

Elektrochemische Mikrosensoren

Glucosesensor

Verfasser:

S. Lysenko, W. Dachtler

Übersicht

I. Hintergründe und Grundlagen

1. Was ist Diabetes ?
2. Sensorenarten
3. Funktionsprinzip des Glucosesensors
4. Aufbau des Glucosesensors
5. Herstellung der Sensoren
6. Elektrochemische Grundlagen

II. Charakterisierung des Sensors und praktische Anwendung

1 Was ist Diabetes?

1.1 Wesen und Arten der Erkrankung

- Der Diabetes ist eine Stoffwechselstörung
- Typ-1-Diabetes:
 - Insulin wird nicht gebildet
 - Ursache: Zusammenwirken von Erbfaktoren, Virusinfekten und Autoimmunerkrankungen
 - Seltene Krankheit, an der in Deutschland zwischen 150000-200000 Menschen leiden
- Typ-2-Diabetes:
 - Vorhandener Insulin wird nicht freigesetzt oder gelangt nicht richtig zum Einsatz
 - Ursache: angeborene oder erworbene Insulinunempfindlichkeit
 - In Deutschland 5-7 Mio. Typ-2-Diabeteskranke
- Insulin: Verdauungsenzym, das überflüssige Nährstoffe in Speicherformen umbaut; ermöglicht Abbau von Glucose; Bildung in der Bauchspeicheldrüse
- Weltweit etwa 117 Mio. Diabeteskranke
- Beide Arten unheilbar
- Therapie: ständige Gabe von Insulin

1.1 Tägliche Kontrolle

- Zur Kontrolle der Therapie des Diabetes mellitus sind regelmäßige Eigenmessungen – d.h. die Selbstkontrolle der Blut- und Harnzuckerwerte wichtig, um erhöhte oder erniedrigte Blutzuckerwerte sofort zu erkennen und zu behandeln.
- Durch den (dauerhaft) erhöhten Blutzuckerspiegel können körperliche Schwäche; Gefäßverschlüsse; Nierenversagen; Ketoacidose und Coma Diabeticum auftreten.

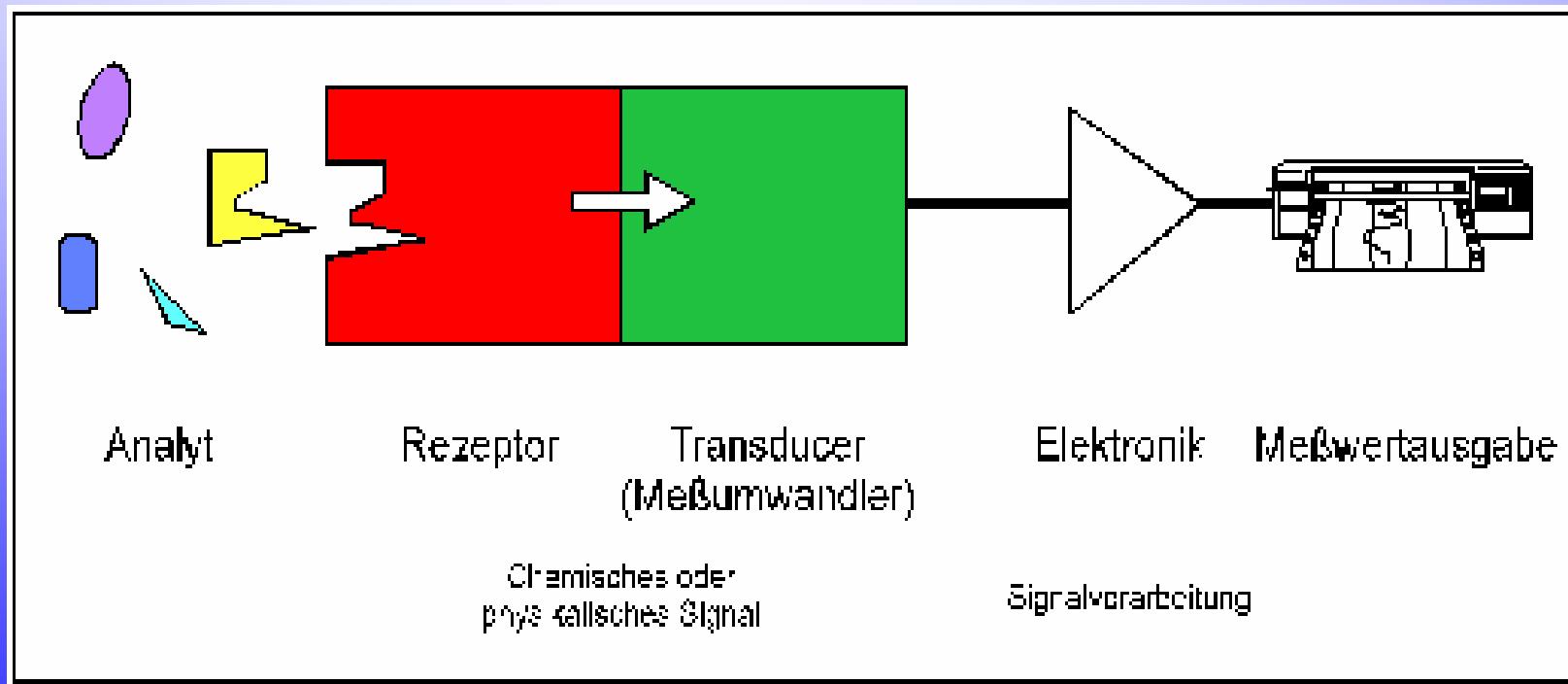
=> Motivation einen geeigneten Sensor zu bauen .

2 Sensorenarten

- Sensoren sind Messfühler, die eine bestimmte Messgröße erfassen können und diese z.B. in eine elektrische Größe transformieren.
- Unterteilung in
 - a) Chemosensoren
 - Reagieren auf die Anwesenheit eines bestimmten Analyten mit einem physikalisch-chemischen Prozess
 - c) Biosensoren
 - Nutzen zur Erkennung eines Analyten biochemische Prozesse

2.1 Funktionsprinzip der Biosensoren

- Alle Biosensoren arbeiten nach einem einheitlichen Funktionsschema

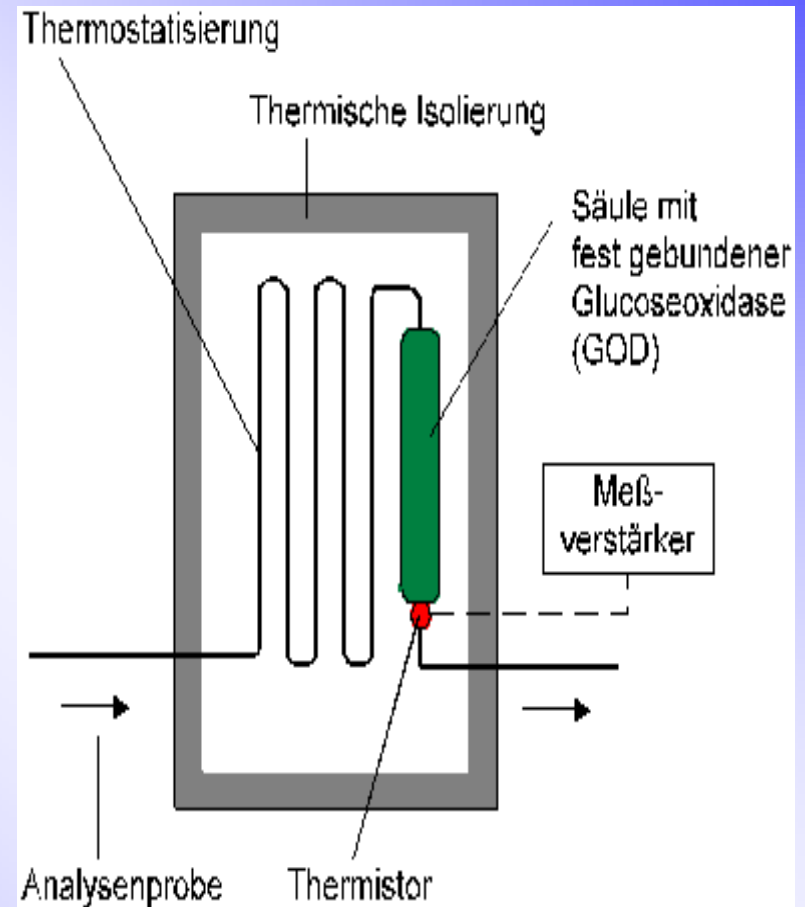


2.2 Biosensoren-Einteilung nach dem Detektionsprinzip

- Nach der Art des Detektionsprinzips erfolgt die Einteilung der Biosensoren in vier Gruppen
 - Kalorimetrie
 - Microgravimetrische Detektion
 - Optische Detektion
 - Elektrochemische Detektion

2.2.1 Kalorimetrie (Temperatureffekte)

- Die Temperaturerhöhung einer exothermen Reaktion ist direkt proportional zu der Stoffmenge der Reaktionspartner
- Nachteile:
 - Temperatureffekte klein
 - Gut isolierte Gefäße notwendig
 - Ebenso exakt die gleiche Temperatur der Reaktionspartner vor der Messung



2.2.2 Mikrogravimetrische Detektion (Piezoelektrische Sensoren)

- Bei diesem Sensortyp reagiert ein in Resonanz schwingender Kristall auf die Veränderung der Massebeladung
- Nachteil:
Einmalige Anwendung (Allerdings geringe Herstellungskosten)

2.2.3 Optische Sensoren (Optoden)

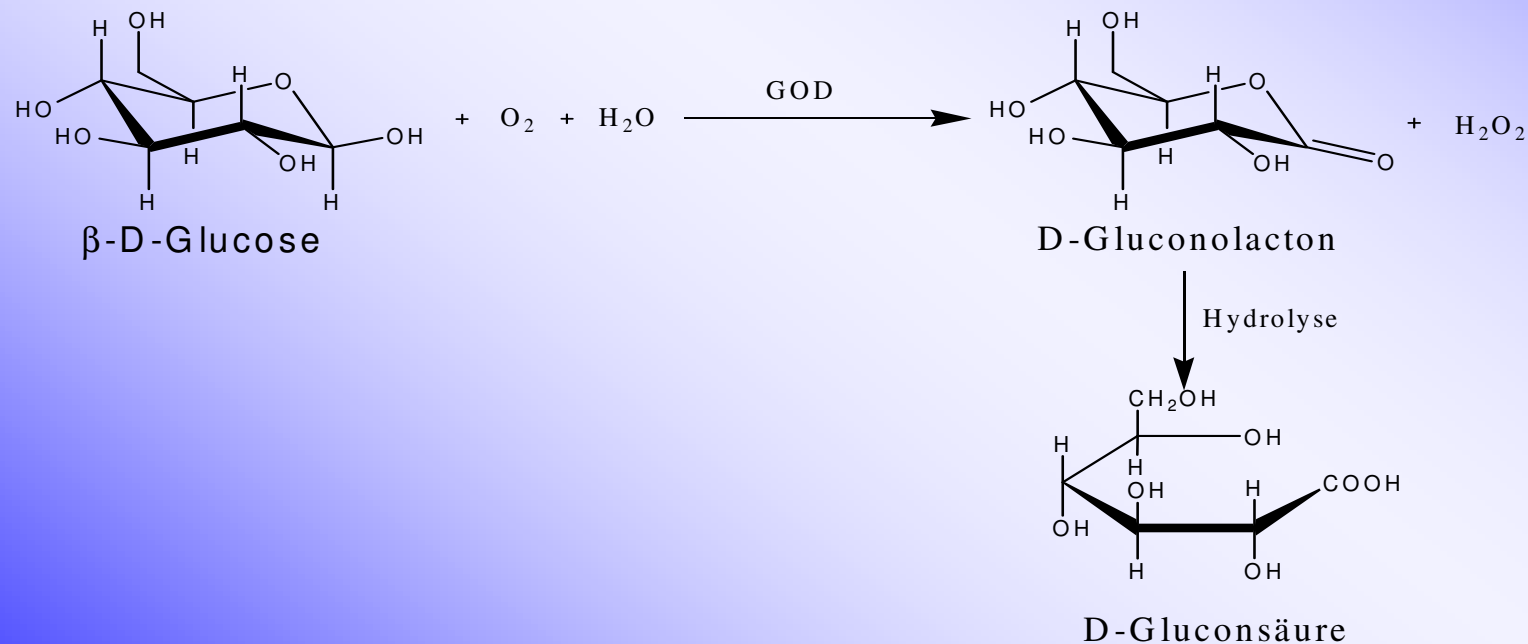
- Gut geeignet für die Sauerstoffgehaltsmessungen in Flüssigkeiten (oder bei den Enzymreaktionen, bei denen Sauerstoff gebildet oder verbraucht wird)
- Meßprinzip: Fluoreszenzlöschung
- Lichtwellenleiter mit einem Indikator als optische Meßeinrichtung
- Lumineszenz- oder Absorptionseigenschaften des Indikators sind O_2 -Abhängig
- Vorteile:
 - Räumliche Trennung von Meßgerät und optischer Meßeinrichtung
 - Lichtwellenleiter sind von magnetischen oder elektrischen Störfeldern unbeeinflusst

2.2.4 Elektrochemische Detektion

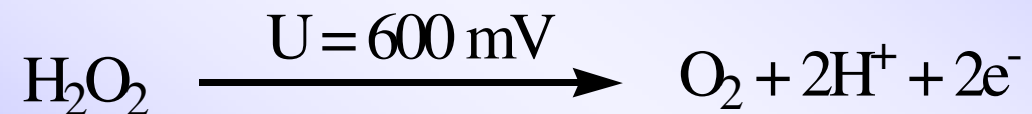
- 2 Unterarten: Amperometrie und Potentiometrie
- Amperometrie: Messung des Stromflusses bei konstanter Spannung. Gut geeignet für Stoffwechselprodukte, die leicht oxidiert bzw. reduziert werden können (H_2O_2).
- Potentiometrie: Messung des elektrochemischen Potentials von ionischen Reaktionsprodukten (NH_4^+ , CO_3^{2-} , H^+)

3. Funktionsprinzip des Glucosesensors

- Glucose und Sauerstoff werden durch das Enzym Glucoseoxidase zu H_2O_2 und Gluconolacton umgesetzt, das anschließend zu Gluconsäure hydrolisiert:



- Das entstandene Wasserstoffperoxid wird bei einem Potential von $U = +600 \text{ mV}$ vs. Ag/AgCl an einer Platinelektrode oxidiert. Dadurch wird ein Stromfluss möglich:

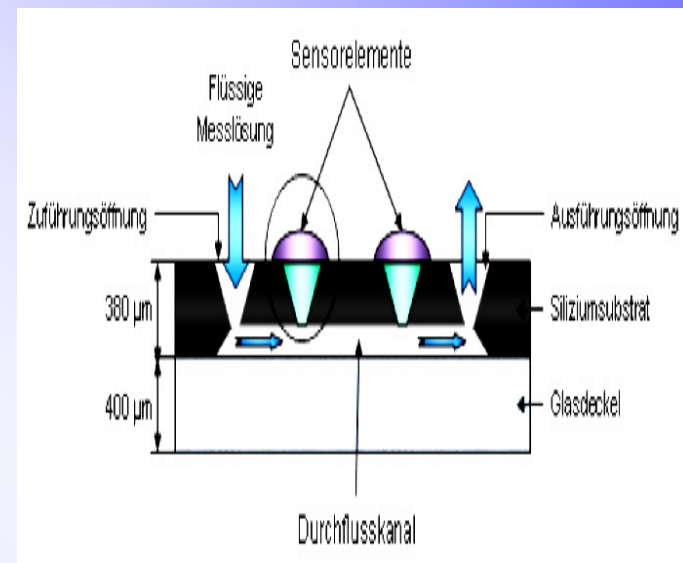


- Der Stromfluss wird über ein hochempfindliches Amperemeter registriert.
=> Die Stromstärke ist dabei proportional zur Glucosekonzentration.

4. Aufbau des Glucosesensors

4.1. Chip-Layout

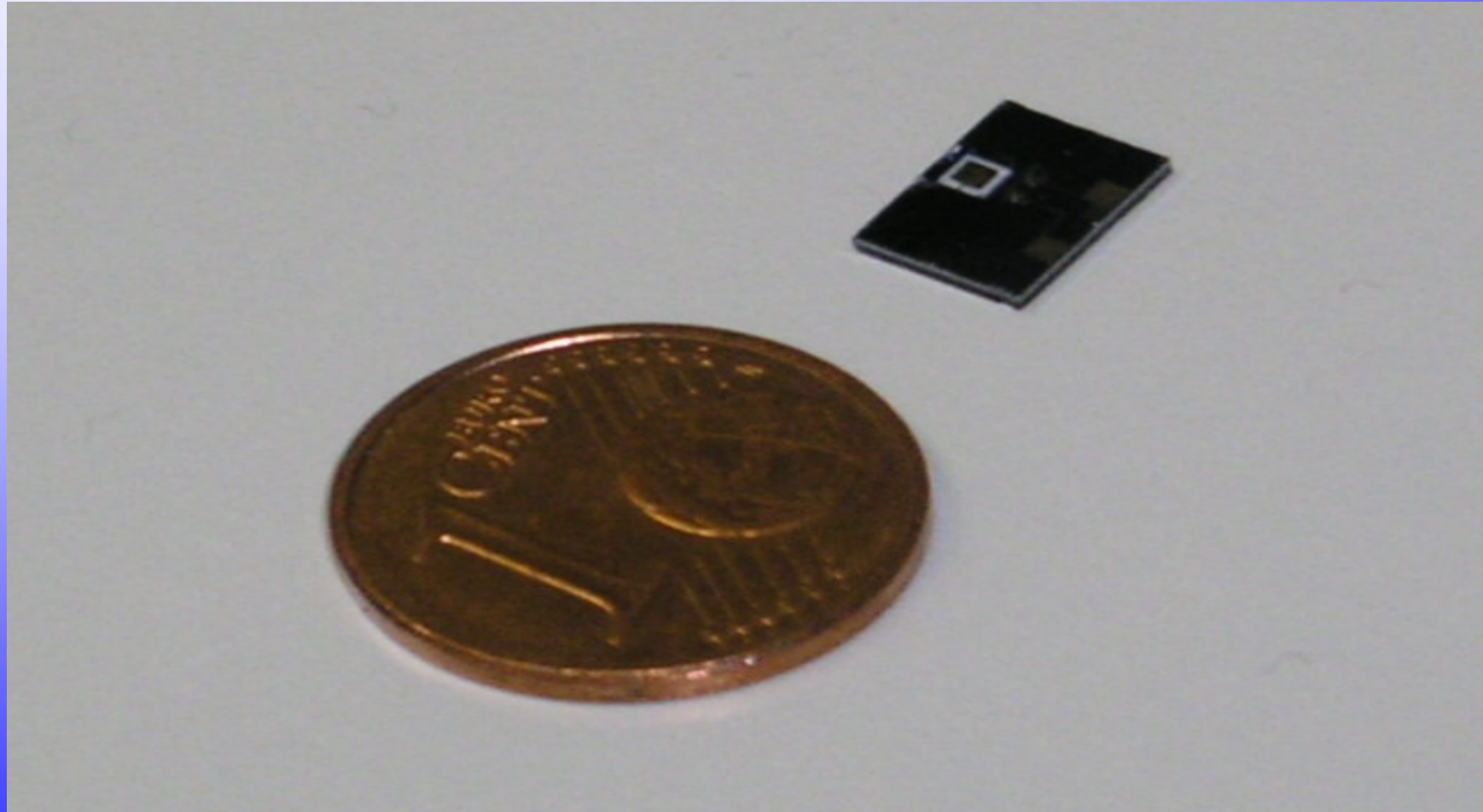
- Einkristallines Siliciumsubstrat als Basis, das pyramidenstumpfförmige Hohlräume (Containments) aufweist
- Innere Oberfläche ist mit einer Elektrodenschicht aus Platin bedeckt
- Containments werden mit GOD in einer PVA-Matrix gefüllt
- Verschluss durch eine Verkapselungsschicht
- Messflüssigkeit wird mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit durch den Chip gepumpt
- Glucose kann durch die diffusionshemmende Membran in das Containment diffundieren



4.2 Vorteile der Containmenttechnologie

- Die Containmentsensoren werden auf der Rückseite kontaktiert
 - Vereinfachte Verbindungs- und Verkapselungstechnik; einfacher Anschluss an Durchflusszellen.
- Gute Verankerung der Stofferkennenden Membran
- Minimale Enzymauswaschung in der Stofferkennenden Membran gegenüber Immobilisierung von GOD auf planarer Oberfläche
- Mechanische Stabilität von Membranen und Biokomponente.
- Aufbringen mehrerer Analysensysteme auf einem Chip.
- Massenproduktionstauglichkeit

4.3 Abbildung des Glucosensors



5. Herstellung des Glucosesensors

Sämtliche Prozesse zur Herstellung der Sensor-Chips erfolgen im Reinraum (gleichmäßige Klimabedingungen und Vermeidung einer Contamination)

Einkristalline Si-Scheibe als Ausgangsprodukt

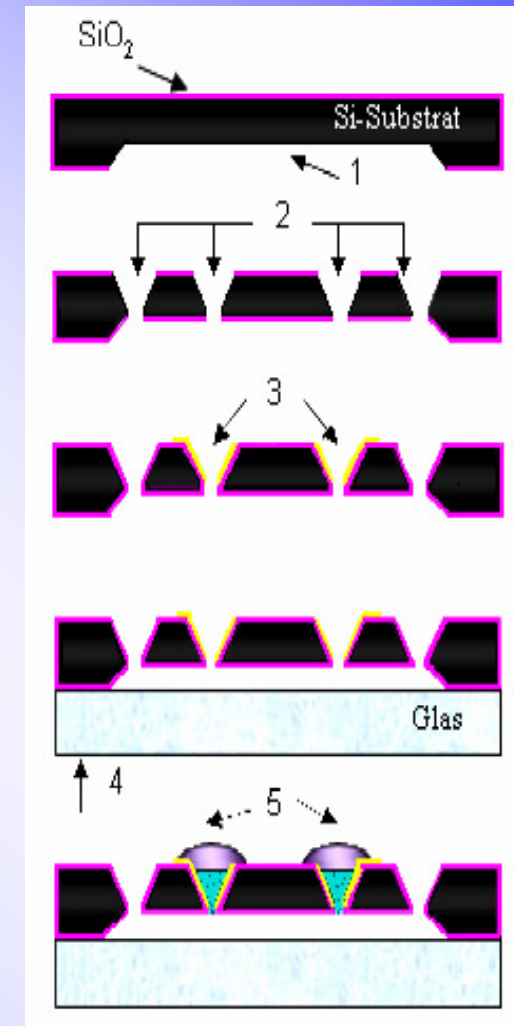
1) Vertiefung für Durchflüsskanal

2) Bildung der beiden Containments und Zu- bzw. Ausführungsöffnungen

3) Metallisierung des Containments

4) Verschließung des Kanals mit einem Glasdeckel

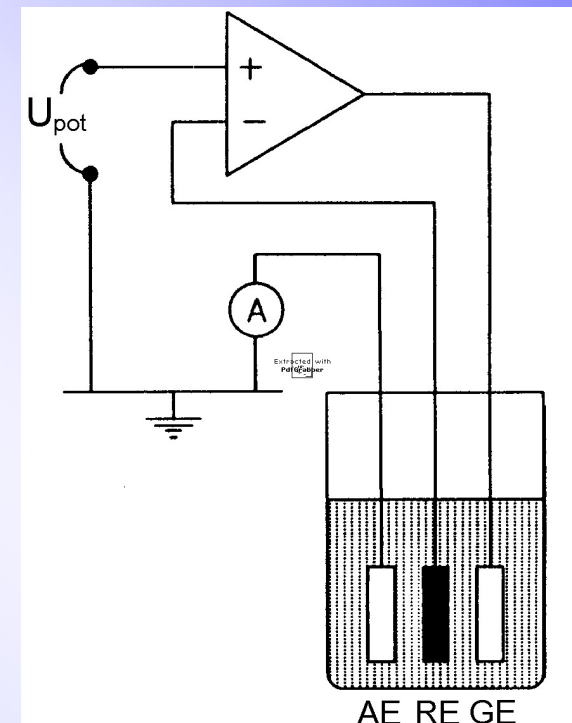
5) Befüllung und Verkapselung



6. Elektrochemische Grundlagen

6.1. Dreielektrodenanordnung

- Der Glucosesensor arbeitet mit einer Dreielektrodenanordnung
 - An der Arbeitselektrode findet die Redox-Reaktion statt
 - Die hochohmigen Referenzelektrode und der Potentiostat kontrollieren das Potential
 - Die niederohmige Gegenelektrode dient als Stromkontakt.
 - Dreielektrodenanordnung: die Messung wird nicht von Stromabhängigen Prozessen an der Gegenelektrode beeinflusst
- Die Stromstärke ist somit nur noch vom Stofftransport abhängig



6.2 Stofftransport

- **Stofftransport**

- Migration: Wanderung aufgrund eines elektrischen Feldgradienten
- Diffusion: Wanderung aufgrund eines Konzentrationsgradienten
- Konvektion: durch eine Strömung verursachte Bewegung

- **Problem**

- Diffusionsgrenzstrom ist proportional zur Konzentration

- **Lösung**

- Migration wird durch Leitelektrolytzusatz (NaCl) verringert
- Konvektion wird ausgeschlossen da im Elektrolyt keine Strömung auftritt

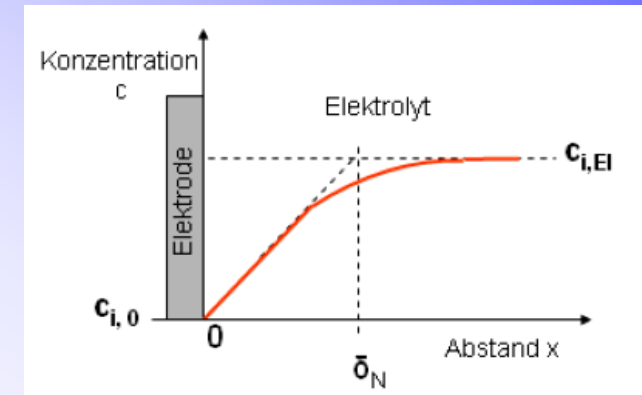
6.3 Mathematische Grundlagen

- **Diffusionsgrenzstrom**
- Nach dem 1. Fickschen Gesetz gilt:

$$\frac{dN}{dt} = -D \frac{dc}{dx}$$

- Für die elektrochemische Stromdichte gilt:

$$j_{\text{Ladung}} = zF \cdot j_{\text{Teilchen}} = zFD \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x=0} = zFD \frac{c_{i,\text{El}} - c_{i,0}}{\delta_N}$$



- Bei Überspannung geht $c_{i,0}$ gegen 0:

$$j_{\text{Ladung}} = zFD \frac{c_{i,\text{El}}}{\delta_N} = \frac{I_{\text{Grenz}}}{A}$$

- Somit ist der Diffusionsstrom nur von der Anfangskonzentration abhängig:

$$I_{\text{Grenz}} = \frac{zFDA}{\delta_N} \cdot c_{i,\text{El}}$$

z = Ladungszahl; F = Faradaykonstante; D = Diffusionskonstante;

$c_{i,\text{El}}$ = Konzentration im Elektrolyt; $c_{i,0}$ = Konzentration an der Elektrode;

δ_N = Nernstsche Diffusionsschichtdicke

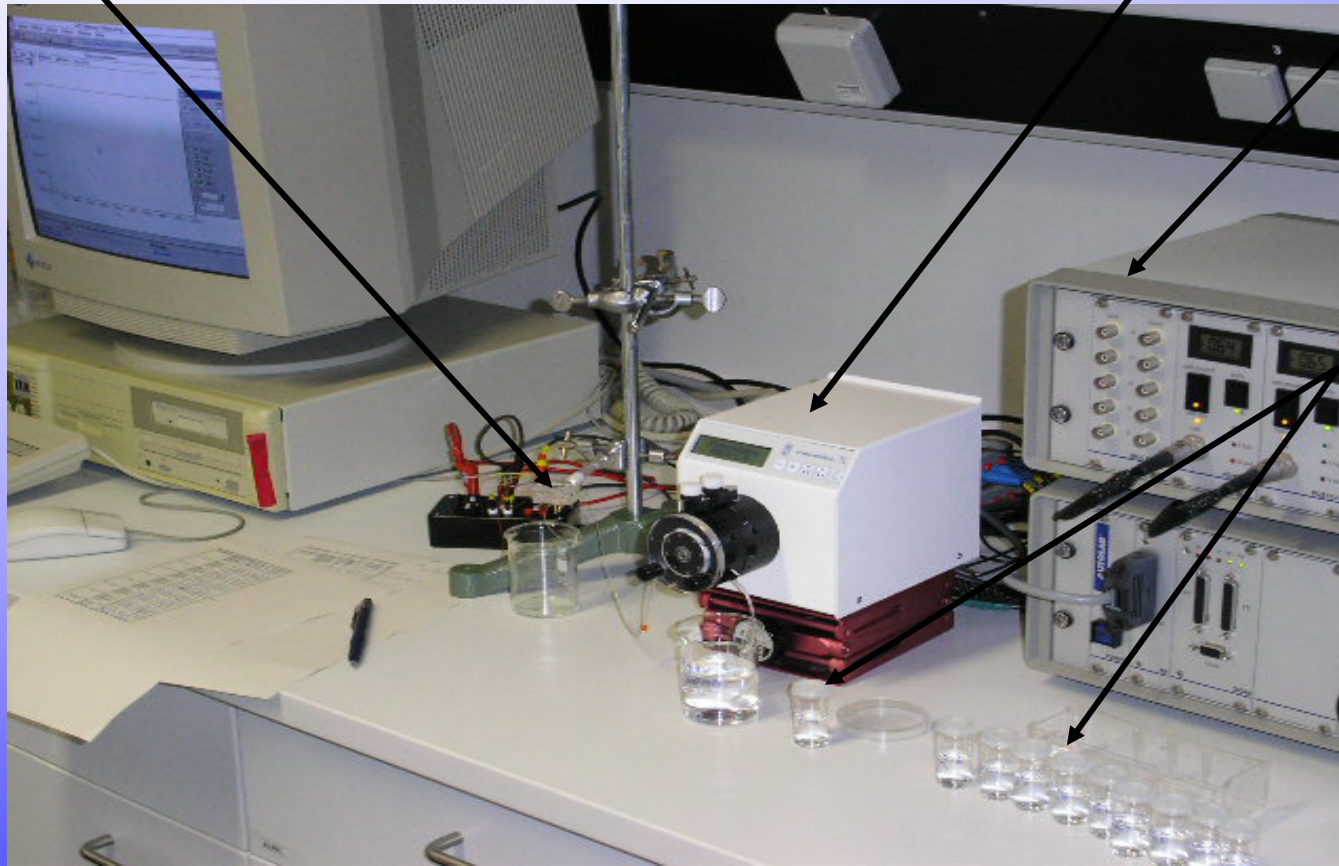
II. Charakterisierung des Sensors und praktische Anwendung

7.1. Apparaturaufbau

Sensor mit den Elektroden

Rollenpumpe

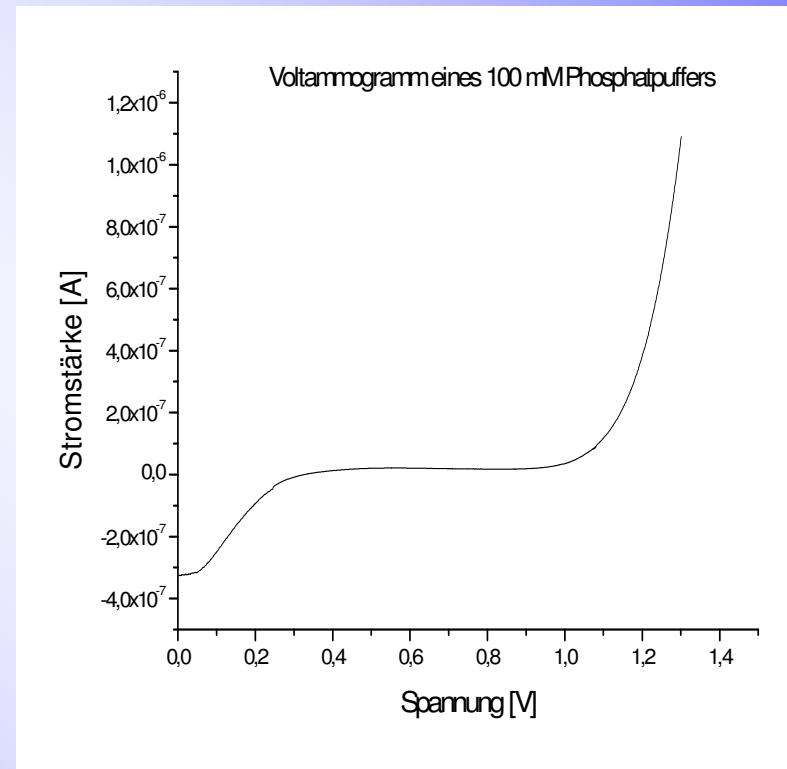
Potentiostat



Messlösungen

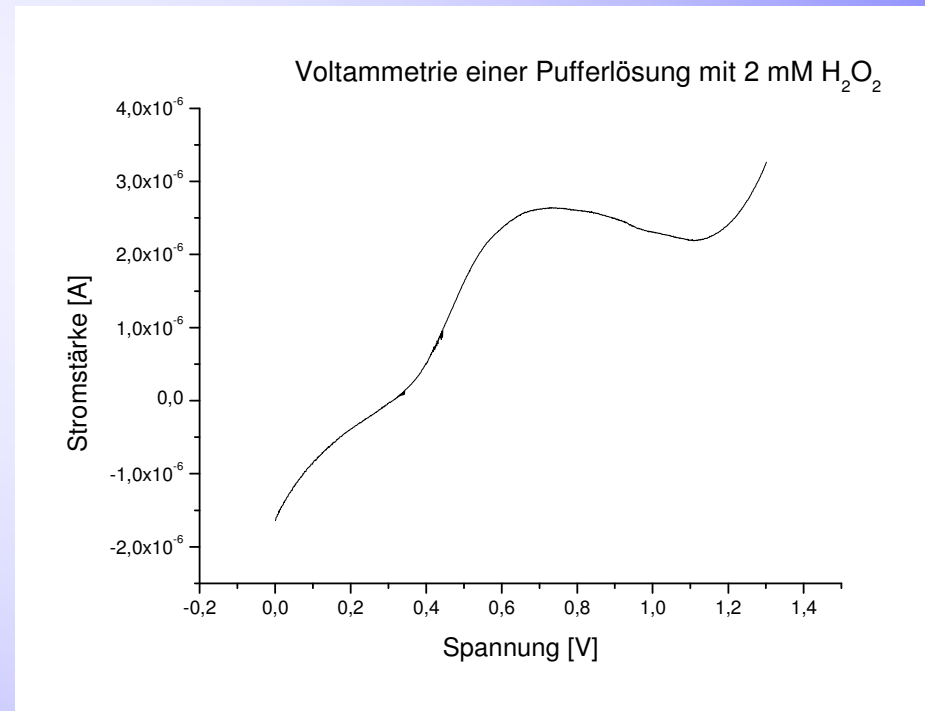
7.2. Voltammetrie und Voltammogramm

- **Voltammetrie**
 - Messung des Stromes in Abhängigkeit vom Elektrodenpotential
 - Ermittlung des Arbeitspotentials
- **Voltammogramm**
 - Kein Signal für den Phosphatpuffer
 - Keine Störung seitens des Puffers



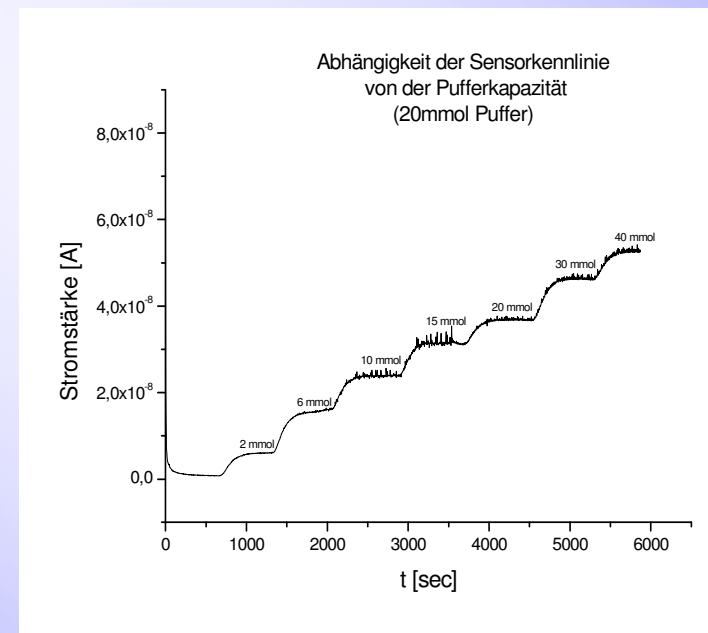
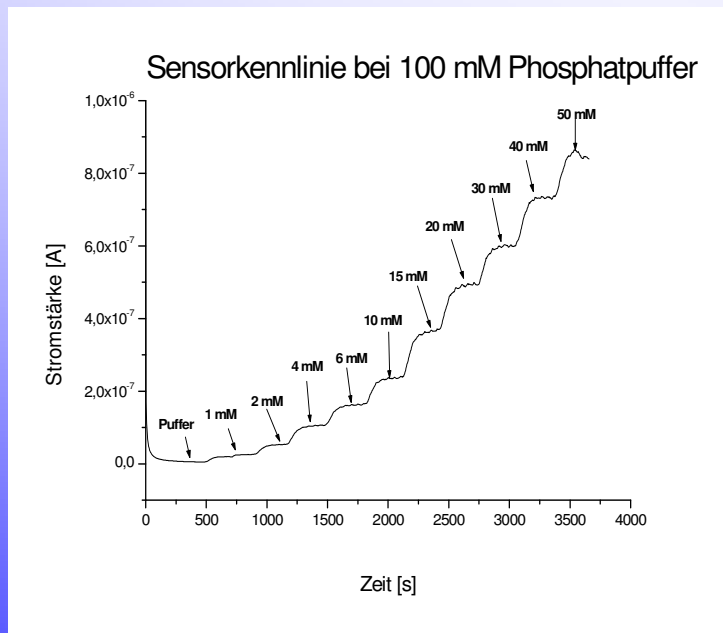
7.3. Ermittlung des Arbeitspotentials

- **Ermittlung des Arbeitspotentials für die amperometrische Bestimmung von H_2O_2**
 1. Beginn der Zersetzung von H_2O_2
 2. Sättigungswert oder Diffusionsgrenzstrom
 3. Verarmung von Wasserstoffperoxid an der Elektrode, δ_{N} wächst in die Lösung hinein
 4. Zersetzung von H_2O



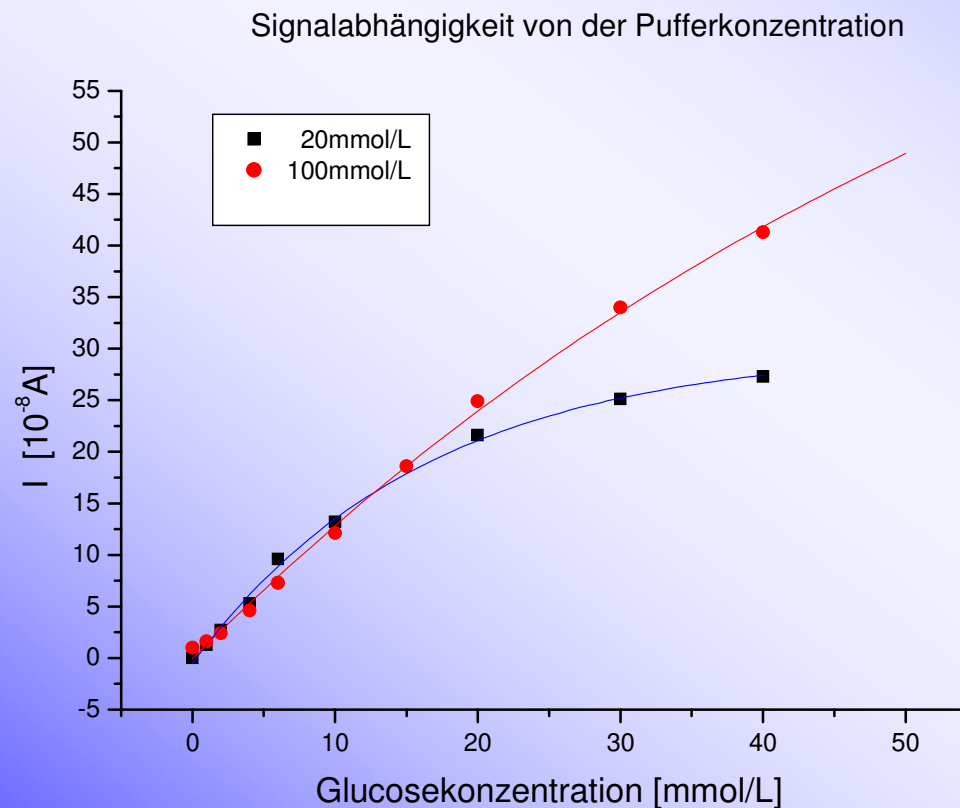
7.4. Kalibration des Glucosesensors

- Messung verschiedener Lösungen unterschiedlicher Konzentration
- Phosphatpuffer fängt die entstehenden H^+ -Ionen ab
- Kein Plateau bei 50 mM, nicht genügend Pufferkapazität
 - Erniedrigung der Aktivität der GOD



7.5. Kalibrationskurve

- Auftragung von Stromstärke gegen Konzentration
- Abweichung der letzten beiden Werte ist auf ungenügende Pufferkapazität zurückzuführen

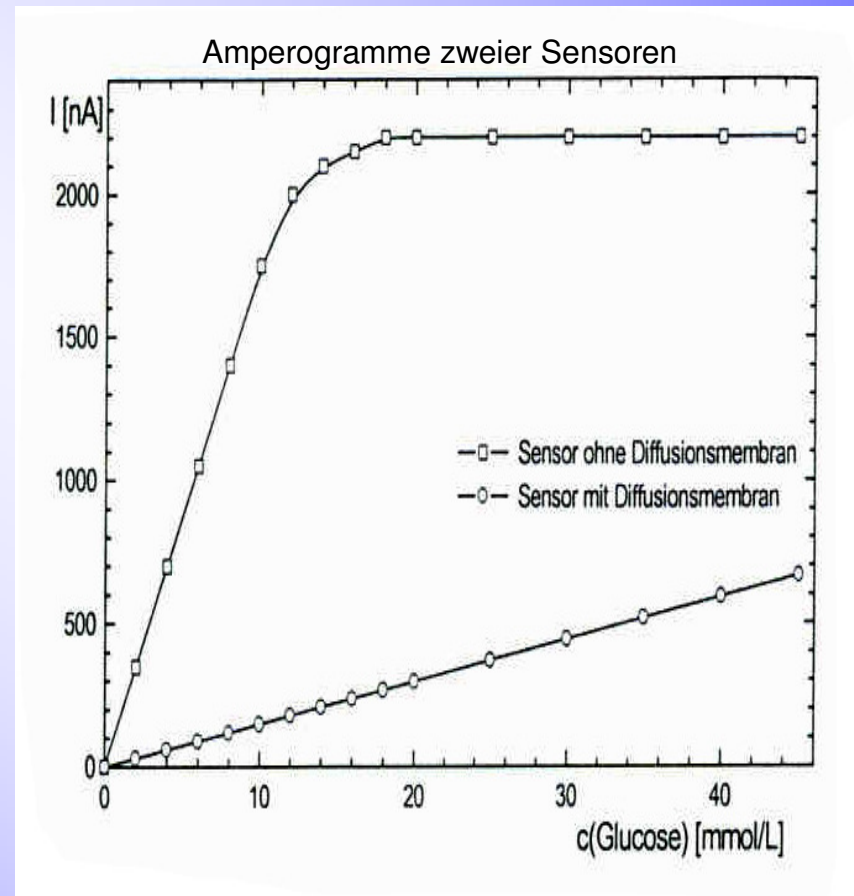


7.6. Parameter zur Charakterisierung des Glucosesensors

1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
 - Sauerstoffkonzentration im Reservoir
 - Glucosekonzentration
1. Fließgeschwindigkeit
2. Selektivität
3. Störsubstanzen
4. Interferenzen nach heterogenem und homogenem Mechanismus

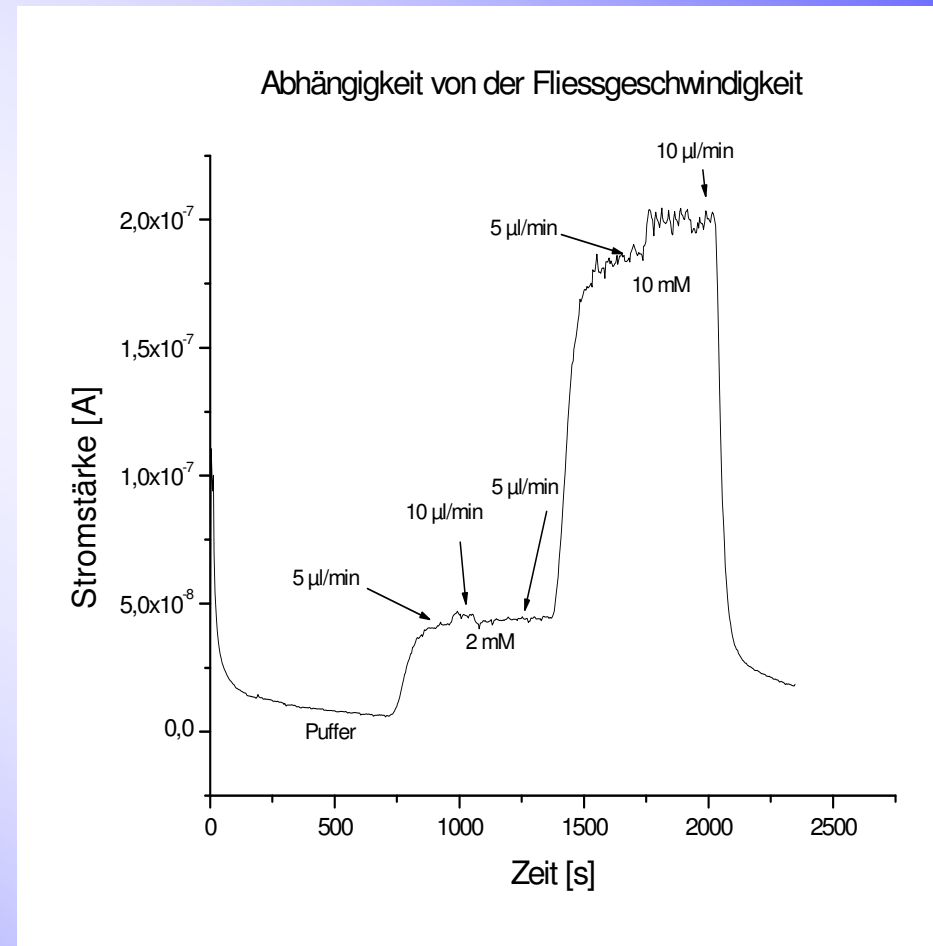
7.6.1. Einfluss der Sauerstoffkonzentration

- Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt unter anderem von der Sauerstoffkonzentration ab
- Zu kleine Sauerstoffkonzentration begrenzt den linearen Messbereich
- Abhilfe: Verkapselung des Containments mit einer sauerstoffpermeablen Membran
- Reaktionsgeschwindigkeit wird von der Glucosekonzentration beeinflusst
- Um die Konzentration gering zu halten wird eine diffusionshemmende Membran an der Öffnung des Containments angebracht



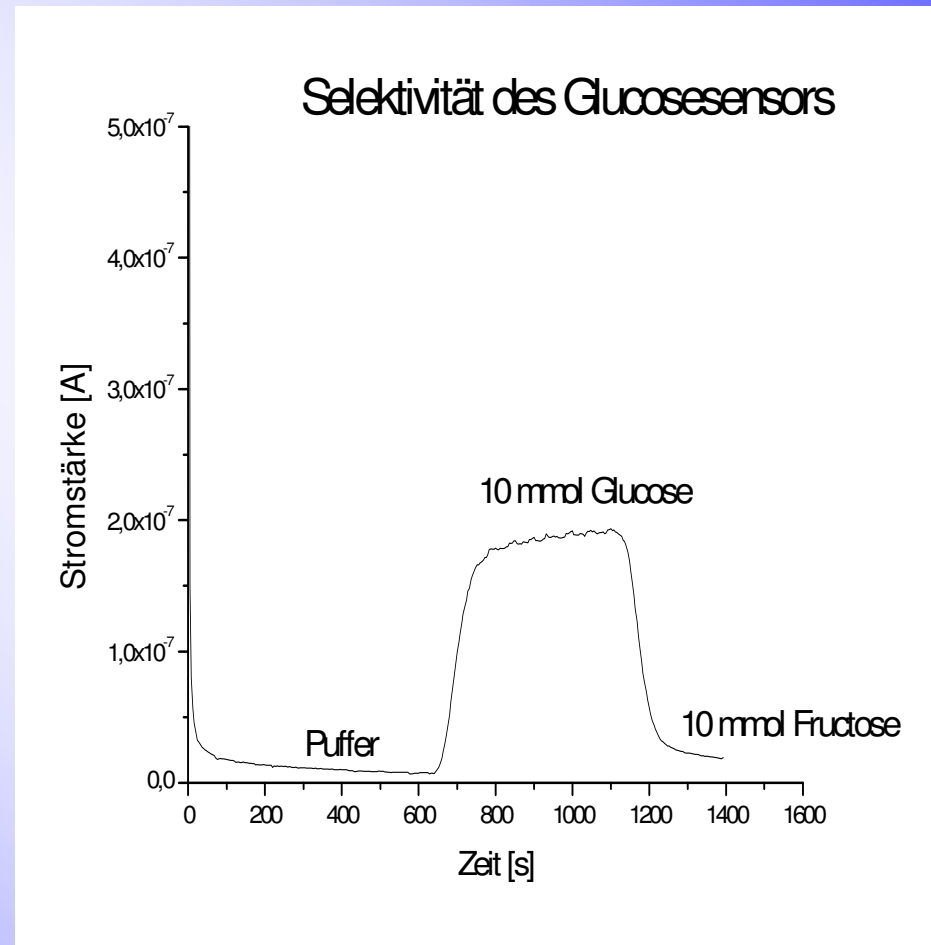
7.6.2. Fließgeschwindigkeit

- Gemessene Stromstärke abhängig von der Fließgeschwindigkeit



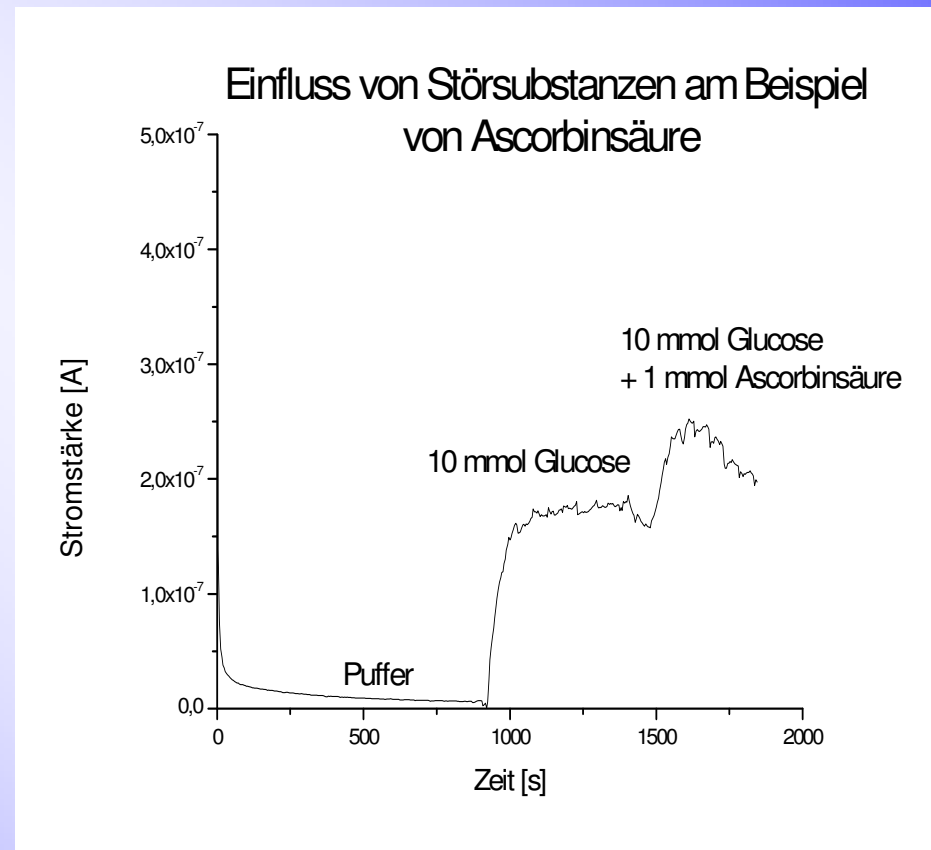
7.6.3. Selektivität

- GOD reagiert selektiv auf Glucose
- Bei Fructose gibt es kein Signal
- Hohe Selektivität des Sensors

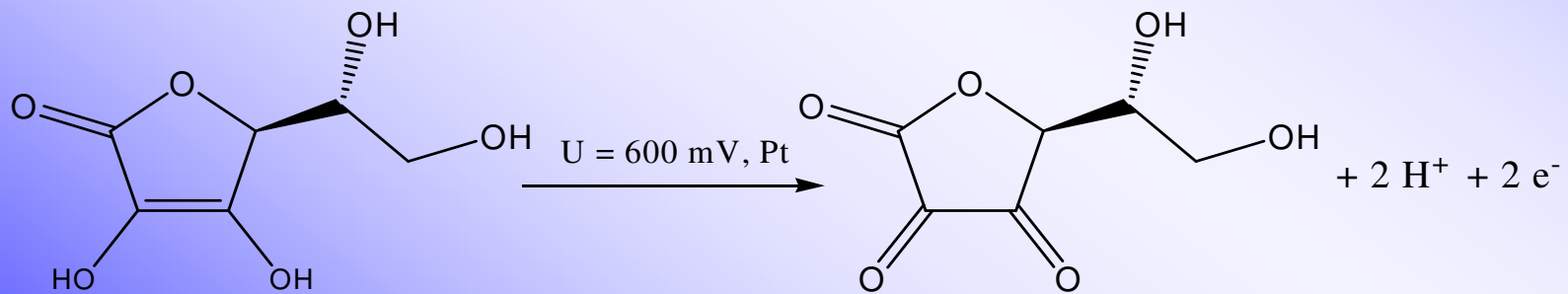


7.6.4 Einfluss von Störsubstanzen

- Auch geringe Mengen Ascorbinsäure können das Ergebnis der Messung stören

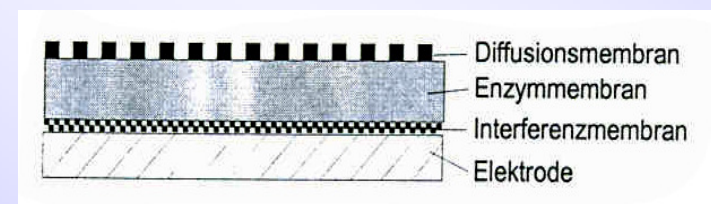
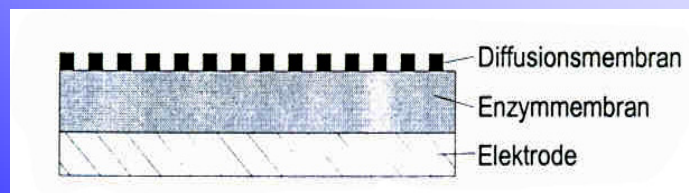


- Bei 600 mV oxidierbare Substanzen verursachen Störungen, z.B. Ascorbinsäure, Harnsäure, Medikamentenrückstände u.s.w.
- Bei einem Potential von 600 mV kommt es zur folgenden Reaktion



7.6.6. Ansätze zur Unterdrückung von Störungen

- **Differenzmessung**
- Parallelmessung ohne Glucose
- Differenz der Werte ergibt Glucosekonzentration
- Beide Sensoren müssen gleiche Diffusionseigenschaften aufweisen
- **Diffusionsbarrieren für hochmolekulare Verbindungen**
- Aufbringen einer nur für H_2O_2 permeablen Membran
- Störsubstanzen können nicht in die Containments diffundieren



Literatur

- F. Scheller, F. Schubert, Biosensoren, Birkhäuser Verlag, Basel, 1989
- V. M. Schmidt, Elektrochemische Verfahrenstechnik, Wiley. VCH GmbH & Co. KGaA, 2003
- Knoll M., Verfahren zur Herstellung von miniaturisierten Chemo- und Biosensorelementen mit ionenselektiver Membran sowie von Trägern für diese Elemente, Deutsches Patent, DE 4115414, 1991
- Knoll M., Miniaturisierte Durchflussmesskammer mit integrierten Chemo- und Biosensorelementen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung, Deutsches Patent, DE 44 08 352, 1994
- R. Holze, Leitfaden der Elektrochemie, B. G. Teubner Stuttgart-Leipzig, 1998
- Internet: www.diabeticus.de/infos/technik/biosensor.html