

УДК 543.257.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ N-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВОГО БИОСЕНСОРА НА ЛАКТАТ

Л.Х. Корнеева¹, А.В. Борисова¹, Е.И. Яшина², Е.Е. Карякина^{1,3}, О.Г. Воронин^{1,3}, С. Косниер⁴, А.А. Карякин^{2,3}

(¹кафедра химической энзимологии (e-mail: ol.voronin@gmail.com), ²кафедра аналитической химии, ³ООО «Русенс» (Москва), ⁴Университет имени Ж. Фурье (Гренобль, Франция))

Путем иммобилизации лактатоксидазы в пленку проводящего полимера, полученного при электрополимеризации триэтил-(12-пиррол-1-ил-додецил) тетрафторбората аммония, на поверхности планарных электродов, модифицированных Берлинской лазурью, создан биосенсор на лактат с высокой чувствительностью (190 ± 14 мА/М·см²), с линейным диапазоном градуировочного графика 5×10^{-7} – 5×10^{-4} М, и с высокой операционной стабильностью. Показана возможность применения разработанного биосенсора для анализа качества пищевых продуктов (кваса).

Ключевые слова: Берлинская лазурь, лактатоксидаза, планарные электроды, биосенсор, электрохимическая полимеризация, электроанализ, определение молочной кислоты.

Введение

Пищевая промышленность, а также клиническая диагностика нуждаются в избирательных, чувствительных и экспрессных методах анализа, позволяющих выявить главные составные части продуктов питания или продуктов обмена веществ, что даст возможность быстро и точно определять качество продуктов, а также признаки болезней или физиологического состояния человека. Молочная кислота (СН₃СНОНСООН) относится к числу наиболее важных для анализа веществ, поскольку она является универсальным продуктом обмена веществ практически у всех живых организмов, конечным продуктом тканевого обмена глюкозы при нехватке кислорода, а также натуральным или искусственным компонентом многих пищевых продуктов [1]. Высокоэффективные и недорогие биосенсоры на лактат (молочную кислоту) могут найти широкое применение в клинической диагностике, спортивной медицине, контроле качества продуктов питания, сельскохозяйственного сырья, контроле процессов ферментаций, продуктом которых является молочная кислота.

Большинство электрохимических биосенсоров состоит из фермента (оксидазы), окисляющего субстрат с выделением пероксида водорода и чувствительного элемента, отвечающего за определение пероксида водорода на рабочем электроде. Чаще всего

для этих целей используется платиновый рабочий электрод [2]. Однако на сегодняшний день наиболее эффективными датчиками на пероксид водорода считаются электроды, модифицированные Берлинской лазурью, которая позволяет избирательно определять пероксид водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода [3].

Впервые применение электродов, модифицированных Берлинской лазурью, для разработки биосенсоров было показано в нашей лаборатории в 1994 г. [4]. В настоящее время электроды на основе Берлинской лазури широко используются при конструировании сенсоров пероксида водорода и биосенсоров, содержащих иммобилизованные оксидазы в качестве биочувствительного элемента как в нашей лаборатории, так и за рубежом [5].

Электроды на основе Берлинской лазури по своим аналитическим характеристикам превосходят известные из литературы аналоги. Они обладают самой высокой чувствительностью среди известных электрокатализаторов пероксида водорода (0,5 А/М·см²), наиболее низким пределом обнаружения Н₂О₂ (менее 0,01 мкмоль/л), линейным диапазоном измеряемых концентраций более 6–7 порядков (0,1 мкмоль/л – 0,1 моль/л Н₂О₂). Для них характерны отсутствие отклика на примеси природных восстановителей в

анализируемых образцах из-за низкого потенциала измерения (0 мВ), высокая операционная стабильность (более 1000 измерений), малые времена отклика (менее 30 с на одно измерение в проточно-инжекционном анализе) [3, 6].

Для расширения возможности применения Берлинской лазури в аналитической практике мы предлагаем использовать коммерчески производимые электроды, такие, как электроды на основе углеродной пасты, и электроды, полученные методом трафаретной печати. Для приготовления таких электродов можно использовать Берлинскую лазурь, синтезированную химическим способом [7].

Фермент лактатоксидаза (КФ 1.1.3.2) окисляет субстрат (лактат) кислородом воздуха по реакции, представленной на схеме:



При этом кислород восстанавливается до пероксида водорода. Однако по сравнению с другими ферментами этого класса лактатоксидаза (ЛОД) заметно теряет активность в процессе иммобилизации, а ферментные электроды, как правило, имеют невысокие аналитические характеристики [8].

Для иммобилизации лактатоксидазы и разработки ферментного электрода мы использовали метод включения макромолекул в пленки полимера, электрохимически полимеризуемого на поверхности электрода. Этот простой одностадийный метод подходит для иммобилизации разнообразных биомолекул и широко используется для создания биосенсоров [9]. Однако он обладает рядом недостатков. К ним следует отнести возможную электростатическую несовместимость ферментов и/или субстратов с полимерами, влияние условий полимеризации на активность фермента, влияние полимерных пленок на диффузию субстрата(ов) и продукта(ов), необходимость наличия высоких концентраций мономера и биомолекул в исходном растворе [9, 10].

Абсолютное большинство работ, посвященных включению биомолекул в полимеры, проводилось с использованием проводящих полимеров, таких, как полипиррол, полианилин и политиофен. Полипиррол, в частности, может быть синтезирован при биосовместимых условиях – низкий окислительный потенциал и

нейтральные значения pH. Относительная легкость синтеза N-замещенных производных пиррола предоставляет широкие возможности получения пленок с разными электрохимическими свойствами [9].

В целом, несмотря на определенные недостатки, включение биомолекул в проводящие полимеры обладает целым рядом достоинств, таких, как возможность проведения адресной иммобилизации, широкое варьирование свойств полимерных пленок за счет различных заместителей, более надежное по сравнению с обычной адсорбцией закрепление фермента на поверхности электрода, универсальность методов включения фермента, подходящих для использования практически на любых типах электродов.

Настоящая работа посвящена изучению иммобилизации лактатоксидазы путем включения фермента в пленки проводящих полимеров и разработке нового биосенсора на лактат. Применимость нового биосенсора для анализа качества пищевых продуктов показана на примере разработанного экспресс-метода определения молочной кислоты в квасе.

Материалы и методы

Все эксперименты проводили в дистиллированной воде. Использованные в работе неорганические соли (“х.ч.” и “ч.д.а.”) изготовлены фирмами “Рехаим” (Россия) и “Sigma” (Германия). Растворы серной и соляной кислот приготовлены из фиксаналов фирмы “Germen” (Германия). Для нейтрализации буферов использовали гидроксид калия фирмы “Lachema” (Чехия) и соляную кислоту “Germen” (Германия). Раствор ацетонитрила изготовлен компанией “Криохром” (Россия).

Лактатоксидазу (ЕС 1.1.3.2) из *Pediococcus species* (“Sorachim”, Франция) применяли в виде лиофилизованного белка с заявленной активностью 72,3 У/мг, а также 40%-й водный раствор лактата натрия (“ICN”, США).

В работе использовали органические соединения: пиррол (“Sigma”, Германия) и замещенные пирролы (N-(CH₂)₁₁COOH-пиррол, N-(CH₂)₄COOH-пиррол, N-(CH₂)₆Ру-пиррол, N-(CH₂)₃N(C₂H₅)₃-пиррол, N-(CH₂)₁₂N(C₂H₅)₃-пиррол)*. В качестве основы для изготовления биосенсоров использовали трехэлектродные структуры, изготавливаемые методом трафаретной печати на установке “SCF 550” (Китай). Готовые структуры для хранения упаковывали на термоупаковочной машине “DD300” (Китай).

*Синтезированы в лаборатории органической электрохимии Университета имени Ж.Фурье (Гренобль, Франция).

В данной работе использовались электроды, напечатанные с использованием графитовых паст “Gwent C10903P14” и “Gwent C2030519D4” (“Gwent Electronic Materials Ltd.”, Великобритания).

Модификацию поверхности рабочего электрода Берлинской лазурью проводили по методу, приведенному в [7]. Все потенциалы, представленные в нашей работе, даны относительно хлоридсеребряного электрода. В работе использованы следующие буферные растворы: фоновый электролит 1 – для первой активации Берлинской лазури (0,1 М KCl; 0,1 М HCl); фосфатный буфер 1 – 0,1 М KCl; 0,05 М K_2HPO_4 , pH 7,0; фоновый электролит 2 – 0,1 М $LiClO_4$; фоновый электролит 3 – 0,1 М тетрабутиламмония перхлорат в ацетонитриле; фоновый электролит 4 – 0,1 М KCl.

Измерение общей активности ЛОД

Измерение активности ЛОД в реакции окисления лактата в воде и смесях вода–ацетонитрил проводили с помощью кислородного электрода Кларка при 25°C и рабочем потенциале –0,6 В. При этом регистрировали изменение тока, пропорциональное скорости убывания кислорода в системе в ходе химической реакции, катализируемой ферментом.

Приготовление и тестирование лактатного биосенсора

Растворы пирролов в водном, водно-органическом или органическом растворителях мы добавляли к ферменту таким образом, чтобы содержание фермента составляло 12,5–25 мкг в 3 мкл, а концентрация пиррола была равной 3–6 мМ. Растворы озвучивали на ультразвуковой бане в течение 30 мин. На поверхность электрода наносили 3 мкл раствора. После этого электроды высушивали в течение 1–2 ч при комнатной температуре в темном месте. При этом концентрацию пирролов с разными заместителями варьировали от 3 до 6 мМ, а содержание фермента от 12,5 до 25 мкг в 3 мкл. После высушивания электрода проводили электрополимеризацию пирролов в потенциостатическом режиме при потенциале 0,8 В в трехэлектродной ячейке. Для электрополимеризации использовали раствор $LiClO_4$ в воде (0,1 М).

Электрополимеризацию в водном растворе фонового электролита проводили в течение 3 мин, в органическом растворе – в течение 12 мин. После чего электрод промывали дистиллированной водой и запечатывали в специальную фольгированную упаковочную бумагу. Ферментные электроды хранили в сухом

состоянии в запечатанном виде в холодильнике при температуре 4°C.

Проточно-инжекционное определение лактата

Проточно-инжекционная система состояла из перистальтического насоса “Masterflex” (“Cole-Parmer Instruments Company”, США) и инжектора с объемом пробы 50 мкл, соединенных с проточной амперометрической ячейкой, в которую помещали биосенсор.

Ячейку подсоединяли к потенциостату “PalmSense” (Нидерланды), соединенному с компьютером. В ходе эксперимента поддерживалось постоянное напряжение, равное 0 В.

Перед началом измерений через ячейку, содержащую электрод, модифицированный Берлинской лазурью, пропускали буфер (0,1 М KCl; 0,05 М K_2HPO_4) (pH 7,0) до полного установления базового тока (10–15 инъекций).

Для построения градуировочного графика модифицированного электрода лактат определяли в проточно-инжекционном режиме. Для этого осуществляли инъектирование 50 мкл модельного раствора лактата (1×10^{-7} – 1×10^{-3} М) в буфере (0,1 М KCl; 0,05 М K_2HPO_4) (pH 7,0). Среднюю величину отклика электрода на лактат вычисляли по результатам трех единичных измерений. О величине единичного отклика судили по величине тока пика, прописываемого на мониторе компьютера сразу после инъектирования, при подсчетах также учитывали величину базового тока. Время единичного измерения отклика электрода составляло не более 30 с.

Изучение операционной стабильности биосенсоров и стабильности при хранении

Операционную стабильность сенсора определяли как изменение активности сенсора при нахождении электрода в постоянном потоке раствора определенной концентрации (для лактатных датчиков 5×10^{-5} М). Стабильность сенсора при хранении определяли в ходе его периодического тестирования в течение определенного времени.

Определение лактата в реальных объектах

Для определения лактата в квасе разбавляли анализируемый образец фосфатным буфером 1 (0,1 М KCl; 0,05 М K_2HPO_4) (pH 7,0) в 30 раз. Инъектировали по 50 мкл модельного раствора лактата (1×10^{-7} – 1×10^{-3} М) в фосфатном буфере (0,1 М KCl; 0,05 М K_2HPO_4) (pH 7,0), строили градуиро-

вочный график, после чего несколько раз инжесктивировали по 50 мкл разбавленного раствора кваса и определяли концентрацию лактата в пробе кваса по градуировочному графику.

Далее готовили пробу с концентрацией лактата в два раза больше вычисленной и повторно инжесктивировали подготовленную пробу. О величине отклика судили по величине прописываемого на мониторе пика за вычетом базового тока. После этого готовили пробу с концентрацией лактата в 3 раза большей, чем рассчитанная, и проводили ее инжесктивирование. Строили зависимость величины тока от концентрации пробы кваса. Пересечение градуировочного графика с горизонтальной осью позволяет определить реальную концентрацию лактата в квасе.

Результаты и обсуждение

В качестве метода иммобилизации лактатоксидазы на поверхности планарных электродов нами был выбран метод включения фермента в пленки проводящих полимеров. Такой способ иммобилизации дает возможность провести адресную иммобилизацию фермента на поверхности планарных электродов на основе Берлинской лазури и добиться улучшения аналитических характеристик биосенсора. Так, в работе [11] пероксидаза хрена была иммобилизована в проводящей полипиррольной пленке на поверхности обычного полипиррола. В [12] сообщается о последо-

вательной электрохимической иммобилизации трех ферментов (ксантин оксидазы, пурин нуклеозид фосфорилазы и аденозиндеаминазы) в полипиррольной пленке, генерированной на микроэлектроде. Контролируемое количество и пространственное размещение ферментов позволили получить высокоэффективную систему определения пуринов.


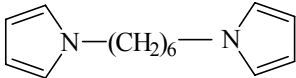
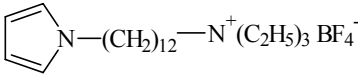
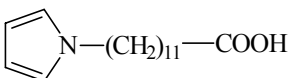
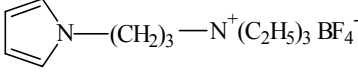
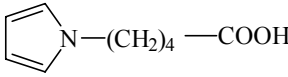
В целом, проводящие полимеры могут быть синтезированы путем химической или электрохимической полимеризации из раствора соответствующего мономера. Для электрохимической полимеризации применяют разные режимы (гальваностатический, потенциостатический и потенциодинамический). В случае же необходимости достижения однородных покрытий электродов с точки зрения толщины пленки и равномерности ее распределения на поверхности оптимальным является контроль потенциала электрода при полимеризации [10].

Разработка и оптимизация условий иммобилизации лактатоксидазы на поверхности электродов, модифицированных Берлинской лазурью

Для рассмотрения влияния заряда заместителя и длины спейсера на свойства датчиков нами были выбраны пирролы с разными заместителями. Структурные формулы этих соединений, а также номера мономеров, которые будут в дальнейшем использованы, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Пирролы с различными заместителями, используемые для иммобилизации лактатоксидазы

Номер мономера	Структурная формула	Номер мономера	Структурная формула
1		4	
2		5	
3		6	

Для оценки аналитических характеристик биосенсоры тестировали в проточно-инжекционной системе. Перед началом измерений через ячейку, содержащую электрод, модифицированный Берлинской лазурью и содержащий ЛОД, и иммобилизованную путем включения в пиррольную матрицу, пропускали буфер до полного установления базового тока и инжестировали модельные растворы лактата (1×10^{-7} – 1×10^{-3} М) в постоянный поток фонового буфера, протекающий через проточную электрохимическую ячейку с рабочим электродом. Такая проточно-инжекционная система позволяет проводить быстрое (менее 1 мин на анализ) и высокочувствительное определение лактата вплоть до его концентрации 1–2 мМ.

Отклик системы на появление анализируемого образца регистрируется в виде пиков тока, высота которых пропорциональна концентрации анализируемого вещества (рис. 1).

Среднюю величину отклика вычисляли по результатам трех единичных измерений. О величине единичного отклика судили по величине тока пика, возникающего на мониторе компьютера после инъекции, с вычетом величины базового тока.

Для оценки биосенсора использовали такие аналитические характеристики, как линейный диапазон определяемых концентраций и чувствительность анализа, определяемую как тангенс угла наклона линейного участка градуировочного графика.

На рис. 2 линейная зависимость тока от концентрации определяемого вещества наблюдается в диапазоне концентраций 5×10^{-7} – 1×10^{-3} М. Чувствительность сенсора составляла $202 \text{ мА/М}\cdot\text{см}^2$. Время отклика не превышало 30 с. Биосенсор позволял за 1 ч осуществлять более 40 измерений лактата в образ-

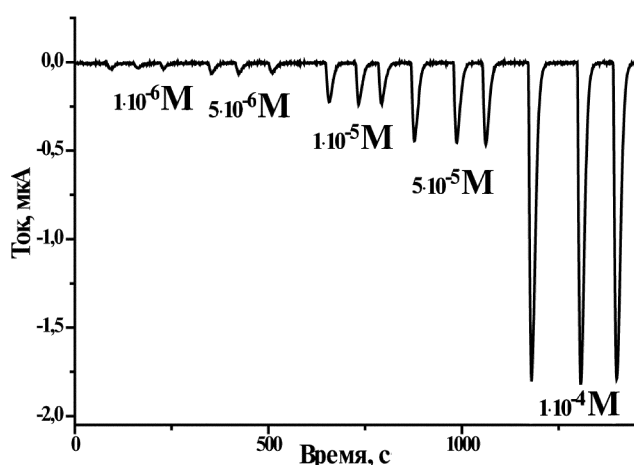


Рис. 1. Амперометрическое определение лактата в проточно-инжекционной системе

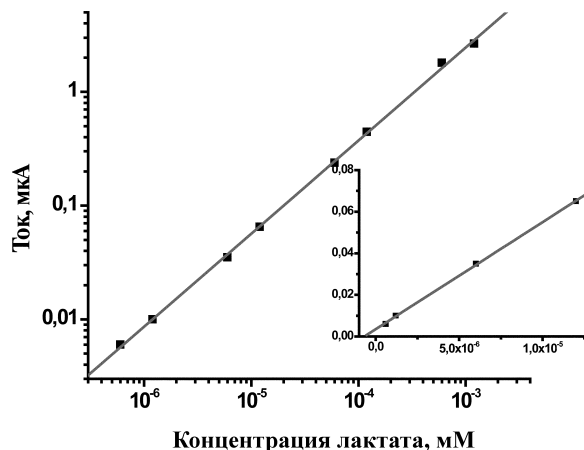


Рис. 2. Градуировочный график для определения лактата с помощью биосенсора, изготовленного с использованием мономера 2 и лактатоксидазы из *Pediococcus sp.*

цах. Воспроизводимость отклика биосенсора по результатам пяти измерений соответствовала 98% (величина стандартного отклонения равна 0,02).

Для разработки оптимальных условий иммобилизации ЛОД и получения лучших характеристик биосенсора варьировали следующие параметры: тип проводящего полимера (заряд заместителя и длина спейсера), количество фермента на электроде (мкг), содержание мономера (мМ), время высушивания; среда электрополимеризации. При этом концентрацию пирролов с разными заместителями варьировали от 3 до 6 мМ, а содержание фермента – от 12,5 до 25 мкг в 3 мкл раствора. В табл. 2 проанализированы аналитические характеристики биосенсоров в зависимости от формулы мономера, использованного для иммобилизации ЛОД.

Лучшие аналитические характеристики (максимальные чувствительность и линейный диапазон определяемых концентраций) наблюдаются для сенсоров с ЛОД, иммобилизованной в полипиррольные матрицы мономера 2 (длинный спейсер и положительный заряд заместителя), 3 (короткий спейсер и положительный заряд заместителя) и 6 (короткий спейсер и отрицательный заряд заместителя).

Датчики, в которых использовались пирролы с положительным зарядом N-заместителя, характеризуются лучшими аналитическими характеристиками, чем пирролы с отрицательным зарядом. Рассматривая влияние длины спейсера на аналитические характеристики, следует отметить, что при положительном заряде заместителя предпочтительнее длинный спейсер, при отрицательном заряде – короткий. Это свидетельствует о возможности элект-

Т а б л и ц а 2

Сравнение аналитических характеристик биосенсоров с различными пирролами. Электрополимеризация проводилась в 0,1 М водном растворе LiClO_4 , концентрация мономера 6 мМ

Номер соединения	Чувствительность биосенсора, $\text{мА/М}\cdot\text{см}^2$	Диапазон линейности градуировочного графика, М
1	$6,9 \pm 0,5$	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$
2	164 ± 9	$1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$
3	50 ± 4	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$
4	$1,5 \pm 0,1$	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$
5	$4,8 \pm 0,4$	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$

ростатических взаимодействий полипиррольной матрицы с активным центром фермента, имеющим положительный заряд. Для сенсоров с мономером **2** чувствительность составила $164 \pm 9 \text{ мА/М}\cdot\text{см}^2$, отклик оказался линейным в диапазоне более трех порядков концентрации лактата.

Для оптимизации условий иммобилизации варьировали содержание фермента и мономера в наносимой на поверхность электрода капле. Лучшие характеристики (чувствительность и диапазон линейности) наблюдаются для датчиков с содержанием ЛОД 25 мкг в 3 мкл раствора и концентрацией мономера, равной 6 мМ.

В табл. 3 приведены литературные данные для электрохимических биосенсоров на лактат. Таким образом, сенсоры, полученные иммобилизацией ЛОД путем включения в полипиррольную матрицу, обладают более высокими показателями чувствительности и линейного диапазона, чем известные из литературы.

Разработанные нами биосенсоры пригодны также для определения низких концентраций лактата ($5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4} \text{ М}$). Высокая чувствительность и низкий предел обнаружения лактата с помощью данных биосенсоров могут быть использованы для разработки неинвазивного метода определения лактата в клинической диагностике.

Таким образом, разработан лактатный биосенсор, имеющий следующие характеристики: время отклика 25–40 с, чувствительность около $190 \text{ мА/М}\cdot\text{см}^2$, линейный диапазон от 1×10^{-7} до $0,001 \text{ М}$ глюкозы. Датчик демонстрирует стабильный отклик при нахождении в непрерывном потоке $1 \times 10^{-5} \text{ М}$ лактата в течение

полтора часа. Биосенсоры также полностью сохраняли свою чувствительность после месяца хранения в холодильнике при температуре 4°C в запечатанном виде. Благодаря использованию разработанной методики иммобилизации биосенсоры имеют высокую воспроизводимость изготовления: разброс чувствительности сенсоров не превышает 8%.

Определение лактата в реальных объектах

Многие продукты питания (кефир, простокваша, сыр, квашеные овощи), напитки (вино, пиво, квас) являются продуктами ферментативного брожения и содержат в своем составе широкий спектр органических кислот, среди которых важное место занимает молочная кислота. Выделяют несколько типов брожения (молочно-кислое, спиртовое, масляно-кислое и др.), в которых содержание молочной кислоты является показателем качества продукции.

Квас (традиционный русский слабоалкогольный напиток) – продукт незаконченного молочно-кислого и спиртового брожения хлебного сула. В зависимости от сорта, условий приготовления, брожения и хранения состав кваса весьма лабилен. В нем содержится от 0,21 до 0,58% молочной кислоты. При этом отсутствие молочной кислоты может быть однозначным индикатором нарушения технологического регламента производителем.

Исследования проводили в проточно-инжекционной системе, позволяющей анализировать до 40–60 проб в час. Для построения градуировочного графика определяли лактат в модельных образцах ($5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-3} \text{ М}$) в проточно-инжекционном режи-

Таблица 3

Сравнение аналитических характеристик нового лактатного биосенсора с литературными данными

Сенсор	Чувствительность, мА/М·см ²	Диапазон линейности градуировочного графика
[13]	30	0,25–1,5 мМ
[14]	125	нет данных
[15]	90	0,02–2 мМ
[16]	16	до 2 мМ
ЛОД, иммобилизованная в пленку электрополимеризованного производного пиррола	190 ± 14	5×10 ⁻⁷ –5×10 ⁻⁴ М

ме. После чего образцы кваса разбавляли в 30 раз, а кисло-молочных напитков – в 3000 раз (“Нео Имунеле”) и 100 раз (“Данакор”), а затем вводили пробу в проточно-инжекционном режиме.

Определение лактата в напитках проводили несколькими методами: путем непосредственного вычисления с помощью градуировочного графика и методом добавок. В качестве отклика биосенсора на содержание лактата принимали среднее значение по результатам пяти измерений отклика. Величина стандартного отклонения определения лактата в образце электрохимическими методами, включающими как вычисление концентрации лактата с помощью градуировочной кривой, так и определение концентрации методом добавок, не превышала 7%.

Пример определения лактата в образце кваса “Старый классический” методом добавок приведен на рис. 3. По пересечению графика с осью абсцисс определяли концентрацию лактата в разбавленной пробе.

В табл. 4 приведены экспериментальные данные по результатам определения лактата в образцах напитков.

В квасе, полученном методом естественного брожения, содержание лактата составляет 6,7–11,7 мМ. В напитках, содержащих добавленную молочную кислоту, согласно составу продукта (квас “Кружка и Бочка Традиционный”), содержание лактата было намного ниже, чем в квасе естественного брожения, а в квасе “Никола” молочная кислота вообще не определяется, т.е. широко рекламируемый квасной на-

ток “Никола” не является продуктом естественного брожения.

Добавление молочной кислоты в готовый продукт удорожает его стоимость, поэтому производители предпочитают добавлять более дешевую лимонную кислоту для улучшения вкуса готового продукта, что было сделано в квасе “Кружка и Бочка Традиционный”.

В кисло-молочных продуктах определена концентрация лактата выше, чем в квасе, что может свидетельствовать о наличии пробиотических культур и закваски.

Кроме того, результаты определения молочной кислоты в квасе соответствовали данным хроматографических тестов, выполненных в работе [17].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности применения разработанного нами лактатного биосенсора на основе планарных

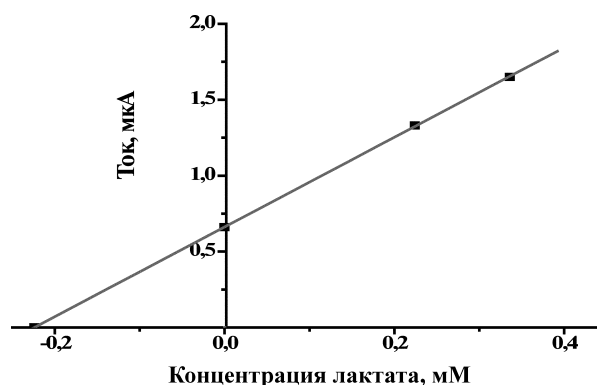


Рис. 3. Определение лактата в квасе «Старый классический» с помощью биосенсора методом добавок

Т а б л и ц а 4

Результаты определения лактата в квасе и кисло-молочных продуктах с помощью лактатного биосенсора

Анализируемый объект	C(лактата), мМ
Квас «Никола» <u>Состав:</u> очищенная вода, сахар, солод ржаной, солод ячменный, мука ржаная, хлебопекарные дрожжи.	не обнаружен
Квас «Кружка и Бочка® Традиционный» <u>Состав:</u> подготовленная вода, сахар, концентрат квасного сусла (ржаная мука, ржаной и ячменный солод), дрожжи хлебопекарные сушеные, регуляторы кислотности (кислота молочная, кислота уксусная).	2,7 ± 0,2
Квас «Старый классический» <u>Состав:</u> вода питьевая, сахар, концентрат квасного сусла, дрожжи.	6,7 ± 0,3
Квас «Бражник» <u>Состав:</u> подготовленная питьевая вода, концентрат квасного сусла, сахар-песок, дрожжи хлебопекарные.	11,2 ± 0,5
Квас «Очаковский» <u>Состав:</u> специально подготовленная вода, сахар, концентрат квасного сусла (ржаная мука, ржаной и ячменный солод), чистые культуры дрожжевой и молочно-кислой бактерий в виде смешанной закваски, двуокись углерода.	11,5 ± 0,5
Квас «Рамстор» (натуральный квас, полученный путем естественного брожения) <u>Состав:</u> подготовленная питьевая вода, концентрат квасного сусла, сахар-песок, дрожжи хлебопекарные.	11,7 ± 0,5
Данакор (Danone) <u>Состав:</u> молоко обезжиренное, молоко сухое обезжиренное, сахар, эфиры растительных стеринов «Фитонатуралис», йогуртовая закваска, фруктовая добавка (концентрат белого винограда, сахарный сироп, сироп глюкозы и фруктозы, загустители: Е 1422, камедь рожкового дерева; регуляторы кислотности: лимонная кислота, цитрат натрия; ароматизатор, идентичный натуральному (лимон).	30 ± 2
Neo Imunele (natural) <u>Состав:</u> молоко нормализованное, сахар, вода, концентрированный яблочный сок, сыворотка сухая, стабилизаторы (пектин, камедь рожкового дерева, гуаровая камедь), лимонная кислота, ароматизатор, идентичный натуральному, закваска, пробиотические культуры (<i>Lactobacillus Casei</i> , <i>Lactobacillus Rhamnosus</i>).	1455 ± 10

электродов, модифицированных Берлинской лазурью, для определения лактата в реальных объектах. Показано, что биосенсор, включенный в проточно-инъекци-

онную систему, позволяет производить экспрессную оценку качества пищевых продуктов, например, определять качество кваса.

Данная статья подготовлена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 06-03-33013-а, ИНТАС 05-10000070429, ИНТАС 06-1000014-5981), Госконтракт ФЦНП № 02.512.11.2180, Госконтракт ФЦНП № 02.512.11.2261.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smutok O., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. // Biosens. Bioelectron. 2005. **20**. P. 1285.
2. Guilbault G. G., Lubrano G. J., Gray D. N. // Anal. Chem. 1973. **45**. P. 2255.
3. Karyakin A.A. / Electrochemical sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. N.Y., 2008. P. 411.
4. Karyakin A.A., Gitelmacher O.V., Karyakina E.E. // Anal. Chem. 1995. **67**. P. 2419.
5. Karyakin A.A. // Electroanalysis. 2001. **13**. P. 813.
6. Лукачева Л.В., Закемовская А.А., Карякина Е.Е., Зоров И.Н., Симицын А.П., Сухачева М.В., Нетрусов А.И., Карякин А.А. // ЖАХ. 2007. **62**. P. 431.

7. Borisova A.V., Karyakina E.E., Cosnier S., Karyakin A.A. // *Electroanalysis*. 2008. **20** (in press).
8. Lee J.-A., Tsai Y.-C., Chen H.-Y., Wang C.-C., Chen S.-M., Fukushima T., Imai K. // *Anal. Chim. Acta*. 2005. **534**. P. 185.
9. Cosnier S., Mousty C., Gondran C., Leppelec A. // *Materials Science and Engineering C*. 2006. **26**. P. 442.
10. Cosnier S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. **377**. P. 507.
11. Serradilla Razola S., Lopez Ruiz B., Mora Diez N., Mark Jr H.B., Kauffmann J.-M. // *Biosens Bioelectron*. 2002. **17**. P. 921.
12. Llaudet E., Botting N.P., Crayston J.A., Dale N. // *Biosens Bioelectron*. 2003. **18**. P. 43.
13. Ito N., Miyamoto S., Kimura J. // *Biosens. Bioelectron*. 1996. **11**. P. 119.
14. Minagava H., Nakayama N., Matsumoto T., Ito N. // *Biosens. Bioelectron*. 1998. **13**. P. 313.
15. Garjonyte R., Yigzaw Y., Meskys R., Malinauskas A., Gorton L. // *Sens. Actuat.* 2001. **79**. P. 33.
16. Hart A.L., Turner A. // *Biosens. Bioelectron*. 1996. **11**. P. 263.
17. Нестеренко П. Н., Кебец П. А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2002. **43**. С. 34.

Поступила в редакцию 05.11.08.

ELECTROCHEMICAL POLYMERIZATION OF N-SUBSTITUTED PYRROLS FOR DEVELOPMENT OF NOVEL LACTATE BIOSENSOR

L.Ch. Korneyeva, A.V. Borisova, Y.I. Yashina, E.E. Karyakina, O.G. Voronin, S. Cosnier, A.A. Karyakin

(Division of Chemical Enzymology, Division of Analytical Chemistry)

Lactate oxidase from *Pediococcus species* was immobilized into conducting polymer films on the surface of planar electrodes modified with Prussian Blue. Polypyrrole ammonium was electropolymerized to obtain the conducting polymer. The analytical characteristics of the resulted biosensor were: the sensitivity of 190 ± 14 mA/M·sm², linear dynamic range of 5×10^{-7} – 5×10^{-4} M, and high operational stability. The applicability of lactate biosensor for food quality control (for example, kvass) has been shown. Effective and non-expensive biosensors for lactate analysis may be applied in clinical diagnostics, sports medicine, food and farm products quality control as well as for biotechnology processes.

Key words: Prussian blue, lactate oxidase, planar electrodes, biosensor, electrochemical polymerization, electroanalysis, lactate detection.

Сведения об авторах: Корнеева Людмила Хамидулловна – аспирантка химического факультета МГУ; Борисова Анастасия Владимировна – аспирантка химического факультета МГУ; Яшина Евгения Ивановна – инженер химического факультета МГУ; Карякина Елена Евгеньевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. биол. наук (ekaryakina@analyt.ch); Воронин Олег Геннадьевич – науч. сотр. химического факультета МГУ (ol.voronin@gmail.com); Серж Косниер – зав. лабораторией университета имени Ж. Фурье, Гренобль, Франция, Карякин Аркадий Аркадьевич – профессор, зав. лабораторией электрохимических методов кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук.