

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 932**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2002 E 10010432 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2330407**

54 Título: **Método, instrumento y aparato para medir la concentración**

30 Prioridad:

14.09.2001 JP 2001278966

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.07.2013

73 Titular/es:

**ARKRAY, INC. (100.0%)
57, Nishiaketa-cho Higashikujo
Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 601-8045, JP**

72 Inventor/es:

**NAGAKAWA, KENJI y
YAMAOKA, HIDEAKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 415 932 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Método, instrumento y aparato para medir la concentración

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a tecnología para medir la concentración de un compuesto a analizar (tal como glucosa o colesterol) contenido en una muestra líquida (tal como sangre u otra de tales muestras biológicas, o uno de sus preparados líquidos).

Antecedentes de la técnica

10 Las reacciones enzimáticas se usan como un modo de cuantificar la concentración de glucosa. En un caso típico, se usa como enzima la glucosa oxidasa (GOD). La GOD es una enzima que está unida a flavin adenina dinucleótido (FAD), que es una coenzima. La reacción enzimática de glucosa cuando se usa GOD avanza según la siguiente fórmula química (en la fórmula, FADH₂ es la especie reducida de la FAD).



15 Cuando se miden los niveles de azúcar en sangre en un entorno clínico, las concentraciones de glucosa se cuantifican a veces midiendo el cambio de absorbancia, que corresponde al cambio de concentración de glucosa. Sin embargo, el método más común es medir la concentración de glucosa por amperometría. La amperometría se emplea mucho como método para medir la concentración de glucosa en dispositivos de medida de azúcar en sangre portátiles.

20 Un ejemplo de cómo se mide el azúcar en sangre por amperometría se da a continuación, para el caso de medir la corriente de oxidación. En la primera etapa, se construye un sistema de reacción usando sangre, una enzima, y un medio oxidante de transferencia de electrones (mediador). El resultado es que la reacción enzimática anteriormente mencionada avanza produciendo un mediador reductor por una reacción de oxidación-reducción entre el mediador y la FADH₂ producida por esta reacción enzimática. Se usa comúnmente ferricianuro de potasio como mediador, en cuyo caso la reacción se puede representar por la siguiente fórmula química.



25 A continuación, en la segunda etapa, se aplica voltaje al sistema de reacción usando un par de electrodos, que oxida el ferrocianuro de potasio (desprende electrones) y produce ferricianuro de potasio como se muestra en la siguiente fórmula general. Los electrones que se originan en el ferrocianuro de potasio se suministran al ánodo.



30 En la tercera etapa, se mide el valor de la corriente de oxidación atribuible a la aplicación de voltaje, y se calcula la concentración de glucosa en base a este valor medido.

35 Cuando el azúcar en sangre se mide usando un dispositivo portátil de medida de azúcar, se usa un sensor de glucosa en el que se forma entre electrodos una capa de reactivo que contiene una enzima y un mediador, y se constituye un sistema de reacción entre los electrodos suministrando sangre a la capa de reactivo. Este sensor de glucosa se instala en un dispositivo portátil para azúcar en sangre, se aplica voltaje entre los electrodos, se mide el valor de la corriente de oxidación, y se cuantifica la concentración de glucosa en sangre en base a este valor de la corriente de oxidación.

40 Como se discutió anteriormente, la GOD se usa usualmente como enzima, y ferricianuro de potasio como mediador. Sin embargo, en un sistema de reacción que combina GOD con ferricianuro de potasio, se encuentran los problemas discutidos a continuación con un método para medir la concentración de glucosa por un procedimiento electroquímico, tipificado como amperometría.

45 El primero de estos problemas es el efecto de las sustancias reductoras. Por ejemplo, si consideramos la medida de la concentración de glucosa en sangre, hay sustancias reductoras (tales como ácido ascórbico, glutatión, y Fe(II)²⁺) que coexisten en la sangre además de la glucosa. Si está presente una sustancia reductora distinta de cianuro de potasio cuando se aplica voltaje al sistema de reacción, los electrones que se originan en la oxidación de la sustancia reductora provocada por la aplicación de voltaje se suministrarán a los electrodos además de los electrones que se originan en el ferrocianuro de potasio. Como resultado, el valor de la corriente medida incluirá una corriente de fondo (ruido) atribuible a la transferencia de electrones de la sustancia reductora. Por consiguiente, la concentración de glucosa medida acabará siendo mayor que la concentración de glucosa real. Cuando mayor sea la cantidad de voltaje aplicado entre los electrodos, más tipos y cantidad de sustancias reductoras que se oxidan, y más pronunciado es este error de la medida. Por lo tanto, cuando se usa ferricianuro de potasio como mediador, el azúcar en sangre no se puede medir con precisión a menos que se determine la concentración final corrigiendo el valor medido. Este efecto de las sustancias reductoras no está limitado a cuando se mide el azúcar en sangre, y se encuentra similarmente con otros componentes cuando se calcula en base al valor de la corriente de oxidación.

Otro problema se refiere a la estabilidad de almacenamiento del sensor de glucosa cuando se mide la concentración de glucosa con un dispositivo portátil de medida de la concentración de glucosa en sangre y un sensor de glucosa. El ferricianuro de potasio es susceptible a los efectos de la luz y agua, y cuando se expone a estos, recibe electrones de fuentes distintas de la glucosa y se convierte en ferrocianuro de potasio reductor. Si sucede esto, entonces el sistema de reacción contendrá tanto ferrocianuro de potasio que se ha vuelto reductor por la reacción enzimática como ferrocianuro de potasio que se ha vuelto reductor por la exposición. Como resultado, así como con el problema de las sustancias reductoras descrito anteriormente, la corriente de oxidación durante la aplicación de voltaje incluye una corriente de fondo que se origina en el ferrocianuro de potasio resultante de la exposición. Consecuentemente, la concentración de glucosa medida acaba siendo mayor que la concentración de glucosa real. Para minimizar este problema, el sensor de glucosa debe estar sellado en una bolsa hecha de un material que bloquea la luz, por ejemplo, de modo que la capa de reactivo en el sensor de glucosa no esté expuesta. Además, para extender la vida útil del sensor de glucosa, tiene que estar sellado en un estado hermético a la humedad realizando un desplazamiento con nitrógeno u otro de tales tratamientos para evitar la exposición a la humedad, y esto complica la fabricación y eleva el coste cuando el sensor de glucosa se produce en masa a escala industrial.

15 Descripción de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar tecnología que reduzca el efecto de la corriente de fondo con bajo coste, y permita medir con más precisión la concentración de un compuesto a analizar en una muestra líquida.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para medir la concentración de un compuesto a analizar, por lo que se constituye un sistema de reacción para incluir el compuesto a analizar, una enzima de oxidación-reducción y un mediador de electrones, y a continuación se mide la concentración del compuesto a analizar utilizando un procedimiento electroquímico. Para el mediador de electrones, se hace uso de un compuesto de Ru.

El método anterior de medida de la concentración puede comprender preferentemente una primera etapa de producir un reductor del compuesto de Ru en el sistema de reacción, una segunda etapa de aplicar voltaje al sistema de reacción para oxidar el reductor, y medir el valor de la corriente de respuesta correlacionado con la cantidad de electrones desprendidos por el reductor en este momento, y una tercera etapa de calcular la concentración del compuesto a analizar en base al valor de la corriente de respuesta medida en la segunda etapa.

Electroanalysis 4 (1992) 1-9 describe un método que implica la medida continua de la corriente transitoria de una etapa de aplicación de voltaje hasta la finalización de la re-oxidación y la integración de los valores de la corriente transitoria con el tiempo, lo que da como resultado un valor de carga que se correlaciona con la cantidad de electrones transferidos y la concentración de glucosa en la muestra.

Dicho método requiere una celda especialmente construida y la medida extendida de la corriente transitoria.

Con el método de la presente invención, la primera etapa se puede efectuar con el sistema de reacción en un estado de no aplicación de voltaje y efectuar a continuación la segunda etapa con el sistema de reacción en un estado de aplicación de voltaje, o la primera y segunda etapa se pueden efectuar simultáneamente con el sistema de reacción en un estado de aplicación de voltaje continuamente desde el momento en que se suministra la muestra líquida que contiene por lo menos el compuesto a analizar.

El voltaje aplicado entre el primer y segundo electrodo en la segunda etapa es preferentemente un potencial constante, y su valor es preferentemente por lo menos el potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre el complejo de Ru(II) reductor y el complejo de Ru(III) oxidante, y menos del potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre iones ferrocianuro e iones ferricianuro. El voltaje constante aplicado entre el primer y segundo electrodo puede ser de 100 a 500 mV, por ejemplo, y más preferentemente de 100 a 300 mV.

Preferentemente, la primera etapa dura de 0 a 10 segundos, y el valor de la corriente medida después de que ha pasado una cantidad específica de tiempo (por lo menos 3 segundos) desde el comienzo de la segunda etapa se emplea como valor computacional de la corriente que sirve como base para el cálculo de la concentración de glucosa en la tercera etapa. Incluso más preferentemente, la primera etapa dura de 0 a 3 segundos, y el valor de la corriente medida después de que ha pasado una cantidad específica de tiempo (de 3 a 5 segundos) desde el comienzo de la segunda etapa se emplea como valor computacional de la corriente.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un instrumento de análisis de la concentración que comprende un sustrato, primer y segundo electrodos formados sobre el sustrato, y una capa de reactivo en forma sólida. La capa de reactivo puede comprender una enzima de oxidación-reducción y un compuesto de Ru, y puede estar constituida para disolver y construir un sistema de reacción en fase líquida cuando se suministra una muestra líquida que contiene el compuesto a analizar.

Preferentemente, en el primer y segundo aspecto de la presente invención, el compuesto de Ru está presente en el sistema de reacción en forma de un complejo de Ru oxidante. No hay restricciones particulares del tipo de ligando

en el complejo de Ru con tal de que el complejo funcione como mediador (medio de transferencia de electrones), pero es preferible usar un tipo oxidante expresado por la siguiente fórmula química.



5 Los ejemplos de X en la fórmula química incluyen NH₃, un ión halógeno, CN, piridina, nicotinamida, y H₂O, pero es preferible NH₃ o un ión halógeno. n+ en la fórmula química es la valencia del complejo de Ru(III) oxidante como se determina por el tipo de X.

10 Si el compuesto de Ru es un complejo de Ru(III) oxidante, entonces el sistema de transferencia de electrones se selecciona de modo que el complejo de Ru(II) reductor se producirá por solo dos reacciones: una reacción de oxidación del compuesto a analizar de la medida catalizada por la enzima de oxidación-reducción, y una reacción de reducción del complejo de Ru(III) oxidante.

15 El sistema de reacción está constituido, por ejemplo, como un sistema de reacción de fase líquida uniforme o sustancialmente uniforme en el que una relativamente pequeña cantidad de la enzima de oxidación-reducción se dispersa uniformemente o sustancialmente uniformemente con respecto a una cantidad relativamente grande del complejo de Ru(III) oxidante. En este caso, el reductor se produce sustancial y uniformemente en cada localización del sistema de reacción.

Los ejemplos del compuesto a analizar incluyen glucosa, colesterol, ácido láctico y ácido ascórbico.

20 La enzima de oxidación-reducción se selecciona según el tipo de compuesto a analizar, pero preferentemente es por lo menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en glucosa deshidrogenasa (GDH) (incluyendo la α GDH y CyGDH discutidas a continuación), glucosa oxidasa (GOD), colesterol deshidrogenasa, colesterol oxidasa, ácido láctico deshidrogenasa, ácido láctico oxidasa, ácido ascórbico deshidrogenasa, ácido ascórbico oxidasa, alcohol deshidrogenasa, ácido 3-hidroxibutírico deshidrogenasa, ácido pirúvico deshidrogenasa, NADH oxidasa, ácido úrico oxidasa (uricasa), ureasa, y dihidrolipoamida deshidrogenasa (diaforasa).

25 Con la presente invención, los ejemplos de GDH que se pueden usar incluyen tipos en los que la pirroquinolina quinona (PQQ), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), u otro de tales compuestos sirven como coenzima, así como α -GDH, CyGDH, etc. Es preferible que la GDH sea α GDH, CyGDH, o un compuesto en el que PQQ sirve como coenzima (PQQGDH).

30 La α GDH contiene una proteína activa de GDH cuyo peso molecular es aproximadamente 60 kDa en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones de reducción como subunidades que tienen actividad de deshidrogenación de glucosa. La CyGDH, mientras tanto, contiene como subunidades la anteriormente mencionada proteína activa de GDH y una proteína mediadora de electrones (citocromo C) cuyo peso molecular en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones de reducción es aproximadamente 43 kDa. La GDH puede ser también una que adicionalmente tiene subunidades distintas de una proteína activa de GDH y citocromo C.

35 La CyGDH se puede obtener refinando una enzima secretada externamente por un microbio que pertenece a Burkholderia cepacia, o refinando una enzima encontrada internamente en este microbio. La α -GDH, mientras tanto, se puede obtener formando un transformante implantado con un gen que codifica la expresión de α GDH recogida de un microbio que pertenece a Burkholderia cepacia, por ejemplo, y refinando una enzima externamente secretada por este transformante, o refinando una enzima encontrada internamente en este transformante.

40 Por lo que respecta al microbio que pertenece a Burkholderia cepacia, por ejemplo, se puede usar la cepa KS1 de burkholderia cepacia. Esta cepa KS1 depositada el 25 de septiembre de 2000 como depósito de microorganismos número FERM BP-7306 en el Patent Organism Depository del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Chuo No. 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan, 305-8566).

45 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato de medida de la concentración que se usa junto con un instrumento de análisis de concentración que incluye una capa de reactivo, un primer electrodo y un segundo electrodo, en el que la capa de reactivo contiene un compuesto de Ru como enzima de oxidación-reducción. El aparato de medida incluye un aplicador de voltaje para aplicar voltaje entre el primer y segundo electrodo, un medidor del valor de la corriente para medir el valor de la corriente de respuesta cuando se ha aplicado voltaje entre el primer y segundo electrodo, y un ordenador para calcular la concentración del compuesto a analizar en base al valor de la corriente de respuesta.

50 Preferentemente, el aparato de medida de la concentración puede comprender adicionalmente un controlador para controlar la aplicación de voltaje realizada por el aplicador de voltaje, o para controlar la medida del valor de la corriente efectuada por el medidor del valor de la corriente.

55 El controlador anterior está constituido, por ejemplo, de tal modo que el voltaje aplicado por el aplicador de voltaje está controlado para que sea un voltaje constante seleccionado de un intervalo de 100 a 500 mV, y preferentemente de 100 a 300 mV. El controlador puede también estar constituido de tal modo que el voltaje aplicado por el aplicador de voltaje esté controlado para que sea un voltaje constante seleccionado de un intervalo de por lo menos el

potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre el oxidante y reductor del compuesto de Ru, y menos del potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre iones ferrocianuro e iones ferricianuro.

5 Preferentemente, el aparato de medida de la concentración de la presente invención puede comprender adicionalmente un detector para detectar que se ha suministrado una muestra líquida a la capa de reactivo del instrumento de análisis de la concentración. El controlador está constituido, por ejemplo, para controlar el aplicador de voltaje de tal modo que no se aplique voltaje entre el primer y segundo electrodo durante un primer periodo específico de 0 a 10 segundos después de que el detector ha detectado que se ha suministrado una muestra líquida a la capa de reactivo. En este caso, los medios de control controlan el aplicador de voltaje de modo que se aplica un potencial específico entre el primer y segundo electrodo por el aplicador de voltaje comenzando en el instante cuando ha pasado el primer periodo de tiempo. Los medios de control están constituidos adicionalmente de tal modo que el valor de la corriente de respuesta usado para el cálculo de la concentración por el ordenador se mide por el medidor del valor de la corriente en un momento en el que ha pasado un segundo periodo de tiempo específico de por lo menos 3 segundos después del comienzo de la aplicación previa del potencial específico. Preferentemente, el primer periodo de tiempo específico es de 0 a 3 segundos, y el segundo periodo de tiempo específico es de 3 a 5 segundos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra la estructura básica en un aparato de medida de la concentración de glucosa según la presente invención;

20 La Fig. 2 es una vista en una perspectiva oblicua general que ilustra un sensor de glucosa usado en el aparato de medida de concentración de glucosa en la Fig. 1;

La Fig. 3 es una vista en despiece ordenado en perspectiva oblicua del sensor de glucosa en la Fig. 2.

25 La Fig. 4A es un diagrama del sistema de transferencia de electrones en un sistema de reacción que incluye PQQ-GDH y un complejo de Ru, y la Fig. 4B es un diagrama del sistema de transferencia de electrones en un sistema de reacción que incluye GOD y un complejo de Ru;

La Fig. 5 es un gráfico del cambio con el tiempo en el voltaje aplicado al primer y segundo electrodo y el valor de la corriente de respuesta en la medida de la concentración de glucosa;

La Fig. 6 es un gráfico de las ondas de CV de un sensor 1 de glucosa de la presente invención y de un sensor de glucosa comparativo.

30 La Fig. 7 es un gráfico del efecto del valor de voltaje aplicado;

La Fig. 8 es un gráfico del cambio con el tiempo en la corriente de respuesta cuando se aplica voltaje a la capa de reactivo (circuito cerrado) después de que se ha abierto el circuito durante un periodo de tiempo específico después del suministro de sangre entera a una capa de reactivo en la que se usa un complejo de Ru;

35 La Fig. 9 es un gráfico del cambio con el tiempo en la corriente de respuesta cuando se aplica voltaje a la capa de reactivo (circuito cerrado) después de que se ha abierto el circuito durante un periodo de tiempo específico después del suministro de sangre entera a una capa de reactivo en la que se usa un complejo de Fe;

La Fig. 10 es un gráfico del valor de la corriente de respuesta 5 segundos después del comienzo de la aplicación de voltaje cuando se aplica un voltaje de 500 mV 10 segundos después de que se suministra sangre entera a la capa de reactivo, para varios tipos de sangre entera con diferentes concentraciones de glucosa;

40 La Fig. 11 es un gráfico del valor de la corriente de respuesta 5 segundos después del comienzo de la aplicación de voltaje cuando se aplica un voltaje de 250 mV 10 segundos después de que se suministra sangre entera a la capa de reactivo, para varios tipos de sangre entera con diferentes concentraciones de glucosa.

45 La Fig. 12 es un gráfico de barras del valor de la corriente de respuesta (corriente de fondo) para sangre entera con una concentración de glucosa de 0 en los gráficos mostrados en las Figs. 10 y 11, dado separadamente para un complejo de Fe y un complejo de Ru;

La Fig. 13 es un gráfico de una evaluación del efecto de la exposición a la humedad del valor de la corriente de respuesta cuando se suministra una disolución estándar a la capa de reactivo;

La Fig. 14 es un gráfico de una evaluación de la dispersabilidad de un complejo de Ru del valor de la corriente de respuesta cuando se suministra una disolución estándar a la capa de reactivo;

50 La Fig. 15 es un gráfico de la correlación entre la concentración de glucosa y valor de la corriente de respuesta para sensores de glucosa que tienen diferentes formulaciones de la capa de reactivo (enzimas de oxidación-reducción); y

La Fig. 16 es un gráfico de la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente de respuesta para sensores de glucosa en los que se usa GOD como enzima de oxidación-reducción.

Mejor método para llevar a cabo la invención

5 Las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán ahora con referencia a los dibujos. En estas realizaciones, la descripción será para los ejemplos de un aparato de medida de la concentración de glucosa y un sensor de glucosa constituido de tal modo que se mide la concentración de glucosa en una muestra líquida. Sin embargo, la presente invención no está limitada a la medida de la concentración de glucosa, y se puede aplicar también a la medida de otros componentes.

10 Como se muestra en la Fig. 1, un aparato 1 de medida de la concentración de glucosa usa un sensor 2 de glucosa para medir la concentración de glucosa en una disolución de glucosa tal como sangre. Este aparato 1 de medida de la concentración de glucosa comprende un aplicador 3 de voltaje, un medidor 4 de corriente, un detector 5, un controlador 6, un ordenador 7, y una unidad 8 de monitor.

Como se muestra claramente en las Figs. 2 y 3, el sensor 2 de glucosa incluye una placa 20 de cubierta, un separador 21, y una placa 22 base. Se crea un canal 25 por estos miembros.

15 Se hace un agujero 23 en la placa 20 de cubierta, y se proporciona en el separador 21 una rendija 24 que comunica con el agujero 23 y está abierta en su extremo 24a distal. El canal 25 comunica con el exterior vía el agujero 23 y el extremo 24a distal abierto de la rendija 24. El extremo 24a distal constituye una abertura 25a de introducción de la muestra líquida. La disolución de glucosa suministrada a través de esta abertura 25a de introducción de la muestra líquida se mueve por acción capilar a través del canal 25 hacia el agujero 23.

20 Se proporciona un primer electrodo 26, un segundo electrodo 27, y una capa 28 reactiva sobre la superficie 22a superior de la placa 22 base.

El primer y segundo electrodos 26 y 27 generalmente se extienden en dirección longitudinal de la base 22. El primer y segundo electrodos 26 y 27 tienen en sus extremos 26A y 27A una porción de trabajo 26a y una porción equivalente 27a que se extienden en paralelo hacia los lados más cortos de la placa 22 base.

25 La superficie 22a superior de la placa 22 base está cubierta por una película 29 aislante para exponer la porción de trabajo 26a del primer electrodo 26, la porción equivalente 27a del segundo electrodo 27, y los extremos opuestos 26b y 27b del primer y segundo electrodo 26 y 27. Como se discute a continuación, los extremos opuestos 26b y 27b del primer y segundo electrodo 26 y 27 constituyen terminales para proporcionar contacto con el primer y segundo contacto 3a y 3b (véase la figura 1) del aparato 1 de medida de la concentración de glucosa.

30 La capa de reactivo 28 está, por ejemplo, en forma sólida y está provista para abarcar la distancia entre la porción de trabajo 26a y la porción 27a equivalente. Esta capa 28 reactiva incluye, por ejemplo, una cantidad relativamente grande de mediador (medio de transferencia de electrones) y una cantidad relativamente pequeña de la enzima de oxidación-reducción. La capa 28 reactiva se forma, por ejemplo, aplicando un revestimiento de pintura, en la que están sustancial y uniformemente dispersos el mediador y la enzima de oxidación-reducción, para que abarque la
35 distancia entre el primer y segundo electrodo 26 y 27, y secando este revestimiento a continuación. Cuando la capa 28 reactiva se forma de este modo, se convierte en una sola capa sólida en la que, está uniforme y sustancialmente dispersa la enzima de oxidación-reducción en el mediador, y se disuelve fácilmente por el suministro de la disolución de glucosa.

40 Es preferible usar glucosa deshidrogenasa (GDH) o glucosa oxidasa (GOD) como enzima de oxidación-reducción. La GDH puede ser de un tipo en el que tales compuestos como pirroquinolina quinona (PQQ), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o nicotimánima adenina dinucleótido fosfato (NADP) sirven como coenzima, o puede ser α -GDH o CyGDH. De estas GDHs, es preferible usar α GDH, CyGDH, o un compuesto en el que PQQ sirve como coenzima (es decir, PQQGDH).

45 Se usa como mediador, por ejemplo, un complejo de Ru. No hay restricciones particulares del tipo de ligando en el complejo de Ru con tal de que el complejo funcione como un medio de transferencia de electrones, pero es preferible usar un tipo oxidante expresado por la siguiente fórmula química.



50 Los ejemplos de X en la fórmula química incluyen NH₃, un ión halógeno, CN, piridina, nicotinamida, y H₂O, pero es preferible NH₃ o un ión halógeno. n+ en la fórmula química es la valencia del complejo de Ru(III) oxidante, que está determinada por el tipo de X.

Los complejos de Ru están usualmente en la forma de un tipo (III) oxidante porque los tipos (II) son inestables. Por consiguiente, el complejo de Ru no sufrirá fácilmente reducción indeseable incluso cuando se expone a la luz o al agua cuando se mezcla en la capa 28 reactiva del sensor 2 de glucosa. Otra característica de un complejo de Ru es que no cristaliza fácilmente y se puede mantener apropiadamente en forma de micropolvo. Otra ventaja, por lo

menos para combinaciones de complejo de Ru y PQQGDH, es la rápida transferencia de electrones.

5 El suministrador 3 de voltaje mostrado en la Fig. 1 aplica un voltaje constante entre el terminal 26b del primer electrodo 26 y el terminal 27b del segundo electrodo 27. El suministrador 3 de voltaje está diseñado de modo que cuando el sensor 2 de glucosa está montado en su componente de montaje (no mostrado) proporcionado al aparato 1 de medida de la concentración de glucosa, hay continuidad eléctrica entre los terminales 26b y 27b del sensor 2 de glucosa vía el primer y segundo contacto 3a y 3b. Se usa un suministro de corriente continua tal como una pila seca o una pila recargable como suministrador 3 de voltaje.

10 El medidor 4 de corriente mide el valor de la corriente de respuesta correlacionado con la cantidad de electrones desprendidos del complejo de Ru(III) reductor de la capa 28 reactiva cuando se aplica voltaje entre el primer y segundo electrodo 26 y 27.

Después de que el sensor 2 de glucosa está montado en el aparato 1 de medida la concentración de glucosa, el detector 5 detecta si se ha suministrado o no una disolución de glucosa a la capa 28 reactiva y es posible la medida de la concentración de glucosa.

15 El controlador 6 controla el aplicador 3 de voltaje y selecciona entre estados en los que se aplica voltaje (circuito cerrado) y no se aplica voltaje (circuito abierto) entre el primer y segundo electrodo 26 y 27. El controlador 6 también controla el ritmo de la medida del valor de la corriente en el medidor 4 de corriente.

El ordenador 7 calcula la concentración de glucosa en la disolución de glucosa según el valor de la corriente de respuesta medida por el medidor 4 de corriente.

20 El detector 5, el controlador 6 y el ordenador 7 están cada uno constituido por una CPU y una memoria tal como una RAM o ROM, por ejemplo, pero también es posible constituir todos, el detector 5, el controlador 6 y la calculadora 7 conectando una pluralidad de memorias a una sola CPU. Los resultados de cálculo del ordenador 7 se muestran por la unidad 8 de monitor. La unidad de monitor está constituida por un LCD o similares.

A continuación, se describirá el procedimiento para medir la concentración de glucosa en una disolución de glucosa con referencia a las Figs. 4 y 5 además de las Figs. 1 a 3.

25 Como se muestra claramente en la Fig. 1, primero se instala el sensor 2 de glucosa en el aparato 1 de medida de la concentración de glucosa. Como resultado, los terminales 26b y 27b del primer y segundo electrodo 26 y 27 del sensor 2 de glucosa se ponen en contacto con el primer y segundo contacto 3a y 3b del aparato 1 de medida de la concentración de glucosa. Como se mencionó anteriormente, hay continuidad eléctrica entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 y el aplicador 3 de voltaje en este estado. En la medida real, se aplica un voltaje constante entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 por el aplicador 3 de voltaje bajo el control del controlador 6 incluso antes de que se suministre la disolución de glucosa al sensor 2 de glucosa.

30 El voltaje constante aplicado entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 se establece dentro de un intervalo de 100 a 500 mV, por ejemplo. Preferentemente, el voltaje constante es por lo menos el potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre el complejo de Ru(II) reductor y el complejo de Ru(III) oxidante, y menos del potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre iones ferrocianuro e iones ferricianuro. El potencial de oxidación-reducción estándar de un complejo de Ru varía algo con el tipo de ligandos, pero es aproximadamente +100 mV, mientras que el de los iones ferricianuro es +360 mV. Por lo tanto, el voltaje constante aplicado entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 por el aplicador 3 de voltaje se selecciona de un intervalo de 100 a 350 mV, por ejemplo. Se discutió anteriormente que es mejor que el complejo de Ru sea un tipo oxidante expresado por $[Ru(NH_3)_8]^{3+}$ (o un tipo reductor expresado por $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$). De nuevo aquí, el voltaje constante es preferentemente de 100 a 350 mV, e incluso más preferentemente de 100 a 300 mV.

35 A continuación, se suministra una disolución de glucosa tal como sangre a través de la abertura 25a de introducción de la muestra líquida del sensor 2 de glucosa. La disolución de glucosa se mueve por acción capilar a través del canal 25 del sensor 2 de glucosa. En el transcurso de este movimiento la disolución de glucosa disuelve la capa 28 reactiva.

40 Como se mencionó brevemente anteriormente, dado que un complejo de Ru no cristaliza fácilmente y se puede mantener apropiadamente en forma de un micropolvo, si un complejo de Ru está contenido en la forma de un micropolvo en la capa 28 reactiva, toda la capa 28 reactiva se disolverá fácil e instantáneamente cuando se suministra la disolución de glucosa. Debido a que la capa 28 reactiva comprende un complejo de Ru disperso en una enzima de oxidación-reducción, ocurre una reacción enzimática uniformemente en cada localización de la capa 28 reactiva, lo que permite medir con precisión la concentración de glucosa en un tiempo corto.

45 Mientras tanto, si se suministra una disolución de glucosa a la capa 28 reactiva, la glucosa se oxida a gluconolactona y el mediador se convierte en un tipo reductor por la enzima de oxidación-reducción. Dado que el mediador está sustancial y uniformemente disperso en la capa 28 reactiva, se produce espontáneamente un mediador reductor, sin que sea aplicado ningún voltaje, sustancial y uniformemente en cada localización de la capa

38 reactiva. La gluconolactona se convierte en ácido glucónico sin la ayuda de la enzima.

Aquí, la Fig. 4A es un diagrama del sistema de transferencia de electrones cuando se usa $[\text{Ru(III)(NH}_3)_6]^{3+}$ como mediador y se usa PQQGDH como enzima de oxidación-reducción, mientras que la Fig. 4B es un diagrama del sistema de transferencia de electrones cuando se usa $[\text{Ru(III)(NH}_3)_6]^{3+}$ como mediador y se usa GOD como enzima de oxidación-reducción.

En el ejemplo representado en las Figs. 4A y 4B, en un estado en el que se aplica un voltaje constante entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 vía los dos terminales 26b y 27b, el complejo de Ru(II) reductor presente en la capa 28 reactiva se mueve al lado 26a de la porción de trabajo del primer electrodo 26, desprende electrones a esta porción 26a de trabajo, y crea un complejo de Ru(III) oxidante. Por lo tanto, en un estado en el que se aplica un voltaje constante entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 por el aplicador 3 de voltaje, la cantidad de electrones desprendidos por el complejo de Ru(II) reductor se mide como valor de la corriente de respuesta por el medidor 4 de corriente vía el primer electrodo 26 y el primer contacto 3a. Este valor de la corriente de respuesta se correlaciona con la cantidad de electrones que se originan en el complejo de Ru(III) reductor que se ha movido a través de la capa 28 reactiva como resultado de la aplicación de voltaje, y se conoce como corriente de difusión.

Mientras tanto, el valor de la corriente de respuesta medido por el medidor 4 de corriente se monitoriza por el detector 5, y como se muestra en la Fig. 5, el detector 5 detecta que la disolución de glucosa se ha suministrado a la capa 28 reactiva y que la capa 28 reactiva se ha disuelto en el momento t_0 cuando el valor de la corriente de respuesta excede de un umbral I_1 (tal como de 2 a 3 μA).

Cuando el detector 5 ha detectado que se ha suministrado la disolución de glucosa, el controlador 6 controla el suministrador 3 de voltaje y detiene la aplicación de voltaje entre el primer y segundo electrodo 26 y 27. Dado que el complejo de Ru(II) reductor no se oxida mientras se detiene la aplicación de voltaje, el complejo de Ru(II) reductor se acumula como resultado de la reacción de oxidación de glucosa y la reacción de reducción de mediador provocada por la enzima de oxidación-reducción. En un punto t_1 cuando ha pasado una cantidad de tiempo específica (tal como $t_1 - t_0 = 0$ a 10 segundos, y preferentemente de 0 a 3 segundos), se aplica un voltaje constante V entre el primer y segundo electrodo 26 y 27 por el aplicador 3 de voltaje bajo el control del controlador 6. Incluso después de que el detector 5 ha detectado que se ha suministrado la disolución de glucosa, la aplicación de voltaje puede continuar de modo que el complejo de Ru(II) reductor producido se mueve sucesivamente a la porción 26a de trabajo y se mide la corriente de difusión.

Aquí, como se muestra en las Figs. 4A y 4B, un complejo de Ru(III) reductor desprende electrones e^- para convertirse en complejo de Ru(II) oxidante. Cuando están presentes otras sustancias reductoras en la disolución de glucosa junto con un complejo de Ru(III) reductor, estas sustancias también desprenden electrones según el tipo y cantidad de componente correspondiente al voltaje aplicado, y se vuelven oxidantes.

Los electrones desprendidos por el complejo de Ru(III) reductor y cualquier otra sustancia reductora se suministran a la porción 26a de trabajo del primer electrodo 26 y se miden como valor de la corriente de respuesta por el medidor 4 de corriente vía el primer contacto 3a. Por lo tanto, el valor de la corriente de respuesta que se mide realmente incluye el producido por electrones que se originan en las sustancias coexistentes que se vuelven oxidantes por la aplicación del voltaje. La probabilidad (proporción) de que las sustancias coexistentes que eran reductoras desprendan electrones y se vuelvan oxidantes depende de la cantidad de voltaje aplicado al primer y segundo electrodo 26 y 27; cuanto más voltaje aplicado, más tipos de las sustancias coexistentes desprenden electrones y mayor la cantidad total de electrones desprendidos por las sustancias individuales. Además, el complejo de Ru(III) reductor puede incluir no solo uno que ha estado dando electrones en la reacción de oxidación-reducción con la enzima de oxidación-reducción, sino también uno que se ha convertido en Ru(III) reductor por medio de la exposición a agua o luz. Por consiguiente, el valor de la corriente de respuesta que se mide realmente puede incluir corriente de fondo atribuible al Ru(III) reductor que se origina en los electrodos por algo distinto de la reacción enzimática, o ruido de fondo debido a las sustancias coexistentes que están presentes.

En contraste, según la presente realización, como está claro en la Fig. 5, el voltaje constante V aplicado al primer y segundo electrodo 26 y 27 es el mismo que el voltaje constante V aplicado hasta el momento en el que el detector 5 detecta que se ha suministrado la disolución de glucosa a la capa 28 reactiva. Específicamente, el voltaje constante reaplicado V está entre 100 y 350 mV, y preferentemente de 100 a 300 mV, que es menor que el potencial de oxidación-reducción estándar del ión ferricianuro. Con esto, el voltaje aplicado al primer y segundo electrodo 26 y 27 es menor que cuando se usa ión ferricianuro (de potasio) como mediador. Esto hace posible suprimir la oxidación (desprendimiento de electrones) de las sustancias reductoras coexistentes tales como ácido ascórbico o glutatión que están también presentes cuando la sangre o similares se usan como disolución de glucosa, que si no ocurriría por la aplicación de voltaje. Esto reduce la corriente de fondo provocada por el efecto de las sustancias reductoras coexistentes presentes en la disolución. Como resultado, es posible calcular la concentración con buena precisión incluso sin incluir el efecto de estas sustancias reductoras coexistentes y corrigiendo los valores medidos.

Además, debido a que un complejo de Ru(II) oxidante es mucho más estable que un complejo de Ru(III) reductor, este complejo de Ru es menos propenso a descomponerse en presencia de humedad o con irradiación óptica, y la mayor parte de él permanece como Ru(II) oxidante hasta que se le dan electrones por una reacción enzimática. Por

lo tanto, la proporción de complejo de Ru(II) que se ha vuelto reductor por electrones de otras fuentes distintas de la reacción enzimática es mucho menor, y esto de nuevo permite reducir la corriente de fondo. Por consiguiente, no hay necesidad de pensar mucho sobre el efecto de la humedad en el almacenamiento del sensor 2 de glucosa, de modo que no hay necesidad de reducir la cantidad de humedad por medio de remplazamiento con nitrógeno o similares. Como resultado, la fabricación es correspondientemente más fácil cuando el sensor 2 de glucosa se produce en masa a escala industrial, y esto mantiene bajo el coste.

Además, en la presente realización, la corriente de difusión basada en el complejo de R(II) reductor producida por toda la capa 28 reactiva se mide como corriente de respuesta. En otras palabras, dado que las dos reacciones de oxidación-reducción mostradas en las Figs. 4A y 4B ocurren en cada localización de la capa 28 reactiva, la reacción de glucosa concluye tan pronto como se suministra la disolución de glucosa. Por consiguiente, si la concentración de glucosa es de alrededor de 600 mg/dl, el complejo de Ru(III) oxidante se convertirá en Ru(II) reductor en una cantidad correspondiente a la concentración de glucosa en el momento en el que se mide el valor de la corriente de respuesta, tal como 5 segundos después de que se suministra la glucosa. Por lo tanto, el valor de la corriente de respuesta será relativamente grande (del nivel de μA) aunque la concentración de glucosa esté en el nivel de 100 mg/dl, y está por lo tanto menos afectada por el ruido de las ondas electromagnéticas etc.. Esto quiere decir que la concentración de glucosa se puede medir con buena precisión sin tener que efectuar tales etapas como asegurar una gran área superficial de electrodo. Además, los niveles altos de concentración son difíciles de medir cuando, por ejemplo, un mediador o enzima se fija a los electrodos, la enzima se somete a una reacción catalítica justo sobre la superficie de los electrodos, los electrones se intercambian entre el mediador y los electrodos, y se mide aquí la cantidad de movimiento de electrones (corriente de catálisis). En otras palabras, si incluso una de la pluralidad de reacciones que participan en el intercambio de electrones entre glucosa y los electrodos es más lenta que las otras reacciones, esa reacción se convertirá en la etapa limitante de la velocidad, e incluso si la glucosa se suministra por encima de una concentración específica, el valor de la corriente de respuesta no subirá por encima de un valor específico. Consecuentemente, el valor de la corriente de respuesta se aproxima gradualmente a un valor constante dentro de un intervalo en el que la concentración de glucosa es relativamente alta, haciendo difícil medir altas concentraciones. En contraste, cuando se mide el valor de la corriente de difusión, el valor de la corriente de respuesta se mide en el momento en el que la reacción de la glucosa de hecho ha concluido, de modo que las concentraciones de glucosa se pueden medir apropiadamente incluso a relativamente altos niveles de concentración.

Mientras tanto, el ordenador 7 calcula la concentración de glucosa en una disolución de glucosa en base a la corriente de respuesta I2 medida por el medidor 4 de corriente en el momento t2 cuando ha pasado un tiempo específico (tal como $t_2 - t_1 =$ por lo menos 3 segundos, y preferentemente de 3 a 5 segundos) desde la reaplicación de voltaje entre el primer y segundo electrodo 26 y 27. La concentración de glucosa se calcula convirtiendo el valor de la corriente de respuesta en un valor de voltaje, a continuación contrastando este valor de voltaje con una curva de calibración que se produce con antelación y expresa la relación entre voltaje y concentración de glucosa. Esta curva de calibración, por ejemplo, se convierte en datos y se almacena en una ROM junto con el programa para ejecutar el cálculo. La concentración de glucosa se calcula utilizando una CPU o RAM para ejecutar el programa almacenado en esta ROM.

Ejemplos

Se probará a continuación por medio de los Ejemplos 1 a 8 que cuando se usa un complejo de Ru como mediador en la medida de la concentración de glucosa utilizando una reacción enzimática, se puede medir la concentración de glucosa en un periodo de tiempo corto y a bajo voltaje, cualquier substancia reductora contenida en la disolución de glucosa tiene poco efecto, la resistencia a la exposición a la luz o agua es alta, y la solubilidad de la capa de reactivo es alta.

Producción de un sensor de glucosa

Un sensor de glucosa con un primer electrodo, un segundo electrodo, una capa de reactivo y un canal formado sobre un substrato como se muestra en las Figs. 2 y 3, se usó en los Ejemplos 1 a 8. El primer y segundo electrodo se formaron sobre el substrato por impresión serigráfica con una pasta de carbono.

Se compararon dos sensores de glucosa en los Ejemplos 1 a 6. Uno de estos se denominó sensor 1 y el otro sensor 1 de glucosa comparativo. La diferencia entre estos sensores de glucosa estaba en la formulación de sus capas reactivas, como se muestra en la Tabla 1 a continuación. Estas capas reactivas se formaron aplicando gotas de $1 \mu\text{l}$ de reactivo compuesto de una enzima de oxidación-reducción y un tampón de fosfato de potasio sobre un substrato, y secando a continuación.

Tabla 1

	Formulación de la capa de reactivo		
	Mediador	Enzima de oxidación-reducción	Tampón (pH 7)
Sensor 1 de glucosa de la presente en la invención	300 mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	5.000 U/ml de PQQGDH	50 mM de fosfato de potasio
Sensor 1 de glucosa comparativo.	300 mM K ₃ [Fe(III)(CN) ₆]	5.000 U/ml de PQQGDH	50 mM de fosfato de potasio

- 5 En el Ejemplo 7, se usaron, como se indica en la Tabla 2 a continuación, dos sensores de glucosa 2 y 3 de la presente invención que comprenden dos diferentes enzimas de oxidación-reducción a las usadas en los Ejemplos 1 a 6. Aparte de por la constitución de la capa de reactivo, estos eran iguales que los sensores de glucosa en los Ejemplos 1 a 6. α GDH y CyGDH eran como se discutió previamente.

Tabla 2

	Formulación de la capa de reactivo		
	Mediador	Enzima de oxidación-reducción	Tampón (pH 7)
Sensor 2 de glucosa de la presente en la invención	300 mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	600 U/ml de CyGDH	250 mM de fosfato de potasio
Sensor 3 de glucosa de la presente invención.	300 mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	600 U/ml de α GDH	250 mM de fosfato de potasio

- 10 Se usaron en el Ejemplo 8 un sensor 4 de glucosa de la presente invención y un sensor 2 de glucosa comparativo en el que se usó GOD como enzima de oxidación-reducción como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Aparte de por la constitución de la capa de reactivo, estos eran iguales que los sensores de glucosa en los ejemplos 1 a 6.

Tabla 3

	Formulación de la capa de reactivo		
	Mediador	Enzima de oxidación-reducción	Tampón (pH 7)
Sensor 4 de glucosa de la presente en la invención	300 mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	5.000 U/ml de GOD	50 mM de fosfato de potasio
Sensor 2 de glucosa comparativo.	300 mM K ₃ [Fe(III)(CN) ₆]	5.000 U/ml de GOD	50 mM de fosfato de potasio

15 Ejemplo 1

- En este ejemplo, se evaluaron las características de respuesta del electrodo de sensores de glucosa examinando las ondas de CV. La forma de la onda de CV se examinó aplicando gotas de disolución de glucosa sobre la capa de reactivo del sensor de glucosa, barriendo de tal modo que la velocidad de barrido era 50 mV/s y el voltaje aplicado era 0→+800 mV→0 mV→-800 mV→0 mV→+800 mV, y midiendo la corriente de respuesta durante el barrido. La disolución de glucosa usada aquí era una disolución estándar con una concentración de 200 mg/dl (preparada disolviendo glucosa en una disolución salina fisiológica (0,9% en peso de NaCl)). La cantidad de la gota de aplicación de la disolución de glucosa sobre la capa de reactivo era 1 μ l. La Fig. 6 muestra las ondas de CV.

- 20 Se puede ver en las ondas de CV en la Fig. 6 que dentro de un intervalo en el que el voltaje aplicado era 0 mV→+800 mV la segunda vez, el valor de la corriente de respuesta estaba en su máximo cuando el voltaje aplicado era aproximadamente 100 mV con el sensor 1 de glucosa de la presente invención en el que se usó [Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃ como mediador, mientras que el valor de la corriente de respuesta alcanzó su máximo a ligeramente menos de 300 mV con el sensor 1 de glucosa comparativo en el que se usó K₂[Fe(III)(CN)₆]. Las ondas de CV en la Figura 6 nos dicen que cuando se usa [Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃ como mediador, si el voltaje aplicado se

establece en 100 mV o más alto, substancialmente todos los compuestos reductores se pueden oxidar y hacer oxidantes, y similarmente que cuando se usa $K_2[Fe(III)(CN)_6]$, el voltaje aplicado debe ser por lo menos 300 mV. El voltaje aplicado al que el valor de la corriente de respuesta de cada mediador alcanzo su máximo sustancialmente igualaba el potencial de oxidación-reducción estándar para cada mediador.

- 5 Por lo tanto, se puede concluir que si se usa un complejo de Ru con un bajo potencial de oxidación-reducción estándar como mediador, se puede medir favorablemente la concentración de glucosa incluso con un bajo voltaje aplicado, y que en este caso se hace posible la medida con buena precisión disminuyendo la corriente de fondo provocada por otras substancias reductoras presentes en la disolución.

Ejemplo 2

- 10 En este ejemplo, se examinó si la concentración de glucosa se puede medir con precisión con un bajo voltaje (200 mv). Con este fin, se midió el valor de la corriente de respuesta usando cuatro diferentes disoluciones estándar con concentraciones de glucosa de 0 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl y 600 mg/dl y usando el sensor 1 de glucosa de la presente invención y el sensor 1 de glucosa comparativo, con voltajes aplicados de 500 mV y 200 mV. El valor de la corriente de respuesta se midió 5 segundos después de la aplicación de la gota de 1 μ l de disolución estándar a la capa de reactivo, manteniendo constante la aplicación de voltaje entre el primer y segundo electrodo. Estos resultados se dan en la Fig. 7.

- Como se puede ver en la Fig. 7, cuando el voltaje aplicado era 500 mV, el sensor 1 de glucosa de la presente invención exhibía buena linealidad para el grupo de puntos representados, indicando que el sensor de glucosa puede medir favorablemente incluso cuando la concentración de glucosa es alta (400 mg/dl o más alta). En contraste, con el sensor 1 de glucosa comparativo, se aparta algo de la linealidad cuando la concentración de glucosa era alta (400 mg/dl o más alta), aunque la linealidad general era excelente.

- Mientras tanto, cuando el voltaje aplicado era 200 mV, el sensor 1 de glucosa de la presente invención se apartaba algo de la linealidad cuando la concentración de glucosa era alta (400 mg/dl o más alta), pero el grupo de puntos representados exhibía buena linealidad. La desviación de la linealidad a 200 mV con el sensor 1 de glucosa de la presente invención era aún menor que la del sensor 1 de glucosa comparativo a 500 mV.

- De este modo, se confirmó que cuando se usó un complejo de Ru como mediador, la concentración de glucosa se podría medir favorablemente dentro de un intervalo de concentración de glucosa de por lo menos de 0 a 600 mg/dl incluso a un bajo potencial (voltaje aplicado de 200 mV). Por lo tanto, se puede concluir que el uso de un complejo de Ru como mediador hacer posible manejar el aparato de medida de concentración a bajo voltaje, que rebaja el consumo de energía y reduce los costes de utilización.

Ejemplo 3

- En este ejemplo, se examinó cuanto se tardó en medir la concentración de glucosa favorablemente. Con este fin, la aplicación de voltaje de 500 mV entre el primer y segundo electrodo comenzó 0, 1, 2, o 10 segundos después de la aplicación de la gota de 1 μ l de sangre entera con una concentración de glucosa de 400 mg/dl a la capa de reactivo, se midió la corriente de respuesta durante la aplicación de voltaje sostenido, y se midió el cambio con el tiempo. Estos resultados se dan en las Figs. 8 y 9.

- Se puede ver en la Fig. 8 que con el sensor 1 de glucosa de la presente invención, los valores de medida individuales obtenidos 3 segundos después del inicio de la aplicación de voltaje eran los mismos, sin tener en cuenta el tiempo antes de la aplicación de voltaje (el tiempo en un estado sin aplicación). Por lo tanto, se puede concluir que el sensor de glucosa de la presente invención da resultados de medida estables con tal de que el tiempo de aplicación sea por lo menos 3 segundos, y, como se ve en la Fig. 9, que el tiempo de aplicación puede ser más corto que cuando se usa un complejo de Fe como mediador. Además, dado que no hay ventaja real en incrementar excesivamente el tiempo del estado de no aplicación, y teniendo en cuenta los resultados de la Fig. 8, se puede concluir que 10 segundos o menos es un tiempo adecuado en un estado de no aplicación con el sensor de glucosa de la presente invención, y que de 10 a 15 segundos es suficiente para el tiempo desde el suministro de la disolución de glucosa hasta que se mide la corriente de respuesta con el propósito de calcular la concentración de glucosa. Por lo tanto, se puede ver de los resultados mostrados en las Figs. 8 y 9 que cuando se usa un complejo de Ru como mediador, la medida no tarda tanto como cuando se usa un complejo de Fe.

Ejemplo 4

- 50 En este ejemplo, se examinó el efecto de los reductores concomitantes (el efecto de la corriente de fondo). Se midió el valor de la corriente de respuesta usando cuatro tipos diferentes de sangre entera (con componentes distintos de glucosa ajustados a su concentración media en sangre humana) con concentraciones de glucosa de 0 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl y 600 mg/dl, y usando el sensor 1 de glucosa de la presente invención y el sensor 1 de glucosa comparativo, con voltajes aplicados de 500 mV y 250 mV. Había un estado de no aplicación de voltaje que duraba 10 segundos después de la aplicación de la gota de 1 μ l de sangre entera a la capa de reactivo, después de lo cual se midió el valor de la corriente de respuesta 5 segundos después del inicio de la aplicación de voltaje entre el

primer y segundo electrodo. Estos resultados se dan en las Figs. 10 y 11.

Como se puede ver en las Figs. 10 y 11, el valor total de la corriente de respuesta era más alto con el sensor 1 de glucosa comparativo que con el sensor 1 de glucosa de la presente invención. La razón para esto parece ser que el sensor 1 de glucosa comparativo está más afectado por los reductores concomitantes en la sangre que el sensor 1 de glucosa de la presente invención, y que la corriente de fondo de estas sustancias eleva el valor de la corriente de respuesta.

Se debe advertir aquí que con el sensor 1 de glucosa comparativo, la corriente de respuesta se mide como un valor positivo incluso cuando la concentración de glucosa es 0 mg/dl. De nuevo aquí, se sospecha que el efecto de la corriente de fondo provocada por los reductores concomitantes es la razón del más alto valor de la corriente de respuesta con el sensor 1 de glucosa comparativo.

La Fig. 12 es un gráfico de barras del valor de la corriente de respuesta aquí cuando la concentración de glucosa era 0 mg/dl. Se puede ver de este gráfico que con el sensor 1 de glucosa comparativo, se mide una corriente de respuesta relativamente grande incluso con una concentración de glucosa de 0 mg/dl, la razón para ello se cree que es el mayor efecto de los reductores concomitantes. En contraste, con el sensor 1 de glucosa de la presente invención, la corriente de respuesta medida es pequeña a una concentración de glucosa de 0 mg/dl, y se puede concluir que el efecto de los reductores concomitantes se ha reducido enormemente. Por lo tanto, si se usa un complejo de Ru como mediador, se puede calcular la concentración con buena precisión incluso sin corregir el efecto de otras sustancias reductoras.

Ejemplo 5

Se evaluó la resistencia a la exposición en este ejemplo. Esta resistencia a la exposición se evaluó dejando el sensor 1 de glucosa de la presente invención y el sensor 1 de glucosa comparativo, que habían sido producidos ambos a aproximadamente el mismo tiempo, en una habitación termo-higro-estática mantenida a una humedad relativa del 50% y a una temperatura de 25°C, y usando a continuación una disolución estándar con una concentración de glucosa de 0 mg/dl para medir el valor de la corriente de respuesta. La aplicación de voltaje de 500 mV entre los electrodos comenzó 10 segundos después de la aplicación de la gota de la disolución estándar a la capa de reactivo, y se midió el valor de la corriente de respuesta 10 segundos después de la aplicación de la gota de la disolución estándar a la capa de reactivo, y se midió el valor de la corriente de respuesta 5 segundos después del inicio de la aplicación de voltaje. Los sensores de glucosa se dejaron 1 y 4 días dentro de la habitación termohigroestática. Se midió el valor de la corriente de respuesta en las mismas condiciones tanto para un sensor de glucosa que tenía aún que ser dejado en la habitación termohigroestática (inicial) como para un sensor de glucosa que había estado encerrado en un desecador (volumen interior de 0,2 l, estableciendo la humedad relativa inicial a 50%, y temperatura de 25°C) que contiene 6 g de tamiz molecular (desecante) y a continuación se dejó durante 4 días en un habitación termohigroestática mantenida a una humedad relativa del 50% y una temperatura de 25°C (sellada 4 días). Estos resultados se dan en la Fig. 13.

Como se puede ver en la Fig. 13, en todos los entornos medioambientales, el sensor 1 de glucosa de la presente invención tenía mucho mayor corriente de respuesta que el sensor 1 de glucosa comparativo, y sus valores eran aproximadamente los mismos en todos los entornos medioambientales. Se supone por lo tanto que cuando se usa un complejo de Ru como mediador, hay menos degradación (reducción) de la capa de reactivo en el medio de exposición, de modo que la estabilidad de almacenamiento es superior y es menos probable que ocurra la degradación a largo plazo. Por lo tanto, si se usa un complejo de Ru como mediador, no hay necesidad de pensar mucho en el efecto de la exposición a la humedad en el almacenamiento del sensor de glucosa. Esto significa que cuando se producen en masa y envasan sensores de glucosa a escala industrial, no se necesita realizar el desplazamiento con nitrógeno u otro de tales tratamientos dentro del envase, lo que facilita la fabricación y reduce los costes.

Ejemplo 6

En este ejemplo se examinó la solubilidad de la capa de reactivo. En el examen de la solubilidad de la capa de reactivo, se midió el valor de la corriente de respuesta usando cuatro tipos diferentes de disolución estándar con concentraciones de glucosa de 0 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl, y 600 mg/dl y usando el sensor 1 de glucosa de la presente invención y el sensor 1 de glucosa comparativo, con un voltaje aplicado de 500 mV. Había un estado de no aplicación de voltaje que dura 10 segundos después de la aplicación de la gota de 1 µl de disolución estándar a la capa de reactivo, después de lo cual se midió el valor de la corriente de respuesta 5 segundos después del inicio de la aplicación de voltaje entre el primer y segundo electrodo. Estos resultados se dan en la Fig. 14. La Fig. 14 también muestra los resultados para cuando se añadió un gel inorgánico (usado como dispersante) en una cantidad de 1 parte en peso por 100 partes en peso de complejo de Fe en el sensor 1 de glucosa comparativo.

Como se puede ver en la Fig. 14, el sensor 1 de glucosa de la presente invención exhibía excelente linealidad incluso a alta concentración de glucosa. Esto significa que la capa de reactivo se disuelve bien en 15 segundos desde el suministro de la disolución estándar, independientemente de la concentración de glucosa.

Por lo tanto, si se usa un complejo de Ru como mediador, la capa de reactivo tendrá excelente solubilidad, formando toda la capa de reactivo un sistema de reacción uniforme, y como resultado las concentraciones de glucosa se pueden medir en un corto tiempo y con buena precisión incluso con disoluciones de glucosa que tienen una relativamente alta concentración de glucosa, sin tener que recurrir al uso de un dispersante o similares.

5 Ejemplo 7

En este ejemplo, se midió el valor de la corriente de respuesta para los sensores de glucosa 2 y 3 de la presente invención, que tenían una capa de reactivo formada como se muestra en la Tabla 2 anterior, usando cuatro tipos de sangre entera con diferentes concentraciones de glucosa de 0 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl, y 600 mg/dl. Estos resultados se dan en la Fig. 15. La Fig. 15 muestra también los resultados cuando se midió en valor de la corriente de respuesta en las mismas condiciones para el sensor 1 de glucosa de la presente invención constituido como en los Ejemplos 1 a 6.

Como se puede ver en la Fig. 15, con los sensores 2 y 3 de glucosa de la presente invención, en los que se usó CyGDH o GDH como enzima redox, se puede medir favorablemente la concentración desde relativamente bajas concentraciones hasta altas concentraciones, con la aplicación de una corriente de solo 200 mV y solo un corto tiempo de 5 segundos después del inicio de la aplicación. La Fig. 15 también nos dice que la corriente de fondo es pequeña con estos sensores de glucosa. Por lo tanto, usando un complejo de rutenio como mediador, las ventajas descritas en los Ejemplos 1 a 6 se pueden conseguir para varios tipos de GDH.

Ejemplo 8

En este ejemplo, se midió el valor de la corriente de respuesta de la misma manera que en el Ejemplo 7 para un sensor 4 de glucosa de la presente invención, en el que se usó un complejo de Ru como mediador y se usó GOD como enzima de oxidación-reducción, y un sensor 2 de glucosa comparativo, en el que se usó ferricianuro de potasio como mediador y se usó GOD como enzima de oxidación-reducción. Estos resultados se dan en la Fig. 16.

Como se puede ver en la Fig. 16, cuando se combinan GOD y un complejo de Ru, justo como con el sensor 1 de glucosa de la presente invención usado en los Ejemplos 1 a 6, la linealidad era excelente y la corriente de fondo era pequeña incluso cuando la concentración de glucosa era relativamente alta. Se puede concluir por lo tanto que las ventajas descritas en los Ejemplos 1 a 6 se pueden conseguir también cuando se combinan GOD y un complejo de Ru.

Como se describe anteriormente, con la presente invención, se puede medir con precisión la concentración de un compuesto a analizar en una muestra líquida, tanto si la concentración del compuesto a analizar en la muestra líquida es relativamente baja o relativamente alta, la medida estará menos afectada por las sustancias reductoras coexistentes presentes en la muestra líquida, y se puede asegurar la adecuada solubilidad de la capa de reactivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir, en sangre, la concentración de un compuesto a analizar, comprendiendo el método: construir un sistema de reacción que contiene el compuesto a analizar, una enzima de oxidación-reducción y un mediador de electrones; medir la concentración del compuesto a analizar utilizando un procedimiento electroquímico;

en el que se usa un compuesto de Ru como mediador de electrones, y adicionalmente en el que el método comprende:

una primera etapa de producir un reductor del compuesto de Ru en el sistema de reacción;

10 una segunda etapa de aplicar voltaje al sistema de reacción para oxidar el reductor, y medir el valor de la corriente de respuesta correlacionado con la cantidad de electrones desprendidos por el reductor; y

una tercera etapa de calcular la concentración del compuesto a analizar en base al valor de la corriente de respuesta medida en la segunda etapa.

2. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto de Ru es un complejo de Ru(III) oxidante, y el reductor del compuesto es un complejo de Ru(II) reductor.

3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto de Ru es un complejo de Ru(III) oxidante expresado por la siguiente fórmula química:



20 (en la que X en la fórmula es NH₃, un ión halógeno, CN, piridina, nicotinamida o H₂O, y n⁺ en la fórmula es la valencia del complejo de Ru(III) oxidante como se determina por el tipo de X).

4. El método según la reivindicación 2 o 3, en el que en la primera etapa el complejo de Ru(II) reductor se produce por solo dos reacciones: una reacción de oxidación del compuesto a analizar catalizada por la enzima de oxidación-reducción, y una reacción de reducción del complejo de Ru(III) oxidante.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el sistema de reacción es un sistema de reacción en fase líquida uniforme o sustancialmente uniforme en el que está dispersa una cantidad relativamente pequeña de la enzima de oxidación-reducción sustancial y uniformemente con respecto a una relativamente gran cantidad del complejo de Ru(III) oxidante.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto a analizar es glucosa, colesterol, ácido láctico o ácido ascórbico.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima de oxidación-reducción se selecciona del grupo que consiste en glucosa deshidrogenasa (GDH) (incluyendo αGDH y CyGDH), glucosa oxidasa (GOD), colesterol deshidrogenasa, colesterol oxidasa, ácido láctico deshidrogenasa, ácido láctico oxidasa, ácido ascórbico deshidrogenasa, ácido ascórbico oxidasa, alcohol deshidrogenasa, alcohol oxidasa, fructosa deshidrogenasa, ácido 3-hidroxibutírico deshidrogenasa, ácido pirúvico oxidasa, NADH oxidasa, ácido úrico oxidasa (uricasa), ureasa, y dihidrolipoamida deshidrogenasa (diaforasa).

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la primera etapa dura de 0 a 10 segundos y el valor de la corriente de respuesta se mide por lo menos 3 segundos después del inicio de la segunda etapa.

9. El método según la reivindicación 8, en el que se mide el valor de la corriente de respuesta cuando ha pasado un periodo de 3 a 5 segundos desde el inicio de la segunda etapa.

10. Un dispositivo que comprende un aparato de medida de la concentración junto con un instrumento de análisis de la concentración, en el que:

el instrumento de análisis de la concentración comprende un sustrato; por lo menos un primer y segundo electrodo formados sobre el sustrato; y una capa de reactivo en forma de sólido; en el que la capa de reactivo comprende una enzima de oxidación-reducción y un compuesto de Ru, y está constituida para disolverse y construir un sistema de reacción en fase líquida cuando se suministra una muestra líquida que contiene el compuesto a analizar;

y en el que:

el aparato de medida de la concentración comprende:

un aplicador de voltaje para aplicar voltaje entre el primer y segundo electrodo;

un medidor del valor de la corriente para medir el valor de la corriente de respuesta cuando se aplica voltaje entre el primer y segundo electrodo; y

un ordenador para calcular la concentración del compuesto a analizar en base al valor de la corriente de respuesta;

en el que dicho ordenador convierte el valor de la corriente de respuesta en un valor de voltaje, y chequea el valor del voltaje con una curva de calibración predeterminada que expresa la relación entre el voltaje y la concentración del compuesto a analizar.

11. El dispositivo según la reivindicación 10, en el que la capa de reactivo está constituida de tal modo que cuando se suministra la muestra líquida, la enzima de oxidación-reducción y el compuesto de Ru están presentes en el sistema de reacción en fase líquida.

12. El dispositivo según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la enzima de oxidación-reducción es como se define en la reivindicación 7.

13. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el compuesto de Ru es como se define en la reivindicación 3.

14. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el compuesto a analizar es como se define en la reivindicación 6.

15. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la capa de reactivo contiene el compuesto de Ru como oxidante, y está constituido de tal modo que cuando se suministra la muestra líquida a la capa de reactivo, se produce un reductor del oxidante por solo dos reacciones: una reacción de oxidación del compuesto a analizar catalizada por la enzima de oxidación-reducción, y una reacción de reducción del compuesto de Ru, y preferentemente en el que la capa de reactivo está constituida de modo que el reductor se produce sustancial y uniformemente en cada localización del sistema de reacción en fase líquida.

16. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que comprende adicionalmente un controlador para controlar la aplicación de voltaje efectuada por el aplicador de voltaje,

en el que el controlador está constituido de tal modo que el voltaje aplicado por el aplicador de voltaje se controla para que sea un voltaje constante seleccionado de un intervalo de 100 a 500 mV, preferentemente de 100 a 300 mV.

17. El dispositivo según la reivindicación 16, en el que el voltaje aplicado por el aplicador de voltaje se controla para que sea un voltaje constante seleccionado de un intervalo de 100 a 350 mV.

18. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que comprende adicionalmente un controlador para controlar la aplicación de voltaje efectuada por el aplicador de voltaje,

en el que el controlador está constituido de tal modo que el voltaje aplicado por el aplicador de voltaje se controla para que sea un voltaje constante seleccionado de un intervalo de por lo menos el potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre el oxidante y reductor del compuesto de Ru, y menos que el potencial de oxidación-reducción estándar (frente a un electrodo de hidrógeno estándar) entre iones ferrocianuro e iones ferricianuro.

19. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, que comprende adicionalmente un controlador para controlar la medida del valor de la corriente efectuada por el medidor de corriente,

en el que el controlador está constituido de tal modo que el valor de la corriente de respuesta necesario para el cálculo por el ordenador es medido por el medidor del valor de la corriente en cualquier momento entre 3 y 5 segundos después de que se suministra la muestra líquida a la capa de reactivo.

FIG.1

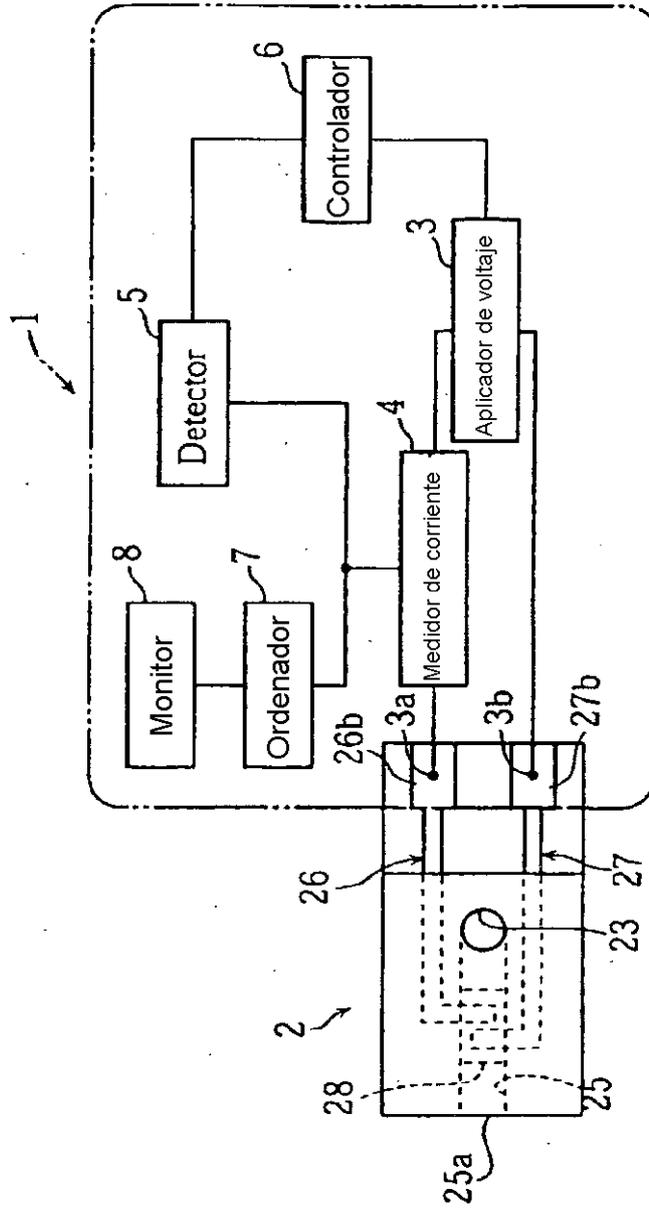


FIG.2

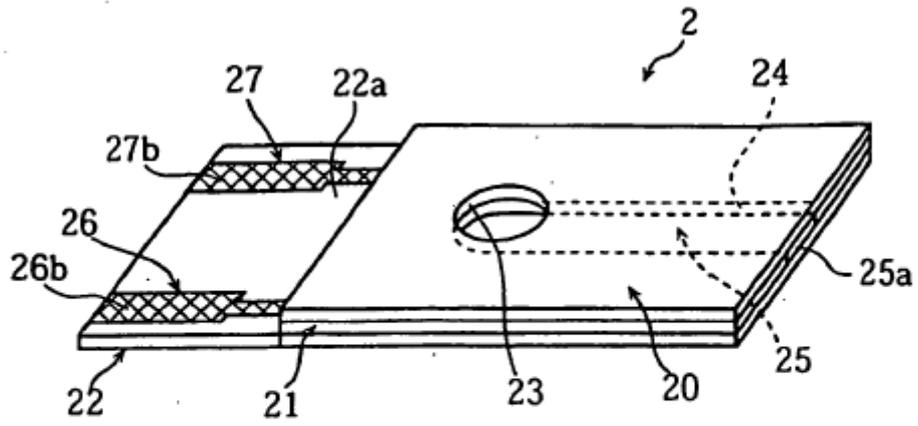


FIG.3

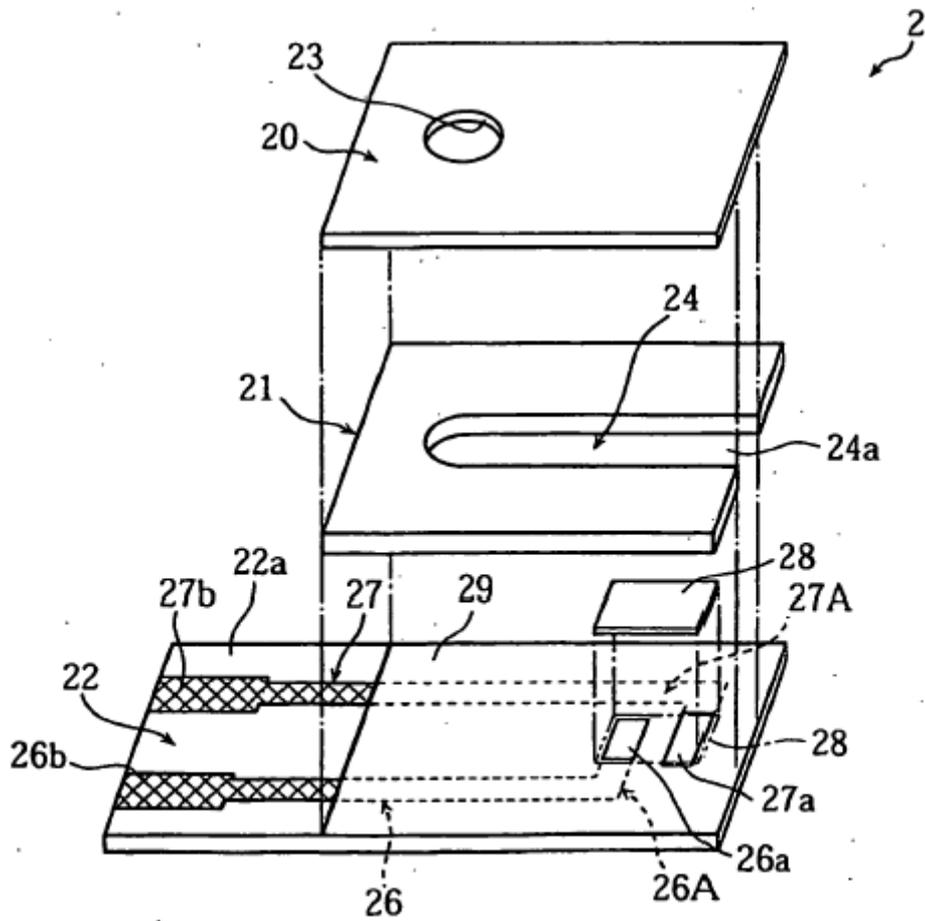


FIG.4A

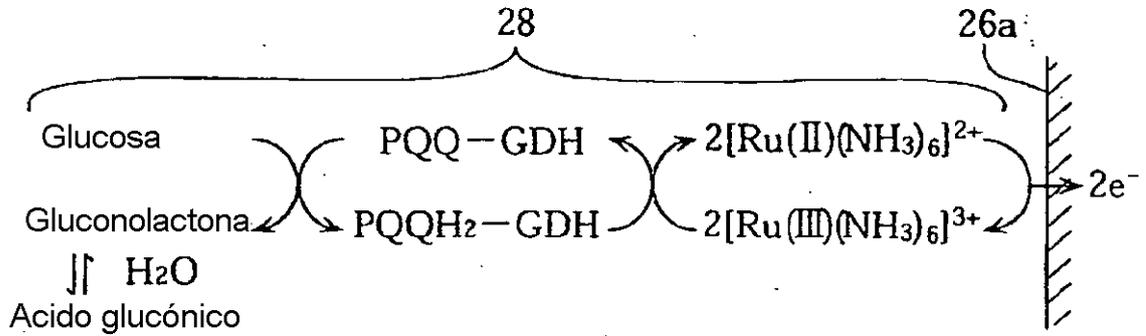


FIG.4B

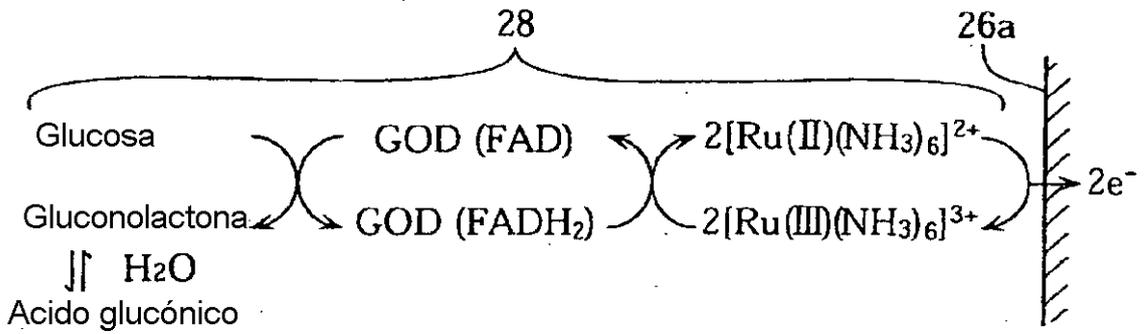


FIG.5

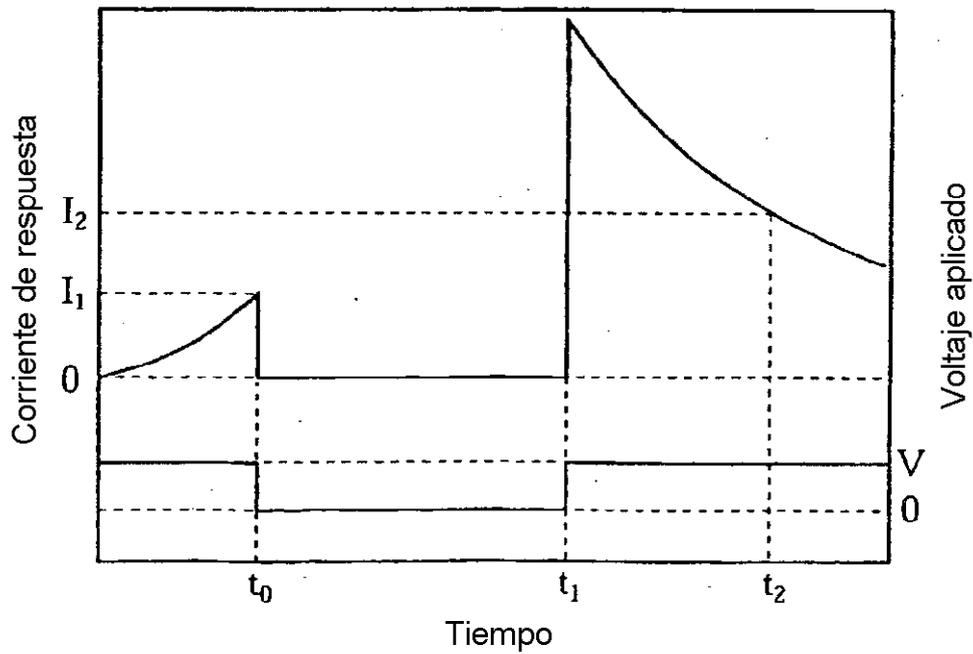


FIG.6

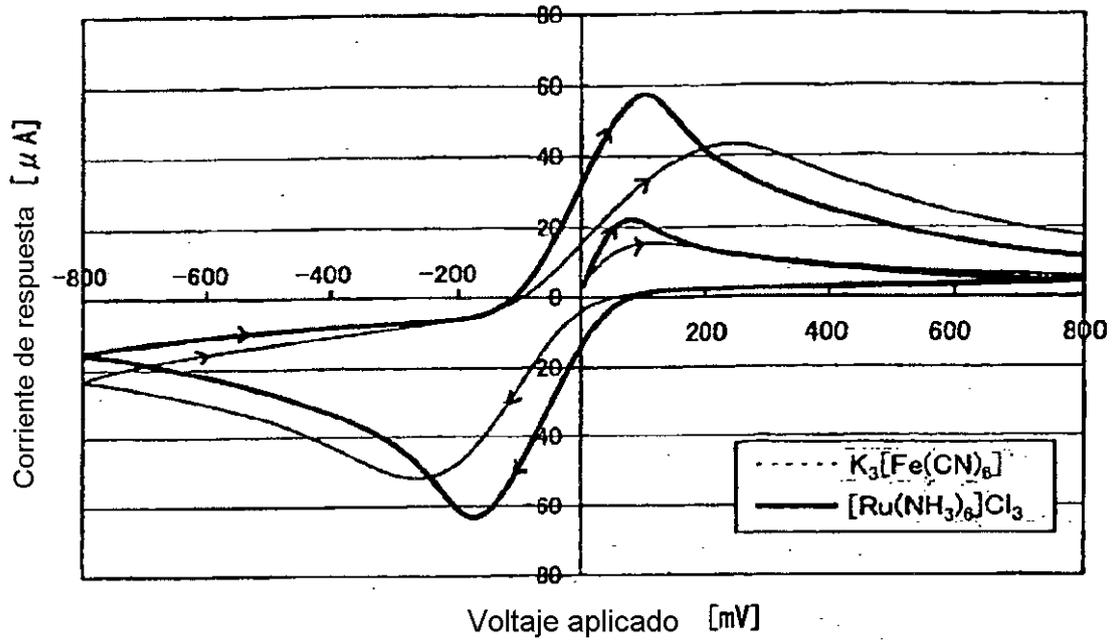


FIG.7

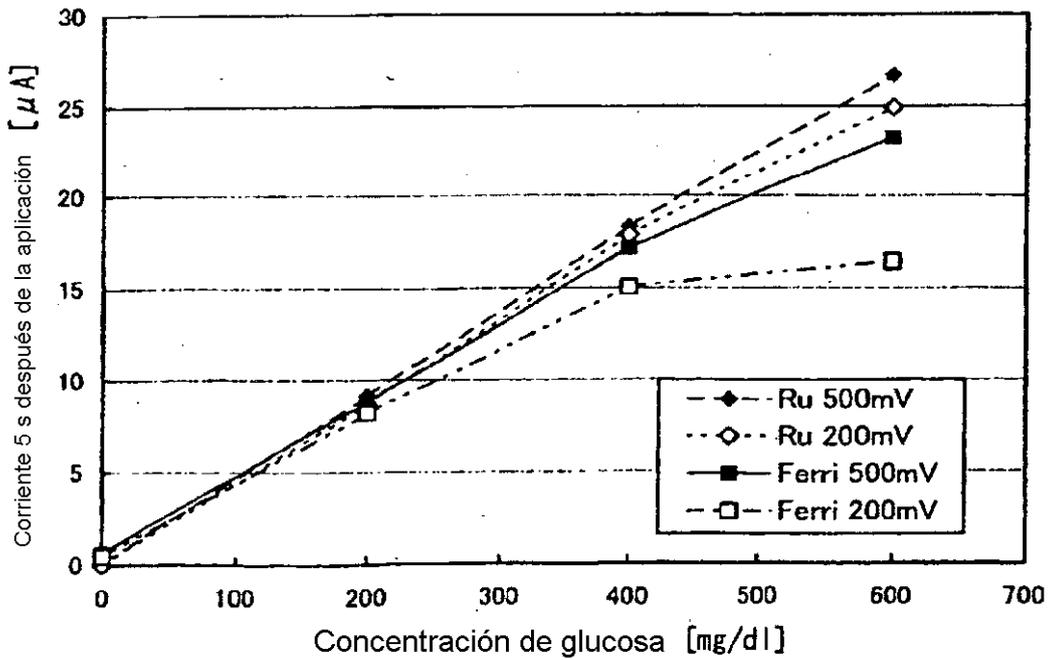


FIG.8

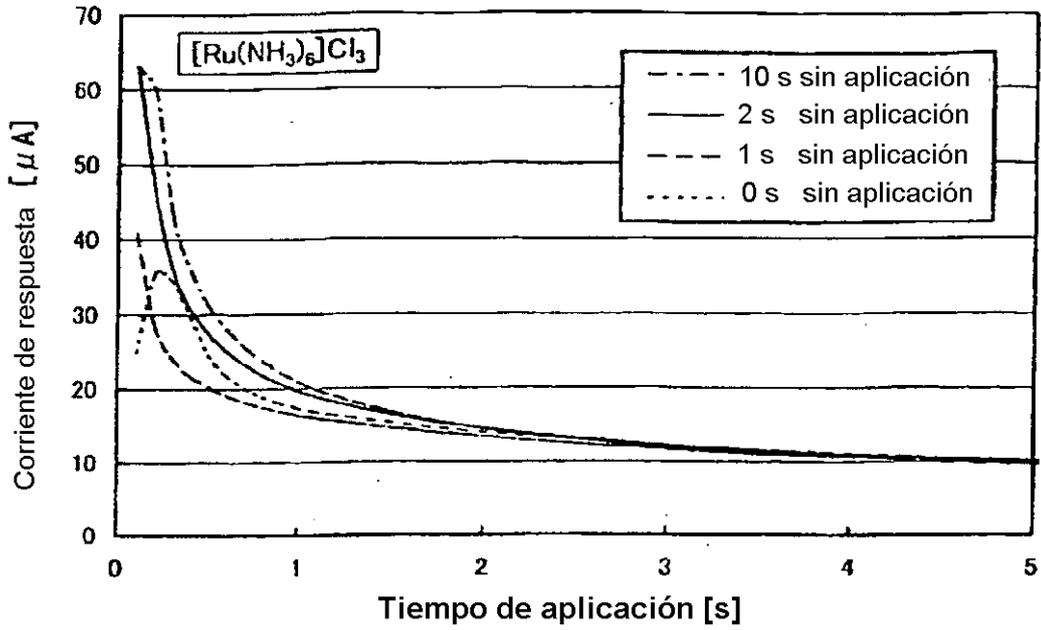


FIG.9

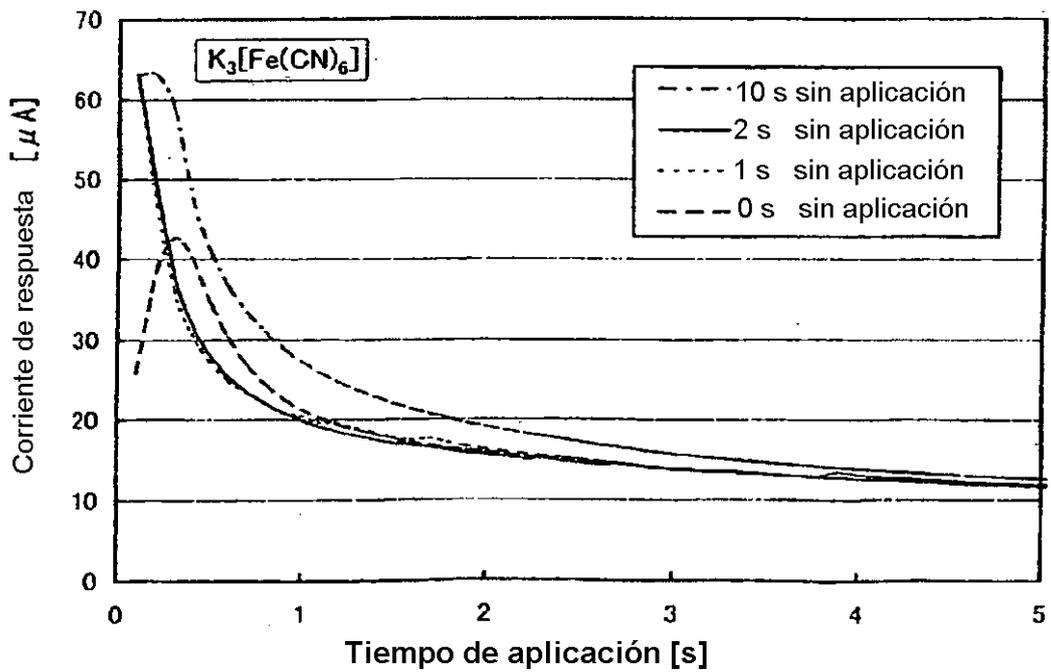


FIG.10

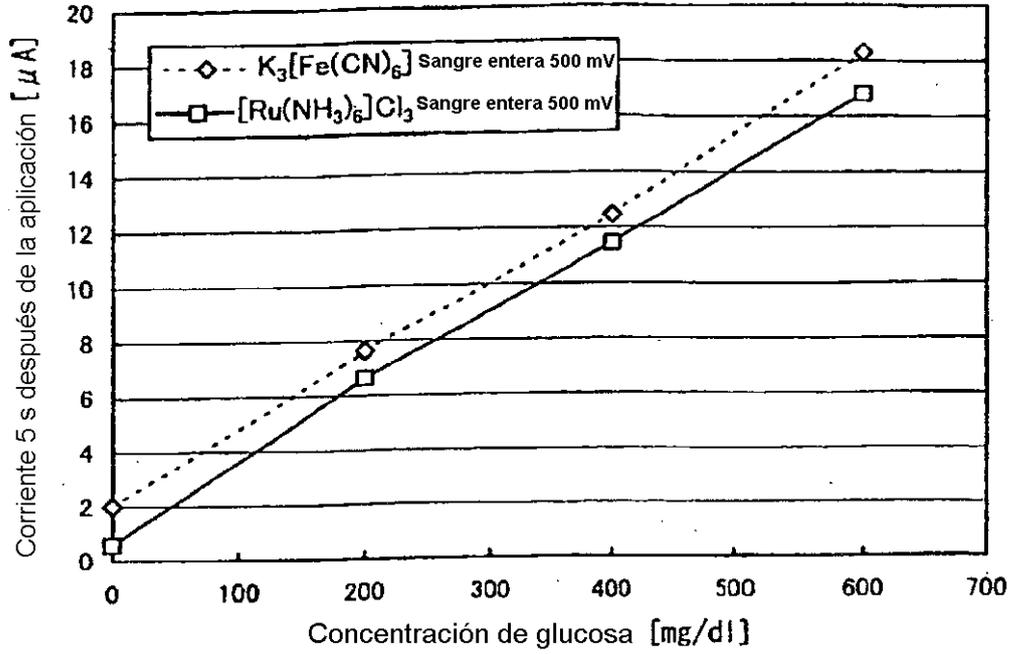


FIG.11

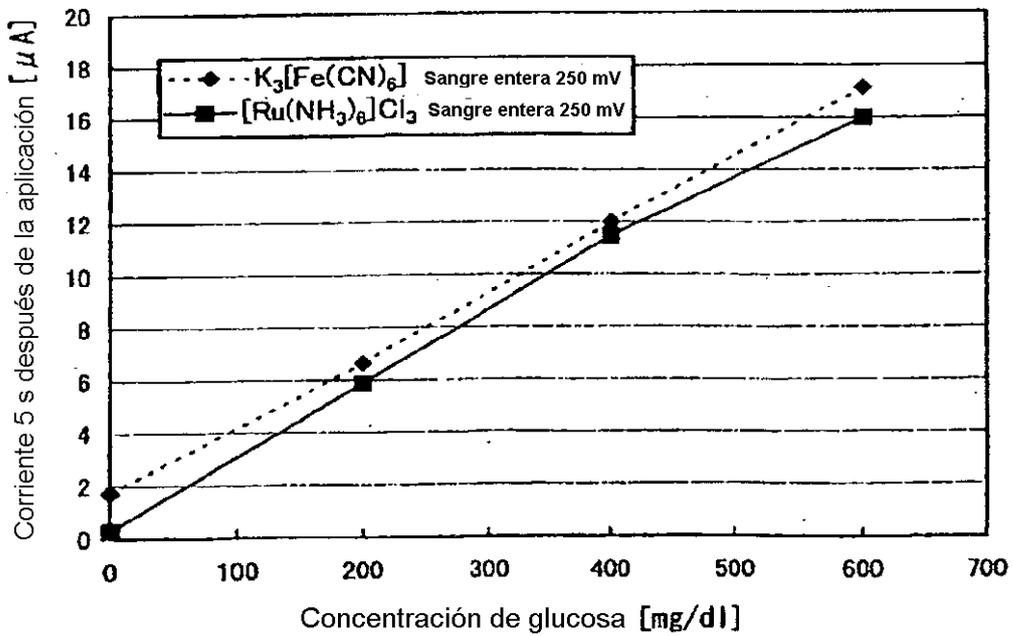


FIG.12

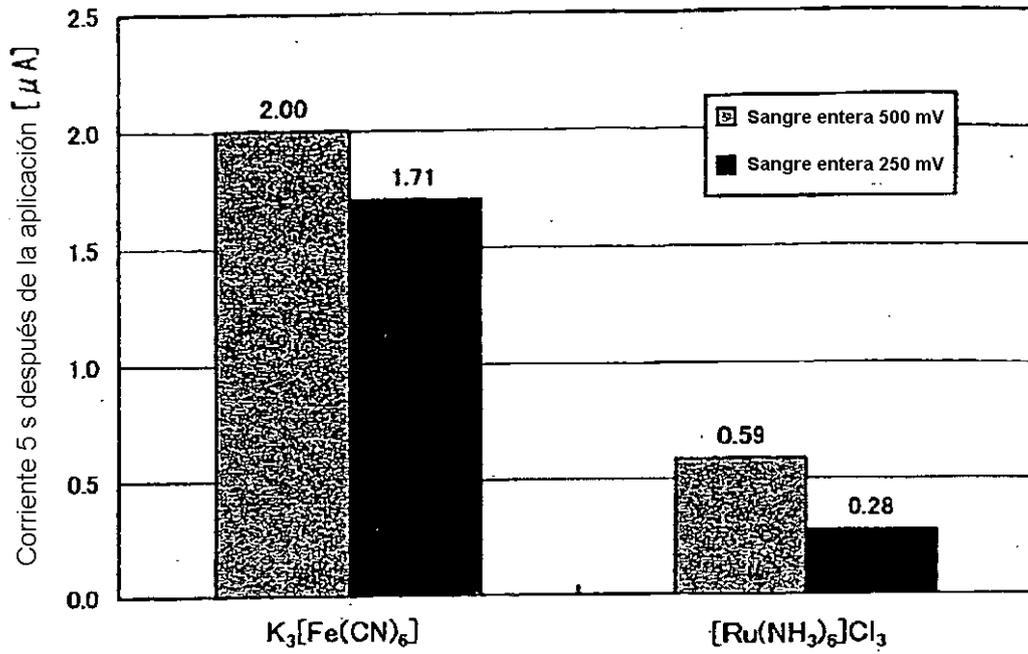


FIG.13

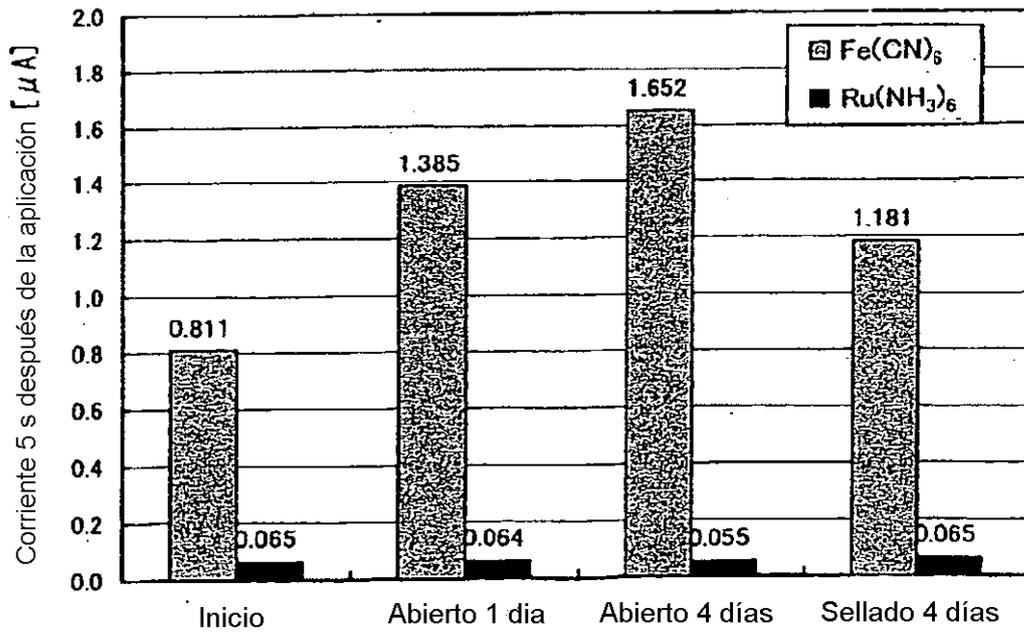


FIG.14

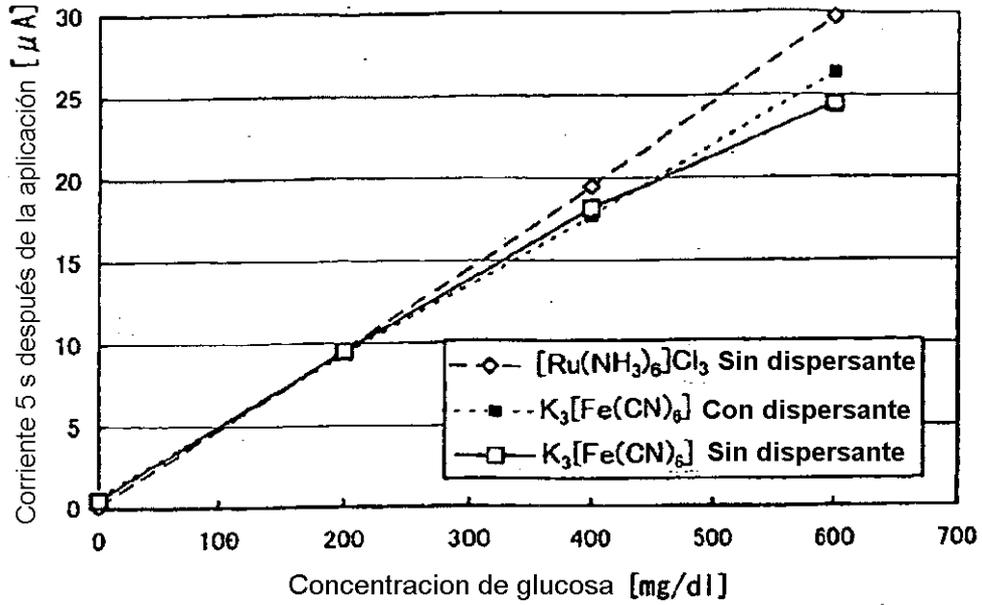


FIG.15

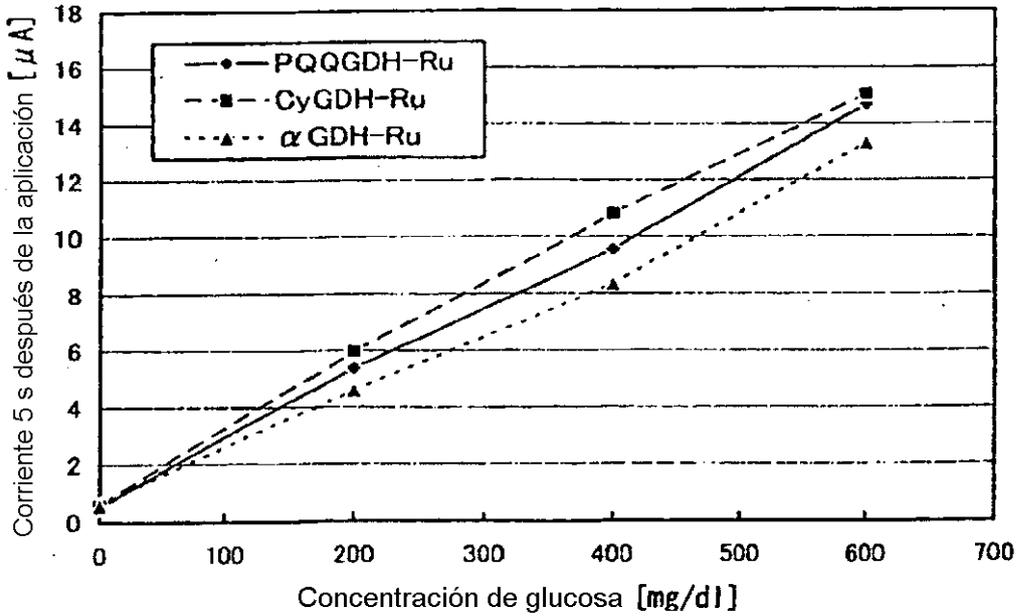


FIG.16

