

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 27/327
C12Q 1/00 G01N 27/403



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01805425.0

[43] 公开日 2003 年 3 月 19 日

[11] 公开号 CN 1404575A

[22] 申请日 2001.2.28 [21] 申请号 01805425.0
[30] 优先权
[32] 2000.2.28 [33] DE [31] 10009467.8
[86] 国际申请 PCT/DE01/00824 2001.2.28
[87] 国际公布 WO01/64938 德 2001.9.7
[85] 进入国家阶段日期 2002.8.22
[71] 申请人 BCS 生物和化学传感器有限公司
地址 德国格赖夫斯瓦尔德
[72] 发明人 彼得·阿贝尔 托马斯·冯·沃德科
亚历山大·施沃克

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所
代理人 刘激扬

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 酶促电化学测量装置
[57] 摘要

本发明涉及一种基于克拉克氏电极的酶促电化学测量装置，含有一个由 Ag/AgCl 参比电极构成的为阳极，和电化学活跃的工作电极；所述工作电极由电解质层及疏水膜和酶构成传感器，其中，至少两个传感器安排成双重传感器，两个传感器的电极都覆盖并且均匀地浸润电解质层和疏水性膜，所述疏水膜是主要通透气体的公知聚合物，在其上仅在一个传感器的工作电极上固定酶，而另一个传感器的疏水膜上保持没有酶。这种可工业生产且使用方便的测量装置可以用于在医学诊断及食品业和生物技术业中测定、控制和监测各种被分析物质的存在及浓度。特别的优点是，这种尿糖测量装置既适用于固定的也适于流动的条件下，从而可以由老年患病者在居家条件下日常使用。

ISSN 1008-4274

1. 基于克拉克氏电极的酶促电化学测量装置,含有一个由Ag/AgCl参比电极构成的阳极和电化学活跃的工作电极;所述工作电极由电解质层及疏水膜和酶构成传感器,其特征在于,至少两个传感器构成双重传感器,两个传感器的电极都覆盖并且均匀地浸润电解质层和疏水性膜,所述疏水膜是主要通透气体的公知聚合物,在其上仅在一个传感器的工作电极上固定酶,而另一个传感器的疏水膜上保持没有酶。

2. 如权利要求1所述的酶促电化学测量装置,其特征在于,电化学工作电极是金、铂、碳电极或者是由氧活性催化剂制造的电极,优选地由钨-硒基或者铁基催化剂制造。

3. 如权利要求1或2所述的酶促电化学测量装置,其特征在于,所述酶是耗氧的酶,也就是氧化酶,优选地是葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、醇氧化酶、亚硫酸盐氧化酶、脲酶或者过氧化酶。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的酶促电化学测量装置,其特征在于,所述含酶促电极通过耦连各种酶构成为双或多酶促电极,优选地通过配合选自氧化酶族或者过氧化酶族的酶构成双或多重酶促电极。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的酶促电化学测量装置,其特征在于,所述覆酶的膜覆盖有亲水膜。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的酶促电化学测量装置,其特征在于,不设酶的传感器测量样品溶液中原始的未受影响的氧分压,而覆酶的传感器测量样品溶液中由于酶反应而降低了的氧分压。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的酶促电化学测量装置，其特征在于，把两个传感器的信号输入到差分放大器，而所述差分放大器把两个电极信号的差构成为受检测的被分析物质有或无或者其浓度的定性和定量的指示，并且把这种值供选择地光学地或声响地，模拟或者数字地输出。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的酶促电化学测量装置，其特征在于，把传感器安排在溢流容器中，而且所述溢流容器设计得在每次测量过程中保证对测量足够用的液体的灌注状态。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的酶促电化学测量装置的应用，用于测定、控制和监测尿液中葡萄糖的存在及浓度，或者用于测定、控制和监测葡萄糖、乳酸、尿酸、亚硫酸盐、麦芽糖、蔗糖淀粉、谷氨酸盐、果糖、丙酮酸盐、酚、谷胺、半乳糖和细胞溶解素的存在及浓度。

10. 如权利要求 9 所述的应用，其特征在于，为了测定、控制和监测尿液中葡萄糖的存在及浓度，把酶促电化学测量装置固定地安排在厕所的坐便器或/和便池中，或者在结构上实施得可以携带使用。

特别是对于预防用的筛选措施还采用尿糖检测试纸，这类试纸多数是在酶化化学基础上产生葡萄糖依从性的颜色反应。这些试纸条的缺点是准确性差，从而测量结果很不可靠，并且只有能分辨颜色的人才能采用。恰好糖尿病患者，特别是 II 型糖尿病的老年患者中，相当多的人是色盲，至少辨色不准确。

偏光光度计是作为实验室设备而配备的用于临床化学中，而尿糖试纸又不适宜用作日常新陈代谢控制中可靠地表达尿液中的葡萄糖存在及其浓度的常规方法。

因此研究和开发越来越集中于酶促电化学测量装置及其在葡萄糖测定方面的应用。

与经典的克拉克氏氧气传感器相应的酶促电化学生物传感器的电化学基本传感器是公知的并且在文献中有许多阐述。

在 DD227 029 A3 中公开了一种用于测定液体中的被分析物的酶促电化学生物传感器。

根据这种为测量葡萄糖确定的技术方案，酶促电极由一种夹层的膜装置构成，所述的夹层的膜装置有一个疏水膜和一个亲水膜，以及夹在两膜之间的酶。这种安排，利用修改了的经典克拉克氏电极专门测定受检测的被分析物在酶氧化作用下耗氧产生的过氧化氢，所述过氧化氢在阳极于 600mv 至 700mv 的电位下电化学氧化作为被分析物浓度的测度。这种安排的缺点是，其它可以通过该膜系统渗出的电化学活跃的物质也可以从探头到达该生物传感器的反应层，并且同样地像产生的被分析物特性的过氧化氢那样在工作电极上受到氧化，从而作为干扰物导致测量信号出现伪差。

这些其它如此抵达工作电极的物质非特异性地影响电极的电化学特性，从而导致电极染毒和老化。

酶促电化学测量装置

本发明涉及一种具有克拉克氏电极的酶促电化学测量装置，这种酶促电化学测量装置在医学诊断中被广泛地应用。

为了控制新陈代谢的情况，特别是对于糖尿病病例，需要定期地控制体循环中的葡萄糖浓度。这不仅对于要注射胰岛素的 I 型糖尿病患者是必须的，对于 II 型糖尿病患者也是如此，后者约占这种糖代谢疾病的 85%。据预计，至 2010 年世界糖尿病患者数将达到两亿两千一百万(Hauner, H.; Dtsch Med Wochenschr(德国医学周刊) 1998; 123; 777-82; Pharmaco Economics (医药经济)1995; 8 (Suppl, I) 28-71; Ammon, H. P. T.; Deutsche Apoteker Zeitung(德国药房报); 1999; 139 Jahrgang Nr. 30)。

鉴于糖尿病的高发病率，仅有常规的通过皮肤穿刺进行的血糖测量不能够满足定期的新陈代谢控制的需要和希望。这不仅需要患者在每次测量前克服刺伤皮肤的心理障碍，还造成了由操作方法决定的一次性用品在每次测量时的物质耗费。

对于大多数患者来说，并不需要测量血糖，而只要控制尿液中的葡萄糖的比例就行了。如果通过新陈代谢的刺激超过了肾脏的阈值，就导致生理需要之外的葡萄糖作为尿糖经过肾脏排出，在尿液中的葡萄糖就体现为可以检测出的浓度。

一种公知的测定尿糖的方法基于葡萄糖的特性，使光偏振而右旋。所说的偏光光度计就利用了这种特性，其中光从偏振面偏转的角度是实际的葡萄糖浓度的测度(Poege, A.W.Z med. Labortechnik(医用实验室诊断技术) 17(1976)59-79)。

可以通过选择适当的工作电极与参照电极间电压，结合不以氧作为电子受主的介体以降低这种非特定的受分析物质干扰的作用，在此可以把电极电位降低到约 300mv。但是用这种方法也不可避免异性分子普遍达到电极系统。

所述的缺点导致，由于干扰物或者由于电极染毒或老化可能强烈地影响测量的结果，以致于甚至不能够可靠、稳定及可重现地进行所要求的指出本来要被分析的物质存在。

本发明的任务是，提供可以重复使用的，以酶促电化学为基础工作的，改进的装置，使用这种装置可以以简单的方式稳定并且可重现地测定和指出水溶液中被分析物质的存在及浓度。特别是，本发明的基本任务是提供一种装置，使老年人在日常生活的条件下也可能通过常规检查测量尿液中葡萄糖的存在及浓度，并且以合适的方式指出和/或发出信号。

根据本发明，上述任务通过具有权利要求 1 特征的酶促电化测量装置解决。本发明测量装置的有利的扩展由从属权利要求 2 至 8 的特征指出。根据本发明测量装置的应用由权利要求 9 和 10 指出。

本发明的测量装置优点是，它可以用于在医学诊断及食品业和生物技术业中多方面地测定、控制和监测不同被分析物质的存在及浓度。本发明以酶促电化学生物传感器构成的双重传感器为基础，根据本质上公知的克拉克氏氧电极原理结合了适于容纳所述双重生物传感器及足量样品的容器。

为了测定葡萄糖，需要在样品容器的生物传感器的灵敏区内滞留足量的尿液。把容纳所述双重酶促电化学生物传感器的容器构成得可以在排尿液的过程中容纳一定的，对相应测量任务确定的部分尿液量。该容器在结构上就需要达到，使其中装入检测葡

萄糖的双重生物电化学传感器的容器部分灌充至溢流的边缘，同时让多余尿液量能够自由流走。

下面以测定尿液中的葡萄糖为例详细说明根据本发明的测量装置的工作方式及其与现有技术比较的优点，但是不限制本发明的使用范围。

由现有技术(DD227 029 A3)公知，物理溶解了的氧通过一个预设有经典的克拉克氏电极的只对气体通透的疏水膜然后在工作电极上电化学还原。这里，每个氧分子释放出二个电子，产生代表实际物理溶解的氧浓度，也就是代表氧分压的电流。

在同样公知的检测葡萄糖的酶促电化学生物传感器中，疏水膜设有酶层，所述疏水膜含有葡萄糖氧化酶并且覆盖有可以通透溶解的离子和分子的亲水膜。这时如果从内有所述传感器的溶液中渗进被分析的物质，其氧化物受存在的酶催化，从而由于反应耗氧而降低了工作电极处的氧分压。换言之，在这种情况下测量的氧分压由于酶反应所消耗的量而降低。以此方式，溶液中原有的氧分压与工作电极上减少了的氧分压之间的差就是要检测的被分析物质浓度的测度。然而利用这种分压差的前提是受分析的介质中的原始氧分压是恒定且已知的。但是生物溶液中却不存在这种前提。根据本发明的方案就从此着手。

为了尽管这样还能够利用耗氧测量作为受检查的样品中的实际存在的葡萄糖的指标，根据本发明对公知的电化学基础传感器进行了发展并且重新设计，在经典的克拉克氏电极系统中增加了另一个传感器，增加的传感器的工作电极的疏水膜覆层上没有覆盖要用来氧化被检测的被分析物质的酶。在这个工作电极上氧相应于其在受分析的样品中的实际浓度被还原，因为没有发生由酶反应决定的氧耗。按此方式构成的双重传感器的工作电极的信

号根据本发明输入到差分放大器，其中，在被分析物质存在葡萄糖的情况下产生即时信号差。这种特殊信号的进一步处理可选择地按对应用有利的方式进行。

与根据本发明的方案相联系的优点是，可以保证在一方面充分而有选择地排除影响工作电极测量的物质，另一方面同样充分而有选择地让受检测的被分析或者特定检测反应产物达到工作电极。避免干扰和电极染毒。

该双重酶促电化学传感器及容纳对测量任务足量尿液的溢流容器根据本发明既可以设计成便携的也可以设计成固定在便池中的装置。

以此方式，这种可工业生产且使用方便的根据本发明的尿糖测定方案既适于固定的也适于流动的条件，从而可以由老年患病者在居家条件下日常使用。可测量的次数仅受生物传感器寿命的限制。

如果用其它同样耗氧的反应参与物代替葡萄糖氧化酶，还可以测定未知混合物的介质中其它的被分析物质。例如，有可能通过采用乳酸氧化酶作为酶测量并指示甜菜生汁或者其它溶液中的乳酸浓度。