



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 14 519 T2** 2008.02.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 521 960 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 14 519.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB03/02901**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 738 310.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/008130**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.07.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.01.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.04.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/327** (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0216039 **11.07.2002** **GB**

(73) Patentinhaber:

Hypoguard Ltd., Woodbridge, Suffolk, GB

(74) Vertreter:

**propindus Patentanwälte Niedmers Jaeger Köster,
82131 Gauting**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR**

(72) Erfinder:

**BLACK, Murdo M., Forfar, Angus DD8 2AZ, GB;
BUTTERS, Colin, Marlesford, Ipswich IP13 0AH,
GB; HO, Wah On, Ipswich IP4 1QB, GB; RIPPETH,
John, Ipswich IP4 1HY, GB**

(54) Bezeichnung: **ENZYMELEKTRODEN UND VERFAHREN ZUR SEINER HERSTELLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

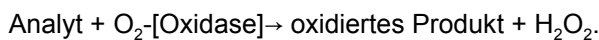
Hintergrund der Erfindung

1. Anwendungsgebiet der Erfindung

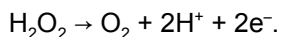
[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Enzymelektroden zur Messung der Analytkonzentration in Fluiden, beispielsweise von Glukose in Vollblut. Enzymelektroden umfassen ein Enzym, das als Schicht auf einem elektrisch leitenden Substrat aufgetragen ist oder damit vermischt ist. Die Elektroden sprechen amperometrisch auf die katalytische Aktivität des Enzyms in Anwesenheit eines geeigneten Analyten (Substrats) an. Die Erfindung erstreckt sich auch auf einen Biosensor, insbesondere einen einmal zu verwendenden Biosensor, welcher die Enzymelektrode beinhaltet.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Amperometrische Biosensoren sind im Stand der Technik gut bekannt. Bei dem Enzym handelt es sich typischerweise um eine Oxidoreductase, beispielsweise Glukoseoxidase, Cholesterinoxidase oder Lactatoxidase, welche Wasserstoffperoxid gemäß der folgenden Gleichung produziert:



[0003] Das Peroxid wird an einer Elektrode mit fixiertem Potenzial wie folgt oxidiert:



[0004] Die elektrochemische Oxidation von Wasserstoffperoxid an den Platinzentren der Elektrode führt zu einem Transfer von Elektronen von dem Peroxid zu der Elektrode, wodurch ein Strom erzeugt wird, welcher der Analytkonzentration proportional ist. Handelt es sich bei dem Analyt um Glukose, dann ist das oxidierte Produkt Glukonolacton. Die nicht geprüfte japanische Patentveröffentlichung Nr. 56-163447 beschreibt ein System, bei dem Glukoseoxidase eingesetzt wird, die auf einer Platinelektrode immobilisiert ist. Die Elektrode umfasst eine Schicht aus immobilisiertem Enzym auf einer elektrisch leitenden Kohlenstoffbasis. Die Basis wird aus geformtem Graphit mit einem Gehalt von bis zu 10 Gewichtsteilen eines Fluorkohlenstoffharzbinde-mittels gebildet, auf welchem ein dünner (weniger als 1 µm) Platinfilm abgeschieden wird. Es wird behauptet, dass durch die Erfindung die Probleme vermieden werden können, welche mit der Immobilisierung des Enzyms direkt auf der Platinoberfläche assoziiert sind. Außerdem wird dargelegt, dass eine Enzymelektrode mit schnellen Ansprechzeiten (5 Sekunden), einer hohen Empfindlichkeit und Haltbarkeit erhalten wird. Gemäß dem US-Patent Nr. 4,970,145 zeigen jüngere experimentelle Arbeiten mit derartigen Elektroden jedoch, dass diese über keine derartigen Vorzüge verfügen.

[0005] Im US-Patent Nr. 4,970,145 wird eine Enzymelektrode beschrieben, die ein im Wesentlichen heterogenes poröses Substrat umfasst, welches im Wesentlichen besteht aus harzgebundenen Kohlenstoff- oder Graphitpartikeln mit einem Metall der Platingruppe, das im Wesentlichen gleichförmig in dem Substrat dispergiert ist, und mit einer katalytisch aktiven Menge eines Enzyms, das auf den Oberflächen des porösen Substrats adsorbiert oder immobilisiert ist. Die Elektroden werden hergestellt entweder durch Vernetzen des Enzyms mit dem Substrat oder durch Suspendieren des porösen Substrats in einer gepufferten Enzymlösung während 90 Minuten bei Raumtemperatur. In alternativer Weise wird die Adsorption des Enzyms auf der Elektrode durch Elektroadsorption durchgeführt, bei der das Elektroden-Basismaterial bei einem positiven Potenzial in einer Enzymlösung während 60 Minuten suspendiert wird. Von der Elektrode wird geschildert, dass sie über schnelle Ansprechzeiten (1 bis 2 Sekunden ohne eine Schutzmembran und 10 bis 30 Sekunden mit einer Membran) und eine gute Stabilität verfügt. Zudem wird von einem erweiterten Arbeitsbereich berichtet. Ferner soll die Elektrode ein wesentlich niedrigeres Arbeitspotenzial als normal (325 mV gegenüber dem mehr üblichen Wert von 650 mV) erforderlich machen und einen niedrigen Hintergrund bei dem Betriebspotenzial besitzen.

[0006] In dem US-Patent Nr. 5,160,418 ist eine vereinfachte Enzymelektrode offenbart, die einen dünnen Film aus einer im Wesentlichen homogenen Mischung aus Enzym und fein verteiltem Metall oder Oxid der Platingruppe besitzt. Gewünschtenfalls kann fein verteilter Kohlenstoff bzw. fein verteiltes Graphit in platinisierter oder paladisierter Form Anwendung finden. Ebenfalls gewünschtenfalls kann ein Bindemittel verwendet werden. Der Film kann durch Siebdruck einer flüssigen Suspension, welche die Komponenten enthält, hergestellt werden.

[0007] Wir haben gefunden, dass die oben beschriebenen Systeme des Standes der Technik bezüglich der Empfindlichkeit über hohe Intercepts verfügen, woraus eine schlecht kalibrierte Präzision resultiert. Wir haben ferner festgestellt, dass eine allmähliche Abschwächung der Empfindlichkeit mit der Zeit eintritt, wobei dies nicht notwendigerweise mit einer Instabilität des Enzyms in Verbindung steht.

[0008] Die US 5,616,222 beschreibt einen elektrochemischen Sensor zur mehrfachen Verwendung mit einem elektrisch nicht leitenden Substrat, einer Arbeitselektrode und einer semi-permeablen Membran, welche die Arbeitselektrode bildet und die Basis für die Präambel des Anspruchs 1 bildet. In JP 04 326054 ist ein Glukosesensor zur kontinuierlichen Messung in einem Medium für eine anaerobe Kultur und eine Blutmessung offenbart. Der Sensor verfügt über leitfähigen Kohlenstoff und eine Fluor-Harzmischung, eine Sauerstoff-permeable Membran auf dem Rücken des Elements und eine Glukoseoxidase-immobilisierte Membran auf der Vorderseite.

[0009] Als eine Alternative zur Messung eines elektrischen Signals, worauf sich ein Transfer von Elektronen vom Peroxid zur Elektrode anschließt, enthalten einige Biosensoren einen Elektronenträger oder „Vermittler“ (Mediator), der in einer oxidierten Form Elektronen aus dem Enzym akzeptiert und dann, in einem reduzierten Zustand, die Elektronen zu der Elektrode transportiert, wo er re-oxidiert wird. Beispiele aus dem Stand der Technik für derartige Vermittler bzw. Mediatoren sind Ferrocen, Ferrocenderivate, Ferricyanid, Osmiumkomplexe, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Nilblau und Medolablau, man vgl. z.B. US 5,708,247, US 6,241,862, WO 98/55856 und WO 99/13100. Biosensoren, bei denen ein Redoxvermittler zum Transfer von Elektronen zwischen dem Enzym und der Elektrode Anwendung finden, werden hier als „vermittelte Biosensoren“ bezeichnet.

[0010] Vermittelte Biosensoren können mit einer Vielzahl von Problemen behaftet sein, wozu die chemische Instabilität zählt. Der Vermittler muss sich, um zu funktionieren, in einem besonderen Redoxzustand befinden, so dass, falls die reduzierte Form durch Luft oxidiert wird, der gemessene Strom reduziert wird. Sauerstoff kann auch dadurch stören, dass Elektronen akzeptiert werden, wobei Peroxide gebildet werden, die nicht beim Potenzial der vermittelten Elektrode oxidiert werden. Wird das Elektrodenpotenzial erhöht, um das Peroxid zu oxidieren, dann macht dies das System anfällig für die Störung durch andere Spezies, welche im Blut gelöst sein können, beispielsweise Paracetamol, Ascorbat und Harnsäure. Die Veränderung der Sauerstoffkonzentration im Blut kann zu einer Veränderung des gemessenen Glukoseansprechens in einem vermittelten System führen.

[0011] Wünschenswerte Eigenschaften für einen Biosensor zum Einmalgebrauch sind folgende:

- Niedriger Intercept bezüglich des Hintergrundes – um niedrige Variationskoeffizienten (CV's) nach der Kalibrierung zu erreichen,
- eine Empfindlichkeit, die so groß ist wie die Elektronik zulässt,
- Stabilität,
- gute Präzision,
- reproduzierbare Herstellung,
- schnelles Ansprechen,
- niedrige Kosten.

[0012] Erfindungsgemäß sollen eine Enzymelektrode und ein Biosensor bereitgestellt werden, welche bezüglich mindestens einiger der oben aufgeführten Kriterien verbessert sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Erfindungsgemäß wird gemäß einem Gegenstand der Erfindung bereit gestellt eine nicht-vermittelte Enzymelektrode zur amperometrischen Anzeige der katalytischen Aktivität eines Oxidoreductase-Enzyms in Anwesenheit eines Fluids, das eine Substanz enthält, auf die das Enzym einwirkt, und eines elektrischen Potentials an der Elektrode, wobei die Elektrode ein Basissubstrat umfasst, auf dem vorgesehen ist:

- a) eine elektrisch leitende Basisschicht, die fein verteiltes, durch ein Harz miteinander verbundenes Metall oder Oxid der Platingruppe umfasst,
- b) eine Oberschicht auf der Basisschicht, wobei die Oberschicht einen Puffer umfasst und in dem Fluid löslich ist, und
- c) eine katalytisch wirksame Menge des Oxidoreductase-Enzyms in mindestens einer der Basisschicht und der Oberschicht.

[0014] Der hier verwendete Ausdruck „nicht-vermittelte“ (non-mediated) bezieht sich auf eine Enzymelektrode, die keine signifikante Menge eines Redoxvermittlers enthält, und auf einen eine derartige Enzymelektrode

enthaltenden Biosensor. Vorzugsweise enthält die Enzymelektrode keinerlei Redoxvermittler. Wird ein Oxidoreductase-Enzym, beispielsweise Glukoseoxidase, zur Anwendung gebracht, dann resultiert der gesamte oder im Wesentlichen der gesamte gemessene Strom aus der Oxidation des Peroxids an der Elektrode.

[0015] Wir haben gefunden, dass durch Bereitstellung des Puffers in der Oberschicht schnellere Ansprechzeiten als bei üblichen nicht-vermittelten Biosensoren zusammen mit einer erhöhten Stabilität und Empfindlichkeit erzielt werden können. Wir nehmen an, dass die Zunahme hinsichtlich Empfindlichkeit und Ansprechzeit durch die Bereitstellung einer hohen Pufferkapazität auf dem Streifen erreicht wird. Die Oxidation von Wasserstoffperoxid führt zu Wasserstoffionen, die durch den Puffer neutralisiert werden. Dies kann zwei Effekte bewirken: die Enzymaktivität wird durch Beibehalten des lokalen pH um das Enzym aufrechterhalten und das Gleichgewicht der Wasserstoffperoxidoxidation wird verschoben, wodurch die Effizienz gesteigert wird. Die Steigerung der Wirksamkeit der Wasserstoffperoxidoxidation führt auch zu einem größeren Sauerstoffrecycling, das durch das Oxidoreductase-Enzym genutzt werden kann. Wir haben ferner gefunden, dass das Verhältnis von Enzym zu Puffer wichtig ist, um eine gewünschte Linearität des Ansprechens zu erhalten und um eine vernünftige untere Grenze der Empfindlichkeit zu erzielen. Wir haben ferner festgestellt, dass der Puffer und das Enzym eine bestimmte Grenzkonzentration überschreiten müssen, um die maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Oberhalb dieser Konzentration kann das Verhältnis von Puffer zu Enzym dazu genutzt werden, um das Ansprechprofil des Biosensors auf die Blutglukose zu „tunen“; dies wird später im Zusammenhang mit unseren experimentellen Ergebnissen näher diskutiert.

[0016] Der pH-Bereich des Puffers hängt von der speziellen Chemie des Systems ab. Ein bevorzugter Bereich beträgt pH 7 bis 10, insbesondere 7 bis 8,5. Bevorzugte Puffer sind Phosphat bei etwa pH 8 und ADA bei etwa pH 7,5.

[0017] Das Metall oder Oxid der Platingruppe kann in einer so großen Menge vorhanden sein, dass die Basisschicht, wie von der US-5 160 418 gelehrt, elektrisch leitend ist. In alternativer Weise kann die Basisschicht auch Partikel von fein verteiltem Kohlenstoff oder Graphit enthalten. Der Ausdruck „Katalysator“ wird hier der Einfachheit halber benutzt, um das fein verteilte Metall oder Oxid der Platingruppe zu bezeichnen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich der Katalysator in engem Oberflächenkontakt mit dem Kohlenstoff- oder Graphitpartikeln, beispielsweise als platinisierter Kohlenstoff oder palladisierter Kohlenstoff.

[0018] Das Harz kann jedes geeignete Bindematerial oder Bindemittel umfassen, das dazu dient, das Metall oder Oxid der Platingruppe in der Basisschicht zu binden. Dabei kann es sich beispielsweise um ein Polyesterharz, Ethylcellulose oder Ethylhydroxyethylcellulose (EHEC) handeln.

[0019] Die Enzymelektrode kann dadurch hergestellt werden, dass eine den Katalysator enthaltende Farbe bzw. Druckfarbe auf das Basissubstrat gedruckt wird, die gedruckte Farbe zur Ausbildung einer Basisschicht trocknen gelassen wird und anschließend die Oberschicht durch Auftragen eines Beschichtungsmediums, welches den Puffer umfasst oder enthält, ausgebildet wird. Bei dem Beschichtungsmedium handelt es sich vorzugsweise um ein Fluid, insbesondere ein wässriges Fluid, in dem der Puffer gelöst ist. Das Beschichtungsmedium kann jedoch ein Trockenpulver, das aus dem Puffer besteht oder diesen enthält, umfassen und wird beispielsweise durch Sprühen auf eine klebrige Basisschicht aufgetragen. Zu den geeigneten Verfahren zur Ausbildung der Oberschicht bei Einsatz eines Beschichtungsfluid zählen Drucken, Sprühen, Farbenstrahldrucken, Tauchbeschichten und Spinbeschichten. Eine bevorzugte Beschichtungstechnik stellt das Tropfenbeschichten mit einem Beschichtungsfluid dar. Die Erfindung wird nachstehend unter Bezug auf dieses bevorzugte Verfahren beschrieben.

[0020] Die Enzymelektrode wird typischerweise in die Arbeitselektrode eines Biosensors inkorporiert. Außerdem wird auch eine Referenzelektrode zur Vervollständigung eines Stromkreises und zur Verfügungstellung eines stabilen Referenzpotentials bereitgestellt; dies ist im Stand der Technik gut bekannt.

[0021] Demzufolge ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein nicht-vermittelter Biosensor gemäß Anspruch 18.

[0022] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Enzym in der Oberschicht mit dem Puffer bereitgestellt. Diese Anordnung erleichtert die Einstellung des pH-Wertes in der lokalen Umgebung der Oberschicht auf einen Wert, bei dem das Enzym wirksamer operieren kann. Dieser Wert unterscheidet sich typischerweise von demjenigen Wert, bei dem das Metall oder Oxid der Platingruppe optimal arbeitet.

[0023] In der Oberschicht kann vorteilhafterweise ein Systemstabilisator enthalten sein. Geeignete Stabilisa-

toren sind Polyole, die sich von denjenigen unterscheiden, auf die das Enzym einwirkt; beispielsweise Trehalose, Mannit, Lactit, Sorbit oder Sucrose, sofern das Enzym Glukoseoxidase ist. Der Systemstabilisator kann das Enzym durch Einkapselung, wodurch tertiäre strukturelle Veränderungen beim Lagern verhindert werden, oder durch Ersatz der Wasseraktivität um das Enzymmolekül stabilisieren. Das Glukoseoxidaseenzym hat sich als ein sehr stabiles Enzym herausgestellt, und die Zugabe von Stabilisatoren dienen primär nicht zum Schutz dieses Enzyms. Die Stabilisatoren sind dabei behilflich, die Langzeit-Katalysator-Passivierungs-Effekte zu reduzieren, beispielsweise durch Beschichten einer platinisierten Kohlenstoff-Harz-Basisschicht sowie durch Schutz der Kohlenstoffoberfläche vor Luftoxidation.

[0024] Sind in der Basisschicht Kohlenstoffpartikel vorhanden, dann kann gewünschtenfalls ein Blockierungsagens in diese Schicht einverleibt sein, um aktive Stellen auf den Kohlenstoffpartikeln zu blockieren. Dies unterstützt die Lagerstabilität und die Gleichmäßigkeit der Kohlenstoffaktivität. Zu den geeigneten Blockierungsagentien zählen die Systemstabilisatoren und außerdem Proteine, beispielsweise bovines Serumalbumin (BSA). Werden anstelle des Kohlenstoffes mit großer Oberfläche Graphitpartikel eingesetzt, dann verfügen die Partikel über eine höhere Leitfähigkeit. Zudem ist ein Blockierungsagens weniger wünschenswert, da die Zahl der aktiven Einheiten auf dem Graphit wesentlich geringer ist als die auf dem Kohlenstoff gefundene Anzahl. Der geringere Oberflächenbereich und die weniger aktiven Oberflächengruppen dienen beide dazu, die Aufnahmefähigkeit zu reduzieren. Macht der Analyt 0 mM aus, dann besteht die Aufnahmefähigkeit bzw. der Intercept hauptsächlich aus einer kapazitiven Komponente, die bezogen ist auf den Oberflächenbereich.

[0025] Das Basissubstrat kann aus jedem geeigneten hitzestabilen Material gebildet sein. Die Hitzestabilität ist wichtig, um eine gute Registrierung von Drucken bei dem Herstellungsverfahren sicherzustellen. Ein bevorzugtes Substrat stellt Valox FR-1 dar, bei dem es sich um einen thermoplastischen Polyesterfilm (Poly(butylenterephthalat)copoly(bis-phenol-A/tertabrombisphenol-A-carbonat)) handelt. Andere geeignete Substrate sind dem Fachmann gut bekannt. Dazu zählen beispielsweise PVC, Poly(ethersulfon) (PES), Poly(etheretherketon) (PEEK) und Polycarbonat.

[0026] Bei dem Enzym kann es sich um jedes geeignete Oxidoreductase-Enzym handeln, beispielsweise Glukoseoxidase, Cholesterinoxidase oder Lactatoxidase.

[0027] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines nicht-vermittelten Biosensors gemäß Anspruch 29 dar.

[0028] Weitere Aspekte und Vorteile der Erfindung gehen aus der nachfolgenden Beschreibung, Zeichnungen und Ansprüchen hervor.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0029] Die Erfindung wird nachstehend in beispielhafter Weise unter Bezug auf die folgenden Zeichnungen näher erläutert, von denen zeigen:

[0030] [Fig. 1](#) Stufen bei der Herstellung eines Biosensors gemäß einem Gegenstand der vorliegenden Erfindung,

[0031] [Fig. 2](#) eine Kurve, welche einen Vergleich zwischen Glukosekalibrierungen auf einem erfindungsgemäßen Biosensor und einem Biosensor des Standes der Technik wiedergibt,

[0032] [Fig. 3](#) eine Kurve, welche die Wirkung des Phosphatpuffers in der Oberschicht beim Ansprechen wiedergibt,

[0033] [Fig. 4](#) eine Kurve, welche die Wirkung des pH auf das Glukose-Ansprechen wiedergibt,

[0034] [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) Kurven, welche die Wirkung des pH-Wertes auf das Wasserstoffperoxid-Ansprechen wiedergeben,

[0035] [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) Kurven, welche die Wirkung des pH-Wertes auf das Glukose-Ansprechen wiedergeben,

[0036] [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) Kurven, welche die Wirkung des Puffertyps auf das Wasserstoffperoxid-Ansprechen wiedergeben,

[0037] [Fig. 11](#) Kalibrierungskurven für Biosensoren mit einem festgelegten Puffer/Enzym-Verhältnis,

[0038] [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) Kalibrierungsergebnisse für Biosensoren mit verschiedenen Puffer/Enzym-Verhältnissen,

[0039] [Fig. 14](#) Ergebnisse für unterschiedliche Kombinationen von Druckfarbe und Tropfenbeschichtungen,

[0040] [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) Kurven der Ergebnisse für Biosensoren mit einer Siebschicht und

[0041] [Fig. 17](#) und [Fig. 18](#) Kurven, welche die Wirkung des ADA-Puffers in der Oberschicht beim Ansprechen wiedergeben.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

Herstellung von BSA-Pt/Kohlenstoff

[0042] In einer 250 ml Glasflasche wurden 6,4 g BSA, Miles Inc. in 80 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline (PBS)) gelöst und 20 g von 10 % Pt/XC72R-Kohlenstoff, MCA Ltd., wurden nach und nach unter konstantem Rühren hinzu gegeben. Die Flasche wurde dann auf einen Rollmischer gelegt, und eine Inkubierung für einen Zeitraum von 2 h bei Raumtemperatur wurde ermöglicht.

[0043] Aus zwei Teilen eines Filterpapiers, Whatman™ Nr. 1, wurde ein Büchner-Trichter hergestellt. Die Mischung wurde in den Trichter gegossen, und der Kohlenstoff wurde 3 × mit etwa 100 ml PBS gewaschen. Durch den Kuchen aus Kohlenstoff wurde für einen Zeitraum von etwa 5 min Vakuum hindurch gezogen, um soviel Flüssigkeit wie möglich zu extrahieren. Der Kuchen aus Kohlenstoff wurde vorsichtig in einen Kunststoffcontainer gekratzt und mit einem Spatel zerbrochen. Der Kohlenstoff wurde dann in einen Ofen bei 30°C über Nacht getrocknet. Der Zweck dieser Vorgehensweise besteht darin, aktive Stellen auf dem Kohlenstoff zu blockieren und somit die Lagerstabilität und die Reproduzierbarkeit der Eigenschaften des Kohlenstoffes zu verbessern.

Herstellung von Farben aus Metall der Platingruppe/Kohlenstoff

[0044] BSA-Pt/Kohlenstoff wurde in Metech 8101 Polyesterharz als Polymerbindemittel, Terpeneol BP, von RC Treatt, als Flussmittel und Butylcellosolveacetat (BCA) als Lösungsmittel für die Farbe hergestellt.

[0045] Die Formulierung einer ersten Farbe bestand aus:

Formulierung der Farbe (I)

Metech 8101-Harz	54,05 %
BSA-Pt/Kohlenstoff	27,09 %
BCA	12,57 %
Terpeneol BP	6,29 %

[0046] Das Harz, Lösungsmittel und Flussmittel wurden am Anfang zusammen miteinander vermischt, bevor die Zugabe zur Kohlenstofffraktion erfolgte. Am Anfang wurde die Formulierung von Hand gemischt. Es schlossen sich mehrere Durchgänge durch eine Dreifachrollenmühle an. Dies führt zu einer weichen homogenen thixotropen Kohlenstofffarbe, die für den Siebdruck geeignet ist.

[0047] Eine alternative Formulierung ist eine solche, die derjenigen ähnlich ist, die im US-Patent 4,970,145 beschrieben ist, dessen Inhalt unter Bezugnahme darauf in die vorliegenden Unterlagen inkorporiert wird. Bei dieser Formulierung wird Glukoseoxidase (GOD) auf Pt/Kohlenstoff adsorbiert, bevor eine Adsorption an BSA und eine Inkorporation in eine Farbe erfolgt.

[0048] Bei einer weiteren Formulierung wurde der Gehalt an BSA-Pt/Kohlenstoff reduziert, und Graphit wurde hinzugefügt. Das Agens zur Fließkontrolle wurde weggelassen, und ein grenzflächenaktives Mittel wurde inkorporiert.

Formulierung der Farbe (I)

Metech 8101-Harz	45,32 %
BSA-Pt/Kohlenstoff	18,67 %
Graphit	9,77 %
BCA/Cyclohexanon	23,26 %
Tween® 20	2,98 %

[0049] Bei Tween 20 handelt es sich um ein grenzflächenaktives Mittel, das von Sigma-Aldrich zur Verfügung gestellt wird. Tween ist eine eingetragene Marke der ICI Americas Inc. Bei dem Lösungsmittel handelt es sich um eine 50 % V/V-Mischung von BCA und Cyclohexanon. Das zusätzliche Lösungsmittelvolumen, verglichen mit demjenigen, das für die Formulierung der Farbe I eingesetzt wurde, wurde zu der Farbe nach 3-fachem Walzenmahlen hinzugegeben, um der Farbe eine geeignete Viskosität zum Drucken zu verleihen. Beim Graphit handelte es sich um Timrex KS15 (Partikelgröße < 16 µm), von GS Inorganics, Evesham, Worcs. UK.

[0050] Eine weitere Testformulierung enthielt GOD in der Farbe und entsprach folgender Zusammensetzung:

Formulierung der Farbe (III)

Metech 8101-Harz	44,68 %
BSA-Pt/Kohlenstoff	18,42 %
Graphit	9,64 %
BCA/Cyclohexanon	22,94 %
Tween® 20	2,94 %
Glukoseoxidase	1,38 %

Herstellung einer Lösung zur Tropfbeschichtung

[0051] Die Beschichtungslösung basiert auf Wasser und besteht aus einer hohen Konzentration an Puffer, vorzugsweise Phosphat bei pH 8. Es wurde gefunden, dass die Pufferkapazität wichtiger ist als die Ionenstärke. Bei diesem Beispiel enthielt die Lösung Glukoseoxidase und einen Systemstabilisator, in diesem Falle Trehalose.

Pufferenzym	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	385 mM, pH 8	Sigma
Enzym	Glukoseoxidase	4080 U/ml	Biozyme
Stabilisator	Trehalose	1 %	Sigma

Bevorzugte Bereiche

Puffer	300–1000 mM, pH 7–10
Enzym	500–12000 U/ml (1,85–44,4 mg/ml)
Stabilisator	0,5–10 %

[0052] Die Aktivität der Glukoseoxidase betrug etwa 270 Einheiten pro mg an Material (360 Einheiten/mg an Protein, da das Enzym in einem Präparat mit anderen lyophilisierenden und stabilisierenden Agentien zum Einsatz kam).

[0053] Befindet sich das Enzym in der Basisschicht, beispielsweise in einer unter Einsatz der Formulierung der Farbe III hergestellten Basisschicht, dann kann die Lösung zur Tropfenbeschichtung nur den Puffer, gewünschtenfalls zusammen mit dem Stabilisator, enthalten.

Herstellungsverfahren

[0054] Glukoseteststreifen (Biosensoren) wurden unter Einsatz einer Kombination aus Siebdruck- und Tropfenbeschichtungs-Technologien hergestellt. Andere Druck- und/oder Beschichtungstechnologien, die dem Druck- und Beschichtungsfachmann gut bekannt sind, können ebenfalls Anwendung finden.

[0055] Ein Basissubstrat **2** (man vergleiche [Fig. 1](#)) wurde aus einem Polyester (Valox™) hergestellt. Leiterbahnen **4** wurden auf das Substrat **2** als eine leitfähige Kohlenstoffpaste, Produktcode C80130D1, Gwent Electronic Materials, UK, gedruckt. Der Zweck dieser Farbe besteht darin, eine Leiterbahn zwischen dem Interface der Messvorrichtung und den Referenz- und Arbeitselektroden zur Verfügung zu stellen. Nach dem Drucken wurde die Farbe 1 h in Gebläselufttrockner bei 130°C getrocknet. Bei der zweiten Farbe, die oben auf den leitenden Kohlenstoff **4** gedruckt wurde, handelte es sich um eine Silber/Silberchlorid-Polymerpaste, Produktcode C61003D7, Gwent Electronic Materials, UK. Diese Farbe **6** wurde nicht auf den Kontaktbereich oder den Arbeitsbereich gedruckt. Diese Farbe **6** bildete die Referenzelektrode **16** des Systems. Es wurde in einem Gebläselufttrockner während eines Zeitraums von 1 min bei 130°C getrocknet.

[0056] Bei der nächsten Schicht handelt es sich um die Platin-Gruppe-Metall-Kohlenstoff-Farbe (Formulierungen der Farben I, II oder III), die als Schicht **8** auf dem leitenden Kohlenstoff **4** in dem Zielbereich gedruckt wurde. Diese Farbe wird 1 min lang bei 90°C in einem Gebläselufttrockner getrocknet, um eine Basisschicht mit einer Dicke von etwa 12µm zu bilden. Eine erste dielektrische Schicht **10** wurde dann gedruckt. Bei der ersten dielektrischen Schicht **10** handelte es sich um MV27, von Apollo, UK. Der Zweck dieser Schicht besteht darin, einen Zielbereich für das Auftragen von Blut zu bilden und das System zu isolieren. Sie wurde bei 90°C 1 min in einem Gebläselufttrockner getrocknet. Eine Ausbreitungsschicht **12**, die aus einem mit einem grenzflächenaktiven Mittel beschichteten Polyestersieb bestand, Saaticare PES 105/52, Saati, Italien oder Petex 07-105/52, Sefar, Schweiz, wurde dann auf den Zielbereich gelegt. Dieser wird dann auf der Elektrode unter Einsatz einer weiteren Schicht **14** von MV27 Dielektrikum versiegelt und getrocknet. Gewünschtenfalls kann die Basisschicht **8** in alternativer Weise nach der ersten dielektrischen Schicht gedruckt werden. Es wird jedoch bevorzugt, die Basisschicht **8** zuerst zu drucken, da das nachträgliche Aufbringen der ersten dielektrischen Schicht **10** einige der Toleranzerfordernisse des Drucks entfernt.

[0057] Die Tropfbeschichtungsschicht wurde dann auf die Elektrode unter Einsatz einer BioDot-Tropfen-Beschichtungs-Vorrichtung aufgetragen.

[0058] Das Volumen der eingesetzten Tropfbeschichtungslösung betrug 1 µl; diese wurde in einem Gebläselufttrockner 1 min bei 50°C getrocknet. Der endgültige Biosensor **20** besaß eine Referenzelektrode **16** und eine Arbeitselektrode **18** innerhalb des Zielbereichs. Die Arbeitselektrode umfasst die Basisschicht **8** auf einer leitenden Kohlenstoffschicht **4** auf dem Basissubstrat **2** und eine Oberschicht einschließlich des Puffers. Das Sieb **12** unterstützt das Ausbreiten bzw. Verbreiten einer Blutprobe, wenn diese auf den Zielbereich aufgetragen wird.

Herstellung eines Vergleichs-Biosensors (Stand der Technik)

[0059] Wie oben beschrieben, wurde eine Farbe (Formulierung der Farbe I) formuliert, jedoch wurde Glukoseoxidase (GOD) anstelle von BSA eingesetzt. Die Farbe wurde wie oben beschrieben bei der Herstellung eines Biosensors (Herstellungsverfahren) eingesetzt, jedoch ohne die Tropfbeschichtungsstufe.

Standard-Testverfahren

[0060] Zu dem Testverfahren gehörte die Herstellung einer Verbindung der Teststreifen mit einem Potentialstaten. Es wurde ein Potential von 350 mV angelegt über die Arbeits- und Referenzelektroden nach Auftragen einer Probe, in diesem Falle einer Probe von Vollblut (whole blood; WB). Das Potential wurde 15 s beibehalten, danach wurde der Strom gemessen. Dieser Strom wird zur Herstellung von Ansprechkurven verwendet. Die Ergebnisse für die Kurven 2 bis 10 wurden unter Einsatz der Formulierung der Farbe I erhalten.

Erläuterung der Figuren

- Vergleich von Glukosekalibrierungen nach alter und neuer Methodik ([Fig. 2](#)).

[0061] Die alte Methodik bezieht sich auf die nicht-vermittelten Vergleichsbiosensoren nach dem Stand der Technik, die keine hohen Pufferkonzentrationen aufwiesen. Wie man sieht, führt eine Zunahme des pH-Wertes

von pH 7,4 innerhalb der Farbe bei niedrigen Pufferkonzentrationen zu einem pH 8 bei einer hohen lokalen Pufferkonzentration mit einer Oberschicht, die auch das Enzym aufweist, zu einer dramatischen Zunahme der Empfindlichkeit.

- Wirkung der Phosphatpufferkonzentration in der Oberschicht auf das Ansprechen ([Fig. 3](#)).

[0062] Aus dieser Kurve ist ersichtlich, dass die Empfindlichkeit des Ansprechens auf Glukose und auch auf Wasserstoffperoxid durch die Konzentration des Phosphatpuffers dramatisch zunimmt. Der pH-Wert des Puffers betrug pH 7,4. Diese Kurve zeigt auch den Wirksamkeitsunterschied zwischen der Wasserstoffperoxid-Bestimmung und der Glukosebestimmung. Wasserstoffperoxid wird direkt an der Platinoberfläche oxidiert, während Glukose mit Glukoseoxidase reagieren und Wasserstoffperoxid produzieren muss. Befand sich die Glukoseoxidase in der Oberschicht, dann ging sie beim Auftragen der in die Hauptmasse diffundierenden Probe sehr schnell in Lösung. Durch Glukoseoxidation hergestelltes Wasserstoffperoxid verfügte über eine variable Diffusionsdistanz zu der Elektrodenoberfläche, während dies beim in die Probe aufgetragenen Wasserstoffperoxid nicht der Fall war. Die ideale Situation wäre eine solche, bei der Glukoseoxidase an der Elektrodenoberfläche immobilisiert wäre, wobei außerdem eine hohe Ionenstärke und Stabilisierungsmittel in der Oberschicht vorhanden wären.

- Wirkung des pH-Wertes auf das Glukoseansprechen ([Fig. 4](#)).

[0063] Diese Probe zeigt, dass das Glukoseansprechen mit dem pH zunahm. Die Pufferkonzentration bei jedem pH wurde bei 350 mM gehalten. Dies kann nicht auf der erhöhten Aktivität von der Glukoseoxidase beruhen, da sie ihr pH-Maximum bei pH 5,6 besitzt; bei pH 10 sollte die Glukoseoxidase größtenteils inhibiert sein. Ein möglicher Mechanismus für das gesteigerte, mit Glukose im Zusammenhang stehende Ansprechen besteht darin, dass die Glukose direkt an der Elektrodenoberfläche oxidiert wird. Es ist bekannt, dass Glukose an einer Platinoberfläche oxidiert wird, wobei jedoch bei normalen Bedingungen dieses Ansprechen im Vergleich zu der durch Enzym erleichterten Glukoseoxidation sehr gering sein sollte. Es kann sein, dass eine hohe Pufferkonzentration gekoppelt mit einem hohen pH-Wert zu einer sehr großen Verstärkung bezüglich der direkten Oxidation der Glukose führt, obwohl dies unwahrscheinlich ist. Falls das Wasserstoffperoxid-Ansprechen mit dem pH zunehmen würde, könnte dies in alternativer Weise einen Teil des Abfalls bezüglich des Glukoseoxidase-Ansprechens kompensieren.

- Wirkung des pH-Wertes auf das Wasserstoffperoxid-Ansprechen ([Fig. 5](#), [Fig. 6](#)).

[0064] Diese Kurve zeigt eine geringe Veränderung hinsichtlich des Wasserstoffperoxid-Ansprechens mit dem pH-Wert mit Ausnahme bei niedrigen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen. Die Empfindlichkeit auf Wasserstoffperoxid ist um einen Faktor 5 höher als dasjenige auf Glukose; daher sollte das Augenmerk mehr auf niedrigere Wasserstoffperoxid-Konzentrationen gerichtet werden. Ein erhöhter pH-Wert resultiert in einer Ionisierung der aktiven Gruppen auf der Kohlenstoff-Oberfläche. Diese erhöht die Nicht-Faradayische Komponente des elektrochemischen Ansprechens, was zu einem erhöhten Intercept führt.

- Wirkung des Puffertyps auf das Glukoseansprechen ([Fig. 7](#), [Fig. 8](#)).

[0065] Unterschiedliche Puffer wurden bewertet. Alle Puffer wurden auf der Elektrodenoberfläche tropfbeschichtet und getrocknet. Alle Puffer waren bei pH 7,4 und 350 mM. Die Puffer konnten in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden.

Gruppe A – bis-tris – Dieser Puffer führte zu einer hohen Aufnahmefähigkeit bzw. Intercept und einer verhältnismäßig geringen Empfindlichkeit auf Glukose.

Gruppe B – Phosphat, MOPS, MES, HEPES, ACA, ACES, TES und Tricine – Diese Puffer ergaben in etwa ähnliche Ansprechen, niedrige Intercepts und eine vernünftige Empfindlichkeit auf Glukose.

Gruppe C – Borat, Tris – Diese Puffer führten zu niedrigen Verschiebungen sowie jedoch zu einer niedrigen Glukose-Empfindlichkeit.

- Wirkung des Puffertyps auf das Wasserstoffperoxid-Ansprechen ([Fig. 9](#), [Fig. 10](#)).

[0066] Es wurden Elektroden eingesetzt, die denjenigen ähnelten, welche für die Bestimmung der Wirkung des Puffertyps auf das Glukose-Ansprechen eingesetzt wurden. Die Puffertypen konnten in drei Gruppen unterteilt werden.

Gruppe A – bis-tris – Dieser Puffer führte zu einer hohen Aufnahmefähigkeit bzw. Intercept sowie jedoch zu einer vernünftigen Empfindlichkeit oberhalb 4 mM.

Gruppe B – Phosphat, MOPS, HEPES, ACES, TES, ACA – Alle ergaben ähnliche Ansprechen, eine niedrigen Aufnahmefähigkeit bzw. Intercept und eine vernünftige Empfindlichkeit auf Wasserstoffperoxid.

Gruppe C – Borat, Tris und Tricin – Niedrige Aufnahmefähigkeit bzw. Intercepts und reduzierte Empfindlichkeit auf Wasserstoffperoxid.

[0067] Ähnliche Trends existieren, wenn die Glukose- und Wasserstoffperoxid-Empfindlichkeit mit dem Puffertyp verglichen werden. Dies würde implizieren, dass der Puffer hauptsächlich auf die Wasserstoffperoxid-Oxidation einwirkt. Der bis-tris-Puffer ist elektrochemisch aktiv, was zu einem hohen Hintergrundstrom bei null Wasserstoffperoxid führte. Die Borat-Tris- und Tricin-Puffer besaßen pKa-Werte größer als 8; sie würden somit über eine niedrige Pufferkapazität bei pH 7,4 verfügen. Alle die anderen Puffer besaßen pKa-Werte in der Nähe 7,4.

[0068] In den [Fig. 11](#) bis [Fig. 18](#) sind Ergebnisse für Biosensoren dargestellt, bei denen die Basisschicht unter Verwendung der Formulierung Farbe II mit verschiedenen Tropfbeschichtungsformulierungen zur Herstellung der Oberschicht gedruckt wurde, sofern nichts anderes angegeben ist. Die Pufferkonzentration in der Tropfbeschichtungsformulierung ist ausgedrückt als mmol l^{-1} (mM), und die Konzentration von GOD-Enzym ist ausgedrückt als mg/ml. Jede Tropfbeschichtungslösung enthielt auch 1 % Trehalose.

[0069] [Fig. 11](#) zeigt die Glukosekalibrierungen für venöses Blut für Proben mit Phosphatpuffer/GOD-Verhältnissen (mol/kg) von etwa 60. Diese Ergebnisse zeigen, dass für ein feststehendes Puffer/Enzym-Verhältnis oberhalb einer dreifachen Konzentration des Produktes im Wesentlichen zu demselben Ansprechen führte. Eine bevorzugte minimale Pufferkonzentration betrug etwa 300 mM.

[0070] [Fig. 12](#) zeigt die Glukosekalibrierung für Blut von Biosensoren, die aus Formulierungen mit unterschiedlichen GOD-Konzentrationen und einer festgelegten Phosphatpuffer-Konzentration von 385 mM hergestellt wurden. [Fig. 13](#) ist ein Teil der Kurve der [Fig. 12](#), die erweitert wurde, um die Ergebnisse für eine niedrige Glukosekonzentration klarer darzustellen. Die Kurven machen klar, dass eine Zunahme des Verhältnisses von Puffer zu Enzym (Abnehmen des Enzyms) die Empfindlichkeit bei kritisch niedrigen Blutglukose-Konzentrationen verbessert. Oberhalb des minimalen Ansprechwertes kann die Einstellung des Verhältnisses von Puffer zu Enzym dazu eingesetzt werden, das Profil des Ansprechens auf den Biosensor bezüglich der Blutglukose zu „tune“. Um eine bessere Linearität des Ansprechens zu erhalten, liegt ein bevorzugtes Puffer-Enzym-Verhältnis (mol/kg) im Bereich von 30–80, insbesondere von 40–60.

[0071] In der [Fig. 14](#) sind die Ergebnisse dargestellt, die für unterschiedliche Farben und Tropfbeschichtungsformulierungen erhalten wurden. Die mit BSA-Farbe markierten Ergebnisse beziehen sich auf eine Basis-Beschichtungsfarbe, die der Formulierung der Farbe II entsprach. Die mit GOD-Farbe bezeichneten Ergebnisse wurden für eine Basisbeschichtungsfarbe erhalten, die in Übereinstimmung mit der Formulierung für die Farbe III erhalten wurde. Es sind die Ergebnisse gezeigt, die erhalten wurden für Tropfbeschichtungslösungen, welche gemäß der weiter oben angegebenen Formulierung hergestellt wurden, und auch für eine ähnliche Lösung ohne GOD und für einen Fall, bei dem keine Tropfbeschichtung aufgetragen wurde. In letzterem Fall ergab sich eine geringe Empfindlichkeit, in den anderen Fällen konnten jedoch die Glukoseniveaus bei allen praktischen Konzentrationen bestimmt werden. Die besten Ergebnisse wurden erhalten, wenn sowohl Enzym als auch Puffer in der Oberschicht vorhanden waren.

[0072] In [Fig. 15](#) sind Kalibrierungskurven für einen Biosensor ohne die Siebschicht **12** gezeigt. Wird die Siebschicht **12** weggelassen, dann ist es möglich, niedrige Tropfbeschichtungsvolumen zur Anwendung zu bringen, da das aufgetragene Fluid nicht von dem Arbeitsbereich durch das Sieb weggezogen wird. Allerdings muss der Tropfen präzise aufgetragen werden. Die Ergebnisse sind für 2×125 nl Tropfen an Phosphat in der Tropfbeschichtungslösung gezeigt, wobei Basisschichten unter Verwendung der GOD-Farbe (Formulierung der Farbe III) gebildet wurden. Höhere Niveaus an Puffer führten zu einer besseren Linearität. Die Kurven in der [Fig. 16](#) zeigen die Ergebnisse von Biosensoren, welche über Basisschichten, die unter Einsatz der Formulierung der Farbe II, und Oberschichten, die unter Einsatz von Tropfbeschichtungslösungen mit GOD und Puffer, erhalten wurde. Auch in diesem Fall führten höhere Niveaus an Puffer zu einer besseren Linearität.

[0073] Die [Fig. 17](#) und [Fig. 18](#) zeigen die Ergebnisse von Tropfbeschichtungslösungen von GOD- und ADA-Puffer (N-(2-Acetoamido-2-iminodiessigsäure), die in Form von Kurven dargestellt sind. Die Schwellenpuffer-Konzentration betrug etwa 200 mM, und das bevorzugte Verhältnis (mol/kg) Puffer/GOD betrug etwa 40–100, insbesondere etwa 60–80.

Patentansprüche

1. Nicht-vermittelte Enzymelektrode zur amperometrischen Anzeige der katalytischen Aktivität eines Oxidoreductase-Enzyms in Anwesenheit eines Fluids, das eine Substanz enthält, auf welche das Enzym einwirkt, und eines elektrischen Potentials an der Elektrode, wobei die Elektrode ein Basissubstrat (**2**) umfasst, auf dem bereitgestellt wird:

- a) eine elektrisch leitende Basisschicht (**8**), die fein verteiltes, durch ein Harz miteinander verbundenes Metall oder Oxid der Platingruppe umfasst,
- b) eine Oberschicht auf der Basisschicht und
- c) eine katalytisch wirksame Menge des Oxidoreductase-Enzyms in mindestens der Basisschicht und/oder der Oberschicht,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Oberschicht einen Puffer umfasst und in dem Fluid löslich ist.

2. Enzymelektrode nach Anspruch 1, bei der der Puffer ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend: Phosphat, ADA, MOPS, MES, HEPES, ACA und ACES oder Puffern mit einem pKa $7,4 \pm 1$.

3. Enzymelektrode nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, bei der der Puffer einen pH im Bereich von 7 bis 10 besitzt.

4. Enzymelektrode nach Anspruch 3, bei der der Puffer einen pH im Bereich von 7 bis 8,5 besitzt.

5. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, die außerdem einen Systemstabilisator in der Oberschicht, welcher ein Polyol umfasst, das nicht auf das Enzym einwirkt, aufweist.

6. Enzymelektrode nach Anspruch 5, bei der der Systemstabilisator Trehalose ist.

7. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, bei der das Oxidoreductase-Enzym Glukoseoxidase ist.

8. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, bei der die Basisschicht außerdem Partikel aus fein verteiltem Kohlenstoff oder Graphit enthält.

9. Enzymelektrode nach Anspruch 8, bei der die fein verteilten Partikel des Metalls oder Oxids der Platingruppe auf der Oberfläche des fein verteilten Kohlenstoffs oder Graphits adsorbiert sind.

10. Enzymelektrode nach Anspruch 8 oder Anspruch 9, bei der die Partikel aus fein verteiltem Kohlenstoff oder Graphit Kohlenstoff umfassen und bei der die Basisschicht außerdem ein Blockierungsmittel zur Blockierung der aktiven Stellen der Kohlenstoffpartikel beinhaltet.

11. Enzymelektrode nach Anspruch 10, bei der das Blockierungsmittel ein Protein oder ein Polyol umfasst.

12. Enzymelektrode nach Anspruch 11, bei der das Blockierungsmittel bovines Serumalbumin (BSA) oder Trehalose ist.

13. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, bei der das Oxidoreductase-Enzym im Wesentlichen in der Oberschicht lokalisiert ist.

14. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, die außerdem eine Ausbreitungsschicht aufweist, welche das Ausbreiten des Fluids unterstützt.

15. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, bei der das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 30 bis 80 mol/kg liegt.

16. Enzymelektrode nach Anspruch 15, bei der das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 40 bis 60 mol/kg liegt.

17. Enzymelektrode nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, bei der das Fluid Vollblut umfasst.

18. Nicht-vermittelter Biosensor (**20**) zur amperometrischen Anzeige der katalytischen Aktivität eines Oxi-

doxoreductase-Enzyms in Anwesenheit eines Fluids, das eine Substanz enthält, auf welche das Enzym einwirkt, wobei der Sensor umfasst:

- a) ein Basissubstrat (2),
 - b) eine Arbeitselektrode (18) und eine Referenzelektrode (16) auf dem Basissubstrat,
 - c) Leiterbahnen (4), die mit den Elektroden verbunden sind, um elektrische Verbindungen mit einer Untersuchungsvorrichtung herzustellen,
- wobei die Arbeitselektrode beinhaltet:
- d) eine elektrisch leitende Basisschicht (8), die fein verteilt ist und durch ein Harz zusammengebundenes Metall oder Oxid der Platingruppe aufweist,
 - e) eine Oberschicht auf der Basisschicht, wobei die Oberschicht einen Puffer enthält und in dem Fluid löslich ist, und
 - f) eine katalytisch wirksame Menge des Oxidoreductase-Enzyms in mindestens der Basisschicht und/oder der Oberschicht.

19. Biosensor nach Anspruch 18, bei dem der Puffer ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Phosphat, ADA, MOPS, MES, HEPES, ACA und ACES.

20. Biosensor nach Anspruch 18 oder 19, bei dem der Puffer einen pH im Bereich von 7 bis 10 besitzt.

21. Biosensor nach Anspruch 20, bei dem der Puffer einen pH im Bereich von 7 bis 8,5 besitzt.

22. Biosensor nach einem der Ansprüche 18 bis 21, der außerdem einen Systemstabilisator in der Oberschicht enthält, welcher ein Polyol umfasst, auf das das Enzym nicht einwirkt.

23. Biosensor nach Anspruch 22, bei dem der Systemstabilisator Trehalose ist.

24. Biosensor nach einem der Ansprüche 18 bis 23, bei dem das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 30 bis 80 mol/kg liegt.

25. Biosensor nach Anspruch 24, bei dem das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 40 bis 60 mol/kg liegt.

26. Biosensor nach einem der Ansprüche 18 bis 25, bei dem die Basisschicht auch Partikel von fein verteiltem Kohlenstoff oder Graphit enthält.

27. Biosensor nach Anspruch 26, bei dem die fein verteilten Partikel des Metalls oder Oxids der Platingruppe auf der Oberfläche des fein verteilten Kohlenstoffs oder Graphits adsorbiert sind.

28. Biosensor nach einem der Ansprüche 18 bis 27, bei dem das Fluid Vollblut umfasst.

29. Verfahren zur Herstellung eines nicht-vermittelten Biosensors zur amperometrischen Anzeige der katalytischen Aktivität eines Oxidoreductase-Enzyms in Anwesenheit eines Fluids, das eine Substanz enthält, auf welche das Enzym einwirkt, wobei das Verfahren folgende Stufen umfasst:

- a) es wird ein Basissubstrat mit einer Arbeitselektrode und einer Referenzelektrode darauf sowie Leiterbahnen, die mit der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode verbunden sind, zur Herstellung von elektrischen Verbindungen mit einer Überprüfungsvorrichtung eingesetzt,
- b) auf die Arbeitselektrode wird eine Farbe gedruckt, die fein verteiltes Metall oder Oxid der Platingruppe und einen Harzbinder enthält,
- c) das Trocknen der gedruckten Farbe unter Herstellung einer elektrisch leitenden Basisschicht, welche das durch das Harz zusammengebundene Metall oder Oxid der Platingruppe aufweist, wird hervorgerufen oder erlaubt, und
- d) eine Oberschicht auf der Basisschicht wird hergestellt, indem die Basisschicht beschichtet wird mit einem Beschichtungsmedium, das einen Puffer umfasst oder enthält, wobei die Oberschicht in dem Fluid löslich ist, wobei
- e) eine katalytisch aktive Menge des Oxidoreductase-Enzyms in mindestens der gedruckten Farbe und/oder dem Beschichtungsmedium bereit gestellt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, bei dem das Beschichtungsmedium ein Beschichtungsfluid darstellt, das den Puffer enthält, und bei dem das Verfahren außerdem die Trocknung des Beschichtungsfluids und der Bildung einer Oberschicht auf der Basisschicht hervorruft oder erlaubt.

31. Verfahren nach Anspruch 30, bei dem das Beschichtungsfluid durch Tropfbeschichtung aufgetragen wird.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder Anspruch 31, das außerdem die Stufe des Auftragens einer Ausbreitungsschicht auf der Basisschicht vor dem Auftragen des Beschichtungsfluids beinhaltet.
33. Verfahren nach Anspruch 32, bei dem die Stufe des Auftragens einer Ausbreitungsschicht das Auftragen eines mit einem grenzflächenaktiven Mittel beschichteten Polyesternetzes auf die Basisschicht umfasst.
34. Verfahren nach Anspruch 32, das außerdem die Stufe des Auftragens einer ersten dielektrischen Schicht vor dem Auftragen der Ausbreitungsschicht umfasst, wobei die erste dielektrische Schicht um die Referenzelektrode und die Arbeitselektrode aufgetragen wird, um eine Zielzone zu definieren, auf welche das Fluid aufgetragen wird, das eine Substanz enthält, welche auf das Enzym einwirkt.
35. Verfahren nach Anspruch 34, das außerdem die Stufe des Auftragens einer zweiten dielektrischen Schicht um die Zielzone umfasst, um die Ausbreitungsschicht an Ort und Stelle zu sichern.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 35, bei dem das Enzym in dem Beschichtungsfluid bereit gestellt wird.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 35, bei dem die Konzentration des Puffers in dem Beschichtungsfluid im Bereich von 300 mmol/l bis 1 mol/l beträgt.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 36, bei dem das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 30 bis 80 mol/kg liegt.
39. Verfahren nach Anspruch 38, bei dem das Verhältnis von Puffer zu Enzym im Bereich von 40 bis 60 mol/kg liegt.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 38, bei dem der Puffer Phosphat oder ADA umfasst.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 40, bei dem das fein verteilte Metall oder Oxid der Platingruppe in der Farbe auf der Oberfläche der Partikel aus fein verteiltem Kohlenstoff oder Graphit adsorbiert ist.
42. Verfahren nach Anspruch 30, bei dem das Beschichtungsfluid einen pH im Bereich von 7 bis 8,5 besitzt.
43. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 29 bis 42, bei dem das Fluid Vollblut umfasst.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

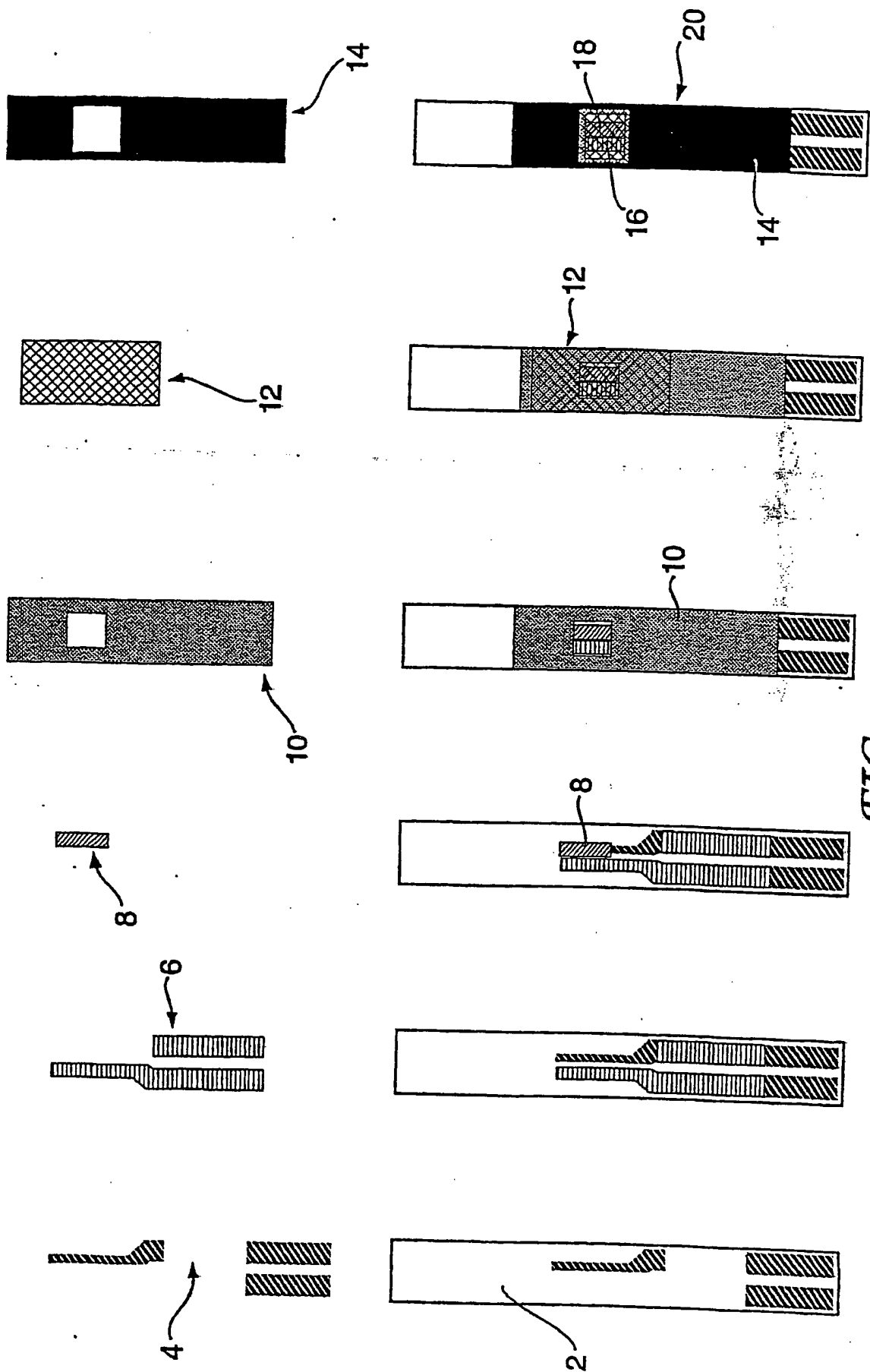


FIG. 1

Vergleich zwischen Glucosekalibrierungen nach neuer und alter Methodik

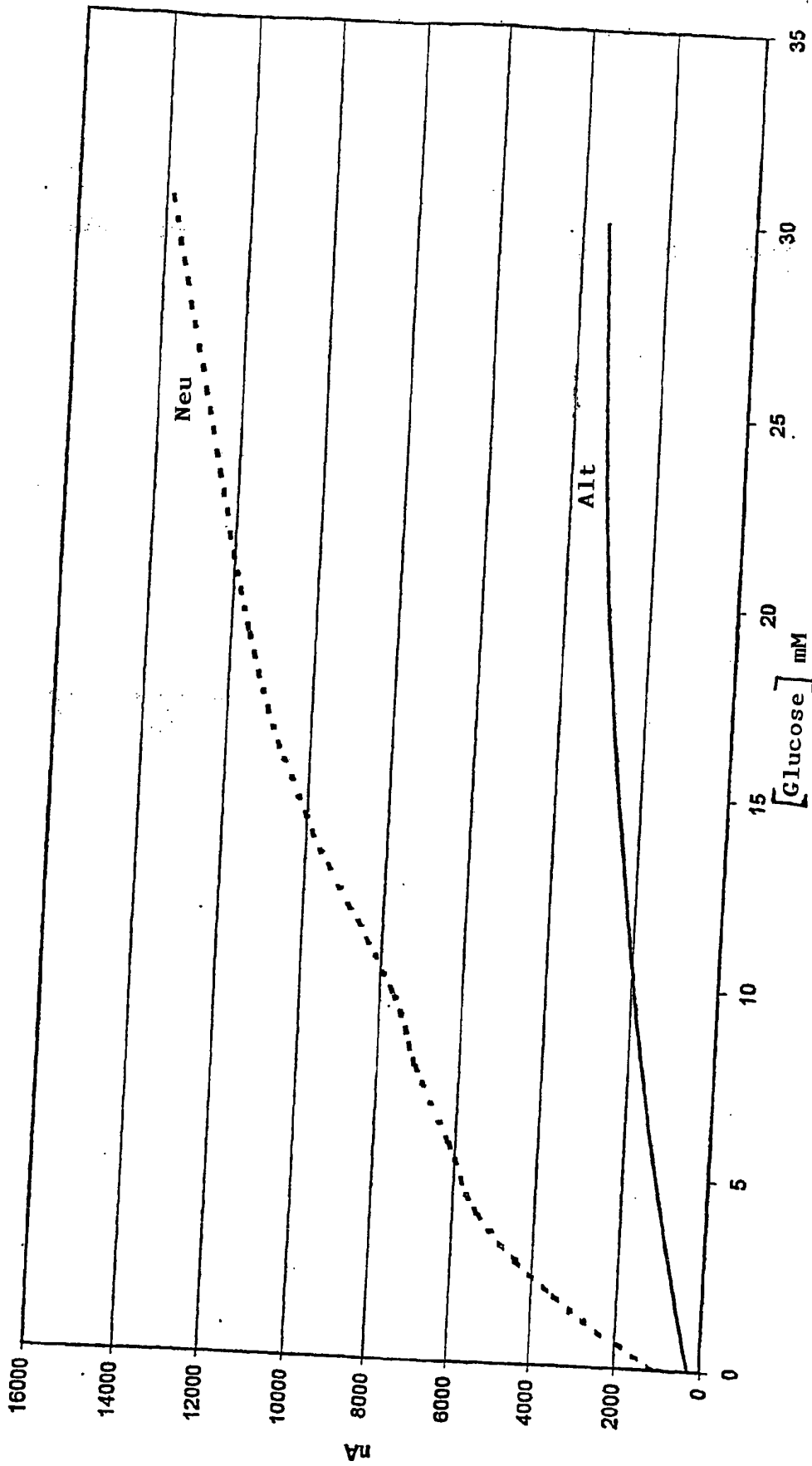


FIG. 2

Wirkung der Phosphatpufferkonzentration in der Oberschicht auf
das Ansprechen

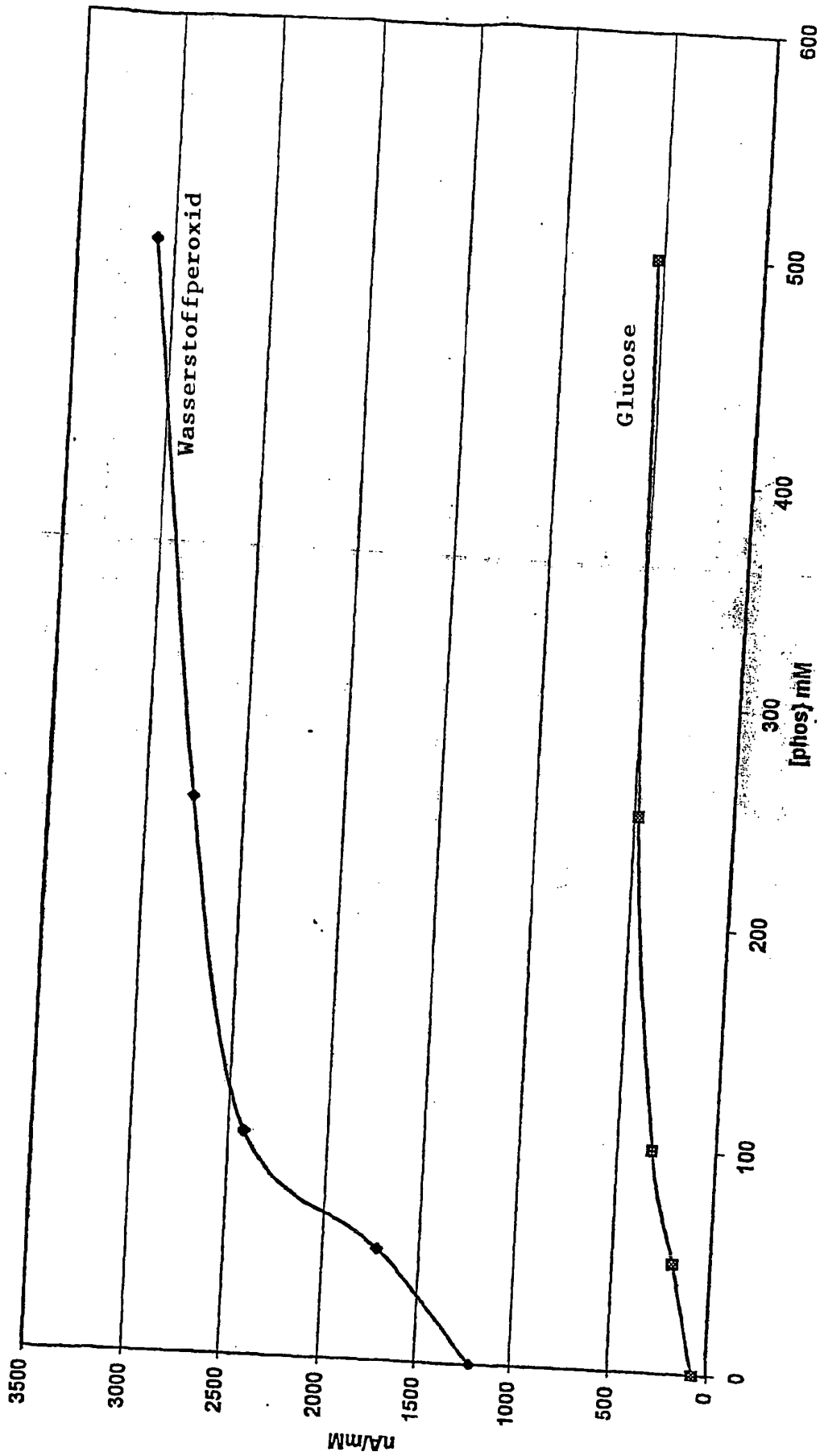


FIG. 3

Wirkung des pH-Wertes auf das Glucoseansprechen

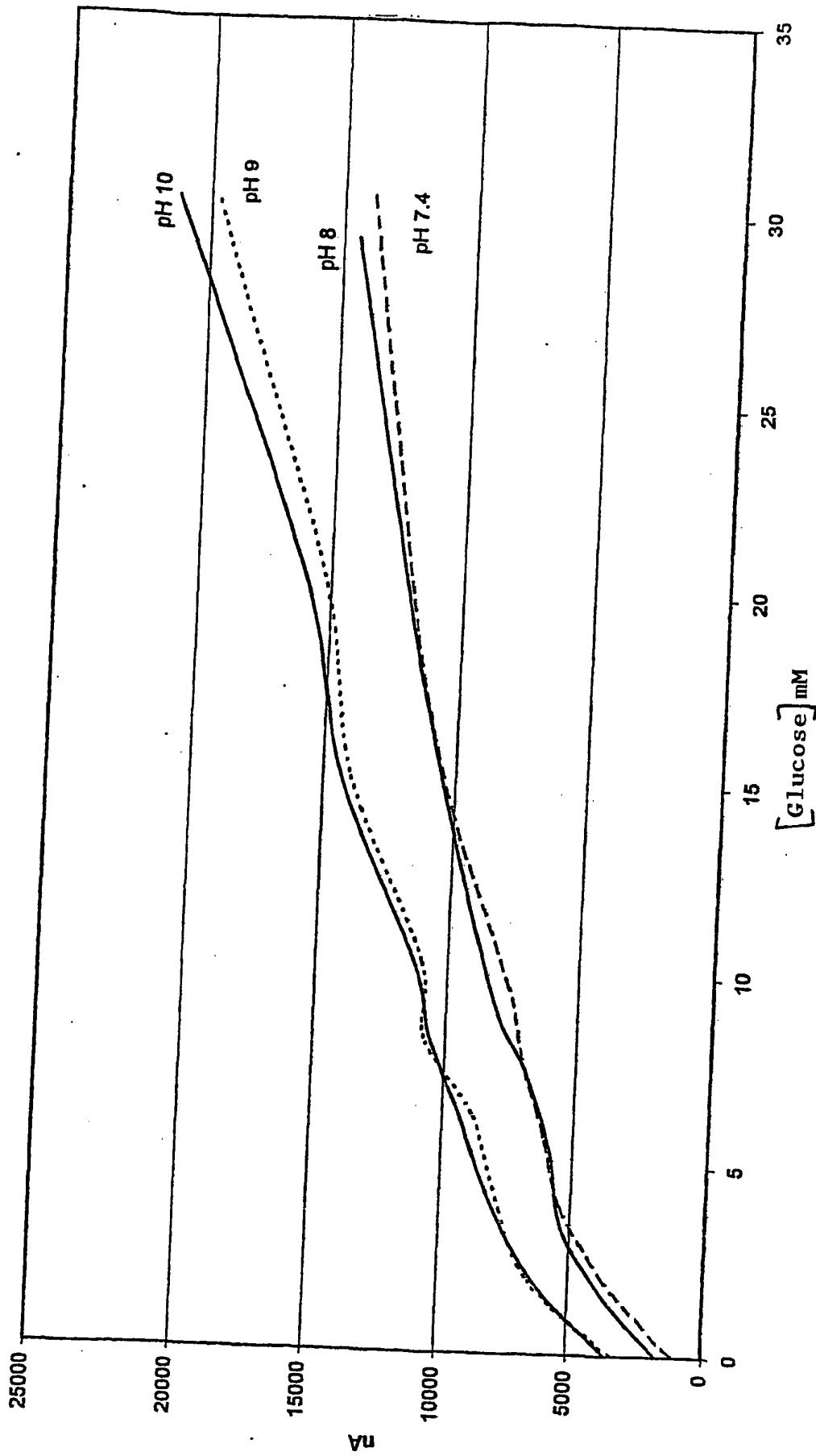


FIG. 4

Wirkung des pH auf das Wasserstoffperoxidansprechen

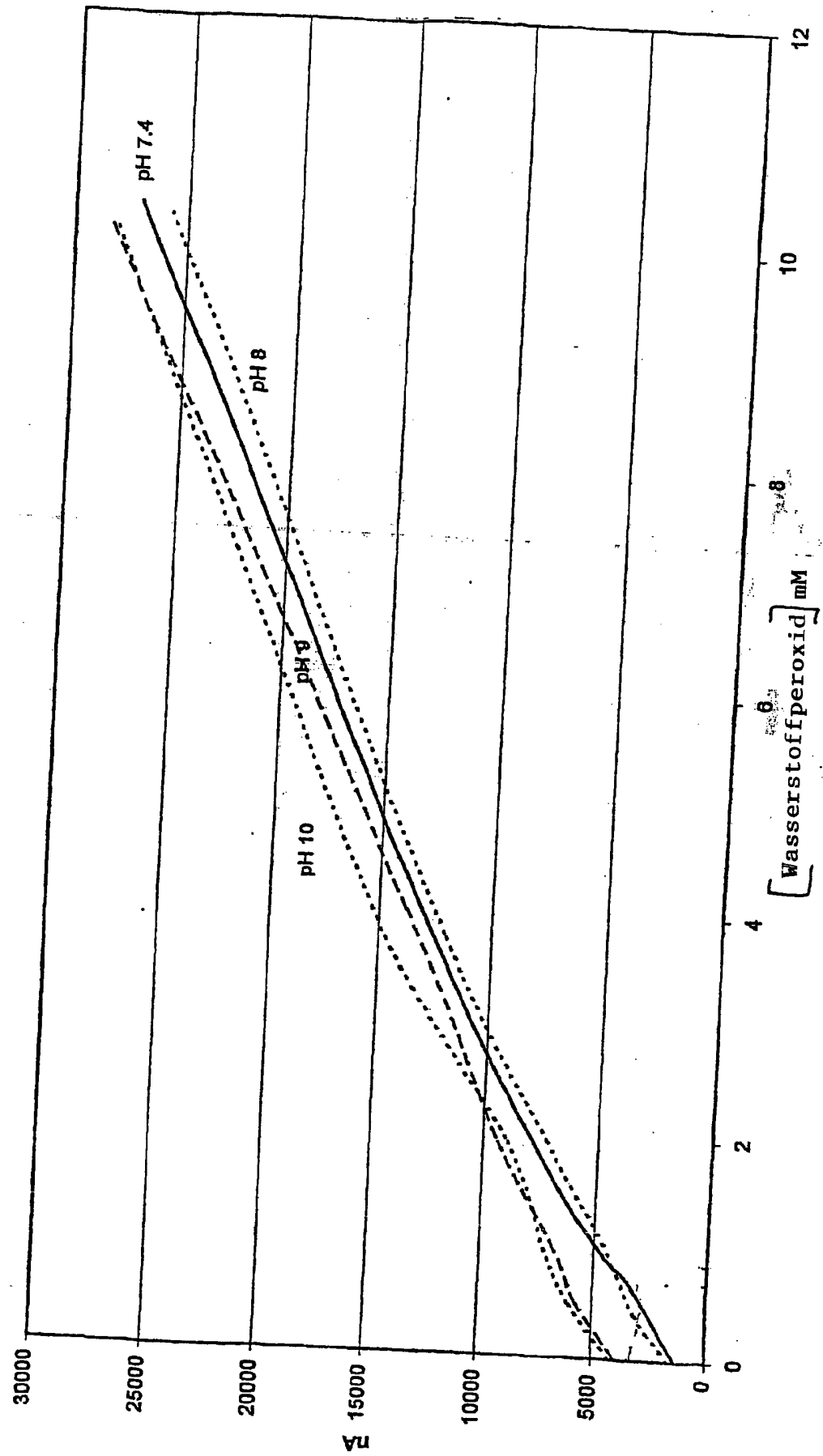


FIG. 5

pH-Wirkung auf niedriges Wasserstoffperoxidansprechen

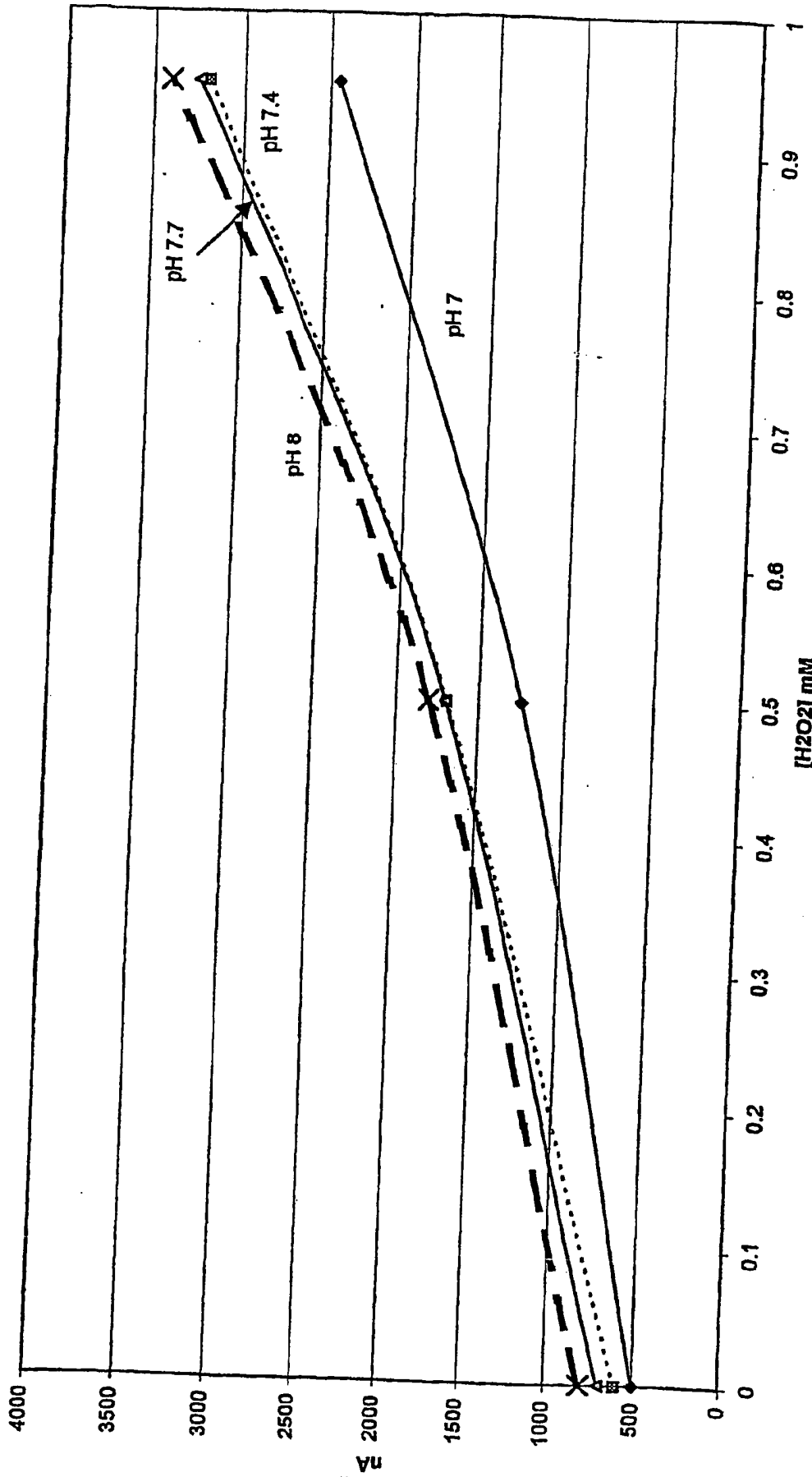


FIG. 6

Wirkung des Puffertyps auf das Glucoseansprechen

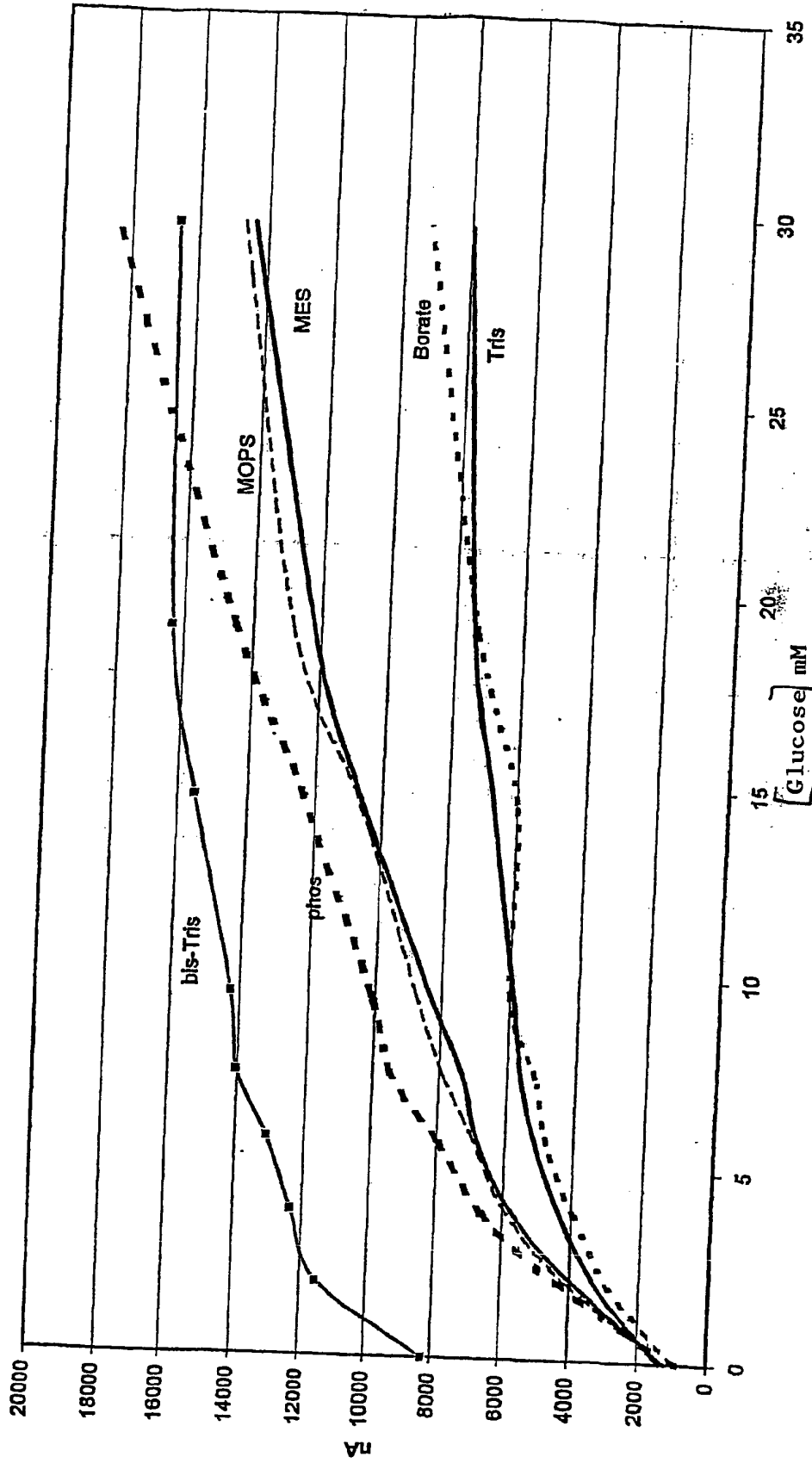


FIG. 7

Wirkung des Puffertyps auf das Glucoseansprechen

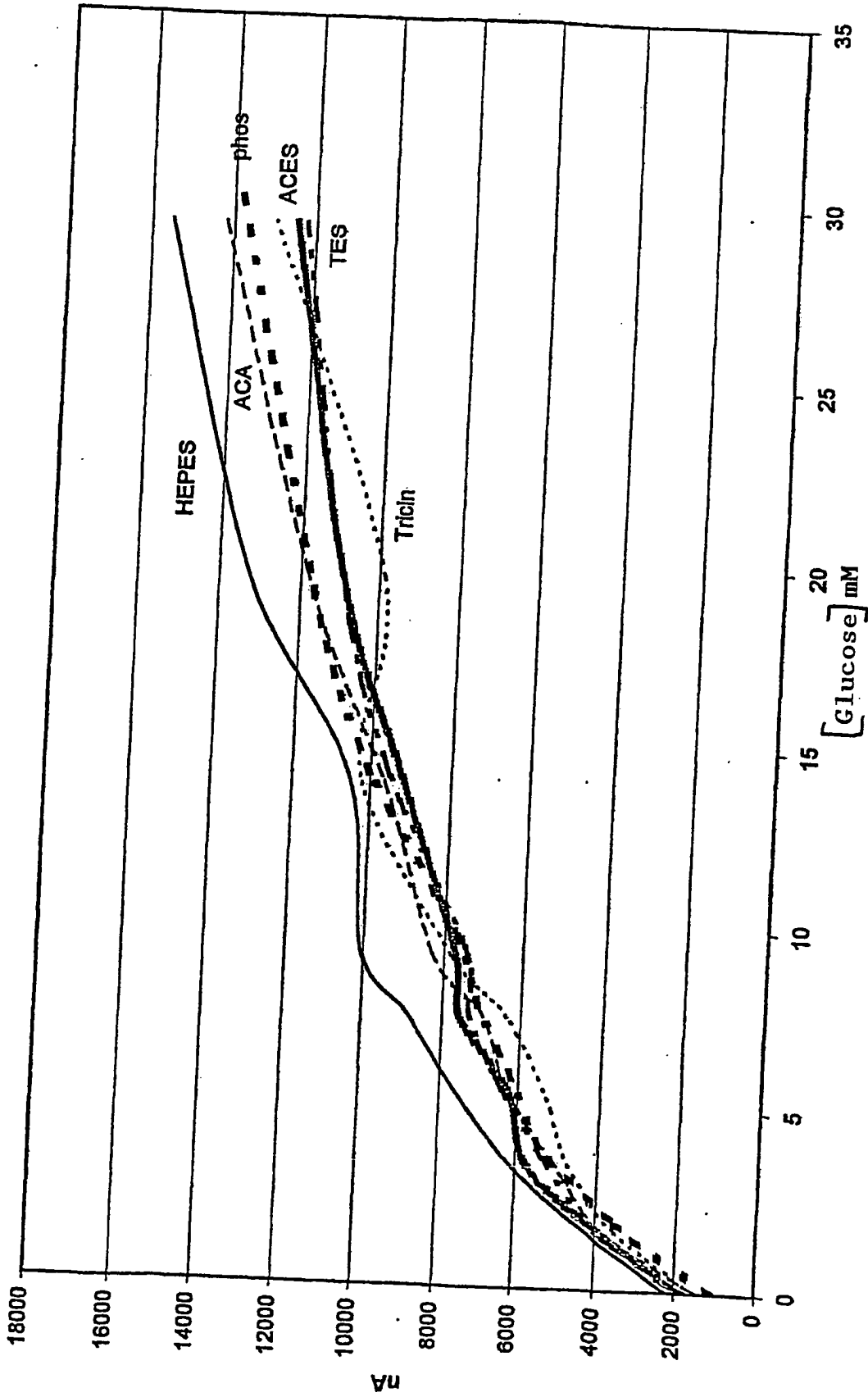


FIG. 8 :

Wirkung des Puffertyps auf das H_2O_2 -Ansprechen

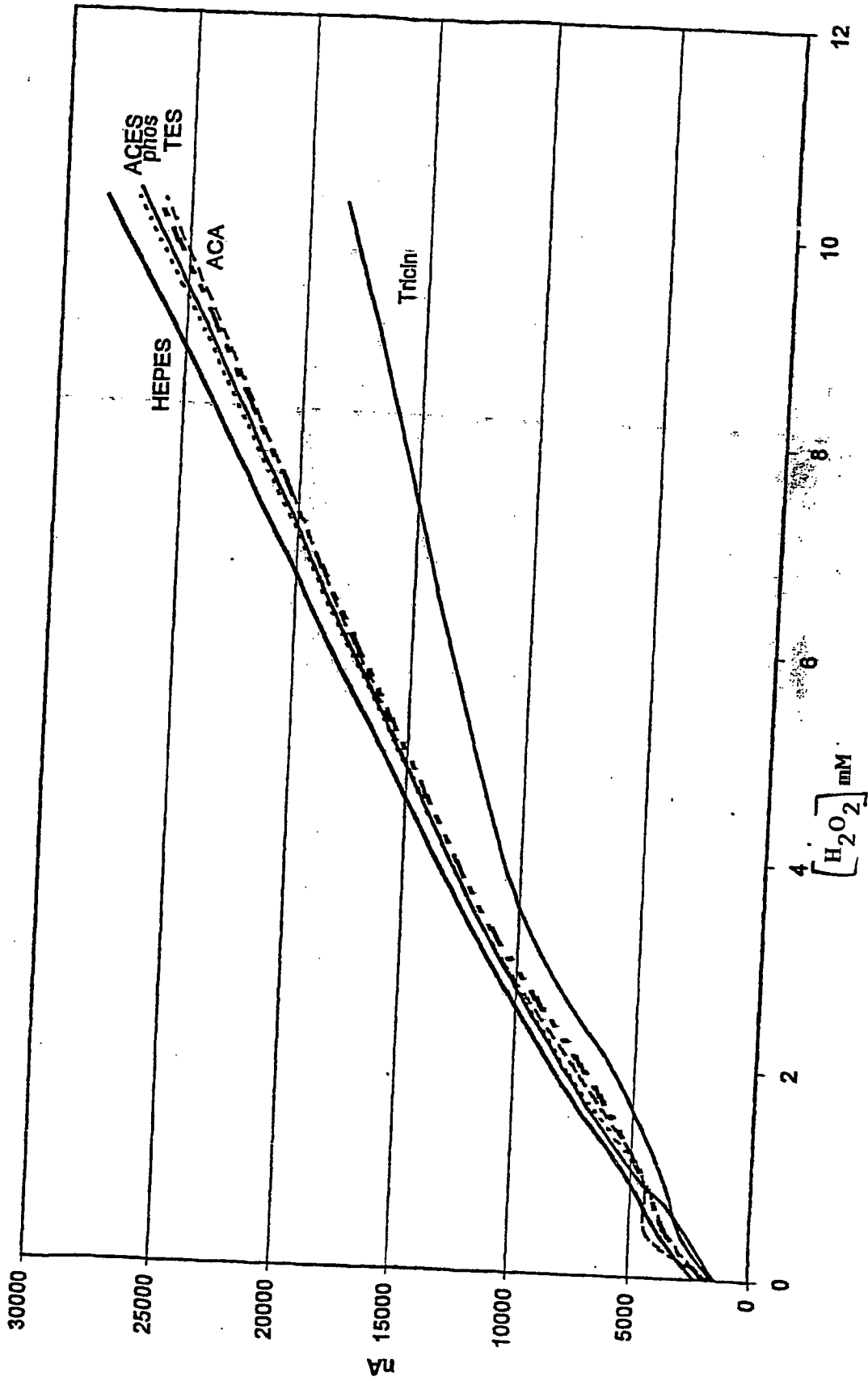


FIG. 9

Wirkung des Puffertyps auf das H_2O_2 -Ansprechen

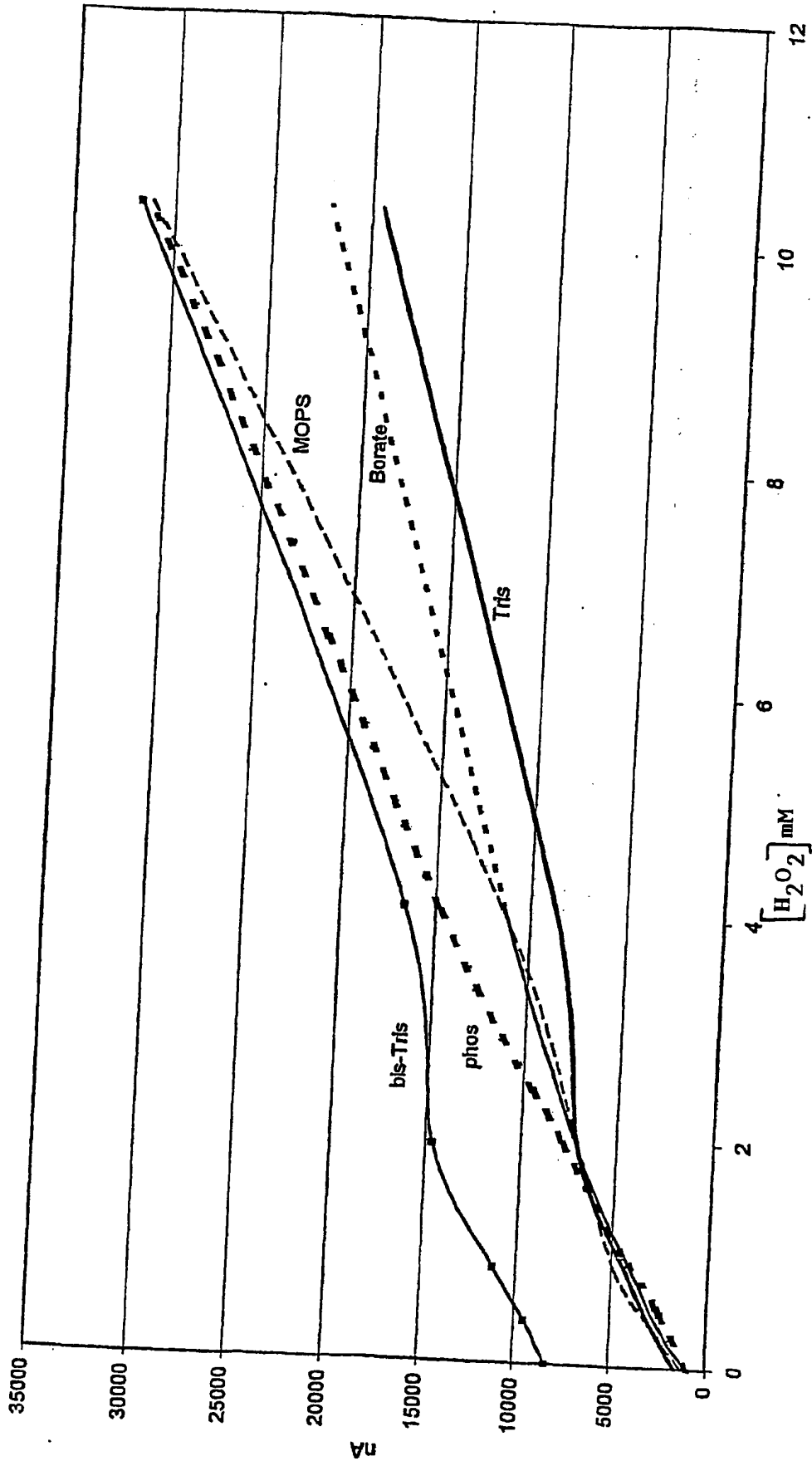


FIG. 10

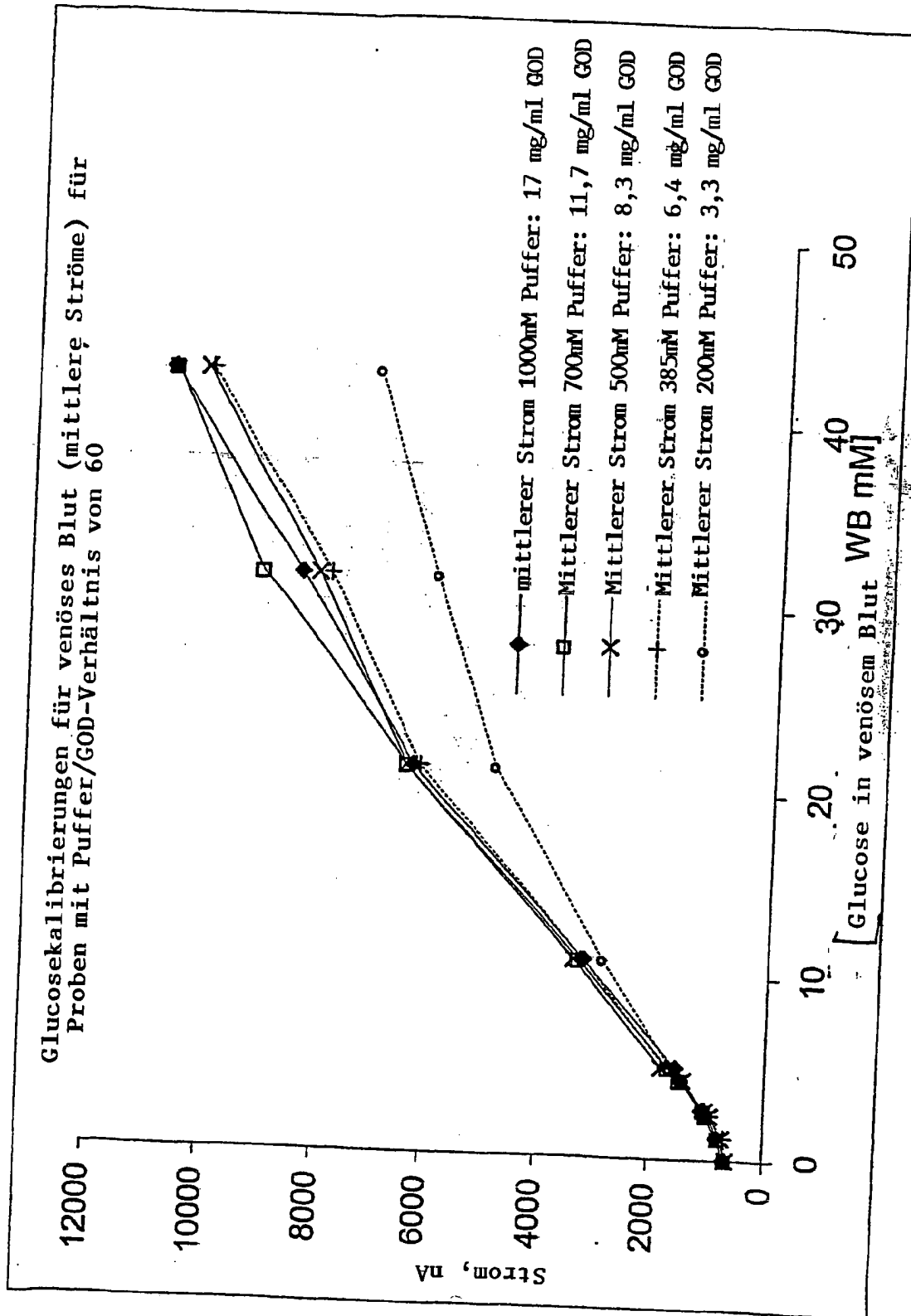


FIG. 11

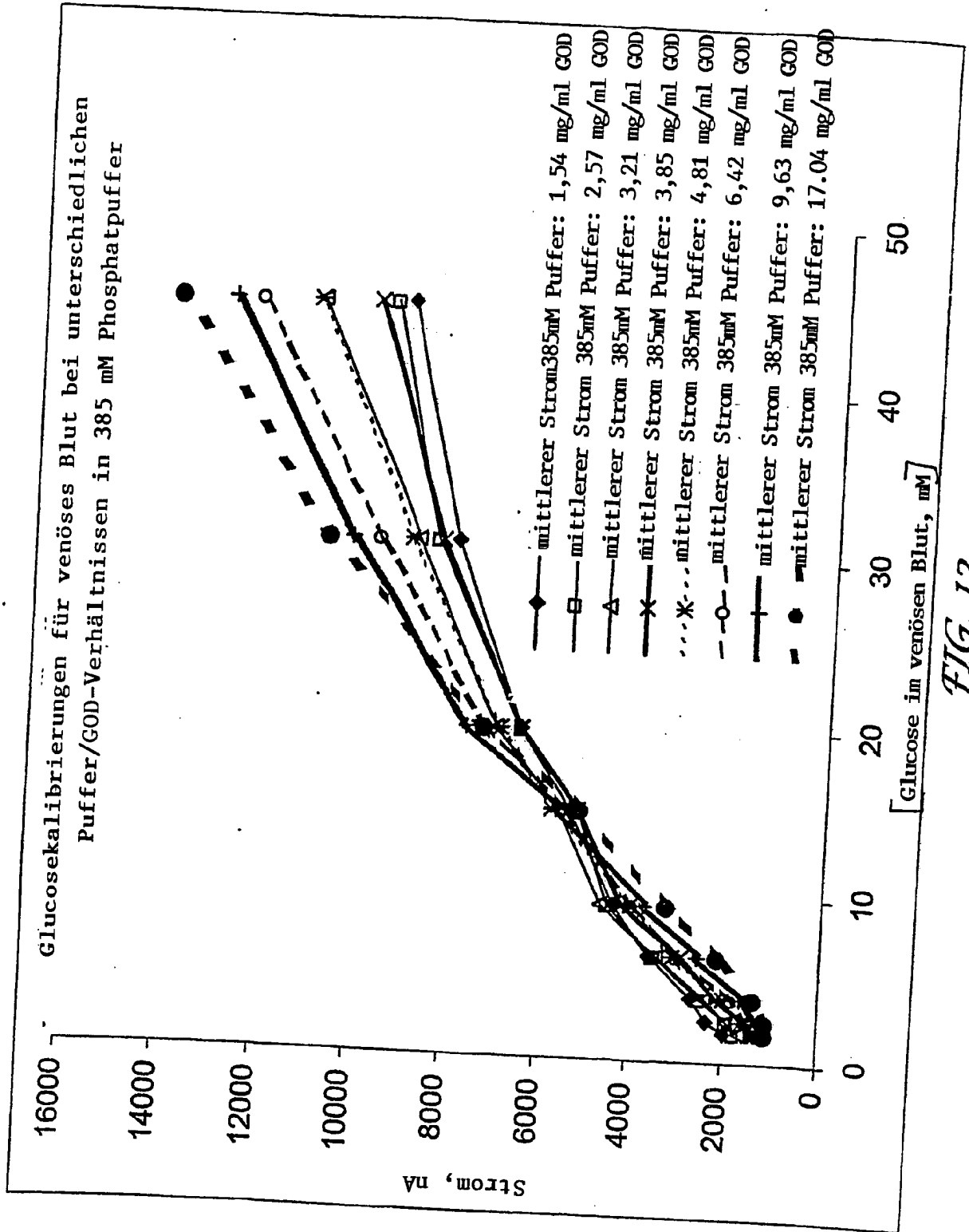


FIG. 12

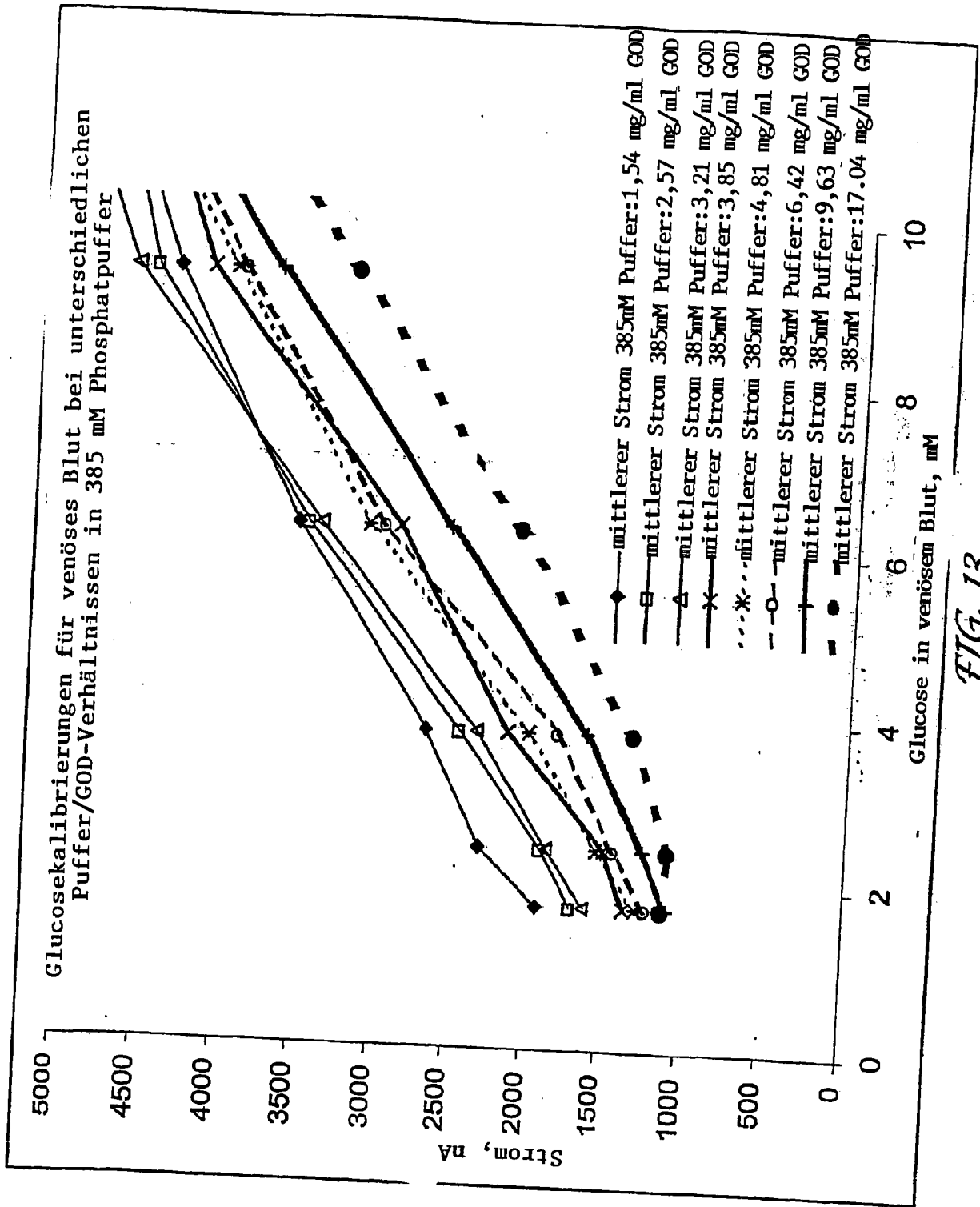


FIG. 13

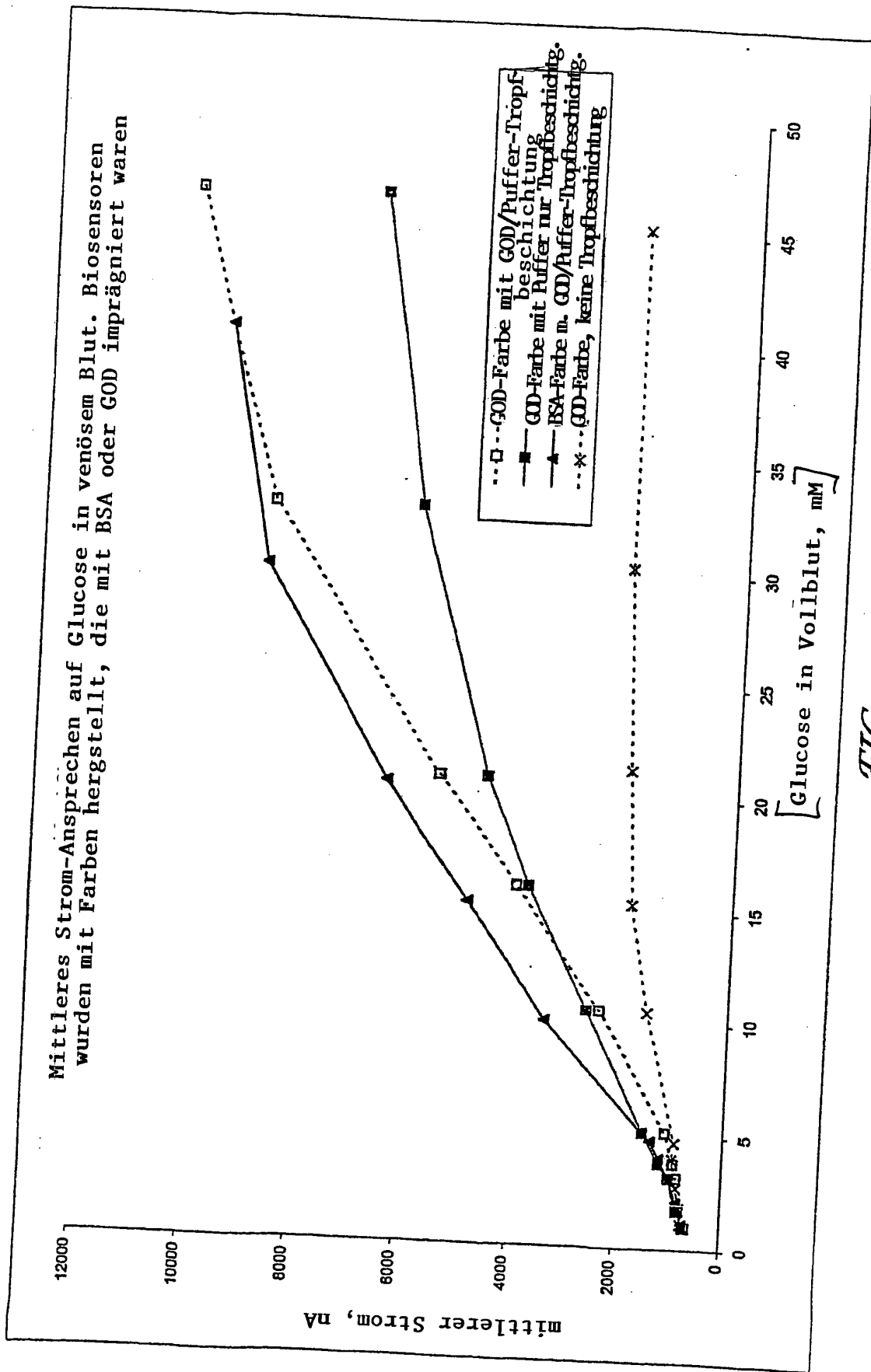


FIG. 14

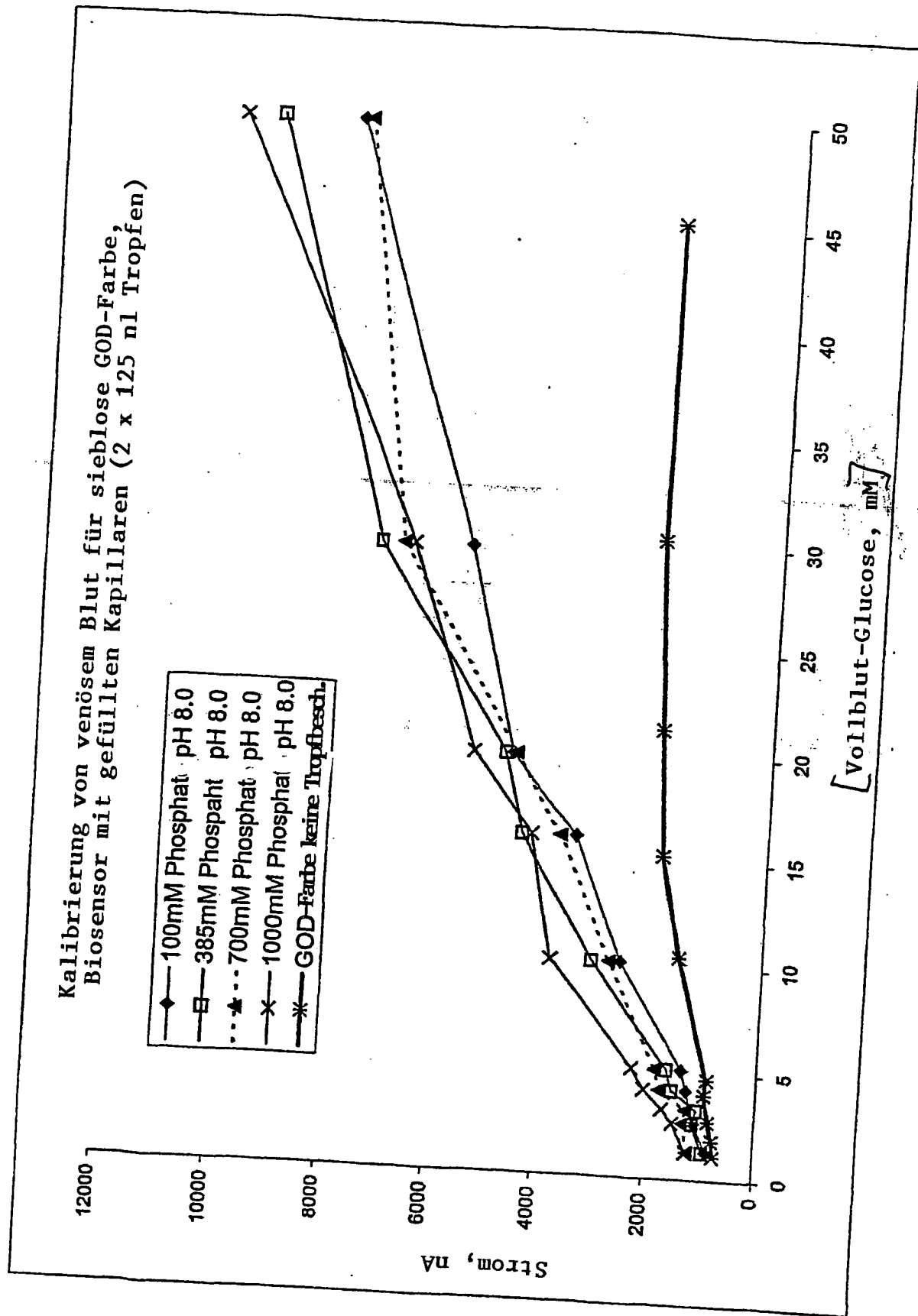


FIG. 15

Mittleres Strom-Ansprechen auf Glucose in venösem Blut. BSA-Farbe
 sieblos, Biosensor mit gefüllten Kapillaren, Tropfbeschichtung
 mit GOD
 Phosphatlösung

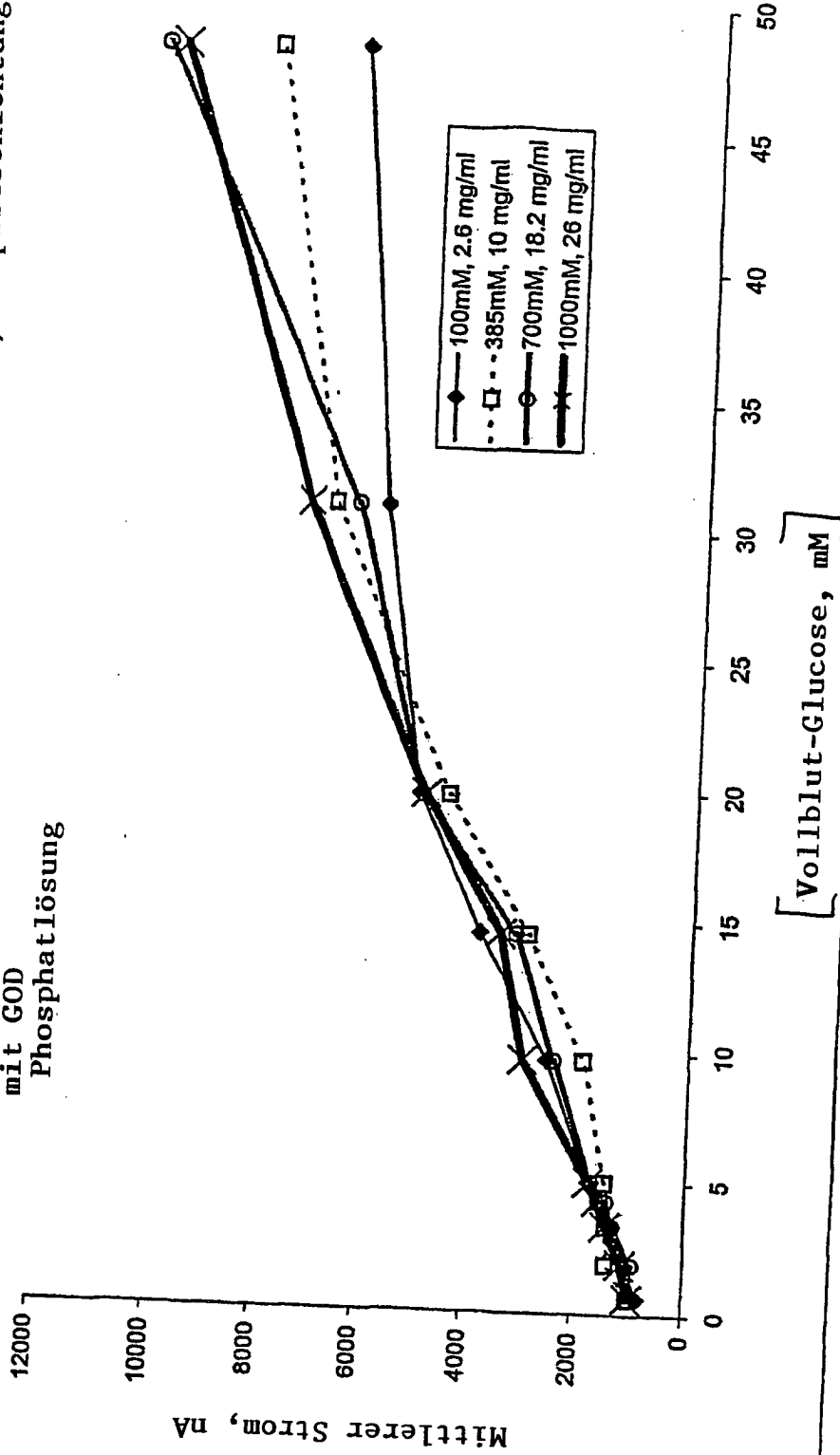


FIG. 16

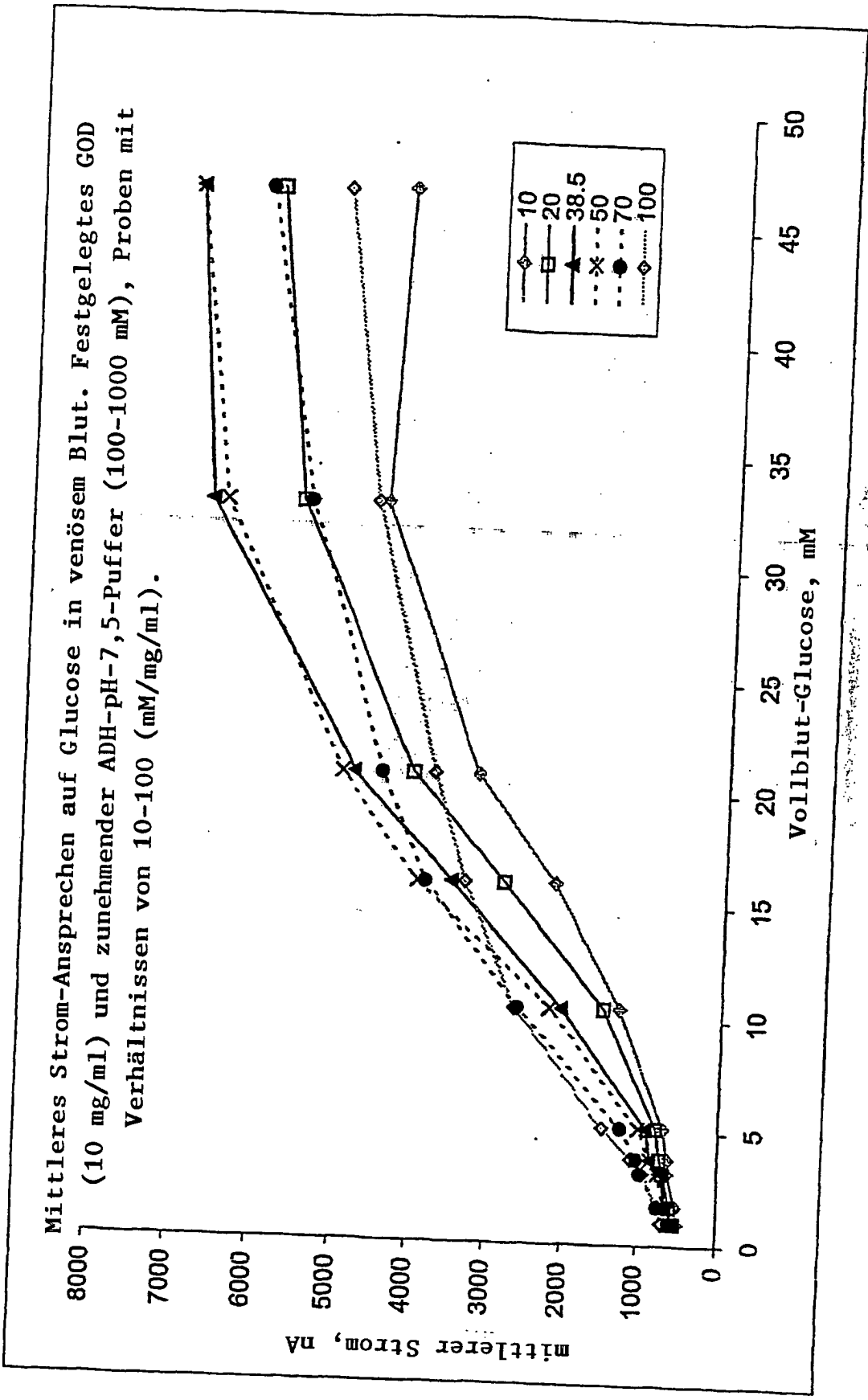


FIG. 17

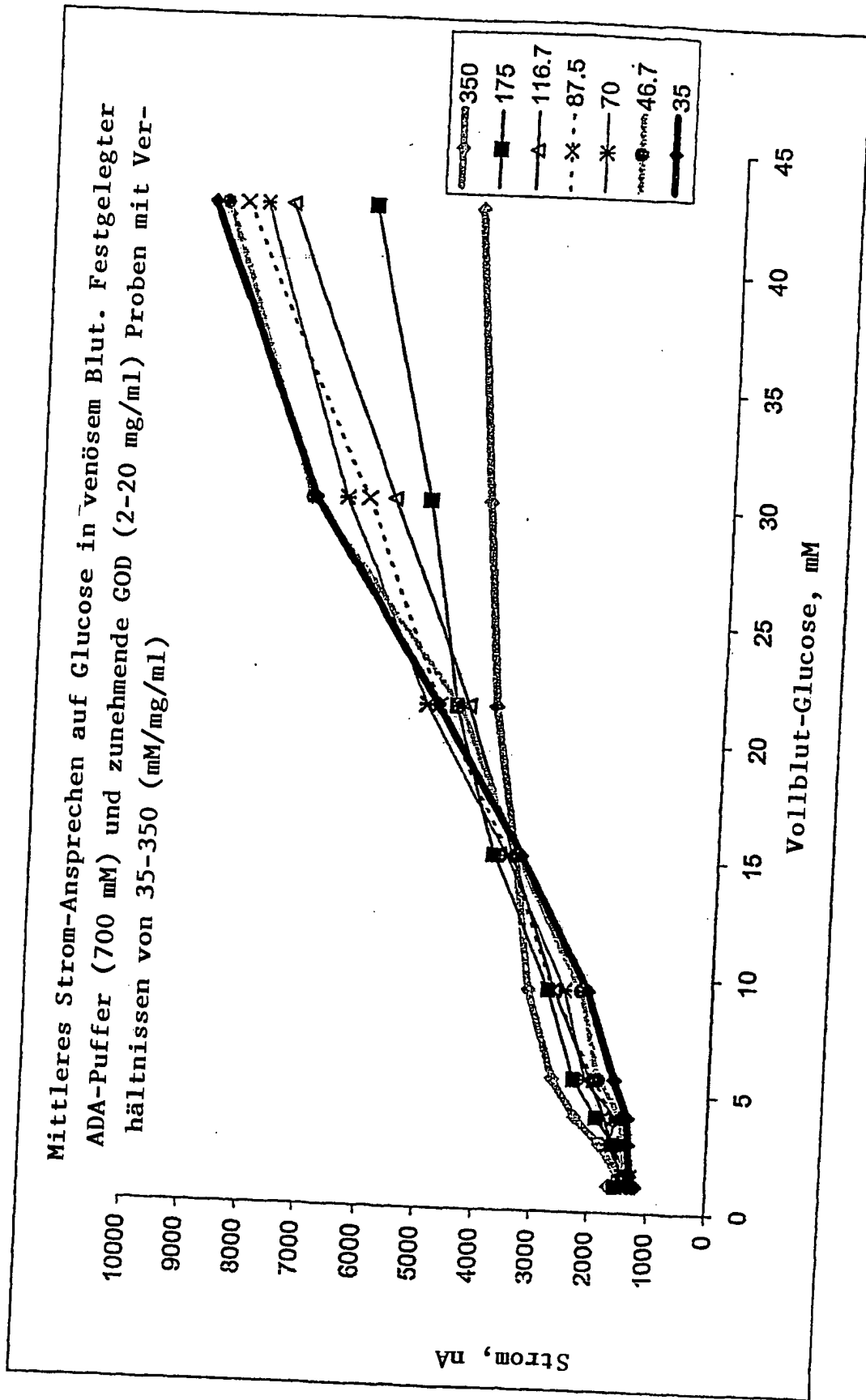


FIG. 18