



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 32 572 T2** 2006.06.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 909 952 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 572.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 118 218.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **25.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/487** (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 21/55 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

26348397 **29.09.1997** **JP**

26349297 **29.09.1997** **JP**

(73) Patentinhaber:

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

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**Ikeda, Shin, Katano City 576-0022, JP; Yoshioka,
Toshihiko, Hirakata City 573-0035, JP; Nankai,
Shiro, Hirakata City 573-0071, JP**

(74) Vertreter:

JUNG HML, 80799 München

(54) Bezeichnung: **Biosensor und Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Biosensor zum Ermöglichen einer einfachen und hochgenauen Quantifizierung eines Substrats sowie auf ein Verfahren zum quantitativen Messen eines Substrats unter Verwendung des Sensors.

[0002] Es bestand ein herkömmliches einfaches Verfahren zum Quantifizieren eines spezifischen Bestandteils in einer Probenlösung ohne Verdünnen oder Rühren bzw. Schütteln der Probenlösung. Dieses Verfahren bewirkt, dass der spezifische Bestandteil mit einer Oxidoreduktase reagiert, deren Substrat dem spezifischen Bestandteil in Anwesenheit eines Elektronenvermittlers oder Elektronenakzeptors entspricht und oxidiert anschließend den Elektronenvermittler, der durch die Enzymreaktion elektrochemisch reduziert ist. Die Konzentration des spezifischen Bestandteils wird dann durch den während dieser elektrochemischen Oxidation fließenden Oxidationsstrom bestimmt.

[0003] Dieses Verfahren verwendet normalerweise einen Biosensor wie er in der Japanischen Offenlegungsschrift Nr. 2,517,153 offenbart ist.

[0004] Der Biosensor wird hergestellt, indem zuerst ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode auf einer elektrisch isolierenden Grundplatte durch ein Raster- bzw. Siebdruckverfahren oder dergleichen gebildet wird, anschließend auf dem Elektrodensystem eine Oxidoreduktase und einen Elektronenvermittler enthaltende Reaktionsschicht gebildet wird, und schließlich eine Abdeckung und ein Abstandshalter auf der elektrisch isolierenden Grundplatte verklebt werden.

[0005] Dieser Biosensor ermöglicht die Quantifizierung von verschiedenen spezifischen Bestandteilen durch Variieren der Oxidoreduktase.

[0006] Ein Glucosesensor wird als ein Beispiel für einen Biosensor beschrieben.

[0007] Ein herkömmlich bekanntes Verfahren zur quantitativen Messung von Glucose ist ein System, das eine Kombination einer Glucoseoxidase mit einer Sauerstoffelektrode oder einer Wasserstoffperoxidelektrode umfasst (z.B. "Biosensor", herausgegeben von Shuichi Suzuki, Kodansha, Japan).

[0008] Glucoseoxidase oxidiert selektiv ein β -D-Glucose Substrat in D-Gluconsäure- δ -lacton durch Verwendung von Sauerstoff, der in einer Probenlösung als ein Elektronenvermittler gelöst ist. Wenn das Substrat durch die Glucoseoxidase oxidiert wird, wird der als der Elektronenvermittler ver-

wendete Sauerstoff in Wasserstoffperoxid reduziert. Die Glucosekonzentration kann entweder durch Messung des Volumens des während dieser Reaktion verbrauchten Sauerstoffs durch Verwendung einer Sauerstoffelektrode oder durch Messung des Volumens des erzeugten Wasserstoffperoxids unter Verwendung einer Wasserstoffperoxidelektrode aus Platin oder dergleichen quantifiziert werden.

[0009] Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, dass die Messung stark durch die Konzentration des in einer Probenlösung enthaltenen Sauerstoffs, abhängig vom Messgegenstand, beeinflusst wird. Dieses System weist noch einen anderen Nachteil auf, nämlich dass das System nicht in Abwesenheit von Sauerstoff funktionieren kann.

[0010] Zum Überwinden dieser Probleme wurde ein Typ eines Glucosesensors entwickelt, der eine organische Zusammensetzung oder einen Metallkomplex wie Kaliumferricyanid, Ferrocenderivate, Chinonderivate, usw. als Elektronenvermittler anstelle von Sauerstoff enthält.

[0011] Dieser Biosensor kann eine bekannte Menge einer Glucoseoxidase auf einem Elektrodensystem zusammen mit einem Elektronenvermittler in deren stabilisiertem Zustand tragen. Diese Struktur ermöglicht es, das Elektrodensystem mit der Reaktionsschicht integral in nahezu trockenem Zustand zu kombinieren.

[0012] Ein derartiger Biosensor ist normalerweise ein Einwegartikel bzw. wegwerfbar und ermöglicht die Messung der Konzentration von Glucose durch eine einfache Einträufelung einer Messprobe an einem in einer Messvorrichtung montierten Sensorchip. Dadurch hat dieser Biosensor in jüngster Zeit viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

[0013] EP 0 736 607 lehrt einen Biosensor mit einer Mess- und einer Gegenelektrode, die beide eine Reagenzschicht mit einer Oxidoreduktase und einer Redoxverbindung tragen.

[0014] Wie oben beschrieben kann das Substrat in einer Probe quantifiziert werden auf der Grundlage des Stroms, der benötigt wird zum Oxidieren der reduzierten Form des Elektronenvermittlers, der durch eine Reihe von Enzymreaktionen auf der Elektrode erzeugt worden ist. Ein derartiges Verfahren und der zugehörige Biosensor sind in US 5,288,636 offenbart, die eine Reagenzschicht mit einer Oxidoreduktase und einer Redoxverbindung auf der Arbeitselektrode und eine Redoxverbindung in ihrer oxidierten Form auf der Gegenelektrode lehrt.

[0015] Es wird jedoch angenommen, dass einige Proben eine leicht zu oxidierende Substanz enthalten, die durch Oxidation eines Elektronenvermittlers

in seinem reduzierten Zustand auf der Elektrode oxidiert wird, und einen Oxidationsstrom erzeugt, und dadurch einen positiven Fehler in dem gemessenen Stromwert erzeugt. Darüber hinaus kann der Oxidationsstrom variieren, wenn die Messprobe eine hohe Konzentration des Substrats enthält.

[0016] Zum Lösen dieser Probleme schlagen die gegenwärtigen Erfinder ein Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats auf der Grundlage des Werts des Reduktionsstroms, der während der Reduktion des Elektronenvermittlers in seinem oxidierten Zustand auf der Arbeitselektrode, die nicht durch eine Reihe von Enzymreaktionen reduziert bleibt, fließt. Dieses Verfahren verhindert nachteilige Auswirkungen jeglicher leicht zu oxidierender Substanzen auf die Messergebnisse.

[0017] Wenn jedoch der Reduktionsstromwert mit einem Zweielektrodensystem, das eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode umfasst, gemessen wird, dann wird die Anwesenheit einer gewissen Menge eines Elektronenvermittlers in seinem reduzierten Zustand, der auf der Gegenelektrode oxidiert werden muss, entsprechend der Reduktion des bereits oxidierten Elektronenvermittlers auf der Arbeitselektrode, zwingend erforderlich. Wenn jedoch zu erwarten ist, dass die Konzentration des Substrats niedrig ist, kann sich bei diesem System der Elektronenvermittler in seinem reduzierten Zustand abreichern, was dazu führt, dass die Oxidation auf der Gegenelektrode sich zu einem ratenbestimmenden Schritt entwickelt, der den gemessenen Reduktionsstromwert nachteilig beeinflusst.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Biosensor bereitzustellen, der die Quantifizierung einer Substratkonzentration in einer Probe mit hoher Genauigkeit durch Beseitigung der oben genannten Schwierigkeiten ermöglicht.

[0019] Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur einfachen und quantitativen Hochleistungsmessung eines Substrats mit hoher Genauigkeit mit Hilfe dieses Biosensors bereitzustellen.

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt einen Biosensor bereit, der umfasst: eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer auf der Grundplatte gebildeten Gegenelektrode, und eine Reaktionsschicht, die auf oder in der Nähe des Elektrodensystems gebildet ist und die wenigstens eine Oxidoreduktase und einen Elektronenvermittler enthält, wobei die Gegenelektrode wenigstens eine Redoxverbindung in ihrem reduzierten Zustand, die eine elektrolytische Oxidation erlaubt, enthält.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit zur quantitativen Messung eines Substrats unter Verwendung des oben genannten Biosensors, wobei das Verfahren umfasst: einen ersten Schritt des Hinzufügens einer Probe zu der Reaktionsschicht, um zu bewirken, dass ein in der Probe enthaltenes Substrat mit einem in der Reaktionsschicht enthaltenem Enzym reagiert; einen zweiten Schritt des Anlegens eines Potentials an die Arbeitselektrode zum Reduzieren des Elektronenvermittlers im oxidierten Zustand, der im Verlauf des ersten Schritts nicht reduziert bleibt; und einen dritten Schritt des Messens eines durch die Arbeitselektrode und die Gegenelektrode fließenden Reduktionsstroms.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die Gegenelektrode Ferrocen oder ein Ferrocenderivat als Redoxverbindung.

[0023] Während die neuen Merkmale der Erfindung insbesondere in den angefügten Patentansprüchen dargelegt sind, wird die Erfindung in der folgenden ausführlichen Beschreibung in Verbindung mit den Zeichnungen sowohl hinsichtlich ihres Aufbaus bzw. ihrer Einrichtung als auch ihres Inhalts, zusammen mit ihren weiteren Aufgaben und Merkmalen, besser verstanden und gewürdigt.

Kurze Beschreibung der verschiedenen Ansichten der Zeichnung

[0024] [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Explosionsansicht eines Glucosesensors nach einem Beispiel der vorliegenden Erfindung mit Auslassung der Reaktionsschicht.

[0025] [Fig. 2](#) ist eine vertikale Querschnittsansicht, die den wesentlichen Bestandteil des Glucosesensors mit einer Auslassung des Abstandshalters und der Abdeckung veranschaulicht.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0026] Wie oben ausgeführt, fügt das Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats nach der vorliegenden Erfindung eine Probe zu der Reaktionsschicht hinzu, um zu bewirken, dass das Substrat mit dem Enzym reagiert. Wenn die Enzymreaktion fortschreitet, wird der in der Reaktionsschicht enthaltene Elektronenvermittler so weit reduziert, dass er die Konzentration des Substrats in der Probe wieder spiegelt. Dann wird ein Potential an die Arbeitselektrode angelegt, um den Elektronenvermittler in seinem oxidierten Zustand, der während der Enzymreaktion nicht reduziert bleibt, zu reduzieren, um dabei den Reduktionsstrom zu erzeugen. Die Substratkonzentration wird dann durch Messung des durch die beiden Elektroden fließenden Reduktionsstroms bestimmt.

[0027] Wenn der Anteil des Elektronenvermittlers in der Reaktionsschicht auf einem konstanten Niveau gehalten wird, spiegelt der Reduktionsstrom bei diesem Verfahren die Konzentration des Substrats in der Probe scharf bzw. genau wieder. Wenn daher ein Reduktionsstromwert einer Standardlösung, die einen bekannten Anteil eines Substrats enthält, vorher kalibriert wird, um eine Referenzkalibrationskurve zu erhalten, kann die Substratkonzentration in einer Probe auf der Grundlage dieser Referenz quantitativ bestimmt werden.

[0028] Die vorliegende Erfindung als solche quantifiziert ein Substrat auf der Grundlage des Reduktionsstroms, was den Reduktionsstrom davor bewahrt, durch die Anwesenheit, falls vorhanden, einer leicht zu oxidierenden Substanz nachteilig beeinflusst zu werden.

[0029] Weiterhin enthält die Gegenelektrode wie oben beschrieben wenigstens eine Redoxverbindung in ihrem reduzierten Zustand. Diese Ausgestaltung verhindert, dass die Oxidation auf der Gegenelektrode im Verlauf der Messung des Reduktionsstromwerts an der Arbeitselektrode in den ratenbestimmenden Schritt Einzug hält, selbst wenn die Probe eine niedrige Konzentration des Substrats enthält und dadurch der verfügbare Elektronenvermittler in seinem reduzierten Zustand, der durch die Enzymreaktion erzeugt worden ist, klein hinsichtlich seines Anteils ist.

[0030] Der Biosensor nach der vorliegenden Erfindung schließt eine verbesserte Gegenelektrode mit ein, die ein Bedenken über Einflüsse der Gegenelektrode auf die Sensorerhaltung ausschließt. Einige Redoxverbindungen könnten nachteilige Auswirkungen auf die Sensorerhaltung aufweisen; daher ist es wichtig, dass wenn eine Redoxverbindung zu der Enzymschicht hinzugefügt werden soll, ihre Auswirkung vorher überprüft wird. Die vorliegende Erfindung schließt eine Redoxverbindung in ihrem reduzierten Zustand in der Gegenelektrode mit ein, wobei diese Ausgestaltung einen Vorteil mit sich bringt, dass diese im Vergleich zu einem Biosensor, bei dem derartige Komponenten in der Reaktionsschicht hinzugefügt werden, in einer größeren Menge hinzugefügt werden können wenn die Substratkonzentration hoch ist.

[0031] Es ist vorteilhaft bzw. besser, dass der Anteil der Redoxverbindung, die in der Gegenelektrode enthalten sein soll, größer ist als die Menge des Elektronenvermittlers, der in der Reaktionsschicht enthalten sein soll.

[0032] Als bevorzugt verwendete Redoxverbindungen können Ferrocen, ein Ferrocenderivat sowie Vinylferrocen, ein Metallkomplex, Hydrochinon, usw. als Beispiel genannt werden.

[0033] Es ist auch bevorzugt, die gesamte Oberfläche des auf der Grundplatte gebildeten Elektroden-systems mit einer Schicht eines hydrophilen Polymers zu beschichten, um den möglichen Kontakt des Enzyms und des Elektronenvermittlers in der Reaktionsschicht oder die mögliche Adsorption bzw. Anlagerung von Protein in der Probe mit oder auf der Oberfläche des Elektroden-systems zu vermeiden.

[0034] Verfügbare hydrophile Polymere zum Bilden der hydrophilen Polymerschicht umfassen: Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Polyaminosäuren wie Polylysin, Polystyrolsulfonat, Gallerte und ihre Derivate, ein Polymer einer Acrylsäure oder ein Acrylat, ein Polymer von Methacrylsäure oder ein Methacrylat, Stärke und ihre Derivate, ein Polymer von Maleinsäureanhydrid oder ein Maleat, Cellulosederivate wie Carboxymethylzellulose, Hydroxypropylzellulose, Methylzellulose, Ethylzellulose, Hydroxyethylzellulose, Ethylhydroxyethylzellulose, Carboxymethylethylzellulose oder dergleichen. Unter diesen sind Carboxymethylzellulose, Hydroxyethylzellulose, Hydroxypropylzellulose, Methylzellulose, Ethylzellulose, Ethylhydroxyethylzellulose und Carboxymethylzellulose bevorzugt.

[0035] Als Elektronenvermittler, der in der Reaktionsschicht enthalten sein soll, können Kaliumferricyanid, p-Benzochinon, Phenazinmethosulfat, Methyleneblau, Ferrocenderivate oder dergleichen verwendet werden.

[0036] Einsetzbare Oxidoreduktasen beinhalten Glucoseoxidase, Glucosedehydrogenase, Alkoholoxidase, Lactatoxidase, Lactatdehydrogenase, Fructosedehydrogenase, Urikase, Cholesteroxidase, Cholesterolesterase, Xanthinoxidase, Aminosäureoxidase und dergleichen.

[0037] Eine Kombination von mehreren Oxidoreduktasen kann ebenfalls verwendet werden, beispielsweise Glucoseoxidase plus Invertase, Glucoseoxidase plus Invertase plus Mutarotase, Fructosedehydrogenase plus Invertase oder dergleichen.

[0038] Die Enzyme und der Elektronenvermittler können in der Probenlösung gelöst werden oder durch Fixieren der Reaktionsschicht an der Grundplatte an einer Lösung in der Probenlösung gehindert werden. Wenn die letztere Ausgestaltung übernommen wird, ist es bevorzugt, dass die Reaktionsschicht ferner eines der hydrophilen Polymere, die oben als Beispiel genannt worden sind, enthält.

[0039] Die Reaktionsschicht kann ferner einen pH-Puffer enthalten. Als Beispiel für den pH-Puffer können genannt werden: Kaliumdihydrogenphosphat-Dikaliumphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat-Dinatriumphosphat, Natriumdihydrogenphosphat-Dikaliumphosphat, Natriumdihydrogenphosphat.

phat-Dinatriumphosphat, Zitronensäure-Dinatriumphosphat, Zitronensäure-Dikaliumphosphat, Zitronensäure-Trinatriumzitat, Zitronensäure-Trikaliumzitat, Kaliumdihydrogenzitat-Natriumhydroxid, Natriumdihydrogenzitat-Natriumhydroxid, Natriumhydrogenmaleat-Natriumhydroxid, Kaliumhydrogenphthalat-Natriumhydroxid, Kaliumhydrogenphthalat-Natriumhydroxid, Bernsteinsäure-Natriumtetraborat, Maleinsäure-Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Tris(hydroximethyl)aminoethanhydrochlorid, [N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure]-Natriumhydroxid, (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-Aminoethansulfonsäure)-Natriumhydroxid und [Piperazin-N, N'-Bis(2-Ethansulfonsäure)]-Natriumhydroxid.

[0040] Auf der Reaktionsschicht kann auch eine Lezitinsschicht zum gleichmäßigen Zufügen einer Probenlösung gebildet werden.

[0041] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand konkreter Beispiele spezifisch erläutert.

[0042] Auch wenn in den unten genannten Beispielen die Arbeitselektrode, die Gegenelektrode und die Isolationsschicht durch spezifische Druckmuster gebildet werden, ist die vorliegende Erfindung nicht auf solche Muster beschränkt. In ähnlicher Weise ist die an die Elektrode anzulegende Spannung nicht auf die in den unten genannten Beispielen verwendete beschränkt.

[0043] **Fig. 1** zeigt eine perspektivische Explosionsansicht eines Glucosesensors mit einem Zweielektrodensystem bei Auslassung der Reaktionsschicht. In dem Glucosesensor wird eine Silberpaste auf eine elektrisch isolierende Grundplatte **1** aus Polyethylenterephthalat durch das Raster- bzw. Siebdruckverfahren aufgedruckt, so dass Anschlüsse **2** und **3** auf der Grundplatte **1** gebildet werden. Anschließend wird eine leitfähige Kohlenstoffpaste, die einen Harzbinder enthält, auf die Grundplatte **1** aufgedruckt, so dass eine Arbeitselektrode **4** gebildet wird. Die Arbeitselektrode **4** ist in Kontakt mit dem Anschluss **2**, Dann wird weiterhin eine elektrisch isolierende Schicht **6** auf der Grundplatte **1** gebildet, indem eine isolierende Paste darauf aufgedruckt wird. Die elektrisch isolierende Schicht **6** bedeckt den Umfang der Arbeitselektrode **4**, so dass die bloßliegende Teilfläche der Arbeitselektrode **4** konstant gehalten wird. Danach wird eine leitfähige Kohlenstoffpaste, die einen Harzbinder und eine Redoxverbindung enthält, auf die Grundplatte **1** aufgedruckt, um zu bewirken, dass die Paste den vorher gebildeten Anschluss **3** berührt, was eine ringähnliche Gegenelektrode **5** ausbildet.

[0044] Dann werden die elektrisch isolierende Grundplatte **1**, eine Abdeckung **9** mit einem Entlüfter **11** und einem Abstandshalter **10** in einer Lagebeziehung

miteinander verbunden, wie durch die gestrichelte Linie in **Fig. 1** dargestellt, was einen Biosensor liefert, der in den unten genannten Beispielen als ein Glucosesensor verwendet wird. Der Abstandshalter **10** weist einen Schlitz **13** zum Bilden eines Probenzufuhrwegs zwischen der Grundplatte und der Abdeckung auf. Referenzzeichen **12** entspricht einer Öffnung des Probenzufuhrwegs.

[0045] **Fig. 2** ist eine vertikale Querschnittsansicht, die wesentliche Teile des Biosensors nach der vorliegenden Erfindung veranschaulicht, wobei der der Abstandshalter und die Abdeckung ausgelassen sind. Auf der elektrisch isolierenden Grundplatte **1**, auf der das Elektrodensystem bereits wie in **Fig. 1** gezeigt ausgebildet ist, wird eine Reaktionsschicht **7**, die die Reagenzien einschließlich eines Enzyms und eines Elektronenvermittlers enthält ausgebildet und oberhalb davon wird später ferner eine Lezitinsschicht **8** ausgebildet.

[0046] Die Reaktionsschicht **7** wird vorzugsweise auf dem Elektrodensystem gebildet, sie kann jedoch in der Nähe des Elektrodensystems ausgebildet werden, beispielsweise auf der Seite der Abdeckung, so dass sie zu dem Probenzufuhrweg hin exponiert ist.

Beispiel 1

[0047] Wie in **Fig. 1** gezeigt wurde auf der Grundplatte **1** zuerst ein Elektrodensystem mit wenigstens einer Gegenelektrode aus einer leitfähigen Kohlenstoffpaste, die einen Harzbinder und Ferrocen als die Redoxverbindung enthält, ausgebildet.

[0048] Dann wurde die Reaktionsschicht **7** ausgebildet indem eine gemischte wässrige Lösung von Glucoseoxidase (EC1.1.3.4; im folgenden als "GOD" bezeichnet) mit Kaliumferricyanid auf das Elektrodensystem aufgebracht und getrocknet wird.

[0049] Anschließend wurde die Lezitinsschicht **8** durch Aufbringen einer Toluolenlösung von Lezitin auf die Reaktionsschicht **7** und Trocknen derselben ausgebildet.

[0050] Die Abdeckung **9** und der Abstandshalter **10** wurden dann mit der Grundplatte **1** in einer durch die gestrichelte Linie in **Fig. 1** gezeigten Lagebeziehung miteinander verbunden, was einen in diesem Beispiel verwendeten Glucosesensor lieferte.

[0051] Als eine Probenlösung wurde eine wässrige Glucosestandardlösung (3 µl) dem Glucosesensor durch die Öffnung **12** des Probenzufuhrwegs zugeführt. Die Probenlösung avancierte zu der Entlüftung **11** und löste die oberhalb des Elektrodensystems vorhandene Reaktionsschicht **7** auf. Beim Auflösen der Reaktionsschicht **7** wird eine Enzymreaktion stattfinden, bei der in der Probenlösung enthaltene

Glucose durch das GOD zu Gluconsäurelacton oxidiert wird. Diese Enzymreaktion begleitet gleichzeitig die Reduktion der Ferricyanidionen in Ferrocyanidionen.

[0052] Wenn eine bestimmte Zeit nach Zufuhr der Probenlösung abgelaufen ist, wird an die Arbeitselektrode **4** eine Spannung von $-1,0$ V in Bezug auf die Gegenelektrode **5** angelegt, was eine Reduktion des Kaliumferricyanids, welches unempfindlich bzw. refraktorisch für die durch die Enzymreaktion auf der Arbeitselektrode bewirkte Reduktion war, induzierte. Andererseits wird auf der Gegenelektrode eine Oxidation des in der Gegenelektrode enthaltenen Ferrocens stattfinden und Ferriciniumionen erzeugen. Der Wert des durch die Elektroden fließenden Reduktionsstroms wurde fünf Sekunden nach dem Anlegen der Spannung gemessen.

[0053] Die Stromwerte, die unter Verwendung verschiedenartiger wässriger Standardlösungen bei verschiedenen Glucosekonzentrationen gemessen worden sind, zeigten Abfälle bei Anstiegen in der Glucosekonzentration. Dies impliziert, dass die Anwesenheit von Ferrocen in der Gegenelektrode einen ausreichenden Anteil eines Reduktionsmittels in dem Reaktionssystem sicherstellte, und dass die Stromwerte von dem Anteil der Ferricyanid-Ionen, die auf der Arbeitselektrode zu Ferrocyanid-Ionen reduziert werden sollen, abhängen. Der mit dem Glucosesensor gemessene Antwortstromwert zeigte eine hohe Genauigkeit.

Beispiel 2

[0054] In diesem Beispiel wurde eine wässrige Lösung von Carboxymethylzellulose (im folgenden abgekürzt als "CMC") auf das Elektrodensystem identisch zu dem des Beispiels 1 aufgebracht und getrocknet, um eine CMC-Schicht auszubilden. Die Reaktionsschicht und die Lezitinsschicht wurden in dieser Reihenfolge auf der CMC-Schicht in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 1 ausgebildet.

[0055] Ein Glucosesensor wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 1 hergestellt, um die Sensorantworten auf verschiedenartige Glucosestandardlösungen zu messen. Die Ergebnisse zeigten ähnliche Antwortcharakteristiken bzw. Kennlinien für den Glucosesensor dieses Beispiels im Vergleich zu dem des Beispiels 1, was auf weniger Variationen hinweist.

Beispiel 3

[0056] In diesem Beispiel wurde der Antwortstromwert des Glucosesensors in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 2 gemessen, mit Ausnahme der Verwendung verschiedenartiger wässriger Glucosestandardlösungen, die bekannte Anteile von Ascor-

binsäure als Standardlösung enthielten.

[0057] Die Ergebnisse zeigten, dass der Glucosesensor ähnliche Antwortcharakteristiken bzw. -kennlinien wie die des Beispiels 2, welches ausschließlich wässrige Glucosestandardlösungen ohne Ascorbinsäure verwendete, aufwies.

Vergleichendes Beispiel 1

[0058] Als ein vergleichendes Beispiel wurde ein Glucosesensor und eine wässrige Glucosestandardlösung, die Ascorbinsäure enthielt, identisch zu denen des Beispiels 3 verwendet zum Messen der Werte des Oxidationsstroms, der fünf Sekunden nach dem Anlegen einer Spannung von $0,5$ V an die Arbeitselektrode bei Verwendung der Gegenelektrode als Referenz floss.

[0059] Die Ergebnisse zeigten, dass die Antwortstromwerte sich erhöhten, wenn der Anteil der in der wässrigen Glucosestandardlösung enthaltenen Ascorbinsäure anstieg.

Beispiel 4

[0060] Ein Glucosesensor wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 2 hergestellt, mit Ausnahme der Verwendung von Vinylferrocen als Redoxverbindung, und hinsichtlich ihrer Antworten auf die wässrigen Glucosestandardlösungen vermessen. Der Glucosesensor des Beispiels 4 zeigte ähnliche Antwortcharakteristiken bzw. -kennlinien wie die des Beispiels 2.

Patentansprüche

1. Ein Biosensor umfassend eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer auf der Grundplatte ausgebildeten Gegenelektrode, und eine Reaktionsschicht, die auf dem Elektrodensystem gebildet ist und wenigstens eine Oxidoreductase und einen Elektronenvermittler im oxidierten Zustand enthält, wobei die Gegenelektrode wenigstens eine Redoxverbindung im reduzierten Zustand enthält, wobei die Oxidoreductase aus der Gruppe umfassend: Glucoseoxidase, Glucosedehydrogenase, Alkoholoxidase, Lactatoxidase, Lactatdehydrogenase, Fructosedehydrogenase, Uricase, Cholesteroxidase, Xanthinoxidase und Aminosäureoxidase ausgewählt ist.

2. Der Biosensor nach Anspruch 1, wobei die Redoxverbindung Ferrocen oder ein Ferrocenderivat ist.

3. Der Biosensor nach Anspruch 1, wobei die Reaktionsschicht weiterhin ein hydrophiles Polymer beinhaltet.

4. Verwendung eines Biosensors für die quantita-

tive Messung eines Substrats, wobei der Biosensor umfasst: eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer auf der Grundplatte gebildeten Gegenelektrode, und eine Reaktionsschicht, die auf dem Elektrodensystem gebildet ist und wenigstens eine Oxidoreductase und einen Elektronenvermittler enthält, die Verwendung umfassend:

- einen ersten Schritt des Hinzufügens einer Probe zu der Reaktionsschicht, um zu bewirken, dass ein in der Probe beinhaltenes Substrat mit der in der Reaktionsschicht beinhaltenen Oxidoreductase reagiert, und des Reduzierens eines Teils des in der Reaktionsschicht enthaltenen Elektronenvermittlers im oxidierten Zustand,
 - ein zweiter Schritt des Anlegens eines Potentials an die Arbeitselektrode zum Reduzieren eines Teils des in der Reaktionsschicht enthaltenen Elektronenvermittlers im oxidierten Zustand, und
 - einen dritten Schritt des Messens eines durch die Arbeitselektrode und die Gegenelektrode fließenden Reduktionsstroms,
- wobei die Gegenelektrode wenigstens eine Redoxverbindung im reduzierten Zustand beinhaltet und die Redoxverbindung in dem zweiten Schritt oxidiert wird.

5. Ein Verfahren zum quantitativen Messen eines Substrats, umfassend:

- einen ersten Schritt des Bereitstellens eines Biosensors, der umfasst: eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer auf der Grundplatte gebildeten Gegenelektrode, und eine Reaktionsschicht, die auf dem Elektrodensystem gebildet ist und wenigstens eine Oxidoreductase und einen Elektronenvermittler enthält;
 - einen zweiten Schritt des Hinzufügens einer Probe zu der Reaktionsschicht, um zu bewirken, dass ein in der Probe enthaltenes Substrat mit der in der Reaktionsschicht enthaltenen Oxidoreductase reagiert, und des Reduzierens eines Teils des in der Reaktionsschicht enthaltenen Elektronenvermittlers im oxidierten Zustand,
 - einen dritten Schritt des Anlegens eines Potentials an die Arbeitselektrode zum Reduzieren eines Teils des in der Reaktionsschicht enthaltenen Elektronenvermittlers im oxidierten Zustand; und
 - einen vierten Schritt des Messens eines durch die Arbeitselektrode und die Gegenelektrode fließenden Reduktionsstroms,
- wobei die Gegenelektrode wenigstens eine Redoxverbindung im reduzierten Zustand enthält und die Redoxverbindung in dem dritten Schritt oxidiert wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

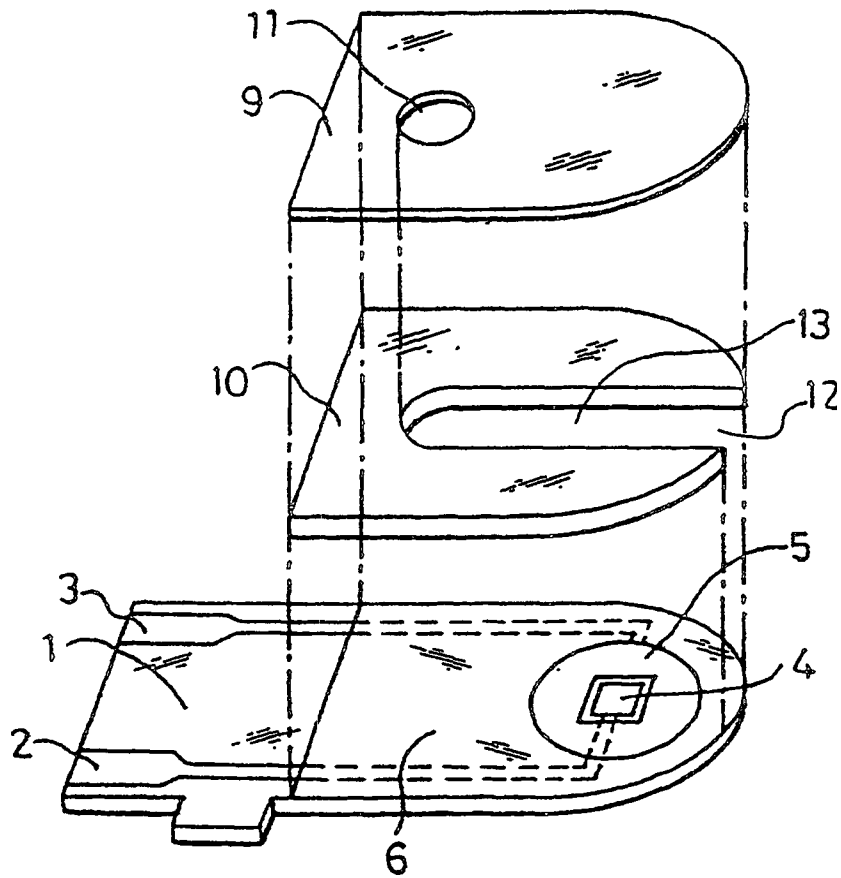


FIG. 2

