

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 164839 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1697/86

(51) Int.Cl.5

G 01 N 27/30

(22) Indleveringsdag: 15 apr 1986

(41) Alm. tilgængelig: 17 okt 1986

(44) Fremlagt: 24 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 16 apr 1985 AT 1148/85

(71) Ansøger: *A V L AG; Grabenstrasse 11; CH-8201 Schaffhausen, CH

(72) Opfinder: Petra *Hochmuth; DE, Otto S. *Wolfbeis; AT

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.

(54) Føler til bestemmelse af elektrolytkoncentrationer

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

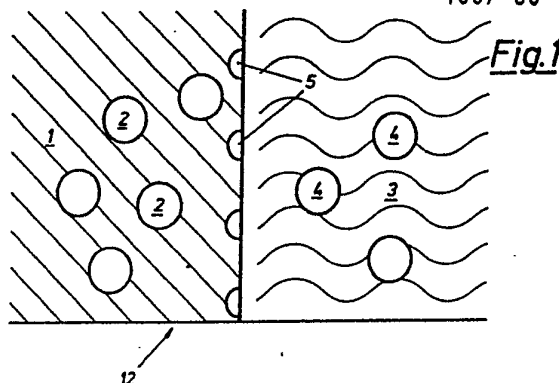
1697-86

Føler til bestemmelse af elektrolytkoncentrationer

Til bestemmelse af elektrolytkoncentrationer i vandige opløsninger benytter man bl.a. ionselektive elektroder, dvs. elektroder, hvis ionfølsomme lag kun lader bestemte ioner passere. Den potentialforskel som således indstiller sig, er et mål for elektrolytkoncentrationen i prøven. Især ved den medicinske anvendelse er det en ulempe, at disse elektroder er forholdsvis store, at elektrolytbroen er følsom over for forstyrrelser, og at der kræves en referenceelektrode.

Til undgåelse af disse ulemper anbringes der ifølge opfindelsen på det ionselektive lag en potentialfølsom fluorescensindikator, hvis fluorescensintensitet måles og benyttes til bestemmelse af elektrolytkoncentrationen (fig. 1).

1697-86



Opfindelsen angår en føler til bestemmelse af koncentrationen af en elektrolyt, som foreligger i en vandig prøveopløsning, ved hjælp af en ionselektiv membran, som kan bringes i kontakt med prøveopløsningen, idet den potentialforskelle, som opstår på elektrodeoverfladen, kan sættes i relation til elektrolytkoncentrationen.

5

Følere af denne art kendes som ionselektive elektroder (ISE). Elektroderne er dækket med et materiale, som er gennemtrængeligt for en speciel elektrolyt. Materialets fornødne gennemtrængelighed for kun én elektrolyt opnås ved tilsætning af såkaldte bærer-molekyler (Carrier-molekyler). Denne betegnelse giver man molekyler, som er i stand til at binde visse ioner på
10 specifik måde og at muliggøre deres diffusion fra en vandig til en hydrophob base. Den på denne måde opstående potentialforskelle ved elektrodeoverfladen måles elektrokemisk, og ved passende justering kan elektrolytkoncentrationen angives direkte.

Fra WO 81/02218-A1 fig. 3 kendes der fx en ionselektiv elektrode af den ovennævnte art, hvis
15 ionselektive yderlag kun slipper kaliumioner igennem. Et eksempel på en meget specifik ionbærer er valinomycin, som er i stand til at indsluse kaliumionerne meget specifikt i lipidmembraner, selv i nærværelse af et stort overskud af natriumioner.

Ionselektive elektroder er grundlaget for mange nye fremgangsmåder til bestemmelse af elektrolytkoncentrationerne i vandige opløsninger, især i blod (især lithium, natrium, kalium, calcium, magnesium og chlorid). De har den fordel frem for de fotometriske fremgangsmåder, fx flammefotometri, at de tillader kontinuerlige målinger, da indstillingen af potentialet ved elektrodeoverfladen sker reversibelt.
20

Uanset den store udbredelse, som elektrokemiske følere på grundlag af ionselektive elektroder og deres udvidelser i forbindelse med fetteffekttransistorer har fået, har de nogle ulemper: de er forholdsvis store, hvilket ved deres benyttelse in vivo i form af katetere medfører vanskeligheder. De kræver en referenceelektrode med omtrent lige så store dimensioner. De elektrolytbroer, som er nødvendige ved disse elektroder, er meget følsomme over for forstyrrelser. Endelig påvirkes eller forstyrres måleresultatet let af overfladepotentialer af anden oprindelse.
30

Formålet med den foreliggende opfindelse er at anvise en føler, som gør det muligt at bestemme elektrolytkoncentrationen i vandige opløsninger, idet de ovennævnte ulemper er undgået, og idet der navnlig ikke er nogen hindringer for en benyttelse in vivo.

35

Denne opgave løses ifølge opfindelsen ved, at der på den side af den ionselektive membran, som vender mod prøveopløsningen, er immobiliseret en fluorescensindikator, hvis fluorescensintensitet afhænger af potentialforskellen på skillefladen mellem den ionselektive membran og

prøveopløsningen. Ved den foreliggende opfindelse måles den potentialforskel, som indstiller sig mellem prøvefasen og en polymermembran, som er forsynet med en ionbærer, og som formidles elektrokemisk ved hjælp af den ionselektive elektrode, derved, at der anbringes en passende potentialfølsom fluorescensindikator på den grænseflade, hvor potentialforskellen indstiller sig, og at fluorescensintensiteten måles som en funktion af elektrolytkoncentrationen. Den resulterende potentialforskel på overfladen fører altså til en forandring af indikatorens fluorescensintensitet, hvilket sker i matematisk forhold til elektrolytkoncentrationen. På denne måde er der tilvejebragt en føler, som både er egnet til behandling af blodelektrolytter og andre ioner, og som kan fungere uden referenceelektrode og uden elektrolytbro.

10

Som ionselektive membraner er især sådanne egnede, som også benyttes til fremstillingen af bærermembraner til ionselektive elektroder, altså fx PVC. I denne sammenhæng kan også difunktionelle molekyler som fx phosphatidylfedtsyrer og andre, som forekommer i naturlige lipidmembraner, tjene som membranmaterialer. Som bærer benyttes fortrinsvis sådanne, som har en høj specificitet over for den ion, som skal bestemmes, men som ikke lader andre ioner diffundere ind i membranen. Der kendes forholdsvis specifikke bærere for protoner, kalium, natrium, calcium, lithium og chlorid, så at der nu ved hjælp af disse og den netop beskrevne føler for første gang står en fluorescensoptisk og kontinuerlig metode til rådighed til bestemmelse af de vigtigste blodelektrolytter.

20

Som potentialfølsomme fluorescensindikatorer egner sig først og fremmest sådanne stoffer, hvis dipolmoment er forskelligt i den anslåede tilstand og i grundtilstanden. Tillige skal disse indikatorer yderligere have en række egenskaber: de skal være så stabile som muligt, hvilket vil sige, at de ikke skal ødelægges af hverken oplagring eller belysning. Hvis fluorescensindikatorerne har langbølgeabsorptions- og fluorescensmaksima, muliggør dette fotoanslag ved hjælp af billige lyskilder samt benyttelsen af formstoflysledere, der som bekendt ikke lader ultraviolet lys passere. Endvidere muliggøres på grund af en stor Stokes-forskydning en effektiv adskillelse af fluorescenslys og eventuelt spredt anslagslys samt Raman-lys. Stokes-forskydningen betegner forskellen mellem indikatorens absorptionsmaksimum og dens fluorescensmaksimum.

30

Fluorescensoptiske ikke-potentialfølsomme følere kendes ganske vist for en række forskellige ioner og beror i alle tilfælde på, at enten en indikator indgår en reversibel binding med målestørrelsen, eller at indikatorens fluorescens udslukkes, eller - som i tilfælde af CO_2 - at en forskydning af en i forvejen etableret syre-base-ligevægt forfølges over en pH-måling. Man har imidlertid hidtil savnet fluorescensindikatorer til bestemmelse af de ovennævnte vigtige blodelektrolytter.

35

Ifølge en yderligere udformning af opfindelsen anvises det, at den potentialfølsomme fluorescensindikator sammen med den ionselektive membran er anbragt direkte på en lysgennemtrængelig bærer, især en glasbærer, og at anslags- eller fluorescenslyset kan tilledes eller bortledes gennem denne bærer. På denne måde råder man samtidig over en stabil bærer og en

5 mulighed for tilførsel af anslagslyset til fluorescensindikatoren. Anslagslyset kan også totalreflekteres så længe i det indre af et bærelement med planparallelle dæklader, at et i forhold til omgivelserne forhøjet brydningsindeks i det tilgrænsende indikatorlag muliggør en passage gennem grænsefladen og således sikrer et anslag af indikatormolekylerne.

10 Ifølge en videre udformning af opfindelsen anvises det, at den potentialfølsomme fluorescensindikator sammen med den ionselektive membran - via dennes bort fra fluorescensindikatoren vendende side - står i forbindelse med enden af en lysleder, især en fiberoptik. En passende måleanordning kan fx være udformet som et fiberoptisk kateter. I dette tilfælde er følermembranen, som består af den ionselektive membran og fluorescensindikatoren, integreret i enden

15 af en fiberoptisk lysleder. Også her er laget med den potentialfølsomme fluorescensindikator vendt mod prøven. Anslagslyset tilføres indikatoren over den fiberoptiske lysleder. Fluorescenslyset kan enten føres gennem samme lysleder eller gennem den anden arm på en toarmet lysleder. Som lyskilder kommer i betragtning fx wolfram- og halogenlamper, gasudladningslamper, lysemitterende dioder (LED) og laser. Valget retter sig især efter det foreliggende analyseproblem og indikatorens karakter.

20

En væsentlig fordel består i, at sådanne optiske følere kan gøres meget små. Der er således beskrevet fiberoptiske oxygenkatetere med 0,2 mm diameter. Endvidere behøver disse følere i modsætning til de elektrokemiske følere ikke nogen referenceelektrode og ikke nogen elektro-

25 lytbro.

Anbringelsen af fluorescensindikatorerne i grænselaget mellem den vandige og polymere fase sker fortrinsvis ved fysisk eller kemisk immobilisering, enten i et bærer materiale eller direkte på polymerfasen. Immobiliseringen har den fordel, at indikatoren ikke udvaskes af prøvemateria-

30 let. Til immobiliseringen kan man benytte de metoder, som er beskrevet indgående i talrige publikationer vedrørende immobilisering af organiske molekyler i almindelighed. Specielle immobiliseringsmetoder til indikatorer kendes fra DE-OS 28 51 138.

Opfindelsen skal i det følgende forklares nærmere i forbindelse med tegningen, hvor

35

- fig. 1 viser et funktionsskema for en føler ifølge opfindelsen,
 fig. 2 og 3 måleanordninger eller anbringelsesmuligheder for føleren, og
 fig. 4 et målesignal opnået ved hjælp af måleanordningen ifølge fig. 2.

Ifølge fig. 1 befinder der sig i en ionselektiv membran 1, fx et polymerlag, nogle bærermolekyler 2 samt på dens overflade en fluorescensindikator 5, som fluorescerer potentialfølsomt. Foran polymerlaget befinder der sig en prøveopløsning 3 med en elektrolyt 4, som ved hjælp af bærermolekylerne 2 delvis indsluses i polymerlaget. Fluorescensindikatoren 5 indikatormolekyler er immobiliseret kemisk eller fysisk i polymerlaget. Den potentialforskel på overfladen, som fremkommer ved iontransporten, fører til en forandring af indikatorens fluorescensintensitet, som måles. Den af den ionselektive membran 1 og den potentialfølsomme fluorescensindikator 5 opbyggede følermembran er i fig. 1 betegnet 12. Fig. 2 viser skematisk en måleanordning (her specielt et spektrofluorimeter Aminco SPF 500), idet følermembranen 12 er anbragt direkte på en glasbærer 9. Anslagslyset 7, som kommer fra en lyskilde 6, falder på følermembranen 12, hvis fluorescensindikator 5 er immobiliseret på den side, som vender mod prøveopløsningen 3. Fluorescenslyset 8 føres på sædvanlig måde til en opfangnings- og måleenhed 13.

Det følgende er blot et eksempel på fremstillingen af en kaliumfølsom følermembran.

15

2 mg valinomycin, 2 mg kalium-tetrakis-chlorphenylborat, 30 mg PVC og 66 mg dioctylphthalat opløses i 10 ml tetrahydrofuran. Man anbringer 0,2 ml af denne opløsning på en lille glasplade (2,5 x 2,6 cm) og lader fordampe langsomt ved stuetemperatur. Glaspladen tjener ikke blot som fast underlag ved fremstillingen af membranen, men kan også senere benyttes som optisk transparent og mekanisk fast bærer for membranen i den optiske føler. Før opløsningen er fordampet til fuldstændig tørhed, påstrør man ca. 5 mg almindelig aminoethylcellulose. Efter den påfølgende endelige tørring hæfter en del af aminoethylcellulosen til PVC-overfladen, mens dens resten blæses bort.

20

25 Immobiliseringen af den potentialfølsomme indikator rhodamin B i grænselaget sker ved covalent binding til aminoethylcellulosens aminogrupper. Til dette formål fremstiller man en opløsning af 2 mg EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, HCl) og 5 mg rhodamin B i 5 ml vand. Af denne opløsning anbringes ca. 0,5 ml i dråbeform på den ovenfor beskrevne PVC-membran. Det hele henstår derpå 18 timer, og derpå hældes man fra og vasker flere gange med vand.

30

Den således opnåede rosafarvede følermembran er brugsklar. Den kan benyttes i en måleanordning som i fig. 2 til bestemmelse af kaliumkoncentrationer.

35

Fig. 3 viser en som fiberoptisk kateterudformet måleanordning, hvor følermembranen 12 er anbragt ved enden 11 af en lysleder 10, som er dannet af en kerne 14, som er indlejret i en kappe 15. Sammen med denne omgives den af en beskyttende omhylning 16. Det er imidlertid også muligt at benytte lysledere uden kappe 15. Den potentialfølsomme fluorescensindikator 5

vender mod prøveopløsningen 3. Både anslags- og fluorescenslyset kan ledes gennem fiber-optikken.

I en alternativ udførelsesform tjener en flerarmet lysleder i kateterform til, at en følermembran
5 12 forsynes med anslagslys, og at fluorescenslyset føres til detektoren. Endelig kan det poten-
tialfølsomme følerlag også i stedet for kappen 15 anbringes på lyslederen 14, idet fluorescen-
sen anslås ved hjælp af en såkaldt evanescerende bølge. Som evanescerende bølge betegner
man den andel af det elektromagnetiske felt, som trænger ind i kappen ved totalreflektion på en
grænseflade, fx på grænsen mellem kerne og kappe i en lysleder. Dens intensitet aftager dér
10 eksponentielt, idet den gennemsnitlige indtrængningsdybde på nogle få nanometer er nok til at
anslå en dér anbragt indikator til fluorescens.

Den ifølge ovenstående eksempel fremstillede membran viser i en i fig. 2 vist måleanordning de
i fig. 4 viste signalændringer ved forbistrømning af forskellige koncentrerede kaliumchloridop-
15 løsninger, angivet ved deres molaritet m , idet den relative fluorescensintensitet I er vist i måleti-
den t i min. Det er bemærkelsesværdigt, at svækkelsen af signalet praktisk taget kun bevirkes
af kaliumioner, medens natriumioner praktisk taget ikke har nogen virkning.

Man fremstiller en følermembran, som er specifik på natriumioner, på samme måde som i
20 ovenstående eksempel, idet man i stedet for valinomycin benytter en natriumbærer som fx
 N,N' -dibenzyl- N,N' -diphenyl-1,2-phenylendioxiddiacetamid. Ved passende valg af en bærer
kan man på denne måde fremstille membraner med udpræget selektivitet for den ion, som i
hvert enkelt tilfælde har interesse.

25 Et andet eksempel beskriver fremstillingen af en kaliumfølsom følermembran med elektrostatiske
immobilisering. Kationbytteren fremstilles ved sulfonering af et perlepolymerisat. I en 250 ml
trehalskolbe med omrører, tilbagesvaler og termometer opvarmes en blanding af 0,1 g sølvni-
trat og 75 ml koncentreret svovlsyre til 80°C , og derpå indrører man 10 g af et copolymerisat
bestående af 98% styren og 2% divinylbenzen. Temperaturen holdes på 100°C i 3 timer, og
30 derpå afkøler man langsomt. Kolbens indhold røres i 250 ml 50%'s svovlsyre, og man fortynder
denne blanding med destilleret vand efter afkøling. De guldbrunne perler suges fra, vaskes med
vand og dioxan og tørres i tørreapparat. Til indlejring af valinomycin i ionbytteren inkuberes 200
mg ionbytter plus 2,8 mg valinomycin og 1 ml tetrahydrofuran sammen i 24 timer. Derefter
fjernes tetrahydrofuranet, og formstofsmaåperlerne tørres natten over i tørreapparat.

35 Til immobilisering af rhodamin B i ionbytteren omrøres den tørrede ionbytter 5 min. i 4 ml af en
vandig opløsning, som indeholder 0,5 mg rhodamin B. Derpå filtrerer man fra, vasker med
vand og tørrer atter i tørreapparat. Endelig opløses 30 mg polyvinylchlorid og 66 mg dioxtyl -

phthalat i 30 ml tetrahydrofuran. Deraf dryppes 0,2 ml på en glasplade, som måler 2,5 x 2,8 cm. Afdampningen af opløsningsmidlet sker ved stuetemperatur. Under afdampningen indlejres den sulfonerede copolymer, til hvilken rhodamin B er immobiliseret. Efter tørringen kan følermembranen benyttes til kaliumbestemmelse.

5

Et tredje eksempel beskriver fremstillingen af en natriumfølsom følermembran med immobilisering af rhodamin B på en glasoverflade.

10 Til aminomodifikation blandes 30 ml toluen (absolut) med 3 ml toluen (vandmættet). Der tilsættes 0,15 ml triethoxysilylpropylamin, 30 mg tosylchlorid og 100 mg CPG (Controlled Porous Glass, 500 Å). Denne reaktionsblanding koges 2 timer under tilbagesvaling. Efter afkøling vaskes CPG-kuglerne med toluen og acetone. Man tørrer ved 100°C i 3 timer.

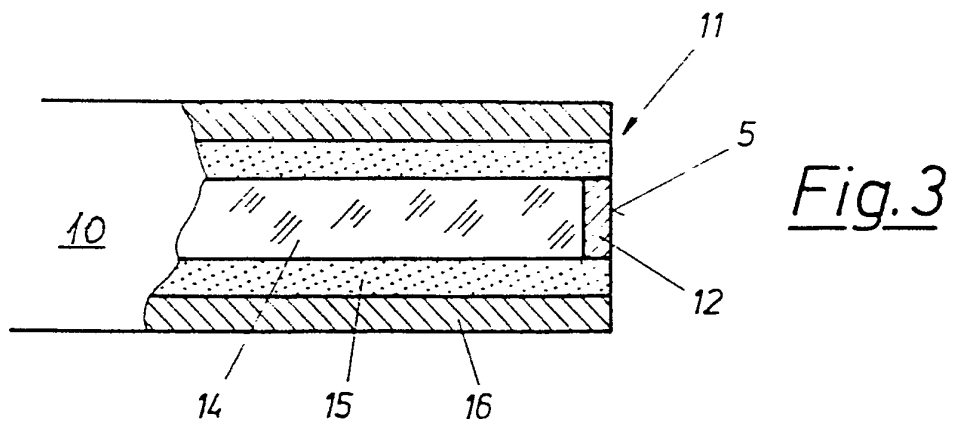
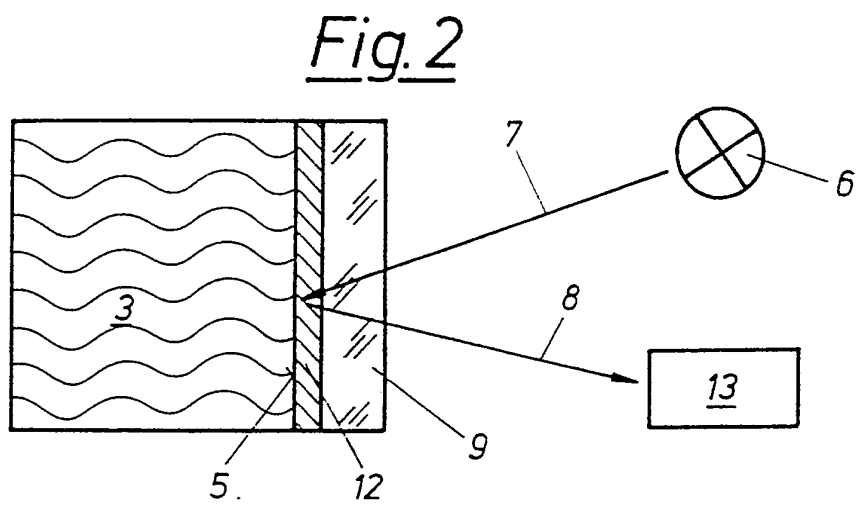
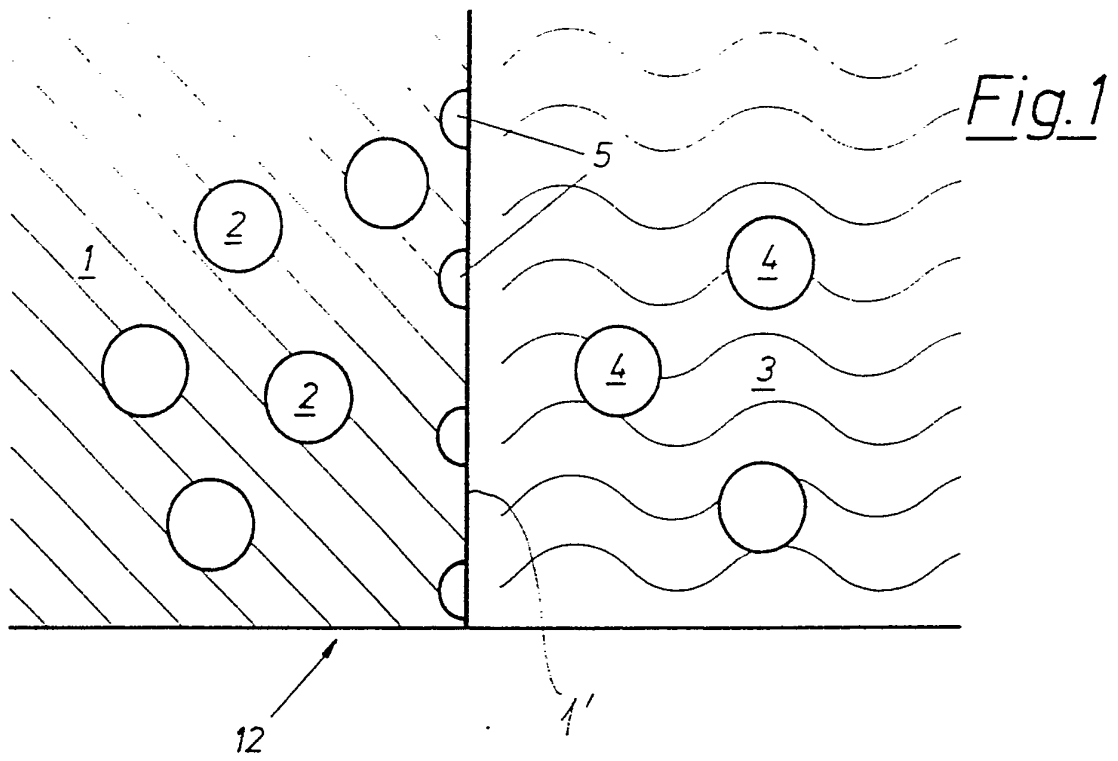
15 På det således fremstillede CP-glas immobiliseres rhodamin ved kobling ved hjælp af reagenset EDC. Til dette formål tilsætter man de tørrede CPG-kugler 50 ml vand, som indeholder 5 mg EDC og 11 mg rhodamin B, og man lader henstå 6 timer ved stuetemperatur. Derefter foretager man en yderligere tilsætning af 5 mg EDC. Efter 16 timers forløb tilsætter man atter 5 mg EDC og lader reagere 6 timer. Derpå frafiltrerer man CP-glasset, vasker med vand og acetone og tørrer 3 timer ved 100°C.

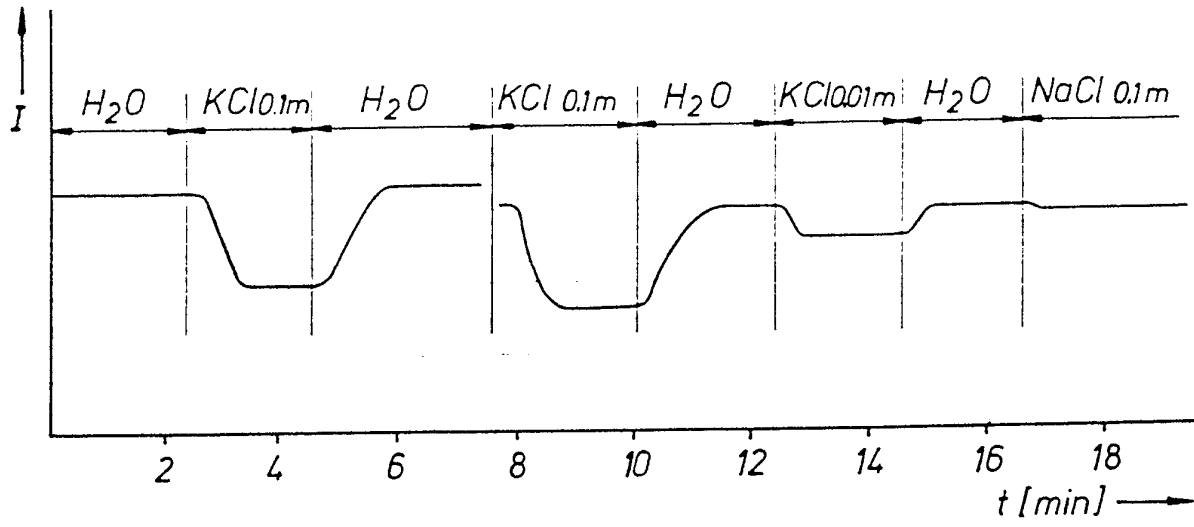
20

0,2 ml af en natrium-bærer-polyvinylchlorid-opløsning (vægtsammensætning som i første eksempel) dryppes på en glasplade, som måler 2,5 x 2,8 cm. Under inddampningen (ved stuetemperatur) påstrør man ca. 1 mg CP-glas, til hvilket der i forvejen er immobiliseret rhodamin B. Dette hæfter efter fuldstændig tørring af PVC-membranen fast til overfladen. De således
25 fremstillede følermembraner er i denne form parate til bestemmelse af natriumioner.

Patentkrav

1. Føler til bestemmelse af koncentrationen af en elektrolyt, som foreligger i en vandig prøveopløsning, ved hjælp af en ionselektiv membran, som kan bringes i kontakt med prøveopløsningen, idet den på elektrodeoverfladen opstående potentialforskkel står i relation til elektrolytkoncentrationen, k e n d e t e g n e t ved, at der på den side (1') af den ionselektive membran (1), som vender mod prøveopløsningen (3), er immobiliseret en fluorescensindikator (5), hvis fluorescensintensitet afhænger af potentialforskellen på skillefladen mellem den ionselektive membran (1) og prøveopløsningen (3).
- 10 2. Føler ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den potentialfølsomme fluorescensindikator (5) sammen med den ionselektive membran (1) er anbragt direkte på en lysgennemtrængelig bærer, især en glasbærer (9), og at anslags- (7) og fluorescenslyset (8) kan ledes gennem denne bærer.
- 15 3. Føler ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den potentialfølsomme fluorescensindikator (5) sammen med den ionselektive membran (1) - via dennes bort fra fluorescensindikatoren (5) vendende side - står i forbindelse med enden (11) af en lysleder, især en fiberoptik (10).



Fig.4