Analytische Chemie 2008/2009

Reinhard Nießner et al.

Echte analytische Verfahrensentwicklungen laufen fast nur noch im kleinskaligen Bereich ab, etwa bei der Entwicklung von Nanomaterialien, neuen Reagenzien oder von Trennverfahren sowie bei Anwendung und Validierung. Das Wissen zur Entwicklung komplexer Spektrometer oder autonom arbeitender Analysenplattformen ist zwar nach wie vor die Schlüssel zur Technologieführerschaft, aber kaum noch bei den universitären Analytik-Arbeitsgruppen vorzufinden. In der Anwendung schieben sich Lebensmittelanalytik und klinische Diagnostik weiter nach vorn. Prozessanalytik löst die Umweltüberwachung ab.

Optische Verfahren: Atomspektrometrie

◆ Die Erforschung neuer Plasmen als Strahlungsquellen für die optische Emission führte wie in den Vorjahren zu Neuentwicklungen besonders bei miniaturisierten Plasmen. Wie Staack et al.[1)] berichten, lassen sich auch in Flüssigkeiten Entladungen erzeugen, sogar an Nanoröhren als Elektroden. Dies ist für Monitoringzwecke entwicklungsfähig (Abbildung 1).

Mikroplasmen wurden für den Transfer von Elementen nach ihrer Verflüchtigung eingesetzt, etwa für Hg mit Kaltdampftechnik, für Elemente mit flüchtigen Hydriden oder für C und S nach ihrer Verflüchtigung durch Redoxreaktionen. Auch wurden den Mikroplasmen Mikrohohlkathodenentladungen hinzugefügt, die für die optische Emission wie für die Elementmassenspektrometrie von Bedeutung sind, z. B. für die elementspezifische Detektion in der Gaschromatographie.[2)]

Für die Modellierung von Plasmen sind jetzt verfeinerte Modelle verfügbar, wie sie Bogaerts et al. entwickelt haben (siehe z. B. Lit.[3)]). Damit sind zunächst Untersuchungen der neuen Mikroplasmen und in Zukunft auch induktiv gekoppelter Plasmen für ihre Optimierung denkbar. Dieses ist besonders wichtig, um Matrixeffekte in der Laserablation in Verbindung mit der Plasmamassenspektrometrie zu minimieren, da gerade hier die Eigenschaften des Plasmas im Ionenabsaugbereich große Gradienten zeigen.

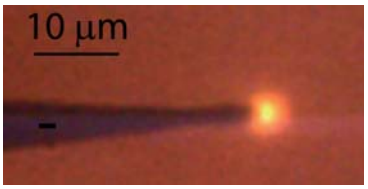

Abb. 1. Corona an der Spitze einer Elektrode, die sich in Blutplasma befindet (Durchmesser des Plasmas: circa 10 µm).[1)] (Copyright Wiley-VCH. Reproduced with permission)

In der Atomabsorptionsspektrometrie sind Untersuchungen zur Verflüchtigung weiterer Elemente als derjenigen, die flüchtige Hydride bilden, von aktuellem Interesse. Hierzu wurden mechanistische Studien durchgeführt, die eine bessere Optimierung und Ausnutzung der analytischen Güteziffern auch bei realen Proben ermöglichen werden. ➜

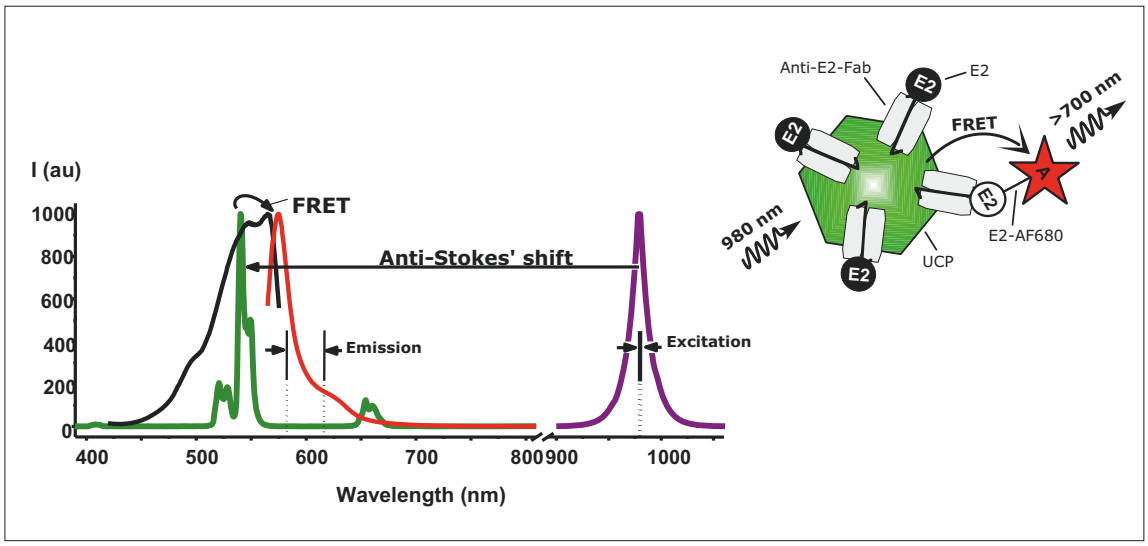

Abb. 2. Links: spektrale Analyse von Upconversion(UC)-FRET; Anregungs- (violett) und Emissionsspektrum (grün) eines UC-Nanopartikels ($NaYF_4$:Er^{3+},Yb^{3+}) und ß-Phycoerythrin (schwarz, bzw. rot) als Akzeptor. Rechts: Prinzip eines kompetitiven Immuntests für 17ß-Estradiol (E2) basierend auf UC-FRET mit Fab-Fragment modifizierten Nanopartikeln. (Abbildungen: T. Soukka)

Optische Verfahren: Photolumineszenz

◆ Lumineszente Detektionstechniken sind in der Bioanalytik – und in den Life Sciences allgemein – zu einem der wichtigsten Werkzeuge geworden. Die Fluoreszenzmarkierung von Zellen, Zellkompartimenten, Membranen oder Biomolekülen gehört zu den Hilfsmitteln, die zu den großen Errungenschaften der Zell- oder Molekularbiologie der letzten Jahre maßgeblich beigetragen haben. Zu nennen sind insbesondere bildgebende Methoden und Mikroskopie, die quantitative Real-time-PCR, die Gensequenzierung mit Kapillarelektrophorese (praktisch immer mit Fluoreszenzdetektion), die Genexpressionsanalyse mit DNA-Chips, die mittlerweile mit Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion verfeinerten Immunoassays, das industrielle Hochdurchsatz-Screening, die Durchflusszytometrie und die fluoreszente In-situ-Hybridisierung. Somit hat sich die Fluoreszenzanalyse in der Bioanalytik, Molekularbiologie, medizinischen Diagnostik und in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik voll etabliert. Die Verleihung des Chemie-Nobelpreises 2008 an Shimomura, Chalfie und Tsien für die Entdeckung, Isolierung, Expri-

mierung und Nutzbarmachung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) für analytische Zwecke unterstreicht dies.

Die Verfügbarkeit von Farbstoffen, die im nahen Infrarotbereich (NIR) absorbieren und emittieren, ist wegen des biologischen Absorptionsfensters, der minimalen Eigenfluoreszenz im Wellenlängenbereich von 650 bis 850 nm und der höheren Eindringtiefe von NIR-Licht in Gewebe eine Voraussetzung für viele bioanalytische Anwendungen. Vor allem Tsien hat die Einsatzmöglichkeiten von fluoreszierenden Proteinen durch die Entwicklung weiterer Farbvarianten einschließlich rot fluoreszierender Spezies erweitert. Somit ist es nicht verwunderlich, dass im Jahr 2009 ein infrarot fluoreszierendes Protein in Säugetierzellen exprimiert wurde, das Licht von 708 nm Wellenlänge emittiert.[4)]

Neue Möglichkeiten bieten Terbium-Komplexe als FRET(Förster-Resonanzenergietransfer)-Donoren, deren Emissionslinien für einen multiplen Energietransfer auf verschiedene Akzeptoren genutzt werden können. So lassen sich mehrere Parameter gleichzeitig bestimmen.[5)] Weitere vielversprechende Felder eröffnen sich durch lumineszente Nanopartikel, etwa für das Wirkstoff-Screening oder den Nachweis krankheitsspezifischer Veränderungen auf molekularer Ebene, teils mit In-vivo-Imaging. Oft werden diese kombiniert mit FRET-Techniken, Beispiel hierfür sind Goldnanopartikel zur Bestimmung von Matrixmetalloproteinasen.[6)]

Andere attraktive Materialien sind Upconversion-Nanopartikel, die im NIR angeregt werden können und im sichtbaren Bereich emittieren[7,8)] (Abbildung 2) oder Silica-Kern-Schale-Partikel, die multifunktionell beladen werden können und deshalb als Lab-on-Particle betitelt wurden.[9)]

Mit Lumineszenzfarbstoffen lassen sich nicht nur Biomoleküle

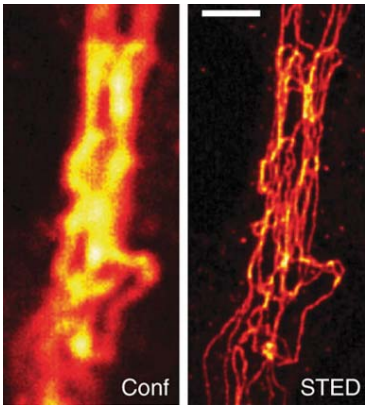

Abb. 3. Konfokale (Conf) und STED-Aufnahme von immun-markierten Vimentin (Intermediärfilament) in einer Säugetierzelle.[4)] (Mit freundlicher Genehmigung von Nature Publishing Group 2009)

markieren und sichtbar machen, sie dienen auch als molekulare Sonden zur Bestimmung chemischer Parameter wie pO_2, pH, pCO_2, Ca^{2+} oder K^+ in verschiedenen Probenmatrizes, auch intrazellulär. Derartige Sonden werden darüber hinaus in optischen Sensoren für die Blutanalyse eingesetzt. Multiple Lumineszenz-Sensoren mit verschiedene Sonden im selben Sensorbereich ermöglichen Mehrfachsensorik, wenn sich die Signale der Indikatoren spektral oder zeitaufgelöst trennen lassen.[10)]

Auf der instrumentellen Seite dominieren die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion und die Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern. Dies gilt auch für die Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. Da die Nachweisgrenze der Fluoreszenz bis zur Einzelmoleküldetektion verbessert wurde, sind entsprechend empfindliche Detektorarrays gefragt. Üblicherweise werden Avalanche-Photodioden in Kombination mit konfokalen Mikroskopen eingesetzt, mit denen sich das Anregungslicht auf ein kleines Volumensegment der Probe fokussieren lässt. Gekühlte CCD(Charged Coupled Device)-Kameras mit immer besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnissen ermöglichen auch Einzelmolekülbeobachtung mit Weitfeldmikroskopie.[11)] Vielversprechend scheint ein Aufbau, der auf Total-Internal-Reflection(TIR)-Mikroskopie und Evaneszentfeld-Anregung beruht und das Anregungsvolumen minimiert.[12)] Die Verbesserung der lateralen Auflösung in der Fernfeldmikroskopie ist ein weiterer Meilenstein in der Fluoreszenzmikroskopie.

Die STED-Mikroskopie (stimulated emission depletion) bildet die die Grundlage, die Abbesche Beugungsgrenze zu umgehen und damit Strukturen abzubilden, die kleiner als 100 nm, zuletzt sogar bis hin zu 20 nm sind (Abbildung 3).[13)] Ähnliche Verbesserung der Auflösung erzielt eine Photoschaltung zwischen einem fluoreszenten und einem deaktivierten Zustand der eingesetzten Farbstoffe.[14)]

Optische Verfahren: Raman-Mikro- und Nanospektroskopie

◆ Die Kombination Raman-spektroskopischer Techniken mit einem Mikroskop ermöglicht die Aufnahme von mikrometeraufgelösten Bildern mit labelfreiem chemischen Kontrast. Nachteil dieser klassischen Raman-Methode ist jedoch der niedrige Raman-Streuquerschnitt, woraus ein relativ großer Zeitbedarf resultiert, um ein komplettes Raman-Bild aufzunehmen.

Nichtlineare Raman-Techniken wie CARS(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering)-[15)] oder SRS(Stimulated Raman Scattering)[16)]-Mikroskopie sind jedoch Ansätze, die Aufnahmezeiten zu verkürzen. Raman-Bilder können hiermit in Echtzeit mit Video-Wiederholungsrate

aufgezeichnet werden. Diese nichtlinearen Raman-Methoden beruhen darauf, dass zwei Laserstrahlen durch eine Probe geschickt werden und dort Moleküle zu kohärenten In-Phase-Schwingungen anregen. Abbildung 4 zeigt den Einsatz der Raman- und CARS-Mikroskopie in der Gewebediagnostik. Eine Übersicht biomedizinischer Raman-Studien findet sich in Lit.[17)]

Möchte man die räumliche Auflösung bis auf wenige Nanometer steigern, so lässt sich dies durch die Kombination von Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) mit dem Raman-Signal verstärkenden SERS-(Surface-Enhanced Raman Scattering)-Verfahren erreichen. Bei diesem als TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy) bezeichneter Ansatz wird ein einzelnes Silberpartikel an der Spitze eines AFM-Cantilevers gebunden und mit einem Laser aktiviert.[18)] Durch den SERS-Effekt werden zum einen die Raman-Signale von Molekülen in der Nähe des Silberpartikels verstärkt, zum anderen wird dieser Effekt durch die Verstärkungsregion von wenigen Nanometern auf einen sehr begrenzten Bereich beschränkt. Dadurch gelingt nanometeraufgelöste Raman-Spektroskopie an biologischen Proben, z. B. an einzelnen Viren.[19)]

Das Potenzial der nichtlinearen Raman-Mikroskopie und von TERS für In-vivo-Untersuchungen wird in den nächsten Jahren weiter erschlossen werden.

Die Nutzung der elektromagnetischen Eigenschaften von Nanopartikeln für SERS ist wohlbekannt und findet immer neue Anwendungen. Die Anregung von Oberflächen-Plasmonen in Nanopartikeln mit funktionalisierten Oberflächen lässt sich auch mit anderen spektroskopischen Verfahren kombinieren. Einen umfassenden Überblick über Mechanismen und Anwendungen findet sich bei Zhao et al.[20)] Nachdem die Absorptionen in Folge von Plasmonenanregung im sichtbaren Spektralbereich stattfinden, ist es einfach, entsprechende Sensorsysteme auszulesen und sie beispielsweise auch in einen Mikrochip zu integrieren.

Optische Verfahren: Terahertzspektroskopie

◆ Der Terahertz-Spektralbereich (0,2 bis 2 THz) war lange Zeit vernachlässigt, weil kaum Emissionsquellen zur Verfügung standen. Der Grund dafür ist, dass sich dieser Bereich an der Grenze zwischen direkter Emission elektromagnetischer Wellen niedriger Frequenz über Antennen einerseits und der Emission von höherfrequenten Lichtquanten bei Übergängen in Halbleitern und anderen optisch aktiven Medien andererseits befindet. THz-Wellen tauchen immer wieder in der Presse als neues Sicherheitssystem auf. Allerdings stehen dabei eher bildgebende als spektroskopische Verfahren im Vordergrund (Stichwort Nacktscanner). Neue und einfach zu bedienende THz-Quellen sorgen aber auch für eine wachsende Zahl von Publikationen über spektroskopische Anwendungen in der analytischen Chemie.

Eine Möglichkeit, einen breitbandigen THz-Impuls zu erzeugen, basiert auf der Absorption eines fs-Laserpulses in einem nichtlinearen

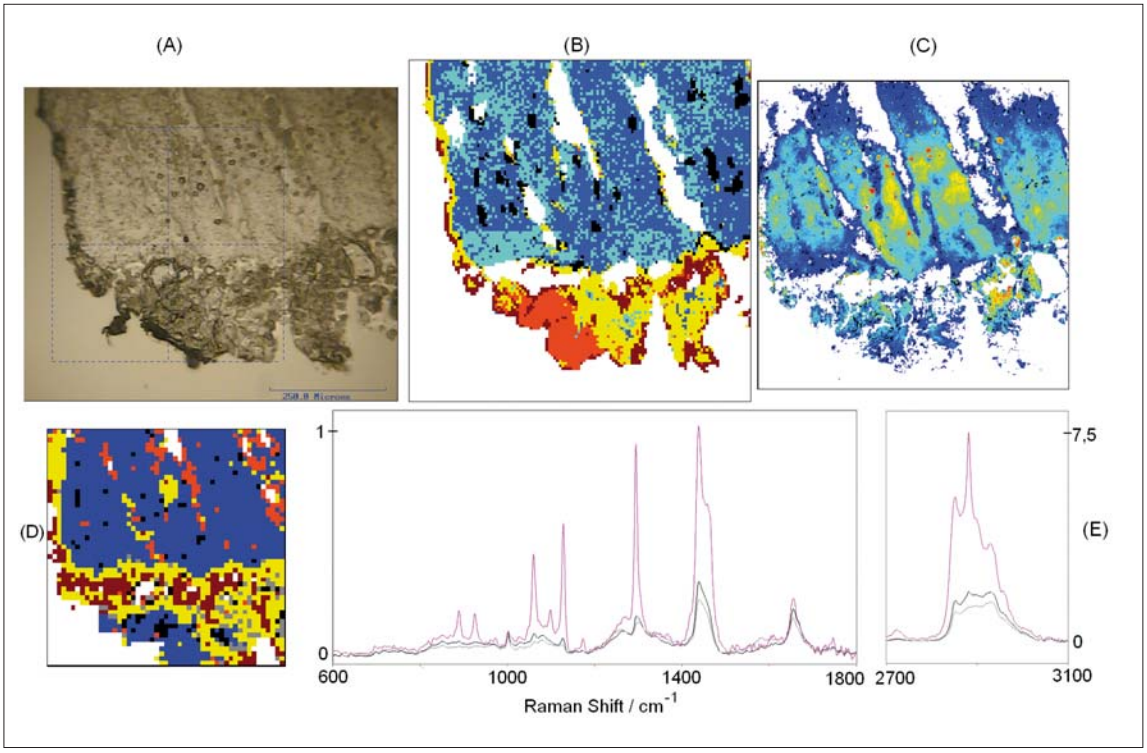

Abb. 4. Darmschnitt eines Menschen: a) Mikroskopiebild, b) 128 × 128 FTIR-Bild einer Fläche von 500 × 500 µm, c) CARS-Bild einer Fläche von 636 × 636 µm, d) 51 × 51 Raman-Bild einer Fläche von 500x500 µm und e) Raman-Spektren. Das CARS-Bild (c) wurde bei 2850 cm^{-1} aufgenommen und zeigt die räumliche Verteilung von CH-Streckschwingungsoszillatoren. Die Farben in den Raman- und FTIR-Bildern entsprechen der Gruppenzuordnung einer Clusteranalyse.

optischen Kristall oder in einem speziellen Halbleiter. Über einen analogen Mechanismus werden THz-Pulse zeitaufgelöst detektiert, wobei sie mit einem ultrakurzen Laserpuls in einem entsprechenden Kristall zeitlich überlagert werden. Eine spektral aufgelöste Messung ist über die Fourier-Analyse der zeitaufgelöst gemessenen THz-Intensität möglich.

Kontinuierliche THz-Strahlung kann über Quantenkaskadenlaser (QCL) ebenso wie über Frequenzmischung in nichtlinearen optischen Kristallen erzeugt werden. Anwendungen sind insbesondere für die pharmazeutische Analytik und für die von Explosivstoffen beschrieben.[21)]

Klassische analytische Aufgaben wie die Untersuchung von binären und ternären Mischungen von Biomolekülen finden sich ebenfalls in der Literatur. Dabei ist die Messung nicht nur in Transmission möglich, sondern auch in Reflexion und sogar mit diffuser Reflexion.

Ein mikrofluidisches System mit integriertem Sub-Terahertz-Absorptionsspektrometer zur Analyse von Enzymreaktionen haben Abbas et al. beschrieben.[22)]

Trenntechniken und Massenspektrometrie-Kopplungen

◆ Unter den Flüssigphasen-Trenntechniken bleibt die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) die dominierende Technik. Aber bei elektrophoretischen Prinzipien, besonders bei der Kapillarelektrophorese (CE) sind wiederum mehr Anwendungen zu beobachten, vor allem in der chemischen und biotechnischen Industrie. Dies äußerte sich unter anderem dadurch, dass seit längerer Zeit wieder einer der großen Hersteller von Analysengeräten ein überarbeitetes Gerät für die CE einführte.

Ein Fortschritt im molekularen Verständnis des chromatographischen Prozesses gelang durch die direkte Visualisierung der Dynamik des Adsorptionsprozesses auf Oberflächen mit einzelnen DNA- und Protein-Molekülen.[23)]

In der HPLC setzt sich der Trend zu kürzeren Analysenzeiten durch schnelle Trennungen bei hohem Druck (UHPLC) fort. Inzwischen sind von praktisch allen größeren Herstellern HPLC-Instrumente mit einem oberen Drucklimit von 800 bis 1200 bar auf dem Markt. Auch die Anwendung höherer Trenntemperaturen findet stärkeren Anklang, und die Zurückhaltung vor Trenntemperaturen >70 °C scheint überwunden.

Ein großes Thema war im Jahr 2009 der im Zuge der Wirtschaftskrise aufgetretene Engpass an Acetonitril. Dieser veranlasste Forscher und Firmen, nach Alternativen wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol zu suchen und Trennungen bei hohen Temperaturen durchzuführen.[24)] ➜

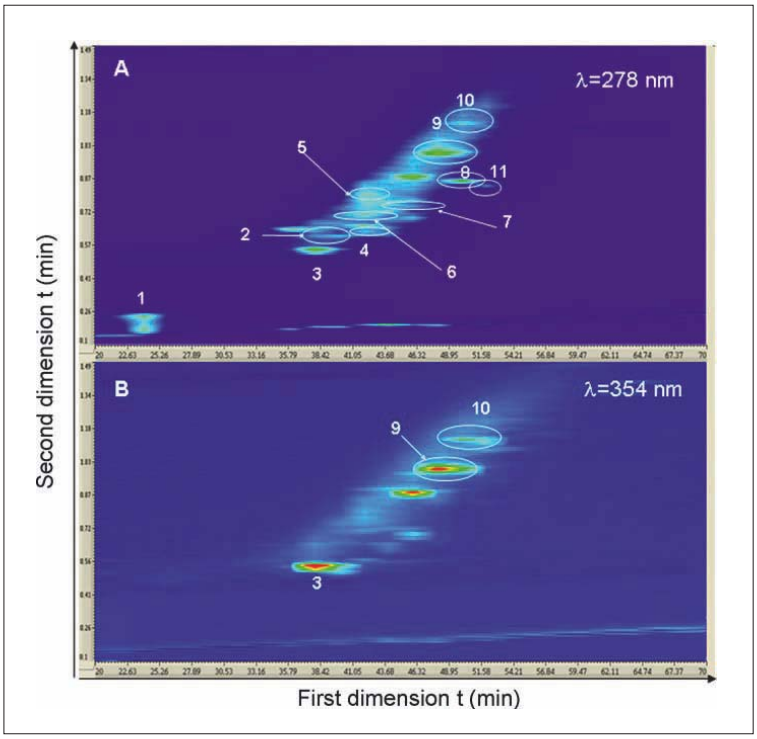

Abb. 5. Zweidimensionale chromatographische Trennung und Quantifizierung von polyphenolischen Verbindungen in Rotwein.[26)]
(Copyright 2009 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Auf der Seite der stationären Phasen findet man immer mehr Anwendungen von sub-2-µm-porösen Partikeln und Monolithen. Unter den monolithischen stationären Phasen nimmt der Anteil von organisch-polymeren Monolithen ständig zu. Erstmals wurden auch eine größere Zahl von Trennungen kleiner Moleküle auf organischen Monolithen präsentiert.[25)]

Für die Analyse komplexer Probenmischungen wird verstärkt die mehrdimensionale Chromatographie eingesetzt, immer mehr auch in umfassender Ausführungsform (comprehensive LC×LC). Abbildung 5 zeigt beispielsweise die zweidimensionale Trennung polyphenolischer Komponenten in Rotwein durch eine Kombination aus Umkehrphasen-HPLC auf einer konventionellen Phenylsäule und einer oberflächenporösen Octadecylsäule.[26)]

Die neueste Generation von Flugzeit- und Orbitrap-Massenanalysatoren erzielt Massengenauigkeiten von ≤ 1 ppm, dadurch gewinnt die akkurate Masse als Identifizierungsmerkmal im Anschluss an Trennungen an Bedeutung. Diese hohen Massengenauigkeiten sind auch bei der Interpretation von Fragmentionenspektren eine große Unterstützung, da sich Fragmentmassen und Massendifferenzen vielfach Summenformeln zuordnen lassen.

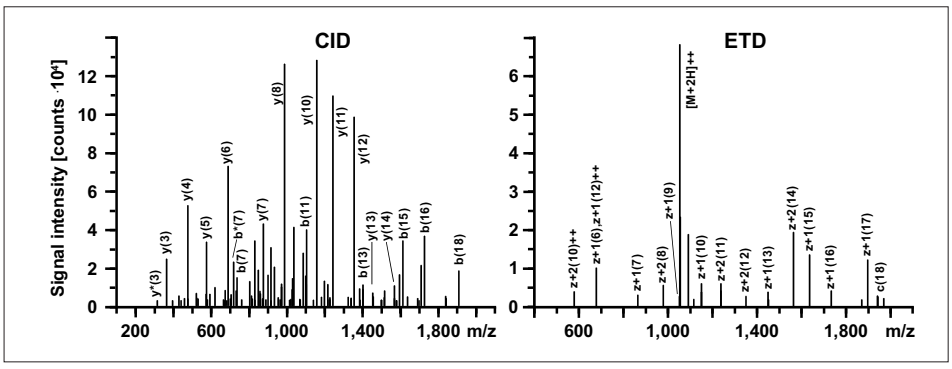

Abb. 6. Fragmentionenspektren des Peptides ADYVANVLSGLNWDVINAR, fragmentiert durch kollisionsinduzierten Dissoziation (CID, links) und Elektronen-Transfer-Dissoziation (ETD, rechts).[27)] *(Copyright 2009, mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society)*

Bei der Fragmentierung biologischer Moleküle, vor allem von Peptiden und Proteinen, ist die Elektronen-Transfer-Dissoziation (ETD) eine Alternative zur etablierten kollisionsinduzierten Dissoziation (CID). Die Ausbeute an mit beiden Techniken identifizierbaren Peptiden nach Optimierung der Datenbanksuche nähert sich langsam an.[27)] Abbildung 6 zeigt die Gegenüberstellung von zwei mit CID und ETD gewonnenen Fragmentionenspektren eines Peptids aus dem Proteom des Bodenbakteriums *Sorangium cellulosum*.[27)]

Entwicklungen in der Massenspektrometrie

◆ In unserem letzten Trendbericht [*Nachr. Chem.* 2008, *58*, 418] haben wir ausführlich über die Orbitrap-Technik berichtet. Hier soll nun erwähnt werden, dass Alexander Makarov, Thermo Fisher Scientific, Bremen, auf der IMSC in Bremen für seine Pionierarbeit den Curt Brunnée Award erhielt. In nahezu atemberaubendem Tempo hat sich die Orbitrap-Technik weiterentwickelt und ist nun mit dem neuen Exactive-System auf Benchtop-Dimensionen geschrumpft, mit dem sich auf jedem Labortisch neue Möglichkeiten in der LC-MS eröffnen.

Eine weitere bemerkenswerte Geräteentwicklung, die lange Zeit nur in Form von Laborprototypen sichtbar war, ist das Waters-Synapt-HDMS-System. Es kombiniert die Ionen-Mobilitätsspektrometrie (IMS) mit der Time-of-Flight-Massenspektrometrie (ToF-MS). Ergänzt durch leistungsstarke Trenntechniken (UPLC) eröffnen sich im IMS durch die Unterschiede in der Driftzeit von Molekülen neue Trennmöglichkeiten, die besonders die Proteomforschung nutzen kann, beispielsweise bei der Aufklärung von posttranslationalen Modifikationen von Pro-

teinen. Weitere Anwendungsbereiche finden sich bei der Aufklärung von Glyko- oder Lipidstrukturen (Abbildung 7, S. 230). Die Vorteile sind, dass sich isomere und isobare Komponenten im Spektrum trennen und Konformationsunterschiede messen lassen.[28)] Dazu kommt ein deutlich reduzierter chemischer Untergrund und damit einer geringere Komplexität der Massenspektren.

Pionierarbeit bei der Geräte- und bei der zugehörigen Softwareentwicklung für das Bioimaging hat die Arbeitsgruppe um Bernhard Spengler an der Universität Gießen geleistet. Das von dieser Gruppe vorgestellte neue Massenspektrometerkonzept basiert auf einem MALDI-System mit sehr hoher Ortsauflösung, das in einem scannenden Betriebsmode operiert und mit wenigen Handgriffen an ein konventionelles LTQ-Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron(FT-ICR)-MS gekoppelt werden kann.[29)] Dabei kommt die hohe Massenauflösung, wenn auch mit eingeschränkter Empfindlichkeit, besonders bei komplexen biologischen Proben zur Geltung (im FT-ICR-Mode), während die hohe Empfindlichkeit im LTQ-Mode für die Analyse einzelner Laserschüsse mit Pixelgrößen bis hinunter zu 8 µm genutzt werden kann. Massenspektren können von einzelnen Laserschüssen aufgezeichnet werden, um Dünnschnitte biologischer oder medizinischer Proben zu analysieren.

Sabine Becker hat am Forschungszentrum Jülich ein bildgebendes Verfahren mit Laser-Ablation-ICP-MS zum Bioimaging von Metallverteilungen in Dünnschnitten entwickelt (Abbildung 8, S. 232). Damit lassen sich Metallverteilungen beispielsweise in biologischen oder medizinischen Objekten der Größe eines menschlichen Gehirns bestimmen.[30)]

Die nächste Entwicklung, die hier vorgestellt werden soll, liegt an der Schnittstelle zwischen organischer und anorganischer Massenspektrometrie. Im Rahmen eines EU-Projekts ist ein ToF-MS entwickelt worden mit einer gepulsten Radiofrequenzentladung als Ionenquelle, das so auch nichtleitende Materialien analysiert. Die Detektion wird zeitlich mit der Entladungsdauer synchronisiert. In der Entladungsphase geben die Spektren mehr die atomare Zusammensetzung wieder, während in der Abklingphase (Afterglow) die molekulare Zusammensetzung der Probe erhalten bleibt. Dies er-

möglicht beispielsweise die Analyse von Polymermaterialien[31] oder eignet sich zur Detektion von negativen Ionen in halogenierten Polymeren.[32]

Elektrochemische Analytik

◆ In der elektrochemischen Analytik gibt es einen Trend zu mikro- und nanostrukturierten Materialien in Sensoren. Diese Materialien erhöhen zum einen die Oberfläche und erleichtern den Abtransport des Analyten, zum anderen ist es etwa in der Bioanalytik damit möglich, biologische Erkennungskomponenten an die Elektrode optimal anzubinden.

Neue Strategien zum gezielten Aufbau von Mikro- und Nanostrukturen werden vorgeschlagen. So erzeugen Soleymani et al. zunächst ein Array von acht individuell adressierbaren Gold-Mikroelektroden mit einem Durchmesser von ca. 500 nm als Basis für durch Elektrodeposition abgeschiedene nanostrukturierte Pd-Strukturen, deren Morphologie durch die Abscheideparameter gezielt variiert werden kann. In der DNA-Detektion werden mit derartig mikrostrukturierten Elektroden Nachweisgrenzen von 1 fM erreicht.[33]

Wen et al. erzeugen Arrays aus geordneten Kohlenstoffnanoröhren (carbon nanotubes, CNTs) mit inkorporierten Pt-Nanopartikeln als Basis für Glucose-Biosensoren. Die Arrays wird über hydrothermale Infiltration von porösen Alumina-Membranen mit Glucose und anschließende Carbonisierung hergestellt. Ein Komposit aus den Pt-CNT-Arrays mit Glucoseoxidase zeigt eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit für Glucose.[34]

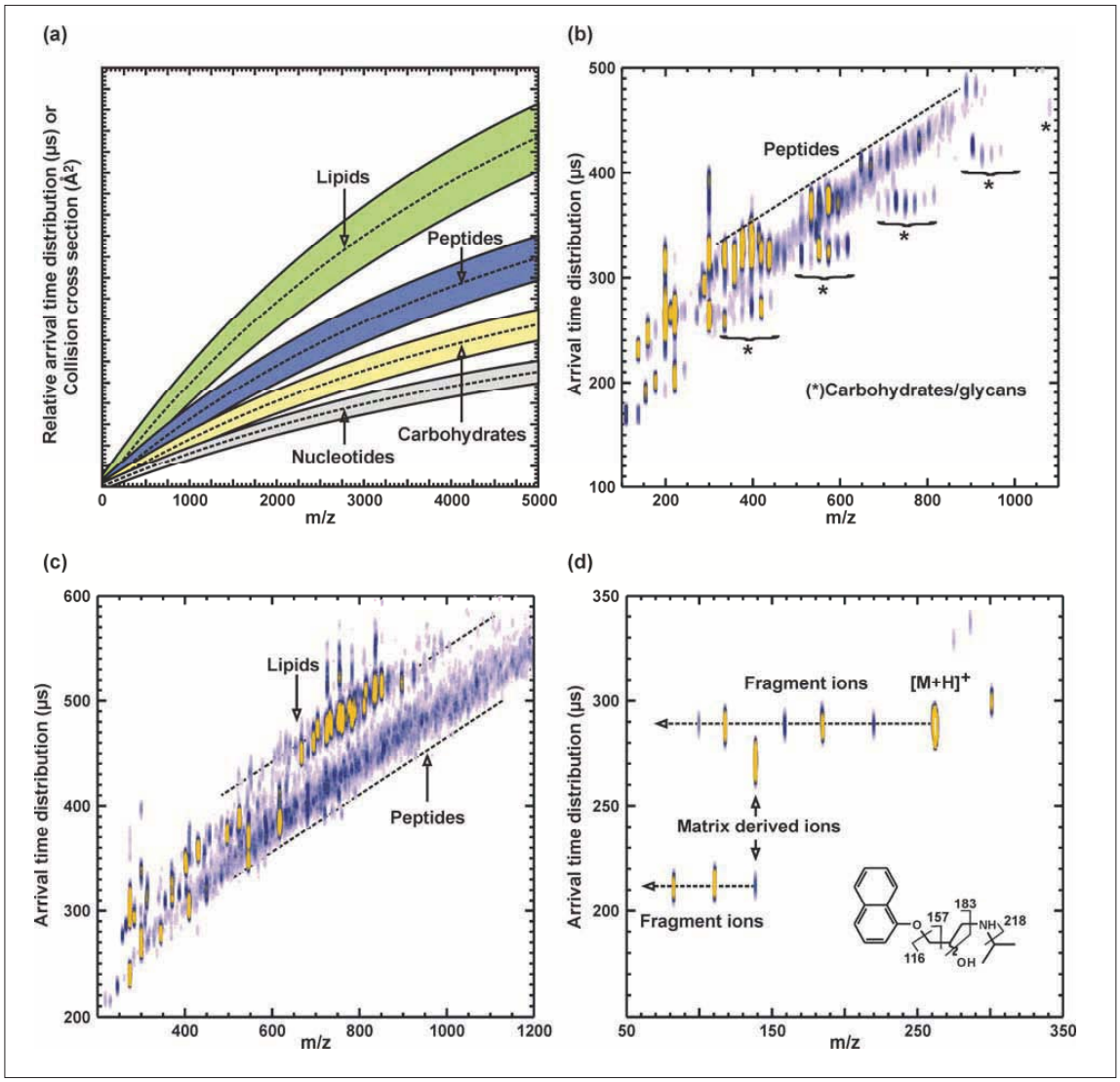

Abb. 7. a) Schema, wo einfach geladene Ionen verschiedener Klassen von Biomolekülen in einer MALDI-MS-Messung zu finden sind, wenn sie mit der Driftzeit (Ionenmobilität: IM) verknüpft werden. b) Beispiel für einen 2-D-Plot einer MALDI-IM-Messung zur simultanen Messung von Peptiden und Glykanen des Glykoproteins Ribonuclease b. c) Beispiel für einen 2-D-Plot einer MALDI-IM-Messung einer direkten Messung eines Gewebe-Dünnschnitts eines humanen Gewebes (gefrorenes Gehirntumorgewebe). d) Beispiel für einen 2-D-Plot einer MALDI-IM-Messung im CID-Mode des Wirkstoffs Propanolol. CID-Zerfall des Mutterions bei m/z = 260.

(Mit freundlicher Genehmigung von John A. McLean und Springer Science and Business Media aus: L. S. Fenn, J. A. McLean, Anal. Bioanal. Chem. *2008, 398, 906.)*

Auch die Suche nach neuen Materialien für die elektrochemische Analytik wird fortgeführt. Viele dieser Materialien zeigen elektrokatalytische Aktivität und sind daher eng verbunden mit Arbeiten aus der Elektrokatalyse. In den Fokus gerückt sind in den letzten Jahren stickstoffmodifizierte Kohlenstoffnanoröhren (N-CNTs, nitrogen-modified carbon nanotubes). Kundu et al. synthetisieren und charakterisieren N-CNTs, die an der Oberfläche nahezu metallfrei sind. Die katalytische Aktivität dieser N-CNTs für die elektrokatalytische Sauerstoffreduktion ist nur um eine Größenordnung kleiner als die von platinbasierten Katalysatoren. Die Autoren korrelieren das Auftreten von pyridinischem Stickstoff sowie graphitischen Kanten mit hoher katalytischer Aktivität.[35)] Diese katalytische Aktivität stickstoffmodifizierter Kohlenstoffe machen sich Tang et al. zu Nutze, um neue Materialien für die elektrochemische Analytik vorzuschlagen. Anstelle von Kohlenstoffnanoröhren verwenden sie jedoch „nitrogen doped carbon nanotube cups“ (NCNCs), also glockenförmige, ineinander gestapelte Kohlenstoffstrukturen (Abbildung 9, S. 232). An diesen kann H_2O_2 direkt umgesetzt werden; für den Glucosenachweis wird ein Komposit aus NCNC und Glucoseoxidase auf ein Glaskohlenstoffsubstrat aufgebracht.[36)]

Bioanalytik: Immunoassays

◆ Die meisten antikörperbasierten (immunologischen) Assays benötigen Markierungsverfahren, um antikörpergebundene und freie Analytmoleküle für die Bestimmung unbekannter Proben zu differenzieren. Zwar haben Enzym- und Fluoreszenzlabel noch immer die Nase vorn, Nanopartikel rücken als neuartige Label aber unübersehbar in den Vordergrund, wegen ihrer einzigartigen einstellbaren größen- und formabhängigen chemischen und physikalischen (vor allem optischen) Eigenschaften. Neben Halbleitern (Quantenpunkte)[37)], Edelmetallen (Gold, Silber)[38)], magnetischen[39)] und Raman-aktiven Partikeln[40)] sind biofunktionalisierte dotierte Silica-Core-Shell-Nanokomposite interessant[41,42)] (Abbildung 10, S. 232).

Generell eröffnet die Kombination aus hoher Spezifität (bedingt durch die immobilisierte biologische Komponente) und ultrasensitiver Detektion des Nanolabels neue Wege, z. B. für die Einzelmolekülдetektion[43)] und die Entwicklung nachweisstarker Multianalyt-Verfahren. Noch sind die entsprechenden Verfahren nur Arbeitsgruppen vorbehalten, die über das Know-how in Synthese, Reinigung und Qualitätskontrolle der Nanobiokomposite verfügen. Hier sind robustere Methoden gefragt, um Partikel von gewünschter Größe und Form, guter Wasserlöslichkeit, optimaler Oberflächenfunktionalisierung und ausreichender Stabilität zu erhalten.

Eine interessante biologische Partikelsynthesemethode haben Jääskeläinen et al.[44)] vorgeschlagen. So ist es kein Problem, ein Fusionsprotein aus einem Hüllprotein und einer Anzahl von Bindungsmolekülen (hier Antikörperfragmente) gentechnisch herzustellen. Im konkreten Fall wurde humanes Ferritin mit rekombinanten Antikörperfragmenten (single chain variable fragments, scFv) gegen das Schilddrüsen-stimulierende Hormon (TSH) in Bakterien rekombinant produziert und anschließend gereinigt. Durch spontane Faltung und Ausbildung von Proteinpartikeln (Durchmesser < 20 nm) gelangen die Antikörperbindungsfragmente in korrekter Orientierung (freier Analytbindungsregion) an die Oberfläche der Partikel. Die Dotierung erfolgte durch passive Einlagerung von Eu^{3+}-Ionen (Abbildung 11, S. 233). Es können jedoch auch andere Markermoleküle verwendet werden. Obwohl sich der Prozess durch hervorragende Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität sowie einfaches Upscaling auszeichnet, werden ihn vorerst nur gentechnisch versierte Laboratorien nutzen können. ➜

Chemo- und Biosensoren

◆ Definitionsgemäß besteht ein Sensor aus einer den Analyt erkennenden Grenzfläche, einem Wandler, der die Wechselwirkung des Analyten mit dem Rezeptor in ein optisches oder elektrisches Signal umformt, und der Datenauswertung.

Häufig und mit steigender Tendenz werden künstliche Rezeptoren, die bei der Interaktion z. B. ihre optischen Eigenschaften ändern, als Sensor bezeichnet. Hier werden sich in den nächsten Jahren die Definitionen ändern, da mit fortschreitender Miniaturisierung immer mehr komplette Sensorsysteme entwickelt werden.

Bei der optischen Auslesung sind Arrayanordnungen (Microarray) oder Mikro- und Nanopartikel als Basis für parallele Erkennung und Auswertung im Vormarsch. Beispiel ist ein Multiplex-Mikropartikel-Array, der mit individuell an Mikropartikeln gebundenen Antikörpern zehn inflammatorische Markerproteine am Ende eines faseroptischen Faserbündels quantitativ und qualitativ erkennt.[45] Die Nutzung eines 2-D-Mikroarrays mit punktförmig aufgebrachten Rezeptoren, etwa um trinkwasserrelevante Mikroorganismen zu erfassen, beruht auf der Che-

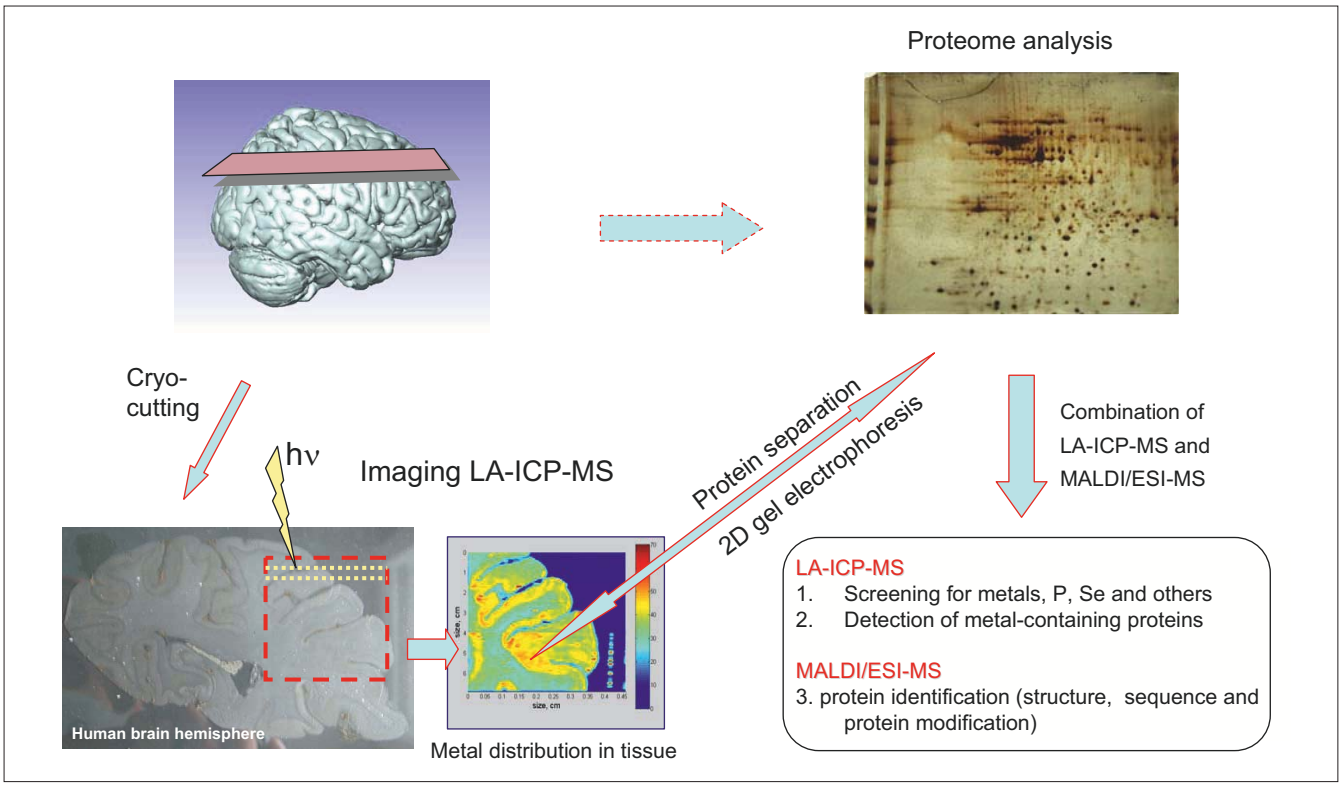

Abb. 8. Strategie von J. Sabine Becker beim Imaging von Gewebedünnschnitten. Die Laser-Ablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) dient zum Screenen der Metalle, und die Proteomanalyse soll dann die zugehörigen Metalloproteine identifizieren und helfen, deren biologische Rolle aufzuklären. (Mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry, weitere Details in Lit.[32]).

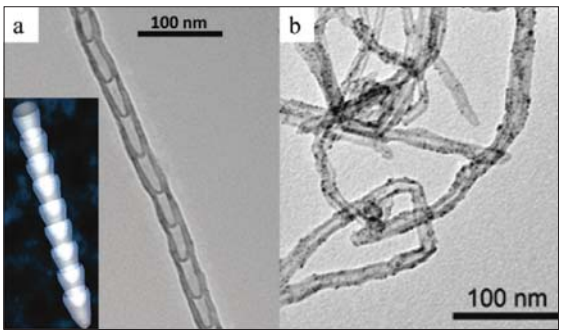

Abb. 9. a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von gestapelten, Stickstoff-dotierten carbon nanotube cups; Insert: Orientierung der gestapelten cups; b) TEM Aufnahme von Pt/CNT, die als Vergleichsmaterial dienten. (Aus Lit.[37])

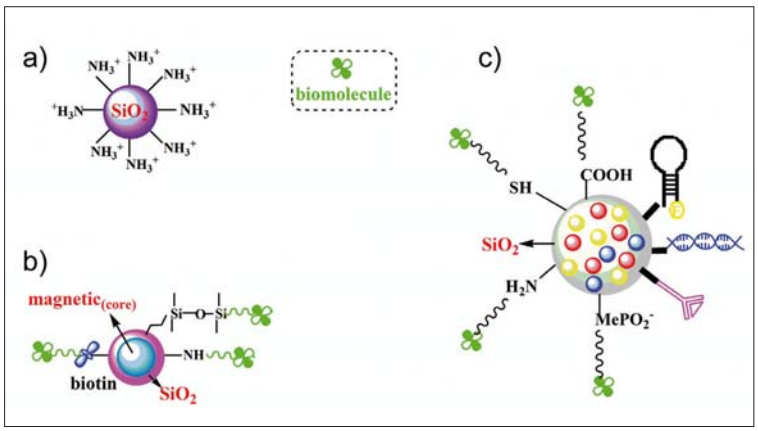

Abb. 10. Möglichkeiten zur Biokonjugation von Silica-Nanopartikeln mit verschiedenen Liganden; a) über elektrostatische Anziehung; b) Nanokomposit-Partikel mit magnetischem Kern und SiO_2-Schale mit funktionalisierter Oberfläche; c) Luminophor/QD(quantum dot)/Raman-Label-dotierter SiO_2-Nanopartikel mit funktionalisierter Oberfläche. (Aus Lit.[43])

milumineszenz im FIA(Fließinjektionsanalyse)-Betrieb.[46)] Eine Plattform enthält alle Reagenzien, führt vollautomatisch eine 200-µL-Wasserprobe dem Array zu und dosiert weitere Detektionsantikörper in den Probenstrom, die mit dem Enzym Peroxidase markiert sind. Die Intensität der auf dem Array ausgelösten Lumineszenz wird ausgelesen und im integrierten Rechner verarbeitet.[47)] Damit werden vier Spezies in 30 min im Bereich > 10^3 cfu·mL^{-1} erkenn- und quantifizierbar. Weitere Arraychips zur selben Plattform sind für Antibiotika in Milch und für Mykotoxine in Lebensmitteln in der Entwicklung.

Als unmarkierte Rezeptoren verwendbare Optoden wurden ebenfalls weiterentwickelt. So wurden ionenselektive submikrometergroße Partikel mit Chromoionophoren im Emulsionspolymerprozess erzeugt, die sich für die Bestimmung von gelöstem Na, K und Ca eignen.[47)]

Fluoreszierende Proteine als Rezeptoren in Biosensoren sind auf dem Vormarsch. Eine Einführung mit Übersicht dazu (mit Podcast) ist als Featureartikel zugänglich.[48)]

Interessant ist die Kopplung der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) mit antikörperverknüpften magnetischen Nanopartikeln, um Analyten anzureichern und Signale zu verstärken. Vorgestellt wurde dies in Kombination mit einer tragbaren 24-Kanal-SPR-Plattform.[49)] Anwendungsgebiet ist auch hier die Toxinanalytik. Staphylokokken-Enterotoxin ist damit noch bis zu einer Konzentration von 100 ng·L^{-1} nachweisbar.

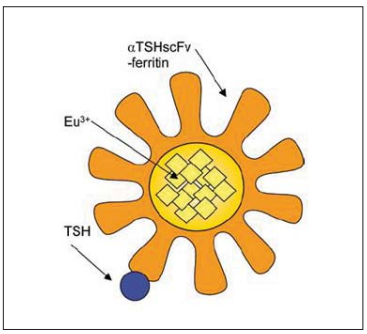

Abb. 11. Funktionalisiertes Proteinnanopartikel aus einer globulären Proteinhülle (Ferritin) mit Europiumionen-Dotierung (Label) und TSHscFv (Antikörperfragmente gegen das Schilddrüsen-stimulierende Hormon) auf der Partikeloberfläche; (TSH – Schilddrüsen-stimulierendes Hormon). (Aus Lit.[45)])

Eine eher seltene Anwendung ist die Erkennung der Enantiomerenreinheit mit einem Massenschwinger.[50)] Wie bei allen Biosensoren sind das Finden und Applizieren von Rezeptoren (in diesem Beispiel chirale Cyclodextrinderivate) der Schlüssel. Der Transducer aus 128 frei schwingenden Fingerpaaren in einem kapazitiven Mikrosensor-Bauelement ist für die Selektivität eher zweitrangig, aber instrumentell anspruchsvoll.

In den letzten zwei Jahren wurde über zahllose Weiterentwicklungen elektrischer oder optischer Sensorprinzipien berichtet. Für die analytische Chemie entscheidend sind Anwendungen für große Moleküle oder intakte Organismen. Anwendungen der Zukunft liegen in den Life Sciences, etwa in der Lebensmittelüberwachung oder im klinisch-chemischen Screening.

Die Prozessanalytik dagegen ist auf gereifte Sensortechniken angewiesen, deren Messverfahren auf Kompatibilität mit dem zu überwachenden Prozess ausgerichtet sind. Daher gehört die Prozessanalytik nicht zu den Treibern bei Chemo- und Biosensoren.[51)]

Chemometrik

◆ Nach wie vor liegt ein Schwerpunkt der methodischen Entwicklung der Chemometrik auf dem Gebiet der künstlichen neuronalen Netze. Neue, auch robuste Algorithmen und ein sich ständig erweiterndes Anwendungsfeld kennzeichnen einen weiteren Schwerpunkt, die Partial-Least-Squares-Regression. Methodische Arbeiten zur multivariaten Kalibration umfassen neben den genannten Techniken vermehrt Arbeiten zu Mehrwegemethoden und zur Variablenselektion. Bilineare Regressionsmethoden sind als neue Entwicklung zu nennen. Nichtparametrische und nichtlineare Klassifikationsmethoden werden neben den klassischen Verfahren weiterentwickelt. Hierbei ist die

Methode der Support-Vektor-Maschinen hervorzuheben.

Interessant sind vor allem im Zusammenhang mit der Entwicklung bildgebender Analysenmethoden neue nichtlineare Projektionsmethoden und Methoden der Imageanalyse.

Weiterhin im Fokus des Interesses steht eine Vielzahl von Methoden der multivariaten Signalbehandlung, oft zur multivariaten Kurvenauflösung angewendet. Eine vielversprechende Technik zur Signalauflösung und -entrauschung ist die Wavelet-Transformation.

Bei der weiter stark zunehmenden Zahl an Veröffentlichungen zur Chemometrik dominieren anwendungsorientierte Arbeiten, die mehr und mehr über die Chemie hinausgehen, so dass letztlich auch manche Gebiete der Chemometrik mit Disziplinen wie Informatik, Chemoinformatik, Bioinformatik etc. verschmelzen.

Einsatzgebiete sind vor allem die quantitative Modellierung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen, die Imageanalyse hochdimensionaler Daten (hyperspectral imaging), sowie mannigfaltige Anwendungen in der „Omik"-Forschung.

Chemometrische Methoden werden immer stärker essenzieller Bestandteil der Prozessanalytik, wobei hier zunehmend die multivariate Betrachtungsweise greift. Erfreulicherweise finden auch mit wieder steigender Tendenz Prinzipien der statistischen Versuchsplanung Anwendung zur Optimierung analytischer Methoden, insbesondere in Chromatographie und Spektroskopie.

Eine Vielzahl gut dokumentierter, anwendungsorientierter Softwarepakete ermöglicht einen guten Zugang und damit eine leichtere Anwendbarkeit auch neuerer chemometrischer Methoden. Die bisher nicht schlechte Situation auf dem Gebiet der chemometrischen Literatur hat sich durch die Veröffentlichung des auf hohem wissenschaftlichen Niveau verfassten Handbuchs „Comprehensive Chemometrics" von Brown, Tauler und Walczak,[52] noch verbessert.

Metrologie und Referenzmaterialien

◆ Für alle drei Säulen der internationalen Infrastruktur für Messungen wurden in letzter Zeit Dokumente verabschiedet und publiziert, die weitreichende Auswirkungen haben werden. Das „Internationale Vokabular der Metrologie" (auch als ISO Guide 99 bezeichnet) fasst in seiner dritten Auflage grundlegende metrologische Konzepte und Begriffe zusammen.[53] Die Akkreditierung wurde mit der Direktive 765/2008/EC in der Europäischen Union auf eine einheitliche rechtliche Basis gestellt und die European co-operation for Accreditation erhielt den Auftrag, Kompetenzbeurteilungen, unter anderem von analytischen Laboratorien nach ISO/IEC 17025, weiter zu harmonisieren. Der ISO Guide 34, der die notwendigen Fachkompetenzen von Referenzmaterial-Produzenten festhält und als deren Akkreditierungsstandard dient, wurde vollständig überarbeitet.[54]

Die europäische Gesetzgebung setzt zunehmend den Rahmen für die internationale Vergleichbarkeit von Analysenergebnissen. So wurde im Juli 2008 eine Direktive im Rahmen der EU-Wasserrahmenrichtlinie (Water Framework Directive, WFD) verabschiedet, die Qualitätsparameter für chemisch-analytische Verfahren festlegt und damit auch den Einsatz nichtstandardisierter Analysenverfahren im WFD-Monitoring zulässt.[55]

Neben zuverlässigen Kontrollen im Lebensmittel- und Umweltbereich stellen Medizin, Welthandel und Konsumgütersicherheit und -kennzeichnung erhebliche neue Anforderungen an Entwickler und Anwender von Referenzmaterialien. Dies fordert von Analysenlabors zunehmend ein kritischeres Herangehen an die wissenschaftlich abgesicherte Rückführbarkeit (metrological traceability) ihrer Analysenergebnisse, auch bei Informationen über kommerzielle Kalibrierstandards. Hier gibt es noch erheblichen metrologischen Entwicklungsbedarf, vom konzeptionellen Herangehen bis zur Umsetzung im analytischen Labor.

Reinhard Nießner, München

Jose A. Broekaert, Hamburg
Michael Bron, Bochum/Halle
Jürgen Einax, Jena
Hendrik Emons, Geel
Christoph Haisch, München
Christian Huber, Salzburg
Norbert Jakubowski, Berlin
Dietmar Knopp, München
Jürgen Popp, Jena
Michael Schäferling, Regensburg

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.

Literatur

1) *D. Staack, A. Fridman, A. Gutsol, Y. Gogotsi, G. Friedman.*, Angew. Chem. *2008*, 120, *8140*
2) *J. Franzke*, Anal. Bioanal. Chem. *2009*, 395, *547*
3) *D. Petrovic. T. Martens, J. van Dijk, W. J. M. Brok, A. Bogaerts*, J. Phys. D: Appl. Phys. *2009*, 42, *205206.*
4) *X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien*, Science *2009*, 324, *804.*
5) *T. Kokko, T. Liljenbäck, M. T. Peltola, L. Kokko, T. Soukka*, Anal. Chem. *2008*, 80, *9763.*
6) *S. Lee, E.-J. Cha, K. Park, S.-Y. Lee, J.-K. Hong, I.-C. Sun, S. Y. Kim, K. Choi, I. C. Kwon, K. Kim, C.-H. Ahn*, Angew. Chem. *2008*, 120, *2846.*
7) *T. Rantanen, M.-L. Järvenpää, J. Vuojola, K. Kuningas, T. Soukka*, Angew. Chem. *2008*, 120, *3871.*
8) *F. Wang, X. Liu*, Chem. Soc. Rev. *2009*, 38, *976.*
9) *Y. Piao, A. Burns, J. Kiom, U. Wiesner, T. Hyeon*, Adv. Funct. Mater. *2008*, 18, *3745.*
10) *M. I. J. Stich, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis*, Adv. Mater. *2009*, 21, *2216.*
11) *C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, T. Ha*, Annu. Rev. Biochem. *2008*, 77, *51.*
12) *R. Roy, S. Hohng, T. Ha*, Nat. Methods *2008*, 5, *507.*

13) *V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell,* Science *2008,* 320, *246.*
14) *S. W. Hell,* Nat. Methods *2009,* 6, *24.*
15) *A. Volkmer,* J. Phys. D: Appl. Phys. *38,* R59 *2008; A. Zumbusch, A. Volkmer,* Physik J. *2005,* 4, *31 und darin zitierte Literatur.*
16) *C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X .S. Xie,* Science, *322,* 1857, *2008; P. Nandakumar, A Kovalev, A Volkmer,* New J. Phys. *2009,* 11, *033026.*
17) *C. Krafft, A. A. Ramoji, C. Bielecki, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, P. Rösch, M. Schmitt, B. Dietzek, I. Petersen, A. Stallmach, J. Popp, J. Biophoton. 2, 303, 2009; C. Krafft, B. Dietzek, J. Popp,* Analyst *2009,* 134, *1046 und darin zitierte Literatur.*
18) *V. Deckert,* J. Raman Spectrosc. *2009,* 40, *1336 und darin zitierte Literatur.*
19) *D. Cialla, T. Deckert-Gaudig, C. Budich, M. Laue, R. Möller, D. Naumann, V. Deckert, J. Popp,* J. Raman Spectrosc. *2009,* 40, *240.*
20) *J. Zhao, L. Sherry, C. G. Schatz, V. P. Duyne,* R. IEEE J. Sel. Top. Quant. *2008,* 14, *1418.*
21) *L. Ho, M. Pepper, P. Taday,* Nat. Photonics *2008,* 2, *541.*
22) *A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, E. N. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet,* Biosens. Bioelectron. *2009,* 25, *154*
23) *N. Li, H. Tang, H. W. Gai, X.L. Dong, Q. Wang, E. S. Yeung,* Anal. Bioanal. Chem. *2009,* 394, *1879.*
24) *R. E. Majors, 2009 LC GC North America (June 2009) web edition, http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=605650&pageID=1&sk=&date=*
25) *A. Greiderer, S. C. Ligon, C. W. Huck, G. K. Bonn,* J. Sep. Sci. *2009,* 32, *2510.*
26) *P. Dugo, F. Cacciola, P. Donato, D. Airado-Rodriguez, M. Herrero, L. Mondello,* J. Chromatogr.*2009,* A 1216, *7483.*
27) *A. Leinenbach, R. Hartmer, M. Lubeck, B. Kneissl, Y. A. Elnakady, C. Baessmann, R. Muller, C. G. Huber,* Journal of Proteome Research *2009,* 8, *4350.*
28) *A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill Jr.,* J. Mass Spectrom. *2008,* 43, *1.*
29) *M. Koestler, D. Kirsch, A. Hester, A. Leisner, S. Guenther, B. Spengler,* Rapid Commun. MS. *2008,* 22, *3275.*
30) *J. S. Becker, N. Jakubowski,* Chem. Soc. Rev. *2009,* 38, *1969.*
31) *N. Tuccitto, L. Lobo, A. Tempez, et al.,* Rapid Commun. MS. *2009,* 23, *549.*
32) *S. Canulescu, J. Whitby, K. Fuhrer, et al.,* J. Anal. Atom. Spectrom *2009, 24, 178.*
33) *L. Soleymani, Z. Fang, X. Sun, H. Yang, B. J. Taft, E. H. Sargent, S. O. Kelley,* Angew. Chem. *2009,* 121, *8609.*
34) *Z. Wen, S. Ci, J. Li,* J. Phys. Chem. C *2009,* 113, *13482.*
35) *S. Kundu, T. C. Nagaiah, W. Xia, Y. Wang, S. Van Dommele, J. H. Bitter, M. Santa, G. Grundmeier, M. Bron, W. Schuhmann, M. Muhler,* J. Phys. Chem. C *2009,* 113, *14302.*
36) *Y. Tang, B.L. Allen, D. R. Kauffman, A. Star,* J. Am. Chem. Soc. *2009,* 131, *13200.*
37) *E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner,* Anal. Chem. *2009,* 81, *9291.*
38) *S. Mayilo, B. Ehlers, M. Wunderlich, T. A. Klar, H.-P. Josel, D. Heindl, A. Nichtl, K. Kürzinger, J. Feldmann,* Anal. Chim. Acta *2009,* 646, *119.*
39) *A. Radoi, M. Targa, B. Prieto-Simon, J. L. Marty,* Talenta *2008,* 77, *138.*
40) *R. Narayanan, R. J. Lipert, M. D. Porter,* Anal. Chem. *2008,* 80, *2265.*
41) *H. Wu, Q. Huo, S. Varnum, J. Wang, G. Liu, Z. Nie, J. Liu, Y. Lin,* Analyst *2008,* 133, *1550.*
42) *D. Knopp, D. Tang, R. Niessner,* Anal. Chim. Acta *2009,* 647, *14.*
43) *C. Zhang, L.W. Johnson,* Anal. Chem. *2009,* 81, *3051.*
44) *A. Jääskeläinen, R.-R. Harinen, T. Soukka, U. Lamminmäki, T. Korpimäki, M. Virta,* Anal. Chem. *2008,* 80, *583.*
45) *T. Blicharz, W. Siqueira, E. Helmerhorst, F. Oppenheim, P. Wexler, F. Little, D. Walt,* Anal. Chem. *2009,* 81, *2106.*
46) *A. Wolter, M. Seidel, R. Niessner,* Anal. Chem. *2008,* 80, *2325.*
47) *V. Bychkova, Shvarev,* Anal. Chem. *2009,* 81, *2325.*
48) *R. Campbell,* Anal. Chem. *2009,* 81, *5972.*
49) *S. Soelberg, R. Stevens, A. Limaye, C. Furlong,* Anal. Chem. *2009,* 81, *2357.*
50) *P. Kurzawski, A. Bogdanski, V. Schurig, R. Wimmer, A. Hierlemann,* Anal. Chem. *2009,* 81, *196.*
51) *J. Workman, M. Koch, B. Lavine, R. Chrisman,* Anal. Chem. *2009,* 81, *4623.*
52) *S. D. Brown, R. Tauler, B. Walczak, (Hrsg.):* Comprehensive Chemometrics. Chemical and Biochemical Data Analysis, *4 Vols., Elsevier, Amsterdam, 2009.*
53) *BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML, The international vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms, 3rd ed. JCGM 200, 2008, www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html.*
54) *International Organization for Standardization, ISO Guide 34: 2009, General requirements for the competence of reference material producers, 3rd ed., 2009, Geneva.*
55) *Commission Directive 2009/90/EC,* Off. J. Eur. Union, *1.8.2009, L 201/36.*