



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103946701 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201280055939. 7

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22) 申请日 2012. 07. 10

代理人 舒艳君 李洋

(30) 优先权数据

2011-252765 2011. 11. 18 JP

(51) Int. Cl.

G01N 27/416 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 14

G01N 27/327 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/004442 2012. 07. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/073074 JA 2013. 05. 23

(71) 申请人 株式会社村田制作所

地址 日本京都府

(72) 发明人 大江秀明 高木纯 横山宪二

平塚淳典 吉田信行 佐佐木典子

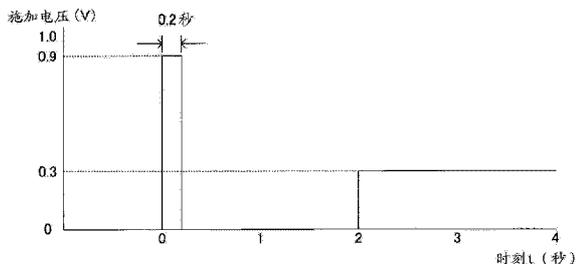
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

物质的测定方法

(57) 摘要

本发明涉及物质的测定方法。提供一种通过降低向作用极施加以对极为基准的测定电位而得到的响应电流所含的电流分量中、与通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流不同的电流分量造成的影响,能够提高对被检体所含的测定对象物质进行定量时的测定精度的技术。由于以脉冲状对作用极施加电位比测定电位高的调整电位,所以能够降低向作用极施加以对极为基准的测定电位而得到的响应电流所含的电流分量中、与通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流不同的电流分量造成的影响,因此能够稳定地计测响应电流,可提高对被检体所含的测定对象物质进行定量时的测定精度。



1. 一种物质的测定方法,使用生物传感器计测氧化电流,来进行测定对象物质的定量,所述生物传感器具有:被供给被检体的腔室、包含作用极和对极的电极系统、以及含有与所述测定对象物质进行特异性反应的酶的反应层,所述氧化电流是通过向所述作用极施加以所述对极为基准的测定电位来氧化还原物质而得到的电流,所述还原物质是通过被供给至所述腔室的被检体所含的所述测定对象物质与所述反应层反应而生成的还原物质,该物质的测定方法的特征在于,

在向所述腔室供给了所述被检体后、对所述作用极施加所述测定电位之前,以所述对极为基准,对所述作用极以脉冲状施加至少 1 次电位比所述测定电位高的调整电位。

2. 根据权利要求 1 所述的物质的测定方法,其特征在于,

所述测定电位是所述还原物质被氧化的氧化电位以上的大小。

3. 根据权利要求 1 或者 2 所述的物质的测定方法,其特征在于,

所述调整电位是比水的分解电压低的电位。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的物质的测定方法,其特征在于,

向所述作用极施加所述调整电位时的脉冲宽度为 30 ~ 750 毫秒。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任意一项所述的物质的测定方法,其特征在于,

在从检测到向所述腔室供给了所述被检体开始经过 1 秒之前,施加所述调整电位。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任意一项所述的物质的测定方法,其特征在于,

在从检测到向所述腔室供给了所述被检体开始经过 1 秒以上之后,施加所述测定电位。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任意一项所述的物质的测定方法,其特征在于,

所述腔室的容量比 $0.6 \mu\text{l}$ 小。

物质的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用生物传感器来进行被检体所含的测定对象物质的定量的物质的测定方法。

背景技术

[0002] 以往,已知有一种如下所述的物质的测定方法:使用生物传感器来计测氧化电流,由此进行测定对象物质的定量,所述生物传感器具有:被供给被检体的腔室、包含作用极和对极的电极系统、以及包含与测定对象物质进行特异性反应的酶的反应层,所述氧化电流是通过将对极为基准的测定电位施加给作用极来使还原物质氧化而得到的电流,所述还原物质是通过被供给至腔室的被检体所含的测定对象物质和反应层反应而生成的物质。

[0003] 生物传感器通过层叠在由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的绝缘性的基板设置电极而成的电极层、保护 (cover) 层、以及被电极层和保护层夹持配置的隔离物 (spacer) 层而形成。另外,在隔离物层设置有用于形成被供给被检体的腔室的狭缝,通过对电极层隔着隔离物层层叠保护层并粘合,由电极层以及保护层和隔离物层的狭缝的部分形成被供给血液样品等被检体的腔室,在生物传感器的侧面形成有被检体导入口。另外,虽然从被检体导入口向腔室供给被检体,但为了利用毛细现象向腔室供给被检体,在保护层形成有与所形成的腔室的终端部分连通的空气孔。

[0004] 另外,通过将作用极及对极、与分别和作用极及对极电连接的电极图案设置于电极层,来在电极层形成电极系统。另外,作用极及对极分别以其一部分露出于在生物传感器形成的腔室的方式设置在电极层,在作用极和对极的露出于腔室的部分设置有反应层。因此,若从被检体导入口向腔室供给被检体,则被检体与露出于腔室的各电极以及反应层接触,并且反应层溶解于被检体。

[0005] 另外,设置在作用极和对极上的反应层中含有被检体所含的例如与葡萄糖进行特异性反应的葡萄糖氧化酶、和作为介体 (电子受容体) 的铁氰化钾。而且,铁氰化钾溶解于被检体所产生的铁氰化离子被在葡萄糖与葡萄糖氧化酶进行反应而被氧化为葡萄糖酸内酯时释放的电子还原成作为还原体的亚铁氰化离子。因此,若从被检体导入口向形成于生物传感器的腔室供给包含葡萄糖的被检体,则由于铁氰化离子基于葡萄糖被氧化而释放的电子而还原,所以作为铁氰化离子的还原体的亚铁氰化离子生成与包含于被检体并通过酶反应而被氧化的葡萄糖的浓度对应的量。

[0006] 在这样构成的生物传感器中,通过将酶反应的结果所产生的介体的还原体在作用极上氧化而得到的氧化电流成为依赖于被检体的葡萄糖浓度的大小。因此,通过计测该氧化电流,能够进行被检体所含的葡萄糖的定量。

[0007] 为了实现上述氧化电流的测定精度的提高,在以去除在露出于生物传感器的腔室的作用极和对极上附着的污垢、灰尘等杂质为目的,向作用极施加以对极为基准的测定电位之前,以对极为基准向作用极施加调整电位。例如,在专利文献 1 所记载的物质的测定方法中,如图 12 的用于对以往的物质的测定方法的一例进行说明的图所示,在向作用极施加

以对极为基准的测定电位 E2 之前,向作用极施加电位比测定电位 E2 低的调整电位 E1。

[0008] 因此,由于通过在计测上述氧化电流之前先向作用极施加调整电位 E1,能够利用电化学反应来除去附着在作用极和对极的杂质,所以可降低通过向作用极施加以对极为基准的测定电位而得到的响应电流所含的电流分量中、由附着在作用极和对极的杂质进行电化学反应产生的电流分量,由于能够增大响应电流所含的上述氧化电流的比例,所以可期望提高作为计测对象的氧化电流的计测精度。

[0009] 专利文献 1: 日本特表 2009-533690 号公报(段落 0008 ~ 0012、说明书等)

[0010] 在上述的以往的物质的计测方法中,由于向作用极施加电位比测定电位低的调整电位,所以无法从作用极和对极除去在向作用极施加了电位比调整电位高的测定电位时进行电化学反应的杂质,因此要求改善技术。

发明内容

[0011] 本发明是鉴于上述技术问题而进行的,其目的在于,供给一种降低由向作用极施加以对极为基准的测定电位而得到的响应电流所含的电流分量中、与通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流不同的电流分量造成的影响,由此可提高对被检体所含的测定对象物质进行定量时的测定精度的技术。

[0012] 为了实现上述目的,本发明的物质的测定方法使用生物传感器计测氧化电流,来进行测定对象物质的定量,所述生物传感器具有:被供给被检体的腔室、包含作用极和对极的电极系统、以及含有与测定对象物质进行特异性反应的酶的反应层,所述氧化电流是通过向上述作用极施加以上述对极为基准的测定电位来氧化还原物质而得到的电流,该还原物质是通过被供给至上述腔室的被检体所含的上述测定对象物质与上述反应层反应而生成的还原物质,该物质的测定方法的特征在于,在向上述腔室供给了上述被检体后对上述作用极施加上述测定电位之前,以上述对极为基准,对上述作用极以脉冲状施加至少一次电位比上述测定电位高的调整电位(技术方案 1)。

[0013] 另外,该物质的测定方法的特征在于,上述测定电位是上述还原物质被氧化的氧化电位以上的大小(技术方案 2)。

[0014] 另外,该物质的测定方法的特征在于,上述调整电位是比水的分解电压低的电位(技术方案 3)。

[0015] 另外,该物质的测定方法的特征在于,在向上述作用极施加上述调整电位时的脉冲宽度为 30 ~ 750 毫秒(技术方案 4)。

[0016] 另外,该物质的测定方法的特征在于,在从检测到向上述腔室供给了上述被检体开始经过 1 秒之前,施加上述调整电位(技术方案 5)。

[0017] 另外,该物质的测定方法的特征在于,在从检测到向上述腔室供给上述被检体开始经过了 1 秒以上后,施加上述测定电位(技术方案 6)。

[0018] 另外,该物质的测定方法的特征在于,上述腔室的容量比 0.6 μ l 小(技术方案 7)。

[0019] 根据技术方案 1 的发明,由于在将被检体供给至生物传感器的腔室后、向作用极施加用于计测通过被检体中的测定对象物质和酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流的测定电位之前,以对极为基准,对作用极以脉冲状施加至少一次电位比测定电位高的调整电位,所以,附着在将测定电位施加到作用极时进行电化学反应的作用极和对

极上的杂质通过以对极为基准对作用极施加调整电位而进行电化学反应,被从作用极和对极除去。因此,能够降低通过向作用极施加以对极为基准的测定电位而得到的响应电流所包含的电流分量中、与通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流不同的电流分量造成的影响,所以可提高对被检体所含的测定对象物质进行定量时的测定精度。

[0020] 根据技术方案 2 的发明,由于测定电位是通过测定对象物质的酶反应而生成的还原物质被氧化的氧化电位以上的大小,所以被检体所含的还原物质的量不会由于向作用极施加测定电位引起的还原反应而增大,能够抑制被检体中的还原物质的浓度的变动,可使因还原物质被氧化而得到的氧化电流稳定,因此能够实现测定对象物质进行定量时的测定精度的提高。

[0021] 根据技术方案 3 的发明,由于调整电位是比水的分解电压低的电位,所以能够防止被检体的离子浓度在向作用极施加调整电位时因电解水而增大,因此,能够降低在向作用极施加了测定电位时计测的响应电流所含的、因电解水产生的离子物质所引起的电流分量,可防止氧化电流的计测精度变差。

[0022] 根据技术方案 4 的发明,由于向作用极施加调整电位时的脉冲宽度是 30 ~ 750 毫秒,所以能够抑制在向作用极施加了调整电位时进行氧化反应的还原物质的量,因此能够抑制在向作用极施加了测定电位时还原物质被氧化而计测的氧化电流的变动。

[0023] 根据技术方案 5 的发明,若向腔室供给了被检体,则通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成还原物质,但在从检测到向腔室供给被检体开始经过 1 秒之前、即在被检体中的还原物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进展而增大之前,向作用极施加调整电位。因此,通过向作用极施加调整电位能够抑制进行氧化反应的还原物质的量,并且,由于在向作用极施加了调整电位后,被检体中的还原物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进一步进展而增大,所以通过施加调整电位,能够抑制向作用极施加了测定电位时还原物质被氧化所计测的氧化电流发生变动。

[0024] 根据技术方案 6 的发明,通过被检体中的测定对象物质与酶进行反应而生成还原物质,但在从检测到向腔室供给被检体开始经过了 1 秒以上之后、即在被检体中的还原物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进展而充分增大后,向作用极施加测定电位。因此,能够可靠地计测向作用极施加测定电位而还原物质被氧化所得到的氧化电流。

[0025] 根据技术方案 7 的发明,腔室的容量比 $0.6 \mu\text{l}$ 小,能够根据被供给至腔室的少量的被检体来进行测定对象物质的定量。

附图说明

[0026] 图 1 是表示在本发明的物质的测定方法中使用的生物传感器系统的一例的图。

[0027] 图 2 是表示生物传感器的一例的图。

[0028] 图 3 是表示计测处理的一例的流程图。

[0029] 图 4 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的一例的图。

[0030] 图 5 是表示通过向作用极施加测定电位而得到的响应电流的一例的图。

[0031] 图 6 是表示通过向作用极施加测定电位而得到的响应电流的比较例的图。

[0032] 图 7 是表示向作用极施加的调整电位的大小与所计测的响应电流的变动系数之

间的关系的图。

[0033] 图 8 是表示向作用极施加的调整电位的脉冲宽度与所计测的响应电流的变动系数之间的关系的图。

[0034] 图 9 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的其他例子的图。

[0035] 图 10 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的其他例子的图。

[0036] 图 11 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的其他例子的图。

[0037] 图 12 是用于说明以往的物质的测定方法的一例的图。

具体实施方式

[0038] 参照图 1 ~ 图 8, 对本发明的物质的测定方法的一个实施方式进行说明。

[0039] 图 1 是表示在本发明的物质的测定方法中使用的生物传感器系统的一例的图。图 2 是表示生物传感器的一例的图, (a) 是分解立体图, (b) 是立体图。图 3 是表示计测处理的一例的流程图。图 4 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的一例的图。图 5 是表示通过向作用极施加测定电位而得到的响应电流的一例的图。图 6 是表示通过向作用极施加测定电位而得到的响应电流的比较例的图。图 7 是表示向作用极施加的调整电位的大小与所计测的响应电流的变动系数之间的关系的图。图 8 是表示向作用极施加的调整电位的脉冲宽度与所计测的响应电流的变动系数之间的关系的图。

[0040] <生物传感器系统>

[0041] 如图 1 所示, 生物传感器系统 1 具备: 生物传感器 100, 其具有被供给被检体的腔室 103、包含作用极 101 和对极 102 的电极系统、以及含有与测定对象物质进行特异性反应的酶的反应层 (省略图示); 和测定器 2, 生物传感器 100 可装卸自如地安装于该测定器 2。而且, 生物传感器系统 1 通过对向作用极 101 施加以对极 102 为基准的测定电位来氧化还原物质而得到的氧化电流进行计测, 来进行被检体所含的测定对象物质的定量, 其中, 所述还原物质是通过向在被安装于测定器 2 的生物传感器 100 的前端侧设置的腔室 103 供给的血液等被检体所含的葡萄糖等测定对象物质、与被设置于生物传感器 100 的反应层进行反应而生成的物质。

[0042] 测定器 2 若检测到生物传感器 100 的安装则自动接通电源, 当向生物传感器 100 供给了血液等被检体时, 测定器 2 开始被检体中的葡萄糖等测定对象物质的测定。然后, 若完成被检体中的测定对象物质的定量, 则将测定结果显示于由 LCD 等显示单元形成的显示部 3, 并且, 从扬声器 4 输出表示计测结束的警报, 测定结果被存储于由存储器等存储介质形成的存储部 5。

[0043] 另外, 测定器 2 具备由操作开关等形成的操作部 6, 通过操作部 6 被操作来执行各种初始设定、将存储部 5 中存储的过去的计测结果等显示于显示部 3。

[0044] 另外, 测定器 2 具备串行接口 7 (I/F), 能够与经由 I/F7 连接的外部的个人计算机之间进行测定结果等数据的发送接收。其中, 存储部 5 中保存有: 过去的测定结果、用于基于响应电流来进行被检体所含的测定对象物质的定量的换算式、通过被 CPU8 执行来实现各种功能的程序等, 其中, 所述响应电流是通过向生物传感器 100 的作用极 101 施加规定的测定电位而计测的电流。

[0045] 另外, 测定器 2 具备: 电压输出部 9、电流电压转换部 10、以及 A/D 转换部 11。电

压输出部 9 具有数字 - 模拟转换功能 (D/A 转换功能), 其基于来自 CPU8 的控制指令, 向安装于测定器 2 的生物传感器 100 的对极 102 输出一定的参照电位, 并且将以施加至对极 102 的参照电位为基准的规定电位输出给作用极 101。

[0046] 电流电压转换部 10 具有由运算放大器、电阻元件形成的一般的电流电压转换电路, 将通过由电压输出部 9 向生物传感器 100 的作用极 101 施加规定的测定电位而在作用极 101 与对极 102 之间流动的响应电流转换成电压信号, 以便能够输入至 CPU8。A/D 转换部 11 将由电流电压转换部 10 转换后的电压信号转换成数字信号。然后, 由 A/D 转换部 11 转换的数字信号被 CPU8 获取, 通过在 CPU8 中实施规定的运算, 来从电压信号转换成电流信号。

[0047] CPU8 通过执行存储部 5 中存储的、用于对被检体所含的测定对象物质进行定量的各种程序而具备以下的功能。

[0048] 检测部 8a 通过对经由 A/D 转换部 11 输入至 CPU8 的在作用极 101 与对极 102 之间流动的电流值进行监视, 来检测因由液体组成的被检体使作用极 101 与对极 102 间短路而引起的电阻值的变化, 由此, 来检测向设置于生物传感器 100 的腔室 103 供给了被检体的情况。计时部 8b 基于从省略图示的时钟电路输出的时钟信号, 对例如从由检测部 8a 检测到向腔室 103 供给被检体起的经过时间、由电压输出部 9 向作用极 101 施加规定电位的施加时间等进行计时。

[0049] 计测部 8c 计测由电压输出部 9 向作用极 101 施加了以对极 102 为基准的规定的测定电位时在作用极 101 与对极 102 之间流动的响应电流。

[0050] 定量部 8d 基于由计测部 8c 计测到的响应电流来进行测定对象物质的定量。具体而言, 通过预先计测向作用极 101 施加以对极 102 为基准的规定的测定电压时所计测的响应电流、与被检体所含的测定对象物质的浓度之间的关系, 来导出用于根据响应电流换算测定对象物质的浓度的换算式并预先保存于存储部 5。然后, 基于存储部 5 中保存的换算式和实际上计测出的响应电流来进行测定对象物质的定量。

[0051] 通知部 8e 通过将定量部 8d 的定量结果显示于显示部 3、将表示测定结束的警报从扬声器 4 输出来进行通知。

[0052] <生物传感器>

[0053] 如图 2 所示, 生物传感器 100 分别由陶瓷、玻璃、塑料、纸、生物降解材料、聚对苯二甲酸乙二醇酯等绝缘性材料形成, 如图 2(a) 所示, 其通过以前端侧对齐的状态层叠并粘合设置有作用极 101 和对极 102 的电极层 110、形成有空气孔 105 的保护层 130、和形成有用于形成腔室 103 的狭缝 104 且被电极层 110 和保护层 130 夹持配置的隔离物层 120 来形成。而且, 通过从后端侧被插入到测定器 2 的规定的插入口进行安装, 来将生物传感器 100 安装于测定器 2。

[0054] 在该实施方式中, 电极层 110 通过由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的基板形成。另外, 通过向利用丝网印刷、溅射蒸镀法在电极层 110 的基板上形成的由铂、金、钯等贵金属或碳、铜、铝、钛、ITO、ZnO 等导电性物质构成的电极膜实施基于激光加工、光刻的图案形成, 设置有作用极 101 和对极 102、以及在将生物传感器 100 安装于测定器 2 时分别将作用极 101 和对极 102 与测定器 2 电连接的电极图案 101a、102a。

[0055] 另外, 隔离物层 120 通过由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的基板形成, 在基板的前

端边缘部的大致中央形成有用于形成腔室 103 的狭缝 104, 如图 2(a) 所示, 隔离物层 120 与电极层 110 以前端对齐的状态层叠并粘合。

[0056] 反应层通过在层叠保护层 130 之前, 对一部分在向电极层 110 层叠隔离物层 120 而形成的腔室 103 露出的作用极 101 和对极 102 滴落含有羧甲基纤维素或白明胶等增粘剂、酶、介体、氨基酸或有机酸等添加物的试剂来形成。另外, 为了顺利地向腔室 103 供给血液等被检体, 在腔室 103 的内壁涂覆界面活性剂、磷脂等亲水剂。

[0057] 作为酶, 能够使用葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、胆固醇氧化酶、醇氧化酶、肌氨酸氧化酶、果糖基氨基酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、葡萄糖脱氢酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、羟基酪酸脱氢酶、胆固醇酯酶、肌酐酶、肌酸酶、DNA 聚合酶等, 通过根据想要检测这些酶的测量对象物质进行选择, 能够形成各种传感器。

[0058] 例如, 若使用葡萄糖氧化酶或者葡萄糖脱氢酶则可形成检测被检体中的葡萄糖的葡萄糖传感器, 如果使用醇氧化酶或者醇脱氢酶则可形成检测被检体中的乙醇的乙醇传感器, 如果使用乳酸氧化酶则可形成检测被检体中的乳酸的乳酸传感器, 如果使用胆固醇酯酶与胆固醇氧化酶的混合物则可形成总胆固醇传感器。

[0059] 作为介体, 能够使用铁氰化钾、二茂铁、二茂铁衍生物、苯醌、醌衍生物、钼络合物、钌络合物等。

[0060] 作为增粘剂, 能够使用羧甲基纤维素、羧甲基乙基纤维素、聚乙烯亚胺、DEAE 纤维素、二甲氨基乙基葡聚糖、卡拉胶、海藻酸钠、葡聚糖等。作为亲水剂, 可使用 TritonX100、Tween20、双(2-乙基己基)磺基丁二酸钠等界面活性剂、卵磷脂等磷脂。另外, 为了降低血液等被检体所含有的离子浓度的偏差, 也可以设置磷酸等缓冲剂。

[0061] 保护层 130 通过由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成的基板形成, 在基板形成有在被层叠到隔离物层 120 时与腔室 103 连通的空气孔 105。而且, 在露出于腔室 103 的作用极 101 和对极 102 上形成了反应层之后, 通过将保护层 130 层叠并粘合到隔离物层 120, 来形成为了将血液等被检体供给至腔室 103 而在前端形成有与腔室 103 连通的被检体导入口 103a 的生物传感器 100。另外, 按照生物传感器 100 的腔室 103 的容量小于约 $0.6 \mu\text{l}$ 的方式在隔离物层 120 形成狭缝 104。

[0062] 在该实施方式中, 生物传感器系统 1 以进行血液中的葡萄糖的定量为目的而形成, 含有葡萄糖脱氢酶作为与作为测定对象物质的葡萄糖进行特异性反应的酶, 在露出于腔室 103 的作用极 101 和对极 102 设置有反应层, 该反应层含有铁氰化钾作为被测定对象物即葡萄糖与葡萄糖脱氢酶的反应所生成的电子还原而成为还原物质的介体。

[0063] 在这样构成的生物传感器 100 中, 通过使被检体与前端的被检体导入口 103a 接触, 被检体基于毛细现象被吸引至空气孔 105 而将被检体供给至腔室 103。然后, 通过反应层溶解于供给至腔室 103 的被检体, 基于被检体中的作为测定对象物质的葡萄糖与葡萄糖脱氢酶的酶反应而释放出电子, 利用释放出的电子来还原铁氰化离子而生成作为还原物质的亚铁氰化离子。

[0064] 若向腔室 103 供给了被检体, 则在施加用于计测上述氧化电流的测定电位之前, 测定器 2 通过以对极 102 为基准, 至少一次以脉冲状将电位比测定电位高的调整电位施加到作用极 101, 来除去附着在作用极 101 和对极 102 上的污垢、尘埃等杂质。另外, 在测定器 2 向作用极 101 施加了调整电位之后, 通过以对极 102 为基准, 向生物传感器 100 的作用极

101 施加因反应层溶解于被检体引起的氧化还原反应而生成还原物质被氧化的氧化电位以上的大小的测定电位,将还原物质电化学氧化,来计测在作用极 101 与对极 102 之间流动的氧化电流,偶此进行被检体中的葡萄糖的定量。

[0065] 此外,在该实施方式中,生物传感器 100 形成为具有作用极 101 和对极 102 的二电极结构,但也可以通过进一步设置参照极来将生物传感器 100 形成为三极电极结构。该情况下,只要在将对极 102 接地并由电压输出部 9 向参照极施加了参照电位的状态下,向作用极 101 施加以对极 102 为基准的规定的测定电位即可。

[0066] 另外,在该实施方式中,构成为通过监视在作用极 101 与对极 102 之间施加规定电压而在作用极 101 与对极 102 之间流动的电流,来检测向腔室 103 供给被检体的情况,但也可以进一步设置被检体检测用电极,通过监视在对极 102 与被检体检测用电极之间施加规定电压而在对极 102 与被检体检测用电极之间流动的电流,来检测向腔室 103 供给被检体的情况。另外,优选形成生物传感器 100 的电极层 110、隔离物层 120 以及保护层 130 中至少保护层 130 由透明的构件形成,以便能够视觉确认向腔室 103 供给被检体的情况。

[0067] <计测处理>

[0068] 接着,对在生物传感器系统 1 中执行的计测处理的一例进行说明。若通过省略图示的检测电路检测到测定器 2 安装了生物传感器 100,则向作用极 101 与对极 102 之间施加用于检测对生物传感器 100 的腔室 103 供给了由血液构成的被检体的情况的被检体检测用电压(步骤 S1)。然后,若向腔室 103 供给了被检体而使作用极 101 和对极 102 基于被检体而发生液体间电路连接(liquid junction),则由于根据在作用极 101 与对极 102 之间流动的电流增大而检测出电阻值的变化,所以,可由此通过检测部 8a 检测向腔室 103 供给了被检体的情况(步骤 S2)。

[0069] 若通过检测部 8a 检测出向腔室 103 供给了被检体,则在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过 1 秒、优选经过 0.5 秒之前,以对极 102 为基准,由电压输出部 9 向作用极 101 施加调整电位(步骤 S3)。在该实施方式中,如图 4 所示,从通过检测部 8a 检测出向腔室 103 供给了被检体的时刻 $t = 0$ 开始,以对极 102 为基准,以约 0.2 秒的脉冲宽度向作用极 101 施加约 0.9V 的调整电位。

[0070] 然后,当向作用极 101 施加了调整电位之后,在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过了 1 秒以上之后,通过电压输出部 9 以对极 102 为基准向作用极 101 施加测定电位(步骤 S4)。在该实施方式中,从通过检测部 8a 检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过了 2 秒的时刻 $t = 2$ 起,以对极 102 为基准,向作用极 101 施加约 0.3V 的测定电位。

[0071] 接着,在向作用极 101 施加了测定电位之后,通过计测部 8c 检测从检测到向腔室 103 供给了被检体开始约 3 ~ 5 秒后的响应电流(氧化电流)(步骤 S5)。然后,基于计测到的响应电流的电流值和存储部 5 中存储的换算式来进行被检体所含的葡萄糖的定量,并利用通知部 8e 通知测定结果来结束处理(步骤 S6)。

[0072] 其中,在该实施方式中,测定电位被设定成葡萄糖的酶反应的结果所产生的还原物质即亚铁氰化离子被氧化的氧化电位以上的大小,设定成约 0.3V。另外,调整电位被设定成比测定电位高的电位且比水的分解电压(约 1V)低的电位的约 0.9V。

[0073] <响应电流的比较>

[0074] 图 5 表示了在与上述的“计测处理”的条件相同的条件下计测了 3 次响应电流时

的计测结果。另外,图 6 表示除了未向作用极 101 施加调整电位之外,在与上述的“计测处理”的条件相同的条件下计测了 3 次响应电流时的计测结果。

[0075] 如图 5 所示,在如上述的“计测处理”那样向作用极 101 施加测定电位之前对作用极 101 施加了调整电位的情况下,稳定地计测大致相同的响应电流。另一方面,如图 6 所示,在向作用极 101 施加测定电位之前未对作用极 101 施加调整电位的情况下,所计测的响应电流不稳定。

[0076] 综上所述,根据该实施方式,由于在向生物传感器 100 的腔室 103 供给了被检体之后,在向作用极 101 施加用于计测通过被检体中的测定对象物质和酶反应而生成的还原物质被氧化所得到的氧化电流的测定电位之前,以对极 102 为基准,向作用极 101 以脉冲状施加至少 1 次电位比测定电位高的调整电位,所以通过对极 102 为基准向作用极 101 施加调整电位,使附着在向作用极 101 施加了测定电位时进行电化学反应的作用极 101 和对极 102 的杂质进行电化学反应而从作用极 101 和对极 102 除去。

[0077] 因此,由于能够降低通过向作用极 101 施加以对极 102 为基准的测定电位而得到的响应电流所含的电流分量中、与通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成的还原物质被氧化所引起的氧化电流不同的电流分量造成的影响,所以能够稳定地计测响应电流,可提高对被检体所含的测定对象物质进行定量时的测定精度。

[0078] 另外,由于测定电位是测定对象物质的酶反应所生成的还原物质被氧化的氧化电位以上的大小,所以被检体所含的还原物质的量不会因向作用极 101 施加测定电位而引起的还原反应增大,能够抑制被检体中的还原物质的浓度的变动,由于可使还原物质被氧化而得到的氧化电流稳定,所以能够实现对测定对象物质进行定量时的测定精度的提高。

[0079] 另外,由于调整电位是比水的分解电压低的电位,所以能够防止被检体的离子浓度在向作用极 101 施加了调整电位时因电解水而增大,因此,在向作用极 101 施加了测定电位时计测响应电流,能够降低该响应电流所含的因电解水产生的离子物质引起的电流分量,可防止氧化电流的计测精度变差。

[0080] 在计测向作用极 101 施加的调整电位的大小与向作用极 101 施加了测定电位时所计测的响应电流(氧化电流)的变动系数(CV:Coefficient of variation)之间的关系时,得到如下的结果。即,如图 7 所示,在调整电位的大小为比氧化电位大且比水的分解电压小的约 0.5V~约 0.9V 时,能够将向作用极 101 施加了测定电位时计测的响应电流的 CV 抑制在 3% 以下。

[0081] 另外,由于将调整电位施加到作用极 101 时的脉冲宽度是 0.2 秒,所以能够抑制向作用极 101 施加了调整电位时进行氧化反应的还原物质的量,因此能够抑制向作用极 101 施加了测定电位时还原物质被氧化而计测的氧化电流的变动。

[0082] 以脉冲状向作用极 101 施加的调整电位的脉冲宽度并不局限于 0.2 秒。当计测向作用极 101 施加的调整电位的脉冲宽度与向作用极 101 施加了测定电位时所计测到响应电流(氧化电流)的变动系数(CV:Coefficient of variation)之间的关系时,得到了如下的结果。即,如图 8 所示,在调整电位的脉冲宽度为约 30 毫秒~约 750 毫秒时,能够将向作用极 101 施加了测定电位时所计测的响应电流的 CV 抑制在 3% 以下。

[0083] 另外,若向腔室 103 供给被检体,则通过被检体中的测定对象物质与酶反应而生成还原物质,但在从检测出向腔室 103 供给被检体开始经过 1 秒之前、即在被检体中的还原

物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进展而增大之前,向作用极 101 施加调整电位。因此,通过向作用极 101 施加调整电位,能够抑制进行氧化反应的还原物质的量,并且,在向作用极 101 施加调整电位后,被检体中的还原物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进一步发展而增大,所以通过施加调整电位,能够抑制向作用极 101 施加了测定电位时还原物质被氧化而所计测的氧化电流发生变动。

[0084] 另外,通过被检体中的测定对象物质与酶反应来生成还原物质,但在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过了 1 秒以上后、即在被检体中的还原物质的量因测定对象物质与酶的氧化还原反应进展而充分增大之后,向作用极 101 施加测定电位。因此,能够可靠且稳定地计测向作用极 101 施加测定电位使还原物质被氧化而得到的氧化电流。

[0085] 另外,即使在腔室的容量比 $0.6 \mu\text{l}$ 小而供给至腔室 103 的被检体是少量的情况下,由于如上述那样,通过在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过 1 秒之前,施加电位比还原物质的氧化电位高的调整电位,也能防止因测定对象物质与酶的氧化还原反应而产生的还原物质被氧化,所以可利用少量的被检体来进行测定对象物质的定量。

[0086] 另外,本发明并不局限于上述的实施方式,只要不脱离其宗旨,能够在上述方式之外进行各种变更,例如,也可以通过使上述的生物传感器 100 的反应层所含的酶以及介体的组合变更来形成乙醇传感器、乳酸传感器等。另外,反应层中也可以不必含有介体,该情况下,只要对通过葡萄糖等测定对象物质的酶反应而生成的过氧化氢、酶的还原体等还原物质被氧化而得到的氧化电流进行计测即可。

[0087] 另外,也可以在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过 1 秒以上之前向作用极 101 施加测定电位,例如,可以如图 9 所示,通过电压输出部 9 以对极 102 为基准刚以约 0.2 秒的脉冲宽度对作用极 101 施加了约 0.9V 的调整电位之后,立即向作用极 101 施加约 0.3V 的测定电位。

[0088] 另外,也可以从检测到向腔室 103 供给了被检体开始,多次以脉冲状对作用极 101 施加调整电位,例如,可以如图 10 所示,在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过 1 秒之前、优选经过 0.5 秒之前,通过电压输出部 9 以对极 102 为基准多次对作用极 101 施加 0.9V 的脉冲状调整电位。

[0089] 另外,调整电位也可以不是固定的电位,例如,可以如图 11 所示,在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始经过 1 秒之前、优选经过 0.5 秒之前,通过电压输出部 9 以对极 102 为基准多次对作用极 101 施加电位不同的脉冲状调整电位。其中,图 9 ~ 图 11 是表示以对极为基准向作用极施加的电位的其他例子的图。

[0090] 另外,也可以不必在刚检测到向腔室 103 供给了被检体后立即向作用极 101 施加调整电位,另外,也可以在从检测到向腔室 103 供给了被检体开始超过 1 秒,向作用极 101 施加调整电位。另外,也可以多次将脉冲宽度和电位不同的脉冲状调整电位施加到作用极 101。另外,也可以将水的分解电压以上的调整电位施加到作用极 101。

[0091] 另外,在上述的实施方式中,在以对极 102 为基准的调整电位被施加给作用极 101 之后,作用极 101 和对极 102 间的电压被设定成 0V,但为了促进测定对象物质与酶的氧化还原反应,也可以在将调整电位施加给作用极 101 之后,断开电路。

[0092] 另外,优选生物传感器 100 的腔室 103 的容量形成得更小。

[0093] 工业上的可利用性

[0094] 本发明能够应用于使用了各种生物传感器的物质的测定方法。

[0095] 附图标记说明：

[0096] 100：生物传感器；101：作用极；102：对极；103：腔室。

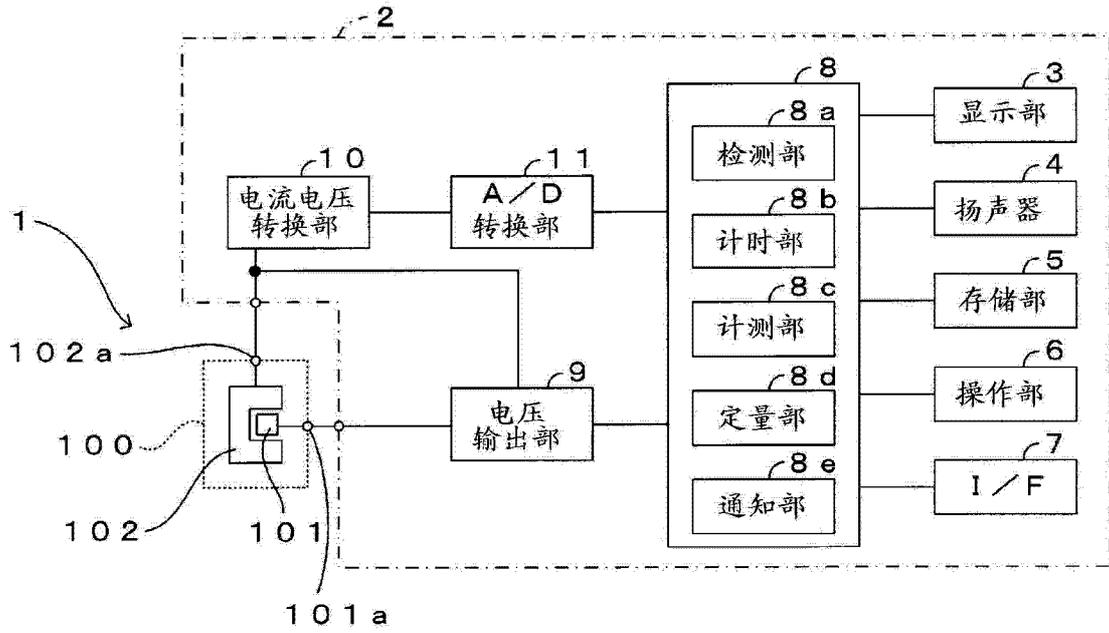


图 1

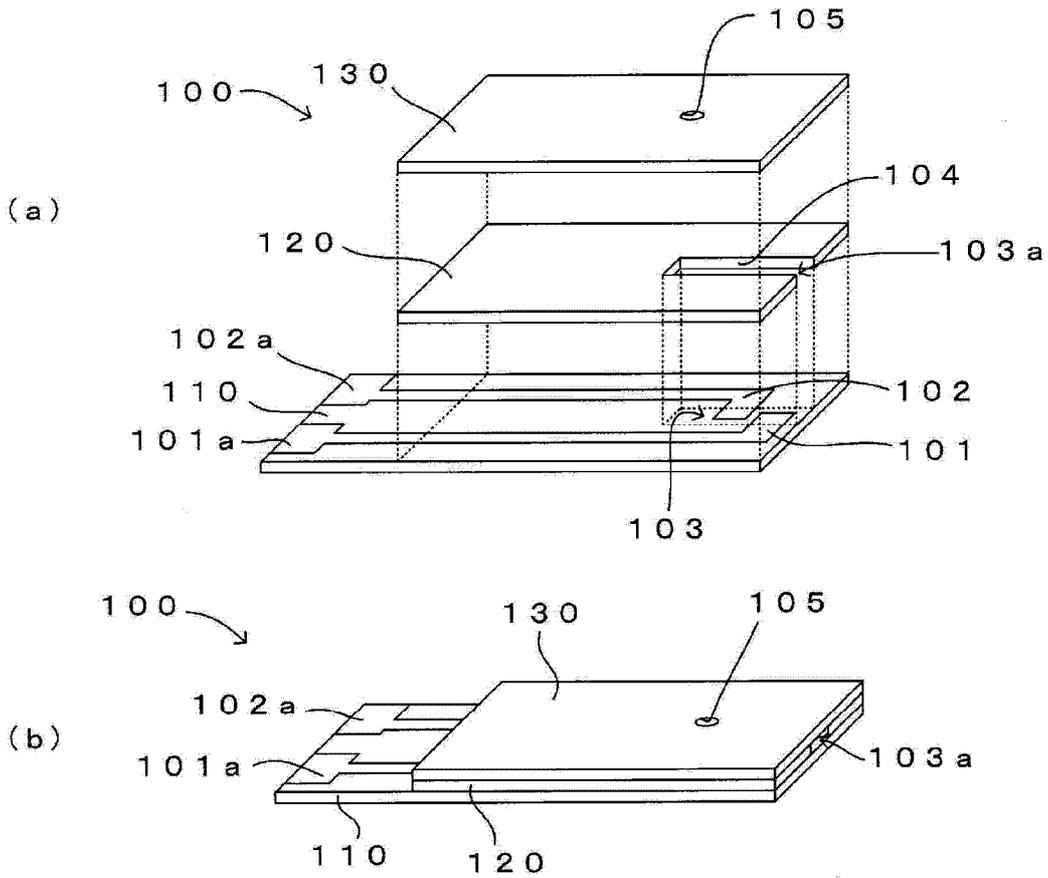


图 2

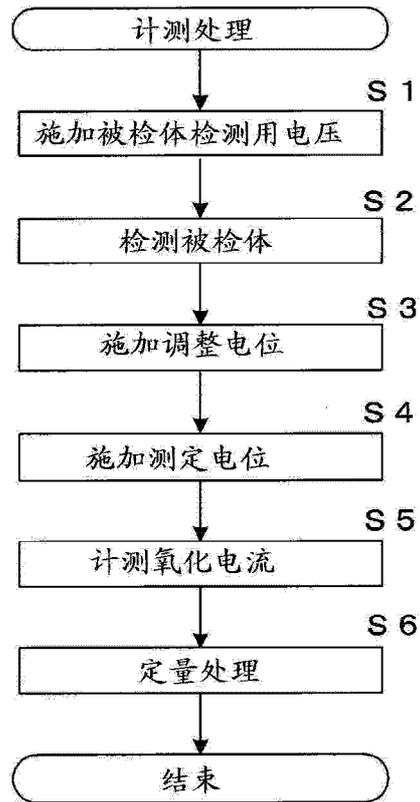


图 3

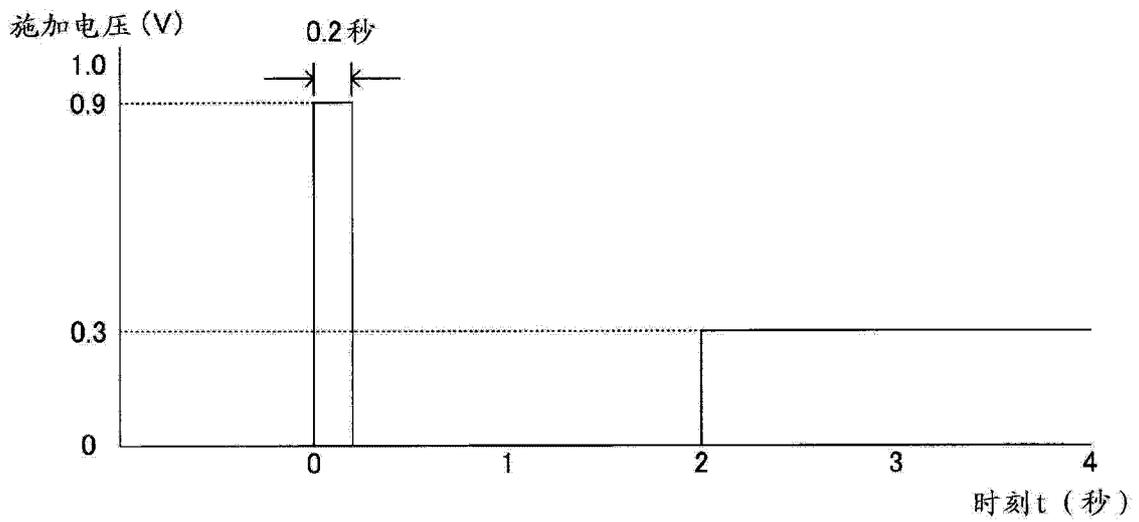
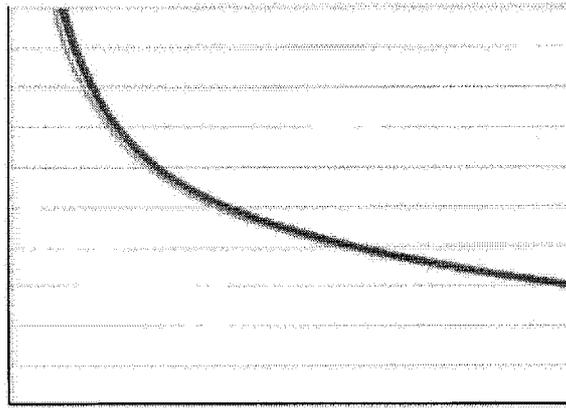


图 4

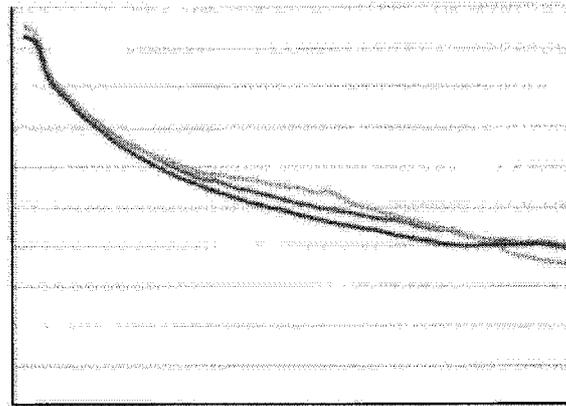
响应电流
(μA)



时间 (秒)

图 5

响应电流
(μA)



时间 (秒)

图 6

CV(%)

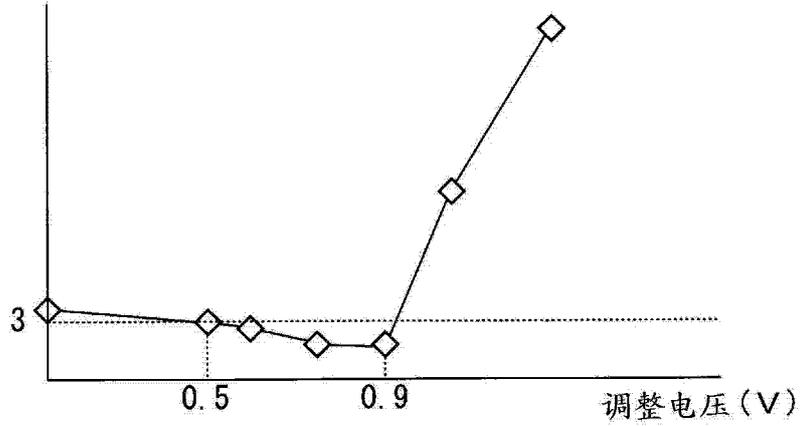


图 7

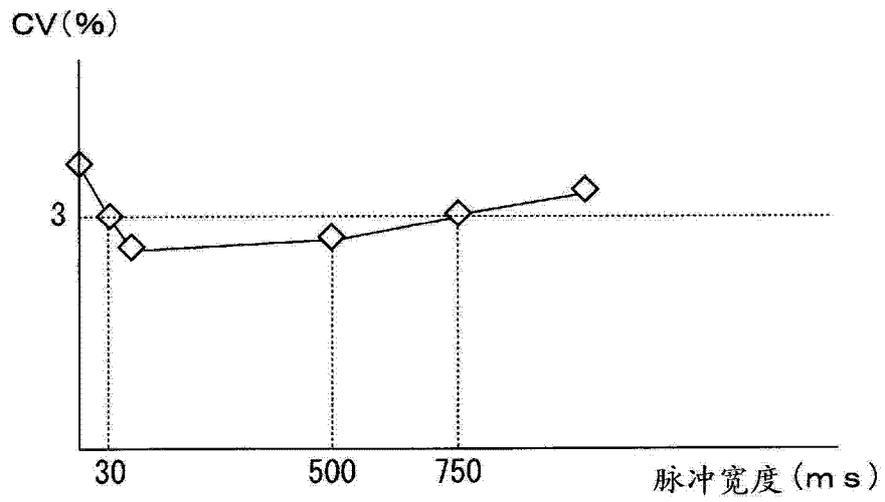


图 8

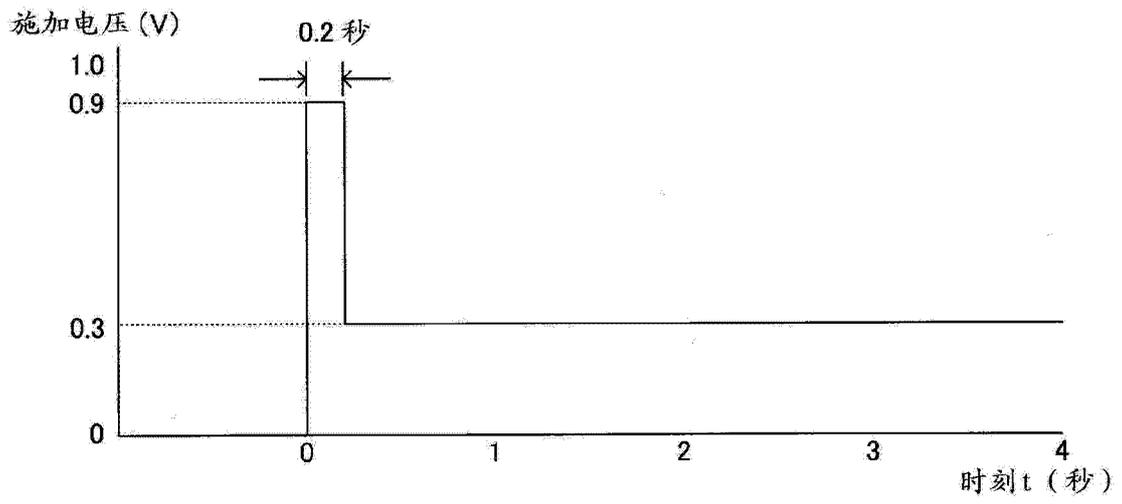


图 9

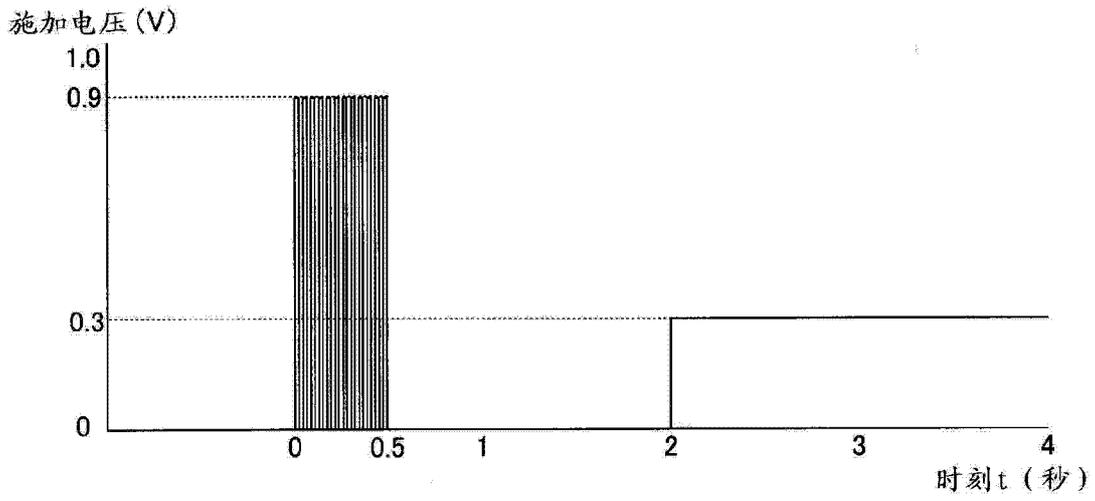


图 10

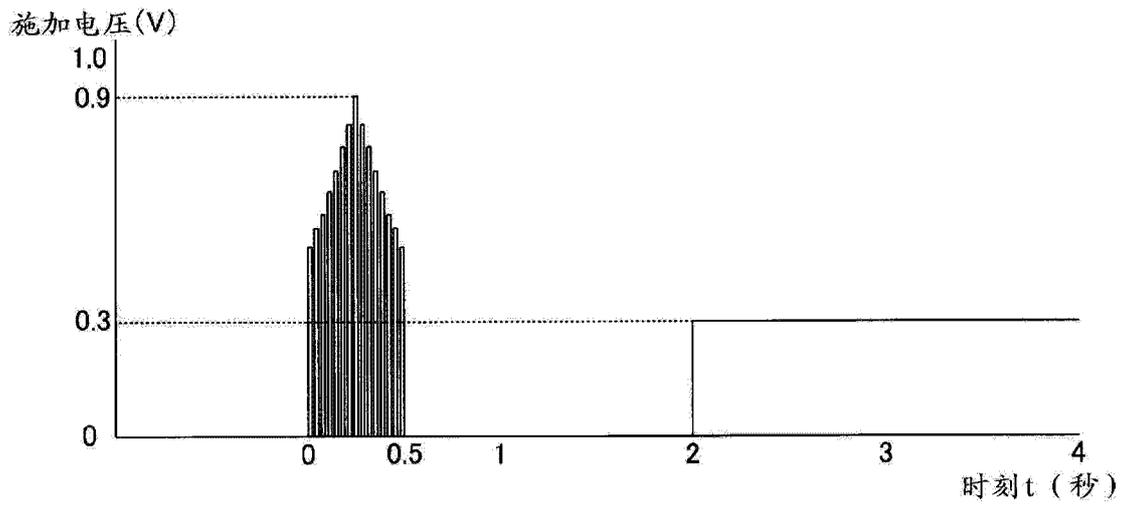


图 11

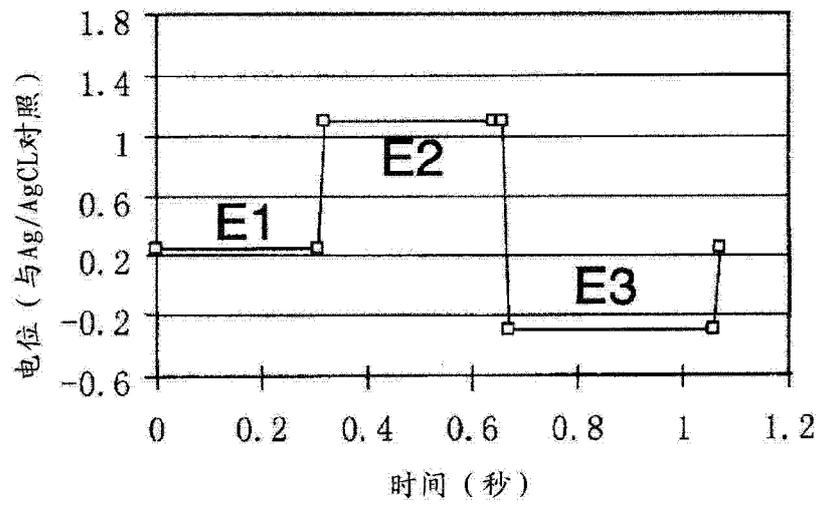


图 12