VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Rugilė Chmieliauskaitė

GLIUKOZĖS BIOLOGINIO JUTIKLIO KŪRIMAS BIOLOGIŠKAI AKTYVIŲ JUNGINIŲ BEI CISTAMINO DIHIDROCHLORIDO PAGRINDU

THE DEVELOPMENT OF GLUCOSE BIOSENSOR BASED ON BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS AND CYSTAMINE DIHYDROCHLORIDE

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017
Biotechnologijų studijų kryptis

Vilnius, 2023

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

_____
(Parašas)
Dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

_____
(Data)

Rugilė Chmieliauskaitė

GLIUKOZĖS BIOLOGINIO JUTIKLIO KŪRIMAS BIOLOGIŠKAI AKTYVIŲ JUNGINIŲ BEI CISTAMINO DIHIDROCHLORIDO PAGRINDU

THE DEVELOPMENT OF GLUCOSE BIOSENSOR BASED ON BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS AND CYSTAMINE DIHYDROCHLORIDE

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017
Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas	Dr. Natalija German (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)	(Parašas)	(Data)
Konsultantas	Lekt. Eimantas Ramonas (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)	(Parašas)	(Data)
Lietuvių kalbos konsultantas	Lekt. dr. Vaida Buivydienė (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)	(Parašas)	(Data)

Vilnius, 2023

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijų studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

TVIRTINU
Katedros vedėjas

_____
(Parašas)
Dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

_____
(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO (PROJEKTO)
UŽDUOTIS

…….....Nr. .....

Vilnius

Studentui (ei) Rugilei Chmieliauskaitei
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo (projekto) tema „Gliukozės biologinio jutiklio kūrimas biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu“.

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2023 m. gegužės 23 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

1. Skirtingai modifikuoti grafito elektrodus (GE) aukso nanodariniais, cistamino dihidrochloridu (CADHCl) bei fermentu – gliukozės oksidaze (GOx).
2. Nustatyti optimalias GE modifikavimo sąlygas.
3. Cikline voltamperometrija įvertinti ant modifikuotų elektrodų vykstančių oksidacijos-redukcijos reakcijų grįžtamumą bei sukurtų sistemų tinkamumą elektrocheminei analizei, elektronų pernešime dalyvaujant mediatoriui – 1,10-fenantrolin-5,6-dionui (FD).
4. Įvertinti gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų skirtingai modifikuotų elektrodų pagrindu, analizines nustatymo charakteristikas.
5. Ištirti pranašiausių gliukozės biologinių jutiklių stabilumą laike.
6. Pritaikyti sukurto gliukozės biologinio jutiklio modelį praktinėje analizėje, atliekant tyrimus realiuose objektuose.

Baigiamojo magistro darbo (projekto) konsultantas: Lekt. Eimantas Ramonas
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vadovas ..... Dr. Natalija German
(Parašas) (Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau …… Rugilė Chmieliauskaitė 2021 m. rugsėjo 16 d.
(Parašas) (Vardas, pavardė) (Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk. ……..
Data ….-….-….

Antros pakopos **Bioinžinerijos** studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas **Gliukozės biologinio jutiklio kūrimas biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu**

Autorius **Rugilė Chmieliauskaitė** Vadovas **dr. Natalija German**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Sergamumas cukriniu diabetu pasaulyje sparčiai didėja, todėl mokslininkų dėmesys skiriamas gliukozės biologinių jutiklių konstrukcijos tyrimams. Pastaraisiais metais biologinių jutiklių kūrimo technologijos sparčiai vystėsi, padaryta pažanga kuriant nanodydžio BJ, kuriuose naudojamos įvairios nanomedžiagos.

Darbo tikslas – sukurti jautrų bei stabilų laike gliukozės biologinį jutiklį biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu ir pritaikyti modelinę sistemą praktikoje. Sukurtos 7 elektrodų sistemos ir nustatytos 3 didžiausią analizinį signalą generavusios: GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA. Nustatyta, kad GE turi būti laikomas 5 mM CADHCl tirpale 16 val. kambario temperatūroje (+21 ^{o}C), o elektrocheminiams tyrimams patartina naudoti chronoamperometrinį metodą, esant +0,30 V potencialui. Pastebėta, kad BJ yra tinkami elektrocheminei analizei dėl oksidacijos-redukcijos proceso grįžtamumo. Nustatyta, kad biologinis jutiklis GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu pasižymi geromis analizinėmis charakteristikomis: 0,1–22,9 mM tiesiniu gliukozės koncentracijos intervalu, 0,9969 koreliacijos koeficientu, 6,89 % variacijos koeficientu (esant 7,2 mM Glc) bei 87 % atsikartojamumu (esant 4,48 mM Glc ir 16 matavimų) bei mažiausia aptikimo riba (0,088 mM) ir didžiausiu stabilumu (27 paros), lyginant su GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA. Taip pat GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas BJ modelis buvo sėkmingai pritaikomas žmogaus seilėse bei serume, migdolų piene bei mandarinų sultyse, nes pasižymėjo atsparumu trukdžiams ir geromis gliukozės išgavomis žmogaus seilėse: 96,0–98,6 %, žmogaus serume: 86,0–97,1 %, migdolų piene: 90,0–98,7 % ir mandarinų sultyse: 85,0–95,7 %.

Darbą sudaro 12 dalių: turinys, santrumpų sąrašas, paveikslų sąrašas, lentelių sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, metodinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas, padėka, priedai.

Darbo apimtis – 89 p. be priedų, 57 paveikslai, 6 lentelės ir 78 bibliografiniai šaltiniai.

Atskirai pridedami darbo priedai.

Prasminiai žodžiai: aukso nanodalelės, aukso nanostruktūros, biologinis jutiklis, cistamino dihidrochloridas, gliukozė, gliukozės oksidazė, grafito elektrodas, mandarinų sultys, migdolų pienas, žmogaus seilės, žmogaus serumas.

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No. ……..
Date ….-….-….

Master degree studies **Bioengineering** study programme Master Graduation Thesis

Title **The development of glucose biosensor based on biological active compounds and cystamine dihydrochloride**

Author **Rugilė Chmieliauskaitė** Academic supervisor **dr. Natalija German**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Diabetes rates are increasing worldwide, prompting extensive research on glucose biosensors. Nanoscale biosensors using various nanomaterials have shown significant advancements in recent years.

The aim of this work is to develop a sensitive and time-stable glucose biosensor based on biologically active compounds and cystamine dihydrochloride and to apply the model system in practice. 7 electrode systems were developed and the 3 electrodes with the highest analytical signal were identified: GE/CADHCl/AuNP/PD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuNP/PD/GOx/GA and GE/AuNP/CADHCl/PD/GOx/GA. It has been established that graphite rod electrode should be stored in 5 mM CADHCl solution for 16 hours at room temperature (+21 ^{o}C), and that for electrochemical analysis, the chronoamperometric method at a potential of +0.30 V is recommended. The reversibility of the oxidation-reduction process has been observed to make the biosensors suitable for electrochemical analysis. The GE/AuNP/CADHCl/PD/GOx/GA based biosensor was found to have good analytical performance: 0.1-22.9 mM of linear glucose concentration range, 0.9969 of correlation coefficient, 6.89 % of variation coefficient (at 7.2 mM Glc) and 87 % of reproducibility (at 4,48 mM of Glc and 16 measurements), the lowest limit of detection (0,088 mM) and the highest stability (27 days) compared to GE/CADHCl/AuNP/PD/GOx/GA and GE/AuNS/CADHCl/AuNP/PD/GOx/GA. In addition, the GE/AuNP/CADHCl/PD/GOx/GA based biosensor model has been successfully applied to human saliva and serum, almond milk and mandarin juice, due to its resistance to interference and good glucose recoveries in human saliva solution: 96,0-98,6 %, in human serum solution: 86,0-97,1 %, in almond milk: 90,0-98,7 % and in mandarin juice: 85,0-95,7 %.

Thesis consists of 12 parts: content, abbreviations, list of pictures, list of tables, introduction, literature review, methodological part, results and their discussion, conclusions, references, acknowledgment, appendices.

Thesis consists of: 89 p. text without appendices, 57 figures, 6 tables and 78 bibliographical sources.

Appendices are included.

Keywords: almond milk, biosensor, cystamine dihydrochloride, glucose, glucose oxidase, gold nanoparticles, gold nanostructures, graphite rod electrode, human saliva, human serum, mandarin juice.

Turinys

Paveikslų sąrašas 8
Lentelių sąrašas 12
Santrumpų sąrašas 13
Įvadas 14
1. Literatūros apžvalga 16
1.1. Cukrinis diabetas 16
1.2. Biologiniai jutikliai 17
1.2.1. Amperometriniai biologiniai jutikliai 19
1.2.2. Fermentiniai biologiniai jutikliai 20
1.3. Biologiniuose jutikliuose naudojami fermentai 21
1.4. Mediatoriai biologiniuose jutikliuose 24
1.5. Aukso nanomedžiagos 25
1.5.1. Aukso nanostruktūros 26
1.5.2. Aukso nanodalelės 27
1.6. Fermentų imobilizavimas 28
1.6.1. Cistamino dihidrochloridas 28
1.6.2. Glutaro aldehidas 29
1.7. Gliukozė 31
1.8. Elektrocheminiai metodai 32
1.9. Elektrodai 35
2. Metodinė dalis 37
2.1. Naudoti reagentai 37
2.2. Tyrimuose naudota įranga 38
2.3. Aukso nanodalelių ir nanostruktūrų sintezė 39
2.4. Spektrometriniai matavimai 39
2.5. Grafito elektrodo paruošimas 39
2.6. Elektrocheminiai analizės metodai ir duomenų apdorojimas 41
2.7. Stabilumo tyrimai 42
2.8. Biologinio jutiklio pritaikymas realiuose objektuose 42
3. Rezultatai ir jų aptarimas 43
3.1. AuND sintezė 43
3.2. Biologinio jutiklio kūrimo būdo paieška. Elektrocheminio efektyvumo įvertinimas 44
3.2.1. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/FD/GOx/GA 44

3.2.2. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA 45
3.2.3. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA 46
3.2.4. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/FD/GOx/GA 47
3.2.5. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA 48
3.3. Optimali grafito elektrodo išlaikymo CADHCl tirpale temperatūra 49
3.4. Optimalus grafito elektrodo išlaikymo CADHCL tirpale laikas 51
3.5. Optimalios CADHCl tirpalo koncentracijos nustatymas 52
3.6. Optimalaus oksidacijos-redukcijos potencialo nustatymas 53
3.7. Ciklinės voltamperogramos bei oksidacijos-redukcijos proceso grįžtamumas 54
3.8. Ciklinės voltamperogramos ir analizinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tiriamojoje sistemoje 60
3.9. Pagrindinių analizinių charakteristikų nustatymas ir įvertinimas, naudojant gliukozės biologinius jutiklius bei chronoamperometrinį metodą 63
3.10. Biologinių jutiklių stabilumo tyrimas 67
3.11. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurto biologinio jutiklio pritaikymas gliukozei nustatyti realiuose objektuose 68
3.11.1. Žmogaus seilės 69
3.11.2. Žmogaus serumas 72
3.11.3. Migdolų pienas 75
3.11.4. Mandarinų sultys 78
Išvados 82
Literatūros sąrašas 83
Padėka 89
Priedai 90

Paveikslų sąrašas

1 pav. Biologinio jutiklio veikimo schema 17
2 pav. Biologinių jutiklių kartos remiantis skirtingais elektronų perdavimo procesais 20
3 pav. Gliukozės oksidazės 3D struktūra 22
4 pav. Gliukozės oksidazės katalizuojama reakcija 23
5 pav. 1,10-Fenantrolin-5,6-diono struktūrinė formulė 25
6 pav. Tauriųjų metalų (aukso) nanomedžiagos 25
7 pav. Ant grafito elektrodo elektrochemiškai nusodintos aukso nanostruktūros esant pastoviam 200s -0,2 V potencialui 0,1 M KNO_3 tirpale, kuriame yra skirtingos $HAuCl_4$ koncentracijos: (A) 0,02, (B) 3,0 ir (C) 6,0 mM 27
8 pav. Cistamino struktūrinė formulė 29
9 pav. Glutaro aldehido struktūrinė formulė 30
10 pav. Baltymų imobilizavimo procesas ant aminuotų laikiklių, iš anksto aktyvuotų glutaro aldehido tirpalu 30
11 pav. Baltymų, adsorbuotų ant aminintų katijoninių nešiklių, kryžminis sujungimas naudojant glutaro aldehido tirpalą 31
12 pav. Gliukozės struktūrinės formos: A – atvira grandinė, B – Haworth projekcija, C – „kėdės“ forma 32
13 pav. Principinė amperograma 34
14 pav. Principinė ciklinė voltamperograma 35
15 pav. Aukso nanodalelių sintezės schema 39
16 pav. Grafito elektrodų paruošimo schema naudojant cistamino dihidrochlorido tirpalą 40
17 pav. A – grynas GE, B – GE padengtas AuND, C – GE padengtas AuNS 41
18 pav. A – 13 nm AuND tirpalas ir B – sugerties spektras 43
19 pav. GE/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 45
20 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 46
21 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 47
22 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 48
23 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 48

24 pav. Modifikuotų grafito elektrodų sistemų generuojamas analizinis signalas prie 239 mM gliukozės koncentracijos 49
25 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA chronoamperograma, išlaikius grafito elektrodą CADHCl tirpale kambario temperatūroje 50
26 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei diagramos (B), naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą CADHCl tirpale skirtingose temperatūrose 51
27 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei diagramos (B), naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą skirtingą laiko tarpą CADHCl tirpale 51
28 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės (A) nuo Glc koncentracijos bei diagramos esant 239 mM gliukozės (B) naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą skirtingų koncentracijų CADHCl tirpale 52
29 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei oksidacijos-redukcijos potencialo įtakos srovės stiprio pokyčiui diagramos esant 239 mM gliukozės (B) naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA 54
30 pav. GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams 55
31 pav. GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų vertės (B) priklausomai nuo skleidimo greičio 56
32 pav. GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams 57
33 pav. GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų vertės (B) priklausomai nuo skleidimo greičio 58
34 pav. GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams 58
35 pav. GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų (B) vertės priklausomai nuo skleidimo greičio 59
36 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamas signalas prie 100 mV/s elektrocheminio potencialo skleidimo greičio 60
37 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms 61
38 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms 62

39 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms 62
40 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B) 64
41 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B) 64
42 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B) 65
43 pav. Gliukozės biologinių jutiklių GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA pagrindu Michaelis-Menten kinetiniai parametrai: ΔImax (A) ir K_M (B) 65
44 pav. Gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų pagrindu, tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai 66
45 pav. Gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų pagrindu, maksimalios srovės pokytis (%), priklausomai nuo sistemos išlaikymo laiko 68
46 pav. Chronoamperograma (A) bei diagrama (B) vaizduojančios angliavandenių įtaką gliukozės analiziniam signalui žmogaus seilėse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Angliavandenių pridėjimo vietos grafike A pateikiamos rodyklėmis 69
47 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C bei šlapimo rūgšties įtaka Glc analiziniam signalui žmogaus seilėse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 70
48 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei žmogaus seilių tirpale, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 71
49 pav. Chronoamperograma (A) bei diagrama (B) vaizduojančios angliavandenių įtaką gliukozės analiziniam signalui žmogaus serume, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Angliavandenių pridėjimo vietos grafike A žymimos rodyklėmis 72
50 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C bei šlapimo rūgšties įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA žmogaus serumo tirpale 73
51 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei žmogaus serumo tirpale, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 74
52 pav. Angliavandenių įtaka analiziniam signalui migdolų piene, išreikšta procentais, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 75

53 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA migdolų piene 76
54 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei migdolų piene, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 77
55 pav. Angliavandenių įtaka analiziniam signalui mandarinų sultyse, išreikšta procentais, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 78
56 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA mandarinų sultyse 79
57 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei mandarinų sultyse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA 80

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Tyrimų metu naudotų angliavandenių tirpalai 37

2 lentelė. Biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu sukurtų gliukozės biologinių jutiklių stabilumo kitimas, priklausomai nuo išlaikymo laiko 67

3 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, žmogaus seilių tirpale 72

4 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, žmogaus serumo tirpale 75

5 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, migdolų piene 78

6 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, mandarinų sultyse 81

Santrumpų sąrašas

Ag/AgCl – palyginamasis sidabro/sidabro chlorido elektrodas

ATP – adenozin-5-trifosfatas

AuND – aukso nanodalelės

AuNS – aukso nanostruktūros

BJ – biologinis jutiklis

CADHCl – cistamino dihidrochloridas

ChA – chronoamperometrija / chronoamperograma

CV – ciklinė voltamperometrija / ciklinė voltamperograma

FAD – oksiduotos formos flavino adenino dinukleotidas

$FADH_2$ – redukuotos formos flavino adenino dinukleotidas

FD – 1,10-fenantrolin-5,6-dionas

GA – glutaro aldehidas

GE – grafito elektrodas

Glc – gliukozė

GOx – gliukozės oksidazė

Įvadas

Cukrinis diabetas yra lėtinis endokrininis angliavandenių apykaitos sutrikimas, kurio paplitimas pasaulyje sparčiai didėja (Lai et al., 2016; Lović et al., 2018; Sabu et al., 2019). Šios ligos komplikacijos yra viena pagrindinių žmonių mirtingumo priežasčių pasaulyje (Martinkova & Pohanka, 2015; Yoo & Lee, 2010). Todėl labai svarbu stebėti gliukozės (Glc) kiekį kraujyje (Fracchiolla et al., 2013; Sabu et al., 2019) diagnozuojant ir kontroliuojant cukrinį diabetą, o norint išvengti mirtinų komplikacijų, būtina taikyti greitus ir tikslius diagnostikos metodus (Martinkova & Pohanka, 2015).

Labai svarbu greitai ir tiksliai nustatyti gliukozę, kaip tylaus ir pavojingo diabeto žymenį (Huang et al., 2021). Dėl šios priežasties viena iš jutiklių srities mokslininkų interesų sričių yra gliukozės biologinių jutiklių (BJ) konstrukcijos tyrimai. Biologiniai jutikliai yra galingas analizės įrankis, pasižymintis sparčia vystymosi technologija ir pritaikymu įvairiose srityse (Yoo & Lee, 2010). Tarp gliukozės kiekybinės analizės metodų dėl savo paprastumo, didelio jautrumo ir nedidelės kainos (Huang et al., 2021; Teles & Fonseca, 2008) plačiai tyrinėjami fermentiniai elektrocheminiai biologiniai jutikliai (Lai et al., 2016; Yoo & Lee, 2010). Fermentų stabilizavimas yra vienas svarbiausių šių metodų klausimų (Huang et al., 2021). Dėl fermento stabilizavimo poveikio jutiklio veikimui svarbu ieškoti medžiagų, kurios išlaikydamos fermento biologinį aktyvumą, sudarytų tinkamas sąlygas efektyviai biologinio jutiklio apkrovai (Huang et al., 2021; Saei et al., 2013). Dėl šios priežasties mokslininkai, kuriantys gliukozės biologinius jutiklius, siekia optimizuoti elektronų perdavimo procesą tarp imobilizuoto fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus, tokiu būdu prailginti gliukozės BJ veikimo laiką ir pagerinti sistemos analizines charakteristikas (Lai et al., 2016).

Pastaraisiais metais sukurta daugybė biologinių jutiklių (fermentiniai, elektrocheminiai, optiniai, imuniniai, receptoriniai (Liu et al., 2018) bei nanotechnologijomis pagrįsti BJ), kurie užtikrina nuolatinę gliukozės ir insulino stebėseną (Sabu et al., 2019). Laikui bėgant gliukozės kiekio kraujyje savikontrolės sistemomis tapo paprasčiau naudotis ir jos pasiekė didesnį tikslumą. Tačiau tokio tipo sistemos teikia tik statinę informaciją apie gliukozės kiekį, neatsižvelgiant į dinaminį gliukozės pokyčių pobūdį (Kravarusic & Aleppo, 2020). BJ yra viena našiausių gliukozės ir insulino nustatymo priemonė. Padaryta pažanga kuriant nanodydžio biologinius jutiklius, kuriuose naudojamos įvairios nanomedžiagos (tauriųjų metalų nanodalelės) (Sabu et al., 2019). Todėl pažangių biologinių jutiklių kūrimas suteikia galimybę stebėti diabetu sergančių asmenų būklę ir individualizuoti ligos valdymą, kontroliuojant cukraus kiekį kraujyje (Lai et al., 2016).

Darbo tikslas

Sukurti jautrų bei stabilų laike gliukozės biologinį jutiklį biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu ir pritaikyti modelinę sistemą praktikoje.

Darbo uždaviniai

1. Skirtingai modifikuoti grafito elektrodus (GE) aukso nanodariniais, cistamino dihidrochloridu (CADHCl) bei fermentu – gliukozės oksidaze (GOx).
2. Nustatyti optimalias GE modifikavimo sąlygas.
3. Cikline voltamperometrija įvertinti ant modifikuotų elektrodų vykstančių oksidacijos-redukcijos reakcijų grįžtamumą bei sukurtų sistemų tinkamumą elektrocheminei analizei, elektronų pernešime dalyvaujant mediatoriui – 1,10-fenantrolin-5,6-dionui (FD).
4. Įvertinti gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų skirtingai modifikuotų elektrodų pagrindu, analizines nustatymo charakteristikas.
5. Ištirti pranašiausių gliukozės biologinių jutiklių stabilumą laike.
6. Pritaikyti sukurto gliukozės biologinio jutiklio modelį praktinėje analizėje, atliekant tyrimus realiuose objektuose.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Cukrinis diabetas

Cukrinis diabetas išsivysto dėl netinkamo gliukozės kiekio kraujyje reguliavimo (Lai et al., 2016; Shajaripour Jaberi et al., 2019; Yoo & Lee, 2010). Tai patologinė būklė, atsirandanti dėl absoliutaus arba santykinio insulino trūkumo organizme (Martinkova & Pohanka, 2015), kai kasa nepajėgia gaminti žmogaus organizmui reikiamo insulino kiekio, arba kai žmogaus organizmas negali veiksmingai valdyti gaminamo insulino (Varma et al., 2018). Todėl glikemijos (gliukozės kiekio) kraujyje stebėjimas yra būtina cukrinio diabeto valdymo priemonė (Fracchiolla et al., 2013; Sabu et al., 2019). Padidėjusi gliukozės koncentracija kraujyje vadinama hiperglikemija, sumažėjusi – hipoglikemija (Bruen et al., 2017).

Gliukozė ir insulinas yra pagrindiniai ligos kontrolės, valdymo rodikliai, kurie leidžia valdyti hiperglikemijos ir hipoglikemijos epizodus (Bruen et al., 2017; Makaram et al., 2014). Glikemijos kontrolė padeda sumažinti su cukriniu diabetu susijusių komplikacijų progresavimo riziką (Alwafi et al., 2020; Lović et al., 2018). Cukriniu diabetu sergantys žmonės susiduria su širdies ir kraujagyslių ligomis (Martinkova & Pohanka, 2015; Shajaripour Jaberi et al., 2019), inkstų, nervų sistemos ir pėdų pažeidimais (Shajaripour Jaberi et al., 2019). Tačiau vienas dažniausiai pasireiškiančių šalutinių poveikių yra akių pažeidimai (Lović et al., 2018), atsirandantys dėl baltymų glikacijos akies kraujagyslėse (Bruen et al., 2017). Todėl ankstyva cukrinio diabeto diagnostika ir nuolatinė jo kontrolė padeda gerinti šia liga sergančių žmonių gyvenimo kokybę (Shajaripour Jaberi et al., 2019).

Gliukozės koncentraciją kraujyje reguliuoja antagonistiniai hormonai: insulinas ir gliukagonas (Bratlie et al., 2012). Insulinas vaidina svarbų vaidmenį gliukozės apykaitoje, o jo nustatymas yra labai vertingas diagnozuojant ir kontroliuojant ligą (Sabu et al., 2019). Tai peptidinis hormonas, sintetinamas kasoje ir išskiriamas kaip tarpininkas metabolinėms reakcijoms vykti (Martinkova & Pohanka, 2015). Insulinas mažina gliukozės kiekį kraujyje, skatindamas beveik visas kūno ląsteles, išskyrus smegenų, iš kraujo pasisavinti gliukozę (Bratlie et al., 2012; Bruen et al., 2017). Gliukozės kiekį kraujyje insulinas taip pat mažina lėtindamas glikogeno (polimerinės gliukozės formos) skilimą kepenyse ir slopindamas aminorūgščių bei riebalų rūgščių virtimą cukrumi. Gliukagonas reguliuoja cukraus kiekį kraujyje, siųsdamas signalą kepenų ląstelėms padidinti glikogeno hidrolizę, aminorūgštis ir riebalų rūgštis paversti gliukoze ir pastarąją išskirti atgal į kraujotaką (Bratlie et al., 2012).

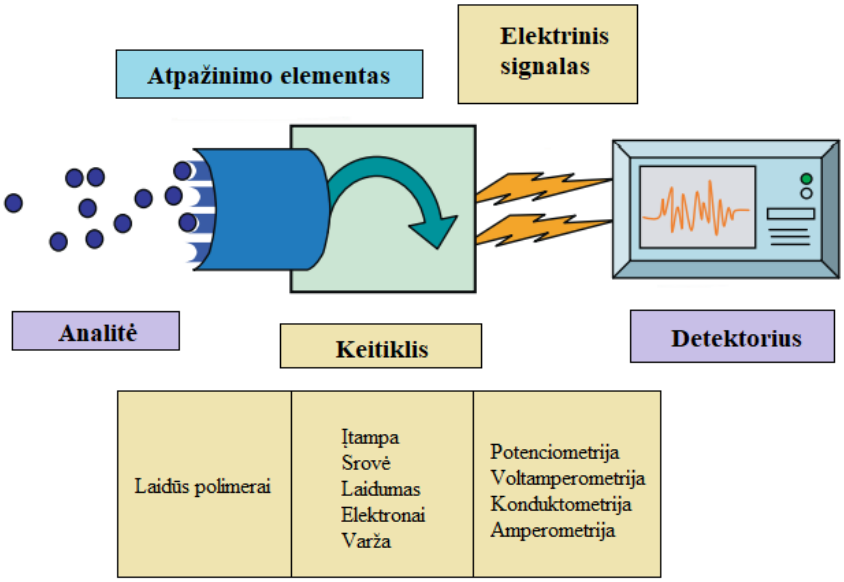
Cukrinis diabetas skirstomas į du tipus: pirmo ir antro tipo. Pirmo tipo diabetas yra autoimuninė liga, kuri sunaikina insuliną gaminančias Langerhanso salelių beta ląsteles (Bratlie et al., 2012; Makaram et al., 2014). Dėl šios priežasties kasa negamina pakankamo kiekio insulino, reikalingo normaliam organizmo funkcionavimui (Lai et al., 2016; Varma et al., 2018). Antro tipo

diabetas pasižymi atsparumu insulinui, kai ląstelėms nepavyksta įsisavinti kasos gaminamo insulino (Makaram et al., 2014; Varma et al., 2018).

Biologinis jutiklis gali būti naudingas nustatant hipoglikemiją ar hiperglikemiją ir realiuoju laiku teikiant informaciją, reikalingą vaistams, mitybos režimui ir fiziniam aktyvumui koreguoti. Taip pat reguliarus ir dažnas gliukozės kiekio kraujyje matavimas gali suteikti duomenų žmonių, sergančių cukriniu diabetu, ligos kontrolės strategijų optimizavimui (Yoo & Lee, 2010).

1.2. Biologiniai jutikliai

Per pastaruosius dešimtmečius biologinių jutiklių kūrimo technologijos sparčiai vystėsi, sukurta daugybė cukrinio diabeto valdymo priemonių (Kravarusic & Aleppo, 2020). Biologinis jutiklis apibrėžiamas kaip prietaisas, galintis aptikti analitės buvimą mėginyje ir nustatyti jos kiekį (Hasan et al., 2014; Huang et al., 2021), pateikiant kiekybinius arba pusiau kiekybinius analizės duomenis, naudojant biologinio atpažinimo elementą (Sabu et al., 2019). Elektrocheminis biologinis jutiklis – tai kompaktiškas analizės įrankis, turintis biologinį ar biologiškai išvestą jautraus atpažinimo elementą, integruotą ar susietą su fizikocheminiu signalo keitikliu (Yoo & Lee, 2010). BJ susideda iš aptikimo sistemos, vadinamos receptoriumi (imtuvu arba atpažinimo elementu), signalo vertimo prietaiso (keitiklio) ir signalo nuskaitymo sistemos (detektoriaus) (Huang et al., 2021; Sabu et al., 2019) (žr. 1 pav.). Taip pat svarbi analitė – medžiaga, kurią siekiama aptikti (Staiano et al., 2017).



1 pav. Biologinio jutiklio veikimo schema (pagal Griffin et al., 2014; Lakard, 2020)

Biologinio jutiklio elementas – receptorius įvairiais būdais tvirtinamas prie keitiklio. Šis atpažinimo elementas priima signalą iš aplinkos analitės pavidalu, sąveikaudamas su ja (Fracchiolla et al., 2013; Staiano et al., 2017). Receptorius pasižymi dideliu selektyvumu biologinei sąveikai ir

analitės aptikimui (biologinėse sistemose tarp receptoriaus ir jo ligando yra specifinė sąveika) (Huang et al., 2021). Receptoriais gali būti biologinės molekulės (antikūnas, fermentas, receptorinis baltymas nukleino rūgštis (Alarcon-Angeles et al., 2018; Huang et al., 2021; Sabu et al., 2019) ar antigenas (Fracchiolla et al., 2013)) arba gyva biologinė sistema (ląstelė, audinys ir organizmas), kurios aptikimui naudoja biocheminį mechanizmą. Labiausiai paplitę bioreceptoriai yra pagrįsti antigeno ir antikūno sąveika, nukleino rūgšties sąveika (dvi komplementarios grandinės), fermentine sąveika (fermentas-substratas) ar ląstelės sąveika (mikroorganizmai, baltymai) (Huang et al., 2021). Ypatinga analitės ir receptoriaus sąveika lemia biologinio jutiklio funkcijos specifiškumo laipsnį.

Signalo vertimo prietaisas (keitiklis) – tai BJ elementas, aptinkantis signalą, konvertuojantis vieną energijos formą į kitą (Staiano et al., 2017) ir biologinę informaciją verčiantis elektriniu signalu (Huang et al., 2021), kuris gali būti sėkmingai išmatuotas ir kiekybiškai įvertintas (Fracchiolla et al., 2013). Biologinių jutiklių sėkmė priklauso nuo to, kaip bioreceptoriaus sluoksnis (biologinis komponentas) tvirtinamas ant keitiklio (Huang et al., 2021). Keitikliai yra skirstomi į pjezoelektrinius, elektrocheminius, termometrinius, magnetinius, optinius ir masės (Staiano et al., 2017).

Signalo nuskaitymo sistema (detektorius) – tai signalo procesorius, kuris vykdo duomenų apdorojimą ir perduoda rezultatus (Fracchiolla et al., 2013). Keitiklis yra BJ dalis, paverčianti biologinio atpažinimo molekulės prisijungimo proceso įvesties signalą į atitinkamą detektoriaus užregistruotą išvesties signalą (Hasan et al., 2014; Martinkova & Pohanka, 2015), kuris yra sustiprinamas ir kiekybiškai įvertinamas (Staiano et al., 2017).

Biologinis jutiklis turi pasižymėti šiomis charakteristikomis:

1. BJ naudojamas biokatalizatorius turi būti skirtas numatytam analizės tikslui ir pasižymėti geru stabilumu natūraliomis sąlygomis.
2. Elektrocheminė reakcija turi būti grįžtama ir greita, nepriklausoma nuo fizikinių sąlygų, tokių kaip maišymas ir temperatūros pokyčiai.
3. Signalas turi būti tikslus, atsikartojantis, linijinis pageidaujamame analitės koncentracijos diapazone ir kiek įmanoma be triukšmo.
4. Klinikinių BJ, kurie naudojami tiesiogiai ir invaziniu būdu, zondas turi būti mažas, biologiškai suderinamas, neturintis toksinio ar imunogeninio poveikio.
5. Biologiniai jutikliai turi suteikti galimybę atlikti greitą ir momentinę analizę realiuoju laiku.
6. BJ turi pasižymėti mobilumu, maža kaina ir dydžiu.
7. Idealiu atveju pageidautina, kad sistemos būtų visiškai automatizuotos arba reikalautų mažai operatoriaus įgūdžių įprastinei analizei atlikti (Griffin et al., 2014; Huang et al., 2021).
8. Biologinis jutiklis turi turėti galimybę vienu metu aptikti kelias analites (Griffin et al., 2014).

Biologiniai jutikliai atsižvelgiant į pastarųjų sudėtį yra klasifikuojami į keletą grupių, pavyzdžiui receptoriniai, fermentiniai ir imuniniai. Taip pat pagal signalo vertimo tipą, BJ yra diferencijuojami į elektrocheminius, pjezoelektrinius, fotoelektrinius ir puslaidininkius (Lai et al., 2016). Pastebima, jog biologinių jutiklių rinkoje dažniausiai naudojami elektrocheminiai fermentiniai gliukozės biologiniai jutikliai (Yoo & Lee, 2010), kurie, remiantis detektoriaus generuojamu atsaku, yra skirstomi į potenciometrinius, amperometrinius ar konduktometrinius (Fracchiolla et al., 2013; Hasan et al., 2014; Lai et al., 2016; Sabu et al., 2019).

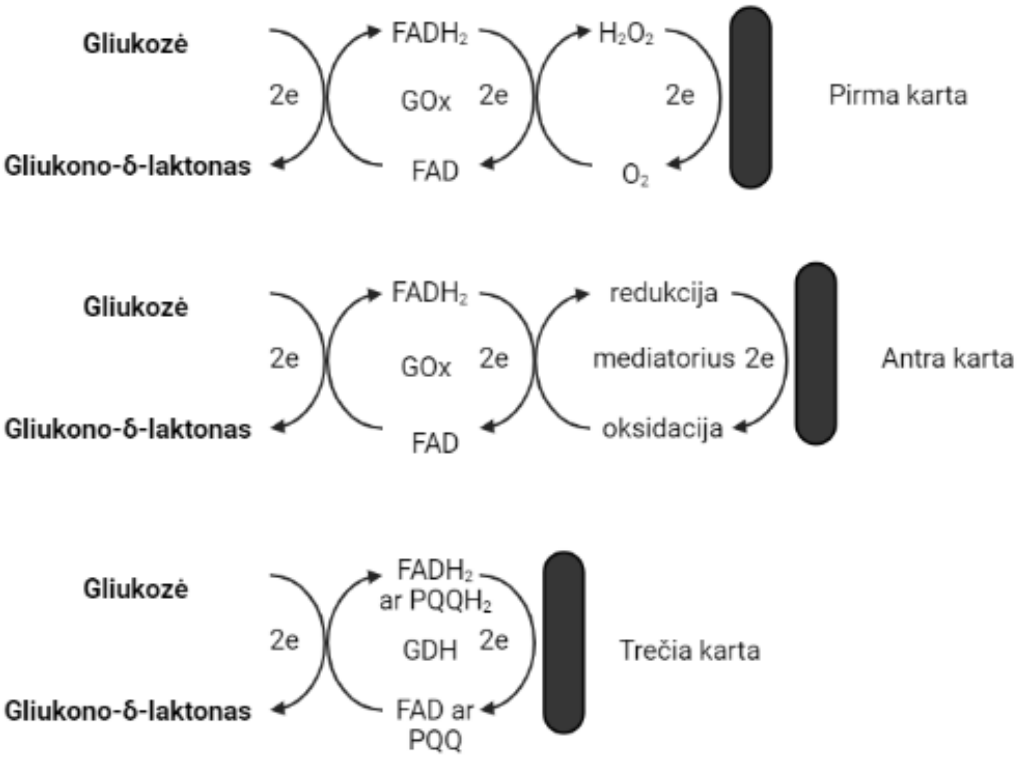
Elektrocheminis signalų registravimas, lyginant su įprastiniais optiniais matavimais, turi keletą privalumų: pasižymi didesniu našumu, mažesniu fonu ir galimybe tyrimus atlikti drumstuose mėginiuose (Zhang et al., 2018) (nuo kraujo iki žarnyno skysčių (Sabu et al., 2019), šlapimo ar kraujo serumo (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014)). Dėl šios priežasties elektrocheminiai BJ yra plačiai taikomi klinikinėje analizėje, farmacijoje, maisto pramonėse, žemės ūkyje, veterinarijoje ir aplinkosaugoje (Saei et al., 2013). Taip pat dinaminės savybės, tokios kaip selektyvumas, atkuriamumas, jautrumas, stabilumas ir tiesiškumo intervalas yra labai svarbios kuriant biologinius jutiklius (German et al., 2014; Sabu et al., 2019), o efektyvios BJ sąsajos sukūrimas yra esminis elektrocheminėje analizėje (Zhang et al., 2018).

Selektyvumas nurodo sistemos gebėjimą atskirti analitę nuo kitų mėginyje esančių medžiagų. Todėl kuo didesnis selektyvumas, tuo veiksmingiau biologinis jutiklis identifikuoja ir matuoja analitę su mažiausiais kitų medžiagų trukdžiais mėginyje. Kita svarbi savybė yra jautrumas. Didelis jautrumas reiškia, kad, esant minimaliems analitės koncentracijos pokyčiams, pastebimas žymus BJ signalo pokytis. Matavimo rezultatų atkuriamumas (išmatuojamumas) yra dar viena svarbi savybė, kuri apibrėžiama tikslumu. Didelis tikslumas rodo, kad pakartotinių matavimų rezultatai yra artimi vienas kitam (artimi tikrajai vertei) (Huang et al., 2021).

1.2.1. Amperometriniai biologiniai jutikliai

Po pirmųjų C. L. Clark ir C. Lyons elektrocheminio gliukozės biologinio jutiklio kūrimo darbų 1962 m. (Clark & Lyons, 1962) buvo tyrinėjami fermentiniai gliukozės BJ (Navaee & Salimi, 2019; Yoo & Lee, 2010), kurie skiriasi fermentų ir elektrodų tipais, imobilizacijos metodais ir tiesiogine ar tarpine elektronų pernaša (Navaee & Salimi, 2019). Siekta sukurti patobulintas sistemas, skirtas glikemijos lygio nustatymui ir kontrolei (Ferri et al., 2011).

Kuriant fermentinius biologinius jutiklius labai svarbu užtikrinti tinkamą elektronų perdavimo procesą tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus (Alarcon-Angeles et al., 2018; Zhang et al., 2018). Todėl ilgainiui buvo atlikti išsamūs tyrimai, kurių metu amperometriniai gliukozės BJ buvo suskirstyti į tris skirtingus tipus (vadinamus kartomis) pagal vykstantį elektronų perdavimą (žr. 2 pav.) (Alarcon-Angeles et al., 2018).



2 pav. Biologinių jutiklių kartos remiantis skirtingais elektronų perdavimo procesais (pagal Navaee & Salimi, 2019)

Pirmos kartos BJ oksidacijos-redukcijos mechanizmas priklauso nuo deguonies (Alarcon-Angeles et al., 2018). Nustatant gliukozės koncentraciją sistemoje atsižvelgiama į deguonies suvartojimą arba vandenilio peroksido išsiskyrimą (Ferri et al., 2011; Sabu et al., 2019).

Antros kartos biologiniuose jutikliuose oksidacijos-redukcijos proceso tarpininkai (mediatoriai) naudojami elektronams perduoti tarp aktyviojo fermento centro vietos ir keitiklio (Alarcon-Angeles et al., 2018). Elektronų perdavimas vyksta dviem etapais: pirmame etape vyksta fermento ir substrato oksidacijos-redukcijos reakcija, inicijuota mediatoriaus, o antrajame etape vyksta mediatoriaus oksidacija elektrodo paviršiuje (Ahuja et al., 2007). Oksidacijos-redukcijos reakcijai vykti naudojami mediatoriai, analizuojamajame tirpale (German et al., 2010, German et al., 2014) arba elektrodo paviršiuje (German et al., 2015).

Trečioji BJ karta, pagrįsta tiesioginiu elektronų perdavimu tarp fermento aktyviojo centro ir keitiklio (Alarcon-Angeles et al., 2018), fermentui su elektrodu kontaktuojant tiesiogiai. Tokio tipo BJ biologinio atpažinimo komponentas yra neatskiriama keitiklio dalis (Ahuja et al., 2007). Ši pernaša nereikalauja deguonies ar mediatoriaus (Navaee & Salimi, 2019).

1.2.2. Fermentiniai biologiniai jutikliai

Elektrocheminiai fermentiniai gliukozės biologiniai jutikliai yra plačiai paplitę prietaisai, kurie komerciškai per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo nuosekliai tiriami (Kausaite-

Minkstimiene et al., 2014). Šie jutikliai pasižymi dideliu specifiškumu ir jautrumu sudėtingose sistemose (Lai et al., 2016). Elektrocheminiuose BJ fermentų veikimo mechanizmas – katalitinis. Kadangi fermentas reakcijos pabaigoje yra nepakitęs (Hasan et al., 2014), nėra sunaudojamas ir išlieka stabilus, šie biologiniai jutikliai gali būti naudojami ilgą laiką (Liu et al., 2018).

Fermentais pagrįsti biologiniai jutikliai pasižymi keletu trūkumų: ribotas fermentų stabilumas ir priklausomybė nuo jų aktyvumo, taip pat priklausomybė nuo įvairių veiksnių, tokių kaip pH, jonų stiprumas, cheminis slopinimas ir temperatūra (Hasan et al., 2014).

Kuriant elektrocheminius BJ, dažniausiai fermentai imobilizuojami heterogeninės katalizės metu ant įvairių kietųjų laidžių paviršių bei atlieka biologinę analitės atpažinimo funkciją (German et al., 2010; Pečar & Goršek, 2017). Biologinių jutiklių elektrodai imobilizuojami fermentais pasyvios fizinės adsorbcijos, kovalentinio prijungimo, įkapsuliavimo arba sugavimo ant itin plonos polimerinės plėvelės paviršiaus ar kryžminio kovalentinio ryšių siuvimo būdais (German et al., 2014; Hasan et al., 2014; Huang et al., 2021). Dažniausiai BJ konstrukcijoje fermentai adsorbuojami arba prijungiami prie elektrodo paviršiaus kovalentiniais ar nekovalentiniais ryšiais (Alarcon-Angeles et al., 2018). Imobilizacijos procesas yra labai svarbus BJ kūrimo žingsnis, nes stabilumas ir katalitinis aktyvumas priklauso nuo to, ar bus išvengta fermento denatūracijos, užtikrinant veiksmingą heterogeninį elektronų perdavimą, neprarandant fermento katalitinių savybių. Fermento stabilumui įtakos gali turėti kritinių veiksnių, tokių kaip pH, jonų stiprumas, temperatūra, paviršiaus įtempimas, krūviai ir mėginio matrica. Labai svarbu griežtai kontroliuoti visus šiuos kintamuosius (Alarcon-Angeles et al., 2018).

Fermentiniai biologiniai jutikliai gali matuoti specifinį stabilizuotą substratą arba inhibitorių, pasižymintį dideliu specifiškumu ir efektyvumu (Huang et al., 2021). Taip pat fermentiniai BJ pasižymi selektyvumu, jautrumu (Sabu et al., 2019), atkuriamumu (German et al., 2014) ir greitu atsako laiku į analitę, kuris yra proporcingas pastarosios koncentracijai (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014).

1.3. Biologiniuose jutikliuose naudojami fermentai

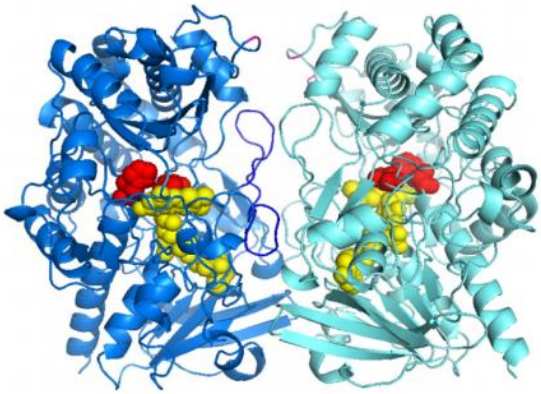
Fermentai yra svarbi baltymų grupė, biologinėse sistemose katalizuojanti chemines reakcijas. Šie katalizatoriai pasižymi dideliu efektyvumu ir selektyvumu (Du Toit & Di Lorenzo, 2014; Huang et al., 2021). Tai 10–400 kDa dydžio molekulės (Navaee & Salimi, 2019). Oksidoreduktazės – fermentų klasė, katalizuojanti oksidacijos-redukcijos reakciją, supaprastinant elektronų perdavimą iš reduktorių (elektronų donorų) oksidatoriams (elektronų akceptoriams). Jie veikia įvairias funkcines grupes, pavyzdžiui, -CHO, -CHOH, $-CH_2-NH_2$, -CH=NH arba $-CH_2-CH_2-$, padedami neorganinių ir organinių kofaktorių. Daugumoje oksidacijos reakcijų elektronai pernešami ADP (adenozindifosfatas) paversti į ATP (adenozin-5-trifosfatas) (Navaee & Salimi, 2019).

Fermentai, naudojami BJ kurti, yra komerciškai prieinami, pasižymintys dideliu grynumu, taip pat specifiškumu ir surišimo galimybėmis, tinkamumu naudoti įvairiais perdavimo metodais ir galimybe aptikti daugybę analitės medžiagų (Hasan et al., 2014).

Gliukozės oksidazė ir gliukozės dehidrogenazė, yra patraukliausi fermentai BJ kurti (Navaee & Salimi, 2019). Šie fermentai skiriasi redokso potencialu, kofaktoriais ir selektyvumu gliukozei (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014; Yoo & Lee, 2010). Tačiau gliukozės oksidazė yra populiariausias fermentas, naudojamas gliukozės BJ gaminti (Martinkova & Pohanka, 2015).

Gliukozės oksidazė pasižymi žemu oksidacijos-redukcijos potencialu – -0,42 V palyginamojo elektrodo $Ag/AgCl_{(KCl)}$ (dažniausiai naudojama 3 M KCl tirpalo koncentracija) atžvilgiu, kai pH siekia 7,4 (Mano, 2019), ir stabilumu temperatūros pokyčiams (Lović et al., 2018; Mano, 2019). Gliukozės oksidazė pasižymi lengva gryninimo procedūra, mažesne kaina ir gebėjimu atlaikyti ekstremalius pH, joninės jėgos ir temperatūros pokyčius nei daugelis kitų fermentų (Sabu et al., 2019), todėl jų gamybos proceso metu gali būti taikomos santykinai lengvesnės sąlygos (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014; Yoo & Lee, 2010).

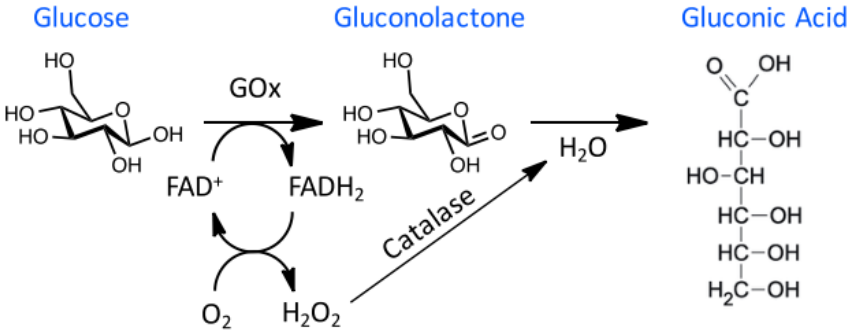
Gliukozės oksidazė buvo išskirta 1928 m. iš *Aspergillus niger* ir *Penicillium glaucum* ekstraktų (Mano, 2019; Martinkova & Pohanka, 2015). GOx molekulinė masė yra apie 150-180 kDa (Wang et al., 2013). Struktūriškai gliukozės oksidazė yra holofermentas, sudarytas iš dviejų identiškų 80 kDa subvienetų, kurių aktyviajame centre yra kofaktorius flavino adenino dinukleotidas (FAD) (žr. 3 pav.). FAD geba atlikti grįžtamąsias oksidacijos-redukcijos reakcijas, todėl veikia kaip kofermentas (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014), kuris katalizės metu atlieka elektronų pernešimo funkciją (Martinkova & Pohanka, 2015).



3 pav. Gliukozės oksidazės 3D struktūra (Janati-Fard et al., 2016)

Gliukozės oksidazė katalizuoja β-D-gliukozės oksidaciją į D-gliukono-δ-laktoną ties pirmąja hidroksilo grupe, naudodama molekulinį deguonį (O_2) kaip elektronų akceptorių ir sinchroniškai generuodama vandenilio peroksidą (H_2O_2). D-gliukono-δ-laktonas vėliau lėtai hidrolizuojamas iki D-gliukono rūgšties, o susidaręs H_2O_2 katalazės fermento yra suskaidomas iki O_2 ir vandens (žr. 4 pav.)

(Du et al., 2012; Dubey et al., 2017; Kausaite-Minkstimiene et al., 2014; Wang et al., 2013; Yoo & Lee, 2010). Susidarę galutiniai produktai suyra spontaniškai (Dubey et al., 2017).



4 pav. Gliukozės oksidazės katalizuojama reakcija (pagal Bruen et al., 2017)

Kadangi fermento aktyvumas priklauso nuo aktyviajame centre esančių aminorūgščių jonizacijos būsenos, pH vaidina svarbų vaidmenį palaikant tinkamą fermento konformaciją. Dauguma baltymų yra aktyvūs tik siaurame pH intervale, dažniausiai 5-9. Gliukozės oksidazės pH optimumas svyruoja nuo 5,0 iki 7,0 (Bankar et al., 2009; Martinkova & Pohanka, 2015), tačiau tiksli pH reikšmė priklauso nuo organizmo, iš kurio buvo išskirta. Daugumos pelėsių ir mielių GOx optimalus pH svyruoja nuo rūgštinio iki neutralaus, pavyzdžiui, *Aspergillus niger* ir *Penicillium chrysogenum* pH nuo 5,0 iki 6,0 (Bankar et al., 2009; Mano, 2019). Optimali temperatūra – 20±2 ºC (Yoo & Lee, 2010).

Dažnai oksidacijos-redukcijos reakcijos metu susidarantis H_2O_2 sumažina fermentų stabilumą, O_2 konkuruoja su redokso mediatoriumi dėl GOx elektronų (Mano, 2019). Tačiau, reikalui esant, to galima išvengti, modifikuojant elektrodą polimero sluoksniu (German et al., 2015) bei deaeruojant tirpalą azotu. Tiesioginė GOx imobilizacija ant pliko elektrodo nėra optimali, nes sunku pasiekti tiesioginį elektronų pernešimą, kadangi GOx oksidacijos-redukcijos aktyviosios vietos yra giliai paslėptos fermento viduje (Mano, 2019; Palanisamy et al., 2014). Todėl, siekiant imobilizuoti GOx ant kietųjų elektrodų paviršiaus, susiduriama su apribojimai: prastas ryšys tarp aktyviojo GOx centro ir elektrodo paviršiaus bei fermento išplovimas. Norint įveikti šias problemas, labai svarbu paruošti tinkamą elektrodų matricą. Nepaisant to, elektrodo matrica neturėtų keisti elektrodo mechaninio stabilumo ir katalizinių GOx savybių (Devasenathipathy et al., 2015). Todėl nanomedžiagos buvo panaudotos kaip matrica gliukozės oksidazės imobilizacijai, kuriant gliukozės BJ (Palanisamy et al., 2014). Siekiant padidinti elektrocheminių biologinių jutiklių ilgaamžiškumą, biologiniai komponentai, sudarantys BJ, turėtų pasižymėti dideliu saugojimo ir veikimo stabilumu (German et al., 2014).

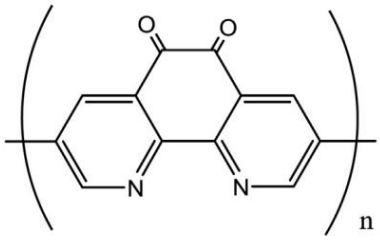
1.4. Mediatoriai biologiniuose jutikliuose

Kuriant elektrocheminius biologinius jutiklius kyla tiesioginė elektronų pernešimo problema (German et al., 2011). Siekiant palengvinti efektyvią elektronų pernešą iš fermento aktyviojo centro prie darbinio elektrodo paviršiaus, BJ naudojami mediatoriai (Radomska et al., 2019).

Veiksmingi mediatoriai turėtų greitai reaguoti su redukuota GOx, kad sumažintų konkurenciją su ištirpusiu molekuliniu deguonimi. Oksidacijos-readukcijos reakcijose dalyvaujančių mediatorių heterogeninė kinetika turėtų būti grįžtamoji, mediatorių oksidacijos-redukcijos potencialas turėtų būti žemas ir oksiduotos, ir redukuotos mediatoriaus formos turėtų būti stabilios, o redukuotoji forma neturėtų reaguoti su ištirpusiu deguonimi. Taip pat mediatoriai turi būti netoksiški ir mažai tirpūs vandeninėje terpėje. Nepaisant reikalavimo būti netirpiems, dauguma tradiciškai naudojamų mediatorių tirpsta abiejose arba bent vienoje iš savo oksidacijos-readukcijos būsenų (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014). Jei mediatorius yra tirpale, jo difuzija prie elektrodo leidžia greičiau perduoti elektronus, palyginus su tiesioginiu perdavimu iš paties fermento. Mediatoriai gali būti polimerizuojami tiesiogiai ant elektrodo paviršiaus arba imobilizuojami kartu su reaguojančiais fermentais, kad dar labiau padidėtų elektronų pernašos greitis (Du Toit & Di Lorenzo, 2014). Dažnai BJ kūrime naudojami tokie mediatoriai kaip ferocenas ir jo dariniai, chinono junginiai, fericianidas, pereinamųjų metalų kompleksai, tioninas, tetratiafulvalenas ir tetracianochinodimetanas bei jų kompleksas, fenazino metosulfatas ir metileno mėlynasis (Kausaite-Minkstimiene et al., 2014).

1,10-Fenantrolin-5,6-dionas yra pirminis chelatinių medžiagų klasės junginys, kuris kartu sudaro daug cheminių junginių su įvairių metalų kompleksais. Šie kompleksai anksčiau buvo tiriami dėl jų gebėjimo veikti kaip oksidacijos-redukcijos proceso indikatoriai kiekybinei analizei, atsižvelgiant į jų aukštą oksidacijos-redukcijos potencialą. FD junginiai gali būti naudojami elektrochemiškai nusodinti arba polimerinti ant elektrodo paviršiaus kaip oksidacijos-redukcijos mediatoriai (Halpin et al., 2021).

FD savo sudėtyje turi du diimininius azoto atomus, leidžiančius prisijungti metalo jonus, ir o-kvinoidinę molekulės dalį, atsakingą už oksidacijos-redukcijos proceso aktyvumą (Goss & Abruña, 1985; Halpin et al., 2021). FD elektroaktyvumas priklauso nuo terpės pH, o šio ligando metalų kompleksai potencialiai leidžia keisti ir kontroliuoti oksidacijos-redukcijos reakcijos savybes plačiame diapazone (Goss & Abruña, 1985). 1,10-Fenantrolin-5,6-diono struktūroje (žr. 5 pav.) yra azometano atmainų, kurios gali užtikrinti efektyvų elektronų priėmimą, taigi ir greitesnį elektronų perdavimo greitį (Halpin et al., 2021).

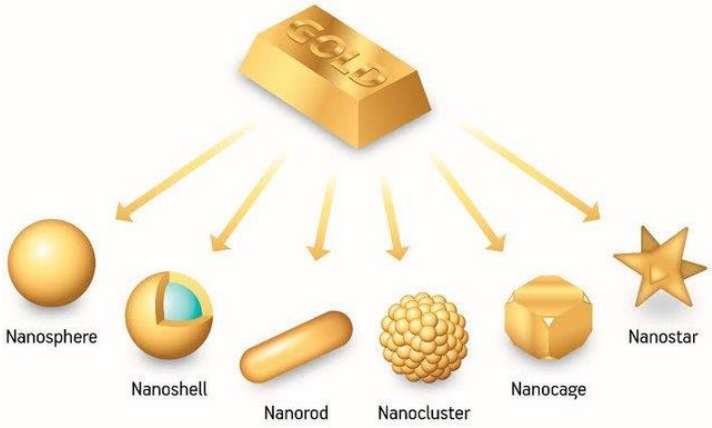


5 pav. 1,10-Fenantrolin-5,6-diono struktūrinė formulė (Halpin et al., 2021)

1.5. Aukso nanomedžiagos

Pastaruoju metu vis didėja nanotechnologijų mokslinis ir pramoninis poveikis analitinėje elektrochemijoje (German et al., 2014). Todėl didelis dėmesys skiriamas tauriųjų metalų nanomedžiagoms (žr. 6 pav.), kurios pasižymi patraukliomis savybėmis bei yra pritaikomos daugelyje sričių, įskaitant katalizę, biologinius jutiklius, elektroniką ir fotoniką (Shajaripour Jaberi et al., 2019).

Kombinuojant nanostruktūras ir elektrocheminius metodus sukurti BJ, pasižymintys dideliu jautrumu, skaidymo galia (Huang et al., 2021), specifiškumu, atkuriamumu ir patikimumu (German et al., 2014). Nanostruktūros biologiniuose jutikliuose paprastai naudojamos siekiant užpildyti tarpą tarp keitiklio ir bioreceptoriaus, padidinant elektrodo darbinį plotą, tokiu būdu vykdant pilnesnę fermento imobilizaciją ant elektrodo paviršiaus. Kuriant elektrocheminius BJ, nanodalelės gali būti naudojamos kaip substratai biomolekulių imobilizavimui, elektrocheminių reakcijų katalizatoriai ar kaip elektronų pernašos stiprikliai (German et al., 2014). Siekiant pagerinti BJ struktūros našumą ir efektyvumą, suteikti galimybę reaguoti, esant žemiems potencialams, bei atlikti greitą elektronų pernašą gali būti naudojamos nanostruktūros, nanodalelės, nanovamzdeliai, nanoporos, lipnūs monosluoksniai ir nanokompozitai (Huang et al., 2021).



6 pav. Tauriųjų metalų (aukso) nanomedžiagos (Piyushkumar et al., 2020)

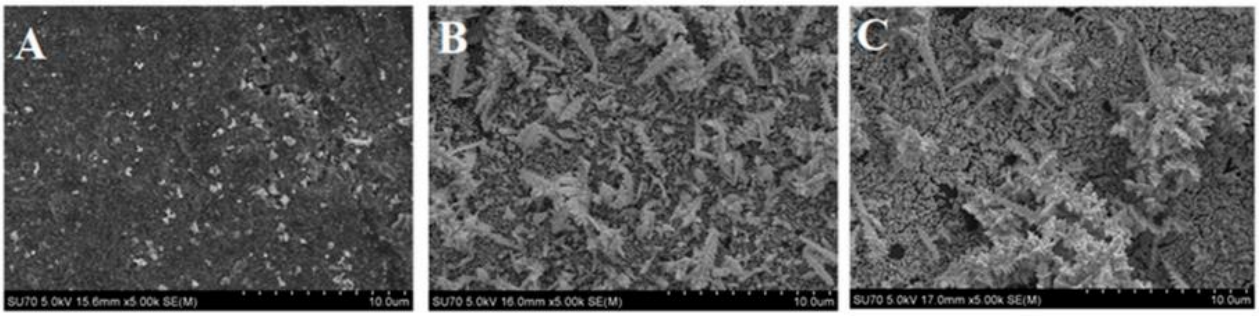
1.5.1. Aukso nanostruktūros

Taurių̨jų metalų (aukso, platinos, sidabro) nanostruktūros veiksmingai panaudotos imobilizuojant biomolekules, ypač fermentus, elektrocheminiams biologiniams jutikliams gaminti, kadangi pasižymi dideliu efektyvaus paviršiaus plotu, didesne masės pernaša, tinkama mikroaplinka ir geru laidumu (Du et al., 2012), kataliziniu poveikiu bei didele laisvojo paviršiaus energija (Shajaripour Jaberi et al., 2019).

Nanostruktūrų pagrindu sukonstruoti biologiniai jutikliai pasižymi dideliu efektyvumu ir jautrumu dėl plataus mėginio stabilizavimo lygio. Sumažinus biologinio jutiklio dydį, galima kurti svarbius klinikinės diagnostikos taikymui pritaikytus BJ, kuriuose sutelkti visi mėginio pateikimui, jutimui ir duomenų apdorojimui reikalingi komponentai (Huang et al., 2021). Taip pat nanostruktūros pasižymi tiesioginiu fermento prisijungimu prie elektrodo paviršiaus, diagnostinio signalo sustiprinimu, biologiniu suderinamumu ir didele adsorbcijos galia (Huang et al., 2021). Taigi, aukso nanostruktūros (AuNS) kelia didelį susidomėjimą dėl savo puikių optinių, katalizinių magnetinių ir cheminių savybių, kurios leidžia jas plačiai taikyti realiuose mėginiuose (Almira Ramanaviciene et al., 2021; Zhang et al., 2018).

Aukso nanostruktūros gali būti sintetinamos įvairiais būdais: drėgnuoju cheminiu metodu, galvaniniu pakeitimu, sėjamojo augimo ir šablonų metodais, hidrotermine redukcija, sinteze per sąsają ir elektrocheminiu nusodinimu (Almira Ramanaviciene et al., 2021). Tiesioginis, ekonomiškas, greitas elektrocheminis AuNS nusodinimas, t. y. auginimas iš $HAuCl_4$ vandeninio tirpalo, potenciostatiniais metodais gali būti atliekamas ant polikristalinio aukso paviršiaus, stikliškosios anglies, grafito elektrodų iš anksto modifikuotų redukuotu grafeno oksidu, arba modifikuotų daugiasluoksnių anglies nanovamzdelių ir aukso nanodalelių hibridine struktūra (Almira Ramanaviciene et al., 2021). AuNS nusodinimas gali būti atliktas, naudojant kvadratinės bangos voltamperometrijos bei chronoamperometrinį (ChA) metodus. Elektrochemiškai sintetinant aukso nanostruktūras, potencialo bei $HAuCl_4$ tirpalo koncentracijos pasirinkimas turi įtakos AuNS morfologijai ir dydžiui (Almira Ramanaviciene et al., 2021).

Kuriant elektrocheminius BJ, nanostruktūromis padengiami elektrodų paviršiai, ant kurių sudaromos 3D AuNS (žr. 7 pav.). Šios struktūros padidina BJ paviršiaus plotą, yra naudojamos kaip elektronų pernašos stiprikliai, elektrocheminių reakcijų katalizatoriai (German et al., 2014).



7 pav. Ant grafito elektrodo elektrochemiškai nusodintos aukso nanostruktūros esant pastoviam 200s -0,2 V potencialui 0,1 M KNO_3 tirpale, kuriame yra skirtingos $HAuCl_4$ koncentracijos: (A) 0,02, (B) 3,0 ir (C) 6,0 mM (Almira Ramanaviciene et al., 2021)

1.5.2. Aukso nanodalelės

Tauriųjų metalų nanodalelės pasižymi geromis laidumo, katalizinėmis savybėmis ir veikia kaip elektronų nešikliai tarp baltymų oksidacijos-redukcijos centro ir elektrodų paviršiaus, didindamos elektrocheminių reakcijų greitį. Elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose elektronų pernašos greitis ant elektrodo gali turėti įtakos jo atsako laikui ir tikslumui. Nanodalelės pagerina elektrocheminio jutiklio atsaką.

Didelis dėmesys skiriamas auksui, platinai ir sidabrui, nes iš jų lengva pagaminti nanodydžio daleles. Plačiausiai naudojamos aukso nanodalelės (AuND), stabilizuojančios baltymus kovalentinių ryšių tarp aukso atomų ir baltymų aminų bei cisteinų grupių pagalba (Huang et al., 2021). Koloidinis auksas yra inertiškas, stabilus ir biologiškai suderinamas (Kalimuthu et al., 2020; Shi et al., 2004). Dar visai neseniai auksas buvo žinomas tik kaip metalas. Tačiau atsiradus nanotechnologijoms ir atradus nanodaleles bei ištyrus fizikines ir chemines aukso savybes, jis tapo aukščiausios kokybės medžiaga biologinių jutiklių kūrimui (Kalimuthu et al., 2020).

Aukso nanodalelės – tai koloidinės submikrometrinio dydžio dalelės (Hammami et al., 2021; Kalimuthu et al., 2020), kurios paprastai yra suspenduotos vandenyje. Tirpalas, kuriame AuND dydis siekia mažiau nei 100 nm, pasižymi koncentruota raudona spalva, didesnio nei 100 nm dydžio AuND tirpalas – mėlyna arba violetine spalva (Abdulbari & Basheer, 2017). AuND yra labai mažos, palyginti su šviesos bangų ilgiais, sugeria mėlynai žalios spektro dalies šviesą (~ 450 nm), atspindi – raudoną šviesą (~ 700 nm) (Hammami et al., 2021). Mažesnės kaip 13 nm nanodalelės yra tinkamesnės fermentų imobilizavimui (German et al., 2014; Huang et al., 2021), nes biomolekulių aktyvumas išlieka nepakitęs. AuND pasižymi funkcionalumu, kuris lemia nanodalelių sukibimo su kitomis molekulėmis, dalelėmis ir paviršiais galimybes. Taip pat susiformavusioms superstruktūroms įtakos gali turėti ne tik dalelių dydis, bet ir dalelių paviršiaus funkcionalumo ir tirpiklio poliškumo pokyčiai (Shi et al., 2004).

Labiausiai paplitę aukso nanodalelės yra elektrocheminiuose, optiniuose ir pjezoelektriniuose biologiniuose jutikliuose. Elektrocheminiuose BJ, kurių pagrindą sudaro aukso nanodalelės, elektronų perdavimą palengvina tai, kad AuND pasižymi patraukliomis savybėmis – dideliu paviršiaus ir tūrio santykiu, didele paviršiaus energija, gebėjimu mažinti atstumą tarp baltymų ir metalo dalelių, veikti kaip elektronų laidininkai (Abdulbari & Basheer, 2017). Aukso nanodalelių naudojimas elektrodo paviršiuje septynis kartus padidina elektronų perdavimo greičio konstantą tarp fermento gliukozės oksidazės ir substrato. Dėl šios priežasties yra sutrumpinamas atsako laikas ir pagerinamas elektrocheminio jutiklio efektyvumas. Todėl galima aptikti femtomolarų ir net vienos molekulės lygmens daleles (Huang et al., 2021).

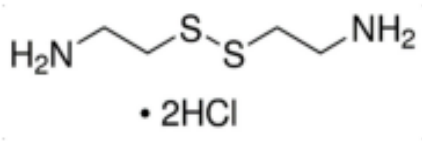
Nuo 1 iki 100 nm dydžio AuND sintetinamos taikant dvi strategijas – „iš viršaus į apačią“ ir „iš apačios į viršų“. Taikant metodą "iš viršaus į apačią" – birios medžiagos palaipsniui suskaidomos iki nanodydžio medžiagų. Tačiau taikant metodą "iš apačios į viršų" – atomai ar molekulės yra surenkamos į nanodydžio molekulines struktūras (Kalimuthu et al., 2020). Aukso nanodalelių sintezei naudojama daugybė fizikinių, cheminių ir biologinių metodų, tačiau populiariausia sintezės strategija – naudojant citrato reduktorių („iš apačios į viršų“), kurį 1951 m. aprašė Turkevitch (Turkevich et al., 1951).

1.6. Fermentų imobilizavimas

Fermentų imobilizavimas yra svarbus biologinių jutiklių kūrimo žingsnis. Fermentų imobilizavimo strategijos naudojamos ne tik siekiant pakartotinai panaudoti brangius fermentus, tačiau taip pat pagerinti fermentų katalitines funkcijas, tokias kaip aktyvumas, stabilumas ir selektyvumas (Wirde et al., 1999).

1.6.1. Cistamino dihidrochloridas

Cistamino dihidrochloridas (mokslinėje literatūroje dar vadinamas cistaminu) yra linijinis alifatinis (Gibrat & Cicchetti, 2011), reaktyvus diaminas (Khalafi et al., 2021), sudarytas iš disulfidinio tiltelio (Gibrat & Cicchetti, 2011). Cistaminas – maža disulfido turinti molekulė su pirminiais aminais abiejuose galuose (žr. 8 pav.). Šis universalus reagentas gali būti naudojamas sulfhidrilo liekanoms įvesti į baltymus, nukleino rūgštis ir kitas molekules arba kaip aktyvioji medžiaga disulfidų mainų susiejimo reakcijose, grįžtamojo konjugavimo procedūrose (Hermanson, 2013b).



8 pav. Cistamino struktūrinė formulė (Wang et al., 2020)

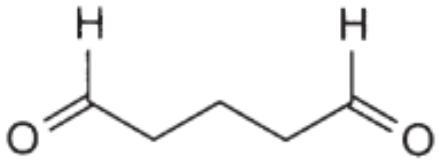
Cistamino dihidrochloridas – tirpus vandenyje, pasižymintis koaguliacijos savybėmis reagentas. CADHCl abiejuose molekulinės grandinės galuose yra teigiamą krūvį turinti aminogrupė, kuri dėl elektrostatinės sąveikos gali veikti kaip koaguliantas (Wang et al., 2020). Taip pat dažnai naudojamas kaip jungiklis vaistų tiekimo sistemose (Khalafi et al., 2021). Cistaminas buvo tiriamas kaip potencialus junginys neurodegeneratyvinėms (Hangtintono ir Parkinsono) ligoms gydyti (Gibrat & Cicchetti, 2011).

CADHCl taip pat naudojamas kaip aktyvuojantis reagentas disulfidinių mainų reakcijose. Šios procedūros metu reagentas naudojamas vieno iš dviejų konjuguojamų baltymų modifikavimui. Cistaminu modifikuotas baltymas sumaišomas su kitu baltymu, kuriame yra sulfhidrilinė grupė arba baltymas yra tiolintas. Vykstant disulfidiniams mainams, sulfhidrilo turinti molekulė suskaido cistaminu modifikuoto baltymo disulfidą, išsiskiria 2-merkaptoetilaminas ir susidaro disulfidinis kryžminis ryšys (Hermanson, 2013b).

Cistaminas ir cisteaminas dažnai naudojami kaip dvifunkciniai statybiniai blokai, kurių sieros atomai jungiasi prie elektrodų paviršiaus (pavydžiui aukso paviršiaus), o aminogrupės gali būti naudojamos kitoms grupėms prie savaime susiformavusio tiolio sluoksnio prijungti. Todėl CADHCl monosluoksniai gali būti naudojami mikroperoksidazės, glutationo reduktazės, fruktozės dehidrogenazės, gliukozės dehidrogenazės ar gliukozės oksidazės imobilizavimui ant elektrodų paviršiaus (Wirde et al., 1999). Taip pat cistamino dihidrochloridas gali padidinti bendrą elektrodo paviršiaus plotą, suteikdami galimybę tvirčiau ir stabiliau prisitvirtinti fermentams (Han et al., 2013).

1.6.2. Glutaro aldehidas

Kovalentinis fermentų imobilizavimas naudojant glutaro aldehidą (GA) yra viena iš dažniausiai naudojamų fermentų imobilizavimo technologijų (Betancor et al., 2006; Lović et al., 2018). GA yra homobifunkcinis junginys, turintis aldehido liekanų abiejuose anglies atomų grandinės galuose (žr. 9 pav.). Šis junginys gali susieti baltymus, sudarydamas stabilias antrines aminines jungtis (Hermanson, 2013a). Glutaro aldehidas yra dvifunkcinis reagentas, galintis reaguoti su dviem pirminėmis amino grupėmis. Įrodyta, kad šios GA grupės užtikrina intensyvų fermentų ir kietųjų paviršių kryžminimą esant įvairioms reakcijos sąlygoms (Guisan et al., 2020).



9 pav. Glutaro aldehido struktūrinė formulė (Hermanson, 2013c)

Glutaro aldehidas kambario temperatūroje yra bespalvis, aštraus kvapo skystis (Migneault et al., 2004; Pal et al., 2013). Tai lengvai prieinamas, ekonomiškas, reaktyvus reagentas (Guisan et al., 2020; Pal et al., 2013), kuris visomis proporcijomis tirpsta vandenyje ir alkoholyje, taip pat organiniuose tirpikliuose (Migneault et al., 2004).

Glutaro aldehidas yra universalus reagentas (Betancor et al., 2006), plačiai naudojamas biomedicinoje (Pal et al., 2013). Tai dialdehidas, kurio aldehidinės grupės pasižymi reaktyvumu ir gebėjimu sudaryti kovalentinius ryšius su funkcinėmis grupėmis, tokiomis kaip aminai, tioliai, fenoliai, hidroksilas ir imidazolai (Migneault et al., 2004; Pal et al., 2013). Jis greitai reaguoja su amino grupėmis, esant neutraliam pH ir yra efektyvesnis už kitus aldehidus (Migneault et al., 2004).

Siekiant imobilizuoti fermentus ant įvairių kietųjų paviršių (atramų), glutaro aldehidas gali būti naudojamas dviem būdais:

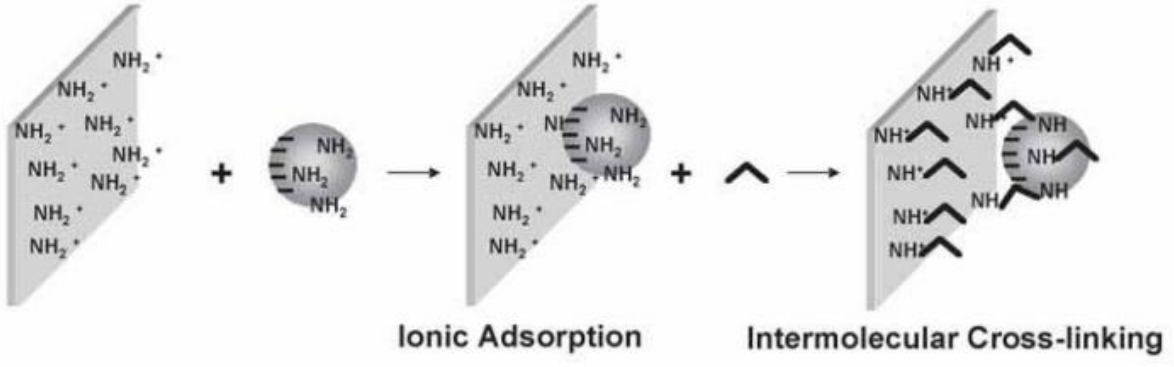
1. Baltymų imobilizavimui ant aminuotų laikiklių, iš anksto aktyvuotų GA tirpalu.
2. Apdorojant baltymus, adsorbuotus ant atramų, turinčių pirmines aminogrupes (Betancor et al., 2006).

Pirmuoju atveju baltymų imobilizavimas ant GA tirpalu iš anksto aktyvuotų matricų yra gana paprastas ir veiksmingas, o kai kuriais atvejais pagerina fermento stabilumą imobilizuojant kelis subvienetus. Šios atramos gaunamos glutaro aldehidu derivatizuojant matricą, turinčią pirmines aminogrupes, kuri gali būti laikoma heterofunkcine matrica. Prieš kovalentinį baltymų mainų procesą ant kietųjų paviršių vyksta joninis baltymų keitimasis (žr. 10 pav.) (Betancor et al., 2006).



10 pav. Baltymų imobilizavimo procesas ant aminuotų laikiklių, iš anksto aktyvuotų glutaro aldehido tirpalu (Betancor et al., 2006)

Antruoju atveju baltymai, adsorbuoti ant katijoninių atramų, turinčių pirminių aminogrupių, yra apdorojami GA tirpalu. Fermentas jonizacijos būdu adsorbuojamas ant jonitinio mainų nešiklio ir švelniomis sąlygomis apdorojamas glutaro aldehido tirpalu. Visos fermento ir atramos pirminės aminogrupės turi būti aktyvuotos viena GA molekule (gali įvykti atramos ir fermento kryžminis sujungimas). Šios GA grupės gali skatinti intensyvų jungimąsi įvairiomis reakcijų sąlygomis (žr. 11 pav.) (Betancor et al., 2006).



11 pav. Baltymų, adsorbuotų ant aminintų katijoninių nešiklių, kryžminis sujungimas naudojant glutaro aldehido tirpalą (Betancor et al., 2006)

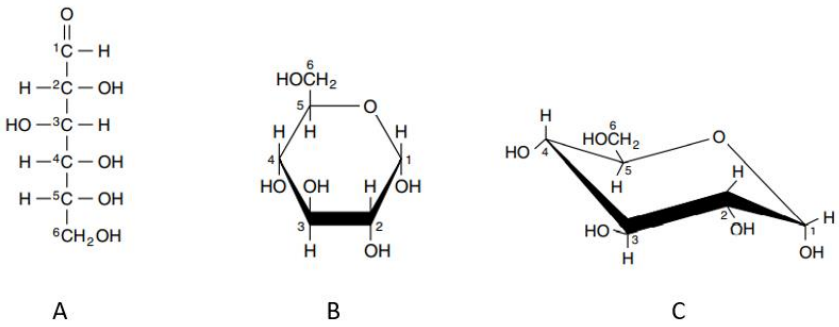
Imobilizavimas kovalentiniu būdu, prisitvirtinant prie vandenyje netirpių nešiklių per GA, yra vienas iš paprasčiausių ir švelniausių fermentų technologijos jungimo metodų (Migneault et al., 2004).

1.7. Gliukozė

D-gliukozė – monosacharidas (arba paprastasis cukrus), vienas svarbiausių angliavandenių biologijoje (Genova et al., 2007; Shendurse & Khedkar, 2016). Gliukozė pirmą kartą 1747 m. buvo išskirta iš razinų (Shendurse & Khedkar, 2016). Šis monosacharidas negali būti hidrolizuojamas į paprastesnius angliavandenius. Priklausomai nuo anglies atomų skaičiaus jie gali būti klasifikuojami kaip triozės, tetrozės, pentozės, heksozės arba heptozės. Taip pat priklausomai nuo to, ar juose yra aldehido, ar ketono grupė – kaip aldozės arba ketozės (Mayes, 2003).

Gliukozės molekulinė formulė – $C_6H_{12}O_6$, molekulinė masė – 180,16 g/mol. Šis miltelių pavidalo monosacharidas lengvai tirpsta vandenyje. Žemesnėje nei +50 ^oC temperatūroje α-D-gliukozės hidratas yra stabilus. Tuo tarpu +50 ^oC temperatūroje gaunama bevandenė forma, o aukštesnėje temperatūroje – α-D-gliukozė (Shendurse & Khedkar, 2016).

Gliukozės molekulė gali būti atviros grandinės (aciklinė forma) ir žiedo (ciklinė forma) pavidale (žr. 12 pav.). Vandens tirpale šios formos yra pusiausvyroje, o pH 7,0 tirpale vyrauja ciklinė forma (Genova et al., 2007). Ciklinės gliukozės konformacijos skirstomos į žiedo ir „kėdės“ (Mayes, 2003; Sreeranjit, C. V. K., Lal, 2003).



12 pav. Gliukozės struktūrinės formos: A – atvira grandinė, B – Haworth projekcija, C – „kėdės“ forma (Mayes, 2003; Sreeranjit, C. V. K., Lal, 2003)

Ląstelės gliukozę naudoja kaip energijos šaltinį ir tarpinę medžiagų apykaitos procesuose. Gliukozė yra vienas pagrindinių fotosintezės produktų, nuo kurio prasideda ląstelinis kvėpavimas tiek prokariotuose, tiek eukariotuose. Gliukozę sudaro šeši anglies atomai ir aldehidinė grupė, todėl ji vadinama aldoheksoze (Genova et al., 2007). Gliukozė yra plačiai paplitęs paprastasis cukrus, augaluose sintetinamas fotosintezės būdu ir paprastai saugomas polisacharidų pavidalu. Gyvūnų maiste esantys angliavandeniai po virškinimo gliukozės pavidalu difunduoja į kraują ir yra įsisavinami kepenyse. Kepenyse gliukozė naudojama kitų angliavandenių sintezei, taip pat kaip pagrindinis organizmų audinių kuras (energijai gaminti) (Sreeranjit, C. V. K., Lal, 2003). Šis angliavandenis gyvūnuose saugomas glikogeno (kepenų arba raumenų glikogenas), o augaluose – krakmolo arba celiuliozės pavidalu (Sreeranjit, C. V. K., Lal, 2003).

1.8. Elektrocheminiai metodai

Elektrocheminiai analizės metodai grindžiami srovės pokyčių, potencialo, laidumo tarp dviejų elektrodų, impedanso ir lauko efekto matavimu. Šie metodai skirstomi į dvi kategorijas: statinius (kai srovė lygi nuliui) ir dinaminius (kai srovė teka). Statiniams metodams priskiriama tiesioginė potenciometrija ir potenciometrinis titravimas, o dinaminiams – potenciostatinis (su potencialo kontrole) ir galvanostatinis (su kontroliuojama srove) metodai. Potencialo kontrolės metodai apima voltamperometriją ir polarografiją, o srovės kontrolės metodai – amperometriją (Huang et al., 2021). Biologiniuose jutikliuose, naudojant tam tikrą elektrocheminį metodą, cheminis signalas yra paverčiamas į išmatuojamą elektrinį signalą (Huang et al., 2021; Lakard, 2020).

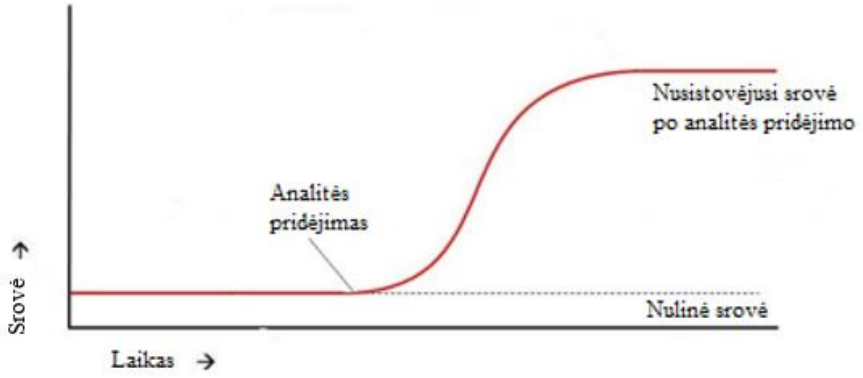
Elektrochemines matavimo sistemas paprastai sudaro darbinis ir palyginamasis elektrodai. Palyginamasis elektrodas gali būti gaminamas iš $Ag/AgCl_{(KCl)}$ (dažniausia naudojamas 3 M koncentracijos KCl tirpalas), taip pat moksliniuose tyrimuose naudojamas kalomelio palyginamasis elektrodas, o darbinis elektrodas veikia kaip keitiklis. Taikant potencialo valdymo metodus, darbinio elektrodo potencialas reguliuojamas palyginamojo elektrodo atžvilgiu. Todėl būtina išlaikyti pastovų palyginamojo elektrodo potencialą. Tais atvejais, kai per palyginamąjį elektrodą tekanti srovė keičia

jo potencialą, srovei praleisti naudojamas trečiasis elektrodas, vadinamas pagalbiniu elektrodu. Tokiose trijų elektrodų sistemose sukuriama srovė tarp palyginamojo ir darbinio elektrodų, o pagalbinis elektrodas naudojamas pastoviam potencialui palaikyti (Huang et al., 2021).

Daugelis cheminių medžiagų yra elektroaktyvios ir redukuojasi arba oksiduojasi, kai tarp elektrodų, panardintų į tirpalą, kuriame yra tos cheminės medžiagos, skleidžiamas elektrinis potencialas. Vykstant šioms oksidacijos-redukcijos reakcijoms elektronai perduodami, todėl tarp elektrodų per tirpalą teka srovė. Ši srovė (vadinama Faradėjaus srove) yra susijusi su medžiagos, dalyvaujančios oksidacijos-redukcijos reakcijoje, koncentracija (Franklin et al., 2016).

Ampermetriniu (chronoamperometriniu) metodu matuojamas srovės intensyvumas, atsirandantis dėl elektroaktyviųjų jonų aktyvumo kitimo elektrocheminės reakcijos metu, esant pastoviam potencialui bei kintant laikui. Amperometrija grindžiama ryšiu tarp emisijos srovės stiprumo ir elektroaktyvaus junginio koncentracijos. Amperometriniai biologiniai jutikliai yra jautresni už potenciometrinius BJ. Darbinis elektrodas yra padengtas biologiniu atpažinimo elementu ir veikia kaip keitiklis (Huang et al., 2021). Šio tipo biologiniuose jutikliuose matuojama srovė, susidaranti oksiduojantis ar redukuojantis elektroaktyviam biologiniam elementui (Lakard, 2020). Kadangi ampermetriniuose biologiniuose jutikliuose turi būti kontroliuojamas veikimo potencialas, naudojama trijų elektrodų elektrocheminė sistema. Tokiu būdu, neleidžiant srovei tekėti pagrindine sistema, potencialų skirtumas tarp palyginamojo ir darbinio elektrodų laikui bėgant išlieka pastovus. Kadangi dauguma analičių nėra elektroaktyvios, elektronų pernešimui prie darbinio elektrodo paviršiaus naudojami mediatoriai (Huang et al., 2021).

Amperometrija yra paprasčiausias metodas, kai vienu metu (t_0 pradinio laiko momentu) prijungiama vienkartinė įtampa ir matuojama srovė, atsirandanti dėl prijungto potencialo (žr. 13 pav.). Pradinė įtampa tarp darbinio ir palyginamojo elektrodo įjungiama taip, kad darbinio elektrodo paviršiuje nevyksta jokios elektrocheminės reakcijos ir elemente neteka grynoji srovė. Tam tikru laiko momentu potencialas pakeliamas iki naujos įtampos, kuri yra neigiamesnė už pradinę įtampą, todėl beveik visas elektrodo paviršiuje esantis deguonis akimirksniu redukuojamas, o bet koks papildomas deguonis, kuris difuzijos būdu patenka į elektrodo paviršių, iš karto reaguoja taip, kad deguonies koncentracija elektrodo paviršiuje iš esmės yra lygi nuliui. Po tam tikro laiko potencialas vėl pakeliamas iki įtampos, kuri leidžia elektrodo paviršiuje esančiam redukuotam deguoniui vėl oksiduotis ir eksperimentas baigiamas (Franklin et al., 2016).



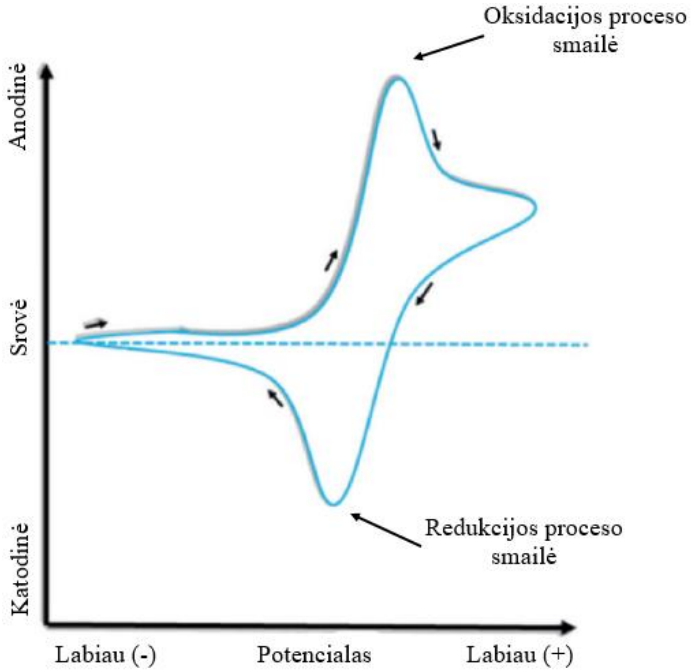
13 pav. Principinė amperograma (Jin & Maduraiveeran, 2018)

Voltamperometrija yra priskiriama potencialo kontrolės metodui. Pagal potencialo tipą (nuolatinė arba kintamoji srovė) ir jo taikymo būdą (skenavimas, impulsas ir kvadratinė banga) sukuriami skirtingi voltamperometrijos tipai – ciklinė, diferencinė impulsinė ir kvadratinės bangos voltamperometrijos. Voltamperometrijos metu matuojama srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo, susidariusio tarp palyginamojo ir darbinio elektrodų (Huang et al., 2021; Lakard, 2020).

Atliekant voltamperometrinę analizę, tarp dviejų elektrodų paprastai įjungiama įtampa ir matuojamas celėje tekantis srovės stipris. Siekiant, jog tekėtų srovė, abiejuose elektroduose turi vykti oksidacijos-redukcijos reakcijos, tačiau svarbi tik reakcija darbiniame elektrode. Daugelyje voltamperometrinių analizių darbinis elektrodas yra poliarizuojamasis, o tiriamasis tirpalas yra stiprus elektrolitas, taigi geras jonų laidininkas. Jei tiriamasis tirpalas nėra stiprus elektrolitas, laidumui padidinti galima pridėti foninio elektrolito, pavyzdžiui, NaCl. Susidaręs dvigubas sluoksnis prie darbinio elektrodo yra labai plonas, šioje srityje susidaro dideli elektriniai laukai, suteikiantys energijos, reikalingos elektronų perdavimui ir sukeliantys analizuojamos medžiagos oksidacijos-redukcijos reakciją (Franklin et al., 2016).

Atvirkštinis svyravimas ciklinės voltamperometrijos (CV) metu suteikia papildomos informacijos, padedančios identifikuoti medžiagas. Taip pat, medžiaga verčiama atgal į pradinę formą, todėl gali būti išvengta nepageidaujamos medžiagos kaupimosi. Analizuojant smailių viršūnes ciklinėje voltamperogramoje (žr. 14 pav.) galima nustatyti daug faktų apie elektrodo paviršiuje vykstančias chemines reakcijas, apie elektrocheminiame procese dalyvaujančių elektronų skaičių bei analitės koncentraciją (Franklin et al., 2016). Kol elektrodo potencialas nuskaitomas srityje, kurioje nevyksta krūvio pernaša (nuo pradinio potencialo iki kylančios smailės formos atsako dalies), registruojama tik nedidelė srovė, nes elektrodo ir tirpalo tarpfazė pasižymi talpa, priklausančia nuo elektrodo potencialo, kurio pokyčiai sukelia jonų ir molekulių, esančių šalia elektrodo, orientacijos pokyčius. Kai potencialas pasiekia sritį, kurioje vyksta elektrocheminė reakcija, registruojama Faradėjaus srovė, kuri staigiai didėja, kol pasiekia maksimumą, vėliau – tolygiai mažėja. Tokią smailės formą lemia kompromisas tarp didėjančio elektrodinės reakcijos greičio, kai potencialas

tampa vis tinkamesnis jai vykti (vyrauja kylančioje smailės dalyje), ir didėjančio difuzinio sluoksnio storio dėl laipsniško depoliarizatoriaus išeikvojimo didėjančiu atstumu nuo elektrodo paviršiaus (vyrauja mažėjančioje dalyje). Todėl didžiausia srovė registruojama esant potencialui, kai šie neutralizuojantys poveikiai atsveria vienas kitą, kai analitės koncentracija elektrodo paviršiuje dar nėra nukritusi iki nulio (Bontempelli & Toniolo, 2009).



14 pav. Principinė ciklinė voltamperograma (Taherpour & Mousavi, 2018)

Pastaraisiais metais kuriant biologinius elektrocheminius jutiklius, kuriuose derinamos nanostruktūros ir elektrocheminiai metodai, buvo pasiekta didelė šių sistemų jautrumo ir analitinės galios pažanga (Huang et al., 2021).

1.9. Elektrodai

Biologiniai jutikliai pasižymi plačiu keitiklių ir gamybos elementų paviršių pasirinkimu (Annu et al., 2020). Biologinių medžiagų nustatymui (kaip darbiniai elektrodai) naudojami įvairūs anglies pastos, boru legiruoto deimanto, stikliškosios anglies, grafeno pastos, rutenio (Purushothama et al., 2018), aukso ir platinos (Abdulbari & Basheer, 2017), grafito nanovamzdelių (Liu et al., 2018) elektrodai. Iš įvairių anglies pagrindo elektrodų plačiai paplitę grafito strypai (Purushothama et al., 2018).

1997 m. pabaigoje grafito strypas buvo identifikuotas kaip nebrangus, lengvai prieinamas ir atsinaujinantis elektrodas. Tai – grafito nanokompozitas, gaunamas įterpiant molio daleles ant daugelio substratų, taikant švelnią jėgą. Šie grafito strypai vadinami „grafito armuotąja anglimi“ ir ruošiami maišant natūralų grafitą (75–80 %) su organine rišamąja medžiaga (13 %) ir verpstės alyva (8 %). Paruoštas grafito mišinys spaudžiamas į strypo formą ir dehidratuojamas +100-300 °C

temperatūroje, kepinamas +1000 °C temperatūroje. Grafito ruošimo procesas vyksta inertinių dujų atmosferoje, siekiant išvengti deformacijos. Nedidelio dydžio laidūs grafito strypai yra sudaryti iš daugybės grafeno sluoksnių, kurie yra persipynę grafito gabalėlių dalelėmis, nepaisant to, kad yra nelaidžių molio dalelių (Annu et al., 2020).

Mokslininkų dėmesio traukos centu grafito elektrodai tapo dėl sp^2 hibridizuotos anglies, kuri pasižymi gera adsorbcija, laidumu, dideliu jautrumu, mažesne fonine srove, paprastu paruošimu ir paviršiaus modifikavimo savybėmis (Purushothama et al., 2018). Nemodifikuotų, plikų elektrodų paviršiai nėra labai jautrūs, todėl negali būti naudojami mažų koncentracijų lygio nustatymui, kadangi elektrodų paviršius sąveikauja su medžiagomis ir oru. Kietosios dalelės iš aplinkos arba tiriamos oksidacijos-redukcijos sistemos liekanos blokuoja aktyviąsias keitiklio vietas, o aplinkos arba potencialo sukelta oro sąveika su elektrodų medžiagomis (ypač anglies elektrodais) oksiduoja paviršių. Oksiduotas paviršius pasižymi dideliu polinkiu į polinių molekulių adsorbciją dėl polinių deguonies turinčių funkcinių grupių ir didelio drėkinamumo. Dėl šios priežasties elektrodas visiškai (arba iš dalies) užsikemša ir pasižymi mažu reakcijos greičiu bei mažiau atkuriamais konkrečios analitės rezultatais. Jei tiriamoji analitė tinkamai nepašalinama nuo elektrodo paviršiaus, tai gali sukelti didelį paviršiaus užterštumą, todėl elektrodo paviršiaus pirminis apdorojimas yra labai svarbus. Pirminis apdorojimas ne tik išvalo elektrodo paviršių, bet taip pat pakeičia paviršiaus cheminę sudėtį ir mikrostruktūrą, todėl ilgainiui daro įtaką elektrodo jautrumui tikslinėms analitėms. Atliekant elektrocheminius matavimus paruoštas elektrodas turi pasižymėti dideliu cheminių ir elektrinių savybių atkuriamumu (Rana et al., 2019)

Nustatyti įvairūs būdai, kaip aktyvuoti elektrodą atliekant išankstinį apdorojimą ir gauti atkuriamus bei jautrius rezultatus. Anglies pagrindo elektrodai yra plačiai naudojami elektroanalizei, todėl mokslininkų dėmesys sutelktas į anglies medžiagų pagrindu pagamintų elektrodų pirminio apdorojimo metodus: mechaninis poliravimas ir valymas tirpikliais, vakuuminis terminis apdorojimas, terminis apdorojimas lazeriu, apdorojimas mikrobangų plazma, apdorojimas radijo dažnio plazma, elektrocheminis poliarizavimas. Tačiau prieš bet kokį pirminį apdorojimą, mechaninis poliravimas atliekamas siekiant pašalinti iš aplinkos adsorbuotas daleles arba ankstesnio naudojimo liekanas, kad paviršius būtų šviežias. Paprastai mechaninis poliravimas yra ne savarankiškas pirminio apdorojimo būdas, o pirmasis apdorojimo procedūros etapas (Rana et al., 2019).

2. Metodinė dalis

2.1. Naudoti reagentai

Acetatinis buferinis tirpalas – maišomi 0,05 M natrio acetato buferio (CH_3COONa x $3H_2O$ (Reanal, Vengrija)) ir 0,1 M kalio chlorido (KCl (Lachema, Čekija)) koncentracijų tirpalai. Naudojamas pH 6,0 rūgštinis tirpalas.

Druskos rūgšties tirpalas – skiedžiamas 37 % HCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Vokietija) tirpalas distiliuotu vandeniu. Naudojamas paruoštas 1 M koncentracijos tirpalas.

Cistamino dihidrochlorido tirpalas – atitinkamas kiekis cistamino dihidrochlorido (Fluka, Kinija ($C_4H_{12}N_2S_2$ x 2HCl)) tirpinamas distiliuotame vandenyje. Tyrimuose naudojami 1-20 mM koncentracijos tirpalai.

1,10-Fenantrolin-5,6-diono tirpalas – atitinkamas kiekis FD (SigmaAldrich, JAV) tirpinamas etanolyje (UAB „Gintarinė vaistinė“, Lietuva). Naudojamas 38 mM koncentracijos mediatoriaus tirpalas.

Gliukozės oksidazė – naudojamas 25 mg/mL koncentracijos specifinio aktyvumo (201 U/mg) fermentas išskirtas iš grybelio *Aspergillus niger* (Fluka, Šveicarija,). Siekiant išlaikyti fermento stabilumą ir aktyvumą, GOx tirpalas laikomas šaldymo kameroje (-20 °C).

Šlapimo rūgšties tirpalas – ruošiamas iš šlapimo rūgšties (AppliChem GmbH, Vokietija) svėrinio, tirpinamo kalio hidroksido (Reanal, Vengrija) tirpale iki 0,01–0,30 mM koncentracijos.

Vitamino C tirpalas – ruošiamas tirpinant tam tikrą vitamino C (Fluka Chemie GmbH, Šveicarija) kiekį distiliuotame vandenyje iki 0,01–0,20 mM koncentracijos.

Naudoti angliavandenių tirpalai buvo ruošiami tirpinant tam tikrą atitinkamos medžiagos kiekį distiliuotame vandenyje. Gliukozės darbinis tirpalas naudojamas praėjus 24 val. po jo paruošimo, nes turi įvykti dalinė mutarotacija ir nusistovėti pusiausvyra tarp α ir β gliukozės formų. Angliavandenių tirpalų charakteristikos pateikiamos 1 lentelėje.

1 lentelė. Tyrimų metu naudotų angliavandenių tirpalai

Tirpalo pavadinimas	Koncentracija, M	Gamintojas	Kilmės šalis
D(+)-gliukozė	1,0	Carl Roth GmbH & Co. KG	Vokietija
D(-)-fruktozė			
D(-)-manozė			
D(-)-galaktozė			
D(-)-ksilozė			
D(-)-sacharozė			

Taip pat naudota:

1. **Aukso tetrachloratas** – 6,0 mM $HAuCl_4$ (SigmaAldrich, JAV).
2. **Kalio nitratas** – 0,1 M KNO_3 (Acros Organic, JAV).
3. **Taninas** – $C_{76}H_{52}O_{46}$ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Vokietija).
4. **Natrio citrato dihidratas** – $Na_3C_6H_5O_7$ (Penta, Čekija).
5. **Al_2O_3 milteliai** (Electron Microscopy Sciences, JAV).
6. **25 % glutaro aldehido tirpalas** (Fluka Chemie GmbH, Šveicarija).
7. **Realūs objektai** (žmogaus seilės ir serumas, migdolų pienas ir mandarinų sultys).

2.2. Tyrimuose naudota įranga

Techniniam darbinio elektrodo paruošimui naudojami 3 mm, 99,999 % grynumo ir mažo tankio grafito strypeliai (Sigma-Aldrich, JAV). Strypeliai šlifuojami stambiu ir smulkiu švitriniu popieriumi, izoliuojami silikono vamzdeliais.

Birių reagentų svėrimams naudojamos analizinės svarstyklės „ABJ 120-4M“ (KERN & SOHN GmbH, JAV). Ruošiamų mažo tūrio tirpalų maišymui – purtyklė MS1 Minishaker IKA (USA). AuND tirpalo ruošimui naudojama maišyklė/kaitinimo prietaisas TechnoKartell (Italija). Paruoštų 13 nm AuND sugerties spektrų fiksavimui naudojamas spektrometras „Lambda 25 UV/VIS“ (JAV) ir 1 cm skersmens plastiko kiuvetės „Brand“ (Vokietija).

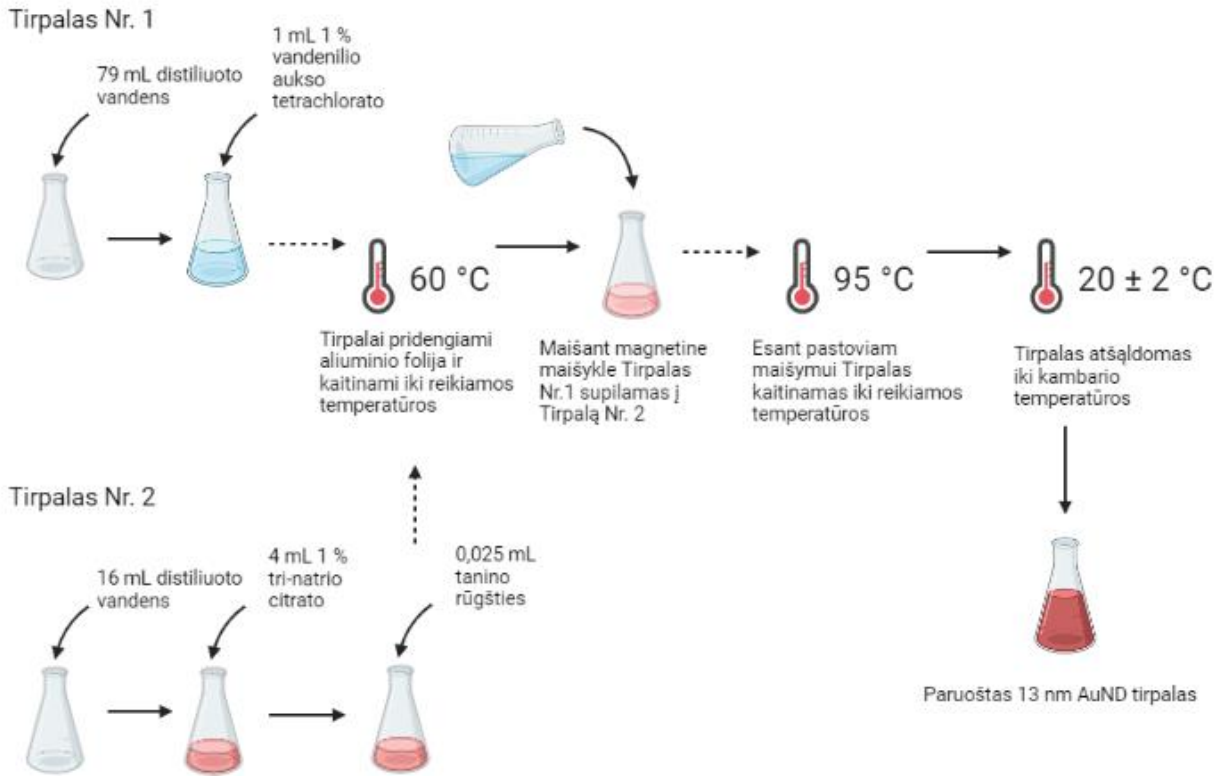
Acetatinio buferinio tirpalo pH nustatymui naudojamas pH-metras (Thermo Electron Corporation, JAV). Ultragarso vonelėje „Bandelin Sonorex” (Vokietija) disperguojamas FD tirpalas. Tyrimo metu analitės pridėjimui naudojamos įvairaus tūrio (0,1 – 1000 μL) automatinės pipetės Ependorf research (Ependorf, Vokietija). Tam tikros temperatūros palaikymui naudojamas termostatas Termostat TC-80M-2 (Rusija).

Registruojant ciklines voltamperogramas bei chronoamperogramas naudojamas kompiuterizuotas potenciostatas „PGSTAT 302N/Autolab“ (Eco Chemie BV, Olandija) su „GPES 4,9“ programine įranga. 100 mL talpos elektrocheminė celė iš prietaiso komplekto ir trys elektrodai: darbinis (imobilizuotas grafito strypelis), lyginamasis Ag/AgCl su 3,0 M KCl „Metrhom“ (Herisau, Šveicarija), pagalbinis (spiralės formos platinos vielutė). Matavimų metu maišant tirpalą ir analitę naudojama magnetinė maišyklė „IKA“ (Werke GmbH & Co. KG, Vokietija).

Grafinis ir statistinis duomenų apdorojimas vykdomas „SigmaPlot 12,5“ matematine programa (Systat Software, Inc). Darbo schemos brėžiamos naudojant „Biorender“ programą.

2.3. Aukso nanodalelių ir nanostruktūrų sintezė

Tyrimuose naudojamos sintetintos aukso nanodalelės ir aukso nanostruktūros. Aukso nanodalelių sintezės schema („iš apačios į viršų“ sintezei naudojant citrato reduktorių) pateikiama 15 paveiksle.



15 pav. Aukso nanodalelių sintezės schema. Sudaryta autoriaus naudojant „Biorender“ programą

Aukso nanostruktūrų sintezė atliekama iš 6,0 mM chloro aurato rūgšties ($HAuCl_4$) ir 0,1 M kalio nitrato (KNO_3) tirpalų. Susintetintomis nanostruktūromis, pasitelkiant chronoamperometrinį metodą, padengiamas grafito elektrodas. Elektrocheminis potencialas siekia -0,4 V, padengimo laikas – 400 s (Almira Ramanaviciene et al., 2021).

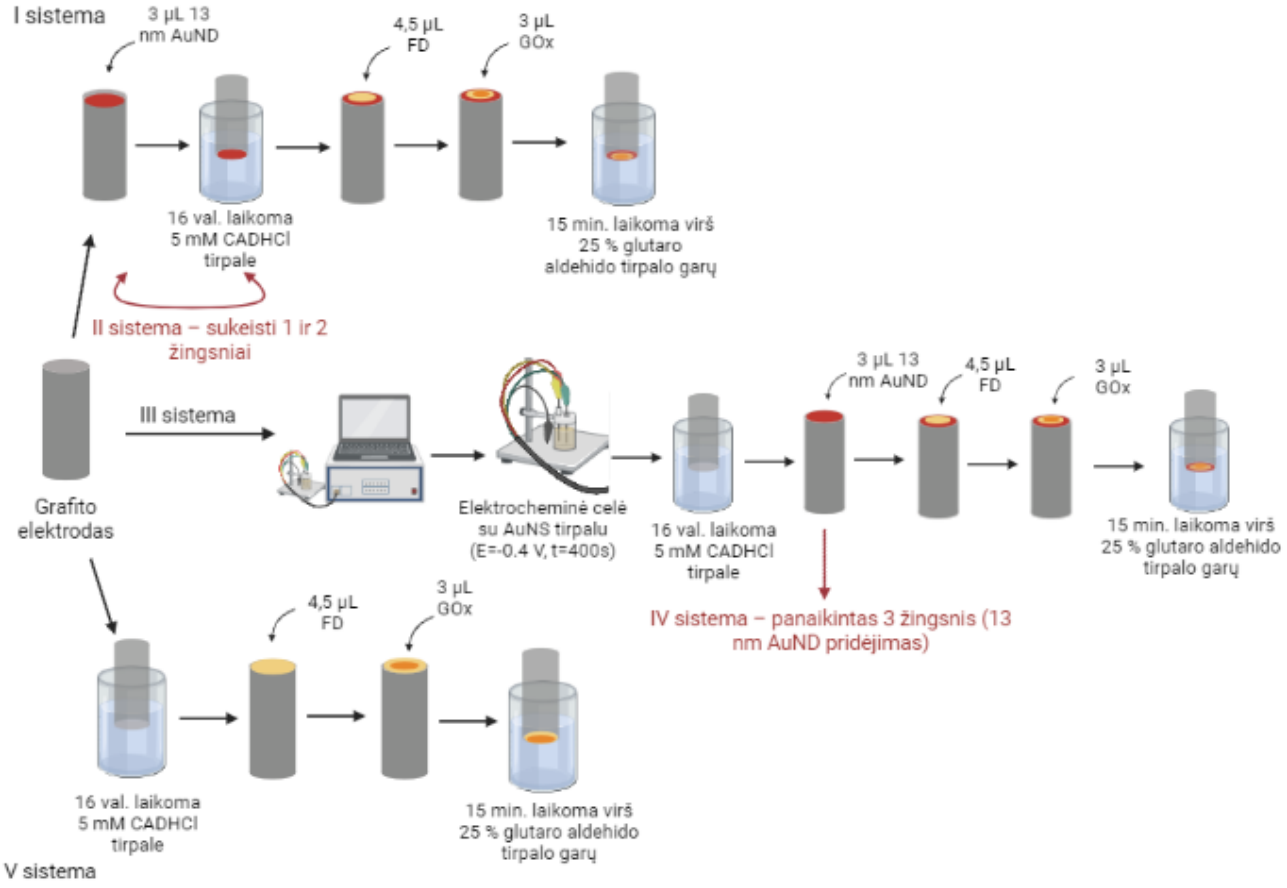
2.4. Spektrometriniai matavimai

Atlikus 13 nm aukso nanodalelių sintezę, siekiama įvertinti paruoštų AuND bangos ilgį ir absorbcijos dydį. Sugerties spektras registruojamas spektrometru palyginimui naudojant distiliuotą vandenį. Spektrometro bangos ilgis skleidžiamas nuo 400 iki 800 nm. Gautas rezultatas apdorojamas „SigmaPlot 12,5“ kompiuterine programa.

2.5. Grafito elektrodo paruošimas

Tyrimuose naudojami darbiniai grafito elektrodai, kurių paruošimas yra pagrindinis biologinio jutiklio kūrimo etapas. GE modifikuojami atitinkamai aukso nanodalelėmis ar aukso nanostruktūromis, pasitelkiant skirtingus imobilizavimo komponentus. Darbinių elektrodų paruošimo

schema ir pridedamų medžiagų kiekiai bei imobilizavimo laikas pateikiami 16 paveiksle. Tyrimų metu naudotas 4 val., 16 val. ir 26 val. imobilizavimo laikas. Darbiniai elektrodai CADHCl tirpale laikomi termostate (+31 ^{o}C), kambario temperatūroje (+21 ^{o}C) ir šaldytuve (+4 ^{o}C) temperatūrose.



16 pav. Grafito elektrodų paruošimo schema naudojant cistamino dihidrochlorido tirpalą. Sudaryta autoriaus naudojant „Biorender“ programą

Grafito elektrodo paruošimą galima išskirti į du etapus. Pirmasis etapas apima grafito elektrodo šlifavimą. Šis žingsnis atliekamas prieš GE padengimą įvairiais komponentais. Grafito strypelio paviršius sukamaisiais judesiais šlifuojamas naudojant įvairaus grūdėtumo švitrinį popierių. Šlifuojama iki veidrodinio blizgesio švitrinio popieriaus grūdėtumo mažėjimo tvarka nuo stambiausio iki smulkiausio imtinai. Atlikus šlifavimą elektrodo paviršius valomas Al_2O_3 pasta, turinčia 0,3 mikronų dydžio grūdelius, kuri nuplaunama distiliuotu vandeniu ir GE džiovinamas kambario temperatūroje (+20±2 ^{o}C). Grafito elektrodo šoninis paviršius izoliuojamas silikoniniu vamzdeliu. Vykdomas antrasis GE paruošimo etapas – elektrodo imobilizavimas. Atliekant imobilizacijos būdo paiešką ruošiamos sistemos:

I) GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

II) GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA

III) GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA

IV) GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA

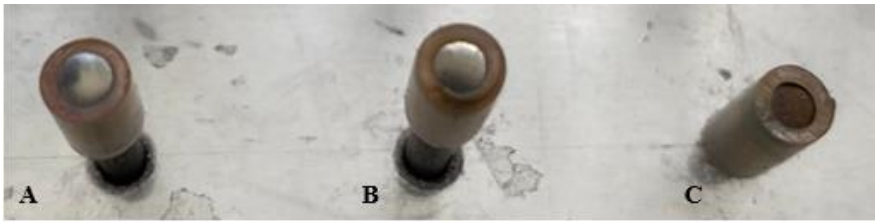
V) GE/CADHCl/FD/GOx/GA

Tyrimuose taip pat naudojami analogiški elektrodai nelaikant jų cistamino dihidrochlorido tirpale, atitinkamai:

VI) GE/AuND/FD/GOx/GA

VII) GE/FD/GOx/GA

Atlikus darbinių elektrodų imobilizavimą, vykdomas paruoštų elektrodų plovimas distiliuotu vandeniu. Paruošti elektrodai naudojami elektrocheminiams matavimams (kiekvienu atveju ruošiami 3-4 elektrodai). 17 paveiksle pateikiamos skirtingomis dalelėmis modifikuotų grafito elektrodų paviršiaus nuotraukos.



17 pav. A – grynas GE, B – GE padengtas AuND, C – GE padengtas AuNS

2.6. Elektrocheminiai analizės metodai ir duomenų apdorojimas

Elektrocheminiams matavimams naudojami paruošti darbiniai grafito elektrodai. Atliekant analizinių signalų registravimą, skirtingomis dalelėmis imobilizuotas GE patalpinamas į trijų elektrodų elektrocheminę celę su 0,05 M acetatinio buferinio tirpalo ir 0,1 M KCl (pH 6,0). Elektrocheminė analizė atliekama 5 mL acetatinio buferinio tirpalo tūryje naudojant kompiuterizuotą potenciostatą. Rezultatai apdorojami naudojant trijų arba keturių nepriklausomų eksperimentų vidutines matavimų vertes.

Registruojant ciklines voltamperogramas elektrocheminis potencialas skleidžiamas nuo -0,8 V iki 0,8 V, skleidimo greitis siekia 100 mV/s (tyrimuose taip pat naudoti nuo 5 iki 300 mV/s skleidimo greičiai). Darbinio elektrodo potencialas kinta teigiamų arba neigiamų reikšmių kryptimi, fiksuojamas srovės didėjimas ir atitinkamai stebima anodinė ar katodinė banga (Skučas, 2004). Eksperimentų metu matuojamas per celę tekančios srovės stipris tirpale. Fiksuojant anodinės srovės kitimą laike (tiesioginę CV smailę), stebima elektrochemiškai aktyvių medžiagų oksidacija (potencialo kitimas teigiamų reikšmių kryptimi). Stebint katodinės bangos kitimą laike (atvirkštinę CV smailę), fiksuojama antroji banga, nurodanti medžiagų (jonų) redukciją į pradinę formą (potencialo kitimas neigiamų reikšmių kryptimi (Franklin et al., 2016; Skučas, 2004)). Ciklinių voltamperogramų registravimas vyksta nemaišant tirpalo, taip pat pridedant tam tikrus analitės kiekius. Grafiškai vaizduojama srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo.

Taikant srovės kontrolės metodą – ChA ir registruojant chronoamperogramas, naudojamas pastovus maišymas 1200 rpm, bei nekintantis 0,3 V (Ag/AgCl atžvilgiu) elektrocheminis potencialas (tyrimuose taip pat naudoti nuo -0,1 iki 0,4 V elektrocheminės srovės potencialai). Matuojamas srovės stiprio ir trukmės kitimas laike. Remiantis srovės stiprio pokyčio (ΔI) kalibracinėmis kreivėmis pagal lygtį apskaičiuojami Michaelis-Menten kinetiniai parametrai (maksimalio srovės stiprio pokytis ($\Delta I max$) ir Michaelis-Menten konstanta (K_M)) :

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{max} * Glc}{K_M + Glc}$$

čia ΔI – srovės stiprio pokytis (μA), $\Delta I max$ – maksimalios srovės stiprio pokytis (μA), K_M – Michaelis-Menten konstanta, Glc – gliukozės koncentracija (mM).

Aptikimo riba apibrėžiama kaip koncentracija, atitinkanti tris analizinio signalo standartinius nuokrypius, atliekant matavimus tik foninę analitės koncentraciją turinčiame tirpale. Kai foninė gliukozės koncentracija labai maža ir analizinis signalas sunkiai išmatuojamas, į tirpalą įvedamas toks Glc kiekis, kuriam esant registruojamas minimalus analizinis signalas bei įvertinamas rezultatų atsikartojamumas.

2.7. Stabilumo tyrimai

Biologinių jutiklių stabilumas tiriamas trims sistemoms (GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA). Atliekant chronoamperometrinius matavimus (žr. 2.6. skyrių), modifikuoti GE laikomi šaldytuve +4 ^{o}C temperatūroje virš 0,05 M acetatinio buferinio tirpalo su KCl (pH 6,0) lašo. Stabilumas matuojamas nuo pagaminimo iki 27 paros GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemai, 20 paros GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemoms. Siekiant tikslesnių ir patikimesnių rezultatų naudojami 3 kiekvienos sistemos elektrodai.

2.8. Biologinio jutiklio pritaikymas realiuose objektuose

Pritaikymo realiuose objektuose tyrimuose naudojamos žmogaus seilės ir serumas, migdolų pienas bei mandarinų sultys. Žmogaus seilės ir serumas, migdolų pienas bei mandarinų sultys skiedžiami 10 kartų 0,05 M acetatiniu buferiniu tirpalu su KCl (pH 6,0). Paruošti tiriamieji objektai centrifuguojami 8 min., 13300 aps/min greičiu.

Angliavandenių (gliukozės, sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės), vitamino C ir šlapimo rūgšties įtakos tyrimai, tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas ir nežinomas analitės kiekis realiuose objektuose nustatomas chronoaperometrinių metodų metu (žr. 2.6 skyrių) grafito elektrodą talpinant į elektrocheminę celę su atitinkamu tiriamojo objekto kiekiu. Šlapimo rūgšties

įtakos tyrimai atliekami išskirtinai žmogaus seilėse ir serume, kadangi kituose tiriamuose gamtiniuose objektuose šlapimo rūgšties neturi būti aptinkama.

Tiriant angliavandenių įtaką BJ analiziniam elektrocheminiam signalui atitinkamuose realiuose objektuose, elektrochemiškai fiksuojamas modifikuotų grafito elektrodų generuojamas analizinis signalas po kiekvieno atitinkamo angliavandenių pridėjimo: pirmiausia į elektrocheminę celę dedama 10 mM Glc, tada atitinkamai po 1,0 mM sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės, ksilozės ir 10 mM Glc.

Siekiant nustatyti vitamino C įtaką gliukozės biologiniam jutikliui, į elektrocheminę celę pridedami tam tikri atitinkamos koncentracijos gliukozės (10 mM) ir vitamino C kiekiai (nuo 0,01 iki 0,20 mM).

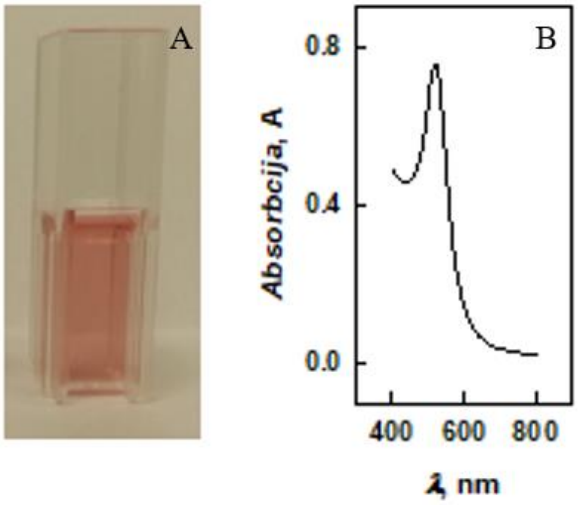
Šlapimo rūgšties įtakos tyrimų metu į elektrocheminę celę su žmogaus seilių ar serumo tirpalu pridedami atitinkami kiekiai tam tikros koncentracijos mišinių: 10 mM Glc su šlapimo rūgšties tirpalų koncentracijomis nuo 0,01 iki 0,30 mM.

Nežinomas analitės kiekis realiuose objektuose nustatomas priedų metodu. Brėžiama analizinio signalo priklausomybė nuo Glc koncentracijos. Iš tiesės lygties apskaičiuojamas nežinomas analitės kiekis mišinyje.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. AuND sintezė

Aukso nanodalelių sintezė atlikta taikant aukso nanodalelių sintezės strategiją – naudojant citrato reduktorių („iš apačios į viršų“), kurį 1951 m. aprašė Turkevitch (Turkevich et al., 1951). Šio metodo metu atomai ar molekulės yra surenkamos į nanodydžio molekulines struktūras (Kalimuthu et al., 2020). Susintetintų AuND tirpalas ir spektrofotometru užfiksuotas sugerties spektras pateikiami 18 pav.



18 pav. A – 13 nm AuND tirpalas ir B – sugerties spektras

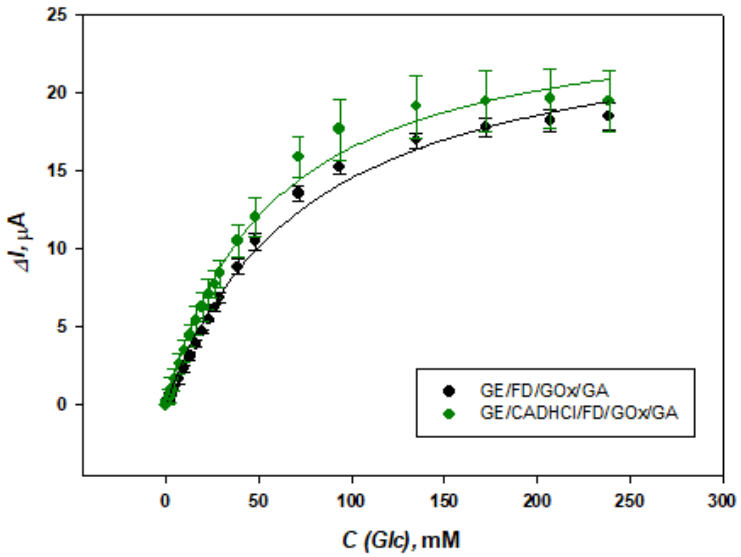
Analizuojant rezultatus matyti, kad aukso nanodalelės vandeninį tirpalą nudažo raudona spalva. Paprastai AuND dydis kontroliuojamas keičiant sintezės metu naudojamų medžiagų (tanino rūgšties) kiekį. Sintetinant 13 nm AuND daleles naudojamas 0,025 mL tanino rūgšties kiekis. AuND absorbcija fiksuojama prie 522 nm bangos ilgio, ir tai leidžia teigti, kad AuND susintetintos tinkamai (Haiss et al., 2007; A. Ramanaviciene et al., 2009).

3.2. Biologinio jutiklio kūrimo būdo paieška. Elektrocheminio efektyvumo įvertinimas

Siekiant nustatyti potencialiai tinkamiausią grafito elektrodo imobilizavimo būdą, kurio metu būtų fiksuojamas didžiausias gliukozės analizinis signalas, naudojamos 7 imobilizavimo strategijos (paruošimo schema pavaizduota 2.5. skyriuje). Kaip elektrodo pagrindas naudojamas grafito strypas, kuris modifikuojamas 3 μL aukso nanodalelėmis ar nanostruktūromis (priklausomai nuo eksperimento), padengiamas 4 μL FD, 3 μL GOx ir 15 min. laikomas virš glutaro aldehido tirpalo garų (GE/.../FD/GOx/GA). Elektrocheminiai matavimai vykdomi naudojant chronoamperometrinį metodą, nustatant pastovų +0,30 V elektrocheminį potencialą ir 1200 aps/min magnetinės maišyklės greitį. Matavimai atliekami acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) kaip analitę naudojant 1,0 M koncentracijos gliukozės tirpalą. Į elektrocheminę celę pridedami tam tikri gliukozės kiekiai (gliukozės koncentracijai kintant nuo 0,1 iki 239 mM). Kiekvienu atveju ruošiami 3 darbiniai elektrodai. Rezultatai apdorojami naudojant 3 nepriklausomų bandymų vidutines matavimų vertes. Hiperbolinės kreivės atitinka Michaelio-Menten kinetiką.

3.2.1. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/FD/GOx/GA

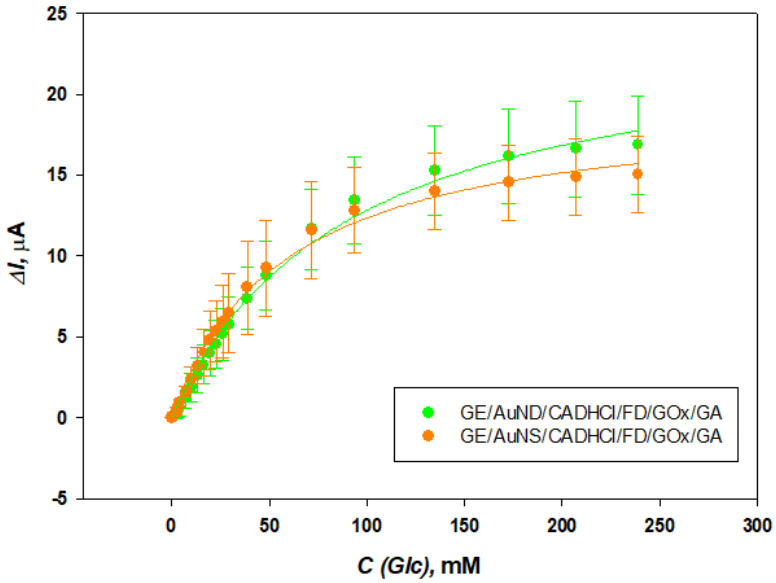
Pirmu tyrimo etapo metu buvo siekiama patikrinti, ar išlaikymas cistamino dihidrochlorido tirpale turi įtakos modifikuoto elektrodo generuojamo analizinio signalo stipriui. Naudojami du elektrodai: išlaikant grafito strypą CADHCl tirpale – GE/CADHCl/FD/GOx/GA bei nelaikant – GE/FD/GOx/GA. Kompiuterizuoto potenciostato fiksuojami analiziniai signalai analizuojami į acetatinį buferinį tirpalą pridėjus 239 mM koncentracijos gliukozės tirpalą. Pirmasis elektrodas, kurio modifikavimui naudojamas 5 mM koncentracijos CADHCl tirpalas, buvo laikomas 16 val. kambario temperatūroje ir generavo 19±2 μA analizinį signalą (žr. 19 pav.), kuris yra 1,03 karto didesnis nei elektrodo, kuris nebuvo laikomas CADHCl tirpale (GE/FD/GOx/GA) 18,5±0,8 μA. Todėl galima daryti išvadą, jog elektrodo išlaikymas CADHCl tirpale padidina elektrodo generuojamą gliukozės analizinį signalą.



19 pav. GE/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos

3.2.2. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA

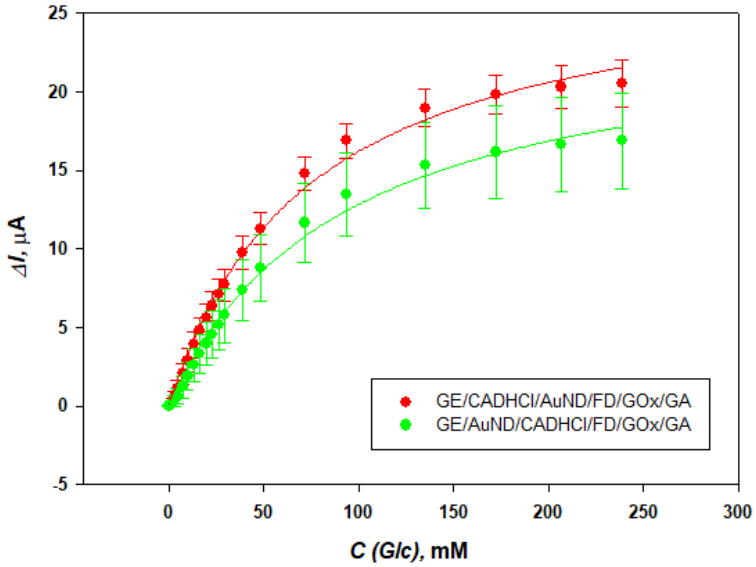
Antrojo eksperimento etapo metu buvo siekiama patikrinti aukso nanodarinių įtaką BJ analiziniam signalui. Siekiama įvertinti ar AuNS, ar AuND modifikuotas darbinis elektrodas yra pranašesnis. Tiriami du elektrodai: GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA. Darbinis elektrodas prieš modifikavimą aukso nanodalelėmis ar aukso nanostruktūromis (naudojama 3 μL AuNS ar AuND) išlaikomas 16 val. 5 mM CADHCl koncentracijos tirpale. Elektrodai buvo laikomi kambario temperatūroje (+21 ^{o}C). Analizuojant elektrocheminius duomenis (žr. 20 pav.) nustatyta, kad AuND modifikuota sistema (į acetatinį buferinį tirpalą pridėjus 239 mM koncentracijos gliukozės tirpalą) pasižymėjo 1,13 karto didesniu analiziniu signalu (17±3 μA), nei AuNS padengtas GE (15±2 μA). Todėl galima daryti išvadą, kad AuND pridėjimas modifikuojant bazinį elektrodą yra naudingesnis.



20 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos

3.2.3. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA

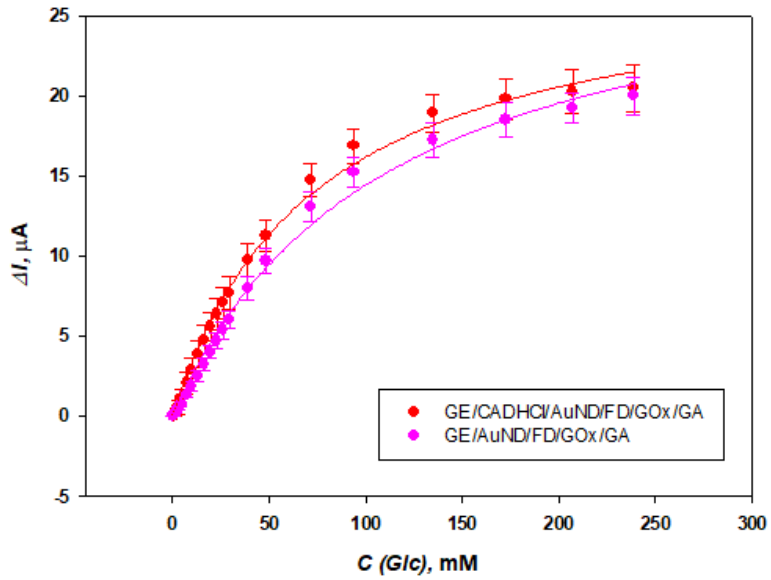
Sekančiu imobilizavimo etapo metu buvo siekiama patikrinti AuND imobilizavimo vietą elektrodo modifikavimo sistemoje. Naudojami du darbiniai elektrodai: GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, aukso nanodalelių imobilizavimą (3 μL) atliekant prieš arba po elektrodo išlaikymo 5 mM CADHCl tirpale etapo. Gliukozės analiziniai signalai analizuojami į acetatinį buferinį tirpalą pridėjus 239 mM koncentracijos gliukozės tirpalą. Pirmojo elektrodo atveju (AuND užnešamos ant GE paviršiaus prieš elektrodo išlaikymą 5 mM CADHCl tirpale) analizinis signalas siekė 17±3 μA, antruoju atveju (AuND užnešamos ant GE paviršiaus po išlaikymo 5 mM CADHCl tirpale) – 21±1 μA (žr. 21 pav.). GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektodo atveju analizinis signalas yra 1,24 karto didesnis, lyginant su GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA generuojamu analiziniu signalu. Nustatyta, jog grafito elektrodą aukso nanodalelėmis modifikuoti naudingiau atlikus grafito elektrodo išlaikymą CADHCl tirpale.



21 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos

3.2.4. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/FD/GOx/GA

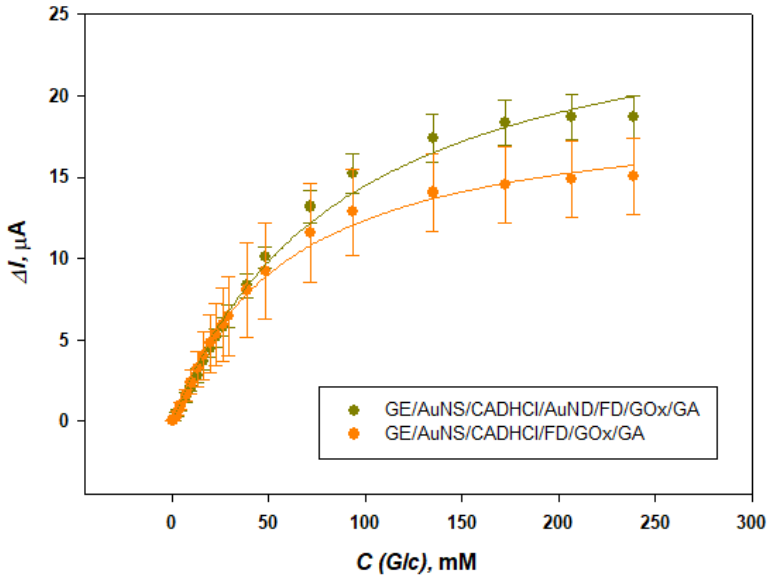
Ketvirtuoju etapu siekiama patikrinti, ar darbinis GE (modifikuotas AuND), išlaikomas CADHCl tirpale, generuoja didesnį elektrocheminį signalą, lyginant su identiškai modifikuotu elektrodu nelaikant pastarojo CADHCl tirpale. Šis etapas pasirinktas siekiant įvertinti aukso nanodarinių įtaką, kadangi pirmuoju tyrimo etapu vertintas pradinis (GE/...FD/GOx/GA) elektrodas ir jo generuojamo analizinio signalo priklausomybė nuo pastarojo išlaikymo CADHCl tirpale. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA analizinis signalas lyginamas su GE/AuND/FD/GOx/GA generuojamu signalu (prie 239 mM Glc koncentracijos). Pirmuoju atveju 21±1 μA analizinis signalas yra 1,05 karto didesnis, nei nenaudojant CADHCl (20±1 μA) tirpalo (žr. 22 pav.). Tyrimo metu buvo patvirtinta AuND imobilizavimo strategija ir darbinio elektrodo išlaikymas CADHCl tirpale.



22 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos

3.2.5. Gliukozės analizinių signalų palyginimas, naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA

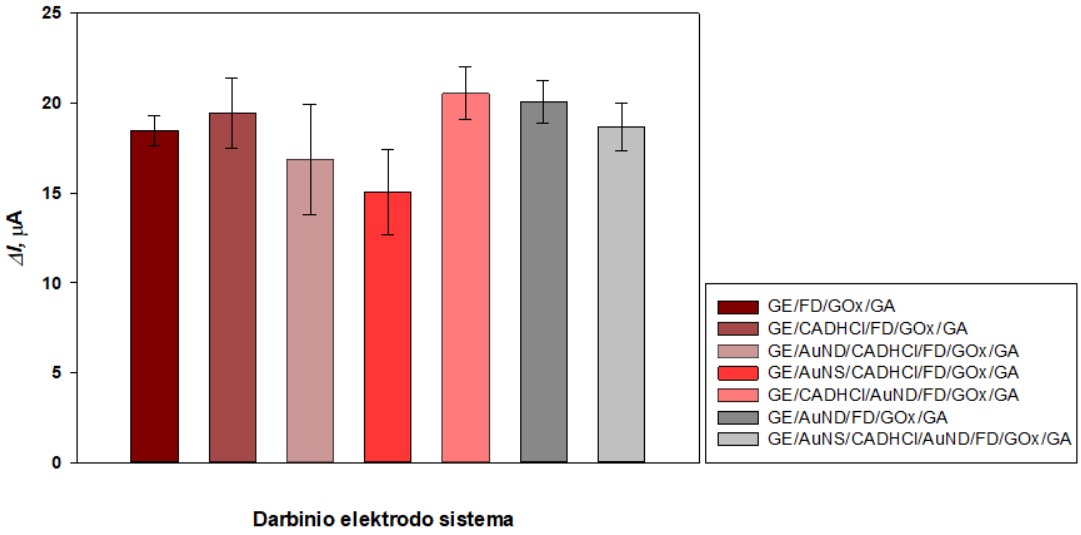
Penktojo eksperimento etapo metu buvo dar kartą patvirtinta AuND imobilizavimo strategija. Naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA sistemas, t. y. imobilizavus grafito elektrodą AuNS bei išlaikius 5 mM CADHCl tirpale, elektrodas buvo padengiamas (arba nedengiamas) AuND. Pirmuoju atveju (žr. 23 pav.) analizinis signalas siekė 19±1 μA, antruoju – 15±2 μA (analiziniai signalai lyginami į sistemą pridėjus 239 mM gliukozės tirpalo). Todėl galima daryti išvadą, kad AuND pridėjimas analizinį signalą šiuo atveju padidina 1,27 karto.



23 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/FD/GOx/GA sistemų generuojamo analizinio signalo pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos

Išanalizavus rezultatus, galima teigti, kad darbinio elektrodo išlaikymas 5 mM CADHCl tirpale yra būtinas, kadangi padidina analizinį signalą. Taip pat tyrimai, kuriuose grafito elektrodas dengiamas aukso nanodariniais, FD bei GOx, nenaudojant CADHCL, grupės narių buvo atlikti ir publikuoti anksčiau (German et al., 2015). Atlikus imobilizacijos būdo paiešką buvo identifikuotos trys didžiausią analizinį signalą generavusios darbinių elektrodų sistemos, sudėtyje turinčios aukso nanodarinius (žr. 24 pav.):

1) GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA (21±1 μA),
2) GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA (19±1 μA),
3) GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA (17±3 μA).



24 pav. Modifikuotų grafito elektrodų sistemų generuojamas analizinis signalas prie 239 mM gliukozės koncentracijos

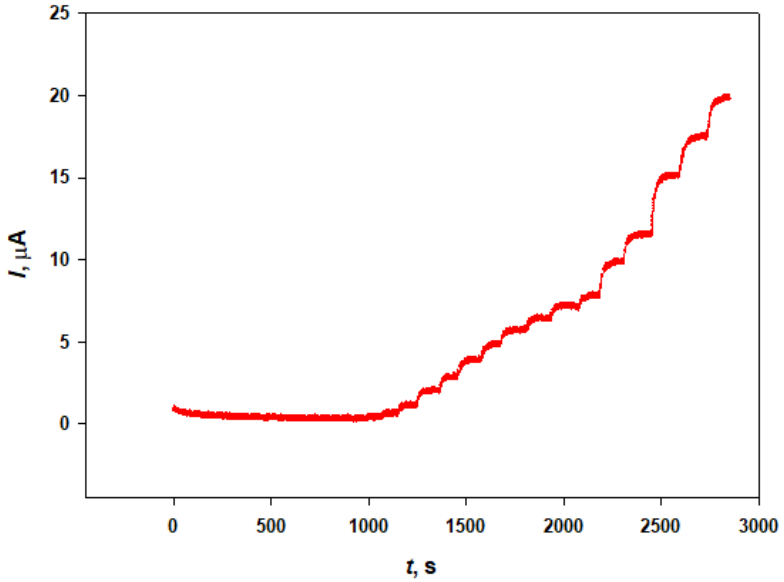
Nustatyta, kad darbinį grafito elektrodą tikslinga laikyti CADHCl tirpale, modifikuoti AuND, padengti FD, GOx ir išlaikyti virš glutaro aldehido tirpalo garų, todėl tolimesniems tyrimams, ieškant optimalių sąlygų, pasirinkta didžiausiu analiziniu signalu pasižyminti GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA.

3.3. Optimali grafito elektrodo išlaikymo CADHCl tirpale temperatūra

Siekiant nustatyti optimalią temperatūrą darbinio elektrodo (GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA) išlaikymui 5 mM CADHCl tirpale, atlikti chronoamperometriniai matavimai, kurių metu buvo fiksuojamas gliukozės analizinis signalas. ChA matavimai atliekami acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0), esant pastoviam maišymui 1200 aps/min ir pastoviam elektrocheminiam potencialui +0,30 V. Į 5 mL elektrocheminę celę buvo pridedami tam tikri gliukozės kiekiai (gliukozės koncentracija kintant nuo 0,1 iki 239 mM). Po kiekvieno pridėjimo buvo fiksuojamas anodinės srovės stiprio kitimas laike. Darbiniai elektrodai 16 val. laikyti CADHCl tirpale termostate (+31 ^{o}C), kambario temperatūroje (+21 ^{o}C) ir šaldytuve (+4

°C) temperatūroje. Kiekvienu atveju buvo ruošiami 3 elektrodai bei rezultatai apdorojami naudojant 3 nepriklausomų matavimų vidutines matavimų vertes.

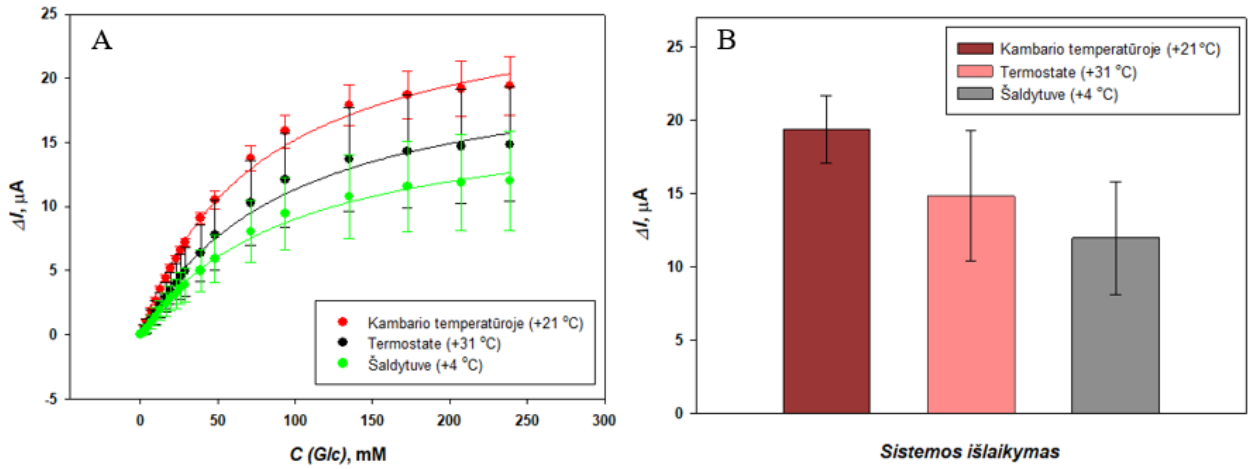
Atliekant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA paruošimą, išlaikant grafito elektrodą CADHCl tirpale skirtingose temperatūrose, buvo registruojamas elektrodo generuojamas analizinis signalas fiksuojant chronoamperogramas. Kaip pavyzdys 25 pav. yra pateikta registruota GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA chronoamperograma, išlaikius grafito elektrodą CADHCl tirpale kambario temperatūroje. Pagal gautus rezultatus brėžiama elektrodų generuojamos srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos kalibracinės kreivės (žr. 26 A pav.). Analizuojant skirtingoje temperatūroje išlaikytų GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybę nuo Glc koncentracijos nustatyta, kad didžiausias analizinis signalas generuojamas darbinius elektrodus laikant kambario temperatūroje (+21 °C) (žr. 26 B pav.).



25 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA chronoamperograma, išlaikius grafito elektrodą CADHCl tirpale kambario temperatūroje

Lyginant registruotą analizinį signalą GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA išlaikius skirtingose temperatūrose ir pridėjus atitinkamą kiekį 239 mM koncentracijos gliukozės tirpalo (žr. 26 B pav.) nustatyta, kad didžiausias srovės pokytis (ΔI) pasiekiamas modifikuotą darbinį elektrodą išlaikius kambario temperatūroje (19±2 μA). Grafito elektrodą išlaikius termostate nustatytas ΔI=15±4 μA, šaldytuve – ΔI=12±4 μA stiprio elektrocheminis signalas.

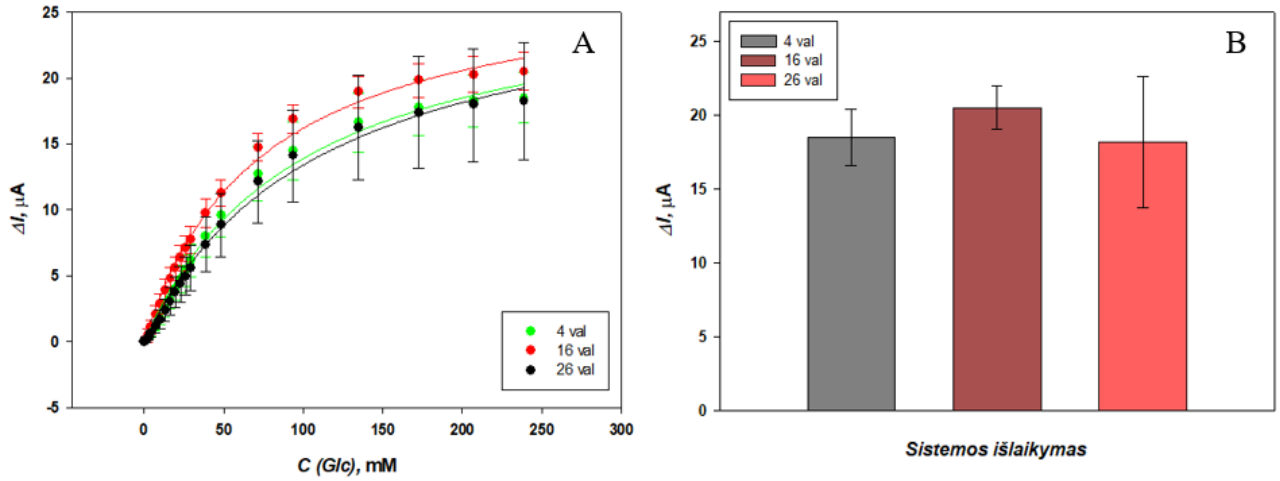
Kambario temperatūroje (CADHCl tirpale) išlaikytas grafito elektrodas (19±2 μA) pasižymėjo 1,27 karto didesniu analizinio signalo pokyčiu, nei išlaikius termostate (15±4 μA). Taip pat kambario temperatūroje išlaikyto elektrodo analizinio signalo pokytis buvo 1,58 karto didesnis, nei išlaikius šaldytuve (12±4 μA). Todėl tolimesniems tyrimams nuspręsta grafito elektrodus išlaikyti CADHCl tirpale kambario temperatūroje, t. y. +21 °C.



26 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei diagramos (B), naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą CADHCl tirpale skirtingose temperatūrose

3.4. Optimalus grafito elektrodo išlaikymo CADHCL tirpale laikas

Tolimesnių tyrimų metu buvo siekiama nustatyti optimalų grafito elektrodo išlaikymo laiką CADHCl tirpale, chronoamperometrinių metodų metu atliekant matavimus, naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA. Darbiniai grafito elektrodai buvo ruošiami pagal 2.5 skyriuje pateiktą schemą (II sistema) elektrodus CADHCl tirpale išlaikant 4, 16 ir 26 valandas. Matavimai atliekami acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0), esant 1200 aps/min greičiui ir fiksuotam potencialui +0,30 V, registruojant gliukozės analizinį signalą (žr. 27 A pav.). Į elektrocheminę celę pridedama gliukozės, šios koncentracijai kintant nuo 0,1 iki 239 mM. Rezultatai apdorojami naudojant 3–4 darbinių elektrodų nepriklausomas matavimų vertes.



27 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei diagramos (B), naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą skirtingą laiko tarpą CADHCl tirpale

Analizuojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos kalibracines kreives, kai sistemoje gliukozės koncentracija yra 239 mM (žr. 27 B pav.), matyti, kad didžiausias gliukozės analizinis signalas generuojamas grafito elektrodą išlaikant

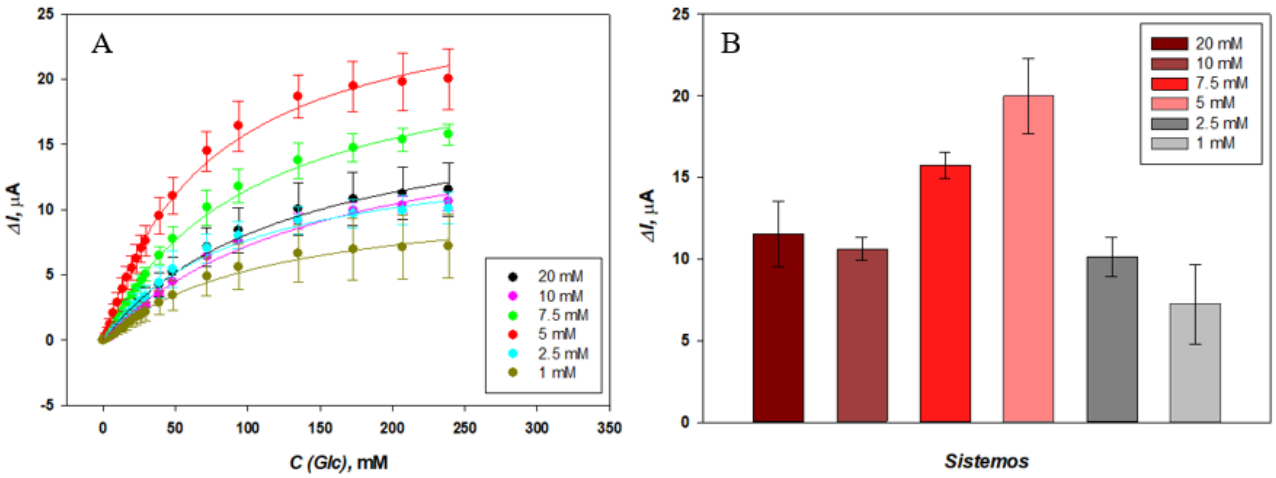
16 val. CADHCl tirpale. Šiuo atveju analizinio signalo pokytis siekia 21±1 µA. Išlaikius grafito elektrodą 4 val. CADHCl tirpale, fiksuojamas 19±2 µA analizinio signalo pokytis, kuris yra 1,11 karto mažesnis lyginant su grafito elektrodu CADHCl tirpale išlaikytu 16 val. (ΔI=21±1 µA).

Mažiausias fiksuotas analizinis signalas GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektodų paruošimui grafito elektrodus cistamino dihidrochlorido tirpale išlaikius 26 val.: ΔI=18±4 µA (žr. 27 B pav.). Šis signalas yra 1,17 karto mažesnis už analizinį signalą, fiksuojamą po 16 val. išlaikymo. Taip pat pastebėta, jog grafito elektrodą CADHCl tirpale išlaikius ilgiausią laiko tarpą (26 val.), fiksuojamos didesnės matavimų paklaidos.

Tolimesni tyrimai atliekami imobilizuotas sistemas CADHCl tirpale išlaikius 16 val., kadangi pasiekiamas didžiausias GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA generuojamas analizinis signalas.

3.5. Optimalios CADHCl tirpalo koncentracijos nustatymas

Optimalios cistamino dihodrochlorido koncentracijos nustatymas vykdomas acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0), naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodą. Pastarasis imobilizuojamas pagal 2.5 skyriuje aprašytą schemą (II elektrodo sistema) su tolimesniu AuND, FD ir GOx imobilizavimu bei išlaikymu virš glutaro aldehido tirpalo garų. Kiekvienu atveju ruošiami 3 elektrodai. Į elektrocheminę celę pridedami tam tikri gliukozės kiekiai, šios koncentracijai kintant nuo 0,1 iki 239 mM bei regeneruojamas srovės stipris. Gautos kalibracinės kreivės atitinka Michaelio-Menten lygčiai (žr. 28 A pav.).



28 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės (A) nuo Glc koncentracijos bei diagramos esant 239 mM gliukozės (B) naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, išlaikius grafito elektrodą skirtingų koncentracijų CADHCl tirpale

Analizuojant rezultatus matyti, kad modifikuotą grafito elektrodą (GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA) išlaikant 20 mM CADHCL koncentracijos tirpale, analizinio signalo pokytis (ΔI=12±2 µA) yra 1,13 karto didesnis negu fiksuotas po išlaikymo 10 mM CADHCl

tirpale (ΔI=10,6±0,7 μA). Nepaisant to, grafito elektrodą išlaikius 7,5 mM koncentracijos cistamino dihidrochlorido tirpale, nustatyta, jog GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA generuoja 15,8±0,8 μA analizinį signalą, kuris yra 1,32 karto didesnis už sistemos generuojamą signalą po išlaikymo 20 mM CADHCl tirpale (ΔI=12±2 μA). Didžiausias analizinio signalo pokytis pasiekiamas grafito elektrodą išlaikant 5 mM CADHCl tirpale – 20±2 μA, kuris yra 1,27 karto didesnis už išlaikytą 7,5 mM CADHCl tirpale (ΔI=15,8±0,8 μA) (žr. 28 pav.).

Mažinant CADHCl tirpalo koncentraciją nuo 2,5 iki 1 mM stebimas analizinio signalo pokyčio mažėjimas. Išlaikant grafito elektrodus 2,5 ir 1 mM CADHCl tirpaluose, išmatuoti GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA analizinio signalo pokyčiai siekia 10±1 ir 7±2 μA, tai yra 2,0 ir 2,86 karto mažiau, lyginant su analizinio signalo pokyčiu, registruotu po grafito elektrodo išlaikymo 5 mM CADHCl tirpale (ΔI=20±2 μA).

Lyginant 2,5 ir 1 mM CADHCl tirpalus nustatyta, kad naudojant 2,5 mM CADHCl tirpalą (ΔI=10±1 μA) registruotas GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodo generuojamas analizinio signalo pokytis yra 1,43 karto didesnis nei naudojant 1 mM CADHCl tirpalą (ΔI=7±2 μA).

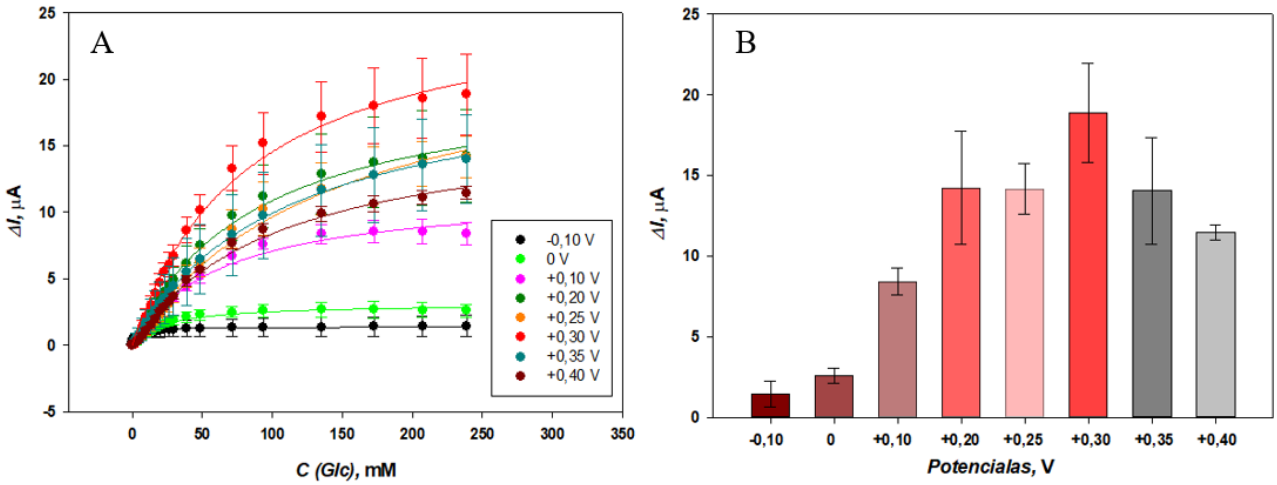
Apibendrinant skirtingomis CADHCl koncentracijomis veikiant ruošiamus darbinius elektrodus, galima daryti išvadą, kad GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA generuojmas didžiausias analizinis signalas, naudojant 5 mM cistamino dihidrochlorido tirpalą (žr. 28 B pav.), todėl tolimesni tyrimai atliekami darbinių elektrodų imobilizavimui naudojant 5 mM koncentracijos CADHCl tirpalą.

3.6. Optimalaus oksidacijos-redukcijos potencialo nustatymas

Nustačius optimalų darbinio elektrodo imobilizavimo būdą, išlaikymo CADHCl tirpale temperatūrą bei laiką ir CADHCl koncentraciją, tolimesnių tyrimų metu siekiama įvertinti GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA oksidacijos-redukcijos potencialo įtaką srovės stiprio pokyčiui. Chronoamperometrinių matavimų metu skleidžiamas fiksuotas oksidacijos-redukcijos potencialas nuo -0,10 V iki +0,40 V (metodika aprašyta 2.6. skyriuje). ChA analizė atliekama acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0), esant pastoviam maišymui 1200 aps/min. Į 5 mL elektrocheminę celę buvo pridedami tam tikri gliukozės kiekiai (nuo 0,1 iki 239 mM koncentracijos). Kiekvienu atveju buvo ruošiami 3 elektrodai bei rezultatai apdorojami naudojant šių elektrodų nepriklausomas matavimų vertes. Kalibracinės kreivės yra aprašomos hiperboline funkcija (žr. 29 A pav.).

Analizuojant gliukozės analizinio signalo priklausomybę nuo oksidacijos-redukcijos potencialo, pridėjus 239 mM gliukozės, pastebėta, kad oksidacijos-redukcijos potencialui didėjant nuo -0,10 iki +0,30 V, gliukozės analizinis signalas didėja nuo 1,4±0,8 iki 19±3 μA. Tolimesnių

tyrimų metu didinant oksidacijos-redukcijos potencialą iki +0,35 iki +0,40 V pastebimas analizinio signalo mažėjimas nuo 14±3 iki 11,5±0,5 µA (žr. 29 B pav.).



29 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos (A) bei oksidacijos-redukcijos potencialo įtakos srovės stiprio pokyčiui diagramos esant 239 mM gliukozės (B) naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA

Iš pateiktų rezultatų (žr. 29 B pav.) matyti, kad gliukozės analizinio signalo pokytis oksidacijos-redukcijos potencialui siekiant 0 V (ΔI=2,6±0,5 µA) yra 1,86 karto didesnis už gautą esant -0,10 V oksidacijos-redukcijos potencialui (ΔI=1,4±0,8 µA). Tuo tarpu oksidacijos-redukcijos potencialams siekiant +0,10, +0,20, +0,25 ir +0,30 V, gliukozės analizinių signalų pokyčiai siekia 8,9±0,8 µA, 14±4 µA, 14±2 µA ir 19±3 µA, atitinkamai, t. y. 6,36; 10; 10 ir 13,6 kartų daugiau, lyginant su rezultatais, gautais esant -0,10 V oksidacijos redukcijos potencialui. Didinant oksidacijos-redukcijos potencialą iki +0,35 ir +0,4 V fiksuojami 14±3 ir 11,5±0,5 µA analizinių signalų pokyčiai, kurie yra 1,36 ir 1,65 kartų mažesni, lyginant su gautu esant +0,30 V oksidacijos-redukcijos potencialui (ΔI=19±3 µA).

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, siekiant maksimaliai padidinti biologinio jutiklio GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA pagrindu registruotus gliukozės analizinius signalus bei padidinti nustatymo jautrumą, tolimesnių tyrimų metu nuspręsta naudoti +0,30 V oksidacijos-redukcijos potencialą.

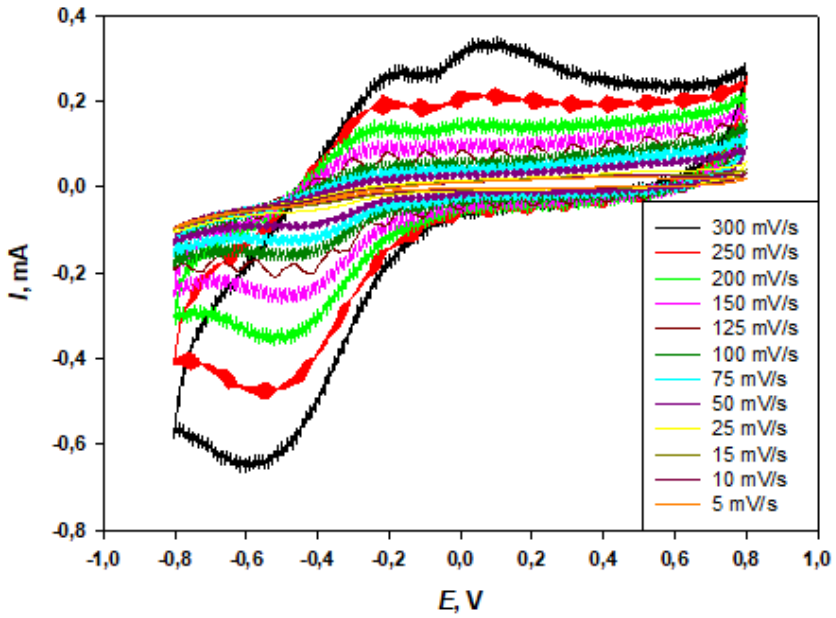
3.7. Ciklinės voltamperogramos bei oksidacijos-redukcijos proceso grįžtamumas

Siekiant įvertinti oksidacijos-redukcijos proceso grįžtamumą bei tinkamumą elektrocheminei analizei, naudojant elektrodų sistemas: GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, buvo nuspręsta įvertinti ciklinių voltamperogramų formas, katodines ir anodines smailes bei analizinių signalų ir potencialo

pasislinkimo priklausomybes nuo skleidimo greičio. Šiam tikslui elektrodai ruošiami pagal 16 paveiksle pateiktas schemas. Ciklinės voltamperogramos registruojamos acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) be gliukozės priedų, be maišymo, skleidžiant oksidacijos-redukcijos potencialą nuo +0,8 iki -0,8 V, mažinant skleidimo greitį nuo 300 iki 5 mV/s. Kiekvienu atveju ruošiami 3 elektrodai.

I sistema (GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA)

Analizuojant GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos CV metodu nustatytas ciklinių voltamperogramų (žr. 30 pav.) anodinės ir katodinės smailių augimas atitinkamai -0,139 ÷ -0,263 V ir -0,398 ÷ -0,586 V potencialo intervaluose. Taip pat matyti, kad skleidimo greičiui siekiant 300 ir 250 mV/s prie 0 V potencialo atsiranda anodinė smailė, kuri išnyksta skleidimo greičiui sumažėjus iki 200 mV/s. Ši anodinė smailė gali atsirasti dėl ypač didelio skleidimo greičio, kuris paprastai elektrocheminiuose tyrimuose nėra naudojamas.



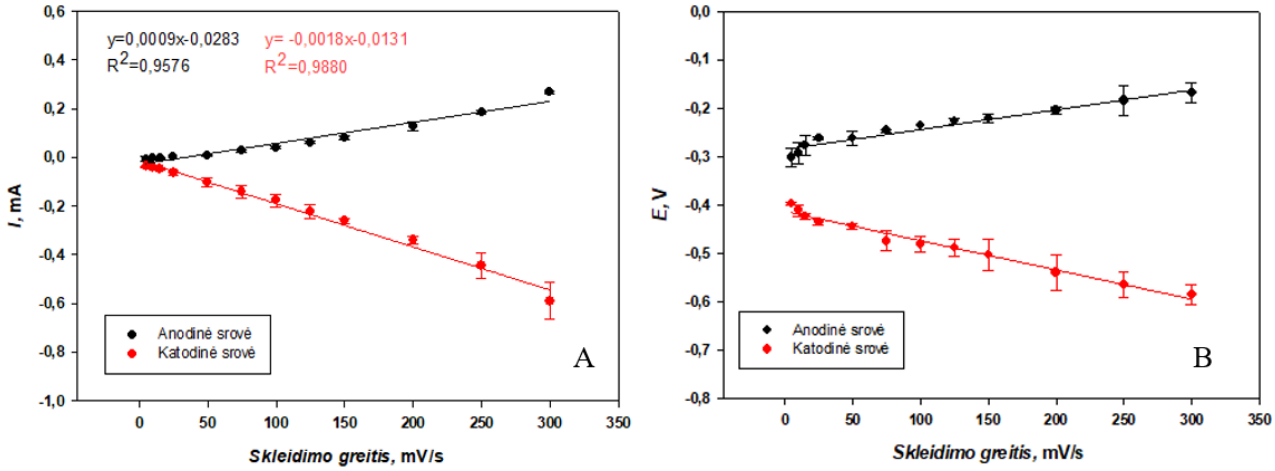
30 pav. GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams

Analizuojant GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės srovės stiprio priklausomybę nuo skleidimo greičio (žr 31 A pav.) pastebimas tiesinis anodinės srovės mažėjimas mažinant skleidimo greitį. Skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s nustatytas anodinės srovės stipris 0,267±0,004 mA. Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s srovės stipris yra 6,68 karto mažesnis (0,040±0,004 mA), lyginant su maksimalia srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Pasiekus 25 mV/s srovės skleidimo greitį, nustatytas 0 µA srovės stipris. Sumažinus skleidimo greitį iki 5 mV/s, fiksuojamas neigiamos srovės stipris (-0,007±0,002 mA), todėl galima teigti, kad skleidimo greitį racionalu mažinti iki 25 mV/s.

Taip pat analizuojant katodinės smailės aukščio priklausomybę nuo skleidimo greičio (žr. 31 A pav.) pastebimas tiesinis katodinės srovės mažėjimas, mažinant skleidimo greitį. Skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s nustatytas katodinės srovės stipris yra -0,59±0,08 mA. Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s srovės stipris yra 3,28 karto mažesnis (-0,18±0,03 mA), lyginant su maksimalia katodinės srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Sumažinus skleidimo greitį iki 5 mV/s, fiksuojama srovė – 0,038±0,002 mA.

Tiriant GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinio ir katodinio potencialų vertės priklausomybę nuo skleidimo greičio (žr 31 B pav.) nustatyta, kad anodinis potencialas slenkasi į neigiamesnę pusę, katodinis – į teigiamesnę pusę mažinant skleidimo greitį. Anodinės srovės atveju esant 300 mV/s skleidimo greičiui fiksuojama anodinė smailė prie -0,17±0,02 V potencialo (katodinės srovės atveju – prie -0,59±0,02 V). Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s, anodinė smailė atsiranda prie -0,24±0 V potencialo (katodinė – prie -0,48±0,02 V). Skleidimo greitį sumažinus iki 5 mV/s, anodinė smailė fiksuojama prie -0,30±0,02 V potencialo (katodinė – prie -0,398±0,003 V). Taigi akivaizdžiai stebimas potencialo slinkimasis neigiamesne arba teigiamesne kryptimi, priklausomai nuo nagrinėjamos srovės (anodinės arba katodinės).

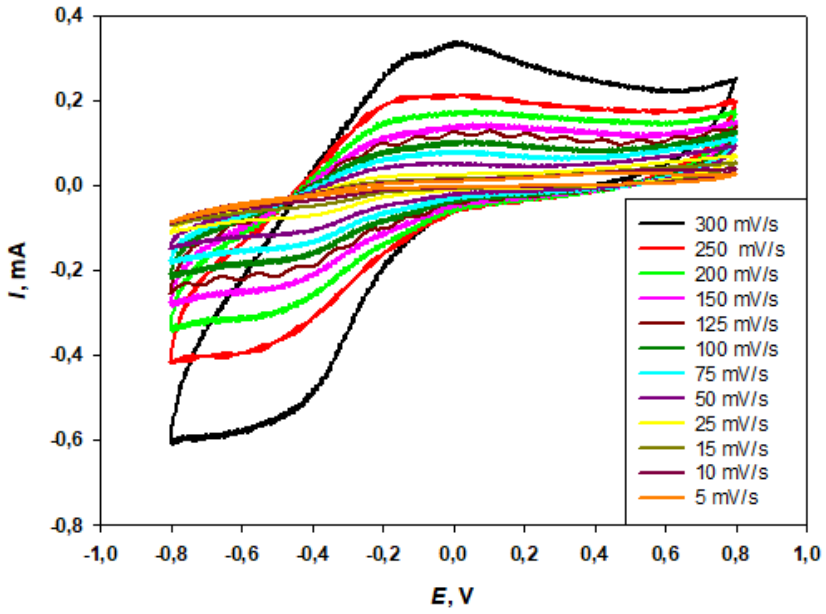
Pagal anodinės ir katodinės srovės stiprio tiesines priklausomybes galima teigti, kad oksidacijos-redukcijos procesas yra grįžtamas.



31 pav. GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų vertės (B) priklausomai nuo skleidimo greičio

II sistema (GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA)

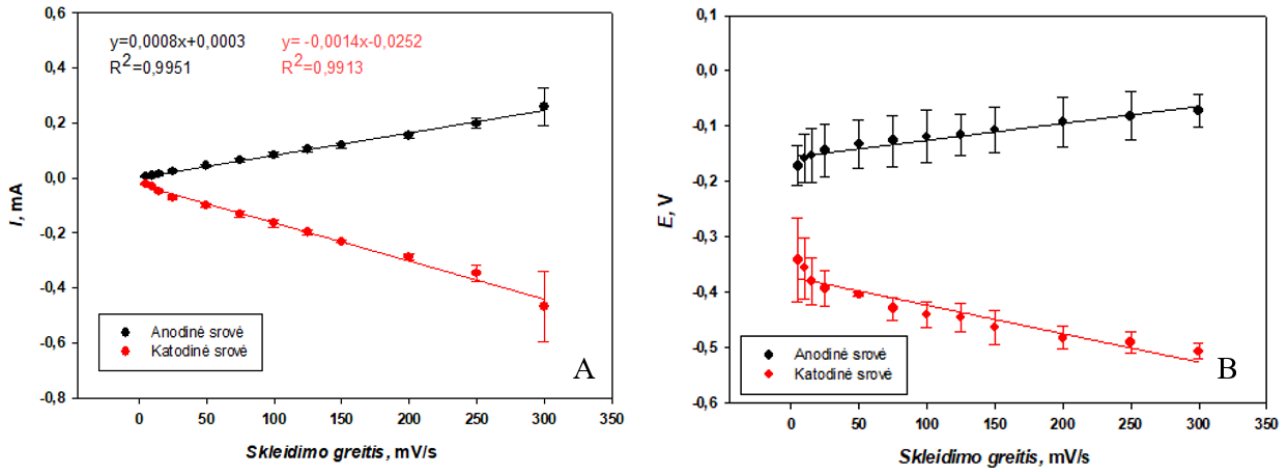
Analizuojant GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos CV metodu pastebimas ciklinių voltamperogramų (žr. 32 pav.) anodinės ir katodinės smailių augimas atitinkamai -0,072 ÷ -0,173 V ir -0,343 ÷ -0,508 V potencialo intervaluose. Taip pat matyti, kad skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s prie 0 V potencialo atsiranda anodinė smailė, kuri išnyksta skleidimo greičiui sumažėjus iki 250 mV/s. Ši anodinė smailė gali atsirasti dėl ypač didelio skleidimo greičio, kuris paprastai elektrocheminiuose tyrimuose nėra naudojamas.



32 pav. GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams

Analizuojant GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės stiprio priklausomybes nuo skleidimo greičio (žr 33 A pav.) pastebimas tiesinis srovės stiprio mažėjimas, mažinant skleidimo greitį. Skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s nustatytas anodinės srovės stipris 0,26±0,07 mA. Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s srovės stipris yra 3,10 karto mažesnis (0,084±0,009 mA), lyginant su maksimalia srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Sumažinus skleidimo greitį iki 5 mV/s fiksuojamas anodinės srovės stipris mažėja iki 0,004±0,002 mA. Kaip matyti iš 33 A pav., katodinės srovės stipris yra -0,5±0,1 mA, skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s. Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s srovės stipris yra 2,94 karto mažesnis (-0,17±0,01 mA), lyginant su maksimalia katodinės srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Sumažinus skleidimo greitį iki 5 mV/s, fiksuojama srovė -0,024±0,004 mA.

Tiriant GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos anodinio ir katodinio potencialų vertės priklausomybę nuo skleidimo greičio (žr 33 B pav.) nustatyta, kad anodinis potencialas slenkasi į neigiamesnę pusę, katodinis – į teigiamesnę pusę mažinant skleidimo greitį. Anodinės srovės atveju esant 300 mV/s skleidimo greičiui fiksuojama anodinė smailė prie -0,07±0,03 V potencialo (katodinė – prie -0,51±0,01 V) . Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s, anodinė smailė atsiranda prie -0,12±0,05 V potencialo (katodinė – prie -0,44±0,02 V). Skleidimo greitį sumažinus iki 5 mV/s, anodinė smailė fiksuojama prie -0,17±0,04 V potencialo (katodinė – prie -0,34±0,08 V). Stebimas potencialo slinkimasis neigiamesne arba teigiamesne kryptimi, atitinkamai anodinės ir katodinės srovių atvejais.

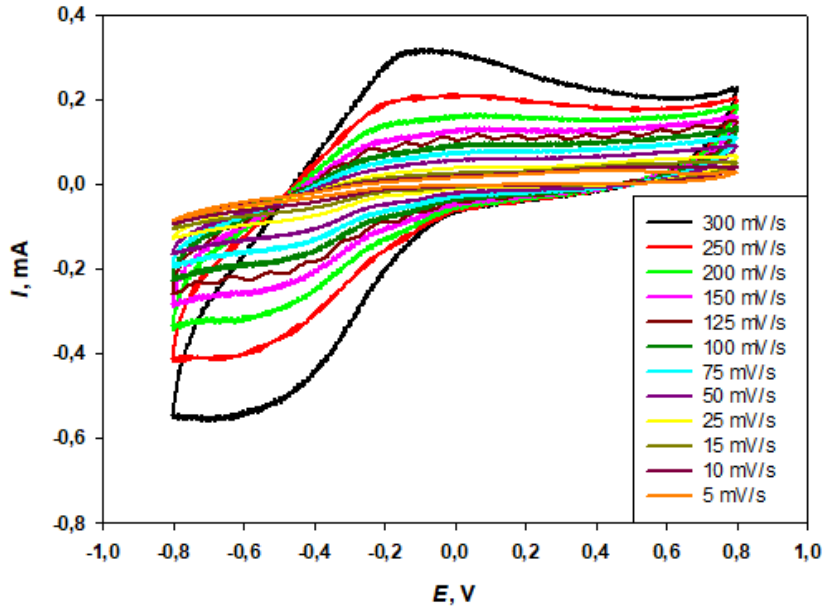


33 pav. GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų vertės (B) priklausomai nuo skleidimo greičio

Pagal anodinės ir katodinės srovės stiprio tiesines priklausomybes galima teigti, kad oksidacijos-redukcijos procesas yra grįžtamas ir sistema tinkama elektrocheminei analizei.

III sistema (GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA)

Analizuojant GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos CV metodu nustatytas ciklinių voltamperogramų (žr. 34 pav.) anodinės ir katodinės smailių augimas atitinkamai -0,127 ÷ -0,229 V ir -0,427 ÷ -0,561 V potencialo intervaluose.

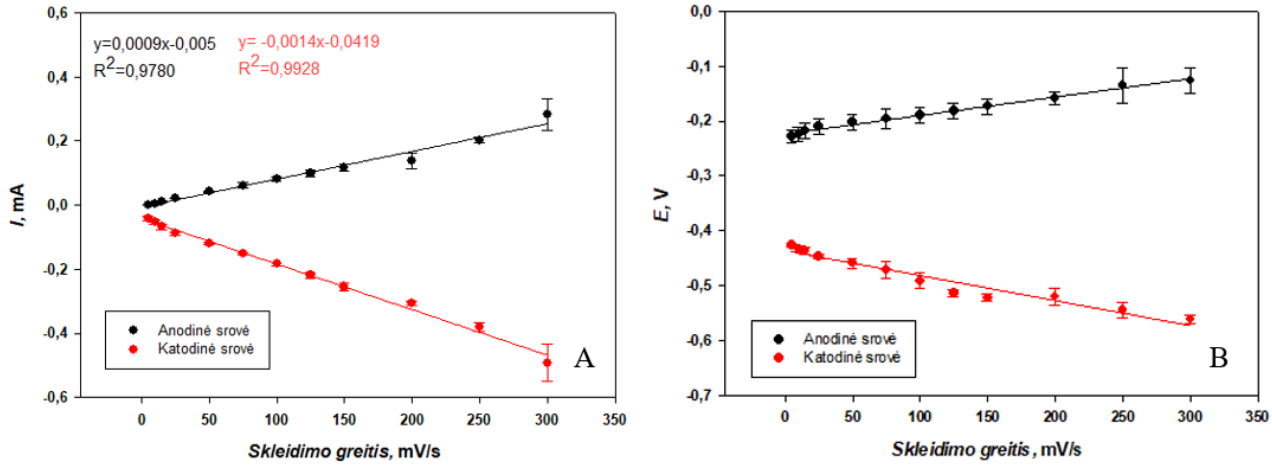


34 pav. GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos ciklinės voltamperogramos, esant skirtingiems skleidimo greičiams

Analizuojant GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės stiprio priklausomybes nuo skleidimo greičio (žr 35 A pav.) pastebimas tiesinis srovės stiprio mažėjimas mažinant skleidimo greitį. Skleidimo greičiui siekiant 300 mV/s nustatytas anodinės srovės stipris 0,28±0,05 mA bei katodinės – -0,49±0,06 mA. Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s anodinės srovės

stipris yra 3,42 karto mažesnis (0,082±0,008 mA), lyginant su maksimalia srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Tuo tarpu katodinės srovės stipris prie 100 mV/s yra 2,66 karto mažesnis (-0,184 ± 0,005 mA), lyginant su maksimalia katodinės srovės stiprio verte prie 300 mV/s. Sumažinus skleidimo greitį iki 5 mV/s, fiksuojami anodinės ir katodinės srovės stipriai, kurie, atitinkamai, yra lygūs 0,0015±0,0007 µA ir -0,041±0,008 mA.

Tiriant GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinio ir katodinio potencialų vertės priklausomybes nuo skleidimo greičio (žr 35 B pav.) nustatyta, kad mažinant skleidimo greitį anodinė smailė slenkasi į neigiamesnio potencialo pusę, katodinė – į teigiamesnio potencialo pusę. Anodinės srovės atveju esant 300 mV/s skleidimo greičiui fiksuojama anodinė smailė prie -0,13±0,02 V potencialo (katodinė – prie -0,561±0,008 V). Skleidimo greičiui siekiant 100 mV/s, anodinė smailė atsiranda prie -0,19±0,01 V potencialo (katodinė – prie -0,49±0,01 V). Skleidimo greitį sumažinus iki 5 mV/s anodinė ir katodinė smailės fiksuojamos prie -0,23±0,01 V ir -0,427±0,003 V, atitinkamai. Kaip ir prieš tai aprašytoms sistemoms (GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA) GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos atveju anodinės arba katodinės smailės atveju stebimas slinkimas neigiamesnio arba tegiamesnio potencialo kryptimi.

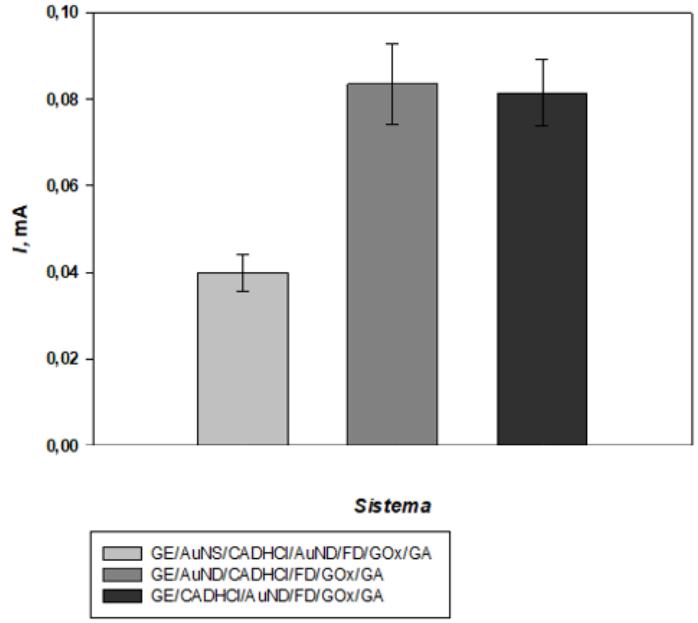


35 pav. GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos anodinės ir katodinės srovės (A) ir potencialų (B) vertės priklausomai nuo skleidimo greičio

Pagal anodinės ir katodinės srovės stiprio tiesines priklausomybes galima teigti, kad oksidacijos-redukcijos procesas yra grįžtamas.

Išanalizavus GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų analizinio signalo stiprį esant skirtingiems skleidimo greičiams nustatyta, kad prie 100 mV/s (žr. 36 pav.) didžiausią signalą generuoja GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA elektrodo sistema (0,084±0,009 mA). Mažiausiu analiziniu signalu pasižymi GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA biologiškai aktyviais junginiais padengta sistema (0,040±0,004 mA), kuri yra 2,10 karto mažesnė už didžiausią analizinį signalą generuojančią sistemą. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistema pasižymi 0,082±0,008 mA analiziniu signalu,

kuris yra 1,02 karto mažesnis už GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, todėl akivaizdu, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos pasižymi didžiausiu analiziniu signalu.



36 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų generuojamas signalas prie 100 mV/s elektrocheminio potencialo skleidimo greičio

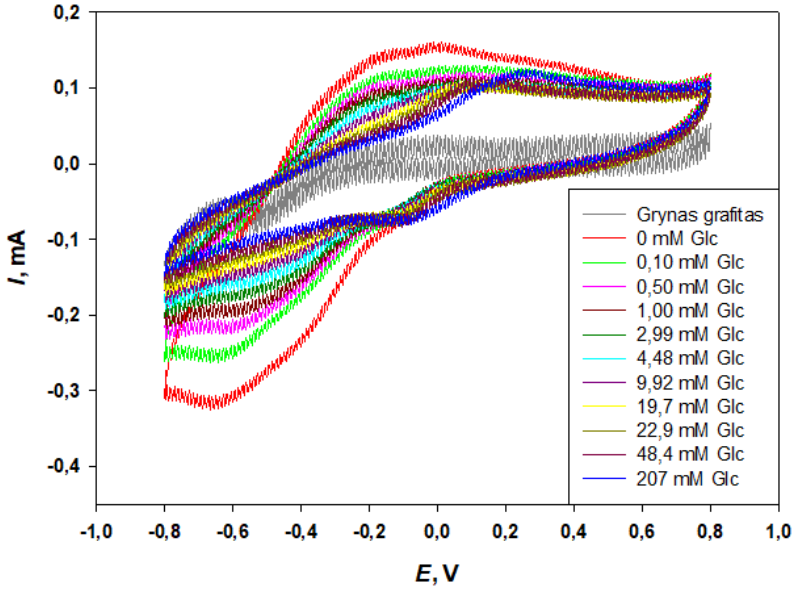
3.8. Ciklinės voltamperogramos ir analizinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tiriamojoje sistemoje

Siekiant įvertinti analizinio signalo priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos tiriamojoje sistemoje, naudojant elektrodų sistemas: GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, elektrodai buvo ruošiami pagal 16 paveiksle pateiktą schemą. Šiam tikslui naudojamas ciklinės voltamperometrijos metodas, kurio voltamperogramos registruojamos acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) pridedant atitinkamą kiekį Glc, pastarosios koncentracijai kintant nuo 0,10 iki 207 mM. Kiekvienu atveju ruošiami 3 elektrodai.

Kaip matyti iš 37, 38, 39 paveiksluose pateiktų ciklinių voltamperogramų, esant grynam grafitui, t. y. nepadengtam elektroaktyviomis medžiagomis, joks elektrocheminis oksidacijos-redukcijos procesas ant elektrodo paviršiau nevyksta, nėra elektronų pernašos. Tuo tarpu ciklinių voltamperogramų formos keičiasi bei didėja skirtumas tarp anodinės ir katodinės srovės stiprio, naudojant GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CAHDCl/FD/GOx/GA ir GE/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemas.

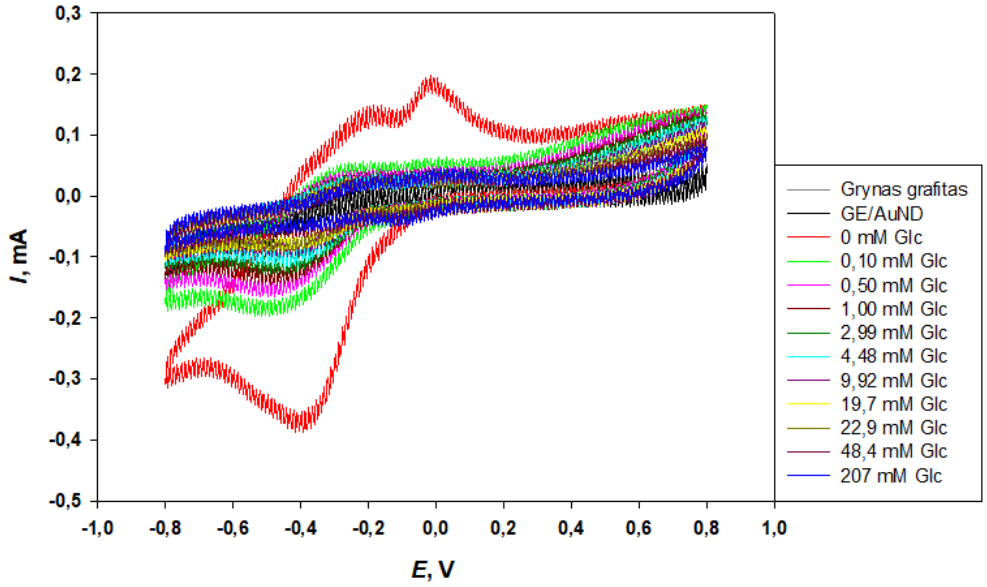
Analizuojant 37 pav. nustatyta, kad didinant Glc kiekį iki 9,92 mM gliukozės tiriamojoje sistemoje, fiksuojamas anodinės smailės signalas mažėja nuo 0,143 iki 0,101 mA. Tai rodo, kad

GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodo sistema yra jautri ir gali būti naudojama elektrocheminei analizei. Pridedant į analizuojamą tirpalą didesnius Glc kiekius (nuo 19,7 iki 207 mM), stebimas analizinio signalo didėjimas nuo 0,102 iki 0,120 mA, dėl analizuojamo tirpalo prisotinimu gliukoze, taip pat dėl praskiedimo, kai tirpale yra didelė Glc koncentracija. Anodinė smailė, didinant gliukozės koncentraciją, slenkasi į teigiamo potencialo pusę. Taip pat nustatyta, kad anodinė smailė, kai Glc koncentracija sistemoje siekia 207 mM, atsiranda prie +0,273 V potencialo. Dėl šios priežasties tolimesniuose tyrimuose naudojamas +0,30 V elektrocheminis potencialas. Tačiau analizuojant katodinės smailės poslinkį pastebėta, kad didinant gliukozės koncentraciją nuo 0,10 iki 207 mM smailė slenkasi neigiamesne potencialo kryptimi ir analizinis signalas kinta nuo -0,317 iki -0,075 mA.



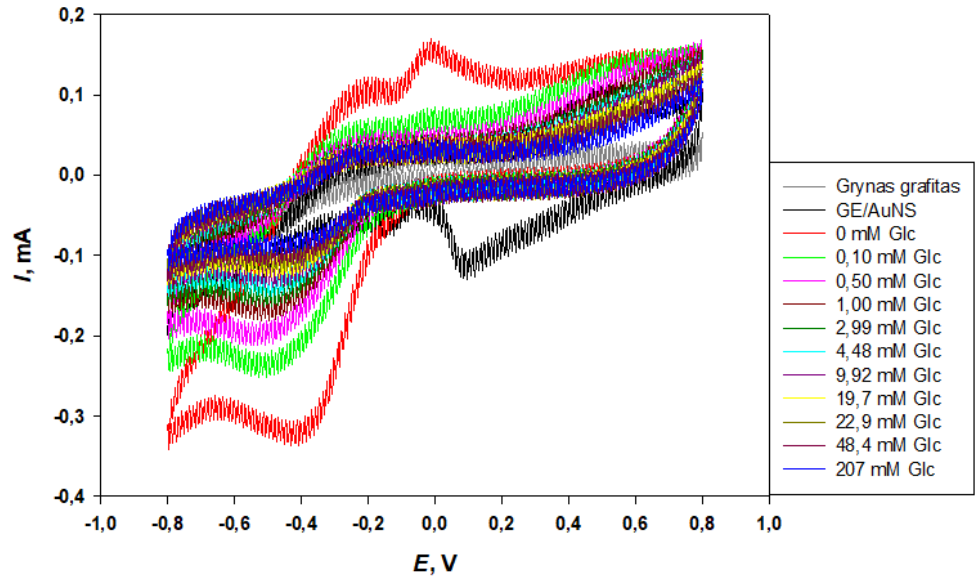
37 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms

Analizuojant 38 pav. nustatyta, kad didinant Glc kiekį iki 19,7 mM gliukozės tiriamojoje sistemoje, fiksuojamas anodinės smailės signalas mažėja nuo 0,136 iki 0,020 mA. Tai rodo, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA elektrodo sistema yra jautri ir gali būti naudojama elektrocheminei analizei. Pridėjus Glc kiekius nuo 22,9 iki 207 mM stebimas nedidelis analizinio signalo didėjimas nuo 0,021 iki 0,024 mA, tai gali būti susieta su tirpalo prisotinimu gliukoze bei tirpalo praskiedimu, esant didelėms analitės koncentracijoms. Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, anodinė smailė, didinant gliukozės koncentraciją, slenkasi į teigiamo potencialo pusę. Įvertinta, kad anodinė smailė, kai Glc koncentracija sistemoje siekia 207 mM, atsiranda prie +0,019 V potencialo. Tolimesniuose tyrimuose naudojamas +0,30 V elektrocheminis potencialas. Tuo metu katodinė smailė, didinant Glc koncentraciją nuo 0,10 iki 207 mM, slenkasi neigiamesne potencialo kryptimi ir analizinis signalas kinta nuo -0,369 iki -0,047 mA.



38 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms

Iš 39 pav. pateiktų eksperimentinių duomenų nustatyta, kad didinant Glc kiekį iki 22,9 mM tiriamojoje sistemoje, fiksuojamas anodinės smailės signalas mažėja nuo 0,104 iki 0,025 mA, tai rodo jautrų elektrodo imobilizavimo būdą ir galimybę panaudoti jį elektrocheminiuose tyrimuose. Naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemą ir pridėjus į tirpalą didesnį Glc kiekį (nuo 48,4 iki 207 mM), analizinis signalas nekinta (0,027 mA). Didinant gliukozės koncentraciją, anodinė smailė slenkasi į teigiamo potencialo pusę. Nustatyta, kad prie 207 mM Glc koncentracijos tiriamojoje sistemoje, anodinė smailė atsiranda prie +0,018 V potencialo. Tai lėmė +0,30 V elektrocheminio potencialo panaudojimą tolimesniuose tyrimuose. Iš pateiktų duomenų matyti, kad katodinė smailė, didinant Glc koncentraciją nuo 0,10 iki 207 mM, slenkasi neigiamesne potencialo kryptimi, o analizinis signalas kinta nuo -0,318 iki -0,085 mA.



39 pav. Ciklinės voltamperogramos, naudojant GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms

Išanalizavus skirtingai imobilizuotas sistemas ir jų generuojamą elektrocheminį signalą prie skirtingų Glc koncentracijų tolimesniuose tyrimuose nuspręsta taikyti +0,30 V potencialą. Nagrinėtų biologinių jutikių analizinių charakteristikų įvertinimas naudojant ciklinę voltamperometriją būtų netikslus, sudėtingas dėl anodinės smailės slinkimosi, didinant analitės koncentraciją. Dėl šios priežasties BJ analizinių charakteristikų nustatymui tinkamiausia naudoti chronoamperometrinį metodą.

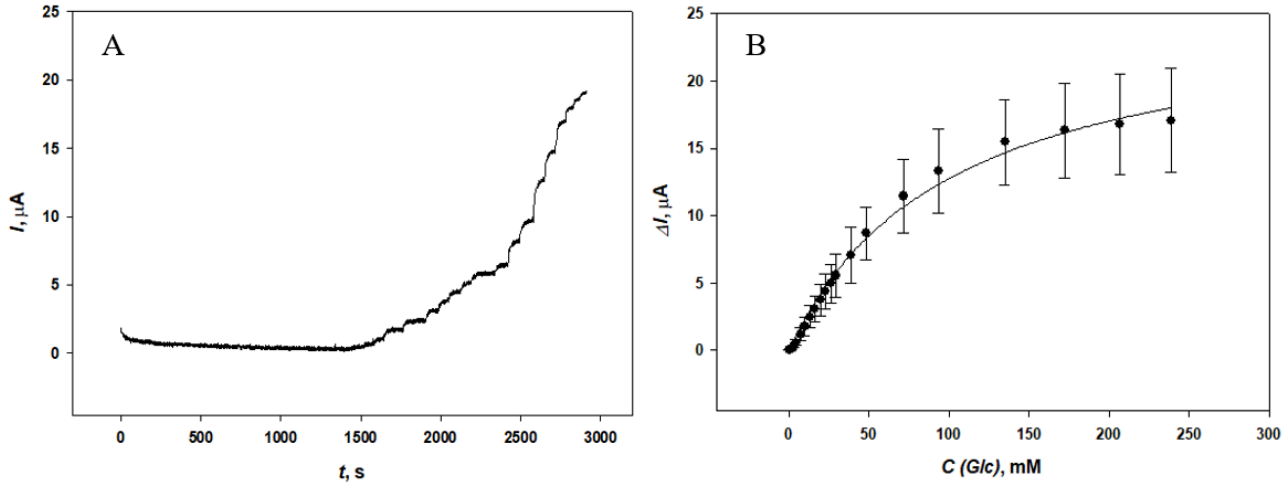
3.9. Pagrindinių analizinių charakteristikų nustatymas ir įvertinimas, naudojant gliukozės biologinius jutiklius bei chronoamperometrinį metodą

Parinkus optimalias sąlygas gliukozės biologinio jutiklio analizinio signalo registravimui buvo atliekama tiriamųjų sistemų analizė. Naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CAHDCl/AuND/FD/GOx/GA sistemas (žr. 16 pav.) buvo siekiama nustatyti pagrindines šių sistemų analizines charakteristikas, tokias kaip:

1. Michaelis-Menten kinetiniai parametrai.
2. Tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas.
3. Analizinių signalų atsikartojamumas.
4. Gliukozės aptikimo riba.

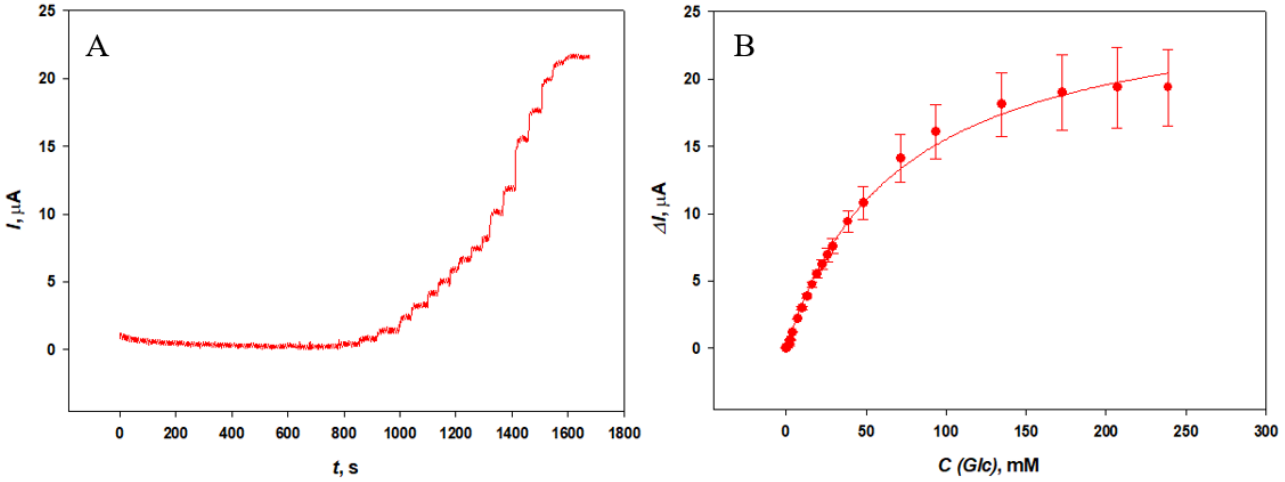
Chronoamperometriniai tyrimai (aprašyti 2.6. skyruje) buvo atlikti naudojant 3 kiekvienos sistemos elektrodus. Rezultatai apdorojami naudojant 3 nepriklausomų eksperimentų vidutines matavimų vertes. ChA matavimų metu, nustatant gliukozės analizinio signalo priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos, į elektrocheminę celę su buferiniu tirpalu (pH 6,0) buvo pridedami tam tikri gliukozės kiekiai (gliukozės koncentracijai kintant nuo 0,1 iki 239 mM). Po kiekvieno pridėjimo buvo fiksuojamas anodinės srovės stiprio ir trukmės kitimas laike.

GE modifikavus aukso nanodalelėmis, išlaikius 5 mM cistamino dihidrochlorido tirpale, pridėjus FD bei gliukozės oksidazės ir GA buvo fiksuojamas elektrodo generuojamas analizinis signalas, registruojant chronoamperogramas (žr. 40 A pav.). Remiantis gautais rezultatais buvo brėžiama GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos kalibracinė kreivė (žr. 40 B pav.).



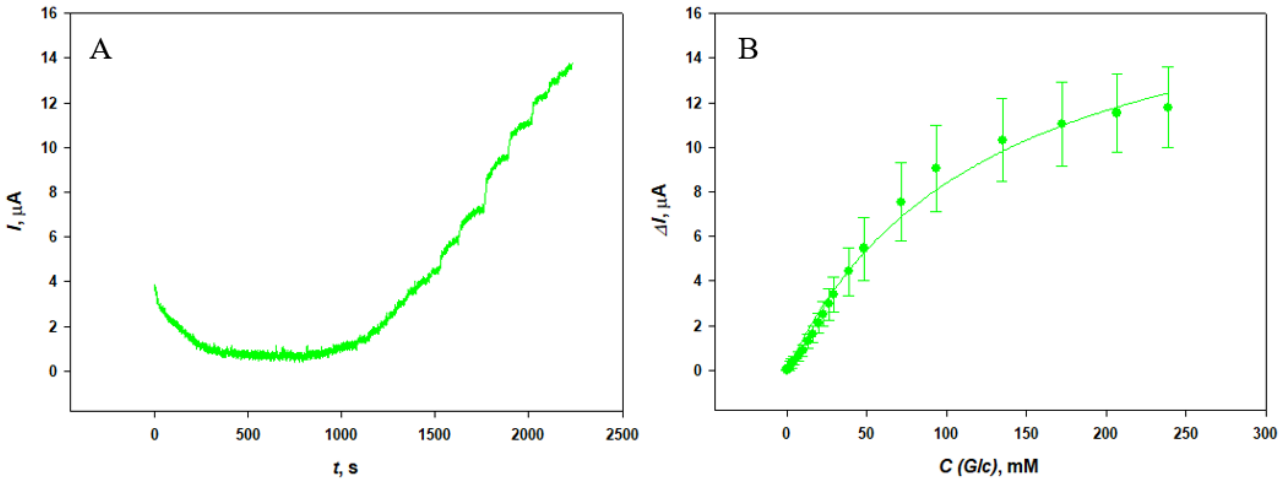
40 pav. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B)

Atliekant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos tyrimą buvo registruojamas elektrodo generuojamas analizinis signalas, fiksuojant chronoamperogramas (žr. 41 A pav.). Pagal gautus rezultatus buvo brėžiama GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodų *ΔI* priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos kalibracinė kreivė (žr. 41 B pav.)



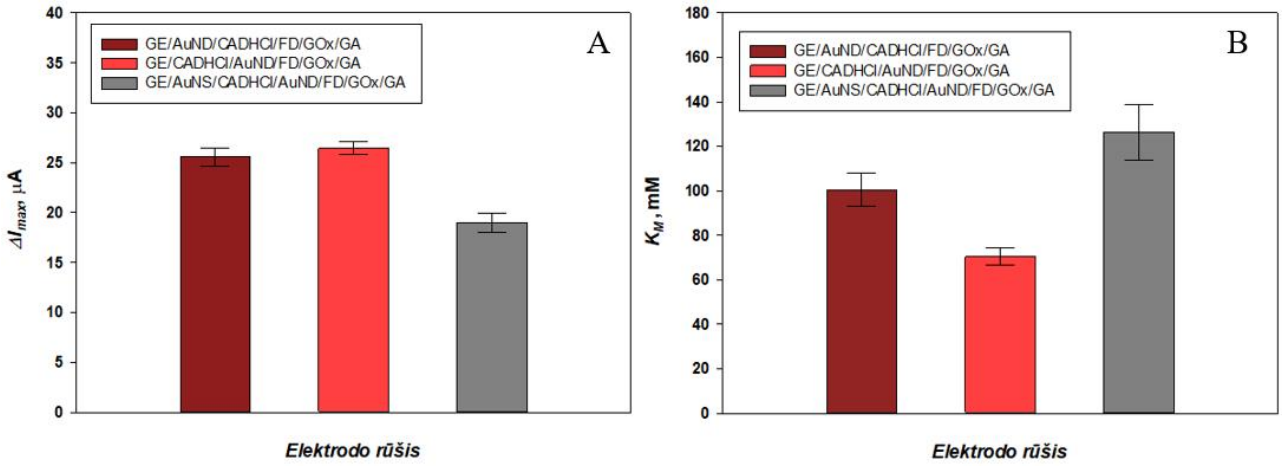
41 pav. GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B)

GE modifikavus aukso nanostruktūromis, išlaikius 5 mM cistamino dihidrochlorido tirpale, modifikavus aukso nanodalelėmis, FD bei gliukozės oksidaze ir GA buvo fiksuojamas elektrodo generuojamas analizinis signalas, registruojant chronoamperogramas (žr. 42 A pav.). Remiantis gautais rezultatais buvo brėžiama GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Glc koncentracijos kalibracinė kreivė (žr. 42 B pav.).



42 pav. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA registruota chronoamperograma (A) ir kalibracinė kreivė (B)

Kaip matyti iš pateiktų paveikslų, kalibracinės kreivės aprašomos hiperboline funkcija. Pagal chronoamperometriškai gautus rezultatus (tiek GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, tiek GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, tiek GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA atvejais) buvo apskaičiuojami Michaelis-Menten kinetiniai parametrai: maksimalios srovės stiprio pokytis ir Michaelis-Menten konstanta, kurie pateikiami atitinkamai 43 A ir 43 B paveiksluose.



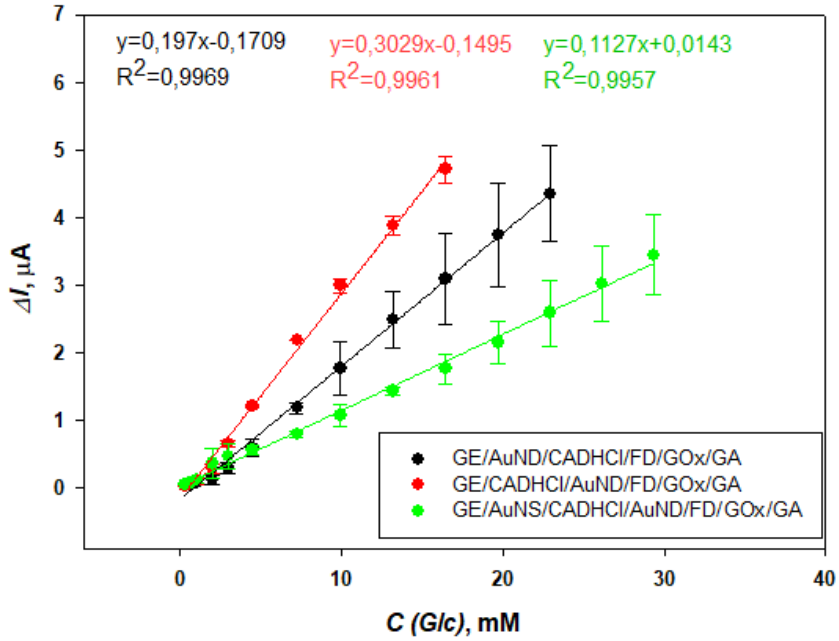
43 pav. Gliukozės biologinių jutiklių GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA pagrindu Michaelis-Menten kinetiniai parametrai: *ΔImax* (A) ir K_M (B)

Analizuojant 43 A pav. matyti, kad didžiausias maksimalios srovės pokytis 26,5±0,6 μA buvo fiksuojamas GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemai. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pasižymėjo 25,6±0,9 μA maksimalios srovės pokyčiu, kuris yra panašus į GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos analizinį signalą. Tuo tarpu sistemos, kurios sudėtyje yra aukso nanostruktūrų, t. y. GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA nustatytas srovės pokytis siekė 19±1 μA ir yra 1,39 karto mažesnis, nei GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos.

Didžiausia Michaelis-Menten konstanta (126±12 mM) buvo fiksuojama GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemai. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA ir

GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos pasižymėjo 101±8 mM ir 70±4 mM dydžio Michaelis-Menten konstantomis, kurios yra 1,25 ir 1,80 karto mažesnės nei pirmosios sistemos atveju.

Darbo metu buvo nubrėžtos analizinio signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos, nustatyti tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai visom trims elektrodų sistemoms (žr. 44 pav.).



44 pav. Gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų pagrindu, tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai

Kaip matyti iš 44 pav. pateikto grafiko, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų tiesinės priklausomybės pasižymi geromis koreliacijos koeficiento (R^2) reikšmėmis atitinkamai: 0,9969; 0,9961 ir 0,9957. Aptikimo riba skaičiuojama kaip koncentracija, atitinkanti tris analizinio signalo standartinius nuokrypius, kai matavimai atliekami foninę analitės koncentraciją turinčiame tirpale.

Nors GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų atvejais tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai yra nuo 0,3–29,4 mM ir 0,3–16,5 mM (žr. 44 pav.), tačiau aptikimo ribos atitinkamai siekia tik 0,19 mM ir 0,14 mM. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos atveju tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas yra 0,1–22,9 mM, o aptikimo riba – 0,088 mM. Nepaisant to, kad didžiausias tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas fiksuotas GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemai, tačiau mažiausia aptikimo riba ir pakankamai didelė *ΔImax* reikšmė gali būti nustatyti GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos atveju. Todėl galima daryti išvadą, jog GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema turėtų būti tinkamiausia gliukozei nustatyti biologiniuose jutikliuose.

Biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu sukurtiems BJ būdingas geras rezultatų atsikartojamumas. Gliukozės koncentracijai siekiant 7,2 mM GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA atveju nustatytas variacijos koeficientas siekė 6,89 %, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA – 1,02 %, ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA atveju 5,37 %. Atlikti GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos atsikartojamumo matavimai elektrodą matuojant keletą kartų iš eilės. Tyrimų metu nustatyta, jog prie 48,4 mM gliukozės koncentracijos tiriamojoje sistemoje, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA generuojamas analizinis signalas išlieka 8±1 μA iki 16 matavimų, variacijos koeficientas – 13 %, atsikartojamumas – 87 %.

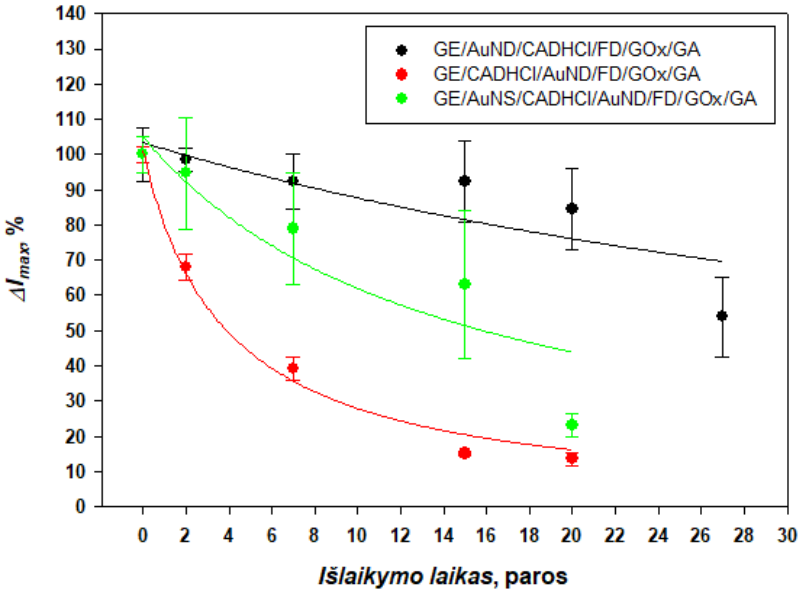
3.10. Biologinių jutiklių stabilumo tyrimas

Tyrimų metu buvo siekiama nustatyti pranašiausią BJ vertinant sukurtos sistemos (GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA) stabilumą atsižvelgiant į sistemos generuojamą analizinį signalą. Atliekant ChA matavimus (žr. 2.6. skyrių) stabilumas matuojamas nuo pagaminimo iki 20 ar 27 paros priklausomai nuo analizuojamos sistemos (žr. 2 lentelę).

2 lentelė. Biologiškai aktyvių junginių bei cistamino dihidrochlorido pagrindu sukurtų gliukozės biologinių jutiklių stabilumo kitimas, priklausomai nuo išlaikymo laiko

GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA						
Išlaikymo laikas, paros	0	2	7	15	20	27
ΔImax, μA	26±2	25,6±0,9	24±2	24±3	22±3	14±3
GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA						
Išlaikymo laikas, paros	0	2	7	15	20	
ΔImax, μA	26,5±0,6	18±1	10,4±0,9	4,0±0,2	3,6±0,5	
GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA						
Išlaikymo laikas, paros	0	2	7	15	20	
ΔImax, μA	19±1	18±3	15±3	12±4	4,4±0,6	

Siekiant tiksliai įvertinti Glc biologinių jutiklių stabilumo kitimą laike, vertinamas maksimalios srovės pokytis *ΔImax* (atitinkamai GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemoms) išreikštas procentais prilyginant 0 parų maksimalios srovės pokytį 100 % (žr. 45 pav.).



45 pav. Gliukozės biologinių jutiklių, sukurtų GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų pagrindu, maksimalios srovės pokytis (%), priklausomai nuo sistemos išlaikymo laiko

Analizuojant maksimalios srovės pokyčio priklausomybės nuo sistemos išlaikymo laiko grafiką (žr. 45 pav.) nustatyta, kad didėjant išlaikymo laikui srovės stiprio pokytis mažėja. Atliekant elektrocheminius matavimus svarbu, kad sukurti BJ išlaikytų iki 50 % aktyvumą ilgesnį laiką. Nustatyta, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema biologinį aktyvumą – 54 % išlaikė iki 27 parų, t. y. *ΔImax* sumažėjo 46 %, lyginant su ką tik pagamintos GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos *ΔImax* (100 %). Lyginant GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos generuojamus maksimalios srovės pokyčius po 2 ir 7 parų nustatyta, jog po 2 parų GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA išlaiko 68 % aktyvumą, lyginant su 0 parų (100 %) signalu. Po 7 parų tiriamoji sistema išlaikė 39 % aktyvumą lyginant su aktyvumu, nustatytu iškart po elektrodo paruošimo. Lyginant *ΔImax* po 15 ir 20 parų matyti, jog po 15 parų GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistema išlaiko 63 % aktyvumą, lyginant su 0 parų (100 %). Tačiau po 20 parų *ΔImax* krito iki 23 %. Kadangi GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema išlieka aktyvi (t. y. iki 50 %) ilgesnį laiką (27 paras), todėl šis Glc biologinis jutiklis gali būti pranašesnis bei plačiau pritaikomas realių objektų tyrimuose.

3.11. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurto biologinio jutiklio pritaikymas gliukozei nustatyti realiuose objektuose

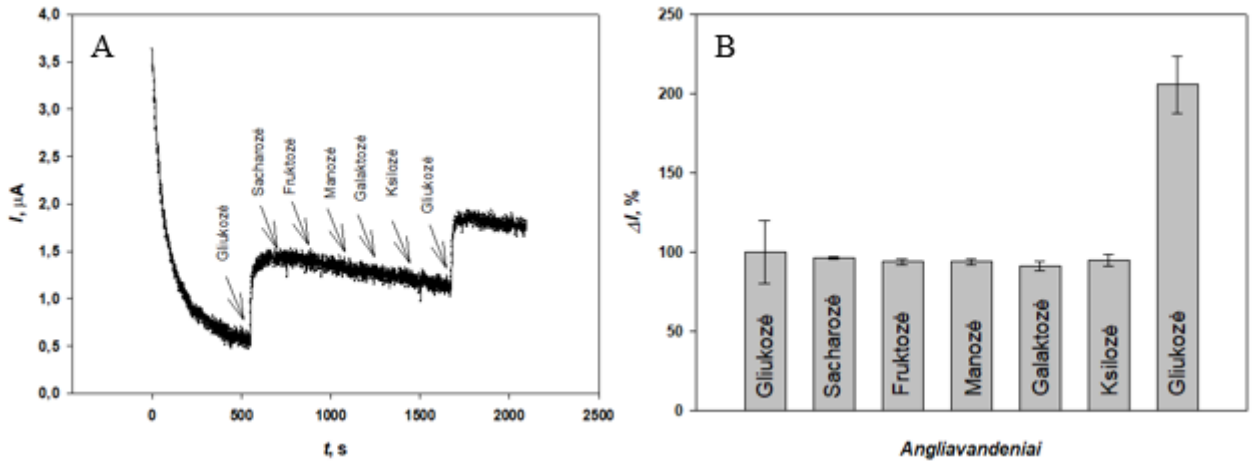
Atlikus GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA, GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemų pagrindu sukurtų gliukozės biologinių jutiklių stabilumo tyrimus ir nustačius, jog GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA yra stabilesnis laike, nuspręsta šį elektrodą pritaikyti tyrimams realiuose objektuose. ChA matavimų metu siekiama įvertinti sistemos

tinkamumą bei efektyvumą nustatant analitę žmogaus seilėse ir serume, migdolų piene, ir mandarinų sultyse (metodika pateikta 2.8. skyriuje).

3.11.1. Žmogaus seilės

Angliavandenių įtakos tyrimas žmogaus seilėse

Tyrimų metu buvo atliekama analizė naudojant angliavandenių tirpalus bei GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Eksperimentų metu siekiama įvertinti sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės įtaką Glc nustatymui žmogaus seilėse (žr. 2.8. skyrių). Gauti rezultatai, t. y. chronoamperograma ir diagrama pateikiami atitinkamai 46 A ir 46 B pav. Siekiant tiksliau įvertinti gautus rezultatus ir BJ atsparumą angliavandenių tirpalams, vertinamas analizinio signalo pokytis išreiškiamas procentais prilyginant prieš tai pridėto angliavandenio generuojamą analizinį signalą 100 %.



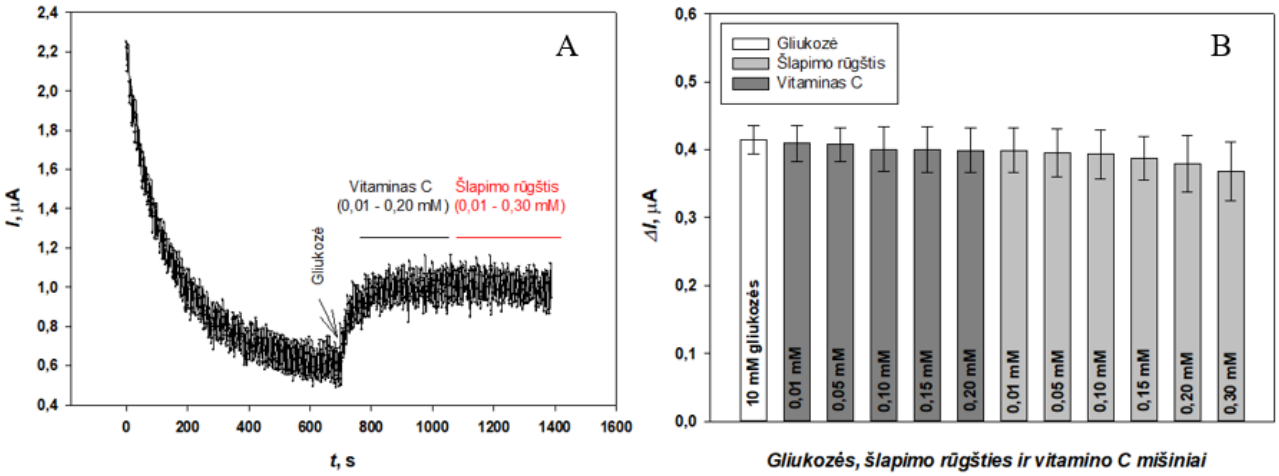
46 pav. Chronoamperograma (A) bei diagrama (B) vaizduojančios angliavandenių įtaką gliukozės analiziniam signalui žmogaus seilėse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Angliavandenių pridėjimo vietos grafike A pateikiamos rodyklėmis

Analizuojant angliavandenių įtaką GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos analiziniam signalui žmogaus seilėse, nustatyta, kad 10 mM Glc pridėjimas (nusistovėjus foniniam analiziniam signalui) didina sistemos signalą iki 1,0±0,2 µA (žr. 46 A pav.). Šis signalas prilyginamas 100 % ir toliau į analizuojamą sistemą kas 200 s pridedami tam tikri angliavandenių tirpalų kiekiai. Remiantis gautais rezultatais (žr. 46 pav.) galima teigti, kad 1,0 mM sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės tirpalų pridėjimas neturėjo reikšmingos įtakos gliukozės analizinio signalo pokyčiui, kadangi pridėjus tam tikrus angliavandenių kiekius analizinis signalas kito iki 3 %, priklausomai nuo pridėto angliavandenio. Į elektrocheminę celę dar kartą pridėjus 10 mM Glc tirpalo buvo stebimas analizinio signalo didėjimas 111 % lyginant su analiziniu signalu, generuojamu į sistemą pridėjus ksilozės tirpalo. Taigi, remiantis gautais duomenimis galima teigti, kad

GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA elektrodas žmogaus seilėse pasižymi jautrumu išskirtinai gliukozei.

Vitamino C ir šlapimo rūgšties įtaka žmogaus seilėse

Tyrimų metu buvo siekiama įvertinti vitamino C bei šlapimo rūgšties įtaką Glc analiziniam signalui žmogaus seilėse. Į elektrocheminę celę buvo pridedami tam tikri gliukozės mišinio kiekiai su atitinkamos koncentracijos vitamino C (0,01–0,20 mM) ir šlapimo rūgšties (0,01–0,30 mM) tirpalais (metodika pateikta 2.8. skyriuje). Chronoamperograma bei gauti rezultatai pateikiami atitinkamai 47 A ir 47 B pav.



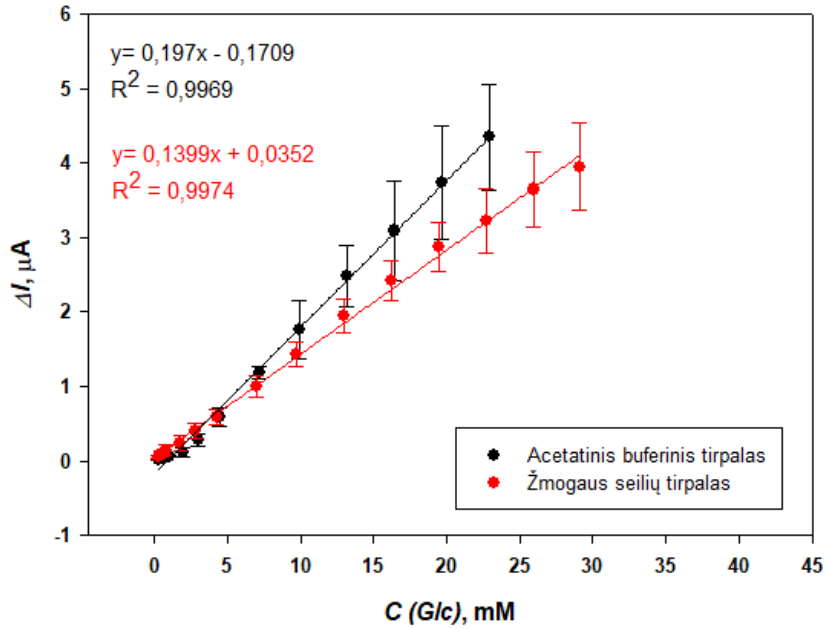
47 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C bei šlapimo rūgšties įtaka Glc analiziniam signalui žmogaus seilėse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Analizuojant vitamino C įtaką gliukozės analiziniam signalui (žr. 47 B pav.) matyti, kad didėjant vitamino C koncentracijai iki 0,20 mM fiksuojamas analizinio signalo mažėjimas iki 0,40±0,03 µA, t. y. šis generuojamas signalas yra 1,05 karto mažesnis lyginant su duomenimis, kai sistemoje nėra pridėta vitamino C (0,42±0,02 µA). Tiriant šlapimo rūgšties įtaką sukurtam Glc biologiniam jutikliui (žr. 47 B pav.), nustatyta, jog, didinant šlapimo rūgšties kiekį žmogaus seilėse nuo 0,01 mM iki 0,30 mM, pastebimas analizinio signalo mažėjimas (1,08 karto) nuo 0,40±0,03 µA iki 0,37±0,04 µA. Galima daryti išvadas, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA biologinis jutiklis yra atsparus nedidelėms iki 0,20 mM vitamino C, ir iki 0,30 mM šlapimo rūgšties koncentracijoms.

Biologinio jutiklio GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu praktinis pritaikymas gliukozei nustatyti žmogaus seilėse

Ištyrus angliavandenių, vitamino C ir šlapimo rūgšties poveikį Glc analiziniam signalui žmogaus seilėse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą, toliau buvo siekiama įvertinti, ar sukurtas BJ yra tinkamas praktiniam pritaikymui nustatant Glc kiekį. Eksperimento metu

buvo nustatomi tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai 0,05 mM acetatiniame buferiniame tirpale (žr. 2.8. skyrių) bei žmogaus seilių mėginyje. Gauti rezultatai pateikiami 48 paveiksle.



48 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei žmogaus seilių tirpale, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Analizuojant 48 pav. pateiktus rezultatus nustatyta, jog acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema pasižymi nuo 0,10 iki 22,9 mM tiesiniu gliukozės koncentracijos intervalu, žmogaus seilių tirpale – nuo 0,30 iki 29,2 mM tiesiniu Glc koncentracijos intervalu. Matyti, kad žmogaus seilių tirpale tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas yra 1,28 karto platesnis nei acetatiniame buferiniame tirpale. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai registruoti matavimus atlikus acetatiniame buferiniame tirpale ir skiestame žmogaus seilių tirpale pasižymi atitinkamai 0,9969 ir 0,9974 koreliacijos koeficientais.

Tačiau, nepaisant to, pastebėta, jog iki pasiekiant 4,48 mM gliukozės koncentraciją tiriamojoje sistemoje, seilių tirpale generuojamas didesnis Glc analizinis signalas, lyginant su GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA generuojamu signalu acetatiniame buferiniame tirpale. Į sistemą pridėjus 0,30 mM gliukozės, acetatiniame buferiniame tirpale nustatytas analizinis signalas siekė 0,023±0,006 μA, tuo tarpu skiestame žmogaus seilių tirpale – 0,050±0,016 μA, t. y. 2,17 karto daugiau žmogaus seilių tirpale. Tiriamojoje sistemoje esant 4,48 mM gliukozės tirpalui, acetatiniame buferiniame tirpale nustatytas 0,6±0,2 μA signalas, kuris žmogaus seilių tirpale siekia 0,6±0,1 μA.

Įvertinus tiesinį gliukozės koncentracijos intervalą skiestame žmogaus seilių tirpale, buvo siekiama pritaikyti sukurtą BJ analitės nustatymui. Gliukozės kiekis buvo nustatomas priedų metodu į elektrocheminę celę pridedant tam tikros koncentracijos gliukozės tirpalą bei fiksuojant analizinio signalo pokytį. Gauti rezultatai (gliukozės kiekiai ir išgavos) yra pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, žmogaus seilių tirpale

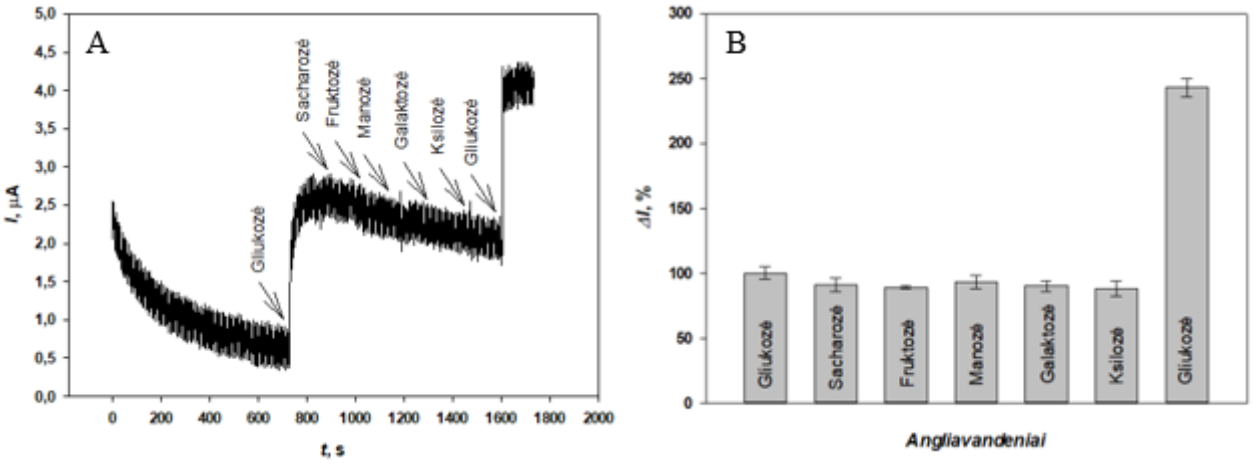
Gliukozės koncentracija, mM		Išgava, %	Bandymų skaičius
Pridėta	Rasta		
0,50	0,48 ± 0,01	96,0	3
0,80	0,77 ± 0,08	96,3	2
2,79	2,75 ± 0,03	98,6	2

Analizuojant gliukozės kiekio, nustatyto priedų metodu, žmogaus seilių tirpale rezultatus, matyti, jog GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos praktiškai gautos išgavos yra nuo 96,0 iki 98,6 % gliukozės koncentracijai kintant nuo 0,50 iki 2,79 mM. Todėl galima teigti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikomas nustatant Glc kiekį žmogaus seilėse.

3.11.2. Žmogaus serumas

Angliavandenių įtakos tyrimas žmogaus serume

Angliavandenių įtakos žmogaus serume tyrimo metu, naudojant sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės tirpalus bei GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą, buvo atliekama kokybinė ir kiekybinė analizės. Tyrimo metu siekiama įvertinti angliavandenių įtaką gliukozei nustatyti žmogaus serume (žr. 2.8. skyrių). Chronoamperograma ir gauti rezultatai pateikiami atitinkamai 49 A ir 49 B pav.



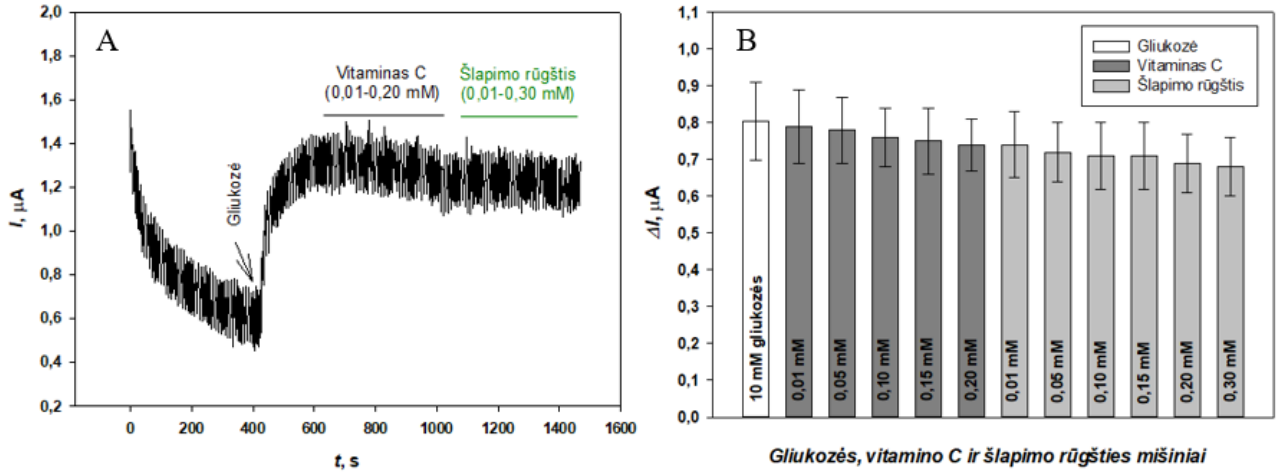
49 pav. Chronoamperograma (A) bei diagrama (B) vaizduojančios angliavandenių įtaką gliukozės analiziniam signalui žmogaus serume, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Angliavandenių pridėjimo vietos grafike A žymimos rodyklėmis

Analizuojant gautus rezultatus matyti, kad Glc pridėjimas sąlygojo staigų analizinio signalo didėjimą iki 1,97±0,09 µA, lyginant su foniniu analiziniu signalu. Toliau į elektrocheminę celę ~200 s intervalu buvo pridedami tam tikri 1 mM koncentracijos sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės bei ksilozės kiekiai, kurie lėmė analizinio signalo mažėjimą. Elektrocheminis signalas kito nuo 1 iki

9 %, priklausomai nuo pridėto angliavandenio. Siekiant patikrinti sistemos atrankumą gliukozei, kai sistemoje yra įvairių angliavandenių tirpalų, į celę su skiestu žmogaus serumo tirpalu buvo pridedamas papildomas 10 mM Glc kiekis. Šis pridėjimas sąlygojo analizinio signalo didėjimą 155 %, todėl galima daryti išvadą, jog GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema skiestame žmogaus serumo tirpale yra jautri išimtinai gliukozei.

Vitamino C ir šlapimo rūgšties įtaka žmogaus serumo tirpale

Tolimesnių tyrimų metu buvo siekiama įvertinti Glc analizinio signalo priklausomybę nuo vitamino C bei šlapimo rūgšties koncentracijos žmogaus serumo tirpale. Į elektrocheminę celę buvo pridedami tam tikri gliukozės mišinio kiekiai su atitinkamos koncentracijos vitamino C (0,01–0,20 mM) ir šlapimo rūgšties (0,01–0,30 mM) tirpalų kiekiais (metodika pateikta 2.8. skyriuje). Chronoamperograma bei gauti rezultatai pateikiami atitinkamai 50 A ir 50 B pav.

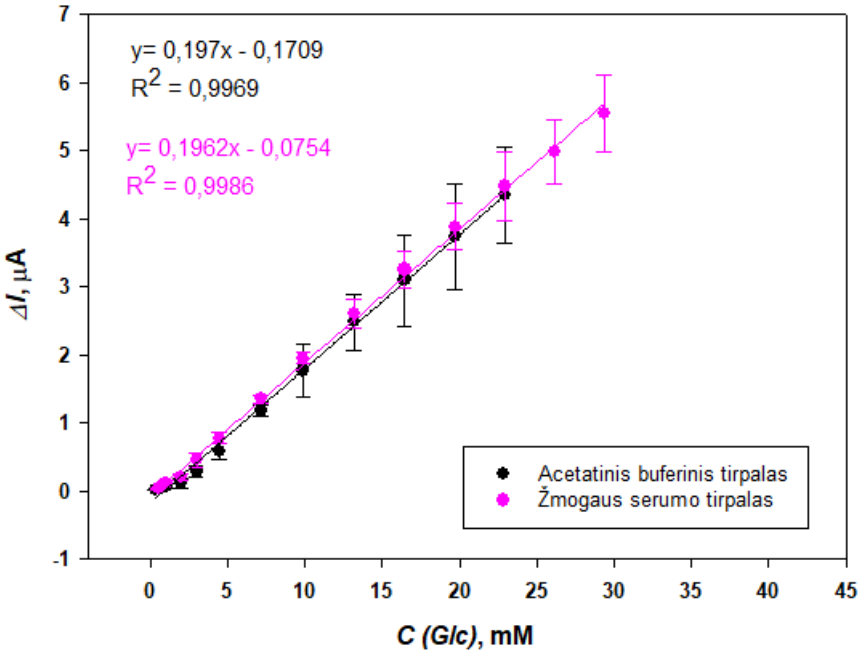


50 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C bei šlapimo rūgšties įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA žmogaus serumo tirpale

Analizuojant gautus rezultatus matyti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema žmogaus serumo tirpale pasižymi jautrumu gliukozei, kadangi pridėjus 10 mM Glc tirpalo stebimas analizinio signalo didėjimas. Į sistemą pridėjus atitinkamus vitamino C kiekius nustatyta, jog sistema yra atspari nedidelėms iki 0,20 mM koncentracijoms. Vitamino C koncentracijoms tiriamojoje sistemoje kintant nuo 0,01 iki 0,20 mM stebimas signalo mažėjimas. Analizinis signalas mažėjo 1,08 karto iki 0,74±0,07 µA, lyginant su 0 mM vitamino C koncentracija (0,8±0,1 µA) tiriamojoje sistemoje (50 B pav.). Tiriant šlapimo rūgšties įtaką nustatyta, jog GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema žmogaus serumo tirpale pasižymi atsparumu nedidelėms iki 0,30 mM šlapimo rūgšties koncentracijoms. Pridėjus 0,01 mM šlapimo rūgšties, sistemoje fiksuotas 0,7±0,1 µA stiprio analizinis signalas, kuris krito iki 0,68±0,08 µA, į sistemą pridėjus 0,30 mM šlapimo rūgšties.

Biologinio jutiklio GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu praktinis pritaikymas gliukozei nustatyti žmogaus serumo tirpale

Tyrimo metu buvo siekiama įvertinti, ar GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas BJ yra tinkamas praktiniam pritaikymui nustatant Glc kiekį žmogaus serumo tirpale. Šiam tikslui buvo lyginami tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai 0,05 mM acetatiniame buferiniame tirpale (žr. 2.8. skyrių) bei žmogaus serumo mėginyje. Gauti rezultatai pateikiami 51 paveiksle.



51 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei žmogaus serumo tirpale, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Analizuojant 51 pav. pateiktus rezultatus matyti, kad tiek acetatiniame buferiniame tirpale, tiek skiestame žmogaus serumo tirpale GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis pasižymi plačiu tiesiniu Glc koncentracijos intervalu. Acetatiniame buferiniame tirpale fiksuotas nuo 0,10 iki 22,9 mM, tuo tarpu skiestame žmogaus serumo tirpale – nuo 0,50 iki 29,4 mM tiesinis Glc koncentracijos intervalas. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai registruoti acetatiniame buferiniame tirpale ir skiestame žmogaus serumo tirpale pasižymi atitinkamai 0,9969 ir 0,9986 koreliacijos koeficientais.

Pastebėta, jog žmogaus serumo tirpale GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos tiesinis Glc koncentracijos intervalas yra platesnis, ir generuojamas analizinis signalas yra šiek tiek didesnis. Nustatyta, kad sistemoje esant 22,9 mM Glc koncentracijai, acetatiniame buferiniame tirpale generuojamas signalas siekia 4,4±0,7 μA, o skiesto žmogaus serumo tirpale – 5,0±0,5 μA, t. y. 1,14 karto didesnis analizinis signalas skiestame žmogaus serumo tirpale.

Tolimesnių tyrimų metu buvo bandoma nustatyti gliukozės kiekius praskiestame žmogaus serume, naudojant priedų metodą: į elektrocheminę celę pridedant tam tikros koncentracijos analitės

tirpalą bei fiksuojant analizinio signalo pokytį. Nustatyti gliukozės kiekiai ir išgavos yra pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, žmogaus serumo tirpale

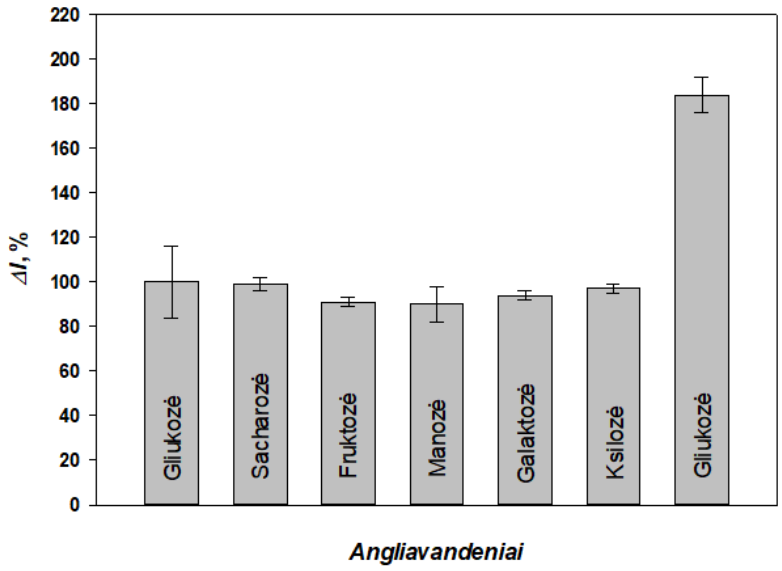
Gliukozės koncentracija, mM		Išgava, %	Bandymų skaičius
Pridėta	Rasta		
0,50	0,43 ± 0,01	86,0	2
0,70	0,65 ± 0,03	92,9	2
2,00	1,9 ± 0,3	95,0	3
7,21	7 ± 2	97,1	2

Analizuojant 4 lentelėje pateiktus rezultatus matyti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos praktiškai gautos išgavos yra nuo 86,0 iki 97,1 % gliukozės koncentracijai kintant nuo 0,50 iki 7,21 mM. Galima teigti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikomas nustatant Glc kiekį žmogaus serume.

3.11.3. Migdolų pienas

Angliavandenių įtakos tyrimas migdolų piene

Sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės tirpalai bei GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema buvo naudojami angliavandenių įtakos gliukozės analiziniam signalui tyrimui migdolų piene (žr. 2.8. skyrių). Siekiant tiksliau įvertinti gautus rezultatus ir BJ atsparumą angliavandenių tirpalams, vertinamas analizinio signalo pokytis išreiškiamas procentais prilyginant prieš tai pridėto angliavandenio generuojamą analizinį signalą 100 % migdolų piene (žr. 52 pav.).

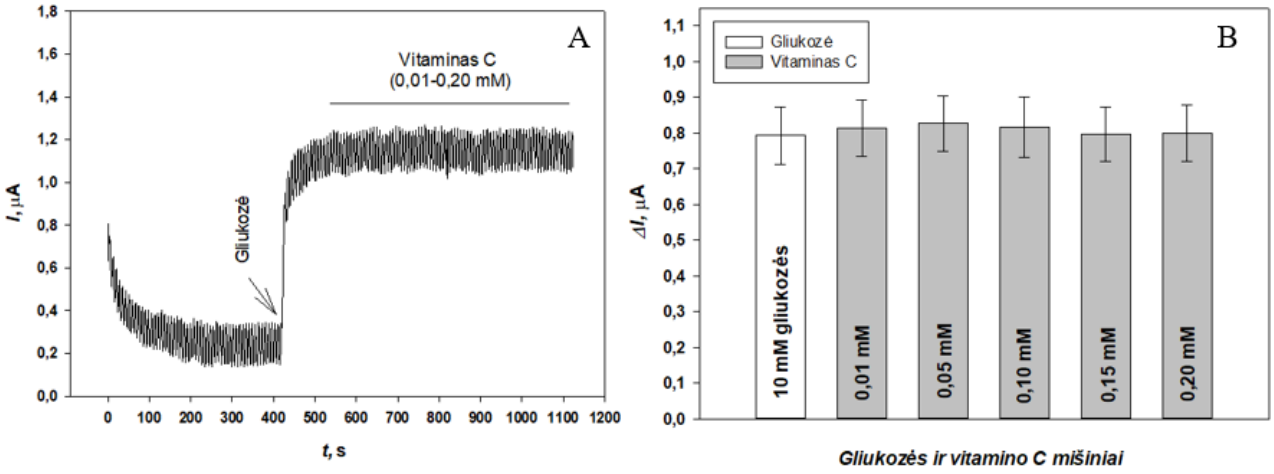


52 pav. Angliavandenių įtaka analiziniam signalui migdolų piene, išreikšta procentais, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Analizuojant angliavandenių įtaką GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA analiziniam signalui migdolų piene, nustatyta, kad 10 mM Glc pridėjimas didina sistemos analizinį signalą iki 3,0±0,5 μA. Šis signalas prilyginamas 100 % ir toliau į analizuojamą sistemą kas 200 s pridedami tam tikri angliavandenių tirpalų kiekiai. Remiantis gautasi rezultatais (žr. 52 pav.) galima teigti, kad angliavandeniai (sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir ksilozės) neturėjo reikšmingos įtakos gliukozės analizinio signalo didėjimui, kadangi pridėjus tam tikrus angliavandenių kiekius analizinis signalas kito nuo 1 iki 8 %, lyginant sistemos generuojamą analizinį signalą su prieš tai pridėtų angliavandenių generuojamu analiziniu signalu. Į elektrocheminę celę dar kartą pridėjus 10 mM Glc tirpalo buvo stebimas analizinio signalo didėjimas 89 % lyginant su analiziniu signalu, generuojamu į sistemą pridėjus ksilozės tirpalo. Taigi, remiantis gautais duomenimis galima teigti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA elektrodas migdolų piene pasižymi jautrumu išskirtinai gliukozei.

Vitamino C įtaka migdolų piene

Tolimesnių tyrimų metu buvo siekiama įvertinti Glc analizinio signalo priklausomybę nuo vitamino C koncentracijos migdolų piene. Į elektrocheminę celę buvo pridedami tam tikri gliukozės mišinio kiekiai su atitinkamos koncentracijos vitamino C (0,01–0,20 mM) tirpalų kiekiais (metodika pateikta 2.8. skyriuje). Chronoamperograma bei gauti rezultatai pateikiami atitinkamai 53 A ir 53 B pav.



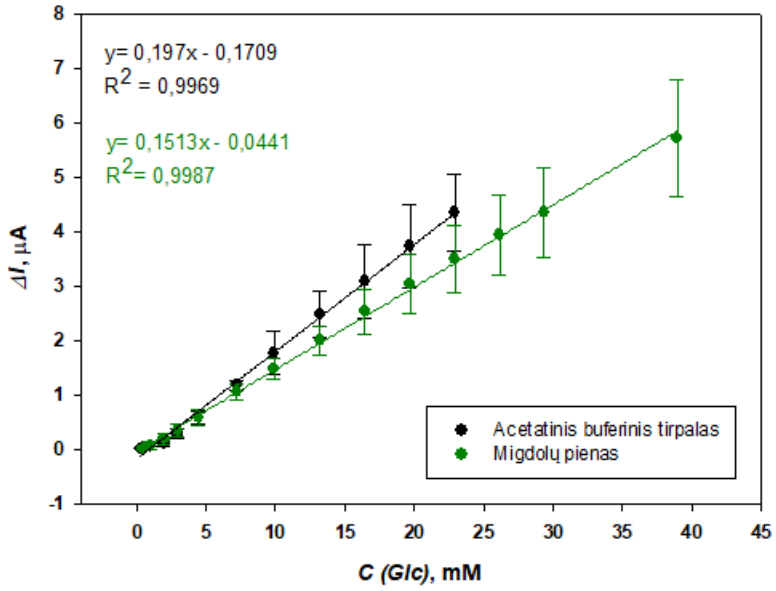
53 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA migdolų piene

Analizuojant gautus rezultatus matyti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema migdolų piene pasižymi jautrumu gliukozei, kadangi pridėjus 10 mM Glc tirpalo stebimas analizinio signalo didėjimas. Į sistemą pridėjus atitinkamus vitamino C kiekius nustatyta, jog sistema yra atspari nedidelėms iki 0,20 mM koncentracijoms. Vitamino C koncentracijoms tiriamojoje sistemoje kintant nuo 0,01 iki 0,05 mM stebimas signalo didėjimas. Analizinis signalas didėjo 1,05 karto nuo 0,79±0,08 μA (0 mM vitamino C žymima 10 mM Glc) iki 0,83±0,08 μA (0,05 mM vitamino C). Į sistemą

pridėjus 0,10 mM vitamino C pastebimas analizinio signalo mažėjimas iki 0,82±0,09 µA, kuris krito į sistemą pridėjus didesniu vitamino C kiekius iki 0,20 mM. Todėl galima daryti išvadą, jog BJ, sukurtas GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu, yra nejautrus mažoms vitamino C koncentracijoms.

Biologinio jutiklio GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu praktinis pritaikymas gliukozei nustatyti migdolų piene

Tyrimo metu buvo siekiama įvertinti, ar GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas BJ yra tinkamas praktiniam pritaikymui nustatant Glc kiekį migdolų piene. Eksperimento metu buvo nustatytas tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas migdolų piene bei palygintas su 0,05 mM acetatiniame buferiniame tirpale (žr. 2.8. skyrių). Gauti rezultatai pateikiami 54 paveiksle.



54 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei migdolų piene, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Iš pateiktų 54 pav. rezultatus matyti, kad midgolų piene GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis pasižymi platesniu tiesiniu Glc koncentracijos intervalu 0,50 iki 39,0 mM (R^2 = 0,9987), nei acetatiniame buferiniame tirpale – nuo 0,10 iki 22,9 mM (R^2 = 0,9969).

Nustatyta, kad sistemoje esant 22,9 mM Glc koncentracijai, acetatiniame buferiniame tirpale generuojamas signalas yra 1,26 karto didesnis (4,4±0,7 µA) negu migdolų piene (3,5±0,6 µA). Tačiau pastebėta, kad iki pasiekiant 7,21 mM gliukozės koncentraciją GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA migdolų piene generuojamas didesnis (arba lygus) analizinis signalas, nei acetatiniame buferiniame tirpale. Pavyzdžiui į sistemas acetatiniame buferiniame tirpale ir migdolų piene pridėjus 0,70 mM Glc, pirmuoju atveju fiksuotas 0,043±0,006 µA dydžio analizinis signalas, antruoju atveju – 0,05±0,05 µA. Sistemoje esant 4,48 mM gliukozės koncentracijai, acetatiniame buferiniame tirpale

nustatytas 0,6±0,2 μA dydžio analizinis signalas, migdolų pieno tirpale pastarasis taip pat siekė 0,6±0,1 μA.

Įvertinus tiesinį gliukozės koncentracijos intervalą migdolų piene, buvo siekiama pritaikyti sukurtą BJ gliukozei nustatyti priedų metodu (žr. 5 lentelę).

5 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, migdolų piene

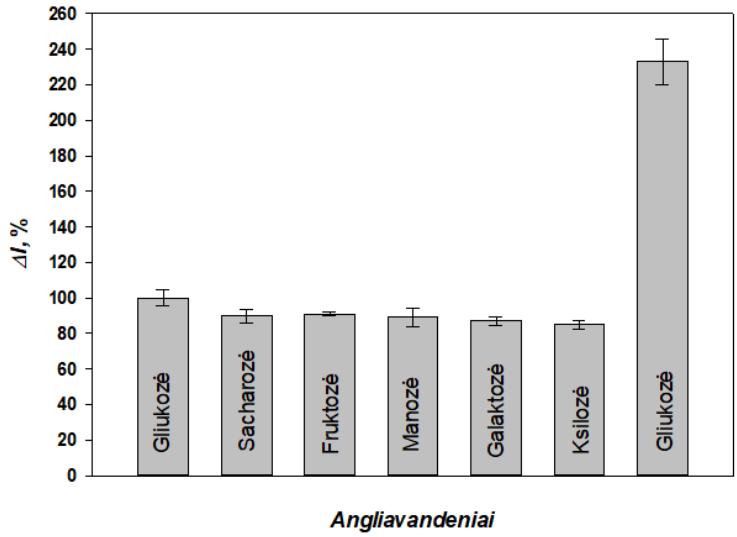
Gliukozės koncentracija, mM		Išgava, %	Bandymų skaičius
Pridėta	Rasta		
2,00	1,8 ± 0,7	90,0	2
7,21	6,8 ± 0,3	94,3	2
9,92	9,79 ± 0,08	98,7	2

Iš pateiktų 5 lentelėje rezultatų matyti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemos praktiškai gautos išgavos yra nuo 90,0 iki 98,7 % gliukozės koncentracijai kintant nuo 2,00 iki 9,92 mM. Akivaizdu, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikomas nustatant Glc kiekį migdolų piene.

3.11.4. Mandarinų sultys

Angliavandenių įtakos tyrimas mandarinų sultyse

Chronoamperograma ir gauti rezultatai, atliekant sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės bei ksilozės tirpalų įtakos tyrimus mandarinų sultyse (žr. 2.8. skyrių), naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistemą. Siekiant tiksliau įvertinti gautus rezultatus ir BJ atsparumą angliavandenių tirpalams, vertinamas analizinio signalo pokytis išreiškiamas procentais prilyginant prieš tai pridėto angliavandenio generuojamą analizinį signalą 100 % mandarinų sultyse (žr. 55 pav.)

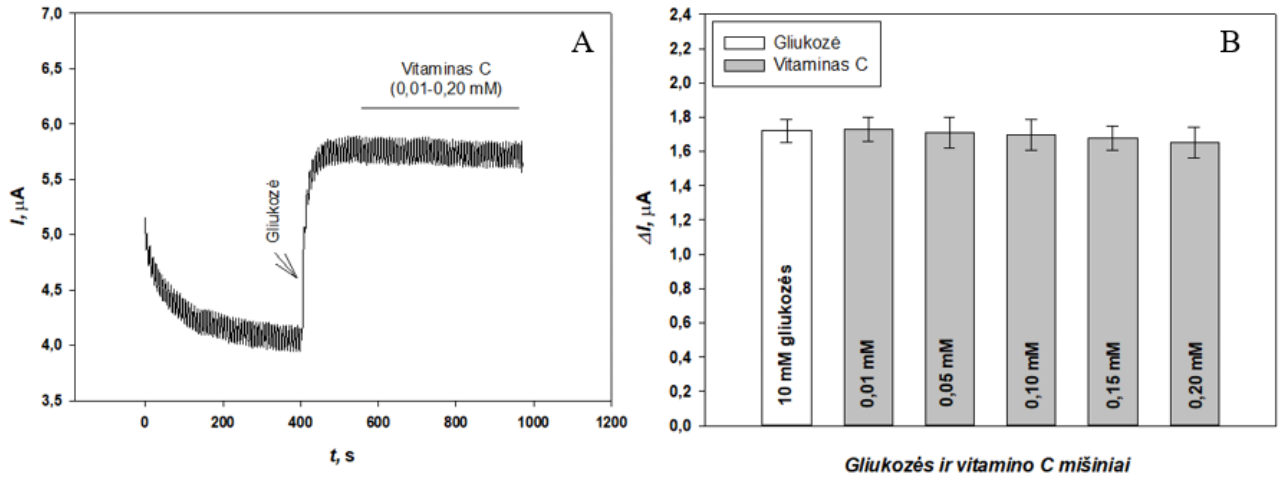


55 pav. Angliavandenių įtaka analiziniam signalui mandarinų sultyse, išreikšta procentais, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Analizuojant 55 pav. gautus rezultatus matyti, kad Glc pridėjimas sąlygojo staigų analizinio signalo didėjimą iki 2,1±0,1 μA, lyginant su foniniu analiziniu signalu. Šis signalas prilyginamas 100 % ir toliau į analizuojamą sistemą 150 s intervalu pridedami tam tikri 1 mM koncentracijos sacharozės, fruktozės, manozės, galaktozės bei ksilozės kiekiai, kurie lėmė analizinio signalo pokytį. Elektrocheminis signalas kito nuo 1,1 iki 10 % po kiekvieno angliavandenio pridėjimo. Siekiant patikrinti sistemos atrankumą gliukozei, kai sistemoje yra įvairių angliavandenių tirpalų, į celę su skiestu mandarinų sulčių tirpalu buvo pridedamas papildomas 10 mM Glc kiekis. Šis pridėjimas sąlygojo analizinio signalo didėjimą 148 % lyginant su su analiziniu signalu, generuojamu į sistemą pridėjus ksilozės tirpalo, todėl galima daryti išvadą, jog sukurtas biologinis jutiklis, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu, mandarinų sultyse yra jautrus išskirtinai gliukozei.

Vitamino C įtaka mandarinų sultyse

Tyrimų metu buvo siekiama įvertinti Glc analizinio signalo priklausomybę nuo vitamino C koncentracijos mandarinų sultyse. Į elektrocheminę celę buvo pridedami 10 mM gliukozės mišinio kiekiai su atitinkamos koncentracijos vitamino C (0,01–0,20 mM) tirpalų kiekiais (metodika pateikta 2.8. skyriuje). Chronoamperograma bei gauti rezultatai pateikiami atitinkamai 56 A ir 56 B pav.



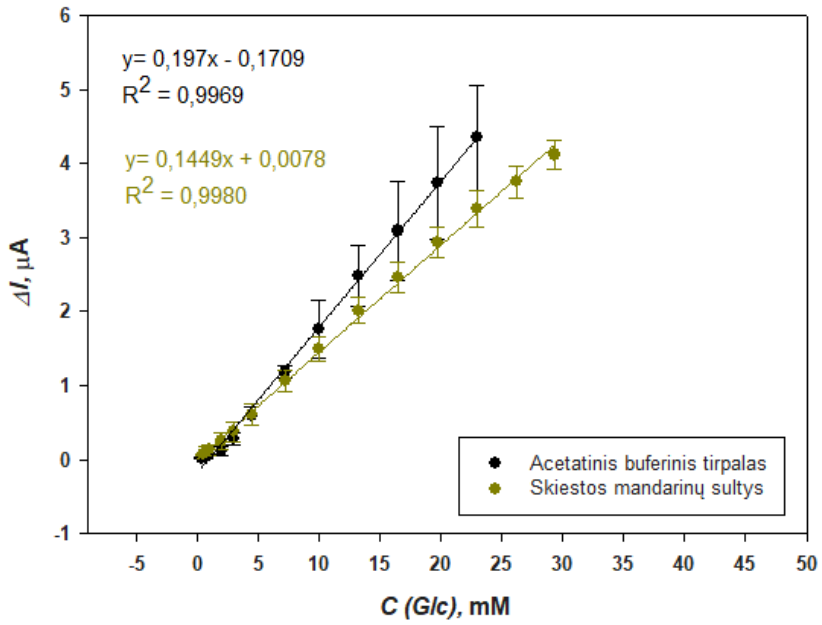
56 pav. Chronoamperograma (A) ir diagrama (B) vaizduojančios vitamino C įtaką gliukozės analiziniam signalui, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA mandarinų sultyse

Analizuojant gautus rezultatus matyti, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema mandarinų sultyse pasižymi jautrumu gliukozei, kadangi pridėjus 10 mM Glc tirpalo stebimas analizinio signalo didėjimas. Į sistemą pridėjus atitinkamus vitamino C kiekius nustatyta, jog sistema yra atspari nedidelėms iki 0,20 mM koncentracijoms. Vitamino C koncentracijoms tiriamojoje sistemoje kintant nuo 0 iki 0,01 mM stebimas signalo didėjimas. Analizinis signalas išliko beveik nepakitęs nuo 1,72±0,07 μA (0 mM vitamino C žymima 10 mM Glc) iki 1,73±0,07 μA (0,01 mM vitamino C). Į sistemą pridėjus 0,05 mM vitamino C pastebimas analizinio signalo mažėjimas iki

1,71±0,09 μA, kuris krinta į sistemą pridėjus didesniu vitamino C kiekius iki 0,20 mM. Todėl galima daryti išvadą, jog biologinis jutiklis, sukurtas GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu, yra atsparus mažoms vitamino C koncentracijoms.

Biologinio jutiklio GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu praktinis pritaikymas gliukozei nustatyti mandarinų sultyse

Tyrimo metu buvo siekiama įvertinti, ar GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas BJ yra tinkamas Glc kiekio nustatymui mandarinų sultyse. Eksperimento metu buvo nustatytas tiesinis gliukozės koncentracijos intervalas mandarinų sultyse bei palygintas su 0,05 mM acetatiniame buferiniame tirpale (žr. 2.8. skyrių). Gauti rezultatai pateikiami 57 paveiksle.



57 pav. Tiesiniai gliukozės koncentracijos intervalai acetatiniame buferiniame tirpale bei mandarinų sultyse, naudojant GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA

Iš pateiktų 57 pav. rezultatų matyti, kad tiek acetatiniame buferiniame tirpale, tiek mandarinų sultyse GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis pasižymi plačiu tiesiniu Glc koncentracijos intervalu: acetatiniame buferiniame tirpale – nuo 0,10 iki 22,9 mM (R^2 = 0,9969), mandarinų sultyse – nuo 0,50 iki 29,4 mM (R^2 = 0,9980).

Tačiau, nepaisant to, pastebėta, jog iki pasiekiant 4,48 mM gliukozės koncentraciją tiriamojoje sistemoje, mandarinų sultyse generuojamas didesnis Glc analizinis signalas, lyginant su GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA generuojamu signalu acetatiniame buferiniame tirpale. Į sistemą su mandarinų sultimis pridėjus 0,50 mM gliukozės, analizinis signalas (0,07±0,02 μA) yra 2,12 karto didesnis, lyginant su analiziniu siganlu, gautu acetatiniame buferiniame tirpale (0,033±0,006 μA).

Įvertinus tiesinį gliukozės koncentracijos intervalą mandarinų sultyse, buvo siekiama pritaikyti BJ, sukurtą GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu, gliukozei nustatyti priedų metodu (žr. 6 lentelę).

6 lentelė. Gliukozės kiekiai, nustatyti priedų metodu, mandarinų sultyse

Gliukozės koncentracija, mM		**Išgava, %**	**Bandymų skaičius**
Pridėta	**Rasta**		
1,00	0,85 ± 0,04	85,0	2
2,00	1,91 ± 0,06	95,5	2
7,21	6,9 ± 0,8	95,7	2

Analizuojant 6 lentelę matyti, kad mandarinų sultyse praktiškai gautos išgavos yra nuo 85,0 iki 95,7 % gliukozės koncentracijai kintant nuo 1,00 iki 7,21 mM. Nustatyta, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikomas nustatant Glc kiekį mandarinų sultyse.

Išvados

1. Tyrimų metu susintetintos AuND bei AuNS. Sukurtos 7 elektrodų sistemos, modifikuotos aukso nanodariniais, cistamino dihidrochloridu bei gliukozės oksidaze. Nustatytos trys didžiausią analizinį signalą generavusios elektrodų sistemos: GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA.
2. Nustatyta, jog didesnis gliukozės analizinis signalas pasiekiamas GE išlaikius 5 mM CADHCl tirpale 16 val. kambario temperatūroje (+21 ^{o}C). Elektrocheminiams tyrimams patartina naudoti chronoamperometrinį metodą, esant +0,30 V potencialui.
3. Ciklinės voltamperometrijos metodu nustatyta, jog biologiniai jutikliai GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu tinkami elekrocheminei analizei, kadangi vykstantys oksidacijos-redukcijos procesai yra grįžtami.
4. Biologinis jutiklis GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu pasižymi geromis analizinėmis charakteristikomis: 0,1–22,9 mM tiesiniu gliukozės koncentracijos intervalu, 0,9969 koreliacijos koeficientu, 0,088 mM aptikimo riba, 6,89 % variacijos koeficientu (esant 7,2 mM Glc) bei 87 % atsikartojamumu (esant 4,48 mM Glc ir 16 matavimų).
5. Ištirtas gliukozės biologinių jutiklių GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA, GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu stabilumas laike. Nustatyta, kad GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema iki 50 % aktyvumą išlaiko 27 paras, tuo tarpu GE/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA ir GE/AuNS/CADHCl/AuND/FD/GOx/GA sistemos – 2 ir 15 parų atitinkamai.
6. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu sukurtas gliukozės BJ modelis buvo sėkmingai pritaikomas žmogaus seilėse bei serume, migdolų piene bei mandarinų sultyse, nes pasižymi atsparumu trukdžiams, t. y. angliavandeniams, vitaminui C bei šlapimo rūgščiai. GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA sistema pasižymėjo geromis gliukozės išgavomis žmogaus seilių tirpale: 96,0–98,6 %, žmogaus serumo tirpale: 86,0–97,1 %, migdolų piene: 90,0–98,7 % ir mandarinų sultyse: 85,0–95,7 %.

Sukurtas gliukozės biologinis jutiklis GE/AuND/CADHCl/FD/GOx/GA pagrindu po kelių patobulinimų ateityje gali būti pritaikomas gliukozės kiekio nustatymui realiuose objektuose.

Rugilė Chmieliauskaitė
(Vardas, pavardė)

Parašas

Literatūros sąrašas

Abdulbari, H. A., & Basheer, E. A. M. (2017). Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. *ChemBioEng Reviews*, *4*(2), 92–105. https://doi.org/10.1002/cben.201600009

Ahuja, T., Mir, I. A., Kumar, D., & Rajesh. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, *28*(5), 791–805. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.046

Alarcon-Angeles, G., Álvarez-Romero, G. A., & Merkoçi, A. (2018). Electrochemical biosensors: Enzyme kinetics and role of nanomaterials. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 140–155. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13477-8

Alwafi, H., Alsharif, A. A., Wei, L., Langan, D., Naser, A. Y., Mongkhon, P., Bell, J. S., Ilomaki, J., Al Metwazi, M. S., Man, K. K. C., Fang, G., & Wong, I. C. K. (2020). Incidence and prevalence of hypoglycaemia in type 1 and type 2 diabetes individuals: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *170*, 108522. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108522

Annu, Sharma, S., Jain, R., & Raja, A. N. (2020). Review—Pencil Graphite Electrode: An Emerging Sensing Material. *Journal of The Electrochemical Society*, *167*(3), 037501. https://doi.org/10.1149/2.0012003jes

Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, *27*(4), 489–501. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003

Betancor, L., López-Gallego, F., Alonso-Morales, N., Dellamora, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2006). Glutaraldehyde in Protein Immobilization. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 57–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_5

Bontempelli, G., & Toniolo, R. (2009). Measurement Methods | Electrochemical: Linear Sweep and Cyclic Voltammetry. *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, 643–654. https://doi.org/10.1016/B978-044452745-5.00069-1

Bratlie, K. M., York, R. L., Invernale, M. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2012). Materials for Diabetes Therapeutics. *Advanced Healthcare Materials*, 267–284. https://doi.org/10.1002/adhm.201200037

Bruen, D., Delaney, C., Florea, L., & Diamond, D. (2017). Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments. *Sensors (Switzerland)*, *17*(8), 1–21. https://doi.org/10.3390/s17081866

Clark, L. C.; Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *102*(1), 29–45. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

Devasenathipathy, R., Mani, V., Chen, S. M., Huang, S. T., Huang, T. T., Lin, C. M., Hwa, K. Y., Chen, T. Y., & Chen, B. J. (2015). Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. *Enzyme and Microbial Technology*, *78*, 40–45. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.006

Du, J., Yu, X., & Di, J. (2012). Comparison of the direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on the surface of Au, CdS and ZnS nanostructures. *Biosensors and Bioelectronics*, *37*(1), 88–93. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.04.044

Du Toit, H., & Di Lorenzo, M. (2014). Glucose oxidase directly immobilized onto highly porous gold

electrodes for sensing and fuel cell applications. *Electrochimica Acta*, *138*, 86–92. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.074

Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R., & Bajpai, V. K. (2017). Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): Current updates. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 1–22. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032

Ferri, S., Kojima, K., & Sode, K. (2011). Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, *5*(5), 1068–1076. https://doi.org/10.1177/193229681100500507

Fracchiolla, N. S., Artuso, S., & Cortelezzi, A. (2013). Biosensors in clinical practice: Focus on oncohematology. *Sensors (Switzerland)*, *13*(5), 6423–6447. https://doi.org/10.3390/s130506423

Franklin, R. K., Martin, S. M., Strong, T. D., & Brown, R. B. (2016). Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.00549-x

Genova, J., Zheliaskova, A., & Mitov, M. D. (2007). Monosaccharides (fructose, glucose) and disaccharides (sucrose, trehalose) influence the elasticity of SOPC membranes. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, *9*(2), 427–430.

German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanavicius, A., Semashko, T., Mikhailova, R., & Ramanaviciene, A. (2015). The use of different glucose oxidases for the development of an amperometric reagentless glucose biosensor based on gold nanoparticles covered by polypyrrole. *Electrochimica Acta*, *169*, 326–333. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.072

German, N., Ramanaviciene, A., Voronovic, J., & Ramanavicius, A. (2010). Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, *168*(3), 221–229. https://doi.org/10.1007/s00604-009-0270-z

German, N., Ramanavicius, A., & Ramanaviciene, A. (2014). Electrochemical deposition of gold nanoparticles on graphite rod for glucose biosensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *203*, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.021

German, N., Ramanavicius, A., Voronovic, J., Oztekin, Y., & Ramanaviciene, A. (2011). The effect of colloidal solutions of gold nanoparticles on the performance of a glucose oxidase modified carbon electrode. *Microchimica Acta*, *172*(1), 185–191. https://doi.org/10.1007/s00604-010-0474-2

Gibrat, C., & Cicchetti, F. (2011). Potential of cystamine and cysteamine in the treatment of neurodegenerative diseases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(2), 380–389. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.023

Goss, C. A., & Abruña, H. D. (1985). Spectral, Electrochemical, and Electrocatalytic Properties of l,10-Phenanthroline-5,6-dione Complexes of Transition Metals. *Inorganic Chemistry*, *24*(25), 4263–4267. https://doi.org/10.1021/ic00219a012

Griffin, G. D., Stratis-Cullum, D. N., & McKnight, T. E. (2014). Biosensors. In *Encyclopedia of Microbiology* (Issue August). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02488-0

Guisan J. M., Bolivar, J. M., Lopez-Gallego, F., Rocha-Martin, J. (2020). Immobilization of Enzymes on Supports Activated with Glutaraldehyde: A very Simple Immobilization Protocol. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2100, pp. 118–127). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_3

Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and

concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, *79*(11), 4215–4221. https://doi.org/10.1021/ac0702084

Halpin, G., Herdman, K., & Dempsey, E. (2021). Electrochemical investigations into enzymatic polymerisation of 1,10-phenanthroline-5,6-dione as a redox mediator for lactate sensing. *Sensors and Actuators Reports*, *3*(December 2020), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100032

Hammami, I., Alabdallah, N. M., jomaa, A. Al, & kamoun, M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(7). https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560

Han, D., Chand, R., Shin, I. S., & Kim, Y. S. (2013). Screening and electrochemical detection of an antibiotic producing gene in bacteria on an integrated microchip. *Analytical Methods*, *5*(23), 6814–6820. https://doi.org/10.1039/c3ay41321g

Hasan, A., Nurunnabi, M., Morshed, M., Paul, A., Polini, A., Kuila, T., Al Hariri, M., Lee, Y. K., & Jaffa, A. A. (2014). Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. *BioMed Research International*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/307519

Hermanson, G. T. (2013a). Enzyme Modification and Conjugation. *Bioconjugate Techniques*, *2002*, 951–957. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00022-4

Hermanson, G. T. (2013b). Functional Targets for Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00002-9

Hermanson, G. T. (2013c). Homobifunctional Crosslinkers. *Bioconjugate Techniques*, 275–298. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00005-4

Huang, X., Zhu, Y., & Kianfar, E. (2021). Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, *12*, 1649–1672. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048

Janati-Fard, F., Housaindokht, M. R., & Monhemi, H. (2016). Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *134*, 16–24. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.09.008

Jin, W., & Maduraiveeran, G. (2018). Nanomaterial-based environmental sensing platforms using state-of-the-art electroanalytical strategies. *Journal of Analytical Science and Technology*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s40543-018-0150-4

Kalimuthu, K., Cha, B. S., Kim, S., & Park, K. S. (2020). Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Microchemical Journal*, *152*, 104296. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104296

Kausaite-Minkstimiene, A., Mazeiko, V., Ramanaviciene, A., Oztekin, Y., OsmanSolak, A., & Ramanavicius, A. (2014). Evaluation of Some Redox Mediators in the Design of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor. *Electroanalysis*, *26*(7), 1528–1535. https://doi.org/10.1002/elan.201400023

Khalafi, H. R., Ehsani, M., & Khonakdar, H. A. (2021). Investigation of the cure kinetics and thermal stability of an epoxy system containing cystamine as curing agent. *Polymers for Advanced Technologies*, *32*(3), 1251–1261. https://doi.org/10.1002/pat.5174

Kravarusic, J., & Aleppo, G. (2020). Diabetes Technology Use in Adults with Type 1 and Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *49*(1), 37–55. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.10.006

Lai, J., Yi, Y., Zhu, P., Shen, J., Wu, K., Zhang, L., & Liu, J. (2016). Polyaniline-based glucose

biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *782*, 138–153. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.033

Lakard, B. (2020). Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(18), 6614. https://doi.org/10.3390/APP10186614

Liu, H., Ge, J., Ma, E., & Yang, L. (2018). Advanced biomaterials for biosensor and theranostics. In *Biomaterials in Translational Medicine: A Biomaterials Approach*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813477-1.00010-4

Lović, J., Stevanović, S., Andjelković, B., Petrović, S., Vuković, D., Prlainović, N., Mijin, D., Nikolić, N. D., & Ivić, M. A. (2018). Electrochemical glucose biosensor with the characterization of surface morphology and content of glucose oxidase-glutaraldehyde-cysteine layers on gold electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, *13*(12), 12340–12348. https://doi.org/10.20964/2018.12.59

Makaram, P., Owens, D., & Aceros, J. (2014). Trends in Nanomaterial-Based Non-Invasive Diabetes Sensing Technologies. *Diagnostics*, *4*(2), 27–46. https://doi.org/10.3390/diagnostics4020027

Mano, N. (2019). Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, *128*, 218–240. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.015

Martinkova, P., & Pohanka, M. (2015). Biosensors for Blood Glucose and Diabetes Diagnosis: Evolution, Construction, and Current Status. *Analytical Letters*, *48*(16), 2509–2532. https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1043661

Mayes, K. M. B. P. A. (2003). Cholesterol Synthesis,Transport, & Excretion. Harper's Illustrated Biochemistry. In *Molecular Physiology* (Vol. 16, Issue 1). http://www.mhprofessional.com/product.php?cat=39&isbn=0071625917

Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, *37*(5), 790–802. https://doi.org/10.2144/04375RV01

Navaee, A., & Salimi, A. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors. In *Electrochemical Biosensors*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00007-3

Pal, K., Paulson, A. T., & Rousseau, D. (2013). Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00014-8

Palanisamy, S., Cheemalapati, S., & Chen, S. M. (2014). Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid biocomposite. *Materials Science and Engineering C*, *34*(1), 207–213. https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.011

Pečar, D., & Goršek, A. (2017). Process and kinetic characteristics of glucose oxidation catalyzed with immobilized enzyme. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, *122*(1), 43–51. https://doi.org/10.1007/s11144-017-1202-2

Piyushkumar, S., Anjali, R., Avinash, K., Dillip, D., Nirmal, S & Shivkant, P. (2020). A Combined Approach of Gold Nanoparticles with Cannabinoids for the Treatment of Cancer - A Review. *International journal of pharmaceutical research, 12*, 393-405. 10.31838/ijpr/2020.SP1.077.

Purushothama, H. T., Nayaka, Y. A., Vinay, M. M., Manjunatha, P., Yathisha, R. O., & Basavarajappa, K. V. (2018). Pencil graphite electrode as an electrochemical sensor for the voltammetric determination of chlorpromazine. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *3*(2), 161–166. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.03.007

Radomska, M., Rutkowska, I. A., Kowalewska, B., Cox, J. A., & Kulesza, P. J. (2019). Development and kinetic characterization of hierarchical bioelectrocatalytic system utilizing a redox mediator, functionalized carbon nanotubes and an enzyme for glucose oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *832*, 417–425. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.11.027

Ramanaviciene, A., Nastajute, G., Snitka, V., Kausaite, A., German, N., Barauskas-Memenas, D., & Ramanavicius, A. (2009). Spectrophotometric evaluation of gold nanoparticles as red-ox mediator for glucose oxidase. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *137*(2), 483–489. https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.021

Ramanaviciene, Almira, German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., & Ramanavicius, A. (2021). Glucose biosensor based on dendritic gold nanostructures electrodeposited on graphite electrode by different electrochemical methods. *Chemosensors*, *9*(8). https://doi.org/10.3390/chemosensors9080188

Rana, A., Baig, N., & Saleh, T. A. (2019). Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *833*(November 2018), 313–332. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.12.019

Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P., & Pramod, K. (2019). Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosensors and Bioelectronics*, *141*(January), 2–21. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034

Saei, A. A., Dolatabadi, J. E. N., Najafi-Marandi, P., Abhari, A., & de la Guardia, M. (2013). Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *42*, 216–227. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.011

Shajaripour Jaberi, S. Y., Ghaffarinejad, A., & Omidinia, E. (2019). An electrochemical paper based nano-genosensor modified with reduced graphene oxide-gold nanostructure for determination of glycated hemoglobin in blood. *Analytica Chimica Acta*, *1078*, 42–52. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.018

Shendurse, A. M., & Khedkar, C. D. (2016). Glucose: Properties and Analysis. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., Issue 3). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00353-6

Shi, W., Sahoo, Y., & Swihart, M. T. (2004). Gold nanoparticles surface-terminated with bifunctional ligands. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *246*(1–3), 109–113. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.07.023

Skučas, V. (2004). Elektrochemija. Enciklopedinis žinynas. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 121-122.

Sreeranjit, C. V. K., Lal, J. J. (2003). Glucose. Properties and Analysis. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, *1*, 2898–2903. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00557-5

Staiano, M., Pennacchio, A., Varriale, A., Capo, A., Majoli, A., Capacchione, C., & D'Auria, S. (2017). Enzymes as Sensors. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 589). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.01.015

Taherpour, A. A., & Mousavi, F. (2018). Carbon nanomaterials for electroanalysis in pharmaceutical applications. In *Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813691-1.00006-3

Teles, F. R. R., & Fonseca, L. P. (2008). Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Materials Science and Engineering C*, *28*(8), 1530–1543. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.04.010

Turkevich, J.; Stevenson, P. T.; Hillier, J. . (1951). *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. 55–75.

Varma, P. R. K., Kumari, V. V., & Kumar, S. S. (2018). *Progress in Computing, Analytics and Networking* (Vol. 710, Issue Dmd). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7871-2

Wang, J., Zhang, K., Fei, G., de Luna, M. S., Lavorgna, M., & Xia, H. (2020). High silica content graphene/natural rubber composites prepared by a wet compounding and latex mixing process. *Polymers*, *12*(11), 1–15. https://doi.org/10.3390/polym12112549

Wang, L., Gao, X., Jin, L., Wu, Q., Chen, Z., & Lin, X. (2013). Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *176*, 9–14. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.077

Wirde, M., Gelius, U., & Nyholm, L. (1999). Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltammetry. *Langmuir*, *15*(19), 6370–6378. https://doi.org/10.1021/la9903245

Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors*, *10*(5), 4558–4576. https://doi.org/10.3390/s100504558

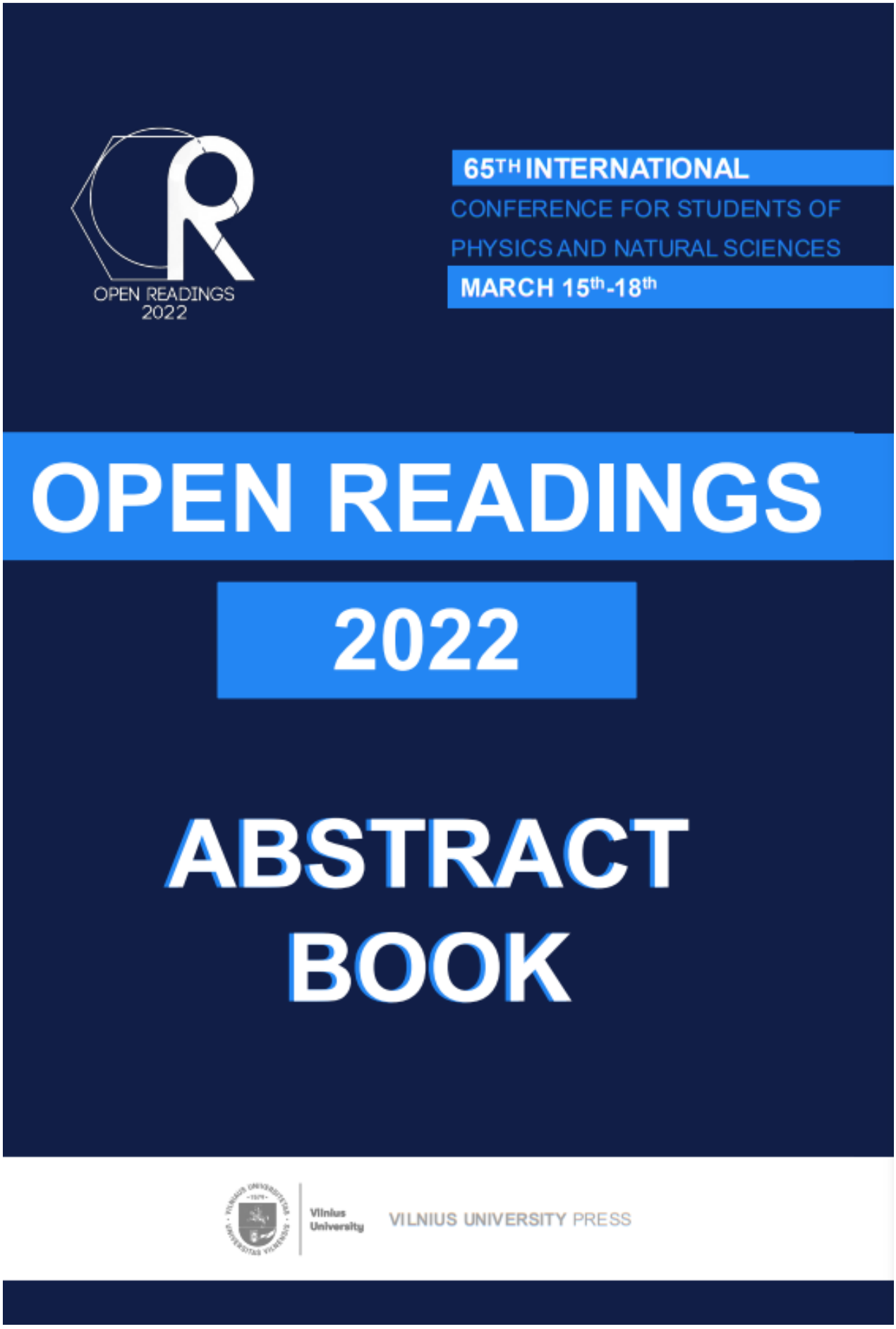
Zhang, Y., Wang, G., Yang, L., Wang, F., & Liu, A. (2018). Recent advances in gold nanostructures based biosensing and bioimaging. *Coordination Chemistry Reviews*, *370*, 1–21. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.005

Padėka

Dėkoju darbo vadovei dr. Natalijai German už žinias ir pagalbą rengiant baigiamąjį magistro darbą: formuluojant darbo tikslą bei uždavinius, naudingus patarimus bei pastabas eksperimentinių procedūrų atlikimo ir rezultatų apdorojimo bei viso baigiamojo darbo rengimo metu. Taip pat dėkoju *Vilnius Tech* lektoriui Eimantui Ramonui už praktinius patarimus atliekant baigiamojo magistro darbo apipavidalinimą ir lietuvių kalbos konsultantei lekt. dr. Vaidai Buivydienei už kalbos konsultacijas.

Priedai

Magistro studijų metu buvo dalyvauta konferencijoje – *65th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences* „OPEN READINGS 2022“, p. 281, March 15th–18th, Vilnius, Lithuania. Konferencijos tezės tema „The comparison of glucose biosensors modified by enzyme-assisted polyaniline nanocomposites without and with gold derivatives” bei sertifikatas pateikti priede.


OPEN READINGS
2022
65TH INTERNATIONAL
CONFERENCE FOR STUDENTS OF
PHYSICS AND NATURAL SCIENCES
MARCH 15th-18th
OPEN READINGS
2022
ABSTRACT
BOOK
Vilnius
University
VILNIUS UNIVERSITY PRESS

Editors
Šarūnas Mickus
Simona Pūkienė
Lukas Naimovičius

Cover and Interior design
Milda Stancikaitė

Vilnius University Press
9 Saulėtekio Av., III Building, LT-10222 Vilnius
info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt/en/
www.knygynas.vu.lt, www.journals.vu.lt

Bibliographic information is available
on the Lithuanian Integral Library Information System (LIBIS) portal ibiblioteka.lt.

ISBN 978-609-07-0722-7 (PDF)
© Vilnius University, 2022

THE COMPARISON OF GLUCOSE BIOSENSORS MODIFIED BY ENZYME-ASSISTED POLYANILINE NANOCOMPOSITES WITHOUT AND WITH GOLD DERIVATIVES

Rugile Chmieliauskaite[1], Natalija German[2]

[1]Department of Chemistry and Bioengineering, Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical University Vilnius Tech, Sauletekio ave.11, LT-10223, Vilnius, Lithuania
[2]Division of Immunology, State Research Institute Center for Innovative Medicine, Santariskių g. 5, LT-08406, Vilnius, Lithuania
rugile.chmieliauskaite@stud.vgtu.lt

The design and wide application of electrochemical biosensors in nanoscience, nanotechnology, medicine, pharmaceutics industry, environmental and food monitoring significantly increased during the past decade [1,2]. The research community is working to develop effective tools for diabetes management and diagnosis, because diagnosed for seven million people every year diabetes mellitus is considered a worldwide public health problem (the risk of heart disease, kidney failure, blindness, postoperative and wound infections) [2,3]. Last time such π-π conjugated polymers as polyaniline (PANI), polypyrrole are becoming an integral part of biomolecules immobilization strategies and electrochemical sensor platforms [1,4]. During the enzyme-assisted formation of π-π conjugated polymers, the monomer is attacked by a radical cation induced by H_2O_2 [5]. Combined with electroactive gold nanoparticles (AuNPs) and enzyme polyaniline is suitable for the development of biosensors dedicated for the monitoring of glucose due their positive effect on the sensitivity and selectivity [1,6].

The main aim of this research was to compare analytical characteristics of glucose biosensors modified by enzyme-assisted polymeric nanocomposites (PNC) with embedded enzyme enzyme (glucose oxidase (GOx)) without/with 6 nm of gold nanoparticles. Firstly, polyaniline nanocomposites with GOx (PANI-GOx) without and with AuNPs (PANI-GOx-AuNPs) were synthesized by enzyme-assisted polymerization, washed, separated and dispersed in the solution of sodium acetate (SA) buffer (Fig. 1). Then, graphite rod (GR) electrode was immobilized by described above kind of polyaniline nanocomposites with following addition of GOx. Electrochemical investigations were performed by cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (ChA) in the presence of red-ox mediator phenazine methosulfate (PMS). The reversibility of electrochemical reaction was evaluated by CV, the analytical characteristics, stability and selectivity – by ChA. It was investigated that the biosensor based on GR/PANI-GOx-AuNPs/GOx has been found more efficient than an analogous electrode coated with PANI-GOx nanocomposites. Developed glucose biosensors based on GR/PANI-GOx/GOx and GR/PANI-GOx-AuNPs/GOx electrodes were characterized by high sensitivity (52.0 and 65.4 $\mu A\ mM^{-1}\ cm^{-2}$), low detection limit (0.084 or 0.070 mmol/L), wide linear concentration range (till 16.5 mmol/L), good correlation coefficient (0.9936 or 0.9968) and repeatability (6.10 and 4.67 %), appropriate stability (17 and 22 days). Biosensor based on GR/PANI-GOx-AuNPs/GOx electrode presented the excellent anti-interference ability to ascorbic and uric acids, successful practical application for glucose determination in serum.

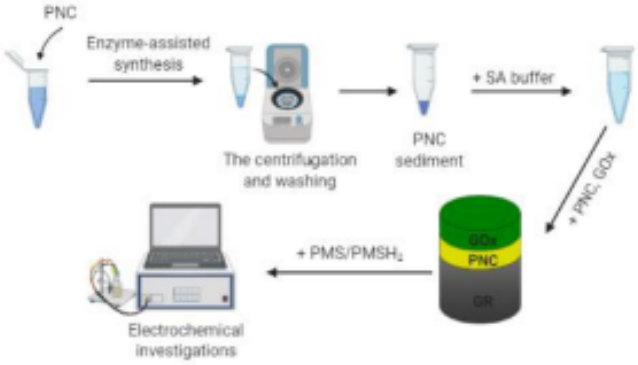


Fig.1. Schematic representation of PNC enzyme-assisted synthesis and electrochemical investigation.

[1] R. Batool, A. Rhouati, M.H. Nawaz, A. Hayat, J.L. Marty, A review of the construction of nano-hybrids for electrochemical biosensing of glucose, Biosensors **9**, 1–19 (2019).
[2] H.C. Wang, A.R. Lee, Recent developments in blood glucose sensors, Journal of Food and Drug Analysis **23**, 191–200, (2015)
[3] E-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice, Sensors **10**, 4558-4576 (2010).
[4] N. German, A. Ramanavicience, A. Ramanavicius, Formation and electrochemical evaluation of polyaniline and polypyrrole nanocomposites based on glucose oxidase and gold-nanostructures, Polymers **12**, 3026 (2020).
[5] N. German, A. Popov, A. Ramanavicience, A. Ramanavicius, Evaluation of enzymatic formation of polyaniline nanoparticles, Polymer **115**, 211–216 (2017).
[6] B. Haghighi, M.A. Tabrizi, Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on an overoxidized polypyrrole film decorated with Au nanoparticles, Colloids Surfaces B Biointerfaces **103**, 566–571 (2013).

OPEN READINGS

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

THIS DOCUMENT CERTIFIES THAT

Rugilė Chmieliauskaitė

HAS PARTICIPATED IN THE 65TH INTERNATIONAL CONFERENCE FOR STUDENTS OF PHYSICS AND NATURAL SCIENCES "OPEN READINGS 2022" WHICH TOOK PLACE ON MARCH 15-18.

VAIDA MARČIULIONYTĖ
CONFERENCE CHAIR

Organizing committee of
Open Readings,
Vilnius University

www.openreadings.eu

Saulėtekio Ave. 3
LT-10257 Vilnius, Lithuania
info@openreadings.eu