



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 689 24 026 T3** 2008.01.10

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 359 831 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 24 026.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP89/00337**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **89 904 212.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1989/009397**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.03.1989**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.10.1989**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.03.1990**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.08.1995**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **20.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/28** (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

C12M 1/40 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

80829/88 **31.03.1988** **JP**

80842/88 **31.03.1988** **JP**

121002/88 **18.05.1988** **JP**

(73) Patentinhaber:

**Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Kadoma,
Osaka, JP**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**NANKAI, Shiro, Hirakata-shi Osaka 573, JP;
KAWAGURI, Mariko, 1-chome Moriguchi-shi
Osaka 570, JP; OHTANI, Mayumi, Moriguchi-shi
Osaka 570, JP; IJIMA, Takashi, Hirakata-shi Osaka
573, JP**

(54) Bezeichnung: **BIOSENSOR UND DESSEN HERSTELLUNG.**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Biosensoren, die eine spezifische Komponente in verschiedenen Probenlösungen aus dem lebenden Körper schnell und leicht mit hoher Genauigkeit quantitativ bestimmen können, und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] In den letzten Jahren sind verschiedene, eine spezifische, katalytische, Enzymen eigene Wirkung verwendende Biosensoren entwickelt worden, und insbesondere ist versucht worden, Biosensoren auf dem klinischen Gebiet anzuwenden. In der heutigen Zeit, wo Untersuchungsgegenstände und Probenmahlen zunehmen, sind Biosensoren, die schnelle Analyse mit hoher Genauigkeit bieten können, gewünscht worden.

[0003] Einen Glucosesensor als Beispiel nehmend, hat Diabetes heutzutage merklich zugenommen, und zur Messung und Kontrolle des Blutzuckerspiegels im Blut benötigt es eine sehr lange Zeit, da konventionellerweise Blut zentrifugiert und Plasma für die Messung vorgesehen wird. So wird ein Sensor, der Messung mit Gesamtblut durchführen kann, benötigt. Als handlichen Typ gibt es einen Stab-ähnlichen Träger, der mit einem Träger darauf versehen ist, der ein Enzym, das fähig ist, nur mit Glucose zu reagieren, und einen Farbstoff enthält, der eine Änderung nach Enzymreaktion oder durch das Produkt der Enzymreaktion verursacht, wie ein für die Untersuchung von Urin verwendeter Teststreifen. Der Stab hat das System, dass Blut auf den Träger getropft und nach einer bestimmten Zeitdauer eine Änderung des Farbstoffs visuell oder optisch bestimmt wird. Jedoch ist die Störung aufgrund gefärbter Stoffe im Blut schwerwiegend, was in einer niedrigen Genauigkeit resultiert.

[0004] Nun wird ein Mehrschichttyp-Analysenträger, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, vorgeschlagen (offengelegte Japanische Gebrauchsmuster-Anmeldung Nr. 54-178495). Der Träger hat den Aufbau umfassend einen transparenten Träger **51**, der darauf der Reihenfolge nach mit einer Reagensschicht **52**, einer Verteilerschicht **53**, einer wasserabweisenden Schicht **54** und einer Filterschicht **55** versehen ist. Die Messung hat das folgende System: Wenn eine Blutprobe von oben aufgetropft wird, werden feste Bestandteile im Blut, wie rote Blutkörperchen, Plättchen etc., durch die Filterschicht **55** entfernt, das Blut tritt gleichmäßig hindurch in die Verteilerschicht **53** durch ein Loch **56** in der wasserabweisenden Schicht, und eine Reaktion läuft in der Reagensschicht **52** ab. Nach Vollendung der Reaktion wird ein Licht aus der Pfeilrichtung durch den transparenten

Träger **51** eingestrahlt, wodurch eine Substratkonzentration durch Colorimetrie bestimmt wird. Das System hat einen komplizierten Aufbau, verglichen mit dem konventionellen handlichen Stab-ähnlichen Träger, aber seine Genauigkeit ist verbessert, da Blutzellen entfernt werden, etc. Jedoch dauert der Durchtritt von Blut und die Reaktion eine lange Zeit, so dass die wasserabweisende Schicht **54**, die Trocknen der Probe verhindert, benötigt wird. Zusätzlich ist Inkubation bei einer hohen Temperatur zur Reaktionsbeschleunigung erforderlich. So bringt das System Probleme mit sich, dass Vorrichtungen und Träger kompliziert werden.

[0005] Auf der anderen Seite ist ein Biosensor, wie in [Fig. 2](#) gezeigt, als das System zur quantitativen Analyse eines spezifischen Bestandteils in einer Probe wie Blut, etc. aus dem lebenden Körper mit hoher Genauigkeit, ohne Durchführung von Arbeitsgängen wie Verdünnen, Schütteln etc. der Probenlösung, vorgeschlagen worden (zum Beispiel offengelegte Japanische Patentanmeldung Nr. 59-166852). Der Biosensor umfasst eine isolierende Basisplatte **63** mit einer darin eingebetteten Messelektrode **64** und einer Gegenelektrode **65** aus Platin, etc., mit Leitungen **61** bzw. **62**, und die freiliegenden Bereiche dieser Elektroden sind mit einem porösen Material **66** bedeckt, das darauf eine Oxidoreduktase und einen Elektronenakzeptor trägt. Wenn eine Probenlösung auf das poröse Material aufgetropft wird, werden die Oxidoreduktase und der Elektronenakzeptor in der Probenlösung gelöst, wodurch eine Enzymreaktion mit einem Substrat in der Probenlösung abläuft und der Elektronenakzeptor reduziert wird. Nach Reaktionsvollendung wird der reduzierte Elektronenakzeptor elektrochemisch oxidiert, und eine Substratkonzentration in der Probe wird aus einem in diesem Fall erhaltenen Stromlevel für die Oxidation bestimmt. In solch einem Aufbau benötigen die Elektroden jedoch Arbeitsvorgänge, wie Waschen etc., während das poröse Material für jede Analyse ausgewechselt werden kann, um dadurch leicht eine Messung zu ermöglichen. Wenn es auf der anderen Seite möglich ist, die Vorrichtung einschließlich des Elektrodensystems für jede Messung zu verwerfen, werden die Arbeitsvorgänge für die Messung extrem einfach, aber unter Gesichtspunkten von Elektrodenmaterialien, wie Platin etc., Aufbau und dergleichen, ist die Vorrichtung unvermeidlich sehr teuer. Für den Aufbau von Platinelektroden kann auch die Zerstäubungsmethode oder Abscheidungsmethode angewendet werden, aber Produktionskosten steigen.

[0006] Als ein das Elektrodensystem enthaltendes Einweg-System ist ein in der offengelegten Japanischen Patentanmeldung Nr. 61-294351 beschriebener Biosensor vorgeschlagen worden. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, werden in diesem Biosensor die Elektrodensysteme **72 (72')**, **73 (73')** und **74 (74')**, zusammengesetzt aus Kohlenstoff etc., auf einer isolierenden

Basisplatte **71** durch Siebdruck etc. gebildet; nach Aufbringen einer isolierenden Schicht **75** darauf werden die Elektrodensysteme mit einem porösen Material **77**, das darauf eine Oxidoreduktase und einen Elektronenakzeptor trägt, bedeckt, und das Ganze wird mit einem Halterahmen **76** und einer Abdeckung **78** integriert. Wenn eine Probenlösung auf das poröse Material getropft wird, werden die Oxidoreduktase und der Elektronenakzeptor in der Probenlösung gelöst, wodurch eine Enzymreaktion mit einem Substrat in der Probenlösung abläuft und der Elektronenakzeptor reduziert wird. Nach Vollendung der Reaktion wird der reduzierte Elektronenakzeptor elektrochemisch oxidiert und eine Substratkonzentration in der Probe aus einem in diesem Fall erhaltenen Stromlevel für die Oxidation bestimmt.

[0007] In dem vorangehenden konventionellen Aufbau wird die Basisoberfläche einschließlich des Elektrodensystems nicht immer gleichförmig befeuchtet, so dass Luftblasen zwischen dem porösen Material und der Basisplatte zurückbleiben, wodurch ein Ansprechstrom beeinflusst wird oder seine Reaktionsrate gelegentlich herabgesetzt wird. Wenn ferner Feuchtigkeit einer Umgebung gering ist, verdunstet die Feuchtigkeit in einer Probenlösung während der Messung, so dass eine Änderung im Ansprechverhalten beobachtet wird. Wenn darüber hinaus eine Substanz, die leicht an die Elektroden adsorbiert wird, oder eine Substanz, wie Ascorbinsäure oder dergleichen, die leicht oxidiert wird, in einer Probenlösung zugegen ist, wird das Ansprechverhalten des Sensors durch eine solche Substanz beeinflusst.

[0008] Daher sind als Sensoren zur Messung eines spezifischen Bestandteils in einer lebensnotwendigen Probenlösung, wie Blut oder dergleichen, einfach und schnell mit hoher Genauigkeit, Sensoren erwünscht, die durch bloßes Aufbringen einer Spurenmenge von Probenlösung Messdaten liefern können, ohne die Probenlösung zu verdünnen oder zuvor quantitativ zu bestimmen. Darüber hinaus sind Sensoren vom Einweg-Typ erwünscht, die frei von Arbeitsvorgängen wie Waschen, Wischen etc. sind.

[0009] Schließlich wird festgestellt, dass, außer den obigen plattenartigen Vorrichtungen, EP-A-0267724 Testvorrichtungen zum Ausführen mikrochemischer Tests, worin ein chemisch oder elektrochemisch aktives Material auf eine innere Oberfläche eines Behälters aufgebracht wird, offenbart.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0010] Der Biosensor der Erfindung ist in Anspruch 1 definiert. Das Verfahren zur Herstellung eines Biosensors ist in Anspruch 11 beschrieben. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

[0011] Der Biosensor der vorliegenden Erfindung umfasst eine isolierende Basisplatte, worauf das Elektrodensystem vorgesehen ist, bestehend aus mindestens einer Messelektrode und einer Gegenelektrode und auf dem Elektrodensystem einer Enzymschicht und eine Elektronenakzeptorschicht umfassenden Reaktionsschicht. Weiterhin wird durch Integrieren dieser Einheit mit einem Überzug bzw. einer Abdeckung ein Raum, die Reaktionsschicht einschließend, gebildet, der mit einer Einlassöffnung zum Einführen einer Probenlösung in den Raum und einer Auslassöffnung zum Ablassen eines Gases in dem Raum durch Einfließen der Probenlösung versehen ist. Eine durch die Reaktion zwischen dem Enzym und der Probenlösung verursachte Konzentrationsänderung einer Substanz wird durch das Elektrodensystem wahrgenommen, um dadurch eine Substratkonzentration in der Probenlösung zu bestimmen.

[0012] Darüber hinaus kann das Elektrodensystem auch aus einem Mehrfachsatz von Elektrodensystemen bestehen, und Reaktionsschichten, entsprechend dem Mehrfachsatz von Elektrodensystemen, sind vorgesehen, wodurch die unabhängigen Sensorsysteme aufgebaut werden können. Durch diese Vorgehensweise können zwei oder mehr Substratkonzentrationen gleichzeitig bestimmt werden. Darüber hinaus können auch zwei Paare von Elektrodensystemen verwendet werden, worin ein Elektrodensystem zur Messung und ein anderes Elektrodensystem als Bezug verwendet wird. Durch Bestimmen einer Differenz im Ansprechverhalten zwischen den Elektrodensystemen kann Störung durch Ascorbinsäure etc. eliminiert werden.

[0013] Weiterhin wird durch Integrieren der Basisplatte, des Elektrodensystems und der Reaktionsschicht mit dem Überzug bzw. der Abdeckung ein Raum gebildet, und die Oberfläche der den Raum aufbauenden Teile wird hydrophil gemacht, wodurch eine bestimmte Menge von Probenlösung in den oben beschriebenen Raum, durch einen einfachen Arbeitsvorgang durch bloßes in-Kontakt-Bringen einer Spurenmenge einer Probenlösung mit der Einlassöffnung des Sensors, leicht eingebracht werden kann.

[0014] Die eingebrachte Probenlösung löst den Elektronenakzeptor, Enzym und hydrophile, hochmolekulare Substanz in der Reaktionsschicht, wo eine Enzymreaktion abläuft, unter Umwandlung der Probenlösung in eine viskose Flüssigkeit. Durch die Enzymreaktion wird ein reduzierter Elektronenakzeptor hergestellt, ansprechend auf die Substratkonzentration in der Probenlösung. Dann wird der reduzierte Elektronenakzeptor elektrochemisch auf der Messelektrode oxidiert, um die Substratkonzentration aus einem Stromlevel für die Oxidation zu bestimmen.

[0015] In dem Biosensor der vorliegenden Erfin-

ung wird eine hydrophile, hochmolekulare Substanz verwendet, so dass der Einfluss von festen Bestandteilen, wie roten Blutkörperchen und dergleichen, in einer Blutprobe auf die Elektroden verhindert werden kann, und gleichzeitig, durch Vorsehen des Raumes, Verflüssigung der Probenlösung auf den Elektroden wirksam verhindert werden kann. So kann ein Einfluss durch Vibration während der Messung verhindert werden.

[0016] Auf der anderen Seite besteht die Reaktionsschicht in dem Biosensor der vorliegenden Erfindung aus einer Enzymschicht und einer darauf vorgesehenen Elektronenakzeptorschicht. Weiterhin sind, durch Vorsehen einer hydrophilen hochmolekularen Substanzschicht zwischen diesen Schichten, das Enzym und der Elektronenakzeptor voneinander getrennt, um einen Biosensor mit ausgezeichneten Haltbarkeitseigenschaften zu liefern.

[0017] Erfindungsgemäß kann ein das Elektroden-system einschließender Einweg-Biosensor so aufgebaut sein, dass eine Substratkonzentration in der Probe, zum Beispiel eine Glucosekonzentration im Blut, rasch in einem einfachen Arbeitsgang mit hoher Genauigkeit, durch bloße Zugabe einer extremen Spurenmenge von Probenlösung bestimmt werden kann, ohne Verdünnen oder quantitatives Bestimmen der Probenlösung im voraus.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] [Fig. 1](#) ist eine veranschaulichende Zeichnung, die ein Beispiel herkömmlicher Glucosesensoren zeigt. [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigen veranschaulichend herkömmliche Enzymelektroden verwendende Glucosesensoren. [Fig. 4](#) zeigt eine perspektivische Ansicht eines auseinandergenommenen Biosensors, der eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist. [Fig. 5](#) zeigt eine Außenansicht des Biosensors. [Fig. 6](#) zeigt veranschaulichend eine Querschnittsansicht des Biosensors. [Fig. 7](#) zeigt eine Ansprechcharakteristik des Biosensors. [Fig. 8](#) zeigt eine perspektivische Ansicht eines auseinandergenommenen Biosensors, der eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist. [Fig. 9](#) zeigt eine Außenansicht des Biosensors. [Fig. 10](#), [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) zeigen perspektivische Ansichten auseinandergenommener Biosensoren, die andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind. [Fig. 11](#) zeigt eine perspektivische Ansicht eines auseinandergenommenen Biosensors, der eine andere Ausführungsform der Erfindung ist. [Fig. 14](#) zeigt eine Beziehung zwischen Ascorbinsäurekonzentration und Ansprechcharakteristik. [Fig. 15](#) zeigt eine Beziehung zwischen dem Teilchendurchmesser von Kaliumhexacyanoferrat (III) und der Zeit, nach der die Reaktion vollständig ist.

BESTE ANWENDUNGSWEISEN DER ERFINDUNG

Beispiel 1

[0019] In Beispiel 1 ist die Reaktionsschicht als Bezugsbeispiel angegeben.

[0020] In den folgenden erklärenden Zeichnungen in den Beispielen wird die gleiche Nummerierung für gemeinsame Elemente verwendet, und ihre Erklärung ist teilweise weggelassen.

[0021] Als eine Ausführungsform des Biosensors ist ein Glucosesensor erklärt. [Fig. 4](#) zeigt eine perspektivische Ansicht eines auseinandergenommenen Glucosesensors, hergestellt als eine Ausführungsform des Biosensors gemäß der vorliegenden Erfindung. [Fig. 5](#) zeigt eine Außenansicht des Biosensors. [Fig. 6](#) zeigt veranschaulichend eine Querschnittsansicht des Biosensors, der erhalten wird, wenn der in [Fig. 5](#) gezeigte Biosensor in der Mitte in Längsrichtung aufgeschnitten wird. In [Fig. 4](#) ist eine in [Fig. 6](#) gezeigte Reaktionsschicht **14** nicht gezeigt.

[0022] Nachfolgend wird ein Verfahren zur Herstellung des Sensors beschrieben. Silberpaste wird auf eine isolierende Basisplatte **1**, zusammengesetzt aus Polyethylenterephthalat, durch Siebdruck aufgedruckt, um Leitungen **2**, **3** (**3'**) zu bilden. Als nächstes wird eine einen Harzbinder enthaltende leitende Kohlenstoffpaste aufgedruckt. Durch Trocknen durch Erhitzen wird das Elektrodensystem, bestehend aus einer Messelektrode **4** und einer Gegenelektrode **5** (**5'**), gebildet. Darüber hinaus wird eine isolierende Paste aufgedruckt, um teilweise das Elektrodensystem zu bedecken, um so den freiliegenden Bereich der Elektroden festzulegen und den unnötigen Teil der Leitungen zu bedecken. Durch eine Wärmebehandlung wird eine isolierende Schicht **6** gebildet.

[0023] Als nächstes wird der freigelegte Bereich des Elektrodensystems **4**, **5** (**5'**) poliert und dann an Luft bei 100°C für 4 Stunden wärmebehandelt. Nachdem der Elektrodenteil so aufgebaut wurde, wird eine 0,5%ige wässrige Lösung von Carboxymethylcellulose (nachfolgend einfach als CMC bezeichnet) als die hydrophile, hochmolekulare Substanz auf die Elektroden verteilt und getrocknet, um eine CMC-Schicht zu bilden. Eine Lösung von Glucoseoxidase (GOD) als Enzym in Phosphatpufferlösung wird darauf aufgetragen und getrocknet, um eine Reaktionsschicht **14** zu bilden, die aus CMC-GOD-Schicht besteht. In diesem Fall bilden CMC und GOD eine dünne Schicht mit einer Dicke von mehreren Mikrometern in einem teilweise vermischten Zustand.

[0024] Als nächstes werden drei Teile von dieser Basisplatte **1**, ein Abstandhalter **7**, bestehend aus einer Harzplatte und einem Überzug bzw. einer Abdeckung **9**, in einer solchen räumlichen Anordnung

zwischen den betreffenden Teilen, wie durch die gestrichelten Linien wie in [Fig. 4](#) gezeigt, zusammengefügt, um den Sensor, wie in der Außenansicht in [Fig. 5](#) gezeigt, zu integrieren. Hier hat der Abstandshalter eine Dicke von ungefähr 300 µm und hat eine Form, dass der zentrale Teil in eine U-Form weggeschnitten wird mit einer Breite von 2 mm und einer Länge von 7 mm. Das Ende des Schnittteils wird eine Einlassöffnung **10** einer Probenlösung und der zentrale Teil bildet einen Raum **8**, wenn integriert. Darüber hinaus besitzt der Überzug bzw. die Abdeckung **9** ein Loch mit einem Durchmesser von 2 mm und bildet eine Auslassöffnung **11**, wenn integriert.

[0025] Wenn die Einlassöffnung am Ende des Glucosesensors, wie oben beschrieben aufgebaut, mit einer Glucosestandardlösung (200 mg/dl) in Kontakt gebracht wird, die eine Probenlösung ist, wird die Probenlösung durch die Einlassöffnung **10** in das Innere eingebracht. In diesem Fall wird die Luft in dem Raum **8** rasch durch die Auslassöffnung **11** abgelassen, und gleichzeitig wird der Raum mit der Probenlösung bis nahe an die Auslassöffnung aufgefüllt. So verteilt sich die Probenlösung rasch auf der Elektrodenoberfläche, um den Raum auszufüllen, so dass irgendwelche zurückbleibenden Luftblasen nicht bemerkt werden.

[0026] Dies ist vermutlich so, weil die Probenlösung in eine Richtung durch Vorsehen der Einlassöffnung und der Auslassöffnung fließen würde, und wegen der hydrophilen, hochmolekularen, zuvor auf den Elektroden gebildeten Substanzschicht würde Benetzen auf der Elektrodenoberfläche verbessert werden, so dass das Gas glatt gegen die Flüssigkeit ausgetauscht wird.

[0027] Weiter kann die Probenlösung durch vorheriges Behandeln der Oberflächen der den Raum bildenden Teile, wie der Überzug bzw. die Abdeckung, Abstandshalter, etc., mit einem oberflächenaktiven Mittel, um sie hydrophil zu machen, glatter eingebracht werden.

[0028] Auf der anderen Seite löst die zugesetzte Probenlösung CMC darin, um die Flüssigkeit viskos zu machen. Glucose in der Probenlösung reagiert mit dem Enzym durch die Wirkung von auf die Elektroden aufgebracht Glucoseoxidase, um Wasserstoffperoxid zu bilden. Daher wird die Messelektrode durch Anlegen einer Spannung von 1 V zwischen den Elektroden eine Minute nach Einbringen der Probenlösung in die Anodenrichtung polarisiert. Durch Anlegen einer Spannung zur Anodenrichtung oben beschrieben, wird ein oxydierender Strom für das erzeugte Wasserstoffperoxid erhalten. Dieser Stromlevel entspricht der Konzentration von Glucose, die ein Substrat ist.

[0029] Als ein Beispiel der Ansprechcharakteristik

des wie oben beschrieben aufgebauten Sensors wird die Beziehung zwischen einem Stromlevel 5 Sekunden nach Anlegen von Spannung und einer Glucosekonzentration in [Fig. 7](#), A, gezeigt, was anzeigt, dass eine gute Ansprechcharakteristik erhalten wurde.

[0030] Weiter wurde in Bezug auf 30 Glucosesensoren mit der gleichen Spezifikation wie oben beschrieben die gleiche Probenlösung mit den Sensoren getestet. Ein Variationskoeffizient war ungefähr 5%.

[0031] Darüber hinaus wurde der Einfluss durch Verdampfen unter Feuchtigkeitsbedingungen von 30% und 80%, unter Verwendung von je 10 Sensoren untersucht und mit dem in [Fig. 3](#) gezeigten Glucosesensor, der in einer konventionellen Bauweise hergestellt wurde, durch Ausprobieren verglichen. In den Glucosesensoren gemäß dem Beispiel war der Einfluss vernachlässigbar, sogar nach 5 Minuten Standzeit. Jedoch war die Verdampfung in den Sensoren mit einer konventionellen Bauweise um ungefähr 3% höher unter der geringeren Feuchtigkeitsbedingung 2 Minuten danach.

[0032] Wie oben beschrieben, kann der Glucosesensor gemäß dem Beispiel mit der oben beschriebenen Bauweise rasch eine Spurenmenge der Probenlösung in die Reaktionsschichtzone absorbieren und eine Glucosekonzentration einfach und rasch mit hoher Genauigkeit ohne Einfluss durch Umgebungsfeuchtigkeit, etc., bestimmen.

Beispiel 2

[0033] Das Verfahren war ziemlich das gleiche wie in Beispiel 1, bis die CMC-GOD Schicht gebildet wurde. Danach wurde weiter eine Reaktionsschicht, zusammengesetzt aus einer CMC-GOD-Elektronenakzeptorschicht, darauf nach der folgenden Methode gebildet.

[0034] Oberflächenaktives Mittel, Lecithin (Phosphatidylcholin), wurde in Toluol gelöst, um 1 gew.-%ige Lösung herzustellen und Mikrokristalle (ein mittlerer Teilchendurchmesser von weniger als 10 µm) von Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor wurden in der Lösung dispergiert. Dann wurde Toluol abgedampft, um die Reaktionsschicht, zusammengesetzt aus CMC-GOD-Elektronenakzeptorschicht, auf dem Elektrodensystem zu bilden, worauf mit einem Abstandshalter und einem Überzug bzw. einer Abdeckung wie in Beispiel 1 integriert wurde. So wurde ein Glucosesensor mit der in [Fig. 5](#) gezeigten Bauweise erhalten.

[0035] Als nächstes wurde eine Glucosestandardlösung durch den Endteil des Sensors wie oben beschrieben eingebracht. Durch Anlegen einer Spannung von 600 mV zwischen den Elektroden nach ungefähr einer Minute, wurde durch die Enzymreaktion

gebildetes Kaliumhexacyanoferrat (II) auf der Messelektrode oxydiert. Ein Stromlevel in diesem Fall wurde 5 Sekunden nach Anlegen der Spannung gemessen. Als Ergebnis wurde eine extrem gut lineare Beziehung zwischen der Glucosekonzentration und dem Ansprechstromlevel erhalten, wie in [Fig. 7](#), B gezeigt. Weiter wurde, 30 Sensoren verwendend, ein Variationskoeffizient untersucht. Der Variationskoeffizient war 2,6% mit Bezug auf die Glucosestandardlösung und 3% mit Bezug auf die gesamte Blutprobe, die extrem gut waren. Weiter wurde mit Bezug auf Einfluss von Verdampfung ein Test, in einer Weise ähnlich Beispiel 1, ausgeführt und ähnliche Effekte wurden erhalten, wie oben beschrieben.

[0036] In dem obigen Beispiel wurde Kaliumhexacyanoferrat (III), wenn die Konzentration von Lecithin größer als 0,01 Gew.-% war, wirksam in Toluol dispergiert, so dass Tropfen leicht wurde, um eine dünne Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht zu bilden. Wo kein Lecithin gegenwärtig ist, wurden Fehler, dass die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht nicht gleichmäßig gebildet oder die Basisplatte beim Biegen abgelöst wurde, bemerkt. Jedoch konnte die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht, die gleichmäßig war und sich nur mit Schwierigkeit ablöste, durch Einbringen von Lecithin leicht gebildet werden. Mit steigender Lecithinkonzentration löste sich die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht schwieriger ab, aber eine Auflösungsrate von Kaliumhexacyanoferrat (III) nahm auch ab. Daher wird 0,01 bis 3 Gew.-% für eine geeignete Konzentration gehalten. Polyethylenglykolalkylphenylether (Warenzeichen: Triton X) wurde anstelle von Lecithin verwendet. Um feine Teilchen von Kaliumhexacyanoferrat (III) in Toluol zu dispergieren, war mehr als 0,1% nötig, aber eine gute Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht konnte wie in dem Fall der Verwendung von Lecithin gebildet werden. Als das oberflächenaktive Mittel gibt es zusätzlich zu dem oben beschriebenen Beispiel Ölsäure, Polyoxyethylenglycerinfettsäureester, Cyclodextrin, etc. Oberflächenaktive Mittel sind nicht besonders beschränkt, so lange wie sie den Elektronenakzeptor in einem organischen Lösungsmittel dispergieren können und nicht die Enzymaktivität beeinflussen. Als das organische Lösungsmittel zum Vermischen des Elektronenakzeptors damit können Lösungsmittel, wie Toluol, Petrolether, etc., verwendet werden, so lange sie einen minimierten Einfluss auf GOD Aktivität und die gedruckten Elektroden besitzen.

[0037] Mit Bezug auf den Teilchendurchmesser des oben verwendeten mikrokristallinen Kaliumhexacyanoferrat (III)s wurden kommerziell erhältliche Kristalle von Kaliumhexacyanoferrat (III) zu Pulvern gemahlen, und Kristalle mit einem bestimmten Teilchendurchmesser wurden durch Sieben gesammelt, um eine Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht zu bilden. Die Ansprechverhalten der gleichen aus Kristallen verschiedener Teilchendurchmesser hergestellten

Glucosesensoren, wie oben beschrieben, wurden miteinander verglichen. [Fig. 15](#) zeigt eine Sieb-Maschengröße auf der Abszisse und auf der Ordinate eine Zeit zur Vollendung der Reaktion bis 400 mg/dl Glucose. Zahlen in Klammern zeigen eine Größe (μm) der Maschenöffnung an. Wie in [Fig. 15](#) gezeigt, wurden die Kristalle mit einer kleineren Teilchengröße schneller aufgelöst und die zur Reaktionsvollendung benötigte Zeit war kürzer. In dem mit durch 145er Maschen (Japanischer Industriestandard) passiertem Kaliumhexacyanoferrat (III) (Teilchengröße von 100 μm oder weniger) hergestellten Sensor war die Reaktion innerhalb von 2 Minuten vollendet. Zudem konnten, wenn die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht hergestellt wurde, Kristalle mit einem kleineren Teilchendurchmesser eine gleichförmige Schicht bilden und lieferten weniger Ungleichmäßigkeiten im Ansprechverhalten. Mikrokristalle von Kaliumhexacyanoferrat (III) konnten durch Mahlen zu Pulvern gebildet werden, aber Umkristallisieren einer wässrigen Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung aus Ethanol konnte leicht Kristalle mit einem Teilchendurchmesser von nicht mehr als 10 μm erzeugen. Wenn die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht aus solchen Kristallen gebildet wurde, wurde die Schicht dicht und die Zeit zur Reaktionsvollendung konnte verkürzt werden.

[0038] Wenn Kaliumhexacyanoferrat (III), fein zerteilt in Teilchendurchmesser von weniger als 100 μm , mit Toluol vermischt wurde und die Mischung getropft wurde, wurde Toluol rasch verdampft, und die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht konnte in einem mikrokristallinen Zustand gebildet werden, so dass eine Auflösungsrate rasch war und rasche Messung erreicht wurde. Weiter konnte durch Verwendung des organischen Lösungsmittels die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht getrennt auf der CMC-GOD-Schicht gebildet werden, wodurch Haltbarkeitseigenschaften verbessert werden konnten.

[0039] Durch Vorsehen der Einlassöffnung und der Auslassöffnung in dem oben beschriebenen Beispiel, können, zusätzlich zu der in [Fig. 4](#) bis [Fig. 6](#) gezeigten Anordnung, Öffnungen in dem Überzug bzw. der Abdeckung **9** bzw. der Basisplatte **1** vorgesehen und als Einlassöffnung **10** und Auslassöffnung **11** verwendet werden, wie in der perspektivischen Ansicht des auseinandergenommenen Sensors in [Fig. 8](#) und in der Außenansicht in [Fig. 9](#) gezeigt.

[0040] Darüber hinaus kann der Abstandshalter, wie in der perspektivischen Ansicht des auseinandergenommenen Sensors in [Fig. 10](#) gezeigt, in zwei Teile **7** und **7'** geteilt werden, und die Teile können als der Abstandshalter **8**, die Einlassöffnung **10** und die Auslassöffnung **11** verwendet werden.

[0041] Darüber hinaus wurde die Form des Endteils des Biosensors, mit dem in [Fig. 5](#) gezeigten Aufbau,

wie in der in [Fig. 11](#) gezeigten Außenansicht gerundet. So wurde ein Teil, der mit der Probenlösung in Kontakt gebracht wurde, fast auf die Einlassöffnung **10** begrenzt, wenn die Probenlösung eingebracht wurde. So wanderte die Probenlösung nicht um die Peripherie der Einlassöffnung, sondern konnte sogar in einer kleinen Menge glatt eingebracht werden.

Beispiel 3

[0042] Der in [Fig. 12](#) gezeigte Elektrodenteil wurde in einer Weise ähnlich Beispiel 1 aufgebaut. D.h. Silberleitungen **3**, **21**, **22** und **23**, Gegenelektrode **5** und, entsprechend dazu, drei Messelektroden **41**, **42** und **43** wurden auf einer Basisplatte gebildet, um drei Paare von Elektrodensystemen, die die Gegenelektrode gemeinsam besitzen, aufzubauen. Als nächstes wurde eine aus CMC-GOD-Elektronenakzeptorschicht zusammengesetzte Reaktionsschicht um jede der Messelektroden in einer Weise ähnlich Beispiel 2 gebildet.

[0043] Dann wurden ein Abstandshalter und ein Überzug bzw. eine Abdeckung zusammengefügt, um sie wie in Beispiel 1 zu integrieren. Hierin wird der Abstandshalter teilweise weggeschnitten zu einer „Kamm-ähnlichen“ Form, und der weggeschnittene Teil bildet einen Raum **8**. Der Raum ist in die betreffenden Elektrodensysteme unterteilt, aber ist fortlaufend als ein Ganzes, um einen gemeinsamen Raum zu bilden. Darüber hinaus wird das Ende die Einlassöffnung **10**.

[0044] Entsprechend dem auf diesen jeweiligen Elektrodensystemen unterteilt konstruierten Raum sind drei Öffnungen in dem Überzug bzw. der Abdeckung **9** gebildet, um Auslassöffnungen **11**, **12** und **13** zu bilden. Wenn die Einlassöffnung **10** mit einer Probenlösung in Kontakt gebracht wird, wird die Probenlösung rasch in den Raum eingebracht, während sie die Luft in dem Raum durch die drei Auslassöffnungen hinausdrängt.

[0045] Ein Ansprechverhalten auf die Glucosestandardlösung wurde in Bezug auf die drei Elektrodensysteme in einer Weise ähnlich Beispiel 2 gemessen, und sein Mittelwert wurde bestimmt, um es zu einem Ansprechverhaltenslevel für einen Sensor zu machen. Der Test wurde durchgeführt mit 30 Glucosesensoren mit der gleichen Spezifikation. Der Variationskoeffizient war so gut wie 2%.

[0046] In dem Sensor vom Einweg-Typ ist es für verbesserte Zuverlässigkeit wichtig, die Faktoren für Fehler, eine Differenz im Elektrodengebiet jedes Sensors einschließend, zu minimieren. Die Differenz zwischen den Sensoren ist ein Grund für das Verursachen einer Differenz im Fehler von Messdaten der gleichen Probenlösung. Jedoch kann, wie oben beschrieben, Messung mit höherer Genauigkeit durch

Vorsehen einer Vielzahl von Elektrodensystemen für den gleichen Sensor und Erhalten eines Mittelwerts der Ansprechverhaltenslevel rasch erreicht werden.

[0047] [Fig. 12](#) zeigt die Ausführungsform mit 3 Paaren von Elektroden, aber die vorliegende Erfindung ist nicht darauf beschränkt und kann weiter eine große Anzahl von Elektrodensystemen vorsehen. Darüber hinaus ist die Gestalt des Raumes nicht auf die in den Figuren gezeigten beschränkt, desgleichen die Gestalt oder Anordnung der Elektrodensysteme.

Beispiel 4

[0048] [Fig. 13](#) zeigt eine Variation des Aufbaus mit einer Vielzahl der Elektrodensysteme. In einer schon beschriebenen Weise, ähnlich Beispiel 1, wurden auf der Basisplatte Silberleitungen **21**, **22** und **3** und zwei Paare der ihnen entsprechenden Elektrodensysteme, bestehend aus Messelektroden **41** und **42** und einer gemeinsamen Gegenelektrode **5**, aufgebaut. Als nächstes werden, wie in Beispiel 2, nachdem eine Reaktionsschicht zusammengesetzt aus CMC-GOD-Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht auf jedem der Elektrodensysteme gebildet wurde, ein Abstandshalter **7** und ein Überzug bzw. eine Abdeckung **9** daran angefügt. Hierin hat der Abstandshalter zwei Öffnungen, die unabhängig Räume **81** und **82** bilden, und Auslassöffnungen **11** und **12** entsprechend den Öffnungen und die gemeinsam verwendete Einlassöffnung **10** werden in dem Überzug bzw. der Abdeckung vorgesehen.

[0049] Mit Bezug auf den Glucosesensor mit dem oben beschriebenen Aufbau, wie in [Fig. 3](#) gezeigt, wurde ein Durchschnitt von den Ansprechverhaltenswerten von zwei Paaren von den Elektrodensystemen zur Glucosestandardlösung genommen und zu einem Messwert für einen Sensor gemacht. Wenn 30 Sensoren mit der gleichen Spezifikation getestet wurden, war der Variationskoeffizient so gut wie 2,2%.

[0050] So kann in dem in [Fig. 13](#) gezeigten Sensor Messung mit höherer Genauigkeit ausgeführt werden. Zusätzlich können, da der Sensor die unabhängigen Räume besitzt, verschiedene Probenlösungen mit einem Sensor gemessen werden, oder der Sensor kann für Messung unter verschiedenen Bedingungen in Zeit, Temperatur, etc. vorgesehen werden.

[0051] In dem oben beschriebenen Beispiel war eine Öffnung in dem Überzug bzw. der Abdeckung vorgesehen, um sie zu einer gemeinsamen Einlassöffnung zu machen, aber die vorliegende Erfindung ist nicht auf diese Ausführungsform beschränkt. Es ist wichtig, das Messsystem eine Vielzahl von Paaren der Elektrodensysteme und eine Vielzahl von unabhängigen Räumen umfassend aufzubauen. Daher können auch zwei Öffnungen vorgesehen werden, und Einlassöffnungen zu den betreffenden Räumen

können aufgebaut werden.

Beispiel 5

[0052] In Beispiel 5 ist die Reaktionsschicht als Bezugsbeispiel angegeben.

[0053] Unter Verwendung des Elektrodenteils, Abstandshalters und Überzugs bzw. der Abdeckung mit in [Fig. 13](#) gezeigten Konstruktionen wurde ein unten beschriebener Glucosesensor konstruiert. Zuerst wurde eine aus CMC-GOD zusammengesetzte Reaktionsschicht auf einer Messelektrode **41** in einer Weise ähnlich Beispiel 1 gebildet. Auf der anderen Seite wurde CMC-Schicht alleine auf einer Messelektrode **42** gebildet.

[0054] Mit Bezug auf den Glucosesensor mit zwei Paaren der Elektrodensysteme, erhalten, wie oben beschrieben, wurde eine Ascorbinsäure in verschiedenen Konzentrationen enthaltende Glucosestandardlösung (200 mg/dl) auf die Einlassöffnung **10** getropft und auf jedes der Elektrodensysteme aufgebracht. Als nächstes wurde wie in Beispiel 1 eine Spannung von 1 V ungefähr 1 Minute nach Auftropfen angelegt, und ein Stromlevel wurde 5 Sekunden danach gemessen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 14](#) gezeigt. Der Ausstoß des Elektrodensystems der CMC-GOD-Schicht ist durch A und der Ausstoß (Bezugsausstoß) des Elektrodensystems der CMC-Schicht alleine ist durch B gezeigt. Wie aus der Zeichnung ersichtlich ist, steigt der Ausstoß von A, wenn die Konzentration von Ascorbinsäure steigt, und andererseits wird ein ähnlicher Anstieg bemerkt mit dem Ausstoß von B. Dies zeigt an, dass die Empfindlichkeiten der betreffenden Elektrodensysteme gegenüber Ascorbinsäure beinahe gleich zueinander sind. Wenn eine Differenz im Ausstoß zwischen beiden Elektrodensystemen (A–B) davon erfasst wird, kann ein auf Glucose basierender Stromlevel erhalten werden. So kann durch Verwendung von zwei Paaren der Elektrodensysteme ein Fehler aufgrund elektrodensensitiver Substanzen stark reduziert werden. Solch ein Effekt wurde auch mit Harnsäure etc., zusätzlich zu Ascorbinsäure, bemerkt.

[0055] So kann durch Konstruieren des Sensors durch Vorsehen von zwei Paaren der Elektrodensysteme und Bilden einer hydrophilen, hochmolekularen Substanz-Enzymschicht auf einem Elektrodensystem und einer hydrophilen, hochmolekularen Substanzschicht alleine auf einem anderen Elektrodensystem eine Substratkonzentration in der störende Substanzen enthaltenden Probenlösung mit guter Genauigkeit gemessen werden.

[0056] In dem Obigen kann, nachdem CMC-GOD-Schicht auf beiden Elektrodensystemen gebildet wurde, lokales Erwärmen durch Laser oder Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen, etc. auch auf

nur ein Elektrodensystem angewendet werden, wodurch GOD inaktiviert wird, um das Elektrodensystem für Bezugsausstoß vorzubereiten. So sind die Konstruktionen in den beiden Elektrodensystemen identisch außer für Enzymaktivität, so dass Ausstoßströme aufgrund Störfaktoren in den beiden Elektrodensystemen viel besser miteinander übereinstimmen können, was in einer verbesserten Erkennungsgenauigkeit mit dem Sensor resultiert.

[0057] In der vorangehenden Ausführungsform ist das Elektrodensystem, worin der Elektrodenteil zwei Elektroden der Messelektrode und die Gegenelektrode umfasst, beschrieben worden. Durch Konstruktion des Elektrodensystems durch drei darüber hinaus Silber/Silberchlorid enthaltende Elektroden kann die Genauigkeit weiter verbessert werden. Eine Ausführungsform zur Konstruktion des Elektrodensystems umfasst das Drucken von 3 Silberleitungen auf eine Basisplatte, dann Drucken einer Kohlenstoffpaste auf lediglich die Endteile von zwei Leitungen, um einen Isolierschicht-Überzug aufzubringen, Behandeln der Oberfläche des Endteils der verbleibenden Leitung, in der Silber freiliegt, um Silberchlorid in eine Silber/Silberchloridelektrode zu überführen. So könnte das Elektrodensystem in einer solchen Weise aufgebaut werden.

Beispiel 6

[0058] In Beispiel 5 wurden eine aus CMC-GOD-Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht zusammengesetzte Reaktionsschicht und eine aus CMC-Kaliumhexacyanoferrat (III) zusammengesetzte Schicht auf der Messelektrode **41** beziehungsweise der Messelektrode **42** in einer Weise ähnlich Beispiel 2 gebildet. Messung wurde in einer Weise ähnlich Beispiel 5 durchgeführt, außer dass die angelegte Spannung 0,6 V war. Einfluss von Ascorbinsäure konnte wie oben beschrieben ausgeschlossen werden.

Beispiel 7

[0059] In Beispiel 5 wurde eine aus CMC-GOD-Kaliumhexacyanoferrat (III)-Schicht zusammengesetzte Reaktionsschicht auf der Messelektrode **41** in einer Weise ähnlich Beispiel 2 gebildet. Weiter wurde auf der Messelektrode **42** die CMC-Schicht gebildet, und eine aus Glucoseoxidase, Mutarotase und B-Glucosidase zusammengesetzte Enzymschicht wurde dann darauf gebildet, und weiter wurde eine aus Kaliumhexacyanoferrat (III) zusammengesetzte Elektrodenakzeptorschicht gebildet, um eine Reaktionsschicht zu erzeugen. Messung wurde durch Anlegen einer Spannung von 0,6 V und Verwendung einer wässrigen, Glucose und Saccharose enthaltenden Lösung als Probenlösung durchgeführt. Mit der Messelektrode **41** wurde ein Strom in Reaktion auf die Glucosekonzentration erhalten, und ein Strom in Re-

aktion auf die Gesamtkonzentration von Glucose und Saccharose wurde mit der Messelektrode **42** erhalten. Aus einer Differenz zwischen diesen Stromleveln konnte die Saccharosekonzentration bestimmt werden. So können zwei Substratkonzentrationen gemessen werden.

Beispiel 8

[0060] Nachdem der Elektrodenteil in einer Weise ähnlich Beispiel 1 hergestellt worden war, wurde eine 0,5%ige wässrige Lösung von Carboxymethylcellulose (hiernach einfach als CMC bezeichnet) als hydrophile, hochmolekulare Substanz auf die Elektroden aufgetragen und getrocknet, um eine CMC-Schicht zu bilden. Als nächstes wurde eine Lösung von Glucoseoxidase in Wasser darauf aufgetragen und getrocknet, um eine CMC-GOD-Schicht zu bilden. In diesem Fall bildeten CMC und GOD eine dünne Schicht mit einer Dicke von mehreren Mikrometern in einem teilweise vermischten Zustand. Darüber hinaus wurde eine 0,5%ige ethanolische Lösung von Polyvinylpyrrolidon (hiernach einfach als PVP bezeichnet) aufgetragen, um die erste aus dieser CMC-GOD-Schicht zusammengesetzte Schicht völlig zu überziehen, und getrocknet, um eine zweite, aus PVP-Schicht zusammengesetzte Schicht zu bilden. Eine Mischung von mikrokristallinem Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor und 1%iger Lösung eines oberflächenaktiven Mittels, Lecithin, in Toluol, wurde getropft und auf die PVP-Schicht aufgetragen und getrocknet, um eine dritte, aus Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht zusammengesetzte Schicht zu bilden, gefolgt von Integrieren mit einem Abstandhalter und einem Überzug bzw. einer Abdeckung wie in Beispiel 1.

[0061] Durch Verwenden von Toluol, in dem PVP geringfügig löslich ist, als ein Lösungsmittel in dem Fall des Bildens der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht ist es möglich, die Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinlösung gleichmäßig auf die PVP-Schicht aufzutragen. Als Ergebnis kann die gleichmäßige Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht erhalten werden.

[0062] So konnten die Verwendung eines Lösungsmittels, in dem die zweite Schicht aufbauende hydrophile, hochmolekulare Substanz als das Lösungsmittel zum Auftragen des Elektronenakzeptors und das oberflächenaktive Mittel die extrem gleichmäßige Elektronenakzeptorschicht bilden (dritte Schicht).

[0063] Eine Glucosestandardlösung wurde in den wie oben konstruierten Glucosesensor durch die Einlassöffnung eingebracht. Durch Anlegen einer Spannung von +0,6 V an die Messelektrode in der Anodenrichtung eine Minute danach wurde ein Ansprechstrom 5 Sekunden danach gemessen. Eine gut lineare Beziehung wurde bis zu der Konzentration

von mehr als 900 mg/dl erhalten. Es wurden auf den oben beschriebenen Glucosesensor 5 µl einer Blutprobe getropft und es wurde eine Minute danach ein Ansprechstrom gemessen. Es wurde ein Ansprechverhalten mit sehr guter Reproduzierbarkeit erhalten.

[0064] Mit Bezug auf zwei Sensoren, z.B. den durch das oben beschriebene Verfahren hergestellten Glucosesensor und den gleichen Glucosesensor, angenommen, dass die zweite aus hydrophiler, hochmolekularer Substanz zusammengesetzte Schicht nicht vorgesehen war, wurde ein Haltbarkeitstest bei 35°C für 30 Tage in einem getrockneten Zustand durchgeführt. Unter Verwendung einer Glucosestandardlösung (90 mg/dl) als Probenlösung, wurde das Sensor-Ansprechverhalten nach 30 Tagen verglichen. Der Sensor, in dem die zweite aus der hydrophilen, hochmolekularen Substanz zusammengesetzte Schicht nicht gebildet war, zeigte einen CV-Wert von 5,3, aber der Sensor, in dem die zweite Schicht aus PVP zusammengesetzt war, zeigte einen extrem guten CV-Wert von 2,5.

Beispiel 9

[0065] Die CMC-GOD-Schicht und die PVP-Schicht wurden in einer Weise ähnlich Beispiel 8 hergestellt. Eine Mischung von mikrokristallinem Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor und 0,5%iger Lösung eines oberflächenaktiven Mittels, Lecithin, in Ethanol wurde getropft und auf die PVP-Schicht aufgetragen und getrocknet, um eine Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht zu bilden. Durch Verwendung von Ethanol, in dem PVP leicht löslich ist, als Lösungsmittel in dem Fall des Bildens der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht ist es möglich, an einem Punkt auf der PVP-Schicht konzentrierend zu entwickeln. So war es möglich, sich auf die Messelektrode des Sensors zu konzentrieren, um die gleichmäßige Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht zu konstruieren, so dass der Sensor, in dem ein stabiles Ansprechverhalten nur durch Auftragen der minimal benötigten Menge erhalten wurde, hergestellt werden konnte.

[0066] Ansprechcharakteristika auf die Glucosestandardlösung des wie oben konstruierten Glucosesensors wurden in einer Weise ähnlich Beispiel 8 bestimmt. Eine gut lineare Beziehung wurde bis zu einer Konzentration von mehr als 900 mg/dl erhalten. Zusätzlich wurde eine Reaktion mit sehr guter Reproduzierbarkeit auch in dem Fall der Verwendung von Blut als Probenlösung erhalten. Darüber hinaus wurde, mit Bezug auf den Glucosesensor, in dem die zweite aus hydrophiler, hochmolekularer Substanz zusammengesetzte Schicht vorgesehen war, und den gleichen Glucosesensor, angenommen, dass die zweite aus hydrophiler, hochmolekularer Substanz zusammengesetzte Schicht nicht vorgesehen war, ein Haltbarkeitstest bei 35°C für 30 Tage in ei-

nem getrockneten Zustand in einer Weise ähnlich Beispiel 8 durchgeführt. Der Sensor, in dem die zweite Schicht aus PVP zusammengesetzt war, zeigte extrem guten CV-Wert in der 30 Tage danach gemessenen Reaktion.

[0067] In der früheren Konstruktion war die GOD-CMC-Schicht schon in Kontakt mit der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht zu der Zeit, als der Sensor hergestellt wurde, so dass es schwierig war, die Haltbarkeitseffizienz zu verbessern. Die hydrophile, hochmolekulare, aus PVP zusammengesetzte Substanzschicht, die im oben beschriebenen Beispiel 8 und gegenwärtigen Beispiel 9 verwendet wurde, spielt eine Rolle, um die GOD-CMC-Schicht vollständig von der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lecithinschicht in einem getrockneten Zustand zu trennen.

[0068] Zusätzlich ist die hydrophile, hochmolekulare Substanzschicht extrem wirksam, um eine stabile Sensorreaktion sicherzustellen, auch in dem Fall, dass Substanzen in einer Probenlösung gegenwärtig sind, die leicht an die Elektrode adsorbiert werden oder elektrodenaktive Substanzen. Sogar in dem Fall, dass eine Glucosekonzentration durch den oben beschriebenen Glucosesensor unter Verwendung von Blut als Probenlösung bestimmt wurde, wurde eine stabile Sensorreaktion, unabhängig von Viskosität oder dergleichen der Probenlösung, erhalten.

[0069] In den oben beschriebenen Beispielen 1 bis 9 ist eine Ausführungsform der bevorzugten räumlichen Anordnung zwischen der Einlassöffnung und der Auslassöffnung, verbunden mit dem Raum, veranschaulichend in den Zeichnungen gezeigt. Die Auslassöffnung kann auch als die Einlassöffnung und die Einlassöffnung als die Auslassöffnung verwendet werden. Darüber hinaus sind die in den betreffenden Zeichnungen gezeigten Abstandshalter und Überzüge bzw. Abdeckungen aus unabhängigen Materialien zusammengesetzt, aber nicht darauf beschränkt. In Massenproduktion ist es vorteilhaft, ein integriertes Überzug- bzw. Abdeckteil mit einer Abstandshalterform durch Formen oder dergleichen zu bilden.

[0070] Weiter wurde eine Probenlösung durch hydrophil-Machen der Oberfläche von den den Raum aufbauenden Materialien glatter durch die Einlassöffnung eingebracht. Die Wirkung wurde entweder durch Verwendung von hydrophilen Materialien oder durch vorheriges Behandeln der den Raum aufbauenden Oberflächenmaterialien mit einem oberflächenaktiven Mittel, um sie hydrophil zu machen, erhalten.

[0071] Auf der anderen Seite kann ein Zwischenraum zwischen der Basisplatte und dem Überzug bzw. der Abdeckung durch Variieren der Dicke von Abstandshalter oder der Größe eines dementspre-

chenden Teils gesteuert werden. Wenn jedoch der Zwischenraum zu groß ist, wird eine für das Auffüllen des Raumes benötigte Menge der Probenlösung groß, und es ist auch unvorteilhaft, die Probenlösung durch ein Kapillarphänomen einzubringen. Wenn der Zwischenraum zu klein ist, wächst ein Widerstand zwischen den Elektroden an oder eine Stromverteilung ist verzerrt. Nach dem Vorhergehenden liegt der Zwischenraum vorzugsweise in einem Bereich von 0,05 bis 1,0 mm, besser 0,1 bis 0,5 mm.

[0072] In den Beispielen wurde CMC als die hydrophile, hochmolekulare Substanz verwendet. Wie schon festgestellt wurde, liegt ihre Rolle darin, den Einfluss von adsorbierbaren, in einer Probenlösung enthaltenen, an die Elektrode adsorbierten Substanzen auf die Reaktion zu verhindern, zusätzlich zu der glatten Einbringung der Probenlösung. Darüber hinaus liegt ihre Rolle auch in der Trennung der Enzymschicht von der Elektronenakzeptorschicht durch die hydrophile, hochmolekulare Substanzschicht, um dadurch die Haltbarkeitseigenschaft weiter zu verbessern. Als die hydrophile, hochmolekulare Substanz kann Gelatine, Methylcellulose und dergleichen verwendet werden, zusätzlich zu CMC, und hydrophile, hochmolekulare Substanzen von Stärke, Carboxymethylcellulose, Gelatine, Acrylat, Vinylalkohol, Vinylpyrrolidon und Maleinsäureanhydrid sind bevorzugt. Diese Wasserabsorbierenden oder wasserlöslichen hydrophilen, hochmolekularen Substanzen werden in einer geeigneten Konzentration gelöst und die anfallende Lösung wird als Überzug aufgetragen und getrocknet, um eine hydrophile, hochmolekulare Substanzschicht mit einer notwendigen Schichtdicke zu bilden.

[0073] In den vorangehenden Beispielen ist das Elektrodensystem, in dem der Elektrodenteil aus zwei Elektroden aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode aufgebaut ist, dargelegt worden. Jedoch kann durch Konstruieren des Elektrodensystems mit drei Elektroden, weiter eine Bezugslektrode einschließend, die Genauigkeit weiter verbessert werden. Als Materialien für die Elektrode ist in den Beispielen veranschaulichter Kohlenstoff als ein stabiles und nicht teures Material geeignet, aber die Materialien sind nicht darauf beschränkt. Andere Edelmetall-Materialien und oxydierte Materialien können auch verwendet werden.

[0074] Weiterhin können als Elektronenakzeptor, obwohl das in den Beispielen verwendete Kaliumhexacyanoferrat (III) exzellent in Stabilität und Reaktionsrate ist, auch Redoxverbindungen, wie Chinonverbindungen oder Ferrocenverbindungen etc., verwendet werden, zusätzlich zu Kaliumhexacyanoferrat (III).

[0075] Darüber hinaus ist die Oxidoreduktase nicht auf die in den vorangehenden Beispielen gezeigte

Glucoseoxidase beschränkt, sondern verschiedene Enzyme, wie Alkoholoxidase, Cholesteroxidase etc., können verwendet werden.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT

[0076] Der Biosensor der vorliegenden Erfindung kann rasch eine spezifische Komponente in verschiedenen Probenlösungen in einer genauen und einfachen Weise bestimmen. Daher ist sein Verwendbarkeitswert bei klinischen Untersuchungen extrem hoch.

Patentansprüche

1. Biosensor zum Bestimmen einer Substratkonzentration in einer Probenlösung, umfassend eine Basisplatte (1) umfassend ein von einer Reaktionsschicht (14) überzogenes Elektrodensystem (4, 5; 5', 41, 42, 43), wobei ein Raum (8; 81, 82) auf dem Elektrodensystem (4, 5; 5', 41, 42, 43) und der Reaktionsschicht (14) gebildet ist, der durch einen Abstandshalter (7, 7') und einen Überzug (9) definiert ist, wobei der Raum (8, 81, 82) mit einer Einlassöffnung (10) zum Einführen der Probenlösung in den Raum durch ein Kapillarphänomen und mit einer Auslassöffnung (11, 12, 13) zum Ablassen des Gases in den Raum (8; 81, 82) durch Einfließenlassen der Probenlösung versehen ist, das Elektrodensystem (4, 5; 5', 41, 42, 43) mit mindestens einer Elektrode zur Messung (4, 41, 42, 43) und einer Gegenelektrode (5, 5') ausgestattet ist, wobei sich mindestens ein Enzym auf der Reaktionsschicht (14) befindet, wobei eine Änderung in der Konzentration einer Substanz in der Reaktion zwischen dem Enzym und der Probenlösung mit dem Elektrodensystem (4, 5; 5', 41, 42, 43) zur Bestimmung einer Substratkonzentration in der Probenlösung erfasst wird; wobei das Elektrodensystem (4, 5, 5'; 41, 42, 43), das mindestens die Elektrode zur Messung (4; 41, 42, 43) und die Gegenelektrode (5, 5') umfasst, auf der Basisplatte (1), die eine isolierende Basisplatte ist, gebildet ist, die Reaktionsschicht (14) auf der Oberfläche des Elektrodensystems (4, 5, 5'; 41, 42, 43) gebildet ist und die Reaktionsschicht (14), die eine aus einer Oxidoreduktase und einer hydrophilen hochmolekularen Substanz zusammengesetzte Enzymschicht umfasst, eine darauf gebildete Elektronenakzeptorschicht, die ein oberflächenaktives Mittel enthält, aufweist.

2. Biosensor nach Anspruch 1, worin das Elektrodensystem (5, 41, 42, 43) einen Mehrfachsatz von Elektrodensystemen umfasst und dem Mehrfachsatz von Elektrodensystemen entsprechende Reaktionsschichten (14) und ein gemeinsamer Raum (8) vorgesehen ist.

3. Biosensor nach Anspruch 1, worin das Elektrodensystem (5; 5', 41, 42) einen Mehrfachsatz von Elektrodensystemen umfasst und dem Mehrfachsatz

von Elektrodensystemen entsprechende Reaktionsschichten (14) und Räume (81, 82) vorgesehen sind.

4. Biosensor nach Anspruch 1, worin die Elektronenakzeptorschicht feine Teilchen eines Elektronenakzeptors mit einer Teilchengröße von nicht größer als 100 µm umfasst.

5. Biosensor nach Anspruch 1, worin die hydrophile hochmolekulare Substanz ein Vertreter, ausgewählt aus hydrophilen hochmolekularen Substanzen von Stärke, Carboxymethylcellulose, Gelatine, Acrylat, Vinylalkohol, Vinylpyrrolidon und Maleinsäureanhydrid oder einer Mischung davon, ist.

6. Biosensor nach Anspruch 1, worin die Oberfläche eines den Raum aufbauenden Materials hydrophil ist.

7. Biosensor nach Anspruch 1, worin das Elektrodensystem (4, 5, 5'; 41, 42, 43) aus einem Material, das hauptsächlich aus Kohlenstoff zusammengesetzt ist, gebildet, welches auf einer isolierenden Basisplatte (1) durch Siebdruck hergestellt ist.

8. Biosensor nach Anspruch 1, worin die Reaktionsschicht (14) eine erste Schicht, zusammengesetzt aus der hydrophilen hochmolekularen Substanz und der Oxidoreduktase, eine zweite Schicht, zusammengesetzt aus einer hydrophilen hochmolekularen Substanz, und eine dritte Schicht, enthaltend den Elektronenakzeptor und das oberflächenaktive Mittel, umfasst.

9. Biosensor nach Anspruch 8, worin die hydrophile hochmolekulare Substanz in der ersten Schicht und der zweiten Schicht ausgewählt ist aus hydrophilen hochmolekularen Substanzen von Stärke, Carboxymethylcellulose, Gelatine, Acrylat, Vinylalkohol, Vinylpyrrolidon und Maleinsäureanhydrid oder einer Mischung davon.

10. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin der Abstandshalter und der Überzug integral ausgebildet sind.

11. Verfahren zur Herstellung eines Biosensors, umfassend das Bilden eines Elektrodensystems, umfassend mindestens eine Elektrode zur Messung und eine Gegenelektrode, auf einer isolierenden Basisplatte, Überziehen des Elektrodensystems mit einer wässrigen Lösung einer hydrophilen hochmolekularen Substanz und einer wässrigen Lösung einer Oxidoreduktase und dann Trocknen zur Bildung einer Enzymschicht, Verteilen einer Mischung eines Elektronenakzeptors und eines organischen Lösungsmittels auf der Enzymschicht, Entfernen des organischen Lösungsmittels zur Bildung einer Elektronenakzeptorschicht, und dann Integrieren dieser Einheit mit einem Überzug zur Bildung eines Raums zur Auf-

nahme einer Probe durch ein Kapillarphänomen und um eine Einlassöffnung und eine Auslassöffnung zu haben; wobei das Elektrodensystem (4, 5, 5'; 41, 42, 43), das mindestens die Elektrode zur Messung (4; 41, 42, 43) und die Gegenelektrode (5, 5') umfasst, auf der Basisplatte (1), die eine isolierende Basisplatte ist, gebildet ist, die Reaktionsschicht (14) auf der Oberfläche des Elektrodensystems (4, 5, 5'; 41, 42, 43) gebildet ist und die Reaktionsschicht (14), die eine aus einer Oxidoreduktase und einer hydrophilen hochmolekularen Substanz zusammengesetzte Enzymschicht umfasst, eine darauf gebildete Elektronenakzeptorschicht, die ein oberflächenaktives Mittel enthält, aufweist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Biosensors nach Anspruch 11, worin vor der Bildung der Elektronenakzeptorschicht eine Lösung einer hydrophilen hochmolekularen Substanz in einem organischen Lösungsmittel auf der Enzymschicht verteilt wird, um eine Schicht einer hydrophilen hochmolekularen Substanz zu bilden.

13. Verfahren zur Herstellung eines Biosensors nach Anspruch 11 oder 12, worin eine Mischung des Elektronenakzeptors, des oberflächenaktiven Mittels und des organischen Lösungsmittels auf der Enzymschicht verteilt wird und das organische Lösungsmittel entfernt wird, um die Elektronenakzeptorschicht zu bilden.

14. Verfahren zur Herstellung eines Biosensors nach Anspruch 13, worin die Elektronenakzeptorschicht feine Teilchen des Elektronenakzeptors mit einer Teilchengröße von nicht mehr als 100 µm umfasst.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

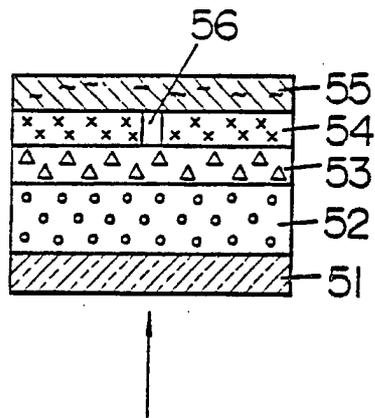


FIG. 2

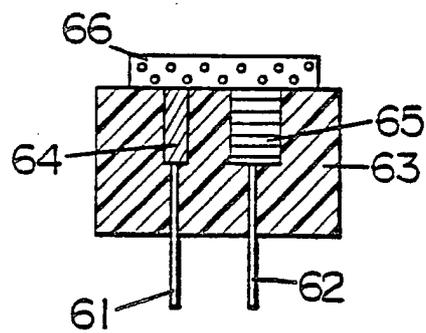


FIG. 3

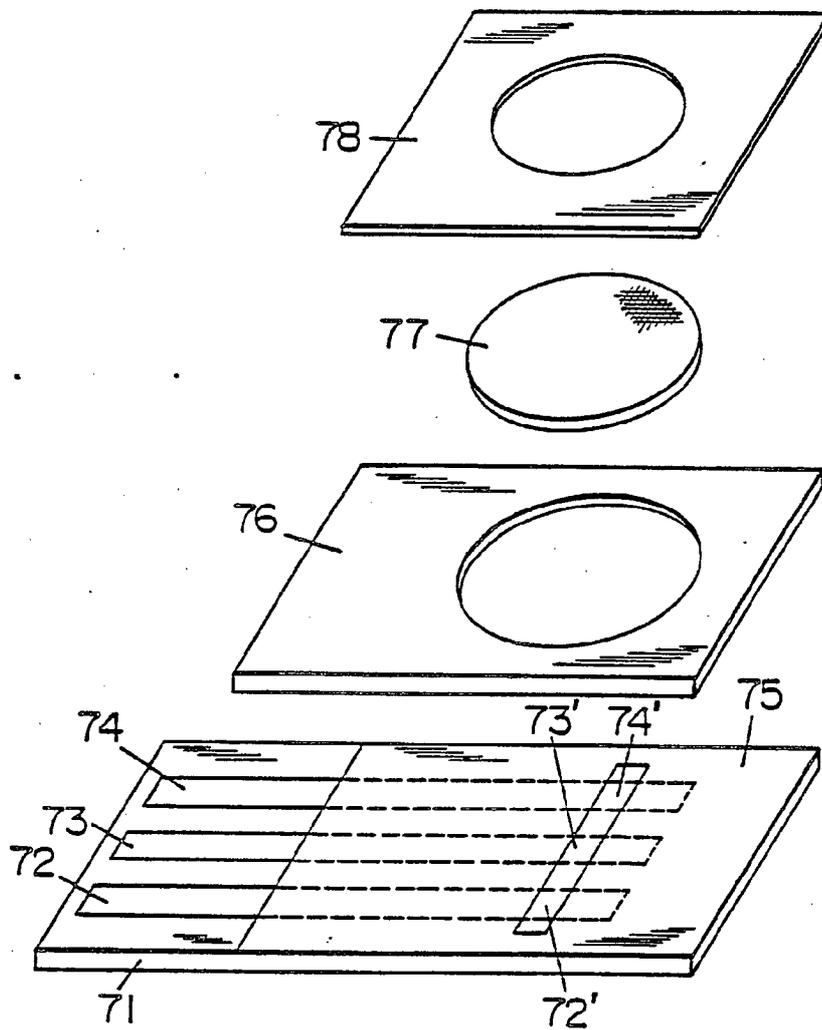


FIG. 4

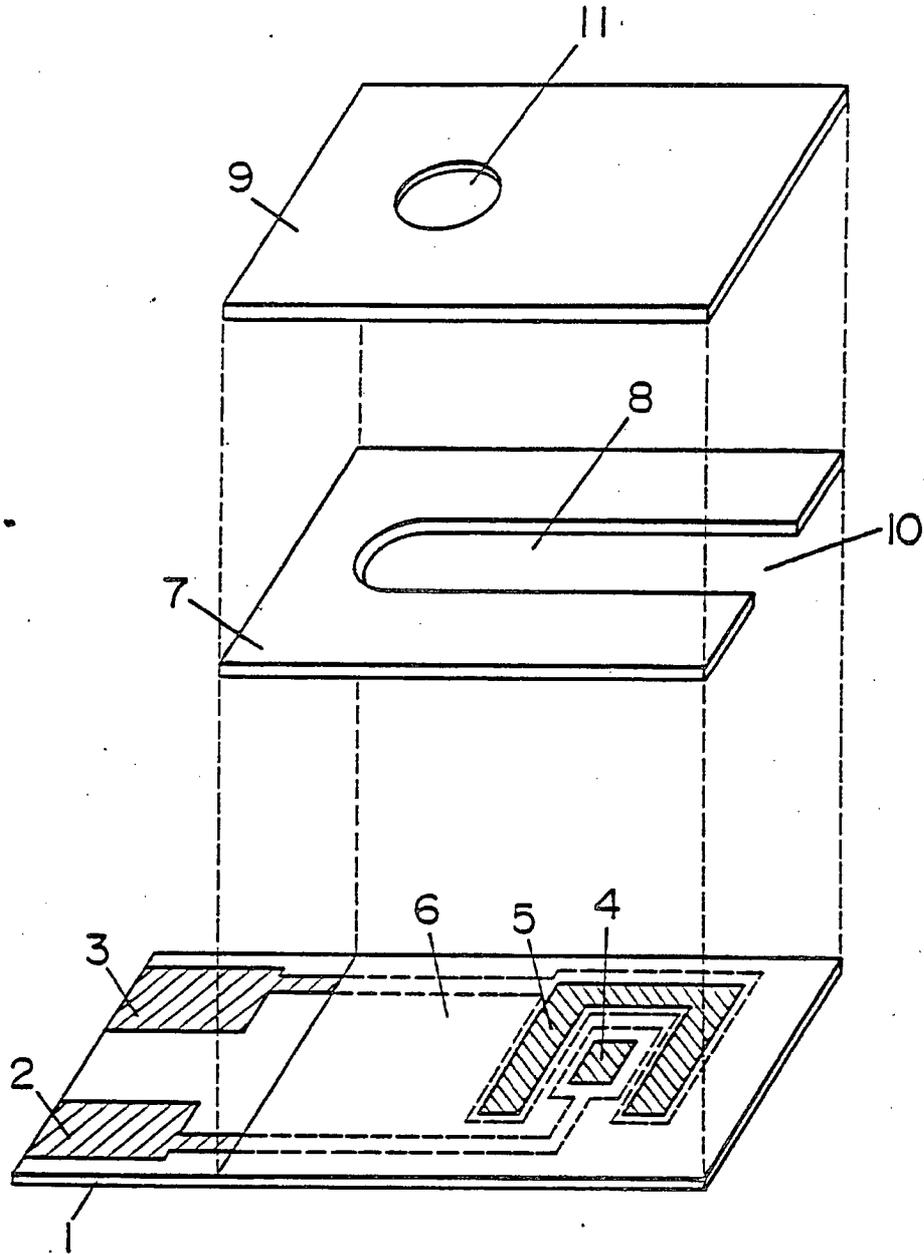


FIG. 5

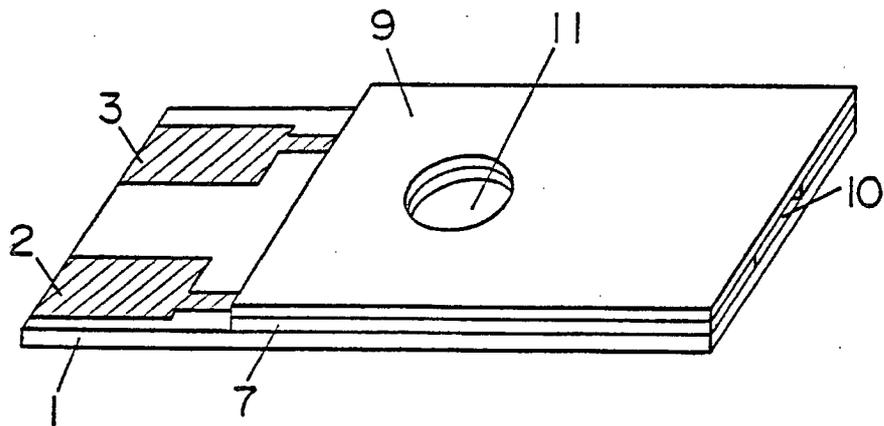


FIG. 6

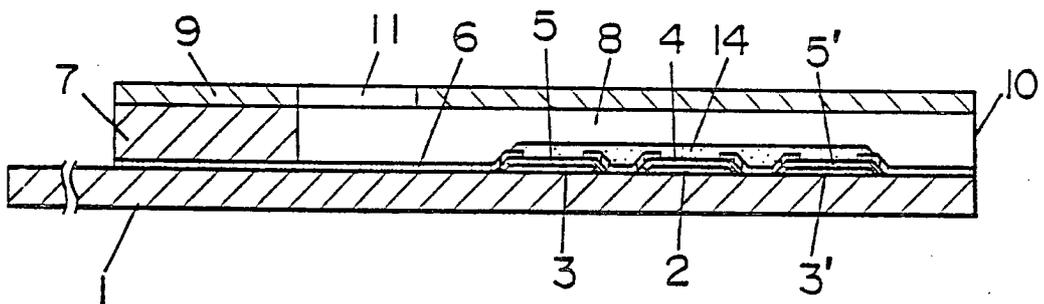


FIG. 7

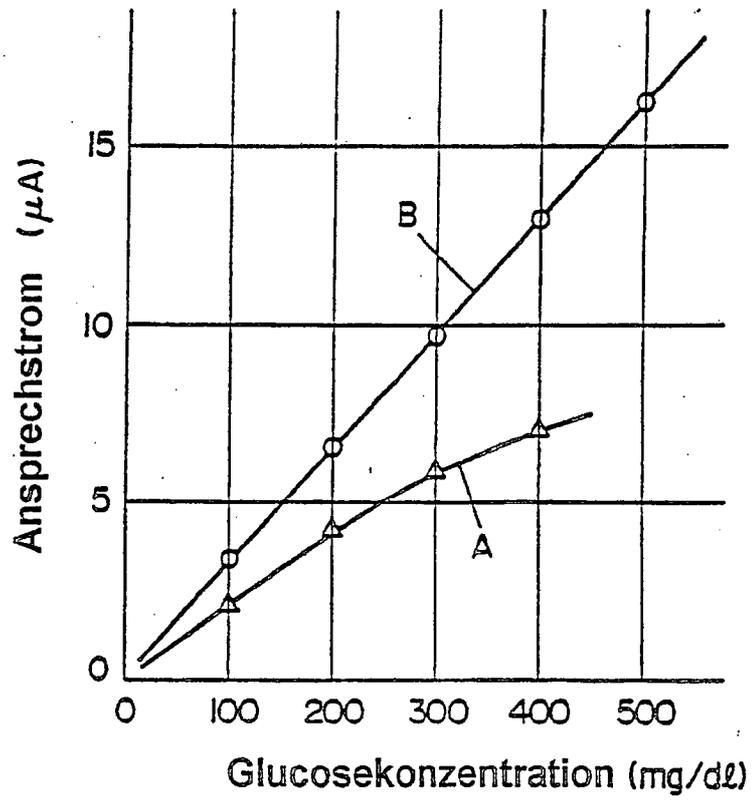


FIG. 8

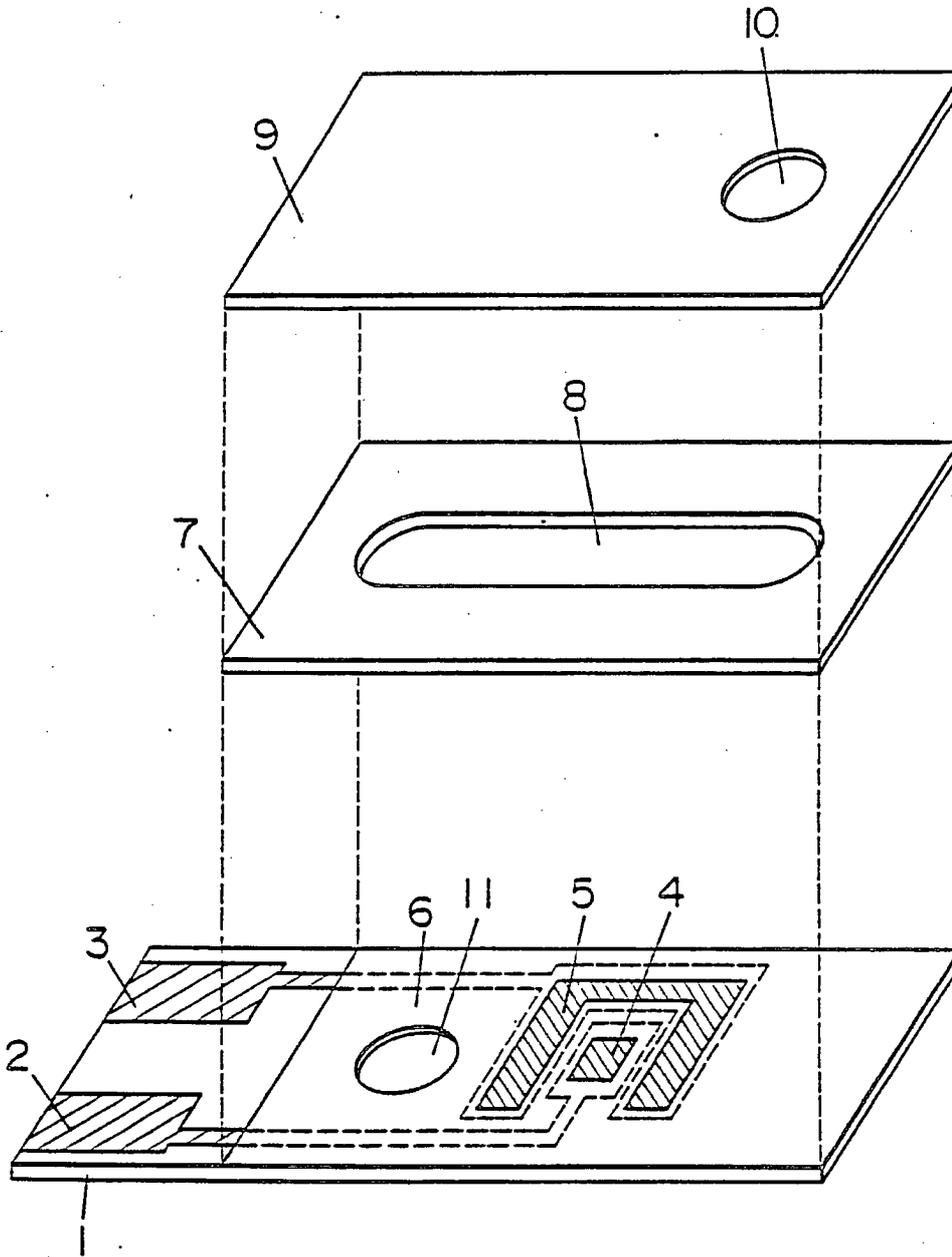


FIG. 9

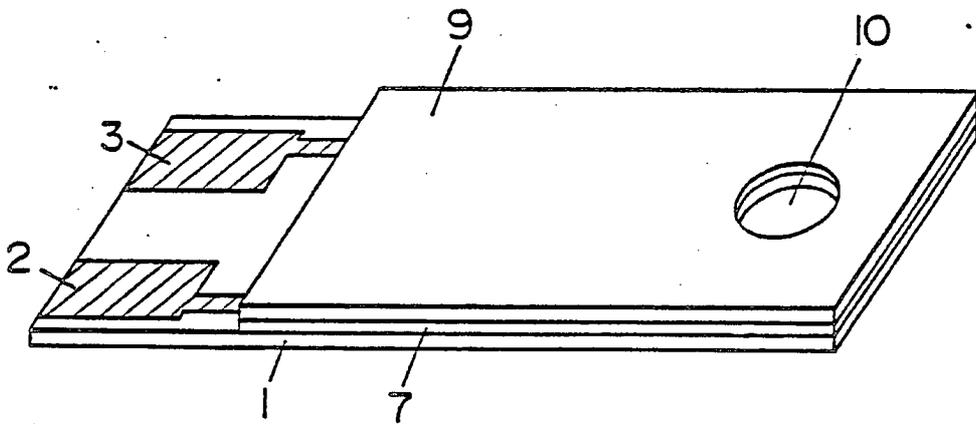


FIG. 10

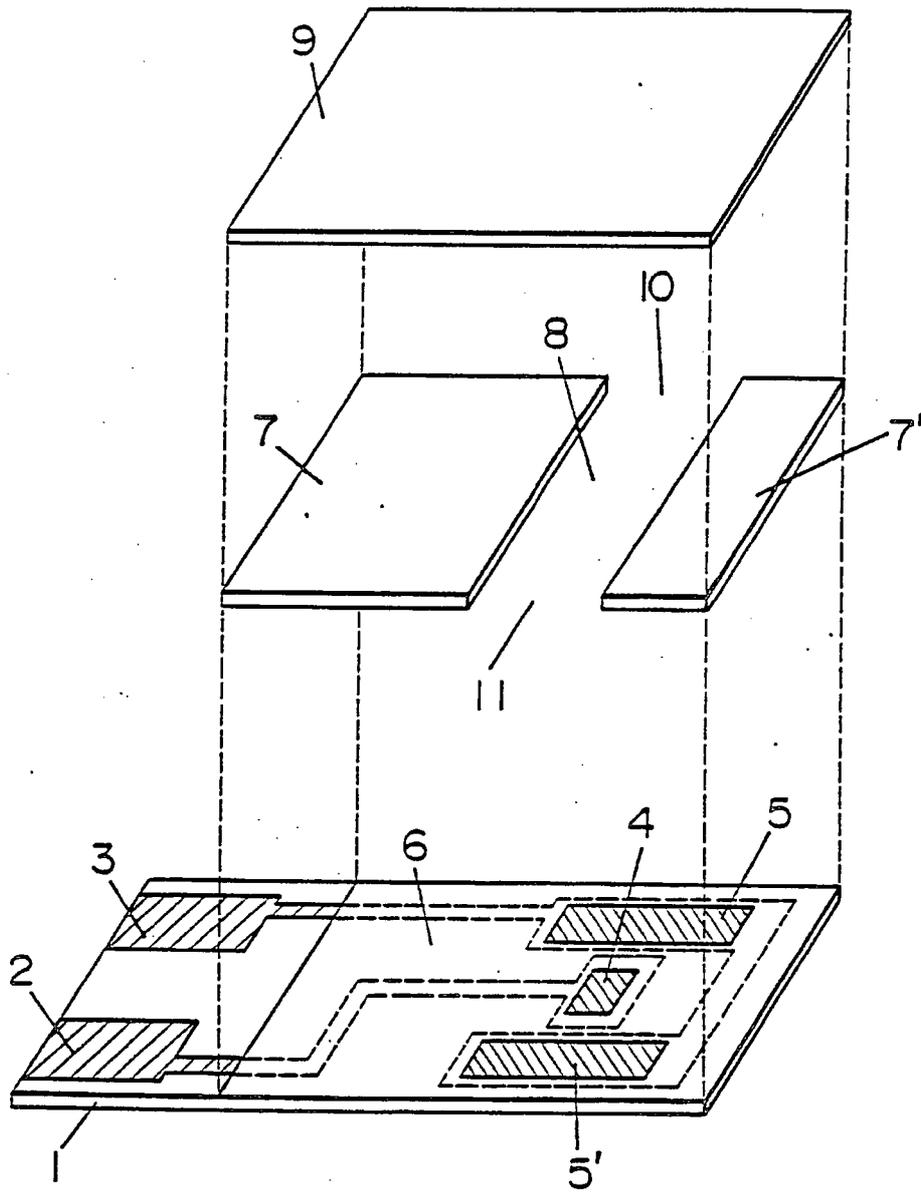


FIG. II

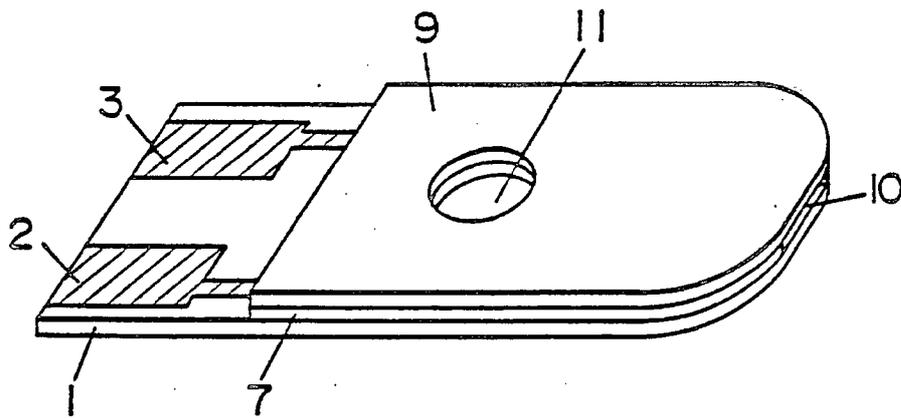


FIG. 12

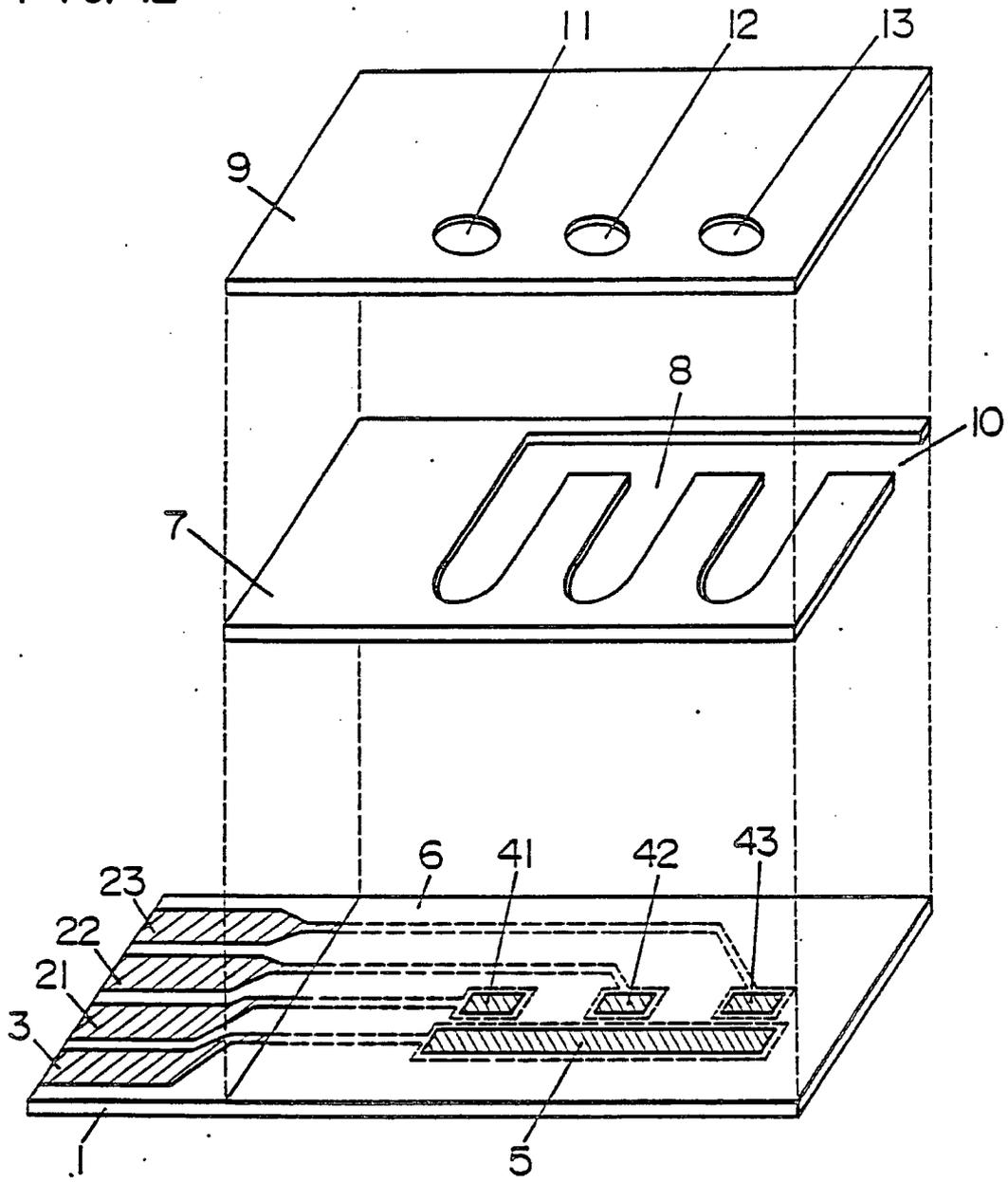


FIG. 13

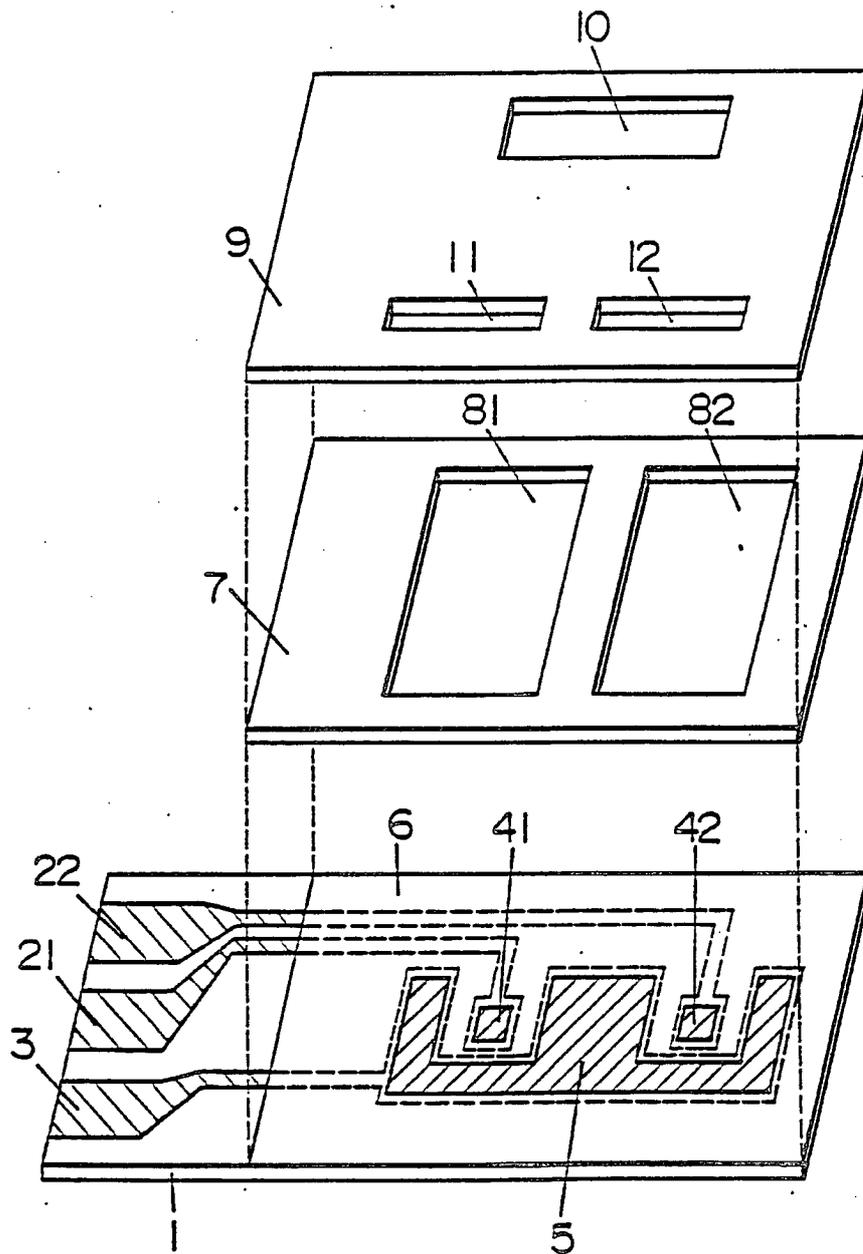


FIG. 14

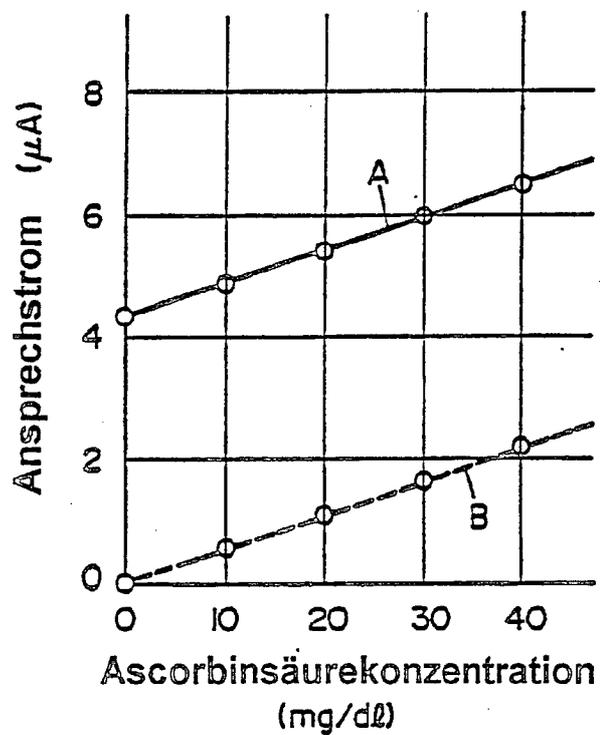


FIG. 15

