

Analytische Chemie 2006/2007

Die analytische Chemie nutzt vermehrt optoelektronische Techniken mit mikrostrukturierten Komponenten. Nach Chemosensoren beherrschen nun Biosensoren das Feld.

Ausschließlich chemisch synthetisierte Rezeptoren bleiben gegenüber molekularbiologischen Reaktionspartnern zurück. In Diagnostik und Lebensmittelkontrolle ist die Zeit autonomer Analysenplattformen angebrochen. Auffällig ist die Dominanz massenspektrometrischer Techniken, sowohl in Kopplung, als auch als Stand-alone-Verfahren.

Generell geht der Trend in Richtung Life-Science-Anwendungen, während die Umweltanalytik fast vollständig verschwindet.

Optische Verfahren: Atomspektrometrie

◆ Die Erforschung neuartiger Plasmen als Strahlungsquelle für die optische Emission und als Ionenquelle für die Elementmassenspektrometrie bleibt treibende Kraft in der analytischen Atomspektrometrie. Dies hat etwa das Colloquium Spectroscopicum Internationale (Xiamen, China) im September 2007 gezeigt.

Neu sind Glimmentladungen bei Atmosphärendruck, die sich als sehr nachweisstarke, sanfte Ionisierungsmethoden erwiesen haben. Im Falle der Massenspektrometrie¹⁾ lassen sich Elemente aus Lösungen direkt bestimmen, was neue Anwendungen

für die elementspezifische Detektion in der Chromatographie bringt. Glimmentladung in Atmosphärendruck in Helium oder Neon (Abbildung 1) ist bereits mit $0,1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ und etwa 20 W stabil, sogar dann, wenn molekulare Gase eingeleitet werden.

Auf dem Gebiet der Elementmassenspektrometrie ist ein umfassendes Werk von Sabine Becker erschienen, das die Entwicklungen bei allen Quellen und Arten von Massenspektrometern und ihren Anwendungen behandelt.²⁾

Für Bestimmungen in realen Proben wurden im Fall der Hydrid-erzeugung Mikroplasmen zur Detektion eingesetzt, besonders mit sanften Methoden wie der elektrochemischen Hydriderzeugung.³⁾

Ein wichtiger Bereich der Atomspektrometrie insgesamt bleibt die elementspezifische Detektion bei der Chromatographie. Sie ist für die Speziation in biomedizinischen und Umweltpollen unersetzlich. Bei der Laserablation wurden mit der Modellierung große Fortschritte gemacht. Hier wurde, ähnlich wie bei Glimmentladungen als Quellen für die Feststoffanalyse, der Einfluss von Ablati-

onskammergeometrien auf die analytischen Gütedaten berechnet, die errechneten Daten stimmen recht gut mit den experimentellen überein.⁴⁾

In der Atomabsorptionsspektrometrie wurden Analysen nach Überführung der Analyten in die Gasphase auch für andere Elemente als die klassischen Elemente der Hydridtechnik studiert.⁵⁾ Auch bleiben Matrixmodifizierer und die Simulation von Verdampfungsvorgängen im Ofen wie auch die simultane Atomabsorption beim Einsatz von Kontinuumstrahlern und hochauflösenden Spektrometern wichtige Gebiete der Forschung.

Optische Verfahren: Raman-Spektroskopie

◆ Die Raman-Spektroskopie hat im letzten Jahrzehnt eine Renaissance erlebt und sich zu einer der leistungsstärksten laserspektroskopischen Methoden entwickelt. Nahezu alle naturwissenschaftlichen Gebiete setzen sie heute ein.⁶⁾ Dies verdankt die Methode vor allem den Fortschritten in der Laser-, Filter- und Detektortechnik.

Die Vorzüge der Raman-Spektroskopie liegen in ihrer Vielseitigkeit –

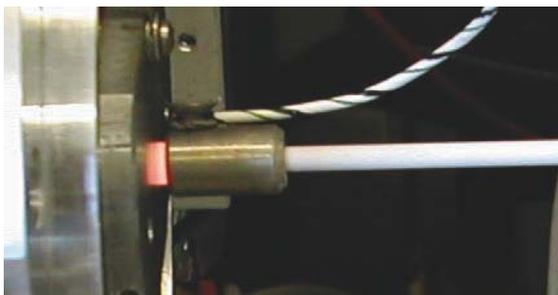


Abb. 1. Massenspektrometrie an Glimmentladung in Helium bei 40 W und atmosphärischem Druck. (Nach F. J. Andrade, J. A. C. Broekaert, G. M. Hieftje und W. C. Wetzels, Indiana University, Bloomington/USA.)

sie ist nichtinvasiv und erfordert minimale bis gar keine Probenvorbereitung – und in ihrer hohen chemischen Spezifität. Aufgrund der Möglichkeit, berührungs- und zerstörungsfrei zu messen, erfreut sich die Raman-Spektroskopie wachsender Beliebtheit in den Lebenswissenschaften. So lokalisiert die Medizin mit Fasersonden operationsbegleitend verändertes Hirngewebe.⁷⁾

Nachteil der Raman-Spektroskopie ist ihre geringe Empfindlichkeit. Daher dienen zur Beantwortung hochsensitiver analytischer Fragen meistens signalverstärkende Techniken wie die Resonanz-Raman-Spektroskopie⁸⁾ und die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (Surface Enhanced Raman Scattering SERS).⁹⁾ Diese ultrasensitiven Raman-Techniken haben sich in den letzten Jahren besonders in den Lebenswissenschaften zu einem unverzichtbaren Werkzeug entwickelt. So detektiert

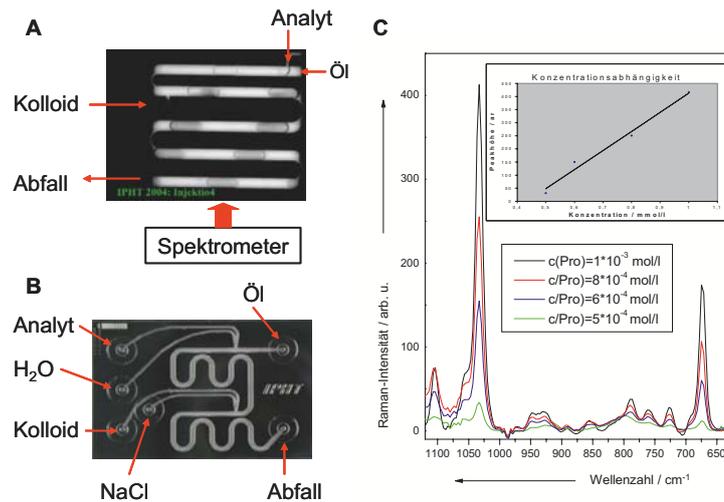


Abb. 2. Mikrochips für Messungen mit segmentiertem Fluss für drei (A) und fünf (B) Komponenten. Konzentrationsabhängige SERS-Messungen (C).

die SERS-Spektroskopie spezifische biologische Markersubstanzen. Beispielsweise lassen sich anhand des Dipicolinat-Signals Endosporen der Gattung *Bacillus* wie *B. anthracis*

schnell nachweisen.¹⁰⁾ Implantierte Sensoren bestimmen Glucose bei Diabetes online und in vivo.¹¹⁾

Die Kombination aus SERS-Spektroskopie mit Mikrofluidik erhöht



Abb. 3.
Eine Zelle für die
photophoretische
Trennung von
Kolloiden.

Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Analysen. Dadurch können im segmentierten Fluss sowohl geringe Konzentrationen als auch geringste Probenvolumina quantitativ analysiert werden (Abbildung 2, S.419).¹²⁾

Optische Verfahren: Nahinfrarot-Spektroskopie

◆ Auch wenn die Nahinfrarot-(NIR)-Spektroskopie kaum durch spektakuläre Neuentwicklungen, etwa gerätetechnischer Art, auffällt, gehört sie doch zu den häufigsten Methoden in der industriellen Prozesskontrolle. Ein Hauptanwender ist die pharmazeutische Industrie, welche die NIR-Spektroskopie in nahezu jedem Produktionsschritt einsetzt. Dabei geht es nicht nur um die Kontrolle der chemischen Zusam-

mensetzung von Rohstoffen, Zwischen- und Endprodukten, sondern auch um die kontinuierliche Überwachung von Mischvorgängen. Hier ist die NIR-Prozesskontrolle nahezu konkurrenzlos.

Auch physikalische Eigenschaften wie Feuchtegehalt, insbesondere während des Granulierungsvorgangs, aber auch im Endprodukt sowie Kristallisationsprozesse und Oberflächenbeschichtungsvorgänge lassen sich inline überwachen.^{13,14)} Ähnliche Anwendungen finden sich in der gesamten chemischen Industrie ebenso wie in der Lebensmittelindustrie.

Ein Grund für die weite Verbreitung der NIR-Technik ist die zunehmende Optimierung mathematischer Auswertemethoden. NIR-Datensätze aus der Prozessmesstechnik weisen im Allgemeinen sehr geringe Schwankungen auf und sind optisch nicht zu unterscheiden. Erst die mittlerweile hohe Rechenleistung kleiner und kostengünstiger Computer macht die NIR-Spektroskopie zu einem Routineinstrument für die Inlineprozesskontrolle.

Bei den chemometrischen Auswertemethoden für die NIR unterscheidet man überwachte und nicht-überwachte Verfahren: Bei nicht-überwachten ergeben sich die mögli-

chen Klassen, denen die Proben nach ihren NIR-Spektren zugeteilt werden, erst aus dem mathematischen Verfahren. Bei überwachten Verfahren werden die Ergebnisräume vorgegeben, und der mathematische Ansatz gruppiert die Proben in einen dieser Ergebnisräume ein. Ein Beispiel für ein nichtüberwachtes Verfahren ist etwa die Hauptkomponentenanalyse (Principle Component Analysis, PCA). Überwachte Verfahren können zum Beispiel korrelations- und distanzbasierte Methoden sein, die eine Eingruppierung nach mathematischen Ähnlichkeiten zwischen der unbekannt Probe und den vorgegebenen Gruppen vornehmen. Auch nichtlineare Verfahren wie neuronale Netzwerke und Support Vector Machines, die zunehmend zum Einsatz kommen, gehören in diese Kategorie.

Optische Verfahren: Optische Chromatographie

◆ Jenseits klassischer Spektroskopieverfahren wird derzeit die direkte Wechselwirkung von Photonen mit Partikeln als physikalisch-chemisches Trennverfahren untersucht. Durch Impulsübertrag von Photonen auf Partikel mit Dimensionen zwischen einigen Nanometern und einigen Mikrometern, die in Flüssigkeiten (Kolloide) oder Gasen (Aerosole) suspendiert sind, können diese Teilchen manipuliert werden. Auch der indirekte Effekt über eine einseitige Erwärmung insbesondere von Aerosolpartikeln und dadurch eine höhere Stoßrate mit den umgebenden Gasmolekülen führt zur Bewegung von Teilchen. Diese Effekte werden seit langem als optische Pinzette genutzt, in letzter Zeit aber auch als optische Chromatographie eingesetzt. Dabei ist ein intensiver Laserstrahl entgegen der Fließrichtung einer Kolloidlösung in einem Röhrchen gerichtet. Je nach ihren optischen Eigenschaften verteilen sich dann verschiedene Partikel entlang der optischen Achse in einem Fließkanal.¹⁵⁾

Alternativ wird die Trennung auch durch einen rechtwinklig zur Fließrichtung gerichteten Laserstrahl¹⁶⁾ er-

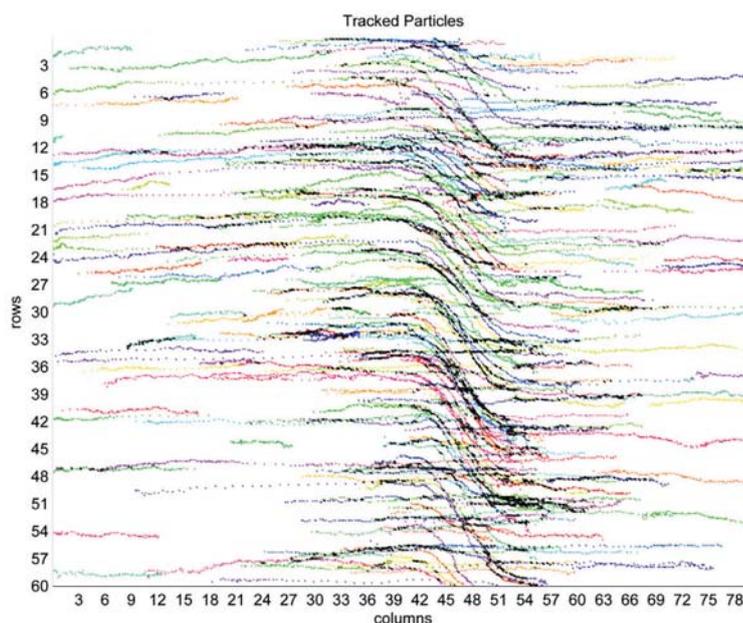


Abb. 4. Trajektorien von Aerosolen in einem Gasstrom unter dem Einfluss von seitlicher Lasereinstrahlung. (Bildausschnitt 5x3.7 mm)

reicht oder beim Durchfließen von stehenden optischen Feldern. In diesem Fall läuft eine kolloidale Lösung durch eine holographisch in den Fließkanal projizierte Anordnung multipler Laserfokusse (Abbildungen 3 und 4). Die attraktive oder repulsive Wirkung dieser Potenzialanordnung trennt die Kolloide nach ihren optischen und geometrischen Eigenschaften.¹⁷⁾

Massenspektrometrie

◆ Die wichtigsten Fortschritte, instrumentell wie methodisch, lassen sich in der organischen und anorganischen Massenspektrometrie in der Bioanalytik ausmachen.

In der organischen Massenspektrometrie hat die Markteinführung der LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) für Aufsehen gesorgt [*Nachr. Chem.* 2007, 55, 1016]. Neu ist hier die Kopplung einer linearen Quadrupolfalle (Linear Trap Quadrupole, LTQ), die sich sowohl als eigenständiges Gerätekonzept als auch als Hybridsystem bereits beim LTQ-Fourier-Transform(FT)-Massenspektrometer (MS) bewährt hat, mit einer rein elektrostatischen Falle, der Orbitrap, die Makarov entwickelt hat (Abbildung 5).¹⁸⁻²¹⁾

In ersten Anwendungen der LTQ-Orbitrap bei der Analyse von Metallkomplexen, Oligosacchariden, Peptiden und Proteinen berichten Hu et al.³⁾ und Makarov et al.²²⁾ von Massenauflösungen bis zu 150 000, einer Massengenauigkeit von 2 bis 5 ppm, einem Massenbereich (m/z) von wenigstens 6000 und einem dynamischen Bereich von 10^3 (Abbildung 6, S. 422).

Von weiteren Verbesserungen der Massengenauigkeit haben Olsen et al. berichtet: Interne Standards (Lock-Massen) haben zu einer Genauigkeit unter 1 ppm geführt und bei variablen Massentoleranzen die Suche in Peptidatenbanken verbessert.²³⁾

Über erste Anwendungen einer LTQ-Orbitrap in der Top-down-Proteomanalyse für Proteine bis zu einer Molmasse von 25 kDa, die bisher nur mit aufwendigen FTMS-Geräten möglich waren, berichten Matthias Mann und Mitarbeiter.²⁴⁾ Dabei ergaben 50 fmol Cytochrom C, injiziert in einen Nano-Elektrospraychip, Massenspektren mit gutem Signal/Rauschverhältnis. Dies entspricht einem Probenverbrauch von nur wenigen Attomol pro Massenspektrum. Dieser Beitrag beschreibt auch Anwendungen für größere Proteine

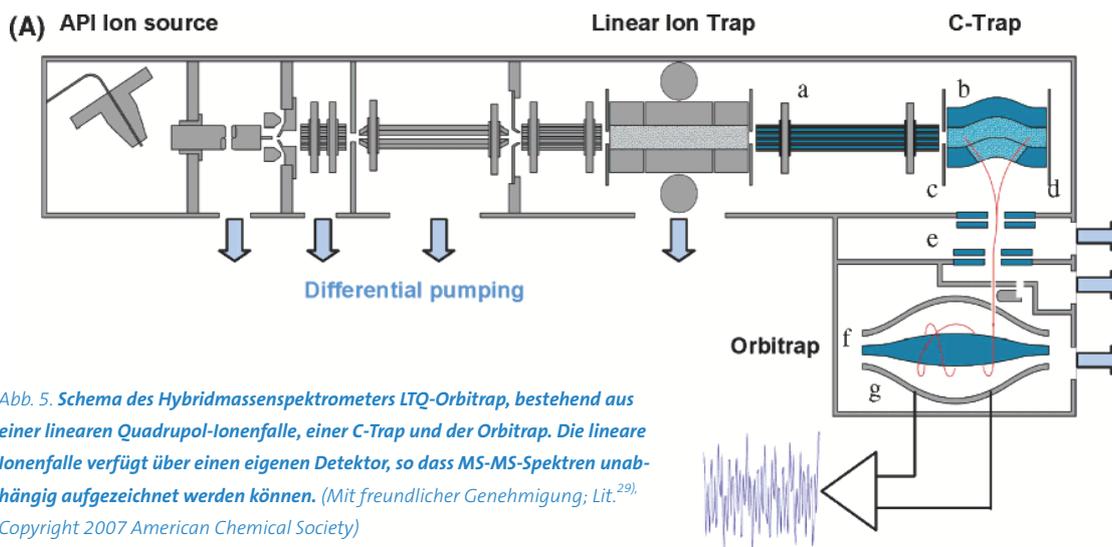


Abb. 5. Schema des Hybridmassenspektrometers LTO-Orbitrap, bestehend aus einer linearen Quadrupol-Ionenfalle, einer C-Trap und der Orbitrap. Die lineare Ionenfalle verfügt über einen eigenen Detektor, so dass MS-MS-Spektren unabhängig aufgezeichnet werden können. (Mit freundlicher Genehmigung; Lit.²⁹⁾ Copyright 2007 American Chemical Society

(Bottom-up-Proteomik), jedoch mit Tandemmassenspektrometer-Option nach einem vorherigen enzymatischen Peptidverdau. Gerade für Top-down- und Bottom-up-Anwendungen zählt sich das Hybridsystem aus.

Elementmassenspektrometrie

◆ Im letzten Trendbericht [Nachr. Chem. 2006, 54, 382] hatten wir bereits über das Hetero-Atom-Tagging insbesondere in der induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) berichtet. Es handelt sich um eine Methode, die Heteroelemente zur Detektion von Biomolekülen nutzt. Einzelheiten stehen in einem Übersichtsartikel,²⁵⁾ eine Diskussion soll in Kürze erscheinen.²⁶⁾ Die Resonanz auf solche Anwendungen ist so groß, dass das erste internationale Symposium für „Metalomics“, das 2007 in Nagoya, Japan, stattfand, alle Erwartungen der Veranstalter übertroffen hat. Es scheint sich hier eine neue Omics-Bewegung abzuzeichnen.

Element-Tags eignen sich auch für Anwendungen zur Entwicklung neuer Detektions- und Quantifizierungskonzepte in der Proteinanalytik. Eine außergewöhnliche Anwendung und damit verbunden eine neue Geräteentwicklung stammen aus der Arbeitsgruppe von Scott Tanner. Sie beschreibt ein Herstellungsverfahren für neue Polymermaterialien, an die ein oder mehrere Lanthanidelemente gleichzeitig gekoppelt werden können.²⁷⁾ Die Materialien haben einen

Linker, der an Proteine oder bevorzugt an Antikörper bindet.

Tanners Gruppe hat den Prototypen eines ICP-TOF-Massenspektrometers für die Elementanalytik entwickelt, um diese Elementlabel besonders empfindlich, extrem schnell und simultan nachzuweisen. Ein solches Gerät eignet sich für die Multiplex-Analyse, es erlaubt das Auslesen vieler Systemparameter gleichzeitig und ermöglicht damit Anwendungen, für die bisher Fluoreszenzmarkierungen notwendig waren. Das Resultat der Entwicklungsarbeit ist ein flow-cytometrischer und massenspektrometrischer Detektor, Anwendungen liegen auf der Hand: Hochdurchsatz-Screening von medizinischen Proben. Die erste Anwendung zeigte die Leistungsfähigkeit des Gerätes zur Detektion von einzelnen Leukämiezellen in Vollblutproben.²⁸⁾ Weitere Anwendungen sind die Detektion von Biomarkern und genetischen Modifikationen.

Trenntechniken und Kopplung mit der Massenspektrometrie

◆ Der Trend zu neuen, effizienteren und selektiveren Phasen ist ungebrochen. Anorganisch-organische Hybridmaterialien zeichnen sich durch sehr gute chemische Stabilität aus, so dass von Silica abgeleitete Säulenmaterialien auch bei erhöhter Temperatur und unter basischen Bedingungen routinemäßig angewandt

werden können. Durch die Verkleinerung der Partikeldurchmesser unter 2 μm lassen sich hohe Bodenzahlen (über 10000) in kurzen Säulen (30 bis 50 mm) in wenigen Minuten erzielen.³⁰⁾ Den für solche Säulen erforderlichen Druck (500 bis 1000 bar) erzeugen spezielle Hochdruck-Pumpensysteme, die inzwischen mehrere Gerätehersteller vertreiben.

Ein weiterer Trend, um die Analysen zu beschleunigen, sind Trennungen bei erhöhter Temperatur von bis zu 120 $^{\circ}\text{C}$.³¹⁾

Monolithische Trennmedien (Abbildung 7) gelten als vielversprechende Alternative zu partikulären Phasen.³²⁾ Sie erzielen bei vergleichsweise niedrigen Drücken sehr hohe Flussraten, dies macht sie geeignet für schnelle und effiziente Trennungen. Auch wenn die Zahl der kommerziell verfügbaren Phasen kontinuierlich steigt, so ist die Produktpalette noch deutlich zu erweitern, bevor monolithische Säulen breiten Eingang in die industrielle Analytik finden werden.

Bessere Stabilität und Bedienbarkeit, niedrigere Detektionslimits sowie gesunkene Anschaffungs- und Erhaltungskosten sind die wichtigsten Gründe für die steigende Beliebtheit massenspektrometrischer Detektoren. Die etablierten Ionisationstechniken Elektrospray-Ionisation und Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck ergänzen neue Varianten wie UV-Photoionisation und Laser-Photoionisation³³⁾ und erwei-

tern das Spektrum an erfassbaren Substanzen.

Nicht zuletzt auf Grund des im Vergleich zu klassischen Ionencyclotron-Massenspektrometern deutlich geringeren Anschaffungs- und Betriebsaufwandes wird der Orbitrap-Massenanalysator³⁴⁾ auch als Detektor für Trenntechniken ein neues Zeitalter für die hochauflösende Massenspektrometrie in der analytischen Chemie einleiten.

Elektrochemische Analytik

◆ Elektroanalytische Methoden eignen sich aufgrund der Verfügbarkeit von Ultramikro- und Nanoelektroden hervorragend für die Entwicklung von nanostrukturierten Edelmetallkatalysatoren für Brennstoffzellen, von Biobrennstoffzellen mit immobilisierten Enzymen, bei der Konzeption und Optimierung neuer Biosensoren sowie zur Visualisierung chemischer Prozesse an lebenden Zellen. Die elektrochemische Rastermikroskopie ist mittlerweile so ausgereift, dass viele Gruppen weltweit kommerzielle Geräte nutzen können und die Methoden auf weitere Anwendungsbereiche in Bio- und Materialanalytik ausdehnen.

Bei der Entwicklung von Brennstoffzellen, versucht man, den Platinanteil in den Elektrokatalysatoren zu reduzieren, da Platin extrem teuer ist. Insbesondere die Sauerstoffreduktion ist kinetisch limitierend, so dass nach neuen, nanostrukturierten Katalysatormaterialien gesucht wird. Stamenkovic et al. entwickelten und charakterisierten Pt₃Ni(111) mit ungewöhnlichen elektronischen Strukturen.³⁵⁾ Voltammetrische Messungen ergaben eine um das Zehnfache erhöhte Reduktionsaktivität für Sauerstoff.

Cyclische Voltammetrie spielte auch eine Rolle bei der Entwicklung von Biobrennstoffzellen. Immobilisierte Enzyme sollen schnellen Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode ermöglichen und die Systeme stabilisieren. Beispielsweise wurden kubische Phasen mit Redoxenzymen wie Oxidasen, Laccase und Bilirubin-Oxidase kombiniert.³⁶⁾

Weiterhin wurde die Elektrodenoberfläche durch Kohlenstoffnanoröhren oder Metallnanopartikel erhöht. Dies verbesserte mit Enzymen, die einen direkten Elektronentransfer zeigen, die Leistung der Biobrennstoffzelle.³⁷⁾

Aus der Vielzahl der Arbeiten aus der Biosensorik sind solche interessant, bei denen es durch Elektrodenarchitekturen, durch das Design von Elektronentransferpfaden oder durch ungewöhnliche biologische Erkennungskomponenten gelingt, mit hoher Sensitivität und Selektivität neue Analyte zu detektieren. So berichten Halamek et al. über die Bestimmung von glykosiliertem Hämoglobin, dem Zuckergedächtnis bei Diabetikern.³⁸⁾ Karyakin et al. haben einen nanostrukturierten H₂O₂-Sensor auf Basis von Preußisch Blau mit einem Detektionslimit von 1 nM entwickelt.³⁹⁾

Bei der DNA-Analytik stieg durch Redoxmarkierung die Empfindlichkeit der Methoden, und es ist nun möglich, Einzelbasen-Polymorphismen zu bestimmen.⁴⁰⁾

In der elektrochemischen Rastermikroskopie (Scanning Electrochemical Microscopy, SECM) wurde die Wechselstrom-SECM (AC-SECM) untersucht und ihr Potenzial zur Visualisierung von Korrosionsphänomenen und biologischen Zellen belegt.⁴¹⁾ Das SECM fand auch Anwendung in der Proteinvisualisierung nach 2D-Gelelektrophorese.⁴²⁾ Die Entwicklung eines Wafer-kompatiblen Fertigungsprozesses kombinierter Spitzen hat die Integration von Rasterkraftmikroskopie und SECM vorangetrieben (Abbildung 8).⁴³⁾

So bleibt die elektrochemische Analytik ein spannendes Forschungsgebiet und trägt wesentlich zur Entwicklung von Nanostrukturierung und miniaturisierten Analysensystemen bei.

Immunochemische Verfahren

◆ Maßgebliche Entwicklungen bei immunochemischen Analyseverfahren sollen seit Jahren vor allem Empfindlichkeit und Probendurchsatz steigern und die Methoden multi-

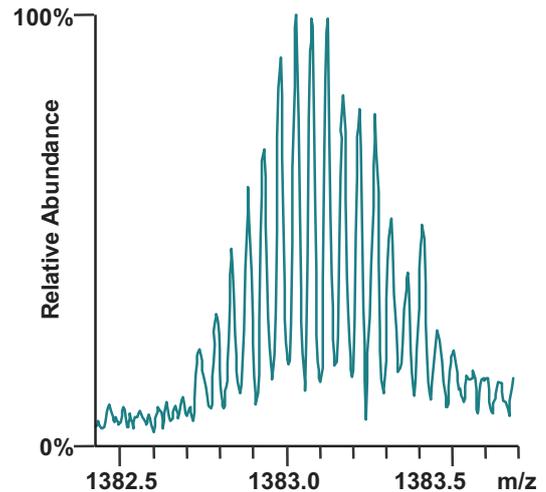
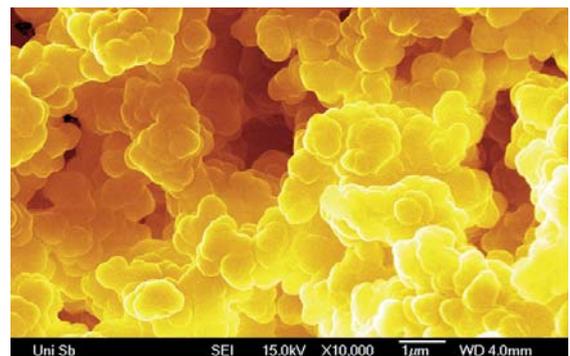


Abb. 6. Mit Auflösung 100 000 aufgenommenes Massenspektrum des 21+ Ladungszustands des Proteins Carboanhydrase, $M=29\,006,683\text{ Da}$. (Mit freundlicher Genehmigung; Lit.²⁹⁾ Copyright 2007 American Chemical Society)

analytisch machen. Dies soll dem zunehmenden Preisdruck in den Hauptanwendungsfeldern klinische Chemie und Lebensmittelsicherheit Rechnung tragen und massenspektrometrischen Methoden Paroli bieten.

Bead-Arrays und Microarrays, also Miniaturisierung und Multiplexing von Immunoassays, bleiben das beherrschende Thema.^{44,45)} Wesentlich ist dabei die Entwicklung neuer, besser biokompatibler Substrate (Oberflächen). Diese sollen Antikörper stabil immobilisieren und dabei ihre Struktur und Aktivität aufrechterhalten sowie die unspezifische Adsorption von Fremdproteinen verhindern.^{46,47)} Die von Boozer et al.⁴⁸⁾ entwickelte Methode einer DNA(ssDNA)-gesteuerten Antikörper-Immobilisierung zur Detektion multipler Analyte bietet entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren: Die Lagerstabilität der Chips ist höher und die ssDNA-

Abb. 7. Monolithische HPLC-Säule aus Poly-(Styrol-Divinylbenzol).



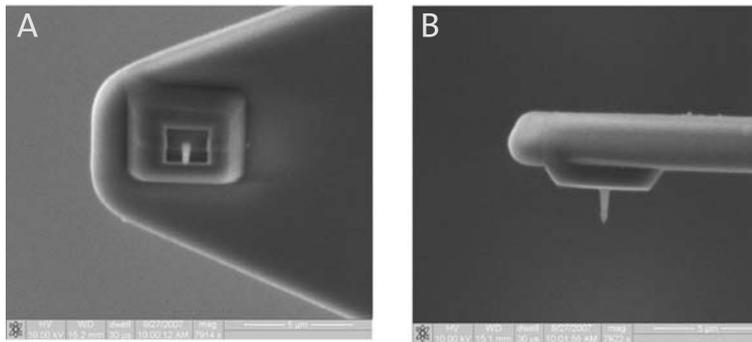


Abb. 8.
Kombinierte AFM-
SECM-Spitze.
(A: Aufsicht,
B: Seitenansicht;
Quelle: Christine
Kranz, Georgia Insti-
tute of Technology,
Atlanta/USA)

Sondenoberfläche ist ein ausgesprochen universell einsetzbares Substrat; die Anwendung des Chips bestimmt die Funktionalisierung und nicht umgekehrt. Die Vorteile zeigen sich, wenn entsprechende Microarrays etwa Ärzten in der klinischen Praxis schmackhaft zu machen sind. Diese sind an etwa 50 Protein-Biomarkern für diagnostische Zwecke interessiert.⁴⁹⁾ Wenn es um die Überwachung therapeutischer Maßnahmen geht, ist die Zahl relevanter Marker noch deutlich geringer.

Darüber hinaus könnte der ssDNA-Chip auch eine ideale Oberfläche für das Design eines kombinierten DNA/Protein-Arrays bieten, das simultan Nukleinsäure- und Protein-Biomarker detektiert.⁵⁰⁾ Damit wäre beispielsweise der hochsensitive Nachweis einer Infektion und die Erfassung des Krankheitsstadiums in einem Schritt möglich – ein Gewinn für Arzt und Patient.

Anstrengungen werden verstärkt, Entwicklungen bei Microarrays und Mikrofluidik enger zu verzahnen und

so die Vorteile dieser Multianalyttechniken besser herauszuarbeiten. Dabei geht es nicht nur um kürzere Analysenzeiten, geringeres Probenvolumen und weniger Reagenzienverbrauch, sondern auch um bessere Nachweisstärke. So senkten Morozov et al.⁵¹⁾ die Nachweisgrenze bis in den zeptomolaren Bereich durch Beschleunigung der Diffusion der Reaktionspartner. Auf einer semipermeablen Membran am Boden einer speziell konstruierten Flusszelle wurden Biotin und Antikörper gegen Ovalbumin und West-Nil-Virus-Partikel als Microarray immobilisiert. Ein elektrisches Feld forciert aus der darüber strömenden Probe geladene Probenbestandteile in Richtung des Mikroarrays. Der Analytnachweis erfolgt mit funktionalisierten Magnetpartikeln, die beim Durchfluss durch die Messzelle ein externer Magnet in Richtung des Arrays lenkt. Wenn Targetmoleküle vorhanden sind, werden die funktionalisierten Magnetpartikel gebunden (Abbildung 9). Allerdings kann

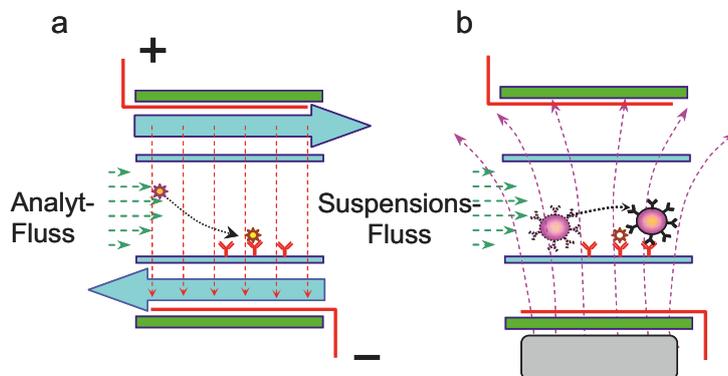


Abb. 9. a) Die geladenen Analyte werden elektrophoretisch aus einem Probenfluss in Richtung Array abgelenkt und von spezifischen Fängerantikörpern gebunden. Grüne Pfeile: Probenfluss; blaue Pfeile: Fluss des Elektrodenpuffers; rote Linien: Platinelektroden. b) Detektion der an den Fängerantikörpern gebundenen Analyte durch Antikörper-funktionalisierte magnetische Beads.

dieses Verfahren nur größere Ziel-moleküle mit mehreren Determinanten detektieren.

Chemo- und Biosensoren

◆ Die Zahl der Publikationen über Biosensoren ist im Jahr 2007 auf 2300 gewachsen, und der Impact Factor von *Biosensors and Bioelectronics* hat sich auf 4,4 erhöht. Beim 10th World Congress on Biosensors in Shanghai gingen fast 1000 Abstracts ein.

Es gibt eine Renaissance bei elektrochemischen Biosensoren. Die Forschung auf diesem Gebiet kennzeichnet die Verbesserung des Signaltransfers zwischen Biomolekül und Transducer durch effektive Grenzflächenarchitektur, z. B. mit Nanopartikeln und Nanodrähten,⁵²⁾ sowie Miniaturisierung und Parallelisierung. Der Weltmarkt für Biosensoren lag 2007 bei 8 Mrd. US-Dollar,⁵³⁾ davon entfielen etwa 85% auf elektrochemische Glucosesensoren.⁵⁴⁾

Bei Nukleinsäure-Arrays gelang Ghindilis et al.,⁵⁵⁾ der 2006 den Biosensors Prize des 9th World Congress on Biosensors erhielt, ein Durchbruch: Die vollelektronischen Chips erlauben die spot-genaue On-Chip-Synthese der Fängeroligos und die parallele Auslese der Hybridisierung der komplementären Probe-DNA.

Die Chips des Herstellers Combi Matrix verfügen über 12544 einzeln adressierbare Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 40 µm. Die Aktivität des Markerenzym Peroxidase wird elektrochemisch ausgelesen, ausgewertet wird die Konzentration des oxidierten Substrats. Bei diesem vollelektronischen DNA-Chip ist die Signalauslese (der Transducer) räumlich in die biologischen Erkennungselemente integriert, sie sind nach Iupac hochparallele Biosensoren (Abbildung 10).

Sensortechniken

◆ Bei Sensoren zeichnen sich zwei Tendenzen ab: Zentral in der Biosensorik ist die Suche nach markierungsfreien Auslesetechniken. Ein Beispiel ist die Kombination von Nanomateria-

lien zur Erzeugung orts aufgelöster Oberflächen-Plasmonen-Resonanz und Interferenzauslesung (Surface-Plasmon-Resonance-Effekt, SPR-Effekt), um DNA-Hybridisierungen auf Chipoberflächen markierungsfrei auszulesen.⁵⁶⁾ Damit lassen sich 10 pM DNA nachweisen. Zum gleichen Zweck eignen sich photonische Bandlücken-Strukturen (microcavities) in makroporösem Silicium. Damit konnten im femtomolaren Bereich *E. coli*-bindende Rezeptorproteine detektiert werden.⁵⁷⁾ Durch Nutzung mehrerer Wellenlängen und neuer Bildverarbeitung ist ein differentielles SPR-Abbild auf Chipoberflächen mit erhöhter Nachweisstärke zu gewinnen.^{58,59)}

Originell ist auch die markierungsfreie Auslesung von Aptamer- und Antikörper-modifizierten Kohlenstoffnanoröhren auf Feldeffekttransistoren. IgE als Modellprotein kann dabei im Bereich von 250 pM detektiert werden.⁶⁰⁾

Die Erzeugung von Siliciumnanodraht-Arrays leitet über zum zweiten Trend: Dem Aufbau von Arraystrukturen für Multianalysensoren. In einem Prototyp dienen Metalloxidhalbleiter-Strukturen zur markierungsfreien Auslesung von Arrays. Die Ziel-DNA kann im femtomolaren Bereich bestimmt werden.⁶¹⁾

Die Entwicklung von Arrayplattformen (z. B. wie in Abbildung 11, S. 426) ist in vollem Gange. Für Kombinationen von vollautomatisierten Sensorarrays mit autarker Probenaufnahme, Reagenszuführung und Auslesetechnik ist nicht nur im Point-of-care-Bereich ein großer Markt zu erwarten, sondern überall dort, wo es möglich erscheint, geschlossene Messaufgaben auf einem Chip abzulegen. Damit gewinnt auch die robuste und validierbare Chip-Produktion an Bedeutung.

Das Beispiel eines Chemolumineszenz-Chips zeigt, wie man durch chemische Architektur auf Chipoberflächen hochreproduzierbare Arraystrukturen erhält.^{62,63)}

Ein Suspension Array, ein Partikelarray in Suspension in Gestalt dispergierter SiO₂-Nanoröhren, kann für Vielfach-Immunoassay-Anwendungen dienen.⁶⁴⁾

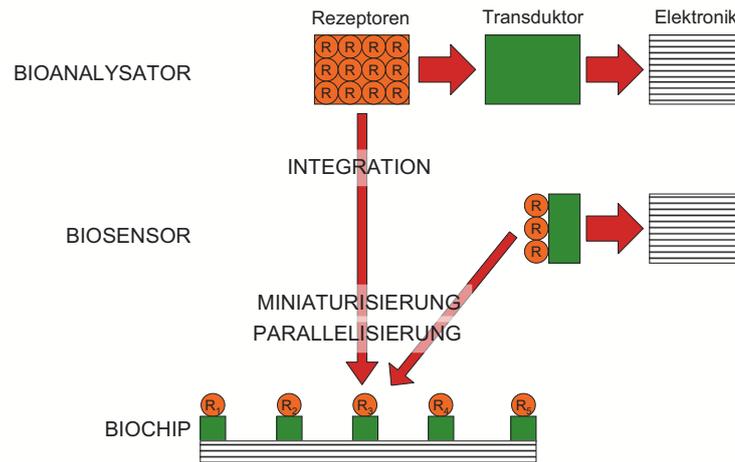


Abb. 10.
Ablaufschema einer hochparallelen Biosensorik.

Ein hübsches Beispiel für eine autonome Plattform ist die Zentrifugalkraft-getriebene Bio-Disc. Eine Variante davon für die Wasseranalytik wird mit Komplexbildnern (Optoden) und optischer Auslesung während der Rotation ermöglicht. Die Analyten K⁺, Na⁺, Cl⁻ und Ca²⁺ werden innerhalb weniger Minuten simultan bestimmt.⁶⁵⁾ Selbst handelsübliche CDs lassen sich als Substrat für eine ganze Palette punktförmig aufgebracht Immunoassays als Array gestalten.⁶⁶⁾

Die ETH Zürich stellt ein Array für die Flüssigphasenanalyse vor, der auf Massenschwingern (cantilever technology) beruht.⁶⁷⁾ Ein überzeugendes Beispiel für einen diagnostischen Virenspeziesarray beruht auf Multiplexing der RNA-Vervielfachung, Hybridisierung und Fluoreszenzauslesung. 65 verschiedene Influenza-Spezies können in acht Stunden detektiert und Stämmen zugeordnet werden.⁶⁸⁾

Ein gerade erschienener Übersichtsartikel fasst die Literatur über automatisierte Microarrayplattformen bis 2007 zusammen.⁶⁹⁾

Chemometrik

◆ Die Zahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Chemometrik steigt weiterhin stark an. Dabei dominieren anwendungsorientierte Arbeiten, die oft weit über die Chemie hinausgehen, so dass letztlich Gebiete der Chemometrik in Disziplinen der Informatik wie Chemoinformatik und Bioinformatik aufgehen.

Der aktuelle Schwerpunkt der Chemometrik liegt auf der Entwicklung und Anwendung künstlicher neuronaler Netze, gefolgt von genetischen Algorithmen sowie Support Vector Machines. Auf hohem Niveau mit etwa gleichbleibender Tendenz werden Prinzipien der multivariaten Kalibration, der Partial-least-squares-Regression und der Zeitreihenanalyse angewendet.

Einsatzgebiete sind vor allem die Umweltüberwachung, die Lebensmittelproduktion und die Arzneimittelforschung, die Auswertung von Prozessdaten, aber auch die Entwicklung und Optimierung analytischer Methoden. Zentrales Anwendungsgebiet ist hier nach wie vor die NIR-Spektroskopie (siehe S. 419). Aber auch andere analytische Bereiche wie die Raman-Spektroskopie, die Chromatographie und die elektrochemische Analytik nutzen häufig chemometrische Methoden. Zu Wavelet-Transformation und geostatistischen Methoden wurde weniger publiziert.

Zwei neue Entwicklungslinien zeichnen sich ab: Zum einen erscheinen wieder verstärkt Arbeiten zur statistischen Versuchsplanung und zum anderen werden zunehmend Methoden zur multivariaten Kurvenauflösung entwickelt und in der Spektroskopie, der Chromatographie, aber auch der Elektroanalytik angewendet. Vielversprechend ist die multivariate Kurvenauflösung mit Alternating-least-squares-Methoden.

Einen aktuellen Einstieg in die Chemometrik geben die Monogra-

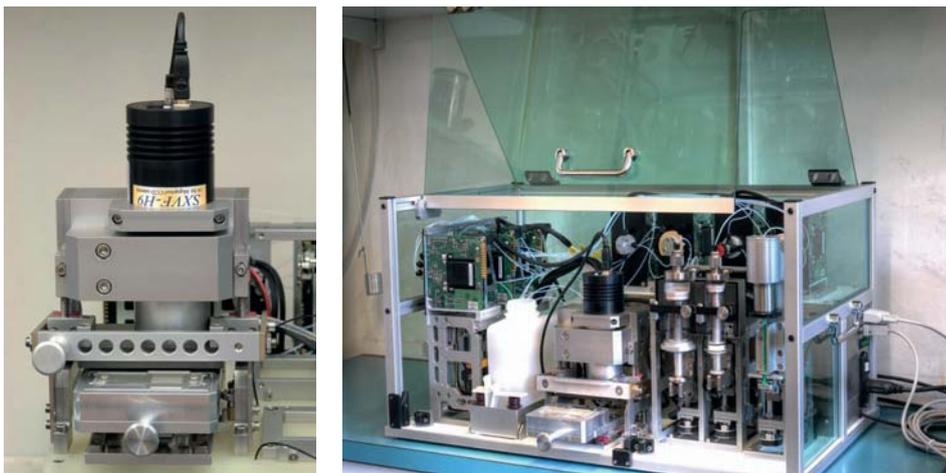


Abb. 11. Prototyp einer automatisiert arbeitenden Immunochip-Microarray-Plattform.

(Foto: Institut für Wasserchemie der TU München)

phie von Richard Breerton,⁷⁰⁾ die neue Auflage des Lehrbuchs von Matthias Otto⁷¹⁾ sowie das Buch „Multivariate Datenanalyse“ von Waltraud Kessler.⁷²⁾

Metrologie und Referenzmaterialien

◆ In den letzten zwei Jahren ist aufgrund der raschen Entwicklung der Analytik in den (und für die) Biowissenschaften das Bewusstsein dafür gestiegen, dass auch die Datenqualität zu überprüfen ist. So erfordert der Übergang von der klassischen mikrobiologischen Analytik zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden Instrumente der analytischen Qualitätssicherung, wie Ringversuche und Referenzmaterialien.⁷³⁾ Letztere sind die Voraussetzung für die metrologische Rückführbarkeit von Messergebnissen auf international harmonisierte Bezugssysteme und damit deren Vergleichbarkeit zwischen Labors und auf der Zeitskala. Die internationalen Symposien on Biological and Environmental Reference Materials (BERM) 2006 in den USA und 2007 in Japan vermittelten einen guten Überblick zu Entwicklungen und Tendenzen bei Referenzmaterialien.^{74,75)}

Zu einem weiteren Grundkonzept der Metrologie gehört die Abschätzung der Messunsicherheit des gesamten Analyseverfahrens und deren Einbeziehung in das Analyseer-

gebnis. Für eine der am weitesten verbreiteten molekularbiologischen Methoden, die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real time Polymerase Chain Reaction, rt-PCR), wurde eine Anleitung, wie die Messunsicherheit zu ermitteln ist, mit Beispielen aus der Quantifizierung genetisch modifizierter DNA publiziert.⁷⁶⁾

Eine Entwicklung in der fundamentalen Metrologie wird von Chemikern bisher kaum wahrgenommen: Die Metrologie-Institute, die im Internationalen Komitee für Maße und Gewichte (Comité International des Poids et Mesures, CIPM) zusammenarbeiten, versuchen, zukünftig die Basiseinheiten des internationalen Maßsystems (SI) über exakt festgelegte Naturkonstanten zu definieren.⁷⁷⁾ Für die analytische Chemie könnte dies eine Festlegung von Mol und Kilogramm über die Avogadro-

zahl bzw. die Planck-Konstante bedeuten. Die Modifizierung der Basiseinheiten, die noch diskutiert wird, wird die tägliche Arbeit im Labor zwar nicht beeinflussen. Jedoch wäre eine unabhängige Definition der Massen- und Stoffmengeneinheiten für die hochpräzise Kalibrierung und die metrologische Rückführbarkeit von Vorteil.

Reinhard Nießner, München
 José A. C. Broekaert, Hamburg
 Jürgen Einax, Jena
 Hendrik Emons, Geel
 Christoph Haisch, München
 Christian Huber, Saarbrücken
 Norbert Jakobowski, Dortmund
 Dietmar Knopp, München
 Jürgen Popp, Jena
 Frieder W. Scheller, Potsdam
 Wolfgang Schuhmann, Bochum

- 1) M. R. Webb, F. J. Andrade G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* 2007, 79, 7807.
- 2) S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- 3) P. Pohl, I. J. Jimenez, N. H. Bings, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 606, 9.
- 4) D. Bleiner, A. Bogaerts, *Spectrochim. Acta*, 2007, Part B 62, 155.
- 5) R. E. Sturgeon, *Special Issue, Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 733.
- 6) M. Schmitt, J. Popp, *J. Raman Spectrosc.* 2006, 37, 20 und darin zitierte Literatur.
- 7) S. Koljenovic, T. C. B. Schut, R. Wolthuis et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 557.
- 8) *Beiträge des "Special Issue of" J. Raman Spectrosc.* 2001, 32, 399.
- 9) K. Hering, D. Cialla, K. Ackermann et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 113 und darin zitierte Literatur.
- 10) X. Zhang, J. Zhao, A. V. Whitney, J. W. Elam, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 10304.
- 11) D. A. Stuart, J. M. Yuen, N. Shah et al., *Anal. Chem.* 2006, 78, 7211.
- 12) K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, M. Köhler, T. Henkel, J. Popp, *Anal. Chem.* 2007, 79, 1542.
- 13) A. Roggo, P. Chalou, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 683.
- 14) J. Luypaert, D. L. Massart, Y. v. Heyden, *Talanta* 2007, 72, 865.
- 15) B. Suk Zhao, Y. Koo, D. Soo Chung, *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 97.
- 16) C. Helmbrecht, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Chem.* 2007, 79, 7097.
- 17) A. M. Lacasta, M. Khoury, J. M. Sancho, K. Lindenberg, *Modern Physics Letters B* 2006, 20, 1427.
- 18) A. Makarov, *Anal. Chem.* 2000, 72, 1156.
- 19) M. Scigelova, A. Makarov, *Practical Proteomics* 2006, 1–2, 16.



Reinhard Nießner,

Jahrgang 1951, studierte Chemie in Freiburg und Dortmund, wo er 1981 promovierte. Nach seiner Habilitation (1985) war er von 1986 bis 1989 Professor für Anorganische und Analytische Chemie an der Universität Dortmund; 1989 nahm er den Ruf auf den Lehrstuhl für Analytische Chemie an der TU München an. Seine Forschung beschäftigt sich mit analytischen Methoden in der Umweltchemie, speziell Laserspektroskopie, Chromatographie und immunserologischen Techniken zum Studium von Aerosolen, Hydrokolloiden und Biofilmen.

- 20) Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 430.
- 21) Q. Hu, A. A. Makarov, R. G. Cooks, R. J. Noll, *J. Phys. Chem. A* 2006, 110, 2682.
- 22) A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, S. Horning, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 977.
- 23) J. V. Olsen, L. M. F. de Godoy, G. Li et al., *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, 4, 12, 2010.
- 24) B. Macek, L. F. Waanders, J. V. Olsen, M. Mann, *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5, 5, 949.
- 25) J. Bettmer, N. Jakubowski, A. Prange, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 7.
- 26) D. Proefrock, A. Prange, *J. Anal. At. Spectrom.*, unveröffentlicht.
- 27) X. Lou, G. Zhang, I. Herrera et al., *Angew. Chem.* 2007, 119, 6223.
- 28) O. Ornatsky, V. I. Baranov, D. R. Bandura, S. D. Tanner, J. Dick, *J. Immunol. Methods* 2006, 308, 68.
- 29) A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev et al., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2113.
- 30) M. E. Swartz, *J. Liq. Chromatogr.* 2005, 28, 1253.
- 31) Y. Xiang, Y. Liu, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 198.
- 32) F. Svec, C. G. Huber, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2100.
- 33) M. Constapel, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 326.
- 34) Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 430.
- 35) V. R. Stamenkovic, B. Fowler, B. Mun et al., *Science* 2007, 315, 493.
- 36) a) E. Nazaruk, R. Bilewicz, *Bioelectrochem.* 2007, 71, 8.
b) P. Rowinski, C. Kang, H. Shin, A. Heller, *Anal. Chem.* 2007, 79, 1173.
- 37) D. Ivnitski, P. Atanassov, C. Applett, *Electroanal.* 2007, 19, 1562.
- 38) J. Halamek, U. Wollenberger, W. Stoeklein, F. W. Scheller, *Electrochim. Acta* 2007, 53, 1127.
- 39) A. A. Karyakin, E. A. Paganova, I. A. Bolshakov, E. E. Karyakina, *Angew. Chem.* 2007, 119, 7822.
- 40) a) T. Garcia, M. Revenga-Parra, H. D. Abruna, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chem.* 2007, 80, 78.
b) Y. Xiao, R. Y. Lai, K. W. Plaxco, *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2875.
- 41) P. M. Diakowski, Z. Ding, *PCCP* 2007, 9, 5966
- 42) M. Zhang, G. Wittstock, Y. Shao, H. H. Girault, *Anal. Chem.* 2007, 79, 4833.
- 43) H. Shin, P. J. Hesketh, B. Mizaikoff, C. Kranz, *Anal. Chem.* 2007, 79, 476.
- 44) G. P. Anderson, S. C. Moreira, P. T. Charles et al., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2279.
- 45) J. R. E. Shepard, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2478.
- 46) S. L. Seuryck-Servoss, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Front. Biosci.* 2007, 12, 3956.
- 47) C. Steinhauer, C. Wingren, F. Khan, M. He, M. J. Taussig, C. A. K. Borrebaeck, *Proteomics* 2006, 6, 4227.
- 48) C. Boozer, J. Ladd, S. Chen, S. Jiang, *Anal. Chem.* 2006, 78, 1515.
- 49) C. A. K. Borrebaeck, C. Wingren, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2007, 7, 673.
- 50) M. M. Ling, C. Ricks, P. Lea, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2007, 7, 87.
- 51) V. N. Morozov, S. Groves, M. J. Turell, C. Bailey, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 12628.
- 52) I. Willner, R. Baron, B. Willner, *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1841.
- 53) „Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development“: J. D. Newman, A. P. F. Turner, In: *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons (im Druck).
- 54) G. S. Wilson, M. Ammam, *FEBS J.* 2007, 274, 5452.
- 55) A. L. Ghindilis, M. W. Smith, K. R. Schwarzkopf et al., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1853
- 56) D.-K. Kim, K. Kerman, M. Saito, et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1855.
- 57) H. Ouyang, L. A. DeLouise, B. Miller, P. M. Fauchet, *Anal. Chem.* 2007, 79, 1502.
- 58) D. Böcker, A. Zybin, V. Horvatic, C. Grunwald, K. Niemax, *Anal. Chem.* 2007, 79, 702.
- 59) A. Zybin, D. Böcker, V. M. Mirsky, K. Niemax, *Anal. Chem.* 2007, 79, 4233.
- 60) K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya, *Anal. Chem.* 2007, 79, 782.
- 61) Z. Gao, A. Agarwal, A. D. Trigg, *Anal. Chem.* 2007, 79, 3291.
- 62) K. Järas, A. Ressine, E. Nilsson et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 5817.
- 63) A. Wolter, R. Nießner, M. Seidel, *Anal. Chem.* 2007, 79, 4529.
- 64) B. He, S. J. Son, S. B. Lee, *Anal. Chem.* 2007, 79, 5257.
- 65) A. Watts, A. A. Urbas, E. Moschou et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 8046.
- 66) S. Morais, J. Carrascosa, D. Mira, R. Puchades, A. Maquieira, *Anal. Chem.* 2007, 79, 7628
- 67) C. Vancura Y. Li, J. Lichtenberg et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1646.
- 68) D. Dankbar, E. D. Dawson, M. Mehlmann et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 2084.
- 69) M. Seidel, R. Niessner, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, im Druck.
- 70) R. G. Brereton, *Applied Chemometrics for Scientists*, Wiley, New York, 2007.
- 71) M. Otto, *Chemometrics, 2nd Ed.*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- 72) W. Kessler, *Multivariate Datenanalyse*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- 73) W. Philipp et al., *Accr. Qual. Ass.* 2007, 12, 134.
- 74) S. Wise et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 2309
- 75) H. Emons, *Accr. Qual. Ass.* 2007, 12, 115.
- 76) S. Trapmann et al., *Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories*, European Communities, Luxembourg, 2007.
- 77) I. M. Mills, P. J. Mohr, T. J. Quinn, B. N. Taylor, E. R. Williams, *Metrologia* 2006, 43, 227.