

Analytische Chemie 2003

Der Trend zu hochmolekularen Analyten scheint Miniaturisierung zu stimulieren. Fragen der klinischen Chemie und der Lebensmittelchemie rücken in den Vordergrund. Apparativ dominiert die Massenspektrometrie, auch als Detektor für die Flüssigchromatographie und die Kapillarelektrophorese. Bei den Trennverfahren spielt die Mehrdimensionalität eine immer größere Rolle. Mehr und mehr Publikationen stammen aus dem asiatischen Raum.

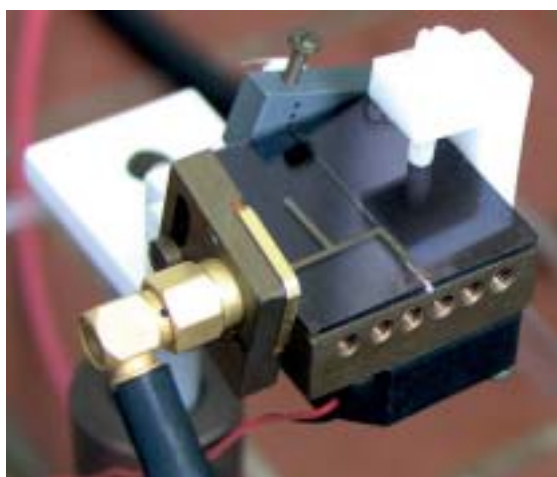


Abb. 1. Ein Microstrip-Mikrowellenplasma in Argon. Der Gas-einlass ist oben und die Mikrowellen-zuführung links sichtbar. Mikrowellenleistung: 30 W, Argonstrom: 0,5 L·min⁻¹ (nach „New microstrip plasma for optical emission spectroscopy of gaseous species“: S. Schermer, N. H. Bings, A. M. Bilgic, R. Stonies, E. Voges, J. A. C. Broekaert, Spectrochim. Acta B 2003, 58, 1585–1596).

◆ Auch zur Analytika 2004 berichtet die GDCh-Fachgruppe Analytische Chemie in Form eines Trendberichtes über die weltweiten Fortschritte ihrer Teilgebiete.

Atomspektrometrie

◆ Elektronenmikroskopische Studien zu den Wirkmechanismen von Matrixmodifiern liefern neue Einsichten in der Atomspektrometrie mit Atomabsorption. Ähnlich wie beispielsweise für Arsen und Antimon gibt es nun auch für Metalle wie Cadmium und Kupfer Reaktionen zur Generierung von flüchtigen Verbindungen. Es ist zu prüfen, ob sich diese Transformationen analytisch nutzen lassen.¹⁾

In der Plasmaspektrometrie sind die Mikroplasmen in voller Entwicklung: Ein induktiv gekoppeltes Plasma

(ICP) auf einem Chip für die Bestimmung von SO₂ und Mikrowellenplasmen bei einem mikrostrukturierten System, wo das Plasma aus dem Kanal im Wafer austritt (Abbildung 1), sind zwei Beispiele. Für die Probenzuführung ins ICP hat sich der „direct injection high efficiency nebulizer“ (DIHEN) als Mikrozerstäuber für die Speziation bewährt. Simulationen dienten als Werkzeug zur Optimierung von Zerstäuberkammern. Für Kopplungen der Plasmaspektrometrie mit elektrothermischer Verdampfung stand der Aerosoltransport im Fokus, und für die Laserverdampfung wurden erstmals fs-Laser und Laser bei kurzen Wellenlängen eingesetzt. Simultane messende Diodenspektrometer machen die optische Emissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES) für Präzisionsmessungen, z. B. zur Bestimmung der Zusammensetzung von Supraleitern, zur Methode der Wahl. Spektrensimulation ermöglicht eine semiquantitative Analyse ohne Kalibrierproben. Eine bemerkenswerte Anwendung der Plasmaemission ist die Bestimmung von Schwermetallen in Abluft mit in Luft erzeugten Mikrowellenplasmen. Auch Glimmentladungen wurden für die Speziation sowie im Falle radiofrequenter Quellen für die Tiefenprofilanalyse erprobt. Ihre Entwicklung ist in einem kürzlich erschienenen Buch nachzulesen.²⁾

IR- und Raman-Spektroskopie

◆ IR- und Raman-Mikroskopie sind seit einigen Jahren verbreitet. Das Abrastern von Probenbereichen (Mapping) ist jedoch sehr zeitaufwändig, deshalb wird das spektroskopische Imaging mit Array-Detektoren sowohl in den Werkstoff- wie in den Lebenswissenschaften immer wichtiger. Nighswander-Rempel et al.³⁾ nutzten die NIR-Imaging-Spektroskopie, um die regionalen Variationen der Sauerstoffanreicherung im schlagenden Herzen mit einer räumlichen Auflösung von besser als 1 mm² zu verfolgen. Anhand des Verhältnisses der Konzentrationen von Desoxyhämoglobin/Myoglobin zu Oxyhämoglobin/Myoglobin, die durch Spektrenanpassung zugänglich sind, konnten verschiedene Grade partieller Ischämie unterschieden werden.

Auch in der Raman-Spektroskopie wird die Imaging-Methode verstärkt eingesetzt (Abbildung 2, S. 546). Uzunbajakava et al.⁴⁾ zeigten erstmals hochauflösende Raman-Images der Proteinverteilung in einzelnen menschlichen Zellen. Das Image war 10 × 10 µm groß, die Messzeit dafür betrug ca. 20 min. Die Arbeit zeigte, dass sich mit Raman-Imaging zelluläre Prozesse wie Apoptose (programmierter Zelltod) oder Mitose (Zellteilung) verfolgen lassen.

Eine Methode, die chemische Informationen mit besonders hoher

räumlicher Auflösung vereint, ist die optische Nahfeldmikroskopie im IR (IR-SNOM). Cricenti et al.⁵⁾ konnten damit chemische Bestandteile in biologischen Zellen und dünnen Filmen identifizieren. Die Resultate lassen erahnen, welches Potenzial IR-SNOM für die Medizin, Biologie oder Materialwissenschaften hat.

Laserspektrometrie

◆ Spektrochemische Analyseverfahren mit Lasern finden sich heute immer dort, wo andere Methoden nicht anwendbar sind. Geringe Probenvolumina und Miniaturisierung von Analysesystemen machen eine konventionelle Absorptionsmessung häufig nicht möglich, so dass die photothermische Spektroskopie, sei es als Thermal Lens Spectroscopy (TLS), Cavity Ring-Down Spectroscopy (CRDS) oder Photoacoustic Spectroscopy (PAS), eine Renaissance erlebte. Eine hohe Empfindlichkeit (10^{-6} – 10^{-8} cm⁻¹) und geringe Störungen in stark streuenden Medien erlauben z. B. Absorptionsmessungen an einzelnen Zellen;⁶⁾ Quantenkaskadenlaser versprechen neue Applikationen im mittleren Infrarot. Großer Popularität erfreuen sich auch weiterhin Laserplasmen, sei es für die Probenzuführung zu anderen Verfahren oder direkt als Atomquelle für die Atomemissionsspektroskopie (laser-induced plasma or breakdown spectroscopy, LIPS oder LIBS) (Abbildung 3). Die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIF) von Einzelmolekülen hat mittlerweile einen festen Platz für die Analyse von biologisch relevanten Molekülen unter physiologischen Bedingungen, so dass mit Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) auch Konformationsanalysen möglich sind und die interne Dynamik und Aktivität von einzelnen Biomolekülen in größeren Ensembles untersucht werden können (Abbildung 4). In Kombination mit einer mikroskopischen konfokalen Beobachtung und mikrofluidischen Systemen können so z. B. mit Fluorophoren markierte Zellen und Zellkompartimente nicht nur detektiert, sondern auch sortiert

werden.⁷⁾ Zwei-Photonen-Anregungen mit fs-Lasern ermöglichen darüber hinaus heute zwanglos das Arbeiten in optisch dichten Medien oder mit photolabilen Aggregaten.

Element-Massenspektrometrie

◆ Die Trends in der Element-Massenspektrometrie haben sich auch weitestgehend bis 2004 fortgesetzt. So ist die induktiv gekoppelte Plas-

ma-Massenspektrometrie (ICP-MS) weiterhin auf dem Vormarsch, wobei durch die Entwicklung leistungsfähiger Multikollektorgereäte diese Methode in immer stärkerem Maße die Thermionen-Massenspektrometrie (TIMS) bei präzisen Isotopenverhältnismessungen ersetzt. Bei der direkten Multielement-Spurenbestimmung in Festkörpern hat weiterhin die Glimmentladungs-MS (GD-MS) ihren Platz, obwohl auf diesem Ge-

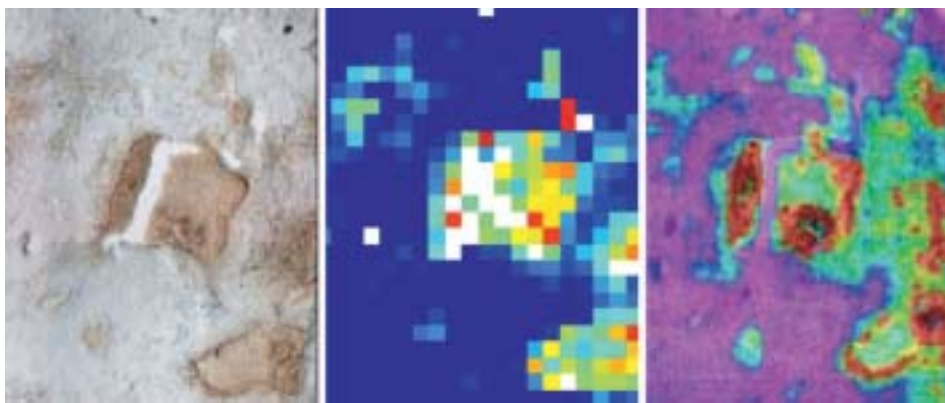


Abb. 2. Links: Mikrophotographie eines unbehandelten Dünnschnitts von Hirngewebe ($1,9 \times 2,4 \text{ mm}^2$). Mitte: Das Mapping dieser Probe mit Raman-Spektroskopie erforderte bisher etwa 10 h Messzeit (785 nm Anregung, 100 μm Schrittweite beim Mapping, Messung: Christoph Krafft, TU Dresden). Tumorbereiche sind blau eingefärbt, Hämoglobin enthaltendes Gewebe rot. Rechts: Erstmals bietet auch das Raman-Imaging räumlich und energetisch hochaufgelöste Ergebnisse in kürzester Zeit. Die Feinstrukturen des Hirngewebes werden exakt wiedergegeben und sind genau charakterisiert (Tumorgewebe hier violett dargestellt, Messung: ChemImage, Pittsburgh/PA).

bietet die Laserablations-ICP-MS (LA-ICP-MS) eine immer größere Bedeutung gewinnt. Immer mehr werden Hyphenated Techniques für die Bestimmung von Elementspezies eingesetzt. Die richtige Kalibration von Analysen ist auch weiterhin in fast allen massenspektrometrischen Bereichen, vor allem im Zusammenhang mit der analytischen Qualitätskontrolle, eine kritische Größe. Im-

mer häufiger findet daher die als besonders zuverlässig geltende massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MS-IVA) in fast allen erwähnten Teilgebieten der Element-Massenspektrometrie Anwendung.

Neuere Entwicklungen in der ICP-MS betreffen Systemteile. So werden momentan z.B. Mikrozerstäuber für den Probeneintrag ins ICP-MS entwickelt, die einerseits ei-

nen Probeneintrag von nur wenigen μL pro min ermöglichen und andererseits eine höhere analytische Nutzung der in das System eingeführten Analyten.⁸⁾ Für die simultane Multi-element-Detektion bei ICP-MS-Messungen wurde kürzlich ein Array-Detektor vorgestellt, welcher die planare Fokussierebene eines Mattauch-Herzog-Separationssystems verwendet.⁹⁾ In der GD-MS brachte die Einführung einer doppelt gepulsten Glimmentladungs-Ionenquelle, die an ein Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) gekoppelt war, eine deutlich höhere Signalintensität gegenüber einem einfach gepulsten System.¹⁰⁾ Bei der LA-ICP-MS geht der Trend zu fs-Lasern, da diese gegenüber ns-Lasern u. a. die Probe weniger stark aufheizen und bei der Ablation kleinere Aerosolpartikel erzeugen, was sich günstig auf mögliche Fragmentierungseffekte und die Plasmaionisation auswirkt.¹¹⁾ LA-ICP-MS-Bestimmungen lassen sich ohne externe Standards mit der Isotopenverdünnungstechnik mit pulverförmigen Proben kalibrieren¹²⁾ – eine wesentliche Voraussetzung zur routinemäßigen Anwendung der ICP-MS in diesem Bereich.

◆ Chemometrik

Die Entwicklung der Chemometrik ist gekennzeichnet durch verstärkte Anstrengungen, bei statistischen und mathematischen Operationen die den Daten zu Grunde liegende Realität maximal möglich zu bewahren. In der multivariaten Datenanalyse zeichnen sich drei wesentliche Tendenzen ab: Zum ersten die Behandlung „schlechter“, d.h. nichtnormalverteilter und ausreißerbehafteter Datensätze mit teilweise fehlenden Daten, zum zweiten die Auswertung hochdimensionaler Multiblock-Mehrweg-Datensätze und zum dritten die Einführung neuer Algorithmen zur Visualisierung mehrdimensionaler Daten und ihrer Zusammenhänge.

Mit stark zunehmendem Gewicht dominiert die Anwendung neuronaler Netze zur Beschreibung komplexer, meist kausal unbekannter und oft nichtlinearer Zusammenhänge. Ein weiterer Trend erwächst aus den Möglichkeiten der modernen Multielement- oder Multikomponentenanalytik: Die Selektion der Merkmale, die das zu untersuchende Problem aussagekräftig beschreiben, mit evolutionären, meist genetischen Algorithmen. Die Partial-least-squares-Regression wird mit teilweise neuen Algorithmen weiterhin häufig vor allem zur Behandlung von Mehrweg-Problemen angewendet. Hinzuweisen ist auch auf erste Publikationen, die „natural patterns“ thematisieren. Die Wavelet-Transformation, oft in der Spektroskopie

zur Signalbehandlung und -auflösung genutzt, bildet einen weiteren Schwerpunkt. Anwendungsorientierte Arbeiten überwiegen deutlich gegenüber grundlagenbezogenen. Dabei gewinnen zusätzlich zu klassischen analytisch-chemischen Fragen wie der Methodenoptimierung zunehmend interdisziplinäre Arbeiten an Gewicht. Hier sind die Untersuchung von Lebensmitteln und Pharmazeutika sowie die chemometrische Durchdringung und Beschreibung technischer Prozesse und die Prozessanalytik zu nennen. Einen Überblick über aktuelle Entwicklungen geben Lavine und Workman.⁵²⁾ Die unlängst erschienene Monographie von Brereton⁵³⁾ ermöglicht einen guten und verständlichen Einstieg in die Chemometrik.

Bei den Hyphenated Techniques spielt vor allem die Kopplung von GC und HPLC, aber auch der Kapillarelektrophorese mit ICP-MS für die Charakterisierung und Quantifizierung von Elementspezies eine weiterhin bedeutende Rolle. Es mehrten sich die Ansätze, die aus einer Kopplung mit ICP-MS erhaltene elementspezifische Information mit einer Strukturinformation durch zusätzliche Analyse z. B. mit ESI-MS zu ergänzen. Ein eindrucksvolles Ergebnis einer solchen Untersuchung ist beispielsweise die Bestimmung eines bisher unbekannten Arsenozuckermetaboliten in Urin mit HPLC-ICP-MS und HPLC-ESI-MS.¹³⁾ Immer häufiger werden ICP-MS Kopplungssysteme aber auch für die Charakterisierung von Metalloproteinen eingesetzt,¹⁴⁾ so dass „Metalloomics“ inzwischen ein wichtiges Teilgebiet der Proteinanalytik geworden ist. Auch spielt die Bestimmung von Heteroatomen in Proteinen mit der

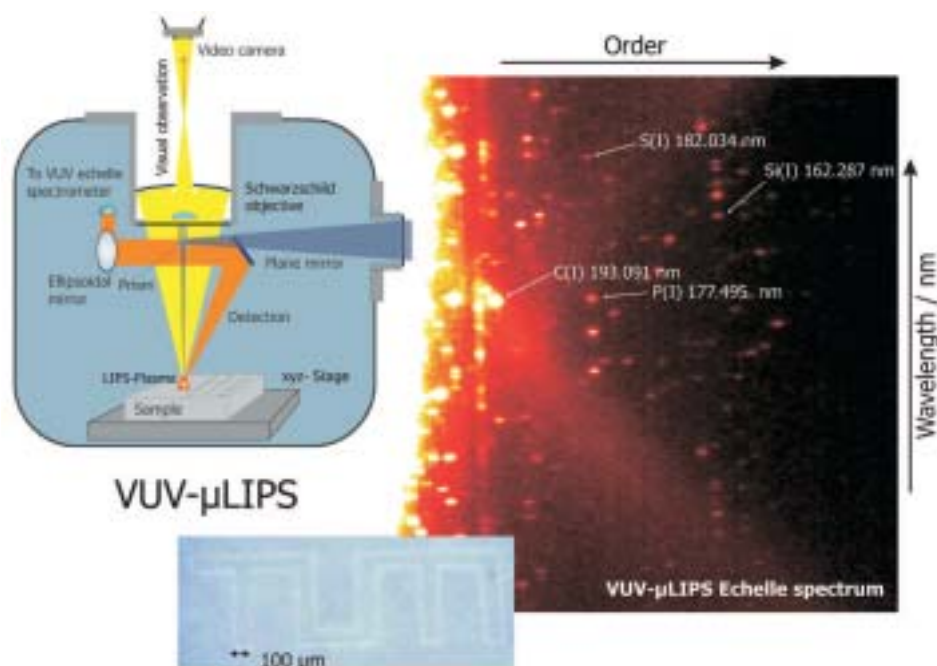
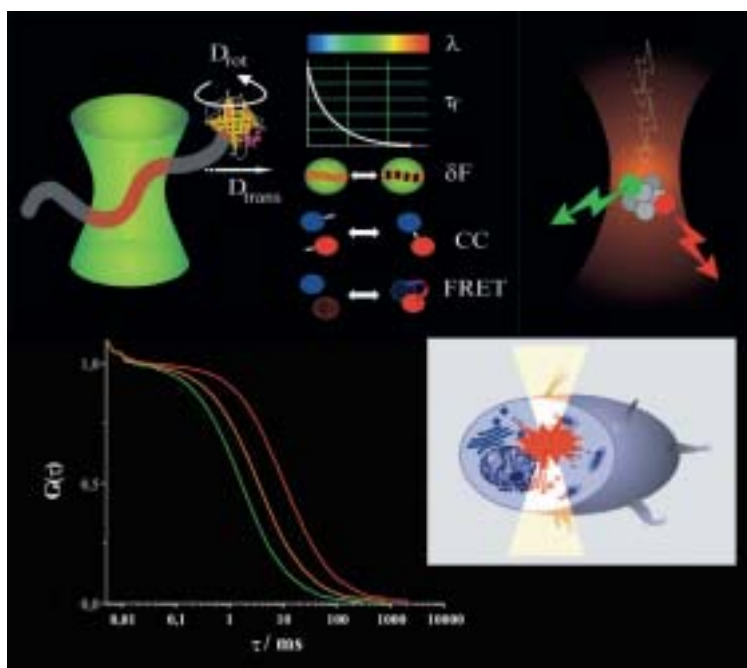


Abb. 3. Mikroanalyse mit der laserinduzierten Plasmaspektroskopie (LIPS) im VUV-Bereich (< 200 nm). Neben dem experimentellen Aufbau ist eine Lichtmikroskopie der Ablationskrater auf einem Edelstahlwerkstoff und ein entsprechendes VUV-Emissionspektrum zu sehen, welches mit einem Echelle-Spektrometer aufgezeichnet wurde (nach „Micro-analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy in the Vacuum Ultraviolet“: I. Radivojevic, C. Haisch, R. Niessner, S. Florek, H. Becker-Ross, U. Panne, Anal. Chem. 2004, 76, 1648–1656).

ICP-MS eine immer größere Rolle. Im Falle von Phosphor lassen sich damit z.B. Phosphorylierungen verfolgen¹⁵⁾. Wendet man die in der Proteinanalytik bekannte Trennung durch eine 2D-Gelelektrophorese an, so ist es inzwischen auch möglich, Heteroatome der getrennten Proteinfractionen, aber auch die daran gebundenen Metallionen durch LA-ICP-MS zu bestimmen¹⁶⁾.

Instrumentelle Trennmethoden

◆ Nach einigen Jahren ruhiger Entwicklung erlebt die Kapillar-Gaschromatographie wieder einen methodischen und apparativen Aufschwung. Innovationen gab es besonders in der schnellen GC, der umfassenden multidimensionalen



◆ Externe Qualitätssicherung und Ringversuche

Für die Akkreditierung und deren Aufrechterhaltung benötigen Prüflaboratorien in regelmäßigen Abständen einen Leistungsnachweis. Die Teilnahme an Ringversuchen gehört zu den wichtigsten Möglichkeiten, um einen derartigen Nachweis zu erbringen. Laborvergleichsversuche sind Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle von Laboratorien, die genau zu diesem Zweck durchgeführt werden. Sie unterscheiden sich in Zielsetzung und Durchführung wesentlich von anderen Arten von Ringversuchen, wie sie z. B. bei der Etablierung einer Normmethode organisiert werden oder von Ringversuchen im Zuge einer Zertifizierungskampagne. Für die Labors ist es vorteilhaft, wenn Laborvergleichsversuche regelmäßig veranstaltet werden. Im englischen Sprachraum wird hierfür der Begriff „Proficiency Testing Scheme“ verwendet, der keine einheitliche deutsche Entsprechung hat. Die Entwicklung der letzten Jahre hat gezeigt, dass regelmäßige Laborvergleichsversuche meist regional organisiert werden, also die meisten Teilnehmer aus dem Inland

und einige aus dem benachbarten Ausland stammen. Die Gründe dafür mögen sein: Der meist notwendige rasche und zuverlässige Transport der Proben, sprachliche Barrieren, welche die Kontaktaufnahme mit dem Ringversuchsveranstalter erschweren, regionale Besonderheiten (z. B. Herbizide, die nur in bestimmten Bereichen der Landwirtschaft eingesetzt werden) und die Zusammenarbeit mit den – ebenfalls regionalen – Akkreditierungsstellen. Aus der Sicht der Labors ist die Auswahl an Ringversuchsveranstaltern in der Regel klein. Für eine bestimmte Analyt-Matrix-Kombination gibt es, wenn überhaupt, nur wenige Anbieter je Land. Die frei zugängliche Datenbank EPTIS („European Information System on Proficiency Testing Schemes“) ist eine hervorragende Hilfe, um einen geeigneten Anbieter zu finden. EPTIS ist seit 2000 über das Internet erreichbar (www.eptis.bam.de).⁵⁴⁾ Die Zahl der Einträge steigt kontinuierlich (z. Zt. 750), und es ist zu erwarten, dass die regelmäßig veranstalteten Laborvergleichsversuche in Europa bald weitgehend vollständig in der Datenbank erfasst sind. Demnächst sollen auch Anbieter aus Ländern außerhalb Europas in

der Datenbank erfasst werden, wobei wahrscheinlich Brasilien als erstes außereuropäisches Land hinzukommen wird. Es gibt nur wenige Normen, welche die Durchführung von Laborvergleichsversuchen regeln. Der in diesem Zusammenhang oft zitierte ISO/IEC Guide 43⁵⁵⁾ beschreibt die Mindestanforderungen, lässt aber insbesondere bei der Auswertung und Bewertung von Laborvergleichsversuchen so viele Möglichkeiten offen, dass man nach wie vor weit von einer Harmonisierung entfernt ist. Bei nationalen Normen ist – nicht zuletzt aufgrund der geringen Anzahl von Ringversuchsanbietern je Land – die Gefahr groß, dass einzelne Anbieter versuchen, ihr eigenes System als Norm festzuschreiben. Als Beispiel sei die 2003 erschienene Norm DIN 38405–45 (DEV A45)⁵⁶⁾ erwähnt. Eine internationale Norm (ISO/DIS 13528)⁵⁷⁾ liegt derzeit als Entwurf vor. Erwähnenswert ist das derzeit laufende COEPT-Projekt, in welchem Ringversuchsanbieter aus mehreren europäischen Ländern verglichen werden, d.h. Ringversuche mit Ringversuchsanbietern durchgeführt werden. Informationen über COEPT sind auf der EPTIS-Website zu finden.

Abb. 4.

Konfokale Techniken wie die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) erlauben es, dynamische Messungen an einzelnen fluoreszenzmarkierten Molekülen vorzunehmen (links oben). Die Messparameter sind Diffusionsverhalten, Fluoreszenzspektrum und -lebensdauer, interne Dynamiken, aber auch Assoziation und Dissoziation unterschiedlich markierter Moleküle. Mit Zweiphotonenanregung lassen sich spektral verschiedene Moleküle gleichzeitig im IR anregen (rechts oben), zudem sind durch die geringe Hintergrundstreuung präzise lokalisierte Messungen in lebenden Zellen möglich (rechts unten). FCS-Autokorrelationskurven erlauben es, charakteristische Zeitkonstanten verschiedener Prozesse wie die Bewegung einzelner Moleküle durch das Messvolumen aufzunehmen (links unten)

(Grafik: Petra Schwille TU Dresden).

GC (comprehensive multidimensional GC, GCxGC), der Large Volume Injection (LVI) sowie der Kombination mit „trockenen“ Extraktionstechniken (direkte Thermodesorption, Festphasenmikroextraktion, stir bar sorptive extraction) und spektroskopischen Methoden.

Die GCxGC-Technik bereichert dank ihres enormen Trennvermögens immer stärker unser Wissen über komplexe Proben.^{17,18)} So konnten z. B. durch Kombination von direkter Thermodesorption mit GCxGCxTOFMS in der Feinpartikelfraktion von Aerosolproben mehrere Tausend Peaks detektiert werden.¹⁸⁾ Zur Charakterisierung von Ölen und Fetten anhand der Triglyceride diente eine neue comprehensive LCxGC-Kopplung; es wurden auch bereits drei Säulen (GCxGCxGC) sowie eine Vorsäule mit zwei parallelen Säulen (GCx2GC) gekoppelt (vgl. Lit.¹⁸⁾).

Die Dosierung größerer Probenmengen ist besonders in der Spurenanalytik von Bedeutung. Die Palette der LVI-Varianten wurde durch eine Splitless-Technik bereichert,¹⁹⁾ bei der die Probe als Flüssigkeit bis zum unteren Ende des heißen Liners gelangt und verdampft. Die Dämpfe kondensieren wieder in der sich anschließenden Vorsäule; der dadurch entstehende Sog beschleunigt den Transfer der verdampfenden Probe auf die Vorsäule. Durch diese „concurrent solvent recondensation“ (CSR) ist das Linervolumen nicht mehr der begrenzende Faktor für die Probemenge.

Die Anforderungen der bioanalytischen Forschung, bei denen eine Vielzahl von Analyten, die sich erheblich im Gehalt und in ihren physikochemischen Parametern voneinander unterscheiden, in komplexen Proben quantifiziert werden müssen, sind zu einer entscheidenden Triebfeder bei der Weiterentwicklung instrumenteller Trennmethode geworden. Zum einen muss die Möglichkeit der (On-line) Kopplung mit der Massenspektrometrie gewährleistet sein, zum anderen macht die Komplexität des Trennproblems zweidimensionale

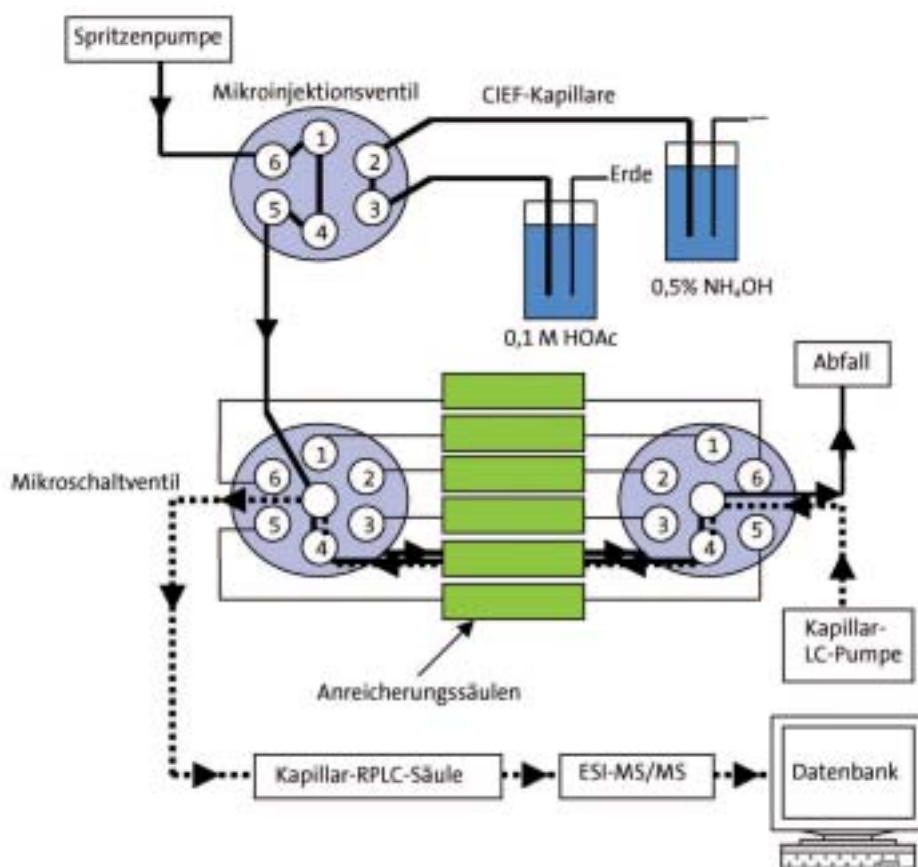


Abb. 5. On-line-Kopplung der CIEF mit der CRP-LC als konzentrierende und zweidimensionale Trenntechnik für die Proteom-Analytik. Durchgezogene und unterbrochene Linien geben die Fließrichtungen für das Laden der CIEF-Fraktionen auf die Anreicherungsäulen bzw. das Spülen dieser Fraktionen auf die Kapillarsäule wieder (aus Lit.²¹, mit frdl. Genehmigung der ACS).

Trennungen erforderlich. Wege werden gesucht, die Nachteile der etablierten 2D-Gelelektrophorese zu vermeiden und gleichzeitig die hohe Peakkapazität zu erhalten.

Bei der Entwicklung eines zweidimensionalen Trennverfahrens ist es wichtig, zwei einander möglichst entgegengesetzte (orthogonale) Trennprinzipien miteinander zu kombinieren. Entwickelt wurden zahlreiche Kombinationen,²⁰ darunter Kationen austausch-Chromatographie/Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (LC), Chromatofokussierung/LC und Kapillar-Isoelektrische-Fokussierung (CIEF)/Kapillar-Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (CRP-LC)²¹ (Abbildung 5).

Elektromigrative Trennungen in Mikrokanälen, welche durch lokale Abtragung auf ebenen Flächen erzeugt wurden (on-chip separations), ermöglichen die Integration mehrerer Verfahrensschritte zusammen mit dem Trennprozess²². Miniaturisierte Trennstrecken machen auch miniaturisierte Detektionseinheiten wünschenswert. Zahlreiche Arbeits-

gruppen haben daher elektrochemische Detektoren für die Chip-Kapillarelektrophorese entwickelt. Integrierte On-line-Derivatisierung ist auch bei elektrochemischer Detektion möglich. Hier stehen insbesondere Anwendungen in der medizinischen Diagnostik im Vordergrund.

Monolithische Trennstrecken haben sich inzwischen für zahlreiche Anwendungsgebiete der Flüssigkeitschromatographie als Alternative zu gepackten Trennstrecken erwiesen. Entscheidende Kenngrößen sind dabei Langzeitstabilität, Permeabilität und Trenneffizienz.²³ Ihre Synthese in Kapillaren ist insbesondere für die Kopplung mit der Massenspektrometrie von Bedeutung.

Enzymatische Analysenverfahren

◆ Neben weiterhin dominierenden Methoden zur enzymatischen Bestimmung von z. B. Glucose rückten Acetylcholinesterasen wieder ins Zentrum des Interesses, möglicherweise im Zusammenhang mit der verschärften Diskussion um

Chemiewaffen. Kampfstoffe wie Sarin, Tabun oder VX, die zu den Organophosphaten gehören, wirken auf Acetylcholinesterasen, die eine lebenswichtige Rolle bei der Nervenleitung spielen. Auch einige wichtige Insektizide, z. B. Parathion (bekannter unter der Bezeichnung E-605), gehören zu den AChE-Inhibitoren. Im Gegensatz zu der häufig verwendeten Acetylcholinesterase aus Zitteraal (*Electrophorus electricus*) werden auch rekombinante Enzyme hergestellt und zudem in ihren Eigenschaften durch Protein-Engineering verändert. Eine kürzlich erschienene Übersicht fasst die Aktivitäten zusammen.²⁴ Für multidimensionale Biosensoren ist das Enzymdesign besonders interessant, da natürliche Enzyme oft nicht die gewünschten Spezifitäten aufweisen. Vollständige Selektivität, wie sie für einfache Enzymtests wünschenswert wäre, ist auch mit rekombinanten Techniken nicht erreichbar. Erste Versuche wurden mit katalytisch aktiven molekular geprägten Polymeren (molecular imprinted polymers, MIPs) unternommen.²⁵ Doch es ist fraglich, ob diese synthetischen Polymere die Selektivität und Geschwindigkeit von natürlichen oder semisynthetischen Enzymen erreichen werden. Ein Ansatz zur Verbreiterung des Repertoires enzymatischer Reaktionen ist die Verwendung von katalytischen Antikörpern.²⁶ Trotz vieler neuer Einsichten in die Funktion von Enzymen scheinen katalytische Antikörper die hochgesteckten Erwartungen in der Praxis nicht erfüllt zu haben – die Zahl der Publikationen ist 2003 auf weniger als die Hälfte der Vorjahre gefallen. Jedoch soll es sogar in der Natur katalytisch aktive Antikörper geben.²⁷

Immunchemische Verfahren

◆ Immunologische Nachweismethoden sind zu einem festen Bestandteil des analytischen Methodenspektrums geworden. Kaum eine Ausgabe, und das betrifft sämtliche namhafte analytische Zeitschriften, in der keine relevante Publikation zu

finden wäre. Völlig neue Trends sind allerdings kaum auszumachen. Vielmehr werden nahezu alle Anwendungsbereiche bedient. Neben neuen Methoden für altbekannte Analyte wie Triazin-Herbizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, polychlorierte Biphenyle, nitrierte Aromaten und Antibiotika werden auch Antikörper und Immunoassays für neue Targets wie Saponine, Pestizide und Pharmaka entwickelt. Dabei nehmen die polyklonalen Antikörper (pAb) noch immer die Spitzenposition ein, obwohl der Anteil der konventionell mit Hybridomatechnik hergestellten monoklonalen Antikörper (mAb) zunimmt. Rekombinante Antikörper (rAb) sind noch immer in einer Außenseiterposition. Dennoch bleibt die Technik zukunftsweisend. Die Aussicht, auf der Basis von Antikörper-Bibliotheken, d. h. auch ohne Immunisierung eines Versuchstieres, innerhalb von zwei bis drei Wochen ein Set von rAb und deren codierenden Genen zur Verfügung zu haben, ist faszinierend.²⁸⁾ Unter der Annahme, dass beispielsweise ca. 1 Mio. Antikörper notwendig sind, um das Human-Proteom mit Antikörper-Arrays zu screenen, sind rekombinante Antikörper-Bibliotheken unter ethischen und ökonomischen Aspekten die einzige vernünftige Alternative.

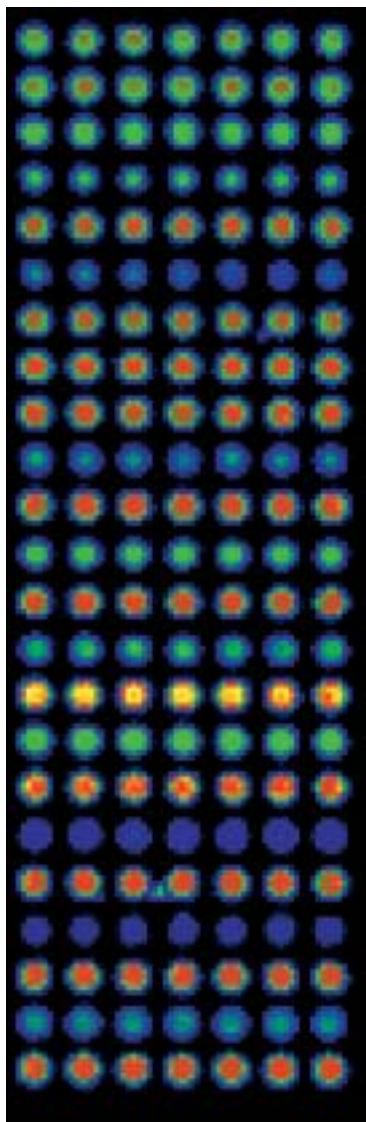
Verstärkte Aktivität ist in der Microarray-Szene zu beobachten, sowohl was die Entwicklung der Hardware (Arrayer, Scanner), die Bereitstellung neuer funktionalisierter Oberflächenstrukturen als auch die Suche nach neuen Labels betrifft.²⁹⁾ Das ist wiederum von enormer Bedeutung vor allem für die Proteomforschung. Protein- und Antikörper-Arrays sind hier komplementär zu den konventionellen Trenntechniken wie der 2D-Gelelektrophorese und können dazu eingesetzt werden, biologische Wechselwirkungen aufzuspüren. Ein Hauptproblem ist nach wie vor das limitierte Angebot an Antikörpern, deren Funktionalität (Performance) auf einem Chip zudem nur in äußerst wenigen Fällen geprüft wurde.^{30,31)} Ein bedeutender Anwendungsbereich

von Immunoassays ist nach wie vor die Lebensmittelüberwachung. Den Schwerpunkt bildet hier das Screening auf Antibiotika und Pflanzenschutzmittel (Abbildung 6). Dabei erwiesen sich Immunoassays erneut als hervorragend geeignet, so z. B. beim Nachweis von Chloramphenicol in Shrimps,³²⁾ von Streptomycin, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Cloxacillin in Milch,³³⁾ Methylcarbamat in Babynahrung³⁴⁾ und Ethinylestradiol in Rindergalle.³⁵⁾ In der Umweltanalytik konnten als neue Targets vor allem endokrine Disruptoren (EDCs) und Arzneimittel ausgemacht werden.

Die Validierung von Immunoassays bleibt ein wichtiges Thema, besonders in der Routineanalytik, z. B. der klinischen Chemie. Kürzlich erregte ein Artikel³⁶⁾ Aufsehen, der zehn käufliche Testosteron-Immunoassays mit Isotopenverdünnungs-GC-MS vergleicht. Begleitet wurde die Publikation von einem Leitartikel³⁷⁾ mit dem Titel „Immunoassays for Testosterone in Women: Better than a Guess?“, in dem die Autoren die provokante These aufstellen, dass die getesteten Assays für die betreffende Anwendung nicht signifikant besser als ein Zufallswert seien. Besonders bedenklich ist, dass es sich ausnahmslos um käufliche Analysensysteme von bekannten Herstellern handelt. Hier soll nicht auf die medizinischen Folgen solcher Quantifizierungsprobleme eingegangen werden. Es stellt sich jedoch die Frage, wie diese Mängel so lange verborgen bleiben konnten, die normalerweise bei einer rigorosen Validierung hätten auffallen müssen. Einige Aspekte betreffen unterschiedliche Probenvorbereitung (z. B. Extraktion), die Verwendung von Pool-Proben anstatt von Einzelproben und die fehlende Validierung mit unabhängigen Analysemethoden. Die Definition einer Methode als „Gold-Standard“ hilft nicht viel weiter, wenn sie unter den gleichen Schwächen leidet, wie die zu validierenden Methoden. Die Studie basiert aber auch auf einer simplifizierenden Vorstellung von Immunoassays. So wird weitgehend ignoriert, dass

Abb. 6.
Microarray-Biosensor zur Bestimmung von Antibiotika in Milch.³¹⁾ Der Chip enthält elf Spot-Zeilen für elf Analyten plus zwölf Zeilen als Referenzmessung. Die Detektion erfolgt mit enzymatisch katalysierter Chemilumineszenz

(Grafik: Bertram G. Knecht, TU München).



Immunoassays immer nur Äquivalentkonzentrationen liefern und die einfache Gleichsetzung Testosteron-Äquivalent = Testosteron-Konzentration unter Umständen fehlschlägt. Die Anwesenheit von kreuzreagierenden Substanzen wie 5-Dihydrotestosteron (übrigens die biologisch wirksamste Form) oder andere Derivate wurde anscheinend weitgehend ignoriert. Dass unter solchen Umständen Korrelationsplots mit Steigungen ungleich 1 auftreten können, ist zu erwarten. Möglicherweise hat man „Äpfel mit Birnen“ verglichen. Wenn man nun glaubt, durch GC-MS könnte man diesen Problemen einfach entgehen, so sieht man sich getäuscht: Die Fokussierung auf eine einzelne Spezies hat ihre Tücken und kann biologisch gesehen völlig

falsche Resultate liefern. Dies zeigte der jüngste Dopingskandal mit Tetrahydrogestrinon (THG) in den USA.³⁸⁾

Chemo- und Biosensoren

◆ Insbesondere Arraytechnologien haben sich auffällig entwickelt. Neben optischen Abfragetechniken (Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR), Akustische Oberflächenwellen (SAW), elektrisch stimulierte Lumineszenz, Fluoreszenz und Chemilumineszenz) wird elektroanalytische Auslese betrieben. Halbleiterstrukturierte Arrays im Chipformat werden neuerdings mit Nanomaterialien (z. B. Multi oder Single Wall Carbon Nanotubes) kombiniert.³⁹⁾ Sehr interessant sind die ebenfalls in lithographischer Technik gefertigten Mikrocantilever-Strukturen,^{40a)} also mechanisch schwingende Körper zur Massendetektion in Gasen oder Flüssigkeiten.^{40b)} Über SAW-Bauelemente oder Mikroquarze wurde nicht mehr allzu häufig berichtet, offensichtlich sind diese Techniken inzwischen ausgereift. Anwendungen der Arraytechniken in der Lebensmittelanalytik als „elektronische Nasen“ sind beinahe schon Standard, neuer sind dagegen „elektronische Zungen“.⁴¹⁾ Als Erkennungsstrukturen für Chemo- und Biosensoren dominieren Antikörper und Enzyme nach wie vor. Rekombinante Antikörper als sensitives Tool in Chemo- und Biosensorik sind auf dem Vormarsch. Nachweisgrenzen für Pesticid (Atrazin) in Wasser von 100 ppt zeigen den Fortschritt (aber immer noch ein Faktor 20 zu insensitiv).⁴²⁾ Rekombinante Enzyme in Verbindung mit Antikörperdetektion und enzyme channeling mit einer Sensitivität unter 1 ppt wurden berichtet.⁴³⁾

Aptamere,⁴⁴⁾ Aptzyme⁴⁵⁾ und kultivierbare Nervenzellen⁴⁶⁾ rücken allmählich in das Zentrum des Geschehens. Echte neuronale (Sensor)-Netze⁴⁷⁾ scheinen möglich. Gerade im Wirkstoff-Screening dürften breite Anwendungsbereiche liegen. Sensoren oder Chips auf DNA-Basis, letztere für PCR-Applikationen, werden zahlreicher. Kombinationen mit elektroanalytischen Sensorprinzipien

(Potentiometrie, Amperometrie) sind hier häufig publiziert. Klinisch-chemische Anwendungen (Erkennung viraler Infektionen) dominieren, siehe z. B. Lit.⁴⁸⁾

Mit Aufmerksamkeit sollte man den Einsatz von MIPs in der Sensorik verfolgen. Gerade im chinesischen Sprachraum ist hierzu eine explosionsartige Aktivitätssteigerung zu beobachten. Die bislang publizierten Leistungen sind allerdings in Bezug auf Selektivität und Nachweisvermögen eher mäßig. So kann z. B. das im Wasserwesen zunehmend wichtige Algentoxin Microcystin-LR in Verbindung mit beschichteten Quarzsensoren und einer Voranreicherung an MIP-Phasen bis in den nM-Bereich bestimmt werden.⁴⁹⁾

Die große treibende Kraft in der Chemo- und Biosensorik muss man in der Detektion von Toxinen, Mikroorganismen und Viren suchen. Terrorismusabwehr, klinische Bedürfnisse sowie Hygieneanforderungen im Lebensmittelbereich (inklusive Trinkwasser) bilden einen attraktiven Markt.

Biologische Targets mit kleinen Messgeräten zu bestimmen, wird, so viel lässt sich zusammenfassend sagen, das Geschäft der Zukunft werden. Exotischere Anwendungen wie Bioaerosolerkennung⁵⁰⁾ oder die Messung an genmanipulierten Lebensmitteln⁵¹⁾ runden das Bild ab.

Reinhard Nießner, München
José Broekaert, Hamburg
Jürgen W. Einax, Jena
Werner Engewald, Leipzig
Klaus Heumann, Mainz
Dietmar Knopp, München
Wolfgang Kandler, Tulln
Ulrich Panne, München
Ute Pyell, Marburg
Reiner Salzer, Dresden
Michael G. Weller, München

- 1) Y.-L. Feng et al., J. Anal. At. Spectrom. 2003, 18, 1435.
- 2) Glow Discharge Plasmas in Analytical Spectroscopy (Hrsg.: R. K. Marcus, J. A. C. Broekaert), Wiley, Chichester, 2003.
- 3) S.P. Nighswander-Rempel et al., Vib. Spectrosc. 2003, 32 (1), 85.
- 4) N. Uzunbajakava et al., Biopolymers (Biospectroscopy) 2003, 72, 1.
- 5) A. Cricenti et al., Biophys. J. 2003, 85, 2705.
- 6) E. Tamaki et al., Anal. Chem. 2002, 74, 1560.
- 7) P. Dittrich, P. Schwille, Anal. Chem. 2003, 75, 5767.
- 8) J.-M. Mermet, J.-L. Todoli, Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378, 57.
- 9) J.H. Barnes IV et al., Anal. Chem. 2002, 74, 5327.
- 10) J. Pisonero et al., J. Anal. At. Spectrom. 2003, 18, 624.
- 11) M. Guillion, D. Günther, J. Anal. At. Spectrom. 2002, 17, 831.
- 12) M. Tibi, K.G. Heumann, J. Anal. At. Spectrom. 2003, 18, 1076.
- 13) H.R. Hansen et al., J. Anal. At. Spectrom. 2003, 18, 474.
- 14) J. Szpunar, Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378, 54.
- 15) M. Wind et al., Anal. Chem. 2001, 73, 29.
- 16) J.S. Becker et al., Int. J. Mass Spectrom. 2003, 228, 985.
- 17) J. Chromatogr. A 2003, 1019, Symposium Volume of the First International Symposium on Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography.
- 18) J. Dallüge et al., J. Chromatogr. A 2003, 1000, 69.
- 19) P. Magni, T. Porzano, J. Sep. Sci. 2003, 26, 1491.
- 20) H.J. Issaq et al., Electrophoresis 2002, 23, 3048.
- 21) J. Chen et al., Anal. Chem. 2003, 75, 3145.
- 22) P.A. Auroux et al., Anal. Chem. 2002, 74, 2637.
- 23) U. Tallarek et al., Chem. Eng. Technol. 2002, 25, 1177.
- 24) H. Schulze et al., Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 201.
- 25) T. Yamazaki et al., Anal. Lett. 2003, 36, 75.
- 26) B. Golinelli-Pimpaneau et al., J. Immunol. Methods 2002, 269, 157.
- 27) J. Marx, Science 2002, 298, 1319.
- 28) Y. F. Yau et al., Biotechnol. Adv. 2003, 21, 599.
- 29) X. Wu et al., Nature Biotechnol. 2003, 21, 41.
- 30) J. Glöckler, P. Angenendt, J. Chromatogr. B 2003, 797, 229.
- 31) B. Knecht et al., Anal. Chem. 2004, 76, 646.
- 32) S. Impens et al., Anal. Chim. Acta 2003, 483, 153.
- 33) A. Strasser et al., Anal. Chim. Acta 2003, 495, 11.
- 34) B. Mickova et al., Anal. Chim. Acta 2003, 495, 123.
- 35) J. Fitzpatrick et al., Food Agric. Immunol. 2003, 154, 55.
- 36) J. Taieb et al., Clin. Chem. 2003, 49, 1381.
- 37) D. A. Herold et al., Clin. Chem. 2003, 49, 1250.
- 38) J. Knight, Nature 2003, 426, 114.
- 39) J. Gooding et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 9006.
- 40) a) J. Zhang and S. O'Shea, Sens. Actuators B 2003, 94, 65. b) Zum Thema „Sensoren“ siehe auch den Trendbericht „Physikalische Chemie 2003“: U. Weimar, H.-D. Wiemhöfer, C. Ziegler, Nachr. Chem. 2004, 52, 317.
- 41) A. Legin et al., Anal. Chim. Acta 2003, 484, 33.
- 42) K. Greenan et al., Anal. Chim. Acta 2003, 500, 287.
- 43) J. Zeravik et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 1321.
- 44) T. McCanley et al., Anal. Biochem. 2003, 319, 244.
- 45) J. Hesselberth et al., Anal. Biochem. 2003, 312, 106.
- 46) M. Chapalone et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 627.
- 47) J. Pancrazio et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 1339.
- 48) Y. Ye et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 1501.
- 49) I. Chanella et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 119.
- 50) D. Stratis-Cullum et al., Anal. Chem. 2003, 75, 275.
- 51) I. Manuelli et al., Biosensors Bioelectronics 2003, 18, 129.
- 52) B. K. Lavine, J. Workman, Jr., Anal. Chem. 2002, 74, 2763.
- 53) R. G. Brereton, Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant, Wiley, Chichester, 2003.
- 54) www.eptis.bam.de
- 55) ISO/IEC Guide 43:1997: Proficiency testing by interlaboratory comparisons -- Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.
- 56) DIN 38405-45 (2003): Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle von Laboratorien (A45).
- 57) ISO/DIS 13528 (2002) Draft international standard: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.