

Schnellverfahren zur Eingangskontrolle von Ausbaupasphalt auf Anwesenheit teer-/pechhaltiger Substanzen

FA 7.207

Forschungsstelle: Dr. rer. nat. Werner Imrecke, Stuttgart
Bearbeiter: Imrecke, W.
Auftraggeber: Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen, Bonn
Abschluss: Dezember 2007

1 Aufgabenstellung

Carbostämmige Bindemittel (Teer bzw. Pech) sind aufgrund ihres Gehalts an polycyclischen Aromaten (PAK) als Gefahrstoffe und besonders abfallrechtlich als gefährliche Abfälle zu betrachten. Schon bei relativ niedrigen Teer/Pechkonzentrationen in Straßenaufbruchmaterialien dürfen diese nur unter Einhaltung spezieller Vorschriften wiederverwendet werden. Sie müssen daher unter Praxisbedingungen auch in Konzentrationen nachgewiesen werden können, in denen sie anhand ihres charakteristischen Geruchs nicht mehr wahrnehmbar sind.

Teere/Peche sind Stoffgemische und können daher als Verunreinigungen artverwandter Stoffgemische wie Bitumen schlecht quantitativ bestimmt werden. Der chemisch-analytische Nachweis erfolgt über den Gehalt an teer/pechtypischen polycyclischen Aromaten (PAK). Der Nachweis ist analytisch anspruchsvoll und mit Schnellverfahren nur halbquantitativ unter der Annahme zu realisieren, dass die relative Zusammensetzung der PAK in der Probe vergleichbar ist mit der des für den Test verwendeten Kalibrierstandards.

Mit dem Forschungsvorhaben sollte ein einfach und schnell durchführbares Testsystem entwickelt werden, das keine zusätzlichen Geräte und keine labortechnischen Fertigkeiten des Anwenders erfordert und das innerhalb von wenigen Minuten mit dem bloßen Auge ablesbar ist. Der Test sollte empfindlich genug sein, um 25 mg PAK pro kg Straßenaufbruchmaterial nachweisen zu können. Lediglich die Probe müsste vorher in Trichlorethen gelöst oder ein Probenstück oberflächlich mit Trichlorethen angelöst werden, um den Test zur Aufnahme von etwas Probelösung eintauchen zu können.

2 Untersuchungsmethodik

Die geplante Methodik bedient sich der Immunreaktion zwischen Antigen (hier: PAK) und Antikörper. Testverfahren auf der Basis von Antigen-Antikörperreaktionen werden nicht nur in der Medizin und Biochemie vielfach verwendet, sie werden auch in der Umweltanalytik, z. B. im Altlastenbereich genutzt. Geeignete Antikörper sind sehr selektiv, sodass störende Begleitstoffe aus der Bindemittelmatrix nicht mitbestimmt werden. Geeignete Testaufbauten lassen sich so ausstatten, dass die Handhabung keine weiteren Geräte benötigt.

Bei Tests dieser Art handelt es sich zwingend um nur einmal verwendbare Tests, die nicht selbst hergestellt werden können, sondern die in darauf spezialisierten Fertigungseinrichtungen in größeren Stückzahlen kostengünstig produziert werden müssen.

Nach Literatur- und Marktrecherche wurde der in der biochemischen Schnelldiagnostik weit verbreitete Lateral Flow Assay (LFA) als geeigneter Testaufbau erkannt. Das Hauptproblem lag in der Überführung des Analyten in das unabding-

bar wässrige Testsystem und in dem Aufbau des Teststreifens selbst. Die für den Test notwendige Schlüsselsubstanz, ein monoklonaler Anti-PAK-Antikörper, konnte von einem Lieferanten aus den USA bezogen werden. Alle weiteren Hilfsmittel stellen diverse Biochemika-Lieferanten (Sigma, Aldrich, Pierce, Whatman) in einiger Vielfalt zur Verfügung.

Als Probenmaterialien wurden Reinstandards sowie analysierte Teer- und Bitumenproben verwendet. Diese wurden bereits für ein anderes Forschungsprojekt zum gleichen Thema genutzt.

Zum Erstellen des Testsystems wurde ein Teststreifen aufgebaut, in dem sowohl die Überführung des Analyten in das immunchemische Detektionssystem sowie die Detektion selbst bis zur Anzeige des Ergebnisses durch Fokussierung eines Farbstoffes als Strich abläuft.

Der Teststreifen selbst besteht aus einem Membranstreifen, der "Laufstrecke", durch den der Analyt mithilfe von anfangs nicht wässrigen, dann wässrigen Laufmitteln wandert. Entsprechend den Erfordernissen sind darauf Reagenzien fixiert, mit denen die PAK reagieren.

Um das gesetzte Ziel erreichen zu können, mussten folgende Entwicklungsschritte erarbeitet werden:

- Lösen des Probenmaterials (kein Entwicklungsbedarf),
- Überführung des Analyten auf eine dem Testsystem zugängliche wasserbasierte Matrix (erhebliches Problem),
- Herstellen der für den Testaufbau notwendigen Reagenzien (mäßiges Problem, hoher Zeitaufwand),
- Aufbau eines Testsystems durch Aufbringen der Reagenzien (Optimierungsproblem),
- Einstellung des Tests auf die gewünschten Grenzkonzentration des Analyten (Optimierungsproblem, zeitaufwendig),
- Prüfen der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen (Zeitaufwand erheblich),
- Quantifizierung und Qualitätskontrolle (bisher noch unerledigt) sowie
- Ausstattung des Systems für leichte Handhabung anhand eines Prototyps (bisher noch unerledigt).

2.1 Herstellung von Probenmaterial

Für die Anwendung des Tests wurde vorausgesetzt, dass 20 g Straßenaufbruchmaterial mit 100 ml Trichlorethen versetzt werden und der Bindemittelanteil durch Schütteln gelöst wird. Unter dieser Voraussetzung entspricht einer bestimmten PAK-Konzentration in der Probe (Straßenaufbruch) etwa die 0,2-fache PAK-Konzentration im gelösten Anteil. Dieser Anteil wird ohne weitere Aufbereitung für den Test verwendet. Der nicht lösliche mineralische Anteil spielt für den weiteren Test sowie für die Konzentrationsbetrachtungen keine Rolle.

In entsprechenden Fällen ist denkbar, dass ein größeres Bruchstück Straßenaufbruchmaterial mit Trichlorethen oberflächlich angelöst wird und diese Lösung dem Test zugeführt wird.

2.2 Überführung des Analyten aus der Ausgangsmatrix in die wässrige Phase der LFA-Laufstrecke (Lösemittelwechsel)

Der Teststreifen wurde am unteren Ende mit einer Kieselgelschicht versehen. Bei Aufnahme der Probe und Zusatz von Lösemittel wandert der Analyt bis in den nicht mit Kieselgel beschichteten Teil, wo er mit wässrig/methanolischem Laufmittel weiter transportiert wird.

2.3 Färbung

Um den Test ablesen zu können, müssen die verwendeten Antikörper (Reaktionspartner des Analyten) farblich markiert werden. Hierzu wurde 40 µm Goldkolloid benutzt, das einen weinroten Farbton ergibt.

2.4 Zweiter Reaktionspartner und dessen Aufbau

Abweichend von Standardtests musste nach einem abgewandelten LFA-Verfahren gearbeitet werden. Hierzu ist ein weiterer Reaktionspartner erforderlich, der mit dem von den PAK nicht gebundenen Antikörperanteil reagiert. Hierzu wurde Phenanthren gewählt, das in 9-Stellung substituiert marktverfügbar ist. Es wurde mit einer Reihe von chemischen Synthesereaktionen an Albumin (BSA) gekoppelt, das dann leicht auf dem Teststreifen fixiert werden konnte. Da Phenanthren im Vergleich zum BSA-Molekül sehr klein ist, wurde zur Vermeidung sterischer Behinderungen die Bindung zwischen Phenanthren und BSA durch einen sogenannten Spacer verlängert.

2.5 Kupplung des Phenanthren-Derivates an Albumin

Die Kupplung an das BSA erfolgte nach dem Prinzip der heterobifunktionalen Reaktion mithilfe von für die Proteinchemie entwickelten Kupplungsreagenzien. Dieser Reaktionstyp verhindert "Kurzschlussreaktionen", bei denen die jeweiligen Kupplungspartner nur mit sich selbst reagieren und damit der Produktausbeute verloren gehen. Da das eigentliche Kupplungsreagenz proteinseitig mit Thiolgruppen und nicht mit Aminogruppen reagiert, wurden die Aminogruppen des Proteins zunächst mithilfe eines Thiolierungsreagenzes in Thiolgruppen umgewandelt. Die Kupplung erfolgte danach in mehreren Schritten. (Das Kupplungsprodukt der hier beschriebenen chemischen Synthesen ist nicht marktverfügbar und musste deshalb selbst synthetisiert werden.)

2.6 Funktionstest der Präparate

Vor Aufbau des LFA-Teststreifens wurde das bisher erhaltene Produkt auf Funktion getestet, d. h. auf Bindungsfähigkeit für den (goldmarkierten) Anti-PAK-Antikörper. Der Test erfolgte visuell durch Anwendung eines in biochemischen Labors üblichen Dot Blots (Westernblot) auf Nitrocellulosemembran.

2.7 Aufbau des Teststreifens

Nach positivem Verlauf des Dot Blots (Bindungsfähigkeit der Präparate erwiesen) wurden die Reagenzien zur Herstellung des Lateral Flow Assay (LFA) verwendet. Um die Reagenzien für Kontroll- und Testlinie, wie unten beschrieben, auf der Membran fixieren zu können, wurden sie an farblose 3 µm-Latex-Microspheres (Latex-Kügelchen) gebunden. Die Latex-Kügelchen binden dann ohne Weiteres an die Membran. Die Reagenzien wurden auf die Teststreifen aufgebracht.

Die Teststreifen wurden zunächst ohne den Laufmittelwechsel mit reinen, wässrigen PAK-Standards erprobt.

Die Teststreifen mussten dann auf die gewünschte Grenzkonzentration einjustiert werden, indem die Reagenzienkonzentrationen variiert wurden.

2.8 Durchführung der LFA-Tests

Die Tests wurden schrittweise ohne/mit dem erwähnten Reinigungsschritt mit Kieselgel durchgeführt. Es wurde zunächst mit Reinstandards und dann mit Bitumen/Teer-Gemischen gearbeitet.

2.9 Ablesen der Tests

Das Ablesen der Teststreifen erfolgt nach mindestens 3 Minuten. Teststreifen wurden nur dann gewertet, wenn sie einwandfrei funktionierten, d. h., wenn die rote Kontrolllinie innerhalb der Drei-Minuten-Frist erschien.

Ein Test wurde dann positiv (PAK nachweisbar) gewertet, wenn die weinrote Testlinie bei guter Beleuchtung oder Tageslicht mit bloßem Auge nach Erscheinen der Kontrolllinie nicht zu erkennen war.

Ein Test wurde negativ bewertet, wenn Test- und Kontrolllinie sichtbar wurden.

Liegt die PAK-Konzentration der Probenlösung im Bereich der Konzentration, auf die der Test eingestellt wurde, ergeben sich oft Ergebnisse mit kaum erkennbarem Testsignal.

2.10 Durchführung von Versuchen zur Streuung der Testergebnisse

Da der Test nur Ja/Nein-Ergebnisse liefert, ist eine Aussage über die Streuung der Messwerte nur indirekt zu machen. Hierzu wurde ein auf eine bestimmte Analytkonzentration eingestellter Test mit Probelösungen mit PAK-Konzentrationen oberhalb und unterhalb der Einstell-Konzentration geprüft, und die positiven, negativen und kaum erkennbaren Testergebnisse jeweils summiert und miteinander verglichen.

3 Untersuchungsergebnisse

Der Testaufbau funktionierte mit den standardmäßig hergestellten 1%igen Bindemittellösungen und variierenden Teeranteilen im Bereich der angepeilten Grenzkonzentration von 5 mg/l PAK.

Grundsätzlich lässt sich der Test bei gutem Licht nach drei Minuten einwandfrei ablesen.

Die oben genannten Wiederholtests ergaben jedoch eine noch unzureichende Wiederholbarkeit in den Aussagen ja/nein bei PAK-Konzentrationen oberhalb und unterhalb der Soll-Konzentration von 5 mg/l in der Probelösung (entsprechend 25 mg/kg PAK im Straßenaufbruchmaterial).

Erwartungsgemäß musste bei der Herstellung neuer Teststreifen, unter Verwendung neuen Reagenzien-Chargen, der Test stets neu einjustiert werden, da Biochemikalien und Syntheseprodukte bezüglich Konzentration und Reaktivität schwanken.

Da der Test noch nicht zuverlässig genug funktionierte, wurden Proben und Laufmittel noch mit Pipetten aufgebracht, ferner war der Teststreifen noch nicht eingekapselt. Daraus folgt, dass der Einbau des eigentlichen Teststreifens in einen einfach handhabbaren Testaufbau ohne Notwendigkeit von Pipetten usw. noch aussteht.

4 Folgerungen für die Praxis

Es hat sich gezeigt, dass die in der Umweltanalytik auf dem Markt befindlichen Standardtests nicht ohne Weiteres für die Identifikation der PAK in Straßenaufbruch bzw. Bitumen genutzt werden können. Während der Bearbeitung des Forschungsvorhabens musste die ursprüngliche Vorgehensweise bzw. Methodik verändert werden, da sie nicht zielführend war (in den vorangegangenen Abschnitten nicht erwähnt). Der Methodenansatz musste den neuen Erkenntnissen und Verfügbarkeiten angepasst werden. Es musste ein großer Anteil Grundlagenforschung erfolgen.

Der entwickelte Test muss weiter verfeinert werden, damit er zuverlässig angewendet werden kann. Hierzu ist vermutlich eine Semi-Quantifizierung sinnvoll, bei der die Testlinie in mehrere parallele Aliquote aufgeteilt wird. Wesentlich ist dabei, die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse weiter zu verbessern, z. B. durch Vereinfachung des Testaufbaus unter Verwendung neu auf den Markt gekommener Hilfsmittel.

Dem Ziel, einen einfachen Test auf Basis der immunochemischen Reaktion herzustellen, ist man nähergekommen. Der Einsatz von immunochemischen Verfahren auf die beschriebene Matrix kann mit dem jetzigen Erkenntnisstand grundsätzlich positiv gesehen werden.

Eine abschließende Bestimmung der Messunsicherheit des Tests sowie die Anwendung auf möglichst unterschiedliche reale Proben, z. B. mit PmB, steht noch aus. Für die praktische Umsetzung muss zugleich eine statistische Absicherung erfolgen. Die Gebrauchsfähigkeit der Tests wird unter Umständen auch durch Zusätze im Bitumen und Asphalt beeinflusst, da sich hier Fehlerquellen ergeben können.

Der Test wurde bisher für den Anwender nicht ausgestattet, d. h. dass nach wie vor Probe und Laufmittel mit Pipetten aufgebracht wurden. Für den Vermarktungsfall ist es erforderlich, den Teststreifen in einen geeignet konstruierten Halter zu platzieren, um ein Pipettieren zu umgehen.