

Analytische Chemie 1999

Die Analytica in München bietet alle zwei Jahre den richtigen Anlaß, über die Veränderungen und Fortschritte in der Analytischen Chemie zu berichten. Die wichtigsten Stichworte im ersten Teil des Berichtes: Life Sciences, kombinierte Methoden, HTS, Chiptechniken...

Ein Nachtrag „Spektroskopie“ vervollständigt den Trendbericht.

In der Analytischen Chemie geht der Trend zu Miniaturisierung, Arraybildung, Nutzung künstlicher Rezeptoren und Anwendungen in den Life Sciences. Trennungen werden zunehmend in der Flüssigphase vorgenommen. „Hyphenated systems“ gewinnen durch laufende Realisierungen robuster Techniken an Bedeutung. High throughput screening sowie parallele Auslesetechniken erobern den instrumentellen Analysensektor. Insbesondere gewinnen Chiptechniken an Popularität. Ebenfalls steigenden Erfolg zeigen die Bemühungen um Referenzmaterialien. Insgesamt verbreitert sich die Analytische Chemie enorm. Waren früher Materialforschung und Umweltmatrices als Herausforderung zu sehen, so gelangen zunehmend Identifizierungen hochmolekularer Stoffe in kleinsten Kompartimenten in den Fokus. Völlig ausgedient haben in einigen Jahren Summenparameter-Bestimmungen.

Chromatographische Techniken

In der Familie der modernen Trenntechniken kann die Gaschromatographie bereits als ein Senior betrachtet werden. Sie ist aber keineswegs veraltet, sondern bleibt die Methode der Wahl für flüchtige und thermisch stabile Verbindungen und hat immer noch ein bemerkenswertes Entwicklungspotential. Im Mittelpunkt der gegenwärtigen Entwicklung stehen Theorie und Praxis der schnellen GC, Miniaturisierung, Injektionstechniken (u.a. Dosierung großer Probevolumina), Säulen- und Detektortechnik, umfassende multidimensionale Trennungen sowie Kopplungstechniken. Einen detaillierten Überblick über die Trends sowie den sich daraus ergebenden Anwendungen vermitteln die Übersichtsartikel, die im vergangenen Jahr in thematischen Bänden zu den Themen „Contemporary Capillary Gas Chromatography“¹⁾ und „Hyphenation: Hype and Fascination“²⁾ erschienen sind.

Die HPLC ist die am weitesten verbreitete Technik zur Trennung nicht unzersetzter verdampfbarer Analyte. Es ist bemerkenswert, daß für diese etablierte Technik offenkundig immer noch ein Bedarf an verbesserten stationären Phasen besteht. Trotz der Vielzahl verfügbarer stationärer Phasen wird auch gegenwärtig überwiegend n-Alkylsilikagel eingesetzt. Ziel der Neuentwicklungen ist vor allem die Erweiterung des tolerierten pH-Bereichs und ein Ausschalten störender Wechselwirkungen der Analyte mit nichtumgesetzten Silanolgruppen des Silikagelgrundgerüsts. Erreicht wird dieses Ziel durch hochreine Silikagele, sterische Abschirmung, Einbau polarer Gruppen in die Alkylkette, Herstellung organisch-anorganischer Kompositmaterialien durch Sol-Gel-Technik oder durch neuartige „zweizählige“ Silane zur Oberflächenmodifizierung.

Durch Packen kurzer Säulen mit sehr kleinen Partikeln (1–2 µm Durchmesser) und steile Gradienten bei der Zusammensetzung der mobilen Phase werden extrem schnelle Trennungen angestrebt. Als neue Variante der HPLC wurde die Ultrahochdruck-Flüssigkeitschromatographie (UHPLC) vorgestellt. Hierbei werden unporöse Teilchen (1 µm Durchmesser) und Eingangsdrücke bis zu 5000 bar verwendet, um Trennsysteme mit sehr hoher Effizienz (200 000 theoretische Böden) zu verwirklichen.³⁾

Besonders effiziente Trennungen (500 000 theoretische Böden pro Meter) lassen sich auch mit der Kapillarelektrochromatographie (CEC) erreichen. Mehrere Übersichtsartikel sind hierzu erschienen.⁴⁻⁶⁾ Daß bei der CEC Elektrophorese und chromatographische Prinzipien zur Trennung ausgenutzt werden können, eröffnet ganz neue Möglichkeiten zur Selektivitätseinstellung.⁷⁾ Es wird jedoch auch deutlich, daß für die CEC noch Defizite hinsichtlich einer umfassenden theoretischen Beschreibung der auftretenden Phänomene bestehen. Die Herausforderung, robuste und effiziente Trennkapillaren für die CEC zu entwickeln, haben viele Forschergruppen aufgegriffen und zahlreiche neue stationäre Phasen vorgestellt: Immobilisierte Gele, starre Monolithe oder poröse Silikagele mit sehr kleinem Teilchendurchmesser. Durch die Bindung ionischer Gruppen und hydrophober Alkylreste an diese Träger gelingt es, den für die CEC erforderlichen elektroosmotischen Fluß weitgehend unabhängig vom pH der mobilen Phase zu stabilisieren.⁸⁾

Immer noch sind instrumentell bedingte hohe Nachweisgrenzen für viele Anwendungen der CE, der MEKC oder der CEC problematisch. Eine neuartige Online-Anreicherungsverfahren, das „Sweeping“, wurde für die MEKC vorgestellt.⁹⁾

Massenspektrometrische Detektion in Kombination mit HPLC, CE oder CEC wird zunehmend zur eindeutigen Identifizierung und mit internen, isotoopenmarkierten Standards auch zur Quantifizierung von Probenkomponenten eingesetzt. Mehrere aktuelle Publikationen zeigen, daß unter bestimmten Voraussetzungen auch eine Kopplung der MEKC mit der Massenspektrometrie möglich ist.¹⁰⁾

Elektrochemische Analytik

Die letzten zwei Jahre der elektrochemischen Analytik waren einerseits durch zahlreiche analytische Verfahrensentwicklungen für die Spurenbestimmung elektroaktiver Stoffe mit konventionellen elektrochemischen Meßanordnungen und Sensoren gekennzeichnet. Andererseits gingen die Entwicklungen in Richtung Miniaturisierung, Kopplungstechniken, neue Elektroden-Materialien und Biomimetik. Einige Beispiele: bei ionenselektiven Elektroden (ISE) gelangen durch die Synthese neuer Ionophore, der kovalenten Immobilisierung von Membrankomponenten und In-situ-Untersuchungen der Ion-Ionophor-Wechselwirkungen erhebliche Fortschritte, wie die Reduzierung der ISE-Nachweisgrenzen auf 10^{-8} mol·l⁻¹ für Ag⁺.¹¹⁾ Zur Komplettierung von einfachen ISE-Elektrodenarrangements zum Kurzeinsatz wurde eine Wegwerf-Referenzelektrode entwickelt.¹²⁾ Neue modifizierte Elektroden lassen sich auch für Methoden unter Stromfluß mittels Sol-Gel-Technik für Metallkompositelektroden mit und ohne Enzymen realisieren.¹³⁾ Die elektrochemische Stripping-Analyse profitiert zunehmend von mikrotechnisch hergestellten Elektroden und Elektrodenarrays. Den Stofftransport im Anreicherungsschritt mittels Ultraschall beschleunigen Sonotroden.¹⁴⁾ An Arbeitselektroden aus ultradünnen Schichten läßt sich das Stripping-Signal auch über die Messung des Oberflächenwiderstandes verfolgen.¹⁵⁾ Die Elektroanalytik findet vielfachen Eingang in die biomedizinische Forschung. Dies reicht von der gezielten Nutzung molekularer Erkennungsmechanismen durch Ionenkanal-Rezeptoren in modifizierten Elektroden, die Biomembranen nachempfunden wurden,¹⁶⁾ über die voltammetrische Charakterisierung des Dopamin-Ausstoßes von Rattenzellen bei Exozytose-Ereignissen (Detektion von 10^{-19} mol·l⁻¹)¹⁷⁾ bis hin zur amperometrischen Detektion von Nicotin bei der Online-Kopplung von In-vivo-Mikrodialyse und Kapillarelektrophorese.¹⁸⁾ Elektrochemische Analysemethoden bilden auch die Grundlage für neue „elektronische Zungen“, bei denen entweder potentiometrisch an Lipid-Polymer-Membranen¹⁹⁾ oder mit unterschiedlicher Puls-Voltammetrie an Pt/Au-Elektroden²⁰⁾ gemessen wird.

Radiochemische Analytik

In der radiochemischen Analytik spielt die Neutronenaktivierungsanalyse weiterhin eine wichtige Rolle. Die Schwerpunkte liegen auf der Neuentwicklung und Verbesserung von Meßtechnik und Auswertesoftware, bei der Charakterisierung von zertifizierten Referenzmaterialien und der Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse auf verschiedenartige Proben. Hervorzuheben ist die Entwicklung eines fokussierten Neutronenstrahls mit einem Sub-Millimeter-Spot bei gleichzeitiger Steigerung der Neutronenflußdichte um den Faktor 20.²¹⁾ Über den k_0 -Faktor läßt sich eine Standardisierung gut durchführen.²²⁾ Beispiele für die Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse sind die Bestimmung von Actinoiden in biologischen Proben²³⁾ und die Spurenanalyse von Halogenen, Edelmetallen und Seltenen Erden. Die Aktivierungsanalyse liefert auch wichtige Beiträge zur Validierung von analytischen Ergebnissen.²⁴⁾ Bemerkenswert ist die zunehmende Anwendung der prompten Gamma-Neutronenaktivierungsanalyse.

Für die Endlagerung nuklearer Abfälle müssen die radioaktiven Stoffe charakterisiert werden, wozu analytische Verfahren erforderlich sind, die bis zu 150 Radionuklide quantifizieren können. Meistens sind α -, β -, γ - und Neutronen-Messungen die geeignetsten Bestimmungsmethoden. Hierzu sind häufig aufwendige chemische Trennungen erforderlich, wobei chromatographische Trennverfahren und die Verwendung selektiver organischer Verbindungen große Fortschritte gebracht haben.²⁵⁾ Die gezielte Abtrennung (Partitioning) der Actinoiden von den Spaltprodukten und deren Verbrennung in speziellen Reaktoren und beschleunigerbetriebenen unterkritischen Anlagen (Transmutation)²⁶⁾ wird zur Zeit sehr intensiv diskutiert.

Bei den Actinoiden spielen Speziationsuntersuchungen eine immer größere Rolle. Die erforderliche Empfindlichkeit wird mit laserspektroskopischen Methoden wie der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie oder der laserinduzierten photoakustischen Spektrometrie erreicht. Zur Speziationsanalytik nutzt man auch die Röntgenabsorptions- (XANES, EXAFS) und die Laserfluoreszenzspektrometrie. Die Resonanzionisationsmassenspektrometrie (RIMS) findet zunehmend Verwendung in der Ultraspurenanalytik langlebiger Radionuklide des Pu, Tc, Sr und Ca mit einer Nachweisgrenze von 10^6 – 10^7 Atomen/Probe.^{27, 28)} Nach mehrfach resonanter Anregung und Ionisation mit Laserlicht erreicht die anschließende Massenanalyse eine gute Isotopenselektivität und eine hohe Nachweisstärke.

Bei der Entwicklung radioaktiver Arzneimittel mit kurzlebigen Markern (¹¹C, ¹⁵O, ¹⁸F, ¹²³I, ^{99m}Tc) gewinnt die Radioanalytik immer mehr an Bedeutung. Dies betrifft sowohl die radionuklidische und -chemische Qualitätskontrolle von Radiopharmaka, als auch deren Metabolitenanalyse. Hier werden moderne Analysemethoden (z. B. LC-MS) mit Radioaktivitätsmessungen kombiniert.²⁹⁾ Autoradiographische Methoden, wie Phosphoimaging, zeigen eine stürmische Entwicklung.

Enzymatische Analysenverfahren

Trends, die sich vor zwei Jahren im Jahresüberblick andeuteten, haben sich bei der enzymatischen Analytik verstärkt fortgesetzt. Dazu gehören

- die Steigerung der Empfindlichkeit durch neue Fluoreszenz- und Lumineszenzmethoden,
- neue Multienzymsysteme für Substratzyklisierungen,
- hochspezifisch orientierte Immobilisierung über Biotin/Streptavidin-Komplexe,
- biologisch - medizinische Forschungsschwerpunkte (Krebsdiagnostik und automatisierbares Screening nach Virusprotease-Inhibitoren).

Ein neues enzymatisches Analysenverfahren beruht darauf, daß der hohe Ureasegehalt von *Helicobacter pylori* zur Schnelldiagnose bakterieller Magen-Darm-Infektionen genutzt wird. Das Enzym Urease kommt im menschlichen Organismus nicht vor, deshalb kann durch Zugabe von Harnstoff zu homogenisiertem Magen-Darminhalt die einsetzende Hydrolyse unter pH-Wert-Erhöhung als sicheres Zeichen für vorhandene *H. pylori*-Bakterien angesehen werden. Neu ist Phthalhydrazidylazo-acetylaceton als lumineszierender pH-Indikator. Es ist bei pH <7 stabil, zerfällt aber bei höheren pH-Werten und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter Lichtemission. Die Empfindlichkeit der neuen Methode ist 50 mal größer als bei üblichen pH-Indikatoren.³⁰⁾

Ähnlich verhalten sich phenoxy-substituierte Acridinester, die als langlebige Chemilumineszenzindikatoren für H₂O₂-bildende Oxidasen eingeführt wurden. Sie reagieren mit dem H₂O₂ um pH 7 unter Lichtemission. Die Empfindlichkeit liegt bei $1,8 \cdot 10^{-16} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Oxidase. Bedeutung erlangt dieser Nachweis für immunologische Tests, bei denen alkalische Phosphatase (AP) als Label-Enzym dient. Sie setzt aus FAD-Phosphat FAD frei, das mit FAD-freier Glukoseoxidase (Apoenzymform) zum aktiven Enzym (Holoenzym) reagiert und dessen Oxidase-Aktivität abschließend bestimmt wird. Damit werden AP-Nachweise mit der extremen Empfindlichkeit von 10^{-15} bis $4,1 \cdot 10^{-19} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ermöglicht.³¹⁾

Der Ersatz von Fluoreszenzfarbstoffen und -markern durch submikroskopische Silber- oder Goldpartikel, die über SH-Gruppen an Proteine gebunden werden können, ist eine neue Variante der Fluoreszenzmessung. Die optischen Eigenschaften kolloiddisperser Edelmetalle sind makroskopisch denen von Fluoreszenzfarbstoffen ähnlich, die Empfindlichkeit ist aber deutlich größer (Detektionsgrenze für Gold oder Silber : $10^{-16} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; ein 60 µm großes Goldpartikel entspricht $3 \cdot 10^5$ Fluoreszeinmolekülen).³²⁾ Die Fluoreszenzmikroskopie eignet sich damit zur Detektion von Einzelproteinmolekülen in Adsorptionsschichten.

In der Enzymologie werden Enzympaare, bei denen das Produkt jeweils eines Enzyms das Substrat des anderen Enzyms ist, zu Substratzyklisierungen genutzt. Abhängig von der Zahl der durchlaufenen Zyklen, bei denen ein nachweisbares Sekundärprodukt gebildet wird, lassen sich sehr geringe Mengen eines primären Enzymsubstrats bestimmen. Das Verfahren wird seit längerer Zeit genutzt; aktuell wurde ein System für NAD⁺/NADH zur Bestimmung von Ribonukleinsäuren bis zur Nachweisgrenze von 10^7 Molekülen, (entspricht $10^{-18} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) eingesetzt.³³⁾

Pharmazeutische Screeningverfahren, für die aufgrund umfangreicher Testserien ein Bedarf nach automatisierbaren Parallelbestimmungen besteht, werden zunehmend mit Mikrotiterplattenlesern durchgeführt. Gegenüber der direkten Bindung der Biomoleküle an die Wandoberfläche der Testplatten hat sich die Immobilisierung von biotinylierten Enzymen und Antikörpern über DNS-Streptavidin-Konjugate als deutlicher Fortschritt hinsichtlich Immobilisierungseffizienz, Reversibilität und Regioselektivität erwiesen.³⁴⁾ Die kovalente Immobilisierung der substituierten DNS ist nur einmal herstellerseitig notwendig, alle Folgereaktionen werden beim Anwender nur noch über Adsorptions- und Desorptionsvorgänge durchgeführt.

Die Krebsdiagnostik ist weiterhin ein Schwerpunkt der medizinischen Analytik. Für Prostataatumore wurden bisher nicht besonders spezifische Antikörper genutzt. Die Bestimmung einer Prekursor-Form von Kallikrein 2 (hK2) im Serum hat sich jetzt als spezifischer erwiesen.³⁵⁾

Metastasenbildung aggressiver Formen von Brustkrebs ist mit einem verstärkten Auftreten einer Serinprotease, Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), gekoppelt und kann deshalb zur Frühdiagnostik eingesetzt werden.³⁶⁾

Das Enzym Telomerase ist für die vollständige Replikation von DNS-Molekülen verantwortlich. Fehlt die Telomerase, geht bei jeder Zellteilung Information verloren. Das führt zur Alterung und zum Tod lebender Organismen. Umgekehrt macht ihre Gegenwart Zellen „unsterblich“ und führt zur Entartung normaler Lebensprozesse und zum Tumorwachstum. Die Bestimmung der Telomerase im menschlichen Organismus ist ein Frühindikator für zahlreiche Tumoren. Ziel der Diagnostik ist die Herabsetzung der Nachweisgrenze für Telomerase. Durch Einführung von neuen Fluoreszenzverfahren mit PicoGreen³⁷⁾ oder mit Acridinester-Oligonukleotiden³⁸⁾ als Substraten, ließ sich die Nachweisgrenze im Berichtszeitraum um mindestens drei Größenordnungen auf $10^{-16} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $3,5 \cdot 10^{-15} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ verringern.

Hepatitis C und HIV sind die derzeit gefährlichsten Viruserkrankungen. Die intensive Suche nach geeigneten Virostatika richtet sich zunehmend auf Inhibitoren viraler Serinproteasen. Neue (möglichst fluoreszierende) Substrate³⁹⁾ und radiochemische Methoden⁴⁰⁾ eignen sich besonders für Screeningverfahren in Mikrotiterplattenlesern.

Immunochemische Verfahren

Immunoassays werden nach wie vor hauptsächlich in der klinischen Chemie eingesetzt. Aktuelle Trends, die gleichermaßen auch für andere Bereiche wie den Umweltsektor typisch sind, hat Hage⁴¹⁾ in einer ausführlichen Übersicht zusammengefaßt. Ungeachtet der anhaltenden Dominanz von Enzymimmunoassays (Verwendung von Enzymen als Label), erfreuen sich insbesondere Fluoreszenz- und Lumineszenzimmunoassays zunehmender Beliebtheit, nicht zuletzt wegen des steigenden Angebots an leistungsfähigen Reader- und Imaging-Systemen. Andere, ebenfalls schon länger bekannte Assay-Formate unter Verwendung von Liposomen (Liposomenimmunoassay) oder elektrochemisch aktiven Substanzen (Elektrochemischer Immunoassay) fristen noch immer ein Schattendasein.

Für die meisten analytischen Chemiker zählen Immunoassays zu den modernsten Techniken. Dies ist jedoch mitnichten so: Schon Anfang des letzten Jahrhunderts waren Immunoassays im Gebrauch. Zwei neuere Publikationen^{42, 43)} rufen wieder in Erinnerung, daß Antikörper chirale Verbindungen unterscheiden können. Eine vergleichbare Veröffentlichung existiert von Landsteiner und van der Scheer aus dem Jahre 1928.⁴⁴⁾ Antikörper differenzieren aufgrund ihrer räumlichen Struktur grundsätzlich zwischen Enantiomeren – es ist recht schwierig, Antikörper herzustellen, die das nicht tun. Somit eignen sich Immunoassays hervorragend für die enantioselektive Analyse von chiralen Verbindungen und sollten dafür verstärkt eingesetzt werden, da sowohl die Pharmazie als auch die Agrochemie verstärkt enantiomerenreine Substanzen fordern.

Nur wenige Arbeitsgruppen bearbeiten ein Thema, an das hohe Erwartungen geknüpft sind: Die Entwicklung rekombinanter Antikörper.⁴⁵⁾ Die kostengünstige Bereitstellung dieser Antikörper-Fragmente (scFv, Fab), maßgeschneidert in Bezug auf Spezifität, Affinität, auf das spätere Assay-Format und die Probenmatrix, ist auch gegenwärtig noch mehr Vision als Realität. Immerhin wird zunehmend die Qualität der entsprechenden monoklonalen Antikörper reproduziert. Ein entscheidender Durchbruch wird in erster Linie davon abhängen, ob es gelingt, eine tragfähige Strategie zur gezielten Manipulation (Optimierung) von Antikörper-Eigenschaften zu entwickeln. Einen Schritt weiter wagte die Gruppe Skerra.⁴⁶⁾ Ausgehend von kleinen Proteinen, den Lipocalinen, wurden antikörperähnliche Systeme („Anticaline“) hergestellt, die nach sechs Runden einer Affinitätsanreicherung aus einer Random Library eine ganz beachtliche Affinität gegen das gewählte Hapten Fluorescein aufwiesen (ca. 150 nM). Dies zeigt, daß man vielleicht in nicht allzu ferner Zukunft von den Antikörpern in der Analytik Abschied nehmen kann.

Eine Anwendung für Immunoassays mit hohem Wachstumspotential ist die Lebensmittelanalytik, insbesondere wegen der Einführung gentechnisch veränderter Nahrungsmittel. Entsprechende gesetzliche Regelungen für die Zulassung dieser Produkte befinden sich in Bearbeitung, endgültige Entscheidungen sind noch nicht gefallen. Die Bevölkerung ist bezüglich der Akzeptanz der Produkte gespalten. Unterschiedliche Regelungen der Staaten und Wirtschaftsblöcke werden Lebensmittelproduzenten sowie Kontroll- und Überwachungsorgane mit neuen Forderungen nach Analysen überziehen. Immunoassays könnten die entstehende Lücke in einem überschaubaren Zeitraum schließen und eine kostengünstige, zeitsparende und für existierende PCR- und Elektrophoresemethoden automatisierbare Alternative darstellen.

Weitere Trends sind Versuche, Immunoassays verstärkt zu miniaturisieren, zu parallelisieren und mit Multianalytfähigkeitsauszustatten.^{47, 48)} Für letzteres gibt es grundsätzlich zwei Ansätze: Multianalytfähigkeit für mehrere Substanzgruppen und die Möglichkeit, mehrere Einzelsubstanzen zu identifizieren. Die Multianalytfähigkeit ist einfacher zu realisieren, da sich die Immunoassays gegen verschiedene Substanzklassen nicht beeinflussen. Immunoarrays, die eine Substanzidentifikation ermöglichen, sind noch selten. Sie erfordern chemometrische Methoden, um aus den meist unerwünschten Kreuzreaktionen nützliche Informationen zur Substanzidentifizierung zu gewinnen.

Zunehmender Beliebtheit erfreuen sich Kopplungstechniken unter Verwendung von Antikörpern zur selektiven Anreicherung der Zielanalyten, gefolgt von einer leistungsstarken Trenntechnik.^{49, 50)} Kopplungstechniken sind besonders für komplexe Probenmatrices und den parallelen Nachweis (Multianalyt-Methoden) mehrerer Verbindungen interessant. Die Kombination ist sehr einfach off-line möglich, wird aber im Online-Betrieb besonders effizient und leistungsstark.

Beherrscht wird dieser Ansatz nach wie vor von der Immunoaffinitätschromatographie (IAC) – Flüssigkeitschromatographie, auch bekannt als High Performance Affinity Chromatography oder High Performance Immunoaffinity Chromatography (HPAC bzw. HPIAC).

Die Kopplung ist jedoch auch mit der Gaschromatographie und der Kapillarelektrophorese (IACE) möglich. Für die Immobilisierung der Antikörper kann mittlerweile auf ein breites Spektrum robuster Träger zugegriffen werden, einschließlich der Inkorporation der Biomoleküle in Gläser im Sol-Gel-Verfahren.

Chemo- und Biosensoren

Optische Nanosensoren für die chemische Analyse innerhalb einzelner lebender Zellen markieren einen Trend zur gezielten Erkundung. PEBBLE (Probes Encapsulated by Biologically Localized Embedding) verbessern das unspezifische flächige Markieren mit Fluorophoren durch Mikroverkapselung (Durchmesser etwa 200 nm). Erste Nanosensoren für intrazelluläre pH-, O₂- und Ca²⁺-Messungen wurden Ende 1999 vorgestellt.⁵¹⁾

Die Miniaturisierung typischer analytischer Grundoperationen auf Mikroskalen nimmt unvermindert zu. So wurden erste Arbeiten zur dynamischen DNA-Hybridisierung auf einem Chip unter Nutzung paramagnetischer Kügelchen (Durchmesser etwa 3 µm) publiziert.⁵²⁾ Außergewöhnlich ist auch die Verwendung eines Helium-Plasmas mit 50 nl Volumen auf einem Glaschip zur Detektion molekularer Verbindungen.⁵³⁾

Die Suche nach neuen Erkennungsstrukturen geht unvermindert weiter. Neu ist die Nutzung von inkludierten solvatochromen Farbstoffen in synthetischen Zeolith-Strukturen. So wurde Nilrot in verschiedenen Zeolithen eingebaut und zur optischen Detektion von Ethanol und Aceton vorgeschlagen.⁵⁴⁾ Supramolekulare Wirt/Gast-Strukturen sind seit längerem Gegenstand der Bemühungen. Calixarene werden in Kombination mit Surface Acoustic Wave Transducern zur nachweisstarken Detektion von Toluol- und Xyloldämpfen im ppm-Bereich angewandt.⁵⁵⁾

Biomimetische Erkennungsstrukturen auf synthetischer Basis sind in zahlreichen Arbeitskreisen in Entwicklung. Ziel ist die Verbesserung und Ablösung natürlicher Rezeptoren wie Antikörper oder Enzyme. Beispielhaft genannt sei die Elektrosynthese von Poly(o-phenylendiamin) als selektive Kavität für Glucose mit beträchtlichem Potential für die Glucosesensorik.⁵⁶⁾ Die kombinatorische Synthese und Findung geeigneter molekularer Imprinting-Strukturen hat erstmals eine japanische Gruppe für Triazinherbizide als Analyten demonstriert.⁵⁷⁾ Die Kombination des molekularen Prägens mit dem Einbau eines Luminophoren in eine Gesamterkennungsstruktur wurde anhand des Nachweises im ppt-Bereich für den Kampfstoff Soman gezeigt.⁵⁸⁾

Für die Suche nach extraterrestrischem Leben wurde im Rahmen der Vorbereitung zur Mars-Expedition der NASA/ESA ein Chip entwickelt, der chirale Aminosäuren erkennt.⁵⁹⁾

Chemische Sensorik ist für höhermolekulare Verbindungen interessant. So nutzt eine Gruppe in Los Alamos, NM/USA, die Beweglichkeit fluoreszenter Rezeptoren einer künstlichen Membranschicht, um beim Andocken eines Cholera-Toxins eine Zweifarbenänderung hervorzurufen.⁶⁰⁾ Derartige Resonanzenergietransferprinzipien gewinnen an Verbreitung.

In der Ionenmobilitätssensorik, einer aus der militärischen Forschung übernommenen Sensortechnik, ist die Frage nach der Ionisierungsquelle essentiell. Hier gelang einer russisch-amerikanischen Gruppe die Substitution der üblichen ⁶³Ni-Strahlerquelle durch eine miniaturisierte Oberflächenionisationsquelle. Amine in der Gasphase können damit im ppt-Bereich detektiert und zugeordnet werden.⁶¹⁾

Sensor-Array-Anordnungen, bekannt aus dem DNA- und Immunoassay-Bereich, gewinnen auch in der chemischen Sensorik Anhänger: Eine US-Gruppe entwickelte eine künstliche Nase, bestehend aus einem faseroptischen Bündel, an dessen Ende sich vor jeder Faser eine unterschiedlich wechselwirkende Solvatochromschicht befindet. Diese ist einem den Riechnerv betreffenden Epithelium von Säugetieren nachempfunden.⁶²⁾

Chemische Sensoren, welche visuell mit dem menschlichen Auge kontrolliert werden können, sind seit langem gefragt. Diesem Ziel kommt die Nutzung der Polarisation zur Fluoreszenzauslesung nahe. Die Sensorstruktur besteht dabei aus zwei örtlich getrennt ausgebrachten Fluorophoren. Einer interagiert mit dem zu messenden Analyten und ein zweiter ist molekular orientiert ausgerichtet und tritt nicht mit dem Analyten in Wechselwirkung. Die Änderung des Polarisationsgrades der gemeinsamen Lichtemission macht die Änderung des Analytgehaltes für das Auge sichtbar.⁶³⁾ Einen ebenfalls einfach auszulesenden chemischen Sensor mit strukturierten farbgebenden Schichten präsentierte eine japanische Gruppe.⁶⁴⁾ Sie erzeugt chemisch sensitive Strichgitter, die nach Interaktion mit dem Analyten unterschiedliche Beugungsstrukturen zeigen. Zur Detektion wird lediglich ein einfacher He-Ne-Laser sowie das menschliche Auge benötigt.

Chemometrik

In zunehmendem Maße hilft die Chemometrik heute bei der Lösung chemischer Probleme. Nur wenn konkrete Fragestellungen es erfordern, besteht die Notwendigkeit neue Methoden zu entwickeln.⁶⁵⁾ So ist die Chemometrik aktuell von einem zunehmendem Grad anwendungsorientierter Arbeiten geprägt, wobei der hohe Stand der Hard- und Software eine weitgehend problemlose Anwendung chemometrischer Methoden im Alltag des Chemikers ermöglicht. Dem entspricht die 1998/1999 stark angestiegene Zahl einschlägiger Publikationen.

Schwerpunktmäßig werden Methoden des „soft modelling“, insbesondere Neuronale Netze und die Partial - Least - Squares - Regression (PLS), zur quantitativen Beschreibung und Vorhersage multivariater, meist spektroskopischer Probleme genutzt. Allgemein reichen die Anwendungen von der multivariaten Kalibration, der Struktur-Aktivitäts-Modellierung, der multivariaten Datenanalyse, d.h. der Mustererkennung und Klassifikation, bis hin zum multivariaten Prozessmonitoring und zur Modellierung. Erfreulicherweise nutzt die analytische Qualitätssicherung zunehmend chemometrische Methoden. Den Stand und die zukünftige Entwicklung der Chemometrik beschreiben Übersichtsartikel.^{65,66)}

Insbesondere in der Wavelet-Transformation^{67,68)} findet Methodenentwicklung statt, wobei verschiedene Algorithmen wie Spline- und Orthogonal-Techniken zur Anwendung kommen. Nach wie vor werden Mehrwegmethoden, nichtlineare Techniken der Principal Component Analysis (PCA), der Factor Analysis (FA) sowie der PLS-Regression und Orthogonal-Projektions-Algorithmen weiterentwickelt. Auch hier sind erste praxisnahe Anwendungsbereiche zu erkennen.

Bezüglich der Literatur sei zum einen auf das Internet verwiesen. Die Trefferquote zur Chemometrik hat sich mit über 6000 Einträgen in den letzten beiden Jahren mehr als verdreifacht. Dabei gibt es auch zahlreiche Verweise auf wichtige Chemometrik-Arbeitsgruppen. Zum anderen ist mit dem „Handbook of Chemometrics and Qualimetrics“⁶⁹⁾ ein fundiertes Werk erschienen, das einen sehr guten Einstieg in das Thema bietet. Außerdem sei auf das Analytiker-Taschenbuch⁷⁰⁾ verwiesen, das interessante Übersichtsartikel zur Datenanalyse, über Neuronale Netze bis hin zu chemometrischen Aspekten der Probennahme enthält. Ein relativ einfacher Einstieg in die Chemometrik ist auch mit dem interaktiven Lehr- und Lernprogramm zur Datenanalyse „Teach/Me“ möglich.⁷¹⁾

Ringversuche und Referenzmaterialien

Der Trend zur verstärkten Teilnahme an Ringversuchen hält unvermindert an. Neben der Veranstaltung von nationalen und internationalen Ringversuchen gibt es auch immer mehr Länder, in denen regionale Laborvergleichsprogramme zur permanenten Überwachung der Laborleistung unter Routinebedingungen („proficiency testing“) veranstaltet werden. Zunehmend verpflichten Auftraggeber auftragnehmende Labors vertraglich zur Teilnahme an Ringversuchen.⁷²⁾ Die regelmäßige Teilnahme an Laborvergleichstests ist auch zur Aufrechterhaltung der Akkreditierung eine Voraussetzung geworden. Erfreulicherweise sind im deutschsprachigen Raum (DACH) alle wesentlichen Informationen zu Ringversuchen im Internet abrufbar.⁷³⁾ Auch das Interesse an den Aktivitäten des Instituts für Referenzmaterialien und Referenzmessungen (IRMM in Geel) innerhalb seines International Measurement Evaluation Programmes ist ungebrochen. Bei diesen Ringversuchen können die Teilnehmer ihre eigenen Resultate mit rückführbaren metrologischen Referenzwerten vergleichen.⁷⁴⁾

Neben Materialien mit zertifizierten Gehalten an definierten Analyten (CRM) nimmt der Bedarf an nicht-zertifizierten Referenzmaterialien (RM, bekannt als Labor-Referenzmaterial LRM oder In-house-RM) für den Routinebetrieb zu. In den Bereichen Umwelt, Ernährung und Landwirtschaft besteht nach wie vor insbesondere für organische Spurenanalyten der größte Bedarf an Referenzmaterialien.⁷⁵⁾ Dabei muß allerdings angemerkt werden, daß es gerade hier zum Teil Schwierigkeiten mit dem Verkauf von CRM gibt, was auf ein erhebliches Informationsdefizit schließen läßt. Der Ruf nach billigeren „Fit-for-purpose“-RM mit eingeschränkter Stückzahl und Lebensdauer wird immer lauter. Als wesentlicher Trend kann die Angabe der Meßunsicherheiten anstatt der gerne verwendeten Vertrauensbereiche bei den Konzentrationsangaben von CRM genannt werden.⁷⁶⁾ Immer öfter werden in diesem Zusammenhang jedoch die mangelnde und größtenteils auch sehr uneinheitliche Dokumentation der kommerziell erhältlichen Referenzmaterialien kritisiert.⁷⁷⁾

In den nächsten zehn Jahren wird der Bedarf an CRM voraussichtlich um 5 Prozent, der an nicht-zertifizierten LRM um 10 Prozent pro Jahr ansteigen.⁷⁸⁾ Da private Anbieter zunehmend CRM mit einfacher Matrix herstellen, werden sich öffentliche Stellen in Zukunft wohl vermehrt der Produktion von schwierigen CRM widmen. Dazu zählen klinische CRM und CRM für transgene Lebensmittel. Einen guten Überblick über die derzeit verfügbaren oder in Produktion befindlichen (C)RM erhält man auf der Cordis-Homepage,⁷⁹⁾ der Homepage des IRMM⁷⁶⁾ und des Nist⁸⁰⁾ als auch über die IAEA⁸¹⁾ und die internationale Datenbank Comar,⁸²⁾ die die umfassendsten Kataloge der weltweit zur Verfügung stehenden (C)RM zusammengestellt haben.⁸³⁾

*Reinhard Nießner, München, José Broekaert, Leipzig, Jürgen Einax, Jena, Hendrik Emons, Jülich, Werner Engewald, Leipzig, Klaus Heumann, Mainz, Dieter Kirstein, Potsdam, Dietmar Knopp, München, Rudolf Krška, Tulln, Ulrich Panne, München, Ute Pyell, Marburg, Reiner Salzer, Dresden, Frieder Scheller, Potsdam, Norbert Trautmann, Mainz
Michael Weller, München
E-Mail: Reinhard.Niessner@ch.tum.de*

- 1) J. Chromatogr. 1999, 842 und 843.
- 2) J. Chromatogr. 1999, 856.
- 3) J. E. MacNair et al., Anal. Chem. 1999, 71, 700.
- 4) L. A. Colón et al., Anal. Chem. 1997, 69, 461A.
- 5) M. G. Cikalo et al., Analyst, 1998, 123, 87R.
- 6) K. D. Altria, J. Chromatogr. A 1999, 856, 443.
- 7) I. S. Lurie et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4563.
- 8) P. Huang et al., Anal. Chem. 1999, 71, 1786.
- 9) J. P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 1999, 71, 1638.
- 10) J. P. Quirino, S. Terabe, J. Chromatogr. A 1999, 856, 465.
- 11) E. Bakker et al., Electroanal. 1999, 11, 915.
- 12) A. Mroz et al., Analyst 1998, 123, 1373.
- 13) J. Wang, P. V. A. Pmidi, Anal. Chem. 1997, 69, 4490.
- 14) R. P. Akkermans et al., Electroanal. 1998, 10, 26.
- 15) O. Glück et al., Electrochim. Acta 1999, 44, 3761.
- 16) P. Bühlmann et al., Electroanal. 1998, 10, 1149.
- 17) K. D. Kozminski et al., Anal. Chem., 1998, 70, 3123.

- 18) *J. Zhou et al.*, Anal. Chim. Acta 1999, 379, 307.
- 19) *K. Toko*, Electroanal., 1998, 10, 657.
- 20) *F. Winqvist et al.*, Anal. Chim. Acta 1997, 357, 21.
- 21) *H. H. Chen et al.*, MTAA-10, Book of Abstracts 1999, 124.
- 22) *F. De Corte*, MTAA-10, Book of Abstracts 1999, 28.
- 23) *R.H. Filby et al.*, MTAA-10, Book of Abstracts 1999, 102.
- 24) *K. Heydorn*, MTAA-10, Book of Abstracts 1999, 21.
- 25) *G. Modolo, R. Odoj*, Solv. Extraction Ion Exchange 1999, 17, 33.
- 26) *R. Odoj, P. W. Phlippen*, VDI-Berichte 1996, 87, 1291.
- 27) *K. Wendt et al.*, Fresenius J. Anal. Chem. 1999, 364, 471.
- 28) *G. Passler et al.*, Kerntechnik 1997, 62, 85.
- 29) *M. F. L' Annunziata*, Handbook of Radioactivity Analysis, Academic Press Inc. 1998.
- 30) *A. Roda et al.*, Anal. Biochem. 1998, 264, 47.
- 31) *R. C. Brown et al.*, Anal. Biochem. 1998, 259, 142.
- 32) *J. Yguerabide, E. E. Yguerabide*, Anal. Biochem. 1998, 262, 137 und 157.
- 33) *B. Wicks et al.*, Anal. Biochem. 1998, 259, 258.
- 34) *Ch. M. Niemeyer et al.*, Anal. Biochem. 1999, 268, 54.
- 35) *M. S. Saeedi et al.*, Clin. Chem. 1998, 44, 2115.
- 36) *M. J. Duffy et al.*, Clin. Chem. 1998, 44, 1177.
- 37) *St. Gelmini et al.*, Clin. Chem. 1998, 44, 2133.
- 38) *D. B. Lackey*, Anal. Biochem. 1998, 263, 57.
- 39) *R. Zhang et al.*, Anal. Biochem. 1999, 270, 268.
- 40) *Y. Liu et al.*, Anal. Biochem. 1999, 267, 331.
- 41) *D. S. Hage*, Anal. Chem. 1999, 71, 294R.
- 42) *O. Hofstetter et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 3251.
- 43) *O. Hofstetter et al.*, Nature Biotech. 1999, 17, 371.
- 44) *K. Landsteiner, K., J. van der Scheer*, J. Experim. Med. 1928, XLVIII, 315.
- 45) *B. Harris*, TibTech 1999, 19, 290.
- 46) *G. Beste et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 1898.
- 47) *G. Gauglitz*, Mikrochim. Acta 1999, 131, 9.
- 48) *M. G. Weller et al.*, Anal. Chim. Acta 1999, 393, 29.
- 49) *D. S. Hage*, Clin. Chem. 1999, 45, 593.
- 50) *J. M. van Emon et al.*, J. Chromatogr. B 1999, 715, 211.
- 51) *H. Clark et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 4831.
- 52) *Z. Fan et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 4851.
- 53) *J. Eijkel et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 2600.
- 54) *T. Bein, J. Meinershagen*, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 448.
- 55) *F. Dickert et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 1338.
- 56) *C. Malitesta et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 1366.
- 57) *T. Takeuchi et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 285.
- 58) *A. Jenkins et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 373.
- 59) *Hutt et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 4000.
- 60) *X. Song et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 1998, 120, 11514.
- 61) *C. Wu et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 273.
- 62) *T. Dickinson et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 2192.
- 63) *I. Grycynski et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 1241.
- 64) *F. Nakajima et al.*, Anal. Chem. 1999, 71, 2262.
- 65) *S. Wold, M. Sjöström*, Chemometr. Intell. Lab. Syst. 1998, 44, 3.
- 66) *S. D. Brown*, Comp. Chem. Engng. 1999, 23, 203.
- 67) Wavelets – Eine Einführung, *C. Blatter, Vieweg, Braunschweig, 1998.*
- 68) Fundamentals of Wavelets – Theory, Algorithms, and Applications, *J. C. Goswami, A. K. Chan, Wiley, New York, Chichester, 1999.*
- 69) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A and B, *D. L. Massart et al.* Elsevier, Amsterdam, 1997 und 1998.
- 70) Analytiker-Taschenbuch, Bd. 19, (Hrsg.: *H. Günzler et al.*), Springer, Berlin, Heidelberg, 1998.
- 71) Teach/Me-Data Analysis, *H. Lohninger, Springer, Berlin, Heidelberg, 1999.*
- 72) *W. Kandler*, Dissertation TU-Wien, 1999.
- 73) www.bam.de/a_s/iris/info.htm und www.ifa-tulln.at.
- 74) *L. Van Nevel*, Accred. Qual. Assur. 1998, 3, 56.
- 75) *Ph. Quevauviller*, Trends Anal. Chem. 1999, 18, 76.
- 76) www.irmm.jrc.be, Certification report IRMM-IFCC-451.
- 77) *L. Jorhem*, Fresenius J. Anal. Chem. 1998, 370, 277.
- 78) *S. D. Rasberry*, Fresenius J. Anal. Chem. 1998, 360, 277.
- 79) www.cordis.lu/
- 80) <http://ts.nist.gov/ts/htdocs/230/232/232.htm>
- 81) www.iaea.org/worldatom/
- 82) www.bam.de/a_i/comar/scr/titel.htm
- 83) IAEA-Dokument: IAEA-TECDOC-854