



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115867795 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202180045463.8

(22) 申请日 2021.04.27

(30) 优先权数据

20205422 2020.04.27 FI

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2021/050312 2021.04.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/219936 EN 2021.11.04

(71) 申请人 费帕有限公司

地址 芬兰赫尔辛基

(72) 发明人 N·韦斯特 J·科斯基宁

I·瓦尔约斯 B·米克拉达尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 徐厚才 彭昶

(51) Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图14页

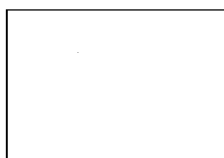
(54) 发明名称

用于样品中的中性分析物的检测的测试条

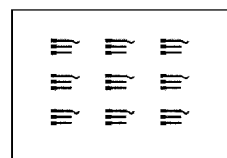
(57) 摘要

提供了一次性多层测试条,其包括在其上沉积有电极组合体的基材,所述电极组合体包括基于碳的工作电极、基于碳的对电极、伪参比电极,其中所述伪参比电极、所述工作电极和所述对电极在同一平面中彼此相邻布置,用于将所述电极与电压源直接接触的触点,并且所述测试条进一步包含选择性透过膜层。所述电极组合体层的所述电极彼此电隔离并且所述电极组合体层位于所述基材和所述选择性透过膜层之间。所述选择性透过膜具有适于允许待分析的样品中的一种或多种电中性分析物穿过所述选择性透过膜到达所述电极组合体的结构。

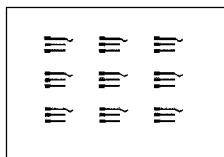
1. 在PET上收集SWCNT



2. 丝网印刷银



3. 激光图案化电极



4. 缝模涂布Nafion



1. 一种一次性多层测试条,其包括在其上沉积有电极组合体的基材,所述电极组合体包括:

- 基于碳的工作电极
- 基于碳的对电极
- 伪参比电极,其中所述伪参比电极、所述工作电极和所述对电极在同一平面中彼此相邻布置,
- 用于将所述电极与电压源直接接触的触点,并且

所述测试条进一步包括选择性透过膜层,

电极组合体层的所述电极彼此电隔离并且所述电极组合体层位于所述基材和所述选择性透过膜层之间,其特征在于所述选择性透过膜具有适于允许待分析的样品中的一种或多种电中性分析物穿过所述选择性透过膜到达所述电极组合体的结构。

2. 根据权利要求1所述的条,其中所述基材选自聚合物和玻璃,优选地所述基材是聚合物例如聚碳酸酯或PET。

3. 根据权利要求1或2所述的条,其中所述基于碳的电极的一者或二者包含碳,所述碳选自无定形碳例如四面体无定形碳、类金刚石碳、石墨、石墨烯、碳纳米管及其混合物。

4. 根据前述权利要求的任意一项所述的条,其中所述伪参比电极包含银。

5. 根据前述权利要求的任意一项所述的条,其中所述伪参比电极由银组成。

6. 根据前述权利要求的任意一项所述的条,其中所述选择性透过膜包含膜材料,所述膜材料选自由以下组成的聚合物的组:Nafion、醋酸纤维素、常规渗析膜、聚乙烯磺酸盐、羧甲基纤维素、聚赖氨酸、过氧化聚吡咯和其他磺化聚合物,优选地所述膜包含Nafion。

7. 根据前述权利要求的任意一项所述的条,其中所述选择性透过膜的结构由施加至所述条的一个或多个膜材料层形成,借此膜材料层的叠层形成所述选择性透过膜。

8. 根据前述权利要求的任意一项所述的条,其中所述选择性透过膜具有在50nm至400nm,优选地75nm至250nm,合适地100nm至200nm的范围内的厚度。

9. 一种装置,其包括:

- 配置为存储参考数据的存储器;
- 至少一个处理核心,其配置为:

○处理来自根据权利要求1至8的任意一项所述的多层测试条的信息;

○将来自根据权利要求1至8的任意一项所述的条的所述信息与所述参考数据进行比较;和

○依据从根据权利要求1至8的任意一项所述的条处理的信息得出结论。

10. 一种用于检测样品中的电中性分析物的方法,其包括以下步骤:

- 提供样品,
- 将所述样品与多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触,
- 改变所述工作电极与对电极之间的电压,
- 测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的

电流,和

- 检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化。

11. 一种用于检测样品中的电中性分析物的方法,其包括以下步骤:

- 提供样品,
- 将所述样品与根据权利要求1至8的任意一项所述的多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触,
- 改变所述工作电极与对电极之间的电压,
- 测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流,和
- 检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化。

12. 根据权利要求10或11所述的方法,其中所述工作电极(2)和对电极(4)之间的电压在扫描速率下从-0.2V扫描至0.8V,优选地从0.1V扫描至0.6V。

13. 根据权利要求10-12的任意一项所述的方法,其中所述扫描速率在5mV/s至1000mV/s的范围内。

14. 一种用于制造多层测试条的方法,其包括以下步骤:

- 提供SWCNT网络,
 - 将所述SWCNT网络压到基材上以形成基于碳的电极,
 - 通过激光图案化分隔所述电极,
 - 丝网印刷银以形成与基于碳的工作电极和基于碳的对电极相邻的银伪参比电极,
 - 将银触垫丝网印刷到各个电极上,
 - 用选择性透过膜层涂覆所述电极,
- 其特征在于所述涂覆步骤适于用预定厚度的选择性透过膜涂覆所述电极。

15. 根据权利要求14所述的方法,用于制造根据权利要求1至8的任意一项所述的多层测试条。

用于样品中的中性分析物的检测的测试条

技术领域

[0001] 本发明涉及多层测试条 (multilayer test strip), 特别地涉及用于样品中的中性分析物例如扑热息痛 (paracetamol) 的检测的多层测试条, 和制造此种多层测试条的方法。进一步地, 本发明涉及用于中性分析物的检测的系统, 所述系统包括多层测试条和测量电路。除此以外, 本发明涉及用于样品中的中性分析物的测量的方法。此外, 本发明涉及诊断患者体内中性分析物或物质例如扑热息痛的过量和/或毒性水平的方法。又进一步地, 本发明涉及以个性化治疗为目标测定个体药物代谢动力学参数。

背景技术

[0002] 扑热息痛, 又称为对乙酰氨基酚 (acetaminophen), 是最为广泛使用的具有退热性质的止痛剂之一。其容易得到、廉价且与NSAID相比被更好地耐受, 并因此被广泛推荐为治疗范围广泛的疼痛的首选。与NSAID不同, 大剂量的扑热息痛可以造成肝毒性。扑热息痛是最经常被过量服用的药物之一并且在美国和欧洲扑热息痛中毒目前是急性肝衰竭的主要成因。仅在美国, 每年就有>111000例暴露报告至毒物中心以及40000个相关的急救部门病例。故意和无意暴露于毒性水平的扑热息痛二者都很常见。

[0003] 扑热息痛的毒性是由于高反应性的代谢物N-乙酰基-对苯醌亚胺 (NAPQI)。毒性剂量的扑热息痛造成更多的药物由CYP2E1酶代谢成为NAPQI。在治疗剂量下该毒性代谢物通过与谷胱甘肽结合而立即失活并通过尿液排出。然而在毒性浓度下, 这一解毒途径被耗尽。NAPQI能共价键合至细胞蛋白并形成毒性加合物, 其可以造成线粒体功能障碍 (mitochondrial dysfunction) 和早期氧化应激 (oxidant stress)。这最终可以导致肝细胞坏死 (liver cell necrosis) 和急性肝衰竭。已经发现细胞损伤与扑热息痛的剂量直接相关。

[0004] 用谷胱甘肽前体N-乙酰半胱氨酸可以有效地治疗扑热息痛中毒。不幸的是, 扑热息痛中毒在最初的24小时中显示很少且非特异性的症状。此外, N-乙酰半胱氨酸治疗当在暴露后8至12小时内启动时最有效并且在15小时后解毒剂的效力迅速减弱。出于这些原因, National Academy of Clinical Biochemistry已经许可了在表现为故意药物摄入的所有急诊部门患者中对于扑热息痛的筛查。通常通过测定扑热息痛血清浓度进行扑热息痛过量的诊断。Rumack-Matthew列线图, 其画出了作为摄入后时间的函数的扑热息痛浓度, 对确定肝中毒的可能性有帮助。已经发现在摄入后4小时等于或高于200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.323 mM) 的血清水平和在摄入后24小时等于或高于6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (43.1 μM) 的血清水平一致地预测了肝中毒。这些点之间的线称为可能毒性线 (probable toxicity line)。之后FDA要求加入低于原始线25%的附加线以构建一些额外的安全性。

发明内容

[0005] 在临床环境中, 由于相对简单且成本低, 所以通常用分光光度方法实施快速测试。尽管具有这些优点, 但这种方法仍限于专业实验室并且不适合即时测试 (point-of-care

testing)。此外,对于这些方法已经报告了造成错误地高和低结果二者的干扰。另外,对于扑热息痛的定性测定,竞争性侧流免疫分析(competitive lateral flow immunoassays)也是可用的。然而,这些测试不定量并且因高截止浓度(cut-off concentrations)已经报告了假阴性。因此,非常期待开发用于扑热息痛中毒筛查的高度可移动、简易和定量的即时检测(point-of-care assay)。

[0006] 本发明由独立权利要求的特征限定。一些具体的实施方案在从属权利要求中限定。

[0007] 根据本发明的第一方面,提供一次性(disposable)多层测试条,其包括在其上沉积有电极组合体(assembly)的基材,所述电极组合体包括基于碳的工作电极、基于碳的对电极和伪参比电极(pseudoreference electrode)。所述伪参比电极、所述工作电极和所述对电极在同一平面中彼此相邻布置。所述条进一步包括用于将所述电极与电压源(voltage supply)直接接触的触点(contacts)、以及选择性透过(permeable)膜层。所述电极组合体层的所述电极彼此电隔离并且所述电极组合体层位于所述基材和所述选择性透过膜层之间。所述选择性透过膜具有适于允许待分析的样品中的一种或多种电中性分析物(electronically neutral analytes)穿过所述选择性透过膜到达所述电极组合体的结构。

[0008] 根据本发明的第二方面,提供装置,其包括配置为存储参考数据的存储器(memory),配置为处理来自本文所述的多层测试条的信息、将来自本文所述的条的所述信息与所述参考数据进行比较、和依据从本文所述的条处理的信息得出结论的至少一个处理核心(processing core)。

[0009] 根据本发明的第三方面,提供用于检测样品中的电中性分析物的方法,其包括以下的步骤:提供样品、将所述样品与多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触、改变所述工作电极与对电极之间的电压、测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流和检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化。

[0010] 根据本发明的第四方面,提供诊断患者体内过量的方法。所述方法包括从受试者获得样品、将所述样品与多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触、改变所述工作电极与对电极之间的电压、测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流、检测所述样品中一种或多种分析物的电流特性的变化、在根据本发明的第二方面的装置中测定所述样品中分析物的量。

附图说明

[0011] 图1示出了根据本发明的至少一些实施方案制造多层测试条的方法的一个例子;

图2显示了根据本发明的至少一些实施方案Nafion涂覆的工作电极(A)和Nafion涂覆的参比电极(B)的横截面的扫描电子显微镜图(scanning electron micrographs)。

[0012] 图3包括根据本发明的至少一些实施方案显示(A)在0.1M PBS溶液中未涂覆和Nafion涂覆的伪参比电极相对于Ag/AgCl(饱和)的电位、显示(B)作为KCl 溶液中Cl⁻浓度的函数的电位和显示(C)在1M KCl中的1mM Ru(NH₃)₆的循环伏安图的三幅曲线图。在常规50ml电化学池中实施所有测量。

[0013] 图4显示了(A)在50mL池中和以40 μ L液滴在50 μ M PA中实施的DPV测量的对比和(B)在40 μ L稀释的人血浆中50 μ M PA的DPV脉冲幅度的优化。

[0014] 图5显示了在(A) PBS、(B) 人血浆、(C) 全血中提高扑热息痛浓度的DPV。(D) 显示了在全部测量的基质中结果的线性化。误差棒表明不同电极4次测量的标准偏差。

[0015] 图6显示了(A)在PBS和血浆中1mM Ru(NH₃)₆的CV和(B)在全血和血浆中1mM PA中作为扫描次数函数的DPV峰值电流。

[0016] 图7示出了干扰研究。(A) 空白PBS(黑色线)、仅干扰物(蓝色线)和干扰物+50 μ M PA(红色线)中的DPV扫描。(B) 仅50 μ M PA(红色)和在干扰物存在下PA(蓝色)的背景消减的峰值电流。误差棒代表了限定为容许限的5%误差。为了清楚起见,已经补偿了(A)中的DPV扫描。

具体实施方式

[0017] 本发明涉及一次性电化学测试条,其用于感兴趣的分子即中性分析物的定量即时测定,所述感兴趣的分子已经被过量使用或以毒性或治疗水平给予受试者或在受试者体内积累。本发明进一步涉及生产此类测试条的方法。采用根据本发明的制造或生产方法,在基材上印刷了高导电性、良好电隔离和图案化的基于碳的电极。通过本发明的手段,生产了具有极优保存期、具有长期稳定性和短水合时间的丝网印刷的银伪参比电极。采用该测试条实现了对感兴趣的分子例如疑似扑热息痛中毒中的扑热息痛浓度的测定的足够低的检测极限和足够宽的线性范围。已经令人惊讶地发现感兴趣的分子例如扑热息痛的检测和定量测定可以用根据本发明的实施方案的检测以仅20 μ L体积的样品实施,所述样品包括例如任选地用至多20 μ L PBS稀释的指刺血样品、静脉血、或任选地用PBS稀释的尿液或静脉血、或甚至唾液。不需要进一步的样品处理并且获得快速结果,实现了小于5分钟的检测时间,这在过量和毒性的情况中是极其重要的。另外,在存在几种干扰物的情况下也实现了选择性。

[0018] 图1示出了传感器条的生产。在该示例性实施方案中,首先通过气溶胶CVD生长SWCNT并收集在过滤器上。然后将所述SWCNT网络压力转移(press-transferred)到A4 PET片上并通过从喷瓶喷射IPA来致密化并用氮气干燥例如吹干或用压缩氮气干燥。为了实现图案化的电极,烧蚀分离电极的线。为了实现参比电极,将银线直接丝网印刷在SWCNT层的顶部(请见图1,步骤3)。在相同的工艺中还制造了银触垫(contact pads)。最后,根据本发明的至少一些实施方案用Nafion涂覆整个A4 PET片。

[0019] 图2显示了从根据本发明的至少一些实施方案的A) 工作电极和B) 参比电极的铣削区获得的横截面图像。可以看到所述工作电极的SWCNT/Nafion层的整体厚度为约170nm厚。可能是由于Nafion,所以在所述SWCNT/Nafion层和Au涂层之间也可以观察到具有65-75nm的厚度的暗层。该结果与先前的研究一致,表明所述SWCNT至少部分地被Nafion涂覆。所述Ag参比的横截面显示了在数微米尺寸范围内的扁平、拉长的Ag颗粒。对于所述参比电极的横截面得到了在5.9 μ m至7.2 μ m之间的厚度。还通过接触式轮廓仪对银线实施了几次测量,其给出在5.5 μ m至7 μ m范围内的厚度。由于大的粗糙度,所以即使在所述Ag颗粒顶部上也无法辨认清晰的Nafion层。

[0020] 图3A显示了支持本发明的至少一些实施方案的在0.1M PBS溶液中未涂覆和Nafion涂覆的丝网印刷Ag参比电极二者的伪参比电极相对于Ag/AgCl[饱和]电极的电位。

两种类型的电极都以 $84 \pm 1\text{mV}$ 的电位开始。然而从图3A中显而易见,未涂覆的电极的电位在电位测量期间漂移。

[0021] 图3B显示了作为 Cl^- 浓度的对数的函数的Ag参比电极的电位。Nafion涂覆的电极的电位线性依赖于电解质的 Cl^- 浓度的对数,斜率为 $-33.9\text{mV}/\log[\text{Cl}^-]$ 。未涂覆的Ag电极的电位也依赖于所述 Cl^- 浓度,但表现出较少的线性行为。尽管有着对 Cl^- 浓度的敏感性,但Nafion涂覆的电极在全部浓度都显示了即时稳定的电位而无任何过渡时间(run-in time)。

[0022] 图3C显示了在 1M KCl 中以 $1\text{mM Ru}(\text{NH}_3)_6$ 以各种扫描速率进行的CV测量。得到了 68.8mV 的峰电位间隔(ΔE_p) (扫描速率: $100\text{mV}/\text{s}$),表明接近可逆电子转移。

[0023] 图4A显示了在常规 50mL 电化学池中和使用直接放置于传感器上的 $40\mu\text{L}$ 液滴使用传感器条实施的DPV测量。对于在 50mL 池和 $40\mu\text{L}$ 液滴中的 $50\mu\text{M PA}$ 分别测量出 $1.178\mu\text{A}$ 和 $1.159\mu\text{A}$ 的背景消减的氧化峰值(在PBS浓度系列中平均 $1.07\mu\text{A}$)。

[0024] 图4B显示了对 $40\mu\text{L}$ 液滴稀释人血浆以不同脉冲幅度进行的DPV测量。可以看到,更大的脉冲幅度不出所料地导致对PA的更高的灵敏度。尽管如此,但仅观察到随脉冲幅度的增加在大约 150mV 和 550mV 处的小峰的微不足道的增加。

[0025] 图5显示了增加PA浓度的DPV测量。可以看到在 $1\mu\text{M}$ 至 2mM 的浓度范围内电流随浓度线性变化。

[0026] 图5D显示了在血浆和全血中分别得到了79%和74%的回收率(recoveries)。

[0027] 图6显示了当在PBS和稀释的人血浆中测量 $1\text{mM Ru}(\text{NH}_3)_6$ 时没有电极的钝化。

[0028] 图6B显示了作为扫描次数的函数的测量的氧化电流。

[0029] 图7显示了在不存在和存在具有 $100\mu\text{M}$ 布洛芬(Ibuprofen)、萘普生(naproxen)和阿司匹林(aspirin)的NSAID混合物、 1mM 水杨酸(阿司匹林的代谢物)、 1mM 尼古丁(nicotine)、 1mM 阿莫西林(amoxicillin)和 1mM 咖啡因(caffeine)、以及 $2.5\mu\text{M}$ 吗啡(morphine)和 $10\mu\text{M}$ o-去甲基曲马多(o-desmethyiltramadol)的情况下的DPV扫描。

[0030] 具体描述

如上文所述,本发明涉及多层测试条。在一个实施方案中,描述了一次性多层测试条,其包括在其上沉积有电极组合体的基材。所述电极组合体包括基于碳的工作电极、基于碳的对电极、和伪参比电极,其中所述伪参比电极、所述工作电极和所述对电极在同一平面中彼此相邻布置。所述多层测试条包括用于将所述电极与电压源直接接触的触点,并且所述测试条进一步包括选择性透过膜层。所述电极组合体层的所述电极彼此电隔离并且所述电极组合体层位于所述基材和所述选择性透过膜层之间。通过实施方案的手段,已经令人惊讶地发现了通过调整所述选择性透过膜的结构,可以控制分析物穿过所述膜。因此在一个实施方案中,所述选择性透过膜具有适于允许待分析的样品中的一种或多种电中性分析物穿过所述选择性透过膜到达所述电极组合体的结构。出于实施方案的目的,电中性分析物是指在生理条件下为中性的分析物。相应地,生理条件是指在约7.4的pH,例如人血液的正常pH通常在7.35至7.45的范围内。具有相等数量的正电荷和负电荷的两性离子也包含在中性分析物的定义中。

[0031] 在一个实施方案中,所述条的基材选自聚合物和玻璃。所述基材是基于可丢弃性(disposability)来选择的。在一个实施方案中,所述基材是聚合物例如聚碳酸酯或PET。因

为聚碳酸酯是通过酶的作用或通过细菌全细胞 (bacterial whole cells) 生物可降解的, 所以最优选地所述基材是聚碳酸酯。

[0032] 如在上文的实施方案中所述, 所述条包括基于碳的电极。在一个实施方案中, 所述基于碳的电极的一者或二者包含碳, 所述碳选自无定形碳例如四面体无定形碳、类金刚石碳、石墨、碳纳米管、石墨烯及其混合物。在一个优选的实施方案中, 所述基于碳的电极的一者或二者包含碳纳米管, 特别是单壁碳纳米管。尽管每个所提到的碳的形式在本发明的实施方案中都是合适的, 但是单壁碳纳米管具有大表面积、高机械强度、高电导率和电催化活性、以及具有低充电电流和增强的质量传递 (例如当网络/薄膜沉积在绝缘基材上时), 在电化学检测中提供使得能够实现高信噪比的额外益处。通过气溶胶化学气相沉积的手段, 可以生产大面积的具有高导电性和表面积的多孔SWCNT电极。该方法允许收集图案化的网络, 其可以被容易地压力转移以生产电极而无需常规碳电极的修饰 (modification)。这使得能够在包含聚合物的范围广泛的基材上生产廉价一次性SWCNT电极。SWCNT膜可以通过标准平板印刷术 (standard lithography) 来图案化或通过激光烧蚀来激光图案化低至10 μm 而不对聚合物基材包括聚碳酸酯和PET造成任何损坏。该方法可以以高生产量实施并且是完全卷对卷 (roll-to-roll) 兼容的。

[0033] 在一个进一步的实施方案中, 所述伪参比电极包含银。Ag/AgCl电极给出令人满意的性能。因此在一个实施方案中, 所述伪参比电极包含Ag/AgCl。然而, 已经令人惊讶地发现所述选择性透过膜涂层稳定所述伪参比电极的电位从而所述伪参比电极能在与导电银线相同的步骤中制造, 省去对使用AgCl墨的第二丝网印刷步骤的需要。因此在一个优选的实施方案中, 所述伪参比电极由银组成。

[0034] 所述选择性透过膜的材料可以选自各种材料。在一个实施方案中, 所述选择性透过膜包含膜材料, 所述膜材料选自自由以下组成的聚合物的组: Nafion、醋酸纤维素、聚乙烯磺酸盐、羧甲基纤维素、聚赖氨酸、过氧化聚吡咯和其他磺化聚合物。在一个实施方案中, 所述选择性透过膜包含常规渗析膜材料。磺化聚合物中的磺酸根基团拒绝/排斥干扰中性分析物例如扑热息痛的定量检测的带负电荷的阴离子, 同时允许中性分子扩散通过所述膜。因此在本发明的一次性多层测试条的实施方案中磺化聚合物是尤其合乎需要的。Nafion在整个聚合物上具有特别高浓度的磺酸根基团。因此, 在一个优选的实施方案中, 所述膜包含Nafion。Nafion还具有对于阳离子的亲和性, 所述阳离子例如吗啡和曲马多以及它们的代谢物, 其通常在样品中共存且也可以在中性分子例如扑热息痛的测定中造成干扰。通过实施方案的手段, 已经发现Nafion膜功能化所述电极使得阿片类药物 (opioid) 干扰物例如吗啡在中性分析物例如扑热息痛的测量中不造成干扰。

[0035] 在一个进一步的实施方案中, 所述选择性透过膜的结构由施加至所述条的一个或多个膜材料层形成, 借此膜材料层的叠层形成所述选择性透过膜。因此通过实施方案的手段, 可以调整所述选择性透过膜的厚度。

[0036] 已经表明选择性透过膜例如包含磺酸根的聚合物例如Nafion膜形成因离子交换反应而富集阳离子的涂层。所述涂层中的带负电荷的通道, 所述通道具有几纳米的尺寸, 不允许阴离子通过。中性分析物可以通过被动扩散通过所述膜。由于不同的分析物和所述选择性透过膜例如含有磺酸根的聚合物膜例如Nafion膜之间不同的相互作用, 所以不同的中性分子也呈现出不同的透过性。因此在一个实施方案中, 仔细控制沉积参数例如沉积方法、

涂覆时间、膜例如Nafion膜中的磺酸根基团浓度、层数等等,提供其中能控制中性物的透过性和SWCNT电极的表面功能化程度的多层测试条。先前我们已经表明我们能制造多层电极,其优化阳离子的富集同时阻挡阴离子和大部分中性物到达电极,因此使得能够实现在中性物例如扑热息痛存在下选择性检测阿片类药物。已经通过控制沉积参数优化了目前的多层电极以允许中性物通过而不损害在具有高浓度阴离子的复杂基质中的测量的选择性,所述复杂基质例如血液、尿液和唾液。在测量扑热息痛的情况中,所述SWCNT电极层也在某种程度上被所述选择性透过膜功能化,从而阳离子吗啡和O-去甲基曲马多在临床相关水平的测量中不造成干扰。在一个实施方案中,所述膜材料的叠层具有在10nm至4000nm的范围内的厚度。堆叠所述层具有双重效应。磺酸根基团的量随层数增加而增加,因此使得阳离子基团穿过膜通过愈加地困难,并且因为所述层如此薄,所以在每层中都发现了中性分析物可以容易地穿过其通过的缺陷。在一个实施方案中,所述选择性透过膜具有在50nm至3000nm、优选地75nm至2500nm、合适地100nm至2000nm的范围内的厚度。在一个进一步的实施方案中,所述选择性透过膜具有在50nm至400nm、优选地75nm至250nm、合适地100nm至200nm的范围内的厚度。

[0037] 进一步的实施方案涉及用于分析来自多层测试条的数据的装置。在一个实施方案中,装置包括配置为存储参考数据的存储器,至少一个处理核心,其配置为处理来自根据本文所述实施方案的多层测试条的信息、将来自根据本文所述实施方案的条的信息与所述参考数据进行对比;和依据从根据本文所述实施方案的条处理的信息得出结论。

[0038] 进一步的实施方案涉及用于检测样品中的电中性分析物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:提供样品、将所述样品与多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触、改变所述工作电极与对电极之间的电压、测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流和检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化。在一个实施方案中,所述方法检测样品中的游离或未结合部分的中性分析物。游离或未结合部分是未结合至血液和/或血清蛋白的部分。在一个进一步的实施方案中,中性分析物的游离或未结合部分的检测在不使用平衡渗析的情况下实施。也就是说,在一个特定的实施方案中,中性分析物的游离或未结合部分的检测在无平衡渗析的检测方法中实施。

[0039] 进一步的实施方案描述了用于检测样品中的电中性分析物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括提供样品,通常所述样品是可例如从指刺获得的血液样品,将所述样品与本文上述的多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触,改变所述工作电极与对电极之间的电压,测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流和检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化。在一个进一步的实施方案中,待检测的电中性分析物选自扑热息痛、四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC)、阿普唑仑(alprazolam)、劳拉西泮(lorazepam)以及全身麻醉剂例如丙泊酚(propofol)。在一个实施方案中,用缓冲溶液、优选地用PBS稀释所述样品。优选地所述样品完全没有被稀释。在一个实施方案中,与所述工作电极和对电极接触的样品的量等于大约3.5 μ l-20 μ l,优选地5 μ l-15 μ l,合适地10 μ l。

[0040] 根据待检测的分析物而扫描所述工作电极和对电极之间的电压,例如在一个实施方案中,所述工作电极和对电极之间的电压在扫描速率下从-0.2V扫描至0.8V,优选地从

0.1V扫描至0.6V,其为用于扑热息痛的检测的合适范围。

[0041] 类似地,在一个实施方案中,根据待检测的分析物调整扫描速率。在一个实施方案中,所述扫描速率在5mV/s至1000mV/s、优选地10mV/s-400 mV/s的范围内。

[0042] 进一步的实施方案描述多层测试条的制造方法。在一个实施方案中所述方法包括以下步骤:提供SWCNT网络、将所述SWCNT网络压至基材上以形成基于碳的电极、通过激光图案化分离所述电极、丝网印刷银以形成与基于碳的工作电极和基于碳的对电极相邻的银伪参比电极、将银触垫丝网印刷至每个电极上、用选择性透过膜层涂覆所述电极。在一个实施方案中,调整所述涂覆步骤以用预定厚度的选择性透过膜来涂覆所述电极。在一个可替代的实施方案中,在所述基材上由无定形碳形成基于碳的电极。通过具有荫罩(shadow masks)的物理气相沉积或通过标准平板印刷术将无定形碳施加至所述基材上。通过所述方法的实施方案的手段,制造了上文所述的多层测试条。

[0043] 也公开了其中在患者或受试者中诊断过量的实施方案。在一个实施方案中所述诊断方法包括从受试者获得样品、将所述样品与多层测试条的电极组合体的工作电极和对电极电接触、改变所述工作电极与对电极之间的电压、测量与所述工作电极与对电极之间施加的电压相关的所述工作电极与对电极之间的电流、检测所述样品中的一种或多种分析物的电流特性的变化、在根据本发明的第二方面的装置中测定所述样品中分析物的量。

[0044] 以下非限制性的实施例说明了本发明的至少一些实施方案。

实施例

[0045] 首先如由Kaskela, A等在Aerosol-Synthesized SWCNT Networks with Tunable Conductivity and Transparency by a Dry Transfer Technique. *Nano Lett.* 2010, 10 (11), 4349-4355. <https://doi.org/10.1021/nl101680s>中和由Moisala A等在Single-Walled Carbon Nanotube Synthesis Using Ferrocene and Iron Pentacarbonyl in a Laminar Flow Reactor. *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61 (13), 4393-4402. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.02.020>.中详细讨论的那样(该二者的方法经此引用并入本文),通过气溶胶CVD生长SWCNT并将其收集在过滤器上。然后将18x26cm SWCNT网络压力转移至A4 PET片上并通过从喷瓶喷射IPA来致密化并用氮气干燥。用相同方法制造的SWCNT电极先前已经由Wester, N.等在Simultaneous Detection of Morphine and Codeine in the Presence of Ascorbic Acid and Uric Acid and in Human Plasma at Nafion Single-Walled Carbon Nanotube Thin-Film Electrode. *ACS Omega* 2019, 4 (18), 17726-17734. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02147>.中和由Wester, N.等在Single-Walled Carbon Nanotube Network Electrodes for the Detection of Fentanyl Citrate. *ACS Appl. Nano Mater.* 2020, [acsanm.9b01951](https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01951). <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01951>.中详细表征(其教导经此引用并入本文)。所述压力转移的SWCNT具有71.6% (550nm)的光学透明度和73 Ω /sq的薄层电阻(sheet resistance)。为了实现图案化的电极,用脉冲激光烧蚀,烧蚀分离所述电极的线。

[0046] 为了实现参比电极和降低活性电极区域和触垫之间的线的电阻,将银线直接丝网印刷在SWCNT层的顶部上(请见图1,步骤3)。银触垫也以相同的方法制造。最后,在室温下使用缝模涂布机(Schneider Electric)用Nafion涂覆整个A4 PET片。对于该方法,在涂覆之

前用乙醇(94.5重量%, Altia, Finland)将5%Nafion溶液(Sigma Aldrich)稀释至2.5%。使用以下缝模涂布参数:涂覆宽度:200.0mm,注射器直径:22.0mm,泵速率:1.2ml/min,湿膜厚度:15.0 μ m,速度:40cm/min。将所述PET片放置在所述缝模涂布机中以使所述电极最先并且触垫最后被涂覆。测量之前,所述电极用具有预先冲出的6mm孔的PTFE膜(Saint-Gobain Performance Plastics CHR 2255-2)覆盖。然而对于单次测量,因为所述电极周围的激光烧蚀的区域足够疏水以在测量期间将所述40 μ L液滴保持就位,所以不需要该掩模。在用Nafion缝模涂布之后,对于每个测试条用万用表(multimeter)测试所述电极的电隔离。

[0047] 使用扫描电子显微镜(SEM)测量所述Ag参比电极和所述SWCNT/Nafion层的厚度。在成像之前,用聚焦离子束(FIB)铣削制备横截面样品。FIB铣削和SEM成像二者都使用FEI Helios NanoLab 600双光束系统实施。在铣削之前,通过蒸发将所述样品用100nm金涂覆,以在离子铣削和SEM成像期间充当保护免受束破坏的导电涂层。在粗铣削中以16 kV加速电压和280/460pA电流铣削所述横截面。用5-30 kV和43-170 pA低电流实施SEM成像。还使用轮廓仪(Dektak 6M)在银线的几个地方和在参比电极上测量所述银线的厚度。

[0048] 在常规的50ml玻璃电化学池中使用Gamry Reference 600恒电位仪(potentiostat)实施对KCl中的Ru(NH₃)₆的循环伏安测试(CV)和丝网印刷的Ag伪参比电极的电位测量。具有Pt丝对电极和放置在Luggin毛细管中的Ag/AgCl[饱和](+0.199 V vs SHE, Radiometer Analytical)参比电极的三电极设置被用来测量作为工作电极连接的Ag电极的电位。对于在所述50ml池中实施的CV测量,连接所述测试条的集成的电极。在这些测量中,使用了改变的串行ATA(serialATA)电缆作为连接器。

[0049] 所有采用40 μ L液滴的差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)和CV实验都采用PalmSens4便携式恒电位仪实施。所述条直接连接至购买自PalmSens的连接器,其中2mm香蕉夹可以连接至所述连接器的任何电极。通过将KCl(Merk Suprapur)溶解在去离子水(18.2 M Ω ·cm)中来制备具有不同浓度的KCl溶液,以研究所述Ag参比电极对Cl⁻浓度的敏感性。

[0050] 盐酸吗啡获自University Pharmacy, Helsinki, Finland。所有其他化学品获自Sigma-Aldrich。在1M KCl和PBS中制备外层氧化还原探针(outer sphere redox probe)Ru(NH₃)₆的1mM溶液以研究电子转移。在pH 7.4磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液中制备扑热息痛和干扰物溶液。在每个测量日制备新鲜的储备溶液。

[0051] 对于血浆测量,过期的人血浆(Octaplas AB, Sweden)。在Eppendorf中通过将1ml血浆加入1ml pH 7.4 PBS中来以1:1比例稀释血浆样品。通过从健康志愿者指刺获得全血并用20 μ L校准的微毛细管(Drummond Scientific Company, USA)收集。然后将血液样品放置于2 ml Eppendorf中并用20 μ L PBS稀释。通过将用于稀释的PBS掺加(spiking)两倍目标PA浓度来制备带有扑热息痛的血浆和全血样品。对于每次测量,获得新样品以避免全血的凝固。对于每次测量,使用微量吸管将40 μ L液滴放置在所述测试条上。因为随着积累时间的增加观察到PA信号的缓慢增加,所以使用2.5min的积累时间。在每次测量之间,用棉纸(tissue paper)擦拭被测量的液滴并且在将下一滴液滴放置在测试条上之前用PBS液滴冲洗2.5分钟。

[0052] 可以看到所述工作电极的SWCNT/Nafion层的整体厚度大约为170nm厚。可能是由

于Nafion,所以在SWCNT/Nafion层和Au涂层(通过电子束沉积施加以保护Nafion层在离子铣削和SEM成像期间免受束破坏)之间还可以观察到具有65-75nm的厚度的暗层。该结果与我们,例如Wester, N.等 Simultaneous Detection of Morphine and Codeine in the Presence of Ascorbic Acid and Uric Acid and in Human Plasma at Nafion Single-Walled Carbon Nanotube Thin-Film Electrode. ACS Omega 2019, 4 (18), 17726-17734. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02147>.,以及其他组先前的研究是一致的,表明所述SWCNT至少部分地被Nafion涂覆。所述Ag参比的横截面显示了在数微米尺寸范围内的扁平、拉长的Ag颗粒。对于所述参比电极的横截面得到了在5.9 μm 至7.2 μm 之间的厚度。还使用接触式轮廓仪对银线实施了几次测量,其给出在5.5 μm 至7 μm 范围内的厚度。由于大的粗糙度,所以在所述Ag颗粒顶部上不能辨认清晰的Nafion层。

[0053] 通常由银制造的准参比电极(quasi-reference electrodes)受到测量过程中漂移电位、短寿命、电位稳定前的长过渡时间和相对短的保存期的困扰。尽管一次性测试条不必须要求长期稳定性,但过渡时间和测量期间的电位漂移可能潜在地造成问题。图3A显示了0.1M PBS溶液中未涂覆和Nafion涂覆的丝网印刷的Ag参比电极二者的OCP电位vs Ag/AgCl[饱和]电极。两种类型的电极都以84 \pm 1mV的电位开始。然而,从图3A中显而易见所述未涂覆的电极的电位在电位测量期间漂移。尽管存在这种电位漂移,在大约1h之后,未涂覆的电极也达到稳定电位。相比之下,Nafion涂覆的电极立即显示出稳定的电位而不需要过渡时间。4个Nafion涂覆的电极中的一个还被测量了7.5h并给出了84.78 mV \pm 0.35的平均电位。在测量期间没有任何时候电位变化超过 \pm 1 mV,因为最低和最高测得电位分别为84.07mV和85.39mV。还进行了一项长期稳定性研究,其中在PBS中浸没7天期间观察到小于10mV(9.85mV)的电位下降。这种电位稳定性和漂移速率与具有保护层并入盐基质(KCl)的复杂得多的设计的丝网印刷Ag/AgCl电极是相当的。本工作中的电极立即产生了稳定电位并长达7天保持稳定。这些测量清楚地表明所述Nafion涂覆的电极可以无任何预处理用于即时应用中的伏安测量。此外,所述4个被测量的电极条中的一个来自不同批次,其在测量前在环境条件下储存了大约1.5年。在3h测量期间该电极同样显示出了84.42 \pm 0.47 mV的稳定电位,表明在没有任何电极包装的情况下参比电极极好的保存期。

[0054] 通过测量在不同浓度的KCl溶液中制造的Ag参比电极vs.常规Ag/AgCl电极的电位研究对Cl⁻浓度的敏感性。图3B显示了作为Cl⁻浓度的对数的函数的所述Ag参比电极的电位。所述电极二者的电位都依赖于Cl⁻浓度。所述Nafion涂覆的Ag电极显示出对电解质的Cl⁻浓度的线性依赖,斜率为-33.9 mV/log[Cl⁻]。所述未涂覆的电极显示出对Cl⁻浓度较低的依赖。尽管存在对Cl⁻浓度的敏感性,但所述Nafion涂覆的电极在所有浓度下显示出立即稳定的电位而无任何过渡时间。但是,这些结果表明应该控制电解质溶液的离子强度。

[0055] 采用外层氧化还原探针Ru(NH₃)₆研究电子转移。图3C显示了在1M KCl中以1mM Ru(NH₃)₆以各种扫描速率进行的CV测量。得到了68.8mV的峰电位间隔(ΔE_p) (扫描速率: 100 mV/s),表明接近可逆电子转移。然而随着扫描速率增加(110mV, 400mV/s)峰电位间隔增加,表明准可逆电子转移。对于PBS溶液中的6个电极还测量了164.1 \pm 25.6 Ω 的未补偿电阻值。

[0056] 在扑热息痛浓度测量的线性化中,对于PBS、血浆和全血分别得到了R²=0.9959、R²=0.9999和R²=0.9984的相关系数,表明在1 μM 至2mM的宽线性范围内所获得的信号线性依赖

于扑热息痛浓度,其覆盖整个生理相关的浓度范围。检测极限 (LOD) 以 $LOD = (3 \cdot \sigma) / S$ 计算,其中 σ 是空白 PBS 中三次测量的标准偏差且 S 是整个线性范围上的灵敏度。对于 4 个电极分别测定了 LOD 且平均值为 $0.819 \pm 0.265 \mu\text{M}$ 。最高的 LOD 是 $1.06 \mu\text{M}$, 仍然远低于所需的扑热息痛中毒截止浓度。大多数临床实验室使用约 $66.15 \mu\text{M}$ (10mg/L) 的截止浓度。结果表明即使在用 1:1 比例的 PBS 稀释后并考虑血浆和全血中较低的回收率,所开发的测试条仍可以容易地定量测定在这些水平的血液扑热息痛。

[0057] 在整个线性范围内, PBS、血浆和全血中的氧化电流的平均相对标准偏差 (RSD) 分别为 4.3%、7.0% 和 10.0%。应该注意的是,所使用的血浆和全血来自不同的个体。应该进一步注意的是,在分开的 3 天、在当天的不同时间实施全血测量。由于图 5 中血浆和全血测量中的较大变动,因此在掺加 1mM PA 的血浆中用 3 个电极实施了单次测定。在这些测量中,获得了 4.0% 的相对标准偏差和 $75.7 \pm 0.22\%$ 的回收率。这表明对于在含有蛋白质的溶液中的长时间测量可能发生所述电极的一定钝化。因为所述电极意在用于单次即时测定,所以还对掺加全血样品以 3 种不同浓度实施了回收率测试,每个浓度 3 个电极。该回收率研究的结果在表 1 中显示并显示回收率为约 74%。

[0058] 表 1. 全血中的回收率研究。使用 3 个不同电极 3 次测定的平均值。

| 加入 | 测定 | 回收率% | RSD% (n=3) |
|-----|-------|------|------------|
| 50 | 36.5 | 73.1 | 7.4 |
| 100 | 74.7 | 74.7 | 5.5 |
| 500 | 371.8 | 74.4 | 1.9 |

[0059] 对于扑热息痛先前已经报道了 20%-25% 的蛋白质结合部分。还发现未结合部分与临床相关浓度范围内的浓度无关。在最近的报告中也得到了类似的结果,其中我们发现使用 Nafion 涂覆的 SWCNT 电极吗啡和可待因的回收率分别为 60% 和 40%。所有这些回收率都与先前报道的未结合部分的那些密切匹配。Banis 等还得出结论,只有氯氮平(一种苯并二氮杂草 (benzodiazepine)) 的游离部分对使用脱乙酰壳多糖基复合物涂覆的电极在含有 BSA 的分析物溶液中的测量电化学信号有贡献。这些结果表明,用聚合物膜涂覆的电极可以直接用于测定未结合的 PA 部分,而不需要耗时的平衡渗析。

[0060] 如从表 2 可以看出的那样,几个组先前已经报告了更低的检测极限。类似地,在先前的工作中也已经报告了相对宽的线性范围。然而,如从治疗列线图中显而易见的那样,不需要极端的灵敏度。此外,表 2 中的所有工作都依赖于耗时的样品加工,包括蛋白质的沉淀(血液样品)和大量的稀释,以减少基质效应。还应注意的是,以血清或血浆开始的工作也已经实施了血液样品的预处理。相比之下,本工作中开发的检测可以用于在不到 5min 内从全血中测定 PA 浓度,只在用等份的 PBS 稀释后并且无蛋白质沉淀。因此,本工作的结果提出了一种简单得多的系统,其明显减少所需的样品处理并因此具有更快的检测时间。

[0061] 尽管这些结果表明了开发的传感器条和提议的检测用于 PA 中毒筛查的适用性,但还需要进一步研究以表明对真实患者样品的适用性。将需要从静脉和毛细血管针刺血液样品二者来评估药物代谢动力学参数。随着进一步的开发,为实现更高的灵敏度或电极进一步的小型化,还可以进一步减少所需的样品量。

[0062] 表 2. 现有用于生物基质中 PA 检测的电分析方法的非穷举对比。

[0063]

| 电极 | 方法 | DL(μM) | 线性范围(μM) | 生物基质 | 样品处理 |
|---|-----------|---------------------|-----------------------|----------|--|
| SWCNT-GNS/GC 电极 | DPV | 0.038 | 0.05-64.5 | 人血清 | 离心: 30 min, 4000 rpm 蛋白质的沉淀: 2 ml 血清中 2 ml 乙腈 漩涡振荡: 45 s 离心: 10 min, 10000 rpm |
| CuNP/C60/MWCNT/CPE | 吸附溶出 SWV | 0.000073 | 0.009-0.4 | 尿液、血浆、血清 | 血液: 离心: 30 min (分离血清与血浆) 蛋白质的沉淀: 乙腈和离心以沉淀蛋白质 用 pH 6.8 的未明确体积的磷酸盐缓冲液将未明确体积的掺加样品转移至伏安法 (voltammetric) 中 尿液 稀释 4 倍 |
| Pd/GO 修饰的 GCE 电极 | DPV | 0.0022 | 0.005-0.5 0.5-80 | 尿液 | 尿液: 用 0.1M PBS (pH 6.8) 稀释 50 倍 |
| ERG/GCE | DPV | 1.2 | 5-800 | 人血清 | 5mL 人血清的掺加 用乙腈处理以使蛋白质沉淀, 离心 4000 rpm 15 min 从 0.01M 稀释至 10-25 μM |
| MWCNT: 石墨/GC 电极 | SWV | 0.157 | 0.472-13.2 | 尿液 血浆 | 1 mL 的 0.2 M NaOH + 0.8 mL 样品, 漩涡振荡 3min, 加入 3mL 乙酸乙酯, 漩涡振荡 3min, 离心 5 min 4500 rpm 移除有机相 重复提取 在 60 °C 氮气流下干燥乙酸乙酯相 用 20mL 缓冲溶液恢复(reconstitution) |
| Dowex50wx2 和金纳米粒子修饰的玻璃碳糊 (glassy carbon paste) 电极 | 吸附溶出方波伏安法 | 0.00471 | 0.0334-42.2 | 尿液、人血清 | 尿液(原样?) 在 25 mL 缓冲溶液中 50 μL 血清 通过 0.22 μm PVDF 注射器式过滤器过滤 |
| AuNP/MWCNT/GCE | DPV | 0.03 | 0.09-35 | 血清 | 血清 1: 蛋白质的沉淀 0.8ml 乙腈至 1ml 样品, 掺加 10min 离心 稀释至 25ml 的最终体积 血清 2: 1ml 样品用 BRBS(pH 6.0) 将稀释至 50mL 的最终体积 |

| | | | | | |
|---|-------------------|------------------------|---|-----------|--|
| RG/Ni ₂ O ₃ -NiO 修饰的 GC 电 极 | DPV | 0.02 | 0.04-100 | 尿液 | 未说明 |
| 电化学还原的氧 化石墨烯 (ER-GO)/Nafio n 玻璃碳电极 (GCE)] | SWV | 0.025 | 0.4-1 1-10 | 尿液 | 2ml 样品+ 8 ml 0.1 M 氨缓冲液 |
| 石墨烯/铂纳米 粒子/nafion 复 合物修饰的玻璃 碳电极 | 吸附溶 出方波 伏安法 | 1.06×10^{-10} | 8.2×10^{-6} - 1.6×10^{-9} M | 尿液、 血清 | 过滤, 0.22 μ m PVDF 注射器式过滤器 稀释 在 25ml 缓冲液中 50 μ L 样品 |
| SWCNT/Nafion | DPV | 0.819 | 1-2000 | 血浆 全血 | 20 μ L 样品+用分析物掺加的 PBS |

[0064] 为了验证血浆和全血中较低的回收率不是由于蛋白质造成的污染 (fouling), 研究了所述电极的钝化。首先在 PBS 和人血浆二者中测量了 1mM Ru(NH₃)₆。图6显示当在 PBS 和稀释的人血浆中测量 1 mM Ru(NH₃)₆ 时电极没有明显的钝化。这个结果与先前报告中对 Nafion 涂覆的 SWCNT 电极实施的类似钝化研究是一致的。通过在带有 1mM PA 的血浆和全血中实施 10 次连续 DPV 扫描, 进一步研究了高浓度 PA 中的钝化。这些测量给出了全血中 3.6% 的 RSD 和血浆中 4.3% 的 RSD。这些 RSD 与表 1 中单次测定的重复性和 PBS 中 PA 的 RSD 是相当的。此外, 用来测量全血中 50 μ M PA 的电极 (请见表 1) 也被用来测量 PBS 中的 50 μ M PA。在擦去全血、用 PBS 的 40 μ L 液滴清洗并确认背景恢复到空白 PBS 的背景后, 对于 50 μ M PA 得到了 1.83 \pm 0.09 μ M 的平均峰值电流。这代表了 101.7% 的回收率, 表明在全血测量后没有永久性污染。

[0065] 图 4 中背景电流中任何基质效应的缺乏表明所述血浆和全血样品中存在的内源性物质没有造成可觉察的干扰。尽管如此, 几种其他药物可能会在扑热息痛的测定中造成干扰。出于这个原因, 测试了经常与扑热息痛同时过量服用的几种药物。所述药物在远高于血液样品中预期浓度的浓度下测试。在其中发现被测试的物质造成干扰的情况下, 容许限被定义为在 PA 测定中造成小于 5% 误差的干扰物的最大浓度。图 7 显示了在不存在和存在具有 100 μ M 布洛芬、萘普生和阿司匹林的 NSAID 混合物、1mM 水杨酸 (阿司匹林的代谢物)、1mM 尼古丁、1mM 阿莫西林和 1mM 咖啡因的情况下的 DPV 扫描。PA 经常与阿片类药物例如曲马多和吗啡共同给予。阿片类药物也是最经常与扑热息痛同时过量服用的药物组中的其中之一。此外, 已经表明 Nafion 积累阳离子例如阿片类药物, 还研究了两种常见阿片类药物吗啡 (可待因和海洛因的活性代谢产物) 和 o-去甲基曲马多 (ODMT) (曲马多的活性代谢产物) 的干扰。吗啡和 ODMT 二者在生理条件下都是阳离子并具有酚官能团。特别是已经表明吗啡在接近与 PA 相同的电位氧化。出于这个原因, 也测试了这两种阿片类物质的干扰。

[0066] 从图 7 中显而易见, 所述 NSAID 混合物、1mM 水杨酸、1mM 阿莫西林、1mM 尼古丁和 1mM 咖啡因在 50 μ M PA 的信号中没有造成超过 5% 的干扰。得到了 2.5 μ M 吗啡和 10 μ M o-去甲基曲马多的低得多的容许限。尽管是相对低的容许限, 但这些浓度却与治疗浓度相比代表高浓度。即使在吗啡和曲马多中毒的致死情况中, 浓度仍保持低于测试浓度, 分别在大约 1.75 μ M 和 3.8 μ M。

[0067] 如从表 1 可以看出的那样, 通过在生理相关浓度范围内的 3 个不同浓度中测量 3 个电极评估检测重复性。在 50 μ M、100 μ M 和 500 μ M 的浓度下分别得到 7.4%、5.5% 和 1.9% 的相对标准偏差。应该注意的是, 通过抽取 20 μ L 指刺全血、用 PA 掺加的 PBS 溶液稀释和使用微量吸管

将样品转移至测试条上来获得这些结果。因此，RSD值代表了来自所有这些步骤的累积误差。

[0068] 还在环境条件下储存4个月之后测试了所述电极的保存期。实现了相同的灵敏度，表明极好的稳定性。类似地，在储存1.5年之后也观察到了Ag参比电极的类似行为。

[0069] 要理解的是所公开的本发明的实施方案不限于本文公开的特定的结构、工艺步骤或材料，而是扩展到那些相关领域的普通技术人员会认识到的它们的等同方式。还应理解的是本文使用的术语仅出于描述特定的实施方案的目的使用且不意在是限制性的。

[0070] 在本说明书通篇中提及一个实施方案或实施方案是指关于所述实施方案描述的特定特征、结构或特性被包括在本发明的至少一个实施方案中。因此，在本说明书通篇的各种地方中出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定全部是指同一个实施方案。当使用术语例如约或大体上来提及数值时，也公开了精确的数值。

[0071] 如本文中所使用的那样，为方便起见，多个项目、结构要素、组成要素和/或材料可以在共同的列表中呈现。然而，这些列表应被理解为如同所述列表中的每个成员都被单独确定为单独和独特的成员。因此，此类列表中的单独成员都不应仅仅基于它们在共同的组中呈现而没有相反指示而被理解成相同列表中的任何其他成员的事实等同方式。此外，本发明的各种实施方案和例子与其各种组成部分的替代方案可以一起在本文中提及。要理解的是此类实施方案、例子和替代方案不应被理解为是彼此的事实等同方式，而应被视为本发明的单独和自主的表现。

[0072] 此外，所描述的特征、结构或特性可以以任何合适的方式在一个或多个实施方案中合并。在下文的描述中，提供了大量的具体细节，例如长度、宽度、形状等的例子，以提供对本发明实施方案的全面理解。然而，相关领域中的技术人员将认识到，可以在没有多个所述具体细节的情况下实践本发明，或可以通过其他方法、部件、材料等实践本发明。在其他情况下，没有显示或详细描述众所周知的结构、材料或操作以避免模糊本发明的方面。

[0073] 虽然上述例子在一个或多个特定应用中说明了本发明的原理，但将对本领域中的普通技术人员显而易见的是在不行使发明能力和不脱离本发明的原理和概念的情况下，可以在形式、用法和实施细节上进行大量修改。因此，其不意在限制本发明，除了由下面列出的权利要求之外。

[0074] 动词“包含”和“包括”在本文件中被用作开放式限制，其既不排除也不要求未提及的特征的存在。除非另外明确说明，否则在从属权利要求中提及的特征是可相互自由组合的。此外，要理解的是，本文件通篇中“一个”或“一种”，即单数形式，的使用并不排除多个或多种。

[0075] 工业实用性

本发明的至少一些实施方案在医疗行业找到了工业应用。描述了一次性电化学测试条的适合大规模生产的制造方法，所述测试条用于在中性分析物例如扑热息痛过量的疑似病例中所述中性分析物的定量即时测定。通过该方法在基材上印刷高导电性、良好电隔离和图案化的基于碳的电极。此外，生产了具有极好的保存期、具有长期稳定性和短水合时间的丝网印刷的银伪参比电极。采用该测试条，实现了用于在疑似中毒中中性分析物浓度测定的足够低的检测极限和足够宽的线性范围。所述条在疑似扑热息痛过量和/或中毒的

病例中在扑热息痛浓度的检测和测定中特别有用。

[0076] 所开发的测试条可以用作用于扑热息痛中毒筛查的高度便携和快速的即时检测。

[0077] 首字母缩写词列表

PA 扑热息痛

UA 尿酸

AA 抗坏血酸

MO 吗啡

CO 可待因

PBS 磷酸盐缓冲盐水

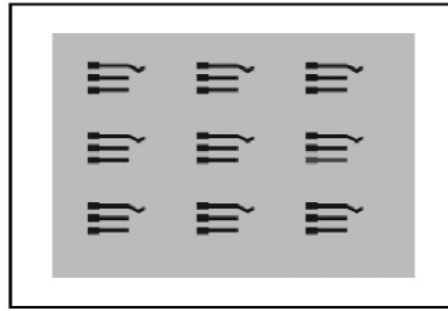
DPV 差分脉冲伏安法

PET 聚对苯二甲酸乙二醇酯。

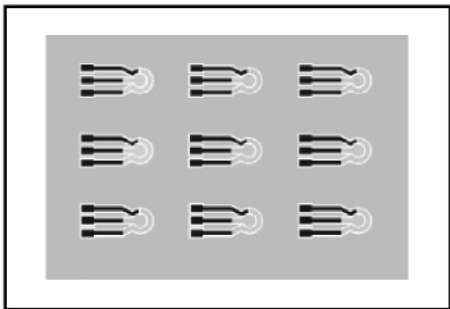
1. 在PET上收集SWCNT



2. 丝网印刷银



3. 激光图案化电极



4. 缝模涂布Nafion

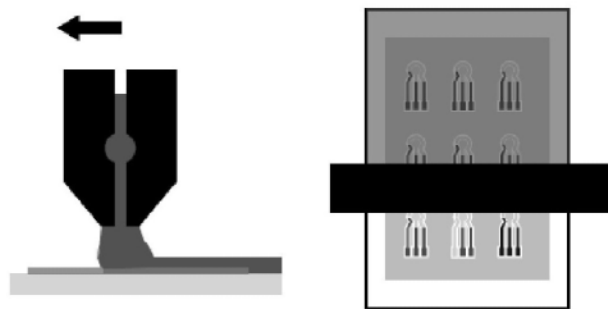


图 1

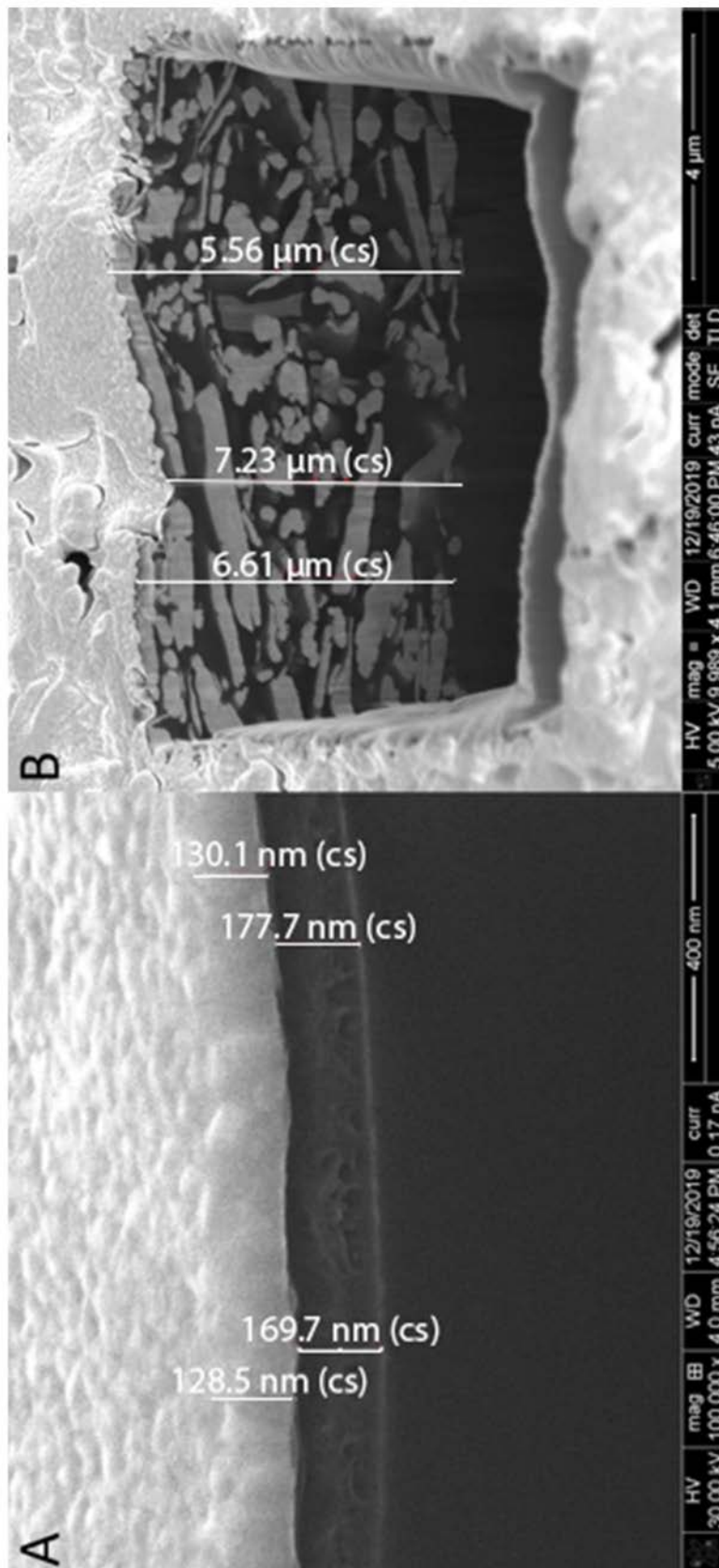


图 2

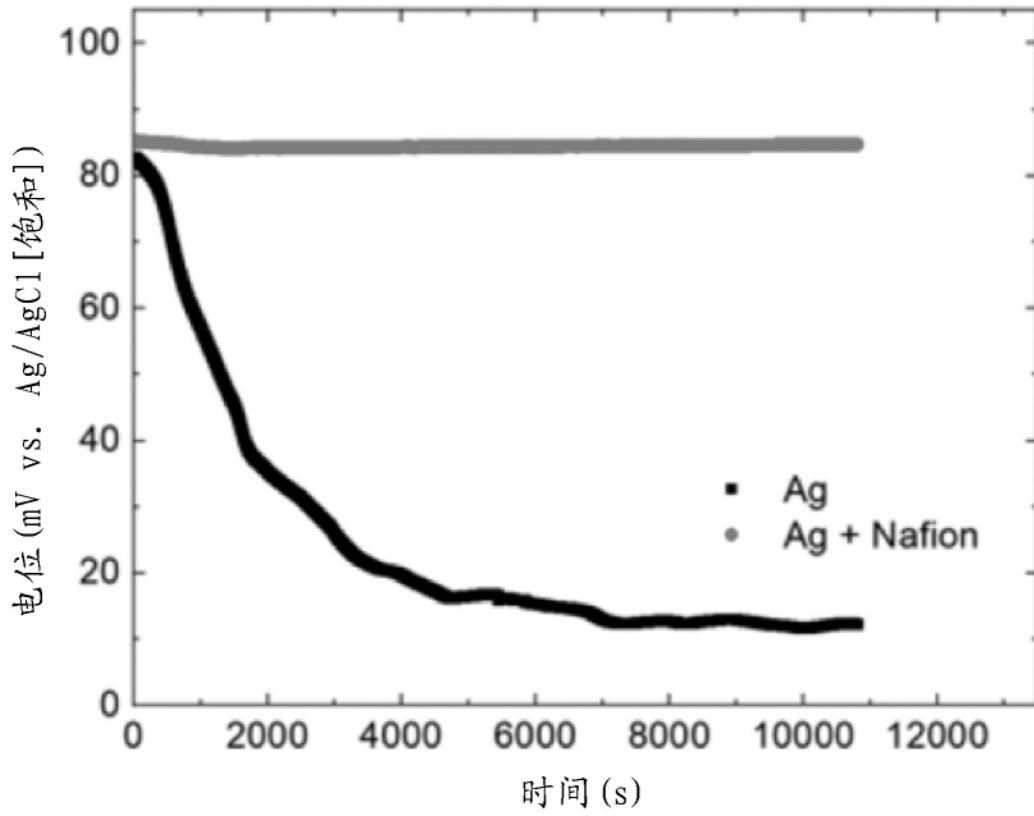


图 3A

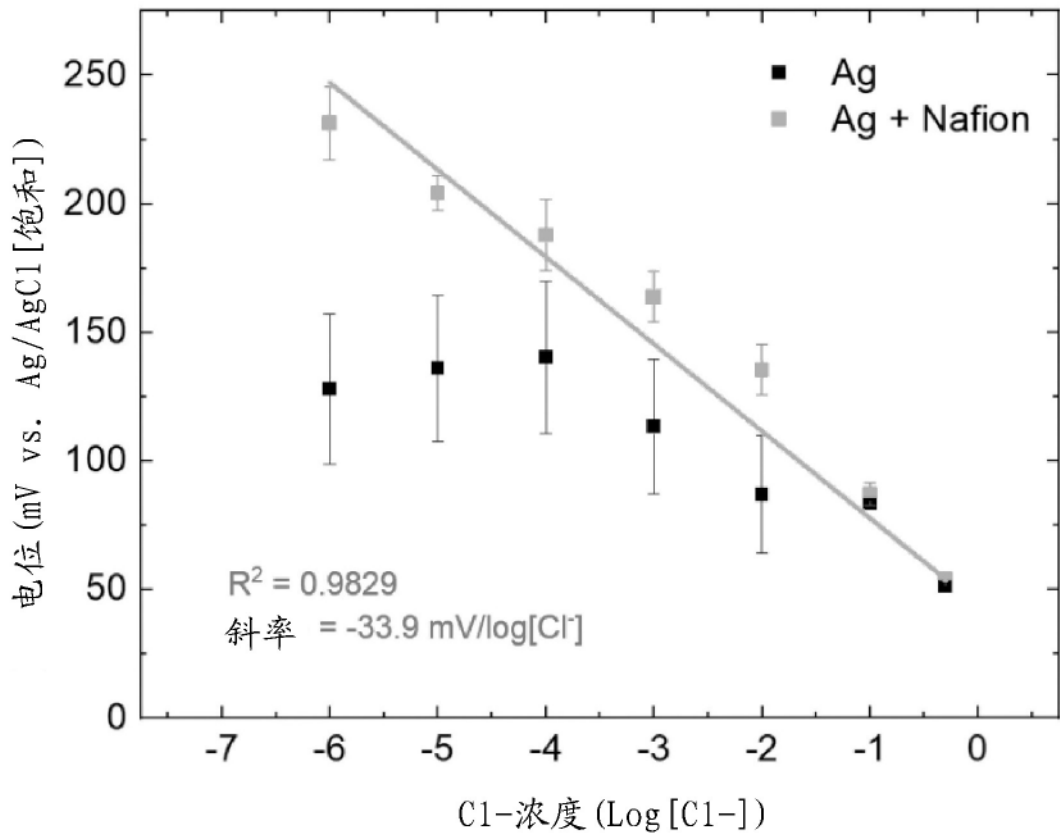


图 3B

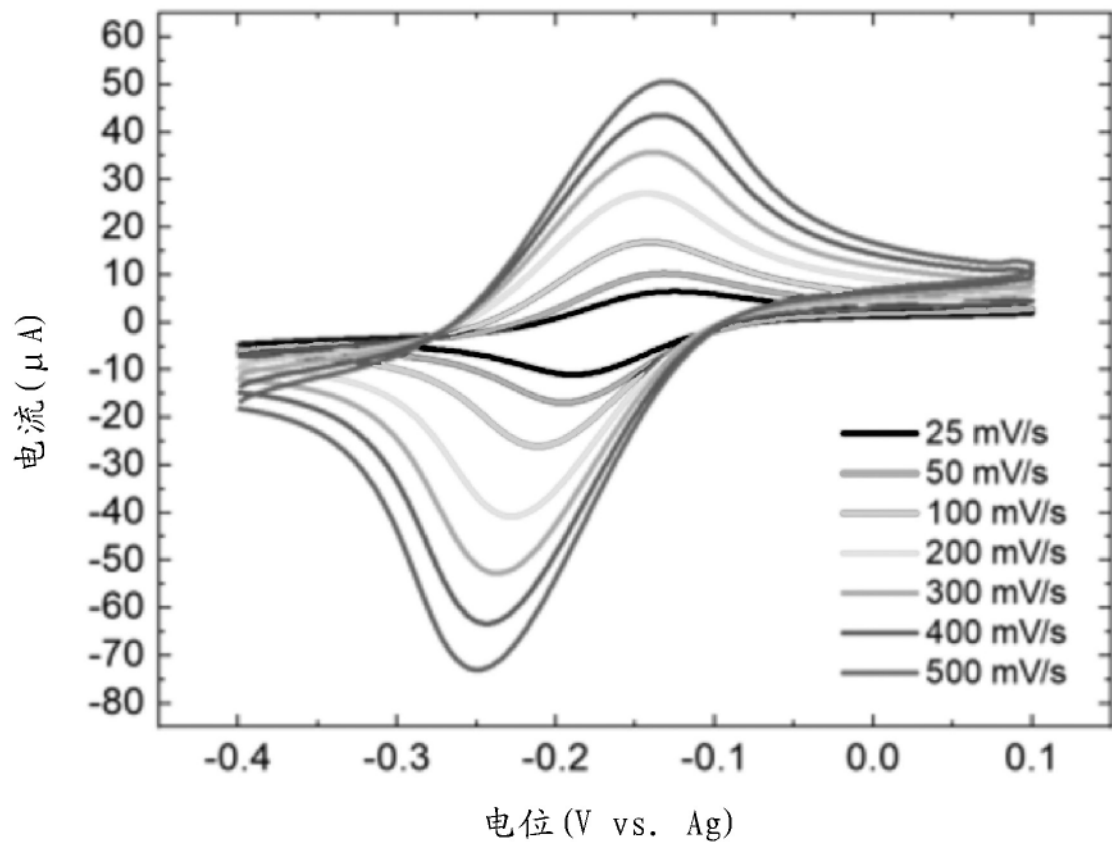


图 3C

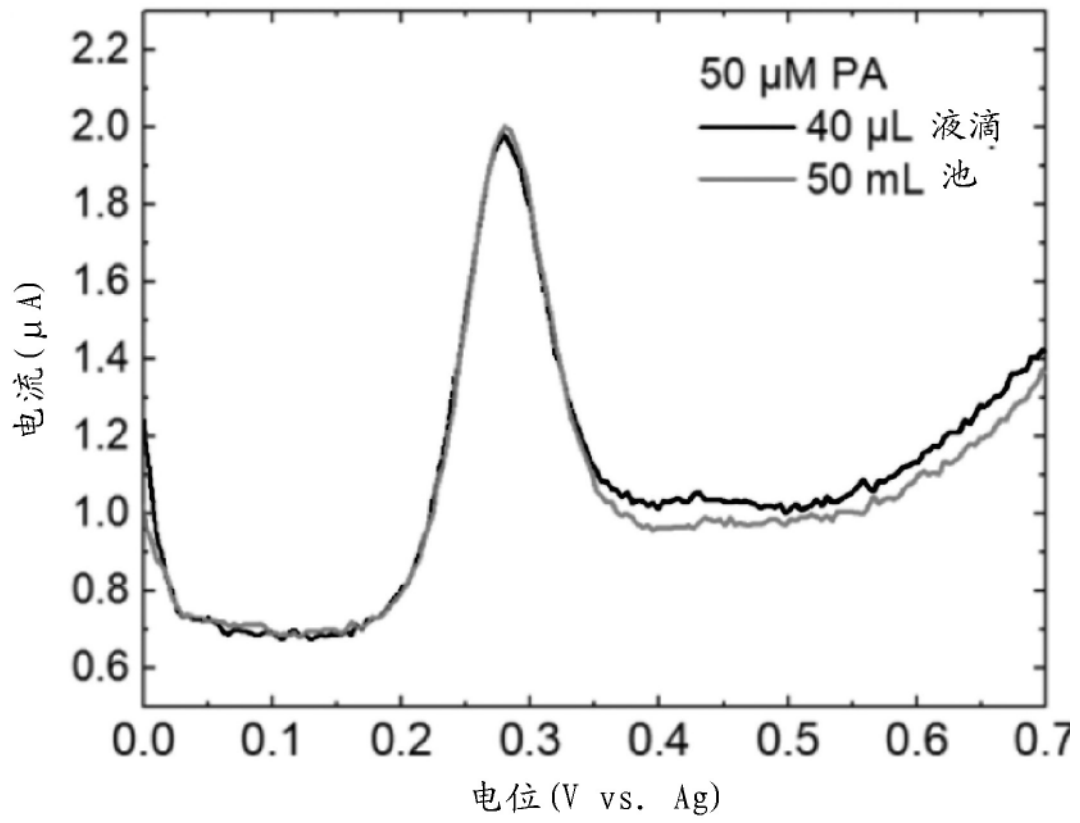


图 4A

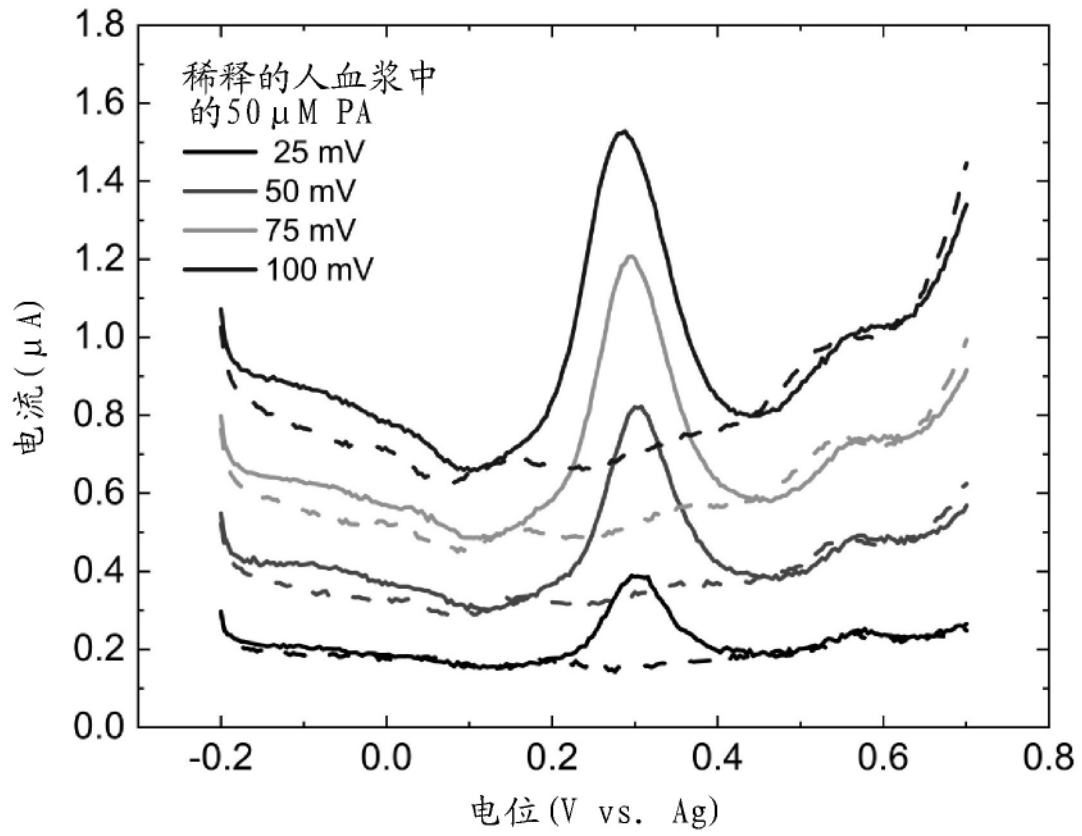


图 4B

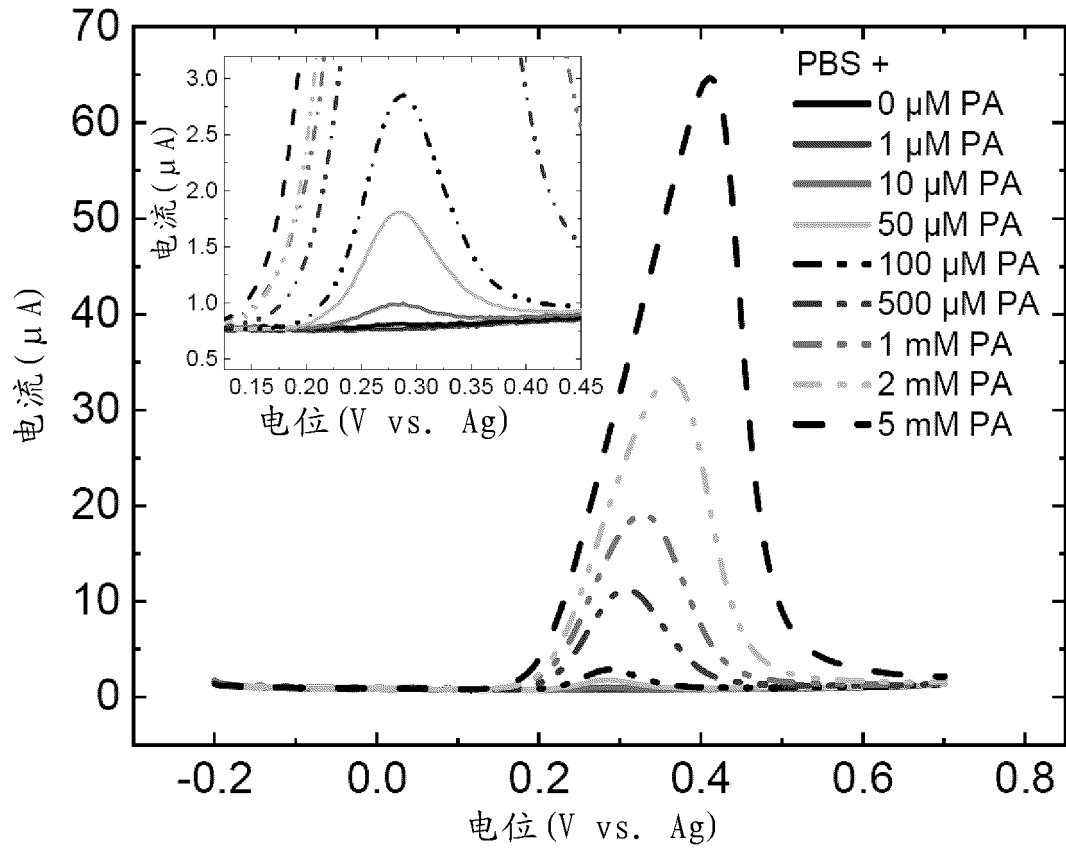


图 5A

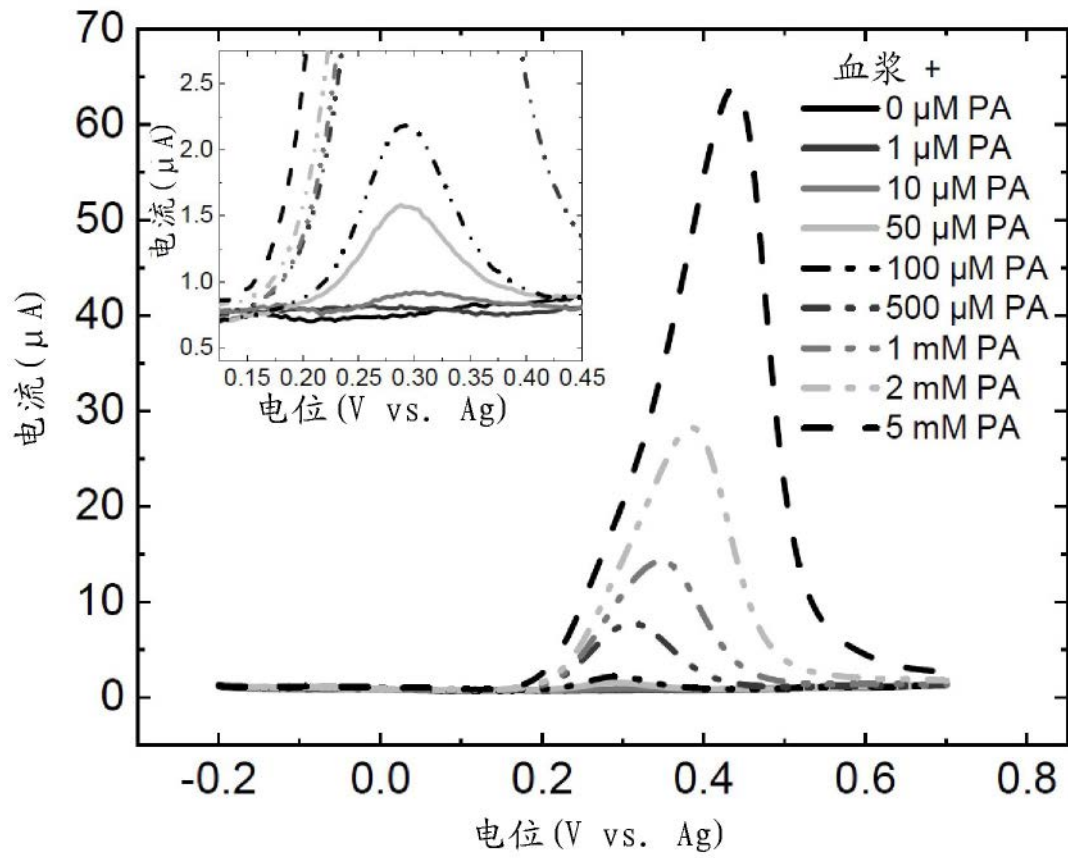


图 5B

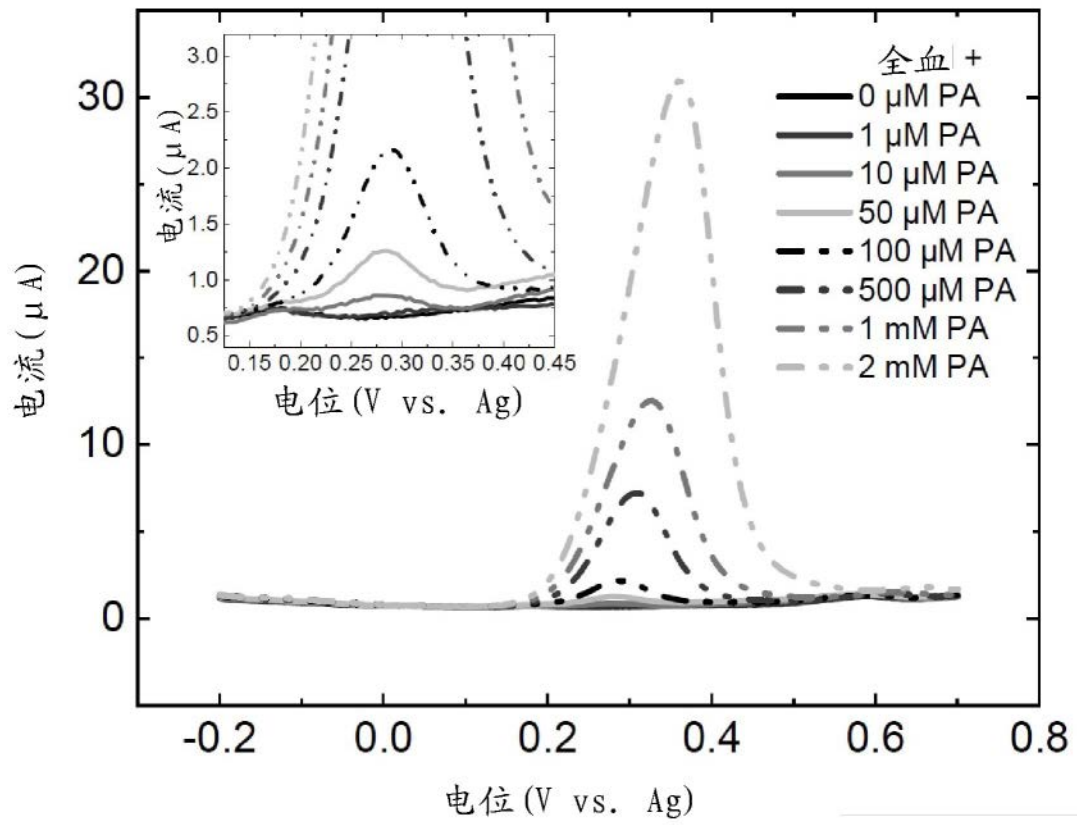


图 5C

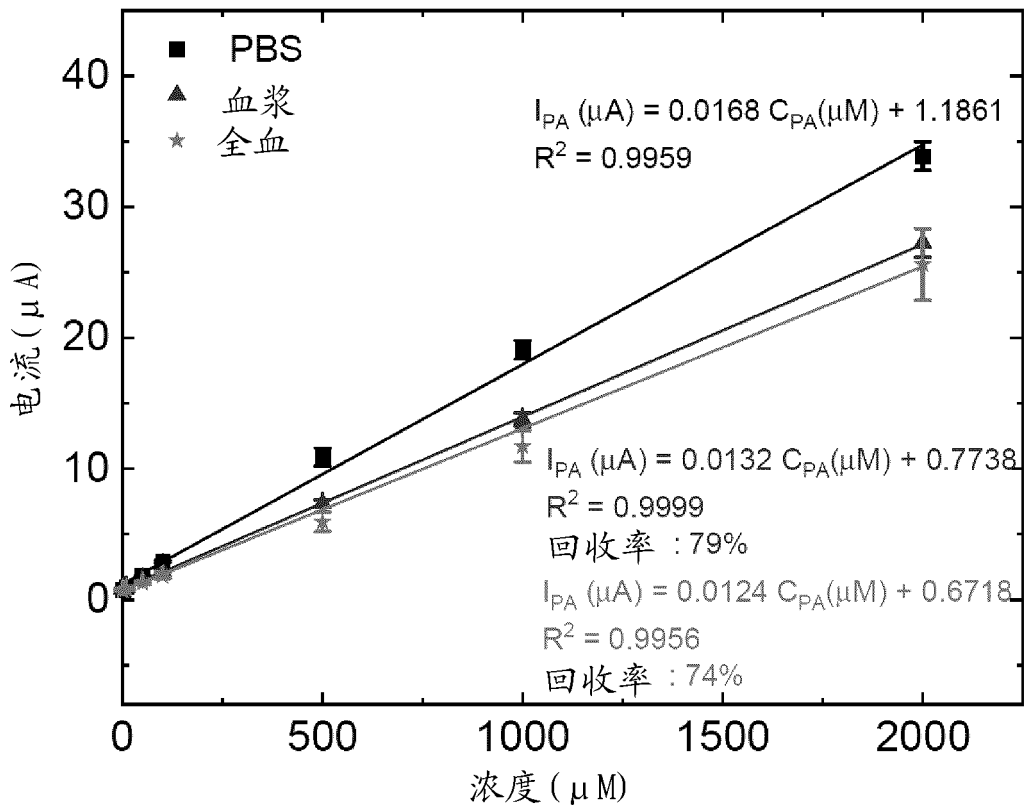


图 5D

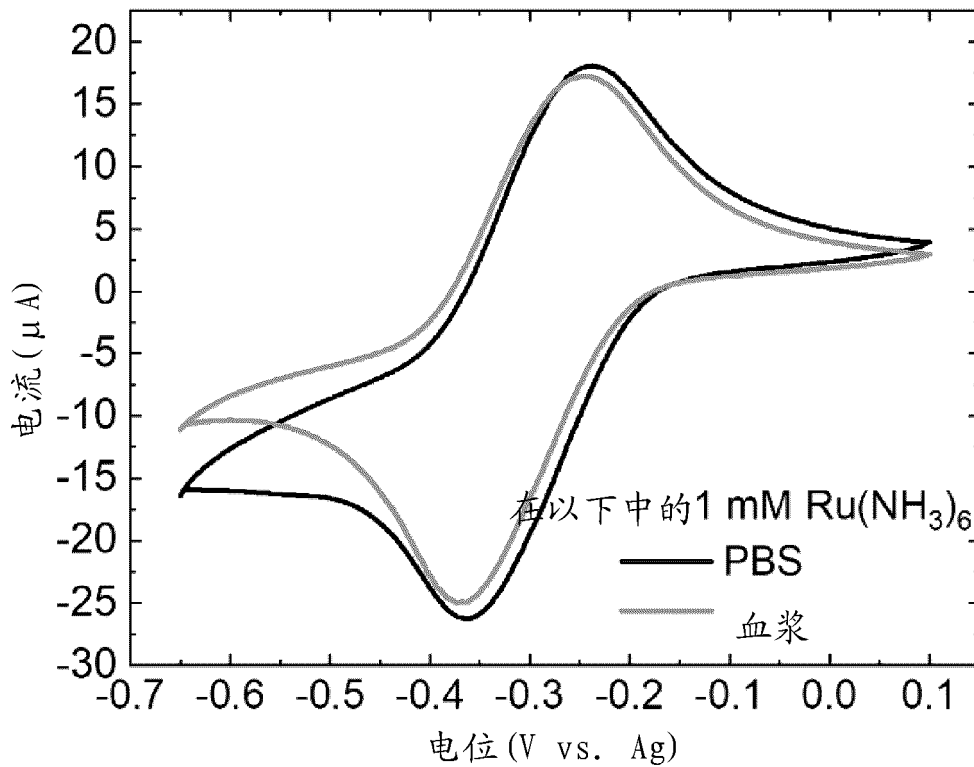


图 6A

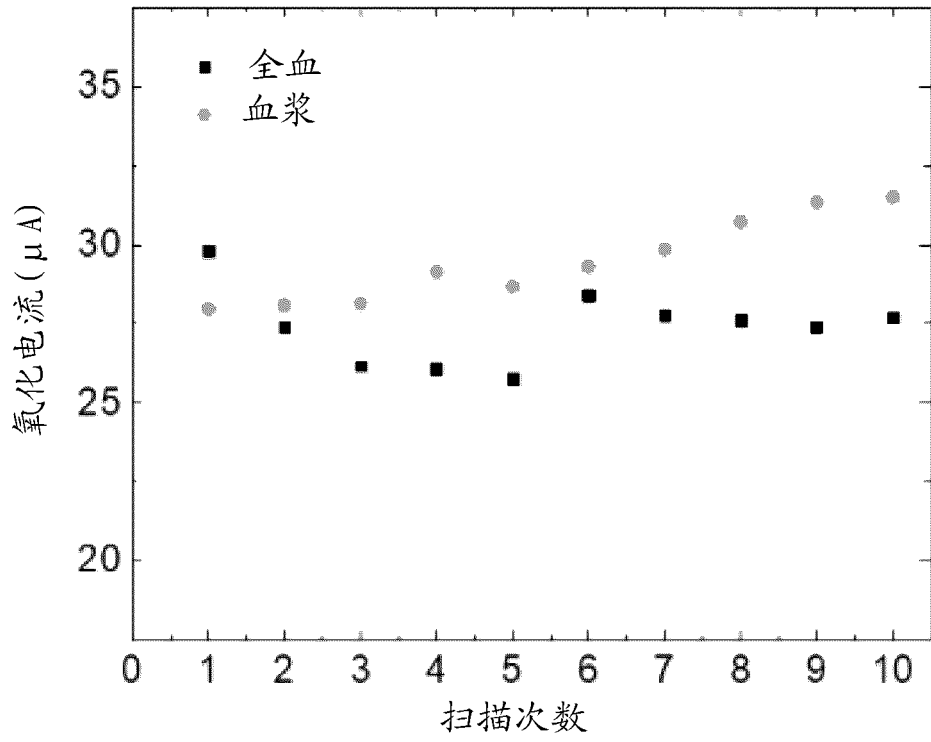


图 6B

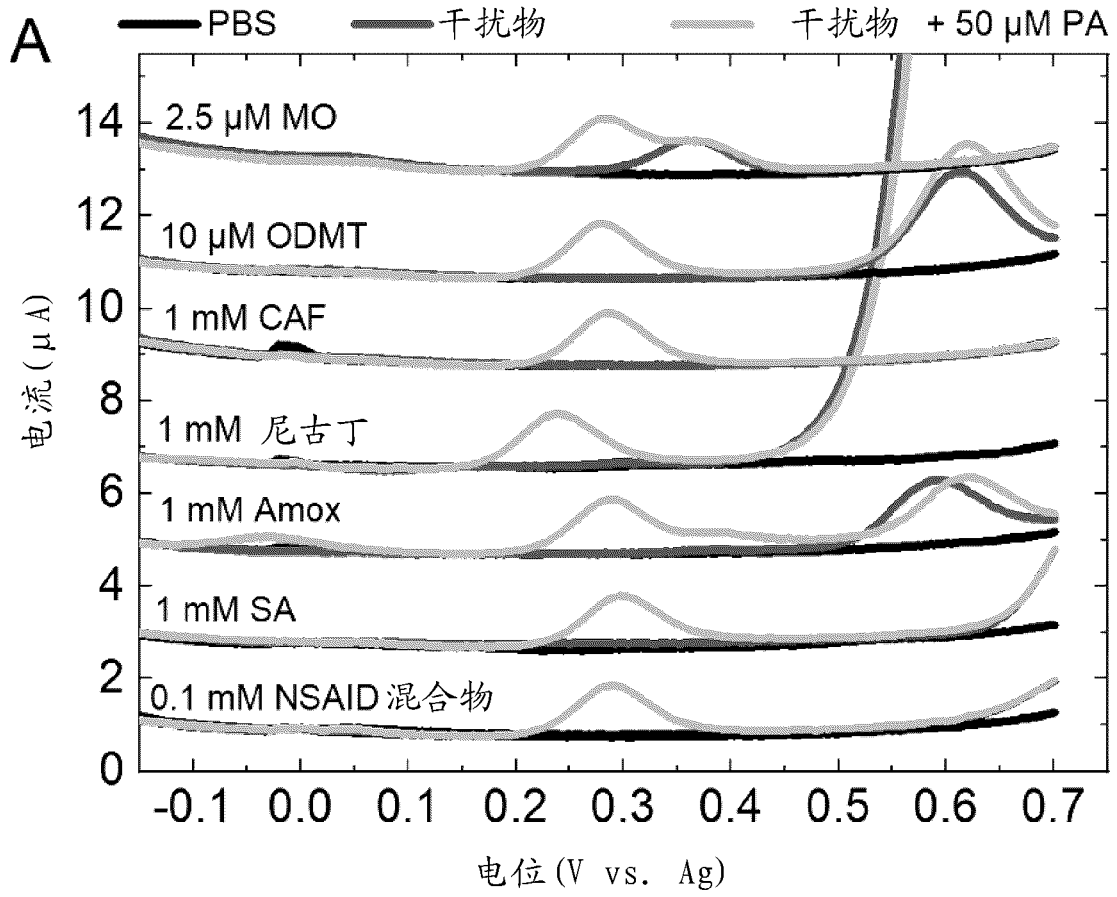


图 7A

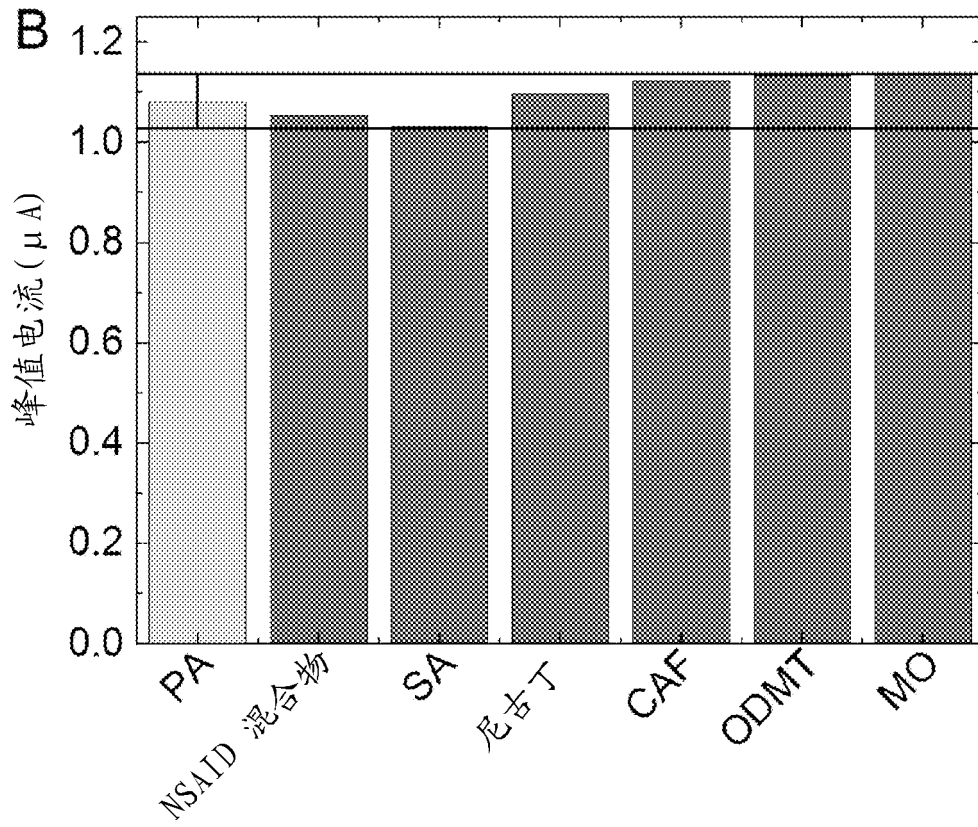


图 7B