

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 936**

51 Int. Cl.:

**C25D 9/02** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2002 E 10009522 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2261647**

54 Título: **Membrana de material compuesto para un sensor enzimático**

30 Prioridad:

**31.05.2001 US 872240**

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

**02.06.2017**

73 Titular/es:

**INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY  
(100.0%)**

**180 Hartwell Road  
Bedford, MA 01730, US**

72 Inventor/es:

**PAMIDI, PRASAD;  
SHIN, MELANIE;  
XU, CLARKE;  
MANSOURI, SOHRAB y  
COSOFRET, VASILE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 614 936 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).

**Membrana de material compuesto para un sensor enzimático****DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los sensores electroquímicos, particularmente 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 O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y similares. Estas situaciones oscilan desde una visita rutinaria de un paciente a una consulta médica hasta el seguimiento de un paciente durante cirugía a corazón abierto. La velocidad, exactitud y otras características de realización requeridas varían con cada situación.

15

20

Típicamente, los sistemas sensores electroquímicos que proporcionan análisis químicos de sangre son máquinas independientes o están adaptados para su conexión a una derivación extracorpórea o a una fuente de sangre ex vivo, tal como una máquina para el corazón/pulmones usada para mantener a un paciente durante la cirugía. Así, por ejemplo, pequeñas muestras de ensayo de sangre ex vivo se pueden desviar fuera de línea desde la vía de flujo venoso o arterial de una máquina para el corazón/los pulmones directamente a una cámara expuesta a un banco de microelectrodos que genera señales eléctricas proporcionales a las características químicas de la muestra de sangre que fluye en tiempo real.

25

Los sistemas de sensores electroquímicos son herramientas analíticas que combinan un componente de reconocimiento químico o bioquímico (por ejemplo, una enzima) como un transductor físico, tal como un electrodo de platino. El componente de reconocimiento químico o bioquímico es capaz de interaccionar de manera selectiva con un analito de interés y de generar, directa o indirectamente, una señal eléctrica a través del transductor. Los sistemas sensores electroquímicos desempeñan una función creciente en la resolución de problemas analíticos y clínicos y encuentran aplicaciones en el campo de los diagnósticos médicos.

30

La selectividad de ciertos componentes de reconocimiento bioquímicos hace posible desarrollar sensores electroquímicos que puedan detectar con exactitud ciertos analitos biológicos, incluso en una mezcla de analitos compleja, tal como sangre entera. A pesar del alto grado de selectividad de ciertos componentes de reconocimiento bioquímico, la selectividad de tales sensores en conjunto puede, sin embargo, estar comprometida por la presencia de ciertos interferentes biológicos (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido úrico, paracetamol, cisteína, etc.) que pueden interaccionar directamente con el transductor físico si no se evita que lo hagan. La exactitud y la precisión de los sistemas sensores electroquímicos con compuestos de reconocimiento bioquímicos también están comprometidas por los niveles residuales de analito que permanecen en el sensor de una muestra previa, que afectan al análisis de la muestra posterior.

40

**Sumario de la invención**

45

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema y método para aumentar la exactitud y la duración durante toda la vida 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 actúa protegiendo el sensor electroquímico del ensuciamiento o interferencia por compuestos en la muestra y, de este modo, aumenta la exactitud que se pierde por la degradación por ensuciamiento de la membrana o por interferencia por compuestos analitos de la muestra.

50

En un aspecto de la presente invención, un sensor electroquímico incluye al menos un electrodo y una membrana de material compuesto. La membrana de material compuesto incluye una capa externa, una capa enzimática y una capa interna regenerable. La capa interna está en contacto con al menos un electrodo e incluye una membrana polimerizable.

55

La capa externa de la membrana de material compuesto es una capa de membrana basada en poliuretano.

60

La capa enzimática incluye enzimas como se define en la reivindicación 1. En una realización, el sensor electroquímico incluye además una superficie regenerada sobre la capa interna en la que la superficie es regenerada por el monómero polimerizado. La capa interna del sensor electroquímico puede incluir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos.

65

En un aspecto, un cartucho de sensores electroquímicos incluye una tarjeta sensora electroquímica, al menos un sensor electroquímico y un depósito que contiene una solución de monómero electropolimerizable en comunicación

fluida con la tarjeta sensora electroquímica.

En una realización, el cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos una membrana de material compuesto. En otra realización, el cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una membrana de material compuesto con una capa interna regenerable.

En una realización, el cartucho de sensores electroquímicos incluye al menos un depósito de solución de calibración en comunicación fluida con la tarjeta sensora electroquímica. En otra realización, la solución de monómero electropolimerizable se puede combinar con la solución de calibración en un depósito único. En otra realización de la presente invención, el cartucho de sensores electroquímicos incluye una solución de monómero electropolimerizable en la solución de calibración, en la que la concentración del monómero está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mM.

En otra realización, al menos uno de los sensores electroquímicos del cartucho de sensores electroquímicos comprende un sensor de electrodo enzimático. En otra realización, el sensor electroquímico del cartucho de sensores electroquímicos se forma sobre un electrodo compuesto por un material seleccionado del grupo que consiste en platino, oro, carbono o uno de su estructura modificada. En otra realización, el sensor electroquímico incluye un monómero electropolimerizable seleccionado de un grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos. En otra realización, el sensor electroquímico es selectivo para un ion hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ion sodio, ion potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea. En otra realización más, el sensor electroquímico incluye un monómero electropolimerizable que es un derivado de fenilendiamina.

En otro aspecto, un sistema de sensores electroquímicos incluye una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos un sensor electroquímico, en el que el sensor electroquímico incluye al menos una membrana polimérica. El sistema sensor electroquímico también incluye un aparato sensor electroquímico que está en contacto eléctrico con la tarjeta sensora electroquímica. El aparato sensor electroquímico se configura para medir señales eléctricas procedentes de la tarjeta sensora electroquímica y puede proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico para la polimerización de la solución de monómero electropolimerizable a la membrana polimérica. El sistema sensor electroquímico también incluye un depósito que contiene una solución de monómero electropolimerizable 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.

En una realización, el cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos una membrana de material compuesto. En otra realización, el cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una membrana de material compuesto con una capa interna regenerable.

En una realización, el sistema de sensores electroquímicos incluye además una solución de calibración en un depósito junto con una solución de monómero electropolimerizable. La concentración de la solución de monómero electropolimerizable está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mM. En otro ejemplo, el sistema de sensores electroquímicos incluye al menos un sensor de electrodo enzimático. En otra realización más, el sistema de sensores electroquímicos incluye un sensor electroquímico que es selectivo para un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en ion hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ion sodio, ion potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea.

En otra realización más, el sistema de sensores electroquímicos incluye un monómero electropolimerizable que se selecciona de un grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos, en los que la concentración de la solución de monómero electropolimerizable en la solución de calibración es 1-100 mM. En otra realización, el sistema sensor electroquímico incluye un aparato sensor electroquímico capaz de proporcionar un potencial eléctrico durante al menos la eliminación parcial de agentes de interferencia en la membrana polimérica. En otra realización, el sistema de sensores electroquímicos incluye además una membrana externa y una capa enzimática, en el que la capa enzimática está en contacto con la membrana externa y la membrana polimérica.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a acelerar la recuperación del sensor electroquímico durante el proceso de aclarado después de exposición a una muestra, de manera que el tiempo de recuperación del sistema de sensores electroquímicos sea un período de tiempo más corto. La reducción en el tiempo de recuperación se realiza retirando agentes de interferencia 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 exposición del sensor electroquímico a una muestra son ejemplos de agentes de interferencia. Otro ejemplo de agentes de interferencia es la concentración residual del monómero electropolimerizable en la membrana polimérica después de exposición del sensor electroquímico a la solución de monómero electropolimerizable.

La eliminación de agentes de interferencia de una membrana polimérica se lleva a cabo proporcionando un sensor electroquímico que incluye un electrodo y una membrana de material compuesto, incluyendo la membrana de material compuesto al menos una membrana polimérica, una fuente eléctrica en contacto eléctrico con dicho

electrodo y aplicando un potencial eléctrico al electrodo suficiente para causar al menos una porción de los agentes interferentes en la membrana polimérica en contacto con el electrodo que se tiene que eliminar. En una realización, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0, 1 a 0, 8 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos. En otra realización, el potencial eléctrico es de aproximadamente 0, 4 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante aproximadamente 50 segundos.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al método para recuperar 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 de material compuesto, incluyendo la membrana de material compuesto al menos una membrana polimérica. El sistema sensor electroquímico también incluye un aparato sensor electroquímico en contacto eléctrico con la tarjeta sensora electroquímica. El aparato sensor electroquímico se configura para medir señales eléctricas desde la tarjeta sensora electroquímica y proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico. El sistema sensor electroquímico también incluye 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 de recuperación de las propiedades funcionales de un sensor electroquímico también incluye poner en contacto el sensor electroquímico con la solución y aplicar un potencial eléctrico de suficiente intensidad y suficiente duración para causar que se polimerice al menos una porción del monómero electropolimerizable en la solución sobre la membrana polimérica.

En una realización, el método de recuperación de las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye añadir el monómero electropolimerizable a una solución de calibración para formar la solución de monómero electropolimerizable. En una realización, el potencial eléctrico comprende un intervalo de aproximadamente 0, 1 a 0, 8 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora. En otra realización, el potencial eléctrico comprende aproximadamente 0, 4 V frente a un electrodo de referencia integrado y se aplica durante aproximadamente 3 minutos.

En una realización, el método de recuperación de las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye además la etapa de aplicar un potencial eléctrico adicional de suficiente intensidad y suficiente duración al electrodo para causar la eliminación de al menos una porción de agentes de interferencia en la membrana polimérica. En una realización, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0, 1 a 0, 8 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al método para recuperar las propiedades funcionales de un cartucho de sensores electroquímicos. El método incluye las etapas de conectar un cartucho de sensores electroquímicos que incluye un sensor electroquímico a un aparato sensor electroquímico. El sensor electroquímico incluye un electrodo y una membrana de material compuesto, que incluye al menos una membrana polimérica. El método incluye además poner en contacto el sensor electroquímico con solución de monómero electropolimerizable del cartucho y aplicar un potencial eléctrico de suficiente intensidad y suficiente duración para causar que al menos una porción de la solución de monómero electropolimerizable se polimerice sobre una membrana polimérica. En un ejemplo, el método incluye además añadir un monómero electropolimerizable a una solución de calibración para formar la solución de monómero electropolimerizable. En una realización en particular, se aplica un potencial eléctrico en un intervalo de aproximadamente 0, 1 a 0, 8 V frente al electrodo de referencia integrado. El potencial eléctrico se puede aplicar durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora. En una realización, el método también incluye aplicar un potencial eléctrico adicional de suficiente intensidad y suficiente duración al electrodo para causar la eliminación de al menos una porción de agentes de interferencia en la membrana polimérica. En una realización, el potencial eléctrico está en un intervalo de aproximadamente 0, 1 a 0, 8 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 a 200 segundos.

En otro aspecto, la invención se refiere a una membrana de material compuesto para un biosensor, como se define en la reivindicación 1.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una matriz para un sensor enzimático. La matriz incluye lactato oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizante enzimático. En una realización, la matriz forma una matriz reticulada de proteínas que tienen actividad enzimática. La matriz puede formar un electrodo electroquímico. La matriz también puede incluir seroalbúmina bovina. También se pueden incluir otras proteínas inertes similares a la seroalbúmina bovina. En otra realización, uno o más del agente de reticulación presentes en la matriz pueden incluir un dialdehído, glutaraldehído, por ejemplo, un diisocianato, 1, 4-diisocianatobutano, por ejemplo, y un diepóxido, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidodecano, como ejemplos. En otra realización, el agente de reticulación presente en la matriz es 1-10 % de glutaraldehído en peso. En otra realización más, el agente de reticulación presente en la matriz es 5 % de glutaraldehído en peso. En otra realización, el estabilizante enzimático 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 otra realización, el estabilizante enzimático presente en

la matriz es 1-20 % de polietilenimina en peso. En otra realización, el estabilizante enzimático presente en la matriz es 5 % de polietilenimina en peso.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a una matriz para un sensor enzimático que incluye creatinasa, sarcosina oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizante enzimático. En una realización, la matriz también incluye creatinasa. En una realización, la matriz forma una matriz reticulada de proteínas que tienen actividad enzimática. El sensor enzimático puede formar un sensor electroquímico. En otra realización, uno o más del agente de reticulación presentes en la matriz pueden incluir un dialdehído, glutaraldehído, por ejemplo, un diisocianato, 1, 4-diisocianatobutano, por ejemplo, y un diepóxido, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano, como ejemplos. En otra realización, el agente de reticulación presente en la matriz es 1-10 % de glutaraldehído en peso. En otra realización más, el agente de reticulación presente en la matriz es 5 % de glutaraldehído en peso. En otra realización, el estabilizante enzimático 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 otra realización, el estabilizante enzimático presente en la matriz es 1-20 % de polietilenimina en peso. En otra realización, el estabilizante enzimático presente en la matriz es 5 % de polietilenimina en peso.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a una matriz para un sensor enzimático que incluye una o más de las enzimas, lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatinasa, un agente de reticulación y un estabilizante enzimático.

Éstos y otros objetos, junto con ventajas y características de la presente invención divulgadas en el presente documento, llegarán a ser evidentes por referencia a la siguiente descripción, los dibujos adjuntos y las reivindicaciones. Además, se tiene que entender que las características de las diversas realizaciones descritas en el presente documento no son mutuamente excluyentes y pueden existir en diversas combinaciones y permutaciones.

#### Breve descripción del dibujo

Los objetos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención divulgados en el presente documento, así como la propia invención, se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas y reivindicaciones cuando se leen junto con los dibujos acompañantes. Las figuras no son necesariamente a escala, generalmente poniéndose en lugar de ello énfasis en la ilustración de los principios de la invención.

La figura 1 es un diagrama esquemático de los componentes de un aparato sensor electroquímico que incluye un cartucho de sensores con un banco de sensores y un bloque térmico para hidratación acelerada y calibración de los sensores.

La figura 2 ilustra una vista frontal inversa de la tarjeta sensora, particularmente fragmentaria, de una realización de un cartucho.

Las figuras 3A–B ilustran vistas transversales de un sensor enzimático.

La figura 4 ilustra una realización de un sensor de  $\text{pO}_2$ .

La figura 5 ilustra una vista frontal de la tarjeta de electrodo contenida en un ejemplo del cartucho.

La figura 6 ilustra vistas transversales de un sensor de iones.

Las figuras 7A–G ilustran los componentes de un conjunto de bloque térmico.

#### Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona electrodos y sistemas sensores electroquímicos para medir características de muestras acuosas, incluyendo, pero sin limitaciones, sangre, suero u otros fluidos corporales. Específicamente, la divulgación 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 de material compuesto y se puede regenerar *in situ*. Los sistemas sensores electroquímicos presentan una exactitud y precisión aumentadas y expectativas de vida eficaces aumentadas. En realizaciones preferidas de la invención, el sistema sensor se adapta para medir la concentración o la actividad de los gases en 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

Para señalar y describir de un modo más claro y conciso la materia objeto que el solicitante considera como la invención, se proporcionan las siguientes definiciones para ciertos términos usados en la siguiente descripción y reivindicaciones.

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

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 ion. Cuando se miden los potenciales eléctricos mediante un electrodo de trabajo, el método se denomina potenciometría. Todos los electrodos selectivos de iones funcionan mediante potenciometría. Cuando se mide la corriente mediante un electrodo de trabajo, el método se denomina amperometría. La medición de oxígeno se realiza por amperometría. Los electrodos de trabajo también pueden actuar incluyendo una enzima como parte de una capa enzimática que es parte de una capa de material compuesto que está en contacto íntimo con el electrodo. La enzima, que es específica para un analito en particular, produce peróxido de hidrógeno, un subproducto de la reacción catalítica de la enzima sobre el analito. Se detecta peróxido de hidrógeno mediante el electrodo y se convierte en una señal eléctrica. Un electrodo de referencia sirve como un punto de referencia eléctrico en un dispositivo electroquímico frente al que se miden y se controlan los potenciales eléctricos. En una realización, la plata -nitrato de plata forma los electrodos de referencia. Otros tipos de electrodos de referencia son mercurio-cloruro mercurioso-cloruro de potasio o plata-cloruro de plata-cloruro de potasio. Un contraelectrodo actúa como un disipador para la ruta de la corriente.

Como se usa en el presente documento, el término "sensor" es un dispositivo que responde a variaciones en la concentración de una especie química determinada, 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 mediciones selectivas de iones, los dos electrodos incluyen un electrodo selectivo de iones y un electrodo de referencia. Los electrodos enzimáticos amperométricos requieren adicionalmente un tercer electrodo, un contraelectrodo. Por otra parte, también son frecuentes los sensores enzimáticos basados en dos electrodos, un electrodo de trabajo y de referencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "electrodo selectivo de iones" se refiere, en general, a un hilo 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 selectiva de iones polimérica que está en contacto con la solución de ensayo. La membrana selectiva de iones polimérica consiste típicamente en PVC de alto peso molecular, un plastificante, un ionóforo específico de un ión en particular y una sal de borato. La superficie de la membrana polimérica está en contacto con la muestra de ensayo en un lado y la solución tampón interna en el otro lado de la membrana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sensor electroquímico seco" se refiere al electrodo selectivo de iones, descrito anteriormente, y un electrodo de referencia, descrito anteriormente. En la realización "químico seco", los electrodos selectivos de iones presentan la misma configuración que se ha descrito anteriormente, sin embargo, la solución interna que contiene cloruro, se seca, es decir, se deshidrata, de modo que deja una capa de sal seca. Para actuar como un sensor electroquímico, la sal seca se debe solubilizar en agua para obtener una solución tampón.

Como se usa en el presente documento, la expresión "electrodo enzimático" se refiere en general a una membrana de material compuesto depositada sobre un electrodo de metal, que comprende, por ejemplo, platino. La membrana de material compuesto tiene al menos tres capas distintas, incluyendo una membrana polimérica externa en el lado de la membrana de material compuesto en contacto con la muestra que forma una capa protectora, una capa enzimática media que está situada entre las capas externa e interna y una membrana polimérica interna lo más próxima al electrodo de metal que forma la membrana de rechazo de interferencias, interna. La membrana polimérica externa, que está compuesta por uno o más compuestos poliméricos, en general actúa protegiendo y manteniendo la estructura de la capa enzimática media y controlando la difusión del analito a la capa enzimática media. La capa media o enzimática comprende al menos una especie proteica con actividad enzimática. La actividad enzimática también se puede proporcionar mediante compuestos que incluyen ADN, ARN y carbohidrato, por ejemplo. La enzima se estabiliza en una matriz que conduce a la actividad de la enzima. La membrana interna o de rechazo de interferencias es una membrana polimérica que actúa aislando el electrodo de hilo de los compuestos en la muestra que interfieren con el funcionamiento y la exactitud del electrodo.

Como se usa en el presente documento, el término "hidratación" se refiere al proceso de solubilización de las sales de una capa de sal interna del sensor por el paso de agua a través de la membrana polimérica externa selectiva de iones que une un lado de la capa de sal interna, a la capa de sal interna para formar una solución. Normalmente se puede conseguir hidratación por mero contacto del exterior de la membrana polimérica y la solución de sal interna con una solución acuosa de sal para una duración requerida.

Como se usa en el presente documento, "ciclación térmica" es el proceso por el que la temperatura de un sensor electroquímico, empapado en una solución acuosa de sal, se eleva a una temperatura elevada especificada durante una extensión de tiempo especificada, y después se disminuye.

Como se usa en el presente documento, el término "calibración" se refiere al proceso por el cual las características de respuesta de un sensor a un analito específico se determinan de manera cuantitativa. Para calibrar un sensor, el sensor se expone a al menos dos muestras de reactivos, teniendo cada muestra de reactivos una concentración conocida diferente de un analito. Las respuestas, es decir, las señales, medidas por el sensor, relativas a las

concentraciones del analito en las dos muestras de reactivos diferentes, sirven como puntos de referencia para las mediciones del analito en las muestras que tiene concentraciones desconocidas del analito.

Con referencia a la figura 1, el sistema 8 de sensores electroquímicos emplea un conjunto de sensores, generalmente indicado en 10, que incorpora una pluralidad de electrodos adaptados para realizar mediciones eléctricas en una muestra, tal como una muestra de sangre, introducida en el conjunto 10 de sensores. Las muestras de sangre que se tienen que analizar con el sistema se introducen por una entrada 13a de muestras. Las muestras de sangre se obtienen mediante, por ejemplo, flebotomía, o se derivan sobre una base periódica desde un circuito de flujo sanguíneo extracorpóreo conectado a un paciente durante, por ejemplo, cirugía a corazón abierto. Las muestras de sangre se pueden introducir en la entrada 13a de muestras por otros medios automáticos o manualmente, como mediante jeringuilla. Las muestras de sangre se pueden introducir como muestras distintas.

El sistema 8 electroquímico que incluye una serie de componentes esenciales como se ha descrito anteriormente en una realización preferida de la presente invención está contenido en un cartucho 37 desechable. Un cartucho de un tipo similar se explica con detalle en la Patente de Estados Unidos n.º 4.734.184. En una realización, el sistema 8 de sensores electroquímicos incorpora en el cartucho 37 al menos dos recipientes 14 y 16 preenvasados, conteniendo cada uno una solución acuosa de calibración que tiene valores conocidos de los parámetros que se tienen que medir mediante el sistema. Para fines de referencia, la solución contenida dentro del recipiente 14 preenvasado se denominará solución de calibración A, la solución contenida dentro del recipiente 16 preenvasado se denominará solución de calibración B. En otras realizaciones, el sistema 8 electroquímico ilustrado en la figura 1 incluye un tercer recipiente 23 preenvasado que contiene la solución de calibración AO. Cada uno de los recipientes 14, 16 y 23 preenvasados contiene una cantidad suficiente de su solución de calibración para permitir que el sistema se calibre un número sustancial de veces antes de que llegue a estar vacío el recipiente preenvasado. Cuando uno o más de los recipientes 14, 16 y 23 que contienen las soluciones de calibración están vacíos, se debe reemplazar el cartucho que contiene los recipientes 14, 16 y 23 preenvasados.

En una realización particular, la solución de calibración AO contiene monómero electropolimerizable. El monómero electropolimerizable tal como *m*-fenilendiamina puede estar incluido en las soluciones de calibración en una concentración en un intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferentemente aproximadamente 15 mM. En otra realización, una solución de monómeros electropolimerizables está contenida en un recipiente preenvasado (no mostrado) separado de los recipientes 14 y 16 preenvasados para las soluciones calibradas en una concentración en un intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferentemente aproximadamente 15 mM.

Con referencia a la figura 1, en una realización, el recipiente 14 preenvasado está conectado a la entrada de una válvula 18 de varias posiciones a través de una línea 20 de flujo y el recipiente 16 preenvasado está conectado a una segunda entrada de la válvula 18 de varias posiciones a través de una línea 22 de flujo. En otra realización más, el recipiente 23 está conectado a una tercera entrada de la válvula 18 de varias posiciones a través de una línea 25 de flujo. Otro recipiente 17 contiene una solución de aclarado y está conectado a la entrada de la válvula 18 de varias posiciones a través de una línea 21 de flujo. En otra realización más, la bolsa 17 de aclarado se elimina y se usa una de las soluciones de calibración A o B como una solución de aclarado, también. La línea 12 de salida es la salida de la válvula 18 de varias posiciones y está conectada a la línea de entrada 13 de la muestra por un estilete 11. Dependiendo de la posición de la válvula 18, las líneas de entrada 20, 21, 22, 25 o el aire está abierto a la válvula 18. De manera similar, cuando el estilete está en una posición normal (posición 11b) de la línea de entrada 13b de la muestra, la línea 12b está abierta a la línea de entrada 13b de la muestra y permite el paso de la solución de calibración o de aclarado, o de aire, por la línea de entrada 13b de la muestra al conjunto 10 de sensores a través de la línea 24, facilitada por la operación de una bomba peristáltica ilustrada esquemáticamente en 26. Sin embargo, en una muestra que acepta el modo (13a), la línea 12 se separa de la línea de entrada de la muestra (posición 12a) y la muestra se introduce directamente en el conjunto 10 de sensores a través de la línea 24, facilitado por la operación de la bomba peristáltica 26.

El cartucho 37 también incluye un recipiente 28, para una solución de referencia. El recipiente 28 está conectado al conjunto de sensores mediante una línea de flujo 30. El sistema incluye además un recipiente 32 para desechos, que recibe las muestras de sangre, las soluciones de calibración y la solución de referencia después de que hayan pasado por el conjunto 10 de sensores, a través de un conducto 34 flexible que presenta entrada desde el conjunto 10 de sensores.

Tanto el conducto 34 de flujo de desechos como la línea 30 de flujo de solución de referencia consisten en o incluyen secciones de tubería de paredes flexibles que pasan a través de la bomba peristáltica 26. La bomba 26 comprime y recorre las secciones flexibles de las líneas 30 y 34 de flujo para inducir un flujo presurizado de solución de referencia desde el recipiente 28 al conjunto 10 de electrodos y crear una presión negativa sobre los productos de desecho en la línea 34 de flujo de manera que se extraigan fluidos, incluyendo los fluidos con los monómeros polimerizables, en la línea 24 de flujo a través de pasos en el conjunto 10 de electrodos pasadas las membranas de los sensores. Esta disposición, a diferencia de la alternativa de inducir presión positiva en la sangre y las soluciones de calibración para forzarlas a través del conjunto 10 de electrodos, evita la imposición de fuerzas mecánicas innecesarias y, posiblemente, traumáticas en la muestra de sangre y minimiza las posibilidades de fugas en el conjunto 10 de electrodos.

El cartucho 37 también contiene una tarjeta 50 sensora que proporciona una cámara impermeable a los gases de volumen bajo, en que la muestra, tal como una muestra de sangre, solución de calibración o solución que contiene monómero, se presenta a uno o más sensores electroquímicos, es decir, los sensores de pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, glucosa, lactato, creatina, creatinina y hematocrito, junto con el electrodo de referencia indicado colectivamente como sensores 10, son partes integrales de la cámara. Las membranas hidrófobas químicamente sensibles formadas típicamente a partir de polímeros, tales como cloruro de polivinilo, ionóforos específicos y un plastificante adecuado, se unen de manera permanente al cuerpo de la cámara. Estas membranas hidrófobas, químicamente sensibles, descritas a continuación con detalle, son la interfaz entre la muestra o las soluciones de calibración y la solución tampón en contacto con el electrodo interno (plata/cloruro de plata).

En una realización, con referencia aún a la figura 1, hay incluidas en el cartucho 37 tres soluciones que permiten calibraciones a concentraciones altas y bajas para todos los parámetros excepto el hematocrito, que se calibra en un nivel. En una realización, el cartucho 37 también incluye el brazo 5 del rotor para entrada de la muestra, la tubería 24, 30 y 34 de la bomba, el estilete 11 de muestreo, una bolsa 32 de desechos, el recipiente 28 de la solución de referencia, el recipiente 17 de la solución de aclarado, los recipientes 14, 16 y 23 de la solución de calibración, la válvula 33 de comprobación y los tubos 12, 20, 21, 22 y 25. Se evita que las muestras de sangre que se han analizado fluyan de vuelta a la tarjeta 50 sensora del recipiente 32 de desechos debido a la presencia de una válvula 33 de comprobación de un solo sentido en la línea 34 de desecho. Después del uso en el sistema 8, se desea que el cartucho 37 se deseché y se reemplace por otro cartucho.

Con referencia a la figura 1, los sensores están disponibles como un banco de electrodos 10 fabricados en una tarjeta 50 de plástico y alojados en el cartucho 37 desechable que interacciona con un conjunto 39 de bloque térmico de una máquina de análisis químico de sangre adaptada de manera conveniente. El conjunto 39 de bloque térmico aloja los dispositivos de calentamiento/enfriamiento, tales como un elemento resistivo o un dispositivo de efecto Peltier, un termistor 41 para vigilar y controlar la temperatura, la interfaz 38 eléctrica entre los sensores en la tarjeta 50 de plástico y el microprocesador 40 a través del tablero 45 analógico. El tablero 45 analógico aloja convertidores de analógico a digital y digital a analógico. La señal de la interfaz 38 del electrodo pasa a través del convertidor de analógico a digital, convertido en forma digital para el procesador 40 para almacenar y presentar. A la inversa, las señales digitales del procesador 40, por ejemplo, el voltaje de polarización para el sensor de oxígeno, van por el convertidor de digital a analógico, convertido en una forma analógica y se alimenta a los sensores para el control, a través de la interfaz 38 del electrodo.

El sistema 8 de sensores electroquímicos se forma en la inserción del cartucho 37 en el aparato sensor electroquímico. Tras la inserción, la tarjeta 10 sensora se dispone en el conjunto 39 de bloques del calentador, descrito con detalle a continuación y el conjunto de calentamiento/enfriamiento regulado por el microprocesador 40 cicla la temperatura de la tarjeta 50 sensora y la solución en contacto con los sensores en el interior de la tarjeta 50 sensora a través de una temperatura específica para una duración especificada. El conjunto 39 de bloques del calentador permite el calentamiento y enfriamiento rápidos aplicando, por ejemplo, un dispositivo termoeléctrico, por ejemplo, el efecto Peltier, controlado mediante un termistor 41, todo controlado mediante el microprocesador 40. Los sensores se conectan a la interfaz 38 del electrodo que selecciona una de la pluralidad de señales eléctricas generadas por los sensores y pasa la señal eléctrica al microprocesador 40 en la máquina por un convertidor de analógico a digital en el tablero 45 analógico, donde se convierte de forma analógica a digital, adecuada para almacenamiento y presentación. Con referencia a la figura 1, el conjunto 10 de electrodos presenta una serie de conectores 36 del borde en un banco, que permiten que se conecte en un conector 38 compatible hembra para que los electrodos formados en el conjunto 10 se puedan conectar al microprocesador 40 a través del tablero 45 analógico. El microprocesador 40 se conecta a la válvula 18 de múltiples puertos a través de un conductor 43 de válvulas por una línea 42 y al motor de la bomba peristáltica 26 mediante un conductor 45 de la bomba por una línea 44. El microprocesador 40 controla la posición del brazo 5 de la muestra por el conductor 15 del brazo y la posición de la válvula 18 y la energización de la bomba 26 para producir secuencias de muestras de sangre y soluciones de calibración que tienen que pasar por el conjunto 10 de electrodos. Cuando las soluciones de calibración de, por ejemplo, los recipientes 14, 16 y 23 se bombean al conjunto 10 de electrodos, los electrodos que forman parte del conjunto hacen mediciones de los parámetros de la muestra y el microprocesador 40 almacena estos valores eléctricos. Basándose en mediciones hechas durante el paso de las soluciones de calibración a través del conjunto 10 de electrodos y los valores conocidos de los parámetros medidos contenidos dentro de la solución de calibración de los recipientes 14, 16 y 23, el microprocesador 40 crea de manera eficaz una curva de calibración para cada uno de los parámetros medidos de manera que cuando se haga pasar una muestra de sangre por el conjunto 10 de electrodos las mediciones hechas por los electrodos se puedan usar para derivar mediciones precisas de los parámetros de interés. Estos parámetros se almacenan y se presentan mediante el microprocesador 40. El microprocesador 40 se programa de manera conveniente para realizar funciones de medición, cálculo, almacenamiento y control, tales como diferencias en potencial eléctrico por uno o más electrodos.

#### Soluciones de calibración

En una realización, una composición de la solución A de calibración usada para la calibración del segundo punto, preparada a 37 °C y a presión atmosférica tonometrada con 9 % CO<sub>2</sub> 14 % de O<sub>2</sub> y 77 % de gas helio, es como

sigue: tampón orgánico de pH 6,9;  $p\text{CO}_2 = 63$  mm de Hg ;  $p\text{O}_2 = 100$  mm de Hg ;  $\text{Na}^+ = 100$  mmoles/l;  $\text{K}^+ = 7$  mmoles/l;  $\text{Ca}^{++} = 2,5$  mmoles/l; glucosa = 150 mg/dl; lactato=4 mmoles/l; creatina= 0,5 mmoles/l; creatinina= 0,5 mmoles/l; tensioactivo y conservante inerte.

- 5 En otra realización, una composición de la solución B de calibración usada para la calibración y aclarado de un punto, preparada a 37 °C y a presión absoluta de 700 mm de Hg tonometrada con 27 % de  $\text{O}_2$ , 5 % de  $\text{CO}_2$  y 68 % de gas helio, es como sigue: tampón orgánico de pH 7,40;  $p\text{CO}_2 = 34$  mm de Hg;  $p\text{O}_2 = 180$  mm de Hg);  $\text{Na}^+ = 140$  mmol/l;  $\text{K}^+ = 3,5$  mmol/l;  $\text{Ca}^{++} = 1,0$  mmol/l; tensioactivo y conservante inerte.

- 10 En otra realización más, una composición preferida de la solución AO de calibración para la calibración de oxígeno de bajo nivel y regeneración *in situ* de la membrana polimérica interna para los sensores enzimáticos contiene solución acuosa de sal de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ; 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;  $\text{KNO}_3 = 1$  mol/l; tensioactivo.

- 15 Las composiciones de las soluciones de calibración 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 espaciados por el intervalo de valores permisibles que se miden mediante el sistema, proporcionando una calibración de 2 puntos equilibrados para el instrumento. La solución de calibración AO se elige para la calibración de oxígeno de bajo nivel y la regeneración de la membrana polimérica interna en los sensores de glucosa, creatina, creatinina y lactato.

- 20 Las composiciones de calibración A y B se preparan mediante la premezcla de todos los constituyentes en un cierto orden partiendo del tampón y terminando con la sal de bicarbonato de sodio, después midiendo con el tonómetro la solución con oxígeno y  $\text{CO}_2$  mezclado con helio para producir el nivel deseado de  $p\text{CO}_2$  y  $p\text{O}_2$ . La solución de calibración AO se prepara con una ligera diferencia en el procedimiento. Las sales con la excepción de sulfito de sodio, *m*-fenilendiamina y bicarbonato de sodio se añaden a agua y la solución se mide con el tonómetro con helio para llevar el  $p\text{O}_2$  a menos de 30 mm de Hg. Después, se añaden las sales restantes a la solución y se mide mediante tonómetro la mezcla final con mezcla de  $p\text{CO}_2$  y helio para producir el nivel de  $p\text{CO}_2$  deseado.

- 30 Se añade al menos un monómero electropolimerizable a al menos una de las soluciones de calibración, solución AO en el recipiente 23 por ejemplo. La ausencia de oxígeno disuelto en la solución AO, debido a la presencia de ion sulfito, permite una vida útil más larga de monómero electropolimerizable en la solución AO debido a que el oxígeno disuelto oxidará el monómero electropolimerizable y, de este modo, hace que el monómero no pueda polimerizar. Los monómeros electropolimerizables *m*-fenilendiamina por ejemplo, se pueden incluir en una solución de calibración en una concentración en un intervalo entre aproximadamente 1 y 100 mM, preferentemente 15 mM. El monómero electropolimerizable puede estar incluido en el cartucho 37 en un depósito aparte.

- 35 La temperatura y la presión a las que se preparan las soluciones de calibración y su método de envasado deben ser tales que se impidan la posibilidad de que salgan gases disueltos de la solución en el recipiente, que afectaría a la concentración de gases en las soluciones de calibración y se minimice la tendencia a permear los gases a través incluso de los materiales más impermeables obtenibles de forma práctica. Las soluciones de calibración se envasan con las soluciones llenando completamente los recipientes, de manera que no haya cámara de aire, evacuando los recipientes previamente a su llenado de una manera que se describirá más adelante.

- 45 Llenando con la solución de calibración el recipiente 14, 16, 23 de paredes flexibles, evacuados, a temperaturas elevadas y presión subatmosférica, la solución no tendrá ninguna tendencia a una temperatura de uso inferior para desgasificación y producir de este modo burbujas de gas en el recipiente. Si se produce desgasificación, las concentraciones de los gases en la solución se verían afectadas, creando una falta de precisión en la calibración de los instrumentos. De manera similar, las soluciones de calibración no se deben envasar a una presión demasiado baja, es decir, no por debajo de aproximadamente 625 mm de Hg, debido a que la capacidad de absorción de la solución para gases aumenta de manera concebible a medida que disminuye la presión de envasado y por debajo de ese valor de la presión la capacidad de absorción de la solución puede ser suficientemente alta como para que tienda a extraer gases dentro por la ligera permeabilidad inherente de incluso el material de envasado flexible impermeable a la mayoría de los gases, durante largos periodos de tiempo. De acuerdo con eso, se prefiere una presión de envasado en el intervalo de 625-700 mm de Hg.

- 50 En una realización, una solución de calibración preparada a una temperatura en exceso de su temperatura de uso deseada, de manera que a la temperatura inferior haya menos tendencia a que se desgasifiquen los gases disueltos. Esto coopera con el envasado a presión reducida para minimizar la posibilidad de desgasificación.

- 60 La solución de calibración A, B y AO se preparan a una temperatura por encima de su temperatura de uso deseada a una presión controlada próxima a la presión atmosférica. Por el uso de temperatura elevada (por ejemplo, 37 °C) se puede preparar la solución a aproximadamente presión atmosférica sin ninguna posibilidad de microburbujas posteriores dentro del recipiente o transferencia de gas a través del recipiente cuando se envasa en un recipiente impermeable a los gases, flexible con espacio de cabeza cero.

Las envolturas que forman los recipientes 14, 16, 23, preenvasados de la solución de calibración se forman, por ejemplo, con láminas rectangulares, se sellan con calor en los bordes y se sellan con calor en una esquina a un vástago de entrada de la válvula 18 que se usa para fines de llenado. En la realización preferida ilustrada, los recipientes 14, 16 y 23 preenvasados y las líneas 20, 22 y 25 de los recipientes preenvasados se forman en un grupo unitario con la válvula 18 de manera que el espacio muerto de la fase gaseosa en las líneas 20, 22, 25 se evita de ese modo. En un procedimiento preferido para purgar y llenar las bolsas de las envolturas, la envoltura se evacua primero y después se llena con la solución preparada. La bolsa se agita después mientras la solución en exceso fluye fuera de manera continua de la bolsa. Este proceso retira toda burbuja de gas residual de la bolsa. A continuación, se sella la solución en el recipiente.

Las soluciones de calibración de los recipientes 14, 16 y 23 preenvasados presentan excelente estabilidad y una vida útil larga. Cuando está a la temperatura de uso y a presión atmosférica, no hay posibilidad de desgasificación alguna del líquido para formar burbujas de gas dentro de los recipientes 14, 16 y 23 preenvasados.

#### Solución de referencia

La solución de referencia dispuesta en el recipiente 28 preenvasado se emplea en el conjunto 10 de electrodos como una fuente de suministro a un electrodo de referencia para proporcionar una unión líquida y aislar de ese modo el electrodo de referencia del potencial electroquímico variable de la solución de calibración o la sangre de una manera que se describirá más adelante. En una realización, la solución es 1 mol/l de nitrato de potasio y 1 mmol/l de solución de nitrato de plata. La solución también contiene un tensioactivo, tal como Brij 35. La solución se envasa en un recipiente flexible sellado sin espacio de cabeza.

#### Conjunto de electrodos

Haciendo referencia a la figura 1, durante el funcionamiento de la bomba 26, el conjunto 10 de electrodos recibe un flujo pulsante constante de la solución de referencia mediante la línea 30 y flujos pulsantes intermitentes, secuenciales, de la muestra de sangre o de una de las soluciones de calibración mediante la línea 24. El conjunto también proporciona una salida correspondiente de sus productos de desecho a una bolsa 32 de recogida de desecho mediante la línea 34.

Haciendo referencia a la figura 2, a modo de ejemplo, el conjunto 10 de electrodos en una realización preferida consiste en una tarjeta 50 rectangular estructuralmente rígida de cloruro de polivinilo que tiene con una placa 52 de cobertura de aluminio (u otro material adecuado) rectangular adherida a una de sus superficies. La placa 52 de cobertura cierra los canales 56 de flujo formados en una superficie de la tarjeta 50 y también actúa como medio de transferencia de calor mediante hidratación de los sensores por ciclado térmico, descrito a continuación, y para mantener los fluidos que fluyen a través del conjunto 10 de electrodos y los propios electrodos, a una temperatura constante durante la calibración y durante la medición de los parámetros relevantes en una muestra del paciente. Esto se puede conseguir midiendo la temperatura de la placa 52 y empleando un elemento de calentamiento o enfriamiento 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 pozo 64, formado en la superficie del sustrato 50 de la misma manera que los otros canales 56 de flujo y se cubren de manera similar con la placa 52 de metal. La línea 30 de flujo de solución de referencia pasa por un agujero inclinado en el pozo 64. El pozo 64 está conectado a la sección 34 de salida del canal 56 de flujo a través de una sección 66 capilar muy delgada formada en la superficie del sustrato 50 de plástico de la misma manera que los canales 56 de flujo principales. El canal 66 capilar es sustancialmente más superficial y más estrecho que el canal 56 de flujo principal; su sección transversal es aproximadamente 0,5 mm cuadrados. El fluido de referencia bombeado al pozo 64 por la bomba 26, mediante una línea 30 (véase también la figura 1), llena el pozo y se fuerza a través de la sección 66 capilar donde se une a la corriente de salida de fluido que pasa por la sección 56 del canal de flujo principal y después fluye con él a la bolsa 32 de desecho. La influencia combinada de su mayor densidad descrita anteriormente y la capilaridad del canal 66 de flujo sirve para minimizar cualquier posibilidad de que pase solución de calibración o sangre hacia abajo por el canal 66 al pozo 64 y que se perturben las mediciones electroquímicas.

Como una cantidad de muestra de sangre o solución de calibración introducida en el canal 24 de flujo pasa por el canal 56 de flujo a la sección 34 de salida, pasa por una serie de electrodos como se ilustra en la figura 2.

En referencia a las figuras 1 y 2, la placa 52 de calor colinda y forma una pared del canal 56 de la muestra. La placa 52 de calor está en contacto con el dispositivo de efecto Peltier del conjunto 39 de bloque térmico descrito a continuación. El conjunto 39 de bloque térmico es capaz de cambiar y controlar la temperatura de la placa 52 de calor entre 15 °C y 75 °C. El cambio y control de la temperatura se controla mediante un termistor 41 y se regula mediante el microprocesador 40. Un reloj digital interno del microprocesador 40 controla el tiempo y puede encender y apagar el conjunto 39 de bloque térmico según un programa prefijado. Por tanto, el microprocesador 40 controla el conjunto 39 de bloque térmico, regulando el ajuste de la temperatura y la duración de cada temperatura fijada de la placa 52 de calor.

### Los electrodos

5 El orden de conjunto de los electrodos proporcionado a continuación es solo como ejemplo y no se pretende que limite el orden proporcionado.

### El par de electrodos del hematocrito

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

### El sensor de oxígeno

15 Haciendo referencia a la figura 2, el siguiente sensor en el canal 56 de flujo es el sensor 70 de oxígeno con una configuración de tres electrodos, también ilustrado en la figura 4.

### El electrodo sensor de iones potasio, calcio y sodio

20 A continuación, en la parte superior del canal de flujo es un electrodo 78 sensor de sodio, seguido de un electrodo 86 sensor de calcio y un electrodo 90 sensor de potasio, incluyendo una membrana activa y un hilo de plata fijado y un conector de borde asociado.

### El electrodo de pH

25 Haciendo referencia a la figura 2, después, a lo largo del canal 56 de flujo hay un electrodo 94 sensible al pH también ilustrado en la figura 6, que incluye una membrana 148 y un hilo 87 de plata fijado o ajustado a presión por el espesor del plástico 50 en el canal 56 de flujo. Haciendo referencia a la figura 6, unido en el lado opuesto del canal 56 de flujo hay una sección 88 conductora impresa de almohadilla (también véase la figura 5), que forma un conector de borde. La naturaleza de este electrodo de pH se describirá con detalle más adelante.

### El electrodo de dióxido de carbono

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

### El electrodo de lactato

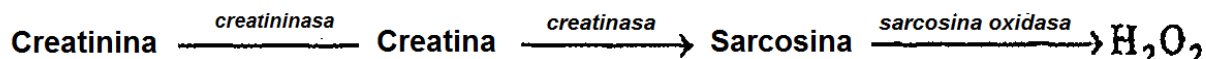
40 Haciendo referencia a la FIG. 2, a continuación, a lo largo del canal 56 de flujo, el electrodo 92 de lactato funciona midiendo subproductos de una reacción enzimática de la lactato oxidasa sobre lactato. El lactato oxidasa presente en la capa enzimática oxida el lactato que produce peróxido de hidrógeno,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

### El electrodo de glucosa

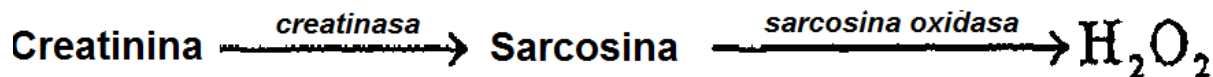
45 Haciendo referencia a la figura 2, un electrodo 91 de glucosa es el electrodo siguiente, que, como el electrodo 92 de lactato, funciona mediante la detección de peróxido de hidrógeno producido por una reacción enzimática en la capa enzimática. La enzima glucosa oxidasa específicamente oxida la glucosa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

### Los electrodos de creatina y creatinina:

50 La medición de creatinina en una muestra de sangre requiere dos electrodos. Un electrodo mide la concentración total de creatinina y creatina y el otro electrodo mide la concentración de solo creatina. La concentración de creatinina se determina mediante la resta de la creatina de las concentraciones de creatina y creatinina combinadas. Haciendo referencia a la figura 2, los siguientes dos electrodos, creatinina 116 y creatina 118, que, como el electrodo 91 de glucosa y el electrodo 92 de lactato, funcionan mediante la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido mediante la reacción enzimática en sus respectivas capas enzimáticas. En el electrodo 116 de creatinina, la capa enzimática incluye una mezcla de tres enzimas: creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla enzimática oxida específicamente creatinina y creatina y produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la siguiente reacción en cascada.



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



### La tierra

La tierra 105 ilustrada en la figura 2 es un hilo de plata insertado a través del sustrato 50. Una tierra sirve como un punto de referencia eléctrico común para todos los electrodos. La tierra también puede servir como un contraelectrodo para el sistema de sensores amperométricos.

### El electrodo de referencia

Como se ilustra en la figura 2, dos hilos 106 de plata están fijados por el espesor del tablero 50 de sustrato de plástico en el pozo 64 de solución de referencia para actuar como el electrodo de referencia integrado. El uso de dos hilos 106 de plata que están conectados eléctricamente asegura el contacto continuo entre el hilo de plata y la solución de referencia en presencia de burbujas de aire. Las burbujas de aire pueden formar en el canal de referencia como resultado de la desgasificación de la solución de referencia a la temperatura elevada del control del sensor. Un elemento 108 de circuito impreso, también ilustrado en la figura 5, se extiende a lo largo de la parte de atrás del panel entre un extremo de este electrodo de referencia y el borde del tablero para proporcionar un conector de borde.

La construcción y el funcionamiento específicos de los electrodos se describirán ahora con detalle.

### Detalles 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.º 4.214.968 y la patente de Estados Unidos n.º 4.734.184.

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

### Polímero de membrana selectiva de iones

Los polímeros para su uso en la membrana selectiva de iones incluyen cualquiera de los polímeros naturales o sintéticos hidrófobos capaces de formar películas delgadas de suficiente permeabilidad para producir, junto con los ionóforos y disolvente o disolventes ionóforos, movilidad iónica aparente a su través. Se han encontrado útiles específicamente cloruro de polivinilo, cloruro de vinilideno, acrilonitrilo, poliuretanos (en particular poliuretanos aromáticos), copolímeros de cloruro de vinilo y cloruro de polivinilideno, polivinilbutiral, polivinilformal, acetato de polivinilo, elastómeros de silicona y copolímeros de alcohol polivinílico, ésteres de celulosa, policarbonatos, polímeros carboxilados de cloruro de polivinilo y mezclas y copolímeros de tales materiales. Las películas de dichos materiales que incluyen los ionóforos y plastificantes se pueden preparar usando técnicas de recubrimiento de película o fundición convencionales y, como se muestra en los ejemplos siguientes, se pueden formar mediante recubrimiento y formación de película directamente sobre el electrodo de referencia interno o alguna intercapa adecuada o por formación por separado y laminación a la misma.

### Ionóforo

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

La selectividad del electrodo para un ion en particular se debe a la naturaleza química del ionóforo y, por tanto, el uso de diferentes componentes químicos ya que el ionóforo proporciona diferentes membranas para su uso en electrodos selectivos de iones específicos para diferentes iones. Ejemplos de tales componentes son un gran número de sustancias, algunas de ellas conocidas como antibióticos, que incluyen:

- (1) valinomicina, un ionóforo selectivo de potasio;
- (2) poliéteres cíclicos de diversa constitución que hacen la membrana selectiva a litio, rubidio, potasio, cesio o sodio y
- (3) otras sustancias con selectividad iónica similar a la valinomicina, tales como otras sustancias del grupo de la

valinomicina, tetralactonas, macrólidos actinas (monactina, nonactina, dinactina, trinactina), el grupo enniatina (enniatina A, B), ciclohexadepsipéptidos, gramicidina, nigericina, dianemicina, nistatina, monensina, ésteres de monensina (especialmente metilmonensina para membranas selectivas de iones sodio), antamanida y alameticina (polipéptidos cíclicos).

Otros numerosos materiales útiles se describen en las publicaciones y patentes anteriores, así como en otra bibliografía sobre este tema.

La concentración de ionóforo en la membrana variará, por supuesto, con el vehículo concreto usado, el análisis iónico experimentado, el plastificante, etc. Se ha encontrado en general, sin embargo, que las concentraciones de ionóforos inferiores a aproximadamente 0,1 g/m<sup>2</sup> de membrana suponiendo los espesores de membrana preferidos en el presente documento dan como resultado respuestas marginales y, en general, no deseables. Las concentraciones de ionóforo de entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,5 g/m<sup>2</sup> son preferidas. El ionóforo se puede incorporar a niveles mucho mayores que éste; sin embargo, debido al coste de muchos de estos materiales, el uso de tales niveles no es económicamente sólido.

#### Plastificante

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

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

La otra característica altamente deseable es que el plastificante sea suficientemente insoluble en agua para que no migre significativamente a una muestra acuosa puesta en contacto con la superficie de la membrana como se describe de ahora en adelante. En general, un límite de solubilidad superior en agua sería aproximadamente 4,0 g/l encontrándose un límite preferido por debajo de aproximadamente 1 g/l. Dentro de estos límites, se puede usar sustancialmente cualquier disolvente para el ionóforo que sea también compatible con el polímero. También es deseable que el plastificante iónico sea sustancialmente no volátil para proporcionar una vida útil prolongada para el electrodo. Entre los disolventes útiles se encuentran ftalatos, sebacatos, éteres aromáticos y alifáticos, fosfatos, fosfatos alifáticos aromáticos mixtos, adipatos y mezclas de los mismos. Plastificantes útiles específicos incluyen trimelitados, bromofenilfeniléter, ftalato de dimetilo, ftalato de dibutilo, fosfonato de dioctilfenilo, bis(2-etilhexil)ftalato, fosfato de octildifenilo, fosfato de tritolilo, fosfato de tris(3-fenoxifenilo), fosfato de tris(2-etilhexilo) y sebacato de dibutilo. Son preferidos en particular entre esta clase bromofenilfeniléter y trimelitados para electrodos de potasio usando valinomicina como vehículo.

Un gran número de otros plastificantes útiles permite el ensamblaje de electrodos del tipo descrito en el presente documento y se pueden usar en la práctica exitosa de la presente invención.

La concentración de plastificante en la membrana también variará enormemente con los componentes de una membrana determinada; sin embargo, las relaciones en peso entre el plastificante y el polímero de 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 con más detalle de algún modo a continuación y se prefiere para mantener el espesor de esta capa por debajo de aproximadamente 5 milipulgadas y, preferentemente, aproximadamente 1 milipulgada. Como también se describe con mayor detalle a continuación, la uniformidad de espesor de la membrana selectiva de iones desempeña una función importante en la utilización óptima de los electrodos del tipo descrito en el presente documento. Por tanto, si se tiene que obtener la máxima ventaja en términos de capacidad de almacenamiento, la membrana selectiva de iones debería ser de espesor relativamente uniforme como se definió anteriormente.

#### Soporte

Haciendo referencia a la figura 1, los electrodos incluyen un soporte o tarjeta 50 que puede estar constituida por cualquier material capaz de soportar, directamente o por medio de alguna capa que mejore la adhesión, intermedia, las otras porciones necesarias del electrodo que se describen con detalle de ahora en adelante. Así, el soporte puede comprender cerámica, madera, vidrio, metal, papel o materiales de plástico o poliméricos fundidos, extruidos o moldeados, etc. La composición del soporte que soporta los componentes del electrodo suprayacente debe ser inerte; es decir, no interfiere con los potenciales indicadores observados como, por ejemplo, por reacción con uno de los materiales suprayacentes de una manera no controlada. Además, la composición del soporte debe resistir las temperaturas elevadas a que se expondrán los sensores, durante la extensión de tiempo requerida para hidratar y/o calibrar los sensores. En el caso de materiales porosos tales como madera, papel o cerámica, puede ser deseable sellar los poros antes de aplicar los componentes del electrodo suprayacentes. Los medios para proporcionar dicho sellado son conocidos y no es necesaria ninguna discusión adicional de los mismos en el presente documento.

Según una realización altamente preferida de la presente invención, el soporte comprende una lámina o película de

un material polimérico aislante. Una variedad de materiales poliméricos formadores de película son adecuados para este fin, tales como, por ejemplo, acetato de celulosa, poli(tereftalato de etileno), policarbonatos, poliestireno, cloruro de polivinilo, etc. El soporte polimérico puede ser de cualquier espesor adecuado, típicamente de aproximadamente 20–200 milipulgadas. De manera similar, se podían usar capas o superficies delgadas de otros materiales mencionados anteriormente. Los métodos para la formación de dichas capas son bien conocidos en la técnica.

#### Detalles del electrodo enzimático

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

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

En referencia a las figuras 3A y 3B, un electrodo 59 enzimático, tal como un electrodo de glucosa, se sitúa en el canal 56 de flujo de la tarjeta 50 sensora. La figura 3B es una sección ampliada de la figura 3A. El electrodo 59 enzimático incluye una membrana 60 de material compuesto de tres capas que comprende, del canal 56 de flujo al hilo 57, una membrana 51 externa adyacente al canal 56 de flujo, una capa 53 enzimática, situada entre la membrana 51 externa y una membrana 55 de rechazo de interferencias interna adyacente a un hilo 57. El electrodo 59 enzimático se pone en contacto con la muestra a medida que la muestra fluye a lo largo del canal 56 de flujo y por la membrana 51 externa del electrodo 59 enzimático. La señal eléctrica generada por el electrodo 59 enzimático se realiza por el hilo 57 y se transfiere al conductor 61 que está en comunicación eléctrica con el conjunto 10 de electrodos mostrado en la figura 2.

En referencia a las figuras 3A y 3B, la membrana 51 externa del electrodo 59 enzimático actúa en general controlando la difusión del analito a la capa 53 enzimática y protegiendo a los otros componentes del electrodo 59 de contacto directo con constituyentes de la muestra en el canal 56. En una realización, la membrana 51 externa es una membrana polimérica que comprende uno o más compuestos a base de poliuretano. La hidrofobicidad de la membrana se determina por la mezcla de especies de compuestos poliméricos. A medida que aumenta la hidrofobicidad de la membrana, la capacidad del oxígeno para difundirse por la membrana aumenta al tiempo que disminuye la capacidad de los analitos para difundir por la membrana. La composición preferida de la membrana 51 externa es la concentración en que existe un equilibrio óptimo de velocidades de difusión de oxígeno, que es un sustrato requerido de las reacciones enzimáticas y 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 debido a que el oxígeno difundirá rápidamente a la capa 53 enzimática y, por tanto, no será un factor limitante para la reacción enzimática. La membrana 51 externa puede presentar un espesor preferible de 8 a 15 micrómetros y podía funcionar como un espesor en el intervalo de 5 a 30 micrómetros.

La membrana 51 externa está compuesta por una mezcla de poliuretanos con diferentes niveles de absorción de agua. Una composición típica de la membrana 51 externa es 77 % de poliuretano a base de poliéter, alifático, con 20 % de absorción de agua, 17 % de poliuretano a base de poliéter, alifático, con 60 % de absorción de agua y 6 % de poliuretano a base de poliéter, alifático, con 3 % de absorción de agua. La membrana 51 externa con esta composición se puede producir dispensando un volumen de una solución de 3,0 ml de disolvente de ciclohexanona, 17,0 ml de disolvente tetrahidrofurano, 1,08 g de poliuretano de 20 % de absorción de agua, 0,24 g como poliuretano de 60 % de absorción de agua y 0,08 g como poliuretano de 3 % de absorción de agua sobre la capa 53 enzimática de la membrana 60 de material compuesto.

Haciendo referencia a la figura 3B, la membrana 51 externa, que se estratifica directamente sobre y en contacto con la capa 53 enzimática, actúa conservando la capa 53 enzimática evitando la exposición de una enzima 49 embebida en la capa 53 enzimática y la matriz estabilizante en que está embebida la enzima 49, a proteínas o compuestos degradatorios de la muestra en el canal 56. Asimismo, la membrana 51 externa evita la difusión de la enzima 49 fuera de la capa 53 enzimática. La membrana 51 externa también actúa controlando la velocidad de difusión del analito (por ejemplo, glucosa, lactato, creatina y creatinina) y oxígeno de la muestra a la capa 53 enzimática. El fracaso en el control de la difusión del analito y oxígeno a la capa 53 enzimática da como resultado mediciones no lineales e inexactas del analito en la muestra.

Haciendo referencia aún a la figura 3B, la capa 53 enzimática del sensor de glucosa o lactato, incluye al menos una enzima 49, especie requerida para la reacción enzimática en que el analito específico participa, que se estabiliza en la matriz de la capa 53 enzimática. En una realización, la enzima 49 incluye al menos una proteína con actividad enzimática. En otras realizaciones, la enzima 49 incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas y estabilizantes,

por ejemplo.

En una realización concreta, la enzima 49 proteica glucosa oxidasa o lactato oxidasa está embebida en la capa 53 enzimática y crea un electrodo 91 y 92 sensible de manera específica a glucosa y lactato, respectivamente, presentes en la muestra. El electrodo 91 de glucosa incluye glutaraldehído y glucosa oxidasa en la capa 53 enzimática. En una realización, el electrodo 91 de glucosa puede incluir 0,10 g de glutaraldehído por gramo de glucosa oxidasa. En una realización concreta, el electrodo 92 de lactato incluye al menos glutaraldehído, seroalbúmina bovina, un estabilizante enzimático tal como, por ejemplo, polietilenimina y lactato oxidasa en la capa 53 enzimática. En una realización, el electrodo 92 de lactato incluye 45 % de lactato oxidasa en peso, 45 % de seroalbúmina bovina en peso, 5 % de polietilenimina (un estabilizante enzimático) en peso y 5 % de glutaraldehído en peso, por ejemplo. Las fracciones en peso de lactato oxidasa y seroalbúmina bovina pueden variar. El porcentaje en peso de polietilenimina en la capa enzimática puede variar de 1 a 20 y el porcentaje en peso de glutaraldehído puede variar de 1 a 10. Otros estabilizantes enzimáticos incluyen, pero sin limitaciones, compuestos poliiónicos tales como polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En otra realización más, la capa 53 enzimática incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas y estabilizantes embebidos en la matriz de la capa 53 enzimática para detección específica de creatinina y creatina o creatina sola. Se usan mezclas enzimáticas en el electrodo 116 de creatinina y el electrodo 118 de creatina. La creatina sola se detecta con el electrodo 118 de creatina. En una realización concreta, el electrodo 116 de creatinina incluye una mezcla de 5 % de creatininas en peso, 55 % de creatinasa en peso, 30 % de sarcosina oxidasa en peso, 5 % de poli(N-vinilimidazol) (un estabilizante enzimático) en peso y 5 % de glutaraldehído 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 electrodos de creatinina y creatina pueden variar, por ejemplo, de 1 % a 20 %, y el porcentaje en peso de glutaraldehído en los electrodos de creatinina y creatina también pueden variar, por ejemplo, de 1 % a 10 %. También se pueden usar estabilizantes poliiónicos, distintos de poli(N-vinilimidazol), para estabilizar la mezcla enzimática. Ejemplos de compuestos poliiónicos incluyen, pero sin limitaciones, polietilenimina, polipropilenimina, polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En una realización de los electrodos de glucosa, lactato, creatina y creatinina, la capa 53 enzimática consiste en una matriz reticulada de enzimas, estabilizantes tales como polietilenimina o poli (N-vinilimidazol) y otras proteínas tales como seroalbúmina bovina. La reticulación de las enzimas, estabilizantes y otras moléculas proteicas se realiza con, por ejemplo, glutaraldehído, un dialdehído. También se pueden usar Otros agentes 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 los estabilizantes poliiónicos y proteínas inertes en la matriz enzimática pueden prolongar significativamente la vida útil y la vida de uso de los electrodos enzimáticos.

En aún otra realización relacionada con los electrodos de creatinina 116 y creatina 118, la capa 53 enzimática incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas, pero carece de estabilizante enzimático. En esta realización, el electrodo 116 de creatinina incluye una mezcla de 30 % de creatininas, 30 % de creatinasa, 30 % de sarcosina oxidasa y 10 % de glutaraldehído (porcentajes en peso). En esta realización, el electrodo 118 de creatina incluye una mezcla de 45 % de creatinasa, 45 % de sarcosina oxidasa y 10 % de glutaraldehído (porcentajes en peso). La capa 53 enzimática puede presentar un espesor en el intervalo de 1 a 10 micrómetros, preferentemente 2-5 micrómetros medidos desde la superficie interna de la membrana 51 externa a la superficie exterior de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna.

En referencia a las figuras 3A y 3B, el electrodo 59 enzimático también incluye una membrana 55 de rechazo de interferencias interna que es una membrana polimérica regenerable en contacto íntimo con el hilo 57. La membrana 55 de rechazo de interferencias interna se puede formar por la polimerización de monómeros electropolimerizables. Entre los monómeros electropolimerizables adecuados se incluyen benzotiofeno, fenilendiaminas y fenoles, por ejemplo. La membrana 55 de rechazo de interferencias interna, que es típicamente menor que un micrómetro de espesor, aísla o protege el hilo 57 de compuestos en la muestra, específicamente compuestos oxidables, que interfieren con el propio funcionamiento del electrodo enzimático.

En una realización de acuerdo con la invención, la membrana polimérica que comprende la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se forma por la aplicación de un potencial eléctrico al hilo 57 en presencia de monómeros electropolimerizables. Los monómeros en presencia de un potencial eléctrico se polimerizan sobre el hilo 57 para formar una membrana 55 de rechazo de interferencias interna sobre el hilo 57, ilustrado en las figuras 3A y 3B. El peróxido de hidrógeno, que se genera por la actividad de la enzima del electrodo enzimático sobre un analito específico, pasa por los poros de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna y se pone en contacto con el hilo 57 haciendo que se genere una señal eléctrica en el hilo 57. El tamaño menor de los poros en la membrana 55 de rechazo de interferencias interna restringe los compuestos encontrados en la muestra, mayores que peróxido de hidrógeno, tales como paracetamol, ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína y otros compuestos electroactivos que son más grandes que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de interferir con y reducir de exactitud del electrodo 59 del sensor electroquímico.

De acuerdo con una realización de la invención, la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se puede regenerar sobre una base repetida para regenerar su función. Después de exposición repetida a muchas muestras, la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se degrada o se ensucia por compuestos presentes en la muestra. La degradación de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se caracteriza por fisuras en la estructura polimérica de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Tales fisuras evitan la capacidad de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna para proteger el hilo 57 de compuestos interferentes presentes en la muestra analítica, por ejemplo, ácido ascórbico, paracetamol y ácido úrico, de ponerse en contacto con el hilo 57 y alterar la señal eléctrica detectada por el hilo 57.

Para evitar problemas inducidos por la degradación de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna, se puede combinar un monómero electropolimerizable con una solución de calibración, tal como solución AO contenida en el recipiente 23 preenvasado del sistema 8 de sensores electroquímicos, ilustrado en la figura 1, por ejemplo, para usar en la repolimerización y regeneración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. La polimerización del monómero tiene lugar cuando se bombea una solución AO que contiene monómero de un recipiente preenvasado y se hace pasar por el canal 56 de flujo sobre la tarjeta 50 sensora durante la aplicación de un potencial eléctrico generado por el aparato 8 sensor electroquímico, ilustrado en la figura 1 al hilo 57. Durante el procedimiento de polimerización el monómero en la solución de calibración en el canal 56 de flujo difunde por la membrana 51 externa y la capa 53 enzimática hasta que alcanza la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Una vez en la membrana 55 de rechazo de interferencias interna, los monómeros presentes en la solución entran en las áreas de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna que han perdido la integridad estructural por degradación, división o agrietamiento y median la regeneración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna por polimerización para rellenar la estructura dañada de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. El monómero se expone a un potencial eléctrico generado a partir de una fuente eléctrica y se transfiere al hilo 57 en las áreas de integridad perdida de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. El potencial eléctrico polimeriza el monómero sobre la estructura polimérica existente de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna en las áreas dañadas de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna hasta que se regenera la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Una vez que se regenera la membrana 55 de rechazo de interferencias interna las propiedades aislantes de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se renuevan y se secuestra el monómero presente en la membrana 55 de rechazo de interferencias interna a partir del potencial eléctrico del hilo 57. Esta regeneración autolimitante de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna se repite de manera automática cada 24 horas, por ejemplo. La regeneración autolimitante, automática, regular, de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna asegura la exactitud del sensor 59 enzimático. Se pueden emplear ciclos de regeneración más o menos frecuentes de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna para estimar diferentes situaciones.

El potencial eléctrico para el proceso de polimerización generado por el sistema 8 sensor electroquímico ilustrado en la figura 1 se aplica al hilo 57 en el intervalo de 0,1 a 0,8 V frente al electrodo 106 de referencia integrado, durante aproximadamente 30 segundos a una hora. Un potencial de polarización óptimo es 0,5 V frente al electrodo 106 de referencia integrado durante 3 minutos, repetidos cada 24 horas. El potencial eléctrico es demasiado bajo si no produce la reacción de polimerización y el potencial eléctrico es demasiado alto si produce hidrólisis de agua y formación de gas en la membrana 55 de rechazo de interferencias interna produciendo así daño al electrodo 59 enzimático.

#### Detalles del electrodo de PO<sub>2</sub>

Un sensor de oxígeno comprende un sistema de tres electrodos que incluye un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo de tierra. En un ejemplo, el electrodo 70 de trabajo de oxígeno comprende un hilo 74 de platino que se fija en el centro de un disco 109 de vidrio aislante y dos membranas 120 y 122 protectoras mostradas mejor en la figura 4. El disco presenta preferentemente un espesor de aproximadamente 40 milipulgadas mientras el tablero 50 puede presentar un espesor de aproximadamente 85 milipulgadas. El diámetro del disco de vidrio es, preferentemente, de aproximadamente 100 milipulgadas.

Se prepara una serie de discos de vidrio con los hilos de platino embebidos insertando una longitud ajustada de hilo de platino en la abertura de un tubo capilar de vidrio y fundiendo después el tubo de manera que se fusione al hilo. Después de que se endurece el tubo con el hilo embebido, los discos de espesor axial determinado se cortan, mediante una sierra eléctrica, por ejemplo.

El disco de vidrio es prácticamente impermeable al oxígeno mientras el cloruro de polivinilo del tablero 50 es relativamente permeable. El disco de vidrio protege así el electrodo 74 de platino del gas de manera que sólo es activo su extremo distal que se enfrenta al canal 56 de flujo.

Las dos membranas 120 y 122 sobre el disco de vidrio protegen el hilo 74 de platino del contacto directo con los constituyentes de la muestra en el canal 56. En una realización, la membrana 120 es un hidrogel basado en ésteres metacrílicos que está unidos mediante enlaces covalentes al disco de vidrio. La membrana 122 por debajo de 120 cubre solo el área alrededor del hilo de platino y está hecha de alcohol polivinílico. La membrana 60 de material

compuesto que incluye 120 y 122 proporciona una mejor protección y realización del sensor que cualquiera de las membranas solas. El tipo de hidrogel que se emplea está basado en ésteres metacrílicos, aunque se pueden usar 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 agente de reticulación, tal como, dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol o dimetacrilato de tetraetilenglicol. La reacción de reticulación puede ser iniciada por un fotoiniciador tal como dimetoxifenilacetofenona. Se puede usar un disolvente, tal como etilenglicol o agua, para diluir las reacciones y controlar la viscosidad de la solución.

Es de considerable ventaja que la membrana de hidrogel no se despegue 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 reticulando la membrana a la superficie. La superficie del disco de vidrio se siliniza con hexametildisilazano y se funcionaliza con grupos metacrílicos por reacción con metacrilato de trimetoxisililpropilo.

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

El disco de vidrio con la membrana de material compuesto en un lado del mismo se embebe en una forma retraída por el espesor del tablero 50 de plástico de manera que la superficie no de hidrogel se nivela con la superficie del tablero opuesta a la placa 52 de cubierta y la superficie de hidrogel del disco se nivela con el fondo del canal 56 de flujo.

El sensor de oxígeno descrito en el presente documento presenta diversas ventajas cuando se compara con el electrodo convencional (electrodo de Clark), incluyendo un tamaño de electrodo menor, fabricación de electrodo más simple, tiempo de respuesta más rápido y vida de uso más prolongada. La separación de los electrodos de referencia y el contraelectrodo del electrodo de trabajo permite un tamaño más pequeño del electrodo de trabajo y fabricación del electrodo más simple. El tiempo de respuesta del oxígeno se reduce debido a la ausencia de solución interna y la membrana más delgada resultante sobre el electrodo de trabajo. El uso de electrodo de referencia externa elimina la formación de dendritas de plata sobre el electrodo de trabajo, que es un modo común de fallo en un electrodo de oxígeno Clark con un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Sobre la función amperométrica del electrodo en funcionamiento, se aplica un potencial negativo relativo al electrodo 106 de referencia integrado al hilo 74 de platino mediante el procesador 40 cuyo potencial disminuido sirve para reducir cualquier oxígeno que alcance su extremo y produce de ese modo una corriente eléctrica proporcional a la difusión de oxígeno por las capas 120 y 122. La capa 120 y 122 hidratada proporciona una ruta de flujo conductor fiable entre el electrodo de platino y el electrodo 106 de referencia integrado para proporcionar un potencial de polarización entre el platino y la solución en la capa hidratada. El flujo de corriente resultante entre el electrodo 74 de platino y el electrodo de tierra se mide y es proporcional a la concentración de oxígeno en el fluido de ensayo que se está controlando.

#### Electrodos de detección de pCO<sub>2</sub>, pH, potasio, sodio y calcio

Los electrodos, mejor ilustrados en general en la figura 2, que conectan los hilos 78, 86, 90, 93 y 94 de plata que detectan actividades de Na, Ca, potasio, pCO<sub>2</sub> y pH, respectivamente, son de construcción similar. La diferencia está en la composición de las capas de las membranas. Un electrodo selectivo de iones típico se ilustra en la figura 6. Cada uno presenta una perla o una capa 152 interna de sal, que en la hidratación forma la capa de solución interna. Esta capa está en contacto con la película delgada de la capa 154 de plata/cloruro de plata obtenida por anodización de la parte superior de los hilos de plata. La capa 148 externa es esencialmente la capa de membrana selectiva de iones, polimérica. Esta capa se forma por el residuo de sal seco de la capa interna en un pozo 150 superficial como un residuo seco restante después de la eliminación del disolvente de una matriz de una membrana hidrófoba permeable que forma solución tal como una solución que contiene cloruro de polivinilo, un plastificante, un ingrediente activo sensible a los iones apropiado y una sal de borato. La membrana externa se aplica como una solución, típicamente en tetrahidrofurano (THF) en una gotita pequeña. Una vez que se evapora el disolvente, se forma la membrana y se une a la tarjeta de plástico. En el caso de electrodos de pH y pCO<sub>2</sub>, el ingrediente activo selectivo de iones puede ser tridodecilamina (TDDA) o un componente sensible al pH adecuado. Para el electrodo de potasio, se puede usar un antibiótico monocíclico, tal como valinomicina, como el ingrediente activo. El electrodo de calcio emplea un componente sensible selectivo a los 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, 5dimetil-1, 8-dioxo-3, 6-dioxaoctametil]-bis (12-metilamino-dodecanoato) de dietilo u otra sustancia selectiva sensible al calcio adecuada. El electrodo de sodio emplea éster de metilmonensina o cualquier otro ingrediente activo sensible al sodio adecuado. Los electrodos de sodio, potasio y calcio usan una sal tampón como MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico) junto con las respectivas sales de cloruro para su solución interna.

Los electrodos de pH y pCO<sub>2</sub> comparten las mismas capas externas, mientras las capas internas difieren de manera significativa. La capa interna para pH usa un tampón fuerte, por ejemplo, tampón MES, mientras que para el electrodo de CO<sub>2</sub> se usa un tampón de bicarbonato.

- 5 Todos los electrodos selectivos de iones, excepto el electrodo de CO<sub>2</sub> funcionan mediante por la medición del potencial entre el electrodo selectivo de iones y el electrodo 106 de referencia (figura 2), el cambio en potencial es directamente proporcional al cambio en el logaritmo de la actividad del ion medido.

- 10 El sensor de CO<sub>2</sub> es una combinación de electrodos de CO<sub>2</sub> y pH trabajando juntos. En función se mide el potencial entre el electrodo de CO<sub>2</sub> y pH. La superficie externa de ambos electrodos responde al pH de la misma manera y se anulan entre sí. La superficie interna de la membrana de pH presenta un tampón alto con pH constante y no produce ningún cambio en el potencial medido. Sin embargo, para el CO<sub>2</sub>, la membrana es permeable libremente a CO<sub>2</sub>, que se disuelve en el tampón de bicarbonato cambiando su pH. Esto produce un cambio en la respuesta del potencial de la superficie interna de la membrana de CO<sub>2</sub>, que es el único cambio para el potencial medido total. Así, el potencial por los electrodos de CO<sub>2</sub> y pH mide directamente la variación en las concentraciones de CO<sub>2</sub> de la muestra.

- 15 El procedimiento de hidratación de la capa de sal interna en estos electrodos selectivos de iones se consigue remojando la superficie externa de las membranas externas en una solución acuosa de sal, normalmente una solución de reactivo de calibración. La hidratación, sin embargo, es un proceso muy lento, ya que el agua tiene que permear por la membrana externa hidrófoba en forma de vapor. El ciclado térmico por temperaturas altas facilita el proceso. Durante el procedimiento de ciclado térmico, la composición y la integridad de las capas de la membrana permanecen intactos.

- 25 La hidratación y calibración de los electrodos sensibles de iones se lleva a cabo por etapas similares a las descritas para el electrodo de pO<sub>2</sub>. La hidratación de un estado seco se puede acelerar remojando los sensores en una solución electrolítica, tales como las soluciones de calibración descritas anteriormente, y ciclando térmicamente los sensores por una temperatura elevada mayor que la de uso normal. Por ejemplo, los sensores se empapan en la solución B de calibración a una temperatura entre 55 °C y 75 °C durante 15 minutos y después se enfrían a 37 °C. Los ciclos de calibración empiezan tan pronto como la temperatura alcanza 37 °C. En una realización preferida, los sensores se empapan en una solución de calibración a una temperatura de 60 °C durante 12 minutos y después enfrían a 37 °C. Los ciclos de calibración empiezan tan pronto como la temperatura vuelve a 37 °C.

#### Medición del hematocrito

- 35 La medición de hematocrito (Hct) se realiza por una medición de la resistividad entre los hilos 98 y 100 de oro. El sensor opera midiendo la resistividad de la solución o muestra de sangre colocada entre los electrodos. El hematocrito se calcula como una función de la resistividad usando la ecuación de Maxwell.

#### Eliminación de agentes de interferencia

- 40 La exposición del electrodo 59 enzimático a la muestra en el canal 56 de flujo produce que la membrana 60 de material compuesto retenga concentraciones residuales de sustrato de la muestra y productos de la reacción enzimática de la operación del electrodo 59 enzimático. Estas sustancias son ejemplos de los agentes de interferencia que causarán que el electrodo 59 enzimático pierda exactitud y precisión en la medición del analito específicamente deseado. Para regenerar la exactitud y precisión para el electrodo 59 enzimático, se eliminan agentes de interferencia de la membrana 60 de material compuesto del electrodo 59 enzimático aplicando una amplitud adicional de polarización al hilo 57 del electrodo 59 enzimático.

- 50 Se puede aplicar un pulso de polarización mediante una fuente eléctrica al hilo 57 después de cada exposición del electrodo 59 a una muestra para preparar el electrodo 59 para la siguiente medición. Por ejemplo, peróxido de hidrógeno, un producto de la reacción de la enzima y el analito de la operación del electrodo 59, es un ejemplo de un agente de interferencia. Para retirar agentes de interferencia tales como peróxido de hidrógeno, se aplica una amplitud adicional de polarización al hilo 57 que produce oxidación del agente de interferencia. La oxidación del agente de interferencia hace que el agente de interferencia sea incapaz de afectar a la actividad eléctrica en el hilo 57 retirando de manera eficaz los agentes del electrodo 59. Los analitos, tales como glucosa y lactato, también constituyen agentes interferentes cuando las concentraciones residuales de glucosa y lactato permanecen en el electrodo 59 enzimático entre lecturas de las muestras. Un pulso de polarización aplicado al hilo 57 oxida al analito residual y así elimina la contribución del analito residual entre muestras para mediciones de analito erróneas.

- 60 En una realización de acuerdo con la invención, después de que se completa la medición de un analito en una muestra, el electrodo 59 enzimático se regenera bombeando la muestra fuera del canal 56 de flujo y se bombea un volumen de solución de lavado del depósito 17 por el canal 56 de flujo. Durante este tiempo, se superpone una polarización adicional sobre la polarización estable aplicada de manera continua a los electrodos 59 después de una medición de la muestra. La polarización se devuelve después a su nivel de referencia y se introduce una solución de calibración en el canal 56 de flujo seguido por una calibración de un punto para tener listo el electrodo 59 para la siguiente medición.

La suficiente amplitud y duración del pulso de polarización requerido para la oxidación del agente de interferencia se determina por la geometría del canal 56 de flujo. Se requieren amplitudes de pulso mayores y duraciones del pulso más largas para un electrodo 59 con un canal 56 de flujo estrecho y un caudal lento de solución de lavado. En una realización preferida ilustrada en la figura 3A, una amplitud de polarización de 0,4 V frente al electrodo de referencia integrado para una duración de 50 segundos es suficiente para eliminar compuestos interferentes de la membrana 60 de material compuesto y mejorar de este modo la exactitud y la precisión de las mediciones del electrodo 59. Una amplitud de la polarización en el intervalo de 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia integrado para una duración de 10 a 200 segundos también puede ser suficiente.

#### Regeneración de la membrana interna (rechazo de interferencias) de la membrana de material compuesto

Una etapa adicional para regenerar la función de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto del sensor 59 enzimático ilustrado, por ejemplo, en la figura 3B. Esta etapa incluye la regeneración de la integridad y el funcionamiento apropiado de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de los electrodos enzimáticos. Dentro de la membrana 60 de material compuesto, ilustrada en la figura 3B, la restauración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna tiene lugar mediante la polimerización *in situ* de monómeros electropolimerizables sobre la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto.

En una realización, los monómeros electropolimerizables están en solución en la solución de calibración AO en el recipiente 23 ilustrado en la figura 1. La solución de calibración AO se hace pasar a través del canal 56 de flujo de la tarjeta 50 sensora ilustrada en la figura 3A. La solución AO con los monómeros electropolimerizables pone en contacto el electrodo 59 enzimático en la membrana 51 externa polimérica de la membrana 60 de material compuesto. Los monómeros electropolimerizables difunden primero por la membrana 51 externa y después por la capa 53 enzimática de la membrana 60 de material compuesto, hasta que los monómeros alcanzan la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto. Un potencial eléctrico mayor que el valor basal, 0,5 v frente al electrodo de referencia integrado se aplica al hilo 57 durante 3 minutos, por ejemplo, lo que hace que los monómeros electropolimerizables se polimericen sobre la estructura polimérica existente de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto. Después de la polimerización de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna, se regeneran las propiedades aislantes de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Debido a que los monómeros electropolimerizables restantes en la solución de calibración ya no se exponen al potencial eléctrico, ya no puede tener lugar la polimerización de los monómeros.

La amplitud del potencial eléctrico y el período de tiempo del potencial elevado suficiente para regeneración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto se determinan mediante la configuración específica del electrodo 59. La composición y la geometría concreta del electrodo afecta a la amplitud del potencial eléctrico y el periodo de tiempo requerido para la regeneración completa de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Una membrana 60 de material compuesto de una composición o geometría que disminuye la difusión de los monómeros del canal 56 de flujo a la membrana 55 de rechazo de interferencias interna requerirá una amplitud de polimerización mayor para una mayor duración de tiempo. Una polarización de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia integrado aplicado durante aproximadamente 30 segundos a 1 hora es adecuada para la regeneración al menos parcial de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Una vez que la regeneración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna es completa, la solución AO en el canal 56 de flujo se reemplaza con solución 17 de aclarado y se devuelve el potencial eléctrico al valor basal.

#### Operación de la solución de referencia

Haciendo referencia a la figura 2, como se ha observado, la solución de referencia llena el pozo 64 donde se pone en contacto con un hilo 106 de plata y se bombea a través del canal 66 capilar para unir la salida de la línea de flujo principal. La solución de referencia es esencialmente una solución hipertónica de nitrato de potasio, con respecto a la sangre o las soluciones de calibración y, de acuerdo con ello, el dominio del electrodo 106 de referencia constituye una unión líquida de potencial estable entre el electrodo de referencia y la sangre o la solución de calibración, estableciendo de ese modo un entorno que es independiente de la actividad iónica de la sangre o de la solución de calibración.

Dado que la solución de referencia une el canal de flujo principal aguas abajo de los electrodos, no afecta a las mediciones de ninguna manera. La solución de referencia es de alta densidad y con fuerza de bombeo debe fluir hacia arriba contra la gravedad a la salida. Por tanto, cuando la bomba se detiene, en cuanto al equilibrado de los electrodos, la solución de referencia permanece estacionaria en el pozo 64 de referencia y la sección 66 capilar y tiende a no difundir en la solución de calibración o la sangre en el canal de flujo principal. Por tanto, el tubo 66 capilar debido al gradiente de densidad, actúa como una válvula de una sola dirección permitiendo que la solución de referencia bombeada pase hacia arriba por el capilar pero evitando el paso inverso no deseado o el mezclamiento de la sangre o solución de calibración en el pozo de referencia.

Conjunto de bloque calentador

En referencia a las figuras 7A–7G, el conjunto 39 de bloque calentador incluye un dispositivo 230 termoelectrico, un termistor 41, un bloque de aluminio que caracteriza dos carcasas 220a, 220b de aluminio, la interfaz 156 del electrodo, la placa 234 de metal, el disipador 236 de calor, las conducciones 229, 229', 231, 231', electricas y el cable 226. El bloque de aluminio aloja una tarjeta 10 sensora cuando el cartucho con la tarjeta sensora se inserta en el instrumento 8 de analisis de fluidos.

Haciendo referencia a la figura 7A, el conjunto 39 de bloque calentador de aluminio incluye dos carcasas 220a, 220b de aluminio que forman juntas una toma 222 en que se puede insertar una tarjeta 10 sensora (no mostrado). Como se ilustra en la figura 7B, la conexion 156 electrica situada en la toma 222 forma interfaz con los correspondientes conectores de borde en la tarjeta sensora ilustrada en, por ejemplo, la figura 5, para transmitir las senales desde los sensores. Un cable 226 conecta los conectores electricos de la tarjeta sensora a un microprocesador 40 por un talero 45 analogico (Véase la figura 1). Un tablero de circuito impreso (tablero analogico situado antes del procesador) controla los sensores y mide la salida del sensor. Los tableros de circuitos impresos dentro del conjunto de bloque calentador contienen postamplificadores que amplifican las senales del sensor en la tarjeta sensora. La salida de los sensores son senales analogicas. Las senales analogicas se convierten en senales digitales via un convertidor de analogico a digital y las senales digitales son transmitidas al microprocesador para almacenamiento, analisis y presentacion.

Haciendo referencia a la figura 7C, la superficie 221 interior de la carcasa 220b de aluminio entra en contacto con la placa 52 de metal de un cartucho 10 de sensores (véase la figura 2). En la superficie 223 externa de la carcasa 220b de aluminio, se sitúa un termistor 41 como se ilustra en la figura 7C. Extendiéndose desde el termistor 41 están las conexiones 229, 229' electricas que conectan el termistor 41 a un microprocesador 40.

En la parte de arriba de la superficie 223 externa de la carcasa 220b de aluminio y por el termistor 41, se coloca un dispositivo 230 termoelectrico ilustrado en la figura 7D. Los dispositivos termoelectricos en el conjunto de bloque calentador pueden usar, por ejemplo, el efecto Peltier, para calentar y enfriar el bloque de aluminio. Las derivaciones 231, 231' electricas suministran corriente electrica programada controlada mediante un microprocesador 40 al dispositivo 230 termoelectrico. La direccion y duracion de la corriente se controla mediante el microprocesador 40 y determina si el dispositivo 230 termoelectrico que recubre la carcasa 220b de aluminio está en un modo de calentamiento o enfriamiento. La temperatura de la carcasa 220b de aluminio se mide mediante el termistor 41 que transmite senales al microprocesador 40. El microprocesador 40 está programado para transmitir senales electricas al dispositivo termoelectrico, dependiendo las senales del termistor, para calentar o enfriar la carcasa 220b de aluminio que a su vez calienta, enfría o mantiene la temperatura de una tarjeta sensora insertada en la toma 222. Cuando la corriente fluye en el dispositivo 230 termoelectrico en la direccion hacia delante, la placa 220b de metal se calienta y este calor es transmitido a la tarjeta sensora en la toma 222. Cuando la corriente fluye en la direccion inversa, la placa 220b de metal se enfría y el efecto de enfriamiento es transmitido a la tarjeta sensora en la toma 222.

En referencia a las figuras 7D y 7E, la superficie 233 externa del dispositivo 230 termoelectrico está en contacto con una placa 234 de metal. La superficie 235 externa de la placa 234 de metal está en contacto con un disipador 236 de calor, ilustrado en la figura 7F.

La toma 222 del cartucho ensamblado, la carcasa 220b de aluminio, el termistor 41, el dispositivo 230 termoelectrico, la placa 234 de metal, el disipador 236 de calor y las derivaciones 229, 229' electricas del termistor 41 y las derivaciones 231, 231' electricas del dispositivo 230 termoelectrico al microprocesador 40 se ilustra en la figura 7G.

En una realizacion preferida del conjunto 39 de bloque calentador, la temperatura para un cartucho de sensores se puede aumentar desde aproximadamente 37 °C a aproximadamente 60 °C a 65 °C en un minuto, mantenido a 60 °C durante 12 minutos con solo 1,0 °C de fluctuacion de la temperatura y enfriado a 37 °C desde 60 °C en aproximadamente dos minutos.

Operación inicial del conjunto

Haciendo referencia a la figura 1, cuando el cartucho con el conjunto 10 de sensores y las bolsas 14, 16 y 28 llenas se usan primero, la válvula 18 se controla para dirigir una de las soluciones de calibración, por ejemplo, la solución B de calibración, al conjunto sensor, por lo que se llena completamente el canal de flujo. A continuación se detiene la bomba durante un periodo de 10-30 minutos, preferentemente 12-15 minutos durante los cuales los electrodos sensores quimicos secos se hidratan por ciclado termico, por ejemplo, de 37 °C a 60 °C y de nuevo a 37 °C.

En una realizacion, el conjunto 10 de sensores de electrodos quimicos, secos, se inserta en el sistema 8 de sensores electroquimicos y la válvula 18 se controla por el microprocesador 40 para dirigir las soluciones B de calibración al conjunto 10 de sensores. El conjunto 39 de bloques termicos se fija a una temperatura segun la cual la

temperatura de la placa 52 térmica es suficiente para calentar la solución de calibración en contacto con el sensor químico seco a una temperatura en un intervalo de 55 °C a 75 °C, preferentemente a 60 °C, durante 10-30 minutos, preferentemente 12 minutos. Después del período de tiempo especificado, el microprocesador 40 invierte el flujo de la corriente a través del dispositivo termoelectrónico para enfriar la placa 52 térmica. La tarjeta 50 sensora y la solución de calibración en contacto con la placa 52 térmica se enfría a 37 °C. La temperatura, controlada mediante el microprocesador 40, se mantiene 37 °C durante la vida del cartucho 37. Después de hidratación de los sensores, el ciclo de acondicionamiento de los electrodos 59 enzimáticos empieza bombeando la solución AO 23 a la tarjeta 50 sensora y remojando los electrodos 59 durante 1 a 6 minutos, preferentemente, durante 3 minutos mientras el potencial de polarización de los electrodos 59 enzimáticos se eleva de 0,25 a 0,5 V frente al electrodo de referencia integrado. Durante la exposición de AO, se regenera la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de los electrodos 59 enzimáticos, ilustrados en la figura 3B. Por otra parte, en este ciclo también se calibra el nivel de oxígeno bajo. En la terminación del ciclo de AO, el ciclo de aclarado empieza bombeando solución de aclarado desde el recipiente 17 preenvasado el canal 56 de flujo por la bomba 26 peristáltica. Durante el ciclo de aclarado, el potencial de polarización de los electrodos 59 enzimáticos cambia desde 0,5 a 0,4 V para acelerar la eliminación de los residuos AO de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna. Después de la terminación del ciclo de aclarado, el potencial de polarización de los electrodos 59 enzimáticos disminuye de nuevo al nivel normal de aproximadamente 0,25 V frente al electrodo de referencia integrado. A continuación, comienza un ciclo de calibración con las soluciones A 14 y B 16. El cartucho 37 llega a estar listo para medición de muestras en 30 minutos de la inserción del cartucho 37 en el sistema 8 de sensores electroquímicos.

## REIVINDICACIONES

1. Una membrana de material compuesto para un sensor enzimático, que comprende:

una capa de membrana interna que comprende una membrana polimerizable regenerable, estando la capa de membrana interna adaptada para funcionar como membrana de rechazo de interferencias;  
una capa de membrana externa basada en poliuretano, adaptada para su disposición adyacente a un canal de flujo durante su uso; y  
una capa enzimática dispuesta entre, y en contacto con, las capas interna y externa de la membrana, comprendiendo dicha capa enzimática una matriz que comprende al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en creatinasa y sarcosina oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizante enzimático seleccionado del grupo que consiste en polietilenimina, polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina y protamina, en la que la membrana externa está adaptada para controlar la difusión de un analito en la capa enzimática.

2. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende creatininasas.

3. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho sensor enzimático comprende un electrodo electroquímico.

4. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en un dialdehído, un diisocianato y un diepóxido; opcionalmente en la que dicho agente de reticulación (a) comprende 1,4- diisocianatobutano o (b) se selecciona del grupo que consiste en 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano.

5. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente de reticulación comprende glutaraldehído; opcionalmente, en la que dicho agente de reticulación comprende aproximadamente 1-10 % de glutaraldehído en peso; opcionalmente en la que dicho agente de reticulación comprende aproximadamente 5 % de glutaraldehído en peso.

6. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la capa enzimática tiene un espesor en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 10 micrómetros; opcionalmente, en la que la capa enzimática tiene un espesor en el intervalo de 2 micrómetros a 5 micrómetros.

7. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la capa de membrana externa comprende una mezcla de poliuretano que tiene diferentes niveles de absorción de agua.

8. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la capa de membrana externa tiene un espesor entre 8 micrómetros y 15 micrómetros.

9. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante enzimático comprende un porcentaje en peso de la capa enzimática que está entre 1 % y 20 % de polietilenimina.

10. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante enzimático es polietilenimina.

11. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante enzimático es poli(N-vinilimidazol).

12. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante enzimático comprende un porcentaje en peso de poli(N-vinilimidazol) entre 1 % y 20 %.

13. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante enzimático comprende aproximadamente 5 % de poli(N-vinilimidazol) en peso.

14. La membrana de material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la membrana de polimerización regenerable se forma mediante la polimerización de monómeros electropolimerizables seleccionados del grupo que consiste en benzotiofeno, fenilendiaminas y fenoles.

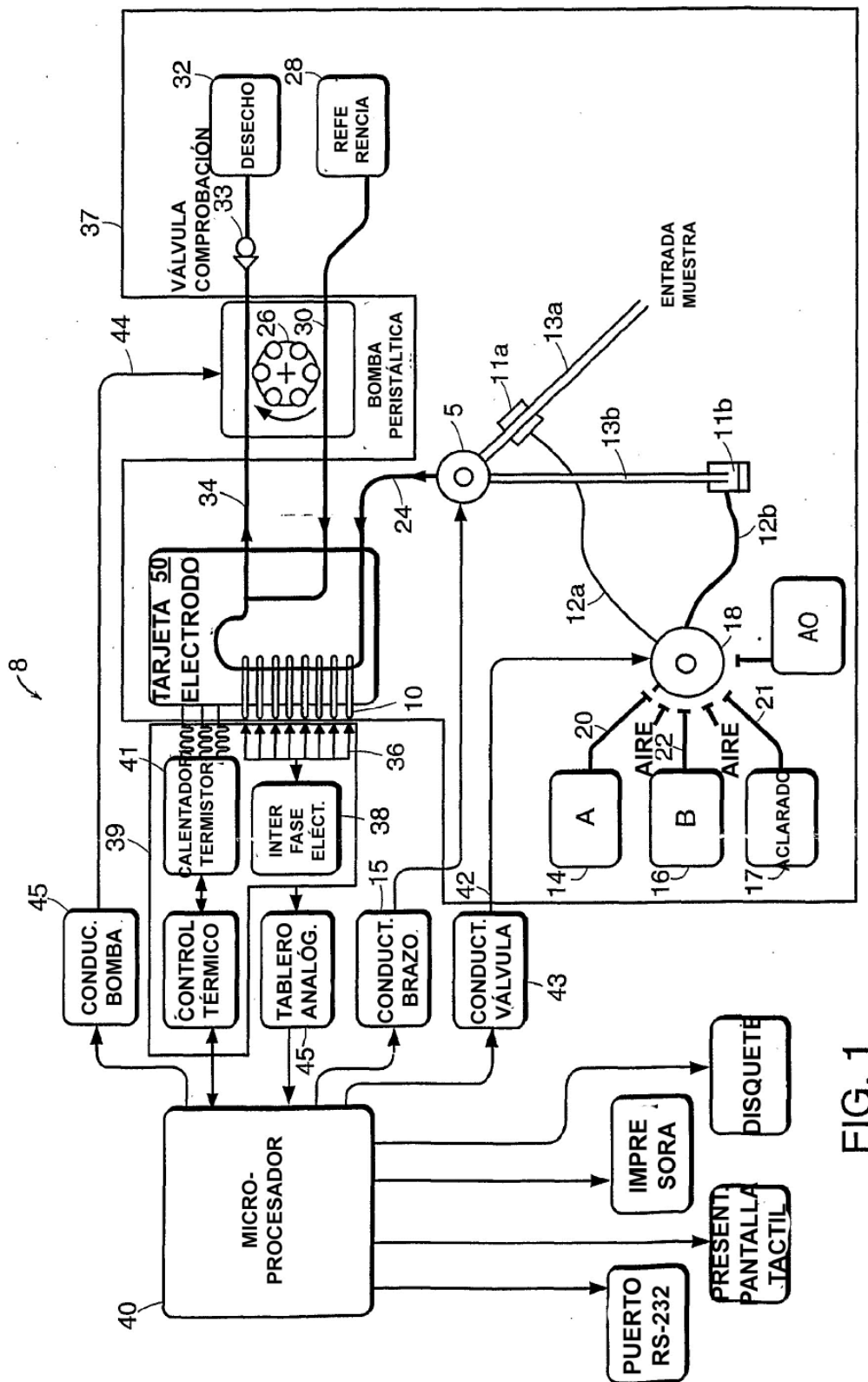


FIG. 1

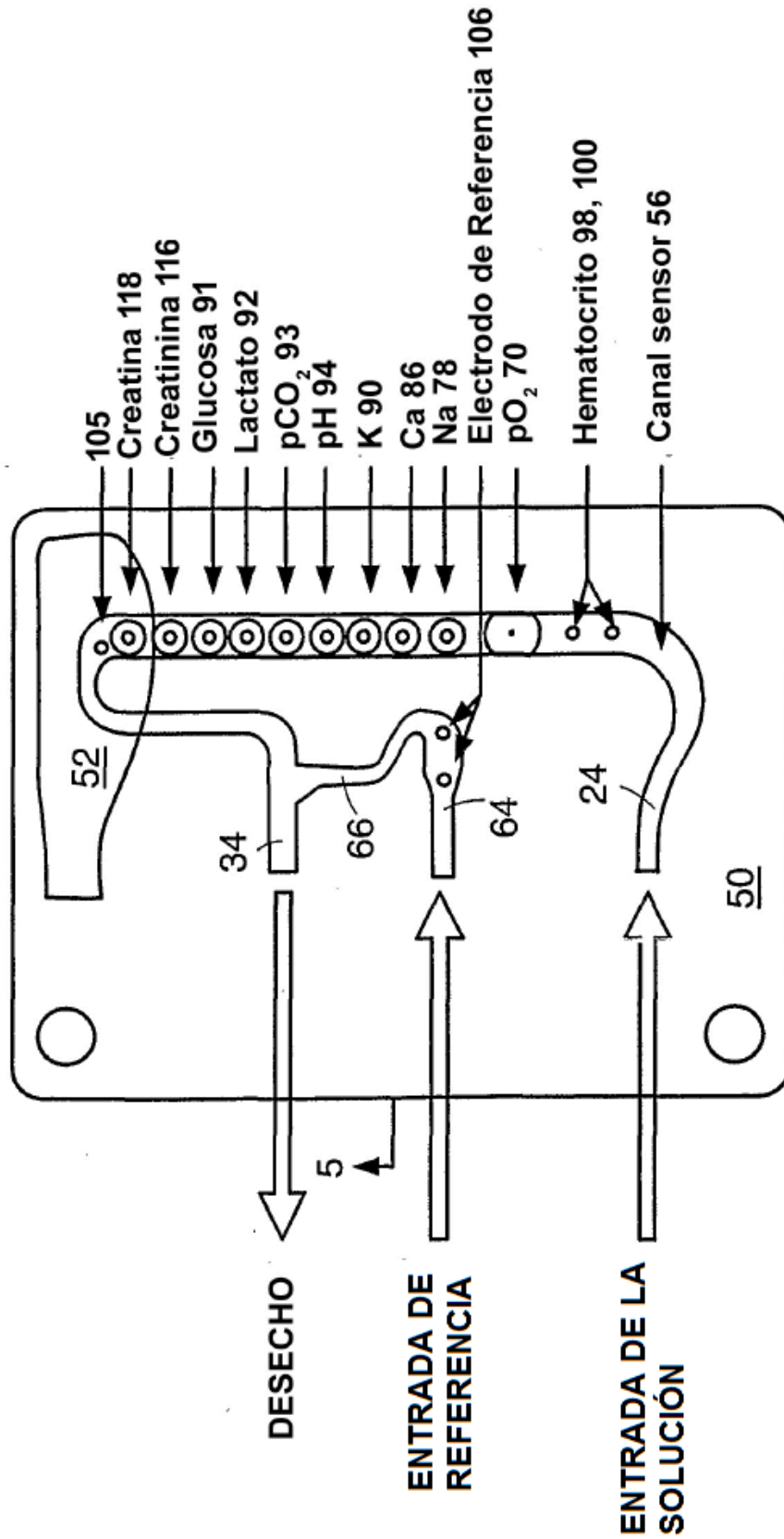


FIG. 2

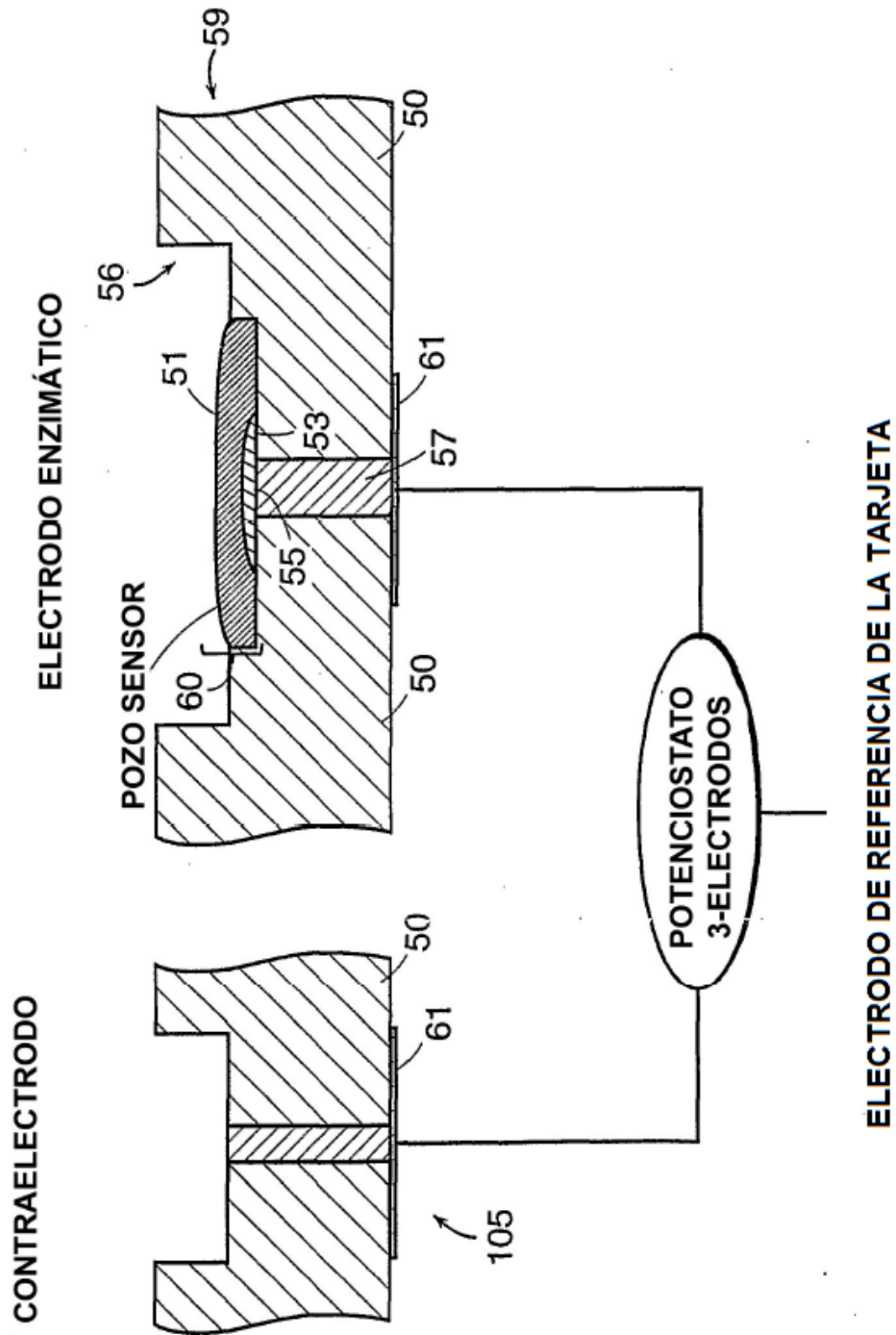


FIG. 3A

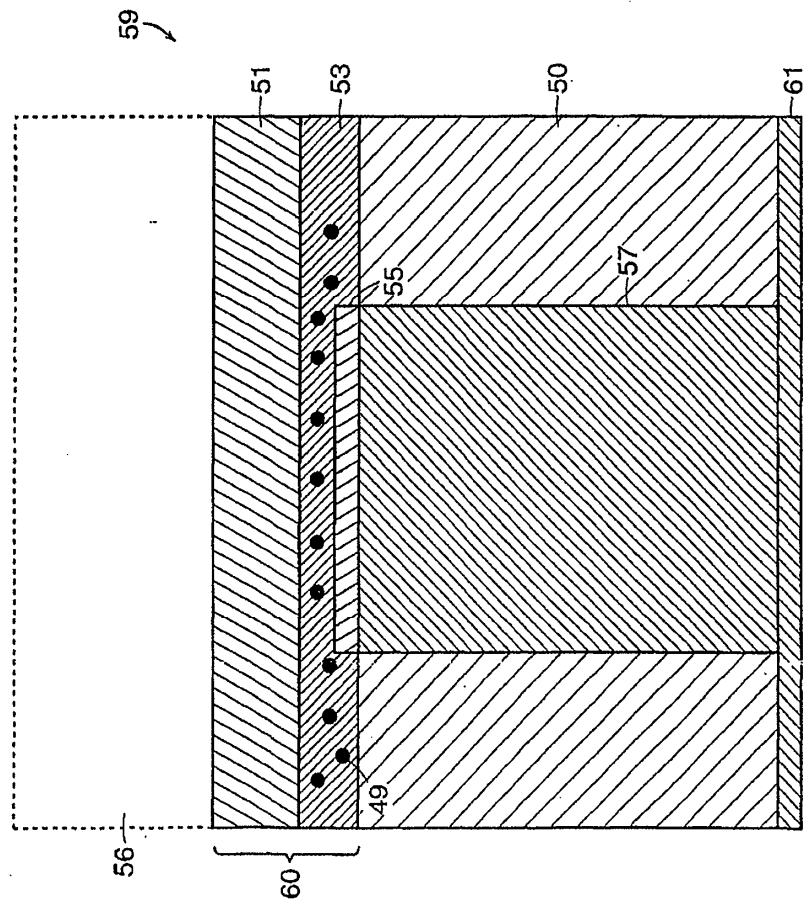
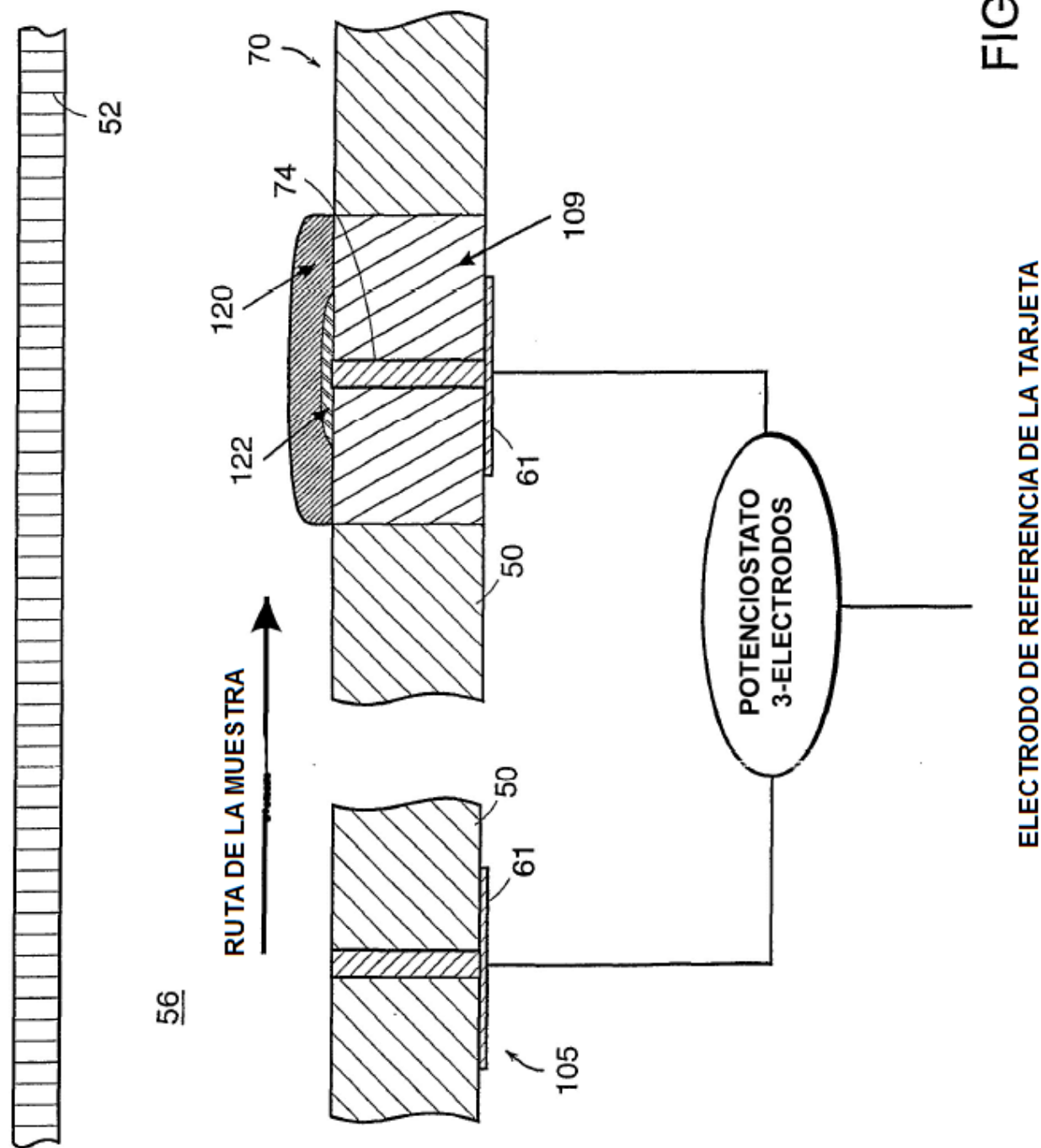


FIG. 3B



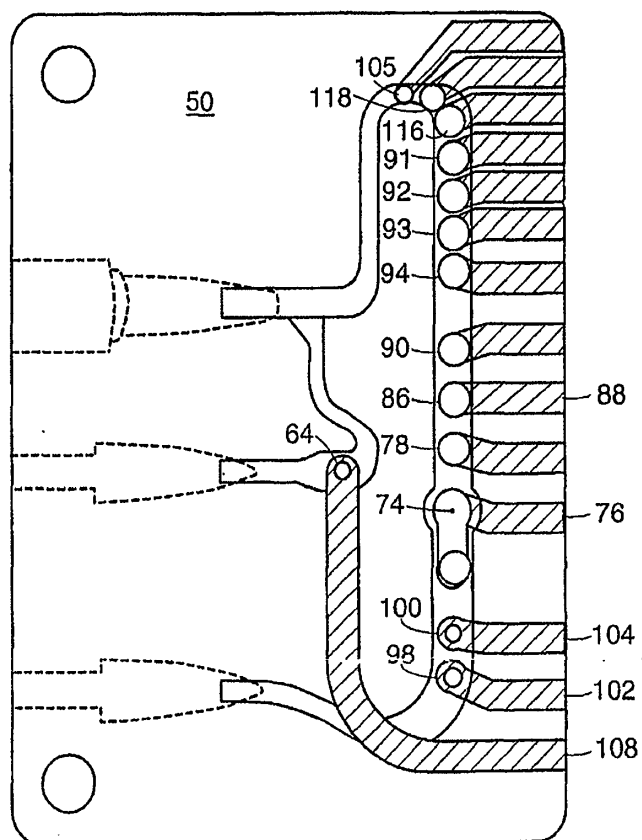


FIG. 5

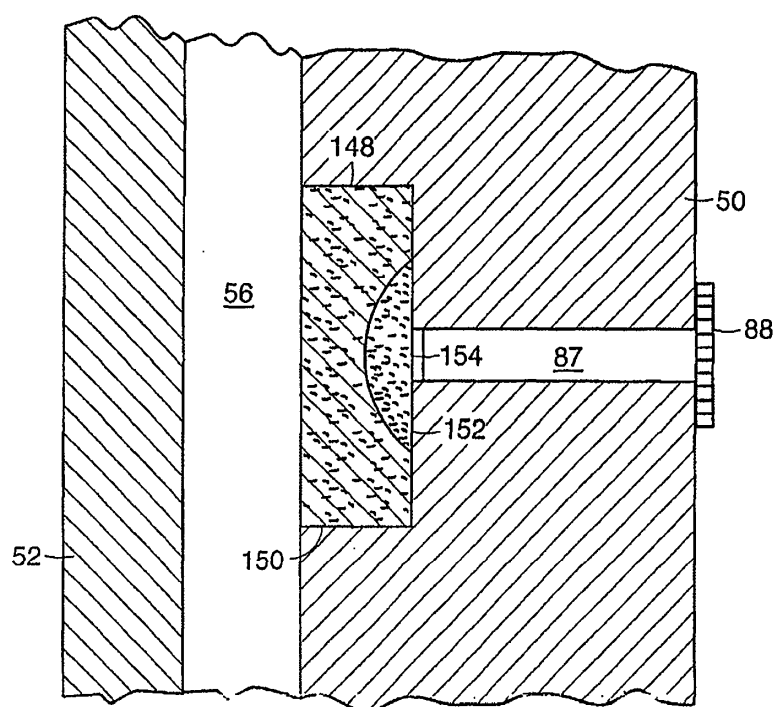


FIG. 6

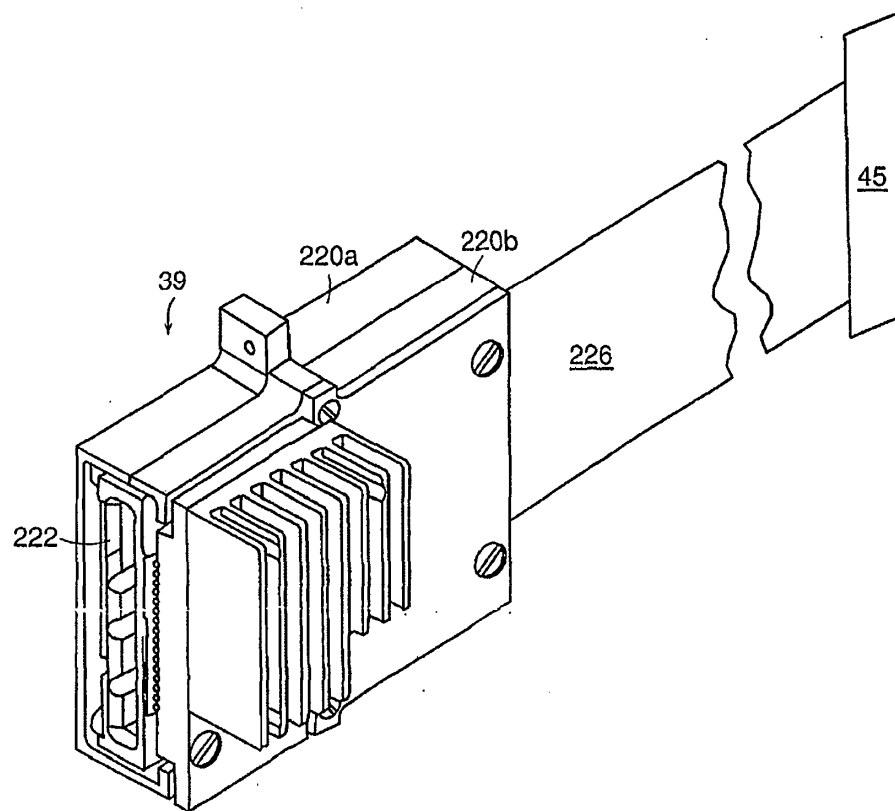


FIG. 7A

