

УДК 543.94

## МУЛЬТИБИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ЛАКТАТА В ТОНКОСЛОЙНОЙ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ СИСТЕМЕ

Д.В. Вохмянина\*, Е.Е. Карякина, Е.А. Андреев, А.А. Карякин

*(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; \*e-mail: vokhtyanina@gmail.com)*

Путем комбинации электрокатализатора на основе берлинской лазури и протокола иммобилизации ферментов глюкозооксидазы и лактатоксидазы из сред с высоким содержанием органического растворителя разработан планарный мультибиосенсор для одновременного определения глюкозы и лактата. В режиме проточно-инжекционного анализа в тонкослойной ячейке мультибиосенсор характеризуется высоким коэффициентом чувствительности ( $>80 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  для биосенсора на лактат и  $>20 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  – на глюкозу). Линейный диапазон определяемых концентраций составил 1–500 мкМ для лактата и 5–1000 мкМ для глюкозы. Мультибиосенсор может применяться многократно (операционная стабильность составляет не менее 100 измерений без необходимости перекалибровки), что позволяет использовать его для анализа разбавленных образцов крови и сыворотки. Электроаналитическая система с мультибиосенсором по своим эксплуатационным характеристикам превосходит коммерческие анализаторы.

**Ключевые слова:** берлинская лазурь, мультибиосенсор, проточно-инжекционный анализ, тонкослойная ячейка, лактат, глюкоза.

Медицинским диагностическим лабораториям необходимы быстрые, точные и недорогие устройства для проведения рутинных анализов [1]. Этим критериям удовлетворяют амперометрические ферментные биосенсоры, селективно определяющие целевой аналит в смеси соединений различной природы без предварительной пробоподготовки. Электрохимические устройства занимают лидирующую позицию на рынке биосенсоров, так как они обеспечивают достаточные чувствительность и воспроизводимость анализа и, что также немаловажно, могут производиться массово при невысокой себестоимости [2].

В целях уменьшения объема анализируемого образца можно проводить определение нескольких аналитов в одной пробе с помощью мультибиосенсора – устройства, объединяющего два и более биосенсора в одном измерительном блоке [3].

Современная клиническая диагностика нуждается в устройствах, позволяющих проводить экспресс-анализ крови пациентов на глюкозу и лактат – ключевые метаболиты, анализ которых весьма важен для медицины, в том числе при мониторинге состояния пациентов в палатах интенсивной терапии и во время хирургических

операций [4]. На отечественном рынке известны около 10 автоматических приборов для одновременного анализа глюкозы и лактата в образцах крови. Принцип их действия заключается в измерении тока электроокисления пероксида водорода, выделяющегося в процессе ферментативной реакции на поверхности платинового электрода при потенциалах в интервале от +0,4 до +0,6 В относительно хлорид-серебряного электрода сравнения (ХСЭ). При проведении анализа используются сменные картриджи, рассчитанные на несколько тысяч измерений и позволяющие анализировать около 100 образцов за 1 ч. Уровень погрешности составляет 1,5–3%. Однако при анализе сложных многокомпонентных образцов (например, крови), где может содержаться неизвестное заранее количество легкоокисляющихся веществ, таких как урат, аскорбат, парацетамол и др., измерения при потенциале более +0,4 В могут привести к повышению систематической погрешности.

Возможность применения берлинской лазури (БЛ) в качестве электрокатализатора окисления и восстановления пероксида водорода для конструирования химических и биологических сенсоров впервые была доказана в работах рос-

сийских ученых химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова [5].

БЛ обладает значительными преимуществами по сравнению с обычно используемой в этих целях платиной. БЛ имеет в 1000 раз более высокую электрохимическую константу скорости, что обуславливает более высокую чувствительность сенсора, и в 1000 раз более высокую селективность к восстановлению пероксида водорода в присутствии кислорода, что обеспечивает возможность детектирования  $H_2O_2$  по его восстановлению при низких потенциалах (0 В относительно ХСЭ) [6, 7].

В настоящее время БЛ считается наиболее эффективным электрокатализатором восстановления пероксида водорода. В изучении данной тематики наша научная группа имеет безусловный приоритет, обеспеченный публикациями в наиболее престижных международных журналах, начиная с 1995 г. ([8, 9] и другие статьи списка литературы).

Для иммобилизации оксидаз на поверхности электродов, модифицированных БЛ, были разработаны новые протоколы включения ферментов в мембраны нафийон и силоксанов из сред с высоким содержанием органического растворителя [10]. Использование данного подхода позволило разработать биосенсоры на глюкозу, лактат и глутамат [11–14].

Существуют примеры создания мультибиосенсоров для совместного определения глюкозы и лактата [15, 16], но их характеристики не позволяют использовать их в анализе крови. Например, мультибиосенсор, предложенный в работе [15], несмотря на достаточную для определения метаболитов в крови чувствительность, обладал недостаточной точностью – концентрации глюкозы и лактата, определенные в образцах, в некоторых случаях отличались от данных, полученных методом сравнения (ВЭЖХ) в 1,5–2 раза, что неприемлемо для медицинских приложений. Другой мультибиосенсор [16] обладал диапазоном определяемых концентраций (ДОК), недостаточным для проведения анализа крови. В обеих работах предлагалось использовать мультибиосенсоры только в пищевой химии для анализа вин.

Цель нашей работы состояла в создании мультибиосенсора для совместного определения глюкозы и лактата в образцах разбавленной крови с использованием имеющихся у научного коллектива разработок в области конструирования биосенсоров на основе БЛ и иммобилизации

глюкозооксидазы (ГОД) и лактатооксидазы (ЛОД) в полимерные мембраны. Стоящая перед нами задача состояла в том, чтобы увеличить чувствительность и точность анализа, снизив при этом его трудо- и времязатратность, а также себестоимость и объем исследуемого образца.

### Материалы и методы

Для всех экспериментов использовали дистиллированную воду. Неорганические соли («х.ч.» и «ос.ч.») изготовлены фирмами «Реахим» (Россия) и «Sigma» (Германия). Растворы соляной кислоты приготовлены из фиксаналов фирмы «Germen» (Германия). Раствор изопропанола изготовлен компанией «Лаверна» (Россия), стандартные образцы сыворотки крови – фирмой «Spinreact» (Испания).

ЛОД (ЕС 1.1.3.2) из *Pediococcus species* («Sorachim», Франция) применяли в виде лиофилизованного белка с заявленной активностью 32,3 У/мг. Для изготовления модельных растворов использовали водный раствор лактата калия (60%) фирмы «Fluka» (Германия). Для иммобилизации ЛОД использовали  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилан (99%) фирмы «Aldrich» (Германия).

ГОД (ЕС 1.1.3.4) из *Aspergillus niger* («Sigma», Германия) применяли в виде лиофилизованного белка с заявленной активностью 163,3 У/мг, для изготовления модельных растворов использовали глюкозу фирмы «Merck» (Германия). Для иммобилизации ГОД использовали перфторсульфонированный полимер (ПФС), структурный аналог нафийон, (10%-й раствор в изопропиловом спирте) фирмы «Пластполимер» (Россия). Активность ферментов контролировали спектрофотометрически по методике, приведенной в [17].

В качестве основы для изготовления мультибиосенсора использовали четырехэлектродные печатные структуры (ЧПС) (рис. 1), изготовленные нами методом трафаретной печати на установке «SCF 550» (Китай). Электроды печатали на пленке полиэтилентерефталата («Владимирский химический завод», Россия) с применением серебросодержащей полимерной пасты (НПП «Дельта-Пасты», Россия), углеродной пасты («Gwent Electronic Materials Ltd.», Великобритания) и УФ-отверждаемой изоляционной пасты («UNICA», Бельгия).

Модификацию поверхности рабочих электродов БЛ проводили по методу [18]. Иммобилизацию ГОД проводили по методике [11], ЛОД – по методике [13]. Все потенциалы измерений даны

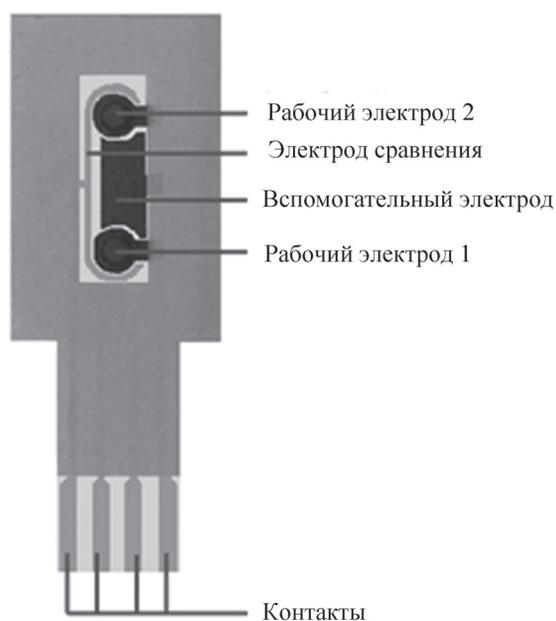


Рис. 1. Схема ЧПС

относительно ХСЭ. Используются следующие буферные растворы: фоновый электролит (ФЭ) – 0,1 М КСl; 0,1 М НСl; фосфатный буферный раствор (ФБ) – 0,1 М КСl; 0,05 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; рН 6,0.

#### **Мультибиосенсор для совместного определения глюкозы и лактата**

Мультибиосенсор готовили путем модификации поверхности двух рабочих электродов пленками БЛ по методике [18] с последующей иммобилизацией на поверхности одного из рабочих электродов фермента ГОД, а на поверхности другого рабочего электрода – фермента ЛОД. В качестве мембранообразующего компонента для иммобилизации ЛОД использовали полимер на основе 3-аминопропилтриэтоксисилана (силоксан) с концентрацией в мембранообразующей смеси 1,5 об.% [13]. При изготовлении мембран для иммобилизации ГОД была принята методика [11]: использовали ПФС (структурный аналог нафийон) с концентрацией в мембранообразующей смеси 0,3 об.%. Готовые электроды хранили в сухом состоянии (они были запечатаны в специальную фольгированную бумагу) при температуре 4 °С.

#### **Проточно-инжекционное определение глюкозы и лактата**

Совместное определение глюкозы и лактата проводили в системе проточно-инжекционного анализа (ПИА), включающей тонкослойную ячейку со сменным мультибиосенсором для совместного определения глюкозы и лактата, ше-

стиходовой инжектор с петлей для ввода пробы, демпфер и перистальтический насос «Masterflex» («Cole-Parmer Instruments Company», США) или шприцевой насос «Perfusor Compact» («B. Braun», Германия). Измерения проводили с помощью потенциостата «EmStat» («Palmsens», Нидерланды), соединенного с компьютером, при потенциале 0 В относительно ХСЭ.

Перед началом измерений через тонкослойную ячейку с мультибиосенсором пропускали ФБ со скоростью 40 мл/ч до установления постоянного базового тока (5–10 мин). Для построения градуировочного графика проводили определение глюкозы и лактата в модельных растворах с концентрацией от 1 до 1000 мкМ. Среднюю величину отклика на аналит вычисляли по результатам трех единичных измерений. О величине отклика судили по величине тока пика, прописываемого на мониторе компьютера после инжектирования модельного раствора (50 мкл) с учетом величины базового тока. Время единичного измерения не превышало 30 с.

#### **Операционная стабильность мультибиосенсоров и стабильность при хранении**

Операционную стабильность биосенсора определяли количеством измерений, которые можно провести без необходимости его перекалибровки (при сохранении более 95% от первоначальной величины отклика). Стабильность сенсора при хранении определяли сравнением его аналитических характеристик, полученных непосредственно после изготовления и через 18 мес. хранения в сухом виде в запечатанном конверте при температуре 4 °С.

#### **Определение глюкозы и лактата в стандартизированной сыворотке крови**

Перед началом измерения коммерческие образцы сыворотки крови разбавляли ФБ в 100 раз. Полученный раствор (50 мкл) инжектировали в систему ПИА. Концентрацию аналитов определяли методом градуировочного графика, построенного по результатам измерений серии модельных растворов, как описано выше. Чтобы избежать возможной потери чувствительности биосенсоров в результате контакта с образцом, после анализа каждого из образцов проводили контрольное измерение модельных растворов аналитов, имеющих концентрацию 10 и 50 мкМ. Полученные данные сравнивали с приведенными в паспорте стандартизованного образца, а

также с данными, полученными на коммерческом анализаторе глюкозы и лактата «EcoBasic» («CareDiagnostics», Германия).

## Результаты и обсуждение

### Конструирование мультибиосенсора

При конструировании мультибиосенсора для одновременного определения глюкозы и лактата была разработана ЧПС (рис. 1), в структуру которой входят два рабочих электрода, поверхность каждого из которых модифицирована сенсорным материалом, обеспечивающим селективное определение соответствующего аналита. При создании сенсорного материала мы использовали две успешные разработки: модификацию поверхности рабочих электродов БЛ и иммобилизацию ГОД и ЛОД из сред с высоким содержанием органического растворителя в мембраны нафiona и силоксана соответственно.

Для создания биосенсора необходима иммобилизация фермента на поверхности электрода. При этом необходимо обеспечить прочное закрепление фермента на поверхности модифицированного электрода при сохранении его активности, а также обеспечить возможность диффузии субстратов и продуктов реакции к ферменту. Наиболее прогрессивным подходом к процессу иммобилизации считается иммобилизация в мембрану водонерастворимого полимера непосредственно в процессе ее формирования. Фор-

мирование однородных полимерных мембран следует проводить из истинных растворов водонерастворимого полимера. Для этого необходимо использовать водно-органические смеси с высоким содержанием органического растворителя (85–90%) для получения ферментсодержащей мембраны.

Ранее был разработан протокол иммобилизации, включающий экспонирование фермента в средах с высоким содержанием органического растворителя совместно с раствором мембранообразующего компонента [11]. При этом удалось добиться сохранения активности фермента [12], что позволило проводить иммобилизацию фермента в полимерную мембрану непосредственно в процессе ее формирования.

В результате оптимизации ранее предложенных методик иммобилизации мы разработали биосенсор для совместного определения глюкозы и лактата с высокими аналитическими характеристиками (рис. 2): коэффициент чувствительности  $>80 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  при определении лактата и  $>20 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  при определении глюкозы, линейный диапазон определяемых концентраций (ДОК) 1–500 и 5–1000 мкМ для лактата и глюкозы соответственно. Чувствительность данного мультибиосенсора более чем в 10 раз превосходит чувствительность мультибиосенсора, предложенного в [16], где использовали аналогичный принцип действия биосенсора на лактат

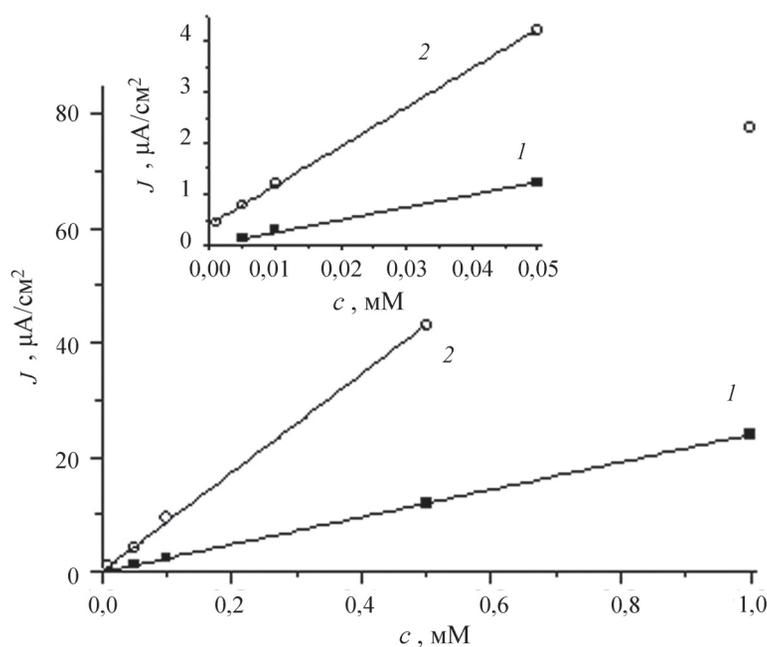


Рис. 2. Градуировочные зависимости мультибиосенсора при определении глюкозы (1) и лактата (2)

(коэффициенты чувствительности составляют 1,6 и 0,51  $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , ДОК имеет значения, равные 250–5000 и 500–5000 мкМ для лактата и глюкозы соответственно). Очевидно, что использование прогрессивных подходов авторского коллектива при конструировании мультибиосенсора позволяет значительно улучшить его аналитические характеристики.

При создании биосенсоров для многоразового применения важно учитывать такие характеристики как воспроизводимость, стабильность (операционная и при хранении), а также время измерения.

Воспроизводимость отклика биосенсора в системе ПИА вычисляли по результатам десяти единичных измерений для разных концентраций аналитов в диапазоне от 0,01 до 1 мМ. Она составляла 97% (величина стандартного отклонения  $<0,03$ ) независимо от типа используемого в системе ПИА насоса (шприцевого или перистальтического). В дальнейшей работе мы использовали перистальтический насос как наиболее подходящий для длительных непрерывных измерений.

Операционную стабильность оценивали путем инъецирования модельного раствора с постоянной концентрацией аналита (0,5 мМ) в систему ПИА. В случае биосенсора для определения глюкозы после 600 единичных измерений модельных растворов глюкозы потери отклика не происходит. Операционная стабильность биосенсора на лактат несколько уступает биосенсору на глюкозу – в течение 300 измерений сохраняется только 80% начального отклика, тем не менее, биосенсор позволяет проводить до 100 измерений без перекалибровки (сохранении  $>95\%$  начального отклика).

Мультибиосенсор сохранял более 80% остаточной активности после 18 мес. хранения при 4 °С в среде без доступа кислорода. Время единичного измерения для мультибиосенсора не превышало 30 с, что обеспечивает высокую производительность анализа.

Преимущества разработанного мультибиосенсора очевидны, однако остается проблема мешающего влияния глюкозы и лактата при их совместном определении. В тонкослойной ячейке последовательно размещаются два биосенсора (на глюкозу и на лактат), обладающие одинаковым принципом функционирования. Оба основаны на определении выделяющегося в процессе биохимических реакций пероксида водорода. В этом случае возникает мешающее влияние пероксида водорода, выделяющегося

на одном из биосенсоров на отклик второго биосенсора.

В целях исключения перекрестной чувствительности биосенсоров исследовано взаимное влияние лактата и глюкозы на отклики индивидуальных биосенсоров при совместном определении глюкозы и лактата в одной тонкослойной ячейке. Для этого отклики биосенсора на целевой аналит сравнивали с его откликами на раствор аналита, содержащий также эквимоллярную концентрацию мешающего аналита (рис. 3). Так как электроды в ячейке расположены последовательно друг за другом, поток фоновый буферного раствора проходит сначала через один биосенсор, а затем через другой. Такое расположение электродов, при котором изучаемый биосенсор располагается первым по направлению потока, мы будем называть прямым, а расположение, при котором исследуемый биосенсор расположен вторым будет называться обратным.

Заметное мешающее влияние наблюдалось только в случае глюкозного биосенсора в обратном потоке (поток фоновый буферного раствора направлен от лактатного биосенсора к глюкозному; при этом выделяющийся в ферментативной реакции на лактатном биосенсоре пероксид водорода вызывает дополнительный мешающий отклик на глюкозном биосенсоре) (рис. 3, б). При определении глюкозы в прямом потоке (поток направлен от глюкозного биосенсора к лактатному) данный эффект не наблюдался (рис. 3, а). Так как добавление глюкозы не оказывает мешающего влияния на определение лактата независимо от направления потока фоновый буферного раствора (рис. 3, в, г), расположение глюкозного биосенсора перед лактатным позволяет избежать мешающего влияния аналитов при их совместном определении и обеспечить высокую селективность анализа.

ДОК мультибиосенсора (с учетом разбавления в 50 раз, стандартного в клинической диагностике) полностью перекрывает диапазон физиологических концентраций глюкозы и лактата в крови как в норме, так и в патологии. Таким образом, характеристики разработанного устройства позволяют использовать его для проведения анализа крови. При этом требуемый объем образца составляет всего 20 мкл.

#### *Анализ образцов сыворотки крови*

Проверку правильности работы мультибиосенсора проводили путем анализа стандартизованных образцов сыворотки крови, произведенных компанией «Spinreact» (Испания), с известной

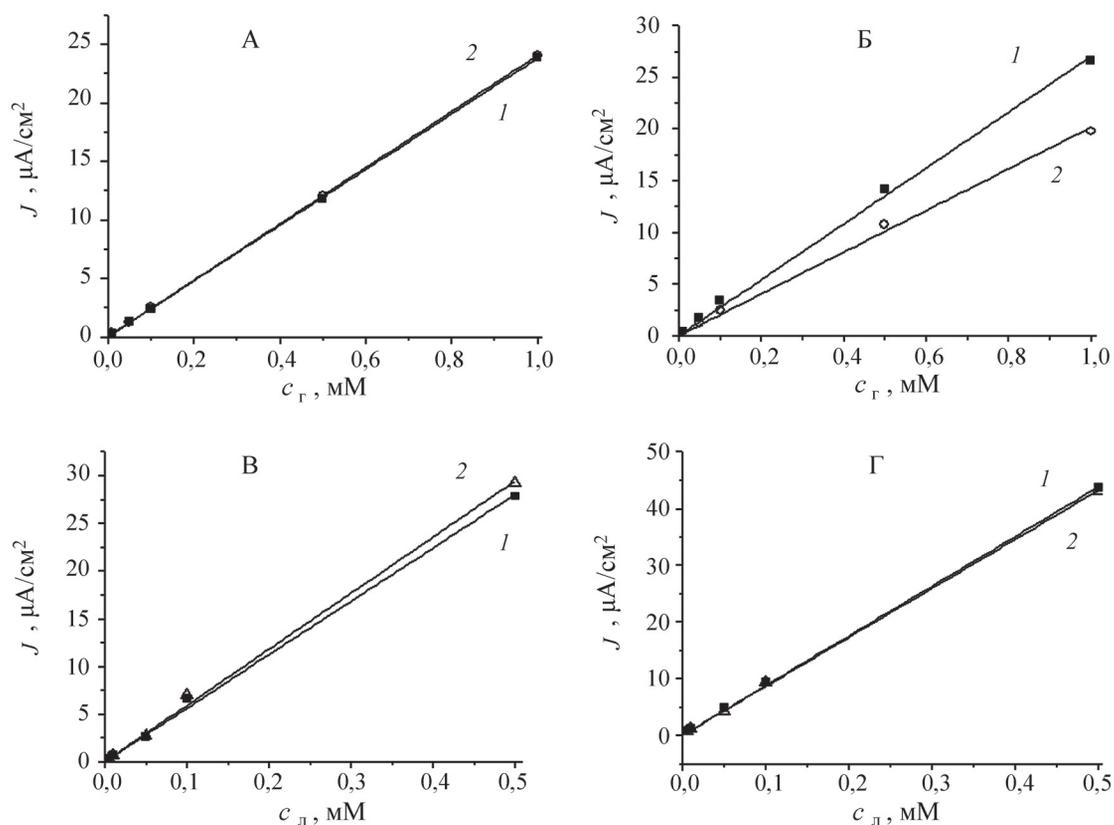


Рис. 3. Взаимное влияние глюкозы и лактата при их совместном определении: градуировочный график глюкозного биосенсора в прямом потоке в присутствии (1) и в отсутствие (2) эквимольной добавки лактата в модельных растворах глюкозы (А); градуировочный график глюкозного биосенсора в обратном потоке в присутствии (1) и в отсутствие (2) эквимольной добавки лактата в модельных растворах глюкозы (Б); градуировочный график лактатного биосенсора в прямом потоке в присутствии (1) и в отсутствие (2) эквимольной добавки глюкозы в модельных растворах лактата (В); градуировочный график лактатного биосенсора в обратном потоке в присутствии (1) и в отсутствие (2) эквимольной добавки глюкозы в модельных растворах лактата (Г)

концентрацией анализируемых компонентов с нормальным и патологическим содержанием. Перед измерением проводили разбавление образцов ФБ в 100 раз (более сложной пробоподготовки не требовалось). Концентрацию аналитов в каждом из образцов определяли по результатам пяти единичных измерений, после измерения серии откликов на образцы проводили измерение отклика на модельные растворы аналитов. При этом изменения откликов на модельные растворы замечено не было, что свидетельствует об отсутствии влияния компонентов матрицы образцов на аналитические характеристики мультибиосенсора.

Значения концентрации глюкозы и лактата, полученные в стандартных образцах сыворотки человеческой крови, приведены в табл. 1. Для сравнения приведены также данные, представленные в паспорте образцов, а также данные, полученные независимым методом срав-

нения (коммерческий анализатор глюкозы и лактата «EcoBasic», изготовленный фирмой «CareDiagnostics», Германия).

Значимого различия результатов, полученных с помощью мультибиосенсора, и данных, приведенных в паспорте образцов и полученных независимым методом сравнения, не наблюдалось. Следовательно, разработанный мультибиосенсор может быть использован для анализа образцов разбавленной крови.

Кроме того, мультибиосенсор был проверен на совместимость с наиболее распространенными консервантами крови для проведения биохимического анализа – ЭДТА и гепаринами натрия и лития. Консерванты не оказывали влияния на работу мультибиосенсора.

Таким образом, мультибиосенсор может использоваться для анализа образцов крови, отбираемых стандартным лабораторным методом, в пробирки, содержащие гепарины или ЭДТА,

Т а б л и ц а 1

**Определение глюкозы и лактата в стандартизованных образцах сыворотки крови ( $n = 5, P = 0,95$ )**

Стандарт	Глюкоза, мМ			Лактат, мМ		
	Измерено	Паспорт	Метод сравнения	Измерено	Паспорт	Метод сравнения
Норма	$6,0 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,5$	$1,69 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$
Патология	$14,8 \pm 0,2$	$14 \pm 2$	$13 \pm 2$	$3,26 \pm 0,04$	$3,6 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,3$

Т а б л и ц а 2

**Сравнение характеристик анализаторов глюкозы и лактата**

Прибор	ДОК <sub>r</sub> , мМ	ДОК <sub>л</sub> , мМ	Погрешность измерения	Время отклика, с	Ссылка
EcoBasic («Care Diagnostica», Германия)	0,8–50	0,8–50	1,5%	24	[19]
SensoStar GL30 («DiaSys Diagnostic Systems», Германия)	0,6–50	0,5–30	Глюкоза 1,5% Лактат 2%	40	[20]
LabTrend («BST Bio Sensor Technology», Германия)	0,5–50	0,5–40	1,5%	30	[21]
SuperGL («Dr.Muller», Германия)	0,5–50	0,5–30	Глюкоза 2% Лактат 2,5%	40	[22]
АГКМ-01 («Кверти-Мед», Россия)	1,0–30	1,0–15	5%	65	[23]
Мультибиосенсор на основе БЛ	0,25–50	0,05–25	3%	30	–

консервирующие биохимические компоненты крови для их последующего определения в диагностических медицинских лабораториях.

**Заключение**

В заключение приведем сравнение разработанной аналитической системы с коммерческими аналогами (табл. 2). Важнейшей характеристикой анализаторов является диапазон концентраций аналитов в крови, в котором можно проводить измерения. Эта характеристика определяется как ДОК сменного картриджа для данного прибора, умноженный на стандартный коэффициент разведения, равный 50. Важными характеристиками являются также точность, определяемая величиной погрешности прибора, и производительность анализа, определяемая длительностью единичного измерения. По своим характеристикам новая система не уступает лучшим из известных аналогов (табл. 2). Так, чувствительность определения глюкозы увели-

чена в 2 раза, а лактата – в 10 раз по сравнению с лучшими из аналогов. Верхний предел линейного ДОК для определения лактата несколько уступает анализатору [19], но при использовании нелинейного участка градуировочной зависимости диапазон определяемых концентраций лактатного биосенсора может быть расширен до 50 мМ (рис. 2).

Таким образом, впервые биосенсоры на основе электрокатализатора берлинская лазурь использованы для разработки мультибиосенсора для одновременного определения глюкозы и лактата.

Электроаналитическая система с тонкослойной ячейкой со встроенным сменным мультибиосенсором демонстрирует пригодность для анализа разбавленных образцов крови, по ряду характеристик превосходит коммерческие аналоги и может быть рекомендована для дальнейшего применения в лабораторной клинической практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда  
(проект № 16-13-00010).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malhotra B.D., Chaubey A. // Sens. Actuat. 2003. Vol. 91. P. 117.
2. Newman J.D., Turner A.P.F. // Biosens. Bioelectron. 2005. Vol. 20. P. 2435.
3. Moser I., Jobst G., Urban G.A. // Biosens. Bioelectron. 2005. Vol. 17. P. 297.
4. Wang J., Chatrathi M.P., Collins G.E. // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 585. P. 11.
5. Karyakin A.A., Gitelmacher O.V., Karyakina E.E. // Anal. Chem. 1995. Vol. 67. N 14. P. 2419.
6. Karyakin A.A. // Electroanalysis. 2001. Vol. 13. P. 813.
7. Karyakin A.A. // Current opinion in electrochemistry. 2017. Vol. 5. N 1. P. 92.
8. Karpova E.V., Karyakina E.E., Karyakin A.A. // RSC advances. 2016. Vol. 6. P. 103328.
9. Sitnikova N.A., Komkova M.A., Khomyakova I.V., Karyakina E.E., Karyakin A.A. // Anal. Chem. 2014. Vol. 86. N 9. P. 4131.
10. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L., Bobrova O.A., Lukachova L.V., Gladilin A.K., Levashov A.V. // Anal. Chem. 1996. Vol. 68. N 24. P. 4335.
11. Karyakin A.A., Kotel'nikova E. A., Lukachova L.V., Karyakina E.E., Wang J. // Anal. Chem. 2002. Vol. 74. P. 1597.
12. Yashina E.I., Borisova A.V., Karyakina E.E., Shchegolikhina O.I., Vagin M.Yu., Sakharov D.A., Tonevitsky A.G., Karyakin A.A. // Anal. Chem. 2010. Vol. 82. P. 1601.
13. Pribil M.M., Cortés-Salazar F., Andreyev E.A., Lesch A., Karyakina E.E., Voronin O.G., Girault H.H. // J. of Electroanal. Chem. 2014. Vol. 731. P. 112.
14. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 1720.
15. Shkotova L.V., Piechniakova N.Y., Kukla O.L., Dzyadevych S.V. // Food Chem. 2016. Vol. 197. P. 972.
16. Kanzo H., Garcia M.B.G., Ma S., Ludwig R., Bolado P.F., Santos D.H. // Electroanalysis. 2017. Vol. 29. P. 87.
17. Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M. // Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed., Academic Press, Inc., NY). 1974. Vol. I. Second Edition. P. 457.
18. Borisova A.V., Karyakina E.E., Cosnier S., Karyakin A.A. // Electroanalysis. 2009. Vol. 21. P. 409.
19. <https://www.carediag.de/wp/glukosemessung/>
20. <https://www.diasys-diagnostics.com/products/poct-systems/sensostar/>
21. <http://www.bst-biosensor.de/index.php?id=14&L=1>
22. <http://www.diasys.ru/Super%20GL.htm>
23. <http://kwertymed.ru/AGKM01GL.htm>

Поступила в редакцию 09.01.18

## THIN-FILM PRUSSIAN BLUE BASED MULTIBIOSENSOR FOR GLUCOSE AND LACTATE SIMULTANEOUS DETERMINATION

D.V. Vokhmyanina\*, E.E. Karyakina, E.A. Andreev, A.A. Karyakin

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; \*e-mail: vokhmyanina@gmail.com)

Multibiosensor for simultaneous determination of glucose and lactate has been developed by combination of the advantageous transducer for hydrogen peroxide reduction (Prussian Blue) and protocol of enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent. The analytical characteristics of the resulted biosensor were: the sensitivity of  $> 80 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  for lactate detection and  $> 20 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  for glucose detection, linear dynamic range of 1–500  $\mu\text{M}$  for lactate and 5–1000  $\mu\text{M}$  for glucose as well as high operational stability (100 measurements without calibration). The applicability of developed multibiosensor for routine blood analysis has been shown. Electroanalytical system based on multibiosensor reveals improved analytical performances compared to commercial analyzers.

**Key words:** Prussian Blue, multibiosensor, flow injection analysis, thin-layer cell, glucose, lactate.

**Сведения об авторах:** Вохмянина Дарья Владимировна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (vokhmyanina@gmail.com); Карякина Елена Евгеньевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (ekaryakina@analyt.chem.msu.ru); Андреев Егор Андреевич – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (andreyev.ea@yandex.ru); Карякин Аркадий Аркадьевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук.