



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817954.4

[43] 公开日 2005年1月26日

[11] 公开号 CN 1571925A

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02817954.4

[30] 优先权

[32] 2001.9.14 [33] JP [31] 278966/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/008855 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/025558 日 2003.3.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.12

[71] 申请人 爱科来株式会社

地址 日本国京都府

[72] 发明人 永川健儿 山冈秀亮

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

司

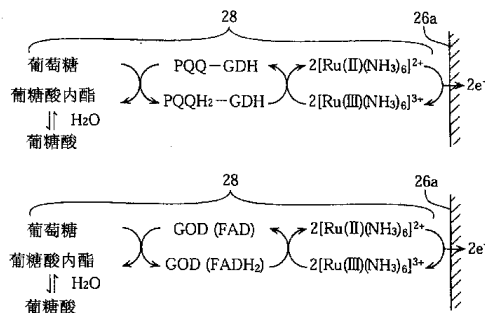
代理人 龙 淳

权利要求书3页 说明书18页 附图9页

[54] 发明名称 浓度测量方法、浓度测量用具以及浓度测量装置

[57] 摘要

本发明涉及构筑含有待测对象、氧化还原酶和电子传递物质的反应体系，利用电化学方法测量待测对象浓度的技术。它使用 Ru 化合物作为电子传递物质。本发明还提供具有基板、形成于该基板上的至少存在的第 1 和第 2 电极、以及呈固体状的试剂层的浓度测量用具。试剂层含有氧化还原酶和 Ru 化合物，且在供给试料液时会溶解，从而构成液相反应体系。



1. 一种待测对象的浓度测量方法，其特征在于，通过构筑含有待测对象、氧化还原酶和电子传递物质的反应体系，利用电化学方法测量待测对象的浓度，所述电子传递物质使用 Ru 化合物。

5

2. 如权利要求 1 所述的待测对象的浓度测量方法，其特征在于，包括：

在所述反应体系内生成 Ru 化合物的还原体的第 1 步骤；

10 对所述反应体系施加电压，将所述还原体氧化，同时测量与此时由所述还原体放出的电子量相应的响应电流值的第 2 步骤；

根据所述第 2 步骤中测得的响应电流值，计算待测对象浓度的第 3 步骤。

15 3. 如权利要求 2 所述的待测对象的浓度测量方法，其特征在于，所述 Ru 化合物为氧化型 Ru (III) 配位体，所述还原体为还原型 Ru (II) 配位体。

4. 如权利要求 3 所述的待测对象的浓度测量方法，其特征在于，所述氧化型 Ru (III) 配位体如下述化学式所示：

20



所述化学式中的 X 为 NH_3 或卤离子，所述化学式中的 $n+$ 则表示由 X 的种类所决定的氧化型 Ru(III) 配位体的价数。

25 5. 如权利要求 3 所述的待测对象的浓度测量方法，其特征在于，在第 1 步骤中，仅通过由所述氧化还原酶催化的待测对象的氧化反应和氧化型 Ru (III) 配位体的还原反应这两个反应生成所述还原型 Ru (II) 配位体。

30 6. 如权利要求 3 所述的待测对象的浓度测量方法，其特征在于，所述反应体系为近似均匀地将相对量较少的氧化还原酶和相对量较多的氧化型 Ru (III) 配位体分散的均匀或近似均匀的液相反应体系。

7. 如权利要求 1 所述的待测对象的浓度测量方法, 其特征在于, 所述待测对象为葡萄糖。

5 8. 一种浓度测量用具, 其特征在于, 具有基板、形成于所述基板上的至少存在的第 1 电极和第 2 电极、呈固体状的试剂层,

所述试剂层含有氧化还原酶和 Ru 化合物, 且在供给含有待测对象的试料液时溶解, 构成液相反应体系。

10 9. 如权利要求 8 所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述试剂层在供给了试料液后, 所述液相反应体系中有氧化还原酶和 Ru 化合物共存。

15 10. 如权利要求 8 所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述试剂层含有所述 Ru 化合物作为氧化体, 且在向所述试剂层供给试料液时, 仅通过由所述氧化还原酶催化的所述待测对象的氧化反应和所述 Ru 化合物的还原反应这两个反应, 由所述氧化体生成还原体。

20 11. 如权利要求 10 所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述试剂层的结构使得所述液相反应体系的各处大致均匀地生成所述还原体。

12. 如权利要求 8 中所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述 Ru 化合物如下述化学式所示,



25 所述化学式中的 X 为 NH_3 或卤离子, 所述化学式中的 $n+$ 则表示由 X 的种类所决定的氧化型 Ru(III) 配位体的价数。

13. 如权利要求 8 所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述待测对象为葡萄糖。

30

14. 如权利要求 13 所述的浓度测量用具, 其特征在于, 所述氧化还原酶为选自 PQQGDH、 α GDH 和 CyGDH 中的至少其中之一。

15. 一种浓度测量装置，其特征在于，使用时安装着具有试剂层、第1电极和第2电极、且所述试剂层含有氧化还原酶和 Ru 化合物的浓度测量用具，并具有：
- 5 在所述第1电极和所述第2电极之间施加电压的电压施加机构；
 测量所述第1电极和所述第2电极之间施加电压时的响应电流值的电流值测量机构；和
 根据所述响应电流值计算待测对象浓度的计算机构。
- 10 16. 如权利要求15所述的浓度测量装置，其特征在于，还具有控制电压施加机构的施加电压动作的控制机构，所述控制机构用于将由所述电压施加机构所施加的电压控制在选自 100~500mV 的范围内的一定电压。
- 15 17. 如权利要求15所述的浓度测量装置，其特征在于，还具有用于控制电压施加机构的施加电压动作的控制机构，
 所述控制机构将由所述电压施加机构所施加的电压控制在选自在所述 Ru 化合物的氧化体和还原体之间的标准氧化还原电位(vs.标准氢电位)以上、小于亚铁氰化离子和铁氰化离子之间的标准氧化还原电位
- 20 20. 所述控制机构将由所述电压施加机构所施加的电压控制在选自在所述 Ru 化合物的氧化体和还原体之间的标准氧化还原电位(vs.标准氢电位)的范围内的一定电压。
18. 如权利要求15所述的浓度测量装置，其特征在于，还具有用于控制所述电流测量部的电流值测量动作的控制机构，
 所述控制机构用于在向所述试剂层供给试料液后的3~5秒后的范围内的任一时刻，用所述电流测量机构测量所述计算机构中计算时所需的响应电流值。
- 25

浓度测量方法、浓度测量用具以及浓度测量装置

技术领域

- 5 本发明涉及由试料液（例如血液等生化试剂及其调整液）测量待测对象（如葡萄糖和胆固醇等）的浓度的技术。

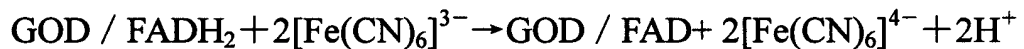
背景技术

- 10 在胆固醇的定量方法中，有一种利用酶反应的方法。其中有代表性的方法是使用葡糖氧化酶（GOD）的方法。GOD是与作为辅酶的黄素腺二核苷酸（FAD）结合而成的糖蛋白质，使用GOD时的葡萄糖的酶反应按照下述化学式所示进行（式中的FADH₂表示FAD的还原型）

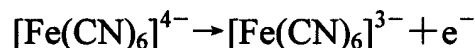


- 15 在临床医学中测量血糖值时，也有通过测量随葡萄糖浓度的变化而引起的吸光度的变化而对葡萄糖浓度进行定量的方法，但一般采用电流滴定法对葡萄糖浓度进行测量的方法。电流滴定法广泛用作便携式血糖值测量装置的葡萄糖浓度测量方法。

- 20 使用电流滴定法的血糖值测量方法，以测量氧化电流的情况为例，如下所述。首先，第1步是构筑可使血液、酶和氧化型电子传递体（介质）共存的反应体系。由此，在上述酶反应进行的同时，通过由该酶反应生成的FADH₂与介质之间的氧化还原反应生成还原型介质。常用作介质的有铁氰化钾，此时的反应式如下述化学式所示。



- 25 其次，第2步是通过用1对电极给反应体系施加电压，将亚铁氰化钾氧化（释放电子），如下述化学式所述生成铁氰化钾。而来自亚铁氰化钾的电子供给到阳极。



- 再次，第3步是测量因施加电压而产生的氧化电流值，同时根据该测量值计算葡萄糖浓度。

- 30 在使用便携式血糖值测量装置测量血糖时，使用在电极之间形成

了含有酶和介质的试剂层的葡萄糖传感器，同时，向试剂层供血，由此在电极间构成反应体系。用这种葡萄糖传感器，可通过将其安装在便携式血糖测量装置上，给电极间施加电压，同时测量氧化电流值，根据该氧化电流值确定血液中的葡萄糖浓度。

5 如上所述，所用酶通常为 GOD，介质通常使用铁氰化钾。但在 GOD 和铁氰化钾组合的反应体系中，以电流滴定法为代表的电化学方法测量葡萄糖浓度的方法中存在下述问题。

10 其一是还原性物质的影响。例如，设想测量血液中葡萄糖浓度时的情况，血液中还同时存在除葡萄糖以外的其它还原性物质（例如抗坏血酸、谷胱甘肽、 Fe(II)^{2+} ）。当给反应体系施加电压时，如果除亚铁氰化钾以外，还同时存在其它还原物质，则除了来自亚铁氰化钾的电子以外，随着电压的施加来自于还原性物质的电子也被供至电极。结果，在测得电流值中也包括因还原性物质的电子转移而产生的本底电流（干扰）。因此，测得的葡萄糖浓度会高于葡萄糖的实际浓度。随着
15 施加在电极之间的电压值越大，被氧化的还原性物质的种类和量就越多，该测量误差也就表现得越显著。所以，当用铁氰化钾作为介质时，必须先对实测值进行修正，然后再决定最终浓度，从而不能以高精度实施血糖测量。还原性物质的影响不仅限于血糖值测量时，在根据氧化电流值计算浓度时，对其它成分也同样有影响。

20 其它问题还有，当使用便携式血糖测量装置和葡萄糖传感器测量葡萄糖浓度时，葡萄糖传感器的保存稳定性方面会出现问题。铁氰化钾易受光和水的影响而减弱，会因暴露在光和水中而由葡萄糖以外的环境中得到电子形成还原型的亚铁氰化钾。当发生这种情况后，反应体系内就形成由酶反应而形成的还原型亚铁氰化钾与因暴露而形成的
25 还原型亚铁氰化钾共存的局面。结果，与上述还原性物质时的情况一样，施加电压时的氧化电流也包括来自因暴露而形成的亚铁氰化钾的本底电流。所以，所测得的葡萄糖浓度会高于实际的葡萄糖浓度。为控制这种问题的发生，就需要避免葡萄糖传感器的试剂层暴露，从而需要将葡萄糖传感器封入由不透光性材料制成的包装袋等内。且为延
30 长葡萄糖传感器的寿命，需要由氮气置换处理等避免水分的影响，以在湿度降低的状态下密封，因此不便于进行葡萄糖传感器的工业化批

量生产，并会造成成本增加。

发明内容

5 本发明的目的在于，提供一种能以较低成本降低本底电流的影响、并精确测量试料液中的待测对象的浓度的技术。

本发明第 1 方面所提供的待测对象的浓度测量方法的特征在于，构筑含有待测对象、氧化还原酶以及电子传递物质的反应体系，利用电化学方法测量待测对象的浓度，上述电子传递物质使用 Ru 化合物。

10 上述浓度测量方法优选为包括：在反应体系内生成 Ru 化合物的还原体的第 1 步骤；对反应体系施加电压，将还原体氧化，同时测量与此时由还原体释放出的电子量相应的响应电流值的第 2 步骤；根据上述第 2 步骤中测得的响应电流值，计算待测对象的浓度的第 3 步骤。

15 在本发明的浓度测量方法中，既可在反应体系为不加电压的状态下的第 1 步骤后进行反应体系为施加电压状态下的第 2 步骤，也可从供给至少含有待测对象的试料液时继续使反应体系为施加电压的状态，同时进行第 1 步骤和第 2 步骤。

20 第 2 步骤中加在第 1 电极和第 2 电极之间的电压优选为一定电压。该电压值优选为在还原型 Ru(II)配位体和氧化型 Ru(III)配位体之间的标准氧化还原电位 (vs.标准氢电极) 以上、且小于亚铁氰化离子与铁氰化离子之间的标准氧化还原电位 (vs.标准氢电极)。施加在第 1 电极和第 2 电极之间的一定电压为例如 100~500mV，更优选为 100~300mV。

25 第 1 步骤的时间为 0~10 秒，而第 3 步骤中作为葡萄糖浓度计算基础的计算用电流值优选采用由第 2 步骤起算经 3 秒以上的一定时间后测量的电流值。更优选采用以第 1 步骤时间为 0~3 秒、由上述第 2 步骤开始 3~5 秒范围内的一定时间内测得的电流值作为计算用电流值。

30 本发明的第 2 方面提供一种浓度测量用具，其特征在于，具有基板、形成于该基板上的至少存在的第 1 电极和第 2 电极、呈固体状的试剂层，上述试剂层含有氧化还原酶和 Ru 化合物，且在供给含有待测对象的试料液时溶解，构成液相反应体系。

试剂层的构成优选为在供给了试料液后，液相反应体系中的氧化还原酶和 Ru 化合物共存。

在本发明的第 1 和第 2 方面中，Ru 化合物优选为以氧化型 Ru 配位体的形式存在于反应体系中。对 Ru 配位体除要求可作为介质（电子传递体）发挥功能之外，对该配位体的种类则没有特别限定，但氧化型配位体优选使用以下述化学式表示的物质。



化学式中的 X 可以举出 NH_3 、卤离子、CN、吡啶、烟酰胺和 H_2O ，其中优选为 NH_3 和卤离子。化学式中的 $n+$ 表示由 X 的种类所决定的氧化型 Ru(III)配位体的价数。

当 Ru 化合物为氧化型 Ru(III)配位体时，所选择的电子传递系统应使得仅通过例如由氧化还原酶催化的待测对象的氧化反应和氧化型 Ru(III)配位体的还原反应这两个反应生成还原型 Ru(II)配位体。

反应体系为例如均匀或近似均匀地将相对量较少的氧化还原酶和相对量较多的氧化型 Ru(III)配位体分散的均匀或近似均匀的液相反应体系。此时，反应体系的各处近似均匀地生成还原型 Ru(II)配位体。

作为待测对象，可以举出葡萄糖、胆固醇、乳酸、抗坏血酸等。

氧化还原酶根据待测对象的种类而选择，优选为选自葡糖脱氢酶（GDH）（包括后述的 α GDH 以及 CyGDH）、葡糖氧化酶（GOD）、胆固醇脱氢酶、胆固醇氧化酶、乳酸脱氢酶、乳酸氧化酶、抗坏血酸脱氢酶、抗坏血酸氧化酶、醇脱氢酶、醇氧化酶、果糖脱氢酶、3-羟基丁酸脱氢酶、丙酮酸氧化酶、NADH 氧化酶、尿酸氧化酶（尿酸酶）、尿素酶以及二羟基硫辛酰胺脱氢酶（心肌黄酶）中的至少一种。

在本发明中，GDH 除以例如吡咯喹啉醌（PQQ）、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）以及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP）等作为辅酶之外，还可使用 α GDH 和 CyGDH 等。作为 GDH，优选使用以 PQQ 作为辅酶的物质（PQQGDH）、 α GDH 或 CyGDH。

α GDH 作为具有葡萄糖脱氢活性的子单元，它包含在还原条件下的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分子量约为 60kDa 的 GDH 活性蛋白质。而 CyGDH 是包含以上述 GDH 活性蛋白质和在还原条件下的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分子量约为 43kDa 的电子传递蛋白质（细胞

色素 C) 为子单元的物质。GDH 还可使用具有除 GDH 活性蛋白质和细胞色素 C 以外的其它子单元的物质。

5 CyGDH 可以通过对例如属于洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) 的微生物在菌体外分泌的酶进行精制, 或者对该菌体的菌体内酶进行精制而得到。另外, α GDH 可以通过例如对形成将取自属于洋葱伯克霍尔德氏菌的微生物的 α GDH 的形成进行编码的遗传因子引入的转化子、并由该转化子分泌到外部的酶进行精制, 或者该转化子的菌体内酶进行精制而得到。

10 属于洋葱伯克霍尔德氏菌的微生物, 例如可以使用洋葱伯克霍尔德氏菌 KSI 菌株。该 KSI 菌株以第 FERM BP-7306 的微生物保藏号于平成 12 年 9 月 25 日保藏在独立专利法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (〒305-8566 日本茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)。

15 本发明的第 3 方面提供一种浓度测量装置, 其特征在于, 使用时安装着具有试剂层、第 1 电极和第 2 电极、且上述试剂层含有氧化还原酶和 Ru 化合物的浓度测量用具, 并具有: 在上述第 1 电极和第 2 电极之间施加电压的电压施加机构; 测量上述第 1 电极和第 2 电极之间加有电压时的响应电流的电流值测量机构; 以及根据上述响应电流值计算待测对象的浓度的计算机构。

20 浓度测量装置优选为还具有控制电压施加机构的施加电压动作或电流测量机构的电流值测量动作的控制机构。

25 控制机构用于将例如由电压施加机构所施加的电压控制在选自 100~500mV 的范围、更优选为选自 100~300mV 的范围内的一定电压。控制机构也可将例如由电压施加机构所施加的电压控制在选自在 Ru 化合物的氧化体和还原体之间的标准氧化还原电位 (vs.标准氢电位) 以上、小于亚铁氰化离子和铁氰化离子之间的标准氧化还原电位 (vs.标准氢电位) 的范围内的一定电压。

30 本发明的浓度测量装置优选为还具有用于对检测向浓度测量用具的试剂层供给试料液的检测机构的结构。控制机构的构成用于控制电压施加机构, 使得例如由检测机构测得试料液供向试剂层的 0~10 秒的第 1 确定时间之内, 不在第 1 电极和第 2 电极之间施加电压。此时,

控制机构控制电压施加机构，使得由经过第 1 确定时间的时间点开始，利用电压施加机构在第 1 电极和第 2 电极之间施加一定电压。控制机构还可采用下述结构，在由在先的开始施加一定电压起算并经 3 秒以上的经过第 2 确定时间的时间点，在电流值测量机构中，由电流值测量机构测量计算机构中的计算浓度用响应电流值。更优选为，第 1 确定时间为 0~3 秒，第 2 确定时间为 3~5 秒。

附图说明

- 图 1 为本发明的葡萄糖浓度测量装置一例的简要结构示意图；
- 10 图 2 为用于图 1 的葡萄糖浓度测量装置中的葡萄糖传感器一例的整体立体图；
- 图 3 为图 2 的葡萄糖传感器的分解立体图；
- 图 4A 为含有葡萄糖、PQQ-GDH 和 Ru 配位体的反应体系的电子传递系统示意图，而图 4B 为含有葡萄糖、GOD 和 Ru 配位体的反应体系的电子传递系统示意图；
- 15 图 5 为测量葡萄糖浓度时施加在第 1 和第 2 电极之间的电压值以及响应电流值随时间变化的示意图；
- 图 6 为本发明的葡萄糖传感器 1 与对照葡萄糖传感器的 CV 波形图；
- 20 图 7 为外加电压值影响的示意图；
- 图 8 为开始向使用 Ru 配位体的试剂层供给全血后一定时间形成开路后，向试剂层施加电压时（闭合回路）的响应电流随时间变化的示意图；
- 图 9 为开始向使用 Fe 配位体的试剂层供给全血后一定时间形成开路后，向试剂层施加电压时（闭合回路）的响应电流随时间变化的示意图；
- 25 图 10 为对不同葡萄糖浓度的多种全血在向试剂层开始供给全血起 10 秒后施加 500mV 的电压时，在开始施加电压 5 秒后的响应电流值的示意图；
- 30 图 11 为对不同葡萄糖浓度的多种全血在向试剂层开始供给全血起 10 秒后施加 250mV 的电压时，在开始施加电压 5 秒后的响应电流值的

示意图；

图 12 为图 10 和图 11 所示图中，对葡萄糖浓度为 0 的全血的响应电流值（本底电流）分别以对 Fe 配位体和对 Ru 配位体表示的柱状图；

5 图 13 为根据向试剂层供给标准液时的响应电流值评价因水分引起的暴露影响的示意图；

图 14 为根据向试剂层供给标准液时的响应电流值评价 Ru 配位体的分散能的示意图；

图 15 为根据不同试剂层配方（氧化还原媒）的葡萄糖传感器，葡萄糖浓度和响应电流值的相关性的示意图；

10 图 16 为在以 GOD 用作氧化还原酶的葡萄糖传感器中，葡萄糖浓度和响应电流值的相关性的示意图。

具体实施方式

下面，参照附图具体说明本发明的优选实施方式。在本实施方式中，以用于测量试料液中的葡萄糖浓度而构成的葡萄糖浓度测量装置和葡萄糖传感器为例进行说明。但本发明不仅限于测量葡萄糖浓度的情况，也可用于测量其它成分。

15 如图 1 所示，葡萄糖浓度测量装置 1 是使用葡萄糖传感器 2 测量血液等的葡萄糖溶液中的葡萄糖浓度的装置。该葡萄糖浓度测量装置 1 具有施加电压部 3、电流值测量部 4、检测部 5、控制部 6、计算部 7 和显示部 8。

葡萄糖传感器 2 如图 2 和图 3 所示，具有罩板 20、隔板 21 和基板 22，由此规定了流通路 25。

25 罩板 20 上设有开孔 23，隔板 21 与开孔 23 相通，且隔板 21 上设有前端 24a 开放的狭缝 24。流通路 25 经狭缝 24 的前端开放部 24a 以及开孔 23 与外部连通。前端开放部 24a 构成试料液导入口 25a，由该试料液导入口 25a 而供给的葡萄糖溶液利用毛细管现象而在流通路 25 内朝向开孔 23 行进。

基板 22 的上面 22a 设有第 1 电极 26、第 2 电极 27 和试剂层 28。

30 第 1 和第 2 电极 26、27 作为整体沿基板 22 的长度方向延伸。第 1 和第 2 电极 26、27 的一端 26A、27A 具有沿基板 22 宽度方向延伸的

作用部 26a 和反电极部 27a。

5 基板 22 的上面 22a 由绝缘膜 29 覆盖, 并露出第 1 电极 26 的作用部 26a、第 2 电极 27 的反电极部 27a、第 1 和第 2 电极 26、27 的另一端 26b、27b。第 1 和第 2 电极 26、27 的另一端部 26b、27b 构成与下述葡萄糖浓度测量装置 1 的第 1 和第 2 探头 3a、3b (参照图 1) 接触的端子。

10 试剂层 28 例如为固体状, 跨接在作用部 26a 和反电极部 27a 之间。该试剂层 28 包含相对较多的介质 (电子传递体) 和相对较少的氧化还原酶。试剂层 28 通过例如将近似均匀地分散有介质和氧化还原酶的涂料涂布在其上, 而在第 1 和第 2 电极 26、27 之间形成桥接, 然后使其干燥后而形成的。这样形成的试剂层 28, 为氧化还原酶近似均匀分散在介质间的单一固体层, 易于因供给葡萄糖溶液而溶解。

15 优选将葡糖脱氢酶 (GDH) 或葡糖氧化酶 (GOD) 用作氧化还原酶。可使用以吡咯喹啉醌 (PQQ)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)、烟酰胺酰嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 等作为辅酶的 GDH, 以及 α GDH、CyGDH 等作为 GDH。在这些 GDH 中, 优选使用以 PQQ 作为辅酶的 (PQQGDH)、 α GDH 和 CyGDH。关于 α GDH 和 CyGDH, 如上所述。

20 介质可使用 Ru 配位体等。对该 Ru 配位体的种类没有特别限制, 只要该 Ru 配位体能起到电子传递体的作用即可, 其中氧化型配位体优选使用以下述化学式表示的 Ru 配位体。



化学式中的 X 可以举出 NH_3 、卤离子、CN、吡啶、烟酰胺或 H_2O , 其中优选为 NH_3 和卤离子。化学式中的 $n+$ 表示由 X 的种类所决定的氧化型 Ru(III) 配位体的价数。

25 由于还原型 (II) 不稳定, 所以 Ru 配位体通常以氧化型 (III) 的形式存在。所以, 即使在葡萄糖传感器 2 的试剂层 28 中掺杂有 Ru 配位体的状态下暴露在光和水中, 也不容易实现还原。而 Ru 配位体具有不易结晶、可适当保持微粉末状态的特性。另外, Ru 配位体和 PQQGDH 的组合具有电子传递速度快的优点。

30 图 1 所示电压施加部 3 用于在第 1 电极 26 的端子 26b 和第 2 电极 27 的端子 27b 之间施加一定电压。电压施加部 3 通过将葡萄糖传感器

2 安装在设于葡萄糖浓度测量装置 1 的装配部（未图示）上，经第 1 和第 2 探头 3a、3b 而与葡萄糖传感器 2 的端子 26b、27b 导通。电压施加部 3 可使用例如干电池或蓄电池等直流电源。

5 电流值测量部 4 用于测量在第 1 和第 2 电极之间施加电压时相应于由试剂层 28 的还原型 Ru(II) 配位体释放出的电子量的响应电流值。

检测部 5 用于在将葡萄糖传感器 2 安装到葡萄糖浓度测量装置 1 上后，向试剂层 28 供给葡萄糖溶液，检测可否测量葡萄糖溶液浓度。

10 控制部 6 用于控制电压施加部 3，以选择第 1 和第 2 电极之间是（闭合回路）还是不是（开路）施加有电压的状态。控制部 6 还控制电流值测量部 4 的测量电流值的时机。

计算部 7 用于根据由电流值测量部 4 测得的响应电流值计算葡萄糖溶液中的葡萄糖浓度。

15 另外，检测部 5、控制部 6 和计算部 7 可分别由例如 CPU 和 ROM、RAM 等存储器构成，检测部 5、控制部 6 和计算部 7 还均可按照一个 CPU 连接多个存储器的结构形成。另外，计算部 7 的计算结果由显示部 8 显示。显示部 8 可由 LCD 等构成。

然后，参照图 1~3，以及图 4 和图 5 说明葡萄糖溶液中的葡萄糖浓度测量的操作顺序。

20 如图 1 所示，首先，在葡萄糖浓度测量装置 1 中设置葡萄糖传感器 2。由此使葡萄糖传感器 2 的第 1 和第 2 电极 26、27 的端子 26b、27b 与葡萄糖测量装置 1 的第 1 和第 2 探头 3a、3b 相接。如上所述，在该状态下，第 1 和第 2 电极 26、27 可与电压施加部 3 导通。在实际测量中，在向葡萄糖传感器 2 供给葡萄糖溶液以前，利用控制部 6 的
25 控制，由电压施加部 3 在第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加一定电压。

30 施加在第 1 电极和第 2 电极之间的一定电压设定在例如 100~500mV 的范围内。一定电压设定为在还原型 Ru(II) 配位体和氧化型 Ru(III) 配位体之间的标准氧化还原电位（vs. 标准氢电位）以上、小于亚铁氰化离子和铁氰化离子之间的标准氧化还原电位（vs. 标准氢电位）。Ru 配位体的标准氧化还原电位因配位体种类的不同而有所不同，大约为 +100mV，而铁氰化离子的标准氧化还原电位为 +360mV。所

以, 由电压施加部 3 施加在第 1 电极和第 2 电极 26、27 之间的定电压可在例如 100~350mV 的范围内选择。如上所述, 作为 Ru 配位体, 氧化型最适合使用表示为 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (还原型为 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$) 的配位体。此时, 定电压优选为 100~350mV, 更优选为 100~300mV。

5 然后, 经葡萄糖传感器 2 的试料液导入口 25a 供给血液等的葡萄糖溶液。由于毛细管现象, 葡萄糖溶液在葡萄糖传感器 2 的流通路 25 内行进。在该过程中, 葡萄糖溶液使试剂层 28 溶解。

10 如上所述, 由于 Ru 配位体可以适度维持难结晶的微粉末状态, 所以在微粉末状态下试剂层 28 中含有 Ru 配位体时, 供给葡萄糖溶液时试剂层 28 整体易于且可立即溶解。由于试剂层 28 的结构是 Ru 配位体分散在氧化还原酶中, 所以试剂层 28 的各处均匀地发生酶反应, 可在短时间内可靠地测量葡萄糖浓度。

15 另外, 当向试剂层 28 供给葡萄糖溶液时, 利用氧化还原酶将葡萄糖氧化成葡糖酸内酯, 同时使介质成为还原型。由于介质在试剂层 28 中被近似均匀地分散, 所以在试剂层 28 的各处近似均匀地、且不用施加电压即可自发生成还原型介质。另外, 葡糖酸内酯不通过酶即形成葡糖酸。

20 在此, 图 4 (a) 表示使用 $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 作为介质、同时使用 PQQGDH 作为氧化还原酶时的电子传递系统, 图 4 (b) 表示使用 $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 作为介质、同时使用 GOD 作为氧化还原酶时的电子传递系统。

25 在图 4 (a) 和 (b) 所示例中, 在经两个端子 26b、27b 在第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加一定电压的状态下, 存在于试剂层 28 中的还原型 Ru(II)配位体向第 1 电极 26 的作用部 26a 侧移动, 在该作用部 26a 释放电子而成为氧化型 Ru(III)配位体。所以, 在由电压施加部 3 在第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加一定电压的状态下, 由还原型 Ru(II)配位体给予的电子量经第 1 电极 26 和第 1 探头 3a 在电流测量部 4 上作为响应电流被测得。该响应电流值是与来自通过施加电压而在试剂层 28 移动的还原型 Ru(II)的电子量相关, 它被称为扩散电流。

30 另外, 电流值测量部 4 上测得的响应电流值由检测部 5 监控, 如图 5 所示, 响应电流值超过阈值 I_1 (例如 2~3 μA) 时的 t_0 点, 检测部

5 测得向试剂层 28 供给葡萄糖溶液而使试剂层 28 溶解的情况。

当检测部 5 检测到供给葡萄糖溶液时,控制部 6 控制电压施加部 3,而停止向第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加电压。在停止施加电压的状态下,还原型 Ru(II)配位体不被氧化,所以通过由氧化还原酶引发的葡萄糖的氧化反应以及介质的还原反应而蓄积还原型 Ru(II)配位体。在 5 在经过一定时间(例如 $t_1 - t_0 = 0 \sim 10$ 秒,更优选为 $0 \sim 3$ 秒)的 t_1 点,根据控制部 6 的控制,由电压施加部 3 再次向第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加一定电压 V。另外,也可在检测部 5 检测到供给了葡萄糖溶液后还继续施加电压,使生成的还原型 Ru(II)依次向作用部 26a 移动 10 测量扩散电流。

此时,如图 4 (a)、(b) 之例所示,还原型 Ru(III)配位体放出电子 e^- 而成为氧化型 Ru(II)配位体。当葡萄糖溶液中除还原型 Ru(III)配位体之外、还同时存在其它还原型物质时,这些物质也释放出与施加电压值相应的成分种类或相应数量的电子而成为氧化型。

15 还原型 Ru(III)配位体及其它还原型物质所释放出的电子被供向第 1 电极 26 的作用部 26a,它们经第 1 探头 3a 而由电流测量部 4 测得作为响应电流。所以,实际测得的响应电流值包括来自于在施加电压时成为还原型的共存物质的电子而形成的部分。形成还原型的共存物质放出电子而成为氧化型的概率(比例)取决于施加在第 1 和第 2 电极 20 26、27 之间的电压大小,施加电压愈大,则释放出电子的共存物质的种类和各共存物质释放出的电子的总量愈多。另外,还原型 Ru(III)配位体不仅包括与氧化还原酶之间的氧化还原反应而给出电子的物质,还包括由于暴露在水和光中而成为还原型 Ru(III)的部分。所以,可以认为实际测得的响应电流值包括来自于由共存物质而引起的本底电流 25 和酶反应以外的电子的还原型 Ru(III)所引起的本底电流。

为此,在本实施方式中,在第 1 和第 2 电极 26、27 之间的一定电压 V,如图 5 所示,与检测部 5 检测到葡萄糖溶液被供给到试剂层 28 为止所加的一定电压 V 的值相同。即,再施加的一定电压 V 小于铁氰化离子的标准氧化还原电位,为 $100 \sim 350\text{mV}$,更优选为 $100 \sim 300\text{mV}$ 。 30 在本实施方式中,第 1 和第 2 电极 26、27 之间(试剂层 28)施加电压值小于使用铁氰化离子(钾)作为介质时。所以,就葡萄糖溶液来说,

可以抑制包括使用血液等情况的抗坏血酸和谷胱甘肽等还原型物质因施加电压而被氧化（释放出电子）的情况。由此，可以减小因还原性共存物质的影响而引起的本底电流。结果，即使不实行考虑还原性共存物质的影响而对实测值的修正，也可以高精度计算浓度。

5 另外，由于 Ru 配位体中氧化型（II）明显比还原型（III）稳定，所以即使在光照射和存在水分的情况下也难于分解，其大部分到由酶反应而得到电子为止均以氧化型（II）的状态存在。所以由来自酶反应以外的电子而成为还原型的 Ru(III)配位体的比例明显减小，因此也可减小本底电流。所以，在保存葡萄糖传感器 2 时几乎不必考虑水分的影响，所以不需利用氮气置换处理等而降低水分的处理。结果，在工业化大批量生产葡萄糖传感器 2 时，就因为其制造容易而有利于降低成本。

15 另外，在本实施方式中，根据由试剂层 28 整体生成的还原型 Ru(II)配位体的扩散电流作为响应电流而测量。即，如图 4 (a) 和 (b) 所示，两个氧化还原反应双方都发生在试剂层 28 的各处，所以，供给葡萄糖溶液后，葡萄糖反应立即结束。因此，当葡萄糖浓度为 600mg / dL 左右时，经过测量响应电流值的时刻——例如开始供给葡萄糖后的 5 秒——时，与葡萄糖浓度相应量的氧化型 Ru(III)配位体形成还原型 Ru (II)。所以，即使葡萄糖浓度为 100mg / dL 的水平，响应电流值为 μA 级时，相对较大，所以不易受电磁波等干扰的影响。所以不须增大以确保电极面积就可以高精度测量葡萄糖浓度。另外，例如，当将介质和酶固定在电极上，仅电极表面上发生酶催化反应，使介质和电极之间发生电子转移，测定此时的电子转移量（催化电流）时，难于以高精度进行测量。即，在与葡萄糖和电极之间的电子转移相关的多个反应中，只要一个反应比其它反应慢，则该反应就会限制反应速度，即使供给一定浓度以上的葡萄糖，响应电流值也不会一定值以上。所以，在葡萄糖浓度比较大的范围内的响应电流值逐渐接近一定值，难于测量高浓度。对此，在测量扩散电流时，由于是在葡萄糖反应事实上结束时测量响应电流值，所以即使在高浓度区域，也可以精确测量葡萄糖浓度。

30 另外，在计算部 7，在再次向第 1 和第 2 电极 26、27 之间施加电

压起经过一定时间（例如 $t_2 - t_1 = 3$ 秒以上，更优选为 3~5 秒） t_2 点，根据在电流测量部 4 上测得的响应电流 I_2 ，进行葡萄糖溶液中的葡萄糖浓度的计算。葡萄糖浓度的计算是在将响应电流值换算为电压值后，将该电压值与通过预先作好的表示电压值和葡萄糖浓度之间的关系的计量曲线相对照而进行计算。计量曲线与被量化而进行计算的程序一起载入 ROM，利用 CPU 和 ROM 而运行载入该 ROM 的程序，从而进行葡萄糖浓度的计算。

实施例

以下，通过实施例 1~8 证实：利用酶反应测量葡萄糖浓度时，使用 Ru 配位体作为介质时，可用低电压在短时间内测量葡萄糖浓度；且受葡萄糖溶液中所含还原物质的影响小；对光和水的暴露耐性高；以及试剂层溶解性高。

（葡萄糖传感器的形成）

在实施例 1~8 中，在基板上使用如图 2 和图 3 所示的形成有第 1 电极、第 2 电极、试剂层和流通路的葡萄糖传感器。由炭糊利用丝网印刷在基板上形成第 1 和第 2 电极。

在实施例 1~6 中，将两个葡萄糖传感器进行了比较。一个是本发明的葡萄糖传感器 1，另一个是对照葡萄糖传感器 1。如下表 1 所示，该葡萄糖传感器的试剂层的配方不同。该试剂层是将包括介质、氧化还原酶和磷酸钾缓冲液的试剂 $1\mu\text{L}$ 在基板上点触后干燥而形成。

表 1

	试剂层配方		
	介质	氧化还原酶	缓冲液
本发明葡萄糖传感器 1	300mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	5000U / ml PQQGDH	50mM 磷酸钾
对照葡萄糖传感器 1	300mM K ₃ [Fe(III)(CN) ₆]	5000U / ml PQQGDH	50mM 磷酸钾

在实施例 7 中，如下表 2 所示，使用与实施例 1~6 的氧化还原酶种类不同的两个本发明的葡萄糖传感器 2、3。试剂层以外的构成与实施例 1~6 的葡萄糖传感器相同。另外， αGDH 和 CyGDH 如上所述。

表 2

	试剂层配方		
	介质	氧化还原酶	缓冲液
本发明葡萄糖传感器 2	300mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	600U / ml CyGDH	250mM 磷酸钾
本发明葡萄糖传感器 3	300mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	600U / ml α GDH	250mM 磷酸钾

在实施例 8 中，如下表 3 所示，使用 GOD 作为氧化还原酶的本发明的葡萄糖传感器 4 和对照葡萄糖传感器 2。试剂层以外的构成与实施例 1~6 的葡萄糖传感器相同。

5 表 3

	试剂层配方		
	介质	氧化还原酶	缓冲液
本发明葡萄糖传感器 4	300mM [Ru(III)(NH ₃) ₆]Cl ₃	5000U / ml GOD	50mM 磷酸钾
对照葡萄糖传感器 2	300mM K ₃ [Fe(III)(CN) ₆]	5000U / ml GOD	50mM 磷酸钾

实施例 1

在本实施例中，通过研究 CV 波形评测葡萄糖传感器的电极响应特性。研究 CV 波形时，是在葡萄糖传感器的试剂层上点触了葡萄糖溶液后，以 50mV / sec 的扫描速度，按照 0mV→+800mV→0mV→-800mV→0mV→+800mV 的方式施加电压，进行扫描，并测量扫描时的响应电流。葡萄糖溶液使用浓度为 200mg / dL 的标准液（将葡萄糖溶解在生理盐水（0.9wt%NaCl）中调制而成）。点触在试剂层的葡萄糖溶液量为 1 μ L。CV 波形如图 6 所示。

15 由图 6 的 CV 波形可知：当施加电压第 2 次达到 0mV→+800mV 的范围内，本发明的以 [Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃ 为介质的葡萄糖传感器 1 上施加电压约为 100mV 时响应电流值最大，而使用 K₃[Fe(III)(CN)₆] 的葡萄糖传感器 1 上施加电压为 300mV 弱时响应电流值最大。图 6 的 CV 波形的意义是：当以 [Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃ 为介质时，施加电压设为 100mV
20 以上时，可将几乎所有还原型氧化为氧化型，同样，在使用 K₃[Fe(III)(CN)₆] 时，施加电压需设在 300mV 以上。各介质的响应电流

值为最大值时的施加电压值与各介质的标准氧化还原电位大致一致。

所以，当使用标准氧化还原电位小的 Ru 配位体为介质时，不降低施加电压也能精确测量葡萄糖浓度，此时，就可在减小因还原性共存物质所引起的本底电流的同时以高精度进行测量。

5 实施例 2

在本实施例中，研究能否在低电压（200mV）下精确测量葡萄糖浓度。在对其进行研究时，分别对本发明的葡萄糖传感器 1 和对照葡萄糖传感器使用葡萄糖浓度为 0mg / dL、200mg / dL、400mg / dL、600mg / dL 的 4 种标准液，分别测量施加电压为 500mV 和 200mV 时的响应电流值。持续第 1 电极和第 2 电极之间加有电压的状态，在试剂层点触 1 μ L 的标准液后，经 5 秒后测量响应电流值。其结果如图 7 所示。

由图 7 可知，当施加电压为 500mV 时，本发明的葡萄糖传感器 1 图中点集线性程度高，即使葡萄糖浓度很高（400mg / dL 以上）时也能精确测量葡萄糖浓度。反之，对照葡萄糖传感器 1 在葡萄糖浓度高时（400mg / dL 以上）有些许偏离线性关系，但作为整体仍呈现很好的线性关系。

另外，当施加电压为 200mV 时，当葡萄糖浓度高时（400mg / dL 以上），本发明的葡萄糖传感器 1 的图中点集有些许偏离线性关系，但图中点集线性程度仍很高。本发明的葡萄糖传感器 1 在 200mV 时偏离线性的程度小于对照葡萄糖传感器 1 在 500mV 时偏离线性的程度。

因此，在使用 Ru 配位体作为介质时，可以确定，即使在施加电压为 200mV 的低电压下，至少在葡萄糖浓度为 0~600mg / dL 的范围内可精确进行葡萄糖浓度的测量。所以，当使用 Ru 配位体为介质时，可以低电压驱动浓度测量装置，减少功率消耗，降低运营成本。

25 实施例 3

在本实施例中，对精确测量葡萄糖浓度时所需时间进行了研究。在进行该研究时，在向试剂层点触了 1 μ L 的葡萄糖浓度为 400mg / dL 的全血后，经 0 秒、1 秒、2 秒和 10 秒后，开始在第 1 和第 2 电极之间施加 500mV 的电压，测量继续施加电压的情况下测得的响应电流随时间的变化。其结果示于图 8 和图 9 中。

由图 8 可知, 在本发明的葡萄糖传感器 1 中, 不论施加电压前的时间(未加电压状态的时间)的长短, 从开始施加电压 3 秒后, 各测量值呈一致。所以, 在本发明的葡萄糖传感器中, 当施加电压时间在 3 秒以上时, 可得到稳定的测量结果, 参照图 9 可知, 它比使用 Fe 配位体为介质时的施加时间短。另外, 由于即使延长未加电压状态的时间也没有实际益处, 所以, 考虑图 8 的结果后, 在本发明中, 葡萄糖传感器 1 不加电压状态时间确保为 10 秒以下已足够, 从供给葡萄糖溶液到测量用于计算葡萄糖浓度的响应电流为止的时间确保为 10~15 秒即已足够。所以, 由图 8 和图 9 所示结果可知, 使用 Ru 配位体为介质时, 与使用 Fe 配位体为介质时相比, 可以缩短时间。

实施例 4

在本实施例中, 对还原性共存物质的影响(本底电流的影响)进行了研究。分别对本发明的葡萄糖传感器 1 和对照葡萄糖传感器 1 使用葡萄糖浓度为 0mg / dL、200mg / dL、400mg / dL、600mg / dL 的 4 种全血(葡萄糖浓度以外成分调整为人血中的平均浓度)分别测量施加电压为 500mV 和 250mV 时的响应电流值。在对试剂层点触 1 μ L 的全血后 10 秒内为未加电压状态, 然后在开始对第 1 电极和第 2 电极之间施加电压起 5 秒后测量响应电流值。其结果如图 10 和图 11 所示。

由图 10 和图 11 可知, 对照葡萄糖传感器 1 与本发明的葡萄糖传感器 1 相比, 整体响应电流值高。据认为, 这是因为对照葡萄糖传感器 1 与本发明的葡萄糖传感器 1 相比, 受血液中的还原性共存物质的影响大, 由本底电流导致的响应电流值大。

在此值得注意的是, 对照葡萄糖传感器 1 即使葡萄糖浓度为 0mg / dL 时, 测得的响应电流仍为正值。这一点据认为也是由于还原性物质导致的本底电流的影响使得对照葡萄糖传感器 1 的响应电流值增大。

在此, 对于葡萄糖浓度为 0mg / dL 时的响应电流值, 如图 12 的柱状图所示。由该图可知, 对于对照葡萄糖传感器 1, 即使葡萄糖浓度为 0mg / dL 也可测得较大的响应电流值, 其受到还原性共存物质的很大影响。反之, 对于本发明的葡萄糖传感器 1, 在葡萄糖浓度为 0mg / dL 时, 测得响应电流值很小, 明显降低了受还原性共存物质影响的程度。所以, 当使用 Ru 配位体作为介质时, 就可在不需考虑还原性共

存物质的影响并进行修正的情况下，以高精度进行浓度计算。

实施例 5

在本实施例中，对暴露耐性进行了评价。评价该暴露耐性时，是将同时制成的本发明的葡萄糖传感器 1 和对照葡萄糖传感器 1 置于维持着相对湿度为 50%、温度为 25℃ 的条件的恒温恒湿室内，使用葡萄糖浓度为 0mg / dL 的标准液测量响应电流值。在向试剂层点触了标准液起 10 秒后，开始在电极间施加 500mV 的电压，同时，在开始加电压 5 秒后测量响应电流值。在恒温温室内的放置时间为 1 日和 4 日，另外，以相同的条件测量即将置于恒温恒湿室内之前（初期）的和封闭在加有 6g 分子筛（Molecular Sieves）（除湿剂）的干燥器（内容积 0.2L、初始设定相对湿度 50%、温度 25℃）内的状态下置于维持着相对湿度 50%、温度 25℃ 的条件的恒温恒湿室内 4 日后的（密闭 4 日）传感器的响应电流值。其结果如图 13 所示。

由图 13 可知，在整个环境设定中，本发明的葡萄糖传感器 1 与对照葡萄糖传感器 1 相比，响应电流明显减小，该值在整个环境设定中为相同程度。所以，可以想见，在使用 Ru 配位体为介质时，即使在暴露环境下，试剂层变质（还原）也很少，保存稳定性佳，在长时间内也不易变质。所以，当使用 Ru 配位体为介质时，不必为保存葡萄糖传感器而特别考虑暴露在水分中的影响。所以，在工业化批量生产葡萄糖传感器，再对其包装时，不需在包装内施行氮气置换处理，所以便于制造并可降低成本。

实施例 6

在本实施例中，研究试剂层的溶解性。在研究试剂层的溶解性时，分别对本发明的葡萄糖传感器 1 和对照葡萄糖传感器 1 使用葡萄糖浓度为 0mg / dL、200mg / dL、400mg / dL、600mg / dL 的 4 种标准液，在施加电压为 500mV 的情况下测量响应电流值。在向试剂层点触 1μL 标准液起 10 秒内为未加电压状态，然后在第 1 电极和第 2 电极之间加电压起的 5 秒后测量响应电流值。其结果如图 14 所示。在图 14 中，同时表示了相对于 Fe 配位体的 100 重量份添加有 1 重量份的用作分散剂的无机凝胶时的对照葡萄糖传感器 1 的结果。

由图 14 可知，即使在葡萄糖浓度大时，本发明的葡萄糖传感器 1

线性程度也很高。这意味着无论葡萄糖浓度如何，在从供给标准液起 15 秒以内，试剂层可很好溶解。

5 所以，当使用 Ru 配位体为介质时，试剂层的溶解性好，试剂层整体可形成均匀的反应体系，结果，即使对于葡萄糖浓度相对较高的葡萄糖溶液，不需使用分散剂等与之相应，即可在短时间内以高精度测量浓度。

实施例 7

10 在本实施例中，对具有按上述表 2 所示配方形成的试剂层的本发明葡萄糖传感器 2 和本发明葡萄糖传感器 3，测量浓度不同的 4 种(0mg / dL、200mg / dL、400mg / dL、600mg / dL) 全血的响应电流值。其结果如图 15 所示。在图 15 中，对于与实施例 1~6 的构成相同的本发明的葡萄糖传感器 1，同时表示由同样条件测得的响应电流值的结果。

15 由图 15 可知，即使对于使用 CyGDH 或 α GDH 作为氧化还原酶的本发明葡萄糖传感器 2 和本发明的葡萄糖传感器 3，通过施加 200mV 的低电压，且在开始加电压起的 5 秒的短时间内，也可以从相对较低浓度到较高浓度范围内精确进行浓度测量。另外，由图 15 可知，对于该葡萄糖传感器，本底电流小。所以，当使用 Ru 配位体为介质时，对于各种 GDH，可以得到实施例 1~实施例 6 中所述效果。

实施例 8

20 在本实施例中，对于使用 GOD 作为氧化还原酶的同时，使用 Ru 配位体为介质的本发明的葡萄糖传感器 4 和使用 GOD 为氧化还原酶、同时使用铁氰化钾为介质的对照葡萄糖传感器 2，与实施例 7 一样，测量其响应电流值。其结果如图 16 所示。

25 由图 16 可知，即使在将 GOD 和 Ru 配位体组合时，与实施例 1~实施例 6 中所用的本发明葡萄糖传感器 1 一样，即使在葡萄糖浓度较高时，线性程度也很好，本底电流小。所以，即使在将 GOD 和 Ru 配位体组合时，也可得到实施例 1~实施例 6 中所示的效果。

30 如上所述，在本发明中，在较短测量时间内，从对象物浓度较低的试料液到对象物浓度较高的试料液，既可降低还原性共存物质的影响，又可充分确保试剂层的溶解性，从而可精确测量试料液中的待测对象的浓度。

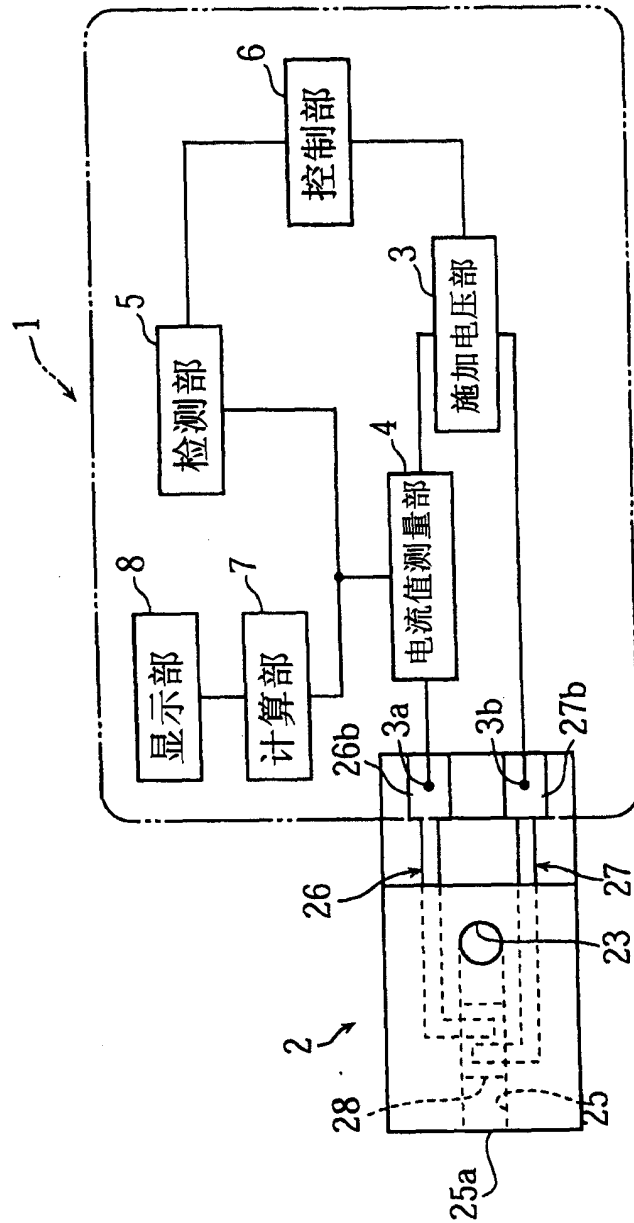


图 1

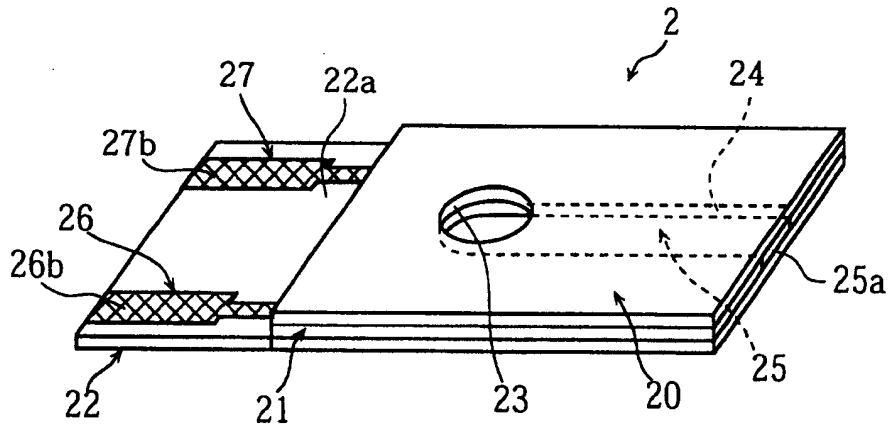


图 2

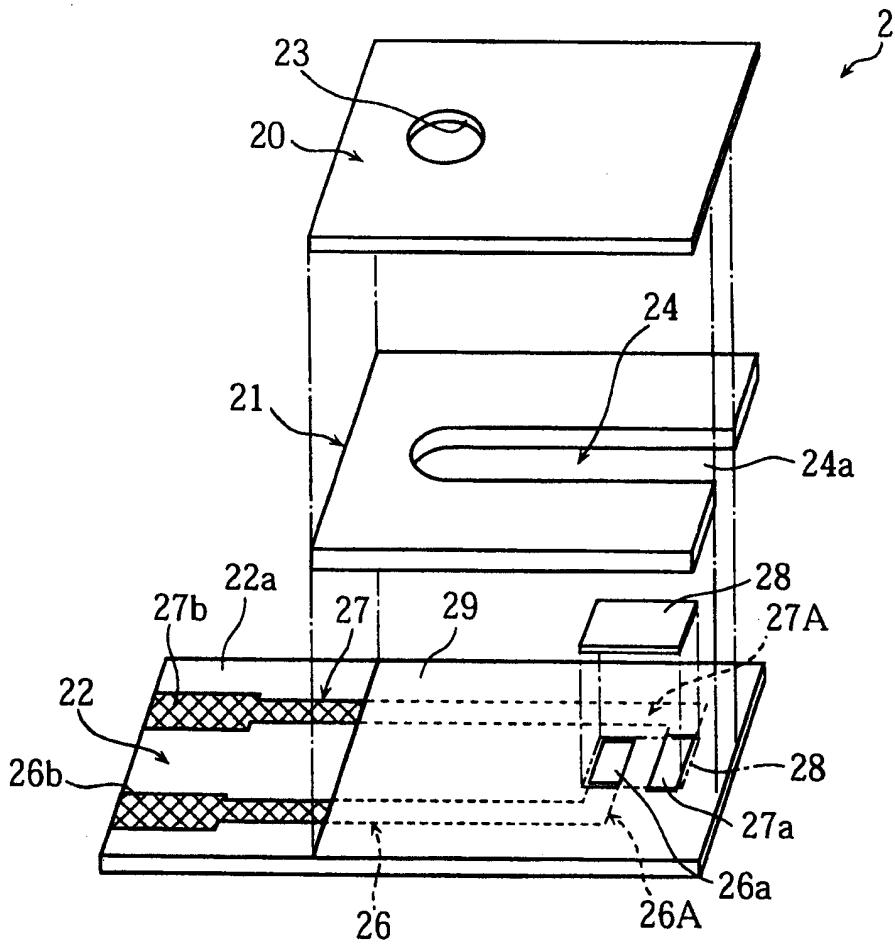


图 3

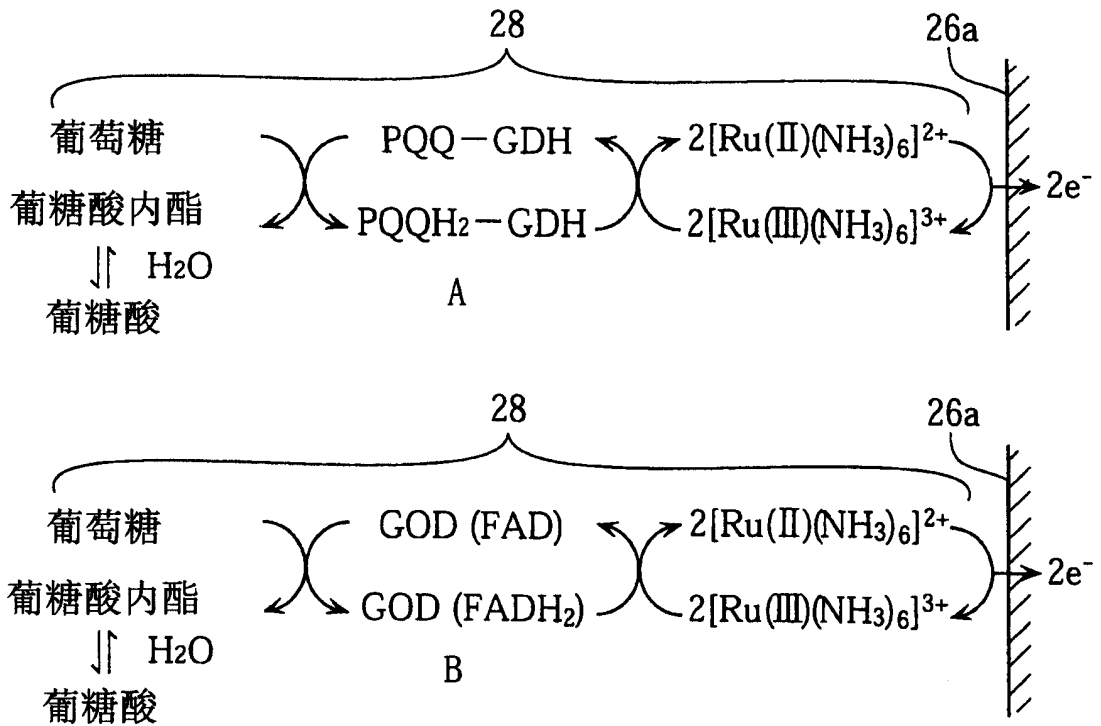


图 4

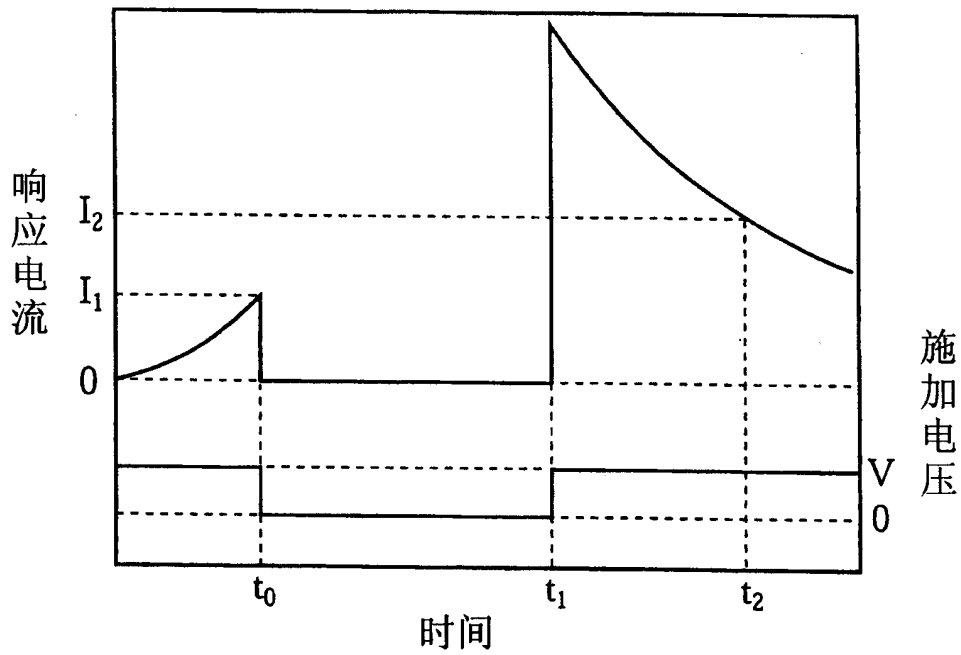


图 5

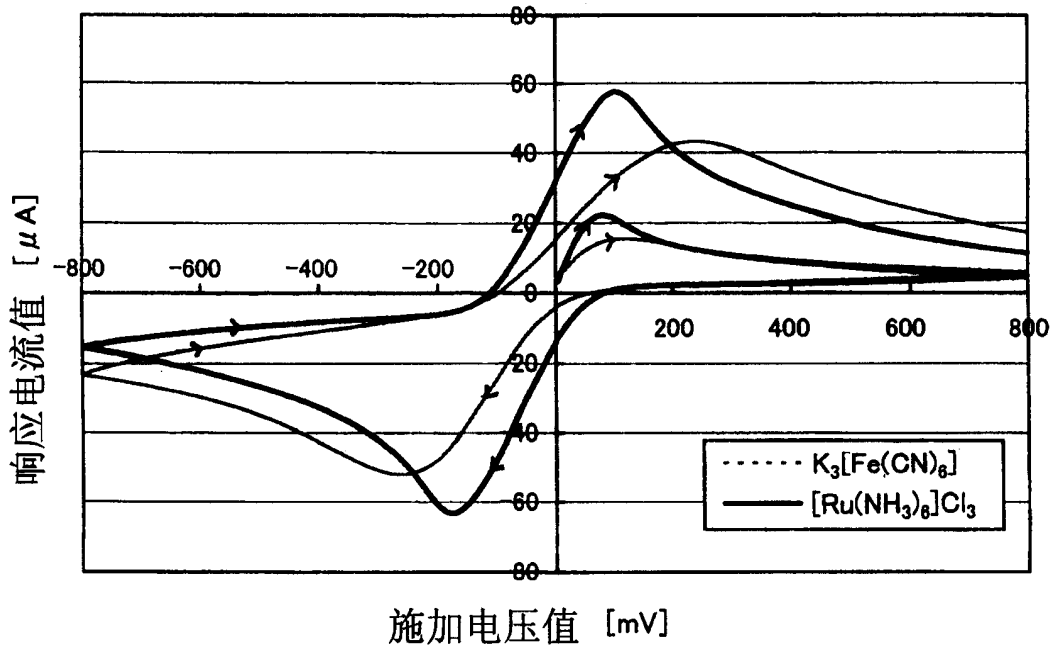


图 6

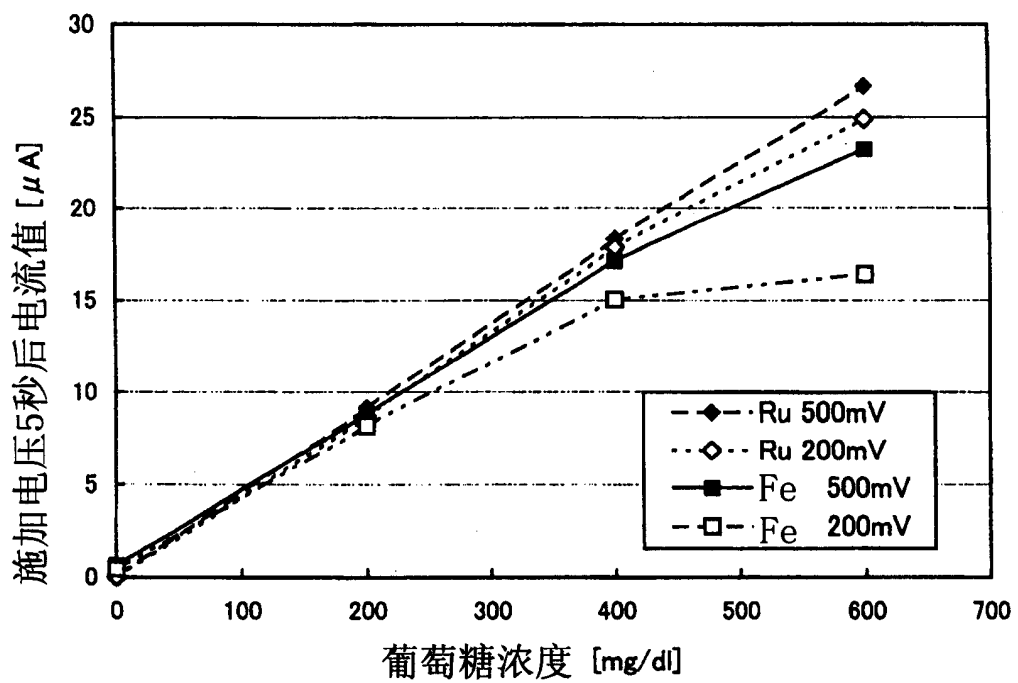


图 7

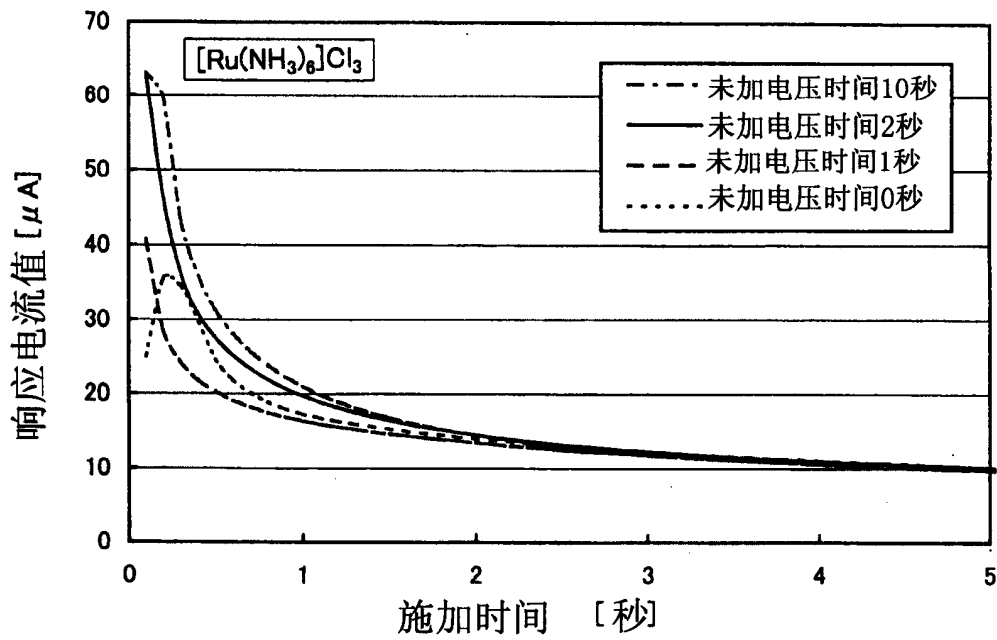


图 8

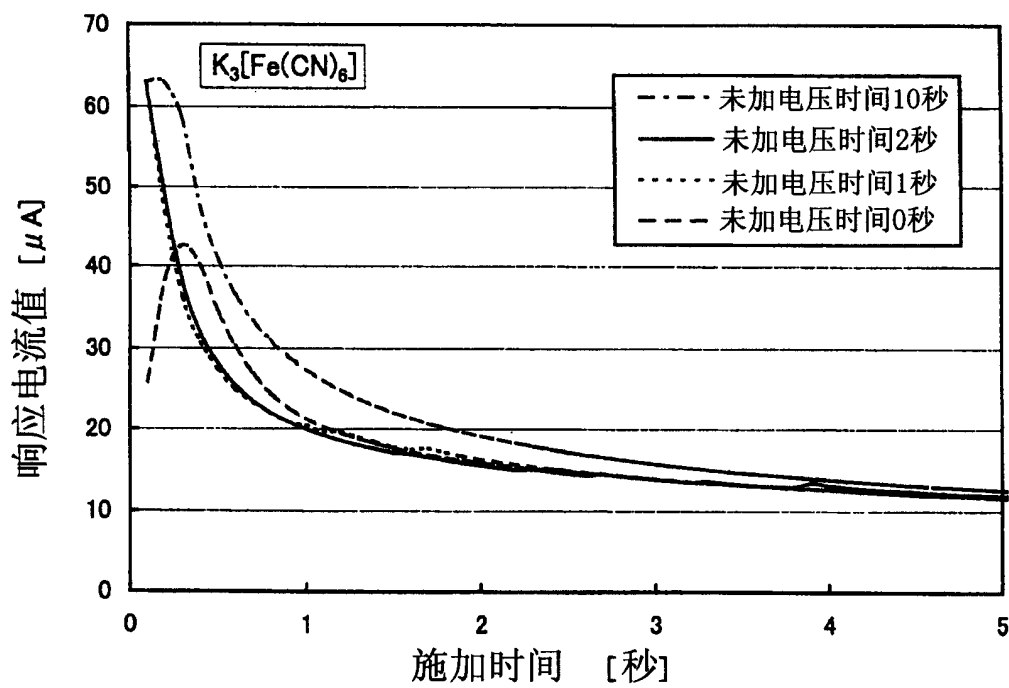


图 9

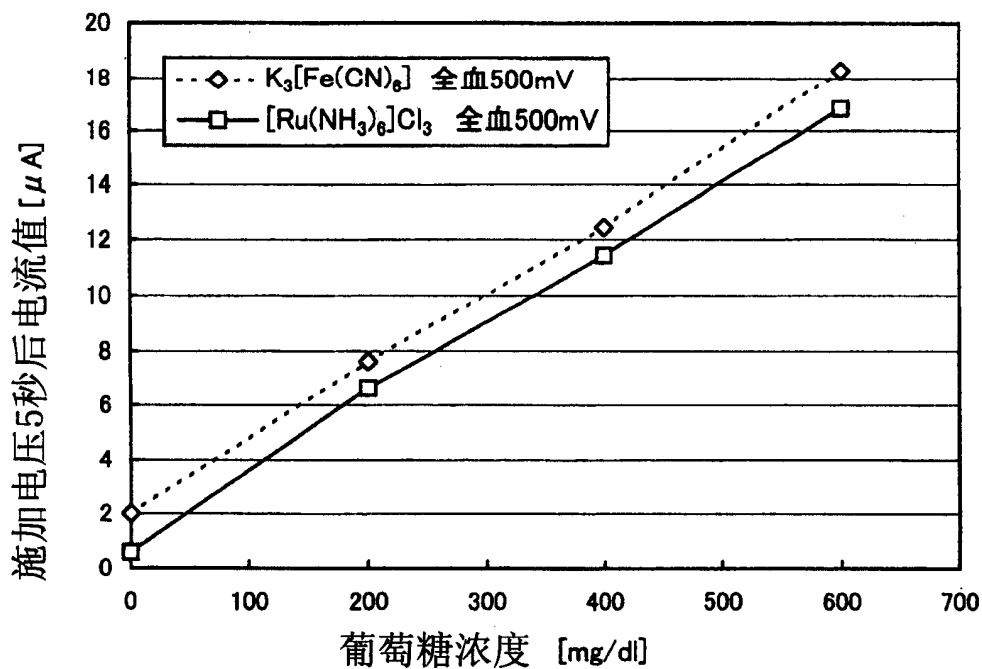


图 10

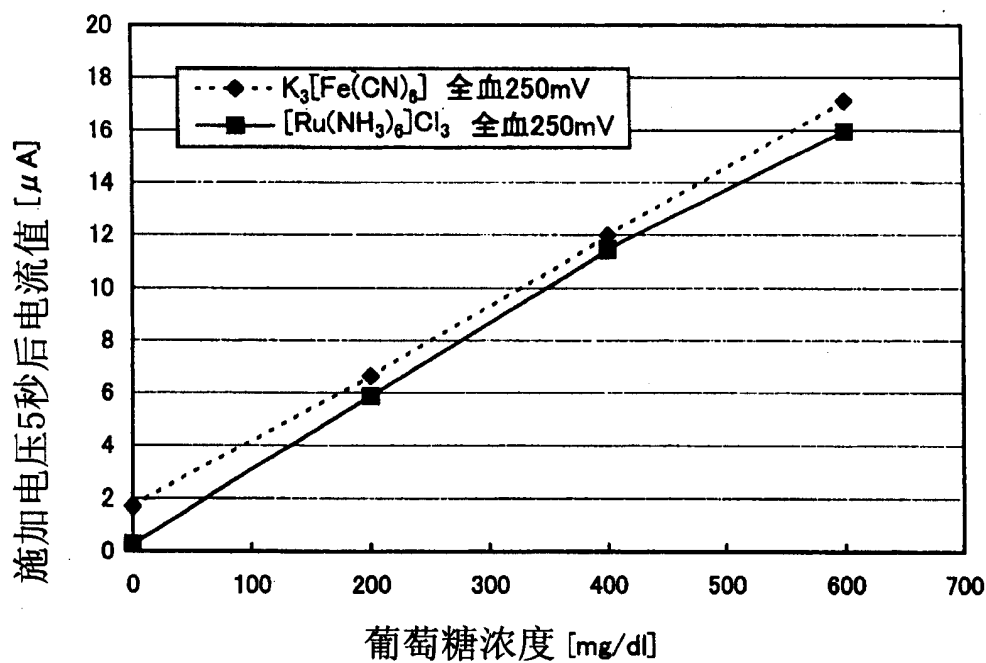


图 11

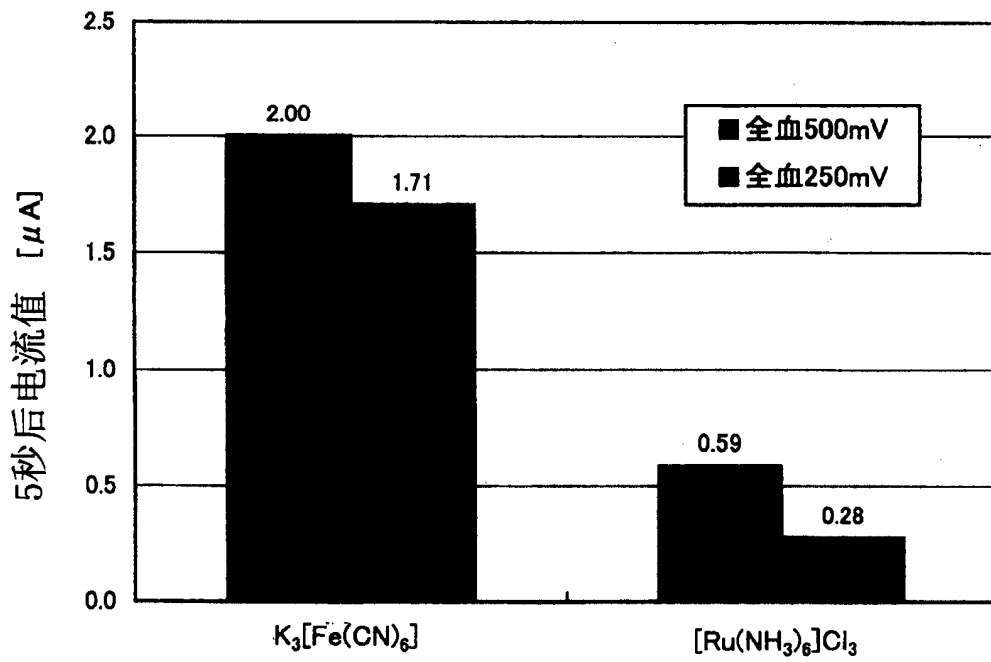


图 12

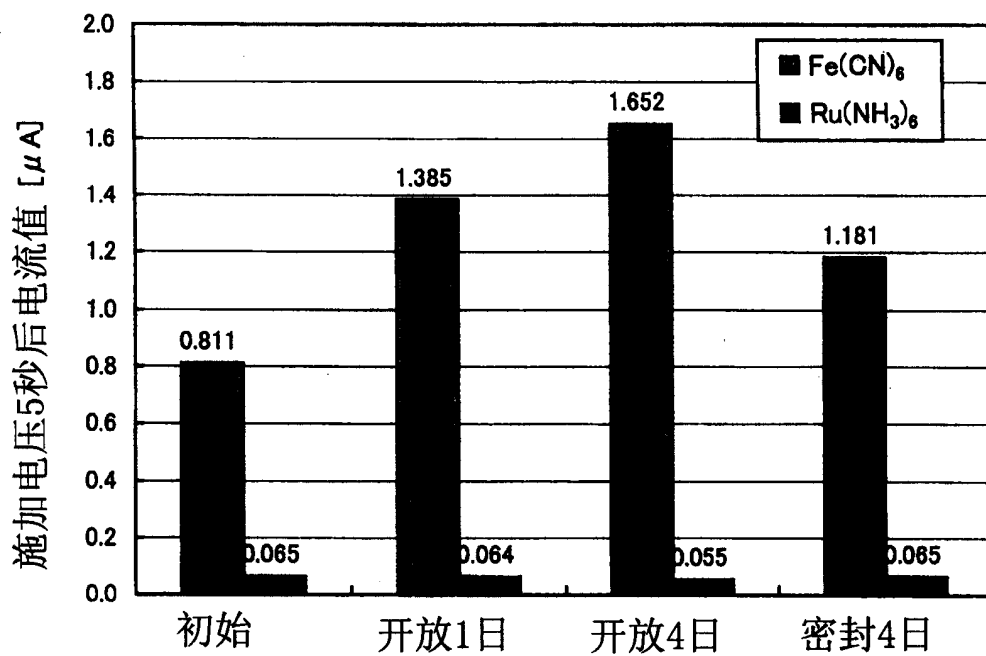


图 13

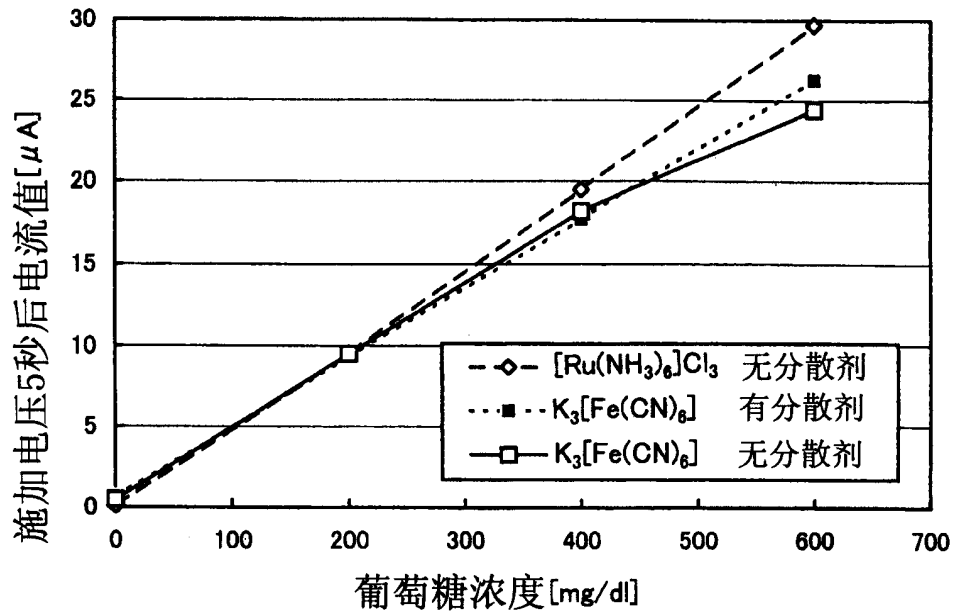


图 14

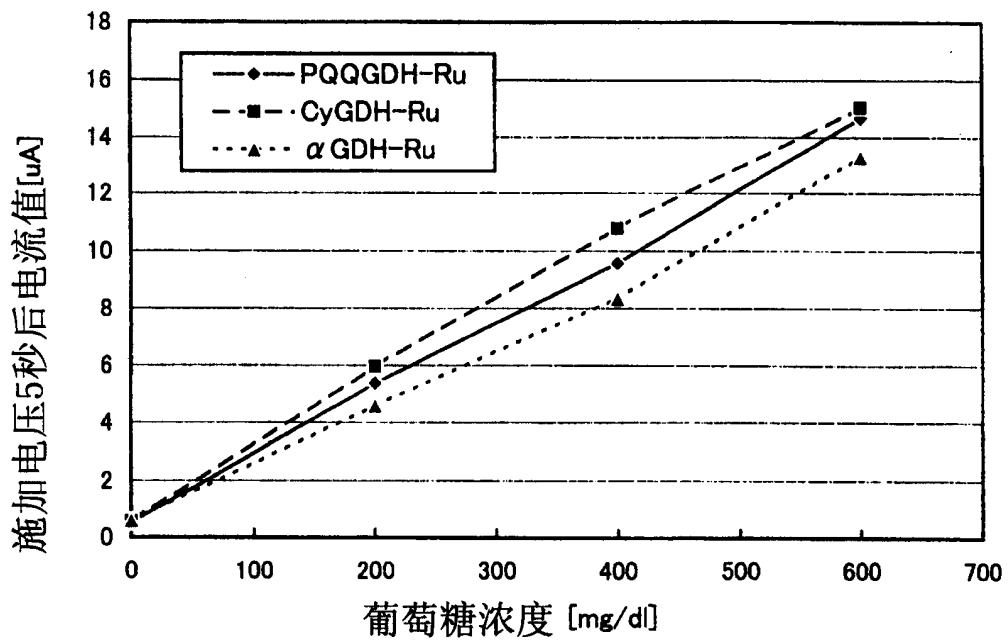


图 15

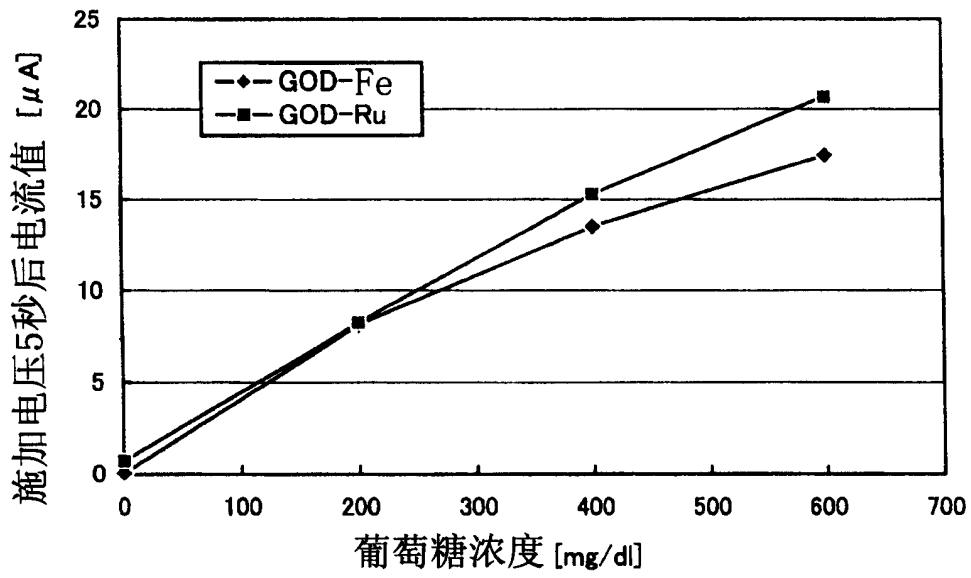


图 16