

Bildgebende chemische Sensorik

Michael Schäferling und Otto S. Wolfbeis

Fluoreszenzoptische Indikatoren und Sensormaterialien bieten die einzigartige Möglichkeit, chemische Analysen nicht nur punktuell an einem Ort, sondern flächenverteilt durchzuführen. Bei Verwendung von Fluoreszenzindikatoren fügt man dem zu untersuchenden Material einen entsprechenden Indikator zu, der dann mit Hilfe eines Kamerasystems detektiert wird. Ein typisches Beispiel besteht etwa in der Zugabe eines fluoreszierenden Sauerstoff-Indikators mit dessen Hilfe die Verteilung des Sauerstoffpartialdrucks kontinuierlich verfolgt werden kann. Dies bedeutet gegenüber bisherigen Verfahren der Sauerstoffanalytik einen erheblichen Fortschritt. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit kann erreicht werden, wenn die Indikatormoleküle in Polymerpartikel (Nano- oder Mikrometergröße) eingeschlossen werden. Die unspezifische Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff (etwa im Falle einer Temperatur- oder pH-Sonde) oder durch Metallionen in der Probe kann dadurch unterbunden werden.

Alternativ kann man Sensorschichten einsetzen, bei denen der Indikator in einem analytpermeablem Polymer eingebettet vorliegt. Diese dünnen Sensorfolien müssen dann in direkten Kontakt mit der zu untersuchenden Probe gebracht werden. Das bildgebende System erfasst nun nicht mehr die Fluoreszenz eines in der Probe gelösten Indikators, sondern die der Sensorschicht, die mit den Analyten in der Probe im Gleichgewicht stehen muss. Mit Hilfe derartiger Sensorfilme ist es möglich geworden, eine Reihe von chemischen Größen, z.B. Sauerstoffpartialdruck (pO_2), pH-Wert, pCO_2 und H_2O_2 , aber auch die Temperatur in komplexen Systemen, z.B. auf der Haut oder Gewebeproben, sichtbar zu machen (siehe Abb. 1,2).

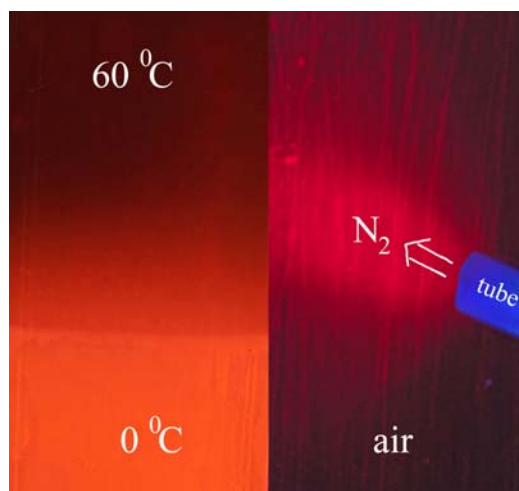


Abb. 1: Chemosensrisches Imaging: Links die fluoreszenzoptische Darstellung eines Temperaturgradienten mit Hilfe einer Sensorschicht bestehend aus einem Eu^{3+} -Komplex in Polyacrylnitril ("seeing temperature"); rechts die Darstellung eines laminaren Stromes von Stickstoffgas mit Hilfe einer Sauerstoffsensormembran (Pd-Octaethylporphyrin in Polystyrol).

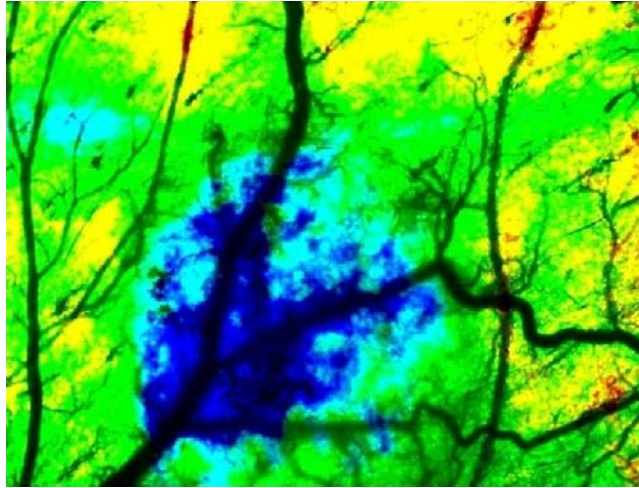


Abb.2: Darstellung der Sauerstoff-Verteilung eines Hauttumors mittels Fluoreszenz-Lifetime Imaging mit Hilfe einer Sauerstoffsensorfolie in direktem Kontakt zum betreffenden Hautgewebe, aufgenommen mit einem intravitalem Fluoreszenzmikroskop an einer Rückenhautkammer (Hamster).

Ein System zur bildgebenden Sensorik besteht aus drei Teilen, nämlich

- a) dem Indikator- oder Sensorsystem,
- b) dem optoelektronischen System, das den Indikator bzw. Sensorfilm abtastet, und
- c) einer rechnergestützten Steuereinheit für die Optoelektronik und einer Software, die die erhaltene optische Information in ein Bild bzw. eine analytisch nutzbare Information umwandelt.

In der bildgebenden Chemosensorik werden fluoreszenzoptische Indikatoren bevorzugt eingesetzt, vor allem, weil sie die Messung in Remission (also im Auflicht) ermöglichen und somit auch die Untersuchung stark gefärbter oder streuender bzw. inhomogener Proben erlauben. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über häufig verwendete Indikatoren, die auch in der Bioanalytik Anwendung finden. In diesen Fällen sind die Anforderungen besonders stringent, weil alle Indikatoren im physiologischen Bereich, ohne Zusatz von Hilfsreagenzien und bei Raumtemperatur ansprechen müssen.

Analyt	Indikator
pH 6 – 8	Hydroxypyrentrisulfonat; Fluoresceine
O ₂	Ru-tris-Phenanthroline; Metalloporphyrine, Pyren-Derivate
H ₂ O ₂	Eu ³⁺ - Tetracyclin-Komplex
Temperatur	Lanthanoiden-Ligandenkomplexe (Eu ³⁺ , Tb ³⁺)
Glucose	Fluorophore mit Boronsäuregruppen
Ca ²⁺	Fura-2; Indo-2

Das optoelektronische Imaging-System zur Abtastung der Fluoreszenz von Indikatoren bzw. Sensorschichten kann beliebige Grade der Komplexität erreichen, z.B. in Verbindung mit konfokalen Mikroskopen oder ultraschnell gepulsten zeitaufgelösten Messmethoden. Allen Systemen gemeinsam ist eine Lichtquelle, z.B. eine Halogenlampe oder ein Array von Leuchtdioden bzw. Diodenlasern, ein optisches Filtersystem, das das kurzwellige Anregungslicht vom langwelligen Fluoreszenzlicht (Emission) trennt, eventuell ein dichroitischer Spiegel (Strahlteiler, je nach Strahlengang), sowie eine Detektorelement (meist ein CCD-Chip). Eine schematische Anordnung ist in Abb. 3 dargestellt.

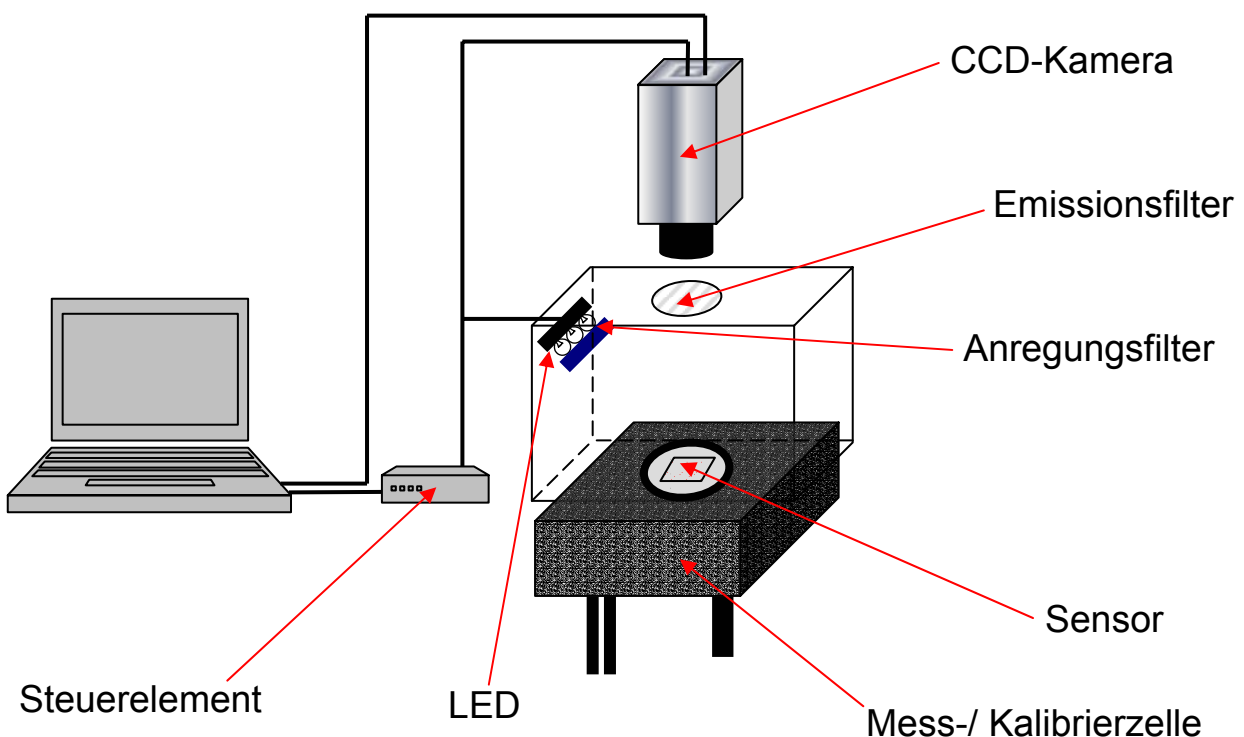


Abb. 3: Aufbau eines Fluoreszenz-Imaging Systems zur Erfassung von Indikatoren bzw. Chemosensoren. Mit einem Computer-gesteuerten Pulsgenerator, der Lichtquelle (LED) und CCD-Kamera synchronisiert, lässt sich auch Fluoreszenz-Lifetime-Imaging (FLIM) durchführen. Zwischen LED und Sensor kann ein dichroitischer Filter (Strahlteiler) eingebaut werden.

Sowohl Fluoreszenzintensität wie auch -abklingzeit können bestimmt werden. In vielen Fällen wird die Abklingzeit als analytische Messgröße verwendet, da sie – im Gegensatz zur Intensität – weniger Anfällig ist gegenüber Störeinflüssen wie reflektiertem Streulicht, einer ungleichen Ausleuchtung der Oberfläche oder gegenüber Abweichungen der Indikatorkonzentration innerhalb der Probe bzw. Sensorschicht. Hinsichtlich des Untersuchungsobjektes ist man mit dem in Abb. 3 dargestellten System sehr vielseitig: Es kann eine mit verschiedenen Reagenzien versehene

Mikrotiterplatte oder ein Mikorarray sein, ebenso wie eine Hautoberfläche oder Gewebeprobe, die auf die Verteilung eines bestimmten Analyten (Oxygenierung, pH) hin untersucht werden soll.

Das dritte wichtige Element besteht aus einem Steuerrechner mit einer entsprechenden Software. Die Steuerung der Optoelektronik hängt naturgemäß vom gewählten Messverfahren ab. Zeitaufgelöste gepulste Messverfahren erfordern eine exakte Synchronisation von Lichtquelle und Detektor. Die Umwandlung der Information in zweidimensionale Darstellungen der Intensität bzw. Abklingzeit beruht üblicherweise auf der Verwendung kommerzieller Software. Abbildung 4 zeigt einige gängige Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie. Für das Fluoreszenz-Lifetime-Imaging (FLIM), das die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer als Kontrast verwendet, ist speziell die RLD-Methode (c) geeignet. Diese so genannte *Rapid Lifetime Determination* ist eine ratiometrische Methode, mit der die Änderung der mittleren Abklingzeit durch die aufeinander folgende Aufnahme von zwei Zeitfenstern abgebildet werden kann. Dabei werden viele nacheinander aufgenommene Einzelbilder aufintegriert und anschließend ein Quotient $W1 / W2$ gebildet und visualisiert.

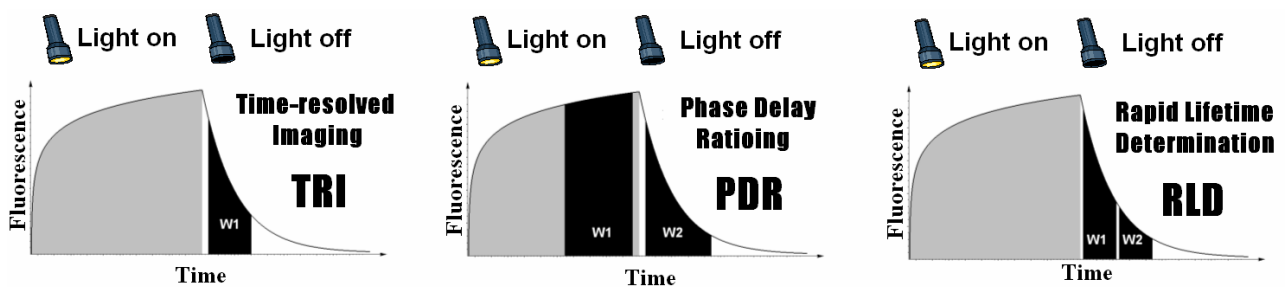


Abb. 4: Verschiedene Methoden des zeitaufgelösten Fluoreszenz-Imagings. W1 und W2 bezeichnet die Zeitfenster nach dem Anregungspuls, während denen der CCD-Detektor geöffnet ist.

Für Schnell- oder Reihentests hat sich die Kombination dieser Methodik mit der Mikrotiterplatten-Technik bewährt. Damit können viele Tests parallel bei geringstem Bedarf an Probenvolumen durchgeführt und ausgewertet werden. Dies ermöglicht auf der einen Seite einen erheblichen Probendurchsatz, eröffnet auf der anderen Seite aber auch die Möglichkeit, mehrere der oben aufgelisteten Parameter (Analyten) gleichzeitig zu erfassen. Dies ist vor allem für zelluläre Testverfahren in der pharmazeutischen Forschung interessant, da die Änderung des Zellmetabolismus bei Einwirkung bestimmter Wirkstoffe durch die Online-Detektion mehrerer relevanter Analyten verfolgt werden kann („Metabolic Imaging“).

Über die chemosensorische Bestimmung von H_2O_2 mit Hilfe eines fluoreszenten Europium-Tetracyclin-Komplexes konnten erstmals Glucosekonzentrationen bei pH 7 direkt unter Einwirkung von Glucoseoxidase mittels Fluoreszenzlebensdauer-Messungen bildlich dargestellt werden (Abb. 5). Weitere Anwendungen dieser fluoreszenten Sonde ergeben sich in der Bestimmung von Enzymaktivitäten (Glucoseoxidase, Katalase, Peroxidase), dem Imaging von Enzym-gekoppelten Immuntests (ELISAs), sowie der Detektion von Citrat oder Phosphaten. Auch in diesem Fall kann die Sonde direkt in der Probenlösung oder eingebettet in einer Polymerschicht im direktem Kontakt zur Probe eingesetzt werden.

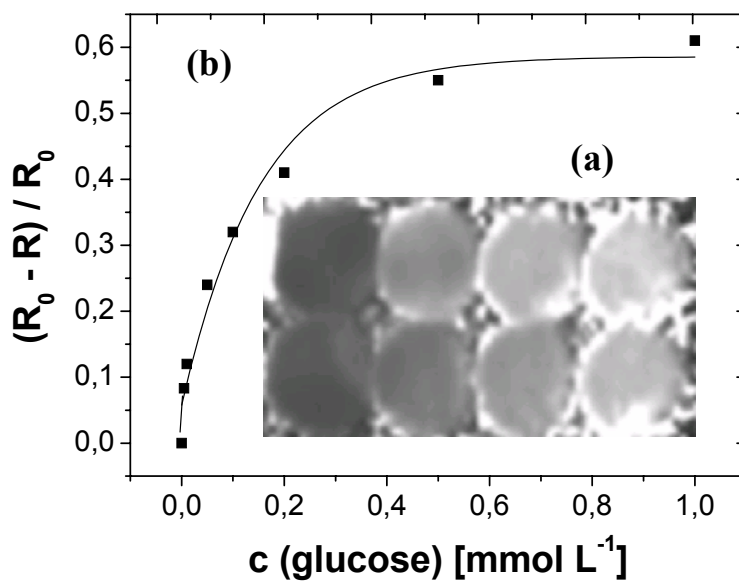


Abb. 5: (a) Zeitaufgelöstes Fluoreszenz-Image (PDR) eines Teils einer Mikrotiterplatte, deren einzelne Vertiefungen mit einem Glucose-sensitiven Polymerfilm beschichtet sind, in Anwesenheit verschiedener Glucosekonzentrationen. (b) Resultierende Kalibrierkurve für den Glucosesensor.

Eine dritte Applikationsform dieser Indikatoren ist die Herstellung von sensitiven Farben. Der Farbstoff wird dabei in einem Hydrogel gelöst und verdünnt in einem Lösungsmittel als dünner Film auf ein Trägermaterial aufgesprüht. Druck- und Temperatur-sensitive Farben (PSP: Pressure-sensitive Paint, TSP: Temperature-sensitive Paint) sind ein vor allem in der Aerodynamik und in der Strömungsmechanik gefragtes Hilfsmittel. Neue Entwicklungen sollen die gleichzeitige Bestimmung der Druck- und Temperaturverteilung auf Flugzeugmodellen in Windkanaltests ermöglichen (Abb. 6). Auch dabei bietet das zeitaufgelöste Fluoreszenz-Imaging eine viel versprechende Alternative, da die Abbildung der Änderung der Fluoreszenzabklingzeiten eine höhere Genauigkeit liefert als ein Intensitätsbild.

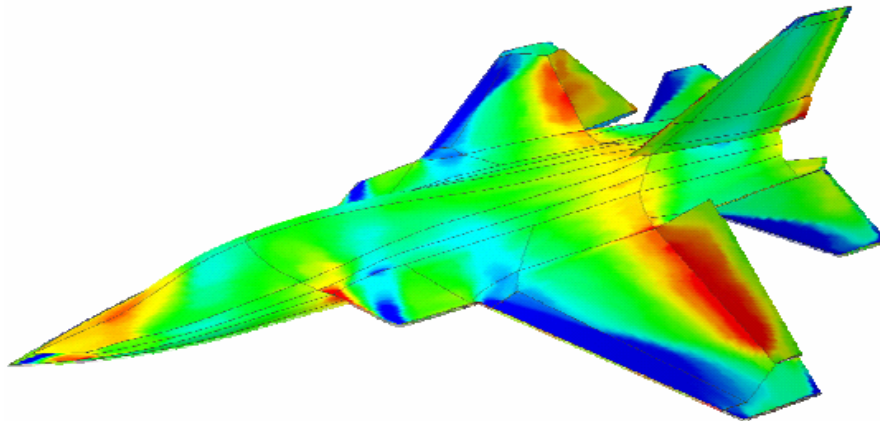


Abb. 6: Visualisierung der Druckverteilung auf der Oberfläche eines Flugzeugmodells im Windkanal mittels einer fluoreszenten drucksensitiven Farbe (PSP).

Die bildgebende chemische Sensorik hat also ein breites Anwendungspotential, von der Aerodynamik über pharmazeutische Paralleltests bis hin zur Umweltanalytik (z.B. Schwermetallionen-Bestimmung), Bioanalytik bzw. medizinischen Diagnostik. Duale Sensormaterialien wie PSP/TSPs aber auch Sensorfolien zur simultanen Bestimmung von pO_2 und pH sind momentan Gegenstand der Entwicklung. Ein großer Entwicklungsbedarf besteht auch noch im Bereich der Mehrparameter-Sensorarrays.

Michael Schäferling, Otto S. Wolfbeis
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg
93040 Regensburg
Tel: 0941 943 4015, Fax: 0941 943 4064
E-mail: michael.schaeferling@chemie.uni-regensburg.de