

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525369

(P2004-525369A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 27/30

GO 1 N 27/28

F I

GO 1 N 27/30 3 1 1 Z

GO 1 N 27/28 3 2 1 F

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2002-575641 (P2002-575641)	(71) 出願人	503222422
(86) (22) 出願日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		インスツルメンテーション ラボラトリー
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月5日 (2003.9.5)		カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007069		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02002/077641		1 4 2, レキシントン, ハートウェル
(87) 国際公開日	平成14年10月3日 (2002.10.3)		アベニュー 1 0 1
(31) 優先権主張番号	60/274, 097	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年3月7日 (2001.3.7)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 参照電極

## (57) 【要約】

本発明は、血液または他の体液のような流体サンプルの特定の特徴を測定するために、少なくとも1つの電極（例えば、電気化学的センサカートリッジ）と共に使用するための、耐久性でありかつ正確な小型液体接合参照電極に関する。本発明は、ミニチュア液間参照電極を提供し、この電極は、以下の2つの構成要素を備える：参照センサおよびコネクタ。この参照センサは、耐久性のある厚膜 Ag / AgCl 要素（これは、支持基材上に堆積した銀（Ag）層およびこの Ag 層の表面に（例えば、電気化学的酸化によって）形成された AgCl 層からなる）を収容する。1つの実施形態において、この参照センサは、ブリッジ電解質入口およびブリッジ電解質チャンネルに接続されており、このチャンネルを通して、ブリッジ電解質溶液が流れ得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

参照電極であって、以下：

(a) 参照センサ；

(b) 該参照センサと流体連絡しているブリッジ電解質チャンネル；ならびに

(c) ブリッジ電解質ポートを介して該ブリッジ電解質チャンネルに連結されたコネクタチャンネルであって、該コネクタチャンネルは、サンプルが流れ得るサンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネル、およびある容量のブリッジ電解質溶液を収容するためのブリッジ電解質ウェル、を含む、コネクタチャンネル、

を含み、

10

ここで、該ブリッジ電解質ウェルは、該サンプルと該ブリッジ電解質溶液との間に液体接合を提供するような形状にされる、

参照電極。

## 【請求項 2】

前記液体接合が、約  $0.5 \text{ mm}^2$  ~ 約  $10 \text{ mm}^2$  の範囲の表面積を含む、請求項 1 に記載の参照電極。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の参照電極であって、前記参照センサが、以下：

(a) 支持基板；

(b) 該支持基板上に沈着された銀層 (Ag)；

20

(c) 該 Ag 層上に沈着された塩化銀 (AgCl) 層；

(d) 該 AgCl 層の少なくとも一部の上に沈着されたグレース層；および

(e) 該グレース層上に配置されたガスケット、

を含む、参照電極。

## 【請求項 4】

前記支持基板が、ポリマー材料および/またはセラミック材料を含む、請求項 3 に記載の参照電極。

## 【請求項 5】

前記ポリマー材料が、ポリ塩化ビニル (PVC)、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレートおよび/またはポリイミドを含む、請求項 4 に記載の参照電極。

30

## 【請求項 6】

前記セラミック材料が、酸化アルミニウムおよび/または二酸化ケイ素を含む、請求項 4 に記載の参照電極。

## 【請求項 7】

前記層の 1 つ以上が、スクリーン印刷層または蒸着層である、請求項 3 に記載の参照電極。

## 【請求項 8】

前記 Ag 層が、少なくとも  $1 \mu\text{m}$  厚 ~ 約  $15 \mu\text{m}$  厚である、請求項 3 に記載の参照電極。

## 【請求項 9】

前記 Ag 層が、少なくとも約  $1 \mu\text{m}$  厚である、請求項 3 に記載の参照電極。

40

## 【請求項 10】

請求項 3 に記載の参照電極であって、前記 AgCl 層が、約  $0.005 \text{ mA/mm}^2$  と約  $0.5 \text{ mA/mm}^2$  との間の電流密度で、約 30 秒 ~ 約 20 分間、約  $0.01 \text{ M}$  と  $1.0 \text{ M}$  との間の塩化物電解質溶液で前記 Ag 上に電着することにより、該 Ag 上に沈着される、参照電極。

## 【請求項 11】

前記塩化物電解質溶液が、NaCl、KCl、および/または  $\text{CaCl}_2$  を含む、請求項 10 に記載の参照電極。

## 【請求項 12】

前記塩化物電解質溶液が、約 pH 1 ~ 約 pH 7、約 pH 1 ~ 約 pH 5、または約 pH 1 ~

50

約 pH 2 の範囲の pH を有する、請求項 11 に記載の参照電極。

【請求項 13】

前記グレーズ層が、アルミナおよび/またはケイ酸を含む、請求項 3 に記載の参照電極。

【請求項 14】

前記グレーズ層が、少なくとも約 10  $\mu\text{m}$  厚である、請求項 13 に記載の参照電極。

【請求項 15】

前記グレーズ層が、約 10  $\mu\text{m}$  と約 500  $\mu\text{m}$  との間の厚みを有する、請求項 14 に記載の参照電極。

【請求項 16】

前記ガスケット層が、ポリウレタン、シリコーンゴム、PVC、viton (登録商標) 10  
、天然ゴムおよび/または合成ゴムを含む、請求項 3 に記載の参照電極。

【請求項 17】

前記ガスケットが、少なくとも約 50  $\mu\text{m}$  厚である、請求項 15 に記載の参照電極。

【請求項 18】

前記コネクタチャネルが、前記ブリッジ電解質溶液と反応すること、該溶液に溶解することもない、ポリマー材料または金属材料を含む、請求項 1 に記載の参照電極。

【請求項 19】

前記ポリマー材料が、成形プラスチックまたは機械加工可能プラスチックである、請求項 18 に記載の参照電極。

【請求項 20】

前記ポリマー材料が、アクリル樹脂、plexiglas (登録商標)、lexan (登録商標)、ポリカーボネート、および/または PVC を含む、請求項 19 に記載の参照電極。 20

【請求項 21】

前記金属材料が、ステンレス鋼、アルミニウム、および/または白金を含む、請求項 18 に記載の参照電極。

【請求項 22】

前記ブリッジ電解質ウェルが、丸底ウェルである、請求項 1 に記載の参照電極。

【請求項 23】

前記ブリッジ電解質ウェルが、平底ウェルである、請求項 1 に記載の参照電極。 30

【請求項 24】

前記ブリッジ電解質ウェルが、円錐型ウェルである、請求項 1 に記載の参照電極。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の参照電極であって、前記サンプル流出チャネルおよび前記サンプル入口チャネルの少なくとも 1 つが、各々、前記ブリッジ電解質チャネルの長手軸に対して約 90° ~ 約 180° の傾斜角を形成する、参照電極。

【請求項 26】

請求項 1 に記載の参照電極であって、前記コネクタチャネルが、前記参照センサから、約 2 mm ~ 約 10 mm の間、約 2 mm ~ 約 15 mm の間、または約 2 mm ~ 約 30 mm の間の範囲の距離に位置する、参照電極。 40

【請求項 27】

前記ブリッジ電解質チャネルが、約 1 mm の直径である、請求項 1 に記載の参照電極。

【請求項 28】

前記ブリッジ電解質チャネルが、約 0.5 mm の直径である、請求項 1 に記載の参照電極。

【請求項 29】

前記サンプル入口チャネルが、約 0.5 mm の直径である、請求項 27 に記載の参照電極。

【請求項 30】

前記サンプル流出チャネルが、約 2 mm の直径である、請求項 1 に記載の参照電極。 50

## 【請求項 3 1】

前記サンプル流出チャンネルが、約 2 mm の直径である、請求項 2 7 に記載の参照電極。

## 【請求項 3 2】

前記サンプル流出チャンネルが、約 2 mm の直径である、請求項 2 8 に記載の参照電極。

## 【請求項 3 3】

請求項 1 に記載の参照電極であって、前記サンプル流出チャンネルおよび前記サンプル入口チャンネルが、約 1 mm ~ 約 2 0 mm の直径の可撓性チューブを含む、参照電極。

## 【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の参照電極であって、前記ブリッジ電解質溶液が、前記ブリッジ電解質溶液が、A g C l で飽和された K C l を含み、塩化物イオン溶液は、該溶液が貯蔵および使用される温度において、約 0 . 1 M ~ 約 0 . 5 M である、参照電極。

10

## 【請求項 3 5】

液体接合参照電極を使用するための方法であって、以下：

( a ) 参照電極を提供する工程であって、該参照電極は、参照センサ；該参照センサと流体連絡したブリッジ電解質チャンネル；およびブリッジ電解質ポートを介して該ブリッジ電解質チャンネルに連結されたコネクタチャンネル、を含み、該コネクタチャンネルは、サンプルが流れ得るサンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネル、およびある容量のブリッジ電解質溶液を保持するためのブリッジ電解質ウェルを含み、ここで、該ブリッジ電解質ウェルは、該サンプルと該ブリッジ電解質溶液との間に液体接合を提供するような形状にされる、工程；

20

( b ) 校正溶液またはサンプルを、該サンプル入口チャンネルに提供する工程；

( c ) ブリッジ電解質溶液を、該ブリッジ電解質入口に提供する工程；

( d ) 該サンプルが該ブリッジ電解質ポートに向かって流れるように、該サンプルに力を与える工程；

( e ) 該ブリッジ電解質溶液が該ブリッジ電解質ポートに向かって流れるように、該ブリッジ電解質溶液に力を与える工程；

( f ) 該ブリッジ電解質ウェルにおいて、該サンプルと該ブリッジ電解質溶液との間に、約  $1 \text{ mm}^2$  ~ 約  $1 0 \text{ mm}^2$  の範囲の表面積を有する液体接合を形成する工程；ならびに

( g ) 測定を行う工程、

を包含する、方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

( 関連出願 )

本願は、2 0 0 1 年 3 月 7 日に米国特許庁に出願された仮特許出願番号 6 0 / 2 7 4 , 0 9 7 ( この全体の内容は本明細書中に参考として援用される ) に対して優先権を主張する。

## 【0 0 0 2】

( 発明の分野 )

本発明は、一般に、液体接合参照電極およびその使用方法に関する。詳細には、本発明は、血液のような流体サンプルの特定の特徴を測定するための電気化学的センサカートリッジと共に使用するための小型液体接合参照電極に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

( 発明の背景 )

生物医学的適用において、少量の患者の体液サンプルの 1 つ以上の物理学的特性および / または成分を分析することが、しばしば望まれる。例えば、患者の全血サンプルは、しばしば、血液検体に関する情報 ( 例えば、p H、p C O <sub>2</sub>、p O <sub>2</sub>、K <sup>+</sup>、N a <sup>+</sup>、C a <sup>+</sup>、C l <sup>-</sup>、ヘマトクリットなど ) を提供するために、分析および / またはモニタリングされる。血液サンプルにおける検体に由来する情報は、正常な生理学的機能および恒常性

50

プロフィールと比較され、そして例えば、診断目的のため、患者のモニタリングのためおよび/または生命維持システムの制御のために、医師により使用され得る。

【0004】

体液の成分を検出するために電気化学的電極を用いるシステムは、当該分野で周知であり、例えば、米国特許第3,658,478号；同第5,387,329号；同第5,338,435号；同第4,734,184号；同第4,361,539号および同第5,200,051号（これらの内容全ては、本明細書中に参考として明確に援用される）に記載される。代表的には、血液の化学分析を提供するシステムは、独立型機械であるか、または体外短絡またはエキソピボ血液源（例えば、手術の間に患者を維持するために使用される心肺機器）に接続されるように適合される。流動する生のエキソピボの血液の少量の試験サンプルは、オフラインで、リアルタイムで、心肺機器の静脈流ラインまたは動脈流ラインのいずれかからチャンバへ直接方向を変えられ得、そしてセンサを含む微小電極のバンクに曝露され、このセンサは、リアルタイムで流動する血液サンプルの化学特性に比例するか、またはこの化学特性の指標となる電氣的シグナルを生成する。

10

【0005】

センサ自体を小型化し、そして集積回路技術における発達により最近利用可能になった技術によって、これらを製造する試みがなされてきた。この点において、集積回路技術により、センサは平面形態で製造され得、それにより、薄膜材料が、厚膜および/または薄膜技術を使用して、誘電性基礎基板に連続的に適用される。平面センサの製造は、有意に自動化され得、低コストで大量生産を可能にする。平面センサは、より小さくされ得、そしてより密接して一緒に構成され、流体サンプル容量の要件を減少する。

20

【0006】

このようなセンサを使用する種々の小型電気化学的センサおよび微小システムが、開発されたが、耐久性で、安定な信頼できる小型参照電極の非利用性は、産業的および生体医学的な用途のための小型電気化学的センサの使用を制限している。ポテンシオメトリにおける参照電極の安定性は、測定の信頼度および精度に非常に重要である。イオン選択電極を使用する一価イオンの測定および二価イオンの測定について、わずか1mVの電位の誤差は、pH測定において約0.02のpH誤差、およびそれぞれ、4%または8%の濃度誤差を生じる。それにもかかわらず、小型化は、大部分が、作用電極および指示電極の開発に制限され、そして多くの場合、市販の大型参照電極が、正確な小型参照電極がない間使用されている。

30

【0007】

別個の独立したユニットとして、マルチセンサ構造中のサブコンポーネントとして、または種々の小型イオン選択センサと一体的に、小型参照電極を作製するいくつかの試みがある。代表的には、このようなシステムは、薄膜Ag/AgCl電極を使用する。この薄膜Ag/AgCl電極は、非常に高い交換電流密度反応に基づく。すなわち、低い電流密度において、この電極は、分極されず、そしてこの電極/電解質界面における電位は、Cl<sup>-</sup>活量のみ関数である。しかし、いくつかの因子は、このAg/AgCl要素の耐久性を制限し得る。従来マクロ液体接合Ag/AgCl電極は、AgClで飽和されたKClの高い活量を有するレザバから構成される。AgClは、高いCl<sup>-</sup>活量において、ある程度の溶解度を示すので、AgClの薄膜は最終的に、ブリッジ電解質溶液の温度に依存して溶解し得る。さらに、標準的な液体接合小型電極は、サンプルと参照ブリッジ電解質溶液（これは参照電極用の回路を完成させる）との間に、適切な接触表面も液体接合も提供しない。従って、改良された小型参照電極の必要性が存在する。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

（発明の要旨）

1つの局面において、本発明は、ミニチュア液間参照電極を提供し、この電極は、以下の2つの構成要素を備える：参照センサおよびコネクタ。この参照センサは、耐久性のある

50

厚膜 A g / A g C l 要素 (これは、支持基材上に堆積した銀 ( A g ) 層およびこの A g 層の表面に (例えば、電気化学的酸化によって) 形成された A g C l 層からなる) を收容する。1つの実施形態において、この参照センサは、ブリッジ電解質入口およびブリッジ電解質チャンネルに接続されており、このチャンネルを通して、ブリッジ電解質溶液が流れ得る。コネクタチャンネルは、サンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネルを備えるコネクタチャンネルを收容し、これらのサンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネルを通して、サンプルまたは校正溶液が流れ得る。このコネクタはまた、ブリッジ電解質ウェルおよびブリッジ電解質ポートを有し、これらのウェルおよびポートに、ブリッジ電解質チャンネルが接続されており、そしてこれらのウェルおよびポートを通して、ブリッジ電解質溶液が通過して、サンプルまたは校正溶液と接触する。

10

## 【0009】

参照センサは、支持基材上に堆積した多数の層からなり得る。この層は、以下を含む：支持基材上に堆積する銀 ( A g ) 層、A g 層の上に形成される塩化銀 ( A g C l ) 層、A g C l 層の一部の上に堆積するグレース層、およびグレース層の上に配置されるポリマーガスケット。これらの層は、任意の手段によって堆積され得るが、好ましくは、スクリーン印刷または蒸着によって堆積される。

## 【0010】

支持基材は、例えば、ポリマー材料および/またはセラミック材料で作製される。ポリマー材料は、例えば、可撓性または硬質のポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレートおよび/またはポリイミドであり得る。セラミック材料は、例えば、酸化アルミニウムおよび/または二酸化ケイ素 ( s i l i c i u m d i o x i d e ) であり得る。

20

## 【0011】

A g 層は、少なくとも約  $1 \mu\text{m}$ 、約  $1 \mu\text{m}$  ~ 約  $15 \mu\text{m}$  であり得るか、または好ましくは、約  $15 \mu\text{m}$  の厚さである。

## 【0012】

A g C l 層は、例えば、電着によって A g 層上に形成され得る。1つの実施形態において、A g C l 層は、A g 層を、 $0.01 \text{ M}$  と  $1.0 \text{ M}$  との間の濃度を有する塩化物電解質溶液で、約  $0.0005 \text{ mA/mm}^2$  と約  $0.5 \text{ mA/mm}^2$  との間の電流密度で、約 30 秒間 ~ 約 20 分間処理することによって、A g 層上に形成される。この塩化物電解質溶液は、例えば、N a C l、K C l、または C a C l<sub>2</sub> であり得、そして約 p H 1 と約 p H 7 との間、約 p H 1 と約 p H 5 との間、または約 p H 1 と約 p H 2 との間の p H 範囲を有し得る。

30

## 【0013】

グレース層は、例えば、アルミナおよび/またはシリカで構成され得、そして  $10 \mu\text{m}$  と  $500 \mu\text{m}$  との間、そして少なくとも約  $10 \mu\text{m}$  の厚さである。

## 【0014】

ポリマーガスケット層は、例えば、ポリウレタン、シリコーンゴム、P V C、天然ゴムおよび/または合成ゴム (例えば、v i t o n (登録商標))、あるいはブリッジ電解質溶液と反応せず、そしてこの溶液に溶解しない、他の任意の可撓性材料で作製され得る。ポリマーガスケット層は、少なくとも約  $50 \mu\text{m}$  の厚さである。好ましい実施形態において、ポリマーガスケット層は、約  $50 \mu\text{m}$  と約  $700 \mu\text{m}$  との間の厚さである。参照センサに接続され、そしてこのセンサを越えるブリッジ電解質チャンネルは、好ましくは、約  $0.5 \text{ mm}$  の直径であるが、これに限定されない。

40

## 【0015】

コネクタチャンネルは、例えば、ポリマー材料または金属材料で作製され、この材料は、ブリッジ電解質溶液と反応せず、そしてこの溶液に溶解しないべきである。適切な金属材料としては、ステンレス鋼、アルミニウムおよび/または白金が挙げられる。適切なポリマー材料としては、アクリル、p l e x i g l a s (登録商標)、l e x a n (登録商標)、ポリカーボネート、および/または P V C が挙げられる。コネクタチャンネルのブリッジ

50

電解質ポートは、好ましくは、参照センサの近くであり、参照電極から約2mmと約10mmとの間、約2mmと約15mmとの間、または約2mmと約30mmとの間の範囲の距離に位置する。コネクタのサンプル入口チャンネルは、好ましくは、直径約1mmであるが、これに限定されない。サンプル流出チャンネルは、好ましくは、直径約2mmであるが、これに限定されない。コネクタチャンネルのサンプル流出チャンネルおよびサンプル入口チャンネルは、1つ以上の管で構成されており、これらの管は一緒に結合され、そして共通の管腔を有する。例えば、サンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネルは、可撓性チューブであり得、好ましくは、直径約1mm～約30mmであるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、サンプル流出チャンネルおよびサンプル入口チャンネルの各々は、ブリッジ電解質チャンネルの長手軸方向に対して約90°～約180°の角度で傾いて配向している。このサンプルチャンネルを傾けるかまたは屈曲させる様式は、ブリッジ電解質ポートの上にブリッジ電解質ウェルを作製し得る。

10

**【0016】**

ブリッジ電解質ポートは、ブリッジ電解質チャンネルをコネクタチャンネルに接続する穴を規定する。ブリッジ電解質ポートに近いコネクタチャンネルは、ある容量のブリッジ電解質溶液を保持し得るブリッジ電解質ウェルを形成するような形状にされる。ブリッジ電解質ウェルは、例えば、平底、丸底、または円錐形であり得る。好ましい実施形態において、コネクタチャンネルまたはブリッジ電解質ウェルは、ある容量のブリッジ電解質溶液を保持するような形状にされる。ブリッジ電解質ウェルにおいて、サンプルとブリッジ電解質溶液との間に形成される液体接合は、参照電極が使用中である場合に、約1mm<sup>2</sup>～約10mm<sup>2</sup>の範囲の表面積を有する。サンプルが、ブリッジ電解質溶液を含むブリッジ電解質ウェルを通過する（例えば、ポンピングされる）場合、サンプル/ブリッジ電解質溶液の液体接合（すなわち、界面）が形成される。1つの実施形態において、液体接合の表面積は、少なくとも約0.05mm<sup>2</sup>～約10mm<sup>2</sup>である。

20

**【0017】**

参照電極において使用されるブリッジ電解質溶液は、好ましくは、AgClを飽和させたKClであり、この溶液が貯蔵および使用される温度において、約0.1M～約0.5Mの塩化物イオンの溶液を含む。

**【0018】**

別の局面において、本発明は、液間参照電極を使用するための方法に関し、この方法は、サンプル中の1種以上の電解質または酵素を測定するために、この参照電極を使用することを包含する。1つの実施形態において、参照電極は、1種以上の分析物を測定するための、電極センサカートリッジに接続される。参照電極を使用する方法は、以下の工程を包含する：較正溶液またはサンプルを、サンプル入口チャンネルに提供する工程；ブリッジ電解質溶液を、ブリッジ電解質入口に提供する工程；サンプルまたは較正溶液、およびブリッジ電解質溶液の各々が、ブリッジ電解質ポートに向かって流れるように、サンプルまたは較正溶液に対する力、およびブリッジ電解質溶液に対する力を提供する工程；ブリッジ電解質ウェルにおいて、サンプルとブリッジ電解質溶液との間に、接触界面または液体接合を形成する工程；ならびにある期間の後（例えば、読取り値が安定したとき）に測定を行う工程。コネクタチャンネルを通してサンプルを移動させるため、およびブリッジ電解質チャンネルを通してブリッジ電解質溶液を移動させるために使用される力は、1つ以上の蠕動ポンプによる正圧または負圧によって、引き起こされ得る。

30

40

**【0019】**

本明細書中に開示される本発明の上述および他の目的、特徴および利点、ならびに本発明自体は、添付の図面と一緒に読まれる場合に、以下の好ましい実施形態の説明および特許請求範囲から、より完全に理解される。

**【0020】**

図において、類似の参照記号は、一般に、異なる図にわたって同じ部品を表す。図は、必ずしも同一縮尺ではなく、本発明の原理を説明する際に、一般に強調がなされる。

**【0021】**

50

(発明の詳細な説明)

本発明は、流体サンプル(例えば、体液(血液が挙げられるが、これに限定されない))の特徴を測定するための、ミニチュア電気化学センサカートリッジと共に使用するための、参照電極を提供する。この参照電極は、血液ガス(例えば、酸素および二酸化炭素)の未結合濃度または活性、イオン(例えば、ナトリウム、塩化物、カリウム、マグネシウム、リチウム、アンモニウム、およびカルシウムなど)、血液pHおよびヘマトクリットを測定するための、耐久性のある参照源として、有用である。本発明の代替の実施形態は、グルコース、乳酸または他の酵素もしくは血液溶質のような因子を測定するために適合され得る。

【0022】

10

(定義)

本発明の主題をより明瞭かつ簡潔に指摘および記載するために、以下の説明および特許請求の範囲において使用される特定の用語に対して、以下の定義が提供される。

【0023】

本明細書中において使用される場合、用語「電極」とは、外部導体と内部イオン媒体との間の界面を作製する、電気化学的デバイスの成分をいう。この内部イオン媒体は、代表的に、塩が溶解した水溶液である。電極は、一般に3つの型であり、作用電極または指示電極、参照電極、および対電極である。作用電極または指示電極は、特定の化学種(例えば、イオン)を測定する。作用電極によって電位が測定される場合、この方法は、ポテンシオメトリーと称される。全てのイオン選択的電極は、ポテンシオメトリーによって作動する。作用電極によって電流が測定される場合、この方法は、電流測定と称される。例えば、酸素測定が、電流測定によって実施される。対電極は、電流経路のためのシンクとして働く。

20

【0024】

「参照電極」とは、本発明によれば、参照センサ(これを通して、ブリッジ電解質溶液が通過する)およびコネクタ(これを通して、サンプルまたは較正流体が流れる)の組み合わせをいう。参照センサは、一般に、電気化学デバイスにおける電気参照点として働き、この点に対して、電位が測定および制御される。

【0025】

本明細書中において使用される場合、用語「センサ」または「電気化学的センサ」とは、サンプル(例えば、体液サンプル)における特定の化学種の濃度の変動に応答するデバイスである。イオン感受性測定については、センサは通常、参照センサを備える参照電極と共に使用される。参照センサとは、参照電極において使用されるセンサである。1つの実施形態において、参照センサは、銀-塩化銀-塩化カリウムを含む。他の型の参照センサは、水銀-塩化水銀-塩化カリウムまたは銀-硝酸銀である。

30

【0026】

本明細書中において使用される場合、用語「液体接合」とは、ブリッジ電解質溶液と、サンプルまたは較正溶液との間の界面をいう。

【0027】

本明細書中において使用される場合、用語「サンプル」とは、参照電極を使用して試験され得る任意の流体または溶液をいい、例えば、水溶液(例えば、参照溶液もしくは較正溶液)、または体液(例えば、血液、血漿、滑液、および尿)が挙げられる。

40

【0028】

本明細書中において使用される場合、用語「較正」とは、特定の分析物に対するセンサの応答特徴が定量的に決定されるプロセスをいう。センサを較正するためには、このセンサは、少なくとも2種類の試薬サンプルまたは較正溶液に曝露され、各試薬サンプルは、異なる既知の濃度の分析物を有する。2つの異なる試薬サンプルにおける分析物の濃度に応答して、センサによって測定される応答(すなわち、信号)は、未知の濃度の分析物を有するサンプルにおける分析物の測定のための参照点として働く。

【0029】

50



「支持基材」とは、本明細書中において使用される場合、センサの種々の層（例えば、Ag、AgCl、うわぐすり、ガスケットなど）が適用されるか、形成されるか、または堆積される、センサの基材をいう。

【0030】

「コネクタ」とは、本明細書中において使用される場合、コネクタチャンネル、ブリッジ電解質ポート、およびコネクタハウジングを含む参照電極の構成要素をいい、このチャンネルは、サンプル入口チャンネルおよびサンプル流出チャンネルを備え、そしてこのブリッジ電解質ポートには、ブリッジ電解質チャンネルが接合される。

【0031】

サンプル入口チャンネルの「傾き角」とは、サンプル入口チャンネルと、ブリッジ電解質チャンネルの長手方向軸との間の角度をいう。サンプル流出チャンネルの「傾き角」とは、サンプル流出チャンネルと、ブリッジ電解質チャンネルの長手方向軸との間の角度をいう。

【0032】

「ブリッジ電解質ウェル」は、コネクタのうちの、一定の容量のブリッジ電解質溶液を保持するように形成された部分である。

【0033】

（参照電極のアセンブリ：参照センサ）

本発明に従う一つの実施形態において、図1Aおよび図1Bに例示される参照電極23は、参照センサ1およびコネクタ10を備える。図1Aを参照すると、参照センサ1は、参照電極23のうちの、支持基板2、Ag層3、AgCl層4、グレース層5およびガスケット層6から作製される部分である。ブリッジ電解質入口7は、ブリッジ電解質チャンネル8に連結する導管であり、このブリッジ電解質チャンネル8を、ブリッジ電解質溶液が流れ得る。ブリッジ電解質チャンネル8は、ブリッジ電解質入口7をブリッジ電解質ポート11に連結するチャンネルである。この参照電極23を作動させるために、ブリッジ電解質溶液は、ブリッジ電解質入口7を通過してポンピングされ、Ag/AgCl層3、4を越え、ブリッジ電解質チャンネル8を通り、ブリッジ電解質ポート11を通り、ブリッジ電解質ウェル15内に入り、ここで、ブリッジ電解質溶液は、ブリッジ電解質ウェル15内の、例えば、校正溶液または校正サンプルと接触して、ブリッジ電解質溶液とこのサンプルとの間に流体接続部または界面14を作製する。

【0034】

一つの実施形態において、参照電極23の支持基板2は、ポリマー材料もしくはセラミック材料またはそれらの組み合わせから作製される。このポリマー材料は、例えば、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレートもしくはポリイミド、またはそれらの組み合わせであり得る。このセラミック材料は、例えば、酸化アルミニウムもしくは二酸化ケイ素（silicium dioxide）またはそれらの組み合わせであり得る。

【0035】

さらに、図1Aおよび図1Bを参照すると、Ag層3は、当該分野で公知の方法に従って、例えば、スクリーン印刷または蒸着法により、支持基板2上に堆積される。スクリーン印刷のために、例えば、Ag粒子を、セラミック結合材料と合わせ、次いでスクリーン印刷し、続いて高温（例えば、700～800）で燃焼し得る。蒸着法のために、例えば、Ag金属を、高減圧下で、エバポレートし、そして支持基板2上に凝縮させ得る。

【0036】

本発明に従う一つの実施形態において、図1Aおよび図1Bをさらに参照すると、参照電極23のAgCl層4は、Ag層3を、約0.01Mと約1.0Mとの間の濃度および約pH1～約pH7のpHを有する塩化物電解質溶液で、 $0.005\text{ mA/mm}^2 \sim 0.5\text{ mA/mm}^2$ の電流密度で30秒～20分間、電着することによって形成される。好ましい実施形態において、電着は、約 $0.05\text{ mA/mm}^2$ の電流密度の塩化物電解質を有する塩化物電解質溶液で6分間にわたって行われる。

【0037】

10

20

30

40

50

図1 Aおよび図1 Bを続けて参照すると、参照電極2 3のグレーズ層5は、アルミナおよび/またはシリカにより構成され得、そして少なくとも約10  $\mu\text{m}$ 厚である。このグレーズ層5は、AgCl層4で覆われていないAg層3のあらゆる部分を覆うようなサイズおよび形状にされ、そしてAgCl層4(例えば、Ag層4の縁部の周り)を形成するために、酸化されないAg層3の絶縁部を提供する。さらに図1 Aおよび1 Bを参照すると、このグレーズ層5はまた、グレーズ層5と同程度の厚さのAgCl層4の周りに、ウェル9の壁を形成する。次いで、絶縁グレーズ層5は、ガスケット層6で覆われる。

**【0038】**

ガスケット層6は、好ましくは、ポリウレタン、シリコンラバー、ポリビニルクロリド(PVC)、ビトン(登録商標)、天然ゴムもしくは合成ゴム、および/またはブリッジ電解質溶液と反応しないか、もしくはこれに溶解しない任意の他の可撓性材料から作製される。ガスケット層6は、少なくとも約50  $\mu\text{m}$ 厚である。好ましい実施形態において、このガスケット層6は、約50  $\mu\text{m}$ 厚と約700  $\mu\text{m}$ 厚との間である。このガスケット層6は、グレーズ層5を覆うような形状にされる。

10

**【0039】**

このブリッジ電解質入口7は、参照センサ1を通過して、ブリッジ電解質チャンネル8を流れる、ブリッジ電解質溶液のための導管を提供する。一つの実施形態において、図1 Aおよび図1 Bを参照すると、ブリッジ電解質入口7およびブリッジ電解質チャンネル8は、アクリルブロック17中に収容される。

**【0040】**

20

**(コネクタ)**

図1 Aを参照すると、一般に、コネクタ10は、サンプル入口チャンネル12、および廃棄物収集容器(示さず)に至るサンプル流出チャンネル13を備えるコネクタチャンネル102、ブリッジ電解質ポート11、ブリッジ電解質ウェル15ならびにコネクタハウジング16を有する。ブリッジ電解質チャンネル8は、ブリッジ電解質ポート11を介してコネクタ10に連結される。サンプル入口チャンネル12は、流体サンプル(例えば、血液または校正溶液)を、ブリッジ電解質ウェル15を越えて、サンプル流出チャンネル13へ、次いで廃棄物容器へと流すための導管である。

**【0041】**

本発明の一つの実施形態において、コネクタ10は、図1 Aに例示されるようなT字形状で形成される。この実施形態において、このサンプル入口チャンネル12およびサンプル流出チャンネル13は、ブリッジ電解質チャンネル8の長手軸に対して本質的に垂直(すなわち、約90°)である。この配向において、ブリッジ電解質チャンネル8に対するサンプル入口チャンネル12の傾斜角(b)、およびブリッジ電解質チャンネル8に対するサンプル流出チャンネル13の傾斜角(a)は、約90°である。図1 Aに示される90°の傾斜角(a)、(b)は、単に例示であり、約90°と約180°との間の任意の角度が、本発明によって意図される。例えば、図1 Cに例示されるように、サンプル流出チャンネル13の傾斜角(a)は、150°であり得、そしてこのサンプル入口チャンネル12の傾斜角(b)は、120°であり得る。

30

**【0042】**

ブリッジ電解質ウェル15のいくつかの実施形態が、図1 A、図2 Aおよび図3 Aに示される。図1 Aを参照すると、一つの実施形態において、ブリッジ電解質ウェル15は、実質的に平底であり得る。図2 Aを参照すると、別の実施形態において、このブリッジ電解質ウェル15は、実質的に円錐形状であり得る。図3 Aを参照すると、なお他の実施形態において、このブリッジ電解質チャンネル8の長手軸に対するサンプル入口チャンネル12の傾斜角(a)および/またはサンプル流出チャンネル13の傾斜角(b)が、約90°より大きい場合、このブリッジ電解質ウェル15は、コネクタチャンネル102において湾曲状態で形成される。サンプル入口チャンネル12またはブリッジ電解質ウェル15を作製するサンプル流出チャンネル13の一方または両方の、任意の上方への湾曲が、意図される。ブリッジ電解質ウェル15は、一定の容量のブリッジ電解質溶液を保持し得るブリッジ電解

40

50

質ポート 11 の真上のコネクタチャンネル 102 中に作製される。流体サンプルまたは較正溶液が、ブリッジ電解質ウェル 15 中のブリッジ電解質溶液と界面を形成する場合、液体接合部 14 が、サンプル溶液または較正溶液とブリッジ電解質溶液との間に作製される。一つの実施形態において、ブリッジ電解質ウェル 15 は、 $10\ \mu\text{l} \sim 500\ \mu\text{l}$  のブリッジ電解質溶液を保持する。本発明の特定の実施形態において、この液体接合部 14 は、好ましくは、約  $0.5\ \text{mm}^2 \sim 10\ \text{mm}^2$  の範囲の表面積を有する。

#### 【0043】

コネクタ 10 は、参照電極 23 において使用されるブリッジ電解質溶液と反応しないか、またはこれに溶解しない物質から作製される。一つの実施形態において、このコネクタ 10 は、金属性であり、そして例えば、ステンレス鋼、アルミニウムおよび/または白金から作製される。別の実施形態において、このコネクタ 10 は、ポリマー材料（例えば、アクリル、プレキシグラス (plexiglas (登録商標))、レキサン (lexan (登録商標))、ポリカーボネート、および/または PVC) から作製される。

10

#### 【0044】

(参照電極の操作)

別の局面において、本発明は、センサシステムの参照電極 23 を使用して、流体サンプル中の分析物を測定するための方法である。図 1A を参照すると、このブリッジ電解質溶液は、ブリッジ電解質入口 7 に導入され、参照センサ Ag / AgCl 層 3、4 を通過し、参照センサ Ag / AgCl 層 3、4 と接触し、この流体は、ブリッジ電解質チャンネル 8 を通ってポンピングされ、ブリッジ電解質ポート 11 を通って、ブリッジ電解質ウェル 15 に入る。流体サンプルが、例えば、蠕動式ポンプによる正の流れによって、サンプル入口チャンネル 12 に導入される場合、流体サンプルは、ブリッジ電解質ウェル 15 中のブリッジ電解質溶液と接触し、液体接合部 14 を形成する。サンプルとこのブリッジ電解質溶液との接触は、参照電極 23 の回路を完了させる。

20

#### 【0045】

(センサカートリッジ)

図 4 を参照すると、本発明の特定の実施形態において、参照電極 23 は、センサカートリッジ 21 に導入されたサンプルについての電気測定を行うために改造されたカートリッジ入口チャンネル 20 によって接続された、少なくとも 1 つのセンサ 22、または複数のセンサ 22 を取り込んだセンサカートリッジ 21 と連結して使用される。好ましいセンサカートリッジ 21 は、米国特許第 4,734,184 号および同第 6,123,820 号に詳細に記載されており、これらは、本明細書中で参考として援用されている。センサカートリッジ 21 は、例えば、pH、 $\text{pCO}_2$ 、 $\text{pO}_2$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{++}$ 、およびヘマトクリットを測定するために、例えば、電気化学センサ (すなわち、電極) 22 を参照電極 23 とともに備え得る。あるいは、センサカートリッジ 21 は、酵素センサ 22 を備え得る。温度制御は、適切な加熱エレメントまたは冷却エレメント (例えば、ペルチエ効果デバイスおよびサーミスター) を使用して、所望の温度にセンサカートリッジ 21 を維持することによって達成され得る。

30

#### 【0046】

(センサカートリッジ - 参照電極アセンブリ)

図 4 を参照すると、このセンサカートリッジ 21 および参照電極 23、ならびにセンサカートリッジ 21 および参照電極 23 の内側および外側に通じている種々のチャンネル (例えば、ブリッジ電解質入口 7、ブリッジ電解質チャンネル 8、サンプル入口チャンネル 12、サンプル流出チャンネル 13、カートリッジ入口チャンネル 20) は、センサカートリッジ - 参照電極アセンブリ 24 (「アセンブリ 24」) に構築される。

40

#### 【0047】

図 5 は、参照電極 23 が、サンプル入口チャンネル 12、pH / mV メータ 40 およびポテンシオスタット 44 を介してセンサカートリッジ 21 に接続され、ポテンシオスタット 44 が白金電極または金電極 35 に必要に応じて連結される、電位差測定値および電流滴定測定値を得るのに使用するための本発明の実施形態を図示する。電位差測定センサ (例え

50

ば、pH、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など)のために、pH/mVメータ40の一方のリード線(すなわち、第1のpH/mVメータ入力リード線36)は、各電位差測定センサ32に接続され、そしてpH/mVメータ40の他方のリード線(すなわち、第2のpH/mVメータ入力リード線38)は、参照電極23に接続される。図5は、pHセンサ32に接続されたpH/mVメータ40の第1のpH/mVメータ入力リード線36、および参照電極23に接続されたpH/mVメータ40の第2のpH/mVメータ入力リード線38の例示的な例を提供するが、さらなるpH/mVメータ入力リード線36、38が、さらなる電位差測定センサ(例えば、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Na}^+$ および $\text{K}^+$ のため)32および参照電極23とpH/mVメータ40とを接続し得る。pH/mVメータ40は、電位差測定センサ32と参照電極23との間の電位差を測定する。この電位差は、サンプルまたは校正溶液中の分析物の濃度に比例する。 10

#### 【0048】

さらに図5を参照すると、2電極型電池配置における電流滴定センサ(すなわち、作用電極)34(例えば、 $\text{pO}_2$ 、グルコース、ラクタート、尿素、 $\text{pCO}_2$ など)に関して、いわゆるポテンシオスタット44(すなわち、作用電極の接続部42)の一方のリード線は、各電流滴定センサ34に連結され、そしてポテンシオスタット44(すなわち、参照電極の接続部46)の他方のリード線は、参照電極23に連結される。図5は、グルコースセンサ34に連結されたポテンシオスタット44の作用電極の接続部42および参照電極23に連結されたポテンシオスタット44の参照電極の接続部46の例示的な例を提供するが、さらなるポテンシオスタットのリード線42、46が、さらなる電流滴定センサ34および参照電極23とポテンシオスタット44を接続し得る。3電極型電流滴定電池配置の場合において、ポテンシオスタット44の第3のリード線(すなわち、対電極(C E)接続部48)は、サンプルまたは校正溶液と直接接触する、白金電極35または金電極35(図5に斜線で例示されている)に接続される。ポテンシオスタット44は、センサ34と参照電極23との間に予め決められた電位を印可する。センサ34を流れ、そしてポテンシオスタット44によって測定される電流は、サンプルまたは校正溶液中の分析物の濃度に比例する。 20

#### 【0049】

イオン選択性電極のようなセンサおよびセンサカートリッジのためのそれらの製造、ならびに使用される蠕動式ポンプシステムの詳細は、米国特許第4,214,968号、同第4,734,184号、同第6,123,820号に記載されており、そして微小電極の操作は、U.S.S.N.60/170,136に詳細に記載されている(これらの全ての内容は、本明細書中で参考として援用されている)。 30

#### 【0050】

センサカートリッジ参照電極アセンブリ24は、サンプル中の分析物の濃度を決定する前に校正する必要がある。センサカートリッジ21のセンサ22は、アセンブリ24によって測定されるべきパラメータについて、既知の値を有する少なくとも1つの水溶液を用いて校正され得る。特定の分析物について異なる既知の値を有する2つの校正溶液は、このシステムが2点の基準で校正されるのを可能にする。アセンブリ24の校正について、図4を参照すると、第1の蠕動式ポンプは、第1の校正溶液を、カートリッジ入口チャンネル20に移動させ(例えば、引っ張られる)、そして1つ以上のセンサ22を通過させてセンサカートリッジ21を通過させる。第2の蠕動式ポンプは、ブリッジ電解質溶液を、ブリッジ電解質入口7に移動させ、参照センサAg/AgCl層3、4を通過して、ブリッジ電解質チャンネル8に入らせる(例えば、押し出される)。次いで、このブリッジ電解質溶液は、ブリッジ電解質チャンネル8を通過して、コネクタ10に移動し、ここで、このブリッジ電解質溶液は、第1校正溶液との液体接合部14を形成する。本発明の特定の実施形態において、液体接合部14は、ブリッジ電解質ウェル15中の約 $10\mu\text{l}$ ~約 $500\mu\text{l}$ のブリッジ電解質溶液と、コネクタチャンネル102中の $10\mu\text{l}$ ~約 $300\mu\text{l}$ のサンプルまたは第1の校正溶液との間で形成される。この液体接合部14が形成された後、第1の蠕動式ポンプおよび第2の蠕動式ポンプが、停止される。約20秒~約90秒後に、過渡的 40 50

なシグナルが、センサ 2 2 について安定化される一方で、測定値（例えば、電位値）が得られる。同一の手順は、第 2 の較正溶液を使用して繰り返され得る。一つの実施形態において、較正溶液を使用して、アセンブリ 2 4 についてベースライン読取値を提供し得る。次いで、血液サンプルのようなサンプルが、同様のサイクルを使用して測定される。一つの実施形態において、サンプルが測定された後、リンス溶液（例えば、較正溶液）を使用して、センサカートリッジ 2 1、カートリッジ入口チャンネル 2 0、サンプル入口チャンネル 1 2、サンプル流出チャンネル 1 3、ブリッジ電解質ウェル 1 5 および / または液体接合部 1 4 を洗浄し得る。洗浄後、第 1 の較正溶液が、センサカートリッジ 2 1 のサンプル入口チャンネル 2 0 にローディングされ、ブリッジ電解質溶液が、新鮮なブリッジ電解質溶液を、ブリッジ電解質入口 7 およびブリッジ電解質チャンネル 8 を通して、ブリッジ電解質ウェル 1 5 内へとポンピングすることによってリフレッシュする。次いで、このアセンブリ 2 4 は、次のサンプルのために準備ができています。

10

#### 【 0 0 5 1 】

一つの実施形態において、ポンプの操作の間、カートリッジ - 参照電極アセンブリ 2 4 は、ブリッジ電極入り口 7 を介するブリッジ電極溶液の一定脈動流れ、およびカートリッジ入り口チャンネル 2 0 を介する血液サンプルまたは 2 つの較正溶液のうちの 1 つのいずれかの脈動流れを受容する。一つの実施形態において、センサーカートリッジ - 参照電極アセンブリ 2 4 を次のサンプルまたは較正のために準備する時間の間、較正溶液（好ましくは、第 2 較正溶液）のうちの 1 つは、一定ベースラインの較正の読みが時間にわたってそしてサンプル間で維持され得るようにセンサーの全面にある。

20

#### 【 0 0 5 2 】

マイクロプロセッサは、当該分野において周知のように、流体サンプル、較正溶液およびリンス溶液（例えば、第 2 較正溶液）の配列が、アセンブリ 2 4 を通過し得るように、ポンプの活動を制御し得る。較正溶液がアセンブリ 2 4 を通過する場合、アセンブリ 2 4 の 1 部を形成するセンサー 2 2 は、サンプルのパラメータの測定を行い、そしてマイクロプロセッサは、これらの電気的値を保存する。較正溶液がセンサーカートリッジ 2 4 を通過する間になされる測定、および較正溶液内に含まれる測定パラメータの既知の値に基づいて、マイクロプロセッサは、測定パラメータのそれぞれについての較正曲線を作製し得、その結果、サンプルがアセンブリ 2 4 を通る場合に、センサー 2 2 によってなされる測定が、目的のパラメータの正確な測定を導くために使用され得る。これらの測定は、これらの測定は、マイクロプロセッサによって保存され、そして表示される。マイクロプロセッサは、測定、計算、保存、および制御機能を実行するために適切にプログラムされる。

30

#### 【 0 0 5 3 】

（血液サンプル）

血液サンプルは、瀉血によって得られ得るかまたは例えば開心手術する間、患者に接続される体外血流回路かの周期的な基準で誘導され得る。血液サンプルは、他の自動手段によってまたは手動によって（例えば、シリンジによって）、カートリッジ入り口チャンネル 2 0 に導入され得る。血液サンプルはまた、別のサンプルとして導入され得る。

#### 【 0 0 5 4 】

（較正溶液）

一つの実施形態において、センサーカートリッジ - 参照電極アセンブリ 2 4 は、2 つの較正溶液（例えば、較正溶液 A および較正溶液 B）を用いて較正され得る。較正溶液 A の好ましい組成（3 7 でそして 8 %  $\text{CO}_2$  - 9 2 %  $\text{N}_2$  ガスでトノメーターされた（tonometered）大気圧で調製される）は、以下の通りである：

40

#### 【 0 0 5 5 】

【表 1】

化合物	量 /1リットル	
脱イオン水	1リットルまで充填した	
MOPS (3-[N- モルホリノプロパンスルホン酸) ) 緩衝液	16.5g	
ナトリウム MOPS 緩衝液	8.2g	10
亜硫酸ナトリウム	5.0g	
塩化カリウム	0.17g	
塩化カルシウム	0.068g	
塩化ナトリウム	2.76g	
重炭酸ナトリウム	1.26g	
Proclin	1.015g	20
HCl	0.15g	
Brij (界面活性剤として25%溶液から )	0.256g	

この組成は、効果的な血液ファクシミリ ( b l o o d f a c s i m i l e ) であり、そしてアセンブリ 2 4 によって測定される以下のパラメーターを有する。

【 0 0 5 6 】

【 表 2 】

30

pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	O <sub>2</sub> (mmHg)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Ca (mmol/L)
6.908 - 6.932	60.5 - 64.5	0	153.5 - 156.5	1.81 - 2.11	0.18 - 0.22

較正溶液 B の好ましい組成 ( 3 7 で、2 1 % O<sub>2</sub> - 4 % C O<sub>2</sub> - 7 5 % N<sub>2</sub> ガスを用いてトノメーターされる 7 0 0 m m H g の絶対圧力で調製される ) は、以下の通りである :

【 0 0 5 7 】

【 表 3 】

化合物	量 / 1リットル	
脱イオン水	1リットルまで充填した	
MOPS (3[N- モルホリノプロパンスルホン酸 ) 緩衝液	6g	
ナトリウム MOPS 緩衝液	18.75g	10
硫酸ナトリウム	3.75g	
酢酸マグネシウム	1.07g	
塩化カリウム	0.527g	
塩化カルシウム	0.535g	
塩化ナトリウム	0.13g	
重炭酸ナトリウム	1.932g	20
Proclin	1.023g	
HCl	0.313g	
Brij (界面活性剤として25%溶液から )	0.256g	

この組成は、効果的な血液ファクシミリであり、そしてアセンブリ 2 4 によって測定される以下のパラメーターを有する。

【 0 0 5 8 】

30

【 表 4 】

pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	O <sub>2</sub> (mmHg)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Ca (mmol/L)
7.385 - 7.415	33.0 - 37.0	190 - 210	133 - 137	5.87 - 6.27	1.90 - 2.04

2つの較正溶液の組成は、このシステムによって測定される特性のそれぞれについて、アセンブリ 2 4 によって測定される許容可能な値の範囲にわたって間隔が空けられる一対の値が得られるように選択され、アセンブリ 2 4 についての平衡化された 2 点較正を提供する。

40

【 0 0 5 9 】

較正組成物は、カルシウム二水和物塩を除いて、成分全てを予備混合し；窒素と混合された酸素および CO<sub>2</sub> を用いて溶液をトノメーターしてこの溶液について所望のレベルの pH を生成し；カルシウム二水和物塩を添加し；そして最後に、カルシウム二水和物塩の添加の間に生じるガスレベルの任意の変動を調整するためにこの溶液を再トノメーターすることによって調製される。

【 0 0 6 0 】

較正溶液 A および B の組成は、例示の目的である；任意の所望の較正溶液が参照電極 1 とともに使用され得ることが企図される。

50

## 【0061】

(ブリッジ電解質溶液)

例えば、図1Aに示されるように、参照電極23に使用されるブリッジ電解質溶液は、液体接合部14にサンプルまたは較正溶液を提供し、そしてそれによって、参照電極23を較正溶液または血液の変動する電気化学電位から隔離して、サンプルまたは較正溶液のイオン活量と独立した環境を参照電極23に確立する。ブリッジ電解質溶液は、本質的に、サンプルまたは較正溶液よりも高張性の塩化物溶液(例えば、KCl)である。

## 【0062】

ガス/電解質測定がなされた後に、ブリッジ電解質溶液がセンサー22から下流でサンプル入り口チャンネル12と合わさるので、ブリッジ電解質溶液は、これらの測定にいかなるようにも影響しない。ブリッジ電解質溶液は、ポンピング力下で、ブリッジ電解質ウェル15に向かって重力に対して上方に流れなければならない。従って、ポンプが停止した場合、ブリッジ電解質溶液は、コネクタ10のブリッジ電解質ウェル15に固定されたままであり、そしてサンプル入り口チャンネル12内の較正溶液またはサンプル中に有意に拡散しない傾向があり、参照センサー1へのサンプルまたは較正溶液の望ましくない逆方向の通過または混合を妨げる。サンプルおよびブリッジ電解質溶液が液体接合部14において幾分混合されるので、ブリッジ電解質溶液が、約0分と約60分との間、必要に応じて、約5分と15分との間の間隔で、新しくされることが重要である。

10

## 【0063】

好ましい実施形態において、ブリッジ電解質溶液は、最初にAgClで飽和された0.1M KCl溶液である。ブリッジ電解質溶液は、0.01%と1.0%との間の濃度で、ポリオキシル水素化ヒマシ油25(例えば、Arlatone G(登録商標))のような界面活性剤を含み得る。他の型の界面活性剤(例えば、Brj35(70 $\mu$ l/lの溶液))もまた使用され得、気泡形成を最小化し得る。1つの実施形態において、ブリッジ電解質溶液は、室温で調製され、次いで、過剰のAgClを用いて飽和される。次いで、懸濁されたAgCl粒子を含む溶液は、ヘッドスペースを有さないシールされた可撓性容器内にパッケージされる。この技術は、この溶液が任意の保存温度でAgClについて飽和されたままであることを確実にする。

20

## 【0064】

(酵素センサー)

イオンセンサー22を使用する上記較正および測定はまた、酵素センサーに企図される。このような酵素センサーは、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>+</sup>以外の溶質、pO<sub>2</sub>、pCO<sub>2</sub>以外の気体、ヘマトクリットおよびpHの分析のために有用である。例えば、酵素センサーは、体液サンプル(例えば、血液)中のグルコース、またはラクトン、または他のタンパク質の分析のために有用である。

30

## 【0065】

(等価物)

本発明は、その精神または必須の特徴から逸脱することなく他の特定形態で実施され得る。従って、上記実施形態は、本明細書中に記載される本発明を制限するというよりも、全ての局面において例示とみなされるべきである。従って、本発明の範囲は、上記記載によってよりも、添付の特許請求の範囲によって示され、そして特許請求の範囲の等価物の意味および範囲内に入る全ての変更は、その中に含まれると意図される。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0066】

【図1A】図1Aは、ブリッジ電解質ウェルが平底カップである、参照電極の実施形態の概略断面図を示す。

【図1B】図1Bは、図1Aに示される参照電極の側面図を示す。

【図1C】図1Cは、本発明によるコネクタチャンネルのブリッジ電解質ウェルの実施形態を示す。

【図2A】図2Aは、ブリッジ電解質ウェルが円錐形である、参照電極の実施形態の概略

50



断面図を示す。

【図 2 B】図 2 B は、図 2 A に示される参照電極の側面図を示す。

【図 3 A】図 3 A は、ブリッジ電解質ウェルが、約 90 ° より大きな角度で傾くように、サンプル入口チャンネルおよび / またはサンプル流出チャンネルを屈曲させることによって形成されている、参照電極の実施形態の概略断面図を示す。

【図 3 B】図 3 B は、図 3 A に示される参照電極の側面図を示す。

【図 4】図 4 は、電気化学的センサカートリッジと共に使用される参照電極の概略図を示す。

【図 5】図 5 は、サンプル入口チャンネル、pH / mV メータおよびポテンシオスタットを介してセンサカートリッジに接続された参照電極の概略図を示し、このポテンシオスタットは、必要に応じて、白金または金の電極に接続されている。

【 図 1 A 】

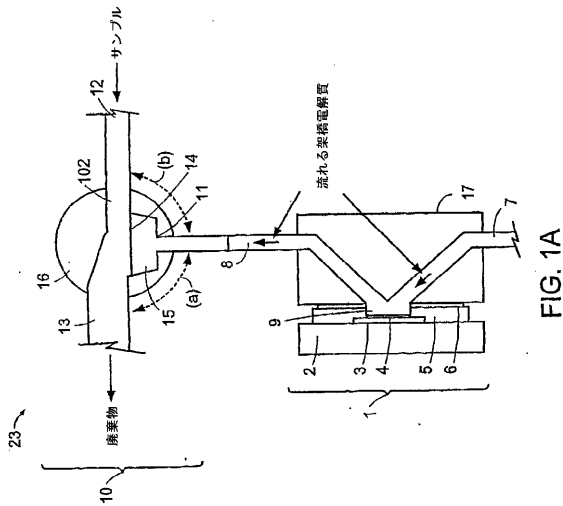


FIG. 1A

【 図 1 B 】

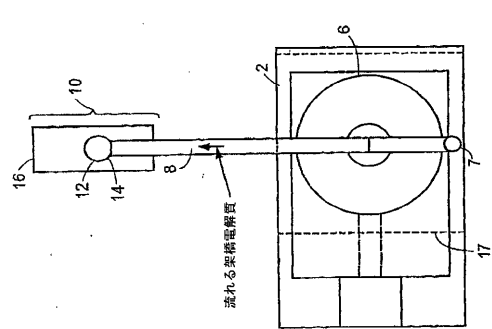


FIG. 1B

【 図 2 A 】

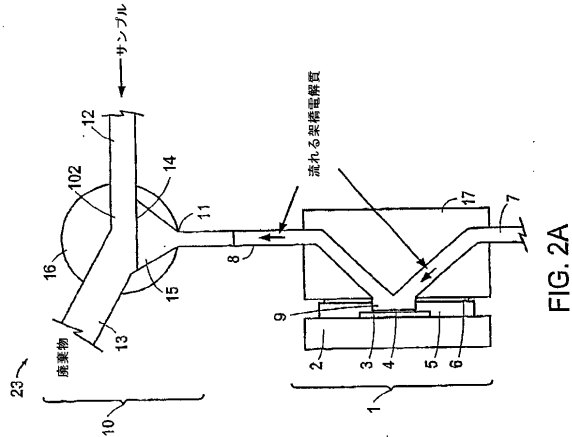


FIG. 2A

【図 2 B】

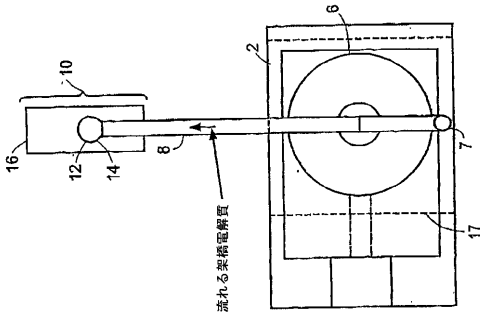


FIG. 2B

【図 3 B】

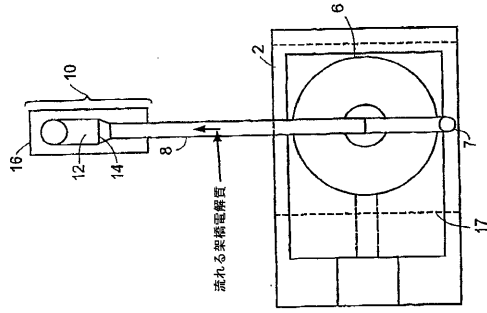


FIG. 3B

【図 3 A】

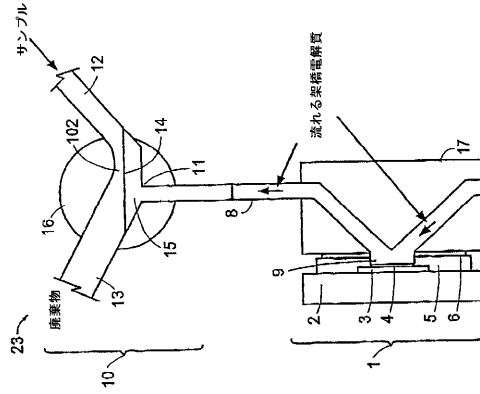


FIG. 3A

【図 5】

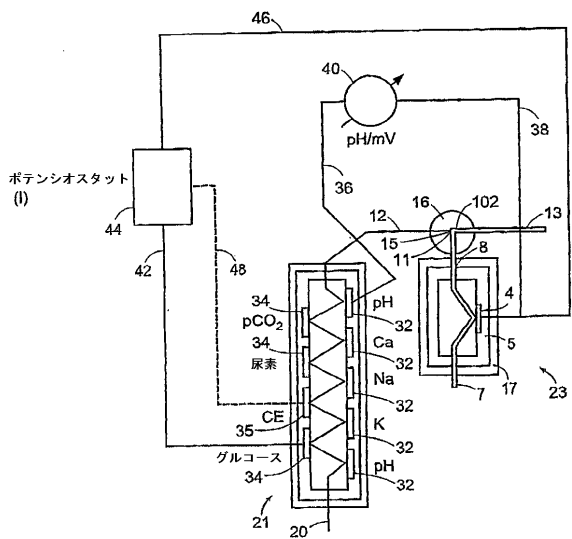


FIG. 5

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/077641 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/487
- (21) International Application Number: PCT/US02/07069
- (22) International Filing Date: 7 March 2002 (07.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/274,097 7 March 2001 (07.03.2001) US
- (71) Applicant: INSTRUMENTATION LABORATORY  
COMPANY [US/US]; 101 Hartwell Avenue, Lexington,  
MA 02142 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).



WO 02/077641 A2

- (72) Inventors: ERDOSY, Miklos; B6 Scotty Hollow Drive,  
North Chelmsford, MA 01863 (US); COSOFRET, Vasile,  
V.; 5 Green Needle Way, Acton, MA 01720 (US).
- (74) Agent: STEEL, Diana, M.; Tsstia, Hurwitz & Thibeault,  
L.L.P., High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA  
02110 (US).
- Published:  
— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: REFERENCE ELECTRODE

(57) Abstract: The invention relates to a durable and reliable miniature liquid junction reference electrode for use with at least one electrode (e.g., an electrochemical sensor cartridge) for measuring certain characteristics of a fluid sample such as blood or other body fluid.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

**REFERENCE ELECTRODE****Related Applications**

[0001] This application claims priority to provisional patent application Serial No. 60/274,097 filed in the U.S. Patent Office on March 7, 2001, the entire contents of which is incorporated by reference herein.

**Field of the Invention**

[0002] The invention relates generally to liquid junction reference electrodes and methods of use thereof. In particular, the invention relates to miniature liquid junction reference electrodes for use with an electrochemical sensor cartridge for measuring certain characteristics of a fluid sample such as blood.

**Background of the Invention**

[0003] It is often desirable in biomedical applications to analyze one or more physical properties and/or constituents of small volume samples of a patient's body fluid. For example, samples of a patient's whole blood are often analyzed and/or monitored to provide information regarding blood analytes such as pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>, hematocrit and the like.

Information derived from analytes in a blood sample is compared to normal physiological function and homeostasis profiles and may be used by a physician for diagnostic purposes, patient monitoring and/or for the control of life support systems, for example.

[0004] Systems which employ electrochemical electrodes for detecting constituents of a body fluid are well known in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos.

3,658,478; 5,387,329; 5,338,435; 4,734,184; 4,361,539 and 5,200,051, the entire contents of which are hereby expressly incorporated by reference. Typically, systems which provide blood chemistry analysis are stand-alone machines or are adapted to be connected to an extracorporeal shunt or an *ex vivo* blood source, e.g., a heart/lung machine used to sustain a patient during surgery. Small test samples of flowing live *ex vivo* blood may be diverted off-line in real-time from either the venous or arterial flow lines of the heart/lung machine directly into a chamber and exposed to a bank of microelectrodes containing sensors which generate electrical signals proportional to, or indicative of, chemical characteristics of the real time flowing blood sample.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 2 -

**[0005]** There have been efforts to miniaturize the sensors themselves and to fabricate them by techniques recently made available by developments in integrated circuit technology. In this regard, integrated circuit technology allows sensors to be fabricated in a planar form, whereby thin layers of materials are applied successively to a base dielectric substrate using thick-film and/or thin film techniques. The manufacture of planar sensors can be significantly automated to allow production in quantity and at lower cost. Planar sensors can be made smaller and configured more closely together, reducing the fluid sample volume requirements.

**[0006]** Though various miniature electrochemical sensors and microsystems using such sensors have been developed, the unavailability of a durable, stable and reliable miniature reference electrode has restricted the use of miniature electrochemical sensors for industrial and biomedical applications. The stability of a reference electrode in potentiometry is very important for the reliability and accuracy of the measurements. A potential error of only 1mV causes about a 0.02 pH error in pH measurements and 4% or 8% concentration error, respectively, for mono- and divalent ion measurements using ion-selective electrodes. Nevertheless, miniaturization has been largely limited to the development of working and indicator electrodes and, in many cases, commercial macro reference electrodes have been used in the absence of a reliable miniature reference electrode.

**[0007]** There have been several attempts to make miniature reference electrodes, as separate, independent units, as subcomponents in a multi-sensor structure, or integrated with various miniature ion-selective sensors. Typically, such systems use a thin film Ag/AgCl electrode. The thin film Ag/AgCl electrode is based on a very high exchange-current density reaction, i.e., at low current densities the electrode is not polarized and the potential at the electrode/ electrolyte interface is only a function of Cl<sup>-</sup> activity. However, several factors can limit the durability of the Ag/AgCl element. Conventional macro liquid-junction Ag/AgCl electrodes consist of a reservoir with a high activity of KCl, saturated with AgCl. Since AgCl shows some degree of solubility in high Cl<sup>-</sup> activities, a thin film of AgCl can ultimately dissolve depending on the temperature of the bridge electrolyte solution. In addition, the standard liquid junction miniature electrodes do not provide an adequate contact surface or liquid junction between a sample and the reference bridge electrolyte solution that completes the circuit for the reference electrode. A need therefore exists for an improved miniature reference electrode.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 3 -

**Summary of the Invention**

**[0008]** In one aspect, the invention provides a miniature liquid junction reference electrode which includes two components: a reference sensor and a connector. The reference sensor houses a durable thick-film Ag/AgCl element composed of a silver (Ag) layer deposited onto a support substrate and an AgCl layer formed onto the surface of the Ag layer by, e.g., electrochemical oxidation. In an embodiment, the reference sensor is connected to a bridge electrolyte inlet and a bridge electrolyte channel through which a bridge electrolyte solution may flow. The connector channel houses a connector channel including a sample inlet channel and a sample outflow channel through which a sample or calibration solution may flow. The connector also has a bridge electrolyte well and a bridge electrolyte port to which the bridge electrolyte channel is connected and through which the bridge electrolyte solution passes to contact a sample or a calibration solution.

**[0009]** The reference sensor may be composed of a number of layers that are deposited onto the support substrate, including: a silver (Ag) layer deposited on the support substrate, a silver chloride (AgCl) layer formed on the Ag layer, a glaze layer deposited on part of the AgCl layer, and a polymeric gasket placed on the glaze layer. The layers may be deposited by any means but are preferably deposited by screen printing or vapor deposition.

**[0010]** The support substrate is made of, for example, a polymeric material and/or a ceramic material. The polymeric material may, for example, be a flexible or hard polyvinyl chloride, polyethylene, polycarbonate, polyacrylate and/or polyimide. The ceramic material may be, for example, aluminum oxide and/or silicon dioxide.

**[0011]** The Ag layer may be at least about 1  $\mu\text{m}$ , about 1  $\mu\text{m}$  to about 15  $\mu\text{m}$  or is preferably about 15  $\mu\text{m}$  thick.

**[0012]** The AgCl layer may be formed, for example, on the Ag layer by electrodeposition. In an embodiment, the AgCl layer is formed on the Ag layer by treatment of the Ag layer with a chloride electrolyte solution having a concentration of between 0.01 and 1.0 M with a current density of between about 0.0005 and about 0.5  $\text{mA}/\text{mm}^2$  for about 30 seconds to about 20 minutes. The chloride electrolyte solution may be, for example, NaCl, KCl, or  $\text{CaCl}_2$ .

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 4 -

and may have a pH range between about pH 1 and about pH 7, between about pH 1 and about pH 5 or between about pH 1 and about pH 2.

[0013] The glaze layer may be composed of, for example, alumina and/or silica and is between 10  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$  and is at least about 10  $\mu\text{m}$  thick.

5 [0014] The polymeric gasket layer may be made of, for example, polyurethane, silicone rubber, PVC, natural and/or synthetic rubber (e.g., viton®), or any other flexible material that does not react with or dissolve in the bridge electrolyte solution. The polymeric gasket layer is at least about 50  $\mu\text{m}$  thick. In a preferred embodiment, the polymeric gasket layer is between about 50  $\mu\text{m}$  and about 700  $\mu\text{m}$  thick. The bridge electrolyte channel which connects to and  
10 passes over the reference sensor is preferably, but not limited to, about 0.5 mm in diameter.

[0015] The connector channel is made of, for example, a polymeric or metallic material that should not react with, or dissolve in, the bridge electrolyte solution. Suitable metallic materials include stainless steel, aluminum and/or platinum. Suitable polymeric materials include acrylic, plexiglas®, lexan®, polycarbonate, and/or PVC. The bridge electrolyte port of the  
15 connector channel is preferably close to the reference sensor, located at a distance range from between about 2 mm to about 10 mm, between about 2 mm to about 15 mm, or between about 2 mm to about 30 mm from the reference electrode. The sample inlet channel of the connector is preferably, but not limited to, about 1 mm in diameter. The sample outflow channel is preferably, but not limited to, about 2 mm in diameter. The sample outflow channel and the  
20 sample inlet channel of the connector channel are composed of one or more tubes that are connected together and have a common lumen. For example, the sample inlet channel and sample outflow channel may be a flexible tube, preferably, but not limited to, about 1 mm to about 30 mm in diameter. In an embodiment, each of the sample outflow channel and sample inlet channel are oriented at a tilt angle of about 90° to about 180° relative to the longitudinal  
25 axis of the bridge electrolyte channel. This manner of tilting or bending the sample channel may create a bridge electrolyte well above the bridge electrolyte port.

[0016] The bridge electrolyte port defines a hole which connects the bridge electrolyte channel to the connector channel. The connector channel proximate to the bridge electrolyte port is shaped to form a bridge electrolyte well capable of holding a volume of bridge electrolyte

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 5 -

solution. The bridge electrolyte well may be, e.g., flat bottomed, round bottomed or cone shaped. In a preferred embodiment, the connector channel or bridge electrolyte well is shaped so as to hold a volume of bridge electrolyte solution. The liquid junction formed in the bridge electrolyte well between a sample and the bridge electrolyte solution has a surface area in the range of about 1 mm<sup>2</sup> to about 10 mm<sup>2</sup> when the reference electrode is in use. When a sample is passed (e.g., pumped) over the bridge electrolyte well which contains the bridge electrolyte solution, a sample / bridge electrolyte solution liquid junction (i.e., interface) forms. In an embodiment, the surface area of the liquid junction is at least about 0.05 mm<sup>2</sup> to about 10 mm<sup>2</sup>.

[0017] The bridge electrolyte solution used in the reference electrode is preferably KCl saturated with AgCl, with a chloride ion solution of about 0.1 M to about 0.5 M at the temperature the solution is stored and used.

[0018] In another aspect the invention relates to methods for using a liquid junction reference electrode, involving using the reference electrode for measuring one or more electrolytes or enzymes in a sample. In an embodiment, the reference electrode is connected to an electrode sensor cartridge for measuring one or more analytes. The methods of using the reference electrode involves the following steps: providing a calibration solution or sample to a sample inlet channel; providing a bridge electrolyte solution to the bridge electrolyte inlet; providing a force to the sample or calibration solution and a force to the bridge electrolyte solution so that each of them flows toward the bridge electrolyte port; forming a contact interface or liquid junction in the bridge electrolyte well between the sample and the bridge electrolyte solution; and taking a measurement after a period of time (e.g., when the readout value settles). The force used to move the sample through the connector channel and the bridge electrolyte solution through the bridge electrolyte channel may be caused by positive or negative pressure by one or more peristaltic pumps.

25

#### **Brief Description of the Drawings**

[0019] The foregoing and other objects, features and advantages of the present invention disclosed herein, as well as the invention itself, will be more fully understood from the following description of preferred embodiments and claims, when read together with the accompanying drawings, in which:



WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 6 -

[0020] Figure 1A illustrates a schematic cross sectional view of an embodiment of a reference electrode in which the bridge electrolyte well is a flat bottom cup.

[0021] Figure 1B illustrates a side view of the reference electrode illustrated in Figure 1A.

5 [0022] Figure 1C illustrates an embodiment of the bridge electrolyte well of the connector channel according to the invention.

[0023] Figure 2A illustrates a schematic cross-sectional view of an embodiment of a reference electrode in which the bridge electrolyte well is cone shaped.

10 [0024] Figure 2B illustrates a side view of the reference electrode illustrated in Figure 2A.

[0025] Figure 3A illustrates a schematic cross-sectional view of an embodiment of a reference electrode in which the bridge electrolyte well is formed by bending the sample inlet channel and/or the sample outflow channel to a tilt angle of greater than about 90°.

15 [0026] Figure 3B illustrates a side view of the reference electrode illustrated in Figure 3A.

[0027] Figure 4 is a schematic view of the reference electrode being used with an electrochemical sensor cartridge.

20 [0028] Figure 5 is a schematic view of the reference electrode connected to a sensor cartridge via a sample inlet channel, a pH/mV meter and a potentiostat, with optional connection of the potentiostat to a platinum or gold electrode.

[0029] In the drawings, like reference characters generally refer to the same parts throughout the different views. The drawings are not necessarily to scale, emphasis instead generally being placed upon illustrating the principles of the invention.

**Detailed Description of the Invention**

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 7 -

[0030] The present invention provides a reference electrode for use with a miniature electrochemical sensor cartridge for measuring characteristics of fluid samples such as body fluids, including, but not limited to, blood. The reference electrode is useful as a durable reference source for measuring the unbound concentration or activity of blood gases (such as, e.g., oxygen and carbon dioxide), ions (such as, e.g., sodium, chloride, potassium, magnesium, lithium, ammonium and calcium), blood pH and hematocrit. Alternative embodiments of the invention may be adapted to measure factors such as glucose, lactate or other enzymes or blood solutes.

#### Definitions

10 [0031] In order to more clearly and concisely point out and describe the subject matter of the invention, the following definitions are provided for certain terms used in the following description and claims.

[0032] As used herein, the term "electrode" refers to a component of an electrochemical device that makes the interface between an external electrical conductor and the internal ionic medium. The internal ionic medium is typically an aqueous solution with dissolved salts. Electrodes are generally of three types, working or indicator electrodes, reference electrodes, and counter electrodes. A working or indicator electrode measures a specific chemical species, such as an ion. When electrical potentials are measured by a working electrode, the method is termed potentiometry. All ion-selective electrodes operate by potentiometry. When current is measured 20 by a working electrode, the method is termed amperometry. Oxygen measurement, for example, is carried out by amperometry. A counter electrode acts as a sink for current path.

[0033] A "reference electrode" according to the invention refers to the combination of a reference sensor, through which bridge electrolyte solution passes and a connector, through which a sample or calibration fluid flows. The reference sensor generally serves as an electrical reference point in an electrochemical device against which electrical potentials are measured and controlled. 25

[0034] As used herein, the term "sensor" or "electrochemical sensor" is a device that responds to variations in the concentration of a given chemical species in a sample, such as a body fluid sample. For ion-selective measurements, the sensor is normally used with a reference

WO 02/077641

PCT/US02/07669

- 8 -

electrode containing a reference sensor. A reference sensor is a sensor that is used in a reference electrode. In one embodiment, the reference sensor includes silver-silver chloride-potassium chloride. Other types of reference sensors are mercury-mercurous chloride-potassium chloride or silver-silver nitrate.

5 [0035] As used herein, the term "liquid junction" refers to the interface between the bridge electrolyte solution and a sample or calibrating solution.

[0036] As used herein, the term "sample" refers to any fluid or solution which may be tested using the reference electrode, including, for example, an aqueous solution, such as a reference or calibrating solution, or a body fluid, such as blood, plasma, synovial fluid, and  
10 urine.

[0037] As used herein, the term "calibration" refers to the process by which the response characteristics of a sensor to a specific analyte are determined quantitatively. To calibrate a sensor, the sensor is exposed to at least two reagent samples or calibrating solutions, each reagent sample having a different, known concentration of an analyte. The responses (i.e.,  
15 signals) measured by the sensor, relative to the concentrations of the analyte in the two different reagent samples, serve as reference points for measurements of the analyte in samples having unknown concentrations of the analyte.

[0038] The "support substrate" as used herein refers to the substrate of a sensor upon which the various layers (such as, e.g., Ag, AgCl, glaze, gasket etc.) of the sensor are applied,  
20 formed, or deposited.

[0039] The "connector" as used herein refers to the component of the reference electrode including a connector channel which includes a sample inlet channel and a sample outflow channel, the bridge electrolyte port to which the bridge electrolyte channel is joined and the connector housing.

25 [0040] The "tilt angle" of the sample inlet channel refers to the angle between the sample inlet channel and the longitudinal axis of the bridge electrolyte channel. The "tilt angle" of the sample outflow channel refers to the angle between the sample outflow channel and the longitudinal axis of the bridge electrolyte channel.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 9 -

[0041] A "bridge electrolyte well" is the portion of the connector shaped to retain a volume of the bridge electrolyte solution.

Assembly of the Reference Electrode: The Reference Sensor

[0042] In one embodiment according to the invention, the reference electrode 23 illustrated in FIGS. 1A and FIG. 1B includes a reference sensor 1 and a connector 10. Referring to FIG. 1A, the reference sensor 1 is the portion of the reference electrode 23 that is made up of a support substrate 2, an Ag layer 3, AgCl layer 4, a glaze layer 5 and a gasket layer 6. A bridge electrolyte inlet 7 is a conduit that connects to the bridge electrolyte channel 8, through which bridge electrolyte solution may flow. A bridge electrolyte channel 8 is a channel that connects the bridge electrolyte inlet 7 to the bridge electrolyte port 11. To operate the reference electrode 23, a bridge electrolyte solution is pumped through the bridge electrolyte inlet 7, over the Ag/AgCl layers 3, 4, through the bridge electrolyte channel 8, through the bridge electrolyte port 11 and into the bridge electrolyte well 15 where the bridge electrolyte solution contacts, e.g., a calibration solution or sample in the bridge electrolyte well 15, creating a fluid junction or interface 14 between the bridge electrolyte solution and the sample.

[0043] In one embodiment, the support substrate 2 of the reference electrode 23 is made of a polymeric material or a ceramic material or a combination thereof. The polymeric material may be, for example, polyvinyl chloride, polyethylene, polycarbonate, polyacrylate, or polyimide or a combination thereof. The ceramic material may be, for example, aluminum oxide or silicon dioxide or a combination thereof.

[0044] Referring still to FIGS. 1A and 1B, an Ag layer 3 is deposited onto the support substrate 2 by, e.g., screen printing or vapor deposition, according to art known methods. For screen printing, the Ag particles may be combined with ceramic binding material and then screen printed, followed by firing at high temperature (e.g., 700-800 °C), for example. For vapor deposition, Ag metal may be evaporated and condensed onto the support substrate 2 under high vacuum, for example.

[0045] In one embodiment according to the invention, referring still to FIGS. 1A and 1B, the AgCl layer 4 of the reference electrode 23 is formed by electrodeposition of the Ag layer 3 with a chloride electrolyte solution having a concentration of between about 0.01 M and 1.0 M

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 10 -

and a pH of about pH 1 to about pH 7 at a current density of 0.005 to 0.5 mA/mm<sup>2</sup> for 30 seconds to 20 minutes. In a preferred embodiment, electrodeposition is performed with a chloride electrolyte solution having a current density of the chloride electrolyte of about 0.05 mA/mm<sup>2</sup> for 6 minutes.

5     **[0046]**     With continued reference to FIGS. 1A and 1B, the glaze layer 5 of the reference electrode 23 may be composed of alumina and/or silica and is at least about 10 μm thick. The glaze layer 5 is sized and shaped to cover any portion of the Ag layer 3 that is not covered with an AgCl layer 4 and provides insulation of the Ag layer 3 which is not oxidized to form an AgCl layer 4 (e.g., around the edges of the Ag layer 4). Referring still to FIGS. 1A and 1B, the glaze layer 5 also forms the walls of a well 9 around the AgCl layer 4 as high as the thickness of the glaze layer 5. The insulating glaze layer 5 is then covered with the gasket layer 6.

15     **[0047]**     The gasket layer 6 is preferably made of polyurethane, silicone rubber, polyvinylchloride (PVC), viton®, natural or synthetic rubber, and/or any other flexible material that does not react with, or dissolve in, the bridge electrolyte solution. The gasket layer 6 is at least about 50 μm thick. In a preferred embodiment, the gasket layer 6 is between about 50 μm and about 700 μm thick. The gasket layer 6 is shaped to cover the glaze layer 5.

20     **[0048]**     The bridge electrolyte inlet 7 provides a conduit for bridge electrolyte solution which flows through the bridge electrolyte channel 8, passing over the reference sensor 1. In one embodiment, referring to FIGS. 1A and 1B, the bridge electrolyte inlet 7 and bridge electrolyte channel 8 are housed in an acrylic block 17.

#### The Connector

25     **[0049]**     Referring to FIG. 1A, in general, the connector 10 has a connector channel 102 including a sample inlet channel 12 and a sample outflow channel 13 which leads to a waste collection container (not shown), a bridge electrolyte port 11, a bridge electrolyte well 15 and a connector housing 16. The bridge electrolyte channel 8 is connected to the connector 10 via the bridge electrolyte port 11. The sample inlet channel 12 is a conduit for the flow of a fluid sample such as blood or a calibration solution over the bridge electrolyte well 15, to the sample outflow channel 13 and then to a waste container.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 11 -

[0050] In one embodiment of the invention, the connector 10 is formed in the shape of a T as illustrated in FIG. 1A. In this embodiment, the sample inlet channel 12 and the sample outflow channel 13 are essentially perpendicular (i.e., about 90°) to the longitudinal axis of the bridge electrolyte channel 8. In this orientation, the tilt angle (b) of the sample inlet channel 12 relative to bridge electrolyte channel 8, and the tilt angle (a) of the sample outflow channel 13 relative to bridge electrolyte channel 8, is about 90°. The 90° tilt angle (a), (b) shown in Figure 1A is merely illustrative and any angle between about 90° and about 180° is contemplated by the invention. For example, as illustrated in Figure 1C, the tilt angle (a) of the sample outflow channel 13 may be 150° and tilt angle (b) of the sample inlet channel 12 may be 120°.

[0051] Several embodiments of the bridge electrolyte well 15 are shown in Figures 1A, 2A and 3A. Referring to FIG. 1A, in one embodiment the bridge electrolyte well 15 can be substantially flat-bottomed. Referring to FIG. 2A, in another embodiment the bridge electrolyte well 15 can be substantially cone-shaped. Referring to FIG. 3A, in yet other embodiment the bridge electrolyte well 15 is formed at a bend in the connector channel 102 when the tilt angle (a) of the sample inlet channel 12 and/or the tilt angle (b) of the sample outflow channel 13 is greater than about 90° relative to the longitudinal axis of the bridge electrolyte channel 8. Any upward bend of one or both of the sample inlet channel 12 or sample outflow channel 13 which creates a bridge electrolyte well 15 is contemplated. A bridge electrolyte well 15 is created in the connector channel 102 just above the bridge electrolyte port 11 which can hold a volume of bridge electrolyte solution. When a fluid sample or calibrating solution interfaces with the bridge electrolyte solution in the bridge electrolyte well 15, a liquid junction 14 is created between the sample or calibrating solution and the bridge electrolyte solution. In one embodiment, the bridge electrolyte well 15 retains 10 µl to 500 µl of bridge electrolyte solution. In a particular embodiment of the invention, the liquid junction 14 preferably has a surface area in the range of about 0.5 mm<sup>2</sup> to about 10 mm<sup>2</sup>.

[0052] The connector 10 is made of a material that does not react with, or dissolve in, the bridge electrolyte solution used in the reference electrode 23. In one embodiment, the connector 10 is metallic and is made of, for example, stainless steel, aluminum and/or platinum. In another embodiment, the connector 10 is made of a polymeric material, for example, acrylic, plexiglas®, lexan®, polycarbonate, and/or PVC.

WO 02/077641

PCT/US02/07669

- 12 -

Operation of the Reference Electrode

[0053] In another aspect, the invention is a method for using a reference electrode 23 in a sensor system for measuring an analyte in a fluid sample. Referring to Figure 1A, the bridge electrolyte solution is introduced into the bridge electrolyte inlet 7, and passes over and comes into contact with the reference sensor Ag/AgCl layers 3, 4, the fluid is pumped through the bridge electrolyte channel 8, through the bridge electrolyte port 11 into the bridge electrolyte well 15. When a fluid sample is introduced into the sample inlet channel 12, e.g., by positive flow by peristaltic pump, it comes into contact with the bridge electrolyte solution in the bridge electrolyte well 15, forming the liquid junction 14. The contact of sample with the bridge electrolyte solution completes the circuit of the reference electrode 23.

The Sensor Cartridge

[0054] Referring to Figure 4, in a particular embodiment of the invention, the reference electrode 23 is used in conjunction with at least one sensor 22, or a sensor cartridge 21 incorporating a plurality of sensors 22, connected by a cartridge inlet channel 20 adapted to make electrical measurements on a sample introduced to the sensor cartridge 21. Preferred sensor cartridges 21 are set forth in detail in U.S. Patent Nos. 4,734,184 and 6,123,820, which are incorporated by reference herein. The sensor cartridge 21 may contain, for example, electrochemical sensors (i.e., electrodes) 22 for measuring, e.g., pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, and hematocrit, together with the reference electrode 23. Alternatively, the sensor cartridge 21 may contain enzyme sensors 22. Temperature control may be achieved by employing a suitable heating or cooling element e.g., a Peltier-effect device and thermistor to maintain the sensor cartridge 21 at a desired temperature.

Sensor Cartridge – Reference Electrode Assembly

[0055] Referring to Figure 4, the sensor cartridge 21 and the reference electrode 23 and the various channels leading in and out of the sensor cartridge 21 and reference electrode 23 (e.g., bridge electrolyte inlet 7, bridge electrolyte channel 8, sample inlet channel 12, sample outflow channel 13, cartridge inlet channel 20) are assembled into a sensor cartridge-reference electrode assembly 24 ("assembly 24").

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 13 -

[0056] FIG. 5 illustrates an embodiment of the invention in which a reference electrode 23 is connected to a sensor cartridge 21 via a sample inlet channel 12, a pH/mV meter 40 and a potentiostat 44, with optional connection of the potentiostat 44 to a platinum or gold electrode 35, for use in obtaining potentiometric and amperometric measurements. For potentiometric sensors (e.g., pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, etc.), one lead of a pH/mV meter 40, i.e., a first pH/mV meter input lead 36, is connected to each potentiometric sensor 32, and the other lead of a pH/mV meter 40, i.e., a second pH/mV meter input lead 38, is connected to the reference electrode 23. FIG. 5 provides an exemplary illustration of the first pH/mV meter input lead 36 of the pH/mV meter 40 connected to a pH sensor 32 and the second pH/mV meter input lead 38 of the pH/mV meter 40 connected to the reference electrode 23; however, additional pH/mV meter input leads 36, 38 may connect the pH/mV meter 40 with additional potentiometric sensors (e.g., for Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup>) 32 and the reference electrode 23. The pH/mV meter 40 measures the potential difference between the potentiometric sensors 32 and the reference electrode 23. This potential difference is proportional to the concentration of the analyte in the sample or calibrating solution.

[0057] Referring still to FIG. 5, for amperometric sensors (i.e., working electrodes) 34 (e.g., pO<sub>2</sub>, glucose, lactate, urea, pCO<sub>2</sub>, etc.) in a two electrode type cell arrangement, one lead of the so-called potentiostat 44, i.e., the working electrode connection 42, is connected to each amperometric sensor 34, and the other lead of the potentiostat 44, i.e., the reference electrode connection 46, is connected to the reference electrode 23. FIG. 5 provides an exemplary illustration of the working electrode connection 42 of the potentiostat 44 connected to a glucose sensor 34 and the reference electrode connection 46 of the potentiostat 44 connected to the reference electrode 23; however, additional potentiostat leads 42, 46 may connect the potentiostat 44 with additional amperometric sensors 34 and the reference electrode 23. In the case of a three-electrode type amperometric cell arrangement, a third lead of the potentiostat 44, i.e., the counter electrode (CE) connection 48, is connected to a platinum or gold electrode 35 (as illustrated with a hatched line in FIG. 5), which is in direct contact with the sample or calibrating solution. The potentiostat 44 applies a predetermined potential between the sensors 34 and the reference electrode 23. The current, flowing through the sensor 34 and measured by the potentiostat 44 is proportional to the concentration of the analyte in the sample or calibrating solution.



WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 14 -

[0058] The details of sensors such as ion-selective electrodes and their manufacture for a sensor cartridge as well as peristaltic pump systems employed are described in U.S. Patent Nos. 4,214,968, 4,734,184, 6,123,820 and the operation of microelectrodes is described in detail in U.S.S.N. 60/170,136, the contents of all of which are incorporated by reference herein.

5 [0059] A sensor cartridge-reference electrode assembly 24 needs to be calibrated prior to determining the concentration of an analyte in a sample. The sensors 22 of the sensor cartridge 21 may be calibrated with at least one aqueous solution having a known value for the parameters to be measured by the assembly 24. Two calibrating solutions having different known values for a particular analyte allows the system to be calibrated on a 2-point basis.

10 Referring to FIG. 4, for calibration of the assembly 24, a first peristaltic pump causes the first calibrating solution to move (e.g., to be pulled) into the cartridge inlet channel 20 and to pass through the sensor cartridge 21 over one or more sensors 22. A second peristaltic pump causes bridge electrolyte solution to move (e.g., to be pushed) into the bridge electrolyte inlet 7, over the reference sensor Ag/AgCl layers 3, 4 and into the bridge electrolyte channel 8. The bridge electrolyte solution then moves through the bridge electrolyte channel 8 toward the connector

15 10, where it forms a liquid junction 14 with the first calibrating solution. In a particular embodiment of the invention, the liquid junction 14 is formed between about 10  $\mu$ l to about 500  $\mu$ l of bridge electrolyte solution in the bridge electrolyte well 15 and about 10  $\mu$ l to about 300  $\mu$ l of sample or a first calibration solution in the connector channel 102. After the liquid junction

20 14 has formed, the first peristaltic pump and the second peristaltic pump are stopped. After about 20 to about 90 seconds, while the transient signals are stabilized for the sensors 22, a measurement (e.g., a potential value) is obtained. The same procedure may be repeated using a second calibrating solution. In one embodiment, a calibrating solution may be used to provide a baseline reading for the assembly 24. A sample such as a blood sample is then measured using

25 a similar cycle. In one embodiment, after a sample is measured, a rinsing solution (e.g., a calibration solution) may be used to clean the sensor cartridge 21, cartridge inlet channel 20, sample inlet channel 12, sample outflow channel 13, bridge electrolyte well 15 and/or liquid junction 14. After washing, the first calibrating solution is loaded into the sample inlet channel 20 of the sensor cartridge 21, the bridge electrolyte solution is refreshed by pumping fresh

30 bridge electrolyte solution through the bridge electrolyte inlet 7 and bridge electrolyte channel 8 into the bridge electrolyte well 15. The assembly 24 is then ready for the next sample.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 15 -

**[0060]** In one embodiment, during operation of the pump, the cartridge – reference electrode assembly 24 receives a constant pulsating flow of the bridge electrolyte solution via the bridge electrolyte inlet 7 and pulsating flows of either the blood sample or one of the two calibrating solutions via the cartridge inlet channel 20. In an embodiment, during the time when  
5 the sensor cartridge-reference electrode assembly 24 is ready for the next sample or calibration, one of the calibration solutions (preferably the second calibrating solution) is in front of the sensors so that a constant baseline calibration reading can be maintained over time and between samples.

**[0061]** A microprocessor may control the activity of the pump to cause sequences of  
10 fluid samples, calibrating solutions and rinsing solutions (e.g., the second calibration solution) to be passed through the assembly 24 as is well known in the art. When the calibrating solutions are passed through the assembly 24, the sensors 22 forming part of the assembly 24 make measurements of the parameters of the sample and the microprocessor stores these electrical values. Based upon measurements made during the passage of the calibration  
15 solutions through the sensor cartridge 24, and the known values of the measured parameters contained within the calibrating solutions, the microprocessor may create a calibration curve for each of the measured parameters so that when a sample is passed through the assembly 24 the measurements made by the sensors 22 can be used to derive accurate measurements of the parameters of interest. These measurements are stored and displayed by the microprocessor.  
20 The microprocessor is suitably programmed to perform measurement, calculation, storage, and control functions.

#### Blood Samples

**[0062]** Blood samples may be obtained by phlebotomy or are derived on a periodic basis from an extracorporeal blood flow circuit connected to a patient during, for example, open heart  
25 surgery. Blood samples may be introduced into the cartridge inlet channel 20 through other automatic means, or manually (e.g., as by syringe). Blood samples may also be introduced as discrete samples.

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 16 -

Calibrating Solutions

[0063] In an embodiment, the sensor cartridge-reference electrode assembly 24 may be calibrated with two calibrating solutions, e.g., calibrating solution A and calibrating solution B. A preferred composition of calibrating solution A, prepared at 37°C and at atmospheric pressure tonometered with 8% CO<sub>2</sub> - 92% N<sub>2</sub> gas, is as follows:

Compound	Amount /1 Liter
Deionized water	Filled up to 1 liter
MOPS (3-[N-morpholinopropanesulfonic acid) Buffer	16.5g
Sodium MOPS Buffer	8.2g
Sodium Sulfite	5.0g
Potassium Chloride	0.17g
Calcium Chloride	0.068g
Sodium Chloride	2.76g
Sodium Bicarbonate	1.26g
Proclin	1.015g
HCl	0.15g
Brij (from a 25% solution as surfactant)	0.256g

[0064] This composition is effectively a blood facsimile and has the following parameters to be measured by the assembly 24.

pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	O <sub>2</sub> (mmHg)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Ca (mmol/L)
6.908 - 6.932	60.5 - 64.5	0	153.5 - 156.5	1.81 - 2.11	0.18 - 0.22

10

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 17 -

[0065] A preferred composition of calibration solution B, prepared at 37°C and at 700 mmHg absolute pressure tonometered with 21% O<sub>2</sub>-4% CO<sub>2</sub>- 75% N<sub>2</sub> gas, is as follows:

Compound	Amount/ 1 Liter
Deionized water	Filled up to 1 liter
MOPS (3[N-morpholinopropanesulfonic acid] Buffer	6g
Sodium MOPS Buffer	18.75g
Sodium sulfate	3.75g
Magnesium Acetate	1.07g
Potassium Chloride	0.527g
Calcium Chloride	0.535g
Sodium Chloride	0.13g
Sodium bicarbonate	1.932g
Proclin	1.023g
HCl	0.313g
Brij (from a 25% solution as surfactant)	0.256g

5 [0066] This composition is effectively a blood facsimile and has the following parameters to be measured by the assembly 24.

pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	O <sub>2</sub> (mmHg)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Ca (mmol/L)
7.385 – 7.415	33.0 – 37.0	190 – 210	133 – 137	5.87 – 6.27	1.90 – 2.04

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 18 -

[0067] The compositions of the two calibrating solutions are chosen so that for each of the characteristics measured by the system, a pair of values are obtained that are spaced over the range of permissible values that are measured by the assembly 24, providing a balanced 2-point calibration for the assembly 24.

5 [0068] The calibration compositions are prepared by premixing all of the components, with the exception of the calcium dihydrate salt; tonometering the solution with oxygen and CO<sub>2</sub> mixed with nitrogen to produce the desired level of pH for the solution; adding the calcium dihydrate salt; and finally retonometering the solution to adjust for any variation in the gas levels which occurred during addition of the calcium dihydrate salt.

10 [0069] The compositions of calibrating solutions A and B are for illustrative purposes; it is contemplated that any desired calibrating solution may be used with the reference electrode 1.

#### Bridge Electrolyte Solution

[0070] The bridge electrolyte solution employed in the reference electrode 23, for example, as illustrated in FIG. 1A, provides a liquid junction 14 with a sample or a calibration  
15 solution and thereby isolates the reference electrode 23 from the varying electrochemical potentials of the calibrating solution or the blood to establish an environment in the reference electrode 23 that is independent of the ionic activity of the sample or calibrating solution. The bridge electrolyte solution is essentially a chloride solution (e.g., KCl) that is hypertonic relative to the sample or calibrating solutions.

20 [0071] Since the bridge electrolyte solution joins the sample inlet channel 12 downstream from the sensors 22, after the gas/electrolyte measurements have been made, it does not affect those measurements in any way. The bridge electrolyte solution is under pumping force must flow upward against gravity toward the bridge electrolyte well 15. Thus, when the pump stops, the bridge electrolyte solution remains stationary in the bridge electrolyte well 15 of the  
25 connector 10 and tends not to diffuse significantly into the calibrating solution or sample in the sample inlet channel 12, preventing unwanted reverse passage or mixing of the sample or calibrating solution into the reference sensor 1. It is important that the bridge electrolyte solution be refreshed at intervals of between around 0 and about 60 minutes, optimally between about 5

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 19 -

and about 15 minutes, since the samples and the bridge electrolyte solution mix somewhat at the liquid junction 14.

[0072] In a preferred embodiment, the bridge electrolyte solution is a 0.1M KCl solution which is initially saturated with AgCl. The bridge electrolyte solution may contain a surfactant such as polyoxyl hydrogenated castor oil 25 (e.g., Arlatone G<sup>®</sup>) at a concentration of between 0.01% and 1.0 %. Other types of surfactants can also be used, such as, e.g., Brij 35 (70  $\mu$ l/l of solution), to minimize bubble formation. In an embodiment, the bridge electrolyte solution is prepared at room temperature and then saturated with excess AgCl. The solution containing suspended AgCl particles is then packaged in a sealed flexible container with no head space. This technique assures that the solution will remain saturated for AgCl at any storage temperature.

#### Enzyme Sensors

[0073] The above-described calibration and measurements using ion-sensors 22 is also contemplated for enzyme sensors. Such enzyme sensors are useful for the analysis of solutes other than Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>+</sup>, gases other than pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, hematocrit and pH. For example, enzyme sensors are useful for analysis of glucose, or lactate, or other proteins in a body fluid sample such as blood.

20

#### **Equivalents**

[0074] The invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential characteristics thereof. The foregoing embodiments are therefore to be considered in all respects illustrative rather than limiting on the invention described herein. Scope of the invention is thus indicated by the appended claims rather than by the foregoing description, and all changes that come within the meaning and range of equivalency of the claims are intended to be embraced therein.

WO 02/077641

PCT/US02/07649

- 20 -

1 We Claim:

- 1 1. A reference electrode comprising:
  - 2 (a) a reference sensor;
  - 3 (b) a bridge electrolyte channel in fluid communication with said reference sensor; and
  - 4 (c) a connector channel connected to the bridge electrolyte channel via a bridgeelectrolyte port, said connector channel comprising a sample inlet channel and a sample outflow  
6 channel through which a sample may flow, and a bridge electrolyte well for retaining a volume  
7 of a bridge electrolyte solution;
  - 8 wherein said bridge electrolyte well is shaped to provide a liquid junction between the
  - 9 sample and the bridge electrolyte solution.
- 1 2. The reference electrode of claim 1, wherein the liquid junction comprises a surface area  
2 in the range of about 0.5 mm<sup>2</sup> to about 10 mm<sup>2</sup>.
- 1 3. The reference electrode of claim 1, wherein said reference sensor comprises:
  - 2 (a) a support substrate;
  - 3 (b) a silver layer (Ag) deposited on said support substrate;
  - 4 (c) a silver chloride (AgCl) layer deposited on said Ag layer;
  - 5 (d) a glaze layer deposited on at least part of said AgCl layer; and
  - 6 (e) a gasket disposed on said glaze layer.
- 1 4. The reference electrode of claim 3, wherein said support substrate comprises a polymeric  
2 material and/or a ceramic material.
- 1 5. The reference electrode of claim 4, wherein said polymeric material comprises polyvinyl  
2 chloride (PVC), polyethylene, polycarbonate, polyacrylate and/or polyimide.
- 1 6. The reference electrode of claim 4, wherein said ceramic material comprises aluminum  
2 oxide and/or silicon dioxide.
- 1 7. The reference electrode of claim 3, wherein one or more of said layers are screen printed  
2 layers or vapor deposited layers.
- 1 8. The reference electrode of claim 3, wherein said Ag layer is at least about 1 μm to about  
2 15 μm thick.

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 21 -

- 1 9. The reference electrode of claim 3, wherein said Ag layer is at least about 1  $\mu\text{m}$  thick.
- 1 10. The reference electrode of claim 3, wherein said AgCl layer is deposited on said Ag by  
2 electrodeposition on said Ag with a chloride electrolyte solution of between about 0.01 M and  
3 1.0 M at a current density of between about 0.005 and about 0.5  $\text{mA}/\text{mm}^2$  for about 30 seconds  
4 to about 20 minutes.
- 1 11. The reference electrode of claim 10, wherein said chloride electrolyte solution comprises  
2 NaCl, KCl, and/or  $\text{CaCl}_2$ .
- 1 12. The reference electrode of claim 11, wherein said chloride electrolyte solution has a pH  
2 range of about pH 1 to about pH 7, about pH 1 to about pH 5, or about pH 1 to pH 2.
- 1 13. The reference electrode of claim 3, wherein said glaze layer comprises alumina and/or  
2 silica.
- 1 14. The reference electrode of claim 13, wherein said glaze layer is at least about 10  $\mu\text{m}$   
2 thick.
- 1 15. The reference electrode of claim 14, wherein said glaze layer has a thickness of between  
2 about 10  $\mu\text{m}$  and about 500  $\mu\text{m}$ .
- 1 16. The reference electrode of claim 3, wherein said gasket layer comprises polyurethane,  
2 silicone rubber, PVC, viton®, natural rubber and/or synthetic rubber.
- 1 17. The reference electrode of claim 15, wherein said gasket is at least about 50  $\mu\text{m}$  thick.
- 1 18. The reference electrode of claim 1, wherein said connector channel comprises a  
2 polymeric or metallic material that does not react with, or dissolve in, said bridge electrolyte  
3 solution.
- 1 19. The reference electrode of claim 18, wherein said polymeric material is a molded or  
2 machinable plastic.
- 1 20. The reference electrode of claim 19, wherein said polymeric material comprises acrylic,  
2 plexiglas®, lexan®, polycarbonate, and/or PVC.



WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 22 -

- 1 21. The reference electrode of claim 18, wherein said metallic material comprises stainless  
2 steel, aluminum and/or platinum.
- 1 22. The reference electrode of claim 1, wherein said bridge electrolyte well is a round bottom  
2 well.
- 1 23. The reference electrode of claim 1, wherein said bridge electrolyte well is a flat bottom  
2 well.
- 1 24. The reference electrode of claim 1, wherein said bridge electrolyte well is a cone-shaped  
2 well.
- 1 25. The reference electrode of claim 1, wherein at least one of said sample outflow channel  
2 and said sample inlet channel each form a tilt angle of about 90° to about 180° relative to the  
3 longitudinal axis of the bridge electrolyte channel.
- 1 26. The reference electrode of claim 1, wherein said connector channel is located at a  
2 distance range from the reference sensor of between about 2 mm to about 10 mm, between about  
3 2 mm to about 15 mm, or between about 2 mm to about 30 mm.
- 1 27. The reference electrode of claim 1, wherein said sample inlet channel is about 1 mm in  
2 diameter.
- 1 28. The reference electrode of claim 1, wherein said bridge electrolyte channel is about 0.5  
2 mm in diameter.
- 1 29. The reference electrode of claim 27, wherein said bridge electrolyte channel is about 0.5  
2 mm in diameter.
- 1 30. The reference electrode of claim 1, wherein said sample outflow channel is about 2 mm  
2 in diameter.
- 1 31. The reference electrode of claim 27, wherein said sample outflow channel is about 2 mm  
2 in diameter.

WO 02/077641

PCT/US02/07069

- 23 -

- 1 32. The reference electrode of claim 28, wherein said sample outflow channel is about 2 mm  
2 in diameter.
- 1 33. The reference electrode of claim 1, wherein said sample outflow channel and said sample  
2 inlet channel comprise a flexible tube that is about 1 mm to about 20 mm in diameter.
- 1 34. The reference electrode of claim 1, wherein said bridge electrolyte solution comprises  
2 KCl saturated with AgCl, with a chloride ion solution of about 0.1 M to about 0.5 M at the  
3 temperature said solution is stored and used.
- 1 35. A method for using a liquid junction reference electrode, comprising the steps of:  
2 (a) providing a reference electrode comprising a reference sensor; a bridge electrolyte  
3 channel in fluid communication with said reference sensor; and a connector  
4 channel connected to the bridge electrolyte channel via a bridge electrolyte port,  
5 said connector channel comprising a sample inlet channel and a sample outflow  
6 channel through which a sample may flow, and a bridge electrolyte well for  
7 retaining a volume of a bridge electrolyte solution; wherein said bridge electrolyte  
8 well is shaped to provide a liquid junction between the sample and the bridge  
9 electrolyte solution.  
10 (b) providing a calibrating solution or a sample to said sample inlet channel;  
11 (c) providing a bridge electrolyte solution to said bridge electrolyte inlet;  
12 (d) providing a force to said sample so that it flows toward said bridge electrolyte  
13 port;  
14 (e) providing a force to said bridge electrolyte solution so that it flows toward said  
15 bridge electrolyte port;  
16 (f) forming a liquid junction between said sample and said bridge electrolyte solution  
17 at said bridge electrolyte well with a surface area in the range of about 1 mm<sup>2</sup> to  
18 about 10 mm<sup>2</sup>; and  
19 (g) taking a measurement.

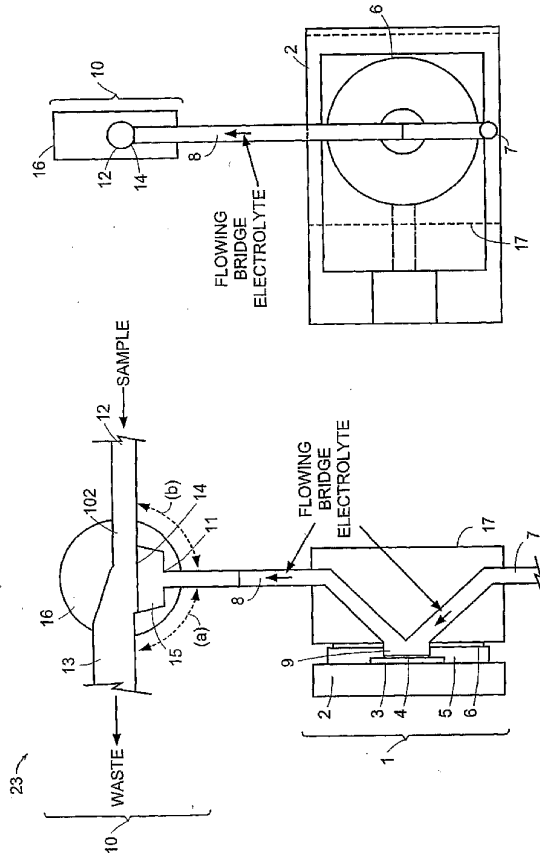


FIG. 1B

FIG. 1A

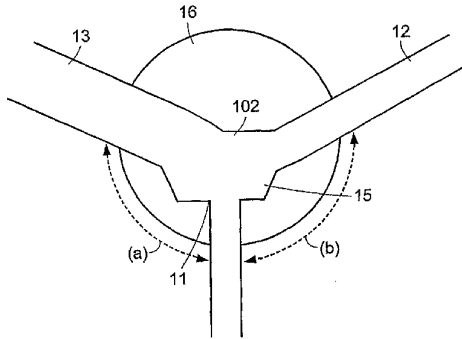


FIG. 1C

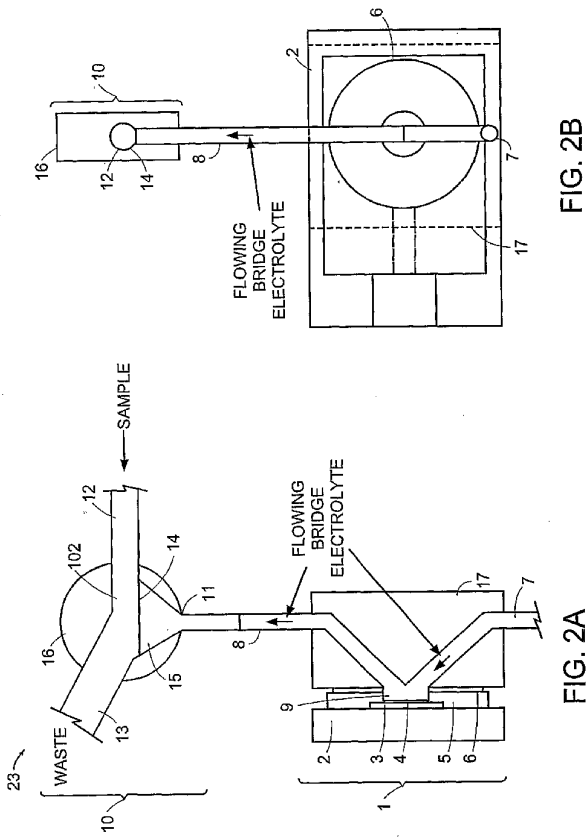


FIG. 2B

FIG. 2A

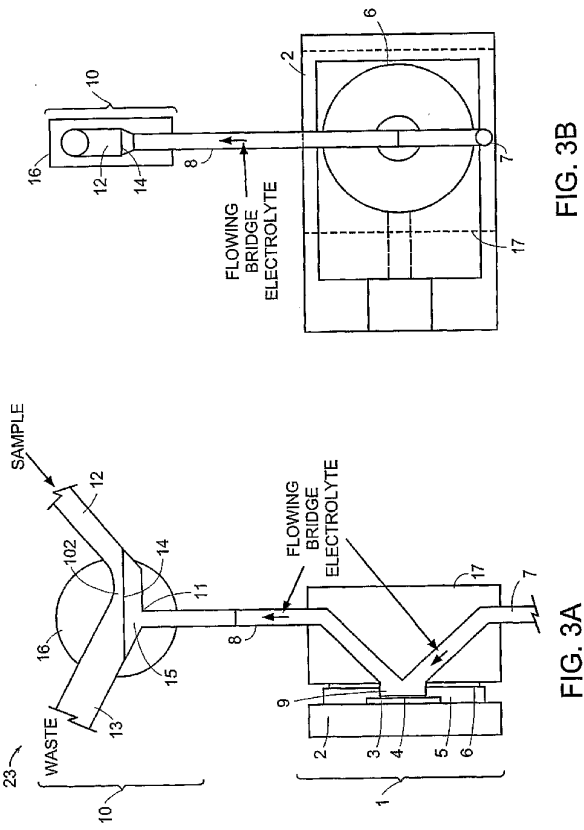


FIG. 3B

FIG. 3A

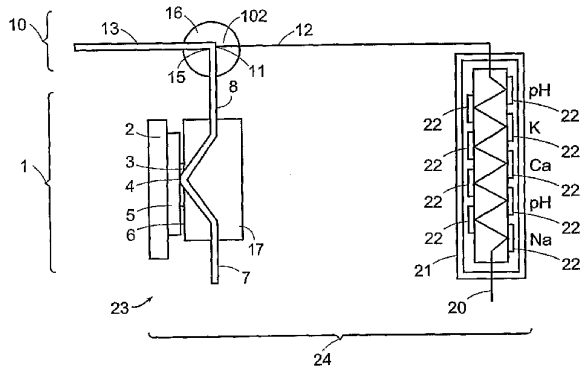


FIG. 4

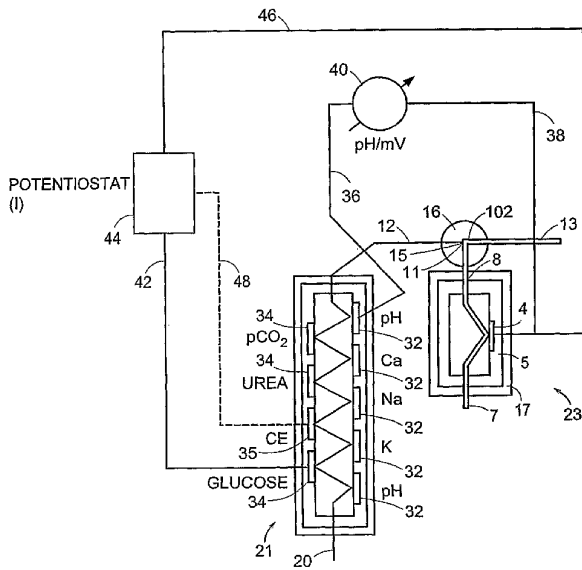


FIG. 5



## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/077641 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 27/401
- (21) International Application Number: PCT/US02/07069
- (22) International Filing Date: 7 March 2002 (07.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
50/274,097 7 March 2001 (07.03.2001) US
- (71) Applicant: INSTRUMENTATION LABORATORY  
COMPANY [US/US]; 101 Harwell Avenue, Lexington,  
MA 02142 (US).
- (72) Inventors: ERDOSY, Miklos; B6 Scotty Hollow Drive,  
North Chelmsford, MA 01863 (US). COSOFRET, Vasile,  
V.; 5 Green Needle Way, Acton, MA 01720 (US).
- (74) Agent: STEEL, Diana, M.; Testa, Harwitz & Thibault,  
LLP, High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA  
02110 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NI, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:  
1 May 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/077641 A3

(54) Title: REFERENCE ELECTRODE

(57) Abstract: The invention relates to a durable and reliable miniature liquid junction reference electrode for use with at least one electrode (e.g., an electrochemical sensor cartridge) for measuring certain characteristics of a fluid sample such as blood or other body fluid.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/07069
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N27/401		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 388 017 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 19 September 1990 (1990-09-19) column 3, line 20 - line 53; figure 2	1-3, 35
Y	SUZUKI H ET AL: "MICROFABRICATED LIQUID JUNCTION AG/AGCL REFERENCE ELECTRODE AND ITS APPLICATION TO A ONE-CHIP POTENTIOMETRIC SENSOR" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 71, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 5069-5075, XP000926900 ISSN: 0003-2700 figure 1	1-3, 35
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2003	Date of mailing of the international search report 04/02/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Duchate'llier, M	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- national Application No PC1/US 02/07069
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 772 041 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 7 May 1997 (1997-05-07) column 7, line 19 -column 8, line 32; figures 1,2	1
A	EP 0 094 677 A (RADIOMETER AS) 23 November 1983 (1983-11-23) page 8, line 28 -page 9, line 26; figure 6	1

Form PCTISA(210) (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Into	int'l Application No
				PC.1/US	02/07069
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP 0388017 A	19-09-1990	US 5130010 A	14-07-1992		
		DE 69015231 D1	02-02-1995		
		DE 69015231 T2	04-05-1995		
		EP 0388017 A2	19-09-1990		
		ES 2068332 T3	16-04-1995		
		US 5294311 A	15-03-1994		
EP 0772041 A	07-05-1997	AU 6084496 A	08-05-1997		
		CA 2184954 A1	04-05-1997		
		EP 0772041 A1	07-05-1997		
		JP 9170998 A	30-06-1997		
		PL 316056 A1	12-05-1997		
EP 0094677 A	23-11-1983	DK 220682 A	18-11-1983		
		AT 29591 T	15-09-1987		
		DE 3373540 D1	15-10-1987		
		EP 0094677 A1	23-11-1983		
		US 4544455 A	01-10-1985		

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アードシー, ミクロス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01863, ノース ケルムスフォード, スコッティ  
ー  
ホロウ ドライブ ビー6

(72)発明者 コソフレット, ヴァシル ブイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, グリーン ニードル ウェイ  
5