



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006144447/28, 16.05.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.05.2005(30) Конвенционный приоритет:
14.05.2004 US 60/571,388

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2008

(45) Опубликовано: 20.04.2010 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 5873990 A, 23.02.1999. SU 1778665 A1,
30.11.1992. US 4340458 A, 20.07.1982.
EP 1143240 A1, 10.10.2001. EP 1010005 A1,
21.06.2000. RU 2038597 C1, 27.06.1995. RU
2041462 C1, 09.08.1995.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 14.12.2006(86) Заявка РСТ:
US 2005/017009 (16.05.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/114164 (01.12.2005)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. С.А.Дорофееву,
рег.№ 146(72) Автор(ы):
У Хуань-Пин (US)(73) Патентообладатель(и):
БАЙЕР ХЕЛТКЭР ЭлЭлСи (US)(54) ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ
АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Способ определения концентрации анализируемого вещества в образце включает приложение ациклического сканирования к образцу, ациклическое сканирование включает в себя прямое и обратное линейное сканирование, причем ациклическое сканирование включает в себя большее количество одного из прямого или обратного пиков тока, чем другого пика тока, или

начинается и заканчивается по существу при одинаковом напряжении, когда сканирование начинается, самое большее, за ± 20 мВ от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары или по существу исключают окислительные и восстановительные пики окислительно-восстановительной пары; измерение тока как функции изменения напряжения; и определение концентрации анализируемого вещества в

образце по току. Также предложено измерительное устройство для определения концентрации анализируемого вещества в образце. Компенсация гематокрита в сочетании с обработкой данных может уменьшить

влияние гематокрита по отношению к анализу глюкозы в цельной крови. В другом аспекте быстрые скорости сканирования могут понизить влияние гематокрита. 2 н. и 56 з.п. ф-лы, 1 табл., 17 ил.

RU 2 3 8 6 9 6 0 C 2

RU 2 3 8 6 9 6 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2006144447/28, 16.05.2005**

(24) Effective date for property rights:
16.05.2005

(30) Priority:
14.05.2004 US 60/571,388

(43) Application published: **20.06.2008**

(45) Date of publication: **20.04.2010 Bull. 11**

(85) Commencement of national phase: **14.12.2006**

(86) PCT application:
US 2005/017009 (16.05.2005)

(87) PCT publication:
WO 2005/114164 (01.12.2005)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. S.A.Dorofeevu, reg.№ 146**

(72) Inventor(s):
U Khuan'-Pin (US)

(73) Proprietor(s):
BAJER KhELTKeHr EhIEhLSi (US)

(54) VOLTAMMETRIC SYSTEM FOR ANALYSING BIOLOGICAL SUBSTANCES

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method of determining concentration of analysed substance in a sample involves acyclic scanning of the sample, where acyclic scanning involves forward and reverse linear scanning. Acyclic scanning involves a number of one of forward or reverse current peaks greater than the number of the other current peaks, or begins and ends at essentially the same voltage. When scanning begins, the greatest value is ± 20 mV of the formal potential E^0 of the redox pair or oxidation and reduction peaks of the redox pair are essentially

excluded; current is measured as a function of voltage variation; and concentration of the analysed substance in the sample is determined from current. A measuring device for determining concentration of analysed substance in a sample is also proposed. Haematocrit compensation combined with data processing can reduce the haematocrit effect on analysis of glucose in whole blood. In another aspect, higher scanning speeds can reduce haematocrit effect.

EFFECT: improved method.

58 cl, 12 ex, 1 tbl, 17 dwg

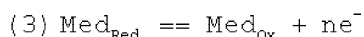
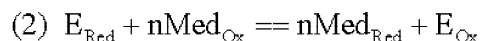
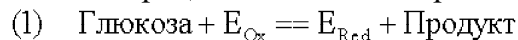
Уровень техники

Количественное определение анализируемых веществ в биологических текучих средах является полезным при диагностике и лечении физиологических аномалий. Например, определение уровня глюкозы в биологических текучих средах, таких как кровь, является важным для индивидуумов, страдающих диабетом, которые должны часто проверять свой уровень глюкозы в крови для подбора своей диеты и/или лекарственных средств.

Для таких целей используются электрохимические способы. Электрохимический биосенсор может использовать фермент, специфичный к анализируемому веществу, такой как глюкоза оксидаза или глюкоза дегидрогеназа, для катализа окисления глюкозы в образце цельной крови. Во время каталитического окисления под действием фермента окислительно-восстановительный центр фермента принимает электроны от анализируемого вещества.

Этот окислительно-восстановительный центр может представлять собой флавино-адениновый динуклеотид (FAD) глюкозы оксидазы или кофактор фермента, такой как пирролохинолин хинон (PQQ), для глюкозы дегидрогеназы. Электроны, приобретенные ферментом, могут затем перемещаться к электроду с помощью медиатора, который преобразуется в восстановленную форму во время окисления фермента. Наконец, восстановленная форма медиатора, такая как частицы ферроцианида окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид, окисляется на электроде, с генерированием измеряемого тока.

Этот процесс может быть представлен следующими уравнениями:



где E_{Ox} и E_{Red} представляют собой окисленную и восстановленную форму окислительно-восстановительного центра фермента, соответственно, в то время как Med_{Ox} и Med_{Red} представляют собой окисленную и восстановленную формы медиатора, соответственно. Продукт ферментативной реакции может представлять собой глюконовую кислоту или глюконолактон.

Один из электрохимических способов, который используется для количественного определения анализируемых веществ в биологических текучих средах, представляет собой кулонометрию. Например, Heller et al. описывают кулонометрический способ для измерений глюкозы в цельной крови в патенте США №6120676. При кулонометрии концентрация анализируемого вещества (глюкозы) количественно определяется посредством избыточного окисления анализируемого вещества в малом объеме и интегрирования тока по времени окисления с получением электрического заряда, представляющего концентрацию анализируемого вещества. Другими словами, кулонометрия улавливает общее количество глюкозы в тест-полоске.

Важный аспект кулонометрии заключается в том, что ближе к концу кривой интегрирования, для заряда как функции времени, скорость, с которой изменяется заряд, становится относительно постоянной с осуществлением стационарных условий. Эта стационарная часть кулонометрической кривой образует относительно плоскую область плато на кривой, таким образом, давая возможность для точного определения соответствующего тока. Однако кулонометрический способ требует полного преобразования всего объема анализируемого вещества. В результате этот способ отнимает много времени и не обеспечивает быстрых результатов, которых требуют пользователи электрохимических устройств, таких как продукты для

отслеживания глюкозы. Другая проблема при кулонометрии заключается в том, что для обеспечения точных результатов должен контролироваться малый объем ячейки сенсора, что может быть сложным для устройства, производимого массово.

Другой электрохимический способ, который используется для количественного определения анализируемых веществ в биологических текучих средах, представляет собой амперометрию. При амперометрии ток измеряется в конце периода при постоянном потенциале (напряжении) между рабочим электродом и электродом сравнения тест-полоски. Ток используют для количественного определения анализируемого вещества в биологическом образце. Амперометрия измеряет скорость, при которой электрохимически окисляются или восстанавливаются активные частицы и, таким образом, анализируемое вещество. Множество вариаций амперометрического способа для биосенсоров описывается, например, в патентах США №№5620579; 5653863; 6153069 и 6413411. Амперометрический способ измеряет концентрацию анализируемого вещества в образце вблизи поверхности электрода посредством измерения тока, который является пропорциональным скорости диффузии и объемной концентрации анализируемого вещества.

Недостаток амперометрического способа представляет собой нестационарную природу тока после приложения потенциала. Скорость изменения тока по отношению ко времени сначала является очень высокой и становится ниже по ходу анализа благодаря изменению природы базового процесса диффузии. До тех пор, пока скорость потребления восстановленного медиатора на поверхности электрода не сравняется со скоростью диффузии, стационарный ток не может быть получен. Таким образом, измерение тока в течение нестационарного периода времени может быть связано с большей неточностью, чем измерение, проводимое в стационарный период времени.

Один из важных аспектов измерения анализируемых веществ в образцах цельной крови представляет собой влияние гематокрита. Гематокрит представляет собой объем эритроцитов (RBC), выраженный как процент объема RBC в образце цельной крови. Значение гематокрита для образцов цельной крови находится в пределах примерно от 20 до 60% и, как правило, составляет примерно 40%.

Реагентные биосенсоры включают в себя любую систему, которая может детектировать глюкозу в образце крови посредством электрохимической реакции. Примеры реагентных биосенсоров включают в себя биосенсоры Ascensia AUTODISC® и Elite®, доступные от Bayer HealthCare, LLC of Elkhart, Indiana; биосенсоры Precision®, доступные от Abbott in Abbott Park, Illinois; биосенсоры Accucheck®, доступные от Roche in Indianapolis, Indiana; и биосенсоры OneTouch Ultra®, доступные от Lifescan in Milpitas, California.

Типичные электрохимические тест-полоски содержат рабочий электрод, противоэлектрод (электрод сравнения) и необязательный третий электрод. Потенциал сравнения может обеспечиваться в системе посредством противоэлектрода, если он конфигурируется соответствующим образом, или посредством необязательного третьего электрода. Слои реагента с ферментом, такой как глюкоза оксидаза или глюкоза дегидрогеназа, и медиатором, таким как феррицианид или рутений гексаамин, отпечатывается или осаждается на рабочий электрод или на рабочий электрод и противоэлектрод с полимером в качестве связующего вещества.

Примеры полимеров, используемых в качестве связующего вещества для реагентов, включают в себя СМС (карбоксил-метилцеллюлозу) и РЕО (полиэтиленоксид). Добавление различных типов и молекулярных масс полимеров в слой реагентов

может способствовать фильтрованию эритроцитов, предотвращая покрытие ими поверхности электрода.

Предпочтительно тест-полоска изготавливается посредством печати электродов на изолирующей подложке с использованием множества технологий, таких как те, которые описаны в патентах США №№6531040; 5798031 и 5120420. Реагент может отпечатываться на рабочем электроде и противоэлектроде вместе со смесью фермента, окисляющего глюкозу, такого как глюкоза оксидаза, медиатора, такого как феррицианид, гидрофильного полимера, такого как полиэтиленоксид (ПЕО), и соответствующего буфера, такого как цитратный буфер.

Альтернативно, другой химический состав реагентов может либо отпечатываться, либо наноситься с помощью микроосаждения, отдельно, на рабочий электрод и на противоэлектрод с использованием способа, описанного во временной заявке на патент США, зарегистрированной 24 октября 2003 года, серийный №60/513817, с реагентом на рабочем электроде, содержащим фермент, медиатор, полимер, и с реагентом на противоэлектроде, содержащим растворимые окислительно-восстановительные частицы, которые могут быть такими же, как медиатор, или другими, и полимером. В одном из вариантов осуществления полимер, используемый при микроосаждении, представляет собой карбоксил-метилцеллюлозу.

Примеры соответствующих настольных электрохимических инструментов, которые могут использоваться для считывания реагентных биосенсоров по настоящему изобретению, включают в себя, но не ограничиваясь этим, BAS 100B Analyzer, доступный от BAS Instruments in West Lafayette, Indiana; CH Instrument Analyzer, доступный от CH Instruments in Austin, Texas; Cypress Electrochemical Workstation, доступный от Systems in Lawrence, Kansas; и EG&G Electrochemical Instrument, доступный от Princeton Research Instruments in Princeton, New Jersey. Примеры переносных инструментов включают в себя измерители Ascensia Breeze® и Elite® от Bayer Corporation.

Биосенсор для глюкозы может иметь фермент и медиатор, осажденные на электродах. Способность этого сенсора к измерению глюкозы изменяется, когда RBC блокируют диффузию соответствующих реагентов в образце крови. Поскольку амперометрический ток является прямопропорциональным диффузии восстановленной формы медиатора, гематокрит будет иметь значительное воздействие на точность измерений глюкозы. В зависимости от уровня гематокрита в образце цельной крови, RBC вызывают смещение экспериментальных данных по глюкозе.

Различные способы и методики предлагаются в попытке уменьшить влияние гематокрита цельной крови на результаты измерений глюкозы. Например, Ohara et al. в патенте США №6475372 описывают способ использования отношения токов от прямого и обратного импульса потенциала для компенсации влияния гематокрита при электрохимических измерениях глюкозы. McAleer et al. в патентах США №№5708247 и 5951836 описывают препарат реагента, использующий частицы окиси кремния для отфильтровывания RBC с поверхности электрода, таким образом, уменьшая влияние гематокрита. Carter et al. в патенте США №5628890 описывают способ использования большого расстояния между электродами в сочетании со слоями сетки для отделения образца крови от влияния гематокрита.

Эти обычные методики для уменьшения смещения, приписываемого влиянию гематокрита, включают в себя (а) совместное осаждение полимера для сведения к минимуму влияния гематокрита, (b) добавление различных видов коллоидной окиси

кремния для усиления фильтрующего влияния слоя полимера, (с) компенсационные коэффициенты на основе отношения токов от прямого и обратного импульса потенциала и (d) автокомпенсацию посредством использования имеющегося сопротивления раствора образцов цельной крови. Хотя эти способы могут быть полезными, обычные сенсоры на глюкозу продолжают демонстрировать значительное аналитическое смещение, приписываемое влиянию гематокрита. Таким образом, было бы желательным создание систем для количественного определения анализируемых веществ в биологических текучих средах, в частности содержания глюкозы в цельной крови, которые уменьшают смещение от влияния гематокрита.

Сущность изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает способ определения концентрации анализируемого вещества в образце, который включает в себя приложение ациклического сканирования к образцу и определение концентрации анализируемого вещества в образце.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает ручное измерительное устройство анализируемых веществ для определения концентрации анализируемого вещества в образце. Измерительное устройство анализируемых веществ содержит измерительное устройство с ациклическим сканированием, адаптированное для приема тест-полоски. Измерительное устройство с ациклическим сканированием содержит, по меньшей мере, два контакта устройства в электрическом соединении с дисплеем через электрическую схему. Тест-полоска содержит, по меньшей мере, первый и второй контакты тест-полоски в электрическом соединении с рабочим электродом и противoeлектродом через проводники, где первый слой реагента находится, по меньшей мере, на одном из электродов, и первый слой содержит оксидоредуктазу и, по меньшей мере, один вид частиц из окислительно-восстановительной пары. Предусматриваются измерительные устройства как с ациклическим, так и с линейным сканированием.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ определения концентрации анализируемых веществ в образце, который включает в себя приложение вольтамперометрического прямого линейного сканирования к образцу, измерение полученных токов, применение к измеренным токам обработки данных и определение концентрации анализируемого вещества в образце.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает ручное измерительное устройство для определения концентрации анализируемого вещества в образце, где устройство адаптируется для приема тест-полоски. Устройство содержит контакты, - по меньшей мере, один дисплей и электронную схему, устанавливающую электрическое сообщение между контактами и дисплеем. Электронная схема содержит электрическое зарядное устройство и процессор в электрическом соединении, процессор в электрическом соединении со средой для хранения данных, считываемой компьютером, содержащей считываемый компьютером программный код. Считываемый компьютером программный код, когда исполняется процессором, заставляет процессор осуществлять обработку данных с помощью половинного интеграла, дифференциальную обработку данных, и/или обработку данных с помощью половинной производной, и/или вольтамперометрическое сканирование.

Для обеспечения четкого и согласованного понимания описания и формулы изобретения ниже приводятся следующие определения.

Термин "медиатор" определяется как вещество, которое может окисляться или восстанавливаться и которое может переносить один или более электронов. Медиатор

представляет собой реагент при электрохимическом анализе и не является анализируемым веществом, представляющим интерес, но обеспечивает опосредованное измерение анализируемого вещества. В упрощенной системе медиатор подвергается окислительно-восстановительной реакции в ответ на окисление или восстановление анализируемого вещества. Затем окисленный или восстановленный медиатор подвергается обратной реакции окисления-восстановления на рабочем электроде и регенерируется до его исходного окислительного числа.

Термин "окислительно-восстановительная реакция" определяется как химическая реакция между двумя частицами, включающая в себя перенос, по меньшей мере, одного электрона от частиц первого вида к частицам второго вида. Таким образом, окислительно-восстановительная реакция включает в себя окисление и восстановление. Окислительный полуэлемент реакции включает в себя потерю, по меньшей мере, одного электрона частицами первого вида, в то время как восстановительный полуэлемент включает в себя добавление, по меньшей мере, одного электрона к частицам второго вида. Ионный заряд частиц, которые окисляются, делается более положительным на величину, равную количеству перенесенных электронов. Подобным же образом, ионный заряд частиц, которые восстанавливаются, делается менее положительным на величину, равную количеству перенесенных электронов.

Термин "окислительно-восстановительная пара" определяется как две объединенные частицы химического вещества, имеющие различные окислительные числа. Восстановление частиц, имеющих более высокое окислительное число, производит частицы, имеющие более низкое окислительное число. Альтернативно, окисление частиц, имеющих более низкое окислительное число, дает частицы, имеющие более высокое окислительное число.

Термин "окислительное число" определяется как формальный ионный заряд химических частиц, таких как атом. Более высокое окислительное число, такое как (III), является более положительным, а более низкое окислительное число, такое как (II), является менее положительным.

Термин "обратимая окислительно-восстановительная пара" определяется как пара окислительно-восстановительных частиц, где различие между прямым и обратным сканированием половинного интеграла составляет, самое большее, 30 мВ, на половинной высоте перехода si_{ss} . Например, на фиг.3В показаны прямое и обратное сканирования с вычислением половинного интеграла для окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид, в дополнение к высоте перехода si_{ss} . На линии, где линия перехода si_{ss} на половинной высоте пересекает линии прямого и обратного сканирования, различие между линиями равно 29 мВ, устанавливая обратимость окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид при показанной скорости сканирования.

Термин "квазиобратимая окислительно-восстановительная пара" определяется как окислительно-восстановительная пара, где для окислительно-восстановительной пары различие между прямым и обратным сканированием с вычислением половинного интеграла является большим чем 30 мВ, на половинной высоте перехода si_{ss} .

Термин "стационарный" определяется как ситуация, когда изменение электрохимического тока по отношению к напряжению является относительно постоянным, например, в пределах ± 10 или $\pm 5\%$.

Термин "точка поворота" определяется как точка при циклическом или ациклическом сканировании, когда прекращается прямое сканирование и начинается

обратное сканирование.

Термин "линейное сканирование" определяется как сканирование, где напряжение изменяется только в одном "прямом" направлении, при фиксированной скорости сканирования, например, от -0,5 В до +0,5 В, с получением диапазона сканирования 1,0 В. Линейное сканирование может аппроксимироваться рядом ступенчатых изменений потенциала. Если эти ступенчатые изменения происходят близко друг к другу по времени, они соответствуют непрерывному линейному сканированию. Таким образом, приложение изменения потенциала, аппроксимирующего линейное изменение, может рассматриваться как линейное сканирование.

Термин "циклическое сканирование" определяется как сочетание линейного прямого сканирования и линейного обратного сканирования, где диапазон сканирования включает в себя пики окисления и восстановления окислительно-восстановительной пары. Например, изменение потенциала циклическим образом от -0,5 В до +0,5 В и назад до -0,5 В представляет собой пример ациклического сканирования для окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид, как используется в сенсоре на глюкозу, где в диапазоне сканирования содержатся пики как окисления, так и восстановления.

Термин "ациклическое сканирование" определяется в одном из аспектов как сканирование, содержащее большее количество одного из прямого или обратного пиков тока, чем другого пика тока. Например, сканирование, содержащее прямое и обратное линейные сканирования, где прямое сканирование начинается при напряжении, ином, чем то, при котором останавливается обратное сканирование, например сканирование от -0,5 В до +0,5 В и назад до +0,25 В, представляет собой пример ациклического сканирования. В другом примере ациклическое сканирование может начинаться и заканчиваться по существу при одинаковом напряжении, когда сканирование начинается, самое большее, за ± 20 , ± 10 или ± 5 мВ от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары. В другом аспекте ациклическое сканирование определяется как сканирование, включающее в себя прямое и обратное линейные сканирования, которые по существу исключают окислительные и восстановительные пики окислительно-восстановительной пары. Например, сканирование может начинаться, обращаться и заканчиваться в пределах стационарной области окислительно-восстановительной пары, таким образом, исключая окислительные и восстановительные пики пары.

Термины "быстрое сканирование" и "высокая скорость сканирования" определяются как сканирование, когда напряжение изменяется со скоростью, по меньшей мере, 176 мВ/с. Предпочтительно высокие скорости сканирования представляют собой скорости, более высокие чем 200, 500, 1000 или 2000 мВ/с.

Термины "медленное сканирование" и "низкая скорость сканирования" определяются как сканирование, где напряжение изменяется со скоростью, самое большее, 175 мВ/с. Предпочтительные низкие скорости сканирования представляют собой скорости, меньшие чем 150, 100, 50 или 10 мВ/с.

Термин "ручное устройство" определяется как устройство, которое может удерживаться в руке человека и является переносным. Пример ручного устройства представляет собой измерительное устройство, соответствующее Ascensia® Elite Blood Glucose Monitoring System, доступному от Bayer HealthCare, LLC, Elkhart, IN.

Термин "на" определяется как "выше" и относится к описываемой ориентации. Например, если первый элемент осаждается поверх, по меньшей мере, части второго элемента, о первом элементе говорится, что он "осаждается на" втором. В другом

примере, если первый элемент присутствует выше, по меньшей мере, части второго элемента, о первом элементе говорится, что он находится "на" втором. Использование термина "на" не исключает присутствия веществ между верхним и нижним элементами, которые описываются. Например, первый элемент может иметь покрытие на своей верхней поверхности, и еще второй элемент, по меньшей мере, поверх части первого элемента, и его верхнее покрытие может описываться как "на" первом элементе. Таким образом, использование термина "на" может означать или не означать, что два соотносимые элемента находятся в физическом контакте друг с другом.

Краткое описание чертежей

Фигуры 1А-1В изображают вид сбоку и с торца рабочего электрода и противоэлектрода типичной тест-полоски.

Фигуры 2А-2В представляют собой виды снаружи тест-полоски на фигурах 1А-1В.

Фиг.2С представляет собой схематическое представление устройства для измерения.

Фиг.3А представляет собой график, показывающий циклическую вольтамперограмму от сенсорной системы.

Фиг.3В представляет собой график половинного интеграла, соответствующего циклической вольтамперограмме на фиг.3А.

Фиг.3С показывает ациклическое сканирование, где обратное сканирование завершается перед началом пика обратного тока.

Фиг.3D представляет собой половинный интеграл ациклических данных.

Фиг.3Е сравнивает циклическое сканирование с ациклическим сканированием, где прямое сканирование ациклического сканирования начинается вблизи формального потенциала E^0 для окислительно-восстановительной пары.

Фиг.3F сравнивает половинные интегралы токов фиг.3Е.

Фиг.3G показывает циклическое сканирование вместе с ациклическим сканированием, наложенным в стационарной области.

Фиг.3Н сравнивает значения половинного интеграла тока и измеренного тока для ациклического сканирования фиг.3G.

Фиг.4А изображает циклическую вольтамперограмму, половинный интеграл и половинную производную 16 мМ ферроцианида в образце цельной крови с 20% гематокритом.

Фиг.4В представляет собой увеличение обработки данных с вычислением половинной производной для кривой на фиг.4А.

Фиг.4С-4Е изображают кривые обработки данных с вычислением половинной производной от прямых частей линейного сканирования циклических вольтамперограмм на фигурах 7А, 7В и 7С, ниже.

Фиг.4F изображает половинные производные токов на фигурах 4С-4Е.

Фиг.4G изображает сравнение вычисленных уровней глюкозы от непреобразованного прямого сканирования вольтамперограммы (LS), половинного интеграла данных вольтамперограммы (si) и половинной производной данных вольтамперограммы (sd).

Фиг.5 представляет собой набор циклических вольтамперограмм, показывающих влияние изменения концентраций глюкозы в водных растворах.

Фиг.6 показывает половинные интегралы токов вольтамперограмм на фиг.5.

Фиг.7А-7С представляют собой циклические вольтамперограммы, иллюстрирующие влияние изменений процента гематокрита и концентрации глюкозы в цельной крови.

Фиг.7D-7F представляют собой ациклические вольтамперограммы, иллюстрирующие влияние изменений процента гематокрита и концентрации глюкозы в цельной крови.

Фиг.8A-8C показывают половинные интегралы токов на фигурах 7A-7C.

Фиг.8D-8F показывают половинные интегралы токов на фигурах 7D-7F.

Фиг.9A-9C представляют собой циклические вольтамперограммы, иллюстрирующие влияние изменения скорости сканирования на влияние гематокрита.

Фиг.10A-10C показывают половинные интегралы токов, соответствующие циклическим сканированиям на фигурах 9A-9C.

Фиг.11A-11C показывают корреляцию между линиями половинного интеграла тока фигур 10A-10C на основе экспериментальных результатов фигур 9A-9C и эталонную концентрацию глюкозы в каждом образце.

Фиг.12 показывает пик половинного интеграла тока и стационарное значение половинного интеграла тока, которые могут использоваться для определения индекса гематокрита.

Фиг.13A показывает корреляцию индекса гематокрита с содержанием гематокрита цельной крови.

Фиг.13B показывает крутизну калибровочных линий ток/глюкоза (мкА/мг/дл) как функцию % гематокрита, полученную из фиг.11A.

Фиг.14 иллюстрирует влияние корректировки содержания глюкозы (мг/дл) на гематокрит с использованием индекса гематокрита.

Фиг.15A-15C показывают графики производных токов для прямых сканирований на фигурах 7A-7C как функции напряжения.

Фиг.16A представляет собой график тока при 0,3 вольта как функцию % глюкозы, при 20, 40 и 60% гематокрита.

Фиг.16B представляет собой график % гематокрита как функции отношения отрицательных и положительных пиков, иллюстрируемых на фиг.15.

Фиг.16C представляет собой график крутизны кривых на фиг.16A как функции % гематокрита.

Фиг.16D показывает влияние корректировки содержания глюкозы на гематокрит с использованием производных токов.

Фиг.17A-17B показывают графики доза - отклик для значений измеренного тока и половинного интеграла тока, соответственно, для ациклического сканирования.

Фиг.17C сравнивает точность значений концентрации глюкозы, полученных от ациклического сканирования, с циклическим сканированием, имеющим низкую скорость сканирования.

Подробное описание

Электрохимическая аналитическая система определяет концентрацию анализируемых веществ в биологических текучих средах, например концентрацию глюкозы в цельной крови. Система содержит устройства, которые могут прикладывать вольтамперометрические линейные, циклические или ациклические сканирования к тест-полоске, содержащей биологический образец.

Вольтамперометрические сканирования измеряют значения тока (ток) от тест-полоски, в то время как потенциал (напряжение), приложенный к полоске, изменяется линейно со временем. Устройства могут сравнивать полученные данные по току и напряжению для определения концентрации анализируемого вещества в образце, в то же время корректируя результаты на изменения содержания гематокрита конкретного образца крови. Устройства также могут применять одну или несколько обработок

данных, включая обработки на основе половинных интегралов, производных и половинных производных, для сравнения и корректировки вольтамперометрических данных.

Системы, как правило, описываются в контексте определения концентрации глюкозы в образце цельной крови. Однако системы имеют другие применения, где анализируемые вещества, такие как холестерин, триглицериды, лактат, пируват, алкоголь, билирубин - мочева кислота, NAD(P)H и моноокись углерода, находятся в биологических текучих средах, включая плазму, мочу, слюну и интерстициальную текучую среду.

Обзор системы

Системы для определения концентрации анализируемого вещества могут содержать тест-полоску для удерживания образца и измерительное устройство для осуществления одной или более методик сканирования и одной или более методик обработки данных. В одном из аспектов настоящее изобретение может представлять собой набор, содержащий одну или более тест-полосок и ручное электронное устройство для осуществления методики сканирования и обработки данных, с получением на выходе концентрации анализируемого вещества.

Тест-полоска может содержать рабочий электрод, противозлектрод и необязательно может содержать опорный электрод или третий электрод. В одном из аспектов рабочий электрод и противозлектрод могут иметь покрытие в виде одного слоя реагента, нанесенного посредством совместного печатания/совместного осаждения, например, как в сенсоре Ascensia® AUTODISC. В другом аспекте каждый электрод может иметь покрытие в виде слоя реагента, оптимизированного для электрода, на котором он находится. Слой реагента на рабочем электроде содержит фермент, который окисляет глюкозу в образце крови, и медиатор, такой как окислительно-восстановительное соединение, которое повторно окисляет фермент после того, как он восстанавливается посредством окисления глюкозы. Восстановленный медиатор, который переносит электроны от ферментативной реакции окисления глюкозы к электроду, повторно окисляется на поверхности рабочего электрода.

Это повторное окисление приводит к прохождению электронов через электроды и проводники тест-полоски. Проводники тест-полоски находятся в электрическом соединении с измерительным устройством, которое прикладывает разность напряжения между электродами. Устройство может регистрировать ток, проходящий через сенсор, как меру содержания глюкозы в образце крови.

Образец цельной крови наносится на тест-полоску, и глюкоза в крови взаимодействует с ферментом в слое реагента или вблизи него. Скорость диффузии восстановленного медиатора из образца к рабочему электроду может ограничивать ток, проходящий между рабочим электродом и электродом сравнения.

Методики сканирования

В отличие от обычной амперометрии и кулонометрии, где прикладывают постоянные напряжения, в то время как ток измеряется как функция времени, вольтамперометрическое сканирование включает в себя приложение к электродам потенциала (напряжения), изменяющегося с фиксированной скоростью (В/с), и измерение тока как функции приложенного потенциала. Вольтамперометрическое сканирование может осуществляться в линейном, циклическом или ациклическом режиме. Циклическое вольтамперометрическое сканирование обычно упоминается как "циклическая вольтамперометрия".

Во время линейного сканирования измеряется ток на рабочем электроде, в то время как потенциал на рабочем электроде изменяется со временем линейно, с постоянной скоростью. Диапазон сканирования, например от -0,5 В до +0,5 В, может перекрывать восстановленные и окисленные состояния окислительно-восстановительной пары, так что происходит переход из одного состояния до другого. Ток, измеряемый на рабочем электроде, может рассматриваться как имеющий три компонента: равновесный ток, диффузионный ток и поверхностный ток. Поверхностный ток, который может возникать от любых частиц, адсорбированных на электроде, как правило, является малым и им можно пренебречь. Равновесный и диффузионный токи представляют собой главные компоненты, представленные в полученной вольтамперограмме.

Вольтамперограмма с линейным сканированием (график тока как функции напряжения) может характеризоваться с помощью графика, который начинается при равновесном токе, достигает пикового тока и затухает до более низкого уровня тока во время сканирования. После начального пика тока измеренный ток затухает и достигает стационарной области, где окисление восстановленного медиатора на поверхности электрода достигает максимальной скорости, ограниченной диффузией. Таким образом, стационарный ток в этой области сканирования, плато, обозначает диффузионно-ограниченный ток, проходящий через электроды, который может использоваться как мера содержания глюкозы образца крови.

После завершения прямого сканирования, для циклического или ациклического сканирования, линейное сканирование с обратным потенциалом прикладывается по существу при такой же скорости сканирования, как и прямое сканирование. Циклические, а в некоторых случаях и ациклические, сканирования могут исследовать переход окислительно-восстановительных частиц из восстановленного состояния в окисленное состояние (и наоборот) по отношению к приложенному потенциалу или по отношению к скорости диффузии окислительно-восстановительных частиц к поверхности электрода.

По сравнению с линейным сканированием циклические и ациклические сканирования могут обеспечивать лучшее представление стационарной (ограниченной диффузией) части сканирования. Преимущество циклических и ациклических сканирований может быть особенно преимущественным для количественного определения стационарных токов от квазиобратимых окислительно-восстановительных пар при высоких скоростях сканирования. Дополнительную информацию о линейной и циклической сканирующей вольтамперометрии можно найти в "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications" by A.J. Bard and L.R. Faulkner, 1980.

Ациклические методики сканирования могут иметь множество преимуществ по сравнению с циклическими методиками сканирования, включая более короткое время сканирования и значительное уменьшение количества медиатора, электрохимически преобразуемого в измеряемое состояние. Таким образом, если медиатор восстанавливается в ответ на анализируемое вещество и электрохимически окисляется во время измерения, прекращение обратного сканирования до того, как окисленный медиатор электрохимически восстанавливается, уменьшает количество восстановленного медиатора в образце, нечувствительного к анализируемому веществу. Уменьшение времени сканирования может сделать возможным более короткое время анализа, представляющее собой значительный выигрыш для пользователя.

Фиг.3А представляет данные циклического сканирования при 25 мВ/с для

окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид как циклическую вольтамперограмму. Вольтамперограмма характеризуется пиком прямого сканирования во время сканирования при положительном напряжении от -0,3 В до +0,6 В, указывающим на окисление ферроцианида, и пиком обратного сканирования во время сканирования при отрицательном напряжении от +0,6 В назад до -0,3 В, указывающим на восстановление феррицианида. Пики прямого и обратного сканирования располагаются вокруг формального потенциала E° (-0,05 мВ) окислительно-восстановительной пары ферроцианид/феррицианид в центре, если сравнивать с электродом сравнения. В этом аспекте потенциал электрода сравнения по существу определяется потенциалом восстановления феррицианида, главных окислительно-восстановительных частиц, присутствующих на электроде сравнения. Фиг.3В представляет данные половинного интеграла вольтамперограммы, чтобы показать влияние этого способа обработки данных на исходные данные. Фиг.3С показывает сравнимое ациклическое сканирование, где обратное сканирование прекращается перед началом пика обратного тока. Фиг.3D представляет собой половинный интеграл ациклического сканирования.

Процесс сканирования приводит к все большим токам вблизи рабочего электрода, когда потенциал возрастает по сравнению с формальным потенциалом E° . В то же время окисление на поверхности электрода генерирует обедненную область и, таким образом, градиент концентрации вблизи электрода. Этот градиент концентрации создает движущую силу для диффузии дополнительного медиатора к электроду. В сочетании эти силы создают начальный прямой пик на вольтамперограмме, когда медиатор, восстановленный с помощью анализируемого вещества или оксидоредуктазы, проходит до рабочего электрода и повторно окисляется. Когда сканирование продолжается, ток затухает и достигает стационарной области от ~0,3 до ~0,6 В на фиг.3А. Ток, измеренный в стационарной области, может коррелировать с концентрацией восстановленного медиатора и, таким образом, с содержанием глюкозы в образце крови.

Хотя потенциалы, где начинаются прямые и обратные сканирования (диапазон сканирования), могут выбираться таким образом, чтобы они включали в себя восстановленные и окисленные состояния окислительно-восстановительной пары, диапазон сканирования может быть уменьшен для сокращения времени анализа. Однако диапазон сканирования предпочтительно включает в себя стационарную область для окислительно-восстановительной пары. Например, при скорости сканирования 25 мВ/с концентрация восстановленных [Red] и окисленных [Ox] частиц обратимой окислительно-восстановительной пары ферроцианид/феррицианид и получаемый электродный потенциал описываются с помощью уравнения Нернста следующим образом.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \stackrel{T=25^{\circ}C}{=} E^{\circ} + \frac{0.059}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \stackrel{n=1}{=} E^{\circ} + 0.059 \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Когда потенциал на рабочем электроде сравнивается с его собственным окислительно-восстановительным потенциалом, формальный потенциал E° станет равным по существу нулю, и уравнение сокращается до:

$$E = 0.059 \log \frac{[Ox]}{[Red]} = 0.059 \log \frac{[Fe(CN)_6^{-3}]}{[Fe(CN)_6^{-4}]} \quad (1)$$

Из уравнения (1), когда отношение окисленного медиатора к восстановленному медиатору изменяется на 10, потенциал на рабочем электроде изменяется примерно на 60 мВ. Обратное утверждение также является верным. Таким образом, для

отношений концентраций феррицианида [Ox] и ферроцианида [Red], 10:1, 100:1, 1000:1 и 10000:1, потенциал на рабочем электроде будет равен приблизительно 60, 120, 180 и 240 мВ, считая от нулевого потенциала, соответственно.

Таким образом, когда отношение феррицианида к ферроцианиду равно ~1000:1, диапазон сканирования от +180 мВ до -180 мВ обеспечит по существу полное окисление восстановленных частиц на рабочем электроде. При 180 мВ скорость окисления ограничивается тем, насколько быстро восстановленная форма медиатора может диффундировать к поверхности электрода, и после этого потенциала имеется область диффузионно-ограниченного стационарного тока. Таким образом, если точка поворота подбирается за ~400 мВ от нулевого потенциала, может создаваться стационарная область ~200 мВ.

Для обратимых систем может быть предпочтительным предусмотреть диапазон сканирования от 400 до 600 мВ, таким образом, сканируя на 200-300 мВ в каждую сторону от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары. Для квазиобратимых систем может быть предпочтительным предусмотреть диапазон сканирования от 600 до 1000 мВ, таким образом, сканируя на 300-500 мВ в каждую сторону от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары.

Большой диапазон сканирования может быть предпочтительным для квазиобратимых систем, поскольку стационарная часть сканирования может осуществляться там, где область плато при сканировании не является такой уж широкой. В дополнение к окислительно-восстановительным парам, которые изначально являются квазиобратимыми, высокие скорости сканирования могут заставить окислительно-восстановительную пару, которая является обратимой при низких скоростях сканирования, демонстрировать квазиобратимое поведение. Таким образом, может быть предпочтительным предусмотреть больший диапазон квазиобратимого сканирования для обратимой окислительно-восстановительной пары при высоких скоростях сканирования.

Предпочтительно стационарная область, величиной, по меньшей мере, 25, 50, 100, 150 или 300 мВ, создается посредством выбранного диапазона сканирования. В другом аспекте точка поворота для циклического или ациклического сканирования выбирается таким образом, что создается стационарная область величиной от 25 до 400 мВ, от 50 до 350 мВ, от 100 до 300 мВ или от 175 до 225 мВ. Для обратимых систем точка поворота для циклического или ациклического сканирования может выбираться таким образом, что создается стационарная область величиной от 180 до 260 мВ или от 200 до 240 мВ. Для квазиобратимых систем точка поворота для циклического или ациклического сканирования может выбираться таким образом, что создается стационарная область величиной от 180 до 400 мВ или от 200 до 260 мВ.

Как только выбирается точка поворота для создания желаемой стационарной области, может выбираться продолжительность обратного сканирования для ациклического сканирования. Как можно увидеть на фиг.3Е, начало прямого сканирования и прекращение обратного сканирования приблизительно при -0,025 мВ приводит к ациклическому сканированию, которое содержит часть пика прямого тока, большую, чем для пика обратного тока. Из сравнения на фиг.3Е, в то время как пиковые токи, полученные для циклических (а) и ациклических (б) методик сканирования, различаются, стационарные части сканирования являются приблизительно одинаковыми, в особенности в отношении обратного сканирования. Когда на графике фиг.3F изображаются половинные интегралы сканирований, данные по стационарному току в области плато обратного сканирования устанавливаются

дополнительно, делая возможным точную регистрацию тока всего лишь за 50 мВ от точки поворота.

В другом аспекте обратное сканирование может прекращаться до достижения пика обратного тока, как изображено на фиг.3С. Когда прямое сканирование начинается при потенциале достаточно отрицательном, например при -0,3 мВ на фиг.3С, до середины диапазона потенциала окислительно-восстановительной пары, например до -0,05 мВ на фиг.3С, прямое сканирование содержит полный диапазон окислительно-восстановительного потенциала окислительно-восстановительной пары. Таким образом, посредством прекращения обратного сканирования на отрицательном потенциале от 50 до 500 мВ, от 150 до 450 или от 300 до 400 мВ, от точки поворота, для окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид может быть исключен, например, пик обратного тока.

Подобным же образом, обратное сканирование также может прекращаться до достижения пика обратного тока посредством прекращения сканирования, когда ток обратного сканирования отклоняется по величине от стационарного тока. Изменение тока обратного сканирования, по меньшей мере, на 2%, 5%, 10% или 25% может использоваться для индикации начала пика тока обратного сканирования.

Фиг.3G сравнивает ациклическое сканирование, которое исключает прямой и обратный пики окисления окислительно-восстановительной пары при быстром циклическом сканировании. Скорость ациклического сканирования является высокой, 1 В/с, с исходными и конечными точками 200 мВ и точкой поворота 300 мВ. Предпочтительные диапазоны сканирования для ациклического сканирования в пределах стационарной области окислительно-восстановительной пары, которые исключают прямой и обратный пики окисления, составляют от 10 до 200 мВ, более предпочтительно от 50 до 100 мВ.

Как видно на графике, значения тока, измеренного для ациклического сканирования, являются численно меньшими, чем значения для циклического сканирования, в то время как фоновый ток ниже для ациклического сканирования. Это полезное уменьшение фона неожиданно получается без необходимости в начале ациклического сканирования в части пика восстановления циклического сканирования. Таким образом, быстрое и короткое ациклическое сканирование в пределах стационарной области окислительно-восстановительной пары может увеличить точность определения анализируемого вещества благодаря уменьшению отношения сигнал-фон.

Фиг.3Н показывает половинный интеграл и регистрируемые значения тока для ациклического сканирования от 200 до 300 мВ на фиг.3G. Токи затухания сканирования преобразуются в плато стационарного тока посредством обработки данных с вычислением половинного интеграла. Стационарная часть половинного интеграла, например значение тока при 300 мВ, может использоваться для определения концентрации анализируемого вещества в образце.

Циклические и ациклические сканирования могут обеспечивать множество преимуществ по сравнению с линейным сканированием. В одном из аспектов часть обратного сканирования от точки поворота до точки, где начинается пик обратного тока, может представлять собой лучшее представление стационарной области, чем стационарная область прямого сканирования. Стационарная область обратного сканирования может представлять собой более точное представление концентрации анализируемого вещества для квазиобратимых окислительно-восстановительных систем или при высоких скоростях сканирования, поскольку прямое сканирование

может не показывать отдельную стационарную область. Это явление наблюдается, например, на фиг.10С.

Обработка данных

Посредством линейного, циклического или ациклического сканирования может определяться концентрация анализируемого вещества в образце. Кроме того, может определяться влияние гематокрита на измерение концентрации анализируемого вещества. В то время как данные от сканирования могут обрабатываться множеством путей для извлечения этой и иной полезной информации, методики с вычислением половинного интеграла, дифференциальные методики и методики с вычислением половинной производной в настоящее время являются предпочтительными.

Хотя обзор этих способов обработки данных описывается ниже по отношению к анализу глюкозы, более глубокое обсуждение этих видов обработки данных для электрохимических токов и родственных численных применений можно найти в Bard A.J., Faulkner L.R. "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", 1980; Oldham K.B. "A Signal-Independent Electroanalytical Method", Anal. Chem. 1972, 44, 196; Goto M., Oldham K.B. "Semi-integral Electroanalysis: Shapes of Neopolarograms", Anal. Chem. 1973, 45, 2043; Dalrymple-Alford P., Goto M., Oldham K.B. "Peak Shapes in Semi-differential Electroanalysis", Anal. Chem. 1977, 49, 1390; Oldham K.B. "Convolution: A General Electrochemical Procedure Implemented by a Universal Algorithm", Anal. Chem. 1986, 58, 2296; Pedrosa J.M., Martin M.T., Ruiz J.J., Camacho L. "Application of the Cyclic Semi-Integral Voltammetry and Cyclic Semi-Differential Voltammetry to the Determination of the Reduction Mechanism of a Ni-Porphyrin", J. Electroanal. Chem. 2002, 523, 160; Klicka R. "Adsorption in Semi-Differential Voltammetry", J. Electroanal. Chem. 1998, 455, 253.

Вычисление половинного интеграла

Вычисление половинного интеграла от вольтамперограммы может отделить ограниченный диффузией стационарный ток от равновесного тока под воздействием гематокрита (начального пика). Половинный интеграл экспериментально полученного вольтамперометрического тока $i(t)$ имеет следующую математическую форму:

$$\frac{d^{-1/2}}{dt^{-1/2}} i(t) = I(t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(u)}{(t-u)^{1/2}} du \quad (2)$$

где $i(t)$ представляет собой вольтамперометрический ток, полученный во время сканирования, как функцию времени;

$I(t)$ представляет собой преобразование и половинный интеграл от $i(t)$;

u представляет собой параметр преобразования; и

$d^{-1/2}/dt^{-1/2}$ представляет собой оператор вычисления половинного интеграла.

При достаточно высоком окислительном потенциале стационарный половинный интеграл тока представляет собой:

$$I_{lim} = nFAD^{1/2}C(\text{кулон/сек}^{1/2}) \quad (3)$$

где I_{lim} представляет собой ограниченный диффузией стационарный ток при условии, что концентрация окисляемых частиц на поверхности равна нулю. Заметим, что единица измерения половинного интеграла тока представляет собой единицу кулон/сек^{1/2}, которая не является традиционной единицей для выражения электрического тока, которая представляет собой кулон/сек.

Для простоты, I_{lim} упоминается как стационарный половинный интеграл тока (SI) с единицей измерения кулон/сек^{1/2}. Ток SI (кулон/сек^{1/2}) представляет собой только половинный интеграл от тока (кулон/сек). Вычисление половинного интеграла

фундаментально отличается от кулонометрии, поскольку при кулонометрии полный интеграл применяется к кривой $i-t$ с получением общего заряда, проходящего через электроды.

Хотя уравнение (2) дает теоретическое определение половинного интеграла, при численной обработке данные $i-t$ могут быть разделены на N одинаковых временных интервалов между $t=0$ и $t=N\Delta t$. Один такой алгоритм численной обработки дается уравнением (4), где $t=k\Delta t$ и $u=i\Delta t$, и i определяется в средней точке каждого интервала.

$$I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{i(j\Delta t - 1/2\Delta t)\Delta t^{1/2}}{\sqrt{k-j+1/2}} \quad (4)$$

Предпочтительный алгоритм для численной обработки дается с помощью:

$$I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{\Gamma(k-j+1/2)}{(k-j)!} \Delta t^{1/2} i(j\Delta t) \quad (5)$$

где $\Gamma(x)$ представляет собой гамма-функцию x , где $\Gamma(1/2)=\pi^{1/2}$, $\Gamma(3/2)=1/2\pi^{1/2}$, $\Gamma(5/2)=3/2*1/2\pi^{1/2}$ и тому подобное.

Из уравнения (3) можно увидеть, что стационарный половинный интеграл тока не имеет фактора временной зависимости обычных амперометрических способов. Таким образом, отклик половинного интеграла тока может рассматриваться как ряд токов плато, вместо непрерывно изменяющихся амперометрических токов, получаемых при обычной амперометрии. Поскольку вычисление половинного интеграла делает возможным количественное определение стационарного тока, может использоваться более высокая скорость сканирования, чем в случае, когда определяются пиковые токи. Таким образом, линейная, циклическая или ациклическая вольтамперометрия в сочетании с вычислением половинного интеграла может быстро генерировать стационарные токи в качестве отклика на концентрации глюкозы. Таким образом, могут быть уменьшены недостатки долгого времени ожидания при кулонометрии и нестационарной природы тока при амперометрии.

Уравнение (3) также показывает, что обратимые или квазиобратимые окислительно-восстановительные пары являются предпочтительными для использования при вычислении половинного интеграла. Это связано с тем, что половинный интеграл от обратимой или квазиобратимой окислительно-восстановительной пары может демонстрировать резкий переход от восстановленного состояния в окисленное состояние (и наоборот) и широкую стационарную область, таким образом, делая определение перехода более простым. Феррицианид/ферроцианид и состояния $+3$ и $+2$ рутений гексамина представляют собой примеры окислительно-восстановительных пар, демонстрирующих предпочтительные обратимые (медленное сканирование) или квазиобратимые (быстрое сканирование) свойства.

Плохо активируемые электроды могут и не обеспечивать приемлемых стационарных условий, даже вместе с обратимыми или квазиобратимыми окислительно-восстановительными парами. Таким образом, процедуры активирования электродов, такие как те, которые описаны в патенте США 5429735, могут использоваться для достижения предпочтительной активности электрода.

Вычисление половинной производной

В дополнение к половинным интегралам вычисление половинных производных от вольтамперограмм также может использоваться для количественного определения анализируемого вещества посредством измерения пика половинной производной. Половинная производная экспериментально полученного вольтамперометрического тока $i(t)$ имеет следующую математическую форму:

$$\frac{d^{1/2}}{dt^{1/2}} i(t) \quad (6)$$

$$\frac{d^{1/2}}{dt^{1/2}} i(t) = \frac{dI(t)}{dt} = \frac{d}{dt} \left[\frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(u)}{(t-u)^{1/2}} du \right], \left(\text{кулон/сек}^{3/2} \right) \quad (7)$$

где $i(t)$ представляет собой половинный интеграл от функции времени $i(t)$.

Одно из применений вычисления половинной производной заключается в вычислении полной производной от половинного интеграла, как показано выше в уравнении (7). В отличие от областей пиков и стационарных плато, представляющих вольтамперометрическое сканирование на графиках половинных интегралов, графики половинной производной преобразуют данные вольтамперометрического сканирования в пик с центром на переходе окислительно-восстановительной пары. Фиг.4А изображает циклическую вольтамперограмму, половинный интеграл и половинную производную для 16 мМ ферроцианида в образце цельной крови с гематокритом 20%. В этом случае рабочий электрод тест-полоски не имеет фермента и окисленного медиатора. Фиг.4В представляет собой увеличение кривой половинной производной на фиг.4А, показывающее высоту пика для прямого сканирования. Значение высоты пика прямого или обратного сканирования может коррелировать с концентрацией анализируемого вещества образца.

Влияние гематокрита

Нормальный диапазон гематокрита (концентрация RBC) у людей составляет от 20% до 60%, с центром около 40%. Влияние гематокрита связано с различием (смещением) между эталонным значением измерения концентрации глюкозы, полученным от эталонного инструмента, такого как YSI 2300 STAT PLUS™, доступный от YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, и экспериментальным измерением концентрации глюкозы, полученным из способов, описанных выше. Различие между эталонным и экспериментальным измерениями возникает в результате различных уровней гематокрита у конкретных образцов цельной крови.

Хотя концентрация глюкозы в образцах цельной крови является одинаковой для различных уровней гематокрита, в аналитических способах на основе диффузии, таких как амперометрия, чем выше гематокрит, тем ниже измеряемый амперометрический ток. Для уровней гематокрита в цельной крови 20, 40 и 60% полученные измерения тока будут различаться примерно на 20% > 40% > 60% для одной и той же концентрации глюкозы. Это различие между измерениями тока от 20% до 60% составляет диапазон связанного с гематокритом смещения для измерений глюкозы, полученных для образца цельной крови. Неточность в определении глюкозы, вносимая различными уровнями гематокрита, для каждого образца цельной крови может составлять главный источник ошибок при анализе.

Например, если полученное экспериментально измерение глюкозы сделано со ссылкой на измерение тока, полученное для глюкозы в плазме, и способ калибровки предполагает 40% содержание гематокрита в образце, тогда более высокие измерения тока, полученные от образцов цельной крови, содержащих 20% гематокрит, будут преобразовываться в положительное смещение по отношению к линии калибровки для 40%. Подобным же образом, более низкие измерения тока, полученные от образцов цельной крови, содержащей 60% гематокрит, будут преобразовываться в отрицательное смещение по отношению к линии калибровки для 40%.

Уменьшение гематокрита

В одном из аспектов низкая скорость сканирования может объединяться с

линейным, циклическим или ациклическим сканированием и вычислением половинного интеграла для уменьшения связанного с гематокритом смещения при определении концентрации, когда цельная кровь анализируется на концентрацию глюкозы. Фиг.10А показывает, что для низкой скорости сканирования 25 мВ/сек

5 большой пик наблюдается в части прямого сканирования половинного интеграла для 60% гематокрита (линия с), в то время как для 40% гематокрита (линия b) наблюдается меньший пик. Линия (a) для 20% гематокрита не имеет значительного пика. Таким образом, часть графика с пиком половинного интеграла является

10 чувствительной к содержанию гематокрита в образце, и величина пика может количественно соотноситься с уровнем гематокрита.

В другом аспекте линейные, циклические или ациклические сканирования могут объединяться с дифференциальной обработкой данных для уменьшения связанного с гематокритом смещения определения концентрации, когда цельная кровь

15 анализируется на концентрацию глюкозы. Фигуры 15А-15С изображают производные циклических вольтамперограмм на фигурах 7А-7С. Эти графики производных показывают начальное увеличение тока при увеличении напряжения с последующим уменьшением и, наконец, стационарную область. Влияние гематокрита можно увидеть

20 для отрицательного пика, расположенного примерно при 0,1 вольта, на фигурах 15А-15С, при этом более высокие концентрации RBC отражаются как более отрицательные значения пиков.

В то время как значения положительных и отрицательных пиков производных, таких как те, которые изображены на графике производной на фиг.15В, являются

25 концентрационно зависимыми, отношение отрицательного пика к положительному пику взаимно компенсирует концентрационную зависимость, являясь, таким образом, зависимым от гематокрита. Поскольку это отношение (HI-DER) является концентрационно независимым и зависимым от гематокрита, отношение показывает

30 процент гематокрита в образце. Таким образом, это отношение пиков производных может использоваться для определения уравнения компенсации гематокрита, для определения анализируемого вещества, как дополнительно описывается ниже.

В другом аспекте линейные, циклические или ациклические сканирования могут объединяться с обработкой данных с вычислением половинной производной для

35 уменьшения связанного с гематокритом смещения при определении концентрации, когда цельная кровь анализируется на концентрацию глюкозы. Фигуры 4С, 4D и 4Е изображают кривые половинных производных от частей прямого линейного сканирования циклических вольтамперограмм на фигурах 7А, 7В и 7С, при 50, 100 и 40

40 мг/дл глюкозы после вычитания фоновой вольтамперограммы (0 мг/дл глюкозы).

Фиг.4F изображает половинные производные токов на фигурах 4С, 4D и 4Е, в виде графиков как функции от эталонных концентраций глюкозы при каждом уровне гематокрита. Перекрывание линий с гематокритом 20% и 40% устанавливает, что

45 влияние гематокрита по существу устраняется при значении ниже 20%. Связанное с гематокритом различие между линией с гематокритом 40% и линией с гематокритом 60% также уменьшается, по сравнению с тем, которое получают из стационарной части непреобразованных данных от вольтамперограммы или от

50 вычисления половинного интеграла вольтамперограммы. Таким образом, обработка данных с вычислением половинной производной может изначально обеспечить компенсацию гематокрита для определения глюкозы.

Фиг.4G изображает сравнение данных от непреобразованного прямого сканирования вольтамперограммы (LS), половинного интеграла данных

вольтамперограммы (si) и половинной производной данных вольтамперограммы (sd). Значения глюкозы вычисляют с использованием кривой калибровки при уровне гематокрита 40%. Как можно увидеть из графика, данные половинной производной хорошо соответствуют линии, полученной от эталонного инструмента YSI.

Обработка данных с вычислением половинного интеграла и дифференцированием дает возможность для идентификации и количественного определения части сканирования тока, подверженной влиянию гематокрита. Таким образом, эти методики обработки данных дают возможность для уменьшения связанного с гематокритом смещения, которые в другом случае влияли бы на определение концентрации анализируемого вещества. Обработка данных с вычислением половинной производной может сделать возможным уменьшение смещения, связанного с гематокритом, которое в другом случае влияло бы на определение концентрации анализируемого вещества без компенсационного уравнения, как дополнительно обсуждается ниже.

В другом аспекте более высокие скорости сканирования, такие как скорости сканирования 500 и 1000 мВ/сек на фигурах 10В и 10С, могут объединяться с линейным, циклическим или ациклическим сканированием и с обработкой данных с вычислением половинного интеграла, с дифференциальной обработкой данных или с обработкой данных с вычислением половинной производной для уменьшения смещения, связанного с гематокритом, и измерения содержания глюкозы в цельной крови. Более высокие скорости сканирования также обеспечивают преимущества более коротких времен сканирования, значительную выгоду для пользователя.

Когда общая продолжительность сканирования является относительно долгой, как при обычной амперометрии или при вольтамперометрии с медленным сканированием, диффузия медиатора и измеренный ток будут сильно зависеть от содержания RBC образца. Наоборот, если скорость сканирования является высокой, например 500 мВ/сек, время, необходимое для достижения точки прекращения 400 мВ от начальной точки -200 мВ, равно 1,2 секунды. Подобным же образом, точка прекращения 400 мВ может быть достигнута через 0,6 секунды, при скорости сканирования 1000 мВ/сек, или через 0,3 секунды, при скорости сканирования 2000 мВ/сек. Таким образом, общие времена сканирования, самое большее, 3 секунды, 1,5 секунды, 1 секунда или 0,5 секунды, могут уменьшить связанное с гематокритом смещение при измерении концентрации без математического устранения.

Определение концентрации анализируемого вещества

Фиг.5 изображает влияние концентрации на циклические вольтамперограммы, когда концентрация глюкозы в водном растворе увеличивается. Показаны линии, представляющие концентрации глюкозы 0 мг/дл (линия а), 100 мг/дл (линия b), 200 мг/дл (линия c), 400 мг/дл (линия d) и 600 мг/дл (линия e). Скорость сканирования равна 25 мВ/сек. Фиг.6 представляет собой данные сканирования из фиг.5 после преобразования в половинные интегралы токов посредством обработки данных с вычислением половинного интеграла. Таким образом, различие в концентрациях глюкозы видно по оси X на фиг.6.

Форма циклической вольтамперограммы будет изменяться, когда сканируется образец цельной крови. Циклическая вольтамперограмма будет показывать смещение вольтамперометрических токов, которое изменяется с гематокритом и концентрацией глюкозы, в частности для токов вблизи стационарной части (0,3-0,4 В на фигурах 7А-7С). Изменение можно увидеть на фигурах 7А-7С, где показаны вольтамперограммы для концентраций глюкозы 50 мг/дл (7А), 100 мг/дл (7В) и 400 мг/дл (7С),

соответственно, а также для гематокрита 20, 40 и 60% (кривые а, b, с, соответственно) для каждой из концентраций глюкозы. Скорость сканирования равна 25 мВ/сек. Как и ожидалось, с точки зрения влияния гематокрита, чем выше процент гематокрита в образце, тем больше измерение для одной и той же концентрации глюкозы.

Соответствующие графики с вычислением половинного интеграла циклических сканирований показаны на фигурах 8А-8С, где сдвиги для стационарных токов обозначены кружком. Фигуры 7D-7F и 8D-8F представляют данные сканирований и соответствующие половинные интегралы для аналогичного ациклического сканирования.

Сканирование может осуществляться в диапазоне от -600 мВ до +600 мВ; однако предпочтительный диапазон сканирования зависит от окислительно-восстановительной пары (медиатор), используемой в биосенсоре. Как правило, измерительное устройство будет программироваться относительно диапазона, который должен сканироваться, во время стадии изготовления.

Фигуры 9А-9С изображают результаты для скоростей сканирования 25 мВ/сек, 500 мВ/сек и 1000 мВ/сек, соответственно, для образцов крови, содержащих 400 мг/дл глюкозы. Когда скорость сканирования увеличивается от 25 мВ/сек на фиг.9А до 500 мВ/сек на фиг.9В и до 1000 мВ/сек на фиг.9С, начальный пик, подверженный влиянию гематокрита, уменьшается. Кроме того, значения пикового тока связаны со значениями гематокрита образца (а представляет собой 20%, b - 40%, с - 60% гематокрит), при этом больший процент гематокрита, как правило, коррелирует с более быстрым затуханием пиковых токов при низких скоростях сканирования.

Графики половинных интегралов, соответствующие вольтамперограммам на фигурах 9А-9С, показаны на фигурах 10А-10С, соответственно. Как видно из обозначенных кружками обратных точек при сканировании при 25 мВ/сек на фиг.10А, стационарные токи линий с гематокритом 20%, 40% и 60% удалены друг от друга относительно оси Y. Когда скорости сканирования увеличиваются до 500 мВ/сек на фиг.10В и до 1000 мВ/сек на фиг.10С, расстояние по оси Y для линий с гематокритом 20%, 40% и 60% уменьшается. Таким образом, когда скорость сканирования увеличивается, подверженная влиянию гематокрита часть сканирования уменьшается.

Фигуры 11А-11С показывают корреляцию между линиями половинных интегралов на фигурах 10А-10С на основе экспериментальных результатов на фигурах 9А-9С и эталонной концентрации глюкозы для каждого образца. Значения эталонной концентрации глюкозы от инструмента YSI (ось X) сравнивают с половинными интегралами тока (ось Y) для каждого процента гематокрита. Согласно ожиданиям сканирование при 25 мВ/сек на фиг.11А показывает самое большое смещение, приписываемое влиянию гематокрита, в то время как более быстрые сканирования при 500 и 1000 мВ/сек на фигурах 11В и 11С, соответственно, показывают меньшее смещение.

Отношение значений пикового и стационарного тока на графике половинного интеграла может упоминаться как индекс гематокрита (HI), который может определяться как пик половинного интеграла тока (i_p), деленный на стационарное значение половинного интеграла тока (i_{ss}), как показано на фиг.12. Вычисленный индекс гематокрита (HI) коррелирует с реальным содержанием % гематокрита образца, обеспечивая линию корреляции, показанную на фиг.13А. Как обсуждалось ранее в отношении дифференциальной обработки данных, отношение HI-DER также может использоваться для создания линии корреляции.

Затем может определяться компенсационное уравнение, которое описывает крутизну или точку пересечения и крутизну линии корреляции, такой как та, которая показана на фиг.13А, для обработки данных с вычислением половинного интеграла. После того как компенсационное уравнение определено, концентрация глюкозы образца с компенсацией на влияние гематокрита может определяться посредством введения в уравнение желаемого значения тока, такого как значение стационарного тока. Таким образом, отношение пикового и стационарного значений тока для отрицательного пика к положительному пику для дифференциальной обработки данных может использоваться для корректировки на аналитическое смещение, приписываемое влиянию гематокрита.

Фиг.13В изображает корреляцию между крутизной и % гематокрита для различных концентраций глюкозы при фиксированном токе с компенсацией гематокрита. Как можно увидеть из графика, компенсационное уравнение, определенное для описания кривой на фиг.13А, предусматривает по существу линейную корреляцию между током и концентрацией глюкозы, независимо от фонового содержания гематокрита образца WB (цельной крови). Фиг.14 сравнивает множество компенсированных и некомпенсированных измерений глюкозы, полученных от сенсорной системы по настоящему изобретению, со значениями, полученными от эталонного инструмента YSI.

Следующие далее примеры приводятся для иллюстрации одного или нескольких предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. По отношению к следующим далее примерам могут быть проделаны многочисленные изменения, и они лежат в рамках настоящего изобретения.

Пример 1

Получение тест-полоски

Обращаясь к фигурам 1А-1В, электроды 12 и 14 формируют на основе изолирующего материала, например, с использованием технологий, описанных в патентах США №№5798031 и 5120420, для получения электрохимической тест-полоски 10. Серебряную пасту 18 осаждают посредством контактной печати на поликарбонатную полосу 16. Эту пасту отпечатывают в виде структуры, с формированием электрических контактов 20а и 20b и нижнего слоя 18 электродов 12 и 14.

На фиг.1В краска, содержащая проводящий углерод и связующее вещество, наносится затем посредством контактной печати в виде структуры 22 и 24 с формированием верхнего слоя каждого электрода, слоя реагента 26 и 28 из глюкозы оксидазы (или PQQ-GDH глюкозы дегидрогеназы) и феррицианида, в качестве медиатора. Рабочий электрод и электрод сравнения 12 и 14 имеют поверхности 1 мм² и 1,2 мм², соответственно, и электроды удалены друг от друга примерно на 0,25 мм. На фиг.2А диэлектрический слой 30, содержащий акрилат-модифицированный полиуретан, осаждают на основу. Затем нижние слои электродов отверждают с помощью УФ-излучения.

Обращаясь к фиг.2В, после сушки основу связывают с крышкой 32 с формированием тест-полоски 10. Конструкция крышки осуществляется, как описано в патенте США №5798031. Раствор для покрытия из водной дисперсии полиуретана распыляют на одной стороне поликарбонатной полоски и позволяют ему высохнуть. Полоску формируют внутри крышки посредством штамповки с формированием вогнутого участка 34 и посредством прodelывания отверстия 36. Крышку связывают с

основой посредством совмещения и приведения в контакт крышки и основы с последующим приложением тепла к контактной области вдоль периферии структуры.

Завершенный электрохимический сенсор активируют, используя процедуры, описанные в патенте США №5429735, для увеличения активности электрода.

Пример 2

Осуществление анализа

Фиг.2С представляет собой схематическое представление измерительного устройства 200, содержащего контакты 220 в электрическом соединении с электрической схемой 210 и дисплеем 230. В одном из аспектов измерительное устройство 200 адаптируется, чтобы оно было ручным и принимало тест-полоску. В другом аспекте измерительное устройство 200 представляет собой ручное измерительное устройство, адаптированное для приема тест-полоски и осуществления вольтамперометрического сканирования. В другом аспекте измерительное устройство 200 представляет собой ручное измерительное устройство, адаптированное для приема тест-полоски и осуществления ациклического сканирования.

Контакты 220 адаптируются для осуществления электрического соединения с электрической схемой 210 и контактами тест-полоски, такими как контакты 20a и 20b тест-полоски 10, изображенной на фиг.1А. Электрическая схема 210 может содержать электрическое зарядное устройство 250, процессор 240 и среду для хранения информации, считываемую компьютером 245. Электрическое зарядное устройство 250 может представлять собой потенциостат или что-либо подобное. Таким образом, зарядное устройство 250 может прикладывать напряжение к контактам 220, в то же время регистрируя полученный в результате ток, функционируя как зарядное устройство - регистрирующее устройство.

Процессор 240 может находиться в электрическом соединении с зарядным устройством 250, средой 245 для хранения информации, считываемой компьютером, и дисплеем 230. Если зарядное устройство не адаптировано для регистрации тока, процессор 240 может быть адаптирован для регистрации тока на контактах 220.

Среда 245 для хранения информации, считываемой компьютером, может представлять собой любую среду для хранения информации, такую как магнитная, оптическая, полупроводниковая память и тому подобное. Среда 245 для хранения информации, считываемой компьютером, может представлять собой фиксированное устройство памяти или удаляемое устройство памяти, такое как удаляемая карта памяти. Дисплей 230 может быть аналоговым или цифровым в одном из аспектов, ЖК-дисплеем, адаптированным для отображения численных данных.

Когда контакты тест-полоски, содержащей образец, находятся в электрическом соединении с контактами 220, процессор 240 может направлять зарядное устройство 250 для приложения вольтамперометрического сканирования к образцу, таким образом, начиная анализ. Процессор 240 может начинать анализ в ответ на вставку тест-полоски, на нанесение образца на предварительно вставленную тест-полоску или, например, в ответ на входной сигнал пользователя.

Инструкции относительно осуществления вольтамперометрического сканирования могут обеспечиваться программным кодом, считываемым компьютером, хранимым в среде 245 для хранения информации, считываемой компьютером. Код может представлять собой объектный код или любой другой код, описывающий или контролирующий функции, описанные в настоящей заявке. Данные, которые возникают в результате сканирования, могут подвергаться воздействию одной или более методик обработки данных в процессоре 240, и результаты, такие как

концентрация анализируемого вещества, могут выводиться на дисплей 230. Как и в случае инструкций по сканированию, обработка данных может осуществляться посредством процессора 240 от программного кода, считываемого компьютером, хранящегося в среде 245 для хранения информации, считываемой компьютером.

Пример 3

Циклическая вольтамперометрия и вычисление половинного интеграла

Водный раствор глюкозы 100 мг/дл вводят в сенсор Ascensia AUTODISC®.

Циклическое сканирование, имеющее скорость сканирования 25 мВ/сек, применяется к тест-полоске, с использованием потенциостата CH Instrument. Циклическая вольтамперограмма (CV) изображается на графике как фиг.3А, в то время как половинный интеграл (si) изображается на графике как фиг.3В. Данные изображаются на графике как функция сканирующего потенциала по сравнению с потенциалом на электроде сравнения (феррицианид). Фиг.3В, кроме того, иллюстрирует плато стационарного тока на графике половинного интеграла, где различия в области стационарного плато, например между 0,2 В и 0,4 В, по существу нулевые, в то время как различие между стационарным плато и пиком прямого тока (si_{ss}) при $\sim -0,15$ В является относительно большим.

Уравнения, используемые для этой обработки данных с вычислением половинного интеграла данных и дифференциальной обработки и обработки данных с вычислением половинной производной, описанные в другом месте, осуществляются с помощью пакета программ Electrochemical Workstation, version 4,07, revised April 26, 2004, которая прилагается к CH Instruments Electrochemical Workstation, model CHI 660A.

Пример 4

Влияние более высокой концентрации глюкозы

На фиг.5 циклическое сканирование применяют к тест-полоскам на глюкозу Ascensia AUTODISC®, загруженным водными растворами глюкоз, содержащими 0, 100, 200, 400 и 600 мг/дл глюкозы, меченным а-с, соответственно. Как видно на фиг.5, пиковый ток для каждой концентрации глюкозы растет и сдвигается в сторону более высоких потенциалов, когда концентрация глюкозы увеличивается. Фиг.6 изображает соответствующие половинные интегралы для циклических вольтамперограмм на фиг.5. При нулевой концентрации глюкозы половинный интеграл тока по существу равен нулю.

Пример 5

Циклическая вольтамперометрия глюкозы на образцах WB, медленное сканирование

Как описано, в целом, во временной заявке на патент США, зарегистрированной 24 октября, 2003 года, серийный номер 60/513817, конструируются тест-полоски, имеющие различные слои реагента на рабочем электроде и на электроде сравнения. Слой феррицианида из раствора примерно 22% $K_3Fe(CN)_6$, 0,7% бентона, СМС 1,5%, но без активных ингредиентов, осаждают на электроде сравнения. Слой, осажденный на рабочем электроде, приготавливают из раствора реагента из 16,8 ед./мкл PQQ-GDH, 250 мМ феррицианида, 1,8% СМС, 64 мМ фосфата и 64 мМ NaCl. Образцы цельной крови, содержащие 50 мг/дл глюкозы и 20%, 40% или 60% гематокрита (меченные а-с, соответственно, на фигурах 7А-7С), вводят на тест-полоски.

Пиковый ток от образца (с) с гематокритом 60% является самым высоким, но быстрее всего затухает примерно до такого же стационарного тока, как для образцов, содержащих гематокрит 20% (а) и 40% (b). Затухание тока, осуществляющееся в образцах цельной крови с гематокритом 60%, при концентрации 50 мг/дл, является

сходным с тем, которое наблюдается на фигурах 7В и 7С для концентраций 100 и 400 мг/дл, соответственно. Когда концентрация глюкозы в образцах цельной крови с гематокритом 60% увеличивается, значение стационарного тока уменьшается по отношению к значениям тока, полученным в образцах с гематокритом 20% и 40%.

Пример 6

Вычисление половинного интеграла циклических вольтамперограмм

Хотя циклические и ациклические токи могут использоваться для количественного определения концентрации глюкозы образцов непосредственно, половинные интегралы этих вольтамперограмм обеспечивают предпочтительные значения для представления концентрации глюкозы в образце. Половинные интегралы, представленные на фигурах 8А, 8В и 8С, получены из фигур 7А, 7В и 7С. Заметим, что половинные интегралы от 20% образцов цельной крови (а) являются по существу плоскими, практически без пика на плато. Когда уровень гематокрита увеличивается, пики становятся все более и более заметными с увеличением гематокрита от 40% до 60% (b, c). Также, когда концентрация глюкозы увеличивается, три стационарных тока при гематокрите 20%, 40% и 60% дополнительно отдаляются друг от друга. Стационарный ток при 0,3 В от половинного интеграла используют для построения кривых калибровки для трех гематокритов.

Пример 7

Циклическая вольтамперометрия глюкозы в образцах WB, быстрое сканирование

Тест-полоски, описанные в примере 4, используют для осуществления циклической вольтамперометрии с быстрым сканированием для глюкозы в цельной крови при уровнях гематокрита 20%, 40% и 60%. Фигуры 9А, 9В и 9С представляют собой циклические вольтамперограммы цельной крови, содержащей 400 мг/дл глюкозы, при скоростях сканирования 0,025 В/сек, 0,5 В/сек и 1 В/сек, соответственно. Хотя существует большой сдвиг между вольтамперометрическими токами при 0,3 В, для вольтамперограмм при скорости сканирования 0,025 В/сек этот сдвиг уменьшается при увеличении скоростей сканирования. Половинные интегралы этих циклических вольтамперограмм показаны на фиг.10А, 10В и 10С. Стационарные токи для каждого процента гематокрита при одной и той же концентрации глюкозы сходятся вместе, когда скорость сканирования увеличивается. Начальный пик тока по существу уменьшается при высоких скоростях сканирования.

Пример 8

Ациклическая вольтамперометрия глюкозы в образцах WB, быстрое, короткое сканирование

Образцы цельной крови, содержащие 400 мг/дл глюкозы и 20, 40 или 55% гематокрита, наносят, каждый, на 3 тест-полоски. После ожидания приблизительно в течение 6 секунд применяют быстрое ациклическое сканирование при 1 В/сек от 0,2 В до 0,3 В и назад до 0,2 В. После определения половинных интегралов тока от сканирования, как описывалось ранее в связи с фиг.3Н, значение тока ациклического сканирования и соответствующее значение половинного интеграла тока при 0,3 В используют для определения концентрации глюкозы в каждом из 3 образцов WB.

Фигуры 17А-17В показывают графики доза - отклик для значений измеренного тока и половинного интеграла тока, соответственно. По отношению к значению измеренного тока обработка данных с вычислением половинного интеграла на фиг.17В обеспечивает относительное уменьшение аналитического смещения между образцами с 20 и 55%, приписываемое влиянию гематокрита. Фиг.17С сравнивает точность значений концентраций глюкозы, полученных из ациклического

сканирования, с теми, которые получают из циклического сканирования, имеющего низкую скорость сканирования, 0,025 В/сек. Значения концентрации, полученные из ациклического сканирования, ближе к значениям, полученным от эталонного

Пример 9

Кривые калибровки токов i_t при различных скоростях сканирования

Используя половинные интегралы токов от линий с гематокритом 20%, 40% и 60%, строят кривые калибровки для скоростей сканирования 0,025 В/сек, 0,5 В/сек и 1 В/сек, как показано на фигурах 11А, 11В и 11С. Тест-полоски являются сходными с полосками примера 4. При скорости сканирования 0,025 В/сек наблюдают три различные линии для трех гематокритов образцов цельной крови, исследуемых на фиг.11А. Когда скорость сканирования увеличивается от 0,025 В/сек до 0,5 В/сек (фиг.11В), все три линии калибровки перемещаются ближе друг к другу и почти сливаются при 1 В/сек (фиг.11С). Этот пример демонстрирует, что измерения глюкозы в образцах цельной крови могут устранить влияние гематокрита на образцы WB.

Пример 10

Определение индекса гематокрита из половинных интегралов

Согласно фигурам 8А-8С существует соотношение между уровнем гематокрита и высотой пиков тока. Отношение высоты пика к стационарному току (i_t) не зависит от концентрации глюкозы. Эта характеристика может использоваться для индикации уровня гематокрита в образце цельной крови.

Фиг.12 определяет индекс гематокрита (HI) как отношение пикового тока к стационарному току из половинного интеграла. Таблица ниже приводит пиковые токи и токи плато половинных интегралов при 50, 100 и 400 мг/дл глюкозы в цельной крови и при 20%, 40% и 60% гематокрите.

Глюкоза, WB	Пиковые токи и токи плато (i_t)					
	20%		40%		60%	
мг/дл	пик	плато	пик	плато	пик	плато
50	34,69	34,31	36,94	32,79	42,25	31,74
100	44,4	43,88	45,22	40,76	44,58	33,44
400	92,34	93,46	94,74	89,16	70,74	56,71
Индекс гематокрита (HI): Отношение Пик/Плато						
	20%	40%	60%			
50	1,01	1,13	1,33			
100	1,01	1,11	1,33			
400	0,99	1,06	1,25			
Среднее	1,00	1,10	1,30			
Станд. откл.	0,014	0,033	0,049			
%-CV	1,35	3,01	3,75			

Пример 11

Компенсация смещений измерений для глюкозы, WB

% гематокрита цельной крови изображается на графике как функция значения индекса гематокрита (HI) в качестве кривой калибровки для индекса гематокрита, как показано на фиг.13А. В то же время крутизна линий калибровки глюкозы при трех уровнях гематокрита на фиг.11А изображается как функция % гематокрита WB, как показано на фиг.13В. Вместо использования одной крутизны (и точки пересечения) при 40% гематокрите для вычисления значений глюкозы из сигналов тока используют крутизну, зависящую от % гематокрита. Это осуществляют следующим образом:

(а) после получения пикового тока и тока плато из половинного интеграла,

например из фиг.12, вычисляют значение индекса гематокрита (HI),

(b) используя это значение HI, находят значение % гематокрита образца WB из фиг.13А,

(c) используя это значение % гематокрита, определяют соответствующую крутизну калибровки из фиг.13В, которая зависит от гематокрита.

Сходный способ может также использоваться для нахождения точки пересечения, зависящей от гематокрита,

(d) затем крутизну (и точку пересечения) из (c) используют для преобразования тока i в значение глюкозы.

Фиг.14 показывает конечный результат такой процедуры компенсации, где некомпенсированные измерения глюкозы показаны как ромбики, в то время как точки скомпенсированных данных показаны как белые квадраты. Улучшение точности является очевидным, в частности, при более высокой концентрации глюкозы.

Пример 12

Производные циклических вольтамперограмм

Значения гематокрита могут различаться посредством процесса затухания тока, который может следовать за пиком тока при сканировании. Эта особенность показана на фигурах 7А, 7В и 7С, где затухание тока является самым быстрым при 60% гематокрите цельной крови. Эта особенность также может быть представлена посредством вычисления производной вольтамперометрических токов при сканировании. Фигуры 15А-15С показывают производные циклических вольтамперограмм при 50 мг/дл, 100 мг/дл и 400 мг/дл для процентов гематокрита 20%, 40% и 60%. Самый большой отрицательный пик на кривой производной представляет самое быстрое затухание тока циклических вольтамперограмм на фигурах 7А-7С. Таким образом, высота пика на диаграмме производной может использоваться для компенсации аналитического смещения, связанного с влиянием гематокрита в цельной крови. В одном аспекте используется способ, иллюстрируемый на фигурах 16А-16С, который подобен тому, который обсуждается в примере 9 для половинных интегралов тока.

Фиг.16А показывает график токов CV в стационарной области 0,3 вольта как функцию % глюкозы при 20, 40 и 60% гематокрите. Он является сходным с фиг.11А для половинных интегралов и иллюстрирует расхождение токов при увеличении гематокрита. Фиг.16В показывает график среднего отношения отрицательного и положительного пиков как функции % гематокрита на фигурах 15А-15С. Это отношение представляет собой другое определение индекса гематокрита, в этом случае с использованием производных тока как функции напряжения вместо половинных интегралов тока. Фиг.16С показывает крутизну кривых фиг.16А как функцию % гематокрита. В процедуре, подобной той, которая осуществляется при вычислении половинного интеграла, получают производные тока как функции напряжения и отношения отрицательных пиков к положительным используют для определения индекса гематокрита (HI-DER). HI-DER используют для определения % гематокрита на фиг.16В. Затем фиг.16С используют для корректировки измеренного содержания глюкозы на % гематокрита. Фиг.16D показывает корректировку на влияние гематокрита с использованием производных токов, полученных посредством вольтамперометрии.

Хотя описываются различные варианты осуществления настоящего изобретения, специалисту в данной области будет ясно, что и другие варианты осуществления и воплощения являются возможными в рамках настоящего изобретения.

Соответственно, настоящее изобретение не должно ограничиваться, кроме как в свете прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Формула изобретения

- 5 1. Способ определения концентрации анализируемого вещества в образце, включающий в себя следующие стадии:
 приложение ациклического сканирования к образцу, где ациклическое сканирование включает в себя прямое и обратное линейное сканирование, причем ациклическое
 10 сканирование включает в себя большее количество одного из прямого или обратного пиков тока, чем другого пика тока, или начинается и заканчивается, по существу, при одинаковом напряжении, когда сканирование начинается, самое большее, за ± 20 мВ от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары или, по существу, исключают окислительные и восстановительные пики окислительно-
 15 восстановительной пары;
 измерение тока как функции изменения напряжения; и
 определение концентрации анализируемого вещества в образце по току.
2. Способ по п.1, в котором анализируемое вещество выбирается из группы,
 20 состоящей из глюкозы, холестерина, триглицеридов, лактата, пирувата, алкоголя, билирубина - мочевой кислоты, NAD(P)H и моноокси углерода.
3. Способ по п.1, в котором анализируемое вещество представляет собой глюкозу.
4. Способ по п.1, в котором образец представляет собой биологический образец.
5. Способ по п.4, в котором образец представляет собой цельную кровь.
- 25 6. Способ по п.1, в котором прямое сканирование начинается при напряжении, отличном от того, при котором заканчивается обратное сканирование.
7. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя прямое и обратное линейное сканирование в стационарной области окислительно-
 30 восстановительной пары, сканирования имеют диапазон сканирования от 10 до 200 мВ.
8. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя изменение напряжения сканирования со скоростью, по меньшей мере, 176 мВ/с.
9. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя изменение
 35 напряжения сканирования со скоростью, по меньшей мере, 500 мВ/с.
10. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя изменение напряжения сканирования со скоростью, самое большее, 175 мВ/с.
11. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя изменение
 40 напряжения сканирования со скоростью, самое большее, 50 мВ/с.
12. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя диапазон сканирования от 400 до 600 мВ.
13. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя диапазон сканирования от 600 до 1000 мВ.
- 45 14. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя стационарную область, по меньшей мере, 25 мВ.
15. Способ по п.14, в котором стационарная область сканирования включает в себя изменение электрохимического тока по отношению к напряжению, самое большее,
 50 $\pm 10\%$.
16. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя точку поворота, выбранную для обеспечения стационарной области от 25 до 400 мВ.
17. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя обратное

сканирование, прекращающееся при потенциале от 50 до 500 мВ, в отрицательную сторону от точки поворота.

18. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя обратное сканирование, прекращающееся, когда ток обратного сканирования отклоняется, по меньшей мере, на 25% от стационарного тока.

19. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя, по меньшей мере, одно напряжение, обеспечивающее отношение концентраций между двумя видами частиц окислительно-восстановительной пары, по меньшей мере, 100:1.

20. Способ по п.1, в котором ациклическое сканирование включает в себя, по меньшей мере, один потенциал на рабочем электроде, по меньшей мере, 180 мВ.

21. Способ по п.1, в котором определение включает в себя обработку данных с вычислением половинного интеграла.

22. Способ по п.21, в котором обработка данных с вычислением половинного интеграла включает в себя вычисление половинного интеграла значений тока от ациклического сканирования и определение стационарного половинного интеграла тока.

23. Способ по п.21, в котором обработка данных с вычислением половинного интеграла отделяет, по меньшей мере, один стационарный ток, по меньшей мере, от одного равновесного тока, подверженного влиянию гематокрита.

24. Способ по п.21, в котором половинный интеграл включает в себя, по меньшей мере, одно вычисление интеграла с половинным шагом.

25. Способ по п.21, в котором при обработке данных с вычислением половинного интеграла отсутствует фактор зависимости от времени.

26. Способ по п.21, в котором определение включает в себя компенсацию гематокрита, включающую в себя определение отношения значения пикового тока к значению стационарного тока.

27. Способ по п.1, в котором определение включает в себя дифференциальную обработку данных.

28. Способ по п.27, в котором определение включает в себя компенсацию гематокрита, включающую в себя деление отрицательного пика на положительный пик.

29. Способ по п.1, в котором определение включает в себя обработку данных с помощью вычисления половинной производной.

30. Способ по п.29, в котором обработка данных с вычислением половинной производной преобразует, по меньшей мере, часть области вольтамперометрического тока в пик.

31. Способ по п.1, в котором определение включает в себя введение значения, по меньшей мере, одного стационарного тока в компенсационное уравнение.

32. Способ по п.1, в котором определение концентрации анализируемого вещества в образце обеспечивает значение концентрации, более близкое к тому, которое получают от эталонного инструмента, чем, если бы ациклическое сканирование заменили кулонометрией.

33. Измерительное устройство для определения концентрации анализируемого вещества в образце, содержащее:

контакты; и

электронную схему в электрическом соединении с контактами, причем электронная схема содержит:

электрическое зарядное устройство и процессор в электрическом соединении, где

процессор находится в электрическом соединении со средой для хранения информации, считываемой компьютером, где

процессор измеряет ток от контактов, и где

среда для хранения информации, считываемой компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который, когда исполняется процессором, определяет концентрацию анализируемого вещества в образце по току, измеряемому на контактах, и где среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который, когда исполняется процессором, заставляет электрическое зарядное устройство прикладывать ациклическое сканирование через контакты, при этом ациклическое сканирование включает в себя прямое и обратное сканирование, где процессор измеряет ток на контактах как функцию изменения напряжения, и где ациклическое сканирование включает в себя большее количество одного из прямого или обратного пиков тока, чем другого пика тока, или начинается и заканчивается, по существу, при одинаковом напряжении, когда сканирование начинается, самое большее, за ± 20 мВ от формального потенциала E° окислительно-восстановительной пары или, по существу, исключают окислительные и восстановительные пики окислительно-восстановительной пары.

34. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя прямое и обратное линейное сканирование в стационарной области окислительно-восстановительной пары, причем сканирования имеют диапазон сканирования от 10 до 200 мВ.

35. Устройство по п.33, в котором устройство приспособлено для приема и содержания сенсорной полоски, причем сенсорная полоска содержит первый и второй контакты сенсорной полоски в электрическом соединении с контактами, первый контакт сенсорной полоски в электрическом соединении с рабочим электродом и второй контакт сенсорной полоски в электрическом соединении с противоэлектродом через проводники, где первый слой реагента находится, по меньшей мере, на одном из электродов, первый слой реагента содержит оксидоредуктазу и, по меньшей мере, один вид из окислительно-восстановительной пары.

36. Устройство по п.35, в котором первый слой реагента находится, по меньшей мере, на рабочем электроде.

37. Устройство по п.36, дополнительно содержащее:

второй слой реагента на противоэлектроде, причем второй слой реагента содержит, по меньшей мере, один вид из окислительно-восстановительной пары, где первый слой реагента находится на рабочем электроде.

38. Устройство по п.35, в котором электрическая схема содержит средства для приложения ациклического сканирования к сенсорной полоске.

39. Устройство по п.33, в котором анализируемое вещество представляет собой глюкозу.

40. Устройство по п.33, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который, когда исполняется процессором, заставляет процессор осуществлять обработку данных, выбранную из группы, состоящей из вычисления половинного интеграла, производной, половинной производной и их сочетаний по отношению к току, измеренному на контактах.

41. Устройство по п.33, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который,

когда исполняется процессором, заставляет процессор осуществлять обработку данных, включающих в себя обработку данных с вычислением половинного интеграла.

42. Устройство по п.41, в котором обработка данных половинного интегрирования включает в себя вычисление половинного интеграла значений тока, измеренных на контактах, и определение стационарного половинного интеграла тока.

43. Устройство по п.41, в котором обработка данных с вычислением половинного интеграла отделяет, по меньшей мере, один стационарный ток, по меньшей мере, от одного подверженного влиянию гематокрита равновесного тока.

44. Устройство по п.41, в котором в обработке данных с вычислением половинного интеграла отсутствует фактор зависимости от времени.

45. Устройство по п.41, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который когда исполняется процессором, осуществляет компенсацию гематокрита, включающую в себя отношение значения пикового тока к значению стационарного тока.

46. Устройство по п.33, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который, когда исполняется процессором, заставляет процессор осуществлять обработку данных, включающую в себя обработку данных с вычислением производной.

47. Устройство по п.46, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который когда исполняется процессором, осуществляет компенсацию гематокрита, включающую в себя деление отрицательного пика на положительный пик.

48. Устройство по п.33, в котором среда для хранения информации, считываемая компьютером, содержит программный код, считываемый компьютером, который, когда исполняется процессором, заставляет процессор осуществлять обработку данных, включающую в себя обработку данных с вычислением половинной производной.

49. Устройство по п.48, в котором обработка данных с вычислением половинной производной преобразует, по меньшей мере, часть области вольтамперометрического тока в пик.

50. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя диапазон сканирования от 400 до 600 мВ.

51. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя диапазон сканирования от 600 до 1000 мВ.

52. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя стационарную область, по меньшей мере, 25 мВ.

53. Устройство по п.52, в котором стационарная область включает в себя изменение электрохимического тока по отношению к напряжению, самое большее, $\pm 10\%$.

54. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя точку поворота, выбранную для обеспечения стационарной области от 25 до 400 мВ.

55. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя обратное сканирование, прекращающееся при потенциале от 50 до 500 мВ, отрицательном, от точки поворота.

56. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя обратное сканирование, прекращающееся, когда ток обратного сканирования отклоняется, по меньшей мере, на 25% от стационарного тока.

57. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя, по меньшей мере, одно напряжение, обеспечивающее отношение концентраций, по меньшей мере, 100:1 между двумя видами частиц окислительно-восстановительной пары.

5 58. Устройство по п.33, в котором ациклическое сканирование включает в себя, по меньшей мере, один потенциал на рабочем электроде, по меньшей мере, 180 мВ.

10

15

20

25

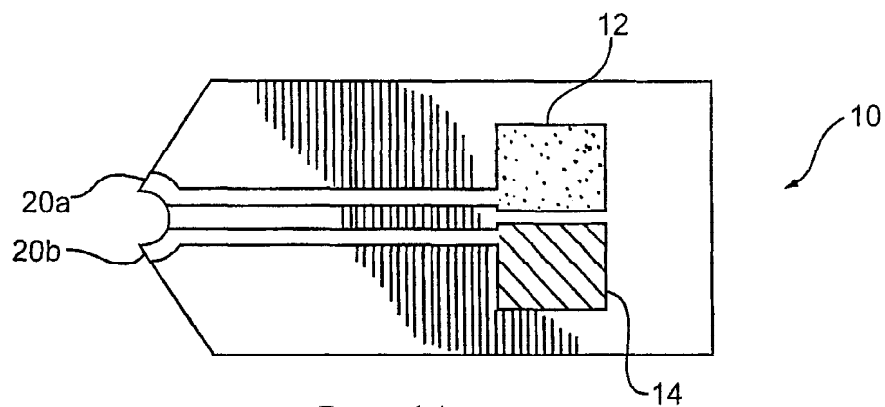
30

35

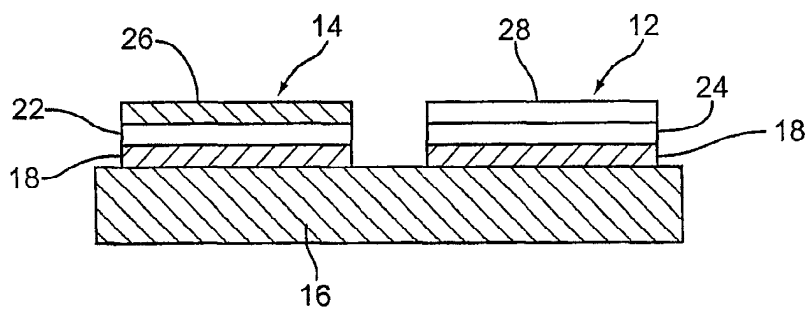
40

45

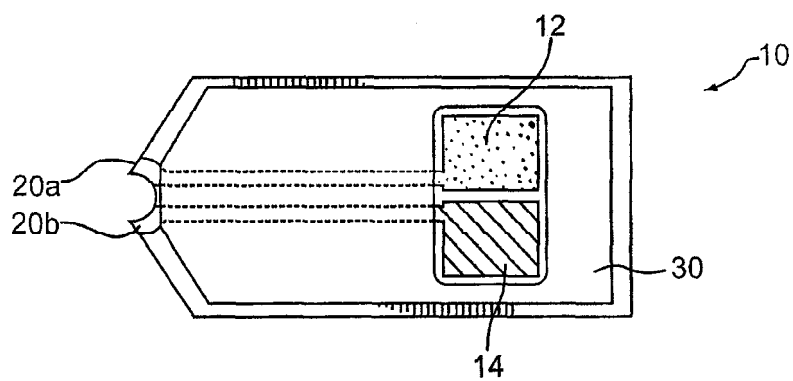
50



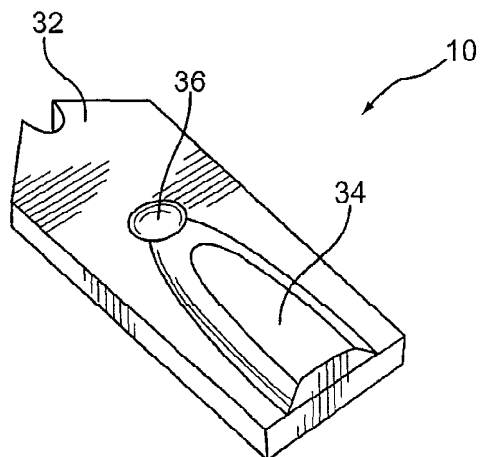
Фиг. 1А



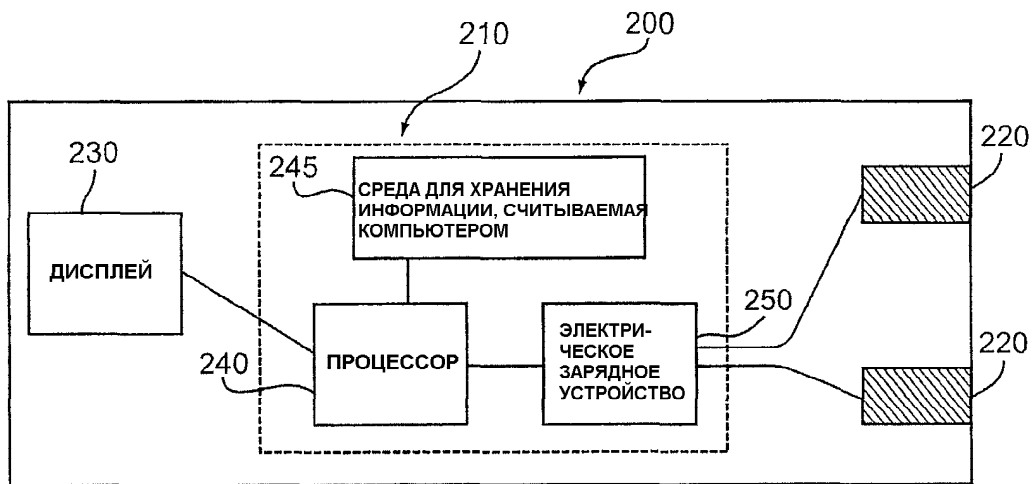
Фиг. 1В



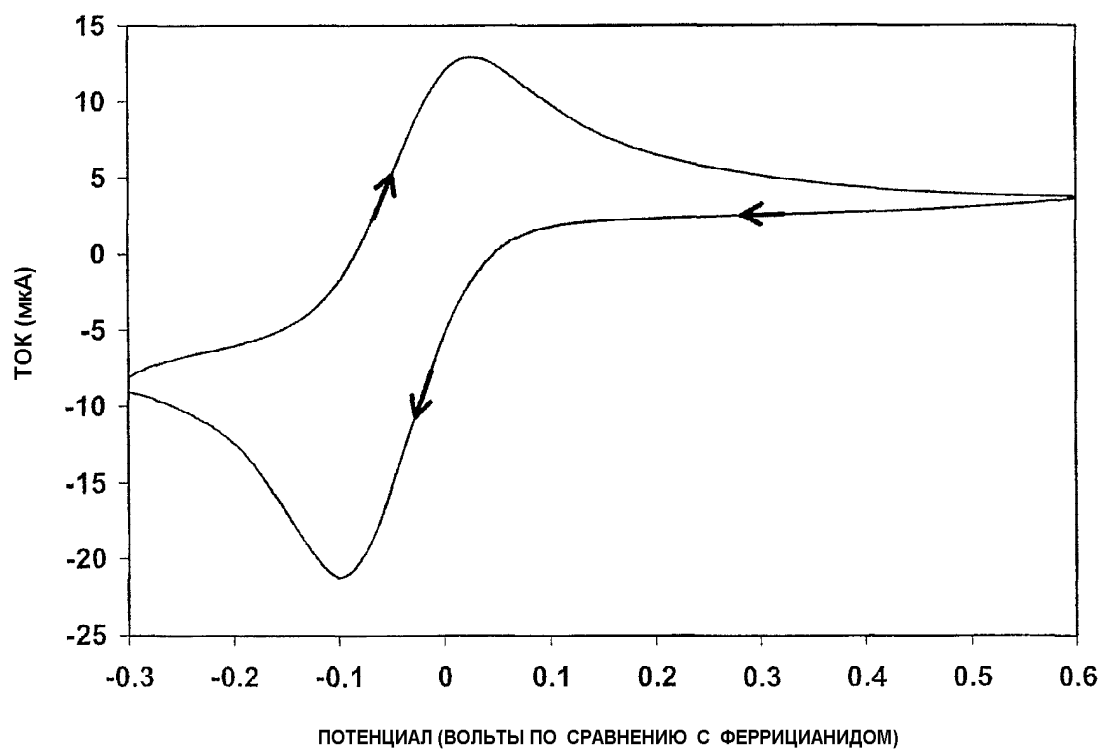
Фиг. 2А



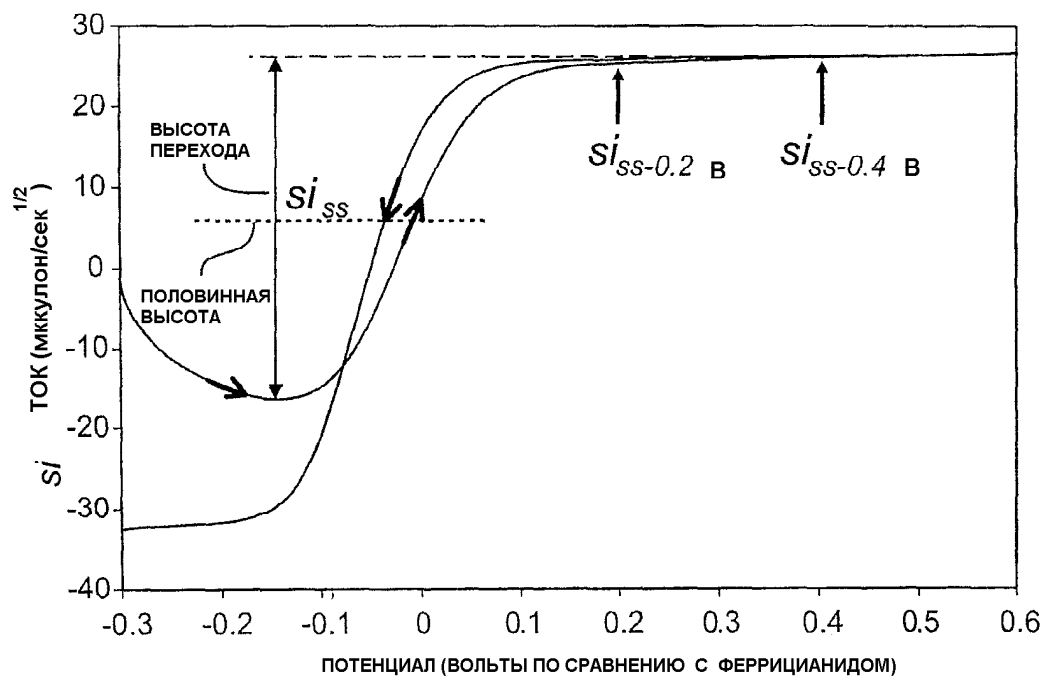
Фиг. 2В



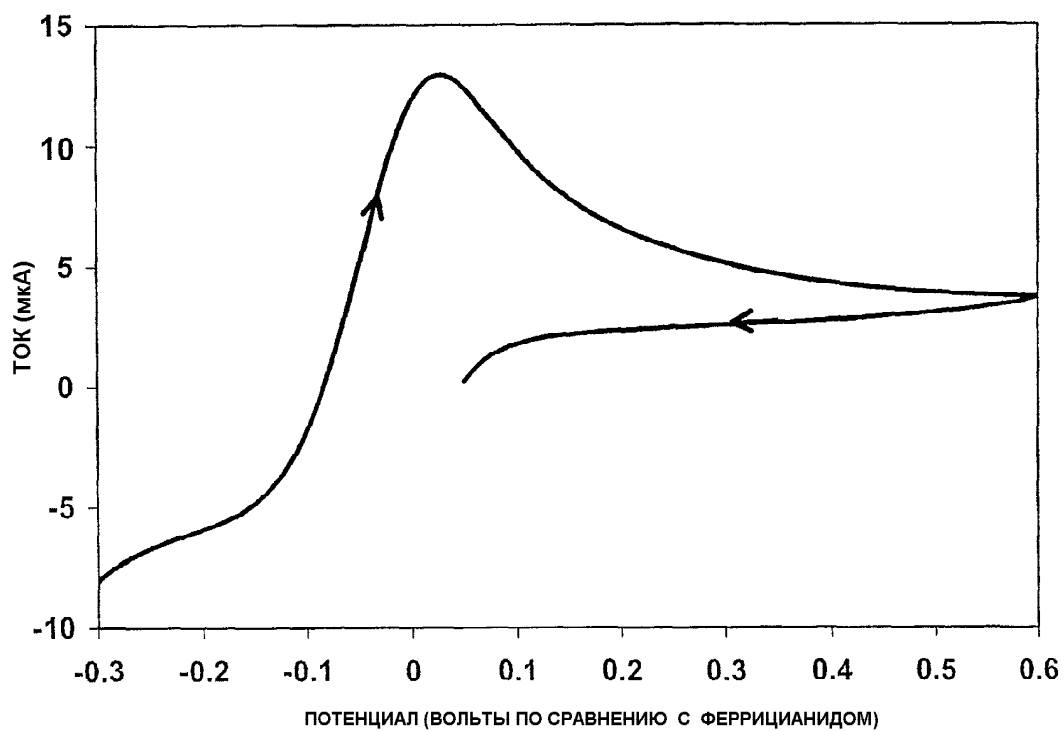
Фиг. 2С



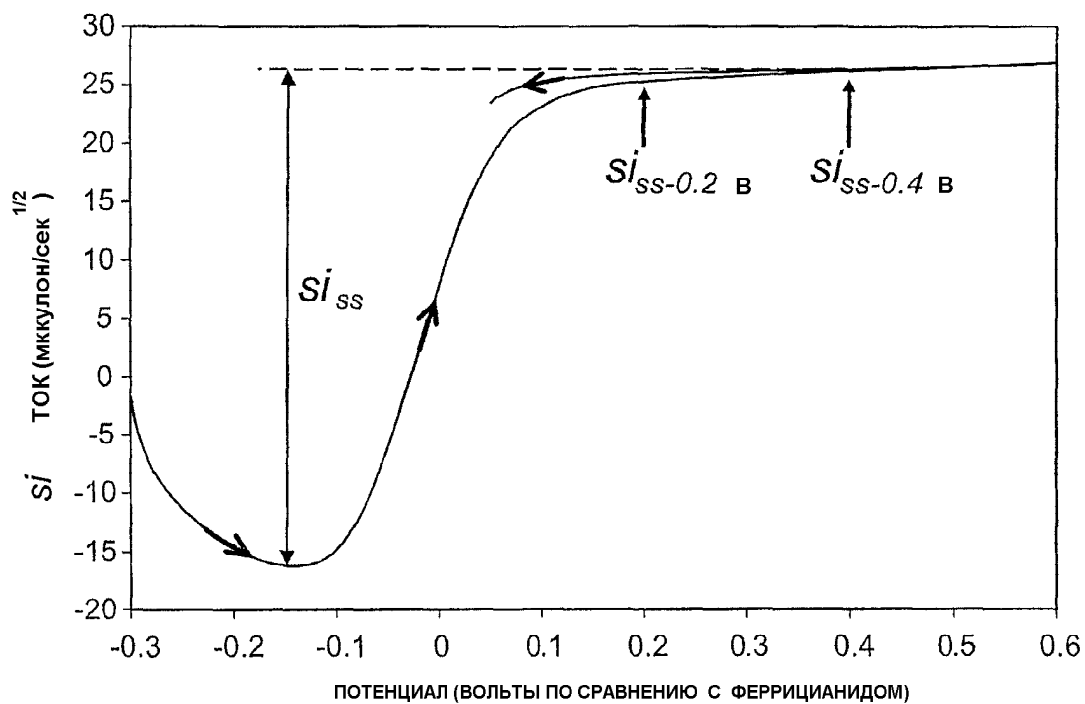
Фиг. 3А



Фиг. 3В

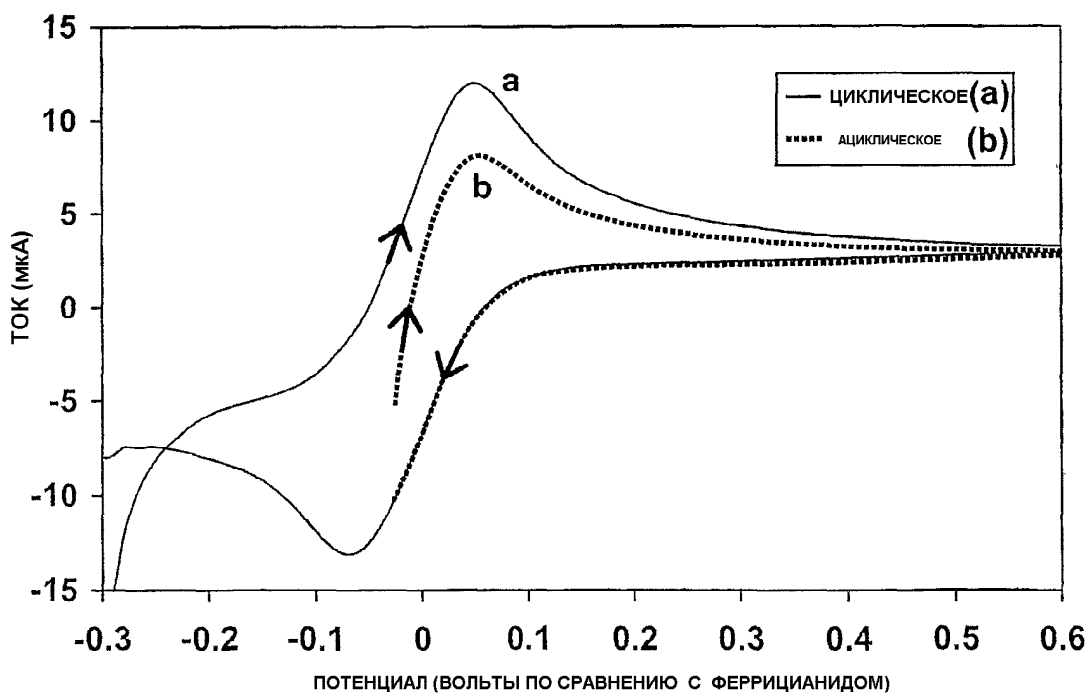


Фиг. 3С



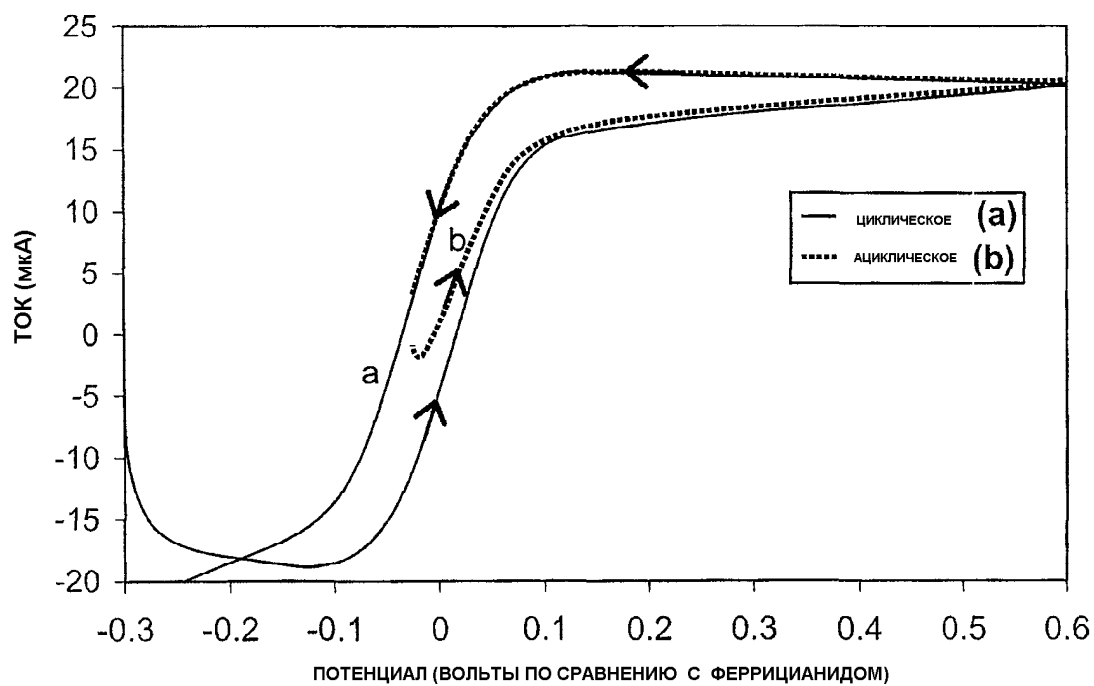
Фиг. 3D

СРАВНЕНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО И АЦИКЛИЧЕСКОГО СКАНИРОВАНИЯ, 0,025 В/сек

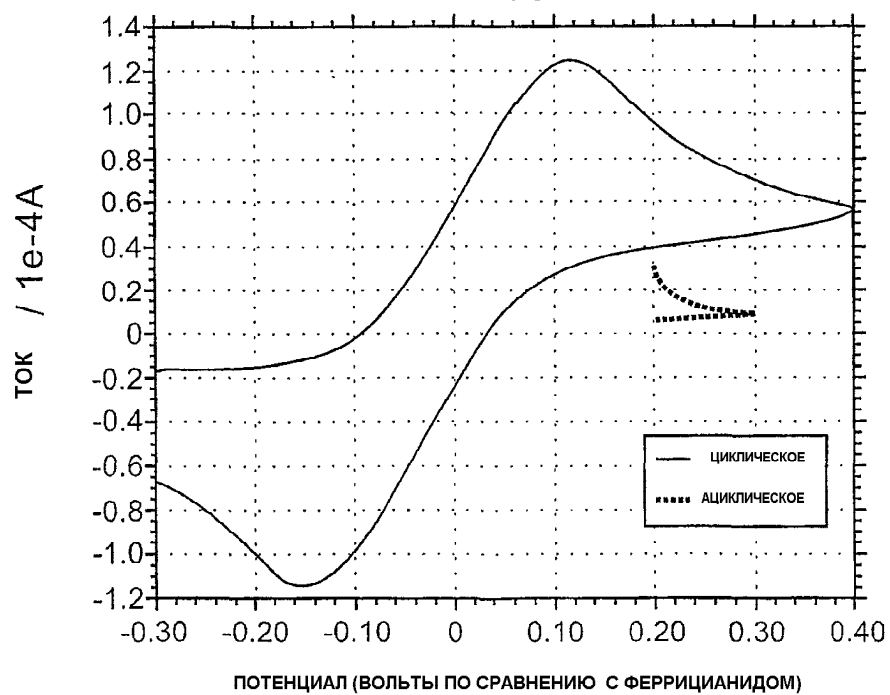


Фиг. 3Е

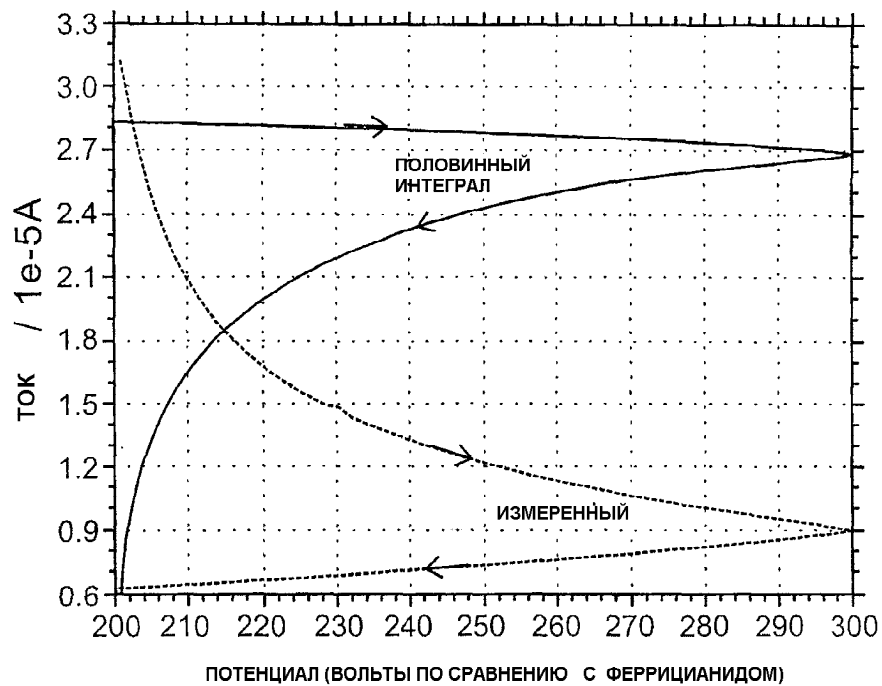
ПОЛОВИННЫЙ ИНТЕГРАЛ ЦИКЛИЧЕСКОГО И АЦИКЛИЧЕСКОГО СКАНИРОВАНИЯ, 0,025 В/сек



Фиг. 3F

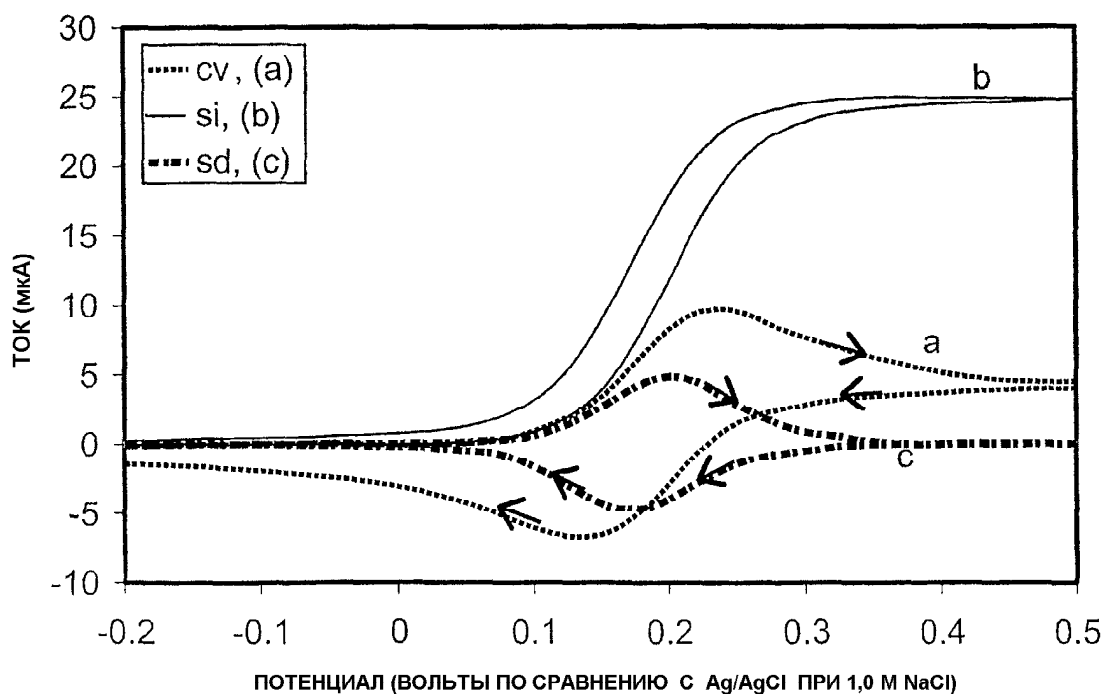


Фиг. 3G

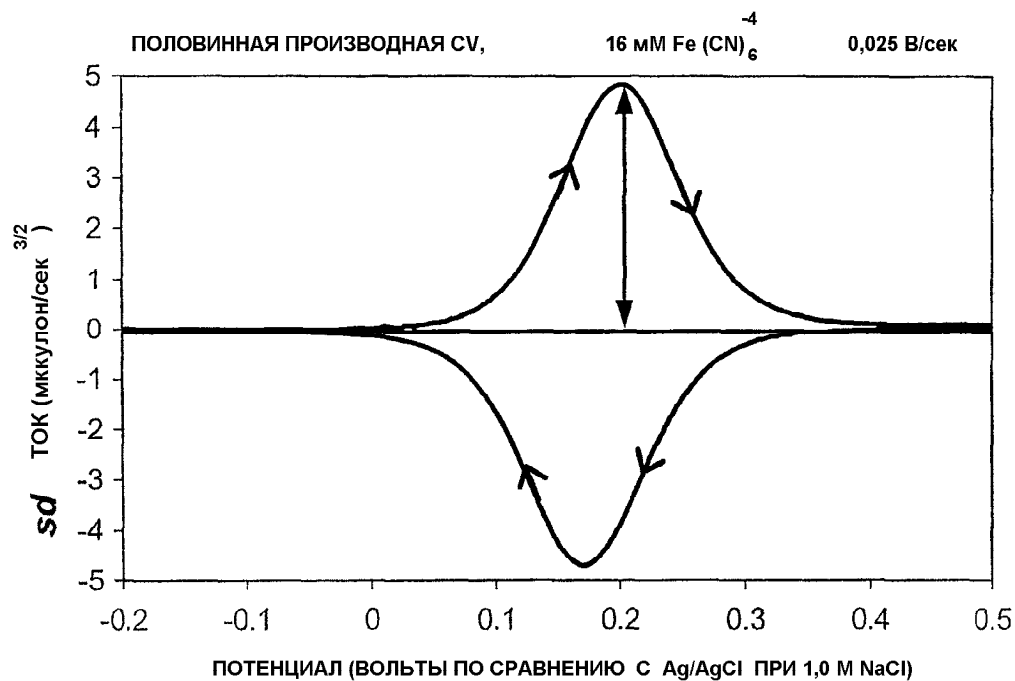


Фиг. 3Н

CV, si и sd для 16 мМ Fe(CN)₆⁴⁻ в WB, 0,025 В/сек

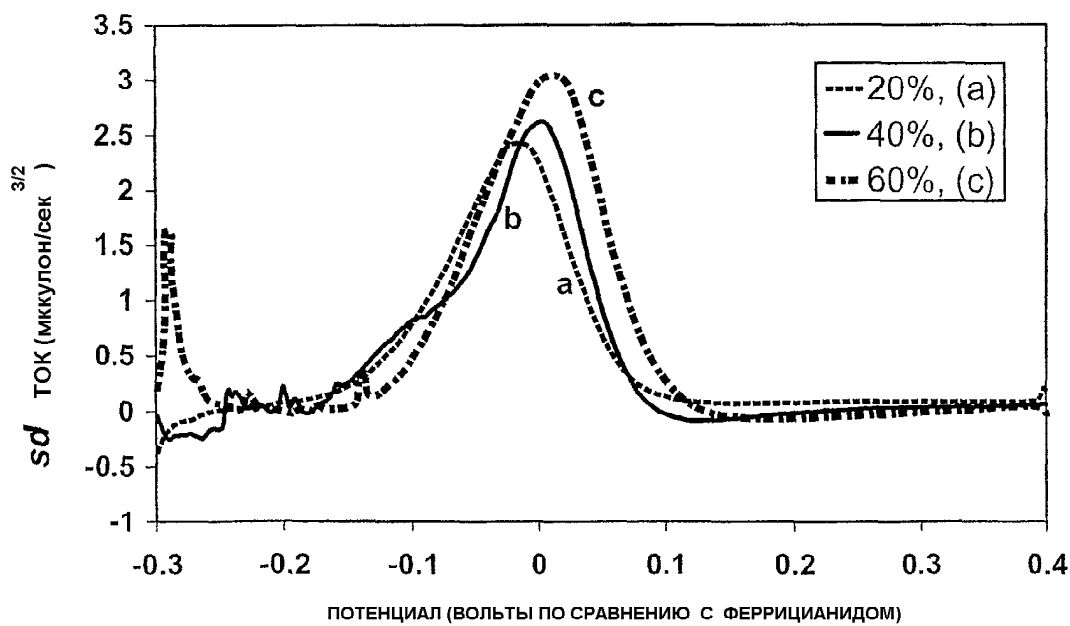


Фиг. 4А



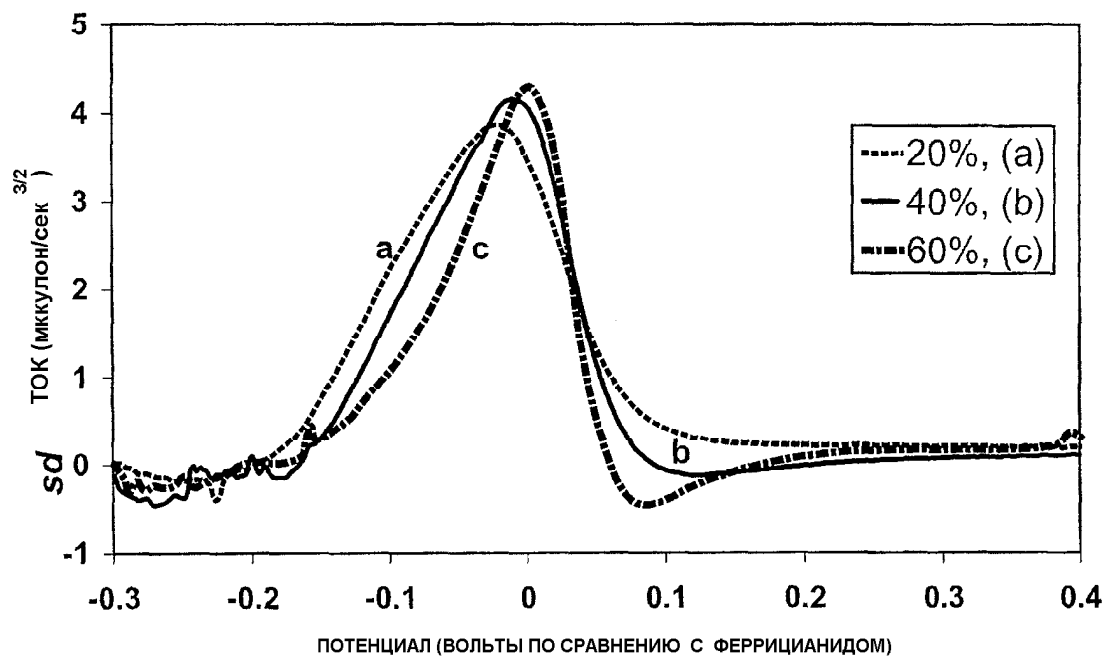
Фиг. 4В

ПОЛОВИННАЯ ПРОИЗВОДНАЯ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ С
ЛИНЕЙНЫМ СКЕНИРОВАНИЕМ, 0,025 В/сек, 50 мг/дл WB



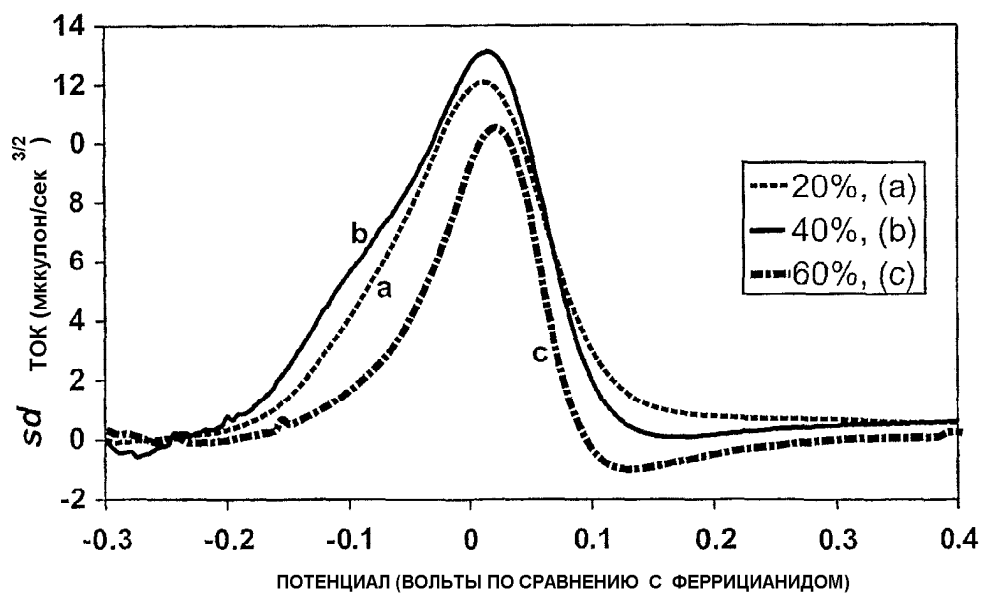
Фиг. 4С

ПОЛОВИННАЯ ПРОИЗВОДНАЯ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ С
ЛИНЕЙНЫМ СКАНИРОВАНИЕМ, 0,025 В/сек, 100 мг/дл WB



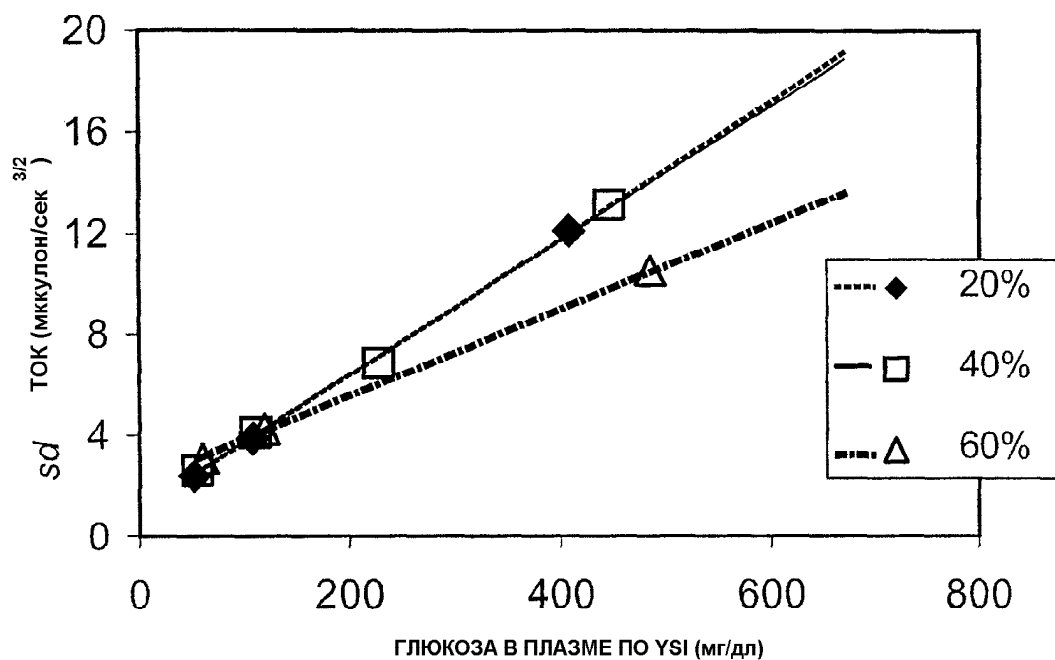
Фиг. 4D

ПОЛОВИННАЯ ПРОИЗВОДНАЯ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ С
ЛИНЕЙНЫМ СКАНИРОВАНИЕМ, 0,025 В/сек, 400 мг/дл WB



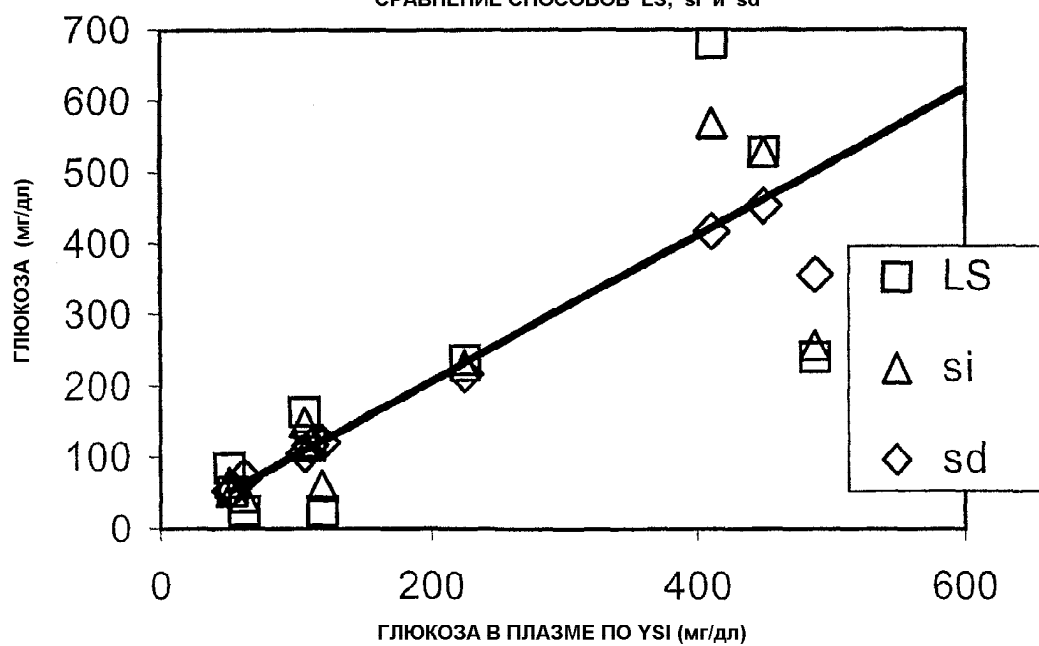
Фиг. 4E

0.025 В/СЕК, WB

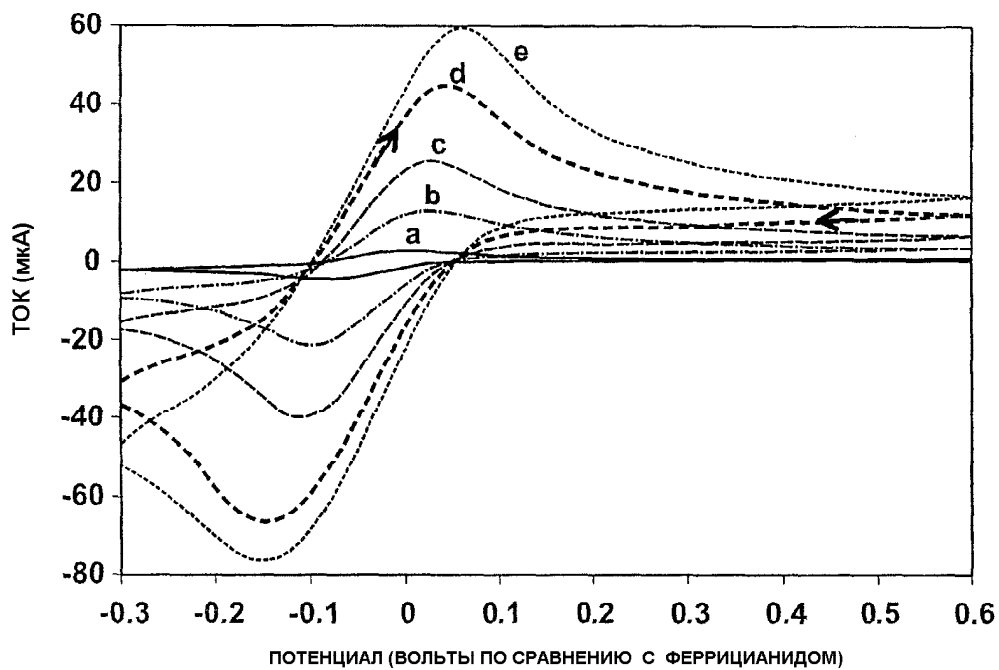


Фиг. 4F

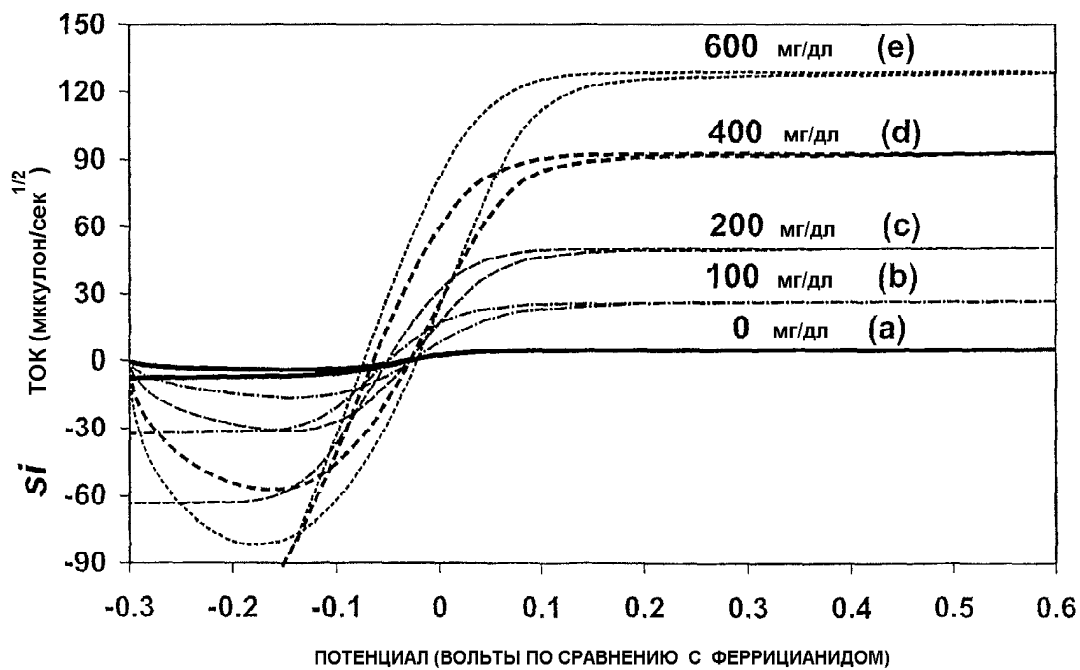
СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ LS, si и sd



Фиг. 4G

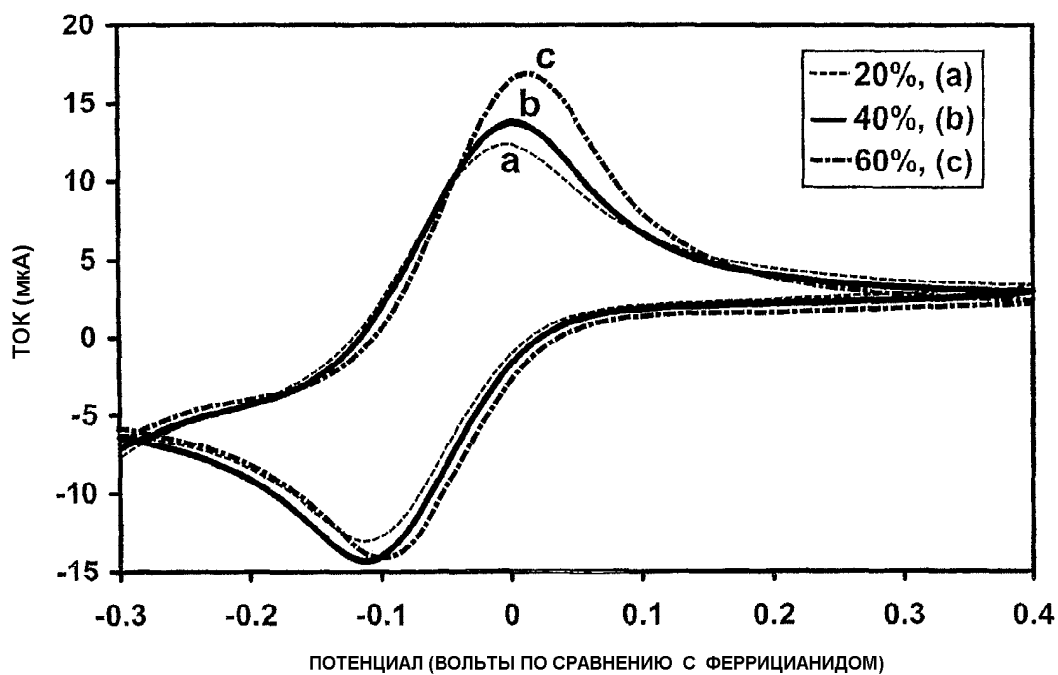


Фиг. 5



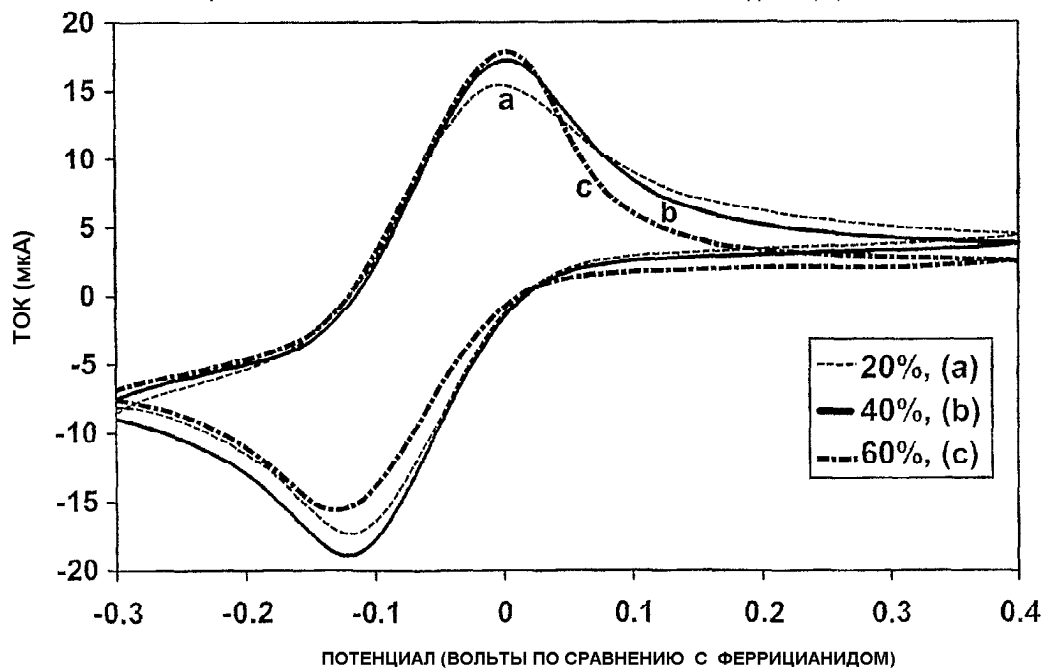
Фиг. 6

ЦИКЛИЧЕСКИЕ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ ПРИ 50 мг/дл WB, 0,025 В/сек



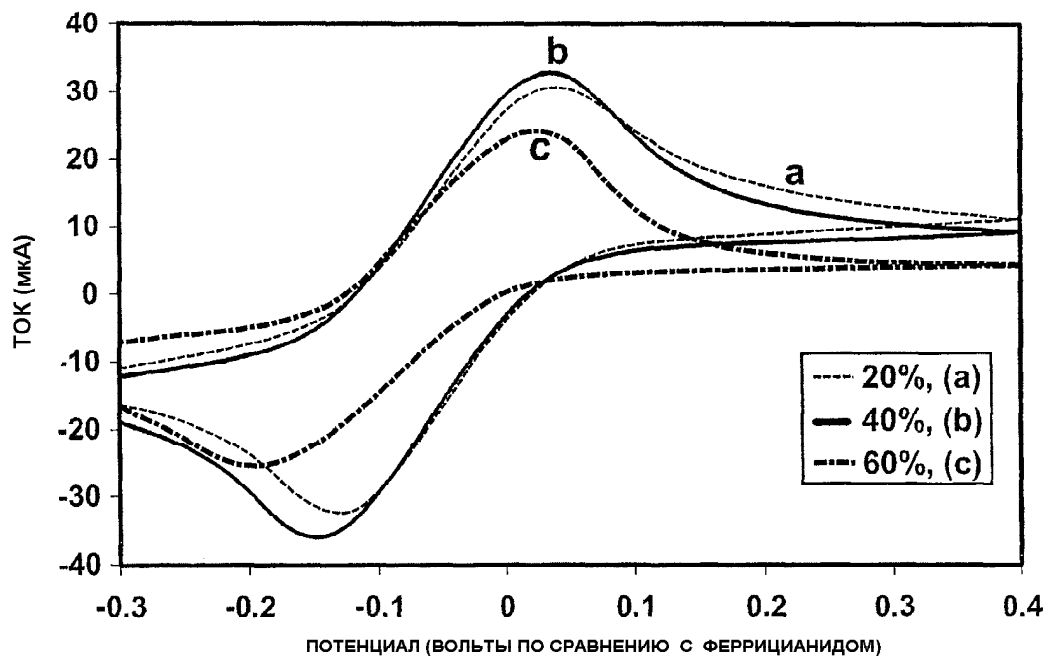
Фиг. 7А

ЦИКЛИЧЕСКИЕ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ ПРИ 100 мг/дл WB, 0,025 В/сек



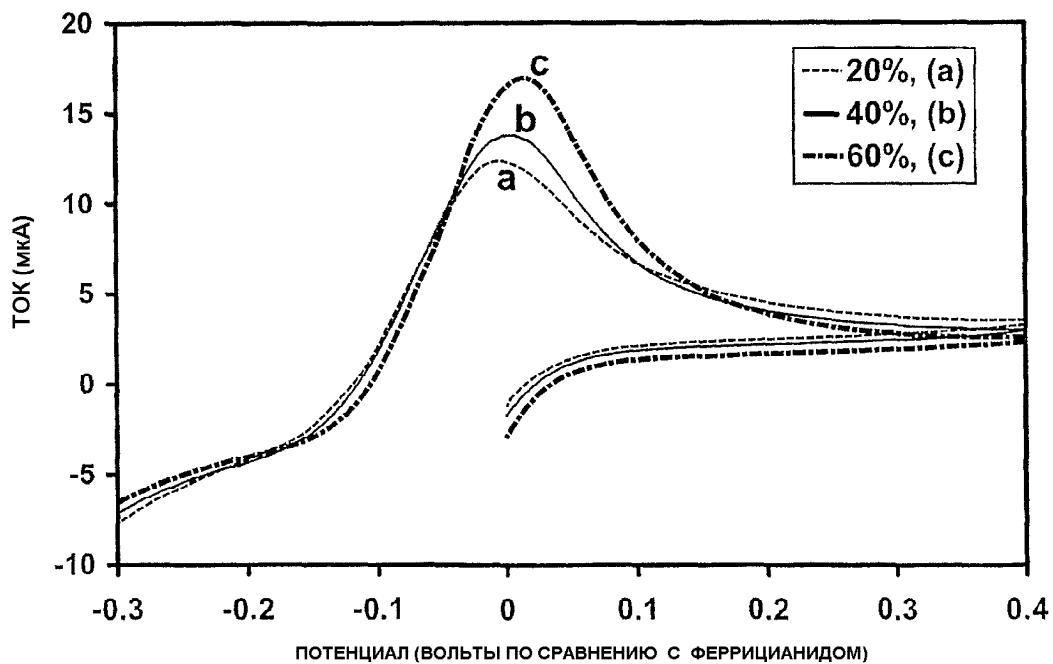
Фиг. 7В

ЦИКЛИЧЕСКИЕ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ ПРИ 400 мг/дл WB, 0,025 В/сек

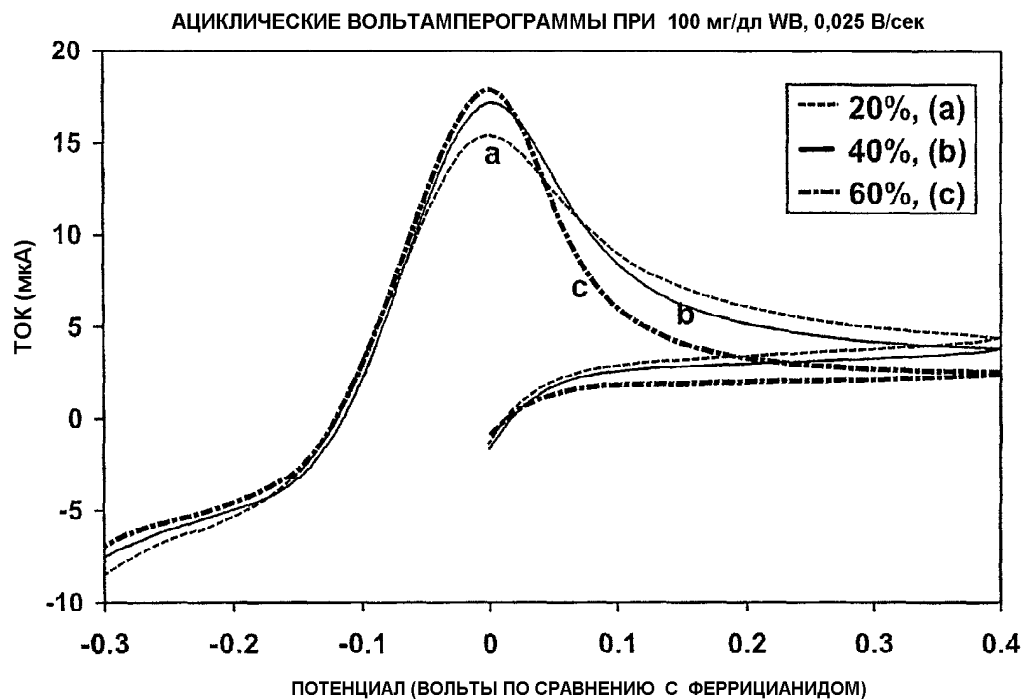


Фиг. 7С

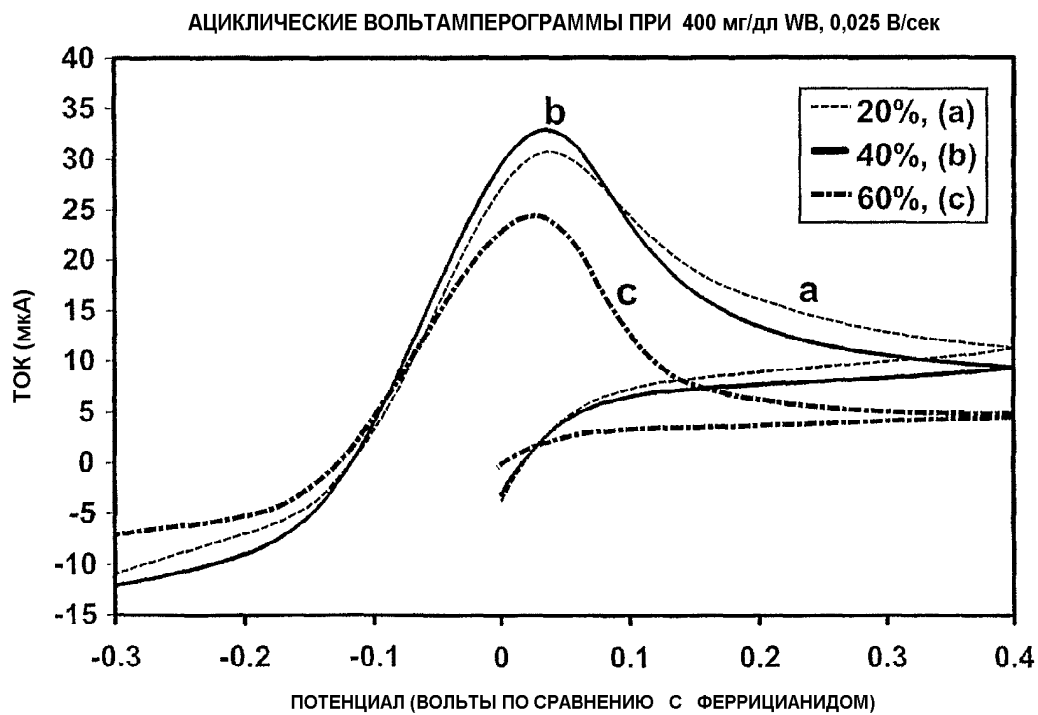
АЦИКЛИЧЕСКИЕ ВОЛЬТАМПЕРОГРАММЫ ПРИ 50 мг/дл WB, 0,025 В/сек



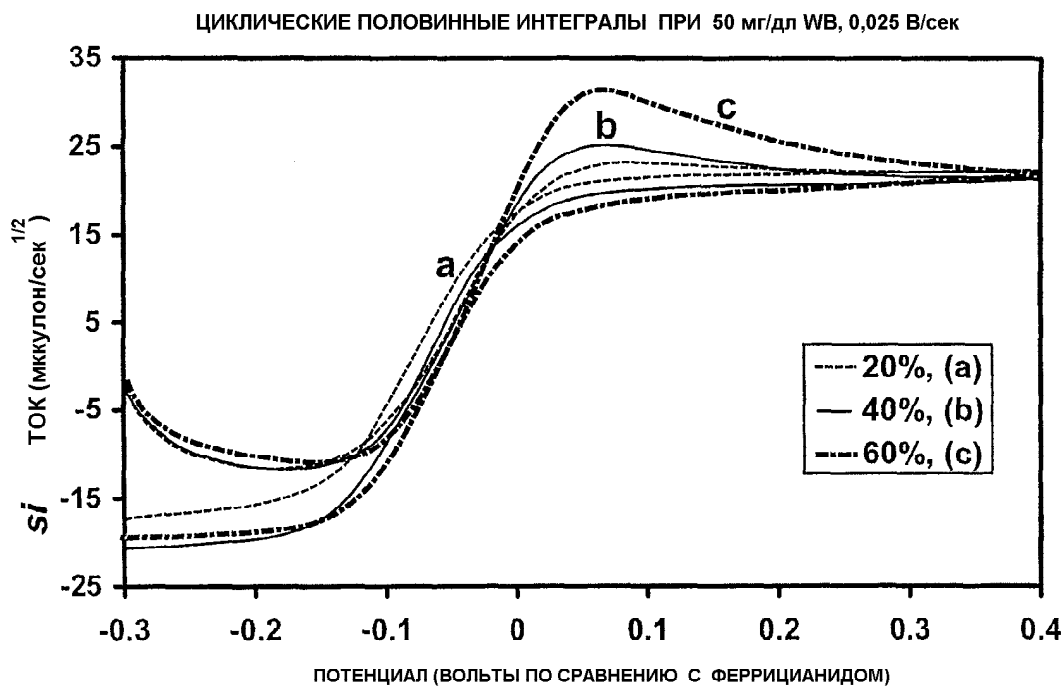
Фиг. 7D



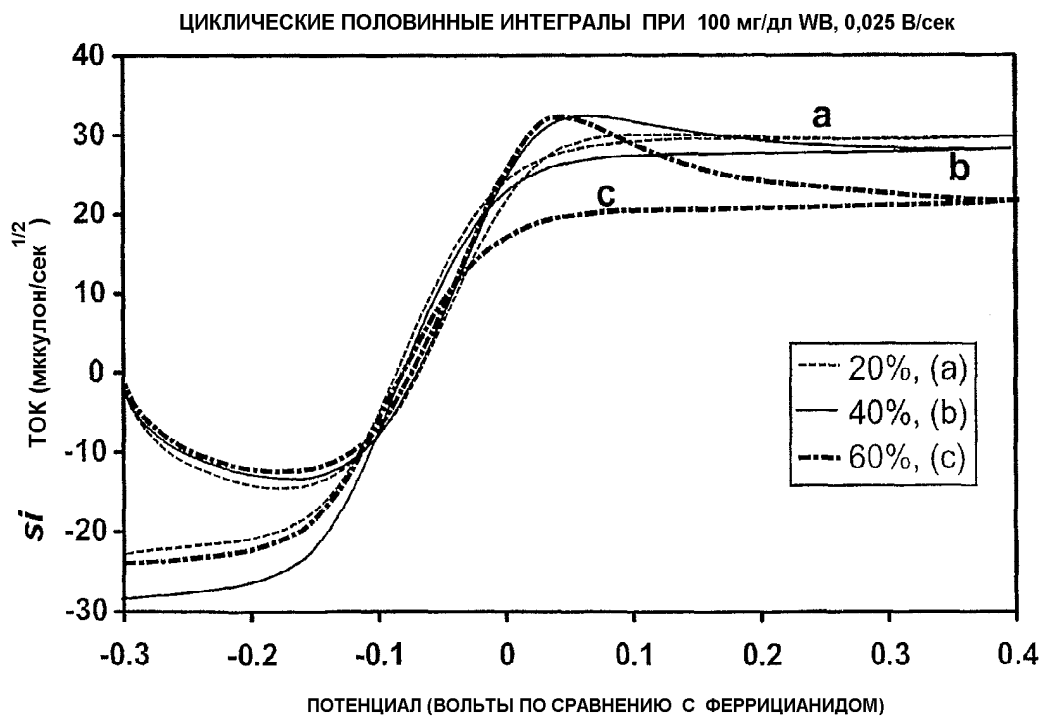
Фиг. 7Е



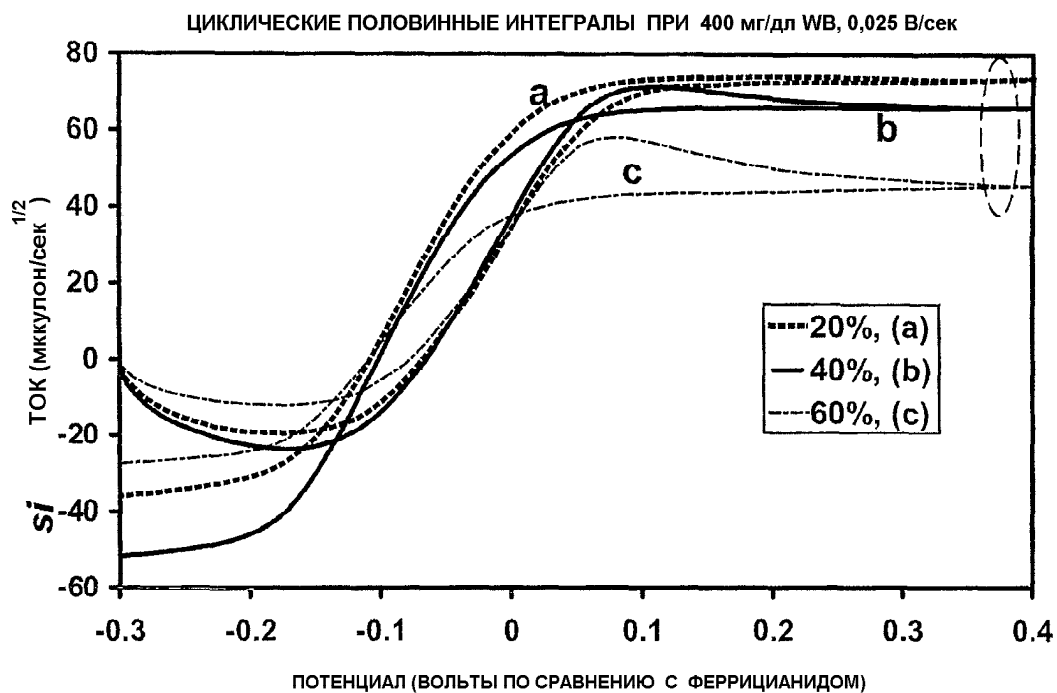
Фиг. 7F



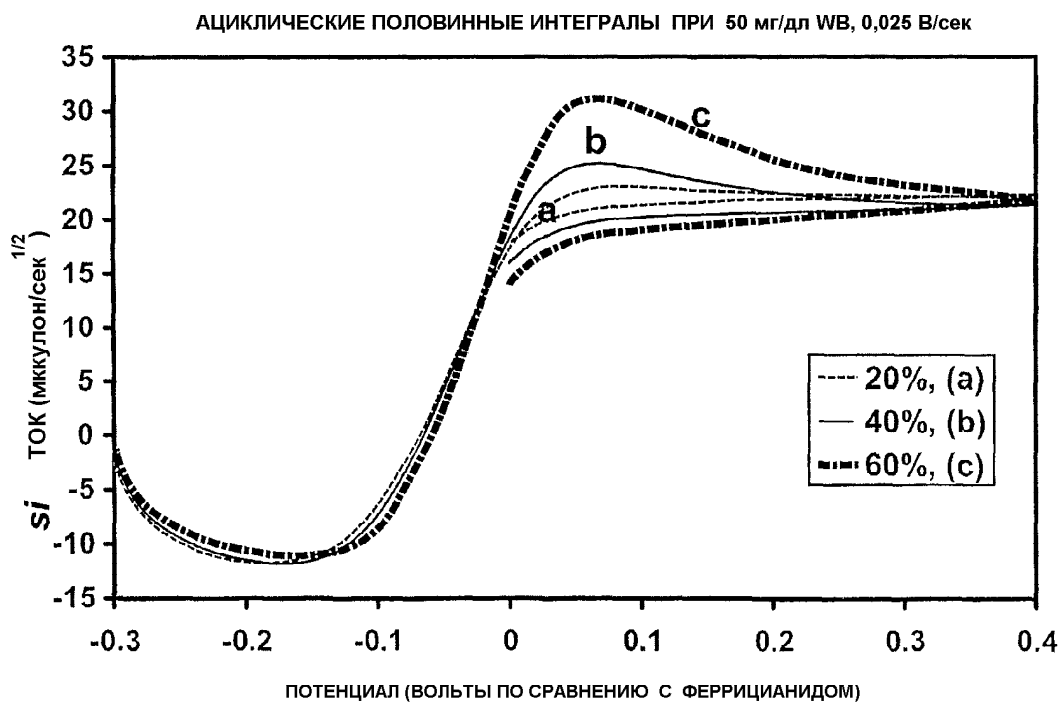
Фиг. 8А



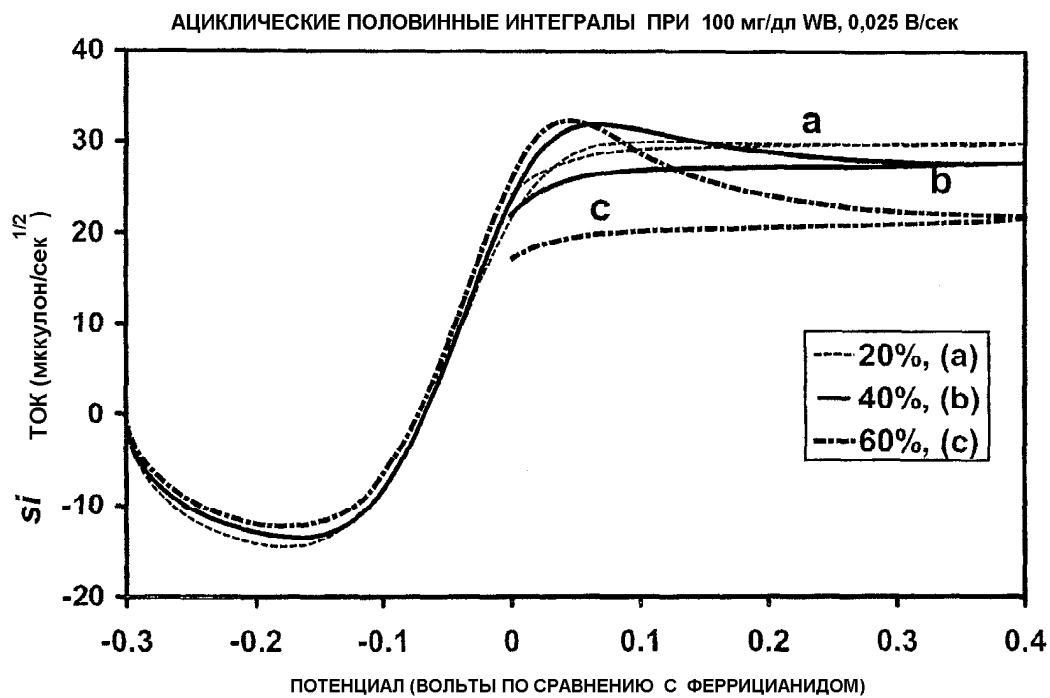
Фиг. 8В



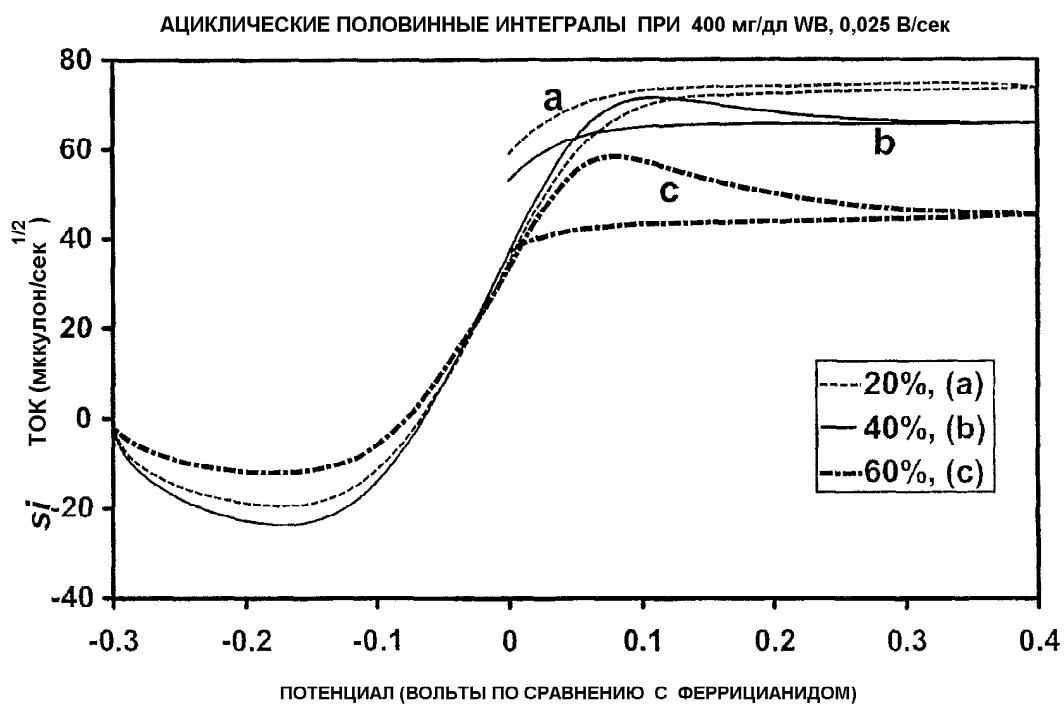
Фиг. 8С



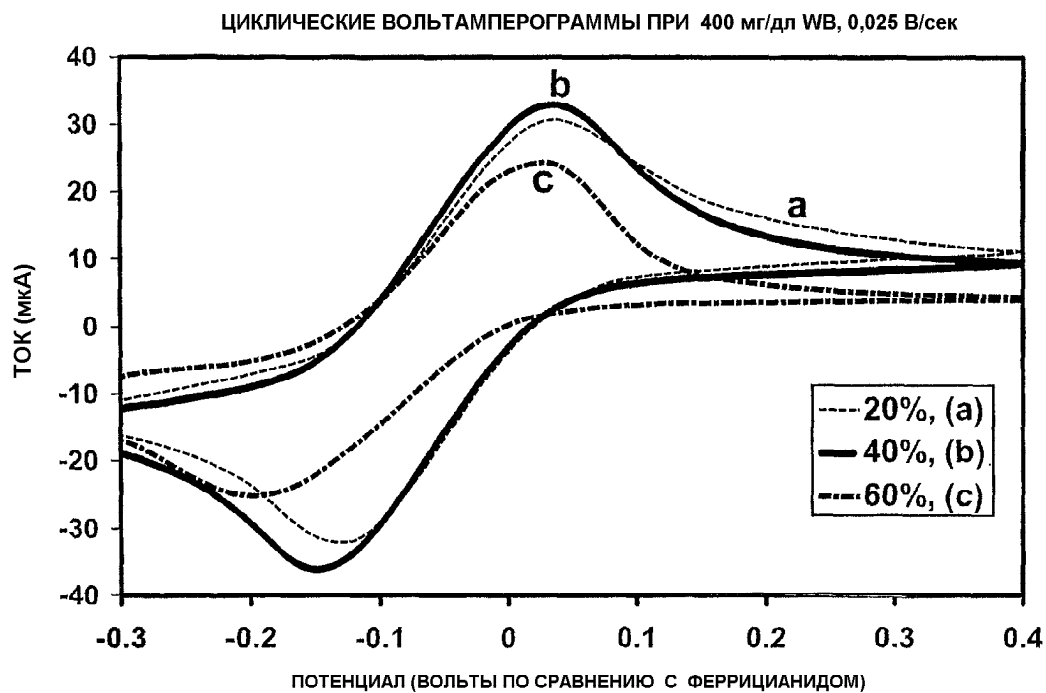
Фиг. 8D



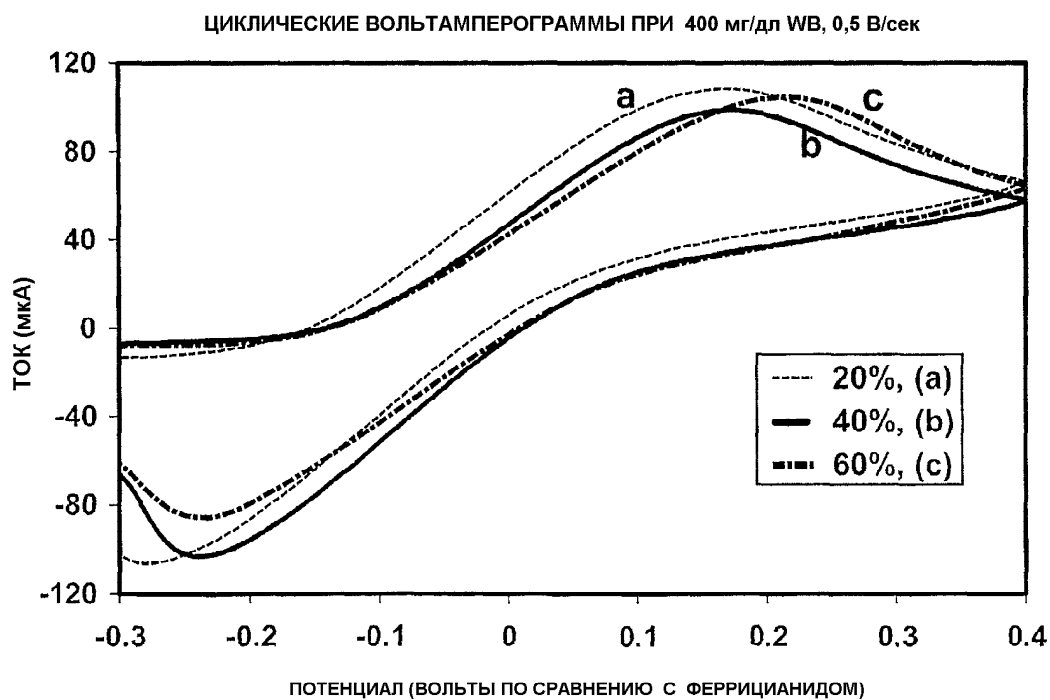
Фиг. 8Е



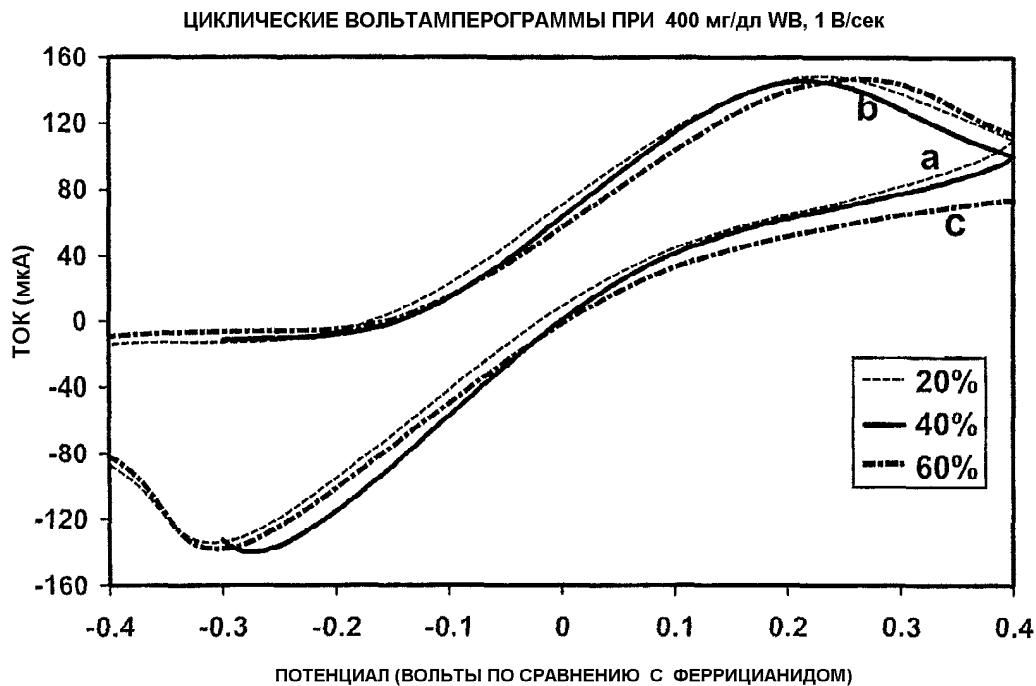
Фиг. 8F



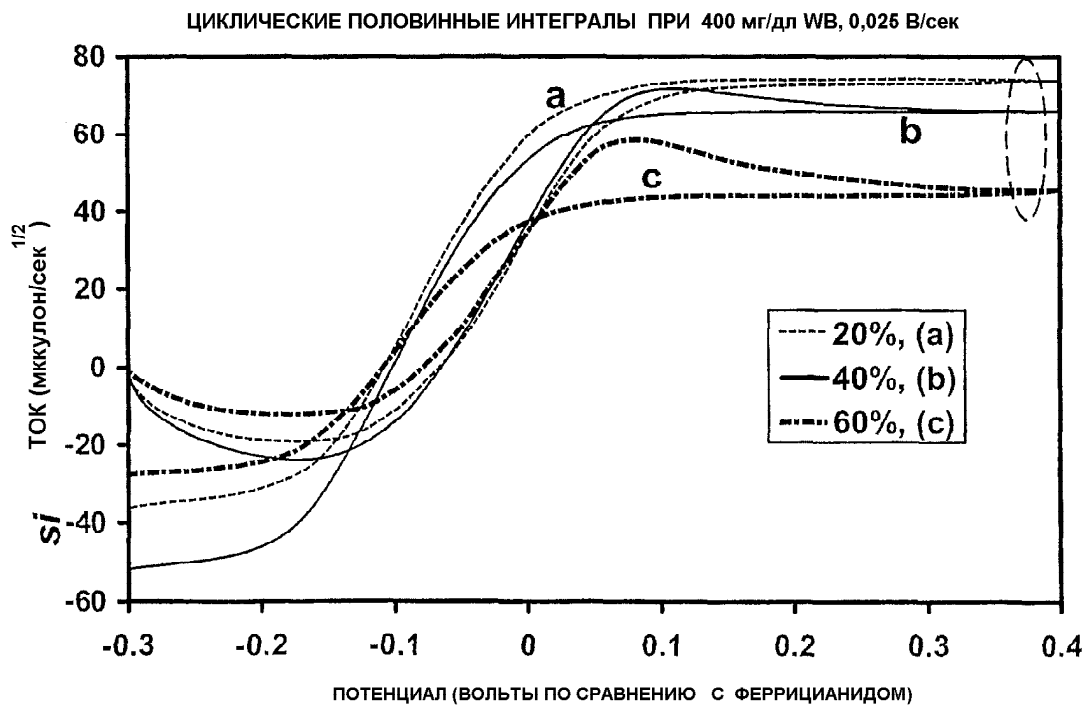
Фиг. 9А



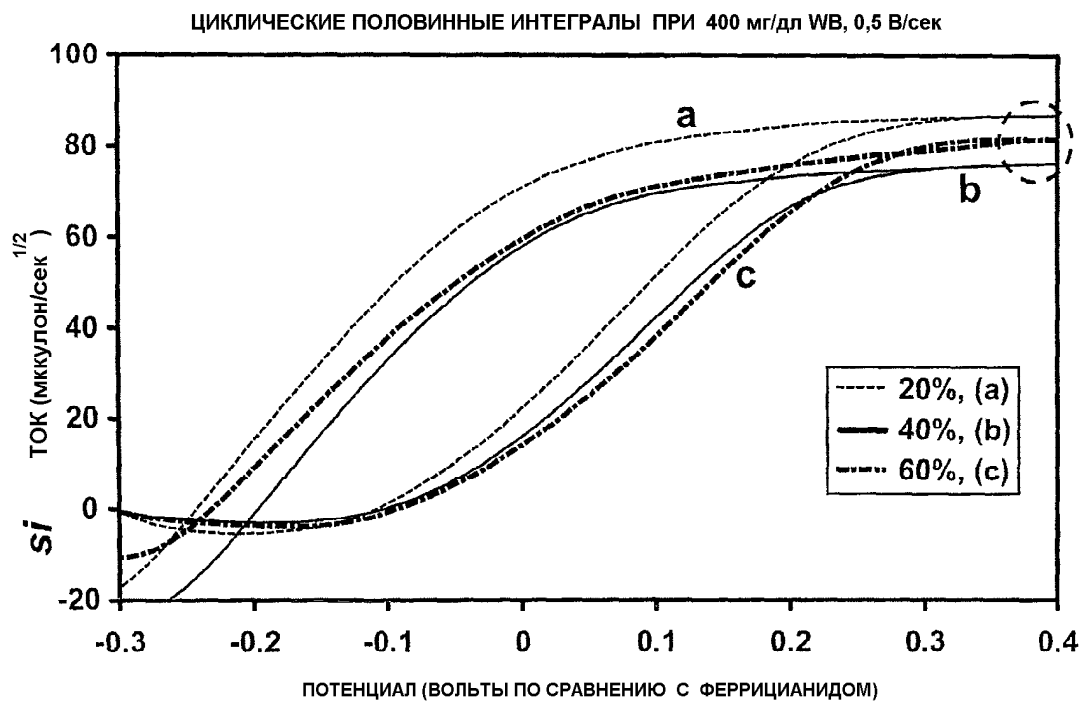
Фиг. 9В



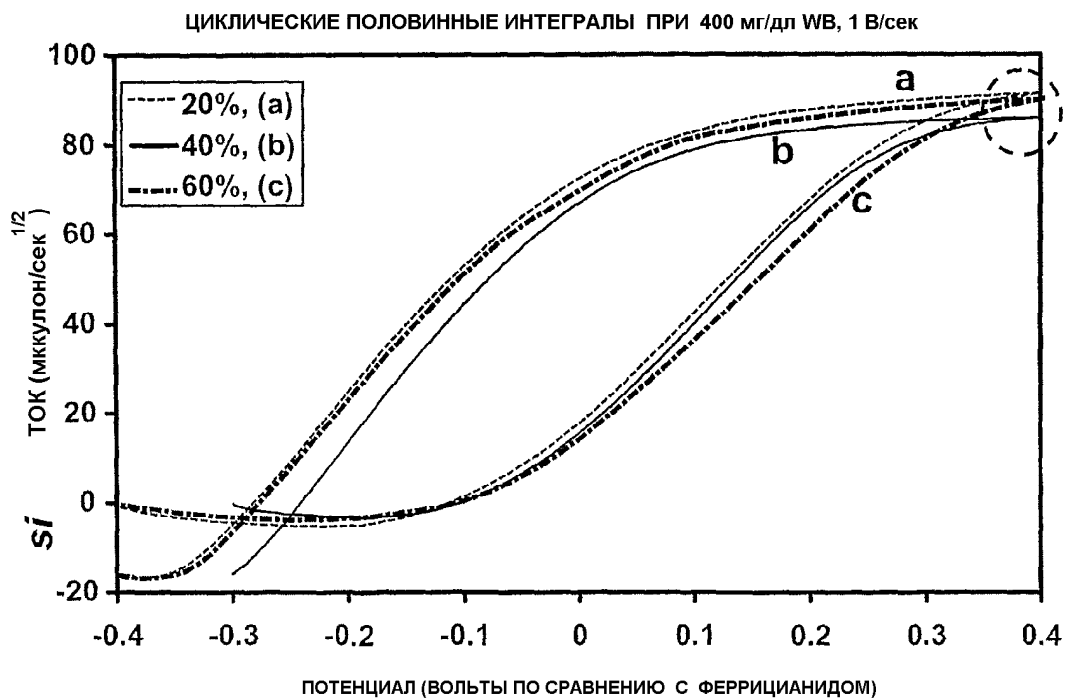
Фиг. 9С



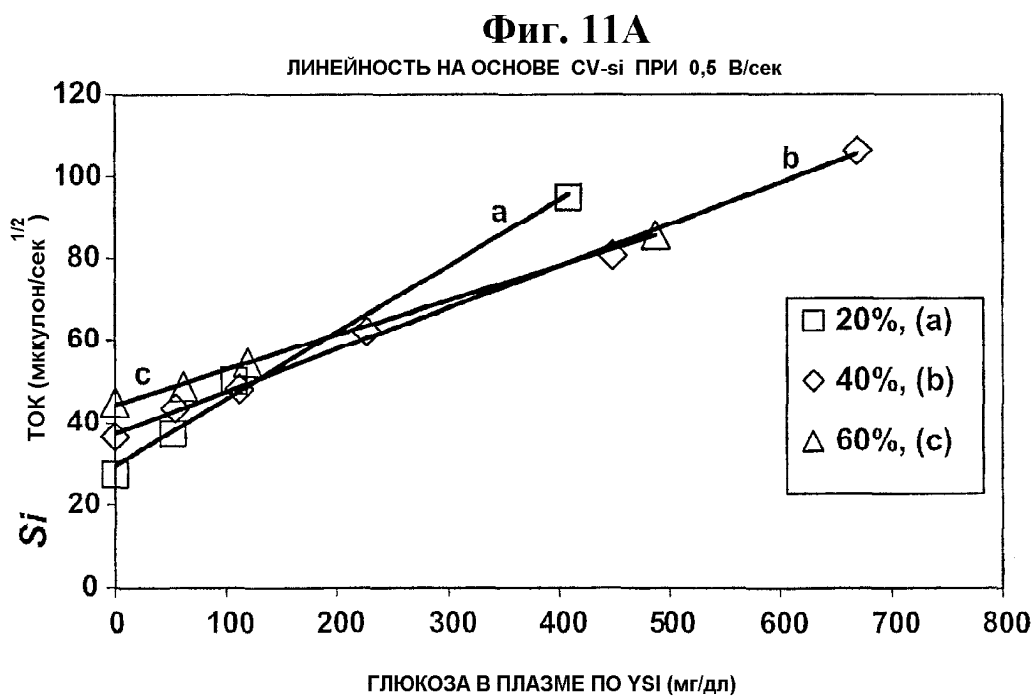
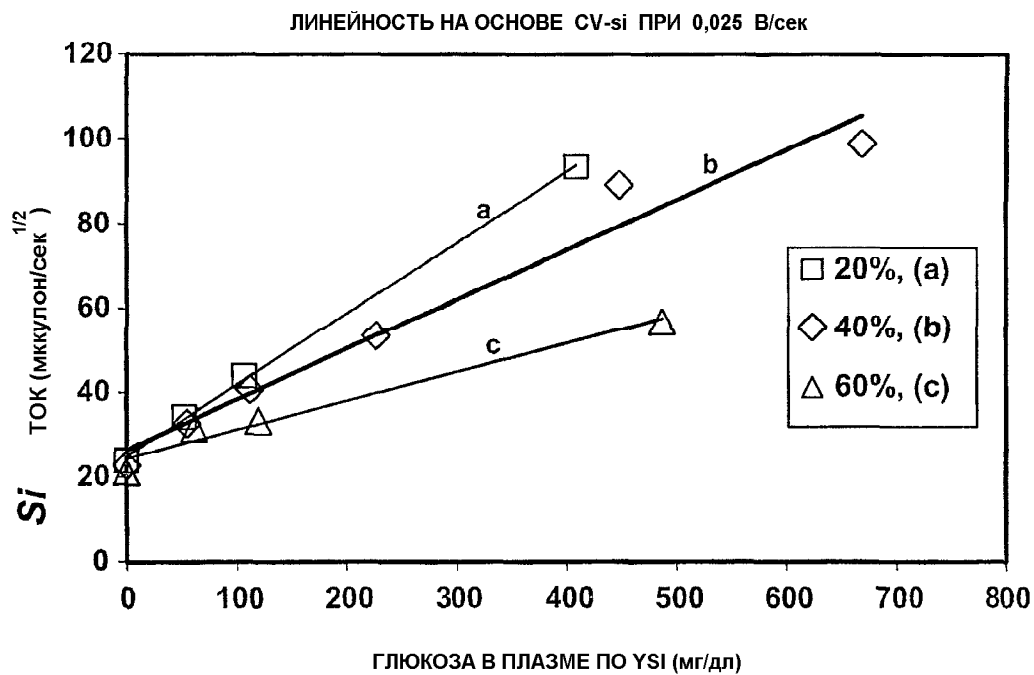
Фиг. 10А

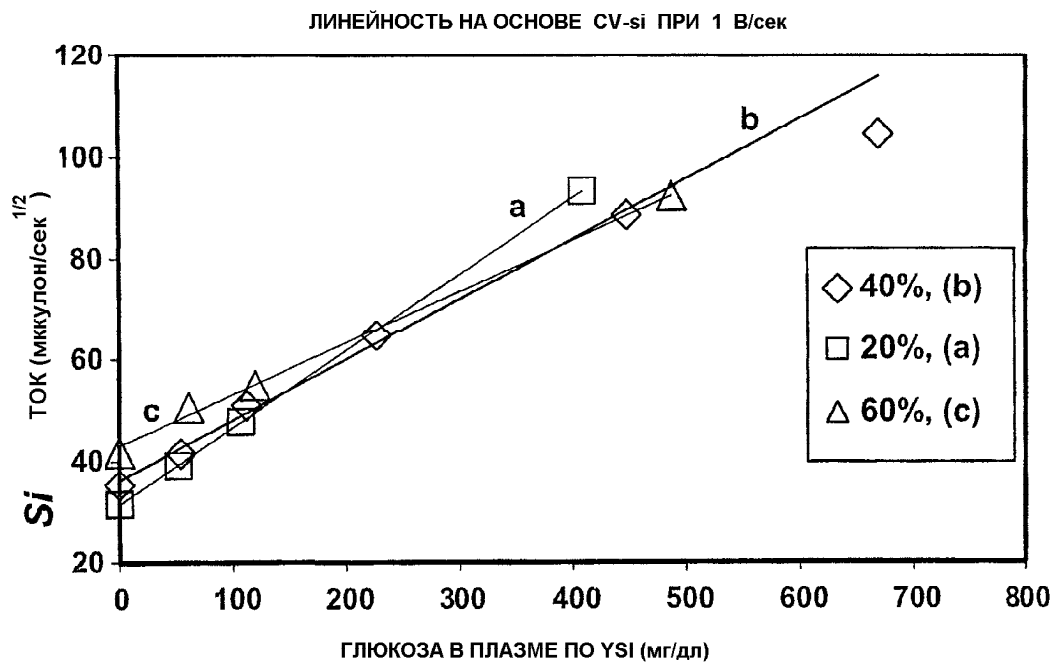


Фиг. 10В

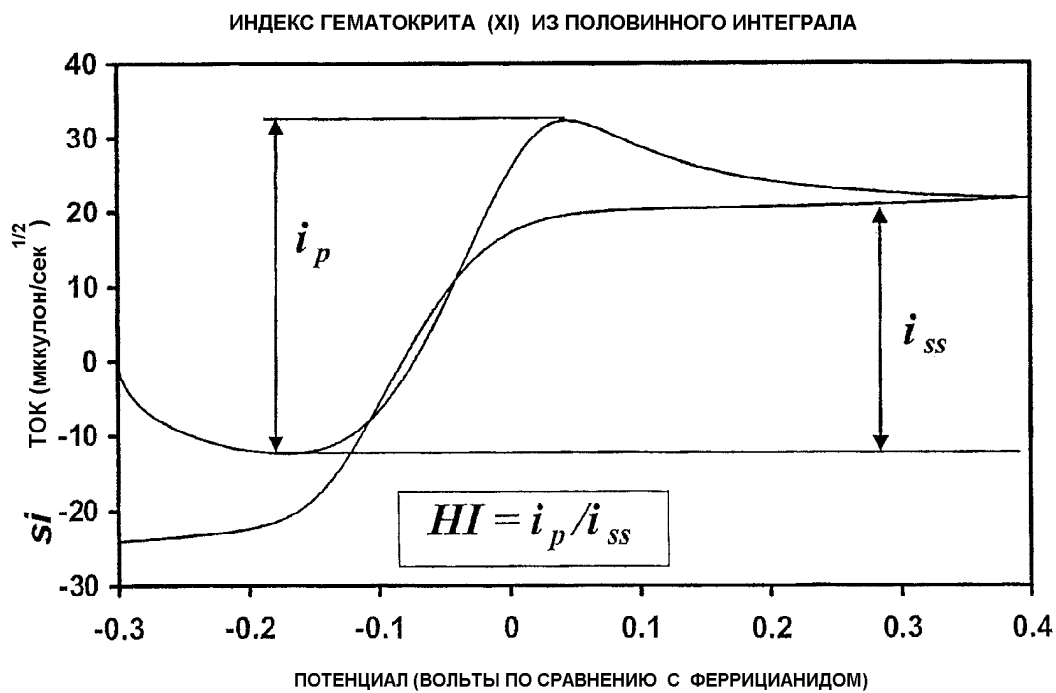


Фиг. 10С

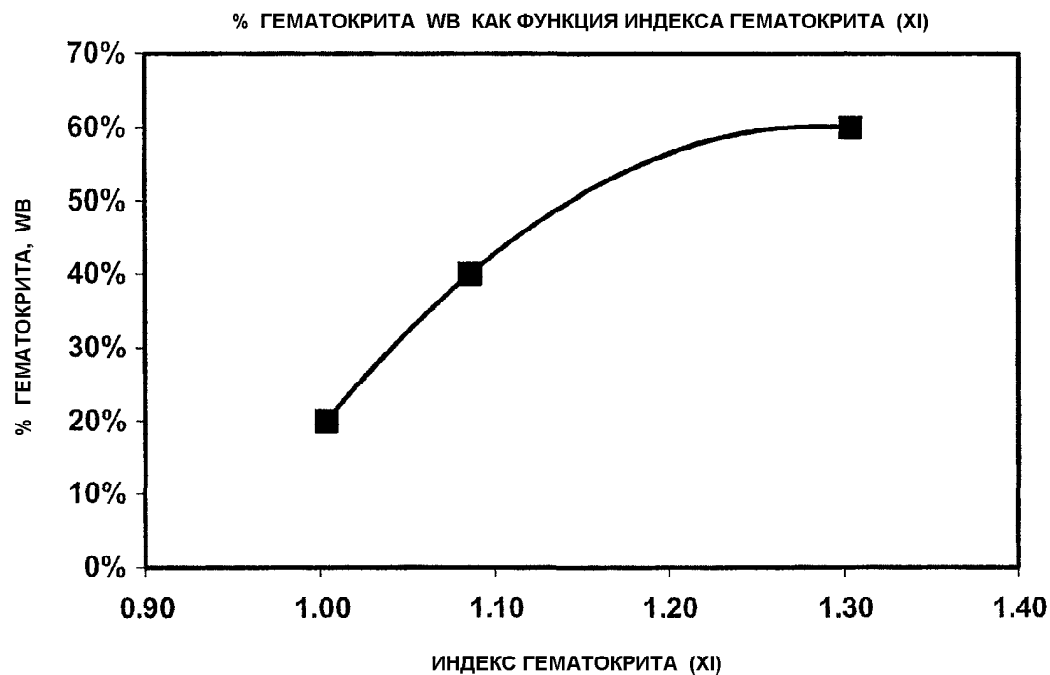




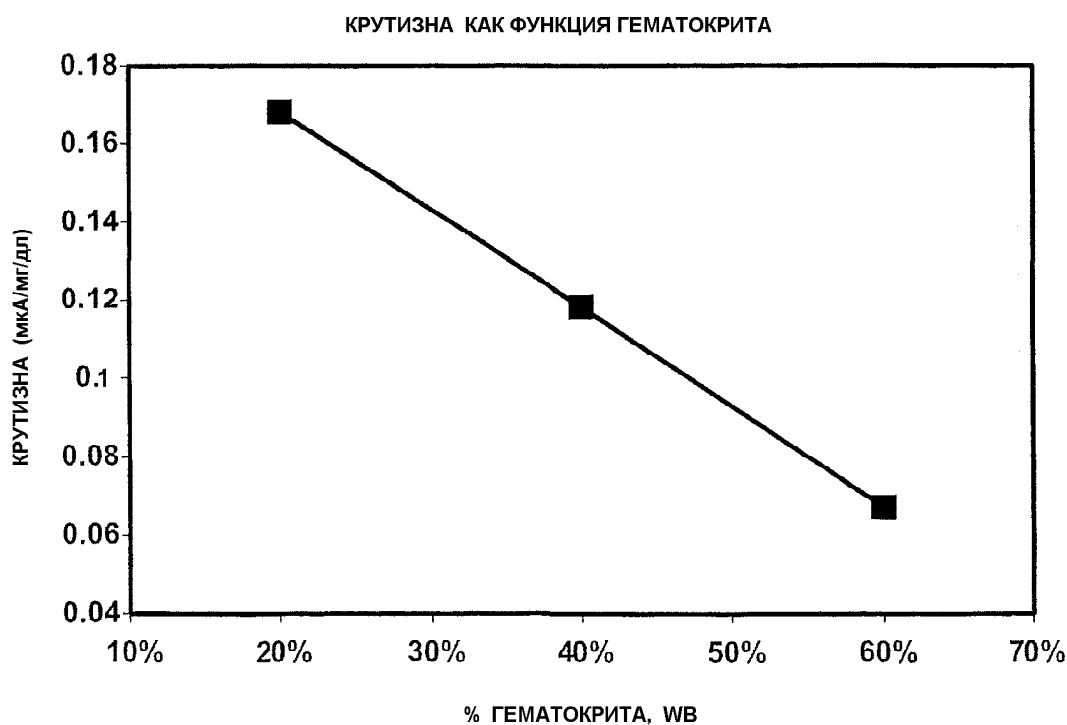
Фиг. 11С



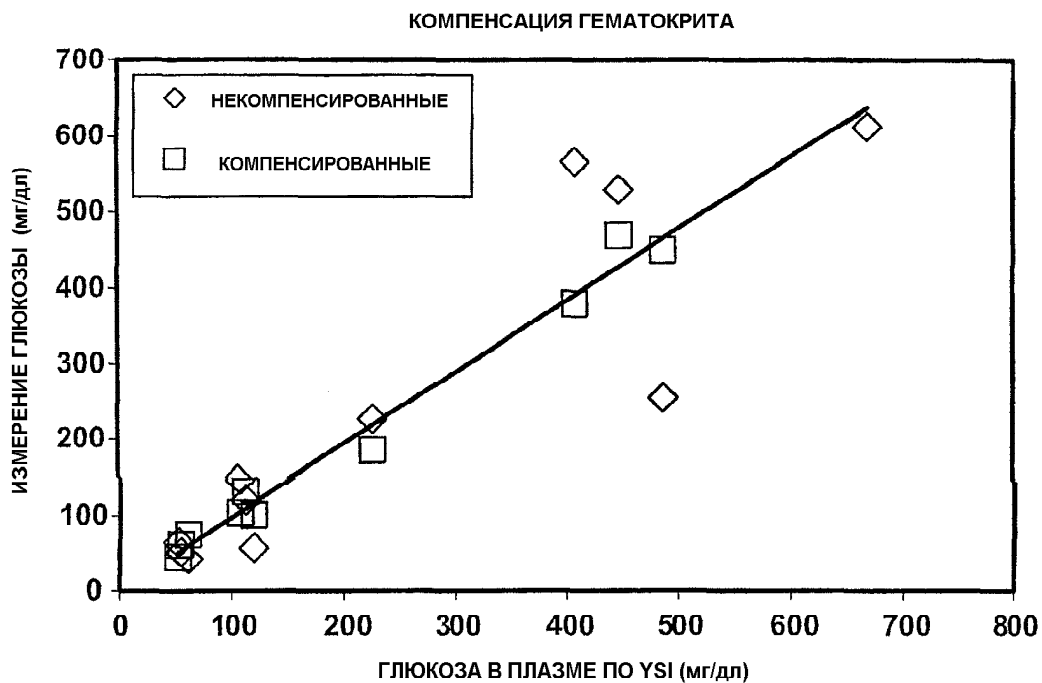
Фиг. 12



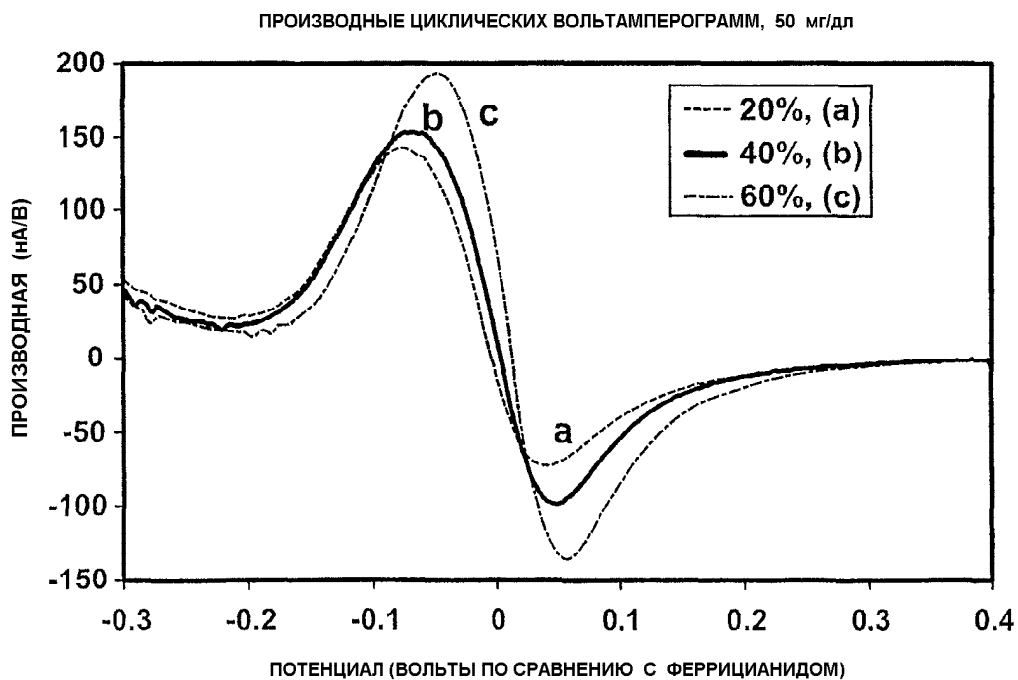
Фиг. 13А



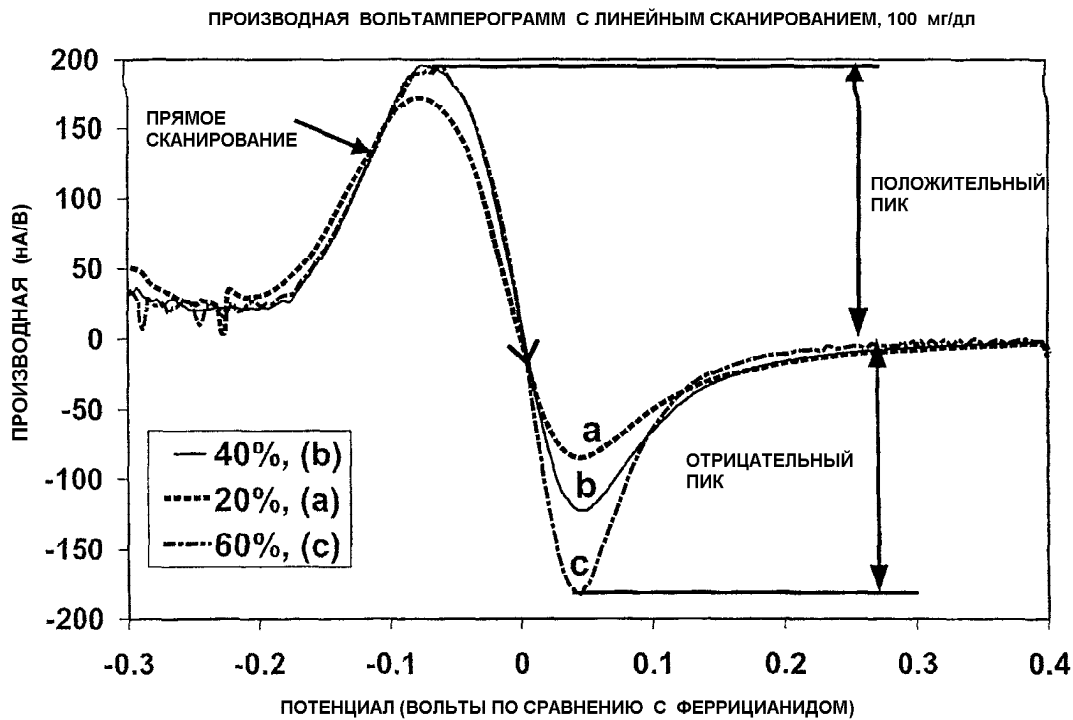
Фиг. 13В



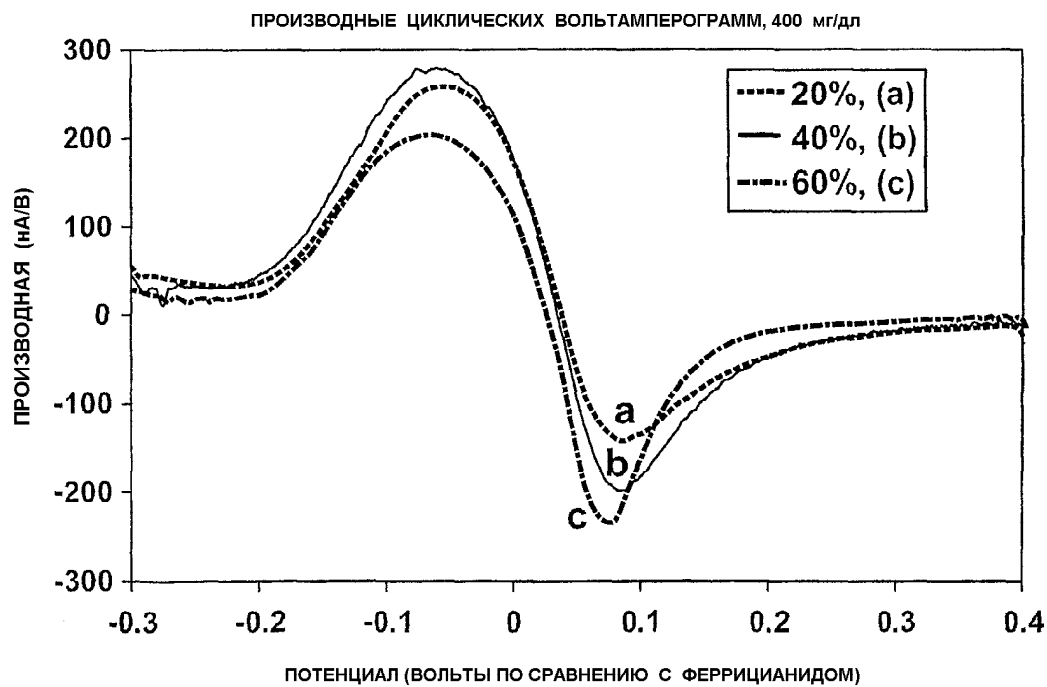
Фиг. 14



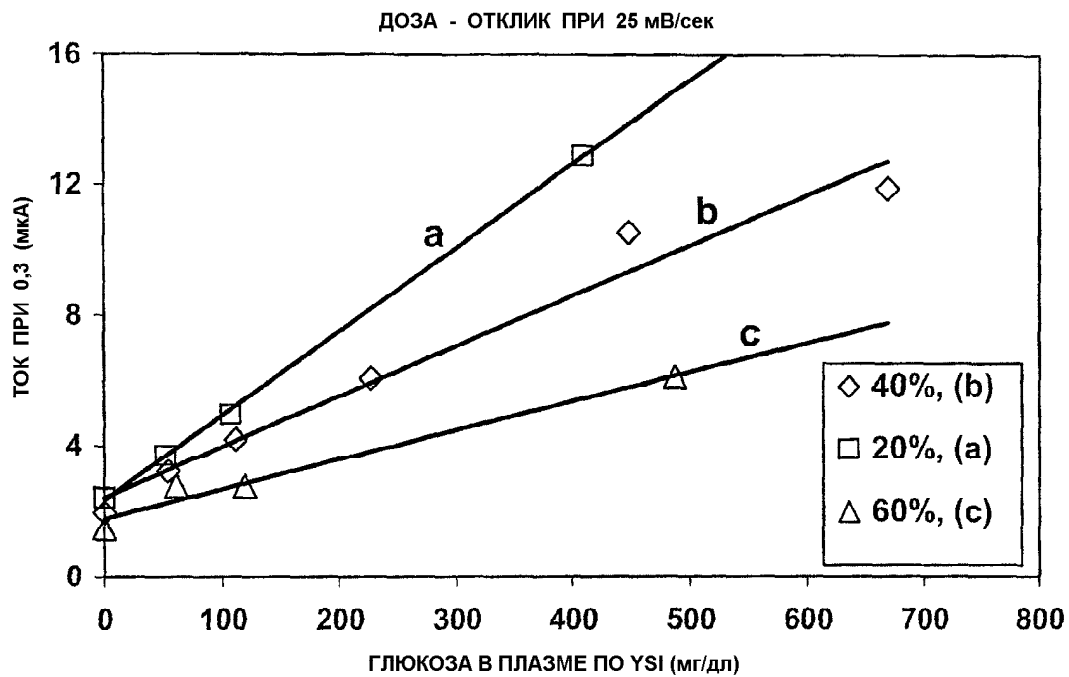
Фиг. 15А



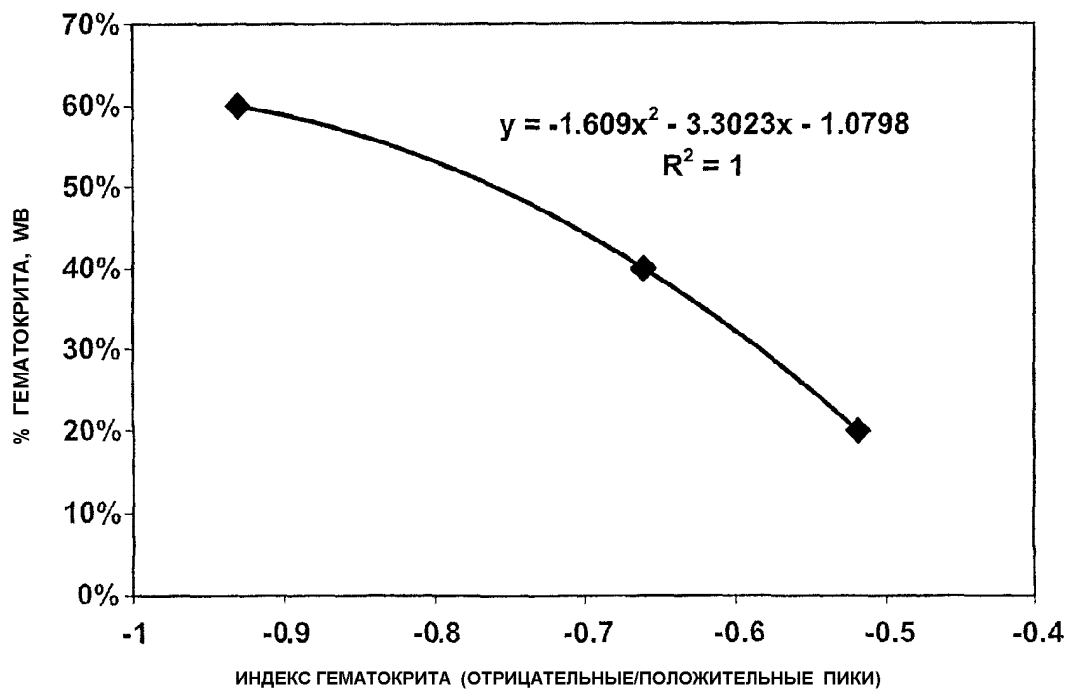
Фиг. 15В



Фиг. 15С

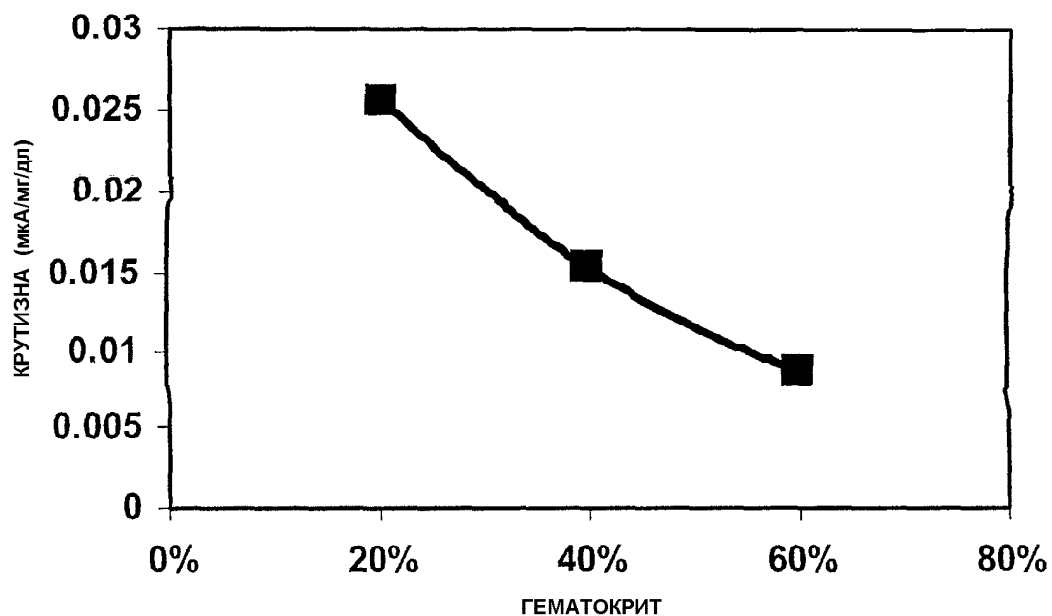


Фиг. 16А



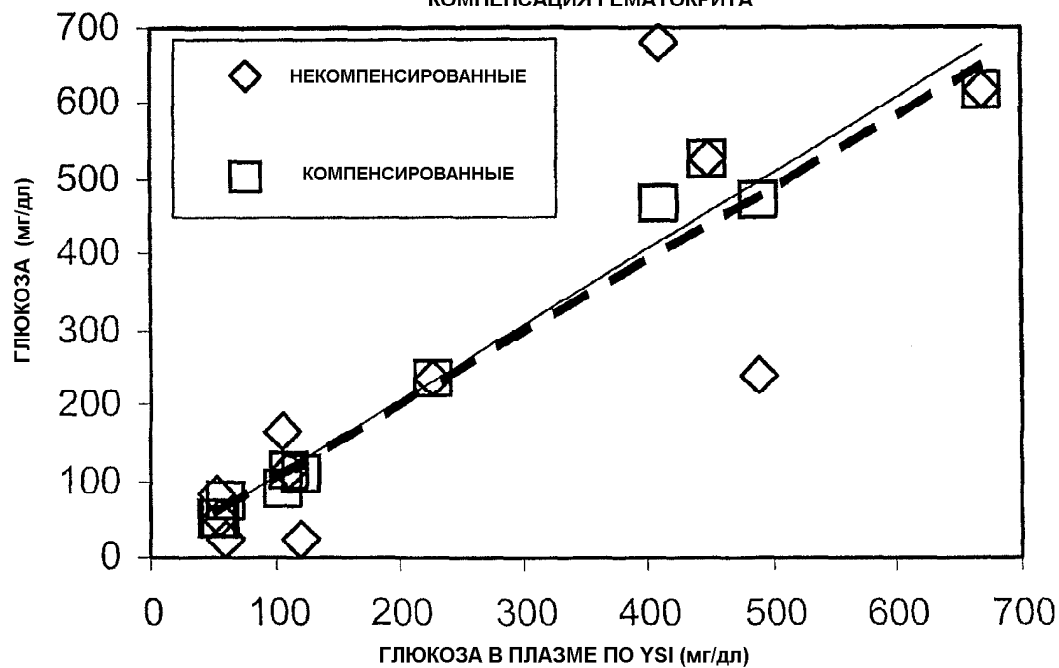
Фиг. 16В

КРУТИЗНА КАК ФУНКЦИЯ % ГЕМАТОКРИТА

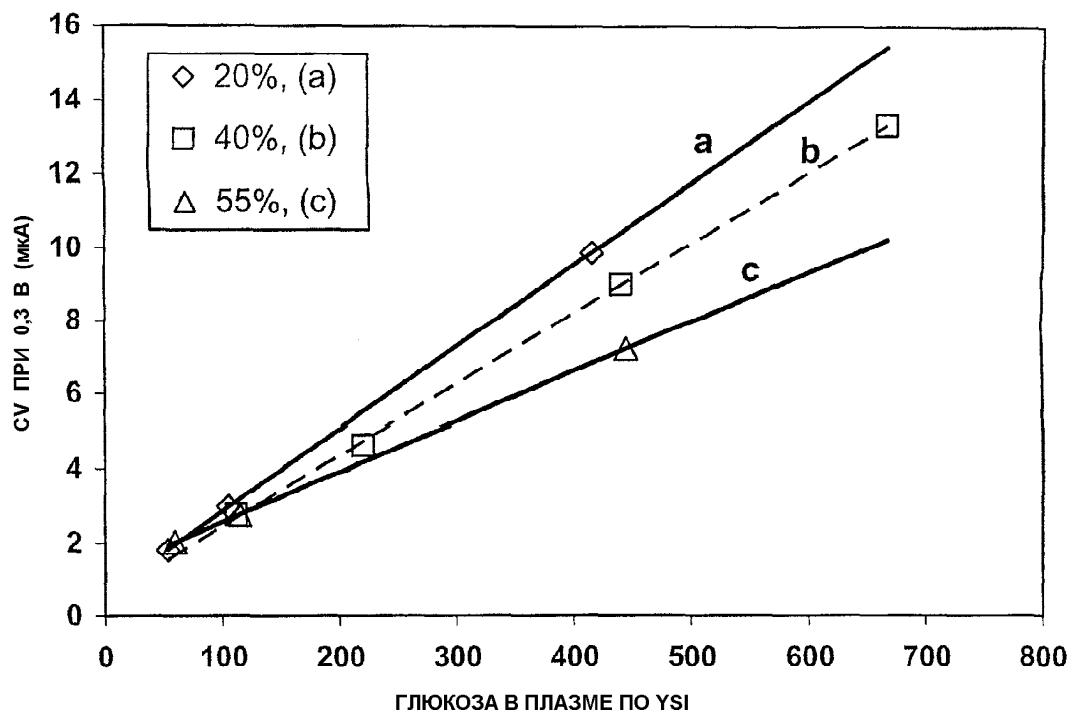


Фиг. 16С

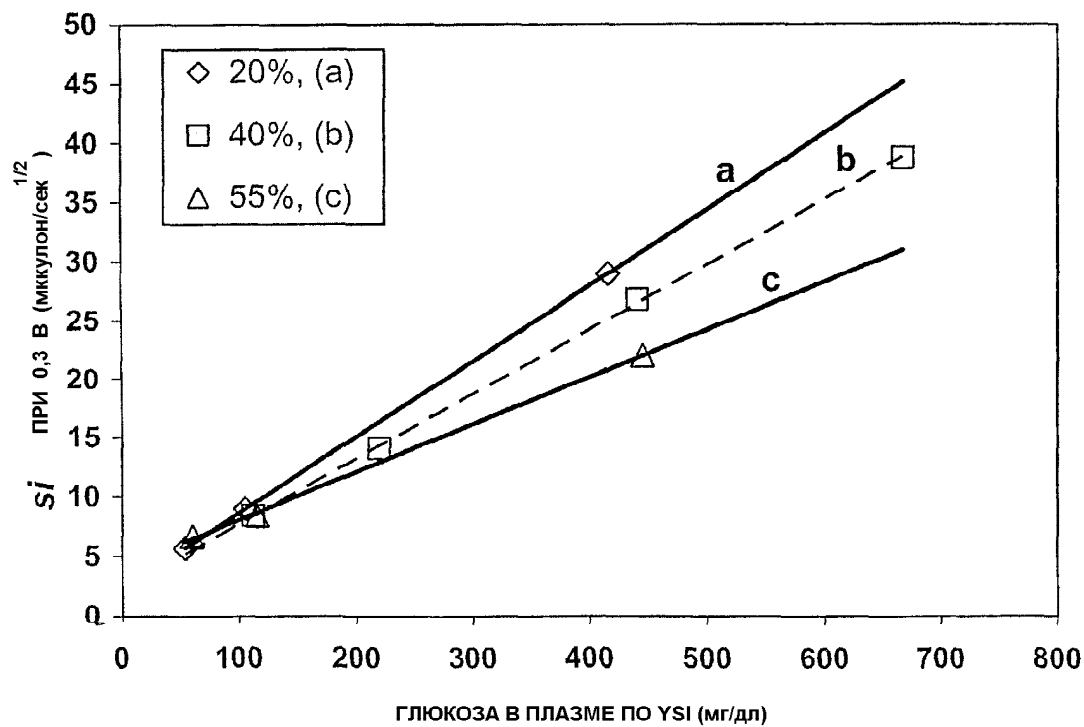
КОМПЕНСАЦИЯ ГЕМАТОКРИТА



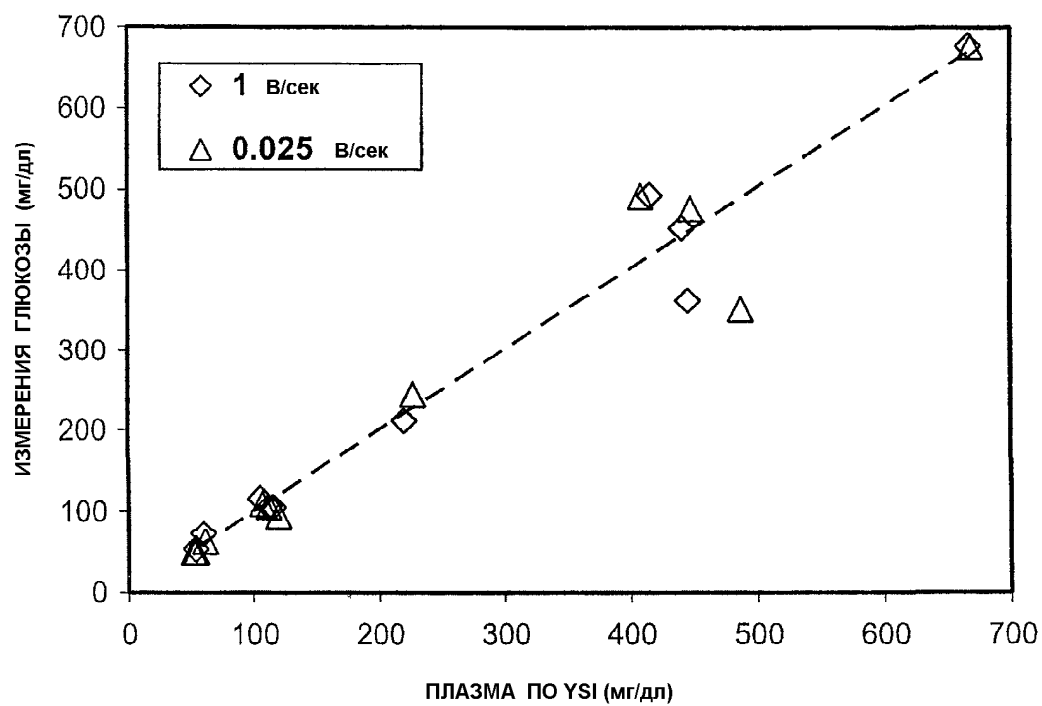
Фиг. 16D



Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 17С