



## [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98116831.0

[43] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1110700C

[22] 申请日 1998.7.28 [21] 申请号 98116831.0

[30] 优先权

[32] 1997.7.28 [33] JP [31] 201620/1997

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本国大阪府

[72] 发明人 宫本佳子 池田信 吉冈俊彦  
南海史郎

[56] 参考文献

CN1146016A 1997.03.26 G01N27/30

EP0094677A 1983.11.23 G01N27/28

EP0136362A 1985.04.10 G01N27/30

JP03-202764A 1991.09.04 G01N27/30

审查员 飞竹玲

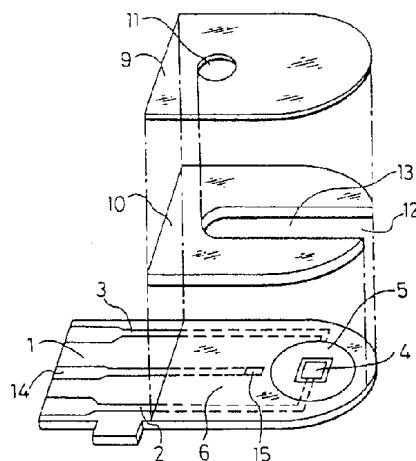
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所  
代理人 章鸣玉

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称 生物传感器及使用其测定全血中组分的方法

[57] 摘要

本发明揭示了能够抑制血液中与底物共存的红细胞的影响，以高精度对底物进行定量的生物传感器。该生物传感器具备形成于电绝缘性基板上的包括工作电极和对应电极的电极系，以及至少包含氧化还原酶和电子接受体的反应层，前述电子接受体为钠盐。



1. 一种生物传感器，其特征在于，具备形成于电绝缘性基板上的包括工作电极和对应电极的电极系，以及至少包含氧化还原酶和电子接受体的反应层，前述电子接受体为钠盐。
2. 如权利要求 1 所述的生物传感器，其中的钠盐为铁氰化钠。
3. 如权利要求 1 所述的生物传感器，前述生物传感器中还包含亲水性高分子。
4. 一种测定全血中的组分的方法，该方法包括：
  - 10 将所述全血施加到电极系统上，所述电极系统包括形成于电绝缘性基板上的工作电极和对应电极，向所述工作电极施加电压，和使所述全血中的所述组分与反应层反应，所述反应层含有至少一种氧化还原酶和电子接受体，其中所述电子接受体为钠盐，且其中所述钠盐使所述全血中的所述组分的测定变得容易且对所述全血中的红细胞没有不利影响。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述钠盐为铁氰化钠。
6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述生物传感器中还包含亲水性高分子。

## 生物传感器及使用其测定全血中组分的方法

5 本发明涉及对生物体试样中的特定成分进行定量的生物传感器。

以往，对于试样中的特性成分，作为不需要对试样溶液进行稀释和搅拌就能够简单地进行定量的方式，揭示了以下所述的生物传感器(日本专利公开公报平3-202764号)。

10 生物传感器是利用网版印刷等方法在电绝缘基板上形成由工作电极和对应电极组成的电极系，在上述电极系上形成由亲水性高分子和氧化还原酶及电子接受体组成的酶反应层的传感器。

15 如果在上述制得的生物传感器的酶反应层上滴下含有底物的试样溶液，则酶反应层会溶解，底物与酶反应而被氧化，同时电子接受体被还原。酶反应结束后，使该被还原的电子接受体电化学氧化，从所得的氧化电流值能够求出试样溶液中的底物浓度。

该生物传感器通过使用各种不同的氧化还原酶可对各种底物进行定量。

作为生物传感器的一个例子，对葡萄糖传感器进行说明。

20 作为对葡萄糖进行电化学定量的方法，一般公知的是葡萄糖氧化酶(EC1.1.3.4)和氧电极及过氧化氢电极组合的方法(例如，铃木周一编《生物传感器》讲谈社)。

葡萄糖氧化酶以氧为电子接受体将作为底物的 $\beta$ -D-葡萄糖氧化为 D-葡萄糖- $\delta$ -内酯。在该反应进行的同时，氧被还原为过氧化氢。通过氧电极测定此时的氧消耗量或通过过氧化氢电极测定过氧化氢的生成量来对葡萄糖进行定量。

25 但是，上述方法中，溶解氧浓度对测定对象有很大影响，且在无氧条件下不能够进行测定。

所以，开发了不以氧为电子接受体，而是以铁氰化合物、二茂铁衍生物、醌类衍生物等有机化合物或金属配位化合物为电子接受体的新型葡萄糖传感器。

该类型的生物传感器可使已知量的葡萄糖氧化酶和电子接受体以稳定状态附载于电极上，能够使电极系和反应层以近乎干燥的状态合为一体。

30 由于这种生物传感器是一次性的(用完即弃型)，只要在被插入测定器的传感器切片中导入检体试样，就能够很容易地对底物浓度进行测定，所以，近年来倍受瞩目，被有效地用作为各种医疗器械的诊断手段。

如上所述，被包含在反应层中的电子接受体可使用铁氰化合物、二茂铁衍生物、醌类衍生物等有机化合物或金属配位化合物，特别是使用其钾盐。

但是，由于生理浓度以上的钾离子对红细胞状态维持有影响，会引起红细胞的破裂，以及对血液试样感应的应答性降低。所以，即使血液中的底物浓度相同，  
5 也会存在血液试样中的红细胞量不同和传感器的应答性产生差异的情况。

本发明的目的是提供能够抑制血液中与底物共存的红细胞的影响，以高精度对底物进行定量的生物传感器。

本发明的具备形成于电绝缘性基板上的包括工作电极和对应电极的电极系和至少包含氧化还原酶和电子接受体的反应层的生物传感器中，前述电子接受体  
10 使用的是钠盐。

本发明的较好实施状态中所用的前述钠盐为铁氰化钠。

图 1 表示本发明一个实施例中的除去反应层的生物传感器的分解斜视图。

图 2 表示同一生物传感器主要部分的纵剖面图。

钠盐溶解于试样溶液而生成的钠离子很少会引起血液中的红细胞破裂。所以，将钠盐作为电子接受体使用时，能够抑制血液中红细胞量的差对传感器的应  
15 答特性的影响。

上述钠盐是指铁氰化钠、β-萘醌-4-磺酸钠等。

本发明能够对包含在血液中的成分进行定量，所以，作为氧化还原酶能够使用葡萄糖氧化酶、葡萄糖脱氢酶、醇氧化酶、醇脱氢酶、胆固醇氧化酶、胆固醇  
20 脱氢酶、乳酸氧化酶、乳酸脱氢酶、抗坏血酸氧化酶和胆红素氧化酶等。

通过使用这些酶能够构成葡萄糖传感器、醇传感器、胆固醇传感器、乳酸传感器、抗坏血酸传感器和胆红素传感器等。

此外，为了保护形成于基板上的电极系表面不受酶的影响，最好是用亲水性高分子覆盖电极系。

25 上述亲水性高分子可使用选自羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧乙基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、明胶及其衍生物、丙烯酸或其盐的聚合物、甲基丙烯酸或其盐的聚合物、淀粉及其衍生物、马来酸酐或其盐的聚合物中的一种。

作为氧化电流值的测定方法可使用只有工作电极和对应电极的二电极方式，或再加上参比电极的三电极方式，三电极方式更能够进行正确的测定。  
30

以下，列举具体实施例对本发明进行更为详细的说明。

图 1 表示本发明的除去反应层的生物传感器的分解斜视图。

在由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的电绝缘性基板 1 上，利用网版印刷法涂刷上银糊状物，形成导电板 2 和 3。然后，在基板 1 上印刷含有树脂粘合剂的导电性石墨糊状物，形成工作电极 4。该工作电极 4 与导电板 2 相接触。接着，在基板 1 上印刷绝缘性糊状物，形成绝缘层 6。绝缘层 6 覆盖在工作电极 4 的外周部，这样就能够确保工作电极 4 露出部分的面积。然后，在基板 1 上印刷含有树脂粘合剂的导电性石墨糊状物，使其与导电板 3 接触，形成环状对应电极 5。接着，在由工作电极和对应电极组成的电极系上或其近旁形成反应层。

具有反应层的绝缘性基板 1 和具备空孔 11 的封盖 9 及隔板 10 按照图 1 中点划线所示的位置连接，制得生物传感器。为了在基板和封盖间形成试样溶液的供给通道，在隔板 10 上设置了缝隙 13。12 为该试样溶液供给通道的开口部。

图 2 表示本发明的一个实施例的除去隔板、封盖的生物传感器的主要部分的纵剖面图。

如图 1 所示，在形成电极系的电绝缘性基板 1 上形成了亲水性高分子层 7、包含酶和电子接受体的反应层(含酶层)8，以及卵磷脂层 8a。

15

### 实施例 1

在图 1 的基板 1 上的电极系上滴下羧甲基纤维素(以下略称为 CMC)水溶液，使其在 50 °C 的暖风干燥机中干燥 10 分钟，形成 CMC 层 7。然后，将 200 单位葡萄糖氧化酶和 40 $\mu\text{mol}$  铁氰化钠溶解于 1ml 水中，调制成混合水溶液。将 5 $\mu\text{l}$  该混合水溶液滴在 CMC 层 7 上，在 50 °C 的暖风干燥机中干燥 10 分钟，形成包含氧化还原酶(葡萄糖氧化酶)和电子接受体(铁氰化钠)的反应层 8。

然后，将卵磷脂的甲苯溶液滴在反应层 8 上，使其干燥，形成卵磷脂层 8a 后，按照图 1 中点划线所示的位置连接封盖和隔板，制得葡萄糖传感器。

所用的试样溶液是葡萄糖浓度为 300mg/dl、红细胞容积比(血细胞比容值)分别为 0 % (血浆)、25 %、38 % 和 50 % 的血液。

通过试样溶液供给通道 12 导入 3 $\mu\text{l}$  血细胞比容值为 0 % 的试样溶液后，试样溶液到达空孔 11，溶解了电极系上的 CMC 层 7、反应层 8 和卵磷脂 8a。导入试样 25 秒钟之后，以电极系的对应电极 5 为基准，在工作电极加上 + 0.5V 的额定电压，测定 5 秒钟之后的电流值。

30 同样，分别测定血细胞比容值为 25 %、38 % 和 50 % 的试样溶液的电流值。所得的电流应答值与试样中的血细胞比容值无关，是一定的。

### 比较例 1

与实施例 1 相同，在图 1 的电极系上形成 CMC 层 7。然后，将 200 单位葡萄糖氧化酶和 40 $\mu\text{mol}$  铁氰化钾溶解于 1ml 水中，调制成混合水溶液。将 5 $\mu\text{l}$  该混合水溶液滴在 CMC 层 7 上，在 50 °C 的暖风干燥机中干燥 10 分钟，形成包含 5 氧化还原酶(葡萄糖氧化酶)和电子接受体(铁氰化钾)的反应层 8。

接着，与实施例 1 同样，形成卵磷脂 8a 之后，制得葡萄糖传感器，测定传感器的应答特性。

电流应答值随着血细胞比容值的增加而减少。其比如表 1 所示。将血细胞比容值为 0 % 时的电流应答值规定为 100。

10

表 1

血细胞比容值(%)	比例
0	100
25	90
38	85
50	80

### 实施例 2

与实施例 1 同样，在图 1 的电极系上形成 CMC 层 7。然后，将 400 单位乳酸氧化酶和 40 $\mu\text{mol}$  铁氰化钠溶解于 1ml 水中，调制成混合水溶液。将 5 $\mu\text{l}$  该混合水溶液滴在 CMC 层 7 上，在 50 °C 的暖风干燥机中干燥 10 分钟，形成包含 15 氧化还原酶(乳酸氧化酶)和电子接受体(铁氰化钠)的反应层 8。

与实施例 1 同样，形成卵磷脂层 8a 后，制得乳酸传感器。

所用的试样溶液是乳酸浓度为 50mg/dl，血细胞比容值分别为 0 % (血浆)、20 25 %、38 % 和 50 % 的血液。

然后，与实施例同样对传感器的应答特性进行测定，所得的电流应答值与血细胞比容值无关，是一定的。

### 比较例 2

与实施例 1 同样，在图 1 的电极系上形成 CMC 层 7。然后，将 400 单位乳酸氧化酶和 40 $\mu\text{mol}$  铁氰化钾溶解于 1ml 水中，调制成混合水溶液。将 5 $\mu\text{l}$  该混合水溶液滴在 CMC 层 7 上，在 50 °C 的暖风干燥机中干燥 10 分钟，形成包含 25 氧

化还原酶(乳酸氧化酶)和电子接受体(铁氰化钾)的反应层 8。

然后，与实施例 1 同样，形成卵磷脂层 8a 后，制得乳酸传感器。与实施例 2 同样，对传感器的应答特性进行测定。

其结果是，电流应答值随着血细胞比容值的增加而减少。其比例如表 2 所示。  
5 将血细胞比容值为 0 % 时的电流应答值定为 100。

表 2

血细胞比容值(%)	比例
0	100
25	95
38	90
50	86

如上所述，本发明提供了能够不受血液中与底物共存的血细胞成分的影响，  
10 以高精度对底物进行定量的生物传感器。

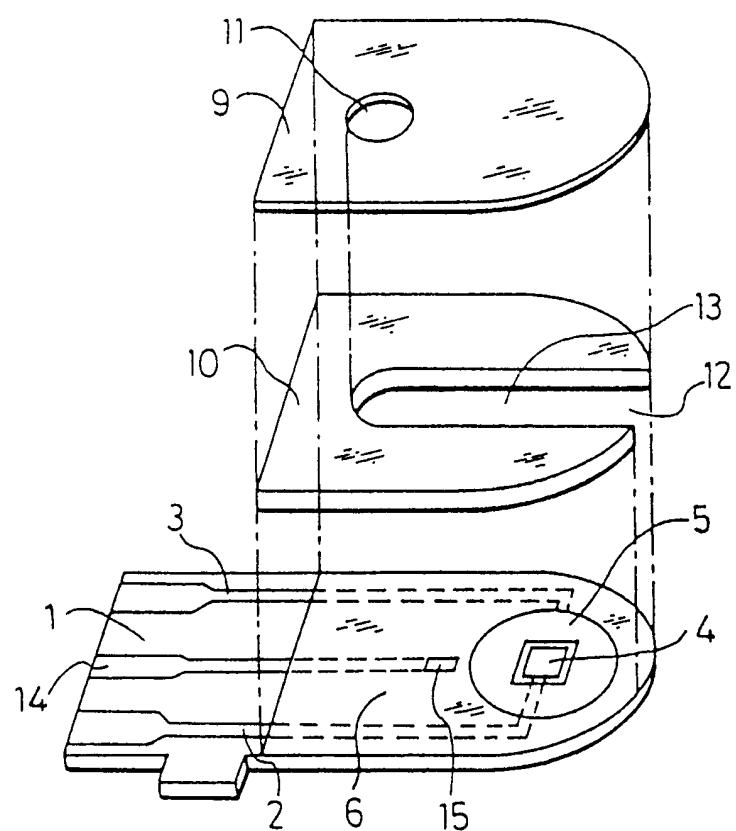


图 1

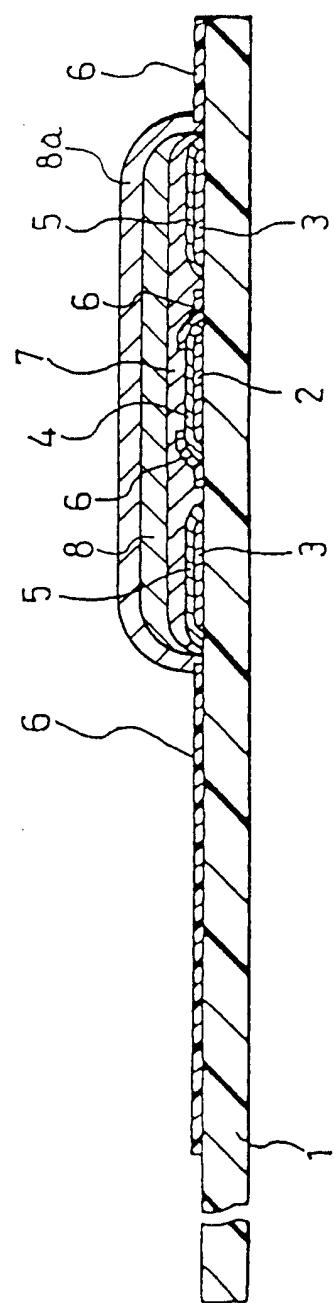


图 2