



F1000091023B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

91023

C (45) Patentti julkaisu
Patent published 05.11.1994

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

G 01N 27/40

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	863738
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.09.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.09.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	17.03.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	14.01.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
16.09.85 GB 8522834 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Imperial Chemical Industries PLC, Imperial Chemical House, Millbank, London SW1P 3JF,
United Kingdom, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Vadgama, Pankaj Maganlal, 191 Cheswick Drive, Gosforth, Newcastle-upon-Tyne, Tyne & Wear,
United Kingdom, (GB)
2. Churchouse, Stephen, 18 Kelvin Drive, Gateshead, Tyne & Wear, United Kingdom, (GB)
3. Mullen, William, 24 Weldon Crescent, High Heaton, Newcastle-upon-Tyne, Tyne & Wear,
United Kingdom, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

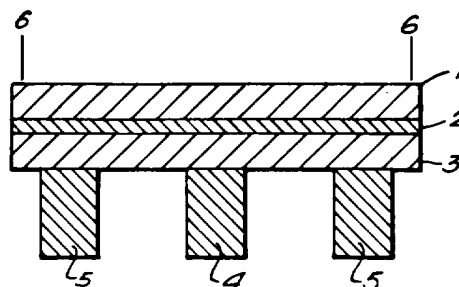
**Sensori
Sensor**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

JP tiiv. 59-164953 (G 01N 27/40), US A 4401122 (A 61B 5/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee entsyymi-elektrodityypistä koetinta, jota käytetään analyysin määrittämiseksi, jolloin analyytti on muutettavissa entsyymien läsnäollessa niin että se on osoitettavissa koettimen avulla. Koetin käsittää elektrodin [4,5] ja nestettä ja liuenneita aineita läpäisevän membraanin (1,2,3) sovitettuna elektrodin ja analyyttiä sisältävän näytteen väliin, jolloin membraani käsittää yhtä tai useampia entsyymejä sisältävän kerroksen sekä ainekerroksen, joka on sijoitettu entsyymiä sisältävän kerroksen ja näytteen väliin. Mainittu ainekerros sisältää alueen, jonka läpi analyytti kykenee kulkemaan ja jonka muodostaa huokoinen materiaali, jonka läpäisevyys on rajoitettu ja jonka huokoisuus ei ole suurempi kuin 5 %. Keksintö koskee myös menetelmää näytteen määrittämiseksi käyttäen edellä kuvattua koetinta.



Uppfinningen avser en sensor av enzym-elektrodtype för bestämning av en analyt, varvid analyten i närvaro av ett enzym kan omvandlas i en form som kan detekteras medelst sensorn. Sensorn omfattar en elektrod (4,5) och ett för vätskor och lösningar genomträngligt membran (1,2,3), vilket placerats mellan elektroden och ett prov som innehåller analyten, varvid membranet omfattar ett skikt, vilket innehåller ett eller flera enzymer, och ett materialskikt, vilket placerats mellan det enzymhaltiga skiktet och provet. Nämda materialskikt innehåller en area, genom vilken analyten kan gå och vilken utformats av ett poröst material med begränsad permeabilitet och en porositet som ej överstiger 5%. Uppfinningen avser även ett förfarande för bestämning av ett prov under användande av den ovan beskrivna sensorn.

Sensori

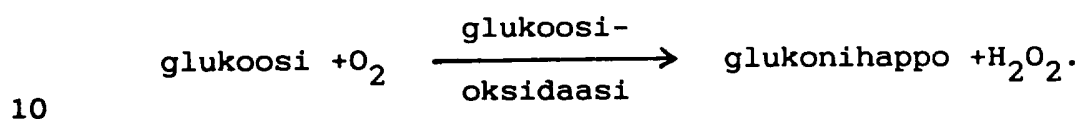
Tämä keksintö koskee entsyymielektrodityypistä sensoria (anturia), joka käsittää parannetun kalvon, sekä
5 analyyttistä menetelmää sensorin käyttämiseksi.

Entsyymielektrodeja käytetään kasvavassa määrässä lääketieteellisissä ja muissa laboratorioissa erityisesti sellaista materiaalien, kuten glukosin ja urean määrittämiseen verinäytteissä ja muissa fysiologisissa nesteis-
10 sä. Tällaisia elektrodeja selostetaan monissa julkaisuissa, varsinkin Clark'in ja Lyons'in artikkelissa (Annals of the New York Academy of Science, 102, 29 - 45, 1962) sekä vastaavasti Clark'in ja Newman'in nimiin myönnettyissä US-patenteissa nro 3 539 455 ja 3 979 274. Entsyymielektrode-
15 ja käytetään yleensä materiaalien määrittämiseen, jotka itse eivät ole sähkökemiallisesti aktiivisia, mutta jotka sopivien entsyymien läsnäollessa osallistuvat reaktioihin, jotka tuottavat lajeja, jotka voidaan helposti todeta elektrodien avulla. Entsyymielektrodeissa entsyymit sijaitsevat usein polymeerisen materiaalin sisässä hyvin lähellä alla olevaa elektrodia.

Huomattava määrä tutkimuksia on suoritettu tarkoituksella parantaa entsyymielektrodeissa käytettäväksi tarkoitettujen kalvojen ominaisuuksia ja monia kalvoja on
25 esitetty tähän tarkoitukseen. Eräs esimerkki kalvotyyppistä, jota usein käytetään, on Newman'in US-patentissa 3 979 274 esittämä laminoitu kalvo. Tämä kalvo käsittää ensimmäisen eli sisemmän kerroksen oleellisesti homogeenista ainetta, esimerkiksi selluloosa-asetaattia, joka
30 kykenee estämään pienimolekyyli-painoisten materiaalien läpikulun, jotka todennäköisesti häiritsevät entsyymisignaalia, aivan vieressä olevan kerroksen itse entsyymiä (joko yhdessä muiden sellaisten aineiden kanssa, joita voidaan sekoittaa sen kanssa, tai ilman näitä), sekä toisen kerroksen (tässä tapauksessa ulomman kerroksen) huo-

koista kantajakalvoa, joka kykenee estämään solumaisten ja kolloidisten osasten läpikulun.

Glukoosin määrittäminen voidaan ottaa esimerkiksi entsyymielektrodin avulla suoritettua materiaalin määrittämisestä. Glukoosioksidasientsyymillä läsnäollessa tapahtuu seuraava reaktio:



Tässä reaktiossa syntynyt vetyperoksidi kulkee sellaisen kalvon, kuten esim. US-patentissa 3 979 274 esitetyn kalvon, ensimmäisen kerroksen läpi ja voidaan määrittää elektrodia käyttämällä. Koska syntynyt vetyperoksidi on riippuvainen näytteessä läsnä olevasta glukoosista, voidaan glukoosin konsentraatio määrittää käyttämällä sopivasti kalibroitua sensoria.

Tähän päivään mennessä ovat monet vaikeudet rajoittaneet entsyymielektrodien hyväksikäyttöä ja supistaneet niiden käyttöasteikkoa, esim. värinäytteiden rutiinianalyseissä. Merkittävää näiden vaikeuksien joukossa on elektrodien vasteen rajoitettu lineaarisuus analysoitavien aineiden, kuten glukoosin tai laktaatin osalta, jotka ovat substraatteja entsyymien katalysoimille reaktioille. Vaste on lineaarinen vain analysoitavien aineiden alhaisten konsentraatioiden rajoitetulla alueella ja sen vuoksi määrittävien materiaalien konsentraatioiden tulee olla alhaiset ja yleensä täytyy käyttää laimennettuja näytteitä näyte-erissä, jotka on tarkoitettu analysoitaviksi käyttämällä entsyymielektrodeja. Aina ei ole mahdollista valmistaa laimeita näytteitä rutiinianalyysijä varten laboratorion ulkopuolella ja se saattaisi olla mahdotonta tehokkaan tarkkailun kannalta.

Keksinnön kohteena on entsyymi-elektrodityyppinen sensori analysoitavan aineen määrittämiseksi, joka analy-

- soitava aine on muutettavissa entsyymien läsnäollessa sellaiseksi lajiksi, joka voidaan todeta sensorin avulla, joka sensori käsittää elektrodin ja nesteitä ja liuennaita aineita läpäisevän kalvon sovitettuna elektrodin ja analysoitavaa ainetta sisältävän näytteen väliin, mainitun kalvon käsittäessä yhtä tai useampia entsyymejä sisältävän kerroksen sekä ainekerroksen, joka on sijoitettu entsyymiä sisältävän kerroksen ja näytteen väliin. Sensoreille on tunnusomaista, että mainittu ainekerros sisältää alueen, jonka läpi analysoitava aine pystyy kulkemaan ja joka on muodostettu huokoisesta materiaalista, jonka läpäisevyys on rajoitettu ja jonka huokoisuus on alueella 0,001 - 0,5 % ja jonka keskimääräinen huokoshalkaisija ei ole suurempi kuin 0,025 µm.
- Keksinnön kohteena on lisäksi menetelmä näytteessä olevan analysoitavan aineen määrittämiseksi saattamalla näyte kosketukseen kalvon ulomman kerroksen kanssa, joka kalvo on nesteitä ja liuennaita aineita läpäisevä ja sisältää yhtä tai useampia entsyymejä, joiden läsnäollessa analysoitava aine on muutettavissa sellaiseksi lajiksi, joka on kalvon sisältävän sensorin avulla todettavissa, sekä yksi tai useampia ainekerroksia, ja mittaamalla sensorin vaste kyseiseen lajiin. Menetelmälle on tunnusomaista, että kalvon entsyymien ja näytteen välissä oleva kerros sisältää alueen, jonka läpi analysoitava aine pystyy kulkemaan, muodostettuna läpäisykyvyltään rajoitetusta huokoisesta aineesta, jonka huokoisuus on alueella 0,001 - 0,5 % ja jonka keskimääräinen huokoshalkaisija ei ole suurempi kuin 0,025 µm.
- Huokoisesta materiaalista muodostettu alue aikaansaa sen, että sen sisältävällä kerroksella on rajoitettu läpäisykyky. Tämän kerroksen tehokas alue on edullisesti kokonaan tai pääosaltaan muodostettu materiaalista, jonka huokoisuus on 0,001 - 0,5 %.
- Keksinnön mukaisessa sensorissa oleva kalvo koostuu yksinkertaisimmassa muodossaan entsyymiä sisältävästä ker-

roksesta ja kerroksesta, jonka läpäisykyky on rajoitettu. Läpäisykyvyltään rajoitettu kerros on ulompana kerroksena tässä kalvon yksinkertaisimmassa muodossa ja se on suoraan kosketuksessa näytteen kanssa keksinnön mukaisessa menetelmässä analysoitavan aineen määrittämiseksi.

On kuitenkin edullista, että kalvo on sitä laminoitua kalvotyyppiä, josta US-patentissa esitetty kalvo on esimerkki. Tällainen kalvo käsittää ensimmäisen eli sisem-
 10 män ainekerroksen sovitettuna entsyymiä sisältävän kerroksen ja elektrodin väliin, entsyymiä sisältävän kerroksen ja toisen ainekerroksen entsyymiä sisältävän kerroksen toisella puolella, joka toinen kerros on se kerros, jonka läpäisykyky on rajoitettu.

Jäljempänä tässä selityksessä sisältää keksinnön mukainen sensori, jota selostetaan, sitä tyyppiä olevan
 15 laminoidun kalvon, josta US-patentissa 3 979 274 kuvattu kalvo on esimerkkinä, ja kalvossa on ensimmäinen ja toinen kerros, jolloin se kerros, joka sisältää huokoista materiaalia, jonka läpäisykyky on rajoitettu, on toisena kerroksena.

On ymmärrettävä, että keksinnön mukaisessa sensorissa olevat kalvot voivat sisältää enemmän kuin kaksi ainekerrosta entsyymiä sisältävän kerroksen lisäksi. Esimerkiksi toinen kerros, so. läpäisykyvyltään rajoitettu
 25 kerros, ei välttämättä ole kalvon uloin kerros. Siinä voi olla lisäksi ainekerros tai ainekerroksia, so. kolmas, neljäs jne, kerros toisen kerroksen eli läpäisykyvyltään rajoitetun kerroksen ja näytteen välissä. Usein kuitenkin toinen kerros on ulompi kerros ja sen ulompi pinta on kosketuksessa näytteen kanssa.

Yleensä toisessa kerroksessa käytetty, läpäisykyvyltään rajoitettu huokoinen aine on polymeeristä materiaalia, mutta muitakin sopivia aineita voidaan käyttää. Niinpä toinen kerros voidaan muodostaa lasista tai metal-
 35 lista, joissa on laser-säteillä leikattuja huokosia.

Prosentuaalinen huokoisuus on huokospinta-alan x ja huokostiheyden tulo kerrottuna sadalla. Esimerkkejä huokosten nimelliskoosta ja huokosten nimellistiheydestä aineille, joilla on sopivat alhaiset huokoisuudet, ovat seuraavat:

Huokosen nimellis- koko (μm)	Huokosten nimellis- tiheys (huokosia/ cm^2)	Laskettu huokoi- suus %:na
0,01	6×10^8	0,047
0,01	1×10^8	0,008

Muita materiaalin parametrejä, joita voidaan käsitellä materiaalin saamiseksi, jolla on sopivasti rajoitettu läpäisykyky, toista, huokoista materiaalia olevaa kerrosta varten on huokosten mutkittelu. Toisen kerroksen paksuus vaikuttaa myös läpäisykykyyn.

Keksinnön mukaisessa sensorissa toimii kalvon toinen kerros diffuusiovallina ja estää suurimolekyyllipainoisten yhdisteiden läpikulun tai estää niiden läpikulkua ja antaa kalvolle riittävästi lujuutta, niin että se kykenee säilyttämään muotonsa ja säilyttämään sopivan kosketuksen elektrodin kanssa. Sopivia huokoisia materiaaleja toista kerrosta varten ovat huokoiset polykarbonaatit, polyuretaanit sekä modifioitu selluloosa, erityisesti selluloosanitraatti, selluloosa-asettaatti ja regeneroitu selluloosa.

Sopivat materiaalit käsittävät myös materiaaleja, joiden "leikkeiden" molekyylipaino on 20 000 tai pienempi. Nopean elektrodivasteen takaamiseksi on toisen kerroksen paksuus edullisesti pienempi kuin 20 μm , erityisesti välillä 1 - 10 μm . Erityisen sopivilla materiaaleilla toista kerrosta varten on keskimääräinen huokoshalkaisija välillä 0,015 μm - 0,025 μm .

Keksinnön mukaisessa sensorissa voi olla irtokalvo tai se voi olla kertakäyttösensori siihen liittyvine kalvoineen. Sensoreihin sopivien elektrodien muodostuksessa käytettyjä materiaaleja ovat inertit metallit ja/tai hiili.

Jos anturiin sisältyy US-patentissa 3 979 274 esitettyä tyyppiä oleva laminoitu kalvo, niin ensimmäinen kerros, joka on tarkoitettu sijoitettavaksi entsyymikerroksen ja elektrodin väliin, muodostetaan sopivasti polymetyyli-metakrylaatista, polyuretaanista, selluloosa-asetaatista tai muusta huokoisesta materiaalista, joka rajoittaa sähköisesti aktiivisten, häiritsevästi vaikuttavien yhdisteiden, kuten askorbiinihapon ja tyrosiinin läpikulua tai estää sen. Ensimmäisen kerroksen paksuus on
 5
 10 sopivasti välillä 0,2 μm - 1,0 μm .

Keksinnön mukaisessa sensorissa oleva entsyymi voidaan sijoittaa kalvoon millä sopivalla tavalla tahansa. Laminoidussa kalvossa se on edullisesti huokoisen materiaalin ensimmäisen ja toisen kerroksen välissä ja muodostaa niiden välisen sidoksen. Tässä sijainnissa, ja myöskin yleensä, entsyymi on tehty edullisesti liikkumattomaksi sekoittamalla aineen kanssa, joka aikaansaa ristikytkeytymisen. Eräs hyvin sopiva aine tähän tarkoitukseen on glutaarialdehydi; proteiineja, kuten albumiinia ja muita materiaaleja voidaan myös sisällyttää. Sensorista saatujen nopeiden stabiilien lukemien saamisen helpottamiseksi on edullista, että entsyymiä sisältävä kerros on ohut, so. ei paksumpi kuin 5 μm .
 15
 20

Keksinnön mukaisessa sensorissa käytettävä entsyymi riippuu analysoitavasta aineesta, jonka konsentraatio on määritettävä. Jos analysoitava aine on glukoosi, niin tällöin entsyymi on esimerkiksi glukoosioksidaasi. Muita entsyymejä, joita voi olla läsnä, ovat urikaasi ja laktaattioksidaasi vastaavasti virtsahapon ja maitohapon määrittämiseksi. Entsyymijärjestelmiä, jotka käsittävät kaksi tai useampia entsyymejä, voi myös olla läsnä.
 25
 30

Keksinnön mukaisessa sensorissa glukoosin määrittämistä silmälläpitäen käytettävälaminoitu kalvo voidaan valmistaa menetelmällä, joka käsittää seuraavat vaiheet:
 35 1. 1 mg glukoosioksidaasia liuotetaan 50 μl :aan (100 mg/ml) albumiinia,

2. 3 µl 12,5-% glutaarialdehydiliuosta sekoitetaan mikroskoopin objektilasilla 3 µl:n kanssa entsyymi/albumiini-seosta,

3. 1 µl edellisessä vaiheessa valmistettua seosta pannaan 1 cm²:n suuruisen polykarbonaattikalvon toiselle puolelle, jonka kalvon huokoisuus ei ole suurempi kuin 5 % ja jonka huokosten keskimääräinen halkaisija on alle 0,03 µm.

4. Entsyymikerroksen toinen pinta peitetään välittömästi ohuella selluloosa-asetaattikalvolla ja saatua laminoitua kalvoa puristetaan 3 minuutin ajan objektilasien välissä. Objektilasien poistamisen jälkeen voidaan edellä esitetyn vaihesarjan avulla valmistettu laminoitu kalvo asettaa platinaelektrodille keksinnön mukaisen sensorin muodostamiseksi, jolloin selluloosa-asetaattikalvo on lähinnä elektrodia ja muodostaa ensimmäisen kerroksen.

Keksinnön mukaisen menetelmän käyttäminen tuottaa etuna sen konsentraatioalueen suurenemisen, jolla alueella diagrammi, joka esittää konsentraatiota sensorin vastauksen funktiona, on lineaarinen. Tavanomaisia menetelmiä käytettäessä lineaarisuus ulottui yleensä vain enintään suunnilleen glukoosin konsentraatioon 3 mmol litraa kohti. Keksinnön mukaista menetelmää käyttäen lineaarisuus suurenee ja alue ulottuu glukoosin konsentraatioihin, jotka ovat 50 mmol litraa kohti ja vieläkin korkeampia. Korkeammilla konsentraatioilla tämä saavutetaan rajoittamalla substraatin tunkeutumista entsyymikerrokseen ja menettämällä tämän vuoksi jonkin verran herkkyyttä. Tällöin alue peittää ne glukoosin konsentraatiot, joita voidaan odottaa olevan verinäytteissä tehden sen vuoksi veren glukoosipitoisuuksien määrittämisen helpommaksi. Tämä on huomattava etu tilanteissa, joissa täytyy tehdä vakituisesti suuri joukko määrittäksiä ja mahdollisimman vähäisellä näytteiden käsittelyllä. Lineaarisuus laajenee myös lisättäessä kalvon toiseen kerrokseen väliainetta, joka käsittää orgaanisia, jossa on reaktiivisia ryhmiä, kuten hakijan viireillä olevassa Eurooppa-patenttihakemuksessa EPO nro

8633907.9 on esitetty. Tämä käsittely voidaan kohdistaa esillä olevan keksinnön mukaisessa sensorissa olevan kalvon toiseen kerrokseen yhdistelmävaikutuksen ja edelleen parantuneen lineaarisuuden aikaansaamiseksi.

5 Keksintöä valaistaan oheisten piirustusten kuvion 1 avulla.

 Kuviossa 1 viitenumero 1 tarkoittaa kalvon toista kerrosta, joka on muodostettu polykarbonaattikalvosta, jonka huokoisuus on 0,42 %, 2 tarkoittaa kerrosta, joka
10 sisältää glukosiooksidaasientsyymiä liuotettuna albumiiniin ja sekoitettuna glutaarialdehydin kanssa, 3 tarkoittaa selluloosa-asetaatista muodostettua ensimmäistä kerrosta, 4 tarkoittaa platinasta valmistettua koe-elektrodia ja 5 tarkoittaa hopeista vertailuelektrodia. 1, 2 ja 3
15 muodostavat yhdessä laminoidun kalvon. Platinainen koe-elektrodi 4 toimii anodina, kun taas hopeinen vertailuelektrodi 5 toimii katodina. Kalvon pitää paikoillaan elektrodilla pleksilasirengas, joka puristaa alaspäin ulompaa kerrosta 1 sen ulkoreunoja vastaan kohdissa 6.

20 Kuviossa 1 esitetyn sensorin käyttöä valaistaan seuraavien esimerkkien avulla:

Esimerkki 1

 Vesiliuos, joka sisälsi 30 mg/ml glukosiooksidaasientsyymiä (E.C.1.1.3.4) ja 200 mg/ml albumiinia, sekoitettiin yhtäsuuren tilavuuden kanssa liuosta, joka sisälsi 50
25 µg/ml glutaarialdehydiä. 1 cm²:n suuruinen pala "NUCLEOPORE"-polykarbonaattikalvoa (keskimääräinen huokoshalkaisija = 0,05 µm) altistettiin 5 µl:lle liuosseosta tarkoituksella kyllästää kalvo entsyymillä. Tässä tapauksessa kalvo
30 toimii entsyymien kantajana ja sillä ei ole mitään vaikutusta anturista saadun vasteen lineaarisuuteen.

 Entsyymillä kyllästetty kalvo pantiin sensorin koe- ja vertailuelektrodien päälle (jotka oli etukäteen kostutettu 0,067 M fosfaattipuskurilla, joka sisälsi 50 mmol
35 litraa kohti natriumkloridia, pH-arvo 7,4, elektrolyyttisen yhteyden takaamiseksi koe- ja vertailuelektrodien vä-

lillä). Toisena kerroksena oleva tutkittava kalvo pantiin entsyymillä kyllästetyn kalvon päälle. Elektrodirungon ruuviasennusosa pantiin sen jälkeen paikoilleen ja kiristettiin kohdistamalla heikkoa jännitystä muodostettuun
5 laminoituun kalvoon. Sen jälkeen kalvoa testattiin. Koska ylempi kalvo (testattava kalvo toisena kerroksena) voidaan korvata muilla kalvoilla, oli mahdollista käyttää samaa tuettua entsyymikerrosta useille erilaisille toisille kerroksille).

10 Tässä esimerkissä toisena kerroksena testatut kalvot olivat seuraavanlaiset:

- (1) "NUCLEPORE"-polykarbonaattilisäkalvo, jonka keskimääräinen huokoshalkaisija on $0,05\ \mu\text{m}$,
- (2) "NUCLEPORE"-polykarbonaattikalvo, jonka keskimääräinen
15 huokoshalkaisija on $0,015\ \mu\text{m}$; ja
- (3) Toiminimen Schleicher and Schull valmistaa regeneroitua selluloosaa olevaa kalvoa (RC52), jonka keskimääräinen huokoshalkaisija on $0,01\ \mu\text{m}$.

Käytettäessä kalvoa (1) oli sensorin lineaarisuus
20 $7\ \text{mmol}$ litraa kohti. Kalvoilla (2) ja (3) saadut tulokset on esitetty vastaavasti oheisten piirustusten kuviossa 2 ja 3, joissa diagrammit esittävät μA -suureina ilmoitettuja virrantiheyksiä (ordinaatat) mmol :eissa litraa kohti ilmoitetun glukoosikonsentraation (abskissat) funktiona.
25 Nämä tulokset osoittavat, että käyttämällä kalvoja (2) ja (3) toisena kerroksena, sensori osoittaa paljon suurempaa lineaarisuutta - suurempaa kuin $20\ \text{mmol}$ litraa kohti kerrokselle (2) ja ainakin $50\ \text{mmol}$ litraa kohti kerrokselle (3). Vasteaika (98 %) kerrokselle (2) oli 30 - 60 sekuntia
30 ja kerrokselle (3) 20 minuuttia. Vasteaika (90 %) kerrokselle (3) oli 7 minuuttia.

Esimerkki 2

Esimerkki 1 toistettiin käyttämällä laktaattioksidasientsyymiä (E.C.1.1.3.2). Toisena kerroksena testatut
35 kalvot olivat sellaiset kuin esimerkissä 1 kohdissa (1) ja

(2) on esitetty, jolloin niiden keskimääräiset huokoshalkaisijat olivat vastaavasti 0,05 μm ja 0,015 μm .

Kalvoa (1) käytettäessä sensorin lineaarisuus oli 0,2 mmol litraa kohti. Kalvolla (2) saatu tulos on esitetty oheisten piirustusten kuviossa 4, joka esittää μA -suureena ilmoitetun virrantiheyden (ordinaatta) diagrammia mmol:eissa litraa kohti ilmoitetun glukoosin konsentraation (abskissa) funktiona. Jälleen lineaarisuus, käyttämällä pienempihuokoista kalvoa toisena kerroksena, on suurempi kuin käytettäessä suurempihuokoista kalvoa. Tässä tapauksessa saavutetaan lineaarisuus vähintään arvolla 4 mmol litraa kohti kalvolla (2), jolloin vasteaika on 1 - 2 minuuttia.

Esimerkki 3

Esimerkin 1 menetelmää käytettiin testattaessa toisena kerroksena toiminimen Schleicher and Schull valmistamaa, regeneroitua selluloosaa olevaa kalvoa (RC52), jonka nimellinen huokoskoko oli välillä 0,005 - 0,010 μm . Tulos on esitetty kuviossa 5, joka esittää suureena μA ilmoitetun virrantiheyden (ordinaatta) diagrammia mmol:ssa litraa kohti (abskissa) ilmoitetun glukoosikonsentraation funktiona. Tämä osoittaa, että sensorin vaste on lineaarinen huomattavan konsentraatioalueen yli.

Esimerkki 4

Esimerkin 1 menetelmää käytettiin testattaessa toisena kerroksena toiminimen Schleicher and Schull valmistamaa selluloosa-asetaattikalvoa (AC62), jonka nimellinen huokoskoko on välillä 0,005 - 0,01 μm . Tulos on esitetty kuviossa 6, joka esittää μA -suureena ilmoitetun virrantiheyden (ordinaatta) diagrammia mmol:ssa ilmoitetun glukoosikonsentraation (abskissa) funktiona. Tämä osoittaa, että vaste on lineaarinen huomattavan konsentraatioalueen yli.

Patenttivaatimukset

1. Entsyymi-elektrodityyppinen sensori analysoitavan aineen määrittämiseksi, joka analysoitava aine on
5 muutettavissa entsyymien läsnäollessa sellaiseksi lajiksi, joka voidaan todeta sensorin avulla, joka sensori käsittää elektrodin ja nesteitä ja liuennaita aineita läpäisevän kalvon sovitettuna elektrodin ja analysoitavaa ainetta sisältävän näytteen väliin, mainitun kalvon käsittäessä
10 yhtä tai useampia entsyymejä sisältävän kerroksen sekä ainekerroksen, joka on sijoitettu entsyymiä sisältävän kerroksen ja näytteen väliin, t u n n e t t u siitä, että mainittu ainekerros sisältää alueen, jonka läpi analysoitava aine pystyy kulkemaan ja joka on muodostettu huokoisesta materiaalista, jonka läpäisevyys on rajoitettu ja
15 jonka huokoisuus on alueella 0,001 - 0,5 % ja jonka keskimääräinen huokoshalkaisija ei ole suurempi kuin 0,025 µm.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää laminoidun kalvon, joka
20 käsittää entsyymiä sisältävän kerroksen sijoitettuna ensimmäisen ainekerroksen ja toisen ainekerroksen väliin, ensimmäisen kerroksen ollessa entsyymiä sisältävän kerroksen ja elektrodin välissä sensorissa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että kalvon ensimmäinen kerros on muodostettu polymetyylimetakrylaatista, selluloosa-asetaatista tai polyuretaanista.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että läpäisykyvyltään rajoitettu huokoinen aine on muodostettu polykarbonaatista tai modifioidusta selluloosasta.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että läpäisykyvyltään rajoitettu huokoinen aine muodostaa sitä sisältävän kerroksen koko tehokkaan alueen.
35

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että läpäisykyvyltään rajoitetun huokoisen aineen huokosten keskimääräinen halkaisija on alueella 0,01 - 0,025 μm .

5 7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen sensori, t u n n e t t u siitä, että läpäisykyvyltään rajoitetun huokoisen aineen huokoisuus on alueella 0,005 - 0,025 %.

10 8. Menetelmä näytteessä olevan analysoitavan aineen määrittämiseksi saattamalla näyte kosketukseen kalvon ulomman kerroksen kanssa, joka kalvo on nesteitä ja liuennneita aineita läpäisevä ja sisältää yhtä tai useampia entsyymejä, joiden läsnäollessa analysoitava aine on muutettavissa sellaiseksi lajiksi, joka on kalvon sisältävän
15 sensorin avulla todettavissa, sekä yksi tai useampia ainekerroksia, ja mittaamalla sensorin vaste kyseiseen lajiin, t u n n e t t u siitä, että kalvon entsyymin ja näytteen välissä oleva kerros sisältää alueen, jonka läpi analysoitava aine pystyy kulkemaan, muodostettuna läpäisykyvyltään
20 rajoitetusta huokoisesta aineesta, jonka huokoisuus on alueella 0,001 - 0,5 % ja jonka keskimääräinen huokoshalkaisija ei ole suurempi kuin 0,025 μm .

Patentkrav

1. Sensor av enzym-elektroddtyp för bestämning av ett ämne, som skall analyseras, varvid ämnet, som skall
5 analyseras, kan i närvaro av ett enzym omvandlas till en sådan art, som kan påvisas med en sensor, vilken omfattar en elektrod och en membran, som släpper igenom västkör och lösta ämnen och är anbringad mellan elektroden och provet, vilket innehåller ämnet, som skall analyseras, varvid
10 nämnda membran omfattar ett skikt, som innehåller ett eller flera enzymer, samt ett materialskikt, som är placerat mellan det enzym-innehållande skiktet och provet, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda materialskikt innehåller ett område, genom vilket ämnet, som skall analyse-
15 ras, är kapabelt att passera, och vilket är format av poröst material, som har begränsad genomsläpplighet och porositet inom området av 0,001 - 0,5 % och vars genomsnittliga pordiameter icke är större än 0,025 μm .

2. Sensor enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller en laminerad membran, som omfattar ett enzym-innehållande skikt placerat mellan ett första materialskikt och ett andra materialskikt, varvid första skiktet är mellan det enzym-innehållande skiktet och elektroden i sensorn.

25 3. Sensor enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att första skiktet i membranen är bildat av polymetylmetakrylat, cellulosaaacetat eller polyuretan.

4. Sensor enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att det porösa materialet
30 med begränsad genomsläpplighet är bildat av polykarbonat eller modifierad cellulosa.

5. Sensor enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att det porösa materialet med begränsad genomsläpplighet bildar det totala effektiva
35 området i skiktet, som innehåller det.

6. Sensor enligt något av patentkraven 1 - 5,
k ä n n e t e c k n a d därav, att porerna i det porösa
materialet med begränsad genomsläpplighet har en genom-
snittlig diameter inom området av 0,01 - 0,025 μm .

5 7. Sensor enligt något av patentkraven 1 - 6,
k ä n n e t e c k n a d därav, att det porösa materialet
med begränsad genomsläpplighet har en porositet inom områ-
det av 0,005 - 0,025 %.

10 8. Förfarande för att i ett prov bestämma ett ämne,
som skall analyseras, genom att bringa provet i kontakt
med yttre skiktet av en membran, som släpper igenom väts-
kor och lösta ämnen och innehåller ett eller flera enzy-
mer, i närvaro av vilka ämnet, som skall analyseras, kan
omvandlas till en sådan art, som kan påvisas med en sen-
15 sor, som innehåller membranen, samt ett eller flera mate-
rialskikt, och genom att mäta sensorens respons till ifrå-
gavarande art, k ä n n e t e c k n a t därav, att skiktet
mellan enzymet och provet i membranen innehåller ett områ-
de, genom vilket ämnet, som skall analyseras, är kapabelt
20 att passera, vilket område är bildat av poröst material,
som har begränsad genomsläpplighet och porositet inom om-
rådet av 0,001 - 0,5 % och vars genomsnittliga pordiameter
icke är större än 0,025 μm .

FIG. 1.

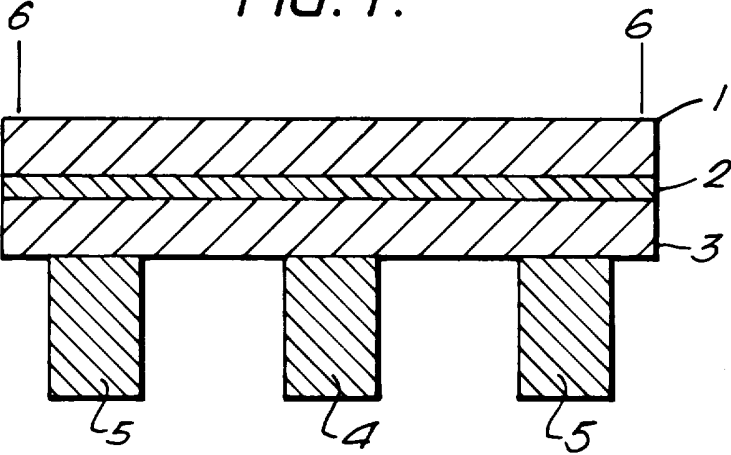


FIG. 2.

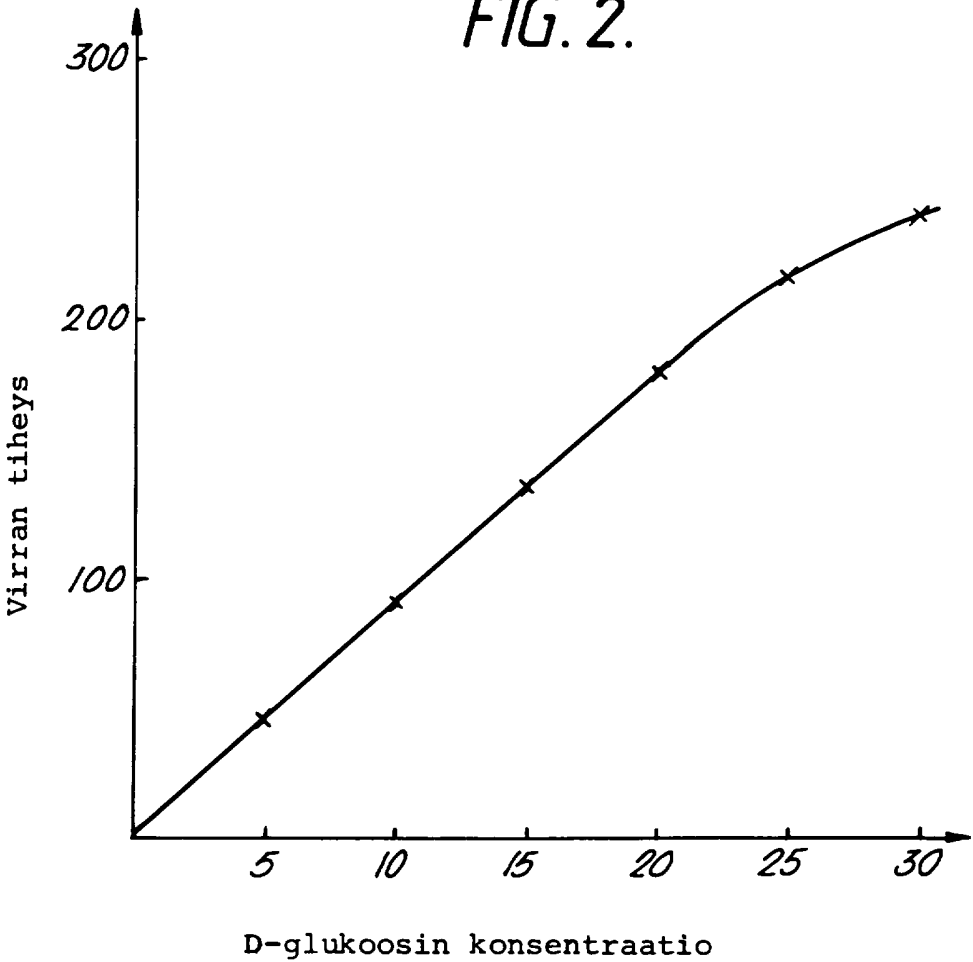


FIG.3.

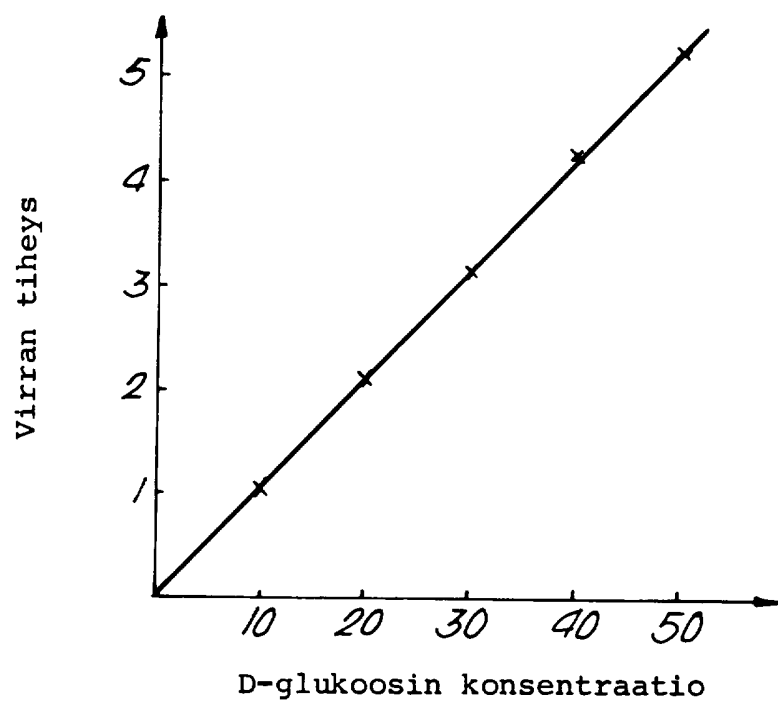


FIG.4.

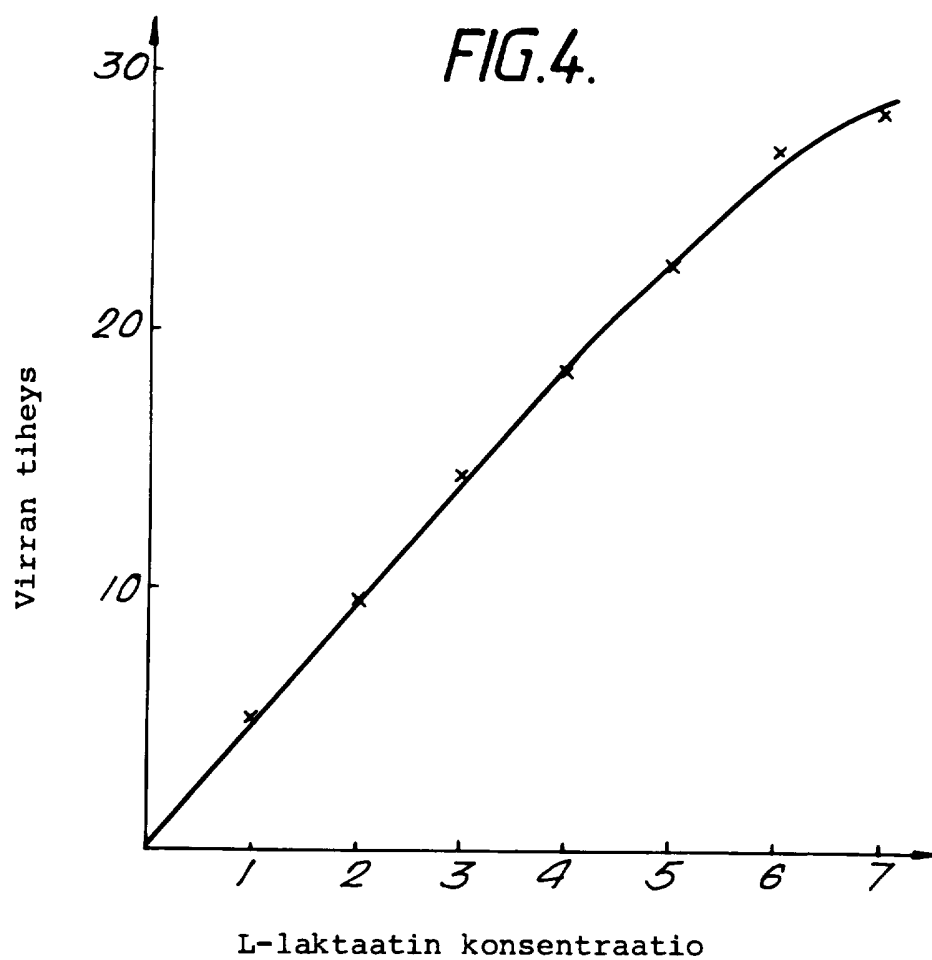


FIG.5.

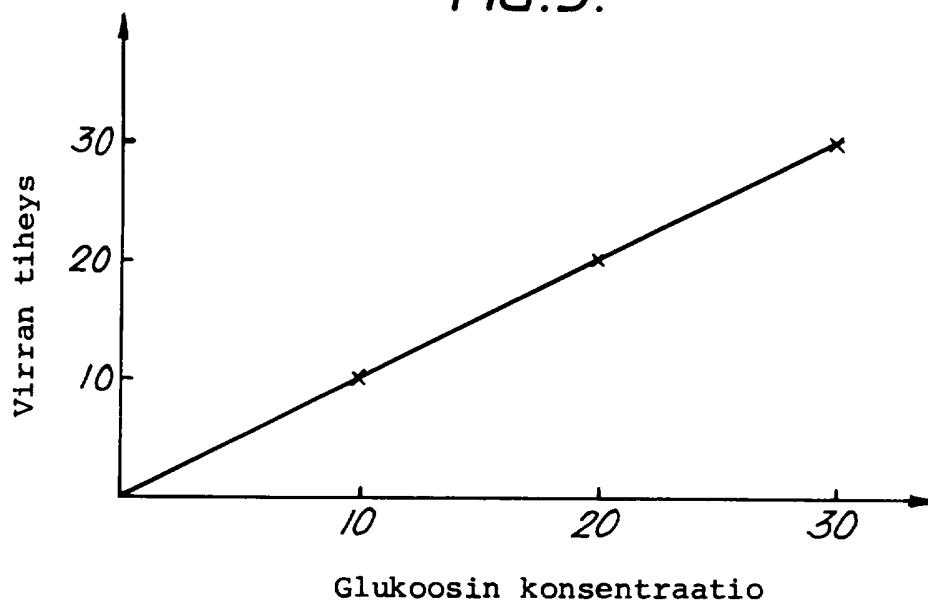


FIG.6.

