

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 440**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2002 E 02759074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 1395813**

54 Título: **Matriz de enzima reticulada**

30 Prioridad:

**31.05.2001 US 872240**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2015**

73 Titular/es:

**INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY  
(100.0%)  
101 HARTWELL AVENUE  
LEXINGTON, MA 02173, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 533 440 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Matriz de enzima reticulada

### Campo de la invención

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

### Antecedentes de la invención

10 En una variedad de situaciones clínicas es importante medir ciertas características químicas de la sangre del paciente tales como: pH, hematocrito, la concentración de iones 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 en un consultorio médico a seguimiento de un paciente durante cirugía a corazón abierto. La velocidad, exactitud y otras características de realización, requeridas, varían con cada situación.

15 Típicamente, los sistemas sensores electroquímicos que proporcionan análisis químicos de sangre son máquinas independientes o están adaptados para estar conectados a una derivación extracorpórea o 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 cualquier línea 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 características químicas de la muestra de sangre que fluye en tiempo real.

20 Los sistemas 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 interactuar de manera selectiva con un analito de interés y de generar, directamente 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.

25 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 la sangre total. 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, acetaminofeno, cisteína, etc.) que pueden interactuar 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 está comprometida por niveles residuales de analito que permanecen en el sensor de una muestra previa afectando al análisis de la muestra siguiente.

35 La patente europea EP 0771867 se refiere a un electrodo enzimático que incluye un miembro de soporte electroconductor con una capa electroconductora porosa, una enzima adsorbida o inmovilizada sobre la superficie de la capa porosa y una capa de protección para evitar la lixiviación de la enzima de la capa porosa.

40 La patente de EE.UU. 6051389 se refiere a un sensor enzimático que incluye una membrana de tres capas, específicamente, una capa de membrana limitante de interferencias enfrentada a un ánodo de platino del electrodo, una capa enzimática y una capa de membrana porosa limitante de la difusión que se enfrenta al fluido de ensayo.

### Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una membrana de material compuesto para un biosensor, como se detalla en las reivindicaciones adjuntas.

45 También se describe en la presente memoria un sistema y método para aumentar la exactitud y la duración de 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 aumenta así la exactitud que se pierde por la degradación por ensuciamiento de la membrana o por interferencia por compuestos analitos de la muestra.

50 También se describe en la presente memoria un sensor electroquímico que 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.

- La capa externa de la membrana de material compuesto puede incluir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: compuestos basados en poliuretano, compuestos basados en polivinilo, compuestos basados en elastómero de silicona y compuestos basados en policarbonato. En un ejemplo, la capa enzimática del sensor electroquímico incluye una enzima generadora de  $H_2O_2$ , tal como glucosa oxidasa o lactato oxidasa, por ejemplo. En otro ejemplo, la capa enzimática incluye una o una combinación de diversas enzimas, tales como una mezcla de glucosa oxidasa, lactato oxidasa, creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa. En un ejemplo, el sensor electroquímico incluye además una superficie regenerada sobre la capa interna en la que la superficie se regenera por monómero polimerizado. La capa interna del sensor electroquímico puede incluir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos.
- En un ejemplo, un cartucho de sensores electroquímicos, incluye una tarjeta sensora electroquímica, al menos un sensor electroquímico y un depósito que contiene una disolución de monómero electropolimerizable en comunicación de fluido con la tarjeta sensora electroquímica.
- El cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos una membrana de material compuesto. El cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una membrana de material compuesto con una capa interna regenerable.
- El cartucho de sensores electroquímicos incluye al menos un depósito de disolución de calibración en comunicación de fluido con la tarjeta sensora electroquímica. En otro ejemplo, la disolución de monómero electropolimerizable se puede combinar con la disolución de calibración en un depósito único. En otro ejemplo, el cartucho de sensores electroquímicos incluye disolución de monómero electropolimerizable en la disolución de calibración en la que la concentración del monómero está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mM.
- En otro ejemplo, al menos uno de los sensores electroquímicos del cartucho de sensores electroquímicos comprende un sensor de electrodo enzimático. En otro ejemplo, el sensor electroquímico del cartucho de sensores electroquímicos se forma sobre un electrodo constituido por un material seleccionado del grupo que consiste en: platino, oro, carbono o una de su estructura modificada. En otro ejemplo, el sensor electroquímico incluye un monómero electropolimerizable seleccionado de un grupo que consiste en: benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos. En otro ejemplo, el sensor electroquímico es selectivo para un ión hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ión sodio, ión potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea. En otro ejemplo más, el sensor electroquímico incluye un monómero electropolimerizable que es un derivado de fenilendiamina.
- También se describe en la presente memoria un sistema de sensores electroquímicos que 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 de la tarjeta sensora electroquímica y puede proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico para la polimerización de la disolución de monómero electropolimerizable a la membrana polimérica. El sistema sensor electroquímico también incluye un depósito que contiene una disolución de monómero electropolimerizable en comunicación de fluido con la tarjeta sensora electroquímica. La disolución de monómero electropolimerizable se polimeriza a la membrana polimérica por el potencial eléctrico proporcionado por el aparato sensor electroquímico.
- El cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una tarjeta sensora electroquímica que incluye al menos una membrana de material compuesto. En otro ejemplo, el cartucho de sensores electroquímicos puede incluir una membrana de material compuesto con una capa interna regenerable.
- En otro ejemplo, el sistema de sensores electroquímicos incluye además una disolución de calibración en un depósito junto con una disolución de monómero electropolimerizable. La concentración de la disolución 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 otro ejemplo más, el sistema de sensores electroquímicos incluye un sensor electroquímico que es selectivo para un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en: ión hidrógeno, dióxido de carbono, oxígeno, ión sodio, ión potasio, calcio ionizado, cloruro, hematocrito, glucosa, lactato, creatina, creatinina o urea.
- En otro ejemplo más, el sistema de sensores electroquímicos incluye un monómero electropolimerizable que se selecciona de un grupo que consiste en: benzotiofeno, fenilendiaminas y dihidroxibencenos, de los cuales la concentración de la disolución de monómero electropolimerizable en la disolución de calibración es 1-100 mM. En otro ejemplo, 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 otro ejemplo, 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.

También se describe en la presente memoria acelerar la regeneración 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 disolución 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 un ejemplo, 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 ejemplo, el potencial eléctrico es aproximadamente 0,4 V frente al electrodo de referencia integrado y se aplica durante aproximadamente 50 segundos.

También se describe un 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 de la tarjeta sensora electroquímica y proporcionar un potencial eléctrico al sensor electroquímico. El sistema de sensores electroquímicos incluye también un depósito que contiene un monómero electropolimerizable en una disolución en comunicación de fluido con la tarjeta sensora electroquímica. La disolución de monómero electropolimerizable se polimeriza a la membrana polimérica por 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 disolución 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 disolución sobre la membrana polimérica.

El método de recuperación de las propiedades funcionales de un sensor electroquímico incluye añadir el monómero electropolimerizable a una disolución de calibración para formar la disolución de monómero electropolimerizable. 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 otro ejemplo, el potencial eléctrico comprende aproximadamente 0,5 V frente a un electrodo de referencia integrado y se aplica durante aproximadamente 3 minutos.

En un ejemplo, 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 un ejemplo, 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.

Se describe además un 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 disolución 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 disolución de monómero electropolimerizable se polimerice sobre una membrana polimérica. En un ejemplo, el método incluye además añadir un monómero electropolimerizable a una disolución de calibración para formar la disolución de monómero electropolimerizable. En un ejemplo particular, se aplica un potencial eléctrico en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 0,8 V frente al electrodo de referencia integrado. El potencial eléctrico se puede aplicar durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora. En un ejemplo, 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 un ejemplo, 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 un aspecto, la invención se refiere a una membrana de material compuesto para un biosensor. El biosensor incluye una capa de membrana interna, una capa de membrana externa y una capa enzimática. La capa enzimática incluye una matriz que incluye al menos una enzima, un agente de reticulación y un estabilizante enzimático. En un ejemplo de la presente invención, la membrana de material compuesto incluye una o más de las enzimas: lactato

oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatininas.

También se describe una matriz para un sensor enzimático. La matriz puede incluir: lactato oxidasa, un agente reticulante y un estabilizador enzimático. En una realización, la matriz forma una matriz reticulada de proteínas con actividad enzimática. La matriz puede formar un electrodo electroquímico. La matriz también puede incluir albúmina de suero bovino. Otras proteínas inertes similares a la albúmina de suero bovino también se pueden incluir. 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% glutaraldehído en peso. En otra realización más, el agente de reticulación presente la matriz es 5% glutaraldehído en peso. En otra realización, el estabilizador enzimático presente en la matriz puede incluir uno o más de los compuestos: polietilenimina, polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina y sus derivados. En otra realización, el estabilizante enzimático presente en la matriz es 1-20% polietilenimina en peso. En otra realización, el estabilizador enzimático presente en la matriz es 5% polietilenimina en peso.

En otro aspecto más, la matriz para un sensor enzimático incluye: creatinasa, sarcosina oxidasa, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático. En una realización, la matriz también incluye creatininas. 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% glutaraldehído en peso. En otra realización más, el agente de reticulación presente en la matriz es 5% glutaraldehído en peso. En otra realización, el estabilizador enzimático presente en la matriz puede incluir uno o más de los compuestos: polietilenimina, polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina y sus derivados. En otra realización, el estabilizador enzimático presente en la matriz es 1-20% polietilenimina en peso. En otra realización, el estabilizador enzimático presente en la matriz es 5% polietilenimina en peso.

De acuerdo con esto, la matriz para un sensor enzimático incluye una o más de las enzimas, lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatininas, un agente de reticulación y un estabilizador enzimático.

Éstos y otros objetos, junto con ventajas y características de la presente invención descritas en la presente memoria, 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 la presente memoria no son mutuamente exclusivas y pueden existir en diversas combinaciones y permutaciones.

#### Breve descripción del dibujo.

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención descritos en la presente memoria, así como la propia invención, se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas y reivindicaciones, cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Los dibujos no son necesariamente a escala, poniéndose énfasis en su lugar en general en la ilustración de los principios de la invención.

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

Las FIGS. 3A-B ilustran vistas transversales de un sensor enzimático.

La FIG. 4 ilustra un ejemplo de un sensor pO<sub>2</sub>.

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

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

Las FIG. 7A-G ilustran los componentes de un conjunto de bloque térmico.

#### Descripción detallada de la invención.

Se describen en la presente memoria electrodos y sistemas sensores electroquímicos para medir características de muestras acuosas incluyendo, pero no limitado a, sangre, suero u otros fluidos corporales. Específicamente, se refiere a sensores en 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 exactitud y precisión aumentadas y expectativas de vida eficaces aumentadas. En algunos ejemplos, el sistema sensor se adapta para medir la concentración o actividad de 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

5 Para señalar y describir más claramente y concisamente la materia que el solicitante considera como la invención, se proporcionan las siguientes definiciones para ciertos términos usados en la siguiente descripción y reivindicaciones.

10 Como se usa en la presente memoria, 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 disolución acuosa con sales disueltas. El medio también puede comprender proteínas en una matriz estabilizante.

15 Los electrodos son de tres tipos, electrodos de trabajo o indicadores, electrodos de referencia y contraelectrodos. Un electrodo de trabajo o indicador mide una especie química específica, tal como un ión. Cuando se miden potenciales eléctricos mediante un electrodo de trabajo, el método se denomina potenciometría. Todos los electrodos selectivos de iones operan 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 particular, produce peróxido de hidrógeno, un subproducto de la reacción catalítica de la enzima sobre el analito. Se detecta peróxido de hidrógeno por 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 potenciales eléctricos. En un ejemplo, 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.

25 Como se usa en la presente memoria, 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 opera 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 comunes los sensores enzimáticos basados en dos electrodos, un electrodo de trabajo y de referencia.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "electrodo selectivo de iones" se refiere en general a un hilo de plata recubierto con cloruro de plata en contacto con una disolución tampón que contiene una concentración de cloruro (la disolución interna). La disolución tampón se cubre con una membrana selectiva de iones polimérica que está en contacto con la disolución de ensayo. La membrana selectiva de iones consiste típicamente en PVC de alto peso molecular, un plastificante, un ionóforo específico para un ión 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 disolución tampón interna en el otro lado de la membrana.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "sensor electroquímico seco" se refiere al electrodo selectivo de iones, descrito anteriormente, y un electrodo de referencia, descrito anteriormente. En el ejemplo "químico seco" los electrodos selectivos de iones presentan la misma configuración que se describió anteriormente, sin embargo, la disolución interna que contiene cloruro, se seca, es decir, se deshidrata dejando una capa de sal seca. Para actuar como un sensor electroquímico, la sal seca se debe solubilizar en agua para obtener una disolución tampón.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "electrodo enzimático" se refiere en general a una membrana de material compuesto depositada sobre un electrodo de metal, que comprende platino, por ejemplo. 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 constituida 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 proteínica 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 conducente 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 compuestos en la muestra que interfiere con el funcionamiento y la exactitud del electrodo.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "hidratación" se refiere al procedimiento de solubilización de las

sales de una capa de sal interna del sensor por el paso de agua por 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 disolución. Normalmente se puede conseguir hidratación por mero contacto del exterior de la membrana polimérica y disolución de sal interna con una disolución acuosa de sal para una duración requerida.

- 5 Como se usa en la presente memoria, "ciclación térmica" es el procedimiento por el que la temperatura de un sensor electroquímico, remojado en una disolución acuosa de sal, se eleva a una temperatura elevada especificada durante una extensión de tiempo especificada, y después se disminuye.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "calibración" se refiere al procedimiento por el que 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, señales, medidas por el sensor, relativas a las concentraciones del analito en las dos muestras de reactivos diferentes, sirven como puntos de referencia para mediciones del analito en muestras con concentraciones desconocidas del analito.

15 Con referencia a la FIG. 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, introducidos en el conjunto 10 de sensores. Las muestras de sangre que se tienen que analizar por el sistema se introducen por una entrada 13a de muestras. Las muestras de sangre se obtienen por, 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  
20 pueden introducir en la entrada 13a de muestras por otros medios automáticos o manualmente, como mediante jeringa. Las muestras de sangre se pueden introducir como muestras discretas.

El sistema 8 electroquímico que incluye una serie de componentes esenciales como se describe hasta este momento está contenido en un cartucho 37 desechable. Un cartucho de un tipo similar se explica con detalle en la Patente de EE.UU. N° 4.734.184.

25 En un ejemplo, el sistema 8 de sensores electroquímicos incorpora en el cartucho 37 al menos dos contenedores 14 y 16 preenvasados, conteniendo cada uno una disolución acuosa de calibración con valores conocidos de los parámetros que se tienen que medir mediante el sistema. Para fines de referencia, la disolución contenida dentro del contenedor 14 preenvasado se denominará Disolución de Calibración A, la disolución contenida dentro del contenedor 16 preenvasado se denominará Disolución de Calibración B.

30 En otro ejemplo, el sistema 8 electroquímico, ilustrado en la FIG. 1, incluye un tercer contenedor 23 preenvasado que contiene Disolución de Calibración AO. Cada uno de los contenedores 14, 16 y 23 preenvasados contiene una cantidad suficiente de su disolución de calibración para permitir que el sistema se calibre un número sustancial de veces antes de que llegue a estar vacío el contenedor preenvasado. Cuando uno o más de los contenedores 14, 16 y 23 que contiene las disoluciones de calibración están vacíos, se debe reemplazar el cartucho que contiene los  
35 contenedores 14, 16 y 23 preenvasados.

En un ejemplo particular, la Disolución de Calibración AO contiene monómero electropolimerizable. El monómero electropolimerizable tal como m-fenilendiamina puede estar incluido en las disoluciones de calibración en una concentración en un intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferiblemente aproximadamente 15 mM. En otro ejemplo, una disolución de monómeros electropolimerizables está contenida en un contenedor preenvasado (no  
40 mostrado) separado de los contenedores 14 y 16 preenvasados para las disoluciones calibradas en una concentración en un intervalo de aproximadamente 1 a 100 mM, preferiblemente aproximadamente 15 mM.

Con referencia a la FIG. 1, el contenedor 14 preenvasado está conectado a la entrada de una válvula 18 multi-  
45 posición por una línea 20 de flujo y el contenedor 16 preenvasado está conectado a una segunda entrada de la válvula 18 multi-posición a través de una línea 22 de flujo. En otro ejemplo más, el contenedor 23 está conectado a una tercera entrada de la válvula 18 multi-posición a través de una línea 25 de flujo. Otro contenedor 17 contiene una disolución de aclarado y está conectado a la entrada de la válvula 18 multi-posición a través de una línea 21 de flujo. En otro ejemplo más, la bolsa 17 de aclarado se elimina y se usa una de las disoluciones A o B de calibración como una disolución de aclarado, también. La línea 12 de salida es la salida de la válvula 18 multi-posición y está  
50 conectada a la línea 13 de entrada de la muestra por un estilete 11. Dependiendo de la posición de la válvula 18, las líneas 20, 21, 22, 25 de entrada 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 13b de entrada de la muestra, la línea 12b está abierta a la línea 13b de entrada de la muestra y permite el paso de la disolución de calibración o de aclarado, o aire por la línea 13b de entrada de la muestra al conjunto 10 de sensores por 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 al conjunto 10  
55 de sensores a través de la línea 24, facilitado por la operación de la bomba 26 peristáltica.

El cartucho 37 también incluye un contenedor 28, para una disolución de referencia. El contenedor 28 está conectado al conjunto de sensores mediante una línea 30 de flujo. El sistema incluye además un contenedor 32 para

desecho, que recibe las muestras de sangre, las disoluciones de calibración y la disolución de referencia después de que hayan pasado por el conjunto 10 de sensores, vía un conducto 34 flexible que presenta entrada desde el conjunto 10 de sensores.

5 Tanto el conducto 34 de flujo de desecho como la línea 30 de flujo de disolución de referencia consisten en o incluyen secciones de tubería de paredes flexibles que pasan por la bomba 26 peristáltica. La bomba 26 comprime y recorre las secciones flexibles de las líneas 30 y 34 de flujo para inducir un flujo presurizado de disolución de referencia desde el contenedor 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 por pasos en el conjunto 10 de electrodos pasadas las membranas de los  
10 sensores. Esta disposición, a diferencia de la alternativa de inducir presión positiva en la sangre y disoluciones de calibración para forzarlas por el conjunto 10 de electrodos, evita la imposición de fuerzas mecánicas innecesarias y posiblemente traumáticas en la muestra de sangre y minimiza posibilidades de fugas en el conjunto 10 de electrodos.

15 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, disolución de calibración o disolución 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 poli(cloruro de vinilo), ionóforos específicos, y un plastificante adecuado, se unen de manera permanente al cuerpo de la cámara. Estas membranas hidrófobas,  
20 químicamente sensibles, descritas a continuación con detalle, son la interfase entre la muestra o disoluciones de calibración y la disolución tampón en contacto con el electrodo interno (plata/cloruro de plata).

25 En un ejemplo, con referencia aún a la FIG. 1, hay incluidas en el cartucho 37, tres disoluciones que permiten calibraciones a concentraciones altas y bajas para todos los parámetros excepto hematocrito, que se calibra en un nivel. En un ejemplo, 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 desecho, el contenedor 28 de disolución de referencia, el contenedor 17 de disolución de aclarado, los contenedores 14, 16 y 23 de disolución 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 contenedor 32 de desecho debido a la presencia de una válvula 33 de  
30 comprobación de un solo sentido en la línea 34 de desecho. Después de uso en el sistema 8, se desea que el cartucho 37 se deseche y se reemplace por otro cartucho.

35 Con referencia a la FIG. 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 interactúa 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 interfase 38 eléctrica entre los sensores en la tarjeta 50 de plástico y el microprocesador 40 por el tablero 45 analógico. El tablero 45 analógico aloja convertidores de analógico a digital y digital a analógico. La señal de la interfase 38 del electrodo pasa por el convertidor de analógico a digital, convertido en forma digital para el procesador 40 para almacenar y presentar. A la inversa, las señales digitales del  
40 procesador 40, por ejemplo, el voltaje de polarización para sensor de oxígeno, van por el convertidor de digital a analógico, convertido en una forma analógica y se alimenta a los sensores para control, por la interfase 38 del electrodo.

45 El sistema 8 de sensores electroquímicos se forma en la inserción del cartucho 37 en el aparato sensor electroquímico. En 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 disolución en contacto con los sensores en el interior de la tarjeta 50 sensora por una temperatura específica para una duración especificada. El conjunto 39 de bloques del calentador permite calentamiento y enfriamiento rápido aplicando, por ejemplo, un dispositivo termoeléctrico, por ejemplo, el efecto Peltier, vigilado mediante un termistor 41, todo controlado mediante el microprocesador 40. Los sensores se  
50 conectan a la interfase 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 FIG. 1, el conjunto 10 de electrodos presenta una serie de conectores 36 del borde en un banco que permite que se conecte en un conector 38 compatible hembra para que los electrodos formados en el conjunto 10 se puedan conectar al microprocesador 40 por el tablero 45 analógico. El microprocesador 40 se  
55 conecta a la válvula 18 multipuerto vía un conductor 43 de válvulas por una línea 42 y al motor de la bomba 26 peristáltica vía 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 disoluciones de calibración que tienen que pasar por el conjunto 10 de  
60 electrodos. Cuando las disoluciones de calibración de, por ejemplo, los contenedores 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 disoluciones de calibración por el conjunto 10 de electrodos y los valores conocidos de los parámetros medidos contenidos dentro de la disolución de calibración de los contenedores 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.
- 5
- 10 Disoluciones de calibración.
- En un ejemplo, una composición de disolución A de calibración usada para calibración del segundo punto, preparada a 37°C y a presión atmosférica tonometrada con 9% de CO<sub>2</sub>, 14% de O<sub>2</sub> y 77% de gas helio, es como sigue: tampón orgánico de pH 6,9; pCO<sub>2</sub>= 8 kPa (63 mm de Hg); pO<sub>2</sub>= 13 kPa (100 mm de Hg); Na<sup>+</sup> = 100 mmoles/l; K<sup>+</sup>= 7 mmoles/l; Ca<sup>++</sup>=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.
- 15
- En otro ejemplo, una composición de disolución B de calibración usada para calibración de un punto y aclarado, preparada a 37°C y a presión absoluta de 93 kPa (700 mm de Hg) tonometrada con 27% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 68% de gas helio, es como sigue: tampón orgánico de pH 7,40; pCO<sub>2</sub>= 4,5 kPa (34 mm de Hg); pO<sub>2</sub>= 24 kPa (180 mm de Hg); Na<sup>+</sup> = 140 mmoles/l; K<sup>+</sup>= 3,5 mmoles/l; Ca<sup>++</sup>=1,0 mmol/l; tensioactivo y conservante inerte.
- 20
- En otro ejemplo más, una composición de disolución AO de calibración para calibración de oxígeno de bajo nivel y regeneración *in situ* de la membrana polimérica interna para los sensores enzimáticos contiene disolución acuosa de sal de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>; 15 mmoles/l de m-fenilendiamina, 20 mmoles/l de sulfito, tensioactivo y conservante inerte; tampón orgánico, pCO<sub>2</sub>. La disolución de referencia contiene AgNO<sub>3</sub>= 1 mmol/l; KNO<sub>3</sub>= 1 mol/l; tensioactivo.
- 25
- Las composiciones de las disoluciones 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 por el sistema, proporcionando una calibración de 2 puntos equilibrados para el instrumento. La disolución de calibración AO se elige para calibración de oxígeno de bajo nivel y regeneración de la membrana polimérica interna en los sensores de glucosa, creatina, creatinina y lactato.
- 30
- Las composiciones de calibración A y B se preparan por 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 disolución con oxígeno y CO<sub>2</sub> mezclado con helio para producir el nivel deseado de pCO<sub>2</sub> y pO<sub>2</sub>. La disolución 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 disolución se mide con el tonómetro con helio para llevar el pO<sub>2</sub> a menos de 4 kPa (30 mm de Hg). Después, se añaden las sales restantes a la disolución y se mide mediante tonómetro la mezcla final con mezcla de pCO<sub>2</sub> y helio para producir el nivel de pCO<sub>2</sub> deseado.
- 35
- Se añade al menos un monómero electropolimerizable a al menos una de las disoluciones de calibración, disolución AO en el contenedor 23 por ejemplo. La ausencia de oxígeno disuelto en la disolución de AO, debido a la presencia de ión sulfito, permite una vida útil más larga de monómero electropolimerizable en la disolución AO debido a que el oxígeno disuelto oxidará el monómero electropolimerizable y así hace al monómero incapaz de polimerización. Los monómeros electropolimerizables m-fenilendiamina por ejemplo, se pueden incluir en una disolución de calibración en una concentración en un intervalo entre aproximadamente 1 y 100 mM, preferiblemente 15 mM. El monómero electropolimerizable puede estar incluido en el cartucho 37 en un depósito aparte.
- 40
- La temperatura y la presión a las que se preparan las disoluciones de calibración y su método de envasado deben ser tales que se impida la posibilidad de que salgan gases disueltos de la disolución en el contenedor, que afectaría a la concentración de gases en las disoluciones de calibración y se minimice la tendencia a permear los gases a través incluso de los materiales más impermeables obtenibles prácticamente. Las disoluciones de calibración se envasan con las disoluciones llenando completamente los contenedores, de manera que no haya cámara de aire, evacuando los contenedores previamente a su llenado de una manera que se describirá con posterioridad.
- 45
- Llenando con la disolución de calibración el contenedor 14, 16, 23 de paredes flexibles, evacuados, a temperaturas elevadas y presión subatmosférica, la disolución no tendrá ninguna tendencia a una temperatura de uso inferior para desgaseado y producir así burbujas de gas en el contenedor. Si se produce desgaseado, las concentraciones de los gases en la disolución se verían afectadas, creando una falta de precisión en la calibración de los instrumentos. De manera similar, las disoluciones de calibración no se deben envasar a una presión demasiado baja, es decir, no por debajo de aproximadamente 83 kPa (625 mm de Hg), debido a que la capacidad absorbente de la disolución 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 absorbente de la disolución puede ser suficientemente alta 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
- 50
- 55

intervalo de 83-93 kPa (625-700 mm de Hg).

En un ejemplo, una disolución 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 despidan los gases disueltos. Esto coopera con el envasado a presión reducida para minimizar la posibilidad de desgaseamiento.

5 La Disolución 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 disolución a aproximadamente presión atmosférica sin ninguna posibilidad de microburbujas posteriores dentro del contenedor o transferencia de gas por el contenedor cuando se envasa en un contenedor impermeable a los gases, flexible, de cámara de aire cero.

10 Las envolturas que forman los contenedores 14, 16, 23, preenvasados de disolución de calibración se forman, por ejemplo, de láminas rectangulares, selladas por calor en los bordes y selladas por calor en una esquina a un vástago de entrada de la válvula 18 que se usa para fines de llenado. En un ejemplo, los contenedores 14, 16 y 23 preenvasados y las líneas 20, 22 y 25 de contenedores preenvasados se forman en un grupo unitario con la válvula 18 de manera que la cámara de aire 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 evacúa primero y después se llena con la disolución preparada. La bolsa se agita después mientras la disolución en exceso fluye fuera de manera continua de la bolsa. Este procedimiento retira toda burbuja de gas residual de la bolsa. Se sella después la disolución en el contenedor.

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

#### Disolución de referencia

25 La disolución de referencia dispuesta en el contenedor 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 disolución de calibración o la sangre de una manera que se describirá con posterioridad. En un ejemplo, la disolución es 1 mol/l de nitrato de potasio y 1 mmol/l de disolución de nitrato de plata. La disolución también contiene un tensioactivo tal como Brij 35. La disolución se envasa en un contenedor flexible sellado sin cámara de aire.

#### Conjunto de electrodos.

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

35 Haciendo referencia a la FIG. 2, a modo de ejemplo, el conjunto 10 de electrodos consiste en una tarjeta 50 rectangular estructuralmente rígida de poli(cloruro de vinilo) con una placa 52 de cubierta de aluminio (u otro material adecuado), rectangular, adherida a una de sus superficies. La placa 52 de cubierta cierra los canales 56 de flujo formados en una superficie de la tarjeta 50 y también actúa como un medio de transferencia de calor por hidratación de los sensores por ciclado térmico, descrito a continuación, y para mantener los fluidos fluyendo por el 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.

45 Haciendo referencia a la FIG. 2, se introduce una disolución 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 por la placa 52 de metal. La línea 30 de flujo de disolución 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, vía una línea 30 (véase también la FIG. 1), llena el pozo y se fuerza por 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 disolución 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 disolución 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 FIG. 2.

5 Haciendo referencia a las FIGS. 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 vigila mediante un termistor 41 y se regula por el microprocesador 40. Un reloj digital interno del microprocesador 40 controla el tiempo y se puede encender y apagar el conjunto 39 de bloque térmico según un programa prefijado. Así, 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

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

El par de electrodos de hematocrito.

15 Haciendo referencia a la FIG. 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 FIG. 5.

El sensor de oxígeno.

20 Haciendo referencia a la FIG. 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 FIG. 4.

El electrodo sensor de iones potasio, calcio y sodio.

A continuación el canal de flujo es un electrodo 78 sensor de sodio, seguido por 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.

25 El electrodo de pH.

Haciendo referencia a la FIG. 2, después a lo largo del canal 56 de flujo hay un electrodo 94 sensible al pH también ilustrado en la FIG. 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 FIG. 6, unido en el lado opuesto del canal 56 de flujo hay una sección 88 conductora impresa de almohadilla (también véase la FIG. 5) que forma un conector de borde. La naturaleza de este electrodo de pH se describirá con posterioridad con detalle.

30

El electrodo de dióxido de carbono.

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

El electrodo de lactato.

35 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 lactato oxidasa sobre lactato. La 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.

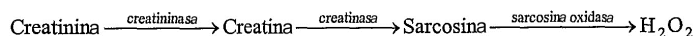
40 Haciendo referencia a la FIG. 2, un electrodo 91 de glucosa es el electrodo siguiente, que como el electrodo 92 de lactato funciona por la detección de peróxido de hidrógeno producido por una reacción enzimática en la capa enzimática. La enzima, glucosa oxidasa, específicamente oxida glucosa y produce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

Los electrodos de creatina y creatinina:

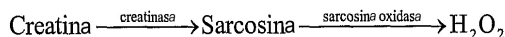
45 La medición de creatinina en una muestra de sangre requiere dos electrodos. Un electrodo mide la concentración total de creatinina y creatina y el otro electrodo mide la concentración de sólo creatina. La concentración de creatinina se determina por sustracción de creatina de las concentraciones de creatina y creatinina combinadas. Haciendo referencia a la FIG. 2, los siguientes dos electrodos, creatinina 116 y creatina 118, que como el electrodo 91 de glucosa y el electrodo 92 de lactato, funcionan por detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por reacción enzimática en sus respectivas capas enzimáticas. En el electrodo 116 de creatinina, la capa enzimática incluye una mezcla de tres

50

enzimas: creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla enzimática oxida específicamente creatinina y creatina y produce  $H_2O_2$  en la siguiente reacción en cascada:



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



La toma de tierra

- 10 La toma de tierra 105 ilustrada en la FIG. 2, es un hilo de plata insertado por el sustrato 50. Una toma de tierra sirve como un punto de referencia eléctrico común para todos los electrodos. La toma de tierra también puede servir como un contraelectrodo para el sistema de sensores amperométricos.

El electrodo de referencia.

- 15 Como se ilustra en la FIG. 2, dos hilos 106 de plata están fijados por el espesor del tablero 50 de sustrato de plástico en el pozo 64 de disolución 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 disolución de referencia en presencia de burbujas de aire. Las burbujas de aire pueden formar en el canal de referencia como resultado de desgaseamiento la disolución de referencia a la temperatura elevada del control del sensor. Un elemento 108 de circuito impreso, también ilustrado en la FIG. 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.

- 20 La construcción y funcionamiento específicos de los electrodos se describirá ahora con detalle.

Especificidades de los electrodos selectivos de iones.

Los detalles de los electrodos selectivos de iones se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 4.214.968 y la patente de EE.UU. Nº 4.734.184.

- 25 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 comúnmente como un ionóforo, que imparte selectividad a la membrana.

Polímero de membrana selectiva de iones.

- 30 Los polímeros para 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 poli(cloruro de vinilo), cloruro de vinilideno, acrilonitrilo, poliuretanos (en particular poliuretanos aromáticos), copolímeros de poli(cloruro de vinilo) y poli(cloruro de vinilideno), polivinilbutiral, polivinilformal, poli(acetato de vinilo), elastómeros de silicona y copolímeros de alcohol polivinílico, ésteres de celulosa, policarbonatos, polímeros carboxilados de poli(cloruro de vinilo) 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 a continuación, se pueden formar por 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

- 40 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, alcalino-térreo, amonio u otros iones. Los ionóforos adecuados se describen más completamente a continuación.

- 45 La selectividad del electrodo para un ión particular se debe a la naturaleza química del ionóforo y, así, el uso de diferentes componentes químicos ya que el ionóforo proporciona diferentes membranas para 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

5 (3) otras sustancias con selectividad iónica similar a 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).

10 La concentración de ionóforo en la membrana variará, por supuesto, con el portador particular usado, el análisis iónico experimentado, el plastificante, etc. Se ha encontrado en general, sin embargo, que las concentraciones de ionóforo de por debajo de aproximadamente 0,1 g/m<sup>2</sup> de membrana asumiendo los espesores de membrana preferidos en la presente memoria 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.

#### 15 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.

20 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  
25 deseable que el plastificante iónico sea sustancialmente no volátil para proporcionar vida útil prolongada para el electrodo. Entre los disolventes útiles están: ftalatos, sebacatos, éteres aromáticos y alifáticos, fosfatos, fosfatos alifáticos aromáticos mixtos, adipatos y mezclas de los mismos. Plastificantes útiles específicos incluyen: trimelitatos, bromofenil fenil éter, ftalato de dimetilo, ftalato de dibutilo, fosfonato de dioctilfenilo, ftalato de bis(2-etilhexilo), fosfato de octildifenilo, fosfato de tritolilo, fosfato de tris(3-fenoxifenilo), fosfato de tris(2-etilhexilo) y sebacato de dibutilo. Son  
30 preferidos en particular entre esta clase bromofenil fenil éter y trimelitatos para electrodos de potasio usando valinomicina como el portador.

La concentración de plastificante en la membrana también variará enormemente con los componentes de una membrana determinada; sin embargo, las relaciones en peso de plastificante a polímero de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 5:2 proporcionan membranas útiles. El espesor de la membrana afectará a la respuesta del  
35 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 127 micrómetros (5 milipulgadas) y preferiblemente aproximadamente 24,4 micrómetros (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 la presente memoria. Así, si se tiene que obtener la máxima ventaja en términos de  
40 capacidad de almacenamiento, la membrana selectiva de iones debería ser de espesor relativamente uniforme como se definió anteriormente.

#### Soporte

Haciendo referencia a la FIG. 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  
45 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. Por otra parte, la composición del soporte  
50 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 aquí discusión adicional de los mismos.

Según un ejemplo, el soporte comprende una lámina o película de un material polimérico aislante. Una variedad de  
55 materiales poliméricos formadores de película son adecuados para este fin, tales como, por ejemplo, acetato de celulosa, poli(tereftalato de etileno), policarbonatos, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), etc. El soporte polimérico puede ser de cualquier espesor adecuado típicamente de aproximadamente 508-5.080 micrómetros (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 conocidos en la técnica.

Especificidades del electrodo enzimático.

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

10 La fabricación del sensor puede basarse en técnicas de fundición con disolvente conocidas en la técnica. 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.

15 Haciendo referencia a las FIGS. 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 FIG. 3B es una sección agrandada de la FIG. 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 20 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 FIG. 2.

Haciendo referencia aún a las FIGS. 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 difundir 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 ser preferida una membrana externa altamente hidrófoba debido a que el oxígeno difundirá rápidamente a la capa 53 enzimática y así 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. 35

La membrana 51 externa consta de 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 40 composición se puede producir dispensando un volumen de una disolución 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 FIG. 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. 50

Haciendo referencia aún a la FIG. 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 un ejemplo, la enzima 49 incluye al menos una proteína con actividad enzimática. En otros ejemplos, la enzima 49 incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas y estabilizantes, por ejemplo. 55

En un ejemplo, la enzima 49 proteínica 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 un ejemplo, el electrodo 91 de glucosa puede incluir 0,10 g de glutaraldehído por gramo de glucosa oxidasa. En un ejemplo particular, el electrodo 92 de lactato incluye al menos glutaraldehído, albúmina de suero bovino, un estabilizante enzimático tal como, por ejemplo, polietilenimina y lactato oxidasa en la capa 53 enzimática. En un ejemplo, el electrodo 92 de lactato incluye 45% de lactato oxidasa en peso, 45% de albúmina de suero bovino 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 albúmina de suero bovino 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 no se limitan a, compuestos poliiónicos tales como polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En otro ejemplo 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 solo. Las mezclas enzimáticas se usan 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 particular, 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 estabilizador 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%. Estabilizantes poliiónicos, distintos de poli(N-vinilimidazol), también se pueden usar para estabilizar la mezcla enzimática. Ejemplos de compuestos poliiónicos incluyen, pero no se limitan a, polietilenimina, polipropilenimina, polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En un ejemplo 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 albúmina de suero bovino. La reticulación de las enzimas, estabilizantes y otras moléculas proteicas se realiza con, por ejemplo, glutaraldehído, un dialdehído. Otros agentes de reticulación, tales como 1,4-diisocianatobutano, un diisocianato, 1,2,7,8-diepoxioctano y 1,2,9,10-diepoxidecano, ambos diepóxidos, también se pueden usar. 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 otro ejemplo más relacionado con los electrodos de creatinina 116 y creatina 118, la capa 53 enzimática incluye una mezcla de diversas enzimas, proteínas, pero carece de estabilizador enzimático. 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). 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, preferiblemente 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.

Haciendo referencia a las FIGS. 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. Monómeros electropolimerizables adecuados 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 un ejemplo, 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 FIGS. 3A y 3B. El peróxido de hidrógeno, que se genera de 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 acetaminofeno, ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína y otros compuestos electroactivos que son más grandes que  $H_2O_2$  de interferir con y reducir de exactitud del electrodo 59 del sensor electroquímico.

La membrana 55 de rechazo de interferencias interna se puede generar 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,

acetaminofeno y ácido úrico, de ponerse en contacto con el hilo 57 y alterar la señal eléctrica detectada por el hilo 57.

5 Para evitar problemas inducidos por la degradación de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna, se puede combinar un monómero electropolimerizable con una disolución de calibración, tal como disolución AO  
 10 contenida en el contenedor 23 preenvasado del sistema 8 de sensores electroquímicos, ilustrado en la FIG. 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 disolución AO que contiene monómero de un contenedor 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 FIG. 1 al hilo 57. Durante el  
 15 procedimiento de polimerización el monómero en la disolución 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 disolución 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  
 20 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 procedimiento de polimerización generado por el sistema 8 sensor electroquímico ilustrado en la FIG. 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.

35 Especificidades 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 masa. 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 FIG. 4. El disco presenta preferiblemente un espesor de aproximadamente 1.016 micrómetros (40 milipulgadas) mientras el tablero 50 puede presentar un espesor de aproximadamente 2.159 micrómetros (85 milipulgadas). El diámetro del disco de vidrio es preferiblemente aproximadamente 2.540 micrómetros (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 poli(cloruro de vinilo) 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.

50 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 un ejemplo, 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 sólo 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  
 55 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 reticulador, 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 disolución.



Es de considerable ventaja que la membrana de hidrogel no se desprege 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.

- 5 Después de la funcionalización del disco de vidrio, se dispensa una pequeña gota de una disolución 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 disolución de componente de hidrogel como se describió 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 min., para fotopolimerizado de 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.

- 15 El sensor de oxígeno descrito en la presente memoria 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 disolución 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.

- 25 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 disolución en la capa hidratada. El flujo de corriente resultante entre el electrodo 74 de platino y el electrodo de masa se mide y es proporcional a la concentración de oxígeno en el fluido de ensayo que se está vigilando.

Electrodos sensibles a pCO<sub>2</sub>, pH, potasio, sodio y calcio.

- Los electrodos, mejor ilustrados en general en la FIG. 2, que conectan los hilos 78, 86, 90, 93 y 94 de plata que son sensibles a Na, Ca, potasio, pCO<sub>2</sub> y actividades de 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 FIG 6. Cada uno presenta una perla o una capa 152 interna de sal, que en la hidratación forma la capa de disolución 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 disolución tal como una disolución que contiene poli(cloruro de vinilo), un plastificante, un ingrediente activo sensible a los iones apropiado y una sal de borato. La membrana externa se aplica como una disolución, 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 CO<sub>2</sub>, el ingrediente activo selectivo de iones puede ser tridodecylamina (TDDA) o un componente sensible al pH adecuado. Para el electrodo de potasio, se puede usar un antibiótico monocíclico del 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)-4,5-dimetil-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 disolución 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.

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

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.

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 disolución acuosa de sal, normalmente una disolución 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 procedimiento. Durante el procedimiento de ciclado térmico, la composición y la integridad de las capas de la membrana permanecen intactos.

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 disolución electrolítica, tales como las disoluciones de calibración descritas anteriormente, y ciclando térmicamente los sensores por una temperatura elevada mayor que la de uso normal. Por ejemplo, los sensores se remojan en la disolución 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 un ejemplo, los sensores se remojan en una disolución 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 de hematocrito.

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 disolución 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.

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.

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.

En un ejemplo, 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 disolución 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 disolución 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 disolución de aclarado. En un ejemplo ilustrado en la FIG. 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 así 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 Fig. 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 Fig. 3B la restauración de la membrana 55 de rechazo de interferencias interna tiene lugar por la polimerización *in situ* de monómeros electropolimerizables sobre la membrana 55 de rechazo de interferencias interna de la membrana 60 de material compuesto.

En un ejemplo, los monómeros electropolimerizables están en disolución en la disolución de calibración AO en el contenedor 23 ilustrado en la FIG. 1. La disolución de calibración AO se hace pasar por el canal 56 de flujo de la tarjeta 50 sensora ilustrada en la FIG. 3A. La disolución AO con los monómeros electropolimerizables ponen 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 de referencia, 0,5 v frente al electrodo de referencia integrado se aplica al hilo 57 durante 3 minutos, por ejemplo, produciendo 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 disolución de calibración ya no se exponen al potencial eléctrico, ya no tiene lugar 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 por la configuración específica del electrodo 59. La composición y la geometría particular de 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 adecuado 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 disolución AO en el canal 56 de flujo se reemplaza con disolución 17 de aclarado y se devuelve el potencial eléctrico al valor de referencia.

Operación de la disolución de referencia

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

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

Conjunto de bloque calentador.

Haciendo referencia a las FIGS. 7A-7G, el conjunto 39 de bloque calentador incluye un dispositivo 230 termoelectrónico, un termistor 41, un bloque de aluminio que caracteriza dos carcasas 220a, 220b de aluminio, la interfase 156 del electrodo, la placa 234 de metal, el disipador 236 de calor, las conducciones 229, 229', 231, 231', eléctricas 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 análisis de fluidos.

Haciendo referencia a la FIG. 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 FIG. 7B, la conexión 156 eléctrica situada en la toma 222, forma interfase con los correspondientes conectores de borde en la tarjeta sensora ilustrada en, por ejemplo, la FIG. 5, para transmitir señales de los sensores. Un cable 226 conecta los conectores eléctricos de la tarjeta sensora a un microprocesador 40 por un talero 45 analógico (Véase la FIG. 1). Un tablero de circuito impreso (tablero analógico 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 señales del sensor en la tarjeta sensora. La salida de los sensores son señales analógicas. Las señales analógicas se convierten en señales digitales vía un convertidor de analógico a digital y las señales digitales son transmitidas al microprocesador para almacenamiento, análisis y presentación.

Haciendo referencia a la FIG. 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 FIG. 2). En la superficie 223 externa de la carcasa 220b de aluminio, se sitúa un termistor 41 como se ilustra en la FIG. 7 C. Extendiéndose desde el termistor 41 están las conexiones 229, 229' eléctricas 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 termoeléctrico ilustrado en la FIG. 7D. Los dispositivos termoeléctricos 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' eléctricas suministran corriente eléctrica programada controlada mediante un microprocesador 40 al dispositivo 230 termoeléctrico. La dirección y duración de la corriente se controla mediante el microprocesador 40 y determina si el dispositivo 230 termoeléctrico 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 señales al microprocesador 40. El microprocesador 40 está programado para transmitir señales eléctricas al dispositivo termoeléctrico, dependiendo las señales 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 termoeléctrico en la dirección 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 dirección inversa, la placa 220b de metal se enfría y el efecto de enfriamiento es transmitido a la tarjeta sensora en la toma 222.

Haciendo referencia a las FIGS. 7D y 7E, la superficie 233 externa del dispositivo 230 termoeléctrico 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 FIG. 7F.

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

En un ejemplo 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 sólo 1,0°C de fluctuación de la temperatura y enfriado a 37°C desde 60°C en aproximadamente dos minutos.

#### Operación inicial del conjunto

Haciendo referencia a la FIG. 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 disoluciones de calibración, por ejemplo, disolución B de calibración, al conjunto sensor así que se llene completamente el canal de flujo. Se detiene entonces la bomba durante un período de 10-30 minutos, preferiblemente 12-15 minutos durante los cuales los electrodos sensores químicos secos se hidratan por ciclado térmico, por ejemplo, de 37°C a 60°C y de nuevo a 37°C.

En un ejemplo, el conjunto 10 de sensores de electrodos químicos, secos, se inserta en el sistema 8 de sensores electroquímicos y la válvula 18 se controla por el microprocesador 40 para dirigir las disoluciones B de calibración al conjunto 10 de sensores. El conjunto 39 de bloques térmicos se fija a una temperatura según la cual la temperatura de la placa 52 térmica es suficiente para calentar la disolución de calibración en contacto con el sensor químico seco a una temperatura en un intervalo de 55°C a 75°C, preferiblemente 60°C, durante 10-30 minutos, preferiblemente 12 minutos. Después del período de tiempo especificado, el microprocesador 40 invierte el flujo de la corriente a través del dispositivo termoeléctrico para enfriar la placa 52 térmica. La tarjeta 50 sensora y la disolución 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 disolución AO 23 a la tarjeta 50 sensora y remojando los electrodos 59 durante 1 a 6 minutos, preferiblemente, 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 FIG. 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 disolución de aclarado desde el contenedor 17 preenvasado el canal 56 de flujo por la bomba 26 peristáltica. Durante el ciclo de aclarado el potencial de

5 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. El ciclo de calibración con disoluciones A 14 y B 16 empieza después. 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 biosensor, que comprende:  
una capa de membrana interna que comprende una membrana polimerizable regenerable que comprende un monómero electropolimerizable, la capa de membrana interna adaptada para funcionar como una membrana de rechazo de interferencias y una capa de membrana externa basada en poliuretano, una capa enzimática dispuesta entre, y en contacto con, las capas de la membrana interna y la externa, comprendiendo dicha capa enzimática una matriz que comprende al menos una enzima, un agente reticulante y un estabilizante enzimático,  
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 según la reivindicación 1, en la que la capa de membrana interna tiene un espesor menor que aproximadamente un micrómetro.
3. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la capa de membrana interna tiene poros suficientemente pequeños, para evitar el paso de compuestos en un líquido de muestra mayores que peróxido de hidrógeno.
4. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la capa de membrana externa tiene un espesor seleccionado de un intervalo de aproximadamente 8 a 15 micrómetros.
5. La membrana de material compuesto según la reivindicación 1, en la que dicha enzima se selecciona de lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y creatininasa.
6. La membrana de material compuesto según la reivindicación 1, en la que dicha matriz comprende lactato oxidasa, creatinasa, sarcosina oxidasa, creatininasa, una mezcla de creatinasa y sarcosina oxidasa o una mezcla de creatinasa, creatininasa y sarcosina oxidasa.
7. La membrana de material compuesto según la reivindicación 1, en la que dicha matriz comprende lactato oxidasa.
8. La membrana de material compuesto según la reivindicación 1, en la que dicha matriz comprende creatinasa y sarcosina oxidasa.
9. La membrana de material compuesto según la reivindicación 8, en la que dicha matriz comprende además creatininasa.
10. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha matriz comprende además albúmina de suero bovino.
11. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho agente de reticulación comprende un dialdehído, opcionalmente, en la que dicho dialdehído es glutaraldehído.
12. La membrana de material compuesto según la reivindicación 11, en la que dicha matriz comprende 1-10% de glutaraldehído en peso, opcionalmente, en la que dicha matriz comprende 5% de glutaraldehído en peso.
13. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho agente reticulante comprende un diisocianato.
14. La membrana de material compuesto según la reivindicación 13, en la que dicho agente reticulante comprende 1,4-diisocianatobutano.
15. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho agente reticulante comprende un diepóxido, opcionalmente, en la que dicho agente reticulante comprende 1,2,7,8-diepoxioctano o 1,2,9,10-diepoxidecano.
16. La membrana de material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que dicho estabilizante enzimático comprende un polímero poliiónico seleccionado de: polietilenimina, polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina y derivados de los mismos.
17. La membrana de material compuesto según la reivindicación 7, en la que dicho estabilizador enzimático comprende 1-20% de polietilenimina en peso, opcionalmente, en la que dicho estabilizador enzimático comprende 5% de polietilenimina en peso.
18. La membrana de material compuesto según la reivindicación 8, en la que dicho estabilizador enzimático comprende 1-20% de poli(N-vinilimidazol) en peso, opcionalmente, en la que dicho estabilizador enzimático comprende 5% de poli(N-vinilimidazol) en peso.

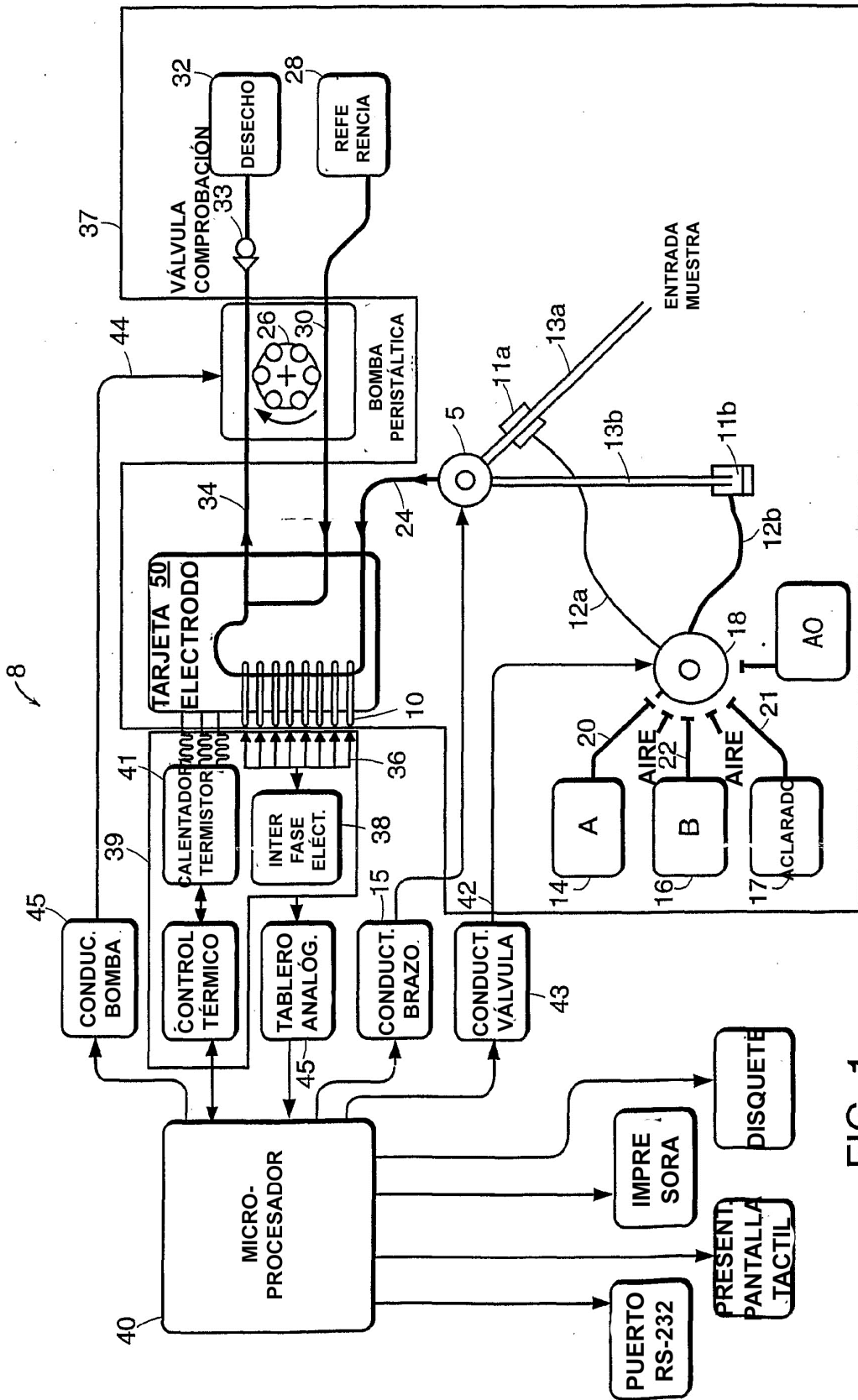


FIG. 1

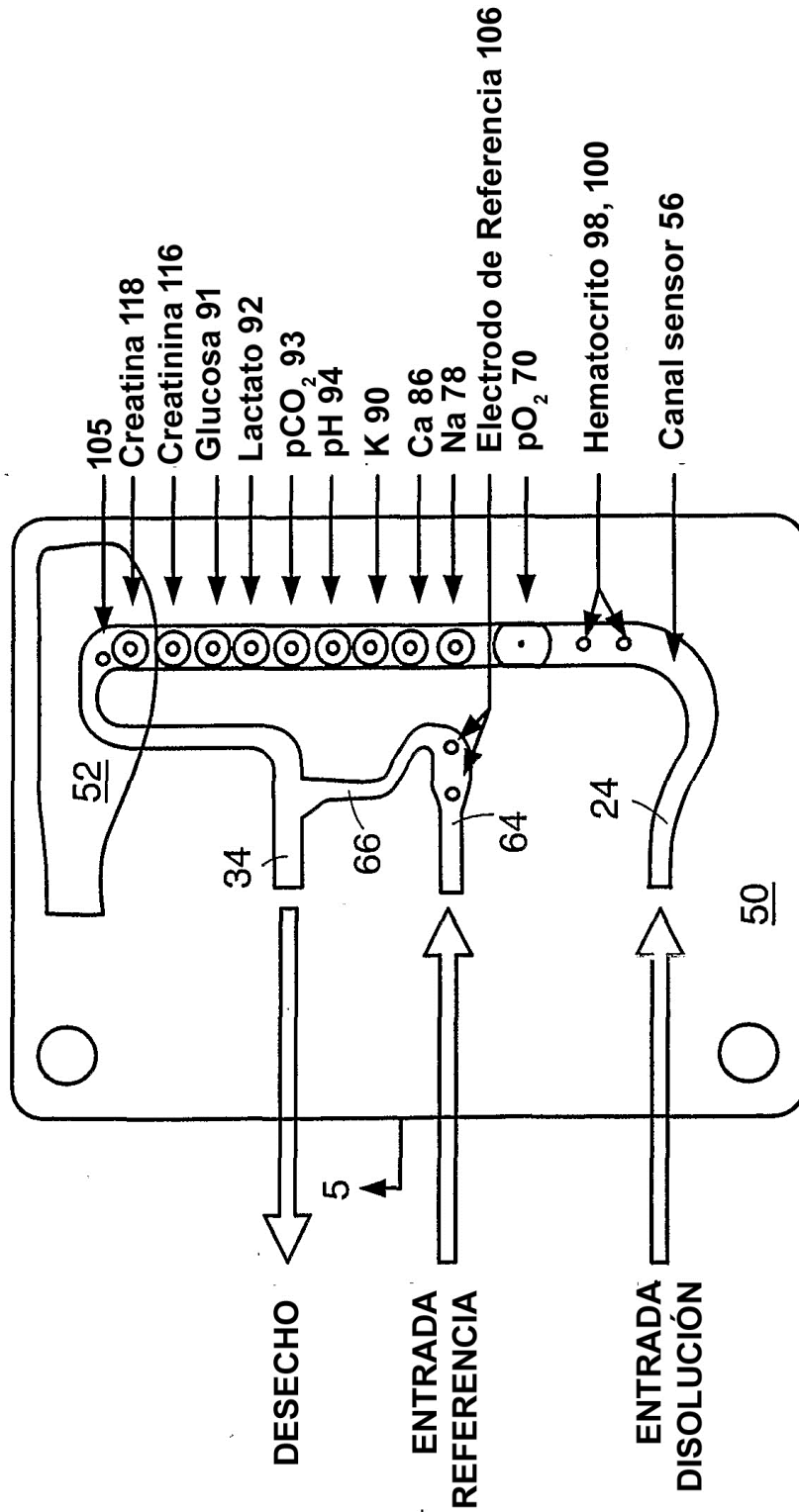
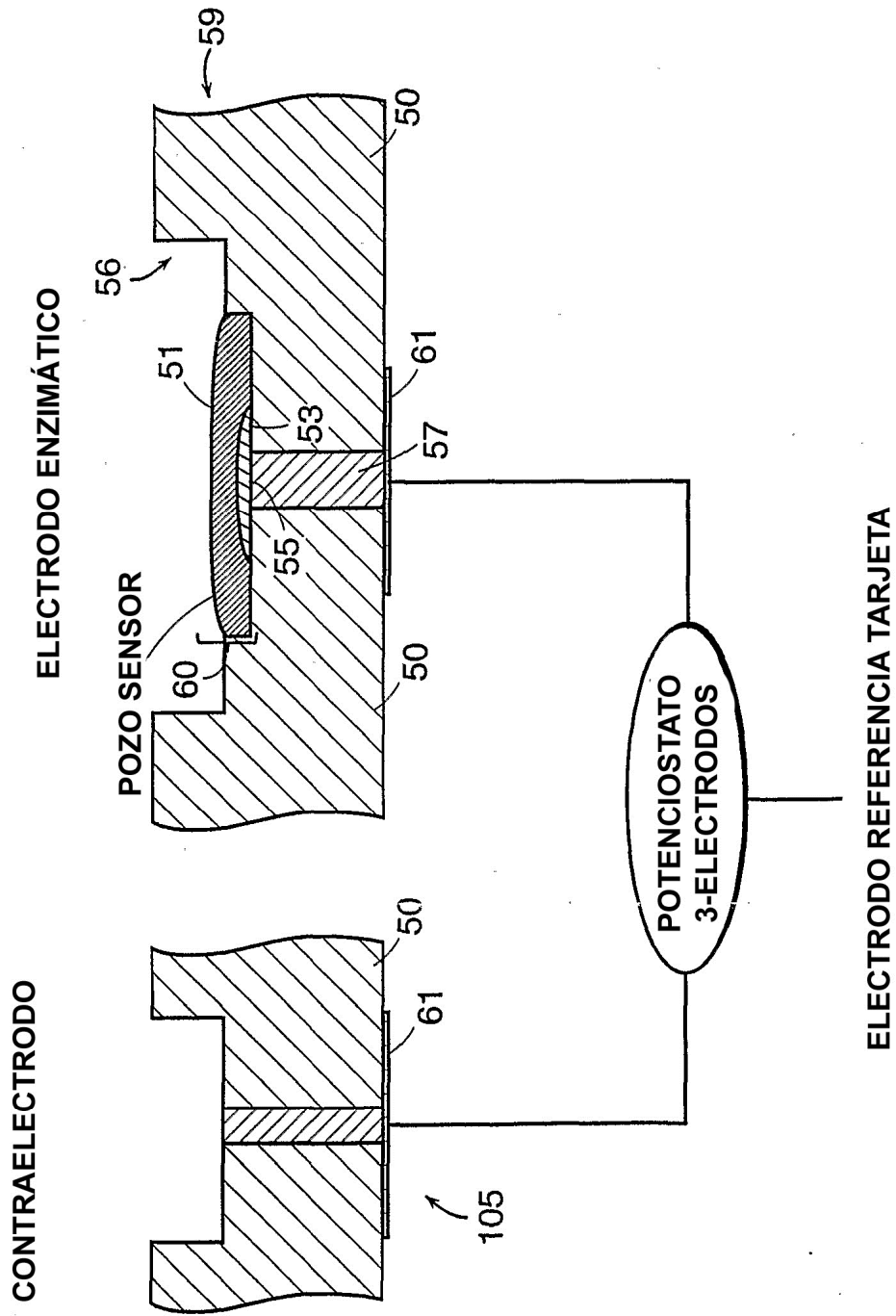


FIG. 2





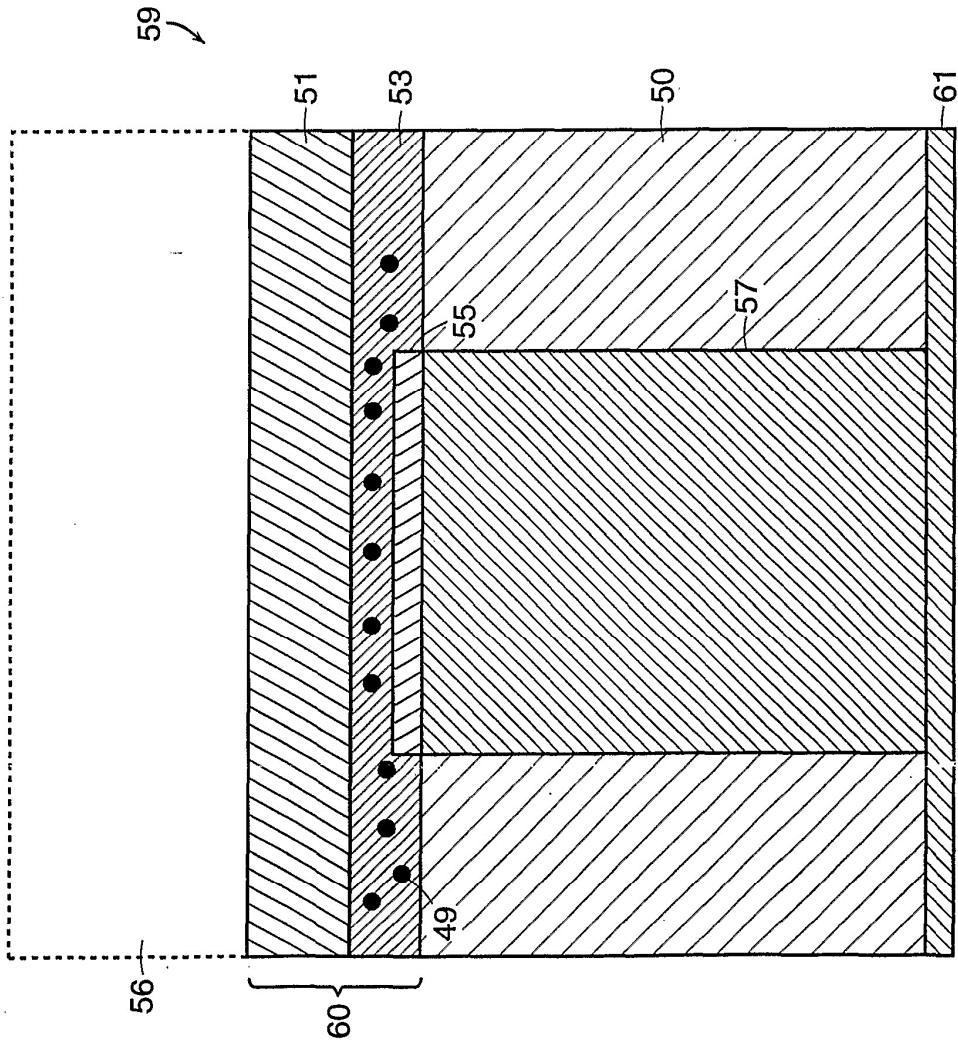


FIG. 3B

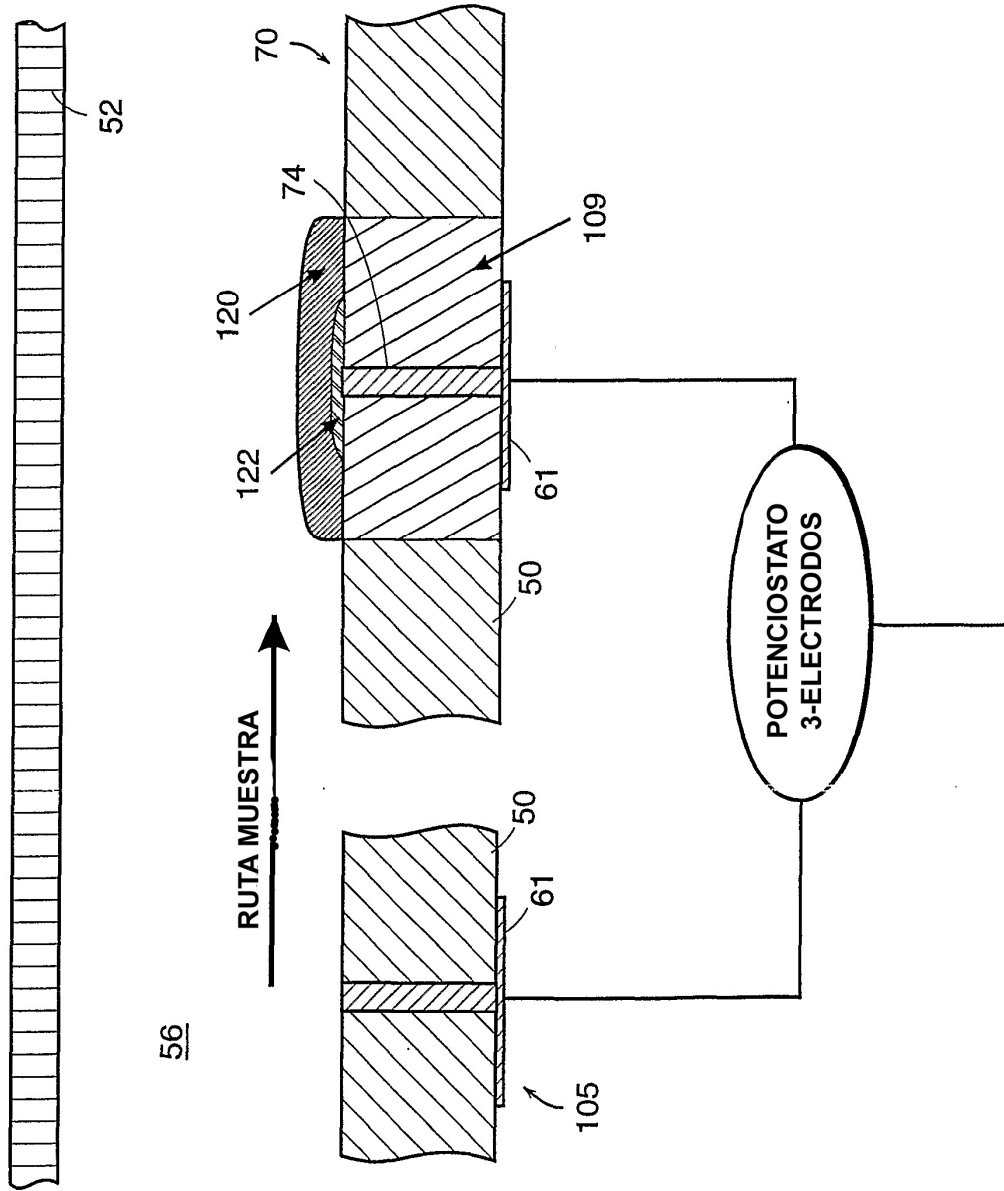


FIG. 4

POTENCIOSTATO 3-ELECTRODOS  
ELECTRODO REFERENCIA TARJETA

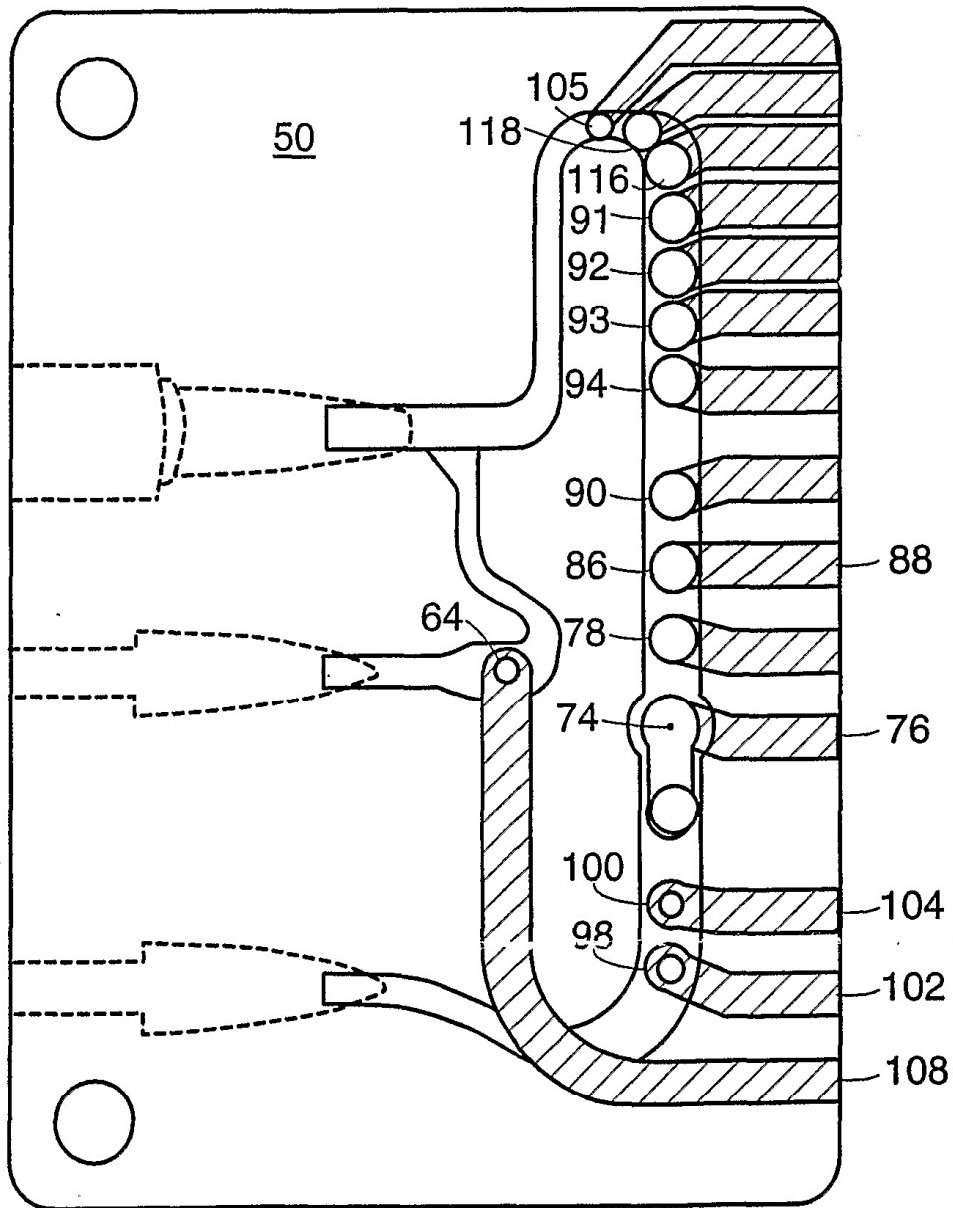


FIG. 5

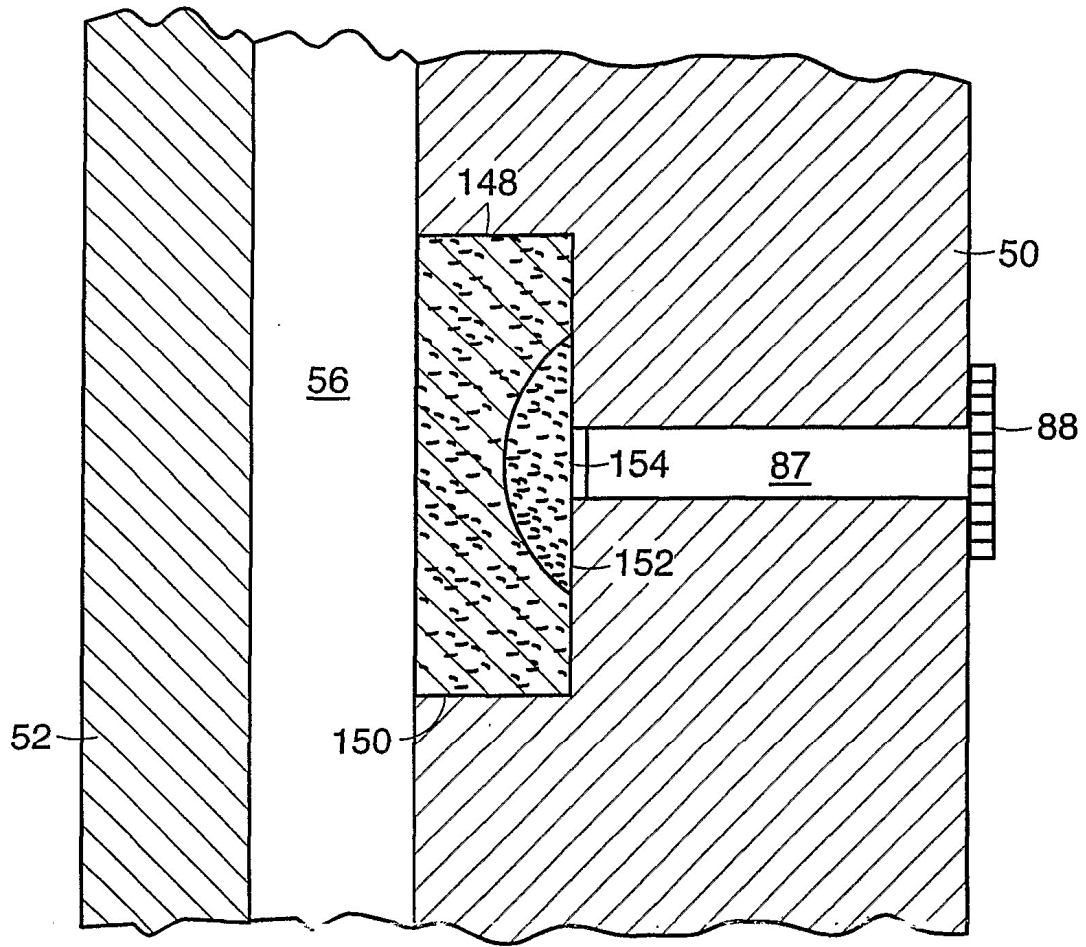


FIG. 6

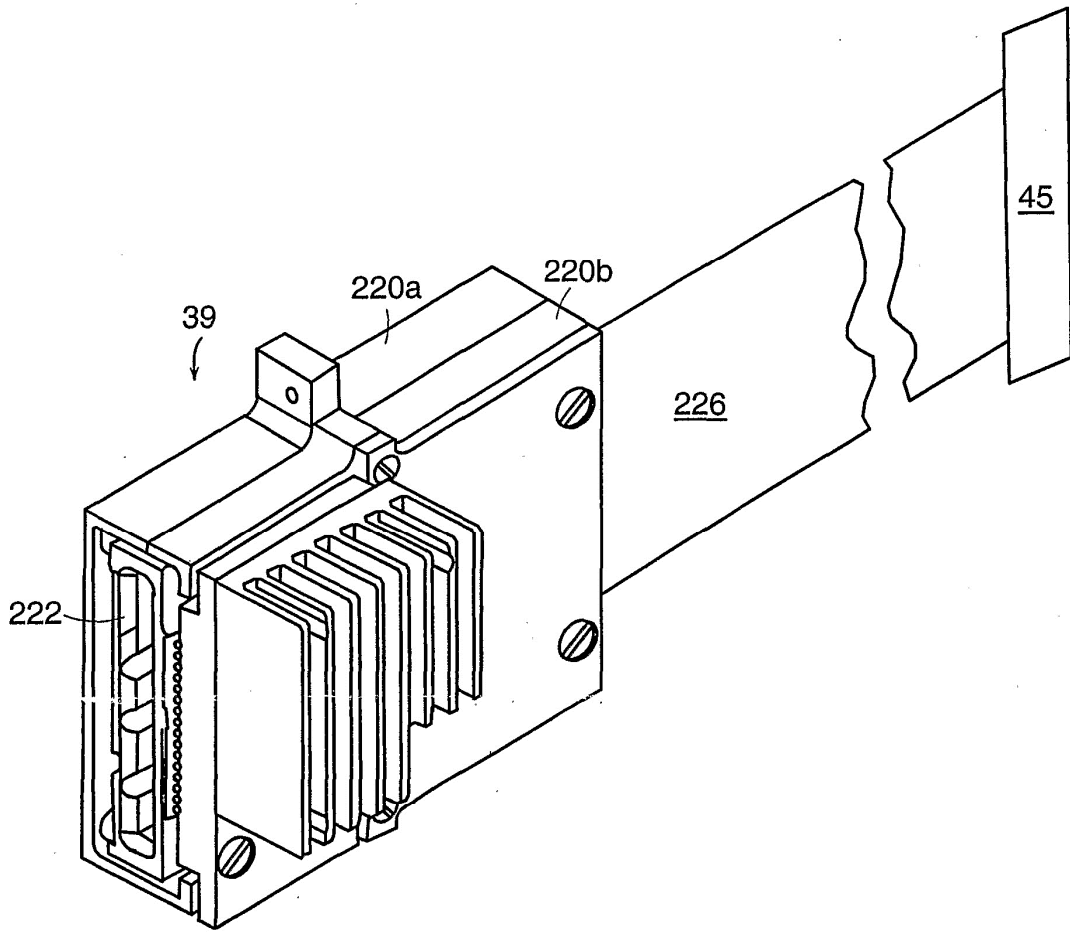


FIG. 7A

