



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 25 751 T2** 2006.10.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 235 068 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 25 751.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP00/08029**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 974 989.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/036954**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.10.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/327** (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

36145099 **15.11.1999** **JP**

(73) Patentinhaber:

ARKRAY, Inc., Kyoto, JP

(74) Vertreter:

**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**KATSUKI, c/o Arkray, Koji, Kyoto-shi, Kyoto
601-8045, JP; HAMAMOTO, c/o Arkray, Katsumi,
Kyoto-shi, Kyoto 601-8045, JP; YAGI, c/o Arkray,
Yuji, Kyoto-shi, Kyoto 601-8045, JP; FUKUOKA,
Takao, Joyo-shi, Kyoto 610-0121, JP**

(54) Bezeichnung: **BIOSENSOR**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Biosensor zu elektrochemischen Messung einer spezifischen Verbindung in einer Probenflüssigkeit wie etwa Blut.

Stand der Technik

[0002] Biosensoren, die ein bestimmtes in einer Probenflüssigkeit zu messendes Objekt auf schnelle und einfache Weise quantifizieren können, zum Beispiel ohne dabei die Probenflüssigkeit zu verdünnen oder zu rühren, werden viel verwendet. Solch ein Biosensor kann hergestellt werden, indem man zum Beispiel durch ein Verfahren wie Schablonendruck ein Elektrodensystem bildet, das eine Arbeitselektrode (auch als „Messelektrode“ bezeichnet) und eine Gegenelektrode auf einem elektrisch isolierenden Substrat besitzt, und eine reaktive Schicht herstellt, die ein Redox(Oxidations-Reduktions)-Enzym und eine Elektronenakzeptorsubstanz, die mit dem Gegenstand der Messung reagiert, umfasst. Wenn die reaktive Schicht im Kontakt mit der Probenflüssigkeit steht, die den Messgegenstand enthält, wird der Messgegenstand durch die katalytische Wirkung des Redox-Enzyms oxidiert, und zugleich wird die Elektronenakzeptorsubstanz reduziert. Die reduzierte Elektronenakzeptorsubstanz wird durch einen elektrochemischen Ansatz re-oxidiert, und die Konzentration des Messgegenstandes in der Probenflüssigkeit kann aus den so erhaltenen Oxidationsstromstärken berechnet werden.

[0003] Jedoch können in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Probenflüssigkeit oder dergleichen Fehler in der Messung vorkommen. Mögliche Gründe hierfür sind die folgenden. Zum Beispiel enthält eine Vollblutprobe Verunreinigungen, zum Beispiel Feststoffe wie Blutzellen, flüssige Bestandteile wie Lipide, Proteine und Saccharide, und unlösliche Bestandteile. Die Oberfläche der Elektroden kann durch die Adsorption dieser Verunreinigungen auf die Elektrodenoberfläche verringert werden, oder die Verunreinigungen können die Diffusion des Reagenz behindern und die enzymatische Reaktion inhibieren. Als Folge hiervon wird die Stromstärke verringert. Weiterhin existieren im Hinblick auf den Hämatokritwert (Hct), bei dem es sich um das Volumenverhältnis der Erythrozyten zum gesamten Blut handelt, große interindividuelle Unterschiede, so dass zwischen Individuen Unterschiede in dem oben beschriebenen Einfluss auf den Biosensor vorliegen. Solch ein durch Verunreinigungen bedingter Unterschied kann zum Beispiel dadurch verringert werden, dass man die Probenflüssigkeit verdünnt und anschließend die verdünnte Probenflüssigkeit einem Biosensor zuführt. Jedoch erfordert dies mehr Zeit und macht die Durchführung komplizierter.

[0004] Um eine solche Beeinflussung zu vermeiden, wurden die folgenden Biosensoren vorgeschlagen: ein Biosensor (JP 9-80010 A), in dem ein Film von immobilisiertem Enzym, der wechselseitig ladungsgekoppelte Redoxenzyme und Chitosan enthält, auf einer Detektionsoberfläche des Elektrodensystems angeordnet ist; und ein Biosensor (JP 10-113200 B), in dem eine Schicht, die Mikropartikel einer wasserlöslichen Verbindung mit hohem Molekulargewicht und leitende Feststoffe umfasst, angeordnet ist. Die Mikropartikel enthalten ein Enzym. Diese Biosensoren versuchen, den durch die Verunreinigungen bedingten Einfluss zu verringern, indem sie die oben beschriebenen verschiedenen Schichten als filternde Filme bereitstellen und die Probenflüssigkeit auf dem Weg über den filternden Film mit der Elektrodenoberfläche in Kontakt bringen, um die Verunreinigungen in der Probenflüssigkeit daran zu hindern, der Elektrodenoberfläche zu nahe zu kommen.

[0005] US-A-5,770,028 offenbart einen elektrochemischen Streifen, der ein auf einem ebenen isolierenden Substrat gebildetes Elektrodennmuster hat. Die Arbeitselektrode ist mit einer Reagenzschicht bedeckt, die aus auf Partikeln aus platinisiertem Kohlenstoff immobilisierter Glukoseoxidase gebildet wird und mit einer semi-permeablen Membran bedeckt ist, die kolloidales Silikat zum Filtern störender Substanzen enthält.

[0006] Solch ein Biosensor kann Verunreinigungen wie Erythrozyten oder Proteine, die die Messung behindern, ausfiltern. Jedoch ist, da der filternde Film vorgesehen ist, die Permeation der Probenflüssigkeit nicht gleichförmig, so dass die Elektrodenoberfläche möglicherweise nicht hinreichend feucht wird. Daher verbleiben zum Beispiel Luftblasen auf den Elektroden, so dass die wirksame Messfläche der Elektroden verringert wird, was Messfehler verursachen kann. Weiterhin erfordert die Permeation der Probenflüssigkeit Zeit, und daher ist die Reaktionsgeschwindigkeit niedrig.

Offenbarung der Erfindung

[0007] Zur Vermeidung dieser Probleme wurde ein anderer Biosensor (JP 7-107525 B) vorgeschlagen, in dem eine aus einer hydrophilen Verbindung von hohem Molekulargewicht, wie zum Beispiel stärke-basierten,

carboxymethylcellulose-basierten oder gelatin-basierten Verbindungen, hergestellte Schicht vorgesehen ist.

[0008] In diesem Biosensor ist das Problem mit dem filternden Film gelöst, aber da eine wasserlösliche Verbindung von hohem Molekulargewicht verwendet wird, ist die Wasserabsorptivität hoch, so dass der Biosensor feuchtigkeitsempfindlich ist, was darin Probleme verursacht, dass die enzymatische Reaktion langsam oder die Form der Schicht instabil ist. Daher ist es schwierig, die Messgenauigkeit zu verbessern, und eine Messung ist zeitaufwendig.

[0009] Daher ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Biosensor bereitzustellen, der einen Messgegenstand in einer Probe schnell und einfach mit hoher Genauigkeit messen kann, ohne von den Verunreinigungen in der Probe beeinflusst zu werden.

[0010] Um die oben genannten Probleme zu lösen, umfasst ein erfindungsgemäßer Biosensor ein Substrat, eine ein Reagenz enthaltende Reagenzschicht und ein eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode beinhaltendes Elektrodensystem, wobei das Elektrodensystem auf dem Substrat angeordnet ist, die Reagenzschicht auf dem Elektrodensystem ausgebildet ist und die Reagenzschicht des Weiteren anorganische Teilchen eines ausdehnungsfähigen Phyllosilikats, wie in den angehängten Ansprüchen definiert, umfasst.

[0011] Als Ergebnis eingehender Forschungen fanden die Erfinder der vorliegenden Erfindung auf der Basis der folgenden Befunde, dass die Verunreinigungen daran gehindert werden können, sich an die Elektroden anzulagern, indem man auf den Elektroden eine Schicht bildet, die von einer die Schicht durchdringenden Probenflüssigkeit in ein Gel oder in ein Sol umgewandelt wird.

[0012] Es ist bekannt, dass die oben beschriebene hydrophile Verbindung von hohem Molekulargewicht im Allgemeinen durch Absorption von Wasser in ein Gel oder ein Sol umgewandelt wird. Jedoch dauert es in einem Biosensor, wenn eine Schicht, die die hydrophile Verbindung von hohem Molekulargewicht enthält, gebildet wird, eine Weile, bis die Probenflüssigkeit diese Schicht durchdrungen hat, so dass die Wassermoleküle in der Probenflüssigkeit die hydrophile Verbindung von hohem Molekulargewicht zum Quellen bringen und in ein Gel umwandeln. In anderen Worten, die Wassermoleküle müssen eine Struktur mit hohem Molekulargewicht durchdringen, in der lange Hauptketten verflochten sind. Da dies eine Bewegung der Hauptketten involviert, ist dies thermodynamisch ungünstig, verglichen mit der Auflösung einer Verbindung von niedrigem Molekulargewicht in Wasser. Daher dauert es eine Weile, bis die Schicht in eine Gelschicht oder dergleichen, durch ihren gequollenen Zustand für Messungen geeignet, umgewandelt ist. Als Ergebnis hieraus tendiert die für Messungen erforderliche Zeit gleichfalls dazu, lang zu sein. Weiterhin können bestimmte Arten von hydrophilen Verbindungen von hohem Molekulargewicht durch den Kontakt mit einer Flüssigkeit teilweise aufgelöst werden, und daher kann sich die Zusammensetzung einer Probenflüssigkeit verändern, oder es kann nicht in genügendem Maße verhindert werden, dass Verunreinigungen an die Elektroden adsorbiert werden. Diese Phänomene können grundsätzlich auftreten, unabhängig davon, ob die hydrophile Verbindung von hohem Molekulargewicht von natürlichen Substanzen oder synthetischen Produkten abgeleitet ist.

[0013] Als Ergebnis weiterer Forschung fanden die Erfinder der vorliegenden Erfindung heraus, dass die genannten anorganischen Feststoffe durch die Permeation der Probenflüssigkeit leicht aufquellen, so dass Verunreinigungen davon abgehalten werden, die Reagenzschicht zu durchqueren, indem man die Reagenzschicht die anorganischen Feststoffe enthalten lässt, und davon abgehalten werden, sich an die Elektrodenoberfläche anzulagern. Weiterhin sind die anorganischen Feststoffe nicht wie oben beschrieben gegenüber Feuchtigkeitseinflüssen empfindlich. Daher wird ein Nachlassen der Empfindlichkeit verhindert, unabhängig von den Eigenschaften der Probe, wie z. B. dem Hämatokritwert des Blutes, und die Messung kann leicht, schnell und mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden.

[0014] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor kann die Reagenzschicht einschichtig oder ein eine reagenzhaltige Schicht, welche das Reagenz enthält, und eine teilchenhaltige Schicht, welche die ausdehnungsfähigen anorganischen Phyllosilikatteilchen enthält, umfassendes Laminat sein.

[0015] In dem Fall, in dem die Reagenzschicht ein Laminat ist, kann die anorganische Teilchen enthaltende Schicht durch die reagenzhaltige Schicht auf dem Elektrodensystem gebildet werden, aber bevorzugt wird die reagenzhaltige Schicht durch die anorganische Teilchen enthaltende Schicht auf dem Elektrodensystem gebildet, da z. B. die Absorption der Verunreinigungen auf die Elektroden weiter unterdrückt werden kann.

[0016] In der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, dass die Reagenzschicht Aggregate anorganischer Teilchen enthält. Wenn die anorganischen Teilchen in der Form von Aggregaten vorliegen, können Verunreini-

gungen wie z. B. Erythrozyten durch Interaktion mit den Teilchen wirksamer daran gehindert werden, die Reagenzschicht zu durchdringen.

[0017] Weiterhin ist es bevorzugt, dass eine Schicht, die anorganische Teilchen enthält (die Reagenzschicht oder anorganische Teilchen enthaltende Schicht) dadurch gebildet wird, dass man ein Dispersionssystem aufträgt, in dem die anorganischen Teilchen auf dem Elektrodensystem dispergiert sind, und das Dispersionssystem trocknet. Das Dispersionssystem kann z. B. in der Form eines Gels oder eines Sols vorliegen. Die auf diese Weise gebildete Schicht hat eine Struktur, die Aggregate von Teilchen umfasst, und die Schicht scheint wieder ein Gel oder ein Sol zu werden infolge der Permeation der Probenflüssigkeit durch die Schicht und der Quellung der Teilchen durch Wassermoleküle. Die anorganischen Teilchen können leicht in einem Dispersionsmedium wie Wasser dispergiert werden, so dass ein Dispersionssystem mit geeigneter Konzentration wie erforderlich hergestellt wird, auf das Elektrodensystem aufgetragen und getrocknet wird, und auf diese Weise kann leicht ein Film mit der notwendigen Dicke gebildet werden.

[0018] In der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, dass der Gehalt an Teilchen in der Reagenzschicht oder in der teilchenhaltigen Schicht im Bereich von 0,14 bis 14,0 mg/cm² Fläche liegt, und es ist bevorzugt, wenn die Dicke der Schicht im Bereich von 0,05 bis 3 µm liegt.

[0019] Erfindungsgemäß sind die anorganischen Teilchen die Teilchen eines ausdehnungsfähigen Phyllosilikats, und Smektit, ausdehnungsfähiger Glimmer und dergleichen sind bevorzugt. Zu bevorzugten Beispielen des Smektit gehören Hectorit, Saponit und Montmorillonit, und zu bevorzugten Beispielen des ausdehnungsfähigen Glimmers gehören Natriumtetrasilikonfluoridglimmer und Tenorit. Diese anorganischen Teilchen können alleine oder in Kombination mit zwei oder mehr Arten verwendet werden.

[0020] Als Smektit können z. B. ein Produkt namens Labonight XLG und ein Produkt namens Labonight XLS (beide hergestellt von Laboat Industries Co. Ltd.), ein Produkt namens Lucentite SWN und ein Produkt namens Lucentite SWF (hergestellt von CO-OP CHEMICAL Co. Ltd.) und ein Produkt namens Chikisopi W (hergestellt von Kyowa Chemical Industry Co., Ltd.), wobei es sich um kommerziell verfügbaren Hectorit handelt, ein Produkt namens Smecton SA (Kunimine Industries Co. Ltd.), bei dem es sich um kommerziell verfügbaren synthetischen Saponit handelt, ein Produkt namens Kunipia F (Kunimine Industries Co. Ltd.), wobei es sich um ein kommerziell verfügbares aus natürlichem Montmorillonit aufgereinigtes Produkt handelt, oder dergleichen verwendet werden.

[0021] Als ausdehnungsfähiger Glimmer können z. B. ein Produkt namens Na-TS (TOPY INDUSTRIES LIMITED), bei dem es sich um einen kommerziell verfügbaren Natriumtetrasilikonfluoridglimmer handelt, ein Produkt namens Li-TN (TOPY INDUSTRIES LIMITED), bei dem es sich um einen kommerziell verfügbaren Tenorit handelt, oder dergleichen verwendet werden.

[0022] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor ist es bevorzugt, dass die Reagenzschicht weiterhin Teilchen einer wasserunlöslichen Verbindung von hohem Molekulargewicht enthält (nachfolgend als „wasserunlösliche Teilchen“ bezeichnet). Diese wasserunlöslichen Teilchen ermöglichen es, die Verunreinigungen in der Probe daran zu hindern, sich an Elektroden anzulagern. Auch in diesem Fall kann die Reagenzschicht eine Einzelschicht oder ein Laminat sein. Im Fall eines Laminates ist es bevorzugt, dass die wasserunlöslichen Teilchen in der reagenzhaltigen Schicht enthalten sind, jedoch ist die Erfindung nicht darauf beschränkt.

[0023] Weiterhin kann außerdem eine wasserunlösliche Teilchen enthaltende Schicht, die die wasserunlöslichen Teilchen enthält, enthalten sein. In diesem Fall kann die Reagenzschicht durch die teilchenhaltige Schicht auf den Elektroden ausgebildet sein, aber es ist bevorzugt, dass die wasserunlösliche Teilchen enthaltende Schicht durch die Reagenzschicht auf den Elektroden ausgebildet ist, da z. B. die Adsorption der Verunreinigungen an die Elektroden weiter verhindert werden kann und der Messgegenstand in der Probe und das Reagenz miteinander leicht reagieren können.

[0024] In dem erfindungsgemäßen Biosensor enthält die wasserunlösliche Verbindung mit hohem Molekulargewicht keine Verunreinigungen, die Elektrolyse verursachen, und sie ist elektrochemisch inaktiv. Insbesondere kann ein Polymer oder ein Copolymer verwendet werden, der mindestens ein Monomer ausgewählt unter Acrylsäure, Methacrylsäure, Maleinsäure, Acrylester, Methacrylsäureester, Maleinsäureester, Styrol und Styrolderivaten enthält. Ein Beispiel für einen von Styrol abgeleiteten Monomer ist Styrol oder Alkylstyrol. Weiterhin können Urethanverbindungen wie Polyurethan und Polyharnstoff, hochmolekulare Polyolefinverbindungen wie Polyethylen und Polypropylen, Polyolefinderivate wie Polyvinylchlorid, Polyamidverbindungen und dergleichen verwendet werden. Zusätzlich zu den oben beschriebenen hochmolekularen Verbindungen können an-

organische Substanzen wie Keramik, z. B. Silicatgel, Tonerde, Zeolith, Apatit, Glas und Alit verwendet werden. Unter diesen ist aufgrund seiner elektrochemischen Inaktivität ein Polymer oder ein Copolymer bevorzugt, der mindestens einen Monomer ausgewählt unter Acrylsäure, Methacrylsäure, Maleinsäure, Acrylester, Methacrylsäureester, Maleinsäureester und einem Styrolderivat enthält, oder eine hochmolekulare Verbindung auf Polyamidbasis. Insbesondere sind Polymethacrylsäure, PMMA, Polystyrol (PS), Polyamid (PA) und dergleichen besonders bevorzugt.

[0025] Zu geeigneten wasserunlöslichen Teilchen gehören ein kommerziell verfügbares Produkt namens Techpolymer bmx-5 (hergestellt von SEKISUI PLASTICS Co. Ltd., PMMA, sphärisch, Partikeldurchmesser 5 µm), ein Produkt namens Ganzpearl GM-0600 (hergestellt von Ganz Kasei Co. Ltd., PMMA, sphärisch, Partikeldurchmesser 6 µm), ein Produkt namens Ganzpearl GS-0805 (hergestellt von Ganz Kasei Co. Ltd., PMMA, quervernetztes PS, Partikeldurchmesser 8 µm), ein Produkt namens Ganzpearl PS-8F (hergestellt von Ganz Kasei Co. Ltd., PMMA, sphärisch, Partikeldurchmesser 0,4 µm), ein Produkt namens Orgasol 2002EXD NAT COS TypeS (hergestellt von Elfatchem Co. Ltd., Nylon, sphäroid, Partikelgröße 10 µm), ein Produkt namens Trefil E-506C (hergestellt von TORAY DOW CORNING SILICONE Co., LTD., quervernetztes Silikon, sphärisch, Partikeldurchmesser 10 µm), ein Produkt namens Saramics SN-E-02 (hergestellt von UBE INDUSTRIES, LTD., Silikonitrid, sphärisch, Partikelgröße 1 µm), ein Produkt namens Gotball (hergestellt von SUZUKI OIL & FATS CO., LTD., Silikat, sphärisch, Partikelgröße 10 µm), ein Produkt namens Glassbeads (hergestellt von Polysciences, inc., Kalkglas, sphärisch, Partikelgröße 3 bis 10 µm) oder dergleichen.

[0026] Der durchschnittliche Partikeldurchmesser der wasserunlöslichen Teilchen liegt im Bereich von 0,1 bis 45 µm, vorzugsweise 0,5 bis 30 µm, besonders bevorzugt 1 bis 20 µm und nochmals ganz besonders bevorzugt 3 bis 15 µm. Wenn der durchschnittliche Partikeldurchmesser 0,1 µm oder mehr beträgt, ist es einfach für eine Probe, in hinreichendem Maß die Reagenzschicht zu durchdringen, und die Empfindlichkeit des Biosensors kann verbessert werden. Wenn der durchschnittliche Partikeldurchmesser 45 µm oder weniger beträgt, kann der Einfluss der Verunreinigung in der Probe in hinreichendem Maße ausgeschlossen werden.

[0027] Der durchschnittliche Partikeldurchmesser kann z. B. dadurch erhalten werden, dass man die wasserunlöslichen Teilchen direkt im Elektronenmikroskop beobachtet und die Partikeldurchmesser misst, um den Durchschnitt zu berechnen. Es gibt keine Beschränkung im Bezug auf die Anzahl der zu messenden Teilchen, aber z. B. beträgt die Zahl 100 oder mehr, und vorzugsweise im Bereich von 100 bis 300.

[0028] Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf die Partikelgrößenverteilung der wasserunlöslichen Teilchen, aber vorzugsweise liegt sie im Bereich von 0,01 bis 100 µm, besonders bevorzugt 0,05 bis 60 µm und nochmals besonders bevorzugt von 0,1 bis 40 µm.

[0029] Als wasserunlösliche Teilchen können sphärische oder sphäroide Teilchen oder sphärische Aggregate von Teilchen verwendet werden, aber es ist bevorzugt, sphärische Teilchen zu verwenden, da die wasserunlösliche Teilchen enthaltende Schicht einheitlich sein und eine passende Dichte behalten kann.

[0030] Weiterhin ist es bevorzugt, dass die wasserunlöslichen Teilchen elektrisch inaktiv sind, und es ist bevorzugt, den Partikeldurchmesser in Übereinstimmung mit den zu entfernenden Verunreinigungen zu verändern und die Merkmale der Teilchenoberflächen zu ändern. Z. B. ist es, wenn es gewünscht wird, die Eigenschaften der wasserunlöslichen Teilchen ins Hydrophobe zu verändern, bevorzugt, aus PS gebildete Teilchen zu verwenden. Wenn es gewünscht ist, die Charakteristika gegenüber PS ins Hydrophile zu verändern, ist es bevorzugt, aus PMMA, PA oder dergleichen gebildete Teilchen zu verwenden. Weiterhin ist es, wenn es gewünscht ist, die Charakteristika zu negativer Ladung zu verändern, bevorzugt, aus PS oder dergleichen, in das eine Carboxylgruppe eingeführt ist, gebildete Teilchen zu verwenden. Wenn es erwünscht ist, die Charakteristika zu positiver Ladung zu verändern, ist es bevorzugt, aus PS oder dergleichen, in das eine Aminogruppe eingeführt ist, gebildete Teilchen zu verwenden.

[0031] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor ist es bevorzugt, wenn eine ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht, die ein oberflächenaktives Mittel enthält, zusätzlich auf der Reagenzschicht ausgebildet ist. Wenn die ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht auf diese Weise vorgesehen ist, wird ein hydrophiler Film auf der Oberfläche der Reagenzschicht gebildet, so dass die Probe und das Reagenz schnell und einheitlich gemischt werden können. Infolge dessen verläuft die Reaktion schnell, und die Reproduzierbarkeit kann verbessert werden.

[0032] Zu Beispielen für oberflächenaktive Substanzen gehören kationische oberflächenaktive Substanzen, anionische oberflächenaktive Substanzen, ampholytische oberflächenaktive Substanzen, nicht-ionische ober-

flächenaktive Substanzen und natürliche oberflächenaktive Substanzen. Unter diesen sind kationische oberflächenaktive Substanzen, nicht-ionische oberflächenaktive Substanzen und natürliche oberflächenaktive Substanzen bevorzugt, und nichtionische oberflächenaktive Substanzen und natürliche oberflächenaktive Substanzen sind besonders bevorzugt. Als natürliche oberflächenaktive Substanzen können z. B. Phospholipide verwendet werden, und Lecithine wie Eidotterlecithin, Sojabohnenlecithin, hydriertes Lecithin und hochreines Lecithin können bevorzugt verwendet werden. Als nicht-ionische oberflächenaktive Substanzen können Polyoxyethylensorbitanfettsäureester wie ein Produkt namens Tween 20, Polyoxyethylenalkylether wie ein Produkt namens Triton X-100, Polyoxyethylenphenylalkylether wie ein Produkt namens Triton X-405 oder dergleichen verwendet werden. Unter diesen ist Phospholipid besonders bevorzugt, und Lecithin wie z. B. hochreines Lecithin ist in höchstem Maße bevorzugt.

[0033] In dem erfindungsgemäßen Biosensor können als Elektroden beliebige Elektroden verwendet werden, solange sie eine Reaktion zwischen dem Messgegenstand und der Probe elektrochemisch detektieren können, und es kann z. B. ein elektrisch leitendes Material verwendet werden. Insbesondere können Goldelektroden, Graphitelektroden, Silberelektroden, Platinelektroden und Palladiumelektroden verwendet werden. Unter diesen sind aufgrund ihrer hervorragenden elektrischen Leitfähigkeiten und chemischen Stabilität Goldelektroden und Graphitelektroden bevorzugt, und Graphitelektroden sind besonders bevorzugt.

[0034] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor gibt es keine bestimmte Begrenzung im Hinblick auf das Reagenz, solange es mit dem zu messenden Gegenstand reagieren kann und die Reaktion elektrochemisch detektiert werden kann, aber es ist bevorzugt, dass das Reagenz z. B. ein Redox-Enzym enthält. Als Enzym können z. B. Redox-Enzyme verwendet werden.

[0035] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor ist es, wenn das Enzym ein Redox-Enzym ist, bevorzugt, dass in einer Reaktion des Enzyms ein Elektronenakzeptor enthalten ist. Das Redox-Enzym kann in Abhängigkeit von dem zu messenden Objekt passend festgelegt werden. Insbesondere können Glukoseoxidase, Pyranoseoxidase, Glukosedehydrogenase, Lactatoxidase, Lactatdehydrogenase, Fructosedehydrogenase, Galactoseoxidase, Cholesteroxidase, Cholesteroldhydrogenase, Alkoholoxidase, Alkoholdehydrogenase, Bilirubinoxidase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Aminosäuredehydrogenase, Formiatdehydrogenase, Glyceroldehydrogenase, Acyl-CoA-Hydrogenase, Cholinoxidase, 4-Hydroxybenzoesäurehydroxylase, Maleinsäuredehydrogenase, Sarcosinoxidase, Uricase und dergleichen verwendet werden.

[0036] Als Elektronenakzeptor können Kaliumferricyanid, p-Benzochinon und seine Derivate, Phenanzinmethosulfat, Indophenol, Indophenolderivate wie 2,6-Dichlorphenolindophenol, Kalium- β -Naphthochinon-4-sulfonat, Ferrocen, Ferrocene (Ferrocenderivate) wie Ferrocencarbonsäure, Osmiumkomplexe, Rutheniumkomplexe, NAD^+ , NADP^+ , Pyrrolochinolinchinine (PQQ), Methyleneblau und dergleichen verwendet werden. Unter diesen sind Kaliumferrocyanid, Ferrocen, Osmiumkomplexe, NAD^+ , NADP^+ und dergleichen bevorzugt. Art und Kombination dieser Reagenzien können in Abhängigkeit von dem zu messenden Gegenstand passend festgelegt werden.

[0037] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor gibt es keine Beschränkung im Hinblick auf die zu messenden Proben, aber die vorliegende Erfindung ist z. B. nützlich für Proben, die Verunreinigungen wie lösliche Bestandteile, unlösliche Bestandteile, feste Bestandteile und dergleichen enthalten. Zu Beispielen für die Verunreinigungen gehören Proteine, Lipide, Saccharide und Blutzellen. Als spezielle Beispiele der Proben können biologische Proben wie Vollblut, Blutplasma, Blutserum, Sputum, Urin und Liquor cerebrospinalis, Getränke wie Saft, Speisen wie Sojasoße und Soße, Abwasser, Regenwasser, Wasser für ein Schwimmbad und dergleichen verwendet werden. Unter diesen sind Vollblut, Blutplasma, Sputum, Liquor cerebrospinalis und dergleichen bevorzugt, und Vollblut ist besonders bevorzugt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0038] [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Darstellung eines Beispiels eines erfindungsgemäßen Biosensors.

[0039] [Fig. 2](#) ist eine Querschnittsdarstellung des Biosensors.

[0040] [Fig. 3](#) ist eine Querschnittsdarstellung, die ein anderes Beispiel eines erfindungsgemäßen Biosensors zeigt.

[0041] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, das die Relation zwischen der Glukosekonzentration und der Stromstärke in einem Beispiel der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0042] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, das die Relation zwischen dem Hämatokritwert und der Stromstärke in dem Beispiel zeigt.

Beste Ausführung der Erfindung

[0043] Nachfolgend werden Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung detaillierter beschrieben.

(Ausführungsform 1)

[0044] Die [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) zeigen ein Beispiel eines erfindungsgemäßen Biosensors. [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Darstellung, die den Biosensor schematisch zeigt, und [Fig. 2](#) ist eine Querschnittsansicht, aufgenommen entlang der Linie I-I aus [Fig. 1](#).

[0045] Wie in den Zeichnungen zu sehen, umfasst dieser Biosensor **1** ein Substrat **11**, ein Elektrodensystem einschließlich einer Arbeitselektrode **12** mit einem Leitungsteil **12a** und zwei Gegenelektroden **13** mit den Leitungsteilen **13a**, eine teilchenhaltige Schicht **21**, eine reagenzhaltige Schicht **22**, einen Platzhalter **17** und eine Abdeckung **19**. Ein Detektionsteil **15** ist an einem Endteil (auf der rechten Seite in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)) des Substrates **11** vorgesehen, die zwei Gegenelektroden **13** und die Arbeitselektrode **12** sind alternierend parallel zur Breitseite des Substrates **11** auf dem Detektionsteil **15** angeordnet. Die aus dem Detektionsteil **15** herausgeführten Elektroden sind auf solche Weise auf dem Substrat **11** angeordnet, dass die Elektroden abknicken, bevor sie die Leitungsteile **12a** und **13a** des Endteils erreichen (in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) links). Die Leitungsteile **13a**, von denen jeder ein Ende der Gegenelektrode **13** ist, sind auf entgegengesetzten Seiten auf der Breitseite des Endteils (links in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)) des Substrates **11** angeordnet, und Leitungsteil **12a**, der ein Ende der Arbeitselektrode **12** ist, ist in der Mitte der breiten Richtung angeordnet. Der isolierende Teil **14** ist zwischen der Arbeitselektrode **12** und der Gegenelektrode **13** ausgebildet. Eine Isolationsschicht **16** ist auf einem solchen Elektrodensystem ausgebildet, mit Ausnahme der Leitungsteile **12a** und **13a** und des Detektionsteils **15**. Eine anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** und die Reagenz enthaltende Schicht **22** sind in dieser Reihenfolge auf den Detektionsteil **15** laminiert, auf dem die Isolationsschicht **16** nicht ausgebildet ist. Ein U-förmiger Platzhalter **17**, der eine Öffnung **18** an einer Stelle, die dem Detektionsteil **15** entspricht, besitzt, ist auf der Isolationsschicht **16** angeordnet. Eine Abdeckung **19**, die einer Aussparung **20** an einer Stelle des Teils, die der Öffnung **18** entspricht, ist auf dem Platzhalter **17** angeordnet. In diesem Biosensor **1** dient ein Freiraum, der sich im Bereich der Öffnung **18** befindet und von der Reagenz enthaltenden Schicht **22** und der Abdeckung **19** auf beiden Seiten abgedeckt wird, als Probenreservoir mit Kapillarstruktur. Die Aussparung **20** dient als Luftloch zum Einsaugen einer Probe durch Kapillareffekt.

[0046] Die Größe des Biosensors **1** ist nicht auf einen bestimmten Wert begrenzt und kann nach Wunsch gewählt werden, in Abhängigkeit von der zuzuführenden Probenmenge. Z. B. kann die Gesamtlänge **15** bis 40 mm betragen, die Gesamtbreite kann 5 bis 15 mm betragen, die maximale Dicke kann 400 bis 500 µm betragen und die minimale Dicke kann 100 bis 200 µm betragen.

[0047] Die Größe der anorganische Teilchen enthaltenden Schicht **21** beträgt z. B. 5 bis 10 mm in der Länge, 0,5 bis 1,5 mm in der Breite und 0,05 bis 5 µm in der Dicke. Die Größe der reagenzhaltigen Schicht **22** beträgt z. B. 5 bis 10 mm in der Länge und 0,5 bis 1,5 mm in der Breite. Die Dicke der isolierenden Schicht **16** beträgt z. B. 10 bis 50 µm. Die Dicke des Platzhalters **17** beträgt z. B. 50 bis 200 µm. Die Dicke der Abdeckung **19** beträgt z. B. 10 bis 300 µm. Der Durchmesser der Aussparung **20** beträgt z. B. 0,5 bis 1,5 mm. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass die „Länge“ jedes einzelnen Teils sich auf die Länge in der Längsrichtung bezieht und die „Breite“ sich auf die Länge in der Breitenrichtung bezieht.

[0048] Der Gehalt der anorganischen Teilchen in der anorganische Teilchen enthaltenden Schicht **21** kann wie erforderlich festgelegt werden in Abhängigkeit von Art oder Menge einer zuzuführenden Probe, der Fläche des Messteils **15** oder dergleichen.

[0049] Z. B. ist, wenn die anorganischen Teilchen Smektit sind, der Gehalt pro cm² vorzugsweise im Bereich von 0,14 bis 14 mg, besonders bevorzugt im Bereich von 0,28 bis 8,4 mg. Wenn der Gehalt pro cm² 0,14 mg oder mehr beträgt, werden z. B. Verunreinigungen wie Blutzellen und Proteine im Blut in höherem Maße daran gehindert, die Schicht zu durchqueren. Wenn der Gehalt pro cm² 14 mg oder weniger beträgt, wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Elektroden hervorragend, und die Stromempfindlichkeit wird noch besser.

[0050] Die Menge an anorganischen Partikeln pro cm² hängt von der Dicke der anorganische Teilchen enthaltenden Schicht **21** ab, und die Dicke der Schicht liegt vorzugsweise im Bereich von 0,05 bis 5 µm, wie oben

beschrieben.

[0051] Der Gehalt des Reagenz in der reagenzenthaltenden Schicht **22** ist nicht auf einen bestimmten Wert beschränkt und kann in Abhängigkeit von der Art des Reagenz, der Art oder Menge der zuzuführenden Probe oder dergleichen passend festgelegt werden. Spezifischer beträgt, wenn GOD als Enzym und Kaliumferricyanid als Elektronenakzeptor verwendet werden, die Menge an GOD pro cm^2 vorzugsweise von 0,2 bis 100 Einheiten, und besonders bevorzugt 0,4 bis 30 Einheiten, und die Menge an Kaliumferricyanid pro cm^2 liegt vorzugsweise im Bereich von 0,4 bis 3,6 mg, und besonders bevorzugt von 0,6 bis 2,4 mg.

[0052] Wenn die Menge an Kaliumferricyanid pro cm^2 0,4 mg oder mehr beträgt, kann der Bereich, in dem die Glukosekonzentration gemessen werden kann, breit sein. Wenn die Menge pro cm^2 3,6 mg oder weniger beträgt, treten in der gebildeten reagenzenthaltenden Schicht keine Sprünge auf, und weitere hervorragende Messungen können durchgeführt werden.

[0053] Solch ein Biosensor **1** kann z. B. auf die folgende Weise hergestellt werden. Zuerst wird ein Substrat **11** hergestellt, auf dem die Elektroden und dergleichen gebildet werden können. Das Substrat **11** besteht vorzugsweise aus einem elektrisch isolierenden Material, wie z. B. Kunststoff, Glas, Papier und Keramik. Zu Beispielen für Kunststoffe gehören Polyethylenterephthalat (PET), PS, PMMA, Polypropylen (PP), Acrylharz und Glasepoxid.

[0054] Als nächstes wird auf dem Substrat **11** das Elektrodensystem einschließlich der Arbeitselektrode **12** und der Gegenelektrode **13** gebildet. Als Elektroden sind Goldelektroden, Graphitelektroden oder dergleichen bevorzugt, wie oben beschrieben, und die Elektroden können in Abhängigkeit vom Typ durch ein bekanntes Verfahren hergestellt werden, wie z. B. durch Beschichten, Schablonendruck oder ein Verdampfungsverfahren.

[0055] Die Goldelektroden können z. B. durch ein Verdampfungsverfahren, Galvanisierung, Aufbringen von Goldfolie oder dergleichen hergestellt werden. Das Verdampfungsverfahren ist ein z. B. auf die folgende Weise durchzuführendes Verfahren. Gold wird auf einer Schicht aus Kunststoff wie z. B. PET durch z. B. Ionenplating bei einem Vakuumgrad von $1,33 \times 10^{-4}$ Pa, einer Eingangsleistung von 300 W und einer Rate von 5×10^{-1} nm/sec (5 Å/sec) 2 min lang abgelagert. Dann wird die auf dem Kunststoff abgelagerte Goldfoliensicht mit einem Überlappungsschneidegerät in der Form einer dünnen Linie geschnitten. Somit dient der Schnitt in Form einer dünnen Linie als isolierender Teil **14**, so dass die Arbeitselektrode **12** und die Gegenelektrode **13** gebildet werden können.

[0056] Alternativ können Graphitelektroden z. B. durch Verfahren zum Schablonendruck, Beschichtung oder Galvanisierung von Graphittusche auf dem Substrat **11** gebildet werden.

[0057] Es ist bevorzugt, dass die Oberflächen der Elektroden so behandelt werden, dass sie hydrophil sind, bevor eine Reagenzschicht **22**, wie später beschrieben, auf dem Detektionsteil **15** gebildet wird. Somit werden die hydrophoben Elektrodenoberflächen hydrophil gemacht, was eine einheitliche Bildung der Reagenzschicht erleichtert.

[0058] Das Verfahren zur hydrophilisierenden Behandlung kann in Abhängigkeit von dem Typ der Elektroden passend festgelegt werden. Wenn die Elektroden z. B. Goldelektroden sind, können sie in eine hydrophile Lösung wie eine Mercaptoethanolösung und eine Mercaptoethanolaminlösung eingetaucht, dann gewaschen und getrocknet werden.

[0059] Als Lösungsmittel für die hydrophile Lösung können z. B. organische Lösungsmittel wie Ethanol, Butanol, Aceton und Tetrahydrofuran verwendet werden. Die Konzentration der hydrophilen Lösung liegt z. B. im Bereich von 0,01 bis 100 mmol/l, vorzugsweise 0,05 bis 50 mmol/l. Zum Waschen können organische Lösungsmittel wie z. B. Ethanol, Methanol, Butanol, Aceton und Tetrahydrofuran und Waschlösungen wie gereinigtes Wasser verwendet werden.

[0060] Im Fall, dass die Elektroden Graphitelektroden sind, kann die hydrophilisierende Behandlung dadurch durchgeführt werden, dass man z. B. die Elektroden in ein oberflächenaktives Mittel eintaucht und dann mit gereinigtem Wasser wäscht.

[0061] Als nächstes wird die Isolationsschicht **16** auf dem Substrat, auf dem das Elektrodensystem gebildet wird, hergestellt. Die Isolationsschicht **16** kann z. B. dadurch gebildet werden, dass man eine isolierende Paste

auf die Elektroden aufdruckt und einer Wärmebehandlung unterzieht.

[0062] Die isolierende Paste kann z. B. dadurch hergestellt werden, dass man ein isolierendes Harz in einem Lösungsmittel auflöst. Zu Beispielen für isolierende Harze gehören Polyester, Butyralharz und Phenolharz. Zu Beispielen für das Lösungsmittel gehören Carbitolacetat und Diester dibasischer Säuren (DBE-Lösungsmittel). Die Konzentration des isolierenden Harzes in der Paste liegt vorzugsweise im Bereich von 65 bis 100 Gew.-%, und besonders bevorzugt 75 bis 90 Gew.-%, und nochmals ganz besonders bevorzugt 80 bis 85 Gew.-%.

[0063] Weiterhin kann die Isolationsschicht **16** außer durch das oben beschriebene Druckverfahren durch Beschichtung, Aufbringen eines Films, Ätzung oder andere Verfahren gebildet werden.

[0064] Als nächstes wird die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** auf der Detektionsschicht **15**, auf der die Isolationsschicht **16** nicht gebildet wurde, hergestellt. Diese Schicht kann z. B. dadurch gebildet werden, dass man ein Dispersionssystem herstellt, in dem die anorganischen Teilchen dispergiert sind, das Dispersionssystem in den Detektionsteil **15** gießt und trocknet.

[0065] Es ist bevorzugt, das Dispersionssystem eine Stunde lang oder länger, besonders bevorzugt 5 Stunden lang oder länger, zu rühren, um zu verhindern, dass die dispergierten anorganischen Teilchen sich absetzen. Aus dem gleichen Grund ist es bevorzugt, während der Verwendung das Rühren fortzusetzen. Zu Beispielen für das Dispersionsmedium des Dispersionssystems gehören Wasser, Alkohol, N,N-Dimethylformamid (DMF), und Dimethylsulfoxid (DMSO). Unter diesen ist ultrareines Wasser bevorzugt. Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf die Konzentration der anorganischen Teilchen in dem Dispersionssystem.

[0066] Es gibt keine spezifische Beschränkung im Hinblick auf die Verfahren zur Trocknung. Z. B. können natürliche Aushärtung, Lufttrocknung, Trocknung unter verringertem Druck, Lyophilisation unter verringertem Druck oder dergleichen verwendet werden. Diese Verfahren können kombiniert werden. Als Bedingungen für diese Behandlung liegt die Temperatur vorzugsweise im Bereich von 4 bis 60 °C und die relative Feuchtigkeit liegt vorzugsweise im Bereich von 5 bis 40 %.

[0067] Als nächstes wird die reagenzenthaltende Schicht **22** auf der die anorganischen Teilchen enthaltenden Schicht **21** gebildet.

[0068] Die reagenzenthaltende Schicht **22** kann gebildet werden, indem man eine Lösung herstellt, die das Reagenz enthält, diese Lösung auf die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** gießt und trocknet. Als Reagenz können die oben beschriebenen verwendet werden.

[0069] Die Lösung kann hergestellt werden, indem man das Reagenz in einem Lösungsmittel auflöst. Es gibt keine spezifischen Beschränkungen im Hinblick auf das Lösungsmittel. Z. B. können Wasser, Puffer oder organische Lösungsmittel wie z. B. Ethanol, Methanol, Butanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Tetrahydrofuran verwendet werden. Zu Beispielen für den Puffer gehören Phosphatpuffer, Citratpuffer, Acetatpuffer, Tris-HCl-Puffer und Goods Puffer. Der pH-Wert desselben liegt vorzugsweise im Bereich von 4 bis 9, insbesondere bevorzugt von 5 bis 8. Zu Beispielen für das Wasser gehören gereinigtes Wasser, destilliertes Wasser und ultrareines Wasser. Unter diesen ist ultrareines Wasser bevorzugt, da ein Biosensor, der kaum Verunreinigungen enthält und eine hohe Genauigkeit hat, hergestellt werden kann.

[0070] Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf die Konzentration des Reagenz in der Lösung. Z. B. kann die Konzentration im Fall eines Enzyms im Bereich von 10 bis 10'000 KU/L Einheiten/l, insbesondere bevorzugt 50 bis 5'000 KU/L liegen. Im Fall, dass ein Elektronenakzeptor enthalten ist, liegt die Konzentration vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 10 mol/l und insbesondere bevorzugt von 0,05 bis 5 mol/l.

[0071] Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf das Verfahren zum Gießen der Lösung auf die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21**, und es kann z. B. ein Verfahren mit einem automatisch angetriebenen Spender oder dergleichen verwendet werden.

[0072] Die Menge der zu gießenden Lösung kann in Abhängigkeit von der Größe der zu bildenden reagenzhaltigen Schicht, dem Gehalt des Reagenz, der Menge der Probe oder dergleichen passend festgelegt werden.

[0073] Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf die Verfahren zur Trocknung der gegossenen Lösung. Z. B. können natürliche Aushärtung, Lufttrocknung, Trocknung unter verringertem Druck, Lyophilisation unter ver-

ringertem Druck oder dergleichen verwendet werden. Diese Verfahren können kombiniert werden.

[0074] Im Fall von Heißlufttrocknung liegt die Temperatur z. B. im Bereich von 10 bis 60 °C, die relative Feuchtigkeit von 5 bis 40 % und die Zeit im Bereich von 1 bis 30 Minuten.

[0075] Als nächstes wird der Platzhalter **17** auf der Isolationsschicht **16** angeordnet. Wie in den Zeichnungen dargestellt, hat der Platzhalter **17** die Öffnung **18** an der Stelle, die der reagenzhaltigen Schicht **22** entspricht.

[0076] Der Platzhalter **17** kann z. B. aus einem Harzfilm oder einem Harzband hergestellt werden. Wenn er ein zweiseitiges Band ist, kann die nachfolgend beschriebene Abdeckung leicht angeheftet werden. Weiterhin kann der Platzhalter z. B. durch Widerstandsdruck oder andere Verfahren gebildet werden.

[0077] Als nächstes wird die Abdeckung **19** auf dem Platzhalter **17** angeordnet. Es gibt keine Beschränkung im Hinblick auf das Material der Abdeckung **19**. Es können z. B. verschiedene Kunststoffe verwendet werden, bevorzugt transparentes Harz wie z. B. PET.

[0078] Es ist bevorzugt, dass der so hergestellte Biosensor **1**, wenn er über längere Zeiträume hinweg gelagert wird, luftdicht zusammen mit einem Trocknungsmittel, wie einem Molekularsieb, Silikatgel und Calciumoxid verpackt wird, so dass er nicht von Feuchtigkeit beeinflusst wird.

[0079] Der Biosensor **1** kann in Verbindung mit einer Messausrüstung verwendet werden, die z. B. mit Mitteln zur Anlegung einer vorbestimmten Spannung über einen bestimmten Zeitraum hinweg, Mitteln zur Messung eines von dem Biosensor übertragenen elektrischen Signals, Mitteln zur Umrechnung des elektrischen Signals in die Konzentration des Messgegenstands und anderen Mitteln ausgestattet ist.

[0080] Die Verwendung des Biosensors **1** wird anhand eines Beispiels, in dem die Probe Vollblut ist, der Messgegenstand Glukose ist und die Reagenzien GOD und Kaliumferricyanid sind, beschrieben.

[0081] Als erstes wird die Vollblutprobe in Kontakt mit einem Ende der Öffnung **18** des Biosensors **1** gebracht. Diese Öffnung **18** hat eine Kapillarstruktur, wie oben beschrieben, und die Aussparung **20** wird in der Abdeckung **19** an dem dem anderen Ende desselben entsprechenden Ort bereitgestellt, so dass die Probe durch den Kapillareffekt eingesaugt wird. Die eingesaugte Probe durchdringt die reagenzhaltige Schicht **22**, die auf dem Detektionsteil **15** bereitgestellt ist. Dann löst die Probe GOD und Kaliumferricyanid in der reagenzhaltigen Schicht **22**, und die Reagenzien reagieren mit der Glukose in der Probe. Die Glukose in der Probe wird von der GOD oxidiert, und das Kaliumferricyanid wird von den Elektronen reduziert, die durch die Oxidationsreaktion verschoben worden sind, so dass Kaliumferrocyanid (Ferrocyanidionen) gebildet wird.

[0082] Diese Reaktionslösung erreicht die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21**, welches die darunter liegende Schicht ist, dringt rasch zwischen den Aggregaten der anorganischen Teilchen ein, und erreicht die Elektrodenoberfläche, wobei sie die anorganischen Teilchen zum Quellen bringt, ohne eine übermäßige thermodynamische Belastung zu bewirken. Hingegen können die Verunreinigungen wie z. B. in der Reaktionslösung enthaltene Blutzellen, nicht zwischen den gequollenen anorganischen Teilchen hindurchwandern, so dass sie in der anorganischen Teilchen enthaltenden Schicht **21** zurückgehalten und davon abgehalten werden, an die Elektrodenoberfläche zu adsorbieren.

[0083] Dann wird nach einer vorher festgelegten Zeit seit der Zufuhr der Blutprobe zwischen den Gegenelektroden **13** und der Arbeitselektrode **12** durch Mittel zum Anlegen einer Spannung eine Spannung angelegt, so dass das reduzierte Kaliumferrocyanid (Ferrocyanidionen), das in Kontakt mit den Elektroden steht, elektrochemisch zu Kaliumferricyanid oxidiert wird, und zu diesem Zeitpunkt wird der Oxidationsstrom durch Mittel zur Messung des elektrischen Signals über den Leitungsteil **12a** der Arbeitselektrode **12** detektiert. Der Spitzenwert des Oxidationsstroms ist proportional zu der Glukosekonzentration in der Probe, so dass die Glukosekonzentration in der Probe ermittelt werden kann, indem man durch Mittel zur Berechnung den Oxidationsstrom in die Glukosekonzentration umrechnet.

[0084] In einem solchen Biosensor können die Verunreinigungen der Probe nicht an die Elektroden absorbiert werden, wie oben beschrieben, so dass eine Verschlechterung der Empfindlichkeit verhindert wird und die Messung mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden kann.

[0085] Bei dem Biosensor **1** kann z. B. die reagenzhaltige Schicht **22** außerdem die oben beschriebenen wasserunlöslichen Teilchen enthalten. Der Gehalt an wasserunlöslichen Teilchen in der Reagenzschicht kann in

Abhängigkeit von deren Typ, dem Typen oder der Menge der Probe oder dergleichen passend festgelegt werden.

[0086] Solch eine anorganische Teilchen enthaltende Schicht kann auf die gleiche Weise wie oben beschrieben gebildet werden, indem man eine Lösung herstellt, die die Reagenzien und die wasserunlöslichen Teilchen enthält.

[0087] In dieser Ausführung ist ein Beispiel eines Biosensors zur Messung von Glukose dargestellt worden, aber die vorliegende Erfindung ist nicht darauf beschränkt. Z. B. kann das Reagenz in Abhängigkeit von dem Messgegenstand passend festgelegt werden. Insbesondere können z. B. Lactatoxidase für einen Biosensor für Milchsäure, Alkoholoxidase für einen Biosensor für Alkohol, Cholesterinoxidase für einen Biosensor für Cholesterin oder dergleichen verwendet werden. Für einen Biosensor für Glukose können z. B. Pyranoseoxidase oder Glukosedehydrogenase verwendet werden.

(Ausführungsform 2)

[0088] Diese Ausführungsform ist ein Beispiel des erfindungsgemäßen Biosensors, die eine oberflächenaktive Substanzen enthaltende Schicht auf der Reagenz enthaltenden Schicht hat. [Fig. 3](#) ist eine Querschnittsdarstellung dieses Biosensors. In [Fig. 3](#) sind die gleichen Bestandteile wie die in [Fig. 2](#) mit den gleichen Bezugsziffern gekennzeichnet.

[0089] Wie in [Fig. 3](#) dargestellt, hat der Biosensor **3** die gleiche Struktur wie in Ausführungsform 1, mit der Ausnahme, dass eine ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht **31** auf die reagenzhaltige Schicht **22** laminiert ist. Somit können, wenn die ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht **31** bereitgestellt wird, nicht nur die Probe und die Reagenzien schnell und gleichförmig gemischt werden, sondern es kann auch die Probenflüssigkeit in der Kapillarstruktur schneller und zuverlässiger eingesaugt werden.

[0090] Der Gehalt an oberflächenaktivem Mittel in der das oberflächenaktive Mittel enthaltenden Schicht **31** kann in Abhängigkeit von der Art oder Menge der zugeführten Probe, der Art des oberflächenaktiven Mittels oder dergleichen passend festgelegt werden.

[0091] Die das oberflächenaktive Mittel enthaltende Schicht **31** kann z. B. dadurch gebildet werden, dass man eine Lösung herstellt, die die verschiedenen oben beschriebenen oberflächenaktiven Mittel enthält, die Lösung auf die reagenzhaltige Schicht **22** gießt und trocknet. Es gibt keine Begrenzung im Hinblick auf die Konzentration der das oberflächenaktive Mittel enthaltenden Schicht. Z. B. liegt die Konzentration vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 1,0 Gew.-%, insbesondere von 0,3 bis 0,6 Gew.-%. Als Lösungsmittel für die Lösung können 1-Butanol, 2-Butanol, Toluol, Ethanol, Methanol, DMF, DMSO oder dergleichen verwendet werden. Insbesondere ist es, wenn Eidotterlecithin als oberflächenaktives Mittel verwendet wird, bevorzugt, dass 1-Butanol als Lösungsmittel verwendet wird und die Konzentration des oberflächenaktiven Mittels von 0,3 bis 0,5 Gew.-% beträgt.

Beispiele

(Beispiel 1)

[0092] Ein Biosensor zur Messung von Glukose, der die gleiche Struktur wie der in [Fig. 3](#) dargestellt hat, wurde auf die folgende Weise hergestellt.

[0093] Zuerst wurde eine PET-Schicht (hergestellt von Toray Industries Inc.) als Substrat **11** hergestellt, und einem Graphitelektrodensystem einschließlich einer Arbeitselektrode und Gegenelektroden, von denen jedes einen Leitungsteil hatte, wurde auf der Oberfläche davon gebildet. Die Graphitelektroden wurden durch Schablonendruck gebildet.

[0094] Als nächstes wurde ein isolierendes Polyesterharz in dem Lösungsmittel Carbitolacetat aufgelöst, so dass die Konzentration 75 Gew.-% betrug, um eine Isolationspaste herzustellen, und die Isolationspaste wurde durch Schablonendruck auf das Elektrodensystem aufgetragen. Der Druck wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Siebweite 300 Mesh und Walzendruck von 40 kg, und die zum Druck verwendete Menge betrug 0,002 ml/cm² der Elektrodenfläche. Auf den Detektionsteil **15** und die Leitungsteile **12a** und **13a** wurde nicht gedruckt. Dann wurde eine Wärmebehandlung durchgeführt, und auf diese Weise wurde die Isolationschicht **16** gebildet. Die Wärmebehandlung wurde 60 min lang bei einer Temperatur von 90 °C durchgeführt.

[0095] Dann wurde die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** auf dem Detektionsteil **15** gebildet, auf dem die Isolationsschicht **16** nicht gebildet worden war. Zuerst wurde ein Dispersionssystem (mit einer Konzentration von 0,2 Gew.-%), in dem Smektit (Produktname Labnight XLG; Laboat Industries Co.) in gereinigtem Wasser dispergiert war, hergestellt, und 4 µl des Dispersionssystems wurden in den Detektionsteil **15** abgegeben. Dann wurde unmittelbar im Anschluss daran 10 min lang eine Trocknungsbehandlung bei 50 °C durchgeführt, und auf diese Weise wurde die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** gebildet.

[0096] Weiterhin wurde die reagenzhaltige Schicht **22** auf der die anorganischen Teilchen enthaltenden Schicht **21** gebildet. Als erstes wurden GOD und Kaliumferricyanid gereinigtem Wasser zugesetzt und bei RT gerührt, so dass eine Reagenzlösung hergestellt wurde, in der sie vollständig gelöst waren. Die Konzentration der GOD betrug 5000 Einheiten/ml, die Konzentration des Kaliumferricyanids betrug 3 Gew.-%. Dann wurden 2 µl der Reagenzlösung auf die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** abgegeben, und 10 min lang wurde eine Trocknungsbehandlung bei 50 °C durchgeführt, und auf diese Weise wurde die reagenzhaltige Schicht **22** gebildet.

[0097] Als nächstes wurde die ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht **31** auf der reagenzhaltigen Schicht **22** gebildet. Dies geschah auf die folgende Weise: Zur Herstellung einer Lecithinlösung wurde Eidotterlecithin in 1-Butanol auf eine Konzentration von 0,5 Gew.-% aufgelöst, und 2 µl der Lecithinlösung wurden auf die reagenzhaltige Schicht **22** geträufelt, auf diese Weise wurde die ein oberflächenaktives Mittel enthaltende Schicht **31** gebildet.

[0098] Ein PET-Platzhalter **17** (von Sony Chemicals Corporation hergestellt) mit einer Öffnung **18** an der der das oberflächenaktive Mittel enthaltenden Schicht **31** entsprechenden Stelle wurde auf der Isolationsschicht **16** angeordnet. Weiterhin wurde eine PET-Abdeckung **19** (hergestellt von Toray Industries Inc.) mit einer Aussparung **20**, die als Luftloch diente, auf dem Platzhalter angeordnet, und auf diese Weise wurde ein Biosensor hergestellt.

(Vergleichsbeispiel 1)

[0099] Ein Biosensor zur Messung von Glukose wurde auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 hergestellt, mit den folgenden Ausnahmen. Anstelle die anorganische Teilchen enthaltende Schicht **21** auf dem Detektionsteil **15** mit Smektit zu bilden, wurden 4 µl einer 0,25 Gew.-% Carboxymethylzellulose enthaltenden Lösung darauf geträufelt, und 10 min lang wurde eine Trocknungsbehandlung bei 50 °C durchgeführt; auf diese Weise wurde eine hochmolekulare Wasserabsorptionsschicht gebildet.

[0100] Die auf die oben beschriebene Weise hergestellten Biosensoren des Beispiels 1 und des Vergleichsbeispiels 1 wurden im Hinblick auf die folgenden Gesichtspunkte getestet.

(Stromstärkemessung in einer Glukoselösung)

[0101] Glukoselösungen mit festgelegten Konzentrationen (100, 200, 300, 400, 500 und 600 mg/100 ml) wurden hergestellt, um als Probenflüssigkeiten verwendet zu werden. Ungefähr 2 µl der Probenflüssigkeit wurden durch den Kapillareffekt in die Öffnung jedes Biosensors eingesaugt und man ließ eine Reaktion 25 sec lang stattfinden. Dann wurde die Stromstärke unter Verwendung eines Potentiostat CV-50W (Produktbezeichnung, hergestellt von BAS Co. Ltd.) zu dem Zeitpunkt, an dem 5 sec lang eine Spannung von 500 mV angelegt wurde, gemessen. [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse.

[0102] In [Fig. 4](#) bezeichnen Kreise die Ergebnisse des Biosensors des Beispiels 1, und Quadrate bezeichnen die Ergebnisse des Biosensors des Vergleichsbeispiels 1.

[0103] Wie in [Fig. 4](#) dargestellt, liefert der Biosensor des Beispiels 1 eine Stromstärke, die etwa 1,2 mal höher ist als die des Biosensors des Vergleichsbeispiels, und er zeigt eine stark korrelierte Beziehung zwischen der Stromstärke und der Glukosekonzentration.

(Einfluss des Hämatokritwerts auf den Biosensor)

[0104] Eine Vollblutprobe mit einem Hämatokritwert von 42 % und einer Glukosekonzentration von 125 mg/100 ml wurde durch Zentrifugation in Blutzellen und Blutplasma aufgetrennt, und sie wurden gemischt, so dass der Hämatokritwert der Probeflüssigkeit auf einen definierten Wert eingestellt wurde (Hämatokrit 20 %, 25 %, 42 % und 70 %). Dann wurde im Hinblick auf jede Probe in der gleichen Weise wie oben beschrieben

die Stromstärke gemessen. **Fig. 5** zeigt die Ergebnisse, wobei die Messwerte als relative Werte (%) im Verhältnis zu der Stromstärke der Probe mit einem Hämatokrit (Ht) von 42 % dargestellt werden, wobei das Ergebnis des Biosensors des Beispiels 1 als 100 % betrachtet wird. In **Fig. 5** bezeichnen Kreise die Ergebnisse des Biosensors des Beispiels 1 und Quadrate die Ergebnisse des Biosensors des Vergleichsbeispiels 1.

[0105] Wie in **Fig. 5** dargestellt, liefert der Biosensor des Beispiels 1 einen im Wesentlichen konstanten Messwert, da er nicht von Erythrozyten oder dergleichen beeinflusst wird, nicht einmal, wenn der Hämatokritwert der Probe sich ändert. Bei dem Biosensor des Vergleichsbeispiels 1 sank hingegen die Stromstärke mit steigendem Hämatokritwert, so dass die Messgenauigkeit fiel.

(Beispiel 2)

[0106] Ein Biosensor zur Messung von Glukose wurde auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 hergestellt, mit der Ausnahme, dass anstelle des Smektit-Dispersionssystems ein wässriges Dispersionssystem (0,2 Gew.-%) aus ausdehnungsfähigen Natriumtetrasilikonfluoridglimmer (Produktname Na-TS; hergestellt von TOPY INDUSTRIES LIMITED) verwendet wurde.

[0107] Die Glukose in den Vollblutproben wurde unter Verwendung der Biosensoren der Beispiele 1 und 2 und des Vergleichsbeispiels 1 gemessen.

[0108] Als Probe wurde Vollblut mit einem Hämatokritwert von 48 % verwendet, und die Stromstärke wurde auf die gleiche Weise wie oben beschrieben gemessen. Als Kontrolle wurde durch Zentrifugation des gleichen Vollblutes erhaltenes Blutplasma hergestellt, und die Stromstärke wurde im Hinblick auf diese Kontrolle gemessen. Alle Vollblutproben und die Plasmaprobe der Kontrolle wurden so hergestellt, dass sie eine Glukosekonzentration von 93 mg/100 ml hatten. Die erhaltene Stromstärke wurde in die folgende Gleichung eingesetzt, um einen relativen Wert (%) im Bezug auf die Stromstärke der Kontrolle als 100 % zu erhalten. Je näher der relative Wert (%) an 100 % ist, desto weniger gilt die Probe als durch Blutzellen beeinträchtigt. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

$$\text{Relativer Wert (\%)} = 100 \times (Y - X)/Y$$

X: Stromstärke einer Vollblutprobe

Y: Stromstärke einer Kontrolle

Tabelle 1

	Material	Relativer Wert
Beispiel 1	ausdehnungsfähiger Glimmer	87,2
Beispiel 2	Smektit	91,8
Vergleichsbeispiel	CMC	78,0

[0109] Wie in Tabelle 1 gezeigt, sind die relativen Werte der beiden Biosensoren der Beispiele 1 und 2 hoch, und die Stromstärken sind nahe an denen der Kontrolle.

[0110] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Biosensoren der Beispiele, die die anorganischen Teilchen enthalten, mit hoher Genauigkeit messen können, ohne von den Unterschieden in den Eigenschaften verschiedener Proben, wie z. B. unterschiedlichen Hämatokritwerten, beeinflusst zu werden.

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0111] Bei dem erfindungsgemäßen Biosensor können Verunreinigungen wie Erythrozyten daran gehindert werden, sich an die Elektroden anzuheften, da die Reagenzschicht anorganische Partikel enthält. Daher kann der Messgegenstand in einer Probe schnell, einfach und mit hoher Genauigkeit gemessen werden. Somit ist der erfindungsgemäße Biosensor z. B. auf dem Gebiet der klinischen Medizin nützlich.

Patentansprüche

1. Biosensor, umfassend ein Substrat, eine ein Reagenz enthaltende Reagenzschicht und ein eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode beinhaltendes Elektrodensystem, wobei das Elektrodensystem auf dem Substrat angeordnet ist, die Reagenzschicht auf dem Elektrodensystem ausgebildet ist und die Reagenzschicht des Weiteren Teilchen eines ausdehnungsfähigen Phyllosilikats umfasst.
2. Biosensor nach Anspruch 1, wobei die Reagenzschicht einschichtig oder ein eine reagenzhaltige Schicht, welche das Reagenz enthält, und eine teilchenhaltige Schicht, welche die Teilchen enthält, umfassendes Laminat ist.
3. Biosensor nach Anspruch 2, wobei die Reagenzschicht ein Laminat ist und die reagenzhaltige Schicht auf dem Elektrodensystem über die teilchenhaltige Schicht ausgebildet ist.
4. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Reagenzschicht Aggregate der Teilchen enthält.
5. Biosensor nach Anspruch 1, wobei das ausdehnungsfähige Phyllosilikat Smektit und/oder ausdehnungsfähiger Glimmer ist.
6. Biosensor nach Anspruch 5, wobei der Smektit Hektorit, Saponit und/oder Montmorillonit ist.
7. Biosensor nach Anspruch 5, wobei der ausdehnungsfähige Glimmer Natriumtetrasiliconfluorid-Glimmer und/oder Tenorit ist.
8. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Gehalt an den Teilchen in der Schicht, welche die Teilchen enthält, im Bereich von 0,14 bis 14 mg pro cm² liegt.
9. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Dicke der Schicht, welche die Teilchen enthält, im Bereich von 0,05 bis 5 µm liegt.
10. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Reagenzschicht des Weiteren Teilchen einer wasserunlöslichen, hochmolekulargewichtigen Verbindung umfasst.
11. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei eine Schicht, die Teilchen einer wasserunlöslichen, hochmolekulargewichtigen Verbindung enthält, auf dem Elektrodensystem über die Reagenzschicht ausgebildet ist.
12. Biosensor nach Anspruch 10 oder 11, wobei die wasserunlösliche, hochmolekulargewichtige Verbindung ein Polymer oder ein Copolymer, das Acrylsäure-, Methacrylsäure-, Maleinsäure-, Acrylester-, Methacrylsäureester-, Maleinsäureester-, Styrol- und/oder Styrolderivat-Monomer enthält, oder eine hochmolekulargewichtige Verbindung auf Polyamid-Basis ist.
13. Biosensor nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der mittlere Teilchendurchmesser der Teilchen der wasserunlöslichen, hochmolekulargewichtigen Verbindung im Bereich von 0,1 bis 45 µm liegt.
14. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei eine tensidhaltige Schicht, welche ein Tensid enthält, des Weiteren auf der Reagenzschicht ausgebildet ist.
15. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Elektroden Goldelektroden, Kohlenstoffelektroden und/oder Silberelektroden sind.
16. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Reagenz ein Redox-Enzym enthält.
17. Biosensor nach Anspruch 16, wobei das Reagenz des Weiteren einen Elektronenakzeptor enthält.
18. Verfahren zur Herstellung eines Biosensors, wobei man:
 - (i) ein eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode auf einem Substrat beinhaltendes Elektrodensystem ausbildet;
 - (ii) eine teilchenhaltige Schicht auf dem Elektrodensystem bildet, wobei die Schicht Teilchen eines ausdehnungsfähigen Phyllosilikats beinhaltet; und

(iii) eine reagenzhaltige Schicht auf der teilchenhaltigen Schicht ausbildet, wobei die teilchenhaltige Schicht ausgebildet wird, indem man eine Dispersionslösung, in der die Teilchen des ausdehnungsfähigen Phyllosilikats dispergiert sind, auf die Elektroden aufträgt und die Dispersionslösung trocknet.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

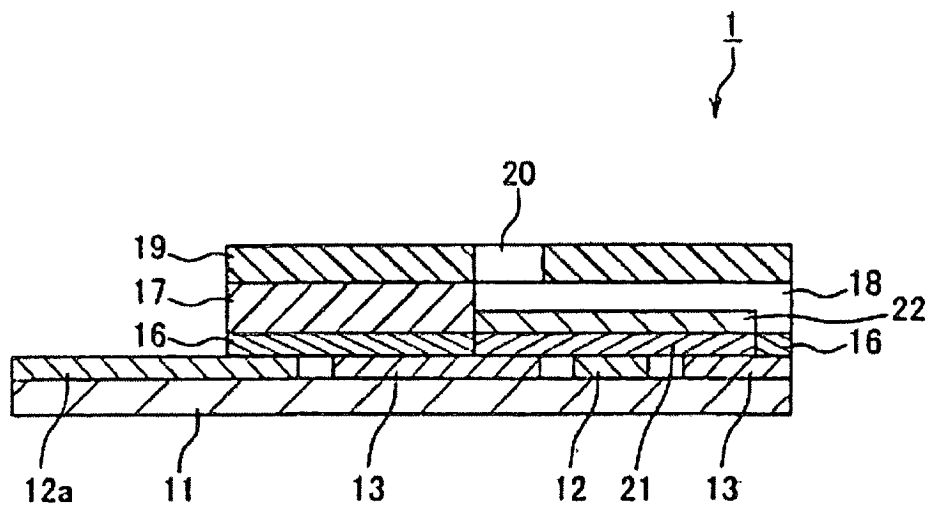


Fig. 2

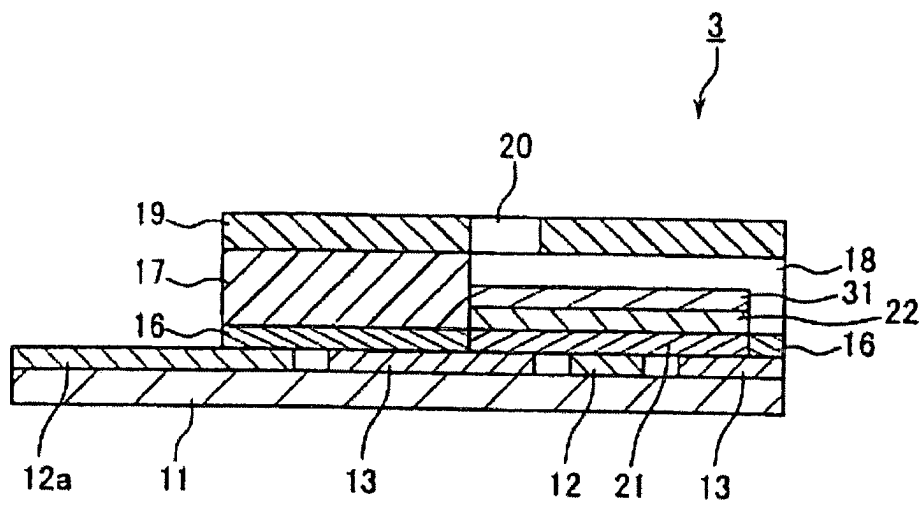
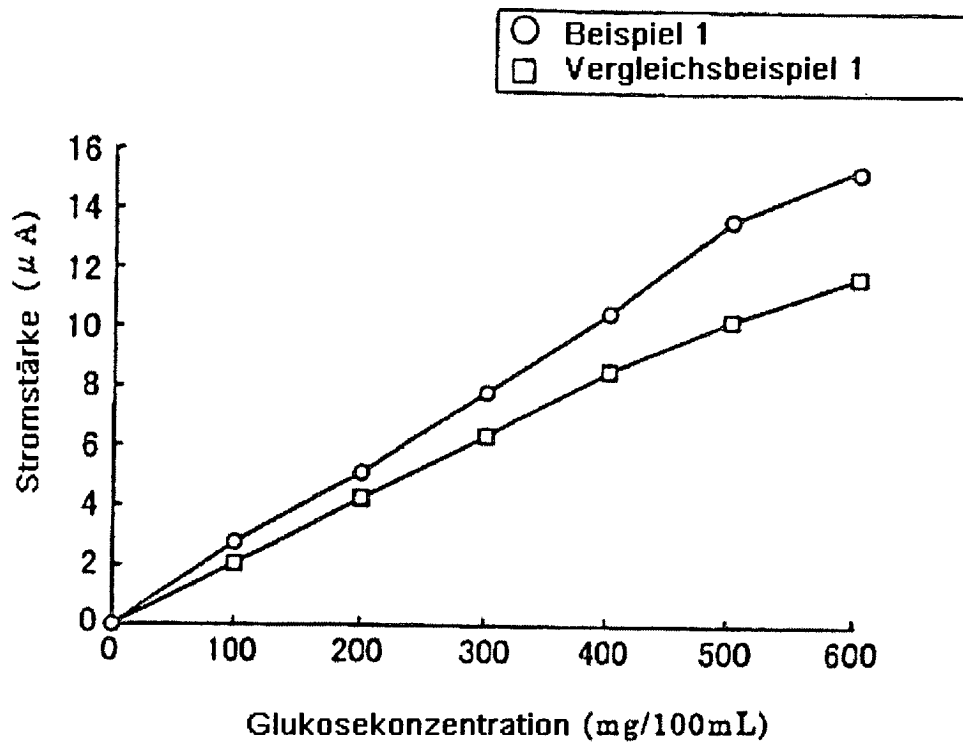
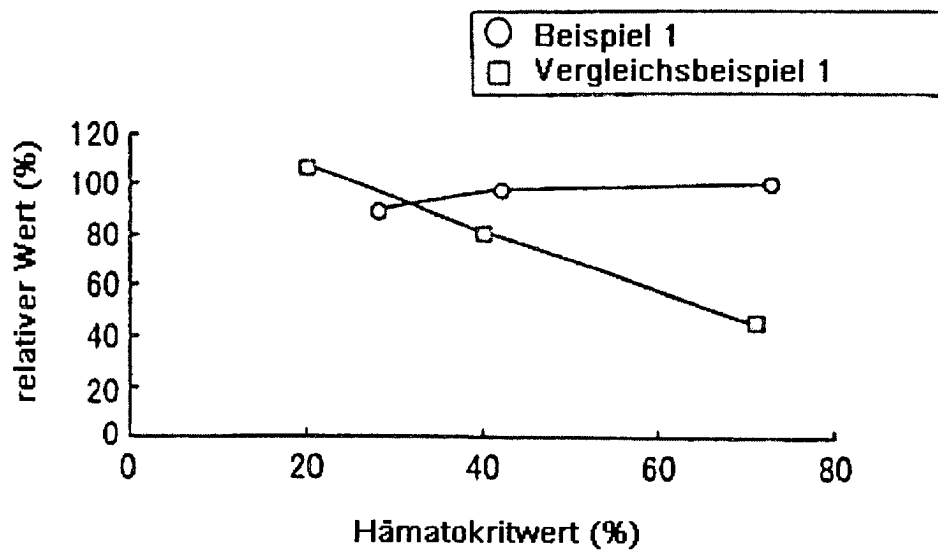


Fig. 3



F i g . 4



F i g . 5