



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 597**

51 Int. Cl.:
G01N 27/403 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02759077 .7**
96 Fecha de presentación : **30.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456635**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Instrumentos analíticos, biosensores y métodos.**

30 Prioridad: **31.05.2001 US 872247**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Instrumentation Laboratory Company
101 Hartwell Avenue
Lexington, Massachusetts 02173, US**

72 Inventor/es: **Xu, Clarke;
Mansouri, Sohrab y
Cosofret, Vasile**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 316 597 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

Instrumentos analíticos, biosensores y métodos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los sensores electroquímicos, particularmente a los sensores de electrodo enzimático, y a la regeneración o mantenimiento de las propiedades funcionales de las membranas de dichos sensores.

10 **Antecedentes de la invención**

En diversas situaciones clínicas es importante medir ciertas características químicas de la sangre del paciente, tales como el pH, el hematocrito, la concentración iónica de calcio, potasio, cloruro, sodio, glucosa, lactato, creatinina, creatina, urea, la presión parcial de O₂ y CO₂ y similares. Estas situaciones varían desde una visita rutinaria de un paciente a la consulta de un médico hasta controlar a un paciente durante una operación quirúrgica a corazón abierto. La velocidad, precisión y otras características de rendimiento requeridas varían con cada situación.

Típicamente, los sistemas de sensor electroquímico que proporcionan un análisis químico de la sangre son máquinas autónomas o que están adaptadas para conectarse a una derivación extracorpórea o a una fuente de sangre *ex vivo* tal como una máquina corazón/pulmón usada para mantener a un paciente durante una operación quirúrgica. De esta manera, por ejemplo, pueden desviarse pequeñas muestras de ensayo de sangre *ex vivo* independientes de las líneas de flujo venoso o arterial de una máquina corazón/pulmón directamente a una cámara expuesta a un conjunto de microelectrodos que generan señales eléctricas proporcionales a las características químicas de la muestra de sangre que está fluyendo en tiempo real.

Los sistemas de sensor electroquímico son herramientas analíticas que combinan un componente de reconocimiento químico o bioquímico (por ejemplo, una enzima) con un transductor físico tal como un electrodo de platino. El componente de reconocimiento químico o bioquímico es capaz de interactuar selectivamente con un analito de interés y de generar, directa o indirectamente, una señal eléctrica a través del transductor. Los sistemas de sensor electroquímico desempeñan un papel cada vez mayor en la resolución de problemas analíticos y clínicos y encuentran aplicación en el campo del diagnóstico médico.

La selectividad de ciertos componentes de reconocimiento bioquímico hace posible desarrollar sensores electroquímicos que pueden detectar con precisión ciertos analitos biológicos incluso en una mezcla compleja de analitos tal como la sangre entera. A pesar del alto grado de selectividad de ciertos componentes de reconocimiento bioquímico, la selectividad de dichos sensores en su conjunto no puede verse comprometida de ninguna manera por la presencia de ciertos interferentes biológicos (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido úrico, acetaminofeno, cisteína, etc.) que pueden interactuar directamente con el transductor físico, si no se evita que lo hagan. La exactitud y precisión de los sistemas de sensor electroquímico con los compuestos de reconocimiento bioquímico pueden verse comprometidas también por los niveles residuales de analito que permanece en el sensor de una muestra anterior, lo que afecta al análisis de la siguiente muestra.

El documento US 6.214.185 describe un sensor enzimático que incluye una capa enzimática y una membrana de recubrimiento hecha de un copolímero de cloruro de polivinilo. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol. 6, N° 2, 1991, páginas 151-160, Geise R.J. *et al.* "Electropolymerized films to prevent interference and electrode fouling in biosensors" describen un sensor electroquímico que incluye un electrodo de carbono vítreo reticulado, metalizado, sobre el que se inmoviliza glucosa oxidasa. PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 0132, N° 1 0 (P-872), 17 de mayo de 1989 (1989-05-17); y el documento JP 01 028555A describen un sensor enzimático que incluye una película de acetato de celulosa y una capa de enzima inmovilizada.

El documento US 5540828 describe un método para preparar un elemento sensor para usarlo como biosensor. El método implica sumergir un electrodo en una solución de monómero, electropolimerizar el monómero para formar un recubrimiento polimérico sobre la superficie del electrodo e impregnar el recubrimiento polimérico con un agente sensor enzimático. El electrodo se construye en un cartucho que se monta después en una carcasa o un cuerpo junto con un electrodo de referencia en un dispositivo de celda de flujo. La electropolimerización puede realizarse *in situ*. De esta manera, el documento US 5540828 constituye la técnica anterior más cercana para evaluar la novedad y la etapa inventiva.

60 **Sumario de la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema y un método para aumentar la exactitud y el periodo de validez eficaz de un sensor electroquímico. La polimerización de monómeros electropolimerizables en una membrana polimérica interna sobre el sensor electroquímico forma una membrana de rechazo de interferencias. Esta membrana polimérica interna funciona para proteger al sensor electroquímico frente a la contaminación o a la interferencia de los compuestos presentes en la muestra y, de esta manera, aumenta la exactitud que se había perdido por la degradación debida a la contaminación de la membrana o por interferencia con los compuestos analitos de la muestra.

ES 2 316 597 T3

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de sensor electroquímico como se define en las indicaciones adjuntas.

5 La capa externa de la membrana compuesta puede incluir un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en compuestos basados en poliuretano, compuestos basados en polivinilo, compuestos basados en un elastómero de silicona y compuestos basados en policarbonato. En una realización, la capa enzimática del sensor electroquímico incluye una enzima que genera H_2O_2 , tal como glucosa oxidasa o lactato oxidasa, por ejemplo. En otra realización, la capa enzimática incluye una o una combinación de varias enzimas, tal como una mezcla de glucosa oxidasa, lactato oxidasa, creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa. En una realización, el sensor electroquímico incluye adicionalmente una superficie restaurada de la capa interna, siendo restaurada la superficie por un monómero polimerizado. La capa interna del sensor electroquímico puede incluir un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos.

15 En un ejemplo, el cartucho sensor electroquímico puede incluir al menos un depósito para la solución de calibrado en comunicación fluida con la tarjeta sensora electroquímica. En otro ejemplo, la solución de monómero electropolimerizable puede combinarse con la solución de calibrado en un solo depósito. En otro ejemplo, el cartucho sensor electroquímico puede incluir una solución de monómero electropolimerizable en la solución de calibrado, entando la concentración de monómero en el intervalo de aproximadamente 1-100 mM.

20 Como se describe en este documento, al menos uno de los sensores electroquímicos del cartucho sensor electroquímico comprende un sensor de electrodo enzimático. El sensor electroquímico del cartucho sensor electroquímico puede formarse sobre un electrodo compuesto por un material seleccionado entre un grupo que consiste en platino, oro, carbono o una de sus estructuras modificadas. En otra realización el sensor electroquímico incluye un monómero electropolimerizable seleccionado entre un grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos. El sensor electroquímico puede ser selectivo para un ión hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ión sodio, ión potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea.

30 Como se describe en este documento, el sistema de sensor electroquímico incluye una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos un sensor electroquímico, incluyendo el sensor electroquímico al menos una membrana polimérica. El sistema de sensor electroquímico puede incluir también un aparato sensor electroquímico que está en contacto eléctrico con la tarjeta sensora electroquímica. El aparato sensor electroquímico está configurado para medir señales eléctricas desde la tarjeta sensora electroquímica y es capaz de proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico para polimerizar la solución de monómero electropolimerizable a la membrana polimérica. El sistema de sensor electroquímico incluye también un depósito que contiene una solución de monómero electropolimerizable en comunicación fluida con la tarjeta sensora electroquímica. La solución de monómero electropolimerizable puede polimerizarse a la membrana polimérica mediante el potencial eléctrico proporcionado por el aparato sensor electroquímico.

40 El cartucho sensor electroquímico incluye una tarjeta sensora electroquímica que incluye, al menos, una membrana compuesta. En otra realización, el cartucho sensor electroquímico incluye una membrana compuesta con una capa interna restaurable.

50 En una realización, el sistema de sensor electroquímico incluye adicionalmente una solución de calibrado en un depósito en combinación con una solución de monómero electropolimerizable. La concentración de la solución de monómero electropolimerizable está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mM. En otra realización, el sistema de sensor electroquímico incluye al menos un sensor de electrodo enzimático. El sistema de sensor electroquímico puede incluir un sensor electroquímico que sea selectivo para un compuesto seleccionado entre un grupo que consiste en ión hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ión sodio, ión potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea.

55 Como se describe en este documento, el sistema de sensor electroquímico puede incluir un monómero electropolimerizable que se selecciona entre un grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos, siendo la concentración de la solución de monómero electropolimerizable en la solución de calibrado de 1-100 mM. En otra realización, el sistema de sensor electroquímico incluye un aparato sensor electroquímico capaz de proporcionar un potencial eléctrico al menos para la retirada parcial de los agentes que interfieren en la membrana polimérica. El sistema de sensor electroquímico puede incluir adicionalmente una membrana externa y una capa enzimática, estando la capa enzimática en contacto con la membrana externa y con la membrana polimérica.

60 En este documento se describe adicionalmente un método para acelerar la recuperación del sensor electroquímico durante el proceso de enjuagado después de la exposición a una muestra, de manera que el tiempo de recuperación del sistema de sensor electroquímico se realice en un periodo de tiempo más corto. La reducción del tiempo de recuperación se consigue retirando los agentes interferentes de la capa de membrana polimérica. La concentración residual de los sustratos para la reacción enzimática y los productos de la reacción enzimática después de la exposición del sensor electroquímico a una muestra, son ejemplos de agentes interferentes. Otro ejemplo de agente interferente es la concentración residual del monómero electropolimerizable en la membrana polimérica después de la exposición del sensor electroquímico a la solución de monómero electropolimerizable.

ES 2 316 597 T3

La retirada de los agentes interferentes de una membrana polimérica se realiza proporcionando un sensor electroquímico que incluye un electrodo y una membrana compuesta, incluyendo la membrana compuesta al menos una membrana polimérica, una fuente eléctrica en contacto eléctrico con dicho electrodo y aplicando al electrodo un potencial eléctrico suficiente para provocar la retirada de al menos una parte de los agentes interferentes presentes en la membrana polimérica en contacto con el electrodo. En un ejemplo, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos. En otro ejemplo, el potencial eléctrico es de aproximadamente 0,4 V frente al electrodo de referencia interno y se aplica durante aproximadamente 50 segundos.

En este documento se describe también un método para restaurar las propiedades funcionales de un sensor electroquímico. El método incluye proporcionar un sistema electroquímico, que incluye una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos un sensor electroquímico. El sensor electroquímico incluye un electrodo y una membrana compuesta, incluyendo la membrana compuesta al menos una membrana polimérica. El sistema de sensor electroquímico incluye también un aparato sensor electroquímico en contacto eléctrico con la tarjeta sensora electroquímica. El aparato sensor electroquímico está configurado para medir las señales eléctricas desde la tarjeta sensora electroquímica y proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico. El sistema de sensor electroquímico incluye también un depósito que contiene un monómero electropolimerizable en una solución en comunicación fluida con la tarjeta sensora electroquímica. La solución de monómero electropolimerizable se polimeriza a la membrana polimérica mediante el potencial eléctrico proporcionado por el aparato sensor electroquímico. El método para restaurar las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye también poner en contacto el sensor electroquímico con la solución y aplicar un potencial eléctrico de suficiente potencia y suficiente duración para provocar que al menos una parte del monómero electropolimerizable presente en la solución se polimerice sobre la membrana polimérica.

En un ejemplo, el método para restaurar las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye añadir el monómero electropolimerizable a una solución de calibrado para formar una solución de monómero electropolimerizable. En el ejemplo, el potencial eléctrico comprende un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora. En otro ejemplo, el potencial eléctrico comprende aproximadamente 0,5 V frente a un electrodo de referencia interno y se aplica durante aproximadamente 3 minutos.

En un ejemplo, el método para restaurar las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye adicionalmente la etapa de aplicar un potencial eléctrico adicional de suficiente potencia y suficiente duración al electrodo para provocar la retirada de al menos una parte de los agentes interferentes que están presentes en la membrana polimérica. En un ejemplo, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos.

Se describe adicionalmente un método para restaurar las propiedades funcionales de un cartucho sensor electroquímico. El método incluye las etapas de conectar un cartucho sensor electroquímico, que incluye un sensor electroquímico, a un aparato sensor electroquímico. El sensor electroquímico incluye un electrodo y una membrana compuesta, que incluye al menos una membrana polimérica. El método incluye adicionalmente poner en contacto el sensor electroquímico con una solución de monómeros electropolimerizables del cartucho y aplicar un potencial eléctrico de suficiente potencia y suficiente duración para provocar que al menos una parte de la solución de monómero electropolimerizable se polimerice sobre una membrana polimérica. En un ejemplo, el método incluye adicionalmente añadir un monómero electropolimerizable a una solución de calibrado para formar la solución de monómero electropolimerizable. En un ejemplo particular, se aplica un potencial eléctrico en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno. El potencial eléctrico puede aplicarse durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora. En un ejemplo, el método incluye también aplicar un potencial eléctrico adicional de suficiente potencia y suficiente duración al electrodo para provocar la retirada de al menos una parte de los agentes interferentes que están presentes en la membrana polimérica. En un ejemplo, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos.

Se describe adicionalmente una membrana compuesta para un biosensor. El biosensor incluye una capa de membrana interna, una capa de membrana externa y una capa enzimática. La capa enzimática incluye una matriz que incluye al menos una enzima, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático. En un ejemplo, la membrana compuesta incluye una o más de las enzimas lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatininas.

Se describe adicionalmente una matriz para un sensor enzimático. La matriz incluye lactato oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático. En un ejemplo, la matriz forma una matriz reticulada de proteínas que tienen actividad enzimática. La matriz puede formar un electrodo electroquímico. La matriz puede incluir también albúmina de suero bovino. Pueden incluirse también otras proteínas inertes similares a la albúmina de suero bovino. En otro ejemplo, uno o más de los agentes de reticulación presentes en la matriz pueden incluir un dialdehído, por ejemplo, glutaraldehído, un diisocianato, por ejemplo, 1,4-diisocianatobutano y un diepóxido, por ejemplo, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano. En otro ejemplo, el agente de reticulación presente en la matriz es glutaraldehído al 1-10% en peso. En otro ejemplo más, el agente de reticulación presente en la matriz es glutaraldehído al 5% en peso. En otro ejemplo, el estabilizador enzimático presente en la matriz puede incluir uno o más de los compuestos polietilenimina, polipropilenoimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisisina, protamina y sus derivados. En otro ejemplo, el estabilizador enzimático presente en la matriz es polietilenimina

ES 2 316 597 T3

al 1-20% en peso. En otro ejemplo, el estabilizador enzimático presente en la matriz es polietilenimina al 5% en peso.

5 Se describe adicionalmente una matriz para un sensor enzimático que incluye creatinasa, sarcosina oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático. En un ejemplo la matriz incluye también creatininas. En un ejemplo, la matriz forma una matriz reticulada de proteínas que tienen actividad enzimática. El sensor enzimático puede formar un sensor electroquímico. En otro ejemplo, uno o más de los agentes de reticulación presentes en la matriz pueden incluir un dialdehído, por ejemplo, glutaraldehído, un diisocianato, por ejemplo, 1,4-diisocianatobutano, un diepóxido, por ejemplo, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano. En otro ejemplo, el agente de reticulación presente en la matriz es glutaraldehído al 1-10% en peso. En otro ejemplo, el agente de reticulación presente en la matriz es glutaraldehído al 5% en peso. En otro ejemplo, el estabilizador presente en la matriz puede incluir uno o más de los compuestos polietilenimina, polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados. En otro ejemplo, el estabilizador enzimático presente en la matriz es polietilenimina al 1-20% en peso. En otro ejemplo, el estabilizador enzimático presente en la matriz es polietilenimina al 5% en peso.

Se describe una matriz para un sensor enzimático que incluye una o más de las enzimas lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatininas, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático.

20 Estos y otros objetos, junto con las ventajas y características de la presente invención descritas en este documento, resultarán evidentes al hacer referencia a la siguiente descripción, los dibujos adjuntos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

25 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la presente invención descrita en este documento, así como la propia invención, se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas y las reivindicaciones, cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Los dibujos no están necesariamente a escala, en lugar de ello generalmente se hace énfasis en la ilustración de los principios de la invención.

30 La Figura 1 es un diagrama esquemático de los componentes de un aparato sensor electroquímico que incluye un cartucho sensor con un conjunto de sensores y un bloque térmico para la hidratación acelerada y el calibrado de los sensores.

35 La Figura 2 ilustra una vista frontal inversa de la tarjeta sensora, parcialmente fragmentada, de una realización del cartucho de la invención.

Las Figuras 3A-B ilustran vistas en sección transversal de un sensor enzimático.

40 La Figura 4 ilustra una realización de un sensor de pO_2 .

La Figura 5 ilustra una vista frontal de la tarjeta del electrodo contenida en una realización del cartucho.

La Figura 6 ilustra vistas en sección transversal de un sensor de iones.

45 Las Figuras 7A-G ilustran los componentes de un ensamblaje del bloque térmico.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención proporciona sistemas de sensor electroquímico para medir las características de muestras acuosas incluyendo, aunque sin limitación, sangre, suero u otros fluidos corporales. Específicamente, la invención se refiere a dichos sensores en los que los electrodos incluyen una membrana de rechazo de interferencias, que es la membrana polimérica interna de la membrana compuesta y puede renovarse *in situ*. Los sistemas de sensor electroquímico de acuerdo con la invención tienen una mayor exactitud y precisión y un mayor periodo de validez eficaz. En las realizaciones preferidas de la invención, el sistema de sensor está adaptado para medir la concentración o actividad de ciertos gases en la sangre (por ejemplo, oxígeno y dióxido de carbono), iones (por ejemplo, sodio, cloruro, potasio y calcio), glucosa, lactato, creatina, creatinina, pH de la sangre y hematocrito.

Definiciones

60 Para señalar y describir más claramente y de forma más concisa el asunto que el solicitante considera la invención, se proporcionan las siguientes definiciones para ciertos términos usados en la siguiente descripción y en las reivindicaciones.

65 Como se usa en este documento el término "electrodo" se refiere a un componente de un dispositivo electroquímico que constituye la interfaz entre el conductor eléctrico externo y el medio iónico interno. El medio iónico interno, típicamente, es una solución acuosa con sales disueltas. El medio puede comprender también proteínas en una matriz estabilizadora.

ES 2 316 597 T3

Los electrodos son de tres tipos, electrodos de trabajo o indicadores, electrodos de referencia y contraelectrodos. Un electrodo de trabajo o indicador mide una especie química específica, tal como un ión. Cuando los potenciales eléctricos se miden mediante un electrodo de trabajo, el método se denomina potenciometría. Todos los electrodos selectivos de iones funcionan por potenciometría. Cuando la corriente se mide mediante un electrodo de trabajo, el método se denomina amperometría. La medición de oxígeno se realiza por amperometría. Los electrodos de trabajo pueden funcionar también incluyendo una enzima como parte de una capa enzimática que es parte de una capa compuesta que está en contacto próximo con el electrodo. Las enzimas, que son específicas para un analito particular, producen peróxido de hidrógeno, un subproducto de la reacción catalítica de la enzima sobre el analito. El peróxido de hidrógeno lo detecta el electrodo y se convierte en una señal eléctrica. Un electrodo de referencia sirve como punto de referencia eléctrico en un dispositivo electroquímico contra el que se miden y controlan los potenciales eléctricos. En un ejemplo, los electrodos de referencia están formados por plata-nitrato de plata. Otros tipos de electrodos de referencia son mercurio-cloruro mercurioso-cloruro de potasio o plata-cloruro de plata-cloruro potásico. Un contraelectrodo actúa como sumidero para la trayectoria de la corriente.

Como se usa en este documento, el término “sensor” es un dispositivo que responde a las variaciones en la concentración de una especie química dada, tal como glucosa o lactato, en una muestra, tal como una muestra de fluido corporal. Un sensor electroquímico es un sensor que funciona basándose en un principio electroquímico y requiere al menos dos electrodos. Para las mediciones selectivas de iones, estos dos electrodos incluyen un electrodo selectivo de iones y un electrodo de referencia. Los electrodos enzimáticos amperométricos adicionalmente requieren un tercer electrodo, un contraelectrodo. Además, los sensores enzimáticos basados en dos electrodos, un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, también son habituales.

Como se usa en este documento, la expresión “electrodo selectivo de iones” generalmente se refiere a un cable de plata recubierto con cloruro de plata en contacto con una solución tampón que contiene una concentración de cloruro (la solución interna). La solución tampón se cubre con una membrana polimérica selectiva de iones que está en contacto con la solución de ensayo. La membrana selectiva de iones típicamente consiste en un PVC de alto peso molecular, un plastificante, un ionóforo específico para un ión particular y una sal borato. La superficie de la membrana polimérica está en contacto con la muestra de ensayo en un lado y con la solución tampón interna en el otro lado de la membrana.

Como se usa en este documento, la expresión “sensor electroquímico seco” se refiere al electrodo selectivo de iones, descrito anteriormente, y a un electrodo de referencia, descrito anteriormente. En el ejemplo de “químico seco” los electrodos selectivos de iones tienen la misma configuración descrita anteriormente, sin embargo, la solución interna que contiene cloruro está seca, es decir, deshidratada, dejando una capa de sal seca. Para que funcione como un sensor electroquímico, la sal seca debe solubilizarse en agua para obtener una solución tampón.

Como se usa en este documento, la expresión “electrodo enzimático” generalmente se refiere a una membrana compuesta depositada sobre un electrodo metálico, que comprende platino, por ejemplo. La membrana compuesta está formada al menos por tres capas distintas que incluyen una membrana polimérica externa sobre el lado de la membrana compuesta en contacto con la muestra que forma una capa protectora, una capa enzimática media que está localizada entre las capas externa e interna y una membrana polimérica interna más cerca del electrodo metálico que forma la membrana interna de rechazo de interferencias. La membrana polimérica externa, que está compuesta por uno o más compuestos poliméricos, generalmente funciona para proteger y mantener la estructura de la capa enzimática media y para controlar la difusión del analito hacia la capa enzimática media. La capa media o enzimática comprende al menos una especie proteica con actividad enzimática. La actividad enzimática pueden proporcionarla también compuestos que incluyen ADN, ARN y carbohidratos, por ejemplo. La enzima se estabiliza en una matriz conductora para la actividad de la enzima. La membrana interna o de rechazo de interferencias es una membrana polimérica que funciona para aislar el electrodo de cable de los compuestos de la muestra que interfieren con el funcionamiento y la exactitud del electrodo.

Como se usa en este documento, el término “hidratación” se refiere al proceso de solubilizar las sales de la capa de sal interna de un sensor haciendo pasar agua a través de la membrana polimérica externa selectiva de iones uniendo un lado de la capa de sal interna a la capa de sal interna para formar una solución. La hidratación normalmente puede conseguirse por el mero contacto del exterior de la membrana polimérica y la solución de sal interna con una solución acuosa de sal durante una duración requerida.

Como se usa en este documento, la “ciclación térmica” es el proceso mediante el cual la temperatura de un sensor electroquímico, empapado en una solución acuosa de sal, se sube a una temperatura elevada especificada durante una cantidad de tiempo especificada y después se baja.

Como se usa en este documento, el término “calibrado” se refiere al proceso mediante el cual las características de respuesta de un sensor a un analito específico se determinan cuantitativamente. Para calibrar un sensor, el sensor se expone a al menos dos muestras de reactivo, teniendo cada una de las muestras de reactivo una concentración diferente conocida de un analito. Las respuestas, es decir, las señales medidas por el sensor, respecto a las concentraciones del analito en las dos muestras de reactivo diferentes, sirven como puntos de referencia para las mediciones del analito en muestras que tienen concentraciones desconocidas del analito.

ES 2 316 597 T3

Haciendo referencia a la Figura 1, el sistema sensor electroquímico 8 emplea un ensamblaje del sensor, indicado de forma general como 10, que incorpora una pluralidad de electrodos adaptados para realizar mediciones eléctricas en una muestra, tal como una muestra de sangre, introducida en el ensamblaje del sensor 10. Las muestras de sangre que tiene que analizar el sistema se introducen a través de la entrada de muestra 13a. Las muestras de sangre se obtienen por ejemplo por flebotomía o se obtienen en una base periódica a partir de un circuito de flujo sanguíneo extracorpóreo conectado a un paciente, por ejemplo, durante una operación quirúrgica a corazón abierto. Las muestras de sangre pueden introducirse hacia la entrada de muestra 13a a través de otros medios automáticos o, manualmente, mediante una jeringuilla. Las muestras de sangre pueden introducirse en forma de muestras discretas.

El sistema electroquímico 8, que incluye numerosos de los componentes esenciales descritos hasta ahora en este documento, está contenido en un cartucho desechable 37. Un cartucho de un tipo similar se explica en detalle en la Patente de Estados Unidos N° 4.734.184.

En un ejemplo, el sistema de sensor electroquímico 8 incorpora en el cartucho 37 al menos dos recipientes pre-ensados 14 y 16, cada uno de los cuales contiene una solución acuosa de calibrado que tiene valores conocidos de los parámetros que va a medir el sistema. Con fines de referencia, la solución contenida dentro del recipiente pre-ensado 14 se denominará Solución de Calibrado A, la solución contenida dentro del recipiente pre-ensado 16 se denominará Solución de Calibrado B. En otro ejemplo, el sistema electroquímico 8 ilustrado en la Figura 1 incluye un tercer recipiente pre-ensado 23 que contiene la solución de calibrado AO. Cada uno de los envases pre-ensados 14, 16 y 23 contiene una cantidad suficiente de su solución de calibrado para permitir que el sistema se calibre un número sustancial de veces antes de que el recipiente pre-ensado quede vacío. Cuando se vacía uno o más de los recipientes 14, 16 y 23 que contienen las soluciones de calibrado, el cartucho que contiene los recipientes pre-ensados 14, 16 y 23 debe sustituirse.

En un ejemplo particular, la Solución de Calibrado AO contiene un monómero electropolimerizable. Puede incluirse un monómero electropolimerizable, tal como *m*-fenilendiamina, en las soluciones de calibrado a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferiblemente a aproximadamente 15 mM. En otro ejemplo, una solución de monómeros electropolimerizables está contenida en un envase pre-ensado (no mostrado) diferente de los recipientes pre-ensados 14 y 16 para las soluciones calibradas a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferiblemente a aproximadamente 15 mM.

Haciendo referencia a la Figura 1, en un ejemplo, el recipiente pre-ensado 14 está conectado a la entrada de una válvula multi-posición 18 a través de una línea de flujo 20, y el recipiente pre-ensado 16 está conectado a una segunda entrada de la válvula multi-posición 18 a través de una línea de flujo 22. En otro ejemplo más, el recipiente 23 está conectado a una tercera entrada de la válvula multi-posición 18 a través de una línea de flujo 25. Otro recipiente 17 contiene una solución de enjuagado y está conectado a la entrada de la válvula multi-posición 18 a través de una línea de flujo 21. En otro ejemplo más, la bolsa de enjuagado 17 se elimina y una de las soluciones de calibrado A o B se usa también como solución de enjuagado. La línea de salida 12 es la salida de la válvula multi-posición 18 y está conectada a la línea de entrada de muestra 13 a través de un estilete 11. Dependiendo de la posición de la válvula 18, las líneas de entrada 20, 21, 22, 25 o el aire están abiertas hacia la válvula 18. Similarmente, cuando el estilete está en una posición normal (posición 11b) de la línea de entrada de muestra 13b, la línea 12b se abre hacia la línea de entrada de muestra 13b y permite el paso de la solución de calibrado o de la solución de enjuagado, o de aire a través de la línea de entrada de muestra 13b al ensamblaje del sensor 10 a través de la línea 24, acción que está facilitada por el funcionamiento de una bomba peristáltica ilustrada esquemáticamente como 26. Sin embargo, en el modo de aceptación de muestra (13a), la línea 12 está separada de la línea de entrada de muestra (posición 12a) y la muestra se introduce directamente al ensamblaje del sensor 10 a través de la línea 24, acción que está facilitada por el funcionamiento de la bomba peristáltica 26.

El cartucho 37 incluye también un recipiente 28, para una solución de referencia. El recipiente 28 está conectado al ensamblaje del sensor por una línea de flujo 30. El sistema incluye adicionalmente un recipiente 32 para residuos, que recibe las muestras de sangre, las soluciones de calibrado y la solución de referencia después de que hayan pasado a través del ensamblaje del sensor 10, mediante un conducto flexible 34 que tiene una entrada desde el ensamblaje del sensor 10.

Tanto el conducto de flujo residual 34 como la línea de flujo de la solución de referencia 30 consisten en o incluyen secciones de un tubo de pared flexible que pasa a través de la bomba peristáltica 26. La bomba 26 comprime y golpea las secciones flexibles de las líneas de flujo 30 y 34 para inducir un flujo a presión de la solución de referencia desde el recipiente 28 hasta el ensamblaje del electrodo 10 y crear una presión negativa sobre los productos residuales en la línea de flujo 34 para extraer los fluidos, incluyendo los fluidos con los monómeros polimerizables, en la línea de flujo 24 a través de los pasajes en el ensamblaje del electrodo 10 después de las membrana de los sensores. Esta disposición, opuesta a la alternativa de inducir una presión positiva sobre la sangre y las soluciones de calibrado para forzarlas a través del ensamblaje del electrodo 10, evita la imposición de fuerzas mecánicas innecesarias y posiblemente traumáticas sobre la muestra de sangre y minimiza las posibilidades de fugas en el ensamblaje del electrodo 10.

El cartucho 37 contiene también una tarjeta sensora 50 que proporciona una cámara de pequeño volumen hermética a gases en la que la muestra, tal como una muestra de sangre, una solución de calibrado o una solución que contiene monómero, se presenta a uno o más sensores electroquímicos, es decir, sensores de pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, Ca⁺⁺, glucosa, lactato, creatina, creatinina y hematocrito, y junto con el electrodo de referencia se indica de forma global como

ES 2 316 597 T3

sensores 10, y son partes integrales de la cámara. Las membranas hidrófobas, químicamente sensibles, típicamente formadas a partir de polímeros tales como cloruro de polivinilo, ionóforos específicos y un plastificante adecuado se unen permanentemente al cuerpo de la cámara. Estas membranas hidrófobas, químicamente sensibles, descritas a continuación en detalle, son la interfaz entre las soluciones de muestra o de calibrado y la solución tampón en contacto con el electrodo interno (plata/cloruro de plata).

En un ejemplo, haciendo referencia aún a la Figura 1, en el cartucho 37 se incluyen tres soluciones que permiten los calibrados a concentraciones altas y bajas para todos los parámetros excepto hematocrito, que se calibra a un solo nivel. En un ejemplo, el cartucho 37 incluye también un rotor para un brazo de entrada de muestra 5, el tubo de bombeo 24, 30 y 34, el estilete de muestreo 11, una bolsa de residuos 32, el recipiente de la solución de referencia 28, el recipiente de la solución de enjuagado 17, los recipientes de la solución de calibrado 14, 16 y 23, la válvula reguladora 33 y los tubos 12, 20, 21, 22 y 25. Se evita que las muestras de sangre que ya se han analizado vuelvan hacia atrás hacia la tarjeta sensora 50 desde el recipiente de residuos 32 debido a la presencia de una válvula reguladora de una vía 33 en la línea de residuos 34. Después de usarlo en el sistema 8, se pretende descargar y sustituir el cartucho 37 por otro cartucho.

Haciendo referencia a la Figura 1, los sensores están disponibles como un conjunto de electrodos 10 fabricados en una tarjeta de plástico 50 y alojados en un cartucho desechable 37 que hace de interfaz con el ensamblaje del bloque térmico 39 de una máquina de análisis químico de sangre adaptada adecuadamente. El ensamblaje del bloque térmico 39 aloja los dispositivos de calentamiento/refrigeración tales como un elemento resistivo o un dispositivo de efecto Peltier, un termistor 41 para seguir y controlar la temperatura, la interfaz eléctrica 38 entre los sensores en la tarjeta de plástico 50 y el microprocesador 40 a través de una placa analógica 45. La placa analógica 45 aloja convertidores de analógico a digital y de digital a analógico. La señal de la interfaz del electrodo 38 pasa a través de un convertidor de analógico a digital, convertida en una forma digital para el procesador 40 para almacenarla y presentarla. A la inversa, las señales digitales del procesador 40, por ejemplo la tensión de polarización para el sensor de oxígeno, pasan a través del convertidor de digital a analógico, se convierten en una forma analógica y se suministran a los sensores para su control, a través de la interfaz del electrodo 38.

El sistema de sensor electroquímico 8 se forma tras la inserción del cartucho 37 en el aparato sensor electroquímico. Tras la inserción, la tarjeta sensora 10 se ajusta en el ensamblaje del bloque calefactor 39 descrito con detalle a continuación, y el ensamblaje de calentamiento/refrigeración regulado por el microprocesador 40 realiza un ciclo con la temperatura de la tarjeta sensora 50 y la solución en contacto con los sensores dentro de la tarjeta sensora 50 a una temperatura específica durante una duración especificada. El ensamblaje del bloque calefactor 39 es capaz de calentarse y enfriarse rápidamente, por ejemplo, mediante un dispositivo termoeléctrico que aplica, por ejemplo, el efecto Peltier, controlado por un termistor 41, controlado todo ello por el microprocesador 40. Los sensores conectados a la interfaz del electrodo 38 que selecciona una de la pluralidad de señales eléctricas generadas por los sensores y pasa la señal eléctrica al microprocesador 40 de la máquina a través de un convertidor de analógico a digital hacia la placa analógica 45 donde se convierte de una forma analógica a una digital, son adecuados para almacenamiento y presentación. Haciendo referencia a la Figura 1, el ensamblaje del electrodo 10 tiene numerosos conectores de borde 36 en un conjunto que permite que se conecte a un conector hembra 38 de manera que los electrodos formados en el ensamblaje 10 pueden conectarse a un microprocesador 40 a través de la placa analógica 45. El microprocesador 40 se conecta a la válvula multipuerto 18 mediante un accionador de válvula 43 por una línea 42 y al motor de la bomba peristáltica 26 mediante el accionador de bomba 45 por una línea 44. El microprocesador 40 controla la posición del brazo de muestreo 5 a través del accionador del brazo 15 y la posición de la válvula 18 y la activación de la bomba 26 para provocar que las secuencias de muestras de sangre y de soluciones de calibrado pasen a través del ensamblaje del electrodo 10. Cuando las soluciones de calibrado, por ejemplo de los recipientes 14, 16 y 23, se bombean hacia el ensamblaje del electrodo 10, los electrodos que forman parte del ensamblaje realizan mediciones de los parámetros de la muestra y el microprocesador 40 almacena estos valores eléctricos. Basándose en las medidas realizadas durante el paso de las soluciones de calibrado a través del ensamblaje del electrodo 10, y los valores conocidos de los parámetros medidos contenidos dentro de la solución de calibrado de los recipientes 14, 16 y 23, el microprocesador 40 crea eficazmente una curva de calibrado para cada uno de los parámetros medidos, de manera que cuando una muestra de sangre se hace pasar a través del ensamblaje del electrodo 10 las mediciones realizadas por los electrodos pueden usarse para obtener mediciones exactas de los parámetros de interés. Estos parámetros se almacenan y se presentan a través del microprocesador 40. El microprocesador 40 se programa adecuadamente para realizar la medición, el cálculo, el almacenamiento y las funciones de control, tales como las diferencias en el potencial eléctrico a través de uno o más electrodos.

Soluciones de Calibrado

En un ejemplo, una composición de la solución de calibrado A usada para el calibrado de puntos secundarios, preparada a 37°C y a una presión atmosférica medida tonométricamente con CO₂ al 9%, O₂ al 14% y gas helio al 77%, es la siguiente: tampón orgánico pH 6,9; pCO₂ = 63 mm Hg; pO₂ = 100 mm Hg; Na⁺ = 100 mmol/l; K⁺ = 7 mmol/l; Ca⁺⁺ = 2,5 mmol/l; glucosa = 150 mg/l, lactato = 4 mmol/l; creatina = 0,5 mmol/l; creatinina = 0,5 mmol/l; tensioactivo y conservante inerte.

En otro ejemplo una composición de la solución de calibrado B usada para el calibrado del primer punto y para enjuagado, preparada a 37°C y a 700 mm de Hg de presión absoluta medida tonométricamente con O₂ al 27%, CO₂

ES 2 316 597 T3

al 5% y gas helio al 68% es la siguiente: tampón orgánico pH 7,40; $p\text{CO}_2 = 34$ mm de Hg; $p\text{O}_2 = 180$ mm Hg; $\text{Na}^+ = 140$ mmol/l; $\text{K}^+ = 3,5$ mmol/l; $\text{Ca}^{++} = 1,0$ mmol/l; tensioactivo y conservante inerte.

5 En otro ejemplo más, una composición preferida de la solución de calibrado AO para el calibrado de oxígeno de nivel bajo y regeneración *in situ* de la membrana polimérica interna para los sensores enzimáticos contiene una solución acuosa de sal de Na^+ , K^+ , Ca^{++} ; 15 mmol/l de *m*-fenilendiamina, 20 mmol/l de sulfito, tensioactivo y conservante inerte; tampón orgánico, $p\text{CO}_2$. La solución de referencia contiene $\text{AgNO}_3 = 1$ mmol/l, $\text{KNO}_3 = 1$ mmol/l; tensioactivo.

10 Las composiciones de las soluciones de calibrado A y B se eligen de manera que para cada una de las características medidas por el sistema se obtiene un par de valores que están incluidos en el intervalo de valores permisibles medidos por el sistema, proporcionando un calibrado de dos puntos equilibrado para el instrumento. La solución de calibrado AO se elige para calibrar el nivel de oxígeno bajo y para regenerar la membrana polimérica interna en los sensores de glucosa, creatina, creatinina y lactato.

15 Las soluciones de calibrado A y B se preparan premezclando todos los constituyentes en un cierto orden empezando con el tampón y terminando con la sal bicarbonato sódico, realizando después la medida tonométrica de la solución con oxígeno y CO_2 mezclados con helio para producir el nivel deseado de $p\text{CO}_2$ y $p\text{O}_2$. La solución de calibrado AO se prepara con una ligera diferencia en el procedimiento. Las sales, con excepción de sulfito sódico, *m*-fenilendiamina
20 y bicarbonato sódico se añaden al agua y se realiza la medición tonométrica de la solución con helio para llevar el pH a menos de 30 mm de Hg. Después, las sales restantes se añaden a la solución y se realiza la medición tonométrica de la mezcla final con la mezcla de $p\text{CO}_2$ y helio para producir el nivel de $p\text{CO}_2$ deseado.

25 Se añade al menos un monómero electropolimerizable a al menos una de las soluciones de calibrado, la solución AO en el recipiente 23, por ejemplo. La ausencia de oxígeno disuelto en la solución AO debido a la presencia de ión sulfito permite un mayor periodo de validez del monómero electropolimerizable en la solución AO porque el oxígeno disuelto oxidará el monómero electropolimerizable y, de esta manera, hará que el monómero sea incapaz de polimerizarse. Los monómeros electropolimerizables de *m*-fenilendiamina, por ejemplo, pueden incluirse en una solución de calibrado a una concentración en un intervalo entre aproximadamente 1 a 100 mM, preferiblemente a
30 15 mM. El monómero electropolimerizable puede incluirse en el cartucho 37 en un depósito separado.

La temperatura y la presión a la que se preparan las soluciones de calibrado y su método de envasado debe ser tal que impida la posibilidad de que los gases disueltos salgan de la solución en el recipiente, lo que afectaría a la concentración de gases en las soluciones de calibrado, y minimice la tendencia de que los gases permean incluso
35 a través de los materiales más impermeables que pueden obtenerse de forma práctica. Las soluciones de calibrado se envasan, llenando las soluciones completamente los recipientes, de manera que no hay un espacio de cabeza, evacuando los recipientes antes de llenarlos de una manera que se describirá posteriormente.

Llenando el recipiente de pared flexible evacuado 14, 16 y 23 con la solución de calibrado a temperaturas elevadas
40 y presión subatmosférica, la solución no tendrá tendencia a desgasificarse a una temperatura de uso menor y, de esta manera, a producir burbujas de gas en el recipiente. Cuando ocurre desgasificación, las concentraciones de los gases en la solución se verían afectadas, creando una imprecisión en el calibrado de los instrumentos. De forma similar, las soluciones de calibrado no deben envasarse a una presión demasiado baja, es decir, no por debajo de aproximadamente 625 mm de mercurio, porque la capacidad de absorción de la solución para los gases podría aumentar a medida que
45 disminuye la presión de envasado y, por debajo de este valor de presión, la capacidad de absorción de la solución puede ser lo suficientemente alta como para que tienda a extraer gases por la ligera permeabilidad inherente incluso de los materiales de envasado flexibles más impermeables a gases, durante largos periodos de tiempo. Por consiguiente, se prefiere una presión de envasado en el intervalo de 625-700 mm Hg.

50 En un ejemplo, se prepara una solución de calibrado a una temperatura mayor que su temperatura de uso pretendido, de manera que a una temperatura menor tenga una menor tendencia a desgasificación de los gases disueltos. Esto ayuda a que el envase de presión reducida minimice la posibilidad de desgasificación.

55 Las soluciones de calibrado A, B y AO se preparan a una temperatura por encima de su temperatura de uso pretendido a una presión controlada cerca de la presión atmosférica. Usando una temperatura elevada (por ejemplo, 37°C) la solución puede prepararse a aproximadamente presión atmosférica sin ninguna posibilidad posterior de formación de microburbujas dentro del recipiente o de transferencia de gas a través del recipiente cuando se envase en un recipiente impermeable a gases flexible con espacio de cabeza cero.

60 Las envolturas que forman los recipientes pre-ensados de solución de calibrado 14, 16, 23 se forman, por ejemplo, de láminas rectangulares, selladas térmicamente en los bordes y selladas térmicamente en una esquina para un vástago de entrada de la válvula 18 que se usa con propósitos de llenado. En el ejemplo ilustrado, los recipientes pre-ensados 14, 16 y 23 y las líneas de los recipientes pre-ensados 20, 22 y 25 se forman en una agrupación unitaria con la válvula 18 de manera que, de esta manera, se evita el espacio muerto en la fase gaseosa en las líneas 20, 22,
65 25. En un procedimiento preferido para purgar y llenar las bolsas de la envoltura, la envoltura se evacua en primer lugar y después se llena con la solución preparada. La bolsa se agita después mientras que la solución en exceso fluye continuamente fuera de la bolsa. Este proceso retira cualquier burbuja de gas residual de la bolsa. La solución se sella después en el recipiente.

ES 2 316 597 T3

Las soluciones de calibrado en los recipientes pre-ensados 14, 16 y 23 tienen una estabilidad excelente y un largo periodo de validez. Cuando se usa a temperatura y presión atmosférica no hay posibilidad de desgasificación del líquido para formar burbujas de gas dentro de los recipientes pre-ensados 14, 16 y 23.

5 Solución de Referencia

La solución de referencia dispuesta en el recipiente pre-ensado 28 se emplea en el ensamblaje del electrodo 10 como una fuente de suministro para un electrodo de referencia para proporcionar una unión líquida y aislar así el electrodo de referencia del potencial electroquímico variable de la solución de calibrado o de la sangre de una manera que se describirá posteriormente. En un ejemplo, la solución es de 1 mol/l de nitrato potásico y 1 mmol/l de solución de nitrato de plata. La solución contiene también un tensioactivo tal como Brij 35. La solución se envasa en un recipiente flexible sellado sin espacio de cabeza.

15 Ensamblaje del Electrodo

Haciendo referencia a la Figura 1, durante el funcionamiento de la bomba 26, el ensamblaje del electrodo 10 recibe un flujo pulsátil constante de la solución de referencia a través de la línea 30 y flujos pulsátiles intermitentes, secuenciales, de la muestra de sangre o de una de las soluciones de calibrado a través de la línea 24. El ensamblaje proporciona también una salida correspondiente de sus productos residuales hacia una bolsa de recogida de residuos 20 62 a través de la línea 34.

Haciendo referencia a la Figura 2, a modo de ejemplo, el ensamblaje del electrodo 10 consiste en una tarjeta rectangular estructuralmente rígida 50 de cloruro de polivinilo que tiene una placa de recubrimiento rectangular 52 de aluminio (u otro material adecuado) adherida a una de sus superficies. La placa de recubrimiento 52 cierra los canales de flujo 56 formados en una superficie de la tarjeta 50 y actúa también como un medio de transferencia de calor para hidratar los sensores mediante un ciclo térmico, descrito a continuación y para mantener los fluidos fluyendo a través del ensamblaje del electrodo 10, y los propios electrodos, a una temperatura constante durante el calibrado y la medición de los parámetros pertinentes en una muestra de un paciente. Esto puede conseguirse midiendo la temperatura de la placa 52 y empleando un elemento calefactor o de refrigeración adecuado, por ejemplo un dispositivo de efecto Peltier y un termistor 41 para mantener la temperatura de la placa 52 a una temperatura deseada.

Haciendo referencia a la Figura 2, se introduce una solución de referencia en un pocillo 64 formado en la superficie del sustrato 50 de la misma manera que los otros canales de flujo 56 y se cubre de forma similar con la placa metálica 52. La línea de flujo de la solución de referencia 30 pasa a través de un orificio inclinado en el pocillo 64. El pocillo 64 está conectado a la sección de salida 34 del canal de flujo 56 a través de una sección capilar muy fina 66 formada en la superficie del sustrato de plástico 50 de la misma manera que los canales de flujo principales 56. El canal capilar 66 es sustancialmente menos profundo y más estrecho que el canal de flujo principal 56; su sección transversal es de aproximadamente 0,5 mm cuadrados. El fluido de referencia bombeado hacia el pocillo 64 por la bomba 26, a través de la línea 30 (véase también la Figura 1), llena el pocillo y se fuerza a través de la sección capilar 66 donde se une con la corriente de salida del fluido que pasa a través de la sección del canal de flujo principal 56 y después fluye con la misma hacia la bolsa de residuos 32. La influencia combinada de su mayor densidad descrita anteriormente y la capilaridad del canal de flujo 66 sirve para minimizar cualquier posibilidad de que la solución de calibrado o la sangre pase hacia abajo a través del canal 66 hacia el pocillo 64 y afecte a las mediciones electroquímicas.

A medida que una muestra de sangre o una cantidad de solución de calibrado introducida en el canal de flujo 24 pasa a través del canal de flujo 56 hacia la sección de salida 34, pasa sobre numerosos electrodos, como se ilustra en la Figura 2.

Haciendo referencia a las Figuras 1 y 2, la placa térmica 52 se apoya en y forma una pared del canal de muestra 50 56. La placa térmica 52 se pone en contacto con el dispositivo de efecto Peltier del ensamblaje del bloque térmico 39 descrito a continuación. El ensamblaje del bloque térmico 39 es capaz de cambiar y controlar la temperatura de la placa térmica 52 entre 15°C y 75°C. El cambio y control de la temperatura lo controla un termistor 41 y lo regula el procesador 40. Un reloj digital interno del microprocesador 40 controla el tiempo y puede conectar y desconectar el ensamblaje del bloque térmico 39 de acuerdo con un programa preestablecido. De esta manera, el microprocesador 55 40 controla el ensamblaje del bloque térmico regulando el ajuste de temperatura y la duración de cada temperatura ajustada de la placa térmica 52.

Los Electrodos

El orden de ensamblaje de los electrodos dados a continuación es sólo a modo de ejemplo y no pretende limitarse al orden proporcionado.

El Par de Electrodos para el Hematocrito

Haciendo referencia a la Figura 2, un par de cables de oro 98 y 100 forman los electrodos para determinar el hematocrito (Hct) de una muestra basándose en su conductividad. Los cables hacen contacto con los conectores de borde de circuito impreso 102 y 104, respectivamente, ilustrados también en la Figura 5.

ES 2 316 597 T3

El Sensor de Oxígeno

Haciendo referencia a la Figura 2, el siguiente sensor en el canal de flujo 56 es el sensor de oxígeno 70 con una configuración de tres electrodos, como se ilustra en la Figura 4.

El Electrodo Sensor de Iones de Potasio, Calcio y Sodio

A continuación en el canal de flujo hay un electrodo sensor de sodio 78, seguido de un electrodo sensor de calcio 86 y un electrodo sensor de potasio 90 incluyendo una membrana activa y un cable de plata estirado y un conector de borde asociado.

El Electrodo de pH

Haciendo referencia a la Figura 2, a continuación a lo largo del canal de flujo 56 hay un electrodo de pH 94 ilustrado también en la Figura 6, que incluye una membrana 148 y un cable de plata 82 estirado o preajustado a través del espesor del plástico 50 hacia el canal de flujo 56. Haciendo referencia a la Figura 6, unido al lado opuesto del canal de flujo 56 hay una sección de adaptador conductor impreso 88 (véase también la Figura 5) que forma un conector de borde. La naturaleza de este electrodo de pH se describirá posteriormente en detalle.

El Electrodo de Dióxido de Carbono

Haciendo referencia a la Figura 2, el siguiente electrodo 93 a lo largo del canal de flujo 56 mide el dióxido de carbono disuelto en la sangre o en la solución de calibrado y trabaja en combinación con el electrodo de pH 94.

El Electrodo de Lactato

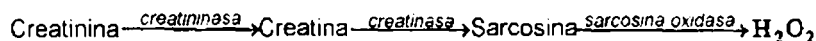
Haciendo referencia a la Figura 2, a continuación a lo largo del canal de flujo 56, el electrodo de lactato 92 funciona midiendo los subproductos de una reacción enzimática de lactato oxidasa sobre lactato. La lactato oxidasa presente en la capa enzimática oxida el lactato produciendo peróxido de hidrógeno, que es detectado por electrodo del sensor de lactato.

El Electrodo de Glucosa

Haciendo referencia a la Figura 2, un electrodo de glucosa 91 es el siguiente electrodo, que al igual que el electrodo de lactato 92, funciona mediante la detección del peróxido de hidrógeno producido por una reacción enzimática en la capa enzimática. La enzima, glucosa oxidasa, oxida específicamente la glucosa y produce peróxido de hidrógeno, un compuesto detectado por el electrodo del sensor de glucosa.

Los Electrodos de Creatina y Creatinina

La medición de creatina en una muestra de sangre requiere dos electrodos. Un electrodo mide la concentración total de creatinina y creatina y el otro electrodo sólo mide la concentración de creatina. La concentración de creatinina se determina restando la concentración de creatina de las concentraciones combinadas de creatina y creatinina. Haciendo referencia a la Figura 2, los siguientes dos electrodos, de creatinina 116 y creatina 118, que al igual que el electrodo de glucosa 91 y el electrodo de lactato 92, funcionan detectando el H_2O_2 producido por la reacción enzimática en sus capas enzimáticas respectivas. En el electrodo de creatinina 116, la capa enzimática incluye una mezcla de tres enzimas: creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla enzimática oxida específicamente creatinina y creatina y produce H_2O_2 en la siguiente reacción en cascada.



En el electrodo de creatina 118, la capa enzimática incluye una mezcla de dos enzimas: creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla enzimática oxida específicamente sólo la creatina y produce H_2O_2 en la siguiente reacción en cascada:



La Toma de Tierra

La toma de tierra 105 ilustrada en la Figura 2 es un cable de plata insertado a través del sustrato 50. Una toma de tierra sirve como punto de referencia eléctrica común para todos los electrodos. La toma de tierra puede servir también como contraelectrodo para el sistema sensor amperométrico.

ES 2 316 597 T3

El Electrodo de Referencia

Como se ilustra en la Figura 2, dos cables de plata 106 se estiran a través del espesor de la placa de sustrato de plástico 50 hacia el pocillo de solución de referencia 64 para actuar como el electrodo de referencia interno. El uso de dos cables de plata 106 que están conectados eléctricamente asegura un contacto continuo entre el cable de plata y la solución de referencia en presencia de burbujas de aire. Las burbujas de aire pueden formarse en el canal de referencia como resultado de la desgasificación de la solución de referencia a la elevada temperatura del control del sensor. Un elemento del circuito impreso 108, ilustrado también en la Figura 5, se extiende a lo largo de la parte trasera del panel entre un extremo de este electrodo de referencia y el borde de la placa para proporcionar un conector de borde.

La construcción y el funcionamiento específico de los electrodos se describirá ahora en detalle.

Aspectos Específicos de los Electrodos Selectivos de Iones

Los detalles de los electrodos selectivos de iones se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.214.968 y en la Patente de Estados Unidos N° 4.734.184.

Las membranas selectivas de iones de este tipo, que se conocen también como membranas líquidas, constituyen una matriz polimérica con un plastificante no volátil que forma la fase líquida en la que se dispersa un vehículo o selector iónico, denominado habitualmente ionóforo, que confiere selectividad a la membrana.

El Polímero de la Membrana Selectiva de Iones

Los polímeros que pueden usarse en la membrana selectiva de iones incluyen cualquiera de los polímeros hidrófobos naturales o sintéticos capaces de formar películas finas de una permeabilidad suficiente para producir, en combinación con los ionóforos y el disolvente o disolventes para los ionóforos, una movilidad iónica aparente a través de las mismas. Específicamente, el cloruro de polivinilo, el cloruro de vinilideno, el acrilonitrilo, los poliuretanos (particularmente, los poliuretanos aromáticos), los copolímeros de cloruro de polivinilo y cloruro de polivinilideno, el polivinilbutiral, el polivinilformal, polivinilacetato, los elastómeros de silicona y los copolímeros de alcohol polivinílico, los ésteres de celulosa, los policarbonatos, los polímeros carboxilados de cloruro de polivinilo y las mezclas y copolímeros de dichos materiales se han encontrado útiles. Las películas de dichos materiales que incluyen los ionóforos y plastificantes pueden prepararse usando técnicas convencional de recubrimiento o moldeo de película y, como se muestra en los ejemplos a continuación, pueden formarse por recubrimiento y formación de la película directamente sobre el electrodo de referencia interno o sobre alguna capa intermedia adecuada o por formación por separado y laminación al mismo.

El Ionóforo

El ionóforo usado en la membrana selectiva de iones generalmente es una sustancia capaz de asociar o unir selectivamente a sí misma, preferiblemente, un metal alcalino, alcalinotérreo, amonio u otros iones específicos deseados. Los ionóforos adecuados se describen con más detalle a continuación.

La selectividad del electrodo por un ión particular se debe a la naturaleza química del ionóforo y, de esta manera, el uso de diferentes componentes químicos como el ionóforo proporciona diferentes membranas para usar en los electrodos selectivos de iones específicos para los diferentes iones. Un gran número de sustancias son ejemplares de estos componentes, algunas de las cuales se sabe que son antibióticos, incluyendo:

(1) valinomicina, un ionóforo selectivo de potasio;

(2) poliéteres cíclicos de diversa constitución que hacen a la membrana selectiva para litio, rubidio, potasio, cesio o sodio; y

(3) otras sustancias que tienen una selectividad de iones similar a la de valinomicina tales como otras sustancias del grupo de la valinomicina, tetralactonas, actinas de macrólidos (monoactina, nonactina, dinactina, trinactina), el grupo de eniatina ((eniatina A, B), ciclohexadepsipéptidos, gramicidina, nigericina, dianemicina, nistatina, monensina, ésteres de monensina (especialmente metil monensina para membranas selectivas de ión sodio), antamanida, y alameticina (polipéptidos cíclicos).

En las publicaciones y en las patentes anteriores, así como otra bibliografía sobre esta materia se describen otros numerosos materiales útiles

La concentración de ionóforo en la membrana, por supuesto, variará con el vehículo particular usado, el ión que está experimentando el análisis, el plastificante etc. Generalmente se ha descubierto, sin embargo, que las concentraciones de ionóforo por debajo de aproximadamente 0,1 g/m² de membrana, suponiendo el espesor de membrana preferido en este documento, dan como resultado respuestas marginales y generalmente indeseables. Se prefieren las concentraciones de ionóforo entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,5 g/m². El ionóforo puede incorporarse a niveles mucho mayores que esto; sin embargo, debido al coste de muchos de estos materiales, el uso de dichos niveles no es económico.

ES 2 316 597 T3

El Plastificante

El plastificante proporciona movilidad iónica a la membrana y la presencia de un plastificante es necesaria para obtener una buena transferencia de iones.

5

Por supuesto, el plastificante debe ser compatible con el polímero de la membrana y debe ser un disolvente para el ionóforo.

10

La otra característica altamente deseable es que el plastificante sea lo suficientemente insoluble en agua como para que no migre significativamente hacia una muestra acuosa puesta en contacto con la superficie de la membrana como se describe posteriormente en este documento. Generalmente, un límite de solubilidad superior en agua sería de aproximadamente 4,0 g/l, situándose el límite preferido por debajo de aproximadamente 1 g/l. Dentro de estos límites, puede usarse sustancialmente cualquier disolvente para el ionóforo que sea compatible con el polímero. También es deseable que el plastificante iónico sea sustancialmente no volátil para proporcionar un periodo de validez prolongado al electrodo. Entre los disolventes útiles están los ftalatos, los sebacatos, los ésteres aromáticos y alifáticos, los fosfatos, los fosfatos alifáticos aromáticos mixtos, los adipatos y las mezclas de los mismos. Los plastificantes útiles específicos incluyen trimelitatos, bromofenil fenil éter, dimetilftalato, dibutilftalato, dioctilfenilfosfonato, bis(2-etilhexil)ftalato, octildifenilfosfato, tritolilfosfato, tris(3-fenoxifenil)fosfato, tris(2-etilhexil)fosfato y sebacato de dibutilo. Entre esta clase se prefieren particularmente el bromofenil fenil éter y los trimelitatos para los electrodos de potasio que usan valinomicina como vehículo.

15

20

Un gran número de otros plastificantes útiles permite el ensamblaje de los electrodos del tipo descrito en este documento y pueden usarse en la práctica satisfactoria de la presente invención.

25

La concentración del plastificante en la membrana variará también en gran medida con los componentes de una membrana dada; sin embargo las proporciones en peso de plastificante a polímero entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 5:2 proporcionan membranas útiles. El espesor de la membrana afectará a la respuesta del electrodo como se describe de una manera algo más detallada a continuación, y se prefiere mantener el espesor de esta capa por debajo de aproximadamente 0,13 mm (5 mils) y preferiblemente a aproximadamente 0,02 mm (1 mil). Como también se describe con más detalle a continuación, la uniformidad del espesor de la membrana selectiva de iones desempeña un papel importante en la utilización óptima del electrodo del tipo descrito en este documento. De esta manera, para obtener la máxima ventaja en términos de capacidad de almacenamiento, la membrana selectiva de iones debe ser de un espesor relativamente uniforme como se ha descrito anteriormente.

30

35 *El Soporte*

Haciendo referencia a la Figura 1, los electrodos incluyen un soporte o tarjeta 50 que puede consistir en cualquier material capaz de soportar, directamente o gracias a alguna capa intermedia de mejora de la adhesión, las otras partes necesarias del electrodo que se describen con detalle a continuación en este documento. De esta manera, el soporte puede comprender materiales cerámicos, de madera, de vidrio, metálicos, de papel o de plástico fundido, extruido o moldeado o materiales poliméricos etc. La composición del soporte que lleva los componentes del electrodo de recubrimiento debe ser inerte; es decir, no debe interferir con los potenciales indicadores observados, por ejemplo, al reaccionar con uno de los materiales de recubrimiento de una manera descontrolada. Además, la composición del soporte debe soportar las temperaturas elevadas a las que se expondrán los sensores durante la cantidad de tiempo requerida para hidratar y/o calibrar los sensores. En el caso de materiales porosos tales como madera, papel o cerámicos, puede ser deseable sellar los poros antes de aplicar los componentes del electrodo de recubrimiento. Los medios para proporcionar dicho sellado se conocen bien y no es necesario un mayor análisis de los mismos en este documento.

45

50

El soporte puede comprender una lámina o película de un material polimérico aislante. Hay diversos materiales poliméricos formadores de película que son muy adecuados para este fin, tales como por ejemplo acetato de celulosa, poli(etilenterftalato), policarbonatos, poliestireno, cloruro de polivinilo, etc. El soporte polimérico puede ser de cualquier espesor adecuado, típicamente de 0,51-5,08 mm (20-200 mils). De forma similar, podrían usarse capas finas o superficies de otros materiales mencionados anteriormente. Los métodos para la formación de dichas capas se conocen bien en la técnica.

55

Aspectos Específicos del Electrodo Enzimático

Un sensor enzimático comprende un sistema de tres electrodos incluyendo un electrodo de trabajo, uno de referencia y un contraelectrodo. El electrodo de trabajo incluye una membrana compuesta que se deposita sobre una superficie en contacto con un cable conductor, por ejemplo un cable de platino. La membrana compuesta comprende dos o más capas incluyendo, por ejemplo, una capa enzimática y una membrana interna de rechazo de interferencias.

60

65

La fabricación del sensor puede basarse en técnicas de moldeo con disolvente bien conocidas en la técnica. El espesor de las capas puede controlarse dosificando volúmenes precisos de los solutos encontrados en las capas. La membrana polimérica que comprende una membrana interna de rechazo de interferencias, descrita en detalle a continuación, se forma sobre el electrodo de cable por electropolimerización de los monómeros electropolimerizables, como se describe a continuación.

ES 2 316 597 T3

Haciendo referencia a las Figuras 3A y 3B, un electrodo enzimático 59, tal como un electrodo de glucosa, se localiza en el canal de flujo 56 de la tarjeta sensora 50. La Figura 3B es una sección ampliada de la Figura 3A. El electrodo enzimático 59 incluye una membrana compuesta de tres capas 60 que comprende, desde el canal de flujo 58 hasta el cable 57, una membrana externa 51 adyacente al canal de flujo 56, una capa enzimática 53 localizada entre la membrana externa 51 y una membrana interna de rechazo de interferencias 55 adyacente a un cable 57. El electrodo enzimático 59 contacta con la muestra a medida que la muestra fluye a lo largo del canal de flujo 56 y sobre la membrana externa 51 del electrodo enzimático 59. La señal eléctrica generada por el electrodo enzimático 59 la lleva el cable 57 y se transfiere al conductor 61 que está en comunicación eléctrica con el ensamblaje del electrodo 10 mostrado en la Figura 2.

Haciendo referencia aún a las Figuras 3A y 3B, las membranas externas del electrodo enzimático 59 generalmente funcionan para controlar la difusión del analito hacia la capa enzimática 53 y para proteger a los otros componentes del electrodo 59 del contacto directo con los constituyentes de la muestra presente en el canal 56. En un ejemplo, la membrana externa 51 es una membrana polimérica que comprende uno o más compuestos basados en poliuretano. La hidrofobicidad de la membrana está determinada por la mezcla de especies de compuestos poliméricos. A medida que aumenta la hidrofobicidad de la membrana, aumenta la capacidad del oxígeno para difundirse a través de la membrana, mientras que la capacidad de que los analitos se difundan a través de la membrana disminuye. La composición preferida de la membrana externa 51 es la concentración a la que existe un equilibrio óptimo de la velocidad de difusión de oxígeno, que es un sustrato requerido de las reacciones enzimáticas, y el analito (lactato en un sensor de lactato, o creatinina y creatina en un sensor de creatinina y glucosa en un sensor de glucosa), en condiciones típicas. Puede preferirse una membrana externa altamente hidrófoba porque el oxígeno se difundirá rápidamente a la capa enzimática 53 y, de esta manera, no será un factor limitante para la reacción enzimática. La membrana externa 51 puede tener un espesor preferible de 8 a 15 micrómetros y podría funcionar con un espesor en el intervalo de 5 a 30 micrómetros.

La membrana externa 51 está compuesta por una mezcla de poliuretanos con diferentes niveles de captación de agua. Una composición típica de la membrana externa 51 es un 77% de poliuretano basado en poliéter, alifático con un 20% de captación de agua, un 17% de poliuretano basado en poliéter, alifático con un 60% de captación de agua y un 6% de poliuretano basado en poliéter, alifático con un 3% de captación de agua. La membrana externa 51 con esta composición puede producirse dosificando un volumen de una solución de 3,0 ml de disolvente de ciclohexanona, 17,0 ml de disolvente de tetrahidrofurano, 1,08 g de poliuretano con un 20% de captación de agua, 0,24 g de poliuretano con un 60% de captación de agua y 0,08 g de poliuretano con un 3% de captación de agua sobre la capa enzimática 53 de la membrana compuesta 60.

Haciendo referencia a la Figura 3B, la membrana externa 51, que se lamina directamente sobre y en contacto con la capa enzimática 53, funciona para conservar la capa enzimática 53 evitando la exposición de una enzima 49 embebida en la capa enzimática 53 y de la matriz de estabilización en la que está embebida la enzima 49, a proteínas de degradación o a los compuestos de la muestra en el canal 56. Igualmente, la membrana externa 51 evita la difusión de la enzima 49 fuera de la capa enzimática 53. La membrana externa 51 funciona también para controlar la velocidad de difusión del analito (por ejemplo glucosa, lactato, creatina y creatinina) y el oxígeno de la muestra a la capa enzimática 53. El fallo a la hora de controlar la difusión del analito y el oxígeno a la capa enzimática 53 da como resultado mediciones no lineales e imprecisas del analito en la muestra.

Haciendo referencia aún a la Figura 3B, la capa enzimática 53 del sensor de glucosa o lactato, incluye al menos una especie enzimática 49 requerida para la reacción enzimática en la que participa el analito específico, que está estabilizada en la matriz de la capa enzimática 53. En un ejemplo, la enzima 49 incluye al menos una proteína con actividad enzimática. En otros ejemplos, la enzima 49 incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas y estabilizadores, por ejemplo.

En un ejemplo, la enzima proteica 49, glucosa oxidasa o lactato oxidasa, se embebe en la capa enzimática 53 y crea un electrodo 91 y 92, específicamente sensible a glucosa y lactato, respectivamente, presente en la muestra. El electrodo de glucosa 91 incluye glutaraldehído y glucosa oxidasa en la capa enzimática 53.

El electrodo de glucosa 91 puede incluir 0,10 g de glutaraldehído por gramo de glucosa oxidasa. En un ejemplo, el electrodo de lactato 92 incluye al menos glutaraldehído, albúmina de suero bovino, un estabilizador enzimático tal como, por ejemplo, polietilenimina y lactato oxidasa en la capa enzimática 53. En un ejemplo, el electrodo de lactato 92 incluye lactato oxidasa al 45% en peso, albúmina de suero bovino al 45% en peso, polietilenimina al 5% en peso (un estabilizador enzimático) y glutaraldehído al 5% en peso, por ejemplo. Las fracciones en peso de lactato oxidasa y albúmina de suero bovino pueden variar. El porcentaje en peso de polietilenimina en la capa enzimática puede variar del 1 al 20, el porcentaje en peso de glutaraldehído puede variar del 1 al 10. Otros estabilizadores enzimáticos incluyen, aunque sin limitación, compuestos poliónicos tales como polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En otro ejemplo más, la capa enzimática 53 incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas y estabilizadores embebidos en la matriz de la capa enzimática 53 para la detección específica de creatinina y creatina o sólo creatina. Las mezclas enzimáticas se usan en el electrodo de creatinina 116 y en el electrodo de creatina 118. La creatina sola se detecta con el electrodo de creatina 118. En una realización particular, el electrodo de creatinina 116 incluye una mezcla de creatininas al 5% en peso, creatinasa al 55% en peso, sarcosina oxidasa al 30% en peso, poli(N-vinilimidazol) (un estabilizador enzimático) al 5% en peso y glutaraldehído al 5% en peso, por ejemplo. Las fracciones en

peso de creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa en el electrodo de creatinina y las fracciones en peso de creatinasa y sarcosina oxidasa en el electrodo de creatina pueden variar. El porcentaje en peso de poli(N-vinilimidazol) en los electrodos de creatinina y creatina pueden variar, por ejemplo del 1% al 20% y el porcentaje en peso de glutaraldehído en los electrodos de creatinina y creatina puede variar también, por ejemplo, del 1% al 10%. Los estabilizadores poliiónicos distintos de poli(N-vinilimidazol) pueden usarse también para estabilizar la mezcla enzimática. Los ejemplos de compuestos poliiónicos incluyen, aunque sin limitación, polietilenimina, polipropilenimina, polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En un ejemplo de los electrodos de glucosa, lactato, creatina y creatinina, la capa enzimática 53 consiste en una matriz reticulada de enzimas, estabilizadores tales como polietilenimina o poli(N-vinilimidazol) y otras proteínas tales como albúmina de suero bovino. La reticulación de las enzimas estabilizadores y otras moléculas proteicas se consigue, por ejemplo, con glutaraldehído, un dialdehído. Pueden usarse también otros reactivos de reticulación tales como 1,4-diisocianatobutano, un diisocianato, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano, ambos diepóxidos. La reticulación de las moléculas enzimáticas y el uso de estabilizadores poliiónicos y proteínas inertes en la matriz enzimática puede prolongar significativamente el periodo de validez y la vida útil de los electrodos enzimáticos.

En otro ejemplo más relacionado con los electrodos de creatinina 116 y creatina 118, la capa enzimática 53 incluye una mezcla de diversas enzimas y proteínas, aunque carece de un estabilizador enzimático. En este ejemplo, el electrodo de creatinina 116 incluye una mezcla de creatininas al 30%, creatinasa al 30%, sarcosina oxidasa al 30% y glutaraldehído al 10% (porcentajes en peso). En este ejemplo, el electrodo de creatina 118 incluye una mezcla de creatinasa al 45%, sarcosina oxidasa al 45% y glutaraldehído al 10% (porcentajes en peso). La capa enzimática 53 puede tener un espesor en el intervalo de 1 a 10 micrómetros, preferiblemente 2-5 micrómetros, medido desde la superficie interna de la membrana externa 51 hasta la superficie externa de la membrana interna de rechazo de interferencias 55.

Haciendo referencia a las Figuras 3A y 3B, el electrodo enzimático 59 incluye también una membrana interna para rechazo de interferencias 55 que es una membrana polimérica restaurable en contacto próximo con el cable 57. La membrana interna de rechazo de interferencias 55 puede formarse mediante la polimerización de los monómeros electropolimerizables. Los monómeros electropolimerizables adecuados incluyen, por ejemplo, benzotiofeno, fenilendiaminas y fenoles. La membrana interna de rechazo de interferencias 55, que típicamente es menor de un micrómetro de espesor, aísla o protege el cable 57 de los compuestos de la muestra, específicamente de los compuestos oxidables que interfieren con el funcionamiento apropiado del electrodo enzimático.

En un ejemplo, la membrana polimérica que comprende la membrana interna de rechazo de interferencias 55 se forma por aplicación de un potencial eléctrico al cable 57 en presencia de monómeros electropolimerizables. Los monómeros en presencia de un potencial eléctrico se polimerizan sobre el cable 57 para formar una membrana interna de rechazo de interferencias polimérica eléctricamente aislante 55 sobre el cable 57 como se ilustra en las Figuras 3A y 3B. El peróxido de hidrógeno, que se genera de la actividad de la enzima del electrodo enzimático sobre un analito específico, pasa a través de los poros de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 y entra en contacto con el cable 57 provocando que se genere una señal eléctrica en el cable 57. El menor tamaño de los poros en la membrana de rechazo de interferencias 55 limita que los compuestos encontrados en la muestra, mayores que el peróxido de hidrógeno, tales como acetaminofeno, ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína y otros compuestos electroactivos que son mayores que el H_2O_2 , interfieran con o reduzcan la precisión del electrodo 59 del sensor electroquímico.

La membrana interna de rechazo de interferencias 55 puede regenerarse en una base de repetición para restaurar su función. Después de una exposición repetida a muchas muestras, la membrana de rechazo de interferencias 55 se degrada o contamina debido a los compuestos presentes en la muestra. La degradación de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 se caracteriza por fisuras en la estructura polimérica de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Dichas fisuras impiden la capacidad de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 para proteger al cable 57 de que los compuestos interferentes presentes en la muestra analítica, por ejemplo, ácido ascórbico, acetaminofeno y ácido úrico, entren en contacto con el cable 57 y alteren la señal eléctrica detectada por el cable 57.

Para evitar los problemas inducidos por la degradación de la membrana interna de rechazo de interferencias 55, un monómero electropolimerizable puede combinarse con una solución de calibrado tal como una solución AO contenida en el recipiente pre-ensvasado 23 del sistema de sensor electroquímico 8 ilustrado en la Figura 1, por ejemplo, para usar en la repolimerización y la restauración de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. La polimerización del monómero ocurre cuando una solución AO que contiene monómeros se bombea desde un recipiente pre-ensvasado y se hace pasar a través del canal de flujo 56 sobre la tarjeta sensora 50 durante la aplicación de un potencial eléctrico generado por un aparato sensor electroquímico 8 ilustrado en la Figura 1 al cable 57. Durante el proceso de polimerización el monómero en la solución de calibrado en el canal de flujo 56 se difunde a través de la membrana externa 51 y la capa enzimática 53 hasta que alcanza la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Una vez que está en la membrana interna de rechazo de interferencias 55 los monómeros presentes en la solución entran en las áreas de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 que han perdido integridad estructural por degradación, división o agrietamiento y median en la restauración de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 por polimerización para rellenar la estructura dañada de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. El monómero se expone a un potencial eléctrico generado desde una fuente eléctrica y se transfiere al cable 57 en las áreas de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 que han perdido integridad. El potencial eléctrico polimeriza el monómero sobre la estructura polimérica existente de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 en las

ES 2 316 597 T3

5 áreas dañadas de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 hasta que se restaura la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Una vez que la membrana interna de rechazo de interferencias 55 se ha restaurado, las propiedades aislantes de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 se renuevan y el potencial eléctrico del cable 57 secuestra el monómero presente en la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Esta restauración auto-limitante de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 se repite automáticamente cada 24 horas, por ejemplo. La restauración automática auto-limitante de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 asegura la precisión del sensor enzimático 59. Pueden emplearse ciclos de restauración más o menos frecuentes de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 para tener en cuenta diferentes situaciones.

10 El potencial eléctrico para el proceso de polimerización generado por el sistema de sensor electroquímico 8 ilustrado en la Figura 1 se aplica al cable 57 en el intervalo de 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia interno 106, durante aproximadamente 30 segundos a una hora. Un potencial de polarización óptimo es de 0,5 V frente al electrodo de referencia interno 106 durante 3 minutos, repetido cada 24 horas. El potencial eléctrico es demasiado bajo si no
15 la formación de gas en la membrana interna de rechazo de interferencias 55, provocando de esta manera un daño al electrodo enzimático 59.

Aspectos Específicos del Electrodo de PO₂

20 Un sensor de oxígeno comprende un sistema de tres electrodos incluyendo un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo de tierra. En un ejemplo, el electrodo de trabajo de oxígeno 70 comprende un cable de platino 74 que está fijado en el centro de un disco de vidrio aislante 109 y dos membranas protectoras 120 y 122, que se muestran mejor en la Figura 4. El disco tiene preferiblemente un espesor de aproximadamente 1,02 mm (40 mils), mientras que la placa 50 tiene un espesor de aproximadamente 2,16 mm (85 mils). El diámetro del disco de vidrio es
25 preferiblemente de aproximadamente 2,54 cm (100 mils).

Numerosos discos de vidrio con los cables de platino embebidos se prepararan insertando una longitud de ajuste ceñido de cable de platino en el lumen de un tubo capilar de vidrio y fundiendo después el tubo de manera que se condense con el cable. Después de que el tubo con el cable embebido se haya endurecido, se laminan los discos de un
30 espesor axial dado, mediante una sierra eléctrica, por ejemplo.

El disco de vidrio es prácticamente impermeable a oxígeno mientras que el cloruro de polivinilo de la placa 50 es relativamente permeable. El disco de vidrio protege de esta manera el electrodo de platino 74 del gas, de manera que sólo su extremo distal, que está orientado hacia el canal de flujo 56, está activo.

35 Las dos membranas 120 y 122 sobre el disco de vidrio protegen el cable de platino 74 del contacto directo con los constituyentes de la muestra en el canal 56. En un ejemplo, la membrana 120 es un hidrogel basado en ésteres metacrílicos que está unido covalentemente al disco de vidrio. La membrana 122 por debajo de la membrana 120 cubre sólo el área alrededor del cable de platino y está hecha de alcohol polivinílico. La membrana compuesta 60, que incluye las membranas 120 y 122, proporciona una mejor protección y rendimiento del sensor que cualquiera de las membranas en solitario. El tipo de hidrogel que se emplea está basado en ésteres metacrílicos, aunque pueden usarse hidrogeles no basados en ésteres de ácido metacrílico. Para formar un gel, el monómero, tal como metacrilato de hidroxietilo o metacrilato de hidroxipropilo, por ejemplo, se copolimeriza con un reticulante, tal como dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol o dimetacrilato de tetraetilenglicol. La reacción de reticulación puede iniciarse mediante
40 un fotoiniciador tal como dimetoxifenilacetofenona. Puede usarse un disolvente, tal como etilenglicol o agua, para diluir las reacciones y controlar la viscosidad de la solución.

Es una ventaja considerable que la membrana de hidrogel no se desprenda de la superficie del electrodo de oxígeno cuando se hidrata la membrana. Esto se consigue por funcionalización del disco de vidrio con grupos metacrílicos y por reticulación de la membrana a la superficie. La superficie del disco de vidrio se siliniza con hexametildisilazano y se funcionaliza con grupos metacrílicos haciendo que reaccione con trimetoxisilil propil metacrilato.

Después de la funcionalización del disco de vidrio, se administra una pequeña gota de una solución de alcohol polivinílico en agua en el centro del disco directamente sobre el cable de platino y se permite que el agua se evapore para formar la membrana de alcohol polivinílico. Una solución del componente hidrogel como se ha descrito anteriormente, se administra después sobre el disco en una cantidad que corresponde a una película de 50 micrómetros de espesor. El disco se expone a una luz UV de banda ancha durante 5 minutos para fotopolimerizar la membrana de hidrogel.

60 El disco de vidrio con la membrana compuesta en un lado del mismo se embebe en un hueco formado a través del espesor de la placa de plástico 50 de manera que la superficie que no es de hidrogel está enrasada con la superficie de la placa opuesta a la placa de recubrimiento 52 y la superficie de hidrogel del disco está enrasada con la parte inferior del canal de flujo 56.

65 El sensor de oxígeno descrito en este documento tiene diversas ventajas cuando se compara con el electrodo convencional (electrodo de Clark) incluyendo un menor tamaño de electrodo, una fabricación más sencilla del electrodo, un tiempo de respuesta más rápido y un mayor periodo de validez. La separación del electrodo de referencia y el contraelectrodo del electrodo de trabajo permite un menor tamaño del electrodo de trabajo y una fabricación más

sencilla del electrodo. El tiempo de respuesta para oxígeno se reduce debido a la ausencia de una solución interna y la membrana más fina resultante sobre el electrodo de trabajo. El uso de un electrodo de referencia externo elimina la formación de dendritas de plata sobre el electrodo de trabajo, que es un modo común de fallo en un electrodo de oxígeno de Clark con un electrodo de referencia interno de Ag/AgCl.

5

Respecto a la función amperométrica del electrodo en funcionamiento, el procesador 40 aplica un potencial negativo respecto al electrodo de referencia interno 106 al cable de platino 74, sirviendo dicho potencial disminuido para reducir cualquier molécula de oxígeno que alcance su extremo y, de esta manera, producir una corriente eléctrica proporcional a la difusión de oxígeno a través de las capas 120 y 122. Las capas hidratadas 120 y 122 dan una trayectoria de flujo conductor fiable entre el electrodo de platino y el electrodo de referencia interno 106 para proporcionar un potencial de polarización entre el platino y la solución de la capa hidratada. El flujo de corriente resultante entre el electrodo de platino 74 y el electrodo de tierra se mide y es proporcional a la concentración de oxígeno en el fluido de ensayo que se está controlando.

15 *Electrodos Sensores de pCO₂, pH, Potasio, Sodio y Calcio*

Los electrodos, que se ilustran mejor de forma general en la Figura 2, que conectan los cables de plata 78, 86, 90, 93 y 94 que detectan las actividades de Na, Ca, potasio, pCO₂ y pH, respectivamente, son de una construcción similar. La diferencia está en la composición de las capas de membrana. En la Figura 6 se ilustra un electrodo selectivo de iones típico. Cada uno tiene una perla o una capa de sal interna 152 que, tras la hidratación, forma la capa de solución interna. Esta capa está en contacto con la película fina de la capa de plata/cloruro de plata 154 obtenida por anodización de la parte superior de los cables de plata. La capa externa 148 es esencialmente la capa de membrana selectiva de iones polimérica. Esta capa se forma sobre el residuo de sal seca de la capa interna en un pocillo poco profundo 150 como un residuo seco que queda después de la retirada del disolvente de una matriz de una solución de formación de una membrana hidrófoba permeable tal como una solución que contiene cloruro de polivinilo, un plastificante, un ingrediente activo sensible a iones apropiado y una sal borato. La membrana externa se aplica como una solución, típicamente en tetrahidrofurano (THF) en una pequeña gota. Una vez que el disolvente se evapora, la membrana se forma y se une a la tarjeta de plástico. En el caso de los electrodos de pH y pCO₂, el ingrediente activo selectivo de iones puede ser tridodecilamina (TDDA) o un componente sensible a pH adecuado. Para el electrodo de potasio, puede usarse un antibiótico monocíclico tal como valinomicina como ingrediente activo. El electrodo de calcio emplea un componente selectivo de iones calcio como su ingrediente activo, tal como (-)-(R,R)-N,N'-(Bis(11-etoxicarbonil)undecil)-N,N'-4,5-tetrametil-3,6-dioxaoctanodiamida; N,N'-[(4R,5R)-4,5-dimetil-1,8-dioxo-3,6-dioxaoctametil]-bis-(12-metilaminododecanoato) de dietilo u otra sustancia selectiva sensible a calcio adecuada. El electrodo de sodio emplea un éster de metil monensina o cualquier otro ingrediente activo sensible a sodio adecuado. Los electrodos de sodio, potasio y calcio usan una sal tampón tal como MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico) junto con las sales cloruro respectivas para su solución interna.

Los electrodos de pH y pCO₂ comparten las mismas capas externas mientras que sus capas internas difieren significativamente. La capa interna para pH usa un tampón fuerte, por ejemplo, un tampón MES, mientras que para el electrodo de CO₂ se usa un tampón bicarbonato.

Todos los electrodos selectivos de iones, excepto el electrodo de CO₂, funcionan midiendo el potencial entre el electrodo selectivo de iones y el electrodo de referencia 106 (Figura 2), siendo el cambio de potencial directamente proporcional al cambio en el logaritmo de la actividad del ión medido.

45

El sensor de CO₂ es una combinación de electrodos de CO₂ y pH que funcionan juntos. Durante el funcionamiento, se mide el potencial entre los electrodos de CO₂ y de pH. La superficie externa de ambos electrodos responde a pH de la misma manera, por lo que se cancelan entre sí. La superficie interna de la membrana de pH tiene un alto tampón con pH constante y no provoca ningún cambio en el potencial medido. Sin embargo, para el CO₂, la membrana permea libremente para CO₂, que se disuelve en el tampón bicarbonato cambiando su pH. Esto provoca un cambio en la respuesta de potencial de la superficie interna de la membrana de CO₂, que es el único cambio respecto al potencial global medido. De esta manera, el potencial a través de los electrodos de CO₂ y pH mide directamente la variación de las concentraciones de CO₂ en la muestra.

El proceso para hidratar la capa de sal interna en estos electrodos selectivos de iones se consigue empapando la superficie externa de las membranas externas en una solución acuosa de sal, normalmente una solución de reactivo de calibrado. La hidratación, sin embargo, es un proceso muy lento, puesto que el agua tiene que permear a través de la membrana externa hidrófoba en forma de vapor. El ciclo térmico a altas temperaturas facilita el proceso. Durante el proceso de ciclo térmico, la composición e integridad de las capas de membrana permanecen intactas.

60

La hidratación y calibrado de los electrodos sensibles a iones se consigue mediante etapas similares a las descritas para el electrodo de pO₂. La hidratación desde un estado seco puede acelerarse empapando los sensores en una solución de electrolito, tal como las soluciones de calibrado descritas anteriormente y realizando un ciclo térmico de los sensores a una temperatura elevada mayor que la de uso normal. Por ejemplo, los sensores se empapan en una solución de calibrado B a una temperatura entre 55°C y 75°C durante 15 minutos, y después se enfrían a 37°C. Los ciclos de calibrado empiezan tan pronto como la temperatura alcanza los 37°C. En un ejemplo, los sensores se empapan en una solución de calibrado a una temperatura de 60°C durante 12 minutos y después se enfrían a 37°C. Los ciclos de calibrado empiezan tan pronto como la temperatura vuelve a 37°C.

65

ES 2 316 597 T3

Medición del Hematocrito

La medición de hematocrito (Hct) se realiza midiendo la resistividad entre los cables de oro 98 y 100. El sensor funciona midiendo la resistividad de la solución o la muestra de sangre puesta entre los electrodos. El hematocrito se calcula como una función de la resistividad usando la ecuación de Maxwell.

Retirada de los Agentes Interferentes

La exposición del electrodo enzimático 59 a la muestra en el canal de flujo 56 provoca que la membrana compuesta 60 retenga las concentraciones residuales de sustrato de la muestra y los productos de la región enzimática a partir del funcionamiento del electrodo enzimático 59. Estas sustancias son ejemplos de los agentes interferentes que provocarían que el electrodo enzimático 59 perdiera exactitud y precisión en la medición del analito pretendido específicamente. Para restablecer la exactitud y la precisión del electrodo enzimático 59, los agentes interferentes se retiran de la membrana compuesta 60 del electrodo enzimático 59 aplicando una amplitud adicional de polarización al cable 57 del electrodo enzimático 59.

Puede aplicarse un pulso de polarización mediante una fuente eléctrica al cable 57 después de cada exposición del electrodo 59 a la muestra para preparar el electrodo 59 para la siguiente medición. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, un producto de la reacción de la enzima y el analito a partir del funcionamiento del electrodo 59, es un ejemplo de un agente interferente. Para retirar los agentes interferentes tales como peróxido de hidrógeno, se aplica una amplitud de polarización adicional al cable 57 que provoca la oxidación del agente interferente. La oxidación del agente interferente hace al agente interferente incapaz de afectar a la actividad eléctrica en el cable 57 retirando eficazmente los agentes del electrodo 59. Los analitos, tales como glucosa y lactato, constituyen también agentes interferentes cuando sigue habiendo concentraciones residuales de glucosa y lactato en el electrodo enzimático 59 entre las lecturas de muestra. Un pulso de polarización aplicado al cable 57 oxida el analito residual y elimina de esta manera la contribución del analito residual entre las muestras a medidas erróneas del analito.

En un ejemplo, una vez completada la medición de un analito en una muestra, el electrodo enzimático 59 se restaura bombeándolo fuera del canal de flujo 56 y un volumen de solución de lavado del depósito 17 se bombea a través del canal de flujo 56. Durante este tiempo, una polarización adicional se superpone sobre la polarización estable aplicada continuamente al electrodo 59 después de la medición de una muestra. La polarización se devuelve entonces a su nivel inicial y una solución de calibrado se introduce en el canal de flujo 56 seguido del calibrado de un punto para preparar al electrodo 59 para la siguiente medición.

La amplitud y duración suficientes del pulso de polarización requerido para la oxidación del agente interferente se determina según la geometría del canal de flujo 56. Se requieren mayores amplitudes de pulso y mayores duraciones de pulso para un electrodo 59 con un canal de flujo estrecho 56 y un caudal lento de solución de lavado. En un ejemplo ilustrado en la Figura 3A, una amplitud de polarización de 0,4 V frente al electrodo de referencia interno con una duración de 50 segundos es suficiente para eliminar los compuestos interferentes de la membrana compuesta 60 y, de esta manera, mejorar la precisión y exactitud de las mediciones del electrodo 59. Una amplitud de polarización en el intervalo de 0,1 a 0,8 V frente a un electrodo de referencia interno con una duración de 10 a 200 segundos puede ser suficiente también.

Restauración de la Membrana Interna (de Rechazo de Interferencias) de la Membrana Compuesta

Una etapa adicional para restaurar el funcionamiento de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de la membrana compuesta 60 del sensor enzimático 59 se ilustra, por ejemplo, en la Figura 3B. Esta etapa incluye restaurar la integridad y el funcionamiento apropiado de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de los electrodos enzimáticos. Dentro de la membrana compuesta 60, ilustrada en la Figura 3B, la restauración de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 ocurre por polimerización *in situ* de monómeros electropolimerizables sobre la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de la membrana compuesta 60.

En un ejemplo, los monómeros electropolimerizables están disueltos en la solución de calibrado AO en el recipiente 23 ilustrado en la Figura 1. Se hace pasar la solución de calibrado AO a través del canal de flujo 56 de la tarjeta sensora 50 ilustrada en la Figura 3A. La solución AO con los monómeros electropolimerizables entra en contacto con el electrodo enzimático 59 en la membrana polimérica externa 51 de la membrana compuesta 60. Los monómeros electropolimerizables se difunden primero a través de la membrana externa 51 y después a través de la capa enzimática 53 de la membrana compuesta 60, hasta que los monómeros alcanzan la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de la membrana compuesta 60. Un potencial eléctrico mayor que el inicial, 0,5 V frente al electrodo de referencia interno se aplica al cable 57 durante 3 minutos, por ejemplo, provocando que los monómeros electropolimerizables se polimericen sobre la estructura polimérica existente de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de la membrana compuesta 60. Después de la polimerización de la membrana interna de rechazo de interferencias 55, se restablecen las propiedades aislantes de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Debido a que los monómeros electropolimerizables restantes en la solución de calibrado ya no se exponen más al potencial eléctrico, la polimerización de los monómeros ya no puede ocurrir.

La amplitud del potencial eléctrico y el periodo de tiempo del potencial elevado suficiente para la restauración de la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de la membrana compuesta 60 se determinan según la configu-

ES 2 316 597 T3

ración específica del electrodo 59. La composición y la geometría particular del electrodo afectan a la amplitud del potencial eléctrico y al periodo de tiempo requerido para la restauración completa de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Una membrana compuesta 60 de una composición o geometría que ralentiza la difusión de los monómeros desde el canal de flujo 56 a la membrana interna de rechazo de interferencias 55 requerirá una mayor amplitud de polimerización durante una mayor duración de tiempo. Una polarización de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente a un electrodo de referencia interno, aplicada durante aproximadamente 30 segundos a 1 hora es adecuada, al menos para la restauración parcial de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Una vez completada la restauración de la membrana interna de rechazo de interferencias 55, la solución AO en el canal de flujo 56 se sustituye por una solución de enjuagado 17 y el potencial eléctrico se devuelve a su valor inicial.

Funcionamiento de la Solución de Referencia

Haciendo referencia a la Figura 2, como se ha indicado, el pocillo 64 se llena con la solución de referencia, donde entra en contacto con un cable de plata 106 y se bombea a través del canal capilar 66 para unirse a la salida de la línea de flujo principal. La solución de referencia es esencialmente una solución hipertónica de nitrato potásico, con respecto a la sangre o a las soluciones de calibrado y, en consecuencia, el dominio del electrodo de referencia 106 constituye una junta líquida de potencial estable formada entre el electrodo de referencia y la sangre o la solución de calibrado, estableciendo de esta manera un entorno que es independiente de la actividad iónica de la sangre o la solución de calibrado.

Como la solución de referencia se une al canal de flujo principal aguas abajo de los electrodos, no afecta a esas mediciones de ninguna manera. La solución de referencia es de alta densidad y bajo una fuerza de bombeo debe fluir hacia arriba contra la gravedad, hacia la salida. De esta manera, cuando la bomba se detiene, por ejemplo para el equilibrado del electrodo, la solución de referencia permanece estacionaria en el pocillo de referencia 64 y en la sección capilar 66 y no tiende a difundirse hacia la solución de calibrado o la sangre en el canal de flujo principal. De esta manera, el tubo capilar 66 debido al gradiente de densidad, actúa como una válvula de una vía permitiendo que la solución de referencia bombeada pase hacia arriba a través del capilar pero evitando el paso inverso no deseado o la mezcla de la sangre o la solución de calibrado hacia el pocillo de referencia.

Ensamblaje del Bloque Calefactor

Haciendo referencia a las Figuras 7A-7G, el ensamblaje del bloque calefactor 39 incluye un dispositivo termoelectrónico 230, un termistor 41, un bloque de aluminio compuesto por dos carcasas de aluminio 220a, 220b, una interfaz del electrodo 156, una placa metálica 234, un sumidero de calor 236, conductores eléctricos 229, 229', 231, 231' y un cable 226. El bloque de aluminio aloja una tarjeta sensora 10 cuando el cartucho con la tarjeta sensora se inserta en el instrumento de análisis de fluidos 8.

Haciendo referencia a la Figura 7A, el ensamblaje del bloque calefactor de aluminio 39 incluye dos carcasas de aluminio a 220a, 220b que forman juntas un adaptador 222 en el que puede insertarse una tarjeta sensora 10 (no mostrada). Como se ilustra en la Figura 7B, la conexión eléctrica 156 localizada en el adaptador 222 hace de interfaz con los conectores de borde correspondientes en la tarjeta sensora ilustrada, por ejemplo, en la Figura 5, para transmitir señales desde los sensores. Un cable 226 conecta los conectores eléctricos desde la tarjeta sensora a un microprocesador 40 a través de una placa analógica 45 (véase la Figura 1). Una placa de circuito impreso (la placa analógica localizada antes del procesador) controla los sensores y mide las salidas del sensor. Las placas de circuito impreso dentro de este ensamblaje del bloque térmico contienen post-amplificadores que amplifican las señales del sensor en la tarjeta sensora. La salida de los sensores son señales analógicas. Las señales analógicas se convierten en señales digitales mediante un convertidor de analógico a digital y las señales digitales se transmiten al microprocesador para su almacenamiento, análisis y presentación.

Haciendo referencia a la Figura 7C, la superficie interior 221 de la carcasa de aluminio 220b entra en contacto con la placa metálica 52 de un cartucho sensor 10 (véase la Figura 2). Sobre la superficie externa 223 de la carcasa de aluminio 220b se localiza un termistor 41 como se ilustra en la Figura 7C. Extendiéndose desde el termistor 41 hay conexiones eléctricas 229, 229' que conectan el termistor 41 con un microprocesador 40.

Encima de la superficie externa 23 de la carcasa de aluminio 220 y sobre el termistor 41, se sitúa un dispositivo termoelectrónico 230 ilustrado en la Figura 7D. Los dispositivos termoelectrónicos en el ensamblaje del bloque calefactor pueden usar, por ejemplo, el efecto Peltier para calentar y refrigerar el bloque de aluminio. Los conductores eléctricos 231, 231' suministran una corriente eléctrica programada controlada por un microprocesador 40 al dispositivo termoelectrónico 230. La dirección y duración de la corriente se controla mediante el microprocesador 40 y determina si el dispositivo termoelectrónico 230 que recubre la carcasa de aluminio 220b está en un modo de calentamiento o de refrigeración. La temperatura de la carcasa de aluminio 220b se mide mediante el termistor 41, que transmite las señales al microprocesador 40. El microprocesador 40 está programado para transmitir las señales eléctricas al dispositivo termoelectrónico, dependiendo de las señales del termistor para calentar o enfriar la carcasa de aluminio 220b, que a su vez calienta, enfría o mantiene la temperatura de una tarjeta sensora insertada en el adaptador 222. Cuando la corriente fluye por el dispositivo termoelectrónico 230 en la dirección hacia delante, la placa metálica 220b se calienta y este calor se transmite a la tarjeta sensora en el adaptador 222. Cuando la corriente fluye en la dirección inversa, la placa metálica 220b se enfría y el efecto de refrigeración se transmite a la tarjeta sensora en el adaptador 222.

ES 2 316 597 T3

Haciendo referencia a las Figuras 7D y 7E, la superficie externa 233 del dispositivo termoelectrico 230 está en contacto con una placa metálica 234. La superficie externa 235 de la placa metálica 234 está en contacto con un sumidero de calor 236 ilustrado en la Figura 7F.

5 En la Figura 7G se ilustran el adaptador del cartucho ensamblado 222, la carcasa de aluminio 220b, el termistor 41, el dispositivo termoelectrico 230, la placa metálica 234, el sumidero de calor 236 y los conductores eléctricos 229, 229' del termistor 41 y los conductores eléctricos 231, 231' del dispositivo termoelectrico 230 para el microprocesador 40.

10 En un ejemplo del ensamblaje del bloque calefactor 39, la temperatura para un cartucho sensor puede aumentarse de aproximadamente 37°C a aproximadamente 60°C a 65°C en un minuto, mantenerse a 60°C durante 12 minutos con una fluctuación de temperatura de sólo 1,0°C y refrigerarse a 37°C desde 60°C en aproximadamente dos minutos.

Funcionamiento Inicial del Ensamblaje

15 Haciendo referencia a la Figura 1, cuando el cartucho con el ensamblaje del sensor 10 y las bolsas llenas 14, 16 y 28 se usan por primera vez, la válvula 18 se controla para dirigir una de las soluciones de calibrado, por ejemplo la solución de calibrado B, hacia el ensamblaje del sensor de manera que llene completamente el canal de flujo. La bomba se detiene entonces durante un periodo de 10-30 minutos, preferiblemente de 12-15 minutos durante el cual los electrodos de sensor químico secos se hidratan mediante un ciclo térmico, por ejemplo, de 37°C a 60°C y de nuevo a 37°C.

20 En un ejemplo, el ensamblaje del sensor de electrodo químico seco 10 se inserta en el sistema de sensor electroquímico 8 y la válvula 18 se controla mediante el microprocesador 40 para dirigir las soluciones de calibrado B hacia el ensamblaje del sensor 10. El ensamblaje del bloque térmico 39 se ajusta a una temperatura tal que la temperatura de la placa térmica 52 sea suficiente para calentar la solución de calibrado en contacto con el sensor químico seco a una temperatura en el intervalo de 55°C a 75°C, preferiblemente a 60°C durante 10-30 minutos, preferiblemente 12 minutos. Después del periodo de tiempo especificado, el microprocesador 40 invierte el flujo de corriente a través del dispositivo termoelectrico para enfriar la placa térmica 52. La tarjeta sensora 50 y la solución de calibrado en contacto con la placa térmica 52 se enfrían a 37°C. La temperatura, controlada por el microprocesador 40 se mantiene a 37°C durante la vida del cartucho 37. Después de la hidratación de los sensores, el ciclo de acondicionamiento de los electrodos enzimáticos 59 empieza bombeando la solución AO 23 a la tarjeta sensora 50 y empapando los electrodos 59 durante de 1 a 6 minutos, preferiblemente durante 3 minutos, mientras que el potencial de polarización de los electrodos enzimáticos 59 se eleva de 0,25 a 0,5 V frente al electrodo de referencia interno. Durante la exposición a AO, se restaura la membrana interna de rechazo de interferencias 55 de los electrodos enzimáticos 59, como se ilustra en la Figura 3B. Además, en este ciclo, el nivel de oxígeno bajo se calibra también. Una vez completado el ciclo de AO, se inicia el ciclo de enjuagado bombeando la solución de enjuagado desde el recipiente pre-envasado 17 del canal de flujo 56 mediante la bomba peristáltica 26. Durante el ciclo de enjuagado el potencial de polarización de los electrodos enzimáticos 59 cambia de 0,5 a 0,4 V para acelerar la retirada de residuos de AO de la membrana interna de rechazo de interferencias 55. Una vez completado el ciclo de enjuagado, el potencial de polarización de los electrodos enzimáticos 59 se disminuye de nuevo a su nivel normal de aproximadamente 0,25 V frente al electrodo de referencia interno. Comienza entonces un ciclo de calibrado con las soluciones A 14 y B 16. El cartucho 37 está listo para realizar la medición de una muestra en los 30 minutos siguientes a la inserción del cartucho 37 en el sistema de sensor electroquímico 8.

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6214185 B [0006]
- JP 1028555 A [0006]
- US 5540828 A [0007] [0007]
- US 4734184 A [0041] [0082]
- US 4214968 A [0082]

Literatura no patente citada en la descripción

- BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol. 6 (2). 151-160 [0007]
- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, 17 May 1989, vol. 0132, 1 0 [0006]

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de sensor electroquímico (8) que comprende:

5 una tarjeta sensora electroquímica (50) que comprende al menos un sensor electroquímico (10), comprendiendo dicho sensor electroquímico un electrodo y una membrana de composite (60) depositada sobre el mismo, comprendiendo dicha membrana de composite una capa externa, una capa enzimática y una capa interna restaurable, en la que la capa interna restaurable comprende una membrana polimerizable y está en contacto con el electrodo; comprendiendo adicionalmente dicho sistema de sensor electroquímico (37).

10 un depósito (23) que contiene una solución de monómero electropolimerizable en comunicación fluida con la tarjeta sensora electroquímica para restaurar dicha membrana polimerizable, en el que la tarjeta sensora electroquímica y el depósito se alojan en un cartucho sensor electroquímico (37).

15 2. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 1, en el que la solución de monómero electropolimerizable está combinada con una solución de calibrado.

20 3. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 2, en el que la concentración de dicho monómero polimerizable en dicha solución de calibrado está en el intervalo de 1 mM a 100 mM.

4. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oxígeno disuelto está sustancialmente ausente en la solución de monómero electropolimerizable.

25 5. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución de monómero electropolimerizable comprende sulfito.

6. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho monómero electropolimerizable se selecciona entre benzotiofeno, fenilendiamina y dihidroxibenceno.

30 7. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho monómero electropolimerizable es fenilendiamina.

35 8. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho monómero electropolimerizable es dihidroxibenceno.

9. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho monómero electropolimerizable es benzotiofeno.

40 10. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la tarjeta sensora electroquímica comprende uno o más sensores electroquímicos seleccionados entre un sensor de electrodo enzimático, un sensor selectivo de iones, un sensor de pH, un sensor de oxígeno y un sensor de dióxido de carbono.

45 11. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la tarjeta sensora electroquímica comprende al menos un sensor de electrodo enzimático.

12. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha capa externa comprende compuestos basados en poliuretano, compuestos basados en polivinilo, compuestos basados en elastómero de silicona o compuestos basados en policarbonato.

50 13. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la capa enzimática comprende una o más enzimas generadoras de H_2O_2 .

55 14. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la capa enzimática comprende una o más enzimas seleccionadas entre glucosa oxidasa, lactato oxidasa, creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa.

15. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha capa enzimática comprende glucosa oxidasa.

60 16. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha capa enzimática comprende lactato oxidasa.

65 17. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha capa enzimática comprende creatinasa y sarcosina oxidasa.

18. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha capa enzimática comprende creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa.

ES 2 316 597 T3

19. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicha capa enzimática comprende al menos una enzima estabilizada en una matriz, comprendiendo dicha matriz adicionalmente un agente de reticulación y un estabilizador enzimático.
- 5 20. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 19, en el que el agente de reticulación es un dialdehído, un diisocianato o un diepóxido.
21. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 19 ó 20, en el que el agente de reticulación se selecciona entre glutaraldehído, 1,4-diisocianatobutano, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano.
- 10 22. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que dicho estabilizador enzimático es poliiónico.
23. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que dicho estabilizador enzimático se selecciona entre poli(N-vinilimidazol), polietilenimina, polipropilenimina, polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y derivados de las mismas.
- 15 24. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en el que dicha matriz comprende adicionalmente una proteína inerte.
- 20 25. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 24, en el que dicha proteína inerte es albúmina de suero bovino.
26. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende adicionalmente una superficie restaurada sobre dicha capa interna restaurable, en el que dicha superficie se restaura mediante un monómero polimerizado.
- 25 27. El sistema de sensor electroquímico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende adicionalmente un aparato sensor electroquímico (38) en contacto eléctrico con la tarjeta sensora electroquímica, estando configurado el aparato sensor electroquímico para medir señales eléctricas a partir de la tarjeta sensora electroquímica y siendo capaz de proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico para restaurar la membrana polimerizable polimerizando un monómero electropolimerizable.
- 30 28. El sistema de sensor electroquímico de la reivindicación 27, en el que dicho aparato sensor electroquímico es capaz adicionalmente de proporcionar un cambio en el potencial eléctrico al menos para la retirada parcial de los agentes interferentes en la membrana compuesta del sensor electroquímico.
- 35

40

45

50

55

60

65

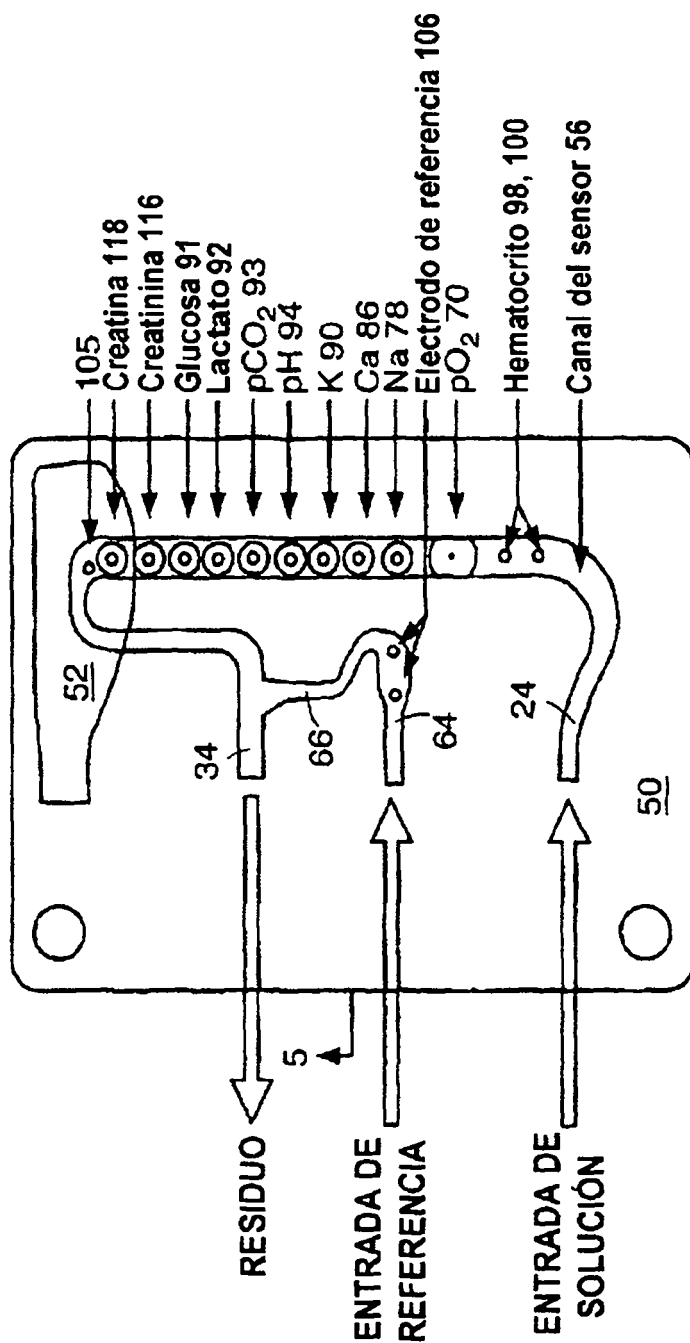


FIG. 2

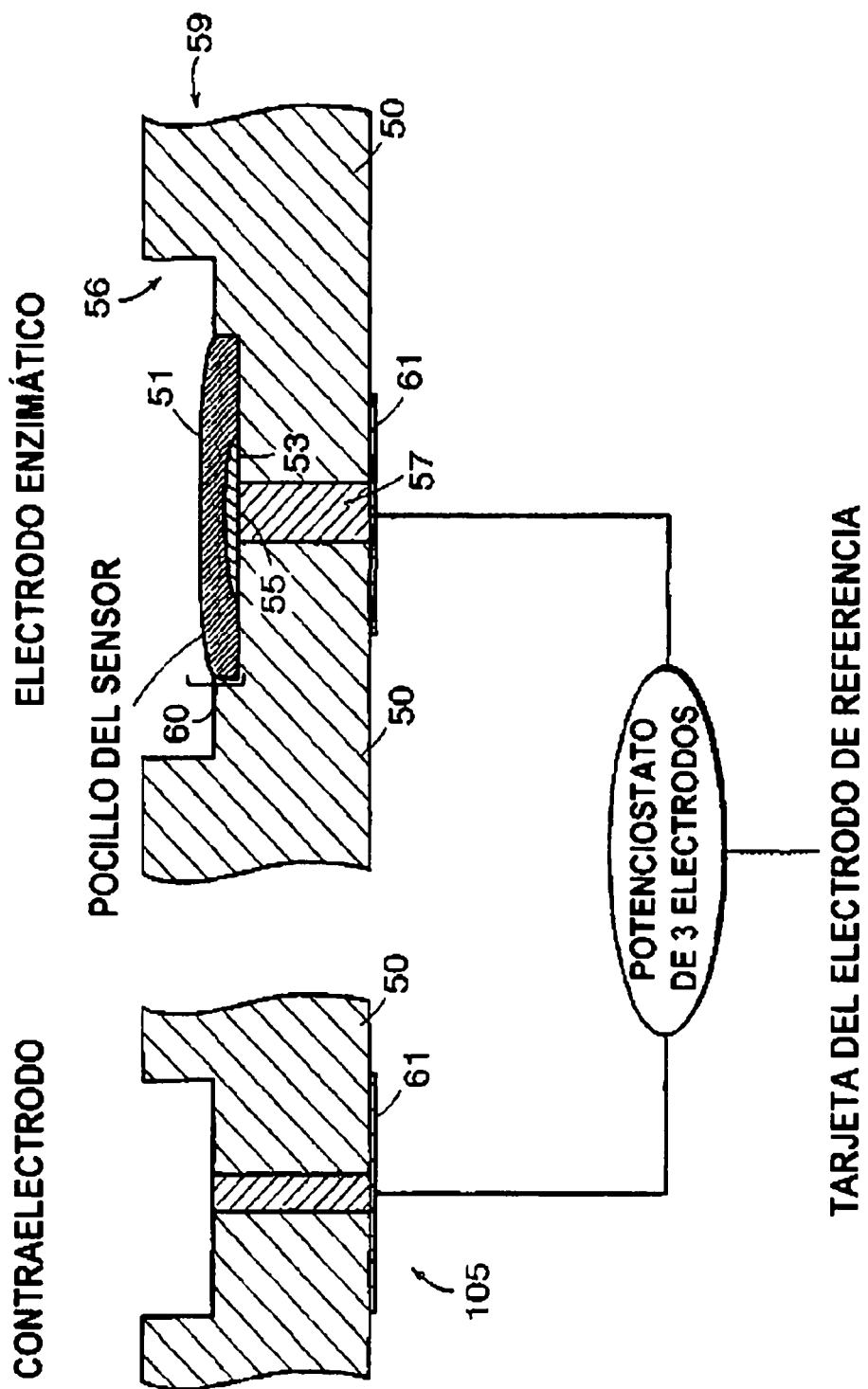


FIG. 3A

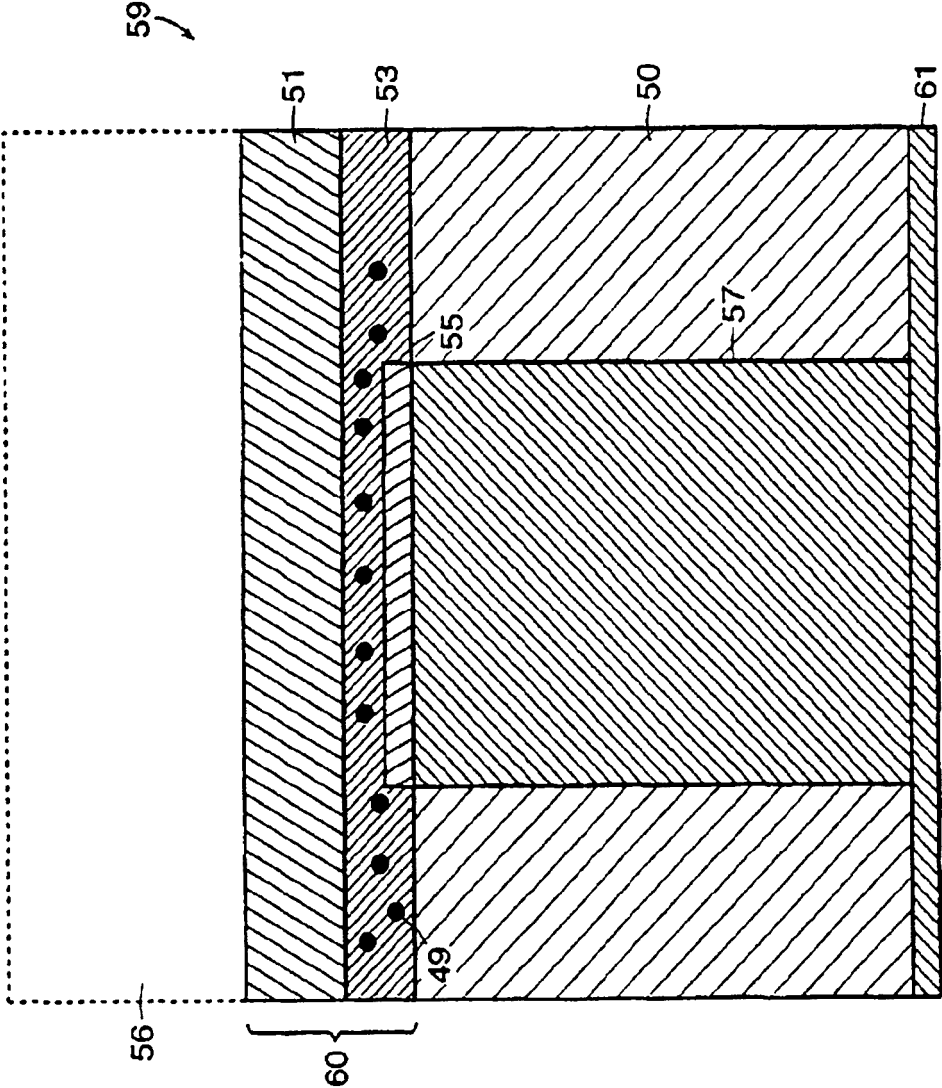


FIG. 3B

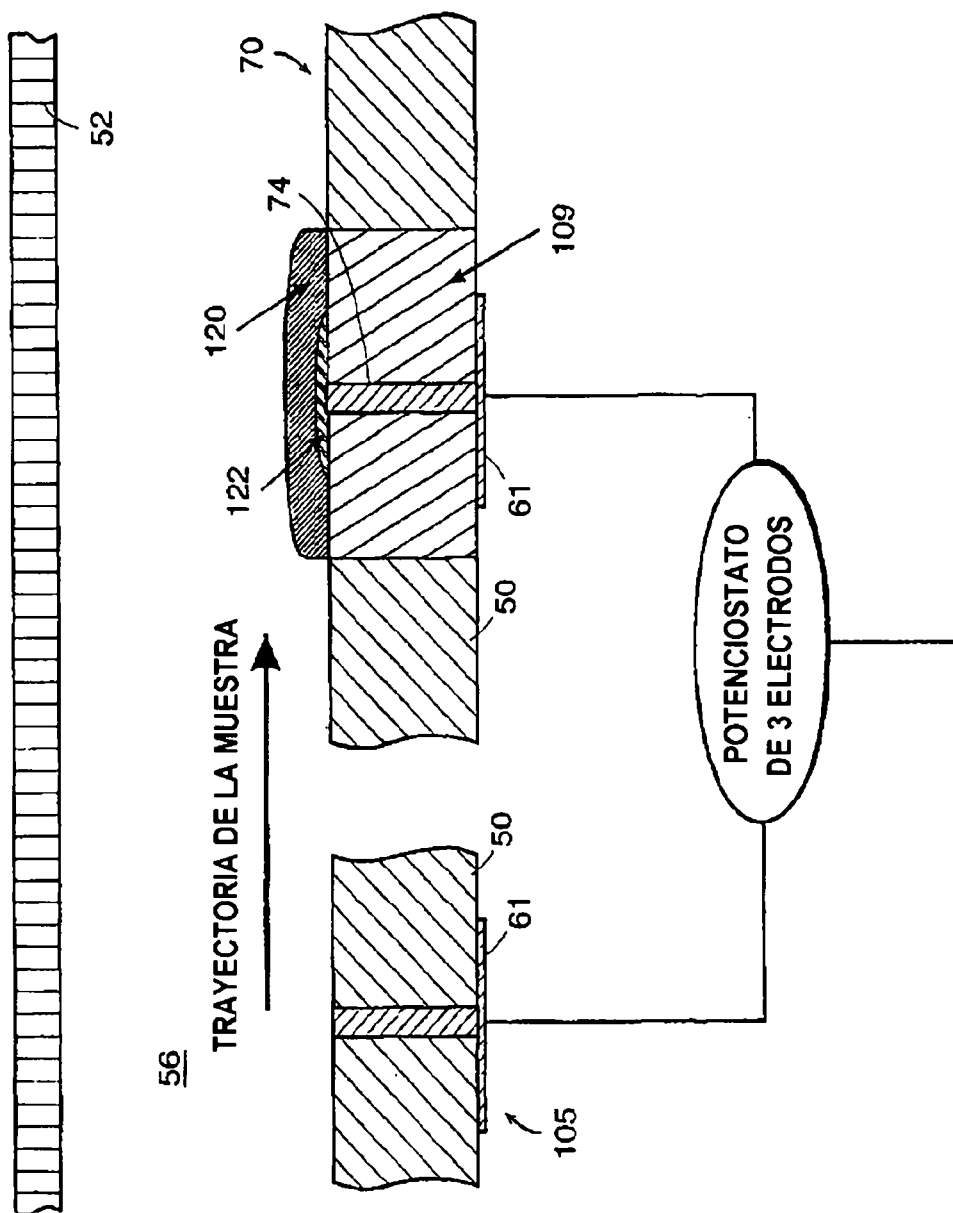


FIG. 4

TARJETA DEL ELECTRODO DE REFERENCIA

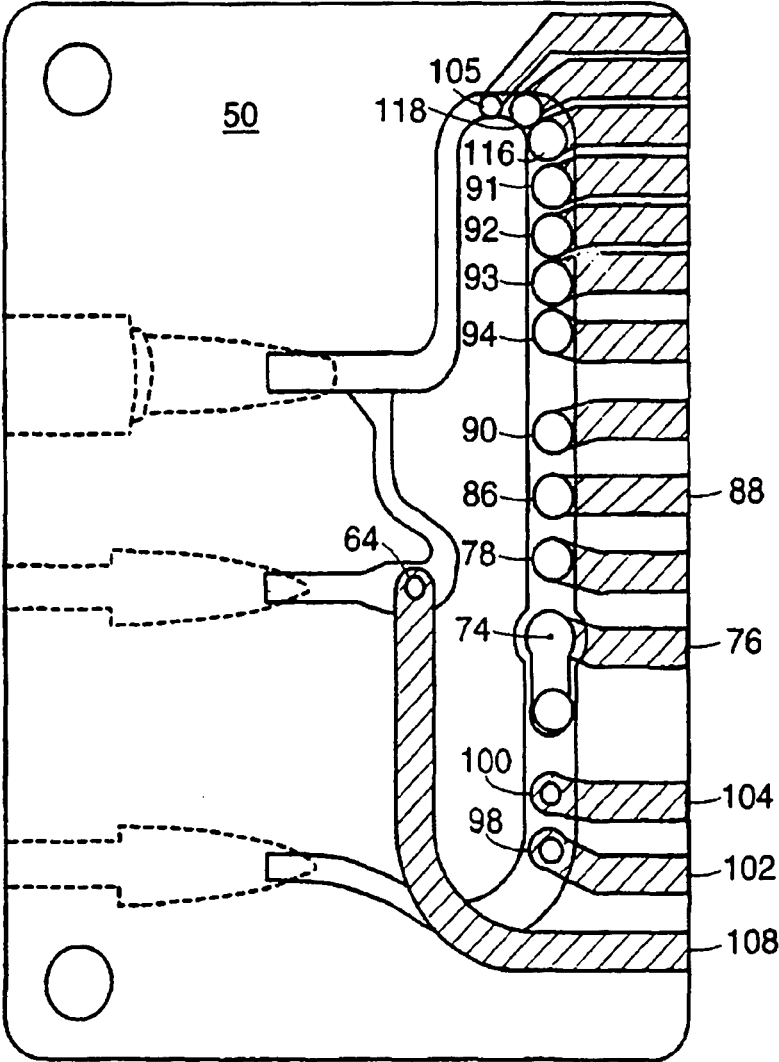


FIG. 5

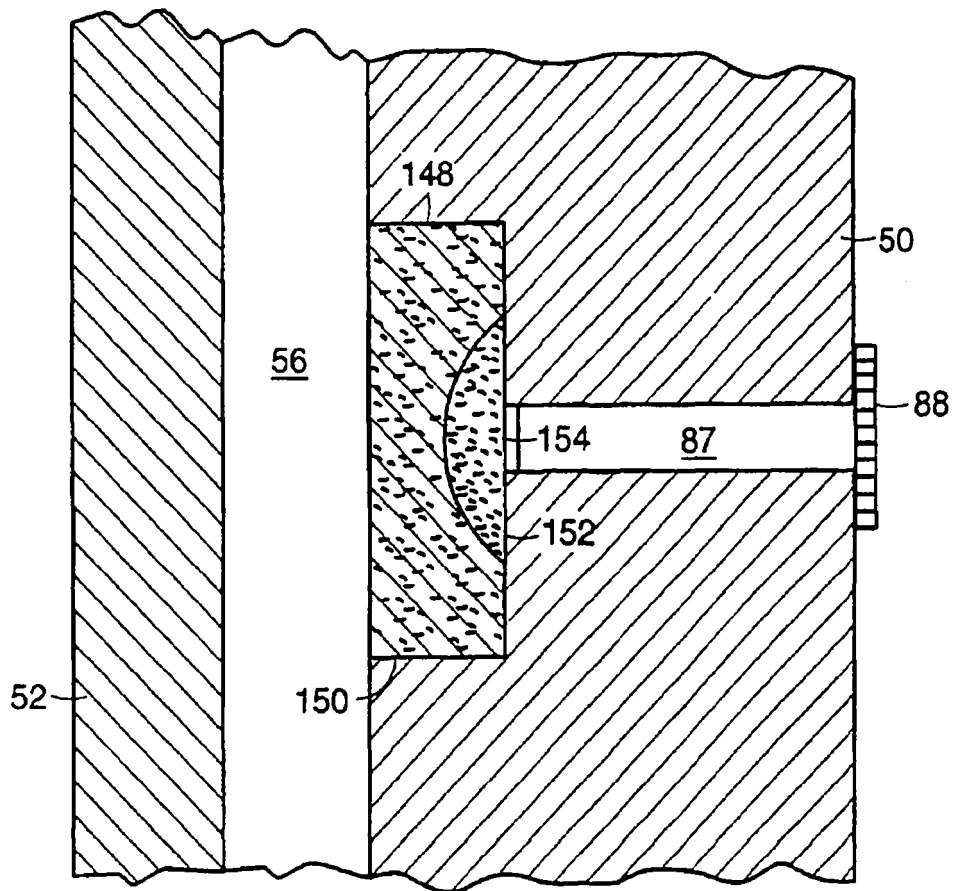


FIG. 6

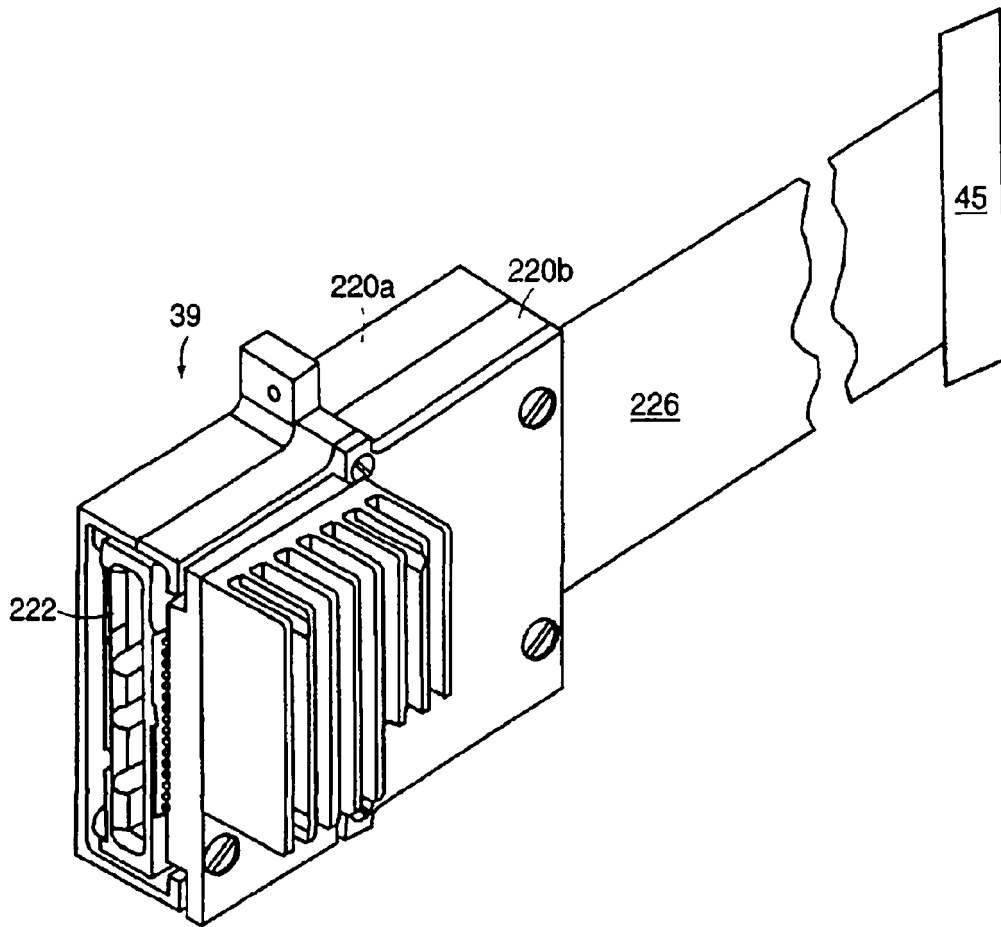


FIG. 7A

