



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 22 949 T2 2005.03.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 901 018 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 22 949.5

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 113 887.8

(96) Europäischer Anmeldetag: 24.07.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.03.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 07.04.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.03.2005

(51) Int Cl.⁷: G01N 33/48
C12Q 1/00

(30) Unionspriorität:
20337197 29.07.1997 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
**Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Kadoma,
Osaka, JP**

(72) Erfinder:
**Ikeda, Shin, Katano-city, JP; Yoshioka, Toshihiko,
Hirakata City, JP; Nankai, Shiro, Hirakata City, JP**

(74) Vertreter:
JUNG HML, 80799 München

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

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, 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**STAND DER TECHNIK**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zu schnellen und einfachen Messung mit hoher Genauigkeit eines Substrats, das in einer Probe wie Blut, Urin oder Fruchtsaft enthalten ist.

[0002] Ein konventionelles einfaches Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer bestimmten Komponente in einer Probenlösung ohne Verdünnen oder Rühren besteht darin, die bestimmte Komponente mit einer Oxidoreductase zur Reaktion zu bringen, wobei das Substrat der Oxidoreductase der bestimmten Komponente in der Gegenwart eines Elektronenüberträgers oder Elektronenakzeptors entspricht, und dann den Elektronenüberträger, der durch diese enzymatische Reaktion reduziert worden ist, elektrochemisch zu oxidieren und dabei den Oxidationsstrom zu messen, der während dieser elektrochemischen Oxidation fließt.

[0003] Bei diesem Verfahren ist es üblich, einen Biosensor zu verwenden, wie er in der japanischen offen gelegten Patentveröffentlichung Hei 3-202764 offenbart ist.

[0004] Der Biosensor wird hergestellt, indem zunächst mittels eines Siebdruckverfahrens oder dergleichen ein Elektrodensystem gebildet wird, das eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode auf einer elektrisch isolierenden Grundplatte aufweist, danach über dem Elektrodensystem eine Reaktionsschicht gebildet wird, die eine Oxidoreductase und einen Elektronenüberträger umfasst, und schließlich eine Abdeckung und ein Abstandshalter auf die elektrisch isolierende Grundplatte geklebt wird.

[0005] Mit diesem Biosensor lassen sich durch Austauschen der Oxidoreductase verschiedene definite Komponenten quantitativ bestimmen.

[0006] In diesem Dokument wird ein Glucosesensor als Beispiel für einen Biosensor beschrieben.

[0007] Ein bekanntes konventionelles Verfahren zur quantitativen Messung von Glucose wird mittels eines Systems durchgeführt, das eine Kombination von Glucoseoxidase mit einer Sauerstoffelektrode oder einer Wasserstoffperoxidelektrode umfasst (z. B. „Biosensor“, hrsg. von Shuichi Suzuki, Kodansha, Japan).

[0008] Glucoseoxidase oxidiert selektiv das Substrat β -D-Glucose zu D-Glucono- δ -Lacton, wobei in einer Probenlösung gelöster Sauerstoff als Elektronenüberträger dient.

[0009] Wenn das Substrat durch die Glucoseoxida-

se oxidiert wird, wird der als Elektronenüberträger verwendete Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert. Die Glucosekonzentration lässt sich entweder unter Verwendung einer Sauerstoffelektrode durch Messung des Volumens des während dieser Reaktion verbrauchten Sauerstoffs oder unter Verwendung einer Wasserstoffperoxidelektrode aus Platin oder dergleichen durch Messung des Volumens des entstandenen Wasserstoffperoxids quantitativ bestimmen.

[0010] Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, dass die Messung je nachdem, an was für einem Objekt die sie durchgeführt wird, stark von der in einer Probenlösung enthaltenen Sauerstoffkonzentration beeinflusst wird. Ein weiterer Nachteil dieses Systems besteht darin, dass es in der Abwesenheit von Sauerstoff nicht funktionieren kann.

[0011] Zur Behebung dieser Probleme ist ein Typ von Glucosesensor entwickelt worden, der als Elektronenüberträger statt Sauerstoff eine organische Verbindung oder einen Metallkomplex wie Kaliumhexacyanoferrat(III), Ferrocenderivate, Chinonderivate, usw. umfasst.

[0012] Dieser Biosensor kann eine bekannte Menge Glucoseoxidase zusammen mit einem Elektronenüberträger in ihrem stabilisierten Zustand auf einem Elektrodensystem tragen. Infolgedessen kann das Elektrodensystem beinahe im trockenen Zustand mit der Reaktionsschicht vereinigt werden.

[0013] Solch ein Biosensor ist im Normalfall für den einmaligen Gebrauch bestimmt und erleichtert die Messung der Glucosekonzentration dadurch, dass von einer zu messenden Probe einfach etwas auf einen Sensorchip geträufelt wird, der in ein Messinstrument montiert ist. Daher hat dieser Biosensor in jüngster Zeit viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

[0014] Wie vorstehend beschrieben, kann das Substrat in einer Probe auf der Basis des Stroms, der während der Oxidation des durch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen reduzierten Elektronenüberträgers durch die Elektroden fließt, quantitativ bestimmt werden.

[0015] Wenn der Wert des Oxidationsstroms mit einem System aus zwei Elektroden gemessen wird, das eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode umfasst, so wird das Vorhandensein eines Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand, der an der Gegenelektrode reduziert werden muss, unerlässlich.

[0016] Wenn erwartet wird, dass die zu messende Probe eine niedrige Substratkonzentration enthält, wird es unnötig, die Gegenwart eines solchen Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand sicherzustellen, da die Menge des oxidierten Elektronenüber-

trägers, die durch enzymatische Reaktion zu reduzieren ist, klein ist.

[0017] Wird hingegen erwartet, dass die Probe eine hohe Substratkonzentration enthält, wird der größte Teil der Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand durch enzymatische Reaktion reduziert, was zu einem Mangel an oxidiertem Elektronenüberträger führt, da dieser an der Gegenelektrode reduziert werden kann. Das hat zur Folge, dass die Reduktion an der Gegenelektrode ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird und den resultierenden Stromwert beeinflusst.

[0018] Darüber hinaus kann je nach Probe eine leicht oxidierbare Substanz vorhanden sein, die oxidiert wird, dadurch zur gleichen Zeit, zu der der Elektronenüberträger im reduzierten Zustand an der Elektrode oxidiert wird, einen Oxidationsstrom herbeiführt und einen positiven Fehler des gemessenen Stromwerts verursacht. Weiter kann der Stromwert bei einer hohen Substratkonzentration schwanken.

KURZE DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, ein Verfahren verfügbar zu machen zur hochpräzisen quantitativen Messung eines Substrats ein innerhalb eines großen Bereichs der Substratkonzentration, insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen, indem die Auswirkung, die ein Mangel an Elektronenüberträger im oxidierten Zustand, der an der Gegenelektrode reduziert werden soll, auf den Stromwert hat, unterdrückt wird und beeinträchtigende Auswirkungen einer leicht oxidierbaren Substanz auf den Stromwert minimiert werden. Die vorliegende Erfindung macht ein Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats verfügbar umfassend: einen ersten Schritt, um zu bewirken, dass ein in einer Probe enthaltenes Substrat mit einer für das Substrat spezifischen Oxidoreductase in der Gegenwart eines Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand reagiert, und

einen zweiten Schritt zur elektrochemischen Reduktion des Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand, der in der enzymatischen Reaktion im ersten Schritt nicht reduziert wurde, wodurch ein Strom erhalten wird, der während der elektrochemischen Reduktion fließt.

[0020] Während die innovativen Merkmale der Erfindung insbesondere in den beiliegenden Ansprüchen dargelegt werden, wird die Erfindung bezüglich Organisation und Inhalt sowie ihrer anderen Aufgaben und Merkmale aufgrund der folgenden detaillierten Beschreibung in Verbindung mit den Zeichnungen besser zu verstehen und zu beurteilen sein.

KURZE BESCHREIBUNG DER VERSCHIEDENEN ANSICHTEN IN DEN ZEICHNUNGEN

[0021] **Abb. 1** ist eine perspektivische Explosionsdarstellung eines Glucosesensors mit einem Zweielektrodensystem, wobei die Reaktionsschicht in einem Beispiel, auf das die vorliegende Erfindung angewendet worden ist, weggelassen wurde.

[0022] **Abb. 2** ist eine perspektivische Explosionsdarstellung eines Glucosesensors mit einem Dreielektrodensystem, wobei die Reaktionsschicht in einem Beispiel, auf das die vorliegende Erfindung angewendet worden ist, weggelassen wurde.

[0023] **Abb. 3.** ist eine Querschnittsansicht in Längsrichtung, die den entscheidenden Teil desselben Glucosesensors zeigt, wobei der Abstandshalter und die Abdeckung weggelassen wurden.

[0024] **Abb. 4** ist eine Darstellung der Charakteristik, die wiedergibt, wie ein Glucosesensor mit Zweielektrodensystem auf verschiedene Glucose-Standardslösungen anspricht in einem Beispiel, auf das die vorliegende Erfindung angewendet worden ist.

[0025] **Abb. 5** ist eine Darstellung der Charakteristik, die wiedergibt, wie ein Glucosesensor mit Zweielektrodensystem auf verschiedene Glucose-Standardslösungen anspricht in einem anderen Beispiel, auf das die vorliegende Erfindung angewendet worden ist.

[0026] **Abb. 6** ist eine Darstellung der Charakteristik, die wiedergibt, wie ein Glucosesensor mit Dreielektrodensystem auf verschiedene Glucose-Standardslösungen anspricht in einem anderen Beispiel, auf das die vorliegende Erfindung angewendet worden ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die leicht oxidierbaren Substanzen schließen im Blut enthaltene Ascorbinsäure und Harnsäure ein. Solche Substanzen widerstehen elektrochemischer Reduktion und würden keinen Reduktionsstrom erzeugen.

[0028] Daher ermöglicht es das Verfahren, bei dem die Substratkonzentration quantitativ bestimmt wird, indem ein Elektronenüberträger im oxidierten Zustand reduziert wird, der nach einer Reihe von enzymatischen Reaktionen nicht reduziert zurückbleibt, und indem weiter der Reduktionsstrom während des Reduktionsvorgangs abgelesen wird, die beeinträchtigende Auswirkung der leicht oxidierbaren Substanz zu minimieren, wodurch eine höhere Genauigkeit bei der quantitativen Bestimmung eines Substrats erreicht wird.

[0029] Wenn das Zweielektrodensystem zur Messung des Werts des Reduktionsstroms angewendet wird, so ergibt sich unter dem Aspekt der Oxidoreduktion, die an den Elektroden stattfindet, dass die Oxidation des Elektronenüberträgers im reduzierten Zustand den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt wegen eines geringen Volumens des Elektronenüberträgers, das durch die enzymatische Reaktion reduziert worden ist, wenn die Substratkonzentration niedrig ist. Der Wert des Reduktionsstroms wächst daher mit wachsender Substratkonzentration.

[0030] Da der Elektronenüberträger im oxidierten Zustand mit einem Anstieg der Substratkonzentration abnimmt, entsteht bei einer bestimmten Substratkonzentration ein Mangel des Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand. Daher ist in der an den Elektroden stattfindenden Oxidoreduktion die Reduktion des Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, was sich in einem verringerten Wert des Reduktionsstroms manifestiert.

[0031] Der Wert des Reduktionsstroms während dieses Vorgangs spiegelt exakt die Menge an Elektronenüberträger im oxidierten Zustand wieder, die nicht durch die enzymatische Reaktion reduziert werden konnte, wodurch es zu der ungewöhnlichen Charakteristik kommt, mit der der Sensor auf die Substratkonzentration anspricht.

[0032] Selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen ist es vorzuziehen, dass ein Elektronenüberträger im reduzierten Zustand an der enzymatischen Reaktionssystem beteiligt ist, wobei das Substrat mit einem Enzym (Oxidoreductase) in Gegenwart eines Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand zur Reaktion gebracht wird, damit die Reduktion des Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Beteiligung des Elektronenüberträgers im reduzierten Zustand an der enzymatischen Reaktion erleichtert die hochpräzise quantitative Bestimmung eines Substrats in einem größeren Bereich von Substratkonzentrationen.

[0033] Das Verfahren zur Messung des Werts des Reduktionsstroms schließt das Zweielektrodensystem ein, das eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode aufweist, sowie das Dreielektrodensystem, das weiter eine Bezugselektrode aufweist. Die letztere ermöglicht eine genauere quantitative Bestimmung eines Substrats bei höheren Konzentrationen.

[0034] Die Anwendung des Verfahrens zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß der vorliegenden Erfindung auf einen Biosensor umfassend ein Elektrodensystem, das wenigstens eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode aufweist, die sich auf einer elektrisch isolierenden Grundplatte befinden,

sowie eine auf dem Elektrodensystem angeordnete Reaktionsschicht, die wenigstens eine Oxidoreductase einschließt, ermöglicht die quantitative Bestimmung einer bestimmten in einer Substanzprobe enthaltenen Komponente mit hoher Genauigkeit und ist somit zu bevorzugen.

[0035] Die weitere Einbeziehung eines hydrophilen Polymers in der Reaktionsschicht ist zu bevorzugen, da es nützlich ist, um die Adsorption von in der Probe enthaltenem Protein oder dergleichen auf der Oberfläche des Elektrodensystems zu verhindern.

[0036] Die Beschichtung der Oberfläche der Reaktionsschicht mit einer lipidhaltigen Schicht erleichtert das problemlose Aufbringen der Probe auf die Reaktionsschicht. Diese Lipidbeschichtung kann aufgebracht werden, wenn es die Umstände erforderlich machen.

[0037] Weiter kann in der Reaktionsschicht ein pH-Puffer einbezogen sein, um die Enzymaktivität in der Reaktionsschicht zu steigern.

[0038] Beispiele für anwendbare Oxidoreductasen sind Glucoseoxidase, Glucosedehydrogenase, Lactatoxidase, Lactatdehydrogenase, Uricase, Fructose-dehydrogenase, Alkoholoxidase, Cholesterinoxidase, Xanthinoxidase, Aminosäureoxidase und dergleichen.

[0039] Eine Kombination mehrerer Oxidoreductasen kann ebenfalls verwendet werden, beispielsweise Glucoseoxidase und Invertase, Glucoseoxidase und Invertase und Mutarotase, Fructosedehydrogenase und Invertase oder dergleichen.

[0040] Als Elektronenüberträger können Kaliumhexacyanoferrat(III), p-Benzochinon, Phenazinmethosulfat, Methylenblau, Ferrocenderivate oder dergleichen verwendet werden. Die Verwendung von Sauerstoff als Elektronenüberträger kann ein ähnliches Ansprechen des Sensors ergeben. Die genannten Elektronenüberträger werden jeweils einzeln oder in Kombination verwendet (eine Kombination von zwei oder mehr dieser Substanzen).

[0041] Beispiele für verwendbare hydrophile Polymere sind Carboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Gelatine oder ein Gelatinederivat, ein Acrylsäure- oder Acrylatpolymer, ein Methacrylsäure- oder Methacrylatpolymer, Stärke oder ein Stärkederivat, ein Polymer aus Maleinsäureanhydrid oder Maleat, Cellulosederivate wie Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose, Ethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Ethylhydroxyethylcellulose, Carboxymethylcellulose oder dergleichen, Polyamino-säuren wie Polylysin und Polystyrolsulfonat.

[0042] Von diesen sind Carboxymethylcellulose,

Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose, Ethylcellulose, Ethylhydroxyethylcellulose und Carboxymethylcellulose zu bevorzugen. Polyaminosäuren wie Polylysin, Polyvinylalkohol und Polystyrolsulfonat können ebenfalls bevorzugt verwendet werden.

[0043] Als Lipid kann vorzugsweise ein beliebiges amphipathische Phospholipid wie Lecithin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder dergleichen verwendet werden. Beispiele für verwendbare pH-Puffer sind Kaliumdihydrogenphosphat-Dikaliumphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat-Dinatriumphosphat, Natriumdihydrogenphosphat-Dikaliumphosphat, Natriumdihydrogenphosphat-Dinatriumphosphat, Citronensäure-Dinatriumphosphat, Citronensäure-Dikaliumphosphat, Citronensäure-Trinatriumcitrat, Citronensäure-Trikaliumcitrat, Kaliumdihydrogencitrat-Natriumhydroxid, Natriumhydrogenmaleat-Natriumhydroxid, Kaliumhydrogenphthalat-Natriumhydroxid, Bernsteinsäure-Natriumtetraborat, Maleinsäure-[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan], [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]-[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid], (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure))-Natriumhydroxid, [N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure]-Natriumhydroxid, [Piperazin-NN'-bis-(2-ethansulfonsäure)]-Natriumhydroxid und dergleichen.

[0044] Die genannte Enzyme und Elektronenüberträger können in einer Probenlösung aufgelöst sein oder aber von der Probenlösung getrennt sein, indem die Enzymschicht, die diese Bestandteile einhält, auf die Grundplatte aufgebracht wird, um zu verhindern, dass sie sich direkt in der Probenlösung auflösen. Wird der letztere Aufbau gewählt, enthält die Reaktionsschicht vorzugsweise ein hydrophiles Polymer.

[0045] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsformen eingehender beschrieben.

[0046] Abb. 1 zeigt eine perspektivische Explosionsdarstellung eines Glucosesensors mit einem Zweielektrodensystem, wobei die Reaktionsschicht weggelassen wurde. Eine Silberpaste wird mittels des Siebdruckverfahrens auf eine elektrisch isolierende Grundplatte 1 aus Polyethylenterephthalat gedruckt, um die Leitungen 2 und 3 auf der Grundplatte 1 zu bilden. Danach wird eine leitende Kohlepaste, die einen Harzträger enthält, auf die Grundplatte 1 gedruckt, um eine Arbeitselektrode 4 zu bilden. Die Arbeitselektrode 4 hat Kontakt zur Leitung 2. Danach wird weiter eine elektrisch isolierende Schicht 6 auf die Grundplatte 1 aufgebracht, indem eine isolierende Paste darauf gedruckt wird. Die elektrisch isolierende Schicht 6 bedeckt die Umgebung rings um die Arbeitselektrode 4, damit der exponierte Bereich der Arbeitselektrode 4 konstant gehalten wird. Danach

wird eine leitende Kohlepaste, die einen Harzträger enthält, auf die Grundplatte 1 gedruckt, so dass die Kohlepaste Kontakt zu der zuvor gebildeten Leitung 3 bekommt, wodurch eine ringförmige Gegenelektrode 5 geformt wird.

[0047] Danach werden die elektrisch isolierende Grundplatte 1, eine Abdeckung 9 mit einer Lüftungsöffnung 11 und ein Abstandshalter 10 aneinander geklebt, so dass ihre Positionen zueinander der strichpunktuierten Linie in Abb. 1 entsprechen, wodurch ein Biosensor erhalten wird, der als Glucosesensor dient. Der Abstandshalter 10 weist einen Schlitz 13 auf, um zwischen der Grundplatte und der Abdeckung einen Weg freizugeben, durch den eine Probe zugeführt werden kann. Die Zahl 12 entspricht einer Öffnung des Wegs, durch den eine Probe zugeführt werden kann.

[0048] Abb. 2 zeigt eine perspektivische Explosionsdarstellung eines Glucosesensors mit einem Dreielektrodensystem, wobei die Reaktionsschicht weggelassen wurde. Dieser Glucosesensor weist denselben Aufbau wie der in Abb. 1 gezeigte auf mit dem Unterschied, dass der Glucosesensor weiter eine aus Kohlepaste bestehende Bezugselektrode 15 außerhalb des Umfangs der Gegenelektrode 5 umfasst, derart dass sie von der elektrisch isolierenden Schicht 6 aus exponiert ist, sowie eine Leitung 14 für die Bezugselektrode.

[0049] Abb. 3. ist eine Querschnittsansicht in Längsrichtung, die unter Weglassung des Abstandshalters und der Abdeckung den entscheidenden Teil eines Glucosesensors zeigt, wie er in einem Beispiel zur Anwendung der vorliegenden Erfindung verwendet wird.

[0050] Auf der elektrisch isolierenden Grundplatte 1, über der das Elektrodensystem wie in Abb. 1 gezeigt gebildet wurde, ist eine Reaktionsschicht 7 aufgebracht, die ein Enzym und einen Elektronenüberträger enthält, und weiter ist eine Lecithinschicht 8 auf der Reaktionsschicht 7 aufgebracht.

Beispiel 1

[0051] In diesem Beispiel wurde die Reaktionsschicht gebildet, indem eine gemischte wässrige Lösung von Glucoseoxidase (EC1.1.3.4; im Folgenden „GOD“) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) auf das auf der Grundplatte 1 in Abb. 1 gebildete Elektrodensystem aufgetropft und getrocknet wurde. Sodann wurde die Lecithinschicht gebildet, indem eine Lösung von Lecithin in Toluol auf die Reaktionsschicht aufgetropft und getrocknet wurde.

[0052] Die Abdeckung 9 und der Abstandshalter 10 wurden dann in der durch die strichpunktuierte Linie in Abb. 1 angedeuteten Position zueinander auf die

Grundplatte **1** geklebt, wodurch der in diesem Beispiel verwendete Glucosesensor erhalten wurde. Glucose-Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden dann als Probenlösungen zubereitet. Jede dieser wässrigen Glucose-Standardlösungen (3 µl) wurde dem Glucosesensor durch die Öffnung **12** des Wegs für die Zufuhr von Probenlösung zugeführt. Die Probenlösung drang bis zu der Lüftungsöffnung **11** vor und löste die Reaktionsschicht **7** und die Lecithinschicht über dem Elektrodensystem. Wenn die Reaktionsschicht **7** aufgelöst wird, erfolgt eine enzymatische Reaktion, bei der die in der Probenlösung enthaltene Glucose durch die GOD zu Gluconolacton oxidiert wird. Diese enzymatische Reaktion wird gleichzeitig von der Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Kaliumhexacyanoferrat(II) begleitet, wodurch Hexacyanoferrat(II)-Ionen entstehen.

[0053] Als eine gewisse Zeit nach der Zufuhr der Probenlösung verstrichen war, wurde an die Arbeitselektrode bezogen auf die Gegenelektrode **5** eine Spannung von -1,0 V angelegt, wodurch eine Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) an der Arbeitselektrode und eine Oxidation von Kaliumhexacyanoferrat(II) an der Gegenelektrode herbeigeführt wurde, was einen Stromfluss durch die Elektroden bewirkte. Der während dieser Oxidoreduktion fließende Strom wurde 5 Sekunden nach Anlegen der Spannung abgelesen.

[0054] **Abb. 4** zeigt die die Sensorsignale, die den unterschiedlichen wässrigen Glucose-Standardlösungen entsprechen, wobei der Stromwert bei einer Glucosekonzentration von ungefähr 700 mg/dl als 100% definiert wurde.

[0055] Das Sensorsignal stieg im Bereich von 0 bis 700 mg/dl linear mit der Glucosekonzentration an. Dies legt nahe, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Oxidation von Kaliumhexacyanoferrat(II) an der Gegenelektrode ist wegen der geringen Mengen der durch die enzymatische Reaktion erzeugten Hexacyanoferrat(II)-Ionen.

[0056] Wenn die Glucosekonzentrationen 700 mg/dl überschritt, fiel das Sensorsignal ab. Dies weist darauf hin, dass die Reduktion der Hexacyanoferrat(III)-Ionen an der Arbeitselektrode der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist wegen hinreichend großer Mengen der durch die enzymatische Reaktion erzeugten Hexacyanoferrat(II)-Ionen.

[0057] Wie aus **Abb. 4** ersichtlich ist, zeigte der Sensor unabhängig von den Glucose-(Substrat-)Konzentrationen eine ausgezeichnete Ansprechcharakteristik.

Beispiel 2

[0058] In diesem Beispiel wurde eine wässrige Lösung von Carboxymethylcellulose (im Folgenden kurz „CMC“) auf das Elektrodensystem über der Grundplatte **1** in **Abb. 1** aufgetropft und getrocknet, so dass sich eine CMC-Schicht bildete. Danach wurden die Reaktionsschicht und die Lecithinschicht auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 gebildet. Die Gegenwart von CMC minimiert die beeinträchtigende Wirkung, die die Adsorption von Protein an den Elektrodenoberflächen auf die Messung hat.

[0059] Auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 wurde ein Glucosesensor hergestellt und seine Signale bei verschiedenen wässrigen Glucose-Standardlösungen, die wie in Beispiel 1 zubereitet wurden, wurden ausgewertet. Die Ansprechcharakteristik war der aus Beispiel 1 ähnlich, doch waren die Schwankungen schwächer.

Beispiel 3

[0060] In diesem Beispiel wurde die CMC-Schicht auf ähnliche Weise durch Auftröpfen einer wässrigen CMC-Lösung auf das Elektrodensystem über der Grundplatte **1** in **Abb. 1** und anschließendes Trocknen gebildet. Danach wurde eine gemischte wässrige Lösung von GOD, Kaliumhexacyanoferrat(III) und Kaliumhexacyanoferrat(II) auf die CMC-Schicht aufgetropft und getrocknet, um die Reaktionsschicht zu bilden. Auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 wurde ein Glucosesensor hergestellt und seine Signale bei verschiedenen wässrigen Glucose-Standardlösungen, die wie in Beispiel 1 zubereitet wurden, wurden ausgewertet.

[0061] **Abb. 5** fasst die Sensorsignale bei den verschiedenen wässrigen Glucose-Standardlösungen zusammen, wobei der Ansprechstromwert bei einer Lösung mit einer Glucosekonzentration von 0 mg/dl als 100% definiert wurde.

[0062] Wie aus **Abb. 5** ersichtlich ist, fiel das Sensorsignal mit wachsenden Glucosekonzentrationen ab. Der Grund dafür liegt darin, dass Kaliumhexacyanoferrat(II) ebenfalls in der Reaktionsschicht vorhanden war, so dass stets genügend von den an der Gegenelektrode zu oxidierenden Hexacyanoferrat(II)-Ionen zu Verfügung standen, wodurch sichergestellt wurde, dass die Reduktion der Hexacyanoferrat(III)-Ionen an der Arbeitselektrode selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt waren.

[0063] Der Sensor zeigte unabhängig von den Glucose-(Substrat-)Konzentrationen eine ausgezeichnete Ansprechcharakteristik.

Beispiel 4

[0064] In diesem Beispiel wurde die CMC-Schicht durch Auftröpfen einer wässrigen CMC-Lösung auf das Elektrodensystem über der elektrisch isolierenden Grundplatte **1** in **Abb. 2** und anschließendes Trocknen gebildet, wobei es vermieden wurde, dass die CMC-Lösung auf die Bezugselektrode **15** gelangte. Danach wurde eine gemischte wässrige Lösung von GOD und Kaliumhexacyanoferrat(III) auf die CMC-Schicht aufgetropft und getrocknet, um die Reaktionsschicht zu bilden, über die eine Lösung von Lecithin in Toluol aufgetropft und getrocknet wurde, um auf ihr eine Lecithinschicht zu bilden.

[0065] Die Abdeckung **9** und der Abstandshalter **10** wurden dann in der durch die strichpunktuierte Linie in **Abb. 2** angedeuteten Position zueinander auf die Grundplatte **1** geklebt, wodurch der in diesem Beispiel verwendete Glucosesensor erhalten wurde. Jede der verschiedenen in Beispiel 1 zubereiteten wässrigen Glucose-Standardlösungen (3 µl) wurde dem Glucosesensor durch die Öffnung **12** des Wegs für die Zufuhr von Probenlösung zugeführt. Als eine gewisse Zeit nach der Zufuhr der Probenlösung verstrichen war, wurde an die Arbeitselektrode mit der Bezugselektrode **15** als Standard eine Spannung von -0,8 V angelegt. Der durch die Arbeitselektrode **4** und die Gegenelektrode **5** fließende Strom wurde 5 Sekunden nach Anlegen der Spannung abgelesen.

[0066] **Abb. 6** fasst die die Sensorsignale, die den unterschiedlichen wässrigen Glucose-Standardlösungen entsprechen, zusammen, wobei der Signalstromwert bei einer Glucosekonzentration von 0 mg/dl als 100% definiert wurde.

[0067] Wie aus **Abb. 6** ersichtlich ist, zeigte der Sensor über einen großen Bereich von Glucose-(Substrat-)Konzentrationen eine ausgezeichnete Ansprechcharakteristik und ermöglichte eine quantitative Bestimmung bis zu ungefähr 6.000 mg/dl.

Beispiel 5

[0068] Es wurde auf die gleiche Weise wie in Beispiel 4 eine Glucosesensor hergestellt.

[0069] Dann wurden die Signale des Sensors auf die gleiche Weise wie in Beispiel 4 ausgewertet, abgesehen davon, dass verschiedene der in Beispiel 1 zubereiteten wässrigen Glucose-Standardlösungen zusätzlich bekannte Mengen an Ascorbinsäure enthielten und so als Probenlösungen verwendet wurden.

[0070] Der Sensor zeigte Signale, die trotz der Gegenwart von Ascorbinsäure im Wesentlichen identisch mit denjenigen aus Beispiel 4 waren, was eine ausgezeichnete Ansprechcharakteristik demonst-

riert.

[0071] Obwohl in den vorstehend beschriebenen Beispielen leitende Kohlepaste und isolierende Paste verwendet wurden, um die gedruckten Strukturen herzustellen, ist die vorliegende Erfindung nicht auf diese Materialien eingeschränkt.

[0072] Wie vorstehend diskutiert, lässt sich die Konzentration eines Substrats gemäß der vorliegenden Erfindung in einem großen Bereich von Substratkonzentrationen mit hoher Genauigkeit quantitativ bestimmen, insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen.

[0073] Obwohl die vorliegende Erfindung anhand der derzeit bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, versteht es sich, dass eine solche Offenbarung nicht als Einschränkung des allgemeinen Erfindungsgedankens zu interpretieren ist. Verschiedene Änderungen und Abwandlungen sind für den Fachmann im technischen Bereich der vorliegenden Erfindung zweifellos offensichtlich, nachdem er die vorstehende Offenbarung gelesen hat. Dementsprechend decken die beiliegenden Ansprüche sämtliche Änderungen und Abwandlungen ab, die sich im Rahmen des allgemeinen Gedankens und des Anwendungsbereichs der Erfindung bewegen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats umfassend:
einen ersten Schritt, um in Gegenwart eines Elektronenüberträgers im oxidierten Zustand die Reaktion eines in einer Probe enthaltenen Substrats mit einer für das genannte Substrat spezifischen Oxidoreduktase herbeizuführen, und
einen zweiten Schritt, um den genannten Elektronenüberträger im oxidierten Zustand, der unter der Enzymreaktion im ersten Schritt nicht reduziert wird, elektrochemisch zu reduzieren und dadurch einen Strom zu erhalten, der während der elektrochemischen Reduktion fließt.

2. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 1, wobei ein Elektronenüberträger im reduzierten Zustand an der Enzymreaktion im genannten ersten Schritt beteiligt ist.

3. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 1, wobei die genannte quantitative Messung unter Verwendung eines Biosensors durchgeführt wird, der eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit wenigstens einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode, die sich auf der genannten Grundplatte befinden, sowie eine Reaktionsschicht umfasst, die eine Oxidoreductase und einen Elektronenüberträger enthält und auf dem genannten Elektrodensystem angeord-

net ist.

4. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 1, wobei die genannte quantitative Messung unter Verwendung eines Biosensors durchgeführt wird, der eine elektrisch isolierende Grundplatte, ein Elektrodensystem mit wenigstens einer Arbeitselektrode, einer Gegenelektrode und einer Bezugselektrode, die sich auf der genannten Grundplatte befinden, sowie eine Reaktionsschicht umfasst, die eine Oxidoreductase und einen Elektronenüberträger enthält und auf dem genannten Elektrodensystem angeordnet ist.

5. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 3, wobei die genannte Reaktionsschicht weiter ein hydrophiles Polymer enthält.

6. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 4, wobei die genannte Reaktionsschicht weiter ein hydrophiles Polymer enthält.

7. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 3, wobei ein Elektronenüberträger im reduzierten Zustand an der Enzymreaktion im genannten ersten Schritt beteiligt ist.

8. Verfahren zur quantitativen Messung eines Substrats gemäß Anspruch 4, wobei ein Elektronenüberträger im reduzierten Zustand an der Enzymreaktion im genannten ersten Schritt beteiligt ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

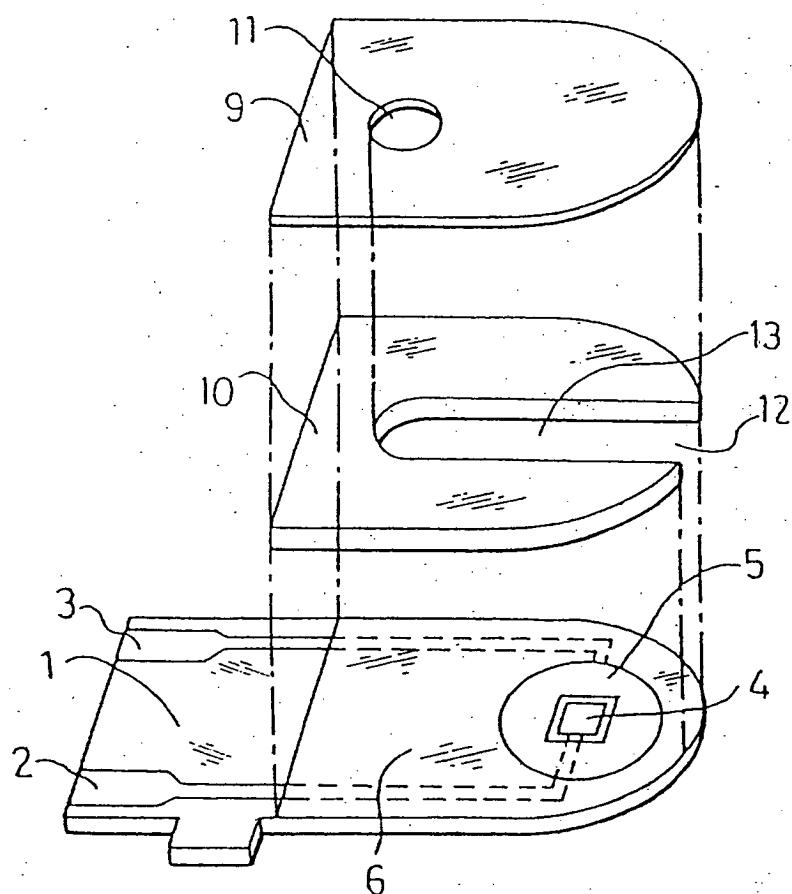


FIG. 2

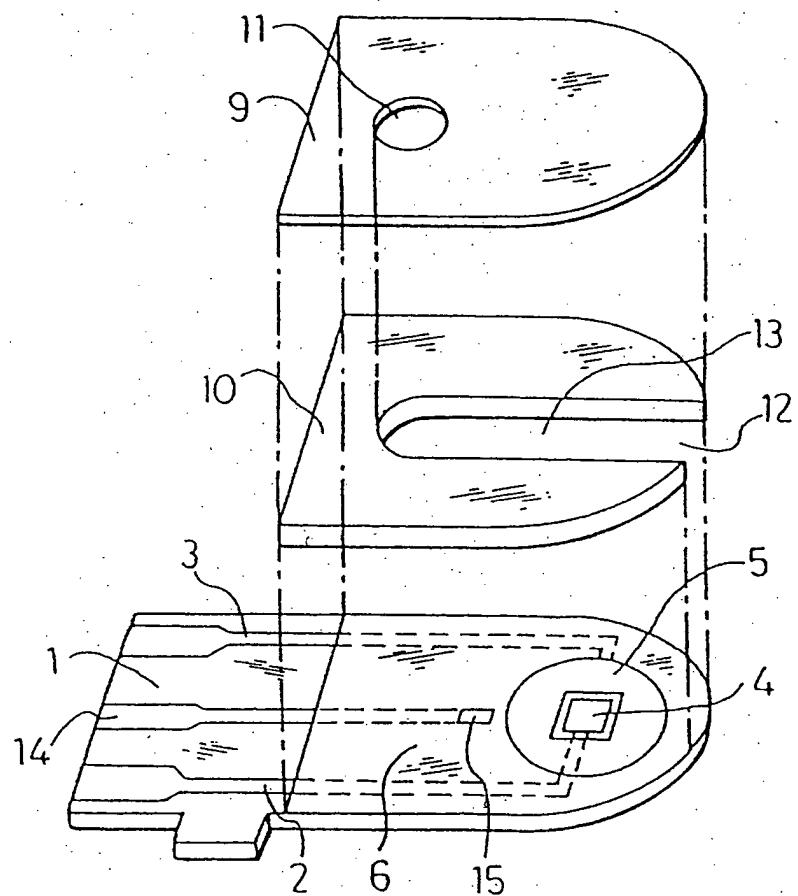


FIG. 3

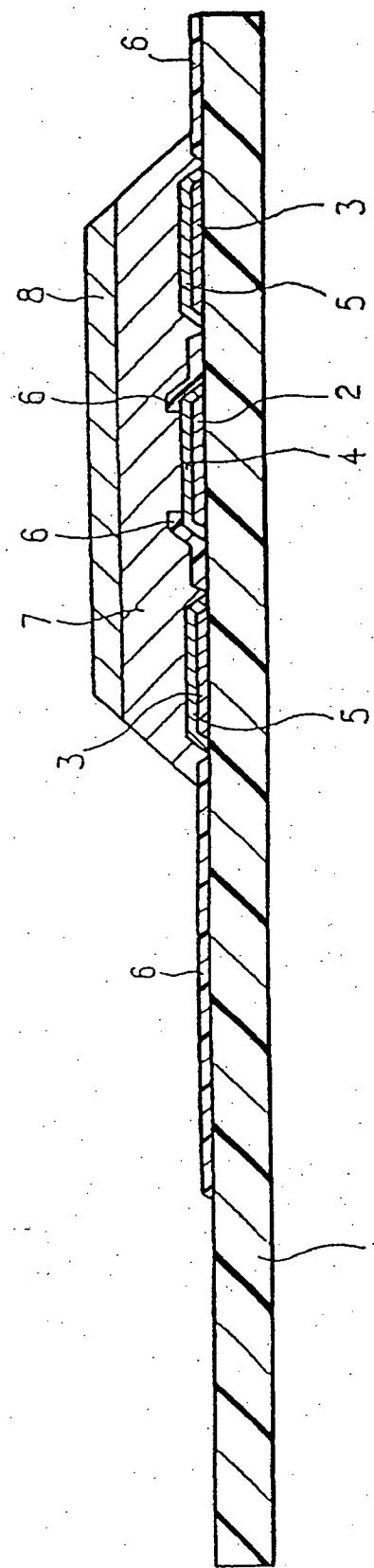


FIG. 4

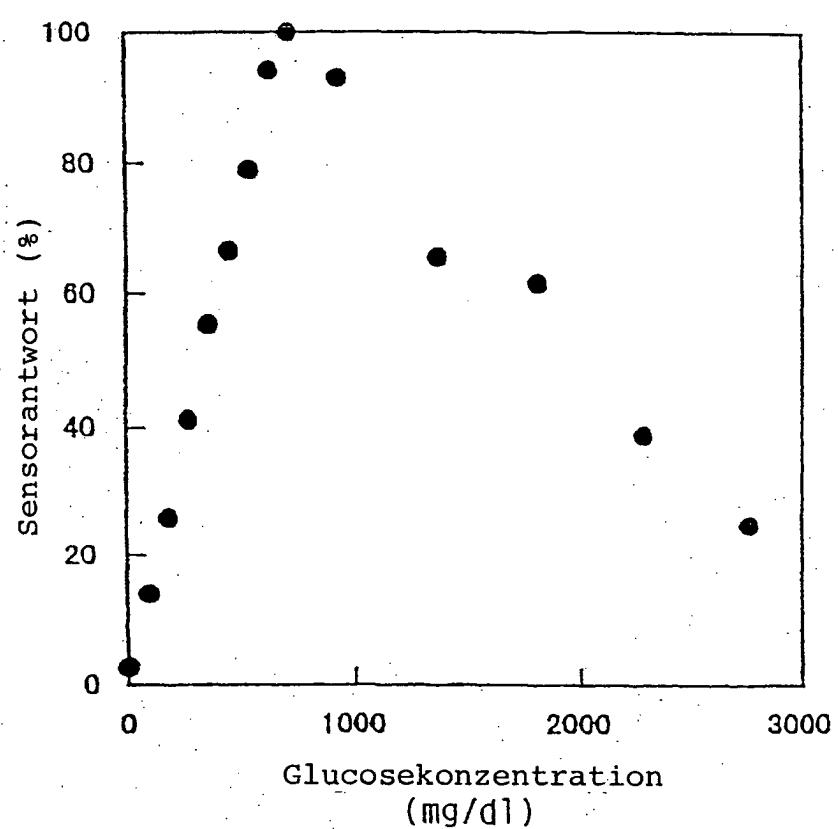


FIG. 5

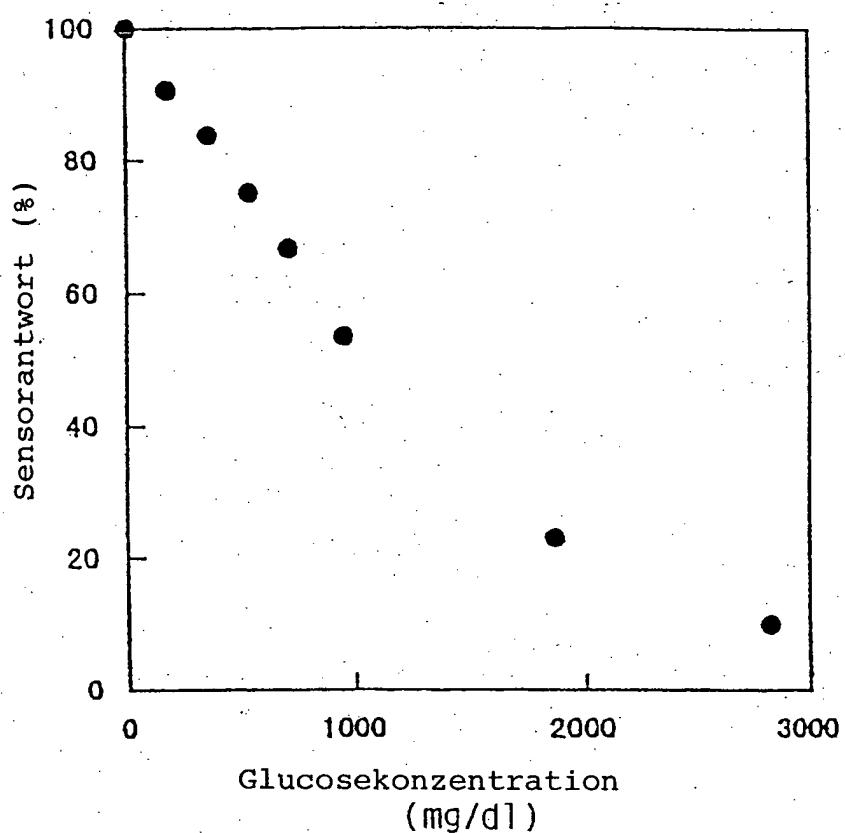


FIG. 6

