



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01800734.1

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1187610C

[22] 申请日 2001.3.28 [21] 申请号 01800734.1

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 29 [33] JP [31] 90362/2000

[32] 2000. 11. 9 [33] JP [31] 342537/2000

[86] 国际申请 PCT/JP2001/002558 2001. 3. 28

[87] 国际公布 WO2001/073419 日 2001. 10. 4

[85] 进入国家阶段日期 2001. 11. 29

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 宫崎正次 德永博之 藤原雅树

中南贵裕 中山润子 山西永吏子

审查员 飞竹玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

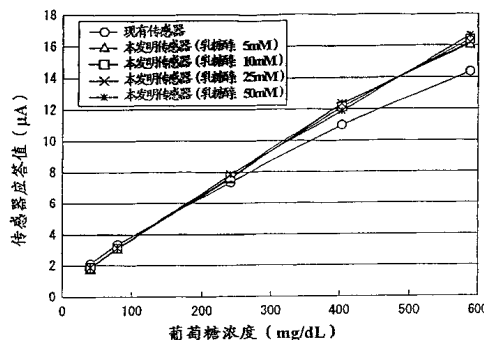
代理人 杨宏军

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 7 页

[54] 发明名称 生物传感器

[57] 摘要

测定液体试样中特定物质的生物传感器，通过在设置在电极上的试剂层中含有糖醇、金属盐、分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐、或分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐中的任意一种或它们的组合，可以提供稳定性好、相对于传感器的基质浓度的应答性(灵敏度、直线性)高、高精度的生物传感器。



1.生物传感器，其具有绝缘性基板、在上述基板上设置的至少由作用极和对极组成的电极、和在上述电极上形成的至少含有酶和糖醇的试剂层，其特征在于，所说的糖醇是麦芽糖醇、乳糖醇中的一种或二种。

2.权利要求1的生物传感器，其特征在于，该试剂层中含有电子传递体。

生物传感器

技术领域

本发明涉及分析液体试样中的特定的成分的生物传感器，特别涉及构成生物传感器的试剂层的试剂构成。

背景技术

生物传感器是利用微生物、酶、抗体等生物材料的分子识别能力，以生物材料作为分子识别元件的传感器。即，被固定化的生物材料是在识别目标特定物质时，利用引起的反应、由微生物的呼吸引起的氧的消耗、酶反应、发光等的物质。

在生物传感器中，酶传感器的实用化正在进步，如葡萄糖、乳酸、胆固醇、乳糖、尿素、氨基酸用的酶传感器正被应用于医疗检测或食品工业。酶传感器利用作为检体的试样液中含有的基质与酶的反应生成的电子来还原受电子体，测定装置利用电化学方法计测该受电子体的还原量，进行检体的定量分析。作为这类生物传感器之一例，已知有特愿平 11-324511 号中提出的传感器。

图 11、12 是现有血糖值测定用的生物传感器的分解斜视图。在聚对苯二甲酸乙二醇酯等绝缘型基板 1、101 上形成由导电性物质组成的测定电极 2、102（也称为作用极）、对电极 3、103（也称为对极）和检测电极 4，在这些电极上形成含有与试样液中的特定成分特异性反应的酶、电子传递体、亲水性高分子的试剂层 5、105。

为形成用上述电极 2、3、4、102、103 检测由试样液中的特定成分与试剂层 5、105 中的试剂反应生成的电流值的空腔，在绝缘基板上贴合在电极和试剂层上的部分处具有细长切口部 7、107 的隔板 6、106，和形成了空气孔 9、109 的盖板 8、108。

在如此构成的生物传感器中，试样液从空腔的入口（试样液吸引口）利用毛细现象向空腔内供给，引导至电极和试剂层的某个位置。

试样液中的特定成分与试剂层的试剂反应，生成电流，生成的电流通过生物传感器得到现有外部的测定装置读取，进行检体的定量分析。

但是，在上述的试剂构成的生物传感器中，在热量或水分的存在下，特别是在温度 30°C 以上、湿度 80% 以上的高温多湿环境下，含在试剂层 5、105 中的酶蛋白或亲水性高分子的一部分等和电子传递体发生还原反应，所以产生背景电流（噪声电流），背景电流值经时性地上升，存在传感器性能显著恶化的问题。

作为解决这一问题的手段，在使用铝密封或树脂等的成型容器的生物传感器保存容器中，封入硅胶或活性氧化铝等干燥剂，用来除去水分，防止传感器的性能恶化，但是单纯利用这类干燥剂是无法完全除去包含在生物传感器中试剂中残存的分子水平的水的。

即使在上述的保存容器中，经过较长的时间后，也是很难作到水分一点都不侵入的，电子传递体和酶蛋白与亲水性高分子的一部分的还原反应，只有在极微量的水分的存在下才能进行，所以极难抑制背景电流的经时性上升，这是其存在的问题。

由酶或电子传递体等各种试剂组成的混合试剂层中含有铁氰化钾等无机盐时，试剂溶液的干燥过程中，试剂层非常容易结晶化，试剂层的表面粗糙，成为不均匀的状态，导致相对于传感器的基质浓度的应答性（直线性、灵敏度）或测定精度等恶化。

本发明为解决上述问题，目的在于提供一种在有效防止因与水分接触而导致生物传感器的性能劣化的同时，相对于传感器的基质浓度的应答性（直线性或灵敏度）高的高精度的生物传感器。

发明的公开

本发明的第一项发明的生物传感器，是测定试样溶液中的特定物质的浓度的生物传感器，其特征在于，为溶于试样溶液中并与试样溶液中的特定物质特异性地反应，而在预先设置的试剂层中含有糖醇，不阻碍酶反应等，可以抑制经时性的背景电流的上升，同时还可抑制与血液中存在的各种共杂物质的不必要的反应，直线性良好（回归式的斜率大，截距小），且各传感器之间的偏差小。

本发明的第二项发明的生物传感器,是上述第1项发明的传感器,特征在于,使用设置在绝缘性基板上的至少由作用极和对极组成的电极测定上述特定物质的浓度,是一种适合于利用电极进行检查的生物传感器。

本发明的第三项发明的传感器,是上述第二项发明的传感器,其特征不在于,上述试剂层形成在上述电极上,或者在该试剂层的试剂溶于试样液中扩散形成的扩散区内配置电极,该试剂层中至少含有酶和电子传递体,是一种适合利用酶和电子传递体的反应进行检查的生物传感器。

本发明的第四项发明的生物传感器,是上述第1-3中任一项发明的生物传感器,其特征不在于,上述糖醇是链状多元醇,或环式糖醇,或它们的取代体或衍生物,是第一项发明中的糖醇具体化的发明,可以与第一项发明得到同样的效果。

本发明的第五项发明的生物传感器,是上述第1-3项中任一项的传感器,其中所说的糖醇是麦芽糖醇、乳糖醇中的一种或二种,是第一项发明中的糖醇具体化的发明,可以与第一项发明得到同样的效果。

本发明的第六项发明的生物传感器,是测定试样溶液中的特定物质的浓度的生物传感器,其特征不在于,为溶于试样溶液中并与试样溶液中的特定物质特异性地反应,而在预先设置的试剂层中含有金属盐,不阻碍酶反应等,可以抑制经时性的背景电流的上升。

本发明的第七项发明的生物传感器,是上述第六项发明的传感器,特征在于,使用设置在绝缘性基板上的至少由作用极和对极组成的电极测定上述特定物质的浓度,是一种适合于利用电极进行检查的生物传感器。

本发明的第八项发明的传感器,是上述第七项发明的传感器,其特征不在于,上述试剂层形成在上述电极上,或者在该试剂层的试剂溶于试样液中扩散形成的扩散区内配置电极,该试剂层中至少含有酶和电子传递体,是一种适合利用酶和电子传递体的反应进行检查的生物传感器。

本发明的九项发明的生物传感器，是上述第6-8中任一项发明的生物传感器，其特征在于，上述金属盐是硫酸金属盐、硫酸氢金属盐、亚硫酸金属盐、亚硫酸氢金属盐，连二亚硫酸金属盐，是第六项发明中的金属盐具体化的发明，可以与第六项发明得到同样的效果。

本发明的第十项发明的生物传感器，是上述第6-8项中任一项的传感器，其中所说的金属盐是硫酸镁、硫酸钙中的一种或二种，是第六项发明中的金属盐具体化的发明，可以与第六项发明得到同样的效果。

本发明的第十一项发明的生物传感器，是上述第6-8项中任一项的传感器，其中所说的金属盐是硝酸金属盐、硝酸氢金属盐、亚硝酸金属盐、亚硝酸氢金属盐或次亚硝酸金属盐，是第六项发明中的金属盐具体化的发明，可以与第六项发明得到同样的效果。

本发明的第十二项发明的生物传感器，是上述第6-8项中任一项的传感器，其中所说的金属盐是硝酸镁、硝酸钙中的一种或二种，是第六项发明中的金属盐具体化的发明，可以与第六项发明得到同样的效果。

本发明的第十三项发明的生物传感器，是测定试样溶液中的特定物质的浓度的生物传感器，其特征在于，为溶于试样溶液中并与试样溶液中的特定物质特异性地反应，而在预先设置的试剂层中含有分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐，不阻碍酶反应等，可以抑制经时性的背景电流的上升，同时还可抑制与血液中存在的各种共杂物质的不必要的反应，线性良好（回归式的斜率大，截距小），且各传感器之间的偏差小。

本发明的第十四项发明的生物传感器，是上述第十三项发明的传感器，特征在于，使用设置在绝缘性基板上的至少由作用极和对极组成的电极测定上述特定物质的浓度，是一种适合于利用电极进行检查的生物传感器。

本发明的第十五项发明的传感器，是上述第十三项发明的传感器，其特征在于，上述试剂层形成在上述电极上，或者在该试剂层的

试剂溶于试样液中扩散形成的扩散区内配置电极，该试剂层中至少含有酶和电子传递体，是一种适合利用酶和电子传递体的反应进行检查的生物传感器。

本发明的第十六项发明的生物传感器，是上述第 13-15 中任一项发明的生物传感器，其特征在于，上述有机酸是脂肪族羧酸、碳环羧酸、杂环羧酸或它们的取代体或衍生物，是第十三项发明中的有机酸具体化的发明，可以与第十三项发明得到同样的效果。

本发明的第十七项发明的生物传感器，是上述第 13-15 项中任一项的传感器，其中所说的有机酸是戊二酸、己二酸、邻苯二甲酸、苯甲酸中的一种或二种以上的组合，是第十三项发明中的羧酸具体化的发明，可以与第十三项发明得到同样的效果。

本发明的第十八项发明的生物传感器，是测定试样溶液中的特定物质的浓度的生物传感器，其特征在于，为溶于试样溶液中并与试样溶液中的特定物质特异性地反应，而在预先设置的试剂层中含有分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐，因为可以致密且均质地形成试剂层，所以可以飞跃性的提高相对于基质浓度的应答性（灵敏度、值线性）。

本发明的第十九项发明的生物传感器，是上述第十八项发明的传感器，特征在于，使用设置在绝缘性基板上的至少由作用极和对极组成的电极测定上述特定物质的浓度，是一种适合于利用电极进行检查的生物传感器。

本发明的第二十项发明的传感器，是上述第十九项发明的传感器，其特征在于，上述试剂层形成在上述电极上，或者在该试剂层的试剂溶于试样液中扩散形成的扩散区内配置电极，该试剂层中至少含有酶和电子传递体，是一种适合利用酶和电子传递体的反应进行检查的生物传感器。

本发明的第二十一项发明的生物传感器，是上述第 18-20 中任一项发明的生物传感器，其特征在于，上述有机酸是氨基酸或其取代体或衍生物，是第十八项发明中的有机酸具体化的发明，可以与第十八

项发明得到同样的效果。

本发明的第二十二项发明的生物传感器，是上述第 18-20 项中任一项的传感器，其中所说的氨基酸是甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、赖氨酸、牛磺酸中的一种或二种以上的组合，是第十八项发明中的羧酸具体化的发明，可以与第十八项发明得到同样的效果。

本发明的第二十三项发明的生物传感器，是测定试样溶液中的特定物质的浓度的生物传感器，其特征在于，为溶于试样溶液中并与试样溶液中的特定物质特异性地反应，而在预先设置的试剂层中含有糖醇、金属盐、分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐或分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐中的至少两种以上的组合，稳定性好，且相对于基质浓度的应答性（灵敏度、值线性）高，是一种高精度的传感器。

本发明的二十四项发明的生物传感器，是上述第 1-23 项发明的传感器，其特征在于，在上述的试剂层中还含有亲水性高分子，因为含有亲水性高分子所以容易在电极表面形成均质的试剂，可以得到提高电极与试剂的密合状态的效果。另外，因为在试剂层内各物质成为均质分散的状态，所以可以实现均质的试剂形成，可以提供各传感器之间的偏差少的高性能生物传感器。

附图的简单说明

图 1 表示在实施例 1 中在试样溶液中添加乳糖醇作为糖醇时的传感器应答特性。

图 2 表示在实施例 1 中在试样溶液中添加麦芽糖醇作为糖醇时的传感器应答特性。

图 3 表示在实施例 1 中使用精制水作为试样溶液时的过酷环境下的背景电流的上升。

图 4 表示在实施例 1 中使用全血作为试样溶液时的过酷环境下的全血应答值的上升。

图 5 表示在实施例 2 中使用精制水作为试样溶液时的过酷环境下

的背景电流的上升。

图6表示在实施例2中使用全血作为试样溶液时的过酷环境下的全血应答值的上升。

图7表示在实施例3中使用精制水作为试样溶液时的过酷环境下的背景电流的上升。

图8表示在实施例4中使用精制水作为试样溶液时的过酷环境下的背景电流的上升。

图9表示在实施例5中使用全血作为试样溶液时的全血应答值。

图10表示在实施例5中使用全血作为试样溶液时的全血应答值。

图11是3电极方式的生物传感器的分解斜视图之一例。

图12是2电极方式的生物传感器的分解斜视图之一例。

实施发明的最佳方案

实施方案1

以下说明本发明的实施方案1的生物传感器。应予说明，在以下说明的本发明的各实施方案中，使用酶作为与试样溶液中的特定物质特异性反应的分子识别元件，以此酶传感器为例进行说明。

图11是3电极方式的生物传感器的分解斜视图之一例，图12是2电极方式的生物传感器的分解斜视图之一例。图11和图12中，1、101为绝缘性基板，在该绝缘性基板1、101上按照规定的位置和形状形成由导电性物质形成的测定电极2、102、对电极3、103。图11所示的3电极方式的生物传感器中，在绝缘性的基板1上还按规定的位置和形状形成有检知电极4。所说的检知电极4有检知检体量不足的功能，可以作为参比电极或对电极的一部分使用。

作为适合的上述绝缘性基板1、101的材料，有聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、聚酰亚胺等。

构成各电极的导电性物质，例如有金、铂、钯等贵金属或石墨等单体材料，或碳糊或贵金属糊等复合材料。

金、铂、钯等贵金属或碳糊等单体材料，可以利用喷溅蒸镀法等容易地在绝缘性基板1、101上形成导电性层，碳糊或贵金属糊等复合

材料可以利用丝网印刷等方法在绝缘性基板 1、101 上形成导电性层。

形成各电极时，利用上述的喷溅蒸镀法或丝网印刷法等，在绝缘性基板 1、101 上全面地形成，或者在一部分上形成上述导电性层后，利用激光等设置狭缝，由此分割形成电极。另外，使用预先形成了电极图案的印刷版或掩膜版的丝网印刷法或喷溅蒸镀法等，也可以同样形成电极。

在上述形成的电极上形成含有酶、电子传递体、亲水性高分子和糖醇的试剂层 5、105。

本发明的实施方案 1 的特征在于，在试剂层 5、105 中含有糖醇。在电极上形成的试剂层 5、105 中，该糖醇与氧化型的电子传递体、试剂中含有的酶蛋白、以及亲水性高分子等中存在的反应性丰富的一部分官能团等接触，具有抑制电子传递体由氧化型转变为还原型（被还原）的功能。

因此，在上述试剂构成的生物传感器中，在热量或水分的存在下，特别是温度 30°C 以上、湿度 80% 以上的高温多湿环境下，试剂层 5、105 中含有的酶蛋白或亲水性高分子的一部分等和电子传递体的还原反应引起的经时性上升的背景电流（噪声电流）可以被抑制，可以防止生物传感器的性能恶化。

通过在试剂层中含有糖醇，可以抑制与血液中特别是血球中存在的各种共杂物质的不必要的反应，直线性良好（回归式的斜率大，截距小），且各传感器之间的偏差少，可以提供高性能的生物传感器。

作为试剂层 5、105 中含有的上述糖醇，例如有山梨糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、甘露糖醇、乳糖醇、还原パラチノース、阿糖醇、丙三醇、核糖醇、半乳糖醇、景天庚糖醇、甘露庚糖、景天庚酮糖、安息香醇、远志糖醇、艾杜糖醇、塔罗糖醇、阿洛糖醇、イシリトール、还原淀粉糖化物等链状的多元醇或环式糖醇。

这些糖醇的立体异构体、取代体或衍生物也能得到同样的效果。

在这些糖醇中，麦芽糖醇和乳糖醇由于材料单价比较便宜且容易得到，可以说是抑制上述背景电流效果最好的材料。

这些糖醇的添加量，作为试样溶液浓度为 0.1-500mM，优选 1-100mM。

图 11 和 12 中所示的生物传感器，之后，在如此形成的试剂层 5、105、电极 2、3、4、102、103 上贴合具有切口部 7、107 的隔板 6、106 和盖板 8、108，形成供给试样液的空腔。

上述隔板 6、106 和盖板 8、108 的适合材料，例如有聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、聚酰亚胺、聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚酰胺、聚氯乙烯、聚偏氯乙烯、尼龙等。

利用毛细管现象实现向由上述空腔构成的生物传感器供给试样溶液，除了实现平稳地供给试样溶液之外，空腔内还有必要具有空气孔 9、109，以使空气排出到生物传感器的外部。

空气孔 9、109 的配置，只要在不妨碍试样液供给的范围内，可以位于空腔内的任何位置。

在上述形成的生物传感器中，试样液中的特定成分与含有酶等的试剂层 5、105 反应得到的电流值，通过测定电极 2、102、对电极 3、103、检知电极 4 的各自的导线部 10、11、12、110、111，由连接的外部的测定装置读取。

实施方案 2

以下说明本发明的实施方案 2 的生物传感器。

本发明的实施方案 2 的生物传感器，如图 11 和 12 所示，试剂层 5、105 由酶、电子传递体、亲水性高分子和金属盐形成。其他的构成要素与前述的实施方案 1 相同，所以省略说明。

本发明的实施方案 2，特征在于在试剂层 5、105 中含有金属盐，该金属盐可以抑制在电极上形成的试剂层 5、105 中，氧化型电子传递体与试剂中含有的酶蛋白、以及存在于亲水性高分子等中的反应性丰富的一部分官能团接触而导致的电子传递体由氧化型向还原型的改性（被还原）。

因此在上述试剂构成的生物传感器中，在热量或水分的存在下，特别是温度为 30 °C 以上、湿度 80% 以上的高温多湿环境下，试剂层

5、105 中含有的酶蛋白或亲水性高分子的一部分等和电子传递体的还原反应引起的经时性上升的背景电流（噪声电流）可以被抑制，可以防止生物传感器的性能恶化。

作为试剂层 5、105 中含有的金属盐，硫酸金属盐或硝酸金属盐等特别有效，例如有硫酸金属盐、硫酸氢金属盐、亚硫酸金属盐、亚硫酸氢金属盐、或连二亚硫酸金属盐，具体为硫酸铝、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锶、硫酸钡、硫酸双氧铀、硫酸铀、硫酸镉、硫酸钾、硫酸镓、硫酸钙、硫酸银、硫酸铬、硫酸钴、硫酸氢钾、硫酸锆、硫酸汞、硫酸锡、硫酸铟、硫酸铯、硫酸铈、硫酸铊、硫酸钛、硫酸铁、硫酸铜、硫酸钠、硫酸铅、硫酸镍、硫酸钆、硫酸钷、硫酸钡、硫酸钪、硫酸镱、硫酸镨、硫酸铍、硫酸锰、硫酸镧、硫酸锂、硫酸铷、硫酸铝钾、硫酸铝钠、硫酸双氧铀钾、硫酸钾铬、硫酸二钠镁、硫酸镁二钾、硫酸锰铯、硫酸铷铝、硫酸氢钾、硫酸氢钠、亚硫酸钾、亚硫酸钙、亚硫酸钠、亚硫酸钡、亚硫酸铷、连二亚硫酸钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢钠等，作为硝酸金属盐、硝酸氢金属盐、亚硝酸氢金属盐或次亚硝酸金属盐，有硝酸铝、硝酸镁、硝酸锌、硝酸锶、硝酸铯、硝酸钷、硝酸铈、硝酸铊、硝酸铉、硝酸双氧铀、硝酸铈、硝酸镉、硝酸钷、硝酸钾、硝酸钙、硝酸银、硝酸铬、硝酸钴、硝酸钆、硝酸镱、硝酸汞、硝酸锡、硝酸铟、硝酸铯、硝酸铈、硝酸铊、硝酸铁、硝酸铷、硝酸铜、硝酸钆、硝酸钠、硝酸铅、硝酸镍、硝酸钆、硝酸钷、硝酸钪、硝酸镱、硝酸镨、硝酸铍、硝酸锰、硝酸镧、硝酸锂、硝酸钷、硝酸铷、硝酸铯、硝酸铊、亚硝酸钾、亚硝酸银、亚硝酸钙、亚硝酸钠、亚硝酸钴钾、亚硝酸钴钠、次亚硝酸钠等。

在这些金属盐中，特别是硫酸镁、硫酸钙、硝酸镁、硝酸钙的吸湿防止效果高，所以优选。

金属盐的添加量，作为试剂溶液浓度为 0.1-500mM，更优选 1-50mM。

实施方案 3

以下说明本发明实施方案 3 的生物传感器。

本发明的实施方案3的生物传感器，如图11和12所示，试剂层5、105由酶、电子传递体、亲水性高分子和分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐形成。其他的构成要素与前述的实施方案1相同，所以省略说明。

本发明的实施方案3，特征在于在试剂层5、105中含有分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐，该分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐可以抑制在电极上形成的试剂层5、105中氧化型电子传递体与试剂中含有的酶蛋白、以及存在于亲水性高分子等中的反应性丰富的一部分官能团接触而导致的电子传递体由氧化型向还原型的改性（被还原）。

因此在上述试剂构成的生物传感器中，在热量或水分的存在下，特别是温度为30℃以上、湿度80%以上的高温多湿环境下，试剂层5、105中含有的酶蛋白或亲水性高分子的一部分等和电子传递体的还原反应引起的经时性上升的背景电流（噪声电流）可以被抑制，可以防止生物传感器的性能恶化。

通过在试剂层中含有分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐，可以抑制与血液中特别是血球中存在的各种共杂物质的不必要的反应，直线性良好（回归式的斜率大，截距小），且各传感器之间的偏差少，可以提供高性能的生物传感器。

作为试剂层5、105中含有的分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐，有脂肪族羧酸、碳环羧酸、杂环羧酸等，及其盐。

例如，作为脂肪族羧酸，有丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、马来酸、富马酸等及其盐。

直链越长、分子量越大，效果越好，特别优选有3个以上烃链的物质。用于生物传感器的试剂要求对水的溶解性要高，所以分子构造中优选具有多个亲水性的官能团。

作为碳环羧酸，有苯甲酸、邻苯二甲酸、间苯二甲酸、对苯二甲酸等或其盐，使用这些物质也可以得到与上述物质相同的效果。

作为杂环羧酸，例如有2-フル酸、烟酸、异烟酸等或其盐，使用

这些物质也可以得到与上述物质相同的效果。

上述脂肪族和碳环羧酸、具有杂环的羧酸或羧酸盐以外，羧酸和羧酸盐的一部分官能团被其他的官能团取代的如苹果酸、乙二酸一酐乙酸、柠檬酸、氧代戊二酸等或其盐也可以得到与上述物质相同的效果。

这些有机酸或有机酸盐中最适合的物质是戊二酸、己二酸、邻苯二甲酸、苯甲酸。

这些有机酸或有机酸盐的添加量，作为试剂溶液浓度，在0.01-100mM范围内，优选在0.1-10mM范围内。

实施方案4

以下说明本发明实施方案4的生物传感器。

本发明的实施方案4的生物传感器，如图11和12所示，试剂层5、105由酶、电子传递体、亲水性高分子和分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐形成。其他的构成要素与前述的实施方案1相同，所以省略说明。

本发明的实施方案4，特征在于在试剂层5、105中含有分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐，通过在试剂层5、105中添加该有机酸或有机酸盐，可以使试剂层5、105的表面状态非常平滑，且可以均质地形成。特别是在试剂层5、105中含有作为电子传递体使用的铁氰化钾等无机盐时，试剂溶液中的干燥过程中试剂层容易结晶化，但通过在试剂中含有分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐，可以抑制该无机盐的结晶化。

结晶化被抑制的无机盐，以微小的粒子状态在试剂层中存在，所以可以与酶分子紧密、均匀地接触，实现与酶分子的电子传递效率良好的试剂层状态。

因为可以提高试剂层的溶解性，所以传感器的灵敏度和直线性可以飞跃性地提高。

作为试剂层5、105中含有的分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐，例如有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨

酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸等或其盐，或肌氨酸、甜菜碱、牛磺酸等有机酸或有机酸盐。

这些有机酸或有机酸盐的取代体或衍生物也能得到同样的效果。

在这些有机酸或有机酸盐中，甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、牛磺酸具有特别高的抑制结晶化的效果，所以优选。

这些有机酸或有机酸盐的添加量，作为试剂溶液浓度为0.1-1000mM范围内，优选在10-500mM范围内。

本发明的实施方案1-4，分别举例说明了在上述试剂层5、105添加糖醇、金属盐、分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐、分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐的例子，这些方案也可以组合应用。

上述实施方案1-4的试剂中含有的酶，例如有葡萄糖氧化酶、乳酸酯氧化酶、胆固醇氧化酶、胆固醇酯酶、尿酸酶、抗坏血酸氧化酶、胆红素氧化酶、葡萄糖脱氢酶、乳酸酯脱氢酶等，作为电子传递体，有铁氰化钾、对苯醌和其衍生物、吩嗪硫酸二甲酯、甲基蓝、二茂铁和其衍生物等。

本发明的实施方案1-4中，对于试剂层5、105中含有的亲水性高分子进行了说明，通过在试剂层5、105中含有亲水性高分子，可以使试剂溶液具有粘性，在电极上容易均质地形成试剂，同时可以提高电极和试剂之间的密合性。另外通过含有亲水性高分子，还可以使试剂干燥后的试剂结晶状态均质，可以制备高精度的生物传感器。

用于以上目的的亲水性高分子，例如有羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、羧甲基乙基纤维素、聚乙烯基醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚赖氨酸等聚氨基酸和其盐、聚苯乙烯磺酸、明胶和其衍生物、丙烯酸和其盐、甲基丙烯酸和其盐、淀粉和其衍生物、马来酸酐和其盐、琼脂糖凝胶和其衍生物等。

本发明的实施方案1-4中，说明了上述的试剂层设置在电极上，

具体而言，在电极的整体或一部分上配置试剂层 5、105，除此之外，在不使生物传感器的性能恶化的范围内，即，试剂层中的试剂溶于试样液中扩散的扩散区内设置电极，配置试剂层 5、105。

实施例 1

在由聚对苯二甲酸乙二醇酯制成的绝缘基板上，利用喷溅蒸镀在绝缘基板的表面整体上形成约 10nm 厚的钯薄膜，之后利用 YAG 激光在上述薄膜的一部分上形成狭缝，将电极分割形成测定电极、对电极和检知电极。在其上以圆形滴加含有酶（葡萄糖氧化酶）、电子传递体（铁氰化钾）、亲水性高分子（羧甲基纤维素）和糖醇的水溶液，以测定电极为中心，覆盖对电极和检知电极的一部分，干燥，形成试剂层。再在其上贴合由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的具有切口的隔板和同样由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的具有空气孔的盖板，形成成为导入血液的毛细管的空腔，制成 3 电极方式的血糖值测定传感器。

图 1 表示在试剂溶液中作为糖醇添加乳糖醇时的传感器应答特性，试样液为全血，变化乳糖醇的浓度，共 4 种。图 2 表示同样添加作为糖醇的麦芽糖醇时，变化 4 种麦芽糖醇的浓度的传感器的应答特性。其中糖醇的添加浓度（作为试剂水溶液的浓度）为 0 时作为现有的传感器来处理，为 5、10、25、50mM 时是本发明的传感器。

图 3 表示使用上述制成的传感器测定在过酷环境下（温度 30°C，湿度 80% 下暴露）的背景电流的经时性变化。作为试样液使用不含葡萄糖的精制水。图 4 表示使用葡萄糖浓度调整为 80mg/dL 的全血作为试样溶液时的经时性的传感器应答值的变化。在任何一种情况下，测定时期都分别为传感器制作后（0 小时）、制作后 6 小时、12 小时、24 小时，共 4 个点。

电流测定条件为，确认在空腔内充填试样溶液后，促进酶反应 25 秒，之后在测定电极和对电极以及检出电极间施加 0.2V 的电压，测定 5 秒钟后得到的电流值。此处，检知电极也作为对电极的一部分使用。

测定次数 n 在各浓度和测定时期均为 $n=10$ ，图中以其平均值作图。

由图 1 可知，添加作为糖醇的乳糖醇的传感器应答特性，与不含糖醇的现有传感器相比，特别在葡萄糖浓度为 400mg/dL 以上的高浓度区显示高应答值倾向，可以得到回归式良好（截距小，斜率大）的应答特性。

由图 2 可知，使用麦芽糖醇作为糖醇时与上述使用乳糖醇的情况相同，也可以得到优良的应答特性。

由图 3 和图 4 可知，在添加糖醇的传感器中，可以有效抑制高湿高温暴露环境下的背景电流的增加，可以得到传感器的应答值经时变化少的优良的保存稳定性。

实施例 2

与实施例 1 同样制备血糖值测定传感器。但其中用硫酸金属盐代替糖醇作为抑制背景电流经时性上升的添加剂，该硫酸金属盐为硫酸镁。

图 5 表示使用上述制成的传感器测定在过酷环境下（温度 30°C，湿度 80% 下暴露）的背景电流的经时性变化。作为试样液使用不含葡萄糖的精制水。图 6 表示使用葡萄糖浓度调整为 80mg/dL 的全血作为试样溶液时的经时性的传感器应答值的变化。

在任何一种情况下，测定时期都分别为传感器制作后（0 小时）、制作后 6 小时、12 小时、24 小时，共 4 个点。

电流测定条件和测定次数同实施例 1。

由图 5 和图 6 可知，添加硫酸金属盐的传感器与实施例 1 的糖醇同样，可以有效抑制高湿高温暴露环境下的背景电流的增加，可以实现传感器的应答值经时变化少的优良的保存稳定性。

实施例 3

在由聚对苯二甲酸乙二醇酯制成的绝缘基板上，利用丝网印刷设置由作用极和对极形成的电极层，在其上形成含有酶（葡萄糖氧化酶）、电子传递体（铁氰化钾）、亲水性高分子（羧甲基纤维素）和脂肪族羧酸（作为试剂溶液的浓度为 5mM）的试剂层，之后贴合由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的隔板和同样由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的盖

板，形成作为导入血液的毛细管的空腔，制成 2 电极方式的血糖值测定传感器。

制备作为有机酸分别使用脂肪族羧酸丙二酸、戊二酸、己二酸的三种，以及不含脂肪族羧酸的现有传感器，共计 4 种 2 电极方式的传感器。

图 7 表示使用上述制成的 4 种传感器测定在过酷环境下（温度 40°C，湿度 80% 下暴露）的背景电流，作为试样液使用不含葡萄糖的精制水。测定时期都分别为传感器制作后（0 天）、制作后 7 天、14 天、30 天，共 4 个点。电流测定条件为，在试样溶液（精制水）充填在空腔内后，促进反应 25 秒，之后在作用极和对极间施加 0.5V 的电压，测定 5 秒后的电流值。

测定次数在各测定点都为 $n=10$ ，图 7 中以其平均值作图。

由图 7 可知，添加脂肪族羧酸的传感器可以确实抑制背景电流的上升，其上升率按照丙二酸、戊二酸、己二酸的顺序减少，表明分子构造越复杂、直链越长、分子量越大，抑制背景电流上升的效果越大。此处得到的电流值，相当于葡萄糖氧化酶与铁氰化钾、以及羧甲基纤维素与铁氰化钾反应生成的铁氰化钾量。

实施例 4

与实施例 3 同样制备生物传感器，与实施例 3 同样评价。其中作为有机酸使用碳环羧酸苯甲酸、邻苯二甲酸和丁二酸的烃链的一部分被羟基取代的苹果酸（丁二酸衍生物）3 种。

由图 8 可知，使用苯甲酸、邻苯二甲酸、苹果酸中的任何一种，都可以与实施例 3 同样地抑制背景电流的上升。

实施例 5

在由聚对苯二甲酸乙二醇酯制成的绝缘基板上，利用丝网印刷设置由作用极和对极形成的电极层，在其上形成含有酶（以吡咯并喹啉苯醌作为辅酶的葡萄糖脱氢酶）、电子传递体（铁氰化钾）、亲水性高分子（羧甲基纤维素）和脂肪族羧酸（邻苯二甲酸）、氨基酸的试剂层，之后贴合由聚对苯二甲酸乙二醇酯形成的隔板和同样由聚对苯

二甲酸乙二醇酯形成的盖板，形成作为导入血液的毛细管的空腔，制成 2 电极方式的血糖值测定传感器。

制备作为有机酸分别使用分子内由至少一个羧基和氨基的氨基酸——甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)、苏氨酸(Thr)、赖氨酸(Lys)、肌氨酸(甘氨酸的衍生物)、牛磺酸，以及不含氨基酸的现有传感器，共计 8 种传感器。

使用如图 9 和图 10 表示使用上述制成的 8 种传感器测定人全血中的葡萄糖时的传感器应答特性。全血中的葡萄糖浓度分别为 40、80、350、600、700mg/dl。

电流测定条件为，在试样溶液(人全血)充填在空腔内后，促进反应 25 秒，之后在作用极和对极间施加 0.5V 的电压，测定 5 秒后得到的电流值。

测定次数在各测定点都为 $n=20$ ，图中以其平均值作图。

由图 9、10 可知，虽然因氨基酸的种类不同应答值有若干差异，但是与不含氨基酸的现有传感器相比，特别是葡萄糖的浓度为 480mg/dl 以上的高浓度区，可以确认飞跃性的应答值和直线性的提高。

表 1 为上述 $n=20$ 测定时的传感器应答值的偏差以 CV 值进行比较的结果。由表 1 可知，添加氨基酸的本发明的传感器中，可以确认大幅度的 CV 值的优化。这是因为，在试剂层中添加了氨基酸防止了铁氰化钾的结晶化，平滑且均质地形成了试剂层，使试剂的溶解性和扩散变得均质，减轻了应答偏差。

表 1

| 浓度 | 40 | 80 | 350 | 600 | 700 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 现有传感器 | 3.25% | 2.48% | 2.05% | 2.11% | 4.15% |
| Gly-133mM | 2.15% | 1.75% | 1.55% | 1.28% | 1.05% |
| Ser-95mM | 2.54% | 2.11% | 1.75% | 1.45% | 1.22% |
| Pro-87mM | 2.38% | 1.98% | 1.69% | 1.40% | 1.18% |
| Thr-84mM | 2.18% | 2.00% | 1.65% | 1.39% | 1.24% |
| Lys-HCl-55mM | 2.48% | 1.89% | 1.58% | 1.41% | 1.14% |
| 肌氨酸-122mM | 2.65% | 2.08% | 1.68% | 1.35% | 1.25% |
| 牛磺酸 | 2.18% | 1.78% | 1.43% | 1.22% | 1.10% |

上述实施例 1-5 显示了测定血液中的葡萄糖浓度的生物传感器，作为测定对象的试样溶液、物质和生物传感器的形式并不限于这些，例如，作为对象试样溶液除血液以外还可以是唾液、细胞间质液、尿或汗液等生物体试样液，也可以是食品或饮料水等。作为对象物质，除葡萄糖以外，还可以使用乳酸、胆固醇、尿酸、抗坏血酸、胆红素等。作为电流测定方式，可以是实施例 1 和 2 中使用的由测定电极、对电极和检知电极组成的 3 电极方式，或实施例 3-5 中使用的只由测定电极、对电极组成的 2 电极方式，任何一种方式都可以得到同样的结果。上述 3 电极方式比 2 电极方式可以更准确地测定。

在本实施例中以酶传感器为例说明了生物传感器，但本发明也同样适用于利用酶以外的物质——如抗体、微生物、DNA、RNA 等作为与试样液中的特定物质特异性反应的分子识别元件的生物传感器。

产业上的可应用性

本发明的生物传感器，通过在试剂层中含有糖醇、金属盐、分子内有至少一个羧基的有机酸或有机酸盐、或分子内有至少一个羧基和氨基的有机酸或有机酸盐中的任意一种或它们的组合，由此可以不阻碍酶反应地抑制经时性的背景电流的上升，抑制与血液中存在各种共杂物质之间的不必要的反应，可以致密且均质地形成试剂层，可以提供稳定性好且高性能的生物传感器。

图 1

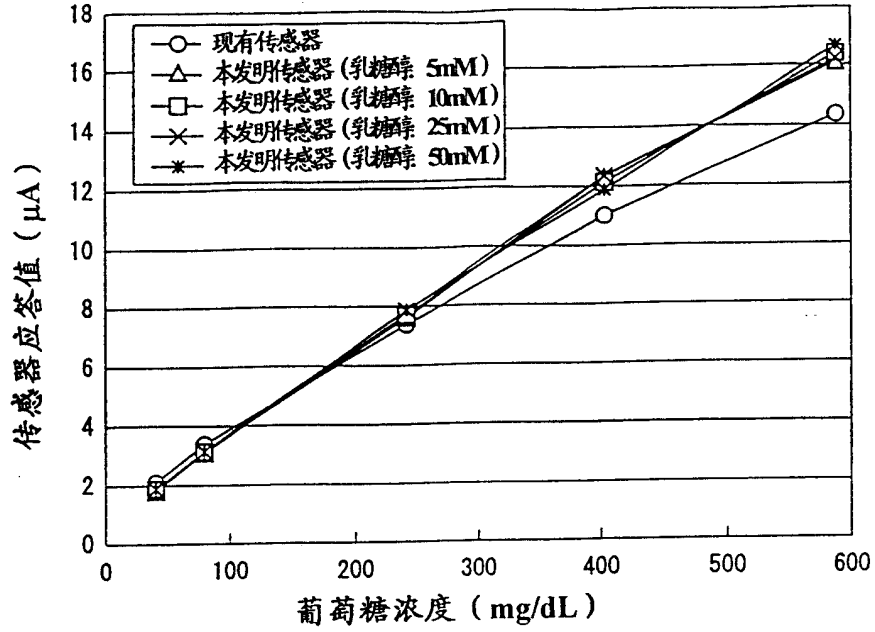


图 2

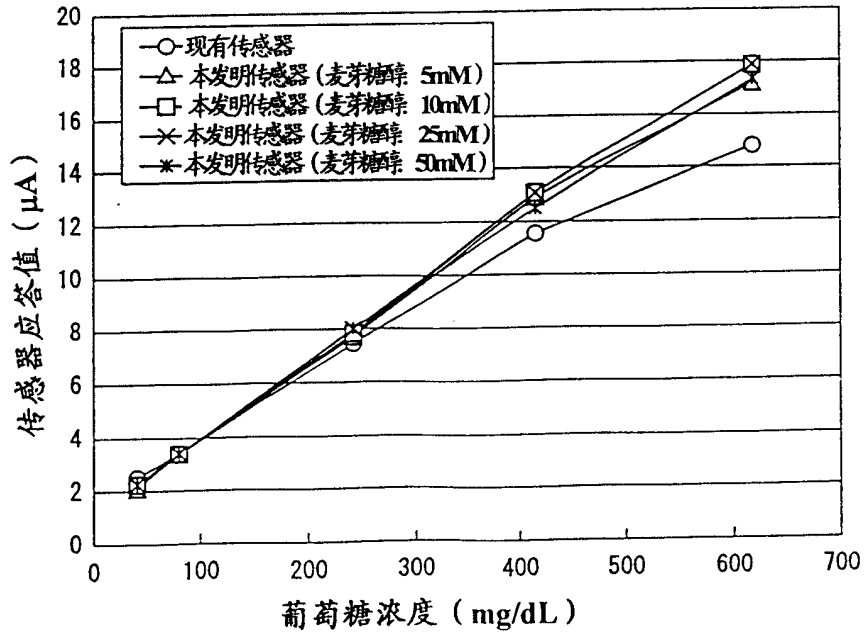


图 3

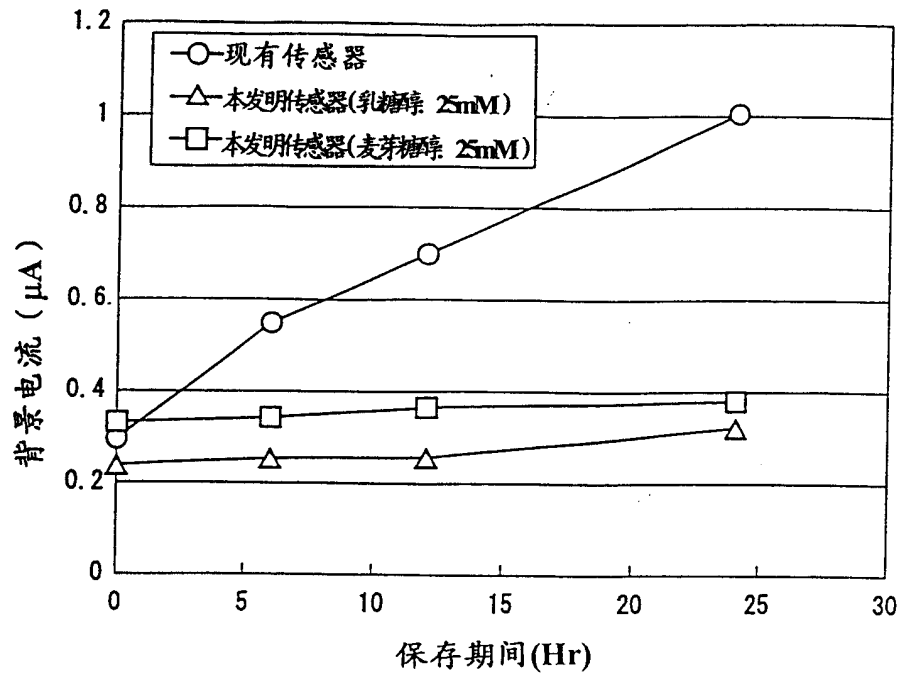


图 4

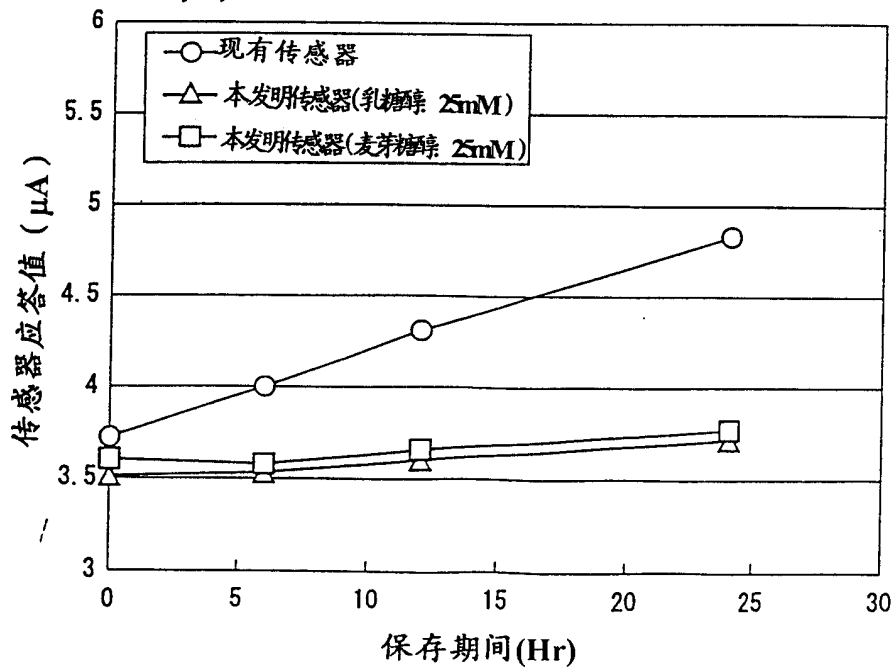


图 5

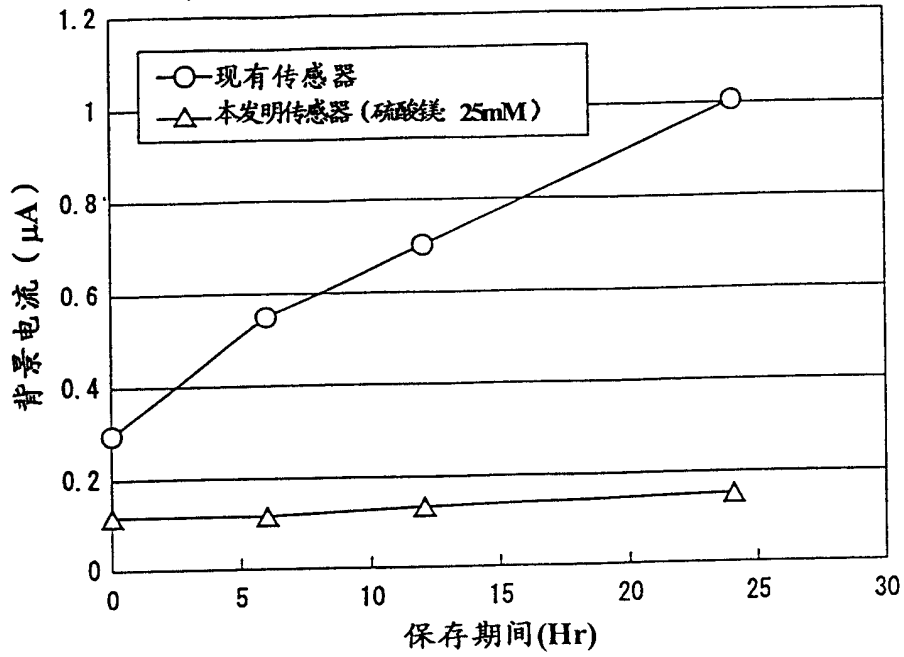


图 6

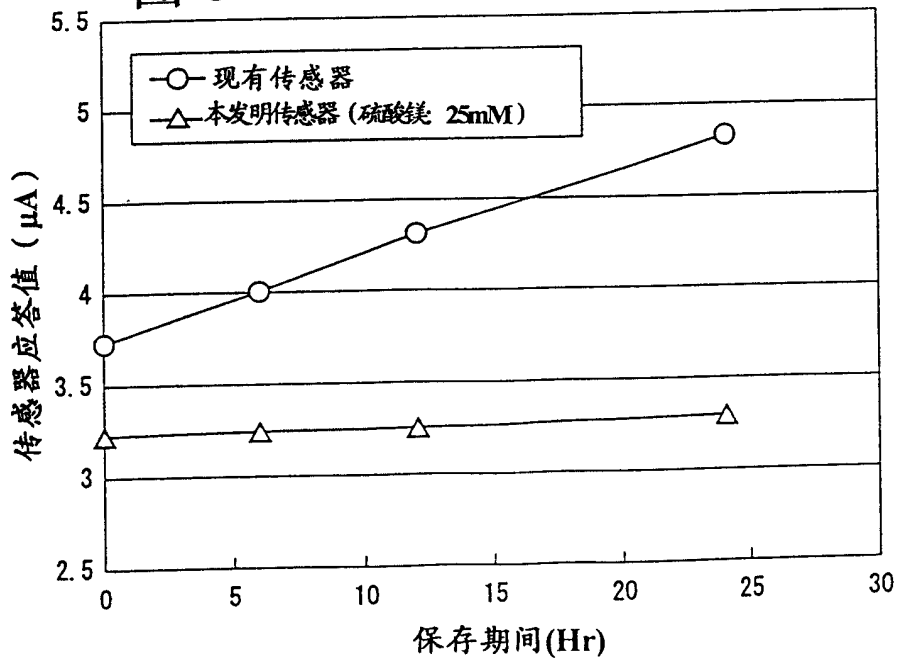


图 7

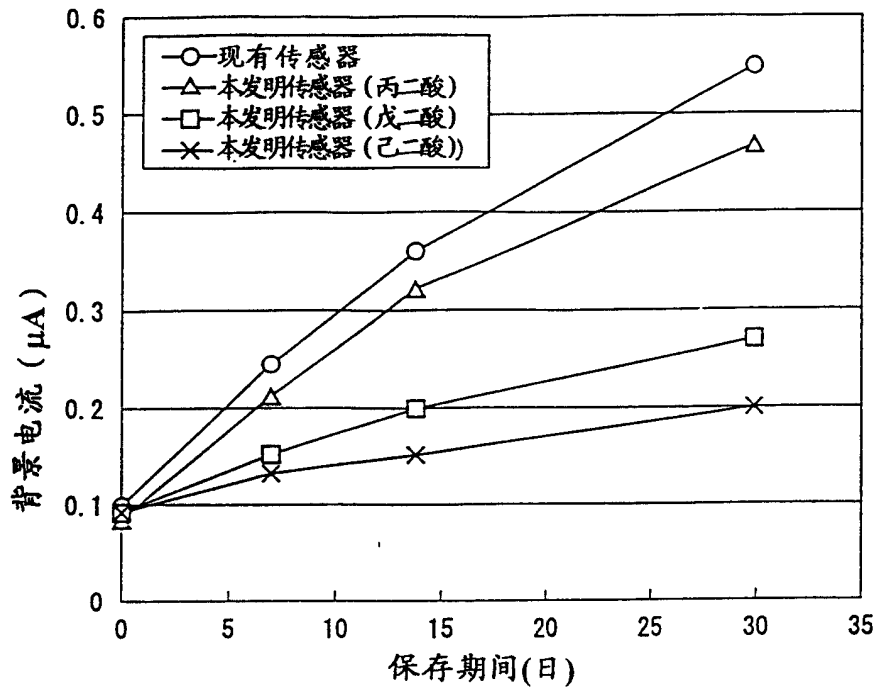


图 8

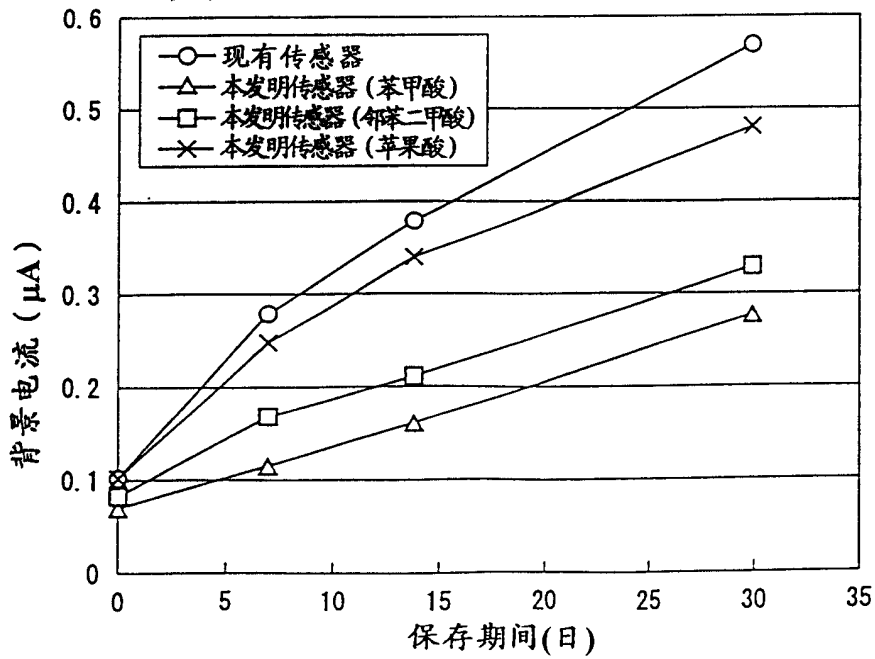


图 9

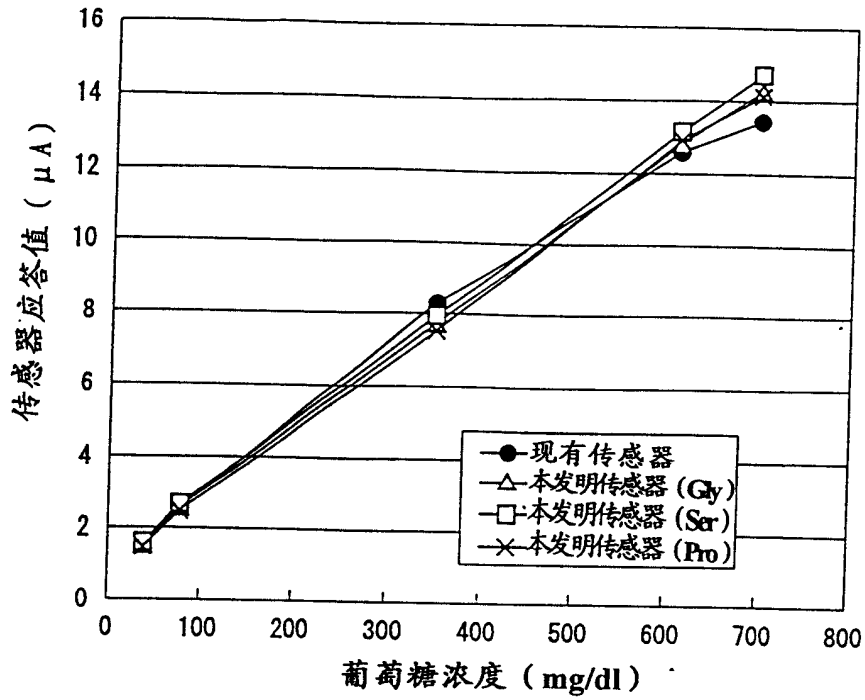


图 10

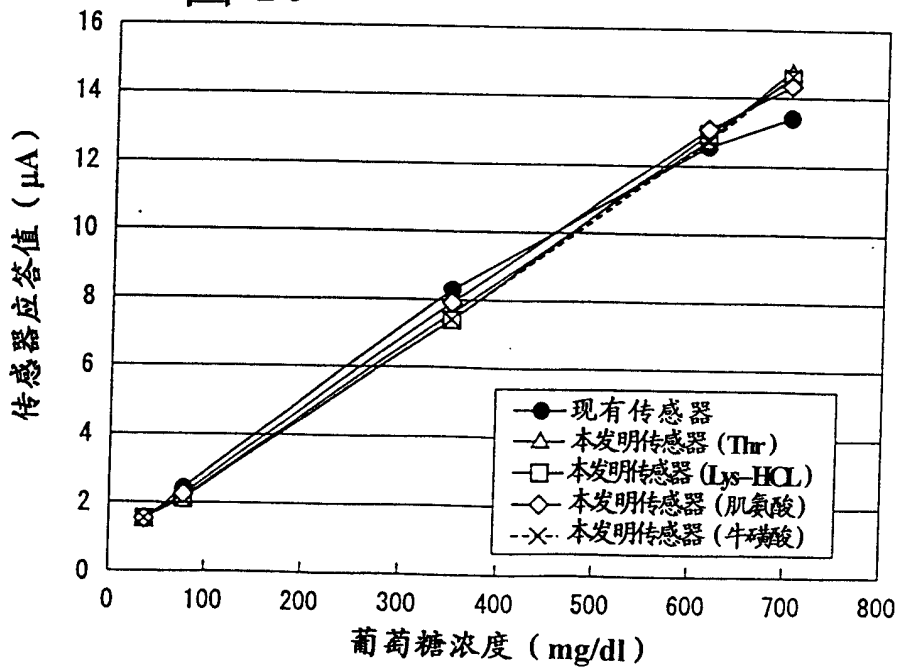


图 11

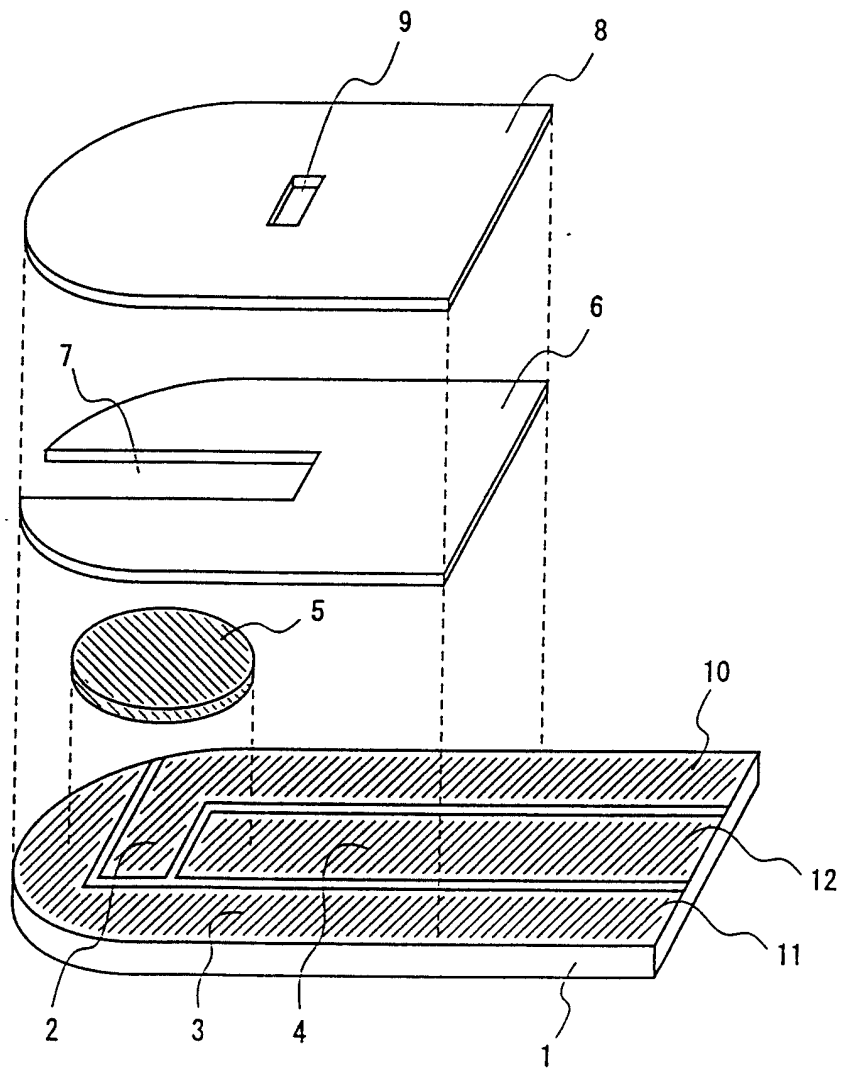


图 12

