

Inwiefern gleichen chemische Sensoren Sensillen?¹

Ursula E. Spichiger-Keller, Zürich

Zusammenfassung

Biologische Sinnesorgane wie die Antennulae von Krabben oder selbst einfache Geschmacks- oder Geruchs-Sinneshaare von Insekten zeigen einen komplexen Aufbau, haben eine anspruchsvolle Energieversorgung und geben eine ebenso komplexe Antwort. Das Ziel der Konstruktion *chemischer Sensoren* ist es jedoch, einfache und zweckmässige Instrumente für den Einsatz in der analytischen Chemie zu schaffen. Chemische Sensoren im engeren Sinn lassen sich auf der Basis von synthetischen Wirtsmolekülen planen und realisieren. Die Umgebung, in welcher die Wechselwirkung zwischen dem Wirts- und einem Gast- oder Zielmolekül stattfindet, trägt wesentlich zur Selektivität bei. Komponenten von biologischen Sinnesorganen – z. B. Enzyme oder spezifische Rezeptormoleküle – macht man sich in chemischen Sensoren zu Nutze, um eine vorgegebene Diskriminierung von Störkomponenten zu erreichen. Diese Sensoren werden *Biosensoren i.e.S.* genannt. Allen chemischen Sensoren gemeinsam ist die Eigenschaft, reversibel bzw. schnell regenerierbar auf die wechselnden Konzentrationen von «Reizstoffen» bzw. Analyten zu reagieren und deshalb für kontinuierliche Messungen einsetzbar zu sein. Die verschiedenen Typen chemischer Sensoren lassen sich in einem dreiteiligen Schema zusammenfassen: (1) Ein Teil der molekularen Erkennung wird (2) gefolgt vom Transduktionsteil (der die molekulare Erkennungsreaktion in eine physikalische Grösse umwandelt) und dieser (3) vom Teil der Signalverarbeitung und Bereitstellung von Information.

How far do chemical sensors resemble sensillae?

*The structure of biological sense organs such as the antennulae of crabs or even simple taste or olfactory hair-sensillae of insects is complex and their supply with nutrients as well as their response functions are complex, too. The goal of developing chemical sensors is, however, to design sound, simple and efficace tools to use in analytical chemistry. Chemical sensors in a strict sense are designed and realized based on synthetic host molecules. The environment of the host-guest interaction contributes significantly to the selectivity of this tool. Components of biological sense organs e.g. enzymes or other receptor molecules are used in chemical sensors in order to have access to the natural discrimination of interfering substances. Such sensors are specified as **Biosensors**. Common to all chemical sensors is their reversible or rapidly regenerable response to varying concentrations of «stimulating» molecules or target analytes. This feature allows to operate those sensors in continuous monitoring. The various types of chemical sensors can be described schematically by a common model involving, firstly, the section of molecular recognition; secondly, the transducing section where the molecular recognition process is translated into a physical quantity, and thirdly, a section responsible for signal processing and yield of information.*

1 EINLEITUNG

Das «Zentrum für Chemische Sensoren / Biosensoren und bioAnalytische Chemie», das im März 1994 in einem Ausenareal der ETHZ, im «Technopark Zürich», eröffnet wur-

de, hat das Ziel, Forschung und Entwicklung von chemischen Sensoren zu fördern, d. h. Messfühler und Messverfahren zu entwickeln, welche in der Lage sind, bestimmte *chemische Komponenten in einem Untersuchungsgut qualitativ und*

¹ Nach der Antrittsvorlesung vom 5. Juni 1996 als Privatdozent am Departement für Pharmazie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

quantitativ zu analysieren. Analyse meint die Bestimmung der Teile eines Ganzen, welche einer Materie ihren typischen Charakter verleihen.² Das «Ganze» ist im Falle der analytischen Chemie ein beliebiges Untersuchungsgut; seine «Teile» sind chemische Komponenten wie z. B. Glucose, Ethanol oder Magnesiumionen, die identifiziert und deren Menge oder Konzentration im Untersuchungsgut bestimmt werden sollen.

Sensoren dienen der Erfassung physikalischer, chemischer oder elektrochemischer Grössen mittels physikalischer oder chemischer Effekte und deren Umwandlung in elektrische Signale. Chemische Sensoren werden gegen physikalische Sensoren abgegrenzt. Während der physikalische Sensor auf die Veränderung von physikalischen Grössen (thermische, optische, akustische, mechanische, elektrische) antwortet, reagiert der chemische Sensor auf chemische Eigenschaften von Komponenten des Untersuchungsgutes. Eine solche chemische Komponente wird hier als *Analyt, Zielmolekül oder Gastmolekül* bezeichnet. Im folgenden beschränke ich mich auf die Diskussion des chemischen Sensors.

Allgemeingültige Definitionen werden innerhalb einer IUPAC-Kommission seit Jahren diskutiert (HULANICKI et al., 1989, unpubl. IUPAC Discussion Paper of Commission V). Da Definitionen in der Regel der Entwicklung nachhinken, ist es sinnvoller, die Konstruktionsziele und Anwendungsbereiche eines Sensors zu umschreiben als eine allgemeingültige Definition zu geben. Ziel in der Entwicklung chemischer Sensoren ist es, Messfühler bzw. Messsysteme zu entwickeln, die es ermöglichen, sich ändernde Konzentrationen von Zielmolekülen zu erfassen und auf einer stetigen Skala darzustellen.

Reversible bzw. schnell regenerierbare chemische Sensoren sind in der Medizinaltechnik seit Jahrzehnten auf dem Markt (Markteinführung in den USA 1972)³ und haben zu einer beträchtlichen Leistungssteigerung von Analysenautomaten geführt. Zudem wurde die notfallmässige und patientennahe Bestimmung von Analyten wie Glucose oder Kaliumionen (K^+) direkt im Vollblut ermöglicht. Eine Schätzung aufgrund des Handelsvolumens für das K^+ -selektive Erkennungsmolekül *Valinomycin* ergibt, dass 1990 weltweit 64 Millionen K^+ -selektive Elektroden gehandelt wurden. Im Jahrbuch der Sensortechnik 1995/96 werden für Deutschland, Österreich und die Schweiz 196 Firmen im Zusammenhang mit dem Handel und der Produktion von Chemischen

Sensoren erwähnt (SCHANZ, 1995). Davon betreffen 9 Einträge Schweizer Firmen, die neben typisch physikalischen Sensoren auch pH- und Redoxelektroden sowie Sensoren für Öl, Feuchte und Gase anbieten. Von diesen 9 Firmen wird *eine einzige* im Zusammenhang mit dem Markt von Sensoren für typisch chemische und biologische Grössen erwähnt.⁴

2 VERGLEICH CHEMISCHER SENSOREN MIT SENSILLEN

Der Titel impliziert, dass zwischen den Sensillen (als biologischen «Sensoren») und ihren technischen Analogen sowohl Ähnlichkeiten als auch Widersprüche bestehen. Der aus dem Englischen entlehnte technische Begriff Sensor nimmt Bezug auf natürlich entwickelte Strukturen von Lebewesen, die lebenserhaltende Funktionen haben wie die Sinneszellen der Nase, des Auges, der Haut u. a. Es gibt also biologische «Sensoren», die reversibel oder regenerierbar auf chemische und/oder physikalische Reize ansprechen. Im Folgenden sollen an einzelnen Beispielen Analogien bzw. Widersprüche und ihr Zusammenhang zur Funktion aufgezeigt werden. Es stellt sich mitunter die Frage, was wir von der Natur lernen können und wie das Potential, das in der Natur selbstverständlich ist, auf Messfühler übertragen und technisch genutzt werden kann.

In Abb. 1 wird versucht, die Funktion und Bauweise eines technischen Sensors und eines biologischen «chemischen Sensors» in einem einfachen gemeinsamen Schema zusammenzufassen. Es können **drei funktionelle Elemente** unter-

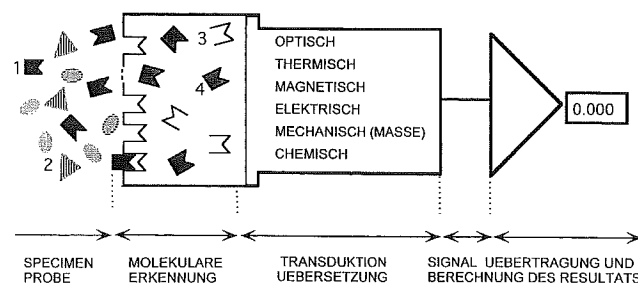


Abb. 1. Schematische Darstellung der funktionellen Gliederung von chemischen Sensoren in die 3 Kompartimente: molekulare Erkennung, Transduktion und Signalverarbeitung.

Fig. 1. Schematic representation of the common operational units of chemical sensors: molecular recognition, transduction and signal processing.

² In dieser Definition stimmen verschiedene Lexika überein.

³ STAT-ION, Technicon Tarrytown, New York/Photovolt Corp., Indianapolis, Indiana, USA.

⁴ Microsens S.A., Neuchâtel.

schieden werden, die technischen und biologischen Systeme **gemeinsam** sind:

1. Ein Element, das mit dem Untersuchungsgut in direktem Kontakt steht und in welchem die selektive *molekulare Erkennung* des Zielmoleküls sowie die Diskriminierung von Begleitkomponenten stattfindet. Für die Wechselwirkung mit einem Ziel- oder Gastmolekül stehen verschiedene *Wirtsmoleküle* und Erkennungsmechanismen zur Verfügung, aufgrund derer auch zwischen *chemischen Sensoren* im engeren Sinne und *chemischen Biosensoren* unterschieden wird. Wirtsmoleküle in ersteren sind z. B. synthetische Liganden und halbsynthetische katalytische Antikörper, in Biosensoren jedoch Antikörper, Rezeptormoleküle und Enzyme.

In biologischen Systemen werden Rezeptoren in *Lipid-Doppelschicht-Membranen* (BLM = bilayer lipid membrane) eingebaut und an der Oberfläche präsentiert. Das Medium, in dem die Wechselwirkung stattfindet, ist immer das aus der Evolution folgende wässrige Milieu. Dieses Muster wurde in der Sensortechnologie für die Implementierung von biologischen Molekülen (Enzyme, Antikörper) in Biosensoren übernommen: Immobilisation in Lipid-Bilayern (Langmuir-Blodgettfilme), auf Polymeren und in Hydrogelen.

Im Gegensatz dazu bewährte es sich, bei der Verwendung synthetischer Liganden als Wirtsmoleküle, diese in wasserabstossende (lipophile) Schichten, sog. unstrukturierte *Bulkmembranen*, einzubringen. Dies hat verschiedene *Vorteile*:

- Beim Übertritt eines Gastmoleküls aus einer in der Regel wässrigen Probe in diese Schicht oder *Membran* findet ein zweistufiger Prozess statt. Der Vorgang der molekularen Erkennung wird gekoppelt mit einem *Extraktionsschritt*, der wesentlich zur *Selektivität* des Sensors und zur Diskriminierung von Begleitkomponenten beiträgt. Die Selektivität ist gegeben durch das Extraktionsverhalten (d. h. den Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten des Analyten und der Begleit- oder Störkomponenten) und die spezifische molekulare Wechselwirkung. Die erforderliche Selektivität wird für jedes Untersuchungsgut abgeschätzt sowie experimentell untersucht und bestätigt.
- Das Erkennungsmolekül ist in dieser Schicht vor unspezifischen Wechselwirkungen teilweise geschützt. Der Sensor zeigt robustere Eigenschaften.
- Durch die hohe Variabilität in der Zusammensetzung der Sensorschichten lassen sich Extraktionsverhalten und chemische Reaktivität bedeutend beeinflussen.
- Es besteht eine hohe Flexibilität bei der Implementierung des Erkennungsprozesses in Messsystemen.

Der Nachteil ist, dass die Ansprechgeschwindigkeit durch die Diffusion der aktiven Komponenten in der Membran

limitiert ist und im Vergleich zu Oberflächensensoren in gewissen Fällen längere Ansprechzeiten zugelassen werden müssen. Die Schichten bzw. Membranen bestehen aus einem transparenten Träger-Gel, das ein Polymer und in der Regel einen Weichmacher sowie alle aktiven Komponenten enthält. Sogenannte dicke Schichten sind üblicherweise 100–500 µm dick, während dünne Schichten den Bereich von einigen nm bis üblicherweise 50 µm umfassen.

2. Ein *Transduktions-Element* ist für die Umsetzung des Erkennungsprozesses in eine physikalische Grösse und die Bildung des Signals verantwortlich. Die Transduktion kann sowohl chemisch wie rein physikalisch erfolgen, wie an Beispielen gezeigt werden soll. Der Transduktionsprozess ist an sich unselektiv. Er bestimmt die Charakteristika des Sensors und den Einsatzbereich wesentlich mit. Die grosse Auswahl der zur Verfügung stehenden physikalischen Sensoren und Aktuatoren⁵ ergibt ein breites Spektrum von möglichen physikalischen Übertragungsprinzipien. Die zurzeit am häufigsten mit chemischen Sensorschichten gekoppelten Verfahren sind Masse-, Potential-, Leitfähigkeits-, Frequenz- und Brechungsindexänderungen.

3. Ein *signalverarbeitendes Element* liefert die von einem Anwender gewünschte *Information*. Auf die Datenverarbeitung sowie die Bereitstellung und Präsentation der Information soll hier nicht weiter eingetreten werden. Der Fragenkreis «was wird gemessen und was wird letztlich als Information vermittelt» wurde aber unter anderem am Beispiel der Mg-selektiven Elektrode in verschiedenen Publikationen diskutiert (SIMON & SPICHTER, 1991; SPICHTER et al., 1991; SPICHTER, 1994, 1995).

3 DIE MOLEKULARE ERKENNUNG

3.1 Synthetische und biologische Magnesium- und Calcium-selektive Liganden

Ein Beispiel der reversiblen molekularen Erkennung mit Hilfe synthetischer Ionophoren soll anhand der **Mg-selektiven Elektrode** geschildert werden. Bei Assoziations- und Komplexbildungsreaktionen beruht das molekulare Prinzip der Wechselwirkung auf der Komplexbildung zwischen dem Liganden (Abb. 2a) und dem Zielmolekül. Zwischen der Erkennungskomponente in der apolaren Membranphase und dem Analyten im Untersuchungsgut stellt sich ein thermody-

⁵ Eigentlich Aktor (im Gegensatz zu Sensor); Sammelbezeichnung für Wandler, die elektrische Signale in mechanische Bewegungen oder andere physikalische Grössen umsetzen.

namisches Gleichgewicht ein. Vorausgesetzt dass der Ligand das Ion überhaupt komplexiert, tut er dies in einem typischen Zahlenverhältnis zwischen dem Ligandmolekül und dem Ion (Stöchiometrie) sowie mit einer typischen Geometrie, hier einer hexagonalen bzw. oktaedrischen. Dazu müssen allerdings durch die Membranzusammensetzung günstige Voraussetzungen für die Vorbereitung dieser Geometrie (durch Präformation der Ligandsphäre) geschaffen werden. Dies bedeutet andererseits, dass die Substituenten R1 bis R4 wie auch die Länge der Methylenbrücke(n) zwischen den Koordinationsstellen, den Malonsäurediamid-Gruppen (siehe Abb. 2a), einen wesentlichen Einfluss auf die Geometrie und deren Präformation besitzen (Abb. 3a). Sie wurden in diesem Falle arbiträr nach den Regeln der kombinatorischen Chemie variiert, bis in einer Membran mit Standardzusammensetzung eine möglichst hohe Diskriminierung von Natrium-, Kalium- und Calciumionen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) erreicht wurde. Es soll nun ein Modell geschaffen werden, welches elektroneninduzierende Effekte und die Lipophilie der Substituenten berücksichtigt und ihren Effekt auf die Diskriminierung von insbesondere Ca^{2+} und Na^+ untersucht, mit anderen Worten, deren Beitrag zur Selektivität der Liganden. Damit wird die Voraussage der Selektivität in vergleichbaren Fällen angestrebt. In zweiter Linie wurde durch die Wahl des Weichmachers (Abb. 2b) die Dielektrizitätskonstante und die Lipophilie der Membrenumgebung variiert, bis letztlich die gewünschte Diskriminierung von Alkali- und Erdalkali-Ionen für den medizinischen Einsatz erreicht wurde (Abb. 3b).

Vergleicht man nun den synthetischen Liganden ETH 7025 mit der relativen Molmasse $863.32 \text{ g mol}^{-1}$ mit einem biologischen Liganden, der reversibel Ionen komplexiert wie z. B. das Ca^{2+} -bindende Calmodulin, ein Proteinmolekül mit einer relativen Molmasse von 17 000, kann der Schluss gezogen werden, dass das biologische System einen wesentlich grösseren Aufwand treiben muss, um Ca^{2+} im wässrigen Medium selektiv zu komplexieren. Die aufwendige helikale Struktur des Calmodulins erlaubt feine Konformationsänderungen der Peptidstruktur. Allerdings besteht die Funktion des Calmodulins nicht in der Komplexierung von Ca^{2+} selbst, sondern in der Erzeugung und Weiterleitung eines Nervenimpulses. Die Konformationsänderung des Trägers als Folge der Komplexierung von Ca^{2+} löst letztlich durch Interaktion mit weiteren Zielproteinen eine Muskelkontraktion aus. Andererseits sind Magnesiumionen im Chlorophyll in der biologisch aktiven Form irreversibel gebunden. In diesen Beispielen bestimmen die Funktion des Liganden und die Kinetik des biologischen Prozesses die Bindungseigenschaften zum Ion.

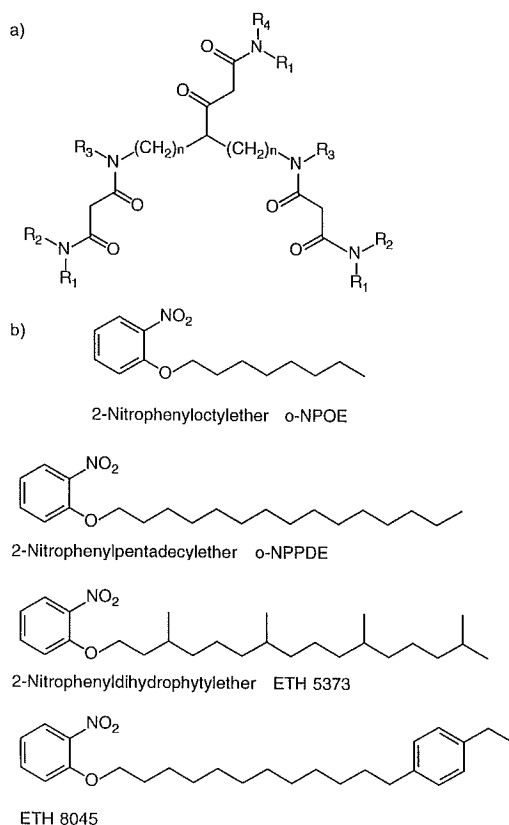


Abb. 2. (a) Magnesium-selektiver Ligand ETH 7025 und seine Derivate. Um dem Liganden die gewünschten Eigenschaften zu verschaffen, wurde die Länge der Methylenbrücken (CH_2) $_n$, welche die Malondiamid-Einheiten verbinden, variiert, sowie die Substituenten R₁, R₂, R₃ und R₄. – (b) Derivate des Weichmachers o-Nitrophenylether. Die Weichmacher wurden erfolgreich als Membranlösungsmittel von Liganden selektiv für zweiwertige Ionen, insbesondere Mg^{2+} eingesetzt. Ihre relative Dielektrizitätskonstante beträgt 23.9 ± 0.3 (DINTEN, 1988).

Fig. 2. (a) A magnesium-selective ionophore and its derivatives. In order to acquire the required selectivity of the ligand, the number of methylene units (CH_2) $_n$, bridging the malondiamide groups, as well as the substituents R₁, R₂, R₃ and R₄ were varied. – (b) Derivatives of the plasticizer o-nitrophenylether which was used very successfully to dissolve ligands selectively for divalent ions, specifically magnesium ions. The relative permittivity of o-NPOE is 23.9 ± 0.3 (DINTEN, 1988).

3.2 Biosensoren und das Fließgleichgewicht (Steady-State)

Die Stimulierung eines biologischen Rezeptors durch eine aktive Komponente löst oft eine Kaskade von Enzymreaktionen aus. Die Enzymaktivität hat die Einstellung von Fließgleichgewichten zur Folge, bei welchen ein Stoffumsatz stattfindet. Dieser kann durch einen Rückkopplungsmechanismus durch die entstehenden Produkte gebremst wer-

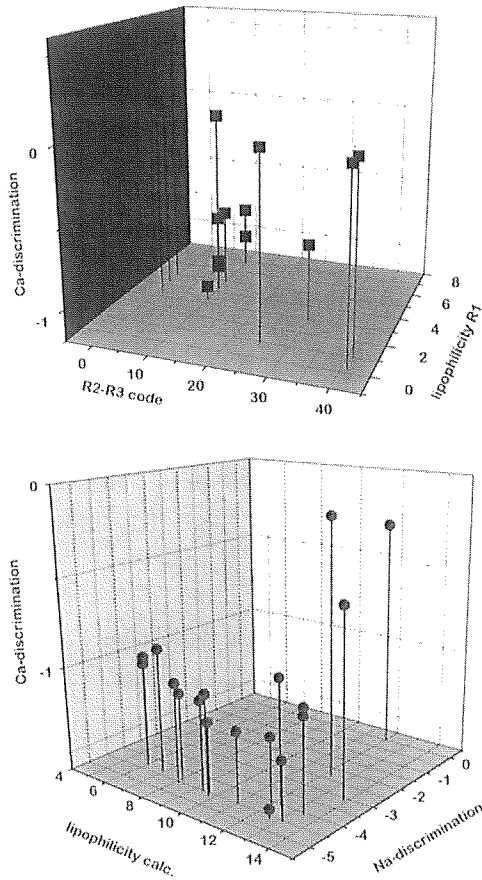


Abb. 3. (a) Einfluss der Substituenten des Liganden ETH 7025 (s. Abb. 2a) auf die Diskriminierung von Calciumionen. Die Position 10 auf der x-Achse vertritt eine Methylgruppe in R₂ und ein Wasserstoffatom in R₃. Die maximale Ca-Diskriminierung wird mit zusätzlich einer n-Heptylgruppe mit einer geschätzten Lipophilie von 3.5 in Position R₁ erreicht. – (b) Einfluss der Lipophilie des Weichmachers o-NPOE (s. Abb. 2b) auf die Ca- und Na-Diskriminierung. Die Diskriminierung beider Ionen verbessert sich mit zunehmender Lipophilie.

Fig. 3. (a) Influence of substituents of ETH 7025 (see Fig. 2a) on discrimination of calcium ions. The position 10 on the x-axis means that R₂ is a methylgroup whereas R₃ is hydrogen. In the best case with maximum Ca²⁺ discrimination, R₁ is a n-heptyl group with an estimated lipophilicity of 3.5. – (b) Influence of the lipophilicity of the plasticizer derivatives of o-NPOE (see Fig. 2b) on discrimination of Ca²⁺ and Na⁺. The discrimination of both ions increases with increasing lipophilicity.

den. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Erkennungsreaktionen können anhand verschiedener analytischer Methoden für die Alkohol- bzw. Ethanolbestimmung dargestellt werden.

Dieses Jahr konnten die erste Arbeiten publiziert werden, wo ein **chemischer Sensor i.e.S.** für die kontinuierliche Messung der Ethanol-Produktion in einem Bioreaktor einge-

setzt wurde (WILD et al., 1996; SPICHTIGER et al., 1996). Die chemische Erkennungsreaktion besteht in der reversiblen Bildung eines Halbacetals zwischen dem nucleophilen Alkohol und einem Trifluoroacetophenon-Derivat (BEHRINGER et al., 1990).

Im Gegensatz dazu beruhen die meisten **Biosensoren** auf dem Prinzip des enzymatischen Stoffumsatzes. Der meist verbreitete enzymatische Test besteht in der Oxidation von Ethanol mit Alkoholdehydrogenase. Da das Gleichgewicht dieser enzymatischen Reaktion im interessierenden Messbereich auf der Seite der Edukte liegt, muss das Produkt Acetaldehyd entfernt werden, um über die Konzentrationszunahme des Coenzym NADH auf die Alkoholkonzentration schliessen zu können. Die Zunahme der NADH-Konzentration lässt sich photometrisch durch die Bestimmung der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 340 bzw. 366 nm messen. Für die Konstruktion von Biosensoren wird vorzugsweise Alkoholoxidase verwendet, da im besten Fall ausser einem pH-Puffer und dem Luftsauerstoff keine weiteren Reagentien für die Quantifizierung von Ethanol benötigt werden. Drei Generationen von Bioassays und Biosensoren bieten eine Anzahl Möglichkeiten an, die Konzentration des Analyten anhand der Abnahme von Edukten, hier z. B. der Abnahme des Sauerstoff-Partialdrucks, oder der Zunahme von Produkten zu erfassen. Damit eröffnen sich zahlreiche Möglichkeiten, um eine Messgrösse zu generieren, welche der Analytkonzentration proportional ist.

Der Röhren- oder Ballontest der Polizei besteht im Gegensatz dazu in einer irreversiblen Oxidation von Alkohol durch Chromat, welche eine Veränderung des Oxidationszustandes des Cr(VI) zu Cr(III) zur Folge hat, was sich in einer Farbänderung von Gelb nach Blaugrün manifestiert. Ein solcher Test entspricht dem «Fieberthermometer» und erfüllt die Ansprüche, welche Sensoren erfüllen sollen, nicht.

Die aktuelle Generation von Biosensoren macht Gebrauch von der direkten Messung der Stromstärke bzw. Anzahl Elektronen, welche z. B. bei der Oxidation eines Analyts frei werden. Diese Elektronen werden über sog. **Mediatoren** (organische, leitende Salze) abgeleitet und als Stromstärke gemessen. In diesem Falle werden in unserem Laboratorium Enzym und Mediator in einer einzigen öligen Schicht kombiniert. Abb. 4 zeigt das Schema eines amperometrischen enzymatischen Biosensors für eine Oxidation (links) und eine Reduktion (rechts) (KORELL & SPICHTIGER, 1993, 1994; MÜLLER & SPICHTIGER, 1995). Diese Biosensoren bedingen in der Regel eine pH-gepufferte Probe; es werden jedoch keine weiteren Reagentien benötigt. Das Fliessgleichgewicht des enzymatischen Stoffumsatzes passt sich an veränderte

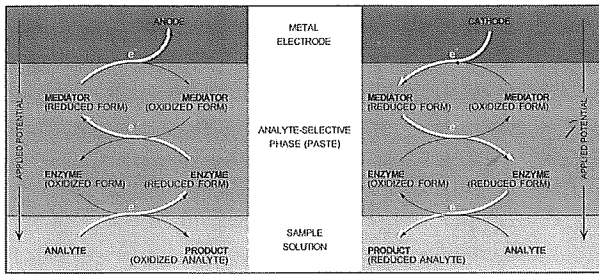


Abb. 4. Schematische Darstellung des Elektronentransfers beim amperometrischen enzymatischen Biosensor für eine Oxidation (links) und eine Reduktion (rechts). Bei der Oxidation ist die Analytkonzentration proportional zum Anodenstrom, bei der Reduktion proportional zum Kathodenstrom. Der Elektronentransfer wird durch ein organisches redoxaktives Salz (Mediator) katalysiert und erleichtert. Mediator und Enzyme sind hier in einer Siliconeelpaste suspendiert.

Fig. 4. Scheme of the electron transfer in an amperometric enzymatic biosensor for an oxidation (left) and a reduction process (right). During oxidation the concentration of the analyte correlates with the anodic current, during reduction it correlates with the cathodic current. The electron transfer is catalyzed by an organic salt (mediator). Mediator and enzyme are suspended within a silicone oil paste.

Konzentrationen des Analyts an und erlaubt deshalb ebenfalls kontinuierliche Messungen.

Andererseits gelang es in einer Zusammenarbeit mit PD Dr. P. Walde, vom Institut für Polymerchemie der ETHZ, Enzyme in der sog. *Biooptode*⁶ in Umkehrmizellen in Bulkmembranen einzubringen (VAILLO et al., 1995). Damit lassen sich in beiden Sensoren die Vorteile der Bulkmembranen mit der Implementierung von Biomolekülen und der Nutzung ihrer natürlichen Selektivität bzw. Spezifität vereinen. Gegenüber Sensoren, die Strukturen mit mindestens zwei Schichten verwenden, um das Enzym zu immobilisieren, zeigen Systeme mit nur einer Schicht keine zusätzlichen Diffusionsbarrieren und damit effizienteres Verhalten. Die Biooptoden bieten zahlreiche neue Möglichkeiten.

4 DIE TRANSDUKTION

4.1 Die optische Transduktion von Ca-selektiven Erkennungsprozessen

Der Austausch von Calciumionen zwischen einer wässrigen Probe und einer ionenselektiven Membran lässt sich durch eine Farbänderung sichtbar machen. Dazu wird ein lipophiler pH-Indikator mit geeignetem pK_a mit dem Ca-selektiven

Liganden zusammen in die Membran eingebracht (Abb. 5a). Bei einem passenden pH des Untersuchungsgutes findet nun ein Ionenaustausch statt. Wenn Ca²⁺ extrahiert wird, wird der Indikator deprotoniert und eine äquivalente Menge H⁺ in die Lösung abgegeben; die Absorbanz bei einer geeigneten Wellenlänge ändert sich. Solche Farbwechsel können über optische Fasern auch ohne direkten Kontakt zum Sensor abgeleitet werden. In diesem Fall wird der chemische Erkennungsprozess, die Komplexierung von Ca²⁺, über eine zweite chemische Reaktion in eine physikalische Messgröße überführt.

Einer Sichtbarmachung von physikalisch-chemischen Reizen stehen wir beim physiologischen Farbwechsel von Tintenfischen gegenüber. Bei letzteren stehen die Chromato-

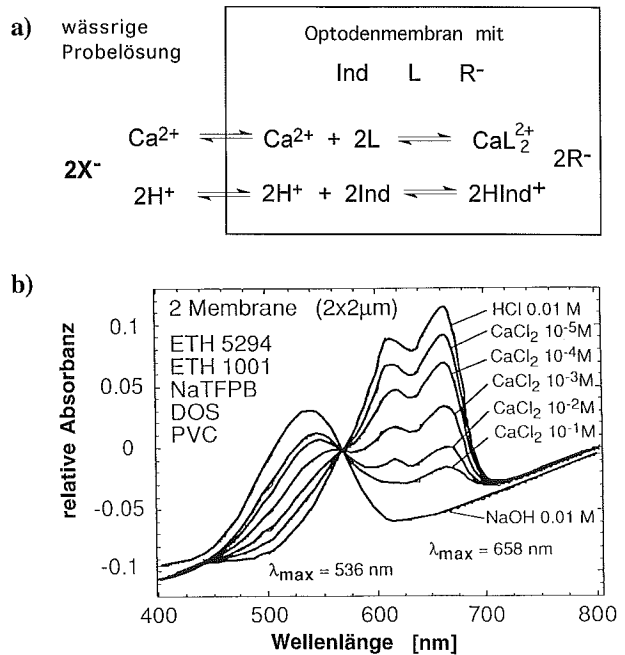


Abb. 5. (a) Modell des Ionenaustausches einer Ca-selektiven Membran mit optischer Transduktion. Ind = lipophiler pH-Indikator; L = ionenselektiver Ligand; R⁻ = lipophile anionische Gegenionen des Ion-Ligand-Komplexes bzw. des protonierten Chromoionophors (Indikator). - (b) Experimentell aufgenommenes Absorbanzspektrum des lipophilen Indikators in Abhängigkeit der wechselnden Ca-Konzentration der wässrigen, auf pH 5.2 gepufferten Kalibrationslösung.

Fig. 5. (a) Model of the ion-exchange of a calcium-selective membrane with optical transduction. Ind = lipophilic pH-indicator; L = ion-selective carrier; R⁻ = lipophilic anionic sites which compensate for the charge of the ion-ligand complex and/or the protonated indicator. - (b) Absorbance spectrum of the lipophilic indicator (chromoionophore) as a function of the variable concentration of calcium ions between zero (HCL) and 10⁻⁵ to 10⁻¹ mole l⁻¹ in a buffered calibration solution of pH 5.2.

⁶ Optode entspricht einer optischen Elektrode. Die Bio-Optode arbeitet mit Enzymen.

phoren der Haut in Verbindung mit glatten Muskelzellen, welche die Gestalt der Chromatophoren und damit die Hautfärbung verändern können. Sie beruht also letztlich auf dem Einstrom von Ca^{2+} ins Cytoplasma dieser Muskelzellen und deren Kontraktion bzw. dem umgekehrten Vorgang. Der physiologische Farbwechsel der Haut als Reaktion auf die Helligkeitsveränderung ihrer Umgebung tritt bei vielen Tierarten innert weniger Minuten auf. Die 4 μm dicke Ca-selektive Optodenmembran ändert ihre Farbe innert weniger Sekunden. In beiden Fällen liegt eine optische Transduktion des Calciumaustausches vor.

4.2 Rezeptroden⁷

Da viele Insekten ihren artspezifischen Geschlechtspartner aufgrund artspezifischer Duftstoffe finden, die mit den Antennen (Fühler) wahrgenommen werden, haben Insektenphysiologen schon früh untersucht, welche elektrischen Signale von Antennen abgeleitet werden können, wenn sie mit Duftstoffen stimuliert werden. SCHNEIDER (1957) war der erste, der solche Elektro-Antennogramme (EAG) ableitete und feststellte, dass die Antennen von Seidenspinner-Männchen bei Reizung mit dem artspezifischen Weibchen-Sexualduft (Sexualpheromon) besonders starke Potentiale lieferten. Dies wurde schon bald zur Analyse und Identifizierung der Sexualpheromone verschiedener Insektengruppen, besonders Kleinschmetterlingen und Nachtfaltern herangezogen, indem EAGs am Auslass eines Gaschromatographen abgeleitet wurden. Hier dienten also ganze Organe sozusagen als chemische «Elektroden» bzw. «Sensoren». Viel später machten der Sensorforscher Rechnitz und seine Mitarbeiter ähnliche Untersuchungen an den Antennulae der Krabbenarten *Podophthalmus vigil* und *Potunus sanguinolatus*, mit der Idee, diese Sinnesorgane bzw. ihre Chemorezeptoren als spezifische «Elektroden» einsetzen zu können; entsprechend wurde der Begriff «Rezeptrode» geprägt (BUCH et al., 1991; WIJESURIYA & RECHNITZ, 1993). In den Chemorezeptoren der Antennulae durchspannen besondere Rezeptorproteine die Dendritenmembranen der Sinneszellen. Bei chemischer Reizung mit z. B. Trimethylaminoxid (TMO) erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins und damit die Öffnung eines zentralen Ionenkanals, was Na-Ausfluss, Depolarisierung der Membran und Bildung eines Generatorpotentials zur Folge hat. Die elektrophysiologischen Untersuchungen mit einer ganzen Palette von Amininen und Aminosäuren, die zur Stimulation der Rezeptoren verwendet wurden, bewirk-

ten Aktionspotentiale. Es gelang jedoch nicht, die Antwort einzelner Neurone bzw. Rezeptoren zu identifizieren. Mit TMO wurden maximale Potential-Amplituden erhalten und es konnte, nach Einführung eines Amplitudensortierprogrammes, eine Dosis-Response-Kurve aufgenommen werden. Die Reizschwelle des Organs lag bei ca. 10^{-17} M TMO in physiologischer Salzlösung; der Ansprechbereich reichte bis 10^{-12} M TMO. Aufgrund der experimentellen Daten wurde offensichtlich, dass in diesen biologischen Systemen die Amplitude eine Funktion der Spezifität der Rezeptoren, die Frequenz aber eine Funktion der Konzentration des Stimulans ist.

In der Konzentrationsanalytik ist das Denken in «Konzentration proportional der Amplitude» Tradition. Die Rezeptroden-Versuche zeigen, dass für kreative neue Ansätze möglicherweise ein Umdenken nötig ist. Die bedeutendste Schwierigkeit ist die Versorgung des biologischen Sensors mit den notwendigen Nährstoffen, d. h. die Rezeptrode am Leben zu erhalten, sowie die Abklärung bzw. Definition der Selektivität der Rezeptorkombination.

Die Verwendung von Organen zeigt umgekehrt den Vorteil, dass die Kombination von Molekularer Erkennung und Transduktion und auch die Selektivität gegeben sind. Die Antwort solcher Sensoren im entsprechenden Medium erfolgt in der Regel innert Millisekunden. Der Sensor benötigt keine weiteren Katalysatoren als die im Gewebe vorgegebenen physiologischen. Die Nachweisgrenze kann im subfemtomolaren Bereich ($< 10^{-15}$ M) liegen, und der Ansprechbereich kann 10 Dekaden der Konzentrationsskala überdecken.

Isolierte Rezeptoren wurden in sog. Langmuir-Blodgett-filmen immobilisiert und stabilisiert. Mit Hilfe solcher Rezeptroden könnten möglicherweise Tests an lebenden Organismen wie z. B. die an lebenden Regenbogenforellen durchgeführten Toxizitätstests (FATS = *fish acute toxicity syndrome*) ersetzt werden, die in den USA von der Environmental Protection Agency (EPA) für Xenobiotica mit cardio-vaskulärer Wirkung in Gewässern anerkannt sind. Zurzeit werden Datenbasen geschaffen, um den Einfluss verschiedener Xenobiotica auf das cardiovaskuläre und respiratorische System solcher Fische zu testen. Der Vergleich zur menschlichen Reaktion bleibt dann immer noch fraglich.

Sensoren sprechen auf die aktive Molalität des Analyten direkt im Untersuchungsgut an. Eine der zentralen Fragen einer zeitgemässen Sensorforschung könnte die folgende sein: Inwiefern korrelieren die physikalisch-chemische und die biologische bzw. toxikologische Aktivität eines Analy-

⁷ Kunstwort, zusammengesetzt aus *Rezeptor* und *Elektrode* (WIJESURIYA & RECHNITZ, 1993).

ten? Die Lösung könnte möglicherweise Tests an lebenden Organismen ersetzen.

4.3 Die Messung von Brechzahländerungen

Ein Ansatz zum Umdenken in der analytischen Messtechnik bildet möglicherweise die Messung von Brechungsindexänderungen. In Zusammenarbeit mit dem Paul-Scherrer-Institut in Zürich ist es uns erstmals gelungen zu zeigen, dass die selektive, konzentrationsabhängige Verschiebung des Wellenlängenspektrums (Farbänderung) der Ca-selektiven Optodenmembran sich auch aufgrund von Brechzahländerungen selektiv erfassen lässt (FREINER et al., 1995). Um die Selektivität nicht zu verlieren und möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen, wurde die Kramers-Kronig-Transformation auf das Absorbanzspektrum angewendet. Das Absorbanzspektrum wurde in eine Dispersionsmatrix umgerechnet und das Dispersionspektrum aufgezeichnet (Abb. 6). Damit erhalten wir eine spektrale Information, welche nicht zwangsläufig mit einem Verlust an Selektivität und Sensitivität verbunden

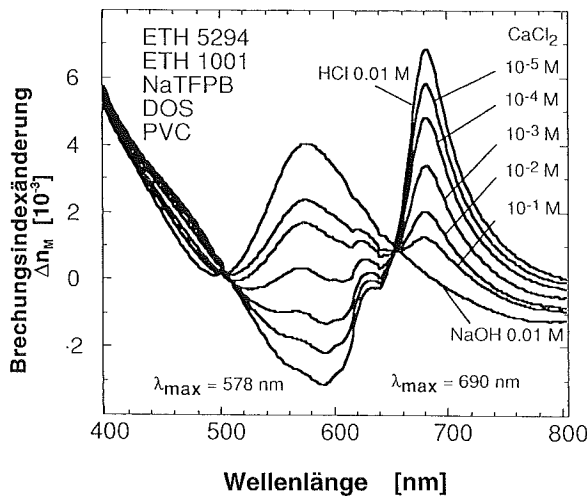


Abb. 6. Dispersionspektrum, das aus dem Absorbanzspektrum in Abb. 5b unter Anwendung der Kramers-Kronig- bzw. Hilbert-Transformation berechnet wurde. Gewisse Annahmen und Vereinfachungen mussten den Berechnungen zu Grunde gelegt werden. Das Dispersionsmaximum zeigt beim Nilblau-Derivat ETH 5294 eine bathochrome Verschiebung von ca. 30 nm zu tieferen Frequenzen. y-Achse = Brechungsindexänderung Δn_M in Abhängigkeit der Änderung der Ca^{2+} -Konzentration.

Fig. 6. Dispersion spectrum calculated from the absorbance spectrum applying the Kramers-Kronig- and Hilbert-Transformation, respectively. The calculations are based on some simplifications. The spectrum shows a bathochromic shift to lower frequencies of about 30 nm for the Nile Blue derivative ETH 5294. y-axis = variation of the refractive index, Δn_M , as a function of the varying calcium concentration.

sein muss. Dies bedeutet nichts anderes, als dass sich die Fortpflanzungsfrequenz einer elektromagnetischen Welle in einem Wellenleiter abhängig von der wechselnden Ca-Konzentration messen lässt. Das Projekt umfasst mitunter die Konstruktion eines auf dem optischen Chip integrierten Mach-Zehnder-Interferometers. Damit wird es möglich sein, ein miniaturisiertes Zweistrahlensystem zu konstruieren, bei dem die Ca-selektive Optodenmembran auf dem einen Arm des Interferometers, eine unselektive Referenzmembran auf dem anderen Arm aufgebracht wird. Die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle im Referenzarm wird dann durch diejenige im Ca-sensitiven Arm moduliert. Diese Messtechnik lässt sich vergleichen mit der Messung der Lumineszenz-Abklingzeit, wo die Konzentration eines Analyten mehr oder weniger unabhängig vom Absolutwert des Messsignals, d. h. von der Amplitude, bestimmt werden kann.

Die Entwicklung solcher neuer Messverfahren ist attraktiv, da bereits eine grosse Zahl von verschiedenen Erkennungsprozessen und von analyt-selektiven Schichten zur Verfügung stehen. Umgekehrt ist auch die Weiterentwicklung der analyt-selektiven Schichten attraktiv, da verschiedene Prinzipien für die Transduktion zur Auswahl stehen.

Durch Kombination können auf ein analytisches Problem zugeschnittene Lösungen gefunden werden.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Biologische Sinnesorgane bzw. Sensillen zeigen einen komplexen Aufbau, wobei an der Reizperzeption Rezeptormoleküle und Enzyme beteiligt sind. Sie sind immer an eine wässrige Umgebung gebunden, doch sind auch die natürlichen biochemischen Reaktionen immer reversibel bzw. regenerierbar. Die Wechselwirkungen an einem sensorischen Rezeptor sind in einem grösseren funktionellen Zusammenhang zu betrachten. Dies hängt damit zusammen, dass die biologischen «Sensoren» dem Schutz des Individuums und der Erhaltung der artgerechten Funktionen dienen und deshalb im Zusammenhang mit einer Kaskade von Folgereaktionen betrachtet werden müssen.

Andererseits sind die Sensoren technische Analoga zu biologischen Rezeptoren, die eine mehr oder weniger selektive Reaktion gegenüber chemischen Komponenten zeigen und ebenfalls reversibel bzw. regenerierbar sind. Auch das 3teilige grobe Funktionsprinzip, bestehend aus Erkennung, Transduktion und Informationsaufbereitung, gilt für beide Typen von «Sensoren», und auf atomarem und subatomarem Niveau gelten dieselben naturwissenschaftlichen Grundge-

setze. Je weiter sich jedoch die Perspektive vom atomaren Niveau abhebt, desto markanter werden die Unterschiede zwischen technischen und biologischen Lösungen, z. B. in der Transduktion der sensorischen Reize und der Aufbereitung der Information. Hier kann die Sensorik durch Modelle aus der Natur bereichert werden.

Biologische Erkennungsprozesse sind ans wässrige Milieu angepasst und haben sich im Laufe der Evolution entwickelt. Der Aufbau der Grundstruktur aus Aminosäuren ist zwingend; die Auffaltung erlaubt jedoch eine nahezu stetige Änderung der Konformation. Obwohl äusserst spezifische biologische Rezeptoren bekannt sind, genügen in natürlicher Umgebung oft auch solche mit geringen Selektivitätsanforderungen, mitunter deshalb, weil ihre «Meldungen» meist noch durch das zentrale Nervensystem weiter analysiert werden. Mit diesen Eigenschaften sind sie aber nicht unbedingt direkt für analytische Zwecke geeignet.

Unter die Biosensoren werden chemische Sensoren gezählt, die sich natürliche Erkennungsprozesse zu Nutze machen. Dies impliziert gleichzeitig, dass die Selektivität vorbestimmt ist.

Das technische Sensor-Analogon wird so einfach wie möglich, so komplex wie nötig, aber immer zweckmässig geplant und aufgebaut. Bei chemischen Sensoren i.e.S. wird die Selektivität aufgrund chemischen Wissens oder anlehnend an Muster, welche in der Natur wirkungsvoll sind, erarbeitet. Durch systematische Veränderung von «Membraneigenschaften», d. h. des umgebenden Mediums, kann auf den Erkennungsprozess Einfluss genommen werden. Ein Ziel ist es, Wechselwirkungen unter Berücksichtigung der Umgebung, in welcher diese stattfinden, voraussagen zu können.

Die chemischen Sensoren bergen in sich ein unglaubliches analytisches Potential für die kontinuierliche Messung der sich ändernden Merkmale eines Untersuchungsgutes. Die kontinuierliche Messtechnik hat in der medizinischen Analytik wesentlich höhere Durchsätze gebracht sowie die Möglichkeit der *Echtzeit-Analyse*. Aufgrund unserer Daten ist nicht einzusehen, weshalb das, was in der Medizintechnik möglich ist, nicht auch in anderen Bereichen, z. B. dem Abwasser-Monitoring oder der Reaktortechnik, angewendet werden kann. Durch Kombination können die unterschiedlichen Eigenschaften von Sensoren «gleichzeitig» genutzt werden.

6 VERDANKUNGEN

Ich möchte einigen Personen danken, die meinen Berufsweg wesentlich mitbestimmt haben. Dies waren Prof. H. Rosenmund und sein Nachfolger, Prof. D.J. Vonderschmitt, Institut für Klinische Chemie des Universitätsspitals Zürich, Prof. W. Simon, Laboratorium für Organische Chemie ETHZ – leider nicht mehr unter uns –, und Prof. G. Folkers, Department Pharmazie, ETHZ. Gerne gedenke ich auch der stimulierenden Vorlesungen von Prof. H. Büchi, Synthetische Pharmazeutische Chemie, und von Prof. P. Waser, Pharmakologie in der Zeit zwischen 1965 und 1968. «Last but not least» danke ich Herrn Prof. R. Hütter, der der Eröffnung *des Zentrums für Chemische Sensoren/Biosensoren und bioAnalytische Chemie* nach dem Tode von Prof. Simon letztlich zugestimmt und die Eröffnung ermöglicht hat.

Der Kommission für Technologie und Innovation danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes Nr. 3194.1 und des Eureka-Projektes D-Mag-Bio Nr. 2715.1.

7 LITERATUR

- BEHRINGER, C., LEHMANN, B., HAUG, J.-P., SEILER, K., MORF, W.E., HARTMAN, K. & SIMON, W. 1990. Anion-selectivities of trifluoroacetophenone derivatives as neutral ionophores in solvent-polymeric membranes. – *Anal. Chim. Acta* 223, 41–47.
- BUCH, R.M., BARKER, T.Q. & RECHNITZ, G.A. 1991. Intact chemoreceptor biosensor based on Hawaiian aquatic species. – *Anal. Chim. Acta* 243, 157–166.
- DINTEN, O. 1988. Experimentelle und theoretische Beiträge zur membrantechnologischen Verbesserung von ionenselektiven Elektroden beruhend auf PVC-Flüssigmembranen. – Diss. ETH Nr. 8591, 248 pp.
- FREINER, D., KUNZ, R.E., CITTERIO, D., SPICIGER, U.E. & GALE, M.T. 1995. Integrated optical sensors based on refractometry of ion-selective membranes. – *Sensors and Actuators B* 29, 277–285.
- JANATA, J. 1989. Principles of Chemical Sensors. – Plenum Press, New York, 317 pp.
- KORELL, U. & SPICIGER, U.E. 1993. Membraneless immobilisation of xanthine oxidase on organic conducting salt/silicone oil electrodes. – *Electroanalysis* 5, 869–876.
- KORELL, U. & SPICIGER, U.E. 1994. A novel membraneless amperometric peroxide biosensor based on a tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane electrode. – *Anal. Chem.* 66, 510–515.
- MÜLLER, J. & SPICIGER, U.E. 1995. The sensors for all reasons. – *Analysis europa October*, 31–34.
- SCHANZ, G.W. Hrsg. 1995. Jahrbuch der Sensortechnik 1995/96. – R. Oldenbourg Verlag, München & Wien.

- SCHNEIDER, D. 1957. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. - Z. vergl. Physiol. 40, 8-41.
- SIMON, W. & SPICHTIGER, U.E. 1991. Ion-selective sensors for clinical analysis. - Analytical Sciences, Suppl. 7, 861-866.
- SPICHTIGER, U.E. 1994. Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications: an area of analytical chemistry. - Habilitationsschrift ETHZ, 353 pp.
- SPICHTIGER, U.E. 1995. Ion-selective electrodes. Applications. Clinical analysis. In: «Encyclopedia of Analytical Science», A. TOWNSEND (ed.), pp. 2341-2353. - Academic Press, New York.
- SPICHTIGER, U.E., RUMPF, G., HAASE, E. & SIMON, W. 1991. Chemische Sensoren im medizinischen Einsatz: Ionenselektive Elektroden, Grenzen und Chancen. - Schweiz. med. Wschr. 121, 1875-1879.
- SPICHTIGER, U.E., SPICHTIGER, J., CITTERIO, D. & WILD, R. 1996. Kontinuierliche Ethanolmessungen mit einem chemischen Sensor. - Bioworld 3, 8-11.
- VAILLO, E., WALDE, P. & SPICHTIGER, U.E. 1995. Development of micellar biooptode membranes. - Anal. Methods Instrumentation 2, 145-153.
- WIJESURIYA, D.C. & RECHNITZ, G.A. 1993. Biosensors based on plant and animal tissues. - Biosensors & Bioelectronics 8, 155-160.
- WILD, R., CITTERIO, D., SPICHTIGER, J. & SPICHTIGER, U.E. 1996. Continuous monitoring of ethanol for bioprocess control by a chemical sensor. - J. Biotech. 50, 37-46.

PD Dr. Ursula E. Spichiger, Centre for Chemical Sensors / Biosensors and bioAnalytical Chemistry, Dept. of Pharmacy, ETH-Technopark, CH-8005 Zürich.