SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

3165-92

(22) Dátum podania: 19.10.92

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 91 02200

(32) Dátum priority: 21.02.91

(33) Krajina priority: FR

(43) Dátum zverejnenia: 12.04.95

(86) Číslo PCT: PCT/CH92/00034, 19.02.92

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:

G 01 N 27/327
G 01 N 33/483
33/66
A 61 B 5/14

(71) Prihlasovateľ: ASULAB S.A., Bienne, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Grätzel Michael, St. Sulpice, CH;
Fraser David, Vevey, CH;
Zakeeruddin Shaik Mohammed, Renens, CH;
Randin Jean-Paul, Cortaillod, CH;
Frenkel Erik Jan, Neuchatel, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Senzor na meranie množstva zložky v roztoku**

(57) Anotácia:
Je tvorený najmenej jednou meracou elektródou (20) a jednou referenčnou elektródou (22), ktoré sú navzájom izolované a obe sú v kontakte s týmto roztokom, viď napr. testovaná kvapka (40). Pritom tieto elektródy majú elektrické kontakty (26, 34) pre spojenie s prístrojom (2) na meranie obsahu zložky v roztoku, ktorý má taktiež kontakty (12, 14), ďalej vodivú spojku (28, 36) vo forme pásika (24, 32) a zberač prúdu (30, 37). Zberač prúdu (37) meracej elektródy je potiahnutý zmesou (38) obsahujúcou najmenej jeden oxidačno-redukčný enzým špecifický pre danú zložku a najmenej jeden mediátor na prevod elektrónov medzi enzýmom a zberačom prúdu, pričom tento mediátor je vybraný zo skupiny komplexov prechodných kovov s najmenej jedným bipyridínovým, tripyridínovým alebo fenantrolínovým ligandom, ktorý je substituovaný najmenej jednou elektrónovou donorovou skupinou. Koncová časť (19) senzora (6) je pripojená na koncovú časť (18) jednotky (4) na spracovanie signálu s displejom (16) pomocou dutiny (10).

PV 3165-92

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
Přil.
19. X. 92
Došlo
05852 7
Čj.

Senzor pro měření množství složky v roztoku.

Oblast techniky

Vynález se týká senzoru pro měření množství složky v roztoku, který je vytvořen takovým způsobem, aby jej bylo možno použít jako součást ampérometrického přístroje pro měření koncentrace uvedené složky v roztoku. Tento senzor je zejména vhodný pro analyzování množství glukózy.

Dosavadní stav techniky

V současné době je mnoho pacientů, kteří trpí cukrovkou, nuceno si častokrát měřit úroveň glukózy v krvi, neboli zjišťovat glykémii. V případě, že tito pacienti zjistí stav hyperglykémie, potom si musí ihned vzít lék za účelem upravení této hladiny glukózy v krvi. Pro ulehčení denních starostí těchto pacientů byla vyvinuta celá řada miniaturních přístrojů pro měření hladiny glukózy v krvi, které se běžně vyskytují na trhu a které může použít i laik.

Rovněž byly vyvinuty metody implantování insulinových čerpadel diabetikům. Tato insulinová čerpadla mohou být doplněna přístroji pro měření hladiny glukózy, které je možno rovněž implantovat, a které fungují tak, že v závislosti na zjištěné úrovni glykémie dodávají informaci uvedenému insulinovému čerpadlu, které se potom případně uvede do činnosti.

Ve většině těchto přístrojů pro měření glykémie se používá enzymu specifického pro glukózu, to znamená

glukózooxidázy (GOD).

Z přiloženého obrázku č. 1 je patrné, že glukózooxidáza (GOD) je flavoprotein (který je možno získat například z plísní), který katalyzuje oxidaci glukózy, v tomto případě glukózy obsažené v krvi, na glukonolakton, za vzniku peroxid vodíku H_2O_2, přičemž tato oxidace probíhá v důsledku přítomnosti kyslíku O_2, který je přítomen v testovaném roztoku, v tomto případě v krvi.

Tento enzym (GOD) a kyslík jsou proto často využívány v přístrojích pro měření glukózy, ve kterých je tato oxidace glukózy zjišťována elektrickým nebo optickým snímačem.

Podobným způsobem je možno uvést, že tento enzym (GOD) a kyslík jsou často používány v ampérometrických přístrojích, přičemž jejich použití je popisováno v literatuře.

Tyto ampérometrické přístroje sestávají na jedné straně z měřící jednotky, která obsahuje přinejmenším dva elektrické kontakty připojené na ampérmetr, a zobrazovací jednotky (displej), a na druhé straně ze senzoru, který může být pro jednoúčelové použití, a který je možno připojit na tyto výše uvedené elektrické kontakty. Tento senzor je tvořen přinejmenším dvěma elektrodami, to znamená referenční elektrodou a měřící elektrodou. Měřící elektroda je tvořena kovovým vodičem povlečeným enzymem specifickým pro daný produkt, který se má určovat.

Na přiloženém obrázku č. 2 jsou ilustrovány chemické reakce, které probíhají na povrchu této měřící elektrody. V případě, že roztok, který se má testovat, se uvede do

kontaktu s měřící elektrodou, potom produkt, který se testuje (v tomto případě glukóza), reaguje s přítomným enzymem (v tomto případě s oxidovanou formou GOD), který je uložen na elektrodě, za vzniku glukonolaktonu, přičemž GOD přechází do redukovaného stavu [$GOD(H_2)_{(red)}$]. Tato redukovaná forma GOD potom reaguje s kyslíkem O_2, který přechází do redukovaného stavu H_2O_2 za vzniku dvou elektronů e^-, které se potom vedou směrem k elektrickému vodiči C, jehož potenciál je pevně nastaven, přičemž v tomto případě se tento potenciál pohybuje v oblasti 650 mV. Tato skutečnost, že je nutno pracovat při vyšších hodnotách potenciálu, způsobuje další nepříznivé problémy. Kyslík takto hraje roli mediátoru, neboť pomocí něho je možno uskutečňovat převod elektronů. Tento převod elektronů, který je přímo úměrný množství glukózy přítomné v roztoku, který je určen k testování, se potom měří ampérmetrem, přičemž množství glukózy přítomné v tomto testovaném roztoku se takto zobrazí na zobrazovací jednotce (displej) měřícího přístroje.

Další výzkumy v této oblasti ukázaly, že tyto přístroje, ve kterých se používá jako mediátoru kyslíku,, mohou být nahraženy ampérometrickými přístroji, které používají nefyziologických, organických, anorganických nebo organokovových mediátorů. Z vyobrazení procesu na obr. 2 je totiž patrné, že jestliže se používají pro výše uvedené účely přístroje, ve kterých je jako mediátoru použito kyslíku, potom tyto přístroje není možno použít v roztocích, ve kterých je stechiometrický obsah kyslíku menší než koncentrace složky, která se má měřit. Jinak uvedeno v tomto případě dochází k situaci, kdy celkové množství složky, která se měří, sice je schopno zreagovat s oxidovaným enzymem za vzniku redukovaného enzymu, ale potom pouze část

z tohoto celkového množství redukovaného enzymu může zreagovat s přítomným kyslíkem, vzhledem k poměrnému menšímu obsahu tohoto kyslíku, který je k dispozici. Zbytek tohoto redukovaného enzymu nemůže zreagovat, takže množství elektronů převedených na vodič C je menší, než by mělo ve skutečnosti být.

Z výše uvedeného vyplývá, že v případě použití přístrojů výše uvedeného typu je uživatel omezen jednak koncentracemi kyslíku a složky, která se má měřit, a jednak je nutno použít membrány k omezení difúze uvedené složky. Tímto je vysvětlena skutečnost, proč byly snahy v tomto oboru zaměřeny na výrobu ampérometrických přístrojů, které používají jiné specifické mediátory jako náhradu za nevhodný kyslík.

Pokud se týče dosavadního stavu techniky, potom je možno uvést, že byla navržena celá řada těchto mediátorů, přičemž z literatury jsou známy jako mediátory pro výše uvedené účely například monomerní ferroceny [viz. například Cass, A.E.G. a kol. (1984), Anal. Chem. 56, str. 667 - 671; Degani, Y. a Heller, A. (1987), J. Phys. Chem. 91, str. 1285 - 1289], dále ferroceny roubované na polymer [viz. Foulds, N.C. a Lowe, C.R. (1988) Anal. Chem. 60, str. 2473 - 2478], dále vodivé soli pro přenos náboje [viz. Albery, W.J. Bartlett, P.N. a Craston, D.H. (1985) J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem. 194, str. 223 - 235], dále cyklamátové sloučeniny niklu [viz. Taniguchi, I., Matsushita, K., Okamoto, M. Collin, J-P a Sauvage, J-P (1990) J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem. 280, str. 221 - 226] a nakonec organické látky, jako jsou například chinony a benzochinony [viz. Kulys, J.J., a Cénas, N.K. (1983) Biochim. Biophys. Acta 744, 57].

Vzhledem k významné práci Hilla a kol. [viz. například Frew, J.E. a Hill, H.A.O. (1987) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B316, str. 95 - 106] vešla v obecnou známost skupina ferrocenových látek, přičemž tyto látky doznaly širokého použití jako mediátory pro GOD a ostatní flavoproteiny. Výsledkem této skutečnosti je to, že senzory běžně se vyskytující na trhu používají jako mediátoru právě těchto látek ze skupiny ferrocenů.

Naneštěstí ovšem mediátory, které jsou běžně k dispozici, mají málokdy požadované ideální vlastnosti, zejména pokud se týče elektrochemického potenciálu, který je přizpůsoben zvolenému enzymu, odpovídající rozpustnosti a dobré chemické stability vzhledem k působení světla, teploty a pH, a kromě toho projevují málokdy požadovanou rychlou reakci s vybraným enzymem.

Kromě toho je nutno uvést, že kyslík, který může být přítomen v testovaných roztocích, vstupuje do konkurenční reakce s některými mediátory, přičemž dochází k jevu, který je zobrazen na přiloženém obr. č. 3. Zatímco mediátor Med, který je přítomen na vodiči C, i nadále vstupuje do reakce s určitým podílem molekul GOD, je zároveň možné, aby určité množství přítomného kyslíku O_2 rovněž vstupovalo do reakce s ostatními molekulami redukované formy GOD za vzniku peroxidu vodíku H_2O_2, jak to bylo v předchozím textu popisováno v souvislosti s obrázkem č. 2. V případě, že se tato měření provádí za použití malého potenciálu mezi měřící elektrodou a referenční elektrodou, potom peroxid vodíku H_2O_2 zachycuje elektrony vznikající při reakci mezi GOD a kyslíkem a tyto elektrony se tudíž nedostanou k elektrodě. Vzhledem k tomu, že množství kyslíku v roztoku se může měnit, mění se rovněž množství zachycených elektronů

prostřednictvím peroxidu vodíku. Výsledkem tohoto děje je to, že zde neexistuje přímá úměra mezi množstvím elektronů, které se vedou směrem k elektrodě a množstvím glukózy v roztoku, který je určen k testování. Za těchto podmínek neposkytují výše uvedené senzory odpovídající spolehlivé výsledky.

Cílem uvedeného vynálezu je odstranit výše uvedené nevýhody metod a přístrojů podle dosavadního stavu techniky.

Podstata vynálezu

Podstata senzoru pro měření množství složky v roztoku podle uvedeného vynálezu spočívá v tom, že je tvořen :

- přinejmenším jednou měřící elektrodou a jednou referenční elektrodou, přičemž tyto elektrody jsou navzájem isolované a vytvořené tak, aby je bylo možno uvést do kontaktu s uvedeným roztokem, a dále tyto elektrody mají elektrické kontakty pro spojení s přístrojem na vyhodnocování získaného signálu pocházejícího od senzoru;
- a měřící elektroda je tvořena přinejmenším jedním sběračem proudu, který je elektricky připojený k jednomu z uvedených elektrických kontaktů a povlečený směsí obsahující přinejmenším jeden oxidačně-redukční enzym specifický pro uvedenou složku a přinejmenším jeden mediátor pro převod elektronů mezi uvedeným enzymem a uvedeným sběračem proudu.

Podle uvedeného vynálezu je mediátor zvolen ze skupiny komplexních sloučenin přechodného kovu s přinejmenším jedním bipyridinovým, tripyridinovým nebo fenantrolinovým ligandem, který je substituovaný přinejmenším jednou elektronovou

donorovou skupinou.

Výsledkem tohoto řešení podle uvedeného vynálezu je vzhledem k charakteristickým vlastnostem senzoru podle tohoto vynálezu a zejména vzhledem k použitým novým mediátorům, nová skupina senzorů, které mají široké rozmezí nízkých oxidačně-redukčních potenciálů, které zůstávají stabilní na vzduchu a které poskytují rychlejší odezvu v porovnání s jinými senzory podle dosavadního stavu techniky.

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude v dalším podrobně popsán pomocí příkladů provedení popisujících výhodná provedení senzoru podle vynálezu, ze kterých bude jasnější podstata tohoto řešení, přičemž tyto příklady jsou pouze ilustrativní aniž by jakýmkoliv způsobem omezovaly rozsah tohoto vynálezu. Podrobný popis uvedeného vynálezu bude v dalším proveden s pomocí přiložených obrázků, na kterých je znázorněno :

- na obr. 1 je ilustrováno štěpení glukózy v přítomnosti glukózooxidázy (GOD),
- na obr. 2 a 3 jsou znázorněny diagramy ilustrující různé chemické reakce probíhající na povrchu uvedených senzorů,
- na obr. 4 je půdorysný pohled na měřící zařízení vybavené senzorem podle uvedeného vynálezu,
- na obr. 5 jsou znázorněny cyklické voltampérické křivky komplexu tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)osmia v nepřítomnosti GOD a glukózy při různých snímacích rychlostech,
- na obr. 6 jsou znázorněny v podstatě stejné křivky

jako na obr. 5, ovšem v přítomnosti GOD a glukózy,

- na obr. 7 jsou znázorněny tři křivky ilustrující změny hustoty proudu, přičemž tyto hodnoty se získají po 30 sekundách (D_{30}) měření, jako funkce koncentrace glukózy ve fyziologickém roztoku pro měření prováděná za použití tří typů senzorů podle uvedeného vynálezu, ve kterých bylo měněno množství uhlíkového prášku,

- na obr. 8 je znázorněn gradient a ordináta pro výchozí body křivek zobrazených na obr. 7 jako funkce množství uhlíkového prášku,

- na obr. 9 jsou znázorněny tři křivky ilustrující změny hodnot proudové hustoty získané po 30 sekundách (D_{30}) měření jako funkce koncentrace glukózy ve fyziologickém roztoku v případě měření prováděných se třemi typy senzorů podle uvedeného vynálezu, ve kterých bylo obsaženo různé množství glukózooxidázy,

- na obr. 10 je zobrazen gradient a ordináta pro výchozí body křivek znázorněných na obr. 9, jako funkce množství glukózooxidázy,

- na obr. 11 jsou znázorněny tři přímky ilustrující změny proudové hustoty získané po 30 sekundách (D_{30}) měření jako funkce koncentrace glukózy ve fyziologickém roztoku v případě měření prováděných se třemi typy senzorů podle uvedeného vynálezu, u nichž bylo použito různé množství mediátoru,

- na obr. 12 je znázorněn gradient a ordináta pro výchozí body křivek zobrazených na obr. 11 jako funkce množství použitého mediátoru,

- na obr. 13 jsou znázorněny výsledky měření proudové hustoty, získané jako funkce koncentrace glukózooxidázy, přičemž tato měření byla provedena s krví a s fosfátovým pufrem za pomoci glukózových senzorů opatřených jedním ze dvou výhodných mediátorů podle uvedeného vynálezu,

- na obr. 14 jsou znázorněny výsledky měření proudové hustoty, získané jako funkce koncentrace glukózy, přičemž tato měření byla provedena za pomoci senzorů podle uvedeného vynálezu se vzorky krve s různými hodnotami hematokritu, a

- na obr. 15 a 16 jsou znázorněny výsledky měření proudové hustoty, získané jako funkce koncentrace glukózy, přičemž tato měření byla provedena za použití senzorů podle uvedeného vynálezu se vzorky fyziologického roztoku vykazující různé koncentrace acetaminofenolu a askorbové kyseliny.

Na obr. 4 je znázorněn přístroj 2 pro měření množství dané složky v roztoku, který je tvořen senzorem 6 podle uvedeného vynálezu a jednotkou 4 pro zpracování signálu poskytovaného tímto senzorem. Tato jednotka 4 pro zpracovávání signálu je jako taková běžně známa a používána, přičemž má v podstatě tvar pera. Rozsah uvedeného vynálezu není samozřejmě omezen na tento tvar.

Tato jednotka 4 ve tvaru pera má na jednom ze svých konců označených jako koncová část 8 dutinu 10, ve které jsou umístěny dva elektrické kontakty 12 a 14, přičemž tyto elektrické kontakty jsou připojeny elektrickým spojením na ampérmetr (není znázorněn na uvedeném obrázku). Tento ampérmetr je připojen na displej 16, na kterém se zobrazuje koncentrace požadované složky v daném roztoku. Tato koncentrace se vykazuje například v hodnotách mg/dl nebo mmol/l. Jednotka 4 pro zpracování signálu v podobě pera rovněž obsahuje uzávěr 18, kterým se uzavírá koncová část 8, čímž se chrání elektrické kontakty 12 a 14 v případech, kdy tato jednotka ve tvaru pera není používána.

Senzor 6 podle uvedeného vynálezu je například ve

tvaru podobném isolované obdélníkové destičce, kterou je možno zasunout pomocí jedné ze svých koncových částí, která má vztahovou značku 19, do dutiny 10 jednotky 4 pro zpracovávání signálu. V tomto bodě je třeba poznamenat, že tento senzor 6 je jednoúčelový.

Tento senzor podle uvedeného vynálezu obsahuje měřící elektrodu 20 a referenční elektrodu 22, které jsou umístěny například paralelně v podélném směru tohoto senzoru 6. Uvedená referenční elektroda 22 je tvořena páskem 24 zhotoveným z elektricky vodivého materiálu. Tento pásek 24 má tři zóny, přičemž první zóna 26 je zakončena elektrickým kontaktem ústícím směrem ke koncové části 19 uvedeného senzoru, středová zóna 28 se označuje jako "vodivá spojka" a zóna 30 je vytvořena na opačném konci tohoto senzoru a označuje se jako "sběrač proudu". Měřící elektroda má podobné provedení jako výše uvedená referenční elektroda, přičemž tato měřící elektroda 20 sestává z pásku 32 zhotoveného z elektricky vodivého materiálu. Tento pásek 32 sestává rovněž ze tří zón, které představují elektrický kontakt 34, vodivá spojka 36 a sběrač proudu 37, který je na rozdíl od sběrače proudu 30 opatřen povlakem směsi 38.

Na obr. 4 není tento sběrač proudu 37 zcela jasně viditelný, neboť je zakryt povlakem směsi 38. V této souvislosti je třeba poznamenat, že každá z uvedených elektrod, sběrač proudu a vodič proudu, neboli vodivá spojka, mohou být zhotoveny ze dvou částí vzájemně spolu elektricky spojených, přičemž tyto části nemusí mít nutně tvar pásku 24 nebo 32. Uvedená směs 38 obsahuje přinejmenším jeden oxidačně-redukční enzym, který je specifický pro danou složku, jejíž obsah má být zjišťován, a přinejmenším jeden mediátor, který převádí elektrony mezi uvedeným enzymem

a sběračem proudu, vytvořeným ve tvaru pásku 32.

V jednom z případných provedení podle uvedeného vynálezu může výše uvedená směs 38 obsahovat rovněž přinejmenším jeden aktivní vodivý materiál a/nebo přinejmenším jedno aditivum, což bude ještě podrobně uvedeno v dalším textu. V případě, že tato směs 38 obsahuje aktivní vodivý materiál, převádí mediátor elektrony mezi enzymem a tímto aktivním vodivým materiálem, který zase převádí elektrony směrem ke sběrači proudu.

Testovaná kapka 40 vzorku roztoku se umístí mezi uvedené dvě elektrody 20 a 22, jak je to znázorněno na obr. 4. Tímto způsobem se dosáhne uzavření elektrického okruhu, který tvoří ampérmetr, elektrické kontakty 14 a 26, vodivá spojka 28, sběrač proudu 30, kapka roztoku 40, směs 38, sběrač proudu 37, vodivá spojka 36 a elektrické kontakty 34 a 12.

Měřící zařízení 2, které bylo popsáno shora, je upraveno k provádění měření in vitro, přičemž je ovšem ze shora uvedeného popisu zřejmé, že senzor 6 může být použit in vivo v implantovatelných měřících zařízeních. V tomto případě tvar tohoto senzoru, resp. zařízení, a jeho rozměry je možno přizpůsobit této nové aplikaci.

Kromě toho je nutno poznamenat, že za účelem zajištění trvalé přesnosti je možno k danému senzoru přidat druhou měřící elektrodu, která je identická s měřící elektrodou 20, ale která neobsahuje enzym nebo která obsahuje denaturovaný enzym.

Kapka 40 roztoku, který je určen k testování, může být

biologické povahy, jako například se může jednak o lidskou krev, krev ze zvířete nebo se může jednat o moč, nebo může být tímto vzorkem fermentační médium s obsahem mikroorganizmů. Tento roztok může být rovněž syntetického původu, jako je například syntetický pufr obsahující složky, které mají být analyzovány.

Uvedeným použitým oxidačně-redukčním enzymem je enzym, který je specifický pro danou analyzovanou složku. Podle uvedeného vynálezu je použitý enzym ve výhodném provedení vybrán ze skupiny oxidáz a flavoproteinů. V případě, že je třeba vytvořit senzor na stanovení glukózy, je možno použít glukózooxidázu GOD, například glukózooxidázu, která má aktivitu asi 250 mezinárodních jednotek (IU) a která se získá pomocí kultury Aspergillus niger.

Uvedeným případně použitým aktivním vodivým materiálem je ve výhodném provedení podle uvedeného vynálezu prášek uhlíku, grafitu, zlata, platiny, paládia nebo vodivého oxidu kovu, jako je například oxid ruthenia, nebo může mít tento materiál formu filmu vodivého polymeru, jako je například polypyrrol. Uhlík se ve výhodném provedení podle vynálezu používá ve formě prášku.

Ze shora uvedeného popisu je zřejmé, že je rovněž možno použít přídavku aditiva, které vytváří imobilizovanou strukturu enzymu, mediátoru a/nebo aktivního vodivého materiálu na povrchu sběrače proudu 37 měřící elektrody 20. Tímto aditivem může být například bovinní sérový albumin (BSA), glutaraldehyd, karbodiimid nebo ve vodě rozpustné polymery.

Uvedené pásky elektricky vodivého materiálu 24 a 32

jsou například zhotoveny ve tvaru vrstvy materiálu vybraného ze skupiny zahrnující zlato, stříbro, platinu, paládium, uhlík, grafit a oxid vodivého kovu, jako je například oxid ruthenia. Pásek 24, který odpovídá referenční elektrodě 22 je ve výhodném provedení zhotoven ze stříbra a pásek 32, který odpovídá měřící elektrodě 20 je ve výhodném provedení zhotoven z platiny. Konkrétněji je možno uvést, že část pásku 24, která odpovídá sběrači proudu 30, je částečně chlorována.

Podle uvedeného vynálezu bylo zjištěno, že jako mediátorů s dobrými vlastnostmi je možno použít nové skupiny komplexních sloučenin na bázi přechodného kovu s přinejmenším jedním bipyridinovým, tripyridinovým nebo fenantrolinovým ligandem, které jsou substituovány přinejmenším jednou elektronovou donorovou skupinou.

Uvedenou elektronovou donorovou skupinou je ve výhodném provedení hydroxylová skupina, alkoxyskupina, aryloxyskupina nebo primární, sekundární nebo terciární aminová skupina.

V případě, že se jedná o glukózový senzor a v případě, že použitým enzymem je glukózooxidáza (GOD), potom ze skupiny výše uvedených mediátorů je možno ve výhodném provedení podle vynálezu vybrat tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia nebo bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia.

V případě glukózového senzoru obsahuje směs 38, která je uložená na sběrači proudu měřící elektrody 20, 1 mililitr 10 mM fosfátového pufru, jehož hodnota pH je upravena na

6,8, dále 1 až 1000 miligramů uhlíkového prášku, ve výhodném provedení podle vynálezu 1 až 100 miligramů nebo ještě lépe asi 10 miligramů, dále 1 až 2000 mezinárodních jednotek (IU) glukózooxidázy na miligram uhlíkového prášku, ve výhodném provedení podle vynálezu 10 až 300 mezinárodních jednotek (IU) nebo ještě lépe asi 100 mezinárodních jednotek (IU) glukózooxidázy, a 1 až 10000 μmolů mediátoru na miligram uhlíkového prášku, ve výhodném provedení podle uvedeného vynálezu 10 až 300 μmolů tohoto mediátoru nebo ještě lépe asi 50 μmolů mediátoru. Tato směs je uložena v množství v rozmezí od 10 do 300 $\mu l/cm^2$ aktivního povrchu, ve výhodném provedení podle vynálezu v množství od 30 do 150 $\mu l/cm^2$ nebo ještě lépe v množství asi 70 $\mu l/cm^2$.

Senzor v konečné suché formě obsahuje nanesenou směs 38, která obsahuje 1 až 2000 mezinárodních jednotek (IU) glukózooxidázy na miligram uhlíkového prášku, ve výhodném provedení 10 až 300 mezinárodních jednotek (IU) nebo ještě lépe 100 mezinárodních jednotek (IU), a 1 až 10000 μmolů mediátoru na miligram uhlíkového prášku, ve výhodném provedení 10 až 300 μmolů nebo ještě lépe 50 μmolů mediátoru.

Tento senzor podle uvedeného vynálezu opatřený výše uvedeným mediátorem poskytuje celou řadu různých vlastností, které se mění podle toho jaké ligandy se použijí a jak jsou tyto ligandy substituovány.

Podle uvedeného vynálezu bylo provedeno několik experimentálních pokusů, které potvrzují vlastnosti a účinnost těchto nových mediátorů, přičemž v těchto pokusech byla provedena optimalizace podmínek týkající se různých prvků tvořících měřící elektrodu. Tyto pokusy jsou

podrobněji popsány v následujícím textu.

P o k u s 1

Měření s různými mediátory, při kterých bylo použito cyklické voltametrie.

(a) Měření za použití tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-ového komplexu osmia.

Tento výše uvedený komplex byl testován za použití metody cyklické voltametrie a stejnosměrného proudu, přičemž cílem této metody bylo jednak stanovit normální oxidačně-redukční potenciál E^{o} a jednak rychlostní konstantu k. Tato konstanta k odpovídá reakci, při které dochází k přenosu elektronů směrem od GOD k mediátoru. Metoda cyklické voltametrie spočívá v tom, že se v roztoku určeném k analyzování umístí pracovní elektroda, protielektroda a referenční elektroda, přičemž potom se snímá konstantní rychlostí mezi dvěma póly potenciál na pracovní elektrodě a současně se měří intenzita vzniklého proudu. Výsledky získané touto metodou jsou znázorněny ve formě křivek na obr. 5 a 6. Tyto pokusy byly provedeny s pracovní elektrodou ze sklovitého uhlíku, s referenční kalomelovou (chlorid rtuťný) elektrodou a s platinovou protielektrodou, přičemž bylo použito elektrochemického článku o objemu 5 až 20 mililitrů. Tato měření byla provedena za použití fosfátovém pufru PBS (tvořený 100 mM chloridu sodného a 10 mM dihydrogenfosforečnanu sodného NaH_2PO_4, jehož hodnota pH byla upravena na 7,4); 0,1 mM roztoku ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA); 0,01 mM roztoku fenylmethylsulfonátfluoridu (PMSF) a výše uvedeného komplexu o koncentraci $5 . 10^{-4}$ M. Dále byly použity různé

rychlosti snímání uvedených potenciálů, a sice 5, 10, 25, 50 a 100 $mV.s^{-1}$. Tímto způsobem byly získány křivky na obr. 5 a hodnota E^{o} = 225 mV. Přídavek nasyceného roztoku glukózy neměl žádný vliv na křivky na obr. 5, což je normální, neboť není přítomna žádná glukózooxidáza (GOD).

Na rozdíl od výše uvedeného způsobil přídavek GOD (v množství větším než 5 . 10^{-8} M, ve výhodném provedení 4 . 10^{-8} M) zvýšení polohy křivek, které jsou zobrazeny na obr. 6, přičemž tyto křivky měly charakteristický tvar označovaný jako tak zvaná "katalytická vlna". V případě křivek na tomto obr. 6 byla použita rychlost snímání potenciálů 10, 25, 50 a 100 $mV.s^{-1}$.

Tímto způsobem dochází k první reakci :

$Mediátor_{(oxidovaný)} + GOD_{(redukovaná)} \longrightarrow$

$Mediátor_{(redukovaný)} + GOD_{(oxidovaná)}$

která je ireversibilní (s konstantou k) a ke druhé reakci :

$Mediátor_{(redukovaný)} + e^{-} \longrightarrow mediátor_{(oxidovaný)}$

která je z elektrochemického hlediska reversibilní a probíhá extrémně rychle.

Prostřednictvím mediátoru se provádí elektrochemicky reversibilní převod elektronů směrem k výše popsaným proudovým sběračům.

Při provádění první reakce je možno změřit konstantu k druhého řádu. Pro sledovanou komplexní sloučeninu byla

zjištěna hodnota $k = 2,5 \pm 0,5\ M^{-1}.s^{-1}$.

(b) měření za použití jiných komplexních sloučenin.

Podobný postup jako je uveden výše byl proveden rovněž i s jinými komplexními sloučeninami. V následující tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky těchto experimentů pokud se týče hodnot rychlostní konstanty k a normálního oxidačně-redukčního potenciálu E^{o} v mV v porovnání s kalomelovou (chlorid rtuťný) referenční elektrodou (SCE).

T a b u l k a č. 1

Komplexní sloučenina		E^o ($mV_{/SCE}$)	k ($M^{-1}.s^{-1}$)
1. Tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia		225	$2,5 . 10^6$
2. Bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono-(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia		340	$2 . 10^6$
3. Bis(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-ový komplex osmia		390	N.D.
4. Mono(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dihydroxy-2,2'-bipyridin)-mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia	pH < 4,5	340	N.D.
	pH > 4,5	190	$2 . 10^5$
5. Tris(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia		425	$1,5 . 10^6$

Tabulka č. 1 (pokračování)

Komplexní sloučenina	E^o ($mV_{/SCE}$)	k ($M^{-1}.s^{-1}$)
6. Tris(4,4'-dihydroxy-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia	-1000	$\cong$ 0
7. Tris(4,4'-diamino-2,2'-bipyridin)ový komplex ruthenia	170	$1,6 . 10^6$
8. Tris(4,4'-diamino-2,2'-bipyridin)ový komplex železa	70	$1,4 . 10^5$

Poznámka : N.D. = nestanoveno

Z výše uvedených výsledků v tabulce č. 1 je patrné, že skupina testovaných mediátorů má velmi široký rozsah redox potenciálů s hodnotami pohybujícími se mezi -1000 mV a +425 mV (vzhledem k referenční kalomelové elektrodě SCE, t. zn. k elektrodě na bázi chloridu rtuťnatého). Spodní hranice tohoto rozmezí je mnohem nižší než všechny uváděné hodnoty redox potenciálů mediátorů dosud známých z literatury podle dosavadního stavu techniky. Kromě toho je nutno uvést, že toto rozmezí potenciálů je navíc mnohem širší než rozmezí potenciálů platné pro skupinu ferrocenových mediátorů. Toto zvětšení rozmezí vyplývá z velkého počtu substituentů, kterých je možno použít v uvedených komplexních sloučeninách, a z velkého počtu kombinací případně použitých substitucí.

Konstanta druhého řádu k_f odpovídající rychlostní konstantě oxidačně-redukční reakce mezi enzymem a mediátorem podle uvedeného vynálezu je mnohem rychlejší než u dosud známých mediátorů podle dosavadního stavu techniky a je dokonce rychlejší než u kyslíku. Hodnota konstanty k u kyslíku je pouze $1,5 \cdot 10^6$ $M^{-1}.s^{-1}$. Tímto způsobem se odstraňuje výše uváděný problém s probíhající konkurenční reakcí mezi kyslíkem a mediátorem během reakce, při které dochází k elektronovému přenosu od GOD. Kromě toho je nutno uvést, že vzhledem k tomu, že ostatní konkurenční reakce probíhají mnohem pomaleji, nemají tyto reakce vliv na výsledek získaný s tímto měřícím systémem.

Vzhledem k výše uvedenému byly jako mediátory pro glukózové senzory vybrány komplexní sloučeniny 1 a 2, přičemž tyto komplexy mají současně vysokou hodnotu konstanty k a nízkou hodnotu oxidačně-redukčního potenciálu E^o, přesto ovšem je tato hodnota větší než

-300 mV, která odpovídá normálnímu potenciálu skupiny $FAD/FADH_2$ pro GOD.

P o k u s 2

Optimalizace různých složek směsi na měřící elektrodě.

Poté, co byly vybrány výše uvedené dva mediátory, které se jevily jako nejvýhodnější pro vytvoření glukózového senzoru, byl další výzkum zaměřen na pokusy nalézt optimální množství odpovídajících různých složek tvořících směs, která je uložena na sběrači proudu na měřící elektrodě.

Při těchto postupech byla nejdříve připravena směs 38 obsahující jednu z výše uvedených výhodných komplexních sloučenin, uhlíkový prášek, imobilizovanou glukózooxidázu a jako aditivum bovinní sérový albumin a glutaraldehyd, přičemž tato směs byla uložena na sběrači proudu 37, který je napojen na elektricky vodivý pásek 36, v množství 70 µl této směsi na cm^2, čímž byla vytvořena měřící elektroda 20. Takto byly zhotoveny různé typy měřících elektrod, přičemž byl postupně měněn obsah jedné ze složek této směsi za současného udržování obsahu ostatních složek na konstantní úrovni.

Tímto způsobem byly připraveny různé senzory, které byly použity pro potenciometrická měření při potenciálu 300 mV s různými vzorky krve, které obsahovaly různá množství glukózy. Získané výsledky jsou uvedeny níže.

(a) Optimalizace obsahu uhlíkového prášku.

Podle tohoto provedení byly zhotoveny různé typy

senzorů (ovšem pro vyhodnocení bylo rozhodnuto použít pouze tří typů), přičemž při jejich přípravě bylo do 3 mililitrů fosfátového pufru PBS přimícháno konstantní množství GOD (to znamená 36,9 miligramů), konstantní množství bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ového komplexu osmia (to znamená 3,0 miligramy), který byl použit jako mediátor, konstantní množství glutaraldehydu o koncentraci 25 % (to znamená 25 µl), konstantní množství bovinního sérového albuminu o koncentraci 15 % (to znamená 290 µl) a 25, 50 nebo 250 miligramů uhlíkového prášku.

Tímto fosfátovým pufrem PBS, který byl použit v tomto postupu a v dále popisovaných pokusech, byl 10 mM pufr upravený na hodnotu pH 6,8.

Potom byly testovány tři typy senzorů ve fyziologickém roztoku, který obsahoval různé množství glukózy (v rozmezí od 0 do 20 mM glukózy), přičemž při těchto testech byla měřena hustota proudu po 30 sekundách (t.zn. hodnota D_{30}). Tento fyziologický roztok obsahoval : 115 mM chloridu sodného NaCl, 25 mM chloridu draselného KCl, 5 mM trihydrátu hydrogenfosforečnanu draselného $K_2HPO_4.3\ H_2O$ a 0,5 mM dihydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4.

Získané výsledky jsou znázorněné v grafu na obr. 7, na kterém přímky (a), (b) a (c) odpovídají výsledkům získaným se senzory obsahujícími 25, 50 a 250 miligramů uhlíku ve 3 mililitrech fosfátového pufru PBS, neboli přibližné koncentraci 8, 17 a 83 miligramů na mililitr. Zde je třeba uvést, že bylo provedeno mnoho měření, ovšem bylo rozhodnuto uvést pouze tyto tři přímky (a), (b) a (c).

Potom byla vypočítána hodnota gradientu (m) pro všechny přímky reprezentující všechna měření prováděná při těchto hodnotách, přičemž tyto hodnoty jsou graficky zobrazeny na obr. 8 (viz. křivka C_1), kde na ose úseček (osa x) je uvedeno množství uhlíku v miligramech na mililitr fosfátového pufru PBS. Podobným způsobem byly zjištěny hodnoty ordinát odpovídající výchozím bodům těchto přímek, přičemž tyto hodnoty jsou na obr. 8 znázorněny pomocí křivky C_2. Hodnota ordináty ve výchozím bodě odpovídá místu, ve kterém protnula přímka na obr. 7 osu pořadnic, jinak řečeno tato hodnota odpovídá hodnotě zbytkového proudu.

K těmto výsledkům je třeba uvést, že křivka C_1 probíhá v podstatě horizontálně v oblasti obsahu uhlíku od 17 do 83 miligramů, což znamená, že mezi těmito dvěma hodnotami má obsah uhlíku malý vliv na výsledky dosažené s tímto senzorem. Přesto ovšem vzhledem k tomu, že tenká vrstva uhlíku poskytuje lepší mechanické a difúzní vlastnosti je přednost dávána použití co možná nejmenšího množství uhlíku jak je to jenom možné. Kromě toho je nutno poznamenat, že hodnota ordináty ve výchozím bodě přímky (a) (to znamená hodnota 8 miligramů uhlíku na mililitr) je menší, což naznačuje, že bylo dosaženo nejmenší hodnoty zbytkového proudu.

Z výše uvedeného vyplývá, že je výhodné použít asi 10 miligramů uhlíku na mililitr fosfátového pufru PBS.

(b) Optimalizace množství enzymu (GOD).

Podle tohoto provedení bylo připraveno několik různých typů senzorů (ovšem bylo rozhodnuto znázornit výsledky pouze tří těchto senzorů), přičemž při jejich

přípravě bylo do 3 mililitrů fosfátového pufru PBS přimícháno konstantní množství uhlíku (25 miligramů), konstantní množství stejného mediátoru jako je uveden v odstavci (a)(to znamená 3 miligramy), konstantní množství glutaraldehydu o koncentraci 25 % (to znamená 25 µl) a konstantní množství bovinního sérového albuminu o koncentraci 15 % (to znamená 290 µl), přičemž množství přimíchávané glukózooxidázy GOD bylo v jednotlivých případech 2175, 4375 a 8750 mezinárodních jednotek (IU), což odpovídá koncentraci GOD 87, 175 a 350 mezinárodních jednotek (IU) glukózooxidázy (GOD) na jeden miligram uhlíku.

V dalším byla provedena stejná řada měření a výpočtů, jako je uvedeno v odstavci (a). Přímky (a), (b) a (c) znázorněné na obr. 9 odpovídají výsledkům získaným se senzory obsahujícími 87, 175 a 350 mezinárodních jednotek (IU) glukózooxidázy na miligram uhlíkového prášku. Křivky C_1 a C_2 na obr. 10 znázorňují průběh odpovídající hodnotám gradientu (m) a ordinát ve výchozím bodě. Na ose úseček je na obr. 10 vyneseno množství GOD v mezinárodních jednotkách (IU) na miligram uhlíkového prášku.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že v oblasti hodnot 75 až 350 mezinárodních jednotek (IU) GOD na miligram uhlíkového prášku je křivka C_1 v podstatě horizontální, což znamená, že mezi těmito dvěma hodnotami má obsah GOD pouze malý vliv na dosažené výsledky. Kromě toho je nutno podotknout, že hodnota ordináty ve výchozím bodě má u přímky (a) nejmenší hodnotu, což znamená, že při této hodnotě bylo dosaženo nejmenšího zbytkového proudu.

Z výše uvedeného vyplývá, že je podle uvedeného vynálezu výhodné použít při přípravě senzoru glukózooxidázu

GOD v množství asi 100 mezinárodních jednotek (IU) na miligram uhlíkového prášku.

(c) Optimalizace množství mediátoru.

Podle tohoto provedení byly připraveny tři různé typy senzorů, přičemž při jejich přípravě bylo do 3 mililitrů fosfátového pufru PBS přimícháno konstantní množství uhlíku (to znamená 25 miligramů), konstantní množství GOD (to znamená 36,9 miligramů), konstantní množství glutaraldehydu o koncentraci 25 % (to znamená 25 µl) a konstantní množství bovinního sérového albuminu o koncentraci 15 % to znamená 290 µl), přičemž bylo použito různého množství bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ového komplexu osmia jako mediátoru, a sice 825, 1675 a 3325 µmolů, což odpovídá koncentraci mediátoru 33, 67 a 133 µmolů na miligram uhlíkového prášku.

V dalším postupu byla provedena stejná měření a výpočty jako ve shora uvedeném odstavci (a). Přímky (a), (b) a (c) znázorněné na obr. 11 odpovídají výsledkům dosaženým se senzory obsahujícími 33, 67 a 133 µmolů výše uvedené komplexní sloučeniny na miligram uhlíku. Křivky C_1 a C_2 v grafu na obr. 12 znázorňují průběh odpovídající hodnotám gradientu (m) a ordinát ve výchozím bodě. Na ose úseček je na obr. 12 vyneseno množství mediátoru v µmolech na miligram uhlíkového prášku.

Z výsledků uvedených na těchto grafech je zřejmé, že průběh křivek C_1 a C_2 je v podstatě horizontální. V případě, že se použije mediátoru v množství menším než 50 µmolů, je nutno provádět měření při potenciálu vyšším než 300 mV. Vzhledem k tomu, že je podle uvedeného vynálezu výhodné

pracovat při co možná nejnižší hodnotě potenciálu, je z tohoto důvodu výhodné použít množství asi 50 μmolů mediátoru na miligram uhlíkového prášku.

Tato optimalizaci, která byla provedena s bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethyl-2,2'- bipyridin)ovým komplexem osmia, platí rovněž i pro tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia.

P o k u s 3

Kalibrace senzoru v krvi a v pufru.

Křivky znázorněné na obr. 13 ilustrují potenciometrická měření prováděná se senzory, ve kterých bylo jako mediátorů použito dvou výhodných komplexních sloučenin podle vynálezu, přičemž ve vzorcích krve a ve vzorcích fosfátového pufru PBS bylo použito různých koncentrací glukózy. Tato měření byla prováděna při 300 mV, přičemž odečítání hodnot proudové hustoty D_{20} bylo prováděno po 20 sekundách.

Křivky C_1 a C_3 znázorněné na tomto grafu odpovídají měřením provedeným ve fosfátovém pufru a v krvi se senzorem, u kterého bylo použito tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-ového komplexu osmia, přičemž křivky C_2 a C_4 odpovídají měřením provedeným ve fosfátovém pufru a v krvi se senzorem, ve kterém bylo použito bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ového komplexu osmia.

Jak je z grafu na obr. 13 patrné, tyto různé naměřené křivky jsou lineární, přičemž mají dostatečně strmý gradient až do hodnoty obsahu glukózy 20 mM. Z výše uvedeného

vyplývá, že u pacientů, u kterých se fyziologické hodnoty obsahu glukózy mohou měnit, obvykle v rozmezí od 3 do 20 mM, je senzor podle uvedeného vynálezu dostatečně spolehlivý, neboť v tomto případě malé změny koncentrace glukózy odpovídají dostatečně velké naměřené změně proudové hustoty.

Změny pozorované mezi měřeními prováděnými s PBS pufrem a s celým podílem krve nastávají v důsledku stejného jevu, který byl popsán pro krevní plazmu a pro celou krev, viz. Fogh-Andersen, N. a kol. (1990), Clin. Chim. Acta 189, str. 33 - 38. K těmto změnám dochází hlavně v důsledku objemu, který zaujímají proteiny v celém podílu krve.

P o k u s 4

Vliv hematokritu na výsledky získané se senzorem podle uvedeného vynálezu.

Křivky znázorněné v grafu na obr. 14 ilustrují změny proudové hustoty (D_{30}), odečítané po 30 sekundách, jako funkce koncentrace glukózy v uměle upravené lidské krvi. Vzorky krve byly připraveny následujícím způsobem. Plazma a krvinky byly odděleny odstředěním při 300 otáčkách za minutu, což bylo prováděno po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Tato krev byla potom upravena tak, aby byly získány různé hematokritové hodnoty (0,35; 0,50 a 0,60), přičemž do těchto vzorků bylo potom přidáno známé množství glukózy. Koncentrace glukózy byla měřena za pomoci kalibrovaného laboratorního zařízení, jako je například zařízení označované 23A (výrobce firma Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, Ohio). Potenciometrická měření byla prováděna při 300 mV, přičemž v použitých senzorech byl jako

mediátor aplikován bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia. Měření proudové hustoty bylo prováděno po 30 sekundách.

Znázorněné křivky C_1, C_2 a C_3 odpovídají jednotlivým vzorkům krve obsahujícím 35 % buněčného podílu krve a 65 % krevní plazmy, 50 % buněčného podílu a 50 % plazmy a 60 % buněčného podílu a 40 % plazmy.

Křivka C_2 odpovídá normálnímu hematokritu. Při provádění těchto pokusů bylo zjištěno, že křivka C_3 (hematokrit 0,60) odpovídající zvýšenému hematokritu se téměř neliší od křivky C_2.

Na rozdíl od výše uvedeného křivka C_1 (hematokrit 0,35) odpovídající hematokritu u pacientů trpících anémií se odlišuje od křivky C_2.

Z výše uvedeného vyplývá, že senzor podle uvedeného vynálezu poskytuje spolehlivé výsledky u pacientů se zvýšeným hematokritem, ale je méně spolehlivý u pacientů trpících anémií.

P o k u s 5

Vliv hodnoty pH na aktivitu mediátoru, kterým je tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia a bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia.

Tyto dva uvedené komplexy byly přimíchány do roztoku fosfátového pufru PBS, ve kterém byla měněna hodnota pH, přičemž byla měřena hodnota normálního oxidačně-redukčního

potenciálu E^{O}.

Při hodnotě pH v rozmezí od 1 do 12 byla pozorována stabilní hodnota potenciálu E^{O}. V případě prvního uvedeného komplexu je tento potenciál E^{O} roven +225 mV a v případě druhého uvedeného komplexu je tato hodnota +340 mV. Vzhledem k tomu, že v praxi je hodnota pH lidské krve asi 7,4 , neovlivňují malé změny hodnoty pH krve výsledky měření úrovně glykémie se senzorem podle uvedeného vynálezu.

P o k u s 6

Vliv přítomnosti určitých léků na výsledky získané se senzorem podle vynálezu.

Nakonec byla provedena řada pokusů za účelem ověření zda výsledky získané se senzorem podle uvedeného vynálezu by nemohly být ovlivněny léky přítomnými v krvi v okamžiku měření. V praktické situaci je totiž možné, aby měl pacient před prováděním měření glykémie vstřebané léky v krvi, jako například aspirin nebo vitamin C.

Z tohoto důvodu byl proveden test na možné ovlivnění výsledků získaných se senzorem podle uvedeného vynálezu kyselinou acetylsalicylovou, acetaminofenolem a kyselinou askorbovou.

Tyto testy byly prováděny se senzorem, ve kterém bylo jako mediátoru použito tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-ového komplexu osmia.

Potenciometrická měření byla provedena při 300 mV. Proudová hustota (D_{30}) byla odečítána po 30 sekundách.

Získané různé křivky odpovídaly různým hodnotám proudové hustoty jako funkci koncentrace glukózy pro případy, kdy ve vzorcích fyziologického roztoku byla různá množství jednotlivých testovaných léků.

Získané výsledky jsou podrobně rozebrány v následujícím textu.

- Acetaminofenol :

Výsledky s acetaminofenolem jsou ilustrovány v grafu na obr. 15. Zobrazené křivky C_1, C_2 a C_3 (přerušovaná čára) odpovídají jednotlivým koncentracím 0, 50 a 500 μM acetaminofenolu.

Hodnota 50 μM odpovídá stavu, kdy pacient absorbuje normální dávku acetaminofenolu, přičemž hodnota 500 μM znamená přebytek tohoto léčiva. K těmto výsledkům je třeba uvést, že v oblasti mezi 4 a 10 mM glukózy (odpovídajícím v podstatě fyziologickým hodnotám), nemá přítomnost tohoto léčiva téměř žádný vliv na výsledky získané za použití tohoto senzoru podle vynálezu, neboť všechny křivky se v podstatě překrývají.

- Kyselina askorbová :

Výsledky získané s kyselinou askorbovou jsou ilustrovány v grafu na obr. 16. Křivky C_1, C_2 a C_3 zobrazené na tomto grafu odpovídají jednotlivým koncentracím 0, 100 a 1000 μM kyseliny askorbové v jednom mililitru krve.

Hodnota 100 μM (křivka C_2) odpovídá stavu zjištěnému u pacientů s absorbovanou normální dávkou vitaminu C, přičemž hodnota 1000 μM (křivka C_3) odpovídá přebytku kyseliny askorbové.

Při provádění tohoto testu bylo zjištěno, že jestliže je kyselina askorbová přítomna v přebytku (křivka C_3), potom všechny hodnoty koncentrace glukózy jsou vyšší než hodnoty normální. Na rozdíl od výše uvedeného, křivka C_2 odpovídající normálním fyziologickým hodnotám je v podstatě totožná s křivkou C_1, takže je možno uvést, že přítomnost kyseliny askorbové nijak neovlivňuje výsledky získané se senzorem podle uvedeného vynálezu.

- Kyselina acetylsalicylová :

Pokud se týče tohoto léčiva nebylo pokládáno za nutné předkládat obrázek ilustrující tyto výsledky získané s uvedeným léčivem, neboť bylo zjištěno, že při množstvích kyseliny acetylsalicylové až do 25 mM byly získány přímky, které jsou v podstatě totožné s přímkou odpovídající množství 0 mM kyseliny salicylové. Z těchto výsledků byl učiněn závěr, že přítomnost kyseliny acetylsalicylové neovlivňuje výsledky dosažené se senzorem podle uvedeného vynálezu.

PV 3165-92

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Senzor pro měření množství složky v roztoku, vyznačující se tím, že je tvořen

- přinejmenším jednou měřící elektrodou a jednou referenční elektrodou, přičemž tyto elektrody jsou navzájem isolované a vytvořené tak, aby je bylo možno uvést do kontaktu s uvedeným roztokem, a dále tyto elektrody mají elektrické kontakty pro spojení s přístrojem na vyhodnocování získaného signálu pocházejícího od senzoru;
- a měřící elektroda je tvořena přinejmenším jedním sběračem proudu, který je elektricky připojený k jednomu z uvedených elektrických kontaktů a povlečený směsí obsahující přinejmenším jeden oxidačně-redukční enzym specifický pro uvedenou složku a přinejmenším jeden mediátor pro převod elektronů mezi uvedeným enzymem a uvedeným sběračem proudu, přičemž tento mediátor je vybrán ze skupiny komplexů přechodných kovů s přinejmenším jedním bipyridinovým, tripyridinovým nebo fenantrolinovým ligandem, který je substituován přinejmenším jednou elektronovou donorovou skupinou.

2. Senzor podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená směs na měřící elektrodě rovněž obsahuje aktivní vodivý materiál, přičemž mediátor převádí elektrony mezi uvedeným enzymem a tímto aktivním vodivým materiálem.

3. Senzor podle nároku 1, vyznačující se tím, že přechodným kovem je železo, ruthenium, osmium nebo vanad.

4. Senzor podle nároku 1, vyznačující se tím, že skupinou, která je elektronovým donorem, je hydroxyskupina,

alkoxyskupina, aryloxyskupina nebo primární, sekundární nebo terciární aminová skupina.

5. Senzor podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedeným oxidačně-redukčním enzymem je oxidáza nebo flavoprotein.

6. Senzor podle nároku 5, vyznačující se tím, že je určen pro měření množství glukózy přítomné v roztoku, přičemž použitým enzymem je glukózooxidáza.

7. Senzor podle nároku 6, vyznačující se tím, že uvedeným mediátorem je tris(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-ový komplex osmia nebo bis(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridin)-mono(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin)ový komplex osmia.

8. Senzor podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedeným aktivním vodivým materiálem je prášek uhlíku, zlata, platiny, paládia nebo vodivého oxidu kovu.

9. Senzor podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedeným aktivním vodivým materiálem je film vodivého polymeru.

10. Senzor podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že uvedená směs na měřící elektrodě obsahuje aditivum pro vytvoření imobilizované struktury enzymu, mediátoru a/nebo aktivního vodivého materiálu na povrchu sběrače proudu na měřící elektrodě.

11. Senzor podle nároku 10, vyznačující se tím, že uvedeným aditivem je bovinní sérový albumin, glutaraldehyd, karbodiimid nebo polymer rozpustný ve vodě.

12. Senzor podle nároků 6, 7 nebo 8, vyznačující se tím, že směs uložená na sběrači proudu na měřící elektrodě obsahuje glukózooxidázu v množství v rozmezí od 1 do 2000 mezinárodních jednotek na miligram uhlíkového prášku a mediátor v množství v rozmezí od 1 do 10000 µmolů na miligram uhlíkového prášku.

13. Senzor podle nároku 12, vyznačující se tím, že směs uložená na sběrači proudu na měřící elektrodě obsahuje glukózooxidázu v množství v rozmezí od 10 do 300 mezinárodních jednotek (IU) na miligram uhlíkového prášku a mediátor v množství v rozmezí od 10 do 300 µmolů na miligram uhlíkového prášku.

14. Senzor podle nároku 13, vyznačující se tím, že směs uložená na sběrači proudu na měřící elektrodě obsahuje glukózooxidázu v množství asi 100 mezinárodních jednotek (IU) na miligram uhlíkového prášku a asi 50 µmolů mediátoru na miligram uhlíkového prášku.

15. Zařízení obsahující senzor podle nároků 1 až 14 a přístroj na zpracování signálu z tohoto senzoru, vyznačující se tím, že tento přístroj obsahuje přinejmenším dva elektrické kontakty přizpůsobené pro spojení s přinejmenším dvěma elektrodami uvedeného senzoru, dále ampérmetr a prostředky pro zobrazení výsledků.

Seznam vztahových značek :

2 - přístroj pro měření obsahu složky v roztoku
4 - jednotka pro zpracování signálu
6 - senzor
8 - koncová část jednotky pro zpracování signálu
10 - dutina
12 - elektrický kontakt
14 - elektrický kontakt
16 - displej
18 - uzávěr
19 - koncová část senzoru
20 - měřící elektroda
22 - referenční elektroda
24 - pásek
26 - elektrický kontakt (první zóna pásku)
28 - vodivá spojka (středová zóna pásku)
30 - sběrač proudu
32 - pásek
34 - elektrický kontakt
36 - vodivá spojka
37 - sběrač proudu
38 - povlaková směs
40 - testovaná kapka

ČJ. 0 5 8 5 2 7
DOSLO 19. X. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.

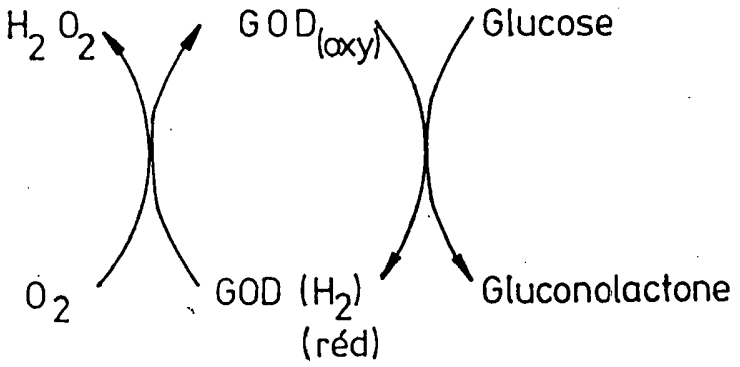


Fig.1

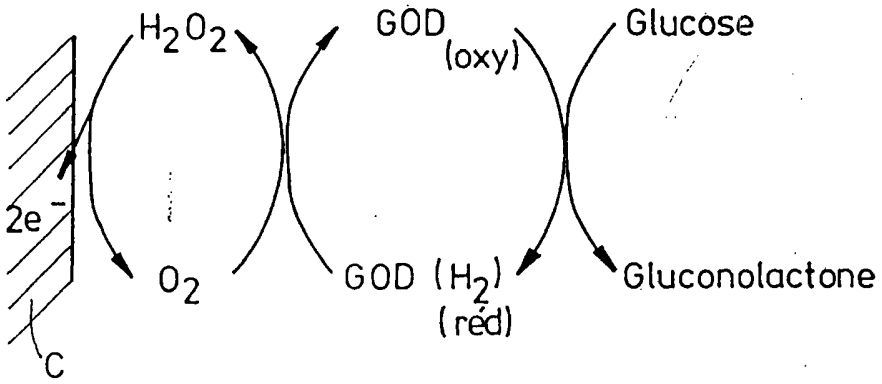


Fig. 2

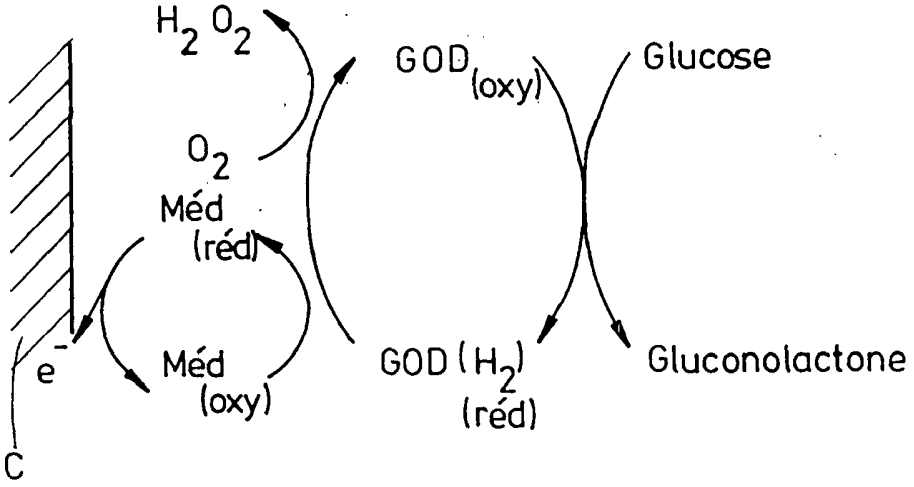

H2 O2
O2
Méd
(réd)
e⁻
Méd
(oxy)
C
GOD(oxy)
GOD (H2)
(réd)
Glucose
Gluconolactone

Fig. 3

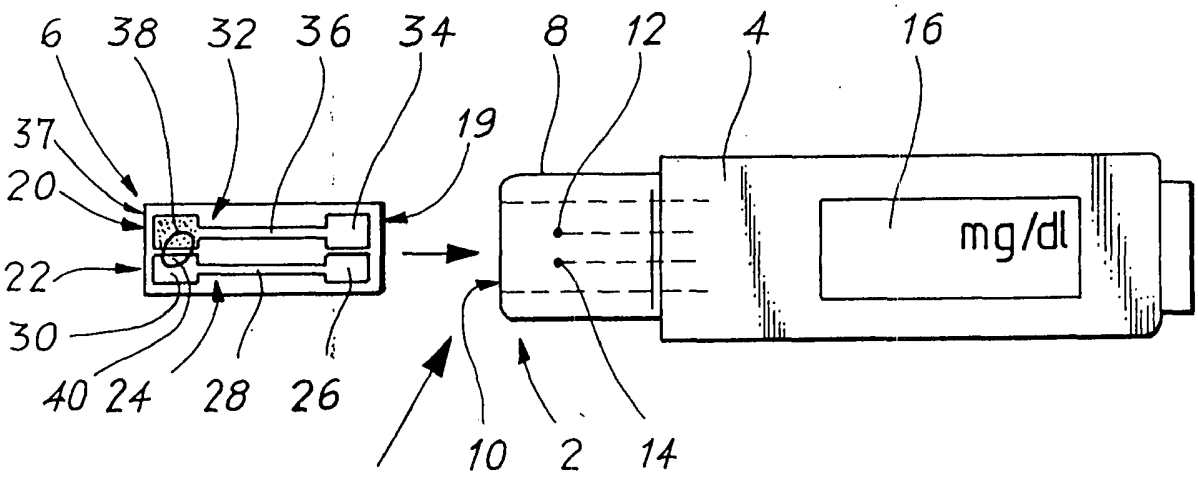
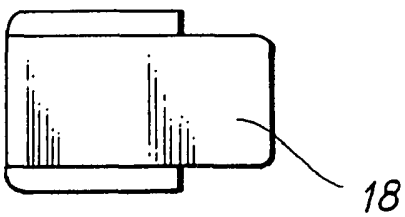

6
38
32
36
34
8
12
4
16
37
20
19
22
30
40
24
28
26
10
2
14
mg/dl

Fig. 4


18

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.
Č.j.
0 5 8 5 2 7
DOSLO
19. X. 92

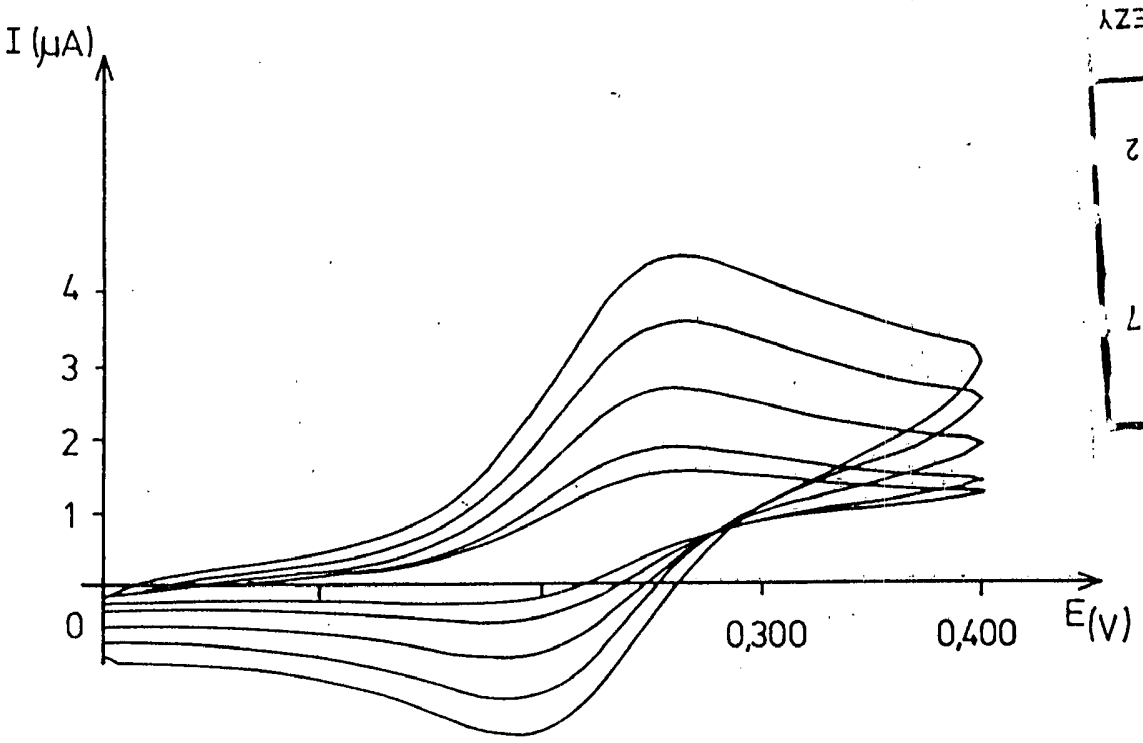


Fig. 5

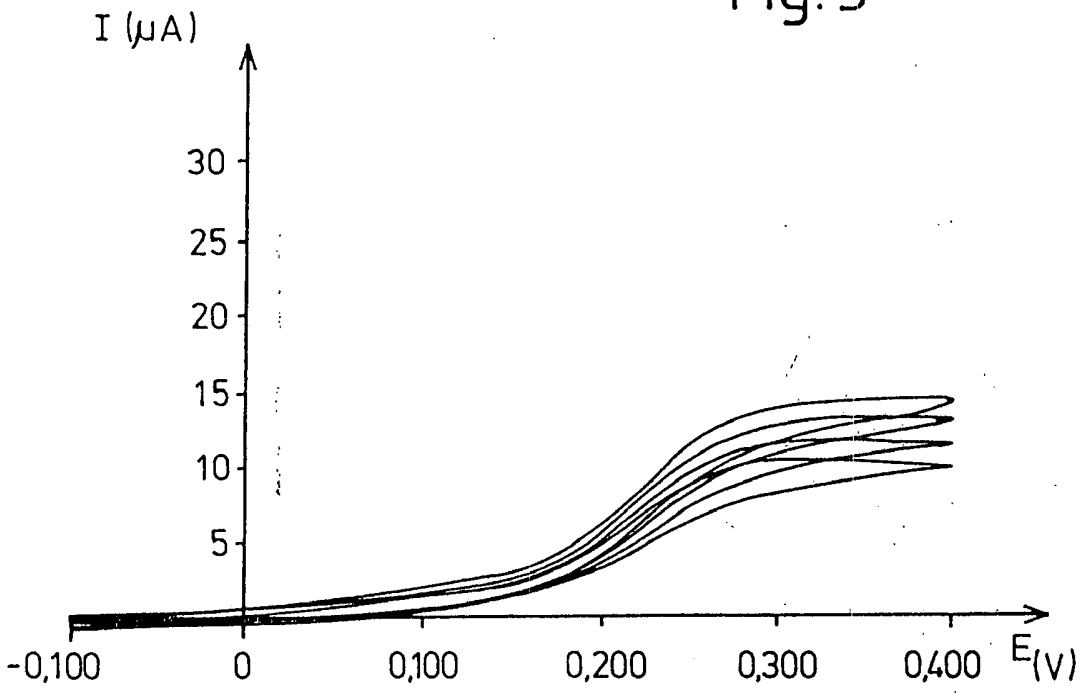


Fig. 6

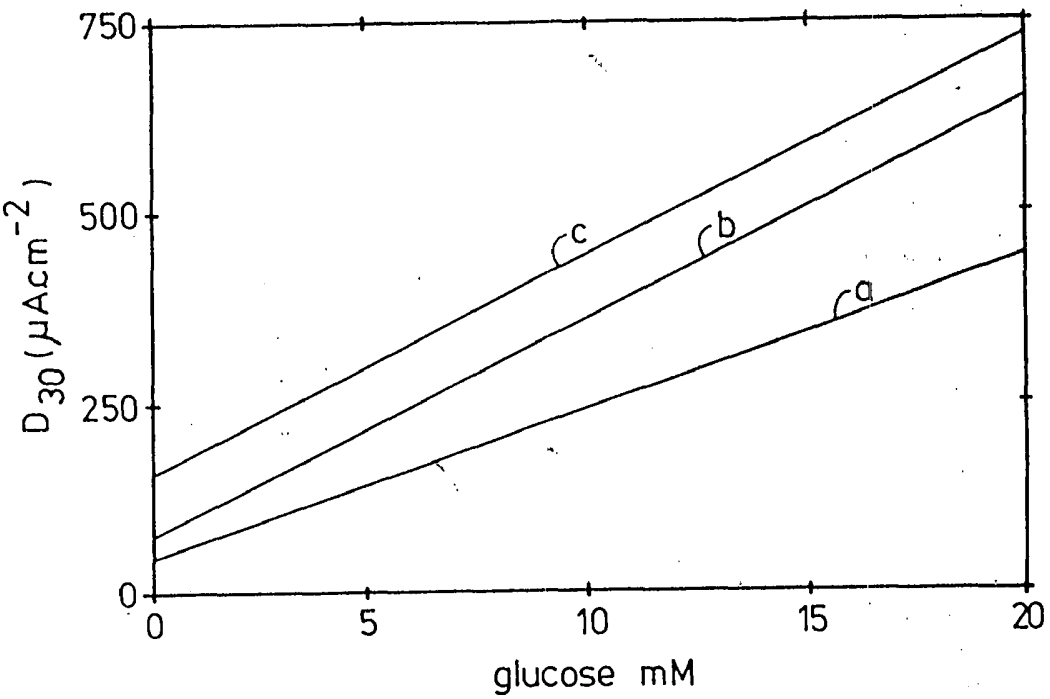

750
500
250
0
0
5
10
15
20
D_{30} ($\mu A cm^{-2}$)
glucose mM
c
b
a

Fig.7

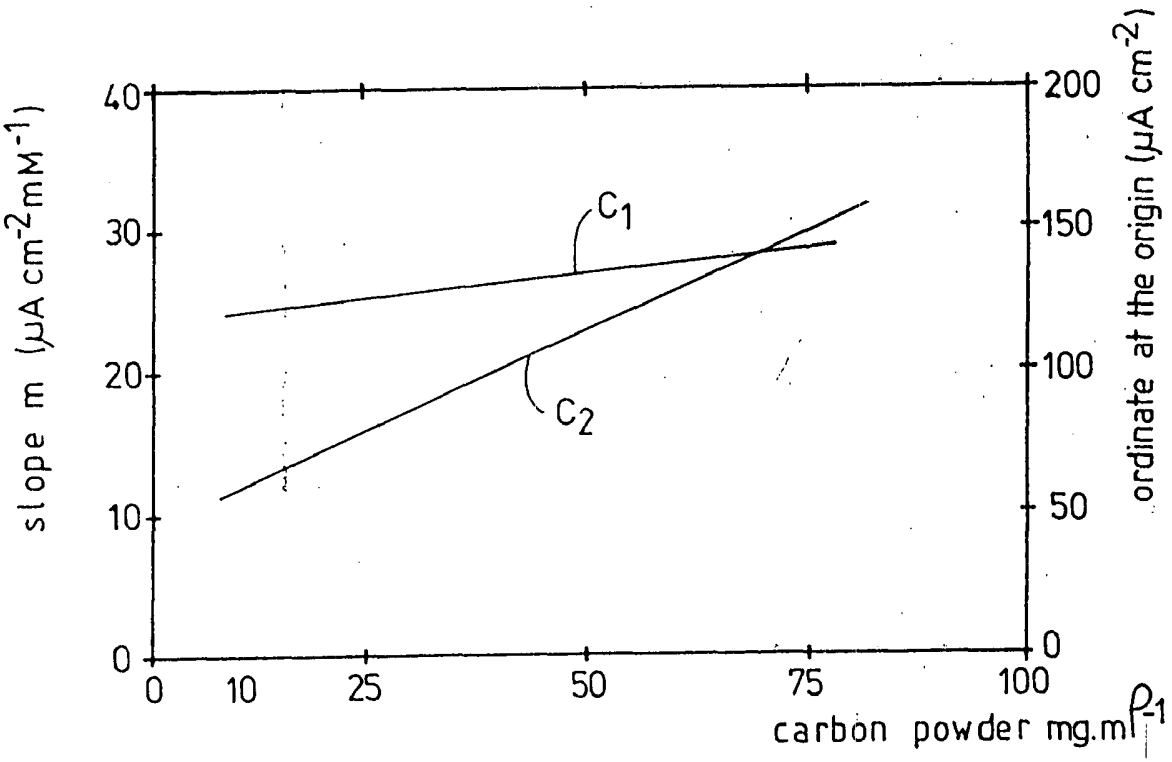

40
30
20
10
0
0
10
25
50
75
100
200
150
100
50
0
slope m ($\mu A\, cm^{-2} mM^{-1}$)
ordinate at the origin ($\mu A\, cm^{-2}$)
carbon powder mg.ml^{-1}
C_1
C_2

Fig.8

PV 3165-92

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.
Č.j.
0 5 8 5 2 7
DOSLO
19. X. 92

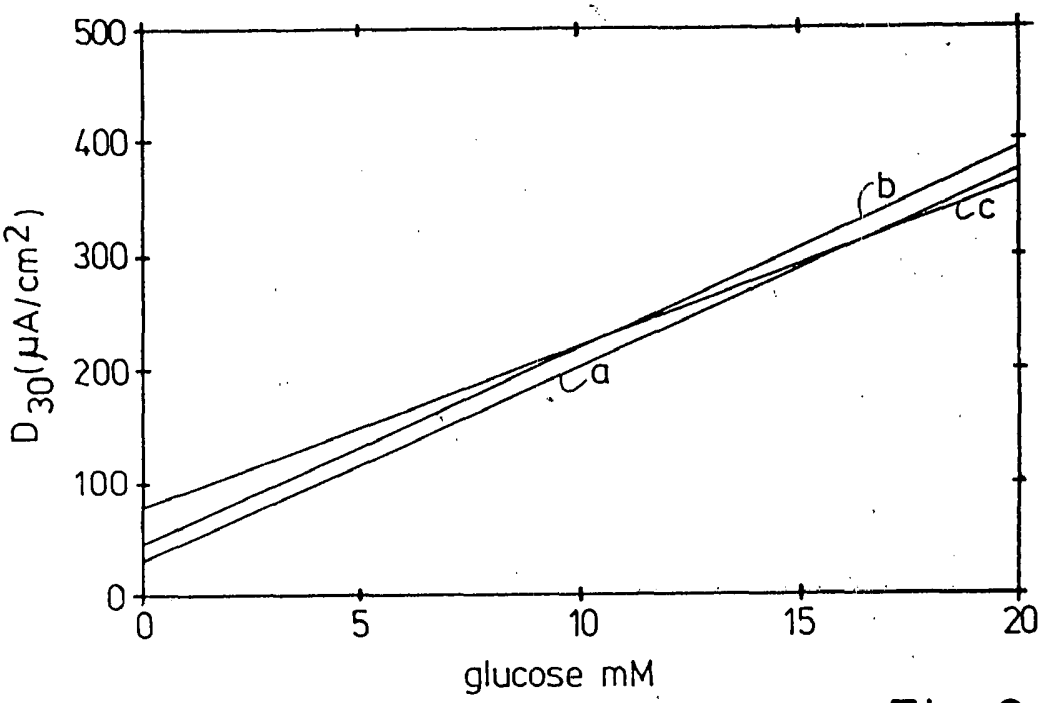


Fig. 9

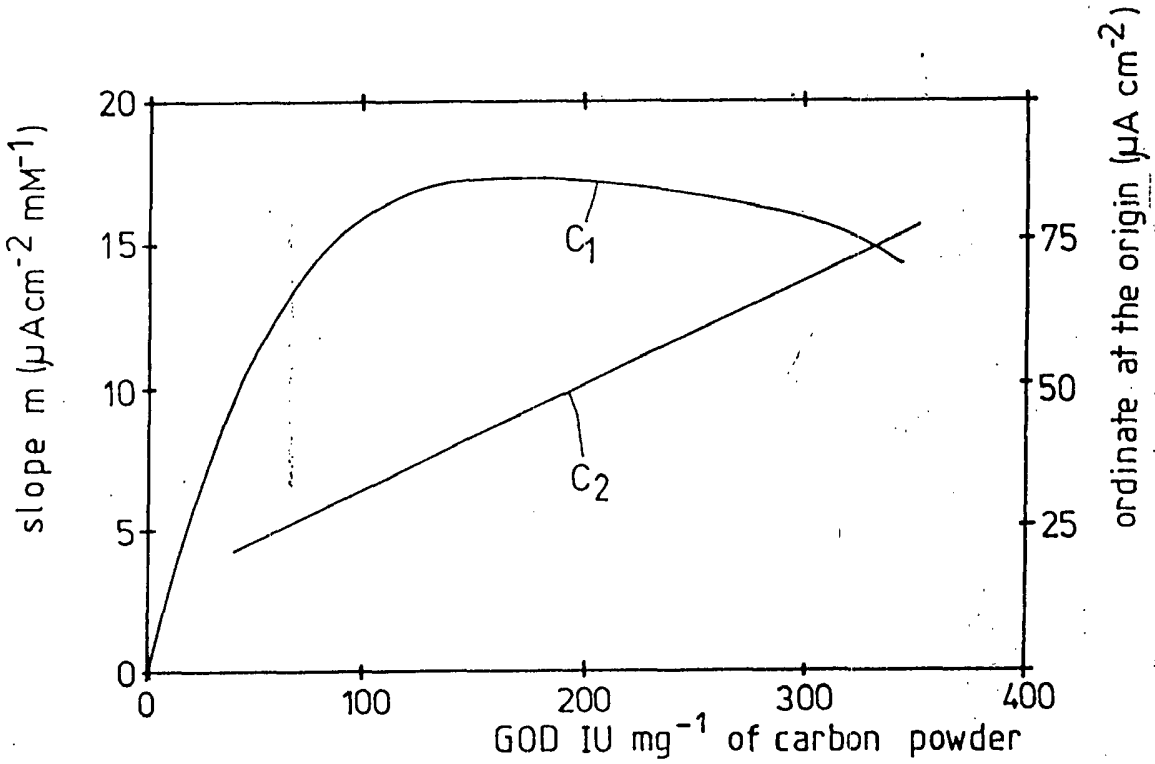


Fig. 10

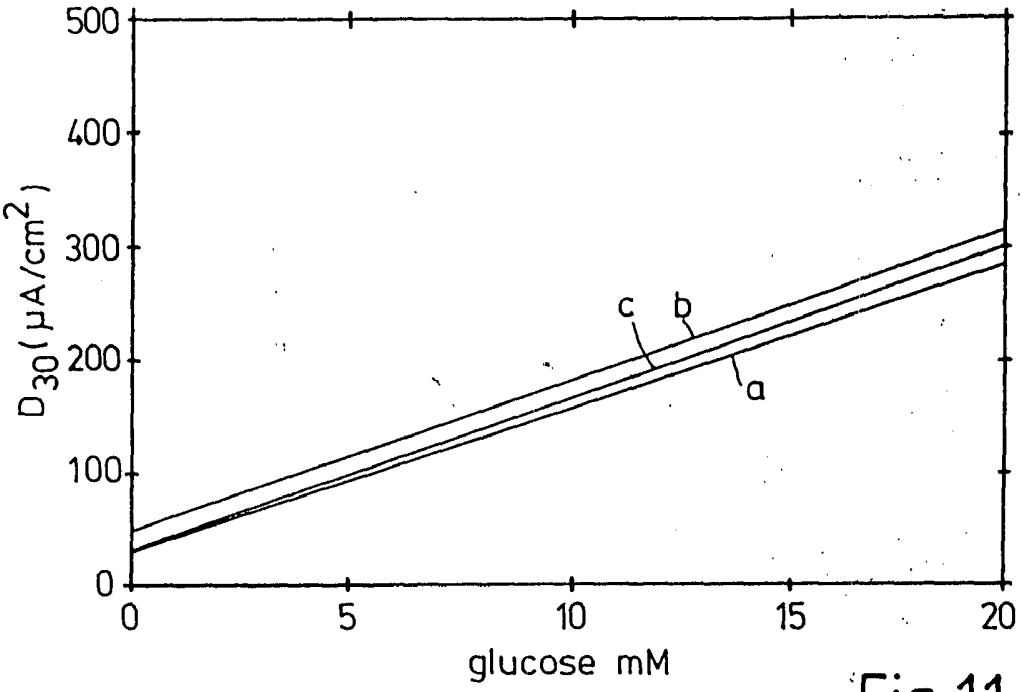


Fig.11

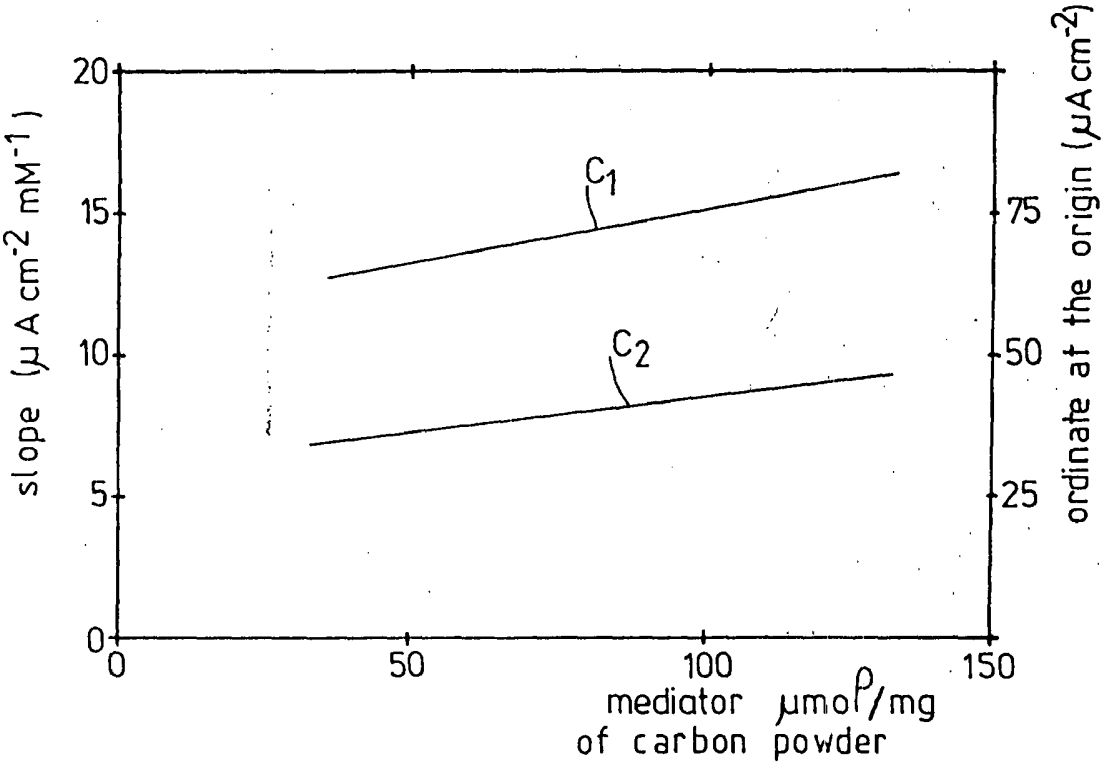
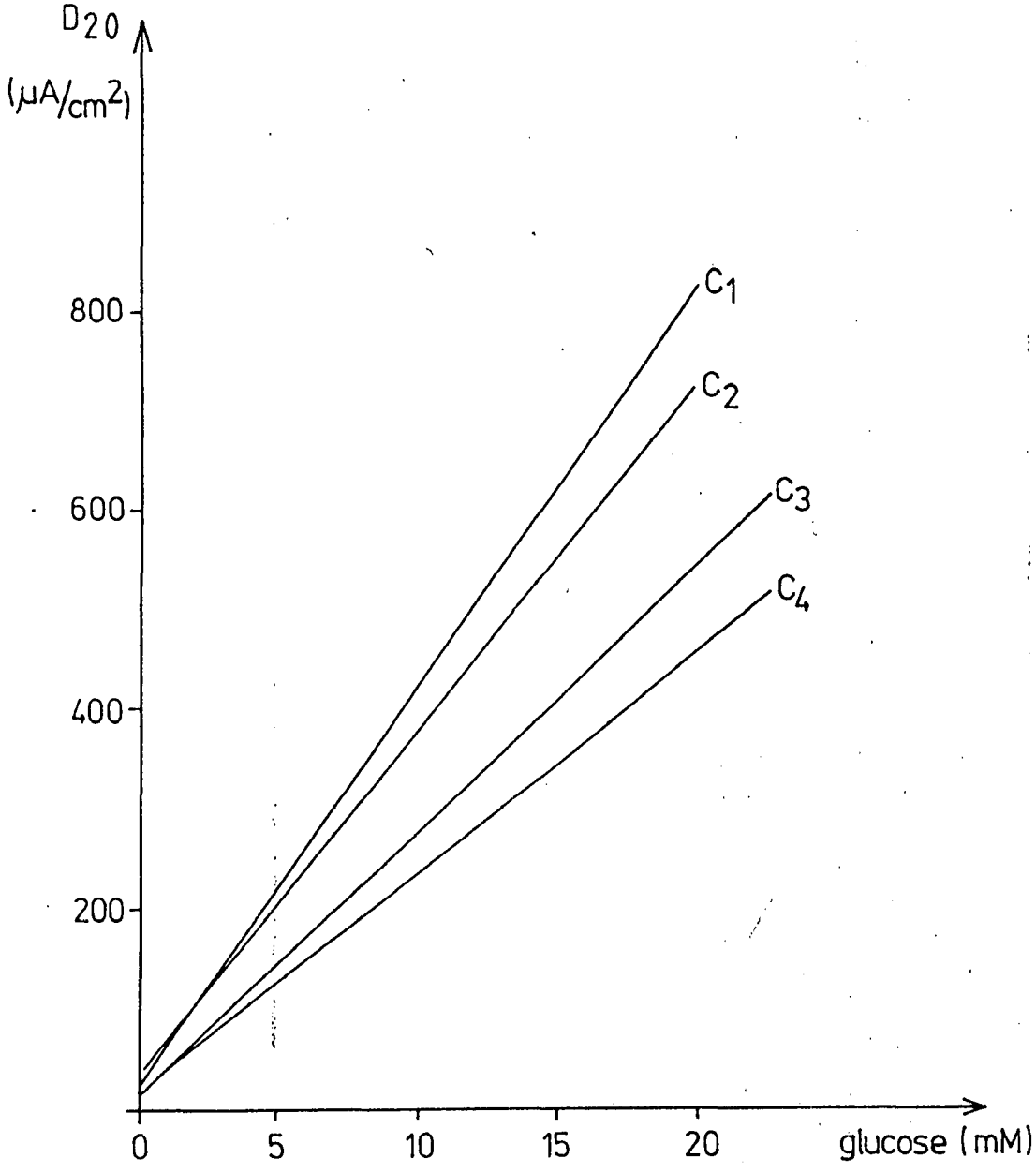


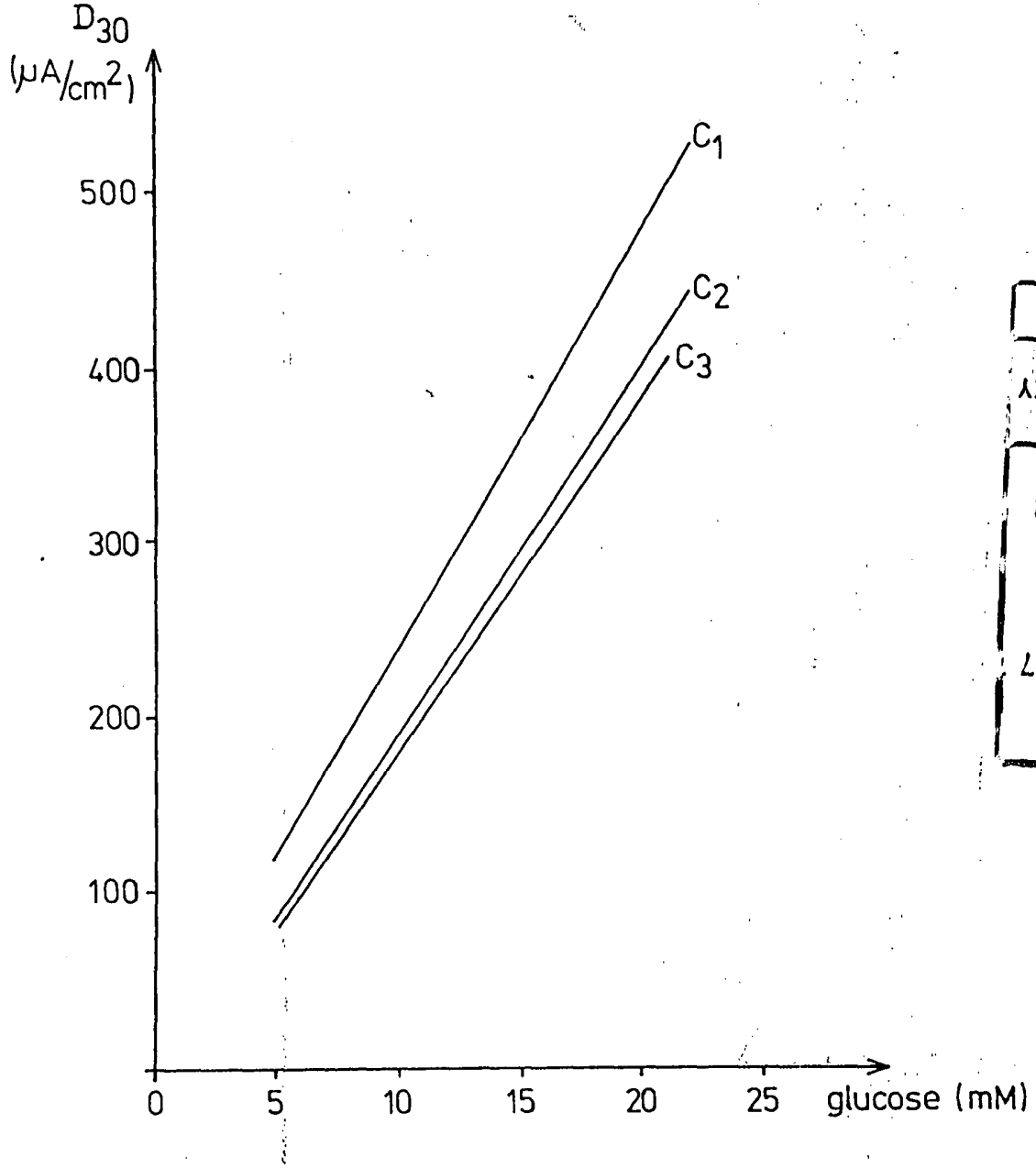
Fig.12

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
Došlo
19. X. 92
0 5 8 5 2 7
Příl.



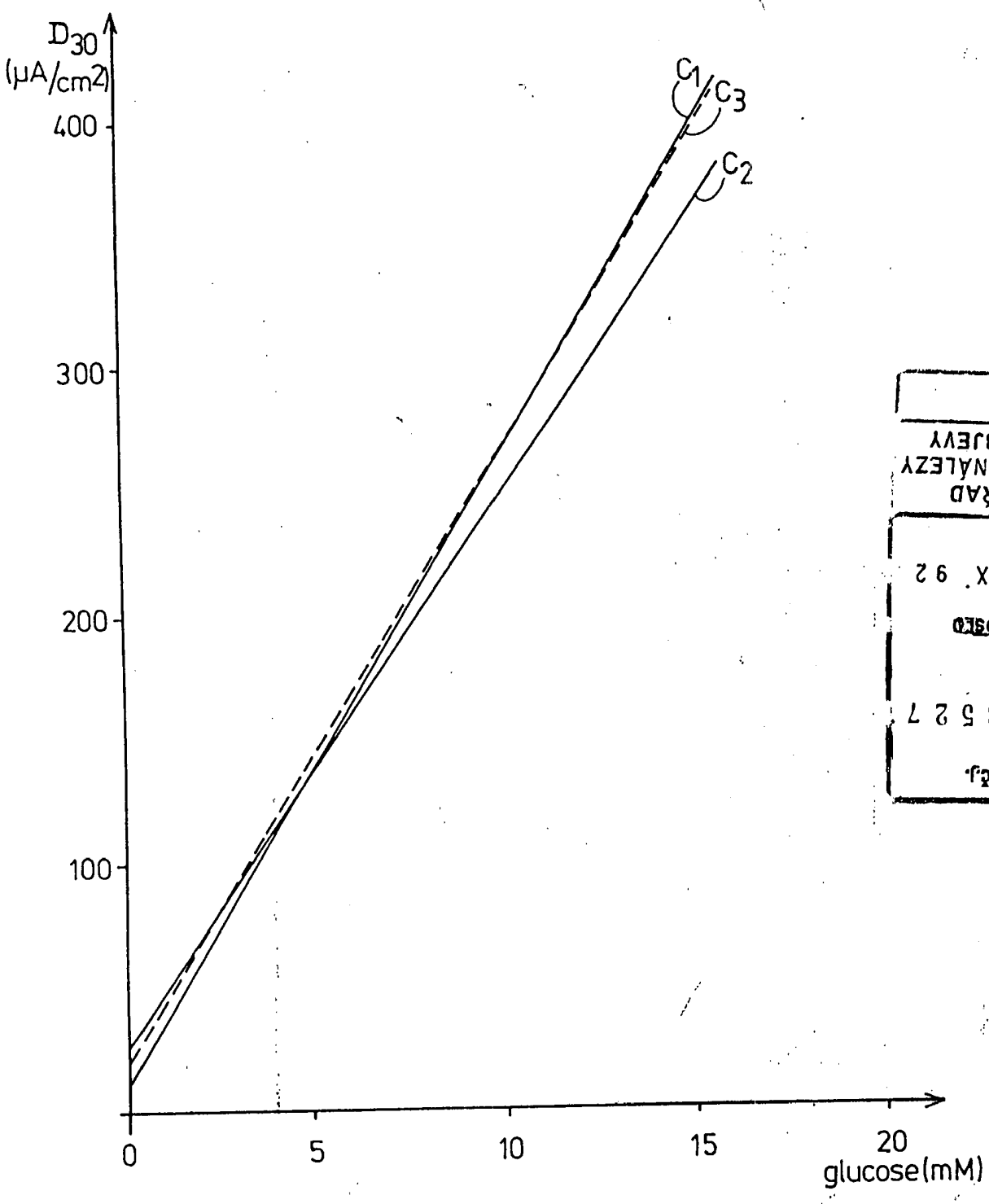
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.
č.j.
0 5 8 5 2 7
DOŠLO
19. X. 92

Fig. 13



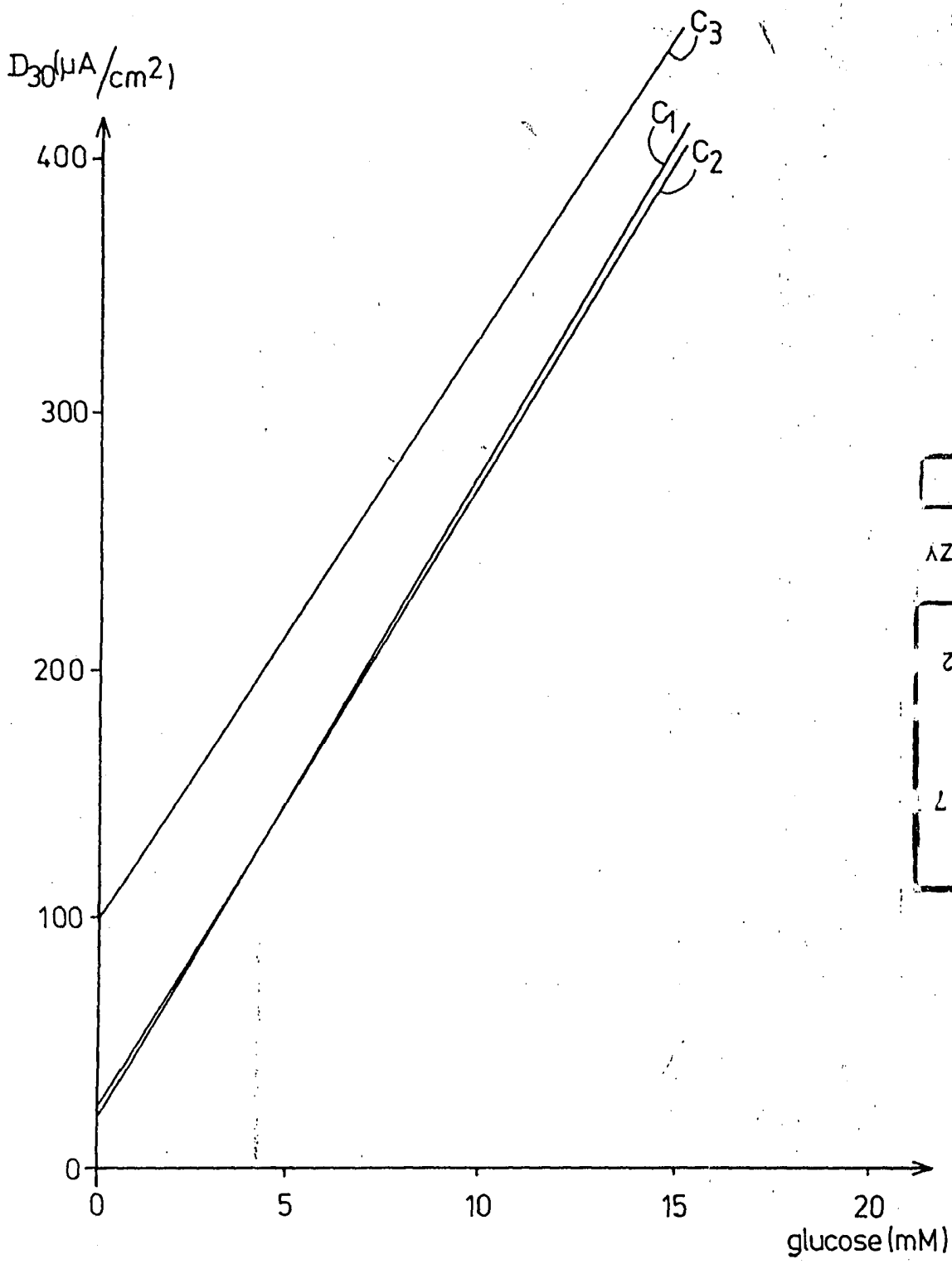
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘIL.
0 5 8 5 2 7
19. X. 92

Fig. 14



č.j.
0 5 8 5 2 7
DOSLO
19. X. 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.

Fig.15



č.j.
0 5 8 5 2 7
DOSLO
19. X. 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.

Fig. 16