

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 886**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14192132 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2998731**

54 Título: **Aparato y procedimiento para medir la concentración de un analito en muestras de sangre completa**

30 Prioridad:

17.09.2014 KR 20140123816

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**I-SENS, INC. (100.0%)
Wolgye-dong 27-34 Gwangun-ro Nowon-gu
Seoul 139-845, KR**

72 Inventor/es:

**CHA, GEUN SIG;
NAM, HAKHYUN;
LEE, SEOK-WON;
CHOI, SUNG HYUK;
KANG, YOUNGJEA;
LEE, MYEONGHO;
PARK, HO DONG y
CHO, SUNG PIL**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 716 886 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

Aparato y procedimiento para medir la concentración de un analito en muestras de sangre completa.

5 **Antecedentes de la invención**(a) Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un aparato y un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, y, más particularmente, a un aparato y un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica por medio de los cuales se pueden medir concentraciones de muestras sanguíneas con una mínima desviación provocada por un material entorpecedor aplicando, adicionalmente, un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera (del inglés, *step ladder-type*) durante un periodo de tiempo breve y optimizando una función formada por rasgos obtenidos a partir de corrientes inducidas en regiones, a las cuales se aplican un voltaje constante y el potencial de perturbación, en forma de una ecuación de calibración para análisis de regresión multivariable con respecto a las muestras sanguíneas bajo varias condiciones si se produce una desviación amplia en los resultados de la medición debido a varios materiales entorpecedores de la sangre, particularmente, hematocrito cuando las concentraciones de las muestras sanguíneas se miden por cronamperometría.

20 (b) Descripción de las anterioridades

25 Es importante medir la concentración de una sustancia clínicamente importante con vistas a obtener diagnósticos y proporcionar una atención sanitaria. En particular, la medición de la concentración de un metabolito (analito), tal como glucosa, cetona, creatina, lactato, grasa neutra, piruvato, alcohol, bilirrubina, NAD(P)H, y ácido úrico de un flujo in vivo, tal como la sangre, se convierte en la clave para el diagnóstico de una enfermedad y el cuidado de los síntomas de una enfermedad.

30 Como procedimiento para medir de manera precisa, rápida y económica la concentración de una sustancia clínicamente significativa a partir de fluido in vivo, se ha estado utilizando ampliamente un procedimiento que hace uso de un biosensor electroquímico.

35 En un biosensor electroquímico del tipo mencionado (al que, en ocasiones, se hace referencia como "tira"), se disponen un par de electrodos (un electrodo de trabajo y un contraelectrodo) en los cuales una celda de muestro que tiene una estructura de tubos capilares se recubre con un reactivo que incluye una enzima, un mediador de transferencia electrónica y diversos estabilizadores y dispersantes.

40 Si la celda de muestro del biosensor electroquímico se llena con sangre de un usuario y, a continuación, se instala en un aparato de medición portátil, se aplica un voltaje constante al electrodo de trabajo y se mide la corriente obtenida del electrodo de trabajo. En una pantalla del aparato de medición portátil se visualiza la concentración de un analito calculada de acuerdo con un algoritmo programado, en menos de entre unos segundos y varios minutos.

45 La medición y la monitorización de un metabolito, es decir, un analito, utilizando un biosensor electroquímico del tipo mencionado es rápida, cómoda y económica, y, por lo tanto, ha sido utilizada ampliamente por todo el mundo.

50 No obstante, los usuarios y las organizaciones de gestión sanitaria en muchos países han demandado un biosensor electroquímico con precisión al mismo tiempo que cómodo, y dicha demanda se ha especificado en forma de normas internacionales, tales como la ISO 15197:2013.

55 El hematocrito es uno de los factores importantes entre los factores que entorpecen la precisión de un biosensor electroquímico que mide una concentración en sangre. Esto es debido a que el movimiento y la velocidad de difusión de una sustancia de reacción de oxidación/reducción depende del hematocrito de la muestra de sangre total y afecta considerablemente a la señal de corriente medida.

60 Por ejemplo, incluso si las muestras sanguíneas tienen la misma concentración de glucosa en sangre, en una muestra sanguínea que tenga un hematocrito mayor, se produce una resistencia al movimiento de una sustancia de reacción de oxidación/reducción. Por lo tanto, se reduce la señal de corriente medida. Por el contrario, en una muestra sanguínea que tenga un hematocrito menor, se incrementa la señal de corriente medida.

65 Dicho aumento o reducción de la señal de corriente provoca que la concentración medida de glucosa en sangre sea inferior o superior a lo que realmente es y, por lo tanto, hace que la medición resulte imprecisa. Para corregir dicha imprecisión, se han sugerido tecnologías para mejorar la precisión ajustando el tiempo de reacción electroquímica de manera que sea mayor o introduciendo un dispositivo adicional en un biosensor incluso si se acepta un aumento del coste de medición.

5 Se ha sugerido un procedimiento en el que se eliminan glóbulos rojos de antemano con un filtro y, a continuación, se mide un analito en un esfuerzo por minimizar la desviación provocada por el hematocrito (patentes US n.º 5.708.247 y 5.951.836). Un procedimiento de este tipo puede resultar eficaz, pero requiere la fabricación de un sensor añadiendo un filtro a una tira, y, por lo tanto, el proceso de fabricación se puede complicar y el coste de los productos puede aumentar.

10 Los glóbulos rojos entorpecen la difusión y el movimiento de una sustancia en una muestra sanguínea y, por lo tanto, cambian la resistencia de la sangre. De este modo, se ha sugerido un procedimiento de reducción de la desviación provocada por el hematocrito utilizando una estructura de red (patente US n.º 5.628.890).

15 Además, se ha sugerido un procedimiento en el que se hemolizan glóbulos rojos con un reactivo y la hemoglobina que fluye saliendo al plasma sanguíneo controla subsidiariamente un aumento/reducción de una señal de corriente provocado por un cambio en el hematocrito (patente de Estados Unidos n.º 7.641.785). No obstante, los procedimientos antes descritos están limitados en cuanto a efectos en un amplio intervalo de hematocrito.

20 Recientemente, se ha sugerido un procedimiento de corrección de la desviación provocada por el hematocrito obteniendo electroquímicamente una señal adicional. Por ejemplo, existe un procedimiento en el cual se aplica un voltaje de AC y se mide la impedancia de una muestra sanguínea, y después de que se haya medido un valor de hematocrito, el valor de medición de un analito se corrige utilizando el valor de hematocrito medido (patente US n.º 7.390.667 y publicaciones de patente abiertas a inspección pública US n.º 2004-0079652, 2005-0164328, 2011-0139634, 2012-0111739).

25 No obstante, dichos procedimientos requieren la aplicación de un voltaje de CC simple a un aparato de medición con el fin de medir la impedancia y requieren, también, un circuito adicional para medir AC y la impedancia además de un circuito de medición de corriente, y se proporciona un biosensor con un electrodo adicional para medir la conductividad o la impedancia. Por lo tanto, dichos procedimientos pueden hacer que aumenten la complejidad y el coste del sistema de medición total (patente US n.º 7.597.793 y publicación de patente US
30 abierta a inspección pública n.º 2011-0139634).

35 Además, muchos documentos de patente han sugerido procedimientos de obtención de una pluralidad de valores de corriente inducida, al mismo tiempo que se mezcla y se aplica una pluralidad de voltajes de onda cuadrada diferentes entre sí en cuanto a nivel, en diversos intervalos de tiempo, sin utilizar un voltaje de AC, y se compensa el hematocrito sobre la base de los valores obtenidos de corriente inducida (patentes US n.º 6.475.372 y 8.460.537, publicación de patente US abierta a inspección pública n.º 2009-0026094, publicación de patente europea abierta a inspección pública n.º 2.746.759, y documento WO2013/164632).

40 Estos procedimientos presentan una ventaja por cuanto se pueden aplicar incluso sin sustituir un biosensor o aparato de medición convencional. No obstante, en estos procedimientos, no solamente puede generarse una corriente provocada por una reacción electroquímica inducida entre una sustancia a medir, un enzima y un mediador de transferencia electrónica, sino que, también, puede generarse una corriente (corriente de fondo) provocada por una reacción electroquímica incontrolable entre sustancias de reacción de oxidación/reducción que quedan en una capa doble eléctrica sobre una superficie de electrodo cuando el voltaje aplicado cambia
45 bruscamente.

50 Por lo tanto, en cuanto a los biosensores fabricados bajo producción en serie, el estado de la superficie de un electrodo o la solubilidad de un reactivo y la homogeneidad de una reacción en cada sensor de tira no pueden ser exactamente iguales, y, por ello, resulta difícil regular la precisión de una corriente de fondo generada cuando un voltaje aplicado cambia bruscamente dentro de un rango de error estadístico. Además, es imposible regular de forma precisa la corriente de carga generada cuando un voltaje aplicado cambia bruscamente de manera que sea equivalente en el electrodo de cada biosensor. Por lo tanto, la precisión en la corrección puede reducirse. En el documento US2011-0155588 se dan a conocer otro procedimiento y otro aparato para analizar muestras sanguíneas y corregir la concentración de glucosa medida en relación con la interferencia del hematocrito. En
55 este caso, como potencial de perturbación después de que haya transcurrido el tiempo de incubación se utilizan ondas simétricas superpuestas sobre una forma de onda en escalera.

60 Los presentes inventores observaron que una voltametría cíclica con periodicidad puede resultar eficaz en la reducción de la desviación con respecto al hematocrito, y aplicaron la voltametría cíclica junto con una cronoamperometría (publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 2013-0131117).

65 En comparación con otros procedimientos que utilizan diversos voltajes de onda cuadrada mixtos para corregir el hematocrito, este procedimiento puede reducir el efecto de una corriente de carga inestable provocada por un cambio brusco de voltaje, y mientras se exploran los voltajes, las concentraciones de sustancias de reacción de oxidación/reducción presentes dentro de una capa doble eléctrica en la superficie de un electrodo se hacen cambiar con un gradiente adecuado de voltaje en comparación con el cambio de voltaje. Por lo tanto, la corriente

de fondo en general se regula dentro de un intervalo específico, y, de este modo, es posible mejorar el efecto de corrección total.

5 No obstante, en este procedimiento, el hematocrito se estima por separado utilizando corrientes obtenidas por medio de la voltametría cíclica, y, a continuación, el hematocrito estimado se aplica a una ecuación correspondiente a una concentración con el fin de corregir el efecto del hematocrito. De este modo, el efecto de corrección total depende, en gran medida, de la precisión del hematocrito estimado.

10 Además, este procedimiento puede requerir un circuito de medición complicado en comparación con un caso en el que solamente se utiliza cronoamperometría con un voltaje de onda cuadrada constante con el fin de implementar de manera estable la voltametría cíclica y medir corrientes inducidas correspondientes a ello.

15 Se ha sugerido un procedimiento de medición de la concentración de sangre en el cual el hematocrito se corrige aplicando acíclicamente voltajes en una exploración directa e inversa con el uso de voltametría acíclica en un biosensor electroquímico (patente US n.º 8.287.717).

20 Asimismo, en este procedimiento, es necesario obtener el hematocrito mezclando adecuadamente unas corrientes inducidas formadas por funciones de voltaje que pueden ser obtenidas aplicando la voltametría acíclica, es necesario aplicar el hematocrito obtenido mediante una ecuación adicional a la ecuación correspondiente a la concentración de sangre con el fin de eliminar un efecto de matriz, y es necesario un circuito adicional capaz de responder a una exploración rápida en un intervalo de voltaje amplio.

25 Además de los procedimientos antes descritos, pueden encontrarse muchos esfuerzos por minimizar o eliminar el efecto del hematocrito. No obstante, la mayoría de estos procedimientos requiere una nueva estructura de la tira o requiere el uso de un aparato de medición que incluye una estructura de circuito adicional, o no puede utilizar tiras y aparatos de medición convencionales.

30 La información anterior que se da a conocer en esta sección de Antecedentes está destinada únicamente a facilitar la interpretación de los antecedentes de la invención y, por lo tanto, puede incluir información que no constituye la técnica anterior que ya es conocida, en este país, para alguien con conocimientos habituales en la materia.

Sumario de la invención

35 La presente invención se ha llevado a cabo en un esfuerzo por proporcionar un procedimiento y un aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, capaces de reducir un error de medición dependiente del hematocrito mediante el uso de *hardware* de una tira convencional y un aparato de medición convencional, y, simplemente, actualizando los microprogramas (*firmware*) del aparato de medición.

40 La presente invención se ha llevado a cabo, también, en un esfuerzo por proporcionar un procedimiento y un aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, capaces de eliminar o minimizar, de manera eficaz y económica, el entorpecimiento de sustancias en la sangre mediante la aplicación de un voltaje constante como voltaje principal y el uso de un voltaje de tipo escalera de tijera para ser aplicado consecutivamente como potencial de perturbación.

45 La presente invención también se ha realizado en un esfuerzo por proporcionar un procedimiento y un aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, capaces de reducir notablemente el efecto del hematocrito al mismo tiempo que se utiliza aproximadamente el mismo procedimiento de calibración que se utiliza para un producto convencional utilizando diversa información obtenida mediante la aplicación consecutiva de un voltaje de tipo escalera de tijera a una cronoamperometría durante un periodo de tiempo breve al mismo tiempo que se utiliza la misma cronoamperometría que se utiliza para un biosensor electroquímico convencional y un aparato de medición convencional.

50 Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y un aparato de acuerdo con la reivindicación 15. Las reivindicaciones dependientes se refieren a otros detalles ventajosos.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 es una gráfica que ilustra un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ utilizado en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

65 La figura 2 es una gráfica que ilustra una corriente inducida obtenida en correspondencia con el voltaje aplicado que se ilustra en la figura 1.

La figura 3 es una gráfica proporcionada para explicar una estructura de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ utilizado en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

5 La figura 4 proporciona vistas en perspectiva frontal y posterior de un aparato de medición en el cual se almacena una ecuación de calibración por medio de un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

10 La figura 5 es un diagrama de bloques que ilustra un circuito del aparato de medición para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según se ilustra en la figura 4.

15 La figura 6 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre medido con un aparato de medición según cronoamperometría y un valor de medición YSI en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

20 La figura 7 es una gráfica que ilustra un efecto del hematocrito sobre un valor medio de valores de medición de glucosa en sangre medidos con un aparato de medición según cronoamperometría en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa con un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o superior se expresa con un error relativo (%)).

25 La figura 8 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre obtenido mediante el uso de cronoamperometría y de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera y un valor de medición YSI en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

30 La figura 9 es una gráfica que ilustra un efecto del hematocrito sobre un valor medio de valores de medición de glucosa en sangre obtenidos mediante el uso de cronoamperometría y de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa con un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o superior se expresa con un error relativo (%)).

35 La figura 10 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

40 La figura 11 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre obtenido mediante el uso de cronoamperometría, un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor de temperatura medido con un aparato de medición y un valor de medición YSI en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (que incluye muestras, respectivamente, que tienen un valor de hematocrito de 10, 20, 42, 55 y 70%).

45 La figura 12 es una gráfica que ilustra un efecto de la temperatura sobre el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre obtenidos mediante el uso de cronoamperometría, un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor de temperatura medido con un aparato de medición en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (que incluye muestras que tienen un valor de hematocrito de 10, 20, 42, 55 y 70%; una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa por medio de un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o mayor se expresa por medio de un error relativo (%)).

55 La figura 13 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de cuerpos cetónicos obtenido según cronoamperometría y un valor de medición medido con un equipo de referencia en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

60 La figura 14 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre un valor medio de valores de medición de cuerpos cetónicos obtenidos según cronoamperometría en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 1,0 mmol/L se expresa por medio de un error absoluto multiplicado por 100 y una concentración de 1,0 mmol/L o superior se expresa por medio de un error relativo (%)).

65 La figura 15 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de cuerpos cetónicos

obtenido mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera y un valor de medición medido con un equipo de referencia en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una quinta forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

5

La figura 16 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre un valor medio de valores de medición de cuerpos cetónicos obtenidos mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la quinta forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 1.0 mmol/L se expresa por medio de un error absoluto multiplicado por 100 y una concentración de 1.0 mmol/L o superior se expresa por medio de un error relativo (%)).

10

Descripción detallada de las formas de realización

15 En lo sucesivo en la presente se explicarán de forma detallada, en referencia a los dibujos adjuntos, un procedimiento y un aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según formas de realización ejemplificativas de la presente invención.

20 En la presente memoria descriptiva, se explicará que, en una forma de realización ejemplificativa, es deseable la corrección de un error de medición generado debido al hematocrito durante la medición de glucosa en sangre. No obstante, de la misma manera que un test de glucosa, introduciendo una enzima específica, es posible corregir valores de medición de concentración de varios metabolitos, tales como sustancias orgánicas que incluyen ácido β -hidroxibutírico, colesterol, triglicérido, lactato, piruvato, alcohol, bilirrubina, ácido úrico, fenilcetonuria, creatina, creatinina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y NAD(P)H, o sustancias inorgánicas.

25

Por lo tanto, la presente invención se puede aplicar a la cuantificación de diversos metabolitos variando el tipo del enzima incluido en una composición de capa de muestra.

30 Por ejemplo, la cuantificación de glucosa, glutamato, colesterol, lactato, ácido ascórbico, alcohol y bilirrubina se puede llevar a cabo utilizando una glucosa oxidasa (GOx), una glucosa deshidrogenasa (GDH), una glutamato oxidasa, una glutamato deshidrogenasa, una colesterol oxidasa, una colesterol esterasa, una lactato oxidasa, una ácido ascórbico oxidasa, una alcohol oxidasa, una alcohol deshidrogenasa, una bilirrubina oxidasa, y similares.

35 Un mediador de transferencia electrónica que puede ser utilizado junto con los enzimas antes descritos puede ser uno de entre ferroceno, cloruro de hexaamino-rutenio (III), ferricianuro potásico, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, y bipyridina, o un complejo de osmio que incluye fenantrolina como ligando, 2,6-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona, 3,7-diamino-5-fenotiacionina, metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenacino, azul de metileno y azul de toluidina, pero puede no limitarse a estos compuestos y puede incluir mediadores de transferencia electrónica orgánicos e inorgánicos capaces de transferir un electrón junto con un enzima capaz de catalizar una reacción de oxidación/reducción de un metabolito.

40

45 Como aparato de medición portátil de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, puede utilizarse un biosensor electroquímico del tipo caras enfrentadas (*vis-a-vis*) en el cual un electrodo de trabajo y un contraelectrodo se proporcionan en planos diferentes para quedar encarados entre sí y una composición de reactivo que incluye una enzima y un mediador de transferencia electrónica dependiente de una sustancia se aplica como recubrimiento sobre el electrodo de trabajo.

45

50 Además, como aparato de medición portátil según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, puede utilizarse un biosensor electroquímico plano en el cual un electrodo de trabajo y un contraelectrodo se proporcionan en el mismo plano y una composición de reactivo que incluye una enzima y un mediador de transferencia electrónica dependiente de una sustancia se aplica como recubrimiento sobre el electrodo de trabajo.

50

55 En lo sucesivo en la presente, se explicarán de forma detallada en referencia a la figura 1 a la figura 5 un procedimiento y un aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con formas de realización ejemplificativas de la presente invención.

55

60 La figura 1 y la figura 2 son gráficas, respectivamente, que ilustran un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ utilizado en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica y una corriente inducida que se obtiene en correspondencia con el voltaje de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, la figura 3 es una gráfica proporcionada para explicar la estructura de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ utilizado en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, la figura 4 proporciona vistas en perspectiva frontal y posterior de un aparato de medición en el cual se almacena una ecuación de calibración por medio de un procedimiento para medir una concentración de un analito en una

65

muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y la figura 5 es un diagrama de bloques que ilustra un circuito del aparato de medición para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según se ilustra en la figura 4.

5 Tal como se ilustra en la figura 1, en un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, se aplica un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera consecutivamente después de aplicar un voltaje constante (V_{CC}). Por consiguiente, se mide la corriente inducida.

10 Tal como se ilustra en la figura 3, el potencial de perturbación utilizado en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la forma de realización ejemplificativa de la presente invención está formado por una onda de tipo escalera de tijera, el potencial de perturbación se caracteriza por una altura ($V_{escalón}$) de cada escalón, un tiempo de aplicación ($t_{escalón}$) para cada escalón, una diferencia (V_{centro}) entre un voltaje central y un voltaje constante en todo el intervalo de variaciones, una diferencia (V_{pico}) entre el voltaje central y un voltaje de pico, y una diferencia de tiempo (t_{ciclo}) entre un voltaje de pico de la onda completa de tipo escalera de tijera y el voltaje de pico de la siguiente onda adyacente de tipo escalera de tijera, y presenta un intervalo según se enumera en la siguiente Tabla 1.

20 La Tabla 1 que enumera un intervalo de una onda de tipo escalera de tijera es simplemente una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y se puede modificar y cambiar de diversas maneras en función de la aplicación.

[Tabla 1]

	Valor mínimo	Valor adecuado	Valor máximo
$V_{escalón}$	0,5 mV	1 - 10 mV	20 mV
$t_{escalón}$	0,001 s	0,01 - 0,05 s	0,1 s
V_{CC}	50 mV	150 - 300 mV	800 mV
V_{centro}	-150 mV	-100 - 100 mV	150 mV
V_{pico}	5 mV	12 - 60 mV	150 mV
t_{ciclo}	0,01 s	0,05 - 0,2 s	1 s

25 En el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la forma de realización ejemplificativa de la presente invención, los valores actuales utilizados para determinar una concentración del analito son puntos que pueden ser obtenidos a partir de un escalón o una pluralidad de escalones de una primera o segunda corriente inducida.

30 Tal como se ilustra en la figura 4, un aparato de medición de concentraciones 100 para medir la concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención es capaz de obtener una señal adicional para corrección en menos de unos cuantos segundos y, preferentemente, dentro de 0,1 a 1 segundo, aplicando un potencial de perturbación que cambia el potencial al mismo tiempo que se mantiene el par de electrodo de trabajo y contraelectrodo de un biosensor electroquímico convencional, es decir, una tira 10.

35 Tal como se ilustra en la figura 5, el aparato de medición de concentraciones 100 para medir la concentración de un analito en una muestra biológica según la forma de realización ejemplificativa de la presente invención, está configurado de tal manera que, si el biosensor electroquímico 10 se proporciona en un conector 110, el conector 110 se conecta eléctricamente a un conversor de corriente-voltaje 120, y un microcontrolador (MCU) 150 puede aplicar un potencial de perturbación al electrodo de trabajo de la tira 10 sin un circuito adicional de potencial de perturbación a través de un circuito conversor digital-a-analógico (DAC) 130 proporcionado en el aparato de medición de concentraciones 100 para aplicar un voltaje constante de acuerdo con la cronoamperometría convencional.

40 Para llevar a cabo esto, el microprograma del aparato de medición de concentraciones 100 destinado a medir la concentración de un analito en una muestra biológica según la forma de realización ejemplificativa de la presente invención almacena una constante predeterminada que puede generar un potencial de perturbación en una memoria del aparato de medición 100, registra una constante predeterminada en un registro del circuito DAC 130 cuando se aplica un voltaje constante, e incrementa/decrementa la constante almacenada en la memoria a un intervalo de tiempo predeterminado y registra la constante en el registro del circuito DAC 130 cuando se aplica el potencial de perturbación.

45 El microcontrolador 150 aplica un voltaje adecuado entre los dos electrodos de la tira en función de una constante registrada en el registro del circuito DAC 130.

La primera o segunda corriente inducida medida por la tira 10 se puede medir directamente por medio de un

circuito conversor analógico-a-digital (ADC) 140 a través del conector 110 y el conversor de corriente-voltaje 120.

5 Cuando el potencial de perturbación está constituido por una onda en forma de escalones según se ilustra en la figura 3, el circuito se puede simplificar en comparación con los otros procedimientos que utilizan AC o un procedimiento de exploración lineal, y es posible reducir la generación de una corriente de carga lo cual puede entorpecer el análisis cuando se utilizan impulsos de diversos voltajes.

10 Tal como se ilustra en la figura 1, si se aplica una onda de tipo escalera de tijera a un intervalo regular con una amplitud constante justo después de que se aplique un voltaje constante, la distribución de concentraciones de componentes a oxidar/reducir en una capa de difusión cerca del electrodo fluctúa.

15 Dicha fluctuación o perturbación provoca un cambio importante en las características de una corriente inducida, y este cambio puede ser unos medios importantes capaces de eliminar o minimizar el efecto del hematocrito con valores de corriente obtenidos a partir de un escalón o una pluralidad de escalones que constituyen la onda de tipo escalera de tijera.

20 En la presente, la corriente inducida se expresa como una primera corriente inducida o una segunda corriente inducida con el fin de mostrar que las mismas son diferentes entre sí debido a un cambio en las características de la corriente inducida provocado por fluctuaciones o perturbaciones.

25 A una aplicación de tipo potencial de perturbación de tipo escalera de tijera que presenta una periodicidad y se aplica adicionalmente durante un periodo de tiempo breve con el fin de eliminar el efecto del hematocrito a partir de una ecuación de calibración después de que se aplique un voltaje constante, se le hará referencia como "potencial de perturbación de tipo escalera de tijera \wedge " o, simplemente, como "potencial de escalera de tijera".

30 Las corrientes antes descritas que son diferentes entre sí en cuanto a las características hacen referencia a corrientes que se pueden utilizar como variables para separar o corregir eficazmente el efecto del hematocrito puesto que las mismas dependen de manera diferente de la glucosa en sangre y del hematocrito (material entorpecedor).

35 Por ejemplo, si dos o más impulsos de voltaje se aplican a un intervalo de tiempo adecuado y se miden una primera y una segunda corrientes inducidas a partir de cada impulso, y se determinan valores de la primera y la segunda corrientes inducidas en función de la glucosa en sangre y el hematocrito y, por lo tanto, los mismos se pueden expresar con las siguientes funciones g_1 y g_2 de glucosa en sangre y hematocrito.

Si la glucosa en sangre y el hematocrito contribuyen a las corrientes de la misma manera en las funciones de corriente g_1 y g_2 y se establece una fórmula lineal de constantes en forma de $i_1 = ki_2$, se dirá que las corrientes tienen las mismas características, y, si no, se dirá que las corrientes tienen características diferentes.

40 En cuanto a las corrientes que tienen las mismas características, es posible calcular de forma precisa el efecto del hematocrito o resulta difícil corregir el efecto del hematocrito debido a la dependencia lineal entre variables durante un análisis de regresión.

45 No obstante, en cuanto a una corriente inducida que se puede obtener aplicando un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, el nivel de fluctuación en una muestra se cambia continuamente cerca de una capa doble eléctrica cuando cada escalón sube o baja durante un periodo de tiempo breve, y la velocidad de transferencia electrónica y el efecto de la corriente de carga cambian en correspondencia. Por lo tanto, la misma puede ser diferente con respecto a la corriente obtenida según cronoamperometría, en cuanto a características.

50 Por ello, a los elementos útiles para formar una ecuación de calibración utilizada para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención debido a una diferencia grande, en cuanto a características, entre la primera y la segunda corrientes inducidas correspondientes a un voltaje constante y un potencial de perturbación, se les hará referencia como puntos característicos, y a los valores de corriente no modificados de los puntos característicos o valores modificados adecuadamente de manera que sean variables adecuadas para una ecuación de calibración se les hará referencia como rasgos.

60 En un biosensor electroquímico, por medio de la ecuación de Cottrell se puede conseguir una aproximación de la corriente inducida obtenida según cronoamperometría, cuando un reactivo del biosensor se mezcla con una muestra en una celda de muestreo y alcanza un estado líquido uniforme.

$$i(t) = \frac{nFAD^{\frac{1}{2}}C}{\pi t^{\frac{1}{2}}} = k(t)AD^{1/2}C$$

5 En este caso, n indica el número de electrones transferidos por molécula de una sustancia (por ejemplo, un mediador de transferencia electrónica) para su oxidación/reducción en un electrodo, F indica la constante de Faraday, A indica un área de electrodo, D indica un coeficiente de difusión dentro de una muestra de la sustancia a oxidar/reducir, y C indica una concentración de la sustancia a oxidar/reducir.

10 Un punto característico en una sección cronoamperométrica es el valor de corriente en un punto que se expresa de forma estable con la ecuación de Cottrell después de que se aplique un voltaje constante. En el presente biosensor electroquímico, es un instante de tiempo con un transcurso de tiempo de varios segundos a varios minutos, preferentemente de 1 a 10 segundos, después de que se aplique un voltaje constante.

15 Tal como se ha descrito anteriormente, la segunda corriente inducida obtenida a partir de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera es diferente considerablemente, en cuanto a características, con respecto a la primera corriente inducida obtenida cuando se aplica un voltaje constante, y, por lo tanto, la misma se puede utilizar como variable con una elevada ortogonalidad en la ecuación de calibración completa.

20 Los siguientes son un procedimiento para hallar puntos característicos a partir de segundas corrientes inducidas correspondientes a una sección en la que se aplica el potencial de perturbación y un procedimiento para elaborar rasgos con estos puntos característicos.

El siguiente procedimiento es uno de los ejemplos y se puede modificar y cambiar de diversas maneras en función de la finalidad de aplicación.

- 25 1) Corrientes inducidas cerca de voltajes de pico y de valle de una onda específica de tipo escalera de tijera
- 2) La curvatura de una línea curvada formada por corrientes inducidas de cada escalón de la onda de tipo escalera de tijera
- 30 3) Una diferencia entre un valor de corriente de un pico y un valor de corriente de un valle de la onda de tipo escalera de tijera
- 4) Corrientes inducidas en medio de subidas y bajadas de la onda de tipo escalera de tijera
- 35 5) Corrientes inducidas en un punto inicial y un punto final de cada ciclo de tipo escalera de tijera
- 6) Un valor medio de corrientes inducidas obtenidas a partir de la onda de tipo escalera de tijera
- 40 7) Valores que pueden ser obtenidos expresando los valores de corriente obtenidos a partir de los rasgos anteriores 1 a 6 por medio de las cuatro operaciones aritméticas fundamentales y funciones matemáticas tales como una función exponencial, una función logarítmica y una función trigonométrica.

45 Si se hallan puntos característicos a partir de las segundas corrientes inducidas en correspondencia con la sección en la que se aplica el potencial de perturbación, y se materializan rasgos con valores de corriente obtenidos a partir de estos puntos característicos y se aplica un análisis de regresión multivariable a una mezcla lineal de los mismos, es posible obtener una ecuación de calibración minimizada en cuanto al efecto del hematocrito.

50 En referencia a las siguientes formas de realización ejemplificativas uno a cinco se explicará detalladamente un procedimiento específico para realizar una ecuación de calibración minimizada en cuanto al efecto del hematocrito.

55 No obstante, la ecuación de calibración a la que se aplica el análisis de regresión multivariable mezclando linealmente los rasgos puede cambiar considerablemente en función del material de los electrodos utilizados en el biosensor electroquímico, de la disposición de los electrodos, de la forma del trayecto del flujo, y de la característica del reactivo que se utilizará.

60 La ecuación de calibración utilizada para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una realización ejemplificativa de la presente invención se puede aplicar a un biosensor electroquímico general que tiene una celda de muestreo que incluye un par de electrodo de trabajo y contraelectrodo. Particularmente, si la sustancia a medir es glucosa o un cuerpo cetónico en la sangre o un metabolito que se pueda medir electroquímicamente, resulta útil para el análisis de, por ejemplo, creatina, lactato, colesterol, fenilcetonuria, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y similares.

65 Para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención con el fin de medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención, una función de rasgos formada utilizando rasgos que pueden ser obtenidos a partir de unas primeras y segundas corrientes

inducidas correspondientes a un voltaje constante y a un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera tiene que optimizarse por análisis de regresión multivariable con el fin de minimizar la desviación de hematocrito a través de experimentos utilizando muestras bajo varias condiciones, y tiene que desarrollarse una ecuación de calibración.

5 A continuación, la ecuación de calibración se obtiene mediante microprogramas del aparato de medición y, por lo tanto, puede utilizarse cuando se analiza una muestra sanguínea.

10 **[Primera forma de realización ejemplificativa] Procedimiento para medir glucosa en sangre utilizando una corriente inducida correspondiente a un voltaje constante**

15 Una celda de muestreo de un biosensor electroquímico utilizado para un procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención es una tira desechable formada por dos electrodos de carbono serigrafiados, y los electrodos están recubiertos con una glucosa deshidrogenasa y un mediador de transferencia electrónica (tionina, cloruro de hexaamino-rutenio).

20 El aparato de medición 100 utilizado para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención es el CareSens N (nombre comercial) disponible comercialmente, según se ilustra en la figura 4.

25 En el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención, el microprograma del aparato de medición 100 se utiliza tal como está para obtener una primera corriente inducida correspondiente a un voltaje constante aplicando el voltaje constante del microcontrolador 150 al electrodo de trabajo a través del circuito conversor digital-a-analógico 130, y se calcula un valor de glucosa en sangre.

30 El experimento se llevó a cabo a una temperatura de 23 °C, y, como equipo de referencia, se usó un equipo YSI (compañía Yellow Springs Instruments, conocida también como YSI Inc.).

35 Para comprobar la desviación provocada por hematocrito, se pueden efectuar los siguientes experimentos en sangre.

40 Sangre extraída de sangre venosa se divide en glóbulos rojos y plasma por centrifugación, y los glóbulos rojos y el plasma se mezclan nuevamente en una relación apropiada para obtener un hematocrito deseado. A continuación, se preparan muestras que tienen, respectivamente, valores de hematocrito de 10, 20, 30, 42, 50, 60 y 70 %. Se prepara una concentración de glucosa adicionando una solución de glucosa que tiene una alta concentración a cada muestra.

45 Las muestras sanguíneas se preparan de tal manera que los valores de glucosa en sangre pueden ser aproximadamente 30, 80, 130, 200, 350, 450 y 600 mg/dL con respecto a los valores de hematocritos respectivos, y se mide un valor de glucosa en sangre real de cada muestra mediante un equipo de referencia a determinar.

50 Al mismo tiempo, el aparato de medición 100 registra una primera corriente inducida correspondiente a un voltaje constante de acuerdo con una cronoamperometría convencional.

55 El voltaje aplicado en este momento es 0 V cuando se aplica entre los dos electrodos de carbono durante 3 segundos después de la afluencia de sangre, y es 200 mV cuando se aplica entre los dos electrodos de carbono durante 2 segundos después de esto. Por lo tanto, se registran valores de corriente después del transcurso de 5 segundos con respecto a las muestras respectivas.

60 Se elabora una fórmula de medición de glucosa en sangre basándose en la muestra que tiene un valor de hematocrito del 42 %. La fórmula de medición de glucosa en sangre es la siguiente.

$$\text{Glucosa} = \text{pendiente} * i_{t=5 \text{ s}} \text{ (un valor de corriente después del transcurso de 5 segundos) + ordenada en el origen}$$

65 Se determina una ecuación de calibración de glucosa en sangre calculando una pendiente y una ordenada en el origen a partir de los datos experimentales por el procedimiento de los mínimos cuadrados.

Los resultados del cálculo con respecto a todas las muestras de hematocrito utilizando la ecuación de calibración obtenida como tal son según se ilustra en la figura 6 y la figura 7.

La figura 6 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre medido con un aparato de medición de acuerdo con cronoamperometría y un valor de medición YSI en un procedimiento

para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y la figura 7 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre medidos con un aparato de medición según cronoamperometría en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa con un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o superior se expresa con un error relativo (%)).

Tal como se ilustra en la figura 6 y la figura 7, en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención, el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre medidos con el aparato de medición según cronoamperometría mantiene una linealidad con todos los valores de hematocrito. No obstante, puede confirmarse que a medida que se incrementa el hematocrito, la pendiente se reduce.

En particular, tal como se ilustra en la figura 7, puede observarse que, para una tendencia de los valores de medición de glucosa en sangre con respecto a los valores de hematocrito respectivos, la desviación se incrementa hacia ambos extremos sobre la base del 42 %.

[Segunda forma de realización ejemplificativa] Ejemplo de ecuación de calibración utilizando rasgos extraídos a partir de puntos característicos después de la aplicación de un voltaje constante y un potencial de perturbación

Con la tira 10 y el aparato de medición 100 utilizados para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención, puede obtenerse una ecuación de calibración con un efecto de hematocrito minimizado.

El entorno experimental y las muestras utilizados para un procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención son los mismos que los correspondientes de la primera forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

El aparato de medición de concentraciones 100 destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención es diferente con respecto al aparato de medición de glucosa en sangre 100 según la primera forma de realización ejemplificativa en la aplicación del voltaje.

En el aparato de medición de concentraciones 100 para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención, el microprograma del aparato de medición 100 se modifica de la manera siguiente de tal manera que puede aplicarse un potencial de perturbación adecuado justo después de que se aplique un voltaje constante convencional.

El microprograma del aparato de medición de concentraciones 100 para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención almacena una constante predeterminada que puede generar un potencial de perturbación, en una memoria del aparato de medición 100, registra una constante predeterminada en un registro del circuito DAC cuando se aplica un voltaje constante, e incrementa/decrementa la constante almacenada en la memoria, a un intervalo de tiempo predeterminado, y registra la constante en el registro del circuito DAC cuando se aplica el potencial de perturbación.

En función de una constante registrada en el registro del circuito DAC se aplica un voltaje adecuado entre los dos electrodos de la tira.

En la siguiente Tabla 2 se describe una estructura de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera aplicado como tal.

[Tabla 2]

$V_{\text{escalón}}$	2.0 mV
$t_{\text{escalón}}$	0,0025 s
V_{CC}	200 mV
V_{centro}	200 mV
V_{pico}	20 mV
t_{ciclo}	0,1 s

Las muestras preparadas se miden con el aparato de medición de glucosa en sangre 100 preparado como tal. En un ordenador se almacenan corrientes inducidas obtenidas a partir de la medición.

- 5 Con puntos característicos óptimos extraídos mediante el análisis de los datos almacenados con una fórmula de glucosa en sangre se forman rasgos, y, se forma una ecuación de calibración constituida por estos rasgos. A continuación, se determina un coeficiente de cada rasgo, determinado a través de un análisis de regresión multivariable para completar la ecuación de calibración. La ecuación de calibración es la siguiente.

$$\text{glucosa} = \sum_j c_j f_j(i, T)$$

- 10 En la presente, i indica uno o más valores de corriente que pueden ser obtenidos a partir de la primera corriente inducida y la segunda corriente inducida, T indica valores de temperatura que se miden de forma independiente, y los rasgos utilizados en la presente son los siguientes.

15 $f_1 = i$ en 5 s (una corriente inducida correspondiente a un voltaje constante)

$f_2 = i$ en 5.4925 s (una corriente inducida en un punto de un escalón ascendente del sexto potencial de tipo escalera de tijera)

- 20 $f_3 = i$ en 5.4425 s (una corriente inducida en un punto de un escalón descendente del quinto potencial de tipo escalera de tijera)

$f_4 =$ curvatura (la curvatura formada por corrientes inducidas en escalones descendentes en el quinto potencial de escalera de tijera)

- 25 $f_5 = f_1^2$
 $f_6 = f_2^2$
 $f_7 = f_3^2$
 $f_8 = f_4^2$
 30 $f_9 = 1/f_1$
 $f_{10} = 1/f_2$
 $f_{11} = 1/f_3$
 $f_{12} = 1/f_4$

- 35 Se establece un modelo formado por los rasgos antes descritos, y, para emparejar valores de glucosa en sangre calculados con respecto a las muestras respectivas, con valores medidos por YSI bajo diversas condiciones de hematocrito, el aparato de medición utilizado en la primera forma de realización ejemplificativa añade un valor ponderado con respecto al hematocrito estándar de 42 % para que se aproxime a una concentración obtenida de acuerdo con solamente cronoamperometría, y optimiza los coeficientes de los rasgos respectivos por análisis de regresión multivariable. Una nueva ecuación de calibración obtenida como tal puede minimizar el efecto de un material entorpecedor al mismo tiempo que mantiene el procedimiento de calibración convencional según cronoamperometría.

- 40 La ecuación de calibración se almacena en el aparato de medición junto con un microprograma modificado para aplicar un potencial de perturbación después de la aplicación de un voltaje constante. En la figura 8 y la figura 9 se ilustran los resultados de acuerdo con la nueva ecuación de calibración.

- 45 La figura 8 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre obtenido mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor de medición YSI en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y la figura 9 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre obtenidos mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa con un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o superior se expresa con un error relativo (%)).

- 55 Tal como puede observarse a partir de la figura 8, el valor de medición de glucosa en sangre obtenido mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera y el valor de medición YSI presentan una correlación muy próxima, y, tal como puede observarse a partir de la figura 9, el efecto del hematocrito sobre el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre obtenidos mediante el uso de cronoamperometría y un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera se reduce a menos de aproximadamente ± 5 %.

Se explicará, en referencia a la figura 10, un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

5 La figura 10 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

10 Tal como se ilustra en la figura 10, un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según una forma de realización ejemplificativa de la presente invención incluye una etapa S110 de introducción de una muestra biológica líquida en una celda de muestreo en la que están fijados una enzima de oxidación/reducción capaz de catalizar una reacción de oxidación/reducción del analito y un mediador de transferencia electrónica y se proporcionan un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, una etapa S120 de obtención de una primera corriente inducida aplicando un voltaje de CC constante al electrodo de trabajo para iniciar la reacción de oxidación/reducción del analito y proseguir con una reacción de transferencia electrónica, una etapa S130 de obtención de una segunda corriente inducida aplicando un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ después de aplicar el voltaje de CC constante, una etapa S140 de cálculo de un rasgo predeterminado a partir de dos o más puntos característicos de la primera corriente inducida o la segunda corriente inducida, y una etapa S150 de cálculo de una concentración del analito utilizando una ecuación de calibración formada por al menos una función de rasgos con el fin de minimizar el efecto de al menos dos materiales entorpecedores en la muestra biológica.

20 Después de aplicar el voltaje de CC constante, se aplica el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ al estilo de una onda de forma en escalón utilizando un circuito DAC convencional según se ha descrito anteriormente.

25 La etapa S140 de cálculo de un rasgo predeterminado a partir de la primera corriente inducida o la segunda corriente inducida incluye obtener un rasgo a partir de un valor de corriente en un punto característico predeterminado de la primera corriente inducida o la segunda corriente inducida o modificando el valor de corriente.

30 **[Tercera forma de realización ejemplificativa] Ejemplo de ecuación de calibración para calcular un valor de glucosa en sangre preciso en diversos intervalos de temperatura utilizando la temperatura como rasgo adicional**

35 Con la tira y el aparato de medición utilizados para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención, puede obtenerse una ecuación de calibración con un efecto minimizado de la temperatura y del hematocrito.

40 El entorno experimental y las muestras utilizados en la presente son similares a aquellos utilizados para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

45 Es decir, se prepararon muestras, respectivamente, que tenían un valor de hematocrito de 10, 20, 42, 55 y 70 % y una concentración de glucosa en sangre de 50, 130, 250, 400 y 600 mg/dL, y se efectuaron, respectivamente, experimentos a 5, 12, 18, 23, 33 y 43 °C.

50 El aparato de medición 100 utilizado para un procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención se modifica con respecto al aparato de medición de glucosa en sangre utilizado en la segunda forma de realización ejemplificativa en la aplicación del voltaje.

55 En la siguiente Tabla 3 se describe la estructura de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera utilizado para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

[Tabla 3]

$V_{\text{escalón}}$	2.0 mV
$t_{\text{escalón}}$	0,005 s
V_{CC}	200 mV
V_{centro}	200 mV
V_{pico}	20 mV
t_{ciclo}	0,2 s

Las muestras preparadas se miden en cada temperatura con el aparato de medición 100 preparado como tal. En

un ordenador se almacenan corrientes inducidas obtenidas a partir de la medición.

5 Con puntos característicos óptimos extraídos mediante el análisis de los datos almacenados con una fórmula de glucosa en sangre se forman rasgos, y, se forma una ecuación de calibración constituida por estos rasgos. A continuación, se determina un coeficiente de cada rasgo, determinado a través de un análisis de regresión multivariable para completar la ecuación de calibración. La ecuación de calibración es la siguiente.

$$\text{cuerpo cetónico} = \sum_j c_j f_j(i)$$

10 En la presente, i indica uno o más valores de corriente que pueden ser obtenidos a partir de la primera corriente inducida y la segunda corriente inducida, T indica valores de temperatura que se miden de forma independiente, y los rasgos utilizados en la presente son los siguientes.

$f_1 = i$ en 5 s (una corriente inducida correspondiente a un voltaje constante)

15 $f_2 = i$ en 5.2675 s (una corriente inducida en un punto descendente desde un pico del segundo potencial de tipo escalera de tijera)

20 $f_3 = i$ en 5.3675 s (una corriente inducida en un punto ascendente desde un valle del tercer potencial de tipo escalera de tijera)

$f_4 =$ curvatura (la curvatura formada por corrientes inducidas en escalones descendentes en el segundo potencial de escalera de tijera)

25 $f_5 =$ Pico-a-Pico (una diferencia entre un voltaje de pico y un voltaje de valle del segundo potencial de escalera de tijera)

30 $f_6 = f_1^2$
 $f_7 = f_2^2$
 $f_8 = f_3^2$
 $f_9 = f_4^2$
 $f_{10} = f_5^2$
 $f_{11} = 1/f_1$
 $f_{12} = 1/f_4$
 $f_{13} = T$
 $f_{14} = T^2$
 $f_{15} = f_1 * T$

40 Se establece un modelo formado con los rasgos antes descritos, y, tal como se explica en la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención, los coeficientes de los rasgos respectivos se optimizan por análisis de regresión multivariable sobre la base de los valores de glucosa en sangre medidos con el equipo de referencia YSI.

45 Una ecuación de calibración obtenida como tal se almacena en el aparato de medición junto con un microprograma modificado para aplicar un potencial de perturbación después de la aplicación de un voltaje constante de la misma manera que la segunda forma de realización ejemplificativa. Los resultados acordes a la nueva ecuación de calibración son tal como se ilustra en la figura 11 y la figura 12.

50 La figura 11 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de glucosa en sangre obtenido mediante el uso de cronoamperometría, de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y de un valor de temperatura medido con un aparato de medición y un valor de medición YSI en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (que incluye muestras, respectivamente, que tienen un valor de hematocrito de 10, 20, 42, 55 y 70 %).

55 La figura 12 es una gráfica que ilustra el efecto de la temperatura sobre el valor medio de valores de medición de glucosa en sangre obtenidos mediante el uso de cronoamperometría, un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor de temperatura medido con un aparato de medición en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 100 mg/dL se expresa con un error absoluto y una concentración de 100 mg/dL o superior se expresa con un error relativo (%)).

60 Tal como se ilustra en la figura 10, la medición de un valor de glucosa en sangre incluye introducir sangre, aplicar un voltaje constante, aplicar un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, calcular rasgos a partir de

corrientes inducidas, y obtener un valor preciso de glucosa en sangre utilizando la ecuación de calibración nueva.

[Cuarta forma de realización ejemplificativa] Ejemplo de ecuación de calibración para medir cuerpos cetónicos

5 En un procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con una cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención, la celda de muestreo del biosensor electroquímico 10 es una tira desechable formada por dos electrodos de carbono serigrafiados, y, si los electrodos se recubren con una cuerpo cetónico deshidrogenasa y un mediador de transferencia electrónica (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenacino, cloruro de hexaamino-rutenio), se obtiene una corriente inducida aplicando un voltaje constante a 23 °C y se calcula la concentración del cuerpo cetónico.

15 Los experimentos en sangre para comprobar la desviación provocada por el hematocrito se efectúan de manera similar a la primera forma de realización ejemplificativa. Se preparan muestras sanguíneas que tienen, respectivamente, un valor de hematocrito de 20, 30, 42, 50, 60 y 70 %.

20 Las muestras sanguíneas se preparan de tal manera que las concentraciones de cuerpo cetónico pueden ser aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4,2, y 5 mmol/L con respecto a los valores de hematocrito respectivos, y se mide un valor de glucosa en sangre real de cada muestra con el equipo de referencia (RX Mónaco, Randox) y, a continuación, se determina el mismo.

25 Al mismo tiempo, el aparato de medición que tiene la misma estructura que el aparato de medición de glucosa en sangre utilizado en la forma de realización ejemplificativa antes descrita registra una corriente inducida correspondiente a un voltaje constante.

En la presente, el voltaje aplicado que se utiliza es 200 mV cuando se aplica entre los dos electrodos dentro de la tira durante 4 segundos después de la afluencia de sangre, es 0 mV cuando se aplica durante 4 segundos después de esto, y, a continuación, es 200 mV cuando se aplica durante 2 segundos después de esto.

30 Se registran valores de corriente después del transcurso de 10 segundos con respecto a las muestras respectivas.

Se obtiene una fórmula de medición de cuerpos cetónicos basándose en la muestra que tiene un hematocrito del 42 %.

35 La fórmula de medición de cuerpos cetónicos es la siguiente.

Cuerpo cetónico = pendiente * $i_{t=10s}$ (un valor de corriente después del transcurso de 10 segundos) + ordenada en el origen

40 Se obtiene una ecuación de calibración calculando una pendiente y una ordenada en el origen a partir de los datos experimentales con los datos experimentales del procedimiento de mínimos cuadrados.

45 Los resultados del cálculo con respecto a todas las muestras de hematocrito utilizando la ecuación de calibración de cuerpos cetónicos obtenida como tal son según se ilustran en la figura 13 y la figura 14.

50 La figura 13 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de cuerpos cetónicos obtenido según cronoamperometría y un valor de medición medido con un equipo de referencia en el procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y la figura 14 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre el valor medio de valores de medición de cuerpos cetónicos obtenidos según cronoamperometría en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica de acuerdo con la cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 1,0 mmol/L se expresa con un error absoluto multiplicado por 100 y una concentración de 1,0 mmol/L o superior se expresa con un error relativo (%)).

55 Tal como se ilustra en la figura 13 y la figura 14, puede confirmarse que el valor medio de los valores de medición de cuerpos cetónicos obtenidos según cronoamperometría presenta una pendiente decreciente a medida que aumenta el hematocrito.

60 Además, tal como se ilustra en la figura 14, puede observarse que, para una tendencia de los valores de medición de cuerpos cetónicos con respecto a los valores de hematocritos respectivos según cronoamperometría, la desviación aumenta hacia ambos extremos sobre la base del 42 %.

65 **[Quinta forma de realización ejemplificativa] Ejemplo de ecuación de calibración para medir cuerpos cetónicos utilizando rasgos extraídos a partir de puntos característicos después de la aplicación de un**

voltaje constante y un potencial de perturbación

5 Con la tira y el aparato de medición utilizados para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención, puede obtenerse una ecuación de calibración para medir un cuerpo cetónico utilizando rasgos extraídos de puntos característicos después de la aplicación de un voltaje constante y un potencial de perturbación.

10 El entorno experimental y las muestras utilizados en la presente son los mismos que los correspondientes utilizados para el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la cuarta forma de realización ejemplificativa de la presente invención.

15 El aparato de medición es diferente con respecto al aparato de medición utilizado en la cuarta forma de realización ejemplificativa en la aplicación del voltaje. Es decir, el microprograma del aparato de medición se modifica de tal manera que puede aplicarse un potencial de perturbación descrito en la siguiente tabla justo después de que se aplique un voltaje constante convencional.

20 En un procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la quinta forma de realización ejemplificativa de la presente invención, se aplica un voltaje en forma de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera descrito en la siguiente Tabla 4 justo después del voltaje utilizado en la cuarta forma de realización ejemplificativa.

[Tabla 4]

V _{escalón}	1.5 mV
t _{escalón}	0,0025 s
V _{CC}	200 mV
V _{centro}	250 mV
V _{pico}	15 mV
t _{ciclo}	0,1 s

25 Las muestras preparadas se miden con el aparato de medición preparado como tal. En un ordenador se almacenan las corrientes inducidas obtenidas a partir de la medición.

30 Los rasgos se forman con puntos característicos óptimos extraídos mediante análisis de los datos almacenados con una fórmula de glucosa en sangre, y se constituye una ecuación de calibración formada con estos rasgos. A continuación, se determina un coeficiente de cada rasgo a través de un análisis de regresión multivariable para completar la ecuación de calibración.

La ecuación de calibración para medir un cuerpo cetónico es la siguiente.

$$\text{cuerpo cetónico} = \sum_j c_j f_j(i)$$

35 En la presente, i indica uno o más valores de corriente que pueden ser obtenidos a partir de la primera corriente inducida y la segunda corriente inducida, y los rasgos utilizados en la presente son los siguientes.

40 f₁= corriente en 10 s (una corriente inducida correspondiente a un voltaje constante)

f₂ = corriente en 8.12 s (una corriente inducida inicial correspondiente a un voltaje constante)

45 f₃ = corriente en 10,27 s (una corriente inducida en un voltaje cerca de un valle del tercer potencial de tipo escalera de tijera)

f₄ = corriente en 10,4925 s (una corriente inducida en un voltaje cerca de un valle del quinto potencial de tipo escalera de tijera)

50 f₅ = curvatura (la curvatura formada por corrientes inducidas en escalones descendentes del quinto potencial de escalera de tijera)

55

$$f_6 = f_1^2$$

$$f_7 = f_2^2$$

$$f_8 = f_3^2$$

$$f_9 = f_4^2$$

$$f_{10} = f_5^2$$

$$f_{11} = 1/f_1$$

$$f_{12} = 1/f_5$$

5 Se establece un modelo formado con los rasgos antes descritos, y para emparejar los valores de glucosa en sangre calculados con respecto a las muestras respectivas con valores medidos por el equipo de referencia bajo diversas condiciones de hematocrito, se añade un valor ponderado con respecto al hematocrito estándar del 42 % de manera que sea próximo a una concentración obtenida de acuerdo con solamente cronoamperometría, y los coeficientes de los rasgos respectivos se optimizan por análisis de regresión multivariable.

10 Una ecuación de calibración obtenida como tal se almacena en el aparato de medición junto con un microprograma modificado para aplicar un potencial de perturbación después de la aplicación de un voltaje constante. Los resultados de acuerdo con la ecuación de calibración son tal como se ilustra en la figura 15 y la figura 16.

15 La figura 15 es una gráfica que ilustra una correlación entre un valor de medición de cuerpos cetónicos obtenido mediante el uso de cronoamperometría y de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera y un valor de medición medido con un equipo de referencia en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la quinta forma de realización ejemplificativa de la presente invención, y la figura 16 es una gráfica que ilustra el efecto del hematocrito sobre el valor medio de valores de medición de cuerpos cetónicos obtenidos mediante el uso de cronoamperometría y de un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera en el procedimiento destinado a medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la quinta forma de realización ejemplificativa de la presente invención (una concentración inferior a 1.0 mmol/L se expresa con un error absoluto multiplicado por 100 y una concentración de 1.0 mmol/L o superior se expresa con un error relativo (%)).

25 El efecto del procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según las formas de realización ejemplificativas de la presente invención puede observarse claramente comparando la primera forma de realización ejemplificativa con la segunda forma de realización ejemplificativa de la presente invención y comparando la tercera forma de realización ejemplificativa con la cuarta forma de realización ejemplificativa.

30 Es decir, es posible obtener directamente un resultado cuyo efecto de matriz de un factor entorpecedor, tal como un hematocrito, se minimiza a partir de una ecuación de calibración, sin utilizar una fórmula de corrección adicional, utilizando un biosensor convencional en un aparato de medición de acuerdo con la cronoamperometría utilizada de manera general y añadiendo un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera (figura 1) a un procedimiento de aplicación de voltaje convencional solamente durante un periodo de tiempo breve.

35 Además, tal como puede observarse a partir de la tercera forma de realización ejemplificativa de la presente invención, si se obtiene una ecuación de calibración utilizando una temperatura medida con un aparato de medición como rasgo adicional, es posible obtener un resultado de medición en el que se minimizan tanto el efecto de matriz y el efecto de la temperatura mediante un cálculo sencillo.

<Descripción de símbolos>

- | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 45 | 10: Biosensor electroquímico (Tira) | 100: Aparato de medición |
| | 110: Conector | 120: Conversor de corriente-voltaje |
| | 130: Circuito DAC | 140: Circuito ADC |
| 50 | 150: Microcontrolador | |

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

5 una etapa de introducción de una muestra biológica líquida en una celda de muestreo en la que están fijados una enzima de oxidación/reducción capaz de catalizar una reacción de oxidación/reducción del analito y un mediador de transferencia electrónica y están previstos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;

10 una etapa de obtención de una primera corriente inducida aplicando un voltaje de CC constante al electrodo de trabajo para iniciar la reacción de oxidación/reducción del analito y proseguir con una reacción de transferencia electrónica;

15 una etapa de obtención de una segunda corriente inducida aplicando un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ después de aplicar el voltaje de CC constante;

una etapa de cálculo de un rasgo predeterminado a partir de dos o más puntos característicos de la primera corriente inducida o la segunda corriente inducida; y

20 una etapa de cálculo de una concentración del analito utilizando una ecuación de calibración formada por al menos una función de rasgos de manera que se minimice el efecto de por lo menos un material entorpecedor en la muestra biológica

25 en el que un punto característico que tiene una ecuación lineal diferente con respecto al analito y al material entorpecedor se selecciona de entre la primera o segunda corriente inducida, se forma un rasgo con el punto característico, y se forma una ecuación de calibración con el rasgo,

30 en el que el rasgo se forma con el punto característico utilizando una de entre las segundas corrientes inducidas cerca de voltajes de pico y de valle de un tipo de escalera de tijera específica, la curvatura de una línea curvada formada con corrientes inducidas de cada escalón del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, una diferencia entre un valor de corriente de un pico y un valor de corriente de un valle del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, unas corrientes inducidas en medio de subidas y bajadas del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, unas corrientes inducidas en un punto inicial y un punto final de cada ciclo del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor medio de corrientes inducidas obtenidas a partir del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y unos valores que pueden ser obtenidos expresando los valores de corriente obtenidos a partir de los mismos por medio de las cuatro operaciones aritméticas fundamentales y funciones matemáticas, tales como una función exponencial, una función logarítmica, y una función trigonométrica, en el que

40 el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ está caracterizado por una altura ($V_{\text{escalón}}$) de cada escalón, un tiempo de aplicación ($t_{\text{escalón}}$) para cada escalón, una diferencia (V_{centro}) entre un voltaje central y un voltaje constante en todo el intervalo de variaciones, una diferencia (V_{pico}) entre un voltaje central y un voltaje de pico, y una diferencia de tiempo (t_{ciclo}) entre un voltaje de pico de la onda completa de tipo escalera de tijera y un voltaje de pico de la siguiente onda adyacente de tipo escalera de tijera, siendo la ecuación de calibración obtenida aplicando un análisis de regresión multivariable a la función de rasgos como una mezcla lineal del rasgo, y la ecuación de calibración varía en función del material de los electrodos, la disposición de los electrodos, una forma del trayecto del flujo, y una característica de un reactivo que se debe utilizar.

50 2. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

la segunda corriente inducida es obtenida dentro de 0,1 a 1 segundo después de que la primera corriente inducida sea obtenida.

55 3. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

el voltaje de CC constante y el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ son aplicados al electrodo de trabajo a través del mismo circuito conversor digital-a-analógico enlazado con un microcontrolador.

60 4. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

65 el analito es uno de entre glucosa, ácido β -hidroxibutírico, colesterol, triglicérido, lactato, piruvato, alcohol, bilirrubina, ácido úrico, fenilcetonuria, creatina, creatinina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NAD(P)H, y un cuerpo cetónico.

5. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

5 la enzima de reacción de oxidación/reducción es una de entre una glucosa oxidasa (GOx), una glucosa deshidrogenasa (GDH), una glutamato oxidasa, una glutamato deshidrogenasa, una colesterol oxidasa, una colesterol esterasa, una lactato oxidasa, una ácido ascórbico oxidasa, una alcohol oxidasa, una alcohol deshidrogenasa, una bilirrubina oxidasa, y una cuerpo cetónico deshidrogenasa.

10 6. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

15 el mediador de transferencia electrónica que puede ser utilizado junto con los enzimas descritos anteriormente es uno de entre ferroceno, cloruro de hexaamino-rutenio (III), ferricianuro potásico, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, y bipyridina, o un complejo de osmio que incluye fenantrolina como un ligando, 2,6-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona, 3,7-diamino-5-fenotiacionina, metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenacino, azul de metileno y azul de toluidina.

20 7. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

25 el voltaje de CC constante que presenta un intervalo de voltaje comprendido entre 0 y 800 mV es aplicado de manera consecutiva o intermitente durante 1 segundo o más hasta menos de 1 minuto, y la primera corriente inducida es medida una vez o varias veces mientras el voltaje de CC constante es aplicado.

30 8. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 2, en el que

35 una altura ($V_{\text{escalón}}$) de un escalón del potencial de tipo escalera de tijera está comprendida entre 0,5 y 20 mV, un tiempo de duración ($t_{\text{escalón}}$) del escalón está comprendido entre 0,001 y 0,1 segundo, una diferencia (V_{centro}) entre un voltaje central y un voltaje constante del potencial de tipo escalera de tijera está comprendido entre -150 y 150 mV, una diferencia (V_{pico}) entre el voltaje central y un voltaje de pico o valle del potencial de tipo escalera de tijera está comprendido entre 5 y 150 mV, y el ciclo del potencial de tipo escalera de tijera o la diferencia de tiempo (t_{ciclo}) entre un pico y el siguiente pico adyacente está en el intervalo comprendido entre 0,01 y 1 segundo.

40 9. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que:

45 la función de rasgos incluye una función que utiliza un valor de corriente inducida obtenido a partir de la corriente de CC constante, una función que utiliza un valor de corriente inducida obtenido a partir del potencial de tipo escalera de tijera, una función que utiliza un valor de temperatura medido por el aparato de medición, y una función que puede ser obtenida expresando unos valores medidos de corriente por medio de las cuatro operaciones aritméticas fundamentales y unas funciones matemáticas que incluyen una función exponencial, una función logarítmica, y una función trigonométrica.

50 10. Procedimiento para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que

la ecuación de calibración es una de entre

$$\text{glucosa} = \sum_j c_j f_j(i),$$

$$\text{glucosa} = \sum_j c_j f_j(i, T),$$

55 y

$$\text{cuerpo cetónico} = \sum_j c_j f_j(i),$$

60 en la que i indica uno o más valores de corriente que pueden ser obtenidos a partir de la primera corriente inducida y la segunda corriente inducida, y T indica unos valores de temperatura que son medidos de manera independiente.

11. Aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica, comprendiendo el aparato:

65 un conector (110) en el cual es insertada una celda de muestreo en la que están fijados una enzima de

oxidación/reducción capaz de catalizar una reacción de oxidación/reducción del analito y un mediador de transferencia electrónica y se proporcionan un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;

5 un circuito conversor digital-a-analógico (130) configurado para aplicar un voltaje de CC constante para iniciar la reacción de oxidación/reducción del analito, proseguir con una reacción de transferencia electrónica, y aplicar un potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ para hacer fluctuar un potencial de la celda de muestreo después de aplicar el voltaje de CC constante; y

10 un microcontrolador (150) configurado para controlar el circuito conversor digital-a-analógico (130) y obtener directamente un valor de concentración del analito a partir de una ecuación de calibración utilizando el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ ,

15 en el que el microcontrolador (150) está configurado asimismo para seleccionar un punto característico que presenta una ecuación lineal diferente con respecto al analito y al material entorpecedor a partir de la primera o la segunda corriente inducida, configurado para formar un rasgo del punto característico, y una ecuación de calibración del rasgo,

20 en el que el rasgo está formado con el punto característico utilizando una de entre las segundas corrientes inducidas cerca de voltajes de pico y de valle de un tipo de escalera de tijera específica, la curvatura de una línea curvada formada con corrientes inducidas de cada escalón del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, una diferencia entre un valor de corriente de un pico y un valor de corriente de un valle del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, unas corrientes inducidas en medio de subidas y bajadas del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, unas corrientes inducidas en un punto inicial y un punto final de cada ciclo del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y un valor medio de corrientes inducidas obtenidas a partir del potencial de perturbación de tipo escalera de tijera, y unos valores que pueden ser obtenidos expresando los valores de corriente obtenidos a partir de los mismos por medio de las cuatro operaciones aritméticas fundamentales y funciones matemáticas, tales como una función exponencial, una función logarítmica, y una función trigonométrica,

30 en el que el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ está caracterizado por una altura ($V_{\text{escalón}}$) de cada escalón, un tiempo de aplicación ($t_{\text{escalón}}$) para cada escalón, una diferencia (V_{centro}) entre un voltaje central y un voltaje constante en todo el intervalo de variaciones, una diferencia (V_{pico}) entre un voltaje central y un voltaje de pico, y una diferencia de tiempo (t_{ciclo}) entre un voltaje de pico de la onda completa de tipo escalera de tijera y un voltaje de pico de la siguiente onda adyacente de tipo escalera de tijera,

35 en el que la ecuación de calibración es obtenida aplicando un análisis de regresión multivariable a la función de rasgos como una mezcla lineal del rasgo, y la ecuación de calibración varía en función del material de los electrodos, la disposición de los electrodos, la forma del trayecto del flujo, y una característica de un reactivo que se debe utilizar.

40 12. Aparato para medir una concentración de un analito en una muestra biológica según la reivindicación 11, en el que

45 el microcontrolador (150) está dispuesto para almacenar un valor constante predeterminado y generar el potencial de perturbación de tipo escalera de tijera Λ correspondiente al valor constante predeterminado, registrar una constante predeterminada en un registro del circuito conversor digital-a-analógico (130) cuando un voltaje constante es aplicado, e incrementar/decrementar la constante a un intervalo de tiempo predeterminado y registrar la constante en el registro del circuito conversor digital-a-analógico cuando el potencial de perturbación es aplicado, y el circuito conversor digital-a-analógico aplica el voltaje constante o el potencial de perturbación entre los dos electrodos en función del valor constante registrado en el registro del circuito digital-a-analógico.

FIG. 1

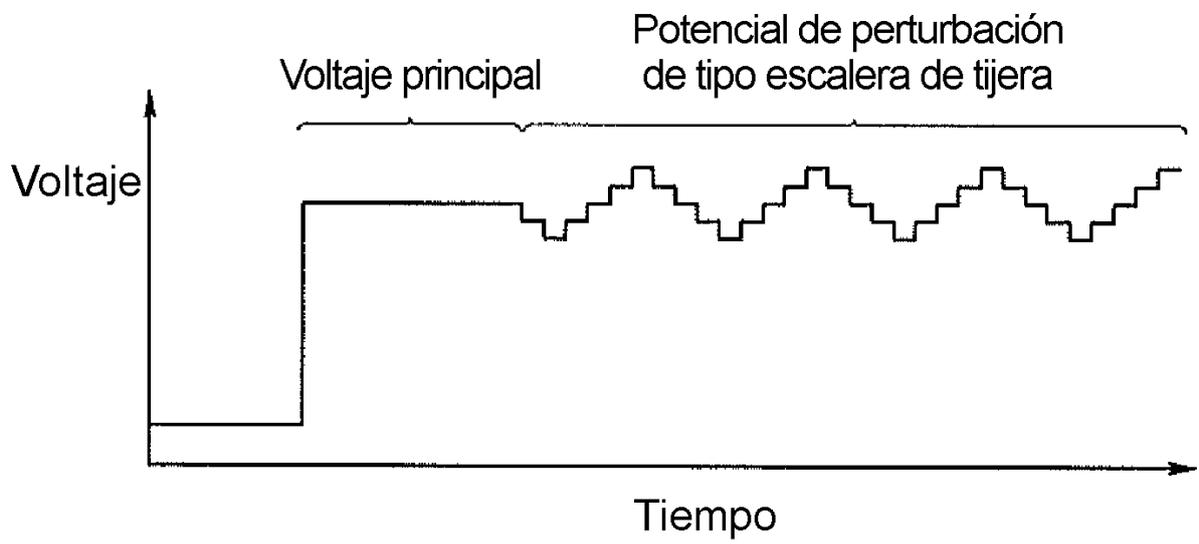


FIG. 2

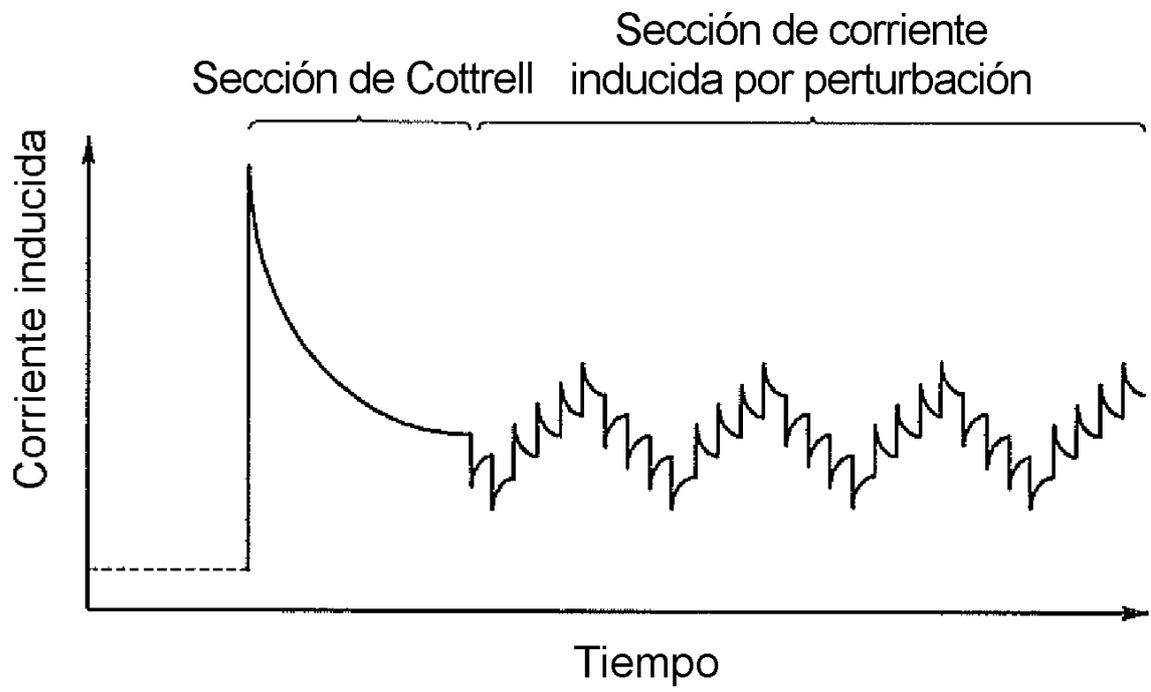


FIG. 3

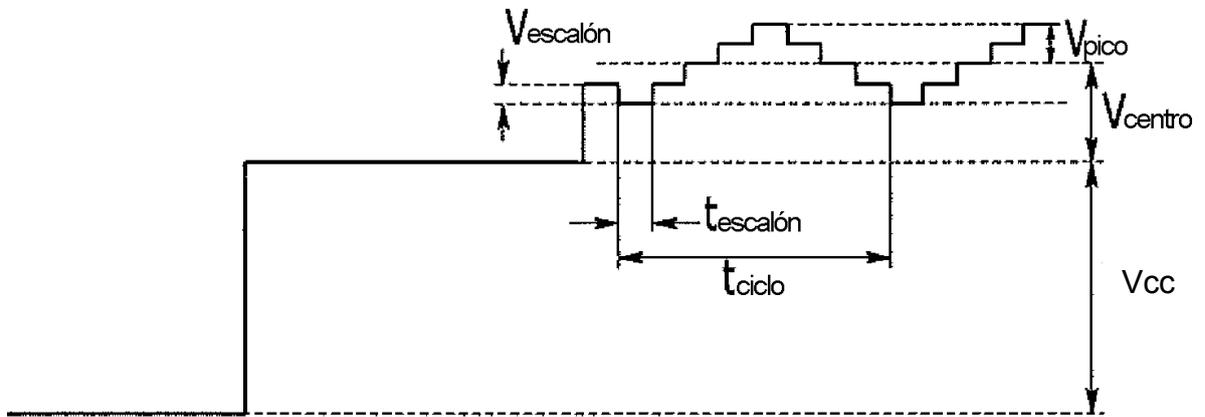


FIG. 4

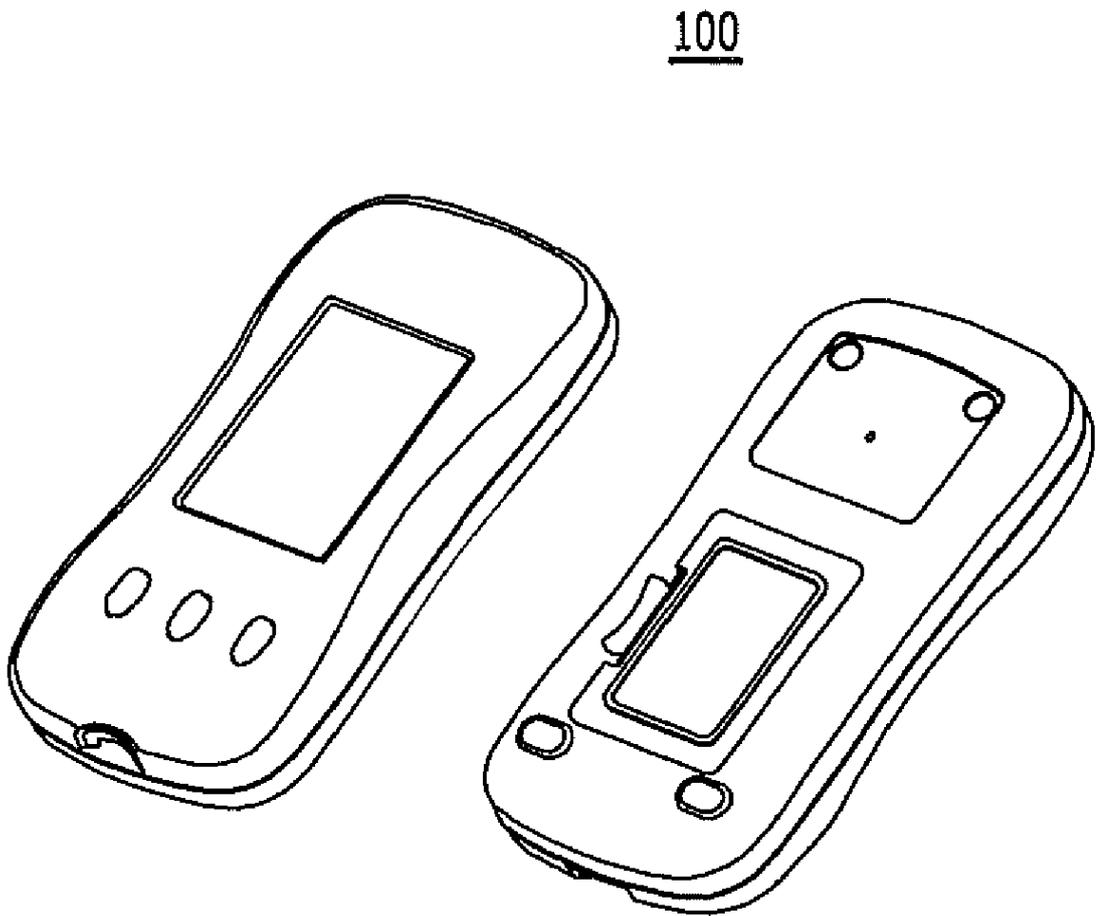


FIG. 5

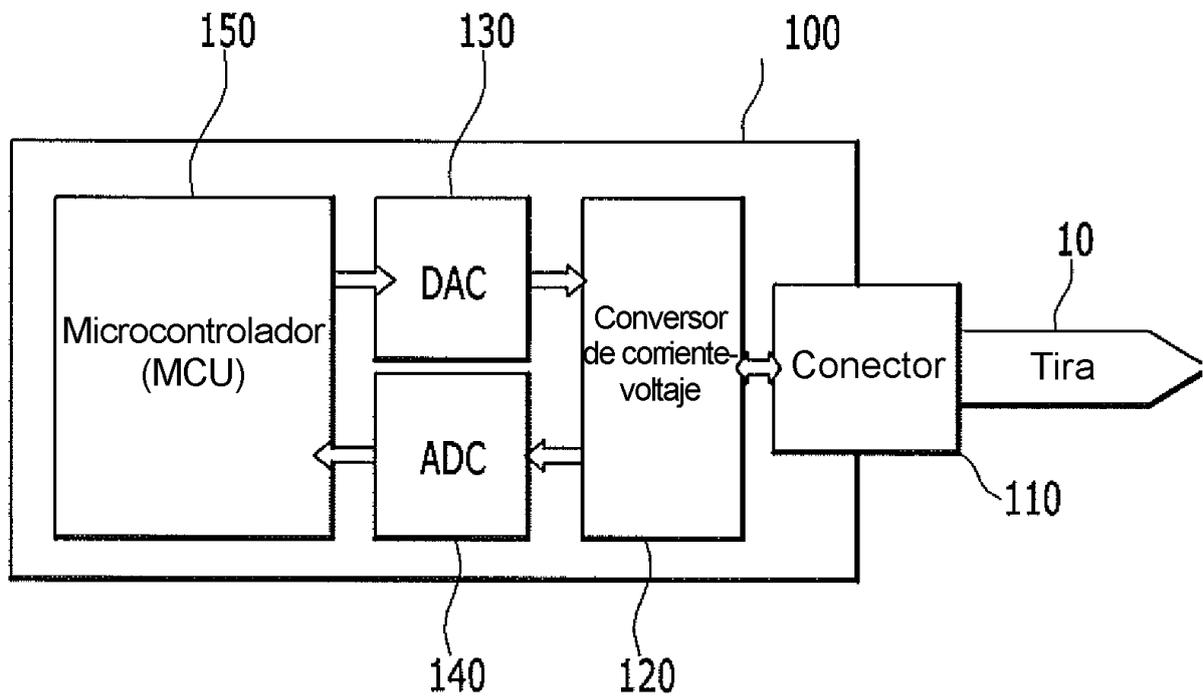


FIG. 6

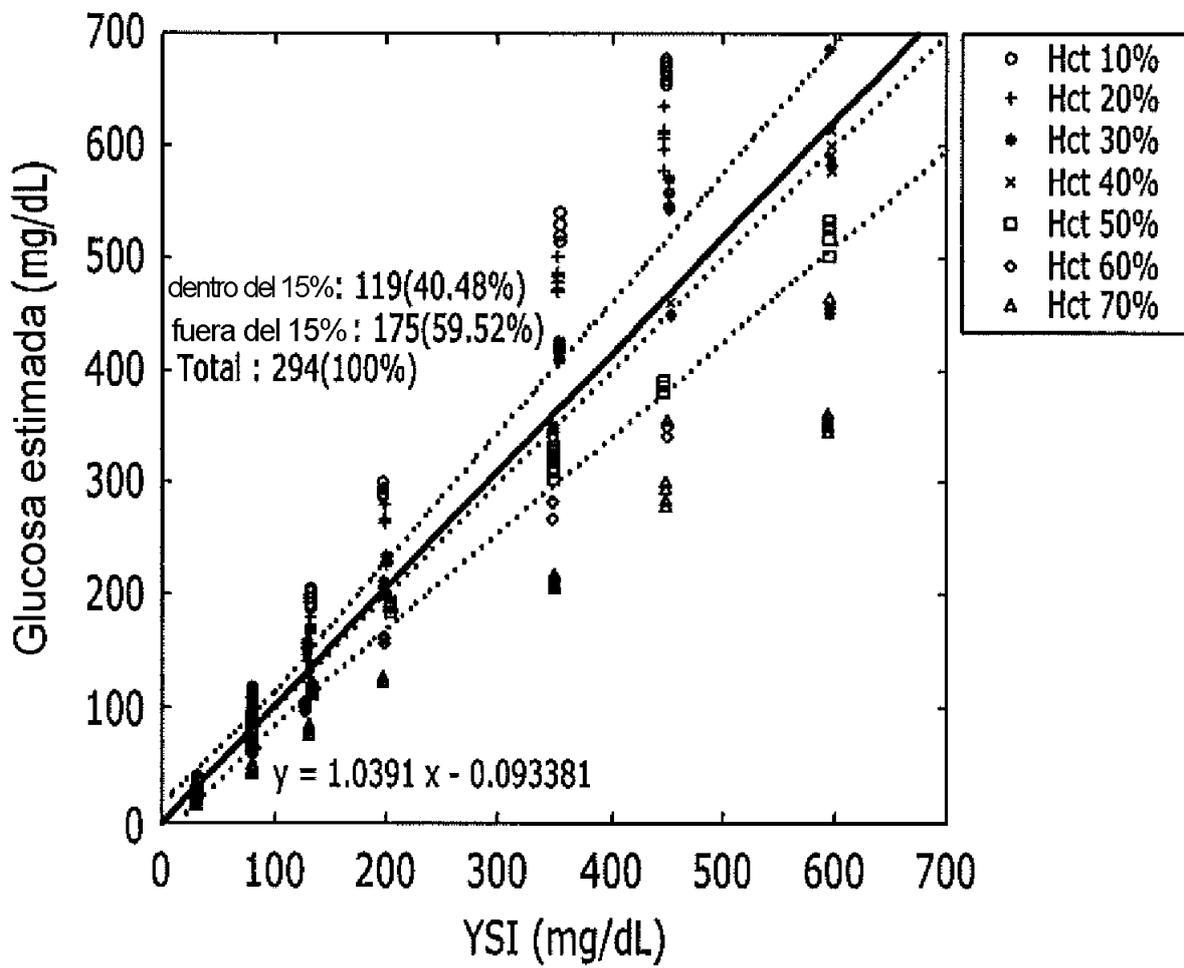


FIG. 7

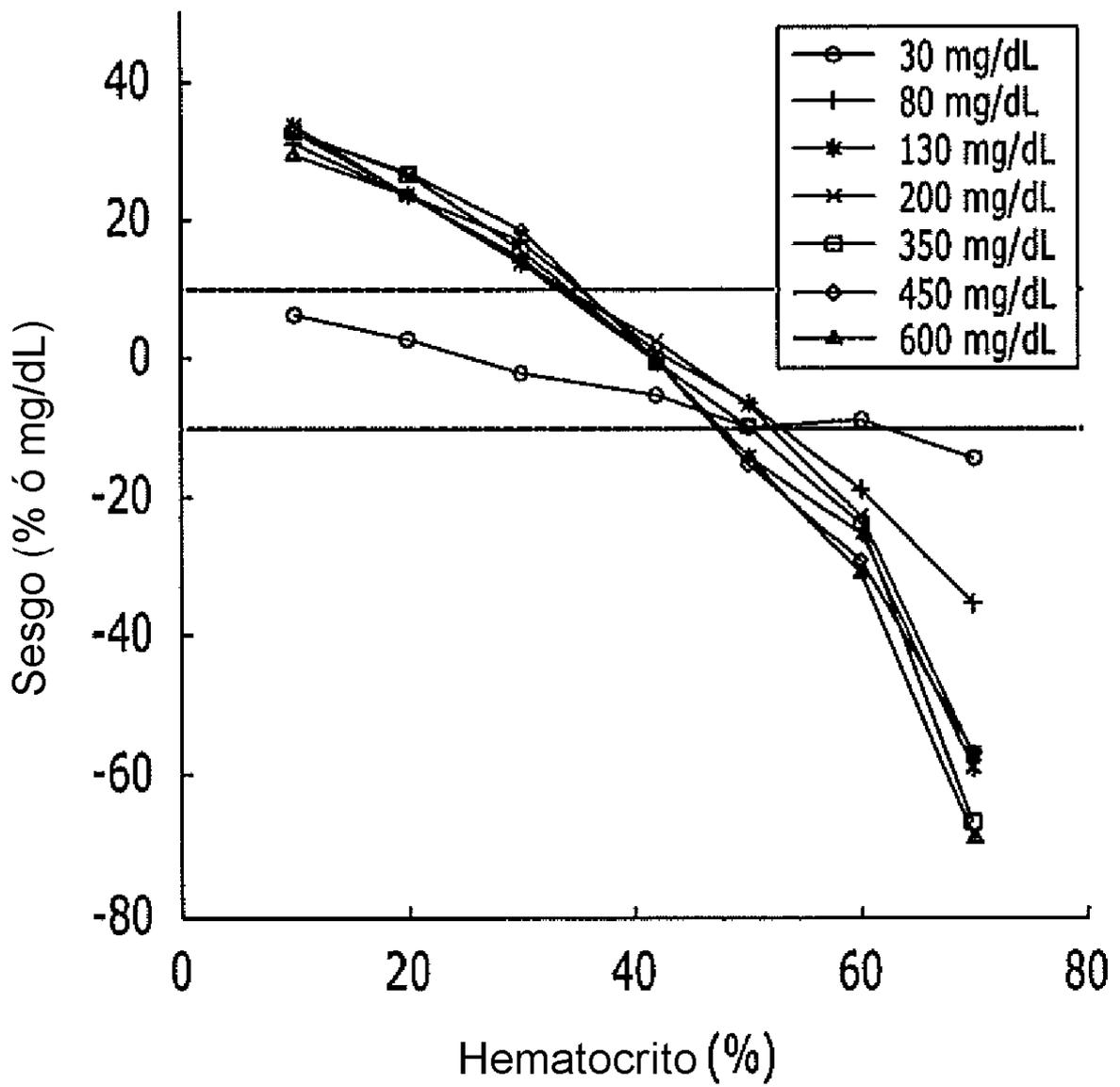


FIG. 8

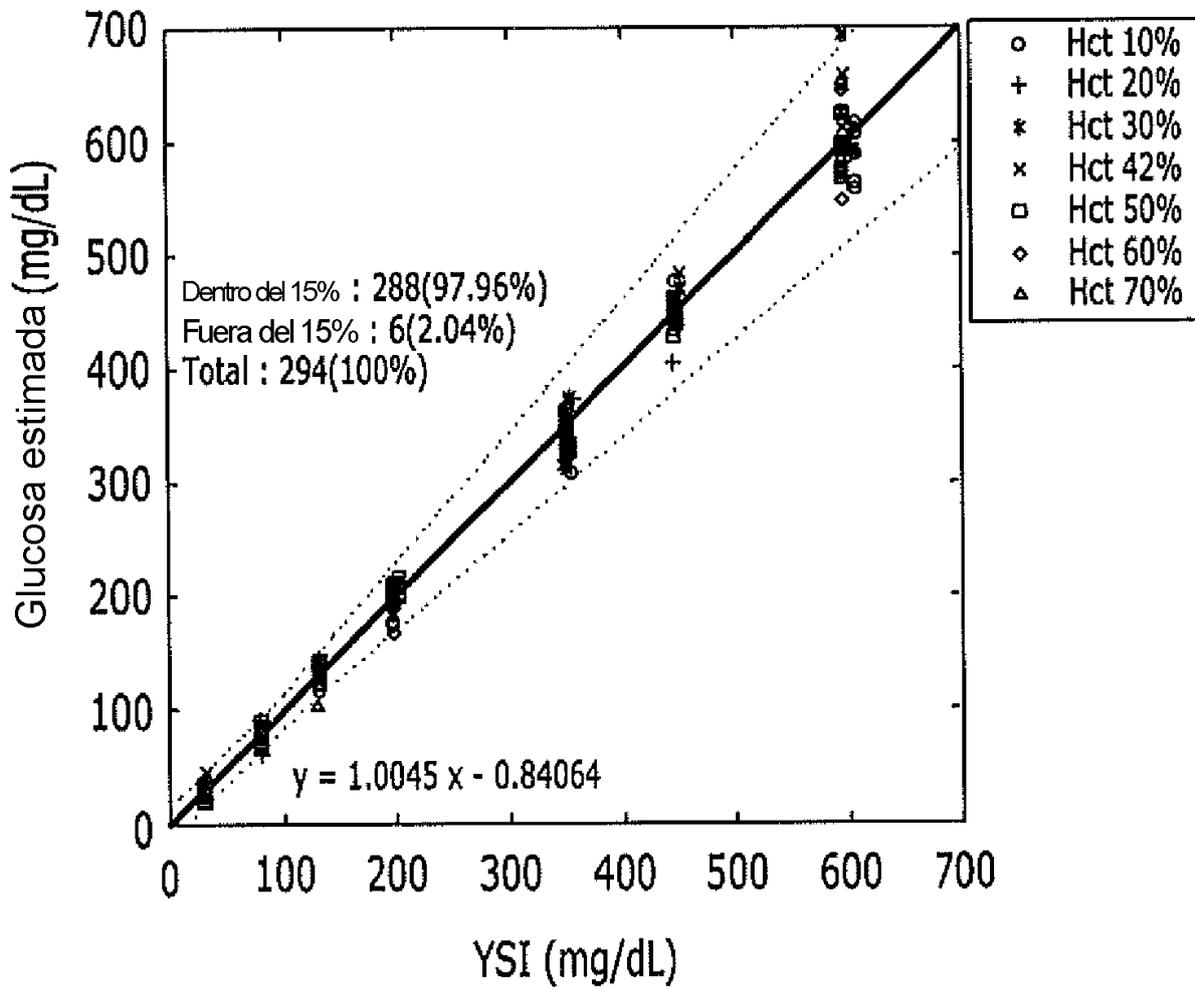


FIG. 9

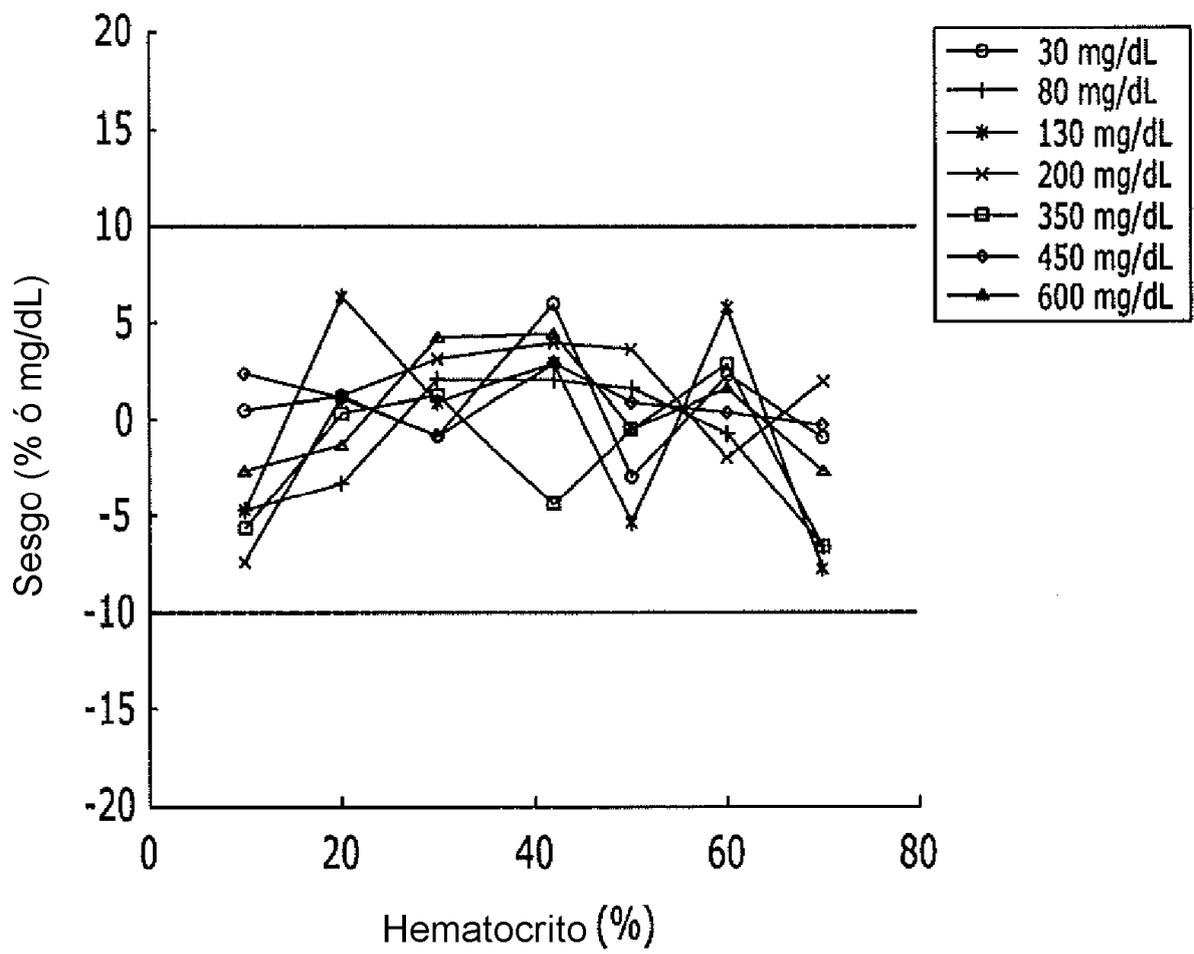


FIG. 10

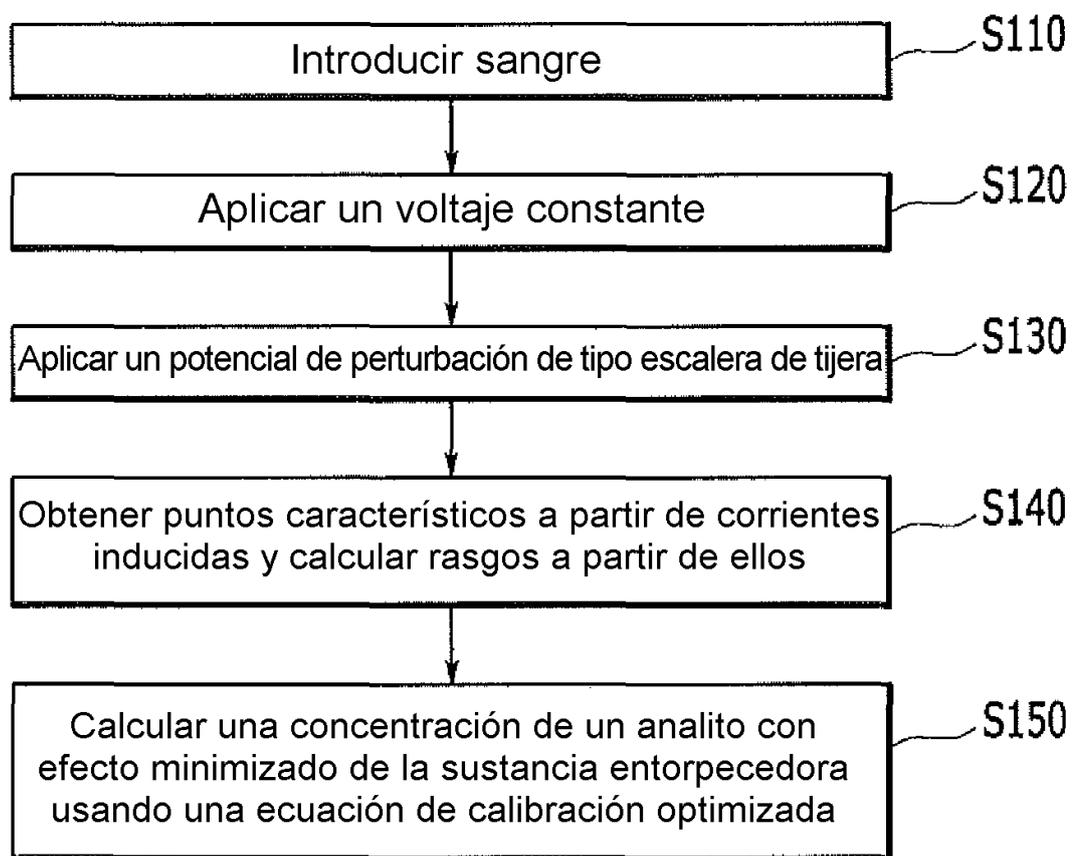


FIG. 11

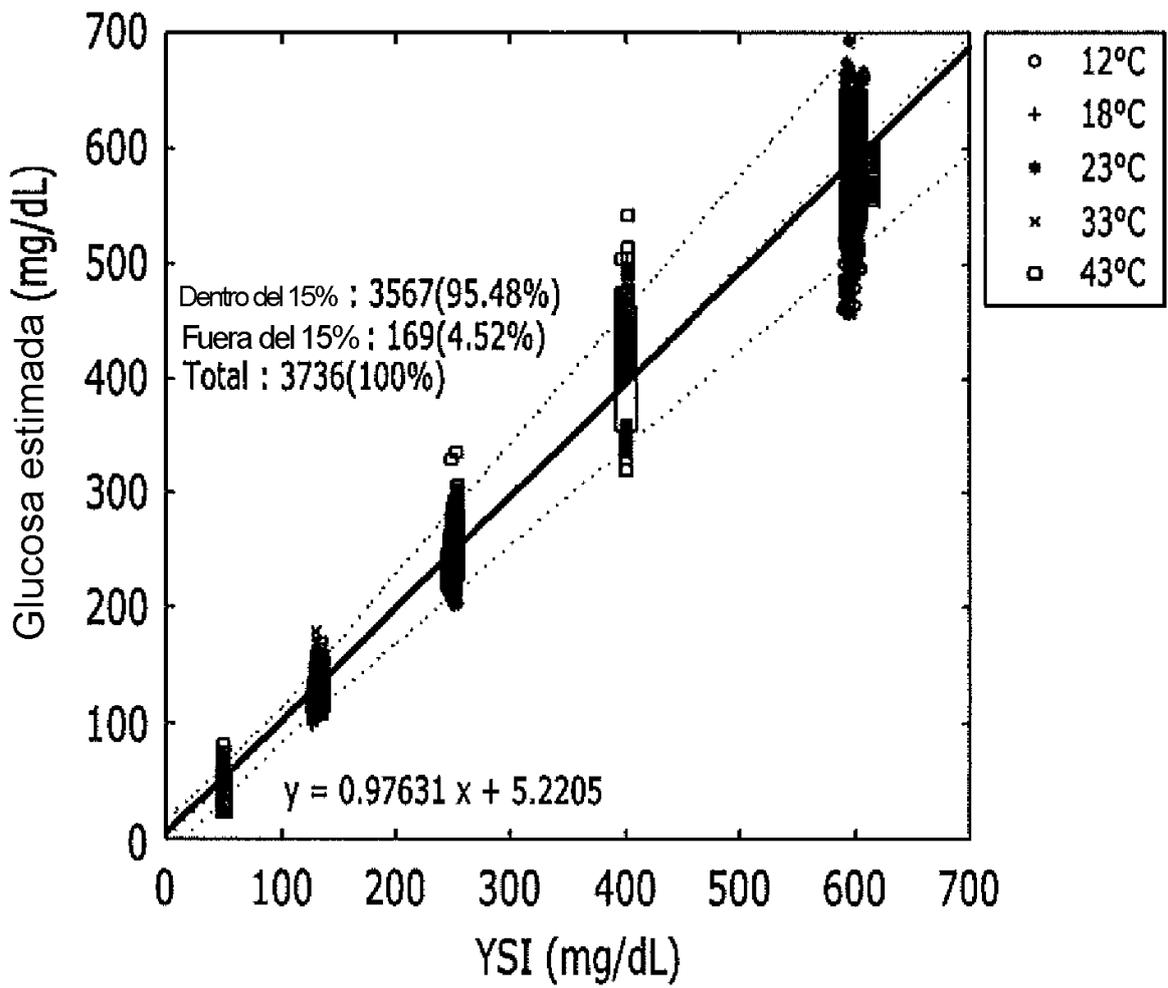


FIG. 12

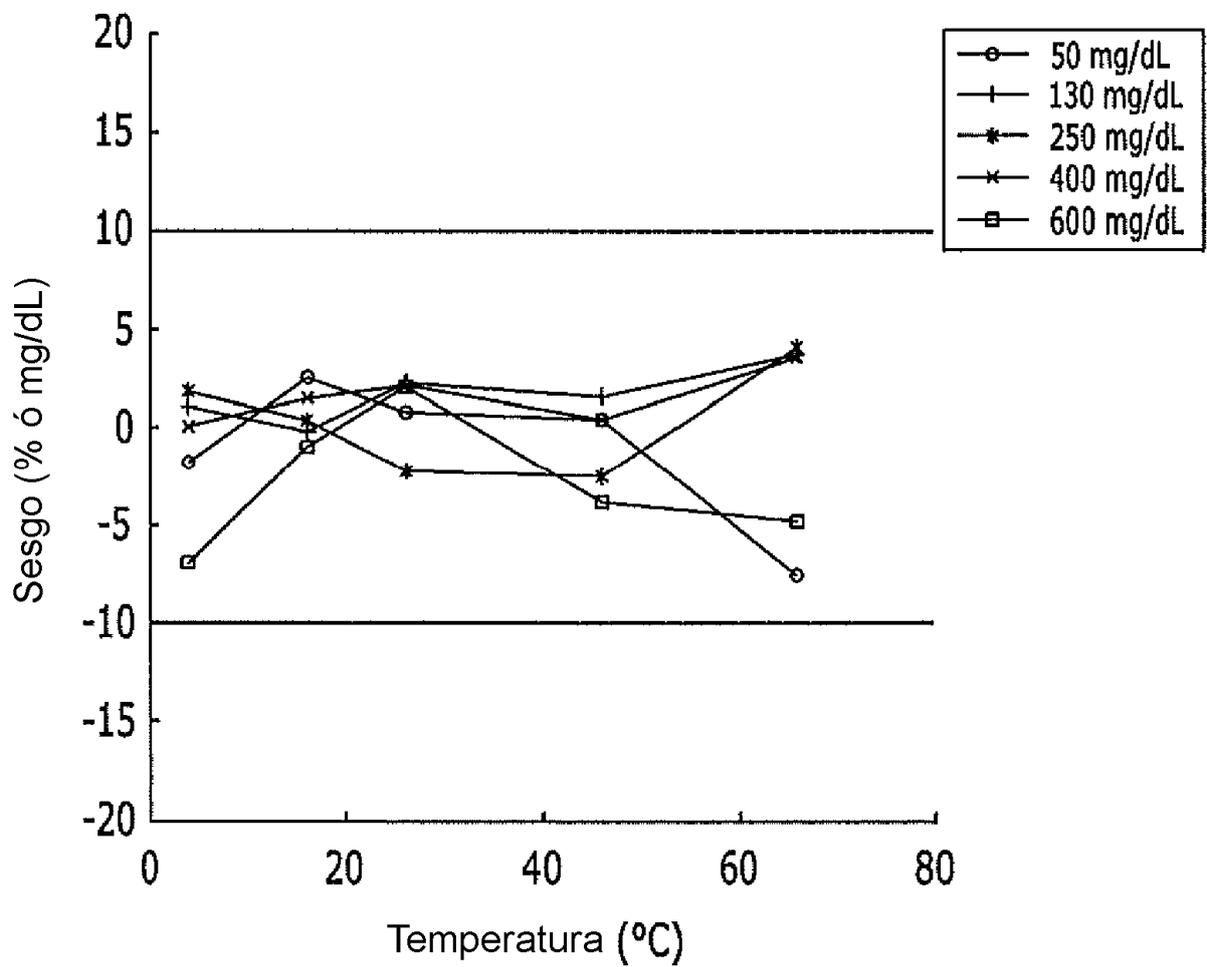


FIG. 13

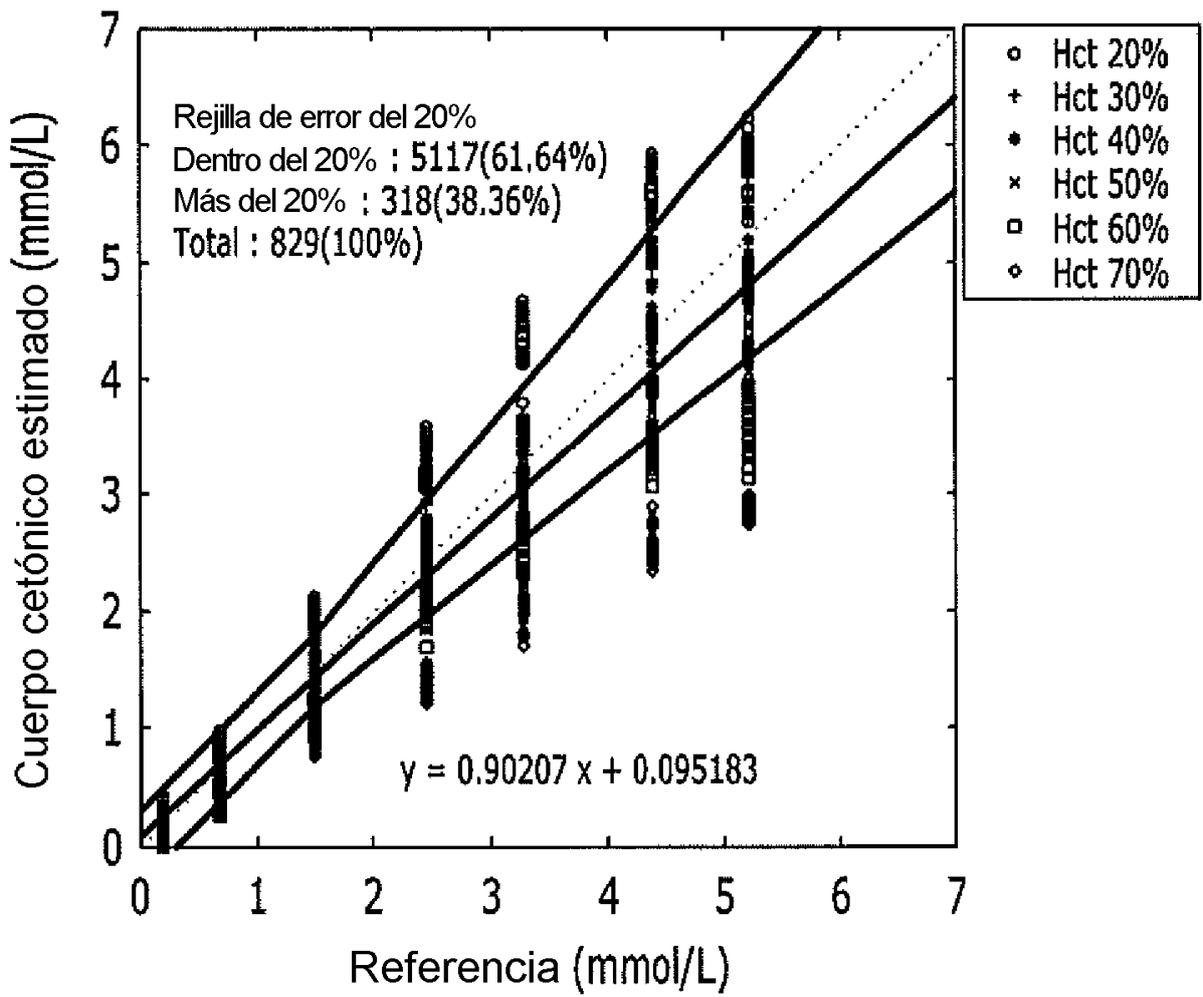


FIG. 14

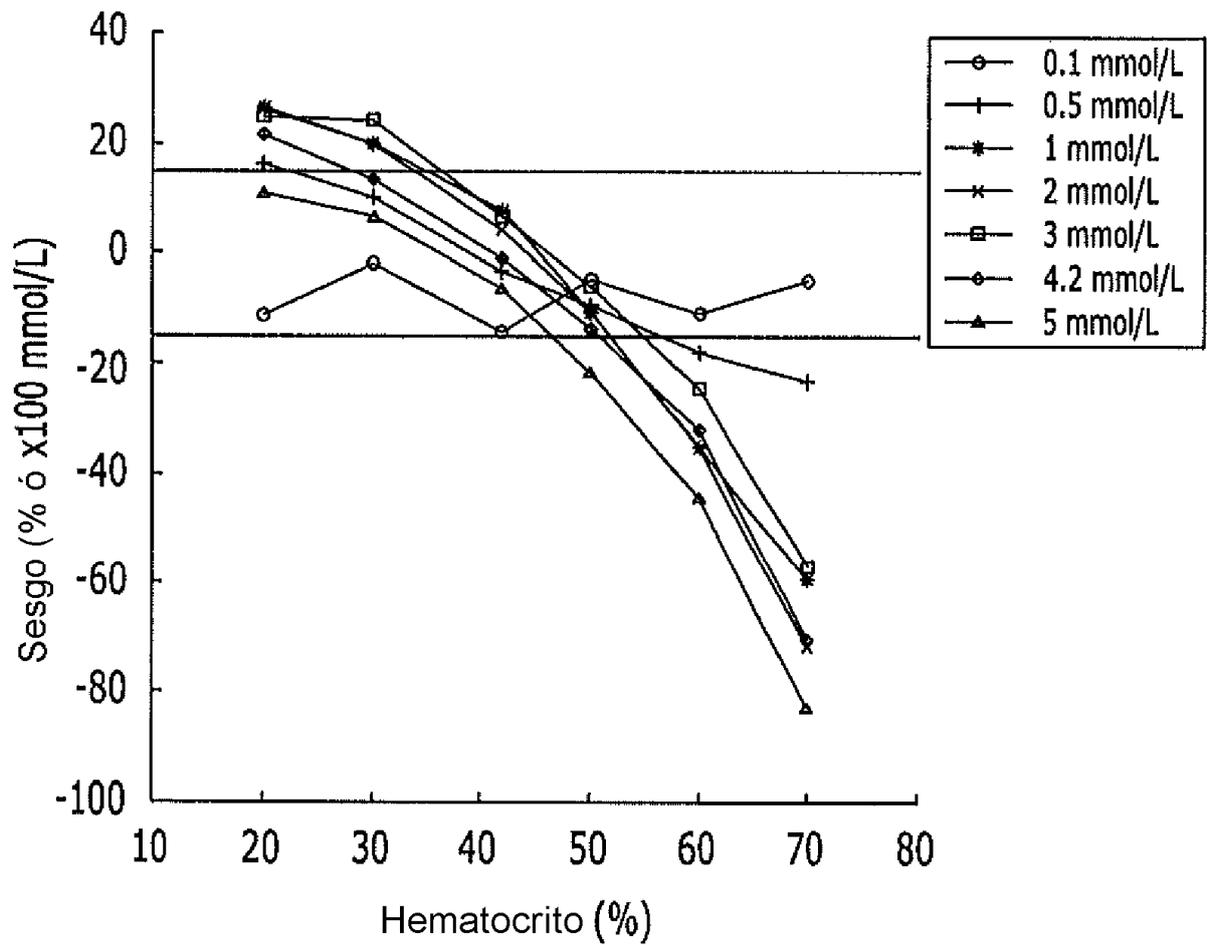


FIG. 15

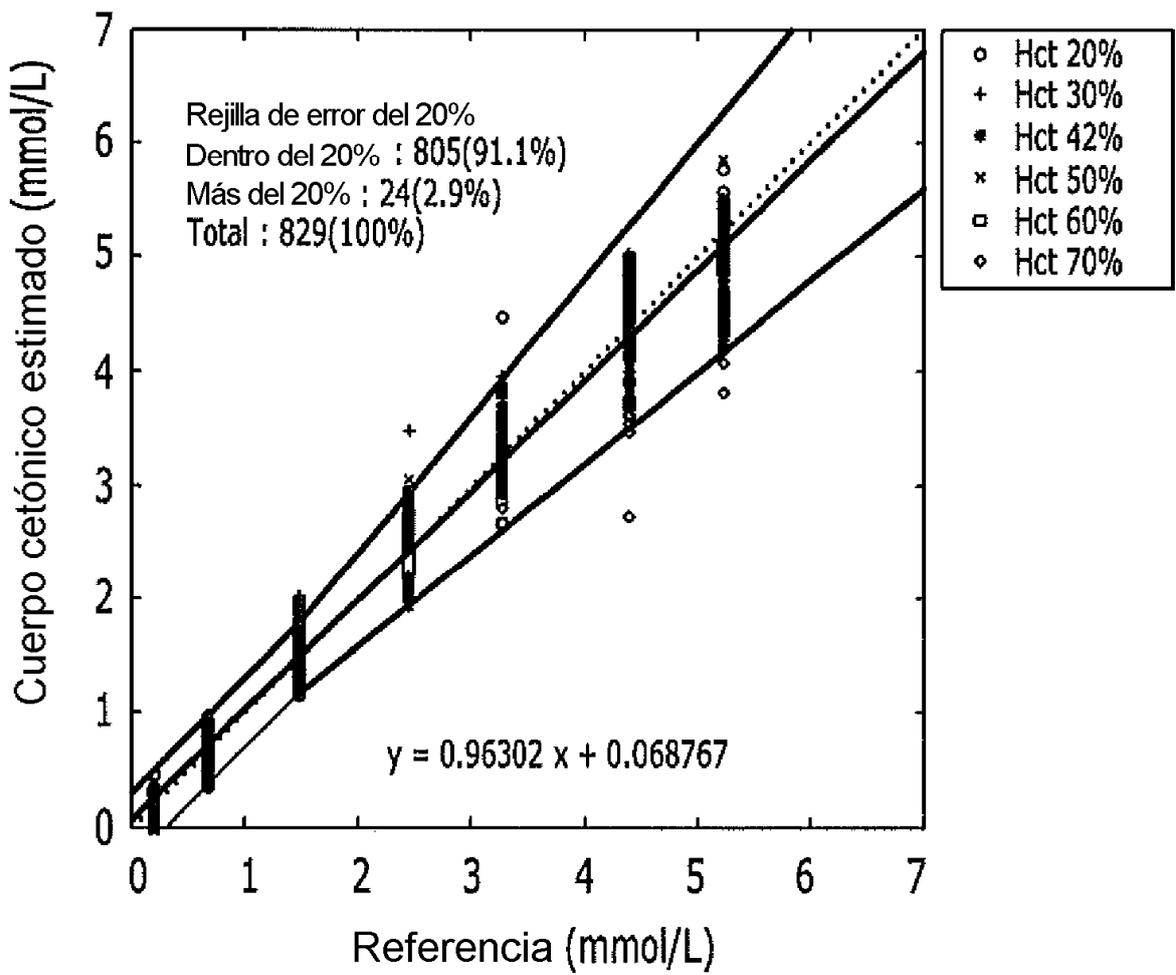


FIG. 16

