 CLEIA Protokoll festgelegt, vgl. Tabelle 1.19.

Tabelle 1.19: Assay-Protokoll des EE2 CLEIA. Zur Beschichtung werden weiße Mikrotiterplatten bei einer Serumverdünnung von 1:200.000 und einem Volumen von 200 µL pro Kavität verwendet. Die Beschichtung erfolgt über Nacht bei 25 °C und 65 % Luftfeuchte auf einem Platteninkubator mit 700 rpm. Zum Waschen werden ein automatisches Waschgerät und der Waschpuffer PBS 1 verwendet. Die Standardreihe des EE2 umfasst den Konzentrationsbereich von 0,001-1000 ng/L. Der EE2-POD Tracer hat eine Verdünnung von 1:500.000 in PBS 2.

1. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
2. Zugabe von je 100 µL Standard bzw. Probe, Inkubation für 30 Minuten
3. Zugabe von je 100 µL EE2-POD, Inkubation für 10 Minuten
4. Waschen und Dekantieren der Mikrotiterplatte
5. Zugabe von je 200 µL Substratlösung im Lumineszenzphotometer

Im Vergleich zum Bio-LC EE2 ELISA und zum EE2 ELISA wurde das neue Protokoll erneut verkürzt. Einschließlich der Waschschritte, der Substratzugabe und Messung des Lumineszenzsignals konnte der Assay auf weniger als 60 Minuten reduziert werden.

1.5.5.1. Kenndaten

Aufgrund der erzielten Steigerung der Sensitivität war es erforderlich, die Kalibratorlösungen stärker zu verdünnen. Die verdünnten Kalibratoren decken den Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1000 ng/L ab. Für den EE2 CLEIA ergeben sich die folgenden analytischen Kenndaten:

Tabelle 1.20: Analytische Kenndaten des EE2 CLEIA. Der Messbereich wurde mit Hilfe des Präzisionsprofils bei einem Variationskoeffizienten von 20 % bestimmt.

Nachweisgrenze	0,2 ng/L
Bestimmungsgrenze	1,4 ng/L
Messbereich	0,8 – 100,0 ng/L

Eine typische Kalibrationskurve des EE2 CLEIA in Abbildung 1.27 gezeigt.

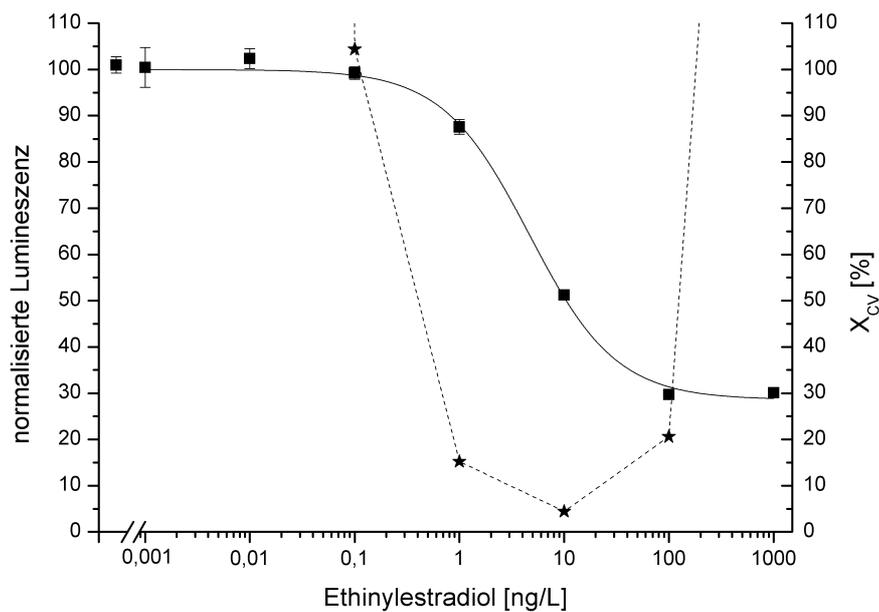


Abbildung 1.27: Typische Kalibrationskurve des EE2 CLEIA. Die Signalstärke ist in Form normalisierter Lumineszenzmesswerte (relative light unit) angegeben.

Die Kalibrationskurve des EE2 CLEIA zeigt einen Sockel von ca. 30 % der Signalstärke. Dies steht, wie schon in Abbildung 1.25 beobachtet, in Zusammenhang mit den Größen von Parameter A und D. Auch hier kommt es bereits zu einer Abschwächung des Gradienten im Lumineszenzmesswert von minimaler zu maximaler Kalibratorkonzentration. Das zugehörige Präzisionsprofil zeigt eine vergleichsweise schmale Form, der Messbereich ist entsprechend auf zwei Dekaden limitiert.

1.5.6. Feldstudie

Im Rahmen der Feldstudie wurde die Anwendbarkeit des EE2 ELISA und EE2 CLEIA für Messungen von Realproben untersucht. Parallel zur Bestimmung mittels Immunoassay wurden auch Messungen in einem sogenannten Referenzlabor durchgeführt.

1.5.6.1. Anreicherungsmethode

Mit der Anreicherung der Wasserproben wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen wurden die Proben aufkonzentriert, zum anderen wurde versucht störende Matrixkomponenten auszuwaschen. Hierzu dienen die in Tabelle 1.10 aufgeführten Schritte 7a-c, die das Spülen der Kartusche mit wässrigem Aceton und Methanolmischungen sowie mit Hexan beschreiben. Dieses Vorgehen geht ursprünglich auf ein Verfahren zur Aufreinigung von Klärschlamm zurück (Ternes et al. 2002), hat allerdings auch Eingang in die Untersuchung belasteter Wasserproben gefunden. Im hier verwendeten Protokoll wurde der hohe pKs-Wert des EE2 von 10,3 berücksichtigt (Quintana et al. 2004). Bezogen auf die Anreicherung des EE2 bedingt ein pKs von 10,3 die Irrelevanz einer pH Absenkung, wie sie teilweise in den Originalarbeiten empfohlen wird (Zühlke et al. 2005). Die Anreicherung des EE2, ebenso wie die Anreicherung des verwandten E2 erfolgt im sauren bis im neutralen Bereich entsprechend unabhängig vom pH-Wert. Eine Anreicherung bei pH 7 mindert die unerwünschte Anreicherung von Matrixkomponenten, insbesondere der sauren Huminstoff-Komponenten (Humin- und Fulvinsäuren). Durch Absenkung des pHs wird eine verstärkte Absorption der Huminstoffe auf der Festphase begünstigt. Entsprechende Extrakte zeigen eine höhere Belastung durch diese Matrixkomponenten. Dies kann im Falle einer massenspektrometrischen Detektion zu wesentlichen Signalsuppressionen und im ELISA zu abweichenden Messwerten führen.

Aus der Bestimmung der Wiederfindung mittels dotierter Realproben ergeben sich die in Tabelle 1.21 aufgeführten Werte.

Tabelle 1.21: Wiederfindung zur Anreicherung.

Leitungswasser	$110,0 \pm 0,1 \%$
Oberflächenwasser	$151,5 \pm 0,02 \%$
Kläranlagenablauf	$125,0 \pm 0,04 \%$

Diese Wiederfindungen liegen alle im erwarteten Bereich. Da die Werte größer als 100 % sind, ist durch Volumenverluste im Zuge der Anreicherung erklärbar, beispielsweise im Rahmen von Einengen und Lösen der Extrakte.

1.5.6.2. Messwerte

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick zu Ergebnissen der Feldstudie. Im Falle der Messung mittels Immunoassay wurden die Nachweisgrenzen jeweils anhand der zugehörigen Kalibrationskurven ermittelt. Im Fall des LC-MS/MS Verfahrens wurde mit Hilfe deuterierter Surrogatstandards eine Nachweisgrenze von 0,3 ng/L festgelegt. Messungen dotierter Proben verdeutlichten allerdings wesentliche Schwierigkeiten beim Erzielen einer annähernd quantitativen Anreicherung der Wasserproben im Referenzlabor¹⁹.

Tabelle 1.22: Messung dotierter Proben.

Probe	EE2 [ng/L]		
	nominell	CLEIA	LC-MS/MS
Reinstwasser	2,5	1,4	2,1
Leitungswasser	2,5	1,5	1,3

Abgesehen von der Messung dotierter Proben zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Reinst- und Leitungswasser zusätzlich im EE2 CLEIA ohne Anreicherung gemessen. Sowohl im CLEIA wie auch in der Referenzmessung kommt es zu einer Unterbestimmung des nominalen Gehalts an EE2. Der Vergleich von CLEIA zu LC-MS/MS zeigt eine dennoch recht gute Übereinstimmung.

¹⁹ Basierend auf den Werten aus Tabelle 1.22 und analogen Messungen mit Oberflächenwasser und Kläranlagenablauf ergeben sich für die Messungen des Referenzlabors Wiederfindungen von 52 % (Leitungswasser), 36 % (Oberflächenwasser) und 34 % (Kläranlagenablauf) [Dirk Skutlarek, persönliche Mitteilung].

Tabelle 1.23: Übersicht der Realproben. Die Abkürzung KA steht für Kläranlage. Es handelt sich stets um Stichproben, mit Ausnahme der mit einer Raute (#) gekennzeichneten 24 h-Mischprobe. Die mit einem Stern (*) gekennzeichnete Probe konnte aufgrund von Glasbruch nicht im EE2 ELISA gemessen werden. Die Nachweisgrenze des EE2 CLEIA betrug hier 0,2 ng/L, die der LC-MS/MS Methode 0,3 ng/L.

Probe	Datum	EE2 [ng/L]		
		ELISA	CLEIA	LC-MS/MS
Ahr Blankenheim	Jan 05	0,3	< LOD	< LOD
Ahr Blankenheim	Feb 05	0,5	< LOD	< LOD
Ahr Dümpelfeld	Jan 05	0,7	< LOD	< LOD
Ahr Dümpelfeld	Feb 05	0,9	< LOD	< LOD
Agger Lohmar	Jan 05	1,0	< LOD	< LOD
Agger Lohmar	Feb 05	0,6	0,7	< LOD
Rhein Bonn	Jan 05	0,7	0,6	< LOD
Rhein Bonn	Feb 05	0,8	< LOD	< LOD
KA Altenrath	Jan 05	1,6	2,8	< LOD
KA Altenrath	Feb 05	3,3	1,9	0,8
KA Blankenheim [#]	Jan 05	0,9	1,0	< LOD
KA Blankenheim [#]	Feb 05	*	1,3	< LOD
KA Dümpelfeld	Jan 05	2,9	1,3	< LOD
KA Dümpelfeld	Feb 05	0,4	0,8	< LOD
KA Ohlenhard	Jan 05	1,8	< LOD	< LOD
KA Ohlenhard	Feb 05	3,1	2,1	< LOD

Auffällig an den in Tabelle 1.23 aufgeführten Messwerten ist die häufige Unterschreitung der Nachweisgrenze (LOD) im Referenzverfahren. Aufgrund der ineffizienten Anreicherung im Referenzlabor muss die angegebene Nachweisgrenze von 0,3 ng/L als nicht haltbar betrachtet werden. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Wiederfindung¹⁹ ist eine Nachweisgrenze von ca. 1,0 ng/L im Referenzverfahren als plausibel anzusehen.

Tabelle 1.24: Messung von 24 h-Mischproben der vier Kläranlagen in Bonn.

Probe	EE2 [ng/L]	
	CLEIA	LC-MS/MS
KA Beuel	0,6	< LOD
KA Salierweg	0,4	0,8
KA Duisdorf	0,4	0,3
KA Bad Godesberg	0,7	0,6

Die mit Hilfe des ELISA und CLEIA bestimmten Messwerte im Oberflächenwasser und im Kläranlagenablauf lagen alle im erwarteten Bereich. Auffällige Abweichungen zu Literaturwerten traten nicht auf (Aerni et al. 2004; Komori et al. 2004; Pawlowski et al. 2004a; Servos et al. 2005). Die in der Pflanzenkläranlage Altenrath und der Teichkläranlage Ohlenhard gemessene EE2 Konzentration ist im Vergleich zu den Messwerten der klassischen mechanisch-

biologischen Kläranlagen leicht erhöht. Im Vergleich zu klassischen Anlagen verläuft die Abwasserreinigung in Altenrath und Ohlenhard mit verminderter Intensität, insbesondere die für den Abbau von EE2 relevante Denitrifikation ist hier offensichtlich unzureichend ausgelegt. Leider stehen keine adäquaten Literaturangaben zu Kläranlagen dieses Typs zur Verfügung. Studien zu Hormonbestimmungen in nicht-konventionellen Kläranlagen wie den hier untersuchten Pflanzen- und Teichkläranlagen wurden bislang nur selten durchgeführt. Ein möglicher Grund mag die analytisch schwierigere Matrixbelastung entsprechender Proben sein. Eine zum Altenrather Typ ähnliche Pflanzenkläranlage wurde in einer Studie des UFZ-Leipzig vorgestellt (Braun et al. 2003). Leider konnten hier aber keine sinnvollen Nachweisgrenzen für EE2 erzielt werden. Eine Studie zu Teichkläranlagen wie in Ohlenhard findet sich bei Kolodziej et al. (Kolodziej et al. 2003). Allerdings beschränkten sich die Autoren auf die Untersuchung der Estrogene Estradiol und Estron. Zudem fungiert die dort beschriebene Anlage lediglich als vergrößertes Nachklärbecken einer mechanisch-biologischen Kläranlage. Zur Beschreibung der mechanisch-biologischen Kläranlagen kann auf ein Modell zur Abschätzung der EE2-Konzentrationen zurückgegriffen werden. Für die Schätzung finden Einwohnergleichwerte, der tägliche Abwasserzufluß sowie eine mittlere EE2 Abbaurate von 85,2 % Eingang in die Auswertung (Johnson et al. 2004). In Abbildung 1.28 sind die Ergebnisse aus Tabelle 1.24 im Vergleich zum jeweiligen Schätzbereich dargestellt.

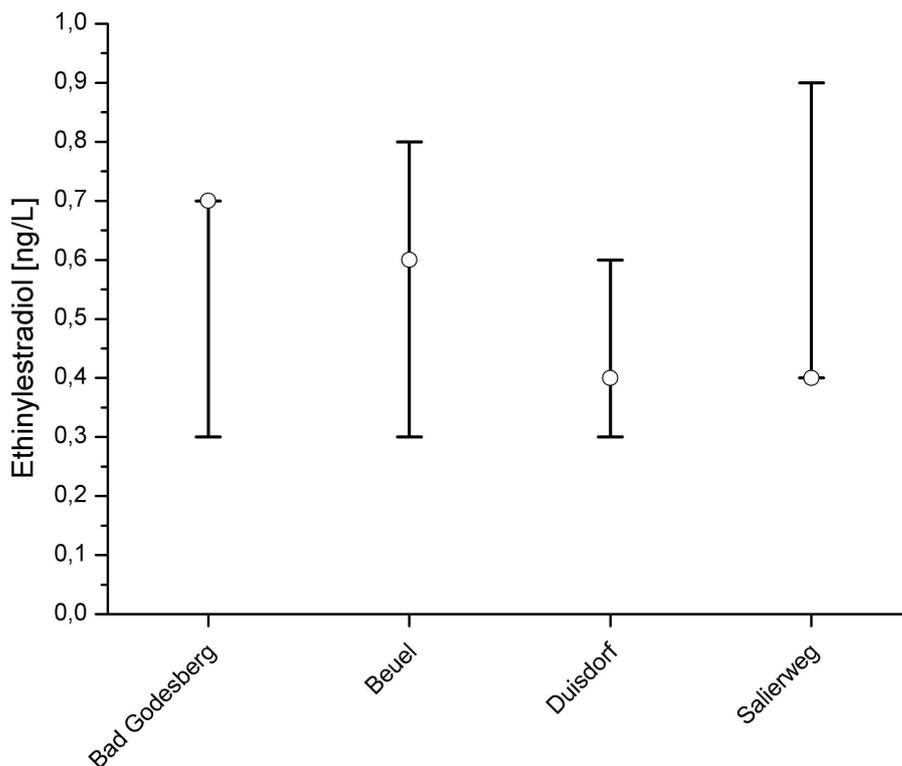


Abbildung 1.28: Vergleich von Messung und Modellschätzung. Schätzwerte sind durch Balken wiedergegeben, Messwerte aus Tabelle 1.24 in Kreisform.

Es lag eine sehr gute Übereinstimmung von Mess- und Schätzwerten vor. Eine schlechtere Übereinstimmung liegt im Fall der Kläranlagen in Blankenheim und Dümpelfeld vor. Anhand der Modellschätzung ergab sich für Blankenheim ein Erwartungsbereich von 0,1 – 0,3 und für Dümpelfeld von 0,3 – 0,7 ng/L. Die im ELISA und im CLEIA gemessenen Konzentrationen lagen mit einer Ausnahme (ELISA Messung in Dümpelfeld, Feb 05) über diesen Schätzwerten. Für die Anlage in Blankenheim lagen die Werte um 1 ng/L, in Dümpelfeld trat ein Maximalwert von 2,9 ng/L auf (vgl. Tabelle 1.23).

1.6. Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation liegt in der Methodenentwicklung sowie der Optimierung bestehender Methoden im Bereich Umweltanalytik mittels Immunoassays.

1.6.1. Immunoassays

Ausgangspunkt der Arbeiten, die zum Aufbau der drei ELISAs für Ethinylestradiol führten, waren Vorstudien an einem Modellsystem zur Bestimmung von Estradiol. Hierzu konnte auf einen Antikörper der Arbeitsgruppe Meyer in Weihenstephan (Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, Technische Universität München) zurückgegriffen werden. Meyer und Mitarbeiter verwendeten diesen Antikörper für Messungen von Estradiol²⁰, wie auch für die Anreicherung von Estradiol aus Rinderserum (Meyer et al. 1990). Das ursprüngliche Protokoll sah eine Inkubation des Tracers über Nacht vor, typische Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen bei 28 und 360 ng/L, der Messbereich erstreckte sich von 35 ng/L bis 57,8 µg/L. Unter den Gesichtspunkten einer einfachen Durchführung und möglichst hoher Sensitivität kann dieser Assay als nicht optimiert angesehen werden. Andererseits genügten die analytischen Kenndaten den Erfordernissen im Bereich Tierphysiologie.

Die Studien im Estradiol Modellsystem ermöglichten zweierlei. Zum einen konnte bereits hier der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit des Tracers und Sensitivität untersucht werden, wobei die mehrstündige Inkubation über Nacht dies geradezu provozierte. Zum anderen konnten durch die Synthese eines biotinylierten Estradiolderivats und der Entwicklung des Bio-LC E2 ELISA neue Methoden erprobt werden. Speziell diese Erfahrungen im Aufbau eines Immunoassays unter Ausnutzung der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung erleichterte wesentlich die ersten Schritte zur Entwicklung des Bio-LC EE2 Assays. Die analytischen Kenndaten des Bio-LC E2 ELISA zeigten bereits eine verbesserte Sensitivität im Vergleich zum ursprünglichen Assay. Das Protokoll des Bio-LC E2 ELISA war allerdings weiterhin umfangreich. Speziell die Notwendigkeit die Mikrotiterplatte mit einem sekundären Antikörper vorzubeschichten, da der eigentliche Antikörper gegen Estradiol keine stabile Bindung an das Polystyrol ausbildete, war sehr nachteilig und verlängerte das Protokoll unnötig.

Mit Verfügbarkeit der Ethinylestradiol Antiseren wurde mit dem Aufbau der drei ELISAs für EE2 begonnen. Von den beiden Seren konnte nur eines für die Entwicklung der Assays verwendet werden, im nicht-verwendeten Serum zeigten sich deutlich schlechtere Bindungseigenschaften bezüglich EE2. Chronologisch folgte auf den Bio-LC E2 ELISA das biotinylierte EE2-Pendant, gefolgt vom EE2 ELISA, der schließlich zur Entwicklung des EE2 CLEIA führte. Im Rahmen der Entwicklung des Bio-LC EE2 und EE2 ELISA war anfangs die Implementierung der Assays auf einer automatisierten Pipettierstation angedacht. Auf Basis des EE2 ELISA konnten hier einzelne Automatenmessungen durchgeführt werden (Schneider et al. 2004b), allerdings zeigten sich wesentliche Schwierigkeiten in der Reprodu-

²⁰ Der Assay diente der Quantifizierung von Estradiol in Rinderserum. Die Proben wurden hierzu chromatographisch aufgereinigt und nachfolgend im ELISA quantifiziert. [Prof. H.H.D. Meyer, persönliche Mitteilung]

zierbarkeit des Pipettierprozesses selbst. Aufgrund des frühen Entwicklungsstandes der Pipettierstation wurde eine weitergehende Automatisierung der Assays daher nicht vorgenommen. Diese Entscheidung ermöglichte es, die Inkubationszeiten im EE2 ELISA und dem hieraus entwickelten EE2 CLEIA weiter zu verkürzen und eine weitere Sensitivitätssteigerung zu erzielen (Schneider et al. 2005).

Die kontinuierliche Optimierung der vier Assays ist durch einen stetig einfacher werdenden Ablauf der Protokolle und eine deutliche Steigerung der Sensitivität gekennzeichnet. Im Unterschied zum Modellsystem wurde in den drei EE2 Assays auf eine Vorbeschichtung der Mikrotiterplatten verzichtet. Dies, sowie die Verkürzung aller Inkubationsschritte, trug wesentlich zur Vereinfachung der Protokolle bei. Mit Entwicklung des EE2 ELISA wurde eine weitere Vereinfachung im Ablauf des Assay erzielt. Die unmittelbare Verwendung des Enzymkonjugats als Tracer ermöglichte es, auf die Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats zu verzichten. Im Vergleich zum Bio-LC EE2 ELISA konnte so ein weiterer Protokollschritt eingespart werden. Die weitere Optimierung des EE2 ELISA und die Entwicklung des EE2 CLEIA führten zu einer nochmaligen Verkürzung des zeitlichen Ablaufs, allerdings war dies lediglich durch den Substratwechsel bedingt. Das Luminol-basierte Substrat erreichte die maximale Signalintensität bereits in der ersten Minute nach Substratzugabe, im TMB-Substratsystem hingegen verlief die Farbstoffentwicklung vergleichsweise langsam über den Zeitraum von 30 Minuten. Die manuelle Bearbeitung einer typischen Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten dauerte im Bio-LC EE2 ELISA 120 Minuten, im EE2 ELISA 70 und im EE2 CLEIA 40 Minuten²¹.

Die Vorteile der optimierten Assays in Bezug auf Protokollablauf und Sensitivität gehen allerdings einher mit besonderen Herausforderungen bezüglich der Signaldetektion. Im Bio-LC EE2 ELISA wurde mit Hilfe eines speziellen Enzymkomplexes bestehend aus Avidin und biotinylierter Peroxidase versucht die Messwerte zu amplifizieren. Parallel zur Signalverstärkung kam es allerdings zu einem deutlichen Anstieg unerwünschter Hintergrundabsorption, verbunden mit verstärktem „Signalrauschen“ (vgl. Abbildung 1.20). Ursächlich hierfür ist die starke Adsorption des Avidinkomplexes an das Polystyrol der Mikrotiterplatte. Letztendlich erwies sich die Verwendung dieses Enzymkomplexes als eher nachteilig und zudem kostenintensiv. Im EE2 ELISA wurden durch die Verkürzung der Inkubationszeiten und die starke Verdünnung des Antikörper die Grenzen der photometrischen Messbarkeit erreicht, d.h. die Optimierung der Sensitivität schien durch die Nachweisbarkeit des Labels begrenzt (vgl. Abbildung 1.25). Diese Schwelle der Optimierung konnte durch den Substratwechsel überwunden werden. Es ist zu betonen, dass der Substratwechsel alleine keine Verbesserung der Sensitivität bewirkt, vielmehr ermöglichte der Substratwechsel die weiterführende Entwicklung des EE2 CLEIA, der den Endpunkt vorliegender Assayentwicklungen und Optimierungen darstellt. In Abbildung 1.29 sind die Kalibrationskurven der drei ELISAs für EE2 dargestellt. Die Sensitivitätssteigerung vom Bio-LC EE2

²¹ Berechnet als reine Assayzeit, beinhaltet nicht die Beschichtung der Mikrotiterplatte und keine Waschschrte.

ELISA, über den EE2 ELISA zum EE2 CLEIA ist deutlich an der Linksverschiebung der jeweiligen Kurve entlang der Konzentrationsachse erkennbar. Weniger deutlich fällt der Sensitivitätsgewinn des EE2 CLEIA bei Betrachtung der analytischen Kenndaten aus (vgl. Tabelle 1.18 und Tabelle 1.20), besonders die Nachweisgrenzen mit 0,5 ng/L im ELISA und 0,2 ng/L im CLEIA erscheinen sehr ähnlich. Hier ist eine kritische Betrachtung der Kenndaten unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Berechnungsgrundlage angebracht. Wie im Abschnitt 1.2.1.4.3 zur Einführung der analytischen Kenndaten dargelegt, leitet sich die Beschreibung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze von der Festlegung eines Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ab. Wie bereits dort diskutiert, kann eine derartige Beschreibung irreführende Ergebnissen hervorbringen⁸. Hilfreicher ist ein Vergleich der Messbereiche, berechnet anhand der beiden Präzisionsprofile. Der EE2 ELISA zeigt ein besonders breites Präzisionsprofil (vgl. Abbildung 1.23), der resultierende Messbereich reicht von 4 ng/L bis zu 128 µg/L. Das Profil des EE2 CLEIA fällt deutlich enger aus (vgl. Abbildung 1.27), der Messbereich beginnt aber bereits bei 0,8 ng/L und endet bei 100 ng/L.

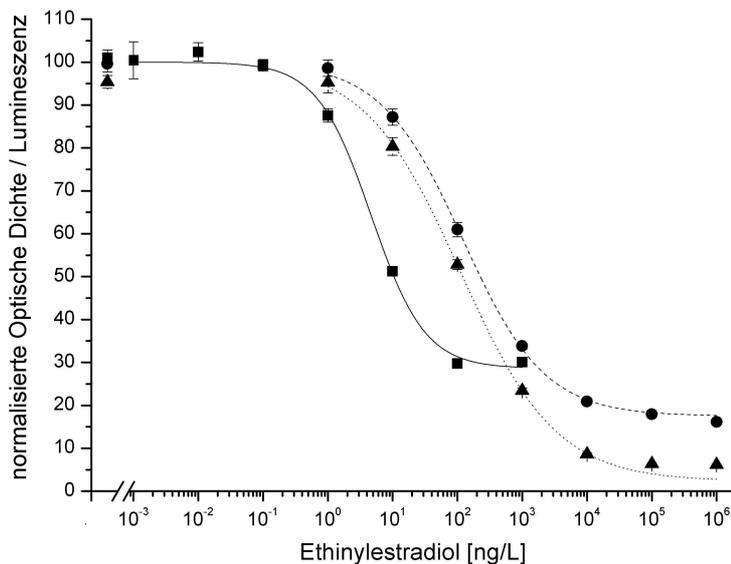


Abbildung 1.29: Vergleich der EE2 Assays anhand ihrer Kalibrationskurven. EE2 CLEIA (durchgezogene Linie, Quadrate), EE2 ELISA (gepunktete Linie, Dreiecke), Bio-LC EE2 ELISA (gestrichelte Linie, Kreise).

Dies bedeutet, dass mit Hilfe des EE2 CLEIA Konzentrationsmessungen im sub ppt-Bereich bei einem maximalen relativen Fehler von 20 % möglich sind. Theoretisch wäre es möglich, den Messbereich des EE2 CLEIA auszuweiten. Hierzu müsste das enge Präzisionsprofil des CLEIA dem wesentlich breiteren des EE2 ELISA entsprechen. Formal betrachtet wird das Präzisionsprofil durch den Quotienten aus Standardabweichung²² und Kalibratorkonzentra-

²² Die Standardabweichung setzt sich zusammen aus verschiedenen Faktoren, wie Messabweichungen und Pipettiergenauigkeiten. Bei manueller Durchführung dominieren die Pipettiergenauigkeiten.

tion, sowie der ersten Ableitung der 4-Parametergleichung beschrieben (vgl. Gleichung 1.10). Mit abnehmender Kalibratorkonzentration steigen entsprechend die Werte des Profils. Da die Werte der 4-Parametergleichung als annähernd konstant betrachtet werden müssen, ist der einzige verbleibende Ansatzpunkt zur Sensitivitätssteigerung in der Standardabweichung zu sehen. Rechnerisch lässt sich dies leicht modellieren. Mit einer Verbesserung der Standardabweichungen um den Faktor 10 könnte der Messbereich beispielsweise auf ca. 0,08 - 645 ng/L vergrößert werden. Denkbar wäre die Verwendung einer geeigneten Pipettierstation mit verbesserter Wiederholgenauigkeit. Allerdings sind solch einer technischen Optimierung auch Grenzen gesetzt. Mit Aufweitung der Präzisionsprofile rutschen die minimalen und maximalen Messwerte immer weiter in die asymptotischen Bereiche der 4-Parametergleichung, was letztlich eine zuverlässige Diskriminierung nur geringfügig unterschiedlicher Probengehalte unmöglich macht. Im Rahmen der Assay-Optimierungen konnte ein Maximum an Sensitivität in der direkten Bestimmung von Ethinylestradiol erzielt werden. Unter Berücksichtigung der sigmoiden Kurvenform ist davon auszugehen, dass selbst mit kleinster Standardabweichung lediglich marginale Verbesserungen des Messbereichs erzielt werden könnten.

Bedeutsam für die Bewertung obiger Immunoassays ist neben erzielbarer Sensitivität und einem einfachen Protokollablauf speziell ihre Selektivität und ihre Stabilität. Zur Charakterisierung der Selektivität wurde eine umfassende Studie zur Kreuzreaktivität des Antiserums durchgeführt. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist das Vorliegen minimaler Kreuzreaktivitäten für die meisten natürlich vorkommenden Estrogene. Typische Werte der Kreuzreaktivität liegen unterhalb von 0,5 % (vgl. Tabelle 1.14). Als Konsequenz wird deutlich, dass mit Hilfe dieser EE2 Immunoassays der Analyt auch in Gegenwart häufig in Realproben auftretender Steroide wie etwa Estron und Estradiol bestimmt werden kann. Eine falsch-positive Bestimmung von EE2, bedingt durch diese Stoffe, kann so ausgeschlossen werden. Die leicht erhöhte Kreuzreaktivität des Antiserums für Glucuronsäureaddukte bzw. Sulfatgruppen an Position 3 des EE2 wäre potentiell dazu geeignet eine Überbestimmung des EE2 in Realproben zu bewirken, vorausgesetzt diese Konjugate liegen in der Probe vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die im Rahmen der Metabolisierung gebildeten Konjugate (vgl. Abbildung 1.1) bereits bei Passage des Rohabwassers im Kanalsystem gespalten werden (Baronti et al. 2000), das heißt, die geringere Selektivität des Antiserums für Konjugate an Ringposition 3 ist irrelevant für die Bestimmung von EE2 in Realproben.

Die Stabilität der Immunoassays bezieht sich auf das Verhalten gegenüber störenden Stoffen der Probenmatrix, speziell auf die Wechselwirkung mit Huminstoffen. Diese Stoffe werden mit der Probe selbst in den ELISA eingebracht. Entsprechend kann der Assays sowohl durch eine Beeinträchtigung des Antikörpers, als auch des Tracers gestört werden. Das Verhalten der ELISAs gegenüber Matrixeffekten wurde mit Hilfe einer Modellsubstanz²³ untersucht.

²³ Kommerziell erhältliche Huminsäure.

Der Bio-LC EE2 ELISA und der EE2 ELISA zeigten hierbei voneinander deutlich abweichende Ergebnisse. Während der Bio-LC EE2 ELISA eine extreme Störanfälligkeit zeigte (vgl. Abbildung 1.16) verhielt sich der EE2 ELISA ausgesprochen robust, selbst bei deutlich erhöhten Matrixkonzentrationen (vgl. Abbildung 1.15). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass der Bio-LC EE2 ELISA nicht für die Anwendung in Realproben geeignet ist. Der molekulare Mechanismus dieser starken Störung des Bio-LC EE2 ELISAs ist nicht völlig verstanden. Über die Ursachen kann spekuliert werden. Zum einen tritt bei erhöhten Matrixkonzentrationen eine Art nicht-spezifische Bindung auf. Dies wäre durch Adsorption der Huminsäure an den Antikörper oder an das Polystyrol der Mikrotiterplatte selbst und eine nachfolgende Wechselwirkung mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erklärbar. Weiterhin kommt es im Bereich kleiner Kalibratorkonzentrationen zu einem deutlichen Verlust (größer 10 %) an Signalintensität. Erklärbar wäre dies durch eine Adsorption des biotinylierten EE2 an die Huminsäure. Ganz offensichtlich werden hier mehrere Effekte parallel wirksam. Der Bio-LC EE2 ELISA kann entsprechend als nicht stabil gegenüber Matrixeffekten bezeichnet werden.

Wesentlich günstiger waren die Ergebnisse des EE2 ELISAs, wie auch des EE2 CLEIAs. Abbildung 1.15 lässt zwar einen geringen Einfluss auf die Sensitivität erkennen (Kurven leicht nach rechts verschoben), die sigmoide Form der Kalibrationskurven blieb aber vollständig erhalten. Im Rahmen der Feldstudie wurde für Messungen mit dem EE2 ELISA eine SPE-Methode entwickelt, die speziell darauf ausgelegt war, eventuelle Huminstoffe zu entfernen, d.h. dieser geringen Überbestimmung entgegenzuwirken. Bei Durchführung der EE2 CLEIA Messungen wurde hierauf jedoch verzichtet. Der Vergleich der EE2 CLEIA Ergebnisse mit den Werten der Referenzmethode (vgl. Tabelle 1.24) verdeutlichte, dass keine Matrixeffekte vorliegen, es kommt nicht zur Überbestimmung der Konzentrationen.

1.6.2. Feldstudie

Die Tauglichkeit des EE2 ELISA und CLEIA zur Messung von Realproben konnte im Rahmen der Feldstudie bestätigt werden. Beide Immunoassays sind für die Bestimmung von EE2 in Oberflächenwasser sowie im Kläranlagenablauf geeignet. Die Messwerte stimmten gut mit den Werten vergleichbarer Studien überein. Im Bereich städtischer Einzugsgebiete zeigt sich zudem eine sehr gute Übereinstimmung mit den modellierten Erwartungswerten. Abweichungen waren allerdings im Fall der beiden Kläranlagen Blankenheim und Dümpelfeld mit ländlich geprägtem Einzugsgebiet zu beobachten. Grundsätzlich kommen zwei Ansätze zur Klärung der Abweichung in Betracht: Einerseits könnte die im Vergleich zu städtischen Anlagen unterschiedliche Matrix im Abwasser dieser beiden Anlagen eine Überbestimmung der Konzentrationen bedingen. Allerdings traten die leicht erhöhten Messwerte konsistent sowohl im ELISA mit Festphasenanreicherung, als auch im CLEIA mit direkter Messung auf. Bedingt durch die Festphasenanreicherung wären im ELISA jedoch deutlich geringere Matrixeffekte zu erwarten gewesen als im CLEIA. Dies konnte durch die Messwerte der Kläranlagen Blankenheim und Dümpelfeld nicht bestätigt werden. Die höchste EE2 Konzentration dieser beiden Anlagen trat im ELISA Verfahren auf (Dümpelfeld, Feb 05, vgl. Tabelle 1.23). Der analytische Ansatz ist ganz offensichtlich ungeeignet zur Klärung der Modellab-

weichung. Vielversprechender erscheint eine kritische Betrachtung des Modells. Ein wesentlicher Aspekt zur Schätzung der Konzentrationen im Ablauf ist die Abbaurate der Kläranlagen für EE2. Im Modell wird hier ein mittlerer Wert von $85,2 \pm 5,1$ % angesetzt. Diese Größe leitet sich ab von zwei Studien in denen die Kläranlagen in Wiesbaden und in Rom hinsichtlich ihrer Abbauleistung für Steroidhormone charakterisiert wurden (Baronti et al. 2000; Andersen et al. 2003). Die dort untersuchten insgesamt sieben Kläranlagen befinden sich alle in städtischen Einzugsgebieten, im Gegensatz zu den Kläranlagen in Blankenheim und Dümpelfeld. Offensichtlich sind die Abbauraten dieser sieben Anlagen nicht repräsentativ für die beiden Anlagen mit ländlichem Einzugsgebiet. Da im Rahmen der Feldstudie keine Konzentrationsmessungen im Zulauf der Kläranlagen durchgeführt wurden stehen die Abbauraten der Anlagen in Blankenheim und Dümpelfeld nicht zur Verfügung.²⁴ Es kann angenommen werden dass der Abbau nicht den Wert von 85 % erreicht. Eine mögliche Erklärung wäre in der unterschiedlichen Spezialisierung der Mikroorganismen im Belebtschlamm der Anlagen zu sehen. Dies impliziert eine Möglichkeit den Abbau des EE2 zu verbessern. Ansatzpunkt wäre die Retentionszeit des Abwassers im Belebtschlammbecken. Ternes und Mitarbeiter konnten zeigen, dass über diese Stellgröße verbesserte Abbauleistungen erzielt werden können (Andersen et al. 2003).

1.6.3. Signifikanz

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein wesentlicher Beitrag zur Analytik des endokrinen Disruptors Ethinylestradiol geleistet werden. Von besonderer Bedeutung ist das Erreichen extrem geringer Nachweisgrenzen zu sehen. Es konnte erstmalig ermöglicht werden direkt im ökotoxikologisch relevanten sub ppt-Bereich zu messen, hervorzuheben ist weiterhin der einfache und effiziente Ablauf der Messungen.

In Abbildung 1.30 sind die Ergebnisse einer aktuellen Literaturstudie zur Empfindlichkeit verschiedener Immunoassays für Ethinylestradiol dargestellt. Die Studie umfasst sowohl Assays für medizinische Anwendungen, beispielsweise für die Bestimmung von Ethinylestradiol in Körperflüssigkeiten (Warren et al. 1974; Fotherby et al. 1981; Agasan et al. 1994; Fitzpatrick et al. 2003; R-Biopharm 2003), als auch Assays zur Umweltanalytik von Ethinylestradiol in Wasserproben (Coille et al. 2002; JapanEnviro Chemicals 2003; Schneider et al. 2004a; Hintemann et al. 2005; Schneider et al. 2005).

²⁴ Vorstudien zur Bestimmung von EE2 im Kläranlagenzulauf führten aufgrund der extremen Matrixbelastung zu einer wesentlichen Überbestimmung des EE2 Gehalts. Da eine zuverlässige Berechnung der Abbauraten auf dieser Datenbasis nicht durchgeführt werden konnte wurden im Rahmen der Feldstudie keine Zulaufmessungen vorgenommen.

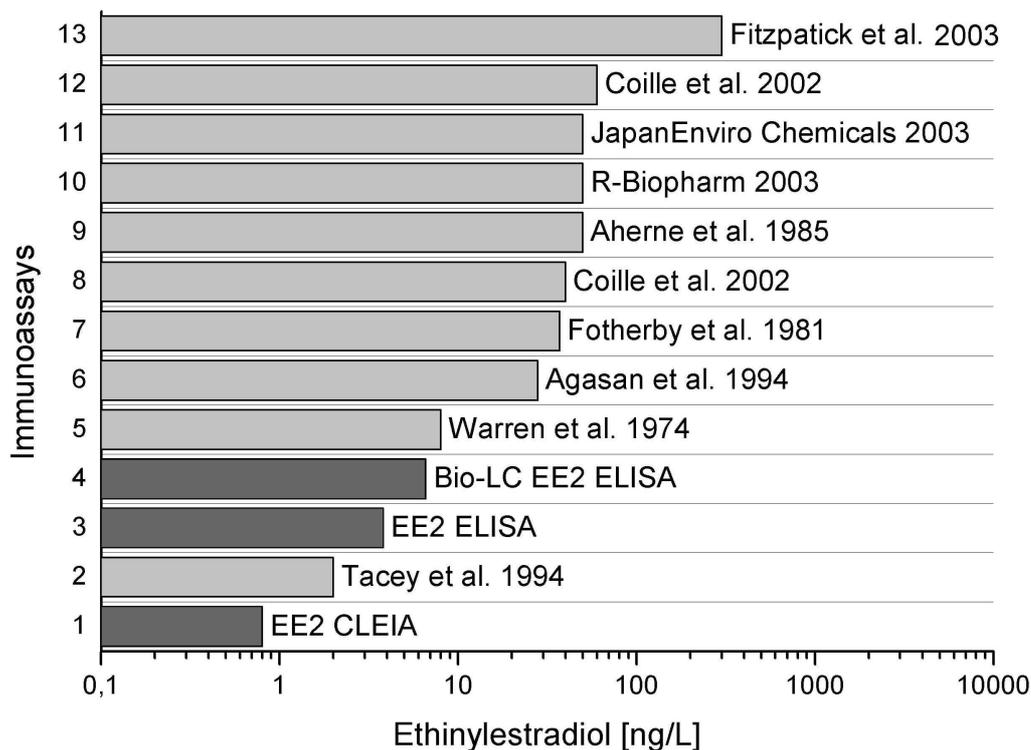


Abbildung 1.30: Sensitivitätsvergleich publizierter Immunoassays für Ethinylestradiol. Abweichend zu den in Abschnitt 1.2.1.4.3 beschriebenen analytischen Kenndaten wird die Sensitivität hier als Kalibratorkonzentration angegeben, die zu einer Signalintensität von 90 % führt²⁵. Gezeigt ist die reine Assaysensitivität, eventuelle Anreicherungsschritte sind nicht berücksichtigt. Die dunkel dargestellten Assays Nr. 1, 3 und 4 sind die in dieser Arbeit entwickelten Testsysteme.

Es fällt auf, dass die in dieser Arbeit entwickelten Assays zu den derzeit vier empfindlichsten gehören. Der von Tacey (1994) beschriebene Assay Nr. 2 erreicht ebenfalls sehr gute Nachweisgrenzen, allerdings unter Verwendung von radioaktiv markiertem Ethinylestradiol als Tracer. Jene Immunoassays, die speziell für die Umweltanalytik entwickelt wurden (Assay Nr. 8, 9, 11, 12), erzielen nur mittlere Sensitivitäten, damit sind sie nur bedingt zur Bestimmung der geringen Konzentrationen in der Umwelt verwendbar.

Mit der Etablierung der optimierten ELISA Methodik können in kürzester Zeit eine Vielzahl von Proben im unteren ng/L-Bereich bestimmt werden. Das Potential der Methode wird an einem einfachen Beispiel deutlich. Bei einer typischen Plattenbelegung mit acht Kalibratoren und dreifacher Bestimmung der Messwerte können 24 Proben parallel bestimmt werden. In einem typischen instrumentellen Messverfahren mittels Probenanreicherung, chromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion ergäbe sich ein Messzeit von mindestens 22 Stunden, unter Berücksichtigung einer 5 minütigen Äquilibrierung des Lauf-

²⁵ Es kann lediglich dieser Vergleich über eine prozentuale Signalintensität durchgeführt werden, da die analytischen Kenndaten in den einzelnen Publikationen meist nur unzureichend dokumentiert sind.

mittelgradienten (Zühlke et al. 2005). Hinzu kämen ca. vier bis acht Stunden für die Anreicherung der Proben. Im Vergleich hierzu kann die Messung der 24 Proben im EE2 ELISA innerhalb von 70 Minuten, mit Hilfe des EE2 CLEIA in nur 40 Minuten abgeschlossen sein.

Aufschlussreich erscheint auch ein Vergleich der Kosten²⁶: Für eine Messung im EE2 ELISA liegen die Kosten pro Probe bei 4,60 €, die gleiche Messung kann im EE2 CLEIA mit 1,20 € deutlich günstiger durchgeführt werden. Ursächlich für die höheren Kosten im EE2 ELISA ist die Anreicherung der Proben. Die Kosten für eine Messung in einem kommerziellen Auftragslabor, mit Hilfe instrumenteller Verfahren, liegen mit 200 € pro Probe deutlich über den ELISA-Kosten.

Über die methodisch-analytische Fragestellung hinausgehend stellt sich die Frage der eigentlichen Relevanz dieser Arbeit. Dies kann nicht allein mit dem akademischen Anspruch einer möglichst optimierten Methode zur Hormonanalytik erklärt werden, vielmehr ist das Ergebnis in einem Umwelt-bezogenen Kontext zu sehen. Zahlreiche ökotoxikologische Studien verdeutlichen eine Gefährdung von Fischpopulationen durch hormonell wirksame Substanzen (Länge et al. 2001; Metcalfe et al. 2001; Panter et al. 2002; Zerulla et al. 2002; Pawlowski et al. 2004b). Dies betrifft speziell die kleineren Fließgewässer, die häufig für mehrere Kläranlagen den Vorfluter darstellen. In diesen Gewässern ist eine Überschreitung biologischer Wirkungsgrenzen eher wahrscheinlich als in den größeren Fließgewässern, wie etwa dem Rhein. Ethinylestradiol zeigt mit einer Halbwertszeit von 10 Tagen einen eher langsamen Abbau in Fließgewässern (Jürgens et al. 2002). Obgleich ein langsamer Abbau möglich ist, führt der kontinuierliche Eintrag durch den Kläranlagenablauf zu einer dauerhaften Belastung der Gewässer. Sumpter (2005) spricht in diesem Zusammenhang von einem „pseudopersistenten“ Verhalten des Ethinylestradiols.

Bislang werden zur Gewässerüberwachung auf endokrine Disruptoren in Deutschland ausschliesslich instrumentelle Verfahren verwendet (Bund-Länderausschuss Chemikaliensicherheit 2003). Bedingt durch den hohen Aufwand dieser Messungen, wird auf eine routinemäßige Bestimmung von Ethinylestradiol meist verzichtet. In Hinblick auf eine nachhaltige Gewässerbewirtschaftung wäre eine solche Routineanalytik zur Bestimmung des Ethinylestradiols jedoch wünschenswert. Mit den hier entwickelten Immunoassays eröffnet sich erstmalig diese Möglichkeit. Die Anwendung dieser Assays könnte einen wichtigen Beitrag zur Gewässerüberwachung leisten, und so dem Schutz der Umwelt dienen.

²⁶ Errechnet als laufende Kosten für Verbrauchsmaterial, Geräteinvestitionen und Abschreibungen sind nicht berücksichtigt.

Kapitel 2. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for Ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative

Christian Schneider^a, Heinz F. Schöler^a, Rudolf J. Schneider^{b, *}

^a Institute of Environmental Geochemistry, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 236, D-69120 Heidelberg, Germany

^b Institute of Plant Nutrition, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn, Germany

Steroids, 2004, 69, 245-253.

Abstract: Ethinylestradiol (EE2) is one of the most potent endocrine disrupting compounds capable to induce estrogenic effects even at trace level concentrations in the aquatic environment. Methods for detecting EE2 in such concentrations are generally based on GC or HPLC coupled to at least one mass spectrometer. Another approach are immunoassays and sensor systems but for most designs, derivatives of EE2 are required (e.g. for coupling to carrier proteins, enzyme or fluorescent labels etc.). Here we present the straightforward synthesis and complete characterization of a new long-chain biotinylated EE2 derivative. The new EE2 derivative is used as tracer in a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of EE2. With pure water, the limit of detection (LOD, S/N = 3) and the test midpoint were found to be 14 ng L⁻¹ and 136 ng L⁻¹ respectively. Cross reactivity (CR) was tested for 10 endogenous steroids and the BSA-conjugate used for immunization, as well as a synthetic precursor of the conjugate. Among the naturally occurring compounds CR was determined to be maximum for metabolites of EE2 conjugated at ring-position 3 (17 % and 37 % for 3-Glucuronide and 3-Sulphate resp.). Assay stability was tested against humic substances and organic solvents. Increasing amounts of organic solvents in the sample caused a clear decrease in sensitivity, presence of humic substances lead to an overestimation of EE2.

Keywords:

Ethinylestradiol, EE2, biotinylation, steroid, biotin, synthesis, ELISA

* corresponding author. Tel.: +49-228-732856; Fax: +49-228-732489; E-mail address: schneider@uni-bonn.de (R. J. Schneider)

2.1. Introduction

The 1990s have witnessed a great expansion of interest in the implications of environmental exposure of wildlife and humans to potential endocrine disruptors (Stone 1994). Gutendorf and Westendorf (Gutendorf et al. 2001) identified more than 50 compounds exhibiting endocrine disrupting effects, with the majority of these compounds being of estrogenic nature. Estradiol and its metabolites estrone and estriol have been detected in Europe (Desbrow et al. 1998; Belfroid et al. 1999; Ternes et al. 1999; Sole et al. 2000), North America (Ternes et al. 1999) and Asia (Oh et al. 2000) in municipal and industrial effluents. The pharmaceutical estrogen 17 α -Ethinylestradiol (EE2) frequently prescribed as an oral contraceptive has been detected at trace-level concentrations in the low ng L⁻¹-range in sewage effluents in Italy, Germany, England, The Netherlands and the U.S. (Desbrow et al. 1998; Routledge et al. 1998; Belfroid et al. 1999; Ternes et al. 1999; Baronti et al. 2000; Johnson et al. 2000; Kuch et al. 2000; Huang et al. 2001; Xiao et al. 2001). In surface waters EE2 was only detected in a few samples. Some studies reported values up to 4.3 ng L⁻¹ (Belfroid et al. 1999). However, most of the samples had levels below 1 ppt (Belfroid et al. 1999; Huang et al. 2001; Xiao et al. 2001). Even though the detected EE2 concentrations are very low there might still be an impact on the aquatic ecosystem, as has been indicated by laboratory studies using vitellogenin as biomarker for endocrine disruption in rainbow trout (Sumpter et al. 1994).

For quantifications in the low ng L⁻¹-range analysts rely on highly sophisticated methods such as GC-MS, HPLC-MS or even tandem MS techniques. As an alternative, sensor techniques and immunochemical assays such as ELISA can be used. In the past, several studies have been published using immunoassays for measuring EE2 in different matrices (de la Pena et al. 1975; Fotherby et al. 1981; Agasan et al. 1986; Agasan et al. 1994; Tacey et al. 1994). Available test kits for EE2 are optimized for biological specimens such as blood and urine. Applicability to environmental samples was neither considered nor assessed for the majority of these kits. Here we present the facile synthesis and complete characterization of a new long-chain biotinylated EE2 derivative (Figure 2.1). We have employed an ϵ -aminocaproic acid spacer connecting the biotin moiety to an EE2-6-Carboxymethyloxime with the intention of maximizing the biotin-avidin interaction (Costello et al. 1979; Leary et al. 1983) in the application of the derivative in a new ELISA. The ELISA based on the long-chain biotinylated Ethinylestradiol is optimized for environmental analysis and shows excellent sensitivity and selectivity.

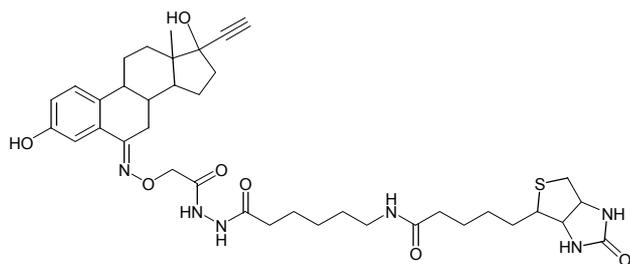


Figure 2.1: Z-form of 3,17b-dihydroxy-1,3,5(10)-17a-ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamide

2.2. Experimental

2.2.1. Reagents and Materials

All reagents were of analytical or biochemical grade and were used as received. 1,3,5(10)Estratrien-17 α -ethinyl-3,17-diol-6-on-6-carboxymethyloxime and the corresponding BSA conjugate were purchased from Steraloids (London, GB), the Biotin-LC-hydrazide was obtained from Molecular Bioscience (Boulder, CO, USA), Acetonitrile was purchased from LGC Promochem (Wesel, Germany), Tetramethylbenzidine (TMB) and TweenTM 20 were purchased from Serva (Heidelberg, Germany), humic acid was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) the streptavidin-HRP conjugate (S5512) and all other reagents were supplied by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Ultrapure water was obtained by running demineralized water through a Milli-Q water purification system from Millipore (Eschborn, Germany). 0.2 μ m syringe filters were obtained from Gelman (Ann Arbor, MI, USA), TLC plates (AlugramTM) were from Machery-Nagel (Düren, Germany). The microtiter plates used were 96 flat-bottom wells with high binding capacity (MaxisorpTM) from Nunc (Roskilde, Denmark). For the immunoassay the following buffers were used: PBS 1 (10 mM PBS pH 7.6, containing 150 mM NaCl and 2.85 % TweenTM 20), PBS 2 (8 mM PBS pH 7.6, containing 145 mM NaCl), PBS 3 (8 mM PBS pH 7.6, containing 145 mM NaCl and 0.5 % TweenTM 20), coating buffer (50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6) and substrate buffer (200 mM citric acid monopotassium salt buffer containing 3 mM perhydrol and 0.01 % sorbic acid potassium salt, pH 3.8). A stabilized TMB-solution (41 mM TMB, 8 mM tetrabutylammoniumborhydrid in dimethylacetamide) was prepared according to Frey et al. (Frey et al. 2000). The final substrate solution consists of 540 μ L TMB-solution in 21.5 ml substrate buffer and was freshly prepared for each run.

2.2.2. HPLC

Preparative high-performance liquid chromatography was carried out on a Perkin Elmer system (advanced LC sample processor ISS 200, binary LC pump 250, LC 235 diode array detector) using a Prodigy ODS column (preparative; 10 μ m, 250 mm x 21.2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Separations were run at 20 °C with a flow rate of 7 mL min⁻¹ with the following acetonitril/water (adjusted to pH 9 with ammoniumhydroxide) gradient: starting with 25 % acetonitril for 5 minutes, increasing linearly to 40 % acetonitril within 8 minutes, continuing with 60 % acetonitril, increasing to 100 % within 12 minutes. UV detection was performed at a wavelength of 260 nm.

2.2.3. NMR spectroscopy

NMR spectra were recorded on a Bruker AM 300 (300 and 75 MHz, for ^1H and ^{13}C , respectively) at room temperature. ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts are reported in parts per million downfield from tetramethylsilane and referenced to residual solvent resonances (^1H NMR: 3.31 ppm for CHD_2OD in CD_3OD ; ^{13}C NMR, 49.15 ppm for CD_3OD). ^1H -NMR signals are given followed by multiplicity, coupling constants J in hertz, and integration in parentheses. For complex coupling patterns, the first coupling constant listed corresponds to the first splitting listed.

2.2.4. Mass spectrometry

Exact masses were determined by FAB MS analysis running in positive ion mode using 3-Nitrobenzylalcohol as matrix on a Concept 1H instrument from Kratos.

2.2.5. Synthesis of 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-17 α -ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamide

6.8 μl of isobutylchloroformiate was added at $-15\text{ }^\circ\text{C}$ to a solution of 20 mg 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-17 α -ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime and 8.3 μl of N-methylmorpholin in 1.04 ml dry DMF. After stirring for 3 minutes the activated steroid was added to a suspension of 19.4 mg of the biotin-LC-hydrazide in 4.16 ml of dry DMF and stirred overnight at $4\text{ }^\circ\text{C}$. Reaction progress was monitored by TLC on precoated silica gel plates (thickness 0.25 mm), spots being detected under a UV lamp. With completion of the reaction the cloudy suspension of the biotin-LC-hydrazide changed to a clear solution. For purification the solution was directly injected into the preparative HPLC system. The combined fractions of the product were evaporated to dryness under reduced pressure. Solid phase material stemming from the preparative column precipitated within the product and was removed by membrane filtration using methanol as solvent and a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ hydrophilic polypropylene membrane. Again methanol was evaporated and the product dried under vacuum.

Yield: 52 %. ^1H -NMR, (CD_3OD): δ 7.31 (d, $J = 2.8\text{ Hz}$, 1H, 4-H), 7.13 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, 1-H), 6.74 (dd, $J = 8.5 ; 2.8\text{ Hz}$, 1H, 2-H), 4.64 (s, 2H, oxime), 4.43 (pseudo-dd, $J = 7.8 ; 5.1\text{ Hz}$, 1H, bio), 4.24 (dd, $J = 7.9 ; 4.5\text{ Hz}$, 1H, biotin), 3.18 (m, 1H, SC-H), 3.13 (m, 2H, NCH_2), 2.87 (dd, $J = 12.7 ; 5.1\text{ Hz}$, 1H, SCH^a), 2.82 (s, 1H, 17-alkyne), 2.65 (d, $J = 12.7$, 1H, SCH^b), 2.3 – 2.1 (m, 6H), 2.0 – 1.9 (m, 3H), 1.8 – 1.3 (m, 20 H), 0.81 (s, 3H, 18-methyl); ^{13}C -NMR, (CD_3OD): δ 176.1, 173.7, 170.4, 169.9, 166.2, 165.0, 157.4, 135.1, 132.1, 126.9, 118.7, 111.7, 80.3, 73.8, 63.5, 61.7, 57.1, 51.2, 42.7, 41.1, 40.3, 40.0, 39.3, 37.0, 36.9, 35.2, 33.7, 31.8, 30.9, 30.1, 29.8, 29.6, 27.5, 27.0, 26.5, 23.8, 22.2, 13.3 ppm; MS (FAB): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 759.3; $[\text{M}]^+$ 737.4; $[\text{M-urea}]^+$ 679.4; $[\text{M-(methyl, ethinyl, both hydroxyfunctions)}]^+$ 663.5; $[\text{M-(methyl, ethinyl, one hydroxyfunction, urea)}]^+$ 621.3; $[\text{M-(methyl, ethinyl, both hydroxyfunctions, urea-fragment, steroid-ring d)}]^+$ 563.3; $[\text{Ethinylestradiol-6-oxime}+\text{Na}]^+$ 329.1; $[\text{Ethinylestradiol-6-oxime}]^+$ 307.1; $[\text{biotin}+\text{Na}]^+$ 234.0; $[\text{biotin}]^+$ 312.0. HPLC (preparative): R_t 11-12 min.

2.2.6. Bio-LC EE2 ELISA

2.2.6.1. Antisera Production

Two New Zealand White rabbits were immunized in cooperation with Eurogentec (Herstal, Belgium) using a BSA conjugate of 1,3,5(10)Estratrien-17 α -ethinyl-3,17-diol-6-on-6-carboxymethyloxime. Primary immunization was performed intradermally at 10 multiple sites by injecting the immunogen emulsified with Freund's complete adjuvant. Booster injections were administered after 2, 4 and 8 weeks after priming using Freund's incomplete adjuvant. Final bleedings were taken after 3 months. The serum from the rabbit which showed highest titer and sensitivity in the assay was used in this study.

2.2.6.2. Optimized ELISA Procedure

Direct competitive ELISA format was adapted for the analysis of EE2. ELISA was performed as follows. Microtiter plates were coated with the polyclonal antibody (dilution 1:50,000, 200 μ L per well) in coating buffer. The plates were covered with Parafilm to prevent evaporation. After overnight incubation at 20 °C, the plates were washed three times with PBS 1 using an automatic plate washer (Flexiwash, Asys Hitech, Eugendorf, Austria). For construction of the calibration curve an EE2 stock solution was prepared using ethylacetate and then further diluted with ultrapure water to obtain standard solutions covering the concentration range between 0.001 μ g L⁻¹ and 1000 μ g L⁻¹. After the three-cycle washing step the plates had EE2 standards added (100 μ L per well) and were shaken at room temperature for 30 minutes. This was followed by addition of the synthesized Bio-LC EE2 in PBS 2 (0.025 pmol mL⁻¹, 100 μ l per well); the plates were shaken at room temperature for another 30 minutes, followed by a second three-cycle washing step. To the plates was then added streptavidin-HRP conjugate solution in PBS 3 (50 ng ml⁻¹, 200 μ L per well) and shaking continued at room temperature for 30 minutes, followed by a third three-cycle washing step. Finally, substrate solution was added (200 μ L per well) and incubated for 30 minutes. The enzyme reaction was stopped by addition of sulfuric acid (50 μ L per well, 1 M). Absorbance was measured at 450 nm and referenced to 650 nm with a plate reader (VMax, Molecular Devices, Munich, Germany). All determinations were made at least in triplicate on different plates. The mean values were fitted to a four-parametric logistic equation (4PL) (Dudley et al. 1985), optical densities were normalized to parameter A of the 4PL and plotted against log C.

2.2.6.3. Cross Reactivity Determination

The relative sensitivity of the immunoassay towards the compounds listed in Table 2.1 was determined by assaying a dilution series of each substance in water. Cross reactivity is calculated as the ratio of molar concentrations at the inflection points (midpoints) of the corresponding calibration curves and expressed in percentage relative to the midpoint for EE2.

2.2.6.4. Effects of Organic Solvents and Humic Acid on the ELISA

Matrix effects of organic solvents and a model humic acid as interfering agents were studied using serial dilutions of EE2 in solutions of the respective substances. Three organic solvents (acetone, acetonitrile, methanol) were tested for their compatibility with the ELISA; concentrations covered the range from 5-40 % solvent in EE2 standard. Commercial humic acid was tested in concentrations ranging from 0.2-10 mg L⁻¹.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Synthesis of 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-17 α -ethinylestratrien-6-on-carboxymethyloxime-hydrazido-(ϵ -biotinyl)-aminocapronamide

We present a facile synthesis and the complete characterization for a new biotinylated Ethinylestradiol derivative. The synthesis relies on activation of the steroid for 3 minutes at -15°C using isobutylchloroformiate as leaving group in DMF as solvent (Munro et al. 1984). Modifications of this procedure published for the biotinylation of estradiol (Tiefenauer et al. 1990) applied a harsher method for activation substituting DMF with dioxane and stirring for 30 minutes at 8°C . However, promising results in the biotinylation of estradiol using the more gentle activation at -15°C (data not shown) led us to the procedure for Ethinylestradiol presented here enabling a very smooth kinetic control in the activation of the steroid.

As a thorough purification of the product is an indispensable prerequisite for the application of this new Ethinylestradiol derivative in immunochemistry, we have developed a new preparative HPLC method for its purification. Problems arose as solid phase material precipitated in the product when evaporating the combined fractions to dryness. This drawback was overcome by using a simple membrane filtration to remove the solid phase. Purity of the isolated product could be confirmed by NMR. The biotinylated Ethinylestradiol was obtained in 52 % yield due to the mentioned difficulties in the process of purification.

2.3.2. Characteristics of the Bio-LC EE2 ELISA

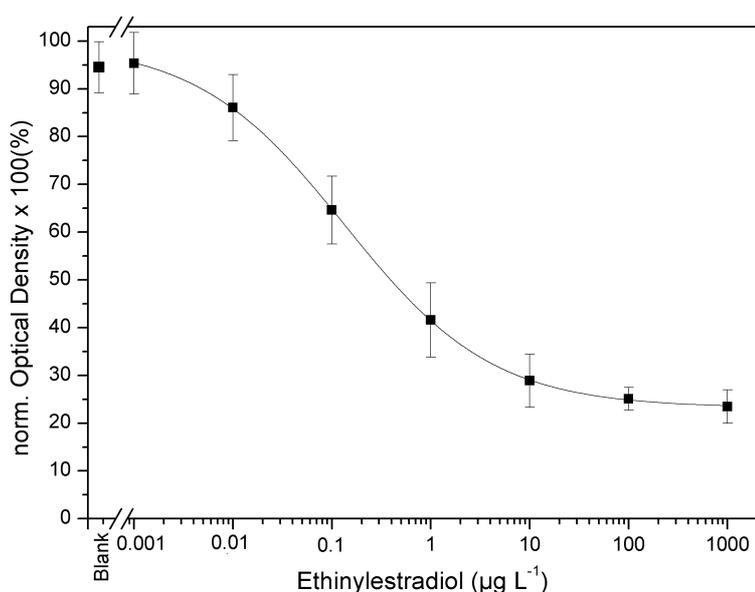


Figure 2.2: Master-calibration curve for Ethinylestradiol obtained with spiked ultrapure water. Results of the four-parametric logistic curve fitting: A 100 %; B 0.6; C 0.136 $\mu\text{g L}^{-1}$; D 23 %. Values averaged from 13 individual calibration curves; error bars calculated according to Gaussian error propagation based on standard deviation at each concentration level in the 13 individual calibration curves.

2.3.2.1. Optimization of Assay Conditions

Unlike noncompetitive ELISAs, in which an excess of reagents is used to increase detectability, limiting concentrations of immunoreagents are required in competitive ELISAs to obtain good sensitivities. Criteria used to evaluate the optimization were maximum optical density (B_0), dynamic range, concentration at midpoint and detection limit (LOD). The best combination of immunoreagents used was found to be a combination of diluting the antiserum 1:50,000 and employ a concentration of the synthesized Bio-LC EE2 of 0.025 pmol ml⁻¹. Further dilution of the Bio-LC EE2 did not yield an improved sensitivity of the assay. This indicates that the affinity limit of the antibodies in the antiserum was reached. Dilution of streptavidin-peroxidase conjugate was chosen according to Bodmer (Bodmer et al. 1989), TweenTM 20 had to be added to reduce nonspecific binding of the conjugate.

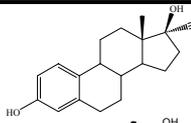
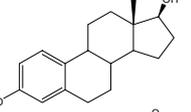
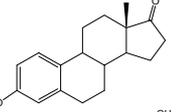
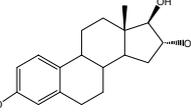
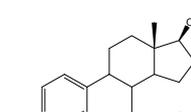
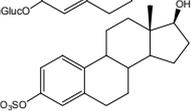
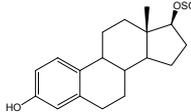
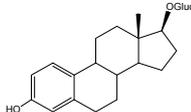
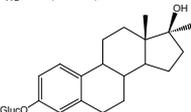
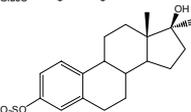
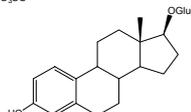
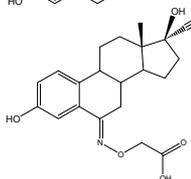
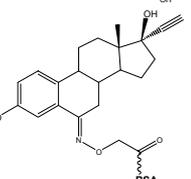
Based on the optimized conditions, the EE2 calibration curve was constructed in the concentration range of 0.001-1000 µg L⁻¹. A mastercurve calculated from 13 calibration curves consecutively performed during 3 weeks is shown in Figure 2.2. The midpoints varied in the range of 111-177 ng L⁻¹ (interassay CV 25 %), the relative standard deviation of the measured optical density for three replicates at each standard concentration was lower than 5 %. The LOD at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 is found to be 14 ng L⁻¹. A suitable analytical working range of the assay is 0.022-1.2 µg L⁻¹ (part of the curve between 40 % and 80 % inhibition).

2.3.2.2. Cross Reactivities

Estradiol, several metabolites of estradiol and ethinylestradiol as well as the immunogen and a synthetic precursor of the immunogen and the biotinylated ethinylestradiol (EE2-6-Carboxymethyloxime) were tested for cross reactivity (Table 2.1). The immunoassay proved to be very specific for ethinylestradiol as only negligible reactivities were observed for most of the endogenous compounds (CR < 0.5 %). Substantial cross reactivities existed only for EE2 metabolites conjugated at ring position 3; EE2-3-sulphate sodium salt and EE2-3-glucuronide sodium salt exhibiting cross reactivities of 37 and 17 % respectively. Binding of the EE2-6-Carboxymethyloxime equals binding of the ethinylestradiol, this indicates only the steroid core being recognized by the antibodies and the oxime-linker being discriminated. As expected the immunogen itself exhibits a very high affinity, at least 4000 times higher than ethinylestradiol. This can be explained by partial recognition of the protein moiety in the immunogen.

These findings clearly demonstrate that the problem of homologous bridge recognition is not observed in this assay. Pronounced binding of the immunogen and lower selectivities of the antibodies towards ethinylestradiol metabolites conjugated at position 3 indicate a deficient recognition which can be explained by the steric requirements of the ethinylestradiol-BSA conjugate employed during the immunization. Proximity of the carrier-protein, bound via the oxime-linker at position 6, to the hydroxygroup at position 3 impedes a good discrimination of sulphate and glucuronide conjugated to position 3 of ethinylestradiol. In contrast excellent selectivities are obtained for the hydroxygroup at position 17. These findings are supported by results of Agasan et al., who reported similar cross reactivities towards the 3- and 17-sulphate of EE2 using the same type of conjugate for immunization (Agasan et al. 1986).

Table 2.1: Cross reactivity of selected estrogens with Ethinylestradiol Antiserum. *Compounds were supplied by Sigma, **Compounds were supplied by Steraloids.

Compound	Cross reactivity [%]	Standard deviation	Structure
Ethinylestradiol (EE2)*	100	---	
17β-Estradiol (E2)*	0,2	0,03	
Estrone**	< 0,1	---	
Estriol**	< 0,1	---	
E2-3-Glucuronide Sodiumsalt*	0,4	0,05	
E2-3- Sodiumsulphate**	< 0,1	---	
E2-17- Sodiumsulphate*	< 0,1	---	
E2-17-Glucuronide Sodiumsalt**	< 0,1	---	
EE2-3-Glucuronide Sodiumsalt**	17	0,11	
EE2-3- Sodiumsulphate**	37	4,3	
EE2-17-Glucuronide Sodiumsalt**	0,1	---	
EE2-6-carboxy- methyloxime**	99	6,7	
EE2-BSA (immunogen)**	435.000	69.000	

2.3.2.3. Stability Tests

Proteins, such as antibodies, are relatively susceptible to matrix effects and harsh conditions (Pfortner et al. 1998). Variation of the matrix in environmental analysis may be considerable and investigations of the matrix interferences should be an integral part of assay development. Compatibility of the immunoassay with organic solvents is important as environmental samples might need to be extracted and enriched prior to quantification.

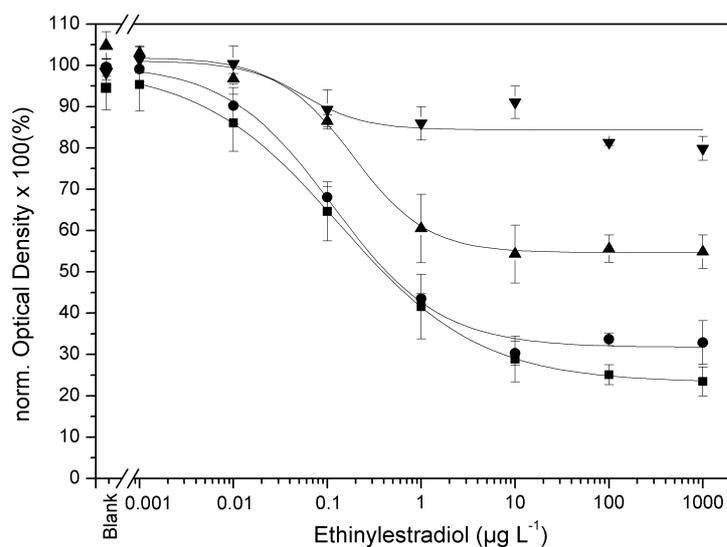


Figure 2.3: Effect of a model humic acid (mHA) on the calibration curve for ethinylestradiol obtained with spiked water samples: ultrapure water (squares), 0.2 mg L⁻¹ (circles), 5 mg L⁻¹ (triangles), 10 mg L⁻¹ (triangles, upside down). Error bars: standard deviation (except ultrapure water: Gaussian error propagation based on master-calibration curve).

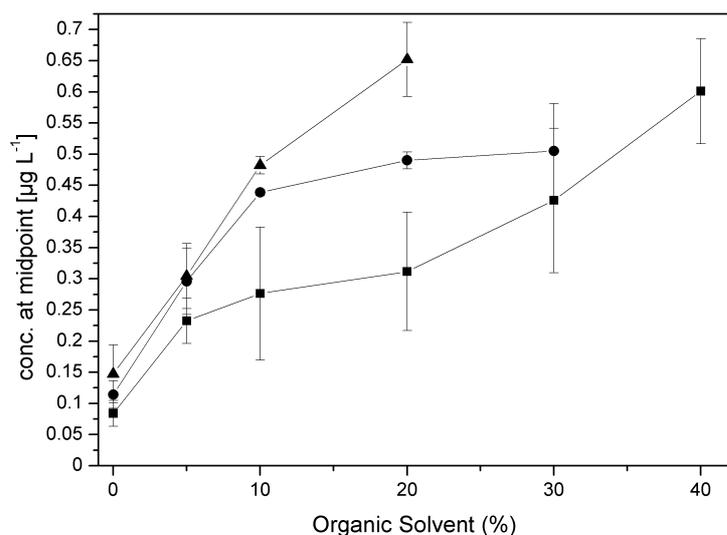


Figure 2.4: Effect of organic solvents on the calibration curve for ethinylestradiol obtained with spiked water samples: methanol (squares), acetone (circles), acetonitrile (triangles). Error bars: standard deviation.

A common effect was observed both for humic acid and organic solvents, i.e. with increasing concentration in the sample the standard curve shifted gradually to higher EE2 concentrations and, therefore, a loss in sensitivity was observed. Interference with humic acid lead to flattened calibration curves of the immunoassay causing an overestimation of EE2 in dependance of the HA concentration (Figure 2.3). With increasing amounts of HA in the sample the sigmoidal shape of the calibration curve was steadily lost. The intrinsic mechanism of this interference is unknown, we assume that it may be due unspecific binding of EE2 to HA. Increasing amounts of organic solvents in the sample lead to a clear decrease in sensitivity (Figure 2.4). Furthermore absorbance values fitted poorly to the four-parametric logistic equation when increasing amounts of solvent were added to the sample. The extent of decline in sensitivity depends on the solvent used; similar to humic acids, organic solvents lead to an overestimation of EE2. These results are in good agreement with data published by Knopp and co-workers (Deng et al. 2003) on matrix interference.

Our goal in this study was to develop a straightforward synthesis for Bio-LC EE2 and set up an ELISA based on polyclonal antibodies. We did not immerse ourselves in discriminating isomeric E- and Z-forms of the biotinylated Ethynylestradiol derivative as a distinction of the isomers played only a role in immunoassays using monoclonal antibodies directed against only one of the two isomers. In the present work we have presented the facile synthesis of a biotinylated ethynylestradiol and developed an optimized ELISA for ethynylestradiol. A further increase in assay sensitivity would be expected if solid-phase extraction for enrichment of samples prior to measurement is employed, which is currently under investigation. This immunoassay could provide an alternative approach for quantifying ethynylestradiol in environmental samples, such as surface waters and effluents from sewage treatment plants.

Acknowledgement

C. Schneider thanks Mr. Thorsten Christian for help in setting up the preparative HPLC, and the German Federal Environmental Foundation (DBU) for financial support.

Kapitel 3. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment

Therese Hintemann^a, Christian Schneider^b, Heinz F. Schöler^b, Rudolf J. Schneider^{a, *}

^a Institute of Plant Nutrition, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn, Germany

^b Institute of Environmental Geochemistry, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 236, D-69120 Heidelberg, Germany

Water Research, 2005, submitted for publication.

Abstract: The effluent of four sewage treatment plants (STP) and eight surface water samples from the river Rhine and two smaller rivers were monitored for estradiol (E2) and ethinylestradiol (EE2). The investigated STPs use three different treatment processes including activated sludge treatment, a constructed wetland, and an aerated lagoon. For analysis of E2 and EE2 in the aquatic environment two immunoassays were developed allowing a very cost-effective screening for both hormones in environmental samples. Detection limits could be established at 0.05 ng L⁻¹ for E2 and 0.01 ng L⁻¹ for EE2, taking an 50fold enrichment into account. Median concentration for E2 and EE2 in effluent samples were 11.7 and 1.8 ng L⁻¹, in surface water 4.0 and 0.7 ng L⁻¹, respectively. The highest estrogen concentrations were found in the lagoon, equipped only with very basic means of sewage treatment.

Keywords: estradiol, ethinylestradiol, sewage treatment plant, constructed wetland, surface water, immunoassay

abbreviations used: PBS phosphate buffered saline, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, CMO carboxymethyloxime, E2 17 β -estradiol, EE2 17 α -ethinylestradiol, POD Horseradish peroxidase,

* corresponding author. Tel.: +49-228-732856; Fax: +49-228-732489; E-mail address: schneider@uni-bonn.de (R. J. Schneider)

3.1. Introduction

Observations of abnormalities in the aquatic environment more than 30 years ago (Blaber 1970; Smith 1971) initiated first research activities regarding endocrine disruption. With the advent of reproductive failure in freshwater fish populations, observed in the early 1990s (Bern 1991; Sumpter et al. 1994) these efforts were intensified. Today there is a still growing public concern about occurrence of estrogenic compounds in the environment (European Commission 2004). Recently it has been shown that steroidal estrogens can bioaccumulate in fish, mainly in the bile and in both, ovaries and testes of fish exposed to contaminated water (Larsson et al. 1999; Gibson et al. 2005). Regarding feminization of rainbow trout strongest estrogenicity has been established for the synthetic estrogen ethinylestradiol (EE2) at a concentration of 0.1 ng L^{-1} (Länge et al. 2001) and for the endogenous estrogen estradiol (E2) at levels from $1\text{-}10 \text{ ng L}^{-1}$ (Routledge et al. 1998). Recent environmental concentrations of E2 and EE2 measured in sewage treatment plant effluents cover a concentration range of $0\text{-}15 \text{ ng L}^{-1}$ for E2 and $0\text{-}2 \text{ ng L}^{-1}$ for EE2 (Servos et al. 2005). Although both compounds are biodegraded in river water (Jürgens et al. 2002), they can be regarded as "pseudopersistent" in habitats continuously affected by STP discharge (Sumpter et al. 2005). These very low effect concentrations of E2 and EE2 found in the aquatic environment require sophisticated techniques for quantitation.

In past years the search for adequate techniques was focused on instrumental methods, such as LC-MS, GC-MS and tandem MS or MSⁿ methods. Unfortunately instrumental methods are always associated with expensive instrumentation and require highly trained personnel, thusly impeding application of these methods on a broader basis. For a widespread determination of E2 and EE2 in the environment less complex and more cost-effective methods are required. Therefore we have developed two immunoassays facilitating the easy and precise quantitation of both estrogens in the aquatic ecosystem. In contrast to other immunoassays described in literature for screening of E2 and EE2 (Goda et al. 2000; Huang et al. 2001; Coille et al. 2002; Majima et al. 2002; Valentini et al. 2002; Hanselman et al. 2004), the development of our assays was initially designed to enable low-cost quantitations in environmental samples. Applicability of our assays for the environmental monitoring was evaluated in a thorough field study involving samples taken from several surface waters and effluent samples from different sewage treatment plants.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Reagents and Materials

All reagents were of analytical or biochemical grade and were used as received. Horseradish peroxidase (EIA grade) was obtained from Roche (Mannheim, Germany), GuardianTM was from Perbio. Tetramethylbenzidine (TMB) and TweenTM 20 were purchased from Serva (Heidelberg, Germany), sodium azide was from VWR (Darmstadt, Germany), ultrapure water was obtained by running demineralized water through a Milli-Q water purification system from Millipore (Eschborn, Germany). 1,3,5(10)Estratrien-3,17-diol-6-on-6-carboxymethyloxime, ethinylestradiol, estradiol, all buffer salts were supplied by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). All metabolites of estradiol and ethinylestradiol were from Steraloids (London, UK). Sephadex columns were from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). Buffers and the TMB-based substrate have been described elsewhere (Schneider et al. 2004a). Microtiter plates used were transparent 96 flat-bottom wells with high binding capacity (MaxisorpTM) from Nunc (Roskilde, Denmark). Washing steps were carried out using an automatic plate washer (Flexiwash, Asys Hitech, Eugendorf, Austria). Absorbance was measured at 450 nm and referenced to 650 nm with a plate reader (VMax, Molecular Devices, Munich, Germany). Filters were obtained from Machery-Nagel (Düren, Germany) and Schleicher & Schuell (Dassel, Germany). SPE cartridges used were StrataXTM purchased from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany), silica gel was from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2.2. Antisera production

Both, E2 and EE2 antisera were produced in New Zealand White rabbits in cooperation with Eurogentec (Herstal, Belgium) using BSA conjugates of the respective 6-carboxymethyloxime of each steroid. Primary immunizations were performed intradermally at 10 multiple sites by injecting the immunogen emulsified with Freund's complete adjuvant. Booster injections were administered after 2, 4 and 8 weeks after priming using Freund's incomplete adjuvant. Final bleedings were taken after 2 months for the E2 antiserum and after 3 months for the EE2 antiserum.

3.2.3. Preparation of enzyme conjugates

The POD conjugate of E2 was synthesized using modifications of a method described by Schneider and Hammock (Schneider et al. 1992). 2.5 µmol of the hapten, E2-6-CMO (3.754 mg), and 2.5 µmol of N-hydroxysuccinimide and N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (1.16 mg and 2,04 mg, respectively) were dissolved in 120 µl anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF) and stirred at room temperature overnight. The mixture was centrifuged at 1750 g for 10 min, 60 µl of the DMF supernatant was added dropwise to 0.6 ml stirred peroxidase solution (6.8 mg POD in 0.6 mL 0.13 M NaHCO₃). Stirring at room temperature was continued for 3h. To purify the conjugate TBS buffer (pH 7.5, 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl) was used for elution of the enzyme conjugate on a Sephadex G-25 column, fractions

were collected in a microtiterplate and measured photometrically at 405 nm. Fractions of highest absorption values were pooled, mixed with an equal amount GuardianTM, aliquoted and stored at 4°C.

Synthesis of the EE2 conjugate followed a different route described elsewhere (Schneider et al. 2005).

3.2.4. ELISA procedures

Direct competitive ELISA format using sequential saturation was adapted for both assays (Zettner et al. 1974). The E2 antiserum was diluted 1:10 000 in coating buffer (50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6) the respective EE2 antiserum 1:50 000. Transparent microtiter plates were coated separately using 200 µL per well. Plates were covered with parafilm to prevent evaporation. After overnight incubation at 20 °C, the plates were washed three times with PBS 1 (10 mM PBS pH 7.6, containing 150 mM NaCl and 2.85 % TweenTM 20) using an automatic plate washer. For construction of the calibration curves E2 and EE2 stock solution were prepared using methanol and then further diluted with ultrapure water containing 5 % methanol to obtain standard solutions. After the three-cycle washing step the plates had standards added (100 µL per well) and were shaken at room temperature for 30 min. This was followed by addition of the related enzyme conjugate in PBS 2 (dilution 1:50,000 for E2-POD and 1:50,000 for EE2-POD, 100 µL per well); the plates were shaken at room temperature for 10 minutes, followed by a second three-cycle washing step. Finally, substrate solution was added (200 µL per well) and incubated for 30 min. The enzyme reaction was stopped by addition of sulfuric acid (50 µL per well, 1 M).

All determinations were at least made in triplicate on different plates. The mean values were fitted to a four-parametric logistic equation (4PL) (Dudley et al. 1985), optical densities and relative light units were normalized according to Equation 3.1 and plotted against log C.

$$Y_N = \frac{Y}{A} * 100$$

Equation 3.1: Y_N normalized optical density, Y optical density, A upper asymptote of the 4PL.

3.2.5. Cross-Reactivity Determination

The relative sensitivity of both ELISAs towards common metabolites of both steroids was determined by assaying a dilution series of each substance in water. Cross reactivity is calculated as the ratio of molar concentrations at the inflection points (midpoints) of the corresponding calibration curves and expressed in percentage relative to the midpoint for E2, respectively EE2 (see Equation 3.2).

$$CR = \frac{C_{\text{standard}}}{C_{\text{test}}} * 100$$

Equation 3.2: CR cross-reactivity, C_{standard} E2 concentration at the inflection point, resp. EE2 concentration, C_{test} concentration of the cross-reacting compound its inflection point.

3.2.6. Water Samples

Water samples were collected in brown glass bottles, stored at 4 °C and analyzed within 24 hours. Eight surface water samples were taken at the river Rhine, its tributary Ahr and at the smaller river Agger. Water quality according to the saprobity system at the sampling sites is in second class, only samples taken from the river Ahr ranged from first to second class. All surface water samples despite this first class sample are affected by sewage treatment plants (STP) (Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen 2005). Seven effluent samples were taken from different STPs. The investigated plants are located in rural regions connected with no industrial influence. Process characteristics include mechanical and biological treatments, consisting of nitrification and denitrification using activated sludge in plants B and C. As well as a constructed wetland (plant A) and a lagoon (plant D). Capacities of the four STP differ significantly, ranging from 150 population equivalents in plant A to 20,000 in plant C (Table 3.1).

Table 3.1: Parameters of the investigated sewage treatment plants. All sites were sampled twice in January and February 2005 when air temperatures were between -5 °C and +5 °C.

Plant no.	A	B	C	D
Classification	Constructed wetland	Tertiary	Tertiary	Lagoon
Population equivalents	150	4500	12000	150
Average daily flow [m ³ day ⁻¹]	12	3200	3500	21
Wastewater	residential, rural	residential, rural	residential, rural	residential, rural
Primary treatment	yes	yes	yes	yes
Secondary treatment	aerated	activated sludge	activated sludge	aerated, seasonal discharge
Tertiary treatment	no	sedimentation	sedimentation	no

3.2.7. Sample Preparation and Preliminary Analysis

For ELISA measurements 500 mL of surface water or effluent samples were filtered using filter papers (Machery-Nagel, ref. No. 619) and glass fibre filter GF 8 (Schleicher & Schuell, ref. no. 370120) followed by solid phase extraction on StrataX™ cartridges optimizing two methods described in literature (Quintana et al. 2004; Zühlke et al. 2005). Samples were adjusted at pH 7 thusly decreasing retention of humic acids on the sorbent, in good agreement with the weak acidity of E2 and EE2. The retention behaviour of these estrogens is not affected of this change. SPE cartridges were conditioned using 8 mL methanol followed by 8 mL distilled water containing 0.5 % methanol. Samples containing the same percentage of methanol were passed through the cartridges at an flowrate of 5.5 mL/min using a vacuum manifold. Cartridges were sequentially washed using 10 mL distilled water, 10 mL of methanol/water (1:1), 10 mL acetone/water (1:2) and 10 mL of hexane. After drying under nitrogen estrogens were eluted from the sorbent using 7 mL of methanol. The eluate was completely blown off using a gentle nitrogen stream and the extract resuspended in 500 µL of a hexane/acetone mixture (65:35). This extract was further purified on a silica gel column (500 mg) using 8 mL of the same mixture as mobile phase. Afterwards this eluate was again completely reduced to dryness and the residue dissolved in 500 µL of methanol. For ELISA measurement the final extract was diluted to a methanol content of 5 %. Recovery rates for E2 and EE2 in surface water and STP effluent were established by spiking aliquots of representative samples separately with 3, 6 and 9 ng L⁻¹ E2 and EE2. Each aliquot was extracted and treated as described above, all extractions were performed in duplicate. Additionally two non-spiked aliquots were extracted, resulting in eight extracts for surface water and STP effluent, respectively. All extracts were analysed for E2 and EE2 by ELISA, results were fitted using weighted linear regression. Recovery rates are determined using the slope of each regression curve. In tap water water recovery rates for E2 and EE2 were 94 and 110 %, in surface water 115 and 151 % respectively, in STP effluent 112 for E2 and 125 % for EE2.

3.3. Results and Discussion

3.3.1. Immunoassays

Both ELISAs, for E2 and EE2, are optimised with regard to sensitivity. Calibration curves for both analytes were constructed in the concentration range of 0.001-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Representative calibration curves and the corresponding precision profiles for each assay are shown in Figure 3.1 and Figure 3.2. Detection and quantitation limits at signal-to-noise ratios (S/N) of 0.05 ng L^{-1} and 0.36 ng L^{-1} , as well as the analytical working range for the E2 assay is 0.28-590 ng L^{-1} , and 0.01 ng L^{-1} (LOD), 0.12 ng L^{-1} (LOQ) and 0.07-2567.4 ng L^{-1} (range) for the EE2 assay, respectively. Analytical ranges are calculated using the respective precision profiles and a maximum CV (relative error, obtained from dividing each standard deviation by its respective calibrator concentration) 20 % (Ekins 1981). All parameters described take account of the 50 fold enrichment applied to all samples.

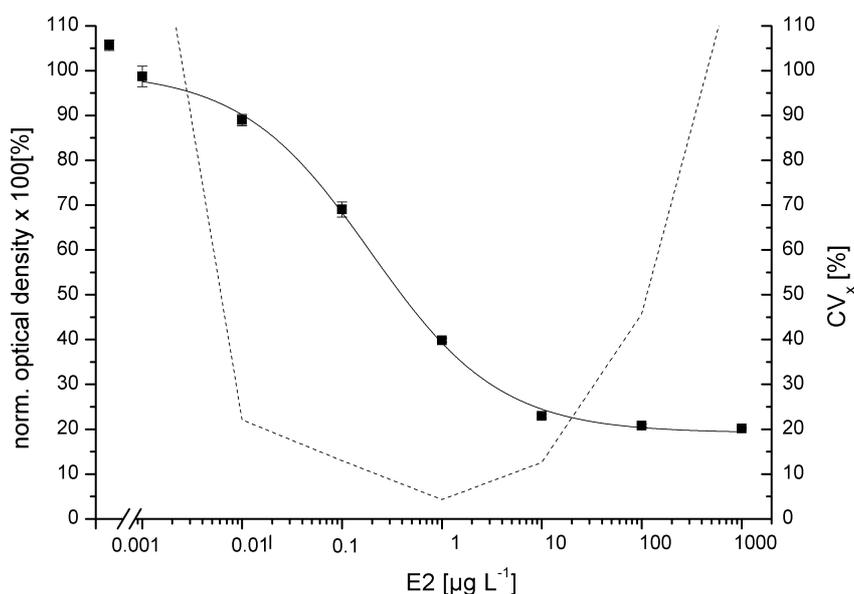


Figure 3.1: Optimized calibration curve of E2 (solid line, squares) with standard deviations indicated as error bars and corresponding precision profile (dashed line). Signal intensity is shown in normalized normalized optical density.

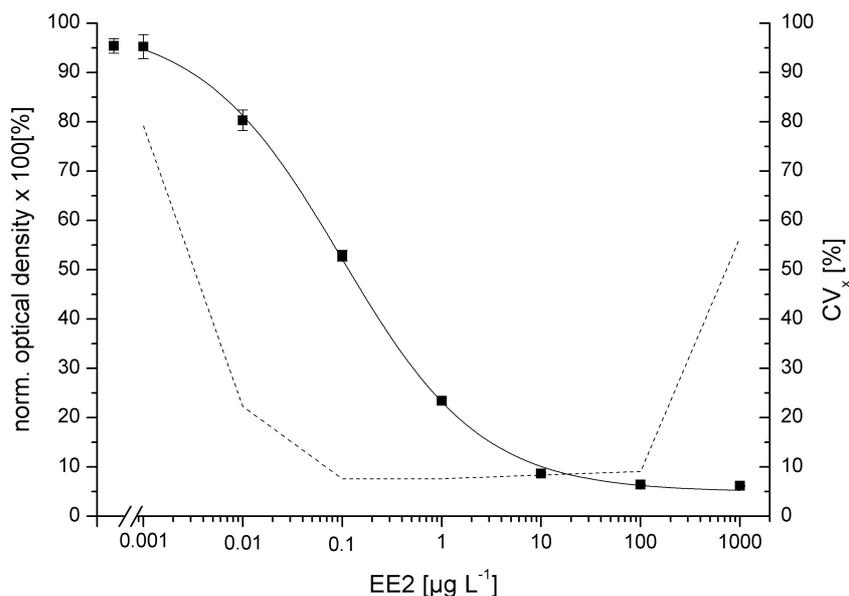


Figure 3.2: Optimized calibration curve of EE2 (solid line, squares) with standard deviations indicated as error bars and corresponding precision profile (dashed line). Signal intensity is shown in normalized normalized optical density.

Both assays exhibit excellent cross-reactivity patterns. Specificity of the E2 antiserum for typical metabolites such as estrone, estriol and sulphate or glucuronide conjugated at ring position 17 is below 1 % (ref. Equation 3.2). Merely sulphate or glucuronide conjugated at ring position 3 lead to cross-reactivity of 9 and 25 %, respectively. Specificity of the E2 ELISA for EE2 is below 0.3 %. The EE2 antiserum exhibits a very similar pattern and has been tested earlier using two different ELISA formats, according results have been discussed elsewhere (Schneider et al. 2004a, 2005).

3.3.2. Water Samples

Concentration of both estrogens determined in surface waters and STP effluents are in a reasonable range (Aerni et al. 2004; Komori et al. 2004; Pawlowski et al. 2004a; Servos et al. 2005), details are shown in table 3. Median concentration for E2 and EE2 found in surface waters are 4.0 and 0.7 ng L⁻¹, respectively. The first sampling site of the river Ahr (Ahr Blankenheim) is close to its four springs located in the middle of a small town. Possible reasons for the contamination of the spring with both hormones can be geological and hydrological aspects combined with human and livestock influence. The watershed of the river Ahr, especially the drainage area of the springs, is in a rural area and has a karstic aquifer where surface and ground water are quickly and intimately connected. These conditions facilitate an input of hormones (Wicks et al. 2004) analogue to pesticides found in karstic springs. The measured concentrations of both hormones are therefore quite reasonable.

Slightly elevated values found in the samples Agger and Ahr (Ahr Dümpelfeld) can be explained by STP discharge upstream of these sampling sites. The concentrations determined

in the river Rhine are lower than in its smaller tributary and in the river Agger possibly due to a higher dilution effect and correspond at both times very well with the E2 and EE2 amounts found by Pawlowski et al. (2004).

In samples taken from STP effluents median concentrations for E2 and EE2 of 11.7 and 1.8 ng L⁻¹ are observed. Plants B and C employ activated sludge as secondary treatment enabling the use of Johnson and Williams' model for predicting effluent concentration of E2 and EE2 in these plants (Johnson et al. 2004). For plant B a concentration range of 0.3–1.7 ng L⁻¹ for E2 and of 0.1–0.3 ng L⁻¹ for EE2 would be estimated. Parameters of plant C would lead to a concentration range of 0.7–4.1 ng L⁻¹ for E2 and of 0.3–0.7 ng L⁻¹ for EE2. For this model a fixed removal percentage of the steroids is assumed. The removal rate varies obviously between STPs and is highly dependent on both, the duration of biological treatment and the amount of biomass present (Holbrook et al. 2002). Therefore deviations to these model predictions could either result from discrepancies within the model itself, or from slight overestimations in our measurements. Such false positive measurements due to matrix interference have been reported before and can not be completely neglected (Ruppert et al. 1992). Because both investigated STP reside in rural areas the influence of livestock, which is not included in the model mentioned above, could also contribute to higher E2 concentrations.

This model is based on mean removal rates for estrogens in activated sludge plants, consequently it can not be adequately applied to predict effluent concentrations in plant A (constructed wetland) and plant D (lagoon). Reports on quantitation of steroidal hormones in constructed wetlands and lagoons are rather scarce. Divergent design concepts of wetlands described in literature and insufficient information complicate a direct comparison of estrogen concentrations. Nevertheless Kolodziej measured in a similar constructed wetland, which is surface-flow engineered and receiving effluents of a preceding STP, E2 concentrations in a range from 0.3 – 4.1 ng L⁻¹ (Kolodziej et al. 2003) which is according to the concentrations found in this study in plant A. In contrast to the constructed wetland examined by Kolodziej plant A receives influents directly from the sewage system without surface-flow and exhibits a dense vegetation of reed (*Phragmites australis*). Measurements of EE2 in a plant of similar size and design have been described in a study by the UFZ (Centre for Environmental Research Leipzig-Halle) (Braun et al. 2003), unfortunately the inadequately high detection limit for EE2 described here obviated useful quantitations in the effluent. The lagoon sampled in our study employs a very basic equipment for sewage treatment. The primary treatment consists only of a simple grid, secondary treatment has been implemented by manually controlled air bubbles arbitrarily adjusted by staff members. E2 values measured at this plant are significantly elevated compared to plants A-C, this can be explained by the non-optimized treatment process in the lagoon, especially the complete absence of a controlled nitrification step might be causative for high concentrations of E2. The importance of optimized nitrifying and denitrifying conditions for elimination of both E2 and EE2 has been thoroughly studied at STPs employing conventional activated sludge treatments (Andersen et al. 2003). Results of this study might also be indicative for improvement of the lagoon presented here.

Evaluating the results the very low air temperature during the sampling period has to be considered because the microbial activity and thus the estrogen removal rate is decreasing with lower temperature (Bringolf et al. 2003). Therefore higher estrogen concentrations during the

winter months in STP effluents and consequently in surface waters with effluent intake are likely.

Table 3.2: Determination of E2 and EE2 in surface water and effluent samples, * lost sample.

Sample	Date	E2 (ng L ⁻¹)	EE2 (ng L ⁻¹)
Ahr Blankenheim	Jan 05	2.2	0.3
Ahr Blankenheim	Feb 05	1.3	0.5
Ahr Dümpelfeld	Jan 05	6.8	0.7
Ahr Dümpelfeld	Feb 05	4.5	0.9
Agger Lohmar	Jan 05	9.2	1.0
Agger Lohmar	Feb 05	3.3	0.6
Rhine Bonn	Jan 05	4.1	0.7
Rhine Bonn	Feb 05	3.9	0.8
STP A	Jan 05	3.8	1.6
STP A	Feb 05	3.1	3.3
STP B	Jan 05	9.5	0.9
STP B	Feb 05	*	*
STP C	Jan 05	12.1	2.9
STP C	Feb 05	11.7	0.4
STP D	Jan 05	51.1	1.8
STP D	Feb 05	14.6	3.1

3.4. Conclusion

In this work E2 and EE2 concentrations of surface waters and STP effluents were determined. Concentrations of both analytes are in a good agreement with data reported in earlier studies. In addition to these studies we have determined steroid concentrations in a typical constructed wetland and a lagoon. Based on two highly sensitive ELISAs and an optimized SPE procedure a new and affordable methodology facilitating the easy and precise quantitation of both estrogens in environmental samples has been developed. Compared to typical instrumental methods or other immunoassays consumption of time and resources has been significantly reduced, thusly providing an opportunity for more frequent screenings of the environment for endocrine disruptors such as E2 and EE2.

Acknowledgement

The authors thank the local authorities for kindly providing wastewater samples. C. Schneider thanks the German Federal Environmental Foundation (DBU) for a Ph.D. scholarship. T. Hintemann and C. Schneider contributed equally to the study.

Kapitel 4. Direct sub ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay

Christian Schneider^a, Heinz F. Schöler^a, Rudolf J. Schneider^{b, *}

^a Institute of Environmental Geochemistry, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 236, D-69120 Heidelberg, Germany

^b Institute of Plant Nutrition, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn, Germany

Analytica Chimica Acta, 2005, 551, 92-97.

Abstract: A chemiluminescence ELISA for the direct detection of Ethinylestradiol (EE2) in water at sub ppt levels was developed and validated. At a signal-to-noise ratio of three the detection limit is $0.2 \pm 0.1 \text{ ng L}^{-1}$, at a ratio of ten the LOQ is found to be $1.4 \pm 0.8 \text{ ng L}^{-1}$. Based on a conservatively calculated precision profile the analytical working range is established from $0.8 - 100 \text{ ng L}^{-1}$. The ELISA was tested in four different matrices, including surface water and effluent of sewage treatment plants. All measurements were validated using an LC-MS/MS method. Typical results were consistent in both methods below 1 ng L^{-1} . Using this chemiluminescence ELISA facilitates for the first time the direct detection of EE2 at ecotoxicologically relevant concentrations.

Keywords: chemiluminescence, ELISA, Ethinylestradiol, sub ppt concentrations, direct measurement, optimization

abbreviations used: PBS phosphate buffered saline, TBS tris buffered saline, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, CLEIA chemiluminescence enzyme immunoassay, CMO carboxymethyloxime, EE2 17α -ethinylestradiol, POD Horseradish peroxidase, STP sewage treatment plant

* corresponding author. Tel.: +49-228-732856; Fax: +49-228-732489; E-mail address: schneider@uni-bonn.de (R. J. Schneider)

4.1. Introduction

Endocrine disrupting effects observed in the aquatic ecosystem have stimulated broad scientific and public interest. First studies already began in the 1970s when adverse effects of synthetic estrogens were discussed for the first time (Tabak et al. 1970). Research was intensified in the early 1990s with the advent of reproductive problems in some freshwater fish populations (Bern 1991; Sumpter et al. 1994).

One of the most potent estrogenic hormones is the synthetic steroid ethinylestradiol (EE2). It has been shown that EE2 induces feminization in immature cyprinids at concentrations of 10 ng L^{-1} in water and in rainbow trout at levels of 0.1 ng L^{-1} (Sumpter et al. 1994). In a thorough full life-cycle study using fathead minnow a NOEC value of 1 ng L^{-1} was established for EE2 (Länge et al. 2001). Therefore there is an urgent need for measurements in the lower nanogram per liter range.

EE2 and other estrogenic hormones are usually quantified in aqueous matrices using standard instrumental methods such as gas chromatography-mass spectrometry or high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Current GC-MS/MS and LC-MS/MS methods achieve detection limits below 1 ng L^{-1} after sample enrichment (Aerni et al. 2004; Hohenblum et al. 2004; Zühlke et al. 2004). In addition to this enrichment that might cause problems with recovery, these chromatographic methods require an extensive sample clean-up due to ionization suppression. Enrichment and clean-up steps are by themselves error prone and can lead to decreased precision and accuracy of results.

Alternatively immunoassays can be used for quantitation of EE2 in the lower nanogram per liter range. Several immunoassays based on RIA and ELISA formats have been developed for measuring EE2 in body fluids (Warren et al. 1974; de la Pena et al. 1975; Morvay et al. 1980; Dyas et al. 1981; Fotherby et al. 1981; Tacey et al. 1994; R-Biopharm 2003). In recent years immunoassays for monitoring EE2 in environmental samples have been introduced, too (Coille et al. 2002; Goda et al. 2003; Schneider et al. 2004a). Although most of the latter assays exhibit improved sensitivities, none of them is capable of measuring the ecotoxicologically relevant sub ppt concentration range directly. In our work we present for the first time the development and optimization of an ELISA for the direct measurement of EE2 in the sub ppt range.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Reagents and Materials

All reagents were of analytical or biochemical grade and were used as received. Horseradish peroxidase (EIA grade) was obtained from Roche (Mannheim, Germany), 1,3,5(10)Estratrien-17 α -ethinyl-3,17-diol-6-on-6-carboxymethyloxime (EE2-6-CMO) was from Steraloids (London, UK), GuardianTM and SuperSignalTM femto was from Perbio (Bonn, Germany). Tetramethylbenzidine (TMB) and TweenTM 20 were purchased from Serva (Heidelberg, Germany), sodium azide was from VWR (Darmstadt, Germany), ultrapure water was obtained by running demineralized water through a Milli-Q water purification system from Millipore (Eschborn, Germany). *N,N*-dimethylformamide, *N*-methylmorpholine, isobutylchloroformiate, ethinylestradiol, estradiol, tris(hydroxymethyl)aminoethane (Tris) and all buffer salts were supplied by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). All metabolites of estradiol and ethinylestradiol were from Steraloids (London, UK). Sephadex columns were from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). Humic acid was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The development of the polyclonal antibody and the preparation of the buffers have been described before (Schneider et al. 2004a), the TMB-based substrate (41 mM TMB, 8 mM tetrabutylammoniumborhydrid in dimethylacetamide) was developed by Frey et al (Frey et al. 2000). The actual substrate solution consists of 540 μ L TMB-solution in 21.5 ml substrate buffer and was freshly prepared for each run. Microtiter plates used were white and transparent 96 flat-bottom wells with high binding capacity (MaxisorpTM and FluoroNuncTM) from Nunc (Roskilde, Denmark). Washing steps were carried out using an automatic plate washer (Flexiwash, Asys Hitech, Eugendorf, Austria). Absorbance was measured at 450 nm and referenced to 650 nm with a plate reader (Vmax®, Molecular Devices, Munich, Germany). Luminescence was detected between 380 and 630 nm using a MicroLumat Plus LB 96 V (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Filters were obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany) and Schleicher & Schuell (Dassel, Germany). Deuterated Estradiol (2,4,16,16-D4) and deuterated Estrone (2,4,16,16-D4) were from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) and CDN Isotopes (via Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany), respectively.

4.2.2. Preparation of enzyme conjugate

Horseradish peroxidase (POD) was coupled to the 6-CMO derivative of EE2 using modifications of a method described for coupling POD and derivatives of progesterone (Munro et al. 1984). The oxime (0.958 mg EE2-6-CMO) dissolved in 50 μ L *N,N*-dimethylformamide in the presence of 0.4 μ L *N*-methylmorpholine was activated with 0.4 μ L isobutylchloroformiate under inert gas at -15 °C. After stirring for three minutes this solution was slowly added to 2.5 mg POD dissolved in a mixture of 25 μ L water and 15 μ L DMF cooled to the same temperature. The reddish solution was stirred for one hour and allowed to reach 0°C, using an ice-bath. Stirring continued for another two hours at 0°C, after which the solution was directly poured on a Sephadex G-25 column previously conditioned with TBS (pH 7.5, 0.1 M Tris,

0.15 M NaCl). The same buffer was used for elution of the enzyme conjugate. Fractions were collected in a microtiter plate and their absorbance measured photometrically at 405 nm. Fractions of highest absorbance values were pooled, mixed with an equal amount of POD stabilizer (Guardian™), aliquoted and stored at 4°C. Using -15 °C as initial temperature enables kinetic control in the activation of the steroid and coupling to lysine residues of POD. Of the total six lysine residues present in POD due to steric restrictions only three of them are accessible for coupling reactions. Conditions described above, using an excess amount of oxime lead to a quantitative coupling to POD, resulting in a steroid to enzyme ratio of 3:1 (Carlsson et al. 1978; Claassen et al. 1985; Moroder et al. 1987). Thusly the initial concentration of enzyme conjugate is estimated to be $5.7 \cdot 10^{-2}$ μmol

4.2.3. Immunoassay procedures

Both immunoassays, the EE2 ELISA utilizing TMB and the EE2 CLEIA using SuperSignal™ femto as substrate, are based on the polyclonal antibody and the enzyme conjugate described above. The direct competitive ELISA format using sequential saturation was adapted for both assays (Zettner et al. 1974). The EE2 ELISA was performed as follows. Transparent microtiter plates were coated with the polyclonal antibody (dilution 1:200,000, 200 μL per well) in coating buffer (50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6). The plates were covered with parafilm to prevent evaporation. After overnight incubation at 20 °C, the plates were washed three times with PBS 1 (10 mM PBS pH 7.6, containing 150 mM NaCl and 2.85 % Tween™ 20) using an automatic plate washer. For construction of the calibration curve an EE2 stock solution was prepared using methanol and then further diluted with ultrapure water to obtain calibration solutions. After the three-cycle washing step the plates had EE2 standards added (100 μL per well) and were shaken at room temperature for 30 min. This was followed by addition of the enzyme conjugate (dilution 1:50,000, 100 μL per well) in PBS 2 (8 mM PBS pH 7.6, containing 145 mM NaCl); the plates were shaken at room temperature for 10 minutes, followed by a second three-cycle washing step. Finally, substrate solution was added (200 μL per well) and incubated for 30 min. The enzyme reaction was stopped by addition of sulfuric acid (1 M, 50 μL per well).

The EE2 CLEIA was performed as follows. White microtiter plates were coated according to the ELISA procedure using a serum dilution of 1:200 000. EE2 standards (100 μL per well) were incubated for 30 minutes, followed by a 10-minute incubation together with the enzyme conjugate (dilution 1:50,000, 100 μL per well). After incubation plates were washed and placed in the luminescence photometer. 200 μL of substrate were used per well, measurements were performed before addition of substrate (blank), immediately after addition and after a three minutes incubation time. Calibration curves were calculated using the difference of the third and the first measurement.

All determinations were at least made in triplicate on different plates. The mean values were fitted to a four-parametric logistic equation (4PL) (Dudley et al. 1985), optical densities and relative light units were normalized according to Equation 4.1 and plotted against the logarithmic concentration:

$$Y_N = \frac{Y - D}{A - D} * 100$$

Equation 4.1: Y_N is the normalized optical density, respectively the normalized relative light unit (RLU), Y is the optical density (RLU, resp.), A is a parameter of the 4PL (“upper asymptote”, optical density (RLU, resp.) at infinitely low analyte concentration, D is the parameter of the 4PL describing the optical density (RLU, resp.) at infinitely high analyte concentration, the “lower asymptote” (due to intrinsic optical density of substrate and microtiter plate and unspecific binding of the tracer).

4.2.4. Cross-Reactivity Determination

The relative sensitivity of the immunoassay towards other steroid hormones was determined for estradiol and estrone by assaying a dilution series of each substance in water. Cross reactivity is calculated as the ratio of molar concentrations at the inflection points (midpoints, parameter C in the 4PL) of the corresponding calibration curves and expressed in percentage relative to the midpoint for EE2 (see Equation 4.2).

$$CR = \frac{C_{\text{standard}}}{C_{\text{test}}} * 100$$

Equation 4.2: CR describes the cross-reactivity in percentage, C_{standard} is a parameter of the 4PL giving the EE2 concentration at the inflection point and C_{test} refers to the concentration of the cross-reacting compound at its inflection point.

4.2.5. Matrix Interference

Matrix constituents can be part of real samples and eventually affect antibody or enzyme performance. Effects were studied using serial dilutions of EE2 in solutions of commercial humic acid as interfering agent. Concentrations of humic acid covered are range from 0.2 to 5 mg L⁻¹.

4.2.6. Water Samples

Water samples were collected in brown glass bottles, stored at 4°C and analyzed within 24 hours. Two spiked samples were prepared using ultrapure water and tap water (of origin 1/3 purified surface water and 2/3 groundwater). Eight surface water samples were taken at the rivers Agger, Ahr and Rhine. Four effluent samples were taken from different municipal sewage treatment plants (STPs) in the surroundings of Bonn and Cologne.

4.2.7. Sample preparation

For CLEIA measurements surface water and effluent samples were passed subsequently through folded filter papers (Macherey-Nagel, ref. No. 619) and glass fibre filter GF 8 (Schleicher & Schuell, ref. no. 370120). For LC-MS/MS measurements all samples were enriched using solid phase extraction following a method described by Zühlke (Zühlke et al. 2005).

4.2.8. LC-MS/MS Procedure

LC-MS/MS determinations were run by the Institute for Hygiene and Public Health, University of Bonn. The HPLC system consisted of an Agilent 1100 system (Agilent, Böblingen, Germany) with a Phenomenex SYNERGITM Max-RP C18, 4.0 μm , 2.0 \times 150 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) as the stationary phase. Gradient elution was applied using acetonitrile and water as solvents. Mass spectrometric measurements were performed using an API 2000TM (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with APCI source operated in the negative ionization mode. The method is an adaption of a method described in literature (Zühlke et al. 2005). The detection limits for EE2 after internal correction for the surrogate standards d₄-estrone and d₄-estradiol was established at a signal-to-noise ratio of three at 0.3 ng L⁻¹.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Assay Optimization

Both immunoassays were optimised with regard to sensitivity. The initial serum dilution of 1:50,000 was further diluted to 1:200,000. Incubation time of the enzyme conjugate was varied from 10 to 180 minutes (see Table 4.1), concluded by serial dilution of the conjugate down to 1:500,000 in PBS 2 (see Table 4.2).

Based on the optimized conditions, the EE2 calibration curve was constructed in the concentration range of 0.001-1000 ng L⁻¹. A typical calibration curve and the corresponding precision profile (Dudley et al. 1985) is compared to a non-optimized calibration curve in Figure 4.1. Results of the optimization process can be clearly identified in the calibration curve shifted to lower analyte concentrations. The LOD at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 is found to be 0.2 ± 0.1 ng L⁻¹, the LOQ (S/N of 10) is 1.4 ± 0.8 ng L⁻¹ calculated from eight individual calibration curves. The analytical working range of the optimized assay is 0.8 – 100 ng L⁻¹. The respective precision profile showed good accuracy (CV < 20 %) for the working range, making the assay useful for a range covering three orders of magnitude of EE2 concentrations.

Table 4.1: Assay Optimization: photometric ELISA. Influence of the tracer incubation time on signal intensity and test sensitivity using an antiserum dilution of 1:200 000 and a tracer dilution of 1:50 000.* cf. Equation 4.1 and Equation 4.2.

Incubation time of enzyme conjugate [min]	10	30	60	180
parameter A* [OD]	0.06 ± 0.001	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.51 ± 0.003
parameter C* [µg L ⁻¹]	0.07 ± 0.03	0.51 ± 0.05	0.79 ± 0.11	14.9 ± 5.0
LOD [µg L ⁻¹]	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.004	0.14 ± 0.01	2.3 ± 2.8

Table 4.2: Assay Optimization: chemiluminescence ELISA. Influence of the tracer dilution on signal intensity and test sensitivity using an antiserum dilution of 1:200 000 and a tracer incubation time of 10 minutes. * cf. Equation 4.1 and Equation 4.2.

Tracer dilution	1 : 500,000	1 : 250,000	1 : 50,000
parameter A* [RLU 10 ³]	38.0 ± 9.3	114 ± 24	436 ± 136
parameter C* [ng L ⁻¹]	7.39 ± 4.18	20.2 ± 4.5	102 ± 13
LOD [ng L ⁻¹]	0.17 ± 0.10	0.77 ± 1.1	9.4 ± 4.6

4.3.2. Specificity of the Antiserum

Specificity of the antiserum was tested in the EE2 CLEIA by determination of the molar cross-reactivities for estradiol and estrone, steroids frequently occurring in STP effluents. Cross reactivity of an antiserum is characterized by intrinsic properties of the antibodies and binding kinetics applied during incubation of sample, enzyme conjugate and antiserum. Sequential saturation methods working under non-equilibrium conditions are to be distinguished from equilibrium type assays (Weller et al. 1992). This assay and its precursor are both non-equilibrium type assays using the same antiserum. The values for estradiol and estrone were 0.2 and 0.1 %, respectively. These results are in excellent compliance with cross-reactivities measured earlier with the precursor (Schneider et al. 2004a). The antiserum proved highly specific for EE2, exhibiting only negligible reactivities for structurally similar compounds. Discrimination of these compounds can be explained through steric requirements of the IgG populations and their respective binding pockets involved in recognition and binding of the analyte.

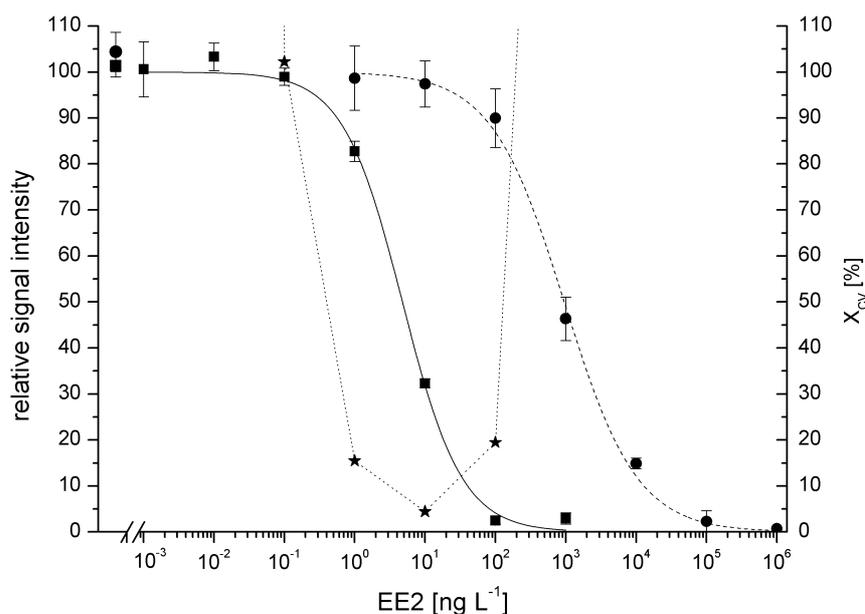


Figure 4.1: Optimized calibration curve (solid line, squares) and corresponding precision profile (dotted line, stars) compared to non-optimized calibration curve (dashed line, circles). Standard deviations are indicated as error bars. Signal intensity is shown in normalized relative light units and normalized optical density, respectively.

4.3.3. Matrix Interference

Humic acid was used as a model substance for the determination of matrix effects. The humic acid used in this study is produced from pulverized lignite, humic substance present in water samples might have a different and more complex composition than this commercially available one. The assay exhibited a very robust behaviour in the presence of humic acids. In contrast to similar studies described in literature the sigmoidal shape of the calibration curves could be maintained at elevated concentrations of humic acids (Deng et al. 2003). However curves were slightly shifted to higher concentrations of EE2 resulting in a minor loss of sensitivity. Effects are shown in detail in Figure 4.2. The humic acid used in this study is produced from pulverized lignite, humic substance present in water samples might have a different and more complex composition than this commercially available one.

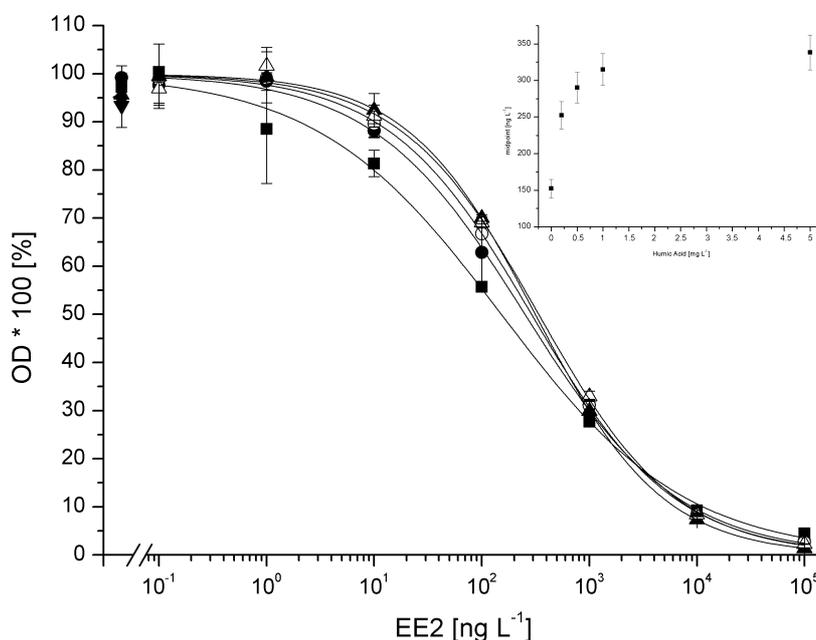


Figure 4.2: Influence of commercial humic acid on EE2 calibration curves. Curves are obtained using spiked calibrators: (squares) ultrapure water, (circles) 0.2 mg L⁻¹, (open circles) 0.5 mg L⁻¹, (triangles) 1 mg L⁻¹, (open triangles) 5 mg L⁻¹ humic acid. Inset shows the influence on the corresponding midpoints.

4.3.4. Water Samples

The optimized CLEIA was tested with four different sample matrices: ultrapure water, tap water, surface water and effluent of sewage treatment plants. All samples were run at least in quadruplicate. Adsorption of EE2 to filters used during sample preparation was not observed, moreover use of these filters is a common procedure frequently applied as sample clean-up (Huang et al. 2001; Aerni et al. 2004). Relative standard deviations were below 10 %. EE2 was below the detection limit in three of the eight surface water samples. Two samples collected from the rivers Rhine and Agger exhibited values above the LOD. All effluent samples taken from local STPs showed values above the LOD from 0.4 to 0.7 ng L⁻¹ (Table 4.3). Re-

sults obtained in reference measurements using LC-MS/MS are in good agreement with the CLEIA results.

Table 4.3: Determination of EE2 in spiked water, surface water and wastewater samples. #samples were spiked with 2.5 ng L⁻¹ EE2, *second sample collection.

Sample	CLEIA (ng L ⁻¹)	LC-MS/MS (ng L ⁻¹)
Spiked samples [#]		
Ultrapure water	1.4	2.1
Tap water	1.5	1.3
Surface water (river, location)		
Ahr, spring	< 0.2	< 0.3
Ahr, spring [*]	< 0.2	< 0.3
Ahr, Dümpelfeld	< 0.2	< 0.3
Ahr, Dümpelfeld [*]	< 0.2	< 0.3
Agger, Lohmar	< 0.2	< 0.3
Agger, Lohmar [*]	0.7	< 0.3
Rhine, Bonn	0.6	< 0.3
Rhine, Bonn [*]	< 0.2	< 0.3
Wastewater		
STP I	0.6	< 0.3
STP II	0.4	0.8
STP III	0.4	0.3
STP IV	0.7	0.6

4.4. Conclusion

Extensive discussions of factors affecting immunoassay sensitivity have been published (Ekins et al. 1970; Zettner et al. 1974; Jackson et al. 1986). The underlying concept of sensitivity in such reagent limited assays is based on the antibody affinity. In contrast to immunometric assays the "detectability" of the label is of minor importance. However, in reagent limited assays the prerequisite of optimum dilutions cannot be achieved due to sensitivity restrictions of the label, then the detectability becomes a significant factor impeding further improvements. It is self-evident that under identical conditions both labels, photometric and luminescent, yield identical calibration curves of the same sensitivity. Exemplary parameters of calibration curves obtained using both labels are as follows: $A^{\text{luminescent}} 100 \pm 6.2$, $A^{\text{photometric}} 100 \pm 7.6$, $B^{\text{luminescent}} 0.65 \pm 0.1$, $B^{\text{photometric}} 0.76 \pm 0.2$, $C^{\text{luminescent}} 42.7 \pm 14.0$, $C^{\text{photometric}} 31.9 \pm 10.4$, $D^{\text{luminescent}} 0 \pm 3.6$, $D^{\text{photometric}} 0 \pm 2.4$. Although the photometric method based on the detection of peroxidase by the TMB/H₂O₂ substrate system with a detection limit of $2 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ POD is already very sensitive (Porstmann et al. 1992), the switch to a luminol based substrate enabled us to achieve better detection limits due to its enhanced detectability. Our assessment of assay characteristics is based on conservative conventions: LOD and LOQ are calculated using signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively, the analytical working range is deduced using Ekins' description of the "precision profile" with a comparatively low admissible coefficient of variation (CV) of 20 % (Ekins 1981). It should be mentioned that any use of empirical rules such as the Horwitz equation (Horwitz et al. 1980) would lead to arbitrary assumptions regarding the working range, simulating unsustainably low assay sensitivities. Furthermore application of the Horwitz equation for concentrations below $100 \mu\text{g L}^{-1}$ yields unacceptably high values for reproducibility CVs (European Commission 2002).

EE2 values measured in surface water and STP effluent are in good accordance with the results obtained in LC-MS/MS measurements. Deviations observed in wastewater samples might be due to matrix effects regarding the antibody. The molecular mechanism of this potential interference is not elucidated, recognition of moieties from humic substance present in the sample might be an explanation for overestimated EE2 concentrations. Such false positive results due to matrix components interfering with the antibodies have been reported before (Ruppert et al. 1992). As expected, with regard to human excretion, dilution factor and more recent observations by other researchers (Aerni et al. 2004; Hohenblum et al. 2004; Zühlke et al. 2004), all values are in the sub ppt range. The antiserum employed in this study shows excellent specificity for EE2 with negligible cross-reactivities to metabolites and conjugates (Schneider et al. 2004a). Additionally, according to Baronti (2000) deconjugation of estrogens excreted as sulphates or glucuronides takes place already in the sewers. Therefore false-positive results due to cross-reacting compounds are not probable to occur.

As shown in this study antibody affinity and label detectability are of major importance for assay optimization. Under optimized conditions the reduction of experimental error and elimination of potential sources becomes relevant. Although we were able to establish excellent detection limits in this manually performed assay, further advances are expected from implementing this assay on an automated system for water analysis (Schneider et al. 2004b).

Acknowledgement

C. Schneider thanks the German Federal Environmental Foundation (DBU) for a Ph.D. scholarship. We express our appreciation to Perbio and Nunc for excellent support and to D. Skutlarek and Dr. H. Färber of the Institute for Hygiene and Public Health, University of Bonn, for reference measurements.

Kapitel 5. Literatur

- Abraham, G. E. (1969). Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J Clin Endocrinol Metab* **29**(6): 866.
- Adler, P. und Kalbfus, W. (2001). Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenen Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **29**(4): 227.
- Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B. V., Wettstein, F. E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M. D., Peter, A., Schönenberger, R., Vögeli, A. C., Suter, M. J. und Eggen, R. I. (2004). Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chem* **378**(3): 688.
- Agasan, A. L., Briggs, M. H., Hewish, D. R. und Stewart, B. (1986). Development of a monoclonal antibody for use in radioimmunoassay of ethynylestradiol. *Steroids* **47** (4-5): 295.
- Agasan, A. L., Stewart, B. J. und Watson, T. G. (1994). Development of a radioimmunoassay method for ethynylestradiol in plasma using a monoclonal antibody. *J Immunol Methods* **177**(1-2): 251.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B. und Ternes, T. A. (2003). Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ Sci Technol* **37**(18): 4021.
- Arrhenius, S. (1907). *Immunochemie*. Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft.
- Avrameas, S., Ternynck, T. und Guesdon, J.-L. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* **27**: 1131.
- Baronti, C., Curini, R., d'Ascenzo, G., DiCorcia, A., Gentili, A. und Samperi, R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. *Environ Sci Technol* **34**: 5059.
- Bayer, E. A., Ben-Hur, H. und Wilchek, M. (1990). Isolation and properties of streptavidin. *Methods Enzymol* **184**: 80.
- Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schafer, A. J., Rijs, G. B., Wegener, J. und Cofino, W. P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* **225**(1-2): 101.
- Bern, H. (1991). Statement from the work session on chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. Wingspread Conference, Racine, Wisconsin, Princeton Scientific Publishing.
- Berzofsky, J. A. und Schechter, A. N. (1981). The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol Immunol* **18**: 751.
- Blaber, S. J. M. (1970). The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proc Malac Soc London* **39**: 231.

- Bodmer, D. M., Tiefenauer, L. X. und Andres, R. Y. (1989). Antigen- versus antibody-immobilized ELISA procedures based on a biotinyl-estradiol conjugate. *J Steroid Biochem* **33**(6): 1161.
- Braun, P., Möder, M., Schrader, S., Popp, P., Kuschik, P. und Engewald, W. (2003). Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethynylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **988**(1): 41.
- Bringolf, R. B. und Summerfelt, R. C. (2003). Reduction of estrogenic activity of municipal wastewater by aerated lagoon treatment facilities. *Environ Toxicol Chem* **22**(1): 77.
- Bund-Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (2003). Arzneimittel in der Umwelt - Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Hamburg, Bund-Länderausschuss für Chemikaliensicherheit: 173.
- Carlsson, J., Drevin, H. und Axen, R. (1978). Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *J Biochem* **173**(3): 723.
- Claassen, E. und Van Rooijen, N. (1985). A trinitrophenyl(TNP)-poly-L-lysine-horseradish peroxidase conjugate for the detection of anti-TNP antibodies in vivo. *J Biochem* **33**(8): 840.
- Coille, I., Reder, S., Bucher, G. und Gauglitz, G. (2002). Comparison of two fluorescence immunoassay methods for the detection of endocrine disrupting chemicals in water. *Biomol Eng* **18**(6): 273.
- Costello, S. M., Felix, R. T. und Giese, R. W. (1979). Enhancement of immune cellular agglutination by use of an avidin-biotin system. *Clin Chem* **25**(9): 1572.
- Croue, J. P., Benedetti, M. F., Violleau, D. und Leenheer, J. A. (2003). Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environmental Science & Technology* **37**(2): 328.
- Currie, L. A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal Chim Acta* **391**: 105.
- de la Pena, A., Chenault, C. B. und Goldzieher, J. W. (1975). Radioimmunoassay of unconjugated plasma ethynylestradiol in women given a single oral dose of ethynylestradiol or mestranol. *Steroids* **25**(6): 773.
- Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q. Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R. und Knopp, D. (2003). Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ Sci Technol* **37**(15): 3422.
- Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. und Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* **32**(11): 1549.
- Deutscher Bundestag (1973). 7. Wahlperiode, 44. Sitzung. Bonn, Sitzungsprotokolle: 2453.

- Deutsches Institut für Normung. (1995). Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. DIN V 38415-2. Deutsche Einheitsverfahren, Gruppe T: Suborganismische Testverfahren, T2. Berlin, Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Dudley, R. A., Edwards, P., Ekins, R. P., Finney, D. J., McKenzie, I. G., Raab, G. M., Rodbard, D. und Rodgers, R. P. (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clin Chem* **31**(8): 1264.
- Dyas, J., Turkes, A., Read, G. F. und Riad-Fahmey, D. (1981). A radioimmunoassay for ethinyloestradiol in plasma incorporating an immunosorbent, pre-assays purification procedure. *Ann Clin Biochem* **18**: 37.
- Ekins, R. P., Chu, F. und Biggart, E. (1989). Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labeled antibodies. *Anal Chim Acta* **227**(1): 73.
- Ekins, R. P., Chu, F. und Biggart, E. (1990). Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin* **48**(9): 655.
- Ekins, R. P. (1960). The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic method. *Clin Chim Acta* **5**: 453.
- Ekins, R. P., Newman, B. und O'Riordan, J. L. H. (1970). Competitive protein-binding assays. Discussion. Cambridge, MA, USA, MIT Press.
- Ekins, R. P. (1981). The "Precision Profile": Its use in RIA assessment and design. *The Ligand Quarterly* **4**(2): 33.
- Engvall, E. und Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871.
- European Commission (2002). Commission Decision of 12 August 2002. Official Journal. **L 221**: 8.
- European Commission (2004). Children's Environment and Health Action Plan for Europe. Fourth Ministerial Conference on Environment and Health, Budapest, Hungary, WHO.
- Ezan, E., Tiberghien, C. und Dray, F. (1991). Practical method for optimizing radioimmunoassay detection and precision limits. *Clin Chem* **37**(2): 226.
- Fitzpatrick, J., Manning, B. M. und O'Kennedy, R. (2003). Development of ELISA and sensor-based assays for the detection of ethynyl estradiol in bile. *Food and Agricultural Immunology* **15**(1): 55.
- Fotherby, K., Akpoviro, J. O., Siekmann, L. und Breuer, H. (1981). Measurement of ethinyloestradiol by radioimmunoassay and by isotope dilution-mass spectrometry. *J Steroid Biochem* **14**(5): 499.
- Frey, A., Meckelein, B., Externest, D. und Schmidt, M. A. (2000). A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* **233**(1-2): 47.

- Gibson, R., Smith, M. D., Spary, C. J., Tyler, C. R. und Hill, E. M. (2005). Mixtures of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents. *Environ Sci Technol* **39**(8): 2461.
- Gillis, E., Gosling, J., Sreenan, J. und Kane, M. (2002). Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk. *J Immunol Methods* **267**(2): 131.
- Gleixner, A., Sauerwein, H. und Meyer, H. H. D. (1997). Effects of drugs which influence renal transport systems on the urinary excretion of the β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol and the anabolic steroids ethinylestradiol and methyltestosterone. *Food Additives and Contaminants* **14**(2): 143.
- Goda, Y., Kobayashi, A., Fukuda, K., Fujimoto, S., Ike, M. und Fujita, M. (2000). Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. *Water Sci Technol* **42**(7-8): 81.
- Goda, Y., Kobayashi, A., Hirobe, M., Fujimoto, S., Ike, M., Fujita, M., Okayasu, Y., Komori, K., Tanaka, T. und Rubio, F. (2003). Development of ELISAs and immunoaffinity columns for estrogens. SETAC 24th Annual Meeting in North America Science Without Borders: Developing Solutions for Global Environmental Challenges, Austin, Texas, Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Grumbach, I. M. und Veh, R. W. (1995). The SA/rABC technique: a new ABC procedure for detection of antigens at increased sensitivity. *J Histochem Cytochem* **43**(1): 31.
- Gutendorf, B. und Westendorf, J. (2001). Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* **166**(1-2): 79.
- Hanselman, T. A., Graetz, D. A. und Wilkie, A. C. (2004). Comparison of three enzyme immunoassays for measuring 17 β -estradiol in flushed dairy manure wastewater. *J Environ Qual* **33**(5): 1919.
- Hintemann, T., Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2005). Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Res zur Veröffentlichung eingereicht*.
- Hirobe, M., Goda, Y., Kobayashi, A., Fujimoto, S., Ike, M., Fujita, M. und Rubio, F. (2003). Development of a super sensitive bisphenol-A ELISA. SETAC 24th Annual Meeting in North America Science without Borders: Developing Solutions for Global Environmental Challenges, Austin, Texas, Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Hohenblum, P., Gans, O., Moche, W., Scharf, S. und Lorbeer, G. (2004). Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci Total Environ* **333**(1-3): 185.
- Holbrook, R. D., Novak, J. T., Grizzard, T. J. und Love, N. G. (2002). Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis. *Environ Sci Technol* **36**(21): 4533.
- Horwitz, W., Kamps, L. R. und Boyer, K. W. (1980). Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *J Assoc Off Ana Chem* **63**(6): 1344.

- Hsu, S. M., Raine, L. und Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**(4): 577.
- Huang, C. H. und Sedlak, D. L. (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* **20**(1): 133.
- IUPAC (1998). *Compendium of Analytical Nomenclature*. Oxford, Blackwell.
- Jackson, T. M. und Ekins, R. P. (1986). Theoretical limitations on immunoassay sensitivity. Current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-radioisotopic tracers. *J Immunol Methods* **87**(1): 13.
- Jahn, C., Zorn, H., Petersen, A. und Schwack, W. (1999). Structure-specific detection of plant cuticle bound residues of chlorothalonil by ELISA. *Pestic Sci* **55**(12): 1167.
- JapanEnviro Chemicals (2003). Ethynylestradiol (EE2) ELISA Kit Test instructions. 20.10.2005 <http://www.jechem.co.jp/eco/ee2-e.html>.
- Johnson, A. C., Belfroid, A. und Di Corcia, A. D. (2000). Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* **256**(2-3): 163.
- Johnson, A. C. und Williams, R. J. (2004). A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environ Sci Technol* **38**(13): 3649.
- Jürgens, M. D., Holthaus, K. I., Johnson, A. C., Smith, J. L., Hetheridge, M. und Williams, R. J. (2002). The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem* **21**(3): 480.
- Kaiser, H. (1966). Zur Definition der Nachweisgrenze der Garantiegrenze und der dabei benutzten Begriffe - Fragen und Ergebnisse der Diskussion. *Z Anal Chem Fresenius* **216**(1): 80.
- Kögl, F. und Tönnes, B. (1936). Isolierung von Biotin. *Z Physiol Chem* **242**: 43.
- Kolodziej, E. P., Gray, J. L. und Sedlak, D. L. (2003). Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem* **22**(11): 2622.
- Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M. und Sato, C. (2004). Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. *Water Sci Technol* **50**(5): 93.
- Kuch, H. M. und Ballschmitter, K. (2000). Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius J Anal Chem* **366**(4): 392.
- Landsteiner, K. (1933). *Die Spezifität der serologischen Reaktion*. Berlin, Julius Springer Verlag.
- Länge, R., Hutchinson, T. H., Croudace, C. P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G. H. und Sumpter, J. P. (2001). Effects of the synthetic estrogen 17α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* **20**(6): 1216.

- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P.-E. und Forlin, L. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol* **45**(2): 91.
- Leary, J. J., Brigati, D. J. und Ward, D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**(13): 4045.
- Majima, K., Fukui, T., Yuan, J., Wang, G. und Matsumoto, K. (2002). Quantitative measurement of 17 β -estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal Sci* **18**(8): 869.
- Metcalf, C. D., Metcalf, T. L., Kiparissis, Y., Koenig, B. G., Khan, C., Hughes, R. J., Croley, T. R., March, R. E. und Potter, T. (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* **20**(2): 297.
- Meyer, H. H. D., Sauerwein, H. und Mutayoba, B. M. (1990). Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 β . *J Steroid Biochem* **35**(2): 263.
- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (2005). Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen. Düsseldorf, Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen.
- Moroder, L., Mourier, G., Bovermann, G., Dufresne, M., Gohring, W., Gemeiner, M. und Wunsch, E. (1987). Studies on immunoassays of peptide factors. IV. New synthesis of a gastrin/peroxidase conjugate. *Biol Chem Hoppe Seyler* **368**(7): 849.
- Morvay, J., Fotherby, K. und Altorjay, I. (1980). Rapid radioimmunoassay (RIA) of ethinyloestradiol in body fluids. *Clin Chim Acta* **108**(1): 147.
- Munro, C. und Stabenfeldt, G. (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* **101**(1): 41.
- Oh, S. M., Choung, S. Y., Sheen, Y. Y. und Chung, K. H. (2000). Quantitative assessment of estrogenic activity in the water environment of Korea by the E-SCREEN assay. *Sci Total Environ* **263**(1-3): 161.
- Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Länge, R., Lye, C. M., Sumpter, J. P., Zerulla, M. und Tyler, C. R. (2002). Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances. *Environ Toxicol Chem* **21**(2): 319.
- Pawlowski, S., Ternes, T. A., Bonerz, M., Rastall, A. C., Erdinger, L. und Braunbeck, T. (2004a). Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicol in Vitro* **18**(1): 129.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C. R. und Braunbeck, T. (2004b). Effects of 17 α -ethinyloestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**(3): 330.

- Pfortner, P., Weller, M. G. und Niessner, R. (1998). Immunological method for the detection of nitroaromatic residues covalently bound to humic acids. *Fresenius J Anal Chem* **360**: 192.
- Porstmann, T. und Kiessig, S. T. (1992). Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* **150**(1-2): 5.
- Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M. und Cela, R. (2004). Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **1024**(1-2): 177.
- R-Biopharm (2003). RIDASCREEN® Ethinylestradiol Test instructions. 14.03.2005 http://www.r-biopharm.com/foodandfeed/pdf/ethinyloestradiol_02_08_26_na.pdf.
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M. und Sumpter, J. P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* **32**(11): 1559.
- Ruppert, T., Weil, L. und Niessner, R. (1992). Influence of water contents on an enzyme immunoassay for triazine herbicides. *Vom Wasser* **78**: 387.
- Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2004a). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids* **69**(4): 245.
- Schneider, C., Schöler, H. F. und Schneider, R. J. (2005). Direct sub ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence ELISA. *Anal Chim Acta* **551**(1-2): 92.
- Schneider, P. und Hammock, B. D. (1992). Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies. *J Agric Food Chem* **40**: 525.
- Schneider, R. J., Hintemann, T., Schneider, C. und Uhlig, S. (2004b). An Automated Instrument for the Immunochemical Determination of Estrogenic Hormones in Surface and Waste Water. The 6th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, Rome, Italy, IAEAC.
- Schütz, A. J., Winklmaier, M., Weller, M. G. und Niessner, R. (1999). Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays. *Fresen J Anal Chem* **363**(7): 625.
- Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A. und Ternes, T. A. (2005). Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* **336**(1-3): 155.
- Smith, B. S. (1971). Sexuality in the american mud snail, *Nassarius obsoletus*. *Proc Malac Soc London* **39**: 377.
- Sole, M., Lopez de Alda, M. J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K. und Barcelo, D. (2000). Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* **34**: 5076.

- Spengler, P., Körner, W. und Metzger, J. W. (1999). Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen industriellen Kläranlagenabläufen. *Vom Wasser* **93**: 141.
- Stenberg, M. und Stibler, L. (1986). External diffusion in solid-phase immunoassays. *J Theor Biol* **120**: 129.
- Stone, R. (1994). Environmental estrogens stir debate. *Science* **265**(5170): 308.
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Haberer, K. und Baumann, W. (1996). Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* **87**: 251.
- Sumpter, J. P., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R. und Purdom, C. E. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* **8**: 275.
- Sumpter, J. P. und Johnson, A. C. (2005). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* **39**(12): 4321.
- Tabak, H. H. und Bunch, R. L. (1970). Steroid hormones as water pollutants. *Dev. Ind. Microbiol.* **11**: 367.
- Tacey, R. L., Harman, W. J. und Kelly, L. L. (1994). Development of a highly sensitive and specific assay for plasma ethinylestradiol using combined extraction, liquid chromatography and radioimmunoassay. *J Pharm Biomed Anal* **12**(10): 1303.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Müller, J., Haberer, K., Wilken, R. D. und Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. 1. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* **225**(1-2): 81.
- Ternes, T. A., Andersen, H., Gilberg, D. und Bonerz, M. (2002). Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal Chem* **74**(14): 3498.
- Tiefenauer, L. X. und Andres, R. Y. (1990). Biotinyl-estradiol derivatives in enzyme immunoassays: structural requirements for optimal antibody binding. *J Steroid Biochem* **35**(6): 633.
- Tschmelak, J., Proll, G. und Gauglitz, G. (2004a). Sub-nanogram per litre detection of the emerging contaminant progesterone with a fully automated immunosensor based on evanescent field techniques. *Anal Chim Acta* **519**(2): 143.
- Tschmelak, J., Proll, G. und Gauglitz, G. (2004b). Quantifizierung von Toxinen im Wasser mittels Biosensoren. *Labor-Fachzeitschrift* **1**: 61.
- Tyler, C. R., Jobling, S. und Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* **28**(4): 319.
- Valentini, F., Compagnone, D., Gentili, A. und Palleschi, G. (2002). An electrochemical ELISA procedure for the screening of 17 β -estradiol in urban waste waters. *Analyst* **127**(10): 1333.
- Warren, R. J. und Fotherby, K. (1974). Proceedings: Radioimmunoassay of ethinyloestradiol. *J Endocrinol* **63**(2): 30P.

- Weller, M. G., Weil, L. und Niessner, R. (1992). Increased sensitivity of an enzyme immunoassay (ELISA) for the determination of triazine herbicides by variation of tracer incubation time. *Microchim Acta* **108**: 29.
- Wicks, C., Kelley, C. und Peterson, E. (2004). Estrogen in a karstic aquifer. *Ground Water* **42**(3): 384.
- Wild, D. (2001). *The Immunoassay Handbook*. London, Nature Publishing Group.
- Wu, Y., Mitchell, J., Cook, C. und Main, L. (2002). Evaluation of progesterone-ovalbumin conjugates with different length linkers in enzyme-linked immunosorbent assay and surface plasmon resonance-based immunoassay. *Steroids* **67**(7): 565.
- Xiao, X. Y., McCalley, D. V. und McEvoy, J. (2001). Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J Chromatogr A* **923**(1-2): 195.
- Yalow, R. S. und Berson, S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**: 1648.
- Yalow, R. S. und Berson, S. A. (1973). Measurement of Hormones. Radioimmunoassay. *Methods in investigative and diagnostic endocrinology 2A*. Yalow, R. S. und Berson (Ed.), S. A. Amsterdam, Elsevier. **84**.
- Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G., Hutchinson, T. und Dietrich, D. R. (2002). Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Lett* **131**(1-2): 51.
- Zettner, A. (1973). Principles of competitive binding assays (saturation analysis). 1. Equilibrium techniques. *Clin Chem* **19**(7): 699.
- Zettner, A. und Duly, P. E. (1974). Principles of competitive binding assays (saturation analyses). 2. Sequential saturation. *Clin Chem* **20**(1): 5.
- Zühlke, S., Dünnbier, U., Heberer, T. und Fritz, B. (2004). Analysis of endocrine disrupting steroids: Investigation of their release into the environment and their behavior during bank filtration. *Ground Water Monit Remediat* **24**(2): 78.
- Zühlke, S., Dünnbier, U. und Heberer, T. (2005). Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* **28**(1): 52.

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit gemäß §8 (3) b) und c) der Promotionsordnung, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Christian Schneider

Ich danke...

Herrn PD Dr. R.J. Schneider für das entgegen gebrachte Vertrauen, die umfassenden Freiheiten und persönlichen Entwicklungsmöglichkeiten.

Herrn Prof. Dr. H.F. Schöler danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die stete Gesprächsbereitschaft.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. T. Braunbeck und Herrn Prof. Dr. P. Comba für die Bereitschaft sich mit meiner Arbeit auseinander zu setzen.

Ein besonderer Dank, für zahlreiche – stets erhellende – Diskussionen zur Immunoassay-Theorie, geht an Herrn PD Dr. M. Weller.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, speziell Herrn Dr. J.P. Lay und Herrn Dr. M. Hempel. Besonders die interdisziplinären Seminare der letzten Jahre möchte ich nicht missen.

Ich danke meinen Kollegen am Institut für Pflanzenernährung für ein stets gutes Arbeitsklima, hierbei besonders den fleissigen Korrekturlesern.

Hervorzuheben sind weiterhin Frau T. Hintemann, Herr M. Hashim, Herr Dr. T. Christian und Herr Heck. Spezieller Dank gebührt dabei Frau Hintemann, unter Anderem dafür mir Begriffe wie „heteroskedastisch“ oder „heterogene Varianzverteilung“ näher zu bringen. Die engagierte und freundschaftliche Zusammenarbeit hat mir Vieles erleichtert.

Danke

Christian Schneider

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 18.04.1977
Geburtsort: Troisdorf

HOCHSCHULAUSBILDUNG

04/2002 - 12/2005 Promotion an der Universität Heidelberg
Titel: Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors Ethinylestradiol

04/2004 - 05/2004 Forschungsaufenthalt am CSIRO Land and Water, Adelaide, Australien
a) Implementierung eines Immunoassays zur Quantifizierung von Ethinylestradiol in Oberflächenwasser
b) Erlernen zellbiologischer Methoden (YES-Assay) zur wirkungsbezogenen Hormonanalytik

02/2002 Diplomprüfung Chemie an der Universität Bonn
Gesamtnote: sehr gut
Nebenfach: Biochemie

07/2001 - 12/2001 Diplomarbeit Chemie
Titel: Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung 4'-C-modifizierter Thymidine und Desoxycytidine in der PCR Reaktion

06/1999 - 08/1999 Forschungsaufenthalt an der San Diego State University, San Diego, Kalifornien
a) Ausbildung in Schutzgasmethoden
b) Synthese neuer Pyrazolderivate unter Schutzgas

10/1996 Beginn des Chemiestudiums an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn

SCHULAUSBILDUNG

1996 Gymnasium Zum Altenforst Troisdorf
Erwerb der Hochschulreife: 06/1996
Gesamtnote: 2,0