



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009115202/28, 09.09.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.09.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.09.2006 US 60/846,688(43) Дата публикации заявки: **27.10.2010** Бюл. № 30(45) Опубликовано: **10.05.2012** Бюл. № 13(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 5997817 A, 07.12.1999. EP 1074832 A1,
21.07.2000. US 6270637 B1, 07.08.2001.
EP 1639362 A2, 29.03.2006. WO 2006042304 A1,
20.04.2006. RU 20076316 C1, 27.03.1997.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **22.04.2009**(86) Заявка РСТ:
US 2007/077955 (09.09.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/036516 (27.03.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Ю.Д.Кузнецову,
рег.№ 595**

(72) Автор(ы):

**У Хуань-Пин (US),
НЕЛЬСОН Кристин Д. (US),
СПРАДЛИН Хоуп (US),
МОРЕР Эрик (US)**

(73) Патентообладатель(и):

БАЙЕР ХЕЛТКЭА ЭлЭлСи (US)**(54) БИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА, ОБЛАДАЮЩАЯ ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ И
ГЕМАТОКРИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к полосковым электрохимическим сенсорам и способам детектирования аналита в образце. Полосковые электрохимические сенсоры могут включать не больше чем 8 мкг/мм² медиатора. Полосковые элементы, слой реагента полоскового элемента позволяют определить значения концентрации, при этом, по крайней мере, одно из значений постоянной систематической погрешности составляет

меньше чем $\pm 10\%$ после хранения при 50°C в течение 4 недель, по сравнению с полосковым элементом, который хранили при 20°C в течение 4 недель, гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом от 20 до 60%, а отношение отрезка, отсекаемого на оси координат, к углу наклона составляет не больше чем 20 мг/дл. Предлагается также способ определения концентрации аналита в

образце. Изобретение обеспечивает системы для количественного определения аналитов в биологических жидкостях, в частности для определения содержания глюкозы в цельной

крови, которые уменьшают систематическую погрешность измерения, вызванную гематокритным эффектом. 4 н. и 46 з.п. ф-лы, 7 ил., 5 табл.

RU 2 4 5 0 2 6 3 C 2

RU 2 4 5 0 2 6 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009115202/28, 09.09.2007**

(24) Effective date for property rights:
09.09.2007

Priority:

(30) Convention priority:
22.09.2006 US 60/846,688

(43) Application published: **27.10.2010 Bull. 30**

(45) Date of publication: **10.05.2012 Bull. 13**

(85) Commencement of national phase: **22.04.2009**

(86) PCT application:
US 2007/077955 (09.09.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/036516 (27.03.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. Ju.D.Kuznetsovu, reg.№ 595**

(72) Inventor(s):

**U Khuan'-Pin (US),
NEL'SON Kristin D. (US),
SPRADLIN Khoup (US),
MORER Ehrik (US)**

(73) Proprietor(s):

BAJER KhELTKEhA EhIEhISi (US)

(54) BIOSENSOR SYSTEM HAVING HIGH STABILITY AND HEMATOCRIT PERFORMANCE

(57) Abstract:

FIELD: physics.

SUBSTANCE: electrochemical sensor strips may include not more than 8 mcg/mm² of a mediator. The strips and the strip reagent layer enable determination of concentration values, wherein at least one of the values of stability bias is less than ±10% after storage at 50° C for 4 weeks when compared to a strip stored at 20° C for 4 weeks, hematocrit bias of less than ±10% for whole blood

samples including from 20 to 60% hematocrit, and an intercept to slope ratio of not more than 20 mg/dl. Also disclosed is a method of determining concentration of analyte in a sample.

EFFECT: invention provides a system for quantitative determination of analytes in biological fluids, particularly for determining glucose content in whole blood, which reduce bias caused by the hematocrit effect.

50 cl, 7 dwg, 5 tbl

Ссылка на родственные заявки

В данной заявке заявляется приоритет предварительной заявки на патент США № 60/846688 с названием “Устройство биодатчика, обладающего повышенной стабильностью и гематокритной эффективностью”, поданной 22 сентября 2006,

Уровень техники

Биодатчики позволяют проводить анализ биологической жидкости, такой как цельная кровь, моча или слюна. Как правило, биодатчик анализирует образец биологической жидкости с целью детектирования в биологической жидкости концентрации одного или нескольких аналитов, таких как глюкоза, мочева кислота, лактат, холестерин или билирубин. Анализ необходим при установлении диагноза и при лечении физиологических аномалий. Например, больной диабетом может использовать биодатчик для определения уровня глюкозы в цельной крови с тем, чтобы провести коррекцию диеты и/или лечения.

Биодатчики могут выпускаться в виде стендовых, портативных и подобных устройств. Портативные устройства могут быть ручными устройствами. Биодатчики могут быть разработаны таким образом, чтобы анализировать одно или несколько аналитов, и могут использовать различные объемы биологических жидкостей. Некоторые биодатчики могут проводить анализ единственной капли цельной крови, объем которой составляет 0,25-15 микролитров (мкл). Примеры портативных измерительных устройств включают измерители Ascensia Breeze® и Elite®, выпускаемые компанией Bayer Corporation; биодатчики Precision®, выпускаемые компанией Abbott (Abbott Park, Illinois); биодатчики Accucheck®, выпускаемые компанией Roche (Indianapolis, Indiana); и биодатчики OneTouch Ultra®, выпускаемые компанией Lifescan (Milpitas, California). Примеры стендовых измерительных устройств включают анализатор BAS 100B Analyzer, выпускаемый компанией BAS Instruments (West Lafayette, Indiana); CH Instruments' Electrochemical Workstation, выпускаемый компанией CH Instruments (Austin, Texas); Cypress Electrochemical, выпускаемый компанией Cypress Systems (Lawrence, Kansas); и EG&G Electrochemical Instrument, выпускаемый компанией Princeton Research Instruments (Princeton, New Jersey).

С целью определения в образце биологической жидкости концентрации аналитов биодатчики обычно измеряют электрический сигнал. Когда на образец подан входной сигнал, аналит обычно претерпевает реакцию окисления/восстановления, или окислительно-восстановительную реакцию. Чтобы усилить окислительно-восстановительную реакцию, к образцу обычно добавляют фермент или подобное химическое вещество. Входной сигнал, как правило, представляет собой электрический сигнал, такой как электрический ток или потенциал. В ответ на входной сигнал окислительно-восстановительная реакция генерирует выходной сигнал. Выходной сигнал обычно представляет собой электрический сигнал, такой как электрический ток или потенциал, который можно измерить и провести корреляцию с концентрацией аналита в биологической жидкости.

Многие биодатчики включают измерительное устройство и полосковый сенсор. Образец биологической жидкости вводят в камеру для введения пробы полоскового сенсора. Полосковый сенсор размещается в измерительном устройстве для проведения анализа. Измерительное устройство обычно имеет электрические контакты, которые соединяют электрические проводники в полосковом сенсоре. Электрические проводники обычно соединяют рабочий электрод, противозлектрод и/или другие электроды, которые простираются в камеру для введения пробы. Посредством

электрических контактов измерительное устройство подает входной сигнал на электрические проводники в полосковом сенсоре. Электрические проводники передают входной сигнал через электроды к образцу, осажденному в камере для введения пробы. В ответ на входной сигнал окислительно-восстановительная реакция с участием аналита генерирует выходной сигнал. В ответ на выходной сигнал измерительное устройство устанавливает концентрацию аналита.

Полосковый сенсор может содержать реагенты, которые взаимодействуют с аналитом в образце биологической жидкости. Реагенты могут включать ионизирующий агент, облегчающий протекание окислительно-восстановительной реакции аналита, а также медиаторы или другие вещества, которые помогают в переносе электронов между аналитом и проводником. Ионизирующий агент может быть оксидоредуктазой, такой как фермент, который специфичен для аналита и который катализирует окисление глюкозы в образце целой крови. Реагенты могут включать связующее вещество, которое удерживает вместе фермент и медиатор.

Одним из недостатков композиций реагентов, используемых в обычных биодатчиках, является изменение эффективности измерения, либо точности измерения, либо погрешности измерения, которое наблюдается при хранении полоскового сенсора. Электронные устройства и методы анализа, которые измерительное устройство использует для определения концентрации аналита в образце, в общем случае подбирают из расчета, что композиция реагента, нанесенная на полосковый сенсор, функционирует так же, как и сразу же после ее изготовления. Однако после транспортировки и хранения на складе композиция реагента разлагается с течением времени и под действием температуры. Это изменение химических свойств композиции реагента может привести к снижению эффективности измерения.

С целью увеличения долговременной стабильности композиций реагентов, применяемых в биодатчике, в обычных биодатчиках используют значительный избыток фермента и медиатора, по сравнению с тем количеством указанных реагентов, которое требуется для анализа образца. С учетом того что указанные реагенты со временем деградируют, композиции обычных реагентов содержат значительно большее количество фермента и/или медиатора, чем требуется по стехиометрии для взаимодействия с аналитом. Помимо увеличения стоимости биодатчика вследствие применения реагентов, которыми приходится жертвовать, ненужные реагенты могут потребовать использования большего объема образца, более длительного времени проведения анализа, а также под действием многих факторов могут привести к ухудшению эффективности измерения.

Например, в РСТ публикации WO 88/03270 раскрывается общая плотность осажденного слоя, полученная методом трафаретной печати, которая равна 3 мг/см^2 (30 мкг/мм^2). Относительное количество $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ составляет 57,7%, фосфатного буфера 28,8% и глюкозо-оксидазы (GO) 3,6%. Пересчет указанных процентов в удельные плотности осаждения на полосковом сенсоре приводит к плотности $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $17,31 \text{ мкг/мм}^2$, плотности фосфатного буфера $8,64 \text{ мкг/мм}^2$ и плотности GO $1,08 \text{ мкг/мм}^2$. В другом примере в патенте США № 4711245, в столбце 17, в строках 25-35, раскрывается осаждение 15 мкл 0,1М раствора 1,1'-диметилферроцена в толуоле на дисковый электрод с диаметром 4 мм. Молекулярная масса 1,1'-диметилферроценового медиатора составляет 214 массовых единиц, и его наносят с плотностью осаждения $25,5 \text{ мкг/мм}^2$ [$(15 \text{ мкл} \cdot 0,1 \text{ М} \cdot 214 \text{ г/мол}) / 2^2 \cdot 3,14 \text{ мм}^2 = 25,5 \text{ мкг/мм}^2$]. В еще одном примере в патенте США № 5958199 раскрывается

осаждение на электрод сенсора из 4 мкл раствора, содержащего 40 мг GO, 16 мг $K_3Fe(CN)_6$ и 20 мг СМС (карбоксиметилцеллюлозы) в 1 мл воды. В этом случае плотность осаждения составляет 6,67 мкг/мм² для GO, 10,67 мкг/мм² для $K_3Fe(CN)_6$ и 13,33 мкг/мм² для СМС при расчетной площади электрода (площади осаждения) 6 мм². В другом примере в патенте США № 5997817 описывается состав реагента, содержащего 59 г $K_3Fe(CN)_6$, растворенного приблизительно в 900 мл воды, вместе с другими ингредиентами. Приблизительно 4,5 мкл этого реагента осаждают в отверстие с площадью 21,4 мм² (3,2 × 6,7) и получают плотность осаждения медиатора, равную 13,96 мкг/мм² ($4,5 \times 10^{-3}$ мл · 59 г/900 мл).

В каждом из этих примеров плотности осаждения медиатора для композиций реагента находятся в диапазоне 10-25 мкг/мм², в то время как плотности осаждения фермента находятся в диапазоне 1-6 мкг/мм². Указанную большую дозировку медиатора по отношению к ферменту можно объяснить тем, что одна и та же композиция наносится как на рабочий электрод, так и на противоэлектрод. В зависимости от конструкции датчика медиатор может функционировать на противоэлектроде с тем, чтобы поддерживать электрохимическую активность рабочего электрода. Таким образом, осаждение одной и той же композиции реагента на оба электрода может привести к значительной избыточной нагрузке рабочего электрода медиатором.

Указанные примеры показывают, что излишки фермента и медиатора используют в качестве гарантии того, что для точного измерения глюкозы имеется достаточное количество активных ингредиентов. При использовании после длительного хранения полосковых сенсоров, изготовленных с увеличенным количеством реагентов, которыми приходится жертвовать, можно столкнуться с рядом недостатков, связанных с изменением эффективности измерения. Указанное изменение может проявляться, по крайней мере, двояко: (1) фоновый ток с течением времени возрастает (оказывает влияние на наклон калибровочной кривой) и (2) наблюдается сдвиг в чувствительности сенсора (оказывает влияние на наклон калибровочной кривой).

Вследствие взаимодействий между окисленным медиатором и ферментной системой и полимером медиатор во время хранения может восстановиться. Указанный самопроизвольный процесс, как полагают, подчиняется законам термодинамики. Чем больше количество медиатора или фермента, тем большее количество восстановленного медиатора образуется. По мере того как с течением времени концентрация восстановленного медиатора возрастает, к концу срока хранения полосковых сенсоров фоновый ток увеличивается.

Было предложено множество способов уменьшить эффект дрейфа рабочих характеристик датчика перед использованием полоскового сенсора после его хранения. Например, Genshaw et al. в патенте США № 5653863 раскрывают способ, предусматривающий использование относительно длительного первоначального импульса перед проведением анализа с тем, чтобы окислить медиатор, который восстановился во время транспортировки и хранения. Несмотря на его эффективность указанный способ удлиняет время, требуемое для проведения полного анализа.

Таким образом, желательно увеличить долговременную стабильность композиции реагента с тем, чтобы повысить эффективность измерений с помощью биодатчика после его транспортировки и хранения. Указанное повышение долговременной стабильности композиции реагента позволяет увеличить эффективность измерений

биодатчика и обеспечить более длительное время хранения полосок сенсора. Желательно также снизить количество фермента и/или медиатора, включенного в состав композиции реагента, которым приходится жертвовать, и уменьшить время, требуемое для проведения полного анализа.

5 Другой недостаток обычных биодатчиков, которые используют для измерения концентрации глюкозы в образцах цельной крови (WB), называют "гематокритным эффектом". Помимо воды и глюкозы образцы WB содержат эритроциты (RBC). Гематокритное число представляет собой объем образца WB, занятый эритроцитами, по отношению к общему объему образца WB и часто выражается в процентах. Гематокритный эффект возникает в том случае, когда эритроциты блокируют диффузию определяемого при анализе вещества и/или медиатора к одному или нескольким электродам биодатчика. Так как выходной сигнал, измеренный биодатчиком, соответствует скорости диффузии определяемого при анализе вещества и/или медиатора, то эритроциты могут привести к ошибке при проведении анализа, поскольку мешают протеканию указанного процесса диффузии. Таким образом, чем больше гематокритное число (объем, занимаемый эритроцитами) отклоняется от гематокритного числа системы калибровки для образца WB, тем больше гематокритная систематическая погрешность измерения (ошибка) в результатах измерения глюкозы, полученных биодатчиком.

Гематокритное число образца WB обычно находится в пределах от 20 до 60%, при этом значение ~40% является средним значением. Если будут протестированы образцы WB, содержащие идентичные уровни глюкозы, а гематокритное число которых составляет 20, 40 и 60%, то система, основанная на одном наборе градуировочных констант (например, наклон и отрезок, отсекаемый кривой на оси координат, для образца WB, гематокритное число которого составляет 40%), даст три различных значения для глюкозы. Даже несмотря на то что концентрации глюкозы одни и те же, система сообщит, что образец WB с 20%-ным гематокритным числом содержит больше глюкозы, чем образец WB с 40%-ным гематокритным числом, а образец WB с 60%-ным гематокритным числом содержит меньше глюкозы, чем образец WB с 40%-ным гематокритным числом, вследствие того, что эритроциты препятствуют диффузии определяемого при анализе вещества и/или медиатора к поверхности электрода. Таким образом, обычные биодатчики могут оказаться не в состоянии различить более низкую концентрацию определяемого при анализе вещества и более высокую концентрацию определяемого при анализе вещества в том случае, когда эритроциты препятствуют диффузии.

Обычные биодатчики в общем случае конфигурируют таким образом, чтобы они указывали концентрацию глюкозы из расчета, что гематокритное число в образце WB составляет 40%, независимо от фактического гематокритного числа. Для указанных систем любое измерение глюкозы, которое проводят для образца крови, имеющего гематокритное число меньше или больше 40%, будет включать некоторую гематокритную систематическую погрешность измерения, которую объясняют гематокритным эффектом.

Различные способы и методики были предложены для уменьшения ошибки, которую вносит гематокритная систематическая погрешность измерения в результаты измерения глюкозы. Например, Ohara et al. в патенте США № 6475372 раскрывают способ, предусматривающий использование для компенсации гематокритного эффекта отношения прямых и обратных импульсов потенциала. McAleer et al. в патентах США № 5708247 и 5951836 раскрывают состав реагента с использованием

частишек оксида кремния для защиты поверхности электрода с помощью фильтрации с целью уменьшить гематокритный эффект. Carter et al. в патенте США № 5628890 раскрывают способ, предусматривающий использование более широкого пространства между электродами в сочетании со слоями сетки с тем, чтобы

распределить образец крови и снизить гематокритный эффект. Указанные обычные методы снижения систематической погрешности измерений, связанной с гематокритным эффектом, включают (а) совместное осаждение полимера с целью минимизации гематокритного эффекта, (b) прибавление различных видов плавленого кварца, чтобы усилить эффект фильтрации полимерного слоя, (с) использование компенсационного коэффициента, основанного на отношении величин токов, полученных при прямом и обратном импульсе напряжения, и (d) самокомпенсацию с использованием существующего сопротивления раствора образцов цельной крови. Хотя эти методы могут оказаться пригодными, обычные датчики глюкозы продолжают показывать при анализе значительную систематическую погрешность измерения, связанную с гематокритным эффектом, которая в общем случае составляет от 15 до 30%. Таким образом, необходимы системы для количественного определения аналитов в биологических жидкостях, в частности для определения содержания глюкозы в цельной крови, которые уменьшают систематическую погрешность измерения, вызванную гематокритным эффектом.

Сущность изобретения

В соответствии с одним аспектом полосковый электрохимический сенсор включает изолирующее основание, первый и второй электроды на изолирующем основании и колпачок на изолирующем основании. Полосковый элемент включает, по крайней мере, один первый слой на первом проводнике, при этом первый слой включает слой реагента, который содержит не больше чем 8 мкг/мм^2 медиатора. Полосковый элемент позволяет определить значение концентрации, при этом, по крайней мере, одно из значений систематической погрешности составляет меньше чем $\pm 10\%$ после хранения при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с тест-полоской сравнения, которую хранили при -20°C в течение 2 недель, гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 20 мг/дл.

Первый и второй электроды полоскового сенсора могут располагаться практически в одной плоскости, а второй электрод может включать первый слой, лежащий на втором проводнике. Второй электрод может включать второй слой на втором проводнике, и второй слой может включать слой реагента, композиция которого отличается от слоя реагента на первом слое. Электроды могут быть отделены друг от друга расстоянием, большим чем 200 мкм, и могут располагаться от верхней части колпачка на расстоянии, равном, по крайней мере, 100 мкм.

Средняя начальная толщина слоя реагента полоскового сенсора может составлять меньше чем 8 мкм или может составлять от 0,25 до 3 мкм. Слой реагента полоскового сенсора можно нанести из раствора реагента с плотностью осаждения не больше чем $0,2 \text{ мкл/мм}^2$. Слой реагента в качестве связующего может включать поли(оксид этилена), поливиниловый спирт, гидроксиэтиленцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или их комбинацию. Плотность осаждения полимерного связующего на первом проводнике может составлять не больше чем 2 мкг/мм^2 . Полимерное связующее может быть частично растворимо в воде и/или может при гидратации образовывать

гелеподобное вещество.

Слой реагента может включать ферментную систему с плотностью осаждения не больше чем $0,8 \text{ мкг/мм}^2$ и/или включать не больше чем 1,3 ферментных единиц. Слой реагента на рабочем электроде может включать не больше чем 2 мкг/мм^2 медиатора. Медиатор может быть медиатором двухэлектронного переноса и может представлять собой 3-фенилимино-3Н-фенотиазины, 3-фенилимино-3Н-феноксазины, их соли, их кислоты, их производные или их комбинации. Медиатор может обладать окислительно-восстановительным потенциалом, по крайней мере, на 100 мВ меньшим, чем окислительно-восстановительный потенциал феррицианида.

Систематическая погрешность измерения полоскового сенсора может быть меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 2 или 4 недель, по сравнению с тест-полоской, которую хранили при -20°C в течение 2 или 4 недель соответственно. Полосковый сенсор может иметь гематокритную систематическую погрешность измерения меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%. Отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее для полоскового сенсора 10 мг/дл или самое большее 1 мг/дл.

В соответствии с другим аспектом полосковый электрохимический сенсор включает изолирующее основание, первый и второй электроды на изолирующем основании и колпачок на изолирующем основании. Полосковый элемент включает, по крайней мере, один первый слой на первом проводнике, при этом первый слой включает слой реагента, который содержит медиатор и ферментную систему, где слой реагента позволяет определить значение концентрации, при этом, по крайней мере, одно из значений систематической погрешности составляет меньше чем $\pm 10\%$ после хранения при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с тест-полоской сравнения, которую хранили при -20°C в течение 2 недель, гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 20 мг/дл.

В соответствии с другим аспектом предлагается способ определения концентрации аналита в образце. Метод включает подачу на образец последовательности импульсов, при этом последовательность импульсов включает, по крайней мере, 3 рабочих цикла в течение 30 секунд. Способ включает также определение значения концентрации аналита в образце, при этом, по крайней мере, одно из значений систематической погрешности составляет меньше чем $\pm 10\%$, гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 20 мг/дл.

Способ может включать, по крайней мере, 3 рабочих цикла в течение 9 сек, а последовательность импульсов может быть завершена не более чем за 5 сек. Определение концентрации аналита в образце может включать определение концентрации аналита в образце на основании данных по определению силы тока, измерение которых проводят в пределах 2 сек после приложения последовательности импульсов. Каждый рабочий цикл может включать возбуждение и релаксацию, где каждое возбуждение может длиться от 0,01 до 3 сек. Суммарная продолжительность возбуждений может составлять не больше 10 сек или не больше 2 сек, а амплитуды возбуждений могут отличаться на 500 мВ. Возбуждения могут составлять не больше чем 45% от длительности последовательности импульсов. Каждая из релаксаций может длиться, по крайней мере, 0,2 сек или может длиться от 0,2 до 3 сек.

Последовательность импульсов может включать первоначальное возбуждение с длительностью от 0,75 до 3 сек, при этом продолжительность первоначального возбуждения больше, чем возбуждения в рабочих циклах.

Способ позволяет определять концентрацию с систематической погрешностью меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 2 или 4 недель, по сравнению с тест-полоской, которую хранили при -20°C в течение 2 или 4 недель соответственно. Гематокритная систематическая погрешность измерения концентрации может составлять меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл или самое большее 1 мг/дл.

В соответствии с другим аспектом способ повышения эффективности количественного детектирования аналита включает введение включающего жидкий компонент образца, который содержит определяемое при анализе вещество, в полосковый электрохимический сенсор, при этом полосковый элемент включает изолирующую подложку, первый проводник на изолирующей подложке, второй проводник на изолирующей подложке и, по крайней мере, один первый слой, по крайней мере, на первом проводнике, где, по крайней мере, один первый слой включает слой реагента, содержащий полимерное связующее, а образец обеспечивает электрический контакт между первыми и вторыми проводниками. Способ также включает приложение электрического потенциала между первыми и вторыми проводниками в форме, по крайней мере, 4 импульсов считывания в течение 30 сек или в течение 9 сек и измерение, по крайней мере, одного из импульсов считывания, с целью количественного определения концентрации аналита в образце с повышенной эффективностью, которая относится, по крайней мере, к одной рабочей характеристике, выбранной из систематической погрешности, составляющей меньше чем $\pm 10\%$ после того, как полосковый сенсор хранился при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с тест-полоской сравнения, которая хранилась при -20°C в течение 2 недель, гематокритной систематической погрешности измерения, составляющей меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне 20-60%, отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл, или их комбинации.

Импульсы считывания могут завершиться не больше чем за 5 сек, импульсы считывания могут быть измерены в пределах 2 сек после приложения электрического потенциала, а каждый импульс считывания может продолжаться от 0,01 до 3 сек. Импульсы считывания могут длиться не больше чем 2 сек, а разница их амплитуды может составлять в пределах 500 мВ.

Способ позволяет определять значение количественной характеристики с систематической погрешностью меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 2 или 4 недель, по сравнению с тест-полоской сравнения, которую хранили при -20°C в течение 2 или 4 недель соответственно. Способ позволяет определять значение количественной характеристики с гематокритной систематической погрешностью меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%. Способ позволяет определять значение количественной характеристики, для которой отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл или самое большее 1 мг/дл.

Краткое описание чертежей

Изобретение станет более понятным после ссылки на следующие чертежи и описания. Компоненты на фигурах необязательно даны в масштабе, вместо этого

основное внимание уделяется пояснению принципов настоящего изобретения. Кроме того, на фигурах одинаковые номера позиций в общем случае обозначают соответствующие части на всех различных рисунках.

На фиг.1А представлен полосковый сенсор в собранном виде.

На фиг.1В приведен вид сверху полоскового сенсора со снятым колпачком.

На фиг.2А показан вид с торца полоскового сенсора, приведенного на фиг.1В.

Фиг.2В поясняет перенос медиатором одного электрона от ферментной системы к рабочему электроду.

Фиг.2С поясняет перенос медиатором двух электронов от ферментной системы к рабочему электроду.

На фиг.3 представлен электрохимический способ определения присутствия и концентрации аналита в образце.

На фиг.4А-4D приведены примеры последовательности управляемых импульсов, при этом на полосковый сенсор после введения образца прикладывают несколько циклов нагрузки.

На фиг.5А и 5В приведены кривые зависимости дозы для полоскового сенсора, включающей ферментную систему PQQ-GDH с гематокритным числом 20%, 40% и 55%.

На фиг.5С приведено отношение I/S, выраженное в мг/дл, которое определяют из экспериментальных данных.

На фиг.5D приведены отношения в I/S диапазоне от 0 до 20 мг/дл для нескольких концентраций глюкозы, которые определяют для полосок сенсора с использованием композиций реагента RC2, RC3 или RC4.

Фиг.5Е показывает практически идентичную гематокритную эффективность системы для образцов плазмы и образцов цельной крови с гематокритным числом 40%.

Фиг.6А показывает постоянную систематическую погрешность для четырех композиций реагентов, включающих ферментную систему PQQ-GDH, через 2 недели при 50°C.

Фиг.6В показывает постоянную систематическую погрешность для четырех композиций реагентов, включающих ферментную систему PQQ-GDH, через 4 недели при 50°C.

Фиг.6С показывает постоянную систематическую погрешность для трех композиций реагентов, включающих ферментную систему PQQ-GDH, через 52 недели при 25°C и относительной влажности 80%.

Фиг.6D показывает дисперсию постоянной систематической погрешности для полосковых сенсоров, содержащих RC2, где опорные данные, которые используют для расчета концентрации аналита, берут в различные моменты времени после начала проведения анализа.

На фиг.7А приведена кривая зависимости дозы, полученная с помощью полоскового сенсора для нескольких образцов цельной крови.

На фиг.7В приведены разбросы абсолютных гематокритных систематических погрешностей для четырех технологических партий, полученные для нескольких образцов цельной крови.

На фиг.7С приведено сравнение гематокритной чувствительности для полоскового сенсора по настоящему изобретению и обычного полоскового сенсора.

Подробное описание изобретения

Биодатчики удобны для пациентов тем, что позволяют практически мгновенно измерить уровни глюкозы. Ошибки при проведении указанных измерений можно объяснить деградацией композиции реагента и/или гематокритным эффектом.

Деградация композиции реагента представляет собой непрерывный процесс, который протекает в то время, пока полосковый сенсор транспортируется и хранится после его изготовления. Множество факторов может влиять на скорость, с которой деградирует композиция реагента, в том числе температура. Гематокритный эффект возникает в том случае, когда эритроциты случайным образом воздействуют на скорость диффузии измеряемых химических веществ к поверхности проводника рабочего электрода.

Уменьшая количество медиатора и/или фермента, которые используют в полосковом сенсоре, можно увеличить долговременную стабильность композиции реагента, по сравнению с обычными биодатчиками и композициями реагентов. Таким образом, для полоскового сенсора можно уменьшить постоянную систематическую погрешность и отношение отсека к угловому коэффициенту. Кроме того, сочетание способа управляемого анализа и увеличенной стабильности композиции реагента позволяет уменьшить гематокритный эффект. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением может быть улучшена одна или любая комбинация указанных и других рабочих характеристик.

В соответствии с одним аспектом биодатчики по настоящему изобретению показывают постоянную систематическую погрешность, которая предпочтительно составляет меньше чем $\pm 10\%$, более предпочтительно составляет меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 4 недель, по сравнению с полосковыми сенсорами, которые хранят при -20°C в течение 4 недель. В соответствии с другим аспектом биодатчики по настоящему изобретению показывают гематокритную систематическую погрешность измерения, которая предпочтительно составляет меньше чем $\pm 10\%$, более предпочтительно составляет меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови с гематокритным числом в диапазоне от 20 до 60%. В соответствии с другим аспектом биодатчики по настоящему изобретению предпочтительно имеют отношение отсека к угловому коэффициенту, которое составляет не больше чем 20 мг/дл, более предпочтительно составляет не больше чем 10 мг/дл или не больше чем 6 мг/дл и еще более предпочтительно составляет не больше чем 1 мг/дл. Могут быть улучшены указанные и другие рабочие характеристики полоскового сенсора.

На фигурах 1А и 1В показан полосковый сенсор 100, который можно использовать по настоящему изобретению. На фиг.1А представлен полосковый сенсор 100 в собранном виде, который включает изолирующее основание сенсора 110, по крайней мере, частично закрытое колпачком 120, который имеет воздушный клапан 130, покрываемую образцом площадь 140 и отверстие для ввода 150. Частично закрытый объем 160 (капиллярная щель) образуется между изолирующим основанием 110 и колпачком 120. Могут использоваться конструкции других полосок сенсоров, совместимые с настоящим изобретением, например, описанные в патентах США № 5120420 и № 5798031.

Жидкий образец для анализа можно поместить в капиллярную щель 160, вводя его в отверстие 150. Жидкость заполняет капиллярную щель 160, вытесняя ранее содержавшийся в ней воздух через воздушный клапан 130. Капиллярная щель 160 может содержать композицию (не показана), которая помогает удерживать жидкий образец в капиллярной щели. Примеры подобных композиций включают набухающие в воде полимеры, такие как карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленгликоль; и пористые полимерные матрицы, такие как декстран и полиакриламид.

На фиг.1В приведен вид сверху полоскового сенсора 100 с удаленным колпачком 120. Проводники 170 и 180 могут проходить под слоем диэлектрика 190 от

отверстия 150 к рабочему электроду 175 и противоэлектроду 185 соответственно. В соответствии с одним аспектом рабочий электрод и противоэлектрод 175, 185 могут находиться практически в одной плоскости, как показано на фигуре. В родственном аспекте рабочий электрод и противоэлектрод 175, 185 могут быть отделены друг от друга больше чем на 200 или 250 мкм и могут отстоять от верхней части колпачка 120, по крайней мере, на 100 мкм. В соответствии с другим аспектом рабочий электрод и противоэлектрод 175, 185 могут быть разделены друг от друга меньше чем на 200 мкм. Диэлектрический слой 190 может частично покрывать электроды 175, 185 и может быть сформирован из любого подходящего диэлектрического вещества, такого как изолирующий полимер.

Противоэлектрод 185 может поддерживать электрохимическую активность рабочего электрода 175 полоскового сенсора 100. В соответствии с одним аспектом потенциал для поддержания электрохимической активности рабочего электрода 175 может быть приложен к чувствительной системе за счет изготовления противоэлектрода 185 из инертного материала, такого как углерод, и за счет введения растворимых окислительно-восстановительных соединений, таких как феррицианид, в капиллярную щель 160. В соответствии с другим аспектом потенциал на противоэлектроде 185 может быть опорным потенциалом, который образуется при формировании противоэлектрода 185 из окислительно-восстановительной пары, такой как Ag/AgCl, с образованием комбинированного электрода сравнения/противоэлектрода. В качестве альтернативы полосковый сенсор 100 может быть снабжен третьим проводником и электродом (не показаны), предназначенным для подачи опорного потенциала к чувствительному устройству.

На фиг.2А приведен вид с торца полоскового сенсора, приведенного на фиг.1В, где показана слоистая структура рабочего электрода 175 и противоэлектрода 185. Проводники 170 и 180 могут располагаться непосредственно на изолирующей подложке 110. Проводниковые слои 270 и 280 на поверхности необязательно могут быть нанесены на проводники 170 и 180 соответственно. Проводниковые слои 270 и 280 на поверхности могут быть изготовлены из одних и тех же или различных веществ.

Вещество или вещества, которые используют для формирования проводников 170, 180, и проводниковые слои 270 и 280 на поверхности могут включать любые электрические проводники. Предпочтительные электрические проводники не ионизируются, т.е. вещества в целом не претерпевают окисление или в целом не претерпевают восстановления в процессе анализа образца. Проводники 170 и 180 преимущественно включают тонкий слой металлической пасты или металла, такого как золото, серебро, платина, палладий, медь или вольфрам. Проводниковые слои 270 и 280 на поверхности преимущественно включают углерод, золото, платину, палладий или их комбинации. Если на проводнике нет слоя поверхностного проводника, то проводник преимущественно изготавливают из неионизирующегося вещества.

Вещество для расположенного на поверхности проводника может быть нанесено на проводники 170, 180 обычными способами, совместимыми с работой полоскового сенсора, в том числе осаждением тонких пленок, химическим осаждением из паровой фазы, осаждением из суспензий и т.п. В случае осаждения из суспензий смесь можно наносить в виде пасты на проводники 170, 180, как описано в патенте США № 5798031.

Слои реагентов 275 и 285 могут быть нанесены на проводники 170 и 180 соответственно. Слои формируют, по крайней мере, из одной композиции реагентов, которая включает реагенты и необязательно связующее вещество. Связующее

вещество предпочтительно представляет собой полимерное вещество, которое, по крайней мере, частично растворимо в воде. В соответствии с одним аспектом связующее при гидратировании образцом может образовать гель или гелеподобное вещество. В соответствии с другим аспектом связующее вещество может фильтровать эритроциты.

Подходящие частично водорастворимые полимерные вещества для использования в качестве связующего могут включать поли(оксид этилена) (PEO), карбоксиметилцеллюлозу (СМС), поливиниловый спирт (PVA), гидроксиэтиленцеллюлозу (HEC), гидроксипропилцеллюлозу (HPC), метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, этилгидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилэтилцеллюлозу, поливинилпирролидон (PVP), полиаминокислоты, такие как полилизин, полистиролсульфонат, желатин, акриловую кислоту, метакриловую кислоту, крахмал, соли малеинового ангидрида, их производные и их комбинации. Среди вышеупомянутых веществ для связующего предпочтительными в настоящем изобретении являются PEO, PVA, СМС и HEC, при этом СМС является более предпочтительным.

Помимо связующего слои реагентов 275 и 285 могут включать те же самые или различные реагенты. Когда они включают те же самые реагенты, слои реагента 275 и 285 могут быть одним и тем же слоем. В соответствии с одним аспектом реагенты, находящиеся в первом слое 275, могут быть выбраны для использования в рабочем электроде 175, в то время как реагенты, находящиеся во втором слое 285, могут быть выбраны для использования в противоэлектроде 185. Например, реагенты в слое 285 могут облегчить свободное протекание электронов между образцом и проводником 180. Аналогично реагенты в слое 275 могут облегчить протекание реакций аналита.

Слой реагента 275 может включать ферментную систему, специфичную для аналита, которая может облегчить протекание реакции аналита и одновременно усиливает специфичность чувствительной системы к аналиту, в частности, в сложных биологических образцах. Ферментная система может включать один или несколько ферментов, коэнзимов и/или других химических веществ, которые участвуют в окислительно-восстановительной реакции с определяемым при анализе веществом. Например, алкоголь-оксидаза может использоваться для получения полоскового сенсора, который чувствителен к присутствию спирта в образце. Подобная система могла быть пригодной для измерения концентраций спирта в крови. В другом примере могут использоваться глюкозодегидрогеназа или глюкозо-оксидаза для получения полоскового сенсора, который чувствителен к присутствию глюкозы в образце. Указанная система могла бы быть пригодной при измерении концентраций глюкозы в крови, например, у больных с установленным диабетом или у больных, у которых подозревают диабет.

Ферменты для использования в ферментной системе включают алкоголь-дегидрогеназу, лактатдегидрогеназу, β -гидроксibuтиратдегидрогеназу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкозодегидрогеназу, формальдегид-дегидрогеназу, малатдегидрогеназу и 3-гидроксистероид-дегидрогеназу. Предпочтительные ферментные системы кислороднезависимы и, таким образом, незначительно окисляются кислородом.

Одним подобным кислороднезависимым семейством ферментов является глюкозодегидрогеназа (GDH). При использовании различных коэнзимов или кофакторов действие GDH может быть различным образом опосредовано различными

медиаторами. В зависимости от их ассоциации с GDH кофактор, такой как флавин-адениндинуклеотид (FAD), может прочно удерживаться ферментом-хозяином, как в случае FAD-GDH; или кофактор, такой как пирролохинолинхинон (PQQ), может быть ковалентно соединен с ферментом-хозяином, как в случае с PQQ-GDH. Кофактор в каждой из указанных ферментных систем может либо перманентно удерживаться ферментом-хозяином, либо коэнзим и апоэнзим могут быть доведены до нужной концентрации, прежде чем ферментная система будет добавлена в композицию реагента. Коэнзим можно также независимо добавить к веществу фермента-хозяина композиции реагента с тем, чтобы содействовать каталитической функции фермента-хозяина, как в случае никотинамид-адениндинуклеотида NAD/NADH⁺ или в случае фосфата никотинамид-адениндинуклеотида NADP/NADPH⁺.

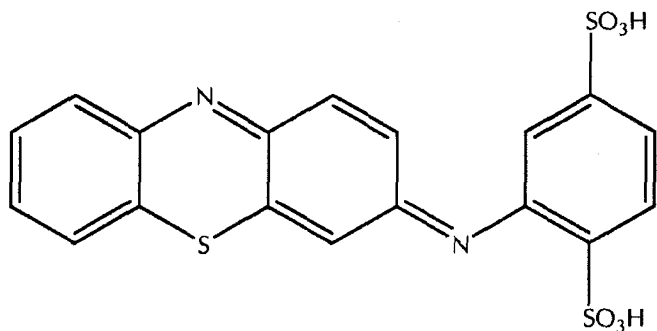
Для того чтобы более эффективно передавать сообщение о результатах реакции аналита к расположенному на поверхности проводнику 270 и/или проводнику 170, слой реагента 275 также может включать медиатор. По своей электрохимической активности медиаторы могут быть разделены на две группы. Медиаторы одноэлектронного переноса представляют собой химические соединения, которые в условиях протекания электрохимической реакции способны принимать один дополнительный электрон, в то время как медиаторы двухэлектронного переноса представляют собой химические соединения, которые в условиях протекания электрохимической реакции способны принимать два дополнительных электрона. Как показано на фиг.2В, медиаторы одноэлектронного переноса способны передавать один электрон от фермента к рабочему электроду, а медиаторы двухэлектронного переноса, как показано на фиг.2С, способны передавать два электрона.

Несмотря на то что могут использоваться другие медиаторы, медиаторы двухэлектронного переноса являются предпочтительными, по сравнению с медиаторами одноэлектронного переноса, благодаря их способности передавать приблизительно вдвое больше электронов от ферментной системы к рабочему электроду для того же самого молярного количества медиатора. За счет уменьшения количества медиатора, требуемого для работы сенсора, полосковые сенсоры по настоящему изобретению, по сравнению с обычными полосковыми сенсорами, могут продемонстрировать увеличенную долговременную стабильность. Указанное увеличение стабильности можно объяснить снижением денатурации фермента медиатором во время хранения. Указанное увеличение стабильности можно также объяснить уменьшением количества медиатора, способного окислять фермент во время хранения.

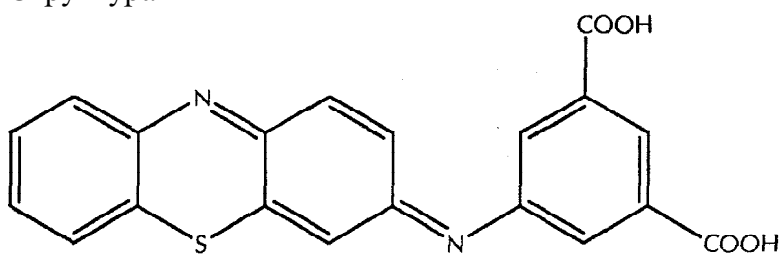
Примеры медиаторов одноэлектронного переноса включают такие соединения, как 1,1'-диметилферроцен, ферроцианид и феррицианид, гексаамин рутения (III) и рутения (II). Медиаторы двухэлектронного переноса включают органические хиноны и гидрохиноны, такие как фенантролинхинон; производные фенотиазина и феноксазина; 3-(фениламино)-3Н-феноксазины; фенотиазины; и 7-гидрокси-9,9-диметил-9Н-акридин-2-он и его производные. Примеры дополнительных медиаторов двухэлектронного переноса включают электроактивные органические молекулы, например, описанные в патентах США № 5393615; 5498542 и 5520786, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

Предпочтительные медиаторы двухэлектронного переноса включают 3-фенилимино-3Н-фенотиазины (PIPT) и 3-фенилимино-3Н-феноксазины (PIPO). Более предпочтительные медиаторы двухэлектронного переноса включают карбоновую кислоту или соль, такую как соли аммония, производных фенотиазина. В настоящем

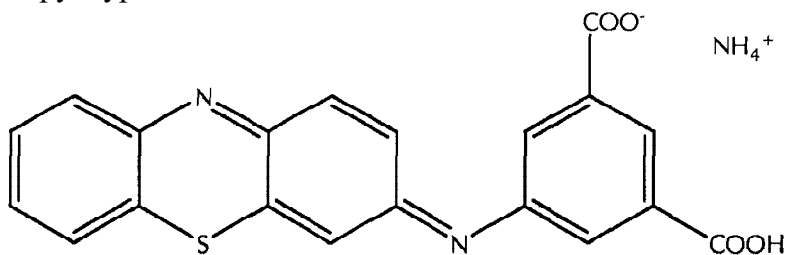
изобретении наиболее предпочтительные медиаторы двухэлектронного переноса включают (Е)-2-(3Н-фенотиазин-3-илиденамино)бензол-1,4-дисульфоновую кислоту (Структура I), (Е)-5-(3Н-фенотиазин-3-илиденамино)изофталевую кислоту (Структура II), аммония (Е)-3-(3Н-фенотиазин-3-илиденамино)-5-карбоксибензоат (Структура III) и их сочетания. Структурные формулы указанных медиаторов представлены ниже.



Структура I



Структура II



Структура III

С другой стороны, предпочтительные медиаторы двухэлектронного переноса имеют окислительно-восстановительный потенциал, который, по крайней мере, на 100 мВ меньше, более предпочтительно, по крайней мере, на 150 мВ меньше, чем окислительно-восстановительный потенциал феррицианида.

Слой реагента 275, 285 можно нанести любыми обычными способами, такими как трафаретная печать, осаждение из жидкости или струйное осаждение. В соответствии с одним аспектом слой наносят трафаретной печатью. При прочих равных факторах угол наклона ракеля может инверсно влиять на толщину слоев реагента. Например, когда ракель перемещается приблизительно под углом 82° к изолирующей подложке 110, то толщина слоя может приблизительно составлять 10 мкм. Аналогично, когда угол наклона ракеля к изолирующей подложке 110 равен приблизительно 62°, то можно получить более толстые слои в 30 мкм. Таким образом, при меньших углах ракеля можно получить более толстые слои реагента. Помимо угла наклона ракеля на полученную толщину слоев реагента 275, 285 могут оказывать влияние другие факторы, такие как вязкость наносимого вещества, а также размер ячеек сита и комбинация эмульсий.

Если предпочтительны более тонкие слои реагента, то потребуются способы нанесения, отличные от трафаретной печати, такие как микропипетирование, струйная печать или контактное нанесение. Указанными способами осаждения обычно получают сухие слои реагента с микронной или субмикронной толщиной, такой как 1-2 мкм. Например, методы контактного нанесения позволяют получить слои реагента со средней толщиной 1 мкм. Например, толщину слоя реагента при контактном нанесении можно контролировать количеством полимера, который включают в композицию реагента, при этом большее содержание полимера приводит к более толстым слоям реагента. Для поддержания требуемых рабочих характеристик и/или надежного измерения определяемого при анализе вещества в пределах диффузионного барьерного слоя (DBL) более тонкие слои реагента могут потребовать приложения меньших длительностей импульсов, чем более толстые слои реагента.

Рабочий электрод 175 также может включать DBL, который является неотъемлемой частью слоя реагента 275 или который представляет собой отдельный слой 290, как показано на фиг.2А. Так, DBL можно сформировать как комбинацию реагент/DBL на проводнике, как отдельный слой на проводнике или как отдельный слой на слое реагента. Когда рабочий электрод 175 включает отдельный DBL 290, то слой реагента 275 может располагаться, а может не располагаться на DBL 290. Вместо размещения на DBL 290 слой реагента 275 может находиться на любой части полоскового сенсора 100, который позволяет реагенту солибилизироваться в образце. Например, слой реагента 175 может находиться на изолирующей подложке 110 или на колпачке 120.

DBL представляет собой образованное порами пространство, в объеме которого могут удерживаться определяемые химические вещества. Поры DBL могут быть выбраны таким образом, чтобы измеряемые виды аналита могли диффундировать в DBL, в то время как физически более крупные составляющие образца, такие как эритроциты, практически отделяются. Хотя в обычных полосковых сенсорах для защиты поверхности рабочего электрода от эритроцитов с помощью фильтрации используют различные материалы, DBL представляет собой образованное порами пространство, в котором находится и изолируется часть измеряемых видов, содержащихся в образце.

В том случае когда слой реагента 275 включает водорастворимое связующее, любая часть связующего вещества, которая не солибилизируется в образце до приложения возбуждения, может функционировать как интегральный DBL. Средняя начальная толщина комбинации DBL/слой реагента предпочтительно составляет меньше чем 16 или 8 микрон (мкм) и более предпочтительно составляет меньше чем 4 мкм. В настоящем изобретении наиболее предпочтительная средняя начальная толщина комбинации DBL/слой реагента составляет от 0,25 до 3 мкм или от 0,5 до 2 мкм. Требуемая средняя начальная толщина комбинации DBL/слой реагента может быть выбрана для конкретной длительности возбуждения исходя из того, когда скорость диффузии измеряемых видов от DBL к поверхности проводника, такой как поверхность проводника 170 или поверхность проводника 270 на поверхности, приведенная на фиг.2А, станет относительно постоянной. В соответствии с одним аспектом DBL/слой реагента может иметь среднюю начальную толщину 1 мкм или меньше в комбинации с длительностью импульса возбуждения 0,25 сек или меньше.

Отдельный DBL 290 может включать любое вещество, которое обеспечивает формирование требуемого образованного порами пространства, при этом он частично или медленно растворим в образце. В соответствии с одним аспектом

отдельный DBL 290 может включать соединение для связывания реагента, которое не содержит реагент. Средняя начальная толщина отдельного DBL 290 может составлять от 1 до 15 мкм и более предпочтительно может составлять от 2 до 5 мкм.

На фиг.3 представлен порядок проведения электрохимического анализа 300 для определения присутствия и необязательно концентрации аналита 322 в образцах 312. На стадии 310 образец 312 вводят в полосковый сенсор 314, такой как полосковый сенсор, изображенный на фиг.1A-1B и 2A. Слои реагента, такие как 275 и/или 285 на фиг.2A, начинают сольобилизоваться в образце 312 и тем самым позволяют начаться реакции. На данном этапе проведения анализа может оказаться полезным предусмотреть начальную временную задержку, или "инкубационный период", прежде чем реагенты начнут взаимодействовать с образцом 312. Предпочтительно, начальная временная задержка может составлять от 0,5 до 5 сек. Более всестороннее определение начальных временных задержек можно найти в патентах США № 5620579 и 5653863.

В процессе протекания реакции часть определяемого при анализе вещества 322, которая содержится в образце 312, химически или биохимически окисляется или восстанавливается на стадии 320, например, оксидоредуктазой. При окислении или восстановлении электроны на стадии 330 могут переноситься между аналитом 322 и медиатором 332, например, посредством оксидоредуктазы.

На стадии 340 несущий заряд медиатор 332 электрохимически возбуждается (окисляется или восстанавливается). Например, в том случае когда образец 312 цельной крови, содержащий глюкозу, на стадии 320 окисляется ферментной системой PQQ-GDH, которая затем на стадии 330 переносит два электрона, чтобы восстановить производное фенотиазина, являющегося медиатором, то возбуждение на стадии 340 окисляет находящийся на рабочем электроде медиатор, в роли которого выступает производное фенотиазина. Указанным образом электроны селективно переносятся от глюкозы, которая является определяемым при анализе веществом, к рабочему электроду полоскового сенсора, где они могут быть обнаружены измерительным устройством.

Электрический ток, который возникает при возбуждении 340, может быть при возбуждении на стадии 340 зарегистрирован на стадии 350 как функция времени. На стадии 360 образец релаксирует. Преимущественно во время релаксации 360 электрический ток не регистрируют. Зарегистрированный ток и показатели времени могут быть проанализированы на стадии 370 с целью определения наличия и/или концентрации аналита 322 в образце 312.

Амперометрический датчик подает потенциал (напряжение) к полосковому сенсору для того, чтобы возбудить измеряемое химическое вещество, при этом контролируют электрический ток (силу тока в амперах). Обычные амперометрические датчики могут поддерживать потенциал и одновременно измеряют электрический ток для непрерывного считывания, например, длительности импульсов от 5 до 10 сек. В отличие от обычных способов рабочие циклы, используемые в электрохимическом анализе 300, заменяют непрерывные длительные импульсы считывания множеством коротких возбуждений и релаксаций. Более детальное описание множества возбуждений и релаксаций, или "управляемой" последовательности импульсов может быть найдено в заявке РСТ/US2006/028013, поданной 19 июля 2006, с названием "Контролируемая амперометрия."

Как видно из фиг.3, возбуждение 340, регистрация 350 и релаксация 360 составляют один рабочий цикл. Предпочтительно, по крайней мере, 2, 4, 6 или 7 рабочих циклов прикладывают в течение независимых интервалов времени, составляющих 3, 5, 7, 9

или 14 сек. В соответствии с одним аспектом рабочие циклы прикладывают в течение интервала времени, составляющего 3-14 сек. В соответствии с другим аспектом, по крайней мере, 4 рабочих цикла прикладывают в пределах 30 сек, 9 сек или меньше. В соответствии с другим аспектом от 2 до 6 рабочих циклов может быть приложено в пределах 10 сек или меньше. В соответствии с другим аспектом от 2 до 4 рабочих циклов может быть приложено в пределах 3-9 сек.

После возбуждения на стадии 340 на стадии 360 измерительное устройство может разомкнуть цепь через полосковый сенсор 314 и тем самым позволяет системе релаксировать. Во время релаксации 360 электрический ток, возникающий при возбуждении 340, значительно ослабляется, по крайней мере, вдвое, предпочтительно ослабляется на порядок величины и более предпочтительно становится равным нулю. Предпочтительно состояние с нулевым током обеспечивается открытой цепью или другим известным специалистам способом, чтобы обеспечить практически нулевой электрический ток. В соответствии с одним аспектом длительность релаксации 360 составляет, по крайней мере, 0,5 или, по крайней мере, 0,2 сек. В соответствии с другим аспектом длительность релаксации 360 составляет от 0,2 до 3 сек или от 0,5 до 1 сек.

На фиг.4F-4D приведены примеры последовательностей контролируемых амперометрических циклов, где несколько рабочих циклов прикладывают к полосковому сенсору после введения образца. В указанных примерах используют прямоугольные импульсы; тем не менее, могут использоваться импульсы другой формы, которые совместимы с устройством датчика и тестируемым образцом.

Каждая изображенная последовательность импульсов включает импульс начального возбуждения 420 длительностью одна секунда с последующими несколькими импульсами возбуждения 430 длительностью 0,25 сек. Импульс начального возбуждения 420 может быть более продолжительным, чем последующие возбуждения 430. Например, импульс начального возбуждения 420 может длиться от 0,75 до 3 сек. Длину импульса возбуждения 420 можно подобрать таким образом, чтобы окислить относительно небольшое количество ферментной системы, осажденной на полосковом сенсоре. Если используют импульс начального возбуждения 420, то он более продолжителен, чем последующие множественные возбуждения 430. Например, последовательность импульса может включать импульс начального возбуждения 420, длительность которого составляет 2 сек, и последующую релаксацию при открытой цепи, длительность которой составляет 3 сек, сопровождаемую последовательностью возбуждений 430, длительность которых равна 0,125 сек.

Длительность множественных возбуждений 430 может быть в диапазоне от 0,01 до 3 сек. В соответствии с одним аспектом общая длительность возбуждения составляет две секунды или меньше и, таким образом, включает начальный импульс 420 длительностью одна секунда, сопровождаемый четырьмя возбуждениями 430 длительностью 0,25 сек. В соответствии с другим аспектом общая длительность возбуждения составляет 1,5 сек или меньше и, таким образом, включает начальный импульс 420 длительностью одна секунда, сопровождаемый одним или двумя возбуждениями 430 длительностью 0,25 сек. Последовательность импульсов может включать дополнительные возбуждения, такие как импульсы возбуждения 440, приведенные на фиг.4A. В соответствии с другим аспектом импульсы возбуждения могут иметь различные амплитуды, как показано на фиг.4C и 4D. В соответствии с предпочтительным аспектом в том случае, когда используют импульсы возбуждения с различными амплитудами, разность в величине амплитуд может быть в пределах 500

мВ.

Короткие импульсы возбуждения могут позволить провести точный анализ образца с использованием композиций реагента, которые содержат меньшие концентрации полимера, ферментной системы и медиатора, по сравнению с обычными композициями. Кроме того, короткие импульсы возбуждения позволяют закончить анализ в пределах 8,5 сек или меньше или более предпочтительно закончить анализ за 5 сек или меньше после приложения первоначального сигнала к полосковому сенсору.

Могут использоваться как короткие, так и длительные импульсы возбуждения. Измерения величин электрического тока, из которых определяют концентрацию аналита, предпочтительно проводят в пределах 2 сек или 1 сек после подачи первичного сигнала. Более предпочтительно множественные короткие возбуждения комбинируют с измерениями тока, которые проводят в пределах 2 сек, 1 сек или меньше после подачи первичного сигнала, с целью определения в образце концентрации аналита.

Было показано, что сочетание последовательностей управляемых амперометрических импульсов по настоящему изобретению и композиции реагента, включая конкретные количества полимерного связующего, ферментной системы и/или медиатора, уменьшает гематокритную систематическую погрешность измерения и/или увеличивает долговременную стабильность. Хотя обычные полосковые сенсоры часто характеризуют процентным содержанием каждого ингредиента в композиции реагента, именно плотность каждого ингредиента в композиции реагента (абсолютное количество на единицу площади) определяет долговременную стабильность.

Ограничивая доступные для взаимодействия количества медиатора и фермента, можно существенно сократить количество медиатора, которое восстанавливается под действием окружающей среды (т.е. количество медиатора, не чувствительного для определения концентрации аналита), и тем самым увеличить количество медиатора, которое доступно на момент проведения анализа. Тем самым обеспечивается полезное снижение фонового тока. Поскольку в попытке улучшить долговременную стабильность в обычных биодатчиках используют избыток фермента, то авторы не ожидали, что уменьшение количества ферментной системы и/или медиатора способно улучшить долговременную стабильность биодатчиков по настоящему изобретению. Кроме того, если индивидуальные композиции реагента оптимизировать для каждого электрода, то относительное количество медиатора, доступного для взаимодействия с ферментом, может быть дополнительно уменьшено по сравнению с вариантом, когда используют единственную композицию реагента для полоскового сенсора.

Например, гематокритные систематические погрешности измерения выше для более высоких концентраций полимера, составляющих 2%, 1,5% и 1%, чем концентрации полимера, равной 0,5% (мас./мас.), в растворе реагента при использовании больших навесок фермента. Это можно объяснить тем, что более высокие концентрации полимера приводят к более толстым слоям реагента, которые влияют на систематическую гематокритную погрешность измерения при регидратации. Таким образом, поскольку время анализа сокращается, быстрая регидратация без увеличения систематической гематокритной погрешности измерения может оказаться предпочтительной. В таком случае может быть достигнут предпочтительный баланс между содержанием полимера и навеской фермента в композиции реагента с тем, чтобы получить требуемый уровень гидратации в течение времени проведения анализа. При использовании в полосковом сенсоре предпочтительные плотности

осаждения полимера могут составлять 2 мкг/мм^2 или меньше, а более предпочтительно плотности осаждения полимера составляют от 0,8 до $1,5 \text{ мкг/мм}^2$.

Когда осаждение на рабочий электрод и противэлектрод осуществляют из растворов, то контролируют количество ферментной системы, находящейся на рабочем электроде. Так, осаждая приблизительно 0,24 мкл раствора, содержащего 1,2 единиц ферментной системы PQQ-GDH, 2,57 мкг медиатора со Структурой I, 1,18 мкг полимера СМС и 3,28 мкг фосфатного буфера, получают раствор реагента с концентрацией 5 ед./мкл ферментной системы, 24 мМ медиатора, 0,5% полимера и 100 мМ фосфатного буфера.

При нанесении указанного раствора реагента на предназначенную для осаждения область с площадью $1,5 \text{ мм}^2$, включая площадь рабочего электрода 1 мм^2 , получают плотность осаждения ферментной системы на рабочем электроде, равную приблизительно $0,8 \text{ ед./мм}^2$ ($1,2 \text{ единиц/} 1,5 \text{ мм}^2$), плотность осаждения медиатора $1,72 \text{ мкг/мм}^2$ ($2,57 \text{ мкг/} 1,5 \text{ мм}^2$), плотность осаждения полимера $0,8 \text{ мкг/мм}^2$ и плотность осаждения фосфатного буфера $2,2 \text{ мкг/мм}^2$. Аналогично для раствора реагента, содержащего приблизительно 2 ед./мкл ферментной системы PQQ-GDH, 24 мМ медиатора со Структурой I, 0,5% СМС и 100 мМ фосфатного буфера, плотность осаждения ферментной системы составит приблизительно $0,3 \text{ ед./мм}^2$. Кроме того, удельную активность ферментной системы можно пересчитать в весовую плотность, выраженную в мкг/м^2 . Например, если активность ферментной системы составляет 770 ед./мг, то плотность активности ферментной системы, равная $0,3 \text{ ед./мм}^2$, составит $0,39 \text{ мкг/мм}^2$ в единицах весовой плотности. Таким образом, можно учесть активность ферментной системы при определении плотности осаждения для ферментной системы.

Обычные слои реагента имеют плотность осаждения фермента от 1 до 6 мкг/мм^2 . Напротив, после их осаждения композиции реагента по настоящему изобретению могут иметь плотности осаждения ферментной системы меньше чем 1 мкг/мм^2 , предпочтительно меньше чем $0,5 \text{ мкг/мм}^2$. Растворы для осаждения по настоящему изобретению могут включать приблизительно 4 ед./мкл или меньше ферментной системы или могут включать приблизительно 3 ед./мкл или меньше ферментной системы. В настоящем изобретении 2,2 ед./мкл или меньше ферментной системы PQQ-GDH могут быть включены в раствор реагента. Таким образом, когда композицию реагента наносят на полосковый сенсор, на полосковом сенсоре может находиться 1,3 единицы или меньше ферментной системы, при этом более предпочтительное количество составляет от 0,3 до 0,8 единиц.

В обычных полосковых сенсорах в общем случае плотность осаждения медиатора равна в пределах от 10 до 25 мкг/мм^2 . Напротив, плотность осаждения медиатора 8 мкг/мм^2 и меньше является предпочтительной для настоящего изобретения, а плотности осаждения медиатора 5 мкг/мм^2 и менее являются более предпочтительными. В настоящем изобретении наиболее предпочтительны плотности осаждения медиатора 2 мкг/мм^2 и меньше. В соответствии с предпочтительным аспектом двухэлектронные медиаторы более предпочтительны, чем одноэлектронные медиаторы.

Ниже в таблице I приведены плотности осаждения полимерного связующего, буфера, ферментной системы и медиатора, являющихся компонентами композиций реагента, используемых на фиг.5А-5Е и на фиг.6А-6С, которые обсуждаются ниже.

Плотность осаждения ферментной системы для композиций реагента 3 (RC3), равная $0,42 \text{ мкг/мм}^2$, приблизительно на 60% меньше, чем наименьшее значение для рассмотренных ранее полосок сенсоров.

Аналогично плотности медиатора, приведенные в таблице I, приблизительно на порядок меньше, чем плотности медиатора обычных полосковых сенсоров. Например, плотность осаждения медиатора в RC3 составляет приблизительно одну пятую от плотности осаждения медиатора в обычном полосковом сенсоре. Указанное уменьшение плотности осаждения медиатора, по сравнению с обычными полосковыми сенсорами, позволяет существенно повысить долговременную стабильность композиции реагента по настоящему изобретению.

Таблица I				
	СМС, мкг/мм^2	Буфер, мкг/мм^2	PQQ/GDH, мкг/мм^2	Медиатор, мкг/мм^2
RC1	1,59	2,17	3,99	1,72
RC2	0,79	2,19	1,07	1,72
RC3	0,79	2,19	0,42	1,72
RC4	0,77	2,22	0,99	1,36

На фиг.5А изображена кривая зависимости дозы глюкозы при различных гематокритных числах в образцах цельной крови для полоскового сенсора RC2, который включает 1,2 единицы на один сенсор (ед./сенсор) при плотности осаждения фермента PQQ-GDH, равной $0,8 \text{ ед./мм}^2$. На фиг.5В изображена кривая зависимости дозы глюкозы при различных гематокритных числах в образцах цельной крови для полоскового сенсора RC3, который включает 0,5 ед./сенсор при плотности осаждения фермента PQQ-GDH, равной $0,3 \text{ ед./мм}^2$. Как сенсор с 1,2 ед., так и сенсор с 0,5 ед. обеспечивают гематокритную систематическую погрешность измерения меньше чем $\pm 5\%$. Тем не менее, наблюдается различие между сенсорами с 1,2 ед. и 0,5 ед., касающееся чувствительности системы и отрезка, отсекаемого на оси координат (отсечения).

Уменьшение отношения отсечения к угловому коэффициенту можно увидеть в случае 0,5 ед./сенсор, показанном на фиг.5В, при сравнении отношений отсечения к угловому коэффициенту (I/S), выраженных в мг/дл, по сравнению со случаем 1,2 ед./сенсор, показанным на фиг.5А, при этом меньшие величины отношений соответствуют уменьшению фонового сигнала. Так, отношение I/S для случая 1,2 ед./сенсор, приведенное на фиг.5А, составляет $\sim 6 \text{ мг/мл}$, в то время как отношение I/S для случая 0,5 ед./сенсор, приведенное на фиг.5В, составляет $\sim 0,15 \text{ мг/мл}$, т.е. соответствует уменьшению приблизительно в 40 раз для гематокритного числа 40%. Применительно к фоновому сигналу установлено, что сенсор 0,5 ед. обладает лучшими рабочими характеристиками, чем сенсор 1,5 ед.

В соответствии с одним аспектом такая рабочая характеристика, как низкий фон (небольшой отрезок, отсекаемый на оси координат), может быть обеспечена при относительно небольших плотностях осаждения медиатора и фермента. В соответствии с другим аспектом такая рабочая характеристика, как высокая чувствительность (большой угол наклона), может быть обеспечена путем оптимизации отношения распределения времени возбуждений и релаксаций в последовательности импульсов. Например, сочетание относительно длительного периода релаксации, равного 1,5 сек, с относительно коротким периодом возбуждения, равным 0,25 сек, обеспечивает большую плотность тока на поверхности рабочего

электрода. В числовом выражении относительно маленькое значение отрезка, отсекаемого на оси координат, по сравнению с относительно большим значением углового коэффициента дополнительно улучшает I/S. Таким образом, предпочтительные рабочие характеристики сенсора (малые значения I/S) могут быть

Приведенное ниже уравнение (1) устанавливает аналитическую зависимость между погрешностью измерения тока и итоговой погрешностью измерения при определении концентрации глюкозы как функции отношения I/S, когда зависимость глюкозы от

тока равна $i = S \cdot G + Int$:

$$\frac{\Delta G/G}{\Delta i/i} = \frac{SD_G/G}{SD_i/i} = \frac{\%CV_G}{\%CV_i} = 1 + \frac{1}{G} \frac{Int}{S} \quad (1)$$

где G обозначает концентрацию глюкозы, $\Delta G/G$ обозначает относительную ошибку измерения концентрации глюкозы, выраженную в мг/дл, $\Delta i/i$ обозначает относительную ошибку измерения величины тока, SD_G/G обозначает относительное стандартное отклонение в $\Delta G/G$, SD_i/i обозначает относительное стандартное отклонение в $\Delta i/i$, $\%CV_G$ обозначает коэффициент дисперсии, который пропорционален относительному стандартному отклонению и представляет собой точность измерения глюкозы, $\%CV_i$ обозначает коэффициент дисперсии, который пропорционален относительному стандартному отклонению и представляет собой точность измерения тока, а Int/S обозначает отношение отрезка, отсекаемого на оси координат, к углу наклона (I/S), выраженное в мг/дл. Уравнение (1) можно получить из $i = S \cdot G + Int$, взяв производную обратной функции $G = f(i) = (i - Int)/S$ при дифференцировании и анализе распространения ошибок. Благодаря члену $1 + 1/G$, погрешность измерения тока, равная 1, приводит к погрешности измерения концентрации глюкозы больше чем 1, если значение I/S больше нуля. Отношения отсечения к угловому коэффициенту (I/S), выраженные в мг/дл, можно выразить в миллимоль на литр (мМ/л), разделив значение I/S (мг/дл) на 18 ($[мг/дл]/18 = [мМ]$ для глюкозы).

Погрешность измерения тока характеризует дисперсию между погрешностями измерения тока для нескольких полосковых сенсоров. Таким образом, погрешность измерения тока представляет собой величину, на которую зарегистрированная величина тока отличается от средней величины тока, когда идентичные образцы глюкозы анализируют, используя несколько полосковых сенсоров. Чем больше зарегистрированная величина тока, измеренная конкретным полосковым элементом, отклоняется от среднего значения для нескольких полосковых элементов, тем хуже величина тока, зарегистрированная указанным полосковым элементом, коррелирует с действительной концентрацией глюкозы в образце. Таким образом, точность измерения тока может быть определена из погрешности ее измерения, или $\%CV_i$, а точность измерения глюкозы также может быть определена из погрешности ее измерения, или $\%CV_G$.

Ниже в таблице II приведены углы наклона прямой (значения $1/G$), рассчитанные по уравнению (1) для нескольких концентраций глюкозы, выраженных в мг/дл. Так, $1/57,6 = 0,0174$, $1/111 = 0,009$, $1/222,25 = 0,0045$, $1/444,75 = 0,0022$ и $1/669 = 0,0015$, где в знаменателе указана концентрация глюкозы в протестированном образце плазмы. По мере увеличения концентрации глюкозы значения угла наклона прямой уменьшаются в соответствии с уравнением (1).

Таблица II

Концентрации глюкозы в мг/дл	Отношение I/S, рассчитанное из уравнения (1)	Экспериментально найденное отношение I/S
57,6	0,0174	0,0174
111	0,009	0,009
222,25	0,0045	0,0045
444,75	0,0022	0,0022
669	0,0015	0,0015

На фиг.5C приведены отношения I/S, выраженные в мг/дл, которые определяют из экспериментальных данных. Величины тока получают с использованием последовательности управляемых амперометрических импульсов для образцов цельной крови с гематокритным числом 40% и с концентрациями глюкозы 57,6; 111; 222,25; 444,75 или 669 мг/дл. Калибровочные константы определяют через 4; 5,5; 7; 8,5; 10; 11,5; 13 и 14,5 сек после начала проведения анализа. Как видно из таблицы, расчетные и экспериментально найденные значения совпадают, что подтверждает способность уравнения (1) описывать поведение полоскового сенсора независимо от погрешности измерения глюкозы и электрического тока.

Для низких концентраций глюкозы, таких как 50 мг/дл и меньше, предпочтительно поддерживают низкое значение I/S с целью уменьшить погрешность, которая вносится в определение концентрации глюкозы погрешностью измеренной величины электрического тока. Например, если отношение I/S составляет 50 мг/дл, а концентрация глюкозы составляет 50 мг/дл, то отношение $\%CV_G/\%CV_i$ равно $2 [1 + (I/S)/G = 1 + 50/50 = 2]$, и любая погрешность измерения электрического тока в 2 раза увеличивает погрешность измерения концентрации глюкозы. Так, если типичная погрешность в измерении величины тока составляет 3,5%, то система, в которой отношение I/S равно 50 мг/дл, приводит к погрешности измерения глюкозы, равной 7%.

На фиг.5D приведены отношения I/S, равные от 0-20 мг/дл для концентраций глюкозы 55,375; 112,25 и 433,5 мг/дл, которые определяют с помощью полоскового сенсора, содержащего композиции реагентов RC2, RC3 или RC4, которые приведены выше в таблице I. По мере того как отношения I/S уменьшаются до величины меньше чем 20, неточность, связанная с измеренной концентрацией глюкозы, также уменьшается. Таким образом, показано, что низкие отношения I/S предпочтительны для низких концентраций глюкозы, как уже указано выше.

Если учитывать все указанные факторы, то предпочтительными являются полосковые сенсоры, для которых отношение I/S равно 20 мг/дл или меньше, а более предпочтительными являются отношения, равные 10 мг/дл или меньше или 6 мг/дл или меньше. В настоящем изобретении полосковые сенсоры, у которых отношение I/S равно 1 мг/дл или меньше, являются еще более предпочтительными.

На фиг.5E приведены практически идентичные гематокритные характеристики датчика по настоящему изобретению, который используют для образцов плазмы и образцов цельной крови с гематокритным числом, равным 40%. В данном примере композицией реагента в полосковом сенсоре является RC2, как описано выше в Таблице I. Таким образом, управляемые последовательности импульсов в сочетании с композициями реагента по настоящему изобретению приводят к значительному снижению гематокритного эффекта, наблюдаемого в образцах цельной крови.

На фиг.6A показано воздействие стресса под влиянием факторов окружающей среды на долговременную стабильность полосковых сенсоров. На оси Y на графике отложена абсолютная систематическая погрешность, выраженная в мг/дл, для концентраций глюкозы меньше 75 мг/дл или % погрешности для концентраций

глюкозы, равных и превышающих 75 мг/дл, для полосковых сенсоров, подвергнутых стрессу под влиянием факторов окружающей среды, по сравнению с полосковыми сенсорами, которые хранились при -20°C. Подвергнутые стрессу полосковые сенсоры хранили при 50°C в течение двух недель перед проведением ускоренного теста, моделирующего хранение при 25°C в течение 18 месяцев. Поскольку плотность медиатора была первоначально низкой (1,72 мкг/мм²), то линия средней систематической погрешности на фиг.6А показывает, что по мере того как плотность фермента уменьшается от RC1 (3,2 ед./мм², или 4 мкг/мм² при величине активности конкретного фермента, равной 770 ед./мг) к RC2, RC3 и RC4 (все имеют 0,8 ед./мм² или меньше), уменьшаются и погрешности измерения, вызванные действием факторов окружающей среды.

Фиг.6А также показывает, что композиция реагента по настоящему изобретению может обеспечить долговременную стабильность, достаточную для того, чтобы не потребовался начальный длительный окислительный импульс перед проведением анализа, как описано в патенте США № 5653863, выданном на имя Genshaw et al. Общая продолжительность анализа, результаты которого приведены на фиг.6А, составляет 4,5 сек, а полное время окисления равно 1,5 сек (соответствует последовательности импульсов, показанной на фиг.4А). Таким образом, лишь 30% времени анализа тратится на окисление образца цельной крови, как показано на фиг.6А, по сравнению с ~67% общего времени анализа в патенте США № 5653863 (20 сек окисления за 30 сек общего времени анализа). В соответствии с одним аспектом 45% или меньше от общего времени анализа тратится на окисление образца. В соответствии с другим аспектом 35% или меньше от общего времени анализа тратится на окисление образца.

Несмотря на то что медиатор со Структурой III имеет несколько меньшую погрешность измерения, чем медиатор со Структурой I, приведенный на фиг.6А, эту небольшую разницу можно объяснить действием других факторов в тестовой системе. Таким образом, композиции реагента RC2, RC3 и RC4 в сочетании с последовательностями контролируемых импульсов по настоящему изобретению обеспечивают погрешность измерения меньше чем $\pm 5\%$ после выдерживания при температуре 50°C в течение двух недель, в то время как RC1 с более высокой плотностью осаждения ферментной системы не дает подобную погрешность измерения.

На фиг.6В показано воздействие стресса под влиянием факторов окружающей среды на долговременную стабильность полосковых сенсоров, которые хранили при 50°C в течение четырех недель. На оси Y графика отложена абсолютная систематическая погрешность, выраженная в мг/дл, для концентраций глюкозы меньше 75 мг/дл или % погрешности для концентраций глюкозы, равных и превышающих 75 мг/дл, для полосковых сенсоров, подвергнутых стрессу под действием факторов окружающей среды, в сравнении с полосковыми сенсорами, которые хранились при -20°C. Увеличение погрешности измерения для 4-недельного периода хранения на фиг.6В, по сравнению с более коротким 2-недельным периодом хранения фиг.6А можно отметить в значениях для RC1 на оси Y. Поскольку плотность медиатора была первоначально низкой (1,72 мкг/мм²), то линия средней систематической погрешности на фиг.6В показывает, что по мере того как плотность фермента уменьшается от RC1 (3,2 ед./мм², или 4 мкг/мм² при величине активности конкретного фермента, равной 770 ед./мг) к RC2, RC3 и RC4 (все имеют 0,8 ед./мм² или

меньше), уменьшаются и погрешности измерения, вызванные действием факторов окружающей среды. Таким образом, средняя систематическая погрешность для более длительного 4-недельного периода на фиг.6B также значительно уменьшается для RC2, RC3 или RC4, по сравнению с RC1. Даже после хранения в течение 4 недель при 50°C композиции реагентов RC2, RC3 и RC4 в сочетании с последовательностями контролируемых импульсов по настоящему изобретению имеют погрешность измерения меньше чем $\pm 5\%$.

На фиг.6C показана систематическая погрешность для трех композиций реагентов, включающих ферментную систему PQQ-GDH, после 52 недель при 25°C с относительной влажностью 60%. В отличие от фиг.6A и 6B для старения полосок используют более длительный период времени при более низкой температуре. Систематические погрешности RC2 и RC3 аналогичны систематическим погрешностям, которые наблюдаются при ускоренном старении, и в среднем составляют меньше чем $\pm 5\%$. RC4 показывает увеличение систематической погрешности, по сравнению с результатами по ускоренному старению, приведенными на фиг.6A и 6B, и увеличение в среднем составляет чуть меньше чем на $\pm 10\%$. Это увеличение можно объяснить ошибкой эксперимента или проблемой стабильности для партии медиатора со Структурой III, используемого в RC4, в конкретных условиях проведения указанного теста.

На фиг.6D приведены значения постоянной систематической погрешности для полоскового сенсора, включающего RC2, где опорные данные, которые используют для расчета концентрации аналита, взяты в определенное время после начала анализа. Например, линия, соответствующая 2,75 сек, представляет собой значение отношения систематической погрешности измерения/% систематической погрешности измерения для концентрации определяемого при анализе вещества, измеряемой после первого короткого импульса возбуждения, такого как возбуждение 430 на фиг.4A. Аналогично линия 4,375 сек представляет собой значение отношения погрешность измерения/% погрешности измерения для концентрации аналита, измеряемой после второго короткого импульса. Таким образом, при использовании полоскового сенсора, подвергнутого стрессу под влиянием факторов окружающей среды, который включает RC2, и последовательности управляемых импульсов, концентрацию аналита в образце можно точно определить меньше чем за 3 сек.

Пример 1. Изготовление полоскового сенсора

В соответствии с одним аспектом полосковые сенсоры по настоящему изобретению изготавливают контактным нанесением. Раствор реагента для противозэлектрода получают, приготавливая маточный раствор 1% карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в 100 мМ фосфатном буфере. Затем в растворе буфер/СМС растворяют достаточное количество порошкообразного медиатора и получают конечную концентрацию 100 мМ медиатора в 100 мМ фосфатного буфера и 1% СМС.

Раствор реагента для рабочего электрода обычно получают, приготавливая раствор 100 мМ фосфатного буфера и 0,5% СМС (например, 100 мл). Затем в маточном растворе буфер/СМС растворяют достаточное количество порошкообразного медиатора и получают раствор (например, 10 мл) с концентрацией 24-25 мМ медиатора в 100 мМ фосфатного буфера и 0,5% СМС. Затем для получения навески фермента 5 ед./мкл приблизительно 33,4 мг ферментной системы PQQ-GDH (с удельной активностью 749 ед./мг) смешивают с 5 мл раствора медиатор/буфер/СМС в стеклянном сосуде ($[5000 \text{ ед./мл} \cdot 5 \text{ мл}] / [749 \text{ ед./мг}] = 33,4 \text{ мг}$). Смесь медленно перемешивают, чтобы растворить добавляемый в раствор порошок

фермента. Указанный состав готовят для RC2. Если необходимо лишь 2 мл раствора реагента, то взвешивают приблизительно 13,4 мг фермента PQQ-GDH с удельной активностью 749 ед./мг. Аналогично для композиции RC3 в количестве 2 ед./мкл приблизительно 13,4 мг фермента PQQ-GDH с удельной активностью 749 ед./мг растворяют в 5 мл раствора медиатор/буфер/СМС и получают конечный раствор реагента для осаждения. Если необходимо лишь 2 мл конечного раствора реагента, то взвешивают приблизительно 5,34 мг фермента PQQ-GDH с удельной активностью 749 ед./мг и получают конечный раствор.

Противоэлектрод получают, используют контактное нанесение на поверхность графита из раствора реагента для противоэлектрода. Объем раствора при каждом осаждении составляет от приблизительно 0,2 до 0,24 мкл, и он растекается, покрывая площадь приблизительно от 1,5 до 2 мм².

Аналогично контактное нанесение используют для осаждения раствора реагента для рабочего электрода на поверхность графита и получают рабочий электрод. Объем раствора для нанесения на каждый рабочий электрод также составляет приблизительно 0,2-0,24 мкл, при этом раствор также растекается по графиту с образованием рабочего электрода. Готовой полоске сенсора дают высохнуть на воздухе, на 15 мин помещают в эксикатор и затем наносят конечный слой, получая готовые полоски сенсора. В соответствии с одним из аспектов плотности осаждения раствора реагента на рабочем электроде предпочтительно составляют 0,16 мкг/л/мм² (0,24 мкл/1,5 мм²) или меньше.

Пример 2. Исследования, которые проводят на донорах

Образцы цельной крови берут у 21 субъекта, страдающих от сахарного диабета. Для каждого субъекта проводят два анализа и получают 42 измерения для партии каждого сенсора с SS1 по SS4, как указано ниже в таблице III. Используют различные композиции реагента рабочего электрода и противоэлектрода для SS1-SS3, в то время как для SS4 используют единственную композицию реагента, которая практически покрывает оба электрода. SS1, SS2 и SS3 представляют собой различные производственные партии, в которых используют одно и то же количество реагента. Объем композиции реагента, который осаждают на индивидуальные проводники для SS1-SS3, составляет приблизительно 0,24 мкл, при этом каждая из двух площадей осаждения равна приблизительно 1,5 мм². Объем композиции реагента, который осаждают, чтобы покрыть оба проводника для SS1, составляет приблизительно 0,3 мкл, а общая площадь нанесения равна приблизительно 3 мм².

Таблица III

	Осажденный слой на рабочем электроде	Осажденный слой на противоэлектроде
SS1	1,62 мкг/мм ² СМС 1,11 мкг/мм ² буфера 0,58 мкг/мм ² ферментной системы PQQ/GDH 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1	1,62 мкг/мм ² СМС 1,11 мкг/мм ² буфера 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1
SS2	1,62 мкг/мм ² СМС 1,11 мкг/мм ² буфера 0,58 мкг/мм ² ферментной системы PQQ/GDH 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1	1,62 мкг/мм ² СМС 1,11 мкг/мм ² буфера 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1
	1,62 мкг/мм ² СМС 1,11 мкг/мм ² буфера	1,62 мкг/мм ² СМС

5	SS3	0,58 мкг/мм ² ферментной системы PQQ/GDH 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1	1,11 мкг/мм ² буфера 1,39 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1
	SS4	1,14 мкг/мм ² СМС 0,78 мкг/мм ² буфера 0,41 мкг/мм ² ферментной системы PQQ/GDH 1,95 мкг/мм ² медиатора со Структурой I pH 7,2 ± 0,1	Такой же, что и на рабочем электроде

Образцы анализируют, используя последовательность импульсов, у которых первичное возбуждение включает короткие импульсы возбуждения, отделенные друг от друга интервалами, равными приблизительно 0,25 сек, за которыми следует релаксация в течение 1 сек. После первичного возбуждения и релаксации прикладывают последовательность трех возбуждений с длительностью приблизительно 0,375 сек, которые разделяют две релаксации длительностью приблизительно по 1 сек. Выходной ток, который регистрируют приблизительно через 5 сек после приложения начального входного сигнала, используют для определения концентрации глюкозы в образце.

Ниже в таблицах IV и V приведены статистические результаты для гематокритной систематической погрешности измерения для образцов SS1-SS4, где два анализа проводят для каждого типа полоскового сенсора и для каждого из 21 образца крови и получают 42 значения. В таблице IV приведен угловой коэффициент, отрезок, отсекаемый на оси координат, и отношение I/S для партии каждого полоскового сенсора, а в Таблице V приведены проценты для значений, погрешность измерения которых лежит в пределах ±15/±15%, ±10/±10% или ±5/±5% от эталонного значения, полученного с помощью датчика фирмы YSI. Для концентраций глюкозы меньше чем 75 мг/дл систематическая погрешность измерения выражена в виде мг/дл (абсолютная величина), а для концентраций глюкозы 75 мг/дл и больше систематическая погрешность измерения выражена в процентах (относительная величина).

Таблица IV			
Датчик	Угловой коэффициент	Отрезок, отсекаемый на оси координат (отсечение)	Отношение I/S, мг/дл
SS1	34,61	91,73	2,65
SS2	32,65	-115,8	-3,55
SS3	30,76	-28,00	-0,91
SS4	33,91	106,87	3,15

Таблица V			
Датчик	% систематической погрешности в пределах ±15%	% систематической погрешности в пределах ±10%	% систематической погрешности в пределах ±5%
SS1	100	100	93
SS2	100	97,6	64
SS3	100	97,6	93
SS4	100	97,6	67

Из таблицы IV следует, что каждая партия полосковых сенсоров имеет отношение I/S меньше чем 5 мг/дл, т.е. подтверждает превосходные параметры полосковых сенсоров для фонового сигнала. Рабочие характеристики датчика можно охарактеризовать разбросом погрешности измерения, по сравнению с эталонными значениями. Разброс можно определить из процента значений погрешности, которые

попадают в определенные пределы, такие как ± 15 мг/дл / $\pm 15\%$ или ± 10 мг/дл / $\pm 10\%$. Чем меньше пределы, тем лучше рабочие характеристики. Множество факторов, включая погрешность измерения и гематокритный эффект, вносит свой вклад в величины погрешности. Обычно рабочие характеристики оценивают тем, что, по

5 меньшей мере, 95% популяции данных попадает в определенные границы эффективности. Так, из таблицы V следует, что 100% множества данных, полученных от SS1-SS4, попадают в пределы ± 15 мг/дл / $\pm 15\%$. Кроме того, 95% множества данных, полученных от SS1-SS4, попадают в пределы ± 10 мг/дл / $\pm 10\%$.

10 На фиг.7А приведена кривая зависимости дозы для партии SS1 для 21 образца цельной крови. Значение для R^2 , составляющее 0,997, указывает на способность полоскового сенсора точно определять значения тока, отражающие точное содержание глюкозы в образце. На фиг.7В приведены разбросы стандартной ошибки для партий с SS1 по SS4 с 42 измерениями, полученными для 21 образца с диапазоном

15 концентраций глюкозы при проведении исследований на донорах. Указанное число показывает, что 100% значений систематической погрешности измерения для всех полосковых сенсоров попадают в $\pm 15\%$ и что рабочие характеристики изготовленных партий SS1 и SS3 показывают лучшие характеристики, при этом 93% данных

20 попадают в лимит $\pm 5\%$. Более узкие значения разбросов стандартной ошибки для полосковых сенсоров можно объяснить повышенной чувствительностью и точностью, на что указывают небольшие величины отношений I/S, и тем, что полоски показывают слабый гематокритный эффект.

25 На фиг.7С показана гематокритная чувствительность и гематокритная систематическая погрешность измерения в зависимости от гематокритного числа образца, полученная для партии SS1, в сравнении с обычным полосковым сенсором, плотность осаждения в котором составляет 2,96 мкг/мм² полимера НЕС, 0,69 мкг/мм² для цитратного буфера, 2,14 мкг/мм² для фермента глюкозо-оксидаза и 13 мкг/мм² для

30 феррицианидного медиатора. Для партии SS1 гематокритная чувствительность равна -0,26, в то время как у обычных полосковых сенсоров угол наклона составляет -1,26, при этом больший по абсолютной величине угол наклона указывает на большую гематокритную чувствительность. Так, гематокритная чувствительность для партии SS1 приблизительно на 79% меньше, чем гематокритная чувствительность

35 обычных полосковых элементов.

Для более ясного и последовательного понимания приведенного описания и формулы изобретения приведены следующие определения.

"Устройство" определяется как полосковый электрохимический сенсор, который с

40 помощью проводников электрически соединен с электронным измерительным устройством, позволяющим количественно измерить в образце аналит.

"Измерительное устройство" определяется как электронное устройство, которое может прикладывать электрический сигнал на входе и измерять полученный на

45 выходе сигнал. Измерительное устройство в ответ на выходной сигнал может также обладать способностью определять наличие и/или концентрацию одного или нескольких аналитов.

"Аналит" определяется как одно или несколько веществ, присутствующих в образце. Анализ определяет присутствие и/или концентрацию присутствующих в

50 образце веществ.

"Образец" определяется как композиция, которая может содержать неизвестное количество аналита. Как правило, образец для электрохимического анализа является жидкостью, и предпочтительно образец представляет собой смесь на водной основе.

Образец может быть биологическим образцом, таким как кровь, моча или слюна. Образец также может быть производным биологического образца, таким как экстракт, разбавленный раствор, фильтрат или восстановленный в жидкости осадок.

"Проводник" определяется как электропроводящее вещество, которое остается неподвижным при проведении электрохимического анализа. Примеры проводниковых соединений включают твердые металлы, металлические пасты, электропроводящий углерод, проводниковые пасты на основе углерода и электропроводящие полимеры.

"Неионизирующееся вещество" определяется как вещество, которое не ионизируется при проведении электрохимического анализа определяемого при анализе вещества. Примеры неионизирующихся веществ включают углерод, золото, платину и палладий.

"Эффективность измерения" определяется терминами точность и/или воспроизводимость. Так, повышение эффективности измерения может быть повышением точности и/или воспроизводимости измерения.

"Воспроизводимость" определяет, насколько близки измерения детектируемого аналита для одного и того же образца. Воспроизводимость можно выразить в терминах разброса стандартной ошибки для нескольких измерений по сравнению со средним значением.

"Точность" определяет, насколько близко количество определяемого при анализе вещества, измеренное полосковым сенсором, соответствует его истинному количеству в образце. Точность можно выразить в терминах погрешности измерения, при этом большие значения отражают меньшую точность.

"Систематическая погрешность измерения" определяется как разница между измеренным значением и взятым для сравнения значением. Систематическая погрешность измерения может быть выражена в терминах "абсолютной систематической погрешности измерения" или "относительной систематической погрешности измерения". Абсолютная систематическая погрешность измерения может быть выражена в единицах измерения, таких как мг/дл, в то время как относительная систематическая погрешность измерения может быть выражена в виде процентного отношения абсолютного значения систематической погрешности измерения и взятого для сравнения значения. Как гематокритное число, так и постоянная систематическая погрешность могут быть выражены в терминах абсолютного значения погрешности измерения или в виде процента. Для определения гематокритной погрешности измерения используют концентрацию детектируемого аналита, полученную с помощью эталонного прибора, такого как YSI 2300 STAT PLUS™, который выпускает компания YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, как принятое значение для сравнения. Для определения постоянной систематической погрешности используют концентрацию детектируемого аналита, полученную с помощью полоскового сенсора, который хранили при температуре -20°C, с целью существенно снизить изменение композиции реагента под действием тепла.

"Гематокритная чувствительность" определяется как степень влияния изменений гематокритного числа в образце на значения гематокритной систематической погрешности измерения в процессе анализа.

"Долговременная стабильность" определяется для упакованных полосковых сенсоров, например, в фольге и с осушителем, которые хранят после изготовления при -20°C в течение от 2 до 4 недель, в сравнении с полосковыми сенсорами, подвергнутыми воздействию температуры 50°C в течение 2 или 4 недель соответственно. Можно считать, что хранение при 50°C в течение 2 недель

приблизительно соответствует 18 месяцам хранения при комнатной температуре. Среднее изменение или отклонение эффективности измерения для гематокритных уровней 0%, 50%, 100% и 400% для образцов, хранившихся при 50°C, в сравнении с полосковым сенсором, хранившимся при -20°C, указывает на дрейф долгосрочной стабильности или на "постоянную систематическую погрешность" для полоскового сенсора. В данном случае увеличение фоновых сигналов или систематические погрешности измерения указывают на снижение рабочих характеристик для полоскового сенсора. Таким образом, при хранении упакованных полосковых сенсоров при 50°C и при наблюдении изменения систематической погрешности измерения в сравнении с полосковыми элементами, хранившимися при -20°C, можно установить, насколько погрешность измерения увеличится для полосковых сенсоров, которые хранятся на складе в течение различных интервалов времени.

"Медиатор" определяется как вещество, которое может окисляться или восстанавливаться и которое может переносить один или несколько электронов. Медиатор является реагентом при проведении электрохимического анализа и не является детектируемым аналитом, но позволяет провести косвенное измерение детектируемого аналита. В простой системе медиатор претерпевает окислительно-восстановительную реакцию в ответ на окисление или восстановление детектируемого аналита. Окисленный или восстановленный медиатор затем претерпевает обратную реакцию на рабочем электроде полоскового сенсора и восстанавливает свою первоначальную степень окисления.

"Измеряемые химические соединения" определяются как любые электрохимически активные химические соединения, которые могут окисляться или восстанавливаться при определенном потенциале на поверхности электрода полоскового электрохимического сенсора. Примеры измеряемых химических соединений включают детектируемый аналит, субстрат или медиатор.

"Оксидоредуктаза" определяется как любой фермент, который облегчает окисление или восстановление измеряемых химических соединений. Оксидоредуктаза является реагентом. Термин оксидоредуктаза включает "оксидазы", которые облегчают протекание реакций окисления, где молекулярный кислород является акцептором электронов; "редуктазы", которые облегчают протекание реакций восстановления, в которых детектируемый аналит восстанавливается, а молекулярный кислород не является детектируемым аналитом; и "дегидрогеназы", которые облегчают протекание реакций окисления, в которых молекулярный кислород не является акцептором электронов. См., например, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition*, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997), p. 161, 476, 477, 560.

"Электроактивная органическая молекула" определяется как не содержащая металл органическая молекула, которая способна вступать в окислительно-восстановительную реакцию. Электроактивные органические молекулы могут вести себя как окислительно-восстановительные химические частицы и/или как медиаторы. Примеры электроактивных органических молекул включают кофермент пироллохинолинхинон (PQQ), бензохиноны и нафтохиноны, N-оксиды, нитрозосоединения, гидроксилламины, оксины, рибофлавины, феназины, фенотиазины, индофенолы и индамины.

"Связующее" определяется как вещество, которое служит основой и является защитной оболочкой для реагентов и при этом химически совместимо с реагентами.

"Средняя исходная толщина" определяется как средняя высота слоя в сухом

состоянии перед введением жидкого образца. Используют термин средняя толщина, поскольку верхняя поверхность слоя неровная и имеет возвышения и впадины.

“Плотность нанесения” определяется как масса вещества, нанесенного на определенную площадь. Например, когда 0,24 мкл раствора, содержащего 2,57 мкг твердого вещества, наносят на поверхность с площадью 1,5 мм², то в результате плотность нанесения составляет 1,72 мкг/мм² (2,57 мкг/1,5 мм²).

“Ферментная единица” определяется как количество ферментной системы, которое будет катализировать превращение (окисление или восстановление) 1 микромоля субстрата (детектируемого аналита) за 1 мин в нормальных условиях.

“Ферментная активность” или “активность” применительно к ферментной системе представляет собой количество ферментных единиц в объеме. Таким образом, активность можно определить в терминах ед./л или миллиед./мл, где 1 ед./л = мкмол/мин/л, например.

“Окислительно-восстановительная реакция” определяется как химическая реакция между двумя химическими частицами, включающая перенос, по крайней мере, одного электрона от первой химической частицы ко второй химической частице. Таким образом, окислительно-восстановительная реакция включает окисление и восстановление. Окислительная часть реакции включает потерю, по крайней мере, одного электрона первой химической частицей, а восстановительная часть включает добавление, по крайней мере, одного электрона ко второй химической частице. Ионный заряд химических веществ, которые окисляются, становится более положительным на количество, равное числу перенесенных электронов. Аналогично ионный заряд химических веществ, которые восстанавливаются, становится менее положительным на количество, равное числу перенесенных электронов.

“Степень окисления” определяется как формальный ионный заряд химических частиц, таких как атомы. Большая степень окисления, такая как (III), является более положительной, а меньшая степень окисления, такая как (II), является менее положительной. Нейтральные химические частицы имеют ионный заряд, равный нулю (0). Окисление химических частиц приводит к увеличению степени окисления указанных химических частиц, а восстановление химических частиц приводит к уменьшению степени окисления указанных химических частиц.

“Окислительно-восстановительная пара” определяется как две сопряженные частицы химического вещества, которые имеют разную степень окисления. Восстановление частиц, имеющих большую степень окисления, приводит к частицам, которые имеют меньшую степень окисления. В качестве альтернативы восстановление частиц, имеющих меньшую степень окисления, приводит к частицам, которые имеют большую степень окисления.

“Окисляемая частица” определяется как частица в окислительно-восстановительной паре, которая имеет меньшую степень окисления и которая способна окисляться с образованием частицы, которая имеет большую степень окисления. По аналогии термин “восстанавливаемая частица” определяется как частица в окислительно-восстановительной паре, которая имеет большую степень окисления и которая способна восстанавливаться с образованием частицы, которая имеет меньшую степень окисления.

“Растворимое окислительно-восстановительное соединение” определяется как вещество, способное претерпевать окисление или восстановление и которое растворимо в воде (рН 7, 25°C) на уровне, по крайней мере, 1,0 грамм на литр. Растворимое окислительно-восстановительное соединение включает электроактивные

органические молекулы, металлоорганические комплексы переходных металлов и координационные комплексы переходных металлов. Термин "растворимое окислительно-восстановительное соединение" не включает элементарные металлы и одиночные ионы металлов, особенно такие, которые нерастворимы или умеренно
5 растворимы в воде.

"Металлоорганический комплекс переходного металла", также обозначаемый как "ОТМ комплекс", определяется как комплексное соединение, в котором переходный металл связан, по крайней мере, с одним атомом углерода посредством сигма-связи (формальный заряд -1 на атоме углерода, соединенном сигма-связью с переходным металлом) или посредством пи-связи (формальный заряд 0 на атоме углерода, соединенном пи-связью с переходным металлом). Например, ферроцен представляет собой ОТМ комплекс с двумя цикlopентадиенильными (Ср) циклами, каждый из которых связан своими пятью атомами углерода к центральному атому железа посредством двух пи-связей и одной сигма-связи. Другим примером ОТМ комплекса является феррицианид (III) и его восстановленная ферроцианидная (II) противоположная часть, где шесть циано лигандов (формальный заряд -1 на каждом из указанных 6 лигандов) присоединены сигма-связью к центральному атому железа посредством атомов углерода циано групп.
15 20

"Координационный комплекс" определяется как комплексное соединение, имеющее вполне определенную геометрию координации, такую как октаэдрическая или плоская квадратная геометрия. В отличие от ОТМ комплексов, которые определяются их связями, координационные комплексы определяются своей геометрией. Таким образом, координационные комплексы могут быть ОТМ комплексами (такими, как ранее указанный феррицианид) или комплексными соединениями, в которых атомы неметалла, отличного от углерода, такие как гетероатомы, включая атом азота, серы, кислорода и фосфора, дативно связаны с центральным атомом переходного металла. Например, гексаамин рутения является координационным комплексом, имеющим вполне определенную геометрию октаэдра, где шесть лигандов NH_3 (формальный заряд 0 на каждом из указанных 6 лигандов) дативно связаны с центральным атомом рутения. Более полное обсуждение металлоорганических комплексов переходных металлов, координационных комплексов и связей переходных металлов можно найти в Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry* (1987) и Miessler & Tarr, *Inorganic Chemistry* (1991).
25 30 35

"Ручное устройство" определяется как устройство, которое можно держать в руке и которое является переносным. Пример ручного устройства - измерительное устройство, дополняющее установку для определения глюкозы Ascensia® Elite Blood Glucose Monitoring System, которая поставляется компанией Bayer Healthcare, LLC, Elkhart, IN.
40

"На" определяется как "поверх" и относится к описываемой ориентации. Например, если первый элемент осажден, по крайней мере, поверх части второго элемента, то говорят, что первый элемент "осажден на" втором элементе. В другом примере, если первый элемент присутствует поверх, по крайней мере, части второго элемента, то говорят, что первый элемент находится "на" втором элементе. Использование термина "на" не исключает наличие веществ между описываемыми верхним и нижележащим элементами. Например, первый элемент может иметь покрытие на своей верхней поверхности и, тем не менее, второй элемент, расположенный, по крайней мере, на части первого элемента и его верхнего покрытия, может быть описан как расположенный "на" первом элементе. Таким образом, использование термина
45 50

"на" может означать или же может не означать, что эти два связанных элемента физически контактируют друг с другом.

Несмотря на то что в описании приведены различные варианты осуществления изобретения, специалистам должно быть очевидным, что в рамках настоящего изобретения возможны другие варианты его воплощения и выполнения. Таким образом, настоящее изобретение ограничивается лишь прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Формула изобретения

1. Полосковый электрохимический сенсор для детектирования аналита, который включает в себя:

основание;

первый электрод на основании, имеющий, по меньшей мере, один первый слой на первом проводнике, при этом первый слой включает в себя слой реагента, который содержит не больше чем 8 мкг/мм^2 медиатора;

второй электрод на основании;

колпачок на основании; и

где полосковый элемент обеспечивает определение значения концентрации, имеющей, по меньшей мере, одно из значений постоянной систематической погрешности, меньшее чем $\pm 10\%$ после хранения при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 2 недель, гематокритная систематическая погрешность измерения меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови, включающих в себя от 20 до 60% гематокрита, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет от самое большее 20 мг/дл.

2. Полосковый элемент по п.1, где первый и второй электроды находятся, по существу, в одной плоскости.

3. Полосковый элемент по п.1, где второй электрод включает в себя первый слой на втором проводнике.

4. Полосковый элемент по п.3, где второй электрод включает в себя второй слой на втором проводнике.

5. Полосковый элемент по п.4, где второй слой включает в себя слой реагента, отличный по составу от слоя реагента первого слоя.

6. Полосковый элемент по п.1, где электроды отделены друг от друга больше чем на 200 мкм.

7. Полосковый элемент по п.1, где электроды находятся на расстоянии, по меньшей мере, 100 мкм от верхней части колпачка.

8. Полосковый элемент по п.1, где средняя исходная толщина слоя реагента составляет меньше чем 8 мкм.

9. Полосковый элемент по п.1, где средняя исходная толщина слоя реагента составляет от 0,25 до 3 мкм.

10. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента формируют с плотностью нанесения не больше чем $0,2 \text{ мкл/мм}$ из раствора реагента.

11. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента содержит полимерное связующее, выбранное из группы, которая включает в себя поли (оксид этилена), поливиниловый спирт, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или их комбинации.

12. Полосковый элемент по п.11, где плотность нанесения полимерного связующего равна не больше чем 2 мкг/мм^2 на первом проводнике.

13. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента содержит частично растворимое в

воде полимерное связующее, которое образует гелеподобный материал при гидратации.

14. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента содержит ферментную систему с плотностью нанесения не больше чем $0,8 \text{ мкг/мм}^2$.

15. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента содержит не больше чем 1,3 единицы ферментной системы.

16. Полосковый элемент по п.1, где слой реагента содержит не больше 2 мкг/мм^2 медиатора.

17. Полосковый элемент по п.1, где медиатор является медиатором двухэлектронного переноса.

18. Полосковый элемент по п.17, где медиатор выбран из группы, содержащей 3-фенилимино-3Н-фенотиазины, 3-фенилимино-3Н-феноксазины, их соли, их кислоты, их производные и их комбинации.

19. Полосковый элемент по п.17, где медиатор имеет окислительно-восстановительный потенциал, по меньшей мере, на 100 мВ меньше, чем окислительно-восстановительный потенциал феррицианида.

20. Полосковый элемент по п.1, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 2 недель.

21. Полосковый элемент по п.1, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 4 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 4 недель.

22. Полосковый элемент по п.1, где гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови, включающих в себя от 20 до 60% гематокрита.

23. Полосковый элемент по п.1, где отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл.

24. Полосковый элемент по п.1, где отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 1 мг/дл.

25. Полосковый электрохимический сенсор для детектирования аналита, который включает в себя:

основание;

первый электрод на основании, имеющий, по меньшей мере, один первый слой на первом проводнике, при этом первый слой включает в себя слой реагента, который содержит медиатор и ферментную систему, где слой реагента обеспечивает

определение значения концентрации, имеющей, по меньшей мере, одно из значений постоянной систематической погрешности, меньшее чем $\pm 10\%$ после хранения при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 2 недель, гематокритная систематическая погрешность измерения меньше чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови, включающих в себя от 20 до 60% гематокрита, отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 20 мг/дл;

второй электрод на основании;

колпачок на основании.

26. Способ определения концентрации аналита в образце, содержащий:

приложение к образцу последовательности импульсов, последовательность импульсов включает в себя, по меньшей мере, 3 рабочих цикла в течение 30 с или менее; и

определение концентрации аналита в образце, определенная концентрация имеет, по меньшей мере, одно значение постоянной систематической погрешности, меньшее чем $\pm 10\%$, гематокритной систематической погрешности, меньшее чем $\pm 10\%$ для образцов цельной крови с гематокритным диапазоном свыше 20 до 60%, а отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 20 мг/дл.

27. Способ по п.26, при этом последовательность импульсов включает в себя, по крайней мере, 3 рабочих цикла в течение 9 с.

28. Способ по п.26, где последовательность импульсов длится не больше чем 5 с.

29. Способ по п.26, где определение концентрации аналита в образце включает в себя определение концентрации аналита в образце из данных по определению силы тока, измерение которых проводят в течение 2 с после приложения последовательности импульсов.

30. Способ по п.26, где каждый рабочий цикл включает в себя возбуждение и релаксацию.

31. Способ по п.30, где каждое возбуждение длится от 0,01 до 3 с.

32. Способ по п.30, где суммарная продолжительность возбуждений составляет не больше чем 10 с.

33. Способ по п.30, где амплитуды возбуждений отличаются друг от друга в пределах 500 мВ.

34. Способ по п.30, где возбуждения составляют не больше чем 45% от длительности последовательности импульсов.

35. Способ по п.30, где каждая релаксация длится от 0,2 до 3 с.

36. Способ по п.30, где последовательность импульсов включает в себя первоначальное возбуждение с длительностью от 0,75 до 3 с, при этом продолжительность первоначального возбуждения дольше, чем продолжительность возбуждений в рабочих циклах.

37. Способ по п.26, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$.

38. Способ по п.26, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 4 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 4 недель.

39. Способ по п.26, где гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 5\%$ для образцов цельной крови, включающих в себя от 20 до 60% гематокрита.

40. Способ по п.26, где отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл.

41. Способ определения концентрации аналита в образце, способ включает в себя: введение аналита, содержащего образец, имеющий жидкий компонент, в полосковый электрохимический сенсор, полосковый элемент, который включает в себя подложку, первый проводник на подложке, второй проводник на подложке и, по меньшей мере, один первый слой, по меньшей мере, на первом проводнике, где, по меньшей мере, один первый слой включает в себя слой реагента, содержащий полимерное связующее, а образец обеспечивает электрическое соединение между первым и вторым проводниками;

приложение электрического потенциала между первым и вторым проводниками в форме, по меньшей мере, 4 считывающих импульсов в течение 30 с или менее;

измерение электрического тока, по меньшей мере, одного из импульсов считывания, для обеспечения количественного значения концентрации аналита в образце с

повышенными эксплуатационными свойствами, по меньшей мере, один рабочий параметр выбран из группы, содержащей постоянную систематическую погрешность, меньшую чем $\pm 10\%$ после того, как полосковый элемент хранился при 50°C в течение 2 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранился при -20°C в течение 2 недель, гематокритную систематическую погрешность измерения, составляющую меньше чем $\pm 10\%$, с гематокритным диапазоном свыше 20 до 60% для образцов цельной крови, отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 10 мг/дл, или их комбинаций.

42. Способ по п.41, где, по крайней мере, 4 считывающих импульса прикладывают в течение 9 с.

43. Способ по п.41, где считывающие импульсы завершаются не больше чем за 5 с приложения электрического потенциала.

44. Способ по п.41, где ток, измеренный от, по меньшей мере, одного из считывающих импульсов измеряют в течение 2 с после приложения электрического потенциала, с целью количественного определения концентрации аналита в образце.

45. Способ по п.41, где длительность считывающих импульсов составляет не больше чем 2 с.

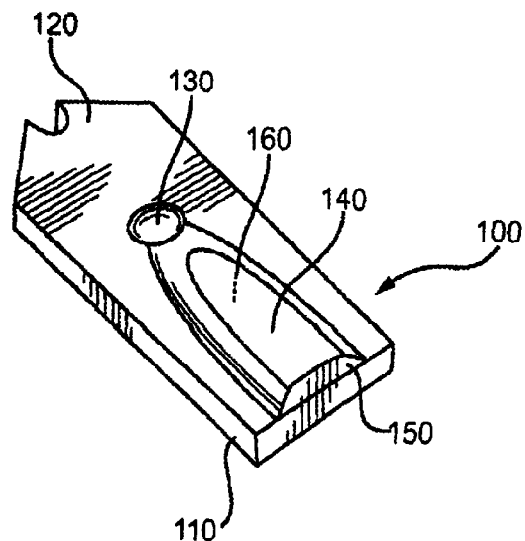
46. Способ по п.41, где разница амплитуд импульсов считывания составляет в пределах 500 мВ.

47. Способ по п.41, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$.

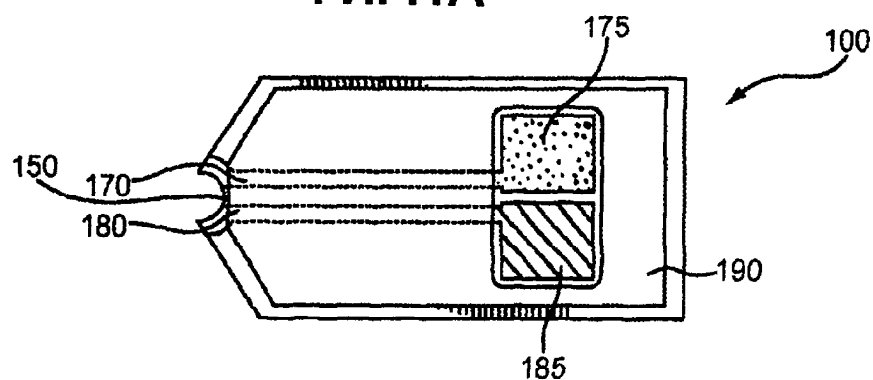
48. Способ по п.41, где постоянная систематическая погрешность составляет меньше чем $\pm 5\%$ после хранения при 50°C в течение 4 недель, по сравнению с полосковым элементом сравнения, который хранили при -20°C в течение 4 недель.

49. Способ по п.41, где гематокритная систематическая погрешность измерения составляет меньше чем $\pm 5\%$, для образцов цельной крови с гематокритным диапазоном свыше 20 до 60% для образцов цельной крови.

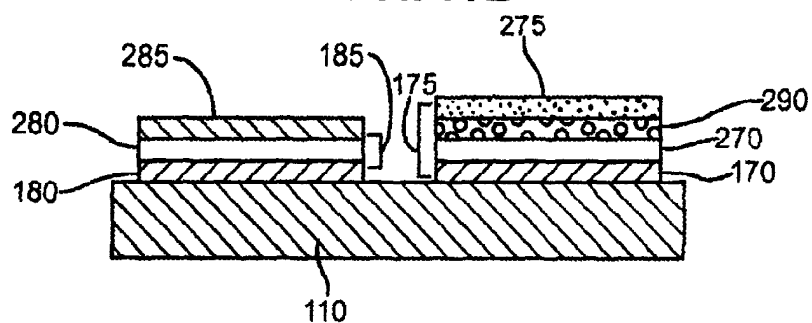
50. Способ по п.41, где отношение отсечения к угловому коэффициенту составляет самое большее 1 мг/дл.



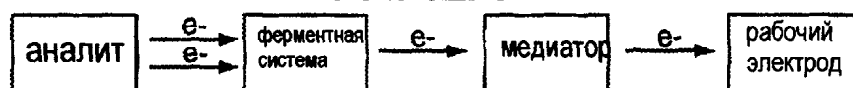
ФИГ.1А



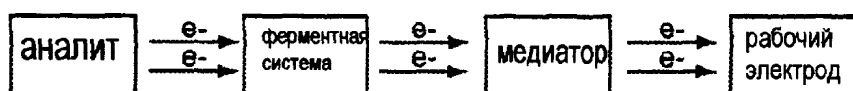
ФИГ.1В



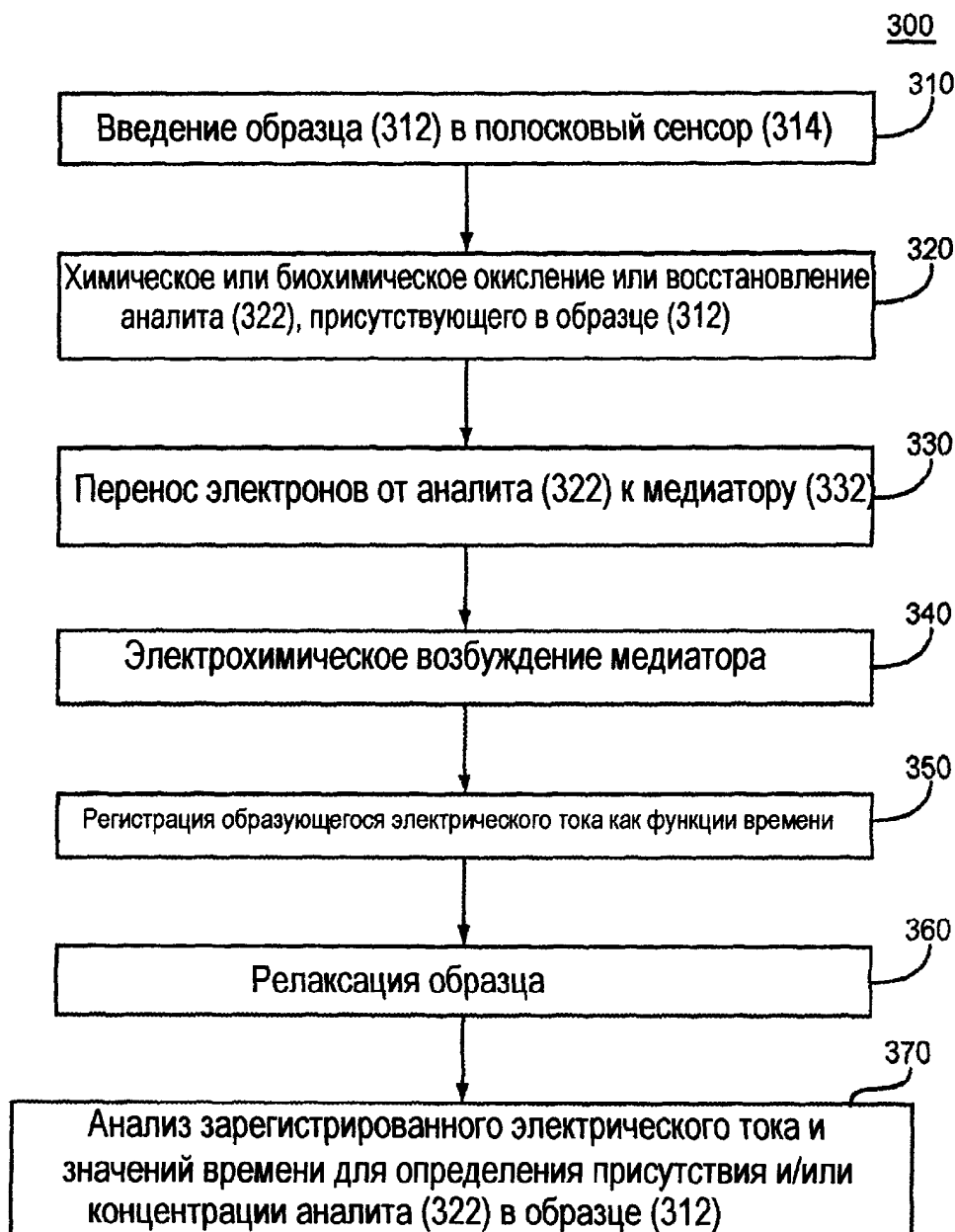
ФИГ.2А



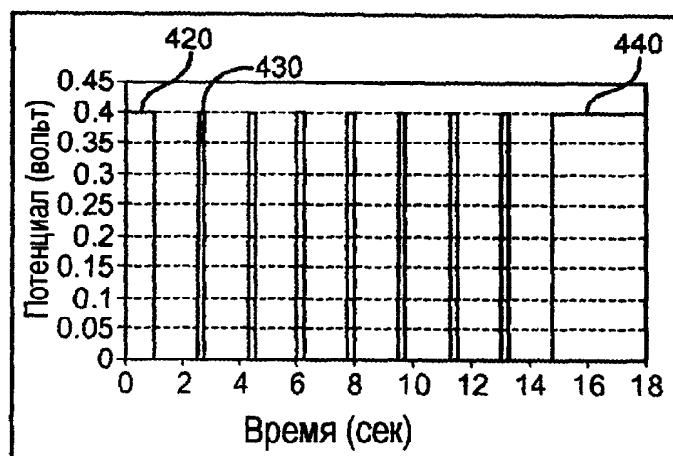
ФИГ.2В



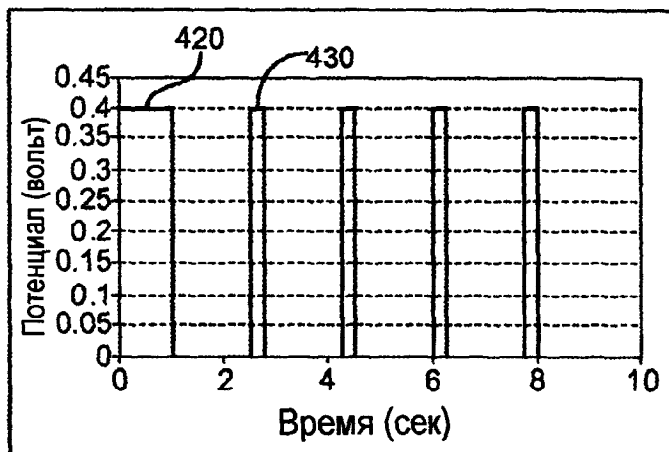
ФИГ.2С



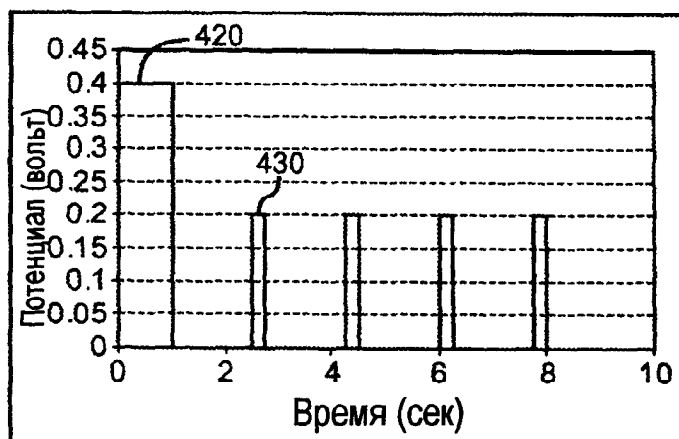
ФИГ.3



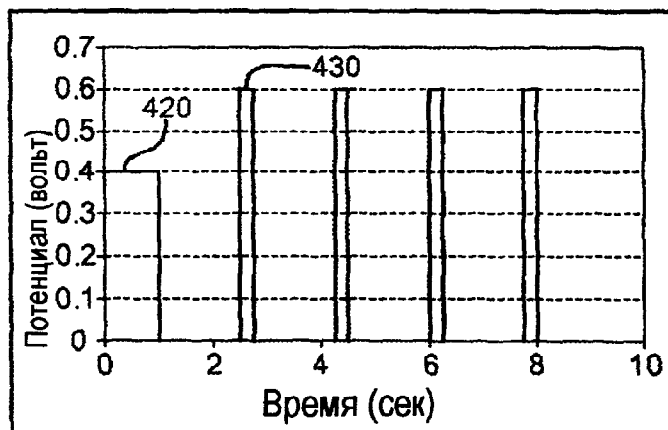
ФИГ.4А



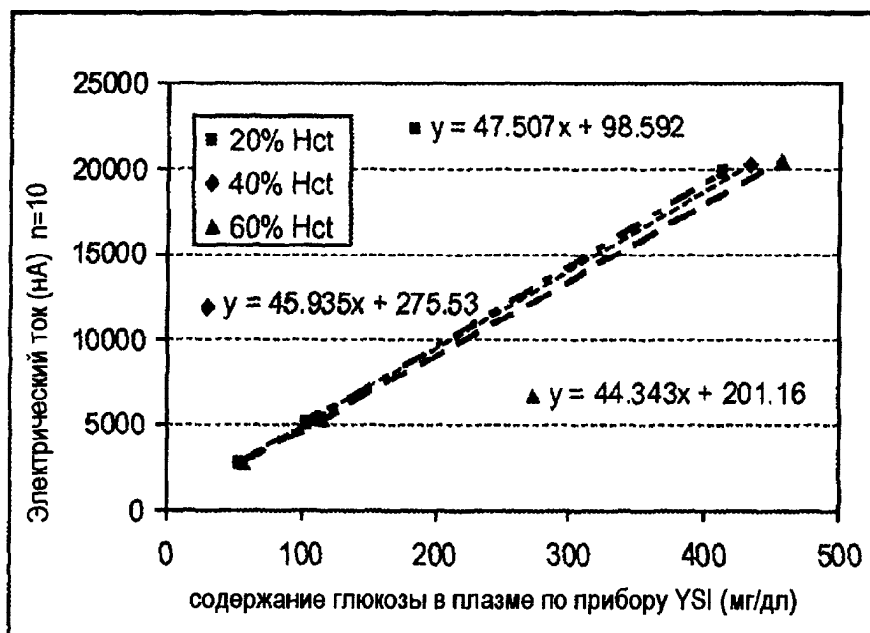
ФИГ.4В



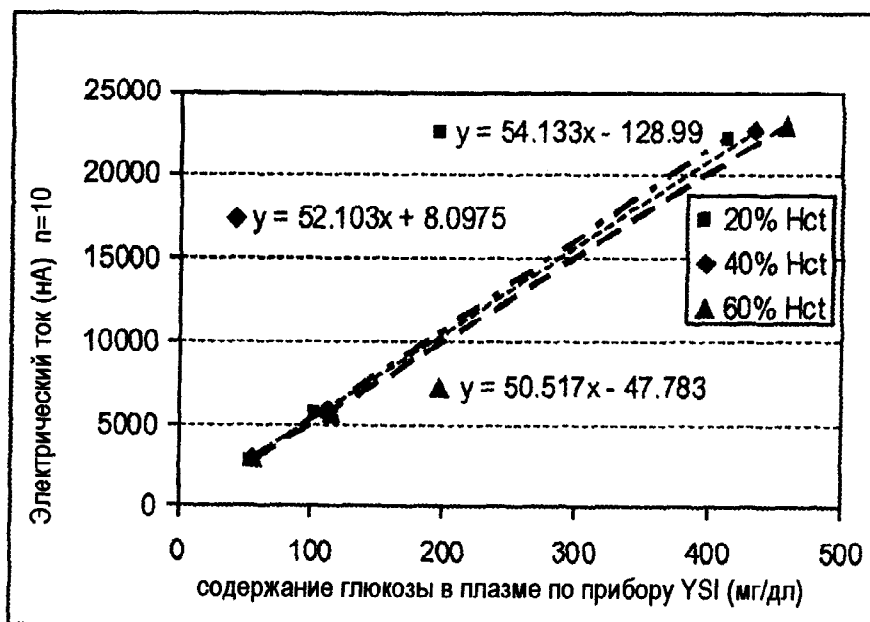
ФИГ.4С



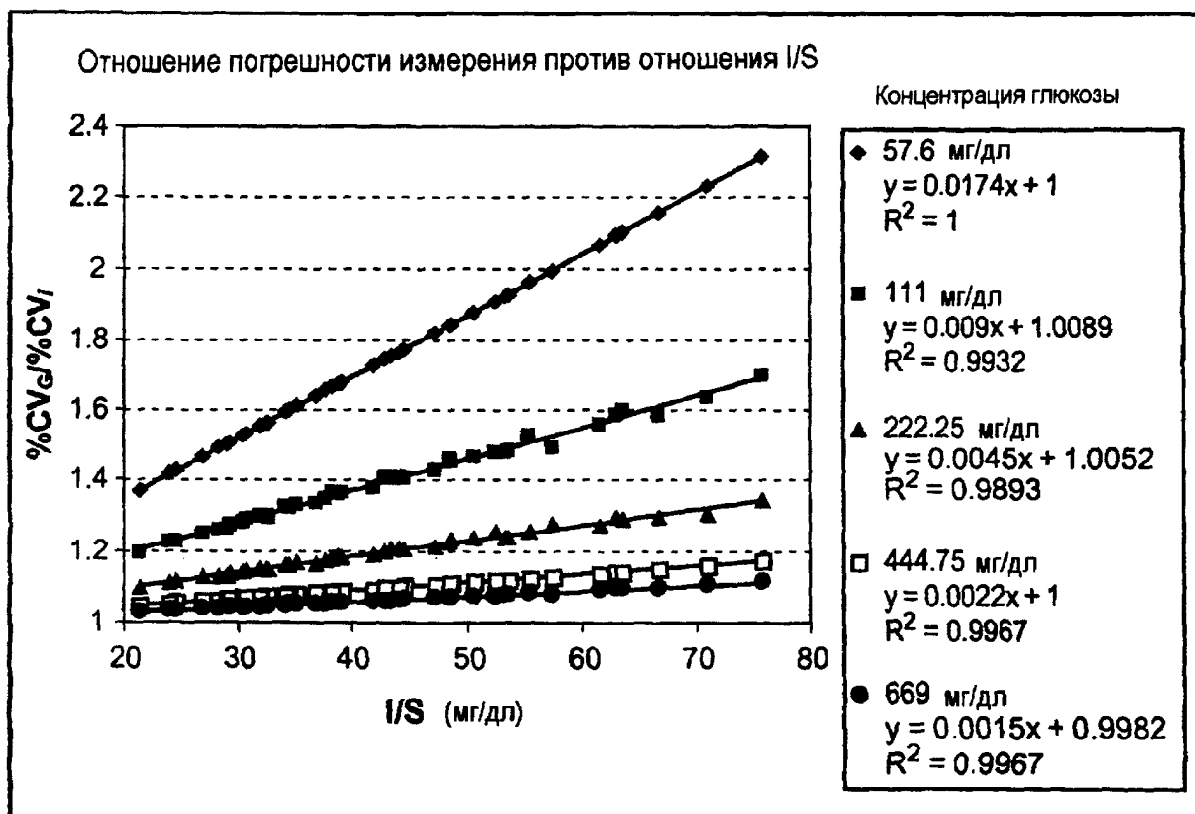
ФИГ.4D



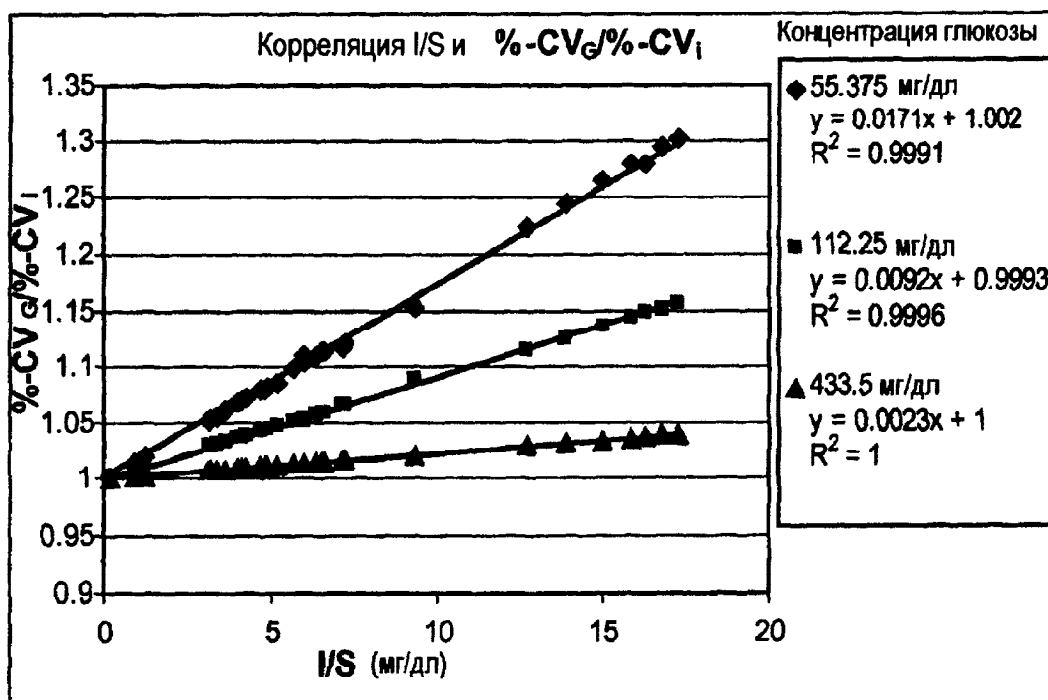
ФИГ.5А



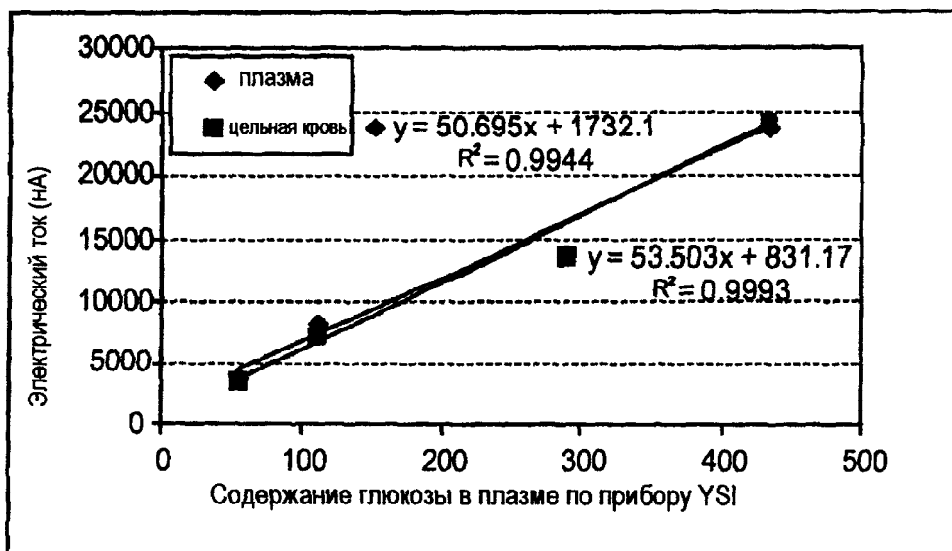
ФИГ.5В



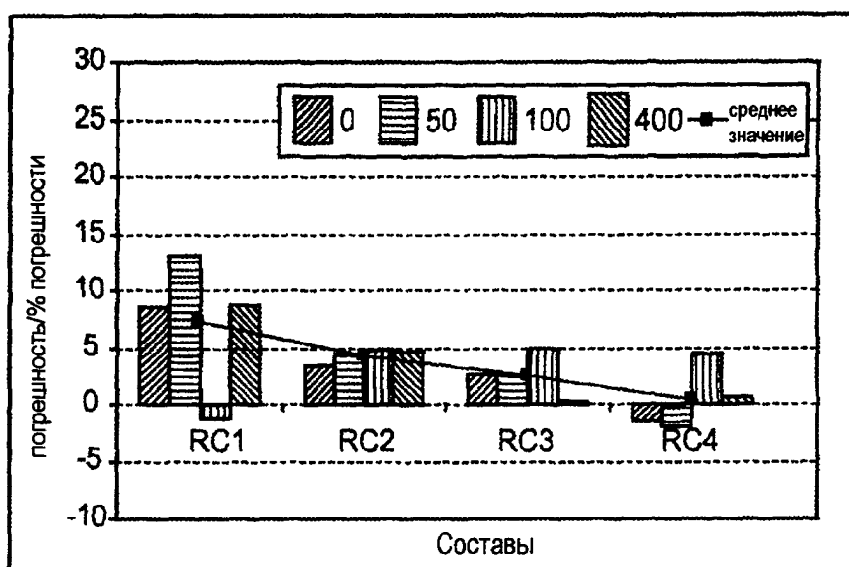
ФИГ.5С



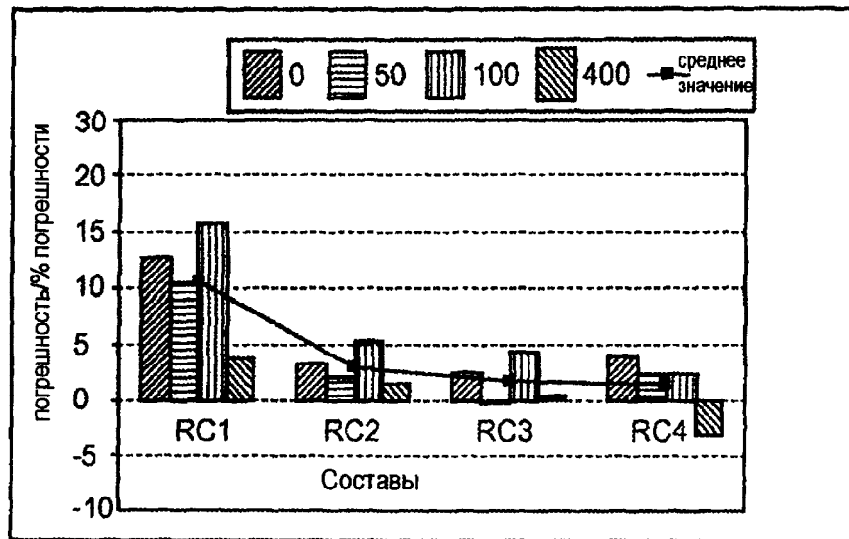
ФИГ.5D



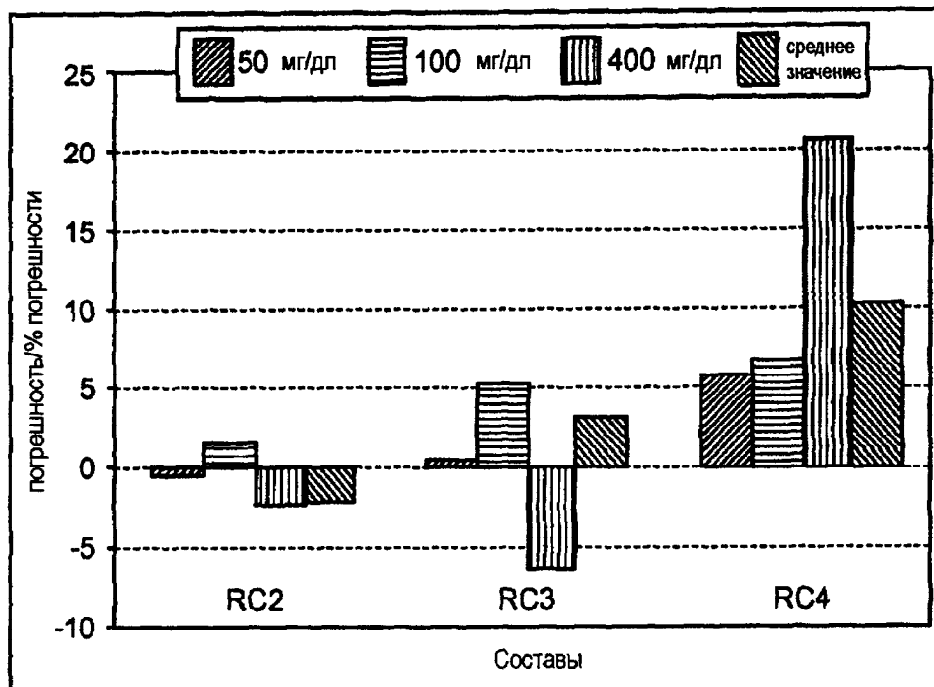
ФИГ.5Е



ФИГ.6А



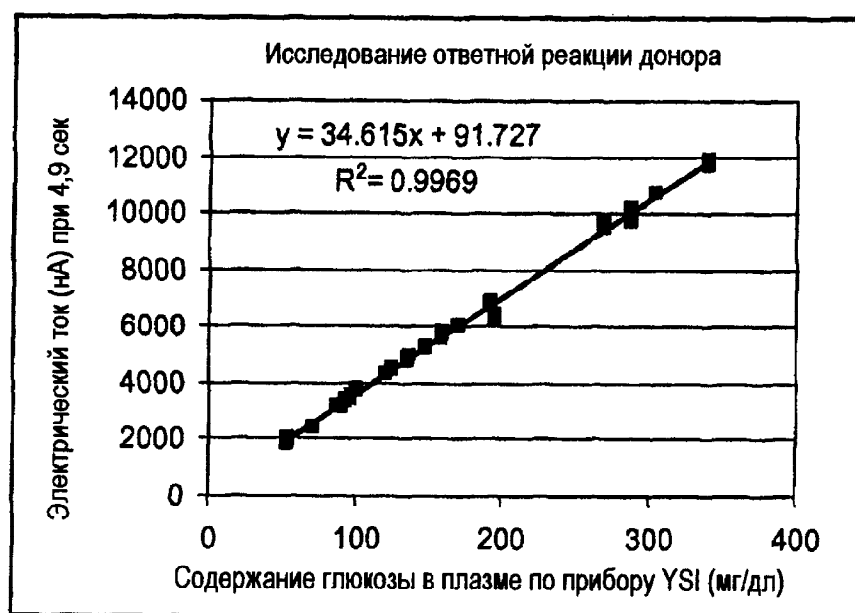
ФИГ.6В



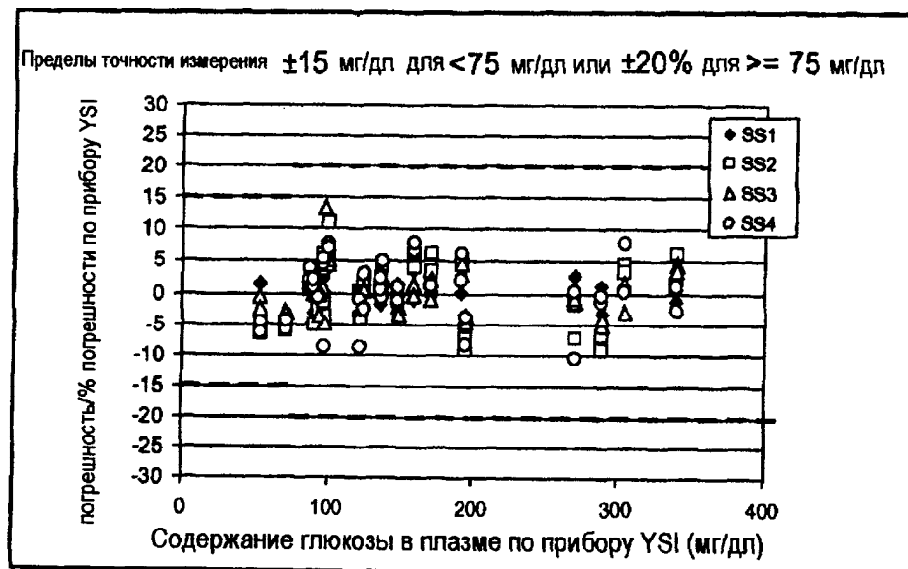
ФИГ.6С



ФИГ.6D

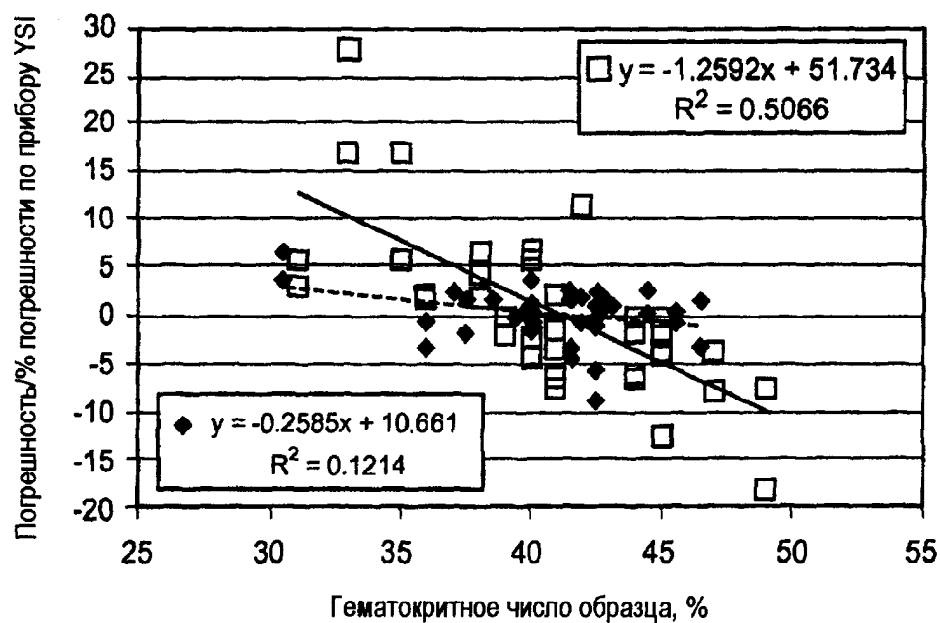


ФИГ.7А



ФИГ.7В

Гематокритная чувствительность



ФИГ.7С