

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.668>

<https://orcid.org/0009-0005-8143-6061>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Laura Sakalauskienė

Nanostruktūrų taikymas gliukozės biologiniuose jutikliuose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Chemija (N 003)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019 – 2023 metais Vilniaus Universitete Chemijos ir geomokslų fakultete.

Mokslinė vadovė – Prof. dr. Almira Ramanavičienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003)

Nariai:

Doc. dr. Lina Mikoliūnaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003)

Doc. dr. Inga Morkvėnaitė-Vilkončienė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003)

Prof. dr. Evaldas Naujalis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003),

Dr. Germanas Peleckis (Wollongong universitetas, Australija, gamtos mokslai, chemija – N 003)

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. spalio mėn. 4 d. 14 val. Vilniaus universiteto, chemijos ir geomokslų fakulteto, neorganinės chemijos auditorijoje. Adresas: Naugarduko g. 24, 141(NChA), Vilnius, Lietuva. tel. +370 5 219 3105; el. paštas info@chgf.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.668>

<https://orcid.org/0009-0005-8143-6061>

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

Laura Sakalauskienė

Application of Nanostructures in Glucose Biosensors

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Chemistry (N 003)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 Vilnius University, Faculty of Chemistry and Geosciences.

Academic supervisor – Prof. Dr. Almira Ramanavičienė (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Lina Mikoliunaite (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003),

Assoc. Prof. Dr. Inga Morkvėnaitė-Vilkončienė (Centre for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry– N 003),

Prof. Dr. Evaldas Naujalis (Vilnius University, Natural sciences, Chemistry, N 003),

Dr. Germanas Peleckis (University of Wollongong, Australia, Natural Sciences, Chemistry - N 003)

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14.00 on 4th october 2024 in the Inorganic chemistry auditorium of Vilnius University, Faculty of Chemistry and Geosciences.

Address: Naugarduko st. 24, 141(NChA), Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 5 219 3105; e-mail: info@chgfvu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, and the library of Center for Physical sciences and Technology, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei, prof. dr. Almirai Ramanavičienei, už neįkainojamą pagalbą, vertingus patarimus ir nuolatinį palaikymą rengiant šį darbą, skatinimą nepalūžti ir palaikymą sunkiais mokslinio darbo etapais, už geranoriškumą, bei supratingumą. Dėkoju už Jūsų kantrybę, skirtą laiką ir atsidavimą, kurie buvo nepakeičiami šiame kelyje.

Noriu padėkoti visiems Vilniaus Universiteto Chemijos ir Geomokslų fakulteto Analizinės ir aplinkos chemijos katedros Nanotechnas – Nanotechnologijų ir medžiagotyros centro kolegoms, už suteiktas išskirtines galimybes ir palaikymą, už draugiškumą, profesionalumą ir nuolatinę pagalbą doktorantūros studijų metu.

Ir galiausiai noriu padėkoti, mano mylimai šeimai, už jų begalinę kantrybę, meilę ir supratimą šios reiklios akademinės kelionės metu.

SANTRUMPOS

- AC – acetatinis buferinis tirpalas
- Ag – sidabras
- AuND – aukso nanodalelės
- AuNS – aukso nanostruktūros
- AuNS/BM – aukso nanostruktūros modifikuotos Berlyno mėliu
- AuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas aukso nanostruktūromis
- BAE – biologinis atpažinimo elementas
- BB – Berlyno baltasis
- BM – Berlyno mėlis
- BM/AuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas aukso nanostruktūromis ir Berlyno mėliu
- DAuNS – dendritinės aukso nanostruktūros
- EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimido hidrochloridas
- EPT – elektronų pernašos tarpininkas
- FAD – flavino adenino dinukleotidas
- FBT – fosfatinis buferinis tirpalas
- FE-SEM – aukštos raiškos skenuojantis elektroninis mikroskopas su lauko emisijos šaltiniu
- FMS – N-metilfenazino metosulfatas
- GA – glutaro aldehidas
- GA-GOx-SAM/DAuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas aukso nanostruktūromis, savitvarkiu monosluoksniu, kovalentiškai imobilizuota bei GA garais surišta gliukozės oksidaze
- Glu – gliukozė
- GOx – gliukozės oksidazė
- GOx/DAuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas dendritinėmis aukso nanostruktūromis ir gliukozės oksidaze
- GOx-SAM/DAuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas dendritinėmis aukso nanostruktūromis, savitvarkiu monosluoksniu ir kovalentiškai imobilizuota gliukozės oksidaze
- GS – grafito strypelio elektrodas
- $I_{\max}$ – maksimalus srovės stipris
- $K_M^{\text{tar.}}$ – tariamoji Michaelio konstanta
- Nf-GOx/BM/AuNS/GS – grafito strypelio elektrodas modifikuotas aukso nanostruktūromis, Berlyno mėliu, gliukozės oksidaze ir nafionu

- Nf – nafionas
- NHS – N-hidroksisukcinimidas
- Pt – platina
- SAM – savitvarkis monosluoksnis (angl. *self-assembled monolayer*)
- 11-MUR – 11-merkaptoundekano rūgštis

TURINYS

PADĖKA.....	5
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS.....	10
LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1 Cukrinis diabetas ir gliukozės koncentracijos stebėjimas	13
1.2 Biologiniai jutikliai.....	15
1.3 Amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai	16
1.4 Gliukozės oksidazė.....	19
1.5 Fermentų imobilizavimo metodai bei jų įtaka registruojamam elektrocheminiam signalui	20
1.6 Elektronų pernašos tarpininkai bei jų savybės	21
1.7 Aukso nanostruktūros bei jų panaudojimas gliukozės biologiniuose jutikliuose	22
1.8 Berlyno mėlis	24
2 EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA	26
2.1 Medžiagos ir reagentai	26
2.2 Elektrocheminių tyrimų metu naudoti prietaisai ir programinė įranga ..	27
2.3 Grafito strypelio elektrodo paviršiaus paruošimas	27
2.4 Elektrocheminiai AuNS sintezės būdai GS elektrodų paviršiuje	28
2.5 Elektrocheminė Berlyno mėlio sintezė.....	28
2.6 GOx imobilizavimo metodai indikatorinio DAuNS/GS elektrodo paviršiuje	29
2.7 GOx imobilizavimo metodai indikatorinio BM/AuNS/GS elektrodo paviršiuje	30
2.8 Amperometriniai matavimai.....	30
2.9 Elektrochemiškai aktyvaus GS elektrodo paviršiaus įvertinimas.....	31
TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	32
3. Gliukozės biologinis jutiklis, naudojant GS elektrodą modifikuotą DAuNS ir GOx.....	32

3.1 Optimalių sąlygų parinkimas gliukozės biologinio jutiklio veikimui	33
3.3 Analizinio signalo pakartojamumo tyrimas.....	42
3.4 Priemaišų įtaka analiziniam signalui ir substratinis atrankumo tyrimas	44
3.5 Biologinio jutiklio taikymas gliukozės nustatymui žmogaus serumo mėginyje	45
3.6 Sukurtų gliukozės biologinių jutiklių stabilumo tyrimas	46
4. Bereagentis gliukozės biologinis jutiklis naudojant GS elektrodą modifikuotą AuNS, BM ir GOx	48
4.1 Optimalių bereagenčio gliukozės biologinio jutiklio veikimo sąlygų parinkimas	49
4.2 AuNS ir BM/AuNS nanokompozitų elektrochemiškai susintetintų GS elektrodo paviršiuje charakterizavimas	52
4.3 Sukurto biologinio jutiklio analizinių charakteristikų tyrimai	53
4.4 Nf-GOx/BM/AuNS/GS savybių tyrimas.....	55
4.5 H ₂ O ₂ nustatymas naudojant elektrodą modifikuotą BM/AuNS/GS.....	58
4.6 Sukurto biologinio jutiklio taikymas gliukozės nustatymui žmogaus kraujo serumo mėginyje	59
IŠVADOS.....	60
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	61
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	70
PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS	70
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	71
SUMMARY	72

IVADAS

Cukrinis diabetas (lot. diabetes mellitus) yra plačiai paplitusi ir sunki lėtinė liga. Šiai būklei būdinga padidėjusi gliukozės koncentracija kraujyje dėl organizmo nesugebėjimo gaminti ar efektyviai panaudoti insulino. Tarptautinės diabeto federacijos duomenimis, pasaulyje cukriniu diabetu serga daugiau nei 537 milijonai žmonių. Prognozuojama, kad iki 2030 m. diabetu sirgs 643 milijonai žmonių, o tendencijai tęsiantis iki 2045 m. šis skaičius gali išaugti iki 783 mln. [1]. Nuolatinis šios ligos plitimas kelia nerimą, nes su cukrinio diabeto diagnoze siejamos tokios komplikacijos kaip širdies ir kraujagyslių ligos, inkstų nepakankamumas, neuropatija ir retinopatija. Ankstyva ligos diagnostika, gliukozės koncentracijos nustatymas ir nuolatinis stebėjimas yra gyvybiškai svarbūs norint valdyti ligą bei užkirsti kelią komplikacijoms ir pagerinti tokių pacientų gyvenimo kokybę. Tiksliai diagnozė leidžia sudaryti veiksmingus gydymo planus, kurie gali sušvelninti ilgalaikius cukrinio diabeto padarinius ir padėti palaikyti bendrą pacientų sveikatos būklę.

Diabetu sergantiems pacientams buvo sukurti įvairūs gliukozės koncentracijos biologiniuose skysčiuose nustatymo metodai, kurių kiekvienas suteikia unikalią naudą. Iš šių analizės metodų labiausiai išskiriami optiniai ir elektrocheminiai. Optiniai metodai, tokie kaip artimoji ir pagrindinė infraraudonųjų spindulių spektroskopija, Ramano spektroskopija ar fluorescenciniai metodai, leidžia atlikti neinvazinį gliukozės nustatymą ir nuolatinį stebėjimą. Šie metodai panaudoja šviesos sąveiką su gliukozės molekulėmis ir gaunami išmatuojami signalai, o tai suteikia pranašumą pacientų patogumo ir integravimo į nešiojamus prietaisus požiūriu. Vis dėlto, iki šiol labiausiai paplitę yra invaziniai ar minimaliai invaziniai elektrocheminiai metodai, kurių veikimui būtinas kapiliarinio kraujo lašas gaunamas pradūrus pirštą arba naudojant poodinę ploną adatą. Ypatinę vietą gliukozės nustatyme elektrocheminiais metodais užima fermentiniai gliukozės biologiniai jutikliai, kur naudojama gliukozės oksidazė (GOx). Tokių jutiklių populiarumą lėmė kelios pagrindinės savybės: jų paprastumas, didelis jautris, puikus atankumas, platus gliukozės koncentracijos nustatymo diapazonas, galimybė atlikti matavimus spalvotuose ir drumstuose tirpaluose, maža gliukozės aptikimo riba ir patraukli kaina. Tokiais jutikliais galima lengvai nustatyti kliniškai svarbias gliukozės koncentracijas, nepaisant kitų kraujyje esančių pašalinių ar elektrochemiškai aktyvių medžiagų.

Nanotechnologijos vis labiau integruojamos į įvairias žmonių gyvenimo sritis ir į analizei skirtus prietaisus, tame tarpe ir į fermentinius skirtingų kartų gliukozės amperometrinius jutiklius. Tarp skirtingų nanomedžiagų aukso

nanosruktūros (AuNS) užima ypatingą vietą. Integruojant AuNS į fermentinius gliukozės biologinius jutiklius, dėl unikalių AuNS savybių galima ne tik sustiprinti analizinį signalą, sutrumpinti analizės trukmę, pagerinti gliukozės aptikimo ribą, bet ir prailginti biologinio jutiklio veikimo trukmę dėl nanomedžiagų biosuderinamumo ir padidėjusio fermento stabilumo. Daugumos elektrocheminių gliukozės biologinių jutiklių veikimui papildomai yra reikalingas elektronų pernašos tarpininkas (EPT), kuris turi būti tirpale matavimų metu. Daug pažangesni ir patrauklesni praktiniam taikymui yra bereagenčiai gliukozės biologiniai jutikliai, kai visos analizei reikalingos medžiagos yra integruotos ant elektrodo. Šiam tikslui galima sėkmingai panaudoti Berlyno mėlį (BM) bei kitas elektrochemiškai aktyvias medžiagas elektrodo modifikavimui ir gliukozės nustatymui. Taigi, panaudojant pažangias nanomedžiagas, naujus technologinius sprendimus ir skirtingas gliukozės nustatymo strategijas tobulinami ir kuriami įvairūs amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai.

Šių tyrimų metu buvo sukurta inovatyvi dendritinių aukso nanosruktūrų (DAuNS) ir grafito strypelio (GS) elektrodo sistema. Elektrocheminė DAuNS sintezė ant GS elektrodo pagerina jutiklių veikimą, lyginant su tradiciniais metodais, kai nėra DAuNS. Šie tyrimai pabrėžia gliukozės oksidazės imobilizavimo ant DAuNS metodo parinkimo svarbą, siekiant gauti didesnę jautrį nustatant gliukozę ir pagerinti elektrodo stabilumą. Tokio tipo gliukozės biologinis jutiklis sėkmingai veikia elektrocheminėje celėje esant EPT N-metilfenazino metosulfato (FMS). Sukurtas ir charakterizuotas bereagentis biologinis jutiklis veikiantis naudojant GS modifikuotą AuNS, BM ir GOx. Toks elektrodo modifikavimo derinys leido pasiekti dar žemesnę gliukozės aptikimo ribą ir gerą signalo pakartojamumą. Šis tyrimas pabrėžia GS elektrodo modifikavimo su AuNS ir BM svarbą, siekiant sukurti itin jautresius bereagenčius gliukozės biologinius jutiklius.

DARBO TIKSLAS

Sukurti fermentinius biologinius jutiklius tinkamus elektrocheminiam gliukozės nustatymui, taikant skirtingas gliukozės nustatymo strategijas bei panaudojant DAuNS, AuNS ir Berlyno mėlį (BM).

DARBO UŽDAVINIAI

1. Sukurti elektrocheminį gliukozės biologinį jutiklį, panaudojant DAuNS ir parenkant geresnį GOx imobilizavimo metodą, jautriam gliukozės nustatymui, naudojant tirpų elektronų pernašos tarpininką N-metilfenazino metosulfatą.
2. Sukurti bereagentį elektrocheminį gliukozės biologinį jutiklį, panaudojant AuNS ir BM.

DARBO GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Elektrocheminio gliukozės biologinio jutiklio veikimas priklauso nuo metodo pasirinkto GOx imobilizavimui ant GS elektrodo modifikuoto DAuNS. Didžiausias analizinis signalas ir mažiausia gliukozės aptikimo riba pasiekiami naudojant kelių fermento imobilizavimo metodų kombinaciją: kovalentinį GOx imobilizavimą ant savitvarkio monosluoksniu (SAM) ir papildomą kryžminį kovalentinį sujungimą, panaudojant glutaro aldehido (GA) garus.
2. GS elektrodas elektrochemiškai modifikuotas AuNS ir BM gali būti sėkmingai panaudotas konstruojant bereagentį fermentinį gliukozės biologinį jutiklį.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Cukrinis diabetas ir gliukozės koncentracijos stebėjimas

Gliukozės koncentracijos įvertinimas yra svarbus maisto ir gėrimų kokybės bei fermentacijos procesų kontrolei, taip pat klinikinėje medicinoje, vertinant paciento sveikatos būklę. Padidėjęs cukraus kiekis žmonių mityboje yra susijęs su daugeliu lėtinių sveikatos problemų, įskaitant širdies ir kraujagyslių ligas (širdies nepakankamumą, insultą ar širdies priepuolį), 2 tipo diabetą, miego apnėją, metabolinį sindromą ir nutukimą [2]. Gliukozės koncentracija žmogaus kraujyje yra vienas iš esminių rodiklių cukrinio diabeto diagnostikoje. Įprastai gliukozės koncentracija kraujyje svyruoja nuo 4,4 iki 6,6 mmol L⁻¹ [2,3]. Skaičiuojama, kad diabetas nustatytas 537 milijonams suaugusiųjų visame pasaulyje, kurie yra tarp 20 ir 79 metų amžiaus. Prognozuojama, kad iki 2030 metų cukriniu diabetu sirgs 643 milijonai žmonių visame pasaulyje, o iki 2045 metų šis skaičius išaugs iki 783 milijonų [4]. Tai rodo, kad cukrinis diabetas tampa vis didesne sveikatos problema pasaulyje ir pabrėžia būtinybę imtis efektyvių priemonių šioje srityje.

Gliukozė – monosacharidas, kuris yra gyvybiškai svarbus energijos šaltinis organizmams [5]. Suaugusio žmogaus smegenys per dieną absorbuoja apie 120 g gliukozės, kad palaikytų savo funkcijas ir veiklą. Kai maisto suvartojimas yra nutraukiamas, organizmas pasitelkia alternatyvius energijos šaltinius, tokius kaip glikogenas, kuris kaupiasi kepenyse ir raumenyse. Glikogenas yra polisacharidas, kurį organizmas gali skaidyti į gliukozę, kai reikia papildomos energijos. Kai maisto nebeįsisaviname, reikiamo glikogeno atsargų kiekio sunaudojimas paprastai įvyksta per 12–18 valandų laikotarpį. Kraujo gliukozės koncentracija yra šiek tiek mažesnė nei plazmoje, o tai rodo, kad dalis gliukozės yra susieta su kitomis medžiagomis kraujyje. Be to, arteriniame kraujyje gliukozės koncentracija gali būti šiek tiek didesnė nei veniniame kraujyje, nes arterinis kraujas tiesiogiai veikia organizmo audinių aprūpinimą maistinėmis medžiagomis. Kapiliariniame kraujyje gliukozės koncentracija taip pat gali būti šiek tiek didesnė nei veniniame kraujyje, nes kapiliarai yra artimesni audiniams ir perneša gliukozę [6].

Angliavandenių apytakos sutrikimas, kuris pasireiškia, kaip gliukozės koncentracijos padidėjimas kraujyje, atsiranda dėl sutrikusio insulino išskyrimo, jo veikimo arba šių dviejų veiksnių kombinacijos [7]. Insulinas yra polipeptidinis hormonas, kurį gamina specializuotos β ląstelės esančios pagrindinėje kasos dalyje. Šis hormonas veikia kartu su kitu hormonu gliukagonu, siekiant reguliuoti gliukozės koncentraciją kraujyje: insulinas

skatina gliukozės kaupimąsi organizme, o gliukagonas atlieka priešingą, katabolinį vaidmenį. Insulinas yra svarbus reguliuojant gliukozės koncentraciją kraujyje, skatindamas jos kaupimąsi kepenyse, raumenyse ir riebaliniame audinyje, dėl ko gali padidėti bendras kūno svoris. Dėl įvairių fiziologinių procesų, kuriuos reguliuoja insulinas, jo sintezė ir koncentracija organizme yra esminiai kai kurių lėtinių ligų kilmės ir progresavimo veiksniai [8]. Išskiriami 1 ir 2 tipo cukrinio diabeto tipai, kuriems būdingi gliukozės koncentracijos pokyčiai kraujyje: hiperglikemija (padidėjusi gliukozės koncentracija) ir hipoglikemija (sumažėjusi gliukozės koncentracija) [9]. 1 tipo cukrinis diabetas (CD1) – nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas. Tai autoimuninė liga, kurioje imuninė sistema pažeidžia β -ląsteles, gaminančias šį hormoną. Šio tipo diabetui yra būdinga hiperglikemija, absoliučioji ir santykinė insulino stoka ir vėlyvosios komplikacijos. 1 tipo diabetu dažniausiai serga jauni asmenys. 2 tipo cukrinis diabetas (CD2) – nuo insulino nepriklausomas. Daugeliu atvejų šio tipo cukrinis diabetas diagnozuojamas suaugusiems asmenims, tačiau pastaruoju metu šio tipo diabetu serga ir vaikai. Šiuo atveju organizmas vis dar gali gaminti insuliną, bet jis nėra veiksmingas, todėl sutrinka gliukozės pernaša ir įvairūs metabolizmo reguliacijos procesai [6,10]. Siekiant stebėti nuolatinį gliukozės koncentracijos kitimą kraujyje, pacientai sergantys cukriniu diabetu kasdien matuoja gliukozės koncentraciją kraujyje. Dėl šios priežasties gliukozė tapo svarbiausia ir dažniausiai tiriama analite klinikinėje diagnostikoje.

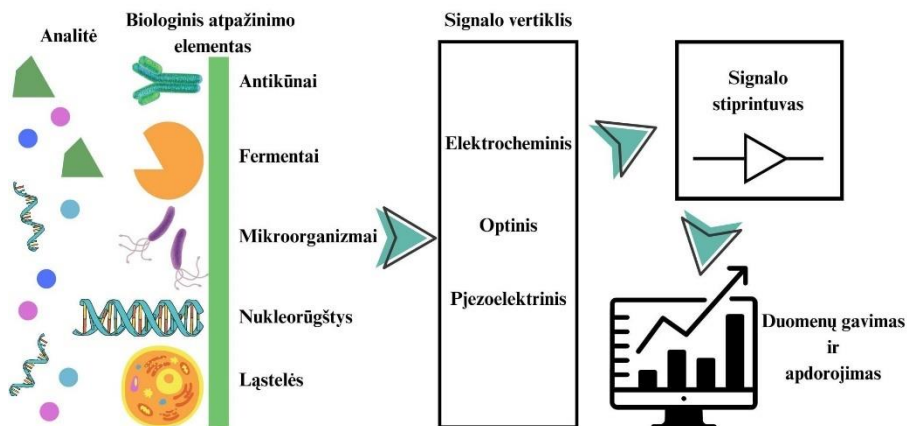
Gliukozės koncentracijos įvertinimui naudojami įvairūs metodai, pavyzdžiui, elektrocheminiai ir optiniai. Elektrocheminis metodas, kuris laikomas vienu iš patikimiausių būdų nustatyti gliukozės koncentraciją, pasižymi daugybe privalumų, įskaitant didelį jautrį, paprastumą, gerą atrankumą, greitą signalo užregistravimą ir mažą savikainą [11]. Cukrinio diabeto diagnozei taip pat naudojami biocheminiai tyrimai, įskaitant gliukozės koncentracijos šlapime nustatymą, kraujo gliukozės koncentracijos matavimą, gliukozės tolerancijos bandymus ir pacientų, sergančių diabetu, ilgalaikį stebėjimą. Dauguma kraujo gliukozės koncentracijos matavimui naudojamų komercinių gliukometrų yra elektrocheminiai. Daugelis mokslininkų siekia kurti efektyvias diagnostikos priemones, kurios padėtų jautriai, tiksliai, vartotojui patogiai nustatyti gliukozės koncentraciją kraujyje ir taip sumažintų diabeto komplikacijų riziką [12].

1.2 Biologiniai jutikliai

Biologiniai jutikliai – tai ypatingos analizinės sistemos skirtos analičių aptikimui ir jų koncentracijų nustatymui. Jutiklis susideda iš biologinio atpažinimo elemento tiesiogiai kontaktuojančio su signalo vertikliu. Ant paviršiaus vykstantys procesai paverčiami išmatuojamu analiziniu signalu, kurio dydis yra proporcingas analitės koncentracijai [13–15].

1 paveiksle pavaizduota tipinė biologinio jutiklio schema, kurioje pirmu numeriu pažymėtos analitės (medžiagos, kurias reikia aptikti) bei pagrindinės biologinio jutiklio sudedamosios dalys:

1. Biologinis atpažinimo elementas – fermentai, antikūnai, mikroorganizmai, ląstelės ir kiti, kurie specifiskai atpažįsta analitę (bioreceptoriai).
2. Signalų vertiklis – prietaisas, kuris paverčia fizikocheminius pokyčius, atsirandančius paviršiuje dėl biologinio atpažinimo elemento sąveikos su analite, išmatuojamu elektriniu signalu. Pagal analizinio signalo registravimo būdą, biologiniai jutikliai suskirstomi į elektrocheminius, optinius, pjezoelektrinius [16].
3. Signalą registruojančio prietaiso, kuris sudarytas iš elektroninės dalies ir programinės įrangos signalo pateikimui. Tai yra būtina analizinių duomenų pateikimui vartotojui suprantamu formatu ir gautų rezultatų vertinimui [17].



1 pav. Bendra biologinio jutiklio schema.

Pirmąją biologinį jutiklį skirtą deguonies koncentracijos matavimams 1956 m. sukūrė Leland C. Clark. Vėliau, 1962 metais Leland C. Clark ir C. Lyons pristatė jutiklį skirtą gliukozės koncentracijos amperometriniam nustatymui. Biologinio jutiklio veikimo principas buvo grindžiamas deguonies koncentracijos matavimu, kurio sumažėjimas priklausė nuo gliukozės koncentracijos mėginyje. Ant indikatorinio elektrodo paviršiaus vyko deguonies redukcija. 1975 metais „Yellow Spring Instruments“ (YSI) pristatė pirmąją komercinį gliukozės biologinį jutiklį pagrįstą vandenilio peroksido susidariusio fermentinės gliukozės oksidacijos metu koncentracijos registravimu kraujo mėginiuose [18,19].

Šiuolaikinėje bioanalizėje dažniausiai naudojami amperometriniai biologiniai jutikliai. Jų veikimo principas yra pagrįstas elektrochemiškai aktyvaus junginio oksidacija arba redukcija ant indikatorinio elektrodo paviršiaus, elektrodui suteikus pastovų potencialą [20]. Šie biologiniai jutikliai taip pat yra plačiai naudojami klinikinėje medicinoje. Siekiant užtikrinti vis geresnį biologinių jutiklių veikimą, jie nuolat yra tobulinami, panaudojant įvairias medžiagas, pvz. nanostruktūras [21–23].

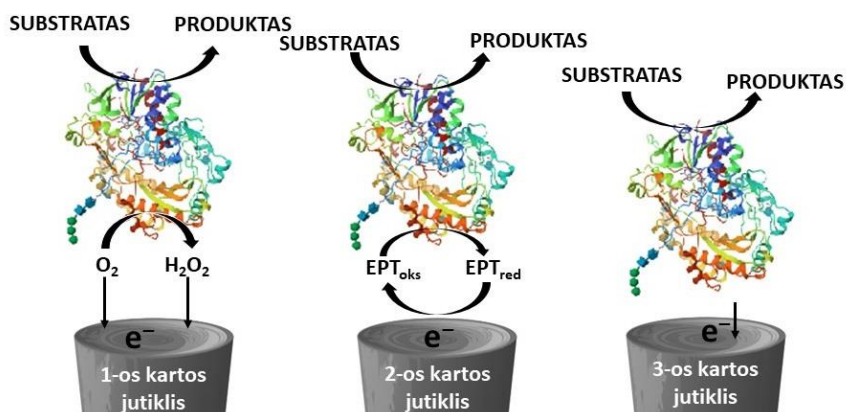
Kuriant biologinius jutiklius, svarbi procedūra yra biomolekulių imobilizavimas ant signalo vertiklio paviršiaus. Tinkamas imobilizavimas turi įtakos biologinių jutiklių jautriui ir stabilumui. Imobilizavimo metodo pasirinkimas priklauso nuo imobilizuojamos biomolekulės bei elektrodo paviršiaus savybių. Dažniausiai naudojami imobilizavimo metodai yra adsorbicija [24], kovalentinis imobilizavimas [25], kryžminis surišimas [26] ir imobilizavimas dėka giminingos sąveikos [27].

1.3 Amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai

Elektrocheminiai jutikliai yra svarbūs gliukozės koncentracijos nustatymui ir apima fermentinius ir nefermentinius jutiklius. Dėl greitos analizės, didelio atrankumo, jautrio, paprastumo, galimybės tirti spalvotus ir drumstus mėginius, elektrocheminiai jutikliai yra plačiai naudojami daugelyje sričių, tokių kaip aplinkos stebėjimas, ligų diagnostika ir kt. [28]. Amperometrinių biologinių jutiklių veikimo principas yra grindžiamas elektrochemiškai aktyvaus junginio oksidacijos/redukcijos reakcijų metu užregistruojamu analiziniu signalu [29]. Tekanti srovė matuojama naudojant trijų arba dviejų elektrodų sistemas. Signalas atsiranda elektrochemiškai aktyvioms medžiagoms oksiduojantis arba redukuojantis indikatorinio elektrodo paviršiuje, suteikus indikatoriniam elektrodui potencialą lyginamojo elektrodo per kurį neteka srovė atžvilgiu. Naudojant trijų elektrodų sistemą atsiranda galimybė kontroliuoti indikatorinio elektrodo potencialą lyginamojo

elektrodo atžvilgiu, tačiau labai svarbu išlaikyti pastovų jo potencialą. Trijų elektrodų sistema pagalbinio elektrodo pagalba kompensuoja potencialo kritimą atsirandantį srovei tekant per tirpalą, taip palaikant pastovų potencialą. Dėl šių savybių trijų elektrodų elektrocheminė sistema yra pranašesnė lyginant su dviejų elektrodų sistema. Gaunami rezultatai yra žymiai tikslesni lyginant su dviejų elektrodų sistema [30–32].

Amperometriniai biologiniai jutikliai, kur panaudojama GOx, yra plačiausiai naudojami dėl savo paprastumo, didelio jautrio ir atrankumo, tinkamo tiesinio diapazono ir mažos gliukozės aptikimo ribos [33,34]. Nuo tada, kai buvo sukurtas ir pritaikytas pirmasis fermentu modifikuotas elektrodas, gliukozės nustatymo principas paremtas fermentine gliukozės oksidacijos reakcija bei substrato ir produkto koncentracijos pokyčiais [18,33] yra tobulinamas, ir taip atsirado net trys amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių kartos:(2 pav.).



2 pav. Pirmos, antros ir trečios kartos gliukozės biologiniai jutikliai skirti gliukozės koncentracijai nustatyti.

1. Pirmos kartos amperometriniuose biologiniuose jutikliuose deguonis dalyvavo reoksiduojant GOx(FADH_2), todėl gliukozės koncentracija mėginyje buvo vertinama pagal tirpale ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimą ar fermentinės reakcijos metu susidariusio vandenilio peroksido koncentracijos didėjimą [34]. Tačiau pagrindinė pirmos kartos gliukozės biologinių jutiklių problema buvo deguonies kiekio svyravimas biologinėje terpėje, kuris gali sukelti trikdžius ir riboti tiesinio

atsako diapazoną, ypač esant didesnėms gliukozės koncentracijoms [2] ir elektrochemiškai aktyvių medžiagų interferencija, kurią sukeldavo didelis potencialas suteiktas indikatoriniam elektrodui nustatant susidariusio H_2O_2 kiekį [35]. Esant dideliui potencialui, kai kurios kartu su gliukoze mėginyje esančios elektrochemiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip askorbo rūgštis ir šlapimo rūgštis, yra registruojamos, todėl sumažėja biologinio jutiklio tikslumas [36,37]. Ši problema buvo sumažinta papildomai naudojant įvairias pralaidžias membranas (nafionas, polipirolas, celiuliozės acetatas ir kt.). Alternatyvus būdas mažinti trukdžiams yra BM panaudojimas, kuris suteikia galimybę sukurti itin atrankų biologinį jutiklį, leidžiantį atlikti matavimus elektrodui suteikus mažesnę potencialą. BM turi didelį katalizinį aktyvumą ir atrankumą H_2O_2 redukcijai. Taip pat, siekiant pagerinti biologinio jutiklio jautrį, naudojamos įvairios nanomedžiagos.

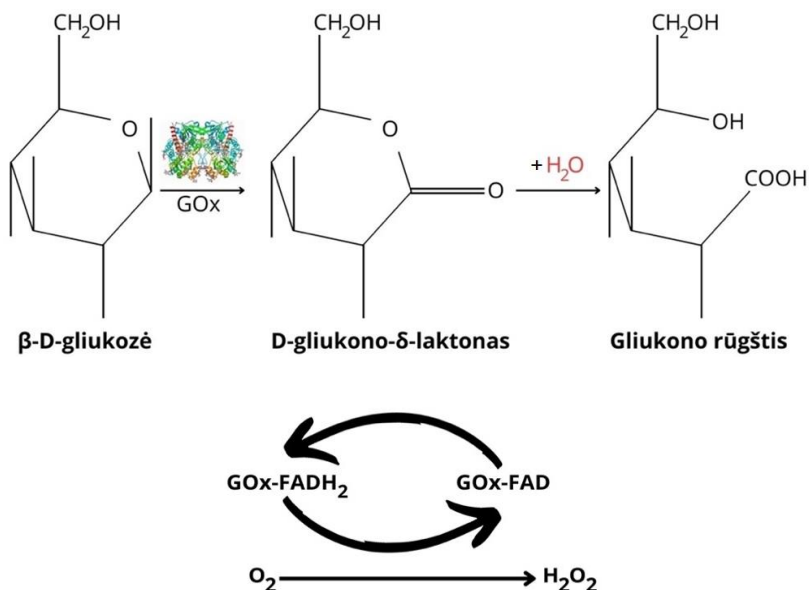
2. Antros kartos biologiniuose jutikliuose vietoje deguonies – natūralaus elektronų akceptoriaus, naudojami dirbtiniai EPT. Jie užtikrina elektronų pernašą iš fermento redokso centro prie elektrodo paviršiaus ir analizinio signalo registravimą prie mažesnių potencialų. Taip eliminuojama interferencija – kuo mažesnis potencialas, tuo mažesnis galinčių oksiduotis elektrodo paviršiuje medžiagų spektras [2,38]. Kataliziniai procesai susideda iš kelių etapų. Vykstant gliukozės fermentinei oksidacijai, GOx(FAD) redukuojasi iki $\text{GOx(FADH}_2\text{)}$. Oksiduota EPT forma dalyvauja reoksiduojant fermento redokso centrą ir pernešant elektronus iš FADH_2 prie elektrodo paviršiaus, kur redukuota EPT forma yra oksiduojama ir to pasekoje yra registruojamas analizinis signalas proporcingas analitės koncentracijai. Antros kartos biologinių jutiklių veikimą galima pagerinti naudojant įvairias nanostruktūras [5], elektrai laidžius polimerus ir kitas pažangias medžiagas, pvz. įvairius nanobiokompozitus [2,19,39,40].
3. Trečiosios kartos biologiniuose jutikliuose vyksta tiesioginė elektronų pernaša nuo fermento redokso centro iki elektrodo paviršiaus. Šiame procese labai svarbus atstumas tarp fermento redokso centro ir elektrodo paviršiaus, nes tai tiesiogiai veikia jutiklio efektyvumą [41,42]. Vis dėlto tokia pernaša įmanoma tik naudojant fermentus, kurių aktyvusis centras yra pakankamai arti baltymo paviršiaus. Trečiosios kartos biologiniai jutikliai yra

efektyvūs be EPT, tačiau iššūkių kyla dėl fermento molekulos sudėtingos struktūros, jos glikozilinimo ir redokso centro buvimo giliai fermento struktūroje. Norint sukurti veiksmingą trečiosios kartos amperometrinį gliukozės biologinį jutiklį, papildomai pritaikomi elektrai laidūs polimerai arba laidžios organinės druskos [2,19,43].

1.4 Gliukozės oksidazė

Oksidoreduktazės, įskaitant oksidazes, oksigenazes, peroksidazes, dehidrogenazes ir kt., yra fermentai katalizuojantys oksidacijos – redukcijos procesus [44]. Struktūriškai fermentas yra dviejų identiškų subvienetų homodimeras, kurio molekulinė masė yra 160 kDa [3,45,46]. Kiekviena GOx molekulė turi po vieną FAD kofaktorių vienam monomerui.

GOx (β -D-gliukozės deguonies-1-oksidoreduktazė, EC 1.1.3.4) išskirta iš *Aspergillus niger* pelėsinų grybelių yra flavofermentas, kuris katalizuoja β -D-gliukozės oksidaciją į D-gliukono- δ -laktoną, kuris spontaniškai hidrolizuojasi vandeninėje terpėje iki gliukono rūgšties. Reakcijos pradžioje β -D-gliukozė fermento yra oksiduojama į D-gliukono- δ -laktoną, o flavino adenino dinukleotidas savo ruožtu redukuojamas į FADH₂. Tada deguonis reoksiduoja FADH₂ į FAD, o šio proceso metu susidaro vandenilio peroksidas (3 pav.) [47].



3 pav. Gliukozės oksidazės katalizuojama reakcija.

Pacientų, kuriems svarbu stebėti gliukozės koncentraciją kraujyje, diagnostikai ir gydymui reikalingos jautrios, atrankios, stabilios, greitos bei patogios naudoti analizinės priemonės [48–52]. Šį vaidmenį geriausiai ir efektyviausiai atlieka modernūs biologiniai gliukozės jutikliai. Dėl didelio GOx specifiškumo gliukozei, aktyvumo bei stabilumo, fermentas yra idealus fermentinių biologinių jutiklių kūrime. Pastaraisiais dešimtmečiais yra sėkmingai kuriami biologiniai jutikliai su GOx, pritaikant skirtingas metalų ir anglies nanostruktūras, įvairius elektronų pernašos tarpininkus ir elektrai laidžius polimerus, taip pat naudojant įvairias elektrodų paviršiaus modifikavimo procedūras [5,53,54].

1.5 Fermentų imobilizavimo metodai bei jų įtaka registruojamam elektrocheminiam signalui

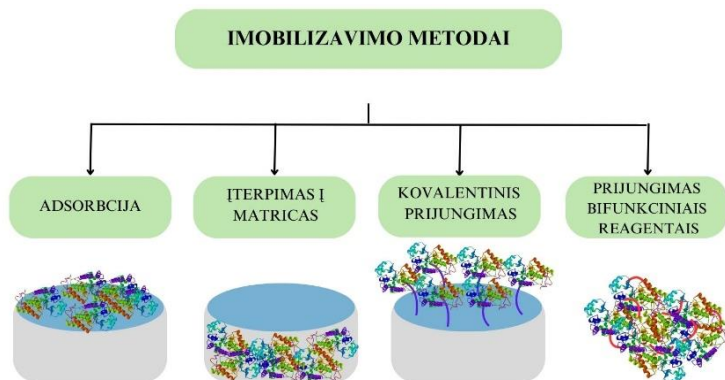
Fermentų imobilizavimas yra esminis žingsnis biologinių jutiklių kūrimo procese. Kadangi imobilizuotas fermentas sąveikauja su analite, todėl svarbu užtikrinti stabilų fermento sluoksnį ant elektrodo paviršiaus ir fermento aktyvumą. Tai leidžia vykti efektyviai elektronų pernašai tarp fermento aktyviojo centro ir substrato, taip užtikrinant tolesnį analizės nustatymą. Fermentiniai biologiniai jutikliai yra intensyviai tyrinėjami dėl jų didelio jautrio ir greito atsako. Sėkmingas fermento įtvirtinimo metodas ant elektrodo paviršiaus turi lemiamą įtaką biologinio jutiklio charakteristikoms, įskaitant jautrį, atrankumą, stabilumą, veikimo trukmę ir kitas svarbias savybes [55,56].

Literatūroje aprašomos įvairios fermento imobilizavimo technologijos, kurios apima klasikinę adsorbciją elektrodo paviršiuje, kovalentinį imobilizavimą prijungiant prie paviršiaus ar sujungiant paviršiuje panaudojant daugiafunkcinius reagentus, įterpiant į gelius ar polimerus, arba panaudojant kelis metodus [55,56]. Adsorbcija yra vienas iš paprasčiausių, greičiausių ir lengviausių fermento imobilizavimo metodų, nes nereikia naudoti papildomų medžiagų. Imobilizuoto fermento stabilumą ir aktyvumą gali paveikti elektrostatinės ar Van der Waalso sąveikos [57] tarp fermento ir elektrodo paviršiaus. Kitaip nei adsorbcija, fermento prijungimas kovalentiniais ryšiais suteikia jam didesnę stabilumą ir atsparumą įvairioms sąlygoms.

Fermentas gali būti kovalentiškai pritvirtinamas prie elektrodo paviršiaus dėka ten esančių funkcinių grupių ar panaudojant SAM modifikuotus elektrodus. Fermentų imobilizavimo metodai, kurie remiasi kovalentiniais ryšiais tarp fermento ir Langmiur-Blodgett plėvelių, savitvarkių monosluoksnių funkcinių grupių arba kryžmiškai sujungiant su bifunkciniais

reagentais, yra laikomi vienais iš efektyviausių fermentų imobilizavimo metodų.

Kai kurie išvardinti kovalentiniai baltymo imobilizavimo metodai gali lemti fermento aktyvumo sumažėjimą, tačiau tuo pačiu jie padidina fermento sluoksnio stabilumą ir patvarumą bei suteikia galimybę kurti tvarkingą molekulių sluoksnį, panaudojant SAM suformuotą ant aukso nanostruktūrų paviršius. Pasirinkus tinkamą nanostruktūrų ir elektrodo paviršiaus derinį, galima pagerinti analizinį signalą [57–59].



4 pav. Dažniausiai naudojami fermentų imobilizavimo metodai: adsorbcija, įterpimas į matricas, kovalentinis prijungimas, prijungimas bifunkciniais reagentais.

1.6 Elektronų pernašos tarpininkai bei jų savybės

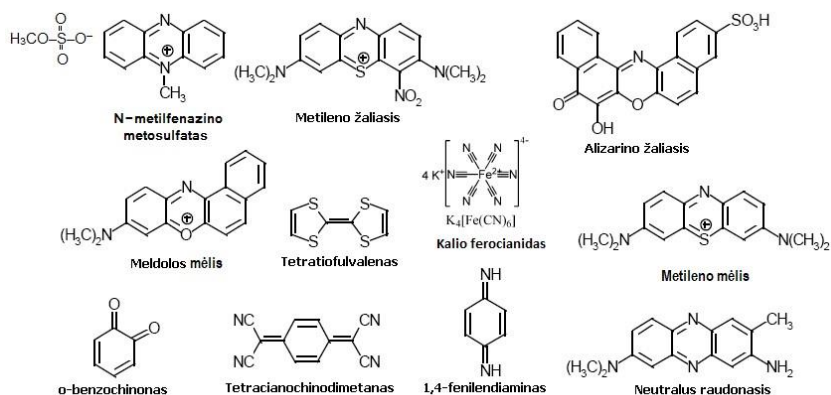
Kuriant antros kartos gliukozės biologinius jutiklius, yra naudojami elektronų pernašos tarpininkai. Tai medžiagos, kurios perneša elektronus nuo fermento redokso grupių elektrai laidžiam sluoksniui, kuriuo gali būti aukso, platinos, anglies ar anglies pastos elektrodų paviršiai, arba elektrai laidūs polimerai suformuoti ant elektrodo [32,60].

EPT dažniausiai būna mažos molekulinės masės organiniai junginiai, neorganiniai pereinamųjų metalų kompleksiniai junginiai (5 pav.). EPT dažnai naudojami net tokiais atvejais, kai elektrochemiškai būtų galima registruoti fermentinės reakcijos metu susidarančio produkto ar sunaudojamo substrato koncentracijas. EPT naudojimas leidžia sumažinti indikatorinio elektrodo potencialą, kuris yra suteikiamas elektrodui registruojant analizinį signalą. EPT turi turėti ne tik tinkamą oksidacijos arba redukcijos potencialą, bet ir greitai reaguoti su imobilizuoto fermento redukuota forma, pasižymėti gera grįžtama heterogenine kinetika, turi būti stabilūs tiriamoje terpėje,

nereaguoti su deguonimi, veikimas neturėtų priklausyti nuo pH, neturėtų dalyvauti pašalinėse reakcijose [32].

EPT gali būti įvairiai pritaikomas kuriant antros kartos amperometrinius gliukozės biologinius jutiklius. Fermentas gali būti pirmiausia modifikuojamas EPT, o tada imobilizuojamas ant elektrodo. Šiuo atveju tarp fermento ir EPT molekulių yra sudaromas stiprus kovalentinis ryšys. Galima EPT modifikuoti elektrodus, kas dažnai taikoma vandeninėje terpėje netirpiems EPT. Efektyvios būna daugiasluoksnės fermento ir EPT struktūros. Dažnai naudojami vandeninėje terpėje tirpūs EPT, kurie iš analizuojamojo tirpalo difuzijos pagalba pasiekia fermento aktyvųjį centrą, o po to redukuota forma pasiekia elektrodo paviršių, kur reoksiduojasi. Šiuo atveju difuzija priklauso nuo daugelio faktorių: hidrofobinių/hidrofilinių fermento savybių, EPT formos, dydžio ir elektrostatinės sąveikos.

Siekiant išspręsti problemas kylančias registruojant gliukozę pirmos kartos biologiniais jutikliais, antros kartos biologiniuose jutikliuose naudojami įvairūs EPT, tokie kaip ferocenas ir jo dariniai, fericianidas, pereinamųjų metalų kompleksai, tioninas, tetratiofulvalenas, tetracianochinodimetanas, tetratiofulvaleno-tetraciano-chinodimetano kompleksas, N-metilfenazino metosulfatas ir kt. [5,61].



5 pav. Dažniausiai biologinių jutiklių kūrime naudojamų elektronų pernašos tarpininkų pavyzdžiai.

1.7 Aukso nanostruktūros bei jų panaudojimas gliukozės biologiniuose jutikliuose

Nanostruktūros yra medžiagos, kurios turi bent vieną matmenį nanometrų skalėje (1-100 nm) [62]. Jos pasižymi unikaliomis fizinėmis ir cheminėmis

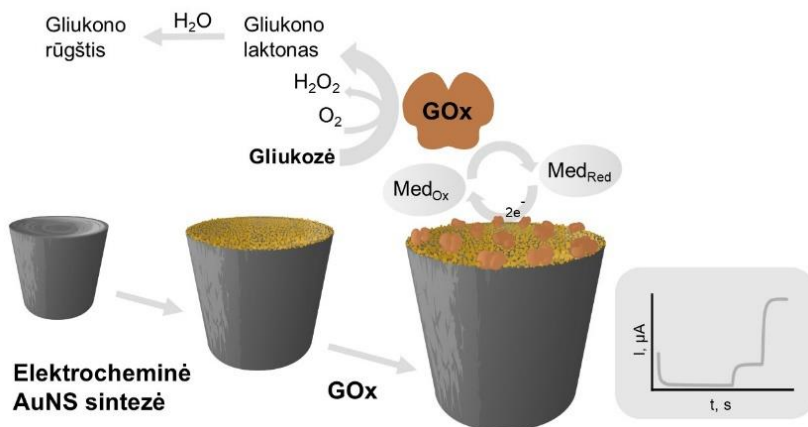
savybėmis dėl savo dydžio, didelio paviršiaus ploto bei tūrio santykio [63]. Šios nanostruktūros gali būti susintetinamos įvairios formos, kaip nanostrygeliai, sferinės nanodalelės, nanolaideliai ir kt., kurių kiekviena turi skirtingas savybes, dėl kurių jos yra vertinamos įvairiose srityse [64]. Nanomedžiagų optinės, elektrinės ir katalizinės savybės ypač naudingos tokiose srityse kaip medicina, aplinkotyra ir aplinkos apsauga ir kt. [65]. Nuo dvidešimtojo amžiaus pradžios buvo atlikti įvairūs anizotropinių AuNS egzistavimo tyrimai. Anizotropinių AuNS struktūrinės, optinės, elektroninės, magnetinės ir katalizinės savybės skiriasi nuo sferinių AuND ir dažniausiai už jas pranašesnės [66].

Nanomedžiagos, tokios kaip anglies nanovamzdeliai, AuNS ir kitos nanostruktūros, yra populiarūs komponentai biologinių jutiklių kūrimui dėl jų unikalių savybių [5]. Remiantis nanometrinių matmenų skaičiumi, AuNS galima suskirstyti į tris grupes: a) vienos dimensijos (1D) tokios kaip lakštai, b) dviejų dimensijų (2D), pvz. nanovamzdeliai, nanovielos ir kt. c) trijų dimensijų (3D) tokios kaip AuND ar dendrimerai. Dėl fizinių ir cheminių savybių AuNS yra plačiai taikomos įvairiose medicinos srityse, ypač biologinių jutiklių kūrime. Didelis paviršiaus plotas, lengvai modifikuojamas paviršius leidžia sukurti jautrius ir specifiskus biologinius jutiklius, naudojamus ligų diagnostikoje, terapijos stebėjime ir biologinių procesų tyrimuose. [67–69].

Vienos iš geriausių savybėmis pasižyminčių trimačių AuNS yra DAuNS. Jos turi didelį praktinio taikymo potencialą įvairiose biomedicinos srityse. Šios nanostruktūros išsiskiria dėl savo didelio hidrofobiškumo, unikalaus dydžio ir savybių, kurios priklauso nuo jų formos. Jos taip pat sustiprina paviršiuje Ramano sklaidos efektą, turi elektrokatalitinį aktyvumą ir gali generuoti fotoluminescencinę emisiją. DAuNS efektyviausiai gaminamos elektrochemiškai. Procesas vyksta etapais: pradžioje kompleksiniai $[\text{AuCl}_4]^-$ jonai redukuojami iki Au^0 , o didėjant Au^0 koncentracijai, formuojasi aukso atomų klasteriai, kurie inicijuoja ir skatina DAuNS formavimąsi bei augimą. AuNS morfologija priklauso nuo įvairių faktorių, tokių kaip $[\text{AuCl}_4]^-$ jonų koncentracija, tirpalo klampumas, elektrodo potencialas, elektrodepozicijos trukmė, pH ir kt. DAuNS susidarymas ant elektrodo paviršiaus didina jo elektrochemiškai aktyvaus paviršiaus plotą ir pagerina elektronų pernašos efektyvumą elektrocheminiame gliukozės aptikime [5]. Mokslininkai išnaudojo puikų tauriųjų metalų biologinį suderinamumą ir jų didelį laidumą [70]. Ramanavičienė ir kt. [71] atliko vienkopę elektrocheminę DAuNS sintezę ant grafito strypo elektrodų ir juos panaudojo fermentiniams gliukozės biologiniams jutikliams paruošti. Dėl

didelio DAuNS paviršiaus ploto, padidintos fermentų adsorbcijos galimybės, todėl paruoštas biologinis jutiklis pasižymi efektyviu veikimu.

Paskutiniu metu yra sėkmingai kuriami antros kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai, kur GS elektrodas elektrochemiškai modifikuojamas AuNS arba DAuNS, ant kurių yra imobilizuojama GOx (6 pav.) [23].

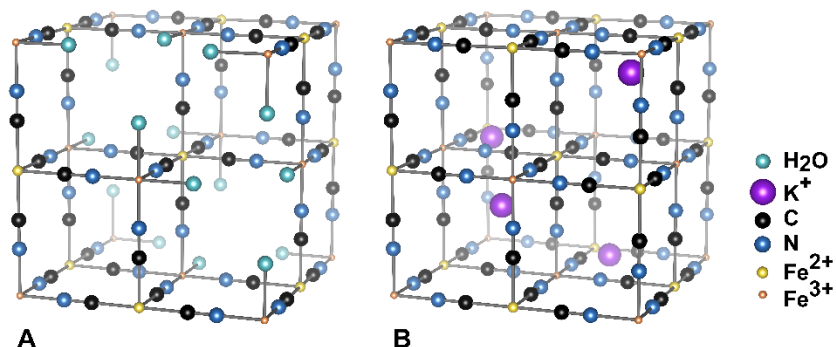


6 pav. Schema, pavaizduojanti elektrocheminę aukso nanodalelių nusodinimą ant anglies elektrodo paviršiaus, GOx imobilizavimą ant gautų AuNS bei tokio elektrodo pritaikymą amperometriniam gliukozės nustatymui.

1.8 Berlyno mēlis

Berlyno mēlis yra mišraus valentingumo daugiacyklis pereinamųjų metalų cianidų kompleksas [72,73] ir gali būti laikomas pirmuoju sintetiniu koordinaciniu junginiu [74], kuris atrastas XVIII a. pradžioje. BM yra kompleksinis junginys, kuriame geležis egzistuoja dviejose skirtingose oksidacijos formose – Fe^{2+} ir Fe^{3+} . Šio junginio trimatė kubinė kristalinė struktūra sudaryta iš Fe^{2+} ir Fe^{3+} sujungtų bidentatiniais $-\text{C}\equiv\text{N}-$ ligandais [75]. Priklausomai nuo sintezės metodikos ir naudojamų reagentų gaunamos dvi skirtingos BM formos – netirpi ir tirpi [76]. Netirpi forma sudaryta iš geležies (III) heksacianoferato (II) $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, kur „x“ nurodo vandens molekulių skaičių), kuri gaunama maišant vandeninius Fe^{3+} tirpalus su $[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]^{4-}$ jonais. Ši forma yra labai stabilus kompleksinis junginys, kuriame ciano grupės jungiasi su geležies atomais, sudarydamos tvirtą kristalinę struktūrą. Dėl šios struktūros netirpi BM forma yra chemiškai inertiška. Tirpi BM forma yra žinoma kaip modifikuota netirpios formos versija, kurioje dalis

ciano grupių yra pakeista kitais ligandais, pvz.: natrio ar kalio jonais ($\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ar $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6)$) [77,78].



7 pav. (a) $\text{Fe}_4^{3+}[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (netirpios BM) ir (b) $\text{KFe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]$ (tirpios BM) kristalinės struktūros.

Sintezės metu kontrolė BM morfologijos yra esminis veiksnys, nes galutinis produkto pavidalas lemia jo savybes [79]. BM yra stipriai mėlynos spalvos, kurią lemia ypatingi elektronų mainai tarp Fe^{2+} ir Fe^{3+} jonų, sukurdami intensyvią šviesos sugertį maždaug ties 700 nm bangos ilgiu. Šios unikalios sugerties savybės lėmė BM populiarumą dailininkų tarpe, ypač praktikuojančius aliejinę tapybą ir kt. [80].

BM gali būti plačiai naudojamas kaip funkcinė nanomedžiaga dėl lengvo paruošimo, mažo redokso potencialo ir gerų elektrokatalizinių savybių. Taip pat BM gali būti naudojamas kaip paviršiaus modifikavimo medžiaga, formuojant elektroaktyvius sluoksnius cheminėmis arba elektrocheminėmis priemonėmis [81,82]. Be to, BM yra žinomas kaip „dirbtinė peroksidazė“, pasižymintis puikiomis į peroksidazę panašiomis katalizinėmis savybėmis H_2O_2 atžvilgiu [83,84], kurios atsiranda dėl to, kad BM nanokristalai turi cianidiniu tilteliu sujungtą $\text{Fe}^{2+}-\text{C}\equiv\text{N}-\text{Fe}^{3+}$ porėtą tinklo struktūrą kubiniuose kristaluose [77,85,86]. Taip pat yra žinoma, kad BM katalizinė konstanta yra trimis dydžiais didesnė nei natūralios peroksidazės [83]. BM gali būti lengvai susintetintas ant elektrodo paviršiaus ir gali pakeisti tirpale esantį elektronų pernašos tarpininką tiesiogiai generuodamas elektrocheminį signalą. Dėl to BM yra labai perspektyvus, pagreitinant elektronų perdavimo procesus, atsirandančius dėl grįžtamųjų redokso reakcijų tarp Fe^{2+} ir Fe^{3+} . Tačiau BM modifikuotų sluoksnių veikimo stabilumas yra labai ribotas, ypatingai neutraliomis ir šarminėmis sąlygomis. Polimerų, pvz. nafiono, naudojimas yra veiksmingas būdas šiai problemai išspręsti [53,87].

2 EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

2.1 Medžiagos ir reagentai

Pagrindinis disertaciniame darbe tirtas fermentas – gliukozės oksidazė, kurios specifinis aktyvumas $228,253 \text{ U mg}^{-1}$ (Sigma–Aldrich, Jungtinė Karalystė) – išskirtas iš *Aspergillus niger* pelėsinių grybelių. Darbo metu buvo naudotas 40 mg mL^{-1} koncentracijos GOx darbinis tirpalas $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatiniame (AC) buferyje, pH 6,0 arba $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatiniame buferyje (FBT) (pH 5,8). Paruoštas GOx tirpalas buvo laikomas šaldiklyje, kad nekistų fermento aktyvumas.

Elektrocheminiams matavimams buvo naudojami keli buferiniai tirpalai – $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ AC ir FBT tirpalai su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. AC buvo ruošiamas ištirpinant $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ („Sigma-Aldrich“, Vokietija) bei KCl (Merck, Vokietija) reikiamą kiekį dejonizuotame vandenyje. Buferinis tirpalas parūgštinamas CH_3COOH tirpalu (Merck, Vokietija) iki pH 6,0. FBT, kurio pH 5,8 buvo ruošiamas ištirpinant K_2HPO_4 („Sigma-Aldrich“, Vokietija), KH_2PO_4 („Riedel-deHaën“, Vokietija) ir KCl („Carl ROTH“, Vokietija) reikiamą kiekį dejonizuotame H_2O . Buferinio tirpalo parūgštinimui buvo naudojamas HCl („Carl ROTH“, Vokietija) tirpalas.

Gliukozės pirminis etaloninis 1 mol L^{-1} koncentracijos tirpalas buvo ruošiamas ištirpinant reikiamą kiekį D-(+)-gliukozės („Carl Roth“, Vokietija) dejonizuotame H_2O ir paliekant parai laiko šaldytuve, kad įvyktų dalinė mutarotacija ir nusistovėtų pusiausvyra tarp α ir β gliukozės formų.

Tyrimų metu buvo naudojamas EPT – N-metilfenazino metosulfatas (FMS) („AppliChem“, Vokietija). Pradinis elektronų pernašos tarpininko $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ FMS koncentracijos tirpalas buvo ruošiamas ištirpinant reikiamą kiekį FMS dejonizuotame vandenyje ir laikomas tamsoje.

Aukso nanostruktūrų sintezei buvo naudojami dviejų rūšių sintezės tirpalai: 10 mmol L^{-1} HAuCl_4 tirpalas ($\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$) („Carl ROTH“, Vokietija) su 1 mol L^{-1} KNO_3 (Merck, Vokietija) ir 1, 3, 6 ir 10 mmol L^{-1} HAuCl_4 tirpalas („Alfa Aesar“, Vokietija) su $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 („Carl ROTH“, Vokietija).

Berlyno mėlio sintezei buvo naudojamas vandeninis tirpalas sudarytas iš: $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Sigma-Aldrich“, Kinija), $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ FeCl_3 („Carl ROTH“, Vokietija), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl („Carl ROTH“, Vokietija) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ HCl („Carl ROTH“, Vokietija).

Taip pat tyrimuose buvo naudojama: 1 mmol L^{-1} 11-merkaptoundekano rūgštis (11-MUR), („Sigma-Aldrich“, Vokietija), 50 mmol L^{-1} N-hidroksisukcinimido (NHS) („Merck“, Vokietija), 200 mmol L^{-1} 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochlorido tirpalai (EDC) („Sigma-Aldrich“, Japonija), askorbo rūgštis (Sigma–Aldrich, Jungtinė Karalystė), šlapimo rūgštis (AppliChem, Vokietija), metanolis, („Sigma-Aldrich“, Vokietija), 25 % koncentracijos glutaro aldehido (GA) tirpalas („Fluka“, Šveicarija), 1 mol L⁻¹ koncentracijų sacharozės (Sigma–Aldrich, Vokietija), ksilozės (Carl ROTH, Vokietija), galaktozės (Carl ROTH, Vokietija), manozės (Carl ROTH, Vokietija) ir fruktozės (Carl ROTH, Vokietija) tirpalai, H₂O₂ 30 % (Carl ROTH, Vokietija), dejonizuotas vanduo, grafito strypeliai (99,999 % grynumo) (Sigma-Aldrich, JAV), stambus (600), smulkesnis (1200) ir smulkus (3500) švitrinis popierius.

Tiksliems reagentų kiekiams sverti buvo naudojamos analizinės svarstyklės „KERN ABJ 220 – 4M“ („Kern & Sohn“, Vokietija), tirpalų maišymui buvo naudojama magnetinė maišyklė „Lab disc“ („IKA“, Vokietija). Tirpalų pH vertė matuojama pH metru „766 Calimatic“ („Knick“, Vokietija). Visi tirpalai ruošiami kambario temperatūroje.

2.2 Elektrocheminių tyrimų metu naudoti prietaisai ir programinė įranga

Elektrocheminiai matavimai buvo atliekami naudojant kompiuterizuotą potenciostatą/galvanostatą PalmSens4 („PalmSens BV“, Olandija) su PSTrace 5.9 programine įranga ir Autolab PGSTAT30 (EcoChemie, Olandija). Matavimų metu buvo naudojama 5 cm³ tūrio elektrocheminė celė užpildyta atitinkamu buferiniu tirpalu su 0,1 mol L⁻¹ KCl, naudojant trijų elektrodų sistemą: indikatoriniu elektrodu buvo naudojamas 3 mm skersmens GS, Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L} elektrodas („Metrohm“, Šveicarija) – lyginamasis ir platinos viela („Metrohm“, Šveicarija) buvo naudojama kaip pagalbinis elektrodas. Elektrocheminių matavimų metu elektrodui buvo suteikiamas pasirinktas potencialas lyginamojo elektrodo atžvilgiu, pastoviai maišant tirpalą magnetine maišykle („IKA“, Vokietija).

Elektrodų elektrochemiškai modifikuotų DAuNS, BM paviršių morfologija buvo tirta aukštos raiškos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu su lauko emisijos šaltiniu (FE-SEM) („Hitachi“, Japonija).

Gauti elektrocheminių matavimų duomenys apibendrinami Sigma Plot 12.5 programos pagalba. Tekstas redaguotas naudojant „Microsoft Excel“, „Microsoft Word“ biuro programų rinkinį.

2.3 Grafito strypelio elektrodo paviršiaus paruošimas

Prieš kiekvieną elektrocheminį tyrimą GS elektrodo paviršius buvo ruošiamas šlifuojant jį iki veidrodinio blizgesio. Elektrodo šlifavimas buvo atliekamas

etapais: pradžioje naudojant stambų (600), tada smulkesnį (1200) ir galiausiai labai smulkų (3500) švitrinį popierių. Toliau elektrodo paviršius buvo šlifuojamas baltu popieriaus lapu, kol pasiekiamas veidrodinis blizgesys. Šoninis GS paviršius izoliuojamas, uždedant silikoninį vamzdelį. Paruoštas GS elektrodo paviršius buvo nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir paliekamas džiūti kambario temperatūroje ($+20 \pm 2^\circ\text{C}$). Taip paruošto GS paviršius buvo modifikuojamas skirtingais būdais, priklausomai nuo pasirinkto eksperimento tikslo.

2.4 Elektrocheminiai AuNS sintezės būdai GS elektrodų paviršiuje

AuNS gali būti sintetintos ant įvairių elektrodų paviršių, o sintetinant AuNS morfologiją galima kontroliuoti pasirenkant sintezės sąlygas, pavyzdžiui sintezės trukmę, elektrodui suteikiamą potencialą ir sintezės tirpalo sudėtį [88,89]. Gera žinoma, kad nuo AuNS dydžio ir morfologijos priklauso optinės ir elektrocheminės savybės [88–90].

Siekiant padengti GS elektrodų paviršių DAuNS sluoksniu, paruošti GS, kurių paviršiaus plotas yra $0,071\text{ cm}^2$, buvo merkami į 5 cm^3 elektrocheminę celę su tirpalu, kurio sudėtis: $10\text{ mmol L}^{-1}\text{ HAuCl}_4$ ir $0,1\text{ mol L}^{-1}\text{ KNO}_3$. Elektrocheminei DAuNS sintezei naudojama trijų elektrodų sistema: indikatorinis GS elektrodas, lyginamasis $\text{Ag/AgCl/KCl}_{3\text{ mol/L}}$ elektrodas bei pagalbinis Pt vielos elektrodas. GS elektrodui suteikiamas $-0,2\text{ V}$ potencialas lyginamojo elektrodo atžvilgiu pasirinktą laiko tarpą (200 arba 400 sek.). Po DAuNS sintezės elektrodai plaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami kambario temperatūroje džiūti. Taip paruošti elektrodai naudojami tolimesniems elektrodo modifikavimo etapams.

Norint padengti GS elektrodų paviršių AuNS sluoksniu, GS elektrodai merkami į 5 cm^3 elektrocheminę celę užpildytą tirpalu, kurio sudėtis buvo pasirinktinai $1,0, 3,0, 6,0$ arba $10\text{ mmol L}^{-1}\text{ HAuCl}_4$ su $0,2\text{ mol L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$. Elektrodui suteikus $-0,2\text{ V}$ potencialą lyginamojo elektrodo atžvilgiu, AuNS sintezę atliekame 120 sek. Po AuNS sintezės elektrodai plaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami kambario temperatūroje džiūti. Paruošti GS elektrodai naudojami papildomiems elektrodų modifikacijos žingsniams.

GS elektrodų paviršiai, modifikuoti elektrochemiškai DAuNS ir AuNS, buvo tiriami FE-SEM.

2.5 Elektrocheminė Berlyno mėlio sintezė

GS elektrodus, kurių paviršiuje yra susintetintos AuNS, norint padengti BM sluoksniu, indikatorinis AuNS/GS elektrodas kartu su Pt pagalbiniu ir

lyginamuoju Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L} elektrodais buvo merkami į 5 cm³ elektrocheminę celę užpildytą tirpalu, kurio sudėtis 3,0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆], 3,0 mmol L⁻¹ FeCl₃, 0,1 mol L⁻¹ KCl ir 0,1 mmol L⁻¹ HCl. Suteikus +0,4 V potencialą lyginamojo elektrodo atžvilgiu, sintezę atliekame 150 sek. Po elektrocheminės sintezės, BM sluoksnis buvo aktyvuojamas ciklinės voltamperometrijos metodu, atliekant 25 ciklines voltamperogramas potencialų intervale nuo -0,1 iki +0,4 V lyginamojo Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L} elektrodo atžvilgiu, esant 50 mV s⁻¹ potencialo skleidimo greičiui. Sekančiame etape elektrodas 15 min. džiovinamas +50 °C temperatūroje. Taip paruoštų elektrodų paviršiaus morfologija buvo ištirta FE-SEM. Tolimesniuose etapuose buvo atliekamas elektrodo modifikavimas GOx.

2.6 GOx imobilizavimo metodai indikatorinio DAuNS/GS elektrodo paviršiuje

Tyrimų metu fermentas GOx DAuNS modifikuoto elektrodo paviršiuje buvo imobilizuojamas trimis skirtingais metodais:

Pirmas metodas (I-as GOx imobilizavimo metodas) – fermento molekulės adsorbuotos ant DAuNS esančių GS elektrodo paviršiuje ir kryžmiškai sujungtos kovalentiškai panaudojant GA garus. Elektrodas modifikuojamas 40 mg mL⁻¹ GOx tirpalu, elektrodą merkiant į fermento tirpalą. Kambario temperatūroje nudžiovintas elektrodas laikomas tam tikrą laiką tarpą uždarame inde 1,5 cm aukštyje virš 25 % GA tirpalo. Glutaro aldehido aldehidinės grupės susijungia su GOx amino grupėmis, sukurdamos pakankamai stiprų tinklą.

Antras metodas (II-as GOx imobilizavimo metodas) – fermento molekulių kovalentinis imobilizavimas ant 11-MUR savitvarkio monosluoksniu suformuoto DAuNS paviršiuje. DAuNS modifikuotas elektrodas merkiamas į 11-MUR tirpalą metanolyje ir inkubuojamas pasirinktą laiką tarpą. 11-MUR jungiasi prie aukso paviršiaus per sulfhidrilo grupės sąveiką su aukso atomais ir savaiminės molekulių organizacijos kieto substrato paviršiuje metu suformuojamas savitvarkis monosluoksnis [91]. SAM/DAuNS/GS modifikuoto elektrodo paviršiuje esančios karboksilo grupės yra aktyvuojamos 50 mmol L⁻¹ N-hidroksisukcinimido (NHS) ir 200 mmol L⁻¹ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimido hidrochlorido (EDC) tirpalų mišiniu, santykis 1:1. Tokiame tirpale elektrodas laikomas 15 min. Aktyvacijos proceso metu mišinyje esantis EDC reaguoja su karboksilo grupe sudarydamas aktyvų tarpinį junginį, kuris jungiasi su NHS taip susidarant esterui, kuris reaguoja su fermento pirmine amino grupe. Po aktyvacijos nuplovus dejonizuotu vandeniu elektrodas su aktyvuotomis

karboksilo grupėmis, naudojamas GOx kovalentiniam imobilizavimui. Elektrodas su aktyvuotu SAM paviršiumi merkiamas 30 min. į mėgintuvėlį pripildytą 40 mg mL⁻¹ GOx tirpalo.

Trečias metodas (III-as GOx imobilizavimo metodas) – fermento molekulių kovalentinis imobilizavimas ant SAM/DAuNS/GS, papildomai sujungiant GOx molekules kryžmiškai kovalentiniais ryšiais, panaudojant GA garus. Ant DAuNS modifikuoto elektrodo paviršiuje, kaip ir antruoju fermento imobilizavimo metodu, formuojamas 11-MUR SAM sluoksnis. Elektrodas su aktyvuotu SAM paviršiumi modifikuojamas 40 mg mL⁻¹ GOx, merkiant elektrodą į fermento tirpalą ir elektrodą tirpale laikant 30 min. Kambario temperatūroje nudžiovintas elektrodas laikomas tam tikrą laiką tarpą uždarame inde 1,5 cm aukštyje virš 25 % GA tirpalo. Kaip ir pirmojo GOx imobilizavimo atveju GA aldehydinės grupės susijungia su GOx amino grupėmis, sukurdamos pakankamai stabilų GOx tinklą elektrodo paviršiuje.

Taip paruošti elektrodai prieš kiekvieną elektrocheminį matavimą buvo nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami džiūti kambario temperatūroje. Tarp matavimų elektrodai laikomi šaldytuve (+4 °C) virš buferinio tirpalo lašo.

2.7 GOx imobilizavimo metodai indikatorinio BM/AuNS/GS elektrodo paviršiuje

Fermento molekulės ant BM/AuNS/GS paviršiaus imobilizuojamos adsorbcijos metodu. Elektrodas BM/AuNS/modifikuojamas 40 mg mL⁻¹ GOx tirpalu, užnešant 3,0, 6,0 arba 9,0 µL fermento tirpalo. Kambario temperatūroje nudžiovinus elektrodą, ant jo paviršiaus užnešami 3,0 µL 0,5 % nafiono tirpalo. Nafiono sluoksnis apsaugo elektrodo paviršių nuo galimos fermento desorbcijos nuo paviršiaus bei stabilizuojamos susidariusios struktūros elektrodo paviršiuje. Modifikuoti elektrodai prieš kiekvieną matavimą buvo nuplaunami FBT tirpalu.

2.8 Amperometriniai matavimai

Nustatant gliukozės koncentraciją, buvo atliekami amperometriniai matavimai su modifikuotais GS elektrodais, juos pamerkus į 5 cm³ elektrocheminę celę, kuri buvo užpildyta AC arba FBT tirpalu su 0,1 mol L⁻¹ KCl ir esant elektronų pernašos tarpininkui FMS arba be jo. Elektrodui buvo suteikiamas pasirinktas potencialas Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L} lyginamojo elektrodo atžvilgiu. Amperometrinių matavimų metu tirpalas esantis elektrocheminėje celėje yra pastoviai maišomas magnetine maišykle. Registruojamas srovės

stipris kinta proporcingai gliukozės koncentracijai analizuojamame mėginyje ir gali būti apibūdinamas hiperbolės lygtimi (1) pagal Michaelis-Menten kinetiką.

$$y = \frac{ax}{b + x} \quad (1),$$

kur a – maksimalus srovės stiprio pokytis (ΔI_{max}), A , b – tariamoji Michaelio konstanta ($K_M^{tar.}$), mol L^{-1} , x – gliukozės koncentracija, mol L^{-1} , y – srovės stiprio pokytis, A .

Pradėjus matavimus buvo laukiama kol per tam tikrą laiko trukmę nusistovi bazinė linija (srovės stipris nebesikeičia). Tada į elektrocheminę celę įnešamas pasirinktas gliukozės tirpalo kiekis ir registruojamas anodinės srovės stiprio kitimas laike, kuris yra proporcingas analitės koncentracijai elektrocheminėje celėje. Atlikus analizę buvo brėžiamos srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos kalibracinės kreivės, iš kurių įvertinami Michaelio-Menten lygties kinetiniai parametrai: maksimalus srovės stiprio pokytis (ΔI_{max}) bei tariamoji Michaelio konstanta ($K_M^{tar.}$), kurie atitinkamai prilyginami hiperbolės lygties $y=ax/(b+x)$ a ir b parametrams [92].

2.9 Elektrochemiškai aktyvaus GS elektrodo paviršiaus įvertinimas

Abiem sintezės metodais suformuoto AuNS elektrochemiškai aktyvus paviršiaus plotas buvo nustatytas ciklinės voltamperometrijos metodu. DAuNS/GS ir AuNS/GS elektrodai buvo panardinti į elektrocheminę celę, kuri buvo užpildoma 5 ml $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ tirpalo. Užrašytos ciklinės voltamperogramos potencialą skleidžiant nuo +0 iki +1,5 V $0,10 \text{ V s}^{-1}$ greičiu. Elektrochemiškai aktyvus paviršiaus plotas buvo apskaičiuotas pagal (2) lygtį [90]:

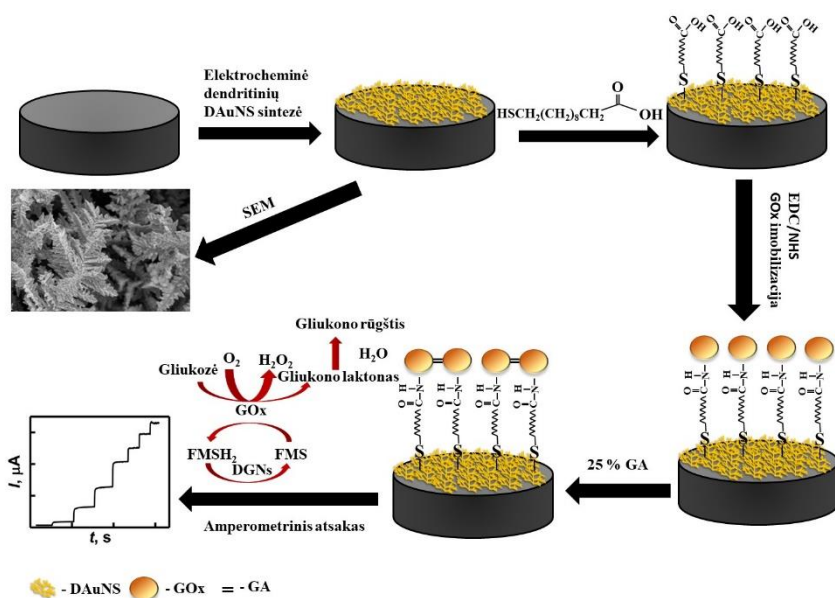
$$EASA = \frac{A}{\nu \cdot 386 \times 10^{-6} \text{ C cm}^{-2}} \quad (2),$$

kur EASA – elektrochemiškai aktyvus DAuNS ir AuNS/GS paviršiaus plotas, cm^2 ; A – katodinės srovės smailės plotas ciklinėje voltamperogramoje $A \cdot V$; ν – potencialo skleidimo greitis, V s^{-1} ; $386 \times 10^{-6} \text{ C cm}^{-2}$ – krūvio tankis ploto vienetui, susijęs su elektrochemiškai adsorbuoto deguonies sluoksnio redukavimu ant polikristalinio aukso paviršiaus [93].

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3. Gliukozės biologinis jutiklis, naudojant GS elektrodą modifikuotą DAuNS ir GOx

Pastaraisiais metais dedama daug pastangų kuriant greitus, jautrius ir patogius naudoti gliukozės biologinius jutiklius skirtus žmonių sergančių cukriniu diabetu gliukozės koncentracijai kraujyje stebėti. Šių tyrimų tikslas buvo sukurti ir palyginti gliukozės biologinius jutiklius, veikiančius naudojant GS elektrodą elektrochemiškai modifikuotą DAuNS ir gliukozės oksidaze, naudojant skirtingus fermento imobilizavimo metodus. FMS buvo naudojamas kaip tirpus elektronų pernašos tarpininkas. Tyrimų metu buvo naudojami trys GOx imobilizavimo metodai: I-as metodas – adsorbicija ant DAuNS ir papildomas fermento sujungimas kryžmiškai kovalentiniais ryšiais naudojant GA garus (GA-GOx/DAuNS/GS); II-as metodas – kovalentinis imobilizavimas ant DAuNS modifikuotų 11-MUR SAM (GOx-SAM/DAuNS/GS) ir III-as metodas – kovalentinis imobilizavimas ant DAuNS modifikuotų 11-MUA SAM su papildomu kryžminių sujungimu GA garais (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS) (1 schema).



1 schema. Pagrindiniai GS elektrodo modifikavimo etapai ir gliukozės nustatymas GA-GOx-SAM/DAuNS/GS indikatoriniu elektrodu, naudojant III-ą GOx imobilizavimo metodą.

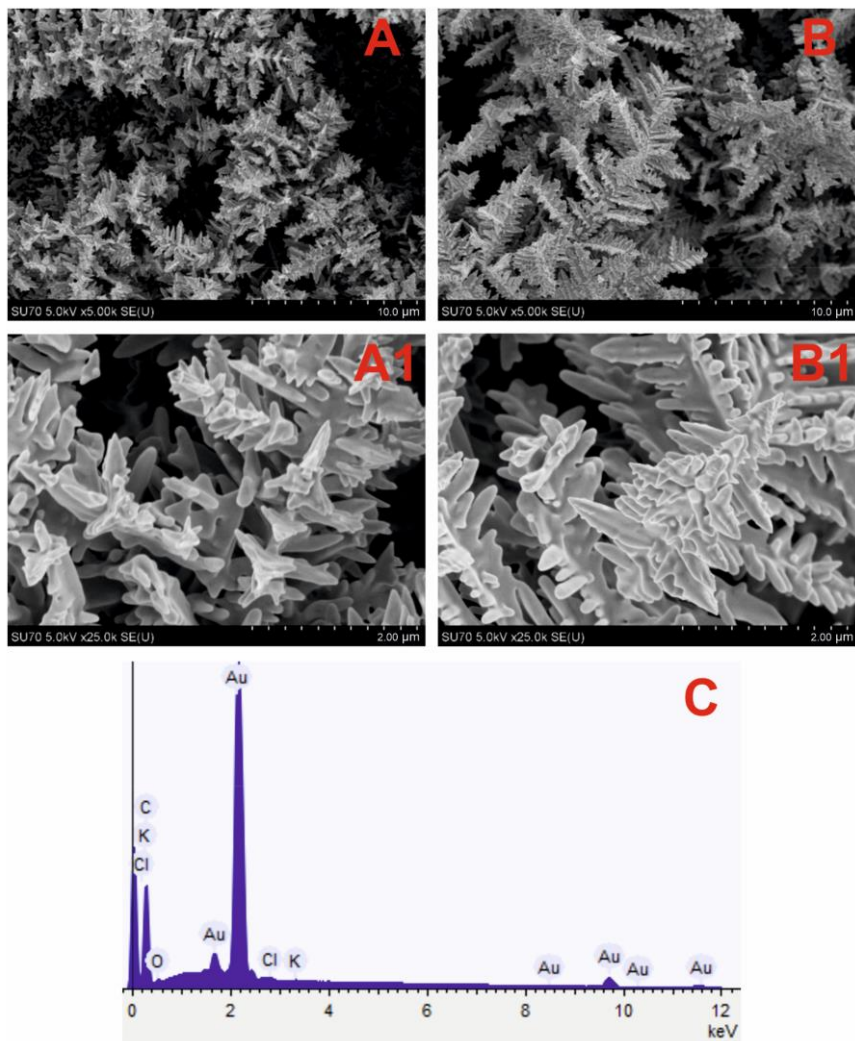
Elektrocheminėje celėje esant buferiniam tirpalui, substratui ir ištirpusiam deguoniui vyksta fermentinė reakcija, kurios metu GOx oksiduojant gliukozę susidaro gliukono laktonas, kuris vandeninėje terpėje hidrolizuojamas iki gliukono rūgšties, ir H_2O_2 , bei susidaro redukuota fermento forma. GOx redokso centras yra giliai baltymo globulėje, kuri yra kaip izoliatorius, todėl elektronai iš fermento aktyviojo centro elektrodui perduodami elektronų pernašos tarpininko FMS pagalba [46].

3.1 Optimalių sąlygų parinkimas gliukozės biologinio jutiklio veikimui

Pastaraisiais metais padaugėjo tyrimų pritaikant nanomedžiagas, pvz. nanovamzdelius, nanodaleles, nanostruktūras, nanoplokštes, nanovamzdelius. Kai kurios šių medžiagų savybės, pavyzdžiui, didelis paviršiaus plotas ir gebėjimas palengvinti elektronų krūvio perdavimą tarp fermento redokso centro ir elektrodo, naudojamos kuriant biologinius jutiklius, siekiant pagerinti jų jautrį ir atrankumą bei sutrumpinti signalo registravimo trukmę. DAuNS tai naujos nanomedžiagos, kurios randa pritaikymą biomedicininėms reikmėms. Panaudojant DAuNS biologinių jutiklių kūrime, atsiranda galimybės padidinti jutiklių jautrį. DAuNS dėl gero biosuderinamumo ir didelio paviršiaus ploto gali būti sėkmingai pritaikytos GOx imobilizavimui elektrodo paviršiuje. Populiariausias DAuNS sintezės metodas yra elektrocheminė jų sintezė iš vandeninio $HAuCl_4$ tirpalo. Formuojantis DAuNS iš pradžių tirpale esantys kompleksiniai $[AuCl_4]^-$ jonai redukuojami iki Au^0 , susidaro klasteriai, ant kurių formuojasi DAuNS [46].

Patogiausias metodas sintetinti DAuNS GS elektrodo paviršiuje yra tiesioginė DAuNS sintezė ant elektrodo paviršiaus, elektrodui suteikus pastovų potencialą tam tikrą laiką tarpą [94]. DAuNS gali būti sėkmingai sintetinės iš skirtingų koncentracijų $HAuCl_4$ tirpalų, naudojant įvairius metodus bei skirtingas sintezės trukmes [71]. Tyrimų metu GS elektrodo paviršiuje buvo elektrochemiškai susintetintos DAuNS esant skirtingoms sintezės sąlygoms (naudojant 10 mmol L^{-1} $HAuCl_4$ tirpalą, esant potencialui $-0,2\text{ V}$, o sintezės trukmei 200 ar 400 sek.) bei ištirtos FE-SEM. Gauti vaizdai (8 pav. A, B) patvirtino, kad abiem atvejais DAuNS buvo sėkmingai elektrochemiškai susintetintos ant GS elektrodo paviršiaus. Ilgesnės, tvarkingesnės DAuNS susidarė, kai sintezės trukmė buvo 400 sek. (8 pav. B, B1), o trumpesnės, aštresnės ir labiau šakotos DAuNS susidarė po 200 sek. (8 pav. A, A1). EDS spektras, kai DAuNS GS elektrodo paviršiuje buvo sintetinės 200 sek. (8 pav. C), rodo, kad jame vyrauja Au ir C elementai. Be to, gautos ir kitos būdingos smailės susijusios su Cl, K ir O elementais,

kurias galima paaiškinti nevisišku elektrodų nuplovimu nuo sintezės metu naudotų medžiagų.

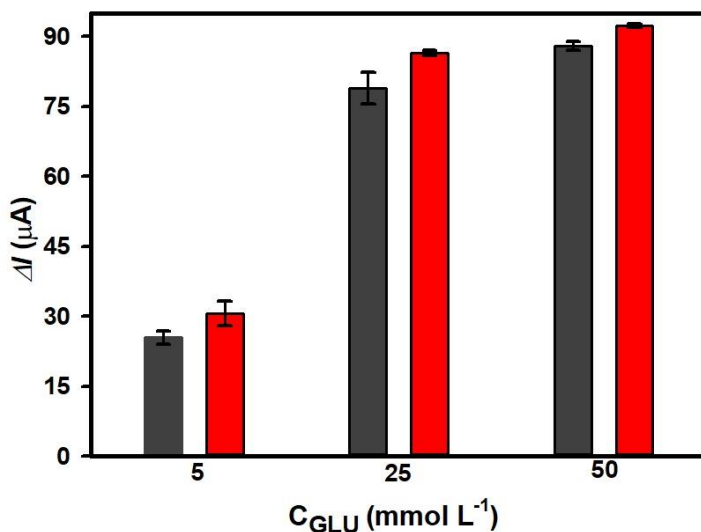


8 pav. DAuNS elektrochemiškai susintetintų ant GS elektrodo esant pastoviam $-0,2$ V potencialui 200 sek. (A, A1) ir 400 sek. (B, B1) iš 10 mmol L^{-1} HAuCl₄ tirpalo, kuriame yra $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KNO₃ (paveikslai (A1, B1) yra padidinti (A, B) vaizdai), ir DAuNS (A) EDS spektras (C).

Morfologijos ir cheminės sudėties skirtumai nebuvo tokie akivaizdūs, todėl DAuNS sintezės poveikis gliukozės biologinio jutiklio veikimui buvo patikrintas elektrochemiškai. Siekiant parinkti tinkamiausią sintezės trukmę,

tyrimams buvo pasirinktas III-as GOx imobilizavimo metodas (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS).

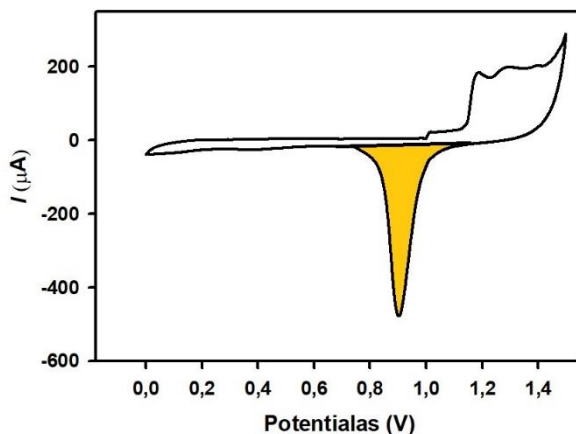
Iš 9 pav. pateiktų duomenų matyti, kad amperometriniai signalai gauti celėje esant 5,0, 25,0, ir 50,0 mmol L⁻¹ gliukozės buvo panašūs abiejų DAuNS elektrocheminės sintezės atvejų. Tačiau visoms tirtoms gliukozės koncentracijoms buvo užregistruotas didesnis signalas, kai buvo naudojama trumpesnė elektrocheminės sintezės trukmė. Šis poveikis buvo didesnis esant mažesnei gliukozės koncentracijai. Pavyzdžiui, esant 5 mmol L⁻¹ gliukozės analizinis signalas buvo 1,2 karto mažesnis, kai DAuNS buvo sintetinės 400 sek. Taigi tolimesniems tyrimams buvo nuspręsta naudoti GS elektrodą su DAuNS susintetintomis esant -0,2 V potencialui ir 200 sek. sintezės trukmei.



9 pav. Gliukozės biologinių jutiklių, modifikuotų elektrochemiškai susintetintomis DAuNS naudojant 10 mmol L⁻¹ HAuCl₄ tirpalą su 0,1 mol L⁻¹ KNO₃ ir esant pastoviam -0.2 V potencialui 200 sek. (raudonas stulpelis) ir 400 sek. (pilkas stulpelis), srovės stiprio palyginimas. Amperometrinis signalas užregistruotas esant +0,3 V potencialui ir matavimus atlikus 0,05 mol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0) ir 2 mmol L⁻¹ FMS. Naudotas III-as GOx imobilizavimo metodas.

Parinkus optimalias DAuNS sintezės sąlygas ant GS elektrodo paviršiaus, DAuNS elektrochemiškai aktyvus paviršiaus plotas buvo įvertintas ciklinės voltamperometrijos metodu 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ tirpale [90]. Iš 10 pav. matyti, kad vyksta elektrocheminė aukso oksidacija ir aukso oksido

redukcija. Apskaičiuotas elektrochemiškai aktyvaus paviršiaus plotas buvo lygus $1,03 \pm 0,15 \text{ cm}^2$.

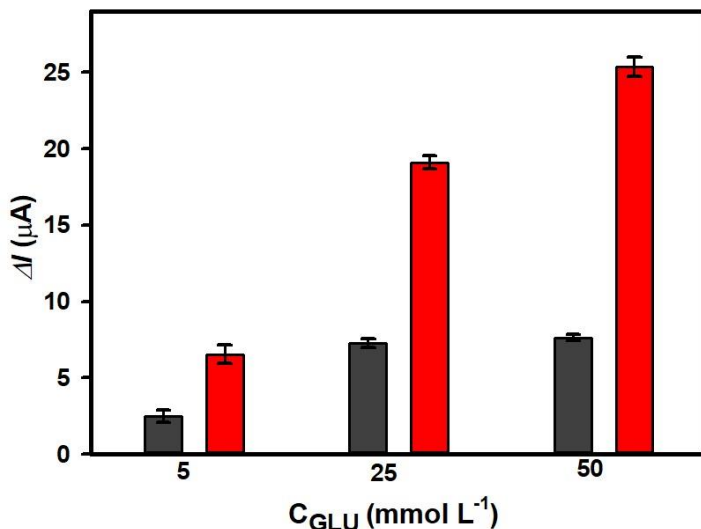


10 pav. DAuNS/GS ciklinė voltamperograma, užrašyta celę užpildžius $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ir skleidžiant potencialą nuo 0 iki $1,5 \text{ V}$ $0,1 \text{ V s}^{-1}$ greičiu. DAuNS elektrodo paviršiuje sintezė buvo atlikta 200 sek. esant pastoviam $-0,2 \text{ V}$ potencialui naudojant $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$ tirpalą, kuriame yra $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$.

Sekančiame etape fermentas elektrodo paviršiuje kovalentiškai imobilizuojamas 11-MUR SAM pagalba, kurio dėka yra gaunamas didelis biologiškai aktyvios medžiagos tankis elektrodo paviršiuje. Siekiant padidinti biologinio jutiklio jautrį, buvo įvertinama skirtingo 11-MUR SAM sluoksnio formavimo laiko įtaka amperometriniam signalui. GS elektrodo modifikuoto DAuNS paviršiuje SAM buvo formuojamas pasirinktinai 2 arba 24 val. Praėjus inkubaciniam laikui, SAM paviršiuje esančios karboksilo grupės aktyvuojamos NHS ir EDC tirpalų mišiniu. Po aktyvacijos ant SAM/DAuNS/GS imobilizuojama GOx ir papildomai fermento molekulės sujungiamos 25 % GA garais (III-as GOx imobilizavimo metodas).

Iš pateiktų duomenų (11 pav.) matyti, kad amperometriniai signalai gauti esant $5,0$, $25,0$, ir $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės yra skirtingi ir priklauso nuo SAM formavimo laiko. Visoms išmatuotoms gliukozės koncentracijoms buvo užregistruotas didesnis analizinis signalas, kai SAM buvo formuojamas 2 val. Šis poveikis buvo ypač ryškus, esant didesnei gliukozės koncentracijai. Pavyzdžiui, esant $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės koncentracijai, analizinis signalas buvo 2,74 karto mažesnis, kai SAM buvo formuojamas 24 val. Atitinkamai analiziniai signalai buvo 2,50 ir 3,45 karto mažesni, esant celėje $5,0$ ir $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės. Siekiant padidinti biologinio jutiklio jautrį,

tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta SAM formuoti 2 val. Adsorbuoti sluoksniai gali pakeisti elektronų pernašos greitį fazių riboje, todėl darome prielaidą, kad formuojant SAM sluoksnį 2 val. jis susidaro mažiau tvarkingas ir mažiau tankus, lieka daugiau laisvo paviršiaus ploto, ir dėl to elektronai nuo fermento aktyviojo centro greičiau ir efektyviau perduodami elektrodui EPT pagalba, ir registruojame didesnę analizinę signalą.

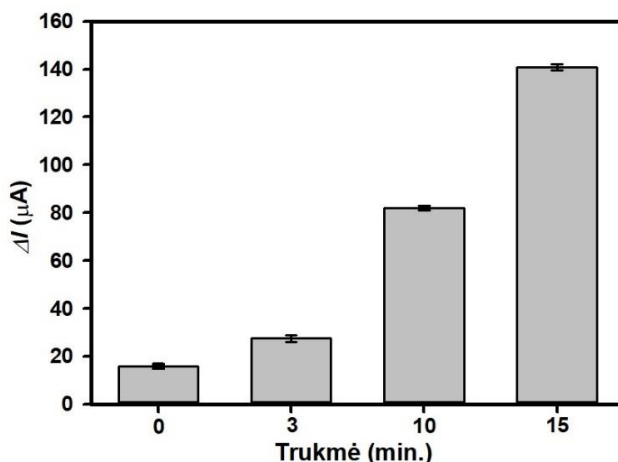


11 pav. Analizinio signalo priklausomybė nuo 11-MUR SAM formavimo laiko: 2 val. (raudonas stulpelis), 24 val. (pilkas stulpelis). Amperometrinis signalas esant +0,3 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0) ir 2 mmol L⁻¹ FMS. Naudotas III-as GOx imobilizavimo metodas.

Atsižvelgiant į aukščiau pateiktus rezultatus buvo pastebėta, kad analizinis signalas registruojamas imobilizavus GOx II-uju metodu (GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodas) yra ganėtinai mažas. Taip pat pastebėjome ir fermento sluoksnio nestabilumą amperometrinių matavimų maišant tirpalą metu. Siekiant padidinti biologinio jutiklio jautrį ir stabilizuoti fermentą elektrodo paviršiuje, buvo nuspręsta kovalentiškai ant 11-MUR SAM imobilizuotą fermentą papildomai sutvirtinti kovalentiniais ryšiais, panaudojant bifunkcinę reagentą GA (III-as GOx imobilizavimo metodas).

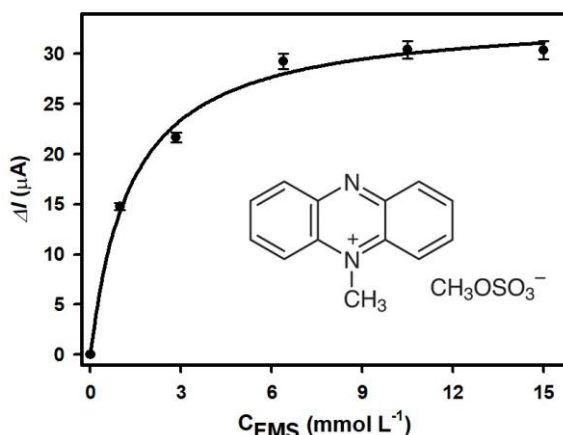
Atlikus amperometrinius matavimus, celėje esant 50,0 mmol L⁻¹ gliukozės (12 pav.), nustatyta, kad didžiausias srovės stiprio pokytis užregistruotas elektrodu laikytu papildomai 15 min. virš GA garų. Maksimalus analizinio signalo pokytis (III-as GOx imobilizavimo metodas)

buvo 8,63 karto didesnis, lyginant su elektrodu kur paviršiuje esantis fermentas papildomai nėra sujungiamas kovalentiniais ryšiais panaudojant GA (II-as GOx imobilizavimo metodas).



12 pav. Srovės stiprio pokytis į elektrocheminę celę pridėjus 50,0 mmol L⁻¹ gliukozės, nustatytas GOx-SAM/DAuNS/GS po papildomo kovalentinio sujungimo glutaro aldehido garais (III-as GOx imobilizavimo metodas). Amperometrinis signalas esant +0,3 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0) ir 2 mol L⁻¹ FMS. Naudotas III-as GOx imobilizavimo metodas.

Biologinio jutiklio analizinis signalas labai priklauso ne tik nuo specifinių fermento savybių, bet ir nuo celėje esančio EPT FMS koncentracijos, kuris užtikrina efektyvią elektronų pernašą nuo fermento redokso centro prie elektrodo paviršiaus. Šiuo tikslu buvo tiriama FMS koncentracijos tirpale įtaka analiziniam signalui. Į elektrocheminę celę buvo įnešama 1, 3, 6, 11 ir 15 mmol L⁻¹ FMS, nusistovėjus bazinei linijai į elektrocheminę celę buvo įnešama 25 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo. Rezultatai rodo, kad didinant FMS koncentraciją, elektronų pernašos efektyvumas didėja. Iš gautų duomenų pateiktų 13 paveiksle matome, kad mažiausias srovės stiprio pokytis buvo stebimas naudojant 1 mmol L⁻¹ EPT, tuo tarpu didžiausias amperometrinis signalas registruojamas biologiniu jutikliu, kai FMS koncentracija celėje yra 6 mmol L⁻¹. Toliau didinant EPT koncentraciją analizinis signalas beveik nekinta. Taigi galime daryti išvadą, kad gliukozės biologinis jutiklis efektyviausiai veikia kai FMS koncentracija elektrocheminėje celėje yra 6 mmol L⁻¹.



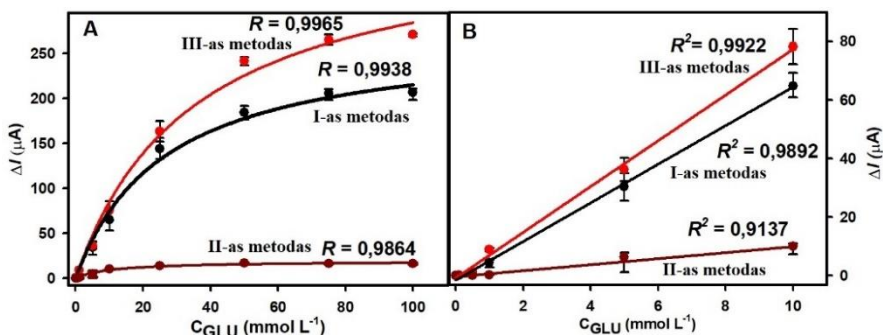
13 pav. Srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo elektronų pernašos tarpininko FMS koncentracijos. Amperometrinis signalas esant +0,3 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0). Naudotas III-as GOx imobilizavimo metodas.

3.2 Įvairių GOx imobilizavimo metodų palyginimas

Fermento imobilizavimo SAM pagalba svarbiausi privalumai yra lengvos sluoksnio formavimo procedūros bei susidariusio biologinio sluoksnio stabilumas ilgą laiką. Paviršių galima padengti įvairiomis funkcinėmis grupėmis. Šis metodas turi ir keletą trūkumų – susiformavęs sluoksnis gali būti netolygus bei imobilizuotos biomolekulės gali desorbuotis nuo paviršiaus, esant dideliems potencialams [95]. Siekiant įvertinti fermento imobilizavimo įtaką biologinio jutiklio veikimui, buvo atliktas palyginimas trijų skirtingų GOx imobilizavimo metodų ant GS elektrodo, iš anksto modifikuoto elektrochemiškai susintetintomis DAuNS. Pirmuoju metodu fermentas GOx buvo adsorbuotas ant DAuNS ir papildomai sluoksnis sutvirtintas GA (GA-GOx-DAuNS/GS, I-as GOx imobilizavimo metodas). Antruoju metodu GOx imobilizuota kovalentiškai ant DAuNS modifikuotų 11-MUR SAM (GOx-SAM/DAuNS/GS, II-as GOx imobilizavimo metodas). Galiausiai trečiasis GOx imobilizavimas buvo atliekamas kovalentiškai ant 11-MUR SAM su papildomu fermento molekulių sujungimu panaudojant GA, kuris kovalentiškai sąveikauja su fermento amino funkcinėmis grupėmis (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS, III-as GOx imobilizavimo metodas).

Srovės stiprio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos visais fermento imobilizavimo metodais aprašoma hiperbolės lygtimi, gliukozės koncentracijų intervale nuo 0,1 iki 100 mmol L⁻¹ (14 pav.). Mažiausias srovės

stiprio pokytis lygus $19,21 \pm 0,75 \mu\text{A}$ ($R = 0,9864$), $K_M^{\text{tar}} = 11,31 \pm 2,42 \text{ mmol L}^{-1}$, buvo gautas naudojant antrąjį GOx imobilizavimo metodą, kai GOx buvo tik kovalentiškai imobilizuota be papildomo sutvirtinimo GA garais (GOx-SAM/DAuNS/GS, II-as GOx imobilizavimo metodas). 14,2 karto didesnis ΔI_{max} lygus $272,06 \pm 8,69 \mu\text{A}$ ($R = 0,9938$), buvo gautas naudojant pirmąjį GOx imobilizavimo metodą, kai GOx buvo adsorbuota ant DAuNS ir sutvirtinta GA garais ($K_M^{\text{tar}} = 26,56 \pm 2,42 \text{ mmol L}^{-1}$). 20 kartų didesnis ΔI_{max} lygus $384,20 \pm 16,06 \mu\text{A}$ ($R = 0,9965$) buvo gautas naudojant trečiąjį fermento imobilizavimo metodą, kai buvo panaudotas papildomas 15 min. trukmės kovalentinis fermento sutvirtinimas panaudojant 25 % GA garus. Šiuo atveju K_M^{tar} buvo šiek tiek didesnė $35,23 \pm 3,76 \text{ mmol L}^{-1}$. Didžiausias srovės signalas ir ΔI_{max} buvo gautas po GOx kovalentinio imobilizavimo ant SAM su papildomu fermento sutvirtinimu GA garais (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS, III-as GOx imobilizavimo metodas). Gliukozės biologinio jutiklio su GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodu ΔI_{max} buvo 1,41 karto didesnis nei naudojant GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą. Tuo tarpu biologinių jutiklių tiesinės priklausomybės intervalas nuo 0,1 iki 10 mmol L⁻¹ buvo vienodas visiems fermento imobilizavimo metodams (14 pav.). Gliukozės aptikimo riba buvo mažiausia naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodą (III-as GOx imobilizavimo metodas) – 0,019 mmol L⁻¹, tuo tarpu su GA-GOx/DAuNS/GS elektrodu (III-as GOx imobilizavimo metodas) aptikimo riba buvo 0,022 mmol L⁻¹, o su GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodu – 0,35 mmol L⁻¹. Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad naudojant GS elektrodą iš anksto modifikuotą DAuNS ir GOx imobilizuotą trečiuoju metodu, gliukozės biologinis jutiklis veikia geriausiai.



14 pav. (A) Gliukozės biologinių jutiklių srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, esant skirtingiems fermento imobilizavimo metodams. (B) Srovės stiprio pokyčio tiesinės priklausomybės

nuo gliukozės koncentracijos intervalas skirtingiems elektrodams. Elektrodai: I-as GOx imobilizavimo metodas, GA-GOx-DAuNS/GS; II-as GOx imobilizavimo metodas, GOx-SAM/DAuNS/GS; III-as GOx imobilizavimo metodas, GA-GOx-SAM/DAuNS/GS. Amperometrinis signalas esant +0,3 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0) ir 6 mmol L⁻¹ FMS.

Tai, kad kovalentiškai ant SAM imobilizuotai GOx reikia papildomo kryžminio sujungimo pastebėjo ir kiti autoriai. Papildomo GOx molekulių kovalentinio sujungimo poreikį galima paaiškinti dideliu GOx dydžiu (apie 160 kDa), lyginant su mažesniais fermentais, tokiais kaip krienų peroksidazė, bei atsitiktiniu amino grupių pasiskirstymu fermento paviršiuje [96]. Taip pat reikia paminėti, kad elektrocheminiai matavimai atliekami pastoviai maišant tirpalą. GOx imobilizavimo metodų įtakos antrosios kartos gliukozės biologinių jutiklių su skirtingomis AuNS veikimui palyginimas pateiktas 1 lentelėje. Sukurtiems gliukozės biologiniams jutikliams su DAuNS būdinga maža aptikimo riba ir tinkamas gliukozės nustatymui tiesiškumo intervalas.

1 lentelė. GOx imobilizavimo metodų įtakos biologinių jutiklių su skirtingomis AuNS veikimui palyginimas

GOx imobilizavimo metodai	Aptikimo riba/ jautris	Tiesinės priklausomybės intervalas	Metodas/ EPT	Nuo- roda
GOx adsorbuota ant DAuNS modifikuotų grafito elektrodo ir kryžmiškai sujungta GA garais	0,059 mmol L ⁻¹	0,1 – 9,97 mmol L ⁻¹	Amperomerija FMS	[71]
GOx ir 2,5-dihidroksibenzaldehidą sujungti naudojant GA buvo adsorbuoti ant nanokompozito sudaryto iš AuND ir redukuoto grafeno oksido, esančio želatinoje ir užnešto ant spausdinto montažo elektrodo.	0,640 mmol L ⁻¹	0 – 11 mmol L ⁻¹	Ciklinė voltamperometrija 2,5-dihidroksibenzaldehidą	[97]
GOx adsorbuotas ant AuND (3,5 nm) ir redokso mediatoriumi modifikuoto grafito elektrodo bei kryžmiškai sujungta su GA garais	0,024 mmol L ⁻¹ 52,1 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,01 – 1,5 mmol L ⁻¹	Amperomerija 1,10-fenantrolin-5,6-dionas	[98]
GOx adsorbuota ant AuND elektrochemiškai	0,083 mmol L ⁻¹ 101,02 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,1 – 10 mmol L ⁻¹	Amperomerija FMS	[99]

imobilizuotų ant GS
elektrodo ir
sutvirtintų GA garais

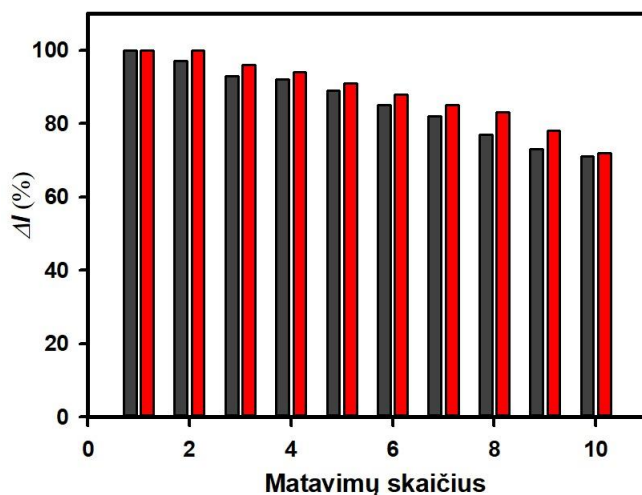
GOx kovalentiškai imobilizuota ant AuND (2,6 nm) monosluoksniu modifikuoto Au elektrodo	0,0082 mmol L ⁻¹ 8,8 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,02 – 5,7 mmol L ⁻¹	Amperomerija Feroenmetanolis	[100]
GOx kovalentiškai imobilizuota ant nanoporėto aukso modifikuoto SAM (3,3'-ditiopropiono rūgštis / 6-merkaptoteksano rūgštis / 11-MUR), naudojant karbodiimido chemiją	2,187 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻² 1,564 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻² 1,160 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,1 – 10 mmol L ⁻¹	Ampertomerija p-benzokvinonas	[101]
Sluosniai GOx kovalentiškai imobilizuotos ant Au elektrodo ir AuND (12 nm) gauti naudojant cisteaminą (6 sluoksniai)	0,008 mmol L ⁻¹ / 5,72 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,01 – 13 mmol L ⁻¹	Amperomerija Feroenmetanolis	[102]
GOx kovalentiškai imobilizuota ant 11-MUR SAM/DAuNS/GS elektrodo ir sujungta GA garais	0,019 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,1 – 10 mmol L ⁻¹	Amperomerija FMS	Šis darbas
GOx adsorbuota ant DAuNS/GS ir sujungta GA garais	0,022 μA mmol L ⁻¹ cm ⁻²	0,1 – 10 mmol L ⁻¹	Amperomerija FMS	Šis darbas

3.3 Analizinio signalo pakartojamumo tyrimas

Pakartojamumas yra viena iš svarbių biologinio jutiklio charakteristikų. Šio tyrimo esmė buvo įvertinti analizinio signalo pakartojamumą. Nepaisant to, kad didžiausias analizinis signalas buvo užregistruotas naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodą (III-as GOx imobilizavimo metodas), pakartojamumas buvo ištirtas ir naudojant GA-GOx/DAuNS/GS elektrodą (I-as GOx imobilizavimo metodas), siekiant patvirtinti III-o GOx imobilizavimo metodo privalumus. Elektrodo paruoštų nustatytomis optimaliomis sąlygomis pakartojamumas buvo įvertinamas matuojant signalą celėje esant 25 mmol L⁻¹ gliukozės dešimt kartų. Matavimai atliekami tą pačią dieną tokiomis pačiomis sąlygomis.

Nagrinėjant 15 paveiksle pateiktus rezultatus matyti, kad geresnis pakartojamumas stebimas naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodą (III-as GOx imobilizavimo metodas): antrą kartą matuojant signalas nepakito,

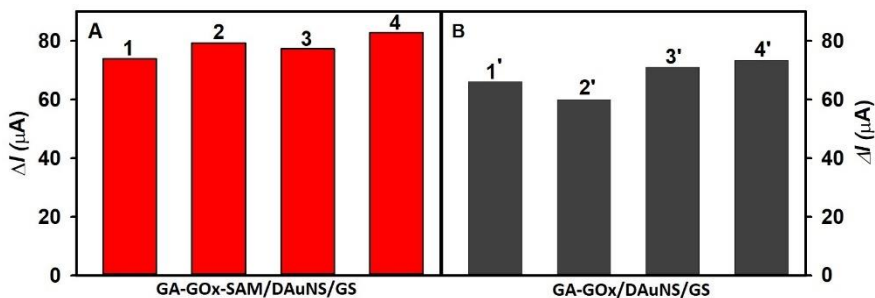
trečią kartą signalas sumažėjo 4 %. Ketvirto ir penkto matavimo metu analizinis signalas sumažėjo 9 %, lyginant su pirmu matavimu. Panašų, bet šiek tiek blogesnį pakartojamumą stebime ir su GA-GOx/DAuNS/GS elektrodu (I-as GOx imobilizavimo metodas). Nustatėme, kad antrojo matavimo metu analizinis signalas sumažėjo 3 %, trečiojo – 7 %. Ketvirtojo ir penktojo matavimo metu analizinis signalas sumažėjo apie 12 % lyginant su pirmuoju matavimu. Iš viso 91 % pradinio srovės stiprio pokyčio buvo išsaugota po penkių matavimų, naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą, kai 88 % signalo buvo išsaugota naudojant GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą. Vėlesni matavimai rodo, kad stebimas abiejų elektrodų nežymus analizinio signalo mažėjimas lyginant signalus tarpusavyje. Remiantis pateiktais duomenimis darome išvadą, kad geresnis pakartojamumas stebimas naudojant III-ą GOx imobilizavimo metodą (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodas). Geresnis pakartojamumas gali atsirasti dėl palankesnio GOx molekulių išsidėstymo po kovalentinio imobilizavimo elektrodo paviršiuje ant iš anksto suformuoto SAM ir mažesnio fermento praradimo dėl papildomo fermento kryžminio sujungimo tarpusavyje panaudojant GA garus.



15 pav. Sukurtų biologinių jutiklių GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas, raudoni stulpeliai) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas, pilki stulpeliai) srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, atliekant pakartotinius matavimus. Amperometriniai matavimai atlikti 0,05 mmol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0), 6,0 mmol L⁻¹ FMS ir 25 mmol L⁻¹ gliukozės, potencialas +0,3 V.

3.4 Priemaišų įtaka analiziniam signalui ir substratinis atrankumo tyrimas

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti elektrochemiškai aktyvių priemaišų esančių žmogaus kraujyje įtaką analiziniam signalui. Pašalinės elektrochemiškai aktyvios medžiagos yra šlapimo rūgštis ar askorbo rūgštis. Buvo ruošiami GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) bei GA-GOx/DAuNS/GS elektrodai (I-as GOx imobilizavimo metodas) nustatytomis optimaliomis sąlygomis. Amperometrinio metodu nustatant 10 mmol L⁻¹ gliukozės koncentraciją elektrocheminėje celėje buvo įvertinama šlapimo rūgšties ir askorbo rūgšties įtaka analiziniam signalui. Nusistovėjus signalui, į elektrocheminę celę buvo įpilamas pasirinktas trukdančios medžiagos kiekis su 10 mmol L⁻¹ gliukozės. Rezultatų įvertinimui buvo atliekami analogiški tyrimai, tačiau į elektrocheminę celę įpilant AC tirpalo su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0), 6 mmol L⁻¹ FMS, o nusistovėjus bazinei linijai papildomai įpilant tik 10 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo.



16 pav. Trukdančių medžiagų poveikis analiziniam signalui, tyrimus atliekant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) (A) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) (B) elektrodais. Užregistruoto srovės signalo diagramos pateikiamos pridėjus: 10 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo (1, 1' stulpeliai), 10 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo su 0,1 mmol L⁻¹ šlapimo rūgšties (2, 2' stulpeliai), 10 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo su 0,01 mmol L⁻¹ askorbo rūgšties (3, 3' stulpeliai) ir 10 mmol L⁻¹ gliukozės tirpalo su 0,05 mmol L⁻¹ askorbo rūgšties (4, 4' stulpeliai). Amperometriniai matavimai atlikti: 0,05 mol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0) ir 6,0 mmol L⁻¹ FMS, potencialas + 0,3 V.

Nustatyta, kad 0,01 ir 0,05 mmol L⁻¹ askorbo rūgšties buvimas tirpale padidina srovės signalą 7,72 % ir 11,2 %, naudojant tyrimams GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą, ir 4,63 % bei

10,8 % naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą. Esant $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ šlapimo rūgšties srovės signalas padidėjo 9,09 % naudojant GA-GOx/DAuNS/GS elektrodą (I-as GOx imobilizavimo metodas) bei 7,02 % naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodą (III-as GOx imobilizavimo metodas). Buvo pastebėta nedidelė tirtų elektrochemiškai aktyvių trukdančių junginių įtaka analiziniam signalui, naudojant GOx skirtingais metodais modifikuotus elektrodus. Daugeliu atvejų signalų skirtumas buvo mažesnis nei 10 % išskyrus didžiausias askorbo rūgšties koncentracijas. Kaip galime pastebėti iš 16 pav. pateiktų duomenų, naudojant III-ą GOx imobilizavimo metodą buvo užregistruotas mažesnis trukdančių medžiagų poveikis analiziniam signalui. Sukurti biologiniai jutikliai yra tinkami gliukozės aptikimui serume, o didesnis signalas registruojamas, kai GOx yra kovalentiškai imobilizuojama ant 11-MUR SAM ir papildomai sutvirtinant GA garais. Taip pat trukdančių medžiagų poveikį analiziniams signalams galima sumažinti naudojant elektrai laidžius polimerus [103,104].

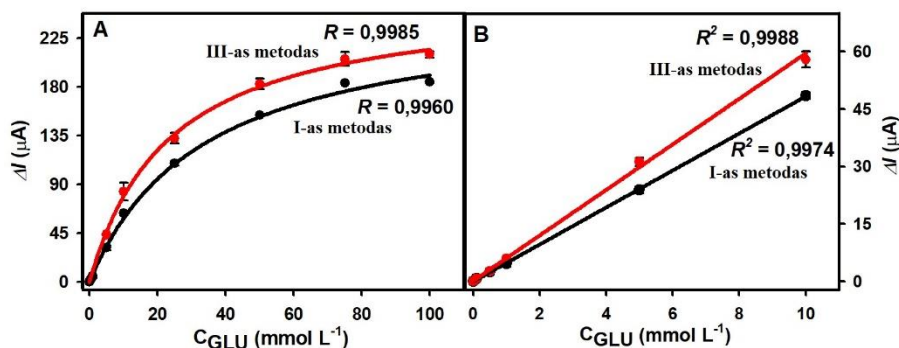
Galiausiai sukurtų biologinių jutiklių atrankumas buvo patikrintas į juos pridėjus 25 mmol L^{-1} galaktozės, fruktozės, ksilozės ir manozės. Šie substratai neturėjo jokios įtakos registruotiems signalams. Tik pridėjus 25 mmol L^{-1} koncentracijos gliukozės gaunamas išmatuojamas srovės stipris. Galime daryti išvadą, kad GOx fermentui giminingas substratas yra gliukozė.

3.5 Biologinio jutiklio taikymas gliukozės nustatymui žmogaus serumo mėginyje

Gliukozės koncentracija diabetu sergančių žmonių serume yra daug didesnė nei sveikų žmonių ir svyruoja nuo $2 - 30 \text{ mmol L}^{-1}$. Paruoštų elektrodų naudojant I-ą ir III-ą GOx imobilizavimo metodą tinkamumas gliukozės koncentracijos nustatymui buvo išbandytas praskiestame žmogaus kraujo serume. Prieš naudojimą serumas atšildomas, filtruojamas ir penkis kartus skiedžiamas AC tirpalu su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 6,0). Dviejų tipų elektrodams buvo gauta hiperbolės formos priklausomybė tarp užregistruotų srovių ir apskaičiuotų srovės skirtumų 5 kartus praskiestame serume, pridėjus gliukozės nuo $0,1$ iki 100 mmol L^{-1} koncentracijų intervale.

Iš 17 pav. pateiktų duomenų akivaizdu, kad didesnis srovės signalas buvo užregistruotas naudojant III-ą GOx imobilizavimo metodą (GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodą). Apskaičiuotas ΔI_{max} buvo $312,58 \pm 18,34 \text{ } \mu\text{A}$ ($R = 0,9985$), o naudojant tyrimams I-ą GOx imobilizavimo metodą (GA-GOx/DAuNS/GS elektrodą), ΔI_{max} buvo $244,12 \pm 8,79 \text{ } \mu\text{A}$ ($R = 0,9960$). Apskaičiuotos $K_M^{tar.}$ buvo atitinkamai $40,42 \pm 5,72 \text{ mmol L}^{-1}$ ir

$22,52 \pm 2,64 \text{ mmol L}^{-1}$. Tiesinės priklausomybės intervalas buvo vienodas ir jokių skirtumų nebuvo pastebėta priklausomai nuo GOx imobilizavimo metodo. Abiem atvejais buvo nustatyti tiesinės priklausomybės intervalai nuo $0,1$ iki 10 mmol L^{-1} gliukozės. Aptikimo riba serume nustatyta biologiniu jutikliu su GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodu buvo $0,022 \text{ mmol L}^{-1}$, o su GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodu – $0,050 \text{ mmol L}^{-1}$ (signalu/triukšmo santykis = 3). Atsižvelgiant į pateiktus rezultatus darome išvadą, kad nustatyta aptikimo riba yra nežymiai žemesnė, kai elektrocheminėje celėje yra serumo, lyginant su rezultatais, kurie buvo atlikti buferiniame tirpale. Darome išvadą, kad sukurtas gliukozės biologinis jutiklis su elektrodu modifikuotu DAuNS, gali būti sėkmingai pritaikytas gliukozės nustatymui realiuose mėginiuose.

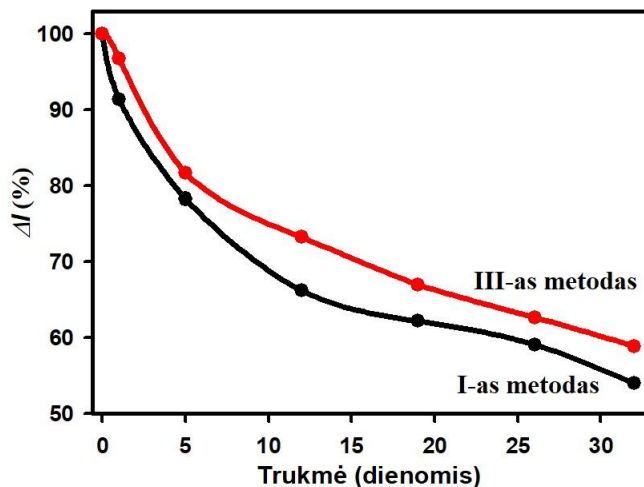


17 pav. (A) Elektrodais GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-asis GOx imobilizavimo metodas, raudona kreivė) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-asis GOx imobilizavimo metodas, juoda kreivė) užregistruoto srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos praskiestame žmogaus serume. (B) Atitinkamai srovės stiprio pokyčio tiesinės priklausomybės intervalas nuo gliukozės koncentracijos skirtingiems elektrodams. Amperometrinis signalas esant $+0,3 \text{ V}$ potencialui buvo užregistruotas $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ AC tirpale su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 6,0) praskiestu serumu, esant $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ FMS.

3.6 Sukurtų gliukozės biologinių jutiklių stabilumo tyrimas

Galiausiai buvo įvertintos GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodų stabilumo charakteristikos. Tyrimai atliekami elektrocheminėje celėje esant 50 mmol L^{-1} gliukozės. Tyrimai buvo atliekami 32 dienas.

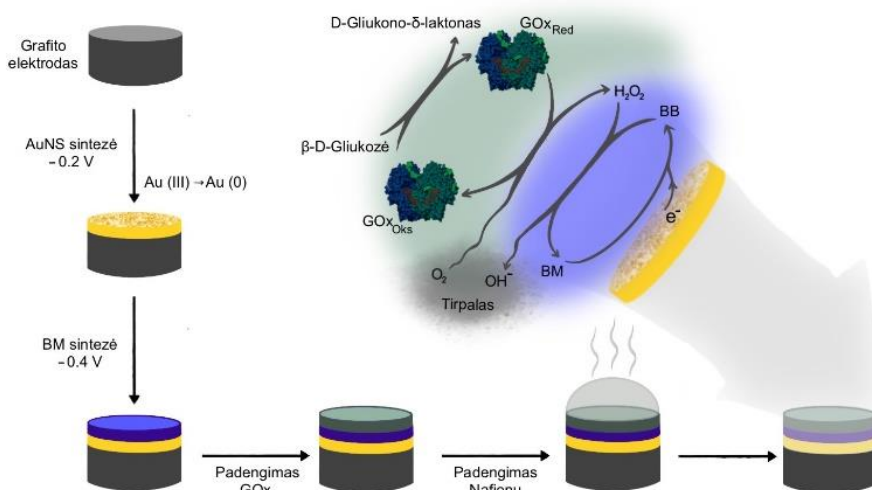
Kaip matome iš 18 pav. pateiktų duomenų, ΔI % skaičiuojant abiejų tipų elektrodams laikui bėgant palaipsniui mažėjo. Šiek tiek spartesnis srovės stiprio mažėjimas buvo stebimas iki 5 dienų naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodą, o elektrodui GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) spartesnis srovės stiprio mažėjimas stebimas iki 12 dienų. Po 12 dienų biologinis jutiklis su GA-GOx-SAM/DAuNS/GS elektrodu (III-as GOx imobilizavimo metodas) išsaugojo 73,25 % pradinio signalo, o naudojant GA-GOx/DAuNS/GS elektrodą (I-as GOx imobilizavimo metodas) – 66,20 %. Nustatyta, kad geresniu stabilumu pasižymi elektrodas, kur GOx buvo imobilizuota naudojant III-ą metodą. Tai gali būti dėl geriau imobilizuoto fermento su tinkama erdvine orientacija ant labiau biologiškai suderinamo paviršiaus, todėl GOx molekulės ilgiau išlieka aktyvios ir stabilios, atliekant elektrocheminius matavimus ir plovimus tarp matavimų.



18 pav. Biologinių jutiklių stabilumas, naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas, raudoni taškai) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas, kreivė juodi taškai) elektrodus. Amperometrinis signalas esant +0,3 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ AC tirpale su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0), esant 6,0 mmol L⁻¹ FMS.

4. Bereagentis gliukozės biologinis jutiklis naudojant GS elektrodą modifikuotą AuNS, BM ir GOx

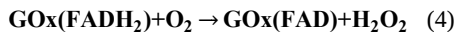
Tikslus gliukozės koncentracijos kraujyje nustatymas atlieka lemiamą vaidmenį diagnozuojant ir gydant cukrinį diabetą. Šio tyrimo tikslas buvo sukurti bereagentį Nf-GOx/BM/AuNS/GS nanokompozito pagrindu veikiančią amperometrinį biologinį jutiklį, kuris gali būti naudojamas gliukozės koncentracijos nustatymui (2 schema). Bereagenčiai biologiniai jutikliai gali būti nešiojami ir skirti vienkartiniams ir tęstiniais matavimams. Šių tyrimų metu BM elektrocheminiu metodu buvo sintetinamas AuNS/GS elektrodo paviršiuje. BM katalizavo H_2O_2 susidariusio fermentinės gliukozės oksidacijos metu elektrocheminę redukciją ir taip generavo elektrocheminį signalą. Sukuriamas elektrocheminis gliukozės jutiklis, kuriam nereikia papildomų reagentų, nes visi komponentai yra integruoti jutiklyje. BM modifikuotų sluoksnių veikimo stabilumui pagerinti buvo naudojamas nafionas (Nf) [83,105–107]. Bereagenčio biologinio jutiklio kūrime AuNS panaudojimas padidino elektrochemiškai aktyvaus paviršiaus plotą.



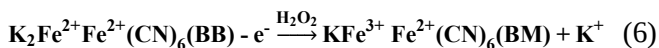
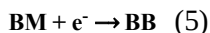
2 schema. Gliukozės biologinio jutiklio paruošimo ir gliukozės koncentracijos nustatymo schema, panaudojant AuNS ir BM.

Ankstesniuose tyrimuose DAuNS buvo sėkmingai pritaikytos kuriant biologinius jutiklius, naudojant vandenyje tirpius (N-metilfenazino metosulfatą) [5,35] ir netirpius elektronų pernašos tarpininkus (ferocenkaboksirūgštį, 1,10-fenantrolino-5-6-dioną, tetrafulvaleną) [5].

Tačiau gliukozės koncentraciją mėginyje galima įvertinti nustatant H_2O_2 susidarantį fermentinės gliukozės oksidacijos metu dalyvaujant deguoniui (3 ir 4 lygtys).



Šių tyrimu metu buvo sukurtas bereagentis biologinis jutiklis, panaudojant GS elektrodą elektrochemiškai modifikuotą AuNS ir BM. Išsamesnis visų procesų paaiškinimas pateikiamas naudojant lygtis ir 2 schemą. Pirmiausia BM susintetintas ant AuNS/GS elektrodo elektrochemiškai redukuojamas iki Berlyno baltojo (BB) (5 lygtis) ir dalyvauja tolesnėje elektrocheminėje H_2O_2 redukcijoje [84,108], ir tos pačios reakcijos metu BB reoksiduojasi į BM (6 lygtis)



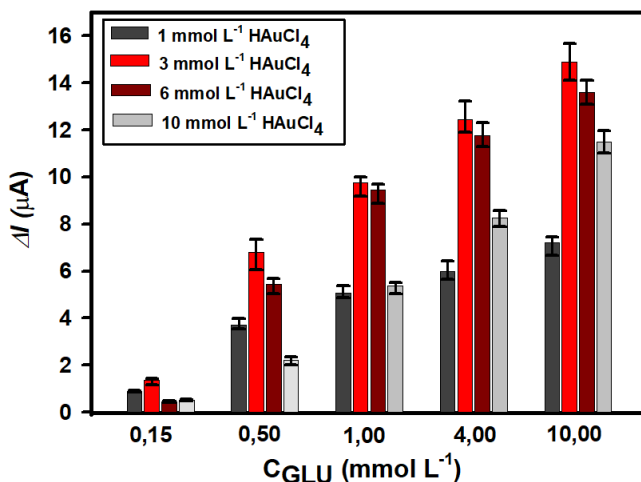
Fe^{2+} ir Fe^{3+} lygtyje (6) atitinka skirtingas Fe atomų oksidacijos būsenas BM struktūroje.

BM katalizuoja H_2O_2 elektrocheminė redukcija leidžia atlikti gliukozės kiekio nustatymą esant gerokai mažesniai potencialui, lyginant su anksčiau minėtais tyrimais, kuriuose buvo naudoti įvairūs elektronų pernašos tarpininkai. Ši savybė gali leisti išvengti pašalinių medžiagų poveikio, pagerinant gliukozės koncentracijos nustatymo tikslumą realiuose mėginiuose. Be to, BM katalizinė konstanta yra tris kartus didesnė už natūralių peroksidazių [109], todėl tai suteikia galimybę kurti itin jautrius biologinius jutiklius. Šių tyrimų tikslas buvo sukurti bereagentį gliukozės biologinį jutiklį ir įvertinti biologinio jutiklio su Nf-GOx/BM/AuNS/GS indikatoriniu elektrodu analizinius parametrus.

4.1 Optimalių bereagenčio gliukozės biologinio jutiklio veikimo sąlygų parinkimas

Pirmiausia ant GS elektrodo elektrochemiškai buvo susintetintos AuNS, o tada BM elektrochemiškai sintetintas ant AuNS. Galiausiai GOx buvo imobilizuota ant BM/AuNS nanokompozito padedant nafionui. BM taikymas kuriant gliukozės biologinį jutiklį leidžia lengvai elektrochemiškai, registruojant katodinės srovės stiprį, nustatyti H_2O_2 , susidarantį GOx

katalizuojamos gliukozės oksidacijos metu mėginyje, esant žemam indikatorinio elektrodo potencialui. Tuo tarpu AuNS padidina elektrochemiškai aktyvų paviršiaus plotą, pagerina GOx imobilizavimą ir užtikrina didesnę analizinį signalą. AuNS dydis bei pasiskirstymas GS elektrodo paviršiuje priklauso nuo HAuCl_4 koncentracijos tirpale, parinkto pagalbinio elektrolito, sintezės trukmės, temperatūros ir kitų parametrų. Elektrocheminės sintezės parametrai bei šio proceso trukmė daro labai didelę įtaką galutinei AuNS morfologijai [110]. Šio tyrimo metu H_2SO_4 buvo naudojamas kaip pagalbinis elektrolitas, siekiant elektrocheminiu metodu susintetinti kuo vienodesnio dydžio AuNS ir kad AuNS pasiskirstymas elektrodo paviršiuje būtų kuo tolygesnis [90]. Siekiant parinkti optimalią HAuCl_4 koncentraciją ir sukurti jautrų gliukozės biologinį jutiklį, AuNS sintezei tomis pačiomis sąlygomis buvo naudojamos keturios HAuCl_4 koncentracijos (1,0, 3,0, 6,0 ir 10,0 mmol L^{-1}). Po BM elektrocheminės sintezės GOx buvo imobilizuota ant BM/AuNS/GS iš anksto modifikuotų elektrodų ir padengti Nf.

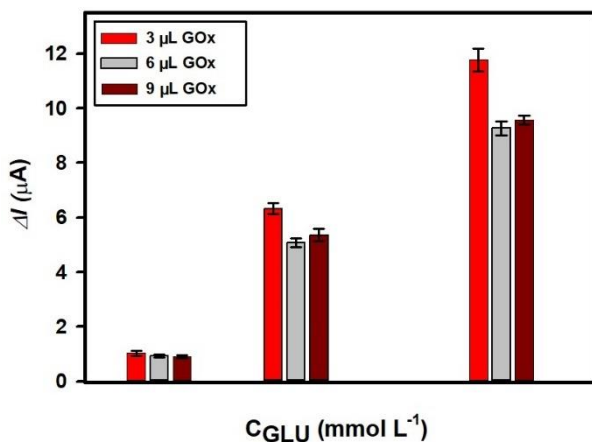


19 pav. Srovės stiprio pokytis užregistruotas biologiniu jutikliu su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodais į elektrocheminę celę pridėjus įvairias gliukozės koncentracijas. AuNS elektrocheminei sintezei buvo naudoti 1,0; 3,0; 6,0 ir 10,0 mmol L^{-1} HAuCl_4 tirpalai, kuriuose yra 0,2 mol L^{-1} H_2SO_4 , elektrodai suteikę $-0,2$ V potencialą 120 sek. Amperometrinis signalas esant $-0,05$ V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mol L^{-1} FBT su 0,1 mol L^{-1} KCl (pH 5,8).

Kaip matyti iš 19 pav. pateiktų duomenų, GS elektrodo modifikavimas AuNS visais atvejais daro teigiamą poveikį registruojamam analiziniams

signalui. Didžiausias srovės stiprio pokytis esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms buvo užfiksuotas naudojant Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodą, iš anksto modifikuotą AuNS gautomis iš 3,0 mmol L⁻¹ HAuCl₄ tirpalo, kai elektrodo paviršiuje užlašinta 3 μl GOx tirpalo. ΔI_{max} esant 0,5 mmol L⁻¹ gliukozės buvo $6,70 \pm 0,10 \mu A$. Tačiau ΔI_{max} gautas naudojant elektrodus iš anksto modifikuotus AuNS naudojant 1,0, 6,0 ir 10,0 mmol L⁻¹ HAuCl₄, buvo atitinkamai 1,8, 1,2 ir 3,1 karto mažesni. Ta pati tendencija buvo pastebėta esant ir didesnei gliukozės koncentracijai. Būtent 2,1, 1,1 ir 1,29 karto mažesnis ΔI_{max} buvo gautas esant 10,0 mmol L⁻¹ gliukozės. Remiantis gautais rezultatais, pasirinkta 3,0 mmol L⁻¹ HAuCl₄ koncentracija kaip optimali AuNS sintezei ir Nf-GOx/BM/AuNS/GS modifikuotų elektrodų pagrindu gliukozės biologinio jutiklio kūrimui.

Biologinio jutiklio signalas labai priklauso nuo imobilizuoto fermento kiekio elektrodo paviršiuje. Sekančiame biologinio jutiklio optimizavimo etape buvo nustatytas optimalus GOx kiekis ant BM/AuNS/GS elektrodo. Ant elektrodo modifikuoto AuNS (sintetinamos iš 3,0 mmol L⁻¹ HAuCl₄ tirpalo) ir BM užlašinama 3,0, 6,0 arba 9,0 μl 40 mg mL⁻¹ GOx tirpalo.



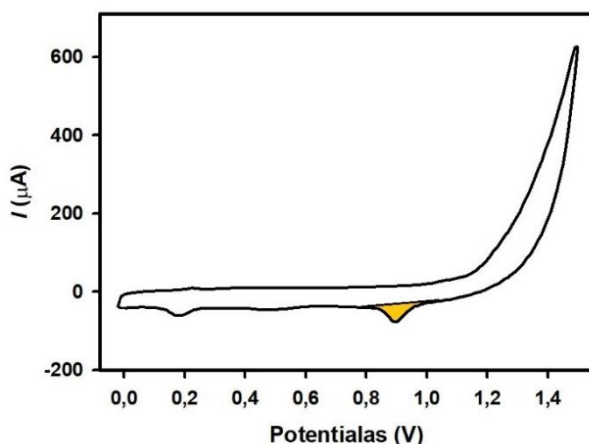
20 pav. Srovės stiprio pokytis į celę pridėjus įvairias gliukozės koncentracijas, nustatytas Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodais, po skirtingų kiekių 40 mg mL⁻¹ GOx imobilizavimo BM/AuNS/GS paviršiuje. Amperometrinis signalas esant -0,05 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ FBT su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 5,8).

20 pav. pateikti duomenys rodo, kad didžiausias signalo stiprio pokytis esant 0,5 mmol L⁻¹ gliukozės buvo registruojamas modifikavus elektrodą 3,0 μl GOx tirpalo ($\Delta I_{max} = 6,32 \pm 0,03 \mu A$). Naudojant 6,0 ir 9,0 μl GOx

tirpalo, užregistruoti analiziniai signalai buvo šiek tiek mažesni ($\Delta I_{max} = 5,08 \pm 0,03 \mu A$ ir $5,36 \pm 0,04 \mu A$). Analizinio signalo sumažėjimą labiausiai gali lemti substrato ir fermentinės reakcijos produktų difuzijos apribojimai, susidarant storesniam fermento sluoksniui. Todėl $3,0 \mu l$ GOx ant BM/AuNS/GS elektrodo paviršiaus laikomas optimaliu kiekiu tinkamu gliukozės biologinio jutiklio veikimui.

4.2 AuNS ir BM/AuNS nanokompozitų elektrochemiškai susintetintų GS elektrodo paviršiuje charakterizavimas

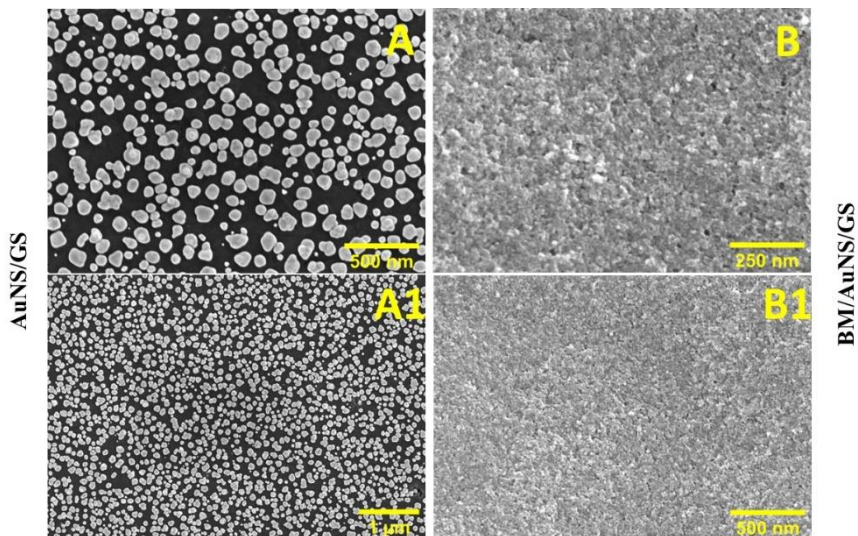
Parinkus optimalias sąlygas AuNS sintezei ant GS elektrodo paviršiaus, AuNS elektrochemiškai aktyvaus paviršiaus plotas buvo įvertintas ciklinės voltamperometrijos metodu $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ tirpale naudojant $0,1 \text{ V s}^{-1}$ potencialo skleidimo greitį. Šių matavimų metu registruojama aukso oksido redukcija ties $+0,9 \text{ V}$ (21 pav.). Elektrocheminiu metodu susintetintų AuNS (sintzei naudojant $3,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$ koncentracijos tirpalą su $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$) nustatytas elektroaktyvaus paviršiaus plotas buvo $0,132 \text{ cm}^2$. Elektrochemiškai aktyvaus paviršiaus plotas padidėjo 1,86 karto lyginant su GS elektrodo paviršiaus plotu, kuris yra $0,071 \text{ cm}^2$. AuNS ir BM/AuNS nanokompozitai gauti geriausiomis biologinio jutiklio modifikavimo sąlygomis buvo ištirti FE-SEM.



21 pav. AuNS/GS ciklinė voltamperograma, užrašyta celę užpildžius $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Potencialas buvo skleidžiamas $0,1 \text{ V s}^{-1}$ greičiu.

AuNS yra polidispersinės ir dažniausiai apskritos formos, jų skersmuo yra $84 \pm 35 \text{ nm}$. Tačiau kaip matyti iš pateiktų vaizdų 22 pav., ne visas GS elektrodo paviršius yra padengtas AuNS. Elektrodo paviršius po BM/AuNS

nanokompozito sintezės yra lygesnis ir beveik visą GS elektrodo paviršių užima BM/AuNS nanokompozitas. Gauti rezultatai patvirtina sėkmingą AuNS ir BM sintezę. Remiantis duomenimis darome išvadą, kad BM buvo susintetintas ant AuNS ir neuždengto GS elektrodo paviršiaus.

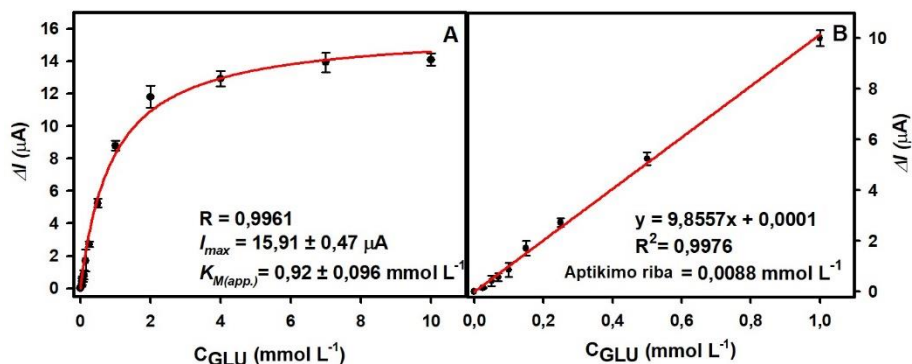


22 pav. AuNS (A, A1) ir BM/AuNS nanokompozito (B, B1) FE-SEM vaizdai, gauti elektrochemiškai padengus GS elektrodą.

4.3 Sukurto biologinio jutiklio analizinių charakteristikų tyrimai

Sekančiame tyrimų etape buvo ištirtas optimaliomis sąlygomis paruošto elektrodo veikimas. Elektrocheminė celė buvo užpildoma $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ FBT tirpalu su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 5,8) ir signalas registruojamas esant $-0,05 \text{ V}$ potencialui. Buvo stebima GOx modifikuotų elektrodų hiperbolinė analizinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos intervale nuo $0,025$ iki $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Iš pateiktų 23 pav. duomenų matome, kad didėjant gliukozės koncentracijai srovės stiprio pokytis didėja, kol pasiekiamas įsotinimas, esant didesnei nei $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės koncentracijai. Tai leidžia daryti prielaidą, kad fermento aktyvūs centrai yra užimti gliukoze esant šiai gliukozės koncentracijai. Sukurto biologinio jutiklio ΔI_{max} buvo $15,91 \pm 0,47 \mu\text{A}$ ($R = 0,9961$), o $K_M^{\text{tar.}} = 0,92 \pm 0,096 \text{ mmol L}^{-1}$. Tiesinės signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos intervalas nuo $0,025$ iki $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9976$). Nustatyta gliukozės aptikimo riba yra $0,0088 \text{ mmol L}^{-1}$, kai signalo ir triukšmų santykis lygus 3.



23 pav. (A) Biologinio jutiklio su optimaliomis sąlygomis modifikuotu Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. (B) Srovės stiprio pokyčio tiesinės priklausomybės intervalas. Amperometrinis signalas esant $-0,05 V$ potencialui buvo užregistruotas $0,05 mmol L^{-1}$ FBT buferyje su $0,1 mol L^{-1}$ KCl (pH 5,8).

Gliukozės biologinių jutiklių sukurtų BM pagrindu, analiziniai parametrai palyginti 2 lentelėje. Kaip matyti iš apibendrintų rezultatų, sukurtas biologinis jutiklis pasižymėjo 5,7 karto mažesne aptikimo riba, lyginant su gliukozės biologiniu jutikliu, sukurtu naudojant anglinio audinio dalį modifikuotą koralų tipo aukso mikro/nanostruktūromis ir BM [111], daugiau kaip 11 kartų mažesnė lyginant su biologiniu jutikliu, sukurtu naudojant azotu-legiruotą grafito putų elektrodą su BM dalelėmis [112] ir apie 17 kartų mažesniu jei lyginsime su anglies spausdinto montažo elektrodais, kurių pagrindą sudaro porėtas grafeno aerogelis ir BM bei chitozano sluoksnis [113]. Beveik visuose aptartuose biologiniuose jutikliuose, išskyrus biologinį jutiklį modifikuotą BM–aukso nanokompozitinėmis plėvelėmis bei platinos nanoklasteriais, susintetintais ant stikliškosios anglies elektrodo [53], buvo pasiekta mažesnė gliukozės aptikimo riba. Tačiau minėtame biologiniame jutiklyje buvo taikyta sudėtingesnė elektrodo modifikavimo procedūra, apimanti BM–aukso nanokompozitinių plėvelių ir platinos nanovamzdelių derinį. Nepaisant minėtų privalumų šiame biologiniame jutiklyje taikomos kelios nanostruktūros, todėl tokių biologinių jutiklių paruošimas sudėtingesnis. Sukurto biologinio jutiklio tiesinės priklausomybės intervalas yra nuo $0,025$ iki $1,0 mmol L^{-1}$ gliukozės ir jis gali veikti esant mažesnėms gliukozės koncentracijoms nei biologinis jutiklis kur elektrodas modifikuotas koralų tipo aukso mikro/nanostruktūromis ir BM [111], tačiau viršutinė riba yra mažesnė ar panaši į biologinio jutiklio kur BM–aukso

nanokompozitinės plėvelės bei platinos nanoklasteriai naudojami stikliškosios anglies elektrodo modifikavimui [53]. Be to, sukurtas naujas amperometrinis gliukozės biologinis jutiklis yra tinkamas gliukozės koncentracijos nustatymui praskiestuose mėginiuose, užtikrinant biologinio jutiklio pritaikomumą kliniškai svarbių gliukozės koncentracijų nustatymui.

2. Lentelė. Gliukozės biologinių jutiklių modifikuotų PB palyginimas.

Modifikuotas darbinis elektrodas*	Potencialas/Tirpalas	Aptikimo riba	Tiesinės priklausomybės intervalas	Nuorodos
Nf-GOx/Pt-NCs/BM-Au/GC	-0,15 V / 0,1 mol L ⁻¹ KNO ₃ (pH 6,0)	0,001 mmol L ⁻¹	0,003–1,1 mmol L ⁻¹	[53]
CTS/GOx/GA@BM/CSME	-0,35 V/0,01 mol L ⁻¹ FBT	0,15 mmol L ⁻¹	0,5–6,0 mmol L ⁻¹	[113]
GOx@BM/koralinėsAuNS/CC	-0,05 V/0,1 mol L ⁻¹ FBT su 0,1 mol L ⁻¹ KCl (pH 6,0)	0,05 mmol L ⁻¹	0,15–6,65 mmol L ⁻¹	[111]
GOx-PCBM/Pt	-0,05 V/ 0,1 mol L ⁻¹ FBT su 0,1 mol L ⁻¹ KCl (pH 6,5)	0,03 mmol L ⁻¹	0,03–0,4 mmol L ⁻¹	[114]
GOx/BM/NGP	-0,05 V/ 0,1 mol L ⁻¹ FBT su 0,1 mol L ⁻¹ KCl (pH 6,0)	0,1 mmol L ⁻¹	0,2 ~ 20,0 mmol L ⁻¹	[112]
GOx-PDA/BM/GC	-0,0 V/ 0,05 mol L ⁻¹ FBT su 0,1 mol L ⁻¹ KCl (pH 7,4).	0,0462 mmol L ⁻¹	0,2–3,4 mmol L ⁻¹	[115]
Nf/GOx/BM/AuNS/GR	-0,05 V / 0,05 mol L ⁻¹ FBT su 0,1 mol L ⁻¹ KCl (pH 5,8).	0,0088 mmol L ⁻¹	0,025–1,0 mmol L ⁻¹	Šis darbas

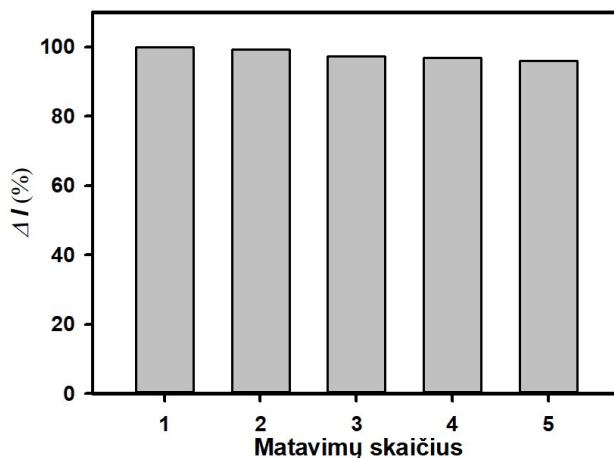
Sutrumpinimai: Pt-NCs – platinos nanoklasteriai; BM-Au – Berlyno mėlio-aukso nanokompozitas; CTS – chitozanas; GA@BM – grafeno aerogelio ir Berlyno mėlio kompozitas; CSME – anglies spausdinto montažo elektrodas; GC – stikliškosios anglies elektrodas; CC – anglinis audinys; PCBM – porėtos anglies ir BM kompozitas; Pt – platinos elektrodas; NGP – azotu legiruoto grafito putų elektrodas; BM/NGF – NGP su BM dalelėmis; PDA – polidopaminas.

4.4 Nf-GOx/BM/AuNS/GS savybių tyrimas

Analizinio signalo pakartojamumas, elektrochemiškai aktyvių medžiagų įtaka analiziniam signalui ir substratinis atrankumas yra labai svarbios biologinio jutiklio charakteristikos.

Pakartojamumo tyrimui elektrodas buvo ruošiamas nustatytomis optimaliomis sąlygomis, matavimai atliekami esant 1 mmol L⁻¹ gliukozės koncentracijai penkis kartus. Matavimai atliekami tą pačią dieną, tomis pačiomis sąlygomis elektrocheminėje celėje užpildytoje 0,05 mmol L⁻¹ FBT

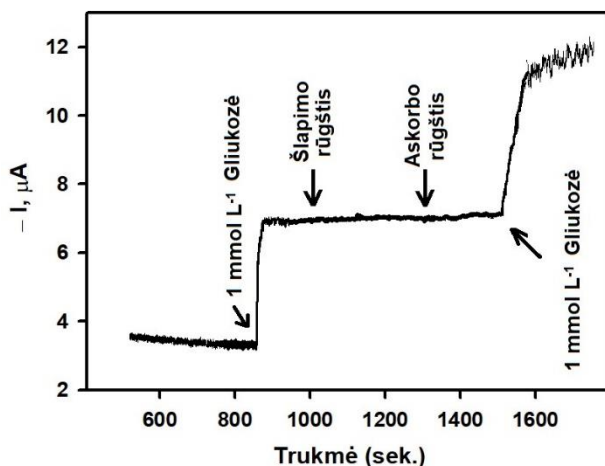
su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 5,8). Po antrojo matavimo srovės stiprio pokytis sumažėjo 0,7 %. Po penkių matavimų išliko 96 % pradinio srovės stiprio pokyčio (24 pav.).



24 pav. Biologinio jutiklio su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, atliekant pakartotinius matavimus. Amperometrinis signalas esant $-0,05 \text{ V}$ potencialui buvo užregistruotas $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ FBT buferyje su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 5,8) ir 1 mmol L^{-1} gliukozės.

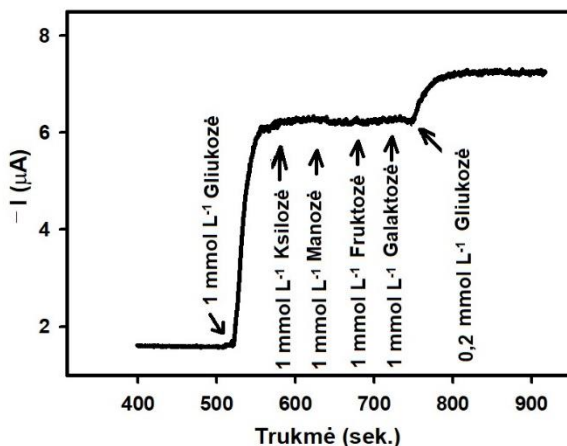
Vienas iš iššūkių su kuriais susiduriama kuriant biologinius jutiklius yra pastangos sumažinti arba neutralizuoti pašalinių medžiagų poveikį jutiklio signalui. Norint įvertinti trukdančių medžiagų įtaką analiziniam signalui, biologinio jutiklio srovės stiprio pokytis buvo išmatuotas optimaliomis sąlygomis paruoštu elektrodu į elektrocheminę celę pridedant $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ elektrocheminius trukdžius sukeliančių medžiagų – šlapimo rūgšties ir askorbo rūgšties. Kaip matome iš 25 pav. pateiktų duomenų, biologinis jutiklis greitai reagavo į $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės pridėjimą į FBT tirpalą. Tuo tarpu buvo stebimas tik nereikšmingas srovės stiprio pokytis pridėjus $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ šlapimo rūgšties ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ askorbo rūgšties. Kai į tirpalą, kuriame yra tirtų elektrochemiškai aktyvių medžiagų buvo pridėta $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės, biologinio jutiklio srovės stiprio pokytis buvo toks pat kaip pirmą kartą pridėjus gliukozės. Gauta pašalinių medžiagų įtaka yra nereikšminga analiziniam signalui. Tai gali lemti tyrimams naudojamas mažas potencialas dėl BM naudojimo elektrodo paruošimui [116,117] ir suformuotos Nf plėvelės elektrodo paviršiuje, kuri dar

labiau slopina elektrochemiškai aktyvių medžiagų prasiskverbimą link elektrodo paviršiaus [118].



25 pav. Srovės stiprio kitimas į celę įnešus gliukozės, šlapimo rūgšties ir askorbo rūgšties, nustatytas biologiniu jutikliu su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu. Amperometrinis signalas esant $-0,05$ V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ FBT buferyje su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 5,8).

Taip pat šių tyrimų metu buvo įvertinta struktūriškai panašių medžiagų, tokių kaip ksilozė, manozė, fruktozė ir galaktozė, įtaka analiziniam signalui.



26 pav. Srovės stiprio kitimas laike į celę pridedant gliukozės, fruktozės, manozės, ksilozės, galaktozės, nustatytas biologiniu jutikliu su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu. Amperometrinis signalas esant $-0,05$ V

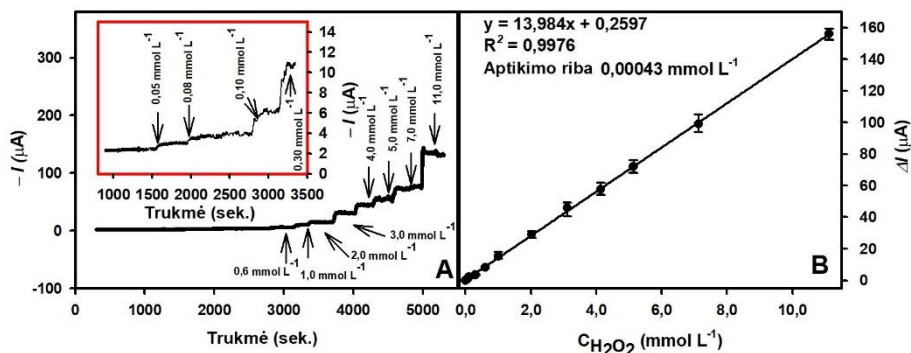
potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ FBT buferyje su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 5,8) ir 1 mmol L⁻¹ gliukozės.

Kai bazinė srovė pasiekė pastovią vertę, į elektrocheminę celę buvo įpilama 1,0 mmol L⁻¹ gliukozės ir stebimas srovės kitimas laike. Po to nusistovėjęs signalui buvo įpilta po 1,0 mmol L⁻¹ ksilozės, manozės, fruktozės ir galaktozės ir galiausiai 0,2 mmol L⁻¹ gliukozės. Iš pateiktų 26 pav. duomenų akivaizdžiai matyti, kad nustatytomis eksperimentinėmis sąlygomis sukurtas biologinis jutiklis atrankus tik gliukozei.

4.5 H₂O₂ nustatymas naudojant elektrodą modifikuotą BM/AuNS/GS

Siekiant patvirtinti biologinio jutiklio gebėjimą nustatyti H₂O₂, BM/AuNS/GS elektrodas buvo tiriamas esant skirtingoms H₂O₂ koncentracijoms. AuNS/GS elektrodo paviršiuje buvo susintetintas BM. Paruoštas elektrodas buvo naudojamas amperometriniais tyrimams FBT tirpale esant -0,05 V potencialui. Nusistovėjęs signalui, į elektrocheminę celę buvo įpilamas tam tikras H₂O₂ kiekis.

Kaip matyti iš 27 pav. A dalyje pateiktų rezultatų, tipinės srovės priklausomybės laike yra registruojamos, pridedant į celę H₂O₂. Didinant H₂O₂ koncentraciją celėje, didėja ir registruojamas signalas. Tiesinė priklausomybė nuo H₂O₂ koncentracijos stebima visame tirtų koncentracijų intervale, t.y. nuo 0,05 iki 11,0 mmol L⁻¹ (27 pav. B), o apskaičiuota aptikimo riba yra 0,00043 mmol L⁻¹.



27 pav. (A) Biologinio jutiklio su BM/AuNS/GS elektrodu srovės stiprio kitimas laike į celę pridedant vandenilio peroksido. (B) Tiesinės priklausomybės nuo vandenilio peroksido koncentracijos intervalas. Amperometrinis signalas esant -0,05 V potencialui buvo užregistruotas 0,05 mmol L⁻¹ FBT buferyje su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 5,8).

4.6 Sukurto biologinio jutiklio taikymas gliukozės nustatymui žmogaus kraujo serumo mėginyje

Įvertinus trukdančių medžiagų įtaką, sukurto biologinio jutiklio veikimas buvo patikrintas 10 kartų 0,05 mmol L⁻¹ FBT su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 5,8) buferiniu tirpalu praskiestame žmogaus serume. Paruoštame ir praskiestame serumo mėginyje komerciniu gliukometru buvo nustatyta, 0,49 mmol L⁻¹ gliukozės koncentracija. Elektrocheminiai matavimai buvo atliekami naudojant priedų metodą, pridedant žinomos koncentracijos gliukozės tirpalą. Kiekvienos gliukozės koncentracijos matavimai buvo kartojami tris kartus, o gauti rezultatai išreikšti vidutinėmis reikšmėmis yra pateikti 3 lentelėje. Gliukozės išgava žmogaus serume buvo 101 – 102 %, santykinė paklaida 0,69 – 0,84 %. Todėl galime teigti, kad sukurtas biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikytas gliukozės nustatymui žmonių kraujo serumuose.

3 lentelė. Gliukozės koncentracijos nustatymas skiestame žmogaus kraujo serume, naudojant elektrocheminį biologinį jutiklį su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu

*Gliukozės koncentracija serume buvo nustatyta naudojant komercinį gliukometrą

Koncentracija serume, mmol L ⁻¹ *	Pridėta koncentracija, mmol L ⁻¹	Nustatyta koncentracija, mmol L ⁻¹	Išgava, %	Santykinė paklaida, % (n = 3)
0,49	0,5	1,01	102	0,84
0,49	1,0	1,51	101	0,74
0,49	1,5	2,02	101	0,69

FreeStyleOptium ART16648 Rev. B 05/10.

IŠVADOS

1. Optimaliomis sąlygomis ant GS elektrodo elektrochemiškai susintetintos DAuNS padidina gliukozės biologiniu jutikliu registruojamą analizinį signalą, kai tirpale yra FMS. Geriausi rezultatai gaunami kovalentiškai imobilizavus GOx per 11-MUR SAM suformuotą ant DAuNS ir papildomai fermento molekules sujungiant kryžmiškai GA garais (III-as metodas). Šiuo atveju apskaičiuotas ΔI_{max} lygus $384,20 \pm 16,06 \mu A$ yra 20 kartų didesnis lyginant su elektrodu, kurio paruošimui GOx buvo tik kovalentiškai imobilizuota ant SAM ir 1,41 kartus didesnis, lyginant su elektrodu, kur GOx buvo adsorbuota ant DAuNS bei papildomai sujungta GA garais.
2. Tiesinės priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos intervalas naudojant GA-GOx-SAM/DAuNS/GS (III-as GOx imobilizavimo metodas) ir GA-GOx/DAuNS/GS (I-as GOx imobilizavimo metodas) elektrodus tiek buferyje, tiek kraujo serume yra nuo 0,1 iki 10 mmol L^{-1} gliukozės. Atitinkamai gliukozės aptikimo riba šiems elektrodams yra 0,019 ir $0,022 \text{ mmol L}^{-1}$. Pasirinkti gliukozės biologinio jutiklio modeliai gali būti sėkmingai taikomi atliekant analizę kraujo serume. Nustatyta, kad geresniu stabilumu pasižymi elektrodas naudojant III-ą GOx imobilizavimo metodą.
3. Bereagenčiu gliukozės biologiniu jutikliu, naudojant GS elektrodą optimaliomis sąlygomis elektrochemiškai modifikuotą AuNS ir BM, buvo sėkmingai registruojama redukcija H_2O_2 susidariusio fermentinės gliukozės oksidacijos metu. H_2O_2 aptikimo riba $0,00043 \text{ mmol L}^{-1}$.
4. Biologiniu jutikliu su Nf-GOx/BM/AuNS/GS elektrodu registruojamas ΔI_{max} yra lygus $15,91 \pm 0,47 \mu A$, tiesinės priklausomybės intervalas nuo 0,025 iki 1 mmol L^{-1} , o gliukozės aptikimo riba $0,0088 \text{ mmol L}^{-1}$. Sukurtas biologinis jutiklis gali būti sėkmingai pritaikomas mažų gliukozės koncentracijų nustatymui mėginiuose.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Federation, I.D. IDF Diabetes Atlas, Tenth. Int. Diabetes 2021.
2. Hassan, M.H.; Vyas, C.; Grieve, B.; Bartolo, P. Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. *Sensors* 2021, 21, 4672.
3. Özbek, M.; Yaşar, A.; Cete, S.; Er, E.; Erk, N. A Novel Biosensor Based on Graphene/Platinum Nanoparticles/Nafion Composites for Determination of Glucose. *J. Solid State Electrochem.* 2021, 25, 1–10.
4. Kumar, A.; Gangwar, R.; Ahmad Zargar, A.; Kumar, R.; Sharma, A. Prevalence of Diabetes in India: A Review of IDF Diabetes Atlas 10th Edition. *Curr. Diabetes Rev.* 2024, 20, 105–114.
5. German, N.; Popov, A.; Ramanaviciene, A. The Development and Evaluation of Reagentless Glucose Biosensors Using Dendritic Gold Nanostructures as a Promising Sensing Platform. *Biosensors* 2023, 13, 727.
6. ZA, K. Klinikinės Biochemijos Ir Laboratorinės Diagnostikos Pagrindai. Vilnius Vilniaus Univ. leidykla 2008, 318–373.
7. Arroyave, F.; Montaña, D.; Lizcano, F. Diabetes Mellitus Is a Chronic Disease That Can Benefit from Therapy with Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8685.
8. Rahman, M.S.; Hossain, K.S.; Das, S.; Kundu, S.; Adegoke, E.O.; Rahman, M.A.; Hannan, M.A.; Uddin, M.J.; Pang, M.-G. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6403.
9. Rachdaoui, N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1770.
10. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2019, 157, 107843.
11. Özer, B.O.; Çete, S. Development of a Novel Biosensor Based on a Polypyrrole–Dodecylbenzene Sulphonate (PPy–DBS) Film for the Determination of Amperometric Cholesterol. *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.* 2017, 45, 824–832.
12. Tan, B.; Baycan, F. Fabricating a New Immobilization Matrix Based on a Conjugated Polymer and Application as a Glucose Biosensor. *J. Appl. Polym. Sci.* 2023, 140, e53268.
13. Banu, N.D.; Jerca, F.A.; Jerca, V.V. 13 - Biosensors. In; Pal, K., Banerjee, I., Sarkar, P., Bit, A., Kim, D., Anis, A., Maji Medical, and Environmental Applications of Polysaccharides, S.B.T.-F., Eds.; Elsevier, 2021; pp. 381–400 ISBN 978-0-12-819239-9.
14. Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical

- biosensors: recommended definitions and classification* . *Anal. Lett.* 2001, 34, 635–659.
15. Turner, A.; Karube, I.; Wilson, G.S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*; Oxford university press, 1987;
 16. Huang, Y.; Xu, J.; Liu, J.; Wang, X.; Chen, B. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* 2017, 17, 2375.
 17. Mohd Said, N.A.; Ogurtsov, V.; Herzog, G. Electrochemical biosensor based on microfabricated electrode arrays for life sciences applications, 2014.
 18. Clark, L.C.J.; Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 102, 29–45.
 19. Juska, V.B.; Pemble, M.E. A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems. *Sensors* 2020, 20, 6013.
 20. Borgmann, S.; Schulte, A.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W. Amperometric Biosensors. *Adv. Electrochem. Sci. Eng. Bioelectrochemistry* 2011, 13, 1–83.
 21. Haun, J.B.; Yoon, T.; Lee, H.; Weissleder, R. Magnetic Nanoparticle Biosensors. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 2010, 2, 291–304.
 22. Rocha-Santos, T.A.P. Sensors and Biosensors Based on Magnetic Nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014, 62, 28–36.
 23. German, N.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Electrochemical Deposition of Gold Nanoparticles on Graphite Rod for Glucose Biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* 2014, 203, 25–34.
 24. Nanduri, V.; Sorokulova, I.B.; Samoylov, A.M.; Simonian, A.L.; Petrenko, V.A.; Vodyanoy, V. Phage as a Molecular Recognition Element in Biosensors Immobilized by Physical Adsorption. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 986–992.
 25. Li, F.; Chen, W.; Zhang, S. Development of DNA Electrochemical Biosensor Based on Covalent Immobilization of Probe DNA by Direct Coupling of Sol–Gel and Self-Assembly Technologies. *Biosens. Bioelectron.* 2008, 24, 781–786.
 26. Teles, F.R.R.; Fonseca, L.P. Applications of Polymers for Biomolecule Immobilization in Electrochemical Biosensors. *Mater. Sci. Eng. C* 2008, 28, 1530–1543.
 27. Wen, Y.; Xu, J.; Liu, M.; Li, D.; Lu, L.; Yue, R.; He, H. A Vitamin C Electrochemical Biosensor Based on One-Step Immobilization of Ascorbate Oxidase in the Biocompatible Conducting Poly (3, 4-Ethylenedioxythiophene)-Lauroylsarcosinate Film for Agricultural Application in Crops. *J. Electroanal. Chem.* 2012, 674, 71–82.
 28. Sensors, P.E. Real-Time Telemetry System for Amperometric and Potentiometric Electrochemical Sensors. 2011, 8593–8610.
 29. Iqbal, M.A.; Gupta, S.G.; Hussaini, S.S. A Review on Electrochemical

- Biosensors: Principles and Applications. *Adv. Biores.* 2012, 3, 158–163.
30. Wang, W.-S.; Huang, H.-Y.; Chen, S.-C.; Ho, K.-C.; Lin, C.-Y.; Chou, T.-C.; Hu, C.-H.; Wang, W.-F.; Wu, C.-F.; Luo, C.-H. Real-Time Telemetry System for Amperometric and Potentiometric Electrochemical Sensors. *Sensors* 2011, 11, 8593–8610.
 31. Pohanka, M.; Skládal, P. Electrochemical Biosensors-Principles and Applications. *J. Appl. Biomed.* 2008, 6, 57–64.
 32. Ramanavicius, A. *Elektrai Laidūs Polimerai Elektrocheminiuose Biologiniuose Jutikliuose*; Vilniaus universiteto leidykla, 2005;
 33. Rapp, B.E.; Gruhl, F.J.; Länge, K. Biosensors with Label-Free Detection Designed for Diagnostic Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398, 2403–2412.
 34. Karyakin, A.A.; Gitelmacher, O. V; Karyakina, E.E. Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2419–2423.
 35. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* 2008, 108, 814–825.
 36. Poulos, N.G.; Hall, J.R.; Leopold, M.C. Functional Layer-by-Layer Design of Xerogel-Based First-Generation Amperometric Glucose Biosensors. *Langmuir* 2015, 31, 1547–1555.
 37. Wang, J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanal. An Int. J. Devoted to Fundam. Pract. Asp. Electroanal.* 2001, 13, 983–988.
 38. Teymourian, H.; Moonla, C.; Tehrani, F.; Vargas, E.; Aghavali, R.; Barfidokht, A.; Tangkuaram, T.; Mercier, P.P.; Dassau, E.; Wang, J. Microneedle-Based Detection of Ketone Bodies along with Glucose and Lactate: Toward Real-Time Continuous Interstitial Fluid Monitoring of Diabetic Ketosis and Ketoacidosis. *Anal. Chem.* 2019, 92, 2291–2300.
 39. German, N.; Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Formation and Electrochemical Evaluation of Polyaniline and Polypyrrole Nanocomposites Based on Glucose Oxidase and Gold Nanostructures. *Polymers (Basel)*. 2020, 12, 3026.
 40. Sekretaryova, A.N.; Vokhmyanina, D. V; Chulanova, T.O.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Reagentless Biosensor Based on Glucose Oxidase Wired by the Mediator Freely Diffusing in Enzyme Containing Membrane. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1220–1223.
 41. Rafighi, P.; Tavahodi, M.; Haghighi, B. Fabrication of a Third-Generation Glucose Biosensor Using Graphene-Polyethyleneimine-Gold Nanoparticles Hybrid. *Sensors Actuators B Chem.* 2016, 232, 454–461.
 42. Mehmeti, E.; Stanković, D.M.; Chaiyo, S.; Zavasnik, J.; Žagar, K.; Kalcher, K. Wiring of Glucose Oxidase with Graphene Nanoribbons: An Electrochemical Third Generation Glucose Biosensor. *Microchim.*

- Acta 2017, 184, 1127–1134.
43. Putzbach, W.; Ronkainen, N.J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* 2013, 13, 4811–4840.
 44. Trisolini, L.; Gambacorta, N.; Gorgoglione, R.; Montaruli, M.; Laera, L.; Colella, F.; Volpicella, M.; De Grassi, A.; Pierri, C.L. FAD/NADH Dependent Oxidoreductases: From Different Amino Acid Sequences to Similar Protein Shapes for Playing an Ancient Function. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 2117.
 45. Guiseppi-Elie, A.; Choi, S.-H.; Geckeler, K.E. Ultrasonic Processing of Enzymes: Effect on Enzymatic Activity of Glucose Oxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2009, 58, 118–123.
 46. German, N.; Popov, A.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Development and Practical Application of Glucose Biosensor Based on Dendritic Gold Nanostructures Modified by Conducting Polymers. *Biosensors* 2022, 12, 641.
 47. Crnoglavac Popović, M.; Stanišić, M.; Prodanović, R. State of the Art Technologies for High Yield Heterologous Expression and Production of Oxidoreductase Enzymes: Glucose Oxidase, Cellobiose Dehydrogenase, Horseradish Peroxidase, and Laccases in Yeasts *P. Pastoris* and *S. Cerevisiae*. *Fermentation* 2024, 10, 93.
 48. Diabetes, U.K. *Www. Who. Int/Ith.* 2005.
 49. Herman, W.H. The Global Burden of Diabetes: An Overview. *Diabetes Mellit. Dev. Ctries. underserved communities* 2017, 1–5.
 50. Bruen, D.; Delaney, C.; Florea, L.; Diamond, D. Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* 2017, 17, 1866.
 51. Heller, A. Integrated Medical Feedback Systems for Drug Delivery. *AIChE J.* 2005, 51, 1054–1066.
 52. Heller, A.; Feldman, B. Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2482–2505.
 53. Wang, C.; Chen, S.; Xiang, Y.; Li, W.; Zhong, X.; Che, X.; Li, J. Glucose Biosensor Based on the Highly Efficient Immobilization of Glucose Oxidase on Prussian Blue-Gold Nanocomposite Films. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2011, 69, 1–7.
 54. Yadav, H.M.; Lee, J.-J. One-Pot Synthesis of Copper Nanoparticles on Glass: Applications for Non-Enzymatic Glucose Detection and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *J. Solid State Electrochem.* 2019, 23, 503–512.
 55. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30, 489–511.
 56. Wang, X.; Uchiyama, S. Polymers for Biosensors Construction. *State art biosensors—general Asp.* 2013, 3, 67–84.
 57. Zucca, P.; Sanjust, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent

- Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* 2014, 19, 14139–14194.
58. Sheldon, R.A.; Schoevaart, R.; Van Langen, L.M. Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization (a Review). *Biocatal. Biotransformation* 2005, 23, 141–147.
 59. Nguyen, H.H.; Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol.* 2017, 26, 157–163.
 60. Kim, D.-M.; Kim, M.; Reddy, S.S.; Cho, J.; Cho, C.; Jung, S.; Shim, Y.-B. Electron-Transfer Mediator for a NAD-Glucose Dehydrogenase-Based Glucose Sensor. *Anal. Chem.* 2013, 85, 11643–11649.
 61. Kausaite-Minkstimiene, A.; Mazeiko, V.; Ramanaviciene, A.; Oztekin, Y.; Osman Solak, A.; Ramanavicius, A. Evaluation of Some Redox Mediators in the Design of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor. *Electroanalysis* 2014, 26, 1528–1535.
 62. Madkour, L.H.; Madkour, L.H. Classification of Nanostructured Materials. *Nanoelectron. Mater. Fundam. Appl.* 2019, 269–307.
 63. Asha, A.B.; Narain, R. Nanomaterials Properties. In *Polymer science and nanotechnology*; Elsevier, 2020; pp. 343–359.
 64. Nasrollahzadeh, M.; Issaabadi, Z.; Sajjadi, M.; Sajadi, S.M.; Atarod, M. Types of Nanostructures. *Interface Sci. Technol.* 2019, 28, 29–80.
 65. Joudeh, N.; Linke, D. Nanoparticle Classification, Physicochemical Properties, Characterization, and Applications: A Comprehensive Review for Biologists. *J. Nanobiotechnology* 2022, 20, 262.
 66. Zhang, X. Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochem. Biophys.* 2015, 72, 771–775.
 67. Zhang, W.; Wang, F.; Wang, Y.; Wang, J.; Yu, Y.; Guo, S.; Chen, R.; Zhou, D. PH and Near-Infrared Light Dual-Stimuli Responsive Drug Delivery Using DNA-Conjugated Gold Nanorods for Effective Treatment of Multidrug Resistant Cancer Cells. *J. Control. Release* 2016, 232, 9–19.
 68. Zeng, S.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Dinh, X.-Q.; Yu, X.; Luan, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* 2011, 6, 491–506.
 69. Elahi, N.; Kamali, M.; Baghersad, M.H. Recent Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: A Review. *Talanta* 2018, 184, 537–556.
 70. Takahashi, Y.; Wanibuchi, M.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kano, K. Improved Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis of Bilirubin Oxidase Using Porous Gold Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 2019, 843, 47–53.
 71. Ramanaviciene, A.; German, N.; Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanavicius, A. Glucose Biosensor Based on Dendritic Gold Nanostructures Electrodeposited on Graphite Electrode by Different

- Electrochemical Methods. *Chemosensors* 2021, 9, 188.
72. Samain, L.; Grandjean, F.; Long, G.J.; Martinetto, P.; Bordet, P.; Strivay, D. Relationship between the Synthesis of Prussian Blue Pigments, Their Color, Physical Properties, and Their Behavior in Paint Layers. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 9693–9712.
 73. Musen, L.; Purchase, R.; Safari, P.; Judd, M.; Barker, E.C.; Reimers, J.R.; Cox, N.; Low, P.J.; Krausz, E. Identification of the Chromophores in Prussian Blue. *arXiv Prepr. arXiv2307.03883* 2023.
 74. Davies, J.A. *Synthetic Coordination Chemistry: Principles and Practice*; World Scientific, 1996; ISBN 9810220847.
 75. Wu, X.; Shao, M.; Wu, C.; Qian, J.; Cao, Y.; Ai, X.; Yang, H. Low Defect FeFe (CN) 6 Framework as Stable Host Material for High Performance Li-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 23706–23712.
 76. Chadwick, B.M.; Sharpe, A.G. Transition Metal Cyanides and Their Complexes. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 1966, 8, 83–176.
 77. Piernas Muñoz, M.J.; Castillo Martínez, E.; Piernas Muñoz, M.J.; Castillo Martínez, E. Prussian Blue and Its Analogues. Structure, Characterization and Applications. *Prussian Blue Based Batter.* 2018, 9–22.
 78. Lee, S.-H.; Huh, Y.-D. Preferential Evolution of Prussian Blue's Morphology from Cube to Hexapod. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012, 33, 1078–1080.
 79. Zakaria, M.B.; Chikyow, T. Recent Advances in Prussian Blue and Prussian Blue Analogues: Synthesis and Thermal Treatments. *Coord. Chem. Rev.* 2017, 352, 328–345.
 80. Grandjean, F.; Samain, L.; Long, G.J. Characterization and Utilization of Prussian Blue and Its Pigments. *Dalt. Trans.* 2016, 45, 18018–18044.
 81. Zhang, X.Q.; Gong, S.W.; Zhang, Y.; Yang, T.; Wang, C.Y.; Gu, N. Prussian Blue Modified Iron Oxide Magnetic Nanoparticles and Their High Peroxidase-like Activity. *J. Mater. Chem.* 2010, 20, 5110–5116.
 82. Karyakin, A.A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* 2001, 13, 813–819.
 83. Yan, L.; Miao, K.; Ma, P.; Ma, X.; Bi, R.; Chen, F. A Feasible Electrochemical Biosensor for Determination of Glucose Based on Prussian Blue – Enzyme Aggregates Cascade Catalytic System. *Bioelectrochemistry* 2021, 141, 107838.
 84. Zhang, X.; Li, G.; Wu, D.; Li, X.; Hu, N.; Chen, J.; Chen, G.; Wu, Y. Recent Progress in the Design Fabrication of Metal-Organic Frameworks-Based Nanozymes and Their Applications to Sensing and Cancer Therapy. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 137, 178–198.
 85. Karyakin, A.A.; Karyakina, E.E. Electroanalytical Applications of Prussian Blue and Its Analogs. *Russ. Chem. Bull.* 2001, 50, 1811–1817.

86. Gao, Z. Da; Qu, Y.; Li, T.; Shrestha, N.K.; Song, Y.Y. Development of Amperometric Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Functionlized TiO₂ Nanotube Arrays. *Sci. Rep.* 2014, 4, 1–7.
87. Karpova, E. V; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Communication—Accessing Stability of Oxidase-Based Biosensors via Stabilizing the Advanced H₂O₂ Transducer. *J. Electrochem. Soc.* 2017, 164, B3056.
88. Feng, L.; Niu, M.; Wen, Z.; Hao, X. Recent Advances of Plasmonic Organic Solar Cells: Photophysical Investigations. *Polymers (Basel)*. 2018, 10, 123.
89. Terao, K.; Kakita, C.; Nagase, N.; Miyanishi, N.; Suzuki, T.; Takao, H.; Shimokawa, F.; Oohira, F. Evaluation of Electrodeposited Gold Nanostructures for Applications in QCM Sensing. *Anal. Sci.* 2012, 28, 291–294.
90. Popov, A.; Brasiunas, B.; Damaskaite, A.; Plikusiene, I.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Electrodeposited Gold Nanostructures for the Enhancement of Electrochromic Properties of PANI–PEDOT Film Deposited on Transparent Electrode. *Polymers (Basel)*. 2020, 12, 2778.
91. Chaki, N.K.; Vijayamohan, K. Self-Assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 1–12.
92. J. Kadziauskas *Biochemijos Pagrindai*; 2012;
93. Cheng, T.-M.; Huang, T.-K.; Lin, H.-K.; Tung, S.-P.; Chen, Y.-L.; Lee, C.-Y.; Chiu, H.-T. (110)-Exposed Gold Nanocoral Electrode as Low Onset Potential Selective Glucose Sensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2010, 2, 2773–2780.
94. Das, A.K.; Samdani, J.; Kim, H.Y.; Lee, J.H. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Assisted Direct Electrodeposition of Gold Nanodendrites and Its Electrochemical Applications. *Electrochim. Acta* 2015, 158, 129–137.
95. ROWLAND, S.J.; Rook, J.A.F. Analytical Methods. *Int. J. Dairy Technol.* 1961, 14, 112–114.
96. Nikolaev, K.; Ermakov, S.; Ermolenko, Y.; Averyaskina, E.; Offenhäusser, A.; Mourzina, Y. A Novel Bioelectrochemical Interface Based on in Situ Synthesis of Gold Nanostructures on Electrode Surfaces and Surface Activation by Meerwein's Salt. A Bioelectrochemical Sensor for Glucose Determination. *Bioelectrochemistry* 2015, 105, 34–43.
97. Sadak, O. One-Pot Scalable Synthesis of RGO/AuNPs Nanocomposite and Its Application in Enzymatic Glucose Biosensor. *Nanocomposites* 2021, 7, 44–52.
98. German, N.; Kausaite-Minkstiniene, A.; Ramanavicius, A.; Semashko, T.; Mikhailova, R.; Ramanaviciene, A. The Use of Different Glucose Oxidases for the Development of an Amperometric Reagentless Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles Covered

- by Polypyrrole. *Electrochim. Acta* 2015, 169, 326–333.
99. German, N.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Electrochemical Deposition of Gold Nanoparticles on Graphite Rod for Glucose Biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* 2014, 203, 25–34.
 100. Zhang, S.; Wang, N.; Yu, H.; Niu, Y.; Sun, C. Covalent Attachment of Glucose Oxidase to an Au Electrode Modified with Gold Nanoparticles for Use as Glucose Biosensor. *Bioelectrochemistry* 2005, 67, 15–22.
 101. Xiao, X.; Li, H.; Wang, M.; Zhang, K.; Si, P. Examining the Effects of Self-Assembled Monolayers on Nanoporous Gold Based Amperometric Glucose Biosensors. *Analyst* 2013, 139, 488–494.
 102. Yang, W.; Wang, J.; Zhao, S.; Sun, Y.; Sun, C. Multilayered Construction of Glucose Oxidase and Gold Nanoparticles on Au Electrodes Based on Layer-by-Layer Covalent Attachment. *Electrochem. commun.* 2006, 8, 665–672.
 103. Kausaite-Minkstimiene, A.; Simanaityte, R.; Ramanaviciene, A.; Glumbokaite, L.; Ramanavicius, A. Reagent-Less Amperometric Glucose Biosensor Based on a Graphite Rod Electrode Layer-by-Layer Modified with 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione and Glucose Oxidase. *Talanta* 2017, 171, 204–212.
 104. German, N.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Amperometric Glucose Biosensor Based on Electrochemically Deposited Gold Nanoparticles Covered by Polypyrrole. *Electroanalysis* 2017, 29, 1267–1277.
 105. Oliveira, T.M.B.F.; Fátima Barroso, M.; Morais, S.; Araújo, M.; Freire, C.; de Lima-Neto, P.; Correia, A.N.; Oliveira, M.B.P.P.; Delerue-Matos, C. Laccase–Prussian Blue Film–Graphene Doped Carbon Paste Modified Electrode for Carbamate Pesticides Quantification. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 47, 292–299.
 106. Chiu, J.-Y.; Yu, C.-M.; Yen, M.-J.; Chen, L.-C. Glucose Sensing Electrodes Based on a Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)/Prussian Blue Bilayer and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2015–2020.
 107. Cinti, S.; Cusenza, R.; Moscone, D.; Arduini, F. Paper-Based Synthesis of Prussian Blue Nanoparticles for the Development of Whole Blood Glucose Electrochemical Biosensor. *Talanta* 2018, 187, 59–64.
 108. Cinti, S.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Killard, A.J. Development of a Hydrogen Peroxide Sensor Based on Screen-Printed Electrodes Modified with Inkjet-Printed Prussian Blue Nanoparticles. *Sensors* 2014, 14, 14222–14234.
 109. Komkova, M.A.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 11302–11307.
 110. Tran, M.; Mundt, C.; Lan, T.; Padalkar, S. Electrodeposition of Gold

- Nanostructures Having Controlled Morphology. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2018, 18, 3492–3498.
111. Yan, L.; Miao, K.; Ma, P.; Ma, X.; Bi, R.; Chen, F. A Feasible Electrochemical Biosensor for Determination of Glucose Based on Prussian Blue–Enzyme Aggregates Cascade Catalytic System. *Bioelectrochemistry* 2021, 141, 107838.
 112. Zhang, Y.; Huang, B.; Yu, F.; Yuan, Q.; Gu, M.; Ji, J.; Zhang, Y.; Li, Y. 3D Nitrogen-Doped Graphite Foam@Prussian Blue: An Electrochemical Sensing Platform for Highly Sensitive Determination of H₂O₂ and Glucose. *Microchim. Acta* 2018, 185, 86.
 113. Hu, T.; Wang, D.; Xu, J.; Chen, K.; Li, X.; Yi, H.; Ni, Z. Glucose Sensing on Screen-Printed Electrochemical Electrodes Based on Porous Graphene Aerogel @prussian Blue. *Biomed. Microdevices* 2022, 24, 1–9.
 114. Thakur, B.; Guo, X.; Chang, J.; Kron, M.; Chen, J. Porous Carbon and Prussian Blue Composite: A Highly Sensitive Electrochemical Platform for Glucose Biosensing. *Sens. Bio-Sensing Res.* 2017, 14, 47–53.
 115. Lin, Y.; Hu, L.; Yin, L.; Guo, L. Electrochemical Glucose Biosensor with Improved Performance Based on the Use of Glucose Oxidase and Prussian Blue Incorporated into a Thin Film of Self-Polymerized Dopamine. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015, 210, 513–518.
 116. Chu, Z.; Shi, L.; Zhang, Y.; Jin, W.; Warren, S.; Ward, D.; Dempsey, E. Single Layer Prussian Blue Grid as a Versatile Enzyme Trap for Low-Potential Biosensors. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 14874–14879.
 117. Garjonyte, R.; Malinauskas, A. Amperometric Glucose Biosensors Based on Prussian Blue– and Polyaniline–Glucose Oxidase Modified Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 445–451.
 118. Niamsi, W.; Larpant, N.; Kalambate, P.K.; Primpray, V.; Karuwan, C.; Rodthongkum, N.; Laiwattanapaisa, W. Based Screen-Printed Ionic-Liquid/Graphene Electrode Integrated with Prussian Blue/MXene Nanocomposites Enabled Electrochemical Detection for Glucose Sensing. *Biosensors* 2022, 12, 852.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. **L. Sakalauskiene**, A. Popov, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. The Impact of Glucose Oxidase Immobilization on Dendritic Gold Nanostructures on the Performance of Glucose Biosensors. *Biosensors*, 12, 320, (2022).
<https://doi.org/10.3390/bios12050320>
2. **L. Sakalauskiene**, B. Brasiunas, A. Popov, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene. The Development of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor Based on Gold Nanostructures, Prussian Blue and Glucose Oxidase. *Biosensors*, 13, 942, (2023).
<https://doi.org/10.3390/bios13100942>

PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS

1. **L. Sakalauskienė**, A. Popov, A. Kaušaitė-Minkštimienė, A. Ramanavičienė. Electrochemical synthesis of dendritic gold nanostructures and application for the development of glucose biosensor. *International Conference "Nanostructured Bioceramic Materials 2020"*, 1 – 3 December 2020; Vilnius – Lithuania; Book of Abstract, ISBN 978-609-07-0557-5.
2. **L. Sakalauskiene**, A. Popov, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene. Development of glucose biosensor: immobilization of glucose oxidase on dendritic gold nanostructures. *64th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open readings 2021“*, 16 – 19 March 2021, Vilnius – Lithuania; Book of Abstract, ISBN 978-609-07-0557-5.
3. **L. Sakalauskiene**, U. Paulikaite, A. Ramanaviciene. Reagentless glucose biosensor based on 1,10-phenanthroline-5,6-dione modified gold nanostructures. *International Conference "Life Sciences Baltics"*, 20-24 September 2021; Online – Vilnius – Lithuania;
4. **L. Sakalauskiene**, B. Brasiunas, A. Ramanaviciene. Gold nanostructure and Prussian blue nanocomposite for the development of amperometric glucose biosensor. *4th International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 23-26 March 2022; Online - Turkey; Book of Abstract, OP7. (žodinis pranešimas)
5. **L. Sakalauskiene**, A. Popov, B. Brasiūnas, A. Ramanaviciene. Reagentless electrochemical glucose biosensor based on electrochemically deposited gold nanostructures and Prussian blue. *International Conference "Functional Inorganic Materials"*, 6-8 October 2022; Vilnius – Lithuania; Stendinis pranešimas. Book of Abstract, P16

GYVENIMO APRAŠYMAS

ASMENINĖ INFORMACIJA

Vardas, Pavardė

Elektroninis paštas

IŠSILAVINIMAS

2009 – 2013

2013 – 2015

2019 – 2023

PROFESINĖ PATIRTIS

2013 08 – 2022 11

2022 11 – dabar

Laura Sakalauskienė

laura.sakalauskiene@chgf.vu.lt

Chemijos Bakalauras, Vilniaus
Universitetas

Chemijos Magistras, Vilniaus
Universitetas

Doktorantūros studijos, Vilniaus
Universitetas

Nacionalinis maisto ir veterinarijos
rizikos vertinimo institutas vyr. inžinierė.
“Sanovus“ UAB Klientų Vadybininkė

SUMMARY

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a widespread and serious chronic disease characterized by elevated blood glucose levels due to the body's inability to produce or effectively use insulin. According to the International Diabetes Federation, more than 537 million people worldwide suffer from diabetes, and this number is expected to rise to 643 million by 2030 and to 783 million by 2045 [1]. The constant spread of this disease is worrying, as diabetes is associated with complications such as cardiovascular diseases, kidney failure, neuropathy, and retinopathy. Early detection of blood glucose concentration and continuous monitoring are vital for managing the disease, preventing complications, and improving the quality of life for such patients. Accurate diagnosis allows for the creation of effective treatment plans that can mitigate the long-term effects of diabetes and help maintain overall patient health.

Different methods have been developed to measure glucose concentration in biological fluids for diabetic patients, each with its own unique benefits. Optical and electrochemical methods are the most prominent. Optical methods, such as near- and mid-infrared spectroscopy, Raman spectroscopy or fluorescence methods, allow for non-invasive glucose determination and continuous monitoring. These methods use the interaction of light with glucose molecules to produce measurable signals, which offer advantages in terms of patient convenience and integration into portable devices. However, invasive, or minimally invasive electrochemical methods, which require a drop of blood obtained by puncturing a finger or using a subcutaneous fine needle, are still the most common. Enzymatic glucose biosensors using glucose oxidase (GOx) have a special place in electrochemical glucose detection methods. The popularity of such biosensors is due to several key features: their simplicity, high sensitivity, excellent selectivity, wide range of glucose detection, the possibility to perform measurements in coloured and turbid solutions, low glucose detection limit and acceptable price. Such sensors can easily detect clinically relevant glucose concentrations regardless of other foreign or electrochemically active substances in the blood.

Nanotechnologies are increasingly being integrated into various areas of human life and analytical devices, including enzymatic amperometric glucose sensors of different generations. Among the different nanomaterials, gold nanostructures (AuNS) occupy a special place. By integrating AuNS into enzymatic glucose biosensors, the unique properties of AuNS can not only

amplify the analytical signal, shorten the analysis time, and improve the glucose detection limit, but also prolong the shelf-life of the biosensor due to the biocompatibility of the nanomaterials and the increased enzyme stability. Most electrochemical glucose biosensors require a redox mediator to be present in the solution during measurements. Much more advanced and attractive for practical applications are reagentless glucose biosensors, where all materials required for analysis are integrated into the electrode. For this purpose, Prussian blue (PB) and other electrochemically active materials can be successfully used for electrode modification and glucose detection. Thus, by employing advanced nanomaterials, new technological solutions, and various glucose detection strategies, different amperometric glucose biosensors are being improved and developed.

This research led to the development of an innovative combination of dendritic gold nanostructures (DAuNS) and a graphite rod (GR) electrode. The electrochemical synthesis of DAuNS on the GR electrode improves the performance of the biosensors compared to conventional methods in the absence of DAuNS. These studies highlighted the importance of selecting a method for GOx immobilization on DAuNS in order to obtain a higher sensitivity for glucose determination and improve electrode stability. This type of glucose biosensor has been successfully operated in an electrochemical cell in the presence of N-methylphenazine methosulphate (PMS) as a redox mediator. A reagentless biosensor has been developed and characterised using GR modified by AuNs, PB and GOx. This combination of electrode modification allowed us to achieve an even lower glucose detection limit and good signal reproducibility. This study highlights the importance of modifying the GR electrode with AuNS and PB for the development of sensitive reagentless glucose biosensors.

The aim of this study:

To develop enzymatic biosensors suitable for electrochemical glucose determination, applying different glucose determination strategies and using DAuNS, AuNS and Prussian blue (PB).

The objectives of this study:

1. To develop an electrochemical glucose biosensor using DAuNS and select a better GOx immobilization method for sensitive glucose determination by using the soluble redox mediator N-methylphenazine methosulfate.
2. To develop a reagentless electrochemical glucose biosensor using AuNS and PB.

The statements for the defense:

1. The performance of the electrochemical glucose biosensor depends on the method chosen for GOx immobilization on the graphite rod (GR) electrode modified by DAuNS. The highest analytical signal and the lowest limit of glucose detection are achieved using a combination of several enzyme immobilization methods: covalent immobilization of GOx on a self-assembled monolayer (SAM) and additional covalent cross-linking using glutaraldehyde (GA) vapour.

2. The GR electrode electrochemically modified with AuNS and PB can be successfully used for the development of a reagentless enzymatic glucose biosensor.

LITERATURE REVIEW

Diabetes and glucose monitoring

Glucose concentration assessment is important for quality control of food and beverages and fermentation processes, as well as in clinical medicine assessing the patient's health status. Increased levels of sugar in the human diet are associated with many chronic health issues, including cardiovascular diseases (heart failure, stroke, or heart attack), type 2 diabetes, sleep apnea, metabolic syndrome, and obesity [2]. Glucose concentration in human blood is one of the essential indicators in the diagnosis of diabetes. Normal blood glucose concentration ranges from 4.4 to 6.6 mmol L⁻¹ [2,3]. Glucose, a monosaccharide, is a vital energy source for organisms [5]. An adult human brain absorbs about 120 g of glucose per day to maintain its functions and activities. When food intake is interrupted, the body uses alternative energy sources such as glycogen, which is stored in the liver and muscles. Glycogen is a polysaccharide that the body can break down into glucose when additional energy is needed. A disorder of carbohydrate metabolism, which manifests itself as an increase in the concentration of glucose in the blood, occurs due to impaired secretion of insulin, its action, or a combination of these two factors [6,7]. Insulin is a polypeptide hormone produced by specialized β -cells in the pancreas. This hormone works together with another hormone, glucagon, to regulate blood glucose levels: insulin promotes the accumulation of glucose in the body, while glucagon plays the opposite role. Insulin is important in regulating blood glucose levels by promoting its storage in the liver, muscles, and adipose tissue, which can lead to an increase in the overall body weight. Due to the various physiological processes regulated by insulin, its synthesis and concentration in the body are essential factors in the origin and progression of some chronic diseases [8]. To monitor changes in blood glucose levels, patients with diabetes measure their blood glucose concentration daily. For this reason, glucose has become the most important and frequently analyzed analyte in clinical diagnostics. Various methods, such as electrochemical and optical, are used to assess glucose concentration. The electrochemical method is considered one of the most reliable methods for glucose concentration determination and offers numerous advantages, including high sensitivity, simplicity, good selectivity, rapid signal recording, and low cost [11,12].

Biosensors

Biosensors are special analytical systems designed for detecting analytes and determining their concentrations. A biosensor consists of a biological recognition element in direct contact with a signal transducer. The processes occurring on the surface are converted into a measurable analytical signal, the magnitude of which is proportional to the analyte concentration [13–15]. Modern bioanalysis predominantly uses amperometric biosensors. Their operation principle is based on the oxidation or reduction of an electrochemically active compound on the surface of the indicator electrode when a constant potential is applied [20]. These biosensors are also widely used in clinical medicine. To ensure better performance, they are constantly improved using various materials, such as various nanostructures [21–23].

An important procedure in the development of biosensors is the immobilization of biomolecules on the surface of the signal transducer. Proper immobilization affects the sensitivity and stability of biosensors. The choice of immobilization method depends on the properties of the biomolecules being immobilized on the electrode surface. Common immobilization methods include adsorption [24], covalent immobilization [25], cross-linking [26], and affinity-based immobilization [27].

Electrochemical amperometric glucose biosensors

Electrochemical sensors are crucial for determining glucose concentrations and include both enzymatic biosensors and non-enzymatic sensors. Due to their rapid analysis, high selectivity, sensitivity, simplicity, and ability to analyze coloured and opaque samples, electrochemical biosensors are widely used in fields such as environmental monitoring and disease diagnosis [28]. The operating principle of electrochemical biosensors is based on the analytical signal registration during the oxidation/reduction reactions of electrochemically active compounds [29]. The current is measured using either a two-electrode or three-electrode system. The three-electrode system typically consists of a working electrode, an auxiliary electrode, and a reference electrode. The signal arises from the oxidation or reduction of electrochemically active substances on the surface of the working electrode when a constant potential is applied vs. the reference electrode. [30–32]. Electrochemical biosensors for glucose detection using GOx are widely used due to their high sensitivity, selectivity, suitable linear range, and low detection limit for glucose [33,34]. Since the development and application of the first enzymatic electrode, the principle of glucose detection [18,33] has

been continuously improved, leading to three generations of amperometric glucose biosensors: the first generation of glucose biosensors is based on the determination of dissolved oxygen concentration or hydrogen peroxide produced during the enzymatic oxidation of glucose concentration changes in the solution; the second generation is based on the oxidation/reduction reactions of a redox mediator, which substitute the oxygen and is responsible for the carry electrons from the enzyme redox center to the surface of the working electrode; third generation is based on the direct electron transfer from the GOx redox center to the working electrode.

Glucose oxidase

GOx (β -D-glucose oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) from the *Aspergillus niger* is a flavoprotein that catalyzes the oxidation of β -D-glucose by molecular oxygen in the initial phase, GOx mediates the oxidation of β -D-glucose to D-glucono- δ -lactone, which subsequently undergoes hydrolysis to form gluconic acid. During this process, the flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor of GOx is reduced to FADH₂. In the subsequent oxidative phase, molecular oxygen reoxidizes the reduced GOx, resulting in the production of H₂O₂ and the reoxidation of FADH₂ to FAD [47].

Sensitive, selective, stable, fast, and user-friendly analytical tools are necessary for the diagnosis and treatment of patients requiring blood glucose monitoring [48–52]. Modern glucose biosensors effectively fulfil this role. Due to GOx's high specificity to glucose, activity, and stability, the enzyme is ideal for the creation of enzymatic biosensors. In recent decades, the successful development of biosensors with GOx has been achieved using different metal and carbon nanostructures, various redox mediators, electrically conductive polymers, and various electrode surface modification procedures [5,53,54].

GOx immobilization methods and their impact on the registered electrochemical signal

GOx immobilization is a crucial step in the development of glucose biosensors. Since the immobilized enzyme interacts with the analyte, it is essential to ensure a stable enzyme layer on the electrode surface and maintain enzyme activity. A successful enzyme immobilization method on the electrode surface significantly impacts the biosensor's characteristics, including sensitivity, selectivity, stability, operating time, and other important properties. Various enzyme immobilization techniques have been described in

the literature, which include classical adsorption on the electrode surface, covalent immobilization by attachment to the surface, coupling on the surface using multifunctional reagents, embedding in gels or polymers, or by using multiple methods [55,56].

Redox mediators and their properties

In the development of second-generation glucose biosensors, redox mediators are used. They transfer electrons from the GOx redox center to the electrically conductive surface, which can be the gold, platinum, carbon, or carbon paste electrodes, and electrically conductive polymers formed on the electrode. Redox mediators are usually of low molecular weight organic compounds, or inorganic transition metal complex compounds [32,60].

Gold nanostructures and their use in glucose biosensors

Nanostructures are materials with at least one dimension on the nanometer scale (1-100 nm) [62]. They possess unique physical and chemical properties due to their size and high surface-area-to-volume ratio [63]. These nanostructures can be synthesized in various shapes, such as nanorods, spherical nanoparticles, nanowires, and more, each with distinct properties valued in different fields [64]. The optical, electrical, and catalytic properties of nanomaterials are particularly useful in areas such as medicine, environmental monitoring [65].

The DAuNS have significant practical application potential in various biomedical fields. These nanostructures stand out due to their unique size and shape-dependent properties. They also improve the surface-enhanced Raman scattering (SERS) effect, exhibit electrocatalytic activity, and can generate photoluminescent emissions. DAuNS are most efficiently produced electrochemically [5].

Prussian blue

Prussian blue (PB) is a mixed-valence polynuclear transition metal cyanide complex [72,73] and was considered the first synthetic coordination compound [74] at the beginning of the 18th century. PB can be widely used as a functional nanomaterial due to its facile preparation, low redox potential, and favorable electrocatalytic properties. Additionally, PB can be used as a surface modification material, forming electroactive layers through chemical or electrochemical means [81,82]. Moreover, PB is known as an “artificial

peroxidase,” exhibiting excellent peroxidase-like catalytic properties towards H_2O_2 [83,84]. In general, the metal-organic framework is primarily composed of $\text{Fe}^{2+}-\text{C}\equiv\text{N}-\text{Fe}^{3+}$ units extending in all three spatial directions, featuring zeolitic sites capable of hosting species with an ionic radius of 1.6 Å [77,85,86]. It is also known that the catalytic constant of PB is three times higher than that of natural peroxidase [84]. PB can be easily synthesized on the electrode surface and is very promising for the development of the first generation of glucose biosensors. However, the operational stability of PB-modified layers is very limited, especially under neutral and alkaline conditions. The use of polymers such as Nafion is an effective way to address this issue [53,58].

EXPERIMENTAL METHODOLOGY

Pretreatment of the working electrode

1. Electrochemical synthesis of DAuNS and AuNS

The exposed working surface area of the GR electrodes was 0.071 cm^2 . The GR electrode was placed in an electrochemical cell containing an aqueous solution of $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$ and $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. Electrochemical deposition of DAuNS was conducted at a constant potential of -0.2 V vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{3 \text{ mol/L}}$ for either 200 s or 400 s. Following the synthesis of DAuNS, the electrode was rinsed with deionized water and dried at room temperature. The surface of the GR electrodes modified with electrochemically deposited DAuNS (DAuNS/GR) was then characterized using an FE-SEM.

To modify the GR electrode with AuNS, the electrode was immersed in solutions containing HAuCl_4 at concentrations of 1.0, 3.0, 6.0, or 10.0 mmol L^{-1} along with $0.2 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. AuNS were synthesized electrochemically at a constant potential of -0.2 V vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{3 \text{ mol/L}}$ for 120 s. After synthesis, the electrode was rinsed with deionized water, dried at room temperature, and characterized using FE-SEM.

To measure the electroactive surface area of the electrodeposited DAuNS or AuNS, cyclic voltammetry (CV) was carried out in a $0.50 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution. The CV was performed within the potential range of 0 V to $+1.4 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{3 \text{ mol/L}}$ at a potential scan rate of 0.1 V s^{-1} . The electroactive surface area of the AuNS/GR electrode was calculated based on the integrated peak of the gold oxide reduction and using a conversion factor of $386 \times 10^{-6} \text{ C cm}^{-2}$.

2. Electrochemical synthesis of prussian blue

The synthesis and deposition of PB on the AuNS/GR electrode were conducted via electrochemical methods. The AuNS/GR electrode was immersed in an aqueous solution containing 3.0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆], 3.0 mmol L⁻¹ FeCl₃, 0.1 mol L⁻¹ KCl, and 0.1 mmol L⁻¹ HCl. A constant potential of +0.4 V vs. Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L} was applied for 150 s to the working electrode. Following the electrochemical deposition, the PB layer was activated by CV within the potential range of -0.1 V to +0.4 V vs. Ag/AgCl/KCl_{3 mol/L}, using a potential scan rate of 50 mVs⁻¹ for 25 cycles. Subsequently, the PB/AuNS/GR electrode was dried at 50 °C for approximately 15 min and characterized using FE-SEM.

3. Immobilization of GOx on a DAuNS/GR Electrode

In this study, three different methods for immobilizing GOx on a GR electrode premodified with electrochemically deposited DAuNS were used and compared. The first method (1st GOx immobilization method) involved simple adsorption of GOx on DAuNS followed by cross-linking with GA vapour (GA-GOx-DAuNS/GR). In the second method (2nd GOx immobilization method) – GOx was covalently immobilized on DAuNS modified with 11-MUA SAM (GOx-SAM/DAuNS/GR). The third method (3rd GOx immobilization method) also involved covalent GOx immobilization on 11-MUA SAM with additional cross-linking using GA vapour (GA-GOx-SAM/DAuNS/GR). For the 1st method, the DAuNS/GR electrode was immersed in a tube containing a 40 mg mL⁻¹ GOx solution for 30 min and dried at room temperature (+20 ± 2 °C). The working electrode was then placed in a closed vessel above a 25% GA solution at room temperature for 15 min. In the 2nd method, the DAuNS/GR electrode was immersed in a 1 mM 11-MUA solution in methanol and stored for 2 h. After rinsing with methanol and deionized water, the carboxyl groups of the 11-MUA SAM were activated with a mixture of 50 mM EDC and 200 mM NHS aqueous solutions (1:1 ratio) for 15 min. The electrode was then rinsed with SA and immersed in a tube with a 40 mg mL⁻¹ GOx solution for 30 min to covalently immobilize GOx. In the 3rd method, GOx was immobilized in the same way as in the 2nd method, but with additional cross-linked using GA vapor. The GOx-SAM/DAuNS/GR electrode was placed in a closed vessel above a 25% GA solution at room temperature for 15 min.

Before all electrochemical measurements, the GOx-modified electrodes were washed with distilled water to remove non-well-immobilized enzymes.

All working electrodes were stored in a closed vessel with SA buffer at +4 °C before use. Before electrochemical measurements, the electrodes were washed with deionized water.

4. Immobilization of GOx on a PB/AuNS/GR electrode

The different volumes of GOx solution (3.0, 6.0, or 9.0 μL of a 40 mg mL^{-1}) were deposited onto the surface of a GR electrode that had been pre-modified with AuNS and PB (PB/AuNS/GR). After drying, the resulting working electrode (GOx/PB/AuNS/GR) was coated with 3 μL of a 0.5% Nafion (Nf) solution at room temperature to prevent leakage of GOx and to stabilize the formed structures on the electrode. The electrodes were washed with PBS solution before conducting electrochemical measurements.

5. Electrochemical measurements

For the determination of glucose concentration, amperometric measurements were performed by immersing modified GR electrodes into a 5 cm^3 volume electrochemical cell filled with AC or PBS solution containing 0.1 mol L^{-1} KCl and in the presence of the redox mediator PMS or without it. The electrochemical measurements were performed at the selected potential vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{3 \text{ mol/L}}$ reference electrode. During the amperometric measurements, the solution in the electrochemical cell was mixed continuously with a magnetic stirrer. The registered amperometric signals showed the hyperbolic dependence on the glucose concentration in the sample and the obtained results can be described by the hyperbolic equation (1) according to Michaelis-Menten kinetics.

$$y = \frac{ax}{b + x} \quad (1),$$

where a is the difference of maximal currents generated during the enzymatic reaction (ΔI_{max}), A; b is the apparent Michaelis constant ($K_{\text{M(app.)}}$), mmol L^{-1} ; x is the glucose concentration, mol L^{-1} .

RESULTS

Glucose biosensor based on graphite rod electrode modified with DAuNS and GOx

The aim of this study was to develop and compare glucose biosensors operating with a GR electrode electrochemically modified with DAuNS and GOx, using different enzyme immobilization methods and a soluble redox mediator PMS. Three GOx immobilization methods were used:

1) 1st GOx immobilization method. Adsorption on DAuNS with additional cross-linking using GA vapour (GA-GOx/DAuNS/GR);

2) 2nd GOx immobilization method. Covalent immobilization on DAuNS -modified with 11-MUA SAM (GOx-SAM/DAuNS/GR);

3) 3rd GOx immobilization method. Covalent immobilization on DAuNS -modified with 11-MUA SAM with an additional cross-linking using GA vapour (GA-GOx-SAM/DAuNS/GR).

Selection of optimal conditions for glucose biosensor performance

DAuNS can be successfully synthesized from different concentrations of HAuCl₄ solutions, using various methods and duration of the synthesis. In this study, DAuNS were electrochemically synthesized on the GR electrode surface under different synthesis conditions (using a 10 mmol L⁻¹ HAuCl₄ solution, at a potential of -0.2 V, and duration of synthesis for 200 s or 400 s) and investigated using FE-SEM. In both cases, DAuNS were successfully synthesized on the GR electrode surface. Longer, more ordered DAuNS were formed after 400 s, while shorter, sharper, and more branched DAuNS were formed after 200 s. The EDS spectrum for DAuNS synthesized after 200 s showed the predominance of Au and C elements. Additionally, characteristic peaks for Cl, K, and O elements were observed, which can be attributed to incomplete washing of the electrodes from the synthesis materials. Morphological and chemical composition differences were not significant; therefore, the impact of DAuNS synthesis on the glucose biosensor's performance was electrochemically evaluated. To select the most appropriate synthesis time, the 3rd GOx immobilization method (GA-GOx-SAM/DAuNS/GR) was chosen.

For all tested glucose concentrations, a higher signal was recorded with a shorter DAuNS electrochemical synthesis duration. This effect was more significant at lower glucose concentrations. For example, at 5 mmol L⁻¹ glucose, the analytical signal was 1.2 times lower when DAuNS were

synthesized in 400 s. Thus, for further studies GR electrode with DAuNS synthesized at a -0.2 V potential for 200 s was used. After selecting optimal DAuNS synthesis conditions on the GR electrode surface, the electrochemically active surface area of DAuNS/GR was evaluated using CV in a $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution [90]. The determined electrochemically active surface area was $1.03 \pm 0.15 \text{ cm}^2$.

In the next step, the GOx was covalently immobilized on the SAM/DAuNS/GR electrode. To increase the biosensor's sensitivity, the effect of different 11-MUA SAM formation times on the amperometric signal was evaluated. SAM was formed on the DAuNS – modified GR electrode surface for either 2 h or 24 h. The carboxyl groups on the SAM were activated with a mixture of NHS and EDC solutions. After activation, GOx was immobilized on the SAM/DAuNS/GR surface, and additional enzyme molecules were cross-linked with 25% GA vapour (3rd GOx immobilization method).

It was found that the amperometric signals at glucose concentrations of 5.0, 25.0, and 50.0 mmol L^{-1} varied and depended on the SAM formation time. For all measured glucose concentrations, a higher analytical signal was recorded after a shorter SAM formation time. This effect was particularly pronounced at higher glucose concentrations. For example, at 25.0 mmol L^{-1} of glucose, the analytical signal was 2.74 times lower using an electrode modified with SAM for 24 h. Similarly, the analytical signals were 2.50 and 3.45 times lower at 5.0 and 50.0 mmol L^{-1} of glucose, respectively. To increase the biosensor's sensitivity, a 2 h SAM formation time was chosen for further studies.

Enzyme layer instability was also noted during amperometric measurements. To enhance the biosensor's sensitivity and stabilize the enzyme on the electrode surface, the enzyme was cross-linked with GA vapour (3rd GOx immobilization method). Amperometric measurements showed that the higher current response was recorded using the electrode held for an additional 15 min above GA vapour. The maximum analytical signal change was 8.63 times greater than with the electrode where the enzyme on the surface was not additionally cross-linked with GA (2nd GOx immobilization method).

The next study to select the optimal PMS concentration was performed using the 3rd GOx immobilization method. PMS concentrations of 1, 3, 6, 11, and 15 mmol L^{-1} were added to the electrochemical cell, and after the baseline stabilized, 25 mmol L^{-1} glucose solution was added. Results showed that increasing PMS concentration increased electron transfer efficiency was achieved. The smallest current change was observed with 1 mmol L^{-1} of PMS, while the highest amperometric signal was recorded with a 6 mmol L^{-1} of PMS concentration in the cell. Further increasing PMS concentration did not

significantly change the analytical signal. Thus, the glucose biosensor operates most efficiently with a 6 mmol L⁻¹ PMS concentration in the electrochemical cell.

Comparison of different GOx immobilization methods

Following the electrochemical synthesis of DAuNS, GOx was immobilized on the electrode surface in three different ways. The lowest ΔI_{max} of $19.21 \pm 0.75 \mu\text{A}$ ($R = 0.9864$) was achieved using the 2nd GOx immobilization method, involving covalent attachment of GOx to SAM/DAuNS/GR without additional crosslinking (GOx-SAM/DAuNS/GR). A notably higher ΔI_{max} of $272.06 \pm 8.69 \mu\text{A}$ ($R = 0.9938$), which is 14.2 times greater than using the 2nd GOx immobilization method, was achieved using the 1st GOx immobilization method, where GOx was adsorbed on DAuNS and cross-linked with GA vapour (GA-GOx/DAuNS/GR). The $K_{M(app.)}$ value was determined to be $26.56 \pm 2.42 \text{ mmol L}^{-1}$. Using the 3rd GOx immobilization method, which involved covalent immobilization of GOx on SAM followed by an additional 15 min cross-linking with 25% GA vapour, an even higher ΔI_{max} of $384.20 \pm 16.06 \mu\text{A}$ ($R = 0.9965$), 20 times greater than using the 2nd GOx immobilization method, was achieved. Here, the $K_{M(app.)}$ was slightly higher – $35.23 \pm 3.76 \text{ mmol L}^{-1}$. The ΔI_{max} for the glucose biosensor based on the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method) was 1.41 times higher than that for the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method), while the linear dynamic range (LDR) from 0.1 to 10 mmol L⁻¹ was consistent across all three GOx immobilization methods. The limit of detection (LOD) was lowest ($0.019 \text{ mmol L}^{-1}$) for the biosensor based on the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method), while for the GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) electrode LOD was $0.022 \text{ mmol L}^{-1}$.

The study of the analytical signal repeatability

The repeatability of the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) and GA-GOx/DAuNS/GR electrodes (1st GOx immobilization method) prepared under optimal conditions was evaluated by measuring the signal in response to 25 mmol L⁻¹ of glucose 10 times. Measurements were performed on the same day under the same conditions. It was found that better repeatability was observed using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method): the signal does not change during the second measurement, the decrease by 4% in the third measurement, while

decrease by 9% during the fourth and fifth measurements were observed if compare with the first measurement. A similar but slightly worse repeatability was observed with the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method) – the analytical signal decreased by 3% during the second measurement, by 7% during the third measurement, and by about 12% during the fourth and fifth measurements if compare with the first measurement.

Overall, 91% of the initial signal response was retained after five measurements using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method), whereas 88% of the signal was retained using the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method). Subsequent measurements showed a slight decrease in the analytical signal of both electrodes. Based on the obtained data, it was concluded that better repeatability was observed using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method). Better repeatability may be due to the more favourable arrangement of GOx molecules after covalent immobilization on the electrode pre-modified with SAM and the reduced enzyme loss after additional cross-linking using GA vapour.

The study of the interfering substances' impact on the analytical signal and substrate selectivity

The aim of this study was to investigate the influence of electrochemically active substances present in blood on the analytical signal. Common interfering electrochemically active substances include uric acid and ascorbic acid. GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) and GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) electrodes were prepared under optimal conditions.

It was determined that the presence of 0.01 and 0.05 mmol L⁻¹ ascorbic acid in the solution increased the current response by 7.72% and 11.2%, respectively, using the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method). The increase by 4.63% and 10.8% was observed using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method). The presence of 0.01 mmol L⁻¹ uric acid increased the current response by 9.09% using the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method) and by 7.02% using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method). In most cases, the difference in signals was less than 10%, except for the highest concentrations of ascorbic acid. The impact of interfering substances was less for GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method). The

developed biosensors are suitable for glucose determination in human serum, with a higher signal recorded when GOx was covalently immobilized on 11-MUA SAM and further cross-linked with GA vapours. The influence of interfering substances on the analytical signal can also be reduced by using electrically conductive polymers [103,104].

Finally, the selectivity of the developed biosensors was tested by adding 25 mmol L⁻¹ of galactose, fructose, xylose, and mannose. The tested substrates had no effect on the current response. Only the addition of 25 mmol L⁻¹ glucose resulted in a measurable current. It was concluded that the GOx enzyme is specifically selective to glucose.

Application of the Biosensor for Glucose Determination in Human Serum Samples

The glucose concentration in the serum of diabetic patients is much higher than that of healthy persons, ranging from 2 to 30 mmol L⁻¹. The suitability of the developed GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) and GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) electrodes for determining glucose concentration was tested in diluted commercial human serum samples. A higher analytical signal was recorded using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method). The calculated ΔI_{max} was $312.58 \pm 18.34 \mu A$ ($R = 0.9985$), while for the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method), ΔI_{max} was $244.12 \pm 8.79 \mu A$ ($R = 0.9960$). The calculated $K_{M(app.)}$ values were $40.42 \pm 5.72 \text{ mmol L}^{-1}$ and $22.52 \pm 2.64 \text{ mmol L}^{-1}$, respectively. The linear range was the same for both methods, with no significant differences observed depending on the GOx immobilization method. In both cases, the linear range was from 0.1 to 10 mmol L⁻¹ glucose. The LOD in serum using the biosensor with the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode (3rd GOx immobilization method) was 0.022 mmol L⁻¹, while with the GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) electrode, it was 0.050 mmol L⁻¹ (signal-to-noise ratio = 3). It was concluded that the LOD is slightly worse when serum is present in the electrochemical cell compared to results obtained in buffer solution. Nevertheless, it can be concluded that the developed glucose biosensor with a DAuNS – modified electrode can be successfully applied for glucose determination in real samples.

Stability study of the developed glucose biosensors

Finally, the stability characteristics of the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) and GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) electrodes were evaluated. The tests were performed in an electrochemical cell with 50 mmol L⁻¹ glucose over 32 days.

It was found that the ΔI % for both types of electrodes gradually decreased over time. A faster decline in current response was observed up to 5 days using the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) electrode, whereas a faster decline was observed up to 12 days for the GA-GOx/DAuNS/GR electrode (1st GOx immobilization method). After 12 days, the biosensor with the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR (3rd GOx immobilization method) electrode retained 73.25% of the initial signal, while the GA-GOx/DAuNS/GR (1st GOx immobilization method) electrode retained 66.20%. It was determined that the GA-GOx-SAM/DAuNS/GR electrode exhibited better stability. This may be due to the better immobilization of the GOx with a suitable spatial orientation on a more biocompatible surface, allowing GOx molecules to remain active and stable for a longer time during electrochemical measurements and between washes.

Reagentless glucose biosensor based on GR electrode modified with AuNS, PB, and GOx

The aim of this study was to develop a reagentless amperometric biosensor based on an Nf-GOx/PB/AuNS/GS nanocomposite for glucose concentration determination.

First, AuNS were electrochemically synthesized on the GR electrode, followed by the electrochemical synthesis of PB. Finally, GOx was immobilized on the PB/AuNS nanocomposite using Nafion. The application of PB in the development of the glucose biosensor facilitates the electrochemical detection of H₂O₂ produced during the GOx-catalyzed glucose oxidation in the sample at a low potential of the working electrode. AuNS increase the electrochemically active surface area, improve the strength of GOx immobilization, and ensures a higher analytical signal. The size and distribution of AuNS on the GR electrode surface depends on the H₂AuCl₄ concentration in the solution, the chosen supporting electrolyte, the duration of synthesis, the temperature and other parameters. The parameters of the electrochemical synthesis and the duration of this process greatly influence the final morphology of AuNS. In this study, H₂SO₄ was used as the

supporting electrolyte to electrochemically synthesize AuNS of a similar size and evenly distributed on the electrode surface.

Selection of optimal conditions for a reagentless glucose biosensor performance

To select the optimal concentration of HAuCl_4 and create a sensitive glucose biosensor, four concentrations of HAuCl_4 (1.0, 3.0, 6.0, and 10.0 mmol L^{-1}) in the presence of 0.2 mol L^{-1} H_2SO_4 were used under the same conditions for AuNS synthesis. After the electrochemical synthesis of PB, GOx was immobilized on the pre-modified PB/AuNS/GR electrodes and coated with Nafion. It was found that modifying the GR electrode with AuNS in all cases positively affected the registered analytical signal. The highest current responses at different glucose concentrations were recorded using the Nf-GOx/PB/AuNS/GR electrode, pre-modified with AuNS synthesized from a 3.0 mmol L^{-1} HAuCl_4 solution and with 3 μL of GOx solution applied on the electrode surface. The ΔI_{max} at 0.5 mmol L^{-1} of glucose was $6.70 \pm 0.10 \mu\text{A}$. However, the ΔI_{max} obtained using electrodes pre-modified with AuNS synthesized from 1.0, 6.0, and 10.0 mmol L^{-1} HAuCl_4 solutions were 1.8, 1.2, and 3.1 times lower, respectively. The same trend was observed at higher glucose concentrations, with ΔI_{max} being 2.1, 1.1, and 1.29 times lower at 10.0 mmol L^{-1} of glucose concentration. Based on the obtained results, a 3.0 mmol L^{-1} HAuCl_4 concentration was chosen as optimal for AuNS synthesis and for the development of glucose biosensor based on Nf-GOx/PB/AuNS/GR modified electrodes.

The biosensor signal depends also on the amount of immobilized enzyme on the electrode surface. In the next optimization step, the optimal amount of GOx on the PB/AuNS/GR electrode was determined. On the electrode modified with AuNS (synthesized using 3.0 mmol L^{-1} HAuCl_4 solution) and PB, 3.0, 6.0, or 9.0 μL of 40 mg mL^{-1} GOx solution was applied. The highest change in current response at 0.5 mmol L^{-1} of glucose was recorded with the electrode modified with 3.0 μL of GOx solution ($\Delta I_{\text{max}} = 6.32 \pm 0.03 \mu\text{A}$). Analytical signals registered with 6.0 and 9.0 μL of GOx solution were slightly lower ($\Delta I_{\text{max}} = 5.08 \pm 0.03 \mu\text{A}$ and $5.36 \pm 0.04 \mu\text{A}$, respectively). Therefore, 3.0 μL of GOx on the PB/AuNS/GR electrode surface was considered to be the optimal amount for glucose biosensor operation.

Characterization of electrochemically synthesized AuNS and PB/AuNS nanocomposites on GR electrode surface

After selecting optimal conditions for AuNS synthesis on the GR electrode surface, the electrochemically active surface area of AuNS was evaluated using CV in a 0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄ solution at a voltage scan rate of 0.1 V s⁻¹. During these measurements, the reduction of gold oxide at 0.9 V was registered. The electrochemically synthesized AuNS (using a 3.0 mmol L⁻¹ HAuCl₄ solution with 0.2 mol L⁻¹ H₂SO₄) had an electroactive surface area of 0.132 cm², which increased by 1.86 times. AuNS and PB/AuNS nanocomposites obtained under the best conditions for biosensor performance was examined by FE-SEM.

Characterization of the developed biosensor

In the following stage of the research, the performance of the electrode prepared under the optimal conditions was investigated. The electrochemical cell was filled with a 0.05 mmol L⁻¹ PBS solution with 0.1 mol L⁻¹ KCl (pH 5.8), and the amperometric signal was recorded at a potential of -0.05 V. The hyperbolic dependence of the analytical signal of GOx-modified electrodes on glucose concentration was observed in the range of 0.025 to 10.0 mmol L⁻¹.

It was found that as the glucose concentration increases, the change in current response increases until saturation, which was reached at concentrations greater than 10.0 mmol L⁻¹ of glucose. This suggested that the active centers of the GOx are saturated by glucose. The ΔI_{max} of the developed biosensor was 15.91 ± 0.47 μA (R = 0.9961), and $K_{M(app.)}$ was 0.92 ± 0.096 mmol L⁻¹. The linear dependence of the signal on glucose concentration was observed in the range of 0.025 to 1.0 mmol L⁻¹ (R² = 0.9976). The LOD was determined to be 0.0088 mmol L⁻¹ with a signal-to-noise ratio of 3.

Investigation of Nf-GOx/PB/AuNs/GR electrode properties

For the repeatability test, the electrode was prepared under defined optimal conditions, and measurements were performed five times at a concentration of 1 mmol L⁻¹ of glucose. Measurements were performed on the same day under identical conditions in an electrochemical cell filled with 0.05 mmol L⁻¹ PBS solution containing 0.1 mol L⁻¹ KCl (pH 5.8). After the second measurement, the current response decreased by 0.7%. After five measurements, 96% of the initial current response was retained.

One of the challenges in the development of biosensors is the effort to reduce or neutralize the effect of interfering substances on the analytical signals. To investigate the impact of interfering substances on the analytical signal, the change in the current response of the biosensor was measured under optimal conditions by adding 1.0 mmol L^{-1} glucose and 0.1 mmol L^{-1} of electrochemically interfering substances – uric acid and ascorbic acid – to the electrochemical cell. From the data provided, it was determined that the biosensors responded quickly to the addition of 1.0 mmol L^{-1} glucose. Meanwhile, only insignificant changes in current response were observed upon adding 0.1 mmol L^{-1} uric acid and 0.1 mmol L^{-1} ascorbic acid. When 1.0 mmol L^{-1} glucose was added to the solution containing the tested electrochemically active substances, the change in the current response of the biosensor was similar to that observed upon the initial addition of glucose. The observed impact of interfering substances on the analytical signal was insignificant. This might be due to the use of low potential during the measurements and the Nf film formed on the electrode surface.

During the next step of studies, the influence of structurally similar monosaccharides, such as xylose, mannose, fructose, and galactose, on the analytical signal was also evaluated. Once the baseline current reached a stable value, 1.0 mmol L^{-1} glucose was added to the electrochemical cell, and changes in current over time were observed. Subsequently, after stabilizing the signal, xylose, mannose, fructose, and galactose were added at 1.0 mmol L^{-1} of each, followed by 0.2 mmol L^{-1} glucose. It was found that under the specified experimental conditions, the biosensor was selective only to glucose.

H₂O₂ determination using PB/AuNS/GR electrode

To confirm the ability of the biosensor to detect H₂O₂, the PB/AuNS/GR electrode was tested at different H₂O₂ concentrations. PB was synthesized on the surface of the AuNS/GR electrode. The prepared electrode was used for amperometric measurements in a PBS solution. Once the signal stabilized (baseline), a certain amount of H₂O₂ was added to the electrochemical cell. Typical current dependencies over time were recorded by adding different H₂O₂ concentrations to the cell: when the H₂O₂ concentration in the cell increased, the registered signal also increased. A linear dependence on H₂O₂ concentration was observed across the entire range of tested concentrations, from 0.05 to 11.0 mmol L^{-1} , with a calculated H₂O₂ detection limit of $0.00043 \text{ mmol L}^{-1}$.

Application of the developed biosensor for glucose determination in human serum samples

After investigating the influence of interfering substances, the operation of the developed biosensor was tested in 10 times diluted with a 0.05 mmol L^{-1} PBS solution with 0.1 mol L^{-1} KCl (pH 5.8) human serum. Using a commercially available glucometer, a glucose concentration of 0.49 mmol L^{-1} was determined in the prepared and diluted serum sample. Electrochemical measurements were conducted by adding known concentrations of glucose to the electrochemical cell. All measurements were repeated three times, and the obtained results were expressed as averages. The recovery of glucose in human serum was 101 – 102%, with an RSD of 0.69 – 0.84%. Therefore, it can be concluded that the developed biosensor can be successfully applied for glucose determination in real samples.

CONCLUSIONS

1. DAuNS electrochemically synthesized on the GR electrode under optimal conditions increase the analytical signal registered by the glucose biosensor when PMS is present in the solution. The best results were obtained after covalent GOx immobilization on 11-MUA SAM formed on the DAuNS and additional cross-linking with GA vapour (3rd GOx immobilization method). In this case, the calculated ΔI_{max} value of $384.20 \pm 16.06 \mu A$ was 20 times higher compared to the electrode for which GOx was only covalently immobilized on the SAM and 1.41 times higher compared to the electrode where GOx was adsorbed on DAuNS and additionally cross-linked with GA vapour.
2. The range of linear dependence on glucose concentration using the GA-GOx-SAM/ DAuNS /GR (3rd GOx immobilization method) and GA-GOx/ DAuNS /GR (1st GOx immobilization method) electrodes in both buffer and serum was from 0.1 to 10 mmol L⁻¹ of glucose. The limit of glucose detection for these electrodes was 0.019 and 0.022 mmol L⁻¹, respectively. The selected glucose biosensor models can be successfully applied for the analysis of blood serum. It was found that the electrode prepared using the 3rd GOx immobilization method was characterized by better stability.
3. The reagentless glucose biosensor based on the GR electrode electrochemically under the optimal conditions modified with AuNS and PB can successfully register the electrochemical reduction of H₂O₂ produced during the enzymatic oxidation of glucose. The H₂O₂ detection limit is 0,00043 mmol L⁻¹.
4. 2The biosensor based on Nf-GOx/PB/AuNS/GR electrode was characterized by ΔI_{max} equal to $15.91 \pm 0.47 \mu A$, the range of linear dependence was from 0.025 to 1 mmol L⁻¹ and the limit of glucose detection was 0.0088 mmol L⁻¹. The developed biosensor can be successfully applied for the detection of low glucose concentrations in the samples.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.