



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1987474 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 18

(21) 申请号 200610054436. 4

(22) 申请日 2006. 07. 13

(73) 专利权人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路 1 号

(72) 发明人 谢国明 邓世雄 李琼 罗鹏

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所

50211

代理人 黄珩

(51) Int. Cl.

G01N 33/98(2006. 01)

G01N 27/413(2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2003-75389 A, 2003. 03. 12, 全文.

US 5294540 A, 1994. 03. 15, 全文.

JP 6-317554 A, 1994. 11. 15, 全文.

US 2003150745 A, 2003. 08. 14, 全文.

CN 1462367 A, 2003. 12. 17, 全文.

US 3926736 A, 1975. 12. 16, 全文.

CN 1766578 A, 2006. 05. 03, 全文.

审查员 石剑平

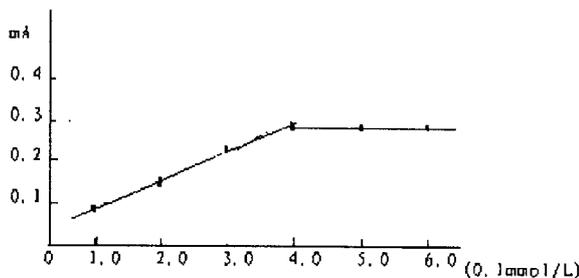
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

检测血酒精浓度的一次性生物传感器

(57) 摘要

本发明提供了一种检测血酒精浓度的一次性生物传感器,其制备方法以银薄层作导电基质,采用丝网印刷技术,在塑料薄膜上一次性丝网印刷商品碳墨作为工作电极,印刷 Ag/AgCl 墨作为对电极及参比电极,然后准确滴涂乙醇脱氢酶分析液于工作电极和参比电极之间的反应腔内,使其自然干燥,待电极片干燥后,用双面胶将透明胶粘到电极片上,在透明胶与塑料膜之间形成一个小电解池,当酶电极浸入待检血样时两者发生反应,在电场作用下产生电子转移并形成电流,根据所得电化学信号与待测底物的浓度之间的对应关系便可检测血酒精浓度。该生物传感器灵敏度高、准确度高,操作方便、快速,制备方法取材容易,操作简单,成本低,一次性使用,可成批生产。



1. 一种检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是包括以下步骤:

(1)、镀银薄片电极的制备选取光滑、平整的塑料薄膜,剪成长条形,将塑料薄膜片置于 8~12% NaOH 溶液中,加热 2~5 分钟,取出,用去离子水洗涤,晾干备用;在备用薄膜片正面覆盖一层保护膜,预留出工作电极和参比电极及其引出导线的形状大小尺寸,背面用保护膜完全覆盖,将该薄膜片置于体积比例是 1:1 的 1~3% 葡萄糖和 1~3% 银氨溶液中,混匀,在室温下静置 15~20 分钟,待薄膜片上形成致密的银镜,将薄膜片取出,用去离子水洗涤晾干,撕去保护膜,即得所需镀银薄片电极;其中所述保护膜是塑料薄膜;

(2)、基础电极的印刷采用丝网印刷技术按以下形状和尺寸印刷:工作电极和参比电极形状均为条型,长度是 30~50mm,宽度是 1~3mm,两者之间的距离是 1~2mm,碳墨经丝网印刷在步骤(1)制得的镀银薄片工作电极上,将银墨平行印刷在工作电极旁边的参比电极上,最后将氯化银墨印刷在参比电极上,每印完一次后,待自然干燥后再印下一次;

(3)、固定乙醇脱氢酶分析液取一块步骤(2)印好的电极片,将带电极孔的绝缘层粘附在电极片上,构成一个反应腔,然后将 10~25 微升的乙醇脱氢酶分析液,滴涂于工作电极与参比电极之间的反应腔内,待电极片自然干燥后,用双面胶将透明胶粘到电极片上;其中所述乙醇脱氢酶分析液是用 pH 值 7~9 的磷酸盐缓冲液稀释成浓度分别为乙醇脱氢酶 10mg/mL、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 5mmol/L、硫酸吩嗪二甲酯 1mmol/L、铁氰化钾 15mmol/L,并按体积配比关系乙醇脱氢酶:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸:硫酸吩嗪二甲酯:铁氰化钾 2.8~3.2:0.4~0.7:1~1.5:0.06~0.1 混合摇匀配制而成;其中所述磷酸盐缓冲液是取磷酸二氢钾 0.68g,加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 29.1ml,用水稀释至 100ml 制得;

(4)、将双面胶剪成与酶层的电极片相匹配的大小贴在有酶层的电极片上,最后将透明胶贴在该双面胶上,这样就制成了一次性生物传感器。

2. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(1)中所用 NaOH 溶液的浓度是 10%。

3. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(1)中葡萄糖和银氨溶液的浓度均为 2%。

4. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(3)中工作电极和参比电极的尺寸是长度是 40mm,宽度是 2mm,两者之间的距离是 1.5mm,加入反应腔的乙醇脱氢酶分析液是 20 微升。

5. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(3)中磷酸盐缓冲液的 pH 值是 7.04。

6. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(3)中所述乙醇脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、硫酸吩嗪二甲酯、铁氰化钾的体积配比关系是 3:0.6:1.2:0.08。

7. 如权利要求 1 所述的检测血酒精浓度的一次性生物传感器的制备方法,其特征是步骤(3)中铁氰化钾在乙醇脱氢酶分析液内的浓度为 0.40mmol/L。

## 检测血酒精浓度的一次性生物传感器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物传感器,特别涉及一种检测血酒精浓度的一次性生物传感器。

### 背景技术

[0002] 酒精性肝病的发生与乙醇(酒精)消费量,即日均饮酒量及滥饮酒有关。研究表明,人日饮酒 50 克,连续 5 年以上,可造成肝损伤。饮酒量和持续时间与酒精性脂肪肝的发生有直接关系,而与酒的种类关系不大。如果饮酒量大于 50 ~ 120 克/天,则发生率增长 5 ~ 25 倍;若饮用纯酒精 300 克/天,7 天后可出现脂肪肝。酒精性脂肪肝的发病机理是进入体内的酒精 90% 在肝脏代谢,它能影响脂肪代谢的各个环节,最终导致肝内脂肪堆积。因此,检测人体血乙醇浓度,对酒精性肝病的防治有重要的意义。

[0003] 另一方面,随着交通运输业的迅猛发展,机动车和拥有驾驶执照的人员数量迅速增长,交通事故频繁发生,其中因驾驶员饮酒与醉酒造成的交通事故大约占 20%。长期以来,由于我国一直没有一种简便、快速、准确和定量检测血乙醇浓度的方法及其检测仪器。

[0004] 目前,血乙醇浓度检测的主要方法有顶空色谱法、分光光度法、呼气法和固化酶电极法等。顶空色谱法和分光光度法是血乙醇浓度分析的较好的方法,顶空色谱法还是参考标准方法,但均需要血浆或血清样本,因此要进行复杂的样本预处理,受试者必须到医院或专业机构,抽取静脉血,检测时间较长,给受试者和临床检验者带来极大不便。呼气法不需样本预处理,不必到医院或专业机构抽取静脉血,但属于乙醇浓度测试筛选法,如果测试失败,仍需受试者到医院或专业机构抽取静脉血检查。固化酶电极法不需样本预处理,但其工作条件苛刻、保存时间短和重复性、可靠性、一致性、批量生产工艺等问题有待解决。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种取样方便、不需预处理、操作方便、准确、快速的高选择性、高灵敏性、高准确性的检测血酒精浓度的一次性生物传感器。

[0006] 具体技术方案如下:

[0007] 一种检测血酒精浓度的一次性生物传感器,其制备方法包括以下步骤:

[0008] (1)、镀银薄片电极的制备选取光滑、平整的塑料薄膜,剪成长条形,将塑料薄膜片置于 8 ~ 12% NaOH 溶液中,加热 2 ~ 5 分钟,取出,用去离子水洗涤,晾干备用;在备用薄膜片正面覆盖一层保护膜,预留出工作电极和参比电极及其引出导线的形状大小尺寸,背面用保护膜完全覆盖,将该薄膜片置于体积比例是 1:1 的 1 ~ 3% 葡萄糖和 1 ~ 3% 银氨溶液中,混匀,在室温下静置 15 ~ 20 分钟,待薄膜片上形成致密的银镜,将薄膜片取出,用去离子水洗涤晾干,撕去保护膜,即得所需镀银薄片电极;其中所述保护膜是塑料薄膜;

[0009] (2)、基础电极的印刷采用丝网印刷技术按以下形状和尺寸印刷:工作电极和参比电极形状均为条型,长度是 30 ~ 50mm,宽度是 1 ~ 3mm,两者之间的距离是 1 ~ 2mm,碳墨经丝网印刷在步骤(1)制得的镀银薄片工作电极上,将银墨平行印刷在工作电极旁边的参比

电极上,最后将氯化银墨印刷在参比电极上,每印完一次后,待自然干燥后再印下一次;

[0010] (3)、固定乙醇脱氢酶分析液取一块步骤(2)印好的电极片,将带电极孔的绝缘层粘附在电极片上,构成一个反应腔,然后将 10 ~ 25 微升的乙醇脱氢酶分析液,滴涂于工作电极与参比电极之间的反应腔内,待电极片自然干燥后,用双面胶将透明胶粘到电极片上;其中所述乙醇脱氢酶分析液是用 pH 值 7 ~ 9 的磷酸盐缓冲液稀释成浓度分别为乙醇脱氢酶 10mg/mL、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 5mmol/L、硫酸吩嗪二甲酯 1mmol/L、铁氰化钾 15mmol/L,并按体积配比关系乙醇脱氢酶:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸:硫酸吩嗪二甲酯:铁氰化钾 2.8 ~ 3.2:0.4 ~ 0.7:1 ~ 1.5:0.06 ~ 0.1 混合摇匀配制而成;其中所述磷酸盐缓冲液是取磷酸二氢钾 0.68g,加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 29.1ml,用水稀释至 100ml 制得;

[0011] (4)、将双面胶剪成与酶层的电极片相匹配的大小贴在有酶层的电极片上,最后将透明胶贴在该双面胶上,这样就制成了一次性血乙醇脱氢酶电极。

[0012] 所述步骤(1)中所用 NaOH 溶液的浓度最好是 10%,如静置 20 分钟后仍没有银镜生成,可放入 70℃左右水浴中微热,加热时间不可太久,一般 1 ~ 2 分钟即可,否则塑料薄膜易变形。如银镜不致密,可重复镀银 1-2 次,待薄膜片上有致密的银镜生成时,将薄膜片取出。

[0013] 所述步骤(1)中所用葡萄糖和银氨溶液的浓度最好是 2%。

[0014] 所述步骤(3)中工作电极和参比电极的尺寸是长度是 40mm,宽度是 2mm,两者之间的距离是 1.5mm,此时加入反应腔的乙醇脱氢酶分析液是 20 微升。在酶量少时,电极响应值的大小随着固定化时所用的酶量的增加而迅速提高,但酶量与电极响应值的关系有其最大值,超过这个值后继续增加酶量,响应值反而下降,且响应时间大大拖长,这个现象与生成的酶层过厚有关,因为在电极头固定的表面积上酶量过多,导致酶层过厚,其结果导致电极响应值的减少和响应时间的拖长。因此为了获得好的结果,酶膜应该尽可能薄。按所述的电极尺寸大小加入反应腔的乙醇脱氢酶分析液是 20 微升效果最好。

[0015] 所述步骤(3)中磷酸盐缓冲液的 pH 值最好是 7.04。

[0016] 步骤(3)中所述乙醇脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、硫酸吩嗪二甲酯、铁氰化钾的最佳体积配比关系是 3:0.6:1.2:0.08。

[0017] 步骤(4)将双面胶剪成与酶层的电极片相匹配的大小贴在有酶层的电极片上,最后将透明胶贴在该双面胶上,形成小电池,这样便于血样的确认,有利于控制血量。

[0018] 制备好的血乙醇脱氢酶电极保存于 4℃的冰箱内。

[0019] 生物传感器的传感原理是待测物质经扩散作用进入固定化生物敏感膜层,经分子识别,发生生物学反应,产生的信息继而由相应的化学或物理换能器转变成可定量和可处理的电信号,再经二次仪表放大并输出,通过换算便可知道待测物浓度与电信号之间的对应关系。本发明血酒精传感器通过乙醇脱氢酶进行分子识别,结合丝网印刷商品碳墨电极来测量电子的流量(电流),并将其转换成电信号,最后将该电信号换算成相应的血酒精浓度,形成相对应的关系。

[0020] 在生物电极中,酶电极占有重要的地位,本发明将酶与电极这两个生物学和化学概念“杂交”在一起。酶电极把固定酶层和化学电极结合在一起,不仅具有不溶性酶体系的优点,而且具有电化学电极的高灵敏度。本发明生物电极为双电极系统,基础电极由一个印制的碳电极和一个印制的银/氯化银电极组成,碳电极为工作电极,银/氯化银电极具备参

比电极和对电极的双重功能,为了检测血酒精的浓度,使用特异性的乙醇脱氢酶,当酶电极浸入待检血样时,待测血样进入酶层的内部,并参加反应,

[0021] 发生在酶电极上的生化—氧化还原反应如下:

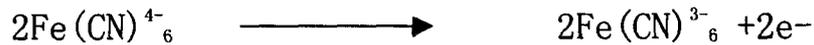
[0022]



[0023]



[0024]



[0025]  $\text{NAD}^+$  是氧化型辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸),  $\text{NADH}$  是还原型辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸), PMS 是硫酸吩嗪二甲酯 ADH 是乙醇脱氢酶。

[0026] 这种酶反应的结果是使反应物和产物的浓度都发生变化,经过一段时间后,产物的生成速度和反应物的消耗速度趋于平衡,反应达到稳态。电活性物质的浓度可以通过电位法和电流法进行测定,所得电化学信号与待测底物的浓度有一定关系,通过这种对应关系可检测血酒精的浓度。

[0027] 一般的氧化还原酶,它们都含有一个或几个氧化还原中心,但在绝大多数酶中,氧化还原中心一般处于酶内部,有的酶外部还有一层糖蛋白包被。这种结构特点阻止了反应中心与电极表面间的电子转移及还原性辅酶的有效循环。因此,解决生物活性中心与电极表面间的电子转移问题是电流型酶电极成功的关键。电子介体(又称电子转移媒介体)是指能将酶反应过程中产生的电子从酶反应中心转移到电极表面。电子介体的选择有以下的标准:

[0028] (1) 快速与酶的还原态反应,使氧化态酶再生;

[0029] (2)  $\text{Mox}$  (氧化型中介体) 的再生所需的过电位较低和 pH 不依赖性;

[0030] (3)  $\text{Mred}$  (还原型中介体) 和  $\text{Mox}$  (氧化型中介体) 是稳定的;

[0031] (4)  $\text{Mred}$  (还原型中介体) 与氧不发生反应;

[0032] (5)  $\text{Med}$  (中介体) 是无毒性的。

[0033] 根据乙醇脱氢酶法检测乙醇的基本原理可知,是根据产生的  $\text{NADH}$  来间接地检测乙醇的含量。不同浓度的乙醇在没有电子介体参与的反应体系下的响应  $i-t$  曲线如附图 1:横坐标单位(秒);纵坐标单位(微安)乙醇浓度( $\text{mmol/L}$ ) 从下到上分别为:0.2、0.4、0.6

[0034] 从附图 1 可以看出,反应的各种浓度的乙醇溶液的响应电流非常小,而且无法得到明显的浓度梯度。分析其原因,认为可能是在该反应体系中, $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADH}$  虽然是松散地键合在酶蛋白上,但却深深地嵌入其中,氧化还原中心与电极之间的转移并不容易,往往需要很高的过电位来克服这种由蛋白质产生的反应障碍和空间位阻。同时, $\text{NADH}$  在电极上的氧化常会引起不需要的副反应,包括部分  $\text{NAD}^+$  的离解。这些反应产物往往引起电极表面污染,从而进一步减慢了电子的异相转移速率。

[0035] 为了得到明显的浓度梯度,本发明再结合电子介体的选择标准选用了电子介体铁氰化钾,铁氰化钾与  $\text{NADH}$  易发生氧化还原反应,可以避免电子介体与酶活性中心反应时空位阻效应的影响,所以响应电流比较大,而且很容易达到稳态电流。在这种体系下,本发明获得了非常明显的浓度梯度,其电流响应如附图 2:横坐标单位(秒)纵坐标(0.1mA)

[0036] 乙醇浓度 (mmol/L) (由下而上) :0.0、1.0、2.0、3.0、4.0

[0037] 由附图 2 可以直观地看出,选用铁氰化钾作为电子介体效果较好。

[0038] 选用了铁氰化钾作为电子介体,还需对其浓度作进一步的限定,铁氰化钾的浓度对响应电流有影响,其浓度有最优化值,浓度太低响应太小,太高则对反应有一定的抑制,影响测定的灵敏度,本发明经过实验摸索其最适浓度。用改变铁氰化钾的量来配制乙醇脱氢酶分析液,用 2 毫升该溶液

[0039] 做底物检测其响应电流,寻铁氰化钾的最佳用量。实验曲线如附图 3 所示。

[0040] 从附图 3(工作电位 290mV、pH7.04、温度 25℃、乙醇 2mmol/L、PMS0.4mmol/L、NAD1.0mmol/L、乙醇脱氢酶 10mg/ml) 可看出,铁氰化钾在乙醇脱氢酶分析液内的最适浓度为 0.40mmol/L。

[0041] 任何酶都具有最适 pH 值,但将酶固定化后其最适 pH 值可能会改变,因而选择配置酶液时缓冲液的适当 pH 值以使酶的活力尽可能得发挥非常重要。可以采用不同 pH 值的缓冲液配制酶液并检测其响应电流,由此选择最适 pH 值。实验中缓冲液的 pH 梯度从 6.0 到 10.0,其中 pH6.0 到 8.0 的用磷酸盐缓冲液,pH9.0 到 10.0 用 Tris(2-氨基-2-羟甲基-(1,3)-丙二醇)一盐酸缓冲液。酶液配制中仅缓冲液改变,其它成分、比例及测定条件均保持不变,底物用 2mmol/L 乙醇溶液。响应电流随缓冲液 pH 值的变化曲线如附图 4 所示(工作电位 290mV、温度 25℃、乙醇 2mmol/L、PMS0.4mmol/L、NAD1.0mmol/L、 $K_3Fe(CN)_6$ 0.4mmol/L、乙醇脱氢酶 10mg/ml)。

[0042] 从附图 4 可以看到:缓冲液的 pH 值在 7.0 到 9.0 的范围内有较好的响应电流值,考虑到人体血液的 pH 值呈微碱性,所以通常配制酶液时选用 pH 值 7.04 的磷酸盐缓冲液效果较为理想,取磷酸二氢钾 0.68g,加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 29.1ml,用水稀释至 100ml 制得。

[0043] 酶的催化活力受温度影响较大,选择温度的原则是保证有较高的灵敏度,附图 5 为乙醇脱氢酶电极的响应电流随温度而变化的曲线。

[0044] 从附图 5(工作电位 290mV、pH7.04、乙醇 2mmol/L、PMS0.4mmol/L、NAD1.0mmol/L、 $K_3Fe(CN)_6$ 0.4mmol/L、乙醇脱氢酶 10mg/ml) 可以看到,温度低于 20℃时,电流响应很小,温度超过 25℃时,响应电流变化很快。所以本发明选择 25℃为测定温度。

[0045] NAD 浓度对酶电极响应电流的影响如附图 6 所示。

[0046] 从附图 6(工作电位 290mV、温度 25℃、pH7.04、乙醇 2mmol/L、PMS0.4mmol/L、 $K_3Fe(CN)_6$ 0.4mmol/L、乙醇脱氢酶 10mg/ml) 可以看出,NAD 浓度从 0.5mmol/L 到 1.0mmol/L 时,响应电流呈上升趋势,当 NAD 浓度达到 1.0mmol/L 时响应电流达到最大并处于稳定状态,所以我们选择乙醇脱氢酶分析液体系中的 NAD 的浓度为 1.0mmol/L,这样既可以得到较高的灵敏度和重现性,又可以降低测定的成本。

[0047] 当 PMS 的浓度从 0.05—0.5mmol/L 变化时,相应的电流变化如附图 7(工作电位 290mV、温度 25℃、pH7.04、乙醇 2mmol/L、NAD1.0mmol/L、 $K_3Fe(CN)_6$ 0.4mmol/L、乙醇脱氢酶 10mg/ml) 所示。当 PMS 浓度约为 0.4mmol/L 时,响应电流最大,之后,电流反而减少,所以 PMS 的最适宜浓度为 0.4mmol/L。

[0048] 本发明步骤 (2) 采用丝网印刷技术,现代丝网印刷技术,是利用感光材料通过照相制版的方法制作丝网印版,使丝网印版上图文部分的丝网孔为通孔,而非图文部分的丝

网孔被堵住。印刷时通过刮板的挤压,使油墨通过图文部分的网孔转移到承印物上,形成与原稿一样的图文。丝网印刷设备简单、操作方便,印刷、制版简易且成本低廉,适应性强。

[0049] 本发明对乙醇脱氢酶电极的重复性进行了试验,方法如下:取三个浓度的血样进行测试,每个浓度测三次,每次测试用一个试纸条,计算均值和方差。结果如表 1。

[0050] 表 1 乙醇脱氢酶电极的重复性实验数据

[0051]

血酒精浓度 (mmol/L)	响应电流( $\mu$ i)			平均值	变异率 (%)
	电极 1	电极 2	电极 3		
0.5	45.0	45.2	45.4	45.2	0.44
1.0	90.0	91.2	92.0	91.1	1.35
1.5	135.0	135.3	135.7	135.3	0.1

[0052] 从表 1 可以看出,该酶电极具有较好的重复性,基本达到实用化的水平。血乙醇脱氢酶电极保存到 90 天,其电流响应率为 95%,可见其保存寿命良好。

[0053] 附图说明

[0054] 本发明酒精传感器的有益效果是:①不需要复杂或昂贵的设备,而且印刷过程简单、迅捷、且容易自动化批量生产;②采用了银薄层电极,导电性好,成本低,可作为一次性酶电极使用,避免了常规银电极在分析中的污染与腐蚀,免去了电极的预处理步骤;③介体酶电极通常是在碳电极的基础上进行介体修饰及酶固定,而印刷的碳电极其电阻较大,采用导电性能良好的银作电极基体,可克服这一问题;④该种酶电极的灵敏度高,使用中可将样品用量减至一滴以下,且不需外加任何支持电解质,这样便可

[0055] 用于直接测定一些只能提取少量但意义重大的血酒精浓度;⑤临床样品浓度低,组成复杂,一般方法测定均不理想,但该生物传感器具有高选择性、高灵敏性和高准确性。

[0056] 图 1 是不同浓度的乙醇在没有电子介体参与的反应体系下的响应  $i-t$  曲线

[0057] 图 2 是不同浓度的乙醇在电子介体参与的反应体系下的响应的  $i-t$  曲线

[0058] 图 3 是铁氰化钾的浓度对响应电流

[0059] 图 4 是响应电流随缓冲液 pH 值的变化曲线

[0060] 图 5 是乙醇脱氢酶电极的响应电流随温度而变化的曲线

[0061] 图 6 是酶电极响应电流随 NAD 浓度变化的曲线

[0062] 图 7 是响应电流随 PMS 的浓度变化的曲线

[0063] 具体实施例

[0064] 制备检测血酒精浓度的一次性生物传感器,按以下步骤操作:

[0065] (1)、镀银薄片电极的制备选取光滑、平整的塑料薄膜,剪成宽度为 10.5mm,长度为 60mm 长条形,将塑料薄膜片置于 10% NaOH 溶液中,加热 3 分钟,取出,用去离子水洗涤,晾干备用;在备用薄膜片正面覆盖一层保护膜,预留出电极及其引出导线的形状大小尺寸,背面用保护膜完全覆盖,将该薄膜片置于体积比例是 1:1 的 2% 葡萄糖和 2% 银氨溶液中,混匀,在室温下静置 20 分钟,待薄膜片上形成致密的银镜,将薄膜片取出,用去离子水洗涤晾干,撕去保护膜,即得所需镀银薄片电极;

[0066] (2)、基础电极的印刷采用丝网印刷技术按以下形状和尺寸印刷：工作电极和参比电极形状均为条型，长度是 40mm，宽度是 2mm，两者之间的距离是 1.5mm，碳墨经丝网印刷在步骤 (1) 制得的镀银薄片工作电极上，将银墨平行印刷在工作电极旁边的参比电极上，最后将氯化银墨印刷在参比电极上，每印完一次后，待自然干燥后再印下一次；

[0067] (3)、固定乙醇脱氢酶分析液取一块步骤 (2) 印好的电极片，将带电极孔的绝缘层粘附在电极片上，构成一个反应腔，然后将 20 微升的乙醇脱氢酶分析液，滴涂于工作电极与参比电极之间的反应腔内，待电极片自然干燥后，用双面胶将透明胶粘到电极片上；其中所述乙醇脱氢酶分析液是用 pH 值 7.04 的磷酸盐缓冲液稀释成浓度分别为乙醇脱氢酶 10mg/mL、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 5mmol/L、硫酸吩嗪二甲酯 1mmol/L、铁氰化钾 15mmol/L，并按体积配比关系乙醇脱氢酶：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸：硫酸吩嗪二甲酯：铁氰化钾 3:0.6:1.2:0.08 混合摇匀配制而成；其中所述磷酸盐缓冲液是取磷酸二氢钾 0.68g，加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 29.1ml，用水稀释至 100ml 制得；配制好的乙醇脱氢酶分析液中铁氰化钾在乙醇脱氢酶分析液内的浓度 0.40mmol/L。

[0068] (4)、将双面胶剪成与酶层的电极片相匹配的大小贴在有酶层的电极片上，最后将透明胶贴在该双面胶上，这样就制成了一次性血酒精传感器。

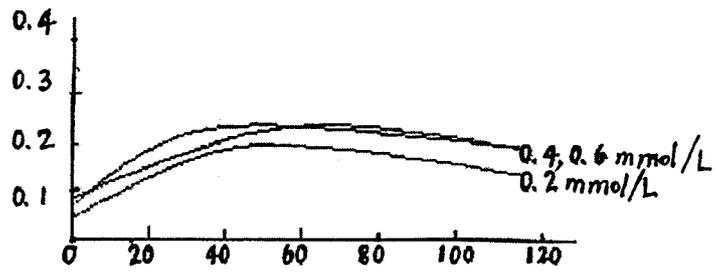


图 1

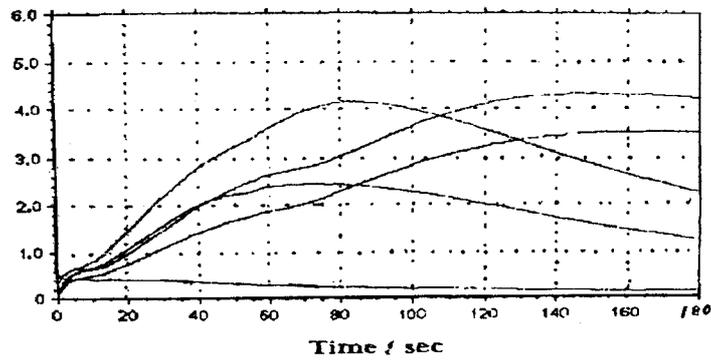


图 2

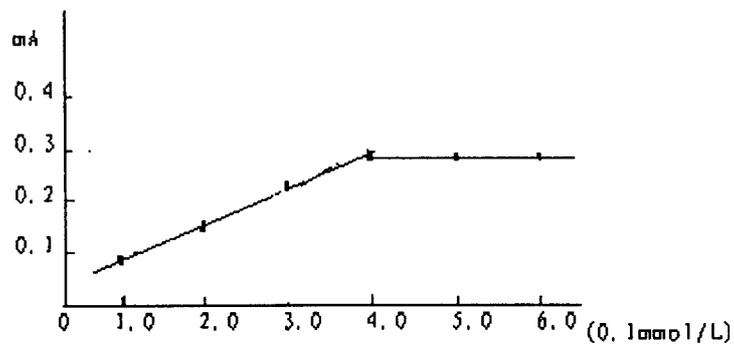


图 3

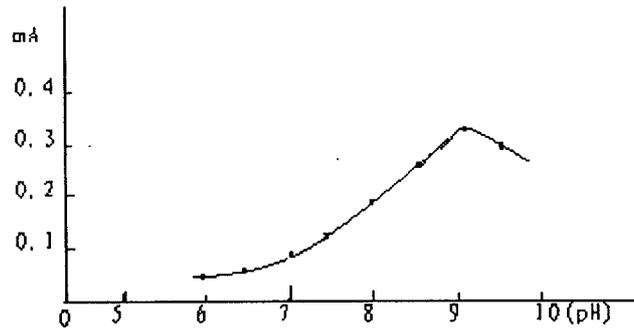


图 4

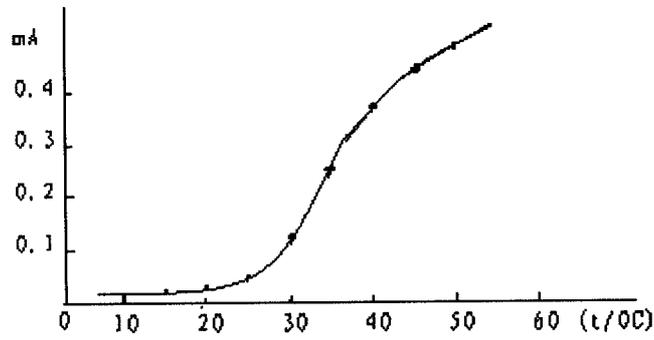


图 5

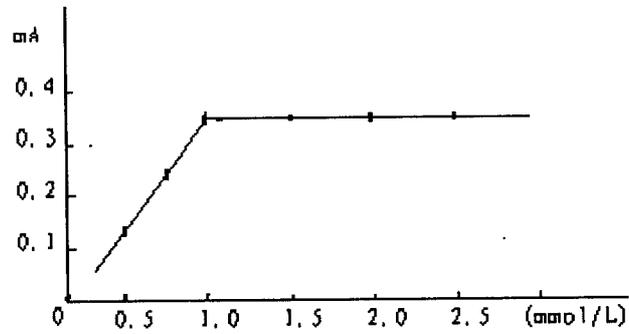


图 6

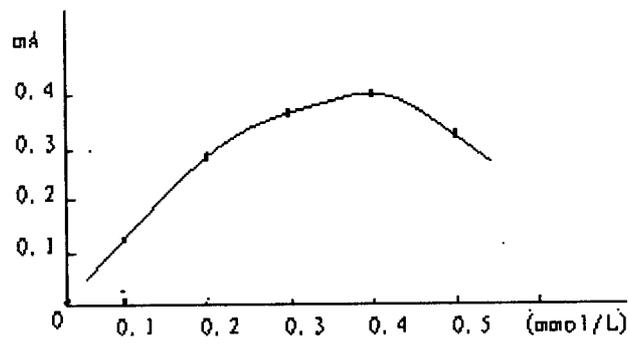


图 7