

Klein und stark

Die 3D-Mikrofluidik mit molekular geprägten Polymerpartikeln eröffnet neue Möglichkeiten der selektiven Pestizid-Bestimmung in Wasser

Jérémy Bell, Kornelia Gawlitza und Knut Rurack

2,4-D ist ein in der Landwirtschaft weitverbreitetes Pflanzenschutzmittel, das Grundwasser kontaminiert, sich innerhalb der Nahrungskette anreichert und Umwelt- und Gesundheitsprobleme verursachen kann. Hier stellen die Autoren ein mikrofluidisches Nachweissystem für die Echtzeitdetektion von 2,4-D in Grund- oder Oberflächenwasser vor. Es basiert auf der Kombination 2,4-D-selektiver, fluoreszierender, molekular geprägter Polymer-(MIP-)Mikropartikel mit einem 3D-mikrofluidischen Extraktions- und Detektionssystem. Messungen vor Ort sollen damit künftig möglich sein.

Die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wird in der Landwirtschaft intensiv zur Unkrautbekämpfung eingesetzt. Trotz der bekannten Umwelt- und Gesundheitsgefährdung, verursacht durch Infiltration des Grund- und Oberflächenwassers, wird es auch in Zukunft weiterhin eingesetzt werden [1]. Um die Kontamination von Nahrungsmitteln und Trinkwasser zu minimieren, wurden die maximal zulässigen Konzentrationen in Trinkwasser von Gesundheits- und Umweltorganisationen auf $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO) bzw. $70 \mu\text{g L}^{-1}$ (EPA) festgelegt [2-3]. Für eine optimale Anwendung wäre es demnach wünschenswert, die Konzentration an 2,4-D in wässrigen Umgebungen direkt vor Ort empfindlich und schnell messen zu können, vor allem während und nach den Applikationsperioden. Laborbasierte Techniken, die kontrollierte Bedingungen erfordern, wie Chromatographie (HPLC oder GC), Massenspektrometrie oder Immunoassays, sind für den Einsatz vor Ort ungeeignet, speziell wenn sie von ungelertem Personal bedient werden müssen, und sie sind häufig in Ressourcen-begrenzten Gegenden nicht verfügbar [4].

3D-Mikrofluidik und Sensorpartikel

Die Nachfrage nach leistungsstarken miniaturisierten Sensorsystemen steigt kontinuierlich, v.a. weil die heutige Gesellschaft immer schneller und umfassender über die verschiedensten Aspekte des Lebens, der Arbeit und der Umwelt informiert sein möchte [5-6]. Betrachtet man Umwelt- und Sicherheitsaspekte, Prozesskontrolle oder medizinische Diagnostik, sind mikrofluidische Systeme vielversprechend für die Vor-Ort-Analyse von flüssigen Proben, da sie bei entsprechendem Design die besonderen Anforderungen an Empfindlichkeit und Selektivität

der direkten Vor-Ort-Analytik erfüllen können [7]. Neben den klassischen Mikrofluidik-Chips sind v.a. alternative Ansätze mit modularen Schlauchsystemen sehr vielversprechend. Diese sogenannte 3D-Mikrofluidik ist durch hohe Flexibilität sowie einfache Handhabung und Komponentenintegration gekennzeichnet, birgt aber gewisse Nachteile gegenüber Chip-Formaten, wenn z.B. ein Austausch des Fluidik-Systems notwendig wird. Vorteilhaft ist hingegen andererseits, dass solche kostengünstigen Systeme einfach für die tröpfchengetriebene Extraktion unter Verwendung von „Off-the-shelf“-Komponenten aufgebaut werden können.

schneiderte Indikator-Nano- und -Mikropartikel an, die größere Mengen Analyt pro Partikel binden können und die jedes einzelne Bindungsereignis z.B. mit empfindlichen optischen Signalen, wie verstärkter Fluoreszenz, anzeigen können. Die Möglichkeiten, die sich aus der Kombination miniaturisierter, mikrofluidischer Analysensysteme und chemischer Indikatorpartikel insbesondere für die Umweltanalytik ergeben, sind bisher allerdings kaum erforscht worden.

Aufbauend auf unseren Arbeiten zu fluoreszierenden, molekular geprägten Polymer-(MIP-)Partikeln für den Nachweis kleiner organischer Moleküle [8] erschien uns die Integration solcher Partikel in einen mikrofluidischen Sensor-Prototypen vielversprechend für die Echtzeitmessung von wässrigen Proben ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Probenbehandlung. Da MIP-Partikel leistungsstarke biomimetische Erkennungsphasen sind, deren Selektivität modular eingestellt werden kann und die im Vergleich zu Antikörpern flexibler im Assay einsetzbar, chemisch und thermisch stabiler sowie kostengünstiger in der Herstellung sind [9], stellt eine Kombination mit der modularen Mikrofluidik ein vielleicht einzigartiges Baukastensystem für die Entwicklung von Sensoren dar.

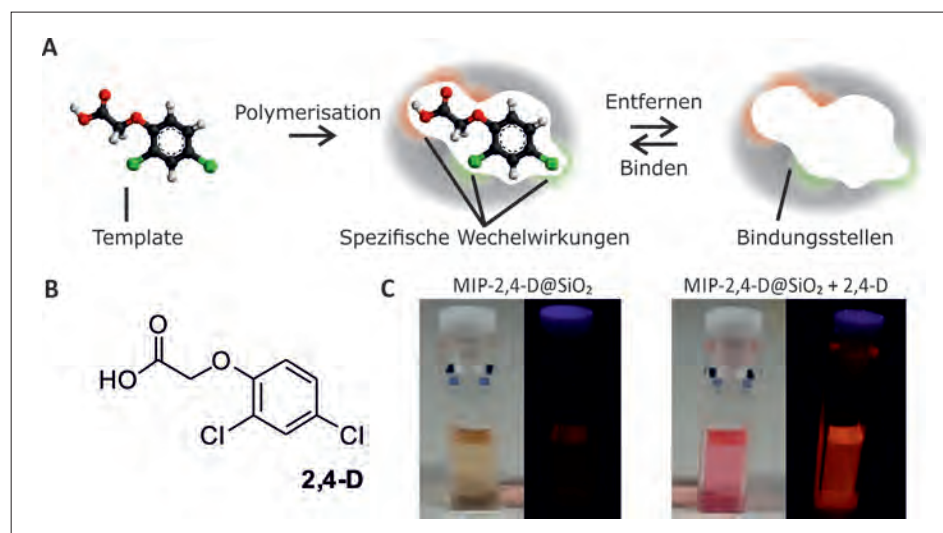


Bild 1: (A) Schema zur Synthese molekular geprägter Polymere (MIPs), (B) Struktur des Analyten 2,4-D und (C) Aufnahmen der MIPs in Chloroform in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 2,4-D im Tageslicht und unter Bestrahlung mit einer UV-Lampe (365 nm). Bilder: BAM

Entscheidend für die Nachweisstärke eines miniaturisierten Sensors sind dabei nicht nur die technologischen Möglichkeiten z. B. beim Design, sondern der Einsatz eines entsprechend performanten chemischen Indikatoren. Diesbezüglich bieten sich vor allem maßge-

Silikat-Kern mit MIP-Schale

Eine der Schlüsselkomponenten für das von uns angestrebte Nachweissystem ist ein fluoreszierender Indikatorfarbstoff, der den Ana-

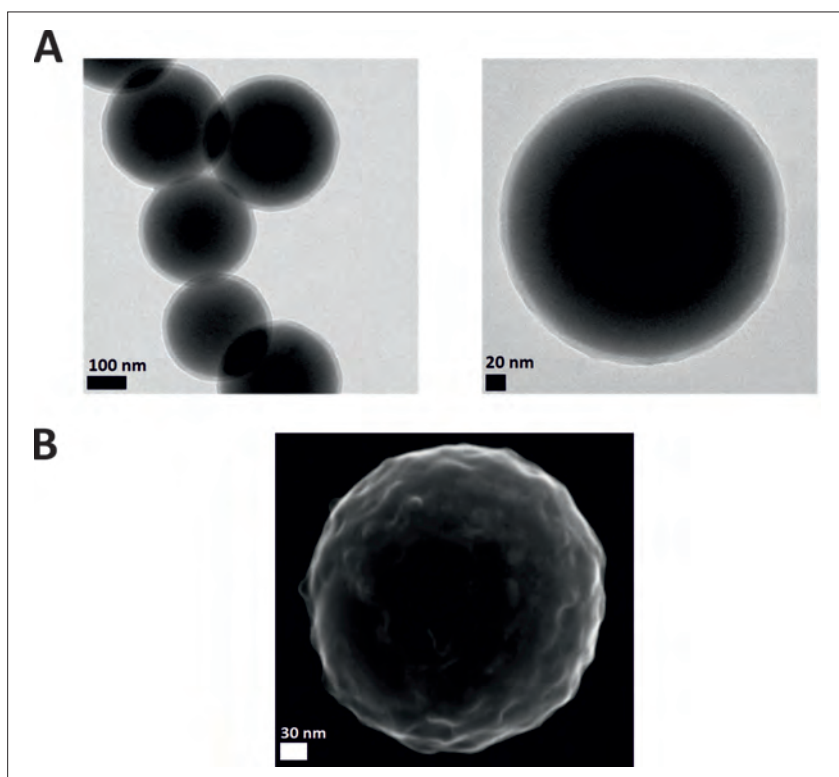


Bild 2: (A) Transmissions- und (B) Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der synthetisierten Silikat-Kern/MIP-Schale-Partikel.

lyten nicht-kovalent bindet, dieses Ereignis in ein optisches Signal umwandelt und der sich kovalent in ein Polymer integrieren lässt. Für die Detektion von 2,4-D eignet sich besonders gut ein Phenoxazinon-Derivat, das eine Harnstoffgruppe als Bindungseinheit für die Carboxylatgruppe des Analyten und zwei Methacrylatgruppen für die kovalente Integration in das Polymernetzwerk aufweist. Durch die Verwendung von zwei polymerisierbaren Gruppen wird dieser fluoreszierende Quervernetzer fest in der Polymermatrix verankert und verliert die Möglichkeit frei zu rotieren. Folglich wird ein stabiles Polymer mit kleinen

Kavitäten gebildet, die den Analyten hochspezifisch binden (Bild 1A). Die Harnstoffgruppe ist dabei so in das π -Elektronensystem des Phenoxazinons integriert, dass die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Carboxylatgruppe des 2,4-D (Bild 1B) zu einem Anstieg und einer Rotverschiebung der Emission führen (Bild 1C).

Um eine einfache Syntheseführung sowie quantitative spezifische und minimale unspezifische Bindung neben schnellen Antwortzeiten im Assay zu garantieren, wurden nur wenige Nanometer dicke MIP-Schichten auf 0,3 μm große Silikatpartikel aufgebracht (MIP@SiO₂,

Bild 2). Präpolymerisationsuntersuchungen ergaben, dass Methacrylam in als Monomer, Ethylenglykoldimethacrylat als Co-Quervernetzer und Chloroform als Lösungsmittel zu den nachweisstärksten Sensorpartikeln führen sollten. Die Polymerisation wird dann in Anwesenheit des Analyten durchgeführt, der sich als sogenanntes Template unter Ausbildung von Kavitäten mit entsprechend komplementär angeordneten Bindungsstellen molekular in das Netzwerk einprägt. Nach dem Entfernen des Templates erhält man MIP@SiO₂-Partikel mit definierten Bindungstaschen.

Erste Untersuchungen der MIP@SiO₂-Partikel in Chloroform zeigten eine Fluoreszenzverstärkung in Anwesenheit von 2,4-D (Bild 1C), wobei die Gleichgewichtseinstellung innerhalb weniger Sekunden erfolgte. Das Verhältnis der Fluoreszenzänderung unter Verwendung von MIP@SiO₂-Partikeln im Vergleich zu sogenannten NIP@SiO₂-Partikeln, einer analog, aber in Abwesenheit des Templates hergestellten Kontrollprobe, ergab einen hohen Prägefaktor von 4,8 und wies auf spezifische Bindungsstellen hin. Die vorhandene Spezifität konnte durch Untersuchungen mit strukturell ähnlichen Molekülen wie 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure (2,4-DP) und 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (2,4-DB) bestätigt werden, welche zu wesentlich geringeren Fluoreszenzverstärkungen führten.

Zwei-Phasen-Assay

Die optische Detektion beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in den Bindungstaschen der dünnen MIP-Schale, was einen Einsatz der Sensorpartikel direkt in der wässrigen Phase unmöglich macht. Für die Vor-Ort-Analytik von wässrigen Proben wurde daher auf einen Phasentransfer-Schritt zurückgegriffen, bei dem der Analyt aus der wässrigen

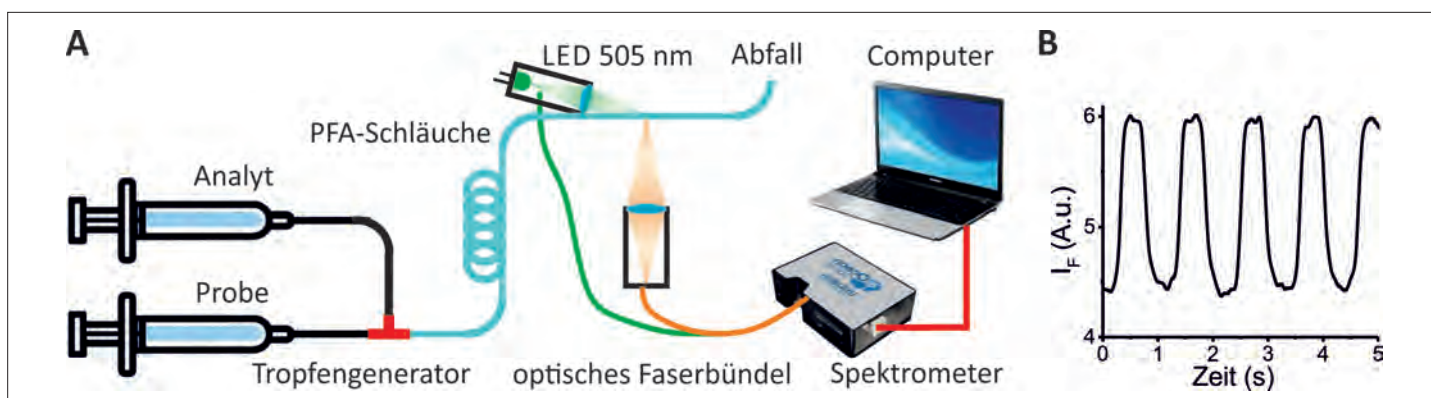


Bild 3: (A) Schema des modularen 3D-Opto-Mikrofluidik-Aufbaus zur Detektion von 2,4-D und (B) gemessenes Fluoreszenzsignal der einzelnen Tropfen als Funktion der Analysendauer.

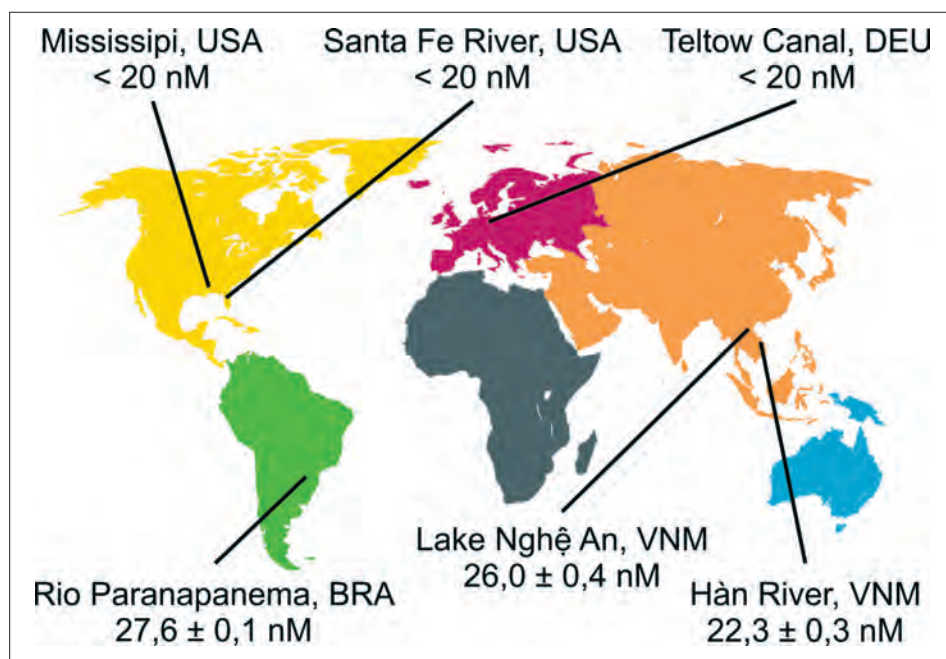


Bild 4: Mittels Mikrofluidik ermittelte 2,4-D-Konzentrationen in weltweit gesammelten Wasserproben.

Probe durch die in der nicht mischbaren, organischen Phase befindlichen MIP@SiO₂-Partikel extrahiert wird. Solch eine Extraktion lässt sich sehr effizient mit Tröpfchen-basierter Mikrofluidik realisieren [10]. Um Flexibilität sowohl in der Optimierung als auch im Aufbau zu gewährleisten, wurde die modulare 3D-Mikrofluidik gewählt, bei der die wässrige (analythaltige) Probe und die MIP@SiO₂-Suspension in Chloroform getrennt injiziert werden (Bild 3A). Nach Ausbildung homogener Wassertropfen in Chloroform werden diese in einen auf eine Metallstange gerollten PFA-(Perfluoralkoxyalkan-)Schlauch geleitet, der als Mikroreaktor fungiert und die Analyten-Extraktion durch chaotische Advektion ermöglicht [11].

Das maßgeschneiderte System zeichnete sich durch eine hohe Extraktions- und Detektionsleistung aus. Optimiert wurden dabei die Flussraten der beiden Phasen in Hinblick auf quantitative Extraktion und die Länge der Schläuche für eine reproduzierbare Gleichgewichtseinstellung. Der transparente PFA-Schlauch passiert einen optomechanischen Würfel, um den ein miniaturisierter optischer Aufbau arrangiert wurde. Als Anregungsquelle wurde eine LED verwendet und zum Auslesen der Fluoreszenz ein senkrecht dazu angeordnetes und an ein USB-Spektrometer gekoppeltes optisches Faserbündel. Durch die Verwendung von inerten PTFE-(Polytetrafluorethylen-)PFA-Schläuchen konnten Memory-Effekte auch ohne spezielle Waschprozesse vermieden werden.

Die Bestimmung des Analyten erfolgte schließlich über die Messung des Fluoreszenzsignals der organischen Phase, die die MIP@SiO₂-Partikel enthält (Bild 3B), wobei das Signal direkt proportional zur Konzentration an 2,4-D ansteigt. Der vergleichsweise große dynamische Bereich von 0,02–5 μM sowie eine Gesamtanalysendauer von 130 s qualifizieren diese Analysenmethode für Echtzeitmessungen vor Ort, beispielsweise indem die Probe über einen Bypass direkt zugeführt wird.

Proben aus aller Welt analysiert

Um die Einsatzmöglichkeit des Systems zu verifizieren, wurden Wasserproben aus Asien, Europa und Amerika gesammelt und per Standardadditionsmethode ohne vorherige Probenvorbereitung analysiert (Bild 4). In Übereinstimmung mit Qualitätsberichten aus 2016 zeigten die Proben aus Nordamerika und Europa sehr geringe Fluoreszenzänderungen, die Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits von 20 nM ergaben. Im Gegensatz dazu zeigten die Proben aus Brasilien und Vietnam, die kurz nach der üblichen Applikationsperiode für Herbizide gesammelt wurden, geringe Konzentrationen an 2,4-D – allerdings unterhalb des von der WHO gesetzten MAK-Wertes.

Um die Methode weiter zu validieren, wurden Wasserproben aus Europa mit einer bestimmten Menge Analyt (200 nM) versetzt, der oberhalb des MAK-Wertes liegt und problemlos nachgewiesen werden konnte [12].

Ausblick

Die Kombination maßgeschneiderter MIP-Partikel mit tropfenbasierter Mikrofluidik eröffnet neue Möglichkeiten in der leistungsstarken miniaturisierten Umweltsensitivität. Die Modularität der Partikelplattform, der MIP-Matrix und des mikrofluidischen Systems bergen enormes Potenzial zur Entwicklung integrierter chemischer Sensoren zur Überwachung einer großen Anzahl von Analyten in flüssigen Proben – nicht nur im Bereich Umwelt, sondern auch in der Pharmazie, der Lebensmittelchemie, der Biochemie oder in der Medizin. Wie bei Immunoassays ist jedoch auch bei dieser Kombination die Performanz eines Assays stärker von den Sensorpartikeln abhängig als von der Fluidik.

Literatur

- [1] Vivian, R. et al., In: Soybean - Pest Resistance (2013). El-Shemy, H. A. (Hrsg.); InTech, 47-84.
- [2] WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 4th Edition, Geneva, (2011).
- [3] U.S. Environmental Protection Agency - Drinking Water Contaminants, (2008).
- [4] Pesticide Protocols (2005). Martinez Vidal, J. L., Garrido Frenich, A. (Hrsg.); Springer, Kap. 7, 10.
- [5] Kaplan, R. M. et al. (2013) Annu. Rev. Psychol. 64:471-498.
- [6] Chan, M. et al. (2008) Comput. Methods Programs Biomed. 91:55-81.
- [7] Mark, D. et al. (2010) Chem. Soc. Rev. 39:1153-1182.
- [8] Wan, W. et al. (2013) Angew. Chem. Int. Ed. 52:7023-7027.
- [9] Wan, W. et al. (2016) Anal. Bioanal. Chem. 408:1753-1771.
- [10] Shang, L. et al. (2017) Chem. Rev. 117:7964-8040.
- [11] Bell, J. et al. (2016) ACS Sens. 1:334-338.
- [12] Wagner, S. et al. (2018) Biosens. Bioelectron. 99:244-250.

AUTOREN

Jérémy Bell

jeremy.bell@bam.de

Kornelia Gawlitza

kornelia.gawlitza@bam.de

Knut Rurack

knut.rurack@bam.de

Fachbereich 1.9

Chemische und optische Sensorik
Bundesanstalt für Materialforschung und
-prüfung (BAM), Berlin