

(11) Patento numeris: **6624** (51) Int. Cl. (2019.01): **G01N 27/00**

(21) Paraiškos numeris: **2017 526**

(22) Paraiškos padavimo data: **2017-09-21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2019-03-25**

(45) Patento paskelbimo data: **2019-05-27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Arūnas RAMANAVIČIUS, LT
Aušra VALIŪNIENĖ, LT
Urtė SAMUKAITĖ-BUBNIENĖ, LT
Povilas VIRBICKAS, LT
Almira RAMANAVIČIENĖ, LT

(73) Patento savininkas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai”,
LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Berlyno mėlynojo pasluoksnio ant titano pagrindo formavimo metodai ir jų
taikymas gliukozės biologiniuose jutikliuose**

(57) Referatas:

Šis išradimas aprašo biologinių jutiklių, kurie gali būti panaudojami gliukozės kiekio nustatymui mėginiuose, gamybos būdus. Šiuose biojutikliuose naudojamos titano plokštelės, padengtos Berlyno mėlynojo sluoksniu, prie kurio prijungiamas polipirolo inkaras arba tiesiogiai nusodinamas fermentas, leidžiantis aptikti mėginyje esančią analizę. Gaminant gliukozės biojutiklius, šis fermentas yra gliukozės oksidazė. Šie biojutikliai pranašesni tuo, kad jų veikimui naudojamas žemas elektrodo potencialas.

Išradimo sritis

Išradimas susijęs su Berlyno mėlynojo dengimo metodika ir šios metodikos panaudojimu nusodinant dangas ant titano pagrindo, siekiant suformuoti gliukozės biologinius jutiklius.

Technikos lygis

Biologiniai jutikliai apibūdinami kaip analizinės sistemos, sudarytos iš biologinio atpažinimo elemento, sujungto su signalo vertikliu, teikiančios analizinius duomenis, kurie yra proporcingi nustatomojo objekto koncentracijai (L. Su et al., 2011). Pagal naudojamą signalo vertiklį biologiniai jutikliai skirstomi į elektrocheminius, pjezoelektrinius, jonams selektyvius, optinius, magnetinius bei akustinius biojutiklius (R. Monošík et al., 2012). Biologiniuose jutikliuose naudojami įvairūs biologiniai atpažinimo elementai: antikūnai, ląstelės, DNR, RNR, fermentai ir kitos struktūros (M. Park, 2013).

Fermentinių biologinių jutiklių (juose biologinio atpažinimo funkciją atlieka fermentas) veikimas pagrįstas fermento katalizuojama analitės chemine reakcija (A. Mulchandani, 1999).

Amperometriniai biologiniai jutikliai – tai elektrocheminiai biologiniai jutikliai, kurie atlieka elektros srovės, susijusios su analitės redokso reakcijomis, matavimus (A. Chaubey ir B.D. Malhotra, 2002). Amperometriniai fermentiniai biologiniai jutikliai yra skirstomi į 3 klases (S.V. Dzyadevych et al., 2008):

1. Biologinius jutiklius, kuriuos naudojant vyksta tiesioginis fermentinės reakcijos produktų koncentracijos nustatymas.
2. Biologinius jutiklius, naudojančius elektronų pernašos tarpininką (EPT), pernešantį elektronus iš aktyvaus fermento centro į elektrodą.
3. Biologinius jutiklius, kuriuose tiesiogiai vyksta elektronų pernaša tarp fermento ir elektrodo.

Gliukozės koncentracijos kraujyje matavimas yra svarbiausias diagnostinis kriterijus, skirtas pacientų, sergančių cukriniu diabetu, stebėjimui. Efektyvi cukrinio diabeto kontrolė priklauso nuo tikslios gliukozės koncentracijos kraujyje stebėjimo sistemos, kurioje gliukozės biologiniai jutikliai užima vieną svarbiausių vietų.

Amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai gali priklausyti kiekvienai iš

išvardintų amperometrinių biojutiklių klasių. Pirmos klasės gliukozės biologinių jutiklių veikimas pagrįstas vandenilio peroksido, susidarančio gliukozės oksidacijos metu, nustatymu (J. Wang, 2008).

Formuojant antros klasės gliukozės biologinius jutiklius naudojami elektronų pernašos tarpininkai (pvz.: ferocenas, fericianidas), leidžiantys sumažinti analizės metu naudojamą darbinio elektrodo potencialą (E.H. Yoo ir S.Y. Lee, 2010).

Trečios klasės amperometriniuose gliukozės biologiniuose jutikliuose naudojamos laidžios organinės medžiagos, pvz., polipirolas, užtikrinančios tiesioginę elektronų pernašą tarp elektrodo ir fermento (C. G. J. Koopal et al., 1994).

Berlyno mėlynasis yra vienas dažniausiai naudojamų elektrocheminių mediatorių analiziniam taikymui biologiniuose gliukozės jutikliuose (F. Ricci ir G. Palleschi, 2005). Biologiniais jutikliais registruojama vandenilio peroksido redukcijos srovė, todėl tyrimai orientuoti į vandenilio peroksidui atrankius elektrodus. Siekiant išvengti pašalinių medžiagų, esančių kraujyje (tokių kaip askorbo rūgštis, šlapimo rūgštis ir kt.), oksidacijos poveikio analizės rezultatams, darbiniam elektrodui turi būti suteiktas santykinai žemas potencialas. Vienas iš būdų darbinio elektrodo potencialui sumažinti yra peroksidazių (pvz., krienų peroksidazės) naudojimas (T. Ruzgas et al., 1996) – naudojant peroksidazes, vandenilio peroksido redukcija vyksta esant žemesniems darbinio elektrodo potencialams (Z. Gao et al., 2014). Tačiau šis būdas turi ir trūkumų, tokių kaip didelės gamybinės išlaidos, žemas stabilumas, krienų peroksidazės ribotas nusodinimas ant kietų paviršių. Berlyno mėlynasis – tai vandenilio peroksido redukcijos reakcijos katalizatorius, pasižymintis dideliu selektyvumu bei efektyvumu vandenilio peroksido redukcijos reakcijos katalizei, todėl Berlyno mėlynasis kartais vadinamas „dirbtine peroksidaze“ (A. A. Karyakin, 1999; Z. Gao et al., 2014). Taigi, gliukozės biologinių jutiklių, neturinčių vandenilio peroksido redukcijos katalizatorių, naudojimas turi trūkumų:

1) tiesioginis analičių amperometrinis nustatymas tradiciniuose elektroduose reikalauja santykinai aukšto potencialo, kuriam esant tirpale gali lengvai oksiduotis kitos medžiagos.

2) siekiant išvengti pašalinių medžiagų oksidacijos srovių įtakos matavimų rezultatams, naudojami papildomi apsauginiai sluoksniai (pvz., celiuliozės-acetatinės membranos, nafiono danga, sintetiniai polimerai), tačiau dangos nepilnai apsaugo nuo

nepageidaujamų jonų ar molekulių, pvz., askorbo, šlapimo rūgščių, prasiskverbimo (A. Ambrozy et al., 2013), prailgina biojutiklio atsako laiką (M.S. Alaejos ir J.G. Montelongo, 2004) taip pat turi būti suteiktas santykinai aukštas darbinis potencialas.

Nafiono danga apsaugo biojutiklį nuo anijoninių elektrochemiškai aktyvių medžiagų patekimo prie biojutiklio paviršiaus – šios medžiagos nėra oksiduojamos biojutiklio paviršiuje ir todėl nedaro įtakos matavimų rezultatams (S.H. Lim, 2005; L. Yang, 2009). Nepaisant to, kad nafiono danga apsaugo matavimo rezultatus nuo analizės tikslumui įtaką darančių oksidacijos srovių (sukeliamų pašalinių medžiagų oksidacijos biojutiklio paviršiuje), naudojant nafiono dangą biojutikliui turi būti suteikiamas santykinai aukštas darbinis potencialas, nors yra žinoma, kad žemas darbinis potencialas, palaikomas analizės metu, daro teigiamą įtaką ląstelių proliferacijai (A. Vaitkuvienė et al., 2013). Siekiant sumažinti biojutiklio darbinį potencialą ir taip išvengti pašalinių elektrochemiškai aktyvių medžiagų oksidacijos, kaip vienas iš variantų, grafito elektrodas, modifikuotas polipirolu, Berlyno mėlynuoju ir gliukozės oksidazės kompozitiniu sluoksniu, neseniai buvo aprašytas A. Ramanavičiaus ir kitų bendraautorių (A. Ramanavičius, 2017).

Pastaruoju metu didelį susidomėjimą šioje srityje sukėlė neorganiniai vandenilio peroksido redukcijos reakcijos katalizatoriai, tame tarpe – elektrokataliziniai pereinamųjų metalų heksacianoferatiniai kompleksai, ypač Berlyno mėlynasis, kuris pirmą kartą kaip „dirbtinė peroksidazė“ biojutiklyje gliukozės nustatymui buvo panaudotas 1995 metais Karyakin (A.A. Karyakin, 2001). Ant Berlyno mėlynojo paviršiaus gali vykti molekulinio deguonies ir vandenilio peroksido redukcija. Vandenilio peroksido redukcijos reakcija gali būti katalizuojama Berlyno mėlynuoju (K. Itaya et al., 1984). Kiti neorganiniai vandenilio peroksido redukcijos reakcijos katalizatoriai, ne tik tarp heksacianoferatinių kompleksų, bet ir tarp kitų žinomų H_2O_2 redukcijos mediatorių, nepasižymi tokiu efektyvumu, kaip Berlyno mėlynasis. H_2O_2 redukcijos srovė, matuojama naudojant Berlyno mėlynuoju modifikuotą elektrodą, dukart didesnė nei O_2 redukcijos srovė, tuo tarpu platina ar kiti taurieji metalai nepasižymi selektyvumu vandenilio peroksido redukcijai esant molekuliniam deguoniui (A.A. Karyakin et al., 2001; A.A. Karyakin et al., 1998; A.A. Karyakin and E.E. Karyakina, 1999).

Formuojant gliukozės biojutiklius svarbu parinkti substratą, tinkamą elektrochemiškai aktyvaus sluoksnio formavimui. Substratas turi pasižymėti aukštu

elektrocheminiu aktyvumu, taip pat cheminiu bei mechaniniu stabilumu. Pastaruoju metu titano oksidas plačiai naudojamas gliukozės biojutiklių kūrime. Titanas pasižymi biosuderinamumu, atsparumu korozijai bei žema kaina (lyginant titaną su kitomis medžiagomis, naudojamomis substratu formuojant gliukozės biojutiklius, pvz.: auksu ir platina). Be minėtų naudingų titano savybių, titanas pasižymi ir tinkamumu būti modifikuojamam Berlyno mėlynojo danga, padengiama atliekant cheminį arba elektrocheminį nusodinimą.

Kai kurių gliukozės biojutiklių formavimo metu, Berlyno mėlynojo danga buvo padengta ant titano oksido nanodalelių ar titano oksido zolio-gelio pavidalo junginių, skirtingų elektrodo medžiagų (SnO_2 , platinos, aukso, stiklo, anglies ir kt.). Tačiau šie dengimo metodai turi ir trūkumų:

- 1) TiO_2 nanodalelių ar zolių-gelių sintezė pati savaime yra brangi procedūra.

- 2) Titano oksido nanodalelių sintezės procesai yra daugiapakopiai ir sudėtingi, todėl metalurginio Ti panaudojimas keliais žingsniais supaprastina ir atpigina procesą.

Vienas iš fermentų imobilizavimo biojutikliuose metodų yra imobilizacija, atliekama panaudojant elektrai laidžius polimerus – šie polimerai gali būti naudojami kaip terpė, skirta kovalentiniam fermentų prijungimui arba jų adsorbavimui. Biomolekulių imobilizavimas, atliekamas naudojantis elektrai laidžiais polimerais (pvz., polipirolo), taip pat palengvina elektrono pernašą nuo fermento į elektrodą. Šiame išradime gliukozės oksidazės imobilizavimui buvo panaudotas polipirolo pasluoksnis.

Trumpas išradimo aprašymas

Išradime pateikta Berlyno mėlynojo nusodinimo ant titano pagrindo metodika, kuri apima cheminį bei elektrocheminį Berlyno mėlynojo nusodinimo ant titano metalurginės plokštelės būdą. Šioje metodikoje taip pat panaudojamos polipirolo pasluoksnio nusodinimo bei gliukozės oksidazės imobilizavimo procedūros, atliekamos siekiant suformuoti gliukozės biojutiklius.

Darbo metu pagaminti tokio tipo biojutikliai:

1. Biojutiklis, suformotas padengiant titano elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę.

2. Biojutiklis, suformotas padengiant titano elektrodą Berlyno mėlynojo

pasluoksniu elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę.

3. Biojutiklis, suformuotas padengiant titano elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, ant jo elektrochemiškai nusodinant polipirolo dangą bei imobilizuojant gliukozės oksidazę naudojantis gliutaro aldehido garais.

4. Biojutiklis, suformuotas ant titano plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais.

5. Biojutiklis, suformuotas ant titano plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį kaitinimo krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais.

6. Biojutiklis, suformuotas ant titano plokštelės chemiškai padengiant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę elektrocheminės polipirolo polimerizacijos metu.

7. Biojutiklis, suformuotas padengiant Berlyno mėlynojo pasluoksnį elektrochemiškai, iškaitinant pasluoksnį krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais.

Detalus išradimo aprašymas

Medžiagos ir metodai

Fermentas - gliukozės oksidazė (GO) (360 U mg^{-1}), gliukozė, $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, NaCl, NaH_2PO_4 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ buvo įsigytos iš „ROTH“ įmonės. Pirolas įsigytas iš „Alfa Aesar“ įmonės. Darbo metu paruoštų tirpalų gamybai buvo naudojamas ultrafiltracinis vanduo.

Darbo metu atliktoms elektrocheminio matavimo ir elektrocheminio nusodinimo procedūroms buvo naudojamas prie kompiuterio prijungtas $\mu\text{AUTOLAB}$ potenciostatas/galvanostatas su instaliuota programine įranga GPES. Elektrocheminiai procesai buvo vykdomi trijų elektrodų celėje, kurioje darbinio elektrodo naudota titano plokštelė (paviršiaus plotas 1 cm^2), palyginamuoju – $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$ elektrodas, pagalbinis – titano plokštelė.

Elektrocheminis Berlyno mėlynojo (BM), polipirolo (PP) ir kompozicinio BM/PP/GO sluoksnio nusodinimas bei chronoamperometriniai biojutiklių tyrimai atlikti naudojantis $\mu\text{AUTOLAB}$ potenciostatu/galvanostatu, įsigytu iš ECO-Chemie įmonės

(Utrechtas, Olandija). Elektrocheminiai procesai buvo vykdomi trijų elektrodų celėje, kurioje darbinio elektrodo naudota titano plokštelė (paviršiaus plotas 1 cm²), palyginamuoju – Ag/AgCl/KCl_(sotus) elektrodas, pagalbinis – titano plokštelė. Chronoamperometrinių matavimų metu darbiniam elektrodui suteiktas 0,05 V potencialas Ag/AgCl/KCl_(sotus) elektrodo atžvilgiu. Matavimai buvo atliekami pH 7,3 buferiniame tirpale, sudarytame iš 0.1 M NaCl ir 0.01 M NaH₂PO₄. Prieš įlašinant gliukozės į buferinį tirpalą, buvo laukiama, kol nusistovės pastovi srovė elektrocheminėje celėje. Tuomet į buferinį tirpalą buvo įlašinama 1 M gliukozės tirpalo bei įjungiamas maišymas (magnetinė maišyklė), kad gliukozės koncentracija visame tirpalo tūryje būtų vienoda. Po 1 – 2 min. maišymas buvo išjungiamas, po maišymo išjungimo nusistovėdavo pastovi elektros srovė, kuri buvo registruojama. Tyrimų metu matuotas elektros srovės pokytis (atsiradęs po gliukozės įlašinimo į buferinį tirpalą), kuris yra proporcingas gliukozės koncentracijai tirpale.

Brėžinių aprašymas

1a paveikslas. Biojutiklio, suformuoto padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai (atliekant 40 voltamperometrinių ciklų), vėliau ant jo polipirolo elektrocheminio nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

1b paveikslas. Biojutiklio, suformuoto padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai (atliekant 50 voltamperometrinių ciklų), vėliau ant jo polipirolo elektrocheminio nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

2 paveikslas. Biojutiklio, suformuoto padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

3 paveikslas. Biojutiklio, suformuoto padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, ant jo elektrochemiškai nusodinant polipirolo dangą bei imobilizuojant gliukozės oksidazę naudojantis gliutaro aldehido garais, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

4 paveikslas. Biojutiklio, suformuoto ant Ti plokštelės chemiškai nusodinant

Berlyno mėlyno pasluoksnį ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

5 paveikslas. Biojutikliu, suformuotu ant Ti plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį kaitinimo krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

6 paveikslas. Biojutikliu, suformuotu ant Ti plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį kaitinimo krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę elektrocheminės polipirolo polimerizacijos metu, srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės.

7 paveikslas. Biojutikliu, suformuotu padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlyno pasluoksniu elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir su gliutaro aldehido garais imobilizuojant gliukozės oksidazę, srovės tankio priklausomybės nuo koncentracijos tirpale kreivės.

8 paveikslas. Visų aštuoniais skirtingais būdais (įskaitant 1a ir 1b) pagamintų biojutiklių palyginimas. Visi biojutikliai buvo tiriami pagaminimo dieną.

Detali eiga

Gaminant gliukozės biojutiklį pirmiausia ant titano plokštelės buvo padengiamas Berlyno mėlynojo (BM) pasluoksnis. Tai buvo atliekama:

a) elektrochemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo sluoksnį ant titano plokštelės ciklinės voltamperometrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V(Ag/AgCl/KCl_(sotus) atžvilgiu) 1 mM FeCl₃ ir K₃[Fe(CN)₆] tirpale

b) chemiškai nusodinant Berlyno mėlynąjį, laikant titano plokštelę 1 mM FeCl₃ ir K₃[Fe(CN)₆] tirpale

c) Berlyno mėlynojo pasluoksnis buvo iškaitinamas krosnyje 1 val. 100 °C arba naudojamas be iškaitinimo

d) ant Berlyno mėlynojo pagrindo elektrochemiškai dengiamas polipirolo sluoksnis, po to imobilizuojamas fermentas - gliukozės oksidazė.

Gliukozės oksidazės imobilizacija atlikta:

a) elektrochemiškai nusodinant polipirolą pirolo (30 mM), FeCl_3 (1 mM), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 mM) bei gliukozės oksidazės (1 mg ml^{-1}) mišinyje skleidžiant potencialą nuo 0,4 iki 0,8 V ($\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sotus})}$ atžvilgiu) ciklinės voltamperometrijos būdu

b) užlašinant ant elektrodo, padengto Berlyno mėlynojo pasluoksniu, 40 mg ml^{-1} gliukozės oksidazės tirpalo (pagaminto pH 7,3 fosfatiname buferyje), jį išdžiovinant ore bei laikant virš gliutaro aldehido 25 % tirpalo 15 min.

Ciklinės voltamperometrijos metu pagalbinio elektrodo buvo naudojama titano plokštelė, palyginamuoju – Ag/AgCl ($\text{KCl}_{(\text{konc.})}$) elektrodas.

Amperometrinių tyrimų metu darbiniam elektrodai buvo suteiktas 0,05 V potencialas $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sotus})}$ elektrodo atžvilgiu. Pagalbinio elektrodo naudota Ti plokštelė.

Gaminant skirtingus biojutiklius, buvo pastebėta, kad biojutikliai, suformuoti imobilizuojant fermentą - gliukozės oksidazę - su gliutaro aldehido garais bei cheminiu būdu padengiant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, analizės metu pasižymi didesniu srovės tankiu (siekė iki $33,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), gaunamu po gliukozės įlašinimo į analizuojamą tirpalą, nei biojutikliai, suformuoti elektrochemiškai padengiant Berlyno mėlynojo pasluoksnį bei elektrocheminės pirolo polimerizacijos metu imobilizuojant gliukozės oksidazę (jų generuojamas srovės tankis siekė iki $23,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Išskaitinus Berlyno mėlynojo pasluoksnį, padidėja tyrimo metu biojutiklio generuojamos srovės tankis: tiriant biojutiklius, suformuotus padengiant titano elektrodą Berlyno mėlyno pasluoksniu elektrochemiškai ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę, didžiausias registruotas srovės tankis buvo $12 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, o tiriant biojutiklius, suformuotus padengiant titano elektrodą Berlyno mėlyno pasluoksniu elektrochemiškai, išskaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę, didžiausias tyrimų metu registruotas srovės tankis buvo $23,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Tiriant biojutiklius, suformuotus padengiant titano plokštelę Berlyno mėlynuoju chemiškai, išskaitinant dangą ir imobilizuojant gliukozės oksidazę elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu, buvo pastebėta, kad gliukozės mėginio analizės metu šio

tipo biojutiklių generuojama srovė pasiekė dideles vertes – viršijo $40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Šio tipo biojutikliams būdingas ir platus nustatomos gliukozės koncentracijos intervalas – elektros srovės stipris dažniausiai ženkliai didėjo po gliukozės koncentracijos padidėjimo mėginyje tol, kol gliukozės koncentracija pasiekdavo 100 mM.

Tiriant biojutiklius, suformuotus padengiant titano plokštelę Berlyno mėlynuoju elektrochemiškai, iškaitinant dangą ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais, buvo pastebėta, kad gliukozės mėginio analizės metu šio tipo biojutiklių generuojama srovė dažniausiai neviršydavo $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Šio tipo biojutikliams būdingas siauras nustatomos gliukozės koncentracijos intervalas – elektros srovės stipris dažniausiai ženkliai didėjo po gliukozės koncentracijos padidėjimo mėginyje tol, kol gliukozės koncentracija pasiekdavo 6 mM. Taip pat šio tipo biojutikliams būdingas stabilumas laike – tiriant gliukozės mėginį šio tipo biojutikliais, praėjus savaitei po biojutiklio pagaminimo, generuojamos srovės stipris dažnai būdavo neženkliai mažesnis ar didesnis nei atliekant tyrimą biojutiklio pagaminimo dieną.

Apibendrinant galima teigti, kad biojutikliai, suformuoti padengiant titano elektrodą Berlyno mėlyno pasluoksnio elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę pasižymi geriausiomis savybėmis.

Jautriausi gliukozės biojutikliai suformuoti naudojant cheminį Berlyno mėlynojo nusodinimą ir gauto pasluoksnio iškaitinimą.

Biojutikliai, suformuoti elektrochemiškai padengiant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį ir chemiškai imobilizuojant gliukozės oksidazę, buvo stabiliausi.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Žemiau yra pateikti išradimo gamybos pavyzdžiai. Išradimas nėra ribojamas šiais pavyzdžiais.

1 pavyzdys. Biojutiklis, suformuotas padengiant titano elektrodą Berlyno mėlyno pasluoksnio elektrochemiškai ir elektrocheminio polipirolo nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę (1) buvo paruoštas taip: Berlyno mėlyno pasluoksnis buvo nusodintas ant titano plokštelės ciklinės voltamperometrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale 40 ciklų (1a pav.) arba

50 ciklų (1b pav.). Vėliau ant elektrodo buvo imobilizuojama gliukozės oksidazė – tai buvo atliekama elektrochemiškai nusodinant polipirolą pirolu (30 mM), gliukozės oksidazės (1 mg ml^{-1}) bei 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale ciklinės voltametrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 20 ciklų. Šiuo biojutikliu išmatuotos elektros tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 1a pav. ir 1b pav.

2 pavyzdys (1-as + BM kaitinimas). Biojutiklis, suformuotas padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir polipirolo elektrocheminio nusodinimo metu imobilizuojant gliukozės oksidazę (2 pav.) buvo ruošiamas nusodinant Berlyno mėlyno pasluoksnį ant titano plokštelės ciklinės voltametrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale 40 ciklų. Po to Berlyno mėlyno pasluoksniu padengtas Ti buvo iškaitintas 100°C temperatūros kaitinimo krosnyje 1 val., atvėsintas iki kambario temperatūros, nuplautas miliporiniu vandeniu ir išdžiovintas ore. Ant išdžiovinto elektrodo buvo imobilizuojama gliukozės oksidazė – tai buvo atliekama elektrochemiškai nusodinant polipirolą pirolu (30 mM), gliukozės oksidazės (1 mg ml^{-1}) bei 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale ciklinės voltametrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 20 ciklų. Šiuo biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 2 pav.

3 pavyzdys. Biojutiklis, suformuotas padengiant titano elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, ant jo elektrochemiškai nusodinant polipirolo dangą bei imobilizuojant gliukozės oksidazę naudojantis gliutaro aldehido tirpalu (3 pav.) buvo ruošiamas taip: Berlyno mėlynojo pasluoksnis buvo nusodintas ant Ti plokštelės ciklinės voltametrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale 40 ciklų. Nusodinus Berlyno mėlynojo dangą ant jos buvo nusodinta polipirolo danga. Tai buvo atlikta ciklinant elektrodą pirolu mišinyje (sudarytame iš pirolu (30 mM) ir FeCl_3 (1 mM) bei $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 mM)) 20 ciklų skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V. Gautas elektrodas buvo nuplautas miliporiniu vandeniu, išdžiovintas ore. Po to ant elektrodo buvo lašinamas gliukozės oksidazės tirpalas (40 mg ml^{-1} gliukozės oksidazės tirpalas pH 7,3 fosfatiniame buferyje), drėgnas elektrodas išdžiovintas ore ir įfiksuotas virš gliutaro aldehido (25 %) tirpalo, laikytas virš jo 15 min. Šiuo biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės

koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 3 pav.

4 pavyzdys. Biojutiklis, suformuotas ant titano plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais (4 pav.) buvo paruoštas įmerkiant Ti plokštelę į 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ mišinį, laikant plokštelę mišinyje 60 min., ištraukiant, nuplaunant miliporiniu vandeniu ir išdžiovinant ore. Gliukozės oksidazę imobilizuota užlašinant gliukozės oksidazės tirpalo (40 mg ml^{-1} gliukozės oksidazės tirpalas pH 7,3 fosfatiname buferyje), išdžiovinant drėgną elektrodą ore ir įfiksuojant virš gliutaro aldehido (25 %) tirpalo, laikant virš jo 15 min. Biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 4 pav.

5 pavyzdys (4-tas + BM iškaitinimas). Biojutiklis, suformuotas ant Ti plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį kaitinimo krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę su gliutaro aldehido garais (5 pav.) buvo paruoštas įmerkiant Ti plokštelę į 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ mišinį, laikant plokštelę mišinyje 40 min. Po to Berlyno mėlynojo pasluoksniu padengtas Ti buvo iškaitintas 100°C temperatūros kaitinimo krosnyje 1 val., atvėsintas iki kambario temperatūros, nuplautas miliporiniu vandeniu ir išdžiovinamas ore. Gliukozės oksidazę imobilizuota užlašinant gliukozės oksidazės tirpalo (40 mg ml^{-1} gliukozės oksidazės tirpalas pH 7,3 fosfatiname buferyje), išdžiovinant drėgną elektrodą ore ir įfiksuojant virš gliutaro aldehido (25 %) tirpalo, laikant virš jo 15 min. Šiuo biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 5 pav.

6 pavyzdys. Biojutiklis, suformuotas ant Ti plokštelės chemiškai nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį, iškaitinant jį kaitinimo krosnyje ir imobilizuojant gliukozės oksidazę polipirolo elektrocheminio nusodinimo metu (6) buvo paruoštas įmerkiant titano plokštelę į 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ mišinį, laikant plokštelę mišinyje 40 min. Po to Berlyno mėlynojo pasluoksniu padengtas Ti buvo iškaitintas 100°C temperatūros kaitinimo krosnyje 1 val., atvėsintas iki kambario temperatūros, nuplautas miliporiniu vandeniu ir išdžiovinamas ore. Ant išdžiovinoto elektrodo buvo imobilizuojama gliukozės oksidazė – tai buvo atliekama elektrochemiškai nusodinant polipirolą pirolu (30 mM), gliukozės oksidazės (1 mg ml^{-1}) bei 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale ciklinės voltamerometrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 20 ciklų. Šiuo biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 6 pav.

7 pavyzdys. Biojutiklis, suformuotas padengiant Ti elektrodą Berlyno mėlynojo pasluoksniu elektrochemiškai, iškaitinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį krosnyje ir su gliutaro aldehido garais imobilizuojant gliukozės oksidazę (7 pav.), buvo ruošiamas nusodinant Berlyno mėlynojo pasluoksnį ant Ti plokštelės ciklinės voltamperometrijos būdu, skleidžiant potencialą nuo 0,4 V iki 0,8 V 1 mM FeCl_3 ir $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpale 40 ciklų. Po to Berlyno mėlynojo pasluoksniu padengtas Ti buvo iškaitintas 100 °C temperatūros kaitinimo krosnyje 1 val., atvėsintas iki kambario temperatūros, nuplautas miliporiniu vandeniu ir išdžiovintas ore. Gliukozės oksidazė imobilizuota užlašinant gliukozės oksidazės tirpalo (40 mg ml⁻¹ gliukozės oksidazės tirpalas pH 7,3 fosfatiniame buferyje), išdžiovinant drėgną elektrodą ore ir įfiksuoiant virš gliutaro aldehido (25 %) tirpalo, laikant virš jo 15 min. Šiuo biojutikliu išmatuotos srovės tankio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tirpale kreivės pateiktos 7 pav.

Literatūra

1. Alaejos M.S. and Montelongo J.G. Application of Amperometric Biosensors to the Determination of Vitamins and α -Amino Acids. *Chem. Rev.* 104, 2004, p. 3239-3265.
2. Amrozy A., Hlavata L., Labuda J. Protective membranes at electrochemical biosensors. *Acta Chimica Slovaca* 6 (2013), p. 35-41.
3. Chaubey A., Malhotra B.D. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (6 - 7), 2002, p. 441 – 456.
4. Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*, 29 (2 – 3), 2008, p. 171 – 180.
5. Gao Z., Qu Y., Li T., Shrestha N.K., Song Y. Development of Amperometric Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Functionized TiO₂ Nanotube Arrays. *Scientific Reports* 4, 2014, 6891.
6. Yang L., Ren X., Tang F., Zhang L. A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/naflon composite film. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (4), 2009, p. 889 – 895.
7. Yoo E.H., Lee S.Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10(5), 2010, p. 4558 – 4576.
8. Itaya K., Shoji N., Uchida I. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian Blue modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1984, 3423-3429.
9. Karyakin A.A., Karyakina E.E. Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxidase detection. Application to biosensors, sensors and Actuators B 57, 1999, p. 268-273.
10. Karyakin, A.A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* 13, 2001, p. 813-819.
11. Karyakin, A.A., Karyakina, E.E., Gorton, L. The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxidase reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. *Electroanalytical Chemistry* 456, 1998, p. 97-104.

12. Koopal C.G.J., Bos A.A.C.M., Nolte R.J.M. Third-generation glucose biosensor incorporated in a conducting printing ink. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18 (1 – 3), 1994, p. 166 – 170.
13. Lim S.H., Wei J., Lin J., Li Q., Kua You J. A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose oxidase onto Nafion-solubilized carbon nanotube electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (11), 2005, p. 2341 – 2346.
14. Mei S., Wang H., Wang W., Tong L., Pan H., Ruan C., Ma Q., Liu M., Yang H., Zhang L., Cheng Y., Zhang Y., Zhao L., Chu P.K. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials* 35, 2014, 4255-4265.
15. Monošík R., Stredánský M., Šturdík E. Biosensors — classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovenica*, 5 (1), 2012, p. 109 – 120.
16. Mulchandani A. Principles of Enzyme Biosensors. *Enzyme and Microbial Biosensors*, 6, 1999, p. 3 – 14.
17. Park M., Tsai S. L., Chen W. Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors*, 13 (5), 2013, p. 5777 – 5795.
18. Qian J., Liu Y., Liu H. et al. Characterization of regenerated silk fibroin membrane for immobilisation of peroxidase and construction of an amperometric hydrogen peroxide sensor employing phenazinemetosulphate as electron shuttle. *J ElectroanalChem* 1995; 397:157-162.
19. Ramanavicius A., Rekertaitė A.I., Valiūnas R., Valiūnienė A. Single-step procedure for the modification of graphite electrode by composite layer based on polypyrrole, Prussian blue and glucose oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 240, 2017, p. 220 – 230.
20. Ruzgas T., Csoregi E., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *AnalyticaChimicActa*, 1996, 123-138.
21. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5), 2011, p. 1788 – 1799.
22. Vaitkuvienė A., Kaseta V., Voronovic J., Ramanauskaite G., Biziuleviciene

G., Ramanaviciene A., Ramanavicius A. Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. *Journal of Hazardous Materials*, 250 –251, 2013, p. 167 – 174.

23. Wang J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, 108 (2), 2008, p. 814 – 825.

24. Zhang M., Yuan R., Chai Y., Li W., Zhong H., Wang C. Glucose biosensor based on titanium dioxide-multiwall carbon nanotubes-chitosan composite and functionalized gold nanoparticles. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34, 2011, p. 1143 – 1150.

Išradimo apibrėžtis

1. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnio, skirto elektronų pernašai ir medžiagų imobilizacijai, gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad apima Berlyno mėlynojo pasluoksnio padengimą ant titano plokštelės.

2. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnio pagal 1 punktą gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad padengimas yra atliekamas cheminiu būdu.

3. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnio pagal 1 punktą gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad padengimas yra atliekamas elektrocheminiu būdu skleidžiant elektrinį potencialą nuo 0,4 iki 0,8 V.

4. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnis gautas būdu pagal 2 punktą.

5. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnis gautas būdu pagal 3 punktą.

6. Biojutiklio elektrodo paviršiaus sluoksnis pagal 4 arba 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pagrindas yra kaitinamas krosnyje 1 val. 100 °C temperatūroje.

7. Biojutiklio elektrodo gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad ant elektrodo paviršiuje suformuoto sluoksnio, pagal bet kurį vieną iš 4 - 6 punktų, yra imobilizuojamas fermentas, skirtas analitės koncentracijos nustatymui mėginyje.

8. Biojutiklio elektrodo gamybos būdas, pagal 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad prieš fermento imobilizavimą ant Berlyno mėlynojo pasluoksnio, gauto elektrocheminio nusodinimo ant elektrodo paviršiaus būdu, yra susintetinamas polipirolo sluoksnis.

9. Biojutiklio elektrodo gamybos būdas, pagal 7 arba 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad ant modifikuoto elektrodo pagrindo imobilizuoti skirtas fermentas yra gliukozės oksidazė.

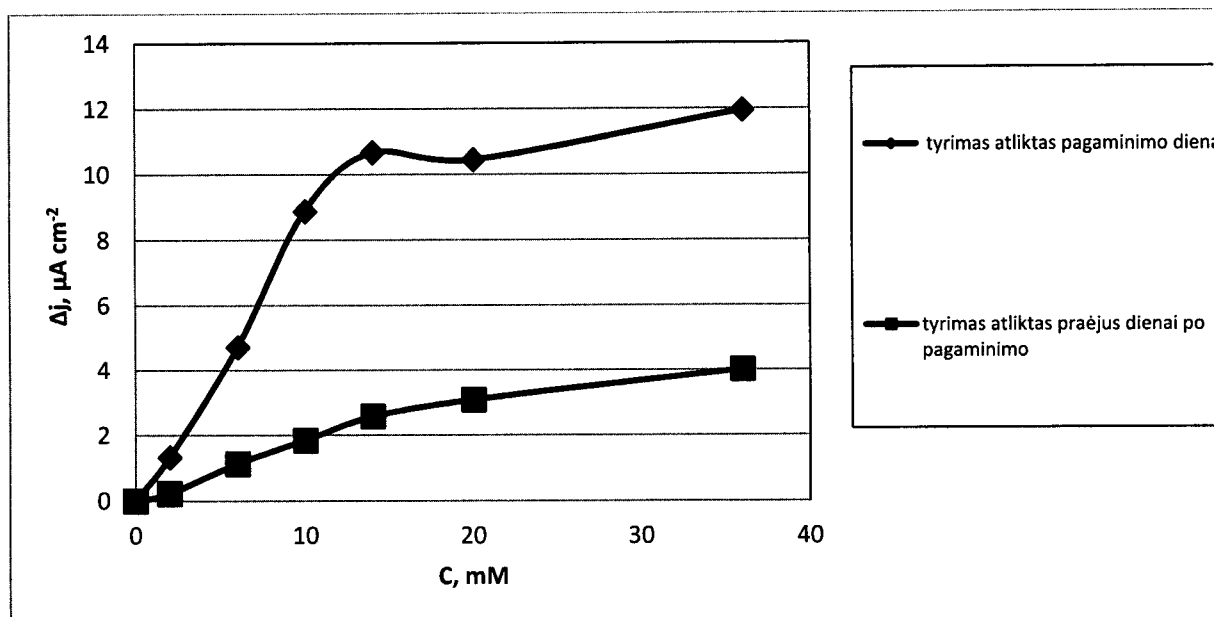
10. Gliukozės biojutiklio elektrodo pagal 9 punktą gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad gliukozės oksidazės imobilizavimas yra atliekamas cheminiu arba elektrocheminiu būdu.

11. Gliukozės biojutiklio elektrodo pagal 10 punktą gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad gliukozės oksidazės cheminis imobilizavimas yra

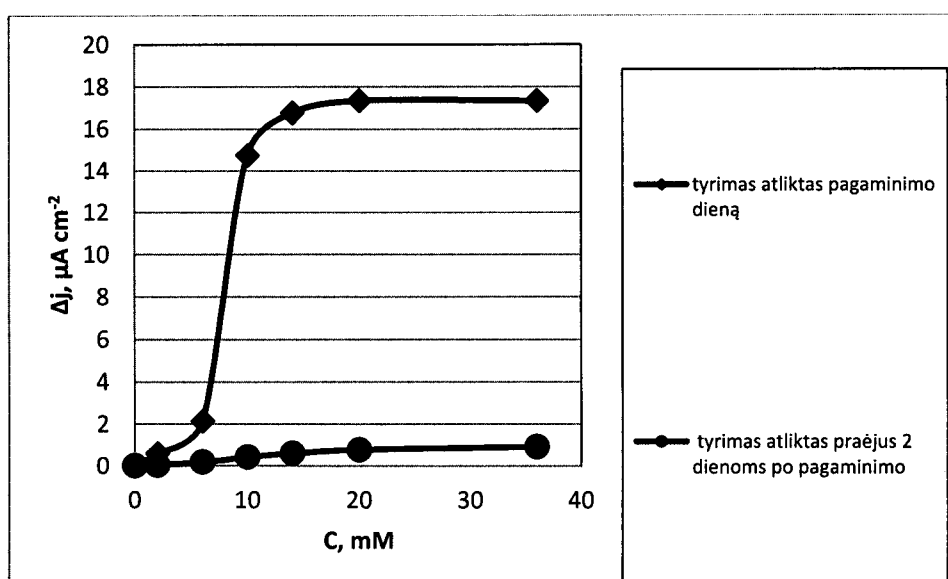
atliekamas glutaro aldehido garais.

12. Biojutiklio elektrodas, gautas būdu pagal 7 arba 8 punktą.

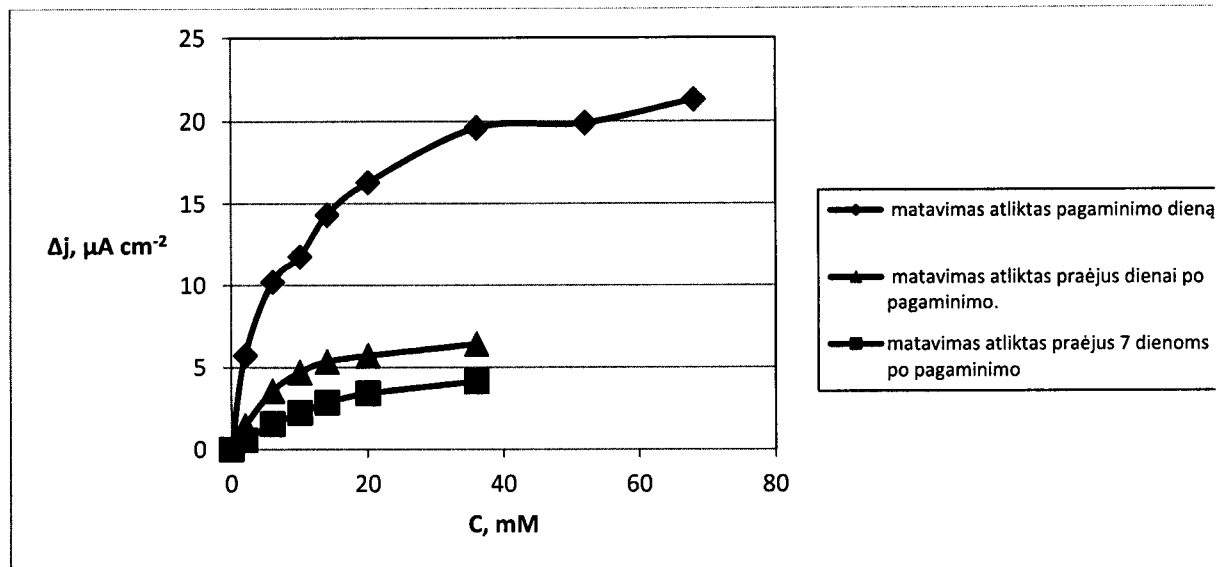
13. Gliukozės biojutiklio elektrodas, gautas būdu pagal bet kurį vieną iš 9 - 11 punktų.



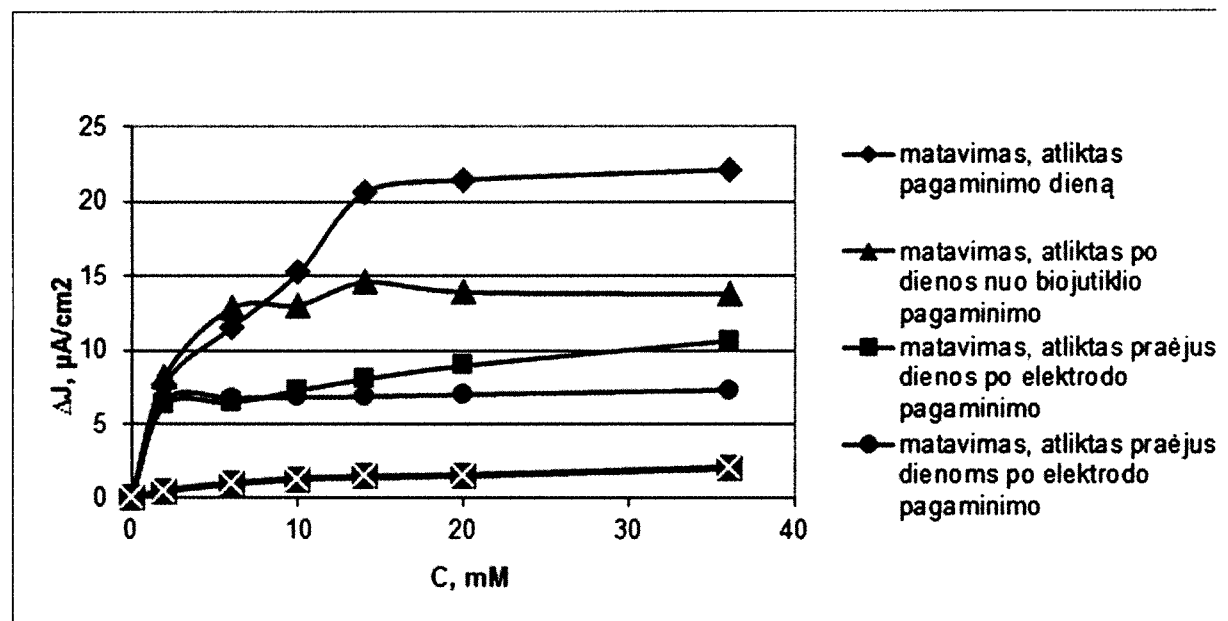
1a pav.



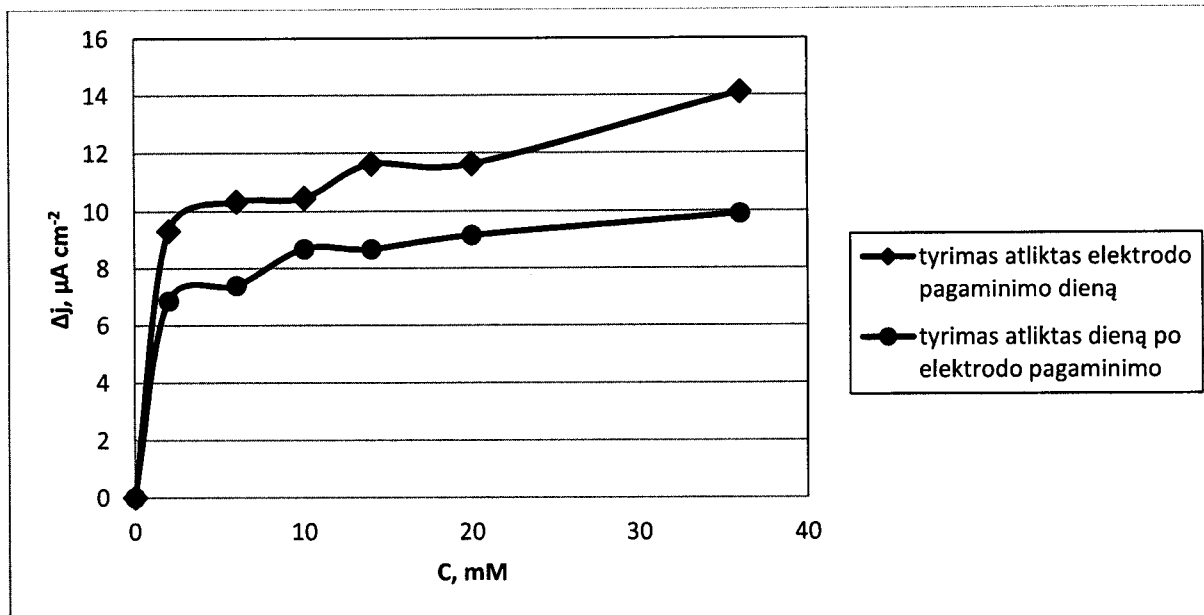
1b pav.



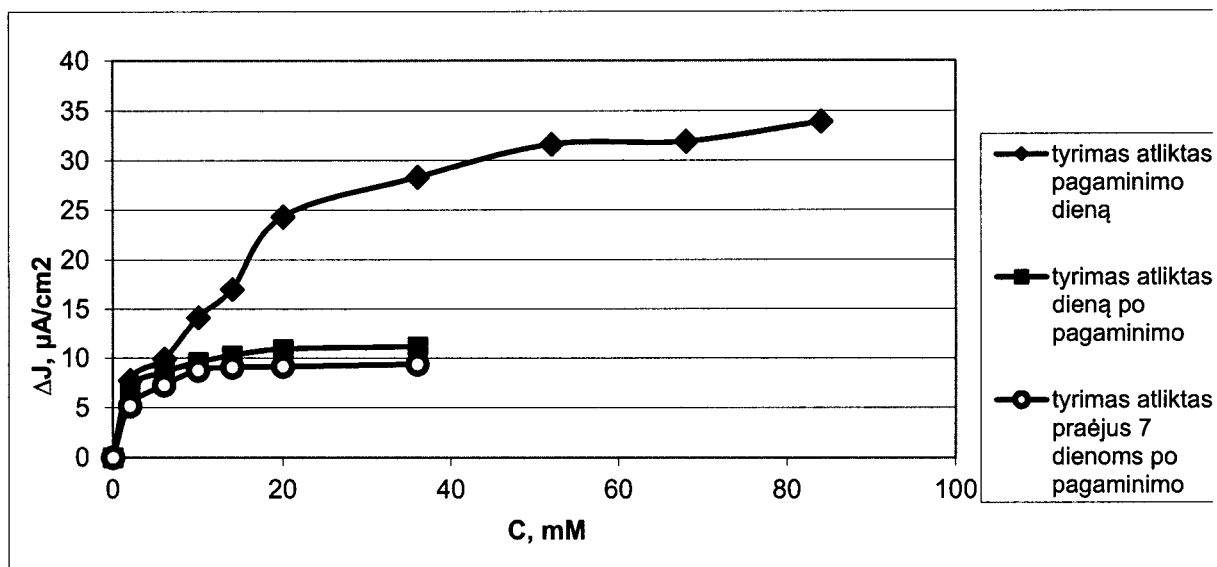
2 pav.



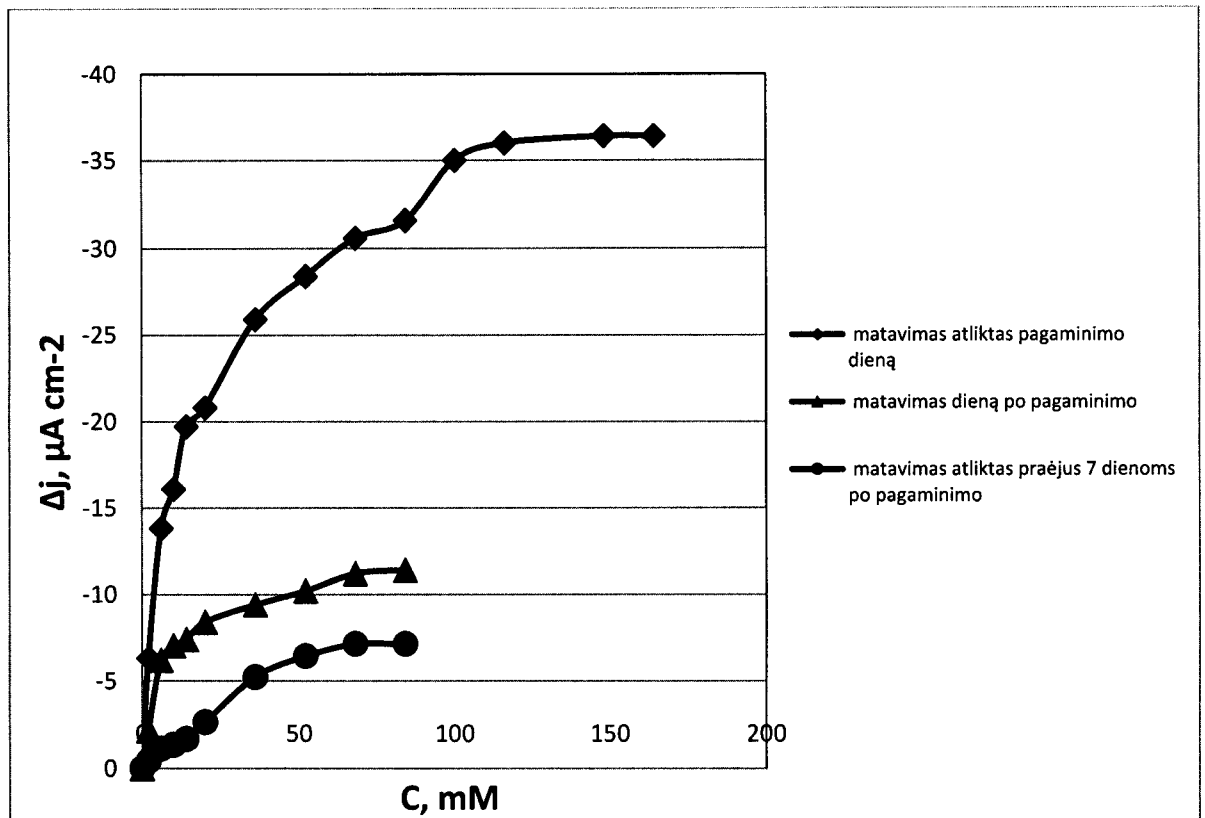
3 pav.



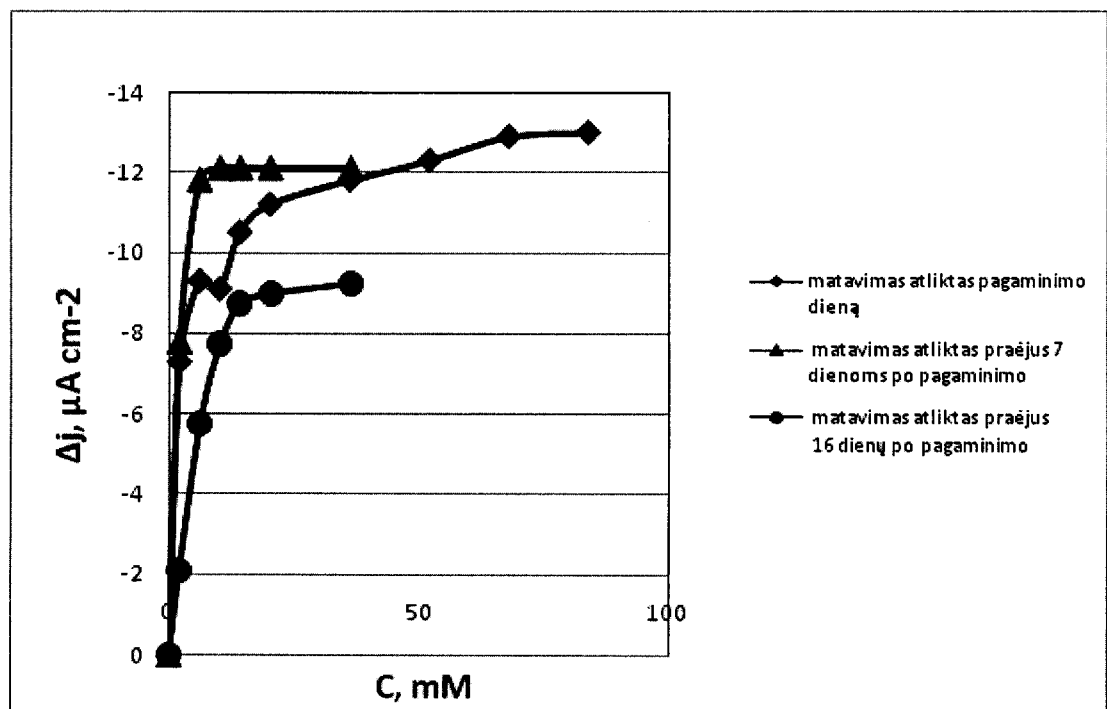
4 pav.



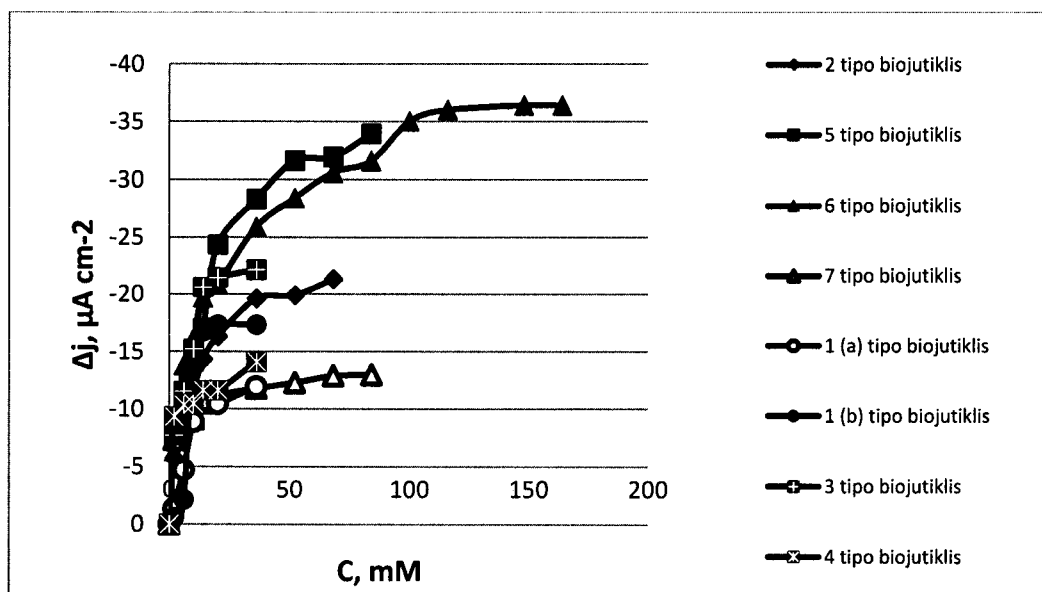
5 pav.



6 pav.



7 pav.



8 pav.