



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107003266 B

(45)授权公告日 2020.06.23

(21)申请号 201580042754.6

(22)申请日 2015.06.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107003266 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(30)优先权数据
62/010,987 2014.06.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.02.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/035428 2015.06.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/191924 EN 2015.12.17

(73)专利权人 帕克-汉尼芬公司
地址 美国俄亥俄

(72)发明人 E·K·李 B·维罗兹恩
J·安德鲁斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 谭冀

(51)Int.Cl.
G01N 27/30(2006.01)
C08J 3/075(2006.01)

(56)对比文件
CN 101268359 A, 2008.09.17,
US 2012/0132544 A1, 2012.05.31,
CN 103154716 A, 2013.06.12,
WO 2005/066618 A1, 2005.07.21,
审查员 许静

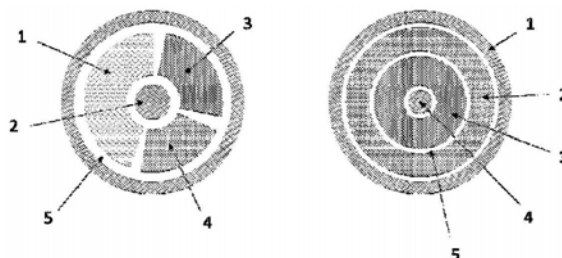
权利要求书1页 说明书21页 附图6页

(54)发明名称

指示电极和包含其的pH感测设备

(57)摘要

本发明涉及指示电极和包含其的pH感测设备。该指示电极具有衬底表面,该衬底表面上非共价地固定有水凝胶,所述水凝胶包括含分析物不敏感材料的单体和至少一种额外的单体。该pH感测设备包含:工作电极,该工作电极包含分析物敏感材料;参比电极;反电极;和所述指示电极。



1. 一种指示电极, 该指示电极具有衬底表面, 该衬底表面上非共价地固定有水凝胶, 所述水凝胶包括含分析物不敏感材料的单体和至少一种选自由以下组分构成的组中的额外的单体: i) 三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯和 ii) N,N-二甲基丙烯酰胺, 其中当所述水凝胶包含三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯和含分析物不敏感材料的单体时, 所述水凝胶包含100:1至1000:1的三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯: 含分析物不敏感材料的单体的第一化学计量比, 并且其中当所述水凝胶包含三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯、含分析物不敏感材料的单体和N,N-二甲基丙烯酰胺时, 所述水凝胶包含90:1:10、85:1:15、80:1:20、900:1:100或800:1:200的三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯: 含分析物不敏感材料的单体: N,N-二甲基丙烯酰胺的第二化学计量比, 并且其中当所述水凝胶包括含分析物不敏感材料的单体和N,N-二甲基丙烯酰胺时, 所述水凝胶包含1:100的含分析物不敏感材料的单体: N,N-二甲基丙烯酰胺的第三化学计量比。

2. 根据权利要求1所述的指示电极, 还包括至少一种选自由以下组分构成的组中的交联单体: i) 亚甲基(双)丙烯酰胺和 ii) 聚(乙二醇)二丙烯酸酯, 并且包括1000:1:5至1000:1:20或1000:10:5至1000:10:20的如下成分的第四化学计量比: 三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯: 含分析物不敏感材料的单体: 亚甲基(双)丙烯酰胺, 或者三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯: 含分析物不敏感材料的单体: 聚(乙二醇)二丙烯酸酯。

3. 根据权利要求1或2所述的指示电极, 其中所述含分析物不敏感材料的单体的所述分析物不敏感材料是二茂铁, 并且其中所述第一、第二、第三和第四化学计量比与所述水凝胶中存在0.1摩尔%至1.0摩尔%的二茂铁的摩尔%相对应。

4. 根据权利要求2所述的指示电极, 其中所述水凝胶是交联的。

5. 根据权利要求3所述的指示电极, 其中所述水凝胶是交联的。

6. 一种pH感测设备, 其包含: 工作电极, 该工作电极包含分析物敏感材料; 参比电极; 反电极; 和如权利要求1-5任一项所限定的指示电极。

指示电极和包含其的pH感测设备

技术领域

[0001] 本发明提供了固态电极,该固态电极包括利用氧化还原活性分析物不敏感材料(“AIM”)的“指示电极”(“IE”)和利用氧化还原活性分析物敏感材料(“ASM”)的工作电极(“WE”)以用于包括pH测量在内的电化学分析,还提供了制造和使用本发明材料的方法以及包括这些材料的电极、传感器和设备。在一个实施例中,将AIM掺入到与伪参比电极(“PRE”)结合使用的IE和用作WE的ASM中。该IE校正由PRE电势的变化引起的pH读数(或其他分析物测量值)的漂移,从而提高测量精度并消除对于其他类型的分析物传感器所需的校准过程的需要。因此,本发明涉及化学领域,尤其是电化学领域,以及分析物测量领域,尤其是pH测量领域,以及进行此类测量的各种领域。

背景技术

[0002] 此前已经描述了基于AIM和/或ASM电化学的电极和分析物感测设备。参见美国专利No. 4,857,167、No. 5,223,117、No. 7,901,555、No. 8,177,958、No. 8,197,650、No. 8,506,779、No. 8,562,797、No. 8,877,037、No. 8,956,519、No. 8,961,754,前述专利以引用方式并入本文。还可参见PCT公布No. 2010/026842、No. 2010/028726、No. 2011/045385、No. 2013/112767、No. 2013/134582以及No. 2014/106066,其各自以引用方式并入本文。利用AIM二茂铁的电极描述见于Lafitte et al. (2008), *Electrochemistry Communications*, 10 (12), 1831-1834 (Lafitte等人, 2008年,《电化学通讯》,第10卷,第12期,第1831-1834页); Hickman et al. (1991), *Science*, 252 (5006), 688-691 (Hickman等人, 1991年,《科学》,第252卷,第5006期,第688-691页); Robinson and Lawrence (2006), *Electroanalysis*, 18 (2006) 677-683 (Robinson和Lawrence, 2006年,《电分析》,第18卷,第2006期,第677-683页),以及Robinson and Lawrence (2008), *Analytical Sciences* 24.339-343 (Robinson和Lawrence, 2008年,《分析科学》,第24卷,第339-343页)。尽管此前在本领域中已描述了二茂铁水凝胶,但是这些教导内容和材料限于用作氧化还原介质,这是出于从单独的感测元件转换信号的目的。此外,这些参考文献没有提出或专注于本文所讨论的二茂铁水凝胶的物理性质。此外,本发明提供了检测和报告参考氧化还原信号的二茂铁水凝胶pH感测元件。

[0003] 利用ASM/AIM和方波伏安法(SWV)的电化学传感器(有时称为“伏安传感器”)因提供“免校准”感测的可能性(意味着传感器不必由最终用户校准)而被交口赞誉,尤其适用于pH测量。在这些传感器中,由WE生成的pH敏感信号和由IE生成的pH不敏感信号通过给定的分析物使用SWV方法同时生成。如果分析物是水合氢离子(用于pH测量),则ASM WE响应于水合氢离子浓度的变化而改变电势,而pH计中IE的理想AIM产生不随pH变化的恒定电势。如图1所示,相对于参比电极(RE)电势测量这两个电势。这样,ASM信号和AIM信号之间的差异可与pH或其他分析物相关联,并且该差异在理想情况下与RE的绝对电势无关,该RE可以是常规的参比电极(“CRE”)或PRE。因此,对于伏安传感器而言,RE的变化对结果的影响比在常规电位计pH传感器中的影响小得多,所述常规电位计pH传感器完全依赖于RE的稳定性和准确性。实际上,对于伏安传感器而言,可使用更简单的PRE(例如,固体Ag/AgCl组合物)来代替

CRE (诸如包封在参比溶液中的Ag/AgCl或甘汞CRE)。

[0004] 然而,对免校准传感器技术的需求仍然存在,因为被称为“免校准”的传感器在实践中并没有被证明为是无需校准的,和/或在精度、信号强度和/或耐久性方面存在缺陷。例如,此前使用二茂铁(Fc)作为内部参比电极的自校准传感器表现出长期稳定性差,并且该Fc仅在有限的pH范围内具有足够的pH不敏感性。任何pH敏感性均降低了任何所需校准的精度,并限制了测试结果的可靠性。

[0005] 在敏感性方面,现有技术中基于Fc的AIM电极(IE)通常具有较弱并且相对有噪声的信号。另外,现有技术的IE和WE生成相对弱和/或不稳定的信号,特别是在严苛的测试条件下。因此,仍然需要用于使用基于ASM的WE和基于AIM的IE的分析物感测的改进的材料和方法。本发明满足这种需要。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供pH计的有用的新部件(包括WE和IE),以及提供可用于在各种条件下测量pH的完整的传感器,迄今为止使用现有的技术和设备是不可能实现的。在一个优选的实施例中,本发明的pH传感器是干湿可逆的小型紧凑型固态传感器,并且包括基于AIM的IE,其中将WE的ASM和IE的AIM结合到交联水凝胶基质中,该交联水凝胶基质非共价地附接到导电衬底,诸如碳、掺杂硅、改性硅或导电硅衍生物或导电聚合物材料。

[0007] 在第一方面,本发明提供了适合用作AIM的材料。在一个实施例中,该材料是适用于形成包括AIM的亲水性交联凝胶的可聚合单体的制备物。在另一个实施例中,该材料是包括AIM的亲水性交联凝胶。在另一个实施例中,该材料是形成固体缓冲剂的可聚合单体的制备物,该固体缓冲剂被涂覆到充当AIM的ASM上。

[0008] 在第二方面,本发明提供了包括多孔导电衬底的电极,该多孔导电衬底与包括AIM或ASM的亲水性交联水凝胶非共价连接。在一个实施例中,该电极是指示电极(IE)。在另一个实施例中,该电极是WE。在另一个实施例中,该电极是pH计的传统玻璃探针的固态替代物。

[0009] 在第三方面,本发明提供了一种分析物感测设备,该设备包括由包括AIM的亲水性交联水凝胶组成的IE、包括ASM的工作电极(WE)和RE,所述凝胶非共价地附接到多孔导电衬底。在一个实施例中,该RE是固态PRE,诸如银和氯化银的固体混合物(Ag/AgCl)或氯化银的表面。在设备的一个实施例中,WE的ASM类似地共价附接到水凝胶或稳定地包封在水凝胶内,该水凝胶继而非共价地附接到导电衬底来形成该WE。导电衬底可以是多孔的或以其他方式成形或处理以有利于水凝胶基质的粘附。

[0010] 在第四方面,本发明提供了一种方法,用于相对于RE(诸如固态PRE)测量自含ASM的WE和含AIM的IE的电极电势,并且在分析物浓度或水平与WE和IE之间的电势差之间建立相关性。在一个实施例中,使用该相关性导出分析物样品的pH。

[0011] 在一个实施例中,本发明涉及改进使用分析物传感器测量分析物的工艺,该分析物传感器包括:第一WE,其中该第一WE包括第一组氧化还原物质(所述ASM),并且其中该第一组氧化还原物质包括对所述分析物敏感的一种或多种氧化还原物质;IE,其中该IE包括第二组氧化还原物质(所述AIM),并且其中该第二组氧化还原物质包括对所述分析物不敏感的一种或多种氧化还原物质;反电极(“CE”);RE,其可以是CRE或PRE;用于在第一对电极

和第二对电极之间施加方波电势扫描的装置,其中所述第一对电极包括所述第一WE和所述RE,所述第二对电极包括所述IE和所述RE;以及用于检测方波伏安图中的第一峰和第二峰之间的相对偏移的装置,其中第一峰由第一组氧化还原物质的氧化和还原之一产生,并且第二峰由第二组氧化还原物质的氧化和还原之一产生,所述改进包括使用IE,其中第二组氧化还原活性物质不共价附接到该IE的表面,而是被共价地、非共价地或以这两种方式包封到附接于该IE表面的聚合物材料中。在另一个实施例中,改进涉及使用WE,其中第一组氧化还原活性物质不共价附接到WE表面,而是共价地、非共价地或以这两种方式包封到附接于该WE表面的聚合物材料中。在另一个实施例中,本发明提供了一种包括改进的IE和改进的WE的设备。

附图说明

[0012] 图1示意性地示出了在未校正的伏安传感器中,RE电势中的任何漂移如何导致包含分析物敏感材料(ASM)的原本稳定的WE的测量误差(在该图的A中示出)。无法将该测量误差与分析物浓度的变化区分开。如果分析物不敏感材料(AIM)用作额外的IE(在该图的B中示出),则任何表观漂移必须归因于RE。因此,IE电势的漂移可用于消除在工作电极中观察到的漂移误差(在该图的C中示出)。这样,WE和IE的电势差便与RE的性质或种类的变化有效地分离,并且传感器提供对分析物的更精确的测量。在缺少IE的情况下,pH的变化可导致WE的变化或者RE漂移可产生误差(A)。测量IE的变化可得出RE漂移的影响(B)。施加基于IE的校正到WE以补偿RE漂移(C)。

[0013] 图2示出了证明二茂铁甲醇(Fc-MeOH)在pH 1至pH 10的缓冲液中具有实际上相同的方波峰值电势的数据。为了生成该数据,将含有1mM Fc-MeOH和100mM氯化钠的缓冲液各扫描五次。误差条反映标准偏差。本发明的一个目的是提供用于IE的二茂铁水凝胶。二茂铁甲醇(Fc-MeOH)在pH值为1至10的缓冲液中显示恒定的方波峰值电势,与平均值的偏差小于6mV(等同于0.1个pH单位)。SCE=标准甘汞电极。

[0014] 图3示出了本发明的免校准固态pH传感器的部件,如实例1中更具体的描述。ASM位于WE之上,而AIM位于IE之上。碳纤维复合材料用作两个电极的衬底。本实施例中的反电极(CE)是围绕WE的金属(例如不锈钢)环。在该示例中,相对于伪参比电极(PRE)进行所有伏安测量。基于ASM-AIM电极对的固态pH传感器的部件、反电极(CE)和伪参比电极(PRE)。

[0015] 图4示出了对于包括如实例1中所述的本发明的AIM水凝胶的pH传感器而言,pH变化对WE(即ASM) pH峰值与IE(AIM,例如Fc)峰值的影响。pH值为6、7和8的缓冲液中,pH敏感ASM电极和pH不敏感AIM电极的氧化还原峰的描述。

[0016] 图5示出了RE中的变化对如在实例1中所述的本发明的WE-IE对的影响。结果证明WE-IE关系与CRE无关。PRE vs. CRE. 改变参比电极不会影响ASM电极和ASM电极之间的峰距离。实线示出使用充当PRE的丝网印刷Ag/AgCl电极时的峰值电势;虚线示出来自相同的ASM-AIM电极对的峰值电势,该电极对使用液体界面Ag/AgCl参比电极,即最常用的CRE。

[0017] 图6示出了如实例2中所述的全固态传感器系统中的WE-IE对的校准。全固态传感器中的ASM-AIM电极部件的校准。

[0018] 图7示出了比较WE-IE对和常规玻璃pH电极的结果,如实例3中所述。ASM-AIM电极对与常规玻璃pH电极的对比。

[0019] 图8示出了本发明的传感器(设备)的各种电极配置。本发明传感器中的电极的示例性空间布置。部件1、2、3和4分别表示含ASM的WE、含AIM的IE、伪参比电极和反电极。根据使用要求设计每个电极的位置和表面积。部件5表示用于使得电极彼此分离和绝缘的非导电材料。电极连接至用于SWV操作的电子电路。

[0020] 图9示出了组装了本发明的pH传感器的多孔板。加入了本发明的pH传感器的多孔板。针对装有电极的单个孔,示出其细节。电极可通过具有连接至SWV电路的贯通板触点以及垫或插针的孔的底部连接。在其他实施方案中,电极以区段的形式位于孔的壁上。在又一实施方案中,电极通过印刷导电迹线连接。

[0021] 图10示出了根据本发明的代表性实施例,被设计用于测量微升样品的pH传感器的细节。设计成测量微升样品的pH传感器的细节。该传感器包括两个半部,所述的两个半部通过毛细作用保持样品溶液的小液滴(2)。上半部(1)包含AIM电极、ASM电极和伪参比电极。下半部包含反电极。部分4示出了上半部的表面,包括伪参比电极、AIM电极和ASM电极。部分5示出了下半部的表面,包含反电极。围绕每个电极的材料均为电绝缘体。每个电极的触点均包含在传感器的两个半部中。

具体实施方式

[0022] 现有技术中的基于AIM的指示电极和基于ASM的工作电极通常具有有限的精度、较差的稳定性,并且对于AIM IE,其pH不敏感性范围小,而对于ASM WE,其pH敏感性范围小。这些现有技术电极中的AIM部分(例如二茂铁)通常通过共价附接直接附接到衬底表面。对于其中AIM或ASM共价附接到衬底表面的电极,可实现的AIM或ASM的有效浓度受到可进行反应/结合的衬底的二维表面积的限制。此外,可获得的官能团密度通常低于反应位点的密度,这导致信号水平低以及随之产生的电极电势测量的不确定性。

[0023] 此外,此前提供完全固态的干湿可逆pH传感器的尝试并没有形成商业产品;在本发明之前,仍然没有基于AIM/ASM固态技术的商业化的固态pH计。先前已失败的尝试可能要归因于:在WE处不能产生足够的信号强度;在使用或存储过程中信号衰减过快;在相当宽的pH范围内敏感性不足;分析物样品或其他使用条件的鲁棒性不足。本发明提供了克服这些限制的各种材料、方法、电极、传感器和设备,首先通过提供水凝胶材料,该材料中ASM或AIM共价附接到或稳定地包封在交联的亲水性聚合物基质内,称为“水凝胶聚合物基质”或“水凝胶”。

[0024] 水凝胶聚合物基质

[0025] 在本发明的IE和WE中,可以是二茂铁衍生物或包括二茂铁衍生物的AIM和可以是蒽醌衍生物或包括蒽醌衍生物的ASM,共价连接到或物理包封在高度溶胀的交联的亲水性聚合物基质(一种“水凝胶”)内,该基质不共价连接到导电衬底,而是通过非共价键附接到其上。三维水凝胶结构容许比现有技术中所实现的高得多的AIM(或ASM)的浓度。水凝胶的高水渗透性确保了AIM(或ASM)与正测试其分析物浓度的样品之间的快速相互作用,这促进了对样品变化的迅速响应。本发明的AIM水凝胶和ASM水凝胶还具有良好的干湿可逆性,干燥时保持物理完整性,并且在再润湿时快速恢复氧化还原活性。本发明的pH传感器的pH不敏感性范围通常涵盖至少pH 2至pH 10。

[0026] 二茂铁(Fc)已被描述为用于IE中的合适的AIM,但是在高浓度下二茂铁的固定作

用通常导致在小的pH范围之外的低却显著的pH敏感性。因此,AIM的与分析物无关的性质仅部分实现。例如,将聚乙烯二茂铁(具有固有高官能团密度的AIM)物理固定到衬底上产生低分辨率信号。

[0027] 本发明部分产生于某些二茂铁衍生物的pH不敏感性范围在溶液中比在固态中明显更宽的发现。例如,如图2所示,二茂铁甲醇(Fc-MeOH, MW=216)在pH 1至pH 10的缓冲液中具有实际上相同的方波峰值电势。因此,本发明的一个目的是在固态电极和传感器的实施例中保持AIM的天然pH不敏感性和ASM的天然pH敏感性。

[0028] 本发明提供的材料在分子水平上提供模拟游离溶液中AIM的环境的AIM操作环境。本发明的一般方法是将Fc衍生物掺入水合聚合物基质中。继而将所得聚合物沉积在导电衬底上来形成电极。优选地, Fc衍生物共价附接到水凝胶上,被定义为通过水高度溶胀但不溶于水的交联聚合物基质。根据本发明的与Fc和Fc衍生物一起使用的典型水凝胶具有比聚合物的质量分数高得多的平衡水含量。通过比较,通过热交联或化学交联变得不可溶的聚合物,诸如聚乙烯醇(适用于形成本发明的WE)具有与聚合物的质量分数相当或远远小于聚合物的质量分数的水的质量分数。这些不太适合作为Fc的主体聚合物,除非可接受更小的pH不敏感性范围。

[0029] 对于本发明,合适的水凝胶被配制为包括一种或多种共聚单体的多组分体系,所述共聚单体形成能够在链之间的空间中保持水的聚合物链的三维网络。为了形成本发明的AIM,在一个实施例中,至少一种共聚单体是反应性Fc衍生物,诸如乙烯基二茂铁。乙烯基二茂铁(MW=212)是Fc-MeOH的反应性类似物,但其不溶于水。然而,根据本发明,其可与其他亲水性乙烯基共聚单体和交联剂结合使用,从而形成基于聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、它们的聚醚衍生物的水凝胶和本领域众所周知的许多其他水凝胶。将乙烯基二茂铁作为少量组分并将其他亲水性共聚单体作为主要组分配制,用于溶剂化乙烯基二茂铁并为其提供有利于保持其pH不敏感性的水合环境的目的。在优选的实施例中,配制AIM水凝胶,使得溶胀凝胶质量的80%是水。在一些实施例中,配制AIM水凝胶,使得溶胀凝胶质量的85%至95%是水。

[0030] 含AIM的水凝胶的组合物可被描述为聚合物基质,而不管它是干燥的还是水合的。本发明阐述了影响AIM性能的基质的两种性质;这些是按占总聚合物单元的百分比计的摩尔百分比(或摩尔%) AIM单元和按占总聚合物单元的百分比计的摩尔%交联剂。对于本发明,单体被认为是具有侧链聚合型基团的分子。交联剂是具有两个聚合型基团的分子。假设聚合反应完成并且所有单体都结合到聚合物链中,则摩尔% AIM和摩尔%交联剂都由所用单体的化学计量的量决定。

[0031] 在本发明的一个实施例中,聚合物基质中的摩尔% AIM保持在0.1和1之间。交联度为交联剂占有共聚单体的1摩尔%至2摩尔%。这两个变量都影响电化学性能。如果水凝胶中的Fc单元未被良好地溶剂化,则其氧化还原性质更类似于不溶解的二茂铁材料的性质。如果二茂铁含量大于基质的0.5摩尔%至1摩尔%,或者如果交联密度大于1.5摩尔%至2摩尔%,则可能出现这种情况。如果二茂铁含量小于0.1摩尔%至0.2摩尔%,将没有足够的二茂铁密度来产生强的氧化还原信号。如果交联密度小于0.8摩尔%至1摩尔%,则水凝胶将缺乏物理完整性,并且可从衬底分离或逐渐溶解。

[0032] 在某些情况下,聚合物基质中的摩尔% AIM保持在0.1和1.5之间。交联度为交联剂占有共聚单体的1摩尔%至2摩尔%。所得的水凝胶表现出良好的结构完整性,以及通过

非共价附接与电极表面的良好结合强度。在某些情况下,将对这种类型的实施例进行 γ 辐照处理,这种处理可为对用于生物技术、制药和食品加工行业的传感器灭菌所需的。

[0033] 在其他实施例中,可使用二茂铁单体的亲水性衍生物,使得在聚合物链中具有大于1摩尔%的二茂铁时表现出良好的溶剂化。类似地,大体积的Fc单体可用于防止聚集并有助于溶剂化。

[0034] 因此,在一些实施例中,本发明提供的用于制备IE的材料包括与亲水性聚合物基质(或与可用于形成这种基质的单体)共价连接的AIM。当基质如本文所述交联时,其被称为“水凝胶”。因此,本发明提供的材料包括“AIM聚合物”、“AIM水凝胶”、“AIM单体”和用于制备它们的各种其他单体。在一个实施例中,本发明的AIM水凝胶在交联的亲水性聚合物中包括二茂铁。在一个实施例中,AIM水凝胶通过乙烯基二茂铁与一种或多种亲水性共聚单体共聚而形成,其中至少一种共聚单体是双官能或多官能的。双官能或多官能共聚单体能够在聚合时形成交联,并且在本文中被称为交联剂。这些组分的共聚产生水凝胶,该水凝胶提供在SWV操作条件下显示pH不敏感信号的IE。然后,如上所述,该信号与来自ASM WE的pH依赖性信号结合使用,以根据本文所述的方法产生对应于分析物浓度的信号(在一个实施例中为pH)。

[0035] 在优选的实施例中,AIM水凝胶包括由N,N-二甲基丙烯酰胺(97-99摩尔%)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(1-2摩尔%)和乙烯基二茂铁(0.1-1.5摩尔%)的自由基聚合形成的聚合物。

[0036] 在另一个实施例中,Fc单体可用作没有交联的线性均聚物。如上所述,乙烯基二茂铁不具有足够的亲水性,因而不是优选的实施例。然而,可根据本发明利用Fc和聚合型基团之间的合适亲水性连接基来制备Fc衍生物,诸如下表1的结构Fc-II中所示的那些Fc衍生物,以提高总体的亲水性。

[0037] 在另一个实施例中,可单独使用含有两个或更多个聚合型基团的多官能Fc单体,诸如下表1的结构Fc-III中所示的多官能Fc单体,来提供交联的均聚物。在这种情况下,聚合物的每个重复单元将含有Fc基团,导致异常高的Fc功能性,但是可为一些应用提供增加的pH敏感性。如在本发明的一些实施例中,通过引入亲水性共聚单体作为连接基,使Fc官能团被“稀释”,从而使所得共聚物具有增强的亲水性。

[0038] 在另一个实施例中,AIM水凝胶是包括AIM单体和一种或多种单官能共聚单体的线性共聚物。线型聚合物必须足够大(每链大于50至100个单体单元),以防止从上面沉积有AIM水凝胶的电极衬底浸出。

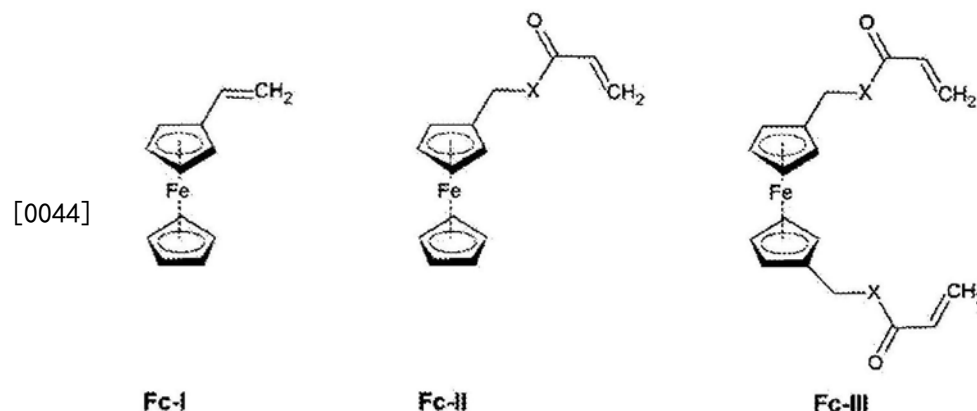
[0039] 在另一个实施例中,AIM水凝胶包括物理包封在交联聚合物基质中的AIM分子。合适的AIM分子可以是长度为50至10,000单元的线型聚合物,如线型聚合物1的结构中所示,或者可以是低聚物或树枝状聚合物,如下表2所示的结构中所示。这种称为互相贯通网(IPN)的结构将使得任意的AIM分子被包封在交联的聚合物中,而不需要该AIM上的聚合型基团。IPN的组分通常不会彼此共价结合。

[0040] 对于本实施例而言,优选的聚合型基团是发生自由基聚合的那些,包括乙烯基、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯基团。这些基团具有产生化学稳定且对水解稳定的烷基聚合物链的优点。分子本身可包括亲水性基团,诸如醇类或乙二醇单元,或包括二茂铁的AIM部分。

[0041] 在另一个实施例中,聚合型基团包括通过形成酰胺或酯键发生反应的那些基团,包括含有反应性羰基(诸如酰氯)和亲核体(诸如醇或胺基)的单体。这些导致产生聚酯或聚酰胺聚合物链。

[0042] 在另一个实施例中,该水凝胶包括非共价交联的水凝胶,也称为超分子水凝胶,其通常由两亲性胶态组分组成。该实施例被认为不太有利,因为超分子水凝胶通常对于通过热和溶剂的溶解不太稳定。

[0043] 表1:含二茂铁的单体



[0045] 表1中示出了典型的含二茂铁的单体。在优选实施例中使用的一个实例是乙烯基二茂铁(Fc-I),其中聚合型基团直接连接到二茂铁芳香环。在结构Fc-II中示出了另一个实例,其特征在于通过亚甲基连接基连接的丙烯酸酯(X=氧)或丙烯酰胺(X=氮)聚合型基团。该连接基可以是 C_nH_{2n} ,其中n可以是1-6。连接基还可包括亲水性基团,诸如乙二醇单元。聚合型基团的烯基部分可以是丙烯酰基(如图所示)或甲基丙烯酰基,其中甲基附接到相对于羰基的 α 位置的碳上。由于聚合速率和耐水解性具有差异,所以这些不同的衍生物可为所需的。聚合物链上的侧链AIM部分的水解有助于信号衰减。另一类型的AIM单体是含有两个或更多个聚合型基团的单体,如上文的结构Fc-III中所示。这种结构在聚合物中提供交联,并且可单独使用或与其他单体一起作为共聚物使用。AIM聚合物和AIM水凝胶可基于任何亲水性聚合物基质。乙烯基聚合物尤其适用,因为通过控制单体、共聚单体和交联剂的种类和配方可获得多种特性。交联提供了以下优点:聚合物可以原位聚合,从而形成物理附接到衬底的稳定网络,任选地穿透具有一定孔隙度的衬底。通过掺入具有那些属性的单体,可将各种水平的阴离子、阳离子或两性离子特性引入水凝胶中。虽然下面引用了二茂铁水凝胶,但是其他AIM诸如有机金属、离子盐和氧化还原活性有机物质也可使用这些单体形成水凝胶。

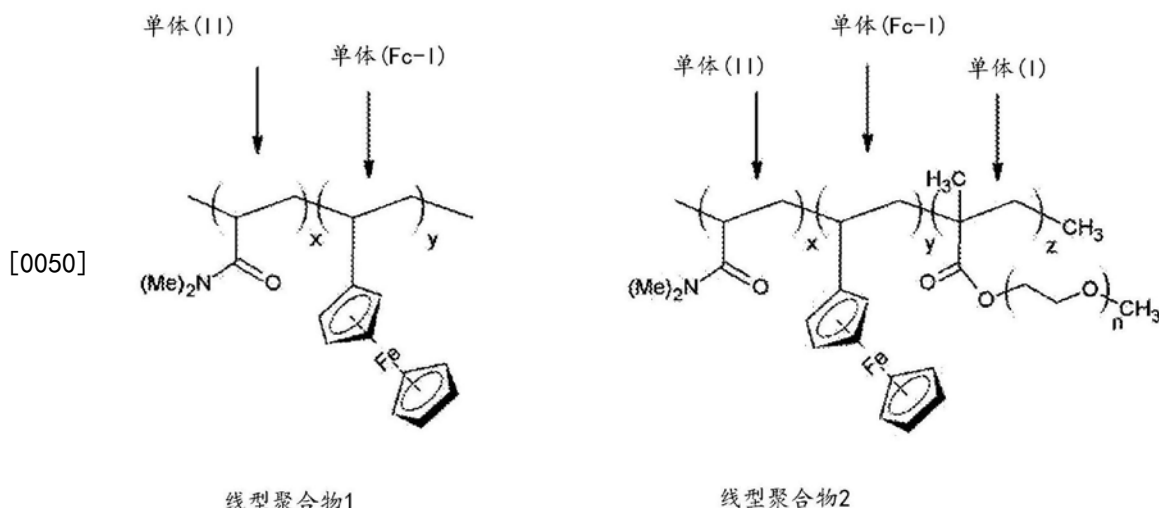
[0046] 例如,紫精聚合物是众所周知的具有两个可逆氧化还原峰的稳定的亲水性聚电解质结构(Naoki et al. "Polyviologen Hydrogel with High-Rate Capability for Anodes toward an Aqueous Electrolyte-Type and Organic-Based Rechargeable Device." ACS Applied Materials&Interfaces 5.4 (2013):1355-1361 (Naoki等人,“具有用于阳极朝向水性电解质型和有机基可再充电设备的高速率能力的聚紫精水凝胶”,《美国化学学会应用材料与界面》,第5卷,第4期(2013年),第1355-1361页)。传统上用作氧化还原标记物的金属盐(诸如,六氰合铁酸盐)也可根据本发明通过用聚合型基团代替配体之一来掺入聚合物中。

[0047] 通过改变共聚单体和/或交联剂的选择、这些组分的比率和水凝胶的总固体含量,

可获得多种聚合物/水凝胶特性。固体含量是指与水相比聚合物基质所占的凝胶的比例。典型的水凝胶含有1%至10%的固体,并且这在很大程度上取决于材料吸水并溶胀的能力。该溶胀本身高度依赖于交联度。在本发明的一些实施例中,AIM聚合物或AIM水凝胶在整个三维聚合物结构中掺入乙烯基二茂铁(或其他合适的二茂铁衍生物或其他AIM连接的单体或聚合物,或AIM和单体的混合制剂),从而使得AIM的有效密度比以前可实现的大得多,但是不超过导致pH不敏感性范围比期望的范围更小的二茂铁(或其他AIM)基团的阈值密度。

[0048] 表2和表3中示出了使用本发明的方法制备的代表性聚合物。这些包括含有乙烯基二茂铁和共聚单体N,N-二甲基丙烯酰胺(II)或更亲水的三乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯(I)或二乙二醇甲基醚甲基丙烯酸酯(类似于I,但是 $n=2$)的线型聚合物,以及与聚(乙二醇)二丙烯酸酯(IV)或亚甲基(双)丙烯酰胺(III)交联的含二茂铁的水凝胶。在表2和表3中, x 、 y 和 z 是指各单体的化学计量比。例如, $x:y$ 的比率对应于二茂铁(或其他AIM)取代主体聚合物的取代度(例如上文所讨论的0.1摩尔%至1摩尔%的二茂铁)。

[0049] 表2:线型聚合物

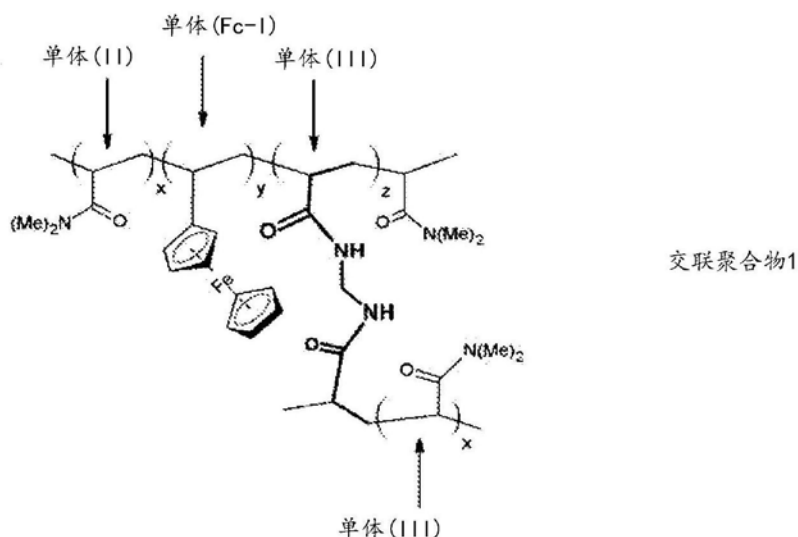


[0051] 表2示出了掺入Fc作为AIM的线型聚合物的实例。 x 、 y 、 z 值表明单体单元的化学计量比,其在整个聚合物中随机分布。在用线型聚合物1说明的优选实施例中, x 和 y 的比率可以是100:1至1000:1。在用线型聚合物2说明的优选实施例中, x 、 y 和 z 的比率可以是90:1:10、85:1:15、80:1:20、900:1:100、800:1:200和0:1:100。在其他实施例中,可使用嵌段共聚物,使得单体链的基团的精确放置和分布是已知的。

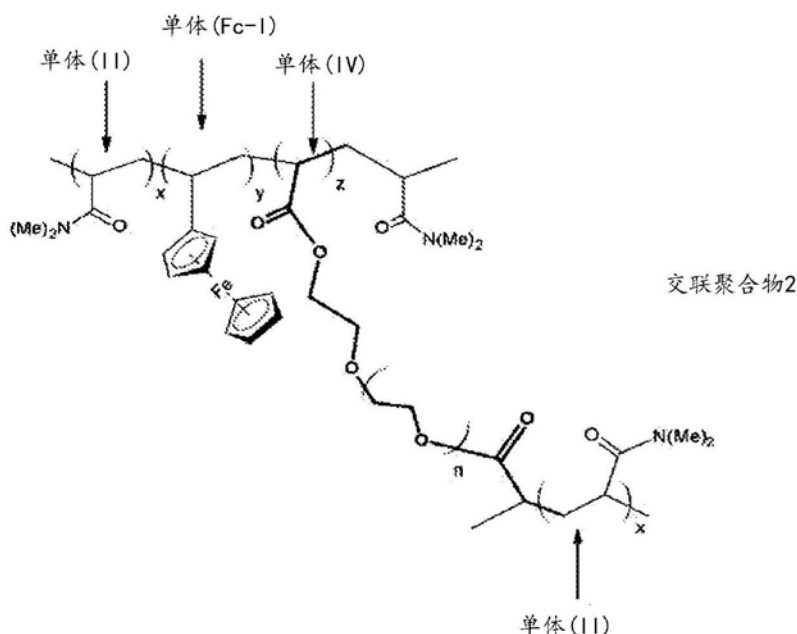
[0052] 线型聚合物1和线型聚合物2说明了有关将Fc(用于说明的目的;可使用任何AIM)官能团掺入到亲水性聚合物中的方法和材料。通过在线型聚合物2中使用三种共聚单体来控制亲水性程度和其他物理性质。然而,两种线型聚合物随时间推移而溶解于水中;因此,根据本发明可使用交联以减慢或消除溶解。

[0053] 交联聚合物1和交联聚合物2分别包含如表3所示的交联剂III和交联剂IV,其中交联剂以粗体突出显示。

[0054] 表3:交联聚合物



[0055]



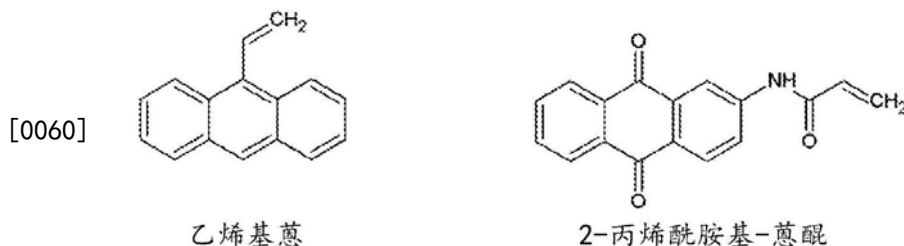
[0056] 表3示出了掺入Fc作为AIM的交联聚合物的实例。 x 、 y 、 z 值表明单体单元的化学计量比,其在整个聚合物中随机分布。对于交联聚合物2,可优选地对双官能交联剂进行改性,从而使其含有对水解更稳定的酰胺键而不是酯键。在针对交联聚合物的优选实施例中,诸如所示的那些实施例, x 、 y 和 z 的比率可以是1000:1:5至1000:1:20;1000:10:5至1000:10:20。在其他实施例中,聚合物仅由AIM单体和交联剂单体组成,比率为0:1:1000至0:20:1000。

[0057] 在一些实施例中,聚乙烯醇用本发明的二茂铁和线型聚合物(例如,包括乙酰基、二茂铁和羟基的线型聚合物)官能化,其被热交联、化学交联或通过辐照交联。例如,在一种情况下,交联剂选自马来酸酐、马来酸、戊二醛、二异氰酸酯、二乙烯基醚、高碘酸盐或任何通用的二醛,如在<http://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19790012957.pdf>中所公开的那样,该公开内容全文并入本文。在某些情况下,使用具有长侧链或较短侧链和/或吸电子或供电子的基团的二茂铁衍生物将PVA官能化,这有利于根据应用将峰值电势调节为更正或更负的电势。在一些实施例中,选择特定的二茂铁衍生物,因

为它们更稳定并且抗扫描引起的衰变,如在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2975373/table/T1/>中所公开的那样,其全文并入本文。

[0058] 本领域技术人员将理解,本发明提供了可用于制备WE的单体、聚合物和水凝胶以及使用它们形成的WE,这些WE与上述AIM材料的不同之处仅在于AIM被ASM代替。因此,本发明的水凝胶的电化学活性组分可包括分析物不敏感材料、分析物敏感材料或两者。例如,可将乙烯基蒽或2-丙烯酰胺基蒽醌(如下表4所示)掺入上述水凝胶基质中来形成本发明的ASM水凝胶。作为另外一种选择,在表现出分析物敏感响应和分析物不敏感响应两者的相同水凝胶中,ASM-乙烯基单体和AIM-乙烯基单体都可用作共聚单体。

[0059] 表4:电化学活性组分

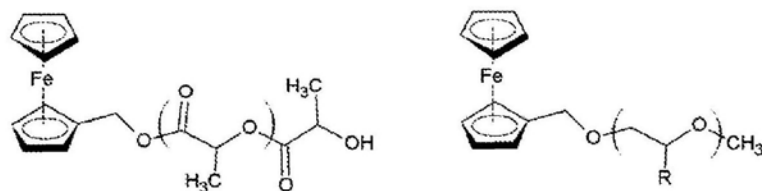


[0061] 在本发明的电极、传感器和设备的各种实施例中,分别使用聚丙烯酰胺二茂铁缀合物和聚丙烯酰胺蒽醌缀合物作为AIM和ASM。这样的实施例包括两种线型聚合物或共聚物,其中ASM和AIM两者作为共聚单体掺入聚合物基质中,得到具有所需组成的无规共聚物。这样的实施例还包括其中WE和IE位于单独的衬底上的实施例。

[0062] 在一些实施例中,使用已经为低聚物、聚合物或树枝状聚合物形式的AIM(诸如二茂铁衍生物)来制备AIM水凝胶,其中AIM不与水凝胶共价附接,而是通过物理包封保持在其中。有效的物理包封需要水凝胶的有效网络密度足够高,以使二茂铁衍生物(或其他AIM)组分的扩散损失量降到最低。单体AIM通常不适用于物理包封,因为所需的使其保持有效的高网络密度与高度溶胀的水凝胶的要求相反。表5中所示的示例性二茂铁材料适用于这种固定作用。替代的亲水性支架包括基于溶胶-凝胶化学的支架(参见PCT公布No.2012/018632,以引用方式并入本文),该替代的亲水性支架可用于形成IPN以固定AIM聚合物或AIM水凝胶(或用于制备本发明的WE的具有ASM的对应材料),其平均分子量与支架的有效孔径相比足够高以提供足够的固定作用。

[0063] 表5:用于形成IPN的二茂铁材料

[0064] 能够包封在电极表面处的水凝胶中的二茂铁材料

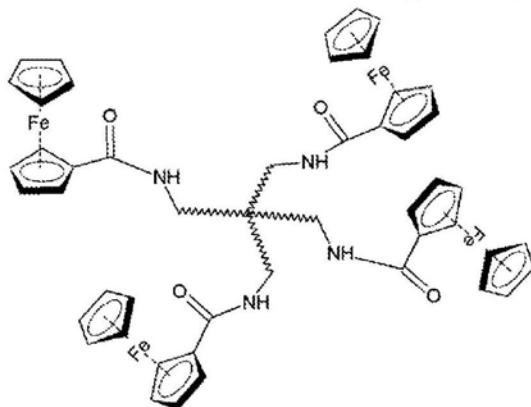


Fc-聚(乳酸)

R=Me: Fc-聚(丙二醇)

R=H: Fc-聚(乙二醇)

[0065]



Fc-树枝状大分子酰胺缀合物

[0066] 二茂铁(或其他AIM)聚合物也可被共混到其他聚合物基质中来产生本发明的AIM聚合物和AIM水凝胶。选择这样的基质以赋予超出水凝胶性能包络的某些属性,例如耐热性或耐化学性。聚偏氟乙烯(PVDF)、环氧树脂、电聚合的聚吡咯和各种导电油墨制剂是可用于该目的的示例性材料。这些及其他聚合物有时用于满足专用传感器的机械、电介质或物理化学要求。

[0067] 电极设计

[0068] 本发明提供了稳定的电极,而无AIM共价附接到衬底或将ASM共价附接到其衬底,所述衬底可以是相同的或不同的。在本发明的一些电极中,AIM水凝胶通过非共价方式固定到衬底表面。本发明提供增强这种附接的衬底,所述衬底具有适当水平的表面纹理、孔隙度和/或三维曲折度以确保可靠的固定作用。这些特征可改善AIM水凝胶(或ASM水凝胶)的附接和/或容纳,而不影响AIM与分析物的相互作用,这部分地受益于溶胀水凝胶的高度可渗透性质。它们还提供保护,使得与沉积在光滑表面诸如玻璃碳或其他金属和非金属表面上的相同材料相比,免于受到原本可能由于AIM水凝胶的反复溶胀和收缩产生的与接触、磨损或脱离相关的物理损伤。效果上,质构化或多孔衬底的机械性能克服了AIM水凝胶的固有脆性,从而得到高结构完整性。

[0069] 任何导电衬底都可用作支承、固定和保护本发明的AIM聚合物和AIM水凝胶(以及ASM聚合物和ASM水凝胶)的电极。这些可包括碳同素异形体,诸如碳纤维、多孔石墨、大孔碳、中孔碳、微孔碳、纳米多孔碳、碳纳米纤维(通过将碳涂覆在诸如纳米多孔氧化铝的材料上制成)以及它们的复合材料;以及纳米管及其复合材料。金属可包括纳米多孔金、铂和银。丝网印刷电极可具有各种具有所需粗糙度的表面涂层,包括中孔碳、碳纳米纤维、碳纳米管、石墨烯或印有微米级或纳米级特征(诸如通道或孔)的碳墨。多孔导电衬底进一步受益于非常短的信号路径,从而提高信号捕获效率。

[0070] 某些导电聚合物可用作电极衬底并用AIM水凝胶涂覆。工程聚合物复合材料包含足够量的碳同素异形体或金属粒子来获得导电性,该复合材料可用作AIM水凝胶的支承物。用于这种复合材料的合适聚合物包括环氧树脂、聚砜、聚醚砜、聚苯硫醚、聚吡咯、聚偏氟乙烯、其他含氟聚合物或共聚物,以及各种烯类聚合物诸如PVC、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯及其衍生物和共聚物、纤维素聚合物和硅氧烷聚合物。

[0071] 本发明的电极可使用刚性衬底诸如各种碳复合材料制成,或者在柔性导电衬底(例如,织造或非织造碳织物)上制成,或使用已经使用导电涂层(诸如碳墨、氧化铟锡、银等)赋予导电性的非导电支承膜(诸如聚酯、聚酰亚胺、聚烯烃等)制成。本发明的材料可成形为多种几何图案,由紧邻的CE和PRE进行补充。例如,电极可被布置为同心环、区段和阵列,如图8所示。导电涂层和由其得到的电极允许以宽范围的形状系数和尺寸来构建传感器。

[0072] 继续参照图8,在一些实施例中,固态传感器的电极部件1、电极部件3和电极部件4被布置为围绕中心电极2的单个同心环中的部分。例如,在一个实施例中,固态传感器的感测表面包括单个同心环,该同心环具有多个电极段,即包括ASM的WE 1、伪参比电极3和反电极4,其中各个电极区段围绕位于中心的含AIM的IE 2径向布置。感测表面还包括插置在多个电极之间的非导电材料5。在某些情况下,选择各个电极段所暴露的表面积,以便产生相对于一个或多个其他电极区段的所需信号。

[0073] 在某些情况下,传感器材料或复合材料形成为具有大约25微米或更小的特征半径的微半球。这些尺寸的传感器产生非常低的信号,但是它们降低的双电层电容也缩短了响应时间。(参见J.Wang, *Analytical Chemistry*, 3rd ed., 2006, John Wiley (J.Wang,《分析化学》,第3版,2006年,约翰威利出版社))。传感器阵列可被构造用于小型化电极或微电极,其具有可用于实际应用的信号电平。

[0074] 在某些情况下,电极部件1、电极部件2和电极部件3被提供为围绕位于中心的电极部件4的单独同心环。非导电材料5插置在电极1、2、3和4的每一个之间,以隔离每个电极部件的相应信号。在某些情况下,基于传感器部件相对于一个或多个其他电极环所需的暴露的表面积来选择传感器部件的位置。在某些情况下,每个同心电极环具有相等的宽度。在某些情况下,一个或多个同心电极环相对于一个或多个其他电极环具有唯一的宽度。

[0075] 导电衬底还可使用坚固的支承材料诸如陶瓷、玻璃或通常用于印刷电路板的玻璃纤维增强复合材料来支承。这些材料提供用于将信号从感测元件传送到电子电路的完善的连接选项。各种封装选择(诸如多层印刷电路板、贯通板触点等)为传感器和设备提供增加的封装密度、可靠性和功能。

[0076] AIM水凝胶和ASM水凝胶可作为涂层施加到衬底上。然而,在各种实施例中,AIM水凝胶或ASM水凝胶原位形成来获得交联结构。当作为涂层施加时,AIM聚合物(或ASM聚合物)必须充分溶于溶剂或溶剂混合物中以制备涂层溶液,但是在目标分析物(通常为水)中充分不溶,以使其在传感器的寿命期间保留在电极表面上。这通常会限制候选线性AIM(或ASM)聚合物的亲水性。交联AIM(或ASM)聚合物避免了这种折衷,因为即使是低交联度也能使高亲水性聚合物不溶。

[0077] 然而,由于该不溶性,交联聚合物不能作为溶液施用并且必须原位制备。这涉及在衬底上施加单体和引发剂的溶液,并随后引发聚合过程。因此,单体可在聚合反应和交联之

前渗透进入衬底的孔中。这确保了即使聚合物未共价连接到表面,聚合物也将具有与衬底的优异粘附力并且适于任何表面特征和内部结构。交联尤其有利于赋予尺寸稳定性并且保留AIM(或ASM)水凝胶的较低分子量级分,这有助于延长AIM传感器(IE)或ASM传感器(WE)的功能寿命。下面的实例1通过显示如何制作本发明的含二茂铁电极(IE)来示出本发明的该方面,制备方式为在电极表面上产生交联水凝胶,其中衬底是碳衬底。

[0078] 本发明的AIM水凝胶和ASM水凝胶具有良好的干湿可逆性,从而在干燥时保持其物理完整性,并且在再润湿时快速恢复其氧化还原活性和电极电势。

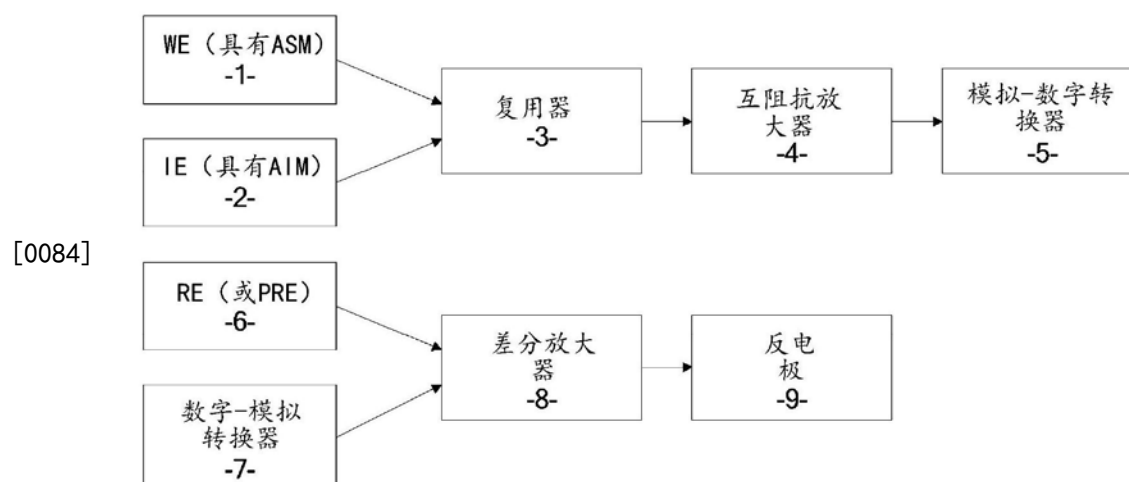
[0079] 方波伏安法(SWV)用于由本发明的传感器部件产生信号。可同时或在不同时间间隔监测WE和IE产生的信号。在当前使用环境下,术语“扫描(sweep)”和“扫描(scan)”可互换使用。在ASM和AIM都位于相同衬底上的实施例中,施用方波电势扫描以引起来自ASM和AIM的独立但同时发生的响应。将相同扫描参数(诸如电压扫描的范围、基座高度和扫描之间的时间间隔,也称为驻留时间)应用于这两个电极。

[0080] 在ASM和AIM分别位于分立的电气独立电极上的其他实施例中,并且根据本发明提供的重要新方法,可将具有不同扫描参数的两个独立方波电势扫描应用于电极。分别对WE和IE采样提供若干有益效果。第一,可针对ASM和AIM单独优化信号质量。第二,与WE相比,可不那么频繁地对IE采样,一些AIM被设计成在不同分析物中保持不变。因此,只需要在分析物发生变化或预期到这种变化时对IE采样,以再确认停滞。未花费在对IE采样的时间可用于恢复监测WE,实际上缩短了WE驻留时间并得到更具响应性的pH测量系统。第三,对IE的较不频繁采样允许采用某些AIM材料,所述AIM材料具有良好精度和较宽的pH不敏感性范围,但是易受由于重复电化学激励导致的信号丢失的影响。

[0081] 在一个实施例中,本发明传感器的SWV电子器件被配置成在来自WE和IE的输入之间复用。WE和IE输入在电气上等效并且与参比电极/伪参比电极(RE/PRE)和CE电路相同。该系统的运行示于表6中。

[0082] 恒电势器电路(框1至9)的区分特征是用于选择ASM电极或AIM电极的复用器3。互阻抗放大器(4)、模拟-数字转换器(ADC)(5)、参比电极(6)、用于产生方波激励(7)的数字-模拟转换器(DAC)和驱动反电极(9)的差分放大器(8)是WE和IE二者所共有的。

[0083] 表6:SWV系统运行

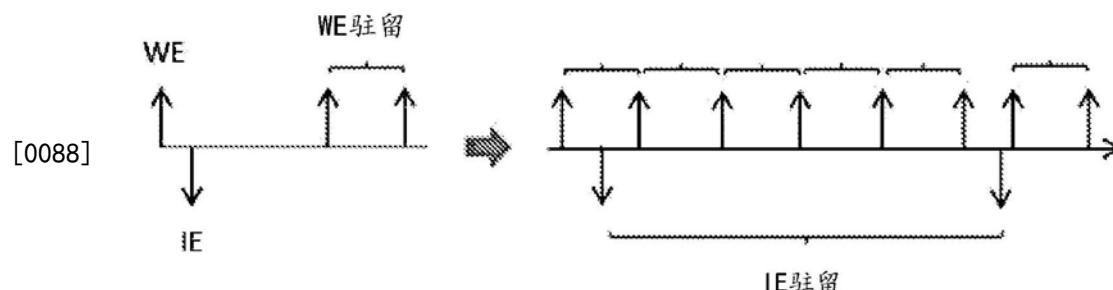


[0085] SWV运行参数,包括电压扫描(或扫描)范围、基座高度、平衡时间和驻留时间(即连

续电压扫描之间的休息时间),可针对WE和IE独立调整。在一个实施例中,相同SWV电路用于依次监测WE和IE。

[0086] WE扫描和IE扫描的总体时间顺序在表7中示出。箭头表示以设置成独立驻留时间的定期时间间隔发生的扫描分组或重复。

[0087] 表7:WE扫描和IE扫描的时间顺序



[0089] 针对每个电极优化扫描参数。可针对WE和IE分别保持统计值,即一系列扫描重复的峰值电势平均值和标准偏差,以便能够独立地分析这些电极产生的结果。

[0090] 针对本发明的WE和IE的SWV的运行参数(包括典型范围和优选值)在表8中示出。

[0091] 表8:针对WE和IE的SWV的运行参数

[0092]

参数	模式	WE (具有 ASM)		IE (具有 AIM)	
		范围	优选的	范围	优选的
扫描速率		30 至 120mV/s	60mV	30 至 120mV/s	60mV/s
基座高度		1 至 150mV	100mV	1 至 150mV	25mV
阶跃高度	查找	1 至 10mV	8mV	1 至 10mV	2mV
	跟踪		2mV		2mV
扫描宽度	查找	-1000mV 至+100mV		-100mV 至+800mV	-100mV 至+500mV
	跟踪	峰值+/- 250mV		峰值+/- 200mV	
驻留		0 至 3600s	30s	0 至 3600s	1200s

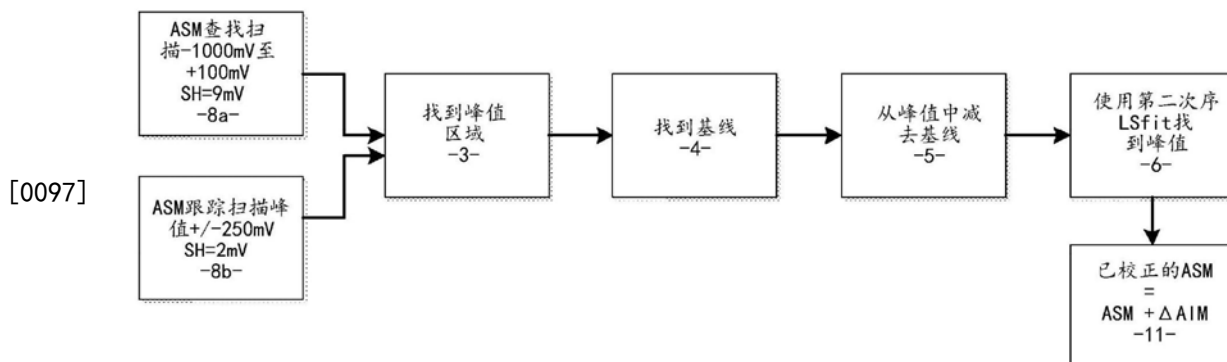
[0093] 本发明的SWV技术的特殊特征是实施两种运行模式。第一,为了定位分析物中ASM或AIM的峰值电势,在涵盖相对较宽电势范围的每次电压扫描开始时使用“查找”模式。第二,为了以较高分辨率定位来自电极的峰值电势,使用具有较小电压增量的“跟踪”模式。在跟踪模式中,例如2mV的阶跃高度对应于0.03pH单位的pH分辨率。这对于大多数pH分析应用已经足够。可进一步将阶跃高度减少至1mV(用于0.015pH单位的分辨率),但是这样做也增加了跨越±200mV范围所需的时间。对于基本不变的AIM峰值电势而言,较窄扫描宽度就足够。

[0094] 下面的过程描述了来自WE和IE的信号如何用于导出所关注分析物的浓度,在这种情况下,水合氢离子浓度表示为pH。

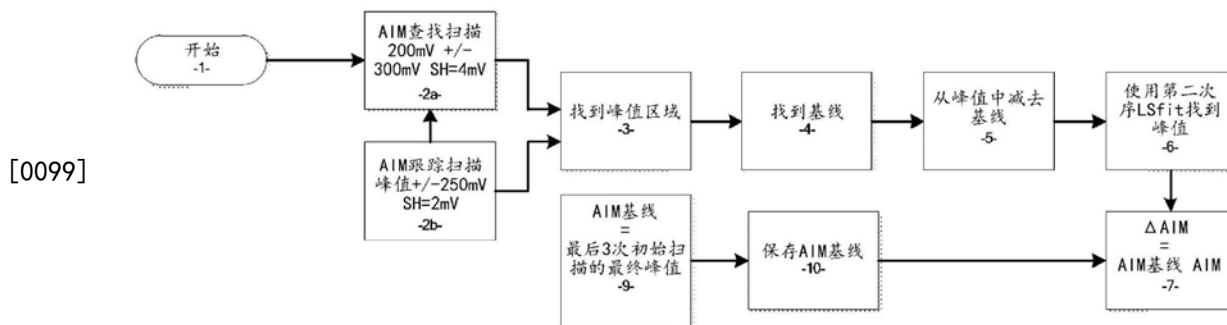
[0095] 如表9至表11中所示,扫描起点(1)开始于以较低分辨率(2a)对WE的较宽SWV扫描,以查找后续WE跟踪扫描(2b)的中心。按照电压范围限值之间的每个电压增量的阶跃高度(SH)来设定扫描速率。在步骤3至6中概述了处理SWV输出以找出峰值。在WE查找扫描(2a)刚刚结束后,但是在WE跟踪扫描(2b)开始之前,IE的较宽SWV扫描(8a)查找后续IE跟踪扫描的中心。IE跟踪扫描的初始组被平均化以确定AIM基线(9),并且被保存在非易失性存储器(10)中。后续AIM跟踪扫描(8b)的峰值(步骤3至6)与AIM基线的差值等于 Δ AIM(11)。因为

AIM峰值是不变的,所以 Δ AIM反映了RE或PRE的漂移。ASM峰值通过 Δ AIM校正(7),作为等同于RE或PRE的漂移的校正因子来应用。校准表表征在若干温度下(例如从5℃至50℃)以及一定pH范围(例如从pH2至pH12)内响应于标准缓冲剂的平均ASM。使用稳定的RE(诸如Ag/AgCl或甘汞)在受控条件下制作校准表的条目。根据校准表,在等于经校正ASM(7)的传感器温度和电压下,测定样品的对应pH(12)。

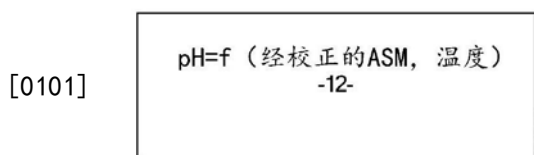
[0096] 表9:WE扫描,基线校正;峰值拾取;计算ASM峰值电势;ASM校正



[0098] 表10:用于计算AIM峰值电势和 Δ AIM的IE扫描(经基线校正、峰值拾取)



[0100] 表11:根据预定校准表(或函数)计算pH



[0102] 用本发明的WE-IE对来确定pH(或其他分析物浓度)可按如下方式进行。可使用在以标准Ag/AgCl或甘汞参比电极为参考的温度范围内ASM对pH缓冲剂的响应的校准表,从而能够响应于AIM的漂移来校正ASM峰值。另一个方法是对于给定温度范围内的pH缓冲剂,直接由ASM峰值电势和AIM峰值电势之间的差值制作校准表。可将这些操作并入到本发明的分析物感测设备的固件中。

[0103] 本发明的分析物感测设备包括传感器组件,所述传感器组件包括WE、IE、RE(CRE或PRE,但通常为PRE)和CE中的至少一者。这些传感器部件可按各种空间布置、表面积比、平面或三维设计、共轴或非共轴几何结构或它们的一些组合来构造。

[0104] 本发明提供的一个期望的构造是直径为12mm的传感器组件。该几何结构类似于常规玻璃电极,并且因此与仪器和安装部分相容。本发明的感测元件可共定位于直径为12mm的探针的末端平表面或者可适当地凹陷以供保护,或者可组织成可触及分析物的三维空间。反电极可为共定位在末端表面上的部件中的一个,或者可为围绕其他感测元件的圈迹

线或圆形迹线形式,如图8中所示。

[0105] 本发明提供的另一实施例为多孔板或微孔板,其中在每个孔的底部和/或内壁中具有可寻址传感器,如图9中所示。电极的构造在一些实施例中类似于上述的12mm探针设计。在电极表面的尺寸上以及电子器件界面上存在主要差异。就多孔板而言,可通过板后侧的孔或借助于导电迹线实现至每个电极的电连接。这些连接常见于用于监测导电性的多孔板传感器中。在典型构型中,96孔板将在每个孔中含有50至200微升溶液。在每个孔底部的电极表面将大约为1至2平方毫米;孔的直径为约1cm。传感器设计的各种示例性实施例在图8中示出。在一个替代实施例中,电极可并入到多孔板中,使得分析物将接触所有感测元件从而能够进行测量。在某些实施例中,一个或多个电极位于样品腔的壁上,留下底部的至少一部分(如果不是全部)透明以供光学分析。另选地,位于柔性膜上的印刷电极尤其适合用作柔性容器、管组中的部件,以及用于生物处理的其他部件(包括单次使用的或者说一次性的部件)。

[0106] 现在参见图10,本发明也可适用于测量极小体积的分析物样品的pH,尤其是根据PCT公布No.2014/106066,该PCT公布以引用方式并入本文。该实施例包括用于测量数量级为微升或次微升的小液滴的传感器组件,以及由这些组件得到的器械。在该实施例中,WE、IE和PRE都位于数量级为若干平方毫米的区域内。在一个实施例中,该区域为WE/IE模块。WE、IE和PRE彼此靠近,确保WE/IE模块与RE能够同时与样品接触。在包括尺寸类似的CE的CE模块被移到紧邻WE部件的位置之后,电路变得完整。这些传感器部件之间形成的间隙用于通过毛细作用保持住分析物小滴,从而桥接并湿润电极表面,使电化学电路变得完整。只有在样品小滴将传感器组件的两个部分桥接起来时,才会有电流。

[0107] 本发明的各个方面也将在下面的实例中示出。

[0108] 实例

[0109] 实例1:通过在电极表面上形成交联水凝胶而制备含二茂铁的电极

[0110] 在该实例中,在用于形成水凝胶的聚合过程期间,本发明的AIM水凝胶固定在(非共价结合到)电极表面上。聚合完成后,在水或水-溶剂混合物中清洗电极,除去污染物、未反应的单体和反应副产物。从电极表面除去过量的水凝胶。然后把电极安装到外壳上,含水凝胶的表面在外壳上暴露于分析物溶液。将衬底的导电背面连接至恒电势器。相对于参比电极或伪参比电极施加扫描方波电势,获得AIM信号,从而给出电流峰值。然后,使用来自AIM的电流峰值电势校准参比电极的偏移,或作为另一个工作电极(ASM)的参比值。

[0111] 在该实例中,AIM的化学结构包括共价连接到本发明的亲水性交联聚合物基质的二茂铁。电极是在导电衬底的存在下聚合单体混合物而制得的。将包括具有5重量%聚乙二醇(PEG)二丙烯酸酯和1重量%乙烯二茂铁的N,N-二甲基丙烯酰胺(DMMA)的单体溶液稀释在正丁醇中,得到25%溶液。添加热活化引发剂(偶氮二异丁腈,AIBN),至0.5%(重量/体积)浓度。把碳纤维圆盘电极浸入混合物,在用氩气鼓泡的同时进行超声处理,以除去氧气。将聚合物封端,在60℃下加热24小时,得到本发明的水凝胶。从凝胶中切出电极,置于清水中洗涤两天。然后从电极表面除去过量的水凝胶。把电极保存在水中,直到要用时再取出。

[0112] 另选地,通过在导电衬底的存在下聚合单体混合物来制备电极,其中,将包括具有3重量%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和3重量%乙烯二茂铁的N,N-二甲基丙烯酰胺(DMMA)的单体溶液稀释在正丁醇中,得到溶液。添加热活化引发剂(例如,偶氮二异丁腈(AIBN)),至

0.5% (重量/体积) 浓度。把碳纤维圆盘电极浸入混合物,在用氩气鼓泡的同时进行超声处理,以除去氧气。将聚合物封端,在75℃下加热。胶凝作用在20分钟至60分钟之间发生,得到本发明的水凝胶。90分钟之后,从凝胶中切出电极,让电极在乙醇中膨胀12至18小时,此后将电极置于1:1的乙醇-水混合物中洗涤2小时,再置于去离子水中洗涤2小时。然后从电极表面除去过量的水凝胶。然后把电极保存在水中,直到要用时再取出。

[0113] 现在参见图3,将四个固态传感器部件同时浸入给定的分析物溶液,来对其进行配置。IE是将二茂铁-水凝胶原位聚合到碳纤维衬底上而制备的。WE是利用聚乙烯醇-蒽醌(PVA-AQ),如美国专利申请公布No.20130168609(以引用方式并入本文)所述制备的。根据本发明,PVA-AQ的另选化学反应在下面的实例4中提供。反电极CE是围绕WE的不锈钢环。相对于伪参比电极(PRE)进行所有伏安测量,在这种情况下,伪参比电极是丝网印刷在柔性聚酯衬底上的银/氯化银膜。采用临时准备的方法来构造图3所示的WE,在该方法中使用了碱,诸如正丁基锂、氢化钠或叔丁醇钾。

[0114] 为核实AIM水凝胶的pH不敏感范围,制备了三个IE,将其置于一系列缓冲液(各自添加了100mM氯化钠)中针对标准甘汞电极(SCE)进行测试。从五次测量中获得方波伏安法峰值。理想的AIM不论在何种pH下,都不会显示出峰值电势偏差。如下方的表12中所示,测试的IE(EL1、EL2、EL3)在整个pH标度内显示出稳定性,但pH敏感性不同。在pH为7.5至6的生物相关范围内,最多存在2mV偏差。在整个较宽的范围内,偏差较大,且电极在pH 2至pH 10的范围内显示出2mV或3mV的标准偏差。考虑到ASM的斜率为58mV/pH单位,则利用该误差,可确定使用AIM在给定的pH范围内可实现的分辨率。例如,6mV的误差转化为0.1单位的pH测量误差。

[0115] 表12:二茂铁-水凝胶电极的pH不敏感性

缓冲液 pH	缓冲液组分	EL 1	EL 2	EL 3
2	盐酸	227	227	
3	邻苯二甲酸盐	237	233	
4	邻苯二甲酸盐	231	229	223
4.1	醋酸盐	229	229	227
5	邻苯二甲酸盐	229	231	225
[0116] 6	磷酸盐	227	227	227
7	磷酸盐	228	227	226
7.5	HEPES	227	227	225
8	磷酸盐			226
9	硼酸盐			221
10	碳酸盐			221
	E (平均值)	229	229	225
	E (标准偏差)	3	2	2

[0117] 用于产生表1中结果的AIM水凝胶是与5%PEG-二丙烯酸酯交联并包含1重量%乙烯二茂铁的DMAA基质。EL1和EL2被聚合为在凝胶中包含20重量%的固体;EL3被聚合为在凝胶中包含25重量%的固体。在每种缓冲液中对电极进行五次SWV扫描,每两次扫描之间有90秒延迟。表1中所报告的值是共计5次的一系列扫描的最终测量结果。表1中pH为7的缓冲液的值,是在pH偏移开始与结束时测得结果的平均值。

[0118] WE和IE对pH改变的特征响应在图4中示出。在实验误差范围内,在pH为6、7、8的缓冲液中测得的AIM峰值可叠加,而ASM峰值随pH变化显示出期望的变化。

[0119] 改变WE-IE对上的参比电极造成的影响在图5中示出。在这种情况下,使用pH为6的缓冲液。使用图3所示的固态Ag/AgCl PRE,获得标记为PRE的数据(实线)。ASM峰值(左侧)和AIM峰值(右侧)分隔开675mV。使用商业Ag/AgCl参比电极替代之前的PRE,获得标记为液体接界RE的数据(虚线)。ASM峰值和AIM峰值分隔开671mV。尽管参考电势的偏移接近100mV,但AIM峰值与ASM峰值之间的差值几乎相同。简单地说,这些结果表明,就本发明的这种WE-IE对来说,AIM-ASM关系不受RE制约。

[0120] 实例2:全固态pH传感器系统的固有pH响应

[0121] 采用常规SWV时,pH与单个WE的特征电势直接相关。就WE-IE对来说,这两个电极的电势差与pH相关。在该实例中,用由不锈钢细棒制成的反电极配置两个WE-IE对,并将丝网印刷的银/氯化银电极用作PRE。所有传感器部件都为固态。如上所述,参比电极有少许柔性,并且pH校准曲线只考虑AIM峰值位置与ASM峰值位置之间的差异。在这种情况下,在环境温度(22℃至24℃)下使用20mM缓冲液和100mM氯化钠,对复制的WE-IE对进行校准。结果在图6中示出。

[0122] 图6示出了两个独立的WE-IE对的电势与pH的线性关系。在这种情况下,电势是相对于PRE测得的AIM峰值与ASM峰值之间的差值。可将其视为校准曲线:使用斜率和截距,可确定未知的pH值。理想的是,ASM与AIM的电势差将只取决于pH值,而不取决于PRE的绝对电势。

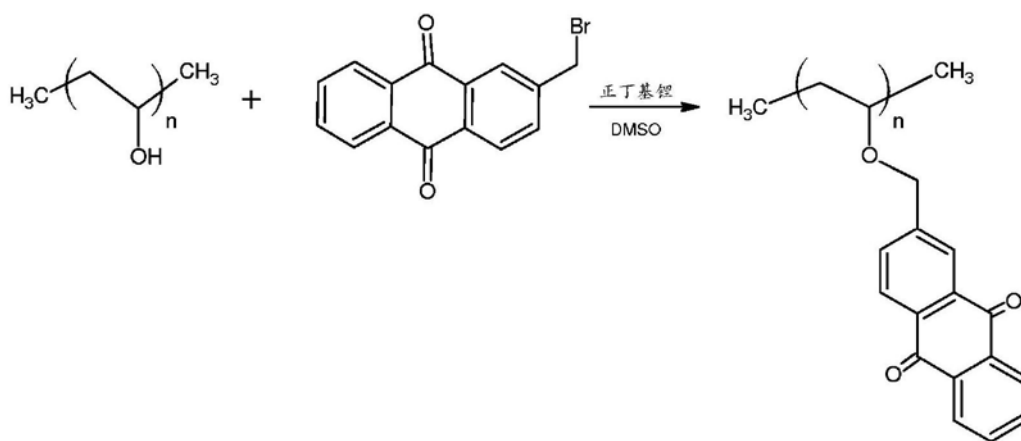
[0123] 实例3:WE-IE对对于分析物扰动(例如离子强度)的响应

[0124] 一般认为,参比电极的电势可能因分析物的离子强度变化而受到影响。用常规电位计测量pH时,可通过以期望的离子强度进行校准,来补偿这些变化。使用本发明的WE-IE电极对时,RE(通常是PRE)的电势改变对ASM和AIM造成类似的影响。因此,误差发生自身消除。这种效果在图7中示出,图中将ASM-AIM对与常规的玻璃pH电极(Thermo Orion)进行了比较。首先在添加了100mM盐(氯化钠)的BDH参考标准缓冲液(VWR International)中校准WE-IE对。然后在10mM氯化钠溶液中测量,这使PRE电势发生30mV偏移。用校准过的玻璃pH探针测得的pH值由空心圆示出。使用WE相对于Ag/AgCl PRE测得且未进行任何校正的pH值由X标记。误差因PRE出现偏移而产生。经AIM校正的pH值由实心圆示出。经校正pH值的准确性显示,与PRE相比,AIM对离子强度的敏感性低得多。概括地说,这些结果表明,本发明的WE-IE对补偿了离子强度对CRE或PRE的影响。

[0125] 实例4:PVA-AQ(ASM) 化学反应

[0126] 适用于本发明的pH计的电极可由共价结合到蒽醌衍生物(PVA-AQ)的聚乙烯醇所构成的水凝胶制备而成。PVA-AQ是使用二乙基氨基甲基聚苯乙烯(常用于有机合成反应的一种聚合物碱)合成的。完成该反应通常大约需要48小时。为缩短反应时间,本发明提供了一种使正丁基锂、氢化钠与叔丁醇钾反应的方法;然而,可根据需要替换常用于有机合成反应的多种碱中的任一种并更改反应条件,以制得本发明期望的PVA-AQ,包括作出任何替换以改变反应时间和/或AQ官能化的密度。因此,可使用若干种不同的碱来定制本发明的方法和PVA-AQ化学反应,以实现特定应用期望的PVA官能化。将正丁基锂用作碱的示例性PVA-AQ合成反应在表13中示出。

[0127] 表13:使用正丁基锂来合成PVA-AQ



[0128]

[0129] 将正丁基锂用作碱来合成PVA-AQ

[0130] 用于制备表12中的PVA-AQ ASM的过程如下。用氩气吹扫带搅拌棒且用烘箱干燥过的500ml烧瓶30分钟。取1.77g (0.042mol) PVA, 连同300mL干燥DMSO一起, 经由转移套管加入烧瓶。将系统保持在正氩气压下, 用油浴加热至50℃, 同时用磁力搅拌棒搅拌, 以使PVA溶解。两小时之后, 将烧瓶冷却至室温, 加入10.4mL (0.0166mol) 正丁基锂。15分钟之后, 加入5g 2-溴甲基蒽醌。在环境温度和氩气氛下继续搅拌混合物20个小时。次日, 将暗棕色的粗制反应混合物投入10倍体积的1,4-二氧六环中, 边加边搅拌。得到焦糖棕色的溶液, 其中有淡黄色固体。继续搅拌该溶液两小时, 然后置于玻璃烧结的布氏漏斗上真空过滤。另选地, 可让上述混合物静置, 在通过滗析除去溶剂混合物之后, 可分离出淡黄色固体。用丙酮洗涤固体。将固体再次溶解于DMSO中, 加入1,4-二氧六环和丙酮使溶液沉淀, 以除去任何未反应的溴甲基蒽醌。还用己烷洗涤, 来帮助除去杂质。

[0131] B. 将氢化钠用作碱来合成PVA-AQ

[0132] 取一只带搅拌棒且用烘箱干燥过的圆底烧瓶(烧瓶1), 在氩气氛下放置30分钟。取924mg (21mmol) PVA, 连同50mL干燥DMF一起, 经由转移套管加入烧瓶。将油浴加热至120℃, 把烧瓶放入油浴, 以使PVA溶解。一旦PVA溶解, 就从油浴取出烧瓶, 使其冷却至室温。取20mL干燥DMF, 经由转移套管加入第二只用烘箱干燥过的烧瓶(烧瓶2)。将氢化钠(400mg, 10mmol)加入烧瓶2, 然后搅拌。经由转移套管将烧瓶2的内容物加入烧瓶1。烧瓶1中的氢化钠/PVA混合物表现为淡黄色悬浮液。搅拌20分钟后, 将溴甲基蒽醌(300mg, 1mmol)加入反应混合物。5分钟后, 混合物转变为深黄棕色, 其中只有极少量未溶解固体。搅拌该混合物90分钟。加入0.5mL水猝灭反应, 然后再搅拌30分钟。接着取10.5mL (10.5mmol) 1M盐酸加入烧瓶1, 以中和去质子化的PVA, 这有助于使混合物增溶, 结果是混合物转变为淡黄色。将烧瓶1的内容物投入装有1.5L丙酮的新烧瓶(烧瓶3)中, 搅拌15分钟, 期间形成了淡黄色沉淀。让沉淀静置10分钟, 然后滗析, 以减小沉淀的体积。然后, 将滗出的沉淀置于冰浴上真空过滤。用丙酮洗涤固体, 随后真空干燥。

[0133] 实例5: 制备碳纤维圆盘

[0134] 用220目砂纸打磨碳纤维/聚乙烯酯圆盘(直径8.5mm)上预期用来感测的侧面。然后把打磨过的圆盘放入100ml烧杯, 向烧杯中加入50ml己烷(VWR), 超声处理1分钟。从烧杯中移除过量的己烷。取50ml乙醇(VWR)加入烧杯, 继续超声处理1分钟, 之后移除过量的乙醇。再次向烧杯中加入50ml乙醇, 对圆盘进行1分钟超声处理, 然后移除过量的乙醇, 由此完

成第三个洗涤步骤。把洗涤过的圆盘保存在干燥环境中,直到要用时再取出。

[0135] 实例6:预凝胶混合物I

[0136] 向干净的小瓶中添加0.06g乙烯二茂铁、0.06g双丙烯酰胺和1.88g DMAA,获得2g水凝胶单体溶液。混合小瓶的内容物,以使乙烯二茂铁溶解。在保存小瓶之前,先用干燥氩气吹扫小瓶的顶部空间,具体做法是将氩气流轻轻吹入小瓶中并持续吹送10秒。为小瓶加上顶盖,然后把小瓶保存在制冷器(-18℃至-22℃)中,最长保存一周。

[0137] 实例7:预凝胶混合物II

[0138] 向干净的小瓶中添加0.10g乙烯二茂铁、1.0g聚(乙二醇)二丙烯酸酯和8.9g DMAA,获得10g水凝胶单体溶液。混合小瓶的内容物,以使乙烯二茂铁溶解。在保存小瓶之前,先用干燥氩气吹扫小瓶的顶部空间,具体做法是将氩气流轻轻吹入小瓶中并持续吹送10秒。为小瓶加上顶盖,然后把小瓶保存在制冷器(-18℃至-22℃)中,最长保存一周。

[0139] 实例8:使用碳纤维电极原位形成水凝胶

[0140] 将油浴预热至平衡温度75℃(+/-2°),同时用较宽的搅拌棒以50至100rpm的速率搅拌。取20mg AIBN、0.75ml单体溶液和3.0ml正丁醇加入20ml小瓶,混合,以使AIBN溶解。将打磨并洗涤过的碳纤维圆盘堆叠起来,放入小瓶底部,让打磨过的表面朝上。把微搅拌棒放入小瓶,抵达圆盘顶部。然后对小瓶进行10秒超声处理。使用不锈钢空心针,向小瓶中的溶液鼓入氩气1分钟,每隔20秒轻轻地漩涡混合溶液。然后将小瓶紧紧地盖上,再浸入油浴,使小瓶的液体内容物位于油面下方1cm处。小瓶处于油浴中时,用微搅拌棒以约50至100rpm的速率混合小瓶的液体内容物,这样,无需移动碳纤维圆盘,就轻轻地搅拌了溶液。胶凝作用在小瓶放入油浴约20分钟至60分钟时发生,由于微搅拌棒被固定而可见。小瓶在油浴中共计放置90分钟后,取出小瓶,使其冷却至环境温度。

[0141] 实例9:洗涤并保存水凝胶电极

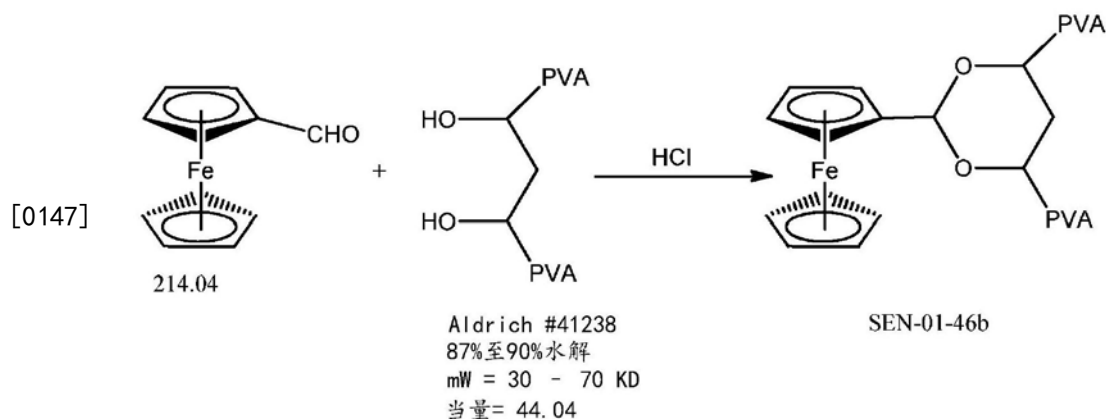
[0142] 用金属抹刀打碎水凝胶溶液,使碳纤维圆盘离开原位。取15ml乙醇(95%)加入装有碳纤维圆盘的小瓶,然后搅拌并混合小瓶12至18小时,以允许水凝胶溶液溶胀。然后从小瓶中移除过量的乙醇和溶胀的水凝胶。取15ml乙醇/水溶液(1:1)添加到小瓶内的圆盘上,搅拌2小时,然后从小瓶中移除过量的溶液。接着,向小瓶内的圆盘添加15ml水,再搅拌2小时。

[0143] 使用剃刀轻轻地刮过每个电极的表面和边缘,来从电极表面除去过量的水凝胶。然后把电极放在纸(Kimwipe)上干燥10分钟。最后,将电极转移到已贴上标签的带螺旋盖干净小瓶内。

[0144] 实例10:使用二茂铁甲醛制备二茂铁/PVA乙缩醛

[0145] 参照表14,通过在室温下搅拌过夜,而使聚乙烯醇(2.0gm, 4.55×10^{-2} 当量)溶解在1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP, 50mL)中。然后向该搅拌过的溶液添加二茂铁甲醛(500mg, 2.34×10^{-3} 摩尔)。再加入浓盐酸(1.0mL),室温下搅拌所得溶液48小时。将NMP溶液缓慢地添加到经用力搅拌的乙酸乙酯(250mL)中,沉淀出聚合物。添加完成后,从聚合物中滗出乙酸乙酯,然后将聚合物置于乙酸乙酯(每次250mL)中搅拌两次,以除去残留的NMP和未结合的二茂铁甲醛。过滤分离聚合物,用乙酸乙酯洗涤,然后在真空下干燥。

[0146] 表14:二茂铁/PVA乙缩醛化合物



[0148] 实例11:在碳纤维材料上形成二茂铁/PVA乙缩醛水凝胶

[0149] 将SEN-01-46b作为溶液施加到制备好的碳纤维圆盘上,随后干燥固化,以使其变得不溶。

[0150] 另选地,首先将SEN-01-46b溶液与纯PVA溶液混合,以调整二茂铁的摩尔%浓度。然后把调整过的SEN-01-46b溶液施加到制备好的碳纤维圆盘上。然后,将选自以下的交联剂加入溶液,以利于在制备好的碳材料上形成水凝胶:马来酸酐、马来酸、戊二醛、二异氰酸酯、二乙烯基醚、高碘酸盐或任何通用的二醛。

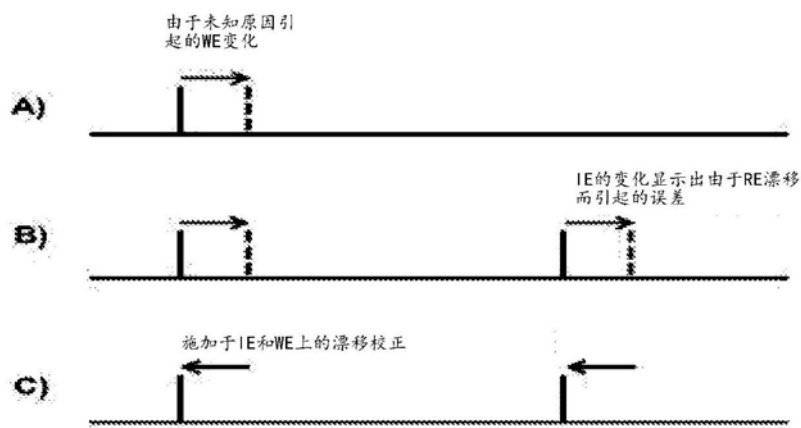


图1

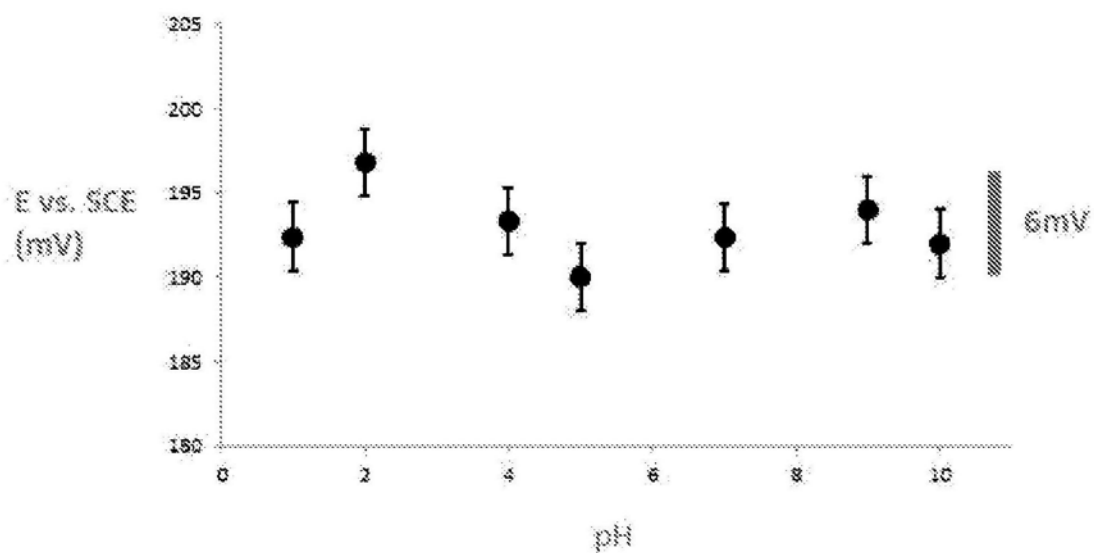


图2

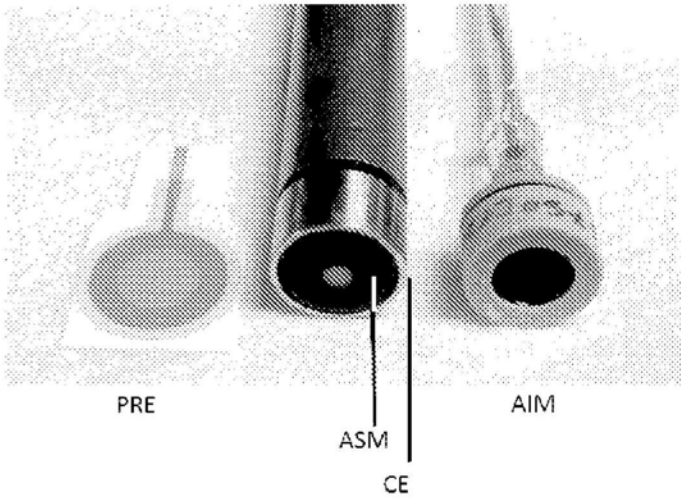


图3

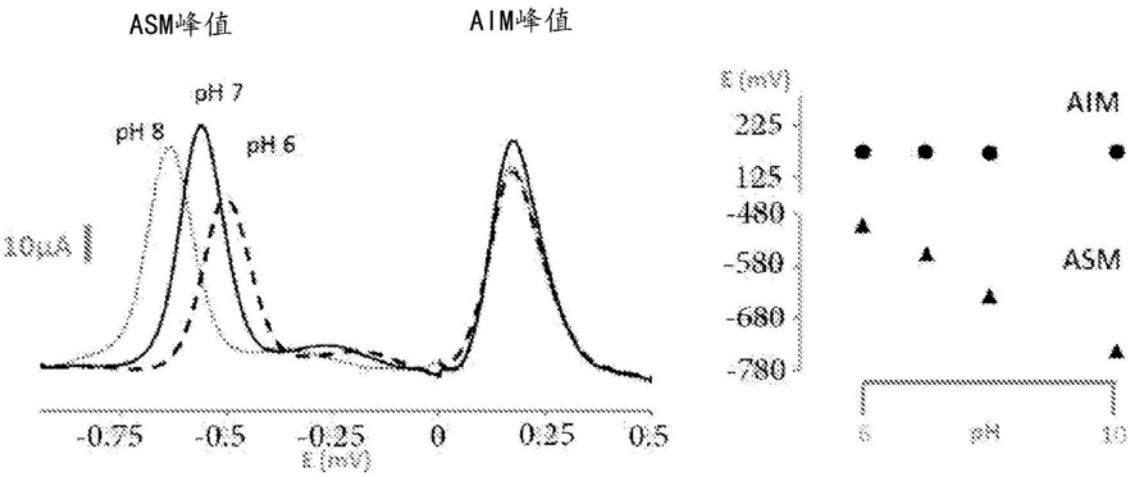


图4

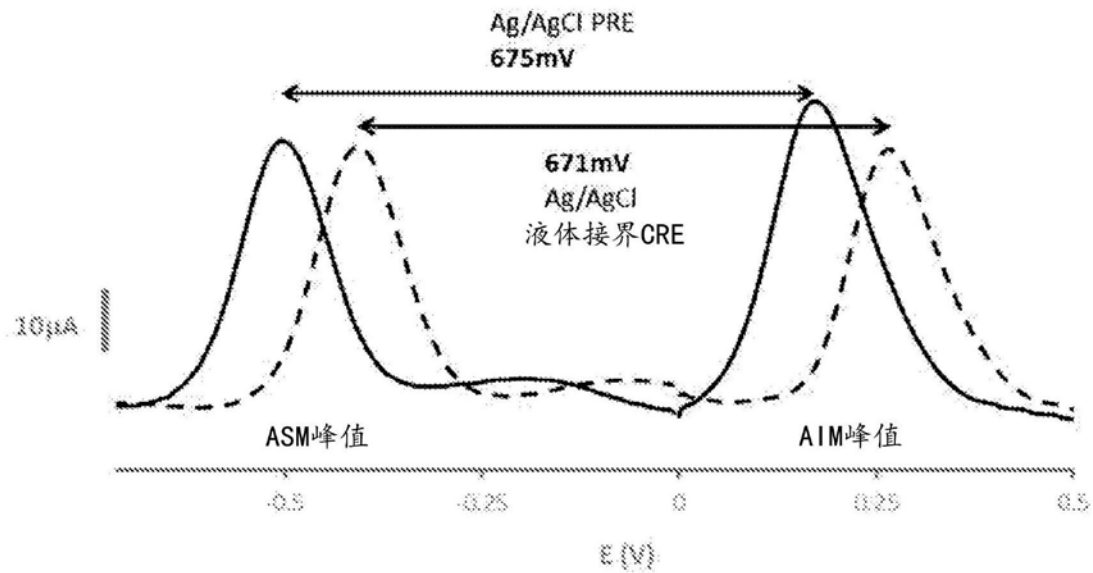


图5

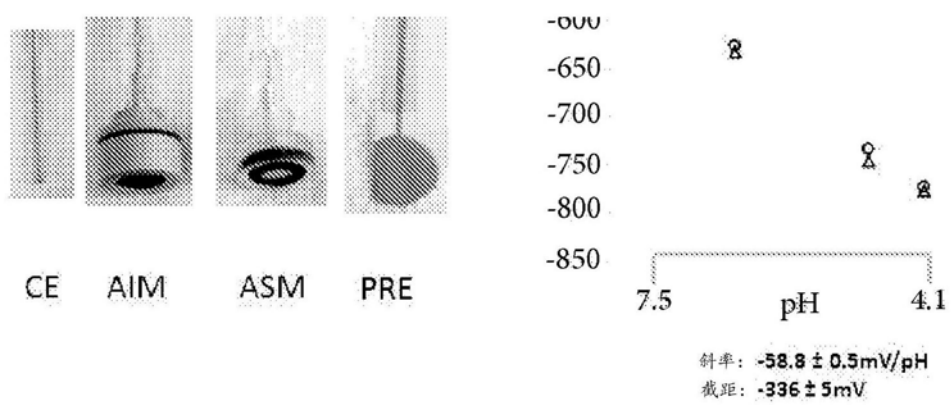


图6

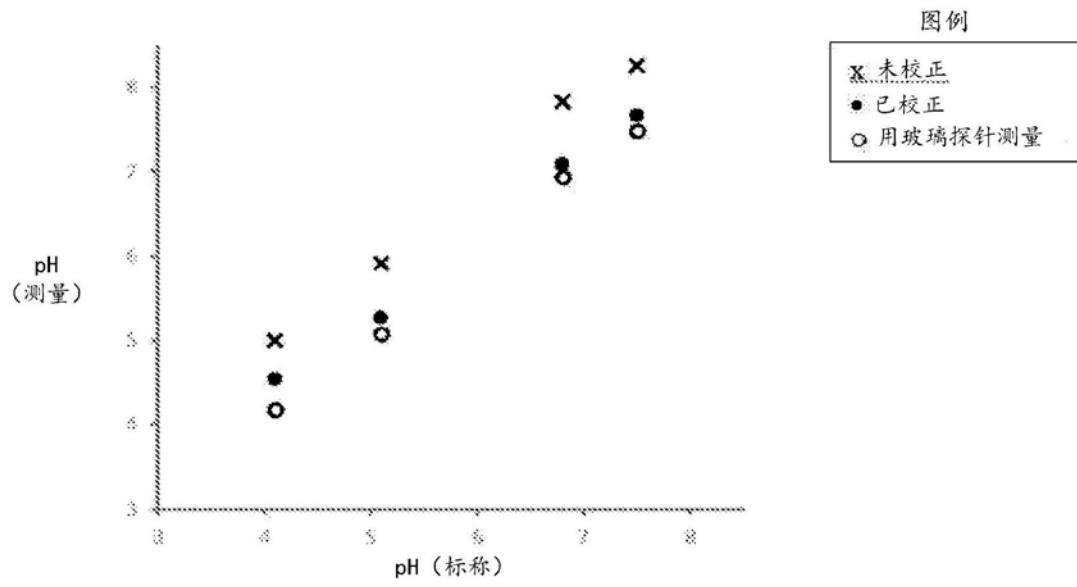


图7

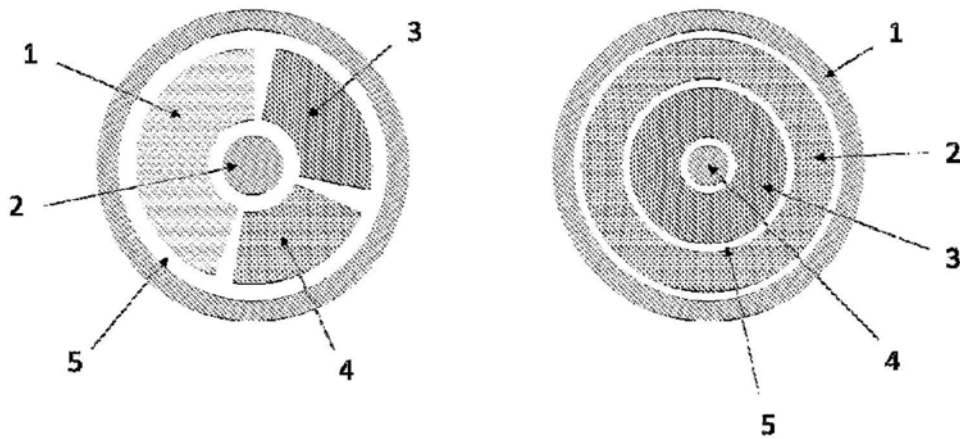


图8

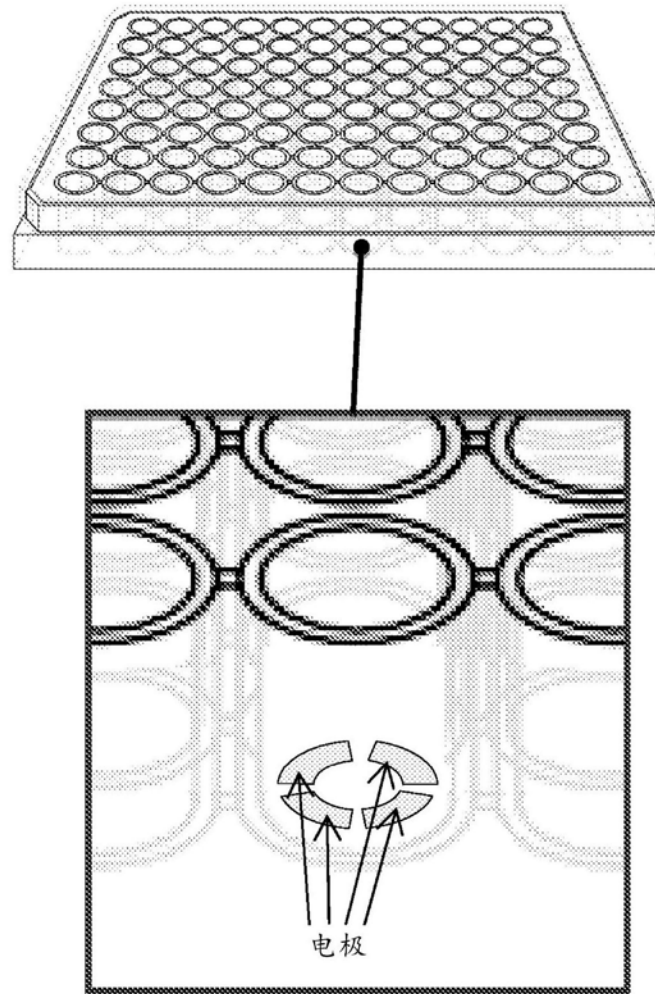


图9

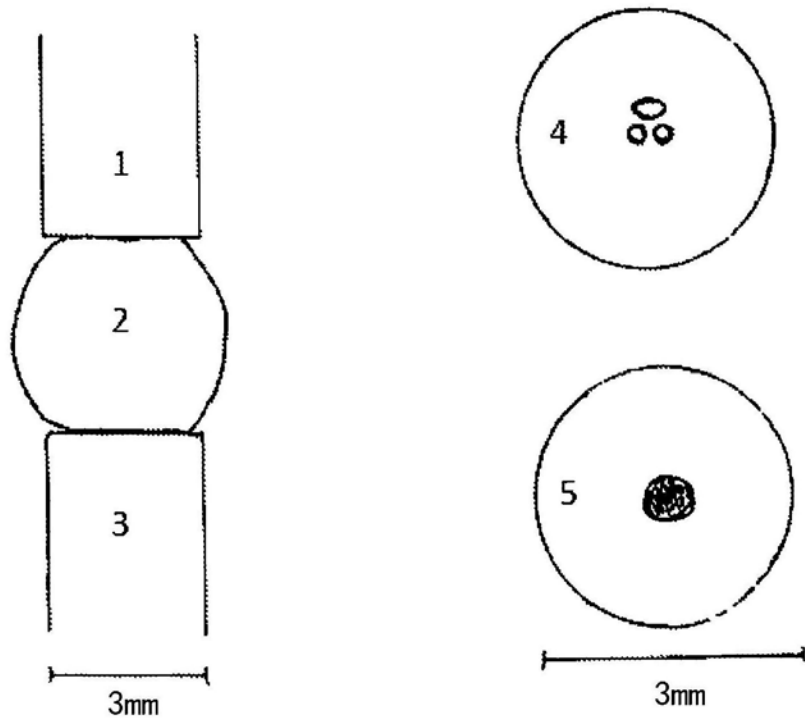


图10