

## Bildgebende chemische Sensorik

*Michael Schäferling und Otto S. Wolfbeis*

*Universität Regensburg, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik*

Bildgebende Analysemethoden (Molecular Imaging) haben im letzten Jahrzehnt einen großen Aufschwung erfahren, von der (bio)medizinischen Forschung und Diagnostik über die Materialforschung bis hin zur Aerodynamik. Die „chemische“ Abbildung von Oberflächen ist vor allem mit den verschiedenen Techniken der Rastersondenmikroskopie und neuen Entwicklungen im Bereich des FTIR- oder Raman-Imagings verbunden. Mit diesen Methoden kann die chemische Zusammensetzung von Materialoberflächen bestimmt werden. Fluoreszenzfarbstoffe werden üblicherweise zum Anfärben von Zellbestandteilen oder Biomolekülen wie Proteinen oder DNA eingesetzt. Damit sind sie zu unverzichtbaren Hilfsmitteln für die Mikroskopie oder Zytometrie geworden. Einige dieser Farbstoffe können aber mehr als nur leuchten, sie können auch die Anwesenheit einer bestimmten chemischen Spezies (Analyt) anzeigen, indem die Fluoreszenzeigenschaften (Emissionswellenlänge, Quantenausbeute oder Fluoreszenzlebensdauer) von dieser verändert werden.

Derartige fluoreszente Indikatoren (Sonden) und darauf aufbauende Sensormaterialien bieten die einzigartige Möglichkeit, chemische Analysen nicht nur punktuell an einem Ort, sondern flächenverteilt durchzuführen, indem man dem zu untersuchenden Material einen entsprechenden Indikator zufügt. Dieser wird dann mit Hilfe eines Kamerasystems detektiert. 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, wie der Clark-Elektrode, einen erheblichen Fortschritt. Eine Verbesserung der Selektivität kann erreicht werden, wenn die Indikatormoleküle in Nano- oder Mikrometer große Polymerpartikel mit analytspezifischer Permeabilität eingeschlossen werden. Somit können unerwünschte Querempfindlichkeiten minimiert oder eine unspezifische Fluoreszenzlöschung verhindert werden. Es stehen mittlerweile maßgeschneiderte Sonden für die Erkennung verschiedenster Analyte wie pH, Sauerstoff, CO<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Verfügung und werden zum Beispiel für die Bestimmung von Blutgas- und Blutelektrolyt-Werten eingesetzt.

Alternativ kann man Sensorschichten einsetzen, bei denen der Indikator in einem analyt-permeablem 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 direkt in der Probe verteilten 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 Parametern, zum Beispiel Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>), Luftdruck, pH-Wert, pCO<sub>2</sub>, aber auch die Temperatur in komplexen Systemen, beispielsweise auf Materialoberflächen oder Haut- und Gewebeproben

sichtbar zu machen (siehe Abbildungen 1,2).<sup>[1,2]</sup>

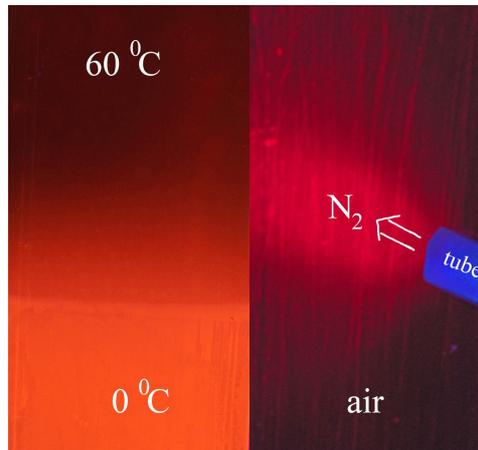


Abbildung 1: *Bildgebende Chemosensorik*: Links die fluoreszenzoptische Darstellung eines Temperaturgradienten ("seeing temperature") mit Hilfe einer Sensorschicht bestehend aus einem Eu<sup>3+</sup>-Komplex in Polyacrylnitril; rechts die Darstellung eines laminaren Stromes von Stickstoffgas mit Hilfe einer Sauerstoffsensorfolie (Pd-Octaethylporphyrin in Polystyrol).<sup>[1]</sup>

Einsatzmöglichkeiten im Bereich des medizinischen Bio-Imagings sind vor allem in der Dermatologie zu finden, etwa zur Untersuchung der Sauerstoffversorgung in melanomen Gewebe oder chronischen Wunden.

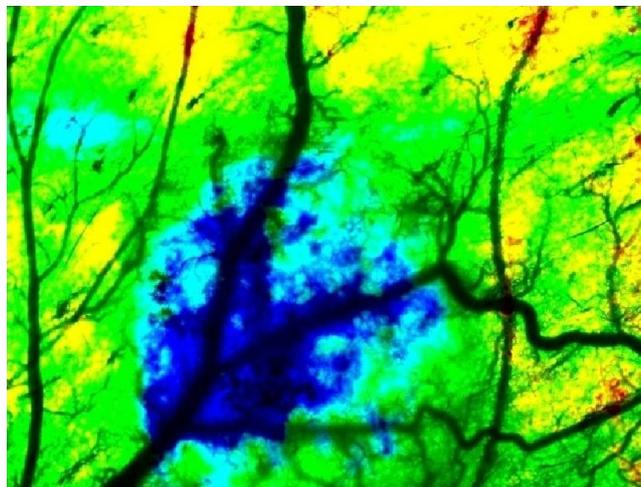


Abbildung 2: Darstellung der Sauerstoff-Verteilung eines Hauttumors mittels Fluoreszenz-Lifetime Imaging mit Hilfe einer Sauerstoffsensorfolie in direktem Kontakt zum betreffenden Hautgewebe, aufgenommen mit einem intravitalen Fluoreszenzmikroskop an einer Rückenhautkammer (Hamster).<sup>[2]</sup>

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.

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

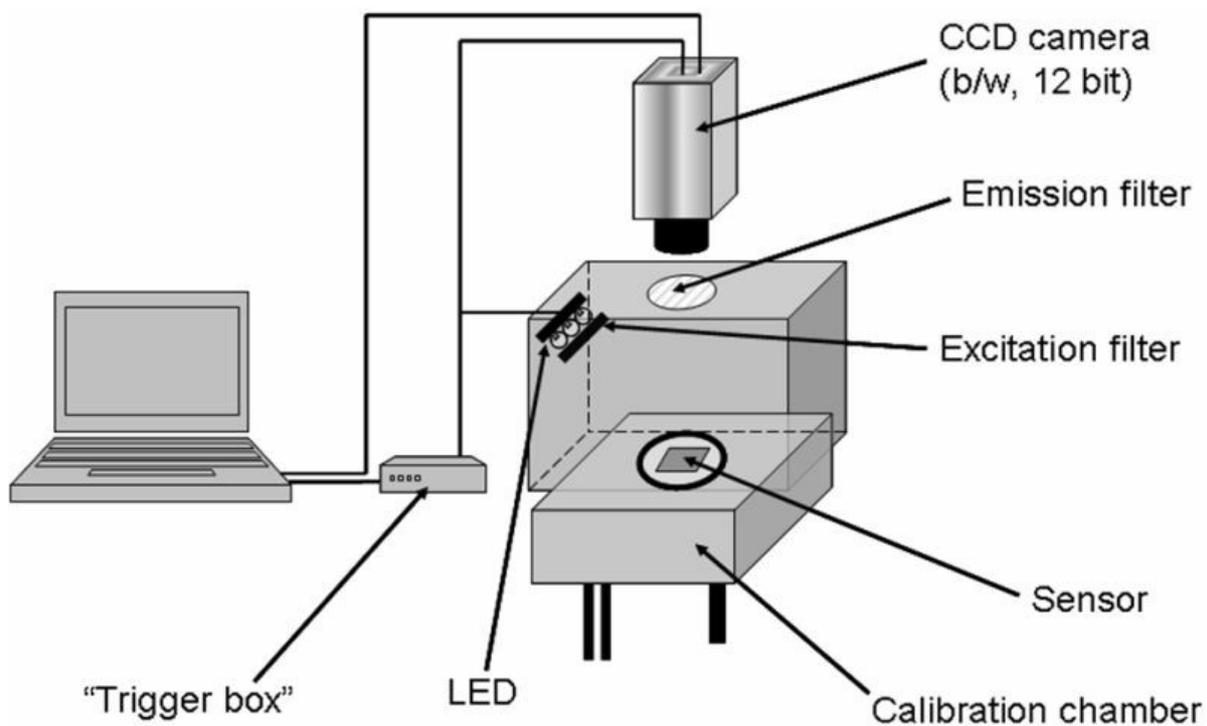


Abbildung 3: Aufbau eines Fluoreszenz-Imaging Systems zur Erfassung von Indikatoren bzw. Chemosensoren. Mit einem Computergesteuerten Pulsgenerator, der Lichtquelle (LED) und CCD-Kamera synchronisiert, lässt sich auch Fluoreszenz-Lifetime-Imaging (FLIM) durchführen. Zwischen LED und Sensor kann ein dichroitischer Filter (Strahlteiler) eingebaut werden.<sup>[3]</sup>

Sowohl Fluoreszenzintensität wie auch -abklingzeit bei einer bestimmten Wellenlänge 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 beziehungsweise Sensorschicht. Hinsichtlich des Untersuchungsobjektes ist man mit dem in Abbildung 3 dargestellten System sehr vielseitig: Sowohl mikroskopische Proben als auch makroskopische Objekte können abgebildet werden.

Letztere können mit verschiedenen Reagenzien versehene Mikrotiterplatten oder Sensor-Mikroarrays 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 beziehungsweise 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 so genannte *Rapid Lifetime Determination* (RLD) Methode (c) geeignet.<sup>[4]</sup> Diese 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.<sup>[5]</sup>

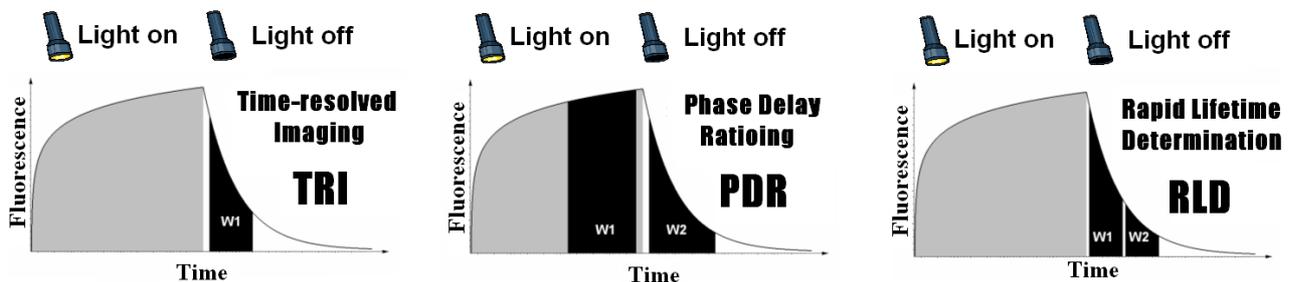


Abbildung 4: Verschiedene Methoden des zeitaufgelösten Fluoreszenz-Imagings. W1 und W2 bezeichnet die Zeitfenster nach dem Anregungspuls, während denen der CCD-Detektor geöffnet ist.<sup>[5]</sup>

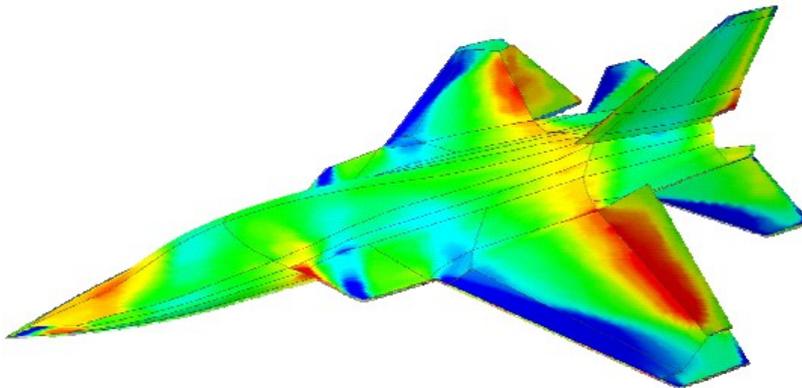
In der bildgebenden Chemosensorik werden fluoreszenztae Indikatoren bevorzugt gegenüber kolorimetrischen Substanzen eingesetzt, vor allem, weil sie die Messung in Remission (also im Auflicht) ermöglichen und somit auch die Untersuchung stark gefärbter oder streuender beziehungsweise inhomogener Proben 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 (HPTS); Fluorescein-Derivate <sup>[6,7]</sup>
O <sub>2</sub>	Ru(II)-Komplexe; Metalloporphyrine, Pyren-Derivate <sup>[6,7]</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Eu <sup>3+</sup> - Tetracyclin-Komplex <sup>[8]</sup>
Temperatur	Lanthanoiden-Ligandenkomplexe (Eu <sup>3+</sup> , Tb <sup>3+</sup> ), Ru(II)-tris-phenanthrolin <sup>[9]</sup>
Glucose	Fluorophore mit Boronsäuregruppen <sup>[10]</sup>
Ca <sup>2+</sup>	Fura-2; Indo-2 <sup>[11]</sup>
K <sup>+</sup>	Fluoroionophor aus Aza-15-Krone-5 / 4-Aminonaphthalimid <sup>[12]</sup>

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Hilfe eines fluoreszenten Europium-Tetracyclin-Komplexes konnten erstmals Glucosekonzentrationen bei pH 7 direkt unter Einwirkung von Glucoseoxidase mittels Fluoreszenzlebensdauer-Messungen bildlich dargestellt werden<sup>[13]</sup>. Weitere Anwendungen fluoreszenter Sonden auf der Basis von Lanthanid-Komplexen ergeben sich in der Bestimmung von Enzymaktivitäten (Glucoseoxidase, Katalase, Peroxidase), dem Imaging von Enzym-gekoppelten Immuntests (ELISAs), sowie der Detektion von Citrat oder Phosphaten<sup>[14,15]</sup>. Auch in diesen Fällen kann die Sonde direkt in der Probenlösung oder eingebettet in einer Polymerschicht im direktem Kontakt zur Probe eingesetzt werden.

Eine besondere Applikationsform fluoreszenter Indikatoren ist die Herstellung von sensitiven Farben und Oberflächenbeschichtungen. 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 (Abbildung 5)<sup>[9,16]</sup>. Neue Entwicklungen ermöglichen die gleichzeitige Bestimmung der Druck- und Temperaturverteilung auf Flugzeugmodellen in Windkanaltests. 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.



**Pressure**



Abbildung 5: Visualisierung der Druckverteilung auf der Oberfläche eines Flugzeugmodells im Windkanal mittels einer fluoreszenten drucksensitiven Farbe (PSP).<sup>[16]</sup>

Die bildgebende chemische Sensorik hat also ein breites Anwendungspotential, von der Aerodynamik über pharmazeutische Paralleltests bis hin zur Umweltanalytik (beispielsweise Schwermetallionen-Bestimmung), Bioanalytik bzw. medizinischen Diagnostik. Die Abbildung von pH- oder Sauerstoffgradienten ist auch wichtiges Hilfsmittel in der Meeresforschung. Vor allem die Grenzfläche zwischen Wasser und Sedimentschicht ist dabei von großem Interesse. Die marine Mikrobiologie nutzt solche Sensoren, um die Aktivität von Bakterien oder mikrobiellen Biofilmen am Meeresgrund zu untersuchen.<sup>[17]</sup>

Zahlreiche duale Sensormaterialien wie PSP/TSPs, aber auch Sensorschichten zur simultanen Bestimmung von  $pO_2$  und Temperatur oder  $pO_2$  und pH konnten in den letzten Jahren realisiert werden. Dabei kommen auch neue Farbstoffe wie zum Beispiel Ir(III)-Komplexe zum Einsatz<sup>[18]</sup>. Ein weiterer Schritt in Richtung bildgebender Mehrparameter-Sensorik ist die Entwicklung eines simultanen Sensors für  $pO_2$ , pH und Temperatur (Abbildung 6), dessen einzelne Signale durch eine Kombination von spektraler Trennung und zeitaufgelöster Messung separiert werden können<sup>[19]</sup>. Eine weitere Vereinfachung der Messtechnik wurde kürzlich dadurch erreicht, dass anstelle teurerer CCD-Detektoren konventionelle Digitalkameras für das Imaging eingesetzt wurden<sup>[20]</sup>, da die in solchen Kameras vorhandene RGB-Speichertechnologie ("red-green-blue") für Multifarbensorik bestens geeignet ist. Auf diese Weise können Sensorflächen ("paints") für einen, zwei oder drei Analyte einfach photographiert werden.

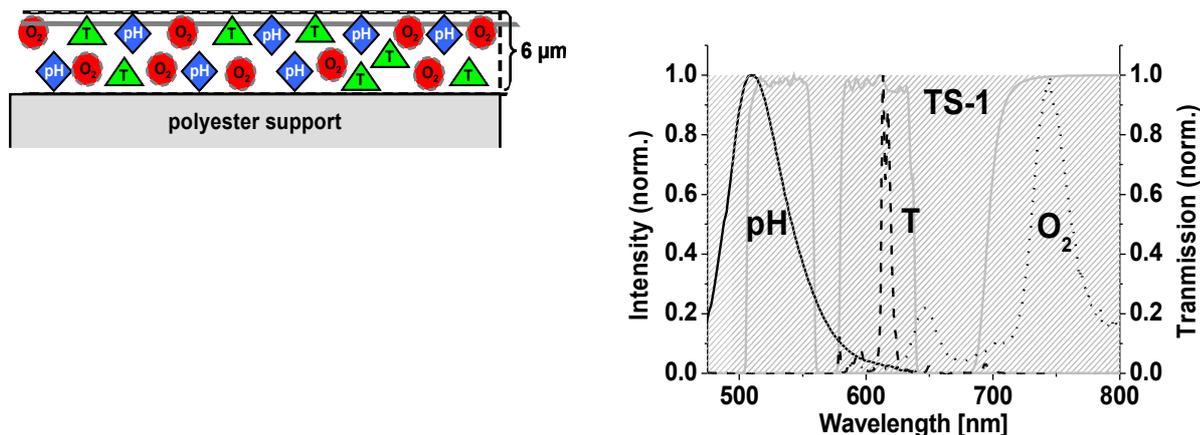


Abbildung 6: **Links:** Aufbau eines optischen Tripel-Sensors für Sauerstoff, pH und Temperatur. **Rechts:** Spektrale Trennung der Lumineszenzemissionen des Sauerstoff- (Pt-porpholacton), pH- (HPTS) und Temperatur-Indikators (Eu(III)-Komplex)<sup>[19]</sup>.

## Literatur

- [1] S. M. Borisov, A.S. Vasylevska, C. Krause, O.S. Wolfbeis. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 1536-1542
- [2] P. Babilas, G. Liebsch, V. Schacht, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, R.-M. Szeimies, C. Abels, *Microcirculation* **2005**, *12*, 477-487.
- [3] M. I. J. Stich, S. Nagl, O.S. Wolfbeis, U. Henne, M. Schäferling, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *118*, 1399-1406.
- [4] R. J. Woods, S. Scypinsky, L.J. Cline Love, H.A. Ashworth, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1395-1400.
- [5] M. Schäferling, S. Nagl, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 500-517).
- [6] O. S. Wolfbeis, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2657-2669
- [7] M. Schäferling, Luminescence Lifetime-based Imaging of Sensor Arrays for High-Throughput Screening Applications; in: *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors Vol. 3*, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi (eds.) Springer, Heidelberg, **2005**, pp. 45-92.
- [8] M. Schäferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1386-1392.
- [9] O.S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3759-3763.
- [10] H. S. Mader, O. S. Wolfbeis, *Microchim. Acta* **2008**, *162*, 1-34.
- [11] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes 2002; www.probes.com
- [12] H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1468-1469.
- [13] M. Schäferling, M. Wu, O.S. Wolfbeis, *J. Fluorescence* **2004**, *14*, 561-568
- [14] Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, O.S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1767-1770.
- [15] C.M. Spangler, C. Spangler, M. Schäferling, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 138-148.
- [16] C. Klein, R.H. Engler, U. Henne, *Experiments in Fluids* **2005**, *39*, 475-483
- [17] M. Kühn, L. Polerecky, *Aquat. Microb. Ecol.* **2008**, *53*, 99-118.
- [18] S. Nagl, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **2007**, *132*, 507-511.
- [19] M. I. J. Stich, M. Schäferling, O.S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2216-2220
- [20] M. I. J. Stich, S. M. Borisov, U. Henne, M. Schäferling, *Sensors Actuators: B (Chemical)* **2009**, *139*, 204-207.