

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104407124 A

(43) 申请公布日 2015.03.11

(21) 申请号 201410524477.X

(22) 申请日 2006.04.07

(30) 优先权数据

60/669,729 2005.04.08 US

(62) 分案原申请数据

200680017393.0 2006.04.07

(71) 申请人 拜尔保健有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 G·P·比尔 伍焕平

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006.01)

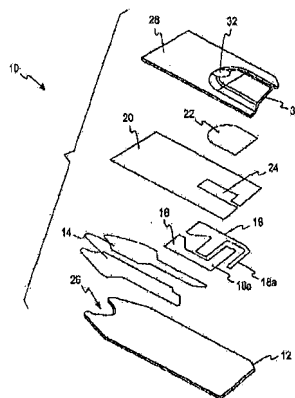
权利要求书3页 说明书16页 附图11页

(54) 发明名称

作为用于生物传感器的对照溶液的内部参考
的可氧化的物质

(57) 摘要

测试用于测量分析物在生物样品中的存在，特别是葡萄糖在全血中的存在的电化学仪的性能，包括引入含有预定数量的分析物和预定数量的内部参考化合物的对照溶液。所述内部参考化合物是经过选择的，以便它在比用于氧化所述分析物大的电位下氧化，从而使它能够区分对照溶液和生物样品。



1. 在电化学传感器工作期间通过测量对照溶液中的和生物样品中的分析物的数量区分所述对照溶液和所述生物样品的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 将内部参考化合物添加到所述对照溶液中,所述化合物适合在比测量所述分析物的氧化所需电位更高的电位下被电化学氧化,所述内部参考化合物是以相对所述对照溶液中的预定数量的分析物的量添加的,其足以指示所述内部参考化合物在所述对照溶液中的存在;

(b) 将含有所述内部参考化合物和所述预定数量的所述分析物的所述对照溶液导入电化学传感器,所述传感器具有工作和参考电极,以及含有用于氧化所述分析物的试剂的反应层;

(c) 至少一次给所述电化学传感器的所述电极施加电位,其足以氧化所述内部参考化合物和所述分析物,并且测量所得到的电流;

(d) 至少一次给所述电化学传感器施加比(c)的电位低的电位,所述电位足以测量所述分析物的氧化,但不足以氧化所述内部参考化合物,并且测量所得到的电流;

(e) 计算差异性指数(DI),定义为 $DI = i_{\text{高电压}} / i_{\text{低电压}}$

其中: $i_{\text{高电压}}$ 是在步骤(c)中测量的电流

$i_{\text{低电压}}$ 是在步骤(d)中测量的电流

(f) 当步骤(e)的差异性指数大到足以超过1,以便区分内部参考化合物和所述预定数量的分析物时,确定存在对照溶液;和

(g) 当步骤(e)的差异性指数为大约1时,确定存在生物样品。

2. 如权利要求1的方法,其中,在步骤(f)中确定的所述差异性指数为1.5或以上。

3. 如权利要求1的方法,其中,所述内部参考化合物是与存在于所述对照溶液中的分析物的数量成比例地添加的。

4. 如权利要求3的方法,其中,当用在所述对照溶液中的分析物的数量最大时,所述内部参考化合物的添加数量使得所述差异性指数为1.5或以上。

5. 如权利要求1的方法,其中,所述(c)的电位是在(d)的电位之前施加的。

6. 如权利要求1的方法,其中,所述(d)的电位是在(c)的电位之前施加的。

7. 如权利要求1的方法,其中,所述(c)和(d)的电位施加了一次以上。

8. 如权利要求1的方法,其中,所述分析物是通过施加足以氧化所述分析物的第一电位第一预定时间,然后施加不足以氧化所述分析物的并且比所述第一电位低的第二电位第二预定时间,然后施加足以氧化所述分析物的比所述第二电位高的第三电位第三预定时间测量的。

9. 如权利要求8的方法,其中,所述(c)的电位是在所述第一预定时间期间施加的,而所述(d)的电位是在所述第三预定时间期间施加的。

10. 如权利要求8的方法,其中,所述(c)的电位和所述(d)的电位是在所述第一预定时间期间施加的。

11. 如权利要求8的方法,其中,所述(c)的电位和所述(d)的电位是在所述第三时间期间施加的。

12. 如权利要求8的方法,其中,所述(d)的电位是在所述第一预定时间期间施加的,而所述(c)的电位是在所述第三时间期间施加的。

13. 如权利要求 8 的方法,其中,所述 (c) 和 (d) 的至少一个电位施加了一次以上。
14. 如权利要求 1 的方法,其中,所述分析物是葡萄糖,而所述生物样品是全血。
15. 如权利要求 1 的方法,其中,所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺化合物。
16. 如权利要求 15 的方法,其中,所述内部参考化合物是所述有机胺化合物,所述有机胺化合物是 3-(N-吗啉代)丙烷磺酸, N-(2-羟乙基)哌嗪-N¹-(2-乙烷磺酸), 2-[(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙氨基)乙烷磺酸, 2-吗啉代乙烷磺酸,和双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷 [Bis-Tris], 4-氨基苄腈, 4-氨基苯甲酸,或 4-碘代苯胺。
17. 如权利要求 16 的方法,其中,所述内部参考化合物是 Bis-Tris。
18. 如权利要求 15 的方法,其中,所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物,所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。
19. 如权利要求 15 的方法,其中,所述内部参考化合物是所述配位化合物,所述配位化合物是亚铁氰化钾。
20. 如权利要求 14 的方法,其中,葡萄糖是通过葡糖氧化酶氧化的,并且,其中,所述对照溶液含有能够将 pH 保持在 5-7 之间的缓冲剂。
21. 如权利要求 14 的方法,其中,葡萄糖是通过葡糖脱氢酶氧化的,并且,其中,所述对照溶液含有能够将 pH 保持在 6-8 之间的缓冲剂。
22. 用于测试电化学系统,以便测量生物样品中的分析物的数量的对照溶液,所述对照溶液包括:
 - (a) 预定数量的所述分析物;和
 - (b) 预定数量的内部参考化合物,所述内部参考化合物适合在比氧化所述分析物所需电位更高的电位下被氧化,所述预定数量的内部参考化合物与所述预定数量的分析物成比例,以便可以检测所述内部参考化合物的存在。
23. 如权利要求 22 的对照溶液,其中,所述分析物是葡萄糖,而所述生物样品是全血。
24. 如权利要求 23 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺化合物。
25. 如权利要求 24 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述有机胺化合物,所述有机胺化合物是 3-(N-吗啉代)丙烷磺酸, N-(2-羟乙基)哌嗪-N¹-(2-乙烷磺酸), 2-[(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙氨基)乙烷磺酸, 2-吗啉代乙烷磺酸,和双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷 [Bis-Tris], 4-氨基苄腈, 4-氨基苯甲酸,或 4-碘代苯胺。
26. 如权利要求 25 的对照溶液,其中,所述内部参考是 Bis-Tris。
27. 如权利要求 24 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物,所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。
28. 如权利要求 24 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述配位化合物,所述配位化合物是亚铁氰化钾。
29. 如权利要求 23 的对照溶液,其中,葡萄糖是通过葡糖氧化酶氧化的,并且添加缓冲剂,以便将 pH 保持在 5-7 之间。
30. 如权利要求 23 的对照溶液,其中,葡萄糖是通过葡糖脱氢酶氧化的,并且添加缓冲剂,以便将 pH 保持在 6-8 之间。

31. 添加到用于测试电化学葡萄糖仪的对照溶液中的内部参考化合物,所述内部参考包括在比测量葡萄糖氧化所需更高电位下可氧化的化合物。

32. 如权利要求 31 的内部参考,其中,所述内部参考是在比测量葡萄糖氧化所需电位高至少 100mV 的电位下可氧化的。

33. 如权利要求 31 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺化合物。

34. 如权利要求 33 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是 3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸, N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N¹-(2- 乙烷磺酸), 2-[(2- 羟基 -1, 1- 双(羟甲基) 乙氨基) 乙烷磺酸, 2- 吗啉代乙烷磺酸, 和双(2- 羟乙基) 氨基 - 三(羟甲基) 甲烷 [Bis-Tris], 4- 氨基苄腈, 4- 氨基苯甲酸, 或 4- 碘代苯胺。

35. 如权利要求 34 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是 Bis-Tris。

36. 如权利要求 33 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物,所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。

37. 如权利要求 33 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是所述配位化合物,所述配位化合物是亚铁氰化钾。

作为用于生物传感器的对照溶液的内部参考的可氧化的物质

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 4 月 7 日、申请号为 200680017393.0、发明名称为“作为用于生物传感器的对照溶液的内部参考的可氧化的物质”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明总体上涉及医疗器械领域。

[0003] 发明背景

[0004] 更具体地讲,本发明涉及生物传感器,它可用于测量体液中分析物的数量。光学方法通常被用于这种测量,不过,本发明涉及电化学生物传感器的改良。尽管本文所披露的方法可用于测量其他分析物,包括胆固醇,尿素,肌酸酐,和肌酸,特别感兴趣的是测量全血中的葡萄糖。尽管本说明书强调了用于测量葡萄糖的发明用途,但应当理解的是,本发明具有更广泛的用途。

[0005] 本发明涉及电化学仪器,其中,将电位施加在与生物样品和试剂接触的电极上。在所述分析物与所述试剂起反应时测量所产生的电流,然后与样品中的分析物的数量相关联。这种仪器被称作测量电流的仪器,它与电量分析仪器不同,这种仪器测量的是通过整个测量期间的电流由样品的反应所产生的库仑计的总电荷。所述测量电流的仪器的优点是,它们不太依赖于体积和时间。它们不需要等待整个体积的分析物发生反应,相反,只需要通过在预定的时间对反应速度进行采样对分析物进行测量。

[0006] 现有技术中业已披露了用于所述生物传感器的多种设计,例如,参见美国专利申请公开号 2001/0042683。所述电极一般被称为工作电极和反电极。所述电极与含有试剂的固体层接触,所述试剂能氧化所述样品中的分析物,如葡萄糖氧化酶以及介体,所述介体能再氧化所述还原的酶。还原的介体本身是在工作电极上氧化的,它能产生可测量的电流。该电流被用于计算被测试的样品中的葡萄糖的数量,因为它是样品中葡萄糖氧化的间接参数。所述反应可以通过以下步骤描述:

[0007] $\text{葡萄糖} + E_{\text{氧化}} \rightarrow E_{\text{还原}} + \text{产物 (葡萄糖酸, 葡萄糖酸内酯)}$

[0008] $E_{\text{还原}} + \text{Med}_{\text{氧化}} \rightarrow \text{Med}_{\text{还原}} + E_{\text{氧化}}$

[0009] $\text{Med}_{\text{还原}} \rightarrow \text{Med}_{\text{氧化}} + n e^-$

[0010] 其中, $E_{\text{氧化}}$ 和 $E_{\text{还原}}$ 是所述酶的氧化还原中心的氧化和还原形式,而 $\text{Med}_{\text{氧化}}$ 和 $\text{Med}_{\text{还原}}$ 是所述介体的氧化和还原形式。

[0011] 为了测量葡萄糖,所述酶可以是葡萄糖氧化酶,而所述介体是铁氰化物。其他分析物的测量要使用合适的酶和介体。在表 1 中列举了酶,介体和分析物的典型组合。

[0012] 表 1 选择的底物,酶和介体系统

[0013]

分析物	酶	介体
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	铁氰化物

葡萄糖	葡萄糖脱氢酶	铁氰化物
胆固醇	胆固醇氧化酶	铁氰化物
乳酸盐	乳酸盐氧化酶	铁氰化物
尿酸	尿酸氧化酶	铁氰化物
醇	醇氧化酶	苯二胺

[0014] 为了确保精确测量,将含有已知数量葡萄糖的对照溶液用于验证所述仪器是正常工作的。对照溶液的配方业已成为多份专利和申请的主题。例如,美国专利号 3,920,580 ;4,572,899 ;4,729,959 ;5,028,542 和 5,605,837 ;WO 93/21928 ;WO 95/13535 ;和 WO95/13536。尽管含有血清的对照溶液业已被使用,但最近的专利一直致力于用不含血清的溶液取代基于血清的对照溶液,因为无血清溶液比含血清的溶液更一致和稳定。所述对照溶液应当在血清样基质中含有已知浓度的葡萄糖,以便测定酶促生物传感器和稳压器的精确性。显而易见的是,所述组合物在使用之前长时间储存时必须是稳定的。

[0015] 对照溶液应当用于检测所述葡萄糖监测系统的功能,不过,与此同时,它们应当识别并且区分实际血样的读数。这是因为所述对照溶液包含已知数量的葡萄糖,并且提供没有治疗目的的读数。如果所述测试仪器不能识别所述对照溶液,并且区分它们的反应和血样的反应,对照溶液的葡萄糖读数就包含在葡萄糖测量的历史中,这可能导致错误的理解患者的糖尿病状态。或者,如果对照溶液取代了血样,它可能被医生误认为表明需要改变治疗。因此,由于所述对照溶液的温度反应与血样的温度反应不同,如果测试仪表不能区分血样和对照溶液的话,在除了 25℃ 以外的温度下进行测量的温度补偿不够精确。因此,葡萄糖监测系统能自动检测和识别对照溶液是高度理想的,以便区分对照溶液和血样的葡萄糖读数,并且为血样和对照溶液分别提供温度补偿。

[0016] 有若干专利业已披露了通过各种机制鉴定对照溶液的方法。在美国专利号 5,723,284 中,披露了血液葡萄糖的电化学测量。’284 号专利提出了修饰所述对照溶液,改变从由休止期隔开的两个氧化时期采集的电流读数的比例。所述仪器能识别被测量的对照溶液,并且采取适当的措施,以便避免所述结果包含在血样结果中。’284 号专利还披露了应当将所述对照溶液的 pH 缓冲到 4.8-7.5 的范围,以便有效。

[0017] 确定测量的是对照溶液还是血样的葡萄糖含量的另一种方法披露于美国申请公开号 2002/0139692A1 中。确定的一个指标将电流的下降与被测试的样品的性质相关联。

[0018] 美国专利号 5,620,579 和 5,653,863 提出了这样开始样品的检测:提供短时间的起始正电位脉冲,以便再氧化任何过早还原的介体。所述起始脉冲被称作“燃烧时间”。

[0019] 当电位施加在工作电极和反电极上并且将液体样品导入所述传感器时,用液体样品使干燥试剂再水合并且电流开始流动,通常增加到峰值,然后经过“燃烧时间”而下降,该时间长度一般大约为 10 秒。在此期间,以前还原的介体被再氧化,以便降低出现不正确的高结果的偏差。如果不存在完整数量的样品,可能导入附加误差,因为所有试剂不能用于反应,或工作电极和反电极可能不能与样品完全接触,因此,减少了在“燃烧”期间的电流。

[0020] 在燃烧时间结束之后,以较低电位或零电位(开路)提供休止周期。在该休止周

期期间,葡萄糖氧化反应继续进行,并且还原介体。然后,再次在工作电极和反电极之间施加稳定电位,并且测量短时间的电流,通常为大约 2-10 秒。所述电流最初很高,不过随着介体扩散开始得到控制会迅速下降。在预定时间,将测量的电流用于确定样品的葡萄糖含量。

[0021] 添加内部参考化合物是分析化学的常见措施,以便提供定量参考信号。这种工作原理业已被用于最近公开的专利申请号 WO2005/078118 中,其中,将内部参考添加到试剂系统中,以便实现某些配方用途。

[0022] 在 WO2004/040286A1 中,提出了对照溶液包括选自下列一组的还原物质:尿酸,胆红素,抗坏血酸,亚甲蓝,双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷, N, N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸,和醋氨酚,因此,改变在由休止周期隔开的两个氧化周期中获得的电流读数的比例,并且能够鉴定对照溶液。

[0023] 本发明人业已探询了区分对照溶液和生物样品的改良的方法。下面将详细介绍它们的方法。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明提供了在电化学仪工作期间通过数量指标区分对照溶液和生物样品的方法。在一种实施方案中,本发明是对照溶液,它包括已知数量的葡萄糖,具有合适 pH 值的缓冲系统,和内部参考化合物。将所述内部参考化合物添加到对照溶液中,以便由葡萄糖监测系统识别对照溶液。本发明提供了检测内部参考化合物存在,计算数量指标,并且确定对照溶液正在被测试的方法。

[0026] 在一种实施方案中,生物样品中的分析物是全血中的葡萄糖,而所述介体是铁氰化钾。所述内部参考化合物是在高于氧化所述介体所需电位的电位下可氧化的,所述电位被用于测量分析物的氧化。在所述对照溶液中,具有预定浓度的内部参考和预定浓度的葡萄糖。所述葡萄糖-相关的介体和内部参考在所述电极上通过不同的电位(低和高)被选择性地氧化。当葡萄糖是分析物时,所述内部参考化合物可以在比用于再氧化还原的介体的电位高至少 100mV 的电位下氧化。

[0027] 用于测量对照溶液的葡萄糖的内部参考化合物包括在所述电极上在合适电位下可氧化的任何物质,如有机金属化合物,配位化合物,和有机胺化合物。所使用的内部参考化合物的数量与所述对照溶液中的葡萄糖的数量相关。优选的是,选择内部参考化合物的数量,以便当所述对照溶液中的葡萄糖是测量电化学葡萄糖仪所需最大数量时可以识别所述对照溶液。或者,内部参考化合物的数量可以与葡萄糖的数量成比例地变化。

[0028] 比较在低电位和高电位下的测量结果,提供了检测内部参考化合物,并因此检测所述对照溶液的方法。当所述测量方法采用由休止周期隔开的两个周期时,所述高电压和低电压可应用在任一个周期或两个周期。电位施加在业已接收了对照溶液的传感器上。将在能氧化内部参考化合物的电位下产生的电流与只能氧化分析物(例如,葡萄糖),但不能氧化内部参考化合物的电位下产生的电流进行比较。两种测量电流之间的比例被定义为差异性指数(DI),提供了用于区分对照溶液和缺少内部参考化合物的液体样品的手段。

[0029] $DI = i_{\text{高电压}} / i_{\text{低电压}}$

[0030] 其中, $i_{\text{高电压}}$ 和 $i_{\text{低电压}}$ 是在高电压和低电压下测量的电流。

[0031] 在较高电压下,内部参考化合物和还原的介体被氧化,而在较低电压下,只有介体被氧化。

[0032] 大约 1 的 DI 值表示样品缺少内部参考化合物,并且推测它是生物样品,而明显大于 1 的 DI 值,优选至少大约 1.5,表明所述样品是对照溶液。

[0033] 在另一种实施方案中,本发明是适合表明存在对照溶液的内部参考化合物,所述对照溶液被用于测试电化学生物传感器/稳压器系统的精确度。当分析物是全血中的葡萄糖时,内部参考化合物可以是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺。

[0034] 本发明的一个结果是改善测量的电流的一致性,以及所得到的分析的精确度。如果在相同的氧化时间内施加高和低的电位,如用于葡萄糖氧化的燃耗和读取时间,不太可能是外部因素,如样品运动或环境温度来影响所述差异性指数。在高电压和/或低电压下产生的电流的多个读数可以改善所述结果的精度。另外,当业已确定存在对照溶液时,可以采用特别针对对照溶液的温度校正算法。通过将不同的温度算法用于对照溶液和生物样品(例如,全血),可以改善临床结果,并且可以更严格地控制范围值。

[0035] 附图的简要说明

[0036] 图 1 是根据一种实施方案的生物传感器的透视图。

[0037] 图 2 是图 1 所示生物传感器的装配示意图。

[0038] 图 3 是电位与燃耗时间的曲线图。

[0039] 图 4 是按图 3 所示施加的电位的电流-时间曲线图。

[0040] 图 5 是例 1 所示循环伏安图。

[0041] 图 6 是例 2 所示循环伏安图。

[0042] 图 7 是例 3 所示循环伏安图。

[0043] 图 8 是例 4 所示循环伏安图。

[0044] 图 9A-E 表示例 5 所示电位顺序。

[0045] 图 10a-b 是例 6 所示循环伏安图。

[0046] 图 11 是在例 7 中所获得的电流-时间曲线图。

[0047] 图 12 是在例 8 中所获得的电流-时间曲线图。

[0048] 附图的详细说明

[0049] 优选实施方案的说明

[0050] 下面将以用于测量全血的葡萄糖含量的具有重要商业价值的方法为例描述本发明。不过,本发明的方法具有其他用途,其中,其他分析物,如胆固醇,尿素,肌酸酐,和肌酸存在于诸如尿液,唾液,和间隙液体的生物液体中,并且,其中,对照溶液被用于检测电化学仪的精度。

[0051] 电化学生物传感器

[0052] 本发明并不局限于现有技术中业已披露过的多种设计的特定的生物传感器。可以使用的生物传感器的一种例子披露于美国专利号 6,531,040 中,参见图 1 和 2。

[0053] 生物传感器 10 在图 1 中以分解示意图的形式示出。它包括绝缘底板 12,在它上面依次印刷有(通常通过丝网印刷术印刷)电导体图案 14,电极图案(部分 16 和 18),绝缘(电介质)图案 20,和反应层 22,并且最后是覆盖层 28。在覆盖层 28 和试剂层 22 之间形成了毛细管 30,构成了用于液体试样的流动通道。在图 2 中示出了所述生物传感器,其中,底板上的所有元件在相同的平面上示出。

[0054] 反应层 22 的作用是与液体试样中的葡萄糖,或其他分析物发生化学反应,并且产

生电流,对产生的电流进行测量,并且使它与所存在的分析物相关联。反应层 22 通常包括酶,和电子受体。所述酶与分析物起反应以便产生电子,通过电子受体将它们转移到工作电极表面。所述电子受体又被称作介体,它通过响应分析物和酶之间的反应被还原。所述反应层中的酶可以与亲水聚合物,如聚氧化乙烯组合。可用于与葡萄糖起反应的一种酶是葡萄糖氧化酶,而所述介体可以是铁氰化物,它与 pH 值保持在 5-7 的缓冲液一起使用。可以使用的另一种酶是葡萄糖脱氢酶,以及辅酶因子,如吡咯喹啉醌 (PQQ),与 pH 保持在 6-8 的缓冲液一起使用。

[0055] 电极图案的两个部分 16,18 提供了电化学测定分析物浓度所必需的各工作电极和反电极。所示出的设计特征是,工作电极和反电极是这样设计的,使得反电极的主要部分位于工作电极 16a 的暴露部分的下游(沿流动通道的流体流动方向)。

[0056] 不过,反电极子元件 18a 位于工作电极上部元件 16a 的上游,以便当测试液体样品(例如,全血样品)的数量不能完全覆盖工作电极时,进入毛细管空间,在反电极子元件 18a 和工作电极 16a 的暴露部分之间形成电连接,这是由于全血样品的导电性。不过,反电极的用于接触全血样品的面积是如此之小,以至只有非常弱的电流能够从所述电极之间通过,并因此通过检流器。当接收到的信号低于某种预定水平时,所述传感器装置通知用户进入传感器间隙的血液量不足,并且应当进行另一次试验,或者添加更多的血液。尽管电极的特定尺寸并不重要,但反电极子元件 18a 的面积通常小于工作电极面积的大约 10%,更优选小于大约 6%。

[0057] 工作电极和反电极一般是使用电极油墨印刷的,它的厚度一般为大约 $14\mu\text{m}$ ($0.00055''$),通常包括电化学活性炭。导电油墨的成分可以是碳和银的混合物,选择它是为了在电极和仪表之间提供低导电电阻,所述仪表通过与传感器的鱼尾端 26 的导电图案接触形成工作连接。反电极可以由银/氯化银组成,不过,优选使用碳。为了增强仪表读数的可再现性,电介质图案隔离了电极和液体试样,靠近电极图案 24 中央的部位除外。参见图 2,在这种类型的电化学测定中,特定部位是重要的,因为测量的电流不仅取决于分析物浓度和反应层 22 的面积,而且还取决于工作电极 16a 接触含有分析物的试样的面积。

[0058] 典型的电介质层 20 包括 UV-固化的丙烯酸酯改性的单体,低聚体或聚合物,并且厚度为大约 $10\mu\text{m}$ ($0.0004''$)。所述电介质层还可以是水可固化的或热可固化的。盖板或盖子 28 适合与所述底板配合,以便形成容纳液体试样的空间,其中,安装有反电极和工作电极。盖子 28 提供了凹形空间 30,并且通常是通过将可变形材料的扁平片材轧花形成的。在盖子 28 上穿孔,以便提供排气孔 32,并且在密封作业中与底板 12 结合。可以通过超声波焊接将所述盖子和底板密封在一起,其中,首先底板 12 和盖子 28 对齐,然后在震动热密封部件或凹模和固定颚板之间将它们压在一起。仅与所述盖子的扁平的,非凸起的区域接触。来自晶体或其他传感器的超声波能量是以热量形式在聚合物结合部散失的,以便将热塑性材料结合在一起。所述凸起的盖子和底板还可以通过使用盖子下面的黏性材料结合。盖子和底板结合的方法更详细地披露于美国专利号 5,798,031 中。

[0059] 用于绝缘底板 12 的合适的材料包括聚碳酸酯,聚对苯二甲酸乙二醇酯,尺寸稳定的乙烯基和丙烯酸聚合物,和共混聚合物如聚碳酸酯/聚对苯二甲酸乙二醇酯,和金属箔结构(例如,尼龙/铝/聚氯乙烯层压制品)。所述盖子通常是用可变形的聚合物片材制成的,如聚碳酸酯,或用可轧花等级的聚对苯二甲酸乙二醇酯,甘油改性的聚对苯二甲酸乙二

醇酯,或金属箔组合物制成(例如,铝箔结构)。

[0060] 可以将其他电化学传感器设计用在本发明中。可用于测量葡萄糖浓度的电化学传感器是用于Bayer Healthcare's Ascensia™ **DEX®** 和 **ELITE®** 系统上的传感器。有关所述电化学传感器的更多细节可以参见美国专利号 5,120,420 和美国专利号 5,320,732。其他电化学传感器可以从Matsushita Electric工业公司购买。可用于测量电流的监测系统上的电化学传感器的其他例子参见美国专利号 5,429,735。

[0061] 电化学传感器可以位于装有多个传感器或测试元件的血液葡萄糖传感器分配仪器中。装在传感器分配仪器中的传感器包的一个例子披露于美国专利号 5,660,791 中。

[0062] 测量全血中的葡萄糖

[0063] 在用于测量全血葡萄糖含量的典型生物传感器上,用一层试剂通过共同印刷或共同沉积对工作电极和反电极进行包衣。试剂层通常包括某些聚合物和反应成分,即能氧化血样中的葡萄糖和介体的酶,即,氧化还原化合物,它能再氧化业已通过氧化葡萄糖还原了的酶。还原的介体将来自葡萄糖氧化的酶促反应的电子携带到工作电极,并且在电极表面上再氧化。两个电极之间的电压差,导致了介体将电子输送到工作电极,产生与样品中的葡萄糖的数量成比例的可测量的电流。所述生物传感器还包括多个试剂层,或可以在每一个电极,工作电极和反电极上包括不同的单个或多个试剂层。

[0064] 正如前面所披露的,测量电流的传感器在电极上施加固定电位,并且用预定的时间测量所产生的电流,所述时间可能相当短,例如,5-10 秒,以便校正可能因为介体的提前还原而造成的偏压,在优选系统中,用中间通过休止周期隔开的两段时间施加电位。在图 3A 中示出了第一或“燃烧时间”的电位与时间的典型曲线图。图 4 表示所产生的电流-时间的典型的曲线图。当所述样品再水合所述试剂层时,电流增加到峰值,使得氧化和还原反应能够发生,然后随着扩散的开始降低到对照水平。在这一短暂时间之后,取消所施加的电位或至少在休止周期减弱,同时,葡萄糖氧化和介体还原继续进行。然后,用第二段时间再次施加电位,并且在“读取”时间(例如,10 秒)测量电流。由于还原的介体是因为酶的伴随氧化作用而产生的,所产生的电流最初很高,不过,随后迅速下降,并且达到稳态扩散-控制状态。在短的“读取”时间结束时记录的电流被用于测定血样的葡萄糖含量,通过以前获得的在读取时间结束时的电流和具有已知浓度的试样中所包含的葡萄糖之间的相关性进行测量。

[0065] 对照溶液

[0066] 正如前面讨论过的,业已采取了各种措施,以便确保对照溶液能提供精确的读数,并且可以区分生物样品。本发明采用了可氧化的物质(即,内部参考),它只能在比用于葡萄糖(或其他分析物)测量高的电压下可以氧化。这意味着,在足以完全氧化葡萄糖-相关的介体,但不足以氧化内部参考化合物的低电位下,只能测量到葡萄糖。不过,当所述电位高到足以氧化所添加的内部参考化合物时,葡萄糖和内部参考化合物都会被氧化。尽管葡萄糖是在较高电位下氧化的,在较低电压下进行的测量已经是扩散限制性的,并且不取决于由所述酶氧化的葡萄糖的总量。因此,可以将所述内部参考物质添加到对照溶液中,并且用它鉴定作为对照而不是生物样品的溶液。

[0067] 在高电压和低电压下测量的电流之间的差可以进行比较,以便表明对照溶液的内部参考特征的存在。电流分量之后的差异性指数(DI)使葡萄糖和内部参考化合物相关:

[0068] $DI = i_{\text{高电压}} / i_{\text{低电压}} = (i_{\text{内部参考}} + i_{\text{葡萄糖}}) / i_{\text{葡萄糖}} = 1 + i_{\text{内部参考}} / i_{\text{葡萄糖}}$

[0069] 其中, $i_{\text{高电压}}$ 是在较高电压下测量的电流, $i_{\text{低电压}}$ 是在较低电压测量的电流。

[0070] 由此可见, 如果不存在内部参考 (如在血样中), $i_{\text{内部参考}}$ 应当为零, 而 $i_{\text{高电压}}$ 应当大体上与 $i_{\text{低电压}}$ 相等。因此, DI 值将接近 1。当存在内部参考时, DI 的值应当大于 1, 这取决于相对葡萄糖的数量的参考化合物的数量。如果添加到对照溶液中的内部参考的数量提供了类似于氧化葡萄糖 - 相关介质所产生的电流, 所述 DI 值可能大约为 2。内部参考应当包括在适用相当于高葡萄糖浓度的对照溶液的量内。通常使用相当于低, 正常, 和高葡萄糖浓度的若干种对照溶液, 以便测试葡萄糖仪。例如, 如果选择内部参考的数量, 以便使所述对照溶液中的最高葡萄糖浓度的 DI 值为 1.75 或以上, 来自内部参考的电流与最低葡萄糖对照溶液中的葡萄糖的电流相比较。这样, 相同数量的内部参考用于具有低葡萄糖浓度的对照溶液甚至能提供更大的 DI 值。所述高 DI 值能在存在对照溶液, 而不是生物样品, 如全血中提供更高的可信度。很明显, 诸如 DI 值的数量指标相对更定性的方法具有优点, 正如在其他专利中所指出的, 所述定性方法取决于燃烧或读取时间中的电流 - 时间曲线的形状。添加在较高电压下氧化的内部参考, 提供了不取决于酶促反应和对照溶液的组成的结果。

[0071] 在一种实施方案中, 添加到对照溶液中的内部参考化合物的数量与存在的葡萄糖的数量相关。就是说, 所述对照溶液中的内部参考的数量与葡萄糖浓度成比例, 以便维持大体上稳定的 DI 值。一种方法是使用足够的内部参考以便提供大约 1.5 或以上的 DI, 此时使用的最大数量的葡萄糖为大约 300mg/dL, 然后, 减少内部参考的数量, 以便含有较低浓度的葡萄糖的对照溶液将 DI 值保持为 1.5 或以上。

[0072] 将内部参考添加到对照溶液中, 使它能够方便地区分对照溶液和生物样品, 并且提供改善了的分析精度。内部参考化合物可以是能够在理想电位下电化学氧化的任何化合物。重要的是, 要了解并非所有可化学氧化的化合物都是能够在合适的电位或任何可氧化的电位下电化学氧化的。可化学氧化的物质 (例如, 存在于均匀溶液中) 可以不是在合适电位下可电化学氧化的, 因为在所述电极上的电子转移动力学屏障必须克服。因此, 还原剂的化学性质在所述电极上可能不是可电化学氧化的。根据试剂传感器系统中介体的氧化还原电位, 可能需要具有不同氧化还原电位的内部参考化合物。例如, 如果所述试剂系统中的介体是钌六胺 ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$), 可以将配位化合物亚铁氰化钾或有机金属化合物二茂铁及其衍生物用作所述对照溶液中的内部参考。另一方面, 如果所述介体是所述试剂系统中的铁氰化物, 就可以将诸如 Bis-Tris 或 4-氨基苄腈的其他化合物用作所述对照溶液中的内部参考。在任何情况下, 所述内部参考化合物将具有至少比所述介体的氧化还原电位高 100mV 的氧化还原电位。

[0073] 内部参考化合物的例子包括, 但不局限于, 有机胺, 如 3-(N-吗啉代) 丙烷磺酸 [MOPS], N-(2-羟基乙基) 哌嗪-N'-(2-乙烷磺酸) [HEPES], 2-[-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基氨基] 乙烷磺酸 [TES], 2-吗啉代乙烷磺酸 [MES], 双(2-羟乙基) 氨基-三(羟甲基) 甲烷 [Bis-Tris], 4-氨基苄腈, 4-氨基苯甲酸, 和 4-碘代苯胺。在下面的实施例中, 证实了 Bis-Tris 和若干种其他化合物是可用于含有葡萄糖的对照溶液的有用的内部参考。

[0074] 尽管可以将 Bis-Tris 用作内部参考, 还可以将它用作缓冲液。所述对照溶液的 pH 是葡萄糖被酶, 如葡萄糖氧化酶氧化的反应中的重要因素。为了测量葡萄糖, 在使用葡萄糖氧化

酶时,优选大约 5-7 的 pH,在使用葡糖脱氢酶时,优选使用大约 6-8 的 pH。通常提供缓冲液,以便确保葡萄糖氧化以预期的速度进行。本发明的优点是,参考化合物和缓冲液可以使分开的,可各自具有不同的功能,因此,能够分别优化每一种功能(缓冲和内部参考)。所述缓冲液可以从与酶促试剂相容的物质中选择。其例子包括,但不局限于柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液。

[0075] 用于模拟血液流体特性的聚合材料可以包括聚氧化乙烯,聚羟乙基甲基丙烯酸酯,聚乙烯基吡咯烷酮(PVP),黄原胶,其用量为大约 12-20wt%。存在于对照溶液中的葡萄糖的数量通常等于大约 30-400mg/dL,该范围跨越了血样的预期的葡萄糖含量。

[0076] 其他添加剂可以包括盐,缓冲剂,染料,抗微生物制剂,聚合物,增稠剂和表面活性剂。

[0077] 对照溶液的工作模式

[0078] 显而易见的是,导入可在比用于氧化葡萄糖-相关介体更高的电压下氧化的内部参考材料,使得有必要在测量过程中的某些时间点施加较高电压。在使用上述两段时间时,即“燃烧”和“读取”时,在燃烧和读取时间内的电位步骤的各种组合可用于提供识别对照溶液的 DI 值和可以测定对照溶液的葡萄糖含量的电流。在最简单的方法中,在燃烧时间内施加高电压,而在读取时间内施加低电压。因此,所述差异性指数为:

$$[0079] \quad DI = i_{\text{燃烧}} / i_{\text{读取}}$$

[0080] 当存在内部参考时,在燃烧时间内测量的电流包括氧化内部参考所产生的电流加上氧化葡萄糖-相关介体所产生的电流。在读取时间内测量的电流只是通过氧化葡萄糖所产生的,因为所述电压太低,以至不能氧化内部参考。因此,燃烧电流与读取电流的比例体现了内部参考电流与葡萄糖测量电流的值。

[0081] 另外,在燃烧时间内可以施加高电压和低电压,以便检测内部参考的存在,而在读取时间内只使用低电压。这种电位步骤的组合仍然能维持采用来自高电压的电流与来自低电压的电流比例的工作原理。当发生从低电压到高电压或从高电压到低电压的变化时,可以观察到电流的明显变化。所述“低”电压不一定与用于测量葡萄糖的读取时间的电压相同。比较电压只需要比氧化内部参考的电压低。因为所述燃烧时间相当于样品水合所述试剂的时间,所述电流可以在燃烧期间改变,正如在图 4 所示一般性示意图中所表明。因此,在高电压和低电压之间进行一次以上变换是有利的,以便确保 DI 值不受在燃烧时间内试剂可利用性变化的影响。

[0082] 在另一种方法中,在一部分读取时间内使用高电压(即,能氧化内部参考的电压)。因此,所述 DI 可以通过仅测量在读取时间内的高和低电流而在读取时间内确定。该方法的优点是,可以避免在燃烧时间内出现的任何试剂可利用性的变化。同样,使用低电压和高电压之间的一次以上的转换可能是有利的。

[0083] 在本发明的另一种实施方案中,高电压和低电压之间的电位的经常性循环被用于影响在读取时间内电流-时间的形状,整体上参见图 4。所述曲线通常表现出由位于和接近电极表面的还原介体的消耗而导致的电流的迅速衰减。因此,总的葡萄糖含量是通过与扩散-限制电流的相关,而不是测量所述对照溶液中的总葡萄糖测定的。显而易见的是,如果要获得一致性的和精确的测量的话,选择时间作为葡萄糖参数是重要的。

[0084] 一般,本发明的对照溶液包括能在比氧化葡萄糖所需电位更高的电位下电化学氧

化的化合物。因为葡萄糖相关介体（例如，铁氰化钾）的氧化需要 200mV 的电位，此相对于铁氰化物的反电极的电位，所述内部参考化合物的氧化电位相对相同的反电极应当至少为 400mV。例如，使用 Bis-Tris 作为参考，所述氧化电位为大约 600mV，如果反电极是通过还原铁氰化物支持的话。其他例子包括 4-氨基苄腈，4-氨基苯甲酸，4-碘代苯胺，它们还可以在 +400 至 +600mV 的电位范围内氧化，该电位是相对通过还原铁氰化物支持的反电极的电位而言的。

[0085] 检查将内部参考添加到对照溶液中的作用的一种方法是使用循环伏安法。除了施加固定电位之外，使用了可变电压，相对所述反电极从负电压向正电压扫描。以下实施例说明了内部参考的概念和使用，以及它用于对照溶液的自动检测的方法。

[0086] 例 1

[0087] 含有 50mM NaCl 的水溶液与用作内部参考的含有 50mM NaCl 和 50mM Bis-Tris 的另一种溶液进行比较。试验包括相同的组合物，不过包括 350mg/dL 葡萄糖的第二组样品。其中不包含酶或介体，以便不能发生葡萄糖的氧化。图 5 表示当电位差以 25mV/秒的速度在 -400mV 和 +1200mV 之间循环，以及银 / 氯化银参考电极使用 CH 仪器公司的电化学工作台时的电流与电位。可以看出的是，在电位差达到 +600mV 之前电极之间的电流没有开始流动。对于不含 Bis-Tris 的样品来说，在整个电位范围内的氧化电流大体上为零。另一方面，在使用 Bis-Tris 时，在 +800mV 下具有明显的电流，从大约 +600mV 处开始。可以得出的结论是，当不存在酶和介体时，Bis-Tris 的氧化与有和没有葡萄糖时相同。通过比较图 5 中有和没有 Bis-Tris 的伏安图之间在 +800mV 下的伏安电流，可以明确区分含有 50mM Bis-Tris 的溶液。

[0088] 例 2

[0089] 在本实施例中，重复了例 1 的试验，参见图 6，所不同的是，用具有一层铁氰化钾的碳的反电极，而不是在例 1 所使用的 Ag/AgCl₂ 反电极。在不包含酶和介体时，Bis-Tris 的氧化不受葡萄糖存在与否的影响。不过，在 +400mV 之后氧化电流开始上升，并且在 +600mV 时达到显著水平。因此，与图 5 中的伏安图相比，在没有内部参考的情况下，背景电流大体上保持为零。唯一的差别是，氧化电流在较低电位下升高。这种差别完全是由于不同的反电极造成的。显而易见的是，在低于 +400mV 时没有氧化电流。因此，可以看出 Bis-Tris 能明确区分葡萄糖氧化，葡萄糖是在略高于零电位的电位下开始氧化的，正如在下面的实施例中所示的。

[0090] 例 3

[0091] 在图 5 和 6 中示出的例 1 和 2 表示在有或没有葡萄糖的溶液中存在内部参考 (Bis-Tris)，但是缺少检测葡萄糖存在所需要的葡萄糖氧化酶和介体。在图 7 所示例子中，使用了例 1 和 2 的溶液，不过添加了葡萄糖氧化酶和铁氰化钾（介体），这样，当存在葡萄糖时，它会被氧化，就像在电化学葡萄糖传感器中那样。比较图 7 和图 6 可以看出，在循环伏安图中出现的伏安特征（电流与电位形式）明显不同。在零伏电位周围出现的氧化电流峰值表明葡萄糖被氧化。当不存在葡萄糖时，在所述电位升高到 0mV 以上时才因为某些背景活性产生很少的电流。当存在 350mg/dL 的葡萄糖时，产生了大量的电流，所述特征性峰值高于或低于零伏。在大约 +400mV 的电位下达到了稳态状态，可将它用于与所存在的葡萄糖的数量相关。在 0 和 350mg/dL 葡萄糖含量下，400mV 之前的氧化电流与有否添加内部参考化

合物的电流相同。当所述电位达到 +600mV 时,用含有 Bis-Tris 的溶液观察到的电流比没有 Bis-Tris 的溶液观察到的电流高,无论葡萄糖浓度为 0 或 350mg/dL。因此,可以鉴定含有内部参考化合物的对照溶液。

[0092] 例 4

[0093] 在例 1-3 将 Bis-Tris 用作参考化合物。在本实施例中,示出了若干种其他内部参考化合物。图 8 表示三种其他内部参考化合物,4-氨基苯甲酸,4-氨基苄腈和 4-碘代苯胺的循环伏安图。这三个循环伏安图是从 Ascensia **AUTODISC®** (DEX) 的商业化葡萄糖传感器条获得的。这三种内部参考化合物分别添加到对照 - 等同溶液中,它含有 20-24% PVP 聚合物,在柠檬酸缓冲液中的 pH 为 5-5.5,但是不含葡萄糖。4-氨基苯甲酸,4-氨基苄腈,和 4-碘代苯胺的浓度分别为 50mM。从图 8 中可以看出,尽管在零伏电位之后的第一个氧化峰大体上相同,但在 +0.3 伏之后的电流依赖于所添加的内部参考化合物而不同。在图 8 中,将 0.1V-0.3V 的电位视为低电位,它被用于仅仅通过氧化介体测量葡萄糖。始于 +0.4 伏到 +0.8 伏的电位被视为高电位,它负责氧化介体和内部参考。在 +0.3 至 +0.8 伏的电位区间,当存在内部参考时的所有电流比在对照溶液中不添加内部参考时的电流高。

[0094] 例 5

[0095] 存在多种组合高电位和低电位以氧化并且测量内部参考,以便检测对照溶液的存在同时测量葡萄糖浓度的方法。图 9A-E 表示用于合并高电位和低电位的某些电位顺序(波形)。在每一种场合下,“燃烧”时间之后是等待时间,然后是“读取”时间,正如前面业已披露的。图 9A 表示在燃烧时间具有高电压,在读取时间具有低电压的电位顺序,它相当于简单的燃烧 - 等待 - 读取电位顺序。图 9B 在燃烧时间的前半程具有低电压,随后在相同的燃烧时间内具有高电压的电位顺序。在图 9C 中,电位顺序是在燃烧时间的前半程具有高电压,随后在相同的燃烧时间内具有低电压。图 9D 表示在读取时间的前半程具有高电压,之后在相同的读取时间内具有低电压的电位顺序。在图 9E 中示出了类似的电位顺序,在读取时间的前半程具有低电压,在相同的读取时间内具有高电压。

[0096] 例 6

[0097] 图 10a-b 表示增加内部参考,在这里是 Bis-Tris 的浓度的作用。在图 10a 中,含有 50mM NaCl 的对照 - 等同的溶液(不含葡萄糖)表现出将内部参考的浓度从 0 增加到 50mM 以及增加到 100mM 的 Bis-Tris(含有 100mM NaCl)的作用。Bis-Tris 的存在是明确可见的,并且增加它的浓度进一步加大了 +600mV 下的电流。在图 10b 中,在具有相同配方的所述对照溶液中存在 350mg/dL 的葡萄糖,正如由 0mV 以上的明显的峰所表明的。由于葡萄糖电流在大约 +600mV 的电压下仍然可见,检测 Bis-Tris 存在所需要的数量比不使用葡萄糖时大。因此,内部参考的浓度应当是这样的,当对照溶液含有高葡萄糖浓度时可以检测它的明确存在。这样,当对照溶液含有较低葡萄糖浓度时,内部参考的存在将更为明显。

[0098] 例 7

[0099] 对本实施例来说,进行了比较添加和没有添加 Bis-Tris 作为内部参考的对照溶液和全血样品的试验。在所有三种情况下,样品都是 Ascensia **AUTODISC®** 商业测试条。测试顺序为施加 +400mV 的电位 4 秒,然后施加 +600mV 的电位 4 秒,在开路状态(不对电极施加电位)静止 5 秒,然后施加 +200mV 的电位 5 秒。在图 11 中示出了三种类型的样品电

流曲线。计算两种比较的差异性指数 (DI)。情形 I-a: 在 8 秒燃耗时间的测量的电流与在 4 秒燃耗时间的电流进行比较。情形 I-b: 在 8 秒燃耗时间的测量的电流与在 2 秒读取时间的电流进行比较。没有向 100mM NaCl 和 100mM Bis-Tris 试液或向全血样品中添加葡萄糖。情形 I-a 等同于图 9B 的顺序, 而情形 I-b 等同于图 9A。这些试验的 DI 值和 DI 值的相对变化如表 2 所示。在两种情况下, 含有内部参考 Bis-Tris 的对照溶液的 DI 值为不含内部参考的对照溶液和全血样品的 DI 值的 500%。以上结果表明, 含有内部参考的对照溶液与缺少参考化合物的对照溶液或全血相比能够方便地检测。

[0100] 表 2 在 0 葡萄糖含量下的 DI 值和 DI 值的 % - 变化

[0101]

	<u>试验溶液</u>		
	<u>有 Bis-Tris</u>	<u>无 Bis-Tris</u>	<u>全血</u>
B8/B4, DI (情形 I-a)	5.5	0.8	0.8
标准误差	0.6	0.1	0.08
%C. V.	11.4	10.1	10.0
相对内部参考的变化%	-	563	603
B8/R2, DI (情形 I-b)	10.7	1.7	1.8
标准误差	1.5	0.23	0.13
%C. V.	14.1	13.6	7.5
相对内部参考的变化%	-	522	503

[0102] 例 8

[0103] 重复例 7 的试验, 不过, 对照溶液中包含 350mg/dL 葡萄糖, 而全血样品含有 400mg/dL 葡萄糖。将相同的电位顺序用于该试验。在图 12 中示出了高葡萄糖浓度的三种样品的典型的电流曲线。在表 3 中报导了 DI 值和 DI 值的相对变化。对于情形 s II-a 和 II-b 来说, 表 2 中的 DI 值与例 7 相同, 含有内部参考和不含内部参考和全血样品的 DI 值的相对变化也相同。对于 350mg/dL 的高葡萄糖浓度来说, 含有内部参考的对照溶液的 DI 值比全血样品高 100%。这种 DI 值的差别确保了含有内部参考的对照溶液能够与缺少内部参考的对照溶液和 WB 样品区分。

[0104] 表 3 在高葡萄糖下的 DI 值和 DI 值 % - 变化

[0105]

对照溶液			
	有 Bis-Tris	无 Bis-Tris	全血
B8/B4, DI (情形 II-a)	2.3	1.2	1.0
标准误差	0.26	0.13	0.07
%C.V.	11.6	11.0	7.0
相对内部参考的变化%	—	96	127
B8/R2, DI (情形 II-b)	1.7	0.9	0.9
标准误差	0.09	0.03	0.03
%C.V.	5.5	3.9	3.1
相对内部参考的变化%	—	95	78

[0106] 对照溶液试验方法

[0107] 在损耗和读取时间内产生的电流的比较可以通过多种方式完成。在例 5 和图 9 中示出了某些试验顺序。在最简单的替代方案中,一种测量是在氧化内部参考化合物所需电位下进行的,另一种测量是在用于氧化分析物的较低电位下进行的。然后计算差异性指数,并且根据上述结果,所述电化学仪报导被测试的是对照溶液还是生物样品。优选所述第一次测量是在损耗时间的后半部分进行,而第二次测量是在读取时间进行,不过,两次测量都可以在损耗时间内或在读取时间内进行。获得电流读数所需要的时间长度可以变化,例如,为大约 1-10 秒。不过,只要电流读取时间长到足以正确体现内部参考化合物或葡萄糖的存在,任何时间长度都可以使用。

[0108] 对于所述结果的额外的可靠性来说,可以将一段以上时间用于高电位和低电位。就是说,用于氧化内部参考物的电位,例如,对于 Bis-Tris 来说为 +600mV,以及用于氧化葡萄糖的电位,例如可以将 +200-400mV 的电位可以在损耗时间或读取时间内施加一次以上。

[0109] 还可以施加高于氧化分析物或内部参考所需电位的电位。就说是,例如,如果葡萄糖介体的氧化电位是 +200mV,就可以使用 +200mV 和以上的电位,其极限是内部参考被氧化的电位。

[0110] 在一种实施方案中,将所施加的电位的多种变化用于提供在高电位和低电位下测量的电流差的更一致性的指示。再者,使所述电位循环的优点是使电流-时间曲线更平滑,并且改善精确性。例如,所施加的电位可以在损耗和 / 或读取时间内每 1 秒钟在高和低的值之间循环。

[0111] 替代方法 A

[0112] 在通过测量所述对照溶液中的和所述生物样品中的分析物的数量的电化学传感器工作期间区分对照溶液和生物样品的方法,该方法包括以下步骤:

[0113] (a) 将内部参考化合物添加到所述对照溶液中,所述化合物适合在比测量所述分析物的氧化所需电位更高的电位下电化学氧化,所述内部参考化合物是以相对所述对照溶液中的预定数量的分析物的量添加的,足以指示所述内部参考化合物在所述对照溶液中的存在;

[0114] (b) 将含有所述内部参考化合物和所述预定数量的分析物的所述对照溶液导入电化学传感器,所述传感器具有工作和参考电极,以及含有用于氧化所述分析物的试剂的反

应层；

[0115] (c) 至少一次给所述电化学传感器的所述电极施加电位，足以氧化所述内部参考化合物和所述分析物，并且测量所得到的电流；

[0116] (d) 至少一次给所述电化学传感器施加比 (c) 的电位低的电位，所述电位足以测量所述分析物的氧化，但不足以氧化所述内部参考化合物，并且测量所得到的电流；

[0117] (e) 计算差异性指数 (DI)，其定义为 $DI = i_{\text{高电压}} / i_{\text{低电压}}$

[0118] 其中： $i_{\text{高电压}}$ 是在步骤 (c) 中测量的电流

[0119] $i_{\text{低电压}}$ 是在步骤 (d) 中测量的电流

[0120] (f) 当步骤 (e) 的差异性指数大到足以超过 1 时，确定存在对照溶液，以便区分内部参考化合物和所述预定数量的分析物；和

[0121] (g) 当步骤 (e) 的差异性指数为大约 1 时，确定存在生物样品。

[0122] 替代方法 B

[0123] 替代方法 A 的方法，其中，在步骤 (f) 中测定的所述差异性指数为 1.5 或以上。

[0124] 替代方法 C

[0125] 替代方法 A 的方法，其中，所述内部参考化合物的添加数量与存在于所述对照溶液中的分析物的数量成比例。

[0126] 替代方法 D

[0127] 替代方法 C 的方法，其中，当用在所述对照溶液中的分析物的数量最大时，所添加的所述内部参考化合物的数量使得差异性指数为 1.5 或以上。

[0128] 替代方法 E

[0129] 替代方法 A 的方法，其中，步骤 (c) 的电位是在步骤 (d) 的电位之前施加的。

[0130] 替代方法 F

[0131] 替代方法 A 的方法，其中，步骤 (d) 的电位是在步骤 (c) 的电位之前施加的。

[0132] 替代方法 G

[0133] 替代方法 A 的方法，其中，步骤 (c) 和 (d) 的电位施加了一次以上。

[0134] 替代方法 H

[0135] 替代方法 A 的方法，其中，所述分析物是通过施加足以氧化所述分析物的第一电位第一预定时间，然后通过施加不足以氧化所述分析物并且低于所述第一电位的第二电位第二预定时间，然后通过施加高于所述第二电位并且足以氧化所述分析物的第三电位第三预定时间测量的。

[0136] 替代方法 I

[0137] 替代方法 H 的方法，其中，步骤 (c) 的电位是在所述第一预定时间内施加的，而步骤 (d) 的电位是在所述第三预定时间内施加的。

[0138] 替代方法 J

[0139] 替代方法 H 的方法，其中，步骤 (c) 的电位和步骤 (d) 的电位是在所述第一预定时间内施加的。

[0140] 替代方法 K

[0141] 替代方法 H 的方法，其中，步骤 (c) 的电位和步骤 (d) 的电位是在所述第三时间内施加的。

[0142] 替代方法 L

[0143] 替代方法 H 的方法, 其中, 步骤 (d) 的电位是在所述第一预定时间内施加的, 而步骤 (c) 的电位是在所述第三时间内施加的。

[0144] 替代方法 M

[0145] 替代方法 H 的方法, 其中, 步骤 (c) 和 (d) 中至少一个的电位施加了一次以上。

[0146] 替代方法 N

[0147] 替代方法 A 的方法, 其中, 所述分析物是葡萄糖, 而所述生物样品是全血。

[0148] 替代方法 O

[0149] 替代方法 A 的方法, 其中, 所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物, 配位化合物, 或有机胺化合物。

[0150] 替代方法 P

[0151] 替代方法 O 的方法, 其中, 所述内部参考化合物是所述有机胺化合物, 所述有机胺化合物是 3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸, N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N¹-(2- 乙烷磺酸), 2-[(2- 羟基 -1,1- 双(羟甲基) 乙氨基) 乙烷磺酸, 2- 吗啉代乙烷磺酸, 和双(2- 羟乙基) 氨基 - 三(羟甲基) 甲烷 [Bis-Tris], 4- 氨基苄腈, 4- 氨基苯甲酸, 或 4- 碘代苯胺。

[0152] 替代方法 Q

[0153] 替代方法 P 的方法, 其中, 所述内部参考化合物是 Bis-Tris。

[0154] 替代方法 R

[0155] 替代方法 O 的方法, 其中, 所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物, 所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。

[0156] 替代方法 S

[0157] 替代方法 O 的方法, 其中, 所述内部参考化合物是所述配位化合物, 所述配位化合物是亚铁氰化钾。

[0158] 替代方法 T

[0159] 替代方法 N 的方法, 其中, 葡萄糖是通过葡糖氧化酶氧化的, 并且, 其中, 所述对照溶液含有能够将 pH 保持为 5-7 之间的缓冲剂。

[0160] 替代方法 U

[0161] 替代方法 N 的方法, 其中, 葡萄糖是通过葡糖脱氢酶氧化的, 并且, 其中, 所述对照溶液含有能够将 pH 保持在 6-8 之间的缓冲剂。

[0162] 替代实施方案 V

[0163] 用于测试电化学系统, 以便测量生物样品中的分析物的数量的对照溶液, 所述对照溶液包括:

[0164] (a) 预定数量的所述分析物; 和

[0165] (b) 预定数量的内部参考化合物, 所述内部参考化合物适合在比氧化所述分析物所需电位更高的电位下氧化, 所述预定数量的内部参考化合物与所述预定数量的分析物成比例, 以便可以检测所述内部参考化合物的存在。

[0166] 替代实施方案 W

[0167] 替代实施方案 V 的对照溶液, 其中, 所述分析物是葡萄糖, 而所述生物样品是全血。

[0168] 替代实施方案 X

[0169] 替代实施方案 W 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺化合物。

[0170] 替代实施方案 Y

[0171] 替代实施方案 X 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述有机胺化合物,所述有机胺化合物是 3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸, N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N^I-(2- 乙烷磺酸), 2-[(2- 羟基 -1, 1- 双(羟甲基) 乙氨基) 乙烷磺酸, 2- 吗啉代乙烷磺酸, 和双(2- 羟乙基) 氨基 - 三(羟甲基) 甲烷 [Bis-Tris], 4- 氨基苄腈, 4- 氨基苯甲酸, 或 4- 碘代苯胺。

[0172] 替代实施方案 Z

[0173] 替代实施方案 Y 的对照溶液,其中,所述内部参考是 Bis-Tris。

[0174] 替代实施方案 AA

[0175] 替代实施方案 X 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物,所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。

[0176] 替代实施方案 BB

[0177] 替代实施方案 X 的对照溶液,其中,所述内部参考化合物是所述配位化合物,所述配位化合物是亚铁氰化钾。

[0178] 替代实施方案 CC

[0179] 替代实施方案 W 的对照溶液,其中,葡萄糖是由葡萄糖氧化酶氧化的,并且添加了缓冲剂,以便将 pH 保持在 5-7 之间。

[0180] 替代实施方案 DD

[0181] 替代实施方案 W 的对照溶液,其中,葡萄糖是由葡萄糖脱氢酶氧化的,并且添加了缓冲剂,以便将 pH 保持在 6-8 之间。

[0182] 替代实施方案 EE

[0183] 添加到用于测试电化学葡萄糖仪的对照溶液中的内部参考化合物,所述内部参考包括可以在比测量葡萄糖氧化所需电位更高的电位下氧化的化合物。

[0184] 替代实施方案 FF

[0185] 替代实施方案 EE 的内部参考,其中,所述内部参考可在比测量葡萄糖氧化所需电位高至少 100mV 的电位下氧化。

[0186] 替代实施方案 GG

[0187] 替代实施方案 EE 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是可氧化的有机金属化合物,配位化合物,或有机胺化合物。

[0188] 替代实施方案 HH

[0189] 替代实施方案 GG 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是 3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸, N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N^I-(2- 乙烷磺酸), 2-[(2- 羟基 -1, 1- 双(羟甲基) 乙氨基) 乙烷磺酸, 2- 吗啉代乙烷磺酸, 和双(2- 羟乙基) 氨基 - 三(羟甲基) 甲烷 [Bis-Tris], 4- 氨基苄腈, 4- 氨基苯甲酸, 和 4- 碘代苯胺。

[0190] 替代实施方案 II

[0191] 替代实施方案 HH 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是 Bis-Tris。

[0192] 替代实施方案 JJ

[0193] 替代实施方案 GG 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是所述可氧化的有机金属化合物,所述可氧化的有机金属化合物是二茂铁或二茂铁衍生物。

[0194] 替代实施方案 KK

[0195] 替代实施方案 GG 的内部参考,其中,所述内部参考化合物是所述配位化合物,所述配位化合物是亚铁氰化钾。

[0196] 尽管本发明可应用于各种改进和替代形式,具体实施方案是以实施例形式在附图中示出并且详细说明的。不过,应当理解的是,并不希望将本发明局限于所披露的特定形式,相反,本发明包括由所附权利要求书所限定的本发明的构思和范围内的所有改进,等同方案和替代方案。

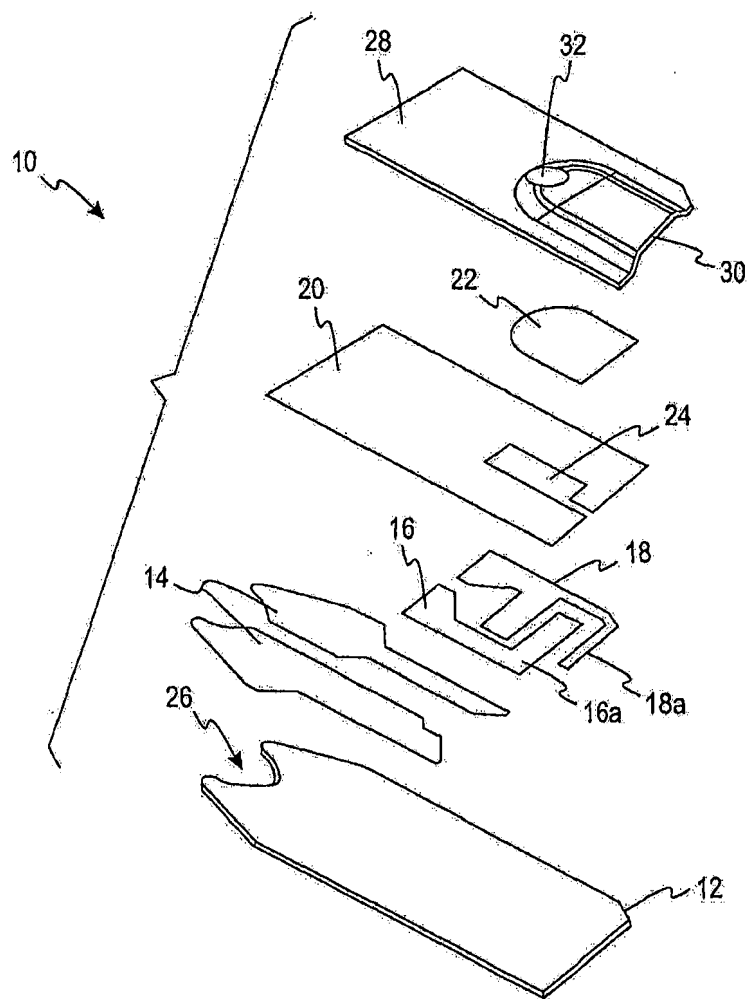


图 1

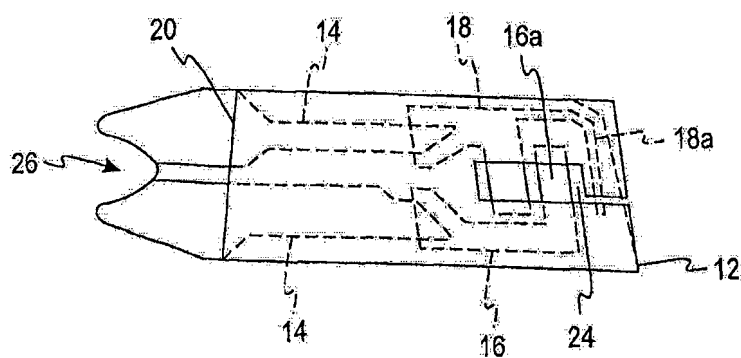


图 2

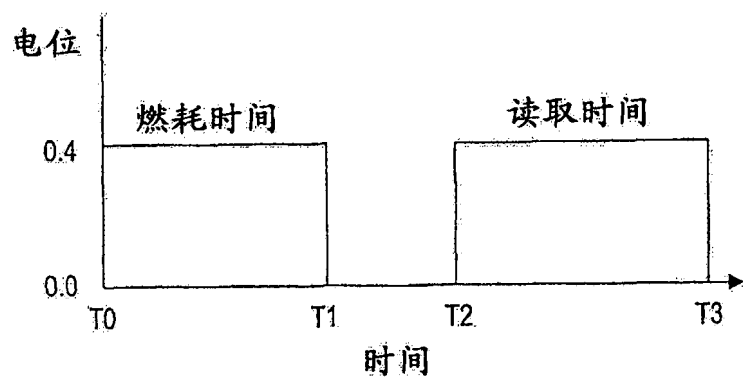


图 3

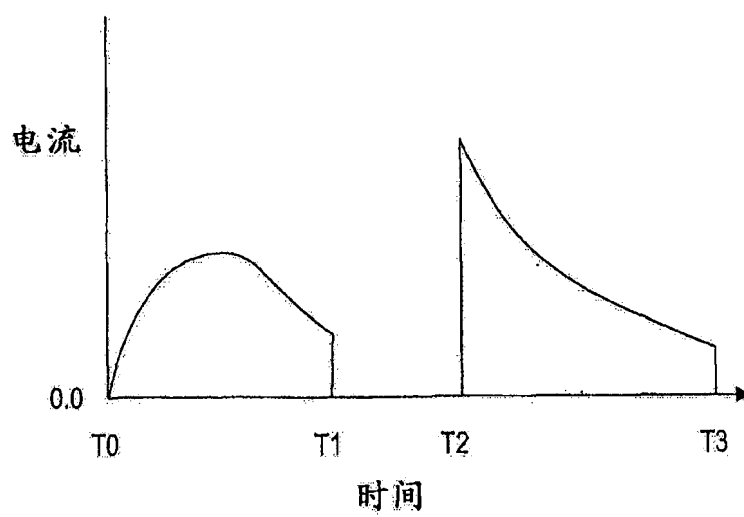


图 4

关于含内部参考化合物和ZP3-1传感器(具有Ag/AgCl反电极/参考电极(无试剂))的对照溶液的循环伏安图

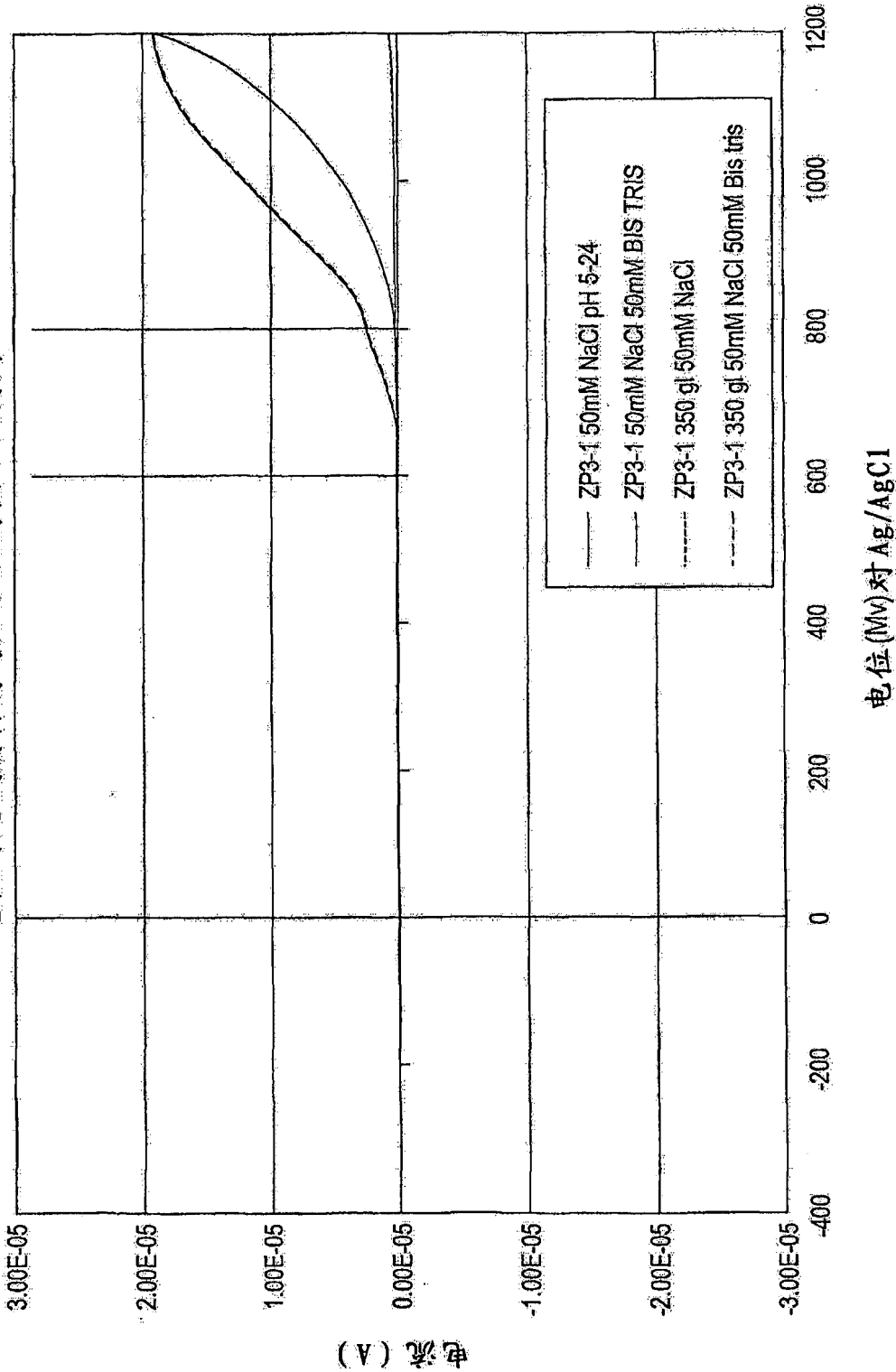


图 5

关于含内部参考化合物和CE1001-1传感器（具有铁氰化物反电极/参考电极（无试剂））的对照溶液的循环伏安图

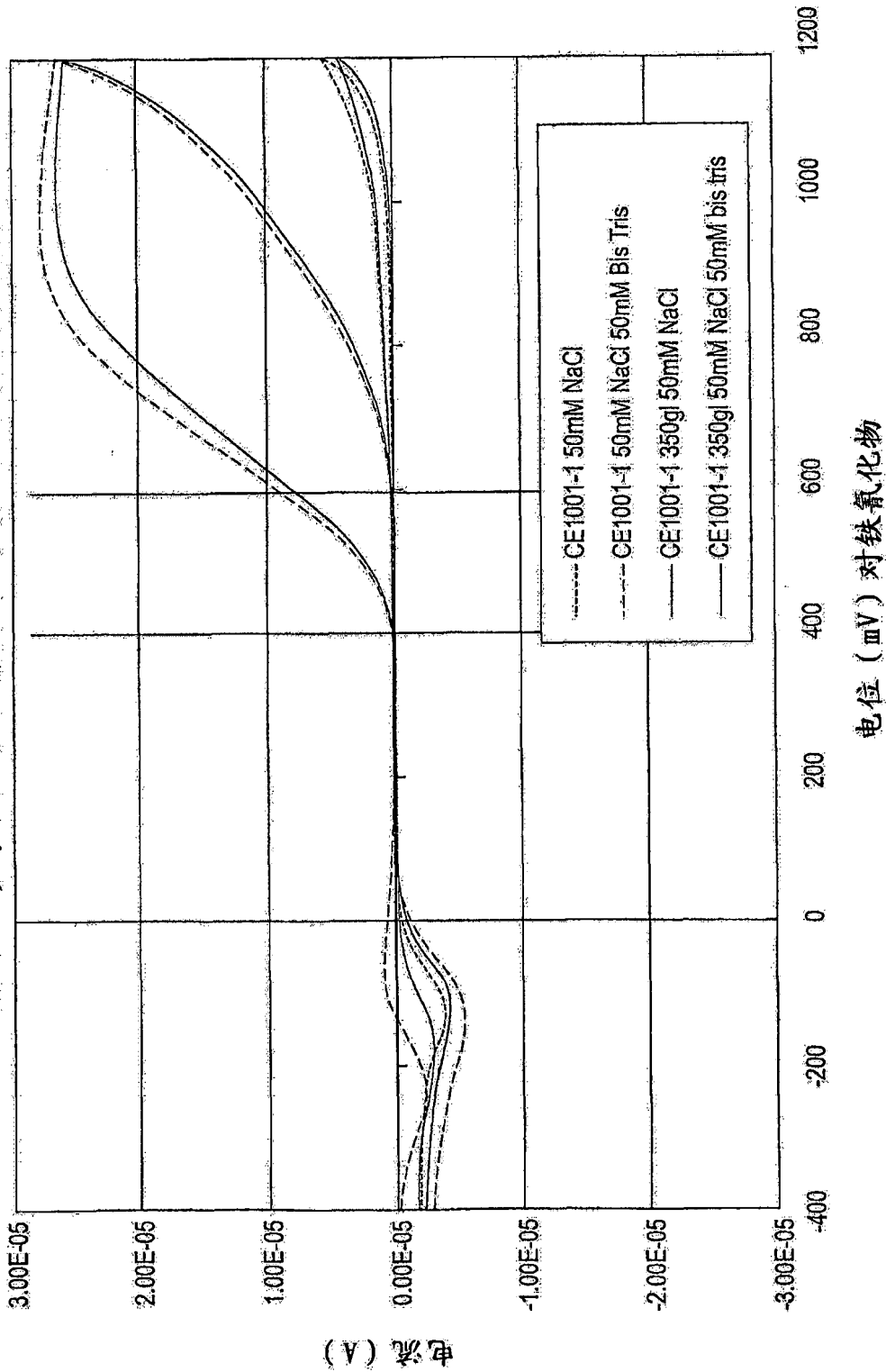


图 6

关于含内部参考和Ascensia Dex传感器
(批号A2444AA) 的对照溶液的循环伏安图

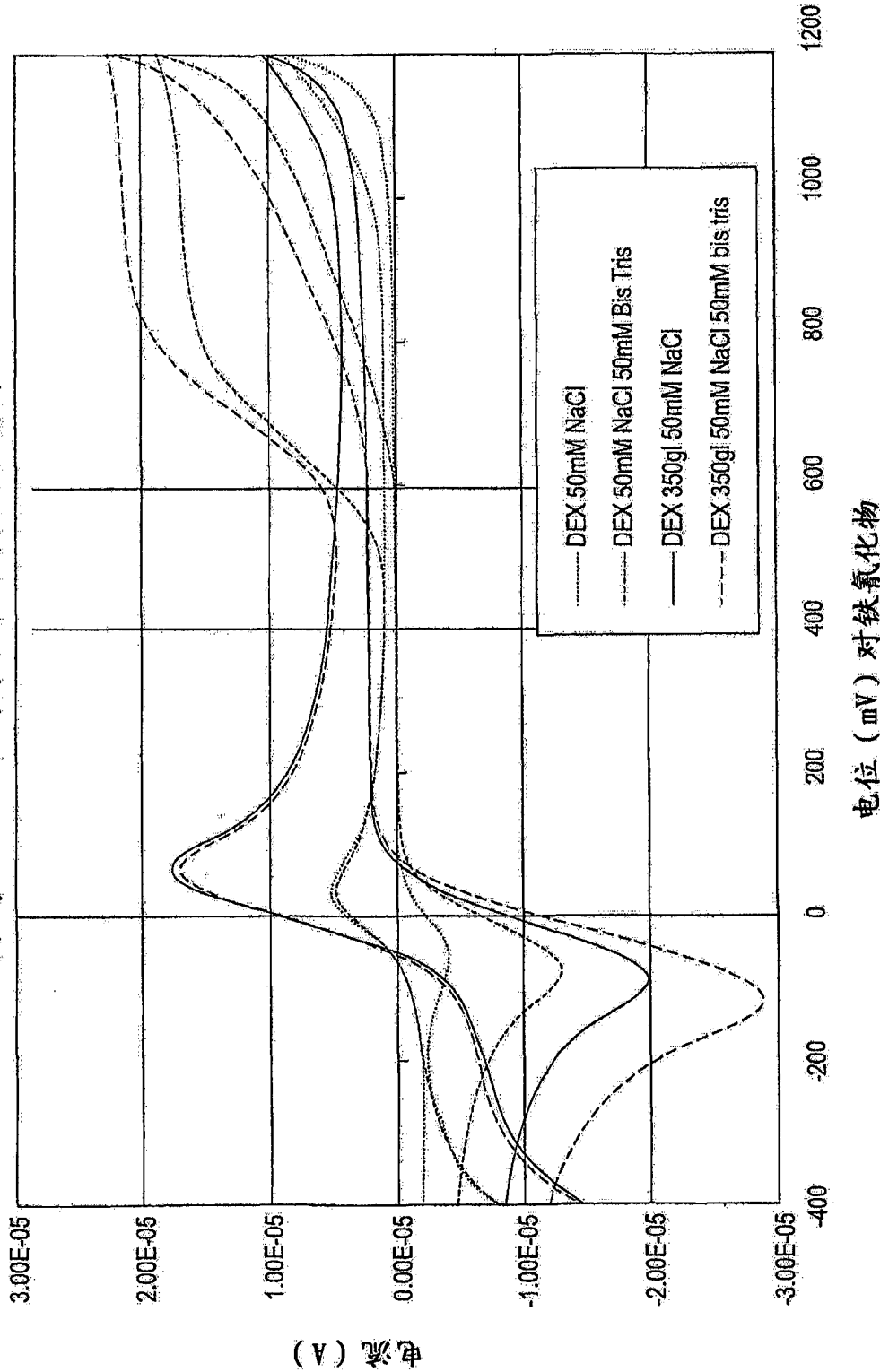


图 7

用于可氧化物质的循环伏安图

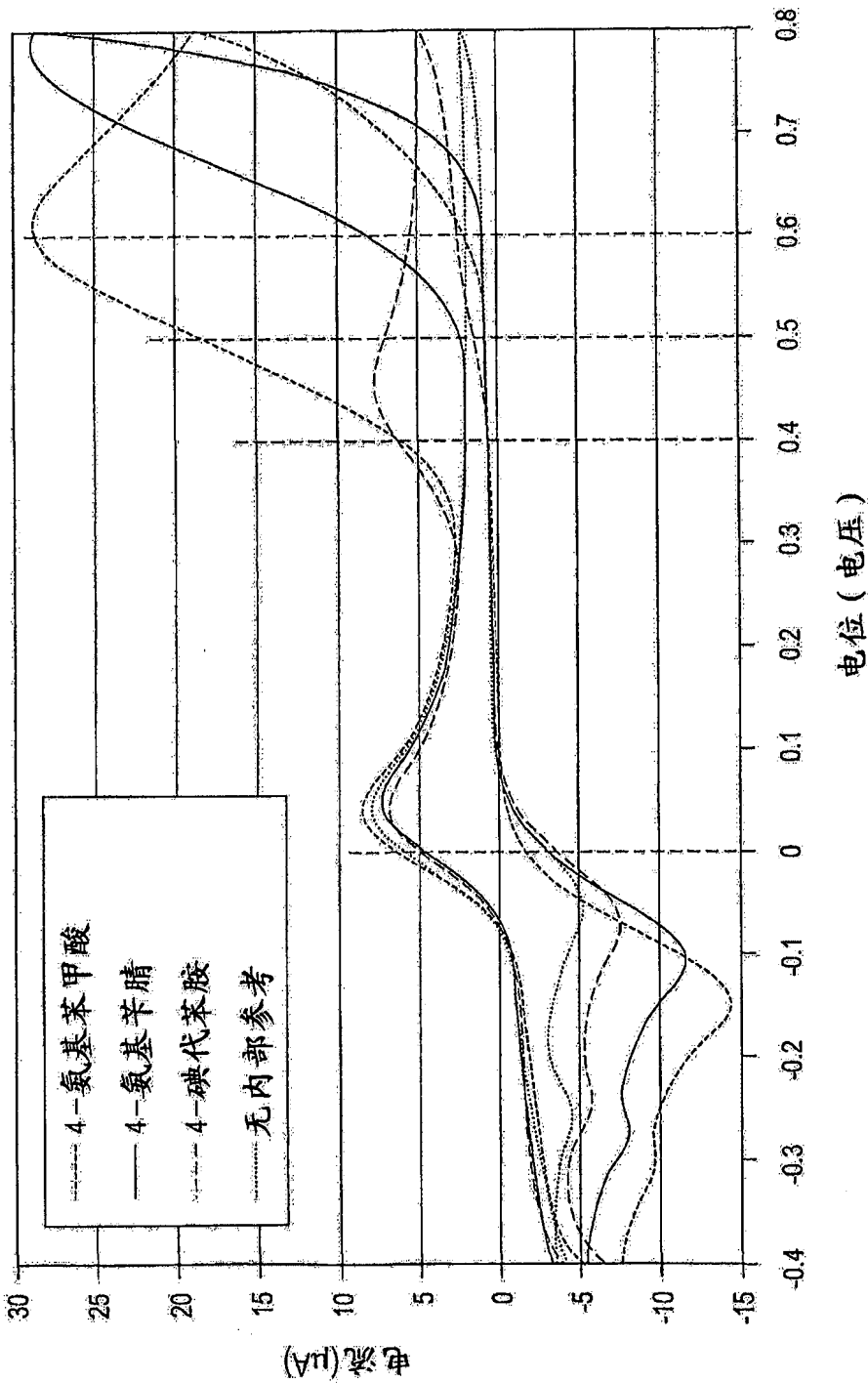


图 8

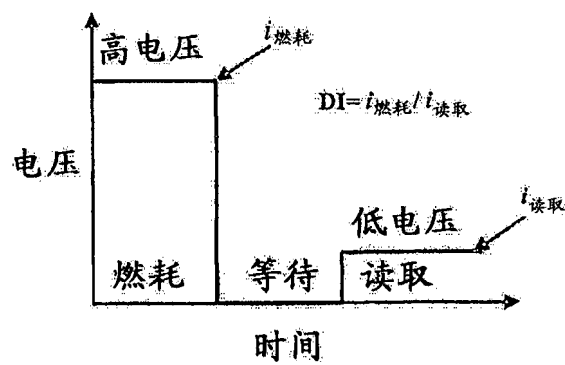


图 9a

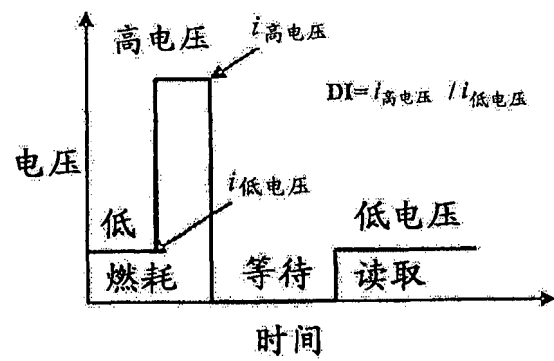


图 9b

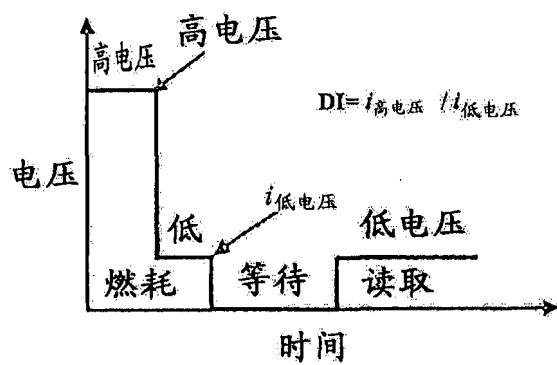


图 9c

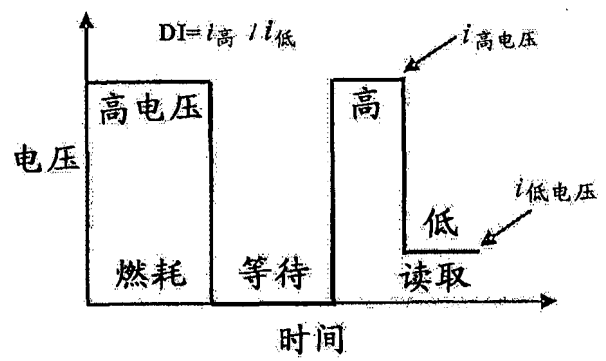


图 9d

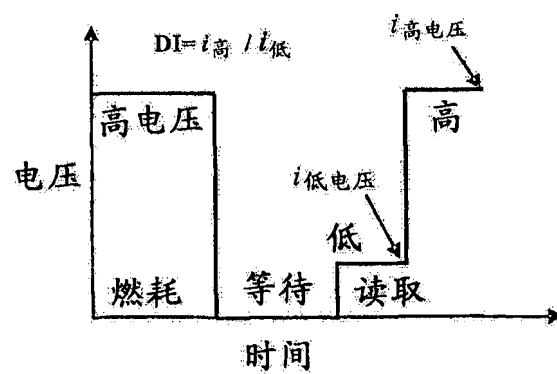


图 9e

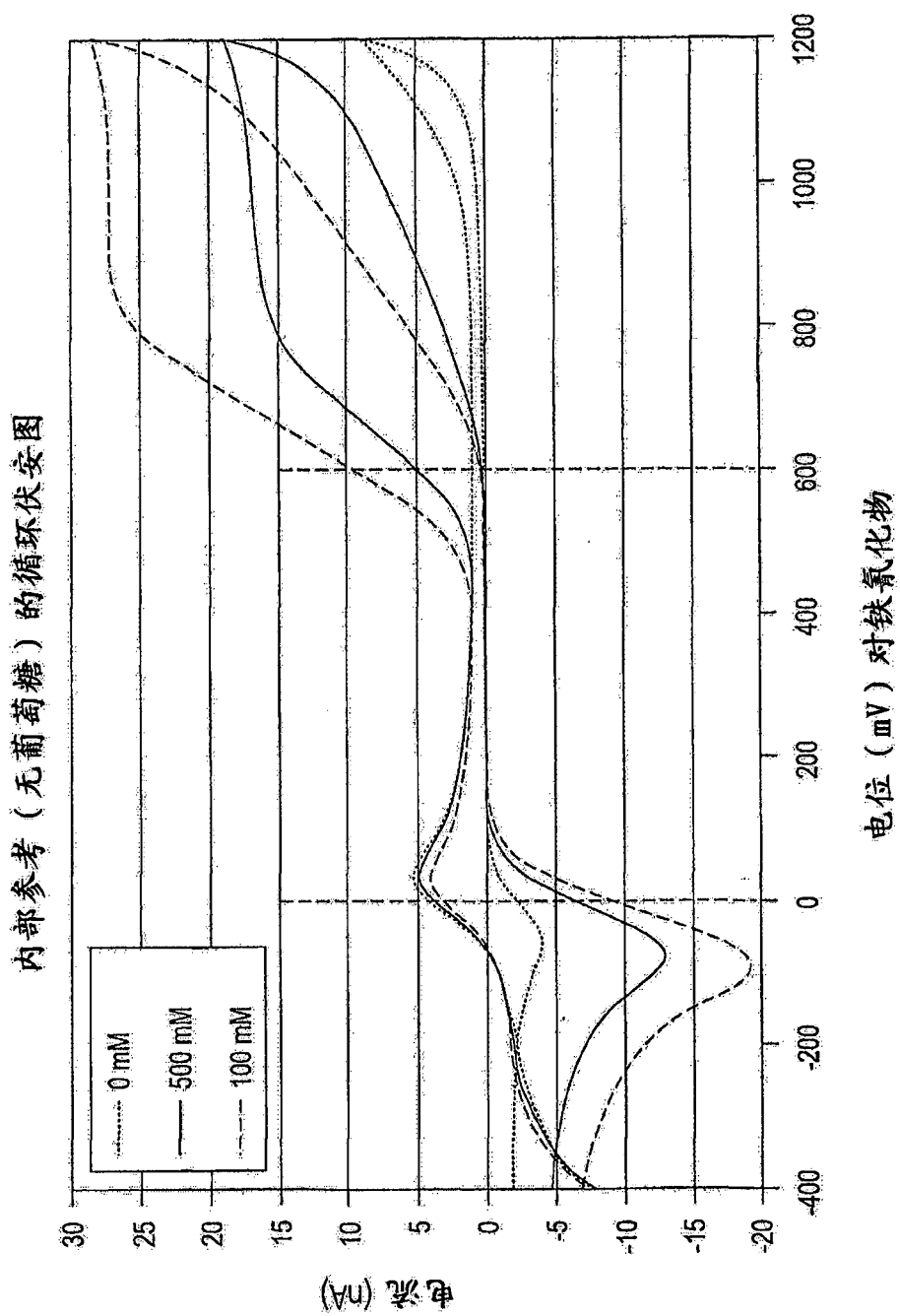


图 10a

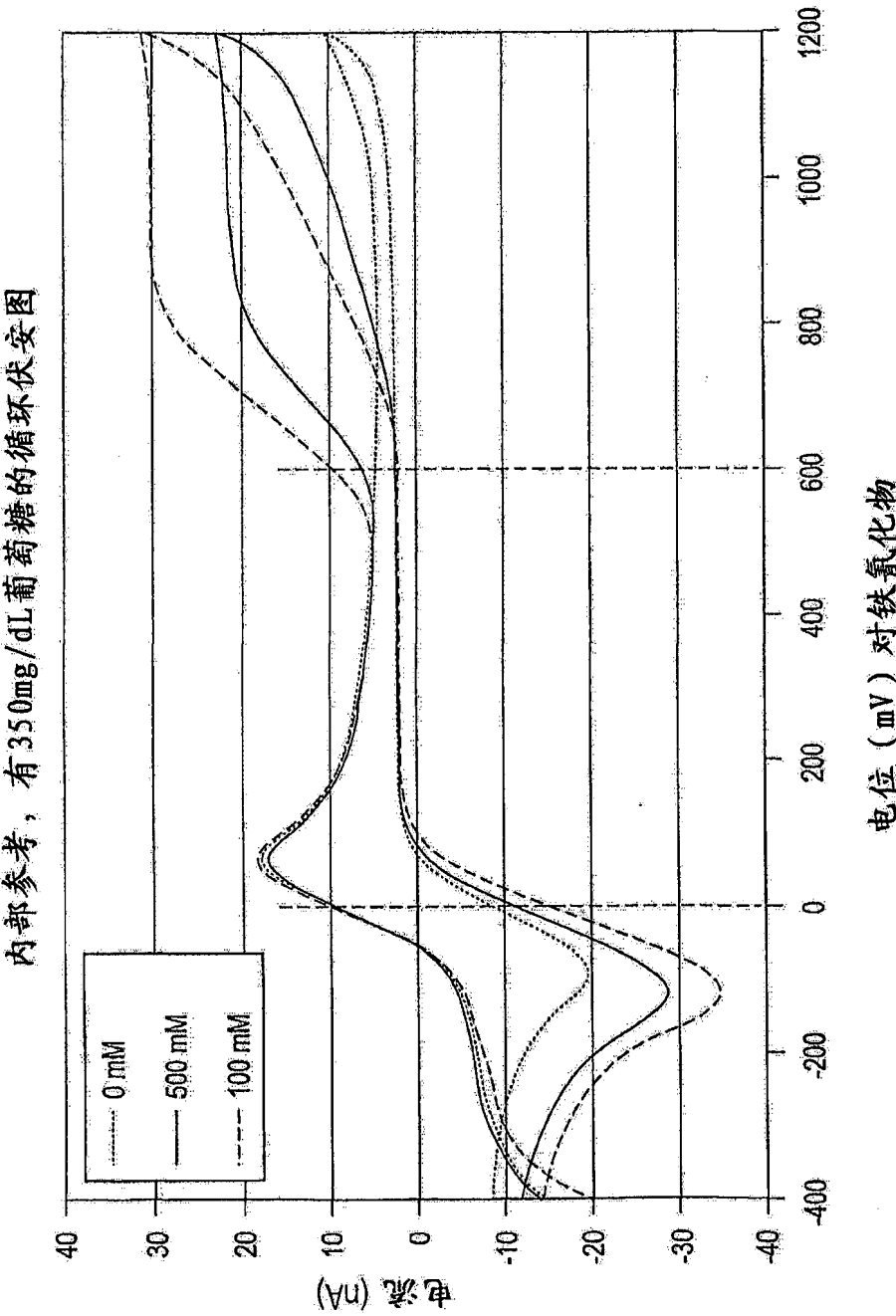


图 10b

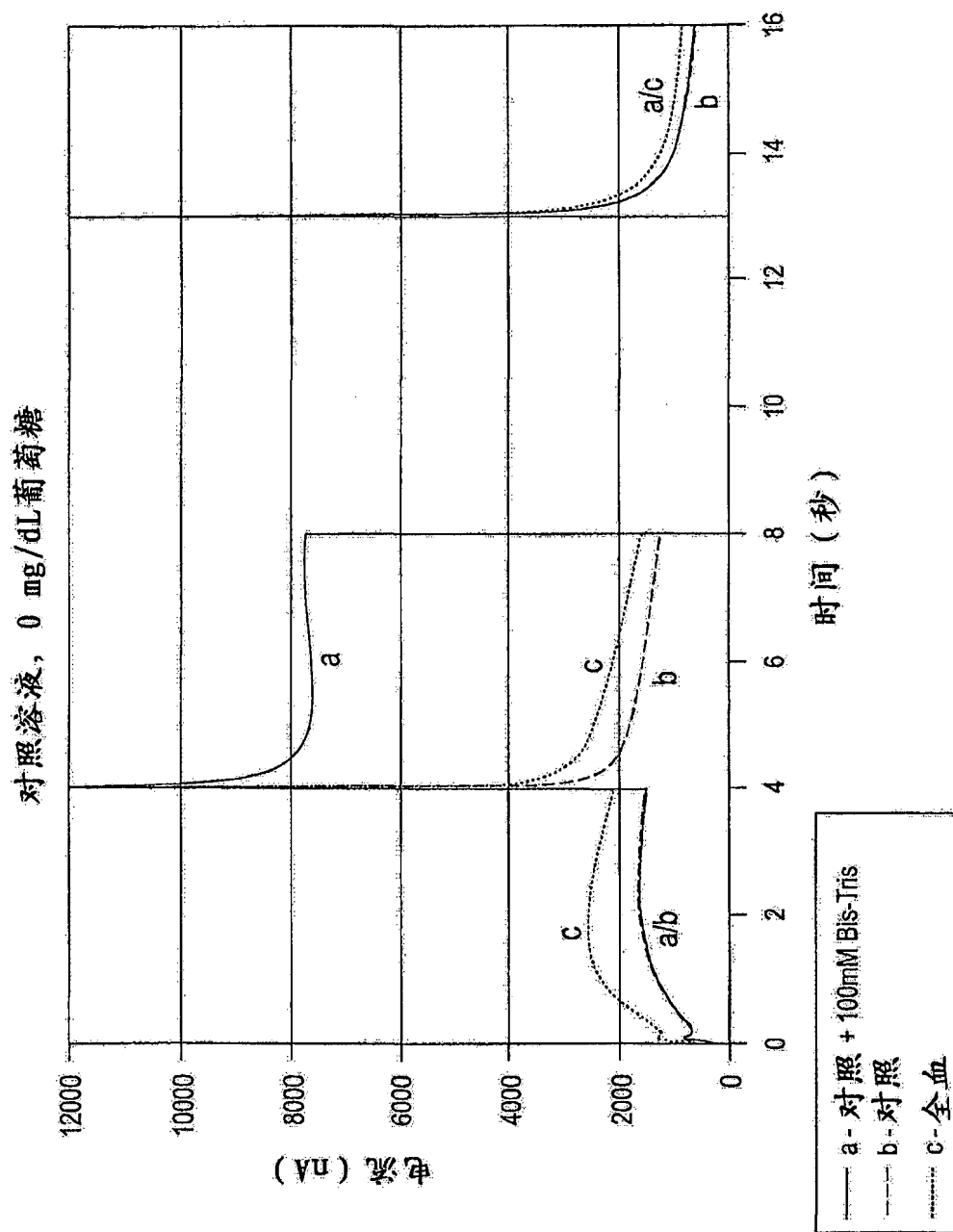


图 11

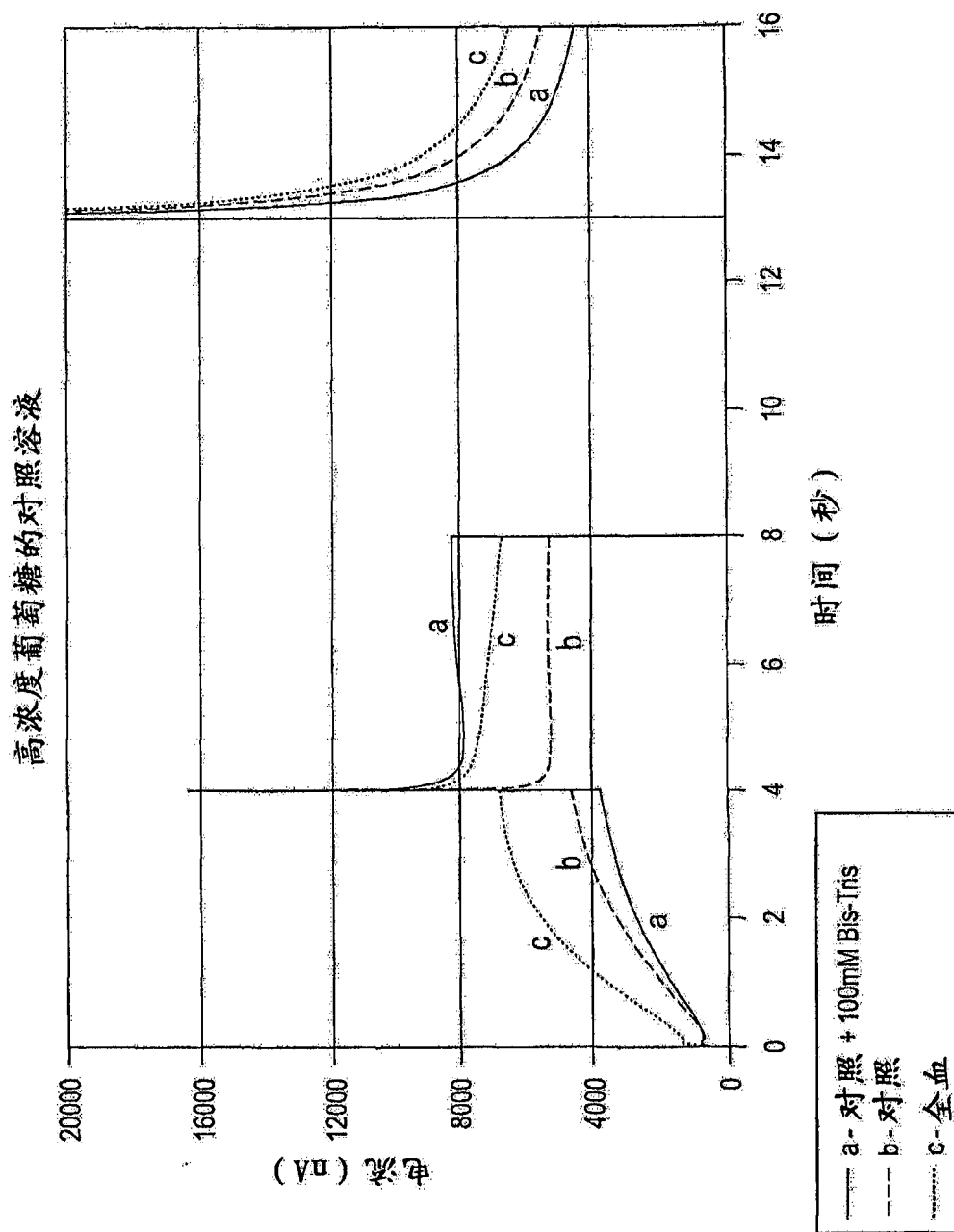


图 12

IH150183 ABSTRACT

Testing of the performance of an electrochemical meter used to measure the presence of an analyte in a biological sample, particularly glucose in whole blood, includes introducing a control solution containing a predetermined amount of the analyte and a predetermined amount of an internal reference compound. The internal reference compound is selected such that it is oxidized at a potential greater than that used to oxidize the analyte, thereby making it possible to distinguish the control solution from a biological sample.