

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**

**Fakulta elektrotechniky a informatiky**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2017**

**Bc. Klára Fiedorová**

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**

**Fakulta elektrotechniky a informatiky**

**Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství**

**Návrh elektrody pro měření koncentrace glukózy v krvi**

**Proposal of electrode for measuring glucose concentration in blood**

**2017**

**Bc. Klára Fiedorová**

VŠB - Technická univerzita Ostrava  
Fakulta elektrotechniky a informatiky  
Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Klára Fiedorová**

Studijní program: N2649 Elektrotechnika

Studijní obor: 3901T009 Biomedicínské inženýrství

Téma: **Návrh elektrody pro měření koncentrace glukózy v krvi**  
**Proposal of Electrode for Measuring Glucose Concentration in Blood**

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

1. Rešerše stávajících senzorů pro měření koncentrace glukózy.
2. Návrh a realizace HW řetězce (elektrody) pro měření koncentrace glukózy v krvi.
3. Ověření funkčnosti navržené elektrody pomocí statických in vitro testů.
4. Ověření funkčnosti navržené elektrody pomocí dynamických testů.
5. Vizualizace měřených dat.
6. Zhodnocení dosažených výsledků závěrečné práce.

Seznam doporučené odborné literatury:

- [1] TROJAN, Stanislav et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s, 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [2] O'ROURKE, Robert A., Richard A. WALSH and Valentí FUSTER. *Kardiologie: Hurstův manuál pro praxi*. 1. české vyd. Překlad Hana POSPÍŠILOVÁ. Praha: Grada, 2010. xxxi, 767 s. ISBN 978-80-247-3175-9.
- [3] MITRO, Peter a Gabriel VALOČIK. *Vyšetřovací metody v kardiologii: vysokoškolská učebnice*. 1. vyd. Košice: Equilibria, 2009. 391 s. ISBN 978-80-89284-26-9.
- [4] PENHAKER, Marek et al. *Lékařské diagnostické přístroje: učební texty*. 1. vyd. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2004. 320 s. ISBN 80-248-0751-3.
- [5] ALBERTS, Bruce et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Překlad Arnošt KOTYK, Bohumil BOUZEK a Pavel HOZÁK. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005. xxvi, 630 s. ISBN 80-902906-2-0.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Augustynek, Ph.D.**

Datum zadání: 01.09.2016

Datum odevzdání: 28.04.2017



doc. Ing. Jiří Koziorek, Ph.D.  
*vedoucí katedry*



prof. RNDr. Václav Snášel, CSc.  
*děkan fakulty*

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným dohledem vedoucího diplomové práce a použila jsem jen literaturu uvedenou v práci.

V Ostravě dne: 28.4.2017

*Triada nová*  
.....

Podpis studenta

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce panu Ing. Martinu Augustynkovi, Ph.D. za metodickou pomoc, vstřícnost a užitečné připomínky k diplomové práci dané problematiky.

Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Tomáši Klinkovskému a paní doc. Ing. Lence Řeháčkové, Ph.D. za cenné rady a informace důležité pro vypracování mé práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za velkou podporu při tvorbě diplomové práce.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá vytvořením vhodného elektrodového systému sloužícího pro určení hladiny glykémie v krvi. Tato problematika úzce souvisí s vývojem patřičného měřícího obvodu, který dokáže zajistit potřebné zdrojové napětí a převést vznikající signál na vhodnou měřenou elektrickou veličinu. Signál vzniká na základě reakce glukózy a enzymu, výsledná hodnota je tedy přímo úměrná koncentraci glukózy. Detekce koncentrace glukózy v krvi je nedílnou součástí mnoha medicínských postupů k určení stavu lidského organismu. Cílem práce je proto sestavit elektrodový systém s příslušným měřícím obvodem, který bude vykazovat přesné výsledky měření, podrobit ho experimentálním zkouškám a naměřené výsledky analyzovat a dále zpracovat.

## **Klíčová slova**

Měření koncentrace glukózy v krvi, glukometry, základní principy analyzátorů, glykémie, diabetes mellitus, senzory pro měření glukózy

## **Abstrakt**

The diploma thesis deals with the creation of a suitable electrode system for determination of the level of blood glycemia. This problem is closely related to the development of an appropriate measuring circuit that can provide the necessary source voltage and convert the generated signal to a suitable measured electrical quantity. The signal is formed by the reaction of glucose and enzyme, the resulting value being directly proportional to the glucose concentration. Detection of blood glucose is an integral part of many medical procedures to determine the state of the human organism. The aim of the thesis is to assemble an electrode system with an appropriate measuring circuit, which will present accurate measurement results, subject it to experimental tests and analyze and process the measured results.

## **Key words**

Measurement of blood glucose concentration, glucose meters, basic principles of analyzers, blood glucose, diabetes mellitus, glucose measurement sensors

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	9
Seznam ilustrací, tabulek, schémat .....	10
1. Úvod.....	13
2. Glukóza .....	14
2.1 Metabolismus glukózy .....	15
2.2 Hormonální regulace glukózy .....	15
2.3 Diabetes mellitus.....	16
2.3.1 Diabetes mellitus typ 1 .....	16
2.3.2 Diabetes mellitus typ 2.....	17
3. Rešerše základních principů měření glukózy v krvi .....	18
3.1 Invazivní metoda - Laboratorní stanovení.....	18
3.2 Invazivní metoda - Glukometry .....	19
3.2.1 Dostupné glukometry .....	20
3.2.2 Selfmonitoring.....	21
3.3 Neinvazivní metody .....	22
3.4 Kontinuální monitoring hladiny glukózy v krvi.....	23
3.4.1 Principy stanovení hladiny glykémie u KMG.....	24
3.4.2 První generace KMG.....	25
3.4.3 Druhá generace KMG .....	25
3.4.4 Dostupné kontinuální monitory.....	26
4. Rešerše senzorů pro stanovení hladiny glukózy v krvi .....	29
4.1 Elektrochemické biosenzory .....	31
4.1.1 Enzymová katalýza .....	32
4.2 Biosenzory 1. generace .....	34
4.3 Biosenzory 2. generace .....	34
4.4 Biosenzory 3. generace .....	34
5. Průtokové techniky biosenzorů .....	35
5.1 Průtoková injekční analýza FIA.....	35
5.1.1 Uspořádání detektorů FIA.....	35



5.2	Sekvenční injekční analýza SIA.....	38
6.	Návrh a realizace.....	40
6.1	Uchycení enzymu na elektrodu – navrhovaný postup.....	40
6.2	Látky použité v experimentálním měření.....	41
6.3	Reakční kinetika – biochemické děje.....	43
6.3.1	Kinetika enzymových reakcí.....	45
6.3.2	Realizace výpočtů .....	47
7.	Experimentální měření .....	49
7.1	Zjišťování koncentrace glukózy pomocí elektrody_1 .....	51
7.1.1	Porovnání naměřených dat pomocí elektrody_1 .....	59
7.2	Zjišťování koncentrace glukózy pomocí elektrody_2.....	60
7.2.1	Porovnání naměřených dat pomocí elektrody_2.....	68
7.3	Doplňující závislost.....	69
7.4	Statistická analýza.....	70
7.4.1	Analýza dat získaných měřením čistého roztoku glukózy .....	70
7.4.2	Analýza dat získaných měřením roztoku glukózy s přidaným enzymem .....	73
8.	Závěr .....	76
9.	Seznam literatury.....	78
10.	Seznam příloh.....	80

## Seznam použitých zkratk a symbolů

ATP	Adenosintifosfát
CE	Výrobek byl před uvedením posouzen a splňuje legislativní požadavky EU
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DM	Diabetes mellitus
EU	Evropská unie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIA	Průtoková vstříkovací analýza
GOD	Enzym glukózaoxidáza
IVD	In vitro diagnostika
KGM	Kontinuální monitoring glukózy
NADP+	Nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát - redukční činidlo
OGTT	Orální glukózový toleranční test
OZ	Operační zesilovač
SIA	Sekvenční injekční analýza
SMD	Součástky pro povrchovou montáž

## Seznam ilustrací, tabulek, schémat

Obr. 1	Strukturální vzorce D-glukózy a L-glukózy [3].....	14
Obr. 2	A - Glukózaoxidázové reakce, B - Hexokinázová reakce [3].....	19
Obr. 3	Dané typy glukometrů: A - GlucoLab, B - SD-Codefree, C - Beurer GL 50, D - SD-CheckGOLD, E - EasyGluco, F - Medisign MM1000 [1] [2] .....	21
Obr. 4	Systém SAP [15].....	24
Obr. 5	A - ukázka zavedeného senzoru při KMG, B - typy elektrod [3] .....	25
Obr. 6	Měření hladiny glykémie pomocí katétru [3].....	25
Obr. 7	A - KGM CGMS Gold s implementovatelnou elektrodou [23], B - KGM Gurdian s implementovatelnou elektrodou [22], C - KGM GlucoDay s komponenty [1].....	27
Obr. 8	A - KGM FreeStyle s aplikátorem elektrody [21], B - KGM GlucoWatch s elektrodou [20], C - KGM Pendra s elektrodou [19] .....	27
Obr. 9	KGM DexComG4 PLATINUM s aplikátorem a elektrodou [18] .....	28
Obr. 10	Konstrukce biosenzoru [8] .....	30
Obr. 11	Detailní popis konstrukce biosenzoru [8] .....	30
Obr. 12	Biosenzor uložený v katétru [8] .....	30
Obr. 13	Biosenzor uložený v katétru [8] .....	31
Obr. 14	Zobrazení vzniku komplexu enzym - substrát za vzniku produktu .....	33
Obr. 15	Poloha detektorů: A - paralelně, B - místění u ústí, C - kaskádové, D - wall-jet [17] .....	35
Obr. 16	Jednolinkové uspořádání [17] .....	36
Obr. 17	Dvojlinkové uspořádání [17] .....	36
Obr. 18	Průtočná technika s využitím naředěním v komůrce [17].....	36
Obr. 19	Zone sampling [17] .....	37
Obr. 20	Sampling splitting [17].....	37
Obr. 21	Hydrodynamický nástřik [17] .....	37
Obr. 22	Titrace pomocí FIA [17] .....	37
Obr. 23	Splitted flow [17] .....	38
Obr. 24	Stopped flow [17].....	38
Obr. 25	SIA metody [9].....	39
Obr. 26	Kovalentní vazba na membránu nebo povrch elektrody .....	41
Obr. 27	Adsorpce thiolů na Au elektrodu .....	41
Obr. 28	Blokový diagram měření s čistým roztokem .....	50
Obr. 29	Blokový diagram měření s roztokem a enzymem.....	50
Tab. 1	Základní vlastnosti glukóz .....	14
Tab. 2	Metabolismus glukózy .....	15
Tab. 3	Přehled nejprodávanějších glukometrů .....	20
Tab. 4	Přehled kontinuálních měřičů hladiny glykémie [6].....	26
Tab. 5	Tabulka použitých roztoků glukózy.....	42
Tab. 6	Tabulka naměřených hodnot .....	47

Tab. 7 Tabulka vypočtených hodnot .....	47
Tab. 8 Tabulka orientačních naměřených hodnot .....	49
Tab. 9 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM .....	51
Tab. 10 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM s enzymem .....	52
Tab. 11 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM .....	53
Tab. 12 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM s enzymem .....	54
Tab. 13 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM .....	55
Tab. 14 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM s enzymem .....	56
Tab. 15 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM .....	57
Tab. 16 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM s enzymem .....	57
Tab. 17 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM (2) .....	60
Tab. 18 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM s enzymem (2) .....	61
Tab. 19 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM (2) .....	62
Tab. 20 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM s enzymem (2) .....	62
Tab. 21 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM (2) .....	64
Tab. 22 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM s enzymem (2) .....	64
Tab. 23 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM (2) .....	66
Tab. 24 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM s enzymem (2) .....	66
Tab. 25 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda_1 .....	70
Tab. 26 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda_2 .....	71
Tab. 27 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu_1 .....	71
Tab. 28 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu_2 .....	71
Tab. 29 F-test pro určení homoskedasticity .....	72
Tab. 30 Aspinové-Welchův test .....	72
Tab. 31 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda_1 .....	73
Tab. 32 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda_2 .....	74
Tab. 33 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu_1 .....	74
Tab. 34 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu_2 .....	74
Tab. 35 F-test pro určení homoskedasticity .....	74
Tab. 36 Aspinové-Welchův test .....	75
Graf 1 Graf vylučování inzulínu v závislosti na příjmu potravy a změny v koncentraci cukru v krvi [3] .....	16
Graf 2 Grafické znázornění rovnice rychlosti - hyperbola [14] .....	33
Graf 3 Grafické znázornění integrované rovnice Michaelise a Mentenové[14] .....	47
Graf 4 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 3mM .....	52
Graf 5 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 7mM .....	54
Graf 6 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 12mM .....	56
Graf 7 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 18mM .....	58

Graf 8 Grafické znázornění naměřených hodnot pomocí elektrody_1 .....	59
Graf 9 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 3mM (2) .....	61
Graf 10 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 7mM (2) .....	63
Graf 11 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 12mM (2) .....	65
Graf 12 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 18mM (2) .....	67
Graf 13 Grafické znázornění naměřených hodnot pomocí elektrody_2 .....	68
Graf 14 Závislost naměřených dat na použité koncentraci roztoku .....	69
Graf 15 Krabicový graf znázorňující hodnoty získané elektrodou _1 a elektrodou_2 měřením čistého roztoku glukózy.....	73
Graf 16 Krabicový graf znázorňující hodnoty získané elektrodou _1 a elektrodou_2 měřením roztoku glukózy s enzymem.....	75

## 1. Úvod

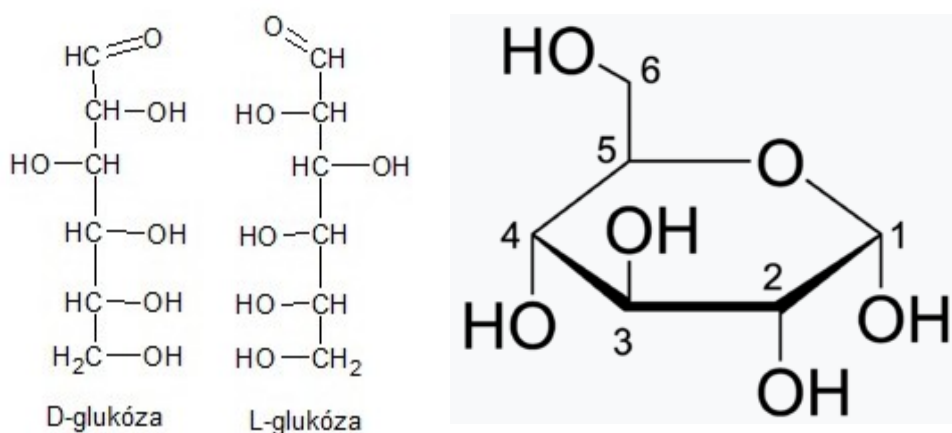
Měření hladiny glykémie v krvi se řadí mezi velice důležité ukazatele stavu lidského organismu. Stanovení koncentrace glukózy nám umožňuje získat další škálu potřebných hodnot, zde se řadí například výpočet srdečního výdeje. Lidský organismus udržuje vnitřní homeostázu v rovnováze. Existují však stavy, kdy se hladina glykémie nekontrolovatelně mění. V takových případech je důležité koncentraci glukózy v krvi hlídat a pomocí dostupných postupů korigovat. V dnešní době mají lidé s tímto onemocněním k dispozici celou řadu metod, pomocí kterých můžou koncentraci glukózy získat. Může se jednat jak o invazivní metody, tak o neinvazivní metody. Nejpoužívanějším principem, řadící se mezi dostupné metody měření hladiny glykémie uplatňující se u individuálního měření, je elektrochemický princip. Tento princip získává požadované hodnoty určitou chemickou reakcí. Danou chemickou reakcí je proces, který vzniká při kontaktu glukózy s enzymem glukózooxidáza. Reakce dává vzniknout určitému elektrickému signálu, jehož hodnota je závislá na daných koncentracích působících složek. Právě tento elektrický signál se zaznamenává a následně vyhodnocuje. Základní informace o dostupných metodách měření, měřících postupech a jednotlivých přístrojích jsou uvedeny v teoretické části práce, která byla zpracována pomocí rešerše.

Tématem diplomové práce je návrh elektrody pro měření koncentrace glukózy v krvi. Elektrody slouží jako místo zajišťující ideální podmínky pro potřebné reakce. Používají se k přívodu elektrického napětí, uchycení enzymu a detekci vzniklého signálu. Předpokládaná metoda, která se uplatní v práci, je založena na elektrochemickém principu. Elektroda by měla pracovat na odporové technice, přesněji by se mělo jednat o elektrolytický snímač. Díky těmto skutečnostem se musí dbát na správný výběr materiálu, který se použije při konstrukci elektrody. Problematika návrhu elektrody nezahrnuje pouze samotnou elektrodu. Nese s sebou mnoho dalších bodů k řešení, jako je vytvoření vhodného obvodu, který dokáže analyzovat vzniklý elektrický signál. Systém těchto komponent tvoří měřící obvod zvaný biosenzor. Zde se musí vyřešit i oblast napájení a analýzy měřených dat, celým systémem se ve své práci budu zabývat. Součástí práce jsou také určité okruhy chemie. Funkce elektrody je založena na chemické reakci, proto se v práci musí uplatnit výpočty pro kinetiku enzymových reakcí, aby byl systém schopen určit hladinu glykémie v krvi. Dalším chemickým prvkem je problematika uchycení enzymu na elektrodu.

Cílem předložené práce je konstrukce elektrodového systému a daných komponent. Sestavený měřící celek se podrobí řadě měření, při kterých se budou analyzovat různé koncentrace roztoku glukózy. Následně se odměří cyklus s danými roztoky a přidaným enzymem. Získaná data se patřičným způsobem zpracují, porovnájí a podrobí se statistické analýze, která potvrdí či vyvrátí předložené předpoklady.

## 2. Glukóza

Glukózu řadíme mezi monosacharidy, jedná se tedy o jednoduchý jednomolekulový cukr, který spadá po skupiny aldohexóz. V chemicky čisté podobě tvoří bílou krystalickou látku nasládlé chuti. Vyskytuje se ve dvou izomerních formách. Nejčastější forma, vyskytující se v přírodě, je D-glukóza, další formací je L-glukóza. Izomer je obecně látka, která nemění svůj sumární vzorec. Ke změnám dochází ve strukturálním vzorci. U glukózy záleží na uspořádání skupin na chirálním uhlíku. Pro existenci organismu je nezbytná D-glukóza, která slouží jako nejrychlejší zdroj energie. Je označována také spojením hroznový cukr či krevní cukr. Jedná se o redukující sacharid, tedy látku pohlcující energii, takové chemické reakce jsou označovány jako anaboličké reakce.



Obr. 1 Strukturální vzorce D-glukózy a L-glukózy [3]

Tab. 1 Základní vlastnosti glukóz

<b>Sumární vzorec</b>	$C_6H_{12}O_6$
<b>Morální hmotnost</b>	180,155 g/mol
<b>Hustota</b>	1,56 g/cm <sup>3</sup>
<b>Rozpustnost ve vodě</b>	1200g/l

Jak už bylo zmíněno, glukóza je hlavní energetický zdroj člověka. Přijímáme ji v potravě a patří k základním živinám. Energii, kterou díky glukóze získáváme, tělo využívá pro zásobování hlavně mozku a erytrocytů, které glukózu dopravují do svalů a orgánů. Jelikož glukóza není tělu dodávána nepřetržitě, udržuje se její hladina v krvi pomocí hormonální regulace.

[1] [3]

## 2.1 Metabolismus glukózy

V potravě se glukóza vyskytuje ve formě polysacharidů, jedná se například o škroby a glykogen. Proto musí docházet ke štěpení složitějších látek na látky jednodušší, dochází k metabolickým přeměnám. Při těchto dějích vzniká energie, která se uplatňuje při řízení chodu těla.

První krok metabolismu cukrů, jak se obecně nazývá štěpení polysacharidů, začíná v ústech, v žaludku nastává útlum. Dalším místem, kde probíhá zpracování cukru, je tenké střevo.

Tab. 2 *Metabolismus glukózy*

Místo štěpení	Vstupující látka	Hormon	Produkty štěpení
Ústní dutina	Polysacharid	Slinná $\alpha$ -amyláza	Disacharid – maltóza Dextridy
Žaludek-nastává útlum	-	-	-
Tenké střevo	Disacharidy	Pankreatická $\alpha$ -amyláza	Monosacharidy

Monosacharidy jsou pro organismus již vstřebatelné, k tomuto jevu dochází v tenkém střevě pomocí aktivního transportu nebo sekundárně aktivního transportu. Z krve do intersticiálního prostředí se dostává difuzí. Z intersticiálního prostoru se poté, opět difuzí, přenáší do kapilár a ukládá se v játre. Z tohoto zásobníku je poté dopraven do místa určení v případě potřeby, což je řízeno neuroendokrinními ději.

[1] [3]

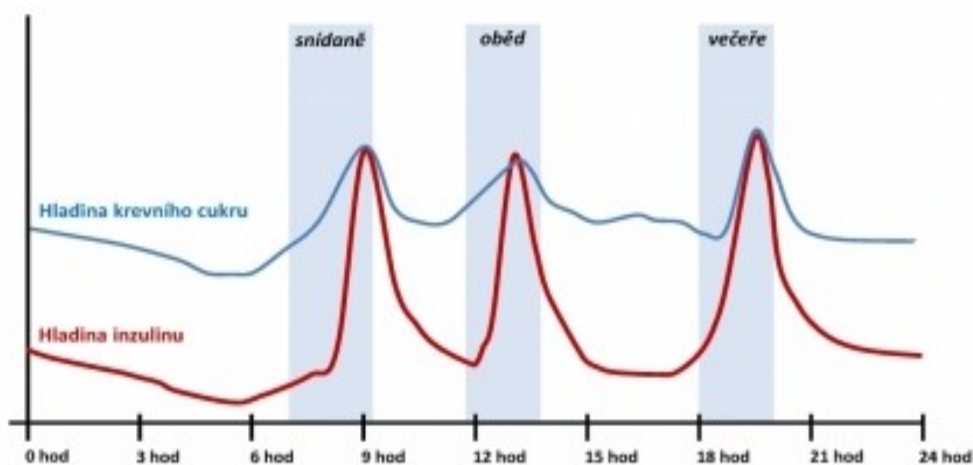
## 2.2 Hormonální regulace glukózy

Hladina koncentrace glukózy v krvi u zdravého jedince se pohybuje okolo 3,6 – 5,6 mmol/l.. Koncentrace cukru v krvi je regulována hormonálně za pomoci hormonů. Nejdůležitějším hormonem je inzulin, který se tvoří v Langerhansových ostrůvcích slinivky břišní. Pokud má organismus dostatek glukózy, probíhá syntéza působením inzulinu za vzniku glykogenu, který se uloží. Inzulin tedy slouží ke snižování glykémie v krvi. Pokud tělo glukózu potřebuje, probíhá děj glykolýza. Při glykolýze dochází k tvorbě glukózy z glykogenu. Glykolýza je ovlivněna hormony adrenalinem, noradrenalinem a glukagonem, vzniká při ní molekula energie ATP. Glukagon se také řadí mezi důležité hormony ovlivňující hladinu glykémie v krvi. Tvoří se v slinivce břišní na  $\alpha$  – buňkách Langerhansových ostrůvků, naopak od inzulinu zvyšuje hladinu cukru v krvi.

Hladina cukru v krvi musí být udržována za všech podmínek, tedy i v případě, že toho tělo není schopno. Hormony se vylučují v závislosti na přijaté potravě. Následující graf vykresluje koncentraci inzulinu v krvi po příjmu potravy



### Fyziologická křivka inzulinu během 24 hodin



Graf 1 Graf vylučování inzulinu v závislosti na příjmu potravy a změny v koncentraci cukru v krvi [3]

V případech, kdy tělo není schopno produkovat inzulin nebo je jeho účinnost nefunkční, hovoříme o onemocnění diabetes mellitus.

[1] [3]

## 2.3 Diabetes mellitus

Onemocnění se projevuje zvýšenou hladinou glykémie, tedy vyšší koncentrací cukru v krvi. Jak je uvedeno výše, fyziologický stav hladiny cukru v krvi se udržuje pomocí daných hormonů. Pro zjištění diagnózy se používá orální glukózový toleranční test (OGTT). Test pracuje na principu podání roztoku s koncentrací 30 g/dl a zjišťuje se reakce organismu na vyšší dávku cukru. Rozlišujeme několik poddruhů onemocnění.

S onemocněním jsou spojené časté komplikace, které vznikají díky nestálé hladině cukru v krvi. Může se projevit hypoglykémie neboli snížená hladina cukru v krvi. Dalším projevem je hyperglykémie, což je zvýšená koncentrace cukru v krvi. Při těchto výkyvech může nemocný jedinec upadnout do kómatu, dochází k poruše cév či orgánů. Častým jevem je odumírání nervových zakončení a následné amputace dolních končetin. Proto je hlídání koncentrace v krvi velmi důležité a moderní technika nám to umožňuje.

### 2.3.1 Diabetes mellitus typ 1

Při této formě nemoci tělo nemůže produkovat vlastní inzulin, jelikož dochází ve slinivce břišní k destrukci  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků. V tomto případě se hovoří o inzulindependentní formě DM. Tělo není schopno regulovat hladinu cukru v krvi, proto je nemocný jedinec celoživotně závislý na podávání inzulinu. Nemoc se většinou projevuje již v dětství, protože je dána genetickou predispozicí.

### **2.3.2 Diabetes mellitus typ 2**

Jedná se o nejčastější typ DM, projevuje se rezistencí na tělem vytvořený inzulín. Zde hovoříme o non-inzulindepedentní formě nemoci. S onemocněním souvisí další rizikové faktory, jako hypertenze nebo obezita. Nemocný jedinec v první fázi DM užívá antidiabetik, po překlenutí do další fáze nemoci přechází na inzulín.

[1] [3]

### 3. Rešerše základních principů měření glukózy v krvi

Stanovení hladiny glykémie v krvi je nezbytným úkonem pro další postupy v léčbě DM, která se projevuje poruchou metabolismu sacharidů. Musí se dbát na spolehlivost daného měření. Naměřené hodnoty, z odebraného vzorku, musí korespondovat s reálnou hodnotou koncentrace glukózy v krvi jedince.

Prvním ukazatelem zvýšené hladiny cukru byl fermentační test. Jeho princip se zakládá na chemické metodě, která detekuje cukr nikoliv v krvi, ale v moči. Jednalo se o orientační měření, které se nevyznačovalo přesností. Chemické metody stanovení hladiny glukózy byly základem pro další vývoj v oblasti měření cukrů. Principem chemických metod byla barevná změna po příslušné chemické reakci, která byla měřena fotometricky. Pokrok nastal v roce 1956, kdy byly poprvé vyrobeny dip-and-read testy. Výstupem metody byla barevná změna, která se porovnávala s referenční barevnou škálou. Tato metoda se označovala jako suchá metoda stanovení glukózy. Na testovacím proužku jsou reagující látky uloženy v pevné a suché vrstvě. V tomto období vznikaly první přenosné přístroje, které využívali testovacích proužků a vyhodnocovaly naměřené hodnoty fotometricky či elektrochemicky. Další vývoj v této oblasti byl zaměřen na technické prvky měření. Avšak principy zjišťování koncentrace glukózy zůstávají stejné, zdokonalují se metody vyhodnocení naměřených hodnot.

Pro měření hladiny glykémie existuje několik základních principů, které jsou založené na redukci, kondenzaci, elektrochemických dějích a enzymatických reakcích. První z nich se již nepoužívá, metoda byla založena na redukčních vlastnostech glukózy. Měření, které využívá kondenzaci, se provádí spektrofotometricky a je potřeba provést několikastupňové chemické reakce. Metoda založena na elektrochemických dějích je jedna z nejpoužívanějších vůbec. Uplatňuje se v glukometrech, kdy se měří elektrický proud vzniklý elektrochemickými ději. Mezi nejpřesnější ukazatele koncentrace glukózy v krvi jsou metody, které využívají enzymatické reakce. Tato metoda se používá pro stanovení hladiny glykémie v laboratorních podmínkách. Měření glukózy je založeno na odebraném vzorku krve, takový vzorek je získáván buď to invazivní metodou, či neinvazivní metodou. Invazivní metoda se vyznačuje porušením lidské tkáně.

Dalším možným rozdělením je princip jednorázového měření, který nám umožní získat hodnotu hladiny glykémie v rámci doby odběru krve. V dnešní době jsou tyto principy používány nejčastěji. Do jednorázových měření spadají všechny způsoby invazivního měření. Další možností, jak měřit koncentraci cukru v krvi, je kontinuální měření. Tento způsob získání informace o potřebné hodnotě je teprve v začátcích. Její vývoj úzce souvisí s využitím inzulínové pumpy.

[1] [3] [4] [10]

#### 3.1 Invazivní metoda - Laboratorní stanovení

Provádí se u jedinců s diagnózou DM nebo jako preventivní vyšetření. Při laboratorním stanovení se naměřené hodnoty koncentrace glukózy srovnávají s referenčními hodnotami, které jsou stanoveny pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s využitím metody izotopové diluce. To vyplývá z nařízení České společnosti klinické biochemie (ČSKB). Odebírá se žilní krev

na lačno, kdy je použita celá krev, sérum nebo plazma. Při stanovování hodnot ze séra či plazmy je nutné použít antiglykolytickou přísadu, tímto zabráníme znehodnocení vzorku.

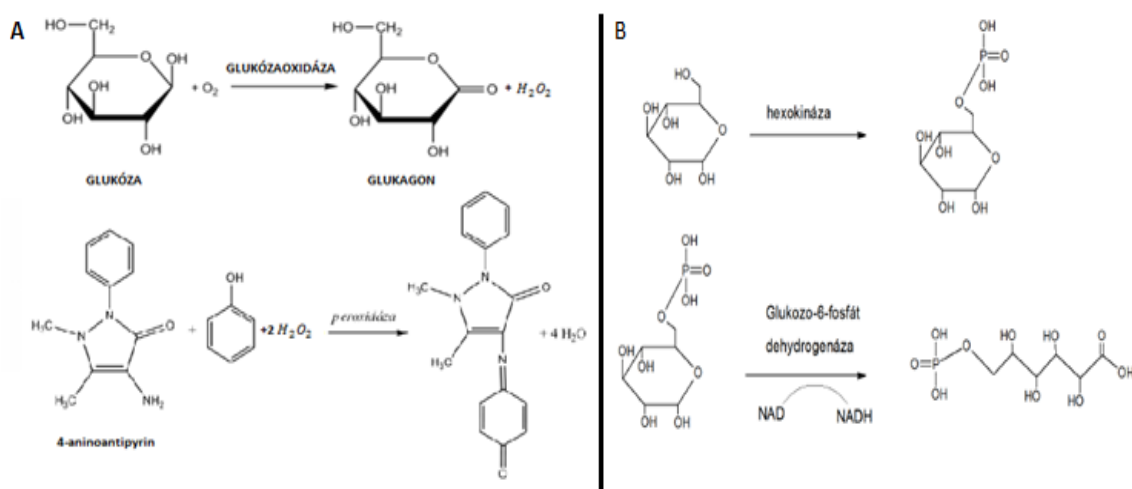
V laboratořích se v minulosti používalo neenzymové stanovení, které je založeno na redukčních vlastnostech cukrů. Dnes je nejrozšířenější enzymová metoda s využitím glukózaoxidázové reakce a hexokinázové reakce. Při těchto reakcích vzniká barevný produkt, který se vyhodnocuje pomocí fotometrického měření. Základem je zde tedy enzym, což je bílkovina, která katalyzuje reakci.

*Glukózaoxidázové reakce:* jedná se o enzymovou metodu – GOD. Při chemické reakci oxiduje glukóza za vzniku D-glukonolaktonu a peroxidu vodíku. Metoda spočívá ve změně absorpce, která je měřena spektrofotometricky.

GOD nebo také glukózaoxidáza, či beta-D-glukóza oxidáza. Chemicky patří do skupiny oxidoreduktáz katalyzující reakci.



*Hexokinázové reakce:* opět je to enzymová metoda, která využívá chemickou reakci, kdy v průběhu dochází ke katalytickému ději hexokinázy a glukózy za vzniku glukozo-6-fosfátu. Reakcí vzniká NADP+, který se redukuje na NADPH. Právě hodnota NADPH je úměrná koncentraci glukózy. I zde se uplatňuje spektrofotometrické měření.



Obr. 2 A - Glukózaoxidázové reakce, B - Hexokinázová reakce [3]

[1] [3] [4] [10] [24] [25]

### 3.2 Invazivní metoda - Glukometry

Přístroje jsou určeny pro pacienty s DM, kteří potřebují provádět pravidelné kontroly hladiny glykémie. Určují aktuální hladinu glukózy v kapilární krvi. Jedná se tedy o jednorázové měřiče. Základním prostředkem jsou testovací proužky. Pro vyšetření se používá kapilární krev, ta je získána

pomocí pera s vystřelovací jehlou. Glukometry používají jednu ze dvou metod stanovení hladiny glukózy v krvi, kterými jsou fotometrické stanovení či elektrochemické stanovení.

*Glukometry s fotometrickým měřením:* k vyhodnocení krve dochází přímo v místě testovacího proužku. Základním principem pro získání potřebné hodnoty je reflexní fotometrie. Na proužku je umístěná chemická vrstva, která po styku s krví reaguje za vzniku barevné sloučeniny. Vyhodnocuje se intenzita výsledného zbarvení reflexní fotometrií.

*Glukometry s elektrochemickými senzory:* používá se princip amperometrického stanovení glukózy. Kdy se měří proud, který vzniká při elektrochemické reakci. Krev je přiváděná k měřicímu proužku obsahující dvě nebo tři elektrody. První z nich je indikační (pracovní), druhá je referenční (srovnávací) a třetí srovnávací. Na proužku je enzymová vrstva (enzym GOD), při styku s krví dochází k chemické reakci a vzniká peroxid vodíku. Právě jeho množství se stanovuje amperoetricky.

[1] [2] [3] [8]

### 3.2.1 Dostupné glukometry

V dnešní době představuje glukometr moderní přístroj, který je schopen se připojit k počítači a v daném softwaru může dojít k vyhodnocení výsledků. Kvalita glukometru se odvozuje i od ceny proužků, které jsou pro daný model dostupné. Dalším kritériem je velikost displeje, který vyobrazuje naměřenou hodnotu. Samozřejmě je kladen důraz i na jednoduchou obsluhu. Součástí glukometru by mělo být odběrové pero, které slouží k odběru potřebné krve. Moderní pero by mělo disponovat nastavením hloubky vpichu.

V současné době disponuje komerční trh velkou spoustou glukometru. V následujícím textu je uveden výčet nejprodávanějších přístrojů pro měření hladiny glykémie.

**Tab. 3 Přehled nejprodávanějších glukometrů**

Název glukometru
GlucoLab
SD-Codefree
Beurer GL 50
SD-CheckGOLD
EasyGluco
Medisign MM1000

*GlucoLab:* přístroj disponuje certifikací značkou CE. Kvalita přístroje je doložena také schválením americkou FDA. Pracuje na biosenzorickém principu. Výsledky jsou vyhodnoceny během 5 sekund.

*SD-Codefree:* tento moderní přístroj je klasifikován podle evropské směrnice pro zdravotnické prostředky 98/79/EC – IVD diagnostika. Glukometru se vyznačuje samonasávacím senzorem. Umožňuje USB připojení k počítači. Součástí je odběrové pero.

*Beurer GL 50*: výhodou glukometru je velký LCD displej. Součástí je odběrové pero, další výhodou je USB připojení. K vyhodnocení hodnoty postačuje 0,6 $\mu$ l krve.

*SD-CheckGOLD*: u toho druhu přístroje se vyskytuje zlatá elektroda se samonasávacím proužkem. Opět spadá pod klasifikaci dle evropské směrnice pro zdravotnické prostředky 98/79/EC – IVD diagnostika.

*EasyGluco*: glukometr používá biosenzorové technologie. Certifikován značkou CE a schválen americkou FDA.

*Medisign MM1000*: certifikace CE i FDA. Pracuje na biosenzorickém principu. Má LCD display. Množství odebrané krve se pohybuje okolo 0,5 $\mu$ l. Výhodou je propojení s počítačem.



Obr. 3 Dané typy glukometrů: A - GlucoLab, B - SD-Codefree, C - Beurer GL 50, D - SD-CheckGOLD, E - EasyGluco, F - Medisign MM1000 [1] [2]

[1] [2] [3] [8] [28]

### 3.2.2 Selfmonitoring

Používání glukometru k monitorování hladiny glykémie v průběhu dne nemocným jedincem se nazývá selfmonitoring. Jedná se o laické měření hladiny glukózy. Pacient získává okamžitou informaci. Pro měření je potřeba 0,3 – 10  $\mu$ l odebraného vzorku krve a náležitý rozsah měření glykémie je 1,1 – 33,3  $mmol/l$ . Podle kritérií by se mělo měřit s chybou pro danou hodnotu glykémie  $\geq 5,6 mol/l$  menší než 15 %, pro glykémie  $< 5,6 mmol/l$  menší než 0,8  $mmol/l$ . Rozdíl mezi měřeními hladiny glukózy doma a v laboratoři je ten, že v laboratoři se používá krevní plazma a doma plná krev. Hodnoty měření glukometrem jsou o 10 – 15 % nižší.

[10]

### 3.3 Neinvazivní metody

Patří sem analýza moči, ta se ale v dnešní době již nepoužívá, neboť se jedná o nepřesnou metodu. Druhou metodou je infračervená spektroskopie, která využívá infračervenou oblast záření. V dnešní době existují metody, které jsou ve fázi testování. Patří zde reverzní iontoforéza, rádio frekvenční impedance, kontaktní čočky s chemickou reakcí, fotoakustická spektroskopie a Ramanova spektroskopie.

*Reverzní iontoforéza:* hladina glukózy se stanovuje z intersticiální tekutiny nebo potu pomocí galvanického proudu. Základem je elektroosmóza a pohyb iontů v přítomnosti elektrického pole. Využívá se toho, že kůže člověka je fyziologicky záporně nabitá.

*Rádio-frekvenční impedance:* jedná se o interakci elektromagnetického záření v oblasti rádiových vln a glukózy. Funguje jako rezonanční obvod, kdy kondenzátor zaznamenává dielektrické ztráty.

*Kontaktní čočky s chemickou reakcí:* zde slzy reagují s kyselinou boritou na povrchu čoček a vytvoří fluoreskující roztok. Tento roztok se ozáří modrým světlem a čočka se zbarví.

*Fotoakustická spektroskopie:* závisí na laserovém paprsku (1000 – 1800 nm), který ozáří kůži. Teplotní změna na kůži vyvolá akustickou vlnu. Principem je zaznamenat praskající zvuk. K tomu slouží mikrofon nebo piezoelektrické zařízení.

*Ramanova spektroskopie:* u této metody dochází k rozptylu monochromatického záření. Ramanovo spektrum má řadu výhod. Vyznačuje se specifickými vibračními pásy molekulární struktury glukózy. Ramanova spektra jsou ostřejší než klasická spektra a nemají tolik překryvů s jinými pásy. Nedochozí tedy k náhodné korelaci s okolními tkáněmi. Metoda je založena na výměně energie mezi fotony, kdy následující foton má vždy nižší energii než předchozí. Na molekulární úrovni dochází ke změnám a díky tomu získáváme potřebné informace. Měření glukózy se provádí záznamem oscilací v tekutině, tyto oscilace způsobují rozptyl světla.

*Spektrometrické stanovení glukózy:* metodu řadíme k infračervené metodě, která je nedestruktivní a informuje o molekulární struktuře. V oblasti elektromagnetického záření používá metoda záření NIR, které navazuje na viditelnou oblast. Dochází k interakci s atomovou strukturou molekul. Díky tomu identifikujeme různé typy molekul ve vzorku. Před měřením se musí určit vlnová délka a kalibrační hodnoty. Záření, vyslané z příslušného zdroje, projde měřeným vzorkem a dopadá na detektory. Zde můžeme měřit veličiny, které jsou závislé na vlnové délce. Mezi měřené veličiny patří absorbance, transmitance a reflektance.

*Absorpce:* v naměřeném spektru se hledá maximální hodnota, která znamená největší absorpci pro daný vzorek. Vyjadřujeme ji jako poměr intenzity počátečního a prošlého záření. Jedná se o vytvoření kalibrační křivky sloučeniny. Absorbance je přímo úměrná koncentraci látky. Uplatňuje se zde Lambert-Beerův zákon.

*Transmitance:* neboli propustnost. Měří se klasická a difuzní transmise (rozptyl světla po průchodu vzorkem). Snímá se záření prošlé vzorkem, závislé na poměru intenzity prošlého a počátečního záření.

*Reflektance*: jedná se o odražené záření vzorkem. Vyskytuje se opět více typů. Difuzní reflektance, což je měření difuzní rozptýlené složky záření. Spekulární reflektance neboli zrcadlová zaznamenává změnu intenzity záření odraženého paprsku. Je závislá na úhlu dopadu a platí, že čím větší úhel, tím větší intenzity měřených pásů. Zeslabená úplná reflektance využívá vnitřního odrazu mezi molekulami zkoumané látky.

Energie fotonů NIR záření je velmi malá, není tedy tak velká, aby způsobila excitaci elektronů. Energie fotonu vyvolává změnu vibračního a rotačního stavu molekuly (zákon kvantové mechaniky). Vibrace způsobují změnu amplitudy, rotace zrychlení a změnu vzdálenosti mezi atomy v molekule. Spektrum není spojitě, ale má pouze překryté pásy. Vibrační pásy glukózy jsou dány chemickým složením glukózy (skupiny OH, CH, COH), hlavní pásmo leží v 1530 – 1850 nm v NIR. Skupina OH a CH se vyskytují ve vlnové délce 1536 nm a ty jsou nejčastěji měřeny.

[1] [3] [4] [10] [15] [28]

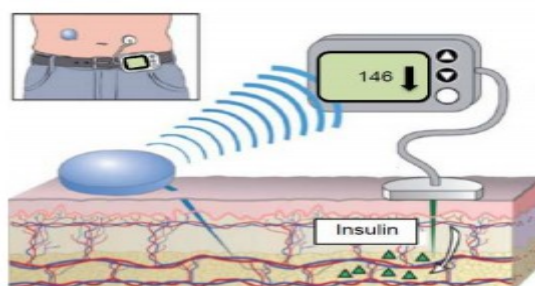
### **3.4 Kontinuální monitoring hladiny glukózy v krvi**

Kontinuální monitorování koncentrace glukózy v krvi umožňuje sledovat hodnoty v průběhu dne. Zaznamenáváme změny glykémie v závislosti na denním příjmu potravy a vyvinuté aktivitě. Nemocný jedinec může reagovat na případné změny hladiny glukózy. I když je měření hodnot pomocí glukometru relativně přesné, musí se během vyšetření odebírat krev a zjišťují se pouze aktuální hodnoty. Na základě studií bylo zjištěno, že nemocný jedinec se během dne může dostávat do hypoglykemického stavu a na tento jev se musí okamžitě reagovat. Proto se vývoj v oblasti měření hladiny glykémie zaměřil na kontinuální monitory glykémie. Takové zařízení měří koncentraci glukózy v krvi v pravidelných časových intervalech, kdy je elektroda zavedena do podkoží.

Systémy stanovují koncentraci glukózy minimálně invazivně z intersticiální tekutiny. Buďto je senzor zavedený do podkoží a glukóza se měří *in situ* nebo dochází k přívodu intersticiální tekutiny k senzoru jednou z metod, kterými jsou mikrodialýza, mikroperfuze, iontoforéza. Sensory jsou založeny na stejných reakcích jako invazivní metody, tedy elektrochemické principy a optické principy. Elektroda, kterou zavádíme do podkoží, se jmenuje subkutánní elektroda. Pomocí transmiteru dochází k bezdrátovému vysílání informace do přijímací jednotky.

V dnešní době se pracuje na systému SAP, což je spojení senzoru s inzulínovou pumpou. Pokud se hodnoty hladiny glykémie pohybují mimo stanovenou mez, spustí se alarm a pumpa automaticky podá tělu inzulín. Jedná se o alternativní nahrazení slinivky břišní.





Obr. 4 Systém SAP [15]

[5] [6] [15]

### 3.4.1 Principy stanovení hladiny glykémie u KMG

Přístroje pro kontinuální měření glykémie pracují na několika způsobech stanovení příslušné hodnoty. Na tomto principu je poté založena i konstrukce zařízení.

*Optické principy:* optické metody se dnes téměř nepoužívají, protože je drahá jejich realizace a musí být umístěny v blízkosti místa snímání. Pokud systém pracuje na principu optiky, uplatňuje se optická spektroskopie. Vyhodnocuje se změna barviva, což je způsobeno příslušnými chemickými reakcemi. Existují i piezoelektrické, termoelektrické, akustické senzory a také senzory založené na fluorescenční spektroskopii.

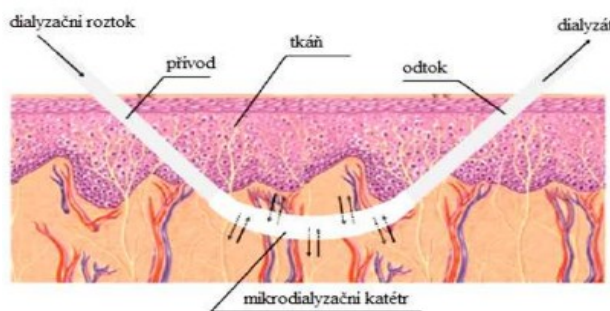
*Elektrochemická principy:* využívají k určení hodnoty vzniklý proud z oxidace peroxidu vodíku. Danou oxidací má za následek reakce glukózy a kyslíku. K zaznamenání příslušné hodnoty postačí jednodušší elektronika, která se může nacházet ve větší vzdálenosti od místa měření. Senzor je zabudovaný v těle pacienta. Hodnota se zaznamenává amperometricky. Transkutánní senzory, které se u KMG používají nejčastěji, jsou zaváděny do podkoží pod úhlem  $90^\circ$  či  $45^\circ$ . Aplikují se do podkožního tuku v hloubce 5 – 10 mm. Další částí funkčního bloku jsou vysílače tzv. transmittery, ty zajišťují přenos naměřené informace do zařízení mimo tělo pacienta.

*Mikrodializační princip:* intersticiální tekutina je přiváděná pomocí katétru k senzoru mimo tělo pacienta. Uplatňuje se zde glukózooxidázová reakce. Na podobném principu funguje i ultrafiltrace, která je využívána minimálně.

*Reverzní iontoforéza:* pomocí proudu proudícího mezi dvěma elektrodami na povrchu těla je přiváděná intersticiální tekutina. Na pokožce je uchycen hydrogelový polštářek, do kterého vstupuje glukóza. V polštářku je glukosidáza. Senzor je tedy umístěn vně těla pacienta.



Obr. 5 A - ukázka zavedeného senzoru při KMG, B - typy elektrod [3]



Obr. 6 Měření hladiny glykémie pomocí katétru [3]

[1] [5] [6] [15]

### 3.4.2 První generace KMG

Základy pro kontinuální měření glykémie položil americký nefrolog Dr. Stuart Updike, který svou teorii postavil na biosenzorech první generace, jejich princip byl vysvětlen v příslušné kapitole. Prvním pokusem byl přístroj, který odebíral krev v dvou minutových intervalech. Jednalo se o zařízení značně objemné, neboť jeho součástí byla pumpa, ředící jednotky a další elektronika. Vývoj nastal s objevením faktu, že při použití hydrofobní membrány není potřeba k chemické reakci kyslík. To vnuklo myšlenku, že by se dala hladina glykémie měřit uvnitř těla.

V roce 1985 byl vytvořen přístroj, který dokázal měřit koncentraci glukózy přímo v krvi. Nesl název Direct 30/30 a detekoval, díky glukózooxidázové membráně, peroxid vodíku. Membrána musela být jednou během dne kalibrována. Také neobsahovala póry a fungovala na rozpustnosti glukózy a kyslíku na svém povrchu. Vycházelo se z faktu, že difuze glukózy byla zpomalena.

Updike poté založil společnost Markwell Medical. Která se zaměřila na zdokonalení implantovaného zařízení. V dnešní době se firma jmenuje DexCom.

### 3.4.3 Druhá generace KMG

V této generaci se uplatňuje mediátor místo kyslíku tak, aby mohly vzniknout enzymatické reakce. Jelikož je mediátor rozpustný v krvi, nešlo ho z počátku použít pro měření uvnitř těla pacienta. Dr. Adam Heller se zasloužil o zrod polymeru, na který je možno uchytit mediátor i enzym. Zde nastává problém spojený s malým místem pro vrstvu mediátoru, kdy mediátor odpadne či nereaguje. Heller založil společnost TheraSense, ta se zaměřovala na implantovatelné senzory.

### 3.4.4 Dostupné kontinuální monitory

Na trhu se do této doby objevuje několik systémů, které umožňují kontinuální měření glykémie. V popředí jsou firmy Medtronic MiniMed Inc.; Biografer, Cygnus Inc; A. Menarini Diagnostic; Pendragon Medical a Abbot Laboratories. Tabulka (Tab. 4 Přehled kontinuálních měřičů hladiny glykémie) nám popisuje základní vlastnosti a funkce jednotlivých kontinuálních monitorů.

[1] [3] [6]

Tab. 4 Přehled kontinuálních měřičů hladiny glykémie [6]

Glukometr	Firma	Senzor	Umístění	Princip měření
<i>DexComG4 PLATINUM</i>	DexCom	Minimálně invazivní	Podkoží břicha	Glukózooxidáza
<i>CGMS Gold</i>	Medtronic MiniMed Inc	Minimálně invazivní	Podkoží břicha	Glukózooxidáza
<i>Guardian</i>	Medtronic MiniMed Inc	Minimálně invazivní	Podkoží břicha	Glukózooxidáza
<i>GlucoDay</i>	A.Menarini Diagnostic	Minimálně invazivní	Podkoží břicha	Glukózooxidáza, mikrodialýza
<i>FreeStyle</i>	Abbott Laboratories	Minimálně invazivní	Podkoží paže	Glukózooxidáza
<i>GlucoWatch</i>	Biografer, Cygnus Inc	Minimálně invazivní	Podkoží paže	Glukózooxidáza
<i>Pendra</i>	Pendragon Medical	Neinvazivní	zápěstí	Impedanční spektroskopie

*CGMS Gold*: tři snímací senzory jsou umístěné v teflonové trubičce, vodičem jsou spojeny s měřicí jednotkou. Senzory se většinou umisťují do oblasti břicha. Hodnota glykémie je vypočítaná z naměřeného proudu. Disponuje záznamem o aplikaci inzulínu a příjmu potravy.

*Guardian*: do těla pacienta je implementován senzor, který pracuje na bázi chemických reakcí s glukózou. Senzor je propojen s přenašečem, který pomocí bezdrátového přenosu vysílá informaci do monitoru, kde se získané informace vyhodnocují. Systém jde propojit s inzulínovou pumpou.

*GlucoDay*: tento typ senzoru využívá ke svému fungování mikrodialýzu. Jedná se o velice propracovaný systém, u kterého je minimalizována interference. Po aplikaci sondy, která zajišťuje dialýzu, je intersticiální tekutina smíchaná s dialyzačním roztokem. Takový roztok je přiváděn k biosenzoru. Biosenzor pracuje na principu glukózooxidázové reakce a výchozím signálem je elektrický proud. Problémem v principu měření je jiná hladina glukózy v krvi a v intersticiu. To se musí při stanovení hodnoty brát v úvahu.



Obr. 7 A - KGM CGMS Gold s implementovatelnou elektrodou [23], B - KGM Gurdian s implementovatelnou elektrodou [22], C - KGM GlucoDay s komponenty [1]

*FreeStyle*: tyto přístroje umožňují zavedení senzoru i na hřbet ruky, zavedený senzor pracuje na glukózaoxidázové reakci s amperometrickým měřením. Systém neposkytuje průměrné hodnoty, ale hodnoty v reálném čase. A disponuje USB propojením.

*GlucoWatch*: jedná se o bezbolestnou metodu kontinuálního měření hladiny glykémie, avšak ne zcela přesnou. Hodnoty jsou průměrné a jsou získány až po třídenním měření.

*Pendra*: tento monitor je zcela neinvazivní. Umisťuje se na zápěstí a má podobu náramkových hodinek. Určování hodnoty hladiny glukózy probíhá z elektroimpedance elektrolytového prostředí intersticiální tekutiny v podkoží. Velkou nevýhodou jsou zde malé hodnoty elektroimpedance, která je mnohdy neměřitelná.



Obr. 8 A - KGM FreeStyle s aplikátorem elektrody [21], B - KGM GlucoWatch s elektrodou [20], C - KGM Pendra s elektrodou [19]

*DexComG4 PLATINUM*: skládá se opět ze senzoru, vysílače a přijímače. Disponuje USB připojením. Přístroj provádí měření každých 5 minut. Vykresluje grafy trendů, tedy průběhy hladiny glukózy během dne. Snímač funguje po dobu 7 dnů.



**Obr. 9 KGM DexComG4 PLATINUM s aplikátorem a elektrodou [18]**

[1] [6] [18] [19] [20] [21] [22] [23]

#### 4. Rešerše senzorů pro stanovení hladiny glukózy v krvi

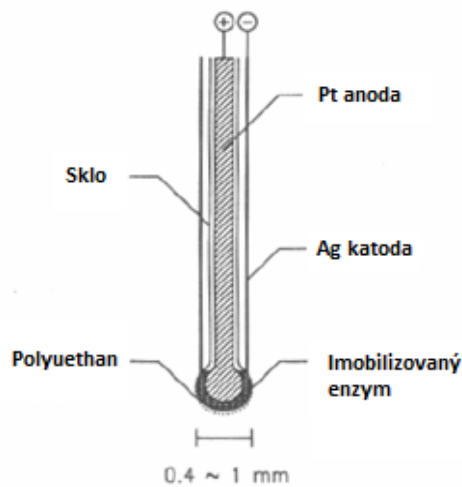
V předešlých kapitolách byla zmíněna důležitost sledování hladiny koncentrace glukózy v pravidelných intervalech a podle potřeby podávat organismu inzulín. Aby byl nemocný jedinec samostatný, potřebuje přístroj, který by měřil hladinu glykémie dle jeho potřeby. K tomu slouží glukometry, které jsou používány pro domácí měření. Jedná se o malé zařízení napájené baterií, vyhodnocuje elektrochemický nebo fotometrický signál. Základem zůstávají testovací proužky, zde označovány jako biosenzor. Podstatou funkce glukometru jsou reakce mezi glukózou a enzymem glukózaoxidázou.

*Proužky pro elektrochemický princip:* skládají se ze dvou nebo tří miniaturních elektrod. Jedna se označuje jako indikační a druhou nazýváme referenční. Pokud proužek disponuje třemi elektrodami, jedna z elektrod se uplatňuje jako spouštěcí. Na povrchu je nanesen enzym, mediátor a stabilizátor.

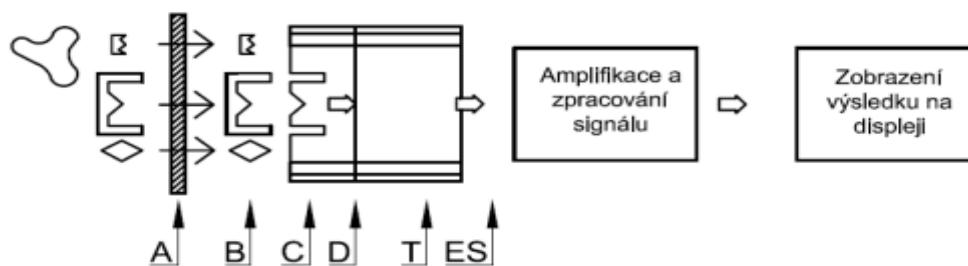
*Proužky pro fotometrický princip:* zde se na povrchu vyskytuje chemikálie, která s krví reaguje za vzniku barevné sloučeniny.

Biosenzor je tedy přípravek, na kterém se realizují chemické děje a je schopen snímat danou veličinu. Jedná se o zařízení převádějící signál elektrochemické reakce na digitální hodnotu. Děje se tak buď pomocí ampérmetru, nebo fotometru. Měření se provádí za použití kapky krve o hodnotě 5  $\mu\text{l}$  po dobu 5 vteřin. Biosenzor se skládá z biologické složky, tedy enzymu. Díky této části rozpoznává analyt. Druhou složkou je fyzikální převodník, který zajišťuje převod na vhodný signál. Enzymy pro glukózu patří do skupiny oxidoreduktáz, oxidují glukózu na glukonát. Uvolněné elektrony jsou přeneseny na oxidovanou formu molekuly přítomného mediátoru a dochází k přeměně na redukovanou formu. Mediátor slouží pro příjem nebo výdej elektronu. Nejčastěji používané biosenzory jsou založeny na glukózo-enzymové reakci a používá se elektrochemický princip měření.

Konstrukce biosenzorů je založena na řídicí membráně, která je propustná pouze pro určité látky. Schéma takového senzoru, je uvedeno níže. Biosenzory se používají pro stanovení daných hodnot přímo v těle pacienta, či z odebraných vzorků. Na následujících obrázcích jsou uvedeny možnosti aplikace elektrody do biosenzoru a následně zavedení do katétru.

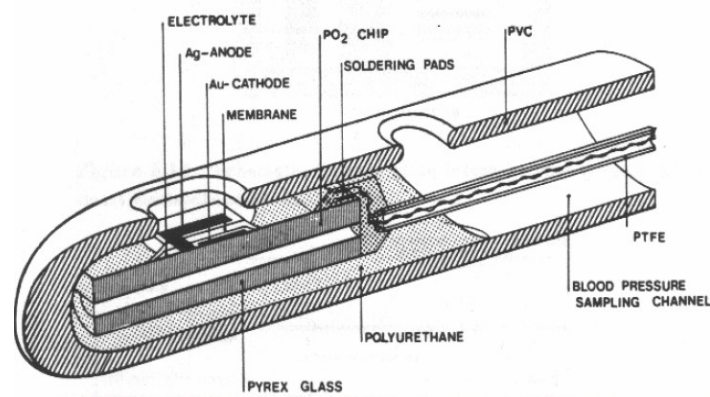


Obr. 10 Konstrukce biosenzoru [8]

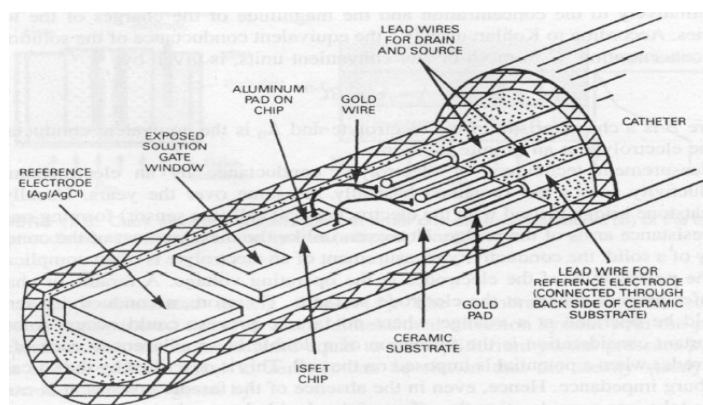


Obr. 11 Detailní popis konstrukce biosenzoru [8]

Biosenzory pro měření hladiny glykémie se někdy zavádí pomocí katétru do těla pacienta za účelem měření krevního průtoku dilucí glukózy. Takový senzor se musí v katétru nacházet na dobrém místě. Typy takových senzorů jsou vyobrazeny na následujících obrázcích.



Obr. 12 Biosenzor uložený v katétru [8]



Obr. 13 Biosenzor uložený v katétu [8]

[1] [5] [7] [8] [12] [28]

#### 4.1 Elektrochemické biosenzory

Chemickou reakcí, která vzniká mezi glukózou a enzymem, se spotřebovávají nebo produkují elektricky aktivní částice, které dokážou přenášet proud. Tento vzniklý proud dokážeme měřit a podle jeho hodnoty určovat koncentraci analytu, tedy množství glukózy v krvi. Uplatňují se zde *amperometrické převodníky*, které pracují při konstantním napětí přiváděné na pracovní elektrodu. Prakticky se jedná o předání elektronů pracovní elektrodě, které vznikají při oxidaci peroxidu vodíku získaného z dané chemické reakce. Podmínkou je, že reakce na pracovní elektrodě probíhá rychleji, než transport elektronů k druhé elektrodě.

Limitní difuzní proud poté vypočítáme:

$$i_d = nFAD ((c - c_0))/\delta \quad (4.1)$$

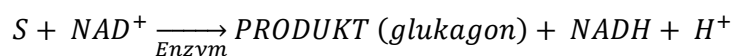
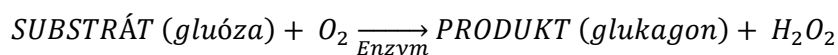
$c$  = koncentrace analytu

$c_0$  = koncentrace analytu na elektrodě

$\delta$  = tloušťka difuzní vrstvy

U elektrochemických biosenzorů se uplatňují senzory používající chemické reakce, kde se spotřebovává kyslík za vzniku peroxidu vodíku nebo NAD(P)H.

Mohou vznikat následující reakce:





Základem elektrochemických senzorů jsou elektrody. Používá se dvouelektrodový systém či tříelektrodový systém. Ve své práci uplatňují *amperometrické elektrody*. Tyto elektrody snímají signál, kterým je elektrický proud. Velikost toho proudu prošlého za čas tudává náboj  $Q$ . Hodnota náboje odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách.

Náboj vypočítáme pomocí vzorce:

$$Q = I * t = (z * F * m) / M_r \quad (4.2)$$

$F = \text{Faradayova konstanta}$

$m = \text{hmotnost přeměněné látky}$

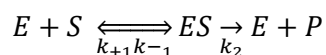
$I = \text{prošlý proud}$

$z = \text{počet vyměněných elektronů}$

$M_r = \text{molekulární hmotnost přeměněné látky}$

#### 4.1.1 Enzymová katalýza

Chemická reakce, která je urychlena použitím enzymů, se jmenuje katalýza. Enzymy se řadí mezi pozitivní katalyzátory. Slouží ke snížení aktivační energie dané reakce. Urychlují tedy jen dosažení rovnováhy mezi výchozími látkami (substráty) a produkty. Právě na jeho povrchu probíhají katabolické reakce. Aby enzym mohl vykonat svou práci, musí dojít ke styku molekuly substrátu se specifickým enzymem. Takovému jemu se říká komplex enzym-substrát. Teprve poté, ve fázi štěpení, vznikne enzym a produkt. Jedná se tedy o následnou reakci se zvratným krokem. Pro chemickou reakci platí následující schéma.



Pro meziprodukt, který během reakce vzniká, platí rovnice uvedena níže.

$$(dc_E)/dt = k_1 c_E c_S - k_1' c_{ES} - k_2 c_{ES} = 0 \quad (4.3)$$

Koncentraci takto vzniklého meziproduktu vyjádříme následovně.

$$c_{ES} = k_1 c_E c_S / (k_1' + k_2) \quad (4.4)$$

$c_E, c_S = \text{koncentrace výchozích látek}$

$k_1, k_2 = \text{rychlostní konstanty}$

Sloučení může proběhnout pouze po sražení molekul enzymu a substrátu. Jelikož jsou molekuly enzymu dostatečně velké, musí se dbát na dostatečné množství molekul substrátu. Pokud dojde ke sražení molekul, tak vzniklá chemická reakce se vyznačuje určitými vlastnostmi. Nejdůležitější vlastnosti pro mou práci je reakční rychlost. Tato rychlost je funkcí koncentrace substrátu. Při zvyšování koncentrace reakční rychlost roste, až dosáhne svého maxima. Poté už

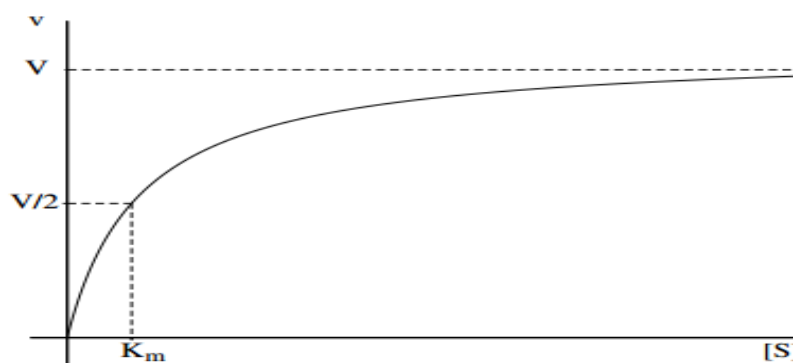
se rychlost navyšovat nemůžeme, i když se zvyšuje koncentrace. Počáteční rychlost tedy vztahujeme k ustálenému vztahu a můžeme jí vypočítat z rovnice Michaelise a Mentelové.

$$v = V * [s] / (K_M + [s]) \quad (4.5)$$

$V = \text{maximální rychlost}$

$K_m = \text{Michaelisova konstanta}$

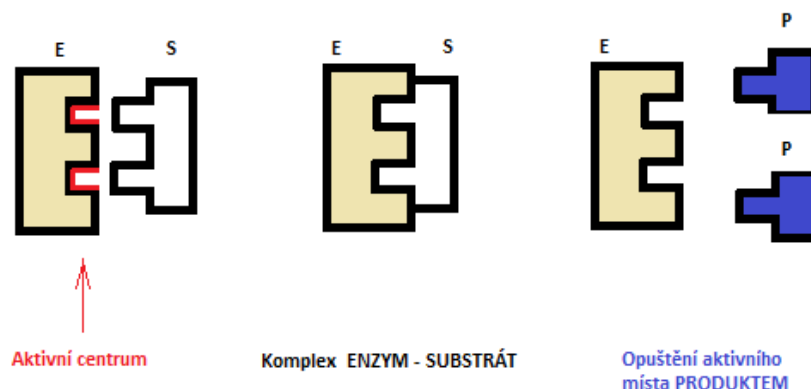
Grafickým znázorněním rovnice je jednoosá hyperbola.



Graf 2 Grafické znázornění rovnice rychlosti - hyperbola [14]

Může nastat stav, kdy se rychlost reakce rovná  $v = v_{max}/2$ . Zde můžeme říci, že  $K_m$  je rovno koncentraci substrátu. Neboli  $K_m$  se rovná koncentraci substrátu, při které dochází k nasycení enzymu právě z jedné poloviny.

Enzymy jsou na povrchu hákovitě řasené, to umožňuje navázání substrátu. Každý substrát má odpovídající enzym, tvarově do sebe zapadají, takovému jevu se říká klíče a zámky. Dané geometrické tvary označujeme jako haptofory. A právě v těchto oblastech se nachází aktivní centrum reakcí. Enzymy se tedy vyznačují svou specifikou pro katalysu pouze určité látky.



Obr. 14 Zobrazení vzniku komplexu enzym - substrát za vzniku produktu

Při biochemických reakcích také záleží na hodnotě  $pH$ , které se u většiny enzymů pohybují v rozmezí 5 – 7. Dalším ovlivňujícím faktorem je teplota, kdy s rostoucí teplotou dochází k zvyšování

rychlosti chemických reakcí, v našem případě i k rychlejšímu rozkladu enzymu. Při hodnotách nad 70°C dochází k zabrzdění reakce, tento jev je nevratný. V oblasti teplot 20 – 38 °C dokáže enzym přeměnit až  $10 - 10^5$  molekul substrátu za sekundu.

[13] [14] [25]

## 4.2 Biosenzory 1. generace

Základ položili vědci Clark a Lyons. Jejich biosenzor využíval faktu, že docházelo ke spotřebě kyslíku při reakci s glukózou za přítomnosti glukosidázy na elektrodě. Enzym byl umístěn do elektrolytu mezi membránu a elektrodu, kde byl imobilizován v polyakrylamidovém gelu na povrchu membrány. Použitá membrána byla permeabilní pro plyny. Stanovoval se pokles tlaku kyslíku, který se spotřebovává při enzymatické oxidaci glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Tento pokles je úměrný koncentraci glukózy.

Prvním funkčním analyzátozem byl přístroj firmy Yellow Springs Instrumens. Byl založen na Clarkově elektrodě.

## 4.3 Biosenzory 2. generace

Biosenzory druhé generace nepoužívají kyslík jako oxidační činidlo. Aby proběhla chemická reakce bez vzniku peroxidu vodíku, na elektrodu se přidala vrstva reakčního prostředí (mediátoru). Ten přenáší elektrony z chemické reakce na pracovní elektrodu. Mediátor zde zastupuje médium pro přenos potřebného signálu přes bariéru vzniklou tlustou proteinovou vrstvou.

## 4.4 Biosenzory 3. generace

Vyznačují se přímým přenosem elektronů mezi aktivním stranou enzymu a povrhu elektrody. Důležitým faktorem je zde imobilizace enzymu, aby nedocházelo k denaturaci bílkovin potřebných k přenosu elektronu k povrchu elektrody. Tyto senzory by měly být implementovatelné a měly by sloužit ke kontinuálnímu měření glykémie.

[1] [5] [7] [27]

## 5. Průtokové techniky biosenzorů

Jedná se o techniky sloužící k transportu látky do místa určení. Přpravují se vzorky či reagentní látky. V této práci se zaměřujeme na stanovení hodnoty glykemie v krvi, proto si tento mechanismus převedeme na možné cesty krve k čidlu elektrody. Průtokové techniky můžeme rozdělit do tří velkých skupin. První z nich je průtoková injekční analýza FIA, další je sekvenční injekční analýza SIA a mikrodialýza.

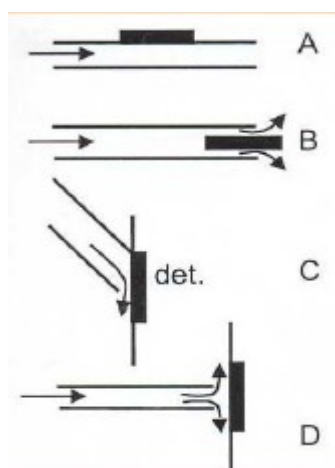
### 5.1 Průtoková injekční analýza FIA

Principem FIA metody je nasátí vzorku do nosného média, kde je naředěn. Uplatňuje se zde princip disperze, ta se popisuje disperzním faktorem, tedy poměr koncentrace vzorku a maxima koncentrace v zóně vzorku procházející detektorem. Použití technik v klinické oblasti se uplatňuje u osobních glukometrů, těhotenských testů nebo u stanovení hladiny alkoholu v krvi.

Vzorek se spojí s pomocným reagentem a je veden do míchací smyčky, nakonec prochází k čidlu detektoru. Vedení zajišťují hadičky o průměru 0,5 – 1 mm z PVC, silikonu či teflonu, které jsou spojeny pomocí spojek T, Y, W. Obvod dále tvoří peristaltická pumpa s krokovým motorem, výsledný tok je tedy pulzující. Průtok je určován průměrem hadičky a rychlostí otáček v rozsahu 0,1 – 5 ml/min. Obvod je dále doplněn o ventily, které slouží pro nástřik vzorku.

#### 5.1.1 Uspořádání detektorů FIA

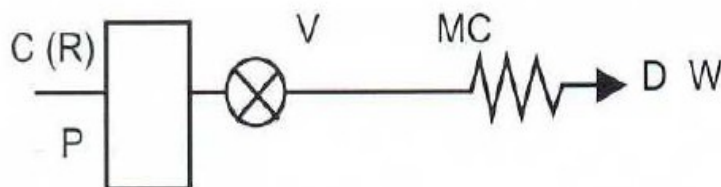
Při této technice se uplatňuje několik typů detektorů. Ty pracují na standardních principech, kterými jsou chemicko-fotometrický princip, fluorometrický princip a elektrochemický princip, který se uplatňuje přímo v biosenzorech. Detektor může vůči přivádějícímu médiu zastávat několik poloh, ty jsou zobrazeny na následujícím obrázku.



Obr. 15 Poloha detektorů: A - paralelně, B - místění u ústí, C - kaskádové, D - wall-jet [17]

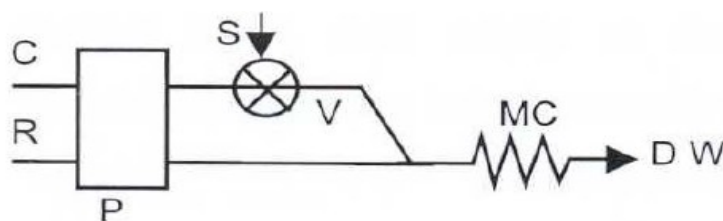
Dále se obvody liší svým uspořádáním. Jednotlivé typy jsou rozpracovány níže. Kde písmenem P označuje pumpu, C vedení nosného média, R je pomocný reagent, S nástřik vzorku, V ventil, MC míchací smyčka, D detektor a W je odpad.

*Jednolinkové uspořádání:* neboli single line. Uplatňuje se zejména u biokatalytických reakcí. Může se použít místo míchací smyčky enzymový reaktor spojený s nespecifickým detektorem.



Obr. 16 Jednolinkové uspořádání [17]

*Dvoulinková konfigurace*

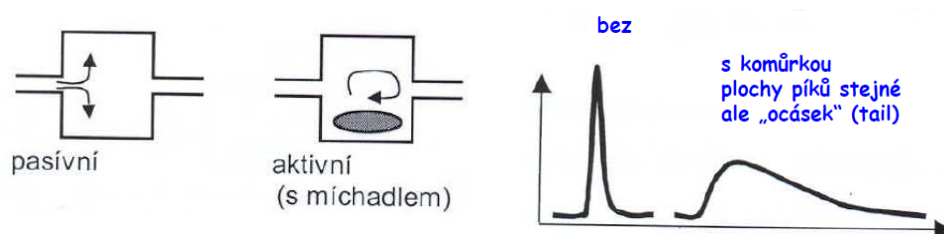


Obr. 17 Dvoulinkové uspořádání [17]

*Merging zones:* skládá se z jedné pumpy, která disponuje dvěma ventily pro vzorek a reagent. Je zde kladen důraz na synchronizaci ventilů. Používá se zejména v případě použití drahého reagentu NADH.

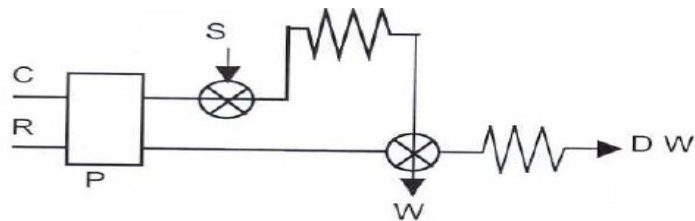
*Reverse FIA:* vzorek nasáván kontinuálně v jedné linii a ve druhé se provádí nástřik reagentu.

*Naředění v komůrce:* umožňuje větší naředění v míchací komůrce, nosné médium se vzorkem protéká rozšířeným místem. Záznamem je nízký a široký pík.



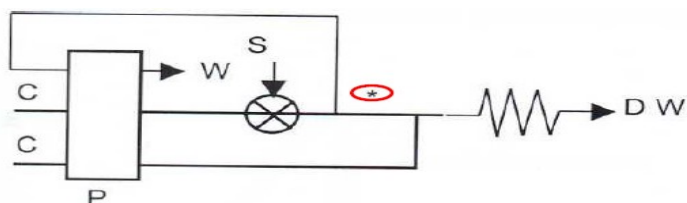
Obr. 18 Průtočná technika s využitím naředění v komůrce [17]

*Zone sampling:* neboli opakovaný nástřik vzorku. Pak se uplatňují jeho naředěné zóny.



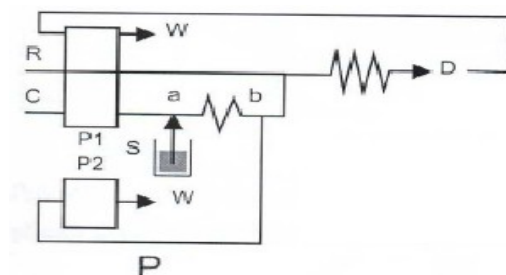
Obr. 19 Zone sampling [17]

*Sampling splitting:* z ramena nastříknutého vzorku se část vzorku odvádí pryč. Dochází k velikému útlumu rychlosti průtoku, toto místo je označeno (\*).



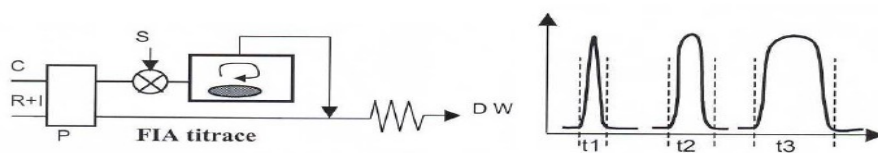
Obr. 20 Sampling splitting [17]

*Hydrodynamický nástřik:* vyznačuje se dvěma pumpami bez ventilu. P1-on, P2-off znamená normální režim. P1-on P2-on umožňuje nasátí zóny vzorku do smyčky a-b, dochází k zablokování zpětného toku, kdy je výstup z detektoru do odpadu přes P1.



Obr. 21 Hydrodynamický nástřik [17]

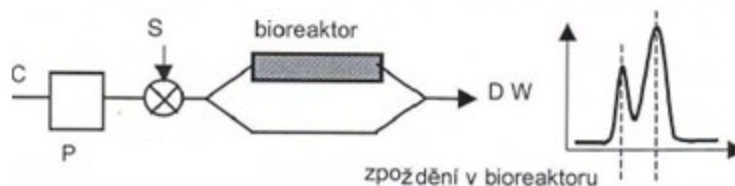
*Titrace pomocí FIA:* v tomto obvodu je umístěna míchací komůrka a měříme plochu píku odpovídající jedné barvě indikátoru.



Obr. 22 Titrace pomocí FIA [17]

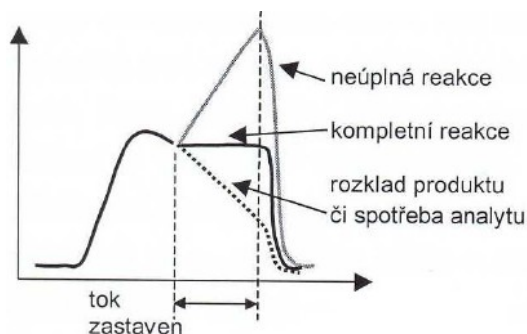
*Reverse flow:* zpětný tok zóny vzorku zpět z detektoru.

*Splitted flow*: rozdělení vzorku na dvě linie, jedna část projde reaktorem, druhá část je vedena pouze k detektoru. Před detektorem se obě spojí a získáme dvě maxima.



Obr. 23 *Splitted flow* [17]

*Stopped flow*: zastavení toku, kdy vzorek v detektoru určitým způsobem reaguje a umožňuje zobrazení reakčního průběhu.



Obr. 24 *Stopped flow* [17]

[9] [12] [17]

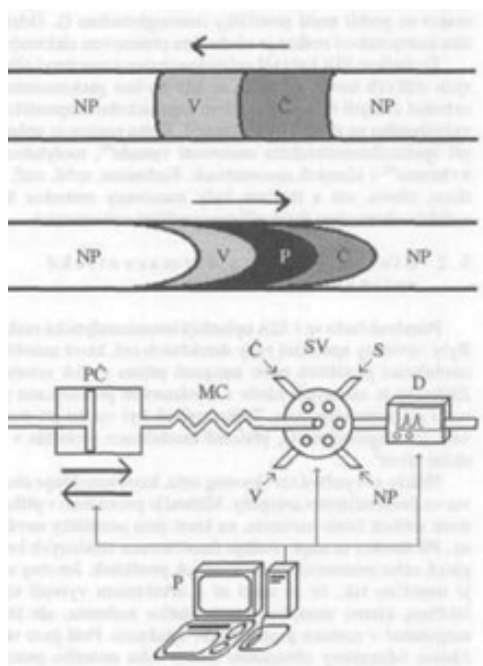
## 5.2 Sekvenční injekční analýza SIA

Průtoková analytická technika, kde se analyt v roztoku vzorku převádí na detekovaný produkt pomocí reakce s činidlem a dále se měří vhodná analytická vlastnost. Vyskytují se zde oddělené měřicí cykly. Mezi jednotlivé části obvodu patří zóny nosného media, vzorku a činidla. Tyto složky jsou aspirovány postupně do jednonábového systému. Děje se tak s pomocí selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Po nasátí je chod čerpadla obrácen a dojde k promíchání za vzniku produktu, který je veden k detektoru. Zaznamenává se změna koncentračního gradientu reakčního produktu, který se odečte v geometrii nosného proudu. Rozdíl od FIA techniky je ten, že se zde uplatňuje přímý a zpětný tok. Objem vzorku je v SIA možno měnit v rozsahu  $\mu\text{l}$ . Tím pádem optimalizujeme disperzi zóny vzorku podle koncentrace analytu a také provádět kalibraci. Tu provádíme tak, že jeden z kanálů selekčního ventilu propojíme s roztokem standartu.

U SIA techniky se používají detektory se spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické a průtokové cely (membrány). Volba závisí na druhu použité analytické reakci. Pro SIA byla vyrobena jet-ring cela, která umožňuje vytvoření optického nebo elektrochemického senzoru. Dále se vyrábí

sandwichova membrána, mikroobjemova cela, fontánová cela. Uplatňují se také iontově selektivní a enzymové elektrody.

Jet-ring cela umožňuje vazbu protilátek s antigeny, měření se provádí s přítomností větších částic sorbetu, na které se dané látky navazují. Mezi celou a detektorem je úzká štěrbina a tou sorbety neprojdou. Tento princip se používá u stanovení glukózy.



Obr. 25 SIA metody [9]

[9] [12] [17]



## 6. Návrh a realizace

Níže popisovaný elektroodový systém a měřicí obvod slouží jako celek k detekci koncentrace glukózy v analyzovaných roztocích. Měřicí obvod byl z části převzat z práce Ing. Petra Fajkuse. Návrh byl konzultován s Ing. Tomášem Klinkovským. Princip měření byl převzat z návrhu glukometru paní prof. MUDr. Alexandry Jirkovské, CSc. Prvotní realizace měřicího obvodu proběhla na nepájivém poli. Elektroda je tedy vybavena vývody, které se dají na pole aplikovat. Velká část měření proběhla právě na tomto obvodu. Poté byla vytvořena deska plošného spoje. A byla provedena řada testovacích měření. Důležitou částí práce bylo vyhodnocení reakční kinetiky probíhající reakce, aby byla funkce elektroodového systému přesně popsána a výsledné hodnoty mohly být přiřazeny k odpovídající koncentraci glukózy ze vzniklého proudu. Dalším bodem bylo nastínit techniky uchycení enzymu na povrch pracovní elektrody, tedy elektrody, na kterou je přiváděno napětí.

Aby bylo možno pomocí navrženého elektroodového systému měřit koncentraci glukózy v krvi, bylo nezbytně nutné sestavit vhodný obvod, který by přiváděl na elektrodu potřebné zdrojové napětí a umožňoval měřit, vhodným způsobem, vzniklý signál, který by měl odpovídat koncentraci glukózy. Při konečném návrhu měřicího řetězce se tedy vycházelo ze dvou částí. První je vytvoření měřicího obvodu, do kterého by se dala připojit část druhá, kterou tvoří elektroodový systém. Elektroodový systém by měl disponovat vhodnou nádobou k aplikaci glukózy a enzymu. Před samostatným návrhem měřicího řetězce se stanovilo několik předpokladů a požadavků, na základě kterých se celý systém vytvořil.

Dané předpoklady a požadavky na konstrukci elektroodového systému a měřicího obvodu se nachází v *neveřejné části* diplomové práce. Dále se v *neveřejné části* práce nachází podrobně popsány postupy vývoje a konstrukce jednotlivých komponent s důrazem na návrh elektroodového systému a měřicího obvodu. Je zde uvedeno i ověření funkčnosti obvodu.

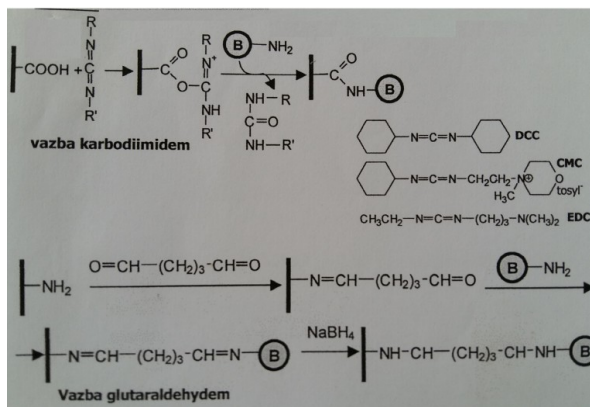
V následující části práce budou uvedeny důležité informace k jednotlivým bodům práce, výsledky měření, náležitě zpracování dat a porovnání naměřených hodnot, které byly získány pomocí dvou elektroodových systémů.

### 6.1 Uchycení enzymu na elektrodu – navrhovaný postup

Aby mohla být elektroda použita pro měření v plné krvi, která obsahuje velkou spoustu volných iontů schopných přenosu elektrického proudu, musí být odlišen proud vzniklý pomocí glukózy. K tomu se používá reakce enzymu glukózooxidázy s glukózou. Zachycená reakce je náležitě vyhodnocena a na základě získané hodnoty je určena hladina glykémie v krvi.

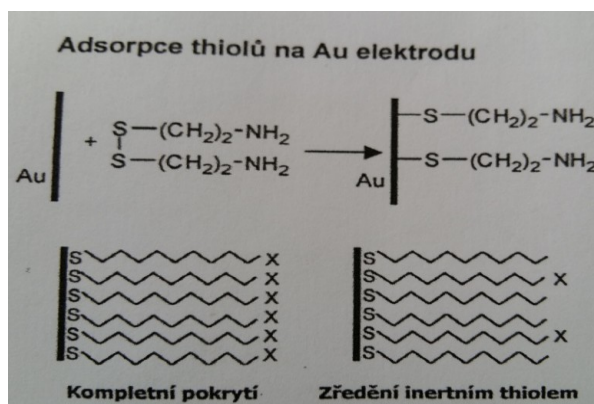
Zde vyvstává problém uchycení enzymu na elektrodu tak, aby došlo k reakci s glukózou a zároveň nebyla tato reakci nikterak ovlivněna. Cílem je uchytit enzym takovým způsobem, aby byla zajištěna dlouhodobá stabilizace enzymové aktivity. Metody uchycení enzymu jsou velice složité. Dalo by se říci, že tato problematika imobilizace, není přesně zpracována. Neexistují jakékoliv obecné způsoby přípravy. Techniky imobilizace, které se používají v současné době, ne se zcela kvalitními výsledky, využívají membrány či kovalentní zesíťování, dále adsorpce nebo zachycení v polymeru.

- *Membrány:* Obsahují póry, které zajišťují průchod pouze dané molekuly. Transport se řídí difuzní kontrolou či ovlivněním selektivity. Musí být zajištěna biokompatibilita. Mezi techniky zachycení patří mechanické zachycení enzymu a zachycení v gelu.
- *Kovalentní zesíťování:* Využívá se glutaraldehyd, díky kterému je na povrchu vytvořeno retikulum.



Obr. 26 Kovalentní vazba na membránu nebo povrch elektrody

Novou a relativně spolehlivou metodou pro imobilizaci enzymu na elektrodu jsou thiolové skupiny. Právě tato metoda by byla vhodná pro další zpracování. Jedná se o organické sloučeniny síry. Jejich molekula obsahuje sulfanylovou skupinu  $-SH$ , tedy vazbu vodíku a síry.



Obr. 27 Adsorpce thiolů na Au elektrodu

Tento problém by měl být reálně řešen, spolu s dalšími body, v rámci dalšího studia a práce na daném tématu.

[26]

## 6.2 Látky použité v experimentálním měření

Během měření je použito několik roztoku o různé hodnotě molární koncentrace glukózy. Na základě jiných koncentrací glukózy určujeme hodnotu glykémie díky měřenému proudu. Čím vyšší koncentrace glukózy v roztoku, tím větší proud je měřen. Hodnota proudu se také zvyšuje, pokud dojde ke kontaktu glukózy s enzymem glukózaoxidázou a proběhnou příslušné reakce.

Molární koncentrace nebo také látková molární koncentrace vyjadřuje látkové množství látky rozpuštěné v jednotkovém objemu rozpouštědla.

$$c = n/V \text{ [mol/l, M]} \quad (6.1)$$

$n = \text{látkové množství [mol]}, n = \frac{N}{N_A}$ , kde  $N_A = 0,6 \cdot 10^{24} = \text{Avogardovo číslo}$ ,  $n = m/M$

$$V = \text{objem roztoku [l]}$$

V krvi se hladina glykémie pohybuje okolo  $5 \text{ mmol/l}$ . Abychom byli schopni si představit, kolik gramů glukózy obsahuje koncentrovaný roztok, je důležité znát vyjádření jednotky molu.

$$\text{Avogardovo číslo: } 0,6 \cdot 10^{24} = 1g/m_p$$

Glukóza:  $C_6H_{12}O_6$

$$6 * C_{12} = 72$$

$$12 * H_1 = 12$$

$$6 * O_{16} = 96$$

—

$$180$$

Můžeme tedy vypočítat, že 1 mol glukózy je  $180 * m_p * N = 180 m_p * 1g/m_p = 180g$ .

Tedy 1 mmol glukózy je  $180 * 10^{-3}g = 0,18g$ .

Pokud vezmeme v potaz fakt, že v lidské krvi je koncentrace glukózy kolem  $5 \text{ mmol/l}$ , můžeme z toho výpočtu určit, že se jedná o  $5 * 0,18 \rightarrow 0,9g/l$ .

Během experimentálního měření se používaly připravené roztoky, které obsahovaly různé množství glukózy. Tyto roztoky vznikly pomocí destilované vody a suché glukózy. V každém měření se použilo **0,3 ml** roztoku. Hodnoty použitých molárních koncentrací glukózy jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5 Tabulka použitých roztoků glukózy

Molární koncentrace roztoku [mmol/l]	Množství gramů v roztoku [g/l]
3 mM	0,54
7 mM	1,26
12 mM	3,06
18 mM	5,4

Dále byl použit enzym zvaný glukózooxidáza aspergillus od společnosti VWR. Při každém měření bylo použito stejné množství tohoto enzymu, které činilo **0,01g**. Enzym se po dobu, kdy nebyl používán, musel uchovávat v mrazicím zařízení, protože v jiném případě by došlo k jeho znehodnocení a ztrátě potřebných vlastností.

Pro měření se využila i destilovaná voda, která obsahuje velice malé množství volných iontů, tudíž by neměla přenášet elektrický proud. Byla využita ke zkouškám elektrod a také k vymývání před každým měřením, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých vzorků.

### 6.3 Reakční kinetika – biochemické děje

V práci je mým úkolem měřit hladinu glykémie s použitím enzymu. Tato problematika úzce souvisí s biochemickými reakcemi, které během měření nastávají. Proto je v řešení problému nemůžu opomenout a musím na ně vzít ohled. Reakční kinetikou se musím zabývat z důvodu správného určení koncentrace glukózy v krvi. Jelikož ta obsahuje značné množství volných iontů schopných přenášet elektrický proud. Biosenzor musí být tedy schopen odlišit chemickou reakci mezi glukózou a enzymem a vyhodnotit potřebný údaj. Děje se tak na základě specifčnosti enzymu, který dokáže reagovat jen s danou látkou, v našem případě s glukózou.

Biochemickými ději označujeme přeměnu látek, které tvoří buňku. Tomuto jevu říkáme látková přeměna nebo také metabolismus. Některé chemické změny jsou specifickým proteinovými sloučeninami katalyzovány, katalyzátorem nazýváme enzym. Vzniklá chemická reakce probíhá pouze jedním směrem. Rychlost a sílu chemických reakcí ovlivňuje hned několik faktorů, kterými jsou koncentrace látek, teplota, přítomnost katalyzátoru, hodnota pH. Obecně dělíme chemické reakce na reakce 0. řádu, reakce 1. řádu a reakce 3. řádu.

Reakční kinetika je oblastí chemie, která se zabývá rychlostí chemických reakcí. Dá se říci, jak rychle se přemění reaktanty v produkty. Uplatňuje se zde pojem srážková teorie nebo také teorie aktivních srážek.

Celý princip reakcí na základě enzymů je založen na teorii aktivních srážek. Reakce je účinná, pokud, díky srážce reaktantů, proběhne chemická reakce. Účinnost je podmíněna dvěma podmínkami:

- 1) Dostatečná kinetická energie: energie potřebná k rozštěpení zanikajících vazeb.
- 2) Vhodná prostorová orientace částic.

V dnešní době se častěji používá teorie aktivovaného komplexu. Která říká, že při účinné srážce reagující částice vytvoří aktivovaný komplex, jakýsi nestálý meziprodukt, který je charakteristický hodnotou aktivační energie  $E_A$ .

Důležitou úlohu zde hraje rychlostní rovnice, která udává vztah mezi reakční rychlostí a složením reakční směsi. Tato rychlost závisí u velkého počtu chemických reakcí pouze na koncentraci výchozích látek. Pro takovou rovnici platí následující vztah.



$$v = kc_A^\alpha c_B^\beta \quad (6.3)$$

$c_A, c_B =$  koncentrace výchozích látek

$k =$  rychlostní konstanta závislá na teplotě

$\alpha, \beta =$  dílčí reakční řády

Jak už bylo zmíněno, reakční kinetika rozděluje reakce do řádu. V práci budeme využívat reakce elementární, neboli izolované.

Reakce 1. řádu se označují jako běžné reakce  $A = B + C$ , kdy koncentrace substrátu exponenciálně klesá podle vztahu:

$$C_A = C_{A0}e^{-kt} \quad (6.4)$$

$t =$  čas reakce

$k =$  rychlost konstanta reakce

Rychlostní konstantu reakce získáme, když známe koncentraci látky ve dvou různých časech.

Tento typ reakce můžeme charakterizovat poločasem rozkladu, tedy časem, který je potřebný k reakci poloviny množství látky A.

$$C_A = 0,5C_{A0}$$

$$0,5C_{A0} = C_{A0}e^{-kt_{0,5}}$$

$$0,5 = e^{-kt_{0,5}}$$

$$\ln 0,5 = -k t_{0,5} \ln e$$

$$t_{0,5} = 0,693/k$$

Rychlostní rovnice tohoto typu reakce je uvedena níže.

$$v = kc_A \quad (6.5)$$

Reakce 2. řádu můžeme popsat obecnými rovnicemi. Rychlost reakce je úměrná druhé mocnině jedné látky nebo součinu dvou látek. Zde je poločas reakce:

$$t_{0,5} = 1/(kC_{A0}) \quad (6.6)$$

Rychlostní rovnice, pro reakce druhého řádu jsou následující.

$$v = kc_A^2 \quad (6.7)$$

$$v = kc_Ac_B \quad (6.8)$$

Dalším ovlivňujícím faktorem je teplota, při které reakce probíhá. Je zřejmé, že s rostoucí teplotou bude růst i rychlostní konstanta  $k$ .

$$k = Ae^{(Ea/RT)} \quad (6.9)$$

$k$  = rychlostní konstanta při teplotě  $T$

$A$  = konstanta úměrnosti (frekvenční faktor)

$Ea$  = aktivační energie,  $R$  = plynová konstanta (8,314J)

[13] [14] [24] [25]

### 6.3.1 Kinetika enzymových reakcí

Základem měření je tedy chemická reakce, díky které může obvodem protékat proud, který je následně měřen. Během reakce mezi glukózou a glukózaoxidázou vzniká v roztoku peroxid vodíku, který dále reaguje za vzniku elektronů, vodíku a kyslíku. Právě vznik volných elektronů je zaznamenáván ve formě elektrického proudu na referenční elektrodě.

Elektrický proud se dá měřit i bez reakce glukózy a glukózaoxidázy. Neboť v roztoku s různou koncentrací glukózy jsou volné ionty, které dokážou přenášet elektrický proud. Proto bylo měření provedeno i bez použití enzymu pro srovnání naměřené hodnoty s hodnotou naměřenou s použitím enzymu. Během měření se musí dbát na udržování potenciálu 0,6V na pracovní elektrodě, jelikož při tomto potenciálu dochází k oxidaci peroxidu vodíku.

Po proběhnutí chemických reakcí můžeme, díky obvodu zapojeného jako mikroampérmetr, měřit elektrický proud. Velikost proudu prošlého za čas  $t$  udává náboj  $Q$ . Tento náboj odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách. Díky tomuto faktu můžeme potřebný proud vypočítat z následujícího vzorce.

$$I = Q/t \quad (6.10)$$

$$I = Q * f \quad (6.11)$$

Je možno použít vzorec:

$$Q = (z * F * m)/M_r \quad (6.12)$$

$F$  = Faradayova konstanta

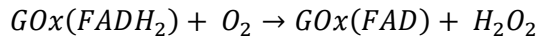
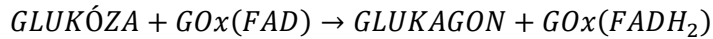
$m$  = hmotnost přeměněné látky

$I$  = prošlý proud

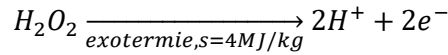
$z$  = počet vyměněných elektronů

$M_r$  = molekulární hmotnost přeměněné látky

Při měření probíhá následující elektrochemické reakce.



V této části chemické reakce vznikne peroxid vodíku, který oxiduje při potenciálu 0,6 V. Proto musíme dbát na udržování tohoto potenciálu na pracovní elektrodě.



Vzniklá chemická reakce probíhá podle vzorce  $E + S \xrightleftharpoons[k_{+1}k_{-1}]{} ES \xrightarrow[k_2]{} E + P$ . Na začátku máme přesně dané počáteční koncentrace substrátu S (glukózy) a konstantní koncentraci enzymu, díky těmto hodnotám můžeme měřeními zjistit závislost koncentrace vznikajícího produktu P (glukagon a peroxid vodíku) na čase. Základem je stanovení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti  $v_{max}$ .

Díky získané časové závislosti vznikajícího produktu vyjádříme okamžitou koncentraci substrátu hmotnostní bilancí.

$$c_s = c_{s0} - x \quad , \quad dc_s = -dx \quad (6.13)$$

$$c_p = x \quad , \quad dc_p = dx \quad (6.14)$$

Dále dosazujeme do diferenciální rovnice Michaelise a Mentlové.

$$v = v_{max}c_s/K_Mc_s \quad (6.15)$$

Dostaneme následující vztah, který podrobíme integraci a upravíme

$$dx/d\tau = v_{max} * (c_{s0} - x/K_M + c_{s0} - x) \quad (6.16)$$

$$1/\tau * \ln * (c_{s0}/c_{s0} - c_p) = (v_{max}/K_M) - (1/K_M) * (c_p/\tau) \quad (6.17)$$

Tímto získáme rovnici přímky, kdy směrnice se rovná  $(-1/K_M)$  a úsek na svislé ose je v poměru  $v_{max}/K_M$ .

Díky známým počátečním hodnotám můžeme dopočítat uvedené rovnice a hodnotu výrazu  $c_p/\tau$ . Poté si můžeme vykreslit křivku, která by měla potvrdit, že závislost je opravdu lineární.

[24] [25] [13]

### 6.3.2 Realizace výpočtů

Následující tabulka obsahuje zapůjčené hodnoty z měření na VŠCHT v rámci cvičení.

Tab. 6 Tabulka naměřených hodnot

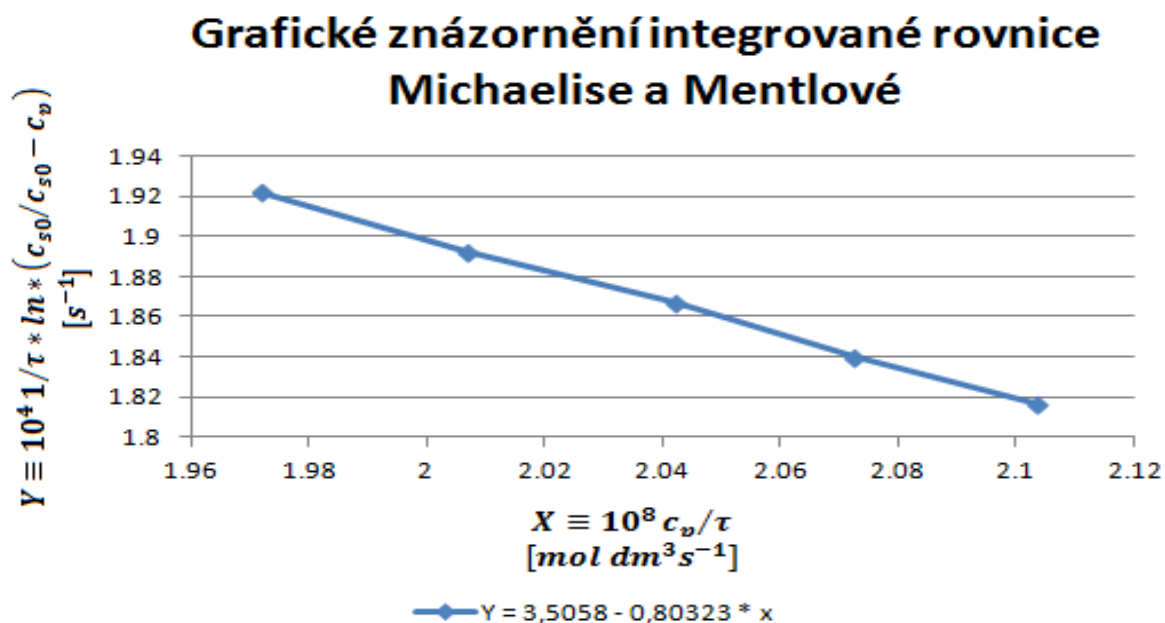
$\tau$ [s]	$c_p$ [mmol dm <sup>3</sup> ]	$\tau$ [s]	$c_p$ [mmol dm <sup>3</sup> ]
580	0,0122	1856	0,0366
883	0,0183	2207	0,0427
1195	0,0244	2575	0,0488
1520	0,0305	2963	0,0549

Po dosazení hodnot do příslušných rovnic získáme následující hodnoty.

Tab. 7 Tabulka vypočtených hodnot

$\tau$ [s]	$10^5 c_p$ [mol dm <sup>3</sup> ]	$Y \equiv 10^4 \frac{1}{\tau} * \ln * (c_{s0}/c_{s0} - c_p)$ [s <sup>-1</sup> ]	$X \equiv 10^8 c_p/\tau$ [mol dm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ]
0	12,2	1,81656	2,10345
580	1,22	1,84053	2,07248
883	1,83	1,86731	2,04184
1195	2,44	1,89265	2,00658
1520	3,05	1,92174	1,97198

Rovnice přímky získáme lineární regresi experimentálních dat  $Y = 3,2058 - 0,80323 * X$ . Grafické znázornění integrované rovnice udává následující graf.



Graf 3 Grafické znázornění integrované rovnice Michaelise a Mentlové[14]



Nyní můžeme dosadit do vzorců a vypočítat náležité hodnoty.

$$1/\tau * \ln *(c_{s0}/c_{s0} - c_p) = 3,5058 * 10^{-4} - 2032,3 * (c_p/\tau)$$

$$1/K_M = 8032,3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

$$K_M = 1,245 * 10^{-4} \text{ mol dm}^3$$

$$v_{max}/K_M = 3,5058 * 10^{-4}$$

$$v_{max} = 3,5058 * 10^{-4} * 1,245 * 10^{-4}$$

$$v_{max} = 4,365 * 10^{-8} \text{ mol dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Touto problematikou se budu zabývat v dalším řešení práce. Jedná se o velice složitý a náročný postup, který vyžaduje konzultace s odborníky na dané téma.

[14]

## 7. Experimentální měření

Experimentálnímu měření jsme podrobila oba elektrodové systémy, měření probíhalo za stálých a neměnných podmínek. Na každé elektrodě byl proveden stejný počet měření. Testováno bylo vždy stejné množství použitých látek. Během měření jsem v určitých časových intervalech zaznamenávala hodnoty napětí. V případě měření s enzymem jsem v danou chvíli přidala dávku.

V první části měření jsem odměřila hodnoty napětí, které vznikaly vedením proudu čistým roztokem. Druhá část měření byla zaměřena na získání hodnot, které vznikaly díky chemické reakci mezi glukózou a enzymem. Po každém měření byly senzory vymyty pomocí destilované vody a vysušeny, až po tomto úkonu mohly být znovu použity. Díky tomu nedocházelo ke smíchání použitého vzorku se vzorkem novým.

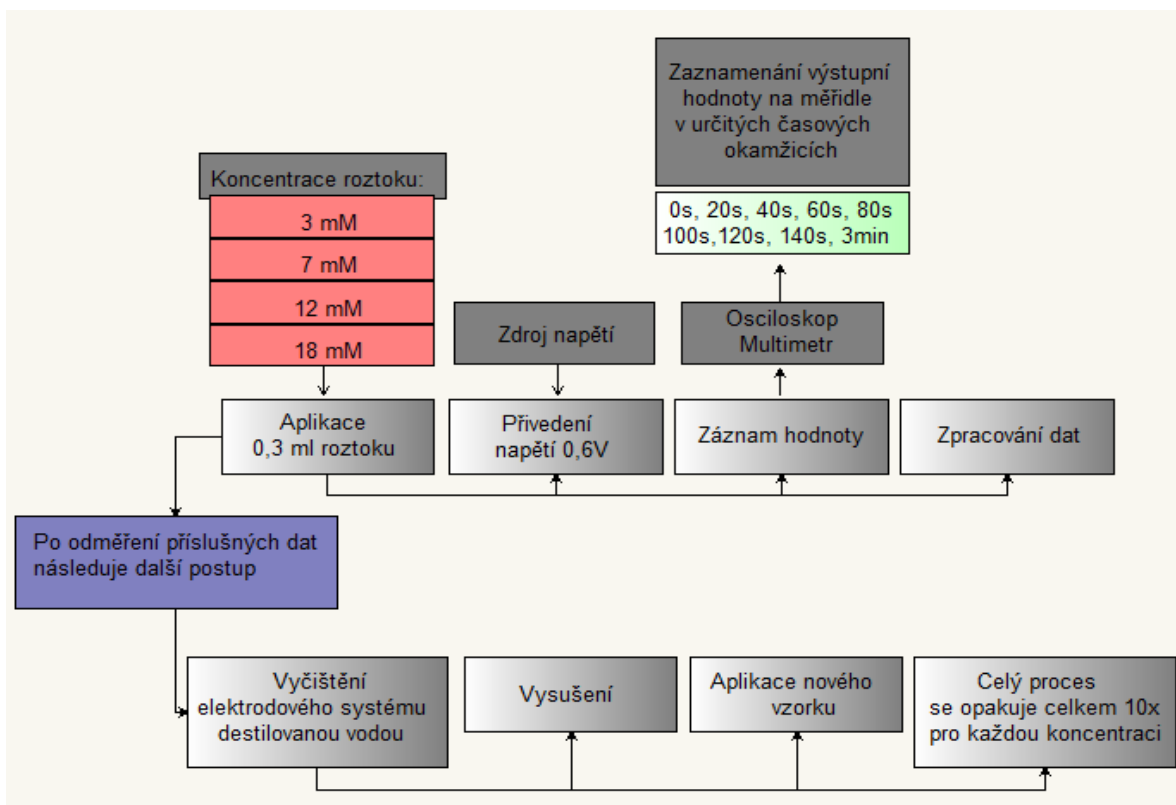
Důležitým faktem během měření bylo zjištění, které bylo předem předpokládáno, že pokud biosenzor neobsahuje žádný vzorek, na výstupu bylo měřené napětí rovno 0V. Dalším předpokladem bylo, že při naplnění elektrody destilovanou vodou bude výsledné napětí zanedbatelné. To se prokázalo vždy před začátkem měření, kdy se hodnoty pohybovaly okolo 0,06V. Avšak během jednotlivých měření jsem pokaždé měřila hodnotu výstupního napětí s použitím destilované vody a zde byly hodnoty větší než u měřených vzorků.

Tab. 8 Tabulka orientačních naměřených hodnot

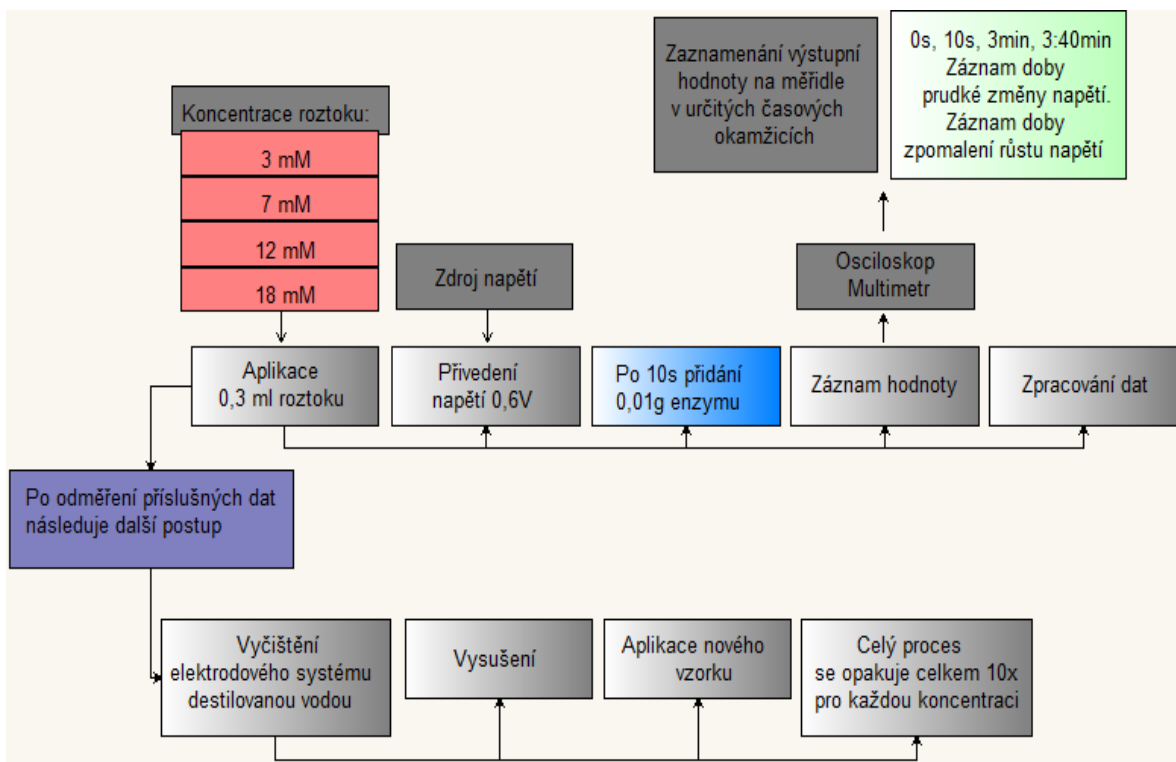
Vzorek	Napětí [V]
Bez vzorku	0
Destilovaná voda před měřením	0,06
Destilovaná voda během měření	Vyšší napětí, než napětí změřené u daného vzorku

Postup měřicího řetězce vykreslují následující diagramy. Všechny postupy jsou aplikovatelné na oba elektrodové systémy. Měření tedy probíhalo konstantně. Rozlišujeme jen měření s různými koncentracemi roztoků glukózy a dále se rozlišuje měření s čistými roztoky a s roztoky, kde je použit enzym. První diagramy odpovídají měřením s čistými roztoky a následují diagramy pro měření s enzymem.

V dalších kapitolách je podrobně rozebrán postup měření s příslušnými hodnotami a dalším zpracováním.



Obr. 28 Blokový diagram měření s čistým roztokem



Obr. 29 Blokový diagram měření s roztokem a enzymem

## 7.1 Zjišťování koncentrace glukózy pomocí elektrody\_1

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty napětí, které byly získány pomocí elektrodového systému 1. Celý proces probíhal podle výše uvedených blokových schémat. Prvním krokem bylo odměření přesného počtu vzorků roztoků bez použití enzymu. Pro každou koncentraci roztoku bylo odměřeno deset měření. Poté se proces opakoval a proběhlo deset měření s přidáním předem daného množství enzymu. V prvním případě je každý vzorek ponechán pod napětím 0,6V po dobu tří minut a v pravidelných časových okamžicích je odebrána měřená hodnota. V druhém případě se čas odebrání měřené hodnoty mění v závislosti na chemické reakci roztoku glukózy, o konkrétní koncentraci, s enzymem. U každé koncentrace, pod odpovídajícími tabulkami, jsou vyobrazeny křivky, které nám poskytují grafický přehled výsledných hodnot. Náhodně byly vybrány tři vzorky a došlo k porovnání jejich hodnot. Tabulky jsou seřazeny vzestupně podle koncentrace roztoku, tedy od roztoku s koncentrací 3mM, 7mM, 12mM po roztok s koncentrací 18mM.

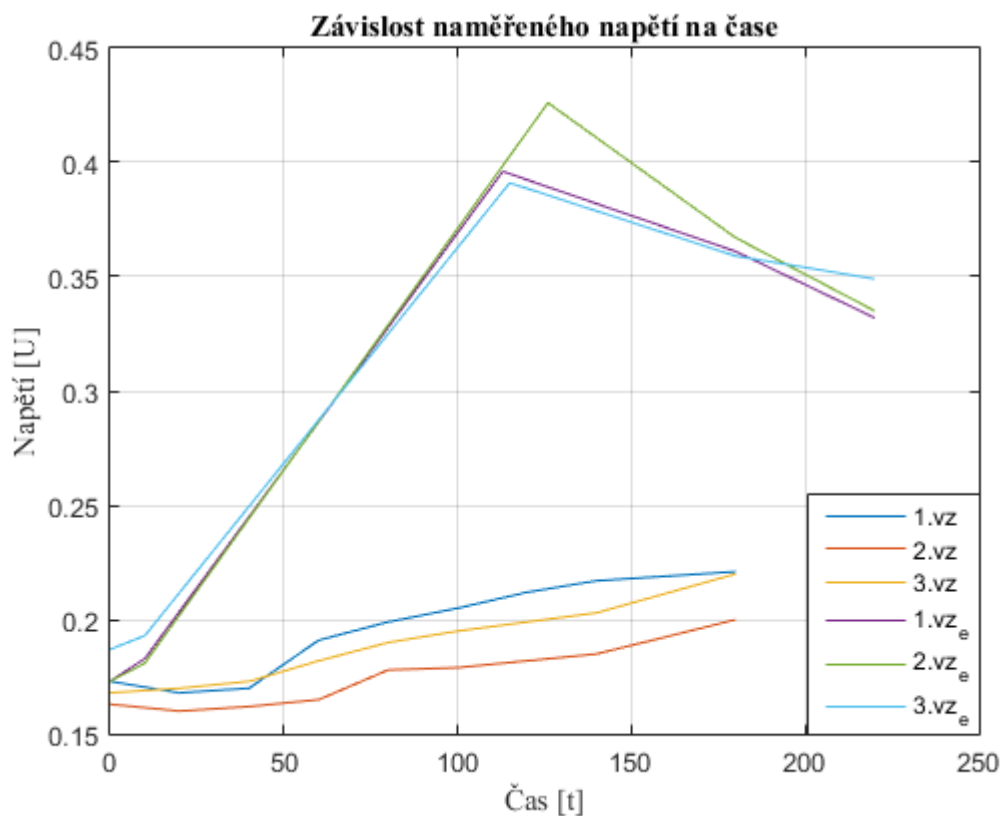
První dvě tabulky nesou hodnoty odpovídající měření s koncentrací roztoku 3mM a s použitím prvního elektrodového systému. Poté je uveden graf, který vyobrazuje náhodně vybrané tři vzorky z každé uvedené tabulky. Při porovnání uvedených hodnot v tabulkách si můžeme všimnout podobnosti naměřených dat. Je tedy zřejmé, že elektroda zaznamenávala vždy relativně shodný signál. Pokud porovnáme hodnoty z tabulky Tab. 9 a Tab. 10 je jasné, že počáteční hodnoty se pohybují ve stejných číslech. V pozdějších časech se však hodnoty rozcházejí. Tento rozkol je zapříčiněn přidáním enzymu. Vývoj měřených hodnot s přesnými časy jsou uvedeny v tabulce Tab. 10.

Tab. 9 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM

Roztok glukózy 3mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,185	0,19	0,183	0,2	0,204	0,205	0,208	0,212	0,2
2.	0,132	0,12	0,145	0,157	0,159	0,162	0,171	0,182	0,188
3.	0,167	0,162	0,161	0,162	0,159	0,155	0,155	0,158	0,158
4.	0,16	0,153	0,15	0,148	0,153	0,156	0,146	0,143	0,138
5.	0,215	0,202	0,203	0,214	0,227	0,238	0,248	0,258	0,265
6.	0,175	0,182	0,199	0,204	0,21	0,216	0,221	0,225	0,23
7.	0,163	0,16	0,162	0,165	0,178	0,179	0,182	0,185	0,2
8.	0,168	0,17	0,173	0,182	0,19	0,195	0,199	0,203	0,22
9.	0,173	0,168	0,17	0,191	0,199	0,205	0,212	0,217	0,221
10.	0,176	0,183	0,197	0,201	0,207	0,211	0,223	0,228	0,231

Tab. 10 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM s enzymem

Roztok glukózy 3mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,16	0,178	21	0,446 (2:06)	0,375	0,335
2.	0,198	0,208	23	0,412 (1:55)	0,398	0,357
3.	0,173	0,183	20	0,396 (1:53)	0,361	0,332
4.	0,201	0,211	23	0,458 (2:03)	0,384	0,341
5.	0,173	0,181	19	0,426 (2:06)	0,367	0,335
6.	0,136	0,14	21	0,385 (2:03)	0,339	0,319
7.	0,187	0,193	20	0,391 (1:55)	0,359	0,349
8.	0,163	0,162	20	0,386 (2:10)	0,374	0,372
9.	0,209	0,216	19	0,403 (1:59)	0,374	0,336
10.	0,173	0,183	20	0,387 (1:55)	0,392	0,385



Graf 4 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymem pro 3mM

Do grafického okna byla vynesena závislost naměřeného napětí na čase. Pro zobrazení byl vybrán, náhodně, průběh tří měřených vzorků pro každou situaci. Z křivek jasně vidíme, že vzorky odměřené pouze s čistým roztokem glukózy vykazují menší hodnoty a lineárnější průběh než vzorky,

kde byl v průběhu měření přidán enzym. Tyto křivky ustáleně stoupají, tento fakt je přiřazován předávání elektrické energie mezi jednotlivými molekulami roztoku. Zaznamenané nerovnosti mohou být způsobeny pohybem elektrod, vniknutím nečistot či vzniku vzduchové bubliny. Ovlivnění může být způsobeno také teplotou roztoku. Křivky patřící odměřeným vzorkům s enzymem se vyznačují strmou částí, zde předpokládáme proces chemické reakce, který je uveden výše, a prudkým zalomením. Toto místo přiřazujeme k saturaci roztoku. Poté hodnoty pomalu klesají, to zapříčiňuje zpomalování chemické reakce. Vrchol průběhu se u každého analyzovaného vzorku vyskytuje na jiném místě. Odchytky nejsou nijak závažné a mohou být způsobeny teplotou roztoku, časem přidání enzymu nebo množstvím a teplotou přidaného enzymu. U tohoto grafu, a všech nadcházejících, se různí časová osa, to je způsobeno probíhajícími reakcemi. Bylo vždy usilováno o konstantní podmínky měření, avšak přesnou teplotu roztoku a enzymu nebylo možné ovlivnit. Ze zkoumání grafu *Graf 4* je jasné, že počáteční napětí má malým rozptyl, což by mělo odpovídat teoretickému předpokladu.

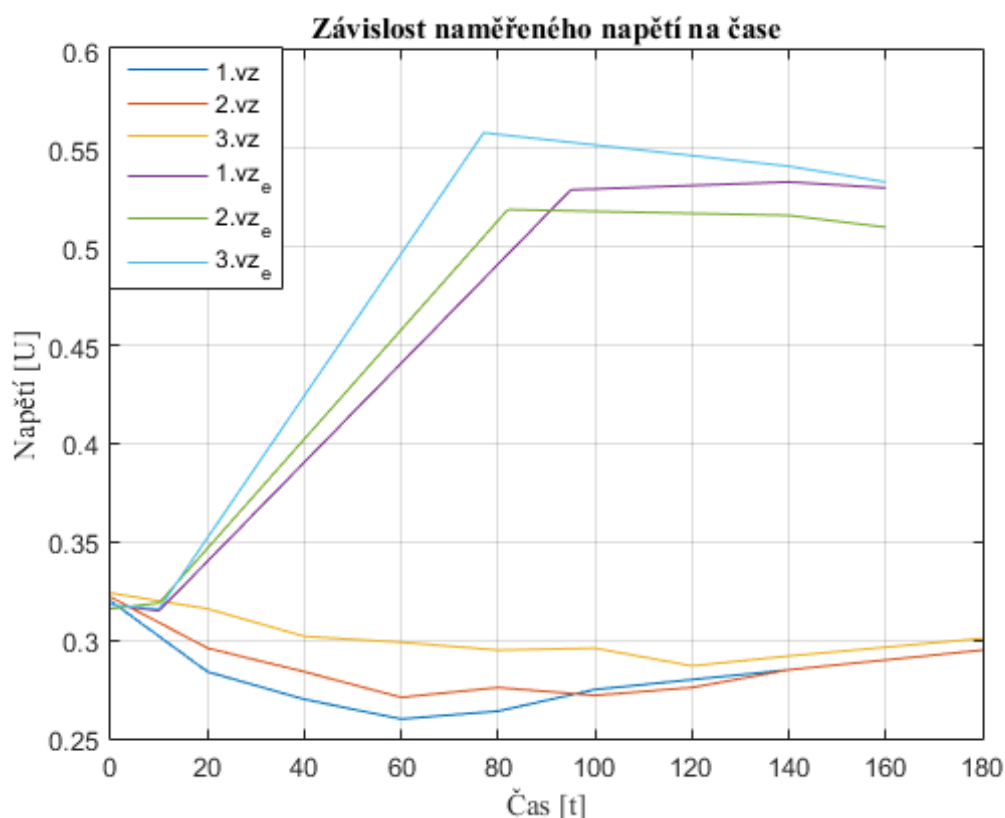
Následující dvě tabulky, *Tab.11* a *Tab 12*, nesou data, která vznikla během měření s roztokem glukózy o koncentraci *7mM*. Poté je opět vyobrazen graf odpovídajících vzorků. Z naměřených hodnot si můžeme povšimnout zajímavého faktu. Signál, snímaný hned po zapojení napětí, nese větší hodnoty nežli údaje odečtené v pozdějších fázích. Tento jev nejsem schopna vysvětlit. Možné zapříčinění může být chemické složení roztoku a ovlivnění měřeného procesu, jelikož u ostatních roztoků se tento jev nevyskytuje. Níže uvedené hodnoty potvrzují údaje z tabulek *Tab. 9* a *Tab 10*. Tedy že vzorky, odměřené s přidáním enzymu, vykazují vyšší napětí. Pokud dojde na srovnání *Tab. 9* a *Tab.11* vidíme zvýšení výsledného napětí u roztoku s vyšší koncentrací, což splňuje předem daný předpoklad. To se ukazuje i při porovnání hodnot z tabulek *Tab. 10* a *Tab. 12*. Uplatňují se zde stejné postupy a chemické reakce jako v předchozí skupině měření.

**Tab. 11 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM**

Roztok glukózy 7mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,316	0,251	0,239	0,238	0,234	0,238	0,238	0,239	0,264
2.	0,307	0,279	0,27	0,268	0,264	0,263	0,265	0,263	0,265
3.	0,32	0,284	0,27	0,26	0,264	0,275	0,28	0,285	0,295
4.	0,245	0,245	0,264	0,255	0,263	0,27	0,268	0,269	0,271
5.	0,31	0,301	0,286	0,275	0,276	0,285	0,292	0,29	0,286
6.	0,32	0,296	0,284	0,271	0,275	0,276	0,279	0,275	0,285
7.	0,322	0,296	0,284	0,271	0,276	0,272	0,276	0,285	0,295
8.	0,253	0,254	0,261	0,265	0,263	0,269	0,274	0,276	0,283
9.	0,324	0,316	0,302	0,299	0,295	0,296	0,287	0,292	0,301
10.	0,318	0,306	0,297	0,289	0,291	0,296	0,293	0,294	0,298

Tab. 12 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM s enzymem

Roztok glukózy 7mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,318	0,315	19s	0,529 (1:35)	0,533	0,53
2.	0,269	0,279	17s	0,576 (1:29)	0,518	0,502
3.	0,241	0,246	16s	0,492 (1:17)	0,478	0,443
4.	0,316	0,319	17s	0,519 (1:22)	0,516	0,51
5.	0,312	0,309	20s	0,536 (1:23)	0,527	0,52
6.	0,322	0,289	19s	0,482 (1:29)	0,496	0,501
7.	0,319	0,309	20s	0,562 (1:21)	0,523	0,536
8.	0,268	0,275	18s	0,521 (1:23)	0,527	0,529
9.	0,318	0,316	19s	0,558 (1:17)	0,541	0,533
10.	0,309	0,299	20s	0,473 (1:26)	0,465	0,472



Graf 5 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymem pro 7mM

V grafu je uvedena závislost naměřené koncentrace napětí na čase. Opět se vykreslují vždy tři náhodné vzorky z každého měření, tedy vzorky čistého roztoku a vzorky s přidáním enzymem. Díky grafickému zobrazení jasně vidíme, že hodnoty naměřené v počátcích měření jsou vyšší oproti

hodnotám získaným během konce měření. Tento jev je patrný jak u vzorků s čistým roztokem, tak u vzorku, kde byl přidán enzym. V předchozím textu je uvedeno, že tato skutečnost mohla vzniknout znehodnocením daného roztoku 7mM. Svým průběhem, kromě prvních 20s, jsou relativně podobné průběhům z grafu *Graf 4*, avšak nesou vyšší hodnoty napětí. Pro křivky, získané měřením čistého roztoku s koncentrací 7mM, platí opět lineárnější průběh, když pomineme počáteční čas měření. U křivek, které náleží vzorkům měřeným s enzymem, se opět nachází zlom v největších hodnotách napětí. Nepřesnosti, které nám křivky vykazují, mohou být opět přisuzovány pohybu elektrody, teplotě použitých látek.

Další dvě tabulky, *Tab.13* a *Tab.14*, zaznamenávají naměřená data získaná měřením s roztokem 12mM. Uvedené hodnoty se, po porovnání s tabulkami *Tab.9*, *Tab.11*, opět vyznačují vyššími hodnotami. Toto zjištění opět podporuje předložený předpoklad, že při vyšších koncentracích by mělo být na výstupu naměřeno větší napětí. Z naměřených hodnot je patrné, že se zde neobjevuje jev, který se objevil u roztoku 7mM. Nedochozí tedy k naměření vyšší hodnoty napětí v počátcích měření. Průběhy měření s tímto roztokem jsou obdobné jako předchozí naměřené hodnoty s jinými roztoky. Vyznačují se pouze vyššími hodnotami. Uplatňují se zde stejné postupy a chemické reakce jako v předchozí skupině měření.

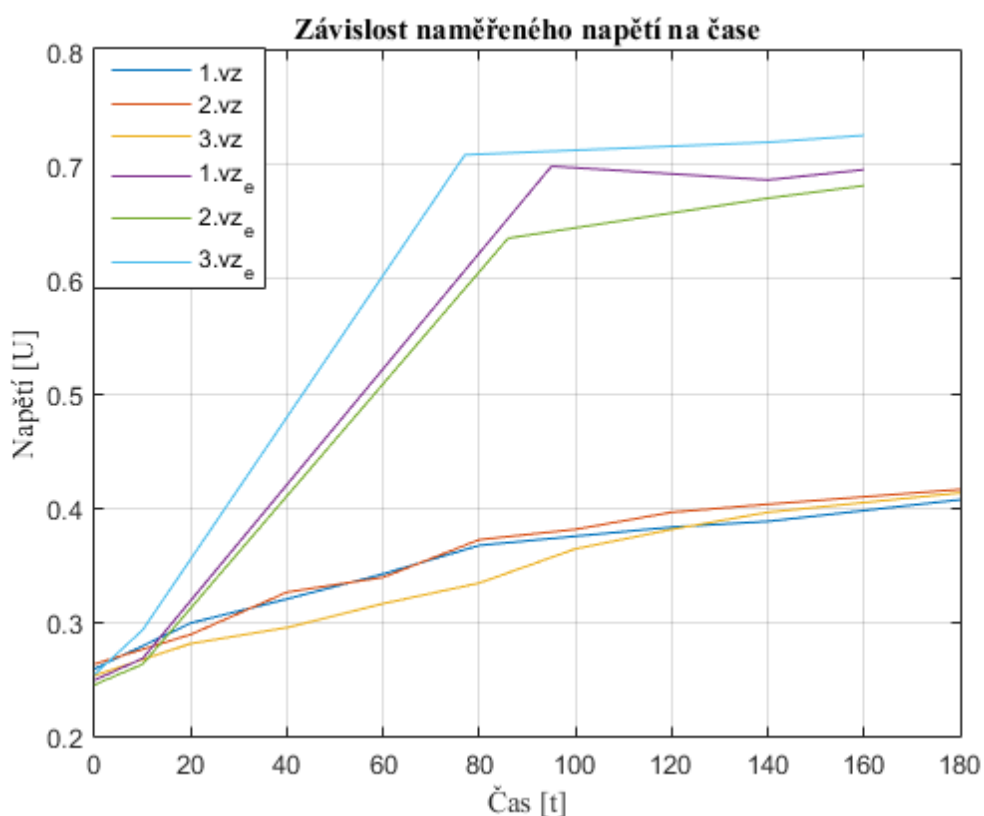
**Tab. 13 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM**

Roztok glukózy 12mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,259	0,299	0,32	0,342	0,367	0,375	0,383	0,388	0,407
2.	0,22	0,233	0,256	0,279	0,305	0,325	0,334	0,342	0,355
3.	0,184	0,22	0,234	0,248	0,263	0,289	0,337	0,34	0,347
4.	0,235	0,26	0,297	0,318	0,34	0,361	0,379	0,392	0,412
5.	0,263	0,289	0,326	0,339	0,372	0,381	0,396	0,403	0,416
6.	0,247	0,286	0,295	0,324	0,358	0,364	0,392	0,399	0,406
7.	0,196	0,228	0,236	0,251	0,28	0,296	0,306	0,328	0,351
8.	0,253	0,281	0,295	0,316	0,334	0,364	0,381	0,396	0,413
9.	0,245	0,274	0,293	0,314	0,339	0,351	0,368	0,382	0,403
10.	0,231	0,239	0,267	0,282	0,296	0,315	0,331	0,348	0,369



Tab. 14 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM s enzymem

Roztok glukózy 12mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,236	0,251	13s	0,604 (1:26)	0,668	0,678
2.	0,261	0,301	15s	0,603 (1:18)	0,651	0,659
3.	0,249	0,268	15s	0,699 (1:25)	0,687	0,696
4.	0,203	0,216	17s	0,576 (1:31)	0,643	0,65
5.	0,262	0,274	14s	0,616 (1:21)	0,662	0,664
6.	0,245	0,263	18s	0,636 (1:26)	0,671	0,682
7.	0,196	0,203	16s	0,589 (1:20)	0,629	0,63
8.	0,254	0,293	17s	0,709 (1:17)	0,72	0,726
9.	0,233	0,246	18s	0,658 (1:19)	0,661	0,668



Graf 6 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymem pro 12mM

Z grafu můžeme opět zcela přesně určit, že hodnoty získané měřením s čistým roztokem jsou evidentně nižší nežli hodnoty u roztoku s enzymem. Graf nám opět vynáší závislost napětí na čase. Projevují se zde stejné změny napětí v oblasti 80s, které jsou projevem všech měřených koncentrací. Je patrné, že vzorky odměřené při dané koncentraci roztoku 12mM nemají tak velký rozptyl. Může to být způsobeno dobrým výběrem vzorků či velice čistým analyzovaným roztokem ve spojení

s dobrými podmínkami. I zde jsou drobné výkyvy přisuzovány pohybu elektrody a teplotě použitých látek, tedy ne zcela konstantními podmínkami.

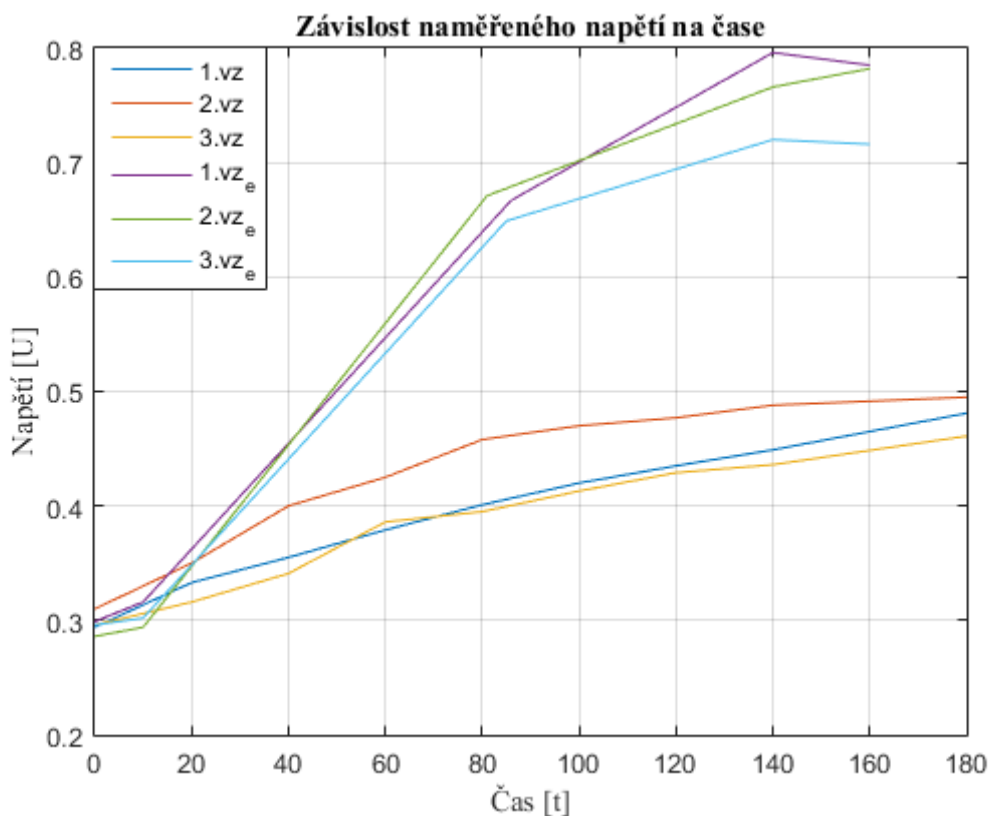
Poslední dvojice tabulek, uvedené v této kapitole, náleží procesu měření s roztokem s koncentrací 18mM. Po srovnání daných hodnot s předchozími tabulkami vyplývá, že tato koncentrace nám poskytuje nejvyšší výstupní napětí. Dále potvrzuje předpoklad, že roztoky s větší koncentrací dokážou vytvořit větší elektrický signál oproti roztokou s nižší koncentrací. I zde se uplatňují stejné postupy a chemické reakce, jako v předchozích skupinách měření.

**Tab. 15 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM**

Roztok glukózy 18mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,294	0,333	0,355	0,379	0,401	0,42	0,435	0,449	0,481
2.	0,31	0,35	0,4	0,425	0,458	0,47	0,477	0,488	0,495
3.	0,314	0,321	0,348	0,378	0,391	0,404	0,418	0,43	0,453
4.	0,24	0,25	0,255	0,263	0,271	0,293	0,305	0,321	0,353
5.	0,279	0,267	0,28	0,312	0,328	0,354	0,393	0,408	0,423
6.	0,286	0,295	0,308	0,324	0,33	0,357	0,361	0,399	0,419
7.	0,325	0,35	0,369	0,394	0,412	0,429	0,452	0,473	0,486
8.	0,296	0,316	0,341	0,386	0,395	0,413	0,429	0,436	0,461
9.	0,265	0,256	0,286	0,301	0,329	0,364	0,386	0,406	0,429
10.	0,348	0,358	0,379	0,411	0,429	0,438	0,451	0,487	0,499

**Tab. 16 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM s enzymem**

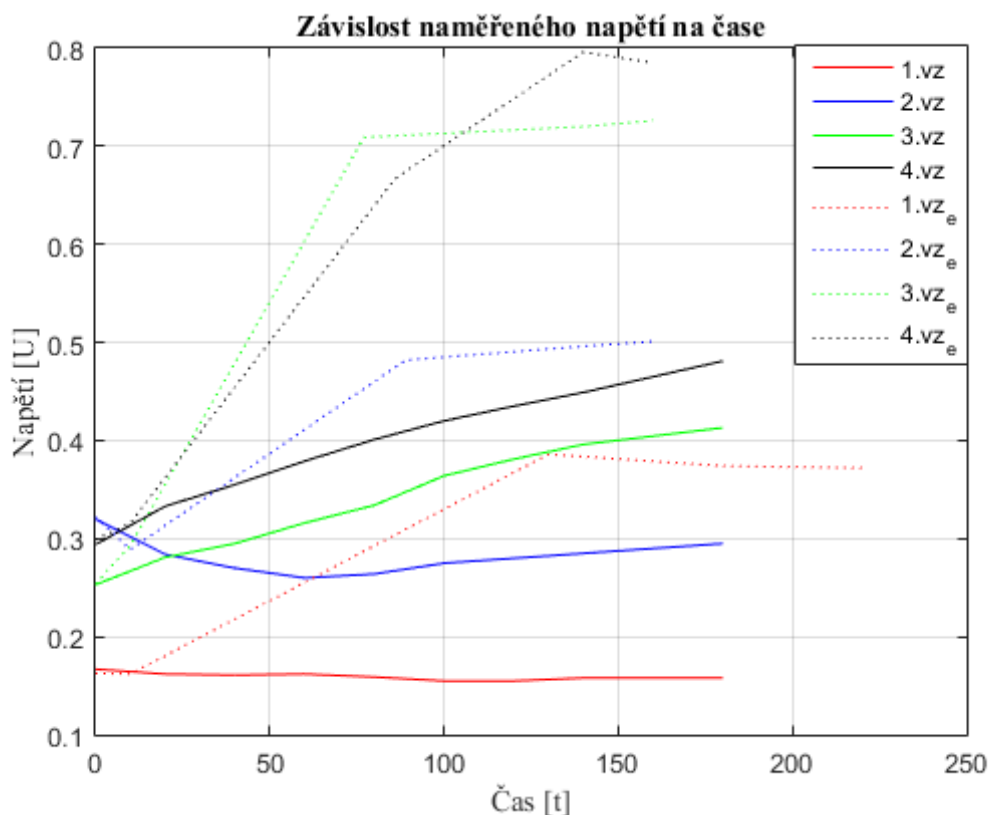
Roztok glukózy 18mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,299	0,316	13s	0,667 (1:26)	0,796	0,785
2.	0,319	0,325	12s	0,762 (1:24)	0,779	0,768
3.	0,342	0,351	15s	0,739 (1:20)	0,798	0,752
4.	0,286	0,294	14s	0,671 (1:21)	0,766	0,782
5.	0,296	0,302	13s	0,649 (1:25)	0,72	0,716
6.	0,326	0,333	16s	0,662 (1:20)	0,719	0,726
7.	0,281	0,299	17s	0,693 (1:25)	0,716	0,724
8.	0,273	0,286	15s	0,756 (1:23)	0,773	0,776
9.	0,329	0,334	17s	0,796 (1:20)	0,801	0,813
10.	0,269	0,306	18s	0,752 (1:19)	0,777	0,776



**Graf 7 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 18mM**

Uvedená závislost napětí na čase jen potvrzuje tvrzení, že hodnoty získané měřením na analyzovaném čistém roztoku glukózy vykazují nižší napětí. Z grafického znázornění můžeme usoudit, že všechny uvedené grafy *Graf 4*, *Graf 5*, *Graf 6* se shodují s posledním poskytnutým grafem *Graf 7*. Proto se i zde dají aplikovat výše uvedené závěry. Kromě faktu, který se objevoval při měření s roztokem o koncentraci 7 mM, nedocházelo tedy k poklesu měřeného napětí.

### 7.1.1 Porovnání naměřených dat pomocí elektrody\_1



Graf 8 Grafické znázornění naměřených hodnot pomocí elektrody\_1

Z grafu *Graf 8* je patrné, že hodnota měřeného napětí, která byla snímána v určitých časových intervalech, stoupá dle zvyšující se koncentrace roztoku, který byl v danou chvíli analyzován. Náhodně byl vybrán, z každého cyklu měření, jeden vzorek. Plné čáry odpovídají čistým roztokům glukózy, tedy bez přidaného enzymu. Tečkované čáry vykreslují vzorky s přidaným enzymem. Pro každou koncentraci roztoku, ať už čistého roztoku či s přidaným enzymem, je zvolena jedna barva. Měření s enzymem a bez enzymu je odlišeno pouze typem čáry. Modré křivky zaznamenávají průběh odpovídající analýze roztoku  $3\text{mM}$ . V obou případech se jedná o nejnižší uvedené hodnoty. Potvrzuje se tedy předpoklad, že by vzorky s roztokem glukózy o koncentraci  $3\text{mM}$  měly vykazovat nejnižší napětí. Červené čáry se řadí ke vzorkům s koncentrací  $7\text{mM}$ . Tyto křivky vynášejí vyšší napětí nežli modré, opět je tedy potvrzený daný předpoklad. Zelená patří křivkám vykreslující měřené napětí z roztoku  $12\text{mM}$ . Opět se jedná o vyšší hodnoty napětí nežli v předchozích situacích. Křivky černé barvy zaznamenávají vzorky měřené s koncentrací  $18\text{mM}$ . Tyto hodnoty jsou viditelně nejvyšší.

Vzorky, které vznikly měřením čistého roztoku glukózy, vykazují rovnější charakter křivky oproti křivkám nesoucí záznam vývoje napětí u vzorku s přidaným enzymem. Tato skutečnost je vysvětlena v předchozí kapitole a je přiřazována uvedeným chemickým reakcím. Křivky odpovídající měření s čistým roztokem glukózy se pohybují v nižších hodnotách napětí. Téměř všechny vzorky měřené s enzymem udávají vyšší hodnotu. Pouze vzorky s enzymem a použitím

roztoku glukózy koncentrací 3 mM uvádí nižší napětí v porovnání se vzorky s čistým roztokem glukózy s koncentrací 12 mM a 18 mM. Tento fakt je ovlivněn počtem molekul glukózy v daném roztoku, neboť po přidání enzymu vzorek s nižším obsahem molekul glukózy, tedy nižší koncentrací, neposkytuje velké množství reakčních látek.

Vykreslením grafu *Graf 8* jsme se utvrdili v daném předpokladu, že hodnota výstupního napětí se bude odvíjet od koncentrace použitého roztoku. A to tak, že se zvyšující se koncentrací bude výstupní napětí stoupat. Dále jsme potvrdili myšlenku, že vzorky, které vznikly měřením s enzymem, budou vykazovat vyšší měřené napětí než vzorky s daným čistým roztokem glukózy.

## 7.2 Zjišťování koncentrace glukózy pomocí elektrody\_2

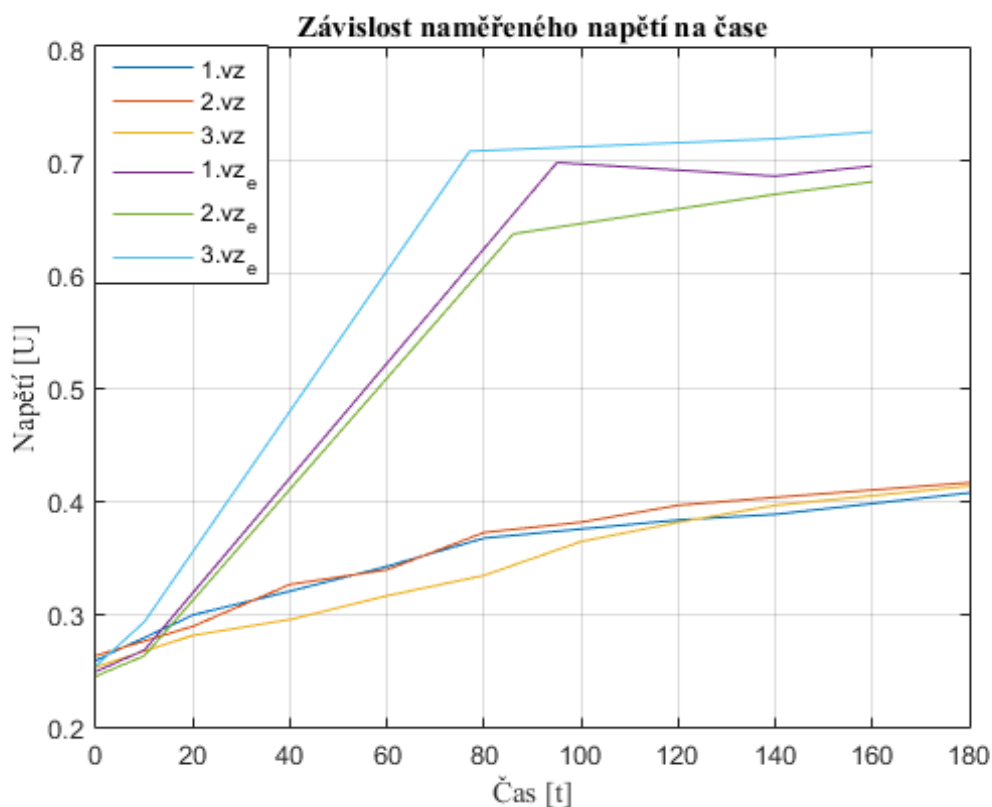
Měření probíhalo dle stejného scénáře jako předchozí skupina měření s elektrodou\_1. Očekávaly se nižší hodnoty napětí kvůli odlišné konstrukci elektrodového systému, mezi které patří zejména větší vzdálenosti elektrod a menší průřez. Tento předpoklad se během měření potvrdil. Z naměřených hodnot je však patrné, že, i přes vykazované nižší měřené hodnoty napětí, elektroda\_2 zaznamenává vzniklý elektrický signál lépe. Přesněji se dá říci, že hodnotu napětí zaznamenává s menším rozptylem. Tato skutečnost bude dále řešena v kapitole Statistická analýza. V následujících tabulkách jsou tedy zaznamenány naměřené hodnoty napětí tak, jak v předešlé kapitole.

Tab. 17 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM (2)

Roztok glukózy 3mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,126	0,131	0,136	0,141	0,15	0,157	0,176	0,179	0,183
2.	0,113	0,11	0,118	0,127	0,145	0,149	0,162	0,164	0,173
3.	0,157	0,161	0,165	0,171	0,177	0,188	0,196	0,2	0,215
4.	0,121	0,126	0,132	0,144	0,149	0,158	0,173	0,186	0,194
5.	0,118	0,117	0,12	0,136	0,137	0,143	0,158	0,171	0,184
6.	0,123	0,118	0,139	0,141	0,149	0,155	0,161	0,175	0,184
7.	0,146	0,152	0,157	0,176	0,182	0,184	0,193	0,203	0,22
8.	0,119	0,132	0,134	0,143	0,154	0,157	0,166	0,183	0,191
9.	0,163	0,152	0,153	0,164	0,169	0,183	0,198	0,208	0,217
10.	0,11	0,123	0,126	0,133	0,157	0,162	0,177	0,186	0,193

Tab. 18 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 3mM s enzymem (2)

Roztok glukózy 3mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,16	0,178	21s	0,446 (2:06)	0,375	0,335
2.	0,198	0,208	23s	0,412 (1:55)	0,398	0,357
3.	0,173	0,183	20s	0,396 (1:53)	0,361	0,332
4.	0,201	0,211	23s	0,458 (2:03)	0,384	0,341
5.	0,173	0,181	19s	0,426 (2:06)	0,367	0,335
6.	0,136	0,14	21s	0,385 (2:03)	0,339	0,319
7.	0,187	0,193	20s	0,391 (1:55)	0,359	0,349
8.	0,163	0,162	20s	0,386 (2:10)	0,374	0,372
9.	0,209	0,216	19s	0,403 (1:59)	0,374	0,336
10.	0,173	0,183	20s	0,387 (1:55)	0,392	0,385



Graf 9 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymem pro 3mM (2)

Z hodnot uvedených v tabulkách Tab. 17 a Tab. 18 a z přiloženého grafu Graf 9, které zaznamenávají vzorky měřené s koncentrací roztoku glukózy 3mM, je patrné, že získané hodnoty měřeného napětí se pohybují v užším rozsahu než hodnoty získané měřením pomocí elektrody\_1. Ale daná hodnota napětí je nižší. Vynáší se závislost napětí na čase. Průběh křivek je však zachován,

to svědčí o stejných postupech a chemických reakcích jako v předešlých situacích. I zde se vyskytují stejní činitelé v zanášení chyb.

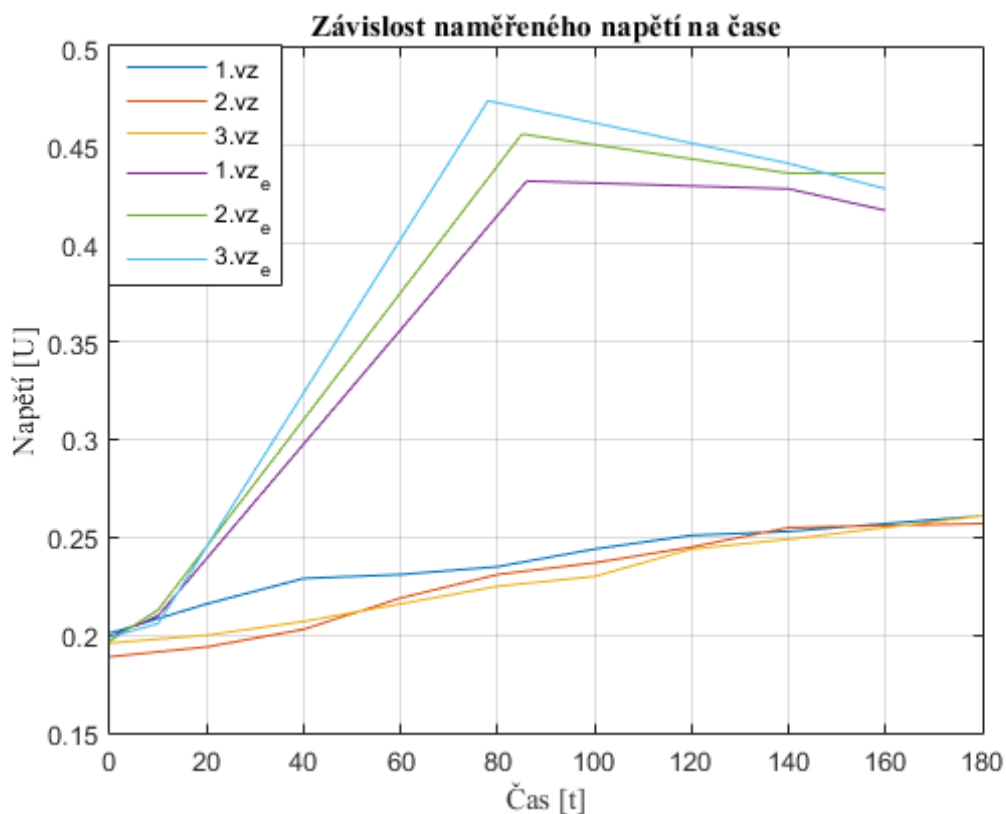
Následující dvě tabulky zaznamenávají data, vzniklá analýzou roztoku s koncentrací 7 mM.

Tab. 19 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM (2)

Roztok glukózy 7mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,201	0,216	0,229	0,231	0,235	0,244	0,251	0,253	0,261
2.	0,217	0,222	0,236	0,242	0,248	0,255	0,259	0,267	0,268
3.	0,189	0,194	0,203	0,219	0,231	0,237	0,245	0,255	0,257
4.	0,211	0,215	0,224	0,234	0,24	0,246	0,252	0,257	0,26
5.	0,196	0,2	0,207	0,216	0,225	0,23	0,244	0,249	0,261
6.	0,222	0,239	0,255	0,264	0,271	0,276	0,286	0,293	0,296
7.	0,206	0,215	0,226	0,236	0,24	0,251	0,255	0,263	0,266
8.	0,2	0,207	0,215	0,231	0,233	0,245	0,248	0,251	0,255
9.	0,205	0,221	0,229	0,236	0,241	0,247	0,25	0,256	0,263
10.	0,216	0,231	0,233	0,241	0,253	0,258	0,262	0,266	0,27

Tab. 20 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 7mM s enzymem (2)

Roztok glukózy 7mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,215	0,22	18s	0,44 (1:30)	0,46	0,455
2.	0,213	0,216	17s	0,462 (1:22)	0,451	0,449
3.	0,199	0,21	19s	0,432 (1:26)	0,428	0,417
4.	0,202	0,217	20s	0,450 (1:22)	0,442	0,433
5.	0,206	0,222	17s	0,444 (1:29)	0,435	0,429
6.	0,197	0,213	19s	0,456 (1:25)	0,436	0,436
7.	0,21	0,219	19s	0,420(1:21)	0,417	0,409
8.	0,208	0,231	20s	0,451 (1:29)	0,438	0,433
9.	0,199	0,206	18s	0,473 (1:18)	0,441	0,428
10.	0,205	0,212	19s	0,440 (1:24)	0,429	0,416



**Graf 10 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 7mM (2)**

I v tomto případě se postupovalo ve stejném duchu jako v předchozích cyklech měření. Z příložených tabulek *Tab. 19*, *Tab. 20* a grafu *Graf 10* můžeme vyčíst, že se jednalo o velice přesné měření. To může být způsobeno dodržением stálých podmínek při měření, čistotou roztoku a přesným dávkováním. Nebo se jen potvrzuje, že elektroda<sub>2</sub> vykazuje přesnější měření. I zde je vynesena závislost měřeného napětí na čase. Pokud porovnáme daný graf s grafem *Graf 5*, který zaznamenává data naměřená za stejných podmínek se stejnou koncentrací s použitím elektrody<sub>1</sub>, všimneme si, že se zde nevyskytuje jev poklesu napětí. V této fázi práce nejsem schopna tuto skutečnost analyzovat a posoudit. Může se jednat o čistotu vzoru či teploty daných složek. Tento cyklus měření vyšel, ze všech uvedených měření, nejpřesněji, tedy s nejmenším rozptylem hodnot. Měření nejspíše nebylo ovlivněno znečištěním roztoku.



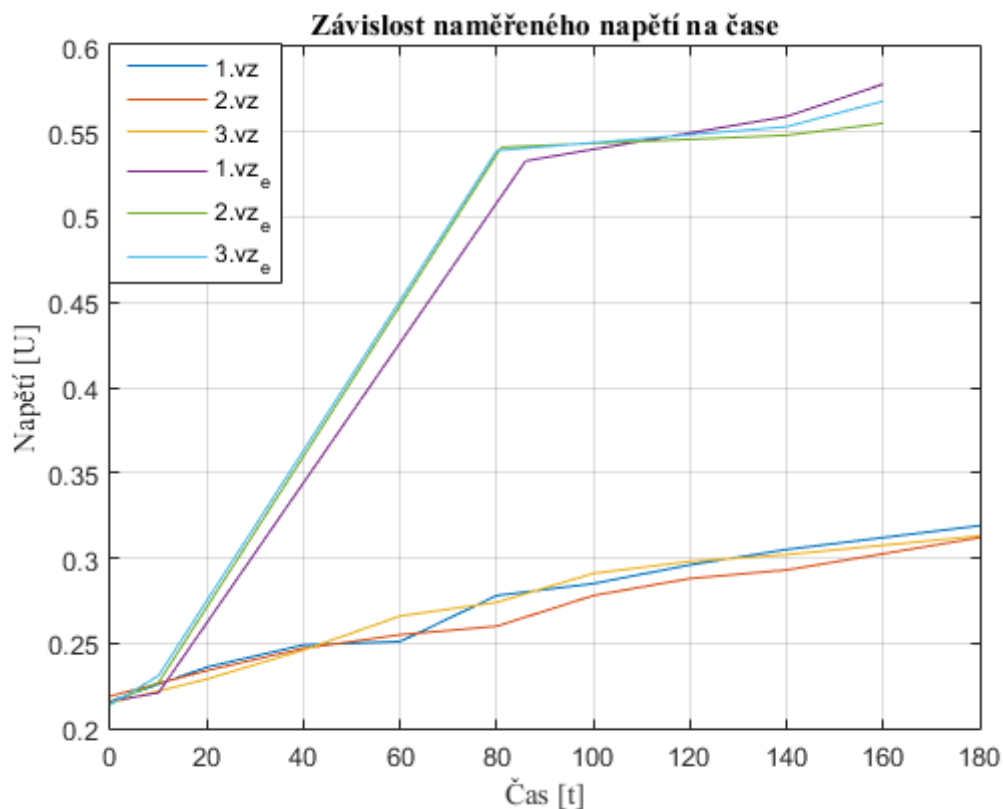
Tabulky uvedené níže zachycují získaná data, která vznikla měřením s roztokem o koncentraci 12 mM. Celý postup měření i zaznamenávání měřených hodnot koresponduje s výše uvedenými postupy. Naměřená data se vyznačují vyššími hodnotami, nežli jsou uvedené v tabulkách *Tab. 17*, *Tab. 18*, *Tab. 19*, *Tab. 20*. To opět utvrzuje předem vyslovený názor, který byl potvrzen již předchozí sadou měření.

**Tab. 21** *Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM (2)*

Roztok glukózy 12mM (vzorky)	Poč. hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,222	0,245	0,26	0,277	0,281	0,296	0,301	0,316	0,32
2.	0,216	0,236	0,249	0,251	0,278	0,285	0,296	0,305	0,319
3.	0,2	0,209	0,214	0,229	0,241	0,248	0,263	0,272	0,28
4.	0,219	0,234	0,247	0,255	0,26	0,278	0,288	0,293	0,312
5.	0,196	0,226	0,241	0,256	0,267	0,286	0,299	0,306	0,321
6.	0,213	0,229	0,246	0,253	0,271	0,279	0,293	0,299	0,214
7.	0,221	0,236	0,252	0,262	0,277	0,281	0,294	0,304	0,318
8.	0,213	0,231	0,256	0,259	0,274	0,282	0,291	0,305	0,314
9.	0,215	0,229	0,246	0,266	0,274	0,291	0,298	0,302	0,313
10.	0,221	0,233	0,239	0,258	0,261	0,272	0,292	0,302	0,317

**Tab. 22** *Tabulka naměřených hodnot pro roztok 12mM s enzymem (2)*

Roztok glukózy 12mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,216	0,221	17s	0,533 (1:26)	0,559	0,578
2.	0,2	0,21	16s	0,546 (1:22)	0,579	0,583
3.	0,22	0,231	16s	0,529 (1:16)	0,56	0,569
4.	0,215	0,227	17s	0,541 (1:21)	0,548	0,555
5.	0,211	0,226	15s	0,548 (1:28)	0,562	0,564
6.	0,219	0,23	19s	0,531 (1:25)	0,547	0,559
7.	0,212	0,236	19s	0,580 (1:20)	0,6	0,607
8.	0,221	0,234	16s	0,547(1:16)	0,563	0,57
9.	0,219	0,229	19s	0,542 (1:23)	0,56	0,566
10.	0,214	0,231	18s	0,539 (1:20)	0,553	0,568



**Graf 11 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 12mM (2)**

Z grafu opět vidíme, že naměřená data jsou vynesena v závislosti na čase. Uvedené hodnoty se nachází v užším rozsahu hodnot, nežli je obvyklé z předchozího cyklu měření s elektrodou\_1. Pokud však hodnoty porovnáme s hodnotami uvedenými v grafu *Graf 5* zjistíme, že uvedené hodnoty jsou v obou případech relativně přesné. Mohlo dojít k výběru přesných dat nebo se roztok 12 mM vyznačoval velkou čistotou, proto jsou naměřené hodnoty ve velice úzkém rozsahu. Dále se zde objevuje zvláštní jev, jedná se o stoupající konečné napětí.

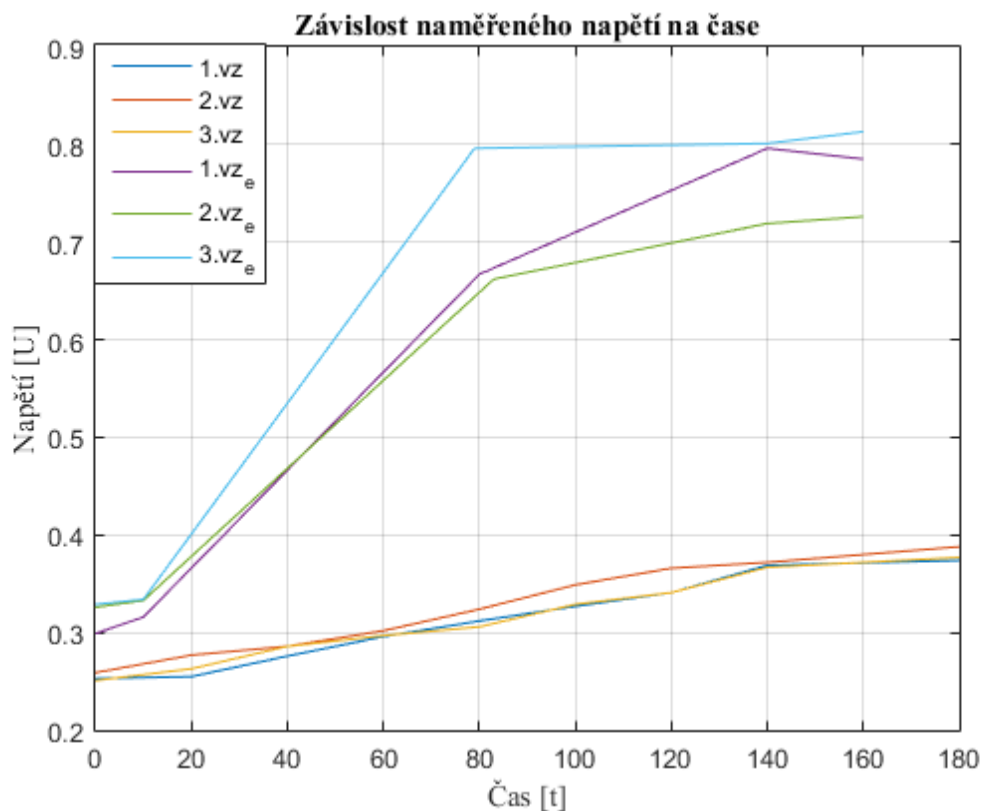
Poslední dvě tabulky udávají hodnoty naměřené na roztoku s koncentrací 18 mM. Z analýzy tabulek vyplývá, že se jedná o nejvyšší hodnoty napětí měřené pomocí elektrody<sub>2</sub>. Tento fakt opět stvrzuje daný předpoklad. Jedná se o poslední sadu měření. V dalších kapitolách se budou uvádět analýzy naměřených dat a uvedeny závěry.

Tab. 23 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM (2)

Roztok glukózy 18mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	20s/ [V]	40s/ [V]	60s/ [V]	80s/ [V]	100s/ [V]	120s/ [V]	140s/ [V]	3min/ [V]
1.	0,26	0,274	0,294	0,316	0,333	0,352	0,365	0,382	0,4
2.	0,253	0,255	0,276	0,296	0,312	0,327	0,341	0,369	0,374
3.	0,24	0,249	0,257	0,268	0,27	0,288	0,293	0,304	0,316
4.	0,259	0,277	0,286	0,302	0,324	0,349	0,366	0,372	0,388
5.	0,271	0,283	0,299	0,304	0,32	0,341	0,363	0,378	0,396
6.	0,243	0,261	0,263	0,269	0,271	0,275	0,286	0,299	0,301
7.	0,266	0,276	0,281	0,299	0,309	0,321	0,342	0,361	0,385
8.	0,251	0,263	0,286	0,297	0,306	0,329	0,341	0,367	0,677
9.	0,265	0,269	0,284	0,3	0,315	0,326	0,347	0,366	0,391
10.	0,246	0,271	0,293	0,31	0,322	0,337	0,358	0,372	0,383

Tab. 24 Tabulka naměřených hodnot pro roztok 18mM s enzymem (2)

Roztok glukózy 18mM (vzorky)	Počáteční hodnota [V]	Přidání enzymu 10s/ [V]	Prudká změna napětí [s]	Změna napětí [V] [min]	2:20 min/ [V]	2:40 min/ [V]
1.	0,259	0,268	15s	0,601 (1:20)	0,623	0,62
2.	0,266	0,271	18s	0,618 (1:27)	0,631	0,629
3.	0,242	0,255	15s	0,614 (1:17)	0,639	0,31
4.	0,247	0,269	14s	0,581 (1:21)	0,622	0,618
5.	0,255	0,257	16s	0,608 (1:24)	0,635	0,626
6.	0,253	0,268	13s	0,621 (1:23)	0,649	0,64
7.	0,242	0,256	15s	0,593 (1:22)	0,658	0,654
8.	0,268	0,273	17s	0,617 (1:23)	0,641	0,626
9.	0,258	0,267	17s	0,615 (1:19)	0,637	0,614
10.	0,269	0,281	18s	0,611 (1:21)	0,636	0,62

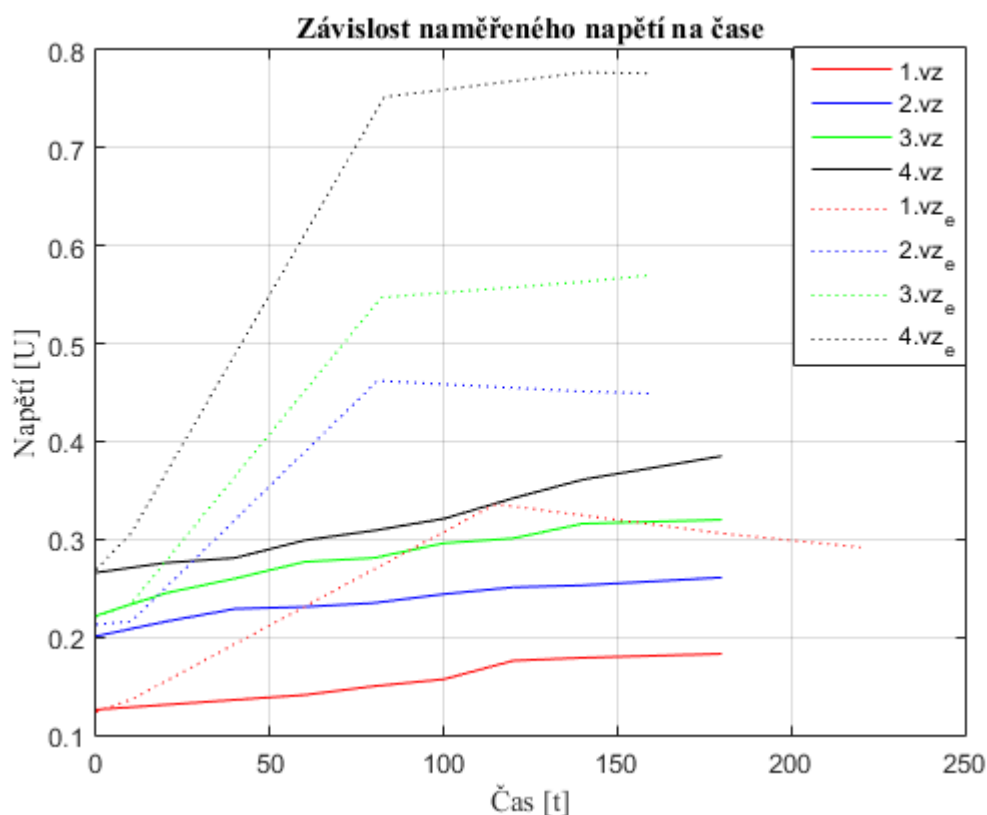


**Graf 12 Graf zaznamenávající porovnání naměřených hodnot čistého roztoku a roztoku s enzymu pro 18mM (2)**

Pro tento graf platí stejná pravidla, jaká jsou uvedena výše. Vyobrazené křivky mají o něco lineárnější průběh nežli křivky vyneseny v ostatních grafech. Možným důvodem je čistota roztoku, kvalitní a přesné podmínky měření či spolehlivost elektrody<sub>2</sub>. Čistota roztoku se zdá být nejlepším vysvětlením, neboť pokud vezmeme v úvahu průběhy v grafu *Graf 5*, vyznačují se oba grafy relativní známkou linearity. I v tomto případě můžeme jen konstatovat, že byl potvrzen předpoklad. Tedy že hodnoty získané měřením a analýzou vzorků roztoku o koncentraci 18 mM vykazují vyšší hodnoty napětí nežli měření se vzorky s koncentrací 3 mM, 7 mM a 12 mM. Dále můžeme s jistotou potvrdit předpoklad, že naměřená data se vzorků s enzymem jsou vyššího charakteru.

Následující podkapitola shrnuje všechna naměřená data pomocí elektrody<sub>2</sub>. Uvádí jejich zhodnocení a potvrzení či vyvrácení daných předpokladů.

## 7.2.1 Porovnání naměřených dat pomocí elektrody\_2



Graf 13 Grafické znázornění naměřených hodnot pomocí elektrody\_2

Graf *Graf 13* vykresluje opět jeden náhodně vybraný vzorek z každé části měření. Jsou tedy vyobrazeny průběhy osmi vzorků. Platí zde stejná pravidla jako u grafu *Graf 8*. Plné čáry odpovídají čistým roztokům glukózy. Tečkované čáry vykreslují vzorky s přidaným enzymem. Barva se shoduje u konkrétní použité koncentrace. Modré křivky zaznamenávají průběh odpovídající analýze roztoku  $3\text{mM}$ , červené čáry se řadí ke vzorkům s koncentrací  $7\text{mM}$ , zelená patří křivkám vykreslující měřené napětí z roztoku  $12\text{mM}$  a černé křivky zaznamenávají vzorky měřené s koncentrací  $18\text{mM}$

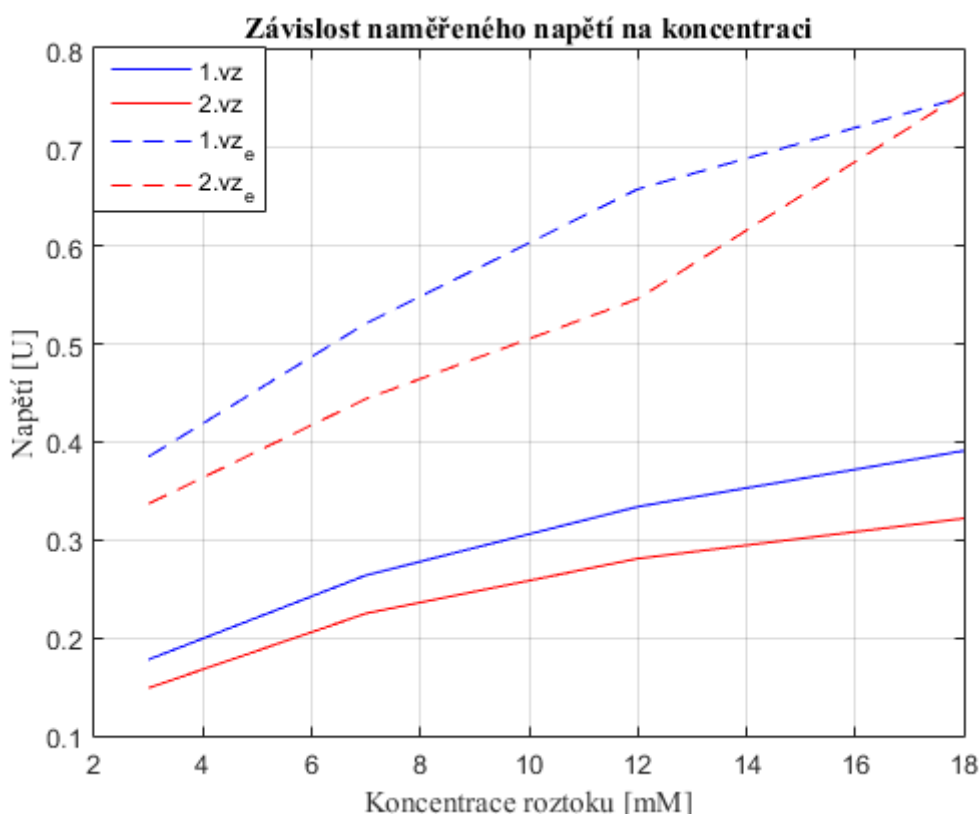
Z grafu *Graf 13* je patrné, že hodnotu měřeného napětí ovlivňuje hodnota koncentrace roztoku glukózy. Vyskytuje se zde jasný vzorek, který udává, že čím větší koncentraci roztoku použijeme, tím vyšší napětí dokážeme na výstupu obvodu naměřit. Dále se potvrzuje, že vzorky u nichž byl použit enzym, vykazují vyšší hodnoty napětí, i tento předpoklad odpovídá. Jak si můžeme z vyobrazených průběhů povšimnout, tečkované křivky zaznamenávají vyšší hodnoty napětí než jejich odpovídající plné čáry. I v tomto případě je křivka vynášející hodnoty vzniklé měřením roztoku  $3\text{mM}$  s přidaným enzymem nižší nežli vzorek vzniklý měřením čistého roztoku s koncentrací  $18\text{mM}$ . Tento jev byl vysvětlen u grafu *Graf 8*, kdy záleží na množství molekul v roztoku a tedy na síle vzniklé chemické reakce.

Vykreslením grafu *Graf 13* jsme opět dokázali pravdivost daných předpokladů a myšlenek. I během druhého kola měření s elektrodou\_2 se potvrdilo, že hodnota výstupního napětí se odvíjí

od koncentrace použitého roztoku. Dále jsme dokázali fakt, že vzorky, které vznikly měřením s enzymem, budou vykazovat vyšší měřené napětí než vzorky s daným čistým roztokem glukózy. Všechny tyto závěry odpovídají závěrům uvedeným u kapitoly s elektrodou\_1.

V následující kapitole uvedu doplňující závislost, která byla potvrzena sadou měření. Jedná se o závislost měřeného napětí na koncentraci použitého roztoku.

### 7.3 Doplňující závislost



Graf 14 Závislost naměřených dat na použité koncentraci roztoku

V grafu *Graf 14* je vynesena závislost naměřeného napětí v určitý čas na použité koncentraci roztoku glukózy. Daným předpokladem, který byl uveden na počátku návrhu, je, že pokud budeme zvyšovat koncentraci roztoku, bude se zvyšovat výstupní napětí.

V grafu je vyobrazen průběh čtyř křivek, modrá barva je přiřazena hodnotám, které vznikly měřením elektrodou\_1, a červená patří elektrodě\_2. Plné čáry odpovídají čistému roztoku a čárkované měřením s enzymem. Pro každý možný případ bylo odměřeno deset vzorků, z těchto deseti vzorků byla náhodně vybrána v určitém čase jedna hodnota. Vybrala se tedy jedna hodnota z měřené každé koncentrace jak čistého roztoku, tak roztoku s enzymem. Hodnoty, které se v grafu uplatňují, byly porovnány ve stejný časový okamžik. Došlo k seřazení těchto hodnot na základě koncentrace, z které byly získány. Seřazení probíhalo vzestupně podle koncentrace, tedy 3 mM, 7 mM, 12 mM a 18 mM.

Výsledná křivka nám určuje, zda je předpoklad správný nebo nikoliv. Z grafu jasně vidíme, že předpoklad je potvrzen. Měřené napětí se zvedá, pokud roste i koncentrace použitého roztoku. Z vynesných průběhů můžeme potvrdit, že elektroda\_2 zaznamenávala nižší hodnoty napětí než elektroda\_1. Tato skutečnost je ovlivněna konstrukcí jednotlivých elektrodových systému. Další grafy související s vykreslením daných hodnot jsou zaznamenány v přílohách.

## 7.4 Statistická analýza

Základem pro statistickou analýzu je soubor dostatečného množství dat. Tyto soubory se nejprve musí vhodným způsobem zpracovat tak, aby bylo možné s těmito daty dále pracovat a podrobit je statistickým zkouškám. Nabízí se velké množství způsobů, jak naměřená data zhodnotit. V práci jsou využity postupy, kterým jsme se naučili v rámci studia.

Prvním krokem celé statistické analýzy je odstranění odlehlých pozorování, ta byla identifikována pomocí interkvartilového rozpětí metodou vnitřních hradeb. Hodnoty, které do hradeb nezapadají, jsou z datového souboru odstraněny. Takto upravený soubor může být dále analyzován.

V našem případě se jedná o dvou výběrová data. Musí se na ně tedy aplikovat konkrétní dvouvýběrové testy statistické analýzy. Těmi jsou parametrické testy shody středních hodnot Studentův t-test, kde musí být splněn předpoklad normality a homoskedasticity, Aspinové Welchův test, zde musí být splněna pouze normalita, a neparametrický Mannův-Whitneyův test shody mediánů, ten se na data aplikuje v případě nesplnění normality. Normalitu zjišťujeme exaktně pomocí Shapiro Willkova testu na základě nulové hypotézy, kdy se určuje, zda data pocházejí z normálního rozdělení. Pro ověření homoskedasticity použijeme F-test.

V následujících kapitolách jsou uvedeny statistické analýzy, které mají dokázat či vyvrátit, že elektrodovým systémem\_2 jsme získali nižší hodnoty napětí nežli elektrodovým systémem\_1. Jsou provedeny dvě analýzy, které jsou rozděleny z hlediska použití enzymu.

### 7.4.1 Analýza dat získaných měřením čistého roztoku glukózy

Před samostatnou statistickou analýzou se data podrobila zkoumání na odlehlá pozorování pomocí krabicových grafů a případná naleznutá odlehlá pozorování byla odstraněna.

Tab. 25 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda\_1

<i>Elektroda_1</i>				
<b>Datový soubor</b>	<i>3 mM</i>	<i>7 mM</i>	<i>12 mM</i>	<i>17 mM</i>
<b>Původní počet</b>	10	10	10	10
<b>Odl. pozorování</b>	0	1	0	0
<b>Ustálený počet</b>	10	9	10	10

Tab. 26 Přehled odlehlých pozorování – Elektroda\_2

<i>Elektroda_2</i>				
<b>Datový soubor</b>	3 mM	7 mM	12 mM	17 mM
<b>Původní počet</b>	10	10	10	10
<b>Odl. pozorování</b>	0	1	1	2
<b>Ustálený počet</b>	10	9	9	8

Po zjištění a odstranění odlehlých pozorování jsme získali nové soubory s daty, které se musí dále podrobit testům na ověření normality a homoskedasticity. Toto testování se provádí za účelem zvolení správného konečného testu. Nejprve se data podrobí testu na normalitu a poté se podrobují testování na homoskedasticitu.

Normalita se testuje pomocí Shapiro Willkova testu na základě výsledné p-hodnoty, která nám určí, zda můžeme zamítnout či nezamítnout nulovou hypotézu. Ta nám říká, zda  $\mu_1$  a  $\mu_2$  pochází z normálního rozdělení. Dále se uvádí alternativní hypotéza, která neguje nulovou hypotézu.

Tab. 27 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu\_1

<i>Elektroda_1</i>				
<b>Datový výběr</b>	3 mM	7 mM	12 mM	17 mM
<b>p-hodnota</b>	0,4484 > 0,05	0,2046 > 0,05	0,1962 > 0,05	0,7285 > 0,05

Tab. 28 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu\_2

<i>Elektroda_2</i>				
<b>Datový výběr</b>	3 mM	7 mM	12 mM	17 mM
<b>p-hodnota</b>	0,1038 > 0,05	0,8312 > 0,05	0,9725 > 0,05	0,5046 > 0,05

*Nulová hypotéza:*  $\mu_1$  a  $\mu_2$  pochází z normálního rozdělení

*Alternativní hypotéza:* negace nulové hypotézy

*p-hodnoty:* všechny p-hodnoty jsou > 0,05. Na základě tohoto zjištění nezamítáme nulovou hypotézu a na data můžeme aplikovat parametrický dvouvýběrové test.

V této chvíli se může přejít k testování homoskedasticity, která nám přesněji řekne, který z testu lze na data uplatnit. Opět se zde zavádí nulová a alternativní hypotéza, o kterých se rozhoduje na základě p-hodnoty.



Tab. 29 F-test pro určení homoskedasticity

<i>Datový výběr vytvořen hodnotami získaných z elektrody_1 i elektrody_2</i>				
Datový výběr	3 mM	7 mM	12 mM	17 mM
p-hodnota	0,0971 > 0,05	0,3897 > 0,05	0,0002 < 0,05	0,0002 < 0,05

Nulová hypotéza:  $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 \dots \sigma_1^2/\sigma_2^2 = 1$

Alternativní hypotéza:  $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \dots \sigma_1^2/\sigma_2^2 \neq 1$

p-hodnoty: p-hodnoty < 0,05. Zde se řídíme souborem všech hodnot. Stačí tedy, aby jedna z hodnot vyšla menší než přesně daná p-hodnota a zamítáme nulovou hypotézu. V tomto případě tedy homoskedasticita nebyla ověřena. Na základě toho nemůže být na daná data použit Studentův t-test. Analyzované data tedy podrobíme Aspinové-Welchově testu.

Výše uvedeným procesem jsme tedy vybrali test, kterým budeme analyzovat naměřená data. A na základě výsledků budeme moci vyslovit závěr, který jsme experimentálně určili. Jak bylo řečeno, byl vybrán parametrický dvouvýběrový Aspinové-Welchův test. V následující tabulce jsou uvedeny střední hodnoty pro každý výběr jak elektrody\_1, tak elektrody\_2. Výsledná p-hodnota se určuje pro celek a potvrzuje, zda hodnoty odpovídají nulové hypotéze  $\mu_1 = \mu_2$ . Potvrzení tohoto faktu znamená, že náš závěr z experimentálního měření není správný. Pokud dojde k zamítnutí nulové hypotézy, potvrdíme výše uvedené údaje.

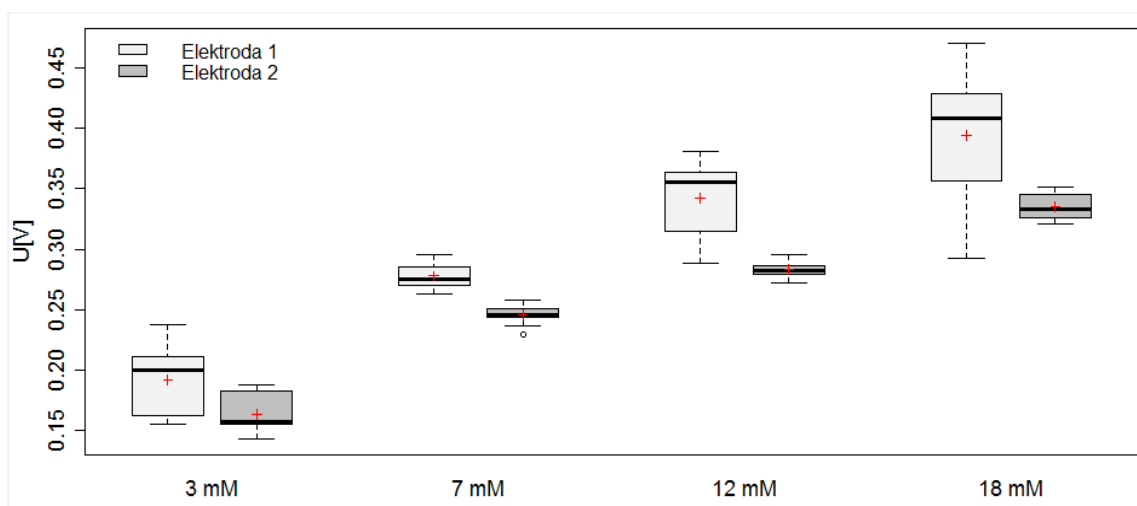
Tab. 30 Aspinové-Welchův test

<i>Datový výběr vytvořen hodnotami získaných z elektrody_1 i elektrody_2</i>								
Výběr	3mM_1	3mM_2	7mM_1	7mM_2	12mM_1	12mM_2	18mM_1	18mM_2
Str.h.	0,192	0,164	0,278	0,246	0,342	0,283	0,394	0,335
p-hod	0,0070 < 0,05		4,851e-06 < 0,05		0,0001 < 0,05		0,0029 < 0,05	

Nulová hypotéza:  $\mu_1 = \mu_2 \dots \mu_1 - \mu_2 = 0$

Alternativní hypotéza:  $\mu_1 > \mu_2 \dots \mu_1 - \mu_2 > 0$

Statistickou analýzou se potvrdilo, že hodnoty naměřené elektrodou\_1 jsou vyšší nežli hodnoty získané elektrodou\_2 a to ve všech případech použité koncentrace roztoku. Výsledky jsou vyobrazeny i pomocí krabicových grafů, kde si povšimneme i jiného faktu, který byl již také zmíněný. Tímto faktem je, že hodnoty, které byly naměřeny elektrodou\_2, mají menší rozsah hodnot. Tedy vyznačují se menším rozptylem. Následující boxplot dokazuje pravdivost statistické analýzy a potvrzuje výše uvedené závěry z experimentálního měření. V boxplotu jsou opět vyneseny jen hodnoty, které vznikly měřením čistého roztoku glukózy daných koncentrací.



**Graf 15** Krabicový graf znázorňující hodnoty získané elektrodou\_1 a elektrodou\_2 měřením čistého roztoku glukózy

V tomto boxplotu jsou světle šedou barvou vyznačeny hodnoty získané měřením s elektrodou\_1, tmavě šedou řadíme k hodnotám naměřeným elektrodou\_2. Zde se nám potvrzuje závěr statistické analýzy, že hodnoty elektrody\_1 jsou vyšší oproti hodnotám elektrody\_2. Dále vidíme, že s elektrodou\_2 opravdu probíhalo přesnější měření. Hodnoty získané touto elektrodou se vyznačují relativně velkou přesností.

Detailní krabicové grafy pro jednotlivé koncentrace a elektrody jsou uvedeny v přílohách.

#### 7.4.2 Analýza dat získaných měřením roztoku glukózy s přidáním enzymem

Uplatňují se zde stejné postupy analýzy jako v předešlé kapitole. Odstranila se tedy případná odlehlá pozorování, ověřila se normalita a homoskedasticita, na základě toho byl vybrán test a zamítla se či nezamítla nulová hypotéza.

Prvně proběhlo zjištění a případné odstranění odlehlých pozorování.

**Tab. 31** Přehled odlehlých pozorování – Elektroda\_1

<i>Elektroda_1</i>				
Datový soubor	3 mM_e	7 mM_e	12 mM_e	17 mM_e
Původní počet	10	10	10	10
Odl. pozorování	0	0	0	0
Ustálený počet	10	10	10	10

Tab. 32 Přehled odlehých pozorování – Elektroda\_2

<i>Elektroda_1</i>				
<b>Datový soubor</b>	3 mM <sub>e</sub>	7 mM <sub>e</sub>	12 mM <sub>e</sub>	17 mM <sub>e</sub>
<b>Původní počet</b>	10	10	10	10
<b>Odl. Pozorování</b>	0	0	1	0
<b>Ustálený počet</b>	10	10	9	10

Nyní proběhne ověření normality a homoskedasticity analyzovaných dat.

Tab. 33 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu\_1

<i>Elektroda_1</i>				
<b>Datový výběr</b>	3 mM <sub>e</sub>	7 mM <sub>e</sub>	12 mM <sub>e</sub>	17 mM <sub>e</sub>
<b>p-hodnota</b>	0,0716 > 0,05	0,7249 > 0,05	0,1489 > 0,05	0,2375 > 0,05

Tab. 34 Shapiro Willkův test normality pro elektrodu\_2

<i>Elektroda_1</i>				
<b>Datový výběr</b>	3 mM <sub>e</sub>	7 mM <sub>e</sub>	12 mM <sub>e</sub>	17 mM <sub>e</sub>
<b>p-hodnota</b>	0,0716 > 0,05	0,7249 > 0,05	0,1489 > 0,05	0,2375 > 0,05

Nulová hypotéza:  $\mu_1$  a  $\mu_2$  pochází z normálního rozdělení

Alternativní hypotéza: negace nulové hypotézy

p-hodnoty: všechny p-hodnoty jsou > 0,05, na základě tohoto zjištění nezamítáme nulovou hypotézu a na data se může aplikovat parametrický dvouvýběrový test.

Po dokázání normality dat se musí určit ještě homoskedasticita.

Tab. 35 F-test pro určení homoskedasticity

<i>Datový výběr vytvořen hodnotami získaných z elektrody_1 i elektrody_2</i>				
<b>Datový výběr</b>	3 mM <sub>e</sub>	7 mM <sub>e</sub>	12 mM <sub>e</sub>	17 mM <sub>e</sub>
<b>p-hodnota</b>	0,0375 < 0,05	0,0211 < 0,05	1,614e-05 < 0,05	0,0003 < 0,05

Nulová hypotéza:  $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 \dots \sigma_1^2 / \sigma_2^2 = 1$

Alternativní hypotéza:  $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \dots \sigma_1^2 / \sigma_2^2 \neq 1$

p-hodnoty: p-hodnoty < 0,05. V tomto případě homoskedasticita nebyla ověřena. Zamítá se nulová hypotéza. Analyzovaná data tedy podrobíme Aspinové-Welchově testu, jako v předešlém případě.

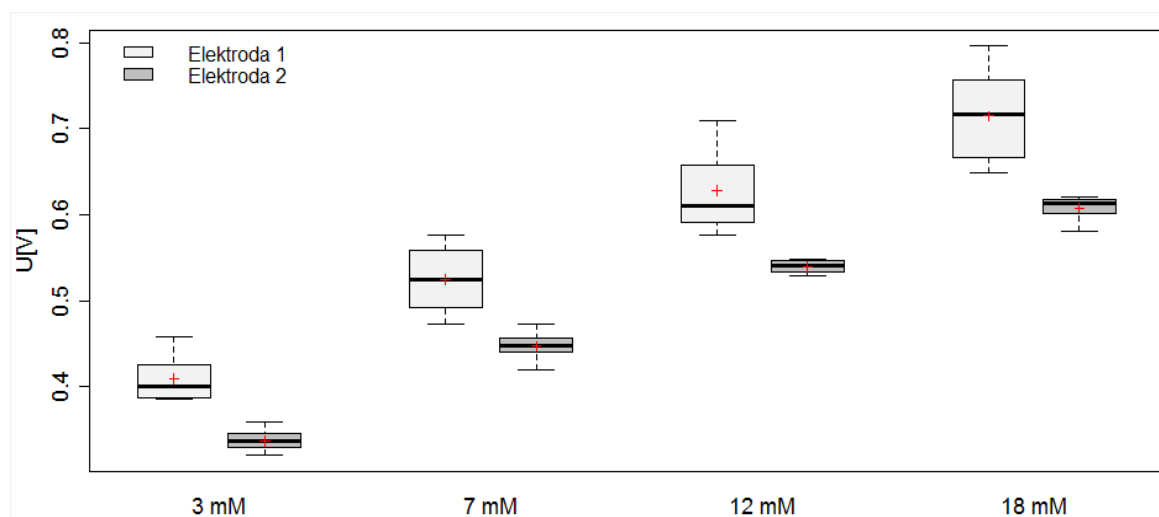
Tab. 36 *Aspinové-Welchův test*

<i>Datový výběr vytvořen hodnotami získaných z elektrody_1 i elektrody_2</i>								
<b>Výběr</b>	<b>3m_11</b>	<b>3mM_2</b>	<b>7mM_1</b>	<b>7mM_2</b>	<b>12mM_1</b>	<b>12mM_2</b>	<b>18mM_1</b>	<b>18mM_2</b>
<b>Str.h</b>	0,409	0,337	0,525	0,447	0,628	0,540	0,715	0,608
<b>p-hod</b>	1,433e-06 < 0,05		1,305e-05 < 0,05		8,942e-05 < 0,05		8,942e-05 < 0,05	

*Nulová hypotéza:*  $\mu_1 = \mu_2 \dots \mu_1 - \mu_2 = 0$

*Alternativní hypotéza:*  $\mu_1 > \mu_2 \dots \mu_1 - \mu_2 > 0$

I v tomto případě jsme díky statistické analýze potvrdili závěr a můžeme říci, že zamítáme nulovou hypotézu. To znamená, že naměřené hodnoty pomocí elektrody\_2 jsou nižší oproti hodnotám měřenými elektrodou\_1. Na tento závěr neměl vliv ani použitý enzym. I zde se díky vykresleným krabicovým grafům *Graf 16* potvrdil úkaz toho, že elektroda\_2 měří v menší oblasti.



**Graf 16** *Krabicový graf znázorňující hodnoty získané elektrodou\_1 a elektrodou\_2 měřením roztoku glukózy s enzymem*

Na základě testování jsme tedy utvrdili vyřčené závěry po experimentálním měření. Z obou statistických analýz jasně vyplývá skutečnost, že elektroda\_2 měří přesněji avšak v nižších hodnotách napětí. Fakt, že bude elektroda\_2 vykazovat nižší napětí, byl předem předložen jako předpoklad pro její konstrukci. Zjištění, že elektroda\_2 měří v menším rozsahu hodnot, tady přesněji, se projevilo až během experimentálního měření a bylo potvrzeno při statistické analýze vykreslením krabicových grafů.

Detailní krabicové grafy pro jednotlivé koncentrace a elektrody jsou uvedeny v přílohách.

## 8. Závěr

Cílem diplomové práce bylo zkonstruování elektrody pro měření koncentrace glukózy v krvi. Téma práce navazovalo na práci pana Ing. Petra Fajkuse. Určování hladiny glykémie v krvi je nedílnou součástí medicínských postupů. Koncentrace glukózy v krvi nemusí být určována jako primární hodnota, ale může poskytovat možnost výpočtu jiné důležité proměnné, například srdečního výdeje. Pro stanovení příslušné hodnoty slouží v praxi velké množství metod. V uvedené diplomové práci jsme zvolili jeden z nejpoužívanějšího a nejpřesnějšího principu, který dokáže zajistit relativně přesné výsledky. Jedná se o elektrochemický princip, založený na chemické reakci mezi glukózou a enzymem a záznamem vzniklého elektrického signálu.

Na začátku práce bylo vyřčeno několik předpokladů a požadavků, které měly vliv na návrh a následnou konstrukci elektrodového systému a daných komponent. Na základě těchto skutečností byl zhotoven elektrodový systém s příslušnými částmi, kterými byly měřící obvod a zdroj napájení. Během manuální práce na konstrukci elektrodového systému se vyskytlo několik problému, které musely být vyřešeny. Jednalo se například o řádné utěsnění elektrody lepidlem, které by svým chemickým složením nevstupovalo do příslušné reakce mezi glukózou a enzymem. Po vyřešení této hardwarové stránky mohly proběhnout statické testy. Ty probíhaly ve dvou cyklech, kdy se stanovovala hodnota napětí čistého roztoku glukózy s různou koncentrací této látky a poté proběhly testy s enzymem. Po ukončení experimentálního měření se mohlo přejít k analýze naměřených dat a následnému potvrzení, či vyvrácení předem daných předpokladů. Rozbor jednotlivých předpokladů a požadavků spolu s verdiktem o správnosti bude uveden v další části textu.

Nelze říci, který z předpokladů a požadavků má největší váhu, jelikož se jedná o velice provázaný a celistvý systém. První vyřčenou myšlenkou byl přenos elektrické energie analyzovaným roztokem na základě volných iontů. Elektroda tedy musela disponovat částí, která přivádí potřebné napětí. V tuto chvíli bylo jasné, že elektroda musí obsahovat i druhou část, která bude detekovat vzniklý elektrický signál. Tímto signálem by měl být elektrický proud. V tomto bodě padla otázka, jak velký proud bude v takovém systému vznikat. Předpokladem bylo, že výstupní data nebudou nabývat příliš vysokých hodnot. Proto musel být navrhnout obvod, který by zajišťoval detekci velice malých signálů. A pro snadnější práci, s naměřenými hodnotami, by se měřený proud měl převádět na výstupní napětí. Dále padl požadavek přivádět pracovní elektrodou do testovaného roztoku napětí o hodnotě 0,6V. Toto napětí je velice specifické pro reakci, která probíhá mezi glukózou a enzymem. Tento fakt se řešil při návrhu zdroje napětí a jeho přívodu na příslušnou elektrodu. Mezi nejdůležitější předpoklady dále patřila myšlenka, že elektroda zaznamená vyšší hodnotu v případě analýzy roztoku s enzymem, nikoliv při měření s čistým roztokem glukózy. Důležitou roli měla hrát i aktuální koncentrace používaného roztoku glukózy, kdy se zvyšující se koncentrací by měla růst výsledná hodnota napětí.

Během prvotních pokusů měření se nám okamžitě potvrdil první předpoklad. Elektrickou energii dokáže přenášet i čistý roztok glukózy, tedy bez řádné chemické reakce. Po tomto ověření se mohlo přejít ke konečné sadě experimentálních měření. Z naměřených hodnot, které byly podrobeny jak grafickému srovnání, tak statistické analýze jasně vyplývá, že hodnoty získané analýzou čistého roztoku glukózy jsou závislé na koncentraci použitého roztoku glukózy, neboť se zvyšující se

koncentrací roste hodnota naměřeného napětí. Touto skutečností se potvrdil druhý předpoklad. Dalším důležitým předpokladem bylo, že data naměřená analýzou roztoku glukózy s použitím enzymu by měla nabývat vyšších hodnot napětí. To se během porovnávání jednotlivých napětí, která byla naměřena při použití stejných koncentrací roztoku glukózy, potvrdilo. Z daného srovnání jasně vyplývá, že vzorky s použitým enzymem vykazují vyšší napětí. Průběh těchto měření se vyznačuje rychlým nárůstem napětí s následným rychlým ústupem. Tento jev se přiřazuje příslušné chemické reakci a její saturaci.

Vzniklé nepřesnosti v měření, které nejsou nijak závažné, mohou být z velké části přisuzovány nedodržení stálých podmínek měření. Během manipulace s používanými roztoky mohlo dojít k znečištění daných roztoků, tento fakt mohl mít za následek výkyvy v naměřeném napětí příslušných koncentrací. Dalším jevem, který mohl ovlivnit výsledek měření, byla teplota používaného enzymu, neboť enzym se musel uchovávat v mrazícím zařízení a během měření docházelo k jeho oteplení, což mohlo mít vliv na rychlost chemické reakce. Z technického hlediska se do měření mohla zanášet chyba pohybem elektrod či kolísáním zdrojového napětí.

V práci byly použity dva typy elektrodových systému, které se lišily svou konstrukcí. Elektroda\_1 byla zhotovena jako hlavní měřicí prvek z pozlacených elektrod, ke kterému se zkonstruovala druhá elektroda nesoucí jiné vlastnosti. Opět byly použity pozlacené elektrody jiného průřezu s jinou roztečí. Předpokládalo se, že tato elektroda\_2 bude měřit v nižších hodnotách napětí, právě díky svým technickým parametrům. To se také analýzou naměřených dat potvrdilo. Během statistické analýzy se ukázala velice důležitá skutečnost, která nebyla předem uvažována. Touto skutečností je, že elektroda\_2 dokáže měřit v menším rozsahu napětí, vyznačuje se tedy menším rozptylem naměřených hodnot. V tuto chvíli ji můžeme označit za přesnější na úkor velikosti měřeného napětí. Abychom mohli určit důvod tohoto faktu, musely by být elektrody podrobeny dalšímu zkoumání.

Nedílnou součástí práce bylo řešení příslušné chemické reakce, aby bylo možné v dalším postupu na tuto práci navázat. Pro měření koncentrace glukózy v roztoku, není potřeba detailně znát chemické postupy. Avšak při měření hladiny glykémie v krvi, kde se nachází mnoho částí způsobilých k přenosu elektrické energie, musíme přesně rozlišit elektrický signál vzniklý danou chemickou reakcí. Proto je v práci uveden snadný postup pro zjištění kinetických vlastností reakce glukózy s enzymem. Dalším důležitým bodem z oblasti chemie jsou metody uchycení enzymu na povrch elektrody. Tato problematika je v práci pouze nastíněná pro další postupy zpracování.

V tuto chvíli jsou splněny body zadání práce a zkonstruované části jsou připraveny k dalšímu použití a řešení složitější problematiky.

## 9. Seznam literatury

- [1] Bc.FAJKUS, Petr. *Metoda měření krevního průtoku dilucí glukózy*. Ostrava, 2016. Diplomová práce. VŠB - TUO. Vedoucí práce Ing. Martin Augustynek, Ph.D.
- [2] BERNARD, Vladan. *Glukometr a jeho příbuzní*. Biofyzikální ústav Lf, MU, 2011.
- [3] BC. VÍTOVÁ, Hana. *Neinvazivní měření glukózy v krvi*. Brno, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Jiří Sekora.
- [4] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. Praha, 2006. ISBN 80-7080-566-2.
- [5] VOKOUNOVÁ, Michaela. *Studie dlouhodobé stability senzoru glukózy pro kontinuální monitorování glykémie*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce RNDr. Jan Krejčí, Ph.D.
- [6] MRÁZ, Miloš, Štěpán SVAČINA a Martin HALUZÍK. Kontinuální monitorace glykemie: minulost, současnost a perspektivy. *DMEV: diabetologie*. 2009, **12**(2), 71 - 78
- [7] SANJAY, Karla a Gupta YASHDEEP. Ambulatory glucose profile: Flash glucose monitoring. *RECENT ADVANCES IN ENDOCRINOLOGY*. 2015, **65**(12), 1-2.
- [8] ZEHNULA, Karel. *Snímače neelektrických veličin: vysokoškolská příručka pro vysoké školy technického směru*. 2., upravené a dopln. vyd. Praha: SNTL, 1983. Automatizace a regulace.
- [9] PASEKOVÁ, Hana, Miroslav POLÁŠEK a Petr SOLICH. Sekvenční injekční analýza. *Chem. Listy*. 1999, **93**(12), 354 - 359.
- [10] MUDR. EDELSBERGER, Tomáš. Selfmonitoring glykemie. *Medicína pro praxi* [online]. 2012, **9**(5), 222 – 226 [cit.2016-10-25]. Dostupné z: [www.medicinapropraxi.cz](http://www.medicinapropraxi.cz)
- [11] TUYEN LE, Thi Thanh, Phu Dyu TRAN, Xuan Tung PHAM, Duy Hien TONG a Mau Chien DANG. Glucose oxidase immobilization on different modified surfaces of platinum nanowire for application in glucose detection. *Nanotechnol.* 2010, **1**(2), 1 - 4.
- [12] *Moderní elektrochemické metody: sborník přednášek .. konference : Jetřichovice ..Praha: Česká společnost chemická*, 1981. ISBN 978-80-254-6710-7.
- [13] KOŠTÍŘ, Josef V. *Biochemie známá i neznámá: vysokoškolská příručka pro vysoké školy technického směru*. Praha: Avicenum, 1980. Život a zdraví (Avicenum).
- [14] VOŠZ A SZŠ HRADEC KRÁLOVÉ. *Zshk* [online]. [cit. 2017-01-14]. Dostupné z: [http://www.zshk.cz/safra/SBIRKA\\_PRIKLADU/Kinetika.htm](http://www.zshk.cz/safra/SBIRKA_PRIKLADU/Kinetika.htm)

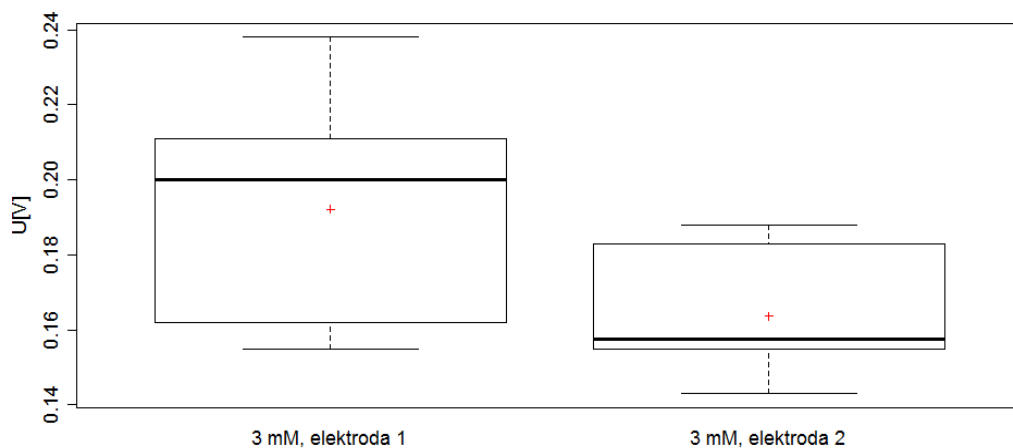
- [15] BC. HRBÁČEK Michal. *Systém automatického řízení glykémie*. Brno, 2015. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Vratislav Harabiš, Ph.D.
- [16] VÁŇA, Jaroslav. *Analyzátory plynů a kapalin*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1984
- [17] KARLBERG, Bo a Gil E. PACEY. *Flow injection analysis: a practical guide*. Amsterdam: Elsevier, 1989. *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, 10. ISBN 04-448-8014-3.
- [18] DecComG4. Aimport: A.Import.CZ spol. s r.o. [online]. Praha [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.aimport.cz/cz/dexcom/dexcom-g4>
- [19] W. SCHREPFER, Thomas. *Technology, Study Results and Device Presentation of the truly non-invasive continuous Glucose Monitor PENDRA: Glucose Monitoring*. Warsaw: Pendragon Medical. Dostupné z: [:http://www.pendra.narod.ru/downloads/Presentation\\_Warsaw\\_110904.pdf](http://www.pendra.narod.ru/downloads/Presentation_Warsaw_110904.pdf)
- [20] GlucoWatch. Mandos.com: Helping Defeat Diabetes Since 1995 [online]. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.mendosa.com/glucowatch.htm>
- [21] FreeStyle. FreeStyleDiabetes: Abbot Laboratories [online]. England [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://freestylediabetes.co.uk/our-products/other-meters/freestyle-navigator-2>
- [22] Gurdian. *Madtronic: Continuous Glucose Monitoring* [online]. 2015 [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.medtronicdiabetes.com/treatments/continuous-glucose-monitoring>
- [23] Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes: Self - Management* [online]. 2005 [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.diabetesselfmanagement.com/diabetes-resources/tools-tech/continuous-glucose-monitoring/>
- [24] ANDERLOVÁ, Martina. *Stanovení oxidovaného a redukováného glutationu v hemolyzátu erytrocytů metodou kapilární elektroforézy a UV\_VIS detekcí*, Hradec Králové, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v HK. Vedoucí práce Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.
- [25] HASAL, Robert. *Enzymové senzory s teplotní regulací*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
- [26] HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate techniques*. 2nd edition. ISBN 978-0-12-370501-3.
- [27] SCHELLER, F. a Florian SCHUBERT. *Biosensors*. New York: Elsevier, 1992. ISBN 0-444-98783-5.
- [28] PENHAKER, Marek. *Lékařské diagnostické přístroje: učební texty*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2004. ISBN 80-248-0751-3.



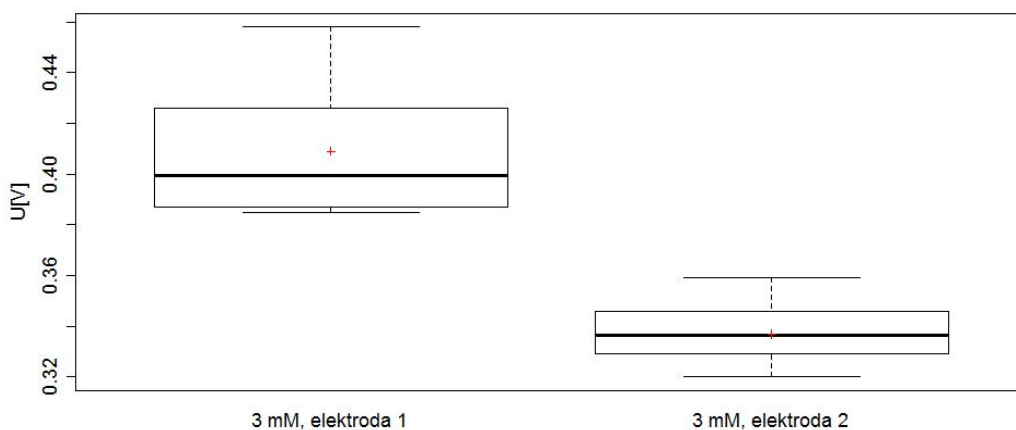
## 10. Seznam příloh

Příloha I	Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 3mM .....	81
Příloha II	Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 7mM .....	81
Příloha III	Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 12mM .....	82
Příloha IV	Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 18mM .....	83
Příloha V	CD .....	83

**Příloha I Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 3mM**

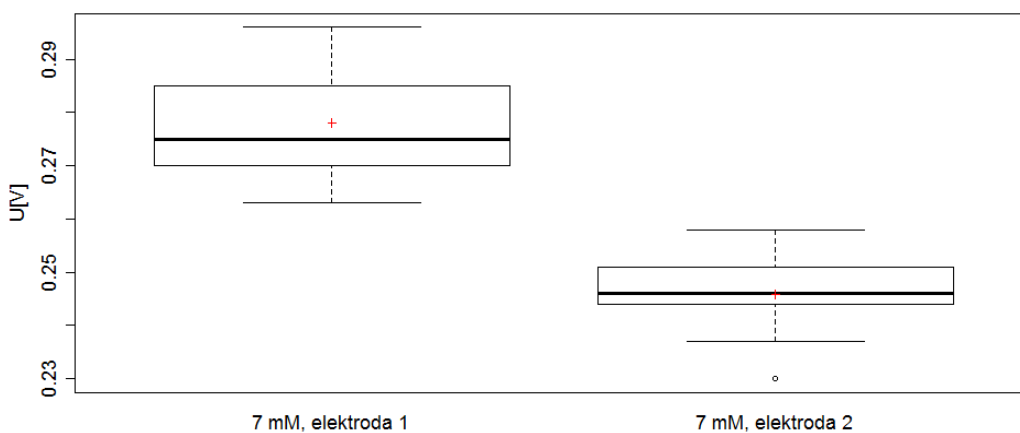


**Graf\_1 Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 3mM**

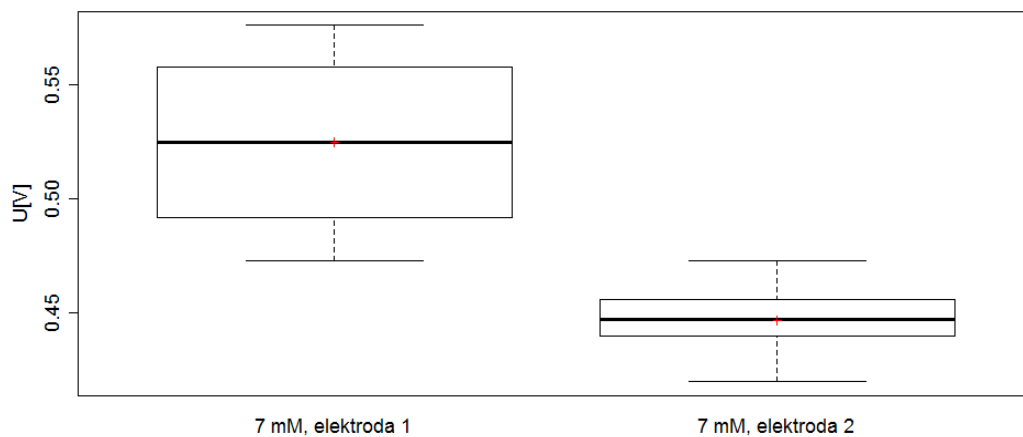


**Graf\_2 Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 3mM s enzymem**

**Příloha II Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 7mM**

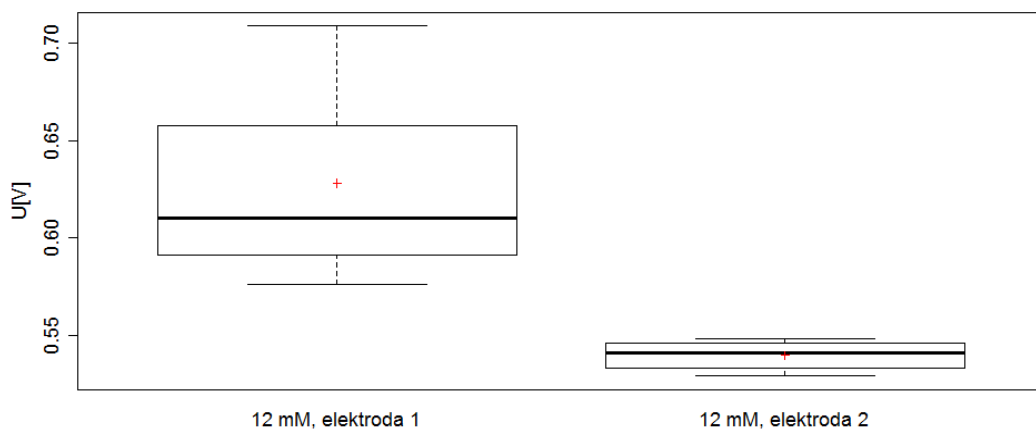


**Graf\_3 Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 7mM**

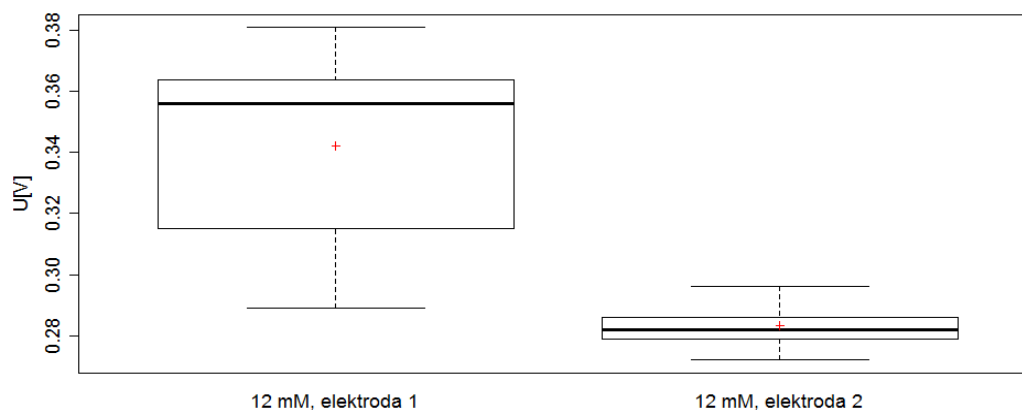


**Graf\_ 4** Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 7mM s enzymem

**Příloha III Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 12mM**



**Graf\_ 5** Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 12mM

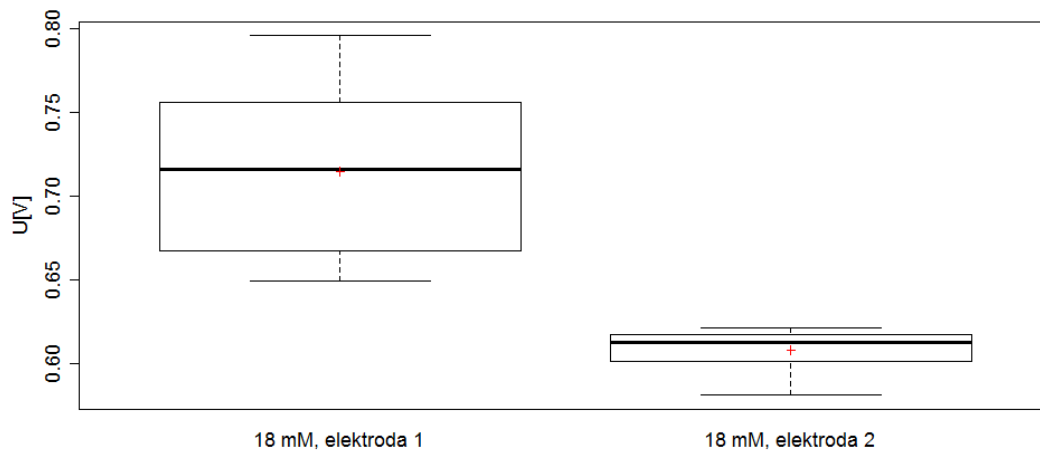


**Graf\_ 6** Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 12mM s enzymem

**Příloha IV Srovnání naměřených hodnot pomocí krabicového grafu – 18mM**



**Graf\_ 7 Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 18mM**



**Graf\_ 8 Krabicový graf srovnávající naměřené hodnoty pomocí elektrody 1,2 při koncentraci 18mM s enzymem**

**Příloha V CD**

1. Datasheet použitých operačních zesilovačů
2. Kompletní tabulky s grafy v Excelu
3. Elektronická verze diplomové práce