



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002116217/14, 25.01.2001

(24) Дата начала действия патента: 25.01.2001

(30) Приоритет: 02.02.2000 US 09/497,304

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2004

(45) Опубликовано: 27.10.2005 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5942102 A, 24.08.1999. US 5628890 A, 13.05.1997. US 5352351 A, 10.04.1994. RU 2028618 C1, 09.02.1995.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 17.06.2002

(86) Заявка РСТ:
US 01/02465 (25.01.2001)

(87) Публикация РСТ:
WO 01/57510 (09.08.2001)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Ю.Д.Кузнецову

(72) Автор(ы):

ОХАРА Тимоти Дж. (US),
КЕРМАНИ Махиар З. (US)

(73) Патентообладатель(ли):

ЛАЙФСКЕН, ИНК. (US)

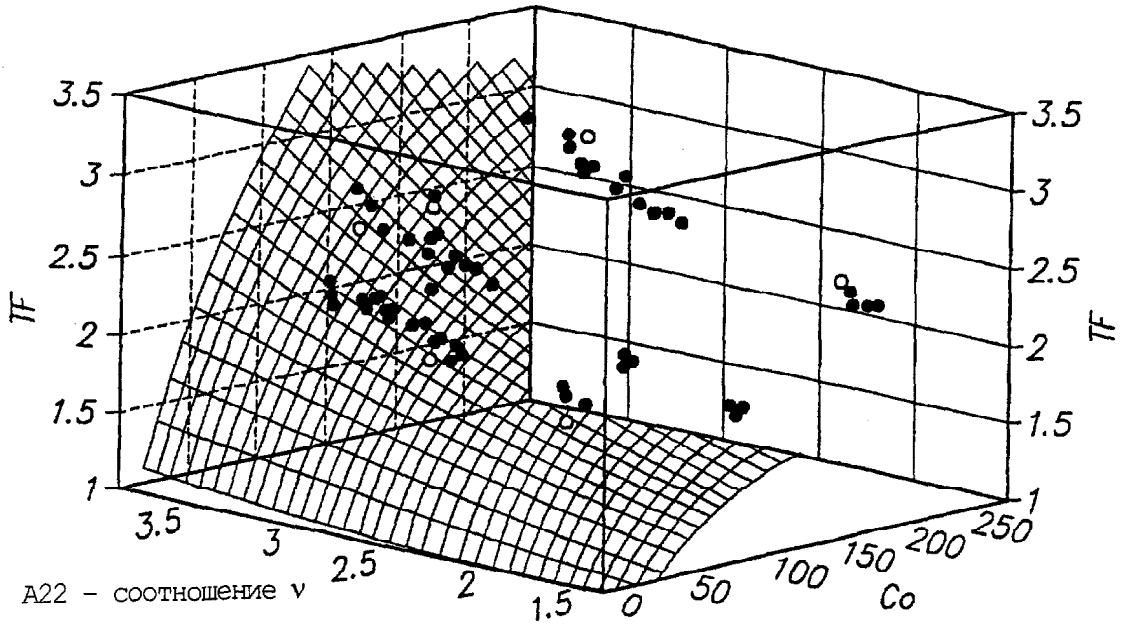
(54) ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ СПОСОБ И УСТРОЙСТВА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОПРАВКОЙ НА ГЕМАТОКРИТНОЕ ЧИСЛО

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к устройствам и способам для применения при анализе широкого круга исследуемых веществ в разнообразных пробах и, в частности, для применения при анализе исследуемых веществ, содержащихся в цельной крови или ее производных. При осуществлении предлагаемого способа физиологическую пробу вводят в измеритель, включающий электрохимическую ячейку, имеющую рабочий электрод и электрод сравнения. К ячейке прикладывают первый электрический потенциал и измеряют протекаемый в ячейке ток за первый период времени для определения первой переходной характеристики время-ток. После этого к ячейке прикладывают

второй электрический потенциал и определяют вторую переходную характеристику время-ток. Затем вычисляют предварительную концентрацию исследуемого вещества на основании первой и/или второй переходных характеристик время-ток. Эту предварительную концентрацию исследуемого вещества за вычетом значения фона затем умножают на коэффициент поправки на гематокритное число для получения концентрации исследуемого вещества в пробе. Изобретение позволяет минимизировать аналитическую погрешность, обусловленную гематокритным числом, при электрохимическом измерении концентрации исследуемого вещества. 3 н. и 6 з.п. ф-лы, 1 ил.

Уравнение 1 ранга 302462004 $z^{(-1)}=a+b\ln x/x+clny$
 $r^2+0.9413853$ DF Adj $r^2=0.94022843$ FitStdErr=0.14473465 Fstat=1228.6334
 $a=0.66370122$ $b=4.9465908$
 $c=0.40124333$



RU 2262890 C2

RU 2262890 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 262 890** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 B 5/145, G 01 N**
33/487, 27/26

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2002116217/14, 25.01.2001**
(24) Effective date for property rights: **25.01.2001**
(30) Priority: **02.02.2000 US 09/497,304**
(43) Application published: **20.01.2004**
(45) Date of publication: **27.10.2005 Bull. 30**
(85) Commencement of national phase: **17.06.2002**
(86) PCT application:
US 01/02465 (25.01.2001)
(87) PCT publication:
WO 01/57510 (09.08.2001)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. Ju.D.Kuznetsov

(72) Inventor(s):
OKhARA Timoti Dzh. (US),
KERMANI Makhlar Z. (US)
(73) Proprietor(s):
LAJFSKEN, INK. (US)

(54) **ELECTROCHEMICAL METHOD AND DEVICES USABLE FOR DETERMINING CONCENTRATION OF SUBSTANCES UNDER STUDY WITH CORRECTION ON HEMATOCRIT NUMBER**

(57) Abstract:

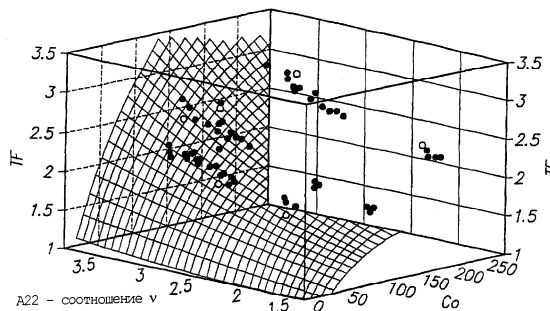
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves introducing physiologic sample into measuring instrument having electrochemical cell with working electrode and comparison electrode. The first electric potential is applied to the cell and the current flowing through the cell is measured during the first time period for determining the first time-current transition characteristic. Then, the second electric potential is applied to the cell for determining the second time-current transition characteristic. Then, preliminary concentration of the substances under study is calculated from the first and/or the second time-current transition characteristics. The preliminary concentration value with background value being subtracted is multiplied by correction coefficient for determining

concentration of substance under study in the sample.
EFFECT: minimized analytical error caused by hematocrit number.

9 cl, 1 dwg

Уравнение 1 ранга 302462004 $z^{(-1)}=a+blnx/x+clny$
 $r^2+0.9413853 DF Adj r^2=0.94022843 FitStatErr=0.14473465 Fstat=1228.6334$
 $a=0.66370122 b=4.9465908$
 $c=0.40124333$



ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Областью техники, к которой относится это изобретение, является определение концентрации исследуемых веществ, в частности, электрохимическое определение концентрации исследуемых веществ, а еще более конкретно - электрохимическое

5 определение концентрации исследуемых веществ, содержащихся в крови.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Обнаружение исследуемых веществ в физиологических жидкостях, например в крови или продуктах, являющихся производными крови, приобретает все возрастающее значение в современном обществе. Анализы, предусматривающие обнаружение различных веществ,

10 находят применение во многих приложениях, включая клинические лабораторные исследования, исследования в домашних условиях и т.д., причем результаты такого контроля играют заметную роль в диагностике и устранении широкого круга болезненных состояний. В число таких исследуемых веществ, представляющих интерес, входят глюкоза, концентрация которой важна при лечении разных форм диабета, холестерин, и т.д. В

15 соответствии с этой возрастающей важностью обнаружения исследуемых веществ создано множество способов (протоколов) и устройств для обнаружения исследуемых веществ, предназначенных для применения как в клинических, так и в домашних условиях.

К одному из типов таких способов, применяемых для обнаружения исследуемых веществ, относится электрохимические способы. При осуществлении таких способов пробу

20 жидкости на водной основе помещают в зону реакции в электрохимической ячейке, содержащей два электрода, т.е. электрод сравнения и рабочий электрод, причем эти электроды имеют полное сопротивление (импеданс), которое делает их пригодными для амперометрического измерения. Далее анализируемому компоненту дают возможность прореагировать непосредственно с электродом, либо непосредственно или косвенно - с

25 окислительно-восстановительным реактивом, с образованием окисляемого (или восстанавливаемого) вещества в количестве, соответствующем концентрации анализируемого компонента, т.е. исследуемого вещества. После этого оценивают количество присутствующего окисляемого (или восстанавливаемого) вещества электрохимическим способом и ставят его в соответствие количеству исследуемого

30 вещества в исходной пробе.

Когда подлежащей анализу физиологической пробой является цельная кровь или ее производное, гематокритное число крови может быть источником аналитической погрешности при измерении окончательной концентрации исследуемого вещества. Например, при реализации способов электрохимических измерений, в соответствии с

35 которыми концентрацию исследуемого вещества выводят на основании переходных характеристик время-ток, гематокритное число может обуславливать замедление химических процессов установления равновесия в электрохимической ячейке и/или замедление ферментативных кинетических процессов за счет увеличения вязкости пробы в ячейке и, тем самым, понижать отклик по току во времени и обуславливать аналитическую

40 погрешность.

Как таковая, эта переменная вызывает большой интерес при разработке способов для, по меньшей мере, минимизации аналитической погрешности, обусловленной гематокритным числом. При реализации некоторых способов применяют фильтрующие

45 кровь мембраны для удаления эритроцитов и достижения тем самым минимизации влияния гематокритного числа. Эти конкретные способы являются неудовлетворительными, потому что требуют увеличенных объемов проб и длительных исследований. В других способах основное внимание уделяется определению времени заполнения капилляров, т.е. времени исчезновения белого пятна после надавливания на кожу. Однако эти способы приводят к усложнению как испытательных полосок, так и

50 устройств, применяемых для считывания показаний с этих полосок. В еще одних вариантах осуществления гематокритное число определяют отдельно, применяя два дополнительных электрода, что также приводит к усложнению и удорожанию полосок и/или устройств.

Поэтому существует постоянная заинтересованность в создании новых способов

электрохимического измерения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе таким образом, чтобы такой способ обеспечивал минимизацию аналитической погрешности, обусловленной гематокритным числом пробы.

Литература по теме заявки

5 К числу патентных документов, представляющих интерес, относятся патент США № 5942102 и публикация WO 97/18465.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены способы и устройства для определения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе. При осуществлении предлагаемых способов физиологическую пробу вводят в электрохимическую ячейку, имеющую рабочий электрод и электрод сравнения. К ячейке прикладывают первый электрический потенциал и измеряют протекаемый в ячейке ток за первый период времени для определения первой переходной характеристики время-ток. После этого к ячейке прикладывают второй электрический потенциал и определяют вторую переходную характеристику время-ток. Затем вычисляют предварительную концентрацию (C_0) исследуемого вещества на основании первой и/или второй переходных характеристик время-ток. Эту предварительную концентрацию исследуемого вещества, за вычетом значения фона, затем умножают на коэффициент поправки на гематокритное число для получения концентрации исследуемого вещества в пробе, причем коэффициент поправки на гематокритное число является функцией предварительной концентрации исследуемого вещества и соотношения (γ) 2-х значений тока в переходной характеристике время-ток электрохимической ячейки. Предлагаемые способы и устройства пригодны для применения при анализе широкого круга исследуемых веществ в разнообразных пробах и, в частности, они пригодны для анализа исследуемых веществ, содержащихся в цельной крови или ее производных, когда исследуемым веществом, представляющим конкретный интерес, является глюкоза.

Краткое описание чертежей

На чертеже представлен трехмерный график C_0 , γ и $\alpha(C_0, \gamma)$, построенный на основании экспериментальных данных с использованием широкого диапазона значений концентраций глюкозы и значений гематокритного числа.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Предложены способы и устройства для определения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе. При осуществлении предлагаемых способов физиологическую пробу вводят в электрохимическую ячейку, имеющую рабочий электрод и электрод сравнения. К ячейке прикладывают первый электрический потенциал и измеряют протекаемый в ячейке ток за первый период времени для определения первой переходной характеристики время-ток. После этого к ячейке прикладывают второй электрический потенциал и определяют вторую переходную характеристику время-ток. Затем вычисляют предварительную концентрацию исследуемого вещества на основании первой и/или второй переходных характеристик время-ток. Эту предварительную концентрацию исследуемого вещества за вычетом значения фона затем умножают на коэффициент поправки на гематокритное число для получения концентрации исследуемого вещества в пробе, причем коэффициент поправки на гематокритное число является функцией предварительной концентрации исследуемого вещества и переменной (γ) электрохимической ячейки. Предлагаемые способы и устройства пригодны для применения при анализе широкого круга исследуемых веществ в разнообразных пробах, и, в частности, они пригодны для применения при анализе исследуемых веществ, содержащихся в цельной крови или ее производных, когда исследуемым веществом, представляющим конкретный интерес, является глюкоза. В дальнейшем описании предлагаемого изобретения сначала приводится информация о способах, а затем следует обзор признаков устройства, предназначенного для применения при осуществлении предлагаемых способов на практике.

Перед изучением дальнейшего описания предлагаемого изобретения следует понять, что изобретение не сводится к конкретным вариантам осуществления изобретения,

описываемым ниже, поскольку возможны изменения этих конкретных вариантов осуществления, также находящиеся в рамках объема притязаний, определяемого прилагаемой формулой изобретения. Следует также понять, что употребляемая терминология имеет целью описание конкретных вариантов осуществления и не носит ограничительный характер. Наоборот, объем притязаний настоящего изобретения будет задан прилагаемой формулой изобретения.

В этом описании и прилагаемой формуле изобретения случаи употребления терминов в единственном числе также относятся и к употреблению этих терминов во множественном числе, если контекст заявки явно не диктует иное. Если не приведены другие конкретные определения, то все технические и научные термины, употребляемые здесь, имеют тот же смысл, в каком их обычно понимает средний специалист в той области техники, к которой относится это изобретение.

СПОСОБЫ

Как вкратце изложено выше, предлагаемое изобретение посвящено способу определения значения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе с поправкой на гематокритное число. Под «концентрацией исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число» подразумевают, что значение концентрации исследуемого вещества, определенное с помощью предлагаемых способов, модулировано или изменено таким образом, что удален по существу весь вклад гематокритного числа в это значение. Иными словами, значение концентрации, определенное с помощью предлагаемых способов, модифицировано таким образом, что любой вклад в это значение, обусловленный гематокритным числом пробы, который мог бы присутствовать в этом значении, удален при практическом осуществлении предлагаемых способов. Как таковой, обусловленный гематокритным числом сигнал восстанавливают методом нахождения обратного (методом деконволюции) из сигнала, обусловленного исследуемым веществом, и при осуществлении предлагаемых способов используют только обусловленный исследуемым веществом сигнал при получении окончательной концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число.

При осуществлении предлагаемых способов на первом этапе вводят некоторое количество физиологической пробы в электрохимическую ячейку, которая включает в себя отстоящие друг от друга рабочий электрод и электрод сравнения, а также систему окислительно-восстановительных реактивов. Физиологическая проба может быть разной, но во многих конкретных вариантах осуществления представляет собой, в общем случае, цельную кровь либо ее производное или фракцию, причем особый интерес во многих конкретных вариантах осуществления представляет именно цельная кровь. Объем физиологической пробы, например, крови, вводимый в область реакции испытательной полоски, является величиной переменной, но в общем случае находится в диапазоне от примерно 0,1 до 10 мкл (микролитров), обычно - от примерно 0,9 до 1,6 мкл. Пробу вводят в область реакции с помощью любого удобного способа, причем эту пробу можно впрыскивать в зону реакции, вводить в зону реакции с помощью тампона и т.п., то есть так, как может оказаться удобным.

Хотя предлагаемые способы, в принципе, можно реализовать, пользуясь электрохимической ячейкой любого типа, имеющей отстоящие друг от друга рабочий электрод и электрод сравнения, а также систему окислительно-восстановительных реактивов, при осуществлении предлагаемых способов во многих конкретных вариантах применяют электрохимическую испытательную полоску. Электрохимические испытательные полоски, применяемые в этих конкретных вариантах осуществления предлагаемых способов, состоят из двух противоположных металлических электродов, разделенных тонким слоем прокладки, причем все эти конструктивные элементы ограничивают область или зону реакции, в которой находится система окислительно-восстановительных реактивов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления этих электрохимических испытательных полосок рабочий электрод и электрод сравнения имеют конфигурацию в

форме удлиненных прямоугольных полосок. В типичном случае длина электродов находится в диапазоне от примерно 1,9 до 4,5 см, обычно - от примерно 2,0 до 2,8 см. Ширина электродов находится в диапазоне от примерно 0,38 до 0,76 см, обычно - от примерно 0,51 см до 0,67 см. Электроды сравнения в типичном случае имеют толщину, находящуюся в диапазоне от примерно 10 до 100 нм, а обычно - от примерно 10 до 20 нм. В некоторых конкретных вариантах осуществления длина одного из электродов меньше, чем длина другого электрода, в типичном случае - примерно на 0,32 см. Более короткий электрод может быть рабочим электродом или электродом сравнения.

Рабочий электрод и электрод сравнения также характеризуются тем, что по меньшей мере поверхность электродов, которая обращена к области реакции в полоске, является металлом, причем металлы, представляющие интерес в этом смысле, включают в себя палладий, золото, платину, серебро, иридий, углерод, легированный оксид олова, нержавеющую сталь и т.п. Хотя, в принципе, весь электрод может быть изготовлен из металла, каждый из электродов обычно изготовлен из инертного несущего материала (подложки), на поверхности которого(-ой) присутствует тонкий слой металлического компонента электрода. В этих наиболее распространенных конкретных вариантах осуществления толщина инертного материала подложки в типичном случае находится в диапазоне от примерно 51 до 356 мкм, обычно - от примерно 102 до 153 мкм, тогда как толщина слоя металла в типичном случае находится в диапазоне от примерно 10 до 100 нм, а обычно - от примерно 10 до 40 мкм, например, в виде напыленного слоя металла. В предлагаемых электродах можно применять любой удобный инертный материал подложки, но в типичном случае этот материал является жестким материалом, который способен обеспечить конструктивную опору для электрода и, в свою очередь, для электрохимической испытательной полоски в целом. В число материалов, пригодных для применения в качестве подложки, входят пластмассы, например, полиэтилентерефталат (ПЭТФ), полиэтиленгликольтерефталат (ПЭГТФ), полиимид, поликарбонат, полистирол, силикон, керамика, стекло, и т.п.

Один из признаков электрохимических испытательных полосок, применяемых в этих конкретных вариантах осуществления предлагаемых способов, заключается в том, что описанные выше рабочий электрод и электрод сравнения обращены друг к другу и разделены лишь коротким расстоянием, так что расстояние между рабочим электродом и электродом сравнения в зоне или области реакции электрохимической испытательной полоски является исключительно малым. Этот минимальный промежуток между рабочим электродом и электродом сравнения в предлагаемых испытательных полосках является результатом наличия тонкого слоя прокладки, расположенного или заключенного между рабочим электродом или электродом сравнения. Толщина этого слоя прокладки в общем случае должна быть меньше или равной 500 мкм, а обычно находится в диапазоне от примерно 102 до 153 мкм. Слой прокладки имеет вырез для обеспечения зоны или области реакции с, по меньшей мере, впускным каналом в зону реакции, а также, обычно, с выпускным каналом из зоны реакции. Слой прокладки может иметь круглую область реакции с боковыми впускными и выпускными отверстиями или каналами или иные конфигурации, например, возможны квадратная, треугольная, прямоугольная, неправильная форма области реакции и т.д. Слой прокладки может быть выполнен из любого удобного материала, при этом в число характерных подходящих материалов входят ПЭТФ, ПЭГТФ, полиимид, поликарбонат и т.п., причем поверхности слоя прокладки могут быть обработаны для обеспечения склеивания с соответствующими им электродами, а значит, и для поддержания целостности конструкции электрохимической испытательной полоски. Конкретный интерес представляет применение штампованной, клейкой с обеих сторон полоски в качестве слоя прокладки.

Электрохимические испытательные полоски в этих конкретных вариантах осуществления предлагаемого изобретения включают в себя зону или область реакции, ограниченную рабочим электродом, электродом сравнения и слоем прокладки, причем все эти элементы описаны выше. В частности, рабочий электрод и электрод сравнения

ограничивают верхнюю и нижнюю поверхности области реакции, тогда как слой прокладки ограничивает боковые поверхности области реакции. Объем области реакции составляет, по меньшей мере, примерно 0,1 мкл, чаще составляет, по меньшей мере, примерно 1 мкл, а чаще всего - по меньшей мере примерно 1,5 мл, причем этот объем может достигать до 10 мкл или превышать это значение. Как упоминалось выше, область реакции в общем случае включает в себя, по меньшей мере, один впускной канал, а во многих конкретных вариантах осуществления также включает в себя выпускной канал. Площадь поперечного сечения впускного и выпускного каналов можно изменять настолько, что она окажется достаточно большой, чтобы обеспечить эффективный впуск или выпуск жидкости из области реакции, но в общем случае эта площадь находится в диапазоне от примерно $9 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см², обычно - от примерно $1,3 \cdot 10^{-3}$ до $2,5 \cdot 10^{-3}$ см².

В области реакции присутствует система окислительно-восстановительных реактивов, причем эта система реактивов обеспечивает наличие вещества, измерение содержания которого производят с помощью электрода, а результат измерения потом используют для выведения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе. Система окислительно-восстановительных реактивов, присутствующая в области реакции, в типичном случае включает в себя, по меньшей мере, фермент(ы) и медиатор. Во многих конкретных вариантах осуществления ферментный компонент(ы) системы окислительно-восстановительных реактивов представляет(ют) собой фермент или множество ферментов, которые действуют совместно, окисляя интересующее исследуемое вещество. Иными словами, ферментный компонент системы окислительно-восстановительных реактивов состоит из единственного фермента, окисляющего исследуемое вещество, или совокупности двух или более ферментов, которые действуют совместно, окисляя интересующее исследуемое вещество. Ферменты, представляющие интерес в этом смысле, включают в себя оксидазы, дегидрогеназы, липазы, киназы, дифоразы, хинопротеины и т.п.

Наличие особого фермента в области реакции зависит от конкретного исследуемого вещества, для обнаружения которого предназначена электрохимическая испытательная полоска, причем характерные ферменты включают в себя: глюкозооксидазу, глюкозодегидрогеназу, холестеринэстеразу, холестериноксидазу, липопротеинлипазу, глицеринкиназу, глицерин-3-фосфатоксидазу, лактатоксидазу, лактатдегидрогеназу, пируватоксидазу, алкогольоксидазу, билирубиноксидазу, уриказу и т.п. Во многих предпочтительных конкретных вариантах осуществления, когда интересующим исследуемым веществом является глюкоза, ферментным компонентом системы окислительно-восстановительных реактивов является фермент, окисляющий глюкозу, например, глюкозооксидаза или глюкозодегидрогеназа.

Вторым компонентом системы окислительно-восстановительных реактивов является медиаторный компонент, состоящий из одного или более медиаторных агентов. В данной области техники известно множество различных медиаторных агентов, которые включают в себя: феррицианид, феназинэтосульфат, феназинметосульфат, фенилендиамин, 1-метокси-феназинметосульфат, 2,6-диметил-1,4-бензохинон, 2,5-дихлоро-1,4-бензохинон, производные ферроцена, комплексы бипиридила осмия, комплексы рутения и т.п. В тех конкретных вариантах осуществления, где интересующим исследуемым веществом является глюкоза, а ферментные компоненты представлены глюкозооксидазой или глюкозодегидрогеназой, к представляющим конкретный интерес медиаторам относятся феррицианид и т.п.

Другие реактивы, которые могут присутствовать в области реакции, включают в себя буферные агенты, например, цитраконат, цитрат, соединения яблочной и малеиновой кислот, фосфат, «Good» буферы и т.п. Могут присутствовать и другие агенты, включающие в себя: двухвалентные катионы, такие как хлорид кальция и хлорид магния; пирролохинолинхинон (PQQ от англ. «pyrroloquinoline quinone»); некоторые разновидности поверхностно-активных веществ, такие как «Тритон», «Макол», «Тетроник», «Силвет», «Зонил» и «Плуроник»; стабилизирующие агенты, такие как альбумин, сахароза,

трегалоза, маннит и лактоза.

В общем случае система окислительно-восстановительных реактивов присутствует в сухом виде. Количества различных компонентов могут изменяться, при этом количество ферментного компонента в типичном случае находится в диапазоне от примерно 1 до 10 мг/мл, обычно - от примерно 5 до 80 мг/мл, а количество медиаторного компонента в типичном случае находится в диапазоне от примерно 5 до 1000 мМ, обычно - от примерно 90 до 900 мМ.

После введения пробы получают первую и вторую переходные характеристики время-ток. Эти первую и вторую переходные характеристики время-ток получают, прикладывая постоянный электрический потенциал к ячейке и наблюдая за изменением тока в ячейке за некоторый период времени. Иными словами, подают в ячейку первый и второй импульсы и наблюдают (измеряют) получаемые переходные характеристики время-ток. Как таковую, первую переходную характеристику время-ток получают, прикладывая постоянный электрический потенциал или первый импульс к ячейке, например, между рабочим электродом и электродом сравнения, и в течение некоторого времени наблюдают за изменением тока, протекающего между электродами, т.е. изменение тока в ячейке для того, чтобы получить первую переходную характеристику время-ток. Величина первого прикладываемого электрического потенциала в общем случае находится в диапазоне от примерно 0 до -0,6 В, обычно - от примерно -0,2 до -0,4 В. Продолжительность времени, в течение которого наблюдают за током между электродами для получения первой переходной характеристики время-ток, в типичном случае находится в диапазоне от примерно 3 до 20 секунд, обычно - от примерно 4 до 10 секунд.

Вторую переходную характеристику время-ток получают, прикладывая к электродам второй постоянный электрический потенциал или второй импульс, полярность которого в типичном случае противоположна полярности первого постоянного электрического потенциала, и наблюдают за изменением тока между электродами в течение второго периода времени. Величина этого второго постоянного электрического потенциала в типичном случае находится в диапазоне от примерно 0 до +0,6 В, обычно - от примерно +0,2 до +0,4 В, при этом во многих конкретных вариантах осуществления величина второго электрического потенциала является такой же, как величина первого электрического потенциала. Второй период времени в типичном случае находится в диапазоне от примерно 1 до 10 секунд, обычно - от примерно 2 до 4 секунд. Наблюдая изменение тока между электродами в течение этого второго периода времени, определяют вторую переходную характеристику время-ток для данной ячейки.

Суммарный период времени, необходимый для получения требуемых переходных характеристик время-ток, описанных выше, является относительно малым в некоторых конкретных вариантах осуществления. В таких конкретных вариантах осуществления суммарное количество времени, требуемого для получения первой и второй переходных характеристик время-ток, составляет менее примерно 30 секунд, обычно - менее примерно 20 секунд, а чаще всего - менее примерно 14 секунд.

Следующий этап при осуществлении предлагаемых способов заключается в использовании наблюдаемых первой и второй переходных характеристик время-ток, полученных согласно описанному выше, для определения: (а) переменной γ электрохимической ячейки, применяемой при осуществлении предлагаемых способов, и (б) предварительной концентрации интересующего исследуемого вещества в пробе.

Переменную γ , применяемую в предлагаемых способах, определяют для описания отклонения электрохимической ячейки от идеала. Следует попутно заметить, что значение γ в идеальных условиях должно быть близким к единице, т.е. достижение равновесного состояния реактивов и реакция глюкозы должны завершиться до окончания первого импульса. Невыполнение любого из этих условий вызовет отклонение упомянутого соотношения в сторону значений, не равных единице. Числитель переменной γ определяют как установившийся ток, наблюдаемый после приложения второго электрического

потенциала к ячейке, т.е. как прогнозируемое значение тока при $t=\infty$ для второй переходной характеристики время-ток. Знаменатель определяют как средний ток за короткий период времени почти в конце первого периода времени, т.е. почти в конце приложения первого электрического потенциала или первого импульса. Короткий период времени, в течение которого определяют средний ток, в типичном случае находится в диапазоне от примерно 0,2 до 2 секунд, обычно - от примерно 0,2 до 1,5 секунды, а чаще всего - от примерно 0,2 до 1,25 секунды, причем во многих конкретных вариантах осуществления этот короткий период времени составляет примерно 0,3 секунды. Средний ток определяют в момент, который близок к концу первого периода времени, который в типичном случае находится в пределах от примерно 0,1 до 1 секунды до конца указанного периода. В некоторых конкретных вариантах осуществления переменную γ описывают формулой:

$$\gamma = i_y / i_{cp},$$

где:

i_y - установившийся ток после приложения второго электрического потенциала, а i_{cp} - средний ток за короткий период времени почти в конце первого периода времени, т.е. почти в конце времени, в течение которого первый потенциал приложен к ячейке. Например, если продолжительность первого периода времени составляет 10 секунд, то средний ток может быть средним током на протяжении интервала от 8,5 до 9,5 секунд из того периода, длительность которого составляет 10 секунд, т.е. этот интервал является периодом времени длительностью 1,0 секунда, истекающим за 0,5 секунды до конца первого периода времени. Как упоминалось выше, первую и вторую переходные характеристики время-ток также применяют для выведения значения предварительной концентрации исследуемого вещества в анализируемой пробе.

Во многих конкретных вариантах осуществления предварительную концентрацию исследуемого вещества определяют с помощью следующих уравнений:

$$i(t) = i_y \{1 + 4 \cdot \exp(-4\pi^2 D t / L^2)\},$$

$$i_y = 2FADC_0 / L,$$

где:

i_y - установившийся ток после приложения второго электрического потенциала;
 i - измеренный ток, который является функцией времени;
 D - коэффициент диффузии для данной ячейки, причем этот коэффициент можно определить, исходя из первого закона Фика, т.е. $J(x,t) = -D \frac{dC(x,t)}{dx}$;

L - толщина прокладки;

t - время приложения 2-го электрического потенциала, причем $t=0$ в начале импульса;

C_0 - предварительная концентрация исследуемого вещества;

F - постоянная фарадея, т.е. $9,6485 \cdot 10^4$ Кл/моль; и

A - площадь рабочего электрода.

Воспользовавшись вышеупомянутыми уравнениями и проведя вышеупомянутые этапы, используют наблюдаемые первую и вторую переходные характеристики время-ток для определения переменной γ электрохимической ячейки, применяемой при осуществлении предлагаемого способа, и значения предварительной концентрации интересующего исследуемого вещества в анализируемой физиологической пробе.

На основании определенных значений переменной γ и предварительной концентрации исследуемого вещества определяют коэффициент поправки на гематокритное число, который используют для получения значения концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число на основании значения исходной или предварительной концентрации исследуемого вещества, как описано выше. Коэффициент поправки на гематокритное число - это коэффициент, на который можно умножить предварительную концентрацию исследуемого вещества (в типичном случае - за вычетом значения сигнала фона), чтобы получить значение концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число, т.е. значение концентрации, из которого удалена обусловленная гематокритным числом составляющая. Коэффициент поправки на гематокритное число

является функцией как значения предварительной концентрации исследуемого вещества, так и переменной γ электрохимической ячейки.

При осуществлении предлагаемых способов можно применять любой коэффициент поправки на гематокритное число, на который можно умножать значение предварительной концентрации (в типичном случае - за вычетом значения сигнала фона, как подробнее описано ниже). К одному классу коэффициентов поправки на гематокритное число, нашедшему применение при осуществлении предлагаемых способов, относятся те коэффициенты, которые берут из трехмерного графика C_0 , γ и $\alpha(C_0, \gamma)$, построенного на основании экспериментальных данных с использованием широкого диапазона значений концентраций исследуемого вещества и значений гематокритного числа. Коэффициент поправки на гематокритное число ($\alpha(C_0, \gamma)$) определяют с помощью формулы:

$$\alpha(C_0, \gamma) = \text{«фактическая концентрация»} / (C_0 - \text{«значение фона»}).$$

(Например, если исследуемым веществом является глюкоза, значение $\alpha(C_0, \gamma)$ во многих конкретных вариантах осуществления равно концентрации глюкозы, измеренной с помощью модели 23А анализатора глюкозы фирмы «Еллоу Спрингс Инструменте» (Yellow Springs Instrument) (описанного в патенте США № 5968760, содержание которого включено в настоящее описание посредством данной ссылки) и деленной на C_0 за вычетом значения фона, которое составляет, например, 22 мг/дл). Этому классу коэффициентов поправки на гематокритное число в типичном случае соответствуют уравнения, эмпирически описывающие гладкую поверхность, которая минимизирует погрешность (разницу) между прогнозируемыми и фактическими данными. См., например, раздел «Описание экспериментов», приведенный ниже. Один характерный коэффициент поправки на гематокритное число, нашедший применение в предлагаемых способах, имеет вид:

$$1 / ((0,6637) + ((4,9466 * \ln(C_0)) / C_0) + (-0,4012 * \ln(\gamma))).$$

При определении концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число в соответствии с предлагаемым изобретением, определенную выше предварительную концентрацию (C_0) исследуемого вещества за вычетом значения сигнала фона умножают на коэффициент поправки на гематокритное число. Значение фона, которое вычитают из значения предварительной концентрации, зависит от исследуемого вещества, концентрацию которого измеряют. Для глюкозы это значение в типичном случае находится в диапазоне от примерно 0 до 40 мг/дл, обычно - от примерно 8 до 25 мг/дл, при этом во многих конкретных вариантах осуществления значение фона составляет примерно 22 мг/дл или точно 22 мг/дл.

В общем случае применяют следующую формулу для определения концентрации исследуемого вещества в соответствии с предлагаемым изобретением:

$$\text{«концентрация с поправкой на гематокритное число»} = \text{«коэффициент поправки на гематокритное число»} \times [C_0 - \beta],$$

где

β - значение фона; а

C_0 - предварительная концентрация исследуемого вещества.

Вышеописанные способы дают значение концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число, т.е. значение концентрации, в котором обусловленная гематокритным числом составляющая восстановлена методом нахождения обратного и удалена. Как таковые, вышеописанные способы обеспечивают точное значение концентрации исследуемого вещества в анализируемой пробе.

Вышеупомянутые этапы вычисления можно проводить вручную или с применением автоматизированных вычислительных средств, причем во многих конкретных вариантах осуществления представляет интерес применение таких автоматизированных вычислительных средств, которые описаны в связи с предлагаемыми устройствами, рассматриваемыми ниже.

УСТРОЙСТВА

В настоящем изобретении также предложены измерители, предназначенные для применения при практическом осуществлении предлагаемого изобретения. Предлагаемые

измерители в типичном случае являются измерителями для амперометрического измерения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе с поправкой на гематокритное число. Предлагаемые измерители в типичном случае включают в себя: (а) средство приложения первого электрического потенциала к электрохимической ячейке, в которую уже была введена проба, и измерения тока в этой ячейке как функции времени для получения первой переходной характеристики время-ток; (б) средство приложения второго электрического потенциала к электрохимической ячейке и измерения тока в этой ячейке как функции времени для получения второй переходной характеристики время-ток; (в) средство определения значения предварительной концентрации исследуемого вещества и переменной γ на основании упомянутых первой и второй переходных характеристик время-ток; и (г) средство удаления обусловленной гематокритным числом составляющей из значения предварительной концентрации для выведения концентрации исследуемого вещества в пробе с поправкой на гематокритное число. Средства (а) и (б) могут быть любыми подходящими средствами, причем характерные средства описаны в публикации WO 97/18465 и патенте США № 5942102, содержания которых включены в настоящее описание посредством данной ссылки. Средства (в) и (г) в типичном случае являются вычислительными средствами, которые присутствуют в измерителе и выполнены с возможностью использования измеренных первой и второй переходных характеристик время-ток для получения в конечном итоге концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число. Как таковое, средство (в) в типичном случае является средством, выполненным с возможностью определения предварительной концентрации интересующего исследуемого вещества и переменной γ на основании первой и второй переходных характеристик время-ток и с использованием описанных выше уравнений. Точно так же, средство (г) в типичном случае является средством, выполненным с возможностью определения концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число с использованием описанных выше уравнений, причем это средство в типичном случае содержит коэффициент поправки на гематокритное число.

Нижеследующие примеры предлагаются для иллюстрации изобретения и ни в коем случае не несут ограничительный характер.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

I. Изготовление электрохимической испытательной полоски

Электрохимическую испытательную полоску, состоящую из двух металлизированных электродов, ориентированных с приданием им «сэндвичевой» конфигурации, изготавливали следующим образом. Верхний слой испытательной полоски представлял собой майларовую полоску, на которую напылено золото. Средний слой представлял собой слой с нанесенным с двух сторон клеем, с пробитым в нем отверстием, которое ограничивало зону или область реакции. Пробитое отверстие было круглым, с двумя расположенными рядом впускным и выпускным каналами. Нижний слой испытательной полоски представлял собой напыленный на майлар палладий. На поверхности напыленного палладия была осаждена пленка феррицианида и PQQ-зависимой глюкозодегидрогеназы.

II. Получение экспериментальных данных

Первую и вторую переходные характеристики время-ток для некоторого количества разных проб, отличающихся друг от друга концентрацией глюкозы и гематокритным числом, получали следующим образом. Пробу наносили на полоску, к которой прикладывали потенциал $-0,3$ В на протяжении периода времени 10 секунд, за которым следовал второй импульс $+0,3$ В на протяжении периода 3-10 секунд (причем эти электродные потенциалы указаны относительно золотого электрода).

III. Выведение коэффициента поправки на гематокритное число для глюкозы

Выводили C_0 , переменную γ и $\alpha(C_0, \gamma)$ для широкого круга значений концентрации глюкозы и значений гематокритного числа, измеренных согласно описанному выше.

C_0 выводили с использованием уравнений:

$$i(t) = i_y \{ 1 + 4 \cdot \exp(-4\pi^2 D t / L^2) \},$$

$$i_y = 2FADC_0/L,$$

где:

i_y - установившийся ток после приложения второго электрического потенциала;

i - измеренный ток, который является функцией времени;

5 D - коэффициент диффузии для данной ячейки, причем этот коэффициент можно определить, исходя из первого закона Фика, т.е. $J(x,t) = -D^{dC(x,t)/dx}$;

L - толщина прокладки;

t - время приложения 2-го электрического потенциала, причем $t=0$ в начале импульса;

C_0 - предварительная концентрация исследуемого вещества;

10 F - постоянная Фарадея, т.е. $9,6485 \cdot 10^4$ Кл/моль; и

A - площадь рабочего электрода.

Переменную γ выводили с использованием уравнения:

$$\gamma = i_y / i_{cp},$$

где:

15 i_y - установившийся ток после приложения второго электрического потенциала; а

i_{cp} - средний ток за находящийся в пределах периода длительностью 10 секунд интервал от 8,5 до 9,5 секунд, в течение которого прикладывали первый импульс.

$\alpha(C_0, \gamma)$ определяли с использованием уравнения:

20 $\alpha(C_0, \gamma) = \text{«ЕСИ-концентрация»} / (C_0 - 22 \text{ мг/дл})$,

где ЕСИ-концентрация - это концентрация глюкозы, определенная с помощью модели 23 А анализатора глюкозы фирмой «Еллоу Спрингс Инструментс» (описанного в патенте США №5968760, содержание которого включено сюда посредством данной ссылки).

25 Для широкого диапазона значений концентрации глюкозы и значений гематокритного числа строили трехмерный график охарактеризованных выше C_0 , γ и $\alpha(C_0, \gamma)$, который показан на чертеже. Затем на этом графике осуществляли эмпирическую подгонку к простому уравнению для описания поверхности. Остаток эмпирически подогнанных данных контролировали на предмет проверки качества модельного подгоночного уравнения.

Обнаружено, что эмпирическое уравнение имеет вид:

30 «Коэффициент поправки на гематокритное число» =
 $= 1 / ((0,6637) + ((4,9466 * \ln(C_0)) / C_0) + (-0,4012 * \ln(\gamma)))$.

Обнаружено, что вышеупомянутый коэффициент поправки является применимым для тех ситуаций, в которых $\gamma > 0,7$ и $C_0 > 40$ мг/дл.

35 IV. Сравнение значений концентрации с поправкой на гематокритное число с определенными значениями ЕСИ-концентрации

Формировали набор прогнозируемых данных путем испытания нескольких полосок на глюкозу в широком диапазоне концентраций глюкозы и уровней гематокрита. На основании этих данных выводили уравнение поправки на гематокритное число с использованием модели, соответствующей членам C_0 , γ и $\alpha(C_0, \gamma)$. Обнаружено, что использование 40 уравнения поправки на гематокритное число, основанного на наборе прогнозируемых данных, вызывает попадание большинства точек данных в пределы диапазона $\pm 15\%$.

Также обнаружено, что такое отклонение концентрации глюкозы приводит к гематокритному числу, составляющему 42%, и это показывает, что влияние гематокритного числа на этот набор данных является минимальным. Чтобы подтвердить достоверность этого алгоритма, 45 испытали другую партию датчиков глюкозы на различных донорах крови. Обнаружено, что этот алгоритм по-прежнему обеспечивает внесение поправки, учитывающей влияние гематокритного числа, аналогично ранее полученным показаниям.

Вышеупомянутые результаты и рассмотрение демонстрируют, что предлагаемое изобретение обеспечивает создание простого и мощного инструмента для получения 50 значений концентраций исследуемых веществ, причем из этих значений по существу, если не полностью, исключена погрешность, обусловленная гематокритным числом. Поскольку предлагаемые способы основаны лишь на измерении переходных характеристик время-ток, их можно осуществить на практике с помощью относительно простых

электрохимических устройств. Кроме того, необходимо использовать лишь малые объемы проб, и при этом обеспечиваются относительно малые продолжительности анализов, т.е. быстрый анализ. Как таковое, предлагаемое изобретение представляет собой значительный вклад в данную область техники.

5 Все публикации и патенты, процитированные в этом описании, включены в него посредством ссылки, и это следует рассматривать так, как если бы каждая отдельная публикация или патент были включены посредством ссылки. Цитирование любой публикации обусловлено ее раскрытием до даты подачи данной заявки и не должно рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение может порочить такая
10 публикация, являющаяся результатом ранее сделанного изобретения.

Хотя вышеупомянутое изобретение описано с некоторой подробностью посредством чертежа и примера, приводимых для ясности понимания, специалистам в данной области техники будет ясно в свете положений этого изобретения, что в него можно внести определенные изменения и модификации в рамках объема притязаний, определяемого
15 прилагаемой формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Способ определения концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе с поправкой на гематокритное число путем введения физиологической пробы в
20 электрохимическую ячейку, содержащую отстоящие друг от друга рабочий электрод и электрод сравнения и систему окислительно-восстановительных реактивов, включающих в себя фермент и медиатор; приложения первого электрического потенциала, имеющего первую полярность, к электрохимической ячейке, измерения тока и получения первой переходной характеристики время-ток; приложения второго электрического потенциала,
25 имеющего вторую полярность, к электрохимической ячейке, измерения тока и получения второй переходной характеристики время-ток; и выведения предварительной концентрации исследуемого вещества на основании первой и/или второй переходных характеристик время-ток, отличающийся тем, что предварительную концентрацию исследуемого вещества за вычетом значения сигнала фона умножают на коэффициент поправки на
30 гематокритное число для определения концентрации исследуемого вещества с поправкой на гематокритное число.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что коэффициент поправки на гематокритное число является функцией предварительной концентрации исследуемого вещества и переменной γ электрохимической ячейки.

35 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что физиологической пробой является цельная кровь или ее производные.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что исследуемым веществом является глюкоза.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что коэффициент поправки на гематокритное число равен $1/((0,6637)+((4,9466 \cdot \ln(C_0))/C_0)+(-0,4012 \cdot \ln(\gamma)))$, где C_0 - предварительная
40 концентрация исследуемого вещества, а γ - переменная соотношения токов электрохимической ячейки.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что первый электрический потенциал является отрицательным, а второй - положительным.

7. Измеритель для амперометрического измерения концентрации исследуемого
45 вещества в физиологической пробе, содержащий (а) средство приложения первого электрического потенциала, имеющего первую полярность, к содержащей пробу электрохимической ячейке и измерения тока в ячейке как функции времени для получения первой переходной характеристики время-ток; (б) средство приложения второго электрического потенциала, имеющего противоположную первой вторую полярность, к
50 электрохимической ячейке и измерения тока в ячейке как функции времени для получения второй переходной характеристики время-ток; (в) средство определения значения предварительной концентрации исследуемого вещества и переменной γ на основании первой и/или второй переходных характеристик время-ток; (г) средство удаления

обусловленной гематокритным числом составляющей из значения предварительной концентрации для выведения концентрации исследуемого вещества в пробе.

8. Измеритель по п.7, в котором электрохимическая ячейка выполнена в виде электрохимической испытательной полоски.

- 5 9. Система, предназначенная для применения при определении концентрации исследуемого вещества в физиологической пробе, содержащая (1) электрохимическую испытательную полоску; (2) измеритель, содержащий (а) средство приложения первого электрического потенциала, имеющего первую полярность, к содержащей пробу электрохимической ячейке и измерения тока в ячейке как функции времени для получения
- 10 первой переходной характеристики время-ток; (б) средство приложения второго электрического потенциала, имеющего противоположную первой вторую полярность, к электрохимической ячейке и измерения тока в ячейке как функции времени для получения второй переходной характеристики время-ток; (в) средство определения значения предварительной концентрации исследуемого вещества и переменной γ на основании
- 15 первой и/или второй переходных характеристик время-ток; (г) средство удаления обусловленной гематокритным числом составляющей из значения предварительной концентрации для выведения концентрации исследуемого вещества в пробе.

20

25

30

35

40

45

50