

Integrierte miniaturisierte Biosensoren

G. Urban, G. Jobst, E. Aschauer, A. Jachimowicz, F. Kohl, R. Fasching, T. Oubda,
P. Svasek, E. Svasek, F. Keplinger

Institut für Allgemeine Elektrotechnik und Elektronik, Ludwig Boltzmann Institut für
Biomedizinische Mikrotechnik und Hirnkreislaufforschung
1040 Wien

In der biologischen Grundlagenforschung und in der klinischen Medizin müssen eine Reihe von metabolischen Parametern wie z.B. pH, O₂, CO₂, Glukose oder Laktat simultan und kontinuierlich gemessen werden. Für die Entwicklung von Sensoren, die in der Lage sind diese Parameter zu messen, mußten eine Reihe elektrochemischer, technologischer und biochemischer Forschungen und Entwicklungen durchgeführt werden. Im Zuge dieser Arbeiten konnten nunmehr integrierte Glukose- und Laktat-Sensoren als biochemische Bauelemente auf miniaturisierten flexiblen Trägern hergestellt und im Vollblut *in vivo* ausgetestet werden.

1. Einleitung

In der Intensivmedizin und in vielen anderen Bereichen herrscht großer Bedarf an der *in vivo* und *ex vivo* Messung von zentralen metabolischen Parametern wie pH, pO₂, pCO₂, Glukose und Laktat. Sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Anwendungen von Sensoren ist eine Miniaturisierung und eine Integration mehrerer Sensoren notwendig. Bei *in vivo* Messungen ist die Invasivität gering zu halten und es deshalb notwendig, mehrere dieser Sensoren auf einem schmalen Träger zu integrieren. Bei *in vitro* Messungen z.B. in einem klinisch-chemischen Analysator ist der niedere Preis und die einfache Bedienung von Bedeutung — Forderungen welche wiederum durch eine hochtechnologische Realisierung von Sensoren erfüllt werden können.

Die Realisierung eines solchen Mehrfach-Sensors erfordert dieselben Kriterien wie sie auch an elektronische Bauelemente gestellt werden nämlich die gezielte räumliche Aufbringung funktioneller Mehrschichtsysteme. Die Dünnschichttechnologie bietet diese Möglichkeit auch für biochemische Komponenten in Kombination mit der Möglichkeit der kostengünstigen Massenproduktion.

Diese Arbeit beschreibt die erstmalig gelungene Integration miniaturisierter Dünnschicht-Glukose- und Laktat-Sensoren.

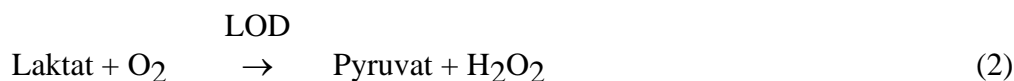
Das Prinzip dieser Biosensoren beruht auf der Immobilisierung von Enzymen auf einer elektrochemischen Sensoranordnung.

Diese Biosensoren nutzen die katalytische Oxidation von Glukose und Laktat mittels Glukoseoxidase (GOD)(EC 1.1.3.4) bzw. Laktat-oxidase (LOD)(EC 1.1.3.2). Das jeweilige Enzym-Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid wird anodisch an einer Platin-Arbeits Elektrode oxidiert wobei der auftretende Meßstrom ein Maß für die Analytkonzentration ist.

Dieser Mehrfach-Sensor wurde auf einem flexiblen Träger mit einer Breite von 0,7 mm integriert und ist damit für den *in vivo* Einsatz bestens geeignet. Er wurde bereits mit guten Ergebnissen in unverdünntem Plasma und Vollblut getestet.

2. Meßprinzip

Die verwendeten Enzyme GOD und LOD haben folgendes chemisches Reaktionsschema mit ihrem Substrat (Analyt):



Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht in beiden Fällen Wasserstoffperoxid, welches amperometrisch an einer Platinelektrode gemessen wird (3).



Diese Reaktion läuft in wäßrigen Lösungen anodisch an einer Metallelektrode ab. Um die Überspannung möglichst nieder zu halten wird ein katalytisches Metall, vorzugsweise Platin, verwendet an welchem die H_2O_2 Oxidation schon bei +400 mV gegen eine Ag/AgCl-Bezugselektrode beginnt.

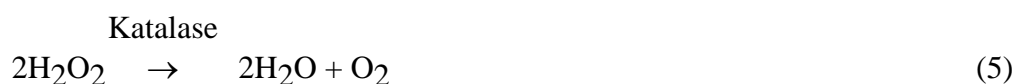
Um eine geschlossene elektrochemische Meßanordnung zu erhalten sind Arbeitselektrode, Gegenelektrode und AgCl-Bezugselektrode, dünnschichttechnologisch ausgeführt, eng benachbart plaziert.

Durch Diffusion des gebildeten H_2O_2 an die Arbeitselektrode entsteht ein stationärer Meßstrom nach Gleichung (4):

$$i_{\text{lim}} = nFDc^0/d \quad (4)$$

i_{lim} ...Diffusionsgrenzstrom, n ...Elektronenausbeute bei Übertrittsreaktion (Elektrodenreaktionswertigkeit), D ...Diffusionskonstante des Analyts, c^0 ...Konzentration des Analyts, F ...Faradaykonstante, d ...Dicke der Diffusionsschicht.

Allerdings erfolgt auch eine Diffusion in Richtung Meßlösung, welches ein unerwünschter Vorgang ist. Durch Einführen einer weiteren Deckmembrane die das Enzym Katalase enthält wird das H_2O_2 katalytisch gespalten (5):



Dadurch verhindert man erstens den Austritt des chemisch aggressiven H_2O_2 in die biologische Meßlösung und zweitens wird der für die Enzymreaktionen (1) und (2) benötigte Sauerstoff rückgeführt (Abb. 1).



Abb.1 Reaktionsschema des Biosensors. Zeichenerklärung: 1..Pt-Arbeitselektrode, 2..Semipermeable Schicht, 3.. pHEMA-Schicht + Glukoseoxidase (OD), 4..pHEMA-Schicht + Catalase (CAT)

Da bei dem Meßpotential von +600 mV nicht nur H_2O_2 sondern eine Reihe anderer physiologisch vorkommender Substanzen (Ascorbinsäure, Harnsäure) oxidiert werden, muß eine semipermeable Membrane über der Pt-Elektrode aufgebracht werden. Da H_2O_2 das bei weitem kleinste vorkommende Molekül ist, muß diese Membrane eine niedere Ausschlußgrenze von einem Molekulargewicht von ca. 80 Dalton aufweisen. Diese nicht einfache Forderung wird durch Elektropolymerisation einer aromatischen Verbindung erfüllt.

2. Herstellung

Der Träger für die Sensoren ist eine $60 \times 60 \text{ mm}^2$ große, 0,1 mm dicke Polyimidfolie auf welcher mittels dünnschichttechnologischer Prozesse gleichzeitig sechzig Glukose/Laktat-Sensoren hergestellt werden.

Die Leiterbahnen und Metallelektroden werden mittels Vakuumbedampfens von 50 nm Ti/50 nm Pt hergestellt, die mittels Standardphotolithographie strukturiert werden. Die Arbeitselektroden weisen eine Fläche von jeweils $0.4 \times 1 \text{ mm}^2$ auf. Die $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ Bezugslektrode wird durch Aufdampfen einer $1 \mu\text{m}$ dicken Ag-Schicht bei darauffolgender Chlorierung in $FeCl_3$ hergestellt. Als Isolation dient ein photostrukturierbarer Polyimidlack (Probimid 408).

Um elektrochemische Interferenzen zu vermeiden, wird mittels Elektropolymerisation von m-Phenylendiamin in Phosphatpuffer (pH=7) durch Zyklisierung des elektrischen Potentials zwischen 0 und +800 mV über 2 Stunden eine semipermeable Membrane auf die Elektroden aufgebracht, die nur für H_2O_2 durchlässig ist.

Für die Immobilisierung der Enzyme auf den Arbeitselektroden wurde eine neue Membraneinbettungstechnik entwickelt: In einem Hydrogel-Vorpolymer (47%pHEMA + 47%HEMA + Photoinitiator 1% Irgacure651 + 5%TEGDMA) werden die Enzyme gelöst und mittels Photopolymerisation auf den gewünschten Ort immobilisiert und gleichzeitig strukturiert [1].

Bei den Mehrfach Glukose-Laktat-Sensoren sind die Enzyme GOD und LOD auf jeweils einer Elektrode in einer photostrukturierten Membran eingeschlossen, und werden durch eine Photomaske mit UV-Licht bestrahlt (ein gängiges Verfahren in der Dünnschichttechnologie) wodurch die bestrahlten Teile der Membran unlöslich werden. Die nichtbelichteten Stellen werden anschließend in einem geeigneten Lösungsmittel weggelöst.

Die Photostrukturierbarkeit dieser Membranen ermöglicht die auf 1/100 mm genaue Aufbringung von Enzymmembranen auf den jeweils dafür vorgesehenen Elektroden. Die Wiederholung dieses Prozesses für verschiedene Elektroden mit verschiedenen Enzymmembranen ermöglicht die Herstellung eng benachbarter Enzymsensoren für verschiedene Substrate auf einem gemeinsamen Träger, welche ihrerseits von einer photostrukturierten Schutzmembran, die das Enzym Katalase enthält, bedeckt ist.

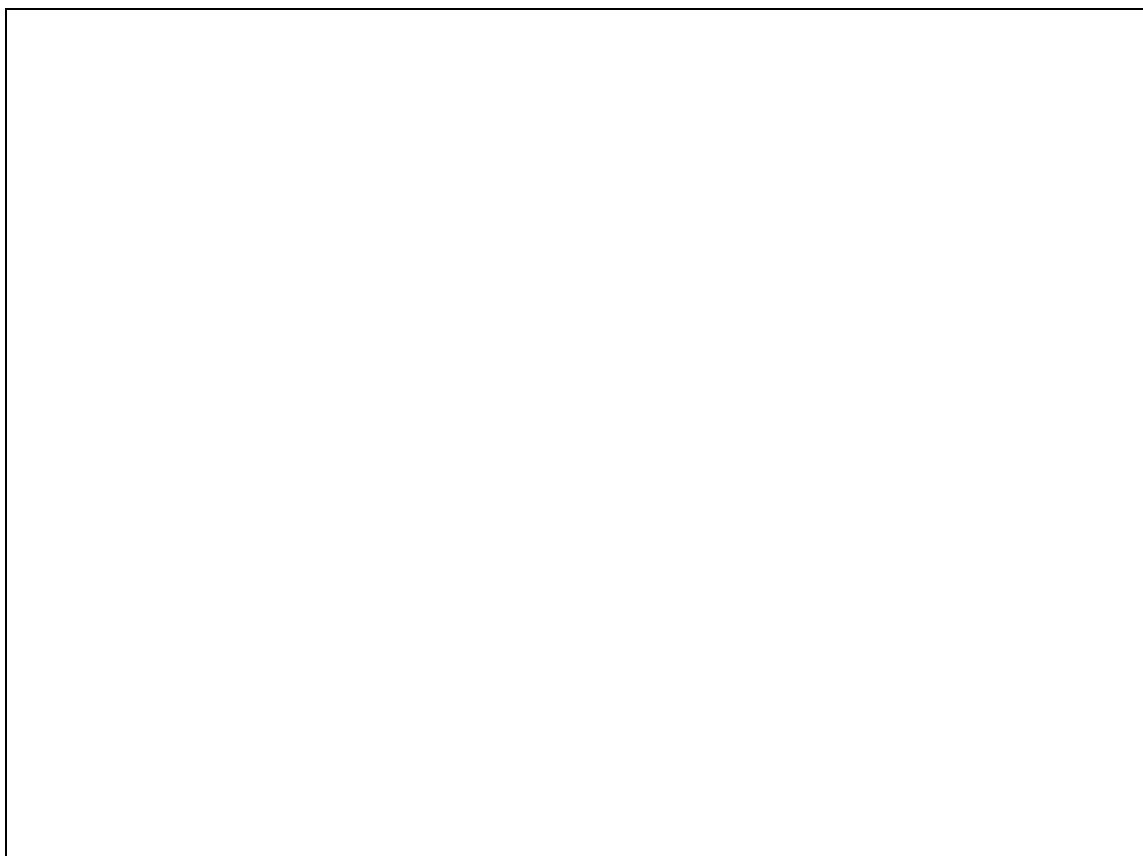


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines integrierten flexiblen Multi-Sensors.:

- 1...Catalase-Membrane, 2...Glukoseoxidase-Membrane, 3...Gegenelektrode,
- 4...Inaktive Membrane, 5...Polyimidisolation, 6...Ag-Schicht, 7...AgCl-Schicht,
- 8...Polyimidträger

Nach dem Zerschneiden des Trägers liegen die Mehrfach-Sensoren als 0,7 mm breite und 60 mm lange Streifen vor (Abb.2) und können durch einen Standard Venflon in ein Blutgefäß eingeführt werden.

3. Messungen

Die Messungen wurden mit einem Bi-Potentiostaten bei +600 mV gegen. Ag/AgCl-Meßlösung durchgeführt. Die hierfür notwendige Gegenelektrode sowie Referenzelektrode befinden sich ebenfalls auf dem Meßstreifen. Als Meßmedium wurde entweder ein pH 7,4 Puffer oder unverdünntes humanes Fluorid-Plasma verwendet. Der Glukosesensor zeigt einen linearen Meßbereich von 0 bis 30 mmol Glukose/l, der Laktatsensor von 0 bis 7 mmol/l (Abb.3).

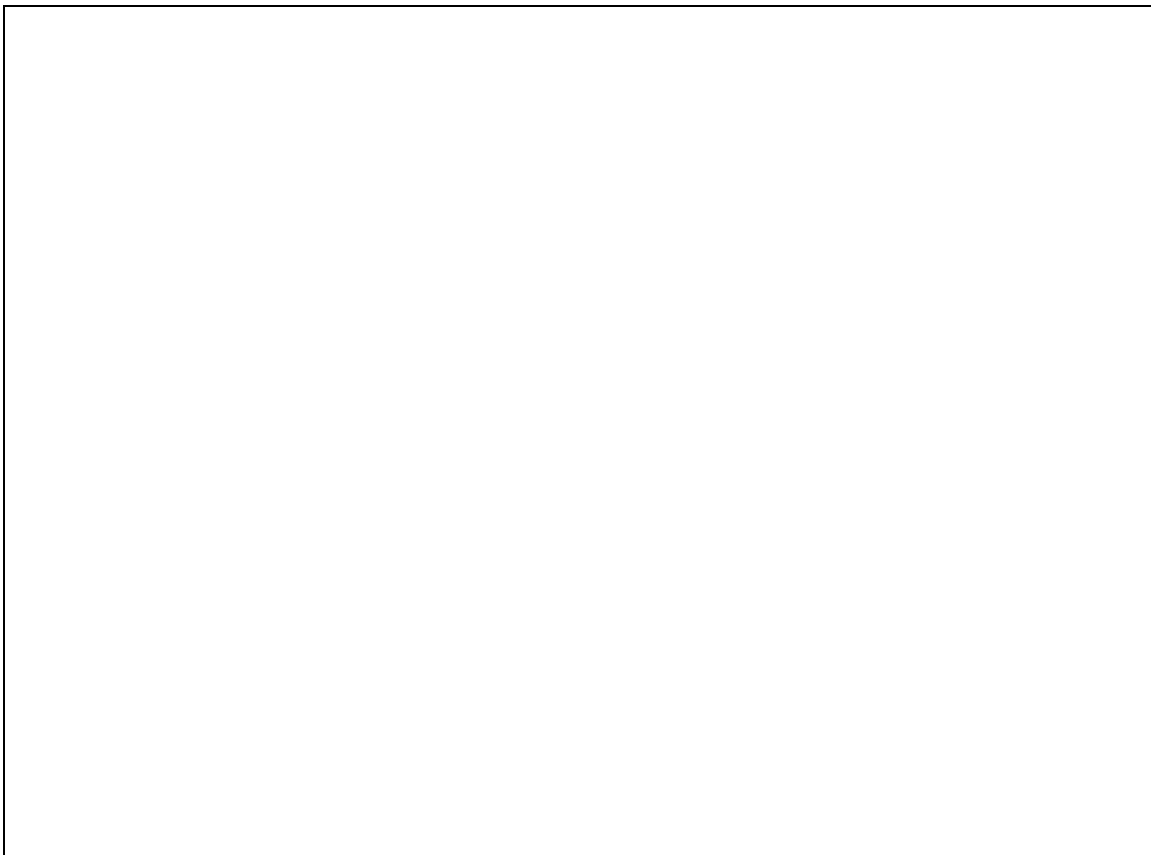


Abb. 3: Kalibrationskurven (Meßstrom über Konzentration) des Multi-Sensors für Glukose (o) und Laktat (●).

Abbildung 4 zeigt, daß der Response der einzelnen Sensoren auf ihren jeweiligen Analyten unabhängig von der Konzentration des anderen Analyten ist, sowie ein sehr schnelles Ansprechen auf Konzentrationsänderungen. Der $t_{95\%}$ liegt für beide Sensoren in der Größenordnung von 30 Sekunden.

Die Langzeitstabilität beträgt für Glukose in Meßlösung mindestens zwei Wochen und für Laktat mindestens vier Tage.

Die Konditionierzeit eines gelagerten Sensors unmittelbar nach Einsetzen in die Meßlösung ist fünf Minuten.

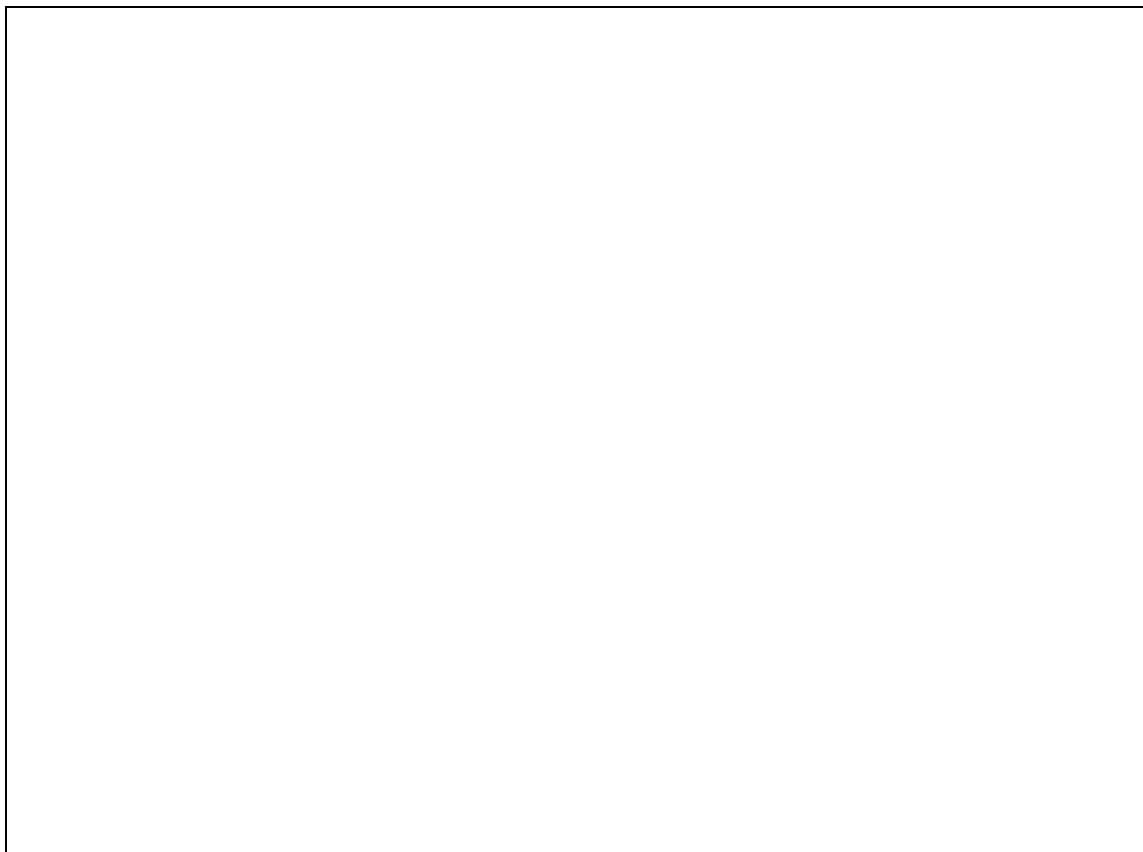


Abb. 4: Response des Glukose/Laktat-Sensors auf wiederholte Addition von 2mmol Glukose/l und 1mmol Laktat/l in unverdünntem humanem Fluorid-Plasma.

4. Ausblick

Mit dem hier vorgestellten Membransystem sind auch eine Reihe weiterer Parameter erfassbar, wie zum Beispiel Galaktose, Sacharose, Lactose, Glutaminsäure. Die Möglichkeit der Integration potentiometrischer Sensoren wurde bereits demonstriert [1], [2]. Diese erlaubt die parallele Erfassung von z.B. pH, pK, pNa und weiteren Ionen. Außerdem könnten durch Integration eines solchen potentiometrischen Sensors mit entsprechenden Enzym-membranen miniaturisierte und integrierte Sensoren für Harnstoff, Kreatinin und viele andere Metaboliten hergestellt werden. Eine weitere integrierbare Sensorgruppe stellen die Gassensoren dar. Die Herstellbarkeit mittels dünnschichttechnologischer Prozesse und damit auch die Integrierbarkeit eines pO_2 -Sensors mit unseren Ionensensoren und Enzymsensoren konnte bereits unter Beweis gestellt werden [3], [4]. Der miniaturisierte pCO_2 -Sensor befindet sich im intensiven Entwicklungsstadium [4]. Die Realisierung des "reagentienlosen miniaturisierten Multi-Parametersensors" für Ionen, Blutgase und Metaboliten ist nun in greifbare Nähe gerückt.

5. Diskussion

Es wurde mit der Realisierung dieses integrierten Glukose/Laktat-Sensors die Möglichkeit der Herstellung enzymatischer Multi-Parametersensoren in Dünnschichttechnologie demonstriert. Diese Sensoren sind klein genug für den in vivo Einsatz, schnell genug für den Einsatz in

klinischen Analysatoren sowie auch potentiell billig in der Herstellung. Hervorzuheben ist noch, daß diese Sensoren durch die Mehrschichtmembransysteme in unverdünntem Vollblut arbeiten können. Es konnte somit ein biochemisches Sensor-Bauelement realisiert werden, welches auch Anwendung in kommerziellen klinischen Produkten finden kann.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom "Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung", der Gesellschaft für Mikroelektronik, dem Ludwig Boltzmann Institut für Biomedizinische Mikro-technik und der Österreichischen Nationalbank unterstützt.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Urban, G. Jobst, F. Keplinger, E. Aschauer, O. Tilado, R. Fasching, F. Kohl, "Miniaturized multi-enzyme biosensors integrated with pH-sensors on flexible polymer carriers for in vivo applications", *Biosensors and Bioelectronics*; 8 (1993), in Druck.
- [2] T.S. Oubda, G. Urban, M. Rakohl, A. Jachimowicz, E. Aschauer, R. Fasching, G. Jobst, "Polythienylpyrrol-Elektrode als pH-Sensor", *Biomedizinische Technik*; Band 57, Ergänzungsband 1 (1992) 155-158.
- [3] G. Jobst, G. Urban, A. Jachimowitz, F. Kohl, O. Tilado, I. Lettenbichler, G. Nauer, "Thin-film clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications", *Biosensors and Bioelectronics*; 8 (1993), in Druck.
- [4] R. Fasching, G. Urban, E. Aschauer, A. Jachimowicz, F. Kohl, O. Tilado, G. Jobst, I. Lettenbichler, G. Nauer, "Miniaturisierte Dünnschicht-Blutgassensoren für die in vivo und in vitro Diagnostik", *Biomedizinische Technik*; Band 57, Ergänzungsband 1 (1992) 161-164.