



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 400 T2 2004.11.11**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 601 720 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 400.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 309 154.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **17.11.1993**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.06.1994**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.11.2004**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 27/416**
C12Q 1/54, C12M 1/40

(30) Unionspriorität:

980465 23.11.1992 US

(73) Patentinhaber:

Disetronic Licensing AG, Burgdorf, CH

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Johnson, Kirk W., Indianapolis, Indiana 46268, US;
Mastrototaro, John J., Indianapolis, Indiana 46220,
US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Verbesserung der Leistung von elektrochemischen Sensoren**

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

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft allgemein elektrochemische Sensoren und insbesondere Verfahren zur Verbesserung der Leistung von elektrochemischen Sensoren auf Glucoseoxidase-Basis durch Verkürzung ihrer Einstellzeit und ihrer Empfindlichkeit gegen störende Verbindungen.

TECHNISCHER HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Eines der Haupthindernisse für die Kommerzialisierung eines amperometrischen Sensors, besonders eines enzymatischen Glucosesensors, ist seine Einstellzeit. Die Einstellzeit ist die Zeitdauer, die nach dem ursprünglichen Anlegen des Potentials an den Sensor für die Einstellung des Stromausgangssignals des Sensors auf einen stabilen Wert notwendig ist. Während dieser Zeit wird die elektrische Doppelschicht an der Oberfläche der Arbeits- und der Gegenelektrode aufgeladen, und es finden Faraday-Reaktionen statt.

[0003] Bei amperometrischen elektroenzymatischen Glucosesensoren können Einstellzeiten bis zu mehreren Stunden dauern. Zum Beispiel haben Koudelka et al. über eine Einstellzeit von 90 Minuten nach einer In-vivo-Implantation berichtet: Koudelka, Rohner-Jeanrenaud, Terrettaz, Bobbioni, Rooij und Jeanrenaud, "In-vivo Behavior of Hypodermically Implanted Microfabricated Glucose Sensors" (In-vivo-Verhalten von subkutan implantierten mikrogefertigten Glucosesensoren) 6 Biosensors & Bioelectronics 31 (1991). Entsprechend berichteten Velho et al. über eine Einstellzeit von mindestens einer Stunde für einen implantierten nadelartigen Glucosesensor: Velho, Sternberg, Thevenot & Reach, "In Vitro and In Vivo Stability of Electrode Potentials in Needle-Type Glucose Sensors" (In-vitro- und In-vivo-Stabilität von Elektrodenpotentialen in nadelartigen Glucosesensoren), 38 Diabetes 164 (1989). Zwei bis vier Stunden Einstellzeit waren für einen von Rebrin et al. gefertigten In-vivo-Sensor erforderlich: Rebrin, Fischer, Woedtke, Abel & Brunstein, "Automated Feedback Control of Subcutaneous Glucose Concentration in Diabetic Dogs" (Automatische Regelung mit Rückführung der subkutanen Glucosekonzentration bei diabetischen Hunden), 32 Diabetologia 573 (1989). Ähnliche Einstellzeiten sind von anderen Forschern beobachtet und berichtet worden. Es läßt sich einschätzen, daß diese Einstellzeiten ein Nachteil für die Kommerzialisierung eines amperometrischen Sensors sind und daß derartige Einstellzeiten den Einsatz elektrochemischer Sensoren in Intensivpflegesituationen ausschließen können.

[0004] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Einstellzeit eines elektroenzymatischen Glucosesensors durch Vorbehandlung der Arbeitselektrode des Sensors verkürzt. Obwohl ein solches Verfahren bisher nicht offenbart wurde, ist die elektrochemische Vorbehandlung von Elektroden für andere Zwecke bekannt. Zum Beispiel sind elektrochemische Methoden zum Entfernen von Verunreinigungen von der Oberfläche von Edelmetallelektroden angewandt worden, um die Empfindlichkeit und Selektivität der Elektroden zu erhöhen und das Oxidationspotential bestimmter Verbindungen zu verschieben. Die elektrochemische Vorbehandlung eines amperometrischen Glucosesensors zum Zweck der Verkürzung seiner Einstellzeit wird jedoch durch solche Behandlungen nicht nahegelegt, und darüber ist bisher nicht berichtet worden.

[0005] Ein anderes Problem, auf das man bei der Verwendung elektrochemischer Sensoren zur Messung der Konzentration einer bestimmten Verbindung wie z. B. Glucose stößt, ist die "Störung", die durch die Oxidation anderer Verbindungen im Körper verursacht wird. Zum Beispiel sind gewöhnliche Störverbindungen, die bei der In-vivo-Implantation angetroffen werden, unter anderem Ascorbinsäure, Harnsäure, Cystein und Acetaminophen. Diese Störverbindungen können eine fehlerhaft positive Abweichung verursachen, die bei der quantitativen Bestimmung der Glucosewerte von Diabetikern nicht akzeptierbar ist.

[0006] Es sind verschiedene Methoden entwickelt worden, um die Auswirkungen von Störverbindungen auf elektroenzymatische Glucosesensoren zu minimieren. Beispielsweise ist eine regenerierte Cellulosemembran oder eine negativ geladene Celluloseacetatmembran zwischen der Arbeitselektrode und der diese Elektrode bedeckenden Enzymschicht eingefügt worden. Diese Membranen lassen das Wasserstoffperoxid durch die Membranschicht dringen, aber Störverbindungen wie z. B. Ascorbinsäure und Harnsäure können wegen der Größen- und/oder Ladungsausschlußseigenschaften der Membran nicht passieren.

[0007] Bei einem anderen Verfahren werden zwei Elektroden verwendet. Eine Elektrode ist mit einem oxidierenden Enzym bedeckt, während an der zweiten Elektrode das Enzym denaturiert oder nicht vorhanden ist. Der von Störverbindungen herrührende Strom wird durch Analyse der Differenz im Stromausgangssignal von den beiden Elektroden eliminiert.

[0008] Diese Verfahren zur Verminderung der Sensorempfindlichkeit gegen Störverbindungen sind nicht attraktiv, da zusätzliche Membranen und/oder Elektroden die Herstellungskosten der Sensoren erhöhen. Außerdem würde das Einfügen einer zusätzlichen Membranschicht zum Ausschluß von Störverbindungen sowohl die Ansprechzeit des Sensors verlängern als auch die Stärke des Stromausgangssignals vermindern.

[0009] Ein weiteres Verfahren beinhaltet eine Chemikalie, die anstelle von Sauerstoff als Elektronenakzeptor wirken kann, um Elektronen vom Redox-Zentrum des Enzyms zur Oberfläche der Arbeitselektrode und zurück zu befördern. Diese Chemikalien werden als Redoxvermittler bezeichnet. Es wird berichtet, daß dieser Sensortyp sauerstoffunempfindlich ist und in einem anaeroben Milieu funktionieren kann. Diese Verbindungen weisen ein niedriges Redox-Potential auf, wodurch sich die Möglichkeit von Störungen von seiten anderer elektroaktiver Verbindungen vermindert. Leider sind diese Verbindungen schwer innerhalb des Sensors zurückzuhalten, und einige sind toxisch.

[0010] Es besteht daher ein Bedarf für ein Verfahren zur Verbesserung der Brauchbarkeit von elektrochemischen Glucosesensoren durch Verkürzen ihrer Einstellzeit und durch Verbesserung ihrer Fähigkeit zur Bereitstellung genauer Meßwerte einer gewünschten Verbindung trotz der Anwesenheit von Störverbindungen. Die vorliegende Erfindung trägt diesen Bedürfnissen Rechnung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Nach einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Messung der Gegenwart oder Konzentration einer interessierenden Substanz in einem Medium unter Verwendung eines elektrochemischen Sensors mit einer oder mehreren Elektroden bereitgestellt, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist: (i) Einbringen des Sensors in das Medium; (ii) Vorbehandeln des Sensors in dem Medium durch Anlegen eines gesteuerten elektrischen Stroms an eine oder mehrere Elektroden des Sensors, und (iii) Verwenden des vorbehandelten Sensors zur Ausführung einer Messung in dem Medium, wobei die Vorbehandlung gemäß Schritt (ii) mit einem elektrischen Strom ausgeführt wird, der mit einer konstanten Stromdichte von 0,1 mA/cm² bis 1,0 mA/cm² während einer Zeit zwischen einer Minute und zehn Minuten angelegt wird, um die Einstellzeit der Elektrode während des Meßschritts (iii) wesentlich zu verkürzen.

[0012] Nach einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Verkürzen der Einstellzeit eines elektrochemischen Sensors mit einer oder mehreren Elektroden bereitgestellt, wobei das Verfahren aufweist: Vorbehandeln des elektrochemischen Sensors nach dem Einbringen in ein Medium durch Anlegen eines gesteuerten elektrischen Stroms an eine oder mehrere Elektroden des Sensors, bevor der Sensor zur Messung der Gegenwart oder Konzentration einer interessierenden Substanz verwendet wird, wobei der gesteuerte Strom während einer Zeit zwischen einer und zehn Minuten mit einer konstanten Stromdichte von 0,1 mA/cm² bis 1,0 mA/cm² angelegt wird.

[0013] Der erste und der zweite Aspekt der vorliegenden Erfindung bieten Verfahren zur Verbesserung der Brauchbarkeit elektrochemischer Glucosesensoren durch Verringerung sowohl ihrer Einstellzeit als auch ihrer Empfindlichkeit gegen Störverbindungen. Die Einstellzeit eines elektrochemischen Glucosesensors wird verbessert, indem die Arbeitselektrode des Sensors durch Anlegen eines konstanten Stroms an diese Elektrode vorbehandelt wird. Die Empfindlichkeit des elektrochemischen Glucosesensors gegen Störverbindungen wird vermindert, indem der Sensor während der Ausführung der Glucosekonzentrationsmessung mit verminderter Spannung betrieben wird.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] Fig. 1 zeigt eine perspektivische Ansicht des erfindungsgemäßen elektrochemischen Glucosesensors nach einer bevorzugten Ausführungsform.

[0015] Fig. 2 zeigt ein Diagramm der "normalen" Einstellzeit einer unbehandelten Elektrode, welches das Stromausgangssignal als Funktion von der Zeit unmittelbar nach der Anfangspolarisierung bei +0,60 V für einen unbehandelten Sensor in einer Glucoselösung von 100 mg/dl bei 37°C darstellt.

[0016] Fig. 3 zeigt ein Diagramm der Einstellzeit einer vorbehandelten Elektrode, welches das Stromausgangssignal als Funktion von der Zeit unmittelbar nach der Anfangspolarisation bei +0,6 V für einen vorbehandelten Sensor in einer Glucoselösung von 100 mg/dl bei 37°C darstellt. Der Sensor wurde vor Anlegen des Potentials zwei Minuten mit einem Konstantstrom (−516 nA) vorbehandelt.

[0017] Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Stromausgangssignals in Abhängigkeit von der Zeit unmittelbar nach der Anfangspolarisation bei +0,6 V für einen vorbehandelten Sensor, der in das subkutane Gewebe eines nar-kotisierten Hundes implantiert wurde. Zehn Minuten nach der Polarisation wurde zur Demonstration der einwandfreien Funktion des Sensors ein venöser Glucosebolus infundiert.

[0018] Fig. 5 zeigt den Vorwärtsabtastungsabschnitt von Voltammogrammen, die durch Abtasten von +0,3 V bis +0,7 V mit 5 mV/s in Lösungen von Glucose (100 mg/dl) und Acetaminophen (4 mg/dl) bei 37°C erzeugt wurden. Die Hintergrundabtastung für den PBS-Puffer wurde von jedem der Voltammogramme subtrahiert.

[0019] Fig. 6 zeigt ein Diagramm der Verhältnisse des Acetaminophen-Oxidationsstroms zum Glucose-(Wasserstoffperoxid-) Oxidationsstrom über einen Bereich von angelegten Potentialen.

[0020] Fig. 7 zeigt ein Diagramm des Stromausgangssignals in Abhängigkeit von der Zeit für einen Sensor in einer Glucoselösung von 100 mg/dl bei 37°C, das die Langzeit-Leistungsstabilität eines Sensors bei Anlegen eines Potentials von +0,35 V darstellt.

[0021] Fig. 8 zeigt ein Korrelationsdiagramm zwischen der Plasmaglukosekonzentration und der durch einen Sensor gemessenen subkutanen Glukosekonzentration bei Anlegen eines Potentials von +0,60 V.

[0022] Fig. 9 zeigt ein Korrelationsdiagramm zwischen der Plasmaglukosekonzentration und der durch einen Sensor gemessenen subkutanen Glukosekonzentration bei Anlegen eines Potentials von +0,35 V.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0023] Zum besseren Verständnis der Grundgedanken der Erfindung wird nachstehend auf bevorzugte Ausführungsformen Bezug genommen, und zu deren Beschreibung wird eine besondere Sprache benutzt. Trotzdem versteht es sich, daß damit keine Einschränkung des Umfangs der Erfindung beabsichtigt ist und daß Änderungen und weitere Modifikationen der Erfindung sowie weitere Anwendungen der Grundgedanken der hier dargestellten Erfindung in Betracht gezogen werden, wie sie normalerweise einem Fachmann auf dem Gebiet einfallen würden, auf das sich die Erfindung bezieht.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Leistung elektrochemischer Glucosesensoren. In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Einstellzeit eines Sensors verkürzt, indem die Arbeitelektrode des Sensors vor dem Gebrauch des Sensors zur Messung von Glucose in einem flüssigen Medium mit einem elektrischen Strom vorbehandelt wird.

[0025] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die Leistung eines elektrochemischen Glucose-sensors verbessert, indem nacheinander das obige Verfahren angewandt und die Empfindlichkeit des Sensors gegen Störverbindungen vermindert wird, indem der Sensor an einem Potential betrieben wird, das erheblich niedriger ist als die +0.6 V, die typischerweise an solche Sensoren angelegt werden.

[0026] Die elektrochemischen Glucosesensoren, die in den bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, wurden nach den Verfahren hergestellt, die in Mastrototaro, Johnson, Morff Lipson, Andrew und Allen, "An Electroenzymatic Glucose Sensor Fabricated on a Flexible Substrate" (Elektroenzymatischer Glucosesensor, gefertigt auf einem flexiblen Substrat), B 5: 1-4 Sensors and Actuators 139-44 (192) und in Johnson, "Reproducible Electrodeposition of Biomolecules for the Fabrication of Miniature, Electroenzymatic Biosensors" (Reproduzierbare elektrochemische Abscheidung von Biomolekülen zur Herstellung von elektroenzymatischen Miniatur-Biosensoren), B 5: 1-4 Sensors and Actuators 85-89 (1992), beschrieben werden. Die Glucosesensoren werden unter Anwendung von Fertigungsverfahren für integrierte Schaltkreise hergestellt, um kleine, zuverlässige, reproduzierbare und fertigungsfähige Geräte zu entwickeln. Die Sensoren werden in Chargengrößen hergestellt, die aus vier 4" x 4"-Platten mit 28 Sensoren pro Platte bestehen. Das Verarbeitungsschema wird ausführlich in US-A-5 108 819, eingereicht am 28. April 1992, dargelegt, deren einschlägige Abschnitte hiermit durch Verweis einbezogen werden. Das Verfahren läßt sich wie folgt zusammenfassen.

[0027] Das Trägersubstrat für den Sensor ist eine 50 µm dicke Schicht aus DuPont PI-2540-Polyimid. Die Schicht wird durch Aufschleudern des flüssigen Polyimids auf eine saubere 4" x 4"-Glasplatte und Heißhärten der entstehenden Schicht ausgebildet. Dieser Schritt kann wiederholt werden, bis die gewünschte Schichtdicke erreicht ist. Verschiedene Polyimide mit unterschiedlichen Viskositäten sind verfügbar und können eingesetzt werden.

[0028] Auf die Platten wird eine Dreifachschicht aus Chrom-Gold-Chrom aufgesputtert und strukturiert, um die leitfähigen Schichten der Glucosesensoren zu formen. Das Chrom dient als Haftvermittler zwischen dem Gold und dem Polyimid. Die Metallschichten werden unter Anwendung eines photolithographischen Standardverfahrens strukturiert. Sobald die Dreifachschicht aus Metall strukturiert ist, wird ein zweiter Photolithographieschritt angewandt, um an den Stellen, wo sich die Elektroden befinden werden, das Chrom zu entfernen und das darunterliegende Gold freizulegen. Die entstehende Schicht besteht aus einem Metallbelag, der strukturiert ist, um die Chrom-Gold-Chrom-Leiter von 28 Glucosesensoren mit 3 Goldelektroden pro Sensor zu bilden.

[0029] Die Platten werden dann mit einer 1,2 µm dicken, photographisch bebildungsfähigen Polyimid-Isolierschicht (DuPont PI-2703D) abgedeckt, die strukturiert wird, um die aktiven Bereiche der darunterliegenden Goldelektroden freizulegen. Das Polyimid wird in flüssiger Form auf jede Platte aufgeschleudert. Es wird dann vorgehärtet, mit UV-Licht bestrahlt, um die Schicht zu strukturieren, sprühentwickelt, gespült und heißgehärtet.

[0030] Die Platten werden 8 bis 24 Stunden in destilliertes entionisiertes (DI-) Wasser getaucht, um den Sensorbogen von der Glasplatte zu entfernen. Das Verfahren kann beschleunigt werden, indem das Wasser zum Sieden gebracht wird. Sobald der Sensorbogen vollständig von der Platte abgelöst ist, wird er in "Viertelbögen" zerschnitten, die aus 7 Sensoren pro Bogen bestehen. Dann wird eine mikroskopische Untersuchung der Sensoren ausgeführt, um festzustellen, welche Elemente strukturell intakt sind. Sensoren mit Defekten werden auf geeignete Weise registriert und in den folgenden Verfahren nicht galvanisiert bzw. plattiert.

[0031] Die Arbeits- und die Gegenelektrode des Sensors werden mit Platinschwarz elektroplattiert, und die Bezugslektrode wird mit Ag/AgCl plattiert. Dann wird unter Anwendung des weiter unten beschriebenen elektrochemischen Abscheidungsverfahrens auf reproduzierbare Weise Glucoseoxidase auf der Arbeitselektrode abgeschieden. Dieses Verfahren ist in US-A-5 166 063, erteilt am 24. November 1992, dargelegt, und seine einschlägigen Teile werden hiermit durch Verweis einbezogen. Gleichzeitig und gemeinsam damit wird Rinder-serumalbumin abgeschieden, woraus sich eine stabilere Schicht ergibt. Die Schicht wird in einer Glutaraldehyd-Lösung vernetzt. Der gesamte Sensor wird mit einer unterschiedlich durchlässigen, biologisch verträglichen äußeren Membran abgedeckt. Diese gesetzlich geschützte Membran ist für Sauerstoff um zwei bis drei Größenordnungen durchlässiger als für Glucose und kompensiert auf diese Weise den "Sauerstoffeffekt". Die Membran wird in einem Lösungsmittel gelöst, durch Schleuderbeschichten auf den Sensorbogen aufgebracht und an der Luft getrocknet.

[0032] Der abschließende Schritt bei der Herstellung des Grundsensors erfordert das Ausschneiden der einzelnen Sensoren. Gegenwärtig wird jeder Sensor von Hand mit einer Skalpellklinge aus dem Bogen ausgeschnitten. In seiner fertigen Form ist der implantierte Teil des Sensors etwa 2,5 cm lang, 0,28 mm breit und 0,06 mm dick.

[0033] Zur elektrochemischen Abscheidung der Enzymschicht auf der Elektrode wird unter Verwendung einer phosphatgepufferten medizinischen Kochsalzlösung (pH 7,4) als Lösungsmittel eine Lösung von 5 Gew.-% Glucoseoxidase hergestellt. Beim Auflösen der Glucoseoxidase durch Rühren ist es wichtig, eine Schaumbildung der Lösung zu verhindern, wodurch die Glucoseoxidase denaturiert werden könnte. Die Zelle für die elektrochemische Abscheidung wird mit dieser Lösung gefüllt und die Elektrode, auf der das Enzym abgeschieden werden soll, sowie eine Gegenelektrode werden in die Zelle eingetaucht. Es werden elektrische Anschlüsse zu einem Galvanostaten hergestellt, und ein Strom wird angelegt, so daß sich eine konstante Stromdichte von 5 mA/cm² an der Elektrodenoberfläche ergibt. Die Richtung des Stromflusses wird so eingestellt, daß sich an der Elektrodenoberfläche eine positive Aufladung ergibt, um die negativ geladenen Glucoseoxidase-Moleküle anzuziehen. Der Strom wird 2 Minuten lang angelegt. Die tatsächliche Spannung an der Arbeitselektrode variiert mit der Impedanz. Die Elektrode wird aus der Enzymlösung entfernt und 5 Sekunden lang ohne Rühren in entionisiertes destilliertes Wasser getaucht, um zurückbleibende Glucoseoxidase zu entfernen. Danach wird die Elektrode 30 Minuten lang in eine Lösung getaucht, die 2,5 Vol.-% Glutaraldehyd in phosphatgepufferter medizinischer Kochsalzlösung (pH 7,4) enthält, um die Glucosemoleküle kovalent miteinander zu vernetzen und eine wasserunlösliche Schicht zu bilden. Die Glutaraldehyd-Vernetzung verhindert, daß die Glucoseoxidase wieder in Lösung geht. Die Elektrode wird nochmals 5 Sekunden lang in entionisiertes destilliertes Wasser getaucht und kann dann 30 Minuten an der Luft trocknen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Enzymkomponente des Biosensors funktionsfähig.

[0034] Nach einem Aspekt der Erfindung wird die Arbeitselektrode des Sensors vorbehandelt, indem ein elektrischer Strom an diese Elektrode angelegt wird, sobald die Elektrode in die Umgebung eingebracht worden ist, in der Messungen ausgeführt werden. Ein geregelter Strom wird an eine oder mehrere Elektroden des Sen-

sors angelegt, bevor der Sensor zur Messung der Gegenwart oder Konzentration einer interessierenden Substanz benutzt wird. Der Strom wird eine bis zehn Minuten lang mit einer konstanten Stromdichte zwischen 0,1 mA/cm² und 1,0 mA/cm² angelegt, um die Einstellzeit der Elektrode(n) erheblich zu verkürzen. Vorzugsweise wird ein konstanter Strom mit einer konstanten Stromdichte angelegt. Man wird jedoch erkennen, daß leichte Schwankungen des Stroms und der Stromdichte während der Anlegezeit akzeptierbar sind und daß ein pulssierender, linear oder periodisch veränderlicher Strom verwendet werden kann.

[0035] Zeitdauer und Betrag des Stroms werden so gewählt, daß die Einstellzeit, die ohne eine solche Vorbehandlung realisiert werden würde, verkürzt wird. Typischerweise sind Verkürzungen der Einstellzeit von mindestens etwa 20% besonders erwünscht, wobei die erreichbaren Verkürzungen der Einstellzeit für gewisse Sensoren beträchtlich größer sind. Jede Verkürzung der Einstellzeit ist vorteilhaft und wird daher durch die vorliegende Erfindung in Betracht gezogen. Wie hier weiter beschrieben wird, verkürzt sich in einigen Fällen die Einstellzeit von 2–3 Stunden auf etwa 5–10 Minuten. Diese Verkürzungen der Einstellzeit können beispielsweise in Intensivtherapie-Milieus besonders wichtig sein. Die Nützlichkeit wird auch in Fällen besonders hervorgehoben, in denen ein Problem mit einem bestimmten Sensor besteht, d. h. in Bezug auf seine Funktion oder seinen richtigen Sitz im Gewebe. In anderen Fällen wäre eine Verkürzung der Einstellzeit von vielleicht 24 Stunden auf 1 Stunde äußerst vorteilhaft.

[0036] In Experimenten wurde bisher vorzugsweise ein negativer Strom verwendet und der Strom mit konstanter Dichte angelegt. Ein negativer Strom mit einer Dichte von etwa 0,5 mA/cm² wird bei den bisher verwendeten Sensoren am stärksten bevorzugt. Eine Vorbehandlungszeit von etwa 2 Minuten wird besonders bevorzugt.

[0037] Die Einstellzeit des vorbehandelten Sensors wird bei Ausführung dieser galvanischen Vorbehandlung von etwa 2 Stunden auf etwa 10 Minuten verkürzt. Diese Verkürzung der Einstellzeit ist besonders wertvoll in Intensivtherapie-Situationen, in denen eine Einstellzeit von 2 Stunden nicht akzeptiert werden kann.

[0038] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein elektrochemischer Glucosesensor mit einem Potential betrieben, das wesentlich niedriger ist als die 0,6 V, die normalerweise an solche Sensoren angelegt werden. Es hat sich gezeigt, daß ein Betrieb des Sensors mit einem Potential zwischen etwa 0,3 V und etwa 0,4 V den Strom wesentlich reduziert, der durch die Oxidation von Verbindungen wie z. B. Acetaminophen entsteht, und dadurch die durch solche Verbindungen im Körper erzeugte Störung auf ein Minimum reduziert, dabei aber keine wesentliche Auswirkung auf die Größe der Glucose-Reaktion hat.

[0039] Nachstehend wird auf konkrete Beispiele Bezug genommen, bei denen die oben beschriebenen Methoden angewandt werden. Es versteht sich, daß die Beispiele angegeben werden, um bevorzugte Ausführungsformen vollständiger zu beschreiben, und daß damit keine Einschränkung des Umfangs der Erfindung beabsichtigt ist.

BEISPIEL 1

[0040] Bei einem unbehandelten elektrochemischen Glucosesensor wurde seine "normale" Einstellzeit nach dem folgenden Verfahren beurteilt. In diesem Beispiel wurde die Einstellzeit des Sensors in vitro gemessen.

[0041] Die Glucosesensoren wurden in einer Reinraumeinrichtung nach den weiter oben skizzierten Verfahren gefertigt. Die entstandenen Sensoren hatten Arbeits- und Gegenelektroden aus Platinschwarz und eine Ag/AgCl-Bezugselektrode. Der Oberflächeninhalt der Arbeitselektrode betrug etwa 0,1 mm². Eine etwa 5 µm dicke Schicht aus Glucoseoxidase und Rinderserumalbumin wurde elektrochemisch auf der Oberfläche der Arbeitselektrode abgeschieden und mit Glutaraldehyd vernetzt.

[0042] Über der Oberfläche der drei Elektroden wurde ein gesetzlich geschütztes äußeres Membranmaterial aufgebracht. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf die Verwendung einer Membran oder irgendeiner besonderen Membran beschränkt; die ausgewählte Membran wurde einfach als bevorzugte Ausführungsform für die in diesem Beispiel benutzten Elektroden gewählt.

[0043] Die äußeren Membranen waren homogene, für Sauerstoff und Glucose durchlässige Membranen und bestanden aus Polyurethan, das als Reaktionsprodukt von Diisocyanat, Poly(ethylenoxid) und aliphatischem Diol hergestellt wurde. Membranen dieses Typs werden in der US-Patentanmeldung, Serien-Nr. 07/771 658, eingereicht am 4. Oktober 1991, mit dem Titel "Hydrophilic Polyurethane Membranes for Electrochemical Glucose Sensors" (Hydrophile Polyurethan-Membranen für elektrochemische Glucosesensoren) beschrieben. Die

einschlägigen Abschnitte dieses Dokuments werden hiermit durch Verweis einbezogen. Solche Polymere können 10 bis 50% ihrer Trockenmasse Wasser absorbieren und weisen ein Verhältnis des Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff zum Diffusionskoeffizienten für Glucose von bis zu etwa 4000 auf.

[0044] Alle In-vitro-Experimente wurden bei einer Temperatur von 37°C ausgeführt, die durch eine Polystat®-Tauchumwälzpumpe und ein Wasserbad gehalten wurde. Das Ausgangssignal wurde entweder auf einem Zweikanal-Bandschreiber aufgezeichnet oder erfaßt und in einem Personalrechner gespeichert, der eine Datenerfassungsplatine mit Fähigkeit zur Analog-Digital-(A/D)-Umwandlung enthielt. Die Daten wurden unter Verwendung eines herkömmlichen Software-Pakets gleichzeitig am Monitor angezeigt und auf Festplatte gespeichert.

[0045] Alle In-vitro-Tests wurden unter Verwendung von phosphatgepufferter medizinischer Kochsalzlösung (PBS) als elektrolytischer Trägerlösung ausgeführt. Die Lösung hatte einen pH-Wert von 7,4 bei 25°C. Der PBS wurden 1,5 mmol Natriumazid als Konservierungsmittel zugesetzt. Aus Dextrose wurde eine Glucosestamm-lösung (10000 mg/dl) hergestellt, die vor Gebrauch über Nacht einer Mutarotation ausgesetzt wurde. Eine Teilmenge der Stammlösung wurde der PBS zugesetzt, um eine Lösung mit einer Glucosekonzentration von 100 mg/dl herzustellen, welche die normale physiologische Konzentration annähert. Die für In-vivo-Infusionen verwendete sterile Glucoselösung (0,5 g/ml) wurde im Anlieferungszustand verwendet.

[0046] Um die normale Einstellzeit eines unbehandelten Sensors zu testen, wurde ein Sensor in eine Glucoselösung eingebracht, und an den Sensor wurde ein elektrisches Potential angelegt. Die Stromänderung in Abhängigkeit von der Zeit wurde aufgezeichnet und wie in **Fig. 2** als Diagramm dargestellt. Genauer gesagt, der Test wurde bei 37°C in einer 100 mg/dl-Glucoselösung durchgeführt, und es wurde ein Potential von +0,6 V angelegt. Wie oben festgestellt, ist diese Glucosekonzentration annähernd äquivalent der normalen physiologischen Konzentration, und das Potential ist das gleiche, wie es gewöhnlich bei solchen Sensoren benutzt wird.

[0047] **Fig. 2** zeigt ein Diagramm des Sensorstrom-Ausgangssignals in Abhängigkeit von der Zeit während der Einstellung des Sensors nach der anfänglichen Polarisation. Wie aus dem Diagramm erkennbar, ist der Sensor anscheinend etwa 1,5 Stunden nach Anlegen des Potentials von +0,6 V voll eingestellt. Bei anderen Sensoren, die auf die gleiche Weise hergestellt wurden wie der Sensor, der zur Erzeugung von **Fig. 2** verwendet wurde, zeigte sich, daß sie bei Implantation in das subkutane Gewebe von Hunden, Kaninchen und Menschen zwei bis vier Stunden zur Einstellung benötigen.

BEISPIEL 2

[0048] Ein elektrochemischer Glucosesensor wurde nach dem folgenden Verfahren vorbehandelt, um die Einstellzeit zu verkürzen. In diesem Beispiel wurde der Effekt der Vorbehandlung in vitro gemessen.

[0049] Die Glucosesensoren wurden hergestellt, wie weiter oben skizziert. Die anderen Apparate und Reagenzien wurden gleichfalls bereitgestellt, wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0050] Zur Beurteilung der galvanischen Vorbehandlung wurde 2 Minuten lang ein konstanter Strom angelegt, während sich der Sensor in der Glucoselösung befand. Dann wurde sofort ein Potential an den Sensor angelegt, und die Einstellzeit wurde bestimmt. Konkret wurde der Sensor vor dem Anlegen des Potentials 2 Minuten lang mit einem Konstantstrom von etwa $-0,5 \text{ mA/cm}^2$ (-516 nA) behandelt. Der Test wurde bei 37°C in einer Glucoselösung von 100 mg/dl ausgeführt, und nach der Vorbehandlung der Elektrode wurde ein Potential von +0,6 V angelegt.

[0051] **Fig. 3** zeigt ein Diagramm der Einstellzeit einer vorbehandelten Elektrode, welches das Stromausgangssignal in Abhängigkeit von der Zeit für den Zeitraum unmittelbar nach der Anfangspolarisation mit +0,6 V darstellt. Wie aus dem Diagramm erkennbar, war die Einstellzeit des vorbehandelten Sensors in der Glucoselösung von 100 mg/dl kürzer als 10 Minuten.

[0052] Der Betrag des an den Sensor angelegten Stroms und die Stromflußrichtung wurden auf der Basis der Einstellzeit des Sensors nach der galvanischen Vorbehandlung optimiert. Die Zeitdauer, in welcher der Strom an die Arbeitselektrode des Sensors angelegt wurde, wurde während der gesamten Untersuchung konstant auf 2 Minuten gehalten. Es zeigte sich, daß die Vorbehandlung vorteilhaft war, wenn der angelegte Strom negativ war. Der in dem Experiment benutzte Potentiostat/Galvanostat entspricht der amerikanischen Polaritätsfestlegung, daher war die Arbeitselektrode die Anode. Die Gegenelektrode wurde während der Vorbehandlung

als Kathode verwendet. Die vorteilhafte Wirkung des Anlegens eines negativen Stroms an die Arbeitselektrode ist logisch, da die Arbeitselektrode auch die Anode ist, wenn das positive Potential an den Sensor angelegt wird. Umgekehrt ist anzunehmen, daß bei einem Sensor, der auf einer Reduktionsreaktion an der Arbeitselektrode basiert, wie z. B. einer Clarkschen Sauerstoffelektrode, eine galvanische Vorbehandlung unter Verwendung eines positiven Stromflusses vorteilhaft wäre.

[0053] Die Stromdichte wurde gleichfalls auf der Basis der Leistung des getesteten Sensors optimiert. Es zeigte sich, daß eine Dichte von $5,0 \text{ mA/cm}^2$ für den Sensor zu hoch war und zu einer Riffelbildung der metallischen Leiter führte. Günstige Ergebnisse wurden für eine Stromdichte von $0,5 \text{ mA/cm}^2$ beobachtet, die 2 Minuten lang angelegt wurde, wie in **Fig. 2** dargestellt.

BEISPIEL 3

[0054] Ein elektrochemischer Glucosesensor wurde nach dem folgenden Verfahren vorbehandelt, um die Einstellzeit zu verkürzen. In diesem Beispiel wurde der Effekt der Vorbehandlung in vivo gemessen.

[0055] Die Glucosesensoren wurden nach dem weiter oben skizzierten Verfahren in einer Reinraumeinrichtung hergestellt. Zusätzliche Geräte und Reagenzien wurden gleichfalls bereitgestellt, wie weiter oben in den In-vitro-Beispielen beschrieben.

[0056] Das für diese Studien benutzte Tiermodell war ein speziell gezüchteter mischrassiger Hund (16–22 kg). Den Tieren wurde eine Venenkanüle zur Erleichterung der Infusion von Fluiden und eine Arterienkanüle zur Entnahme von Blutproben chirurgisch implantiert. Die Hunde wurden während der Implantation des Sensors und der Beurteilung des Verfahrens mit Natriumpentobarbital narkotisiert.

[0057] Vor der Implantation wurde der Sensor in ein Lumen einer Doppellumen-Polyethylenkanüle **10** eingesetzt, wobei die Spitze **11** vorher zugeschweißt wurde. In die Wand der Kanüle war eine Öffnung **12** eingeschnitten worden, um die aktiven Oberflächen der Elektroden **13**, **14** und **15** des Sensors nach der Implantation dem umgebenden Gewebe auszusetzen (Siehe **Fig. 1**). Das zweite Lumen der Kanüle wurde mit einem Stück Nadelmaterial von 27 gauge Dicke gefüllt, um es während der Implantation zu versteifen. Die gesamte Sensorreinheit wurde durch Bestrahlen mit Elektronenstrahlung bei $2,5 \text{ mrad}$ sterilisiert.

[0058] Die Sensoren wurden subkutan in den Abdominalbereich der Hunde implantiert. Eine 18-gauge-Nadel (3,8 cm lang) wurde in das subkutane Gewebe eingesetzt und sofort entfernt, um einen Tunnel für den Sensor zu erzeugen. Nach dem Einsetzen des Sensors in diesen Tunnel wurde das 27-gauge-Nadelmaterial aus der Kanüle entfernt, und der Sensor wurde mit Klebeband an der Haut fixiert. Zur Herstellung des elektrischen Kontakts mit den drei Zuleitungen des Sensors wurde ein speziell gefertigter Steckverbinder benutzt.

[0059] Im Anschluß an die Implantation wurde ein Strom von -500 nA ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) zwei Minuten an die Arbeitselektrode angelegt. Unmittelbar nach dieser Vorbehandlung wurde ein Potential von $+0,6 \text{ V}$ an den Sensor angelegt. Die Einstellzeit dieses Sensors war kürzer als 5 Minuten, wie in **Fig. 3** dargestellt.

[0060] Nach der Einstellung des Sensors wurde die Glucosekonzentration im Blut der Hunde durch venöse Injektion eines Bolus einer sterilen Glucoselösung (50 g Glucose pro kg Hundegewicht) erhöht, um die einwandfreie Sensorfunktion zu demonstrieren. **Fig. 4** veranschaulicht die einwandfreie Funktion des Sensors nach dem Bolus. Die mikroskopische Untersuchung des Sensors nach der Extraktion aus dem Hund zeigte keine schädlichen Effekte der Behandlung. Insbesondere wurden keine Schichtentrennung des Sensors und keine Blasenbildung der Membran beobachtet. Dieses Verfahren wurde mit 24 Sensoren in Hunden und mit weiteren 4 Sensoren in Kaninchen erfolgreich wiederholt. In allen Fällen wurden Einstellzeiten von weniger als etwa 15 Minuten für vorbehandelte Sensoren beobachtet.

[0061] Aus dem vorstehenden Beispiel ist ersichtlich, daß durch das Anlegen eines konstanten Stroms vor dem Anlegen des konstanten Potentials die Einstellzeit des Sensors verkürzt wurde. Es wird angenommen, daß diese vorteilhafte Wirkung auf den exponentiellen Abfall des Stroms während der Einstellung eines unbehandelten Sensors zurückzuführen ist, an den ein konstantes Potential angelegt wird. Zum Beispiel ist der Strom, der durch die Arbeitselektrode eines unbehandelten Sensors fließt, wesentlich kleiner als der Strom, der während des galvanischen Behandlungsschritts durch die Arbeitselektrode eines vergleichbaren Sensors fließt. Insbesondere ist aus **Fig. 2** ersichtlich, daß der Strombetrag, der an der Arbeitselektrode des unbehandelten Sensors während der ersten 2 Minuten nach der Polarisation gemessen wurde, viel kleiner war als die 500 nA , die während des Vorbehandlungsschritts von 2 Minuten Dauer an eine vergleichbare Elektrode ange-

legt wurden. Der Strombetrag an der Oberfläche der Arbeitselektrode steuerte anscheinend die Geschwindigkeit, mit der die Doppelschicht gebildet wurde und die Elektroden polarisiert wurden.

[0062] Außerdem ist erkennbar, daß für Sensoren, die auf gleiche Weise hergestellt und vorbehandelt wurden, bei Verwendung in In-vitro- und In-vivo-Tests unterschiedliche Einstellzeiten beobachtet wurden. Zum Beispiel zeigt **Fig. 3** eine In-vitro-Einstellzeit knapp unter 10 Minuten, während für einen Sensor, der einem Hund implantiert wurde, eine Einstellzeit von etwa 5 Minuten beobachtet wurde (siehe **Fig. 4**). Es wird angenommen, daß diese Differenz auf Impedanzunterschiede zwischen den einzelnen Elektroden in den verschiedenen Milieus zurückzuführen ist.

[0063] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der elektrochemische Glucosesensor mit einem reduzierten Potential betrieben, um die Effekte von Störverbindungen zu minimieren.

[0064] Glucosesensoren werden zwar typischerweise mit einem Potential von etwa +0,6 V betrieben, aber bei solchen Potentialen können Störströme aus der Oxidation von anderen Verbindungen als der interessierenden Substanz beobachtet werden. Daher wäre es vorteilhaft, ein Verfahren mit Verwendung eines elektrochemischen Sensors zu entwickeln, der den durch die Oxidation von Störverbindungen erzeugten Strom minimiert, ohne die Empfindlichkeit des Sensors gegen Glucose zu beeinträchtigen. Dementsprechend wird in dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung der Sensor nur einem Potential von weniger als etwa +0,4 V betrieben, um die Oxidation von Störverbindungen zu minimieren, wie z. B. von Acetaminophen. Es ist erkennbar, daß die Empfindlichkeit des Sensors gegen Glucose-Oxidation durch dieses Verfahren nicht beeinträchtigt wird, obwohl die Empfindlichkeit des Sensors gegen Acetaminophen-Oxidation wesentlich herabgesetzt wird.

BEISPIEL 4

[0065] Ein elektrochemischer Glucosesensor wurde mit einem verminderten Potential betrieben, um die Effekte von Störverbindungen zu minimieren. Insbesondere wurde die Fähigkeit des Verfahrens zur Minimierung der Effekte von Acetaminophen beurteilt. In diesem Beispiel wurde die Auswirkung des Verfahrens in vitro gemessen.

[0066] Die Glucosesensoren wurden auf die weiter oben beschriebene Weise hergestellt. Weitere Geräte und Reagenzien wurden gleichfalls bereitgestellt, wie in den obigen Beispielen beschrieben.

[0067] Alle In-vitro-Experimente wurden ausgeführt, indem die Sensoren in ein mit der PBS-Lösung gefülltes 100 ml-Becherglas eingebracht wurden, das in ein auf 37°C eingestelltes Konstanttemperatur-Wasserbad eingetaucht war. Glucoselösung (100 mg/dl) und Acetaminophenlösung (4 mg/dl) wurden erzeugt, indem die PBS mit einer konzentrierten Lösung jeder Spezies versetzt wurde. Diese Konzentration der Glucose entspricht im allgemeinen einem normalen physiologischen Glucosegehalt, während die Konzentration von Acetaminophen doppelt so hoch wie der normale physiologische Gehalt ist.

[0068] Zunächst wurde das Stromausgangssignal von den Sensoren in PBS und in Glucoselösungen mit angelegten Potentialen von +0,60 V und +0,35 V untersucht. Tabelle 1 zeigt das Stromausgangssignal von den beiden elektrochemischen Glucosesensoren im Anschluß an eine angemessene Einstellzeit nach jeder Änderung des Potentials oder der Lösungskonzentration. Diese Untersuchungen zeigen, daß das Stromausgangssignal von den Sensoren in der 100 mg/dl-Glucoselösung annähernd gleich war. Dies läßt darauf schließen, daß das niedrigere angelegte Potential von +0,35 V noch auf dem Plateau der elektrochemischen Oxidationskurve von Wasserstoffperoxid lag.

TABELLE 1

Sensor	angelegtes Potential	PBS bei 37°C	100 mg/dl Glucoselösung bei 37°C
623A2	+0,60 V	1,0 nA	12,1 nA
	+0,35 V	0,5 nA	12,5 nA
623A3	+0,60 V		14,2 nA
	+0,35 V		14,7 nA

[0069] Tabelle 1 zeigt außerdem den Grundlinienstrom in PBS bei 37°C für einen der Sensoren bei angelegten Potentialen von +0,60 V und +0,35 V. Der niedrigere Strom, der bei einem angelegten Potential von +0,35 V erkennbar ist, kann durch das Ohmsche Gesetz erklärt werden.

[0070] Zur weiteren Untersuchung der positiven Ergebnisse, die bei einem angelegten Potential von +0,35 V erzielt wurden, wurde zyklische Voltammetrie zur Auswahl des optimalen angelegten Potentials angewandt. **Fig. 5** zeigt den Vorwärtsabtastungsabschnitt von Voltammogrammen für eine physiologische Glucoselösung und eine Acetaminophenlösung mit einer Acetaminophen-Konzentration, die etwa doppelt so hoch ist wie die physiologische Konzentration. Die erhöhte Konzentration von Acetaminophen wurde benutzt, um das Stromsignal zu verstärken und mögliche Konzentrationen bei therapeutischer Anwendung nachzubilden. Das von der PBS-Lösung erhaltene Grundlinien-Voltammogramm wurde von den Glucose- und Acetaminophen-Voltammogrammen subtrahiert. Die Voltammogramme veranschaulichen sowohl das wünschenswerte Plateau für die Glucoseoxidation als auch die zunehmenden Stromstärken infolge der Acetaminophen-Oxidation bei höheren angelegten Potentialen.

[0071] Die Auswahl des optimalen angelegten Potentials zum Nachweis von Glucose und zur Minimierung der Effekte der Störverbindungen, besonders von Acetaminophen, erfolgte durch Untersuchung des Verhältnisses des Acetaminophen-Oxidationsstroms zum Glucose-Oxidationsstrom als Funktion des angelegten Potentials. **Fig. 6** zeigt dieses Verhältnis bei einer Veränderung des angelegten Potentials von +0,3 bis +0,7 V. Aus diesem Diagramm ist erkennbar, daß das angelegte Potential von +0,6 V mehr Strom aus der Oxidation von Störverbindungen erzeugt, als bei Anlegen eines Potentials von +0,35 V erzeugt wird. Bei verminderten Potentialen, wie z. B. weniger als etwa +0,4 V, wird jedoch der durch die Oxidation von Acetaminophen erzeugte Strom nicht wesentlich größer als der Strom, der durch die Oxidation von Glucose erzeugt wird. Dieses Diagramm zeigt daher den Nutzen der Verwendung von Spannungen von weniger als etwa +0,4 V, um die von anderen Verbindungen herrührende Störung zu minimieren.

[0072] Die Langzeitstabilität der Sensorfunktion über die geplante Lebensdauer von 72 Stunden des Sensors ist gleichfalls entscheidend für seine befriedigende Leistung. Die Langzeitstabilität des Sensors ist notwendig, damit eine einzige Eichung, entweder in vitro oder in vivo, für den gesamten Untersuchungszeitraum genau ist. Es ist jedoch nicht zu erwarten, daß während der geplanten Lebensdauer des Sensors keine Drift beobachtet wird. Vielmehr ist es lediglich notwendig, daß diese Drift innerhalb vernünftiger und vorhersagbarer Grenzen liegt. Es ist früher gezeigt worden, daß die Langzeit-Drift für einen elektrochemischen Glucosesensor mit einem angelegten Potential von +0,60 V während des Testzeitraums von 72 Stunden weniger als 5% beträgt.

BEISPIEL 5

[0073] Um die Langzeitstabilität des Sensorbetriebs bei einem Potential von etwa +0,35 V zu demonstrieren, wurde ein Sensor bei 37°C in eine Glucoselösung (100 mg/dl) getaucht und 90 Stunden lang mit einem angelegten Potential von +0,35 V betrieben. Die Langzeit-Drift des Sensors wurde während dieser Zeit beobachtet und aufgezeichnet.

[0074] **Fig. 7** zeigt das Stromausgangssignal von dem Sensor, der gemäß der obigen Beschreibung betrieben wurde. Wie aus dem Diagramm erkennbar, betrug die Langzeit-Drift des Sensors unter diesen Bedingungen weniger als 5%. Diese Langzeit-Drift liegt innerhalb akzeptierbarer Grenzen und zeigt, daß die Drift im Potential der Ag/AgCl-Bezugselektrode nicht groß genug ist, um das von der Arbeitselektrode aus gesehene "tatsächliche" Potential von dem Plateau für die Wasserstoffperoxid-Oxidation weg zu verschieben. Wäre die Drift groß genug, um das von der Arbeitselektrode aus gesehene Potential vom Plateau für die Wasserstoffperoxid-Oxidation zu verschieben, dann wäre eine negative Drift im Ausgangssignal des Sensors beobachtet worden.

[0075] In den folgenden Beispielen wird ein elektrochemischer Glucosesensor mit einem verminderten Potential betrieben, um die Effekte von Störverbindungen zu minimieren. Insbesondere wird die Fähigkeit des Verfahrens beurteilt, die Störeffekte von Acetaminophen zu minimieren. In diesen Beispielen wird die Auswirkung des Verfahrens in vivo gemessen.

[0076] Das für diese Untersuchungen verwendete Tiermodell war das neuseeländische weiße Kaninchen. Den Kaninchen wurden eine Venenkanüle zur Erleichterung der Infusion von Fluiden und eine Arterienkanüle für die Entnahme von Blutproben zur Analyse chirurgisch implantiert. Vor dem Einsetzen der Sensoren ließ man die Tiere sich erholen, so daß bei der Auswahl der Implantationsstelle ihre normale Körperhaltung berücksichtigt werden konnte.

[0077] Vor der Implantation wurden die Sensoren in ein Lumen einer Doppellumen-Polyethylenkanüle eingebracht, deren Spitze vorher zugeschweißt worden war. In die Wand der Kanüle war eine Öffnung geschnitten

worden, um nach der Implantation die aktiven Elektrodenflächen des Sensors dem umgebenden Gewebe auszusetzen (siehe **Fig. 1**). Das zweite Lumen der Kanüle wurde mit einem Stück 27-gauge-Nadelmaterial gefüllt, um sie während der Implantation zu versteifen.

[0078] Die Sensoren wurden im subkutanen Gewebe zwischen den Schulterblättern oder oberhalb des Lendenmuskelbereichs nahe der hintersten Rippe implantiert. Die Implantationsstellen wurden vor dem Einsetzen der Sensoren mit einem Lokalanästhetikum Lidocain vorbereitet. In das subkutane Gewebe wurde eine 18-gauge-Nadel (3,8 cm lang) eingesetzt und sofort entfernt, um einen Tunnel für den Sensor zu erzeugen. Nach dem Einsetzen des Sensors in diesen Tunnel wurde das 27-gauge-Nadelmaterial aus der Kanüle entfernt, und der Sensor wurde an die Haut angenäht. Die Kaninchen wurden während der Implantation der Sensoren und der Datenerfassung in einem Restraint gehalten.

[0079] Zur Herstellung des elektrischen Kontakts mit den drei Zuleitungen des Sensors wurde ein speziell gefertigter Steckverbinder benutzt. Es wurde ein Potential von entweder +0,6 V oder +0,35 V angelegt. Bei dieser Untersuchung wurde der Vorbehandlungsschritt nicht angewandt, und statt dessen konnten sich die Sensoren nach der Anfangspolarisierung etwa 2 Stunden lang einstellen. Dadurch blieb ausreichend Zeit für das Abklingen der Wirkungen des Lokalanästhetikums.

[0080] Während der gesamten Dauer jeder Glucoseinfusionsuntersuchung wurden in Abständen von 15 Minuten arterielle Blutproben entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert, und die Glucosekonzentration des entstehenden Plasmas wurde bestimmt. Das Stromausgangssignal vom Sensor zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme wurde aufgezeichnet und zur weiteren Analyse verwendet. Die Glucosekonzentrationen im Blut der Kaninchen wurden durch ständige venöse Infusionen einer sterilen Glucoselösung mit zwei verschiedenen Geschwindigkeiten (15 mg/kg/min und 30 mg/kg/min) erhöht.

[0081] Die die am Sensor aus der Oxidation von Störverbindungen allein erzeugte tatsächliche Stromstärke wurde durch Denaturieren der Glucoseoxidase auf dem Sensor vor der In-vivo-Implantation bestimmt. Das Enzym wurde inaktiviert, indem es 5 Minuten lang in siedendes Wasser getaucht wurde. Die Inaktivität wurde durch einen In-vitro-Test in einer physiologischen Glucoselösung überprüft. Die Auswirkung von Acetaminophen auf diesen Sensor wurde durch Infusion eines Bolus getestet, die eine Konzentration von etwa 15 mg/dl in den Kaninchen ergab. Dieser Wert der Glucosekonzentration ist etwa siebenmal so groß wie der normale physiologische Gehalt.

BEISPIEL 6

[0082] Die In-vivo-Leistung des Sensors wurde durch Implantieren eines vorgeeichten (In-vitro-) Sensors in das subkutane Gewebe eines Kaninchens beurteilt. Bei einem normalen Glucose-Grundkonzentrationswert wurde ein gleichbleibendes Stromausgangssignal erzeugt, und dann wurde eine konzentrierte Glucoselösung infundiert, um den Glucosegehalt im Blut zu erhöhen. Unter Verwendung der Eichgleichung aus dem In-vitro-Test wurde der Strom vom Sensor im subkutanen Gewebe in eine scheinbare In-vivo-Glucosekonzentration umgerechnet. Die Plasma-Glucosekonzentration wurde dann mit der scheinbaren Glucosekonzentration korreliert, wie sie durch den Sensor zum Entnahmezeitpunkt der arteriellen Blutprobe angezeigt wurde.

[0083] **Fig. 8** zeigt ein Korrelationsdiagramm zwischen der Plasma-Glucosekonzentration und der scheinbaren Glucosekonzentration, die von einem Sensor mit einem angelegten Potential von +0,6 V abgeleitet wurde. Die Sensorleistung scheint für 2 von 3 Variablen akzeptierbar zu sein. Der Anstieg ist annähernd gleich 1,0 ($m = 0,97$), und die Reaktion ist völlig linear ($R^2 = 0,98$). Leider tritt eine positive Abweichung auf, die durch den y-Achsenabschnitt ($d = 30,98 \text{ mg/dl}$) angezeigt wird. Diese Abweichung würde für einen physiologischen Glucosegehalt von 100 mg/dl einen Fehler von etwa 30% ergeben, der deutlich größer ist als der Fehler von 10%, der von den meisten Klinikern für akzeptierbar gehalten wird.

[0084] **Fig. 9** zeigt ein ähnliches Korrelationsdiagramm wie **Fig. 8**, wobei aber das angelegte Potential auf +0,35 V eingestellt war. In diesem Experiment wurde das gleiche Kaninchen benutzt wie für die Erzeugung der in **Fig. 8** dargestellten Daten; daher konnte die in vivo ermittelte Konzentration der Störverbindungen in jeder Untersuchung als ähnlich angenommen werden. Die In-vivo-Leistung dieses Sensors war akzeptierbar, da die Abweichung (y-Achsenabschnitt) auf 3 mg/dl vermindert war, während die lineare Korrelation und der nahe bei 1 liegende Anstieg erhalten blieben. Dieses Experiment läßt darauf schließen, daß der durch die Oxidation von Störverbindungen in vivo erzeugte Strom ohne Verwendung zusätzlicher Ausschlußmembranen, Elektroden, Enzyme oder Mediatoren auf einen akzeptierbaren Wert herabgesetzt werden kann. Außerdem erhärtet die dargestellte hervorragende Korrelation zwischen den Plasma-Glucosewerten und der Glucosekonzentration,

die im subkutanen Gewebe durch den Sensor gemessen wurde, die Gültigkeit und Genauigkeit der Überwachung von Glucosewerten im subkutanen Gewebe.

BEISPIEL 7

[0085] Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurde ein Sensor, der mit den in den oben erwähnten Experimenten eingesetzten Sensoren identisch war, in siedendes Wasser getaucht, um die Glucoseoxidase zu denaturieren. Durch diesen Prozeß wurde das Enzym inaktiviert und sichergestellt, daß kein Anteil des durch den Sensor erzeugten Stroms auf Glucose zurückzuführen war. Statt dessen war das Ausgangssignal ausschließlich die Kombination aus dem Hintergrundstrom und dem Störoxidationsstrom.

[0086] Tabelle 2 zeigt den In-vivo-Strom von einem typischen Sensor mit inaktivierter Glucoseoxidaseschicht. Der mit dem Potential von +0,60 V erzeugte "Grundlinien"-Strom ist höher als der In-vivo-Grundlinienstromwert, der normalerweise in PBS beobachtet wird, wie in Tabelle 1 dargestellt. Es besteht die Ansicht, daß diese Differenz von etwa 3,5 nA auf die Oxidation von Störverbindungen an der Arbeitselektrode zurückzuführen ist. Wenn dagegen das angelegte Potential auf +0,35 V verringert wurde, hatte der gleiche Sensor ein Stromausgangssignal von 0,6 nA. Dieser Stromwert, der annähernd gleich dem in Tabelle 1 dargestellten In-vivo-Grundlinienstromwert in PBS für +0,35 V ist, beweist ferner, daß durch Absenken des angelegten Potentials der Beitrag und der daraus resultierende Fehler von der Oxidation von Störverbindungen vermindert werden.

TABELLE 2

Angelegtes Potential	Grundlinienstrom	Von Acetaminophen-Bolus (15 mg/dl) herrührender Stromanstieg
+0,60 V	4,5 nA	9,0 nA
+0,35 V	0,6 nA	0,5 nA

BEISPIEL 8

[0087] Weiteres Beweismaterial wurde durch Infusion eines Acetaminophen-Bolus in die Venenkanüle des Kaninchens und Überwachung der Reaktion des Sensors erzeugt. Der Bolus erhöhte die Acetaminophen-Konzentration in dem Kaninchen um etwa 15 mg/dl, ungefähr das 7-fache des normalen physiologischen Gehalts. Der große Bolus wurde verabreicht, um der Möglichkeit Rechnung zu tragen, daß ein Teil des Medikaments vor der Diffusion in das subkutane Gewebe im Stoffwechsel umgesetzt wird. Wie in Tabelle 2 dargestellt, war die Erhöhung des Stromausgangssignals vom Sensor nach identischen Infusionen von Acetaminophen für die beiden angelegten Potentialwerte völlig verschieden. Der Stromanstieg infolge des Acetaminophen-Bolus für einen angelegten Potentialwert von +0,60 V war etwa 18 mal so groß wie der Stromanstieg, der gemessen wurde, wenn ein Potential von nur +0,35 V an den Sensor angelegt wurde.

[0088] Die oben beschriebenen Beispiele zeigen, daß durch Verringern des angelegten Potentials von +0,60 auf +0,35 V für einen amperometrischen elektroenzymatischen Sensor, der für In-vivo-Anwendungen konstruiert ist, der Effekt von Störverbindungen stark vermindert werden kann, ohne die Reaktion auf Glucose zu beeinträchtigen. Dies wird erreicht, ohne zusätzliche Membranschichten, Elektroden, Enzyme oder Mediatoren zu benötigen. In vitro ausgeführte Experimente zeigten, daß dieses Verfahren zur Verminderung des Effekts von Acetaminophen realisierbar ist. In-vivo-Experimente mit Einschluß aller biologisch auftretenden Störverbindungen haben diesen Befund bestätigt.

[0089] Eine Anzahl von Veränderungen werden in Betracht gezogen und können einbezogen werden, um die in den obigen Ausführungsformen beschriebene Erfindung anzupassen, ohne die grundlegende Erfindung zu verändern. Daher ist die Erfindung zwar in den vorstehenden Beispielen ausführlich dargestellt und beschrieben worden, aber diese Beispiele sind ihrem Charakter nach als erläuternd und nicht einschränkend einzusehen. Es versteht sich, daß die bevorzugten Ausführungsformen dargestellt und beschrieben worden sind und daß alle Änderungen und Modifikationen, die dem Grundgedanken der Erfindung entsprechen, zu schützen sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Gegenwart oder Konzentration einer interessierenden Substanz in einem Medium unter Verwendung eines elektrochemischen Sensors mit einer oder mehreren Elektroden, wobei das

Verfahren die folgenden Schritte aufweist:

- (i) Einbringen des Sensors in das Medium;
- (ii) Vorbehandeln des Sensors in dem Medium durch Anlegen eines gesteuerten elektrischen Stroms an eine oder mehrere Elektroden des Sensors, und
- (iii) Verwenden des vorbehandelten Sensors zur Ausführung einer Messung in dem Medium, wodurch die Vorbehandlung von Schritt (ii) mit einem elektrischen Strom ausgeführt wird, der mit einer konstanten Stromdichte von $0,1 \text{ mA/cm}^2$ und $1,0 \text{ mA/cm}^2$ während einer Zeit zwischen einer Minute und zehn Minuten angelegt wird, um die Einstellzeit der Elektrode während des Meßschritts (iii) wesentlich zu verkürzen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Vorbehandlung das Anlegen eines konstanten elektrischen Stroms aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der elektrische Strom angelegt wird, um die Einstellzeit der Elektrode auf weniger als 15 Minuten zu verkürzen.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die konstante Stromdichte während der Vorbehandlung etwa $0,5 \text{ mA/cm}^2$ beträgt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Strom während der Vorbehandlung etwa zwei Minuten lang mit konstanter Dichte angelegt wird.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Strom ein negativer Strom ist.

7. Verfahren zur Verkürzung der Einstellzeit eines elektrochemischen Sensors mit einer oder mehreren Elektroden, wobei das Verfahren aufweist:

Vorbehandeln des elektrochemischen Sensors nach dem Einbringen in ein Medium durch Anlegen eines gesteuerten elektrischen Stroms an eine oder mehrere Elektroden des Sensors, bevor der Sensor zur Messung der Gegenwart oder Konzentration einer interessierenden Substanz verwendet wird, wobei der gesteuerte Strom während einer Zeit zwischen einer und zehn Minuten mit einer konstanten Stromdichte von $0,1 \text{ mA/cm}^2$ bis $1,0 \text{ mA/cm}^2$ angelegt wird.

8. Verfahren zur Messung der Konzentration von Glucose in einem flüssigen Medium unter Verwendung eines elektrochemischen Sensors gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:

- (i) Inkontaktbringen des glucosehaltigen Mediums mit dem elektrochemischen Sensor;
- (ii) Vorbehandeln des Sensors in dem glucosehaltigen Medium durch Anlegen eines gesteuerten elektrischen Stroms an eine oder mehrere Elektroden des Sensors;
- (iii) Betreiben des Sensors durch Anlegen eines konstanten elektrischen Potentials an die Elektrode;
- (iv) Messen der Stromänderungsgeschwindigkeit bei der Erzeugung von H_2O_2 aus Glucose, Sauerstoff und Wasser an der Elektrode; wobei der vorbehandelte Sensor zur Ausführung der Messung in dem glucosehaltigen Medium verwendet wird, wodurch die Vorbehandlung von Schritt (ii) mit einem elektrischen Strom erfolgt, der mit einer Dichte und während einer Zeit angelegt wird, die ausreichen, um die Einstellzeit der Elektrode während des Meßschritts (iv) wesentlich zu verkürzen, und
- (v) Umrechnen der Stromänderungsgeschwindigkeit in einen Glucosekonzentrationswert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Vorbehandlungsschritt an einem elektrochemischen Sensor ausgeführt wird, der eine Arbeitselektrode aus Platinschwarz, eine Gegenelektrode aus Platinschwarz und eine Ag/AgCl-Bezugselektrode aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das angelegte elektrische Potential etwa $+0,35 \text{ V}$ beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das glucosehaltige Medium außerdem Störkomponenten enthält.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das glucosehaltige Medium außerdem Acetaminophen als Störkomponente enthält.

13. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Arbeitselektrode die Anode und die Gegenelektrode die Kathode ist.

14. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das konstante elektrische Potential größer als $0,1 \text{ V}$ und kleiner als

0,40 V ist.

15. Verfahren nach Anspruch 9, wobei auf der Arbeitselektrode Glucoseoxidase abgeschieden ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

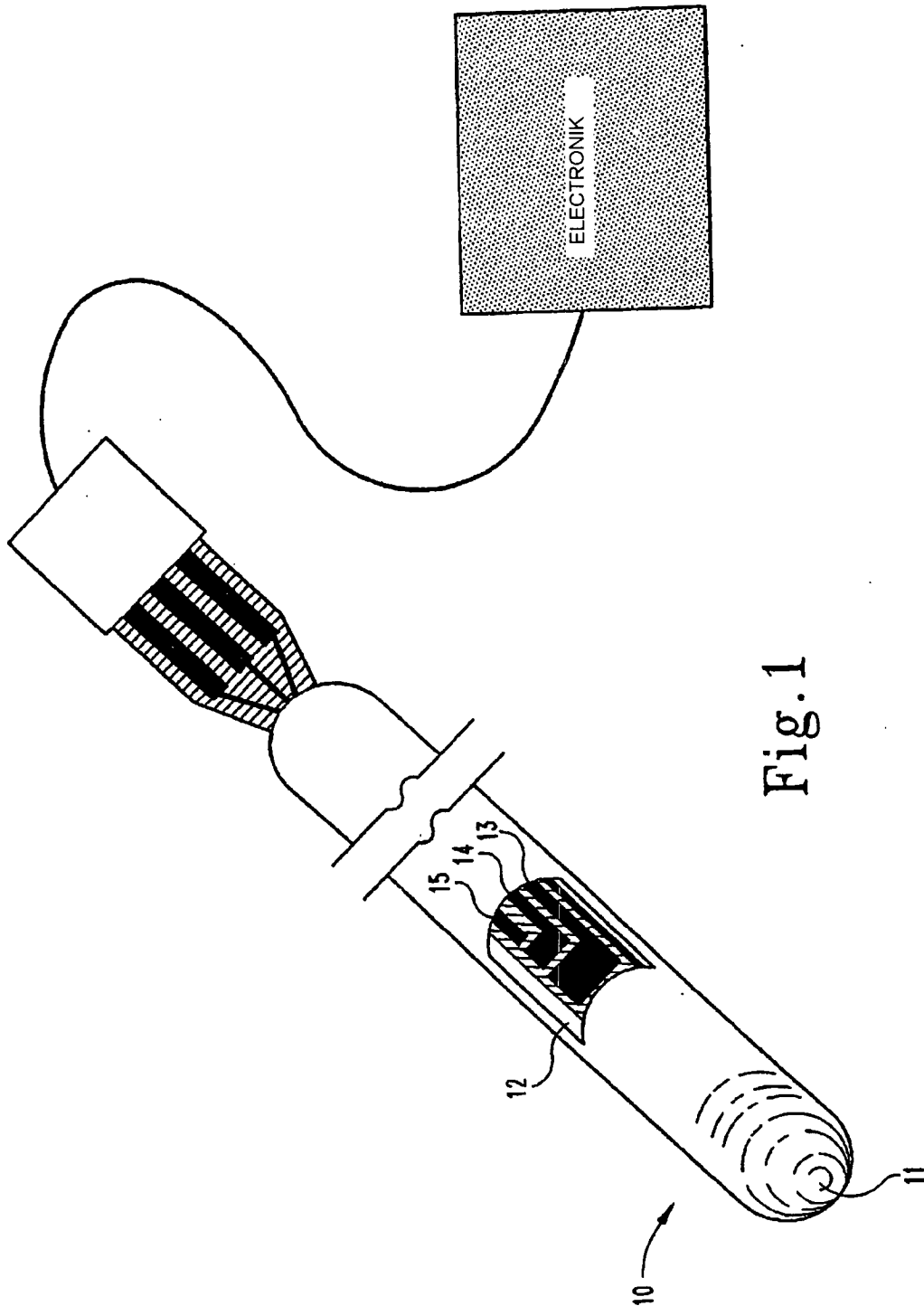


Fig. 1

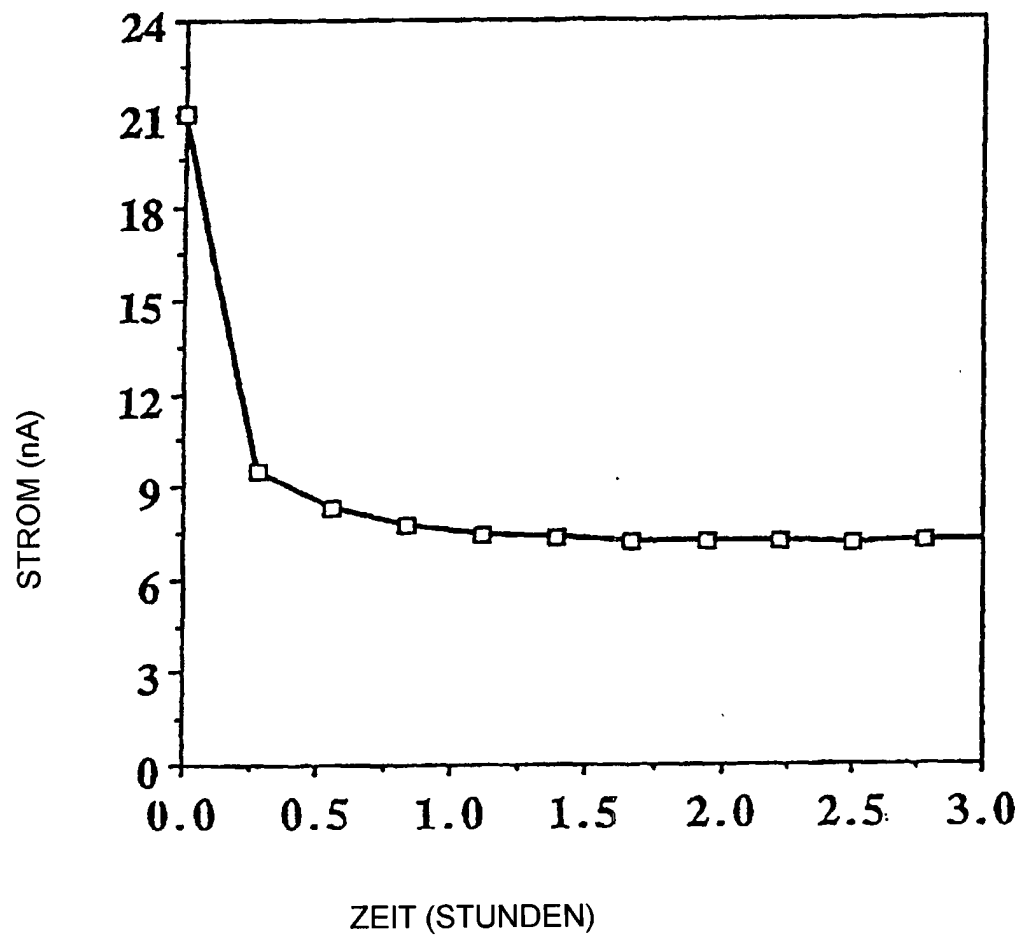


Fig.2

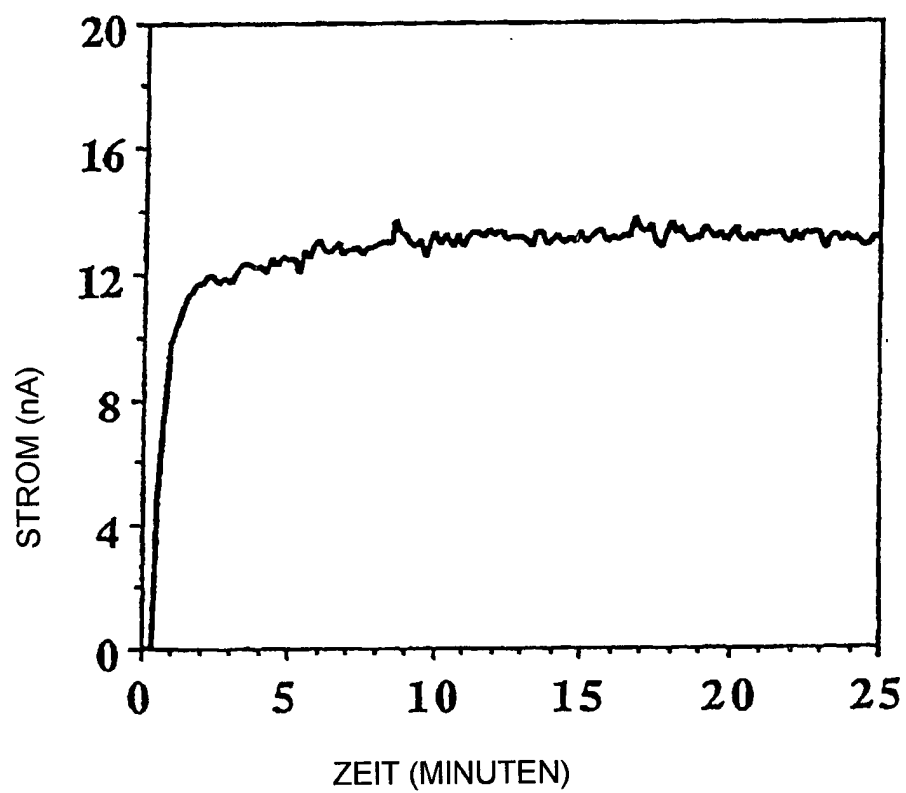


Fig.3

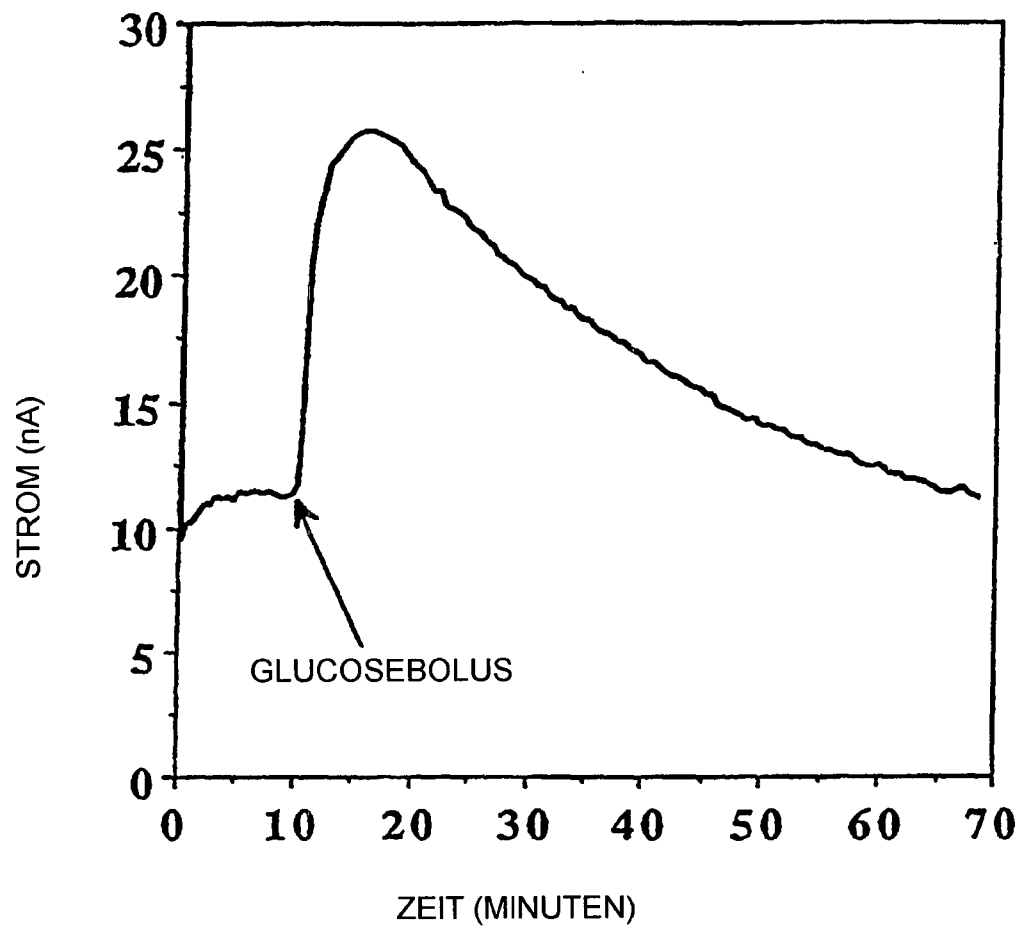


Fig.4

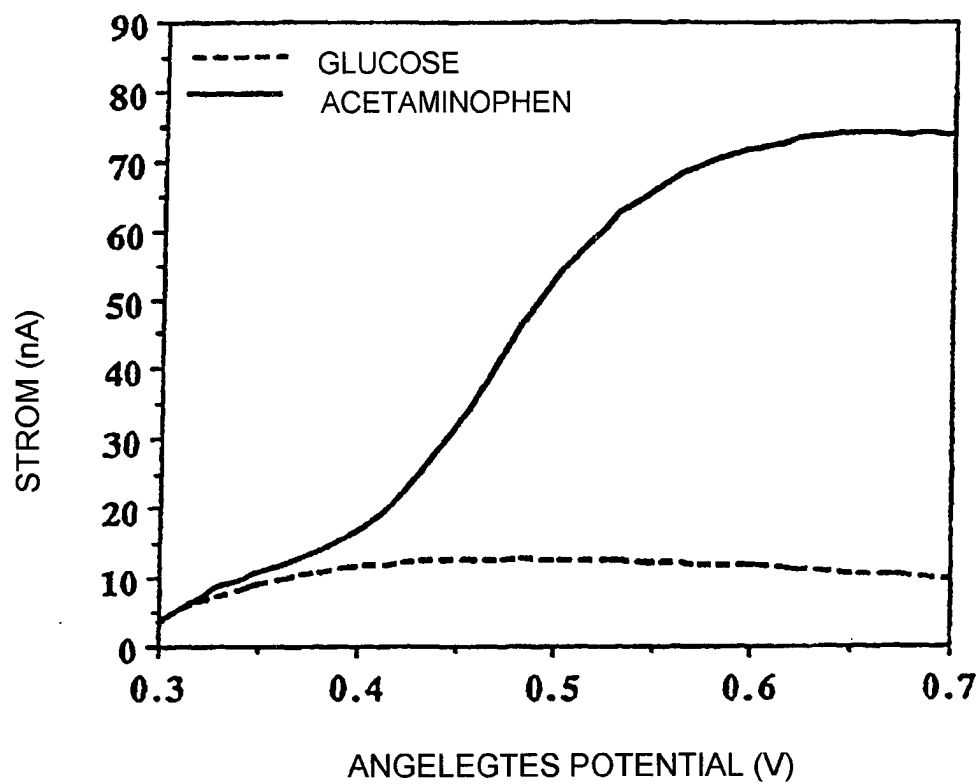


Fig.5

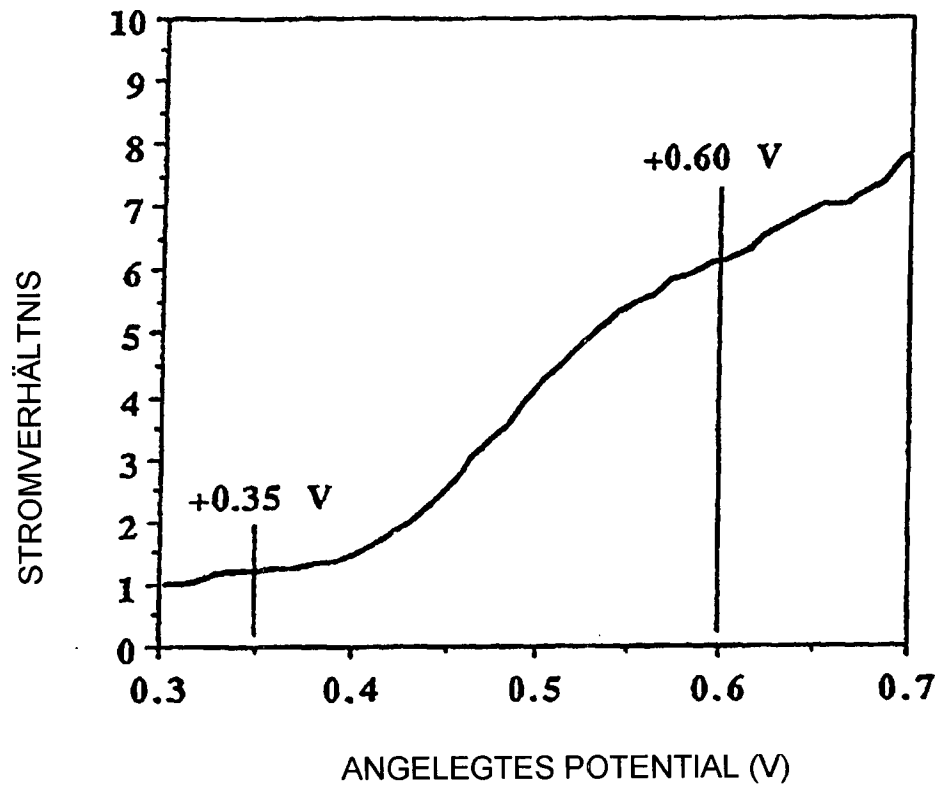


Fig.6

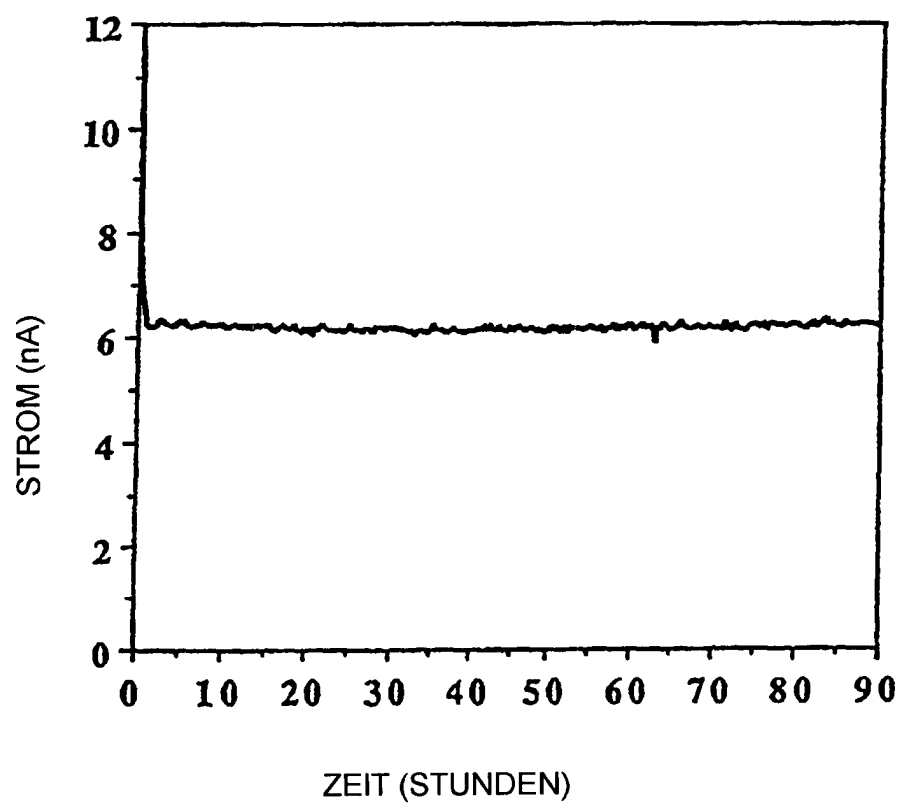


Fig.7

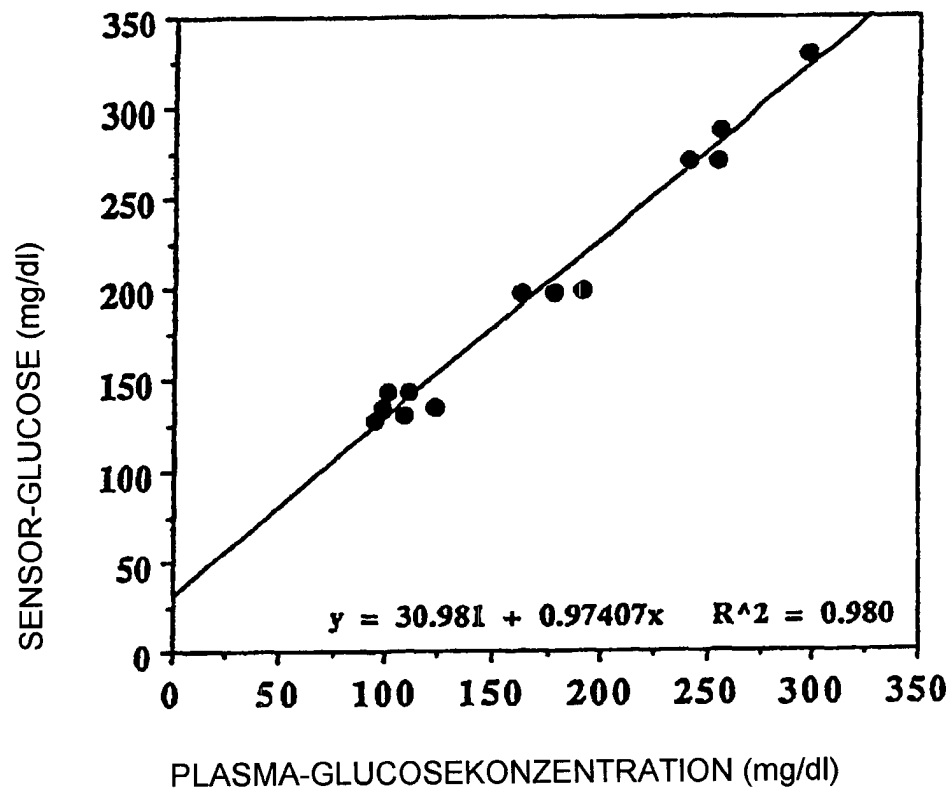


Fig.8

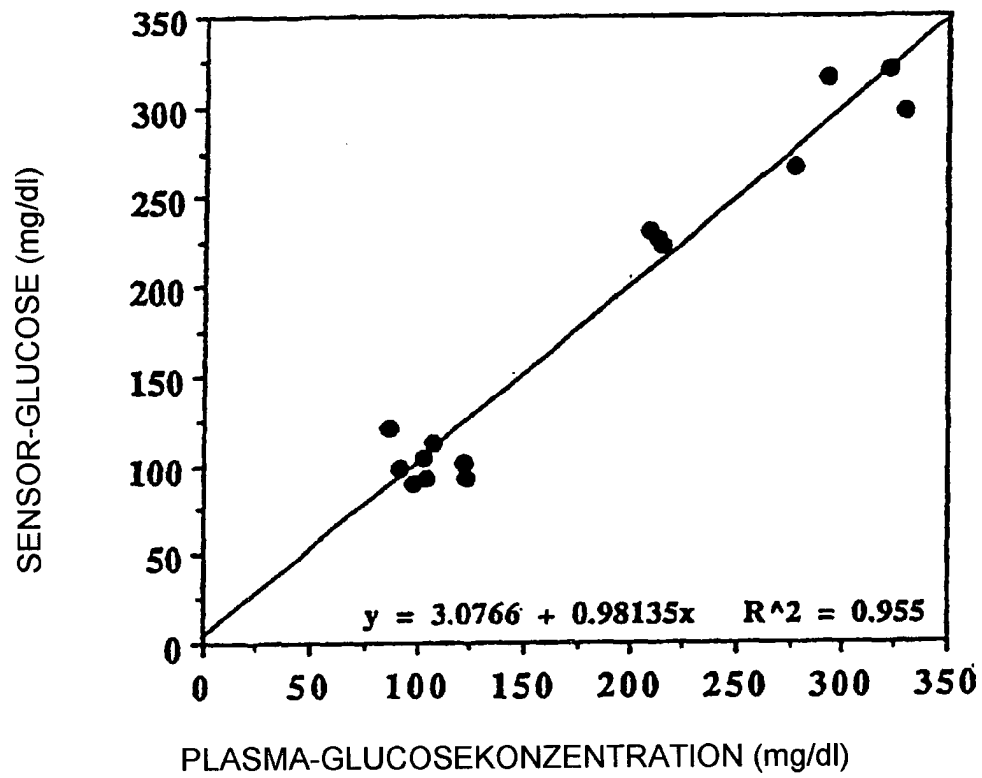


Fig.9