



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) EE-EP 1 935 331 B1

(51) Int. Cl.
C23C 18/16 (2006.01)
C23C 18/12 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/54 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
 PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: E011442	(73) Patendiomanik: A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.R.L. Via Sette Santi 3, I-50131 Firenze, IT
(11) Patendikirjelduse tõlke number: EE-EP 1 935 331 B1	(72) Leiutise autorid: Palleschi, Giuseppe Via Scarlatti 4, 00198 Roma, IT Ricci, Francesco Via Monte Conero 7, 00141 Roma, IT Moscone, Danila Via Bettino Ricasoli 1, 04022 Fondi, IT Poscia, Alessandro Via Vecchia Aretina 82/5, 50067 Rignano Sull'Arno, IT
(30) Prioriteediandmed: 13.12.2006 IT FI20060322	(74) Patendivolinik: Jüri Käosaar Patendibüroo KÄOSAAR OÜ Tähe 94, 50107 Tartu, EE
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: 11.12.2007	
(96) Euroopa patenditaotluse number: 07122884.5	
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: 09.09.2015	
(97) Euroopa patendi number: EP 1 935 331	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: 04.12.2015	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: 15.02.2016	

(54) Meetod modifitseeritud elektroodide valmistamiseks, selle meetodi järgi valmistatud elektroodid ja ensümaatilise biosensor, mis sisaldab seda elektroodi

Meetod modifitseeritud elektroodide valmistamiseks, selle meetodi järgi valmistatud elektroodid ja ensümaatiline biosensor, mis sisaldab seda elektroodi

TEHNIKAVALDKOND

- 5 Käesolev leiutis puudutab analüütide mõõtmiseks bioloogilistes vedelikes kasutatavate modifitseeritud elektroodide valdkonda ja eelkõige Preisi sinisega modifitseeritud elektroodide ettevalmistamise uut protsessi, modifitseeritud elektroode, mis on kirjeldatud viisil ette valmistatud, nimetatud elektroode sisaldavaid biosensoreid ja meetodit analüütide määramiseks bioloogilistes
- 10 vedelikes, kasutades nimetatud elektroode.

TEHNIKA TASE

- Preisi sinise kasutamist amperomeetriliste ensümaatiliste elektroodide modifitseerimiseks teatakse juba mõnda aega ja 80-ndatest pärinevast avastusest tulenevalt saab Preisi sinise sadestada elektroodikihtidena, mis on
- 15 erinevatest materjalidest, nagu plaatina, klaassüsinik, SnO_2 ja TiO_2 , ning sellel on katalüütiline toime analüüdi ensümaatilise oksüdatsiooni ajal produtseeritud vesinikperoksiidile.

- Nimetatud elektroodidega, mida on modifitseeritud Preisi sinisega, saab määrata moodustunud vesinikperoksiidi kontsentratsiooni, võimaldades seeläbi kaudselt
- 20 mõõta oksüdeerunud analüüdi kontsentratsiooni, mis on otseselt proportsionaalne produtseeritud vesinikperoksiidi kogusega.

- Seetõttu on Preisi sinisega modifitseeritud elektroode kasutatud analüütilistes rakendustes, eelkõige amperomeetrilistes biosensorites glükoositasemete mõõtmiseks veres. Lisaks toimimisele elektrokeemilise mediaatorina
- 25 vesinikperoksiidi redutseerimises võib Preisi sinise kihti kasutada ka substraadina oksüdaasi ensüümi immobiliseerimiseks.

Preisi sinisega modifitseeritud elektroode võib ette valmistada näiteks raudferrotsüaniidi lahuste elektrokeemilise sadestamise teel elektroodile, mis

koosneb ühest eespool nimetatud materjalidest. USA patent nr 5 876 581 kirjeldab näiteks elektrokeemilise sadestamise protsessi, milles üks paar elektroode kastetakse lahusesse, mis sisaldab raud(III)- ja heksatsüanoferraat(III)ioone; teostades elektrolüüsi kahest elektroodist ühega katoodina ja teisega anoodina;

- 5 Preisi sinisena tuntud lahustumatu raud(III)heksatsüanoferraat(III) kiht sadestub katoodi pinnale.

Elektroodid, mida selles protsessis saab kasutada vastavalt patendidokumendile US 5 876 581, vajavad inertsest metallist, nagu plaatina, roodium, kuld jne, valmistatud või sellega kaetud katoodi või konduktiivse metalli oksiidi või pooljuhi juuresolekut.

- 10 Viimasel ajal on traditsiooniliste elektrootodide asemel kasutusele võetud sõeltrükitud elektrootodid (*screen printed electrodes* – SPE), millel on palju eeliseid: need on odavad, hõlpsasti ette valmistatavad, need on universaalsed ja sobivad tööstuslikuks masstootmiseks.

- Nagu eespool mainitud, on Preisi sinisega modifitseeritud elektrootode nüüdseks kasutatud juba mõnda aega, sadestades selle toote elektrootodi pinnale elektrokeemiliste meetodite abil. Nimetatud meetodid ei sobi siiski modifitseeritud elektrootodide, eelkõige sõeltrükitud elektrootodide masstootmiseks kahel peamisel põhjusel: 1) elektrokeemilised protseduurid on tavaliselt pikad ja neid tuleb teha elektrootodide kaupa, mis on suure hulga elektrootodide valmistamise puhul tohtu ajakuluga; ja 2) sõeltrükitud elektrootodide lame kuju teeb elektrokeemiliste protseduuride kasutamise raskeks ja töömahukaks, sest need nõuavad elektrootodi kastmist ioonilisi liike sisaldavasse lahusesse, mis võib põhjustada Preisi sinise kihi moodustumise ka võrdluselektrootodi pinnale, takistades elektrijuhtivust ja sõeltrükitud elektrootodi kasutamist analüütilisel otstabel.

- 25 Nendel põhjustel ei ole praegu taotlejale teadaolevalt olemas elektrokeemilist protseduuri Preisi sinise sadestamiseks sõeltrükitud elektrootodidele. Protsessi, mis on ette nähtud Preisi sinise keemiliseks sadestamiseks sõeltrükitud elektrootodile, on kirjeldanud Ricci *et al.* artiklis „Biosensors and Bioelectronics“, 18 (2003) 165–174. Nimetatud protsess hõlmab enne Preisi sinise keemilist sadestamist elektrootodide elektrokeemilist eeltöötlust 3 minuti jooksul volupingel 1,7 V. Vastavalt sellele artiklile on nimetatud protseduur oluline parema korduvteostatavuse ja elektrootodi

reageerimise saavutamiseks, kuid teisalt muudab see modifitseeritud elektrodide tootmise väga töömahukaks, nõudes neist igaühe puhul elektrokeemilist eeltöötlust ja tehes seeläbi olematuks keemilise sadestamise eelised.

- 5 Pealegi sadestatakse eespool nimetatud artiklis kirjeldatud protsessis Preisi sinine elektrodile käsitsi, keerulise protsessi abil, mis nõuab suurt ettevaatust, et vältida süsteemi sisemise takistuse suurenemist: segu tuleb ette valmistada kohapeal, lisades kaaliumferritsüaniidi lahust HCl-is raudkloriidi lahusele HCl-is, mille järel sadestatakse tilk nimetatud segu ainult tööelektroodi pinnale, püüdes vältida võrdluselektroodi ja vastaselektroodi.
- 10 Isegi siis, kui rakendatakse eespool nimetatud ettevaatusabinõusid, on sellisel viisil modifitseeritud elektrodide puhul sadestamise korduvteostatavus ja Preisi sinise kihi stabiilsus piiratud, ning seetõttu, kuigi sõeltrükitud elektroode ennast iseloomustab sellise elektroodi pinna korduvteostatavuse kõrge tase, mis vastutab analüüdi elektrisignaali stabiilsuse ja korduvteostatavuse eest, tekitab kehv
- 15 korduvteostatavus ja ühtluse puudumine Preisi kihi ettevalmistamisel tõsiseid probleeme analüütide koguse mõõtmisel bioloogilistes vedelikes ja üldiselt rakendustes, mille jaoks elektrod on ette nähtud. Teades sõeltrükitud elektrodide kasutamisega seotud eeliseid, on ilmne, et sektoris on suur vajadus hõlpsasti skaleeritava protsessi järele, mille kaudu saab Preisi sinisega sõeltrükitud
- 20 elektrodide pinda modifitseerida, ületades puudused, mis teadaolevate protsesside puhul eespool esile tõstetud on.

LEIUTISE OLEMUS

- Taotleja on välja töötanud uue protsessi, mis on eelkõige odav ja lihtne produtseerida ning mis võimaldab sõeltrükitud elektrodide modifitseerimist Preisi
- 25 sinisega, saavutades kõrgel tasemel stabiilsuse ja korduvusteostatavusega elektrodid, mis on kasulikud tasapinnaliste biosensorite tootmisel kasutamiseks analüütide kvantitatiivseks määramiseks bioloogilistes vedelikes.

- Käesoleva leiutise objekt on seetõttu Preisi sinisega modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi ettevalmistamise protsess vastavalt nõudluspunktile 1, mis hõlmab
- 30 nimetatud sõeltrükitud elektroodi pinnale sellise lahuse järjestikust sadestamist, mis

sisaldab raud(III)- või raud(II)iooni ja vähemalt ühte pindaktiivset ainet sobivas lahustis, ja lahust, mis sisaldab ferrotsüaniid(II)- või ferrotsüaniid(III)iooni ja vähemalt ühte pindaktiivset ainet sobivas lahustis, kusjuures nimetatud lahustel on kontsentratsioonid, mis võimaldavad Preisi sinise moodustumise otse elektroodi pinnal.

Sõeltrükitud elektrood, mida modifitseeriti Preisi sinisega vastavalt nõudluspunktile 16 ning mis valmistati ette eespool nimetatud protsessi abil, ensümaatilise elektrood vastavalt nõudluspunktile 17 ja nimetatud elektroodi sisaldav ensümaatilise biosensor vastavalt nõudluspunktile 19 ning meetod analüüsi koguse määramiseks bioloogilises proovis vastavalt nõudluspunktile 21, mis hõlmab kontakti nimetatud proovi ja eespool nimetatud ensümaatilise biosensori vahel, moodustavad leiutise edasise teema. Leiutise karakteristikuid ja eeliseid illustreeritakse üksikasjalikult alljärgnevas kirjelduses.

JOONISTE LOETELU

- 15 Joonisel 1 on kujutatud sellise modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi profiil, mis on valmistatud vastavalt näites 1 antud kirjeldusele;
- joonisel 2 on kujutatud tsükliline voltamperogramm, mis on registreeritud modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi kasutades, nagu on kirjeldatud näites 1 (köver a), ja tsükliline voltamperogramm, mis on registreeritud sama elektroodiga
- 20 H_2O_2 juuresolekul (köver b), mis näitab Preisi sinise elektrokatalüütilist aktiivsust;
- joonisel 3 on kujutatud tsükliline voltamperogramm, mis on registreeritud, kasutades modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi, nagu on kirjeldatud näites 3 võrdluseks (köver a), ja tsükliline voltamperogramm, mis on registreeritud sama elektroodiga H_2O_2 juuresolekul, mis näitab Preisi sinise elektrolüütilist aktiivsust;
- 25 joonisel 4 on kujutatud näites 1 kirjeldatud modifitseeritud elektroodi kasutamisel registreeritud tsüklilise voltamperogrammi (köver 1) ja näites 3 kirjeldatud modifitseeritud elektroodiga registreeritud voltamperogrammi (köver b) vaheline võrdlus. Tuleb märkida, et Preisi sinise suurem sadestamine saavutati näite 1 elektroodiga; ning
- 30 joonisel 5 tuleb märkida, et võrdluses näitele 1 (joonis 5a) vastava modifitseeritud elektroodi tööstabiilsuse ja näitele 3 (joonis 5b) vastava modifitseeritud elektroodi

tööstabiilsuse vahel saavutati suurem tööstabiilsus näites 1 kirjeldatud protseduuriga.

TEOSTUSNÄIDE

5 Leiutisekohases protsessis kasutatud lahus, mis sisaldab raud(III)- või raud(II)iooni, on näiteks sellise ühendi happelahus, mille pH on vahemikus 0,5–6,0, eelistatavalt happelahus, mis on saadud HCl-i lisamisega, mis on valitud rühmast, mis sisaldab anorgaaniliste hapete raud(III)- või raud(II)soolasid, näiteks raudkloriidi, raudsulfaati ja raudnitraati; eelistatavalt on käesolev lahus raudkloriidi lahus 0,01 M veelises HCl-is, mille pH on 2,0.

10 Raud(III)- või raud(II)iooni kontsentratsioon eespool nimetatud lahuses võib olla näiteks vahemikus 20 mM kuni 2 M ning on eelistatavalt 1 M.

Lahus, mis sisaldab heksatsüanoferraat(III)iooni vastavalt käesolevale leiutisele, on näiteks sellise soola happelahus, mille pH on vahemikus 0,5–6,0 ning mis on saadud eelistatavalt HCl-i lisamise teel, mis sisaldab ferrotsüaniidi $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ iooni
15 või ferrotsüaniidi $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, näiteks naatrium-, kaalium-, ammoonium- või koobalt-heksatsüanoferraati; eelistatavalt on juuresolev lahus kaaliumferriitsüaniidi $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ lahus 0,01 M veelises HCl-is, mille pH on 2,0.

Ferrotsüaniid(II)- või ferrotsüaniid(III)iooni kontsentratsioon eespool nimetatud lahuses võib olla näiteks vahemikus 20 mM kuni 2 M ning on eelistatavalt 1 M.

20 Vastavalt leiutisele hõlmab käesolev protsess raud(III)- või raud(II)iooni sisaldava lahuse sadestamist tööelektroodi pinnale ja vahetult pärast seda heksatsüanoferraat(III)iooni sisaldava lahuse sadestamist võrdses koguses ja kontsentratsioonis.

25 Kahe lahuse, mille kontsentratsioon on vahemikus 20 mM kuni 2 M, maht on näiteks vahemikus 100 nL kuni 4 μL elektroodi sellise pinna kohta, mis on vahemikus 0,314 mm^2 kuni 3,14 mm^2 , eelistatavalt 3,14 mm^2 .

Elektroodid, mis on sөлtrükitud inertsele materjalile, näiteks polükarbonaadile, polüestrile, polüvinüülkloriidile (PVC) või mõnele muule plastmaterjalile, sobivate

elektrit juhtivate materjalide (näiteks grafiit, hõbe, kuld või plaatina) trükivärvidega, sobivad kasutamiseks käesolevas protsessis leiutisekohaste modifitseeritud elektrodide ettevalmistamiseks, kusjuures tööelektroodi puhul eelistatakse grafiittrükivärvi.

- 5 Vajaduse korral jäetakse segu pärast kahe lahuse segamist seisma, näiteks 2 minutist kuni 2 tunnini, ja eelistatavalt 10 minutiks; seejärel pestakse tööelektroodi pinda pesulahusega, mis koosneb näiteks happelisest vesilahusest, mille pH on 0,5–6,0, ja eelistatavalt 0,01 M HCl-i vesilahusest, mille pH on 2,0.

Seejärel saab tööelektroodi pesta veel destilleeritud veega.

- 10 Sellisel viisil modifitseeritud elektrodid jäetakse seejärel ahju kuivama näiteks temperatuuril vahemikus 50 °C kuni 200 °C, ajavahemikuks 10 minutist kuni 3 tunnini. Eelistatavalt pannakse elektrod ahju temperatuuril 100 °C 1 tunniks ja 30 minutiks.

- Kaks lahust, mis sisaldavad raud(III)- või raud(II)iooni ja ferrotsüaniid(II)- või ferrotsüaniid(III)iooni vastavalt käesolevale leiutisele, sisaldavad veel vähemalt ühte pindaktiivset ainet, mis on valitud katioonsete, anioonsete, amfoteersete pindaktiivsete ainete ja nende segude seast sellistes kogustes iga lahuse jaoks, mis moodustavad näiteks 0,001–10% (kaaluprotsent) lahuse kogumahust. Eelistatavalt valitakse pindaktiivne aine rühmast, mis koosneb
- 20 naatriumlaurüülsulfaadist, laurüületoksüsulfaadist, bensalkooniumkloriidist, ühenditest, mis kuuluvad tooteperekonda, mida teatakse kaubanime Tween® all, s.o rasvhapete estrite polüoksüetüleeni derivaadid sorbitooliga ja nende segud.

- Vastavalt käesoleva leiutise ühele eriti eelistatud teostusele lisatakse pindaktiivset ainet polüoksüetüleeni(20)sorbitaan-monolauraati, mida müüakse
- 25 nimetuse Tween® all, mõlemale kahele lahusele, mis sisaldavad vastavalt raud(III)- või raud(II)iooni ja ferrotsüaniid(II)- või ferritsüaniid(III)iooni, kogustes, mis moodustavad 0,05% (kaaluprotsent) lahuse kogumahust.

- Käesoleva sadestamisprotseduuriga on tööelektroodi pinnale võimalik saada Preisi sinise kiht, mis on väga hästi reprodutseeritav ja elektrokeemiliselt aktiivne. Peale selle on tsüklilise voltamperomeetria meetodiga määratud kindlaks tööelektroodil
- 30

pärast sadestamist olev Preisi sinise kogus, mis on vahemikus 10–200 nmol/cm² ja eelistatavalt 100 nmol/cm².

Seetõttu on käesoleva protsessiga võimalik saada Preisi sinise massiivne sadestus, mida pole varem kunagi täheldatud keemiliste ega elektrokeemiliste protsessidega; kusjuures elektroodi pinnal oleva Preisi sinise suur pinnatihedus võimaldab saada
5 väga suure tööstabiilsuse mõjutamata Preisi sinise katalüütilist aktiivsust võrreldes H₂O₂ redutseerimisega.

Käesoleva leiutise kohase protsessiga ettevalmistatud Preisi sinisega modifitseeritud elektroode võib kasutada nii kahe kui ka kolme elektroodiga
10 ensümaatiliste biosensorite ettevalmistamiseks, mis on samuti käesoleva leiutise objektiks. Nimetatud biosensorites kasutatakse modifitseeritud elektroodi sellise sobiva ensüümi immobiliseerimise toena, mis on valitud biosensori jaoks mõeldud analüütilise määramise tüübi alusel, s.t selliselt, et detekteeritav analüüt funktsioneerib ensüümi substraadina, genereerides toote, mida saab modifitseeritud
15 elektroodil oksüdeerida või redutseerida elektrokeemiliselt, varieerides selle voolu kogust, mis on detekteeritud proportsionaalselt analüüsitud vedelikus olemasoleva analüüdi kogusega.

Käesolev biosensor sisaldab ensümaatilist elektroodi, s.o eespool kirjeldatud leiutisekohast modifitseeritud elektroodi, millel ensüüm on immobiliseeritud
20 tavaliselt kasutatavate ja vastava eriala asjatundjale teadaolevate protseduuride abil, ja õönt analüüsitava bioloogilise vedeliku vastuvõtmiseks selliselt, et viimane oleks kokkupuutes ensüümiga.

Vastavalt käesoleva leiutise eelistatud teostusele sisaldab käesolev biosensor leiutisekohast modifitseeritud elektroodi, millel on immobiliseeritud glükoosi
25 oksüdaasi ensüüm, ja seda kasutatakse glükoosi määramiseks bioloogilistes vedelikes, nagu veri, seerum või plasma; kusjuures antud juhul on analüüdiks glükoos, mis oksüdeerimisel ensüümiga moodustab H₂O₂, mida redutseeritakse modifitseeritud elektroodil selle elektroodi ja võrdluselektroodi vahel rakendatava voolupinge tõttu, genereerides voolusignaali, mis on proportsionaalne
30 moodustunud H₂O₂ kogusega ja seetõttu õones olevas vedelikus sisalduva glükoosi kogusega.

Käesoleva leiutise teine objekt on bioloogilises vedelikus sisalduva analüüdi koguse määramise meetod, mis hõlmab sobiva väärtusega voolupinge rakendamist eespool kirjeldatud leiutisekohase modifitseeritud elektroodi ja käesolevas biosensoris sisalduva võrdluselektroodi vahel ning genereeritud
5 voolusignaali lugemist.

Eelistatavalt kasutatakse käesolevat meetodit bioloogilistes vedelikes sisalduva glükoosi koguse määramiseks ning rakendatav voolupinge on madal, näiteks vahemikus -250 mV kuni $+200$ mV, eelistatavalt -50 mV.

Eespool kirjeldatud Preisi sinisega modifitseeritud elektroodide ettevalmistamise
10 protsessil on sadestamise etapi korduvteostatavuse kõrge tase, mis mõjutab positiivselt selle protsessi kaudu modifitseeritud elektroodidega teostatud mõõtmise korduvteostatavust, peale selle võimaldab see saada modifitseeritud elektroodi, mille tööstabiilsus on suurem kui ükskõik millisel Preisi sinisega modifitseeritud elektroodil, mida on siiani ette valmistatud teadaolevate
15 protsessidega. On täheldatud, et käesoleva protsessi abil modifitseeritud elektroodides on pärast 150 tunni pikkust pidevat kasutamist Preisi sinise kiht endiselt aktiivne ja elektrokeemilise aktiivsuse vähenemine on ainult ligikaudu 35%.

Lisaks suuremale tööstabiilsusele on leiutisekohase protsessiga ettevalmistatud ja Preisi sinisega modifitseeritud elektroodidel ka suurem pikaajaline stabiilsus
20 ladustamise ajal.

Peale selle, need stabiilsuse väärtused, nii töötamise kui ka ladustamise ajal, ning korduvteostatavuse väärtused saavutatakse nii kahe kui ka kolme elektroodiga biosensorite puhul sellise protsessiga, mis ei nõua elektroodide elektrokeemilist eeltöötlemist enne Preisi sinise sadestamist, vastupidiselt näiteks protsessile, mida
25 on kirjeldanud Ricci *et al.* artiklis "Biosensors and Bioelectronics" 18 (2003) 165–174, ning on seetõttu palju väiksema töömahukusega ja hõlpsasti automatiseeritav ning seetõttu skaleeritav tööstuslikul tasandil.

Leiutisekohaste modifitseeritud elektroodide veel üks eelis näiteks glükoosi määramiseks kasutatavate kahe elektroodiga biosensorite puhul on see, et need
30 sisaldavad tööelektroodi ja võrdluselektroodi ning ei nõua vastaselektroodi

olemasolu vastupidiselt näiteks eespool nimetatud Ricci *et al.* artiklis kirjeldatud Preisi sinisega modifitseeritud elektroodidele.

Alljärgnevad näited illustreerivad käesolevat leiutist seda piiramata.

1. näide

5 Modifitseeritud elektroodi ettevalmistamine

Järgides teadaolevat protseduuri, valmistati sõeltrükitud elektrood ette polüesterplaadil, mis sisaldas grafiittrükivärviga ettevalmistatud ringikujulist tööelektroodi läbimõõduga 2 mm ja hõbedast võrdluselektroodi; kusjuures tööelektroodi pind oli piiritletud isoleermaterjalist valmistatud trükivärviga.

10 Joonisel 1 on näidatud sellisel viisil saadud elektroodi profiil.

Seejärel valmistati kaks lahust:

- 1) 1 M kaalium ferritsüaniid $K_3Fe(CN)_6$ lahust 10 mM HCl-is, ja
- 2) 1 M lahus: raudkloriid 10 mM HCl-is. Mõlemale lahusele lisati toodet Tween® 20 koguses, mis moodustab 0,05% (kaaluprotsent) lahuse kogumahust.

15 Automaatse doseerimismasinaga 1) sadestati 1 ml lahust tööelektroodi pinnale ja vahetult pärast seda, kasutades sama automatiseeritud sadestamistehnikat, 2) sadestati 1 ml lahust tööelektroodi samale pinnale, mille tulemusena oli nimetatud pinnal 2 ml raudkloriidi ja kaaliumheksatsüanoferraadi lahust.

20 Pärast 10 minuti möödumist pesti sellisel viisil modifitseeritud elektroode mõne milliliitri 10 mM HCl-i lahusega ning asetati seejärel 1 tunniks ahju temperatuuril 100 °C.

Eespool kirjeldatud protseduuri tulemusena sadestati elektroodile väga kompaktna ja stabiilne Preisi sinise kiht suure Preisi sinise pinnatihedusega tööelektroodil.

25 Viimast kinnitavad joonisel 2 näidatud tsüklilise voltamperomeetria tulemused, mis võimaldasid tööelektroodi pinnal oleva Preisi sinise koguse arvutamist: mõõdetud pinnatiheduse väärtus on ligikaudu 100 nmol/cm², mis on palju suurem kui senini kirjanduses avaldatud andmed, mis on saadud erinevaid sadestamismeetodeid kasutades.

2. näide

1. näites ettevalmistatud elektroodi Preisi sinise katalüütilise aktiivsuse määramine

1. näites kirjeldatud viisil ettevalmistatud modifitseeritud elektroodi omadusi kontrollitakse tsüklilise voltamperomeetria abil volupinge vahemikus $-0,4$ kuni $0,4$
5 V.

Joonisel 2 on näidatud voltamperogrammid, mis on saadud veel modifitseerimata sөлtrükitud elektroodi puhul ja Preisi sinisega modifitseeritud sama elektroodi puhul, mis on ette valmistatud vastavalt 1. näites antud kirjeldusele. Viimasena nimetatud elektroodi puhul võib voltamperogrammis näha katoodi laines
10 suurenemist kuni ligikaudu $0,05$ V vesinikperoksiidi juuresolekul, mis näitab elektroodile sadestatud Preisi sinise kihi katalüütilist aktiivsust.

3. näide (võrdlus)

Modifitseeritud elektroodide ettevalmistamine vastavalt Ricci *et al.* kirjeldusele artiklis "Biosensors and Bioelectronics" 18 (2003) 165–174

15 Järgides protseduuri, mida on eelnevalt kirjeldanud Ricci *et al.* artiklis "Biosensors and Bioelectronics" 18 (2003) 165–174, modifitseeriti polüesterplaadile sөлtrükitud elektrood, mis sisaldas grafiittrükivärviga ettevalmistatud ringikujulist tööelektroodi läbimõõduga 2 mm ja hõbedast võrdluselektroodi; kusjuures tööelektroodi pind oli piiritletud isoleermaterjalist valmistatud trükivärviga.

20 Seejärel valmistati kaks lahust:

1) $0,1$ M lahus: kaaliumferritsüaniid $K_3Fe(CN)_6$ 10 mM HCl-is, ja

2) $0,1$ M lahus: raudkloriid 10 mM HCl-is.

Enne kahe lahuse sadestamist elektrokeemilise meetodi abil, sellise protseduuriga, mis on sobimatu automatiseerimiseks ning mis on palju töömahukam ja pikem kui
25 1. näites kirjeldatud protseduur, eeltöödeldi elektroodi, rakendades 3 minuti jooksul konstantset volupinget $1,7$ V vs Ag/AgCl.

Kasutades automaatset doseerimismasinat, 1) sadestati 20 μ l lahust tööelektroodi pinnale ja vahetult pärast seda, kasutades sama sadestamistehnikat, 2) sadestati

20 µl lahust tööelektroodi samale pinnale, mille tulemusena saadi 40 µl raudkloriidi ja kaaliumheksatsüanoferraadi segu.

Pärast 10 minuti möödumist pesti sellisel viisil modifitseeritud elektroode mõnes milliliitris 10 mM HCl-i lahuses ning asetati seejärel 1 tunniks ahju temperatuuril 100 °C. Sellisel viisil sadestatud Preisi sinise elektrokatalüütilist aktiivsust hinnati, järgides sama protseduuri, mida on kirjeldatud näites 2. Joonisel 3 on näidatud tsüklilised voltamperogrammid, mis on saadud eespool kirjeldatud modifitseeritud sөлtrükitud elektroodi puhul.

4. näide

10 Leiutisekohaste ja tehnika tasemest teadaolevate modifitseeritud elektroodide analüütiliste omaduste määramine.

Katsetati Preisi sinisega modifitseeritud ning eespool 1. ja 3. näites antud kirjeldusele vastavalt ettevalmistatud elektroodide analüütilisi omadusi, hinnates reageerimist H₂O₂-le, stabiilsust kasutamisel ja ladustamisel ning korduvteostatavust. Mis puudutab korduvteostatavust, siis korduvteostatavuse väärtused, mis on arvatud suhtelise standardhälvena protsentides (allpool lühendina RSD%), on 3. näites kirjeldatud modifitseeritud elektroodide puhul ligikaudu 20%, mis ei ühildu ühegi tööstuslikku tüüpi rakendusega, seevastu RSD%, mis arvutati 1. näites kirjeldatud viisil modifitseeritud leiutisekohase elektroodi puhul, oli 5%.

Mis puudutab elektroodidele sadestatud Preisi sinise paksust, siis 3. näites kirjeldatud tehnika tasemes teadaoleva protseduuriga saavutati Preisi sinise kiht pinnatihedusega 1–10 nmol/cm², mis on palju väiksem pinnatihedusest, mis saavutati 1. näite leiutisekohase elektroodi puhul (ligikaudu 100 nmol/cm²), nagu on näidatud tsükliliste voltamperomeetriaate võrdlusega (joonis 4).

Selle tulemuseks on Preisi sinise suurem tööstabiilsus, mis on maksimaalselt kuni 200 tundi. Joonisel 5 on näiteks näidatud pidev monitoorimine mõõtmismeetodiga kahe elektroodi puhul, mis on ette valmistatud 1. ja 3. näites kirjeldatud protseduure järgides.

Nagu selgelt on näha, annavad mõlemad elektroodid H_2O_2 5 mM kontsentratsiooni korral redutseerimisvoolu Preisi sinise katalüütilise aktiivsuse tõttu, kuid 1. näite elektrood näitab suuremat tööstabiilsust pikaajaliselt, kusjuures vähenemine esialgses signaalis on 200 tunni järel ainult 20%.

- 5 3. näites ettevalmistatud tehnika tasemes teadaoleva elektroodi puhul täheldati märkimisväärsemat vähenemist, mis oli 200 tunni järel ligikaudu 70%.

5. näide

Biosensori ettevalmistamine

- 10 Modifitseeritud elektroodi, mis valmistati ette vastavalt eespool 1. näites antud kirjeldusele, kasutati toena glükoosi oksüdaasi ensüümi immobiliseerimiseks eesmärgiga saavutada biosensor, mis on kasulik glükoosi pidevaks monitoorimiseks veres.

- 15 Sellel otstarbel sadestati 200 nL glutaraldehüüdi lahust (0,025% (mahuprotsent) H_2O -s) tööelektroodi pinnale, mida oli eelnevalt modifitseeritud Preisi sinisega, nagu on kirjeldatud 1. näites eespool. Ligikaudu 25 minuti pärast sadestati tööelektroodi samale pinnale 200 nL segu, mis saadi 10 mg glükoosi oksüdaasi ensüümi lahustamisel 1 ml Nafion[®]-i (0,1%) vesilahuses. Seejärel jäeti see ligikaudu 25 minutiks seisma, et saavutada sadestatud lahuse täielik kuivamine.

Patendiõudlus

1. Preisi sinisega modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi ettevalmistusmeetod, mis erineb selle poolest, et see sisaldab nimetatud sõeltrükitud elektroodi pinnale sellise lahuse järjestikust sadestamist, mis sisaldab raud(III)- või raud(II)iooni ja vähemalt
- 5 ühte pindaktiivset ainet sobivas lahustis, ja lahust, mis sisaldab ferrotsüaniid(II)- või ferritsüaniid(II)iooni ja vähemalt ühte pindaktiivset ainet sobivas lahustis, kusjuures nimetatud lahustel on sellised kontsentratsioonid, mis võimaldavad saavutada Preisi sinise moodustumise otse elektroodi pinnale; mille korral lahused sadestatakse võrdses koguses ja võrdse kontsentratsiooniga; kusjuures
- 10 modifitseeritud elektrood jäetakse seejärel kuivama ahju temperatuuril vahemikus 50 °C kuni 200 °C, ajavahemikuks 10 minutist kuni 3 tunnini; kusjuures nimetatud pindaktiivne aine valitakse rühmast, mis koosneb naatriumlaurüülsulfaadist ja laurüületoksüsulfaadist, bensalkooniumkloriidist, rasvhapete estrite polüoksüetüleeni derivaatidest koos sorbitooliga ja nende segudest.
- 15 2. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis erineb selle poolest, et nimetatud sõeltrükitud elektrood ei ole läbinud eeltötlust enne nimetatud lahuste järjestikust sadestamist.
3. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis erineb selle poolest, et nimetatud lahus, mis sisaldab raud(III)- või raud(II)iooni, on sellise ühendi happeline lahus vahemikus
- 20 pH 0,5–6,0, mis on valitud rühmast, mis koosneb anorgaaniliste hapete raud(III)- või raud(II)sooladest.
4. Meetod vastavalt nõudluspunktile 3, mis erineb selle poolest, et anorgaaniliste hapete nimetatud raud(III)- või raud(II)sool on valitud raudkloriidi, raudsulfaadi ja raudnitraadi hulgast.
- 25 5. Meetod vastavalt nõudluspunktile 3, mis erineb selle poolest, et nimetatud lahus on raudkloriidi lahus 0,01 M HCl-i vesilahuses, mille pH on 2,0.
6. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis erineb selle poolest, et nimetatud lahus, mis sisaldab heksatsüanoferraat(III)iooni, on sellise soola happeline lahus vahemikus pH 0,5–6,0, mis sisaldab ferrotsüaniid(II)- või ferritsüaniid(III)iooni.

7. Meetod vastavalt nõudluspunktile 6, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud sool valitakse naatriumi, kaaliumi, ammooniumi ja koobaltheksatsüanoferraadi hulgast.
8. Meetod vastavalt nõudluspunktile 6, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud lahus on kaaliumferritsüaniid $K_3Fe(CN)_6$ 0,01 M HCl-i vesilahuses, mille pH on 2,0.
- 5 9. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud lahustel on võrdne kontsentratsioon vahemikus 20 mM kuni 2 mM ning et need sadestatakse võrdses koguses vahemikus 100 nL kuni 4 μ L elektroodi pinnale vahemikus 0,314 mm² kuni 3,14 cm², eelistatavalt 3,14 mm².
- 10 10. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud sõeltrükitud elektroodid on valmistatud inertsest materjalist, mis on sõeltrükitud grafiittrükivärviga.
11. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et sisaldab lisaks järgmisi etappe: sadestatud lahuste 10 minutiks seisma jätmine, tööelektroodi pinna pesemine pesulahusega, mis koosneb veelisest happelahusest, mille pH on vahemikus 0,5–6,0, vajadusel pesemine destilleeritud veega ja jätmine ahju kuivama temperatuuril vahemikus 50 °C kuni 200 °C, 10 minutiks kuni 3 tunniks.
- 15 12. Meetod vastavalt nõudluspunktile 11, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud pesulahus on 0,01 M HCl-i vesilahus, mille pH on 2,0.
13. Meetod vastavalt nõudluspunktile 12, mis **erineb** selle poolest, et elektrood 20 jäetakse 1 tunniks ja 30 minutiks ahju kuivama temperatuuril 100 °C.
14. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud pindaktiivne aine valitakse katioonsete, anioonsete, amfoteersete pindaktiivsete ainete ja nende segude seast ning lisatakse iga lahuse puhul koguseliselt vahemikus 0,001–10 massiprotsenti lahuse kogumahust.
- 25 15. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et nimetatud pindaktiivne aine on polüoksüetüleen(20)sorbitaan-monolauraat, mida on koguseliselt 0,05 massiprotsenti lahuse kogumahust.

16. Preisi sinisega modifitseeritud sõeltrükitud elektrod, mis on ette valmistatud nõudluspunktides 1–15 määratletud protsessiga, mis erineb selle poolest, et Preisi sinise kogus on 100 nmol/cm².
17. Ensümaatiline elektrod, mis sisaldab nõudluspunktis 16 määratletud viisil modifitseeritud sõeltrükitud elektroodi ja sobivat ensüümi, mis on immobiliseeritud nimetatud elektrodile ning valitud selliselt, et toodet saab seetõttu nimetatud modifitseeritud elektrodil oksüdeerida või redutseerida elektrokeemiliselt.
18. Ensümaatiline elektrod vastavalt nõudluspunktile 17, mis erineb selle poolest, et nimetatud ensüüm on ensüümglükoosi oksüdaas.
- 10 19. Ensümaatiline biosensor, mis sisaldab ensümaatilist elektroodi, nagu on määratletud nõudluspunktides 17–18, tööelektroodina, võrdluselektroodi, vajadusel vastaselektroodi ja õõnt analüüsitava bioloogilise vedeliku vastuvõtmiseks selliselt, et viimane on kokkupuutes nimetatud ensümaatilisel elektrodil immobiliseeritud ensüümiga.
- 15 20. Biosensor vastavalt nõudluspunktile 19, mis erineb selle poolest, et sisaldab nimetatud sõeltrükitud elektroodi ja nimetatud võrdluselektroodi ainuelektroodidena.
- 20 21. Määramismeetod bioloogilises vedelikus sisalduva analüüdi koguse määramiseks, mis sisaldab sobiva väärtusega voolupinge rakendamist nõudluspunktides 17–18 määratletud ensümaatilise elektroodi ja sellise võrdluselektroodi vahel, mis sisaldub ensümaatilises biosensoris, nagu on määratletud nõudluspunktides 19–20, ja genereeritud voolusignaali lugemist.
22. Meetod vastavalt nõudluspunktile 21, mis erineb selle poolest, et nimetatud analüüt on glükoos ja nimetatud rakendatav voolupinge on vahemikus –250 ja +200 mV.
- 25 23. Meetod vastavalt nõudluspunktile 22, mis erineb selle poolest, et nimetatud rakendatav voolupinge on võrdne väärtusega -50 mV.

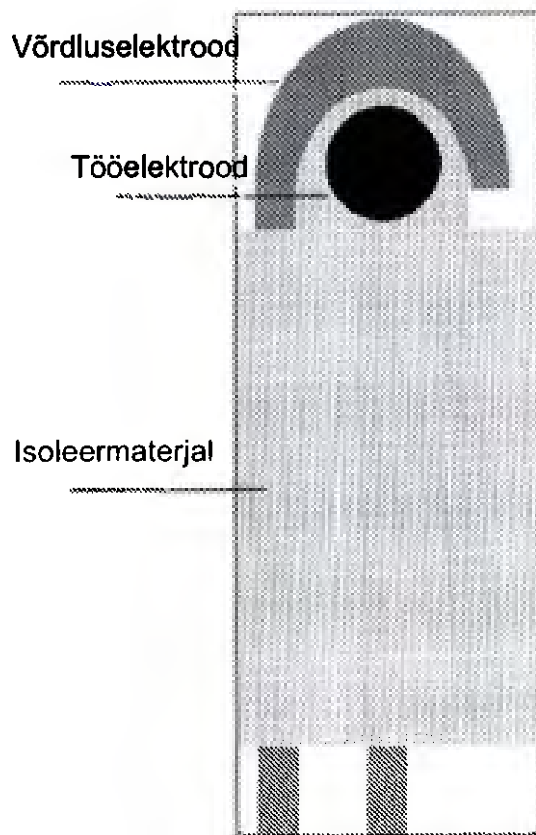
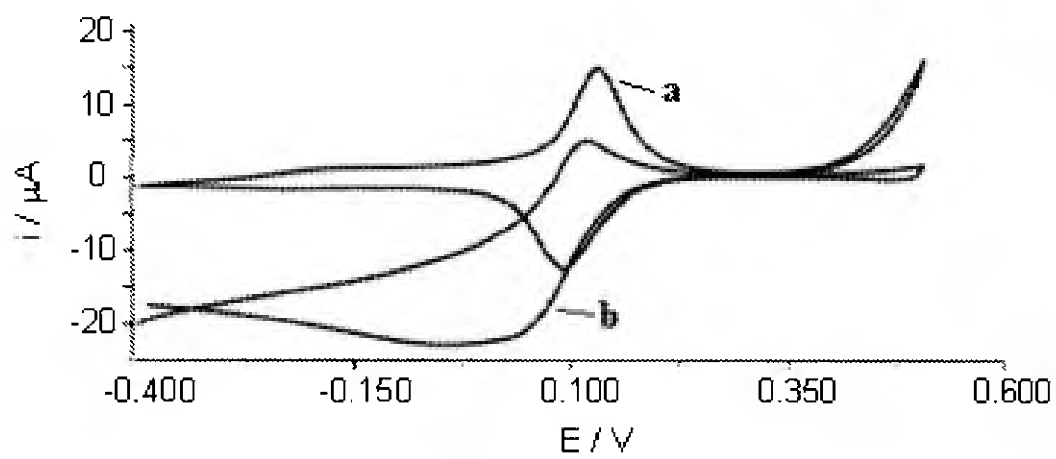
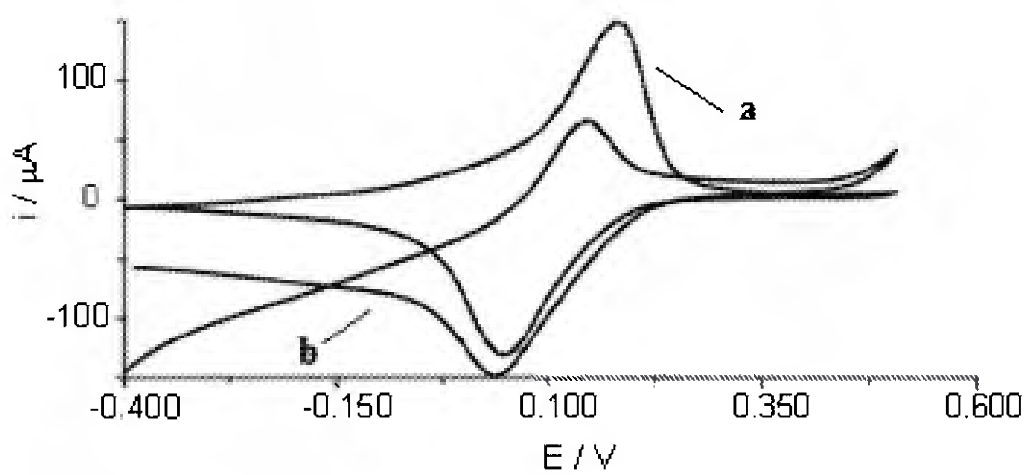


FIG 1

2/4



3/4

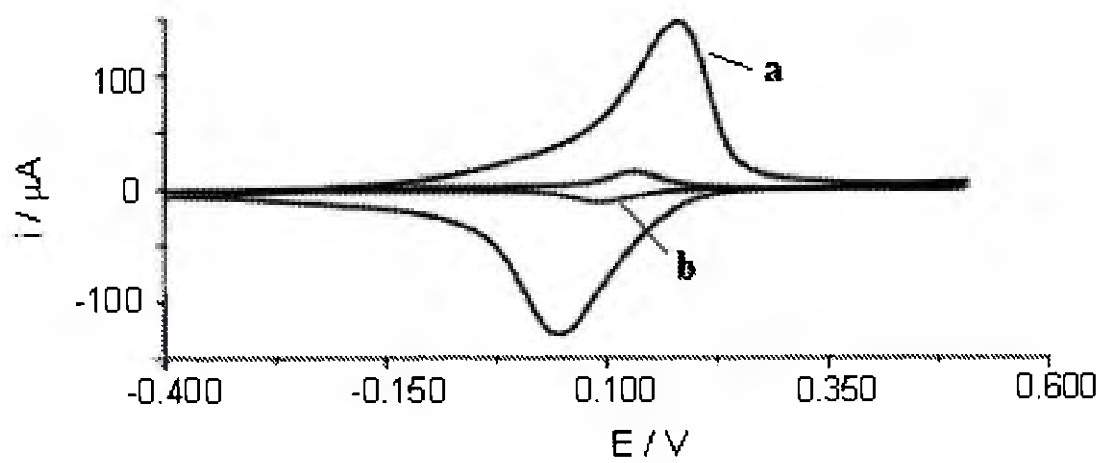


FIG 4

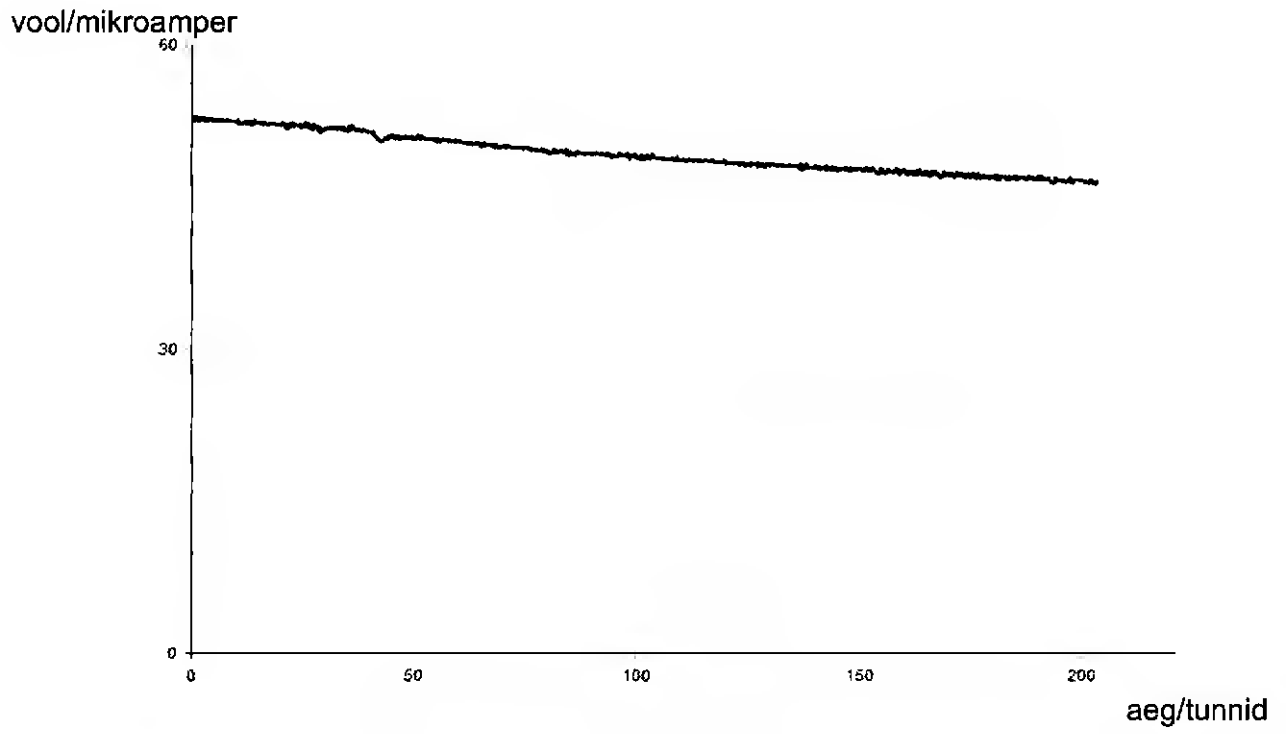


FIG 5a

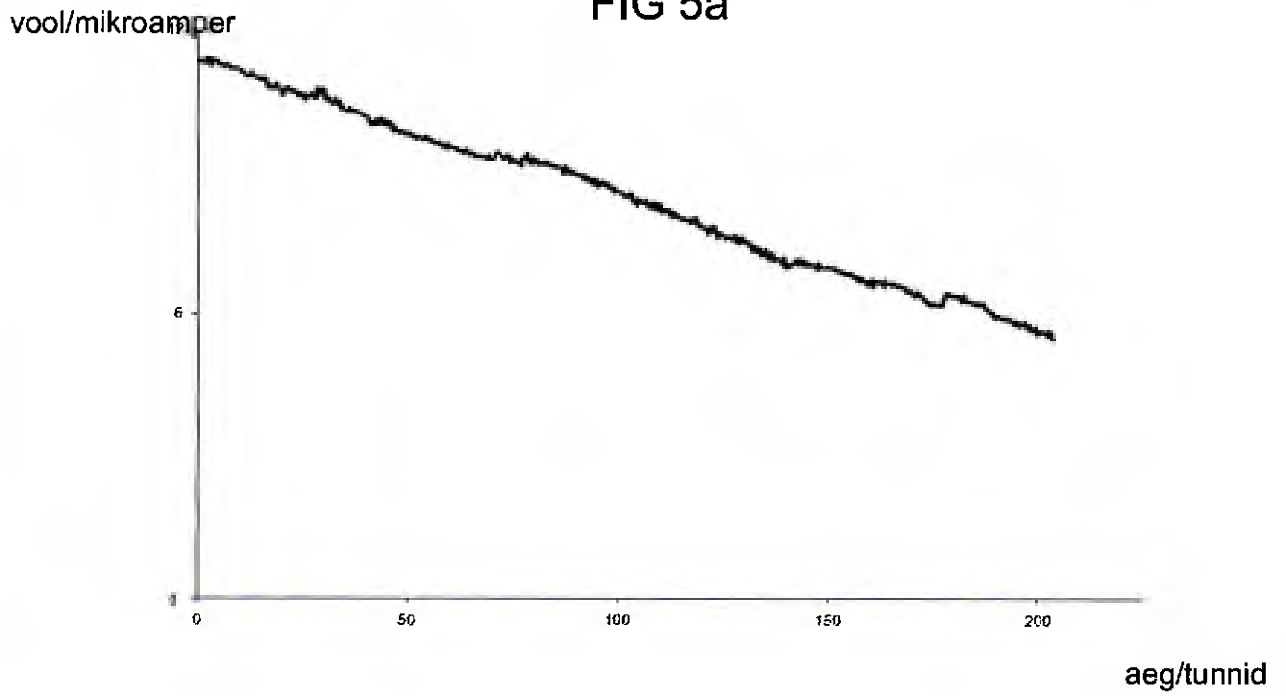


FIG 5b