

Optimierung enzymhaltiger Braunsteinpasten



Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik
Technische Universität Graz

Betreuer

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Bernd Nidetzky¹
Mag. Dr. Bernhard P. H. Schaffar²

Vorgelegt von Reinhard Maier

Institutsleiter: Univ.-Prof. DI Dr.techn. Bernd Nidetzky

A - 8010 Graz, Petersgasse 12/I
Telefon: (+43 316) 873 – 8401
Telefax: (+43 316) 873 – 8434
<http://www.biote.tugraz.at>
<http://www.tugraz.at>

¹ Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik; Technische Universität Graz

² Roche Diagnostics Graz GmbH

Diese Arbeit entstand bei

Roche Diagnostics Graz GmbH

Kratkystraße 2

Abteilung GGRS

A – 8020 Graz

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

meiner Freundin Birgit

für die Unterstützung und Motivation über die letzten Jahre hinweg.

meinen Eltern Irmfried und Manfred

für die Unterstützung und die Möglichkeit, das Studium zu absolvieren.

meinen beiden Schwestern Daniela und Jasmine

für die oft benötigten Aufmunterungen.

Weiters möchte ich mich bei allen beteiligten Mitarbeitern der Firma Roche Diagnostics Graz bedanken.

Insbesondere bei

Mag. Dr. Bernhard P.H. Schaffar

für die optimale Betreuung bei der Planung und Durchführung der nötigen Versuche, sowie der Geduld während der Korrektur dieser Arbeit.

DI Martin Hajsek

für die Hilfestellung während des gesamten Sensorentstehungsprozesses.

Christian Kainz

für die zur Verfügung gestellten Messstände und Hilfe bei der Auswertung.

DI Michael Tomberger

für seine Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Dr. Christoph Ritter

für die Möglichkeit, diese Diplomarbeit an diesem Standort durchzuführen.

Kurzfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Herstellung von enzymatischen Glukose- und Laktatsensoren in einer wasserbasierten Carbon-Matrix und der Ermittlung von Kenndaten dieser Sensoren.

In einer möglichen Bauweise wird das Enzym in eine wässrige Polyacrylat-Präpolymeremulsion zugegeben und auf eine Basiselektrode, aufgebracht. Die einzelnen aktiven Komponenten der Elektrode, Ag/AgCl als Ableitung und Elektrodenoberfläche der Referenzelektrode, Graphit als Elektrodenoberfläche der Gegenelektrode und eine Braunstein/Graphit Kombination als aktive Arbeitselektrodenoberfläche, werden mittels Dickschichttechnologie auf einen Polycarbonatträger appliziert. Auf diese siebgedruckte Basiselektrode werden die Enzymkomponente und in Folge eine Deckmembran dispensiert.

Zur Vereinfachung des Fertigungsprozesses werden die Enzyme in die vormals siebgedruckte Brausteinschicht integriert und durch Nadeldispensierung aufgetragen. Weiters wird die Eliminierung der Deckmembran zur Diffusionslimitierung durch den Einsatz der Enzym/Braunstein-Polymermatrix angestrebt.

Zur Stabilisierung der Enzyme in der Graphit/Braunsteinpaste werden Versuche mit Zugabe von Rinderserumalbumin, Glycerin und Polyvinylpyrrolidon und der Einfluss von Glutardialdehyd zur Verbesserung der Vernetzung der Sensormatrix, sowie der Effekt der Brausteinkonzentration auf das integrierte Enzym untersucht.

Als Messverfahren wird eine amperometrische Messung in einer Drei-Elektrodenanordnung (Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode) gewählt. Die Umsetzung des Substrats erfolgt durch die Enzyme Glukoseoxidase und Laktatoxidase. Das gebildete Wasserstoffperoxid, wird bei einer Polarisationsspannung von 350 mV vs. Ag/AgCl am Braunstein oxidiert. Aufgezeichnet wird der aus der Oxidation des Wasserstoffperoxids resultierende Strom, der proportional der Substratkonzentration ist.

Die Auswertungen erfolgen hinsichtlich des Startverhaltens und der Linearität der Sensoren, sowie des Einflusses von Echtproben und bekannter Interferenten [1]. Die Ergebnisse werden im Rahmen dieser Diplomarbeit diskutiert.

Abstract

The subject of this diploma thesis related to the production process of enzymatic glucose- and lactate sensors with water based carbon matrices as well as the determination of the sensor characteristics.

One possible way of manufacture enzyme sensors is to apply an enzyme membrane to a base electrodes surface. The discrete compounds of the used base sensors, Ag/AgCl for reference electrode material, graphite for counter electrode and a composition of manganese dioxide and graphite for working electrode, are screen printed on a polycarbonate substrate. The enzyme- and the covering membrane are dispensed on the screen printed base sensor subsequently.

This diploma thesis focuses on the reduction of process steps, prepare the sensor by combination of the enzyme-, the cover membrane and the screen printed graphite/manganese dioxide layer.

The thesis also examines the stabilization effects to the enzyme by adding bovine serum albumin, glycerine and polyvinylpyrrolidone and the usability of glutardialdehyde in order to improve the enzyme immobilization. Finally the influence of the manganese dioxide concentration to the enzyme is investigated.

The concentrations of the substrate are tested using an amperometric system with a three electrode configuration, containing a reference-, a working- and a counter electrode. The formation of hydrogenperoxide is measured by oxidizing glucose or lactate at a manganese dioxide electrode at a polarization voltage of 350 mV vs. Ag/AgCl. The current measured as a result of the hydrogenperoxide oxidation is proportional to the substrate concentration in the sample.

The evaluation of these results comprises linearity, sensor wet up behaviors as well as the influence of known interfering substances and the influence of biological samples like human blood or plasma [1].

The conclusion of these subjects will be discussed in course of this thesis.

Inhaltsverzeichnis:

1	KURZFASSUNG	7
1.1	Ziel	7
1.2	Methode	7
1.3	Ergebnisse	7
1.4	Schlussfolgerungen	8
2	EINLEITUNG	9
2.1	Allgemeines	9
2.2	Aufbau von Biosensoren	9
2.3	optische Methoden	17
2.4	Enzymkinetik und Limitierung	19
2.5	Problemstellung	21
3	METHODEN	22
3.1	Herstellung der Sensoren	22
3.1.1	Siebdruck	22
3.1.2	Dispensieren	24
3.2	Messprinzip	25
3.2.1	Kalibration/ Messprogramm	27
4	DURCHFÜHRUNG	34
4.1	Los # R_01 Pastenvariation	34
4.2	Los # R_02 Wasserbasierende Carbonpasten	35
4.3	Los # R_03 Braunsteinkonzentration in wasserbasierenden Systemen	38
4.4	Los # R_04 Stabilisierungsversuche, Deckmembranvariation	39
4.5	Los # R_05 Vernetzungsversuche mit Glutardialdehyd, Änderung des Detergenz	40

5	ERGEBNISSE	42
5.1	Pastenvariation	42
5.1.1	Wetup	42
5.1.2	Stabile Phase	44
5.1.3	Zusammenfassung	47
5.2	Wasserbasierende Carbonpasten	49
5.2.1	Wetup	49
5.2.2	Stabile Phase	51
5.2.3	Zusammenfassung	52
5.3	Braunsteinkonzentration in wasserbasierenden Systemen	53
5.3.1	Wetup	53
5.3.2	Stabile Phase	57
5.3.3	Zusammenfassung	60
5.4	Stabilisierungsversuche, Deckmembranvariation	61
5.4.1	Wetup	61
5.4.2	Stabile Phase	64
5.4.3	Messungen	66
5.4.4	Zusammenfassung	73
5.5	Vernetzungsversuche mit Glutardialdehyd, Änderung des Detergenz	76
5.5.1	Wetup	76
5.5.2	Stabile Phase	79
5.5.3	Messungen	81
5.5.4	Zusammenfassung	86
6	KORREKTURWERTE	89
7	DISKUSSION	93
8	LITERATUR	97
9	ANHANG	99

1 Kurzfassung

1.1 Ziel

In einer möglichen Bauweise werden die Enzyme zur Herstellung von Metabolitsensoren in einer Polyacrylatmatrix auf eine Braunsteinschicht aufgebracht. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird das Verhalten von Sensoren mit direkt in die Braunsteinschicht eingemischten Enzymen untersucht, um eine Reduzierung der benötigten Fertigungsschritte zu erzielen. Die Integration erfolgt sowohl in die aktuell gebräuchliche - auf organische Lösungsmittel basierende - Pastenmatrix, sowie in eine wasserbasierende Matrix.

1.2 Methode

Die Sensoren sind als Drei-Elektrodensystem in Dickschichttechnik ausgeführt und beinhalten eine siebgedruckte Gegen- und Referenzelektrode, sowie eine Arbeitselektrode. Auf die siebgedruckten Schichten der Basiselektrode wird eine Braunstein/Kohlenstoff/Enzym – Schicht mit Hilfe eines Dispensierverfahrens aufgebracht.

Diese Sensoren werden in eigens dafür konzipierten Messständen [2] hinsichtlich ihrer elektrochemischen Kenngrößen untersucht.

1.3 Ergebnisse

Die Einarbeitung von Enzymen und Braunstein in wasserbasierende Carbonpasten zeigen am Glukosesensor sehr hohe Ströme und deutliche Vorteile in der Wetup – Phase. Die hohen Ströme während der Messung und der Kalibration erzielen keinen Nachteil, da die Startlinearität von bis zu 100 Prozent erhalten bleibt. Im Fall des Laktatsensors können keine vorteilhaften Erkenntnisse gegenüber der klassischen Fertigung gewonnen werden. Bereits nach 24 Stunden verliert der Laktatsensor in dieser Art der Herstellung seine Aktivität, was auf ein Ausbluten des Enzyms oder auf eine Inaktivierung während der Fertigung hinweist.

1.4 Schlussfolgerungen

Aufgrund des sehr guten und schnellen StartUp Verhaltens und der daraus resultierenden raschen Messbereitschaft kann der Glukosesensor ohne langwierige Equillibrationsphasen eingesetzt werden. Durch die hohe Reproduzierbarkeit wäre ein Einsatz in einem kalibrationsfreien System denkbar. Voraussetzung hierfür wäre jedoch eine geeignete Deckmembran, um eine Limitierung des Sensorsignals und eine Reduktion des Echtprobeneinflusses zu erreichen. Die Kombination der Enzymschicht mit der Graphit/Braunsteinschicht führt zu einer Reduktion der Fertigungsschritte und damit zu einem einfacheren und leichter handhabbaren Prozess.

2 Einleitung

2.1 Allgemeines

Die enzymatische Bestimmung von Analyten in der medizinischen Diagnostik hat ihre Bedeutung in den vergangenen Jahren nicht verloren. Besonders die Ausführung als Biosensor gewinnt weiterhin an Bedeutung. Biosensoren zeigen deutliche Vorteile gegenüber herkömmlicher instrumenteller Analytik. So kann man diese Sensoren zum Beispiel für kontinuierliche Messungen in Echtzeit, oder durch Miniaturisierung des analytischen Aufbaus direkt in der benötigten Umgebung einsetzen. Da jedoch für viele analytische Probleme noch keine Sensoren zur Verfügung stehen und die Herstellung sehr preiswert ist, wird in der Industrie ein hoher Aufwand betrieben diese Lücken zu füllen.

Als Paradebeispiel dient der Glukosesensor, der in den letzten Jahrzehnten im Blickpunkt der industriellen Entwicklung stand. Aufgrund der hohen finanziellen Gewinnmöglichkeiten in der Bestimmung von Blutzucker, genauer der Blutglukose wurden enorme Investitionen zur Weiterentwicklung getätigt [3]. Aus dieser Forschungsoffensive resultieren verschiedene Analysearten, welche sich im Sensoraufbau, dem verwendeten Enzym, oder in der Art der Signalverarbeitung unterscheiden.

2.2 Aufbau von Biosensoren

Die marktführenden Produkte zur Bestimmung von Glukose und Laktat in biologischen Proben setzen auf enzymbasierende elektrochemische Systeme. Der grundlegende Aufbau eines Biosensors ist in Abb. 2-1 dargestellt.

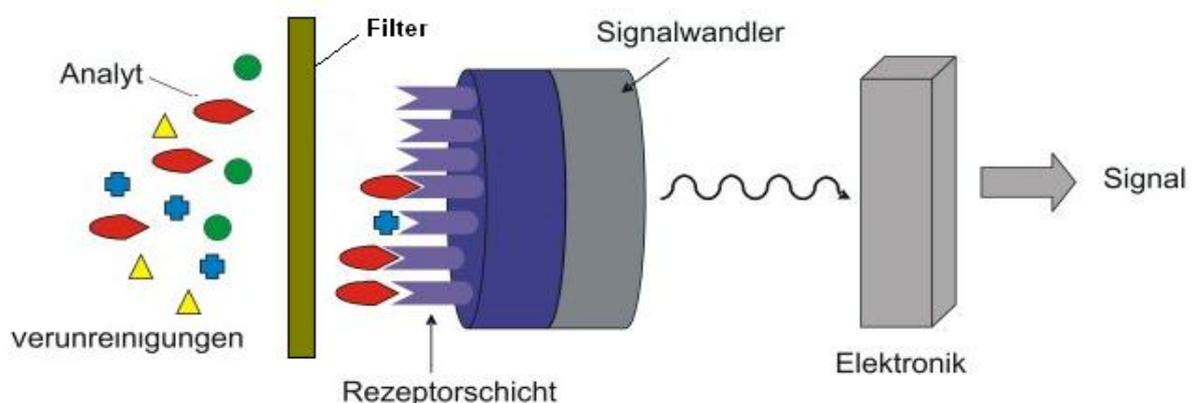


Abbildung 2-1: schematischer Aufbau eines Biosensors [4]

Durch Variation der einzelnen Schichtstrukturen ist es möglich, den Biosensor für genau zugeschnittene Analysenprobleme zu adaptieren. So erlaubt zum Beispiel die Änderung des Filters eine Verbesserung der Selektivität oder eine Limitierung der Diffusion. Wählt man als Filter eine Dialysemembran (Größenausschluss), so kann man eine Abtrennung von Zellen und Proteinen zur Rezeptorschicht erreichen. Erweitert man diesen Filter zum Beispiel um eine Schicht aus Polyethylenterephthalat (PETP) kann man zusätzlich eine Diffusionslimitierung erreichen [4].

Weitere Filtermaterialien sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Prinzip	Material	Anwendung
Größenausschluss (Dialyse)		Abtrennung von Zellen und Proteinen
Hydrophobe Membrane	Teflon, Silikon	Abtrennung von Ionen oder hydrophilen Substanzen
Hydrophile Membran	Hydrogele	Abtrennung von hydrophoben Substanzen
Ionentauscher	Nafion	Abtrennung der entgegengesetzt geladenen Ionen
Flüssigmembran mit Ionenkanälen		Spezifische Selektion von Ionen

Tabelle 2.1– verschiedene Filtermaterialien und deren Anwendung [4].

An der Rezeptorschicht werden die Analyte durch immobilisierte Rezeptoren umgesetzt, oder detektiert. Als Rezeptoren können in Biosensoren nicht nur Enzyme, sondern auch Zellen, Zellfragmente, Antikörper oder ssDNA verwendet werden.

Zur Immobilisierung der Rezeptoren können verschiedene Mechanismen angewandt werden [4, 5, 6]. Die einfachste Möglichkeit besteht darin, das Enzym hinter einer Membran einzuschließen. In dieser Immobilisierungsvariante behalten die Rezeptoren ihre Aktivität und Affinität. Der Nachteil dieser Bauweise ist, dass die Rezeptoren größer und die Analyten kleiner als die Maschenweite der Membran sein müssen (siehe Abb. 2-2 A). Um eine Stabilisierung zu erreichen, werden Rezeptoren oft in 3D-Strukturen eingebettet. Die kann durch Einschluss (siehe Abb. 2-2 B), kovalente Bindung (siehe Abb. 2-2 C) oder durch Quervernetzung der Rezeptoren (siehe Abb. 2-2 D) ermöglicht werden. Der Nachteil solcher Methoden zeigt sich im Verlust von Aktivität, verhindert jedoch sehr gut ein „Ausbluten“ der reaktiven Biomoleküle.

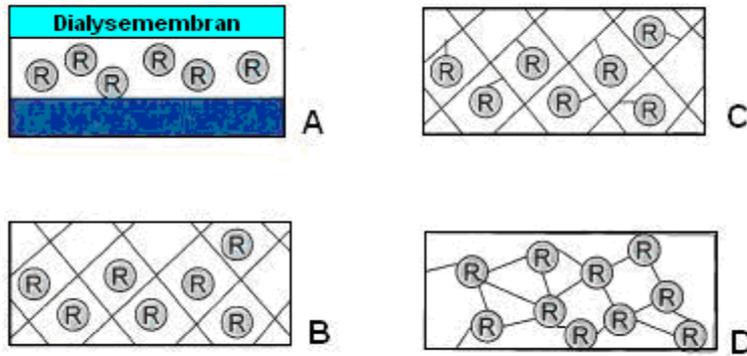


Abbildung 2-2: Immobilisierungsmethoden von Rezeptoren: A) Einschluss hinter Membran, B) Einschluss in 3D-Netzwerk, C) Kovalente Bindung im 3D-Netzwerk, D) Quervernetzung [4]

Der Signalwandler (oder Transduktor) erfasst die in der Rezeptorschicht generierten Signale. Zur Erfassung können verschiedenste physikalische Eigenschaften herangezogen werden (siehe Tab 2-2).

Transduktor	System	Gemessene physikalische Eigenschaft	Anwendung
Potentiometrische Sensoren	Elektrochemische Transduktoren	Elektrodenpotential	ISE
Voltametrische Sensoren		Stromstärke	Clark-Elektrode
Konduktometrische Sensoren		Leitfähigkeit	Halbleitergas-Sensoren
Kapazitive Ströme		Impedanz	Biosensoren
Lumineszenzsensoren	Optische Transduktoren	Fluoreszenz Phosphoreszenz Elektrolumineszenz Biolumineszenz	pO ₂ -Sensor Immunsensoren
Reflektometrische oder Transmissionssensoren		Veränderung des Absorptionsspektrums	Ionensensoren
Refraktometrische Sensoren		Brechungsindex	Affinitätssensoren
Quarzmikrowaage	Massensensitive Transduktoren	Resonanzfrequenz der Schwingung	Immunsensoren
SAW-Sensoren		Oberflächenschwingung	Immunsensoren

Tabelle 2.2– verschiedene Transduktoren [4].

Die Umsetzung von Glukose durch Glukoseoxidase [7] zu Glukonolacton und weiter zur Glukonsäure kann zum Beispiel über verschiedene Transduktionsmöglichkeiten erfasst werden:

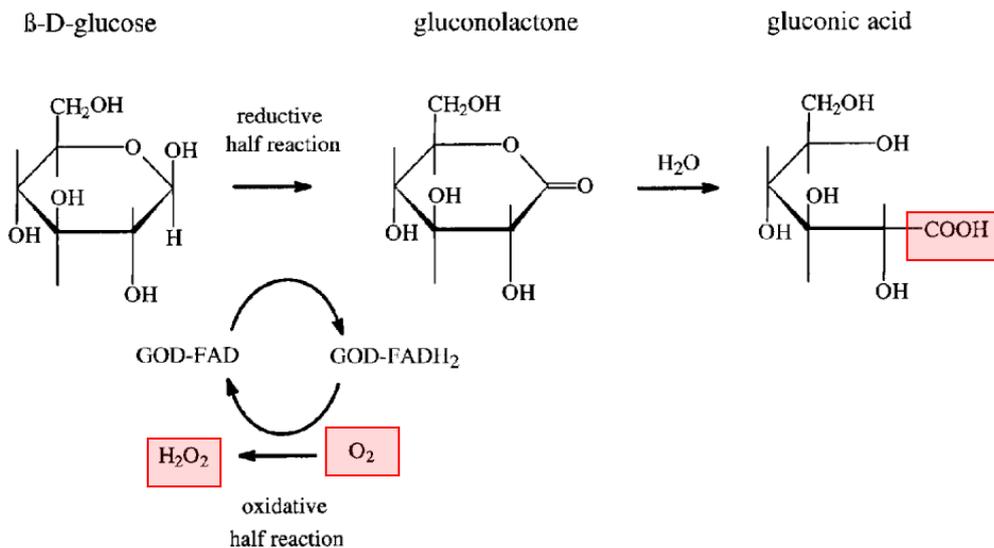


Abbildung 2-3: Reaktionsmechanismus der Umsetzung von Glukose zu Glukonsäure

Die Abnahme des Sauerstoffs kann man durch Anwendung elektrochemischer (Clarkelektrode [8]) oder optischer (Lumineszenz [9, 10]) Methoden messen. Weiters ist auch eine amperometrische Messung des gebildeten Wasserstoffperoxids oder die Abnahme des pH-Werts durch Bildung der Glukonsäure durch eine Glaselektrode[10] möglich.

Die Anwendung der amperometrischen Messung der Wasserstoffperoxidbildung gehört zu den gängigsten Methoden. Folgende Beispiele seien genannt:

- Einwegteststreifen zur amperometrischen Messung von Blutglukose (Fa. Roche AG, [11])
- Stabelektroden (Fa. Radiometer A/S, [13])
- Dickschichtelektroden (Fa. Roche AG, [14])

Die elektrochemische Bestimmung von Glukose durch die Teststreifen des Systems Accu-Check Aviva® der Firma Roche AG [11, 12] arbeitet mit einer PQQ-abhängigen Glukosedehydrogenase (anstatt der sauerstoffabhängigen Reaktion mit NAD (Nicotin-amid-adenin-dinucleotid)), das die D-Glukose zu Glukonolacton oxidiert und das Coenzym PQQ (Pyrrolochinolinchinon) zu PQQH₂ reduziert.

Das Enzym überträgt die Elektronen auf einen Nitrosoanilin-Mediator, der seinerseits irreversibel über die Stufe des Chinondiimins zum Phenylendiamin reduziert wird. Dieses wird an der Anode der Messzelle im Teststreifen nach Anlegen einer geeigneten Gleichspannung wieder zu Chinondiimin oxidiert. Der hierbei in der Elektrode resultierende amperometrische Strom ist proportional der Glukosekonzentration (siehe Abb. 2-4).

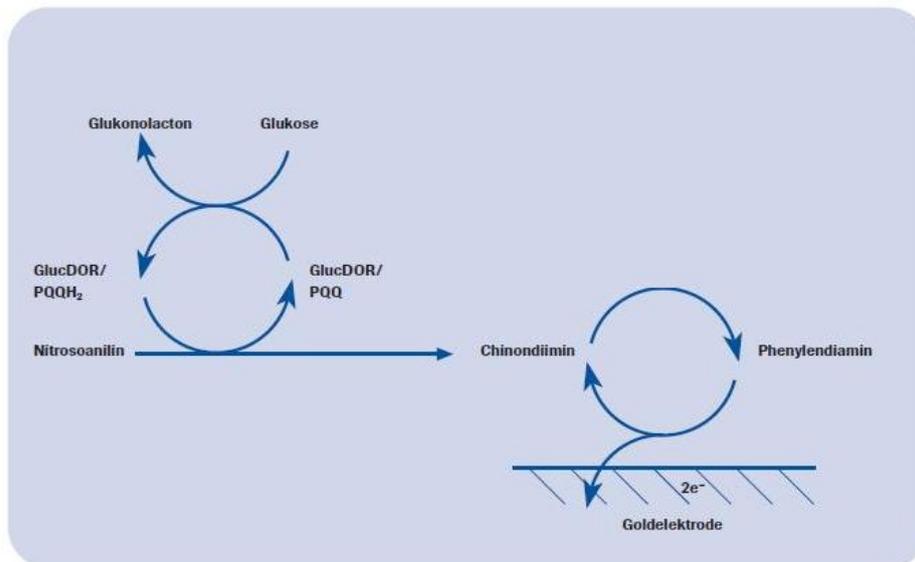


Abbildung 2-4: schematischer Ablauf der Glukosemessung im System Accu-Check Aviva® [11]

Die Basis des Systems der Fa. Radiometer bildet eine konventionelle Platin-Stabelektrode (siehe Abb. 2-5). Die spezifischen Enzyme werden in einer Membran immobilisiert und einer weiteren Schicht zur Limitierung der Diffusion überdeckt.

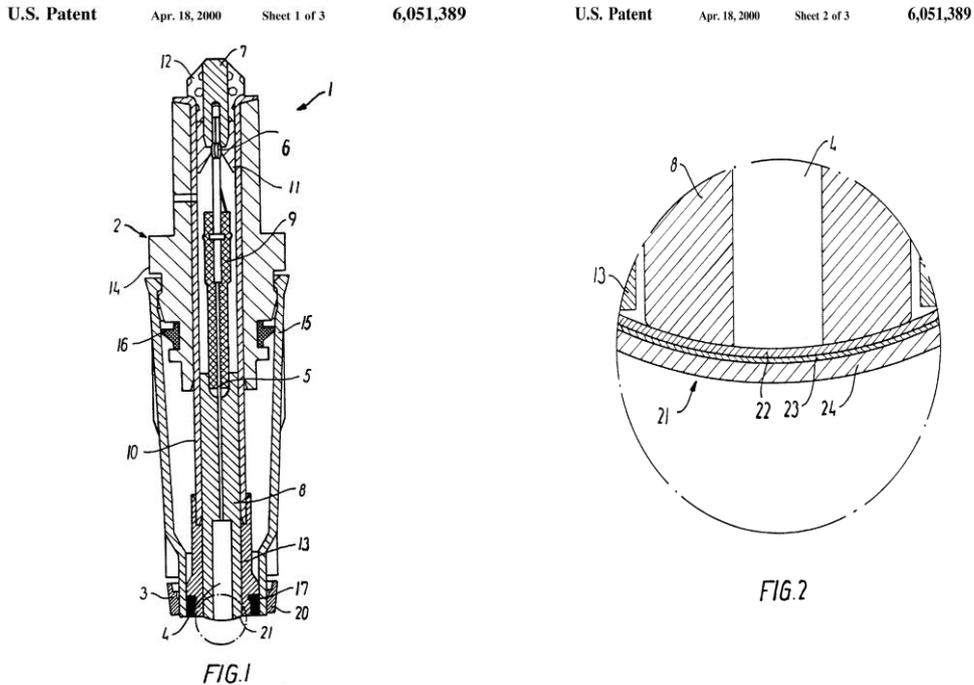
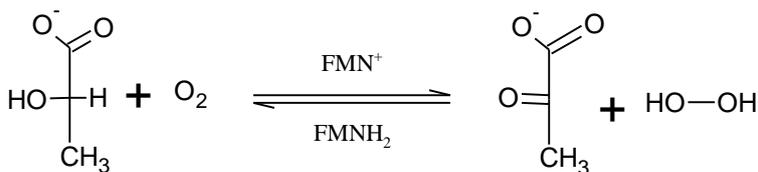


Abbildung 2-5: Aufbau der Stabelektrode zur Messung der Laktatkonzentration [13]: **Fig. I:** 1) gesamte Elektrode, 2) Elektrodenmantel, 3) Membranring, 4) Pt-Anode, 5) Pt-Draht, 6) Mikrostecker, 7) Ag-Kontakt, 8) Glaskörper, 10) Ag-Ref, 9, 11, 13) Halterungen, 12) Epoxidharz, 14) Kontaktstück, 15) Mantel, 16, 17) Dichtungen, 20) Halterung, 21) Membran; **Fig. II:** 4) Pt-Anode, 8) Glaskörper, 13) Halterung, 21) Enzymmembran gesamt, 22) Interferenzsperre, 23) Enzymmembran, 24) Membran zur Diffusionslimitierung.

Das Messprinzip basiert in diesem Beispiel auf der Messung des gebildeten Wasserstoffperoxids durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat durch die Laktatoxidase (Gl. 2-1):



Gl. 2-1

Das Substrat diffundiert durch die äußere Membran in das innere der Stabelektrode und wird dort in Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das gebildete Peroxid diffundiert durch

die Interferenzsperre, welche aus Celluloseacetat besteht, zur Platinanode. An dieser Anode findet die Oxidation des Wasserstoffperoxids statt (Gl 2-2).



Der durch diese Reaktion entstandene Strom ist äquivalent der ausgehenden Laktatkonzentration. Dieser Sensoraufbau beinhaltet nur zwei Elektroden, die Gegenelektrode ist gleichzeitig die Referenzelektrode.

Die Technologie der Dickschichtsensoren wird von der Fa. Roche Diagnostics Graz GmbH zur Bestimmung von Metaboliten in biologischen Proben verwendet [14]. Hierzu werden die Sensorkomponenten durch Siebdruck auf ein nichtleitendes Trägermaterial aufgebracht. Die Referenzelektroden bestehen aus Ag/AgCl, die Gegenelektroden aus Kohlenstoff und die Arbeitselektroden aus einem Kohlenstoff-Braunsteingemisch (siehe Abb. 2-6). Als aktive Komponente werden die verwendeten Enzyme (GOD und LOD) in einer Polyacrylatmatrix gelöst und durch Dispensieren auf die Arbeitselektrode aufgebracht (Abb. 2-7). Als Diffusionssperre dient eine Membran aus einem Polyvinylchlorid – Copolymer.

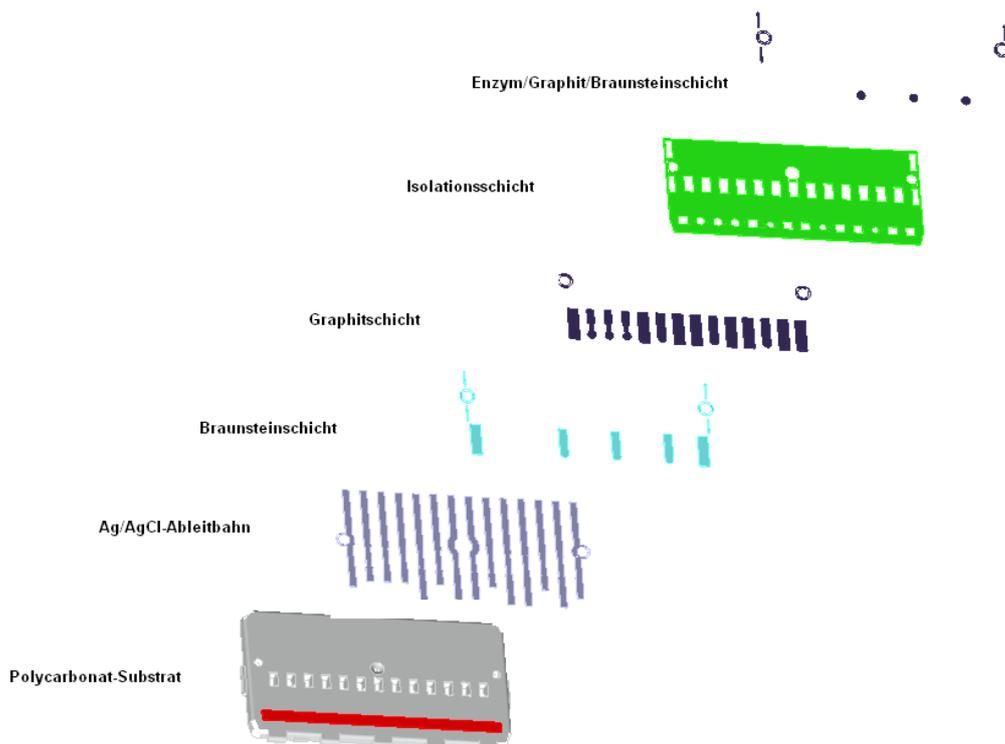


Abbildung 2-6: Explosionszeichnung des verwendeten Sensoraufbaus.

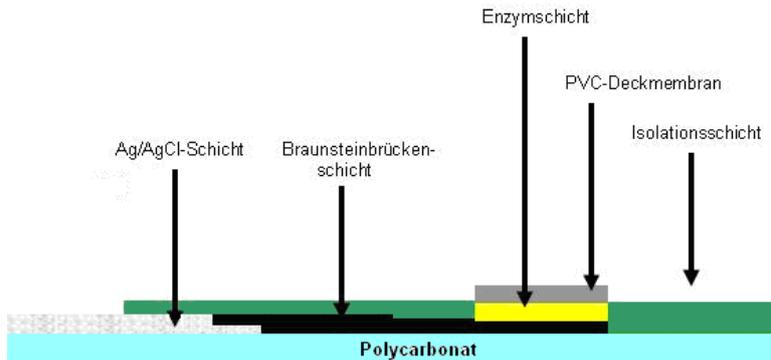


Abbildung 2-7: Schnitt durch eine Dickschicht-Arbeitselektrode.

Zur Messung von Glukose wird das Enzym Glukoseoxidase eingesetzt. Der Mechanismus ist vergleichbar zur Stabelektrode. Das Substrat diffundiert durch die PVC-Membran und wird in der Enzymschicht zu Glukonat umgesetzt (siehe Abb. 2-3). Das Elektrodenmaterial für den elektrochemischen Basissensor besteht aus einem Braunstein - Carbon-Gemisch. Der Einsatz von Braunstein ermöglicht eine Herabsetzung des Arbeitselektrodenpotentials von +650 mV vs. Ag/AgCl (wie bei der oben beschriebenen Platinelektrode) auf + 350 mV vs. Ag/AgCl (Gl. 2-3). Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der elektrochemischen Umsetzung des H_2O_2 Sauerstoff zurückgebildet wird. Dies wirkt der O_2 Verarmung des Elektrodenraums, verursacht durch die enzymatische Umsetzung, entgegen.



Gl. 2-3

Jedes dieser Systeme zeichnet sich durch Vor- aber auch Nachteile aus. So gilt die Stabelektrode als sehr robustes System durch ihre Bauweise, benötigt jedoch zu Beginn aufgrund der schlechten Wetup-Phase länger bis sie stabil misst und ist in ihrer Herstellung schwierig und recht teuer. Die Herstellung der Teststreifen ist dagegen sehr günstig. Der Teststreifen kann aufgrund der irreversiblen Umsetzung des Nitrosoanilin-Mediators nur einmal eingesetzt werden. Das Dickschichtsystem hat aufgrund der dünnen Schichtstrukturen den Vorteil einer schnellen Wetup-Phase und kann leicht in großen Zahlen produziert werden, was sich auch im Preis niederschlägt. Ein weiterer großer Vorteil ist der Einsatz von Braunstein anstatt von Platin, da die Zersetzungsspannung von Wasserstoffperoxid fast halbiert werden kann. Durch die Reduktion der angelegten Spannung werden auch weniger Störsubstanzen oxidiert und verringern so den Einfluss von Interferenzen.

2.3 optische Methoden

Zur enzymatischen Bestimmung von Substratkonzentrationen werden auch optische Verfahren eingesetzt und häufig als Referenzsysteme bei der Bewertung von Biosensoren verwendet.

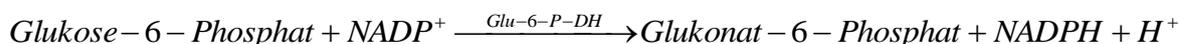
Da innerhalb dieser Arbeit mehrmals auf diese Referenzmessungen bezogen wird, werden die Methoden und deren Mechanismen, nach dem unser ausgewähltes Referenzsystem (Roche Hitachi 902) arbeitet, vorgestellt.

Die Bestimmung von Glukose mittels Hexokinase funktioniert als zweistufiger enzymatischer Prozess. In der ersten Stufe wird Glukose mit Adenosintriphosphat (ATP) durch Hexokinase in Glukose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) umgesetzt (siehe Gl. 2-4).



Im zweiten Schritt wird das produzierte Glukose-6-Phosphat in Gegenwart von Nicotin-amid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP^+) durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Glukonat-6-Phosphat unter Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ oxidiert (siehe Gl. 2-5).

Gl. 2-5



Die Geschwindigkeit der Zunahme von NADPH ist direkt proportional der Glukosekonzentration und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Die Laktatbestimmung im Hitachi 902 System ist ebenfalls eine gekoppelte enzymatische Umsetzung. Durch das Enzym Laktatoxidase (LOD) wird L-Laktat zu Pyruvat unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidiert (siehe Gl 2-6):



Das im ersten Schritt gebildete Wasserstoffperoxid wird in einer zweiten Enzymreaktion durch Peroxidase (POD) zu einem Farbstoff umgesetzt (siehe Gl 2-7):



Die Messung erfolgt ebenso photometrisch bei einer Wellenlänge von 700nm, die Intensität des Chromogens ist proportional der Laktatkonzentration.

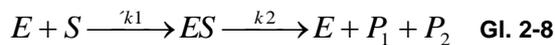


Abbildung 2-8: Hitachi® 902 Analyzer der Fa. Roche AG ®

2.4 Enzymkinetik und Limitierung

Bei der Verwendung von Enzymen als Rezeptoren in Biosensoren ist ein Verständnis der Umsetzungsmechanismen erforderlich.

Enzyme sind Proteine, die als Biokatalysatoren wirken und die Aktivierungsenergie einer Reaktion herabsetzen (siehe Abb. 2-9). Dabei wird das Enzym nicht verbraucht, jedoch wird der Analyt über die Zwischenstufe des Enzym-Substratkomplexes umgesetzt. Diesen Mechanismus beschreibt die von L. Michaelis und M. Menten hergeleitete Reaktionsabfolge (Gl. 2-8) [15, 16]:



E = Enzym

S = Substrat

P₁, P₂ = Produkte

K₁ = Gleichgewichtskonstante zur Bildung des Enzym-Substratkomplexes

K₂ = Gleichgewichtskonstante für den Umsatz der Enzym-gebundenen Reaktionspartner

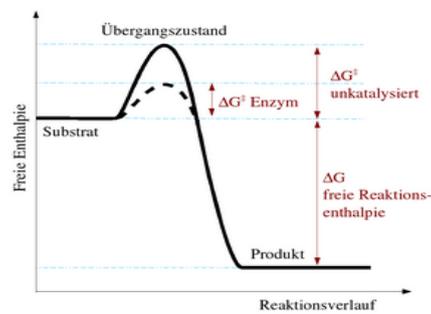


Abbildung 2-9: Energiediagramm einer enzymkatalysierten Reaktion [4]

Die Produkte P₁ und P₂ entstehen in einer vollständig ablaufenden Reaktion aus dem Enzym-Substratkomplex. Die Teilreaktion am Enzym-Substratkomplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die gesamte Reaktion, damit ist die messbare Geschwindigkeit *v* der Konzentration des Enzym-Substratkomplexes proportional. Die maximale Geschwindigkeit ist dann erreicht, wenn alle Enzymmoleküle mit Substrat beladen (oder gesättigt) sind [10].

Aus dem Zusammenhang der Substratkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit entsteht der von Michaelis und Menten hergeleitete Term zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen bei konstanter Enzymkonzentration (Michaelis-Menten-Gleichung, Gl 2-9) und die theoretisch abgeleitete Sättigungskurve (Abb. 2-10):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Gl. 2-9

v = Reaktionsgeschwindigkeit
 v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 $[S]$ = Substratkonzentration
 K_M = Michaelis Konstante

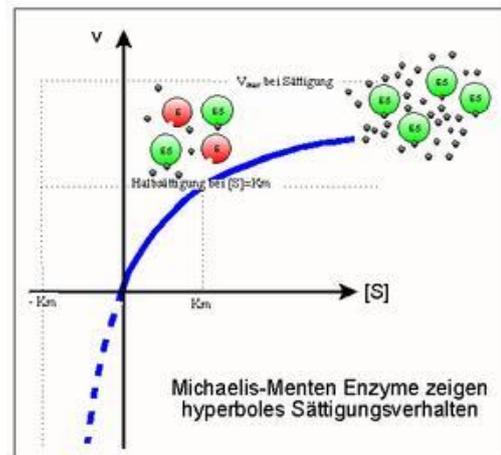


Abbildung 2-10: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration [4]

Der K_M -Wert gibt die Substratkonzentration an, die nötig ist, um die Hälfte der vorhandenen Enzyme zu beladen und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat (je kleiner K_M ist, desto schneller wird das Substrat vom Enzym umgesetzt, da eine geringere Ausgangskonzentration notwendig ist).

Die Sättigungskurve in der angegebenen Form ist jedoch nur dann gültig, wenn keine störenden Effekte eintreten. Effekte dieser Art können strukturell ähnliche Moleküle zum Substrat sein, die um die Bindung am aktiven Zentrum, an welchem die katalytische Funktion lokalisiert ist, konkurrieren. Durch eine solche Hemmung sinkt v_{\max} und es ist eine höhere Substratkonzentration nötig, um die Halbsättigung zu erreichen (damit steigt K_M).

Weitere Störeinflüsse können eine Hemmung durch das gebildete Produkt, sowie einer zu hohen Konzentration an Substrat sein (Produkt- bzw. Substrathemmung), oder durch Komplexierung von benötigten Co-Substraten oder Co-Faktoren.

Werden Enzyme in Biosensoren eingesetzt, ist ein großer Überschuss an Substrat zu vermeiden, da die Bildung der Produkte von der Konzentration (oder besser Aktivität) des Enzyms abhängig wäre (Enzymlimitierung). Daher wird das Substratangebot in Sensoren limitiert. Dies geschieht meist durch den Einsatz von Membranen, die die Diffusionsgeschwindigkeit des Substrats zur Enzymschicht reduzieren. Diese Limitierung ermöglicht es, bei hohen Substratkonzentrationen eine stabile Linearität des Sensorsignals zu sichern. Wäre die Limitierung durch die Aktivität des Enzyms gegeben, wird bei hohen Substratkonzentrationen nur die Konzentration umgesetzt, die nötig ist, um das Enzym abzusättigen. Als Faustregel gilt, dass Biosensoren bei Konzentrationen $<K_m$ betrieben werden sollen.

2.5 Problemstellung

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Reduktion der Fertigungsschritte zur Herstellung der Glukose- und Laktatsensoren in der Dickschichttechnik. Diese Reduzierung kann durch Einmischung des jeweiligen Enzyms in die Graphit-Braunsteinpaste erreicht werden. Weitere Vorteile dieser Kombination können einerseits die Erhöhung der gewonnenen Ströme sein, als auch das erhöhte Sauerstoffrecycling, da der Braunstein in direktem Kontakt zum Enzym steht und das gebildete Wasserstoffperoxid vor Ort umgesetzt werden kann.

Nachteilig kann sich das verwendete Polymer der Pastenmischung auf die Stabilität der Enzyme auswirken. Die verwendeten Lösungsmittel der Graphit-Braunsteinpaste sind organischer Natur und können einen negativen Effekt auf die Enzyme aufweisen (Inaktivierung, Denaturierung). Im derzeit angewandten Verfahren werden die Enzyme in eine wasserbasierende präpolymere Polyacrylat-Präpolymeremulsion eingemischt. Als Alternative könnten wasserbasierende Carbonpasten mit eingemischtem Braunstein/Enzymgemisch dienen, da der Lösungsmittelleffekt geringer ausfallen kann und die Enzyme bereits für die Polyacrylatemulsion konzipiert sind.

3 Methoden

3.1 Herstellung der Sensoren

3.1.1 Siebdruck

Die benötigten Leiterbahnen werden in der Dickschichttechnologie durch ein Siebdruckverfahren [17] hergestellt. Hierfür werden die benötigten Komponenten wie Silber/Silberchlorid oder Graphit in eine dickflüssige Paste aus verschiedenen Polymeren, Weichmachern und organischen Lösungsmitteln eingemischt und auf Siebe aufgebracht. Diese Siebe besitzen Freistellungen an definierten Stellen und ermöglichen so eine Aufbringung der gewünschten Paste auf das Kunststoffsubstrat durch Durchstreichen der Paste mittels eines Rakels (siehe Abbildung 3-1).

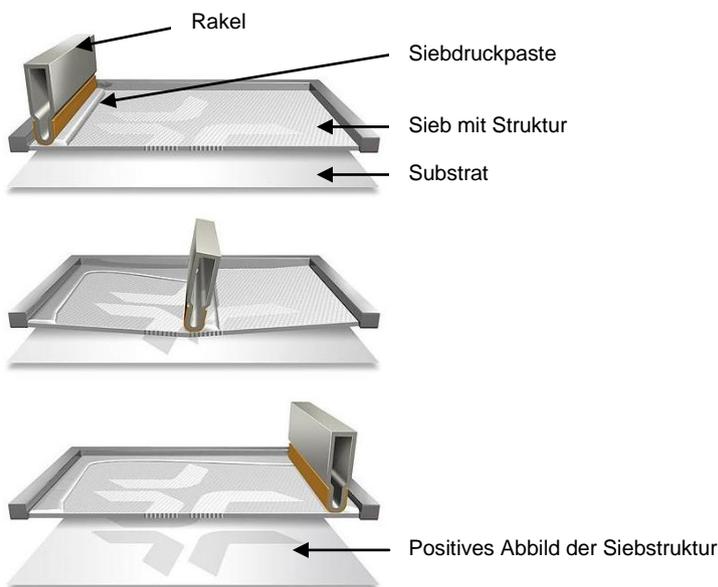


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Siebdrucktechnik (Abbildung aus www.drucktechniken.de)

Im ersten Schritt werden die Ableitungen aus einer Ag/AgCl – Paste gedruckt. Diese dient zur Ableitung des gebildeten Stroms zu den Kontakten des Messaufbaus. Nach dem Druck werden die einzelnen Schichten getrocknet. Die Aushärtezeiten und Temperaturen sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Auf die Ableitungen werden im zweiten Schritt die Graphitabdeckung für die Gegen- und Referenzelektrode gedruckt und wiederum getrocknet. Im dritten Druckschritt wird das Graphit-Braunsteingemisch aufgebracht. Dieser Schritt wird nach Trocknung der Paste wiederholt. Diese Schicht dient zur Umsetzung des gebildeten Wasserstoffperoxids durch den beinhalteten Braunstein. Nach der Trocknung der zweiten Braunsteinschicht wird eine Isolationsschicht über den Sensor gedruckt.

Es gibt lediglich Aussparungen im Bereich der aktiven Komponenten im Probengang und im Bereich der Kontakte zum Messaufbau. Diese Schicht dient der Vermeidung von Kurzschlüssen.

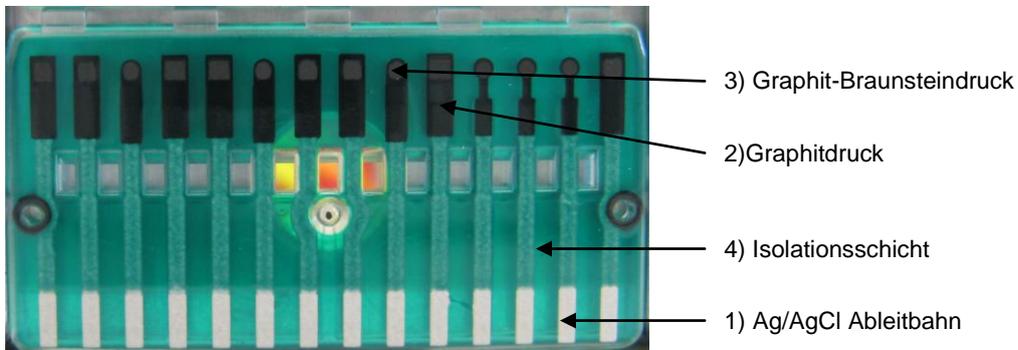


Abbildung 3-2: Darstellung des verwendeten Sensorlayouts nach dem Siebdruckschritt

Siebdruck	Temperatur [°C]	Zeit [h]
Ag/AgCl Paste	85 ± 5	2
Graphitpaste	85 ± 5	1
Graphit-Braunsteinpaste	85 ± 5	1
Isolations-Paste	85 ± 5	3

Tabelle 3.1– Aushärtebedingungen der Siebdruckpasten

3.1.2 Dispensieren

In der herkömmlichen Fertigungsweise werden das benötigte Enzym und die Deckmembran durch ein Dispensierverfahren auf den Sensor aufgebracht. Dazu wird das Enzym in einer Polyacrylatmatrix gelöst und in ein Dispensiermodul gefüllt. Dieses Modul gleicht einer offenen Spritze und wird mit einer Nadel und einem Druckluftanschluss versehen (siehe Abb. 3-3). Um das Enzym/Polymergemisch auf den Sensor aufzubringen wird nun ein Druck angelegt und das Dispensiergut durch die Nadel gedrückt. Durch die Variation des Nadeldurchmessers, sowie des angelegten Drucks kann das aufzubringende Volumen gut kontrolliert werden.

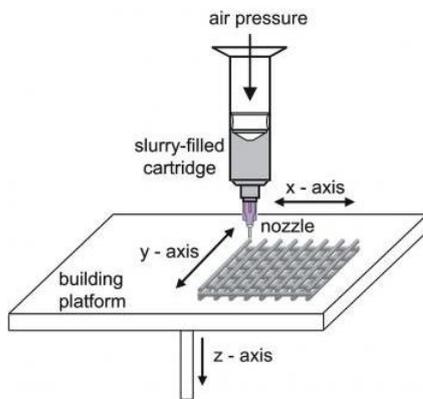


Abbildung 3-3; Schematische Darstellung des Dispensierverfahrens (Abbildung aus <http://www.fbi-biomaterialien.de>)

Im Zuge der Diplomarbeit werden die Enzyme direkt in die Braunstein/Graphitpaste eingemischt und auf den Braunsteinspot der Arbeitselektrode mit Hilfe des Dispensierverfahrens aufgebracht (siehe Abb. 3-4). Dazu werden die Enzyme in einer 10%igen Detergenzlösung gelöst und direkt der mit Braunstein versehenen Graphitpaste zugegeben. Zur Homogenisierung wird die Paste 2 Minuten bei 3000 U/min in einem Planetenmischer der Fa. Speedmixer (DAC150FVZ) gemischt.

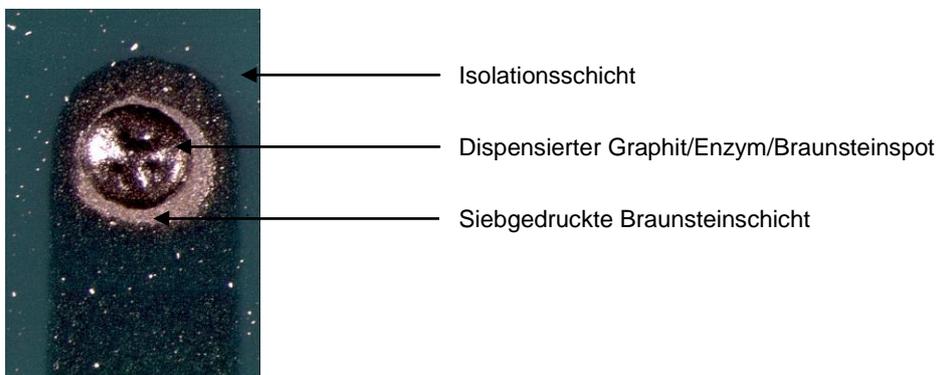


Abbildung 3-4: Abbildung einer fertig gestellten Arbeitselektrode

3.2 Messprinzip

Als Messprinzip wird die Amperometrie gewählt [11, 19]. Hierzu wird an der Arbeits- und der Gegenelektrode (CE) ein konstantes Potential angelegt und der aus der Reaktion generierte Strom gemessen. Um eine Beeinflussung des Potentials an der Arbeitselektrode (WE) zu vermeiden wird eine dritte Elektrode, die Referenzelektrode (RE), hinzugefügt. Dadurch kann das angelegte Potential zwischen Arbeits- und Gegenelektrode solange verändert werden, bis sich die gewünschte Spannung U_0 zwischen der stromlosen Referenz- und Arbeitselektrode einstellt.

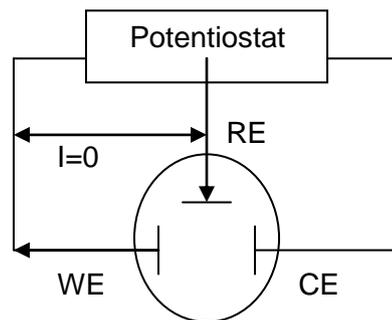


Abbildung 3-5; Darstellung einer amperometrischer Dreielektrodenanordnung

Im vorliegenden Sensorlayout sind drei Dreielektrodenanordnungen vorgesehen, da auf demselben Träger Glukose und Laktat gemessen werden soll und zur Interferenzkorrektur auch eine BSA – Elektrode realisiert wird (BSA = bovine serum albumin = Rinderserumalbumin = nicht reaktives Protein).

An der BSA-Elektrode wird kein Substrat umgesetzt, sondern nur Störsubstanzen, die auch an der Glukose- oder Laktatelektrode detektiert werden. Durch die Differenz des Signals an der Enzymelektrode und des BSA-Signals wird der Einfluss rein redoxaktiver Komponenten des Probenmediums begrenzt.

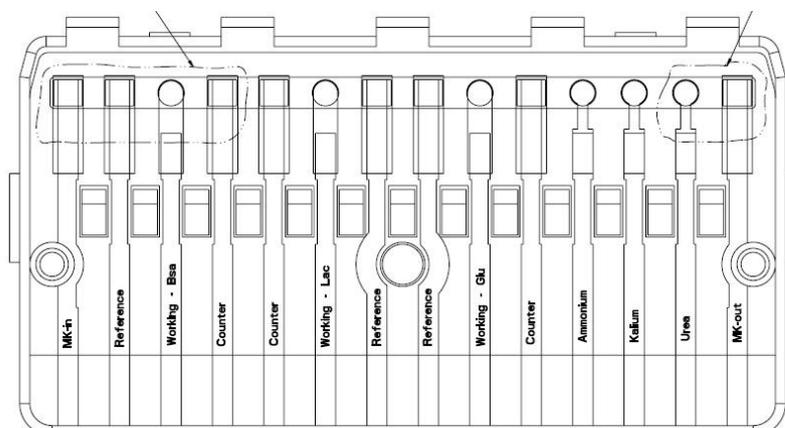


Abbildung 3-6; Darstellung des Sensorlayouts zur parallelen Messung von Glukose und Laktat, sowie der Interferenzkorrektur durch die BSA Elektrode. [18]

Für die Dimensionierung der Elektrode ist die Stromdichte ein wichtiger Parameter. Mit der Ladungsübertragung an der Phasengrenze der Elektrode fließt elektrischer Strom der Stromstärke I (in diesem Fall aus der Zersetzung des Wasserstoffperoxids, limitiert durch die Diffusion). Um den Vergleich des Stromflusses an Elektroden mit verschiedenen großen Phasengrenzflächen zu ermöglichen, bezieht man die Stromstärke auf die Oberfläche A der Phasengrenze und erhält so die Stromdichte j (Gl 3-1).

$$j = \frac{I}{A}$$

Gl. 3-1

3.2.1 Kalibration/ Messprogramm

3.2.1.1 Kalibration

Sensoren in dieser Bauweise müssen kalibriert werden. Dazu werden wässrige Lösungen mit bekannten Substratkonzentrationen hergestellt und vermessen. Um ein genaues Messergebnis zu erhalten werden eine Konzentration im physiologischen Bereich und eine Konzentration im oberen Grenzbereich eingesetzt. Weiters wird der Interferenzeinfluss [1, 23] von Harnsäure untersucht.

Lösung	Konzentration Glukose [mmol/l]	Konzentration Laktat [mmol/l]	Konzentration Harnsäure [mmol/l]
Standbylösung (Stby)	0	0	0
Kalibrationslösung 1 (Cal1)	5	3	0
Kalibrationslösung 2 (Cal2)	25	15	0
Interferenzlösung (Cal 3)	0	0	0,3

Tabelle 3.2– Verwendete Kalibrationskonzentrationen für Glukose und Laktat

Als Bewertungskriterien werden sowohl der Stromhub (Cal1-Stby bzw. Cal2-Stby), als auch die Linearität und der Interferenzeinfluss herangezogen. Unter Linearität versteht man in einem linearen Modell den proportionalen, konzentrationsabhängigen Stromhub:

$$Lin = \frac{\Delta I_{Cal2} * c_{Cal1}}{\Delta I_{Cal1} * c_{Cal2}} * 100 \quad \text{Gl. 3-2}$$

Lin =Linearität [%]

ΔI_{Cal1} = Stromhub durch Cal 1 [nA]

ΔI_{Cal2} = Stromhub durch Cal 2 [nA]

c_{Cal1} = Konzentration an Analyten in der Cal1 Lösung [mmol/l]

c_{Cal2} = Konzentration an Analyten in der Cal2 Lösung [mmol/l]

Beträgt zum Beispiel der Cal1 Hub 100 nA für eine 5 mM Lösung, so entspricht ein Cal2 Hub von 500 nA für eine 25 mM Lösung einer Linearität von 100%.

Der Interferenzeinfluss wird als Quotient Cal1/Cal3 angegeben, wobei ein geringes Cal3 Signal vorteilhaft ist, da es einen geringen Einfluss der Harnsäure auf die Sensorperformance indiziert.

Als Zielwerte werden ein Cal1 Hub von 50-250 nA und eine Linearität von 75-105% angestrebt.

3.2.1.2 Messprogramm

Ab dem Sensorlos # R_04 wird ein Messablauf zur Bestimmung weiterer Kenngrößen durchgeführt. Hierzu werden sowohl wässrige, als auch biologische Proben vermessen (siehe Tab. 3.3).

Nr.	Material	Konzentration Glukose [mmol/l]	Konzentration Laktat [mmol/l]	Interferenten-konzentration [mmol/l]	pH - Wert
1	Cal1	5	3	0	
2	QC-Lösung 1	6	10	0	
3	QC-Lösung 2	2,5	2	0	
4	QC-Lösung 3	22,2	0,8	0	
5	Kalibrationslösung 9 (Cal 9)	5	3	0	7,9
6	Kalibrationslösung 10 (Cal 10)	5	3	0	6,8
7	Gentisinsäure	5	3	0,12	
8	Paracetamol	5	3	1,3	
9	Cal 1	5	3	0	
10-17	8 Blutproben	x	x	x	x
18	Cal1	5	3	0	
19-26	8 Plasmaproben aus 10	x	x	x	x
27-36	Cal 1 – Reihe (10x Cal1)	5	3	0	
	Referenzmessung des Plasmas	x	x	x	x

Tabelle 3.3– Ablauf und verwendete Materialien zur Bestimmung der Sensorkenngrößen (x bezeichnet variierende Konzentrationen durch die Verwendung von biologischen Proben)

3.2.1.3 Auswertung

Die Auswertung des Messablaufs erfolgt durch ein bereitgestelltes Excel-Sheet und beinhaltet das Übersichtsblatt mit den errechneten Kenngrößen (siehe Tab. 3.4), sowie grafische Darstellungen der Referenzuntersuchung, der Cal1-Kalibrationswiederfindung und der Blut/Plasma Korrelation (siehe Abb. 3-8 bis 3-11). Die Aussage der einzelnen Kennwerte ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Steigung und der Fehlerabweichung wird das vermessene Blut zentrifugiert und das erhaltene Plasma sowohl mit den zu untersuchenden Sensoren, als auch mit einem Referenzsystem vermessen. Als Referenzmethode wurde die Glukosebestimmung mit Hexokinase und die Laktatbestimmung mit LOD am System Hitachi 902 ausgewählt (siehe 2.3). Die Abtrennung der festen Blutbestandteile vom Plasma muss sofort nach der Blutmessung erfolgen, um eine weitergehende Glykolyse zu vermeiden.

Bei der anaeroben Glykolyse (siehe Abb. 3-7) wird die im Blut vorkommende Glukose zu Laktat abgebaut. Da aus jedem Molekül Glukose zwei Moleküle Laktat entstehen, steigt der Laktatwert mit fortlaufender Glykolyse doppelt so hoch wie Glukose abgebaut wird.

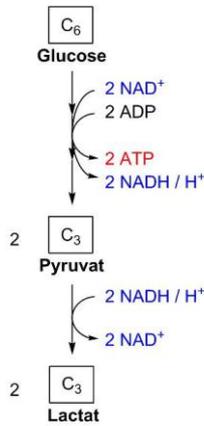


Abbildung 3-7; Vereinfachte Darstellung des Abbaus von Glukose zu Laktat durch die anaerobe Glykolyse. [15]

Braunsteinsensor Test mit Echtproben

Lot: Sensor:
 Gerät: Datum:

Sonstiges:

Probe	Glu	Lac	Glu SOLL	Lac SOLL
Cal 1 vor			5,00	3,00
Cal 1 nach			5,00	3,00
Cal 9			5,00	3,00
Cal 10			5,00	3,00
Gentisinsäure			5,00	3,00
Paracetamol			5,00	3,00
QC-Lösung 1			6,00	10,00
QC-Lösung 2			2,50	2,00
QC-Lösung 3			22,20	0,80

Probe	Glu Blut	Lac Blut	Glu Plasma	Lac Plasma	Hitachi Glu	Hitachi Lac
Probe 1	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 2	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 3	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 4	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 5	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 6	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 7	0,00	0,00	0,00	0,00		
Probe 8	0,00	0,00	0,00	0,00		

Kalibrationsparameter:	Glu	Lac	BSA
Stdby			
Cal 1			
Cal 2			
Cal 3			
Linearität			
Cal3/Cal3 BSA			

Einsatztag :				
Glucose	Werte	Lactat	Werte	
Cal vor/nach Proben		Cal vor/nach Proben		
Interferenten		Interferenten		
QC-Lösung		QC-Lösung		
Blut/Plasma Steigung		Blut/Plasma Steigung		
Blut/Plasma Syx		Blut/Plasma Syx		
Plasma Steigung		Plasma Steigung		
Plasma Syx		Plasma Syx		
Blut Steigung		Blut Steigung		
Blut Syx		Blut Syx		
	PLASMA		BLUT	
	GLUCOSE	LACTAT	GLUCOSE	LACTAT
Slope				
Intercept				
Bias				

Tabelle 3.4– Auswertungsüberblick mit den zu bestimmenden Sensorkenngrößen

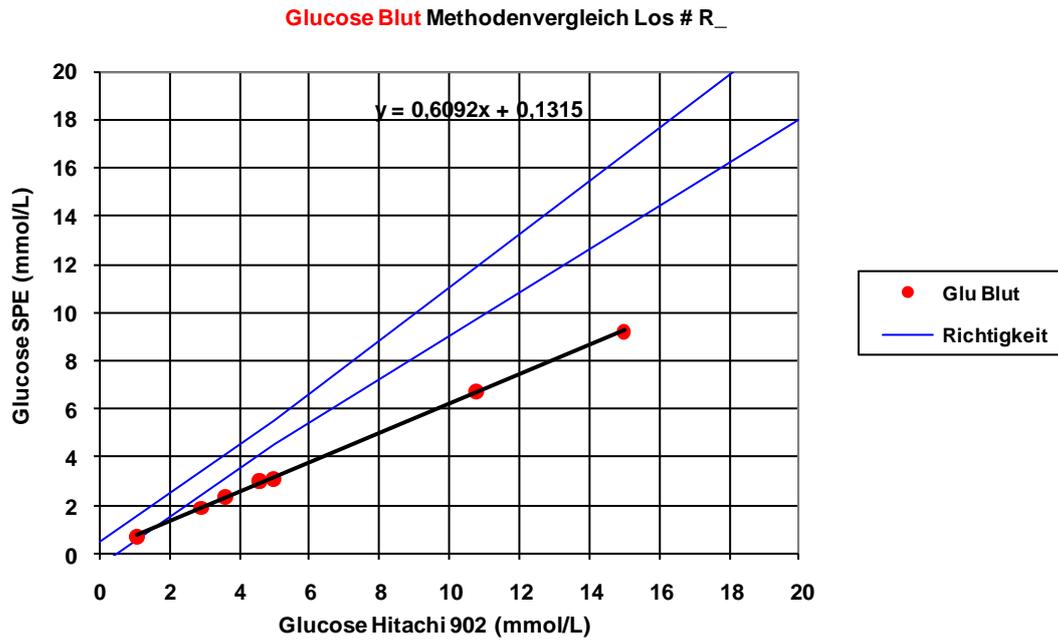


Abbildung 3-8; Beispiel einer Darstellung des Methodenvergleichs im Blut zu Hitachi

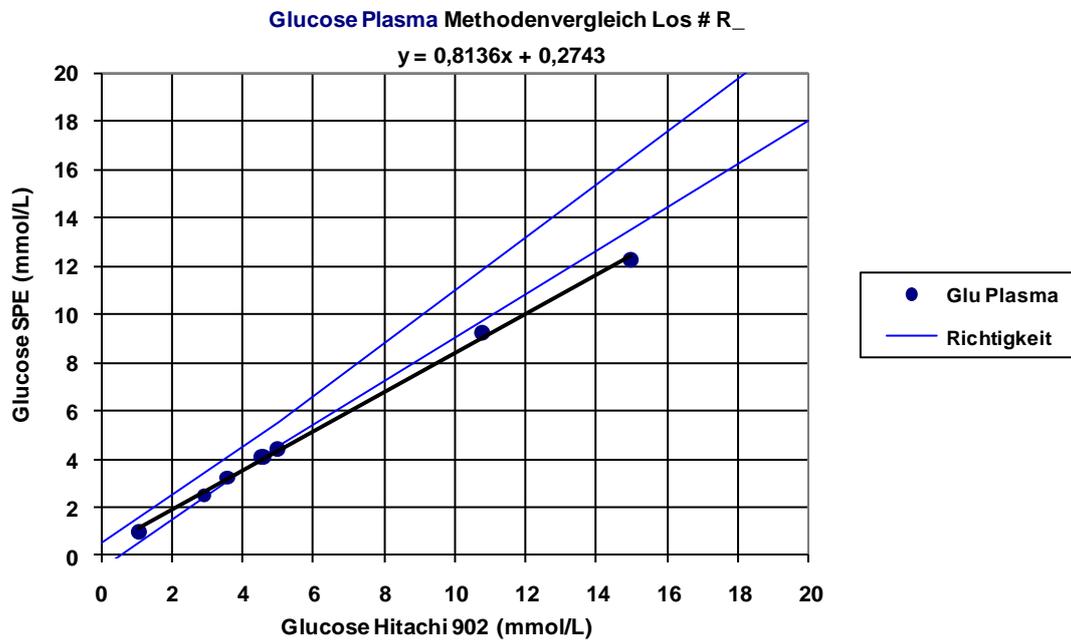


Abbildung 3-9; Beispiel einer Darstellung des Methodenvergleichs im Plasma zu Hitachi

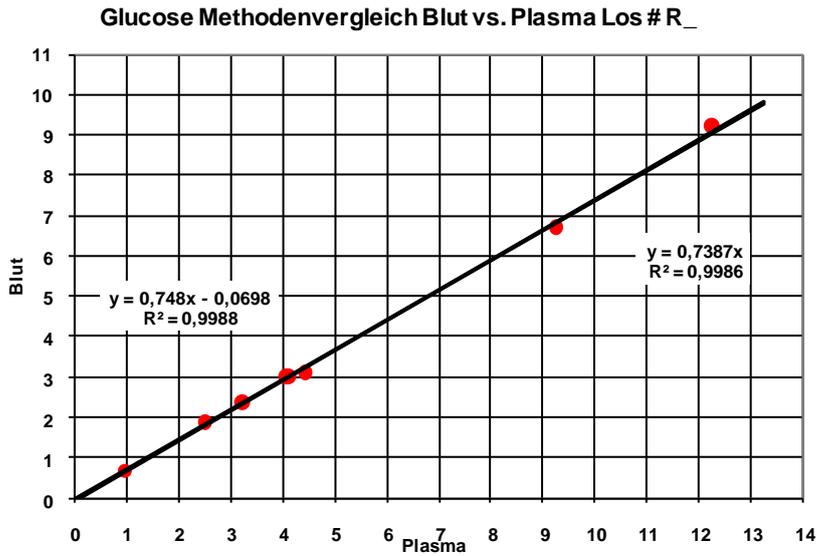


Abbildung 3-10; Beispiel einer Gegenüberstellung von Blut- und Plasmamesswerten

Kalibrationswiederfindung Cal 1

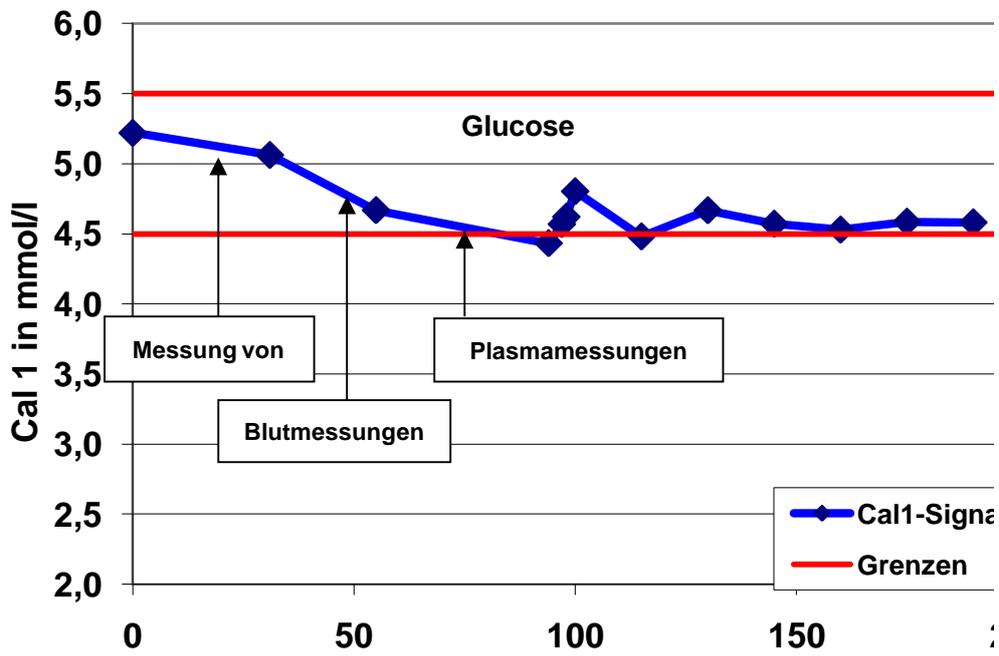


Abbildung 3-11; Beispiel einer Darstellung der Cal1 – Kalibrationswiederfindung

Kenngröße	Aussage	Soll - Bereich
Cal vor/nach Proben	Prozentuelle Änderung des Cal1 Signals zu Beginn der Messreihe zum Cal1 Signal nach der letzten Plasmaprobe. Diese Kenngröße ist ein Maß für die Wiederfindung des Cal1-Kalibrationswertes nach Echtproben (Reversibilität).	< ±10%
Interferenten	Prozentuelle Änderung des Cal1-Signals nach Zugabe von 0,12 mmol/l Gentisinsäure bzw. 1,3 mmol/l Paracetamol.	< ±10%
QC-Lösungen	Hier werden wässrige Probelösungen mit Substratkonzentrationen im physiologischen Bereich und unteren, sowie oberen letalen Bereich vermessen. Durch diese Messung kann eine Aussage über den gesamten Einsatzbereich des Sensors getroffen werden.	
Blut, Plasma und Blut/Plasma Steigung	Die Steigung beschreibt die Empfindlichkeit, d.h. die Änderung des Messwertes pro Konzentrationseinheit des Substrats. Die Steigung im Blut wird durch eine Regression folgender Werte bestimmt: auf der Ordinate werden die durch den Sensor gemessenen Blutwerte und auf der Abszisse die zugehörigen, auf dem Referenzsystem gemessenen Plasmawerte aufgetragen. Bei der Steigung im Plasma werden die gemessenen Blutwerte durch die Plasmawerte ersetzt, bei der Blut/Plasma Steigung werden die beiden Probenarten aus dem Messsystem direkt verglichen. Die Gegenüberstellung der Messwerte zum Referenzsystem stellt die Richtigkeit der Ergebnisse dar. Die Steigung des Blut/Plasma Vergleichs zeigt hingegen den matrixabhängigen Messfehler im Blut und fällt mit höherer Steigung geringer aus.	1,00 (Die Steigung im Plasma soll 1,00 betragen. Im Blut tritt aufgrund des vorhandenen Hämatokrits eine um 15-20 % geringere Steigung auf).
Blut, Plasma und Blut/Plasma Syx	Der Syx ist eine statistische Kenngröße, welche die Abweichung der Messpunkte von einer Regressionsgeraden beschreibt. Je kleiner diese Abweichung ausfällt, desto näher liegen die erhaltenen Messpunkte an der Regressionsgeraden. Die Berechnung der Abweichung erfolgt anhand der Gl. 3-3 : n = Stichprobenumfang x = auf der Abszisse aufgetragener Wert \bar{x} = Mittelwert alle x- Werte y = auf der Ordinate aufgetragener Wert \bar{y} = Mittelwert aller y-Werte	Im biologischen Proben deutet ein kleiner Fehler auf geringen Einfluss von Interferenten und Matrixeffekten hin, da keine der vermessene Blutproben einer anderen hinsichtlich ihrer Matrix (Hämatokrit, Sauerstoffsättigung, Ionengehalt, Medikamente,...) gleicht. Die Abweichungen liegen im Normalfall in einem Bereich von 0,05 – 0,3.

Tabelle 3.5– Zusammenfassung und Erklärung der bestimmten Sensorkenngrößen

KenngroÙe	Aussage	Soll - Bereich
Intercept	Der Intercept oder Offset gibt die Verdrehung der Regressionsgeraden an.	0,0
Bias	Der Bias gibt die prozentuelle Abweichung vom Plasma-Referenzwert an.	0,0%
Richtigkeit	Die Angabe der Richtigkeit der Messergebnisse basiert auf der so genannten QUAMM –Methode (quadratischer Mittelwert der Messabweichung) oder der maximal zulässigen Einzelwert-Abweichung und wird in den Rili-Bäk Vorgaben definiert [14].	Zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des relativen quadratischen Mittelwerts: $\pm 11\%$

Tabelle 3.5– Zusammenfassung und Erklärung der bestimmten Sensorkenngrößen (Fortsetzung)

4 Durchführung

4.1 Los # R_01 Pastenvariation

Im ersten Sensorlos wurden die derzeit verwendeten Siebdruckmaterialien in verschiedenen Kombinationen gefertigt und der Einfluss von Braunstein in der Graphit-Brückenschicht festgestellt. In diesem Los wurde der Braunsteinspot durch Siebdrucktechnik aufgebracht und beinhaltet die Graphitpaste (in folge als CP = Carbonpaste abgekürzt) als Matrixmaterial und für die Ableitung des Stroms, das Enzym Glukoseoxidase (in diesem Fall sind alle drei Arbeitselektroden des Sensors als Glukosesensor ausgeführt) zur Umsetzung der vorhandenen Glukose und 35% Braunstein (bezogen auf den Feststoffanteil der Graphitpaste) zur Umsetzung des, aus der Enzymreaktion, gebildeten Wasserstoffperoxids. Da die verwendeten Materialien für den Braunsteinspot auf organischen Lösungsmitteln basieren, können die Spots ohne Beschädigung der Siebe gedruckt werden. Wasserbasierende Materialien würden dagegen das Polymer, dass die Siebdruckmaske abbildet anlösen und daher unbrauchbar machen.

Lot # R_01 New Generation

Erstellt: RMi am 13.06.08

Anzahl:
10 Stk pro Variante

Siebdruck:
Standard
Verwendung zweier Carbonpasten CP1 und CP2
doppelter Brückenschichtdruck

Varianten	Variable Parameter			
	Siebdruck		Dispensieren	
	Brückenschicht	MnO ₂ Spot	Enzym	Deckmembran
1) Siebdruckvariante 1	MnO ₂ + CP1	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
2) Siebdruckvariante 2	MnO ₂ + CP2	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
3) Siebdruckvariante 3	CP1	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
4) Siebdruckvariante 4	CP2	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
5) Siebdruckvariante 5	MnO ₂ + CP1	MnO ₂ + CP1	GOD	ohne
6) Siebdruckvariante 6	MnO ₂ + CP2	MnO ₂ + CP1	GOD	ohne
7) Siebdruckvariante 7	CP1	MnO ₂ + CP1	GOD	ohne
8) Siebdruckvariante 8	CP2	MnO ₂ + CP1	GOD	ohne
9) Siebdruckvariante 9	MnO ₂ + CP1	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
10) Siebdruckvariante 10	MnO ₂ + CP2	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
11) Siebdruckvariante 11	CP1	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
12) Siebdruckvariante 12	CP2	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
13) Siebdruckvariante 13	MnO ₂ + CP1	MnO ₂ + CP1	GOD	HPU
14) Siebdruckvariante 14	MnO ₂ + CP2	MnO ₂ + CP1	GOD	HPU
15) Siebdruckvariante 15	CP1	MnO ₂ + CP1	GOD	HPU
16) Siebdruckvariante 16	CP2	MnO ₂ + CP1	GOD	HPU

Tabelle 4.1– Variation der eingesetzten Siebdruckpasten

Die verwendeten Carbonpastenmaterialien (CP1 und CP2) zeigen aufgrund ihrer unterschiedlichen Matrixzusammensetzung auch verschiedene Einflüsse auf die

Funktionalität des Sensors. In der oben beschriebenen Form sind alle Pasten auf organischen Lösungsmitteln basierend. Weiters wird der Effekt einer Deckmembran bestehend aus hydrophilem Polyurethan untersucht. Die eingesetzte Aktivität der Glukoseoxidase im Braunsteinspot liegt bei etwa 2,6kU/g Paste. Der Einfluss dieser Umgebungsbedingungen wird mit den nach dem Standardverfahren hergestellten Sensoren verglichen und bewertet.

4.2 Los # R_02 Wasserbasierende Carbonpasten

Der Basissensor für das zweite Sensorlos wurde durch die in 3.1 beschriebenen Siebdruckverfahren hergestellt. Als Braunsteinbrückenschicht wurde ein Gemisch aus der Graphitpaste CP2 und 35% Braunstein (bezogen auf den Feststoffanteil der Paste) angewendet. Zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurden im zweiten Sensorlos wasserbasierende Matrices für den Braunsteinspot verwendet (Zusammenfassung der gefertigten Varianten: Tab.4-2).

Folgende Materialien für die Graphit/Braunstein/Enzympaste wurden eingesetzt:

- wasserbasierende Carbon/GOD-Paste der Fa. Gwent Electronic Ltd., Prod. Nr.: E2060712D5: Es wurde eine vom Hersteller vorgemischte wasserbasierende Carbonpaste mit Glukoseoxidase verwendet. Diese Paste enthält zusätzlich Kaliumhexacyanoferrat als Mediator. Die angegebene Aktivität der Glukoseoxidase beträgt 4,3 kU/g Paste. Als Trockenbedingung wird Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur (15-20°C) angegeben.
- Wasserbasierende Carbonpaste (im Weiteren als CP 3 bezeichnet): Vom selben Hersteller wurde eine wasserbasierende Carbonpaste ohne Enzym und Mediator zur Verfügung gestellt, Prod Nr.: C2070424D4. Die Trockenbedingungen sind erneut die Paste bei Raumtemperatur über Nacht zu trocknen.
- Polyacrylat-Präpolymeremulsion: Die Herstellung der Präpolymeremulsion wird im Patent Nr. 5,928918 [21] beschrieben. Die beiden verwendeten Matrices waren wie folgt aufgebaut:
 - Polyacrylat (1):
 - 41% Polyacrylatemulsion
 - 15% Braunstein
 - 26% Graphit, Partikelgröße < 100µm
 - 18% Flammruß

- Polyacrylat (2)
 - 36% Polyacrylatemulsion
 - 15% Braunstein
 - 22% Graphit, Partikelgröße < 20µm
 - 27% Flammruß

Die Materialien wurden nach Vermengen bei 3000 U/min für 2 Minuten im Planetenmischer homogenisiert.

Aufgrund der hohen Viskosität der kombinierten GOD/Graphitpaste der Fa. Gwent wurden verschiedene Kompositionen mit der enzymfreien Graphitpaste und Wasser hergestellt. Für die Varianten 9-17 musste den Pasten noch das Enzym zugesetzt werden. Auch in diesem Los wurde der Sensor als reiner Glukosesensor gefertigt (anstatt der Laktat- und der BSA-Elektrode wurde je ein Glukosesensor ausgeführt). Das Enzym GOD wurde in 10%iger Tween20 Lösung eingewogen und auf einem Laborrüttler gelöst und der Paste zugesetzt (eingesetzte GOD - Aktivität: 2,7 kU/g Paste). Zur Homogenisierung wurde 2 Minuten bei 3000 U/min gemischt. Die Herstellung der hydrophilen Polyurethan (HPU) Deckmembran ist im Patent [22] beschrieben.

Lot # R_02 New Generation

Erstellt: RMI am 05.Sep.2008

Anzahl:
20 Magazine

Siebdruck:
Standard

Varianten	Variable Parameter		
	Brückenschicht	Enzym	Deckmembran
V1 wasserbasierende Carbon/GOD-Paste pur	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V2 wasserbasierende Carbon/GOD-Paste +10% H ₂ O	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V3 wasserbasierende Carbon/GOD-Paste +15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V4 wasserbasierende Carbon/GOD-Paste +10% H ₂ O + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V5 wasserbasierende Carbonpaste + wasserbasierende Carbon/GOD-Paste 1:1	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V6 wasserbasierende Carbonpaste + wasserbasierende Carbon/GOD-Paste 1:1 + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	-	ohne
V7 wasserbasierende Carbonpaste + wasserbasierende Carbon/GOD-Paste 1:1 + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	-	HPU
V8 wasserbasierende Carbonpaste + wasserbasierende Carbon/GOD-Paste 1:1	MnO ₂ + CP2	-	HPU
V9 Polyacrylat (1)	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
V10 Polyacrylat (1)	MnO ₂ + CP2	GOD	PVC
V11 Polyacrylat (1)	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
V12 Polyacrylat (2)	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
V13 Polyacrylat (2)	MnO ₂ + CP2	GOD	PVC
V14 Polyacrylat (2)	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU
V15 wasserbasierende Carbonpaste + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
V16 wasserbasierende Carbonpaste + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	GOD	PVC
V17 wasserbasierende Carbonpaste + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	GOD	HPU

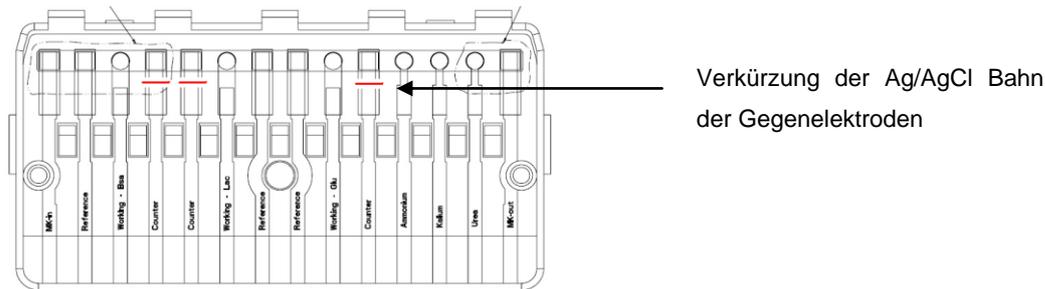
Tabelle 4.2– Variation der Materialien zur Herstellung des Braunsteinspots

4.3 Los # R_03 Braunsteinkonzentration in wasserbasierenden Systemen

Die Siebdruckschritte des dritten Sensorloses wurden verändert. Als erste Schicht wurde eine Zunge aus Graphit unter die Ag/AgCl Schicht gedruckt um eine Verbesserung der Leitfähigkeit zu erhalten und weiters wurde die Ag/AgCl-Bahn der Gegenelektrode verkürzt, so dass die aktive Fläche nur noch aus Carbon besteht. Dadurch soll einer Silbervergiftung der Enzyme entgegengewirkt werden. Weiters wurde der Braunsteingehalt in der Braunsteinschicht von 35% auf 15% und 5% reduziert. In diesem Los wurde der Einfluss der Braunsteinkonzentration im Braunsteinspot in wasserbasierenden Graphitpastenmatrizen untersucht. Als Graphitpaste wurde die Paste der Fa. Gwent aus dem vorigen Versuch (CP3) und eine weitere wasserbasierende Paste eines alternativen Herstellers (Fa. Acheson, wasserbasierende Graphitpaste Nr. AH272) mit der zu untersuchenden Braunsteinkonzentration gemischt und homogenisiert.

Die Varianten mit 15% Braunstein wurden als Glukose/Laktat/BSA – Sensoren ausgeführt, alle weiteren wieder als reine Glukosesensoren.

Die eingesetzte Aktivität der GOD betrug ~2,1kU/ g Paste, die Aktivität der LOD 0,4kU/g.



Verkürzung der Ag/AgCl Bahn der Gegenelektroden

Abbildung 4-1; Position der verkürzten Ag/AgCl Leiterbahn der Gegenelektrode

Lot # R_03 New Generation

Erstellt: RMi am 21.Nov 2008

Anzahl:
V1, V3, V4, V6: je 10 Sensoren
V2, V5: je 40 Sensoren

Siebdruck:
Carbonzunge eingeführt, MnO₂ Einfachdruck

Varianten	Variable Parameter		
	Brückenschicht	Enzym	DM
V1 CP3 + 5% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	GOD/GOD/GOD	keine
V2 CP3 + 15% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	keine
V3 CP3 + 35% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	GOD/GOD/GOD	keine
V4 CP5 + 5% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	GOD/GOD/GOD	keine
V5 CP5 + 15% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	keine
V6 CP5 + 35% MnO ₂ +GOD	15% MnO ₂ + CP2	GOD/GOD/GOD	keine

Tabelle 4.3– Variation der wasserbasierenden Paste und des Braunsteingehalts

4.4 Los # R_04 Stabilisierungsversuche, Deckmembranvariation

Das Los # R_04 wurde wie das vorhergehende Los gedruckt, mit der Ausnahme, dass die Isolationsschicht drei mal aufgebracht wurde, um eine bessere Vertiefung (Töpfchen) für die Dispensierung der Braunsteinspots zu erhalten. Weiters wurden die Enzyme nicht in einer 10%igen Tween20 Lösung gelöst auflösen, sondern in Lösungen mit Polyvinylpyrrolidon (PVP), Glycerin und BSA als Stabilisatoren.

Lot # R_04 New Generation

Erstellt: RMI am 05. Jan.2009

Anzahl:
je 10 Sensoren

Siebdruck:
3-fache ISO

Enzym gelöst in	Variable Parameter			
	Siebdruck	Brückenschicht	Enzyme	DM
V1 0,5% PVP statt 10% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V2 BSA mit 0,5% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V3 5% Glycerin statt 10% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V4 BSA mit 0,5% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	Polyvinylpropionat
V5 0,5% PVP statt 10% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	Polyvinylpropionat
V6 5% Glycerin statt 10% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	Polyvinylpropionat
V7 BSA mit 0,5% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	CA/D1
V8 0,5% PVP statt 10% Tween20	3x ISO	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	CA/D1

Tabelle 4.4– Stabilisierungsversuche und Variation der Deckmembran

Als Deckmembranmaterial wurde Polyvinylpropionat und ein Gemisch aus CA/D1 (für Celluloseacetat und Hydrogel D1) verwendet. Die genaue Rezeptur der CA/D1 Membran kann an dieser Stelle nicht angegeben werden. Diese Sensoren wurden als Glukose-, Laktat- und BSA Ausführung gefertigt. Die eingesetzten Enzymaktivitäten entsprachen ~ 1,9kU/ g Paste GOD und 0,3 kU/g LOD (3% dextransiert als zusätzliche Stabilisierung) bzw. die Konzentration des BSA betrug ~80 mg/g Paste.

Zusätzlich wurden noch Versuche mit Lösungsmitteln für die Celluloseacetat – Deckmembran durchgeführt. Getestet wurden Cyclohexanon, Ethylmethylketon und 1,4 – Dioxan.

4.5 Los # R_05 Vernetzungsversuche mit Glutardialdehyd, Änderung des Detergenz

Im letzten Los wurde der Siebdruck wie in Los # R_03 durchgeführt (einfache Isolationsschicht). Als Graphitpaste wurde die oben beschriebene wasserbasierende Paste der Fa. Gwent verwendet. Dieser Paste wurden 15% Braunstein und die Enzymlösung zugegeben. Zur besseren Immobilisierung durch Quervernetzung wurden drei Varianten mit einer wässrigen 0,05%igen Glutardialdehydlösung versetzt. Das bifunktionale Glutardialdehyd bindet durch die beiden Aldehydgruppen je eine terminale Aminogruppe des Enzyms.

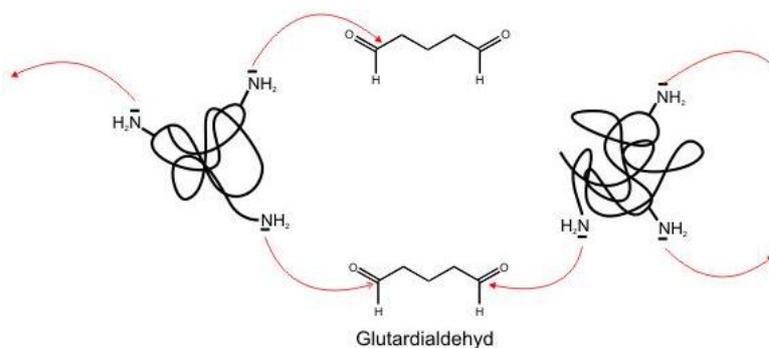


Abbildung 4-2; Mechanismus der Vernetzung von Proteinen durch Glutardialdehyd, aus <http://www.z-juelich.de>

Um den Einfluss der Detergenzien beim Lösen der Enzyme zu erheben, wird das verwendete Tween20 in einer Variante ausgelassen (V6) und in einer anderen Variante durch Brij58 ersetzt (V7).

Eine Sensorvariante wurde mit der Standard-Pastenherstellung gefertigt, jedoch der Braunstein spot des Basissensors vollständig mit der Graphit/Braunstein/Enzympaste abgedeckt. So sollen Interferenzreaktionen auf dem nicht-enzymbedeckten Braunstein spot der Arbeitselektrode vermindert werden. Ebenso wird eine Reduktion des Echtprobeneinflusses (Blut und Plasma) auf die Sensorik erwartet. Die siebgedruckten Braunstein spots wurden aufgrund der hohen Stromdichten in den vorhergehenden Losen und Varianten zur Reduktion des Signals nicht vollständig abgedeckt. Zur Kalibrierung und Messung der R_05_V6-Sensoren werden auch Ströme von > 5000 nA bei einer Substratkonzentration von ca. 20 mmol/l, aus diesem Grund werden die Kalibrationslösungen für diesen Versuch 1:1 verdünnt.

Lot # R_05 New Generation

Erstellt: RMI am 18.Mai.2009

Anzahl:
je 10 SensorenSiebdruck:
Standard

Varianten	Brückenschicht	Enzyme	DM
V1 Standard mit 5% Tween20	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V2 Standard mit 0,05% Glutardialdehyd überdampft	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V3 Standard mit 0,05% Glutardialdehyd aufgetropft	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V4 Standard mit 0,05% Glutardialdehyd eingemischt	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V5 Standard mit 5% Tween20, komplette Abdeckung der offenen Brückenschicht	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V6 Standard ohne Detergenz	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne
V7 Standard mit 10% Brij58	15% MnO ₂ + CP2	BSA/LOD/GOD	ohne

Tabelle 4.5– Vernetzungsversuche mit Glutardialdehyd und Variation des Detergenz

5 Ergebnisse

5.1 Pastenvariation

Getestet wurden im ersten Los der Einfluss von Braunstein in der Brückenschicht, sowie die Änderungen der Sensorsignale bei Verwendung verschiedener Carbonpasten im Braunstein/Enzymspot. Diese Varianten wurden sowohl mit, als auch ohne HPU-Deckmembran hergestellt und vermessen.

5.1.1 Wetup

In der Startphase, nach dem Einsetzen der Sensoren zeigen die Varianten 1-8 ein abweichendes Bild zu den Sensoren der Varianten 9-16. Die deckmembranfreien Systeme starten mit höheren Kalibrationssignalen (170-230 nA), Die Signale steigen innerhalb der ersten 7 Stunden noch an, ehe sie das Maximum erreichen.

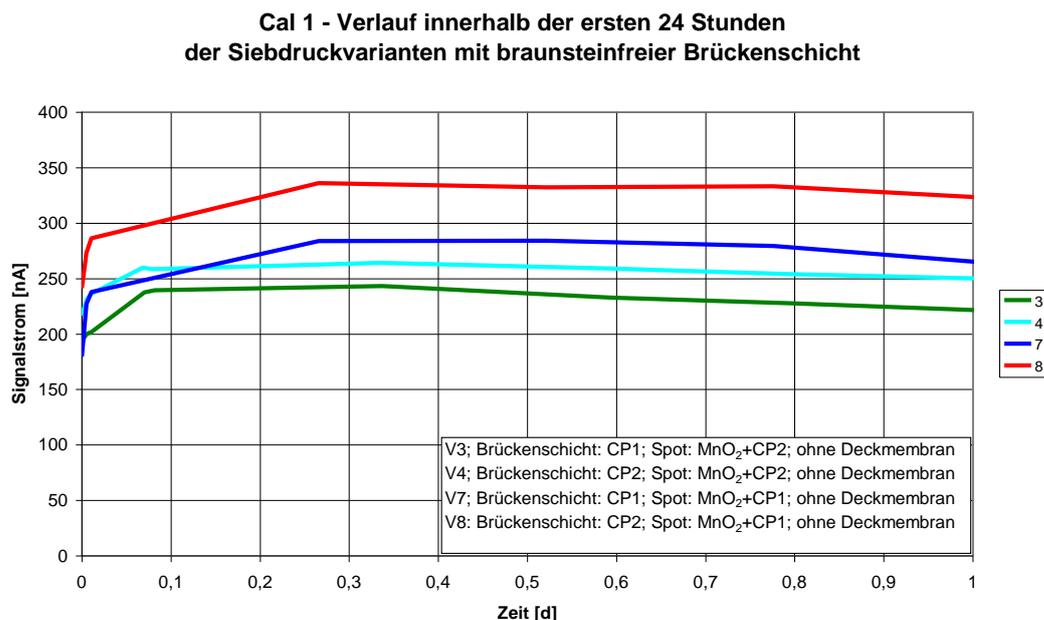


Abbildung 5-1; Verlauf der Kalibrationssignale innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz.

Die Systeme mit aufgebrachtener Deckmembran starten bei nur 10-20 nA und steigen durchgehend innerhalb der ersten 24 Stunden. Dies ist durch die Verzögerung des Flüssigkeitsaustausches zwischen den verwendeten Pasten und den Kalibrationslösungen durch die Deckmembran zu erklären.

**Cal 1 - Verlauf innerhalb der ersten 24 Stunden
der Siebdruckvarianten 9,10,13 und 14**

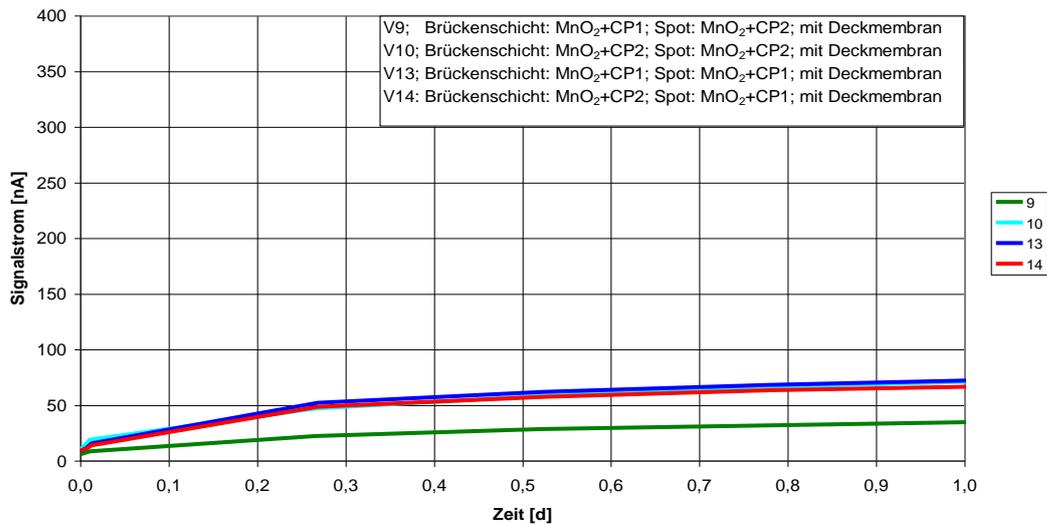


Abbildung 5-2; Verlauf der Kalibrationssignale innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz.

Die Linearitäten der deckmembranfreien Systeme starten zw. 40 und 60 % und steigen nur gering auf stabile 50 – 70%.

Linearitätsverlauf der Siebdruckvarianten 3,4,7 und 8

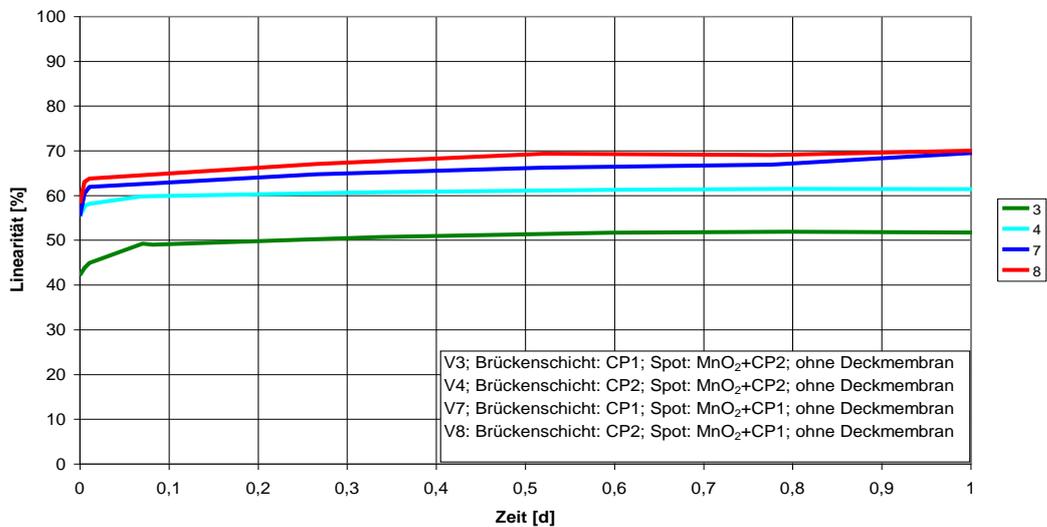


Abbildung 5-3; Verlauf der Linearität innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz.

Im Gegensatz zu den Systemen ohne Deckmembran zeigen die Varianten mit aufgebrachtener Deckmembran eine Erhöhung der Linearität von bis zu 35% (V10 startet bei 40% und steigt auf 75%). Der langsame Anstieg der Linearität innerhalb der ersten sechs Stunden lässt sich wieder durch den Einfluss der Deckmembran auf die Diffusion erklären. Da die Pasten anfangs eine Quellphase benötigen um genügend Flüssigkeit aufzunehmen und diese Aufnahme durch die Deckmembran reduziert wird, resultiert eine längere Wetup-Zeit der Sensoren.

Linearitätsverlauf der Siebdruckvarianten 9,10,13 und 14

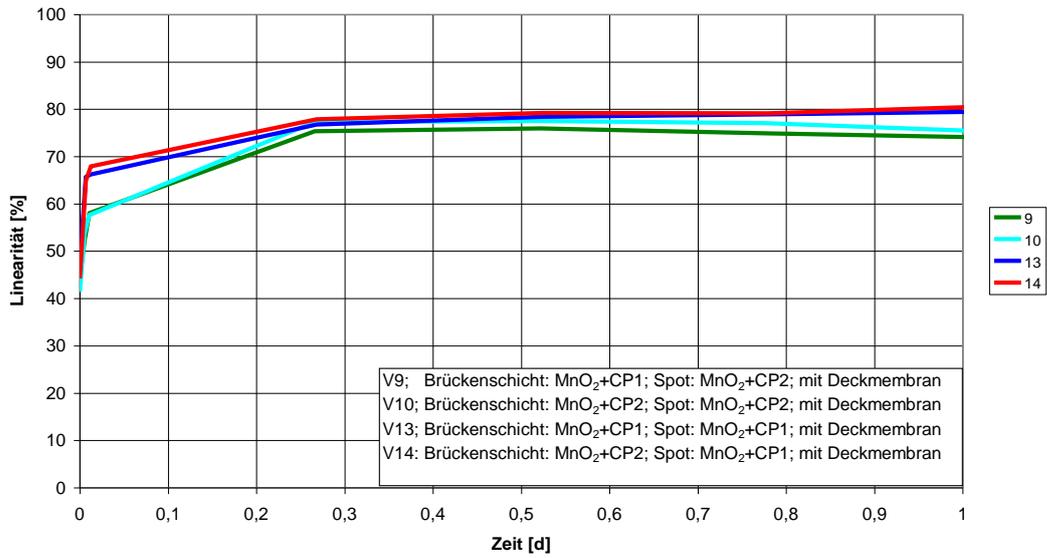


Abbildung 5-4; Verlauf der Linearität innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz.

5.1.2 Stabile Phase

Vergleich der Cal1 - Kalibrationsströme nach 24h

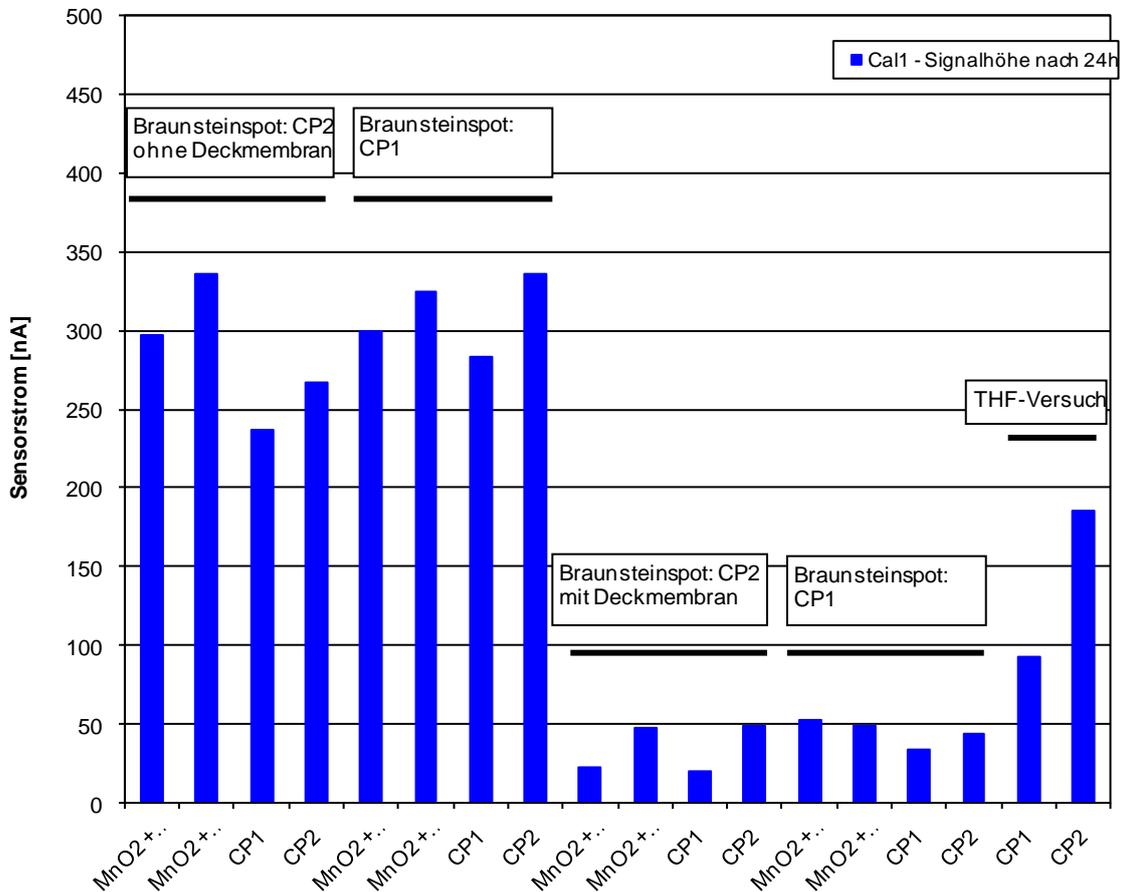
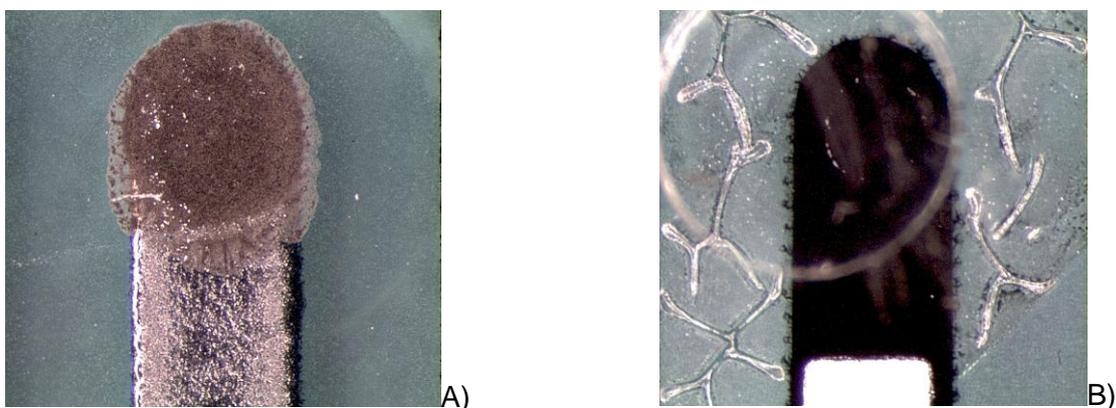


Abbildung 5-5; Darstellung der Cal1 – Ströme nach 24h Messeinsatz

Der Vergleich der Kalibrationsströme aus dem Los R_01 zeigt in der stabilen Phase einen eklatanten Unterschied zwischen den Varianten mit Deckmembran, im Gegensatz zu jenen ohne Deckmembran. Wie Abb. 5-5 verdeutlicht, reduziert sich das Signal durch die Aufbringung der Deckmembran um bis zu 90%, da diese eine Limitierung des Substrats innerhalb des Sensorumfelds verursacht (siehe 2.4). Eine Erhöhung der Kalibrationssignale durch die direkte Einmischung der Enzyme in die Braunsteinpaste ist nicht erfolgt. Dies kann durch Denaturierung der Enzyme durch die organischen Lösungsmittel der Graphitpasten bedingt sein. Ein Auswaschen der Enzyme ist unwahrscheinlich, da der Drift der Kalibrationssignale innerhalb der ersten 7 Tage nur zwischen 18 und 43% beträgt. Die Änderung der Kalibrationssignale der Systeme mit Deckmembran verläuft umgekehrt zu den deckmembranfreien Systemen. Das resultiert aus der erschwerten Wasseraufnahme der Sensoren durch die Polyurethan-Schicht.

Die Fertigung der Brückenschicht aus purer Graphitpaste CP1 zeigt eine Verringerung der Sensorströme um bis zu 30% in allen gefertigten Varianten. Höhere Kalibrationsströme erzielt die Kombination der Graphitpaste CP2 mit integriertem Braunstein als Brückenschicht.

Zusätzlich zu den in 4.1 geplanten Versuchen wurde der Einfluss des Deckmembran-Lösungsmittels auf die Sensorchemie untersucht. Das Lösungsmittel hat neben der Reduzierung des Kalibrationssignals und der Linearität (siehe Abb. 5-7) auch das Polycarbonatsubstrat angegriffen (siehe Abb. 5-6). Die Reduktion der Kalibrationssignale kann sowohl durch Auswaschen des Enzyms durch das Lösungsmittel, als auch durch eine Denaturierung der Enzyme auf der Spotoberfläche resultieren. Weniger wahrscheinlich ist eine Veränderung der Polymermatrix des Braunsteinspots, da sich die Linearität zur unbehandelten Variante wenig unterscheidet

**Abbildung 5-6; Aufnahme des Polycarbonatsubstrats vor (A) und nach Kontakt mit THF (B)**

Die Linearitäten der untersuchten Sensoren zeigen den Vorteil der Deckmembran erneut. Die Substratlimitierung durch Diffusion erhöht die Linearität um bis zu 25%. Ein Glukosesensor sollte eine Linearität von mind. 80-85% aufweisen, damit weitere Untersuchungen mit biologischen Proben sinnvoll sind.

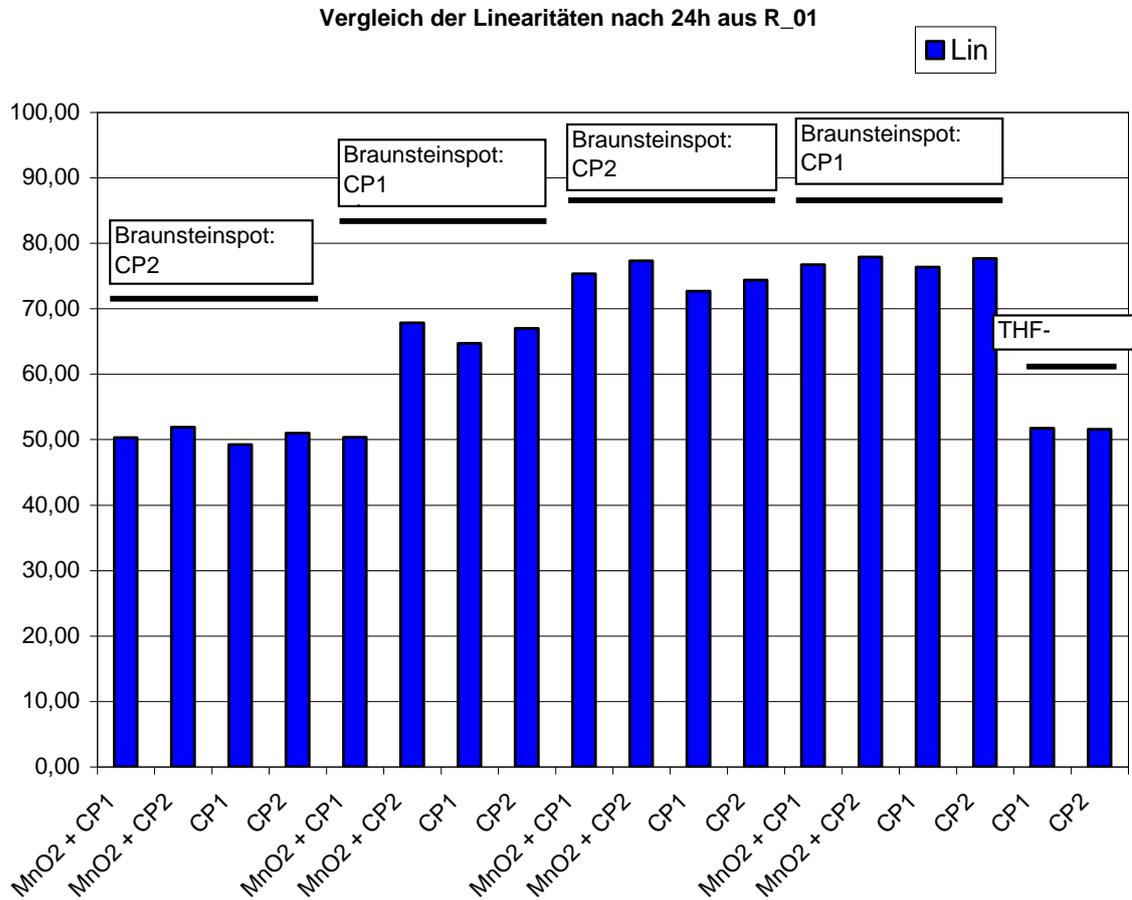


Abbildung 5-7; Darstellung der Linearitäten nach 24h der gefertigten Sensorvarianten

Linearitätsverlauf der Siebdruckvarianten 9,10,13 und 14

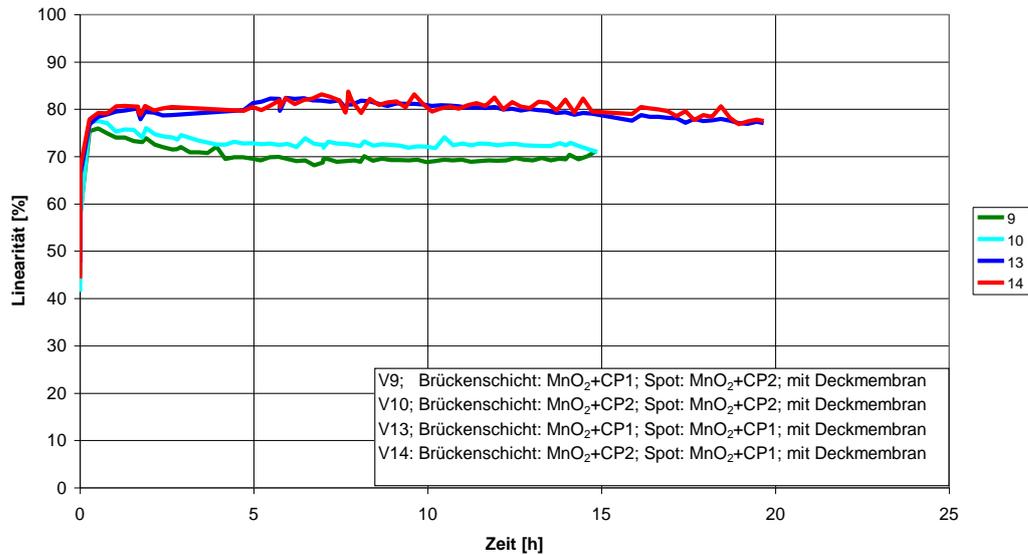


Abbildung 5-8; Detaillierter Verlauf der Linearitäten der Sensorvariationen 9,10,13 und 14

Linearitätsverlauf der Siebdruckvarianten 11,12,15 und 16

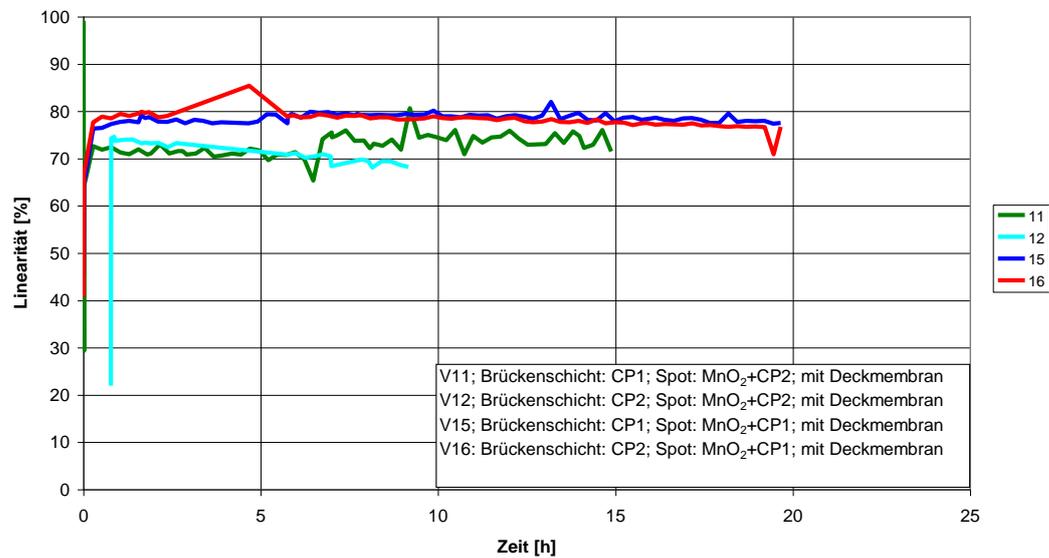


Abbildung 5-9; Detaillierter Verlauf der Linearitäten der Sensorvariationen 11,12,15 und 16

5.1.3 Zusammenfassung

Als Brückenschicht eignet sich am besten die Variante CP2 mit integriertem Braunstein und dazu als Braunsteinspot entweder CP1 oder CP2 mit MnO₂. Bei näherem Betrachten der Linearitäten (siehe Abb. 6-8 und 6-9) dieser beiden Variationen zeigt sich, dass die Variante

14 (Brückenschicht aus CP2 und MnO_2 , sowie Braunsteinspot aus CP1 + MnO_2) nach ca. 5 Tagen die höchste Linearität aufweist. Als Entscheidungskriterium zwischen den Varianten 14 und 15 wurde die Ableitfähigkeit der Sensorbasis herangezogen. Je besser die Leitfähigkeit der Basis ist, desto weniger Verluste treten bei der amperometrischen Messung auf. Die Kombination der Graphitpaste CP2 mit Braunstein zeigt einen Ableitwiderstand von 420 – 460 Ω (gemessen von der Spotmitte bis zur Kontaktstelle des Messaufbaus, Messergebnisse siehe Anhang 9.1.1). Der Ableitwiderstand der Graphitpaste CP1 beträgt hingegen etwa 3,8 – 4,0 k Ω .

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die zukünftigen Basissensoren mit einer Braunsteinbrückenschicht aus einem Gemisch von CP2 und MnO_2 gefertigt.

5.2 Wasserbasierende Carbonpasten

Im Los # R_02 gab es einige Probleme zu bewältigen. Die Varianten 1-8, welche die kombinierte wasserbasierende Enzym-Graphitpaste beinhalteten, konnten nicht charakterisiert werden, da eine längere Einwirkung von wässrigen Medien zur vollständigen Auflösung der Matrix führte. Innerhalb weniger Minuten konnte man die Entfärbung der Paste von gelb zu schwarz erkennen, was ein Auswaschen der Enzyme und des Mediators zeigte. Die Enzym-Graphitpaste der Fa. Gwent Electronics Ltd. scheint nur für einmalige Messungen geeignet. Eine Zersetzung der Matrix durch die angelegte Polarisationsspannung von +350 mV wurde durch die Aufnahme eines cyclischen Voltagramms untersucht. Leider ergab auch diese Messung keine weiteren Aufschlüsse, da sich die Enzymmatrix im Messaufbau zu rasch auflöste.

Des Weiteren konnten die Varianten mit den verschiedenen Deckmembranvarianten nicht untersucht werden, da die Deckmembranlösungsmittel (THF und Cyclohexanon) die Pastenmatrix beschädigten. Daraus entsteht bei einer brauchbaren Basissensorik, eine neuerliche Problemstellung: Die Suche nach geeigneten wasserbasierenden Deckmembranmaterialien.

Die auswertbaren Varianten des Loses # R_02 sind in der Tabelle 5-1 zusammengefasst:

Lot # R_02 New Generation

Erstellt: R Mi am 05.Sep.2008

Anzahl:
20 Magazine

Siebdruck:
Standard

Varianten	Variable Parameter		
	Brückenschicht	Enzym	Deckmembran
V9 Polyacrylat (1)	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
V12 Polyacrylat (2)	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne
V15 wasserbasierende Carbonpaste + 15% MnO ₂	MnO ₂ + CP2	GOD	ohne

Tabelle 5.1 Zusammenfassung der vermessenen Sensoren aus dem Los R_02

5.2.1 Wetup

In den beiden Polyacrylatvarianten liegen die Cal1-Signale in der Einsatzphase bei 2300-2900nA im erwarteten hohen Bereich. In den ersten Minuten sinken die Signale um 10-20%, ehe sie in die stabile Phase übergehen. Das Absinken der Ströme weist auf ein Auswaschen von überschüssigen oder schlecht immobilisierten Enzymen hin. Die eingesetzte wasserbasierende Graphitpaste zeigt eine geringere Signalthöhe und ein Absinken der Ströme um bis zu 50% innerhalb der ersten sieben Stunden (Abb. 5-10).

Los # R_02: Verlauf des Glukose-Cal1-Signals innerhalb der ersten 24 Stunden

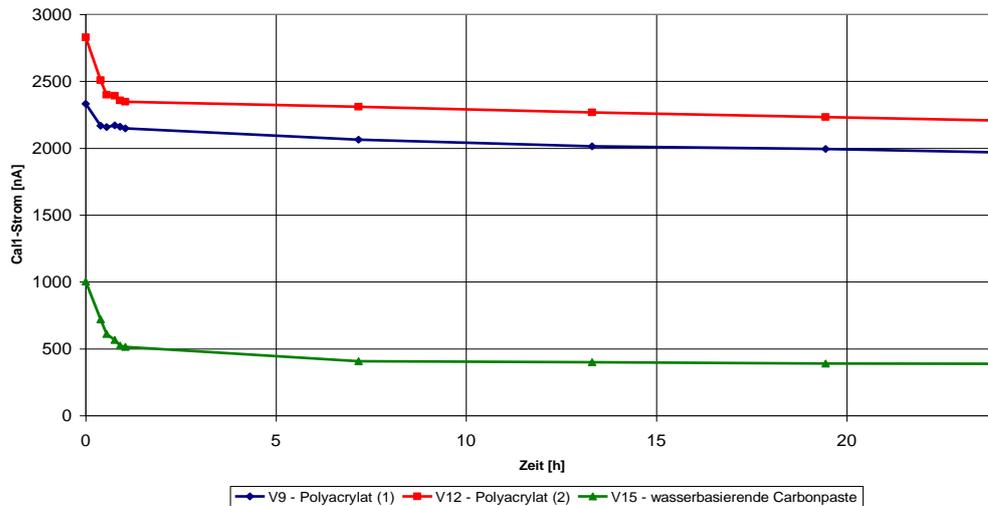


Abbildung 5-10; Verlauf der Kalibrationssignale des Loses # R_02 innerhalb der ersten 24 Stunden.

Die Startlinearität der Variante 15 mit der wasserbasierenden Graphitpaste als Matrix zeigt einen deutlichen Vorteil gegenüber den Polyacrylat-Systemen. Trotz starkem Signalverlust stellt sich eine stabile Linearität von 80% bereits nach 60 Minuten ein (Abb. 5-11). Die negative Linearität der Variante 12 resultiert aus einem Berechnungsfehler. Der verwendete Messaufbau kann nur Ströme bis 5200 nA verarbeiten. Treten jedoch höhere Ströme auf, so werden der höchste verarbeitbare Wert oder aber auch negative Werte angezeigt. Im Laufe der Messdauer sinken die Signale ab und nach ca. 2 Tagen sind die Messergebnisse innerhalb der Verstärkerkapazität (siehe Abb. 5-13).

Los # R_02: Verlauf der Glukose-Linearität innerhalb der ersten 24 Stunden

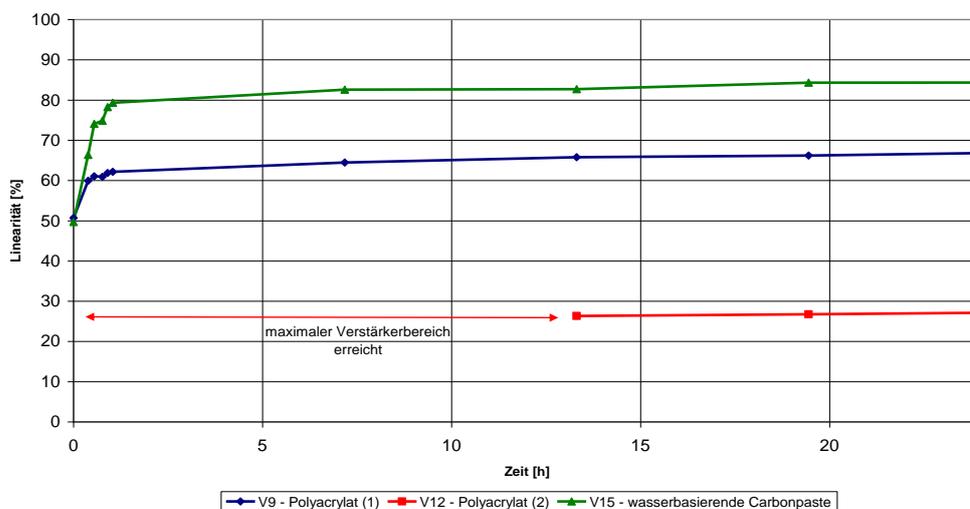


Abbildung 5-11; Verlauf der Linearität des Loses # R_02 innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einsatz.

5.2.2 Stabile Phase

In der stabilen Phase zeigen alle drei Varianten ein Absinken der Kalibrationssignale, wobei sich der Kalibrationsstrom der wasserbasierenden Graphitpaste ab dem 12. Tag kaum mehr verändert. Die Polyacrylatvarianten verlieren innerhalb der Einsatzdauer von 30 Tagen bis zu 75% ihrer Signale. Dies wird durch kontinuierliches Auswaschen der Enzyme erklärt. In der Variante 12 ist die Korngröße des verwendeten Graphits kleiner ($<20\mu\text{m}$) als bei der Variante 9. Durch die bessere Verteilung des Graphits innerhalb der Polymermatrix dürfte die Ableitfähigkeit der Paste besser sein, wodurch auch die höheren Ströme zu erklären sind, da weniger Verluste auftreten. Im Gegensatz zu den Polyacrylatvarianten verlieren die Sensoren mit der wasserbasierenden Graphitpaste nur 40% ihrer Signalhöhe innerhalb der Einsatzzeit (siehe Abb. 5-12).

Los # R_02: Verlauf des Glukose-Cal1-Signals über die gesamte Einsatzdauer

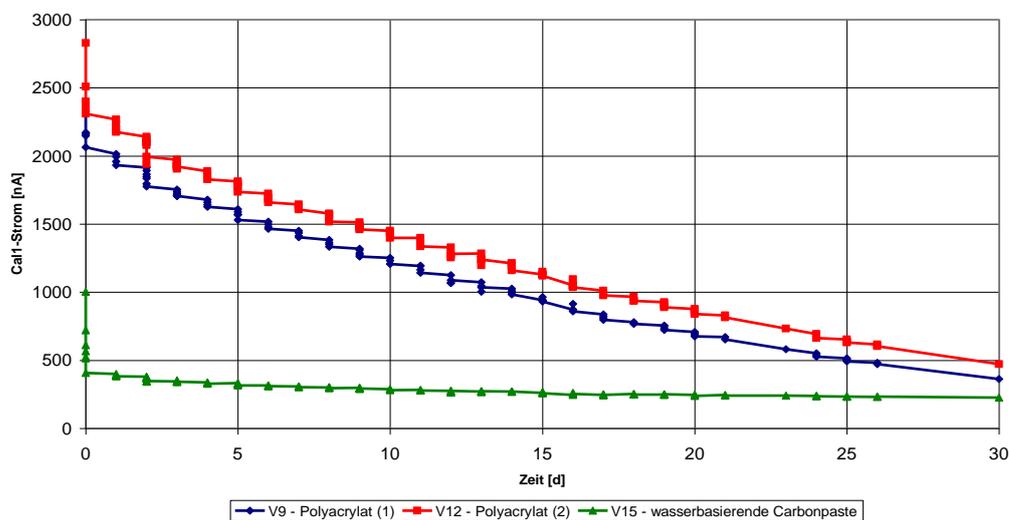


Abbildung 5-12; Verlauf der Kalibrationssignale des Loses # R_02 über die gesamte Einsatzdauer.

Überraschenderweise verlieren die Sensoren mit wasserbasierender Graphitpaste über die gesamte Einsatzdauer kaum an Linearität, sondern sie steigt im Verlauf der 30 Tage von 82% auf bis zu 90% an. Daraus kann man schließen, dass trotz Inaktivierung der Enzyme, was sich durch den Verlauf der Cal1-Signale zeigt, eine Diffusionslimitierung erhalten bleibt und genug Enzymaktivität zur Messung der Kalibrationslösungen zur Verfügung steht. Die beiden Polyacrylatvarianten zeigen einen Verlust an Linearität ab dem 14. Einsatztag. Nachdem die Matrix der beiden Varianten vergleichbar ist, wird angenommen, dass die Polymeremulsion für eine dauerhafte Immobilisierung nicht geeignet ist. Der Verlust kann ein Effekt von Verunreinigungen an der Oberfläche, Verlust oder Inaktivierung von Enzymen sein.

Los # R_02: Verlauf der Glukose - Linearität über die gesamte Einsatzdauer

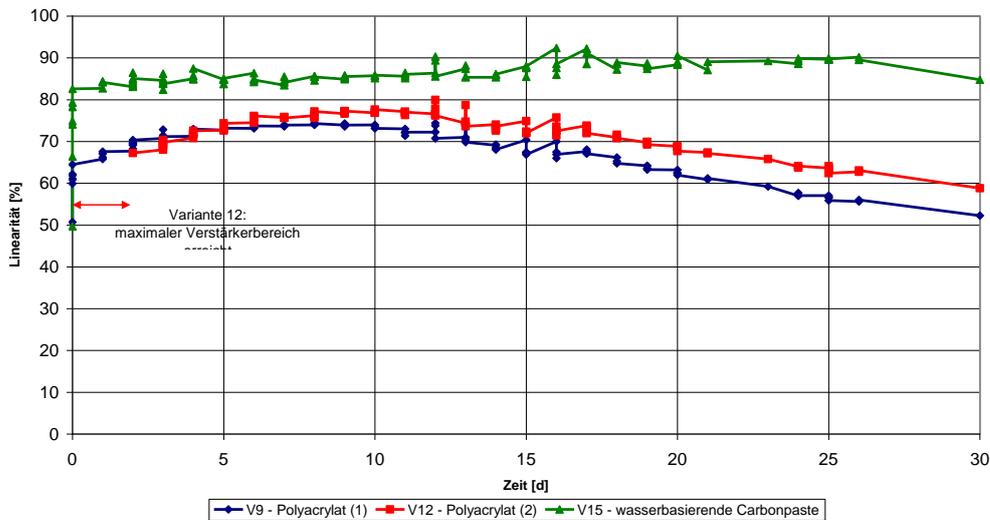


Abbildung 5-13; Verlauf der Linearitäten des Loses # R_02 über die gesamte Einsatzdauer.

5.2.3 Zusammenfassung

Die Varianten 1-8 mit der kombinierten Enzym/Graphitpaste der Fa. Gwent konnte nicht untersucht werden, da sich das Polymermaterial in der Paste für mehrmalige Verwendung in wässrigen Medien nicht eignet.

Die Varianten mit der Polyacrylat-Präpolymeremulsion zeigen die erwarteten hohen Signale. Aufgrund der schlechten Diffusionslimitierung wird sehr viel Substrat umgesetzt und das gebildete Wasserstoffperoxid direkt am Braunstein oxidiert. Zukünftig werden bei erwarteten hohen Strömen nur noch geringere Volumina an Enzym/Braunstein/Graphitpaste dispensiert um eine Verringerung der Stromdichten zu erreichen. Die aufgetretenen Stromdichten in der Variante 12 betragen etwa 900 nA/mm^2 . In derzeit verwendeten Sensoren treten Stromdichten im Bereich von 60 bis max. 300 nA/mm^2 auf.

Die wasserbasierende Graphitpaste zeigt in der Wetup-Phase einen hohen Verlust an Signal. Jedoch zeigt der weitere Verlauf, dass genug Aktivität für Messungen über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt. Die Stabilität der Linearität, vor allem in der Einsatzphase, zeigt jedoch vorteilhafte Eigenschaften der Matrix. Die Signalhöhen liegen in einem akzeptablen Bereich und auch der Drift ist für weitere Untersuchungen interessant.

Die weiteren Untersuchungen werden mit wasserbasierenden Graphitpasten durchgeführt.

5.3 Braunsteinkonzentration in wasserbasierenden Systemen

Für das Los # R_03 stand eine weitere wasserbasierende Graphitpaste eines alternativen Herstellers zur Verfügung. Beide Pasten wurden mit verschiedenen Anteilen an Braunstein im Enzym/Graphitpot gefertigt. Da erfahrungsgemäß die Varianten mit 15% Braunsteinanteil die besten Performanceergebnisse liefern, wurde diese Variante als vollständiger Glukose/Laktat – Sensor mit BSA-Korrektur gefertigt (Varianten 2 und 5).

5.3.1 Wetup

In der Wetup-Phase kann man erkennen, dass die Signalströme mit zunehmender Braunsteinkonzentration sinken. Dies wird am ehesten durch den Einfluss des Braunsteins wegen hoher nichtleitender Anteile auf die gesamte Immobilisierungsmatrix erklärt. Auffällig ist das unterschiedliche Driftverhalten der beiden Pasten. Beträgt der Drift der Gwent-Graphitpaste in den ersten 24 Stunden maximal 25%, sinken die Signale der Acheson-Graphitpaste um bis zu 75% (siehe Abb. 5-14). Daraus lassen sich unerwünschte Matrixeffekte der Acheson-Paste ableiten. Vermutet wird ein vermehrtes Auswaschen der Enzyme durch zu große Poren der Matrix, da die Sensoren mit höheren Strömen starten (d.h. mehr Substrat erreicht das Enzym durch eine weniger limitierende Matrix).

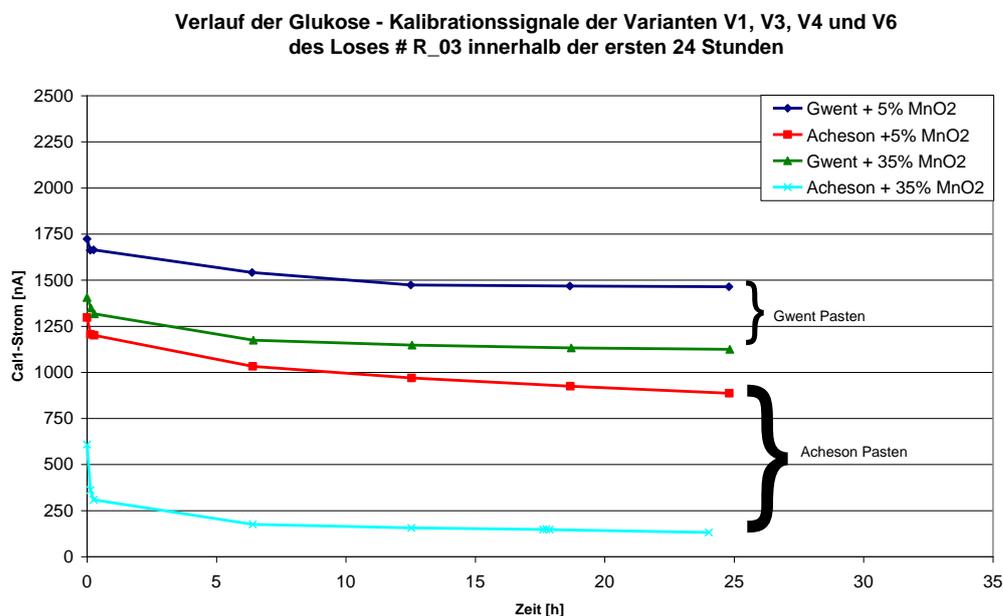


Abbildung 5-14; Verlauf der Signalströme der Varianten 1,3,4 und 6 des Loses # R_03 innerhalb der ersten 24 Stunden

Die Varianten 2 und 5 mit je 15% Braunstein zeigen dasselbe Bild: Durch Verwendung der Acheson-Paste erreichen die Sensoren ca. die doppelte Signalhöhe. Auffällig ist besonders der Unterschied bei den Laktatsensoren.

Beträgt der Startstrom nach Einsetzen der Sensoren mit der Gwent-Paste ca. 800 nA, erreichen die Sensoren mit der Acheson-Paste als Matrix fast 4500 nA. Jedoch sinken die Ströme bei beiden Varianten innerhalb von 44 Stunden auf ca. 100nA ab (siehe Abb. 5-15). Ursache des Signalabfalls kann entweder die bereits angesprochene Porengröße der Matrix sein, oder eine Inaktivierung der Enzyme durch zu niedrige pH-Werte innerhalb der Enzymumgebung. Aufgrund des hohen Substratumsatzes und der hohen Konzentration an Wasserstoffperoxid, das wiederum in Sauerstoff und Wasserstoffionen oxidiert wird (siehe Gl 3-3), könnte ein zu großer Abfall des pH-Werts stattfinden, welcher die Stabilität des Enzyms beeinträchtigt (besonders die Stabilität der LOD). Wobei jedoch der annähernd lineare Abfall der Laktatsignale in der Acheson-Paste eher für ein Auswaschen des Enzyms spricht.

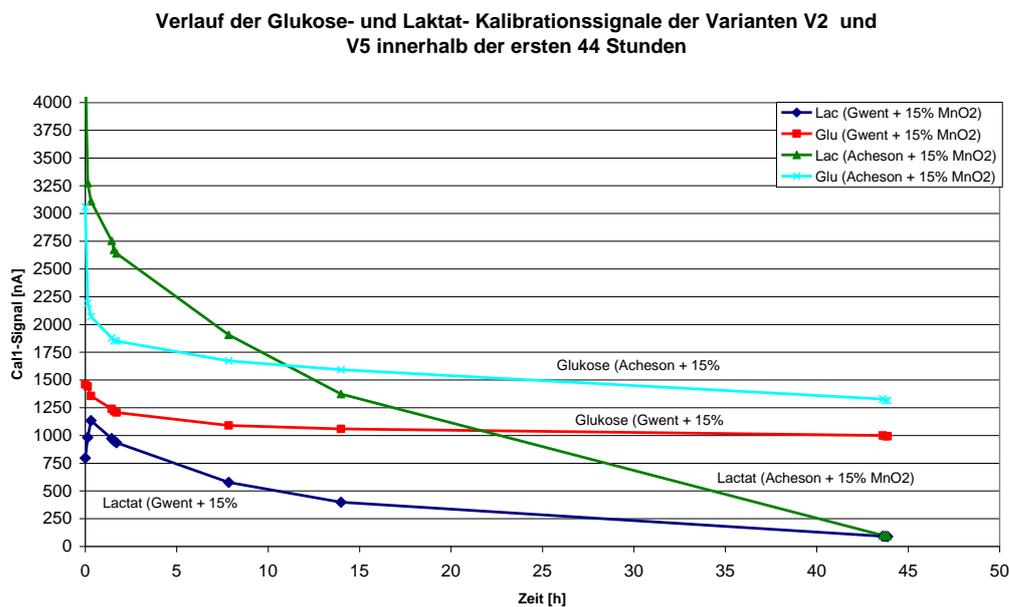


Abbildung 5-15; Verlauf der Signalströme der Varianten 2 und 5 des Loses # R_03 innerhalb der ersten 44 Stunden

Die Ströme der Glukosesensoren in dieser Fertigungsvariante zeigen jedoch ein schönes Ergebnis: Innerhalb von 100 Minuten stabilisieren sich die Signale, wobei auch hier die Variante mit der Acheson-Paste höhere Signale zeigt. Aber über die gesamten 44 Stunden ist ein leichtes Driftverhalten zu erkennen.

Die Linearitäten innerhalb der ersten Stunden zeigen ein ungewöhnliches Ergebnis. Erzielt die Variante 3 mit 35% Braunstein eine höhere Linearität als die Variante 1 mit 5% Braunsteinanteil, so verhält es sich durch Verwendung der Acheson-Paste umgekehrt (siehe Abb. 5-16). Dies lässt auch den Schluss zu, dass die Acheson-Paste die „Immobilisierungskapazität“ durch die hohe Konzentration an Braunstein überschritten hat und sich kein geschlossener Matrixverbund mehr ausbilden kann.

Verlauf der Glukose - Linearität der Varianten V1, V3, V4 und V6 des Loses # R_03 innerhalb der ersten 24 Stunden

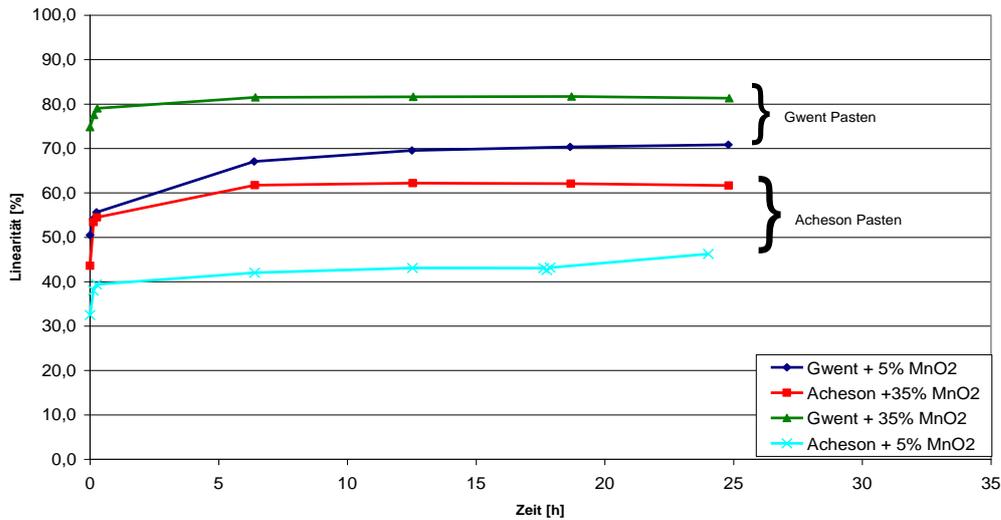


Abbildung 5-16; Verlauf der Linearität der Varianten 1,3,4 und 6 des Loses # R_03 innerhalb der ersten 24 Stunden

Die Zugabe von 15% Braunstein zu den beiden Pastenmaterialien zeigt die besten Glukoseergebnisse dieses Versuchs. So starten die Sensoren mit der Gwentpaste als Matrix bei mehr als 75% Linearität, die innerhalb von 100 Minuten auf annähernd 85% steigt. Die Fertigungsweise mit der Acheson-Paste als Matrix zeigt nach 100 Minuten erst 71% Linearität und bleibt innerhalb von 44 Stunden – nach einem kurzen Anstieg auf fast 76% - auf diesem Wert (siehe Abb. 5-17).

Verlauf der Glukose- und Laktat- Linearität der Varianten V2 und V5 innerhalb der ersten 44 Stunden

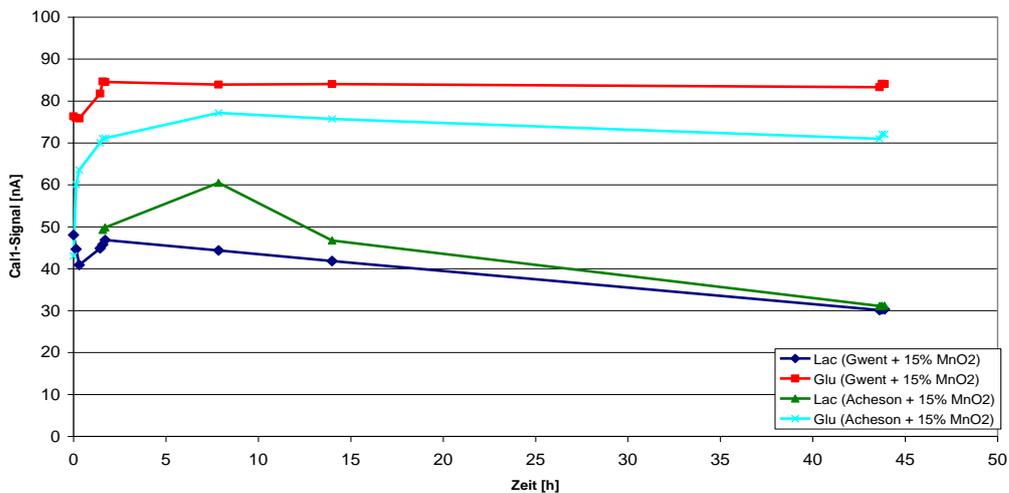


Abbildung 5-17; Verlauf der Linearität der Varianten 2 und 5 des Loses # R_03 innerhalb der ersten 44 Stunden

Die Linearität der Laktatsensoren mit der Gwent-Paste als Matrix startet bei 48% und sinkt innerhalb weniger Stunden auf 40% und nach 44 Stunden auf 30%. Auch die Variante 5 zeigt sehr schlechte Ergebnisse: Während der ersten 100 Minuten ist das Signal für den Verstärkerbereich zu hoch, danach liegt die Linearität kurz bei 50-60% und fällt danach ebenfalls innerhalb der ersten 44 Stunden auf 30% ab. Die geringe Startlinearität könnte durch eine Sauerstoffverarmung in Enzymnähe erklärt werden. Aufgrund des hohen Substratumsatzes könnte der zur Verwertung des Substrats benötigte Sauerstoff verbraucht werden und durch das Recycling des Sauerstoffs durch Oxidation des Wasserstoffperoxids (siehe Gl. 3-3) nicht kompensiert werden. Gegen diese Erklärung sprechen die hohen Signale zu Beginn der Untersuchung und vor allem der Drift der Signale. Wenn Stromspitzen von 4000 nA erreichbar sind und das Signal sinkt auf 100 nA ab, dann müsste auch ein Cal2-Signal von 500nA zum Erreichen einer 100%igen Linearität möglich sein.

5.3.2 Stabile Phase

Im Verlauf der gesamten Einsatzzeit der Varianten sinken die Signalhöhen der Varianten 1 und 3 mit der Gwent-Paste als Matrix weniger, als jene mit der Acheson – Paste. Über den gesamten Zeitraum zeigen die Varianten 1 und 3 ein sehr ähnliches Verhalten, auch die Differenz des Startsignals bleibt konstant (siehe Abb. 5-18). Die Signale des Versuchs V4 driften sehr steil nach unten. Grund für die schlechte Performance sind Probleme mit den Messständen (Tage 5-21). Da weitere Messstände (Bauweise ident zu den bisher verwendeten, jedoch eine aktuellere Software) zur Verfügung standen, wurden diese ebenfalls zur Charakterisierung herangezogen. Die Variante 6 verliert ebenfalls innerhalb weniger Tage die zu Beginn auftretenden Signalhöhen.

Die Signale der Laktatsensoren in beiden Versuchen (V2 und V5) sinken innerhalb von drei Tagen auf weniger als 20 nA ab (siehe Abb. 5-19), d.h. diese Art der Fertigung ist für Laktatsensoren nicht geeignet. Der Signalverlauf der Glukosesensoren der Variante 2 zeigen jedoch ein positives Bild. Der Signaldrift über den gesamten Einsatzzeitraum liegen innerhalb der Erwartungen. Der Drift der Variante 5 wird nicht als repräsentativ angesehen, da der Verlauf durch Messstandsprobleme negativ beeinflusst wird.

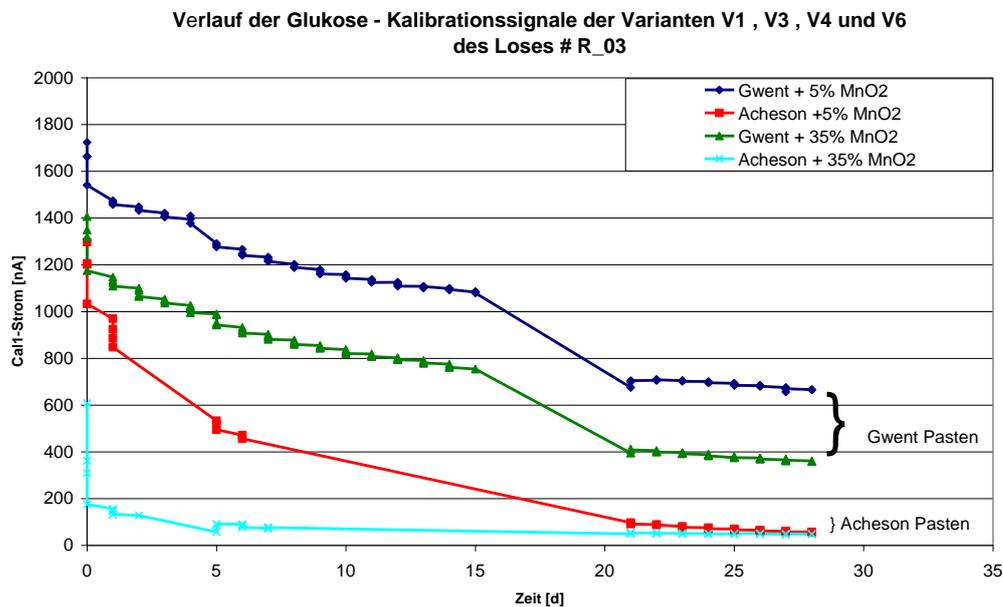


Abbildung 5-18; Verlauf der Kalibrationssignale der Varianten 1, 3, 4 und 6 des Loses # R_03 über die gesamte Einsatzdauer

Verlauf der Glukose- und Laktat- Kalibrationssignale der Varianten V2 und V5 des Loses # R_03

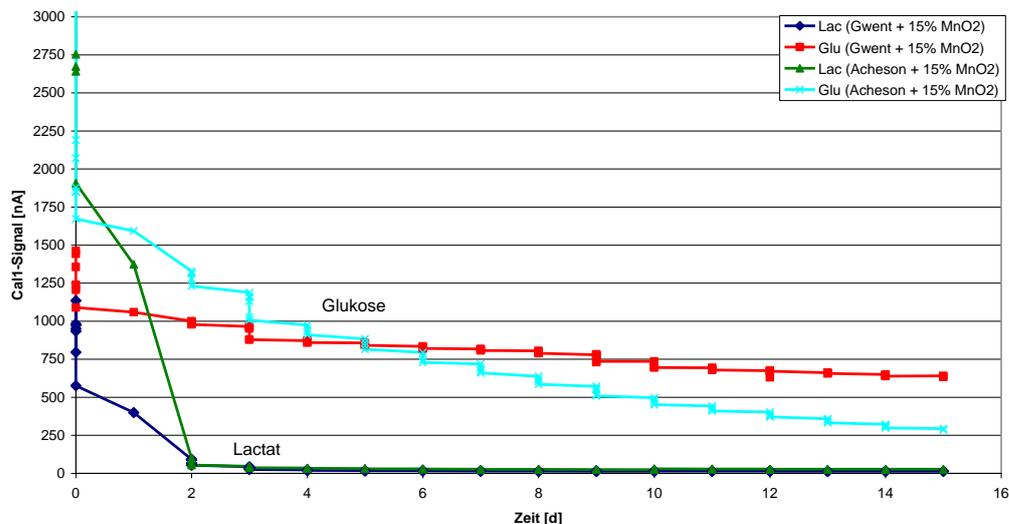


Abbildung 5-19; Verlauf der Kalibrationssignale der Varianten 2 und 5 des Loses # R_03 über die gesamte Einsatzdauer

Die Linearitäten der Gwent-Graphitpasten-Versuche zeigen durchwegs gute Linearitäten, wobei die Variante mit 5% Braunstein eine längere Anlaufphase (7 Tage) benötigt, um das Maximum von 80% zu erreichen. Die Variante 3 mit 35% Braunstein in der Pastenmatrix startet bei 83% Linearität und bleibt im gesamten Einsatzzeitraum im Bereich 80-85% stabil. Die Ergebnisse der Variante 2 mit 15% Braunsteinanteil zeigen eine durchgehend stabile Linearität von ca. 85% (siehe Abb. 5-20 und 5-21).

Die geringe Linearität der Varianten 4, 5 und 6 ist auf die Probleme mit der Messtands-Software zurückzuführen.

Die Ergebnisse der Laktatsensoren in diesem Versuch liegen weit unter den erhofften Werten. In dieser Fertigungsweise sind die Sensoren sowohl mit ihrem Strom, als auch in ihrem Linearitätsverlauf nicht verwendbar.

Verlauf der Glukose - Linearität der Varianten V1, V3, V4 und V6 des Loses # R_03

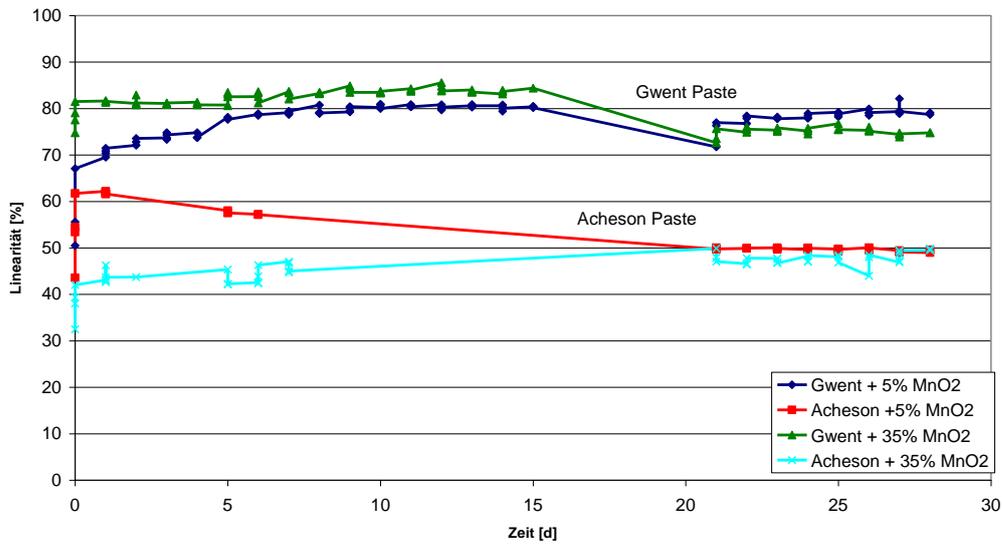


Abbildung 5-20; Verlauf der Linearität der Varianten 1, 3, 4 und 6 des Loses # R_03 über die gesamte Einsatzdauer

Verlauf der Glukose- und Laktat- Linearität der Varianten V2 und V5 des Loses # R_03

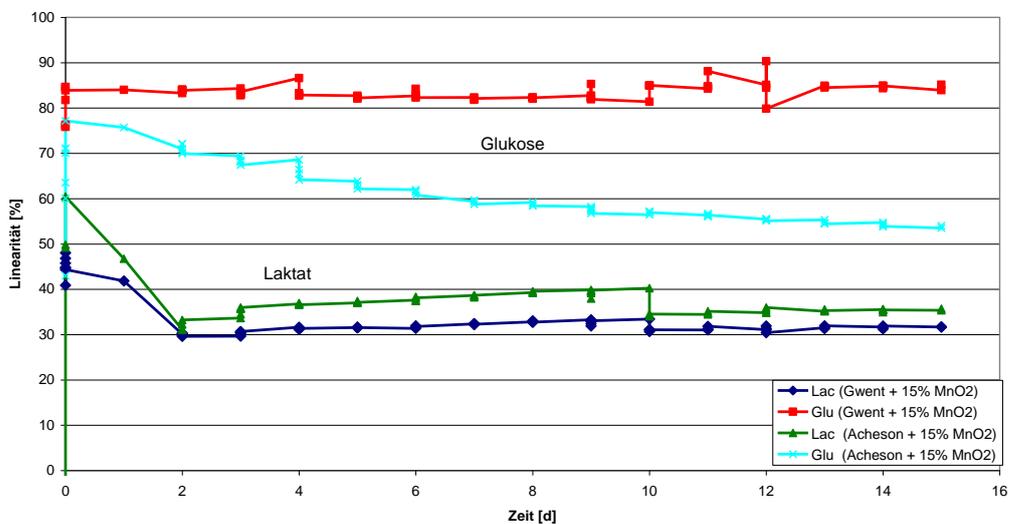


Abbildung 5-21; Verlauf der Linearität der Varianten 2 und 5 des Loses # R_03 über den gesamten Einsatzzeitraum

5.3.3 Zusammenfassung

Glukose:

Mit zunehmender Braunsteinkonzentration in der Pastenmatrix sinken die Signalströme um etwa 20%, jedoch steigt die Linearität von 70% mit 5% Braunsteinanteil auf bis zu 85% bei Verwendung von 15-35% Braunstein.

Der Unterschied der beiden Pastenmaterialien konnte nicht eindeutig über einen längeren Zeitraum aufgrund von Messstandsproblemen untersucht werden, daher werden die Ergebnisse innerhalb der ersten 48 Stunden verglichen: Die Signale der Varianten 4-6 mit der Acheson-Graphitpaste als Matrix liegen über den Signalen der Gwent-Varianten. Die Linearitäten hingegen sprechen eindeutig für die weitere Verwendung der Gwent-Paste, da hier Unterschiede von mindestens 15% auftreten.

Laktat:

Die Fertigungsweise dieser Versuche ist für Laktatsensoren nicht geeignet. Bei beiden Pastenmaterialien treten Verlust des Signals innerhalb weniger Stunden auf. Erklärt wird das durch eine sehr schnelle Inaktivierung einer oder mehrerer Pastenkomponenten oder durch Auswaschen des Enzyms. Eine weitere Ursache kann die „Übersäuerung“ der Enzymumgebung durch die hohen Substratumsätze darstellen.

5.4 Stabilisierungsversuche, Deckmembranvariation

In diesem Los soll der Einfluss verschiedener Enzymstabilisatoren (PVP, BSA und Glycerin) in Kombination mit zwei unterschiedlichen Deckmembranen (Celluloseacetat/Hydrogel und Polyvinylpropionat) untersucht werden.

Bei der Fertigung des Loses # R_04 traten keine Probleme auf. Die tieferen Töpfchen durch den dreimaligen Druck der Isolationsschicht brachte Vorteile beim Dispensierschritt, da die kombinierte Braunstein/Enzym/Graphitpaste leichter zu positionieren war und die Ränder nicht über die Isolationsschicht verlaufen konnten.

Zusätzlich zu den Kalibrationen wurde ab diesem Los auch das vollständige Messprogramm (siehe 3.2) zur Charakterisierung weiterer Sensorkenndaten durchgeführt.

5.4.1 Wetup

Glukose:

Im Laufe der ersten 24 Stunden des Einsatzes zeigen die ersten drei Varianten ohne Deckmembran nur geringe Unterschiede in ihrem Verhalten. So liegen die Kalibrationsströme bei allen Sensoren im Bereich von 300-470 nA bei Linearitäten von ca. 75%. In dieser Zeit ist kein Einfluss der Stabilisatoren zu erkennen (siehe Abb. 5-22 und Abb. 5-23).

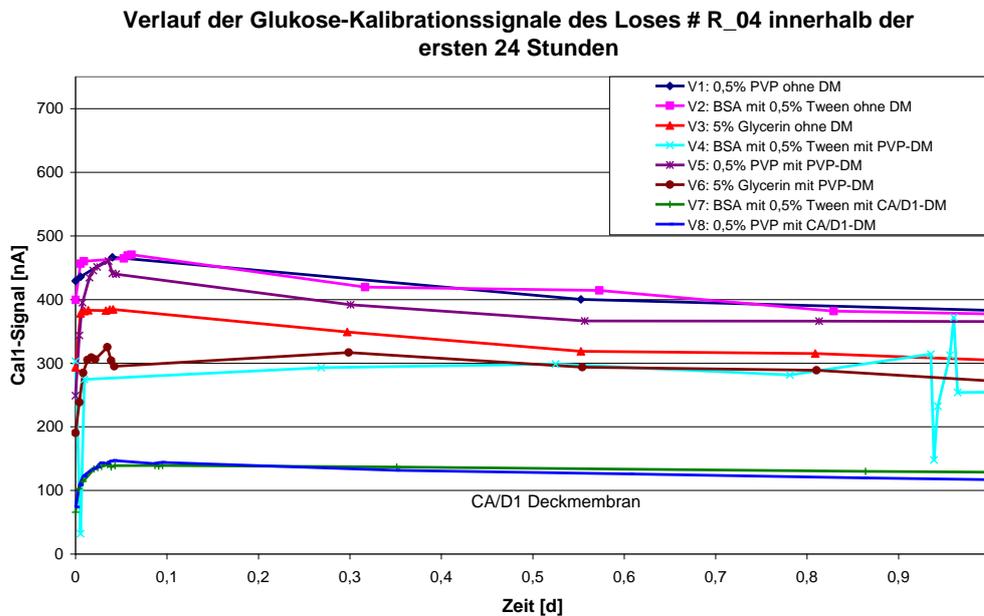


Abbildung 5-22; Verlauf der Cal1-Signale aller Glukosesensoren des Loses # R_04 innerhalb der ersten 24 Stunden.

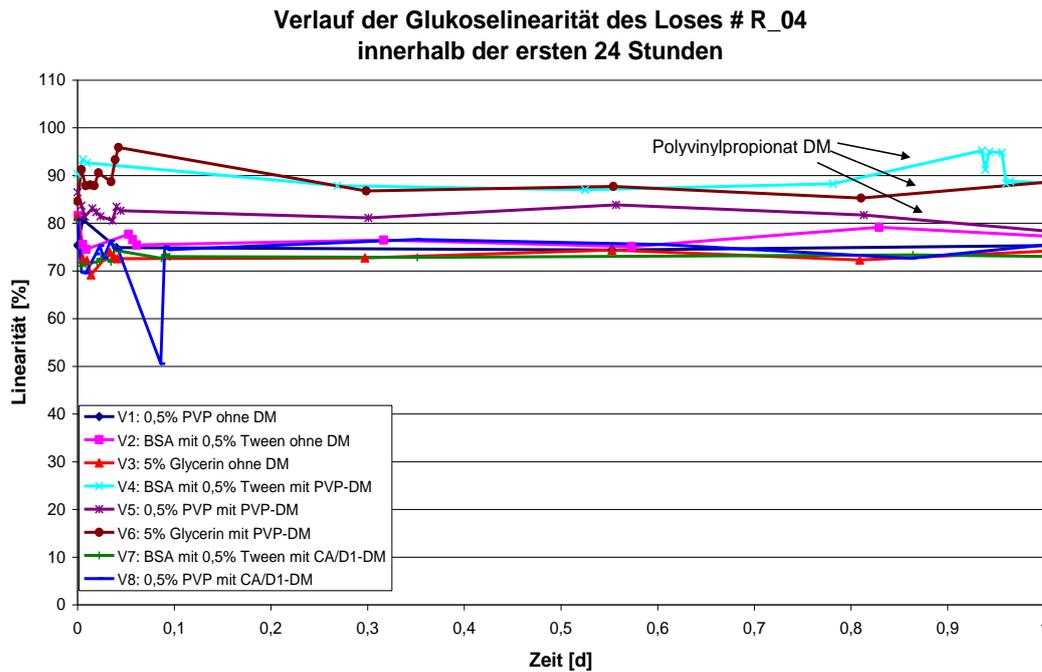


Abbildung 5-23; Verlauf der Linearität aller Glukosesensoren des Loses # R_04 innerhalb der ersten 24 Stunden.

Eine Verbesserung der Kenngrößen ist in den Varianten 4-6 zu sehen, welche baugleich zu den ersten drei Varianten gefertigt wurden, aber zusätzlich mit einer dispensierten Polyvinylpropionat – Membran abgedeckt wurden (siehe Abb. 5-22 und Abb. 5-23). Die Signale der PVP- und Glycerin-Stabilisierten Sensoren sind niedriger, als jene ohne Deckmembran und auch die Erhöhung der Linearität war aufgrund der niedrigeren Signale und durch die Limitierung des Substrats zu erwarten. Überraschend sind aber die Kenndaten der Variante 4 – BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembranmaterial. Die Erhöhung des Kalibrationssignals um bis zu 20% trotz Einsatzes einer Deckmembran, die bei den beiden anderen Losen zu einer Reduktion des Signals führte, ist nicht eindeutig erklärbar, da die Variante auch eine Steigerung der Linearität um mehr als 10% aufweist. Die erhöhte Linearität spricht für eine intakte Deckmembran, wobei das Kalibrationssignal auf die Ausbildung von Löchern in der Deckmembran hinweist.

Der Einsatz der Celluloseacetat/Hydrogel – Mischung in Cyclohexanon zeigt keinen positiven Einfluss auf die Kennlinien der Sensoren. Die Ströme sinken noch weiter ab, eine Erhöhung der Linearitäten bleibt aber in der Wetup-Phase aus. Die Verdopplung des Kalibrationssignal in Variante 7 deutet auf eine schlechte Quellung in der Anfangsphase des Einsatzes hin.

Laktat:

Die Kalibrationssignale der Laktatsensoren innerhalb der ersten 24 Stunden sahen vielversprechend aus (siehe Abb. 5-24), die Linearitäten hingegen zeigten mit 45-60% sehr schlechte Ergebnisse (siehe Abb. 5-25). Nur die beiden Systeme mit Celluloseacetat/Hydrogel konnten innerhalb von 24 Stunden ein stabiles Signal aufweisen. Alle weiteren Varianten verloren kontinuierlich an Signalhöhe.

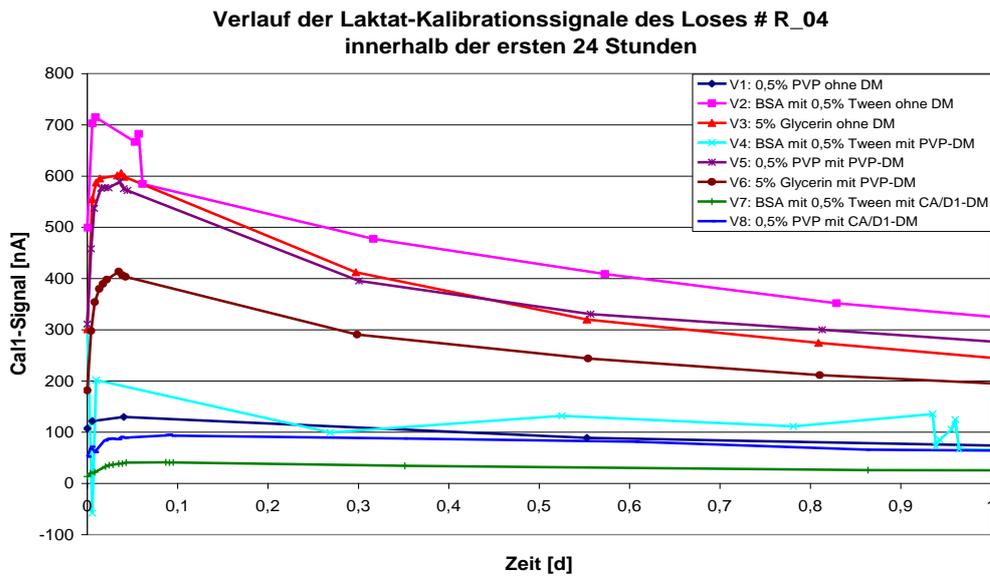


Abbildung 5-24; Verlauf der Cal1-Signale aller Laktatsensoren des Loses # R_04 innerhalb der ersten 24 Stunden.

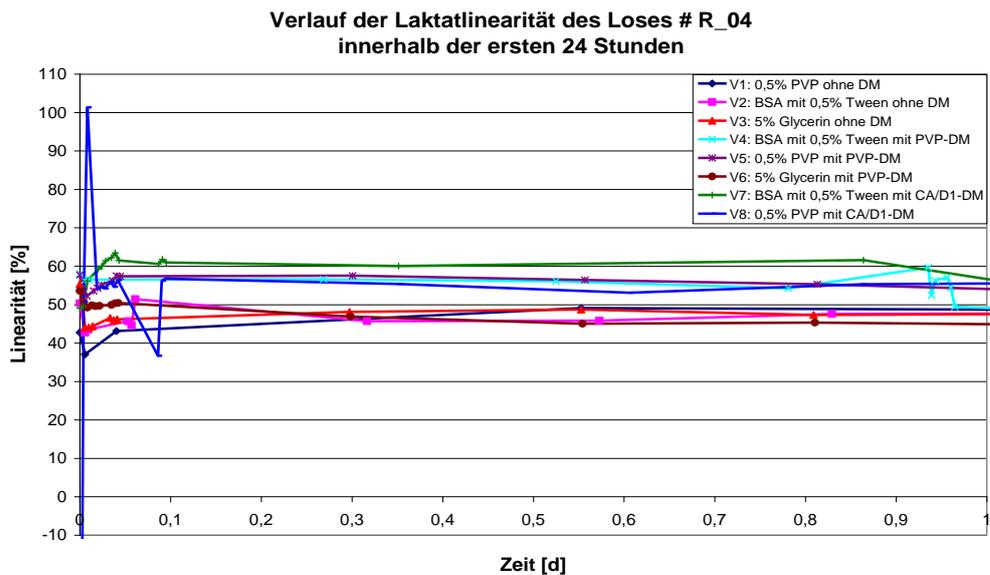


Abbildung 5-25; Verlauf der Linearität aller Laktatsensoren des Loses # R_04 innerhalb der ersten 24 Stunden.

Die Kenndaten der Sensoren variieren auch über die Varianten hinweg, sodass eine Einteilung der Ergebnisse nicht sinnvoll erscheint, da durch den weiteren Verlauf der Betrachtung bereits bekannt ist, dass fast alle Sensoren nach spätestens 5 Tagen kein Signal mehr aufweisen.

5.4.2 Stabile Phase

Glukose:

Die erwarteten Vorteile der Stabilisatoren konnten nicht nachgewiesen werden. Der Verlauf der Kalibrationssignale der Varianten 1- 6 sind, abgesehen ihrer absoluten Signalströme, vergleichbar, denn alle Sensoren driften relativ stark und verlieren innerhalb von 10 Tagen ca. 50% ihrer Ausgangsströme (siehe Abb. 5-26).

Im Verlauf der gesamten Einsatzdauer zeigen sich die Vorteile der Polyvinylpropionat-Deckmembran. So kann man in Abb. 5-27 erkennen, dass die Linearität der Varianten 4 (BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran) und 6 (Glycerin als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran) ca. 10-15% höher liegen als die Ergebnisse der anderen Versuche.

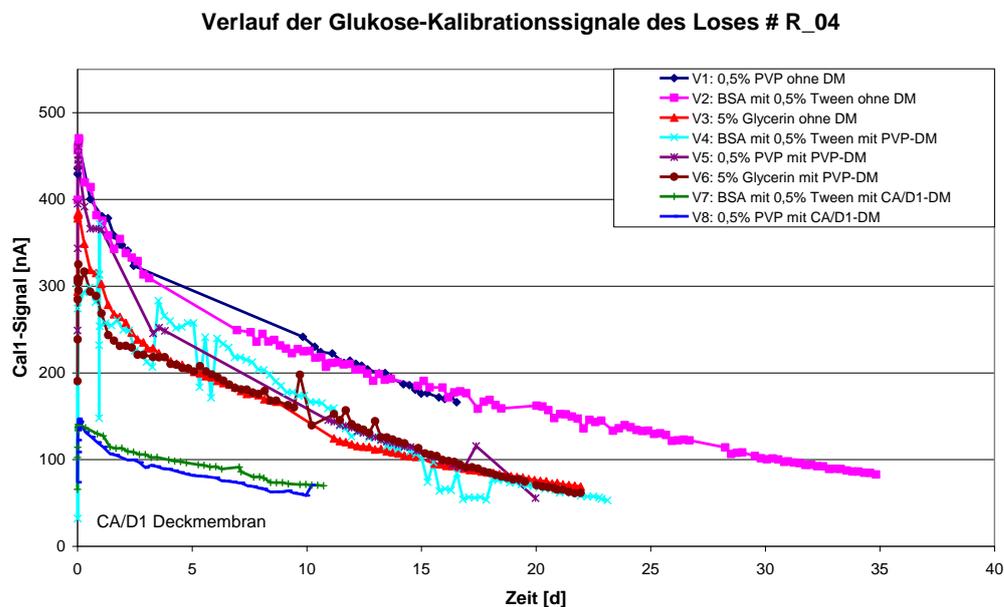


Abbildung 5-26; Verlauf der Cal1-Signale aller Glukosesensoren des Loses # R_04 über die gesamte Einsatzdauer.

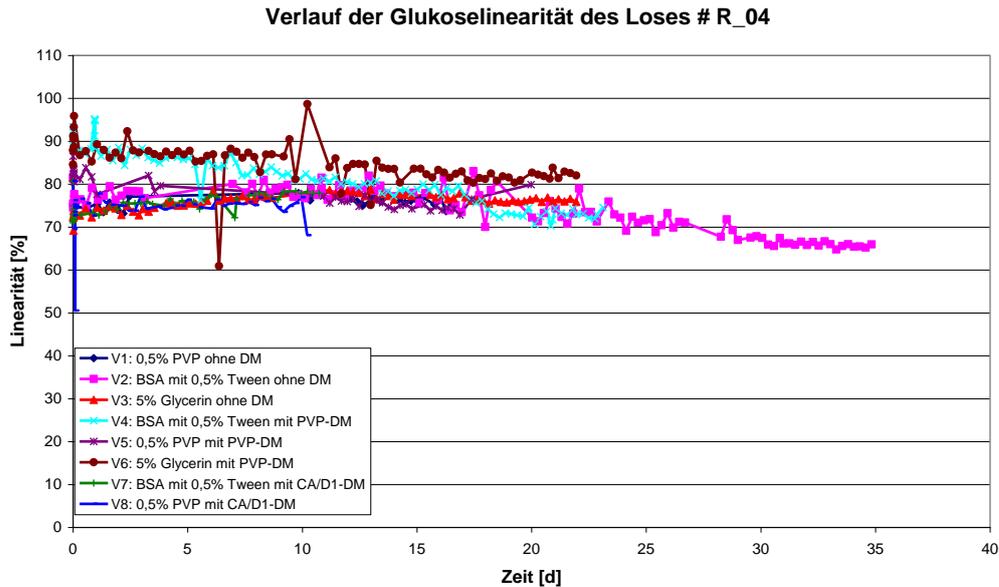


Abbildung 5-27; Verlauf der Linearität aller Glukosesensoren des Loses # R_04 über die gesamte Einsatzdauer.

Die Sensoren der Variante 7 und 8 (jeweils mit der Celluloseacetat/Hydrogel – Deckmembran) zeigen keine Unterschiede in der Linearität zu den deckmembranfreien Systemen. Lediglich die Ströme liegen weit unter den Vergleichssensoren (ca. 70 nA nach 10 Tagen). Nach Beendigung der Messung wurden die Sensoren mikroskopiert und eine Beschädigung der Immobilisierungsmatrix konnte festgestellt werden. Cyclohexanon, das Lösungsmittel der Deckmembran, löst die Polymerbestandteile der Graphitpaste weitgehend auf. Durch das Lösen der Polymermatrix konnten die Enzyme nicht richtig immobilisiert werden. Ein schnelleres Auswaschen (und daher ein vollständiger Signalverlust) wurde wahrscheinlich durch die Deckmembran selbst verhindert. Falls ein Auswaschen durch die Deckmembran komplett verhindert wird, kann auch ein negativer Einfluss des Lösungsmittels direkt auf die Enzyme die niedrigen Signale erklären. Eine weitere Untersuchung des Lösungsmittels auf das Enzym wird aber aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

Der Einfluss alternativer Lösungsmittel auf die Pastenintegrität wurde jedoch angesehen. Als mögliche Lösungsmittel für das Celluloseacetat/Hydrogelgemisch wurden Ethylmethylketon und 1,4 – Dioxan gefunden. Beide Lösungsmittel eignen sich nicht für den Einsatz auf der wasserbasierenden Polymermatrix, da auch in diesen beiden Fällen das Pastenmaterial angelöst wurde.

5.4.3 Messungen

Aufgrund der guten Linearitätsergebnisse der Varianten 4 und 6 (BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran bzw. Glycerin als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran) wird hier näher auf die Ergebnisse der Messreihen eingegangen.

Variante 4 – BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran:

Braunsteinsensor Test mit Echtproben

Lot: **R_04** Sensor: **V4_BSA_P**
 Gerät: **MSS9** Datum: **23. Mär 09**

Sonstiges:

Probe	Glu	Lac	Glu SOLL	Lac SOLL
Cal 1 vor	5,37	0,00	5,00	3,00
Cal 1 nach	11,06	4,13	5,00	3,00
Cal 9	5,90	0,53	5,00	3,00
Cal 10	4,54	4,40	5,00	3,00
Gentisinsäure	4,79	3,76	5,00	3,00
Paracetamol	7,44	3529,11	5,00	3,00
QC-Lösung 1	4,87	61,84	6,00	10,00
QC-Lösung 2	1,85	2,37	2,50	2,00
QC-Lösung 3	17,28	0,00	22,20	0,80

Probe	Glu Blut	Lac Blut	Glu Plasma	Lac Plasma	Hitachi Glu	Hitachi Lac
Probe 1	2,31	0,00	3,09	43,22	3,89	4,25
Probe 2	3,07	0,10	4,06	34,56	4,92	5,00
Probe 3	5,96	0,00	8,63	96,81	10,08	9,73
Probe 4	2,94	0,00	3,91	22,68	4,53	4,04
Probe 5	2,73	0,00	3,85	52,55	4,61	4,42
Probe 6	8,59	0,00	11,33	42,44	14,69	11,97
Probe 7	2,72	0,00	3,73	63,07	4,07	3,36
Probe 8	1,57	0,00	2,78	0,00	3,08	4,00

Kalibrationsparameter:	Glu	Lac	BSA
Stdby	8,21	6,43	6,30
Cal 1	82,59	-1,53	-0,29
Cal 2	304,76	-2,50	-1,43
Cal 3	63,37	38,44	21,66
Linearität	74%	33%	
Cal3/Cal3 BSA	2,93	1,78	

Glucose	Werte	Lactat	Werte
Cal vor/nach Proben	106,0%	Cal vor/nach Proben	#DIV/0!
Interferenten	22,3%	Interferenten	58781,1%
QC-Lösung	-22,4%	QC-Lösung	145,7%
Blut/Plasma Steigung	0,73	Blut/Plasma Steigung	0,00
Blut/Plasma Syx	0,26	Blut/Plasma Syx	0,04
Plasma Steigung	0,81	Plasma Steigung	6,81
Plasma Syx	0,29	Plasma Syx	28,03
Blut Steigung	0,59	Blut Steigung	0,00
Blut Syx	0,20	Blut Syx	0,04

	PLASMA	BLUT	
	GLUCOSE	LACTAT	GLUCOSE
Slope	0,76	3,75	0,58
Intercept	0,42	22,51	0,13
Bias	-0,17	6,60	-0,40

Tabelle 5-2; Übersicht der Messreihenbewertung der Variante R_04_V4 – BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembranmaterial.

Wie in Tabelle 5-2 zu erkennen ist, können die Messungen hinsichtlich Laktat nicht ausgewertet werden. Die Glukosemessungen zeigen sowohl positive als auch negative Ergebnisse. Der Verlauf der Messungen der Kalibrationslösungen, verteilt über die gesamte Messreihe, zeigt einen hohen Einfluss der Probenmatrix auf die Sensorchemie. In Abb. 6-28 ist der erste Messpunkt bei 5,37 mmol/l, der auch innerhalb der festgelegten Grenzen liegt. Bereits nach den Messungen der wässrigen Proben (Cal9 und Cal 10 Lösungen für pH Test, Interferenztestlösungen und die drei QC-Lösungen) sinkt der Cal 1 Wert auf 4,3 mmol/l. Dieses Niveau bleibt aber über die Blutmessungen erhalten. Erst die Messung der acht Plasmaproben bewirkt ein Ansteigen des Cal1-Wertes auf über 11 mmol/l. Über die nachfolgenden Cal1-Messungen erholt sich langsam der Sensor und pendelt sich bei einem Glukosewert von 5,7 mmol/l ein. Die Kalibrationswiederfindung zeigt den reversiblen Einfluss der externen Proben (reversibler Echtprobenfehler) und dieser Fehler ist mit dem vorliegenden Sensoraufbau sehr groß.

Kalibrationswiederfindung Cal 1 der Variante R_04_V4

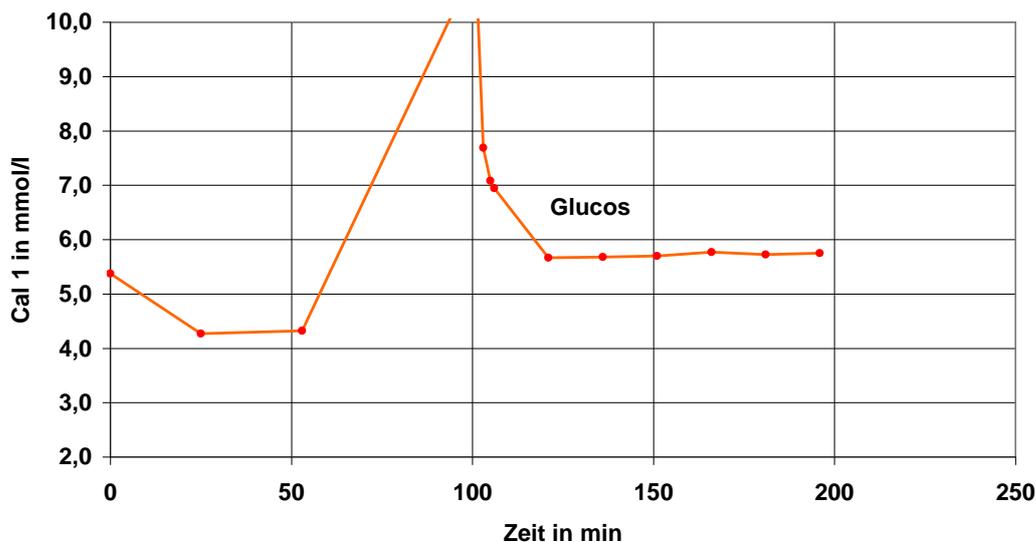


Abbildung 5-28; Verlauf der Kalibrationswiederfindung während der Messreihe mit Sensoren der Variante 4 des Loses # R_04.

Auch der pH - Effekt und der Einfluss der Interferenzen ist sehr hoch. Die Änderung durch Erhöhung des pH-Werts auf 7,9 (Cal9) äußert sich in einem Anstieg der Glukosekonzentration auf 5,9 mmol/l. Während der Einfluss von Gentisinsäure auf die Glukosemessung akzeptabel ist, ist die scheinbare Erhöhung der Glukosekonzentration um 50% bei Anwesenheit von Paracetamol in der Probenmatrix nicht akzeptabel.

Die Ergebnisse der QC-Lösungen sind in jedem Level zu tief und die Abweichungen vom Sollwert zu groß.

Die Messungen im Blut zeigen jedoch sehr gute Ergebnisse. Die Messungen verlaufen über den Konzentrationsbereich linear, jedoch ist die Steigung zu gering. Der angestrebte Wert der Steigung von 1 (bzw. 0,80 durch Berücksichtigung des Hämatokritwerts) ist nicht erreicht worden (siehe Abb.5-29).

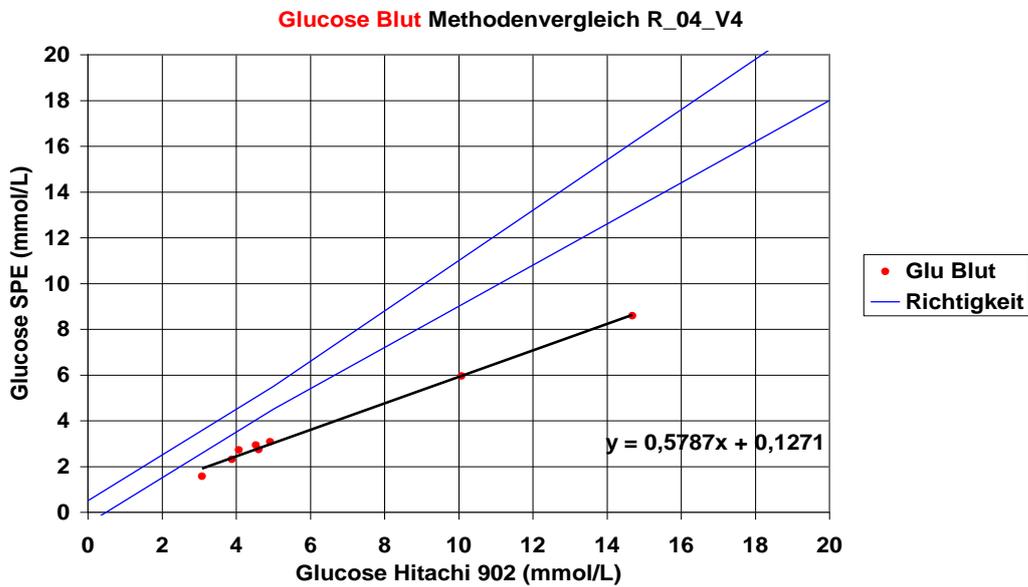


Abbildung 5-29; Methodenvergleich der Glukosemessung in Blut der Sensorvariante R_04_V4.

Den Effekt der Probenmatrix kann man durch Vergleich der Plasmamessungen einer Referenzmethode erkennen. Die Steigung erhöht sich von 0,58 bei Blut auf 0,76 bei Plasma und liegt demnach um gut 20% unter dem Erwartungswert.

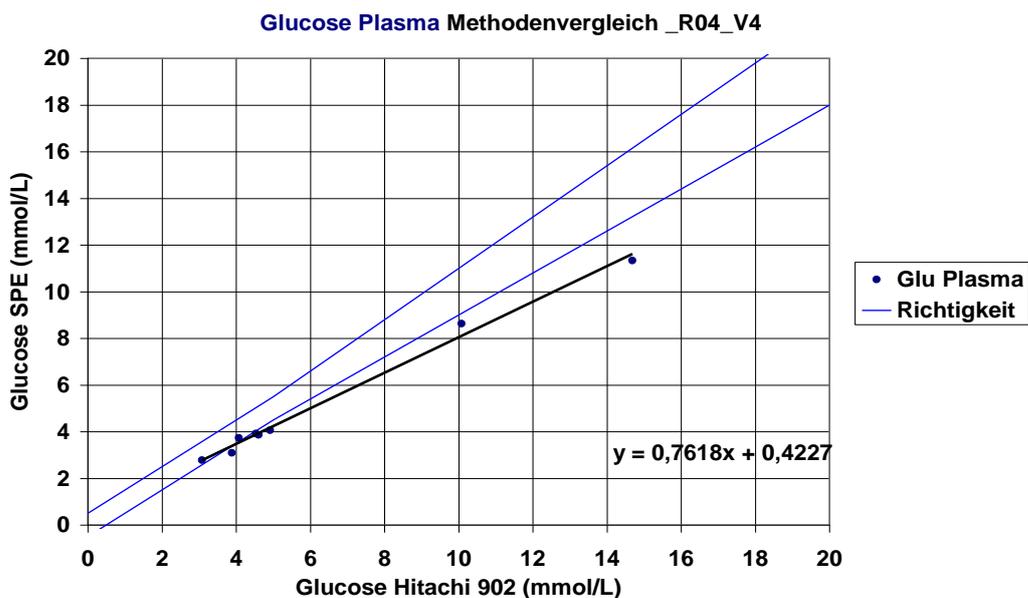


Abbildung 5-30; Methodenvergleich der Glukosemessung in Plasma der Sensorvariante R_04_V4.

Das Maß der Übereinstimmung der Messergebnisse in Blut bzw. Plasma erkennt man in der Gegenüberstellung Abb. 5-31. Je besser die Ergebnisse übereinstimmen, desto genauer liegen die Messpunkte auf der Ausgleichsgerade. Die in rot dargestellte Regressionsgerade wird durch den Ursprung gelegt, um eine Abschätzung der Abweichung der Messergebnisse im unteren Konzentrationsbereich zu ermöglichen (im besten Fall liegen die beiden Ausgleichsgeraden übereinander, dann spricht man von Offset-freien Sensoren). Erwartungswert wären ca. $y = 0,80$, was bei ca. 40% Hämatokrit einen üblichen Blutfaktor von Glukosesensoren darstellt.

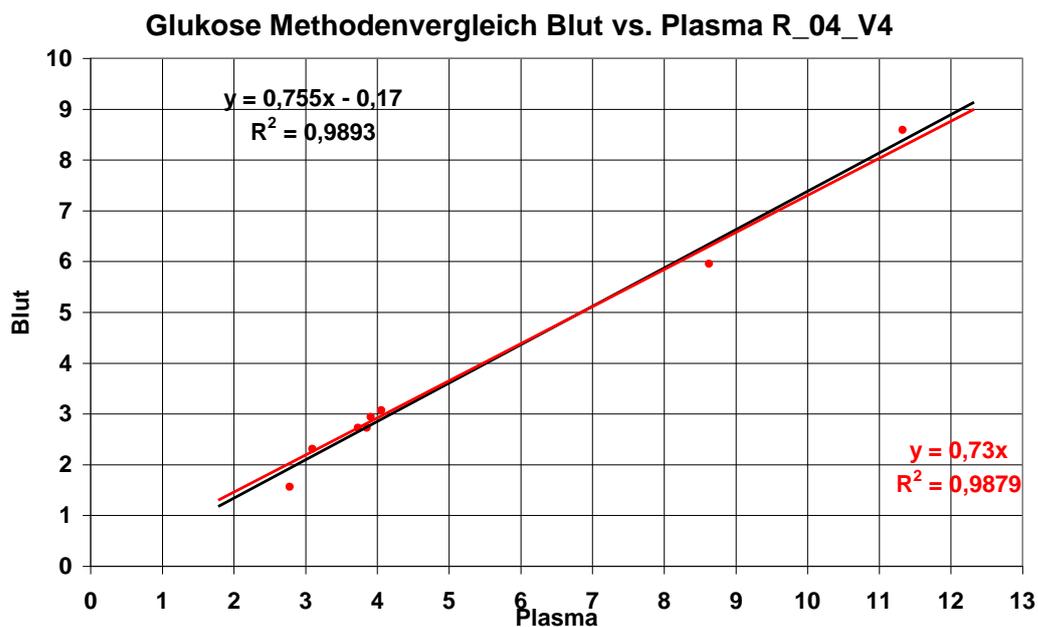


Abbildung 5-31; Methodenvergleich der Glukosemessung Blut vs. Plasma der Sensorvariante R_04_V4.

Bei den Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass der Sensor bereits seit 21 Tagen im Einsatz war und zu Beginn der Messreihe nur eine Linearität von 74% aufweist.

Variante 6 – Glycerin als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran:

Braunsteinsensor Test mit Echtproben

Lot: **R_04** Sensor: **V6_Gly_P**
 Gerät: **MSS9** Datum: **14. Apr 09**

Sonstiges:						
Probe			Glu	Lac	Glu SOLL	Lac SOLL
Cal 1 vor			4,93	73,59	5,00	3,00
Cal 1 nach			5,28	23,40	5,00	3,00
Cal 9			4,76	0,00	5,00	3,00
Cal 10			4,82	129,82	5,00	3,00
Gentisinsäure			4,46	0,00	5,00	3,00
Paracetamol			2,38	0,00	5,00	3,00
QC-Lösung 1			5,18	246,78	6,00	10,00
QC-Lösung 2			2,09	18,97	2,50	2,00
QC-Lösung 3			16,74	0,00	22,20	0,80
Probe	Glu Blut	Lac Blut	Glu Plasma	Lac Plasma	Hitachi Glu	Hitachi Lac
Probe 1	2,95	481,75	3,17	844,45	4,04	4,25
Probe 2	2,61	343,58	3,08	724,93	3,78	3,78
Probe 3	6,70	0,00	7,76	230,57	9,59	8,07
Probe 4	3,26	399,41	3,90	481,29	4,24	4,10
Probe 5	3,22	588,72	3,98	172,52	4,72	5,38
Probe 6	10,00	713,37	12,15	218,06	15,61	13,90
Probe 7	3,78	894,10	4,91	160,15	5,45	5,98
Probe 8	3,10	0,00	3,83	332,63	4,20	4,88

Kalibrationsparameter:	Glu	Lac	BSA
Stdby	15,23	6,10	15,45
Cal 1	142,30	-0,71	-3,18
Cal 2	602,87	1,10	-1,20
Cal 3	51,56	63,50	65,39
Linearität	85%	-31%	
Cal3/Cal3 BSA	0,79	0,97	
Einsatztag :	15		

Glucose	Werte	Lactat	Werte
Cal vor/nach Proben	7,0%	Cal vor/nach Proben	-68,2%
Interferenten	-31,6%	Interferenten	-100,0%
QC-Lösung	-18,2%	QC-Lösung	1038,8%
Blut/Plasma Steigung	0,83	Blut/Plasma Steigung	0,72
Blut/Plasma Syx	0,21	Blut/Plasma Syx	336,42
Plasma Steigung	0,81	Plasma Steigung	42,19
Plasma Syx	0,25	Plasma Syx	243,29
Blut Steigung	0,67	Blut Steigung	59,13
Blut Syx	0,18	Blut Syx	330,89
	PLASMA		BLUT
	GLUCOSE	LACTAT	GLUCOSE LACTAT
Slope	0,75	-40,51	0,62 23,77
Intercept	0,50	650,40	0,45 278,09
Bias	-0,17	61,89	-0,31 66,98

Tabelle 5-3; Übersicht der Messreihenauswertung der Variante R_04_V6 – Glycerin als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembranmaterial.

Die Verwendung von Glycerin anstatt BSA als Stabilisator zeigt Vorteile in der Sensorcharakteristik während der Messreihe. Der Verlauf der Kalibrationswiederfindung zeigt einen geringeren Einfluss der wässrigen Proben, als auch der biologischen Proben auf die Sensorperformance als bei der Vermessung der Variante 4 (siehe Tab. 5-3).

Die Laktatergebnisse sind wiederum nicht auswertbar, da das Signal im Rauschbereich angesiedelt ist.

Kalibrationswiederfindung Cal 1 der Variante R_04_V6

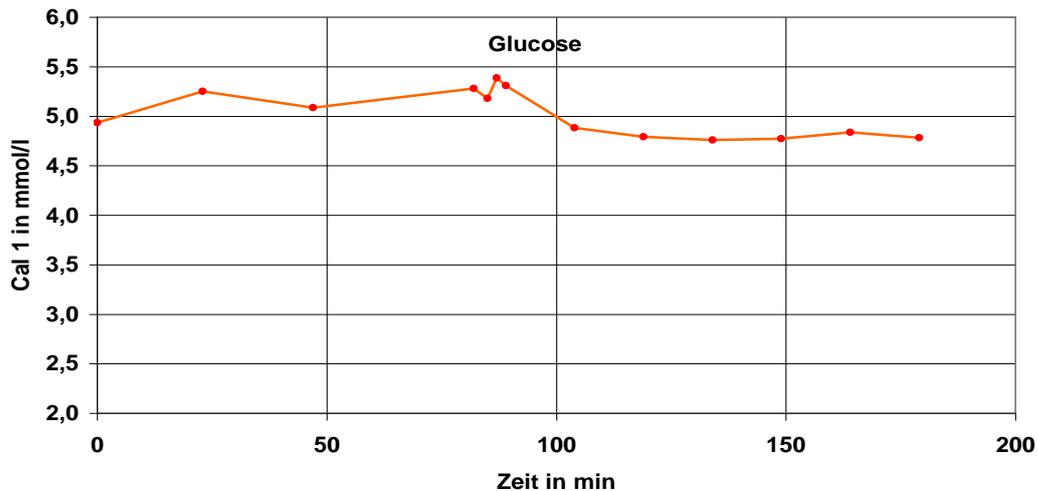


Abbildung 5-32; Verlauf der Kalibrationswiederfindung während der Messreihe mit Sensoren der Variante 4 des Loses # R_04

Nach den Messungen der wässrigen Probenmaterialien steigt das Cal1-Signal leicht an, sinkt jedoch während der Messungen von Blut wieder auf den Sollwert ab. Die Analyse der Plasmaproben bewirkt wiederum einen leichten Anstieg der Signale innerhalb der akzeptablen Abweichung von 10%. Nach drei Messungen der Cal1-Lösung sinkt die ausgegebene Konzentration unter den Sollwert. Gesamt zeigt sich ein akzeptabler reversibler Echtprobenfehler.

Die Messung der pH-Empfindlichkeit der Sensoren durch die Kalibrationslösungen 9 und 10 zeigen verbesserte Ergebnisse gegenüber der vorangegangenen Messreihe mit der Sensorvariante 4. Der Einfluss ist in dieser Ausführung liegt innerhalb der Abweichungsgrenzen und ist zufriedenstellend.

Die Wirkung der Interferenzen zeigt ein anderes Bild als in der Variante 4. Während im Sensordesign der Variante 4 die Zugabe von Paracetamol eine Erhöhung der Glukosekonzentration von 40% bewirkte, resultiert in der Variante 6 die Zugabe von Paracetamol eine Reduktion durch Überkompensierung der BSA-Elektrode um über 50%.

Die Ergebnisse der QC-Lösungen sind vergleichbar schlecht zur oben angeführten Messreihe. Die erhaltenen Glukosekonzentrationen liegen auch hier unter den Sollwerten, nähern sich aber besser an.

Die Sensorperformance in den Echtproben ist geringfügig besser: Die Steigung der Ausgleichsgeraden im Blut ist um 0,03 steiler, der Offset jedoch auch um 0,3 mmol/l höher (siehe Abb. 5-33).

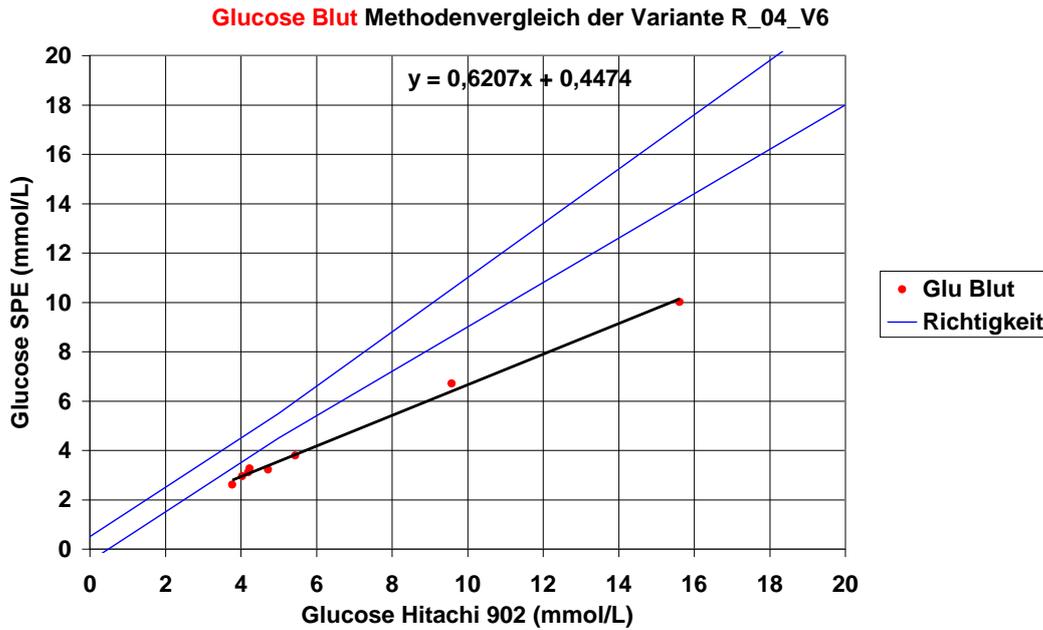


Abbildung 5-33; Methodenvergleich der Glukosemessung in Blut der Sensorvariante R_04_V6.

Die Ergebnisse im Plasma der beiden untersuchten Sensorvarianten sind annähernd ident. Weder die Steigung noch der Offset zeigen größere Unterschiede (Abb. 6-34).

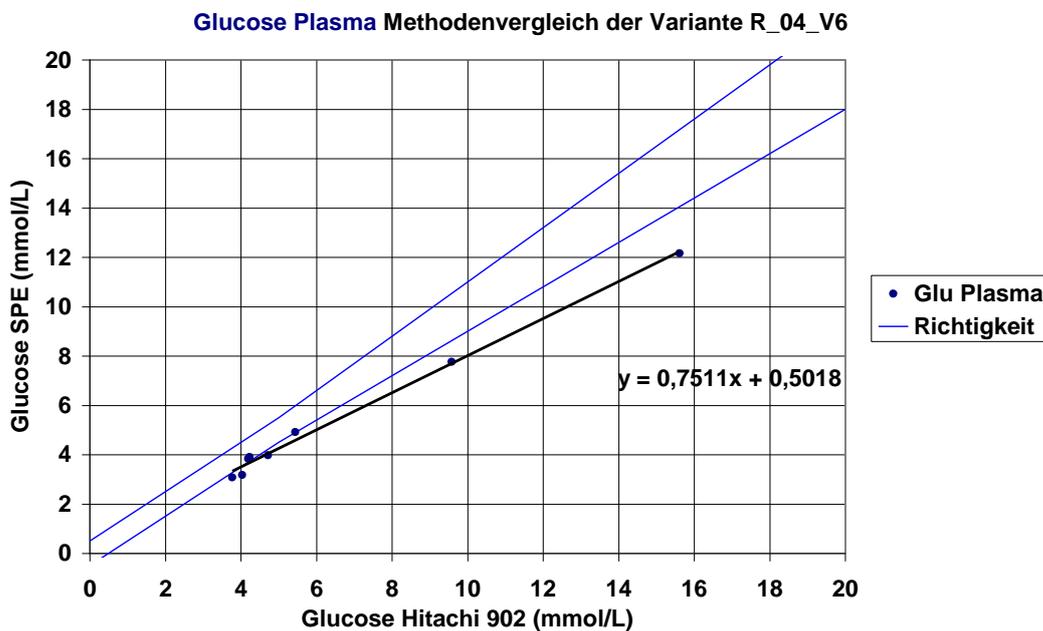


Abbildung 5-34; Methodenvergleich der Glukosemessung in Plasma der Sensorvariante R_04_V6.

Eine Verbesserung zeigt der Vergleich der Messung im Blut und im Plasma. Die Steigung nimmt von 0,73 der BSA-Variante auf 0,81 der Glycerinstabilisierten Variante zu, die Abweichung der Einzelmessungen sinkt und Offset ist praktisch keiner vorhanden (Abb. 5-35).

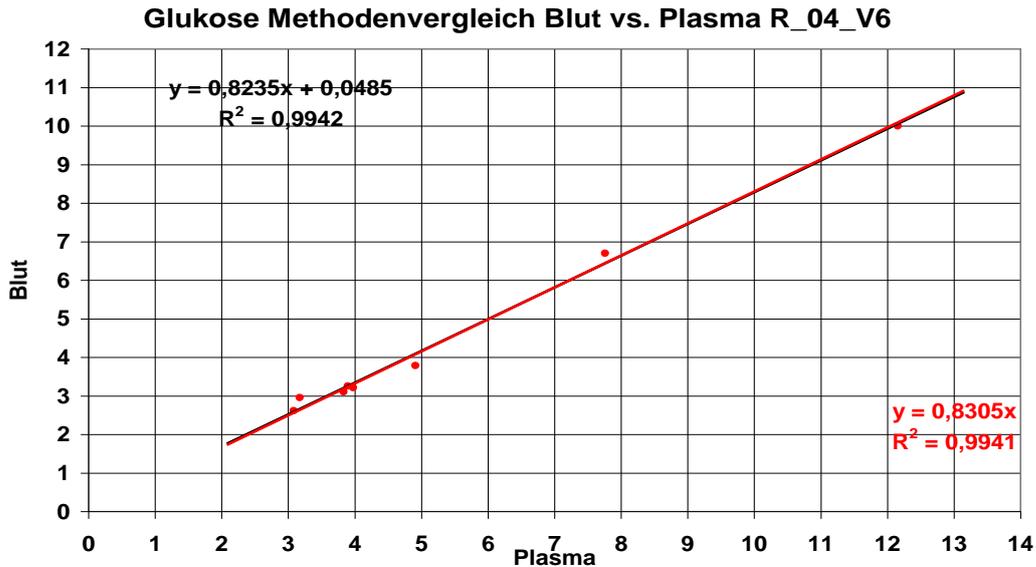


Abbildung 5-35; Methodenvergleich der Glukosemessung Blut vs. Plasma der Sensorvariante R_04_V6.

Die Ausgangslinearität der Sensorvariante 6 betrug bei Beginn der Messreihe 85% und damit um 11% mehr als die Variante 4 zum Zeitpunkt der Messungen. Daraus resultiert, dass die Linearität der Sensorsysteme einen geringen Einfluss auf die Performance der Sensoren in den biologischen Proben aufweist. Der Unterschied in der pH-Empfindlichkeit scheint dagegen aber sehr von der Höhe der Linearität abzuhängen.

5.4.4 Zusammenfassung

Glukose:

Die Variation der Stabilisatoren in den Sensoren ohne Deckmembran zeigt keinen Einfluss auf die Kalibrationsbewertung. Die Signalhöhen und Linearitäten der Sensoren sind als unterdurchschnittlich zu beurteilen. Erst der Einsatz der Polyvinylpropionat-Deckmembran erhöht die Linearität der Glycerin und BSA stabilisierten Systeme um bis zu 15%.

Die Verwendung des Celluloseacetat/Hydrogel-Gemisches als Deckmembran liefert keine Verbesserung der Ergebnisse, da die Sensormatrix durch das Deckmembran-Lösungsmittel Cyclohexanon angegriffen wird. Auch die Untersuchung der alternativen Lösungsmittel Ethylmethylketon und 1,4 – Dioxan lieferte keine positiven Ergebnisse.

Die untersuchten Messreihen mit den Varianten 4 und 6 (BSA als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran bzw. Glycerin als Stabilisator und Polyvinylpropionat als Deckmembran) zeigen in den biologischen Medien Blut und Plasma ein sehr ähnliches Verhalten. Einzig in der Kalibrationswiederfindung, der Empfindlichkeit gegenüber pH-Wert Änderungen und Interferenzen treten nennenswerte Unterschiede zugunsten der Variante 6 auf. Diese Unterschiede können sowohl aus den verwendeten Stabilisator, als auch aus der höheren Linearität der verwendeten Sensoren (V4: 74% und V6: 85%) resultieren.

Glucose Blut Methodenvergleich
Zusammenfassung aller Blutmessungen des Loses # R_04

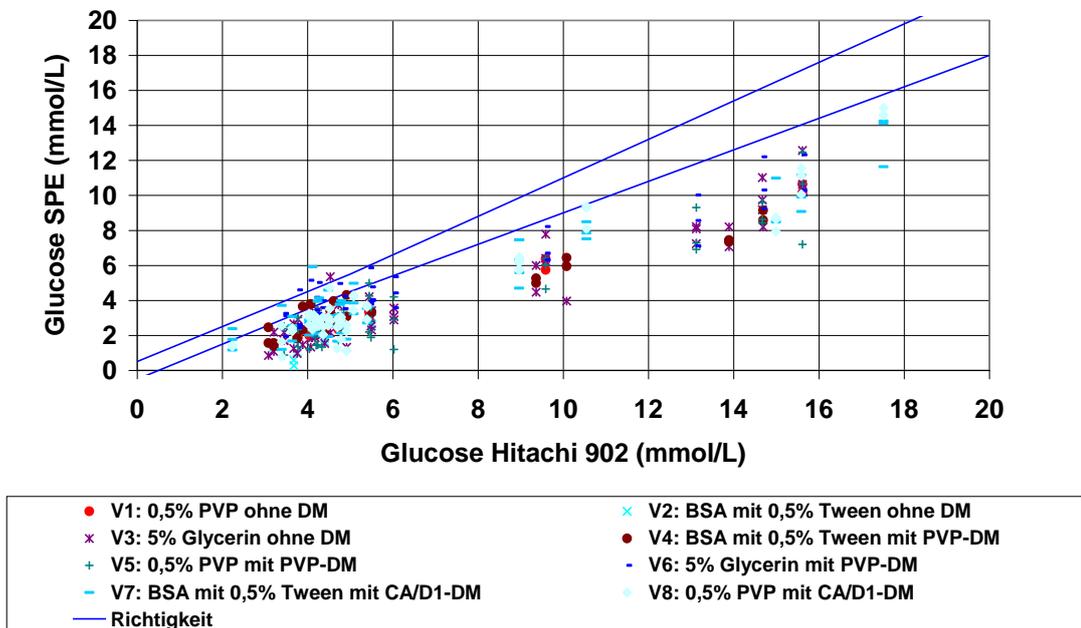


Abbildung 5-36; Zusammenfassung aller Messungen mit Sensoren aus dem Los # R_04 in Blut

Glucose Plasma Methodenvergleich
Zusammenfassung aller Plasmamessungen des Loses # R_04

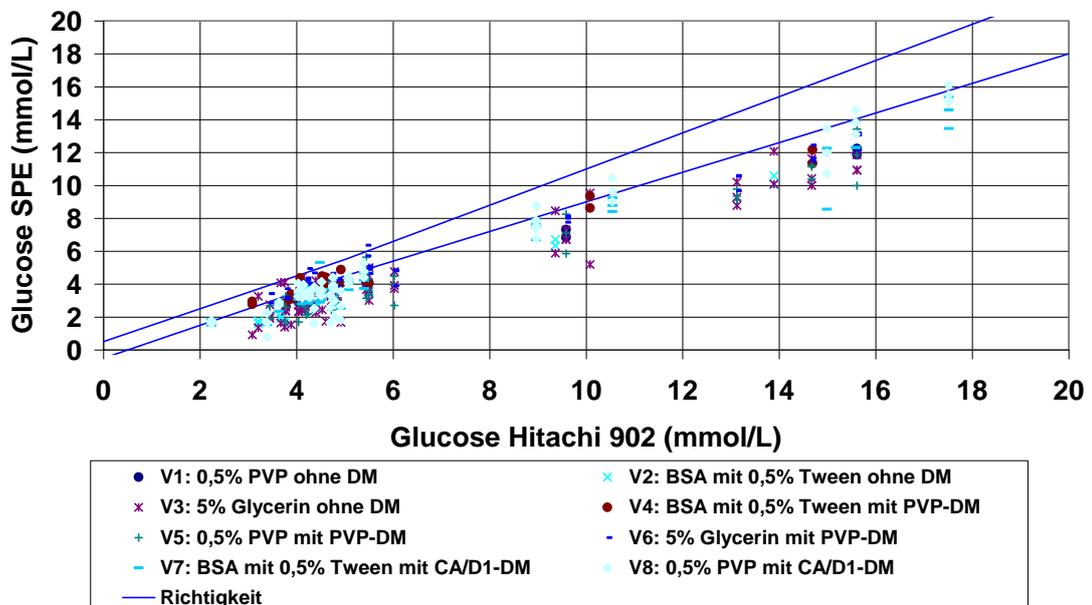


Abbildung 5-37; Zusammenfassung aller Messungen mit Sensoren aus dem Los # R_04 in Plasma

Laktat:

Weder der Einsatz der Stabilisatoren, noch das Aufbringen einer Deckmembran hat einen positiven Einfluss auf die Performance der Laktatsensoren. Die Kalibrationssignale sinken innerhalb von einem bis fünf Tagen auf null.

5.5 Vernetzungsversuche mit Glutardialdehyd, Änderung des Detergenz

Getestet wurden eine alternative Carbonpaste der Fa. Gwent, sowie die Detergenzalternative Brij58 bzw. detergenzfreie Fertigung der Enzympaste und eine Enzymimmobilisierung mit Glutardialdehyd.

Zur Fertigung des Loses # R_05 wurde eine neue Charge der wasserbasierenden Graphitpaste der Fa. Gwent verwendet. Diese Paste ist von der Formulierung der Massenanteile ident mit der zuvor verwendeten Zusammensetzung, jedoch ist der Lösungsmittelanteil höher. Daraus resultiert eine Verringerung der Viskosität der Paste, was zu einer verbesserten Verarbeitbarkeit während des Dispensierens führte.

Die Änderung des Detergenz Tween20 auf Brij58 bzw. das Lösen der Enzyme ohne Detergenz hatte auf den Herstellprozess keinen Einfluss, da sich die Enzyme in beiden Alternativen hervorragend lösten.

5.5.1 Wetup

Das Verhalten der Sensoren in der Startphase ist trotz der weniger viskosen Graphitpaste vergleichbar zu den vorhergehenden Versuchen (siehe Abb. 5-39 und 5-40)

Die Standardvariante mit Tween20 als Detergenz zeigt ein Einsatzsignal von ca. 1000 nA, welches innerhalb der ersten 24 Stunden um 35% auf 630nA sinkt. Die Linearität steigt hingegen innerhalb dieses Zeitraums auf über 80%.

Der Einfluss des Glutardialdehyds nach Überdampfen der Sensoren zeigt sich bereits in der Startphase der Variante 2. Der Signalstrom nach dem Einsatz ist um 10% höher und der Drift der Signale geringer. Innerhalb der ersten 24 Stunden verliert der Sensor lediglich 20% des Stroms. Die Linearität der Variante 2 verschlechtert sich im Vergleich zum Standardsensor um ca. 6%.

Das Auftropfen der 0,05%igen Glutardialdehyd-Lösung auf den Sensor spot zeigt einen Vorteil im Strom-Driftverhalten der Variante 3. Der Signalstrom sinkt innerhalb der ersten 24 Stunden nur um 10% - von 860nA auf 780nA. Nachteilig hingegen ist die niedrige Linearität der Sensoren, die in dieser Ausführung nur noch um 65% liegt.

Das direkte Einmischen des Glutardialdehyds, wie in Variante 4 ausgeführt, zeigt keine Stabilisierung der Kalibrationssignale im Startverhalten. Der Stromdrift beträgt hier annähernd 40% bei Signalhöhen von 800nA und ist damit vergleichbar zum Standardsensor. Positiv hingegen ist die Entwicklung der Linearität: Im Laufe der ersten 24 Stunden erreicht der Sensor eine Linearität von 94%, wobei das Signal um bis zu 6% schwankt.

Bei den folgenden Versuchsausführungen (Varianten 5, 6 und 7) wurde eine Adaption der Kalibrationslösungen durchgeführt. Aufgrund der hohen Cal1-Signale wurden alle Kalibrationslösungen 1:1 mit deionisiertem Wasser verdünnt, um die Verstärkerobergrenze nicht zu überschreiten. Im Vergleich zu den Varianten 1-4 sind die Cal1-Ströme halbiert.

Die vollständige Abdeckung des siebgedruckten Braunsteinspots mit der Enzym/Braunstein/Graphitpaste zeigt sehr gute und stabile Ergebnisse. Die Fertigung erfolgte analog zur Variante 1 mit dem kleinen Unterschied, dass nach Herstellung der Paste nicht sofort dispensiert wurde, sondern eine Zeitspanne von 40 Minuten zwischen Herstellung und Dispensieren vergangen war. Die Cal1-Signale starten in der verdünnten Kalibrationslösung bei 850 nA, und verändern sich innerhalb eines Tages kaum. Die Linearität der Sensoren liegen um 100% und stellen ein ausgezeichnetes Ergebnis dar (siehe Abb. 5-38).

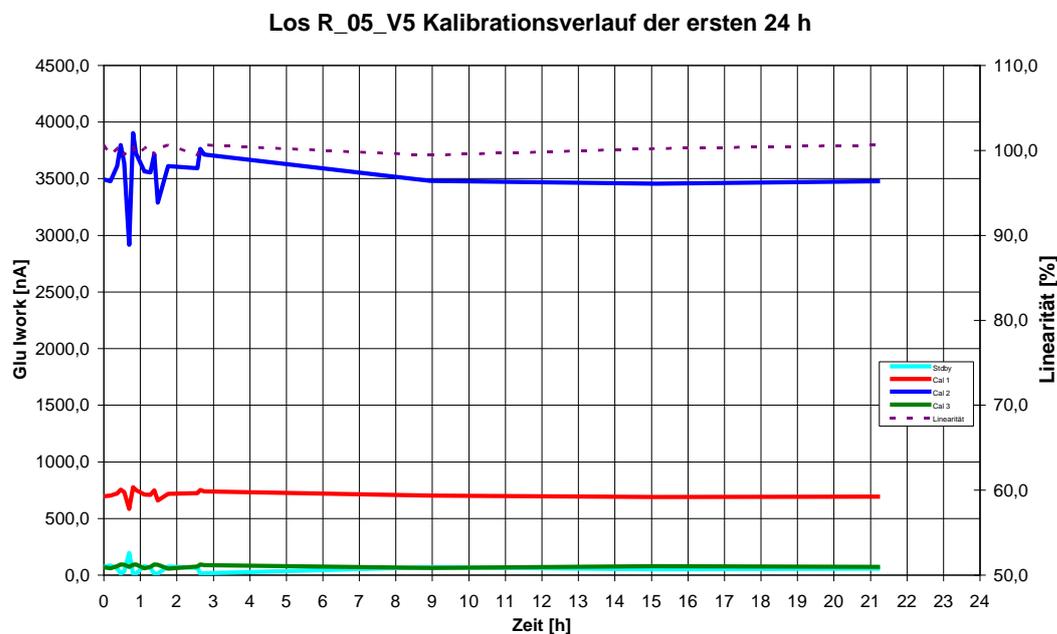


Abbildung 5-38; Verlauf der Kalibrationskenndaten der Variante 5 aus dem Los # R_05.

Bei der Herstellung der Enzymlösung zeigt sich, dass das Fehlen eines Detergenz, oder der Ersatz durch Brij58 keinen großen Einfluss auf die Sensorperformance verursacht. Das Startsignal ist zwar um 400-500nA höher als jenes der Variante 1, doch verlieren die Sensoren innerhalb weniger Stunden einen Großteil der Signalhöhe (60 - 70% Verlust/24h). Die Linearität liegt um bis zu 5% höher als die der Vergleichssensoren.

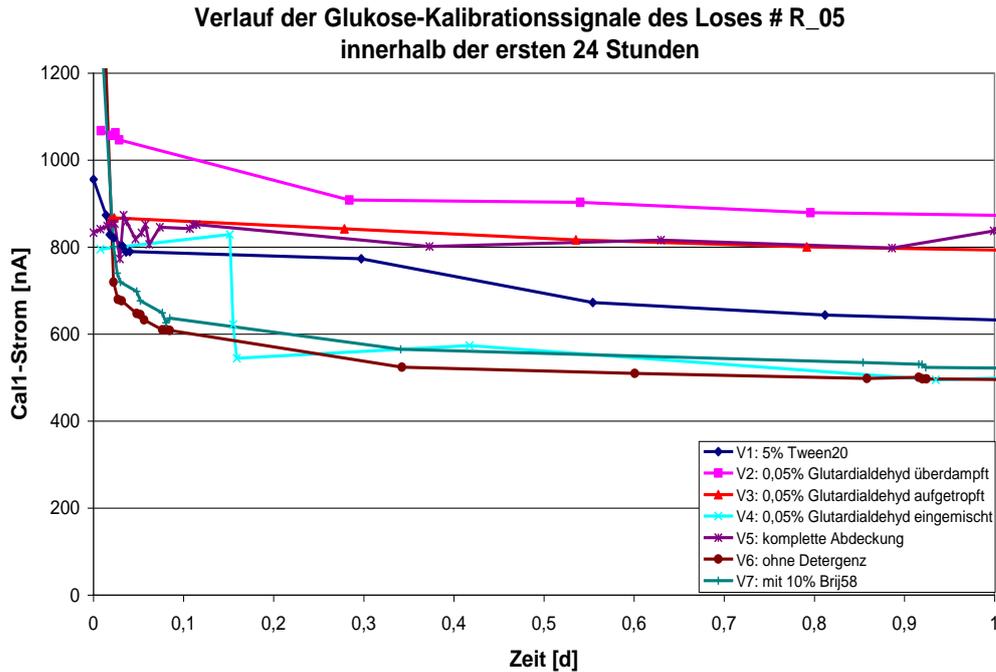


Abbildung 5-39; Verlauf der Cal1-Signale aller Glukosesensoren des Loses # R_05 innerhalb der ersten 24 Stunden.

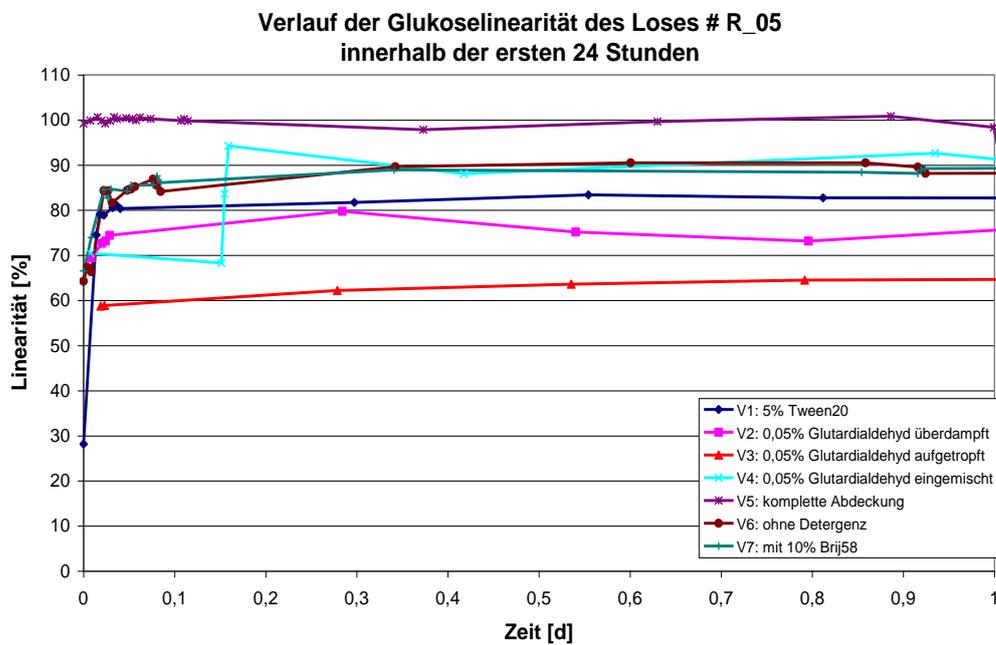


Abbildung 5-40; Verlauf der Linearität aller Glukosesensoren des Loses # R_05 innerhalb der ersten 24 Stunden.

Laktat:

Das Verhalten der Laktatsensoren in dieser Versuchsdurchführung zeigt kaum verbesserte Ergebnisse im Startverhalten. Die Signalströme aller Varianten sinken innerhalb kurzer Zeit stark ab (siehe Abb. 5-40). Lediglich die Varianten 2, 6 und 7 zeigen nach 24 Stunden noch Signale über 100nA. Die Linearität aller Sensoren liegen unter 60%.

Die Zugabe von Glutardialdehyd in jeglicher Form, als auch die Änderung des Detergenz bzw. dessen Eliminierung aus der Pastenformulierung zeigt keine Verbesserung der Sensorperformance.

Der Verlauf der Kalibrationsströme spricht weiter für eine Inaktivierung oder Ausbluten der Laktatoxidase.

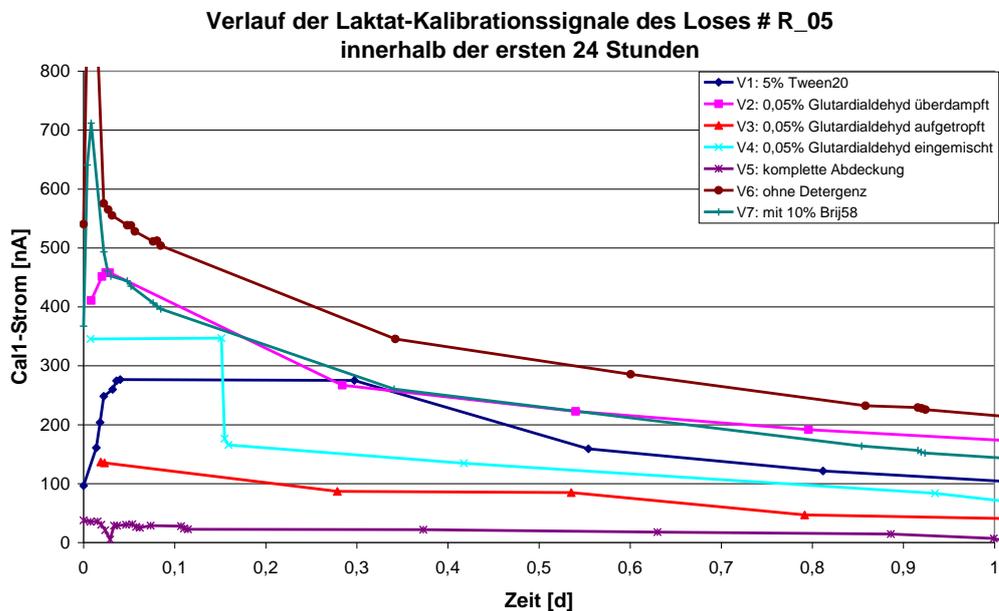


Abbildung 5-41; Verlauf der Cal1 - Signale aller Laktatsensoren des Loses # R_05 innerhalb der ersten 24 Stunden.

5.5.2 Stabile Phase

Glukose:

Im Verlauf der stabilen Phase zeigen die Kalibrationssignale der Glukosesensoren ein positives Ergebnis (siehe Abb. 5-41) über die gesamte Einsatzzeit. Nach dem Signalverlust innerhalb der Wetup-Phase zeigen die Sensoren einen geringeren Drift. Besonders die Variante 5 mit der vollständigen Abdeckung der siebgedruckten Braunsteinschicht zeigt einen annähernd linearen Verlauf. Am tiefsten liegen die Detergenzvarianten, was einen grundsätzlich positiven Effekt des Tween20 auf die Sensorperformance zeigt.

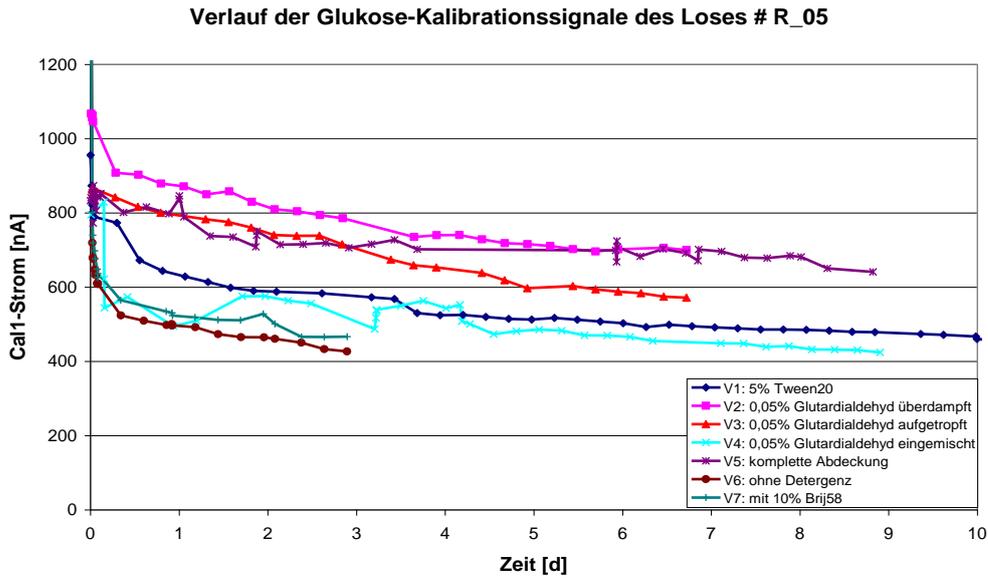


Abbildung 5-42; Verlauf der Cal1 - Signale aller Glukosesensoren des Loses # R_05 über die gesamte Einsatzdauer.

Die Linearitäten der Sensoren aus dem Los # R_05 zeigen großteils die gleichen Verläufe wie die Sensoren aus den vorhergehenden Loses. Im Schnitt werden Linearitäten von 75 – 90% erreicht. Am tiefsten liegen hier die mit Glutaraldehyd behandelten Sensoren. Eine Ausnahme zeigen die Sensoren der Variante 5, welche bei einer Linearität von 100% starten und diese konstant über den Einsatzzeitraum beibehalten. Die Änderung des Detergenz verursacht in der Linearität eine Erhöhung um 5%, was auf die niedrigeren Kalibrationssignale zurückzuführen ist.

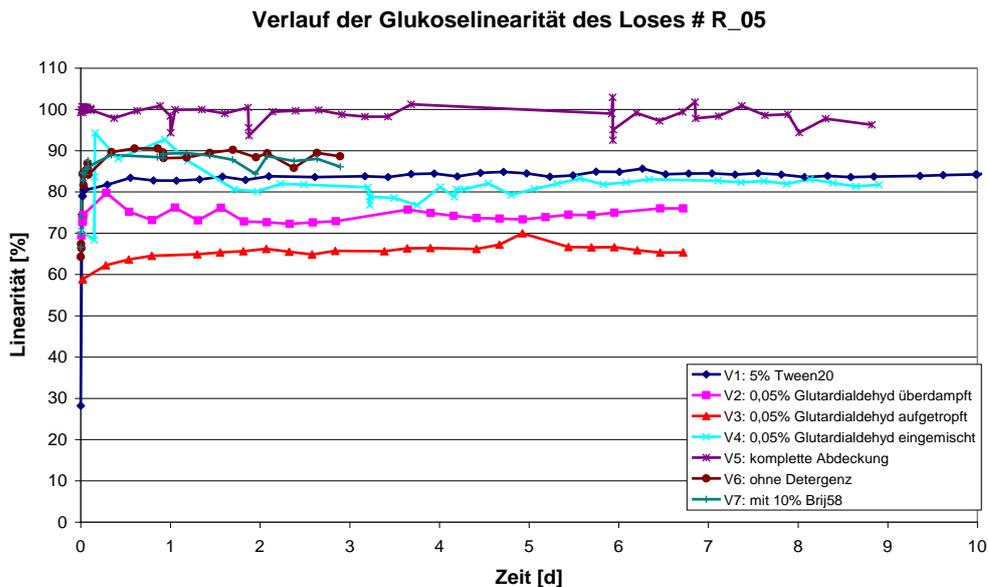


Abbildung 5-43; Verlauf der Linearität aller Glukosesensoren des Loses # R_05 über die gesamte Einsatzdauer.

Laktat:

Auch in diesem Los konnten keine funktionierenden Laktatsensoren hergestellt werden. Wie in Abb. 5-44 ersichtlich, verlieren die Sensoren innerhalb von 3 Tagen den Großteil ihres Signals.

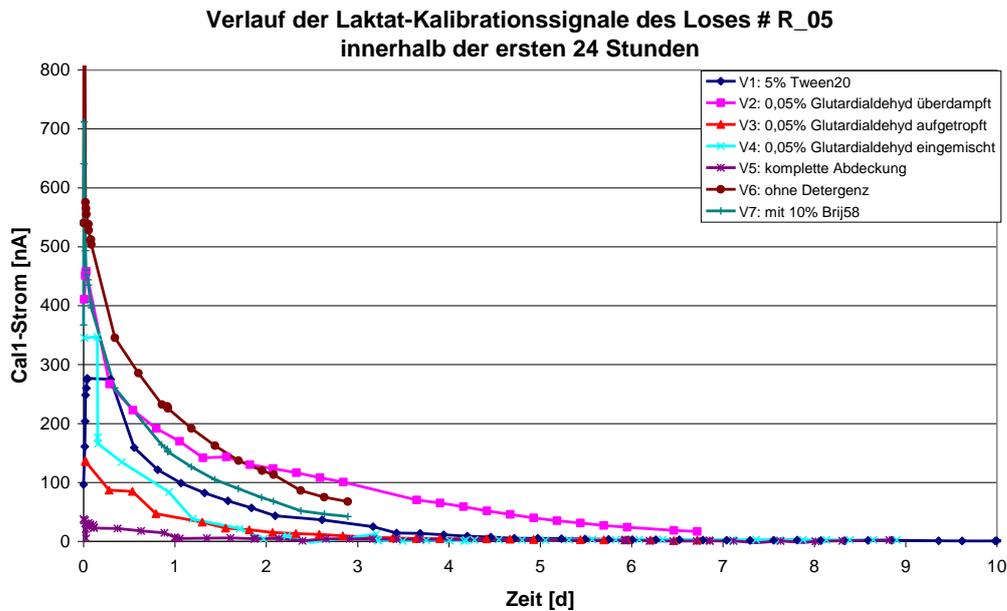


Abbildung 5-44; Verlauf der Cal1 - Signale aller Laktatsensoren des Loses # R_05 über die gesamte Einsatzdauer.

5.5.3 Messungen

Die Einzelauswertung der Messungen wird aufgrund des großen Platzbedarfs hier nicht angeführt, sondern die Gegenüberstellung der einzelnen Varianten in Tabellenform.

Die Verdünnung der Kalibrationslösungen in den Varianten 5, 6 und 7 wurden in der Auswertung berücksichtigt und korrigiert eingefügt.

Die Ergebnisse der Kalibrationsparameter der betrachteten Sensorvarianten sind akzeptabel und in Tabelle 5-4 mit den Einsatztagen angeführt. Alle Sensoren zeigen Linearitäten über 80% und können für die Messreihe verwendet werden.

Kalibrationsergebnisse vor Probenzugabe				
Probe	V1 – Standard	V5 – Standard, komplette Abdeckung	V6 – ohne Detergenz	V7 – Birj58 als Detergenz
Einsatztage	19	5	2	2
Cal1 Signal [nA]	218	981	519	406
Linearität [%]	84	95	88	90

Tabelle 5-4; Kalibrationsergebnisse der vor der Messreihe der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

Die Messung der ersten Kalibrationslösung vor Beginn der Messreihe zeigt, dass alle Sensoren korrekt kalibriert sind (Soll-Wert $5,00 \pm 0,5$ mmol/l).

Messergebnisse Kalibrationswiederfindung				
Probe	V1 – Standard	V5 – Standard, komplette Abdeckung	V6 – ohne Detergenz	V7 – Birj58 als Detergenz
Cal1 vor [mmol/l]	5,08	4,82	4,84	4,77
Cal1 nach [mmol/l]	4,57	4,53	4,27	4,30

Tabelle 5-5; Kalibrationswiederfindung der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

Die Messergebnisse nach den biologischen Proben hingegen zeigen Unterschiede. Der reversible Echtprobenfehler ist in der detergenzfreien Pastenformulierung mit 12% am höchsten und in der Variante 5 mit der kompletten Abdeckung der Braunsteinschicht mit 6% am geringsten. Wie die Abb. 5-45 zeigt, erreichen alle Sensoren nach der zehnmaligen Cal1-Messung am Ende der Messreihe annähernd den Ausgangswert. Die Messbelastung führt bei den Varianten mit teilweiser Abdeckung der Braunsteinschicht zur Senkung der Glukosemessergebnisse, wobei durch eine vollständige Abdeckung die Ergebnisse nach den wässrigen Proben zu einer Erhöhung führen. Die Messungen in Blut und Plasma wirken sich bei allen Sensoren ähnlich aus.

Glukose - Kalibrationswiederfindung Cal 1 der Sensorvarianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

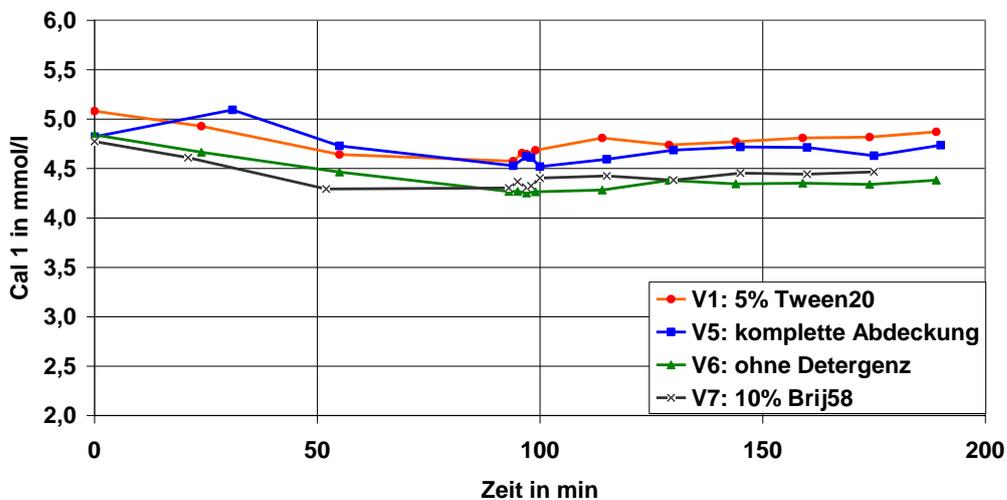


Abbildung 5-45; Kalibrationswiederfindung der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses R_05

Die Empfindlichkeit der Sensoren gegenüber pH-Änderungen und den Interferenten Paracetamol bzw. Gentsinsäure variiert nur gering. Der Einfluss einer Erhöhung des pH-Werts auf 7,9 zeigt eine höhere Abweichung vom Sollwert, als die Verringerung auf pH 6,8.

Messergebnisse wässrige Proben (sollwert: 5,00 ± 0,5 mmol/l)				
Probe	V1 – Standard	V5 – Standard, komplette Abdeckung	V6 – ohne Detergenz	V7 – Birj58 als Detergenz
Cal 9 [mmol/l]	4,37	4,45	4,30	4,34
Cal 10 [mmol/l]	4,92	4,83	4,82	4,65
Gentsinsäure	5,09	5,04	4,73	4,72
Paracetamol	2,80	4,39	3,84	3,90
QC 1	5,46	5,69	5,41	5,28
QC 2	2,21	2,38	2,24	2,23
QC 3	20,28	-	-	-

Tabelle 5-6; Messergebnisse der wässrigen Proben der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

Ein Einfluss von Gentsinsäure auf die Sensorperformance ist nicht vorhanden. Der Zusatz von Paracetamol zur Cal1-Kalibrationslösung zeigt jedoch einen starken Einfluss. Die Messergebnisse sinken um bis zu 40% bei der Standardvariante ab. Einzig die Sensoren der Variante 5 liefern ein brauchbares Ergebnis. Hier beträgt der Unterschied zum Kalibrationsergebnis 9%. Diese Ergebnisse verleiten zu dem Schluss, dass die Variante 5 bei Anwesenheit dieser beiden Störsubstanzen interferenzfrei messen. Die Messungen der QC – Lösung 1 und 2 liegen bei allen Varianten im Zielbereich von 5,00 - 7,00 mmol/l bzw. 2,00 – 3,00 mmol/l. Der Zielbereich von 19,2 – 25,2 mmol/ der QC-Lösung 3 wird von der Variante 1 erreicht. Die Werte der Varianten 5, 6 und 7 können nicht angegeben werden, da in diesem Konzentrationsbereich die Signale die Vertärkergrenzen erreichen.

Die Messungen in den biologischen Probenmatrizes sind in Tab. 5-7 zusammengefasst:

Messergebnisse biologische Proben				
Probe	V1 – Standard	V5 – Standard, komplette Abdeckung	V6 – ohne Detergenz	V7 – Birj58 als Detergenz
Blut/Plasma Steigung	0,84	0,70	0,71	0,70
Blut/Plasma Syx	0,14	0,08	0,15	0,18
Plasma Steigung	0,91	0,79	0,83	0,84
Plasma Syx	0,09	0,13	0,07	0,19
Blut Steigung	0,77	0,55	0,59	0,59
Blut Syx	0,19	0,06	0,10	0,07
Intercept Plasma	-0,33	0,29	0,10	-0,14
Bias Plasma	-10,3%	-19,3%	-16,7%	-16,5%
Intercept Blut	-0,33	0,15	-0,22	0,07
Bias Blut	-24,9%	-44,2%	-42,5%	-40,5%

Tabelle 5-7; Messergebnisse der biologischen Proben der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

Im Blut zeigt die Variante 1 die beste Steigung mit 0,77. Die drei weiteren Varianten erreichen eine um ca. 20% geringere Steilheit. Der Syx-Fehler im Blut ist wiederum bei der Variante 1 mit 0,19 am höchsten. Den geringsten Einfluss der Matrixeffekte auf die Messperformance sind mit 0,06 bei der Variante 5 zu erkennen. Der Syx-Fehler scheint damit von der Linearität des Sensors während der Messung abzuhängen, da auch die Varianten 6 und 7 eine geringeren Fehler trotz unvollständiger Abdeckung der siebgedruckten Braunsteinschicht und höherer Linearität, als bei der Variante 1 zu sehen ist, aufweisen. Die Verdrehung der Regressionsgeraden (Intercept, Offset) in der Auswertung der Blutmessungen weist in der Variante 1 ebenfalls den höchsten Wert auf, was wiederum für eine Abhängigkeit der Performance von der Linearität schließen lässt. Der Bias gibt die Abweichung der Messwerte in Blut von den Referenzwerten im Plasma an, und liegt bei den Varianten 5, 6 und 7 bei über 40%, bei der Variante 1 nur ca. 25%. Diese hohen Abweichungen lassen sich durch die geringe Steigung der Sensorvarianten erklären, denn je geringer die Steigung innerhalb des Konzentrationsverlaufes ist, desto höher muss die Abweichung der Messergebnisse im Blut von den Referenzmessungen im Plasma ausfallen.

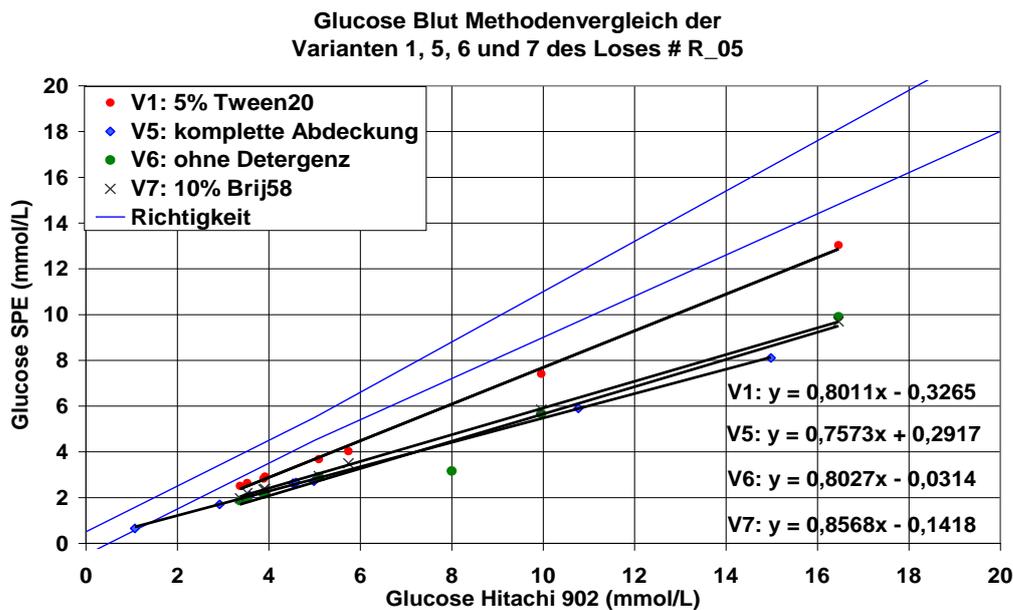


Abbildung 5-46; Messwerte der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses R_05 in Blut

Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Plasmamessungen. Die Steigung der Variante 1 mit 0,91 ist die höchste der vermessenen Sensoren, die drei weiteren Varianten liegen um 0,8. Der höchste Syx-Fehler im Plasma ist hingegen im Unterschied zum Fehler im Blut bei der Variante 7 zu beobachten, trotzdem liegen alle Werte in einem akzeptablen Band. Der Offset im Plasma ist bei allen Varianten 1 und 5 relativ hoch. Der Bias zeigt hier, dass die Plasmamesswerte der Enzymsensoren besser mit den Plasmamesswerten des Referenzsystems korrelieren, als jene im Blut. Trotz der Verbesserung der Abweichung im Plasma sind die Ergebnisse in dieser Form nicht zufriedenstellend.

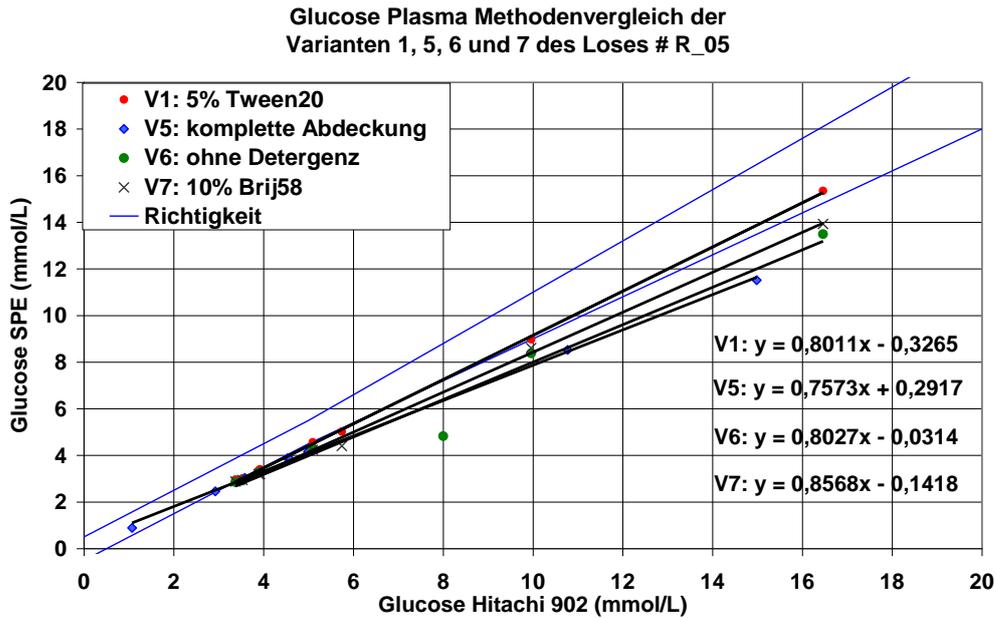


Abbildung 5-47; Messwerte der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses R_05 in Plasma

Der Vergleich der Blut und Plasamessungen mit der elektrochemischen Methode zeigt, dass die Übereinstimmung in Variante 1 mit 84% am höchsten ist. Die drei weiteren Varianten liegen bei einer Deckung von ca. 70%. Der Syx-Fehler zeigt bei der Variante 5 wiederum die geringsten Abweichungen.

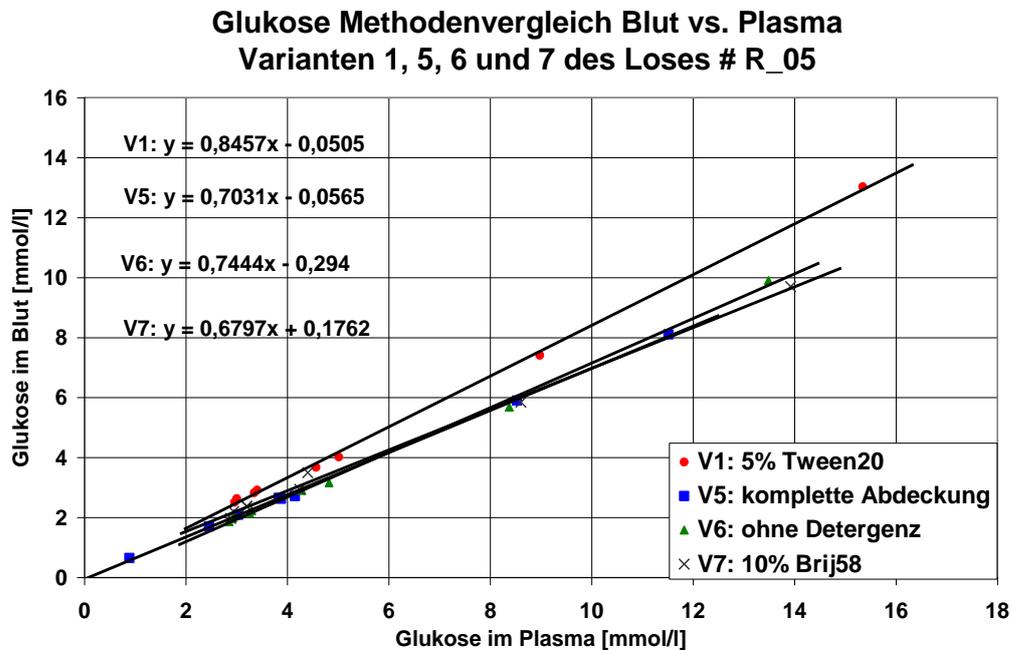


Abbildung 5-48; Methodenvergleich der Messungen in Blut und Plasma der Varianten 1, 5, 6 und 7 des Loses # R_05

5.5.4 Zusammenfassung

Glukose:

Die Vernetzungsversuche mit 0,05%iger Glutardialdehydlösung zeigen keine Verbesserung der Sensorperformance. Die Zugabe des Reagenz direkt in die Paste zeigte die besten Ergebnisse dieses Versuchs, die Sensoren sind über 2 Tage mit den Standardsensoren vergleichbar, verlieren danach aber an Linearität. Die beiden weiteren Varianten der Zugabe lassen noch schlechtere Ergebnisse erkennen.

Die Varianten mit alternativen Detergenzien in der Enzymlösung erreichen trotz höherer Ströme (ca. 30% gegenüber der Standardvariante, da die Kalibrationslösungen verdünnt waren) in den Kalibrationslösungen eine um 5% höhere Linearität. Die Variante 5 mit vollständiger Abdeckung des siebgedruckten Braunsteinspots zeigt erstaunliche 100% Linearität konstant über den gesamten Einsatzzeitraum. Diese hohe Linearität ist überraschend, da Cal1 - Ströme von bis zu 1600 nA auftraten.

Die Messreihe zeigt, dass die Performance in den wässrigen Medien hauptsächlich von der Linearität abhängig ist. Die Standardvariante 1 mit der geringsten Linearität zeigt die größte Empfindlichkeit gegenüber pH-Veränderungen und der Anwesenheit von Interferenten. Der Interferenzeinfluss kann auch auf Reaktionen der Interferenten mit dem freien Braunstein der siebgedruckten Braunsteinschicht zurückzuführen sein, warum eine vollständige Abdeckung des Spots anzustreben ist.

Die Messergebnisse (Steigung, Syx, Offset) in Blut und Plasma sind über die Varianten vergleichbar. Das spricht einerseits für eine relativ stabile Bauweise der Sensoren, andererseits wird es schwieriger diese Fertigungsmethode weiter zu optimieren.

Die Ergebnisse aller Messungen in Blut und Plasma sind in den Abbildungen 5-49 und 5-50 zusammengefasst und zeigen, dass bei höheren Substratkonzentrationen die Messunsicherheit steigt.

Glucose Blut Methodenvergleich
Zusammenfassung aller Blutmessungen des Loses # R_05

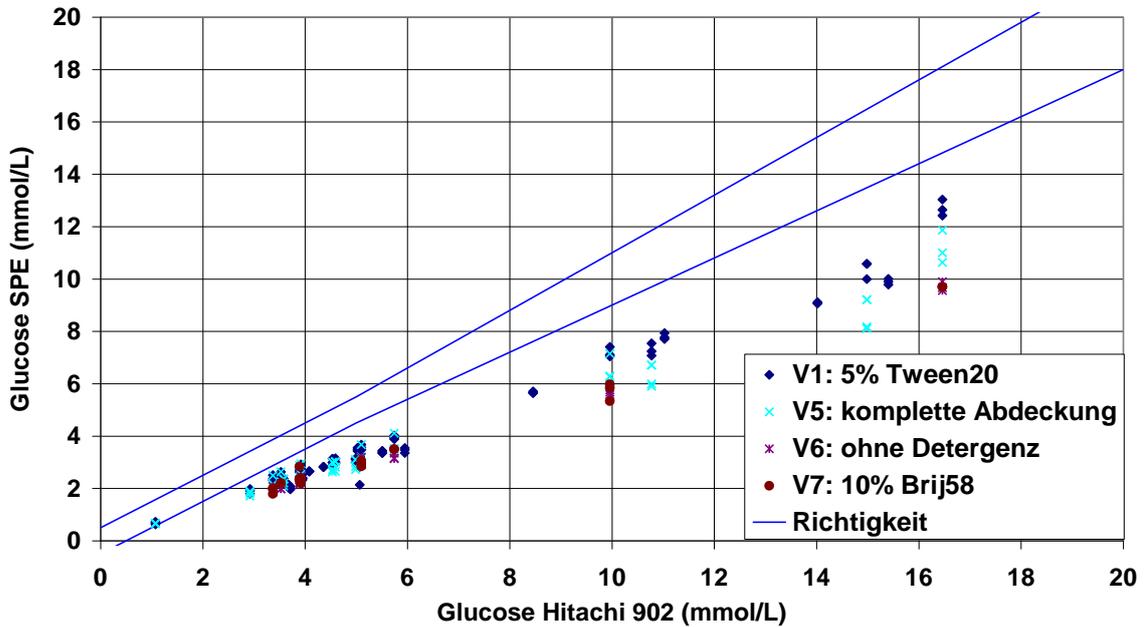


Abbildung 5-49; Zusammenfassung aller Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_05

Die Messergebnisse im Plasma liegen bereits um die untere Richtigkeitsgrenze. Um eine verbesserte Steigung dieser Sensoren zu erreichen, müssten Korrekturwerte eingerechnet werden. Die Korrekturwerte können sowohl lineare Dreh- und Schiefaktoren beinhalten, als auch Abhängigkeiten zu Linearität und Signalhöhe der Kalibrationslösungen.

Glucose Plasma Methodenvergleich
Zusammenfassung aller Plasmamessungen des Loses # R_05

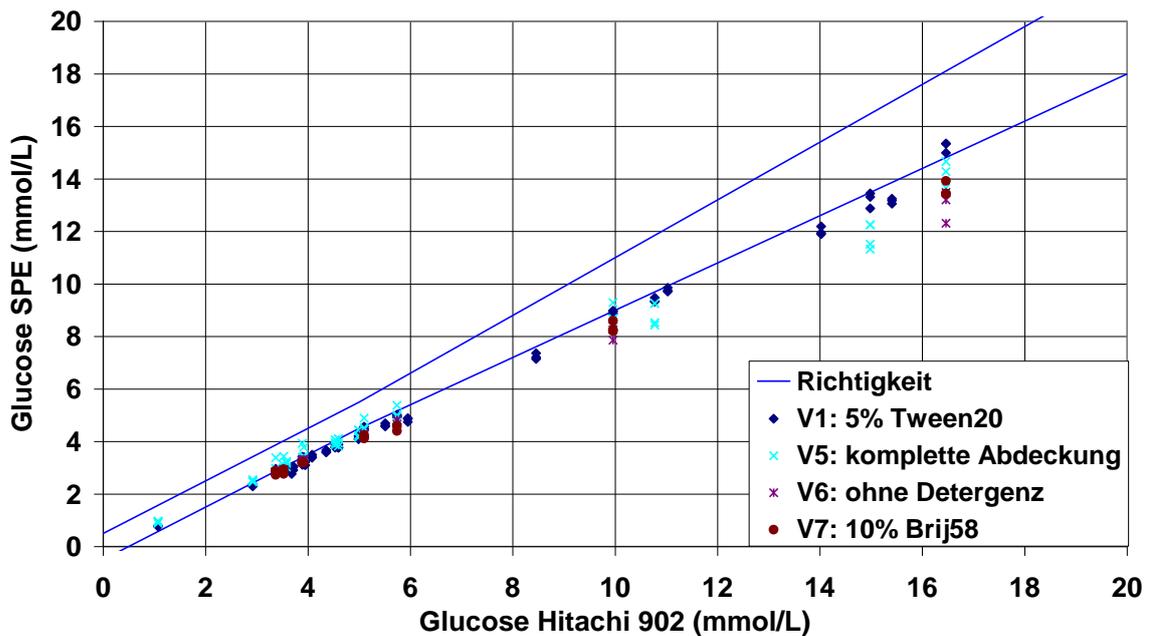


Abbildung 5-50; Zusammenfassung aller Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_05

Laktat:

Die Laktatsensoren in diesen Variationen waren nicht funktionstüchtig. Die hohen Startströme direkt nach dem Einsatz sanken innerhalb weniger Stunden gegen Null. Begründet wird dieser Verlauf mit der Inaktivierung des Enzyms durch Pastenbestandteile oder Produkte der Reaktionen.

6 Korrekturwerte

Da die Lose # R_04 und # R_05 scheinbar sehr ähnliche Ergebnisse in den Messungen der biologischen Proben liefern, soll versucht werden Korrekturwerte aus dem Los # R_04 zu definieren und auf die Messergebnisse des Loses R_05 anzuwenden. Der Rahmen spricht zwar grundsätzlich gegen eine solche Korrekturwerterhebung, da es sich um mehrere verschiedene Fertigungsvarianten handelt, aber die Stabilität der Bauweise gegenüber Veränderung spricht für den Versuch.

Im ersten Schritt werden die gesammelten Daten der Messreihen aus R_04 in Gegenüberstellung Blut vs. Plasma Referenzsystem einem Diagramm dargestellt und eine Regression erstellt. Mithilfe der Geradengleichung sollen nun die Werte auf die Steigung 1 korrigiert werden.

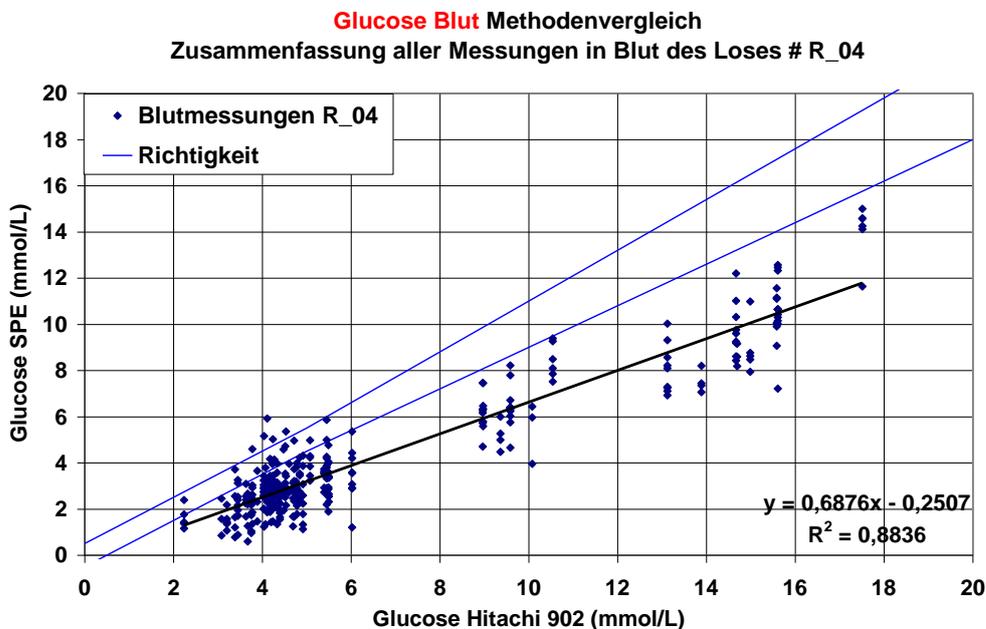


Abbildung 6-1; Zusammenfassung aller unkorrigierten Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_04

Nach Berechnung der korrigierten Messerwerte ergibt sich das folgende Bild (siehe Abb. 6-2):

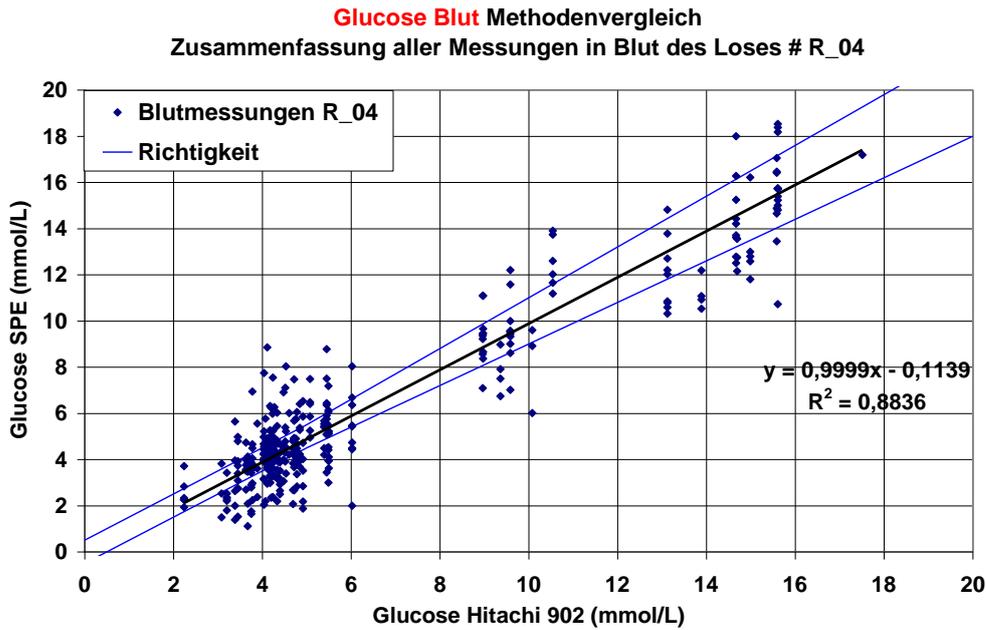


Abbildung 6-2; Zusammenfassung aller korrigierten Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_04

Die Steigung konnte auf annähernd 1 berechnet werden und der verbliebene Offset wird vernachlässigt. Aufgrund des multiplikativen Faktors streuen die Ergebnisse nun mehr um den Sollwert.

Die unkorrigierten Messergebnisse des Loses # R_05 sind in Abbildung 6-3 dargestellt.

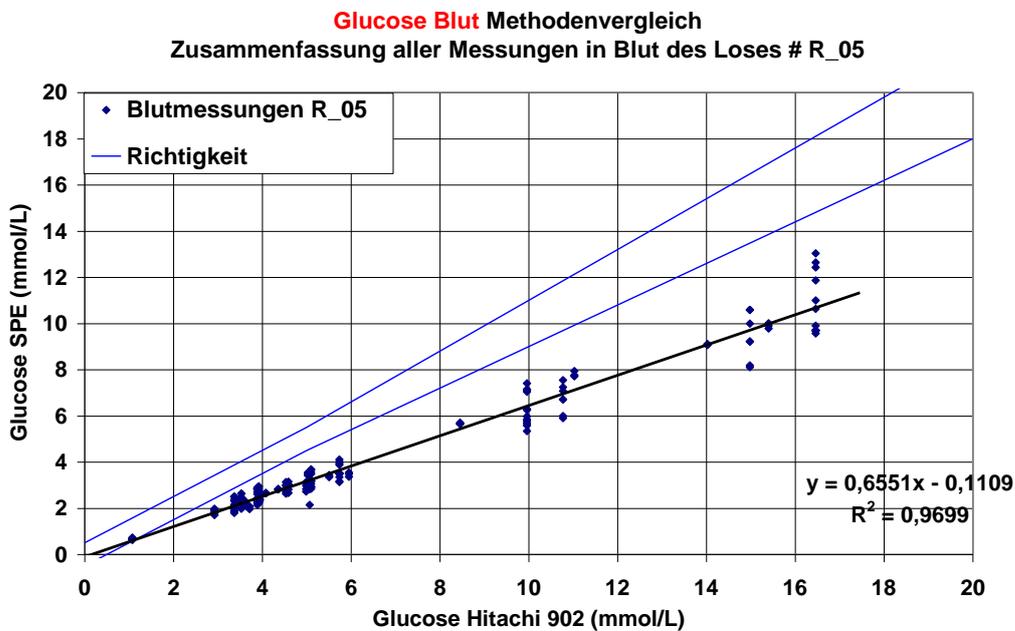


Abbildung 6-3; Zusammenfassung aller unkorrigierten Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_05

Nach Anwendung der aus dem Los # 4 erhaltenen Korrekturwerte auf die Messergebnisse des Loses # R_05 erhält man folgendes Bild:

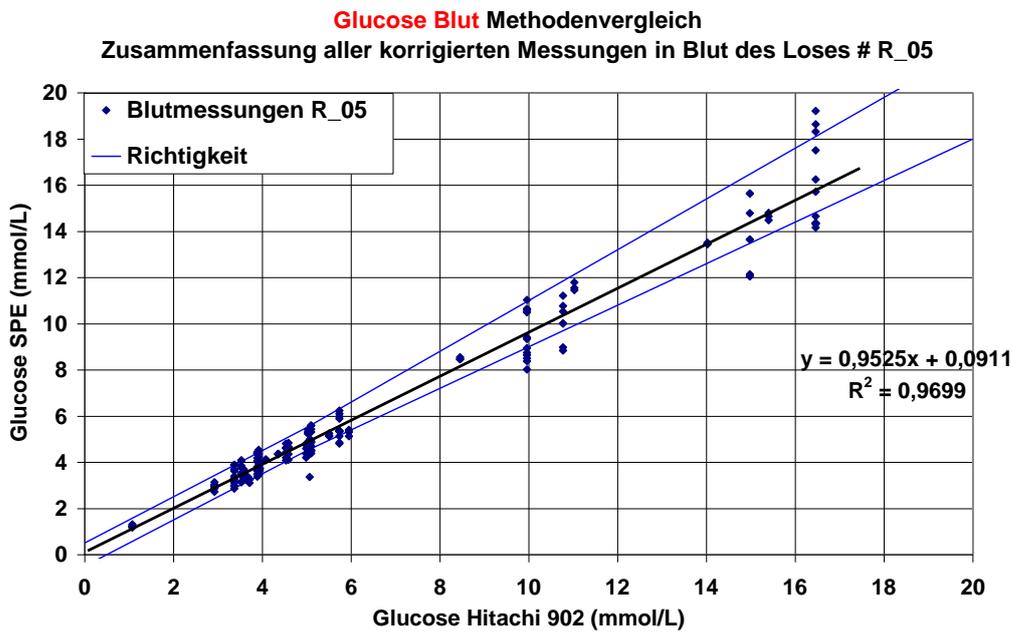


Abbildung 6-4; Zusammenfassung aller korrigierten Messergebnisse in Blut aus den Sensoren des Loses # R_05

Die Steigung konnte durch die Korrektur von 0,65 auf 0,95 erhöht und der Offset ein wenig verringert werden.

Die gleiche Vorgehensweise wurde in der Korrektur der Plasmawerte angewandt.

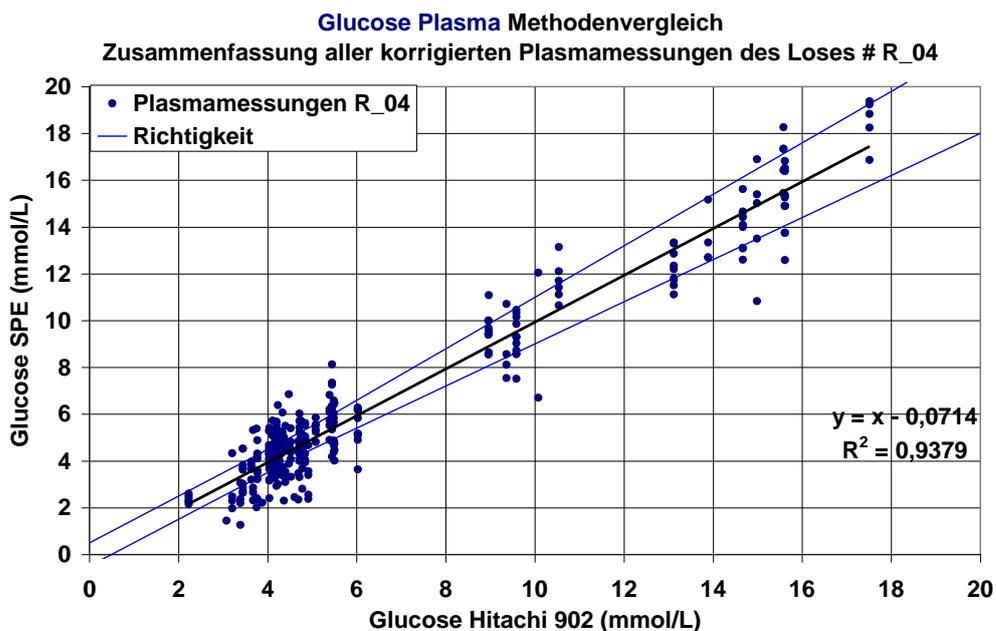


Abbildung 6-5; Zusammenfassung aller korrigierten Messergebnisse in Plasma aus den Sensoren des Loses # R_04

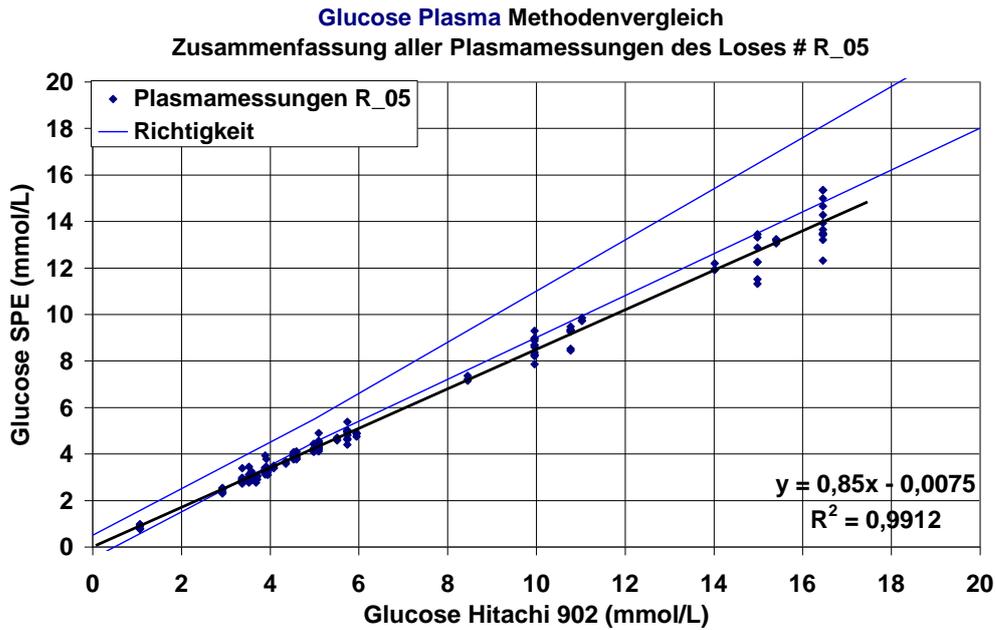


Abbildung 6-6; Zusammenfassung aller unkorrigierten Messergebnisse in Plasma aus den Sensoren des Loses # R_05

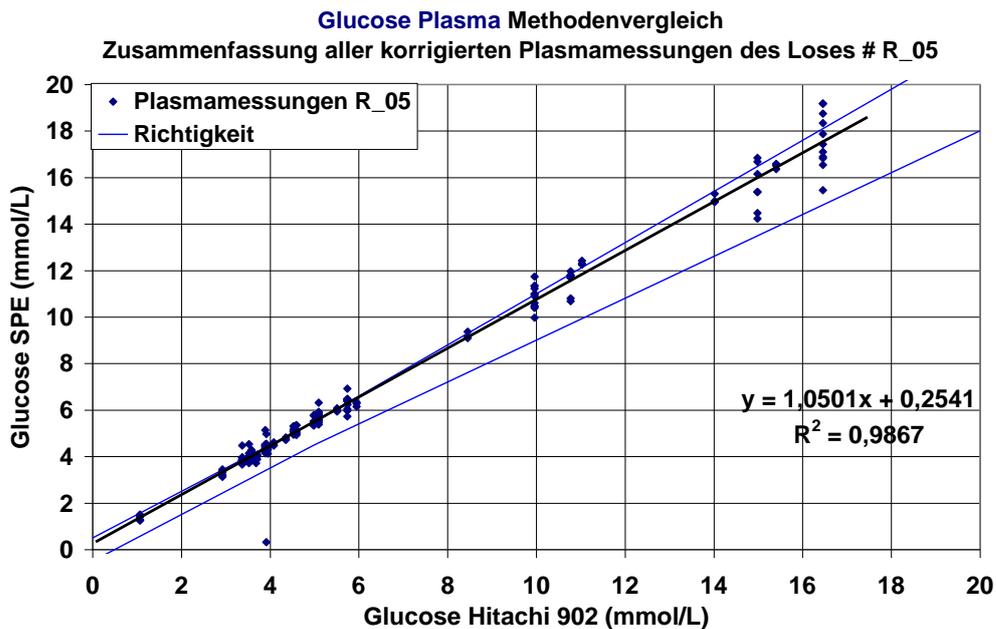


Abbildung 6-7; Zusammenfassung aller korrigierten Messergebnisse in Plasma aus den Sensoren des Loses # R_05

Die Plasmawerte werden in dieser Form überkorrigiert, die Steigung überschreitet 1.

Grundsätzlich ist nach Berücksichtigung der großen Variantenvielfalt und den streuenden Messergebnissen im Blut (im Bereich 4 mmol/l) aus dem Los # R_04 eine sehr gute Übereinstimmung der Messperformance zu erkennen.

7 Diskussion

Die Kombination der Enzymschicht mit der Braunstein/Graphitschicht in einer wasserbasierenden Matrix zeigt für Glukose deutliche Unterschiede gegenüber der getrennten Fertigung der beiden Membrane unter Verwendung von Graphitpasten basierend auf organische Lösungsmittel.

Wie der Versuche im Los # R_01 zeigen, ist eine Einmischung des Enzyms in eine auf organische Lösungsmittel basierende Graphitpaste zu vermeiden. Die Signalhöhen sind bei einem deckmembranfreien System im Bereich von 200-300nA mit Linearitäten von 50 - 65% angesiedelt. Diese Linearitäten konnten zwar durch Hinzufügen einer Deckmembran auf 70 – 80% verbessert werden, erreichen jedoch nicht die erwünschten Werte um 100%.

Der Einsatz einer wasserbasierenden Graphitmatrix, wie erstmals im Los # R_02 eingesetzt führt zu einem neuen Sensorverhalten. Es werden Kalibrationsströme von bis zu 3000 nA in der Cal1-Lösung erreicht. Die Verwendung der Polyacrylat-Präpolymeremulsion mit den manuell zugegebenen Braunstein- und Graphitanteil führt zu Linearitäten von 70-80%, was aufgrund des Fehlens einer diffusionslimitierenden Deckmembran ein überraschendes Ergebnis darstellt. Die Fertigung der Sensoren mit der wasserbasierenden Gwent-Graphitpaste führt zu einer weiteren Verbesserung der Performance: Der Cal1-Strom liegt mit 300 nA weit unter jenen der Polyacrylatversuche, die Linearität steigt aber auf stabile 90% über einen Einsatzzeitraum von 30 Tagen. Dieses Ergebnis lässt sich mit Sensoren am Markt vergleichen. Die hohen Stromsignale lassen sich durch das Fehlen einer diffusionslimitierenden Deckmembran, als auch der hohen Quellfähigkeit der Materialien erklären. Dass trotz dieser hohen Ströme Linearitäten im gezeigten Bereich erreicht werden können, liegt sicherlich in der hohen eingesetzten Enzymaktivität.

Die Änderung der Braunsteinkonzentration im Enzymspot, als auch der wasserbasierenden Graphitpaste führt zu sehr variierenden Ergebnissen. Einerseits steigen die Kalibrationssignale der Sensoren mit abnehmender Braunsteinkonzentration, andererseits liegen die Linearitäten der Varianten mit 15 und 35% höher als jene mit 5%. Die Linearitätssteigerung könnte durch ein erhöhtes Sauerstoffrecycling durch Einsatz von mehr Braunstein erklärt werden. Dass die Signale jedoch mit steigendem Braunsteingehalt sinken, kann am Anstieg des inneren Widerstandes der Enzymmatrix liegen.

Der Einfluss der Pastenmatrix zeigt sich im Vergleich der beiden Einsatzmaterialien. Die Gwent-Graphitpaste erreicht stabile Linearitäten über den gesamten Einsatzzeitraum, wobei die Acheson-Alternative kontinuierlich Signal und Linearität verliert.

Dieser Verlust kann entweder durch die Wirkung der Pastenbestandteile auf das Enzym erklärt werden, oder wahrscheinlicher auf die schlechte Immobilisierung der Enzyme zurückzuführen sein.

Die gefertigten Laktatsensoren liefern sehr enttäuschende Ergebnisse. Bei beiden Varianten sinken die Kalibrationssignale innerhalb kurzer Zeit gegen Null und sind somit nicht mehr funktionstüchtig. Dieser Signalabfall deutet auf eine totale Inaktivierung oder kontinuierliches Auswaschen der Enzyme hin. Die Inaktivierung durch Denaturierung (Änderung der quartären Struktur) kann aufgrund der Pastenbestandteile, durch Produkte der Umsetzung (allen voran die Änderung des pH-Werts durch die Oxidation des Wasserstoffperoxids), oder durch Inaktivierung während des Fertigungs- bzw. Trocknungsprozesses erfolgen. Ein vermehrtes Auswaschen der Enzyme wird als unwahrscheinlicher angesehen, da die aktive LOD als Tetramer vorliegen sollte und somit größere Abmessungen als die GOD aufweist.

Der Zusatz von Stabilisatoren führte zu keinen besseren Glukose-Performanceergebnissen. Alle drei Varianten (Polyvinylpyrrolidon, BSA und Glycerin) zeigen vergleichbare Signale und Linearitäten. Der Einsatz von Polyvinylpropionat als Deckmembranmaterial sollte eine verbesserte Diffusionslimitierung verursachen, zeigte aber nicht den erhofften Anstieg der Linearität von mehr als 10%. Die Änderung des Deckmembranmaterials auf Celluloseacetat/Hydrogel führte zu einem weiteren Problem, denn das Deckmembranlösungsmittel zersetzte die gesamte Pastenmatrix. Nach dem Trocknen der Deckmembran „zerfiel“ der gesamte Braunstein spot und wurde nur durch den Membranfilm zusammengehalten. Als Folge wurden drei häufig verwendete Lösungsmittel für Deckmembranmaterialien getestet, wobei alle zu Auflösungserscheinungen der Pastenmatrix führten. Andererseits scheint die Graphitpaste selbst eine ausreichende Diffusionslimitierung zu erzeugen, da die Linearität der Sensoren über einen ausreichend großen Zeitraum (3-4 Wochen) stabil bleibt.

Die Stabilität der Laktatsensoren in diesem Versuch konnte gegenüber dem vorigen Los nicht verbessert werden.

Um die Immobilisierung der Enzyme zu verbessern wurden die Sensoren im Los # R_05 mit Glutardialdehyd behandelt. Die beiden Aldehydgruppen reagieren mit den terminalen Aminogruppen der Enzyme und führen so zu einer Vernetzung. Zu Aktivitätsverringerng kann eine Bindung am oder in der Nähe des aktiven Zentrums führen, jedoch sollte die verbesserte Immobilisierung diesen Nachteil kompensieren. Die Ergebnisse lassen jedoch auf eine ausreichende Immobilisierung der voran gegangenen Varianten schließen, da sich die Glukoseperformance eher verschlechtert hat. Eine Verbesserung der Laktatperformance durch den Einsatz des Vernetzers ist ausgeblieben, was die Annahme erhärtet, dass die Enzyme inaktiviert werden. Die Herstellung der Enzymlösung mit verschiedenen

Detergenzien (Tween20, Brij58 bzw. detergenzfrei) zeigt keinen Einfluss auf die Sensorperformance.

Die Messungen in Proben zeigen in den beiden Losen # R_04 und # R_05 relativ ähnliche Ergebnisse. So zeigt sich, dass die Richtigkeit bei Änderung des pH-Wertes bzw. durch Zugabe von den beiden Interferenten Paracetamol und Gentisinsäure durch hohe Sensorlinearitäten gewährleistet wird. Die Messungen in Blut und Plasma sind soweit vergleichbar, dass aus dem Los # R_04 Korrekturwerte erstellt wurden und diese auf die Daten im Los R_5 angewendet werden können (siehe 6).

Die hier untersuchte Sensorbauweise kann nur für Glukosemessungen angewandt werden, da die Laktatsensoren innerhalb kurzer Zeit Aktivität verlieren. Vermutet wird, dass die Quartärstruktur der Laktatoxidase durch Pastenbestandteile zerstört wird und dadurch eine Inaktivierung des Enzyms erfolgt.

Für Glukosemessungen ist diese Fertigungsmethode durchaus geeignet. Aufgrund der höheren Kalibrationsströme (bis zu 3000nA im Cal1 (= 5mmol/L Glukose)) ist der Einfluss redoxaktiver Substanzen im Vergleich zu herkömmlichen Sensoren (50-500 nA) geringer, da der Interferenteneffekt eine prozentuell geringere Abweichung verursacht.

Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Wetup-Phase, aufgrund der sehr gut quellfähigen Pastenmatrix. Innerhalb von wenigen Minuten stellt sich in den untersuchten Sensoren eine stabile Linearität ein. Am Markt erhältliche Produkte benötigen bis zu 300 Minuten um eine stabile Phase zu erreichen.

Ein weiterer Vorteil scheint die Stabilität der Fertigung zu sein. Sämtliche Änderungen in den Varianten hatten nur geringe Auswirkungen auf die Sensorperformance. Gleichzeitig kann sich dies auch als Nachteil für die weitere Optimierung herausstellen.

Ein Einsatz dieser Sensoren ist für Anwendungen, welche sehr schnell einsatzfähig sein müssen, vorstellbar. Zum Beispiel für kontinuierliche Online – Messungen in Krankenhäusern wäre ein Einsatz sinnvoll.

Eine offene Fragestellung bleibt die Lebensdauer der Sensoren. Da keine geeignete Deckmembran für die Sensoren gefunden werden konnte, ist noch offen, wie lange genug Enzymaktivität vorhanden ist, bis eine Enzymlimitierung erreicht wird. Diese Limitierung könnte man durch Einsatz einer geeigneten Diffusionsbarriere verzögern.

Eine weitere Optimierung kann am Sensorlayout durchgeführt werden, wenn die Spotgeometrie verringert wird, denn aufgrund der hohen Ströme wird häufig die Verstärkergrenze erreicht. Man kann entweder einen alternativen Verstärker wählen, was jedoch zu bedeutenden Mehrkosten führen würde, wenn man bestehende Messapparaturen

adaptieren will, oder man verringert den Spotdurchmesser um 50%, was ausreichend sein sollte. Natürlich geht der Vorteil der hohen Kalibrationsströme gegenüber den redoxaktiven Substanzen verloren.

Um funktionstüchtige Laktatsensoren zu fertigen, sollten weitere Versuche mit alternativen Pastenmaterialien durchgeführt werden. Voruntersuchungen der Stabilität des Enzyms in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. in verschiedenen gepufferten Medien sind anzuraten.

8 Literatur

- [1] Clinical and Laboratory Standard Institute, EP7-A2 Vol. 25, No.27; Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline, 2nd Edition
- [2] M. Tomberger: „Entwicklung eines Präzisionsmessstandes zur Ermittlung von Kennlinien elektrochemischer Sensoren“ unpublished results; personal communication
- [3] Wang, J: “Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges” Electroanalysis (2001) V13: 983-988
- [4] I. Klimant, Vorlesungsunterlagen Chemo- und Biosensoren, TU Graz, 2006/2007
- [5] BA Gregg, A Heller: “Cross-Linked REDOX Gels containing Glucose Oxidase for amperometric Biosensor Applications“; Analytical Chemistry 62 (1990) 258-263
- [6] APF Turner: “Biochemistry - Biosensors sense and sensitivity”: Science 290 (2000) 1315-1317
- [7] R. Wilson, A.P.F. Turner: „Glucose oxidase: an ideal enzyme” Biosensors & Bioelectronics 7 (1992) 165-185
- [8] L.C. Clark, Electrochemical Device for chemical Analysis; US Patent 2,913,386; 1959
- [9] D. B. Papkovskii et al., Flow-injection glucose determination with long-wavelength luminescent oxygen probes, Biomed Sci. 1991;2(1):63-7.
- [10] F. Scheller, F. Schubert; Biosensoren; Birkhäuser Verlag, 1989
- [11] B. Gambke, D. Young: System Evaluierung Accu-Check® Aviva, 1. Auflage, 2005
- [12] Chaubey, A; Malhotra, BD: “Mediated biosensors” Biosensors & Bioelectronics 17 (2002): 441-456
- [13] Radiometer Medical A/S, Enzyme Sensor, US-Patent Nr. 6,099,804; 2000
- [14] Roche AG, Amperometrische Enzymelektrode, EU-Patent Nr. EP 0 603 154, 1996
- [15] P. Karlson et al, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Thieme Verlag, 14. Auflage, 1994
- [16] J.G. Schindler, M.M. Schindler: Bioelektrochemische Membran-Elektroden, de Gruyter Verlag, 1983
- [17] H. Ernst: Der Siebdruck: ein Lehr- und Handbuch, Ellwanger Verlag 1971
- [18] BPH Schaffar, H. Kontschieder, C. Ritter, H. Berger; Clin Chem. 1999 Sep;45(9):1678-1679

- [19] M Gerard, A Chaubey, BD Malhotra: "Application of conducting polymers to biosensors"
Biosensors & Bioelectronics 17 (2002) 345-359
- [20] Deutsches Ärzteblatt, Jg. 105, Heft 7, A 341 – A355, 15. Februar 2008,
- [21] H. Offenbacher et al, Preparation of a hydrophobic polymermatrix containing immobilized enzymes, US Patent Nr. 5,928,918, 1999
- [22] i-Sens Inc. Seoul; Geung Sig Cha et al.: Method for fabricating Biosensors using hydrophilic Polyurethane, US Patent Nr.: 6,509,148 B2
- [23] TJ Ohara, R Rajagopalan, A Heller: "Wired enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances"
Analytical Chemistry 66 (1994) 2451-2457

9 Anhang

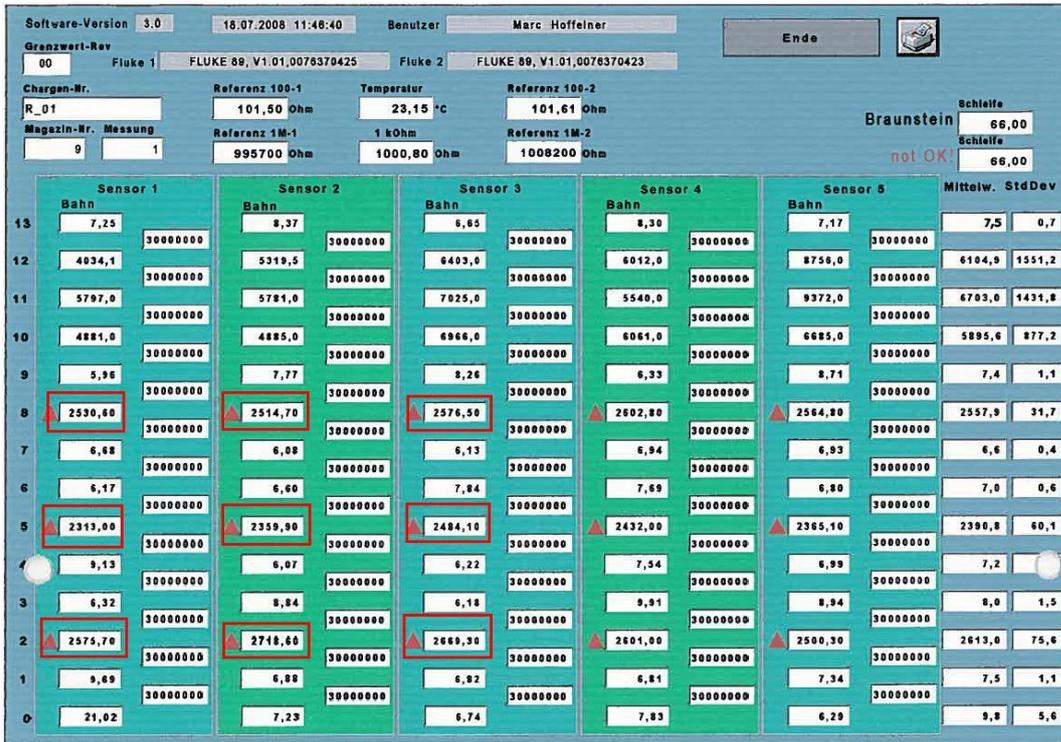


Abbildung 9-1; Widerstandsmessung der Variante 1 (Brückenschicht: MnO₂ und CP1) nach dem Druck der oberen Isolationsschicht

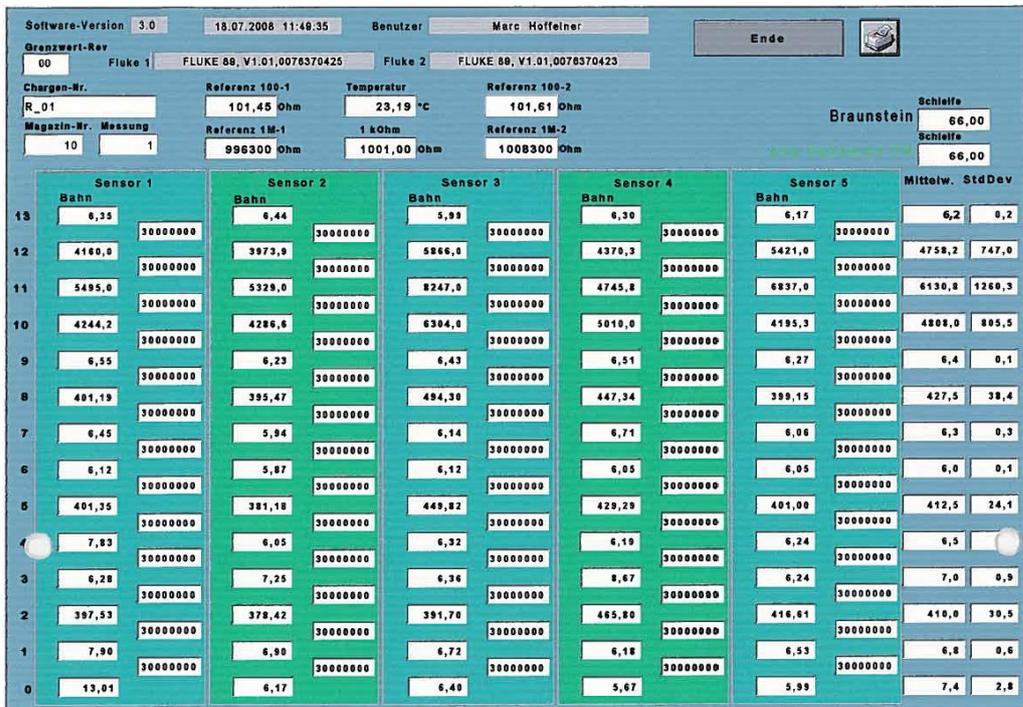


Abbildung 9-2; Widerstandsmessung der Variante 2 (Brückenschicht: MnO₂ und CP2) nach dem Druck der oberen Isolationsschicht



Abbildung 9-3; Widerstandsmessung der Variante 3 (Brückenschicht: CP1) nach dem Druck der oberen Isolationsschicht

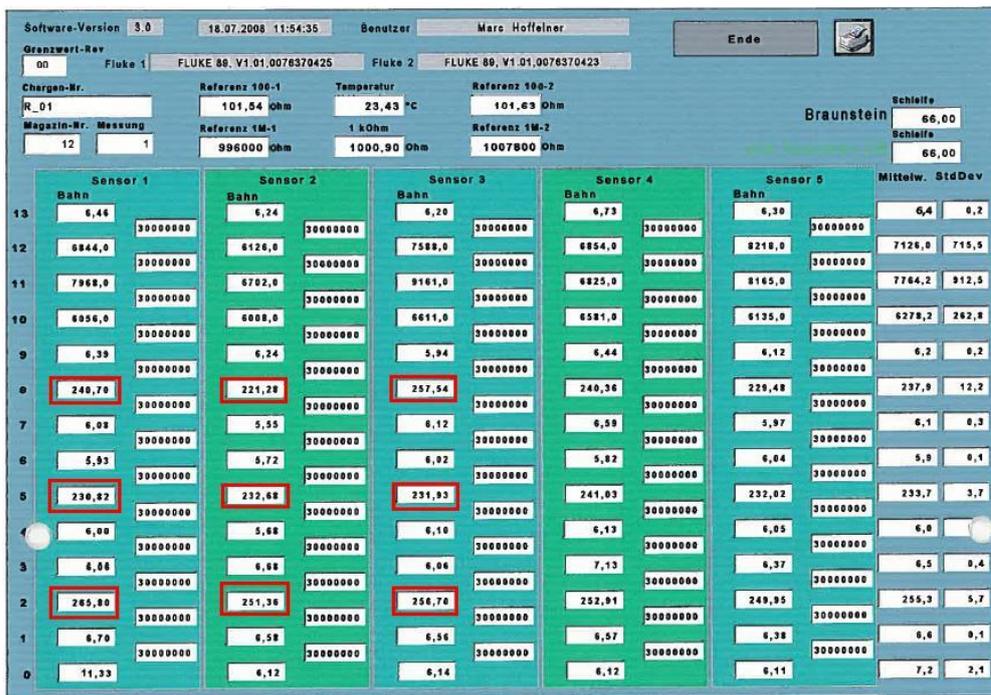


Abbildung 9-4; Widerstandsmessung der Variante 4 (Brückenschicht: CP2) nach dem Druck der oberen Isolationsschicht