



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 33 307 T2** 2005.09.01

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 971 036 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 33 307.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 118 452.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **06.04.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **01.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.09.2005**

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/00**  
**G01N 27/327**

(30) Unionspriorität:

**8233295**      **07.04.1995**      **JP**

(73) Patentinhaber:

**ARKRAY, Inc., Kyoto, JP**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, FR, GB, IT**

(72) Erfinder:

**Hamamoto, Katsumi, Higashikujo, Kyoto, JP;  
Okuda, Hisashi, Higashikujo, Kyoto, JP**

(54) Bezeichnung: **Sensor, Verfahren zu seiner Herstellung und Messverfahren zur Verwendung davon**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Sensor, der genau, schnell und leicht die Konzentration einer bestimmten Komponente (zum Beispiel Milchsäure, Glucose und Cholesterin) in einer extrem kleinen Flüssigkeitsmenge, wie einer Körperflüssigkeit (zum Beispiel Blut (Vollblut), Plasma, Urin und Speichel) misst, zum Beispiel einen Milchsäuresensor, sowie auf ein Verfahren zur Herstellung des Sensors und ein Verfahren zur Messung der Konzentration von Milchsäure in Blut.

Beschreibung des Standes der Technik

**[0002]** Die Japanische Patentveröffentlichung (JP-B) Nr. 58-4557 (1983) offenbart eine Zusammensetzung zur Messung von Milchsäure, die auf Testpapier aufgetragen wird, welches die Milchsäurekonzentration in Blut misst. In dem Testpapier trägt ein Träger eine Reagensschicht, die Milchsäure-Oxidase (LOD), Peroxidase und ein farberzeugendes Reagens enthält. Wenn das Papier verwendet wird, bestimmt man die Milchsäurekonzentration durch Messung des Reflexionsgrads, der sich auf der Basis der Milchsäurekonzentration ändert. Die Japanische Patentveröffentlichung (JP-B) Nr. 5-79319 (1993) schlägt eine Zusammensetzung für die Reagensschicht vor, welche Milchsäure-Dehydrogenase, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), einen Elektronenträger und ein Tetrazoliumsalz enthält.

**[0003]** In jeder dieser Veröffentlichungen wird unter Verwendung einer optischen Apparatur eine Farbreaktion nachgewiesen, nachdem Blut durch eine Entwicklungsschicht gelangt und der Träger damit imprägniert und anschließend das Blut mit der Reagensschicht absorbiert wurde. Da hydrophile poröse Elemente für die Entwicklungsschicht und die Reagensschicht verwendet werden, ist selbst bei dem einfachen Messverfahren eine relativ große Menge Blut (etwa 20 µl) erforderlich. Wenn außerdem die Blutmenge zu gering ist, ist die Farbbildung nicht gleichmäßig, was zu einer nachteiligen Wirkung auf die Messgenauigkeit führen oder die Messung unmöglich machen kann.

**[0004]** Die Japanische Offenlegungsschrift (JP-A) Nr. 6-94672 (1994) offenbart ein Verfahren zur Quantifizierung einer Milchsäurekonzentration unter Verwendung einer Enzymelektrode. Bei dem Verfahren wird ein Sensor verwendet, der eine Reagensschicht aus einem hydrophilen Polymer, LOD, einen Elektronenträger auf einer Messelektrode sowie eine Gegenelektrode, die beide auf einem isolierenden Substrat gebildet sind, umfasst, wobei ein Spacer und eine Abdeckung auf die Reagensschicht laminiert sind. Da die Elektrode des Sensors klein ist, kann sie selbst mit einer sehr kleinen Flüssigkeitsmenge (zum Beispiel 5 µl) messen. Weiterhin wird Blut automatisch kapillar absorbiert, so dass sich das Blut gleichmäßig auf den Elektroden verteilt. So wird das Auftreten von Fehlmessungen unterdrückt.

**[0005]** EP-A-0 636 879 offenbart einen Biosensor, der auf einem isolierenden Substrat ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode sowie eine Reaktionsschicht umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Reaktionsschicht drei Schichten, von denen eine erste Schicht einen Puffer und ein hydrophiles Polymer enthält und eine zweite Schicht das Enzym, das Polymer und vorzugsweise auch einen Elektronenakzeptor enthält.

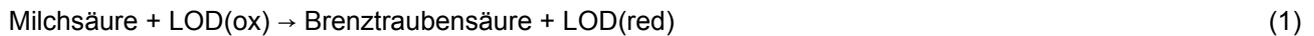
**[0006]** EP-A-0 502 504 offenbart einen Biosensor, der auf einem isolierenden Substrat ein Elektrodensystem mit einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode sowie eine Reaktionsschicht mit einem Enzym und eine pH-Regulationsschicht umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform werden in der Reaktionsschicht oder in benachbarten Schichten ein hydrophiles Polymer und Elektronenakzeptoren bereitgestellt, und die pH-Regulationsschicht umfasst ein Puffersalz, wie Phosphat.

**[0007]** Das Prinzip der Messung mit der oben beschriebenen Enzymelektrode unter Verwendung des Elektronenträgers wird beispielhaft anhand der Messung der Milchsäurekonzentration erläutert:

**[0008]** Wenn ein Substrat "S" (dessen Konzentration gemessen werden soll, zum Beispiel Milchsäure) durch ein Enzym "E" (zum Beispiel Milchsäure-Oxidase) zu einem Produkt "P" (zum Beispiel Brenztraubensäure) oxidiert wird, wird das aktive Zentrum des Enzyms "E" vom oxidierenden Typ "E(ox)" zum reduzierenden Typ "E(red)" umgewandelt. Das Enzym des reduzierenden Typs "E(red)" wird durch eine Verbindung eines oxidierenden Typs "M(ox)", die als Elektronenträger für das Enzym fungiert, in "E(ox)" zurücküberführt, und der Elek-

tronenträger wird in "M(red)" umgewandelt. Gleichzeitig wird "M(red)" unter einer geeigneten, an eine Arbeitselektrode angelegten Spannung zu "M(ox)" elektrolysiert. Die Substratkonzentration kann bestimmt werden, indem man bei der Elektrolyse den Oxidationsstrom misst.

**[0009]** Das obige Messprinzip kann unter Bezugnahme auf die Messung der Milchsäurekonzentration unter Verwendung von Milchsäure-Oxidase (LOD) wie folgt ausgedrückt werden:



**[0010]** Das Messverfahren unter Verwendung der Enzymelektrode ist beschrieben in J. R. Mor und R. Guannaccia, Anal. Biochem., Vol. 79, 5. 319 (1977).

**[0011]** Wenn ein solcher Sensor verwendet wird, wird eine flüssige Probe von zum Beispiel Vollblut, Plasma, Urin oder Speichel automatisch kapillar absorbiert, indem man sie mit einem Probeneinlass des Sensors in Kontakt bringt. Mit fortschreitender Absorption wird Luft durch eine Austrittsöffnung ausgeleitet, so dass die flüssige Probe in der gesamten Reagensschicht verteilt wird. Unmittelbar nachdem die Probenabsorption beendet ist, beginnt die Auflösung der Reagensschicht, und die Enzymreaktion schreitet nach der obigen Gleichung (1) fort.

**[0012]** Als Elektronenträger werden ein Ferrocen, Kaliumhexacyanoferrat(III), ein Benzochinon und dergleichen verwendet. Die in der obigen Gleichung (2) gebildete Verbindung des reduzierenden Typs "M(red)" wird gemäß der obigen Gleichung (3) durch das Anlegen einer konstanten Spannung im Bereich von 0,3 bis 0,6 V an das Elektrodensystem durch eine Anwendungsschaltung aus einer externen Stromquelle elektrolytisch oxidiert. Da der dabei erhaltene Strom ( $\text{e}^-$ ) direkt proportional zur Milchsäurekonzentration ist, kann die Milchsäurekonzentration in der Probe durch die Messung des Stroms erhalten werden.

**[0013]** Der obige Sensor verwendet fast direkt das Prinzip, das in der Japanischen Offenlegungsschrift (JP-A) Nr. 3-54447 (1991) in Bezug auf einen Glucosesensor offenbart ist, und er weist während der Messung der Milchsäurekonzentration ein Problem, das der Enzymelektrode eigentümlich ist, sowie ein weiteres Problem auf.

**[0014]** Zuerst erhöht eine Wechselwirkung zwischen Verunreinigungen, die in dem hydrophilen Polymer enthalten sind, und dem Oxidase-Enzym den Hintergrundstrom während der Messung. Zum Beispiel beträgt die Milchsäurekonzentration etwa ein Zehntel der Glucosekonzentration in Blut. Wenn also der Hintergrundstrom erhöht wird, wird die Messgenauigkeit beeinträchtigt, insbesondere dann, wenn die Milchsäurekonzentration gering ist.

**[0015]** Weiterhin sind insbesondere die Produktionskosten des Sensors für die Konzentrationsmessung von Milchsäure ein Problem. Das heißt, da LOD pro Einheit etwa hundertmal so teuer ist wie Glucose, muss in dem Sensor eine große Menge LOD enthalten sein, damit ein Sensor einen großen Messbereich abdecken kann, was zu hohen Kosten für den Sensor führt. Die Menge an LOD, die für den Sensor verwendet wird, sollte also unter dem Gesichtspunkt der Produktionskosten minimiert werden.

**[0016]** Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Reagensschicht aufgrund der Trockenheit der Schicht partiell abgeschält wird. Wenn die verwendete Menge des LOD in Anbetracht der Kosten minimiert wird, ist die Menge an LOD ungenügend, wodurch die Reproduzierbarkeit der Messung verschlechtert wird.

**[0017]** Wenn ein anderes Oxidase-Enzym verwendet wird, treten ähnliche Probleme auf, die nicht so auffällig sind wie bei LOD.

**[0018]** Wenn der Sensor weiterhin unter Bedingungen mit hoher Feuchtigkeit gelagert wird, um die Trockenheit der Reagensschicht zu unterdrücken, wird ein Abschälen verhindert. Aufgrund eines Effekts von Restwasser in der Reagensschicht wird jedoch der Hintergrundstrom allmählich erhöht, was zu einem weiteren Problem der schlechteren Lagerungsstabilität des Sensors führt. Daher sollte die Reagensschicht mit Abschälfestigkeit unmittelbar nach der Entfernung des Wassergehalts in der Reagensschicht gebildet werden.

## Kurzbeschreibung der Erfindung

**[0019]** Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, einen Sensor bereitzustellen, der den Gehalt (zum Beispiel eine Konzentration) eines zu messenden Materials in einer flüssigen Probe genau misst und mit niedrigeren Kosten hergestellt werden kann.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung stellt einen Sensor (zum Beispiel einen Milchsäuresensor) zur Messung des Gehalts (zum Beispiel einer Konzentration) eines zu messenden Materials (zum Beispiel Milchsäure) in einer Flüssigkeit (zum Beispiel in Blut) bereit, wobei das Material mit einem Oxidase-Enzym oxidierbar ist, wobei in dem Sensor auf einem Elektrodensystem, das aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode, die beide auf einem isolierenden Substrat gebildet sind, besteht, eine Reagenzschicht gebildet ist, wobei die Reagenzschicht aus einer hydrophilen Polymerschicht, die ein hydrophiles Polymer umfasst, und einer reaktiven Schicht, die das Oxidase-Enzym und einen Elektronenträger umfasst, besteht, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens entweder die hydrophile Polymerschicht oder die reaktive Schicht ein Alkylenoxidpolymer umfasst, das mit einer Polycarbonsäure oder einem Polycarbonsäure-Derivat verestert und/oder umgeestert ist und ein Molekulargewicht von etwa 20000 bis 300000 hat.

**[0021]** Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Sensors bereit, das die folgenden Schritte umfasst:

Bilden eines Elektrodensystems, das aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode auf einem isolierenden Substrat besteht;

Beschichten wenigstens eines Teils des Elektrodensystems mit einer hydrophilen Polymerschicht durch Auftragen einer Lösung, die ein hydrophiles Polymer enthält, auf das Elektrodensystem und anschließend Trocknen der Lösung; und

Beschichten wenigstens eines Teils der hydrophilen Polymerschicht mit einer reaktiven Schicht durch Auftragen einer Lösung, die eine Zusammensetzung für die reaktive Schicht enthält, welche ein Oxidase-Enzym und einen Elektronenträger umfasst, auf die hydrophile Polymerschicht und anschließend Trocknen der Lösung; dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der beiden Lösungen weiterhin ein Alkylenoxidpolymer umfasst, das mit einer Polycarbonsäure oder einem Polycarbonsäure-Derivat verestert und/oder umgeestert ist und ein Molekulargewicht von etwa 20000 bis 300000 hat.

**[0022]** Die Zugabe eines Alkylenoxidpolymers zu der reaktiven Schicht und/oder der hydrophilen Polymerschicht verhindert das Abschälen der Reagenzschicht.

**[0023]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Phosphat zu der reaktiven Schicht gegeben, was die Aktivität des Oxidase-Enzyms erhöht, so dass selbst eine kleine Menge des Oxidase-Enzyms hinsichtlich seiner Aktivität nicht ungenügend ist und bis zu einer hohen Konzentration des zu messenden Materials (zum Beispiel Milchsäure) eine Linearität der Aktivität erhalten wird.

**[0024]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein hochreines hydrophiles Polymer verwendet (das zum Beispiel erhalten wird, indem man die Menge der in dem hydrophilen Polymer enthaltenen Verunreinigungen reduziert, indem man ein kommerziell erhältliches hydrophiles Polymer zusätzlich reinigt), was den Hintergrundstrom reduziert, so dass die Messgenauigkeit verbessert wird.

## Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0025]** [Fig. 1](#) zeigt schematisch eine Querschnittsansicht des Milchsäuresensors der vorliegenden Erfindung; und

**[0026]** [Fig. 2](#) ist eine Graphik, die eine Ansprechkurve eines in Vergleichsbeispiel 1 hergestellten Sensors in Bezug auf eine Milchsäurekonzentration zeigt.

## Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0027]** In der vorliegenden Erfindung besteht die Reagenzschicht aus zwei Schichten, der hydrophilen Polymerschicht und der reaktiven Schicht. Diese Schichten sind jedoch nicht notwendigerweise auf zwei getrennte Schichten in der strengen Bedeutung dieses Ausdrucks aufgeteilt. Gegebenenfalls können die zwei Schichten miteinander gemischt werden. Insbesondere können sie je nach dem Herstellungsverfahren des Sensors auch zusammen vorhanden sein.

**[0028]** In der vorliegenden Erfindung soll "Messelektrode" eine Elektrode bedeuten, auf der der Elektronenträger oxidiert oder reduziert wird, d. h. eine Elektrode, die zur Messung des Gehalts des zu messenden Materials dient, und "Gegenelektrode" bedeutet eine Elektrode, die der Messelektrode gegenübersteht.

**[0029]** In der vorliegenden Erfindung ist das Oxidase-Enzym ein Enzym, das eine Reaktion katalysiert, bei der ein biologisches Material (d. h. ein Material in einem Organismus) oxidiert wird, und umfasst eine Oxidase, Dehydrogenase und Oxigenase.

**[0030]** Als konkrete Beispiele seien Milchsäure-Oxidase, Glucose-Oxidase, Cholesterin-Oxidase, Uricase, Alkohol-Oxidase, NADH-Oxidase, Diaphorase und Milchsäure-Dehydrogenase genannt. Außerdem ist in der vorliegenden Erfindung das Material, das durch das Oxidase-Enzym oxidiert wird, ein Material, dessen Gehalt (wie die Konzentration) gemessen werden soll, d. h. ein zu messendes Material. Das zu messende Material ist im Falle von Milchsäure-Oxidase Milchsäure, im Falle von Glucose-Oxidase Glucose und im Falle von Cholesterin-Oxidase Cholesterin.

**[0031]** In der vorliegenden Erfindung kann das zu messende Material in Flüssigkeit gelöst und/oder dispergiert sein. Weiterhin unterliegt die Flüssigkeit keiner besonderen Einschränkung, wenn das zu messende Material nur darin gelöst und/oder dispergiert ist, und es kann sich um Wasser, Ethylalkohol oder ein Gemisch davon handeln. Die Flüssigkeit, die das zu messende Material enthält, kann also eine Körperflüssigkeit sein, wie Blut, Urin, Plasma und Speichel.

**[0032]** Der Sensor, das Verfahren zur Herstellung des Sensors und das Verfahren zur Messung des Gehalts, insbesondere der Konzentration (im Falle einer Lösung) unter Verwendung des Sensors gemäß der vorliegenden Erfindung werden im folgenden anhand eines Beispiels erläutert, bei dem Milchsäure-Oxidase als Oxidase-Enzym verwendet wird. Die vorliegende Erfindung lässt sich gleichermaßen auf andere Oxidase-Enzyme, wie Glucose-Oxidase und Cholesterin-Oxidase, anwenden. Konkret sollte Milchsäure-Oxidase durch ein anderes Enzym ersetzt werden, und das zu messende Material (Milchsäure) sollte durch ein Material ersetzt werden, das durch das andere Enzym oxidiert wird, wenn die vorliegende Erfindung auf das andere Oxidase-Enzym angewendet werden soll.

**[0033]** Ein Elektrodenmaterial, das zur Bildung des Milchsäuresensors der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, kann jedes Material sein, das im allgemeinen für Elektroden verwendet wird. Als konkrete Beispiele seien Kohlenstoff, ein Metall, eine Legierung, verschiedene Verbindungen des Metalls und der Legierung (zum Beispiel ein Oxid, ein Hydroxid, ein Halogenid, ein Sulfid, ein Nitrid und ein Carbid) genannt. Außerdem kann jede Kombination davon, wie ein Gemisch oder ein Verbundstoff aus diesen Elektrodenmaterialien, verwendet werden.

**[0034]** In der vorliegenden Erfindung bedeutet "Gemisch" ein Material, bei dem die Elektrodenmaterialien im Mikromaßstab miteinander gemischt sind, und "Verbundstoff" bedeutet ein Material, bei dem die Elektrodenmaterialien in einem größeren Maßstab als dem Mikromaßstab miteinander gemischt sind (im sogenannten Makromaßstab gemischt und nicht so gleichmäßig gemischt wie das Gemisch), oder ein Material, bei dem getrennte Materialien miteinander kombiniert sind.

**[0035]** Als bevorzugtes Metall seien zum Beispiel Silber, Aluminium, Gold, Cobalt, Barium, Eisen, Mangan, Nickel, Blei, Zink, Platin, Lithium und Kupfer genannt.

**[0036]** Als bevorzugte Legierung seien zum Beispiel Kupfernickel, Manganin, eine Aluminium-Silicium-Legierung und eine Nickel-Kupfer-Legierung genannt.

**[0037]** Als besonders bevorzugte Metallverbindungen seien zum Beispiel  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{PbO}_2$ ,  $\text{V}_2\text{O}_5$  und  $\text{AgCl}$  genannt.

**[0038]** Wenn Kohlenstoff verwendet wird, können verschiedene Kohlenstoffmaterialien verwendet werden, wie Graphit, Pyrokohlenstoff, glasartiger Kohlenstoff, Acetylschwarz und Ruß. Selbstverständlich kann auch ein herkömmliches amorphes Kohlematerial verwendet werden.

**[0039]** Wenn die Elektrodenmaterialien als Gemisch oder Verbundstoff verwendet werden, seien als Beispiele eine Kombination von  $\text{MnO}_2$  und Acetylschwarz, eine Kombination von Platin und Graphit sowie eine Kombination von Silber und Silberchlorid genannt.

**[0040]** Bei dem Milchsäuresensor gemäß der vorliegenden Erfindung unterliegt die Elektrodenstruktur keiner besonderen Einschränkung, und verschiedene Strukturen können eingesetzt werden, die auf dem Gebiet der Glucosemessung für die Enzymelektrode verwendet werden. Die Elektrode kann in Form eines Drahtes, eines Stabes oder einer Lamelle vorliegen. Die Elektroden sind so angeordnet, dass sie mit einer geeigneten Schaltung verbunden sind, die die Stromstärke misst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Elektrode in Form einer dünnen Schicht verwendet (siehe zum Beispiel [Fig. 1](#)).

**[0041]** Eine solche Elektrode kann nach dem herkömmlichen Verfahren zur Bildung einer laminaren Elektrode gebildet werden. Das heißt, eine Paste für das Elektrodenmaterial wird hergestellt, indem man Pulver für das Elektrodenmaterial mit einer vorbestimmten Größe, ein Bindemittel (wie Polyvinylchlorid, ein Epoxyharz, Neopren oder Cellulose) und ein geeignetes Lösungsmittel (wie Tetrahydrofuran, Toluol oder Isopropanol) sowie gegebenenfalls ein leitfähiges Material (wie Kohlepulver oder ein leitfähiges Polymer) miteinander mischt, die Paste mit einem geeigneten Verfahren (wie Siebdruck) in einer vorbestimmten Dicke (zum Beispiel innerhalb von 10 bis 200 µm) auf ein Substrat (wie ein Polyethylenterephthalat- oder Keramikstreifen-substrat) aufbringt und dann die Paste trocknet und die Paste vorzugsweise sintert, so dass man eine laminare Elektrode mit einer Dicke von 1 bis 50 µm erhält.

**[0042]** Falls notwendig, kann die Elektrode weiterhin in einer überlappenden Form aus mehreren laminaren Schichten (zum Beispiel in einer doppelaminaren Schichtstruktur) gebildet sein. Gegebenenfalls kann eine leitfähige Paste, wie eine Silberpaste, nach einem ähnlichen Verfahren wie bei der Bildung der Elektrode im voraus als Anschlussbrücke auf das Substrat aufgetragen werden, und dann kann die Elektrode auf der Anschlussbrücke gebildet werden, wie es oben beschrieben ist. Wenn auf diese Weise die Anschlussbrücke zwischen der Elektrode und dem Substrat gebildet wird, kann der folgende Effekt erhalten werden: Strom geht wahrscheinlich durch die Anschlussbrücke mit dem geringeren Widerstand, so dass der elektrische Widerstand reduziert wird, was zu einer Reduktion des Verlusts der angelegten Spannung führt.

**[0043]** Bei dem vorliegenden Milchsäuresensor wird die Reagensschicht auf wenigstens einem Teil jeder Elektrode, wie es oben beschrieben ist, vorzugsweise auf jeweils der gesamten Elektrode, wie es oben beschrieben ist, so dass die Elektrode vollständig bedeckt wird, gebildet. Besonders bevorzugt wird eine einzige Reagensschicht auf beiden Elektroden gebildet, so dass die Elektroden vollständig bedeckt sind. Die Reagensschicht besteht aus der hydrophilen Polymerschicht und der reaktiven Schicht, und jede Schicht kann mit den Elektroden in Kontakt sein. Alternativ dazu sind die Schichten jeweils nicht durch eine klare Grenze voneinander getrennt, und eine Schicht ist an der Grenze mit der anderen Schicht vermischt, oder beide sind auf der gesamten Reagensschicht miteinander gemischt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die hydrophile Polymerschicht auf der Elektrode gebildet, und darauf wird anschließend die reaktive Schicht gebildet.

**[0044]** Die hydrophile Polymerschicht fungiert als Bindemittel, das die in der Reagensschicht enthaltenen Verbindungen auf der Elektrode hält, wenn der Sensor gelagert wird. Die hydrophile Polymerschicht ist eine dünne Schicht, die als Separator zwischen der Elektrode und der reaktiven Schicht fungiert (wenn sich die hydrophile Polymerschicht zwischen der Elektrode und der reaktiven Schicht befindet), und sorgt für die glatte Absorption einer Probe (wie Blut). Die hydrophile Polymerschicht umfasst ein hydrophiles Polymer. In der vorliegenden Erfindung ist das hydrophile Polymer ein wasserlösliches Material mit einem hohen Molekulargewicht, wobei ein Monomer mit hydrophilen Gruppen polymerisiert wurde.

**[0045]** Bei dem hydrophilen Polymer handelt es sich vorzugsweise um Carboxymethylcellulose (CMC) und andere ähnliche Polymere. Zum Beispiel können Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose und Ethylcellulose verwendet werden. Weiterhin können Polyvinylpyrrolidon und Polyvinylalkohol verwendet werden. Gegebenenfalls kann die hydrophile Schicht weiterhin ein Material mit einer Oberflächenaktivität, wie Phosphatidylcholin, enthalten. Die hydrophile Polymerschicht wird so aufgetragen, dass sie jeweils wenigstens einen Teil der Messelektrode und der Gegenelektrode bedeckt und vorzugsweise beide Elektroden vollständig bedeckt. Das Auftragen kann dadurch erfolgen, dass man die Elektroden mit einer wässrigen Lösung des hydrophilen Polymers beschichtet und anschließend trocknet. Die hydrophile Polymerschicht kann eine Dicke im Bereich von 10 bis 100 µm haben.

**[0046]** Bei dem vorliegenden Milchsäuresensor ist das hydrophile Polymer vorzugsweise ein hochreines Polymer mit einer Reinheit von nicht weniger als 99,9 Gew.-%. Wenn kein hochreines Polymer zur Verfügung steht, kann das Polymer gereinigt werden, indem man eine wässrige Lösung des hydrophilen Polymers mit einem organischen Lösungsmittel mischt, das eine hohe Flüchtigkeit hat (wie Aceton, Tetrahydrofuran, Methylalkohol usw.) und in dem sich das hydrophile Polymer nicht wesentlich löst, so dass Verunreinigungen, die in

dem organischen Lösungsmittel löslich sind, aus dem Polymer entfernt werden, und indem man das umkristallisierte wasserlösliche Polymer (d. h. das hydrophile Polymer) trocknet.

**[0047]** Kommerziell erhältliches hydrophiles Polymer, zum Beispiel CMC, hat eine Reinheit von weniger als 99,9 Gew.-% (die Verunreinigungen sind Redoxverbindungen, Stäube in der Luft, verschiedene Keime, Fette und Öle usw.), und ein solches CMC wird vorzugsweise gereinigt, so dass es eine Reinheit von nicht weniger als 99,9 Gew.-% und besonders bevorzugt 99,99 Gew.-% erhält und damit in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann. Zum Beispiel enthält CELLOGEN (kommerziell erhältlich von Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) wenigstens 0,1 Gew.-% Redoxverbindungen aus der Synthese von CMC sowie verschiedene Keime, Stäube und Öle als Verunreinigungen während des anschließenden Produktionsverfahrens.

**[0048]** Wenn in der vorliegenden Erfindung ein auf diese Weise hochgradig gereinigtes hydrophiles Polymer verwendet wird, wird der Hintergrundstrom reduziert, was zu einer verbesserten Genauigkeit der Messung führt.

**[0049]** Bei dem vorliegenden Milchsäuresensor umfasst die reaktive Schicht, die die Reagensschicht bildet, Milchsäure-Oxidase (LOD), den Elektronenträger und das Phosphat, die in einer festen Phase, vorzugsweise in einer dünnen festen Schicht, die wenigstens Teile der Messelektrode und der Gegenelektrode bedeckt, gleichmäßig miteinander gemischt sind. Wenn das hydrophile Polymer also als getrennte Schicht vorhanden ist, befindet sich die reaktive Schicht auf wenigstens einem Teil der hydrophilen Polymerschicht.

**[0050]** Solche dünnen Schichten (die hydrophile Polymerschicht und die reaktive Schicht) können durch Verfahren gebildet werden, die dem oben beschriebenen Verfahren zur Bildung der Elektrode ähnlich sind. Zum Beispiel wird eine Reagenspaste hergestellt, die das Enzym, den Elektronenträger, das Bindemittel und das Lösungsmittel (zum Beispiel Wasser oder Ethanol, vorzugsweise Ethanol) umfasst, die Paste wird nach einem geeigneten Verfahren (zum Beispiel unter Verwendung eines Spenders) auf die Elektroden aufgebracht, so dass sie die Elektroden bedeckt, und dann wird die Paste zu einer festen Phase getrocknet.

**[0051]** Bei dem vorliegenden Milchsäuresensor kann jeder Elektronenträger verwendet werden, der herkömmlicherweise für die sogenannte Enzymelektrode verwendet wird. Zum Beispiel können Kaliumhexacyanoferrat(III), Benzochinon, Phenazinmethosulfat, Thionin, Ferrocen, Naphthochinon, Methylenblau, Methoxy-PMS und Meldola-Blau verwendet werden.

**[0052]** Das Phosphat in der reaktiven Schicht, die in dem vorliegenden Milchsäuresensor verwendet wird, ist ein Salz, das in Wasser gelöst wird, so dass es dissoziiert und eine alkalische Lösung ergibt. Zum Beispiel wird vorzugsweise Dikaliumhydrogenphosphat verwendet, auf welches das Phosphat aber nicht beschränkt ist. Als weitere Phosphate seien zum Beispiel die folgenden genannt: Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Calciumphosphat und Magnesiumphosphat. Diese Phosphate fördern die Aktivität des LOD, so dass die Messgenauigkeit verbessert wird.

**[0053]** Weiterhin enthält die reaktive Schicht des vorliegenden Milchsäuresensors vorzugsweise ein Polymer, in dem hauptsächlich Esterbindungen vorhanden sind, insbesondere ein Alkylenoxid-Polymer. Zum Beispiel ist das Polymer ein Alkylenoxid-Additionspolymer, das mit einer Polycarbonsäure und/oder einem Derivat davon verestert und/oder umgeestert wird, so dass es ein Molekulargewicht von etwa 20000 bis 300000 erhält. Die Mitverwendung eines solchen Polymers sorgt dafür, dass der Milchsäuresensor eine verbesserte Reproduzierbarkeit hat. Als Alkylenoxid können die folgenden verwendet werden: Ethylenoxid, Propylenoxid, Styroloxid und Butylenoxid. Als Polycarbonsäure und Derivat davon können die folgenden verwendet werden: Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Phthalsäure, Tetrabenzylcarbonsäure und ein Anhydrid, wie Bernsteinsäureanhydrid und Maleinsäureanhydrid, ein Niederalkylester, wie Dimethylphthalat und Dimethylmaleat.

**[0054]** Als Alkylenoxid-Polymer, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann ein Polymer verwendet werden, das eine Weichmachereigenschaft und eine hohe Auflösungsgeschwindigkeit in Wasser aufweist. Zum Beispiel kann ein Ethylenoxid-Polymer oder ein Propylenoxid-Polymer verwendet werden. Ein solches Polymer ist zum Beispiel als PAOGEN PP-15 oder PAOGEN EP-15 von Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd. kommerziell erhältlich.

**[0055]** Diese Alkylenoxid-Polymere tragen zur Verhinderung der Abschälung der Reagensschicht bei, was dazu führt, dass der Messbereich des Sensors gewährleistet ist.

**[0056]** In der vorliegenden Erfindung kann jede geeignete Kombination des Elektrodenmaterials, des Elektronenträgers, des Phosphats und des hydrophilen Polymers sowie des wahlfreien Alkylenoxid-Polymers eingesetzt werden.

**[0057]** Was in der vorliegenden Erfindung zu berücksichtigen ist, sind der zu messende Milchsäure-Konzentrationsbereich, das Reduktionspotential oder Oxidationspotential des Elektronenträgers, die durch die Kombination der Elektroden erzeugte elektromotorische Kraft, die Produktionskosten, Stabilitäten, die Zusammensetzung der Reaktionsschicht usw. Je nach der Kombination dieser Parameter kann ein geeigneter Milchsäuresensor mit geeigneten Merkmalen hergestellt werden.

**[0058]** Ein konkretes Beispiel für einen bevorzugten Sensor ist im folgenden gezeigt:

Isolationssubstratmaterial:	Polyethylenterephthalat
Elektrodenmaterial:	Graphit
Material der hydrophilen Polymerschicht:	CMC (durch Umkristallisieren gereinigt)
Zusammensetzung des Materials der reaktiven Schicht	
Milchsäure-Oxidase:	200–800 Einheiten/ml
Elektronenträger:	Kaliumhexacyanoferrat(III) 1,0 bis 5,0 Gew.-%
Phosphat:	Dikaliumhydrogenphosphat 0,01 bis 1,00 Gew.-%
Alkylenoxid-Polymer:	PAOGEN 0,01 bis 1,00 Gew.-%

**[0059]** Der Milchsäuresensor gemäß der vorliegenden Erfindung kann einen Spacer und eine Abdeckung umfassen, die bei der herkömmlichen Enzymelektrode auf der reaktiven Schicht in der festen Phase verwendet werden, die LOD, den Elektronenträger und das Phosphat umfasst.

**[0060]** [Fig. 1](#) zeigt schematisch eine Querschnittsansicht des Milchsäuresensors der vorliegenden Erfindung. In [Fig. 1](#) umfasst der Milchsäuresensor **10** ein Isolationssubstrat **1**, auf dem sich Anschlussbrücken **2** befinden. Auf den Anschlussbrücken **2** sind Elektroden (eine Messelektrode **3** und eine Gegenelektrode **4**) gebildet. In der in [Fig. 1](#) gezeigten Ausführungsform befindet sich eine Reagensschicht **7**, die aus einer hydrophilen Polymerschicht **5** und einer darauf befindlichen reaktiven Schicht besteht, auf den Elektroden, so dass sie diese vollständig bedeckt. Wie oben beschrieben, bedeckt die Reagensschicht vorzugsweise die gesamten Elektroden. Dies ist jedoch nicht notwendigerweise so, und es reicht aus, wenn sie wenigstens einen Teil jeder Elektrode bedeckt.

**[0061]** Im zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des Sensors (zum Beispiel des Milchsäuresensors) des ersten Aspekts bereit.

**[0062]** Das heißt, das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

Bilden eines Elektrodensystems, das aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode auf einem isolierenden Substrat besteht;

Beschichten wenigstens eines Teils des Elektrodensystems mit einer hydrophilen Polymerschicht durch Auftragen einer Lösung, vorzugsweise einer wässrigen Lösung, die ein hydrophiles Polymer enthält, auf das Elektrodensystem und anschließendes Trocknen; und

Beschichten wenigstens eines Teils der hydrophilen Polymerschicht mit einer reaktiven Schicht durch Auftragen einer Lösung, vorzugsweise einer wässrigen Lösung, die eine Zusammensetzung für die reaktive Schicht enthält, welche ein Oxidase-Enzym (zum Beispiel Milchsäure-Oxidase), einen Elektronenträger und ein Phosphat umfasst, auf die hydrophile Polymerschicht und anschließendes Trocknen.

**[0063]** Wenn die hydrophile Polymerschicht und die reaktive Schicht gebildet werden, werden die Lösungen (zum Beispiel die wässrigen Lösungen) für diese Schichten hergestellt, und die Lösungen werden auf das Elektrodensystem aufgetragen (zum Beispiel aus einem Spender), und anschließend wird getrocknet, um die Lösungsmittel zu entfernen.

**[0064]** Wenn die Lösung für die reaktive Schicht bei dem Herstellungsverfahren so hergestellt wird, dass sie eine Phosphatkonzentration von 0,01 bis 1,00 Gew.-%, insbesondere 0,10 bis 0,50 Gew.-%, hat, kann ein Sensor (Milchsäuresensor) hergestellt werden, der insbesondere eine bessere Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit hat.

**[0065]** Da ein Alkylenoxid-Polymer in der hydrophilen Schicht und/oder der reaktiven Schicht enthalten ist,

enthält die Lösung für die Bildung jeder Schicht vorzugsweise das Polymer in einer Menge von 0,01 bis 1,00 Gew.-%, insbesondere 0,10 bis 0,50 Gew.-%, was die Bildung einer abschälbeständigen Reagensschicht bewirkt.

**[0066]** Außerdem kann die so gebildete Reagensschicht den Spacer und die Abdeckung tragen, die in der herkömmlichen Enzymelektrode verwendet werden und die eine oder mehrere Öffnungen haben, durch die eine der Abdeckung zugeführte Probe hindurchtreten und zur reaktiven Schicht und dem Elektrodensystem vordringen kann.

**[0067]** Was vorstehend in bezug auf den Sensor der vorliegenden Erfindung (Milchsäuresensor) erläutert wurde, gilt auch für das Herstellungsverfahren des Sensors (Milchsäuresensors) sowie für die Messapparatur und das Messverfahren der vorliegenden Erfindung, die weiter unten an geeigneter Stelle beschrieben werden.

**[0068]** Der oben beschriebene Sensor (Milchsäuresensor) kann in einer Messapparatur für die Konzentrationsmessung eines Materials (zum Beispiel Milchsäure), das durch ein Enzym in einer Flüssigkeit oxidiert wird, verwendet werden.

**[0069]** Eine solche Apparatur umfasst eine Probenzufuhr-Nachweisschaltung, eine Messzeit-Steuerschaltung, eine arithmetische Schaltung, eine Anzeigeschaltung und ein Anzeigeelement, welche die Konzentration anzeigen, und sie umfasst weiterhin ein Element, das den Sensor der vorliegenden Erfindung (zum Beispiel Milchsäuresensor) aufnimmt oder enthält, so dass die Messzeit-Steuerschaltung den in dem Sensor (zum Beispiel Milchsäuresensor) je nach der Konzentration des zu messenden Materials erzeugten Strom nachweisen kann.

**[0070]** Die Probenzufuhr-Nachweisschaltung ist eine Schaltung, die eine Impedanzänderung aufgrund des Eindringens der Probe aus einem Probenabsorptionseinlass, welche durch die Abdeckung und den Spacer erfolgt, auf die Reagensschicht des Sensors (zum Beispiel Milchsäuresensors), nachweist und automatisch ein Messprogramm startet.

**[0071]** Die Messzeit-Steuerschaltung ist eine Schaltung, die die Stromstärke misst, wenn nach der Zufuhr der Probe eine Enzymreaktion abläuft, und nach einer Zeitspanne, die für die Erzeugung eines Produkts "P" ausreichend ist, wird ein Stromkreis geschlossen.

**[0072]** Die arithmetische Schaltung ist eine Schaltung, die den von der Messzeit-Steuerschaltung nachgewiesenen Stromstärkewert auf der Grundlage einer arithmetischen Gleichung (oder einer Eichkurve), die zuvor in der Apparatur installiert wurde, in eine Konzentration des zu messenden Materials (zum Beispiel Milchsäure) umwandelt.

**[0073]** Die Anzeigeschaltung ist eine Schaltung, die die von der arithmetischen Schaltung umgewandelte Konzentration auf dem Anzeigeelement der Apparatur zeigt.

**[0074]** Als die oben beschriebenen Schaltungen können solche verwendet werden, die in der Apparatur verwendet werden, die die herkömmliche Enzymelektrode enthält. Ausführliche Schaltungsinformationen darüber können zum Beispiel aus der Japanischen Offenlegungsschrift (JP-A) Nr. 4-357452 (1992) erhalten werden.

**[0075]** In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Messung der Konzentration von zu messender Milchsäure bereit, wobei der oben definierte Sensor verwendet wird.

**[0076]** Die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung bestimmte Konzentration der Milchsäure unterliegt keiner besonderen Einschränkung und kann von der für die Messung zu verwendenden Probenmenge abhängen. Außerdem unterliegt auch die für die Messung zu verwendende Probenmenge keiner besonderen Einschränkung. Zum Beispiel kann für die Messung eine Menge von 1,0 bis 5,0 µl, insbesondere 3,0 bis 5,0 µl, verwendet werden. Wenn eine solche Menge eingesetzt wird, eignet sich das vorliegende Verfahren insbesondere für die Messung der Konzentration des gemessenen Materials im Bereich von zum Beispiel 0 bis 200 mg/dl, insbesondere 2 bis 100 mg/dl.

**[0077]** Der folgende Effekt wird beobachtet, wenn man den Sensor der vorliegenden Erfindung verwendet:

**[0078]** Die Mitverwendung des Alkylenoxidpolymers in der hydrophilen Polymerschicht und/oder der Reagensschicht verhindert, dass die Reagensschicht abgeschält wird, so dass die Reproduzierbarkeit der Mes-

sung verbessert wird.

**[0079]** Durch diese Effekte wird also der Sensor (Milchsäuresensor) mit der verbesserten Genauigkeit, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit bereitgestellt.

#### Beispiele

**[0080]** Beispiele für die vorliegende Erfindung werden im folgenden ausführlich erläutert. In den Beispielen wird das Verfahren zur Herstellung des Milchsäuresensors ebenfalls als Beispiel erläutert. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf den Milchsäuresensor beschränkt, und wenn Glucose-Oxidase als Enzym verwendet wird, erhält man in ähnlicher Weise einen Glucosesensor. Wenn Cholesterin-Oxidase verwendet wird, erhält man in ähnlicher Weise einen Cholesterinsensor.

#### Vergleichsbeispiel 1

**[0081]** Die Anschlussbrücken **2** wurden durch Siebdruck unter Verwendung einer Silberpaste auf ein Isolationssubstrat **1** aus Polyethylenterephthalat gedruckt, und eine Messelektrode **3** und eine Gegenelektrode **4** wurden unter Verwendung von leitfähiger Kohlepaste auf die Anschlussbrücken **2** gedruckt.

**[0082]** Dann wurde eine wässrige Lösung von 0,5 Gew.-% CMC als hydrophiles Polymer (von Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd. unter dem Handelsnamen CELLOGEN kommerziell erhältlich) auf die Elektroden aufgebracht, und anschließend wurde getrocknet, so dass eine hydrophile Polymerschicht **5** entstand. Anschließend wurde eine Lösung mit der folgenden Zusammensetzung auf die Polymerschicht gegeben, und anschließend wurde getrocknet, so dass eine reaktive Schicht **6** entstand. Der so gebildete Milchsäuresensor ist in [Fig. 1](#) in Querschnittsansicht schematisch gezeigt.

LOD	400 E/ml
Kaliumhexacyanoferrat(III)	2,0 Gew.-%
Dikaliumhydrogenphosphat	0,5 Gew.-%

#### Vergleichsbeispiel 2

**[0083]** Ein Sensor nach dem Stand der Technik wurde gebildet, indem man Vergleichsbeispiel 1 wiederholte, außer dass die Lösung für die reaktive Schicht ohne Zugabe von Dikaliumhydrogenphosphat hergestellt wurde. Die Lösung hatte also die folgende Zusammensetzung:

LOD	400 E/ml
Kaliumhexacyanoferrat(III)	2,0 Gew.-%

#### Vergleichsbeispiel 3

**[0084]** Ein Sensor nach dem Stand der Technik wurde gebildet, indem man Vergleichsbeispiel 1 wiederholte, außer dass die Lösung für die reaktive Schicht ohne Zugabe von Dikaliumhydrogenphosphat hergestellt wurde. Außerdem sollte angemerkt werden, dass die Lösung die folgende Zusammensetzung hatte:

LOD	800 E/ml
Kaliumhexacyanoferrat(III)	2,0 Gew.-%

**[0085]** Die Milchsäurekonzentration in Blut wurde gemessen, wobei die in den Vergleichsbeispielen 1 bis 3 hergestellten Sensoren verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt, indem durch die Reaktion erzeugte Stromstärkewerte gegen die Milchsäurekonzentrationen im Blut aufgetragen sind. Bei der Messung wurden etwa 5 µl Blut verwendet. Wie man anhand von [Fig. 2](#) erkennt, erhält man bei Zugabe von Dikaliumhydrogenphosphat eine lineare Beziehung ähnlich der des Sensors des Standes der Technik, auch wenn die Menge des Enzyms im Vergleich zum Sensor des Standes der Technik um 50% reduziert ist. Das heißt, die Empfindlichkeit wird nicht beeinträchtigt, obwohl die Menge des Enzyms reduziert ist, so dass ein billigerer Milchsäuresensor bereitgestellt werden kann, der genauso leistungsfähig ist wie der Sensor des Standes der Technik.

#### Vergleichsbeispiel 4

**[0086]** Vergleichsbeispiel 1 wurde wiederholt, außer dass gereinigtes CMC verwendet wurde. CMC (als CEL-

LOGEN kommerziell erhältlich) wurde in der folgenden Weise gereinigt:

**[0087]** Zuerst wurde ein Gramm CMC in 100 ml Wasser gelöst. Dann wurden 300 ml Aceton allmählich zu dem Wasser gegeben, während mit einem Glasstab gerührt wurde. Sofort fiel weißes faseriges CMC aus, und es wurde unter Verwendung des Glasstabs herausgenommen. Das CMC wurde 60 Minuten lang bei 50°C getrocknet.

**[0088]** Der hergestellte Milchsäuresensor wurde zur Messung der Milchsäurekonzentration in Blut verwendet, und CV-Werte (Variationskoeffizienten) der Messungen (Reproduzierbarkeitsindex; ein größerer CV-Wert bedeutet eine schlechtere Reproduzierbarkeit) sind unten gezeigt:

Milchsäurekonzentration (mg/dl)	CV (%)
9,4	6,2
18,6	2,6
53,2	1,6
101,2	0,9

#### Vergleichsbeispiel 5

**[0089]** Vergleichsbeispiel 4 wurde wiederholt, außer dass kommerziell erhältliches CMC ohne Reinigung verwendet wurde, und die Milchsäurekonzentration in Blut wurde gemessen. Die Ergebnisse sind unten gezeigt:

Milchsäurekonzentration (mg/dl)	CV (%)
9,4	12,6
18,6	4,9
53,2	2,3
101,2	1,4

**[0090]** Wenn die Ergebnisse von Vergleichsbeispiel 4 mit denen von Vergleichsbeispiel 5 verglichen werden, erkennt man, dass die Reinigung von CMC die Reproduzierbarkeit verbessert, so dass ein Milchsäuresensor mit besserer Genauigkeit bereitgestellt wird.

#### Beispiel 1

**[0091]** Vergleichsbeispiel 1 wurde wiederholt, außer dass die Lösung für die reaktive Schicht weiterhin 0,25 Gew.-% PAOGEN (Warenzeichen, kommerziell erhältlich von Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) als Alkylenoxidpolymer enthielt.

**[0092]** Der hergestellte Milchsäuresensor wurde zur Messung der Milchsäurekonzentration in Blut verwendet, und CV-Werte der Messungen sind unten gezeigt:

Milchsäurekonzentration (mg/dl)	CV (%)
9,4	5,9
18,6	1,6
53,2	1,4
155,4	2,3

#### Vergleichsbeispiel 6

**[0093]** Beispiel 1 wurde wiederholt, so dass der Milchsäuresensor entstand, außer dass kein PAOGEN verwendet wurde, und die Milchsäurekonzentration in Blut wurde in ähnlicher Weise unter Verwendung des Sensors gemessen. Die Ergebnisse sind unten gezeigt:

Milchsäurekonzentration (mg/dl)	CV (%)
9,4	10,4
18,6	2,6
53,2	2,7
155,4	2,4

**[0094]** Aus den obigen Ergebnissen ist zu ersehen, dass die Zugabe von PAOGEN die CV-Werte verbessert, insbesondere im Bereich der niedrigeren Milchsäurekonzentration. Es wird in Betracht gezogen, dass die Ver-

besserung auf die das Abschälen verhindernde Wirkung von PAOGEN zurückzuführen ist.

### Patentansprüche

1. Sensor für die Messung des Gehalts an einem Material in Flüssigkeit, wobei das Material mit einem Oxidase-Enzym oxidierbar ist, wobei in dem Sensor auf einem Elektrodensystem, das aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode, die beide auf einem isolierenden Substrat gebildet sind, besteht, eine Reagenzschicht gebildet ist, wobei die Reagenzschicht aus einer hydrophilen Polymerschicht, die ein hydrophiles Polymer umfasst, und einer reaktiven Schicht, die das Oxidase-Enzym und einen Elektronenträger umfasst, besteht, **dadurch gekennzeichnet**, dass wenigstens entweder die hydrophile Polymerschicht oder die reaktive Schicht ein Alkylenoxidpolymer umfasst, das mit einer Polycarbonsäure oder einem Polycarbonsäure-Derivat verestert und/oder umgeestert ist und ein Molekulargewicht von etwa 20000 bis 300000 hat.

2. Sensor gemäß Anspruch 1, wobei das Oxidase-Enzym eine Milchsäure-Oxidase ist und der Sensor für die Messung einer Milchsäure in der Flüssigkeit verwendet wird.

3. Sensor gemäß Anspruch 1, wobei das hydrophile Polymer eine Reinheit von nicht weniger als 99,9 Gew.-% hat.

4. Sensor gemäß Anspruch 1, wobei die reaktive Schicht weiterhin ein Phosphat umfasst.

5. Verfahren zur Herstellung eines Sensors, das die folgenden Schritte umfasst:  
Bilden eines Elektrodensystems, das aus einer Messelektrode und einer Gegenelektrode auf einem isolierenden Substrat besteht;  
Beschichten wenigstens eines Teils des Elektrodensystems mit einer hydrophilen Polymerschicht durch Auftragen einer Lösung, die ein hydrophiles Polymer enthält, auf das Elektrodensystem und anschließend Trocknen der Lösung; und  
Beschichten wenigstens eines Teils der hydrophilen Polymerschicht mit einer reaktiven Schicht durch Auftragen einer Lösung, die eine Zusammensetzung für die reaktive Schicht enthält, welche ein Oxidase-Enzym und einen Elektronenträger umfasst, auf die hydrophile Polymerschicht und anschließend Trocknen der Lösung; dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der beiden Lösungen weiterhin ein Alkylenoxidpolymer umfasst, das mit einer Polycarbonsäure oder einem Polycarbonsäure-Derivat verestert und/oder umgeestert ist und ein Molekulargewicht von etwa 20000 bis 300000 hat.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die Konzentration des veresterten und/oder umgeesterten Alkylenoxidpolymers in der Lösung im Bereich von 0,01 bis 1,00 Gew.-% liegt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei es sich bei dem Oxidase-Enzym um Milchsäure-Oxidase handelt und der Sensor für die Messung einer Milchsäure in der Flüssigkeit verwendet wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das hydrophile Polymer eine Reinheit von nicht weniger als 99,9 Gew.-% hat.

9. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die Lösung, die die Zusammensetzung für die reaktive Schicht enthält, weiterhin Phosphat umfasst.

10. Verfahren zur Konzentrationsmessung von Milchsäure in Blut, gekennzeichnet durch die Verwendung des Sensors gemäß Anspruch 2.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

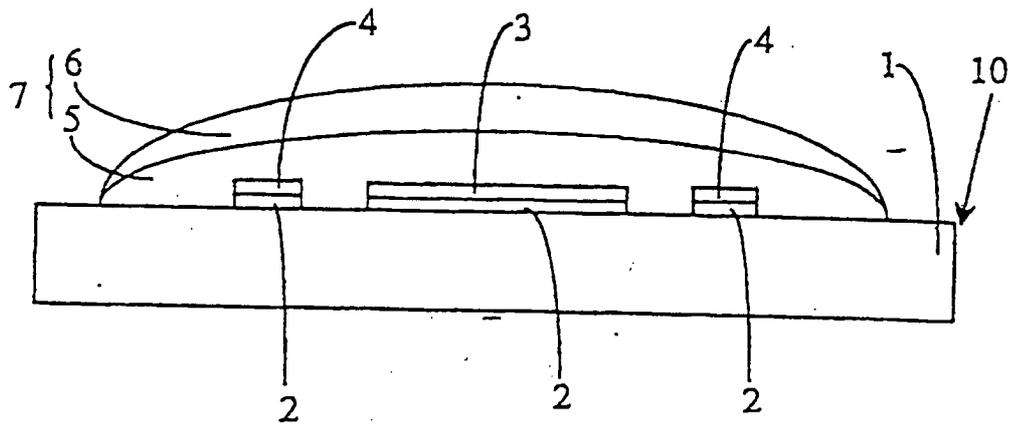


Fig. 2

