

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780035323.2

[43] 公开日 2009 年 8 月 26 日

[11] 公开号 CN 101517094A

[22] 申请日 2007.7.10

[21] 申请号 200780035323.2

[30] 优先权

[32] 2006.7.25 [33] EP [31] 06117822.4

[86] 国际申请 PCT/EP2007/057012 2007.7.10

[87] 国际公布 WO2008/012197 法 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.23

[71] 申请人 斯沃奇集团研究及开发有限公司

地址 瑞士马林

[72] 发明人 W·舒曼 S·博格曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 严志军 刘华联

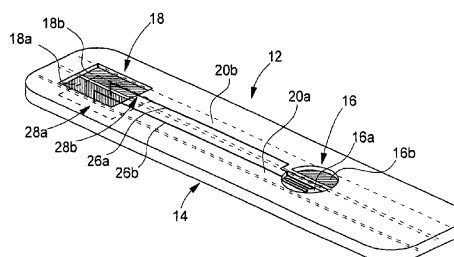
权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 7 页

[54] 发明名称

借助酶测量生物化合物的电化学系统

[57] 摘要

系统包括用于容纳电化学传感器的电子测量仪，该电化学传感器包括衬底，该衬底支承用来将测量电极和参考电极连接到测量仪上的集流器。该测量电极涂敷有试剂，该试剂至少包括要进行分析的体液中的生物化合物的特异酶；该测量仪可施加至少两个不同的温度，以使得能够将来自待分析化合物的信号与来自其它生物化合物的干扰信号区分开来。还公开了以葡萄糖脱氢酶作为酶测量血液中的葡萄糖而不干扰麦芽糖的应用。



1. 一种用于通过电化学测量来测量体液样本中的确定生物化合物的系统，该电化学测量使用所述生物化合物的特异酶，但该特异酶能干扰其它生物化合物，其特征在于，所述系统包括：

-电化学传感器，其包括支承集流器的衬底，该集流器用来将测量仪连接到至少一个测量电极和参考电极上，所述测量电极涂敷有至少包括该特异酶的试剂；

-用来使所述测量电极达到至少两个确定温度的器件；

-测量仪，其用来容纳连接到电源上的该传感器，并包括电子电路和使用由所述传感器供给的信号的设备；该电子电路用来控制所述器件以使测量电极达到至少两个不同的温度，并在所述电极之间施加可变或不可变的电流强度，或可变或不可变的电压；该装置配置用来将所述确定生物化合物特有的信号与其它生物化合物引起的干扰信号区分开来。

2. 根据权利要求 1 所述的测量系统，其特征在于，用来使测量电极达到至少两个确定温度的器件由埋入所述传感器厚度内并在所述测量电极下方延伸的加热蛇管形成。

3. 根据权利要求 1 所述的测量系统，其特征在于，当所述传感器插入到所述测量仪时，该加热器件由结合在所述测量仪中并置于所述测量电极下的加热蛇管形成。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的测量系统，其特征在于，所述加热器件由脉冲电流或非脉冲电流供电，以使所述测量电极达到至少两个不同的温度。

5. 根据权利要求 1 所述的测量系统，其特征在于，所述衬底由陶瓷或类似材料制成。

6. 根据权利要求 1 所述的测量系统，其特征在于，所述衬底由经受不超过 50℃ 的温度的塑料制成。

7. 根据权利要求 2 所述的测量系统, 其特征在于, 所述衬底由如下部件形成:

-绝缘的下衬底, 其支承所述加热器件和到所述测量仪的所述加热器件的连接器件;

-绝缘的中间衬底, 其表面上支承所述电极和到所述测量仪的所述电极的连接器件;

-绝缘的上衬底, 其留有对于所述电极和所述连接区域敞开的孔。

8. 根据权利要求 1 所述的测量系统, 其特征在于, 所述试剂通过阳极电极沉积而沉积在传感器的所述测量电极上。

9. 根据权利要求 1 所述的测量系统, 其特征在于, 所述特异酶进入到由辅因子结合起来的所述试剂的组成中。

10. 根据权利要求 1 所述的测量系统, 其特征在于, 所述试剂还包括介质, 该介质促进电子在所述特异酶和所述测量电极之间的传递。

11. 根据权利要求 1 所述的用于测量血液葡萄糖含量的测量系统, 其特征在于, 所述特异酶为葡萄糖脱氢酶。

12. 根据权利要求 11 所述的测量系统, 其特征在于, 葡萄糖脱氢酶存在于以吡咯喹啉醌作为辅因子的试剂(PQQ-sGDH)中。

13. 根据权利要求 10 和 11 所述的测量系统, 其特征在于, 进入试剂的组成的介质从二茂铁衍生物和钕络合物之中选出。

14. 根据权利要求 11、12 和 13 中任一项所述的测量系统, 其特征在于, 所述测量系统能将葡萄糖特有的信号与来自其它糖类、寡糖、例如麦芽糖的寡多糖的干扰信号区分开来。

15. 根据权利要求 1 所述的测量系统, 其特征在于, 根据所述传感器的构造特征, 将 0 至 500mv 的电压施加在所述电极之间, 通过电流计实施所述电化学测量。

16. 根据权利要求 1 所述的测量系统, 其特征在于, 所述测量仪还包括用来显示葡萄糖含量的显示器。

17. 根据权利要求 16 所述的测量系统, 其特征在于, 所述测量仪还包括存储器, 该存储器能与先前的测量结果比较而显示正在进行的测量的结果, 该显示例如能以曲线图的形式进行。

18. 一种用来通过电化学测量来测量体液中确定生物化合物的方法, 该电化学测量使用所述生物化合物的特异酶, 但该特异酶能干扰其它生物化合物, 该方法包括如下步骤:

- 将所述体液中的样品沉积在电化学传感器的测量区域上, 该传感器包括参考电极和涂敷有至少包括该特异酶的试剂的测量电极;

- 将所述传感器引入连接到电源的测量仪, 该测量仪包括电子电路和器件; 该电子电路在所述电极之间施加可变或不可变的电流强度, 或可变或不可变的电压; 该器件用来使所述测量电极达到至少两个不同的温度;

- 将在至少两个不同温度下获得的信号提交到使用装置上, 以将确定生物化合物特有的信号与其它生物化合物引起的干扰信号区分开来。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 用来使测量电极达到两个不同温度的所述器件由结合在所述传感器或所述测量仪中的加热蛇管形成。

20. 根据权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述使用装置包括用来通过多线性回归处理信号的程序。

21. 一种用来使用所述生物化合物的特异酶测量血液中的确定生物化合物的电化学传感器, 该传感器包括至少一个参考电极和涂敷有至少包括所述特异酶的试剂的测量电极, 其特征在于: 所述传感器还包括置于所述测量电极下并与所述测量电极电绝缘的加热蛇管; 在所述测量区域中, 至少两个不同的温度使得能够将确定生物化合物特有的信号与来自其它生物化合物的干扰信号区分开来。

借助酶测量生物化合物的电化学系统

技术领域

本发明涉及用于确定体液样本中生物化合物含量的电化学系统，该电化学系统借助所述生物化合物的特异酶，但这种酶可干涉其它的生物化合物。本发明将通过借助葡萄糖脱氢酶对血液中的葡萄糖进行定量电流测量(dosage ampérométrique)而更详细地说明。

背景技术

血液中葡萄糖含量的精确控制对于患糖尿病的诸多患者而言是至关重要的预防，这些患者由于其它健康问题在同一时间也不得不接受其它治疗。

为了了解葡萄糖含量，已经存在许多微型装置，该葡萄糖含量确定应该使用的胰岛素的量，并使得这些患者的日常生活更方便。这些装置通常依靠借助电流测量的电化学测量，在特异于葡萄糖的酶存在时，血液样本沉积在用后即弃型传感器上。

当前使用最多的酶是葡萄糖氧化酶(GOD)，因为除其它寡糖(oligosaccharide)以外，这种酶对葡萄糖特别有效，并且在信号高度方面对温度的变化不敏感。然而葡萄糖氧化酶具有对氧的存在非常敏感的缺点，氧的浓度可以变化，这就会使葡萄糖含量的精确测量出错。为了减少或消除该缺点，已有人建议使用会加速电子转移且使得可以忽略氧的影响的介质。在使用最多的介质中，可举出二茂铁及其衍生物，以及钌络合物，例如美国第 5393903 号专利所公开的。

也可使用诸如葡萄糖脱氢酶(GDH)，其具有对氧的存在不敏感的优点。然而，葡萄糖脱氢酶的缺点在于具有较低的葡萄糖特异性并干扰其它糖类、寡糖和寡多糖，例如麦芽糖，这会导致过高估计的葡萄糖含量，进而导致不适当地使用胰岛素。这对糖尿病患者构成了严重

的麻烦,这些糖尿病患者还必须,例如通过吸收艾考糊精(icodextrine)进行持续流动腹膜透析(CAPD),该艾考糊精由 α -淀粉酶以寡糖例如麦芽糖、麦芽三糖或麦芽四糖的形式水解。

发明内容

因而本发明的目标是提供一种用于测量体液中确定的生物化合物的可靠的测量电化学系统,该系统使用所述化合物的特异酶,根据治疗方案能将要测量的生物化合物的信号与其它生物化合物的信号区分开来。该区分主要依赖于要测量的生物化合物和干扰生物化合物由温度决定的灵敏度,该灵敏度引起的不同动力学允许区分各生物化合物的信号。

本发明将更详细地通过一种系统进行说明,该系统通过使用葡萄糖糖脱氢酶的电化学测量法测量血液样本中的葡萄糖含量。

为此该系统包括电子测量仪,该电子测量仪用于容纳电化学传感器并允许在测量电极上施加至少两个确定的温度,以便能够区分要测量的生物化合物特有的信号和来自另一种生物化合物的信号。传感器由支承集流器的衬底以已知方式形成,该集流器用来将测量仪连接到传感器的至少一个测量电极和参考电极上。

沉积在测量电极上的试剂至少包括酶,而且也可混合酶的辅因子和介质,例如二茂铁衍生物或钬络合物,以促进电子在酶和测量电极之间转移。

根据第一实施例,用于使测量电极达到至少两个不同温度的器件由加热蛇管形成,加热蛇管埋入在传感器衬底中且布置在测量电极下,但与测量电极电绝缘。蛇管连接到测量仪上,该测量仪发送例如可预先校准的脉冲电流,允许施加至少两个确定的温度。通过对所述温度下接收的信号进行数学处理,就使得能够将要测量的生物化合物固有的信号与来自另一生物化合物的信号区分开。

根据第二实施例,蛇管结合在测量仪中,使得引入传感器时,测

量区域位于所述蛇管上方。

为了在测量电极上得到至少两个不同的温度，在不脱离本发明范围的情况下，本领域技术人员可设计另一种装置，该装置允许使所述测量电极达到两个不同的温度，例如通过对所述电极进行恒温限制。

附图说明

本发明的其它特征和优点将出现在参考附图以非限制性示例进行描述的以下具体实施方式中，该具体实施方式用来通过以葡萄糖脱氢酶作为酶测量血液中的葡萄糖，其中：

图 1 为在本发明范围内使用的实验装置的示意图；

图 2 为在测量电极处的反应简图；

图 3 为用于传感器的温度校准图；

图 4 和图 5 分别示出了不同温度下作为葡萄糖或麦芽糖浓度的函数的传感器响应；

图 6 和图 7 示出了不同温度下有/无麦芽糖的情况下作为葡萄糖不同浓度的函数的传感器的响应；

图 8 和图 9 分别示出了对于葡萄糖和麦芽糖的作为温度的函数的传感器响应，其分别涉及表观最大强度(*l'intensité maximum apparente*)和表观米氏常数(*la constante de Michaelis apparente*)；

图 10 为显示有/无麦芽糖存在的情况下对于葡萄糖测量的实际测量值和理论值之间相互关系的曲线图；

图 11 示出了根据本发明的用于测量葡萄糖含量的便携装置；

图 12 为根据第一实施例的传感器的放大图；

图 13 为根据第二实施例的传感器的放大图；以及

图 14 是根据又一个实施例的测量仪的一部分的放大图。

具体实施方式

图 1 示意性地示出了用于实施在下文说明的测量和实验的实验室

装置。该系统包括具有稳压器 3 的电子控制箱 1, 该电子控制箱 1 分别通过连接器 5a、连接器 7a 和连接器 9a 连接到 Ag/AgCl/3M KCl 制成的参考电极 5、测量电极 7 和反电极 9 上, 测量电极 7 和反电极 9 均由铂制成。控制箱 1 包括第二稳压器 13, 稳压器 13 的接线电缆 11a、接线电缆 11b 能对埋入在支承测量电极 7 的陶瓷衬底 17 内的加热蛇管 11 施加脉冲或非脉冲电流, 该测量电极 7 由直径为 2 毫米的铂盘形成, 该铂盘在所述衬底 17 的表面上通过丝网印刷而形成。

加热装置 11 的设计使测量电极 7 的表面温度能够在不显著地影响介质温度的情况下变化, 优选地是不影响布置在电极上的待测样本滴的团块(masse)的温度。因此该团块最好保持在环境温度。因而, 在加热区域发生的样本和电极之间的电化学反应最好是局部化的且是快速的。

稳压器 13 与关联控制装置协作, 能根据脉冲电流的特征施加几个不同的温度, 典型地两个至八个温度, 这将在下面得到说明。该装置还包括实施测量的可视显示器 15 和/或用于电子装置(未示出)的连接装置 19, 其例如比较先前测量而以曲线图的形式显示测量结果。

该系统也包括槽 21, 其以更大比例示出且包括电解液 23, 能够容纳测量或测试样本。在实施的所有测量中, 该电解液具有如下组成: 20 mM 的 HEPES、20mM 的 KCl 和 1mM 的 CaCl_2 。

应当注意的是, 根据一种变型, 可省略槽 21, 在此情况下, 样本由直接放置在测量电极上的滴形成, 如下文所述。

在该示例中, 测量电极 7 覆盖有试剂, 该试剂包括 PQQ-sGDH(以吡咯喹啉作为辅因子的葡萄糖脱氢酶)和钬络合物, 该钬络合物用作介质以促进电子在酶和电极之间的转移。

优选地是, 该试剂按照已知的技术以阳极电极沉积水凝胶(EDP)的形式沉积。任何其它沉积方法也是适当的, 例如沉积能通过简单的吸取得到。

图 2 为待分析的介质含有葡萄糖和麦芽糖时测量电极表面的反应

简图, 该介质是葡萄糖的二聚物(dimère)。在该图中, D_M 表示葡萄糖的扩散系数、 D_D 表示麦芽糖的扩散系数、 D_{ML} 表示葡萄糖酸内酯的扩散系数, 而 D_{DL} 是麦芽糖酸内酯(maltolactone)的扩散系数。 K_{ET1} 是在酶活性部位的吡咯并喹啉醌(PQQ)和聚合物结构的钺络合物之间的电子转移系数, K_{ETn} 是钺聚合物中的电子跃迁系数, K_{ETE} 表示测量电极 7 表面的 Os^{++} 电氧化成 Os^{+++} 的系数。

当然, 本领域技术人员可设想使用能与带有其它辅因子的葡萄糖脱氢酶以及其它介质合作的其它酶来获得表示期望化学反应的电流, 图 2 特别示出了其中一个反应。典型地, 介质可选自钺化合物、钒化合物或二茂铁化合物。

图 3 对应于温度校准图, 即从该图可了解传感器的测量电极的表面温度, 该温度为已知时间段其间施加的确定电流的函数。通过 DC/AC 或类似转换器将脉冲模式的确定电压应用到加热蛇管上, 从而在本图中使用已知的电势校准方法。

根据传感器的结构特征, 将电极之间的电压设置在 0 和 750mV 之间, 优选地是 300mV, 就能通过电流分析实现电化学测量。

图 3 的实例示出了当应用 8 个脉冲(每个脉冲持续 40 秒)时在测量电极表面所测得的递增温度的测量结果, 同时, 用电流计持续地记录浸入到包含 0.15mM 葡萄糖的缓冲介质的传感器的电流。能够看到, 这使得温度在 20°C 和 50.5°C 之间变化。如插图所示, 应用强度与特定温度相关。最后, 将限制到低于 50°C 的温度, 因为已经观察到, 超过这个值时 PQQ 辅因子的活性就会下降。实际上, 在下面的实验中, 使用了每 30 秒 7 个脉冲的电流, 以施加在图 4 至图 7 中以括号内的符号表示的 7 个不同的温度: 相应于环境温度的 23°C(□)、28°C(○)、30°C(△)、34°C(+)、38°C(◇)、43°C(星形)、48°C(*)。

图 4 和图 5 以曲线形式分别示出了对于葡萄糖和麦芽糖的曲线组, 该曲线组示出了在前面提及的对于不同温度下增加待分析化合物的浓度时传感器的响应。能够看到, 在同样的浓度下, 对于葡萄糖传

传感器响应电流明显地比对于麦芽糖的高。

现在参考图 6 和图 7, 单独增加葡萄糖的浓度重复先前的实验(见图 6), 然后在存在 0.04mM 的麦芽糖的情况下进行实验(见图 7)。能够看到, 在存在麦芽糖的情况下, 传感器响应升高较低, 这可通过葡萄糖氧化的竞争性抑制得到解释, 因为酶的活化部位被麦芽糖阻断。

由于自动加热实验方案和温度变化极好地仅局限于传感器表面上的一个狭小区域, 这就实际上不改变电解液的温度。在不同温度条件下, 得到了对于待分析化合物的不同浓度的许多测量结果。

如图 8 和图 9 所示, 已通过表观最大电流 I_{Max}^{app} (图 8) 和表观米氏常数 K_M^{app} (图 9) 保持对传感器的性能的估计, 其中, 葡萄糖以(●)表示, 麦芽糖以(▲)表示。在图 8 中, 能够观察到, 对于两种化合物, 作为温度增加的函数的近似线性增加的 I_{Max}^{app} , 但是, 葡萄糖的信号略微高一些。

相反地, 图 9 在 K_M^{app} 上清楚地示出了作为温度增加的函数的葡萄糖和麦芽糖的明显不同的特性。能够看到, 葡萄糖的 K_M^{app} 值实际上未受温度增加的影响。相反地, 麦芽糖的 K_M^{app} 值非常清楚地示出了为温度函数的近似线性增加, 这就使葡萄糖信号与麦芽糖信号区分开来。

假定为温度函数的葡萄糖和麦芽糖的 K_M^{app} 的不同变化, 即是它们不同动力学的函数, 就有可能经由多线性回归通过数学处理区分信号并对信号进行分离。在该多线性回归中, 使用不同温度下的电流强度作为输入值, 以葡萄糖浓度作为输出值。

在葡萄糖/麦芽糖混合物所获结果的基础上完成实验, 该葡萄糖/麦芽糖混合物具有的葡萄糖浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.1 mM; 麦芽糖的浓度分别为 0mM(■)和 0.04mM(*)。在图 10 所示的曲线中, 横坐标表示被测葡萄糖的含量, 纵坐标表示计算葡萄糖含量。能够看到, 无论麦芽糖存在与否, 在确定葡萄糖含量时具有高精度。根据本发明提议的高性能模型一方面由确定系数 $R^2=0.968$ 的高值, 另一方面由均方根误差值 $RMSE=0.0018mM$ 的低值和平均相对误差 $MRE=8.8\%$

确认。

现在参考图 11 至图 14, 示出了根据不同实施例的便携型装置, 该装置具有图 1 所描述系统的所有功能, 但是这种系统的微型化使糖尿病患者无论去哪里都可以携带。

该装置包括测量仪 2, 该测量仪用来将电化学传感器 10 容纳在壳体 6 上制成的槽 4 中, 该壳体由两个外壳 6a 和 6b 形成。壳体 6 包括用来显示测量结果的显示屏 8。该壳体 6 包含电源或连接到电源和电子电路上(未示出), 电源或电路同时允许在传感器 10 的电极之间施加确定电压, 并为测量电极的加热电路供电, 参考图 12 将更会对此有更清楚的了解。图 12 示出了根据本发明第一实施例的以更大比例表示的传感器 12。

在第一实施例中, 传感器 12 由衬底 14 制成, 该衬底 14 例如由多层烧结陶瓷或类似材料制造, 以已知方式, 传感器还包括显露测量电极 16a 和参考电极 16b 的测量孔 16 和显示连接区域 18a、18b 的连接孔 18。电极 16a、16b 和连接区域 18a、18b 通过埋入陶瓷材料中的导电迹线 20a、20b 连接。例如, 测量电极涂有具有上述组成的试剂, 也就是说, 试剂包含 PQQ-sGDH 和钨络合物中的至少一种, 其通过水凝胶(EDP)或类似物的阳极电极沉积涂覆在所述电极上。

传感器还包括由铂制成的加热蛇管 24, 该加热蛇管布置在测量电极 16a 的下面且埋在陶瓷材料中。蛇管 24 通过导体 26a、26b 连接到接触区域 28a、28b 上, 在这个示例中, 接触区域 28a、28b 位于连接区域 18a、18b 的下面。显然, 加热电路与对电极供电的电路完全电绝缘。刚才描述过的传感器 12 仅具有两个电极, 但是很清楚它也可包括反电极。

图 13 对应于第二实施例, 该实施例本质上不同于先前的实施例之处在于衬底 14 由塑料制造。在所示的实例中, 通过堆叠 PET 舌状物形式的三个衬底 14a、14b、14c 而得到衬底 14, 这使得可轻易地经受住不超过 50°C 的温度。在该示例中, 下衬底 14a 支承加热蛇管 24

和通向接触区域 28a、28b 的导体 26a、26b，在此实例中接触区域 28a、28b 布置在传感器的一个边缘上。中间衬底 14b 的顶面支承电极 16a、16b、导电迹线 20a、20b 和连接区域 18a、18b，连接区域 18a、18b 从而与加热蛇管 24 完全地电绝缘。上衬底包括测量孔 16 和连接孔 18。

在已经描述过的两个实施例中，加热蛇管 24 结合在传感器中。根据图 14 所示的一个变型，蛇管 14 与布置在板 4a 内的传感器隔离，该板 4a 伸出测量仪 2 的槽 4，以便测量电极 16a 位于所述蛇管 24 下，同时使传感器接合在槽 4 中。在这些条件下，当用葡萄糖氧化酶测量葡萄糖含量时，传感器可具有完整的普通形状(在图 11 中以参考数字 10 表示)。

在不偏离本发明范围的情况下，本领域技术人员可根据已经描述的实例进行更改，例如，通过使测量电极和加热蛇管之间的衬底的绝缘部分变薄，或通过使用另一装置以在测量电极上施加至少两个不同的温度。

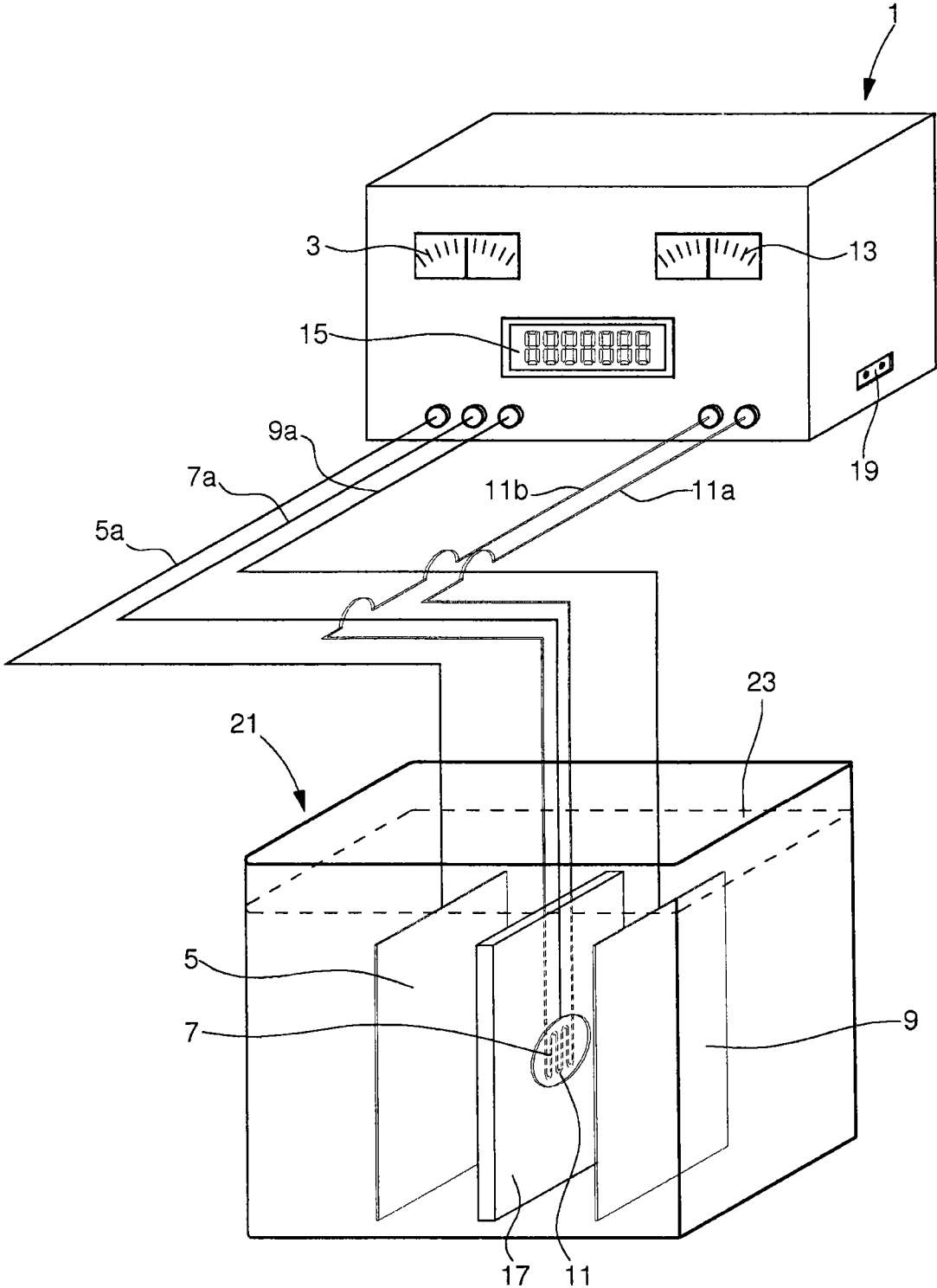


图 1

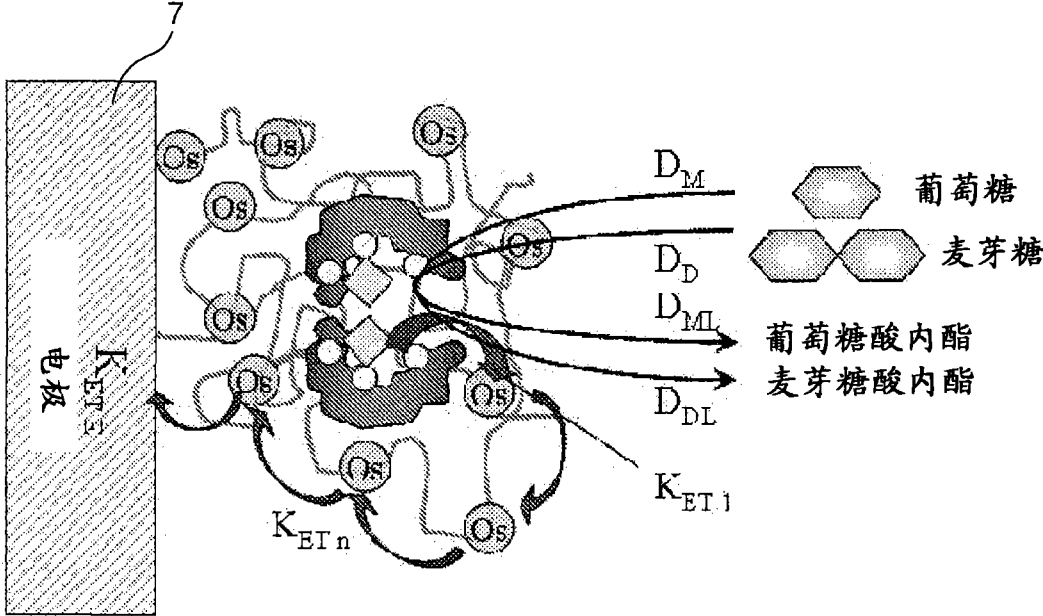


图 2

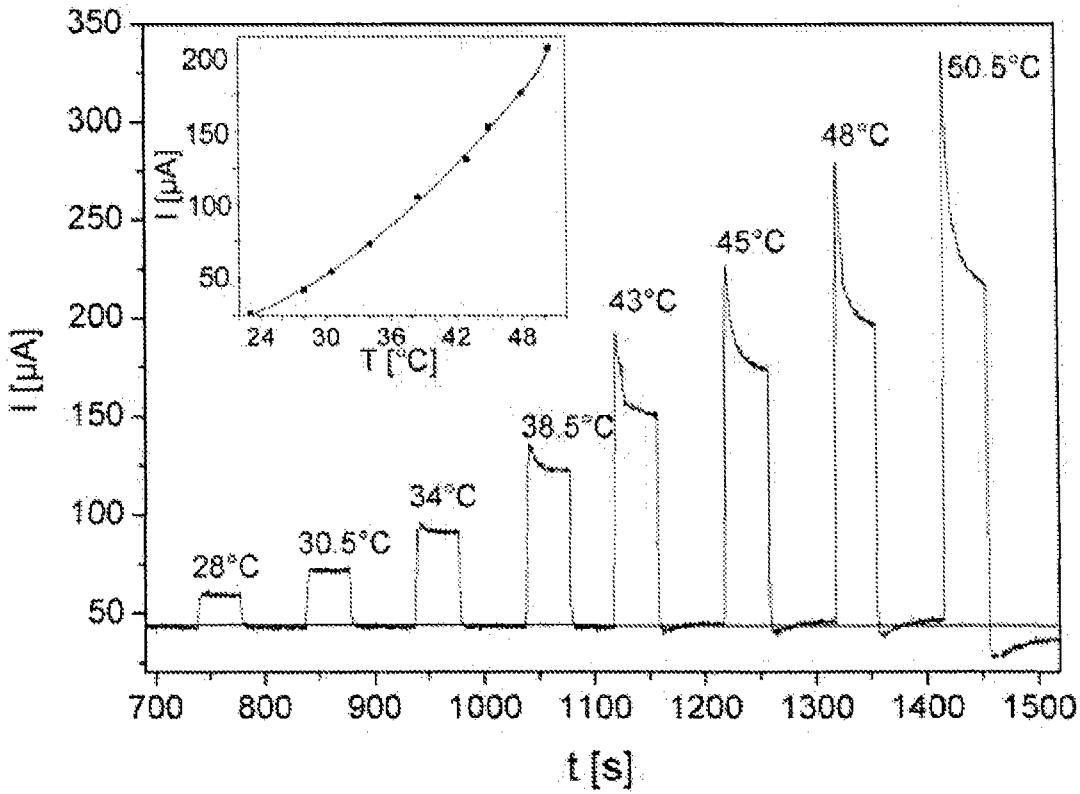
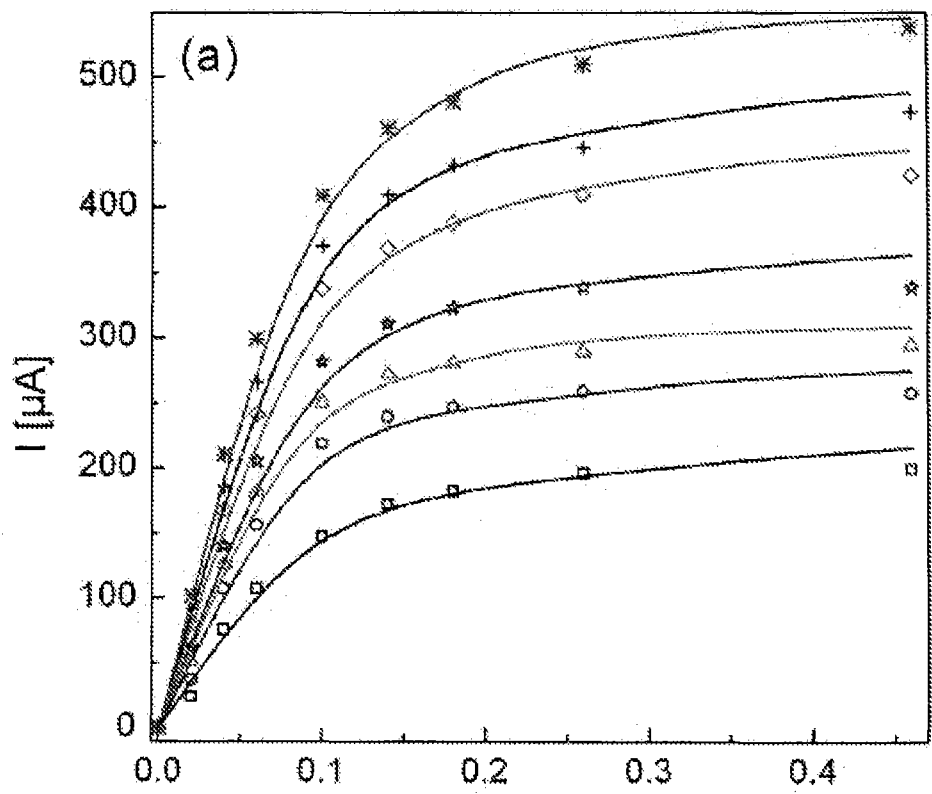
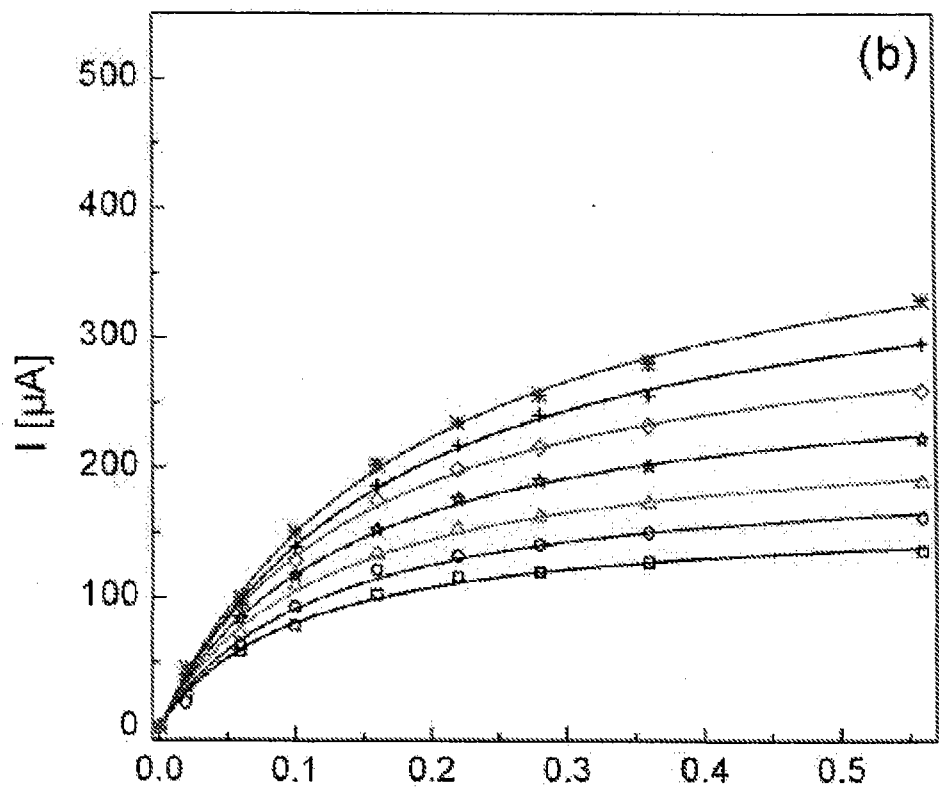


图 3



葡萄糖 [mM] 图 4



麦芽糖 [mM] 图 5

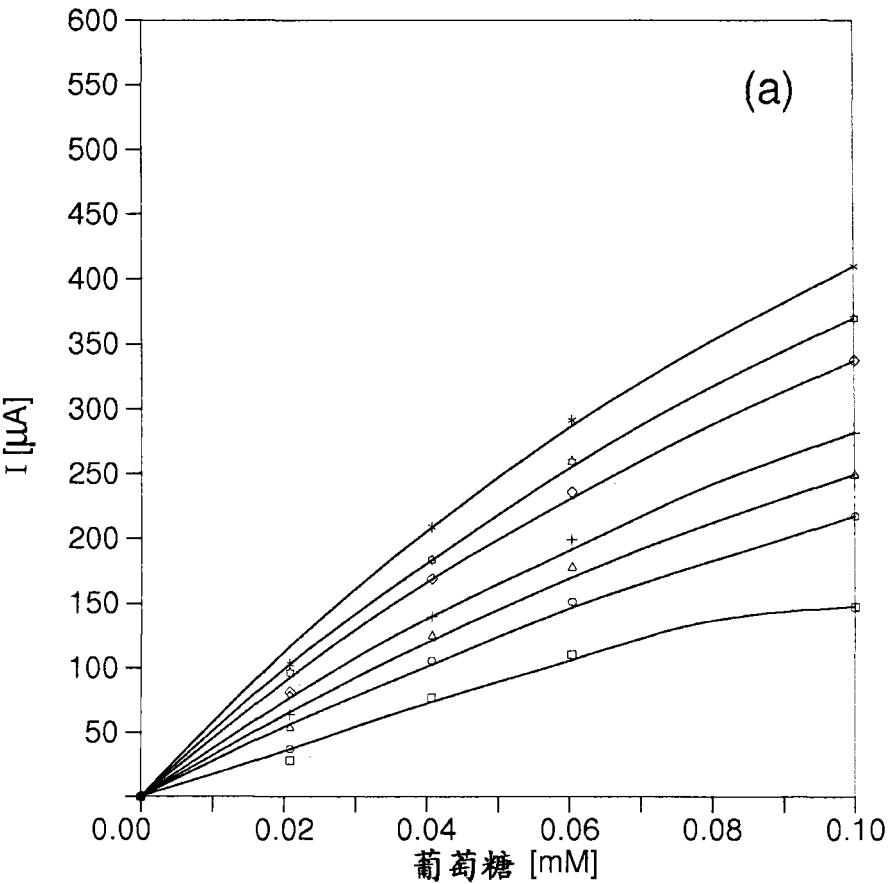


图 6

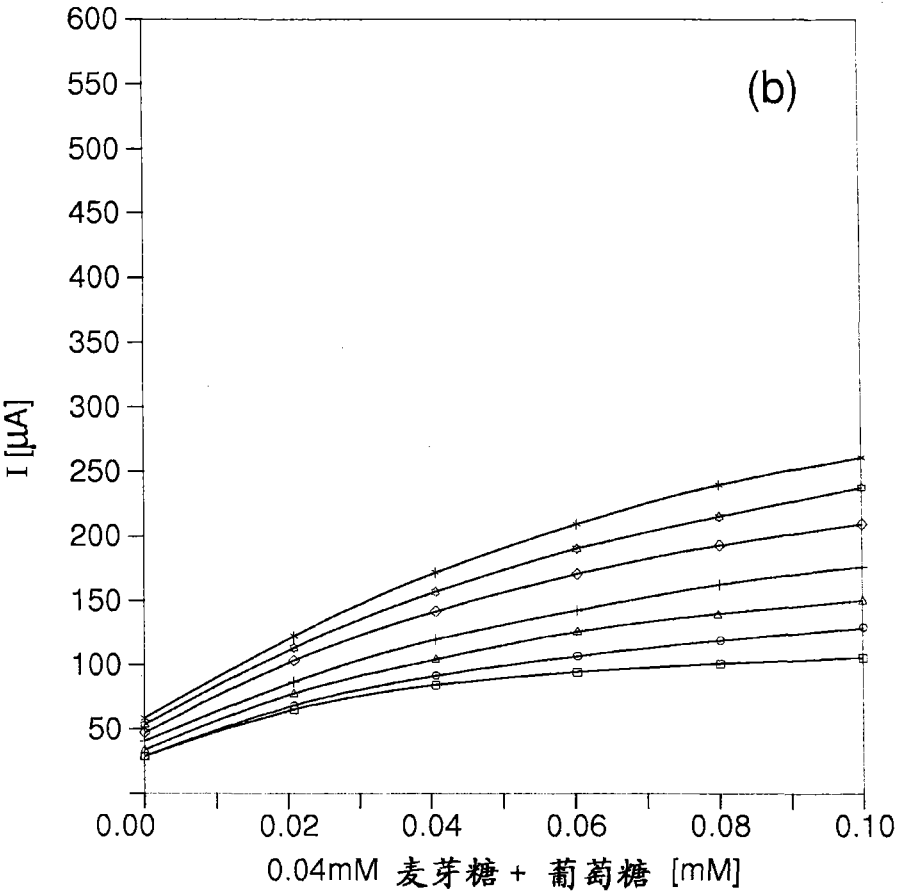
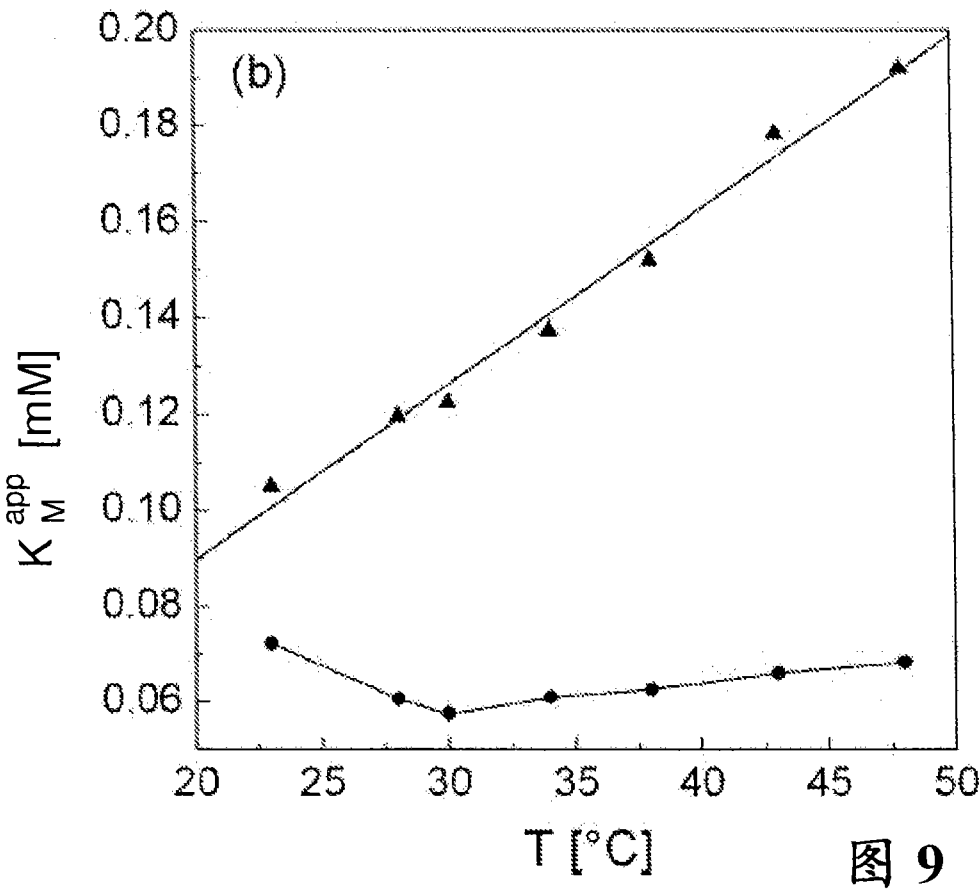
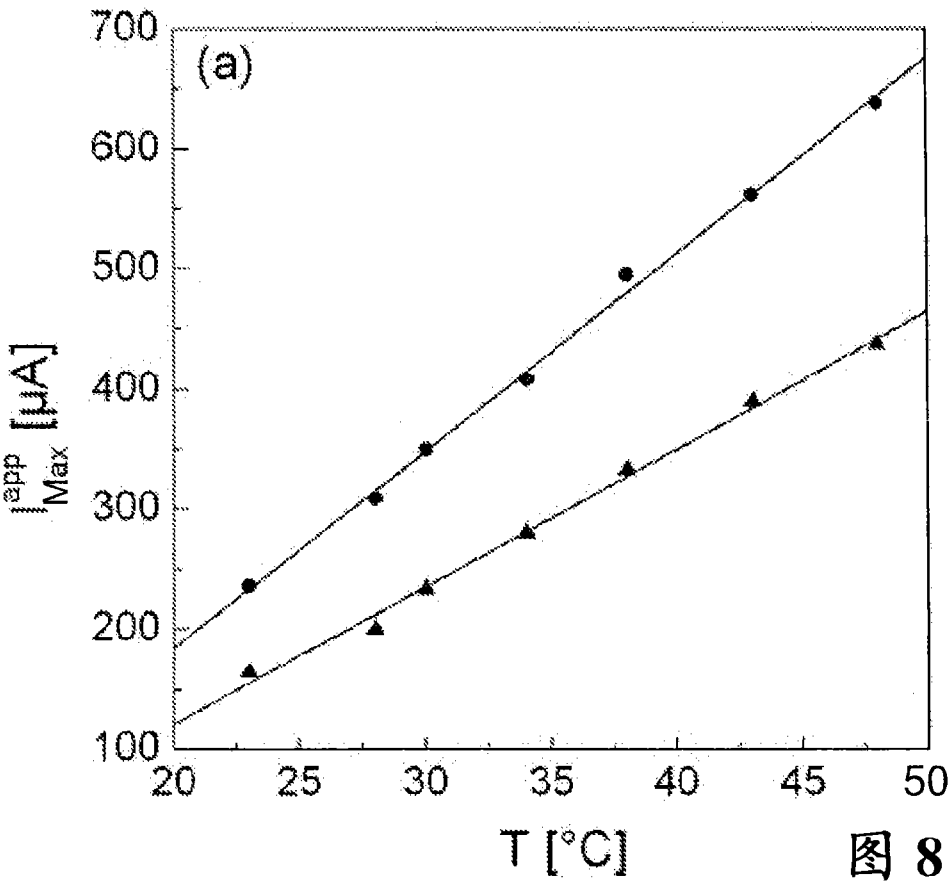


图 7



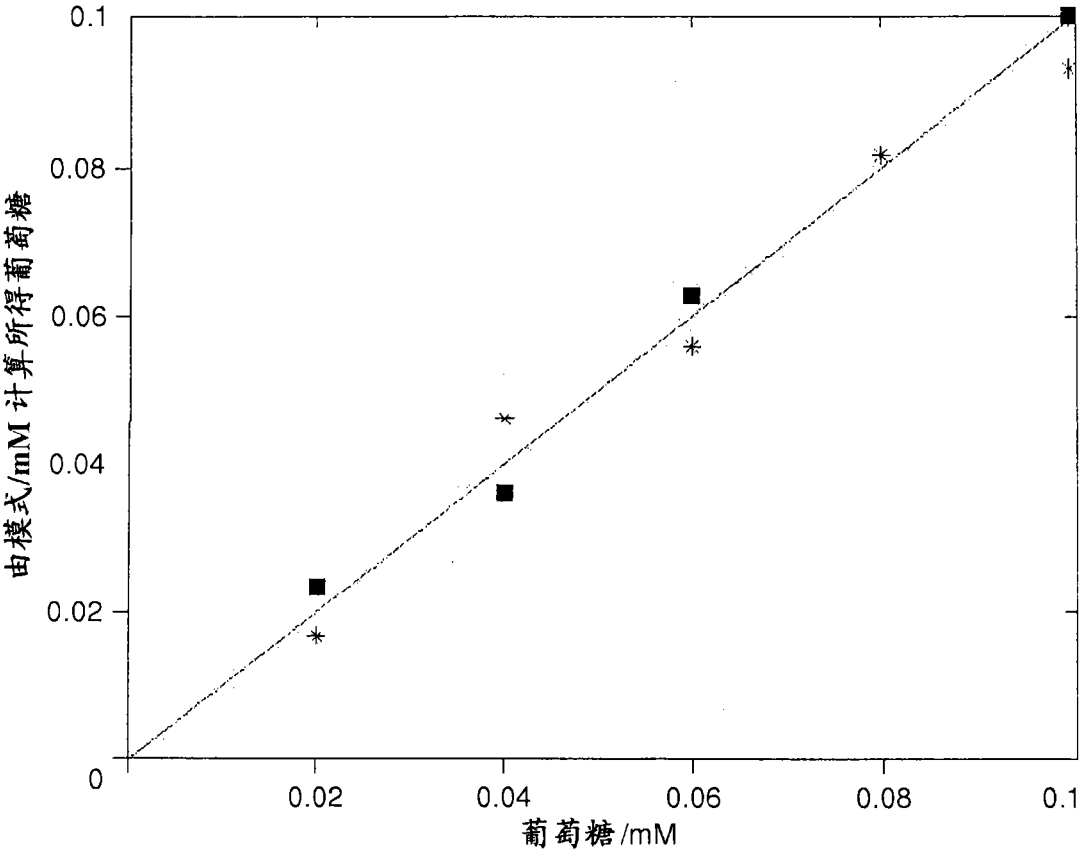


图 10

