

## Abstract

Diclofenac (DCF) is a pharmaceutically active substance that is not sufficiently removed in sewage treatment plants and for which ecotoxicological effects have already been demonstrated. DCF has been included in the Watch List of the European Water Framework Directive. As a result, DCF concentrations in surface water bodies have to be monitored across Europe. Thus, more and more inexpensive yet sensitive detection methods are required.

In recent years, immunoassays, especially Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) have become increasingly important. Currently, a polyclonal (pAb) and a monoclonal antibody (mAb) that binds diclofenac are commercially available. The coating antigen of the already established ELISAs was a construct formed by direct binding of DCF (via its carboxyl function) to the carrier protein, a conjugate that had been used as immunogen for antibody production, too.

To avoid possible shielding effects of the carrier protein, this work aimed to synthesize new haptens in which DCF was conjugated using a spacer between DCF and the respective proteins. Employing these novel conjugates would lead to new ELISAs which should be compared and were to be validated.

Aceclofenac (ACF), a C2 spacer surrogate for diclofenac, is very expensive, and therefore not suitable for many applications. Testing several spacers, an optimum length of six carbon atoms was found which was realized via synthesizing an amide of DCF and 6-aminohexanoic acid (Ahx) to yield DCF-Ahx. DCF cyclizes under a variety of conditions. Therefore a solid-phase synthesis was developed which gave a yield of 22.5%.

DCF-Ahx was bound to various carrier proteins, just like ACF, and, for comparison, DCF. ELISA optimizations with the commercially available antibodies revealed that each assay has its individual best protein conjugate. For both systems, employing or the polyclonal or the monoclonal antibodies, employing a coating conjugate based on DCF-Ahx resulted in a sensitivity increase in the respective ELISA. This hapten was also used for immunization.

Furthermore, a monoclonal antibody against DCF (F01G21), which was generated within the framework of a medical study by the University of Salzburg, Austria, was used to develop a new ELISA. Although ELISAs based on mAb F01G21 were not as sensitive as the ones using the commercially available antibodies, they proved robust in terms of susceptibility to solvents, salt concentration, pH, and the presence of organic matrix. Sewage treatment effluent samples could be measured directly after filtration, drinking water and surface water samples after solid-phase extraction/pre-concentration (SPE).

For the first time, the isolation of a few milligrams of photodegradation products of DCF followed by an assessment of their cross-reactivity succeeded. With cross-reactivities below 0.01%, however, an influence on the results of immunoassays with F01G21 can be excluded.

## Kurzzusammenfassung

Diclofenac (DCF) ist eine pharmazeutisch aktive Substanz, die nur unzureichend in Klärwerken entfernt wird und für die bereits ökotoxikologische Effekte nachgewiesen wurden. DCF wurde in die sog. „Watch List“ zur EU Wasserrahmenrichtlinie aufgenommen. Als Folge sollten seit 2015 europaweit DCF-Konzentrationen in Oberflächengewässern gemonitort werden. Dafür werden kostengünstige, aber dennoch empfindliche Nachweismethoden benötigt.

In den letzten Jahren haben Immunoassays, speziell Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Derzeit sind ein polyklonaler (pAk) und ein monoklonaler Antikörper (mAk) kommerziell erhältlich. Coating-Konjugate der bereits etablierten ELISAs waren über die direkte Bindung von DCF (über seine Carboxylgruppe) an das Trägerprotein erzeugt worden, eine Strategie, die auch für die Immunogensynthese zur Antikörpergewinnung gewählt worden war.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, um mögliche Abschirmeffekte des Trägerproteins zu vermeiden, neuartige Haptene zu synthetisieren, in denen DCF über einen Spacer gebunden ist, neue ELISAs aufzubauen und zu vergleichen und diese zu validieren.

Ein kommerziell verfügbares Hapten ist Aceclofenac, der Glykolsäureester des Diclofenacs, welches als Hapten mit einem C2-Spacer angesehen werden kann. Aceclofenac ist sehr teuer und als optimale Länge für einen Spacer werden oft 6 Kohlenstoffatome angesehen. Daher wurde ein Amid aus DCF und 6-Aminohexansäure (DCF-Ahx) synthetisiert. Da DCF unter einer Vielzahl von Bedingungen zyklisiert, wurde ein Syntheseweg über Festphasensynthese entwickelt, der eine Ausbeute von 22.5 % zeigte.

DCF-Ahx wurde genau wie ACF – und zum Vergleich DCF –, an verschiedene Trägerproteine gebunden. Vergleichende Untersuchungen an den ELISAs mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern ergab, dass jeder Assay sein individuell bestes Proteinkonjugat hat. In beiden Systemen (ELISAs mit polyklonalem und monoklonalem Antikörper) wurde durch den Ersatz von DCF durch DCF-Ahx als Hapten für das Coating-Antigen eine Sensitivitätssteigerung im jeweiligen ELISA erzielt. Dieses Hapten wurde zudem zur Immunisierung für neue Antikörper eingesetzt.

Weiterhin wurde ein monoklonaler Antikörper gegen DCF (mAk F01G21), der im Rahmen einer medizinischen Studie von der Universität Salzburg generiert wurde, zur Entwicklung eines neuen ELISA verwendet. Obwohl mAk F01G21 nicht so sensitiv ist wie die kommerziell erhältlichen Antikörper, sind die resultierenden ELISAs robust gegen Lösungsmittel, hohe Salzkonzentrationen, pH und organische Matrixbestandteile. Klärwerksablaufproben können direkt nach Filtration gemessen werden, Trink- und Oberflächenwasserproben nach einer Festphasenextraktion mit Anreicherung.

Erstmals gelang die Isolierung von mehreren Milligramm Photoabbauprodukten des DCF und eine Untersuchung auf mögliche Kreuzreaktivität im ELISA. Mit einer Kreuzreaktivität unter 0,01% ist eine Beeinflussung von Immunoassays mit F01G21 allerdings auszuschließen.