

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040108- -00004-0000

Fecha: 2008-11-10 14:55:42 Dep: 2020 NUL CREACIONE
Lib: 11 PATENTELIYII Lve: 378 FASE NACIONAL
Act: 558 PETICION Folia: 2

Clarke, Moadet & C^u

COLOMBIA

SEÑORES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E.S.D.

REF: EXPEDIENTE No. 07.040.108
SOLICITANTE: BAYER HEALTHCARE LLC.

ASUNTO: SOLICITUD EXAMEN DE PATENTABILIDAD

DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad solicitante, pido a usted que se proceda a examinar si la invención, cuya patente se tramita en el expediente de la referencia, es patentable.

Adjunto al presente memorial el recibo No. 08-86,267 de 4 de noviembre de 2008 por la suma de \$420.000.00, con lo cual queda cubierta la tasa oficial correspondiente a dicho estudio.

Señor Superintendente,

DILIA RODRIGUEZ D' ALEMAN
C.C. 41.654.882 de Bogotá
T.P. 20824 del C.S.J.

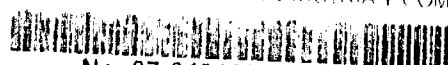
P-924

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 96,267
FECHA : NOVIEMBRE 4 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040108-00004-0000

Fecha: 11/10/14 05:42 Dep. 2020 NULORACIONE
Cta. 11 PATENTILYII Lvs 3/8 FASLNACIONAL
Act 58 PLICION Folios 2

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MOTT Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	95151114	31/10/2008	39,200,000.00

***** CONCEPTO *****

CART. IDENTIFICADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	85 EXAMEN DE PATECTABILIDAD DE INVEN	420,000.00
	TOTAL :	\$ 420,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 07-40108

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**

FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **594** DE

FECHA **31 DE JULIO DE 2008** EL TÉRMINO HÁBIL SEÑALADO POR LA LEY

EXPIRA EL **27 DE OCTUBRE DE 2008**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI _____

NO X

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

REC'D 16 FEB 2006

WIPO

PCT

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

20/4

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/036806

International filing date (day/month/year)
12.10.2005

Priority date (day/month/year)
12.10.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
G01N27/30, G01N33/487, C12Q1/00

Applicant
BAYER HEALTHCARE LLC

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Komenda, P

Telephone No. +49 89 2399-2777



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

172
International application No.
PCT/US2005/036806

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN

Por la cual se resuelve un recurso de reposición

Rad. PCT/03-003729

sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial”.

Por su parte, el artículo 18 de la Decisión 486 señala: “Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.”

EL CASO EN ESTUDIO

Examinado nuevamente el expediente se advierte que el objeto de la solicitud se refiere a “una composición fungicida útil para el tratamiento de enfermedades fúngicas de cultivos, que consta de un aceite vegetal con poder secante elevado, así como un procedimiento de tratamiento de cultivos, utilizando una composición según la invención.” (ver folio 39)

Previo a argumentar las razones por las cuales manifiesta su inconformidad recuerda el recurrente que el problema técnico que resuelve la presente invención es “suministrar una composición fungicida que contiene iprodiona fungicidamente efectiva libre de cualquier aceite mineral aunque manteniendo o incrementando la capacidad de la sustancia activa para controlar hongos que dañan las plantas.”

Considera el recurrente que “el documento (D1) (ES-8307448) no afecta el nivel inventivo de la presente invención por las siguientes razones: D1 se refiere a una composición basada en uso de iprodiona en asocio con algunos aceites. Se mencionan algunos aceites vegetales. Un aceite emulsificante que es un ácido graso emulsionado también se utiliza en la composición descrita de acuerdo con este documento. Sin embargo, los aceites minerales son los aceites preferidos para ser combinados con la iprodiona de acuerdo con la descripción de dicho documento. La elección de estos aceites se hace mediante una selección de acuerdo al respectivo valor HLB de estos aceites y no teniendo en consideración el poder secante o los índices de yodo tal como se hace para la presente invención...”

Tal como lo señala el recurrente el documento ES 8307448 (D1) divulga una combinación entre iprodiona y aceites de origen mineral y vegetal y aunque los preferidos en esta publicación son los aceites de origen mineral, también se sugiere la combinación del fungicida con aceites de origen vegetal; más aún el ejemplo 4 de la anterioridad citada es específico en presentar la combinación iprodiona con un aceite vegetal (cacahuete).

Así las cosas, si bien es cierto que el antecedente D1 no muestra específicamente combinaciones de iprodiona con alguno de los aceites vegetales relacionados en la reivindicación 1 de la solicitud en estudio, ciertamente divulga la posibilidad de combinar iprodiona con un aceite de origen vegetal y formular una composición

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. ¹²³
PCT/US2005/036806

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 2-13,14-20,22-26

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 2-13,14-20,22-26
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

5. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 5395356	1	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

DORIS ELENA POLO CÓRDOBA
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha _____

CONCEPTO TÉCNICO No. 3219	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202065
-------------------------------------	--

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/036806

174

(2)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	1,14,21
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1,14,21
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1,14,21
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

De acuerdo a las observaciones hechas anteriormente en el numeral 3.1., para efectos del examen, se toman las características técnicas esenciales estructurales de los elementos y la disposición de las partes o componentes definidos en la reivindicación 1, no teniéndose en cuenta los parámetros de operación o funcionales de la invención.

La reivindicación 1 enseña: *"Un sistema de corrección de presbicia que comprende: un sistema para remover tejido de estroma corneal, el cual incluye medios para remover tejido y el cual incluye un sistema de láser y medios de control para proveer corrección de presbicia a un estroma corneal expuesto de un ojo; caracterizado porque dichos medios de control incluyen medios directivos los cuales dirigen el sistema de láser para formar una región de ablación en dicho estroma corneal (...)"*

4.1.2. Respecto al estado de la Técnica:

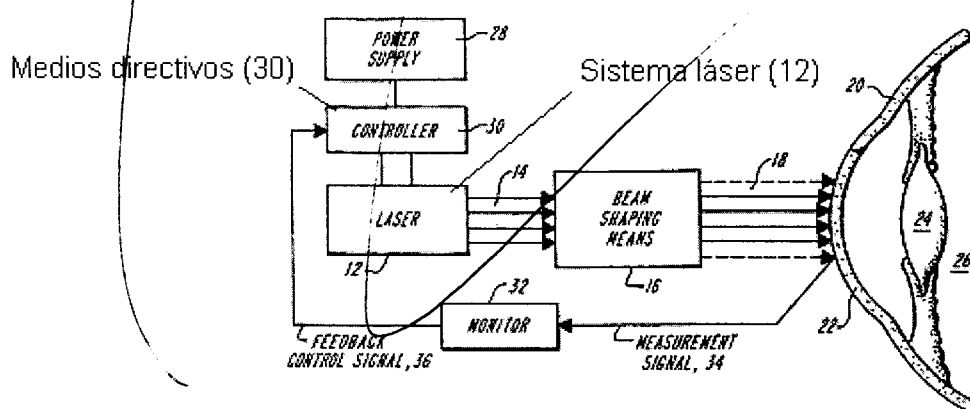
El documento **US 5395356** (mencionado como **D1**) enseña un sistema y un método para realizar una cirugía correctiva de presbicia, que comprende:

Un sistema láser (12), el cual es un medio para eliminar el tejido de estroma corneal.

Medios directivos (30), que dirigen el sistema láser para realizar la corrección presbiópica.

Ver el resumen; columna 2, líneas 25-35; columna 12 líneas 7-18; y figura 3; en folios 341, 342, 343

Figura 3 del documento D1 US 5395356



4.1.3. Al comparar elemento por elemento de la invención, tal como está definida en la reivindicación independiente 1, con las enseñanzas del documento **D1**, se observa que todas las características de dicha reivindicación, fueron anticipadas por el documento **D1**. Por lo tanto, la reivindicación 1, tal y como está reivindicada y sus dependientes, podrían verse afectadas por falta de novedad.

Se observa que la reivindicación independiente 1, está formulada en un sentido amplio y general, comprendiendo características técnicas que se encuentran en el estado de la técnica.

Section III:

1. The independent claims do meet the requirements of Article 6 PCT since they leave the skilled reader in doubt as to which subject-matter protection is sought for. The wording used for specifying the "thickness of the first layer" (claim 1) tries to define the respective feature by the result to be achieved ("so that") in conjunction with the application of a "read pulse" and the consequence of such application, rather than simply indicating a value for the intended thickness of said layer.
2. The problem is compounded by the fact that the specification does not provide sufficient disclosure for solving the above problem. As far as can be understood from the title of the application and from the description of figures 2 and 9, the presence of a "diffusion barrier layer" appears to be essential for the claimed subject-matter. However, the application leaves it unclear which of the various "first", "second" or "reagent" layers defines the diffusion barrier layer, how those various layers are arranged relative to each other, how the diffusion barrier layer is obtained, which material is used for such a layer or against which compound(s) the said layer functions as a barrier.
3. In order to conduct a meaningful search, the main embodiment represented by the following combination of features was selected:

"An electrochemical sensor strip, comprising
- a base;
- a first electrode on the base, where the first electrode comprises at least one first layer including a reagent layer; and
- a second electrode on the base;
- the layer on the first electrode having a thickness of from 1 μm to 30 μm (see claims 8 and 9)."

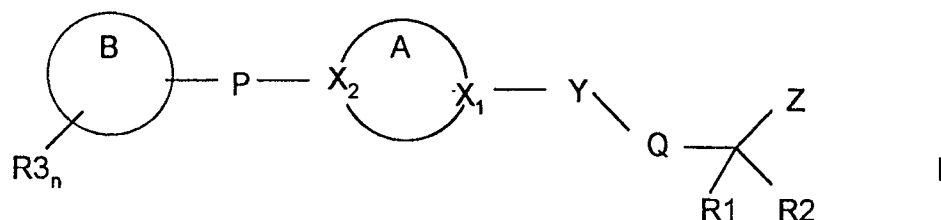
- Since the above combination of features is clearly known in the art of glucose sensor strips (see below), documents which additionally describe read pulse detection and "diffusion barrier layers" have also been considered.

CLAIMS:

What we claim is:-

1. A compound of the formula I

5



- 10 wherein ring B is a monocyclic or bicyclic alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl or heteroaralkyl ring comprising up to 12 ring atoms and containing one or more heteroatoms independently chosen from N, O, and S; alternatively ring B may be biphenyl; ring B may optionally be linked to ring A by a C1-4 alkyl or a C1-4 alkoxy chain linking the 2-position of ring B with a carbon atom alpha to X2;

- 15 each R3 is independently selected from hydrogen, halogen, NO2, COOR wherein R is hydrogen or C1-6alkyl, CN, CF3, C1-6 alkyl, -S-C1-6 alkyl, -SO-C1-6 alkyl, -SO2-C1-6 alkyl, C1-6 alkoxy and up to C10 aryloxy, n is 1,2 or 3;

- 20 P is $-(CH_2)_n-$ wherein $n = 0, 1, 2$; or P is an alkene or alkyne chain of up to six carbon atoms; where X2 is C; P may be -Het-, $-(CH[R6])_n$ -Het-, -Het- $(CH[R6])_n$ -or -Het- $(CH[R6])_n$ -Het-, wherein Het is selected from -CO-, -S-, SO-, -SO2-, -NR6-, or -O- wherein n is 1 or 2; or P may be selected from -CO-N(R6)-, -N(R6)-CO-, -SO2-N(R6)- and -N(R6)-SO2-, and R6 is hydrogen, C1-6 alkyl, up to C10 aralkyl or up to C9 heteroalkyl;

- Ring A is a 5-7 membered aliphatic ring and may optionally be mono- or di-substituted by optionally substituted C1-6 alkyl or C1-6 alkoxy, each substituent being independently selected from halogen, C1-6 alkyl or an oxo group.

- 25 X1 and X2 are independently selected from N and C, where a ring substituent on ring A is an oxo group this is preferably adjacent a ring nitrogen atom;

Y is selected from -SO2- and -CO-;

Z is -CONHOH, Y is -CO- and Q is selected from -C(R6)(R7)-, -C(R6)(R7)-CH2-, -N(R6)-, and -N(R6)-CH2- wherein R6 is as defined above, and solely in relation to Q as here

Section V:

Reference is made to the following documents:

- D1: US-A-5 312 590
- D2: EP-A-0 878 708
- D3: EP-A-0 741 186

Novelty (Article 33(2) PCT:

1. Due to the above, only the following opinion can be given.
2. Document D1 describes an electrochemical sensor strip comprising all the features as outlined above (Section III, 3.) and in addition also describes the read pulse detection (50 to 60 milliseconds, Example 2) and the provision of a diffusion barrier layer (see figure 1 and corresponding description, in conjunction with column 4, lines 4-6). Document D1 is thus novelty destroying for such a subject-matter.

Similar considerations apply with respect to independent claims 14 and 21.

3. Document D2 describes an electrochemical sensor strip of the type defined above, which strip has a thickness of 6 μm (column 3, lines 29, 30). The sensor of D1 would thus be novelty destroying for claim 9.

Inventive step (Article 33(3) PCT:

1. Document D3 describes an electrochemical sensor strip of the type defined above, where the duration of a read pulse is 5 seconds (page 5, lines 21-24). It does not appear to involve an inventive step to reduce the said duration to "less than 5 seconds", as presently recited in claim 4. -

Industrial applicability (Article 33(4) PCT):



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : C07D 213/42, 239/42, 295/22, 213/74, 417/12, 401/12, 215/12, 333/20, 241/12, A61K 31/44, 31/495		A1	(11) International Publication Number: WO 00/12478
			(43) International Publication Date: 9 March 2000 (09.03.00)
(21) International Application Number: PCT/GB99/02801			(74) Agent: PHILLIPS, Neil, Godfrey, Alasdair; Astrazeneca PLC, Global Intellectual Property, Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG (GB).
(22) International Filing Date: 25 August 1999 (25.08.99)			
(30) Priority Data: 98402144.4 31 August 1998 (31.08.98) EP 99401351.4 4 June 1999 (04.06.99) EP			(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) Applicants (for all designated States except US): ZENECA LIMITED [GB/GB]; 15 Stanhope Gate, London W1Y 6LN (GB). ZENECA-PHARMA SA [FR/FR]; "Le Galien", 1, rue des Chauffours, Boîte Postale 127, F-95022 Cergy Cedex (FR).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): BARLAAM, Bernard, Christophe [FR/US]; 1800 Concord Pike, P.O. Box 15437, Wilmington, DE 19850-5437 (US). NEWCOMBE, Nicholas, John [GB/GB]; Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG (GB). TUCKER, Howard [GB/GB]; Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG (GB). WATERSON, David [GB/GB]; Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG (GB).			Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(54) Title: ARYLPIPERAZINES AND THEIR USE AS METALLOPROTEINASE INHIBITING AGENTS (MMP)			
(1)			
(57) Abstract Arylpiperazines of formula (I) useful as metalloproteinase inhibitors, especially as inhibitors of MMP 13.			

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/036806

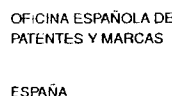
Industrial applicability is acknowledged.

Section VII:

1. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in document D1 is not mentioned in the description, nor is this document identified therein.
2. The independent claims are not in the two-part form in accordance with Rule 6.3(b) PCT, which in the present case would be appropriate, with those features known in combination from the prior art (document D1) being placed in a preamble (Rule 6.3(b)(i) PCT) and with the remaining features being included in a characterising part (Rule 6.3(b)(ii) PCT).
3. The features of the device claims are not provided with reference signs placed in parentheses (Rule 6.2(b) PCT).

Section VIII:

1. Claims 4 to 7, 12, 17 and 22 are unclear since they try to define the subject-matter by the result to be achieved.



⑪ Número de publicación **2 241 073**

⑤ Int. Cl. : **G01N 27/327**
C12Q 1/00
G01N 33/543
C12M 1/40

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: 98107765 .4
(86) Fecha de presentación : 29.04.1998
(87) Número de publicación de la solicitud: 0878708
(87) Fecha de publicación de la solicitud: 18.11.1998

(S4) Título: Biosensor electroquímico con tapa.

(30) Prioridad: 12.05.1997 US 854439

① Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2005

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente
16.10.2005

73 Titular/es: **Bayer Corporation**
100 Bayer Road
Pittsburgh, Pennsylvania 15205-9741, US

(72) Inventor/es **Charlton, Steven C.;
Johnson, Larry D.;
Musho, Matthew K. y
Slomski, Dennis**

74 Agente: Carpintero López, Francisco

DESCRIPCIÓN

Biosensor electroquímico con tapa.

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un biosensor electroquímico que puede utilizarse para la cuantificación de un componente específico (análito) de una muestra líquida y a un procedimiento de fabricación de dicho biosensor. Los biosensores electroquímicos del tipo objeto de la invención se divulgan en las Patentes estadounidenses 5.120.420 y 5.264.103. Los dispositivos divulgados en estas Patentes tienen una base aislante sobre la cual se imprimen uno o más electrodos de carbón, electrodos que se cubren con una capa reactiva que consiste en un polímero hidrófilo en combinación con una oxidoreductasa específica para el analito. Hay normalmente un elemento separador situado sobre la base, elemento que se recorta para obtener una pieza en forma genérica de U y una pieza de cubierta, de forma que cuando la base, el elemento separador y la pieza de cubierta se unían conjuntamente, se crea un espacio capilar que contiene los electrodos y la capa reactiva. Además de la oxidoreductasa, se incluye un aceptor de electrones sobre la capa reactiva o en otra capa dentro del espacio capilar. Un polímero hidrófilo, por ejemplo celulosa de carboximetilcelulosa, se utiliza para facilitar la extracción del fluido de prueba acuoso al interior del espacio capilar.

En la Patente estadounidense 5.141.868 se divulga otro sensor en el cual los electrodos están contenidos dentro de un intersticio capilar. Esta referencia describe el procedimiento preferente de preparar el sensor acoplado la base y las placas de cubierta utilizando una resina compuesta de partículas sólidas, como por ejemplo partículas de vidrio fino, para asegurar la deseada separación entre ellas para de esta forma constituir el intersticio. También se describe la conformación de los sensores a partir de un revestimiento de plástico o vidrio, manifestándose que "cuando se utiliza un revestimiento de plástico, puede consistir en moldes de precisión, por ejemplo provistos de separadores de forma de aristas para conseguir la separación controlada de las paredes que componen las cavidades capilares".

La presente invención se refiere a un sensor electroquímico compuesto de dos partes: una parte inferior (base) que soporta la estructura de electrodo y de los agentes reactivos químicos que se depositan en y de acuerdo con lo requerido y una parte superior (tapa) que se emplea para constituir los tres lados de un espacio capilar donde la base constituye el cuarto lado tras su acoplamiento con la tapa y la base. A la base y la tapa son laminados conjuntamente, por ejemplo, por medio de una soldadura sónica. El sensor se emplea haciendo el extremo abierto del capilar en una pequeña gota de fluido de prueba, como por ejemplo sangre, la cual es absorbida hacia el interior del tubo capilar de forma que cubra la enzima y el aceptor de electrones sobre la superficie del electrodo. En una forma de realización preferente, el electrodo incorpora una oxidoreductasa y un aceptor de electrones distribuidos en una matriz polimérica hidratable situada sobre su superficie. Debido a la naturaleza hidratable de la matriz polimérica, se dispersa en el fluido de prueba acuoso permitiendo de esta forma que la oxidoreductasa, que es glucosa oxidasa cuando el sensor está diseñado para determinar la concentración de glucosa en la

sangre, que oxide el analito y el aceptor de electrones para lanzar los electrones sobrantes del electrodo operativo, creando de esta forma una corriente medible proporcional a la concentración del analito del fluido de prueba.

La construcción del sensor de dos piezas de la presente invención no requiere una tapa enzimática. Por ejemplo, hay una categoría general de sensores que detectan directamente en la superficie del electrodo. Ejemplos de sensores del tipo indicado serían aquellos para detectar el hematocrito o un sensor para detectar plomo en la sangre. Otra clase de sensores son aquellos que tienen un agente aglutinante o de adhesión sobre una superficie del electrodo que inicia una reacción química. Así, un sensor con un agente aglutinante capaz de liberar una porción detectable, como por ejemplo protones, cuando el analito se fija al agente y medir la modificación del cambio de pH de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, el sistema de unión puede ser un par anticuerpo-anticuerpo en el que el anticuerpo podría impedir o potenciar una reacción en la superficie del electrodo.

La fabricación de los sensores de la técnica anterior según lo antes descrito conlleva el uso de una parte extra, la capa separadora, y una serie de etapas de tratamiento que no se requieren en el sensor de dos partes (base y tapa) en que consiste la presente invención. El sensor de la presente invención se prepara mediante un procedimiento directo que conlleva las etapas definidas en la reivindicación 11.

Sumario de la invención

La presente invención es un sensor electroquímico para la detección de un anabito de una muestra de prueba de fluido que consiste en:

- una placa de base aislante;
- una capa de electrodo sobre la placa de base; y
- una tapa de material deformable que proporciona un área cóncava en una porción de la misma, dejando al tiempo una superficie plana rodeando la porción cóncava de tal forma que, cuando se acopla con la base, la tapa y la base forman un espacio capilar en el cual la enzima está disponible para contactar directamente con la muestra de prueba de fluido que es absorbida hacia el interior del espacio capilar (muestra de prueba de fluido) mediante acción capilar.

Típicamente, el electrodo está en conexión operativa con una enzima que reacciona con el analito para producir electrones móviles.

Descripción de la invención

La construcción del sensor al que se refiere la presente invención se ilustra mediante la Fig. 1. El sensor 34 consta de una base aislante 36 sobre la cual se impregna en secuencia (generalmente mediante técnicas de impresión de pantalla, una configuración de conductor eléctrico 38, una estructura de electrodo (39 y 40), una configuración aislante (dieléctrica) 42 y finalmente una capa reactiva 44. La función de la capa reactiva es convertir la glucosa, u otro analito, estoiométricamente en una especie química que es mensurable electroquímicamente, en términos de la corriente que produce, mediante los componentes de la configuración de electrodo. Las dos partes 39 y 40 de la impresión de electrodo proporcionan los elec-

79p
D1

trodos operativos y de referencia necesarios para la determinación electroquímica. La tinta de electrodo, que tiene un grosor aproximado de 14μ ($0,00055''$), típicamente contiene carbón electroquímicamente activo. Los componentes de la tinta conductora son una mezcla de carbón y plata, escogida para proporcionar una vía de resistencia química baja entre los electrodos y el modificador con el cual están en conexión operativa mediante su contacto con la configuración de conductor situada en el extremo en forma de cola de pescado del sensor 45. El grosor típico de la configuración entera es de 6μ ($0,00025''$). La función de la estructura dieléctrica es aislar los electrodos respecto de la muestra de prueba excepto en un área definida cerca del centro de la estructura de electrodos 41 para potenciar la reproducibilidad de la lectura del sensor. Un área definida es importante en este tipo de determinación electroquímica porque la corriente medida depende tanto de la concentración del analito como del área del electrodo que está expuesta al analito que contiene la muestra de prueba. Una típica capa dieléctrica está constituida por poliuretano modificado con acrilato curado con rayos UV de un grosor aproximado de 10μ ($0,0004''$). La tapa 46, que proporciona un espacio cóncavo 48 conformado típicamente mediante el embudo de una lámina plana del material deformable, está perforada para proporcionar una salida de aire 50, y está unida a la base 36 en una operación de sellado. La tapa y la base están selladas entre sí mediante soldadura sónica en la cual la base y la tapa son primero alineadas y a continuación comprimidas mutuamente entre un miembro vibratorio de termosellado o cuerno y una mordaza fija. El cuerno está configurado de manera que se produce el contacto únicamente con las zonas de la tapa planas, no embudadas. Se utiliza energía ultrasónica procedente de un cristal u otro transductor se utiliza para excitar vibraciones en el cuerno metálico. Esta energía mecánica se disipa a medida que el calor de la junta de plástico permite el aglutinamiento de los materiales termoplásticos. El procedimiento se describe completamente en las Patentes estadounidenses 3.805.136; 3.573.139; 3.562.041 y 4.313.774.

Materiales adecuados para la base aislante comprenden policarbonato, tercalfato de polietileno y polímeros acrílicos y de vinilo dimensionalmente estables así como mezclas de polímero como por ejemplo policarbonato/tercalfato de polietileno y estructuras de lámina metálica, como por ejemplo un laminado de nailon/aluminio/cloruro de polivinilo. La tapa se fabrica típicamente a partir de un material de lámina polimérica deformable, como por ejemplo policarbonato o un tercalfato de polietileno de calidad embudible, tercalfato de polietileno modificado glicol o un compuesto de lámina metálica como por ejemplo una estructura de lámina de aluminio. La capa dieléctrica puede fabricarse a partir de un poliuretano modificado con acrilato que puede curarse por luz UV o humedad o un polímero de vinilo que es termocurable.

La presente invención facilita el empleo de una tapa embudida (46, fig. 1) por oposición al empleo de un separador como en los elementos de sensor de la técnica anterior en los cuales, en lugar del embudo en relieve, los dos lados del espacio capilar se constituyen a partir de un elemento separador. El empleo de la tapa embudida permite evitar el empleo de una parte extra, esto es el separador, y una serie de etapas de tratamiento. Las etapas implicadas en el montaje

del separador que contiene el sensor son:

- preparar las completas estructuras de electrodo incluyendo la capa reactiva; se necesita incluir en la tapa de más arriba un agente para inducir un efecto de mecha de la sangre en el interior del espacio capilar;
- añadir una capa adicional que contenga un agente para inducir el efecto de mecha de la sangre en el interior del espacio capilar; esta capa puede ser obviada si se incluye el agente en la capa química;
- cortar por troquel un canal capilar en el interior del material separador que es típicamente un laminado de desprendible/adhesivo/material separador/adhesivo/recubrimiento/desprendible;
- retirar el recubrimiento desprendible de un lado del material separador y fijar el separador a la base; y
- retirar el recubrimiento desprendible y ensamblar la tapa con el otro lado del separador.

La presente invención permite fabricar un sensor mediante los siguientes etapas:

- imprimir unos electrodos sobre el material de base y, opcionalmente, aplicar la placa reactiva sobre los electrodos;
- opcionalmente revestir una capa adhesiva sobre la superficie inferior de la tapa;
- embutir la parte superior y los lados del espacio capilar dentro de la tapa; y
- acoplar la capa a la base y sellarla entre sí mediante soldadura sónica.

Los sensores de la presente invención pueden fabricarse acoplado un conjunto de tapas, esto es una lámina plana de material de piezas semelaboradas de tapa que tengan una pluralidad de indentaciones cóncavas embudidas en su interior, con un correspondiente conjunto de bases y a continuación perforando unos sensores individuales en el conjunto con un troquel después de que la pieza semelaborada de tapa y la lámina del material de base hayan sido acopladas y termoselladas.

La construcción de un sensor de acuerdo con la presente invención se efectúa de acuerdo con el siguiente ejemplo general:

Ejemplo general

En este ejemplo, se fabrican un gran número de tapas de sensor a partir de una lámina enrollada de policarbonato que ha sido desenrollada para obtener una superficie plana. Esta lámina es designada como pieza matriz semelaborada de tapa, puesto que constituirá la fuente de una multiplicidad de tapas.

Una solución de revestimiento bifuncional, consistente en una dispersión de poliuretano acuosa, es extendida sobre un lado de la lámina de policarbonato utilizando una barra de alambre enrollada o una revestidora con troquel ranurado y secada al aire. Este material proporciona una superficie humedificable en el interior de la tapa para potenciar la capacidad del espacio capilar para ser llenado con el fluido de prueba. El grosor del revestimiento secado es de $0,0007''$

a $0,002''$ (17μ a 15μ), oscilando el grosor del revestimiento húmedo entre $0,0014''$ y $0,005''$ (35μ a 125μ) para un contenido sólido típico entre el 40% y el 50%. La capa bifuncional tiene una cierta viscosidad durante un corto periodo de tiempo después del secado y cuando la lámina es desenrollada se introduce un recubrimiento o capa de intercalamiento temporal en contacto con el revestimiento. Después de un periodo de unas horas, la viscosidad inicial se pierde posibilitando que la pieza matriz semelaborada de tapa de policarbonato sea desenrollada sin perjudicar el revestimiento. Materiales apropiados para el recubrimiento son las poliolefinas o tercalfato de polietileno.

La etapa siguiente del proceso consiste en embutir las áreas cóncavas y perforar diversos agujeros en la lámina de policarbonato para el registro y seguimiento antes de que las cintas hendidas de la pieza matriz de tapa sean enrolladas.

La pieza semelaborada de base, normalmente de policarbonato, es impresa con diversas tintas para formar los electrodos y a continuación recubierta por encima con una capa dieléctrica en una configuración predeterminada diseñada para dejar al descubierto una superficie descada del electrodo. El material bifuncional debe adherirse al material dieléctrico cuando la tapa se acopla directamente con la capa dieléctrica. Con el fin de ensamblar la pieza semelaborada de tapa a la base, la cinta continua de la pieza de tapa es desenrollada haciéndola discurrir a través de un laminador especial donde es registrada y a continuación combinada con una tira de la pieza de material semelaborado de la base. Después de la soldadura sónica la cinta continua de laminado es enrollada para formar una bobina.

Con el fin de separar sensores individuales a partir de la cinta laminada, se hace pasar el laminado a través del equipo de perforación en el cual los sensores individuales son perforados desde un conjunto preparatorio para ser sumados dentro de un paquete de vialitas de papel metálico ("blisters") para su almacenamiento. En el procedimiento preferente de empleo de los sensores, estos son empacquetados en un disco circular que tiene diez compartimentos individuales

dispuestos radialmente. El disco está hecho a partir de un laminado de plástico/papel metálico de aluminio que se sella para aislar el sensor de la humedad ambiente y de los demás sensores con una cubierta de papel de aluminio de ruptura por presión, disco que está montado dentro de un instrumento específicamente diseñado. Para recuperar un sensor, una cuchilla es introducida hacia dentro atravesando de la lámina metálica de ruptura por presión hasta el interior de un compartimento alargado individual situado en el extremo más próximo al eje central del disco y a continuación es desplazado radialmente hacia el perímetro del blister. Al hacerlo, la cuchilla encaja con la parte trasera (cola de pescado) del sensor de ese compartimento. El desplazamiento radial de la cuchilla empuja la punta del sensor saliendo a través de la lámina metálica de ruptura por presión y a través de las partes del instrumento, de forma que el morro del sensor queda completamente fuera del instrumento y listo para recibir una muestra de fluido de prueba, por ejemplo sangre. Para esta etapa, es esencial que la unión entre la base y la tapa del sensor soporte las fuerzas efectivas generadas cuando el sensor sale empujado a presión a través de la lámina metálica. Este procedimiento de proporcionar un sensor listo para su uso se describe de forma más acabada en la Patente estadounidense 5.575.403.

En uso, la punta del sensor, que contiene la abertura al espacio capilar, es puesta en contacto con una pequeña gota de la muestra de prueba de fluido que es normalmente sangre producida por un pinchazo en el dedo. La sangre es rápidamente absorbida hacia el interior del espacio capilar donde se inicia la interacción con la enzima y el instrumento es ajustado para iniciar su secuencia cronizada. Es esencial que la sangre sea absorbida muy rápidamente hacia el interior del espacio capilar, con independencia de su orientación espacial, con el fin de que se inicie la secuencia cronizada. Las dimensiones del espacio capilar oscilan normalmente entre $0,125 \text{ mm}$ y $0,38 \text{ mm}$ ($0,005''$ y $0,015''$) de altura y $2,5 \text{ mm}$ a $3,75 \text{ mm}$ ($0,1''$ y $0,15''$) de anchura para facilitar el arrastre de la sangre dentro del espacio capilar.

REIVINDICACIONES

1. Un sensor electroquímico para la detección de un analito de una muestra de prueba de fluido que consiste en los siguientes elementos de abajo arriba:

- a) una placa de base aislante;
- b) una capa de electrodo sobre dicha placa de base;
- c) una tapa de material deformable que proporciona un área cóncava en su porción central de tal forma que puede, cuando se acopla con la placa de base, la tapa y la placa de base forman un espacio capilar en el cual la capa de electrodo está disponible para contactar con la muestra de prueba de fluido que es absorbida hacia el interior del espacio capilar mediante acción capilar, en el que la tapa y la base están unidas entre sí mediante técnicas de soldadura sónica.

2. El sensor de la reivindicación 1 en el que hay una capa reactiva que incluye una enzima que reacciona con el analito para producir electrones móviles sobre la capa de electrodo.

3. El sensor de la reivindicación 2 que tiene una capa de material dieléctrico configurado sobre la capa de electrodo, de forma que solamente una porción de la capa de electrodo, según lo predeterminado por la configuración de la capa dieléctrica, está disponible para un contacto directo con el fluido de prueba.

4. El sensor de la reivindicación 3 en el que la tapa está configurada de forma que sus bordes se acoplan con la capa dieléctrica.

5. El sensor de la reivindicación 3 en el que la capa dieléctrica está configurada de forma que deja una porción de la capa de electrodo al descubierto para su

contacto directo con los bordes de la tapa.

6. El sensor de la reivindicación 2 en el que la enzima de la capa reactiva está combinada con un polímero hidrófilo.

7. El sensor de la reivindicación 6 en el que la capa reactiva contiene también un aceptor de electrones.

8. El sensor de la reivindicación 7 en el que el aceptor de electrones es un ferrocianuro.

9. El sensor de la reivindicación 6 en el que el polímero hidrófilo es óxido de polietileno.

10. El sensor de una de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el área cóncava se constituye grabando una lámina plana del material deformable.

11. Un procedimiento para la preparación de un sensor electroquímico que consiste en acoplar una base que soporta una estructura de electrodos sobre su superficie con una tapa de un material deformable que proporciona un espacio cóncavo para formar tres lados de un espacio capilar, tapa y base que proporcionan un sensor electroquímico que tiene un espacio capilar que está abierto a la atmósfera con una estructura de electrodo sobre la superficie de la base y que está expuesta al espacio capilar, en el que se hace que la tapa y la base se adhieran entre sí mediante soldadura sónica.

12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que la estructura de electrodo incorpora una oxidoreductasa y un aceptor de electrones distribuidos dentro de una matriz de polímero hidratable sobre su superficie.

13. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que la matriz de polímero hidratable está constituida por óxido de polietileno.

14. El procedimiento de la reivindicación 12 en el que la oxidoreductasa es oxidasa de glucosa y el aceptor de electrones es un ferrocianuro.

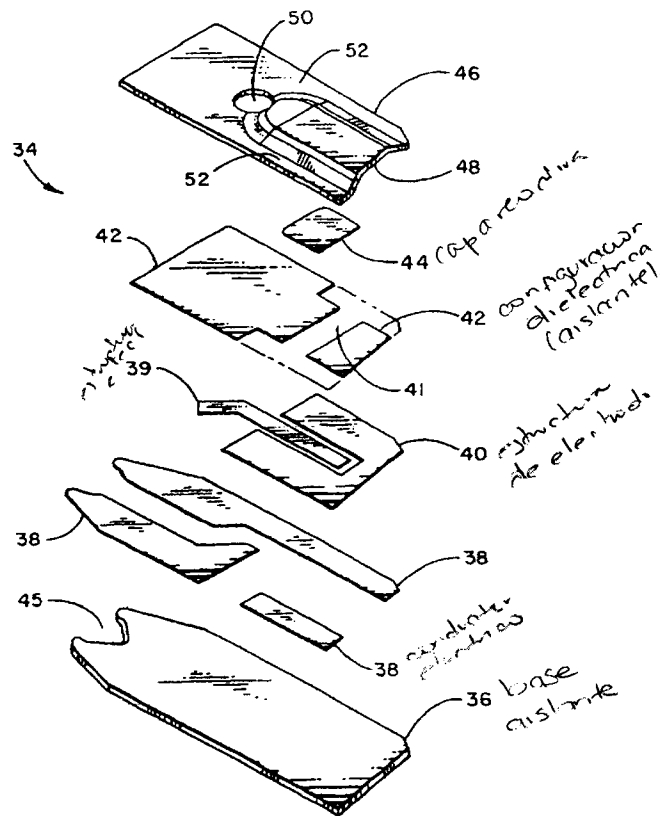


FIG. 1

United States Patent [19]
Gunasingham

US005312590A
[11] Patent Number: **5,312,590**
[45] Date of Patent: **May 17, 1994**

U.S. Patent

May 17, 1994

Sheet 1 of 5

5,312,590

[54] **AMPEROMETRIC SENSOR FOR SINGLE AND MULTICOMPONENT ANALYSIS**

[75] Inventor: **Hari Gunasingham, Singapore, Singapore**

[73] Assignee: **National University of Singapore, Kent Ridge, Singapore**

[21] Appl. No.: **342,075**

[22] Filed: **Apr. 24, 1989**

[51] Int. Cl.³ **G01N 27/12**

[52] U.S. Cl. **422/56; 422/82.02; 422/82.03; 422/98; 435/11; 435/14; 435/817; 204/403**

[58] Field of Search **422/56, 57, 82.01, 82.02, 422/82.03, 98; 435/817, 11, 14; 204/403**

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,225,410 9/1980 Pace 422/98 X
4,517,291 5/1985 Scago 435/817 X
4,525,265 6/1985 Abe et al. 435/817 X
4,545,382 10/1985 Higgins et al. 204/403 X
4,871,440 10/1989 Nagata et al. 435/817 X

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0127958 12/1984 European Pat. Off. .
0136362 4/1985 European Pat. Off. .

OTHER PUBLICATIONS

Henning et al., J. Am. Chem. Soc., 104, 5862-5868 (1982).

Primary Examiner—James C. Housel

Assistant Examiner—Jeffrey R. Snay

Attorney, Agent, or Firm—Gregory O. Garmon

ABSTRACT

A device for detecting chemical species in liquids having one or more sensor elements is described. Each sensor element includes a test electrode coated with a perfluorinated ion-exchange polymer film incorporating a redox mediator; an immobilized enzyme layer and, over this, a semipermeable membrane. The invention discloses the method whereby the test electrode is normally kept at a zero potential and then poised at a positive potential for a few milliseconds during which time the test signal is evaluated. The invention formulates a method for calibrating each measurement sample and reference solution wells. These are symmetrically arranged with respect to the sensor element so that the center of the sample solution well and the center of the reference solution well are equidistant to the sensor element. Thus the diffusion of chemical species from the sample and reference solutions occurs equally and can be correlated. The invention additionally discloses a method for selectively detecting a number of species in a single sample drop through the provision of multi-sensor elements. The technique proposed in the invention is particularly suitable for the determination of glucose and cholesterol in biological fluids.

13 Claims, 5 Drawing Sheets

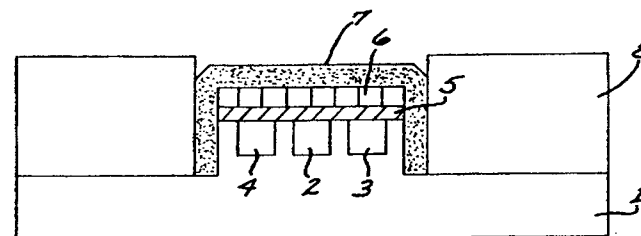
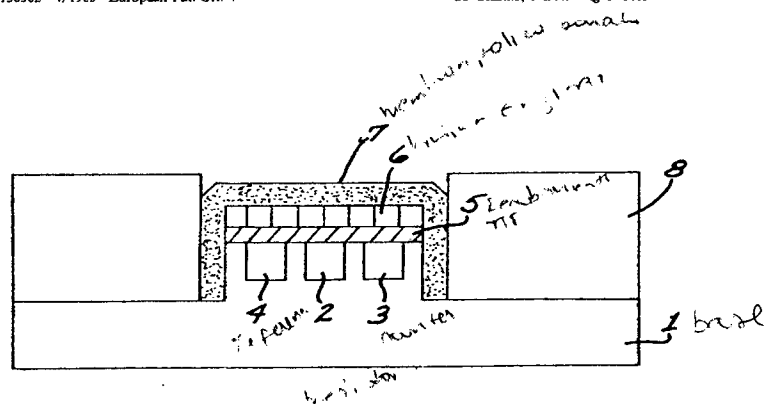


FIG. 1

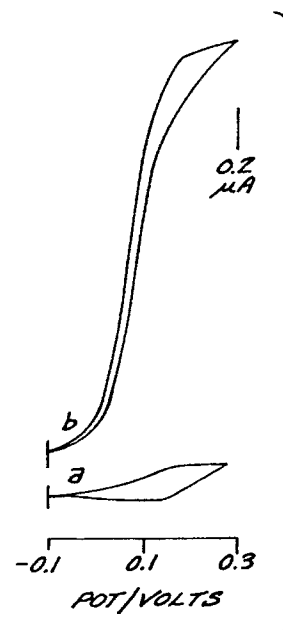


FIG. 2

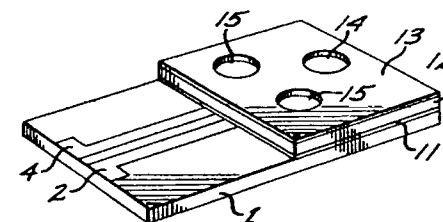


FIG. 3

FIG. 4

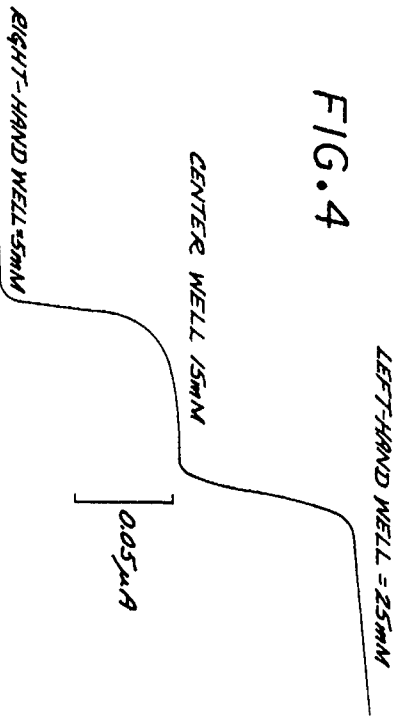


FIG. 5

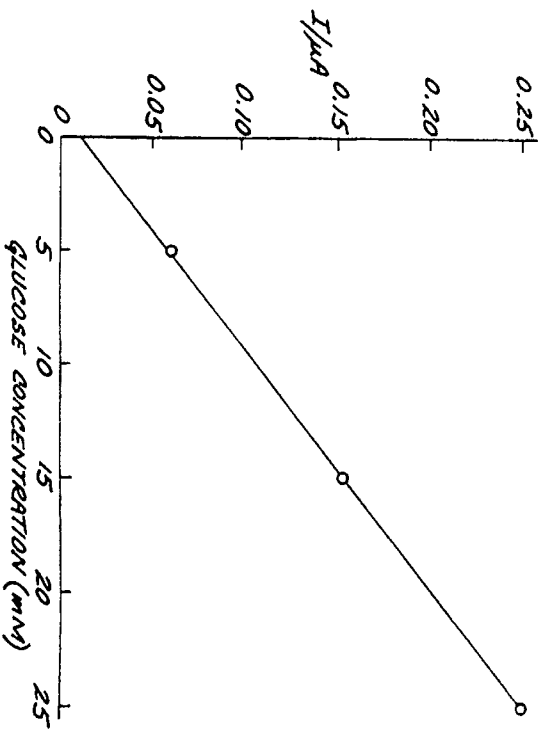


FIG. 6(e)

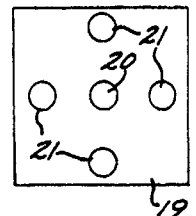


FIG. 6(d)

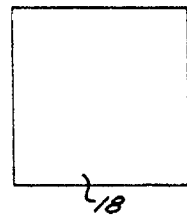


FIG. 6(c)

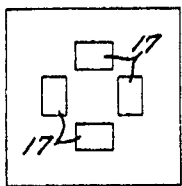


FIG. 6(b)

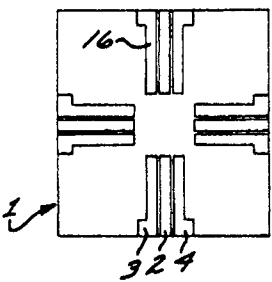
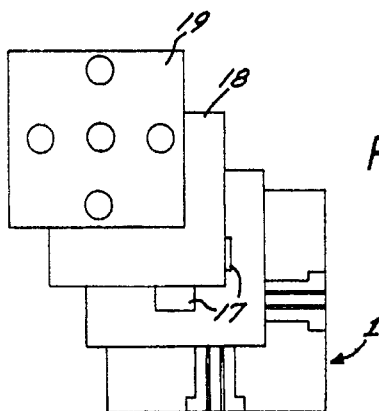


FIG. 6(a)



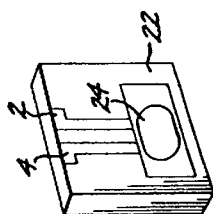
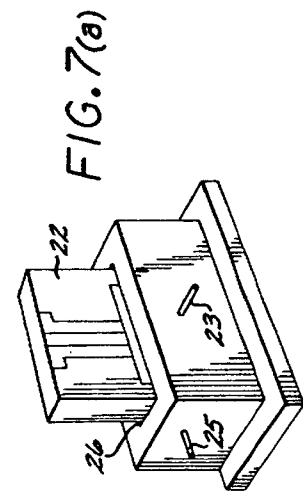


FIG. 7(a)

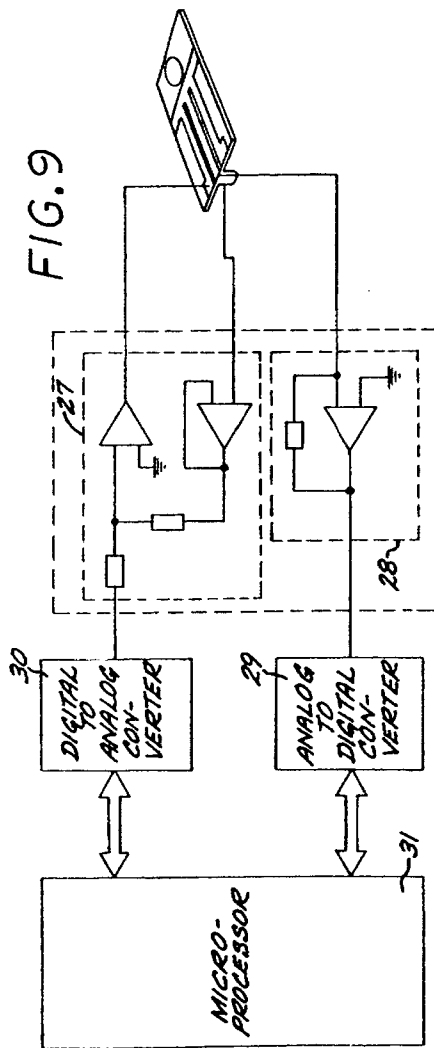


FIG. 9

FIG. 8(a)

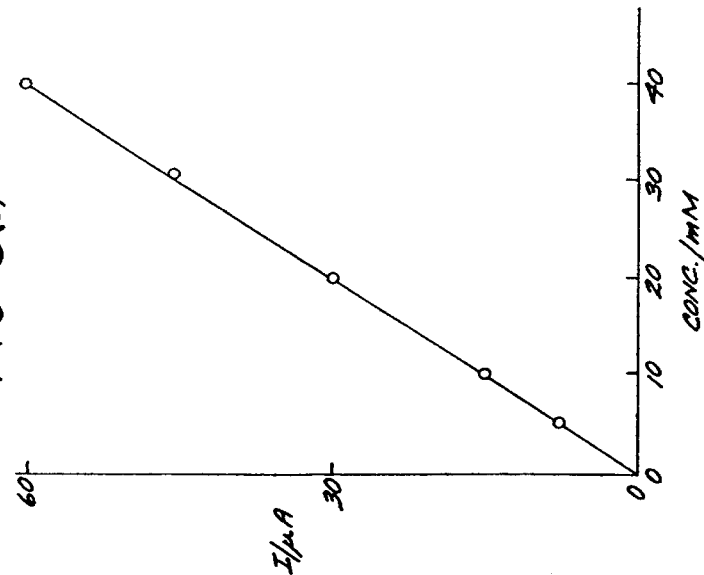
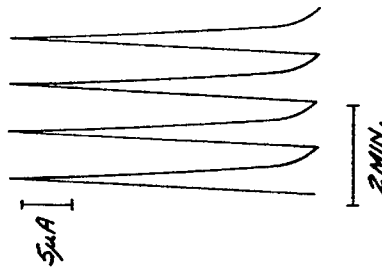


FIG. 8(b)



AMPEROMETRIC SENSOR FOR SINGLE AND MULTICOMPONENT ANALYSIS

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to a method for the analysis of chemicals in liquids. This is accomplished by means of a dry chemistry test device made up of one or more selective amperometric sensor elements coated with specific chemical reagent layers and an electronic apparatus that provides a pulse measurement voltage to the sensors.

The analysis of chemical species in liquids can be carried out by wet chemistry or by dry chemistry systems. Wet chemistry analyses employ reagents in liquid solution and are widely used in both manual and automated analytical methods. In dry chemistry systems, a complete chemistry for a particular analysis is miniaturized into a single test probe or device. No prior reconstitution of reagents is required. The dry chemistry methods are often simpler in design, require less reagent manipulation, give quicker results and are more stable. These advantages coupled to the feasibility of using small instrumentation favours more decentralized clinical testing.

In a U.S. Pat. No. 4,042,335 issued to Clement on Aug. 16, 1977, a multilayered test device for the analysis of liquids is described. The device includes a reaction layer including a composition that is interactive in the presence of a predetermined analyte to provide a diffusible detectable species, and a registration layer that is permeable to the detectable species and within which the species can be detected by diffuse reflectance spectroscopy. The element can include other layers which provide for radiation blocking and for uniform spreading of the test sample.

Dry chemistry systems can be defined as disposable, single-use devices or multi-use devices, depending on whether the analytical reaction occurring in the reaction layer is reversible.

Dry chemistry tests based on enzyme-catalysed reactions have become widely used. By way of example are dry chemistry test devices for the measurement of glucose in blood developed by Boehringer Mannheim Corporation. The device is a flat strip that employs a reaction layer consisting of glucose oxidase-peroxidase enzymes coupled to a redox mediator dye. The reaction layer is supported in an inert film carrier matrix. The blood sample is analysed by placing about 50 μ l of whole blood on the surface of the dry chemistry strip. The plasma containing the glucose is separated from the red blood cells by the carrier matrix. After about 1-3 minutes, the red blood cells are removed by washing or wiping and the colour developed is measured by reflectance spectroscopy. In a similar device developed by Ames Division, Miles Laboratories Inc., a separate film membrane is placed over the carrier matrix to separate the red blood cells.

Electrochemical dry chemistry enzyme test devices have been developed as an alternative to spectrophotometric devices. These include amperometric and potentiometric devices. Electrochemical systems have the advantage that they can be used as disposable, single-use devices as well as multiple-use devices in continuous-flow and automated systems.

Amperometric dry chemistry enzyme test devices include a sensing element comprising a measuring or working electrode and reference electrode. The electrodes are coated with an enzyme and optional mediator

and, over this, a membrane to prevent interfering species from reacting at the measuring electrode. When an appropriate test potential is applied, the measuring electrode provides a faradaic current proportional to the concentration of the chemical species being determined.

As an example of prior art in this field, U.S. Pat. No. 3,539,455 issued to Clark in Nov. 1970 discloses an amperometric dry chemistry device based on glucose oxidase suitable for the determination of glucose.

The role of the redox mediator is to serve as an electron shuttle between the active center of the enzyme and the electrode. Various redox mediators have been used in enzyme electrodes. For example, an article published in *Clinica Chimica Acta* in 1974 describes a range of mediators which include ferricyanide, quinones and organic dyes. European patent application EP 0,136,362, A1 published on 04 Oct. 1985 describes an amperometric test device for monitoring blood-glucose levels comprising a measuring electrode and reference electrode coated with a porous support carrying glucose oxidase and a redox mediator, and over this, a membrane to prevent interfering molecules from reacting at the measuring electrode.

Higgins et al. have described the use of ferrocenes as a mediator for glucose oxidase-based enzyme sensor for glucose in European patent application EP 0,127,958, A2 published on Dec. 12, 1984; U.S. Pat. No. 4,545,382 dated Oct. 8, 1985; and U.S. Pat. No. 4,711,245 dated Dec. 8, 1987. Another mediator system employs organic metal coatings based on salts of tetracyanoquinodimethane as first described by Cenas and Kulys, *Bioelectrochem Bioenerg.* 8(1981)103. Albery has filed an application based on this work in European patent application EP 0,184,909, A2. Albery et al. have also shown that tetraethiafulvalene can act as a mediator for glucose oxidase in the determination of glucose (W.J. Albery, P.N. Bartlett and D.H. Craston, *J. Electroanalytical Chemistry*, 194(1985)223).

Although spectrophotometric and amperometric dry chemistry test devices are gaining increasing usage, present systems suffer from a number of practical limitations.

First, in the case of disposable single-use dry chemistry test devices, it is not possible to calibrate every measurement. Presently the practice is only to calibrate every batch by means of a two point calibration using test devices representative of the batch. It is then assumed that the calibration holds for the remaining devices in the batch. The difficulty that arises is that there is no way of knowing if any of the remaining devices are defective for whatever reason.

A further consideration is that, because the measurement of chemical species in blood is sensitive to the blood matrix, it is necessary to use reference calibrators that mimic the average human blood matrix as close as possible. The need for calibration is even greater for amperometric devices where changes in the electrode response characteristics can occur for a number of reasons.

Further, single use test devices, especially for blood-glucose monitoring are often intended for home care applications where the user is generally not highly skilled or trained. Consequently, poor analytical results may be obtained where the user technique is incorrect or where the test devices have been badly handled or stored in adverse conditions.

Second, present disposable, single-use test devices normally can determine only one chemical species. Thus, if several different analyte in a particular sample have to be determined, multiple samples have to be obtained and a different sensor must be used for each analyte. This is time consuming, requires extra manipulation and is expensive.

Third, in present systems because of the requirement that all devices in a batch must be identical, the manufacturing and quality control process must be quite stringent increasing the cost of production. Again this is more difficult to achieve for dry chemistry devices based on amperometric sensing.

Fourth, redox mediators that are commonly used in amperometric glucose-oxidase based sensors have increased solubility in the active, oxidised form. Thus, when the sensor is continuously poised at a positive operating potential in multiple-use applications, loss of mediator in the oxidised form occurs readily from the electrode surface. This leads to a loss of sensitivity and a limitation in the linear range with time.

Fifth, even though the use of a redox mediator enables the operating potential to be reduced by several hundred millivolts, significant interference from electroactive species such as ascorbic acid is still found. For some cases the mediator can actually enhance the signal due to the interfering species. This leads to erroneous results that can have serious clinical consequences.

Because of these problems, previous approaches to enhancing the performance of amperometric dry chemistry enzyme test devices have not been entirely successful.

Accordingly, it is an object of the present invention to provide a general amperometric dry chemistry enzyme test device for measuring chemical species such as glucose and cholesterol in liquids.

It is another object of the present invention to provide a method for measuring glucose concentrations in liquids using the enzyme glucose oxidase.

It is a further object of the present invention to provide a method for measuring chemical species such as glucose and cholesterol in liquids by providing a means for calibrating the test device for each measurement.

Yet another object of the invention is to provide a method for measuring chemical species such as glucose and cholesterol in liquids using a test device having multiple sensors to simultaneously measure more than one chemical species.

Still, a further object of the present invention is to provide a method for measuring chemical species such as glucose and cholesterol in liquids using a selective sensor element comprising an electrode system coated with a perfluorinated cation exchange polymer film incorporating a redox mediator.

Yet another object of the present invention is to provide a method for measuring chemical species such as glucose and cholesterol in liquids using a pulse detection mode to minimise loss of the mediator and enable reactivation of the sensor electrode.

Still other objects of the invention will in part be obvious, and will, in part, be apparent from the following description.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention relates to a method and apparatus for measuring a wide range of chemical species in liquids. In its general embodiment it employs a flat test device comprising a number of symmetrically arranged sensor

elements that enable multi-species determination from a single sample drop. Each sensor element is coated with a unique reaction layer that makes it responsive to specific chemical species. Additionally, all the sensor elements are coated with a single membrane which serves the dual function of a diffusion barrier and filter. An insulating layer is further coated over the membrane with specific provision for wells where the sample and reference solutions may be placed. According to the preferred form of the invention, the sample well is centrally located so that chemical species present in the sample can diffuse equally to the various sensing elements. The reference solution wells are located adjacent to the specific sensing element. The center of the sample solution well and the center of the reference solution well are equidistant to the respective sensing element so that the diffusion of chemical species from the sample and reference solutions occurs equally.

According to one preferred form of the invention, the sensing element comprises a working electrode and reference electrode. The working electrode can be made of carbon paste, platinum or gold whereas the reference electrode is made of silver coated with a silver chloride layer. The reference electrode can alternatively be made of carbon, gold or platinum. The working electrode is coated with a reaction layer consisting of an enzyme specific to the chemical species being detected. An optional redox mediator can be included in the reaction layer to take the place of the naturally occurring oxygen to transfer electrons from the enzyme to the electrode.

In the case a mediator is used, it is preferable to have it incorporated into a perfluorinated ion exchange polymer film that is coated on the test electrode. The ion exchange polymer is preferably a copolymer of tetrafluoroethylene and perfluoro [2-(fluorosulfonylthoxy) propylvinyl ether manufactured by E.I. du Pont Nemours & Co. Inc commonly referred to by its trademark, Nafion. This polymer combines the hydrophobic properties of its Teflon backbone with the superacidity and selective permeability of sulfonic acid functional groups. The key property of Nafion that is exploited in this invention is the fact that the polymer is permeable to cations but is impermeable to anions and nonpolar compounds. Thus it is able to exclude anionic interferences such as that of ascorbic acid and paracetamol.

Whereas various mediator compounds can be used in accordance with the invention, the preferred form of mediator is tetraethiafulvalene (2,2'-bi-1,3-dithiole) or its derivatives.

The tetraethiafulvalene (TF)-Nafion system provides a unique mediator system whereby the selectivity of the sensor element is enhanced and electrode fouling minimised. Also, the stability of the sensing element is enhanced because of the ability of Nafion to selectively bind positively charged, oxidised forms of TTF. The TTF-Nafion matrix also provides a medium for ionic conduction as well as electronic conduction which further improves the performance of the sensor.

Another aspect of the present invention therefore is a method of using the TTF-ion exchange polymer as a redox mediator system for enzyme reactions.

According to another form of the invention, the sensing element can utilise a third electrode in addition to the working and reference electrode. The purpose of the third electrode is provide improved potential control where a potentiostat is used.

The enzyme system used depends on the chemical species that is to be detected. It can be selected from a range of flavoproteins which include glucose oxidase and haem-containing enzymes such as horseradish peroxidase. Horseradish peroxidase can be used in conjunction with other hydrogen peroxide generating enzymes such as cholesterol oxidase.

Another aspect of the invention relates to the use of a pulse detection mode whereby the test electrode is normally kept at zero potential. The test signal is then only evaluated during the few milliseconds that the electrode is poised at the positive test potential. By doing this it is possible to minimize the loss of mediator, enhance the electrocatalytic performance and increase the linear range.

The invention also relates to a measurement apparatus comprising an electronic circuit for applying predetermined pulse potential sequence to each sensing element and a multiplexed current-to-voltage converter that enables the monitoring of the current derived from each sensing element in a specified sequence whereby the sample and reference values can be differentiated. A microprocessor is used to direct the actual sequence and it also records the current in digital form and converts this into concentration units by comparison with values obtained for the reference solutions either by a standard addition method (where a single reference solution is used) or by a two point calibration (where two reference solutions are used).

A presently preferred use and application of the invention is the measurement of chemical species such as glucose and cholesterol in physiological fluids such as blood and urine. In blood-glucose analysis a sample drop as small as 10 μ l can be used. The analysis is done automatically in a specific sequence under the control of the microprocessor.

A key advantage of the invention is that by virtue of the ability to calibrate each measurement it is feasible to ensure a high level of accuracy.

In accordance with the invention a method of measuring chemical species in liquids is provided. The method includes steps of i) fabricating a dry chemistry amperometric test device comprising one or more sensor elements each coated with a redox mediator/ion exchange polymer film, enzyme and semipermeable membrane ii) providing a pulse mode of detection and iii) providing a means of calibrating every measurement. The invention can be seen as a marked improvement over existing amperometric sensors for both single use and multi-use applications. The sensor system has particular application to the measurement of chemical species such as glucose and cholesterol in biological fluids. Further, the system enables multi-species measurements using a single strip and a single sample drop of less than 10 μ l. The system can be used for home monitoring as well as in the hospital and doctors clinic.

The nature of the invention is further illustrated in the drawing in which:

FIG. 1 is a schematic diagram showing the glucose sensor element.

FIG. 2 shows the current potential response of the glucose sensor element shown in FIG. 1 in the absence and presence of glucose.

FIG. 3 is a schematic diagram of the amperometric dry chemistry test device for single species analysis which can be used for glucose determination.

FIG. 4 shows the response of the amperometric test device shown in FIG. 3 for the sequential addition of low, medium and high glucose standards.

FIG. 5 shows a calibration plot derived from the response curves shown in FIG. 4.

FIG. 6 is a perspective exploded view (FIG. 6(a)) and plan views of the individual layers (FIGS. 6(b)-6(e)) amperometric dry test strip for multi-species detection.

FIG. 7 is a view of a flow cell (FIG. 7(a)) and its associated test device (FIG. 7(b)) used for continuous-flow analysis.

FIG. 8 shows a calibration plot (FIG. 8(a)) for successive injections of varying concentrations of glucose using the flow cell of FIG. 7 and glucose enzyme test device described in FIG. 3, using the flow injection profiles shown in FIG. 8(b).

FIG. 9 is a block diagram of an electronic apparatus according to one embodiment of the system.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

EXAMPLE 1

Nafion-Tetrathiafulvalene Mediator System

A sensor element according to one form of the invention that is selectively responsive to glucose is shown in FIG. 1. The base of the sensor (1) is made of an inert plastic such as teflon. The measuring (2), counter (3) and reference (4) electrodes are embedded in the plastic so that the surfaces of the electrodes are flush with the plastic base. The measuring (2) and counter (3) electrodes are made of graphite whereas the reference electrode (4) is made of silver. The silver surface is coated with silver chloride.

At least one of the working electrode (2) and the counter electrode (3) may be made by screen printing carbon ink onto the base strip (1). At least one of the working electrode (2) and the counter electrode (3) may be made by screen printing a metallo-organic liquid onto the base strip (1), which in this case is made of glass or ceramic, and then fired. The working electrode (2) may be made of gold or platinum, in the form of a microelectrode array formed on a substrate made of glass or silicon. The microelectrode is prepared by photolithographic technique.

The base electrodes are then coated with three distinct chemical layers. The first coating over the electrodes (5) consists of a film of Nafion incorporating tetrathiafulvalene (TTF). This is formed by droplet evaporating 10 μ l of a 5% by weight ethanolic Nafion solution. The TTF is preferably incorporated into the Nafion film in such a way as to ensure a uniform distribution in the film.

A preferred approach is to immerse the Nafion ion exchange polymer film coated electrode in an aqueous solution of 1 mM TTFCl for 10 minutes as described by Henning et. al. (J. American Chemical Society, 104(1982)5862-5868). The Nafion film turned a golden colour after immersion in the TTF⁺ solution due to the incorporation of TTF according to the following scheme:



Further treatment of the TTF-Nafion electrode may be done by potential cycling in an 1.0 M KBr solution

which leads to the formation of zones of TTF-Br crystals. Electrocrystallisation can be similarly carried out to form TTF-I and TTF-BF₄ crystals. These TTF crystals grow three dimensionally and are electronically conducting, thus facilitating electronic conduction through the Nafion film. Thus the TTF-Nafion film is unique as it provides electronic conduction as well as ionic conduction.

The enzyme layer (6) is next deposited by placing 10 μ l 2% glucose oxidase (EC 1.1.3.4 Type II from Aspergillus Niger) made up in 0.1 M pH 7.4 sodium phosphate buffer containing 0.01% w/v sodium azide over the Nafion/TTF layer. The enzyme was dried overnight at 4° C. 5 μ l of a freshly prepared 1:1 mixture of 10% bovine serum albumin (Fraction V 96-99% Albumin) and 2.5% glutaraldehyde was then placed over the dried enzyme layer covered by a 0.03 micron pore size polycarbonate membrane (7). The enzyme may also be a mixture of cholesterol oxidase, cholesterol esterase, and horseradish peroxidase, so that the sensor is selective to total cholesterol. The membrane may also be made of cellulose acetate, polyvinyl alcohol, or polyurethane. The test device was allowed to dry overnight at 4° C. The entire assembly was held in place by means of the plastic cover (8).

In place of the polycarbonate membrane, a cellulose acetate or cellulose nitrate membrane can be employed. In this case the membrane is formed by dip coating the sensor in a 1% w/v solution of the cellulose acetate or cellulose nitrate in an acetone/cyclohexanone mixture.

The interaction between the TTF/Nafion mediator and glucose oxidase was investigated by DC cyclic voltammetry. FIG. 2a shows a typical cyclic voltammogram obtained for the TTF/Nafion system in a phosphate buffer solution of pH 7.4. On addition of 20 mM glucose the cyclic voltammogram (FIG. 2b) shows a large anodic catalytic current due to the regeneration of the reduced form of the mediator by the immobilized glucose oxidase.

EXAMPLE 2

Pulse mode of detection

The glucose sensor shown in FIG. 1 was operated in the pulse potential mode in which the working electrode is pulsed between OV and +150 mV with respect to the silver-silver chloride reference electrode. The duration at OV ranges between 300 and 500 milliseconds, whereas the duration at +150 mV ranges between 50 and 60 milliseconds.

At OV, the TTF in the Nafion film is in the reduced form. The catalytic current response is thus only obtained when the working electrode is poised at +150 mV when the TTF is oxidised to TTF⁺. The test measurement is made 10 milliseconds before the end of the positive pulse to allow the working electrode capacitive charging current to decay.

EXAMPLE 3

Two point calibration

FIG. 3 shows a schematic diagram of an amperometric dry chemistry test device for glucose measurement that has specific provision for reference solution wells in addition to the sample well that enables either a two point or one point calibration. In this device only a measuring (2), and reference (4) electrodes are employed.

The electrodes are coated with the Nafion-TTF-Glucose oxidase reaction layer (11) and mem-

brane layer (12) as described in Example 1. Next an insulating layer (13) is placed over the membrane layer with provision for sample (14) and reference (15) wells.

The wells are symmetrically arranged in relation to the electrodes so that the center point of each well is equidistant to the center point of the measuring electrode (2). In an actual analysis, the reference and sample solutions are measured by placing a drop of the solution in the respective well while the pulse potential is applied to the working electrode. A specific sequence is followed: First the low reference solution is measured, then the sample solution is measured and then the high reference solution is measured.

FIG. 4 shows the current response of the device during an actual analysis and FIG. 5 gives a calibration plot which shows the response to be linear.

It will be obvious from the above example that a one point calibration can be performed using a single reference solution.

EXAMPLE 4

Multi-Species Detection

A dry chemistry test device for multi-species detection is shown in FIG. 6 which gives an exploded view of the device. The device consists of four symmetrically arranged sensor elements (16) that enable multi-species determination from a single sample drop. Each sensor element is coated with a unique reaction layer (17) that makes it responsive to specific chemical species. Additionally, all the sensor elements are coated with a single membrane (18) which serves the dual function of a diffusion barrier and filter. An insulating layer (19) is further coated over the membrane with specific provision for wells where the sample (20) and reference solutions (21) may be placed. The sample well is centrally located so that chemical species present in the sample can diffuse equally to the various sensing elements. The reference solution wells are located adjacent to the specific sensing element. The center of the sample solution well and the center of the reference solution well are equidistant to the respective sensing element so that the diffusion of chemical species from the sample and reference solutions occurs equally.

EXAMPLE 5

Continuous-flow monitoring

In another form of the invention, the dry chemistry device can be used for automated, continuous-flow monitoring. For this purpose use is made of a flow cell as described in FIG. 7.

In this flow cell, the dry chemistry test device (22) employed. The inlet (23) is placed directly opposite the central sample well (24) of the test device. The outlet (25) determines the level of the cell solution reservoir (26). The flow cell may have an inlet placed opposite a sample well, the inlet having a diameter of 0.3 to 0.5 millimeters and a distance from the sample well of 1 to 2 millimeters, and an outlet positioned to control the level of the solution in the cell reservoir. Although the diameter of the inlet is variable, the preferred diameter is 0.3 mm. The preferred distance between the inlet and test device is 1 mm.

A key feature of the flow cell design is the fact that the test device can be easily positioned and the fact that there is no need to enclose the cell to prevent leakages as in conventional designs.

The flow cell is usually operated in a flow-injection mode where a discrete volume of the sample (usually between 10 to 100 microliters) is injected into the cell to give a transient peak shaped response. The peak height is proportional to the concentration of the chemical species being measured.

FIG. 8 shows the actual flow-injection profiles and the corresponding calibration plot for successive injections of various concentrations of glucose standards. It can be seen that the plot is linear up to glucose concentrations of 40 mM.

EXAMPLE 6

Instrumentation

The microprocessor-based instrumentation for the control of the amperometric dry chemistry test devices is described in FIG. 9. The instrumentation comprises a potentiostat (27), sensitive current monitor (28), analog-to-digital converter (29), digital-to-analog converter (30) and microprocessor (31).

Pulse waveforms for the pulse mode of detection is conveniently generated by the microprocessor software through the digital-to-analog converter (30). The test current can be sampled via the analog-to-digital converter (29).

What is claimed is:

1. An amperometric dry chemistry test apparatus applicable to a broad range of chemical analyses, comprising:

a dry-chemical test device including

a bottom layer of a non-conducting material having at least two working electrode/reference electrode pairs supported by the non-conducting material with a face of each electrode exposed at a surface of the bottom layer;

a second layer overlying the bottom layer including a perfluorinated ion exchange film incorporating a redoxmediator overlying the bottom layer and the electrodes, and an enzyme-containing layer overlying the ion exchange film,

a third layer overlying the second layer comprising a permeable membrane, and

a top insulating layer overlying the third layer with separate wells for a sample and for a reference standard therein, the top insulating layer having at least one sample well and at least one reference well adjacent each working electrode/reference electrode pair, the distance from each of said at least one sample well to said adjacent working electrode/reference electrode pair being substantially the same as the distance from each said at least one reference well to that same working electrode/reference electrode pair; and

a microprocessor-based measuring apparatus operatively connected to the working electrode/reference electrode pairs.

2. An amperometric dry chemistry test apparatus applicable to a broad range of chemical analyses, wherein the apparatus is used to analyze several chemical species from a single sample drop of less than 10 microliters volume, comprising:

a dry-chemistry test device including

a bottom layer of a non-conducting material having at least two working electrode/reference electrode pairs supported by the non-conducting material with a face of each electrode exposed at a surface of the bottom layer,

a second layer overlying the bottom layer including a perfluorinated ion exchange film incorporating a redox mediator overlying the bottom

layer and the electrodes, and an enzyme-containing layer overlying the ion exchange film,

a third layer overlying the second layer comprising a permeable membrane, and

a top insulating layer overlying the third layer with separate wells for a sample and for a reference standard therein, the top insulating layer having a sample well for the sample drop and at least one reference well adjacent each working electrode/reference electrode pair, the distance from the sample well to said adjacent working electrode/reference electrode pair being substantially the same as the distance from each said at least one reference well to that same working electrode/reference electrode pair; and

a microprocessor-based measuring apparatus operatively connected to the working electrode/reference electrode pairs.

3. The test apparatus of claim 2, wherein

each working electrode is made of a material selected from the group consisting of carbon, gold, and platinum, and

each reference electrode is made of a material selected from the group consisting of carbon, gold, and platinum.

4. The test apparatus of claim 2, wherein each working electrode is made of a material selected from the group consisting of gold and platinum, and each working electrode is a microelectrode array formed on a substrate made of a material selected from the group consisting of glass and silicon.

5. The test apparatus of claim 2, wherein the ion exchange film consists of a Nafion film incorporating tetraethafulvalene.

6. The test apparatus of claim 2, wherein the membrane is made of a material selected from the group consisting of cellulose acetate, polyvinyl alcohol, and polyurethane.

7. The test apparatus of claim 2, wherein the measuring apparatus includes means for maintaining each working electrode at 0 volts for 300 to 450 milliseconds and then pulsing each working electrode to a test voltage for 60 to 60 milliseconds, and for evaluating a test current during the last 10 milliseconds of the pulse.

8. The test apparatus of claim 2, wherein the enzyme is glucose oxidase, so that the sensing element is responsive only to glucose.

9. The test apparatus of claim 2, wherein the enzyme is a mixture of cholesterol oxidase, cholesterol esterase and horseradish peroxidase, so that the sensor is selective to total cholesterol.

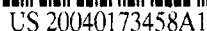
10. The test apparatus of claim 2, further including a flow cell which receives the test device.

11. The test apparatus of claim 2, further including at least two counter electrodes made of a material selected from the group consisting of carbon, gold, and platinum, each counter electrode being supported by the bottom layer adjacent one of said working electrode/reference electrode pairs.

12. The test apparatus of claim 11, wherein at least one of the working and counter electrodes is made by screen printing conductive carbon ink onto the non-conducting bottom layer.

13. The test apparatus of claim 11, wherein at least one of the working and counter electrodes is made by screen printing a metallo-organic liquid onto a substrate made of a material selected from the group consisting of glass or ceramic, and then fired.

* * * * *



Noda et al.

(10) Pub. No.: US 2004/0173458 A1

(43) Pub. Date: Sep. 9, 2004

(30) Foreign Application Priority Data

Jul. 18, 2001 (JP) 2001-218021

Publication Classification

Correspondence Address:

Douglas P Mueller

Merchant & Gould

3200 IDS Center

80 South 8th Street

Minneapolis, MN 55402-2215 (US)

(51) Int. Cl.⁷ C07K 1/26; C02F 1/469

(52) U.S. Cl. 204/452

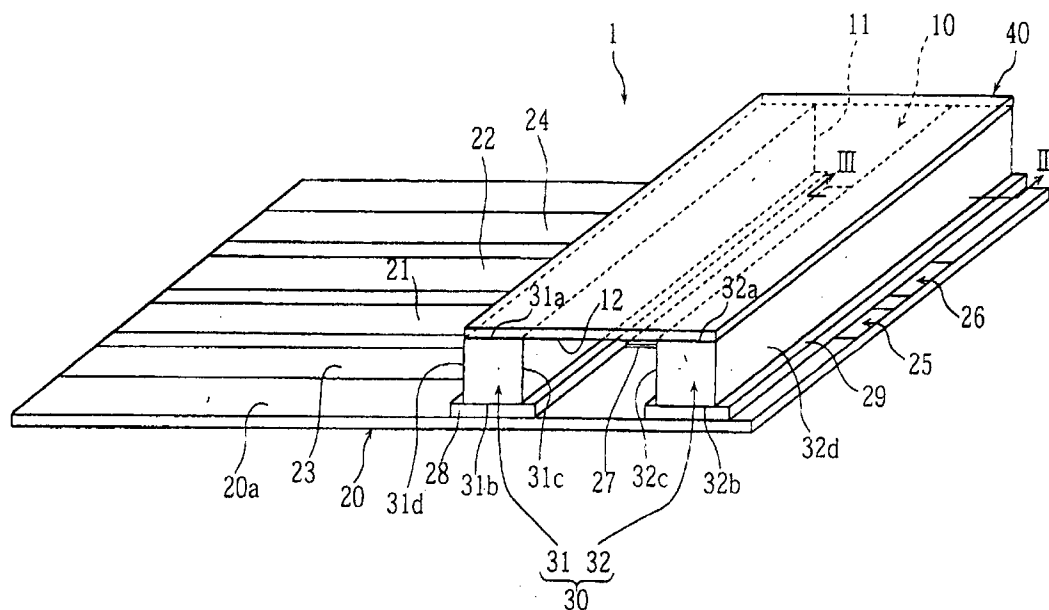
(57) ABSTRACT

The present invention relates to an analyzing implement (1) having a capillary for movement of a specimen liquid. The capillary has inner surfaces (21c, 32c) provided with a first and a second opposed electrodes opposed to each other. The implement (1) includes, for example, a substrate (20), a cover (40) and a spacer (30) between the substrate (20) and the cover (40). In this case, the capillary is provided by the substrate (20), the cover (40) and the spacer (30). Preferably, capillary forming surfaces (31c, 32c) of the spacer (30) are electrically conductive, in which case the surfaces (31c, 32c) provide the first and the second electrodes.

(21) Appl. No.: 10/483,442

(22) PCT Filed: Jul. 16, 2002

(86) PCT No.: **PCT/JP02/07239**



IMPLEMENT AND DEVICE FOR ANALYSIS

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to a technology for measurement of at least one of the followings: a concentration level of a specific component in a specimen liquid (e.g., a glucose concentration in a body fluid such as blood), and a physical quantity correlating to an amount of coexisting component in the specimen liquid.

BACKGROUND ART

[0002] For a purpose of measuring blood sugar levels privately at home and elsewhere, palm-size, portable blood sugar level testers are used widely. When measuring the blood sugar level with these handy-type blood sugar level testers, a biosensor which serves as an enzyme reaction field must be attached to the level tester, and then the blood must be supplied to the biosensor.

[0003] Blood contains solid component (blood cells), and it is known that the amount of blood cells influences the measurement. In order to overcome this, some methods of measurement include steps of measuring the percentage of blood-cell component (hematocrit value) in the blood, and correcting the calculated blood sugar level in accordance with the hematocrit value.

[0004] The hematocrit value can be measured, for example, by using methods disclosed in the Japanese Patent Laid-Open No. 11-18794 and the Japanese Patent Laid-Open No. 2002-55069. In each method, the hematocrit value is measured by correlation to the level of electric conductivity (resistance).

[0005] The method disclosed in the Japanese Patent Laid-Open No. 11-18794 uses a hematocrit value measuring element to measure the hematocrit value of blood. As shown in FIG. 10A and FIG. 10B, a hematocrit value measuring element 9 includes a substrate 90 formed with a pair of electrodes 91, 92 spaced from each other on the same plane, and a layer of reagent 93 covering a pair of ends of the electrodes 91, 92.

[0006] In a liquid phase such as blood, ions in the liquid serve as a carrier in electric charge transfer, and therefore in order to measure the level of electric conductivity of a liquid phase at a high accuracy, appropriate movement of the carrier is necessary between the electrodes. For this purpose, as shown in, a conceptual drawing in FIG. 11, electric lines of force between electrodes 95, 96 should desirably be uniform. In order to provide uniform electric lines of force, it is necessary that the measuring electrodes 95, 96 are opposed to each other, and that an area of the opposed surface (A2) in the electrodes 95, 96 must be greater than or equal to an area of the section (A1) of a body of an object liquid 97.

[0007] However, as clearly shown in FIG. 10A and FIG. 10B, the electrodes 91, 92 in the hematocrit measuring element 9 are spaced in the same plane, and therefore are not opposed to each other. This leads to an electric conductivity measurement based on a localized-carrier movement due to non-uniform electric lines of force. As a result, it is impossible to accurately measure the electric conductivity, nor the hematocrit value derived therefrom.

[0008] In the above method, the hematocrit value measurement is made using the hematocrit value measuring element 9, which is a separate implement from the biosensor implement which is for the measurement of blood sugar level. This poses another problem of increased cost in measurement incurred by the needs for two analyzing implements for a single measurement of the blood sugar level. Still another problem is inconvenience, i.e., the hematocrit value measurement using the hematocrit value measuring element 9 and the blood sugar level measurement using the biosensor must be made separately by replacing the hematocrit value measuring element 9 with the biosensor.

[0009] On the other hand, in the method disclosed in the Japanese Patent Laid-Open No. 2002-55069, a blood tester uses a blood sampling probe having a double-wall construction provided by an inner tube and an outer tube, and each of the inner tube and the outer tube has a tip serving as an electrode for measurement of the electric conductivity of blood.

[0010] This method is primarily for a large apparatus such as one having a sampling probe, and is not a technique applicable to a combination of a handy-type blood sugar level tester and a biosensor.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0011] It is an object of the present invention to provide a simple method of reducing the influence of the hematocrit value, for accurate measurement of the concentration level.

[0012] A first aspect of the present invention provides an analyzing implement including a capillary for movement of a specimen liquid. The capillary has an inner surface provided with a first and a second opposed electrodes opposed to each other.

[0013] The implement according to the present aspect includes, for example, a substrate, a cover covering the substrate, and a spacer between the substrate and the cover. In this case, the capillary is formed by the substrate, the cover and the spacer. Surfaces of the spacer forming the capillary are electrically conductive and provide the first and the second opposed electrodes.

[0014] The spacer includes, for example, two blocks opposed to each other. In this case each block is preferably formed entirely of an electrically conductive material. Each block is formed of an electrically insulating resin containing an electrically conductive polymer or an electrically conductive filler, or of a metal.

[0015] Alternatively however, each block may include an electrically insulating part and an electrically conductive part, and the electrically conductive parts of the pair of spacers serve as the first and the second electrodes. The spacer may be a single member having a slit. In this case, the first and the second electrodes are provided in mutually opposing surfaces in the slit.

[0016] Each block has, for example, a rectangular cross section defined by an upper surface, a lower surface and two side surfaces, with the upper surfaces and the lower surfaces being adhesive. In this case, the cover is bonded to the substrate via the two blocks. In other words, the spacer may serve as an adhesive layer for the cover to be bonded to the substrate.

[0017] The first and the second physical electrodes are for measurement of e.g. a dielectric constant, a resistance value or a physical quantity correlating to electrical conductivity of the specimen liquid.

[0018] The analyzing implement according to the present aspect preferably further includes a first and a second electrodes for measurement of a physical quantity correlating to concentration of a specific component of the specimen liquid.

[0019] The analyzing implement according to the present aspect includes, for example, a first through a fourth leads formed on the substrate. In this case, the capillary is formed by the substrate, the cover and the spacer. Surfaces of the spacer forming the capillary are electrically conductive and provide the first and the second opposed electrodes. The spacer is bonded to the substrate via an insulating layer, for example. The first and the second opposed electrodes are electrically connected to the third and the fourth leads respectively, via through holes formed in the insulating layer. On the other hand, the first and the second electrodes are formed on the substrate, and are electrically connected to the first and the second leads. This construction allows individual measurements, i.e., the measurement of the physical quantity correlating to e.g. dielectric coefficient using the first and the second opposed electrodes and the measurement of the physical quantity correlating to concentration of a specific component using the first and the second electrodes.

[0020] The first and the second opposed electrodes can also be used in the measurement of a responding current value correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid. In this case, the first and the second opposed electrodes may be used in a measurement of a physical quantity correlating to dielectric coefficient, resistance value or electric conductivity of the specimen liquid.

[0021] A second aspect of the present invention provides an analyzing device which uses an analyzing implement, for measurement of concentration of a specific component in the specimen liquid. The analyzing implement includes a capillary for movement of the specimen liquid; a first and a second opposed electrodes opposed to each other in an inner surface of the capillary for measurement of a first physical quantity correlating to dielectric constant, resistance value or electric conductivity of the specimen liquid; and a first and a second electrodes for measurement of a second physical quantity correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid. The analyzing device includes: DC voltage applying means for applying a DC voltage between the first and the second electrodes; AC voltage applying means for applying an AC voltage between the first and the second opposed electrodes; first measuring means for measuring the first physical quantity; second measuring means for measuring the second physical quantity; and calculating means for calculating a concentration level of a specific component in the specimen liquid based on the first physical quantity measured by the first measuring means.

[0022] The analyzing device according to the present aspect preferably further includes switching means for selecting between a first state in which the AC voltage applying means and the first measuring means are electrically connected to the first and the second opposed electrodes and a second state in which the DC voltage applying

means and the second measuring means are electrically connected to the first and the second electrodes.

[0023] A third aspect of the present invention provides an analyzing device which uses an analyzing implement, for measurement of concentration of a specific component in the specimen liquid. The analyzing implement includes: a capillary for movement of the specimen liquid; a first and a second opposed electrodes opposed to each other in an inner surface of the capillary. The first and the second opposed electrodes serve in measurement of a first physical quantity correlating to dielectric constant, resistance value or electric conductivity of the specimen liquid, as well as in measurement in a second physical quantity correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid. The analyzing device includes: DC voltage applying means for applying a DC voltage between the first and the second electrodes; AC voltage applying means for applying an AC voltage between the first and the second opposed electrodes; first measuring means for measuring the first physical quantity; second measuring means for measuring the second physical quantity; and calculating means for calculating a concentration level of a specific component in the specimen liquid based on the first physical quantity measured by the first measuring means.

[0024] The analyzing device according to the present aspect preferably further includes switching means for selecting between a first state in which the AC voltage applying means and the first measuring means are electrically connected to the first and the second opposed electrodes and a second state in which the DC voltage applying means and the second measuring means are electrically connected to the first and the second electrodes.

[0025] According to the second and the third aspects of the present invention, preferably, the calculating means calculates the concentration level of the specific component in the specimen liquid while taking into account the second physical quantity measured by the second measuring means.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0026] FIG. 1 is an overall perspective view showing a biosensor according to a first embodiment of the present invention.

[0027] FIG. 2 is an exploded perspective view of the biosensor in FIG. 1.

[0028] FIG. 3 is a sectional view taken in lines III-III in FIG. 1.

[0029] FIG. 4 is a plan view of the biosensor as attached to an analyzing device according to the first embodiment, and a block diagram of the analyzing device.

[0030] FIG. 5 is a circuit diagram for describing a resistance value measuring circuit.

[0031] FIG. 6 is a flowchart for describing a concentration level measuring operation.

[0032] FIG. 7 is an exploded perspective view of a biosensor according to a second embodiment of the present invention.

[0033] FIG. 8 is an exploded perspective view of a biosensor according to a third embodiment of the present invention.

[0034] FIG. 9 is a plan view of the biosensor as attached to an analyzing device according to the third embodiment, and a block diagram of the analyzing device.

[0035] FIG. 10A is an overall perspective view showing a conventional hematocrit measuring element, and FIG. 10B is a sectional view taken in lines XB-XB in FIG. 10A.

[0036] FIG. 11 is a perspective view for describing an electric conductivity measuring system ideal for the liquid phase.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[0037] Now, a first mode of embodiment of the present invention will be described with reference to FIG. 1 through FIG. 6.

[0038] A biosensor 1 shown in FIG. 1 and FIG. 2 is for a measurement of a blood glucose level, and is used as attached to an analyzing device 5 to be detailed later with reference to FIG. 4. The biosensor 1 includes a substrate 20, a cover 40 laminated thereon, and a spacer 30 in between. These members 20, 30 and 40 form a capillary 10. The capillary 10 introduces the blood from an open end 11, allows the blood to move and stay within, under the principle of capillarity. The capillary 10 has another open end 12 in order to release gas from within the capillary 10 when introducing the blood into the capillary 10.

[0039] The spacer 30 includes a pair of blocks 31, 32 opposed to each other. These blocks 31, 32 serve as electrodes for applying an AC voltage to the blood when measuring a resistance value of the blood. The blocks 31, 32 have upper surfaces 31a, 32a, lower surfaces 31b, 32b, and two side surfaces 31c, 32c and 31d, 32d respectively. Each block has a rectangular section, and the whole block is electrically conductive. Therefore, the electrodes for applying AC voltage to the blood are opposed to each other. The blocks 31, 32 can be formed of an electrically conductive polymer, a resin containing an electrically conductive filler, or a metal.

[0040] The upper surfaces 31a, 32a and the lower surfaces 31b, 32b of the blocks 31, 32 are adhesive. The adhesiveness of the upper surfaces 31a, 32a and the lower surfaces 31b, 32b is used to bond the cover 40 onto the substrate 20.

[0041] The substrate 20 is rectangular. The substrate 20 has an upper surface 20a formed with a first through fourth leads 21-24, each extending longitudinally of the substrate 20. Further, the upper surface 20a of the substrate 20 is provided with a first and a second electrodes 25, 26 and a reactor 27. The reactor 27 is solid for example, and bridges the first and the second electrodes 25, 26. The reactor 27 includes, for example, an oxidation-reduction enzyme and an electron transfer material. The oxidation-reduction enzyme is provided by glucose oxidase or glucose dehydrogenase for example, whereas the electron transfer material is provided by potassium ferriyranide for example.

[0042] The first and the second leads 21, 22 are for application of a voltage between the first and the second electrodes 25, 26. The first lead 21 is formed integrally with the first electrode 25, and the second lead 22 is formed integrally with the second electrode 26.

[0043] The third and the fourth leads 23, 24 are for application of a voltage between the two blocks 31, 32. The third lead 23 is electrically connected to the block 31, and the fourth lead 24 is electrically connected to the block 32.

[0044] The blocks 31, 32 are bonded to the substrate 20, via insulating layers 28, 29 respectively. The insulating layer 28 covers the first through the fourth leads 21-24 whereas the insulating layer 29 covers the first, the third and the fourth leads 21, 22, 23.

[0045] The insulating layers 28, 29 are formed with through holes 28a, 29a. The blocks 31, 32 are connected to the third lead 23 or the fourth lead 24 via the through holes 28a, 29a. It should be noted however, that electrical connection between the blocks 31, 32 and the relevant third lead 23 or fourth lead 24 may be established any other way, without being limited by the use of the through holes 28a, 29a.

[0046] According to the biosensor 1, capillarity allows the blood to come in from the open end 11 of the capillary 10 and move toward the open end 12 of the capillary 10. During this movement, the blood solves the reactor 27. The introduction of the blood continues until the blood reaches the open end 12, i.e. until the blood has filled the capillary 10. As a result, a liquid-phase reaction system is established inside the capillary 10.

[0047] As shown in FIG. 4, an analyzing device 5 includes a DC power source 50, an electric current value measuring division 51, a detecting division 52, a resistance value measuring division 53, an AC power source 54, a storing division 55, a controlling division 56, a calculating division 57 and a display division 58.

[0048] The DC power source 50 applies a DC voltage between the first and the second electrodes 25, 26 via ends 21a, 22a of the first and the second leads 21, 22. The DC power source 50 is electrically connected with the ends 21a, 22a when the biosensor 1 is attached to the analyzing device 5. The DC power source 50 can be provided by a dry battery or a rechargeable battery.

[0049] The electric current value measuring division 51 measures a value of responding current when the DC voltage is applied between the first and the second electrodes 25, 26.

[0050] The detecting division 52 detects, after the biosensor 1 is attached to the analyzing device 5, if the blood has been supplied inside the capillary 10. The detecting division 52 checks whether or not an electric current value detected by the electric current value measuring division 51 exceeds a predetermined threshold value, thereby determining whether or not the blood has been introduced.

[0051] The resistance value measuring division 53 measures a resistance value of the blood (the liquid-phase reaction system) held in the capillary 10. Resistance values of blood correlate with the amount of ionized component, i.e. percentage of blood cells (hematocrit value) in the blood. Therefore, by measuring a resistance value of the blood, a hematocrit value can be calculated and a level of influence from the hematocrit value can be estimated. The resistance value measuring division 53 includes a measuring circuit 53a shown in FIG. 5. The measuring circuit 53a constitutes a Wheatstone bridge circuit together with the blocks 31, 32 and other members. The measuring circuit 53a includes

three resistors R1-R3 and a balance detector D. The resistors R1, R2 are variable resistors. Blood held in the capillary 10 is represented by a resistor R4 in the figure. The measuring circuit 53a controls resistance values of the variable resistors R1, R2 so that there is no current flowing through the balance detector D, and a measurement is made for a blood resistance value on the basis of the controlled resistance values of the R1, R2 and a known value of the resistor R3. Specifically, the blood resistance value r4 is given by the following formula, where resistance values of the resistors R1 through R4 are represented by r1 through r4 respectively.

$$r4 = r1 \cdot r3 / r2$$

[0052] Alternatively, circuits different from the measuring circuit 53a in FIG. 5 may be constructed for measurement of blood dielectric constant or electric conductivity, for calculation of hematocrit values or estimation of the level of influence from the hematocrit values.

[0053] The AC power source 54 applies an AC voltage between the blocks 31, 32 and to the measuring circuit 53a. The application of the AC voltage between the two blocks 31, 32 is made via the ends 23a, 24a of the third and the fourth leads 23, 24.

[0054] The storing division 55 stores a control program for controlling the DC power source 50, the AC power source 54 and so on, calibration curve data used in calculating blood glucose levels, a calculation program for calculating the glucose levels, a resistance calculation program for calculating the resistance value r4, correction data for the calculated value to be corrected on the basis of the given resistance value r4, and a correction program for correcting the calculated value. The calibration curve data or the correction data is stored in the form of lookup table which indicates a relationship between, for example, the value of responding current and the glucose level or between the resistance value r4 and the corrected value. The storing division 55 is provided by a ROM or a RAM.

[0055] The controlling division 56 is provided by a CPU for example, and controls voltage application from the DC power source 50 and the AC power source 54, as well as operation of the divisions 52, 53 and 58.

[0056] The calculating division 57 calculates a blood glucose level based on the responding current value measured by the electric current value measuring division 51, and corrects the calculated value, on the basis of the resistance value measured by the resistance value measuring division 53.

[0057] The display division 58 displays the glucose level and other information, and is provided by a liquid crystal display for example.

[0058] Hereinafter, description will cover how a blood sugar level is measured by the biosensor 1 and the analyzing device 5, with reference to FIG. 1 through FIG. 5 as well as a flowchart in FIG. 6.

[0059] When measuring the blood sugar level, first, the biosensor 1 is attached to an analyzing device 5 (S1), and blood is introduced into the capillary 10 (S2).

[0060] Meanwhile, the controlling division 56 applies a DC voltage between the first and the second electrodes 25, 26 (S3). At this time, the electric current value measuring

division 51 measures a value of responding current (S4). The measurement of the responding current value is made per 0.05-0.2 seconds for example. The detecting division 52 monitors the responding current values measured at the electric current value measuring division 51, and checks if the responding current value is not smaller than a threshold value (S5).

[0061] When the detecting division 52 sees that the responding current value is not smaller than the threshold value (S5: YES), the detecting division 52 determines that the blood has been introduced into the capillary 10. On the other hand, if the detecting division 52 sees that the responding current value is not greater than the threshold value (S5: NO), the detecting division 52 continues the check in Step S5. However, if the detecting division 52 continues to see the responding current value being smaller than the threshold value after a lapse of a predetermined duration of time (S5: NO), then the program may execute an error processing routine.

[0062] When blood is introduced into the capillary 10, a liquid-phase reaction system is established as described earlier. In this liquid-phase reaction system, the glucose is oxidized while the electron transfer material is reduced. The electron transfer material is then oxidized when a DC voltage is applied, and a quantity of electrons released per a unit of time can be measured as a responding current value.

[0063] When the detecting division 52 has determined that the responding current value is not smaller than the threshold value (S5: YES), then the controlling division 56 checks if a predetermined amount of time (e.g. 5-30 seconds) has passed since the time when the responding current exceeded the threshold value (S6). This check in Step S6 is repeated until the controlling division 56 sees that the predetermined amount of time has passed (S6: YES).

[0064] When the controlling division 56 sees that the predetermined amount of time has passed (S6: YES), the electric current value measuring division 51 measures the responding current value (S7), and the measured responding current value is converted into a voltage value (S8).

[0065] Meanwhile, in parallel to the application of the DC voltage, the controlling division 56 applies an AC voltage between the blocks 31 and 32 (S9) while allowing the resistance value measuring division 53 to measure a blood resistance value (S10). The measurement of the resistance value is made after the detecting division 52 has detected introduction of the blood into the capillary 10.

[0066] The calculating division 57 calculates a glucose concentration level (S11) with reference to the calibration curve data stored in the storing division 55 and based on the voltage value given by the conversion in Step S8. Then, the calculating division 57 corrects the calculated value, based on the resistance value measured by the resistance value measuring division 53. The correction of the calculated value is made by referring to the correction data stored in the storing division 55. The corrected value is displayed in the display division 58.

[0067] The display division may display, in addition to the corrected value, a hematocrit value which can be calculated from the pre-correction calculation or from the resistance value. Alternatively, both of the pre-correction value and the hematocrit value may be displayed.

[0068] According to the present embodiment, a DC voltage can be applied to the biosensor 1 or between the first and the second electrodes 25, 26, whereas an AC voltage can be applied between the blocks 31, 32. Therefore, it is possible to measure a responding current value which is necessary for calculating the glucose level and a resistance value which is necessary for correcting the calculated value, with a single biosensor 1. This provides a cost advantage in measurement, to the extent that there is no need for separate preparation of an analyzing implement for measuring glucose level and an analyzing implement for measuring hematocrit value (resistance value). Further, this provides an improved operability to the extent that there is no need for replacing an analyzing implement necessary for glucose level measurement with an analyzing implement necessary for hematocrit value measurement in order to allow measurement of a hematocrit value.

[0069] The biosensor 1 uses the blocks 31, 32 as electrodes for measuring a resistance value. According to the described construction, the object of measurement, i.e. the liquid-phase reaction system (the capillary 10) has an area of the section which is generally equal to an area of the opposed surface in the blocks (electrodes) 31, 32, making possible to make uniform distribution of the electric lines of force. This makes possible to measure a value of resistance in the liquid-phase reaction system (blood) at a high accuracy, leading to accurate measurement of a blood sugar level regardless of the hematocrit value.

[0070] According to the biosensor 1, application of a DC voltage between the first and the second electrodes 25, 26 and application of an AC voltage between the blocks 31, 32 can be made separately and simultaneously. Therefore, according to the biosensor 1, the amount of time necessary for measurement is not long even if a measurement is made for a resistance value in addition to a responding current.

[0071] Next, a second embodiment of the present invention will be described with reference to FIG. 7. It should be noted that in FIG. 7, elements identical with those used in the biosensor according to the first embodiment are given the same alpha-numeric codes, and their description will not be repeated hereinafter.

[0072] A biosensor 1' shown in FIG. 7 includes a spacer 30' (two blocks 31', 32') which has a different construction from the one used in the biosensor 1 according to the first embodiment (See FIG. 1 and FIG. 2).

[0073] The blocks 31', 32' include insulating members 31A, 32A each having a rectangular cross section. The insulating members 31A, 32A have surfaces formed with conductive layers 31B, 32B respectively.

[0074] The conductive layers 31B, 32B respectively have: first regions 31Be, 32Be which cover side surfaces 31Ac, 32Ac of the insulating members 31A, 32A; and second regions 31Bb, 32Bb which continue from the first regions 31Be, 32Be and cover lower surfaces 31Ab, 32Ab of the insulating members 31A, 32A. The first regions 31Be, 32Be are opposed to each other, and serve as a pair of opposed electrodes for measurement of blood resistance values. The second regions 31Bb, 32Bb are connected to the third and the fourth lead 23, 24 respectively, and are used together with the third and the fourth leads 23, 24, to apply a voltage between the opposed electrodes (the first regions 31Be, 32Be).

[0075] The biosensor 1' can be attached to the analyzing device 5 shown in FIG. 4, and by introducing blood into the capillary, measurements can be made for a responding current value which is necessary for glucose level calculation and a resistance value which is necessary for correction of the calculated value. Further, since electrodes for measuring the resistance value are opposed to each other, and an area of the opposed surface is generally equal to an area of the cross section of the liquid-phase reaction system, accurate measurement of the resistance value is possible.

[0076] Next, a third embodiment of the present invention will be described with reference to FIG. 8 and FIG. 9. It should be noted that in FIG. 8 and FIG. 9, elements identical with those used in the biosensor or the analyzing device according to the first embodiment are given the same alpha-numeric codes, and their description will not be repeated hereinafter.

[0077] In a biosensor 1" shown in FIG. 8, the first and the second leads 21, 22 used for the application of DC voltage to the first and the second electrode 25, 26 are also used for the application of AC voltage to the blocks 31, 32.

[0078] Correspondingly, an analyzing device 5' shown in FIG. 9 includes a switching division 59 for selection whether the first and the second leads 21, 22 are electrically connected to the DC power source 50 or to the AC power source 54. The switching division 59 has a switch 59a, so that the controlling division 56 controls the switch 59a thereby selecting different states of voltage application to the liquid-phase system.

[0079] When measuring a responding current value, the switch 59a establishes connection with the electric current value measuring division 51, based on the control by the controlling division 56. This allows the DC power source 50 to apply a DC voltage to the liquid-phase system in the capillary 10, and a responding current value is measured by the electric current value measuring division 51. On the other hand, when measuring a resistance value, the switch 59a establishes connection with the resistance value measuring division 53, based on the control by the controlling division 56. This allows the AC power source 54 to apply an AC voltage to the liquid-phase system in the capillary 10, and a resistance value is measured by the resistance value measuring division 51.

[0080] According to the present invention, the blocks (opposed electrodes) may be used for both measurements; the measurement of a resistance value of the specimen liquid and the measurement of a responding current value. In this case, portions representing the first and the second electrodes 25, 26 in the biosensor are covered by an electrically insulating layer.

[0081] The present invention can also provide an analyzing implement only for a measurement of a resistance value of a specimen liquid (e.g. hematocrit value of blood). Such an implement is simply the biosensor in FIG. 8 less the reaction division.

[0082] The present invention is not limited to the embodiments so far described. For example, the spacer may include only one member provided with a slit for formation of a capillary. The application of an AC voltage between the blocks may be made from end faces of the blocks.

1. An analyzing implement including a capillary for movement of a specimen liquid,

wherein the capillary has an inner surface provided with a first and a second opposed electrodes opposed to each other.

2. The analyzing implement according to claim 1, comprising a substrate, a cover covering the substrate, and a spacer between the substrate and the cover,

wherein the capillary is formed by the substrate, the cover and the spacer,

surfaces of the spacer forming the capillary being electrically conductive and providing the first and the second opposed electrodes.

3. The analyzing implement according to claim 2, wherein the spacer includes two blocks opposed to each other,

the two blocks being formed entirely of an electrically conductive material.

4. The analyzing implement according to claim 3, wherein the two blocks are formed of an electrically insulating resin containing an electrically conductive polymer or an electrically conductive filler.

5. The analyzing implement according to claim 3, wherein each of the two blocks has a rectangular cross section defined by an upper surface, a lower surface and two side surfaces,

the upper surfaces and the lower surfaces being adhesive, the cover being bonded to the substrate via the two blocks.

6. The analyzing implement according to claim 1, wherein the first and the second opposed electrodes are for measurement of a dielectric constant, a resistance value or a physical quantity correlating to electrical conductivity of the specimen liquid.

7. The analyzing implement according to claim 6, further comprising a first and a second electrodes for measurement of a physical quantity correlating to concentration of a specific component of the specimen liquid.

8. The analyzing implement according to claim 7, further comprising a first lead electrically connected to the first opposed electrode and to the first electrode, and a second lead connected to the second opposed electrode and to the second electrode.

9. The analyzing implement according to claim 8, comprising a substrate, a cover covering the substrate, a spacer between the substrate and the cover, and a first through a fourth leads formed on the substrate, wherein

the capillary being formed by the substrate, the cover and the spacer,

surfaces of the spacer forming the capillary being electrically conductive and providing the first and the second opposed electrodes,

the spacer being bonded to the substrate via an insulating layer,

the first and the second electrodes being formed on the substrate and electrically connected to the first and the second leads respectively,

the first and the second opposed electrodes being electrically connected to the third and the fourth leads respectively, via through holes formed in the insulating layer.

10. The analyzing implement according to claim 1, wherein the first and the second opposed electrodes serve in measurement of a responding current value correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid.

11. The analyzing implement according to claim 10, comprising a substrate, a cover covering the substrate, a spacer between the substrate and the cover, and a first and a second leads formed on the substrate, wherein

the capillary being formed by the substrate, the cover and the spacer,

surfaces of the spacer forming the capillary being electrically conductive and providing the first and the second opposed electrodes,

the spacer being bonded to the substrate via an insulating layer,

the first and the second opposed electrodes being electrically connected to the first and the second leads respectively, via through holes formed in the insulating layer.

12. An analyzing device which uses an analyzing implement, for measurement of concentration of a specific component in the specimen liquid,

the analyzing implement including: a capillary for movement of the specimen liquid; a first and a second opposed electrodes opposed to each other in an inner surface of the capillary for measurement of a first physical quantity correlating to dielectric constant, resistance value or electric conductivity of the specimen liquid; and a first and a second electrodes for measurement of a second physical quantity correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid;

the analyzing device comprising:

DC voltage applying means for applying a DC voltage between the first and the second electrodes;

AC voltage applying means for applying an AC voltage between the first and the second opposed electrodes;

first measuring means for measuring the first physical quantity;

second measuring means for measuring the second physical quantity; and

calculating means for calculating a concentration level of a specific component in the specimen liquid based on the first physical quantity measured by the first measuring means.

13. The analyzing device according to claim 12, wherein the calculating means calculates the concentration level of the specific component in the specimen liquid while taking into account the second physical quantity measured by the second measuring means.

14. The analyzing device according to claim 12, further comprising switching means for selecting between a first state in which the AC voltage applying means and the first measuring means are electrically connected to the first and the second opposed electrodes and a second state in which

the DC voltage applying means and the second measuring means are electrically connected in the first and the second electrodes.

15. An analyzing device which uses an analyzing implement for measurement of concentration of a specific component in the specimen liquid,

the analyzing implement including: a capillary for movement of the specimen liquid; a first and a second opposed electrodes opposed to each other in an inner surface of the capillary;

the first and the second opposed electrodes serving in measurement of a first physical quantity correlating to dielectric constant, resistance value or electric conductivity of the specimen liquid and in measurement of a second physical quantity correlating to concentration of a specific component in the specimen liquid;

the analyzing device comprising:

DC voltage applying means for applying a DC voltage between the first and the second electrodes;

AC voltage applying means for applying an AC voltage between the first and the second opposed electrodes,

first measuring means for measuring the first physical quantity,

second measuring means for measuring the second physical quantity, and

calculating means for calculating a concentration level of a specific component in the specimen liquid based on the first physical quantity measured by the first measuring means.

16. The analyzing device according to claim 15, wherein the calculating means calculates the concentration level of the specific component in the specimen liquid while taking into account the second physical quantity measured by the second measuring means.

17. The analyzing device according to claim 15, further comprising switching means for selecting between a first state in which the AC voltage applying means and the first measuring means are electrically connected to the first and the second opposed electrodes and a second state in which the DC voltage applying means and the second measuring means are electrically connected to the first and the second opposed electrodes.

* * * * *



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación **2 162 643**

(12) Int. Cl.⁷: C12M 1/40

C12Q 1/00

//C12Q 1/54

(13)

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

(40) Número de solicitud europea: **96106350.0**

(40) Fecha de presentación: **23.04.1996**

(40) Número de publicación de la solicitud: **0 741 186**

(40) Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.1996**

(54) Título: **Procedimiento y aparato para reducir la polarización en sensores amperométricos.**

(46) Prioridad **05.05.1995 US 435993**

(71) Titular/es: **Bayer Corporation
100 Bayer Road
Pittsburgh, PA 15205-9741, US**

(15) Fecha de la publicación de la mención BOPI: **01.01.2002**

(72) Inventor/es: **Genshaw, Marvin A.;
Huang, Dijia;
Musho, Matthew K. y
Yip, Kin-Fai**

(17) Fecha de la publicación del folleto de patente: **01.01.2002**

(73) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas C/Panadell, 1 28030 Madrid

ES 2 162 643 T3

DESCRIPCION

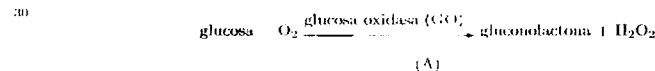
Procedimiento y aparato para reducir la polarización en sensores amperométricos.

La presente invención se refiere, en general, a un biosensor y, más particularmente, a un procedimiento y aparato nuevos y mejorados para reducir la polarización en sensores amperométricos.

Antecedentes de la invención

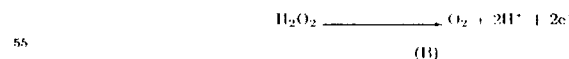
La determinación cuantitativa de analitos en los fluidos corporales es de gran importancia en el diagnóstico y mantenimiento de determinadas anomalías fisiológicas. Por ejemplo, el lactato, colesterol y bilirrubina deben ser supervisados en ciertos individuos. En particular, la determinación de glucosa en los fluidos corporales es de gran importancia en los individuos diabéticos, quienes deben frecuentemente comprobar el nivel de glucosa en sus fluidos corporales como medio de regular la ingesta de glucosa en la dieta. Aunque la presente descripción está dirigida hacia la determinación de la glucosa, debe entenderse que el procedimiento y aparato de la presente invención pueden ser utilizados para la determinación de otros analitos tras la selección de la enzima apropiada. El dispositivo de diagnóstico ideal para la detección de glucosa en los fluidos debe ser simple, de forma que no requiera un alto nivel de capacitación técnica por parte del operario que administra el análisis. En muchos casos, los análisis son administrados por el propio paciente, lo que implica hacer un énfasis adicional en la necesidad de disponer de un análisis que sea fácil de llevar a cabo. Adicionalmente, dicho dispositivo debe estar basado en elementos que son lo suficientemente estables para anclarse a situaciones de almacenamiento prolongadas.

Los procedimientos para la determinación de la concentración de analitos en fluidos pueden basarse en la reacción electroquímica entre el analito y una enzima específica para el analito y un mediador que mantenga la enzima en su estado de oxidación inicial. Entre las enzimas redox apropiadas se incluyen la oxidasa, dehidrogenasa, catalasa y peroxidasa. Por ejemplo, en el caso en el que la glucosa es el analito, la reacción o la glucosa oxidasa y oxígeno se representa por la ecuación (A).



En un análisis colorimétrico, el peróxido de hidrógeno liberado, en presencia de una peroxidasa, origina un cambio de color en un indicador redox, cuyo cambio de color es proporcional a nivel de glucosa en el fluido de análisis. Aunque los análisis colorimétricos pueden realizarse de forma semi cuantitativa mediante el uso de tablas de color para la comparación del cambio de color del indicador redox con el cambio de color obtenido usando fluidos de análisis con una concentración conocida de glucosa, y se pueden hacer más altamente cuantitativos mediante la lectura del resultado con un instrumento espectrofotométrico, los resultados no son generalmente tan exactos ni se obtienen tan rápidamente como los obtenidos usando un biosensor. En la forma utilizada en la presente memoria, el término biosensor se indica para referirse a un dispositivo analítico que responde selectivamente a los analitos en una muestra apropiada y convierte su concentración en una señal eléctrica por medio de una combinación de una señal de reconocimiento biológico y un transductor físico-químico. Además de su mayor precisión, un biosensor es un instrumento que genera una señal eléctrica directamente, facilitando de dicha forma un diseño simplificado. En principio, todo lo que necesita hacer el biosensor es medir el tiempo y leer la corriente. Además, un biosensor ofrece la ventaja de un bajo coste material dado que una delgada capa de producto químico se deposita sobre los electrodos, por lo que se desperdicia poco material.

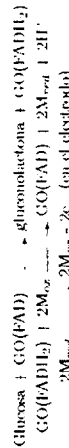
Con referencia a la ecuación anterior (A), un electrodo apropiado puede medir la formación de H_2O_2 debido a la introducción de electrones dentro del fluido de análisis, según la ecuación B:



Posteriormente, el flujo de electrones es convertido en la señal eléctrica que se correlaciona directamente con la concentración de glucosa.

En la etapa inicial de la reacción representada por la ecuación (A), la glucosa presente en la muestra de ensayo convierte el centro dinucleótido flavin adenina (FAD) oxidado de la enzima en su forma reducida (FADH₂). Dado que dichos centros redox están esencialmente aislados eléctricamente dentro de la

molécula de enzima, la transferencia directa de electrones a la superficie de un electrodo convencional no se produce en ningún grado medible en ausencia de una tensión de la célula inaceptablemente elevada. En una mejora respecto a este sistema implica el uso de un acoplamiento redox no disociado entre el electrodo y la enzima para comunicar electrones entre [FADH₂] y el electrodo. Esto está representado por el siguiente esquema, en el que el acoplador redox, normalmente referido como mediador, se representa por M:



En el esquema, GO(FAD) representa la forma oxidada de la glucosa oxidasa y GO(FADH₂) indica su forma reducida. Las especies mediadoras M_{ox}/M_{red} comunican electrones entre la enzima oxidada y el electrodo, oxidando de dicha forma la enzima y originando su regeneración in situ local, evidentemente, es deseable por razones de economía. El objeto principal para usar un mediador es reducir el potencial de trabajo del sensor. Un mediador ideal será oxidado en el electrodo a un bajo potencial bajo el cual la impureza en la capa química y las sustancias que interfieren en la muestra no serán oxidadas, minimizando de dicha forma la interferencia.

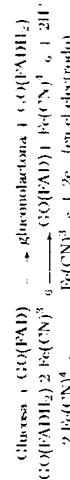
Muchos compuestos son útiles como mediadores debido a su habilidad para adoptar electrones de la enzima reducida y transferirlos al electrodo. Entre los mediadores conocidos que son útiles como agentes de transferencia de electrones en determinaciones analíticas se encuentran los benzos y nafquinonas sustituidos descritos en la patente U.S. 4,746,607; los N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroquinonas y oxinas específicamente descritos en el documento EP 0 354 411; las flavinas, fenoxinas, fenoxinas, indololes, 1,4-benzoquinonas sustituidas e indaninas desveladas en el documento EP 0 340 517 y las sales de fenoxinil/ferrocenium descritas en la patente U.S. 3,781,988. Una revisión amplia de mediadores electroquímicos en sistemas biológicos redox se puede encontrar en la publicación Analytica Chimica Acta, 140 (1982), p. 118.

Entre los mediadores más conocidos se encuentra el hexacianoferrato, también conocido como ferricianuro, que se explica por Schlappier en Química Clínica Acta, 57 (1971), p. 283-289. En la patente U.S. 4,929,545 se describe el uso de un compuesto de ferricianuro soluble en combinación con un compuesto ferrico soluble en una composición para determinar enzimáticamente un analito en una muestra. La sustitución de la sal de hierro del ferricianuro por oxígeno en la ecuación (A) da:



dado que el ferricianuro se reduce a ferrocianuro por su aceptación de electrones de la glucosa oxidada.

Otra manera de expresar esta reacción es mediante el uso de la ecuación siguiente (C):



Los electrones liberados son directamente equivalentes a la cantidad de glucosa en el fluido de ensayo y se pueden relacionar con la misma midiendo la corriente que se produce a través del fluido tras la aplicación de un potencial al mismo. La oxidación del ferrocianuro en el ánodo renueva el ciclo.

De la descripción dada anteriormente resultará evidente que un atributo necesario para un mediador que es su habilidad de permanecer en el estado oxidado bajo las condiciones presentes en la superficie del electrodo con autonomía al uso del sensor. Cualquier reducción del mediador incrementaría la corriente de fondo, dando como resultado que la lectura del biosensor se polarice. Se ha descubierto que dichos mediadores tienden a reducirse con el transcurso del tiempo, especialmente bajo condiciones de estrés, disminuyendo de dicha forma la utilidad de los sensores a los que son aplicados.

En la solicitud de patente internacional publicada WO 92/15704 se da a conocer un uso de dicromato potásico como agente oxidante en una tira reactiva enzimática. El objeto del agente oxidante es oxidar las impurezas en los otros componentes del reactivo para mejorar la estabilidad del sensor colorimétrico.

Esta publicación menciona el documento USSN 07/491,671 (actualmente documento US 5,288,636) y se caracteriza por describir un sistema en el cual un mediador reducido es oxidado por la aplicación de un potencial y la medida de la corriente tras un tiempo específico para determinar la concentración del analito. Mas tarde, en la patente 5,288,636 se requiere la oxidación completa de la glucosa por la glucosa oxidasa. A medida que la enzima es reducida por la glucosa, el ferrocianuro reacciona con la enzima para producir ferrocianuro. El ferrocianuro producido por esta reacción enzimática se combina con el ferrocianuro producido durante el almacenamiento. Este último ferrocianuro es el resultado de la reacción entre el ferrocianuro y las impurezas presentes en las impurezas depositadas en la glucosa oxidada y el ferrocianuro. La patente 5,288,636 no hace distinción entre el ferrocianuro producido entre dichas dos fuentes.

El documento EP-A-0 312 820 da a conocer un procedimiento para medir la concentración de una sustancia en una solución de la muestra que comprende: (i) preparar una solución de análisis que tiene la suficiente cantidad de mediador redox; (ii) presentar la solución de análisis al medio de primer electrodo para asegurar que el mediador redox es completamente oxidado; (iii) pasar la solución de análisis a través de un canal de enzima, mediante lo cual una cantidad de mediador redox es reducido; y (iv) pasar la solución de análisis al segundo medio de electrodo para oxidar dicha cantidad de mediador redox, por medio de lo cual se mide la carga correspondiente a dicho procedimiento.

El documento WO-A-91/09139 da a conocer un biosensor amperométrico que comprende unos electrodos de trabajo y contador que están parcialmente cubiertos con un reactivo que tiene una cantidad suficiente de mediador redox y una enzima. La concentración del analito en una muestra se detecta con este biosensor mediante: (i) añadir la solución de muestra al reactivo; (ii) dejar que reaccione (oxidación/reducción) el analito con la enzima completamente, mediante lo cual una cantidad de mediador redox se reduce/oxida; y (iii) aplicar una diferencia de potencial entre ambos electrodos de forma que el mediador sea electro-oxidado/reducido y medir la corriente producida por el procedimiento.

Sería deseable, y es un objeto de la presente invención, suministrar un procedimiento mediante el cual la reducción no deseada de los compuestos del mediador almacenados sobre la superficie de los electrodos pueda invertirse para minimizar su efecto en la estimación de los valores del analito en las muestras de fluido de ensayo con concentraciones muy bajas de analito.

Un objeto adicional es suministrar un procedimiento como el mencionado en el cual se potencia la precisión de la determinación del analito.

Un objeto adicional es suministrar un método como el mencionado en el cual el analito sea glucosa.

Otro objeto adicional es suministrar un medio matemático para potenciar adicionalmente la precisión en la determinación del analito.

Otro objeto adicional es suministrar un aparato para determinar con precisión los valores del analito.

Otro objeto adicional es suministrar un aparato como el mencionado que sea simple y económico de fabricar.

Sumario de la invención

La presente invención suministra un procedimiento para determinar la concentración de un analito en una muestra fluida de análisis para aplicar la muestra de análisis a la superficie de un electrodo de trabajo. El electrodo tiene sobre su superficie una composición que comprende una enzima específica para el analito, un mediador que es reducido como resultado de la reacción entre el analito y la enzima, habiendo estado sometido dicho mediador a una reducción parcial hasta su estado reducido como resultado de haber estado expuesto a condiciones ambientales. Se desea en la presente memoria una mejora del procedimiento que implica las etapas de:

(a) aplicar un impulso de potencial positivo al electrodo para oxidar al menos una parte del mediador hasta su forma oxidada. Esta etapa reduce la polarización de fondo en el electrodo. La polarización de fondo se podrá reducir adicionalmente mediante:

(a) determinar la corriente (i₁) durante la aplicación del impulso positivo y la corriente (i₂) al final del tiempo de la tira, y

(b) calcular el nivel de analito corregido C resolviendo la ecuación (1):

$$C = \frac{i_2 \cdot \text{Int}}{\text{pendiente}} - k \Delta(i_1, i_2) \quad (1)$$

en la que Int y pendiente son la coordenada en origen y pendiente de i_2 , y $\Delta(i_1, i_2)$ es un término de corrección de error proporcional a la polarización de fondo calculada como:

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{pendiente}} \left(\frac{\text{pendiente } i_1 - i_2}{\text{pendiente } i_1 - i_2} - 1 \right) \quad (2)$$

en la que s_1 pendiente de i_1
 i_1 en un nivel bajo de analito,
 i_2 en un nivel alto de analito, y
 k un nivel de escala seleccionado

Breve descripción de los dibujos

La presente invención, conjuntamente con los objetos y ventajas mencionados anteriormente, así como otros objetos y ventajas, se comprenderá mejor a partir de la descripción detallada siguiente de las formas de realización preferentes de la invención ilustrada en los dibujos, en los que:

la Figura 1 es un gráfico que ilustra el potencial y la corriente con relación al tiempo según el procedimiento de la invención;

la Figura 2 es una representación en forma de diagrama de bloques de un dispositivo para determinar los valores de analito empleados para realizar el procedimiento de la invención; y

la Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas secuenciales realizadas por el procesador de la Figura 2 según el procedimiento de la invención.

Descripción de la invención

La presente invención es un procedimiento que reduce la polarización de fondo debida a las impurezas oxidables en un sensor amperométrico usado para medir un analito específico, como por ejemplo glucosa, en sangre. La corriente de fondo de dicho sensor se incrementará si es almacenado durante un largo periodo de tiempo o bajo estrés (calor, humedad, etc.) debido a la presencia incrementada de un mediador reducido u otras impurezas reducidas presentes en el sensor, por ejemplo estabilizadores de enzima, tales como glutamato, y tiosactivos que tengan equivalentes reductores. Por ejemplo, en un sensor amperométrico basado en ferrocianuro, la polarización de fondo está relacionada con la presencia de ferrocianuro (procedente de la reducción del ferrocianuro) próximo a la superficie del electrodo. Este ferrocianuro se anula, en oposición al ferrocianuro producido durante el uso del sensor (ferrocianuro de nueva aportación) se vuelve a oxidar a ferricianuro para reducir la polarización de fondo causada, y de dicha forma extender la vida en almacén del sensor. Para conseguir este objetivo, el procedimiento utiliza un enfoque electroquímico. La polarización de fondo se reduce adicionalmente cuando la solución electroquímica se acrecienta con una corrección algorítmica.

Con referencia a la Figura 1, el procedimiento de la presente invención implica aplicar en primer lugar un impulso de potencial positivo (llamado el impulso de "quemado") que precede al perfil normal del potencial durante el uso del sensor. Esto se realiza normalmente mediante la aplicación de un potencial positivo de 0,1 a 0,9 voltios (preferentemente de 0,3 a 0,7 voltios) entre los electrodos de trabajo y de referencia del sensor durante un periodo de 1 a 15 segundos (preferentemente de 5 a 10 segundos). El impulso de quemado oxida el ferrocianuro inicial (u otras impurezas oxidables), de forma que el sensor pueda empezar el análisis con sin fondo. Normalmente, el fondo no está perfectamente ausente dado que solamente una parte de las impurezas oxidables se oxidan por el impulso de quemado. Esto es porque la capa química sobre los electrodos de trabajo y de referencia. El ferrocianuro inicial existe en la capa química dado que procede del ferrocianuro. Cuando el fluido muestra se aplica y la capa química se hidrata, el ferrocianuro próximo al electrodo de trabajo se reoxida. El resto del ferrocianuro se difunde

dentro del fluido de muestra y se mezcla con la glucosa. Dicha parte del ferrocianuro inicial no pueden ser reoxidada sin afectar a la glucosa. El ferrocianuro inicial está próximo al electrodo durante un tiempo muy corto (unos pocos segundos) una vez que se aplica el fluido de muestra del análisis. La razón de lo anterior es que los productos químicos (enzima y ferricianuro, etc.) se depositan como una delgada capa sobre los electrodos de trabajo y de referencia. La técnica de quemado se aprovecha de lo anterior, dado que una cantidad significativa del ferrocianuro inicial puede ser quemada sin una reducción apreciable de la concentración de analito en el fluido de muestra del análisis, la mayor parte del cual no se pone en contacto directo con el electrodo. Los experimentos han demostrado que la polarización de fondo de un sensor estresado se puede reducir un 40% con la aplicación apropiada de un impulso de quemado.

La polarización de fondo se puede reducir adicionalmente mediante el uso de un algoritmo de corrección del efecto de fondo que trabaja en conjunción con el impulso de quemado. El algoritmo está basado en la toma de dos lecturas de corriente. La primera lectura (i_1) se toma durante el impulso de quemado y la segunda (i_2) al final del tiempo de lectura, es decir el tiempo transcurrido desde el momento en el que se aplica el segundo impulso de potencial hasta el momento en que se mide la corriente i_2 . El tiempo de lectura es $t_2 - t_1$, como se muestra en la Figura 1. Posteriormente, se calcula la concentración del analito a partir de las dos lecturas de corriente, i_1 e i_2 . Ensayos en los sensores han mostrado que el algoritmo de corrección del efecto de fondo es capaz de eliminar, al menos, el 80% de la polarización de fondo restante y, como resultado, se podrá mejorar la estabilidad del sensor para ampliar de forma significativa la vida en almacenamiento.

Un sensor amperométrico de glucosa del tipo útil en la práctica de la presente invención se construye como sigue: dos electrodos de carbono se imprimen sobre un sustrato de polímero. A continuación se deposita una capa de componentes químicos sobre los electrodos y se deja secar. Una composición química preferente es 5 μ l de un medio que contiene 55 mM de ferrocianuro (sal potásica), 8,5 unidades de glucosa oxidasa, 0,53% de poli(óxido de etileno), 0,40% de cremol como tensioactivo y 83 mM de un tampón de fosfato con 7,2 de pH. Durante el análisis de glucosa se aplica un perfil de potencial que consta de tres periodos de tiempo consecutivos al sensor. Dichos periodos de tiempo son secuencialmente: el tiempo de quemado (normalmente 0,4 voltios durante 10 segundos); periodo de retardo (circuito abierto durante 15 segundos) y tiempo de lectura (0,4 voltios, 5 segundos). El tiempo exacto del periodo de retardo no es crítico pero oscila normalmente entre 10 y 40 segundos. Este periodo de retardo da un tiempo suficiente a la reacción para producir una cantidad de ferrocianuro suficiente y permitir que la corriente resultante de la reoxidación del ferrocianuro se pueda medir sin dificultad. Dichos periodos de tiempo se ilustran en la Figura 1 que representa el potencial y la corriente con respecto al tiempo. Las medidas de la corriente se toman al final del periodo de quemado (i_1) y el tiempo de lectura (i_2) tras lo cual se calcula la concentración de glucosa correspondiente usando la ecuación 1. Las constantes de la ecuación, por ejemplo pendientes y coordenadas en origen son valores predeterminados.

La discusión siguiente se refiere a una muestra de fluido de análisis en la cual la glucosa es el analito que se desea detectar e implica un sensor en el cual el ferrocianuro es el mediador. Sin embargo, la discusión es igualmente aplicable a sistemas para la determinación de otros analitos y en los cuales las especies oxidables son distintas al ferrocianuro.

La técnica de quemado, es decir la aplicación de un impulso de potencial positivo al electrodo para oxidar al menos una parte del mediador y de volverlo a su forma oxidada se ilustra en la Figura 1. En la Figura 1 en la cual se representan los perfiles de potencial y corriente, la temporización es como sigue:

t_0 - se detecta la muestra y comienza el periodo de quemado. La muestra se detecta mediante la inserción del sensor dentro del instrumento lo que origina la aplicación inmediata de un potencial de 0,4 voltios. La corriente se comprueba continuamente para ver si se mide un umbral superior al umbral predeterminado (por ejemplo 250 nA). Cuando se detecta una corriente mayor que el valor umbral, la muestra ha sido detectada y comienza el periodo de tiempo de quemado.

t_1 - final del tiempo de quemado y medida de la corriente i_1 . La longitud del periodo de quemado, $t_1 - t_0$, es normalmente de 5 a 10 segundos. El potencial es de 0,4 voltios en t_1 pero cambia a un circuito abierto o a un potencial que reduce sustancialmente la corriente para minimizar la velocidad de la reacción electroquímica en el electrodo de trabajo para un periodo de retardo establecido tras el periodo de quemado.

t_2 - final del periodo de retardo. La longitud del periodo de espera, $t_2 - t_1$, es normalmente de 10 a 40 segundos. Se aplica en t_2 un potencial de 0,4 voltios.

t_1 : final del tiempo de lectura cuando la corriente i_2 se mide. La longitud del tiempo de lectura, $t_1 - t_2$, es de 5 a 10 segundos.

El impulso de quemado, es decir la aplicación del potencial de 0,3 voltios de t_2 a t_1 , se designa para eliminar parte del ferroxiانو inicial (ferroxiانو acumulado) u otros productos que interfieren con la capa de enzima.

El algoritmo de quemado calcula la concentración de glucosa a partir de dos mediciones de corriente i_1 e i_2 , usando la ecuación 1:

$$G = \frac{i_2 \cdot \text{Int}}{\text{pendiente}} - k \Delta(i_1, i_2) \quad (1)$$

en la que

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{pendiente}} \left(\frac{\text{pendiente } i_1 \cdot i_2}{\text{pendiente } i_1 \cdot i_2} - 1 \right) \quad (2)$$

La ecuación 1 es un algoritmo de corrección parcial que pretende alcanzar un compromiso entre la reducción del potencial de fondo relacionado con el estrés y preservar la precisión del sistema. El esquema básico es usar i_2 como una lectura de la glucosa:

$$G = \frac{i_2 \cdot \text{Int}}{\text{pendiente}}$$

en la que Int y pendiente son la coordenada en origen y la pendiente de i_2 , respectivamente. El término $\Delta(i_1, i_2)$ es el incremento del efecto de fondo estimado debido al estrés o a otras causas, derivado de la corriente i_1 e i_2 . Para sensores nuevos este término es próximo a cero. El parámetro k se suministra selectivamente o se establece según un valor de 0 a 1. No existirá corrección de efecto de fondo si k se establece a 0. Por otra parte, se puede conseguir una corrección total si k es 1. Por los ejemplos siguientes, k se establece a 0,8 para una corrección parcial, dado que se ha encontrado que la variación de i_1 es mayor que la de i_2 cuando se ensayan sensores múltiples bajo la misma concentración de glucosa. En comparación con el valor de glucosa calculado de i_2 solamente, $k = 0$ en la ecuación (1), el valor de glucosa calculado de i_1 e i_2 , conjuntamente con una precisión ligeramente inferior (una desviación estándar superior) y, evidentemente, una polarización de fondo mucho menor. La correlación entre la precisión y la polarización se puede conseguir eligiendo el valor apropiado de k . Si $k = 0$, no existirá corrección de efecto de fondo, por lo que no se utiliza. En este caso, se puede obtener una precisión superior, pero se consigue mediante una polarización de fondo superior. Si $k = 1$, se aplica una corrección de efecto de fondo completa, tras lo cual, se puede conseguir una polarización inferior, a costa de la precisión. El valor k se establece a 0,8 en el ejemplo para obtener un compromiso intermedio entre la precisión y la polarización.

Los parámetros en dichas ecuaciones son:

Int - coordenada en origen de la corriente leída i_2 , nA;

Pendiente - pendiente de la corriente leída i_2 , nA/dl/mg;

i_1 , i_2 - corriente de quemado promedio i_1 , nA a un nivel de calibración de glucosa bajo, es decir 50 mg/dl.

i_2 - corriente del tiempo de lectura promedio i_2 , nA a un nivel bajo de calibración de glucosa. Realmente, i_2 no es un parámetro independiente. Se puede calcular a partir de Int y pendiente:

$$i_2 = \text{Int} + \text{pendiente} \cdot 50$$

k - pendiente de la corriente de quemado, nA/dl/mg.

- se establece a 0,8 para una corrección parcial.

Int, pendiente, i_1 no son parámetros. En tales casos, cada lote de sensores tiene sus propios valores de parámetros, cuyos valores se determinan experimentalmente. El algoritmo necesita dos valores de corriente, uno para i_1 y otro para i_2 para sensores nuevos (no estresados). i_1 y i_2 no están disponibles dado que se usan para determinar la coordenada en origen y las pendientes (S_1 y pendiente). Evidentemente, la corriente en otros niveles de glucosa se puede usar en el algoritmo. Sin embargo esto introduce una etapa adicional al añadir dos parámetros adicionales independientes. El procedimiento de la presente invención queda demostrado mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo I

Se realizan las etapas siguientes para determinar los valores de los parámetros del lote necesarios para el algoritmo:

A. Ensayo de 16 sensores del lote en el nivel bajo de calibración, 50 mg/dl, y obtención de las corrientes promedio i_1 , i_2 y k de las corrientes de quemado y de la corriente del tiempo de lectura, respectivamente. Se encontró que $i_1 = 1951,2$ nA e $i_2 = 1952,3$ nA.

B. Ensayo de 16 sensores en el nivel de calibración alto, 400 mg/dl, y obtención de la corriente promedio i_1 e i_2 . Se encontró que $i_1 = 14003,3$ nA e $i_2 = 8831,7$ nA.

C. Calcular los valores de los parámetros:

$$\text{Int} = \frac{50(i_2 - i_1)}{350} = \frac{50(8831,7 - 1952,3)}{350} = 969,5 \text{ nA}$$

$$\text{Pendiente} = \frac{i_2 - i_1}{350} = \frac{8831,7 - 1952,3}{350} = 19,65 \text{ nA/dl/mg}$$

$$k = \frac{i_2 - i_1}{350} = \frac{14003,3 - 1951,2}{350} = 11,58 \text{ nA/dl/mg}$$

por lo tanto la ecuación (1) queda:

$$G = \frac{i_2 \cdot 969,5}{19,65} - 0,8 \Delta(i_1, i_2)$$

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{969,5}{19,65} \left(\frac{19,65 \cdot 1951,2 - 11,58 \cdot 1952,3}{1} \right) = 0,0616 \cdot i_1 - 0,34$$

Ejemplo II

Se ha descubierto que el impulso de quemado solamente reducirá significativamente la polarización de fondo incluso sin el uso del algoritmo de corrección de fondo.

En este experimento, se ensayaron diez sensores bajo una temperatura de 30°C y una humedad del 91% durante tres horas. Se usó como muestra glucosa acuosa a 50 mg/dl. Se ensayaron cinco sensores estresados con un impulso de quemado de 10 segundos y cinco sin el impulso. Además se ensayaron 10 sensores sin estresar como control (5 con un quemado de 10 segundos y 5 sin el quemado) y se calculó la polarización usando la ecuación siguiente (2):

$$\text{Polarización} = \frac{i_{\text{estresado}} - i_{\text{no estresado}}}{i_{\text{no estresado}}} \times 100\% \quad (3)$$

Se encontró que la polarización era de 30,6% sin el impulso de quemado y 18,0% con el mismo, demostrando dichos datos que el impulso de quemado solo reduce la polarización de fondo en aproximadamente el 40%.

Ejemplo III

Este ejemplo explica la forma en que el algoritmo corrige la polarización de fondo:

Se almacenaron ocho sensores a una temperatura por debajo de -20 °C durante dos semanas y otros ocho sensores se estresaron a 50 °C durante cuatro semanas. Los 16 sensores se ensayaron usando sangre entera que tenía una concentración de glucosa de 100 mg/dl. Los valores de los parámetros se determinaron a partir de sensores sin estresar. Las lecturas de glucosa, G , se calcularon de la manera siguiente:

A. sin algoritmo de corrección de polarización de fondo: ecuación 4 con $k = 0$.

B. corrección parcial: ecuación 4 con $k = 0,8$.

Se calculó la polarización en tantos por ciento usando la ecuación 4 y los resultados se incluyen la Tabla 1.

$$\text{Polarización} = \frac{G-100}{1000} \times 100\%$$

TABLA 1

Polarización a 100 mg/dl

	algoritmo sin quemado	corrección parcial ($k = 0,8$)
-20 °C, 2 semanas	3,8%	5,3%
50 °C, 4 semanas	64,7%	15,0%

En la Figura 2 se representa un dispositivo capaz de poner en práctica la invención. Con referencia a la Figura 2, se muestra una representación en forma de diagrama de bloques de un dispositivo para determinar con precisión valores de análisis designados como en su totalidad mediante el número de referencia 10 y dispuesto según los principios de la presente invención. El dispositivo 10 incluye un microprocesador 12 conjuntamente con un dispositivo de memoria 14. El microprocesador 12 está programado de forma apropiada para llevar a cabo el procedimiento de la invención en la forma ilustrada en la Figura 3. Diversos dispositivos disponibles comercialmente, como por ejemplo el microcontrolador DS5000 fabricado por Dallas Semiconductor se puede utilizar como el microprocesador 12 y la memoria 14. La memoria 14 puede ser incluida dentro del microprocesador 12 o ser suministrada por separado en la forma ilustrada en la Figura 2.

Los datos digitales del procesador 12 se aplican a un convertidor digital-analógico (D/A) 16. El convertidor D/A 16 convierte los datos digitales en una señal analógica. Un amplificador 18 acoplado al convertidor D/A 16 amplifica la señal analógica. La salida de la señal analógica amplificada del amplificador 18 se aplica al sensor 20.

El sensor 20 está acoplado a un amplificador 22. La señal detectada amplificada se aplica a un convertidor analógico-digital (A/D) 24 que convierte la señal detectada analógica amplificada en una señal digital. La señal digital se aplica a un microprocesador 12.

Diversos dispositivos comercialmente disponibles pueden ser utilizados como convertidor D/A 16, los amplificadores 18 y 20 y el convertidor A/D 24. Por ejemplo, un dispositivo tipo PM-752P/FS, fabricado por PMI puede utilizarse como convertidor D/A 16. El dispositivo amplificador operacional tipo TL074AC fabricado y vendido por Linear Technology se puede utilizar como amplificadores 18 y 22. Un dispositivo tipo MAX 135 CWT fabricado y vendido por Maxim se puede utilizar como el convertidor A/D 24.

Con referencia también a la Figura 3, se muestran las etapas secuenciales para una determinación exacta de análisis de la invención. Inicialmente, el microprocesador 12 aplica un impulso de quemado, por ejemplo un potencial de 0,4 voltios, al sensor 20 en la forma indicada en el bloque 300. A continuación, el microprocesador realiza una comprobación para identificar una muestra correspondiente

a un valor de corriente umbral detectada por el sensor, en la forma indicada en el bloque de decisión 302. Cuando se detecta una muestra en el bloque 302, se identifica un intervalo de tiempo de quemado predeterminado, como por ejemplo 10 segundos, en el bloque de decisión 304. A continuación se mide la corriente i_1 en la forma indicada en el bloque 306 y se aplica un circuito abierto al sensor 20, en la forma indicada en el bloque 308. A continuación se identifica un intervalo de tiempo de espera o de retardo establecido predeterminado, como por ejemplo quince (15) segundos en el bloque de decisión 310. Después del retardo establecido se aplica un impulso o potencial de lectura de 0,4 voltios al sensor 20, en la forma indicada en el bloque 312. A continuación se identifica un intervalo de tiempo de lectura predeterminado para el impulso de lectura, como por ejemplo de 5 segundos, en el bloque de decisión 314 y la corriente i_2 es medida en la forma indicada en el bloque 316. A continuación, el microprocesador 12 obtiene los parámetros almacenados para un sensor 20 particular incluyendo Int , pendiente, $i_1 - i_0$, $i_2 - i_0$, S_1 y k , en la forma indicada en el bloque 320. El término de corrección delta (i_1, i_2) se calcula utilizando los parámetros almacenados y medidos, corriente de quemado i_1 y corriente de lectura i_2 , en la forma indicada en el bloque 322. A continuación, se calcula el valor del análisis, como por ejemplo la lectura de la glucosa G , utilizando la corriente de lectura i_2 y el término de corrección calculado delta (i_1, i_2) multiplicado por el valor de escala k seleccionado, en la forma indicada en el bloque 324.

REIVINDICACIONES

1. El procedimiento para incrementar la precisión de la determinación de la concentración de un analito en una de muestras fluidas mediante la aplicación de la de muestras de análisis fluidas a la superficie de un electrodo de trabajo, que está conectado electroquímicamente a un electrodo de referencia cuya superficie lleva una composición que comprende:

una enzima específica para el analito;

un mediador que tiene su respuesta reducida a una reacción entre el analito y la enzima, habiendo soportado dicho mediador una reducción parcial, y posiblemente:

determinar la concentración del analito en la muestra de análisis fluida como una función de la corriente que pasa a través de la muestra de análisis fluida;

mediante la medida de la corriente entre los electrodos de trabajo y de referencia;

siendo dicha corriente el resultado de la cantidad del mediador reducido producido durante el aumento del sensor en condiciones ambientales y durante el período de tiempo anterior al período de inyección de la corriente;

caracterizado porque

a) se aplica un primer potencial entre los electrodos para devolver al menos una parte del mediador a su forma oxidada;

b) siendo controlado el sistema a un circuito abierto o a un potencial que reduce la corriente para minimizar la velocidad de la reacción electroquímica en el electrodo de trabajo para un período de relajo establecido;

c) se aplica un segundo potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia para oxidar el mediador reducido durante un intervalo de tiempo, que normalmente varía entre 10 y 10 segundos, tras la aplicación del potencial; y

d) medir la corriente en el electrodo de trabajo;

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la precisión de la determinación del analito se incrementa adicionalmente mediante:

a) la determinación de la corriente (i_1) al final de la aplicación del primer impulso de potencial y la corriente (i_2) al final de la aplicación del segundo impulso de potencial; y

b) el cálculo del nivel de analito (C) corregido mediante la resolución de la ecuación:

$$C = \frac{i_2 \cdot \ln i_1}{i_1 \cdot \ln i_2} - K \cdot \Delta(i_1, i_2)$$

en la que $\ln i$ es la coordenada en origen de la función lineal de la corriente i respecto a la concentración del analito, K es un parámetro de un valor entre 0 y 1 y $\Delta(i_1, i_2)$ es un término de corrección de error proporcional a la polarización de fondo calculada como:

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\ln i_1}{\text{pendiente}(i_1 - s_1, i_2)} - \frac{\text{pendiente}(i_1 - s_1, i_2)}{\text{pendiente}(i_1 - s_1, i_2) - 1}$$

en la que

s1 pendiente de la función lineal de la corriente i_1 respecto a la concentración del analito;

i_1 en el bajo nivel de analito usado para determinar s_1 ; e

i_2 en el alto nivel de analito usado para determinar la pendiente;

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mediador es una sal de ferrocenuro.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el analito es riboflavin.

5. Los electrodos incluye las capas de aplicar un potencial de corriente suministrado selectivamente entre los electrodos, comparando la corriente medida con un valor umbral e identificar un intervalo de tiempo predefinido para aplicar dicho potencial de corriente que responde a una corriente medida superior a dicho valor umbral.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha capa de identificar un intervalo de tiempo predefinido incluye un intervalo de tiempo establecido suministrado selectivamente en un intervalo comprendido entre 1 y 15 segundos.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa de suministrar un retardo de tiempo seleccionado incluye la capa de esperar un retardo de tiempo seleccionado en un intervalo entre 10 y 40 segundos antes de aplicar dicho segundo potencial, y en el que dicho potencial segundo se aplica durante un período de tiempo seleccionado en un intervalo comprendido entre 5 y 10 segundos antes de la etapa de medir dicha corriente.

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RT 2121/1980, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patentes Europeas, las patentes europeas que designen a España en la medida en que confieren protección a productos químicos y farmaceuticos como

labios

Nota informativa no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva

60

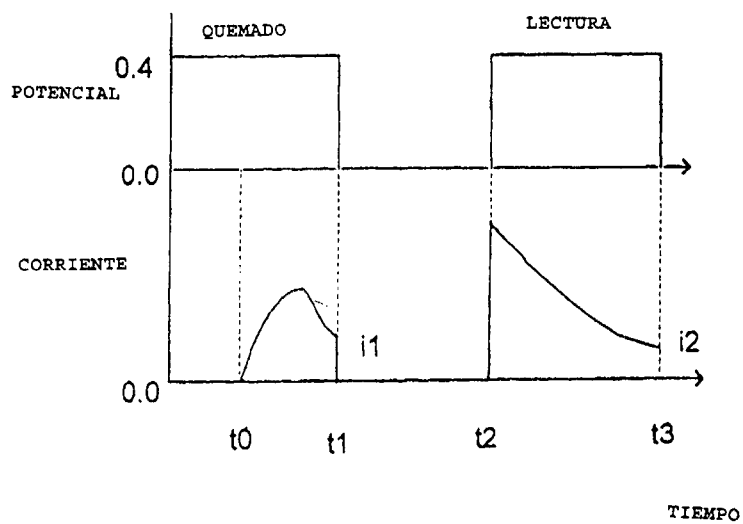


FIG.1

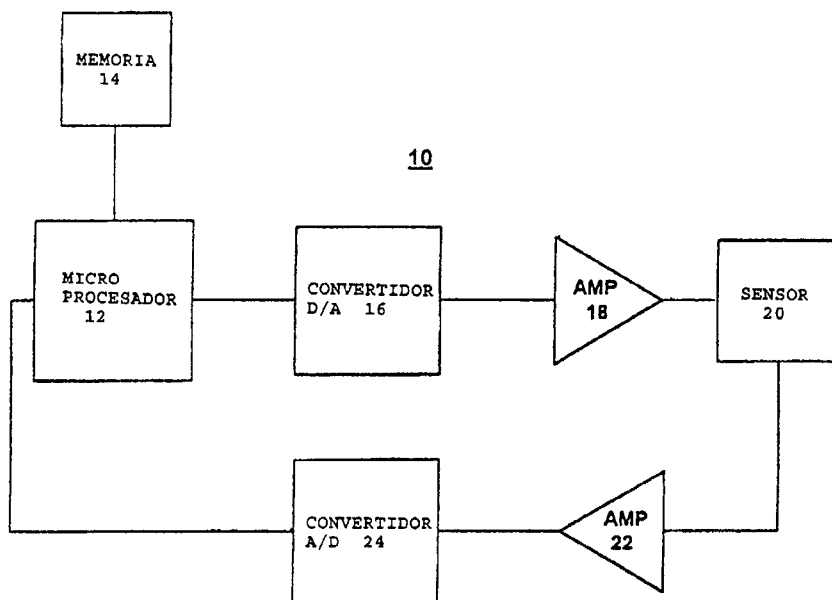
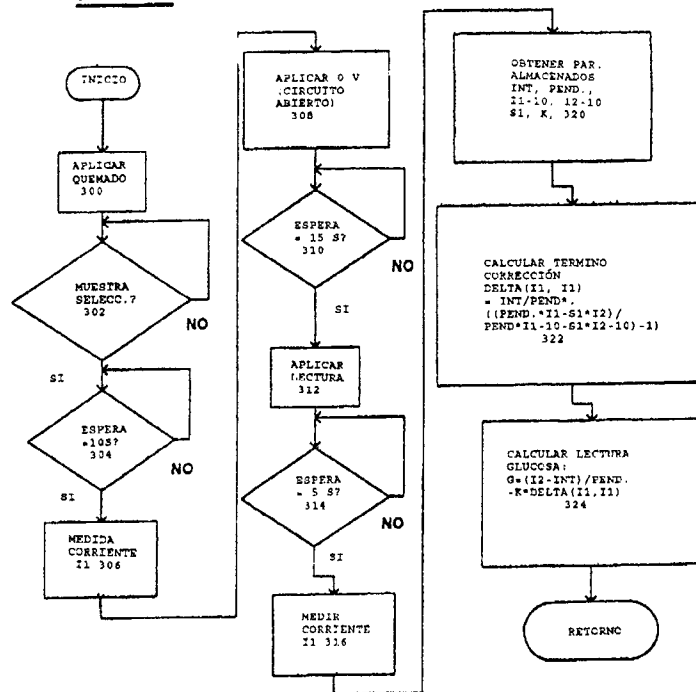


FIG.2

ES 2 162 613 T3

ES 2 162 613 T3

FIG.3



ES 2 162 643 T3