

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS**

Rūta Araminaitė

**ELEKTROKATALIZINIŲ PROCESŲ TYRIMAS ANT
BERLYNO MĖLYNUOJU MODIFIKUOTO STIKLO
ANGLIES ELEKTRODO**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005–2009 metais Chemijos Institute.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Chemijos institutas, fiziniai mokslai,
chemija – 03 P)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju moksliniam vadovui prof. habil. dr. Albertui Malinauskui už vadovavimą disertaciniam darbui, skirtą laiką ir energiją, dr. Rasai Garjonytei už suteiktas žinias ir visokeriopą pagalbą rengiant disertaciją ir publikacijas. Visam Organinės chemijos skyriaus kolektyvui už šiltą priėmimą ir moralinį palaikymą.

Dėkoju Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už finansinę paramą doktorantūros studijoms.

TURINYS

NAUDOTŲ SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS.....	5
ĮVADAS	7
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	9
DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS.....	9
PUBLIKACIJOS DARBO TEMA:	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Elektrokatalizė.....	11
1.2. Pereinamųjų metalų heksacianoferatų elektrochemija	12
1.3. Berlyno mėlynasis.....	13
1.3.1. Cheminės, fizinės ir elektrocheminės Berlyno mėlynojo savybės ..	13
1.3.2. Berlyno mėlynojo nusodinimo būdai	18
1.3.3. Berlyno mėlynojo modifikuoti elektrodai – vandenilio peroksido jutikliai.....	19
1.3.4. Veiksniai, sąlygojantys Berlyno mėlynojo stabilumą.....	25
1.3.5. BM modifikuotų elektrodų taikymas kitų analičių nustatymui.....	27
1.4. Askorbo rūgšties nustatymo būdai	29
1.5. Biojutikliai.....	35
1.5.1. Biojutiklių tipai, klasifikacija, veikimo principai.....	35
1.5.2. Amperometriniai biojutikliai.....	36
1.5.2.1. Pirmos kartos biojutikliai.....	37
1.5.2.2. Antros kartos biojutikliai	38
1.5.2.3. Trečios kartos biojutikliai	40
1.5.3. Berlyno mėlynojo taikymas biojutiklių konstravime	41
1.5.3.1. Gliukozės biojutikliai.....	46
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	48
2.1 Reagentai	48
2.2. Tirpalai	48
2.3. Fermentai	49
2.4. Berlyno mėlynojo modifikuoto elektrodo paruošimas	49
2.4.1. Stiklo anglies elektrodo paruošimas.....	49
2.4.2. BM elektrocheminis nusodinimas ant stiklo anglies elektrodo	50
2.4.3. BM modifikuoto elektrodo stabilizavimas.....	51
2.5. Biojutiklių sistemų paruošimas	51
2.6. Elektrocheminiai tyrimai.....	52
2.6.1. Amperometriniai matavimai	52
2.6.1.2. BM modifikuoto elektrodo stabilumo tyrimai	52
2.6.1.3. Biojutiklio stabilumo tyrimas	53
2.6.2. Voltamperometrinė analizė	53
2.6.2.1. Ciklinė voltamperometrinė analizė	53
2.6.2.2. Hidrodinaminė voltamperometrinė analizė	54

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	56
3.1. Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas.....	56
3.1.1. Berlyno mėlynuoju modifikuoto SAE ciklinės voltamperogramos	56
3.1.2. Vandenilio peroksido redukcija ant Berlyno mėlynuoju	
modifikuoto sukamojo disko elektrodo	59
3.1.3. Askorbato oksidacija ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto	
sukamojo disko elektrodo	69
3.1.4. Elektrokatalizinio Berlyno mėlynojo sluoksnio irimas vykstant	
katodinei vandenilio peroksido redukcijai	77
3.2. BM modifikuoto elektrodo taikymas biojutiklio konstravime.....	83
3.2.1. Gliukozės biojutiklio kūrimas	84
3.2.1.1. Gliukozės biojutiklio charakteristikos	86
3.2.1.2. Biojutiklių stabilumas.....	88
3.2.1.3. Interferentinių medžiagų įtaka	89
3.2.1.4. Gliukozės oksidacija ant BM/Chi-GOD-Gla modifikuoto	
sukamojo disko elektrodo.....	90
4. IŠVADOS	94
LITERATŪROS SĄRAŠAS	95

NAUDOTŲ SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

ΔE_s - maksimalus atskyrimo potencialas

ads - adsorbuotas

ANV – anglies nanovamzdeliai

aq - tirpale

AR – askorbo rūgtis

BM - Berlyno mėlynasis

Chi - chitozanas

ChOD – cholesterolio oksidazė

Cis - cisteinas

Cohcf – kobalto heksacianoferatas

Cuhcf – vario heksacianoferatas

E_0' – standartinis vidurio potencialas

ED – Everitt'o druska

$E_{s,a}$ – anodinės smailės potencialas

$E_{s,k}$ – katodinės smailės potencialas

FAO – fluoru dopuotas alavo oksidas

Gla – glutaro aldehidas

Glu – gliukozė

GOD – gliukozės oksidazė

IAO – indžiu dopuotas alavo oksidas

I_{max} – tariamasis maksimalus srovės stipris

k_{ir} – pirmo laipsnio irimo greičio konstanta

K_M^{tar} – tariamoji Michaelio-Menten konstanta

M - mediatorius

NADH - nikotinamido adenino dinukleotidas

NADHOD - nikotinamido adenino dinukleotido oksidazė

Nihcf – nikelio heksacianoferatas

P - produktas
PANI - polianilinas
Redoks – redukcijos-oksidacijos
S – substratas
S.S.N. – santykinis standartinis nuokrypis
SA – stiklo anglies
SAE – stiklo anglies elektrodas
SAM – srauto analizės metodas
SDE – sukamasis disko elektrodas
SHE – standartinis vandenilio elektrodas
SKE – šotus kalomelio elektrodas
SME – spausdinto montažo elektrodas
TEA⁺ - tetraetilamonio jonas
TS – tirpumo sandauga
TTS - tetrabutilamonio-toluen-4-sulfonatas

IVADAS

Elektrokatalizė – elektrocheminis reakcijų pagreitinimas dalyvaujant tirpale esančioms arba fiksuotoms ant elektrodo paviršiaus specifinėms medžiagoms. Keičiant elektrodo medžiagos prigimtį ar jo paviršiaus fizikines – chemines savybes galima keisti elektrocheminių procesų greitį. Šiuo metu labai sparčiai plečiasi įvairiausi elektrokataliziniai elektrocheminės sintezės procesai bei gyvybiškai svarbių reakcijų dalyvaujant biologiškai aktyvioms medžiagoms (fermentams) išaiškinimas.

Amperometrinis vandenilio peroksido jutiklis yra svarbi gliukozės biojutiklio dalis. Gliukozės biojutiklis, kuriame yra imobilizuota gliukozės oksidazės fermentas, skirtas gliukozės kiekio nustatymui kraujyje, kituose biologiniuose skysčiuose, maisto produktuose bei gėrimuose. Kadangi gliukozės oksidazės veikimo pasekoje išsiskiria vandenilio peroksidas, jo registravimu yra paremtas vandenilio peroksido jutiklio veikimas. Vykstant susidariusio peroksido elektrokatalizinei redukcijai vandenilio peroksido jutiklis registruoja katodinės srovės atsiradimą [1, 2].

Ieškoma būdų, kaip sukonstruoti vandenilio peroksidui atrankų elektrodą, kad išvengtume interferentinių medžiagų poveikio, tiriama kokią elektrodą potencialą geriausia pasirinkti. Pastaruoju metu tam naudojami vandenilio peroksidui atrankūs elektrokataliziniai sluoksniai, t.y. pereinamųjų metalų heksacianoferatiniai kompleksai. Šiame darbe visas dėmesys sutelktas į geležies (III) heksacianoferatu (Berlyno mėlynuoju) modifikuotą stiklo anglies elektrodą.

Daugelis mokslininkų dirbo su Berlyno mėlynuoju modifikuotais elektrodais ir nustatė, kad šis elektrokatalizinis sluoksnis laipsniškai nyksta vykstant vandenilio peroksido katodinei redukcijai neutraliuose tirpaluose. BM taip pat nestabilus ir šarminiuose tirpaluose, todėl palaipsniui elektrokatalizinis aktyvumas mažėja. Ši ypatybė buvo pabrėžta daugelio mokslininkų, taip pat ir mūsų [3]. Kita Berlyno mėlynuoju modifikuoto elektrodo problema yra ta, kad

esant analizuojamame tirpale askorbato, vandenilio peroksido katodinės srovės atsakas sumažėja ir priklauso nuo askorbato koncentracijos [4]. Kadangi viena iš pagrindinių interferentinių medžiagų nustatyti vandenilio peroksidą realiose matricose yra vitaminas C (askorbo rūgštis), todėl mes ją pasirinkome, kaip analizuojamą objektą šalia vandenilio peroksido.

Aišku, kad yra būtina ant BM modifikuoto elektrodo vykstančios vandenilio peroksido redukcijos mechanizmo gilesnė analizė, kad suprastume šio labai svarbaus ir daug žadančio proceso eigą. Šiam tikslui buvo svarbus Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies elektrodo stabilumo tyrimas skirtinguose tirpalo pH vykstant vandenilio peroksido elektrolizei, taip pat vandenilio peroksido elektroredukcijos bei askorbato elektrooksidacijos tyrimas pasinaudojant sukamojo disko elektrodu.

Svarbu išsiaiškinti Berlyno mėlynuoju modifikuoto elektrodo atrankamą abiems šioms medžiagoms, jautrumą bei stabilumą. Tikimasi, kad šios dvi medžiagos netrukdys viena kitos nustatymui ir šį jutiklį bus galima panaudoti biojutiklio kūrimui. Buvo svarbu ištirti principinę galimybę sukurti tokį biojutiklį.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas:

Elektrocheminių vandenilio peroksido ir askorbato reakcijų tyrimas ant Berlyno mėlynuoju modifikuotų elektrodų, siekiant pritaikyti šiuos elektrodus jutiklių ir biojutiklių kūrimui.

Uždaviniai:

- ✓ Ištirti ciklinės voltamperometrinės analizės pagalba vandenilio peroksido ir askorbato elgseną ant BM modifikuoto elektrodo pH 5,5 ir pH 7,3 fosfatiname buferiniame tirpale.
- ✓ Ištirti H₂O₂ redukciją naudojant sukamojo disko elektrodą.
- ✓ Ištirti askorbato oksidaciją naudojant sukamojo disko elektrodą.
- ✓ Ištirti BM modifikuoto elektrodo stabilumą elektrocheminės vandenilio peroksido redukcijos metu.
- ✓ Panaudoti BM modifikuotą elektrodą amperometriškuose gliukozės biosensoriuose gliukozės oksidazės pagrindu. Ištirti tokių sistemų analizes charakteristikas: jautrumą, atrankumą, stabilumą.

DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS

Pirmą kartą išsamiai ištirta ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies elektrodo vykstanti elektrokatalizinė vandenilio peroksido redukcija bei askorbato oksidacija.

Detaliai ištirta BM sluoksnio irimo kinetika vandenilio peroksido elektoredukcijos metu, ir nustatyti faktoriai, įtakoiantys irimo proceso greitį.

Sukurti jutiklių ir biojutiklių prototipai, kurie galėtų būti panaudoti biologiškai aktyvių medžiagų (H₂O₂, askorbato, gliukozės) nustatymui.

PUBLIKACIJOS DARBO TEMA:

1. A. Malinauskas, R. Araminaitė, G. Mickevičiūtė, R. Garjonytė. Evaluation of operational stability of Prussian blue- and cobalt hexacyanoferrate-based amperometric hydrogen peroxide sensors for biosensing application. *Materials Science and Engineering C* 24(4) (2004) 513–519. *Pacituota 19 kartą.*
2. A. Malinauskas, G. Mickevičiūtė, R. Araminaitė and R. Garjonytė. Sensor Prussian-blue Based Hydrogen Peroxide Sensors: Two Types of Ascorbate Interference. *Chem. Anal. (Warsaw)* 51(5) (2006) 809- 818.
3. R. Araminaitė, R. Garjonytė, A. Malinauskas. Kinetic study of the decomposition of Prussian Blue electrocatalytic layer during cathodic reduction of hydrogen peroxide. *Cent. Eur. J. Chem.* 6(2) (2008) 175–179.
4. R. Araminaitė, R. Garjonytė, A. Malinauskas. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at Prussian blue modified electrodes: a RDE study. *J. Solid. State Electrochem.* 14(1) (2010) 149-155.
5. R. Araminaitė, R. Garjonytė, A. Malinauskas. Rotating disk electrode study of electrocatalytic oxidation of ascorbate at Prussian blue modified electrode. *Cent. Eur. J. Chem.* 7(4) (2009) 739–744.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Elektrokatalizė

Elektrokatalizės procese svarbiausią vaidmenį vaidina elektrolite esančių dalelių adsorbcija ant elektrodo paviršiaus. Adsorbcija reagentų, ar produktų, ar tarpinių elektrodo reakcijos produktų, ar kitų tirpalo komponentų, kurie nedalyvauja tiesiogiai elektrodo reakcijoje, gali kartais pagreitinti elektrodinę reakciją ar pakeisti jos mechanizmą. Šį reiškinį ir vadiname elektrokatalize. Cheminę adsorbciją smarkiai įtakoja elektrodo sudėtis, fazių sąlyčio elektrodas-elektrolitas ribos savybės, ir tai apsprendžia elektrokatalizės proceso greitį. Adsorbcija kartais gali turėti ir neigiamą poveikį elektrodo reakcijos greičiui, tai vadinama elektrodo reakcijos inhibicija [5].

Kai, dalyvaujant biologiškai aktyviai medžiagai – fermentui, antigenui, ląstelėms ir pan., vykstanti elektrocheminė reakcija pagreitinama, tokį reiškinį mes vadiname bioelektrokatalize. Fermentai pasižymi katalizine veikla bei nepaprastu specifiskumu, geresniu už bet kokį sintetinį katalizatorių [6]. Fermento katalizinio aktyvumo matas yra fermento katalizine konstanta. Ji aprašo kiek kanalizuojamos reakcijos ciklą per sekundę fermentas gali atlikti aktyviame centre. Atsižvelgiant į tai, kad cheminėje katalizėje šis skaičius gali svyruoti nuo vieno iki šimto, o fermentinėje katalizėje svyruoja nuo tūkstančio iki dešimties milijonų [7]. Tik nuo 1970-ųjų fermentai buvo pradėti naudoti kaip bioelektrocheminiai katalizatoriai. To priežastis buvo sudėtingas fermentų gryninimo procesas, jų nestabilumas. Šios problemos didžia dalimi įveiktos, atsiradus geresnių gryninimo metodų bei fermentų imobilizacijos ant elektrodo paviršiaus būdų [6].

Fermentinės katalizės mechanizmas dar nėra pilnai išaiškintas. Tuo labiau nėra iširta bioelektrocheminė elektrono pernaša [6].

1.2. Pereinamųjų metalų heksacianofertų elektrochemija

Daugelis metalų heksacianofertų jonų sudaro netirpius junginius, kurie pasižymi specifiskomis elektrocheminėmis savybėmis. Siekiant išsiaiškinti šių junginių savybes, buvo atliekami moksliniai tyrimai, voltamperometrijos pagalba imobilizavus mikrodaleles. Buvo iširta didelė dalis skirtingų metalų heksacianofertų, rezultatai parodė, kad šias medžiagas galima naudoti elektrochemijoje, o jų savybės priklauso nuo įterpiamo metalo jonų [8, 9].

Metalų heksacianofertų sluoksnio reakcija apima elektrono pernašą ir prieškatijonio judėjimą vykstant oksidacijos redukcijos procesams. Elektrodai modifikuoti tokiu sluoksniu gali būti panaudoti elektrokatalizinei oksidacijai ir pritaikomi kaip elektrocheminiai jutikliai [10]. Metalų heksacianofertai yra elektrochemiškai aktyvūs, o jų savybės priklauso nuo naudojamo prieškatijonio, todėl galimi selektyvūs jonų mainai. Be to, jie naudojami, kaip mediatoriai elektrocheminėse reakcijose [11, 12], todėl su kiekvienais metais vis didėja mokslininkų susidomėjimas šiomis medžiagomis.

Hidroksilamino, nitritų, tiosulfato ir hidrazino nustatymui pradėti naudoti amperometriniai metodai. Šių medžiagų vykstanti elektrokatalizinė oksidacija tapo reikšminga ne tik chemijos, bet ir biologijos mokslams [13]. Hidrazino elektrooksidacija galima ant elektrodo modifikuoto kobalto heksacianofertu (Cohcf) [14] ar rutenio heksacianofertu [15], dopamino, epinefrino (adrenalino), norepinefrino (noradrenalino) ir tiosulfato elektrokatalizinės reakcijos vyksta ant osmio heksacianofertu modifikuoto elektrodo [16], NO nustatymas įmanomas naudojant nikelio heksacianofertu modifikuotą Pt elektrodą [17].

Atsirandant vis naujiems elektroanalizės metodams, didelis susidomėjimas teikiamas neuroperdavėjams. Keletas neuroperdavėjų, tokių kaip dopaminas, yra elektrochemiškai aktyvūs, todėl gali būti nustatomi elektroanalizės metodais. Vis dėl to dopamino oksidacijos produktai užteršia elektrodo paviršių, todėl dopamino elektrocheminis atsakas yra negrįžtamas ar tik dalinai grįžtamas.

Be to, dopamino voltamperometriniam nustatymui visada trukdo askorbo rūgšties buvimas mėginyje. AR elektrocheminės oksidacijos potencialas beveik sutampa su dopamino. Yra keletas darbų, kurie aptaria abi šias problemas.

Pavyzdžiui elektrodas yra padengiamas neigiamai įkrautu polimero sluoksniu (pvz.: Nafion'u) [18]. Šis sluoksnis elektrostatiškai atstumia AR ir kitas neigiamai įkrautas daleles, bet pritraukia teigiamą krūvį turintį dopaminą. Vėliau dopamino elektrokatalizinė oksidacija gerinama naudojant CoHcf sluoksnį [19].

CoHcf pasižymi geromis tinkančiomis elektroanalizei charakteristikomis ir gebėjimu generuoti stabilų elektrocheminį atsaką. Tokie modifikuoti elektrodai pasižymi geru elektrokataliziniu aktyvumu daugeliui analizių, įskaitant askorbo rūgštį, hidraziną, p-chlorfenolį, NADH, sieros oksoanijonus (SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_5^{2-} ir $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$), sulfidus biologinėse molekulėse (L-cisteiną ir glutationą) ir azoto turinčius junginius (NH_2OH ir N_2H_4) [14, 20].

Pereinamųjų metalų heksacianofertų kompleksai sėkmingai taikomi jutiklių ir biojutiklių kūrimui. Bet, vis dėl to, beveik nėra jokių duomenų apie šių kompleksų stabilumą vandenilio peroksido elektrokatalizinėse reakcijose.

Iš visų žinomų pereinamųjų metalų heksacianofertų mes pasirinkome geležies (III) heksacianofertą (BM) dėl kelių priežasčių. Berlyno mėlynasis pasižymi dideliu elektrokataliziniu aktyvumu. Tačiau be paminėtų plusų, jis turi ir minusų. BM, palyginus su kitais metalų (Co, Cr, Cu, Ni, V) heksacianofertų kompleksais, pasižymi didžiausiu nestabilumu neutraliuose vandeniniuose tirpaluose [11].

1.3. Berlyno mėlynasis

1.3.1. Cheminės, fizinės ir elektrocheminės Berlyno mėlynojo savybės

Berlyno mėlynasis (BM) yra senovinio pigmento pavadinimas, žinomas jau nuo 1704 m. BM priklauso labai svarbiai funkcinių neorganinių medžiagų šeimai: tradicinėms heksacianometalatų medžiagoms (o tiksliau, BM priklauso

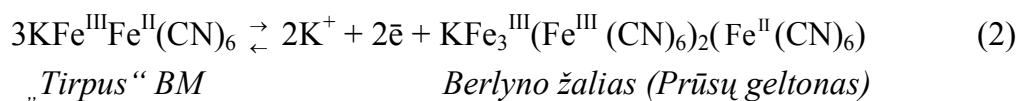
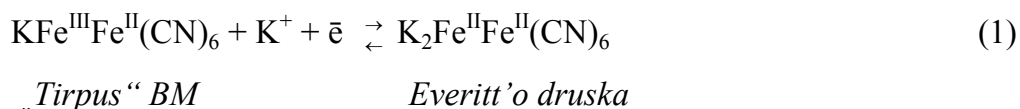
subklasei pavadintai heksacianoferatais), kurių bendra formulė yra $A_h M'_k [M''(CN)_6]_l \cdot mH_2O$, kur h , k , l ir m yra stechiometriniai koeficientai, A – šarminio metalo katijonas, M' ir M'' yra 3d pereinamasis metalas (geležis BM struktūroje). Berlyno mėlynojo struktūroje M' yra priskiriama aukštam sukiniui kristalinėje gardelėje (Fe^{3+}), o M'' pasižymi silpno sukinio savybėmis (Fe^{2+}) [21, 22].

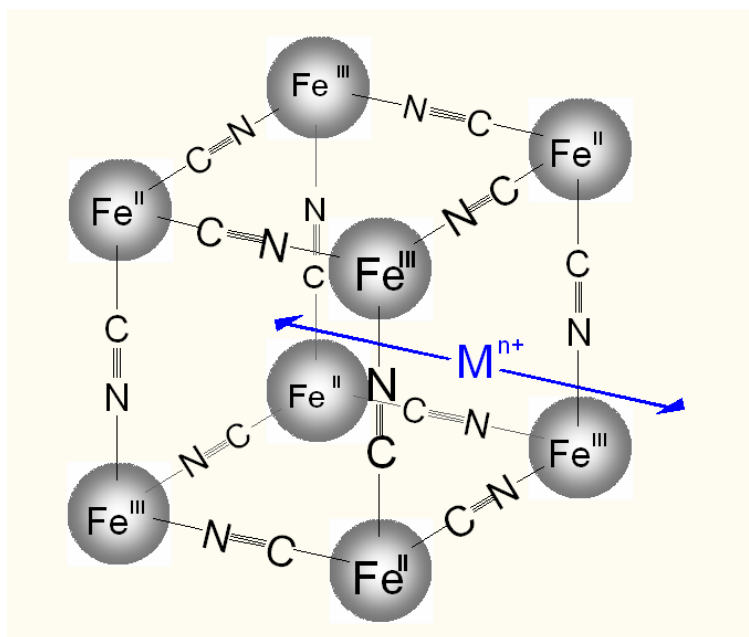
Sėkmingas BM nusodinimas ant platinos elektrodo bei jo elektrocheminės savybės pirmą kartą buvo aprašytos 1978 m. [23]. Ciklinės voltamperometijos metodu elektrodo modifikavimas yra žinomas šiomis dienomis kaip klasikinis nusodinimo būdas. Tuo metu ir buvo identifikuotos Berlyno mėlynojo grįžtamos elektrocheminės reakcijos. Po kelių metų pradėti gausūs BM tyrimai. Berlyno mėlynasis buvo nusodinamas ant skirtingų elektrodo medžiagų (SnO_2 , TiO_2 , platinos, aukso, stiklo anglies ir kt.). Itaya ir kt. [24] aprašė svarbiausią Berlyno mėlynojo savybę. Buvo įrodyta, kad BM redukuota forma (Everitt'o druska) pasižymi kataliziniu poveikiu. Ant Berlyno mėlynojo paviršiaus gali vykti molekulinio deguonies ir vandenilio peroksido redukcija. Taip pat oksiduota BM forma parodė katalizinį aktyvumą vandenilio peroksido oksidacijai. Katalizinės O_2 ir H_2O_2 reakcijos buvo aiškinamos specifine BM struktūra. BM ceolitinė struktūra turi 10,2 Å kubinį vieneto elementą, o kanalo skersmuo yra apytiksliai 3,2 Å, todėl vyksta mažos molekulinės masės molekulių (tokių kaip O_2 ir H_2O_2) difuziją į kanalą. Dėl šios priežasties BM apibūdinamas, kaip trimatis katalizatorius. Itaya iškėlė hipotezę, kad už katalizinę deguonies ir vandenilio peroksido veiklą atsakingos BM vieneto elemente esančios vakansijos (laisvos vietos). Kai vandenilio peroksidas (ar deguonis) prasiskverbia į BM gardelės struktūrą, jis atsiranda vakansijose, apsuptose keturių divalenčių geležies jonų, kurie gali sukelti dviejų elektronų katalizinę H_2O_2 redukcijos reakciją.

Nors ši hipotezė yra visuotinai priimta, bet H_2O_2 redukcijos mechanizmas yra dar ne visiškai aiškus. Labai sudėtinga BM charakterizuoti, nes nėra dar iki galo išaiškinta jo struktūra ir stechiometrija.

Daugelį metų BM struktūra buvo tyrinėjama, siekiant paaiškinti jo elektrocheminį elgesį ir katalizinį aktyvumą. Keggin ir Miles [25] pirmieji ištyrė BM miltelių difrakciją. Jie savo darbe išskyrė dvi skirtingas BM formas, vieną iš jų pavadindami „tirpia“ $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$, kitą „netirpia“ $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ forma. Tačiau šie pavadinimai visai nesiejami su tikru tirpumu vandenyje, bet greičiau rodo kalio jonų buvimą arba nebuvimą kristalinėje gardelėje. BM abi formos labai netirpios ($\text{TS} \approx 10^{-40}$). „Tirpiai“ BM formai buvo priimta centruoto kubo sistema, kur Fe^{II} ir Fe^{III} jonai yra išsidėstę aštuoniose kubo viršūnėse ir sujungti atitinkamai $-\text{CN}$ ir $-\text{NC}$ grupėmis, trimatėje erdvėje sistema kartojasi $-\text{NC}-\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CN}-\text{Fe}^{\text{III}}-$ seka (1 pav.). Tikėtina, kad prieškatijonio ($\text{M}^{\text{n}+}$) vieta yra kubo centre. „Netirpi“ forma skiriasi nuo „tirpios“ geležies jonų pertekliumi, kurie keičia prieškatijonio jonus. Ji taip pat vaizduojama kaip taisyklingas kubas, be vieno ketvirčio dalies $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$, kuri lieka laisva [26]. Tačiau ši iškelta teorija nėra paskutinė, ji yra ginčytina. Yra pabrėžiama, kad ši atsiradusi abejonė dėl Berlyno mėlynojo struktūros turi būti priskirta faktui, kad BM yra sudėtinga medžiaga su kintama stochiometrija. Pripažįstama, kad kristalinio BM struktūra priklauso nuo daugelio faktų (naudojamų medžiagų, atliekamų procedūrų), todėl gali atsirasti įsiterpusių papildomų jonų, neapibrėžtas kiekis vandens, hidrolizuoto fericianido, įvairios vakansijos kristalinėje struktūroje.

Kadangi dėl BM struktūros bendros nuomonės nėra, todėl atsirado abejonų ir dėl elektrocheminės reakcijos, vykstančios ant elektrodo paviršiaus. Buvo pasiūlytas Berlyno mėlynojo redukcijos ir oksidacijos reakcijos mechanizmas [27]:





1 pav. Berlyno mėlynojo struktūra, kur M^{n+} prieškatijonis.

Eksperimentas vykdytas ant platinos ir aukso elektrodų [27]. Tačiau, tai nėra vienintelis pasiūlytas reakcijos mechanizmas, kadangi, kaip jau minėta anksčiau, jis priklauso nuo naudojamo elektrodo rūšies, elektrocheminio ar cheminio nusodinimo būdo, naudojamų elektrolitų.

P. R. Bueno su kolegomis aprašė $\{(H_2O)_6\}$ grupių svarbumą BM struktūroje. Jie studijavo struktūros pakitimus elektrogravimetriniu metodu heksacianoferatų, turinčių savyje šarminį K^+ metalą. Buvo atskleista, kad BM sluoksnio savybės keičiasi labai siaurame potencialų intervale (apie 30 mV). Šis sudėties pasikeitimas priklauso nuo K^+ stochiometrinio skaičiaus. Specifinės K^+ jonų užimamos vietos sudėtinėje struktūroje aktyvina $\{(H_2O)_6\}$ grupės reakciją iki H^+ ir/arba H_3O^+ bei jos prisijungimą. Vandeninė kristalinės struktūros dalis yra svarbi, norint suprasti fotomagnetines, magnetines, optines bei elektrochemines savybes [28].

Vyrauja kelios nuomonės: vieni teigia, kad kalio jonai nedifunduoja į kristalinę BM struktūrą [27], o kiti yra priešingos nuomonės [29, 30]. Todėl buvo

ištirta katijonų įtaka BM struktūrai. Yra publikacijų, kuriose pateikiami duomenys, kad esant tirpale K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ yra išlaikoma BM elektrocheminis aktyvumas. Tačiau esant Na^+ ($r = 1,83 \text{ \AA}$), Li^+ ($r = 2,37 \text{ \AA}$) ir TEA^+ ($r = 2,81 \text{ \AA}$), bei II grupės katijonams (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}), BM aktyvumas yra blokuojama jau po labai mažo elektrocheminių ciklų skaičiaus [27]. Šis reiškinys yra paaiškinamas hidratuotų jonų spindulio ir Berlyno mėlynojo kanalo spindulio dydžiais. Susidaręs kanalas – ertmė, kurioje gali būti inkorporuojami metalų jonai. Pastarieji gali netrukdomai difunduoti į netirpaus junginio vidų, pereidami iš vandeninio tirpalo į netirpų junginį jie redukuojasi ant redukcinio centro išlaikydami krūvio pusiausvyrą, o kai redukcinis centras oksiduojamas išstumiami iš komplekso. BM kanalo spindulys apytiksliai $1,6 \text{ \AA}$, pro kurį lengvai praeina K^+ , Rb^+ , Cs^+ ir NH_4^+ , kurių hidratuotos molekulės atitinkamai turi $1,25$, $1,28$, $1,19$ ir $1,25 \text{ \AA}$ spindulius [29, 30, 31]. Kahlert su bendraautoriais ištyrė talio įtaką BM struktūrai. Jie teigė, kad redukuotas talis pakeičia kalio jonus. Šis fenomenas taip pat gali būti pritaikytas analizėms [32]. Kadangi pastebėtas metalų heksacianoferatų atrankamas, nes ne visi jonai gali patekti į jo sluoksnį, todėl jie pradėti naudoti, kaip jonams atrankūs elektrodai [26].

Iki šiol yra abejonių dėl sudėties ir metalo jono struktūros heksacianoferato sluoksnyje ant elektrodo, ir taip pat dėl prieškatijonio pakeitimo mechanizmo, suderinamumo bei kristalinės gardelės persitvarkymo dalyvaujant skirtingiems metalų katijonams redoks reakcijoje.

Svarbus tyrinėtojams klausimas yra elektrocheminis BM sluoksnio stabilumas. Yra aišku, kad BM sluoksnio stabilumas labai priklauso nuo tirpalo pH ir jo sudėties. Ši charakteristika reikalauja nepaprastai rimto tyrėjų dėmesio dėl Berlyno mėlynojo, kaip mediatoriaus pritaikymo biojutikliuose.

1.3.2. Berlyno mėlynojo nusodinimo būdai

1 lentelėje (22 psl.) yra nurodytos dažniausiai naudojamos Berlyno mėlynojo nusodinimo procedūros ant įvairių elektrodo paviršių.

Berlyno mėlynojo nusodinimas ant įvairių laidžių paviršių paprastai vykdomas cheminiu arba elektrocheminiu būdu, iš trivalentės geležies (Fe^{3+}) ir heksacianoferato (III) ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$) jonų vandeninių tirpalų.

Berlyno mėlynojo nusodinimas ant elektrodo paviršiaus elektrocheminiu būdu dažniausiai vykdomas naudojant pastovų elektrodo potencialą fericianido ir geležies chlorido tirpale, kartais galvanostatinio metodo pagalba (jo metu kontroliuojama srovė). Fericianido jonai nėra ypatingai stabilūs vandeniniame tirpale, nes po kelių laikymo dienų tirpalas pakeičia spalvą [33].

Chronopotenciometriniai tyrinėjimai sumaišius vienodomis koncentracijomis trivalentės geležies ir fericianido jonus parodė dvi pagrindines bangos gulstes esant elektrodo potencialams 0,7 V ir 0,4 V pagal SKE [34]. Šios bangos gulstės atitinkamai buvo priskirtos Fe^{3+} jonų ir $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ komplekso redukcijai. Remiantis $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ komplekso redukcija, esant elektrodo potencialui 0,4 V, buvo nusodintas BM. O esant 0,7 V potencialui didžioji dalis BM nusodinimo įvyksta dėl Fe^{3+} redukcijos iki Fe^{2+} , pastarasis reaguoja su $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. Užduodant elektrodai potencialą mažesnę negu 0,2 V Berlyno mėlynojo nusodinimas nerekomenduojamas, nes ir Fe^{3+} , ir $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ jonai yra redukuoti, ir susidariusio polikristalo struktūra yra netvarkinga.

Po to ciklinės voltamperometrijos pagalba BM sluoksnis stabilizuojamas. Gautoje ciklinėje voltamperometrinėje kreivėje Berlyno mėlynojo/Berlyno baltojo redoks viršūnių smailumas gali būti panaudotas kaip BM sluoksnio kokybės indikatorius (8 pav. 53 psl.). Norint pasiekti reguliarią BM struktūrą, turime kontroliuoti du svarbiausius faktorius: nusodinimo potencialą bei pradinių tirpalų pH. Tirpalo pH - lemiamas dalykas, nes trivalentė geležis lengvai hidrolizuojasi, o

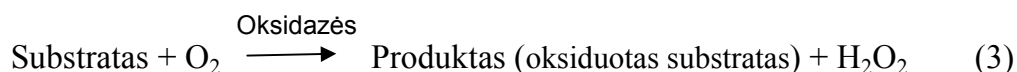
hidroksilo jonai (OH^-) negali pakeisti jų koordinacijos vietos BM kristalizacijos eigoje [35].

Berlyno mėlynasis gali būti sintetinamas ir cheminiu būdu sumaišius trivalentės geležies (divalentės geležies) ir heksacianoferatų jonus su skirtingais geležies atomų oksidacijos laipsniais: arba $\text{Fe}^{2+} + [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ [36], arba $\text{Fe}^{3+} + [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ [37, 38, 39, 40]. Po sumaišymo iš karto formuojasi tamsiai mėlynas koloidas. Tačiau, jei sumaišytume trivalentės geležies (divalentės geležies) ir heksacianoferatų jonus su tais pačiais geležies atomų oksidacijos laipsniais, gautume stabilesnius darinius.

1.3.3. Berlyno mėlynuoju modifikuoti elektrodai – vandenilio peroksido jutikliai

Poreikis selektyviam vandenilio peroksido nustatymui atsirado dėl kelių svarbių priežasčių. Iš įvairių pramonės šakų H_2O_2 patenka į lietaus bei gruntinius vandenis. Be to, vandenio peroksidas naudojamas baseinų, pakuočių dezinfekcijai, todėl jo koncentracijos nustatymas yra svarbus. Antra, H_2O_2 yra oksidazių klasės fermentų šalutinis produktas. Šiuo metu gliukozės oksidazė naudojama daugiau kaip 90 % visų egzistuojančių biojutiklių ir analitinių rinkinių.

Vandenilio peroksido amperometrinių nustatymo problemos yra žinomos visiems tyrėjams, susijusiems su biojutiklių kūrimu, nes vandenilio peroksidas yra vienas iš fermentinės reakcijos produktų (3).



Bet kokiam biojutikliui, kuriame atpažinimo elementu naudojama oksidazė, vandenilio peroksido nustatymas tampa labai svarbus, jo koncentracija yra tiesiogiai proporcinga substrato (t.y. analitės) koncentracijai. Tačiau, tiesioginis vandenilio peroksido amperometrinis nustatymas tradiciniuose elektroduose buvo galimas tiktai esant 0,6 V potencialui pagal Ag/AgCl

lyginamąjį elektrodą. Esant tokiam potencialui, tirpale gali lengvai oksiduotis kiti junginiai, tokie kaip askorbatas, bilirubinas, šlapimo rūgštis ir kitos medžiagos, ir iškreipti elektrodo parodymus. Pradžioje, norint pašalinti interferentines medžiagas, buvo mėginama naudoti apsauginį sluoksnį, tačiau tai sukėlė kitas problemas: atsirado difuzijos barjeras, pailgėjo biojutiklio atsako laikas ir pan. Taigi, buvo pasiūlyta naudoti mediatorius, kurie sugeba oksiduoti fermento aktyvų centrą, arba katalizatorius, kurie gali redukuoti (oksiduoti) vieną iš fermentinės reakcijos produktų. Mediatoriui keliami reikalavimai: jis turi būti jautrus, stabilus, reproduktyvus bei selektyvus. Tokio sluoksnio kūrimas sulaukė mokslininkų susidomėjimo. Ieškoma būdų, kaip imobilizuoti specifinį fermentą ant H_2O_2 jutiklio, kuris pasižymėtų pageidaujamos jautrumo ir selektyvumo savybėmis.

A. Karyakin su kolegomis [1, 2] pirmieji elektrochemiškai nusodino Berlyno mėlynąjį ant stiklo anglies elektrodo ir įrodė vykstančią efektyvią vandenilio peroksido redukciją ir oksidaciją ant šio elektrodo. Esant darbiniam potencialui 180 mV pagal Ag/AgCl, buvo apskaičiuota nustatymo riba lygi 1 μ M, o tiesiškumo intervalas - iki 10 mM. Neorganinio polikristalo aktyvumą įtakoja vykstančios O_2 ir H_2O_2 redukcijos, kurios labai priklauso nuo BM struktūros. Optimizuota elektrocheminė BM nusodinimo procedūra, gauta selektyvi elektrokatalizinė H_2O_2 redukcija esant molekuliniam deguoniui. Deguonies redukcija studijuotoje potencialų riboje buvo nežymi arba net mažesnė nei naudojant nemodifikuotą stiklo anglies elektrodą. Vandenilio peroksido nustatymas galimas plačioje potencialų riboje iki 250 mV pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą [41]. Taikant optimalų potencialą (0,0 V pagal Ag/AgCl) jutikliui ir biojutikliui H_2O_2 redukcijos srovės yra kelis šimtus kartų didesnės negu deguonies.

Buvo iširta Berlyno mėlynojo katalizuojama vandenilio peroksido redukcijos kinetika [42, 43]. Manoma, kad neutraliuose tirpaluose H_2O_2 redukcija vyksta pagal mechanizmą (4):



Karyakin ir bendraautoriai mano, kad elektrocheminės vandenilio peroksido redukcijos reakcijos greičio konstanta priklauso nuo nusodinto BM sluoksnio kiekio ant elektrodo paviršiaus. H_2O_2 prasiskverbia į vidinius polikristalo sluoksnius, kur ir vyksta katalizė. Esant BM nusodinto sluoksnio specifiniam kiekiui 4-6 nmol/cm², elektrocheminės reakcijos greičio konstanta yra apie 0,01 cm/s [42]. BM modifikuoti elektrodai pasižymi dideliu kataliziniu aktyvumu. Nors, pavyzdžiui, yra ir tokių duomenų, kad H_2O_2 elektrooksidacijos greičio konstanta neutraliame tirpale ant platinos elektrodo yra $7 \cdot 10^{-6}$ cm/s [44], o H_2O_2 elektroredukcijos - ant platinos elektrodo dar mažesnė [45].

Berlyno mėlynasis dėl didelio aktyvumo ir selektyvumo buvo pavadinta „dirbtine peroksidaze“ [48, 46]. Naudojant pratekančią celę galima tiksliai ir greitai nustatyti H_2O_2 , be to, šis būdas pasižymi ir geru jautrumu 0,6 A/M·cm².

Jau esant darbiniam elektrodo potencialui 0,0 V pagal Ag/AgCl, galima išvengti ar labai sumažinti pašalinių medžiagų įtaką (askorbo, šlapimo rūgšties, paracetamolio) vandenilio peroksido nustatymo metu [2, 41]. Tačiau žemas darbinis potencialas nepaaiškina BM selektyvumo. Ši ypatybė aiškinama specifine BM struktūra, kuri leidžia mažos molekulinės masės molekulėms prasiskverbti per kubines groteles, išskyrus didesnės molekulinės masės molekules. Tai turbūt yra svarbiausias pranašumas H_2O_2 redukcijai naudoti BM kaip mediatorių. Surišus BM su biologiniu komponentu pasiektas ne tik selektyvumas ir veiklumas, bet ir visi neorganinių medžiagų pranašumai: maža kaina, aukštas stabilumas tam tikrose sąlygose, paprastas ir greitas nusodinimas ant elektrodo paviršiaus.

1 lentelė. Berlyno mėlynuoju modifikuotų elektrodų apžvalga per pastaruosius 15 metų.

Naudojami elektrodai	Nusodinimo būdas	H₂O₂ nustatymo metodas	pH	Darbinis potencialas pagal Ag/AgCl	Nustatymo riba, μM	Tiesiškumo intervalas, μM	Jautris, mA/(M·cm²)	Nuoroda
SAE	Galvanostatinis	Amperometrija (SDE)	6,0	180 mV	1,0	1,0 - 10 ³	-	[1]
SAE	Galvanostatinis	Amperometrija	6,0	180 mV ir 900 mV	1,0	1,0 - 10 ⁴	1000	[2]
SAE	Galvanostatinis	SAM	5,5	0,0 V	1,0	1 - 200	-	[41]
Anglies pastos elektrodas	Cheminis	Amperometrija	3,1	-200 mV	-	-	200	[47]
SAE	Galvanostatinis	SAM	6,0	-50 mV	0,10	0,10 – 100	600	[48]
SME	Cheminis	Amperometrija	7,4	0,0 V	0,4	0,4 – 100	137	[49]
Stiklo anglies disko elektrodas	Chronopotenciometris	SAM	6,0	0,0 V	≈ 0,10	-	300	[50]
Stiklo anglies pastos elektrodas	Cheminis	Amperometrija	6,0	0,0 V	0,25 0,50	0,25 – 500 0,20 – 500	0,188 0,099	[38]
Grafito SME	Cheminis	Amperometrija	6,0	-50 mV	0,3	0,5 – 10 ³	135	[39]
SME	Cheminis	Amperometrija	7,4	-50 mV	0,1	0,1 – 50	324	[40]

1 lentelė (tęsinys). Berlyno mėlynuoju modifikuotų elektrodų apžvalga per pastaruosius 15 metų.

Naudojami elektrodai	Nusodinimo būdas	H ₂ O ₂ nustatymo metodas	pH	Darbinis potencialas pagal Ag/AgCl	Nustatymo riba, μM	Tiesiškumo intervalas, μM	Jautris, mA/(M·cm ²)	Nuoroda
SAE	Galvanostatinis	SAM	7,0	-50 mV	0,5	1 - 800	149,55	[51]
SAE	Ciklinė voltamperometrija	SAM		0,0 / 50 mV	0,10	0,10 - 10 ⁴	200	[52]
SME	Cheminis	SAM	7,4	-50 mV	1,0	1,0 - 1000	213	[53]
IAO elektrodas	Cheminis	Voltamperometrija/ amperometrija	7,0	200 mV	0,10	-	2548	[54]
SAE	Galvanostatinis	Amperometrija (SDE)	6,5	0,0 V	0,005	0,008 - 5	0,52643	[31]
SAE	Cheminis	Amperometrija	6,5	0,0 V	0,01	0,08 - 10	0,50818	[55]
SME	Cheminis	Amperometrija	R N Š	[-100 ÷ 100] mV	-	Iki 5150 Iki 3850 Iki 2430	Esant - 50 mV ir pH 6,0 gautas didžiausias jautrumas	[56]

SAE – stiklo anglies elektrodas; SDE – sukamojo disko elektrodas; IAO – indžiu dopuotas alavo oksidas; SME - spausdinto montažo elektrodas; SAM – srauto analizės metodas; R – rūgštus pH, N – neutralus pH; Š – šarminis pH.

Dėl šios priežasties, didelis dėmesys buvo skirtas BM modifikuotiems elektrodams. 1 lentelėje pateikti reikšmingiausi rezultatai, kurie buvo gauti H₂O₂ nustatymui naudojant BM modifikuotus elektrodus esant skirtingoms elektrodų medžiagoms, nusodinimo procedūroms ir matavimo būdams. Berlyno mėlynuoju modifikuomi įvairūs elektrodai: stiklo anglies [1, 2, 31, 38, 41, 42, 50, 51, 52, 55], grafito [39], anglies pastos [47], IAO [54], platino ir aukso [27] elektrodų, taip pat ir SME [39, 40, 49, 56]. Dažnai naudojami spausdinto montažo elektrodai (SME) dėl savo pranašumų: jie yra nebrangūs, paprastai paruošiami bei tinkami vienkartinėms elektrodų masinei gamybai. Visais šiais atvejais H₂O₂ nustatymo riba visada yra milimoliarinėje srityje ir su geromis charakteristikomis naudojant optimalų tirpalo pH (pakankamu jautumu, plačiu vandenilio peroksido nustatymo intervalu).

Didžiausias kada nors gautas elektrodo jautrumas H₂O₂ yra 0,08 μA/μM esant 0,2 V pagal Ag/AgCl elektrodą, elektrodo plotas lygus 0,0314 cm² [54]. Čia autoriai chemiškai nusodino Berlyno mėlynąjį ant IAO elektrodo. Buvo gautas didžiausias jautrumas vandenilio peroksidui (600 mA/M·cm²) srauto analizės metodu naudojant stiklo anglies elektrodą [2, 48]. Prieš porą metų, Y. Zou, L. Sun, F. Xu sukonstravo hibridinį SAE/ANV/PANI/BM elektrodą, kuris pasižymėjo mažiausia iki šiol H₂O₂ nustatymo riba - 5 nM, taip pat gauta kalibracinė kreivė siekia mažas vandenilio peroksido koncentracijas, kurios yra nuo 0,008 iki 5 μM [31].

Kadangi BM pasižymi labai geru elektrokataliziniu aktyvumu, todėl šiuo katalizatoriumi modifikuotų elektrodų pritaikymas labai platus. Dėl šios priežasties, Berlyno mėlynuoju modifikuoti elektrodai buvo panaudoti ne tik elektrochemijoje bet ir chromatografijoje, kaip detektoriai.

1.3.4. Veiksniai, sąlygojantys Berlyno mėlynojo stabilumą

Norint įvertinti Berlyno mėlynojo stabilumą, buvo naudojama ciklinė voltamperometrija, bandymai buvo pagrįsti maksimalių srovių mažėjimo skaičiavimu po kelių ciklų, esant skirtingoms sąlygoms. Itaya darbuose Berlyno mėlynojo modifikuotas elektrodas pasižymėjo dideliu stabilumu (100 mV/s 10^5 ciklų) [29]. 1992 m. buvo pranešta, kad BM sluoksniui neigiamą poveikį daro silpnai šarminis pH [57]. pH srityje tarp 2 ir 3 buvo pasiekta 10^4 ciklo gyvavimo trukmė, tuo tarpu ilgalaikis sluoksnio stabilumas, ciklinant neutraliame tirpale niekada nebuvo nustatytas. Buvo pranešta, kad BM sluoksnis buvo suardytas po kelių ciklų neutraliame pH, o šarminiame pH nustatytas labai mažas stabilumas. Tokio elgesio priežastimi, tikriausiai, gali būti susidariusios stiprios sąveikos tarp geležies jonų ir hidroksilo jonų (OH^-), kurie formuoja $\text{Fe}(\text{OH})_3$ esant tirpalo pH daugiau nei 6,4, todėl pradeda vykti Fe-CN-Fe grandinės nutrūkimas, kitaip dar vadinamas Berlyno mėlynojo tirpimu [48]. Hidroksilo jonai sukelia elektrokatalizinio sluoksnio paviršiuje tirpalo pH padidėjimą, dėl to prasideda BM sluoksnio irimas. BM sluoksnio irimas lemia ir srovės sumažėjimą. Daugelį metų Berlyno mėlynojo modifikuotų elektrodų nestabilumas buvo svarbiausias jo trūkumas, ypatingai tai svarbu, kai tokie jutikliai naudojami biojutiklių kūrimo [3, 58].

BM sluoksnio stabilumas taip pat priklauso nuo skirtingų nusodinimo būdų. Kaip jau minėta ir anksčiau, BM struktūra yra vis dar tyrinėjamas klausimas ir tikėtina, kad ji yra tiesiogiai siejama su procedūra, panaudota, kad suformuotų BM dangą ant elektrodo paviršiaus. Jei priimtume, kad sluoksnio stabilumas priklauso tik nuo tirpalo pH, vadinasi, tik dėl reakcijos su OH^- ir geležies jonais, tai tikėtina, kad labai mažas BM trimatės struktūros pasikeitimas galėtų įtakoti skirtingą geležies jonų reakciją su OH^- , tokiu būdu sudarydamas skirtingą BM veikimą šarminiame pH.

Buvo studijuoma pradinių tirpalų pH, reikalingų BM nusodinimui ant elektrodo paviršiaus. Nustatyta, kad padidinus tirpalų rūgštingumą, gauti stabilesni BM sluoksniai [59].

Cheminio nusodinimo būdu Berlyno mėlynuoju modifikuotas elektrodo paviršius pasižymėjo padidintu stabilumu šarminiame pH [60]. Garjonytė ir Malinauskas ištyrė vandenilio peroksido redukciją ant BM modifikuoto anglies pastos elektrodo pH 3,05 – 7,3 buferiniuose tirpaluose ir nustatė, kad didėjant tirpalo pH, prastėja ir H₂O₂ elektrokatalizė reakcija. O jautrumas esant pH 7,3 nukrenta per dvi eiles [47, 58]. Tirpalo pH įtaka BM sluoksniui ir H₂O₂ elgesi mediatoriaus sluoksnyje aiškina ir A. M. Gurban su bendraautoriais [56].

Cheminio nusodinimo alternatyva yra elektrocheminis BM nusodinimas ant elektrodo paviršiaus, kuri paprastai naudojo Itaya savo darbuose, o optimizavo Karyakin. Jis yra pagrįstas savaimine reakcija tarp Fe²⁺ jonų ir kalio fericianido, todėl gaunamas labai stabilus BM sluoksnis. Tačiau reikia pažymėti, kad padidintas stabilumas šarminiame pH nėra gerai suprantamas. Gali būti, kad cheminė procedūra leidžia nusodinti Berlyno mėlynąjį, kurio struktūra panašesnė į „tirpią“ BM formą, žinoma, kad ji yra stabilesnė nei „netirpi“.

Kita hipotezė yra ta, kad cheminės procedūros pagalba nusodinamas BM perteklius, kuris veikia kaip rezervuaras. Tai paaiškintų sumažėjusį sluoksnio irimą, kuris atsiranda dėl geležies jonų hidrolizės šarminiame pH. Nors tai nėra patvirtinta jokiais kitais bandymais, manoma, kad cheminis nusodinimas yra tiesiogiai susijęs su stabilumu.

Daugelis autorių pavirtina, kad BM oksiduota forma atsakina už sluoksnio stabilumą, tačiau kai kuriems pavyksta BM dangos stabilumą padidinti ilgesniam laikui [53]. Manoma, kad tai priklauso nuo stiprios BM dalelių adsorbcijos ant SME ir nuo mažo Berlyno mėlynojo tirpumo.

Kai kurių priedų naudojimas, taip pat pagerino BM sluoksnio stabilumą. Tyrimai buvo atliekami naudojant tetrabutilamonio-toluen-4-sulfonatą (TTS). Buvo įrodyta, kad pridėjus į analizuojamąjį tirpalą TTS pagerinamas chromo

heksacianofेरату modifikuoto elektrodo stabilumas [61]. B. Haghghi su klegomis pagerino BM stabilumą. Jie pridėjo TTS į tirpalą nusodinant BM ant elektrodo arba į buferinį tirpalą analizės metu [51]. Remiantis skenuojančiu elektronų mikroskopu, elektrocheminės impedanso spektroskopijos ir rentgeno spinduliuotės difrakcinės analizės metodais buvo nustatyta, kad BM nusodinimui ant SA elektrodo naudojant N-heksadecil-N,N,N-trimetilamonio bromidą, nusėdusio BM sluoksnio grotelių kanalo dydžiai padidėjo, o defektai buvo sumažinti, taip buvo pagerintos elektrokatalizinės savybės bei padidintas Berlyno mėlynojo stabilumas [62].

Kad padidintų BM stabilumą buvo pasiūlyti kiti metodai, t.y. apsauginių polimerų, tokių kaip Nafion'as [63], poli(1,2-diaminobenzenas) [50, 58] ir daugelis kitų, naudojimas. Laidžių ir nelaidžių polimerų naudojimas tapo svarbus dėl biojutiklių kūrimo: jie naudojami ne tik kaip matrica fermentui imobilizuoti, bet ir baltymo ir mediatoriaus fiksavimui ant elektrodo paviršiaus.

Nepaisant visų BM modifikuotų elektrodo pranašumų, yra pažymima, kad jie nestabilūs šarminiame pH. Vadinasi, jutiklių naudojimas apriojamas neutraliuose ar rūgštiniuose tirpaluose.

1.3.5. BM modifikuotų elektrodo taikymas kitų analizių nustatymui

Buvo pastebėta, kad ant BM modifikuoto elektrodo gali vykti ne tik vandenilio peroksido katodinė redukcija ar oksidacija, tačiau ir kitų medžiagų elektoredukcija ar elektrooksidacija. Ant tokio jutiklio gali vykti tiek neorganinių, tiek organinių medžiagų elektrokataliziniai redoks procesai. Buvo aprašyta azoto oksido (NO) elektrokatalizinė redukcija ant BM modifikuoto elektrodo naudojant neigiamus elektrodo potencialus, kur Berlyno mėlynasis yra redukuotoje Prūsų baltojo formoje. Redukcinė srovė buvo stebima esant -0,4 V potencialui ir didėjo esant neigiamesniam potencialui rūgštiniuose vandeniniuose buferiniuose tirpaluose [64]. Buvo gauta ir anglies dioksido (CO₂)

elektroredukcinė srovė ant sudėtinio bis (4,5-dihidroksibenzeno-1,3-disulfonato)ferato(II)-polianilino/BM modifikuoto elektrodo. Manoma, kad šios elektrocheminės reakcijos metu susidaro sudėtingi C₂ ir C₃ junginiai [65]. Elektroanalizinis pritaikymas buvo aprašytas ir amperometriniam elektrokataliziniam kofermento NADH nustatymui, naudojant BM-polipirolu modifikuotą elektrodą [66]. Morfijaus nustatymas naudojant IAO elektrodą modifikuotą BM, kuris leido žymiai sumažinti darbinį elektrodo potencialą, nustatymo intervalas buvo nuo 0,09 iki 1,0 mM, o jautrumas - 16,8 mA/(M·cm²) [67]. Chemiškai adsorbuotas Berlyno mėlynasis ant stiklo anglies elektrodo katalizuoja rūgštinėje terpėje cisteino, N-acetilcisteino ir glutationo elektrocheminę oksidaciją. Šis elektrodas buvo panaudotas kaip detektorius šių medžiagų nustatymui skysčių chromatografijoje [68]. Glutationas yra tripeptidas - antioksidantas, susidedantis iš glutamo rūgšties, cisteino ir glicino. Cisteino nustatymui taip pat buvo pasitelkti elektrochrominiai įrenginiai. Tam BM buvo nusodintas ant FAO elektrodo ir optoelektrochemiškai nustatoma Cis koncentracija. Kadangi sveiko žmogaus normali Cis koncentracija plazmoje yra tarp 152,8 ir 378,0 μM, tai šis metodas gali būti pritaikytas klinikiniuose tyrimuose [69]. Cisteinas - tai viena iš amino rūgščių, nedideliais kiekiais randama daugelyje baltymų. Cis yra svarbus detoksikacijos procesams, padeda neutralizuoti pavojingus toksinus ir saugo organizmą nuo laisvųjų radikalų, kurie yra skausmo ir senėjimo proceso palydovai. BM gebėjimas katalizuoti organinių tiolių elektrooksidaciją vėliau buvo pritaikytas pesticido tiocholino nustatymui, kadangi tiocholinas yra acetilcholino katalizuoto acetilcholinesterazės fermento produktas [70, 71].

Šie visi rezultatai rodo, kad BM modifikuotus elektrodus galima naudoti ne tik amperometriniam vandenilio peroksido, bet ir plataus asortimento cheminių medžiagų elektrocheminiam nustatymui.

1.4. Askorbo rūgšties nustatymo būdai

Vitaminai – biologiškai aktyvios medžiagos. Organizmui stokojant jų, atsiranda įvairių sveikatos sutrikimų, smarkiai veikiama medžiagų apykaita - avitaminozė. Vitaminas C (askorbo rūgštis) dalyvauja angliavandenių bei baltymų apykaitoje, didina organizmo atsparumą įvairioms, ypač kvėpavimo takų infekcinėms, ligoms, reguliuoja cholesterolo kiekį kraujyje, kartu lėtindamas aterosklerozės vystimąsi. Be to, kai askorbo rūgšties (AR) yra pakankamai, geriau pasisavinama geležis.

Jo randama visuose organizmo audiniuose bei skysčiuose, bet daugiausia antinksčiuose, smegenyse, širdyje.

Žmogaus organizmas nesugeba sintetinti šio vitamino, todėl jį būtina nuolat papildyti kartu su maistu arba vartoti AR preparatus. Askorbo rūgšties yra erškėčiuose, juoduosiuose serbentuose, spanguolėse, kopūstuose, pomidoruose, citrinose, apelsinuose, svogūnuose, česnakuose, bulvėse, daugelio vaisių ir augalų želmenyse, ypač ūgliuose.

Stokojant AR, žmogus blogai jaučiasi, greitai pavargsta, blogiau sekasi dirbti ne tik fizinį, bet ir protinį darbą, greitai persišaldo, sutrinka virškinimo trakto darbas. Kaulai pasidaro trapūs, pradeda skaudėti sąnarius, atsiranda mažakraujystė, ir labai sumažėja organizmo atsparumas infekcinėms ligoms. Suaugęs žmogus per parą su maistu turi gauti 50- 78 mg šio vitamino.

Kadangi askorbo rūgštis yra toks svarbus žmogaus organizmui, todėl jo nustatymas maisto produktuose, medikamentuose, audiniuose bei kraujo serume yra labai svarbus.

Nemažai askorbo rūgšties nustatymo metodų galima rasti apžvalgose [72, 73]. Nors mokslinėje literatūroje gausu skirtingų metodų, kurie naudojami askorbo rūgšties nustatymui, tačiau vis dar dedamos pastangos naujų, geresnių metodų paieškoms. Metodams, kurie būtų pigesni, paprastesni bei tikslesni.

Literatūroje yra pasiūlyta AR nustatyti: titrimetriniu [74, 75], voltamperometriniu [76], fluorimetriniu [77], potenciometriniu [78, 79], chemiliuminescenciniu [80], srauto analizės [81, 82] ir chromatografijos [83, 84] metodais.

Vis tik pagrindiniai askorbo rūgšties nustatymo būdai yra titravimas ir chromatografija. Chromatografinis būdas yra ir brangus, o titrimetrinis – nepakankamai tikslus ir selektyvus, kadangi gamtinės kilmės medžiagose būna ir kitų organinių rūgščių (citrinų ar šlapimo rūgšties). Jų sandara ir savybės panašios į AR, todėl jos identifikuojamos kaip askorbo rūgštis, taip iškreipdamos registruojamą atsaką.

Elektrocheminės analizės metodų pagrindą sudaro elektrocheminiai virsmai elektrodų paviršiuje arba tarpelektrodinėje srityje. Vyksmo metu kinta įvairūs sistemos parametrai: tirpalo varža, elektrinis laidumas, elektrodo potencialas, elektros srovė, elektros krūvio kiekis ir kt. Elektrocheminiai analizės metodai remiasi minėtų parametrų priklausomybe nuo analizuojamosios medžiagos koncentracijos tirpale.

Askorbo rūgšties nustatymui buvo išbandyta voltamperimetrinė analizė naudojant mikropilvelinius [85] elektrodus. Tačiau atliekant pakartotinius matavimus tokių elektrodų patikimumas mažėja, nes elektrodo paviršius užsiteršia oksidacijos produktais. Paprastas, selektyvus ir tikslus voltamperimetrinis metodas buvo pasiūlytas askorbo rūgšties nustatymui farmaciniuose preparatuose ir šviežių vaisių sultyse [76]. Metodas yra pagrįstas elektrokatalizine AR oksidacija homogeniniame tirpale, naudojant fericinumkarboksi rūgštį, kaip mediatorių. Autoriai rašo, kad AR (15 - 45 mg/ 100 ml) jų metodu galima nustatyti labai spalvotuose, klampiuose ir drumstuose vaisių sulčių mėginiuose, be papildomo mėginių paruošimo.

Buvo ištirtos ir optimizuotos askorbo rūgšties nustatymas naudojant srauto analizės sistemą kvadratinės bangos voltamperometrijos metodu,

nealkoholiniuose gėrimuose ir vaisių sultyse [86]. AR tiesinė dalis nuo $2 \cdot 10^{-6}$ iki $6 \cdot 10^{-3}$ M, o aptikimo riba yra $2 \cdot 10^{-7}$ M.

S. Uchiyama ir Y. Umetsu [87] sukūrė amperometrinių biojutiklių askorbo rūgšties nustatymui. Jie panaudojo askorbato oksidazės fermentą, esantį agurkų sultyse. Askorbo rūgšties nustatymo intervalas yra nuo $2,5 \cdot 10^{-4}$ iki $1,6 \cdot 10^{-3}$ M.

Pasiūlyta ir amperometrinių jutiklių AR nustatymui. J. J. San su bendraautorais [88] ciklinės voltamperometrijos metodu ant mikrodisko aukso elektrodo elektropolimerizavo 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį ir aniliną. Sudėtinu polimeru modifikuotas elektrodas rodo gerą elektrocheminį atsaką ir didelį stabilumą neutralioje ir silpnai šarminėje terpėje, net naudojant elektrodą ilgą laiką. Elektrodo jautrumas askorbo rūgščiai yra $0,21 \text{ A/M} \cdot \text{cm}^2$, o nustatymo intervalas yra nuo $1,0 \cdot 10^{-4}$ iki $1,0 \cdot 10^{-2}$ M. Sukurtas srauto analizės metodas, galintis tuo pačiu metu nustatyti šlapimo ir askorbo rūgštis panaudojant spektrofotometrą ir miniamperometrinių detektorių. AR amperometrinis nustatymas vyksta esant $+0,6 \text{ V}$ potencialui, nustatymo intervalas yra iki $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ g/l}$. Pastebėta, kad detektorius nepasižymi dideliu selektyvumu [89]. L. E. Leon askorbo rūgšties nustatymui pasinaudojo fotocheminę metileno mėlynojo redukcijos reakcija su AR. Dėl to susidaręs leukometileno mėlynasis pH 3,8 ftalato buferiniame tirpale amperometriškai nustatomas ant stiklo anglies elektrodo esant $+50 \text{ mV}$ potencialui. Šis metodas askorbo rūgštį nustato $5,0 \cdot 10^{-3} - 9,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/l}$ intervale, aptikimo riba yra $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ g/l}$ [90]. Buvo rastas pranašesnis metodas už ką tik paminėtą, naudojant metileno mėlynąjį, mėginams, kurie turi smulkių dalelių, yra stipriai spalvoti ar didelio klampumo [91]. Metileno mėlynąjį chemiškai adsorbavus mordenito kanaluose kaip monomerą ar dimerą ir sumaišius su anglies pastos milteliais, gaunamas jutiklis, kurio pagalba amperometriškai nustatoma AR. Naudojant pH 6,2 buferinį tirpalą bei elektrodo potencialui esant $+0,2 \text{ V}$, askorbo rūgštis nustatoma $2,0 \cdot 10^{-5} - 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ribose, aptikimo riba yra $1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Folio rūgštis, kofeinas, gliukozė, sacharozė, krakmolas, kurių yra farmaciniuose produktuose, taip pat Γ^- , Br^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ buvo patikrinti su šiuo

elektrodu. Gautas rezultatas parodė, kad šių medžiagų buvimas mėginyje (išskyrus $S_2O_3^{2-}$) netrukdo askorbo rūgšties nustatymui. Šis jutiklis gali būti panaudotas tiesioginiam vitamino C nustatymui be jokio papildomo farmacinio ar biologinio mėginio paruošimo. Askorbo rūgšties amperometriniam nustatymui buvo panaudotas jodo/jodido tirpalas rūgštinėje terpėje. Jodo kiekis, sunaudotas redoks reakcijoje, yra proporcingas AR kiekiui mėginyje. AR kalibravimo grafikas buvo tiesinis $2 \cdot 10^{-5}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ M intervale. Manoma, kad AR šviežiuose maisto produktuose nustatoma su gan geru atrankumu [92]. Nors amperimetriniai jutikliai yra ganėtinai jautrūs, tačiau jų naudojimo trukmė yra apribota. Taip pat yra dar vienas elektrocheminio nustatymo trūkumas - askorbo rūgšties oksidacijos produktas (dehidroaskorbo rūgštis) negali būti aptiktas oksiduotoje būsenoje.

Apžvelkime straipsnius, kuriuose AR nustatyti naudojami elektrodai modifikuoti pereinamųjų metalų heksacianoferatų kompleksais. 2 lentelėje pateikti duomenys apie skirtingus geležies ir vario heksacianoferato kompleksų nusodinimo būdus ant skirtingų elektrodų. Berlyno mėlynuoju modifikuotas elektrodas parodė gerą rezultatų atsikartojamumą, S.S.N. buvo lygus 2,8 % [93]. Rezultatai buvo palyginti su oficialiai galiojančiais metodais. R. Pauliukaitė su kolegomis [94] ištyrė visus tris skirtingais būdais vario heksacianoferatu (CuHcf) modifikuotus elektrodus ir nustatė, kad chemiškai modifikuotas elektrodas pasižymėjo geresniu stabilumu, nei elektrocheminiais būdais modifikuoti elektrodai. Jis buvo tinkamas nuolatiniam naudojimui 20 dienų ir stabilus mažiausiai 4 mėnesius. Jutiklis buvo panaudotas AR nustatyti vyne ir sultyse. Interferentinių medžiagų poveikis nebuvo žymus. CuHcf mikrodalelės buvo mechaniškai imobilizuotos ant grafito elektrodo [95]. Hidrodinaminės voltamperometrijos rezultatai ir gautas tikslumas, nustatant AR medikamentuose, rodo, kad šis elektrodas gali būti panaudotas kaip detektorius askorbo rūgšties nustatymui skysčių chromatografijoje. AR nustatymui taip pat buvo naudoti NiHcf modifikuoti aliuminio elektrodai [96]. Ištirta elektrokatalizinė AR oksidacija pH 7,2 fosfatiname buferiniame tirpale. Elektrodas pasižymėjo geru stabilumu. Ištirta

reakcijos kinetika naudojant sukamojo disko elektrodą. Elektrokatalizinės reakcijos greitis buvo apskaičiuotas ant Co₂ modifikuoto stiklo anglies elektrodo, naudojant sukamojo disko elektrodą [10].

2 lentelė. Askorbo rūgšties nustatymas pereinamųjų metalų heksacianoferatu modifikuotais elektrodais.

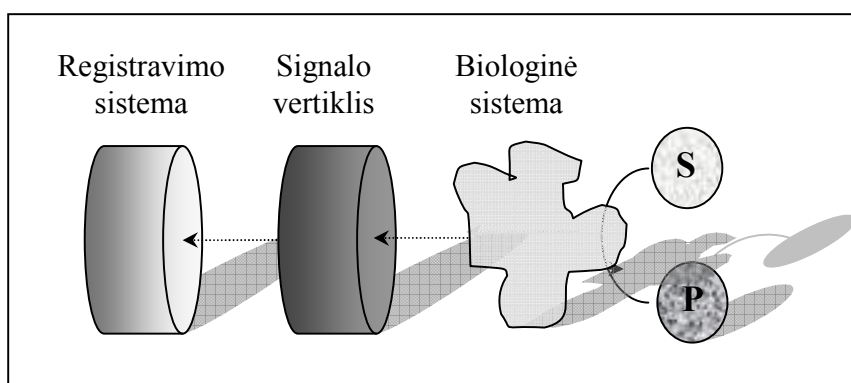
Jutiklis	Nusodinimo būdas	AR nustatymo metodas	pH	Darbinis potencialas	Nustatymo riba, μM	Tiesiškumo intervalas, mM	Jautris, $\text{mA}/(\text{M}\cdot\text{cm}^2)$	Nuoroda	
Stiklo anglies elektrodas modifikuotas BM	Ciklinė voltamperometrija. Pasikartojantis potencialo sklaidimas nuo -0,2 iki 0,6 V, 1,0 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM HCl tirpale, 10 mV/s greičiu.	SAM	3,7	0,27 V pagal Ag/AgCl	2,49	0,005 - 1,00	-	[93]	
Anglies elektrodas modifikuotas Cuhcf	Cheminis. 50 min. elektrodas panardintas į 10 mM Cu^{2+} , 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 100 mM KCl tirpalą.	Amperometrija	7,0	0,05 V pagal SKE	2,10	0,20 - 5,00	1,40 \pm 0,03	[94]	
	Chronopotenciometris. Užduodant -100 mA/cm^2 srovę 300 s, tirpalo sudėtis ta pati.				4,32	0,01 - 3,00	2,31 \pm 0,04		
	Ciklinė voltamperometrija. Pasikartojantis potencialo sklaidimas nuo 0,25 iki 0,9V, 50 mV/s greičiu, 25 ciklus. Tirpalo sudėtis ta pati.				3,65	0,15 - 5,00	0,80 \pm 0,02		

SKE – sotus kalomelio elektrodas; SAM – srauto analizės metodas.

1.5. Biojutikliai

1.5.1. Biojutiklių tipai, klasifikacija, veikimo principai

Biojutiklis - tai įrenginys, susidedantis iš analizės atpažinimo sistemos ir labai artimo arba integruoto selektyvaus signalo vertiklio, kuris tiesiogiai arba per redoks mediatorių registruoja sąveiką tarp paviršiaus ir atpažinimo sistemos (2 pav.).



2 pav. Biojutiklio principinė schema.

Analizės atpažinimo sistema (fermentai, polifermentiniai kompleksai, antigenai, antikūniai, nukleorūkštys, organelos, ląstelės, audiniai ir pan.) yra biologinės kilmės medžiagos, atrankiai atpažįstančios iš reagentų mišinio nustatomą analizę ir kai kuriais atvejais katalizuojančios jos virstimą produktu (P).

Signalų vertiklio pagrindinė funkcija – paversti biologinės kilmės medžiagos fiziko-cheminį virsmą į nesunkiai registruojamą signalą. Taigi, biojutiklis - tai medžiagų koncentracijų pokyčius matuojantis įrenginys, kurio jutiklis yra biokomponentas.

Priklausomai nuo to, koks naudojamas signalų vertiklis, jie gali būti skirstomi į optinius, terminus, pjezoelektrinius ir elektrocheminius. Populiariausia klasė yra elektrocheminiai biojutikliai.

Elektrocheminių biojutiklių veikimas pagrįstas tuo, kad biosąveikos metu elektronai suvartojami arba generuojami ir taip atsirandantis elektrocheminis

signalas gali būti išmatuotas. Pagal detekcijai taikomą elektrocheminį metodą yra skirstomi į konduktometrinius, kulonometrinius (dvigubo elektrinio sluoksnio talpos), potenciometrinius ir amperometrinius [97]. Pastaruosius aptarkime plačiau.

1.5.2. Amperometriniai biojutikliai

Amperometrinių biojutiklių veikimas paremtas elektrochemiškai aktyvaus junginio oksidacija arba redukcija ant darbinio elektrodo paviršiaus. Šiuo elektrodu tekanti srovė matuojama naudojant dvielektrodines ar trielektrodines elektrochemines schemas. Darbinio elektrodo potencialas turi būti pasirinktas atsižvelgiant į elektrochemiškai aktyvios medžiagos prigimtį bei į mėginyje esančias elektriškai aktyvias interferentines medžiagas. Elektrodiui suteikus pastovų potencialą redoks reakcijos greitis bei srovės stipris elektrinėje grandinėje priklauso nuo dalyvaujančių reakcijoje komponentų koncentracijos. Tai heterogeninės prigimties procesai, todėl vykstančių reakcijų greitis taip pat priklauso nuo elektronų pernašos greičio ant elektrodo paviršiaus ir analitės masės transporto prie elektrodo paviršiaus. Šių procesų visumą ir atspindi darbinio elektrodu tekanti srovė.

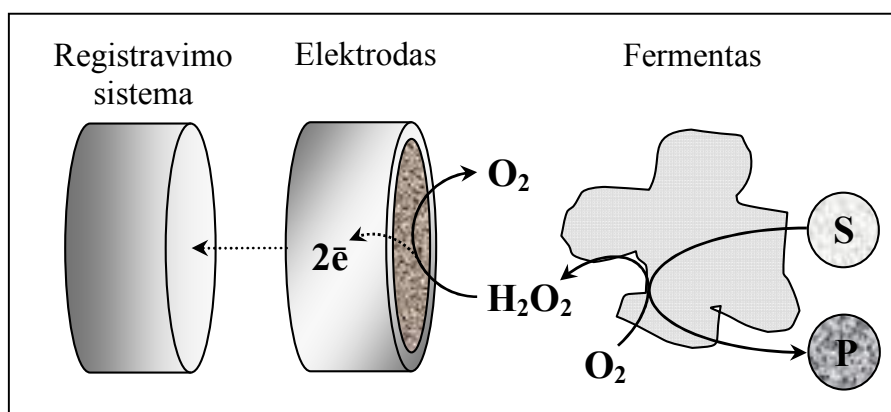
Šiuolaikiniams biojutikliams keliami dideli reikalavimai: jie turi pasižymėti dideliu atrankumu ir jautrumu, geru operaciniu stabilumu, biojutiklio signalui neturi daryti įtakos interferentinės medžiagos (tokios kaip askorbo, šlapimo rūgštis, paracetamolis ir kitos medžiagos, kurių gausu biologiniuose mėginiuose). Taip pat biojutiklių gaminimo procesas turi būti gerai atkartojamas.

Kuriant šiuolaikines selektyvias amperometrines analizines sistemas naudojant fermentus, vienas iš pagrindinių uždavinių yra parinkti tinkamą fermento imobilizavimo būdą ir užtikrinti efektyvų ir greitą elektronų pernašos greitį tarp substrato (S) ir elektrodo.

1.5.2.1. Pirmos kartos biojutikliai

Amperometriniai biojutikliai pagal elektronų perdavimo mechanizmą skirstomi į trijų kartų biojutiklius.

3 pav. pateikiama pirmosios kartos biojutiklio schema. Šio tipo biojutikliams priklauso daugelis sukurtų komercinių gliukozės biojutiklių, kur biologiškai aktyvi medžiaga – gliukozės oksidazė. Gliukozės oksidazės imobilizavimui ant elektrodo paviršiaus naudojamos įvairiausios metodikos: fermentą inkorporuojant po pusiau pralaidžia membrana, įjungiant į įvairius gelius, sumaišant su anglies pasta, surišant su glutaro aldehidu skersiniais ryšiais, nusodinant elektrodo paviršiuje elektrocheminės polimerizacijos būdu [98] ir kt.



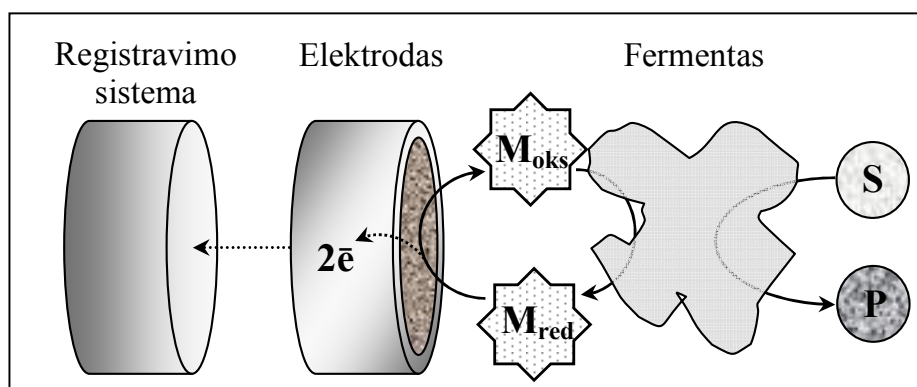
3 pav. Pirmos kartos biojutiklio schema, kurioje fermento elektronų akceptorius yra O_2 .

Pirmos kartos biojutiklių gamyboje naudojamos oksidazės, kurios katalizuoja įvairių organinių medžiagų oksidaciją, pvz. gliukozės, glutamato ar laktato. Juose, esant atitinkamam darbiniam elektrodo potencialui, elektrochemiškai registruojamas ištirpusio deguonies ar vandenilio peroksido koncentracijos pokyčiai. Šios medžiagos, galinčios tiesiogiai redukuotis ar oksiduotis ant metalinių elektrodų, yra naudojamos kaip elektronų pernešimo tarpininkai tarp fermento ir signalo vertiklio.

Tačiau biojutikliai, kuriuose taikomos oksidazės, dėl nepastovių deguonies koncentracijų mėginiuose yra nepakankamai patikimi, o H_2O_2 koncentracija gali būti nustatoma tik esant gana aukštam elektrodo potencialui (0,6 V), todėl, interferentinių medžiagų buvimas mėginyje iškraipo jutiklio atsaką. Šių problemų iš dalies galima išvengti sukuriant vidinius deguonies generatorius, įvedant papildomas membranas arba deguonį pakeičiant kitais mediatoriais (pvz. Berlyno mėlynuoju) [99].

1.5.2.2. Antros kartos biojutikliai

Antrosios kartos biojutikliuose (4 pav.) natūralius oksidazių elektronų akceptorius pakeitė sintetiniai elektronų pernešimo tarpininkai – mediatoriai (M). Mediatoriai - tai elektronų pernešėjai, lengvai reaguojantys su biologiniu komponentu, taip užtikrindami greitą elektronų pernašą nuo fermento aktyvaus centro prie elektrodo paviršiaus. Redoks mediatorių panaudojimas ypač patogus tais atvejais, kai nei reakcijos substratas, nei produktas negali būti detektuojami elektrochemiškai.



4 pav. Antros kartos biojutiklio schema.

Šių mažos molekulinės masės junginių naudojimas leido sumažinti deguonies įtaką bei sumažinti darbinio elektrodo potencialą, dėl to sumažėjo ir interferentinių medžiagų įtaka. Būtina, kad tokios konstrukcijos biojutikliuose,

fermento ir mediatoriaus reakcija būtų greita ir galėtų konkuruoti su lygiagrečiai šiai reakcijai vykstančia fermento redukcija O_2 . Nors įvedant mediatorių deguonies įtaka sumažinama, tačiau didesnė ar mažesnė priklausomybė nuo dalinio O_2 slėgio oksidazių biojutikliuose vis tik išlieka.

Antros kartos biojutiklių konstravime dažniausiai naudojami mažos molekulinės masės, elektrochemiškai aktyvūs mediatoriai. Šios medžiagos turi pasižymėti mažu tirpumu supančioje aplinkoje, mažu redoks potencialu, greita bei grįžtama elektrochemine reakcija, oksiduota ir redukuota formos turi būti stabilios, redukuota forma neturi reaguoti su oro deguonimi, regeneracija neturi priklausyti nuo tirpalo pH.

Pastaruoju metu plačiai naudojami organiniai dažai (metileno mėlynasis, toluidino mėlynasis, tioniniai), neorganinės medžiagos (pereinamųjų metalų heksacianoferatai), įvairūs heterocikliniai junginiai, ferocenas ir jo dariniai [100], chinoniniai junginiai, laidžios druskos, osmio bei rutenio organiniai kompleksai [101] ir daugelis kitų.

Kuriant šio tipo biojutiklius, mediatoriai, pasižymintys mažu tirpumu, buvo adsorbuoti ant elektrodo paviršiaus, o ant jo imobilizuotas fermentas. Tačiau tokiuose biojutikliuose efektyviai elektronų pernašai būtina sąlyga yra elektroaktyvios medžiagos difuzija. Šių biojutiklių trūkumai: mėginio užteršimas ir nepakankamas biojutiklio stabilumas, susijęs su elektroaktyvios medžiagos išsiplovimu [98].

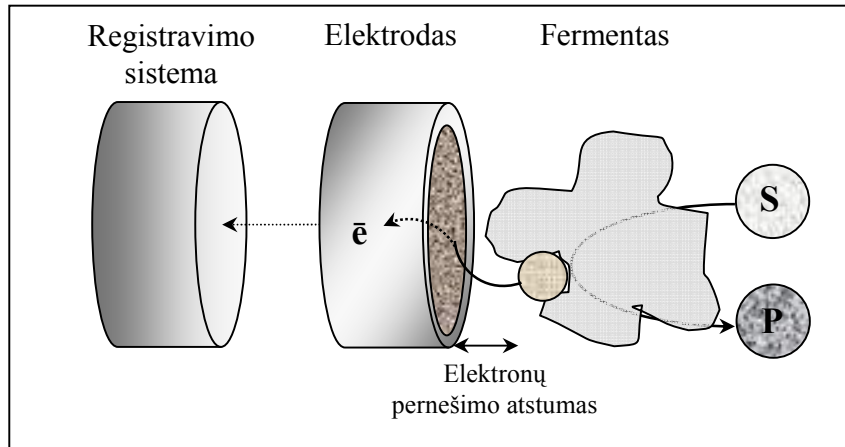
Ganėtinai paprastas ir efektyvus elektroaktyvių medžiagų integravimo metodas yra jų įmaišymas į anglies pastą, adsorbavimas ant stiklo anglies miltelių ir sumaišymas su angliniu rašalu [39]. Taip pat dažnai naudojamas cheminis ar elektrocheminis mediatoriaus nusodinimas ant įvairių elektrodo paviršių [56, 102, 103, 104]. Modifikuotų elektrodų pagrindinis trūkumas yra nepakankamas jų stabilumas, susijęs su lėtu elektroaktyvios medžiagos išsiplovimu. Norint to išvengti buvo pabandyta elektrodo paviršių apgaubti jonų-mainų membranomis (pvz. Nafion [53]). Fermentai tokiuose biojutikliuose taip pat gali būti įmaišomi į

anglies pasta, įkomponuoti į laidžius polimerus, hidrogelius. Siekiant pagerinti stabilumą, atsako laiką ir atsikartojamumą buvo pradėta naudoti elektrocheminiai fermentų imobilizavimo būdai. Naudojant biojutiklių konstravimui laidžius polimerus, didžiausias šių sistemų trūkumas yra besiredukuojančių arba besioksiduojančių interferentinių medžiagų įtaka galutiniam atsakui. Taip pat buvo naudojami, fermentų imobilizavimui elektrodo paviršiuje, nelaidūs polimerai, pvz.: polifenolis, poli(orto-aminofenolis) [104, 105], poli(orto-fenilendiaminas) [106, 107]. Įrodyta, kad šie polimerai yra tinkami gliukozės oksidazės imobilizavimui, o gauti biojutikliai yra jautrūs ir stabilūs gliukozės nustatymui.

1.5.2.3. Trečios kartos biojutikliai

Trečios kartos biojutikliuose (5 pav.) būtina tiesioginė elektronų pernaša tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Šia savybe pasižymi tie fermentai, kurių redoks centrai yra pakankamai arti baltymo globulės arba turi kelis kofaktorių pasižyminčius redoks savybėmis. Nors, konstruojant tokius biojutiklius, galima išvengti įprastinių analizinių problemų, elektronų pernaša tampa įmanoma ir be papildomų medžiagų (mediatorių), tačiau tokiose sistemose atsiranda kitokių problemų. Pagrindinė užduotis kiek įmanoma sumažinti atstumą tarp fermento ir elektrodo paviršiaus.

Markus'o teorija aprašo būtinas sąlygas tiesioginei elektronų pernašai. Elektronų pernašos kelias tarp redoks fermento ir elektrodo turi būtų kiek galima trumpesnis. Nuo imobilizuoto fermento kiekio tiesiogiai priklauso biojutiklio savybės (jautrumas, stabilumas). Žinoma, kad daugelis fermentų, adsorbuotų ant platinos, aukso ar anglies elektrodo paviršiaus, laikui bėgant denatūruojasi, taip užteršdami elektrodo paviršių bei apsunkindami tiesioginę elektronų pernašą.



5 pav. Trečios kartos biojutikio schema.

Labiausiai ištirtinėti fermentai, pasižymintys tiesiogine elektronų pernaša, priklauso peroksidazių grupei [108]. Tiesioginė elektronų pernaša buvo atrasta ir tarp hemus turinčių chinoproteinų.

Kai kurios mokslinės grupės, siekdamos pagerinti tiesioginę elektronų pernašą, bandė tiolių monosluoksnyje atitinkamai orientuoti fermentą elektrodo atžvilgiu ir taip dar apsaugoti jį nuo denatūracijos [109]. Be to, nustatyta, kad fermento orientavimas prostetinėmis grupėmis į elektrodo paviršių, stipriai padidina tiesioginės elektronų pernašos greitį [98].

1.5.3. Berlyno mėlynojo taikymas biojutiklių konstravime

Pirmąjį biojutiklį, kuriame, kaip mediatorius, buvo panaudotas Berlyno mėlynasis, gliukozės nustatymui sukonstravo Karyakin su bendraautorais 1995 metais [2]. Kiekvienais metais vis daugėja mokslinių grupių, taikančių Berlyno mėlynąjį biojutiklių konstravime (3 lentelė). Fermentinės reakcijos metu susidarancio vandenilio peroksido nustatymui buvo taikomos skirtingos procedūros: srauto analizės metodas, amperometrija, amperometrija naudojant sukamojo disko elektrodą.

Berlyno mėlynasis buvo pritaikytas daugelio analičių nustatymui. Buvo pagaminti biojutikliai dopamino ir katecholio [110], lizino [39], sacharozės [51], cholesterolio [111], etanolio [112] ir kitų analičių identifikavimui, todėl ir tokių biojutiklių matricą sudaro įvairūs fermentai. Norint pasiekti norimą rezultatą yra konstruojamos ir tri- fermentinės sistemos, pavyzdžiui, sacharozės atveju [51]. Nors reikėtų paminėti, kad BM dažniausiai naudojamas gliukozės (Glu) nustatymui dėl dviejų pagrindinių priežasčių. Pirma, be galo svarbu yra nustatyti gliukozės kiekį kraujyje, nes ji yra vienas pagrindinių rodiklių diagnozuojant diabetą. Gliukozė teikia energiją mūsų organizmui, ypač svarbi smegenų ir nervų sistemos veiklai. Tačiau nuolat esant padidėjusiam gliukozės kiekiui kraujyje, pažeidžiami nervai ir kraujagyslės, todėl svarbu žinoti savo gliukozės kiekį kraujyje. Kapiliariniame kraujyje gliukozės norma yra 3,33 - 5,55 mM, o veniniame yra nuo 3,1 iki 6,4 mM. Antra, gliukozės oksidazė (GOD) yra naudojama kaip pavyzdinis fermentas, pasižymintis geru stabilumu bei turintis plačią pH veiklos sritį, todėl yra lengviau įvertinti naujo biojutiklio pritaikymo galimybes ateityje.

3 lentelė. Biojutikliai, kuriuose naudojamas mediatorius yra Berlyno mėlynasis.

Nustatoma analitė	Naudojami fermentai	Nustatymo metodas	Elektrodo tipas, potencialas, pH	Nustatymo riba, μM	Tiesiskumo intervalas, μM	Jautris, $\text{mA}/(\text{M}\cdot\text{cm}^2)$	Mėginiai	Nuoroda
Glu	GOD	SAM	Stiklo anglies disko elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 5,5	50	50-2500	350	-	[113]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 7,0	8,0	50 – 26000	5,915	Kraujo mėginiai	[114]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, 180 mV pagal Ag/AgCl, pH 6,0	1,0	1,0 – 5000	180	-	[2]
Glu	GOD	Amperometrija	Grafito SME, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 6,0	0,3	0,5 – 6000	3,9	Vaisių sultyse bei gaiviuose gėrimuose	[39]
Glu	GOD	Amperometrija	Aukso elektrodas, -50 mV pagal SKE, pH 7,0	8,0	50 – 10000	0,45	-	[107]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal SKE, pH 7,0	6,0	50 – 5000	0,64	-	[40]
Glu	GOD	Amperometrija	SME, -50 mV pagal pseudo vidinį Ag palyginamąjį elektrodą, pH 7,4	1,0	2,0 – 100	63	-	[102]
Glu	GOD	Amperometrija	IAO elektrodas, 0,0 V pagal Ag/AgCl, pH 7,0	200	-	16	-	[53]
Glu	GOD	Amperometrija	SME, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 7,4	20	20 – 1000	54	Kraujo serume	[53]

3 lentelė (tesinys). Biojutikliai, kuriuose naudojamas mediatorius yra Berlyno mėlynasis.

Nustatoma analitė	Naudojami fermentai	Nustatymo metodas	Elektrodo tipas, potencialas, pH	Nustatymo riba, μM	Tiesiskumo intervalas, μM	Jautris, $\text{mA}/(\text{M}\cdot\text{cm}^2)$	Mėginiai	Nuoroda
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, 0,0 V pagal Ag/AgCl, pH 6,5	10	1000 – 11000	15,36	-	[55]
Glu	GOD	Amperometrija	SME, -100 mV pagal SKE, pH 6,9	1,0	5,0 - 8000	-	Kraujo ir šlapimo mėginiai	[103]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, 0,0 V pagal PKE, pH 6,0	10	-	2,5	Medikamentuose bei maisto produktuose	[115]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal SKE, pH 7,0	0,69	1,0 - 1600	69,26	Kraujo serume	[116]
Glu	GOD	Amperometrija	Platinos elektrodas, 600 mV pagal SKE, pH 7,0	10	10 - 5000	44	-	[104]
Glu	GOD	Amperometrija	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 6,5	20	20 – 4750	-	Kraujo serume	[117]
NADH	NADHOD	Amperometrija	SME, 250 mV pagal Ag/AgCl, pH 6,5	2,6	22 – 350	2,7	-	[56]
Glu	GOD	Amperometrija	SME, 0,0 V pagal Ag/AgCl, pH 7,4	220	220 – 3000	3,21	-	[49]
Glu	GOD	SAM	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl,	30	150 - 2500	-	Tirpioje kavoje	[118]

3 lentelė (tęsinys). Biojutikliai, kuriuose naudojamas mediatorius yra Berlyno mėlynasis.

Nustatoma analizė	Naudojami fermentai	Nustatymo metodas	Elektrodo tipas, potencialas, pH	Nustatymo riba, μM	Tiesiškumo intervalas, μM	Jautris, $\text{mA}/(\text{M}\cdot\text{cm}^2)$	Mėginiai	Nuoroda
Glu	GOD	Amperometrija	SME, 50 mV pagal SKE, pH 7,0	1	10 – 800	≈ 40	Vynuose, jogurtuose	[112]
Etanolis	AlkoholioOD			1	10 – 700	$\approx 27,5$		
L-laktatas	L-laktatoOD			1	10 – 500	≈ 52		
L-glutamatas	L-glutamatoOD			1	10 – 700	≈ 35		
Sacharozė	GOD + INV + MUT +	SAM	Stiklo anglies elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 6,5	1,5 (Glu)	2 – 800 (Glu)	52,12 (Glu)		[51]
Cholesterolis	ChOD	SAM	Platinos elektrodas, -50 mV pagal Ag/AgCl, pH 7,0	4,5 (Sacharozė)	4 – 800 (Sacharozė)	42,73 (Sacharozė)		
				12	50 – 300	8,57	Sintetiniame serume	[111]

Glu – gliukozė; GOD – gliukozės oksidazė; SAM – srauto analizės metodas; SKE – srauto kalomelio elektrodas; SME – spausdinto montažo elektrodas; IAO – indžiu dopuotas alavo oksidas; NADH – nikotinamido adenino dinukleotidas; NADHOD – nikotinamido adenino dinukleotido oksidazė; AlkoholioOD – alkoholio oksidazė; L-laktatoOD – L-laktato oksidazė; L-glutamatoOD – L-glutamato oksidazė; INV - invertazė; MUT – mutarotazė; ChOD – cholesterolio oksidazė.

1.5.3.1. Gliukozės biojutikliai

Kaip jau minėta aukščiau, pirmąjį gliukozės biojutiklį, turintį elektrokatalizinį Berlyno mėlynojo sluoksnį, sukonstravo Karyakin su kolegomis [2].

Buvo sukonstruotas pirmasis hibridinis organinis/neorganinis biojutiklis, kuriame PANI-BM įkomponuotas ant anglies nanovamzdelių [55]. Nanovamzdeliai, nuo jų atradimo 1992 m., patraukia vis didesnę mokslo pasaulio dėmesį dėl savo išskirtinių savybių.

C. Deng pasirinko eksperimentui aukso ir stiklo anglies elektrodus. Ant GOD-Gla membranos uždėjus papildomą poli(orto-fenilendiamino) sluoksnį buvo gautas geras biojutiklio stabilumas naudojant aukso elektrodą, po 30 dienų laikymo 4 °C temperatūroje pH 7,0 buferiniame tirpale pradinio atsako liko 88 % [107]. Vienos mokslinės grupės eksperimentavo su skirtingais elektrodais, kitos naudojo skirtingus GOD imobilizavimo būdus. Ant stiklo anglies miltelių chemiškai nusodinus BM ir sumaišius su angliniu rašalu bei GOD, viską supresavus, gaunamas biojutiklis pasižymintis geru stabilumu pH 6-9 intervale. Biojutiklio stabilumą autoriai aiškina BM mikrodalelių stipria adsorbcija ant stiklo anglies miltelių [39]. Biojutiklis panaudotas Glu nustatymui įvairiuose vaisių sultyse bei gaiviuose gėrimuose. Visai kitokie rezultatai gauti GOD imobilizavus ant SME viršaus. Nustatymo riba tokio biojutiklio buvo 4 μM su tiesine dalimi iki 500 μM. BM paremtas GOD biojutiklis buvo panaudotas Glu kiekiui nustatyti medikamentuose bei maisto produktuose [115, 112, 118].

M. Ferreira su savo grupe pasiūlė „sluoksnis ant sluoksnio“ (L-b-L) metodą GOD imobilizavimui. Jis tam naudojo poli(alilamino)hidrochlorido polimero sluoksnius. Šis metodas turi du pranašumus, tai yra efektyvi fermento imobilizacija, nes naudojamos švelnios sąlygos ir mažas fermento kiekis. Be to, leidžia išvengti masės transporto problemų [102]. Išbandyta ir interferentinių medžiagų įtaka, į sistemą buvo įlašinama po 1 mM askorbo bei šlapimo rūgties.

Šios pašalinės medžiagos biojutiklio atsakui (0,0 V pagal Ag/AgCl) neturėjo jokios įtakos. Be to, ši koncentracija yra virš fiziologinių lygių, kadangi AR kraujyje yra apie 0,13 mM, o šlapimo rūgštis – 0,20 mM.

Neseniai buvo sukurta keletas biologinių sistemų, su kuriomis, šiuo metu, nustatoma mažiausia Glu koncentracija [2, 39, 116]. Mažų gliukozės koncentracijų nustatymas yra svarbus, nes juos galima pritaikyti neinvaziniams matavimams. Tokioms analizėms nereikalingas kraujas, tam visiškai pakanka prakaito ar ašarų.

Tačiau ne visi sukonstruoti biojutikliai pasižymi geru stabilumu. Fermentinė membrana uždėta ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies elektrodo nebuvo stabili, manoma, kad dėl silpno Nafion^o prilipimo prie lygaus neorganinio paviršiaus [2].

SME/BM-GOD biojutiklis prarado apie 50 % savo jautrumo jau po 4 nuolatinio naudojimo valandų pH > 7,0. Ši elektrodo degradacija autorių priskirta BM sluoksnio dezaktyvavimui, kuris vyksta greičiau negu prarandamas fermentas nuo biosluoksnio [49].

GOD imobilizavus į zolių-gelių metodu pagamintą chitozano/SiO₂ hibridinę membraną, buvo gauta didžiausia tiesinė dalis Glu nustatyme [114]. Šis biojutiklis buvo išbandytas ir kraujo mėginių analizėje. Rezultatai buvo palyginti su spektrofotometriniu metodu (S.S.D. nuo 2,3 iki 4,6 %). F. Ricci ir kolegų [53] sukonstruotas biojutiklis pasižymėjo gan dideliu stabilumu tiriant sudėtingas terpės (pvz. kraujo serumą), jie naudojo srauto analizės metodą, todėl elektrodo paviršius neužsiteršia biologinėmis medžiagomis.

Toks didelis kiekis straipsnių iliustruoja platų Berlyno mėlynojo naudojimą biojutiklių konstravime. Pagamintais biojutikliais galimos ne tik vienkartinės analizės, bet manoma, kad ateityje bus galima juos naudoti, kaip ilgalaikius Glu kiekio analizatorius.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Reagentai

Vandenilio peroksidas (3 %) iš „Vilniaus farmacijos fabrikas“ (Lietuva). Askorbo rūgštis, kalio heksaciano feratas ($K_3[Fe(CN)_6]$), geležies chloridas ($FeCl_3 \cdot 6 H_2O$), kalio chloridas (KCl), kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4) iš „Fluka (Chemika)“ (Šveicarija). Kalio hidroksidas (KOH) iš „Lachema“ (Čekija), druskos rūgštis (HCl) (0,1 M titravimo standartas) iš „Riap“ (Kijevas, Ukraina)

Chitozanas iš „Fluka (BioChemika)“ (Vokietija). Glutaro aldehidas (Gla) 25 % (2,6 M), D-(+)-gliukozė iš „Fluka“ (Šveicarija).

Dializės membrana iš „Sigma-Aldrich“ (Vokietija).

Stiklo anglies strypelis iš „Sigradur K, HTW“ (Vokietija), aliuminio oksido (Al_2O_3) pasta iš „Struers“ (Danija).

2.2. Tirpalai

0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas pH 5,5, 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas pH 7,3 turintys 0,1 M KCl. Tirpalų pH buvo kontroliuotas su pH-metru iš „Mettler Toledo“ (JAV).

Taip pat buvo naudoti 10 mM vandenilio peroksido, 10 mM askorbo rūgštis, 0,1 M HCl ir 0,1 M KCl tirpalai. 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $FeCl_3$ turintys 0,1 M HCl ir 0,1 M KCl. 10 mM gliukozės standartinis tirpalas.

Gliukozės paruošti tirpalai paliekami 24 val. 4 °C temperatūroje, kad nusistovėtų α ir β anomerinių formų pusiausvyra.

1 % chitozanos tirpalas ruoštas 5 % vandeninėje acto rūgštyje.

Tirpalų ruošimui buvo naudojamas bidistiliuotas vanduo.

$K_3[Fe(CN)_6]$ tirpalas buvo laikomas tamsoje.

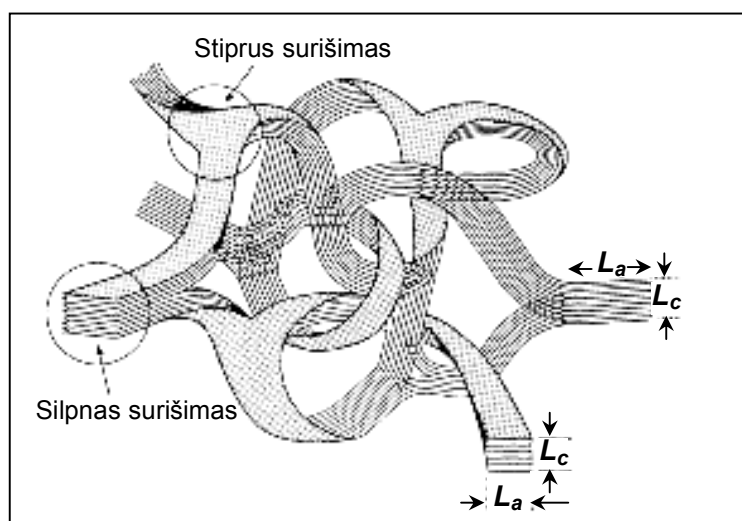
2.3. Fermentai

Gliukozės oksidazė išskirta iš *Aspergillus niger* iš „Merck“ (Vokietija). Pradinis specifinis aktyvumas 90 U/mg baltymo 25 °C temperatūroje, pH 7,0.

2.4. Berlyno mėlynuoju modifikuoto elektrodo paruošimas

2.4.1. Stiklo anglies elektrodo paruošimas

Stiklo anglis yra izotropiška, amorfinė medžiaga, tai galima pamatyti 6 pav. [119]. Tačiau, dėl kietumo ir trapumo, elektrodo gaminimas yra sudėtingas, jis iš esmės riboja jo naudojimą iki matmenų ir formų, kurias galima nusipirkti. Stiklo anglies gamyba susideda iš koksavimo proceso, kuri vykdoma kaitinant fenolio/formaldehido polimerus ar poliakrilonitrilą nuo 1000 °C iki 3000 °C esant tam tikram slėgiui [6].



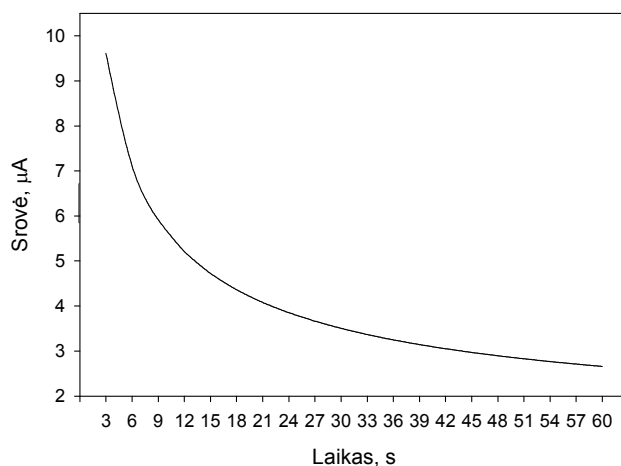
6 pav. Stiklo anglies struktūra [119]. Kur L_c yra tarpplokštuminis mikrokristalo dydis; L_a - intraplokštuminis mikrokristalo dydis.

Stiklo anglies elektrodo lazdelė (\varnothing 3 mm) iš „Sigradur K, HTW“ (Vokietija) buvo įstatyta į plastikinį vamzdelį arba SDE atveju į tefloną. Stiklo anglies elektrodo paviršius prieš kiekvieną naują elektrodo paruošimą buvo

poliruojamas 1 μm , po to smulkesne 0,3 μm Al_2O_3 pasta kol įgydavo veidrodinį blizgesį. Taip nupoliruoti elektrodai buvo įstatomi į indą su bidistiliuotu vandeniu ir 3 min. paliekami ultragarsinėje vonelėje, kad nuo paviršiaus pasišalintų visi nešvarumai. Nors stiklo anglies elektrodo paviršius yra mikroskopiškai grublėtas, sudėtinga įvertinti šiurkštumo faktorius, tokiu būdu visuose skaičiavimuose mes naudosime geometrinį plotą. Darbinis elektrodo paviršiaus plotas lygus 0,071 cm^2 .

2.4.2. BM elektrocheminis nusodinimas ant stiklo anglies elektrodo

Buvo naudojamas BASi-Epsilon potenciostatas (iš Bioanalytical Systems Inc., JAV) sujungtas su kompiuteriu. Amperometriniuose matavimuose naudojame standartinę trielektrodinę schemą. Mūsų darbe, kaip darbinis elektrodas buvo naudojamas stiklo anglies elektrodas, lyginamasis BASi RE-5B Ag/AgCl, 3M NaCl elektrodas, kurio potencialas yra 0,209 V pagal SHE arba -0,035 V pagal SKE ir pagalbinis - stiklo anglies elektrodas, kuriame stiklo anglies lazdelė iš plastikinio vamzdelio yra išsikišusi 6 mm.



7 pav. Srovės kitimas laike, suteikus stiklo anglies elektrodui 0,4 V potencialą 2,5 mM FeCl_3 ir 2,5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale.

Amperometrijoje yra registruojama srovė laike, darbiniai elektrodai uždavus potencialą, kuriam esant vyksta elektrodinė reakcija. Tiriamasis tirpalas yra nemaišomas siekiant, kad medžiagų transportas vyktų tik dėl difuzijos.

Nupoliruotas, kaip aprašyta 2.4.1. skyriuje, stiklo anglies elektrodas patalpinamas į 2,5 mM FeCl₃ ir 2,5 mM K₄[Fe(CN)₆] tirpalą ir suteikus elektrodai pastovų 0,4 V potencialą, registruojama srovė 60 s (7 pav.). Tokiu būdu yra nusodinamas Berlyno mėlynojo sluoksnis ant stiklo anglies elektrodo.

2.4.3. BM modifikuoto elektrodo stabilizavimas

BM modifikuotas elektrodas buvo nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir ciklinės voltamperometrinės analizės pagalba užrašoma CV, (8 pav., 53 psl.), norint įsitikinti gauto elektrokatalizinio sluoksnio stabilumu. Buvo nustatytas optimalus šiai sistemai potencialo skleidimo greitis [3], pagal katodinės ir anodinės smailės potencialų skirtumą (ΔE_s). Ji, buvo lygus 50 mV/s, o ciklų skaičius 76 ciklai. ΔE_s lygus 56 mV, kuris charakterizuoja grįžtamą redokso virsmą tarp Everitt'o druskos ir redukuotos Berlyno mėlynojo formos, o vidurio potencialas (E_0') lygus 178 mV pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą.

SAE ir BM tikslus ploto nustatymas nėra toks svarbus, nes oksidacijos ir(ar) redukcijos reakcijos, manoma, kad vyksta Berlyno mėlynojo sluoksnio viduje. Todėl tikslinga nusodinti sluoksnio storį išreikšti C/cm². Iš gautų CV, 0,1 M HCl ir 0,1 M KCl tirpale, skleidžiant elektrodo potencialą 50 mV/s greičiu, buvo apskaičiuotas sluoksnio aktyvus krūvis oksidaciniam procesui, kuris lygus 0,494 mC/cm² ir redukciniam procesui – 0,566 mC/cm².

2.5. Biojutiklių sistemų paruošimas

SAE/BM/0,35Chi-GOD-Gla. Į GOD tirpalą, kuriame yra 350 μl/ml Chi + 100 mg/ml GOD + 50 μl/ml 2,5 % vandeninio glutaro aldehido, įmerkiamas Berlyno mėlynojo modifikuotas stiklo anglies elektrodas. Tuomet nuo elektrodo

lengvais judesiai nukratomas GOD tirpalo perteklius ir toks biojutiklis džiovinamas kambario temperatūroje apie 1 val.

SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla. Į GOD tirpalą, kuriame yra 400 µl/ml Chi + 100 mg/ml GOD + 50 µl/ml 2,5 % vandeninio glutaro aldehido, įmerkiamas Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas. Tuomet nuo elektrodo lengvais judesiai nukratomas GOD tirpalo perteklius ir toks biojutiklis džiovinamas kambario temperatūroje apie 1 val.

SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla/membrana. Viskas tas pat, kaip aukščiau, tik ant viršaus uždedama dializės membrana.

SAE/BM/0,5Chi-GOD-Gla. Į GOD tirpalą, kuriame yra 500 µl/ml Chi + 100 mg/ml GOD + 50 µl/ml 2,5 % vandeninio glutaro aldehido, įmerkiamas Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas. Tuomet nuo elektrodo lengvais judesiai nukratomas GOD tirpalo perteklius ir toks biojutiklis džiovinamas kambario temperatūroje apie 1 val.

Po modifikavimo visi elektrodai buvo atsargiai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir, jei nenaudojami, laikomi fosfatiniame buferyje pH 7,3 šaldytuve 4 °C temperatūroje. Taip paruošti biojutikliai tyrinėjami elektrochemiškai trielektrodinėje celėje.

2.6. Elektrocheminiai tyrimai

2.6.1. Amperometriniai matavimai

Amperometriniuose matavimuose naudojame standartinę trielektrodinę sistemą, kaip aprašyta 2.4.2 skyriuje.

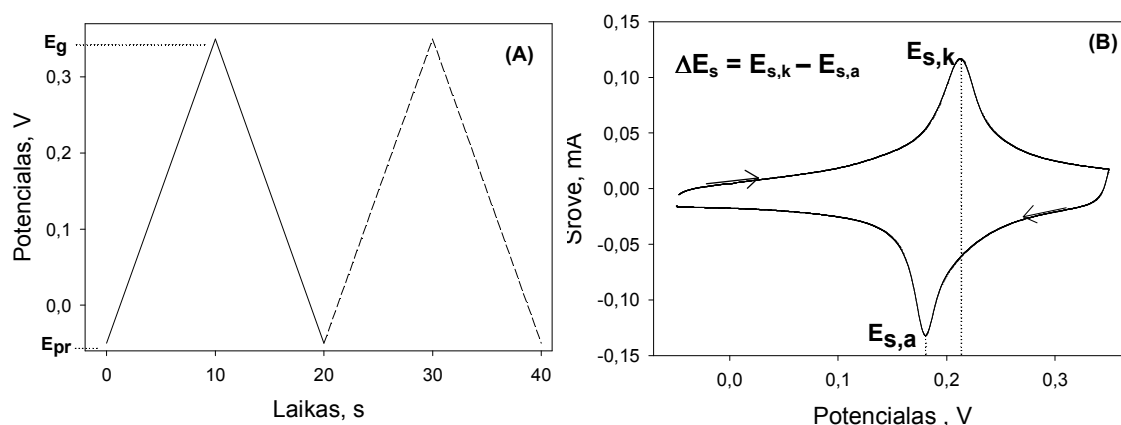
2.6.1.2. BM modifikuoto elektrodo stabilumo tyrimai

3.1.3 skyriuje aprašyti duomenys gauti atliekant Berlyno mėlynojo sluoksnio stabilumo tyrimą. Matavimams pasirinkti du 0,1 M fosfatiniai buferiniai tirpalai, pH 5,5 ir pH 7,3, turintys 0,1 M KCl. Į 15 ml buferinio tirpalo buvo pridėta vandenilio peroksido toks kiekis, kad jo koncentracija bandomajame

tirpale būtų nuo 0,01 iki 1,0 mM. Eksperimento metu tirpalas buvo pastoviu greičiu maišomas, o darbinis elektrodo potencialas buvo 0,0 V ir 0,1 V pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą. Vykstant nenutrūkstamai vandenilio peroksido elektrolizei registruojamas srovės kitimas laike.

2.6.1.3. Biojutiklio stabilumo tyrimas

Biojutiklio stabilumo laike matavimai buvo atliekami trielektrodinėje elektrocheminėje sistemoje. Tam tikrais laikymo intervalais buvo registruojama biojutiklio srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, o tarp matavimų elektrodas buvo laikomas pH 7,3 fosfatiniame tirpale 4 °C temperatūroje.



8 pav. (A) Ciklinės voltamperometrijos tiesinio potencialo skleidimo forma. (B) Ciklinė grįžtamojo vyksmo voltamperograma. BM modifikuoto GC elektrodo CV, 0,1 M HCl + 0,1 M KCl tirpale, potencialo skleidimo greitis 40 mV/s.

2.6.2. Voltamperometrinė analizė

2.6.2.1. Ciklinė voltamperometrinė analizė

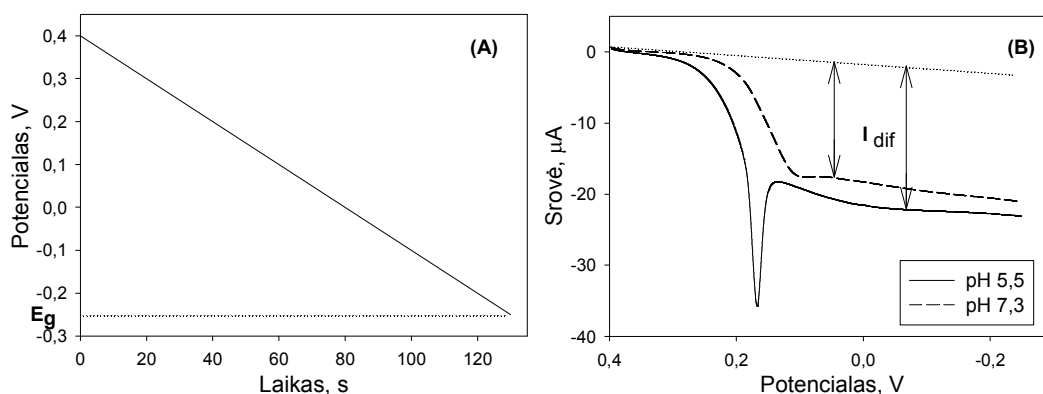
Šiuo atveju potencialą tolygiai galima keisti tarp pradinio potencialo E_{pr} ir galutinio E_g (8 pav). Elektrodo potencialas tiesiškai skleidžiamas iš pradžių katodine, po to anodine kryptimi. Voltamperogramą sudaro dvi lygios, bet

skirtingo poliškumo srovės smailės, pasislinkusios viena kitos atžvilgiu per $0,057/n$ V (esant 25°C) [120].

2.6.2.2. Hidrodinaminė voltamperometrinė analizė

Buvo naudojamas BASi-Epsilon potenciostatas ir BASi RDE-2 sukamojo disko elektrodo sistema (abu iš „Bioanalytical Systems“, JAV). Sukamojo disko elektrodas susideda iš stiklo anglies elektrodo lazdelės (\varnothing 3 mm) įstatytos į tefloną.

Atsižvelgiant į tiriamąją elektrocheminę reakciją, potencialas gali būti skleidžiamas tiek į katodinę (9 pav. (A)), tiek į anodinę pusę (10 pav. (A)). Potencialo skleidimo greitis hidrodinaminėje voltamperometrijoje yra nuo 1 iki 5 mV/s.



9 pav. (A) vienkartinis tiesinio potencialo skleidimas nuo pradinio potencialo iki galutinio potencialo E_g . (B) BM modifikuoto SA elektrodo hidrodinaminė voltamperograma, 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale turinčiame 0,1 M KCl, 0,2 mM H_2O_2 , pH nurodytas, potencialo skleidimo greitis 5 mV/s, 400 aps./min.

Gautos bangos gulstės srovės stipris (9 pav. (B) ir 10 pav. (B)) yra ribojamas konvekcijos. Sukamojo disko elektrodas veikia panašiai kaip siurblys – traukia tirpalą link savęs iš gilumos ir meta į šonus (11 pav.). Kuo arčiau disko paviršiaus, tuo mažesnis srauto greitis ir tuo didesnę reikšmę įgauna tiriamosios

medžiagos ar elektrocheminės reakcijos produktų difuzija. Visas užrašytas hidrodinaminės voltamperogramas galima rasti 3.1.2. ir 3.1.3 skyriuose.

Bangos aukštis hidrodinaminėje voltamperogramoje atitinka ribinę difuzijos srovę i_{dif} . Ribinė difuzijos srovė, susidaranti naudojant sukamojo disko elektrodą, išreiškiama Levich lygtimi [120]:

$$i_{dif} = 0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}c \quad (5)$$

kur n – dalyvaujančių elektronų skaičius;

F – Faradėjaus konstanta 96490 C/mol;

A – elektrodo plotas cm^2 ;

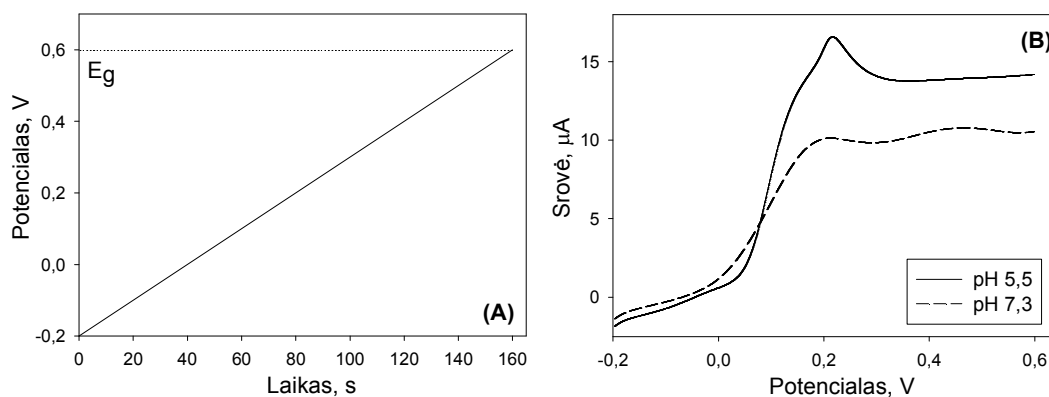
D – dalelių difuzijos koeficientas cm^2/s ;

ω – kampinis elektrodo sukimosi greitis rad/s;

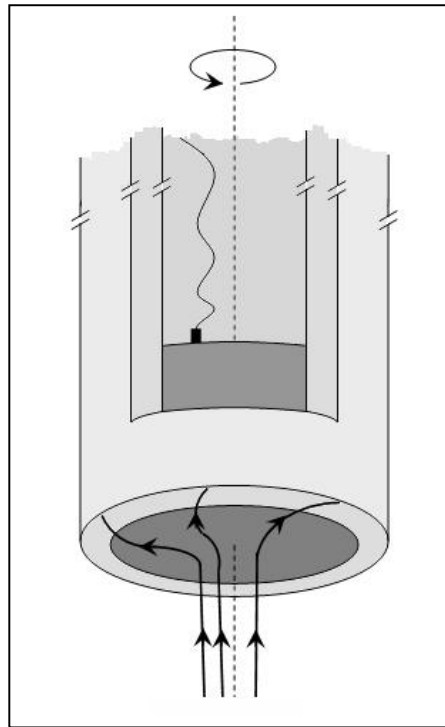
ν - kinetinė tirpalo klampa cm^2/s ;

c - koncentracija mM.

Tai yra Levich lygtis nurodanti, kad srovė yra kontroliuojama masės transporto.



10 pav. (A) vienkartinis tiesinio potencialo skleidimas nuo pradinio potencialo iki galutinio potencialo E_g . (B) BM modifikuoto SA elektrodo hidrodinaminė voltamperograma, 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale turinčiame 0,1 M KCl, 0,4 mM askorbato, pH nurodytas, potencialo skleidimo greitis 5 mV/s, 400 aps./min.



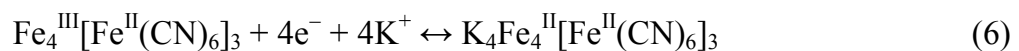
11 pav. Konvekcinė difuzija sukamojo disko elektrodo link.

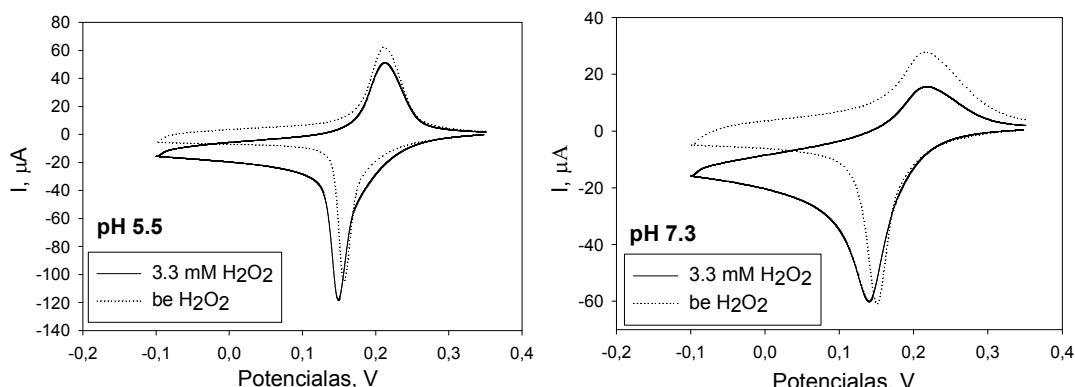
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas

3.1.1. Berlyno mėlynuoju modifikuoto SAE ciklinės voltamperogramos

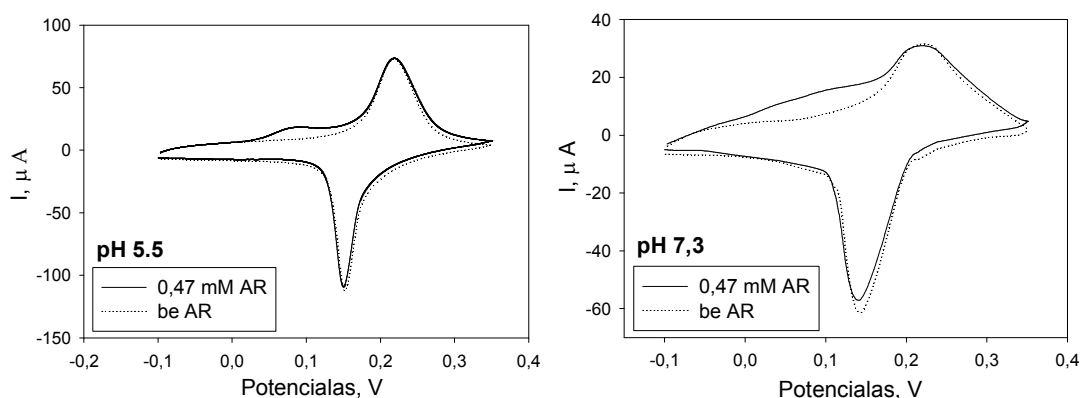
12 pav. pavaizduotos stiklo anglies elektrodui, modifikuotam Berlyno mėlynuoju, būdingos ciklinės voltamperogramos. CV registruotos naudojant du skirtingus buferinius tirpalus pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 (dešinėje). pH 5,5 tirpale ciklinėje voltamperogramoje stebimos dvi smailės - anodinė ir katodinė, kurių vidurio potencialas 190 mV, o maksimalus atskyrimo potencialas (ΔE_s) lygus 60 mV. pH 7,3 buferiniame tirpale – vidurio potencialas 185 mV, o ΔE_s - 70 mV. Šios viršūnės atitinka žinomą BM redoks procesą tarp „tirpios“ BM (oksiduotos) ir Everitt'o drukos (redukuotos) formos, vykstantį ant elektrodo paviršiaus, o šį procesą galima aprašyti lygtimi:





12 pav. BM modifikuotų stiklo anglies elektrodo ciklinės voltamperogramos. CV buvo gautos pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 fosfatiname buferiniame tirpale (dešinėje). be H_2O_2 ; — esant 3,3 mM H_2O_2 . SElektrodo potencialo sklaidimo greitis 20 mV/s, potencialo sklaidimo intervalas nuo 0,35 iki - 0,1 V.

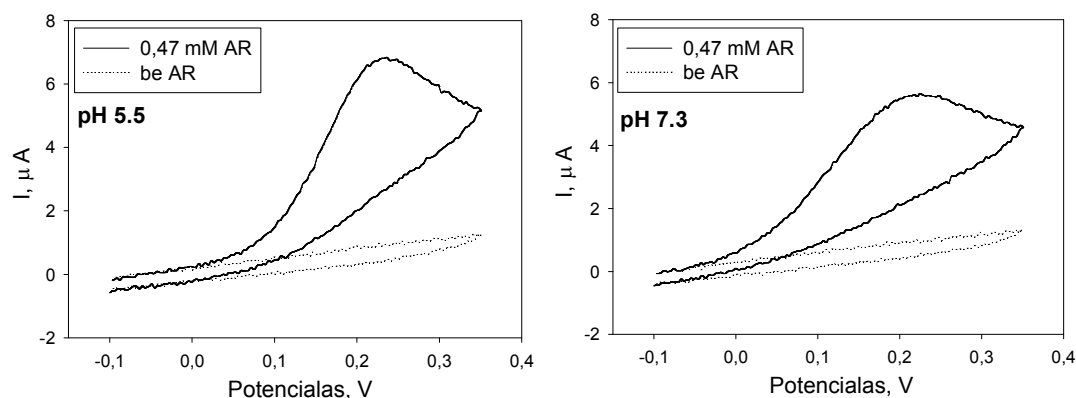
Ilašinus į fosfatinį buferinį tirpalą vandenilio peroksido, įvyksta pakitimai CV. BM redoks poros viršūnės pasislenka į neigiamesnių potencialų sritį (12 pav.). Esant vandenilio peroksidui gerai matomas katodinės srovės padidėjimas žemų potencialų (neigiamesnių už BM vidurio potencialą) srityje, kas atitinka vykstančią elektrokatalizinę H_2O_2 redukciją. Tai reiškia, kad vandenilio peroksido elektoredukcija prasideda esant neigiamesniems nei 190 mV pH 5,5 tirpale (12 pav., kairėje) ir 185 mV pH 7,3 tirpale, potencialams (12 pav., dešinėje).



13 pav. BM modifikuotų stiklo anglies elektrodo ciklinės voltamperogramos. CV buvo gautos pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 fosfatiname buferiniame tirpale (dešinėje). be AR; — esant 0,47 mM AR. Elektrodo potencialo sklaidimo greitis 20 mV/s, potencialo intervalas nuo - 0,1 iki 0,35 V.

Pridėjus į buferinį tirpalą askorbato, taip pat gerai matomi pakitimai ciklinėje volamperogramoje (13 pav.). Pridėjus askorbato, stebimas anodinės srovės padidėjimas nuo 50 mV į teigiamesnių potencialų sritį pH 5,5 ir nuo 0,0 mV pH 7,3 buferiniame tirpale, kas atitinka vykstančią elektrocheminę askorbato oksidaciją.

Palyginimui buvo atliktas eksperimentas su nemodifikuotu SAE. Vandensilio peroksido tirpale pakitimai nebuvo registruojami. O esant buferiniame tirpale askorbato SAE duoda vieną anodinę smailę ties 0,2 V (14 pav.). Esant pH 5,5 tirpale askorbato srovė pradeda augti nuo 50 mV, o pH 7,3 nuo -50 mV. Taigi, beveik neutraliame buferiniame tirpale askorbato elektrooksidacija ant nemodifikuoto elektrodo prasideda esant neigiamesniems elektrodo potencialams, nei pH 5,5 atveju.

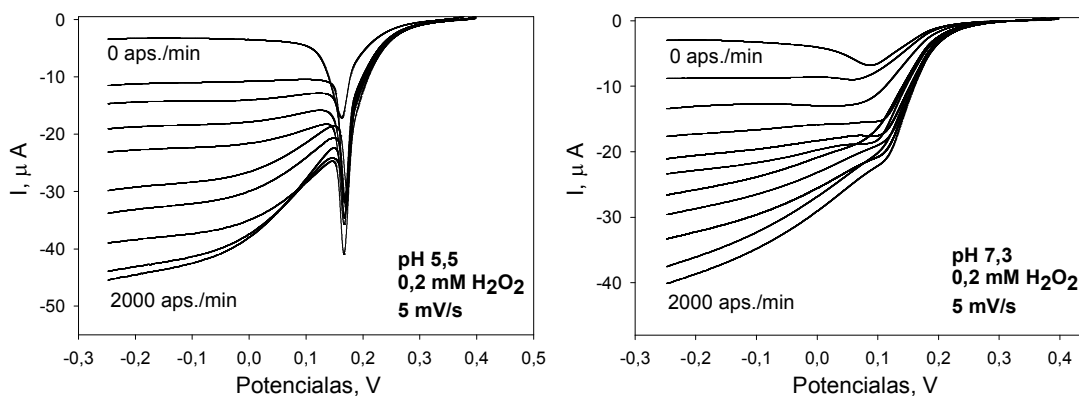
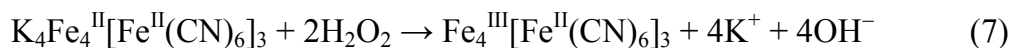


14 pav. Stiklo anglies elektrodų ciklinės voltamperogramos. CV buvo gautos pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 fosfatiniame buferiniame tirpale (dešinėje). be AR; — esant 0,47 mM AR. Elektrodo potencialo skleidimo greitis 20 mV/s, potencialo skleidimo intervalas nuo -0,1 iki 0,35 V.

Šis reiškinys buvo aprašytas ir ankščiau [93]. Pastebėta, kad naudojant BM modifikuota stiklo anglies elektrodą askorbato nustatymui, askorbato elektrooksidacija prasideda ankščiau (esant mažesniai potencialui), nei naudojant nemodifikuotą elektrodą. Buvo nustatyta, kad askorbato elektrooksidacija vykstanti ant BM modifikuoto elektrodo yra kontroliuojama katalizinės reakcijos, o ne difuzijos. Pirmieji tą pažymėjo F. Li ir S. Dong [121].

3.1.2. Vandenilio peroksido redukcija ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto sukamojo disko elektrodo

Nesukant elektrodo, vandenilio peroksido pH 5,5 tirpale ir skleidžiant potencialą į katodinę pusę, yra stebima Berlyno mėlynojo redukcijos katodinė smailė esanti prie 0,16 V, greta katodinės bangos gulstės nuo 0,05 iki –0,25 V potencialių riboje (15 pav., kairėje). O pH 7,3 tirpale vandenilio peroksido katodinė smailė stebima, esant 0,08 V, greta bangos gulstės, kuri yra nuo 0,1 iki –0,25 V (15 pav., dešinėje). Visai nesenai, vandenilio peroksido elektrokatalizinės redukcijos kinetikai tirti, M. H. Pournaghi-Azar, taip pat pasirinko hidrodinaminę voltamperometriją. Jis naudojo BM modifikuotą aliuminio elektrodą padengtą paladžiu. Jis nustatė, kad H₂O₂ redukcijos potencialas priklauso nuo tirpalo pH ir jo sudėties. Tolimesni tyrimai buvo atlikti acetatiniame buferiniame tirpale pH 2,0 [122]. 15 pav. bangos gulstė atitinka vandenilio peroksido elektrokatalizinę redukciją dalyvaujant BM kaip elektrokatalizatoriui, šį procesą galima būtų aprašyti lygtimis (7) ir (6):

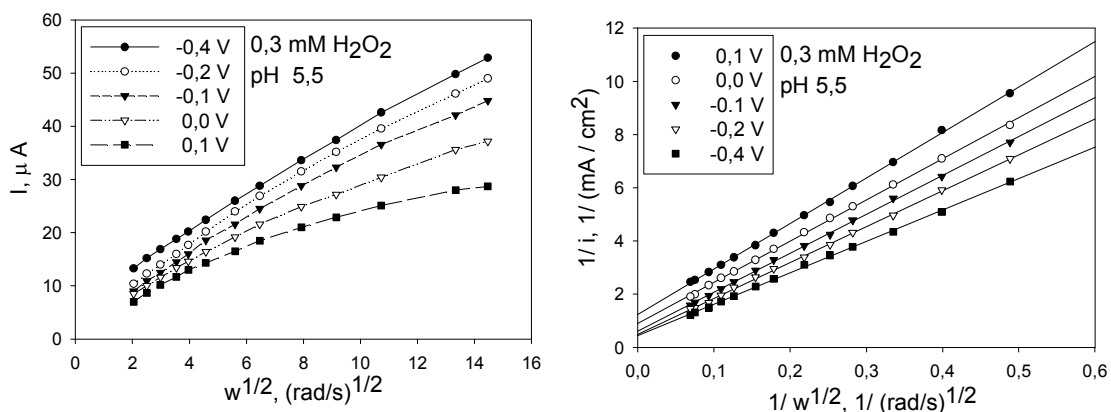


15 pav. Berlyno mėlynuoju modifikuoto sukamojo disko elektrodo srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo, skleidžiant elektrodo potencialą 5 mV/s greičiu nuo 0,4 iki –0,25 V, pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 (dešinėje) fosfatiniame tirpale, turinčiame 0,2 mM vandenilio peroksido. Voltamperogramos gautos esant skirtingiems elektrodo sukimosi greičiams (0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1100, 1700, 2000 aps./min).

Sulyginus abi lygtis gautume galutinę vandenilio peroksido katodinės redukcijos reakcijos lygtį (4) [43].

Lėtai sukantis elektrodai, neviršijant 100 aps./min, katodinės srovės gulstė prasideda jau esant 0,1 V, o esant didesniems sukimosi greičiams katodinės srovės gulstė stebima pasislinkusi į neigiamesnių potencialų sritį (15 pav., kairėje). Naudojant pH 7,3 tirpalą katodinė srovės gulstė nusistovi jau esant 0,0 V ir sukantis elektrodai iki 300 aps./min (15 pav., dešinėje). Didinant elektrodo sukimosi greitį gulstė taip pat pasislenka į neigiamesnių potencialų sritį (15 pav., dešinėje), kaip ir pH 5,5 atveju.

Lyginant, abu tirtus buferinius tirpalus, atrodo, kad gauta katodinė srovė yra šiek tiek žemesnė pH 7,3 tirpale, nei pH 5,5 buferiniame tirpale, esant toms pačioms sąlygoms (15 pav.).



16 pav. Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies elektrodo katodinės srovės priklausomybė nuo elektrodo sukimosi kampinio greičio kvadratinės šaknies (kairėje). pH 5,5 fosfatiniame tirpale, turinčiame 0,3 mM vandenilio peroksido, esant skirtingiems elektrodo potencialams (nurodyti). Taip pat apdoroti duomenys atvirkštinėse koordinatėse pagal Koutecky-Levich lygtį (dešinėje).

16 pav. (kairėje) pristato priklausomybę katodinės srovės nuo elektrodo sukimosi kampinio greičio kvadratinės šaknies, kuri gauta naudojant pastovią 0,3 mM vandenilio peroksido koncentraciją pH 5,5 buferyje bei keičiant elektrodo sukimosi greitį plataus diapazono ribose (nuo 40 iki 2000 aps./min). Matosi, kad

ribinė katodinė srovė didėja neigiamėjant potencialui. Bet kuriam duotam sukimosi greičiui yra gautas beveik dvigubas ribinės srovės padidėjimas keičiant potencialą nuo 0,1 iki - 0,4 V. Ribinė srovė susidaranti naudojant sukamojo disko elektrodą, išreiškiama Koutecky-Levich lygtimi [123]:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_{kin}} + \frac{1}{i_{dif}} = \frac{1}{i_{kin}} + \frac{1}{0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}c} \quad (8)$$

kur i yra bendra (suminė) srovė;

i_{kin} – kinetinė srovė (nesant masės transporto apribojimų);

i_{dif} – ribinė difuzinė srovė kontroliuojama masės transporto.

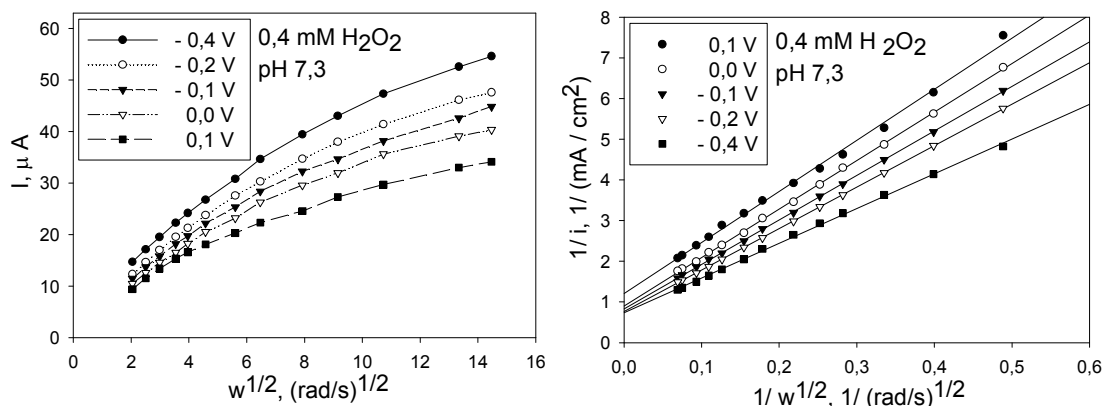
16 pav. (dešinėje) vaizduoja apdorotus duomenis, gautus atvirkštinėse koordinatėse pagal Koutecky-Levich lygtį. Buvo gautos tiesės su gera koreliacija ($R = 0,999$). Ekstrapoliuojant šiuos duomenis į neapibrėžtai didelį sukimosi greitį ($1/\omega^{1/2} \rightarrow 0$) gaunamas atkarpa koordinačių $1/i$ ašyje, iš kurios gali būti apskaičiuota kinetinė srovė (i_{kin}). Esant tam tikroms sąlygoms (pH 5,5, 0,3 mM vandenilio peroksido) ir panaudojus gautus duomenis, pristatytus 16 pav. apskaičiuotos i_{kin} vertės lygios nuo 0,796 iki 2,658 mA/cm² atitinkamai elektrodo potencialui esant 0,1 ir - 0,4 V. Tokiu būdu, kinetinės srovės tankis, perskaičiavus vandenilio peroksido koncentraciją į 1 mM bei priimant, kad srovės nuo koncentracijos priklausomybė yra tiesinė, buvo gautas nuo 2,653 iki 8,860 mA/(mM·cm²), naudojant pH 5,5 tirpalą ir elektrodo potencialui atitinkamai esant nuo 0,1 iki - 0,4 V.

Eksperimentas pavaizduotas 16 pav. buvo atliktas naudojant ir kitas vandenilio peroksido koncentracijas ir taip pat apskaičiuotos kinetinės srovės (i_{kin}). Kinetinės srovės vertės, išskaičiuotos iš tiesių su gera koreliacija, pateiktos 4 lentelėje.

4 lentelė. Apskaičiuotos i_{kin} vertės iš kreivių gautų naudojant skirtingas vandenilio peroksido koncentracijas bei skirtingus elektrodo potencialus. Naudojant pH 5,5 fosfatinį buferinį tirpalą ir keičiant elektrodo sukimosi greitį nuo 40 iki 2000 aps./min.

E, V pagal Ag/AgCl	$i_{kin}, \text{mA/cm}^2$				
	c(H ₂ O ₂), mM 0,8*	0,4	0,3	0,2	0,1
- 0,4	6,209	2,999	2,658	1,978	1,168
- 0,2	4,953	2,299	2,052	1,453	0,897
- 0,1	3,764	1,947	1,733	1,175	0,693
0,0	2,902	1,315	1,181	0,955	0,537
0,1	1,895	0,910	0,796	0,546	0,355

* - gauti nukrypimai nuo tiesinės priklausomybės apie tai skaitykite toliau.



17 pav. Tas pats kaip 16 pav., tik tirpalo pH 7,3, 0,4 mM vandenilio peroksido.

Dažniausiai eksperimentam su jutikliais, skirtais biologiniuose mėginiuose nustatinėti analites, naudojami neutralūs tirpalai, tai yra optimalus tirpalo pH oksidazės fermentams, pvz. gliukozės oksidazei. Taigi, 17 pav. pavaizduoti duomenys gauti naudojant pH 7,3 buferinį tirpalą. Šiuo atveju, taip pat buvo gautas beveik dvigubas elektrokatalizinės srovės padidėjimas keičiant elektrodo potencialą nuo 0,1 iki - 0,4 V. Duomenis, gautus keičiant elektrodo sukimosi greitį nuo 40 iki 2000 aps./min ribose, perskaičiavus atvirkštinėse

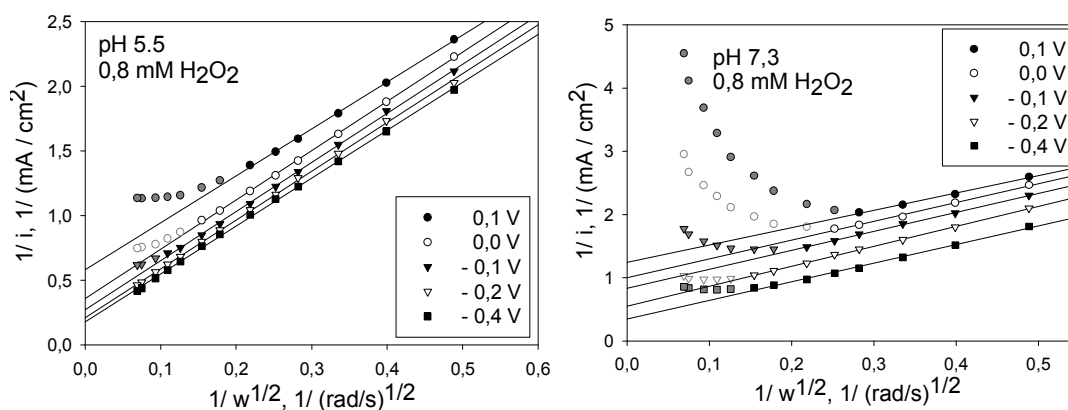
koordinatėse gaunamos tiesės. Buvo apskaičiuotos iš gautų tiesių i_{kin} vertės. pH 7,3 tirpale, esant 0,4 mM vandenilio peroksido bei elektrodo potencialui nuo 0,1 iki -0,4 V, i_{kin} atitinkamai yra nuo 0,738 iki 1,423 mA/cm². Kinetinės srovės tankis, perskaičiavus vandenilio peroksido koncentraciją į 1 mM, buvo gautas nuo 1,85 iki 3,56 mA/cm²·mM, naudojant pH 7,3 tirpalą ir elektrodo potencialui atitinkamai esant nuo 0,1 iki -0,4 V. Lyginant pH 5,5 buferinį tirpalą su pH 7,3, atrodo, kad kinetinis srovės tankis yra apytikriai 1,5 – 2,5 karto mažesnis pH 7,3 tirpale. Tai rodo šiek tiek mažesnę elektrokatalizinę vandenilio peroksido redukcijos našumą pH-neutraliame nei silpnai rūgštiniame tirpale.

5 lentelė. Apskaičiuotos i_{kin} vertės iš kreivių gautų naudojant skirtingas vandenilio peroksido koncentracijas bei skirtingus elektrodo potencialus. Naudojant pH 7,3 fosfatinį buferinį tirpalą ir keičiant elektrodo sukimosi greitį nuo 40 iki 2000 aps./min.

c(H ₂ O ₂), mM E, V pagal Ag/AgCl		i_k , mA/cm ²			
		0,4	0,3	0,2	0,1
- 0,4		1,423	1,293	0,742	0,533
- 0,2		1,291	1,177	0,710	0,524
- 0,1		1,192	1,031	0,652	0,480
0,0		0,987	0,844	0,488	0,411
0,1		0,738	0,578	0,354	0,269

Nagrinėjant sukamojo disko elektrodo duomenis Koutecky-Levich koordinatėse, pastebime, kad tiesės su gera koreliacija ($R \geq 0,995$) gaunamos esant palyginti mažoms vandenilio peroksido koncentracijoms, neviršijant 0,3 ar 0,4 mM tiek pH 5,5, tiek pH 7,3 tirpaluose. Esant didesnėms koncentracijoms, daugiau kaip 0,6 mM, gaunamas ryškus nukrypimas nuo tiesinės dalies (18 pav.). 18 pav. pateikiami Koutecky-Levich koordinatėse duomenys, esant 0,8 mM vandenilio peroksido koncentracijai, gauti abiejuose nagrinėtuose buferiniuose tirpaluose. Matome, kad didelis nukrypimas nuo tiesinės priklausomybės atsiranda

esant didesniems elektrodo potencialams bei didesniems elektrodo sukimosi greičiams. Taip pat daug didesni nukrypimai buvo gauti naudojant pH 7,3 buferinį tirpalą nei pH 5,5. Panašūs nukrypimai nuo Koutecky-Levich koordinačių buvo gauti atliekant deguonies redukciją iki HO_2^- ant aukso elektrodo [123], tačiau nėra paaiškintos šių padarinių priežastys. Iš šių priklausomybių tiesinių dalių gali būti įvertintas kinetinės srovės tankis. pH 5,5 tirpale normalizavus vandenilio peroksido koncentraciją, apskaičiuota i_k yra tarp 2,37 ir 7,76 $\text{mA/cm}^2 \cdot \text{mM}$ potencialų srityje nuo 0,1 iki -0,4 V. pH 7,3 tirpale normalizuotos i_{kin} vertės svyruoja tarp 1,01 ir 3,36 $\text{mA/cm}^2 \cdot \text{mM}$, jos buvo gautos toje pačioje potencialų srityje. Apskaičiuoti duomenys ir yra šiek tiek mažesni nei atitinkami duomenys gauti naudojant mažesnes vandenilio peroksido koncentracijas (žr. 60 ir 61 psl.), to priežastimi gali būti paklaida atsiradusi dėl duomenų nukrypimo nuo tiesinės dalies (18 pav.).



18 pav. 0,8 mM vandenilio peroksido katodinė redukcija ant Berlyno mėlynuoju midifikuoto sukamojo disko elektrodo esant skirtingiems elektrodo potencialams (jie nurodyti). Duomenys atidėti atvirkštinėse koordinatėse pagal Koutecky-Levich lygtį pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 (dešinėje) buferiniame tirpale.

Fizine prasme, nukrypimas nuo tiesiškumo, gautas esant didelei vandenilio peroksido koncentracijai, atitinka katodinės srovės mažėjimą didinant elektrodo sukimosi greitį. Šį reiškinį galbūt galime priskirti vandenilio peroksido elektrocheminės reakcijos mechanizmui ant BM modifikuoto elektrodo. Iš

bendros vandenilio peroksido katodinės redukcijos reakcijos (4), matome, kad viena peroksido molekulė prisijungia du elektronus. Žinoma, kad vandenilio peroksido mišrusis potencialas ant platinos ir aukso elektrodo nepriklauso nuo peroksido koncentracijos, bet priklauso nuo tirpalo pH pagal žinomą lygtį [124]:

$$E = 0,84 - 0,059 \cdot pH \quad (9)$$

Potencialą nustatančios reakcijos yra:

i) katodinė:



ii) anodinė:



Vandenilio peroksido redukcijos mechanizmas (10) ir (11) apima vieno elektrono pernašos procesus, kuriose dalyvauja labai trumpą laiką egzistuojančios dalelės, tokios kaip $OH\cdot$ radikalai. Taip pat žinomas ir antras mechanizmas. Elektrocheminė vandenilio peroksido redukcija susideda iš adsorbcijos pakopos, kurios metu vandenilio peroksido molekulė skyla į $OH\cdot$ radikalus [124]:

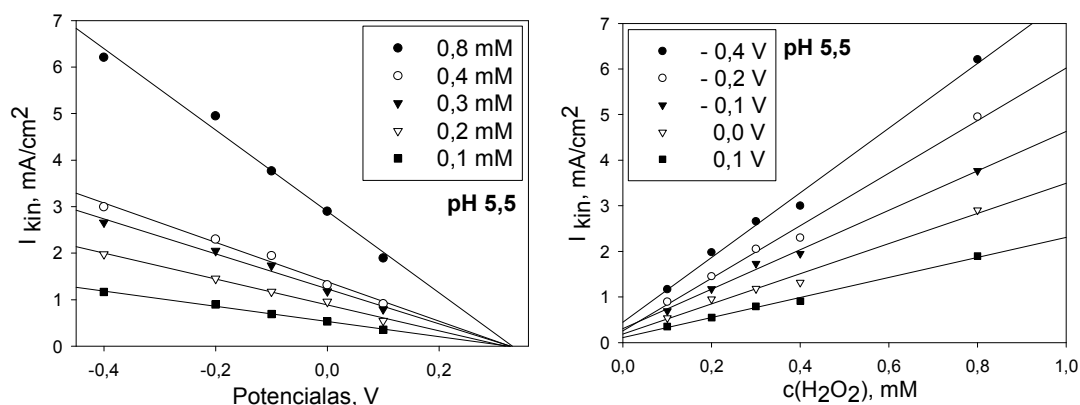


Po to $OH\cdot$ radikalai redukcijos metu prisijungia po vieną elektroną ir virsta OH^- jonais:



Aišku, tai galioja tik tuo atveju, jei $OH\cdot$ radikalų redukcijos procesas daug greitesnis nei vandenilio peroksido adsorbcija. Tuomet atvirkštinės katodinės srovės priklausomybė nuo $1/\omega^{1/2}$ turi būti tiesinė, net esant didžiausiam elektrodo sukimosi greičiui. Priešingu atveju, esant lėtam $OH\cdot$ radikalų elektronų

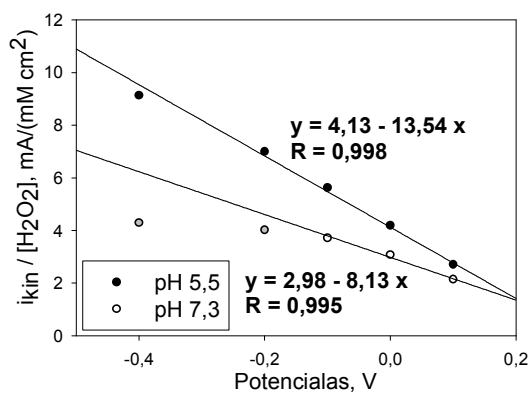
prisijungimui, tikėtina, kad esant dideliam sukimosi greičiui, OH^\cdot radikalai bus nublokšti nuo elektrodo paviršiaus išcentrinės jėgos ankščiau nei jie bus elektrochemiškai redukuoti iki OH^- jonų. Mūsų atveju stebimas katodinės srovės sumažėjimas esant didesniems elektrodo sukimosi greičiams. Tokiu būdu, atsižvelgiant į pateiktą modelį, kuris susideda iš adsorbcijos (14) ir elektroninio prisijungimo (15) etapų, galime daryti išvadą, kad bendras redukcijos procesas turbūt yra apribotas OH^\cdot radikalų elektronų prisijungimo greičio. Arba, jei mes remsimės pirmu pateiktu H_2O_2 redukcijos mechanizmu, kuris aprašomas (10) ir (11) lygtimis, taip pat galima daryti išvadą, kad antro elektrono prisijungimas (katodinė OH^\cdot radikalų redukcija iki hidroksilo jonų) vyksta ribotu greičiu. Akivaizdu (16-18 pav.), kad šios limituojančios stadijos eiga priklauso nuo elektrodo potencialo, tirpalo pH ir vandenilio peroksido koncentracijos. Remiantis 18 pav. pateiktais duomenimis, matome, kad esant mažesniems elektrodo potencialams, elektrono prisijungimo greitis didesnis, o esant didesnėms tirpalo pH vertėms – mažesnis.



19 pav. i_{kin} priklausomybė nuo elektrodo potencialo esant skirtingoms vandenilio peroksido koncentracijoms (kairėje), ir nuo vandenilio peroksido koncentracijos esant skirtingiems elektrodo potencialams (dešinėje). pH 5,5 buferiniame tirpale.

Gautos kinetinės srovės tankio reikšmės priklauso nuo elektrodo potencialo. Kaip matome 19 pav., kairėje, esant pH 5,5 buferiniam tirpalui, gauta

beveik linijinė i_{kin} priklausomybė nuo elektrodo potencialo. Ekstrapoliuojant tieses į nulinę kinetinę srovę ($i_{kin} \rightarrow 0$), gauname vidutinę vertę elektrodo potencialui 0,33 V. Šis potencialas atitinka viršutinę potencialo ribą kai dar gali vykti katodinė vandenilio peroksido redukcija. Iš 3 lygties vandenilio peroksidui mišrusis potencialas pH 5,5 buferiniame tirpale turi būti 0,52 V, t.y. apytikriai 0,32 V pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą. Tokiu būdu viršutinės potencialo ribos vertė vandenilio peroksido redukcijai, gauta iš ekstrapoliacijos duomenų $i_{kin} \rightarrow 0$, sutampa su žinoma mišria potencialo verte neperžengiant 5 % paklaidos ribų [124]. Taip pat buvo gauta beveik linijinė kinetinės srovės nuo vandenilio peroksido koncentracijos priklausomybė visoje studijuotoje potencialų riboje, tai pristatyta 19 pav., dešinėje. Iš 19 pav. pateiktų priklausomybių, buvo gauta linijinė normalizuotos kinetinės srovės priklausomybė ($i_{kin}/[H_2O_2]$ santykis) nuo elektrodo potencialo (20 pav.). Šią priklausomybę galima aprašyti tiesės lygtimi (16):



20 pav. Santykio $i_{kin}/[H_2O_2]$ priklausomybė nuo elektrodo potencialo.

$$\frac{i_{kin}}{c} = \left(\frac{i_{kin}}{c} \right)_0 + aE \quad (16)$$

kur $\frac{i_{kin}}{c}$ aprašo normalizuotą kinetinę srovę (mA/(mM·cm²));

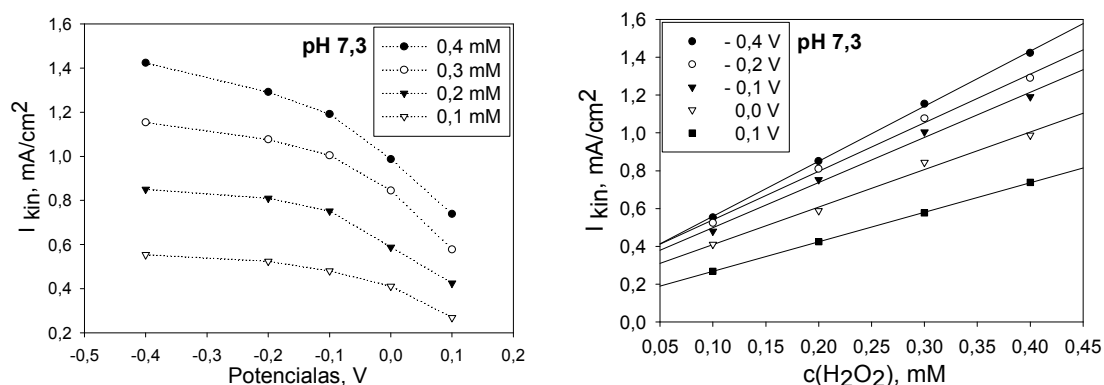
$$\left(\frac{i_{kin}}{c}\right)_0 - \text{vertė esant nuliniam potencialui, } \left(\frac{i_{kin}}{c}\right)_0 = (4,13 \pm 0,20)$$

mA/(mM·cm²);

E – elektrodo potencialas (V, pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą);

a – empirinis koeficientas, išskaičiuotas iš linijinės priklausomybės nuokrypio, $a = (-13,54 \pm 1,51)$ mA/(mM·cm²·V).

Ekstrapolijuojant priklausomybę gautą pH 5,5 buferiniame tirpale (20 pav.) į nulinę normalizuotos kinetinės srovės reikšmę, tiesė kerta potencialų ašį ties 0,31 V. Ši reikšmė smarkiai nesiskiria nuo aukščiau apskaičiuoto potencialo (0,33 V) ir nuo žinomo mišraus vandenilio peroksido potencialo (0,32 V).



21 pav. Tas pats kaip 19 pav., tik šiuo atveju naudojamas pH 7,3 buferinis tirpalas.

Tačiau pH 7,3 tirpale nebuvo gauta linijinė kinetinės srovės priklausomybė nuo elektrodo potencialo (21 pav., kairėje). Galima priežastis yra eksperimentinių duomenų nukrypimas nuo tiesiškumo Koutecky-Levich koordinatėse, kaip aptartas aukščiau (žr. 63-64 psl.). pH 7,3 tirpale šis nukrypimas atrodo akivaizdesnis negu pH 5,5 (18 pav.), todėl skaičiavimams nenaudojome duomenų, gautų naudojant 0,8 mM vandenilio peroksido koncentracijas. Buvo gauta beveik linijinė kinetinės srovės priklausomybė nuo vandenilio peroksido koncentracijos (nuo 0,1 iki 0,4 mM H₂O₂) visoje studijuotoje potencialų riboje, tai

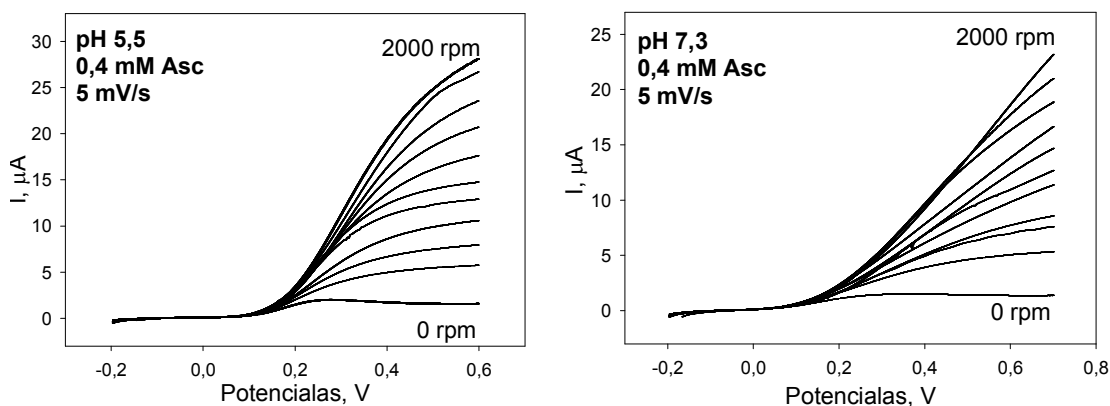
pristatyta 21 pav., dešinėje. Šiuo atveju, buvo gauta linijinė normalizuotos kinetinės srovės priklausomybė nuo elektrodo potencialo ne visoje studijuotoje elektrodo potencialų riboje (nuo - 0,1 iki 0,1 V) (20 pav.), gautos mažesnės vertės,

$$\left(\frac{i_{kin}}{c}\right)_0 = (2,98 \pm 0,07) \text{ mA}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2), a = (-8,13 \pm 0,87) \text{ mA}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{V}).$$

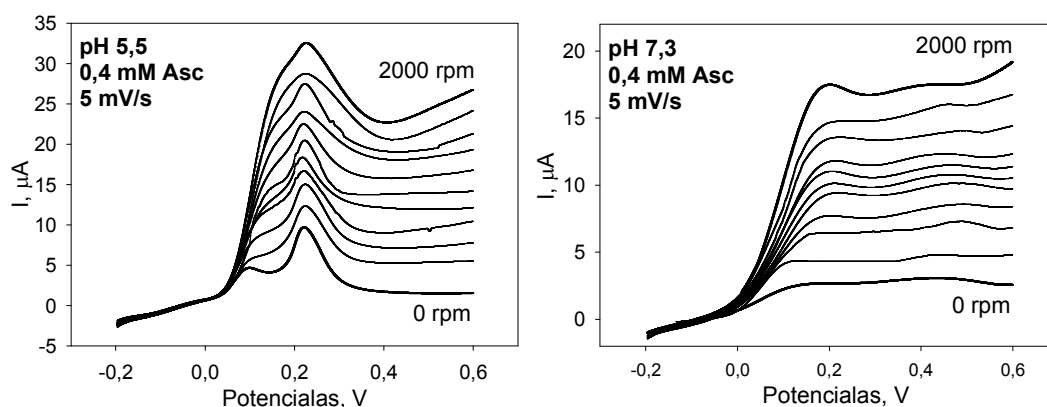
3.1.3. Askorbato oksidacija ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto sukamojo disko elektrodo

Kvazigrįžtamos redoks poros askorbato-dehidroaskorbato pH 7,3 buferiniame tirpale standartinis potencialas $E_0' = 0,058$ V pagal SHE, t.y. -0,139 V pagal Ag/AgCl užpildytą sočiu NaCl [125], o mūsų atveju yra -0,151 V pagal Ag/AgCl (3 M NaCl). Ant stiklo anglies elektrodo askorbato elektrooksidacija prasideda esant 0,1 V tiek pH 5,5, tiek pH 7,3 tirpaluose, tai matyti 22 pav. skleidžiant potencialą 5 mV/s greičiu. Oksidacinė srovė auga didinant elektrodo sukimosi greitį bei skleidžiant potencialą į teigiamesnes potencialo vertes. Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies elektrodo atveju esminis anodinės srovės padidėjimas yra stebimas esant žemesniems elektrodo potencialams, ties 0,0 V (23 pav.) nei aukščiau minėtu atveju (22 pav.). Nesukant BM modifikuoto stiklo anglies elektrodo pH 5,5 tirpale stebimos dvi gerai matomos anodinės smailės, esančios ties 0,1 V ir 0,22 V (23 pav., kairėje). Antroji iš jų atsiranda net nesant sistemoje askorbato, todėl ji atitinka redukuotos Everitt'o druskos formos anodinę oksidaciją į oksiduotą Berlyno mėlynojo formą. Sukantis BM modifikuotam elektrodui pirmoji smailė perauga į bangą, o antrosios smailės padėtis praktiškai nepasikeičia. Taip pat, anodinės srovės padidėjimas stebimas teigiamesniuose potencialuose negu antros smailės potencialas. pH 7,3 tirpale askorbato oksidacijos pradžios potencialas BM modifikuotame elektrode yra apie 0,0 V bei stebima vienintelė anodinė smailė ties 0,2 V (23 pav., dešinėje). Ir šiuo atveju, didinant elektrodo sukimosi greitį anodinės srovės didėjimas stebimas didėjant

elektrodo potencialui, tai yra dešiniau matomos smailės. pH 5,5 buferiniame tirpale gauta oksidacinė srovė yra šiek tiek didesnė nei pH 7,3 tirpale.



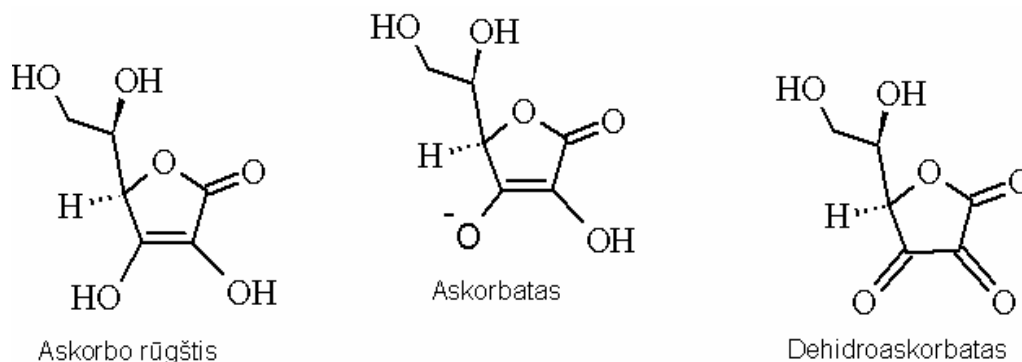
22 pav. Sukamojo disko stiklo anglies elektrodo srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo, sklaidžiant elektrodo potencialą 5 mV/s greičiu nuo -0,2 iki 0,6 V, pH 5,5 (kairėje) ir pH 7,3 (dešinėje) fosfatiniame tirpale, turinčiame 0,4 mM askorbato. Voltamperogramos gautos esant skirtingiems elektrodo sukimosi greičiams (0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1100, 1700, 2000 aps./min).



23 pav. Tas pats kaip ir 22 pav., tik naudojamas Berlyno mėlynuoju modifikuotas sukamojo disko elektrodas.

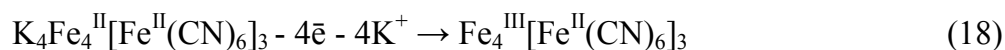
Vandeniniuose tirpaluose askorbo rūgštis gali protonizuotis per dvi grįžtamas pakopas, kurios charakterizuojamos $pK_1 = 4,17$ ir $pK_2 = 11,57$, todėl pH 5,5 bei pH 7,3 tirpaluose askorbo rūgštis egzistuoja monoprotonuotoje monoanijoninėje formoje, kuri vadinama askorbatu (24 pav.). Askorbato/dehidroaskorbato dviejų elektronų redoks poros potencialas yra

mažesnis nei Berlyno mėlynojo/Everitt'o druskos redoks poros potencialas, todėl askorbatas sugeba redukuoti BM paversdamas jį į redukuotą Prūsų baltojo formą:



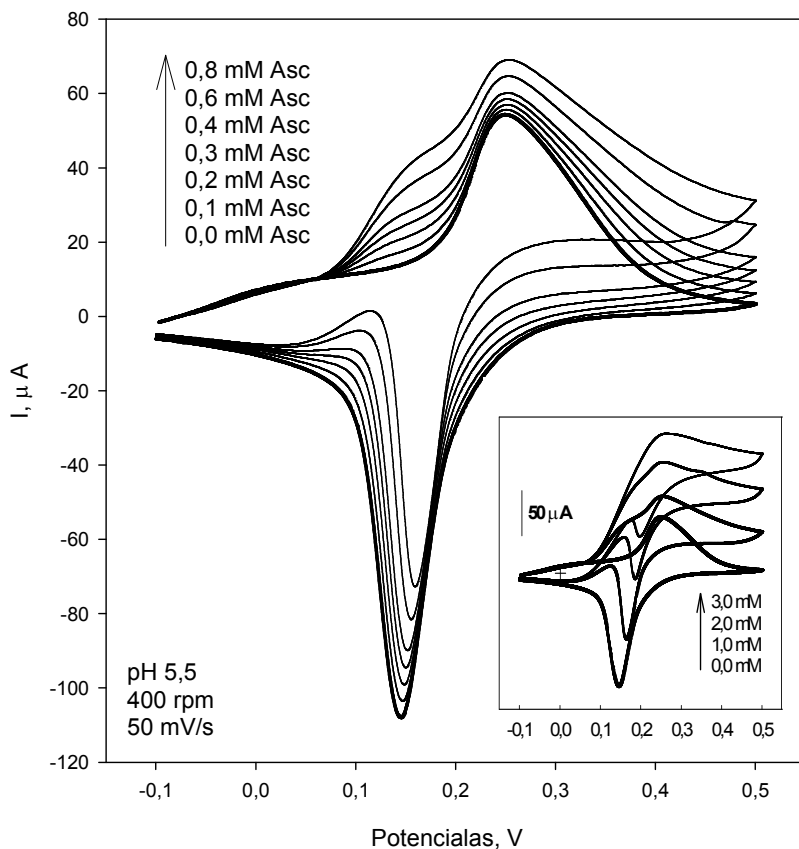
24 pav. Askorbo rūgštis ir jos formos.

Tada Everitt'o druska iš naujo yra elektrochemiškai oksiduojama iki pradinio BM, jei elektrodo potencialas yra tinkamas susidaryti oksiduotai formai:



Šiose redoks reakcijose BM vaidina redoks mediatoriaus-elektrokatalizatoriaus vaidmenį, elektronai taip nuo askorbato perduodami elektrodui. Nors askorbato elektrooksidacija galima ir ant nemodifikuoto stiklo anglies elektrodo (22 pav.), tačiau akivaizdu, kad BM sluoksnis didina šio proceso efektyvumą, mažindamas askorbato anodinės oksidacijos potencialą. Pagal aukščiau aprašytą reakcijos mechanizmą askorbato anodinė oksidacija vyksta numatytose potencialo ribose, kurios atitinka oksiduotą BM formą, tai yra $E > 0,22 \text{ V}$. Tačiau, kaip matome 23 pav., kairėje, pH 5,5 tirpale askorbato elektrooksidacija tęsiasi ir esant mažesniems potencialo reikšmėms, t.y. $< 0,22 \text{ V}$. Labiausiai tikėtina, kad nesukamo BM modifikuoto elektrodo gauta anodinė smailė esanti prie 0,1 V atitinka adsorbcijos bangą. Anodinė adsorbcijos banga

paprastai yra gaunama, kai medžiagos redukuota forma pasižymi stipresniu adsorbingumu nei oksiduota [126].

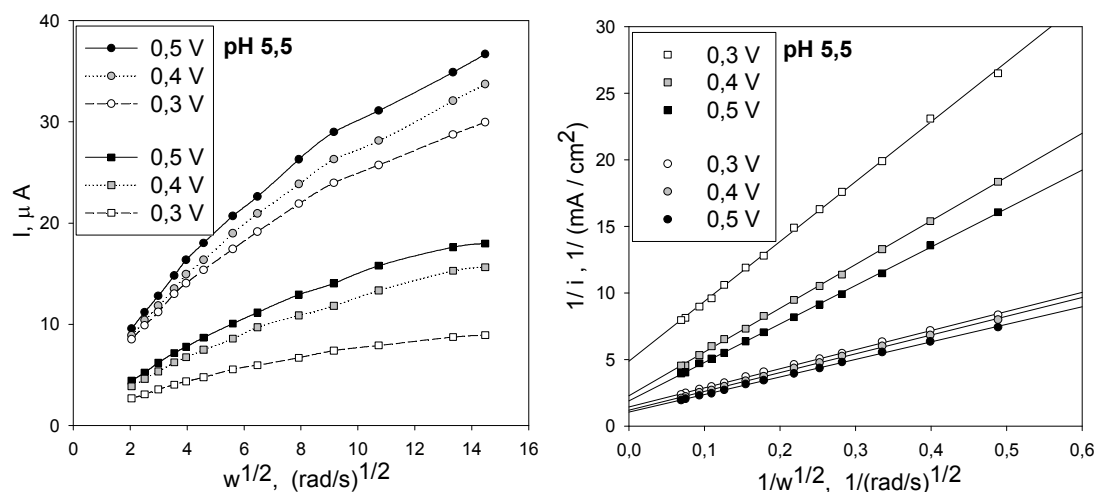


25 pav. Berlyno mėlynuoju modifikuoto stiklo anglies sukamojo disko elektrodo CV. Elektrodo potencialo skleidimo greitis 50 mV/s, potencialo skleidimo intervalas nuo – 0,1 iki 0,5 V, elektrodo sukimosi greitis 400 aps./min. Keičiant askorbato koncentraciją pH 5,5 buferiniame tirpale užrašomos CV. Nuo 0,0 iki 0,8 mM askorbato pagrindiniame grafike, o didelės askorbato koncentracijos (nuo 1,0 iki 3,0 mM) įdėtiniame grafike.

25 pav. pateikiamos CV'os skirtingoms askorbato koncentracijoms pastoviam elektrodo sukimosi greityje. Kai nėra analizuojamame tirpale askorbato duotomis sąlygomis anodinės ir katodinės smailių poros vidurio potencialas 0,197 V, o smailių potencialų skirtumas $\Delta E_s = 0,1$ V. Palyginti mažų askorbato koncentracijų ribose, neviršijant 3 mM, nustatytas anodinės srovės padidėjimas prieš anodinės smailės potencialą ir už jo. Didinant askorbato

koncentraciją, katodinė smailė, atsirandanti grįžtamo potencialo skleidime, palaipsniui slenkasi į didesnes potencialo vertes, tuo tarpu anodinės smailės padėtis lieka beveik nepakitusi. Didžiausioje naudotoje 3 mM askorbato koncentracijoje katodinės smailės poslinkis buvo 0,03 V. O anodinė banga, esanti tarp 0,1 V ir 0,2 V, monotoniškai auga, didinant askorbato koncentraciją (25 pav.).

Pagal Levich lygtį (5) [123], turi būti gauta linijinė priklausomybė askorbato elektrooksidacijos ribinės srovės nuo elektrodo sukimosi greičio kvadratinės šaknies.



26 pav. Berlyno mėlynuoju modifikuoto sukamojo disko elektrodo anodinės srovės priklausomybė nuo elektrodo sukimosi kampinio greičio kvadratinės šaknies (kairėje) ir Koutecky-Levich koordinatėse (dešinėje). pH 5,5 buferinis tirpalas, ● – 0,8 mM askorbato, ■ – 0,3 mM askorbato koncentracijoms ir naudojant skirtingus elektrodo potencialus (nurodyti).

26 pav. (kairėje) rodo, kad tiesinė priklausomybė pagal Levich lygtį pH 5,5 buferiniame tirpale yra išlaikoma tiksliai siaurame sukimosi greičių diapazone esant mažiems elektrodo sukimosi greičiams neviršijant 200 aps./min. Nukrypimas nuo tiesinės priklausomybės prie didesnių elektrodo sukimosi greičių atsiranda dėl riboto elektronų pernašos greičio. BM modifikuoto elektrodo elektroninio perkėlimo mechanizmas skiriasi nuo nemonifikuoto elektrodo. Atrodo, yra ir daugiau faktorių lemiančių šio proceso greitį BM modifikuotame

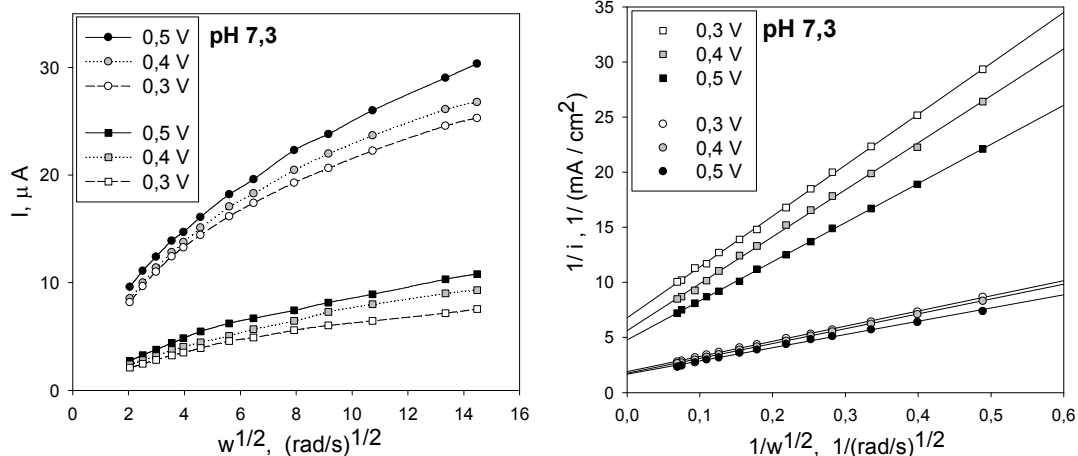
elektrode. Turėtume nagrinėti, bent jau tris procesus, kurie gali turėti įtakos elektrokatalizinei askorbato oksidacijai Berlyno mėlynoju modifikuotame elektrode:

- ✓ Elektrono pernaša tarp askorbato ir Berlyno mėlynojo, t.y. BM redukuojamas iki Everitt'o druskos pagal anksčiau minėtą reakciją (17);

- ✓ Elektrono pernaša per BM sluoksnį, kuris vyksta, turbūt, ribotu greičiu, dėl riboto Berlyno mėlynojo elektrinio laidumo (jis pasižymi puslaidininkio savybėmis);

- ✓ Elektrono pernaša tarp Berlyno mėlynojo (ar Everitt'o druskos) ir elektrodo.

SDE eksperimentu negalime nustatyti, kuris iš šių procesų yra atsakingas už reakcijos greičio apribojimą mūsų nagrinėjamoje sistemoje.



27 pav. Tas pats kaip ir 26 pav., tik naudojamas pH 7,3 fosfatinis buferinis tirpalas.

Bet kokių atveju, visi aukščiau paminėti faktoriai yra įtraukti į kinetinę srovę, kuri gali būti gauta esant be galo dideliame elektrodo sukimosi greičiu. Pagal Koutecky-Levich lygtį (8), bendra (suminė) srovė gali būti padalinta į du komponentus – apribota masės transporto ir kinetinės (arba apribota reakcijos) srovės.

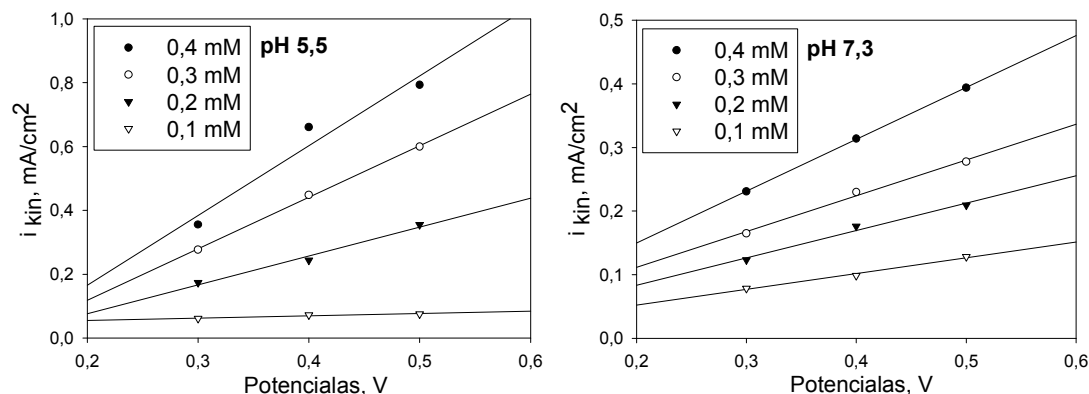
Kaip ir numato Koutecky-Levich lygtis, buvo gauta linijinė priklausomybė I/i nuo $I/\omega^{1/2}$ koordinatėse. Šiose atvirkštinėse koordinatėse apdoroti duomenys yra pateikti 26 pav., dešinėje. Tiesinės priklausomybės su gera koreliacija buvo gautos pH 5,5 buferiniame tirpale elektrodo potencialams esant nuo 0,3 iki 0,5 V ir askorbato koncentracijoms nuo 0,1 iki 0,8 mM, visame studijuotame elektrodo sukimosi greičių intervale. Panašūs duomenys buvo gauti ir pH 7,3 tirpale esant skirtingoms askorbato koncentracijoms ir elektrodo potencialams, šie duomenys pateikti 27 pav., dešinėje.

Ekstrapoliuojant šiuos duomenis (26 pav., 27 pav.) į $I/\omega^{1/2} = 0$, tai yra neapibrėžtai didelį elektrodo sukimosi greitį, gaunama atkarpa koordinačių I/i ašyje, iš kurios gali būti apskaičiuota kinetinė srovė (i_{kin}).

28 pav. pateikiamos kinetinės srovės tankio priklausomybės nuo elektrodo potencialo, abiejuose nagrinėtuose buferiniuose tirpaluose, kai askorbato koncentracija yra nuo 0,1 iki 0,4 mM. Kaip ir galima buvo tikėtis, gautos tiesinės priklausomybės. Šių priklausomybių nuolinkis priklauso nuo tirpalo pH. Ekstrapoliuojant tieses, gautas pH 5,5 tirpale bei esant askorbato koncentracijai 0,2 – 0,4 mM, į nulinę kinetinę srovę, gauname, kad tiesės susikerta beveik tame pačiame taške 0,1 V., o naudojant pH 7,3 buferinį tirpalą – apie 0,0 V. Šios potencialo reikšmės turėtų atitikti askorbato anodinės oksidacijos pradžios potencialą. Juos sulyginę su 23 pav. gautais duomenimis galima sakyti, kad išskaičiuotos potencialo reikšmės neperžengia paklaidos ribų.

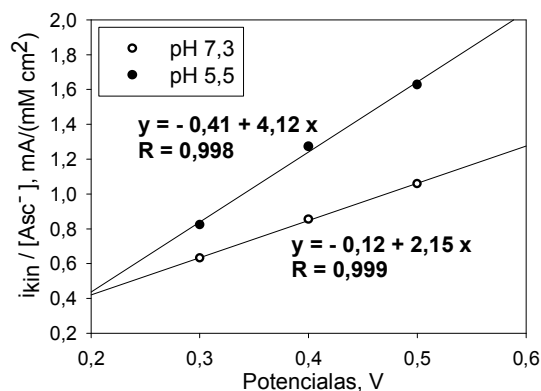
Taip pat iš kreivių nuolinkio galima spręsti, kad elektrokatalizinė askorbato oksidacija efektyvesnė šiek tiek rūgštiniuose nei pH-neutraliuose tirpaluose.

BM modifikuoto elektrodo jautrumas askorbatui priklauso nuo elektrodo potencialo.



28 pav. i_k priklausomybė nuo elektrodo potencialo naudojant skirtingas askorbato koncentracijas (nurodytos). pH 5,5 buferiniame tirpale (kairėje) ir pH 7,3 (dešinėje).

Iš priklausomybių pateiktų aukščiau buvo gauta linijinė normalizuotos kinetinės srovės (santykis $\frac{i_{kin}}{[Asc^-]}$) priklausomybė nuo elektrodo potencialo (29 pav.) abiemis studijuotiems buferiniams tirpalams. Srovės didėjimas yra gautas didinant elektrodo potencialą. Šias tiesines priklausomybes galima aprašyti (16) lygtimi. pH 5,5 ir pH 7,3 tirpaluose apskaičiuotas a koeficientas, atitinkamai, lygus $4,12 \pm 0,26$ ir $2,15 \pm 0,05$ mA/(mM·cm²·V). Vadinasi, kinetinės srovės jautris priklauso nuo elektrodo potencialo ir yra didesnis pH 5,5 tirpale.



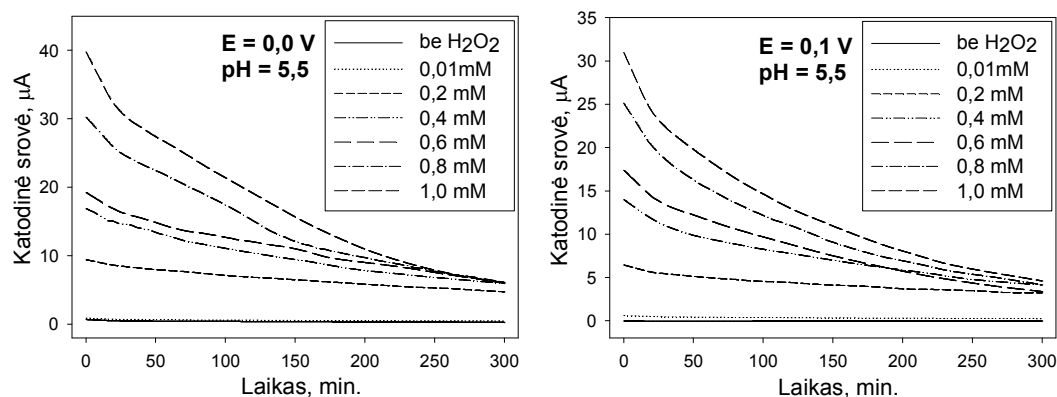
29 pav. Santykio $i_{kin}/[Asc^-]$ priklausomybė nuo elektrodo potencialo.

3.1.4. Elektrokatalizinio Berlyno mėlynojo sluoksnio irimas vykstant katodinei vandenilio peroksido redukcijai

Kompaktiškas Berlyno mėlynojo sluoksnis, nusodintas ant stiklo anglies paviršiaus, duoda gerą elektrokatalizinį aktyvumą vandenilio peroksidui. Jau mums žinoma bendra H_2O_2 elektrocheminės redukcijos reakcijos lygtis (4).

Hidroksilo jonai, šios reakcijos produktai, sukelia lokalų pH padidėjimą viduje ir šalia BM sluoksnio, dėl to Berlyno mėlynojo sluoksnis pradeda laipsniškai irti. Todėl yra nustatytas laipsniškas peroksido elektrokatalizinės katodinės redukcinės srovės mažėjimas. Žinoma, kad BM modifikuoti elektrodai pasižymi geru stabilumu rūgštiniuose tirpaluose, o neutraliuose ar šiek tiek šarminiuose tirpaluose jo stabilumas yra ribotas.

Pasiūlytos dvi hipotezės dėl BM sluoksnio irimo vykstant katodinei vandenilio peroksido redukcijai:



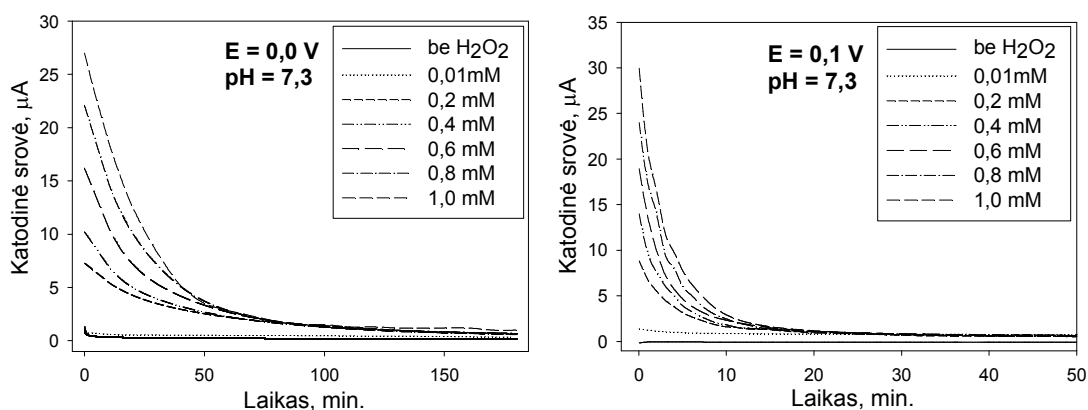
30 pav. Katodinės srovės kitimas laike vykstant nenuktrūkstamai vandenilio peroksido redukcijai pH 5,5 buferiniame tirpale esant pastoviam elektrodo potencialui 0,0 V (kairėje) ir 0,1 V (dešinėje).

Pirma, turbūt gali būti pH tirpalo „kritinė“ vertė, nuo kurios prasideda irimas. Virš šios vertės (t.y. labiau šarminiuose tirpaluose) irimas turi vykti dideliu greičiu, o žemiau šios kritinės vertės poveikio elektrokataliziniam sluoksniui nėra arba yra labai silpnas (mažiau šarminiuos tirpaluose). Šiuo atveju, irimo greičio priklausomybė nuo vandenilio peroksido koncentracijos turi būti netiesinė. Esant

mažoms peroksido koncentracijoms, hidroksilo jonų pasigamina mažai, OH⁻ pasklinda po BM sluoksnį, o Berlyno mėlynojo sluoksnio viduje pH nesiekia arba neviršija kritinės pH vertės. Todėl turėtų nevykti arba silpnai vykti katalizinio sluoksnio irimas. Esant didelėms peroksido koncentracijoms, hidroksilo jonų pasigamina daug daugiau per tą patį laiką, o paviršiaus pH padidėja virš kritinės vertės. Todėl, BM sluoksnio irimas vyksta greičiau.

Antra prielaida, kad neegzistuoja jokia kritinė tirpalo pH vertė. Tuomet, irimo greitis turėtų būti proporcingas hidroksilo jonų pasigaminimo kiekiui, kuris savo ruožtu yra proporcingas vandenilio peroksido koncentracijai.

BM modifikuotas elektrodas patalpinamas į buferinį tirpalą, kuriame yra tam tikras vandenilio peroksido kiekis (jis nurodytas 30 ir 31 pav.), vykdoma nenutrūkstama vandenilio peroksido elektrolizė. Katodinių srovių kitimai pateikti 30 ir 31 pav. Iš pateiktų grafikų aiškiai matomas katodinės srovės mažėjimas, tuo vadovaujantis, galima sakyti, kad elektrokatalizinis sluoksnis laikui bėgant irsta.



31 pav. Katodinės srovės kitimas laike vykstant nenuktrūkstamai vandenilio peroksido redukcijai pH 7,3 buferiniame tirpale esant pastoviam elektrodo potencialui 0,0 V (kairėje) ir 0,1 V (dešinėje).

30 pav. naudojant pH 5,5 buferiniame tirpale didesnes vandenilio peroksido koncentracijas gaunamos didesnės pradinės srovės bei didesnis irimo greitis. Jei lyginti gautus duomenis pagal elektrodo potencialą, tai greičiau

katodinės srovės mažėjimas vyksta esant 0,1 V. Panašios priklausomybės buvo gautos ir pH 7,3 buferiniame tirpale, jos pavaizduotos 31 pav. Didesnės pradinės srovės ir irimo greičiai buvo gauti, kaip ir pH 5,5 atveju, esant didesnei vandenilio peroksido koncentracijai. Esant elektrodo potencialui 0,1 V, pH 7,3 buferiniame tirpale stiprus katodinės srovės mažėjimas matomas per pirmas 10 min., o esant 0,0 V elektrodo potencialui – per 50 min. Katodinės srovės irimo greitis didesnis pH 7,3 tirpale. Pastebėta, kad net nesant sistemoje H_2O_2 , gauta srovė pamažu mažėja tiek pH 5,5 tirpale, tiek pH 7,3.

Vandenilio peroksido elektrokatalizinė redukcija BM modifikuotame elektrode ir BM sluoksnio irimas vykstant elektrokatalizinei redukcijai susideda iš sudėtingų procesų. Irimo proceso pilna kinetinė analizė turi apimti bent jau šiuos dalinius procesus:

1. Vandenilio peroksido difuzija į BM/tirpalo sąlyčio sluoksnį arba tiksliau į reakcijos zoną.

2. Krūvio nešėjų (elektronų) pernaša nuo elektrodo per BM sluoksnį į reakcijos zoną. Į šį procesą turime atsižvelgti todėl, kad BM yra puslaidininkis su apribotu krūvio nešėjų judrumu. Tokiu būdu, esant tam tikroms sąlygoms (pvz.: storam BM sluoksniui), apribotas judrumas gali apriboti absoliutų elektrokatalizinio proceso greitį.

3. Redoks sąveika tarp BM „aktyvių centrų“ ir vandenilio peroksido. Ši reakcija inicijuoja hidroksilo anijonų gamybą, kartu padidėja BM sluoksnio lokalus pH, kuris yra atsakingas už irimo greitį.

Atsižvelgdami į šiuos dalinius procesus, bent jau iš principo, gali būti sudaryta kinetinė schema Berlyno mėlynojo sluoksnio irimui analizuoti. Dėl komplikacijų aprašytų kinetinėje scheme, mums būtų naudingas, bet koks apytikris skaičius kinetinių priklausomybių apibūdinimui. Todėl mes, mažėjančią katodinę srovę (30 ir 31 pav.), kuria siejame su aktyvaus katalizinio BM sluoksnio irimu, galime aprašyti pirmo laipsnio eksponentės lygtimi (19):

6 lentelė. Pirmo laipsnio irimo greičio konstantos vykdant nenutrūkstamą vandenilio peroksido elektrolizę.

pH	E, V	c(H ₂ O ₂), mM	I ₀ , μA	k _{ir} , min ⁻¹	R
5,5	0,0	0,01	0,73 ± 0,01	(0,62 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,936
		0,2	8,97 ± 0,02	(2,16 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,997
		0,4	16,01 ± 0,05	(3,49 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,997
		0,6	18,10 ± 0,07	(3,52 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,997
		0,8	29,04 ± 0,12	(5,50 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,998
		1,0	37,76 ± 0,18	(6,05 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,998
	0,1	0,01	0,52 ± 0,01	(0,90 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,972
		0,2	5,81 ± 0,03	(2,18 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,986
		0,4	12,56 ± 0,08	(3,92 ± 0,10) · 10 ⁻³	0,992
		0,6	16,23 ± 0,06	(5,24 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,998
		0,8	22,90 ± 0,15	(6,08 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,996
		1,0	28,03 ± 0,17	(6,35 ± 0,10) · 10 ⁻³	0,996
7,3	0,0	0,01	0,63 ± 0,01	(0,32 ± 0,01) · 10 ⁻²	0,936
		0,2	6,28 ± 0,10	(1,61 ± 0,04) · 10 ⁻²	0,983
		0,4	8,71 ± 0,18	(2,17 ± 0,06) · 10 ⁻²	0,977
		0,6	14,60 ± 0,26	(2,92 ± 0,08) · 10 ⁻²	0,985
		0,8	21,30 ± 0,25	(3,43 ± 0,06) · 10 ⁻²	0,994
		1,0	26,93 ± 0,71	(3,76 ± 0,17) · 10 ⁻²	0,994
	0,1	0,01	0,96 ± 0,01	(4,10 ± 0,02) · 10 ⁻²	0,938
		0,2	7,47 ± 0,29	(1,32 ± 0,08) · 10 ⁻¹	0,905
		0,4	12,52 ± 0,36	(2,03 ± 0,09) · 10 ⁻¹	0,948
		0,6	17,63 ± 0,47	(2,38 ± 0,10) · 10 ⁻¹	0,955
		0,8	23,11 ± 0,40	(2,48 ± 0,07) · 10 ⁻¹	0,982
		1,0	28,37 ± 0,40	(2,49 ± 0,06) · 10 ⁻¹	0,988

$$I = I_0 \cdot e^{-k_{ir} \cdot t} \quad (19)$$

kur I yra katodinė srovė po kurio nors laiko momento (t);

I_0 – pradinė srovė, kai $t = 0$;

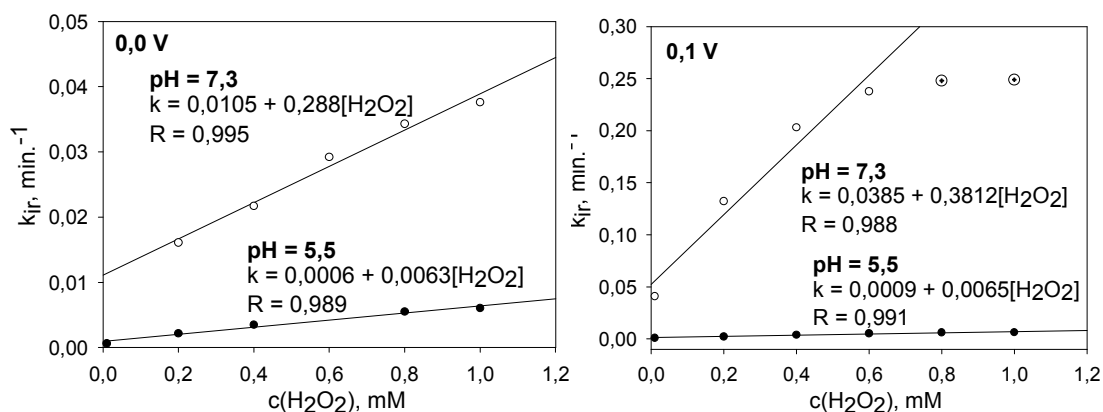
t – laikas;

k_{ir} – pirmo laipsnio irimo greičio konstanta.

Remiantis (19) lygtimi ir duomenimis, atidėtais 30 ir 31 pav., apskaičiuojamos pirmo laipsnio irimo greičio konstantos tam tikroms peroksido koncentracijoms, darbinio potencialo ir tirpalo pH vertėms (6 lentelė). pH 5,5 buferiniame tirpale irimo greičio konstanta kinta nuo $2,16 \cdot 10^{-3}$ iki $6,05 \cdot 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$ vandenilio peroksido koncentracijoms, atitinkamai, esant 0,2 ir 1,0 mM, elektrodo potencialui - 0,0 V. O potencialui esant 0,1 V, esant tom pačioms sąlygoms, nuo $2,18 \cdot 10^{-3}$ iki $6,35 \cdot 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$. Tai reiškia, kad BM sluoksnis pusę savo aktyvumo, esant elektrodo potencialui 0,0 V ir didžiausiai bei mažiausiai H_2O_2 koncentracijai, praranda per 115 ir 321 min. Kai elektrodo potencialas yra 0,1 V - per 109 ir 318 min., atitinkamai, esant didžiausiai ir mažiausiai vandenilio peroksido koncentracijai.

Daugiau šarminiame tirpale (pH 7,3) irimo greičio konstantos reikšmės yra maždaug viena laipsnio eile didesnės - 0,0 V ir dviem – esant 0,1 V, lyginant jas su pH 5,5 buferiniu tirpalu. Elektrodo potencialui esant 0,0 V apskaičiuota k_{ir} reikšmė yra nuo $1,61 \cdot 10^{-2}$ iki $3,76 \cdot 10^{-2} \text{ min.}^{-1}$ peroksido koncentracijoms, atitinkamai, esant nuo 0,2 iki 1,0 mM, o pusę intensyvumo praranda per 43 ir 18 min. Kai elektrodo potencialas yra 0,1 V, apskaičiuotos irimo greičio konstantos, esant tom pačioms peroksido koncentracijoms, yra nuo $1,32 \cdot 10^{-1}$ iki $2,49 \cdot 10^{-1} \text{ min.}^{-1}$, o pusę intensyvumo praranda, labai greitai, per 5 ir 3 min., esant 0,2 ir 1,0 mM vandenilio peroksido koncentracijoms. Gauti duomenys įrodo, kad Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas pasižymi ribotu stabilumu vykstant elektrokatalizinei H_2O_2 redukcijai.

32 pav. pateikiamos irimo greičio konstantų priklausomybės nuo vandenilio peroksido koncentracijos. Linijinės priklausomybės buvo gautos esant 0,0 V potencialui naudotuose buferiniuose tirpaluose, tačiau elektrodo potencialui esant 0,1 V tiesė užsilenkė prie didesnių H₂O₂ koncentracijų pH 7,3 tirpale (32 pav., dešinėje).



32 pav. Pateikiamos pirmo laipsnio irimo greičio konstantos priklausomybė nuo vandenilio peroksido koncentracijos, gautos pH 5,5 ir pH 7,3 tirpaluose, naudojant 0,0 V (kairėje) ir 0,1 V (dešinėje) potencialą.

Gautas priklausomybes galima aprašyti šia tiesės lygtimi:

$$k_{ir} = a + b \cdot [H_2O_2] \quad (20)$$

kur k_{ir} yra pirmo laipsnio irimo greičio konstanta;

a ir b – empiriniai koeficientai.

Šioje lygtyje koeficientas a aprašo BM sluoksnio irimo greitį nesant sistemoje vandenilio peroksido, t.y. „grynas“ elektrocheminis irimas. Šis koeficientas priklauso nuo tirpalo pH bei elektrodo potencialo. Taip pat, į šį koeficientą įskaičiuota ir molekulinio deguonies esančio elektrolite reakcijos įtaka irimui. Koeficientas b reprezentuoja irimo jautrumą nuo vandenilio peroksido koncentracijos todėl, priklauso nuo tirpalo pH bei elektrodo potencialo. Linijinė

priklausomybė gauta 32 pav., kairėje, reiškia, kad jokia „kritinė“ peroksido koncentracija neegzistuoja, ir, atrodo, irimo greitis tiesiogiai proporcingas vandenilio peroksido koncentracijai. Tačiau elektrodo potencialui esant 0,1 V ir didesnėms vandenilio peroksido koncentracijoms (nuo 0,6 mM) tiesė užlinksta naudojant pH 7,3 tirpalą 32 pav., dešinėje.

Gautas linijines priklausomybes ekstrapoliuojant į nulinę vandenilio peroksido koncentraciją gauname Berlyno mėlynojo sluoksnio irimo konstantas, kai sistemoje nėra peroksido. Empirinių koeficientų apskaičiavimas leidžia nustatyti tirpalo pH, elektrodo potencialo, vandenilio peroksido poveikį BM sluoksnio irimui. Šie dydžiai buvo apskaičiuotas iš 32 pav. Įvertinus koeficiento a reikšmes nustatyta, kad BM sluoksnio irimas esant 0,0 V elektrodo potencialui apie 17,5 karto greitesni pH 7,3 buferiniame tirpale, nei pH 5,5. O elektrodo potencialui esant 0,1 V – apie 43 kartus greitesnis.

Irimo greičio konstanta didinant peroksido koncentraciją (t.y. koeficientas b) yra apytiksliai 46 karto didesnė pH 7,3 tirpale nei pH 5,5 esant 0,0 V potencialui ir apie 59 kartus didesnė – esant elektrodo potencialui 0,1 V. Tai rodo, kad BM sluoksnio stabilumas mažėja didinant tirpalo pH bei elektrodo potencialą.

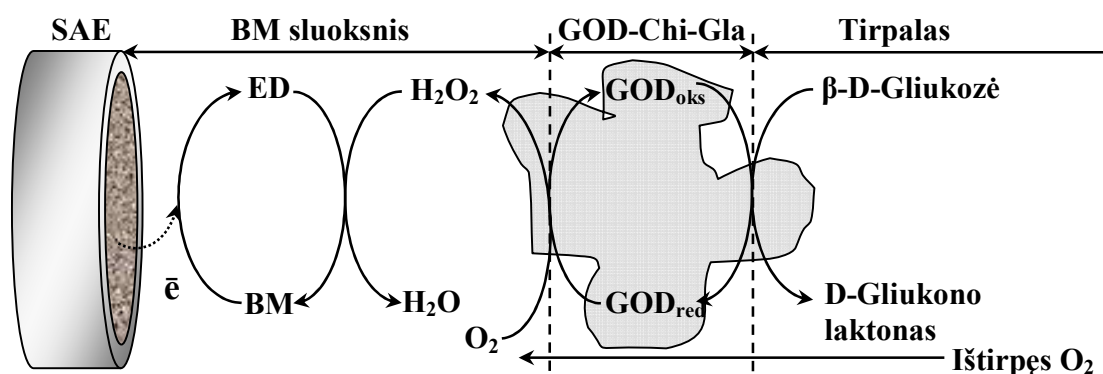
3.2. BM modifikuoto elektrodo taikymas biojutiklio konstravime

Ruošiant bereagentines biojutiklių sistemas, visi jutiklio komponentai tvirtai fiksuojami ant elektrodo paviršiaus. O viena iš svarbiausių užduočių yra efektyvaus elektronų pernašos tarp imobilizuoto fermento ir elektrodo paviršiaus užtikrinimas.

Berlyno mėlynasis yra vienas iš dažniausiai naudojamų mediatorių daugelyje oksidazių bei dehidrogenazių katalizuojamose reakcijose.

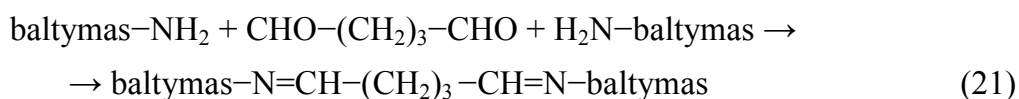
3.2.1. Gliukozės biojutiklio kūrimas

Gliukozės oksidazė katalizuoja gliukozės oksidacijos reakciją, kurios metu susidaro vandenilio peroksidas. O Berlyno mėlynojo sluoksnyje vyksta elektrokatalizinė vandenilio peroksido redukcija, kurios metu registruojamas katodinės srovės atsiradimas (33 pav.).

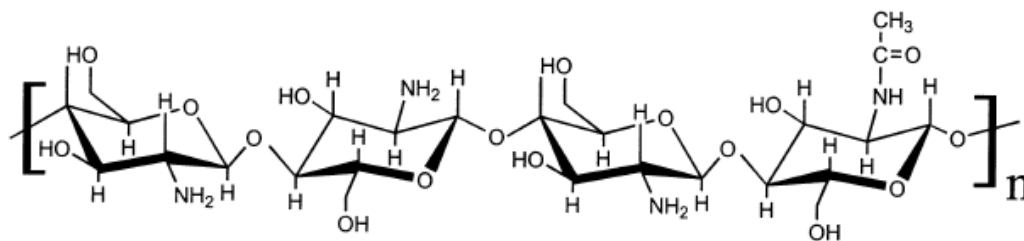


33 pav. Gliukozės biojutiklio veikimo mechanizmas.

Šiame darbe gliukozės oksidazės imobilizavimui pasirinkome chitozaną (34 pav.) ir surišimo agentą – glutaro aldehidą. Glutaro aldehidą – bifunkcinis reagentas, turintis dvi aldehidines grupes, kurios reaguoja su baltymo laisvomis amino grupėmis ir taip imobilizuoja/suriša fermentą. Tokiu būdu baltyminiai komponentai „susiuvami“ į erdvinę struktūrą ir sudaro netirpią plėvelę:

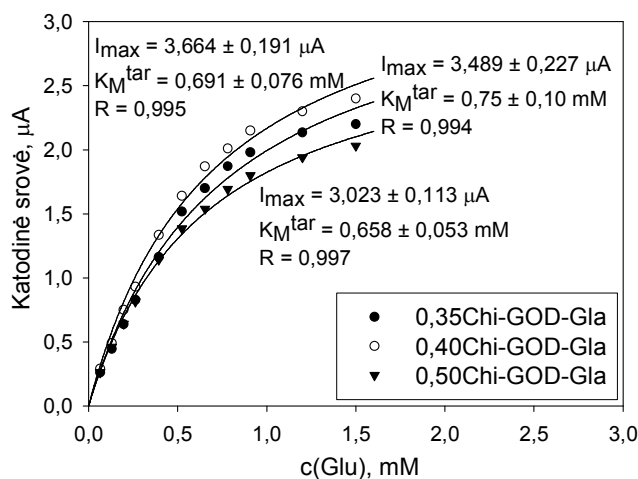


Yra pastebėta, kad imobilizavus fermentą ant ZnO elektrodo chitozано pagalba aktyvumas buvo 7,9 karto didesnis, negu papildomai pridėjus į šią sistemą Gla [127].



34 pav. Chitozano cheminė struktūra.

Chitozanas su fermentu taip pat gali būti „susiuvami“ tarpusavyje, nes chitozanas savo molekuliniėje struktūroje turi amino grupę. Yra pastebėta, kad chitozano membrana yra laidi vandenilio peroksidui, bet nelaidi interferentinėms medžiagoms. Iš to seka, kad chitozanas turi dvi funkcijas: imobilizuoja fermentą ir trukdo tokių medžiagų kaip askorbo, šlapino rūgščių prasiskverbimą per fermentinę membraną prie elektrodo paviršiaus [128, 129]. Tokiose fermentinėse sistemose fermentai pasižymi dideliu aktyvumu, yra stabilūs. Neautomatizuotas biojutiklių paruošimo būdas, kurį naudojame mes, sukelia technologinių problemų dėl polimero sluoksnio nehomogeniškumo, tikslaus sluoksnio užnešimo, nevienodo polimero sluoksnio.



35 pav. SAE/BM/Chi-GOD-Gla biojutiklio atsako priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Biojutikliai paruošti naudojant skirtingą chitozano kiekį. 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,3; elektrodo potencialas 0,0 V.

Nustatytos optimalios elektrodo SAE/BM/Chi-GOD-Gla veikimo sąlygos. Pastebėta, kad biojutiklių jautris priklauso nuo fermento imobilizavimo sąlygų. Buvo keičiamas fermento imobilizavimui naudojamas chirosano kiekis (35 pav.).

Biojutiklių sistemų, naudojant skirtingus Chi kiekius, efektyvumas buvo įvertintas matuojant srovės stiprio priklausomybę nuo Glu koncentracijos (35 pav.). Naudojant tris vienodai modifikuotus elektrodus buvo apskaičiuoti duomenų vidurkiai. Didžiausias srovės tankis buvo pasiektas, kai GOD imobilizavimui buvo naudojama 400 $\mu\text{l/ml}$ Chi ($52,47 \pm 2,36 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$). O naudojant 350 ir 500 $\mu\text{l/ml}$ Chi GOD imobilizavimui srovės tankiai labai panašūs ir lygūs, atitinkamai, $46,20 \pm 2,08$ ir $46,12 \pm 2,08 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$.

3.2.1.1. Gliukozės biojutiklio charakteristikos

35 pav. pateiktos gradavimo kreivės buvo aproksimuotos pagal modifikuotą Michaelio-Menten lygtį:

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [Glu]}{[Glu] + K_M^{\text{tar}}} \quad (22)$$

kur I - srovės stipris;

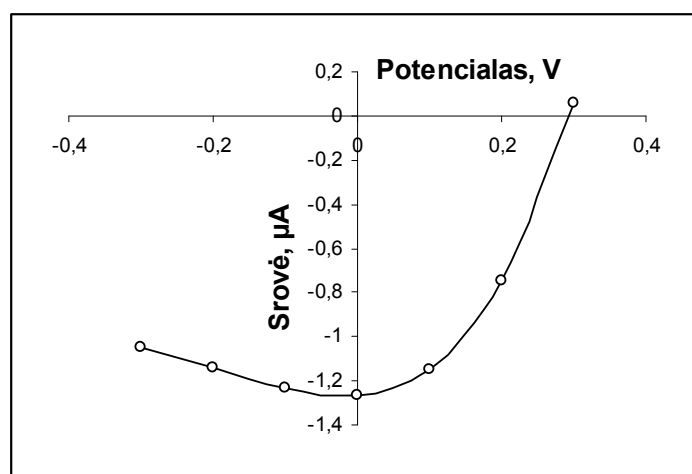
I_{\max} - maksimalus srovės stipris;

$[Glu]$ – gliukozės koncentracija;

K_M^{tar} - tariamoji Michaelio-Menten konstanta.

Fermento katalizinės savybės buvo įvertintos apskaičiuojant tariamas Michaelio-Menten konstantas. Didžiausia K_M^{tar} reikšmė gauta, kai naudojamas mažiausias, t.y. 350 $\mu\text{l/ml}$, Chi kiekis, $0,75 \pm 0,10 \text{ mM}$, o mažiausia, kai naudojamas didžiausias Chi kiekis, $0,658 \pm 0,053 \text{ mM}$. Naudojant 400 $\mu\text{l/ml}$ Chi kiekį K_M^{tar} lygi $0,691 \pm 0,076 \text{ mM}$. Tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla elektrodas, dėl gauto didžiausio jautrumo gliukozei.

Buvo ieškoma fermentinio jutiklio optimalaus darbinio potencialo. Tam išmatuotas srovės stipris esant skirtingiems potencialams (nuo - 0,3 V iki + 0,3 V), kai gliukozės koncentracija tirpale buvo pastovi (36 pav.). Maksimalus srovės stipris buvo gautas esant elektrodo potencialui 0,0 V. SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutiklio nustatymo riba yra 0,41 μM Glu, dar mažesnę nustatymo riba pavyko gauti tik F. Ricci, jis Glu nustatymui naudojo SME [39]. Atsižvelgiant į atsako jautrumą, galimą biojutiklio selektyvumą ir stabilumą, šis potencialas yra išrinktas tolimesniems bandymams.



36 pav. Elektrodo SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo. 0,1 M fosfatinis buferis, pH 7,3; 0,5 mM gliukozės.

Biologiškai aktyvios medžiagos (GOD) ir Berlyno mėlynojo stabilumas priklauso nuo tirpalo pH. Peržiūrėjusi nemažai straipsnių šia tema, pasirinkau neutralų fosfatinį buferinį tirpalą (pH 7,3), kaip optimalų elektrolitą Glu nustatymui mano sukonstruotiems biojutikliams. O GOD tirpalams gaminti pasirinkau pH 5,5 buferinį tirpalą, kadangi laisvo fermento optimalus pH yra 5,19 [130].

Biojutiklio nuostovioji srovė nusistovi per 6 - 8 min. Chitozanas gerai brinksta vandenyje, todėl pagerėja fermento substrato ir reakcijos produkto

difuzija polimero plėvelėje bei priešjonių judrumas, svarbus užtikrinant greitą krūvio pernašą nuo fermento aktyvaus centro elektrodui. Gliukozės biojutiklio atsakymo laikas į tirpalą pridėjus 0,5 mM gliukozės buvo 120 s.

3.2.1.2. Biojutiklių stabilumas

Elektrodų, modifikuotų skirtingais chitozano kiekiais, stabilumas buvo stebimas keletą dienų tarp matavimų elektroda laikant 4°C temperatūroje fosfatiniame buferiniame tirpale pH 7,3. Šių biojutiklių stabilumas nėra didelis, nes per pora dienų prarandama beveik 80 % pradinio jautrio (7 lentelė). Naudojant 500 µl/ml Chi kiekį stebimas šiek tiek didesnis analizinės sistemos stabilumas. Tačiau Chi koncentracijos tolimesnis didinimas labai stipriai pakeitė GOD tirpalo klampumą, todėl jo jau nebeįmanoma buvo padėti ant elektrodo paviršiaus. Taip pat bandymas padidinti glutaro aldehido kiekį nedavė geresnių rezultatų. Manome, kad toks blogas šių biojutiklių stabilumas gali būti paaiškintas nedideliu fermento „susiuvimo“ laipsniu. Labai tikėtina, kad žemas stabilumas gali būti ne tik dėl GOD išsiplovimo, bet ir dėl Berlyno mėlynojo sluoksnio nestabilumo pH 7,3 buferiniame tirpale, kadangi stabilumas nebuvo didelis net naudojant dializės membraną, kuriai esant neturėtų išsiplauti gliukozės oksidazė ar užsiterši elektrodo paviršius. Yra duomenų, kad Pt/BM/GOD-Chi elektrodas pasižymėjo geru stabilumu, jis net 30 dienų neprarado savo jautrumo Glu [128] ir net daugiau kaip 70 dienų [129]. Ant IAO elektrodo chitozano pagalba imobilizavus GOD biojutiklio jautrumas gliukozei per 30 dienu nukrito tik 10 % nuo pradinės vertės [131]. Priešasčių dėl tokių prastų rezultatų mūsų sukonstruoto biojutiklio gali būti daugybė, tačiau manone, kad pagrindinė iš jų yra stiklo anglies elektrodo paviršius, jis yra inertinis, lygus, todėl prie jo sunkiai prilimpa GOD tirpalas.

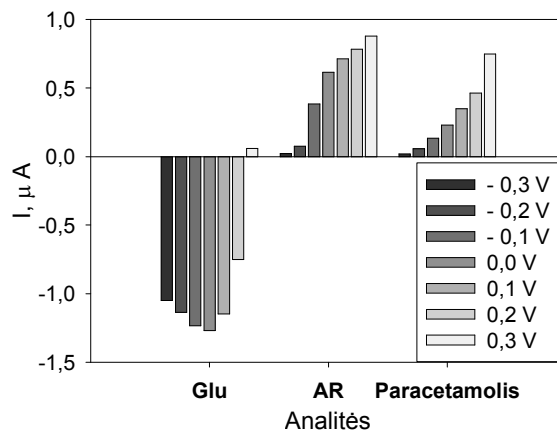
7 lentelė. Gliukozės biojutiklio jautris tik pagaminus biojutiklį ir po trijų parų.

Biojutiklis	Tik pagaminus		Po trijų parų	
	Jautris, $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$	%	Jautris, $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$	%
<i>SAE/BM/0,35Chi-GOD-Gla</i>	46,20 ± 2,29	100	8,33 ± 0,18	18,04
<i>SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla</i>	52,47 ± 2,40	100	10,17 ± 0,23	19,38
<i>SAE/BM/0,5Chi-GOD-Gla</i>	46,12 ± 2,55	100	9,75 ± 0,20	21,14
<i>SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla/dializės membrana</i>	16,09 ± 0,39	100	4,85 ± 0,14*	30,14*

* - po septynių dienų

3.2.1.3. Interferentinių medžiagų įtaka

SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutiklio specifiškumas buvo įvertintas, ištyrus sistemos atsaką į vienodos koncentracijos skirtingų analizių bandinius (37 pav.). Pasirinkome dvi interferentines medžiagas, tai askorbo rūgštį bei paracetamolį. Iš 37 pav. matyti, kad jau esant 0,0 V elektrodo potencialui AR atsakas yra 50 % gliukozės atsako, o paracetamolio – 20 %. Teigiamėjant elektrodo potencialui interferentinių medžiagų atsakas auga, o Glu – mažėja. Buvo sukonstruotas Pt/BM/Chi-GOD biojutiklis, kuris pH 6,86 fosfatiniame tirpale esant 50 mV elektrodo potencialui nedavė jokio AR (0,06 mM) ir šlapimo rūgšties atsako [129]. Tačiau ne visi sukonstruoti biojutikliai chitozano pagrindu pasižymi tokiu geru specifiškumu [131].



37 pav. SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutiklio specifiškumas interferentinėms medžiagoms. Fiksuota elektrodo srovės stiprio priklausomybė nuo potencialo, 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 7,3. Analitių koncentracija tirpale buvo 0,5 mM.

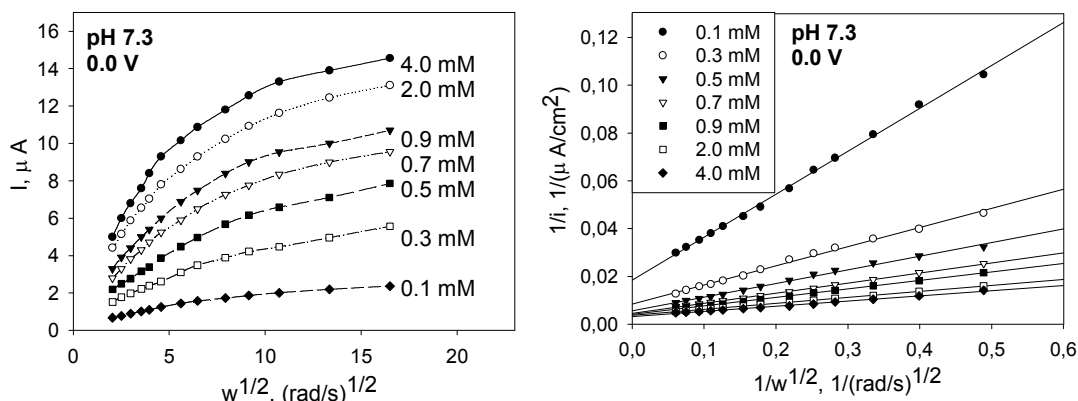
Askorbo rūgšties fiziologiniuose mėginiuose yra beveik 4 kartus mažiau nei mes pasirinkome bandymui (0,5 mM) [106], o Glu koncentracija kraujyje sveiko žmogaus yra nuo 3,1 iki 6,4 mM.

3.2.1.4. Gliukozės oksidacija ant BM/Chi-GOD-Gla modifikuoto sukamojo disko elektrodo

Šiame eksperimente buvo fiksuojamas SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla elektrodo srovės stipris vykstant gliukozės oksidacijai, kai Glu koncentracija tirpale yra pastovi, pH 7,3 fosfatiniame buferiniame tirpale, esant 0,0 V elektrodo potencialui, didinant elektrodo sukimosi greitį nuo 40 iki 2600 aps./min (38 pav., kairėje). Iš grafiko matyti, kad didinant elektrodo sukimosi greitį auga ir srovės stipris.

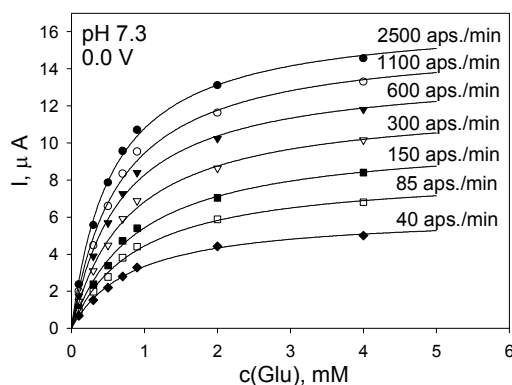
SDE naudojimas mokslininkams leido padidinti metodo jautrumą nustatamai analizei ir nustatyti vis mažesnius jos kiekius. Argentinos mokslininkai pasinaudodami sukamojo disko elektrodu nustatė Cis, koncentracijų ribose nuo 0,05 iki 90 μM ($R=0,998$), glutationą – 0,04 iki 90 μM ($R=0,999$) [132], ciprofloksaciną – 0,02 – 65 μM ($R=0,999$) [133]. Ciprofloksacinas yra chinolonų

grupės antibakterinis vaistas vartojamas kai kurioms bakterijų sukeltoms infekcinėms ligoms gydyti. Metodų aptikimo ribos, atitinkamai, lygios 0,7 nM, 0,3 nM [132], 0,4 nM [133]. Šių, ir ne tik, analičių mažų koncentracijų nustatymas yra svarbus analitiniu požiūriu.



38 pav. Katodinės srovės priklausomybė nuo elektrodo sukimosi kampinio greičio šaknies, kuri gauta SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla elektrodo patalpinus 0,1 M fosfatinį pH 7,3 tirpalą, elektrodo potencialas 0,0 V, naudojant skirtingas gliukozės koncentracijas (jos nurodytos) (kairėje) ir apdoroti duomenys atvirkštinėse koordinatėse pagal Koutecky-Levich lygtį (dešinėje).

38 pav. (dešinėje) vaizduoja apdorotus duomenis, gautus atvirkštinėse koordinatėse pagal Koutecky-Levich lygtį (8). Buvo gautos tiesės su gera koreliacija.



39 pav. SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutiklio atsako priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos esant skirtingiems elektrodo sukimosi greičiams (jis nurodyts). 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 7,3; elektrodo potencialas 0,0 V.

Iš gautų duomenų, naudojant sukamojo disko elektrodą buvo gautos biojutilio srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos esant skirtingiems elektrodo sukimosi greičiams (39 pav.).

8 lentelė. Gliukozės oksidacijos ant SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutiklio kinetiniai parametrai esant skirtingiems elektrodo sukimosi greičiams. Reakcija vykdyta 0,1 mM fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 7,3, elektrodo potencialas 0,0 V.

Elektrodo sukimosi greitis, aps./min	I_{\max} , μA^*	K_M^{tar} , mM*	Jautris, $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)^{**}$
40	6,158 ± 0,155	0,906 ± 0,079	55,55 ± 4,04
60	7,415 ± 0,204	0,901 ± 0,074	58,57 ± 4,70
85	8,441 ± 0,901	0,895 ± 0,061	65,70 ± 5,35
120	9,367 ± 0,314	0,888 ± 0,074	74,22 ± 6,07
150	10,337 ± 0,365	0,874 ± 0,074	80,60 ± 6,58
200	11,403 ± 0,378	0,844 ± 0,054	89,35 ± 7,37
300	12,205 ± 0,394	0,789 ± 0,066	102,13 ± 8,45
400	12,906 ± 0,383	0,734 ± 0,058	112,75 ± 9,26
600	13,902 ± 0,444	0,680 ± 0,059	127,89 ± 10,36
800	14,740 ± 0,447	0,661 ± 0,055	146,57 ± 14,21
1100	15,594 ± 0,471	0,652 ± 0,054	156,12 ± 15,24
1700	16,234 ± 0,404	0,611 ± 0,043	168,80 ± 16,52
2600	16,775 ± 0,325	0,557 ± 0,031	183,64 ± 17,87

* parametrai buvo gauti iš duomenų su gera koreliacija (R buvo 0,997-0,999 ribose).

** jautris buvo apskaičiuotas iš duomenų kur R buvo 0,995-0,998 riboje.

Didinat elektrodo sukimosi greitį mažėja difuzinio sluoksnio storis, todėl gerėja masės pernaša ant ir nuo imobilizuoto fermento aktyvaus centro. Iš kreivių apskaičiuotos tariamos Michaelio-Menten konstantos. Skaičiavimų duomenys pateikti 8 lentelėje. Kai elektrodo sukimosi greitis yra 2600 aps./min I_{\max} padidėja apie 4,5 karto, o Glu nustatymo jautris apie 3,5 karto lyginat duomenis gautus su nesukamu SAE/BM/0,4Chi-GOD-Gla biojutikliu. Nesukant biojutiklio apskaičiuota K_M^{tar} buvo 0,691 ± 0,076 mM, o esant 2600 aps./min nežymiai sumažėjo iki 0,557 ± 0,031 mM. Natyvaus GOD fermento iš *Asp. niger* Michaelio-Menten konstanta yra 22,6 mM. Naudojant sukamojo disko elektrodą

padidėjo metodo jautrumas nustatamai analitei (8 lentelė), sumažėjo gliukozės nustatymo riba nuo 0,36 iki 0,075 μM elektrodo sukimosi greičiui, atitinkamai, esant nuo 40 iki 2600 aps./min. Mažų Glu koncentracijų nustatymas yra svarbus, nes tokioms analizėms nereikalingas kraujas. Šiuo metu Glu nustatymui didžiausias jautris yra gautas 69,26 $\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$, GOD imobilizavimui naudojant chitozaną ir Au nanodaleles [116].

4. IŠVADOS

1. Stiklo anglies elektrodas, modifikuotas Berlyno mėlynuoju, pasižymi elektrokataliziniu aktyvumu vandenilio peroksido redukcinėje ir askorbato oksidacinėje reakcijose. Vandenilio peroksido katodinės redukcijos katalizė efektyviai vyksta plačiame elektrodo potencialo diapazone žemiau Berlyno mėlynojo redukcijos potencialo (apie 0,2 V pagal Ag/AgCl lyginamąjį elektrodą). Askorbato oksidacija ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto elektrodo vyksta esant 0,1 – 0,2 V žemesniame potenciale, lyginant su nemodifikuotu stiklo anglies elektrodu.
2. Esant mažai vandenilio peroksido koncentracijai (iki 0,3 mM), sukamojo disko elektrodo metodu nuo 0,1 iki –0,4 V potencialo ribose nustatyta kinetinė srovė yra apie du kartus didesnė pH 5,5 nei pH 7,3 fosfatiname buferiniame tirpale.
3. Esant santykinai didelei vandenilio peroksido koncentracijai (virš 0,6 mM), stebimi nukrypimai nuo Koutecky-Levich lygties galimai įrodo stadijinį vandenilio peroksido katodinės redukcijos mechanizmą ant Berlyno mėlynuoju modifikuoto elektrodo.
4. Vandenilio peroksido katodinės redukcijos metu Berlyno mėlynojo sluoksnis patiria intensyvius irimo procesus. Apskaičiuotos pseudo pirmojo laipsnio irimo greičio konstantos. pH 5,5 tirpale jos yra nuo $2,16 \cdot 10^{-3}$ iki $6,05 \cdot 10^{-3}$ min.^{-1} esant 0,0 V potencialui, o pH 7,3 visa eile didesnės.
5. Berlyno mėlynuoju modifikuotas stiklo anglies elektrodas panaudotas biojutiklio kūrime. Gliukozės oksidazė imobilizuota ant elektrodo paviršiaus chitozano ir glutaro aldehido pagalba. Nustatytas optimalus elektrodo potencialas, stabilumas, atrankumas. 3,5 karto padidintas biojutiklio jautris naudojant sukamojo disko elektrodą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] A. A. Karyakin, O. V. Gitelmacher, E. E. Karyakina. A high sensitive glucose amperometric biosensor based on Prussian Blue modified electrodes. *Anal. Lett.* 27 (1994) 2861-2869.
- [2] A. A. Karyakin, O. V. Gitelmacher, E. E. Karyakina. Prussian Blue-based first-generation biosensor. a sensitive amperometric electrode for glucose. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2419-2423.
- [3] A. Malinauskas, R. Araminaitė, G. Mickevičiūtė, R. Garjonytė. Evaluation of operational stability of Prussian blue- and cobalt hexacyanoferrate-based amperometric hydrogen peroxide sensors for biosensing application. *Mater. Sci. Eng. C* 24 (2004) 513-519
- [4] A. Malinauskas, G. Mickevičiūtė, R. Araminaitė, R. Garjonytė. Sensor Prussian-blue based hydrogen peroxide sensors: two types of ascorbate interference. *Chem. Anal. (Warsaw)* 51 (2006) 809-818.
- [5] J. Koryta, J. Dvorak, L. Kavan (1993) Principles of Electrochemistry, 2nd edn. *John Wiley & Sons*, England, pp 352-361.
- [6] C. M. A. Brett, A. M. O. Brett (1993) Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications. *Oxford University Press Inc.*, New York, pp 130-132.
- [7] J. O'M Bockris, A. K. N. Reddy, M. Gamboa-Aldeco (2002) Modern Electrochemistry. Fundamentals of Electronics, 2nd edn., vol. 2A, *Kluwer Academic Publishers*, New York, pp 1287-1289.
- [8] F. Scholz, A. Dostal. Die Formalpotentiale fester Metallhexacyanometallate, *Angew. Chem.* 107 (1995) 2876-2878.
- [9] H. Kahlert, U. Retter, H. Lohse, K. Siegler, F. Scholz. On the determination of the diffusion coefficients of electrons and of potassium ions in copper(II) hexacyanoferrate(II) composite electrodes. *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 8757-8765.
- [10] C. X. Cai, K. H. Xue, S. M. Xu. Electrocatalytic activity of a cobalt hexacyanoferrate modified glassy carbon electrode toward ascorbic acid oxidation. *J. Electroanal. Chem.* 486 (2000) 111-118.
- [11] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina. Electroanalytical applications of Prussian Blue and its analogs. *Russ. Chem. Bull.* 50 (2001) 1811-1817.
- [12] N. R. de Tacconi, K. Rajeshwar. Metal hexacyanoferrates: electrosynthesis, in situ characterization, and applications. *Chem. Mater.* 15 (2003) 3046-3062.
- [13] S.-M. Chen. Preparation, characterization, and electrocatalytic oxidation properties of iron, cobalt, nickel, and indium hexacyanoferrate. *J. Electroanal. Chem.* 521 (2002) 29-52.
- [14] S.M. Golabi, F. Noor-Mohammadi. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at cobalt hexacyanoferrate- modified glassy carbon, Pt and Au electrodes. *J. Solid State Electrochem.* 2 (1998) 30-37.
- [15] W. M. Costa, A. L. B. Marques, E. P. Marques, C. W. B. Bezerra, E. R. Sousa, W. S. Cardoso, C. Song, J. Zhang. Hydrazine oxidation catalyzed by ruthenium hexacyanoferrate-modified glassy carbon electrode. *J. Appl. Electrochem.* DOI 10.1007/s10800-009-0006-0

- [16] S.-M. Chen, C. J. Liao. Preparation and characterization of osmium hexacyanoferrate films and their electrocatalytic properties. *J. Electrochim. Acta* 50 (2004) 115-125.
- [17] A. V. Krylov, F. Lisdat. Nickel hexacyanoferrate-based sensor electrode for the detection of nitric oxide at low potentials. *Electroanalysis* 19 (2007) 23–29.
- [18] R. M. Wightmann, L. J. May, A. C. Michael, Detection of dopamine dynamics in the brain. *Anal. Chem.* 60 (1988) 769A-779A.
- [19] Z. Xun, C. Cai, T. Lu. Effects of a surfactant on the electrocatalytic activity of cobalt hexacyanoferrate modified glassy carbon electrode towards the oxidation of dopamine. *Electroanalysis* 16 (2004) 674-683.
- [20] W. Tao D. Pan, Y. Liu, L. Nie, S. Yao. Characterization and electrocatalytic properties of cobalt hexacyanoferrate films immobilized on Au-colloid modified gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 572 (2004) 109-117.
- [21] A. Kumar, S. M. Yusuf, L. Keller. Structural and magnetic properties of $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. *Phys. Rev. B* 71 (2005) 054414.
- [22] F. Herren, Fischer, A. Ludi, W. Halg. Neutron diffraction study of Prussian Blue $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Location of water molecules and long-range magnetic order'. *Inorg. Chem.* 19 (1980) 956-959.
- [23] V. D. Neff. Electrochemical oxidation and reduction of thin films of Prussian Blue. *J. Electrochem. Soc.* 125 (1978) 886–887.
- [24] K. Itaya, N. Shoji, I. Uchida. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian Blue modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3423-3429.
- [25] J. F. Keggin, F. D. Miles. Structures and formule of the Prussian Blues and related compounds. *Nature* 137 (1936) 577-578.
- [26] P. J. Kulesza, M. A. Malik, M. Berrettoni, M. Giorgetti, S. Zamponi, R. Schmidt, R. Marassi. Electrochemical charging, countercation accommodation, and spectrochemical identity of microcrystalline solid cobalt hexacyanoferrate. *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 1870-1876.
- [27] D. Ellis, M. Eckhoff, V. D. Neff. Electrochromism in the mixed-valence hexacyanides. 1. voltammetric and spectral studies of the oxidation and reduction of thin films of Prussian Blue. *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 1225-1231.
- [28] P. R. Bueno, D. Gimenez-Romero, C. Gabrielli, J. J. Garcia-Jareno, H. Perrot, F. Vicente. Changeover during in situ compositional modulation of hexacyanoferrate (Prussian Blue) material. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 17146-17152.
- [29] K. Itaya, H. Akahoshi, S. Toshima. Electrochemistry of Prussian Blue modified electrodes: an electrochemical preparation method. *J. Electrochem. Soc.* 129 (1982) 1498-1500.
- [30] K. Itaya, I. Uchida, V.D. Neff. Electrochemistry of polynuclear transition metal cyanides: Prussian Blue and its analogues. *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 162-168.
- [31] Y. Zou, L. Sun, F. Xu. Prussian Blue electrodeposited on MWNTs–PANI hybrid composites for H_2O_2 detection. *Talanta* 72 (2007) 437-442.
- [32] H. Kahlert, S. Komorsky-Lovric, M. Hermes, F. Scholz. A Prussian Blue-based reactive electrode (reactrode) for the determination of thallium ions. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 356 (1996) 204-208.

- [33] F. Ricci, G. Palleschi. Review. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors&Bioelectronics* 21 (2005) 389–407.
- [34] K. Itaya, T. Ataka, S. Toshima. Spectroelectrochemistry and electrochemical preparation method of Prussian Blue modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4767-4772.
- [35] A.A. Karyakin, Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis* 13 (2001) 813-819.
- [36] R. Garjonytė, A. Malinauskas. Electrocatalytic reactions of hydrogen peroxide at carbon paste electrodes modified by some metal hexacyanoferrates. *Sensors&Actuators B* 46 (1998) 236-241.
- [37] D. Moscone, D. D'Ottavi, D. Compagnone, G. Palleschi, A. Amine. Construction and analytical characterization of Prussian Blue based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Anal. Chem.* 73 (2001) 2529-2535.
- [38] F. Ricci, C. Goncales, A. Amine, L. Gorton, G. Palleschi, D. Moscone. Electroanalytical study of Prussian Blue modified glassy carbon paste electrodes. *Electroanalysis* 15 (2003) 1204-1211.
- [39] F. Ricci, A. Amine, C. S. Tuta, A. A. Ciucu, F. Lucarelli, G. Palleschi, D. Moscone. Prussian Blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability. *Anal. Chim. Acta.* 485 (2003) 111-120.
- [40] F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosensors&Bioelectronics* 18 (2003) 165-174.
- [41] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta* 43 (1996) 1597-1606.
- [42] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton. The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. *J. Electroanal. Chem.* 456 (1998) 97-104.
- [43] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 78-82.
- [44] Y. Zhang and G. S. Wilson. Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors. *J. Electroanal. Chem.* 345 (1993) 253-271.
- [45] A. A. Karyakin. Review. Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis* 13 (2001) 813-819.
- [46] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, Amperometric biosensor for glutamate using Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide. *Anal. Chem.* 72 (2000) 1720-1723.
- [47] R. Garjonytė, A. Malinauskas. Electrocatalytic reactions of hydrogen peroxide at carbon paste electrodes modified by some metal hexacyanoferrates. *Sensors&Actuators B* 46 (1998) 236-241.
- [48] A.A. Karyakin, E.E Karyakina. Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors. *Sensors&Actuators B* 57 (1999) 268-273.

- [49] M. P. O'Halloran, M. Pravda, G. G. Guilbault. Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors. *Talanta* 55 (2001) 605-611.
- [50] L. V. Lukachova, E. A. Kotelnikova, D. D'Ottavi, E. A. Shkerin, E. E. Karyakina, D. Moscone, G. Palleschi, A. Curulli, A. A. Karyakin. Electrosynthesis of poly-o-diaminobenzene on the Prussian Blue modified electrodes for improvement of hydrogen peroxide transducer characteristics. *Bioelectrochem.* 55 (2002) 145-148.
- [51] B. Haghghi, S. Varma, F. M. Alizadeh Sh., Y. Yigzaw, L. Gorton. Prussian blue modified glassy carbon electrodes - study on operational stability and its application as a sucrose biosensor. *Talanta* 64 (2004) 3-12.
- [52] E. A. Puganova, A.A. Karyakin. New materials based on nanostructured Prussian blue for development of hydrogen peroxide sensors. *Sensors&Actuators B* 109, 167 (2005) 167-170.
- [53] F. Riccia, D. Moscone, C. S. Tuta, G. Palleschi, A. Amine, A. Poscia, F. Valgimigli, D. Messeri. Novel planar glucose biosensors for continuous monitoring use. *Biosensors&Bioelectronics* 20 (2005) 1993-2000.
- [54] P. C. Pandey, B. Singh, R.C. Boro, C.R. Suri. Chemically sensitized ormosil-modified electrodes - Studies on the enhancement of selectivity in electrochemical oxidation of hydrogen peroxide. *Sensors&Actuators B* 122 (2007) 30-41.
- [55] Y. Zou, L. X. Sun, F. Xu. Biosensor based on polyaniline-Prussian Blue/multi-walled carbon nanotubes hybrid composites. *Biosensors&Bioelectronics* 22 (2007) 2669-2674.
- [56] A. M. Gurban, T. Noguier, C. Bala, L. Rotariu. Improvement of NADH detection using Prussian blue modified screen-printed electrodes and different strategies of immobilisation. *Sensors&Actuators B*, 128 (2008) 536-544.
- [57] D. Stilwell, K.H. Park, M.H. Miles. Electrochemical studies of the factors influencing the cycle stability of Prussian Blue films. *J. Appl. Electrochem.* 22 (1992) 325-331.
- [58] R. Garjonytė, A. Malinauskas. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(*o*-phenylenediamine) layer. *Sensors&Actuators B* 56 (1999) 85-92.
- [59] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 78-82.
- [60] F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosensors&Bioelectronics* 18 (2003) 165-174.
- [61] M. S. Lin, W. C. Shih. Chromium hexacyanoferrate based glucose biosensor. *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 183-189.
- [62] R. Vittal, Kang-Jin Kim, H. Gomathi, V. Yegnaraman. CTAB-Promoted Prussian Blue-Modified Electrode and Its Cation Transport Characteristics for K⁺, Na⁺, Li⁺, and NH₄⁺ Ions. *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 1149-1156.
- [63] A. Garscia-Jareno, J. Navarro-Laboulais, F. Vincente. Electrochemical study of Nafion membranes/Prussian Blue films on ITO electrodes. *Electrochim. Acta* 41 (1996) 2675-2682.

- [64] K.-C. Pan, C.-S. Chuang, S.-H. Cheng, Y. O. Su. Electrocatalytic reactions of nitric oxide on Prussian blue film modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 501 (2001) 160-165.
- [65] K. Ogura, M. Higasa, J. Yano, N. Endo. Electroreduction of CO₂ to C₂ and C₃ compounds on bis(4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulphonato)ferrate(II)-fixed polyaniline/Prussian Blue-modified electrode in aqueous solutions. *J. Electroanal. Chem.* 379 (1994) 373-377.
- [66] H. Zhao, Y. Yuan, S. Adeloju, G.G. Wallace. Study on the formation of the Prussian blue films on the polypyrrole surface as a potential mediator system for biosensing applications. *Anal. Chim. Acta* 472 (2002) 113-121.
- [67] K.-C. Ho, C.-Y. Chen, H.-C. Hsu, L.-C. Chen, S.-C. Shiesh, X.-Z. Lin. Amperometric detection of morphine at a Prussian blue-modified indium tin oxide electrode, *Biosensors&Bioelectronics* 20 (2004) 3-8.
- [68] W. Hou, E. Wang. Liquid chromatography with electrocatalytic detection of cysteine, N-acetylcysteine, and glutathione by a Prussian blue modified electrode. *J. Electroanal. Chem.* 316 (1991) 155-163.
- [69] L.-C. Chen, K.-C. Ho. Multimode optoelectrochemical detection of cysteine based on an electrochromic Prussian blue electrode. *Sensors&Actuators B* 130 (2008) 418-424.
- [70] E. Wilkins, M. Carter, J. Voss, D. Ivnitski. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents. *Electrochem. Commun.* 2 (2000) 786-790.
- [71] F. Ricci, F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, G. Palleschi. Characterisation of Prussian Blue modified screen printed electrodes for thiol detection. *J. Electroanal. Chem.* 563 (2004) 229-237.
- [72] S. P. Arya, M. Mahajan, P. Jain, Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 1-14.
- [73] A. M. Hossu, V. Magearu. Determination of vitamin C in pharmaceutical products with physico-chemical and bioanalytical technics. *Rouman. Biotech. Lett.* 9 (2004) 1497-1504.
- [74] K. G. Kumar, P. Indrasenan. Titrimetric methods for the determination of vitamin C in some pharmaceutical preparations by use of two N-bromimides. *Talanta* 37 (1990) 269-271.
- [75] K. K. Verma. Determination of ascorbic acid with o-iodosobenzoate Analysis of mixtures of ascorbic acid with methionine and cysteine or glutathione. *Talanta* 29 (1982) 41-45.
- [76] M. H. Pournaghi-Azar, R. Ojani. A selective catalytic voltammetric determination of vitamin C in pharmaceutical preparations and complex matrices of fresh fruit juices. *Talanta* 44 (1997) 297-303.
- [77] S. Feng, X. Chen, J. Fan, G. Zhang, J. Jiang, X. Wei. Kinetic Determination of Ultratrace Amounts of Ascorbic Acid with Spectrofluorimetric Detection. *Anal. Lett.* 31 (1998) 463-474.
- [78] X. Hu, Z. Leng. Determination of L-Ascorbic Acid by Adsorption Potentiometry with Carbon Paste Electrode. *Anal. Lett.* 28 (1995) 2263-2274.

- [79] J. Lie, M. Hu, R. Yu. Pressed-pellet solid potentiometric sensor for ascorbic acid based on derivatives of cobalt(II) phthalocyanine doped with iodine. *Sens. Actuators B* 30 (1996) 65-69.
- [80] W. Qin, Z. J. Zhang, H. H. Chem. Highly sensitive chemiluminescence flow sensor for ascorbic acid. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 861-863.
- [81] A.V. Pereira, O. Fatibello-Filho. Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate. *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 55-62.
- [82] J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota. Use of column with modified silica for interfering retention in a FIA spectrophotometric method for direct determination of vitamin C in medicine. *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 11-22.
- [83] H.R. Kim, P.A. Seib. Assay of l-ascorbic 2-monophosphate in aquaculture feeds by high-performance anion-exchange chromatography with conductivity detection. *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 141-145.
- [84] H. Iwase, I. Ono. Determination of ascorbic acid in food by column liquid chromatography with electrochemical detection using eluent for pre-run sample stabilization. *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 361-364.
- [85] D.H. Craston, C. P. Jones, N. E. Murr, D. E. Williams. Microband electrodes fabricated by screen printing processes: application in electroanalysis. *Talanta* 38, (1991) 17-26.
- [86] Y.-S. Fung, S.-Y. Mo. Application of square-wave voltammetry for the determination of ascorbic acid in soft drinks and fruit juices using a flow-injection system. *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 375-380.
- [87] S. Uchiyama, Y. Umetsu. Concentration-step amperometric sensor of L-ascorbic acid using cucumber juice. *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 53-57.
- [88] J.-J. Sun, D.-M. Zhou, H.-Q. Fang, H.-Y. Chen. The electrochemical copolymerization of 3,4-dihydroxybenzoic acid and aniline at microdisk gold electrode and its amperometric determination for ascorbic acid. *Talanta* 45 (1998) 851-856.
- [89] A. M. Almuaibed, A. Townshend. Individual and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid by flow injection analysis. *Talanta* 39 (1992) 1459-1462.
- [90] L. E. Leon. Amperometric flow-injection method for the assay of L-ascorbic acid based on the photochemical reduction of Methylene Blue. *Talanta* 43 (1996) 1275-1279.
- [91] M. Arvand, S. Sohrabnezhad, M. F. Mousavi, M. Shamsipur, M. A. Zanjanchi. Electrochemical study of methylene blue incorporated into mordenite type zeolite and its application for amperometric determination of ascorbic acid in real samples. *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 193-201.
- [92] M. Cheregi, A. F. Danet. Flow Injection Determination Of L-Ascorbic Acid in Natural Juice with Biamperometric Detection. *Anal. Lett.* 30 (1997) 2625-2640.
- [93] S. S. L. Castro, V. R. Balbo, P. J. S. Barbeira, N.R. Stradiotto. Flow injection amperometric detection of ascorbic acid using a Prussian Blue film-modified electrode. *Talanta* 55 (2001) 249-254.

- [94] R. Pauliukaitė, M. E. Ghica, C. M. A. Brett. A new, improved sensor for ascorbate determination at copper hexacyanoferrate modified carbon film electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 972-978.
- [95] D. R. Shankaran, S. S. Narayanan. Characterization and application of an electrode modified by mechanically immobilized copper hexacyanoferrate. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 686-689.
- [96] M. H. Pournaghi-Azar, H. Razmi-Nerbin. Voltammetric behaviour and electrocatalytic activity of the aluminum electrode modified with nickel and nickel hexacyanoferrate films, prepared by electroless deposition. *J. Electroanal. Chem.* 456, (1998) 83-90.
- [97] A. Armanavičius. Elektrai laidūs polimerai elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose. *VU leidykla*, Vilnius, 2006.
- [98] K. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann. Electron transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 560-568.
- [99] R. Garjonyte, Y. Yigzaw, R. Meskys, A. Malinauskas, L. Gorton. Prussian Blue- and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid. *Sensors & Actuator B*, 79 (2001) 33-38.
- [100] J. Chen, A. K. Burrell, G. E. Collis, D. L. Officer, G. F. Swiegers, C. O. Too, G. G. Wallance. Preparation, characterisation and biosensor application of conducting polymers based on ferrocene substituted thiophene and terthiophene. *Electrochim. Acta* 47 (2002) 2715-2724.
- [101] W. Schuhmann, C. Kranz, J. Huber, H. Wohlschlagel. Conducting polymer-based amperometric enzyme electrodes-towards the development of miniaturized reagentless biosensors. *Synth. Met.* 61 (1993) 35-61.
- [102] M. Ferreira, P. A. Fiorito, O. N. Oliveira, Jr. and S. I. C. de Torresi. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors & Bioelectronics* 19 (2004) 1611-1615.
- [103] Y. Xian, Y. Hu, F. Liu, Y. Xian, L. Feng, L. Jin. Template synthesis of highly ordered Prussian blue array and its application to the glucose biosensing. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 2827-2833.
- [104] D. Pan, J. Chen, L. Nie, W. Tao, S. Yao. Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized *o*-aminophenol film at Prussian blue-modified platinum electrode. *Electrochim. Acta* 49 (2004) 795-801.
- [105] J. Li, X. Lin. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly(*o*-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 2898-2905.
- [106] R. Garjonytė, A. Malinauskas. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(*o*-phenylenediamine) layer. *Sensors & Actuator B*, 56 (1999) 85-92.
- [107] C. Deng, M. Li, Q. Xie, M. Liu, Y. Tan, X. Xu, S. Yao. New glucose biosensor based on a poly(*o*-phenylenediamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications. *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 85-94.

- [108] A. L. Ghindilis, P. Atanasov, E. Wilkins. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis* 9 (1997) 661-673.
- [109] J. J. Gooding, P. Erokhin, D. Losic, W. Yang, V. Policarpio, J. Liu, F. M. Ho, M. Situmorgan, D. B. Hibbert, J. G. Shapter. Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. *Anal. Sci.* 17 (2002) 3-9.
- [110] I.-J. Yi, J.-H. Kim, Y.J. Choi, C.J. Kang, Y.-S. Kim. A disposable biosensor with Prussian blue deposited electrode. *Microelectro. Enginner.* 83 (2006) 1594-1597.
- [111] J.-C. Vidal, J. Espuelas, E. Garcia-Ruiz, J.-R. Castillo. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta* 64 (2004) 655-664.
- [112] S. D. Luca, M. Florescu, M. E. Ghica, A. Lupu, G. Palleschi, C. M. A. Brett, D. Compagnone. Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis. *Talanta* 68 (2005) 171-178.
- [113] I. L. de Mattos, L. Gorton, T. Laurell, A. Malinauskas, A. A. Karyakin. Development of biosensors based on hexacyanoferrates. *Talanta* 52 (2000) 791-799.
- [114] X.-C. Tan, Y.-X. Tian, P.-X. Cai, X.-Y. Zou. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in sol-gel chitosan/silica hybrid composite film on Prussian blue modified glass carbon electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 500-507
- [115] K. Derwinska, K. Miecznikowski, R. Koncki, P. J. Kulesza, S. Glab, M. A. Malik. Application of Prussian Blue based composite film with functionalized organic polymer to construction of enzymatic glucose biosensor. *Electroanalysis* 15 (2003) 1843-1849.
- [116] M.-H. Xue, Q. Xu, M. Zhou, J.-J. Zhu. In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection. *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1468-1474.
- [117] T. Li, Z. Yao, L. Ding. Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol-gel film onto Prussian Blue modified electrode. *Sensors&Actuators B* 101 (2004) 155-160.
- [118] I. L. de Mattos, M. C. da Cunha Areias. Automated determination of glucose in soluble coffee using Prussian Blue-glucose oxidase-Nafion® modified electrode. *Talanta* 66 (2005) 1281-1286.
- [119] G. M. Jenkins, K. Kawamura. Structure of Glassy Carbon. *Nature* 231 (1971) 175-176.
- [120] D. Mickevičius. Cheminės analizės metodai. Elektrocheminė ir chromatografinė analizė. 2 dalis, *Žiburys*, Vilnius, 1999.
- [121] F. Li, S. Dong. The electrocatalytic oxidation of ascorbic acid on prussian blue film modified electrodes. *Electrochim. Acta* 32 (1987) 1511-1513.
- [122] M. H. Pournaghi-Azar, F. Ahour. Electrochemical reduction and kinetics of hydrogen peroxide on the rotating disk palladium-plated aluminum electrode modified by Prussian blue film as an improved electrocatalyst. *J. Solid State Electrochem.* DOI 10.1007/s10008-009-0860-z.

- [123] A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. 2nd ed., Wiley, New York, **2001**, pp. 331-367.
- [124] A. Damjanovic, in: J. O'M. Bockris, B. E. Conway (Eds.). *Modern Aspects of Electrochemistry*, vol. 4, Plenum Press, New York, **1969**.
- [125] A. Malinauskas, R. Garjonytė, R. Mažeikienė, J. Jurevičiūtė. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. *Talanta* 64 (**2004**) 121-129.
- [126] Z. Galus. *Fundamentals of Electrochemical Analysis*. 2nd edn. Ellis Horwood, Chichester, **1994**.
- [127] Y. H. Yang, M. H. Yang, J. H. Jiang, G. L. Shen, R. Q. Yu. A Novel Biomolecular Immobilization Matrix Based on Nanoporous ZnO/Chitosan Composite Film for Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor. *Chin. Chem. Lett.* 16 (**2005**) 951-954.
- [128] J. Zhu, Z. Zhu, Z. Lai, R. Wang, X. Guo, X. Wu, G. Zhang, Z. Zhang, Y. Wang Z. Chen. Planar Amperometric Glucose Sensor Based on Glucose Oxidase Immobilized by Chitosan Film on Prussian Blue Layer. *Sensors* 2 (**2002**) 127-136.
- [129] Y. Wang, J. Zhu, R. Zhu, Z. Zhu, Z. Lai Z. Chen, Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Meas. Sci. Technol.* 14 (**2003**) 831-836.
- [130] H. J. Bright, M. Appleby. The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. *J. Biol. Chem.* 244 (**1969**) 3625-34.].
- [131] Y. Zoua, C. Xiang, L. Suna, F. Xua. Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique. *Electrochim. Acta* 53 (**2008**) 4089-4095.
- [132] J. J. J. Ruiz-Diaz, A. A. J. Torriero, E. Salinas, E. J. Marchevsky, M. I. Sanz, J. Raba. Enzymatic rotating biosensor for cysteine and glutathione determination in a FIA system. *Talanta* 68 (**2006**) 1343-1352.
- [133] A. A. J. Torriero, J. J. J. Ruiz-Diaz, E. Salinas, E. J. Marchevsky, M. I. Sanz, J. Raba. Enzymatic rotating biosensor for ciprofloxacin determination. *Talanta* 69 (**2006**) 691-699.