

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

274 231

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 27/30

(21) PV 7992-88.0

(22) Přihlášeno 05 12 88

(40) Zveřejněno 12 09 90

(45) Vydáno 08 07 92

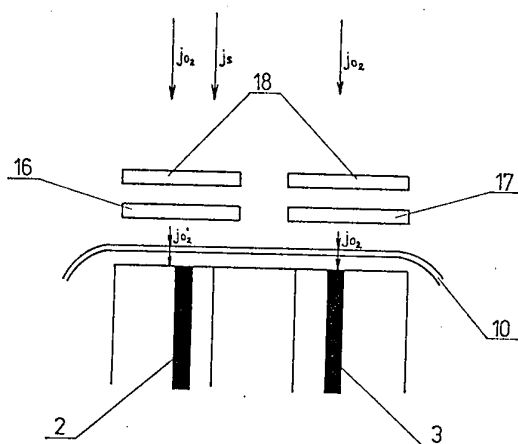
(75) Autor vynálezu

KREJČÍ JAN, RNDr., TIŠNOV,
MACHOLÁN LUMÍR doc.RNDr.CSc., BRNO

(54)

Regenerovatelný enzymový senzor s vyměnitelným membránovým systémem

(57) Účelem je vytvořit takové konstrukční uspořádání enzymového senzoru, které by umožnilo záměnou enzymu v enzymové membráně membránového systému detekci glukózy, laktátu a dalších látek. Tohoto se dosahuje enzymovým senzorem, jehož podstata spočívá v tom, že je tvořen tělem (3) z korundové keramiky ve tvaru válce, které je zakončeno komolým kuželem (12), v němž je vytvořen zásobník (10), ve tvaru válce s podstavou mezikruží, uvnitř kterého je uspořádána jedna proudová elektroda (5) tvořená porézním kovem (22) a jedna elektrolyt (7) například chlorid draselný, přičemž v řezu rovnoběžném se základnou má první keramická vrstva (17) zásobníku (10) tvar mezikruží, v němž je uspořádána nejméně jedna měřicí elektroda (6) a druhá keramická vrstva (18) zásobníku (10) má tvar válce, ve kterém je uspořádána referenční elektroda (4), a dále je tělo (3) překryto krycí membránou (9) a spojeno s krytem (2) senzoru, na kterém je upevněn výměnný membránový systém tvořený držákem (1) opatřeným nejméně jedním otvorem (14), v němž jsou uspořádány alespoň jedna enzymová membrána (8), alespoň jedna ochranná membrána (11) a alespoň jedna řídicí membrána (20).



Vynález se týká regenerovatelného enzymového senzoru s vyměnitelným membránovým systémem.

Účelem vynálezu je nalézt taková konstrukční uspořádání enzymového senzoru, která by umožňovala záměnou enzymu reakční membráně membránového systému detekci glukózy, laktátu i dalších látek, přičemž by bylo dlouhodobě použitelné, nebo snadno regenerovatelné nebo snadno výměnné.

Enzymový senzor je složen ze dvou základních částí:

- 1) Membránového systému
- 2) Elektrodového systému.

Jednotlivé části lze definovat:

Elektrodový systém - soubor alespoň dvou elektrod sestavený do jediného funkčního celku a opatřený spojovacími vodiči, výstupním kabelem a výstupním konektorem pro připojení k vyhodnocovací jednotce.

Elektroda - je část elektrodového systému, skládající se z vodiče s elektronovou vodivostí a (roztoku, nebo/a taveniny nebo/a pevného) elektrolytu.

Membránový systém - je jedna nebo soubor alespoň dvou na sebe přiléhajících membrán, které se liší svými charakteristikami a svým chemickým složením a které řídí přístup měřené látky k elektrodovému systému a v nichž popřípadě probíhají selektivní biochemické reakce, které umožňují detekci sledované látky.

Příklady uspořádání elektrodových systémů užívaných v elektrochemii a analytické chemii jsou uvedeny (například Linek V., Vacek, V., Sinkule, J. Dissolved Oxygen probes).

Elektrodové systémy jsou také připravovány mikroelektronickými technologiemi. Vlastnosti elektrod a elektrodových systémů jsou detailně teoreticky rozpracovány (například Linek, V., Vacek, V., Sinkule, J.: Dissolved Oxygen probes in W.C. Robinson (editor) Comprehensive Biotechnology vol. 3 kap. 22, Pergamon Press, Oxford 1984:

J. Koryta - K. Štulík: Iontově selektivní elektrody, Academia, Praha 1984; J. Veselý, D. Weiss, K. Štulík: Analýza iontově selektivními elektrodami, SNTL Praha 1979; J. Dvořák, J. Koryta: Elektrochemie, Academia Praha 1983; P. H. Rieger: Electrochemistry, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs 1987).

Membránové systémy jsou teoreticky dobře popsány, avšak mnohé membránové systémy pro detekci některých látek jsou nestabilní nebo málo selektivní. U některých činí problém imobilizace enzymu. Příkladem může být membránový systém analyzátoru glukózy firmy Yellow Springs Instrument, který se skládá z polykarbonátové membrány, imobilizovaného enzymu a celulózové membrány o průměru porů 8 nm. Jiným příkladem je membránový systém senzoru glukózy firmy Ames Miles, který se skládá ze dvou membrán z nichž jedna má průměr porů 0,6 nm a druhá 30 nm, přičemž mezi nimi je imobilizován enzym.

Hlavní funkce membránového systému (Baum G. and Weetall H. H.; Electrochemical Applications of Oxidoreductases. Methods in Enzymology, LVI part 6, 1979)

- 1) Difúzně limituje biochemicko-elektrochemický děj v elektrodovém systému
- 2) Snižuje efekty spojené s mícháním
- 3) Zabezpečuje, že reakční oblast má pevně a dobře definované geometrické uspořádání
- 4) Selektivně zabezpečuje definovaný tok látek do elektrodového systému
- 5) Ovlivňuje rychlost odezvy a linearitu senzoru
- 6) Umožňuje zachycení enzymu. Je vhodným nosičem imobilizovaných enzymů.
- 7) Zabezpečuje vysokou aktivitu enzymu v dobře definované oblasti.
- 8) Zabraňuje přístupu nežádoucích látek do elektrodového systému.

Konstrukce elektrodového systému je objasněna na příkladu konstrukce elektrodového systému pro detekci O_2 (Clarkův článek).

Materiál katody: nejlepším materiálem katody je stříbro. Má však podstatnou nevýhodu, že jej nelze zatavit do skla, což je obvykle nutné, aby byl zabezpečen dostatečně vysoký izolační odpor. Další materiály, které se používají na výrobu katody jsou zlato, platina a

uhlík. Elektrody z uhlíku, který je speciálně tavení potenciálu obou platinových měřicích elektrod v důsledku konečné vodivosti elektrolytu stejně nebo se málo liší.

Elektroda obsahuje potenciostat, který je realizován pomocnou elektrodou, který zabezpečuje, že referenční elektroda není proudově zatížena.

Elektroda obsahuje dostatečně velký zásobník elektrolytu, takže změny jeho složení pH jsou malé a zároveň obě měřicí elektrody jsou na čelní ploše ve styku s elektrolytem stejného složení. Elektroda je vytvořena jako masivní celek z křemenného skla, ve kterém nikde nejsou použity látky, které by mohly způsobit nežádoucí svody mezi jednotlivými elektrodami (měřicí, referenční a pomocnou).

Čelní plocha je leštěna, takže díky dobrému spojení platiny, zlata a skla probíhá elektrochemická reakce pouze na čelní ploše elektrody.

Výhodné je i to, že membránový systém není integrován v elektrodě, ale naopak je k ní volně přiložitelný, čímž je zabezpečena univerzálnost měření. Enzymovou membránu lze připravit podle potřeby vždy pro určitý druh měření, například pro měření fenolu ve vodě apod.

Další výhodou symetrické elektrody je, že omezuje některé nelinearity, a to tím způsobem, že děje způsobující nelinearity současně na obou elektrodách se projeví méně významně v rozdílu výstupních signálů měřicích elektrod (například vliv nečistot). Podobně symetrická elektroda podle vynálezu zlepšuje krátkodobou i dlouhodobou stabilitu, a to tím způsobem, že některé příčiny krátkodobé i dlouhodobé nestability se kompenzují symetrickým uspořádáním měřicích elektrod (například pohyb vrstvy elektrolytu, změna pH elektrolytu apod.). Další výhodou uspořádání podle vynálezu je kompenzace zbytkového proudu, která je dosahována stejnou velikostí plochy měřicích elektrod, a tím, že v průběhu výroby jsou elektrody vyráběny a opracovávány společně. Dále je výhodou uspořádání elektrody také to, že částečně omezuje některé negativní vlivy působící hysterezi elektrody a ovlivňují dynamickou charakteristiku elektrody. Zejména to jsou vlivy geometrického uspořádání membránového systému, tvaru zásobníku elektrolytu a velikosti filmu elektrolytu.

Další výhodou symetrické elektrody je, že částečně omezuje vlivy teploty a tlaku, a to tím, že rozdíl mezi výstupními signály měřicích elektrod je méně závislý na teplotě a tlaku, než výstup jednoduché kyslíkové elektrody doplněné enzymovou membránou. Další výhody uspořádání symetrické elektrody pro enzymová měření vyplývají z její konstrukce a funkce.

Na připojených výkresech je znázorněna symetrická elektroda, kde na obr. 1 je schematicky znázorněna jedna z variant její konstrukce v řezu, na obr. 2 je schematicky znázorněn jeden z možných příkladů uspořádání membránového systému s přiloženými enzymovými a řídicími membránami a na obr. 3 je znázorněn jeden z možných příkladů uspořádání s nanesenou enzymovou membránou.

Symetrická elektroda pro enzymová měření je tvořena tělem 4 symetrické elektrody, ve kterém jsou uspořádány první měřicí platinová nebo zlatá elektroda 2 a druhá měřicí platinová nebo zlatá elektroda 3, které jsou propojeny s přívodními drátky 12, například vyrobené z platiny, které jsou také uspořádány v těle 4 symetrické elektrody. Přitom v těle 4 symetrické elektrody je dále vytvořen zásobník 14 elektrolytu 5. V jeho ose 15 je symetricky vůči první platinové nebo zlaté měřicí elektrodě 2 i druhé platinové nebo zlaté měřicí elektrodě 3 umístěna referenční argentchloridová elektroda 6, okolo níž je uspořádána skleněná trubička 13, která je integrální součástí těla 4 symetrické elektrody, a na které je navinuta pomocná elektroda 7 vyrobená ze stříbra. Přívodní drátky 12 těchto referenčních argentchloridových elektrod 6 a pomocné elektrody 7 jsou také uspořádány v těle 4 symetrické elektrody. Přes leštěnou čelní plochu 1 těla 4 symetrické elektrody, jejíž drsnost je od 0,1 do 5 μm , je převlečena krycí membrána 10, která je upevněna přídržným kroužkem 11 k tělu 4 symetrické elektrody. Přitom tělo 4 symetrické elektrody je upevněno v držáku 8, z plastické hmoty například silonu, ve kterém je uspořádán přívodní kabel 9 propojený s přívodním drátkem 12 první měřicí platinové nebo zlaté elektrody 2, s přívodním drátkem 12 druhé měřicí platinové nebo zlaté elektrody 3, dále s přívodním drátkem 12 referenční argentchloridové elektro-

dy 6 a s přívodním drátkem 12 pomocné elektrody 7.

Funkce symetrické elektrody podle vynálezu je následující:

Hlavní funkcí symetrické elektrody je současné měření hladiny kyslíku a jeho úbytku v důsledku enzymové reakce v měřeném roztoku, a to takovým způsobem, že v nepřítomnosti detekované látky je rozdíl proudů tekoucích první platinovou nebo zlatou měřicí elektrodou 2 a druhou platinovou nebo zlatou elektrodou 3 dlouhodobě roven nule. Funkce je zabezpečena tak, že na symetricky uspořádanou první měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 2 je nanесena nebo upevněna enzymová membrána 16 například glukozooxidáza imobilizovaná v glutardehydu a na druhou měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 3 je nanесena nebo upevněna referenční membrána 17, která je vyrobena stejnou technologií jako enzymová membrána 16, avšak neobsahuje enzym (například glutardehydová membrána, byla-li enzymová membrána 16 vytvořena imobilizací v glutardehydu), a které jsou překryty řídicí membránou 18. K první měřicí platinové nebo zlaté elektrodě 2 i druhé měřicí platinové nebo zlaté elektrodě 3 přichází z objemu vzorku stejný tok kyslíku a stejný tok substrátu, který má být detekován. Výsledný tok kyslíku, který je detekován je pro první měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 2 i druhou měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 3 určen vlastnostmi krycí membrány 10, kinetikou elektrochemické reakce, vlastnostmi první měřicí platinové nebo zlaté elektrody 2 i druhé měřicí platinové nebo zlaté elektrody 3. Tyto vlivy jsou stejné jak pro první měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 2, tak i pro druhou měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 3 a proto se neuplatní v rozdílu proudu mezi těmito elektrodami. Rozdíl proudu mezi první měřicí platinovou nebo zlatou elektrodou 2 a druhou měřicí platinovou nebo zlatou elektrodou 3, který je úměrný rozdílu toků kyslíku membránovým systémem s enzymem a bez enzymu bude závislý pouze na množství kyslíku spotřebovaného v enzymové reakci. Množství kyslíku spotřebované v enzymové reakci je úměrné toku substrátu k enzymové membráně 16, který je úměrný koncentraci substrátu v objemu vzorku. Měřením symetrickou enzymovou elektrodou podle vynálezu se budou kompenzovat vlivy teploty, nehomogenity difuzivity krycí membrány 10 a další vlivy vzhledem k toku kyslíku. (V reálném případě tyto vlivy nebudou kompenzovány úplně.) Výstupní signál symetrické elektrody bude tedy hlavní měrou určen chemickou reakcí mezi substrátem a enzymem a difuzními vlastnostmi membránového systému pro substrát.

Toto diferenciální uspořádání tedy omezí:

Nelinearity způsobené postupnou adsorbci kyslíku nebo fyzikální nebo chemickou adsorbci dalších látek na povrchu katody, a to tím způsobem, že adsorbce probíhá ve stejných podmínkách jak pro první měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 2, tak i pro druhou měřicí platinovou nebo zlatou elektrodu 3 a proto se kompenzuje. Změní se pouze cejchovní charakteristika elektrody.

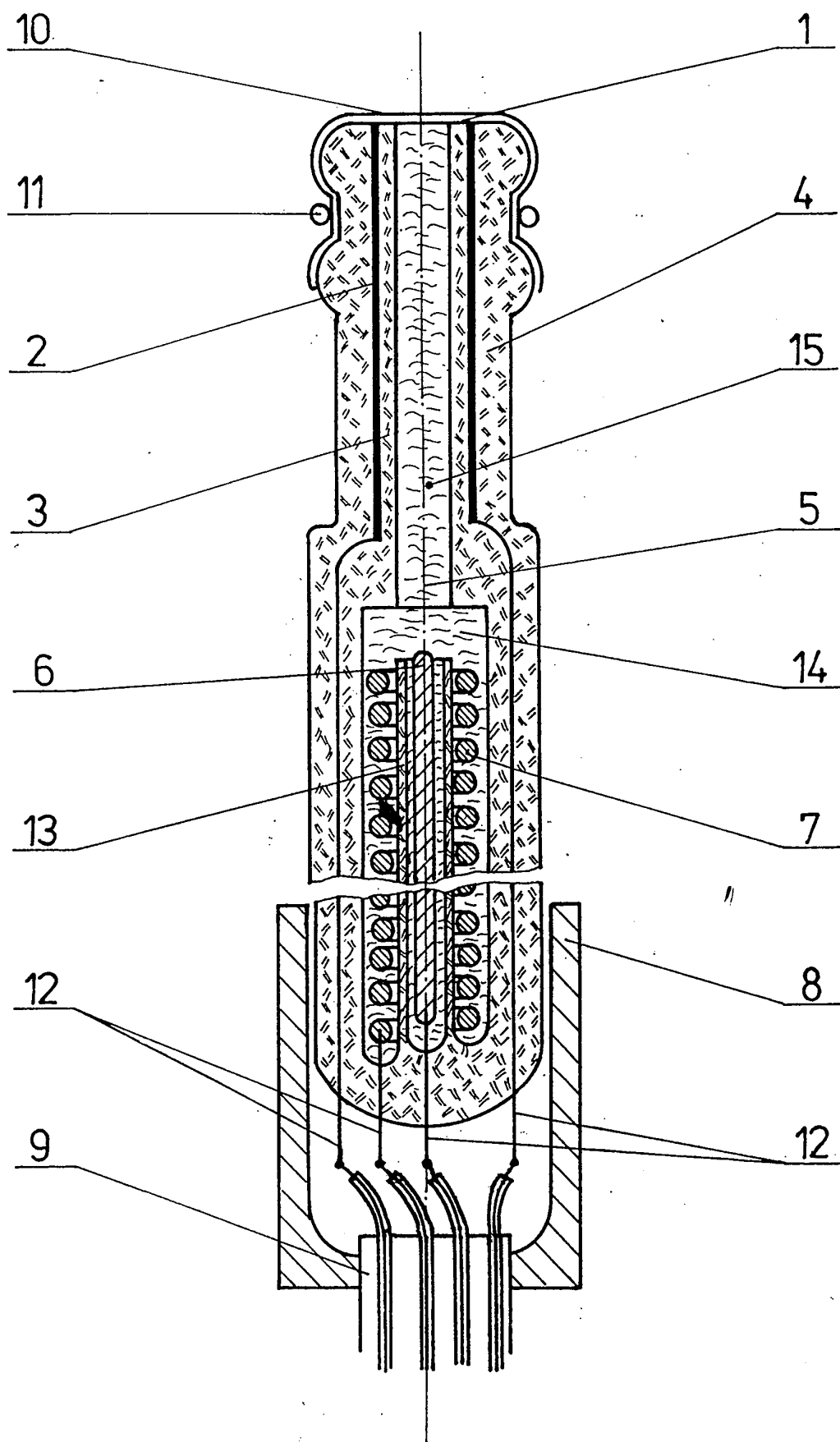
Nelinearity způsobené změnami stavu referenční argentchloridové elektrody 6 (anoda), a to tím způsobem, že referenční argentchloridová elektroda 6 (anoda) je umístěna symetricky a proto jsou první měřicí platinová nebo zlatá elektroda 2 i druhá měřicí platinová nebo zlatá elektroda 3 ovlivňovány stejně a proto bude tento typ nelinearity zmenšen. Symetrickým uspořádáním první měřicí platinové nebo zlaté elektrody 2 i druhé měřicí platinové nebo zlaté elektrody 3 jsou zmenšeny vlivy krátkodobé i dlouhodobé nestability, protože její zdroj je působí stejně na obě tyto měřicí elektrody. Podobně jsou i zmenšeny vlivy zbytkového proudu opět v důsledku symetrie první měřicí platinové nebo zlaté elektrody 2 i druhé měřicí platinové nebo zlaté elektrody 3. Symetrické uspořádání dále zmenšuje vlivy teploty a tlaku na činnost symetrické elektrody a zlepšuje dynamickou charakteristiku elektrody.

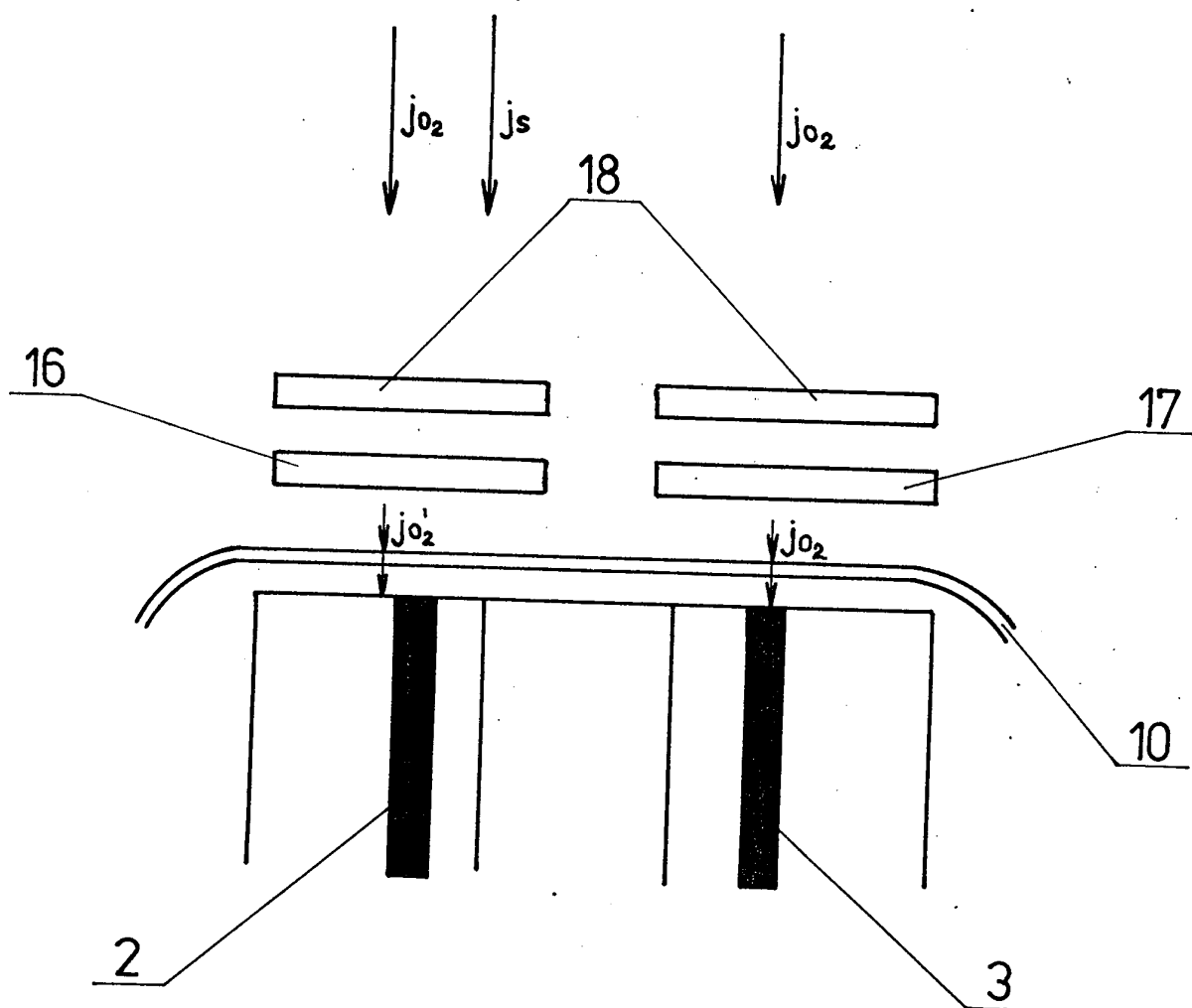
Použití symetrické elektrody je široké. Je ji možno použít v biochemických analýzách při výrobě očkovacích látek a sér, v chemické a biochemické technologii v mikrobiologii, humánním i veterinárním lékařství, v řízení biotransformací a fermentačních procesů.

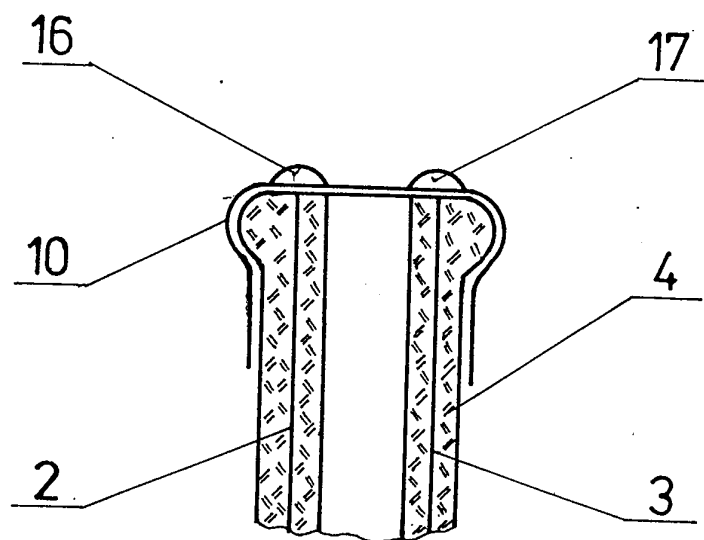
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Symetrická elektroda určená pro enzymatická měření, vyznačující se tím, že je tvořena skleněným tělem (4) symetrické elektrody, ve kterém jsou uspořádány jednak první měřicí kovová elektroda (2) a jednak druhá měřicí kovová elektroda (3) z nichž každá je spojena s přívodním drátkem (12), přitom v těle (4) symetrické elektrody je vytvořen zásobník (14) elektrolytu (5), v jehož ose (15) je symetricky vůči první měřicí elektrodě (2) i druhé měřicí elektrodě (3) umístěna referenční argentchloridová elektroda (6), okolo které je uspořádána skleněná trubička (13), která je integrální součástí těla (4) elektrody, a na které je upevněna pomocná elektroda (7), přičemž přes leštěnou čelní plochu (1) těla (4) symetrické elektrody je převlečena krycí membrána (10), která je upevněna přídržným kroužkem (11), zatímco tělo (4) symetrické elektrody je upevněno v držáku (8), ve kterém je uspořádán kabel (9), který je propojen s přívodními drátky (12) jednotlivých elektrod.
2. Symetrická elektroda podle bodu 1, vyznačující se tím, že první měřicí kovová elektroda (2) i druhá měřicí kovová elektroda (3) je tvořena ušlechtilým kovem platinou nebo zlatem.
3. Symetrická elektroda podle bodu 1, vyznačující se tím, že pomocná elektroda (7) je tvořena kovem, stříbrem nebo paladiem a nebo platinou.
4. Symetrická elektroda, podle bodu 1, vyznačující se tím, že leštěná čelní plocha (1) těla (4) symetrické elektrody má drsnost od 0,1 do 5 μm .
5. Symetrická elektroda, podle bodu 1, vyznačující se tím, že tělo (4) symetrické elektrody je tvořeno křemenným sklem, jehož koeficient délkové roztažnosti je stejný jako koeficient délkové roztažnosti materiálu první měřicí elektrody (2) a druhé měřicí elektrody (3).

3 výkresy







Obz. 31