

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 666-405.8; 544.653
Рег. № И222112300007-4

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
СПбГУ

С.В. Микушев
«19» *февраль* 2022 г.



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ПРОЕКТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ПРИКЛАДНОЙ ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОГО
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ (промежуточный, этап 2)

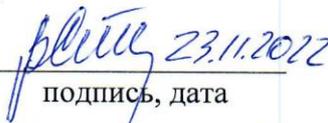
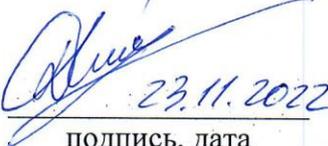
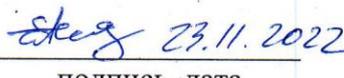
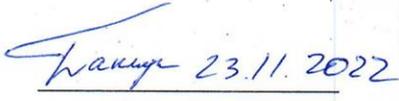
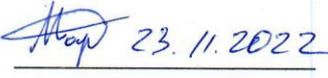
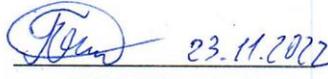
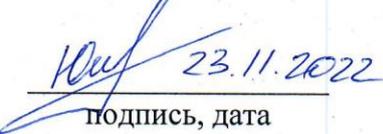
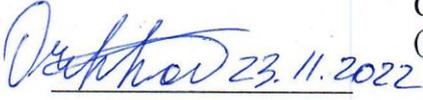
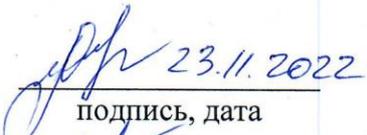
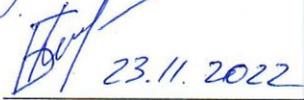
Руководитель НИР,
с.н.с.,
кандидат химических наук

А.Ю. Арбенин

подпись, дата *24.4.2022*

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР, с.н.с., к.х.н.	 23.11.2022 подпись, дата	Арбенин А. Ю., (введение, заключение, раздел 1,2,3,4)
Исполнители: Д.х.н., профессор	 23.11.2022 подпись, дата	Смирнов В. М., (раздел 2)
Д.х.н., профессор	 23.11.2022 подпись, дата	Кирсанов Д. О., (раздел 4)
К.х.н., доцент	 23.11.2022 подпись, дата	Земцова Е. Г., (раздел 2)
Д.ф.-м.н., доцент	 23.11.2022 подпись, дата	Панчук В. В., (раздел 4)
К.ф.-м.н., научный сотрудник	 23.11.2022 подпись, дата	Корусенко П. М., (раздел 2)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Петров А. А., (раздел 1,2,3,4)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Пономарева А. Н., (раздел 3)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Юрчук Д. В., (раздел 4)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Орехов Е., (раздел 4)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Сахарова О.А., (раздел 4)
Инженер-исследователь	 23.11.2022 подпись, дата	Беседина М.А., (раздел 3)

Лаборант-исследователь

Данилова Е.Е.,
(раздел 2)

 23.11.2022

подпись, дата

Нормоконтроль



Н.В. Квадрицус

30.11.2022

Реферат

Отчет 52 с., 7 ч., 44 рис., 0 табл., 7 источников

ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКОЕ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ,
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОМПОЗИЦИОННЫЕ
МАТЕРИАЛЫ, ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ, ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ
СЕНСОРЫ, УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОДЫ, ОЛИГОПЕПТИДЫ,
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ.

Объект исследования и разработки – ультрамикродатродные ансамбли и методы их применения для создания аналитического метода определения веществ с близкими окислительно-восстановительными потенциалами, но с различным коэффициентом диффузии.

Цель работы – разработка метода анализа соединений с близкими окислительно-восстановительными потенциалами, но с различным коэффициентом диффузии при помощи массивов ультрамикродатродов, полученных темплатным и литографическим методом, базирующимся на различии вольтамперных кривых, возникающем вследствие особенностей диффузионного режима подвода аналита из объема раствора.

В рамках работы были исследованы закономерности электрохимического поведения в водных электролитах электроактивных аминокислот и ферроценовых производных аминокислот и олигопептидов в электрохимических ячейках с массивами ультрамикродатродов инертной и электрокаталитически активной природы в качестве рабочих электродов. На основе полученных данных были разработаны методы количественного определения, использующие циклическую вольтамперометрию.

Содержание

1. Введение	6
2. Получение массивов ультрамикроэлектродов.	8
3. Синтез ферроценовых производных.	9
4. Изучение вольтамперометрических кривых растворов ферроценметанола, ферроценкарбоновой кислоты и их производных, полученных прививкой к аминокислотам и пептидам.	12
4.1. Изучение ЦВА ферроцен-метанола и его производных.	12
4.2. Изучение ЦВА ферроцен-карбоновой кислоты и ее производных.	17
4.3. Изучение смеси ферроцен-метанола и ферроцен-карбоновой кислоты.	18
5. Изучение возможности определения электроактивных аминокислот: цистеин, ацетилцистеин и глутатион при помощи электродов, полученных при помощи литографических микроэлектродов и электродов на основе массивов иммобилизованных микрочастиц металлов на поверхности подложки, синтезированных темплатным электрохимическим методом с применением в качестве темплата перфорированных пленок ксерогелей.	21
5.1. Исследование сенсоров на основе массивов ультрамикроэлектродов, полученных темплатным нелитографическим методом.	21
5.2. Исследование темплатных литографических сенсоров.	29
6. Разработка количественных вольтамперографических методов определения аналитов при помощи разработанных активных материалов.	31
7. Разработка метода количественного определения аналитов в смеси с применением нескольких типов активных материалов с обработкой аналитического сигнала при помощи метода проекции на латентные структуры.	45
8. Заключение	51
Список используемых источников	52

Введение

Разработка аппаратных методов в последние десятилетия является основным направлением развития аналитической химии. Появление таких физико-химических методов как хроматография, вольтамперометрия, потенциометрия, термогравиметрия позволило значительно расширить спектр анализируемых соединений, расширить границы качественного и количественного анализа относительно классических химических методов анализа. Электрохимические методы представляют особый интерес, так как их применение при современной элементной базе ведёт к колоссальной миниатюризации оборудования, что выгодно отличает их от таких методов как масспектрометрия, хроматография, калориметрия и т.д. Современные вольтамперометрические приборы становятся не только портативными, но и встраиваемыми в приборы [1] и даже носимые медицинские устройства [2]. В связи с этим весьма перспективным является развитие новых электрохимических методов анализа.

Одним из перспективных методов электрохимического анализа является вольтамперометрия с применением ультрамикроэлектродов [3],[4],[5]: данный метод позволяет получать стационарные вольтамперограммы, а также значительно снижать емкостной вклад ДЭС, что приводит к повышению соотношения сигнал/шум. В данной работе рассматривался иной аспект электрохимического поведения ультрамикроэлектродов: их ансамбли могут работать в стационарном диффузионном режиме, что выражается в сигмоидальной форме вольтамперной кривой, которая переходит в каноническую форму с перегибом при пересечении диффузионных областей соседних электродов [6]. Смена диффузионного режима зависит от взаиморасстояния и коэффициента диффузии, поэтому логично ожидать, что используя массивы ультрамикроэлектродов возможно построить метод анализа сходных по электрохимическому поведению соединений (имеющих близкие

окислительно-восстановительные потенциалы), но имеющих различные коэффициенты диффузии.

В представленной работе рассмотрена возможность анализа соединений с идентичными электрохимически-активными центрами и различной молекулярной массой при помощи хаотично расположенных и упорядоченных массивов ультрамикроэлектродов посредством изучения вольтамперных кривых.

1. Получение массивов ультрамикроэлектродов.

Изготовление структур для исследования проводилось с использованием напыления вакуумным испарением металлов и оптической литографии. Рабочий процесс обработки показан на схеме (Рисунок 1)

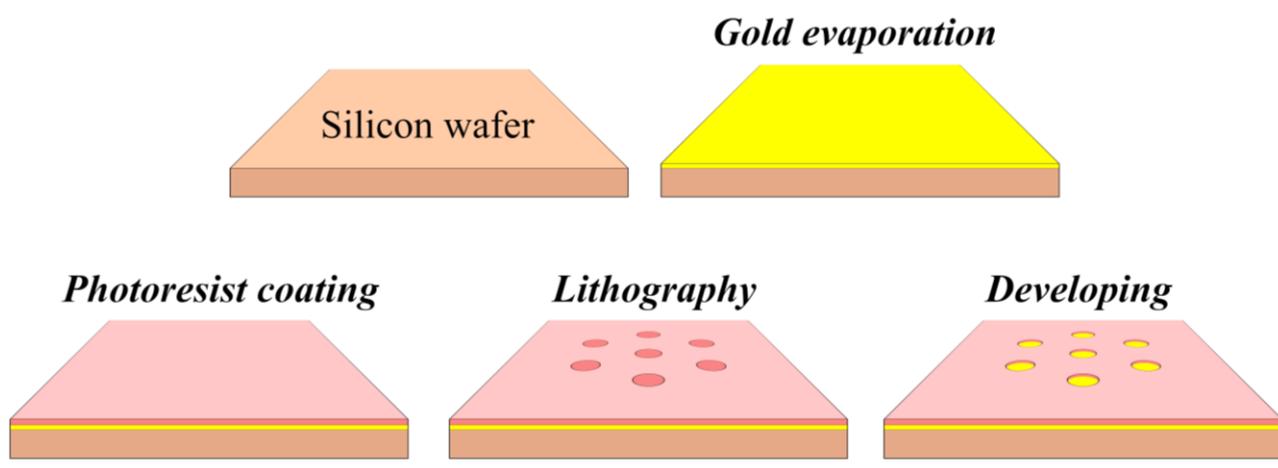
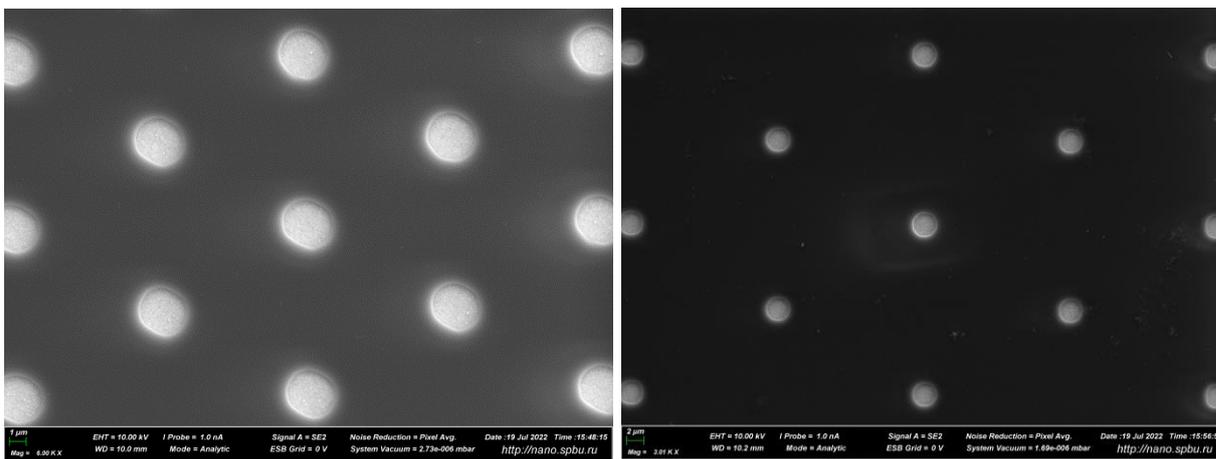


Рисунок 1- Схема получения микроэлектродных ансамблей.

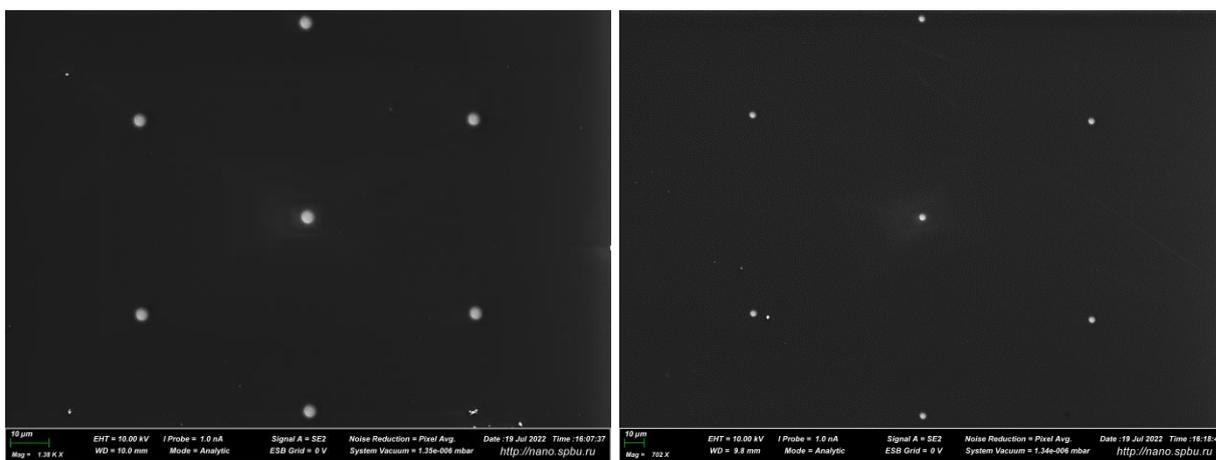
Сначала на одностороннюю полированную монокристаллическую кремниевую подложку наносились адгезионные слои хрома и золота толщиной 5 нм и 200 нм, соответственно. Для осаждения металлических слоев мы использовали термическое испарение. На следующем этапе с помощью оптической литографии были изготовлены массивы точечных контактов. Подложка была покрыта слоем фоторезиста AZ MIR 701 методом спин-коатинга. Затем на этот слой наносились гексагонально упорядоченный массив кругов с помощью безмасочной фотолитографической системы Heidelberg DWL 66FS. Далее слой фоторезиста был обработан проявителем AZ 726MIF, что привело к открытию круговых металлических контактов. Межэлектродные расстояния определялись исходя из результатов моделирования и составили 10, 20, 50 и 100 мкм. Оставшийся слой фоторезиста обеспечивал диэлектрический слой для дальнейших электрических измерений.

На электронных микрофотографиях полученных образцов видна гексагональная структура массивов микроэлектродов (Рисунок 2)



А

Б



В

Г

Рисунок 2 – Электронные микрофотографии массивов ультрамикроэлектродов с межэлектродными расстояниями: А – 10, Б – 20, В – 50 и Г – 100 мкм.

2. Синтез ферроценовых производных.

Исходные олигопептиды были синтезированы по методу Меррифилда: в качестве твёрдофазного носителя была использована смола Ванга, на которую посредством реакции этерификации был ковалентно присоединен FMOC-защищенный глицин. Этерификация производилась посредством карбодиимидной активации карбоксильной группы аминокислоты (взаимодействие ее с DMAP и DCC в DMF при перемешивании в среде сухого аргона в течение 10 минут при охлаждении до 0 по Цельсию). Раствор с активированной аминокислотой приливался в емкость со смолой Ванга

(предварительно набухшей в DMF в течение 1 суток) из расчета 1.1 ммоль аминокислоты на 1 г сухой смолы Ванга. Реакция проводилась 1 час при встряхивании. Последующее удлинение цепи проводилось в пептидном синтезаторе Endeavor AARTES через снятие Fmoc-защиты (при помощи метилпиперидина) с глицина и последовательное присоединение каждого следующего аминокислотного фрагмента, катализируемое HBTU (hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium) в присутствии DIEA. Все операции в синтезаторе предполагают промывку смолы с присоединенными аминокислотами растворами соответствующих веществ в DMF: HBTU 0.4M, DIEA 1M, MPiP 20%. Схема синтеза приведена ниже (Рисунок 3)

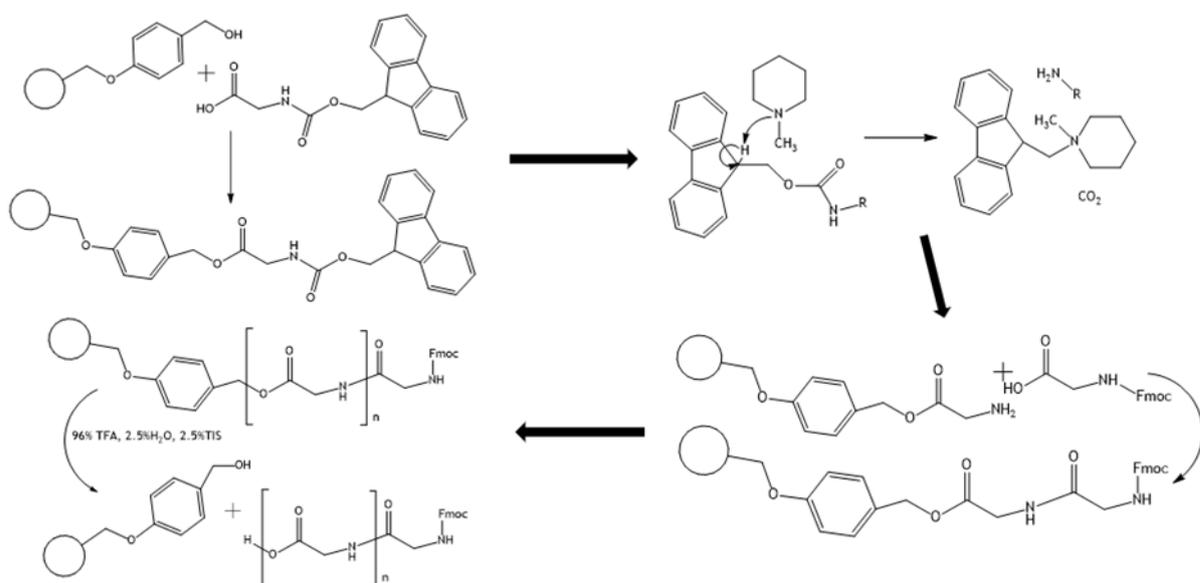


Рисунок 3 – Схема твердофазного синтеза пептидов.

Для прививки ферроценкарбоновой кислоты на реагентной базе пептидного синтеза на последней стадии проводилась обработка активированной кислотой. Далее производилась отшивка продукта трифторуксусной кислотой. Синтез ферроценматенольных производных производился посредством этерификации карбодиимидным методом ферроценметанола и Fmoc-защищенного пептида.

Для производных структура была подтверждена масспектрометрией:

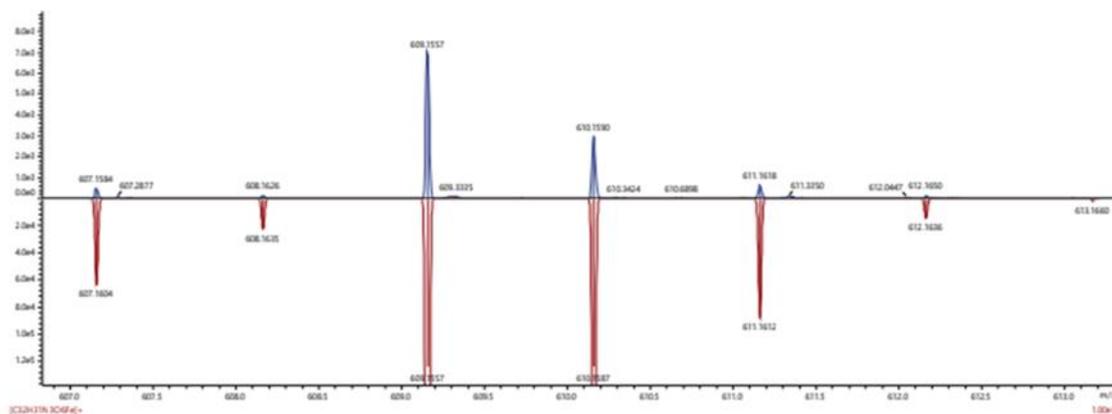


Рисунок 4 – масспектр триглицинового эфира ферроценметанола

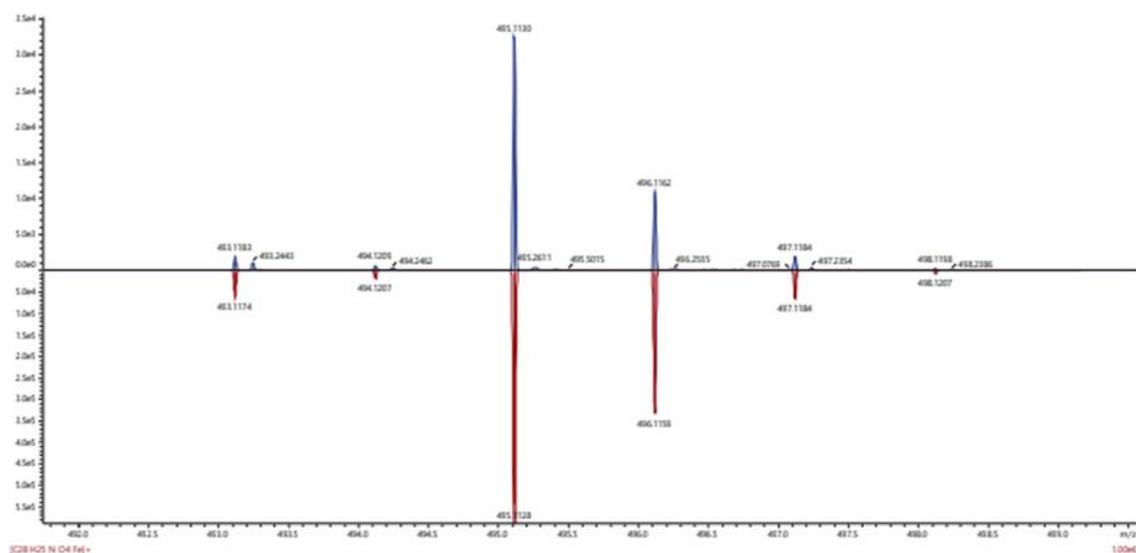


Рисунок 5 – масспектр глицинового эфира ферроценметанола

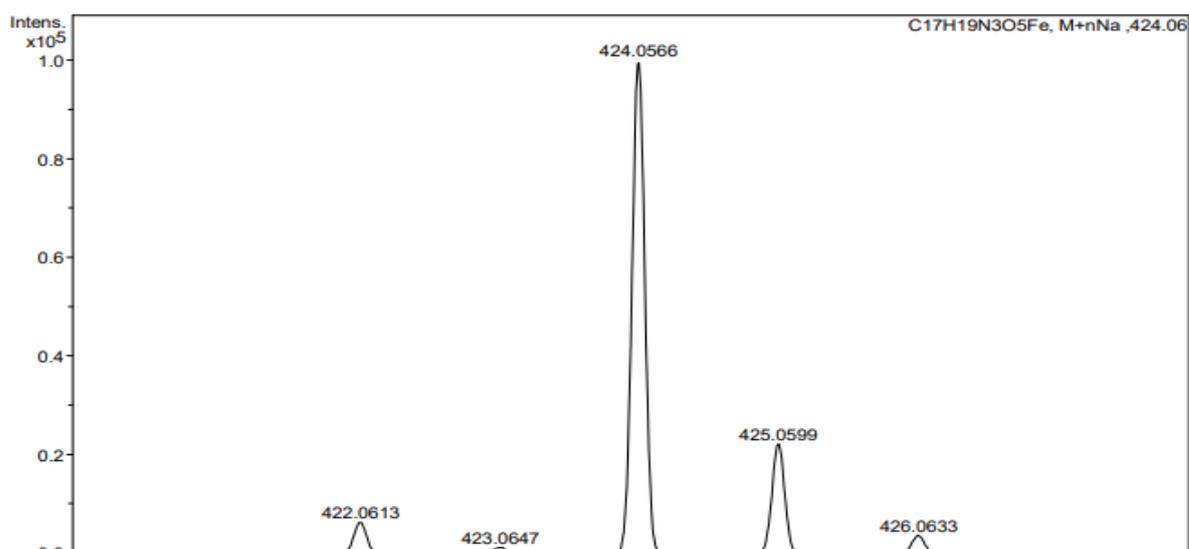


Рисунок 6 – масспектр триглицинового производного ферроценкарбоновой кислоты.

3. Изучение вольтамперометрических кривых растворов ферроценметанола, ферроценкарбонной кислоты и их производных, полученных прививкой к аминокислотам и пептидам.

3.1. Изучение ЦВА ферроцен-метанола и его производных.

Изначально для получения информации о сходимости данных модели, построенной на основе метода конечных элементов по протоколу, представленному в предыдущем отчете, с экспериментальными данными, были зарегистрированы вольтамперные кривые для установленного эффективного межэлектродного расстояния 20 мкм применительно к редокс-системе ферроцен-метанол/ферроцен-метанол. Были использованы различные скорости развертки от 10 до 1000 мВ/с (Рисунок 7):

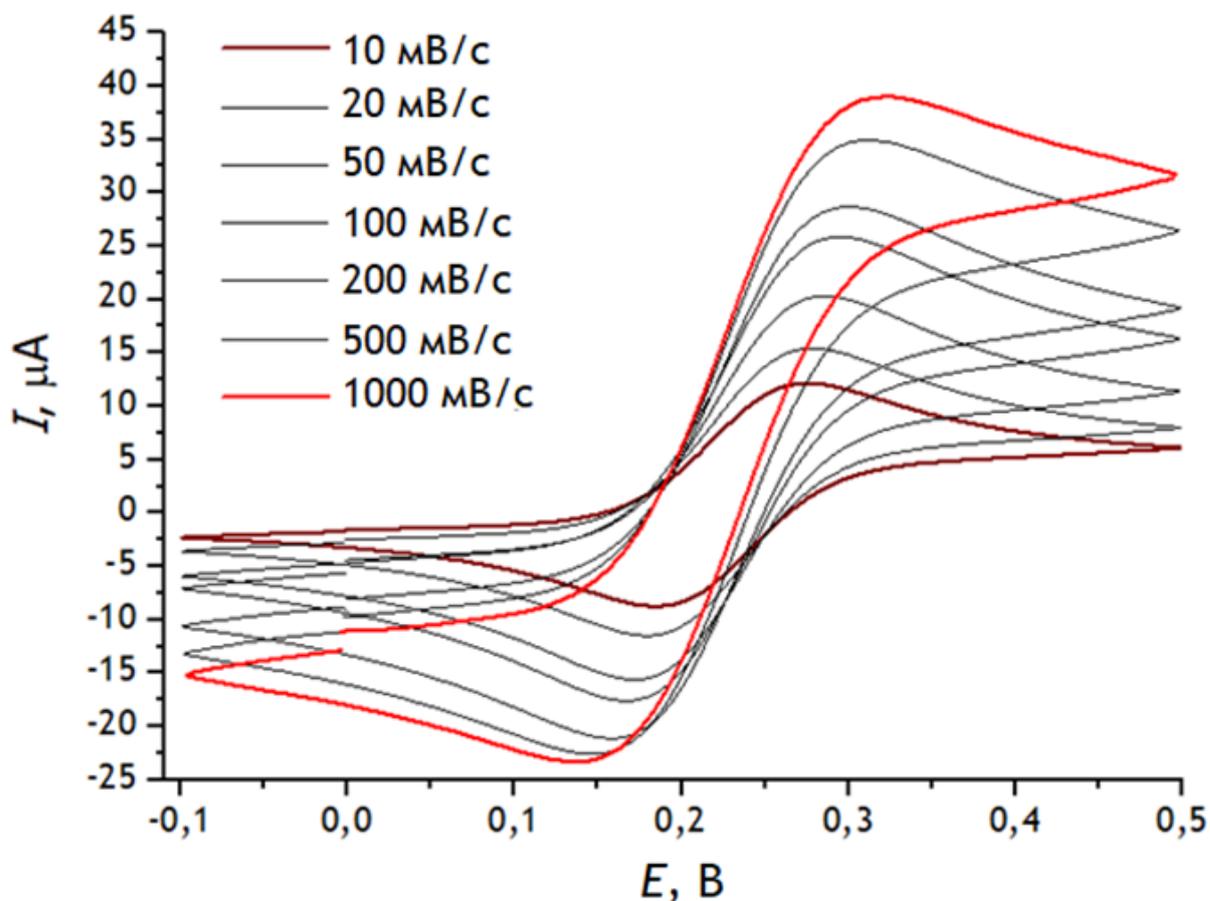


Рисунок 7 - Экспериментальные вольтамперные кривые ферроценметанола на микроэлектродном ансамбле с межэлектродным расстоянием 20 мкм при различных скоростях развертки.

Для сравнения также приведем на одном графике вольтамперные кривые для скорости развертки 100 мВ/с, полученные в результате расчетов и эксперимента (Рисунок 8)

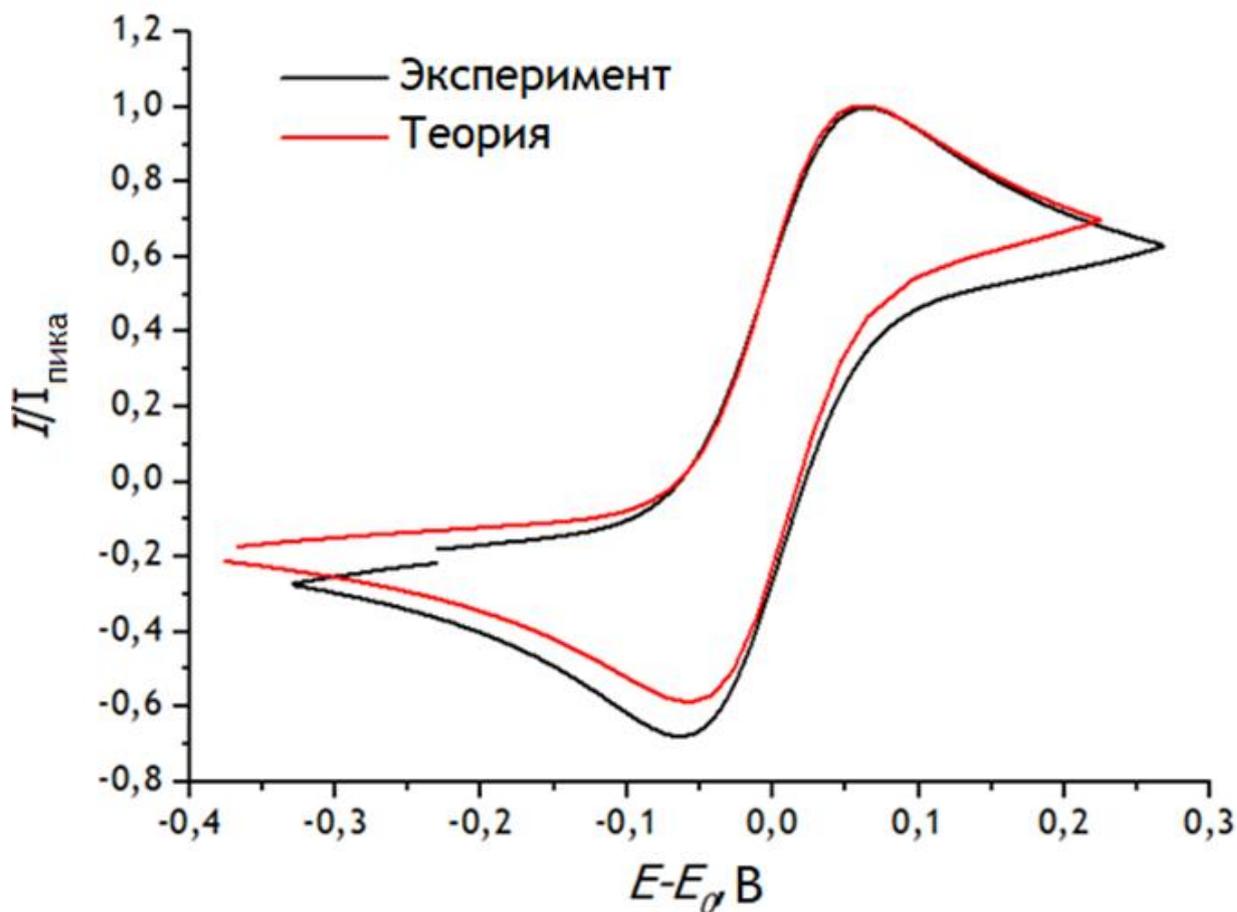


Рисунок 8 - Вольтамперные кривые для сравнения теории и эксперимента.

Среднеквадратическое отклонение на участке окислительного пика ($-0.5 - 0.2$ В) находится в пределах $5 \cdot 10^{-4}$ в относительных единицах (отношение тока к току пика), что можно считать удовлетворительным результатом с точки зрения предсказательного потенциала модели.

Следует отметить, что большие расхождения в восстановительной области потенциалов вызваны тем, что ферроцен-метанол легко окисляется на воздухе, что можно заметить визуально при длительном хранении раствора: окраска меняется от желтого до синего. По этой причине в качестве характеристического использовался пик окисления восстановленной формы.

Кроме того, были построены зависимости смещения потенциала пика от скорости развертки для экспериментальных и теоретических данных (Рисунок 9), которые демонстрируют достаточно высокую сходимость (среднеквадратическое отклонение в пределах 3 мВ, что также говорит в пользу точности использованной модели).

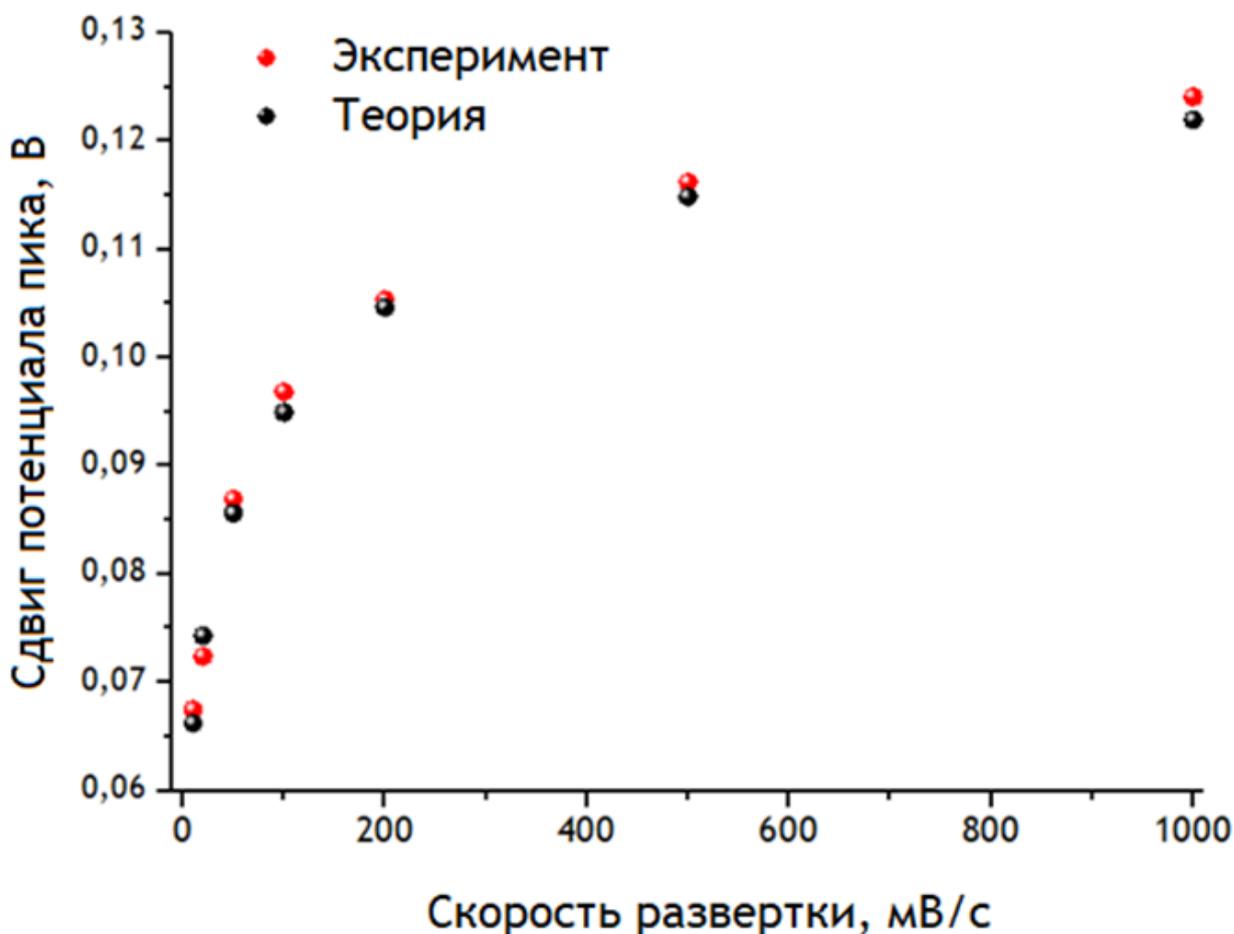
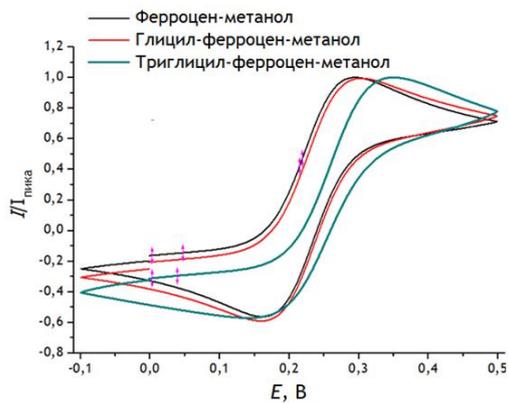


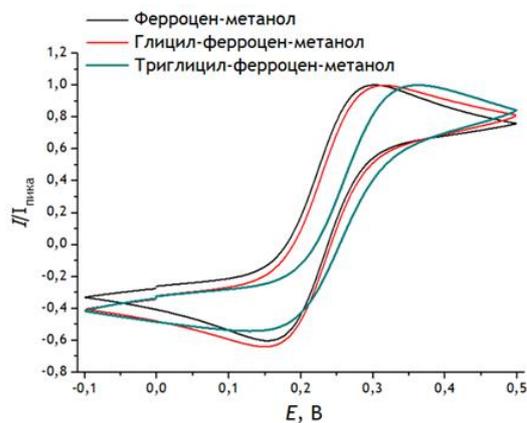
Рисунок 9 - сравнение экспериментальных и теоретических данных о смещении потенциала пика ферроцен-метанола при изменении скорости развертки.

Следующий этап предполагал построение вольтамперных кривых для ферроцен-метанола, модифицированного пептидными фрагментами (моноглицин и триглицин). В результате были зарегистрированы аналогичные серии кривых и построены графики зависимости смещения потенциала пика от скорости развертки. Ниже (Рисунок 10) приведены циклические вольтамперограммы для ферроцен-метанола, глицин-ферроцен-

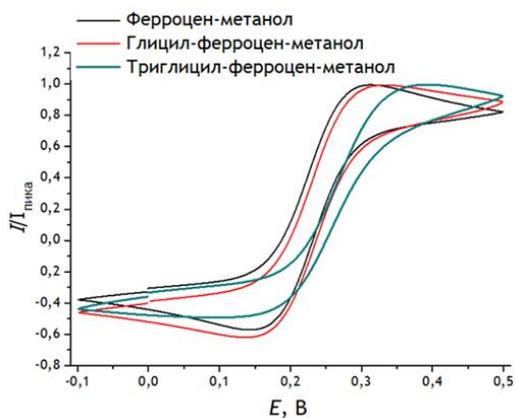
метанола и триглицин-ферроцен-метанола при различных скоростях развертки.



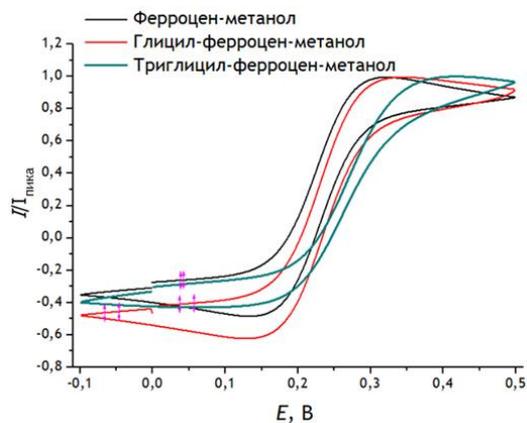
10 мВ/с



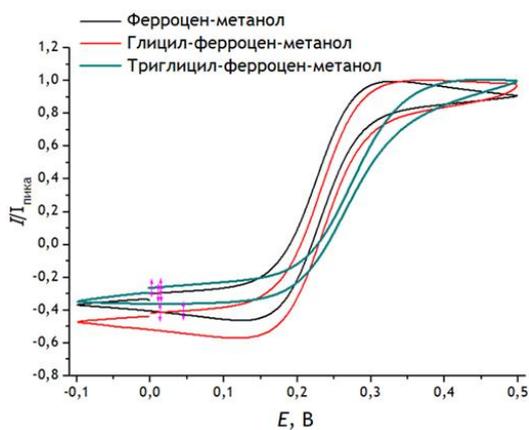
20 мВ/с



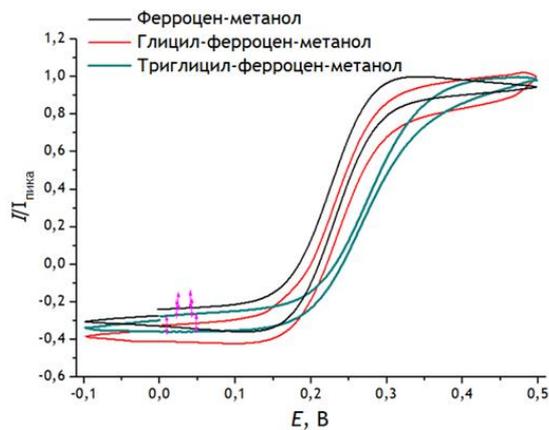
50 мВ/с



100 мВ/с



200 мВ/с



500 мВ/с

Рисунок 10 - циклические вольтамперограммы модифицированных ферроцен-метанолов.

На приведенных ЦВА-кривых видно, что потенциал пика значительно всего смещен относительно равновесного, что полностью соответствует предложенной модели.

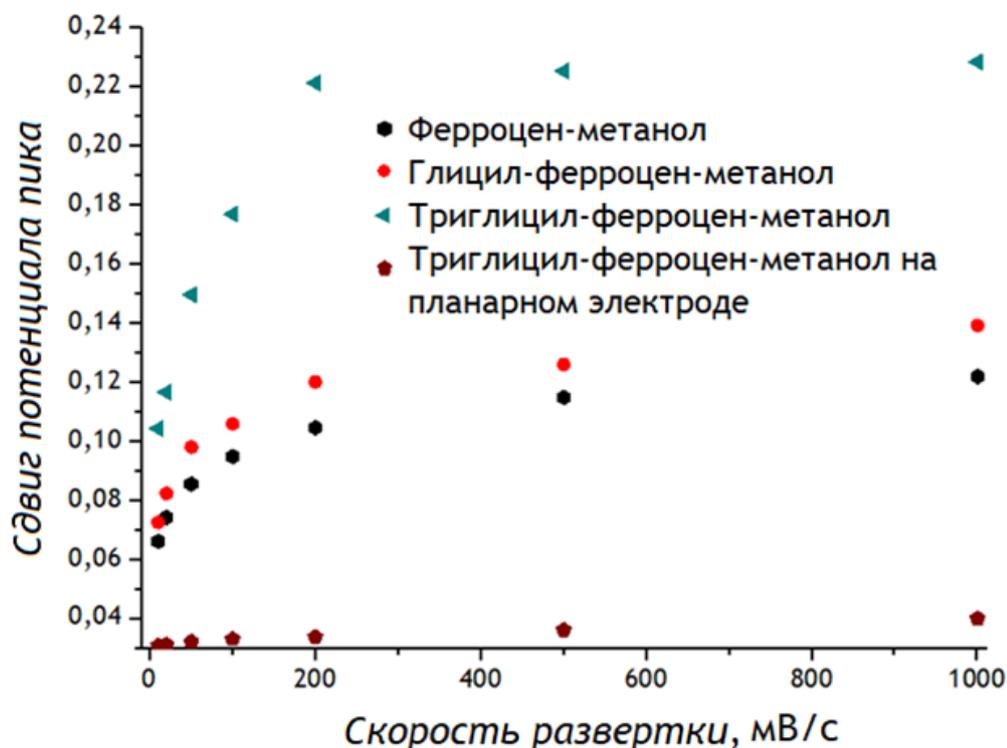


Рисунок 11 - зависимость смещения пика от скорости развертки для модифицированных ферроцен-метанолов для ультрамикроэлектродного ансамбля с межэлектродным расстоянием 20 мкм в сравнении с аналогичной зависимостью для планарного электрода.

Приведенные на графике (Рисунок 11) зависимости однозначно говорят о том, что природа смещения пика относится к области массопереноса, а не электрохимической поляризации, поскольку указанное смещение на микроэлектродах кратно превосходит таковое для планарного золотого электрода. Кроме того, хорошо заметно, что смещение пиков существенно возрастает по мере роста длины пептидного фрагмента, и, следовательно, уменьшения коэффициента диффузии.

3.2. Изучение ЦВА ферроцен-карбоновой кислоты и ее производных.

Для обоснования универсальности закономерностей, полученных на примере производных ферроцен-метанола и олигопептидов, была проделана работа по вольтамперометрической характеристике производного триглицина и ферроцен-карбоновой кислоты в сравнении с чистой ферроцен-карбоновой кислотой. Циклические вольтамперограммы соответствующей системы представлены ниже (Рисунок 12).

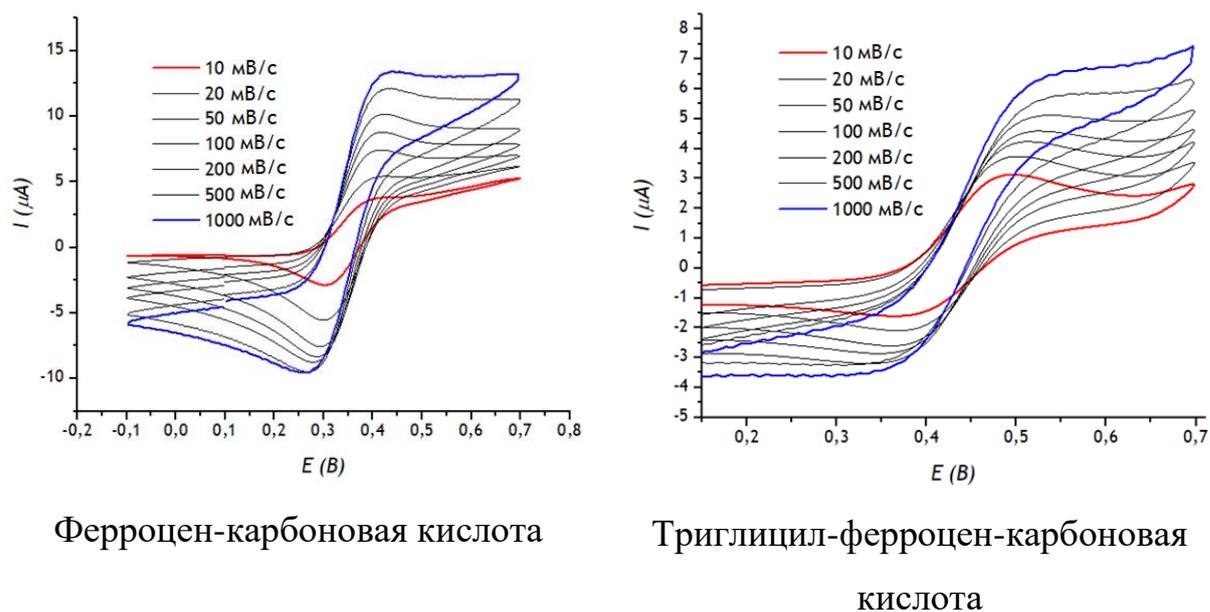


Рисунок 12 - циклические вольтамперограммы ферроцен-карбоновой кислоты и триглицил-ферроцен-карбоновой кислоты.

По полученным данным были построены зависимости смещения потенциала пика от скорости развертки: графики приведены ниже (Рисунок 13). Исходя из представленных данных, могут быть сделаны выводы, аналогичные выводам, сделанным в рамках работы с производными ферроцен-метанола, включая увеличение степени стационарности вольтамперного отклика, которое выражается как в увеличении смещения потенциала пика, так и в изменении формы самих вольтамперных кривых, в результате увеличения размеров молекулы после присоединения к ней пептидного фрагмента.

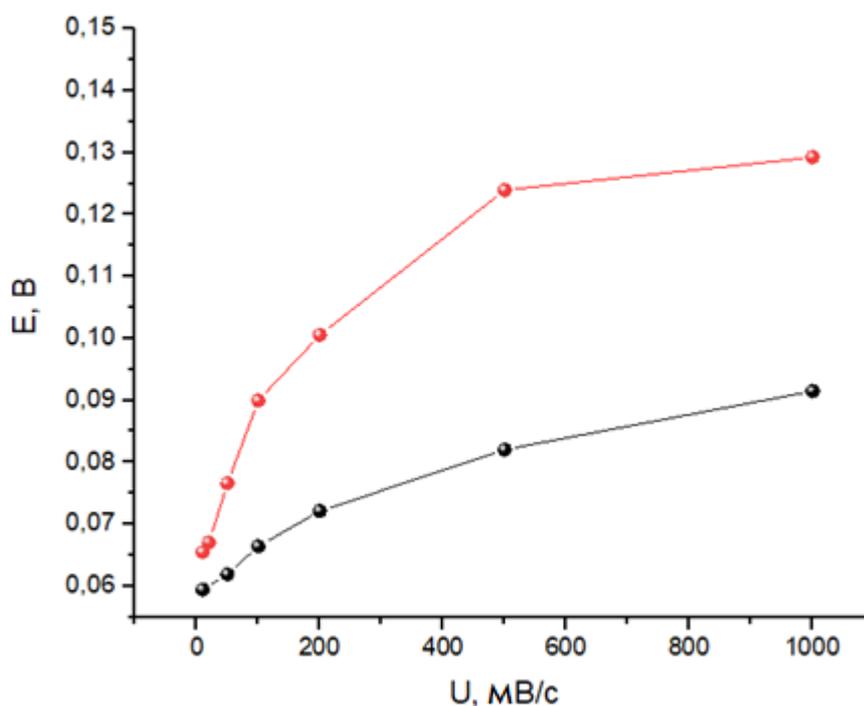


Рисунок 13 - зависимости сдвига потенциала пика от скорости развертки для ферроцен-карбоновой кислоты (черный) и глицил-ферроцен-карбоновой кислоты (красный).

В перспективе, работа с ферроцен-карбоновой кислотой может оказаться более перспективной, поскольку модификация пептидных молекул с ее помощью не требует дополнительной реакции этерификации и может быть выполнена с использованием пептидного синтезатора и тех же реагентов, что и стандартные процедуры твердофазного пептидного синтеза.

3.3. Изучение смеси ферроцен-метанола и ферроцен-карбоновой кислоты.

Целью проводимых измерений являлось экспериментальное подтверждение возможности разделения веществ с различающимися коэффициентами диффузии (ферроцен-метанол и ферроцен-карбоновая кислота) при помощи ансамблей ультрамикроэлектродов. Предполагалось, что окислительно-восстановительные потенциалы исследуемых производных являются близкими (около 250 мВ относительно хлорид-серебряного электрода сравнения). При этом коэффициенты диффузии их существенно

отличаются ($7.4 \cdot 10^{-10}$ м²/с для ферроцен-метанола и $5 \cdot 10^{-10}$ м²/с для ферроцен-карбоновой кислоты).

Для исследования ферроцен-карбоновой кислоты использовался ансамбль ультрамикродатодов с межэлектродным расстоянием 20 мкм. Циклические вольтамперограммы были получены для скоростей развертки 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мВ/с. Приготавливаемые смеси с общей концентрацией 0.1 ммоль/л содержали ферроцен-метанол и ферроцен-карбоновую кислоту в следующих соотношениях: 0:1, 1:5, 2:5, 3:5, 1:1 и 2:1. Пример набора циклических вольтамперограмм смесей представлены ниже (Рисунок 14).

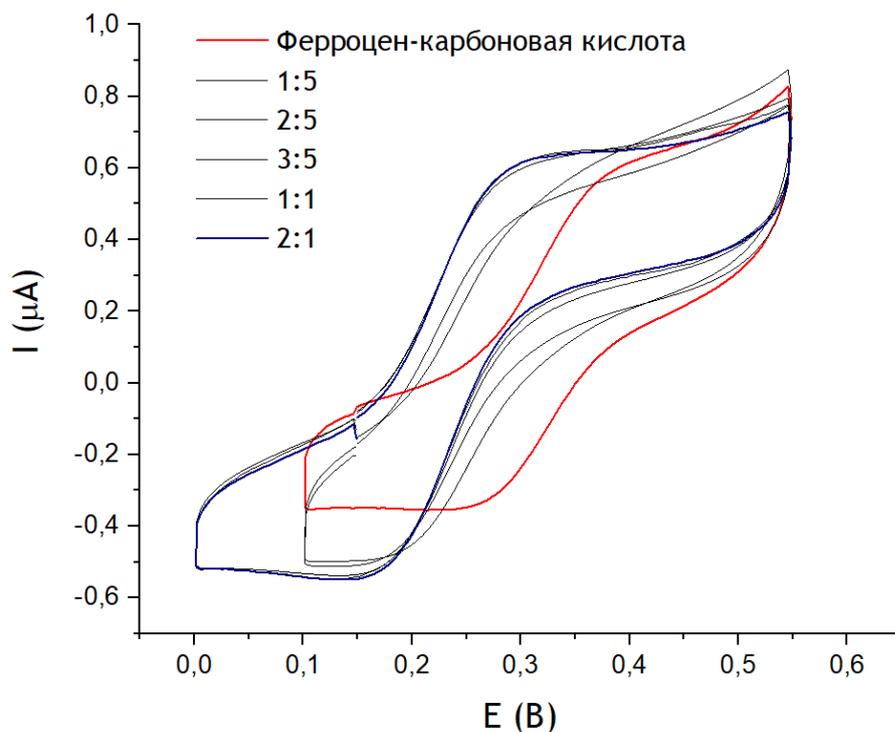


Рисунок 14 - Циклические вольтамперограмм смесей ферроцен-метанола и ферроцен-карбоновой кислоты при скорости развертки 100 мВ/с.

Как может быть видно исходя из вольтамперограмм, для ряда кривых наблюдается смещение равновесного потенциала пика. Тем не менее, было решено исследовать зависимость отклонения потенциала результирующего окислительного пика от результирующего равновесного потенциала редокс-системы как параметра стационарности вольтамперного отклика от

соотношения концентраций исследованных веществ. Ниже (Рисунок 15) приведена подобная зависимость для скорости развертки 100 мВ/с.

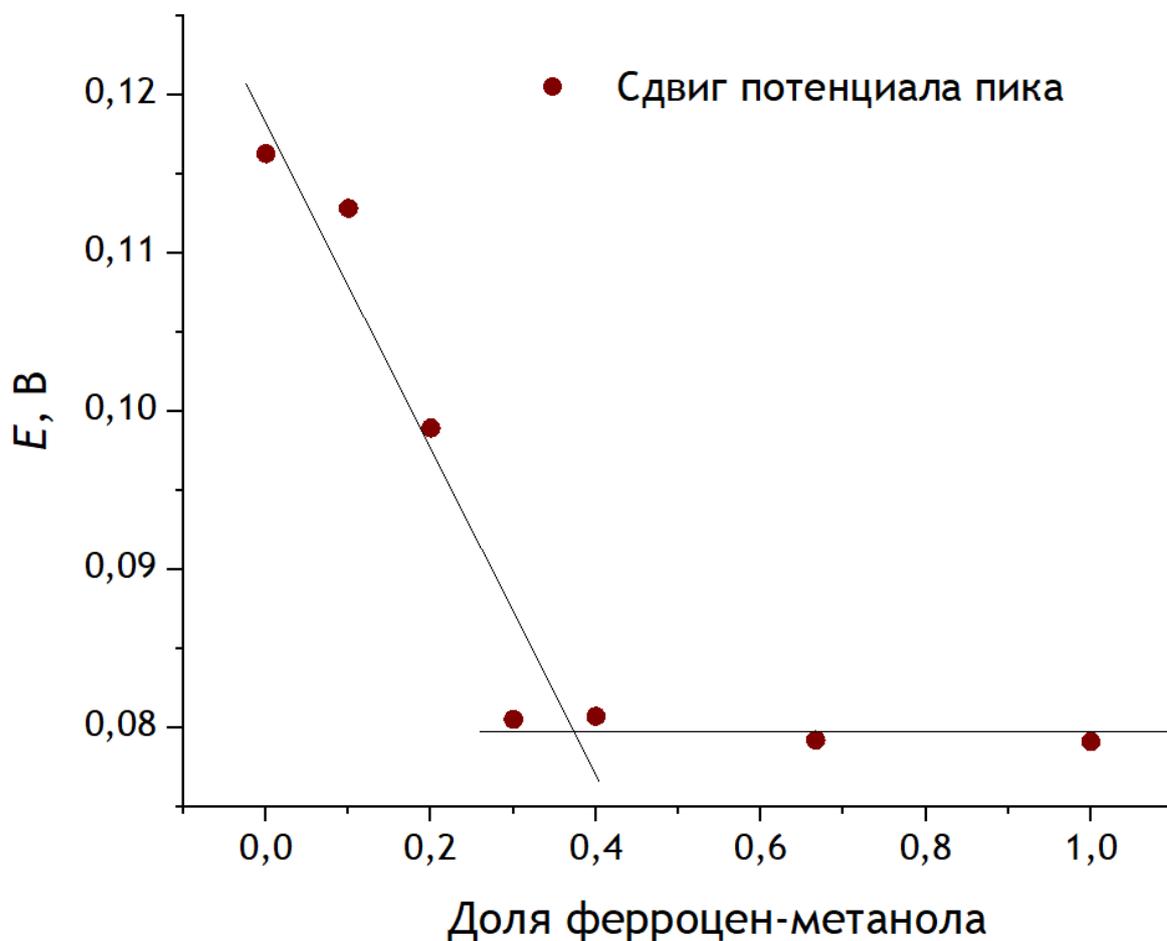


Рисунок 15 - зависимость отклонения потенциала пика от равновесного для системы ферроцен-метанол - ферроцен-карбоновая кислота.

Можно отметить уменьшение отклонения потенциала по мере возрастания доли ферроцен-метанола как вещества, коэффициент диффузии которого больше, что указывает на выполнение исходного предположения о влиянии коэффициента диффузии компонентов на стационарность вольтамперного отклика системы. Полученная зависимость может быть использована при анализе соотношения концентраций ферроцен-метанола и ферроцен-карбоновой кислоты при совместном анализе смесей ферроценовых производных.

На основе данных, полученных в ходе данной экспериментальной работы, могут быть сделаны следующие промежуточные выводы:

1) Полученные ЦВА ферроцен-метанола, глицил-ферроцен-метанола, триглицил-ферроцен-метанола, ферроцен-карбоновой кислоты и триглицил-ферроцен-карбоновой кислоты демонстрируют влияние длины присоединенного к электроактивной группе пептидного фрагмента на вольтамперный отклик аналита в сторону увеличения его стационарности в случае применения в качестве рабочего электрода ансамбля УМЭ.

2) Различие в коэффициентах диффузии компонентов смеси может быть использовано для определения соотношения компонентов в смеси на основе данных об изменении формы ЦВА, что было продемонстрировано на примере смеси ферроцен-метанола и ферроцен-карбоновой кислоты.

3) Смещение потенциала пика может быть эффективно использовано в качестве меры стационарности вольтамперного отклика, поскольку не подвержено влиянию емкостного тока, не зависит от общей концентрации и при этом наглядно отображает зависимость стационарности отклика от скорости развертки и соотношения компонентов в смеси.

4. Изучение возможности определения электроактивных аминокислот: цистеин, ацетилцистеин и глутатион при помощи электродов, полученных при помощи литографических микроэлектродов и электродов на основе массивов иммобилизованных микрочастиц металлов на поверхности подложки, синтезированных темплатным электрохимическим методом с применением в качестве темплата перфорированных пленок ксерогелей.

4.1. Исследование сенсоров на основе массивов ультрамикроэлектродов, полученных темплатным нелитографическим методом.

Изначально на данном этапе исследования определялось наличие влияния геометрии электродов на стационарность вольтамперного отклика

на примере модельного соединения, в качестве которого использовался ферроцен-метанол, циклические вольтамперограммы которого регистрировались при скоростях развертки в диапазоне 10-1000 мВ/с при использовании в качестве рабочего электрода темплатного ультрамикродного ансамбля и планарного электрода из золота. В результате были построены зависимости смещения потенциала окислительного пика от скорости развертки для электрода, обеспечивающего линейную полубесконечную диффузию аналитов (планарный) и обеспечивающих ограниченную цилиндрическую диффузию (темплатный). Циклические вольтамперограммы приведены ниже (Рисунок 16).

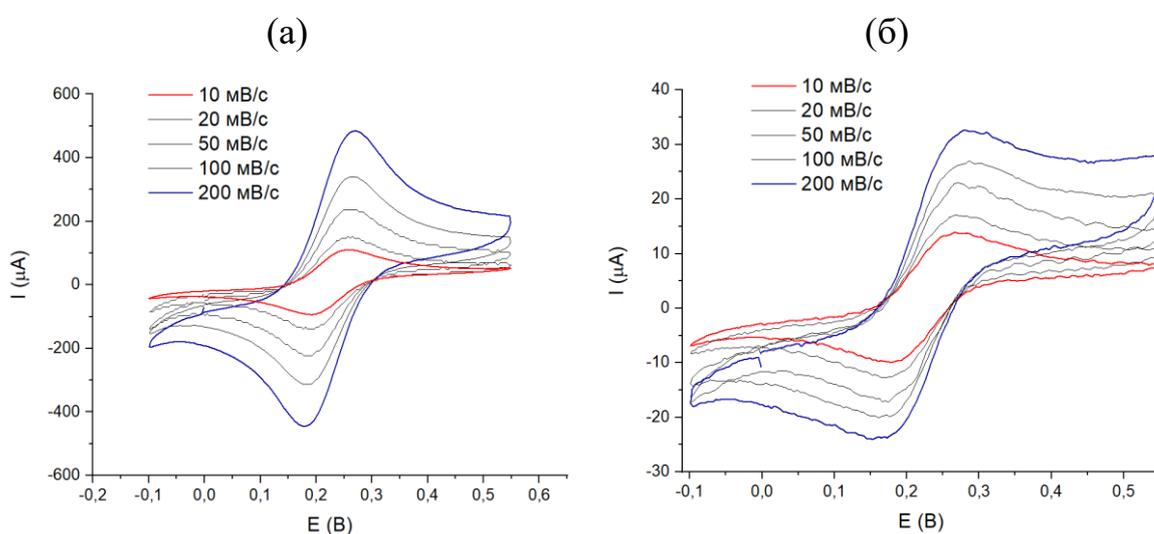


Рисунок 16. Циклические вольтамперограммы ферроцен-метанола на электроде планарной геометрии (а) и темплатном ультрамикродном ансамбле (б).

Зависимости потенциала пика от скорости развертки приведены на графике (Рисунок 17).

Можно отметить существенное превышение смещения, полученного на ультрамикродном ансамбле, что свидетельствует об измененном режиме массопереноса, достигаемом за счет расположения электродов в ансамбле.

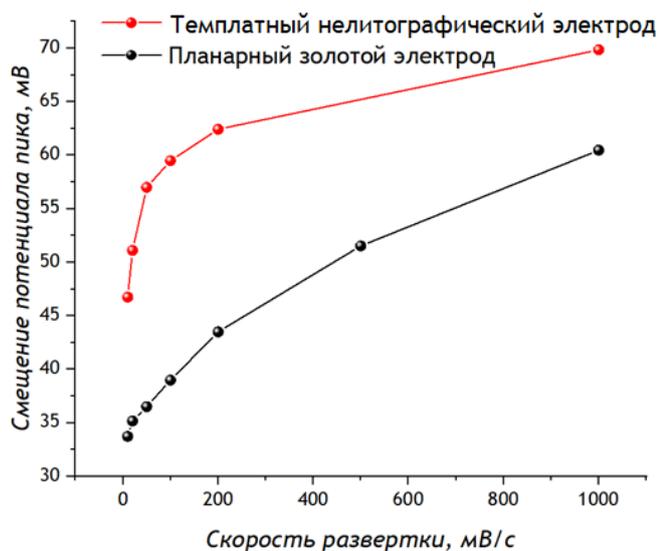


Рисунок 17 - Зависимость смещения потенциала пика от скорости развертки.

После получения экспериментального подтверждения влияния геометрии ансамбля были изготовлены темплатные ультрамикродродные ансамбли, модифицированные электрохимически осажденным серебром, убывание коорозионных токов которых может являться аналитическим сигналом при определении концентрации сульфидных молекул, подобных цистеину и глутатиону, и были зарегистрированы ЦВА в присутствии 1 мкмоль/л, 0.1 ммоль/л и 1 ммоль/л цистеина. Циклические вольтамперограммы представлены ниже (Рисунок 18).

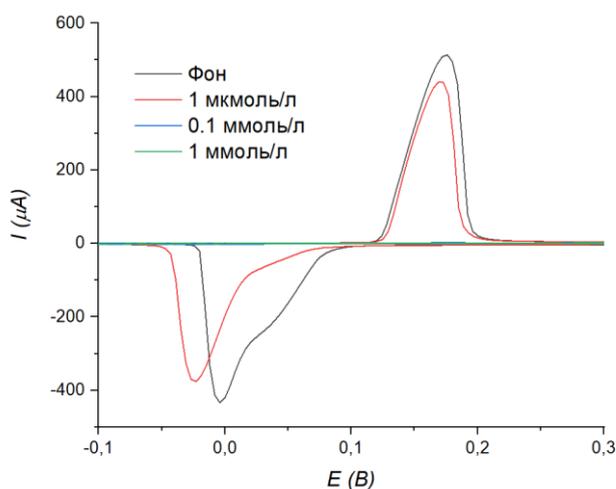


Рисунок 18 - Циклические вольтамперограммы модифицированного серебром ансамбля ультрамикродродов при различных концентрациях цистеина.

По данным вольтамперограмм были построены зависимости тока коррозии серебра от концентрации аналита для цистеина (Рисунок 19).

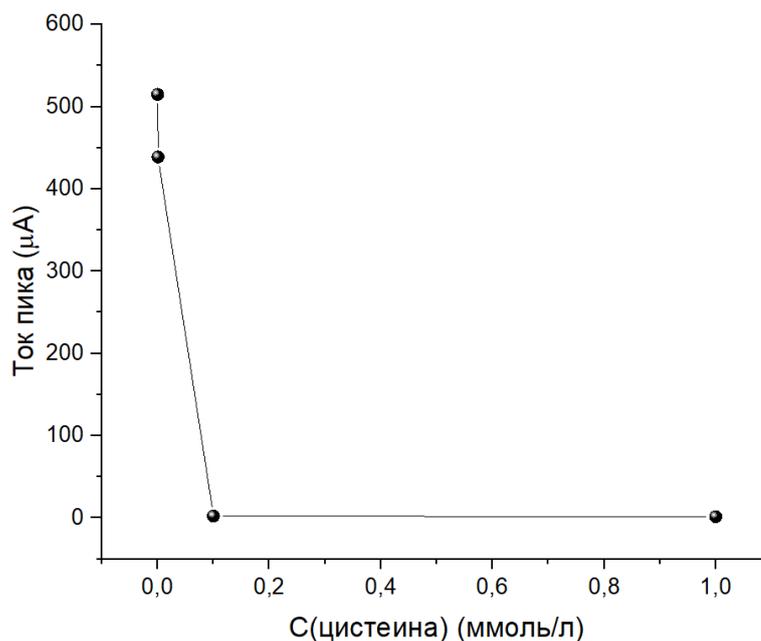


Рисунок 19 - Зависимость тока пика окисления серебра от концентрации цистеина.

Можно отметить резкое падение токов, связанное с ингибированием реакции растворения серебра молекулами цистеина.

Также были построены зависимости потенциала пика от скорости развертки с целью установления влияния геометрии ансамбля на процесс ингибирования, эффективность которого связана с эффективностью диффузионного транспорта молекул цистеина к активной поверхности электрода (Рисунок 20). Для сравнения полученных данных с результатами измерений на планарном электроде были использованы литературные данные [7]. В соответствии с представленными авторами результатами, величины отклонения потенциала пика имеют логарифмическую зависимость от скорости развертки потенциала. Используя приведенные авторами коэффициенты аппроксимации, получим теоретическую зависимость смещения потенциала пика для планарного электрода, также приведенную на графике (Рисунок 20).

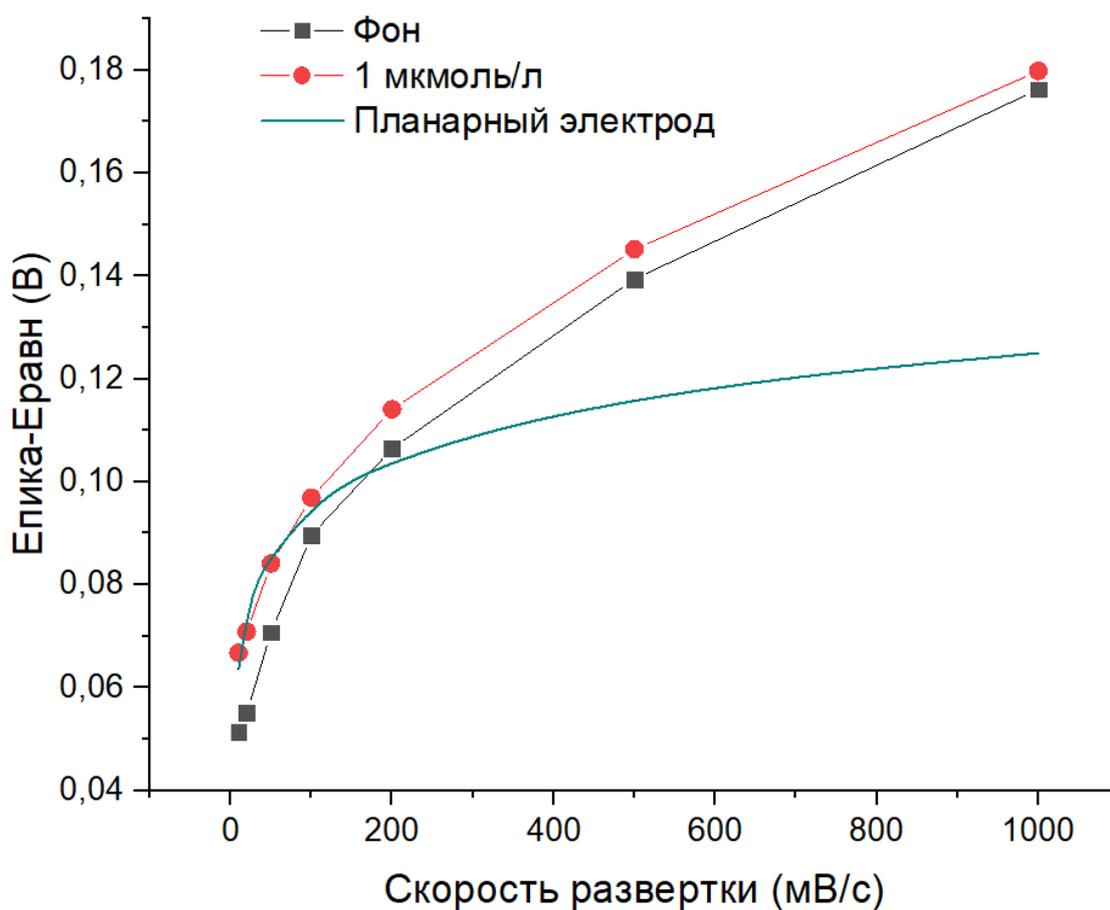


Рисунок 20 - Зависимости отклонения потенциала пика от равновесного потенциала от скорости развертки.

Заметим, что в области малых скоростей развертки наблюдается соответствие данных, полученных на темплатных ансамблях УМЭ, данным для планарного электрода. Однако при увеличении скорости развертки, когда влияние обеднения приэлектродного пространства по радиальной составляющей снижается, возрастает отклонение, имеющее место для ансамблей УМЭ.

Это прямо указывает на то, что геометрия ансамбля является фактором, существенно влияющим на процесс электрохимического окисления серебра и, косвенно, на перспективы использования ансамбля для анализа смесей цистеина с веществами, близкими к нему по электрохимическому потенциалу.

Для установления возможности использования темплатного нелитографического ансамбля к разделению сигналов цистеина и глутатиона, влияние которых на электрохимический отклик серебряных электродов близко и отличается лишь за счет влияния различия в коэффициентах диффузии, были получены ЦВА темплатного ансамбля УМЭ в растворах, содержащих различные концентрации глутатиона (Рисунок 21).

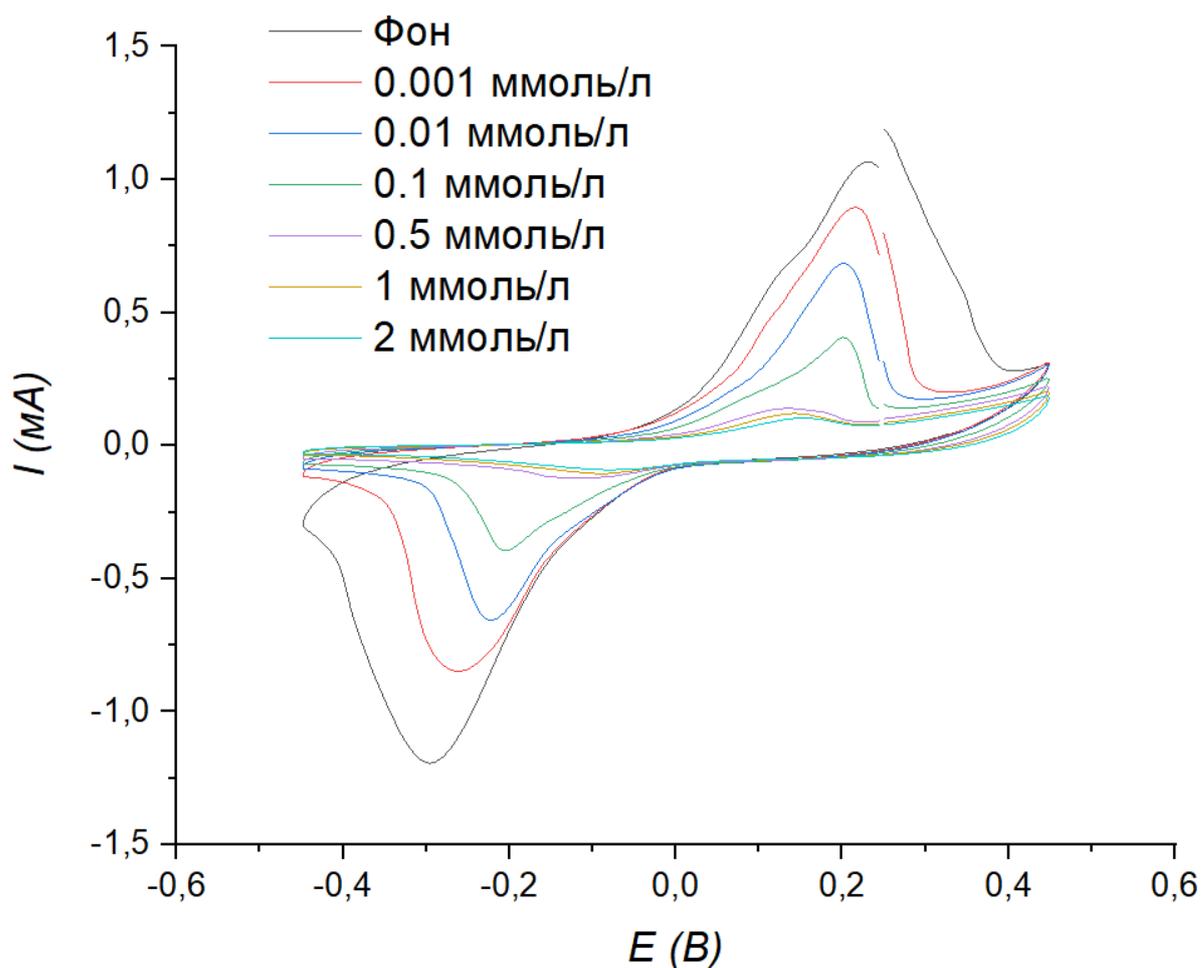


Рисунок 21 - ЦВА темплатного ансамбля на основе серебряных частиц при различных концентрациях глутатиона.

Можно отметить резкое снижение анодного пика ЦВА при добавке глутатиона (аналогично результатам для цистеина), представленное ниже (Рисунок 22).

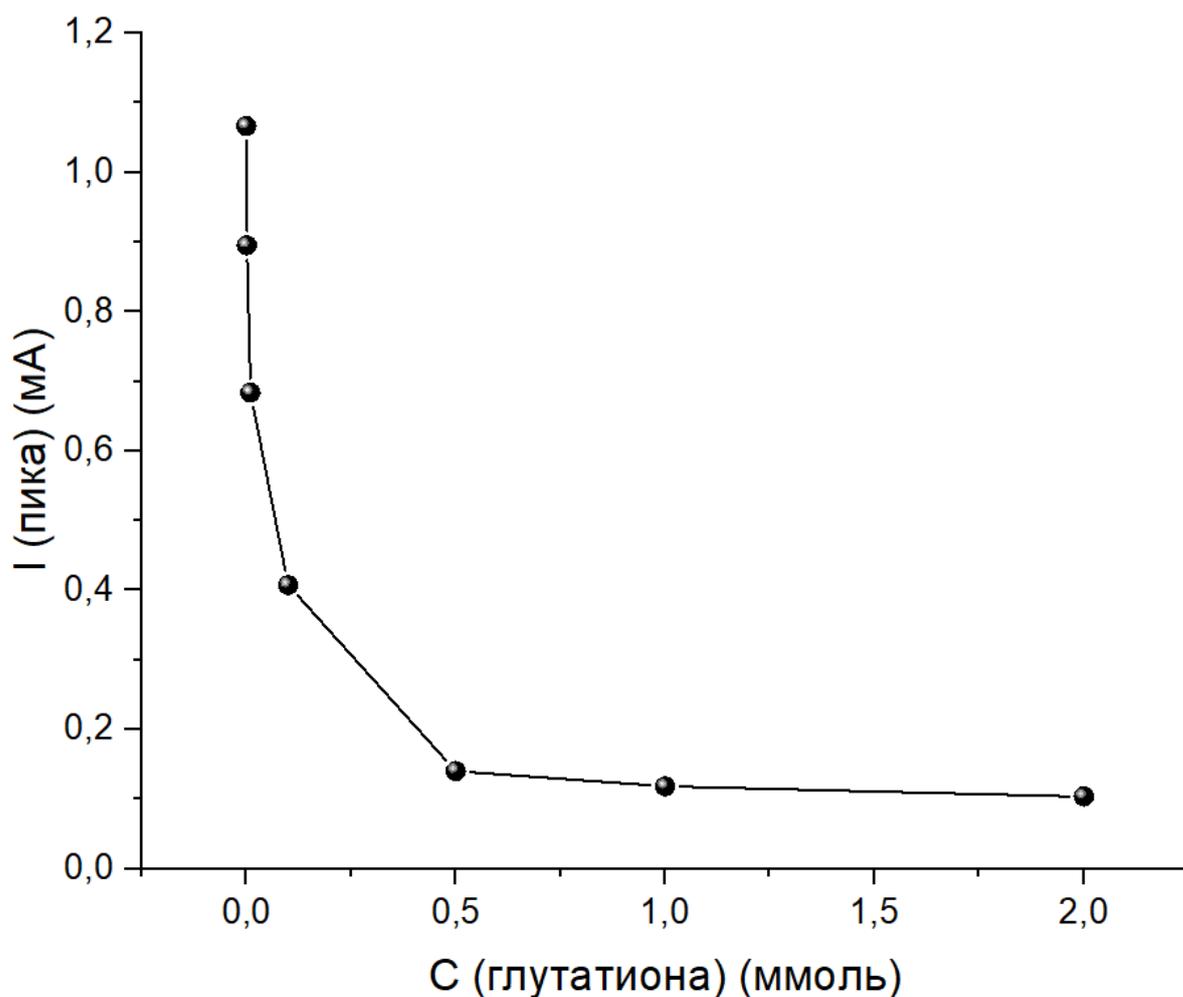


Рисунок 22 - концентрационная (по глутатиону) зависимость тока пика ансамбля.

Для того, чтобы определить применимость изменения формы кривой, характеризуемого смещением потенциала окислительного пика, в качестве аналитического сигнала, необходимо сравнить эти смещения для цистеина и глутатиона при равной скорости развертки и концентрации.

Так, для цистеина смещение потенциала пика при концентрации 1 мкмоль/л смещение составляет 85 мВ, тогда как для глутатиона это значение составляет 239 мВ. Такой результат эксперимента указывает на существенное влияние измененного в результате изменения геометрии ансамбля режима массопереноса.

Однако на пути дальнейшего исследования систем, анализ которых может быть осуществлен с помощью серебра, возникает препятствие, преодолеть которое в рамках разрабатываемой методики невозможно. Это препятствие обусловлено наличием концентрационной зависимости потенциала пика, как это демонстрирует график (Рисунок 23).

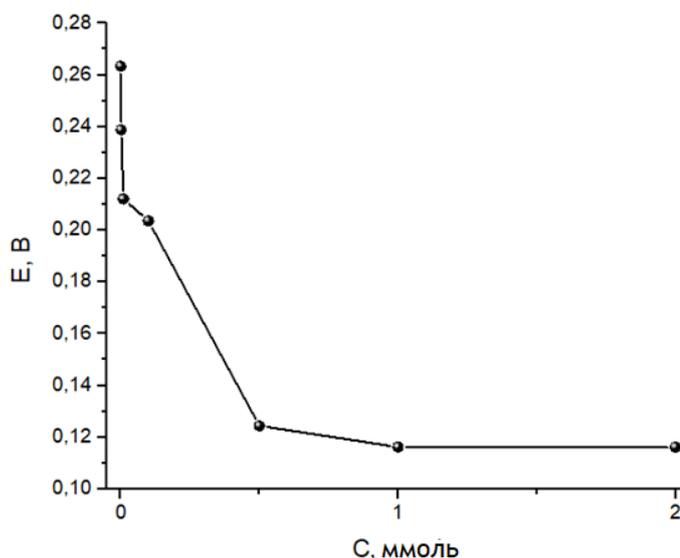


Рисунок 23 - зависимость смещения потенциала пика от концентрации глутатиона.

Подобную же зависимость можно отследить для других аналитов. Существование подобной концентрационной зависимости увеличивает мерность системы, добавляя дополнительную степень свободы, что приводит к тому, что дальнейшая проработка применимости метода к аналитам серии цистеин-глутатион-ацетилцистеин является нерациональной. Подобная концентрационная зависимость характерна для пиков растворения металлических электродов и может быть исключена в будущем при использовании иных активных материалов электродов. Данная особенность привела нас к идее о создании инертных неметаллических ультрамикроэлектродов путём выращивания на металлических слоях нанотрубок. Предпроектные работы были начаты с группой из СО РАН.

4.2. Исследование темплатных литографических сенсоров.

Для полученного литографическим методом ансамбля ультрамикрорезисторов были получены аналогичные зависимости демонстрирующие наличие сложного вольтамперографического отклика (Рисунок 24).

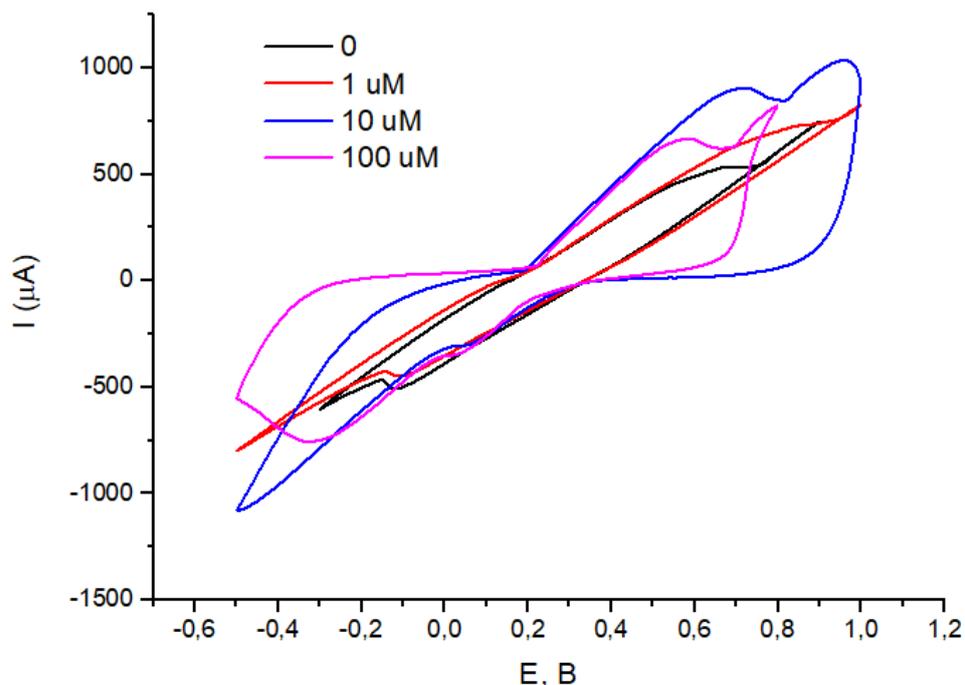


Рисунок 24 - ЦВА темплатного литографического ансамбля электрохимически осажденных частиц (электродов) с межэлектродным расстоянием 20 мкм.

Можно отметить наличие нескольких пиков ЦВА и немонотонный характер изменения тока пика от концентрации аналита (Рисунок 25). Подобное поведение, подтвержденное экспериментами с набором образцов, можно связать со взаимодействием кислой среды сульфатсалицилового электролита серебрения и/или аналита с материалом фоторезиста, в результате чего проявляются изменения характера вольтамперного отклика, включая немонотонную концентрационную зависимость и появление пиков, не характерных для системы серебро-цистеин.

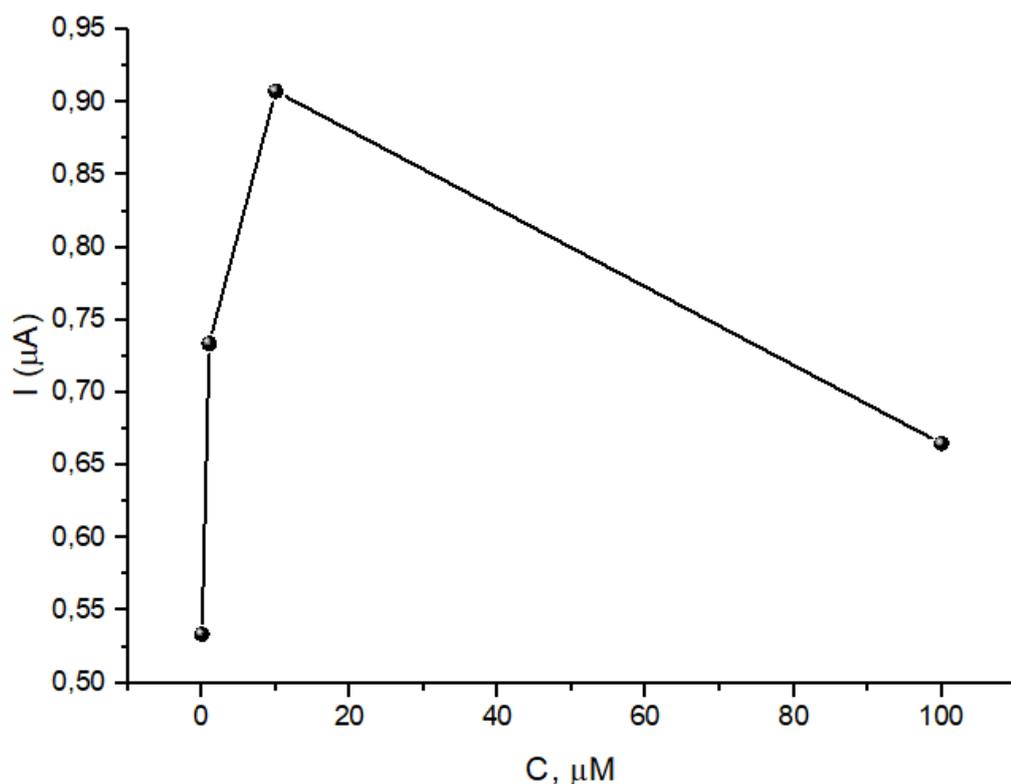


Рисунок 25 - концентрационная зависимость тока пика ЦВА.

Так или иначе, учитывая доводы, приведенные в части работы с темплатными нелитографическими сенсорами, было принято решение отказаться от попыток адаптации метода на основе темплатных частиц серебра в пользу отработки количественных методов анализа с помощью модельных соединений.

Основной вывод, который может быть получен исходя из данных представленной под этим пунктом части работ, является невозможность осуществления количественного анализа цистеина, глутатиона и ацетилцистеина в смеси с использованием темплатных ультрамикрорелектродных ансамблей, полученных путем электрохимического осаждения серебра как в перфорированные ксерогели, так и в литографические ансамбли микроперфораций в фоторезисте. Главной причиной указанной неосуществимости является концентрационная зависимости смещения потенциала пика и, следовательно, формы вольтамперной кривой, что отрицает возможность проведения анализа,

основанного на различиях отклика ансамблей УМЭ на аналиты с различными коэффициентами диффузии.

5. Разработка количественных вольтамперографических методов определения аналитов при помощи разработанных активных материалов.

Разработка количественного метода осуществлялась на примере модельной системы ферроцен-метанола и продуктов его этерификации с олигопептидами. Данная модельная система в перспективе может служить первым объектом исследования, к которому будет применен разрабатываемый метод, поскольку ферроцен-модифицированные олигопептиды могут быть использованы в качестве электроактивных свидетелей исходных неактивных пептидных соединений, являющихся продуктами процесса твердофазного пептидного синтеза.

Были построены серии циклических вольтамперограмм для модельного соединения (ферроценметанол, равновесный потенциал 275 мВ, коэффициент диффузии $0.74 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$) при различных скоростях развертки, а также произведено сравнение вольтамперных кривых веществ с коэффициентом диффузии, отличающимся на порядок, при различных значениях расстояния между отдельными УМЭ. В качестве меры перехода от нестационарного режима к стационарному было выбрано значение смещения потенциала окислительного пика: в случае равновесной кинетики он не зависит от скорости развертки, а значит, может характеризовать изменения, связанные с различиями в параметрах диффузии.

Ниже (Рисунок 2б) приведены серии вольтамперных кривых при различных расстояниях между электродами и различных коэффициентах диффузии.

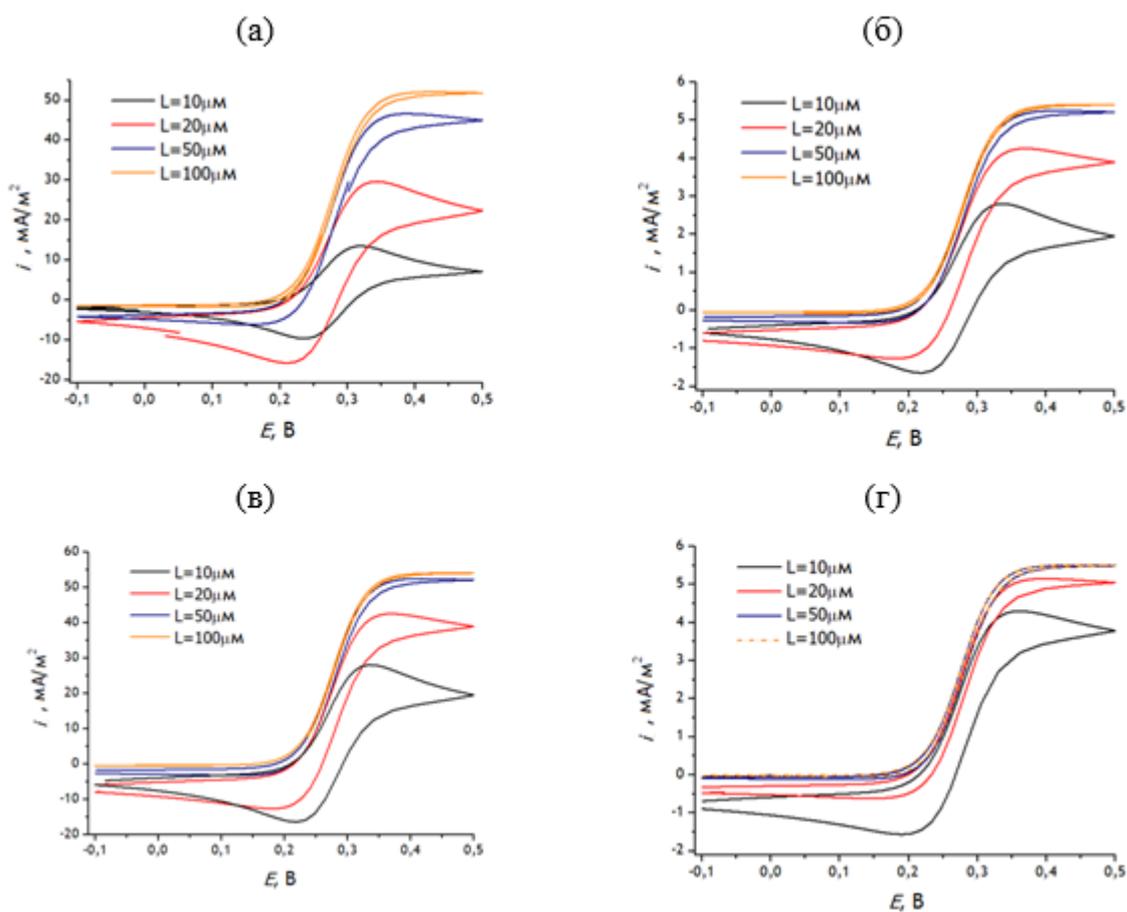


Рисунок 26 - модельные циклические вольтамперограммы веществ с коэффициентом диффузии $0.74 \cdot 10^{-9}$ (а, в) и $0.74 \cdot 10^{-10}$ (б, г) при скоростях развертки 10 (а, б) и 100 (в, г) mV/s .

По данным ЦВА был построен график разницы в параметре стационарности кривых веществ с различным коэффициентом диффузии для различных межэлектродных расстояний в ансамбле (Рисунок 27).

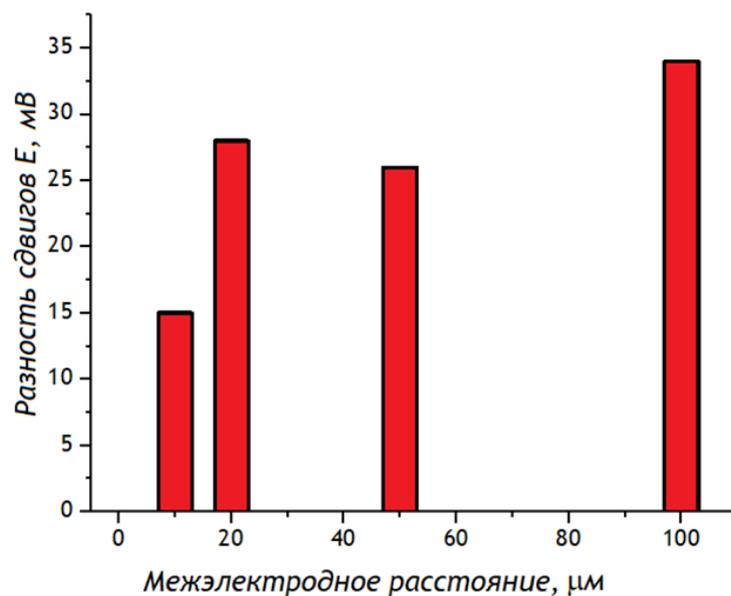


Рисунок 27 - различия параметра стационарности для ансамблей различного межэлектродного расстояния.

Можно отметить, что наиболее заметное расхождение в форме кривых наблюдается при скорости расстояниях 100 и 20 мкм. Учитывая, что с ростом расстояния падает общий регистрируемый ток ансамбля, оптимальным с точки зрения построения зависимостей формы кривой от коэффициента диффузии (Рисунок 28) было выбрано расстояние 20 мкм.

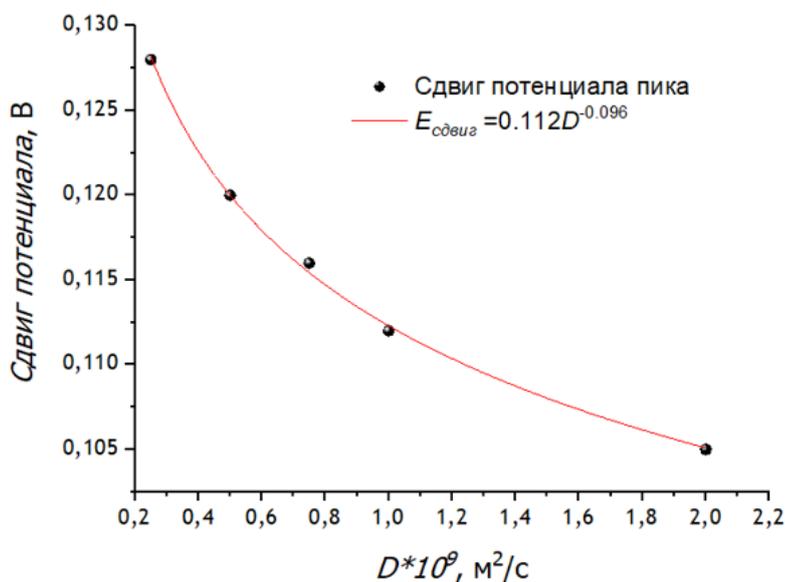


Рисунок 28 - зависимость сдвига потенциала от коэффициента диффузии (20 мкм, 1000мВ/с).

Также были построены модельные циклические вольтамперограммы ферроценметанола на ансамбле с расстоянием 10 мкм для последующего сравнения с экспериментальными данными (Рисунок 29).

Как можно заметить по графику (Рисунок 28), наблюдается существенная зависимость между коэффициентом диффузии и параметром стационарности, связанная с изменением степени перекрытия. Кроме того, она достаточно точно ложится на линейную в билогарифмических координатах зависимость (или степенную в линейных) с коэффициентами, указанными на графике, что теоретически могло бы быть использовано для разделения сигналов веществ с различным коэффициентом диффузии.

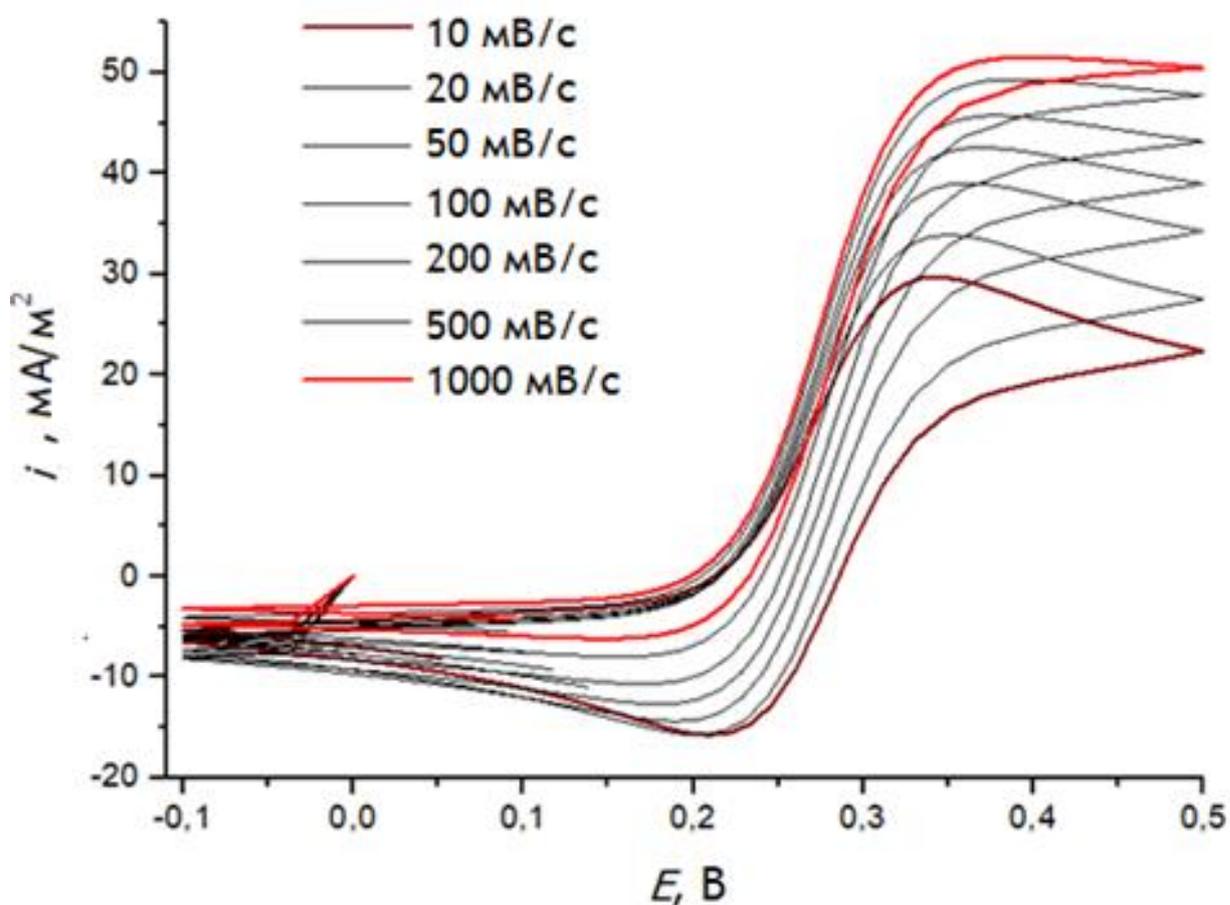


Рисунок 29 - циклические вольтамперограммы ансамбля с межэлектродным расстоянием 20 мкм при различных скоростях развертки.

На основании данных проведенного математического моделирования было решено изготовить 4 набора ансамблей микроэлектродов с

межэлектродным расстоянием 10, 20, 50 и 100 микрон. Первый удобен с точки зрения большей площади и, следовательно, большей величины регистрируемого сигнала, что будет использовано при экспериментальной проверке результатов моделирования, второй обладает оптимальной геометрией с точки зрения построения зависимостей от коэффициента диффузии. Электрод с расстоянием 100 мкм гарантировано обладает стационарным вольтамперным откликом, что будет использовано для определения коэффициента диффузии.

Для более убедительного обоснования применимости ультрамикродродного ансамбля для изучения смесей олигопептидов, было проведено трехфакторное моделирование смесевых систем, в рамках которого изучались зависимости изменения потенциала пика вольтамперограммы от соотношения концентраций модельных соединений, отношения их коэффициентов диффузии и скорости временной развертки потенциала рабочего электрода. Поскольку для ферроцен-метанольной системы наиболее выгодным оказалось межэлектродное расстояние 20 мкм, оно также использовалось и в моделировании смесевой системы.

В качестве исходной точки брался коэффициент диффузии ранее использованного в качестве модельного соединения ферроцен-метанола: $D_{\text{FeCMeth}} = 0.74 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Значения остальных отсчитывались относительно него: $0.1 D_{\text{FeCMeth}}$, $0.2 D_{\text{FeCMeth}}$, $0.5 D_{\text{FeCMeth}}$, $0.7 D_{\text{FeCMeth}}$. Это должно было продемонстрировать влияние присутствия более низкомолекулярного продукта (ферроцен-метанола) в системе, рассчитанной на использование для вещества с $D = x \cdot D_{\text{FeCMeth}}$. Исследовались смеси, содержащие «высокомолекулярный» продукт и ферроценметанол в соотношениях 0.1 к 1, 0.2 к 1, 0.5 к 1, 0.7 к 1, 0.9 к 1, 1 к 1, 2 к 1, 5 к 1, 7 к 1, 9 к 1, а также чистые соединения. Исследовались зависимости при скоростях развертки 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мВ/с. Пример смесевой циклической вольтамперограммы представлен ниже (Рисунок 30):

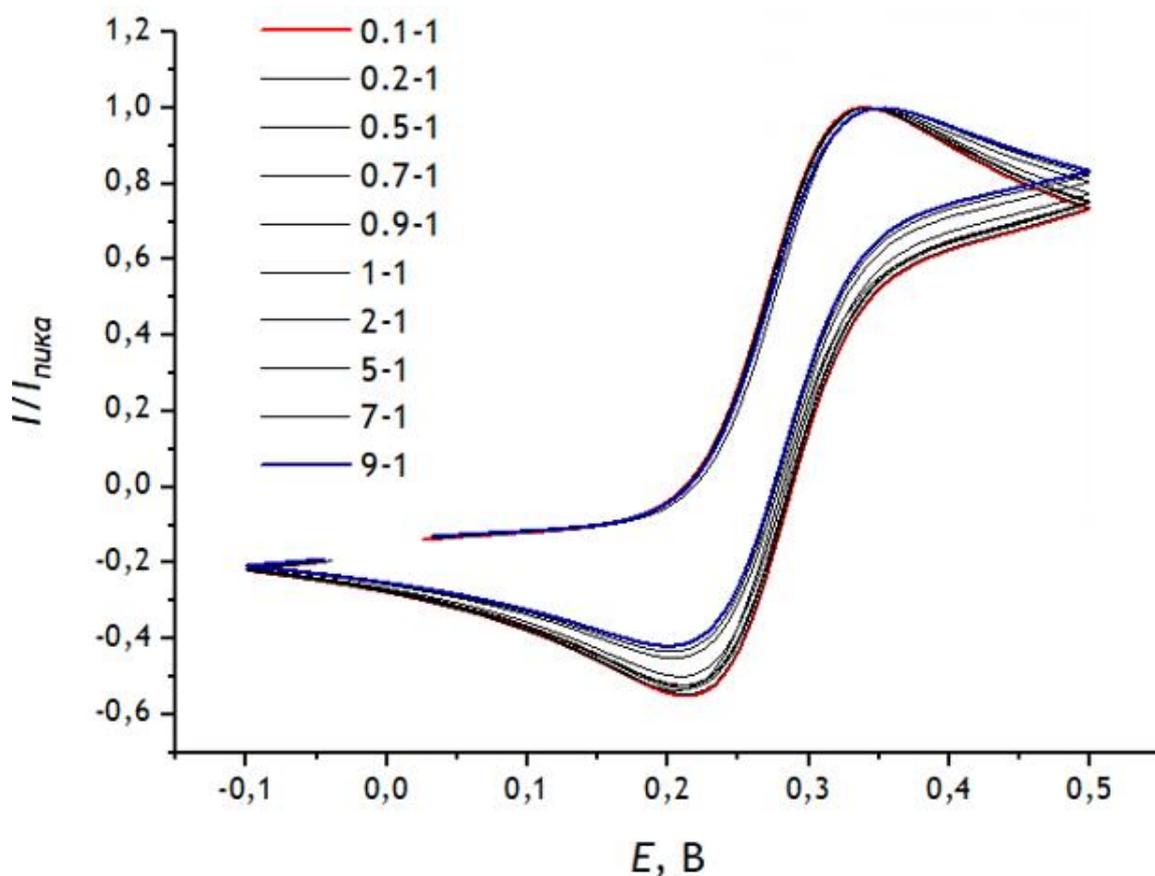


Рисунок 30 - Смесевые циклические вольтамперограммы с различными соотношениями веществ. Ультрамикроэлектродный ансамбль 20 мкм, скорость развертки 10 мВ/с.

По модельным данным были построены зависимости (Рисунок 31) положения пика ЦВА от соотношения концентраций веществ с различными коэффициентами диффузии при различных скоростях развертки.

Четко прослеживается смещение потенциала окислительного пика в сторону более высоких значений по мере того, как вольтамперная кривая демонстрирует вид, соответствующий в большей степени стационарному поведению. Наиболее резкое изменение характерно для системы с десятикратным различием коэффициента диффузии: при добавлении низкомолекулярного продукта (то есть, при движении от 1 к 0 по оси абсцисс) происходит резкое уменьшение значения потенциала пика. По мере того, как разница между коэффициентами диффузии уменьшается,

уменьшается и наклон кривых. Таким образом, можно предположить, что чем сильнее отличаются коэффициенты диффузии, тем более явный аналитический отклик наблюдается при добавлении низкомолекулярного продукта, и тем легче его обнаружить. С другой стороны, логично предположить, что наклон кривых на начальном участке, который отвечает за обнаружение высокомолекулярного продукта, должен меняться антибатно наклону на участке конечном.

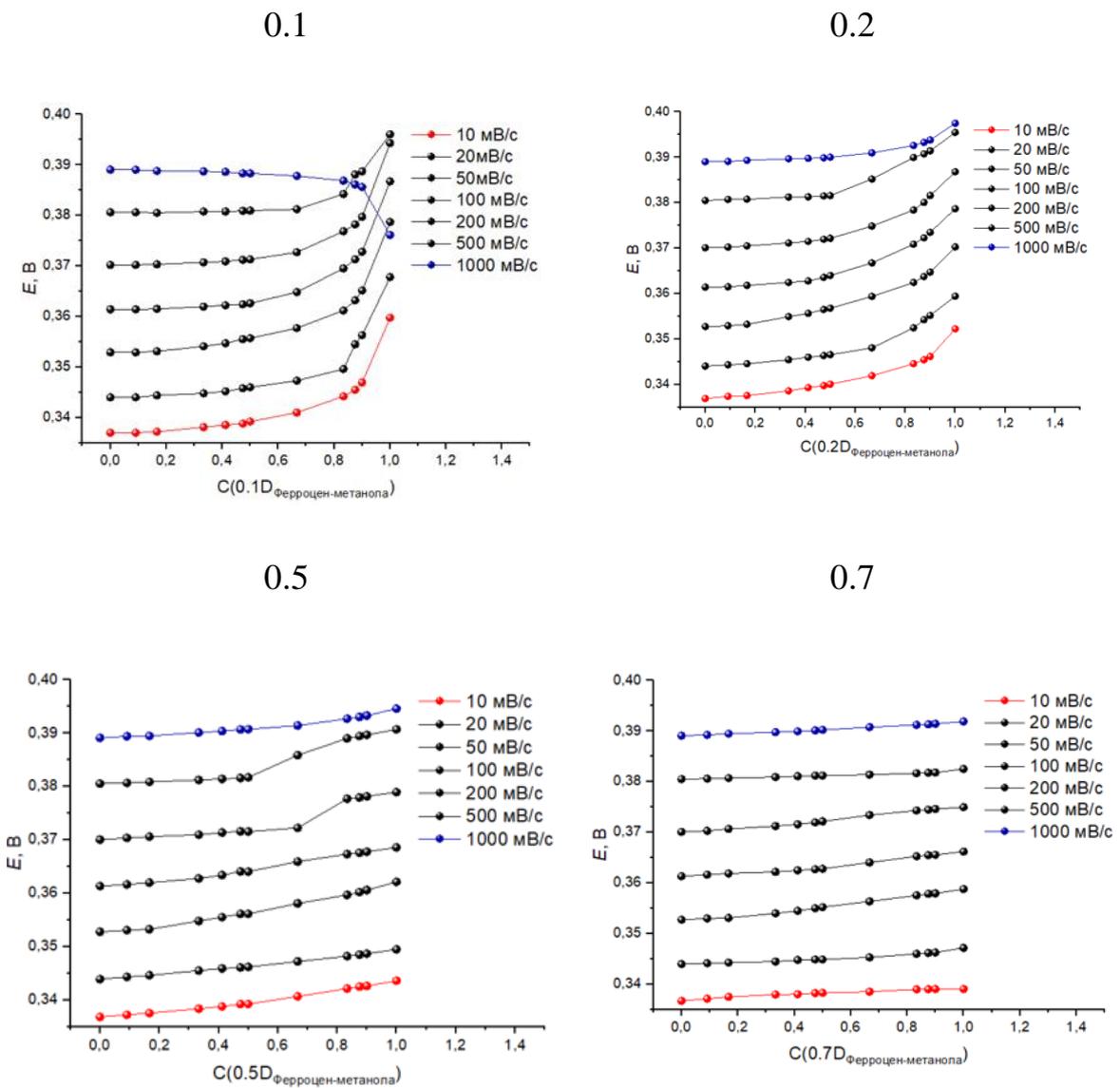


Рисунок 31 - зависимость потенциала окислительного пика от доли «высокомолекулярного» соединения для различных скоростей развертки.

Кроме того, можно отметить интересный эффект, который наблюдается для вещества с наименьшим коэффициентом диффузии при скорости развертки потенциала 1000 мВ/с. Как видно из графика, в данном случае вид зависимости инвертируется, что можно связать с геометрией ультрамикроэлектродного ансамбля. Из-за наличия углубления, в котором находится рабочий электрод, для проявления влияния радиальной составляющей диффузии необходимо, чтобы диффузионный слой на значительное расстояние продвинулся в пространство снаружи углубления. В случае же высоких скоростей развертки, такая ситуация может не реализоваться за время регистрации вольтамперограммы. Подтверждением этого предположения служат цветные диаграммы концентрации, построенные программой COMSOL®, и представленные ниже (Рисунок 32).

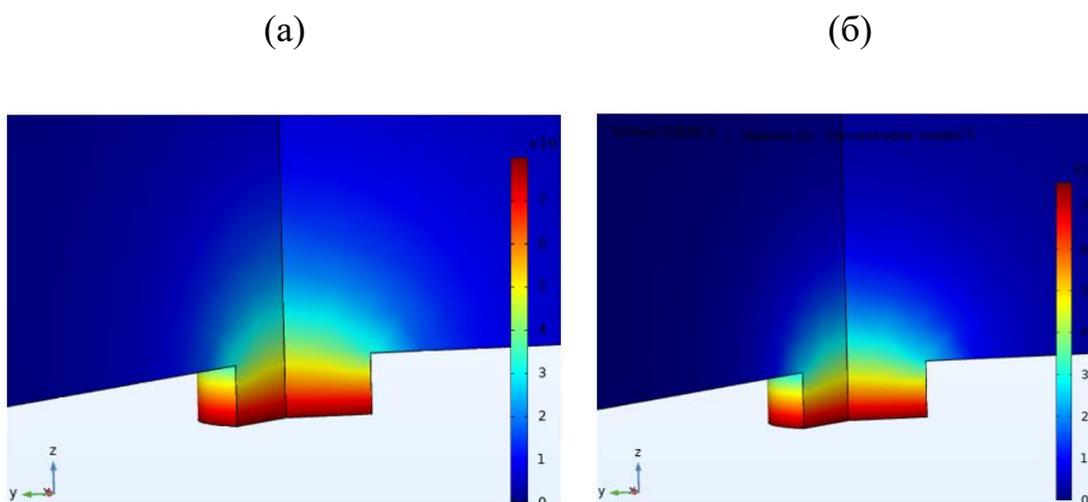


Рисунок 32 - цветные диаграммы концентрации в ультрамикроэлектродных ансамблях на момент достижения конца первой ветви вольтамперограммы для скорости развертки 100 (а) и 1000 (б) мВ/с.

Можно отметить, что диффузионный слой в случае скорости развертки 1000 мВ/с в несколько большей степени сконцентрирован внутри углубления. Еще лучше влияние скорости развертки на распространение диффузионного слоя иллюстрируют концентрационные профили,

построенные для циклической вольтамперограммы в планарной геометрии (Рисунок 33)

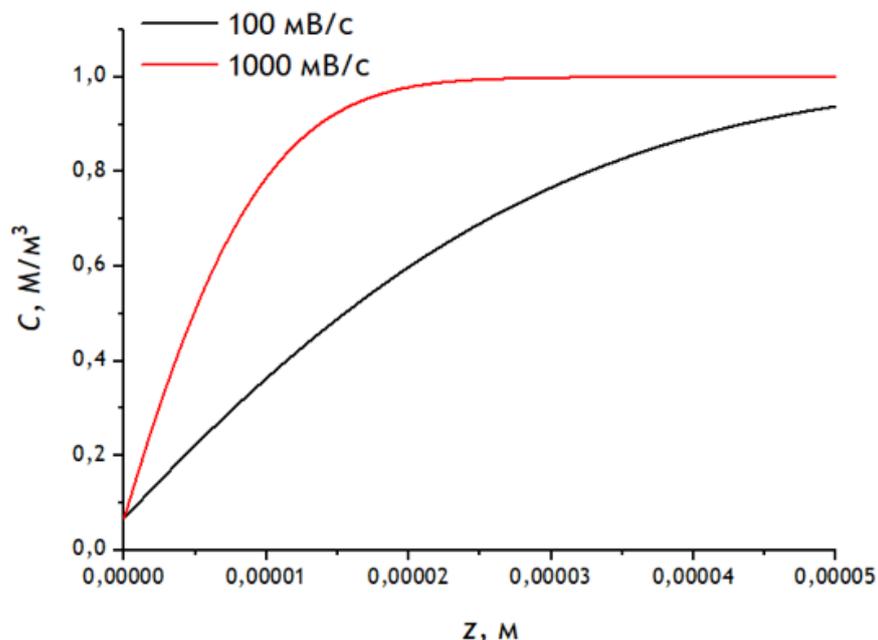


Рисунок 33 - концентрационные профили для циклической вольтамперограммы при перенапряжении 0.069 В для различных скоростей развертки в планарной геометрии.

Для проведения дальнейшего модельного рассмотрения аналитической применимости метода для определения содержания низкомолекулярной примеси при твердофазном пептидном синтезе, зависимости потенциала окислительного пика от соотношения концентраций были перестроены путем вычитания всех значений из значения потенциала пика чистого «высокомолекулярного» соединения (Рисунок 34). По данным представленных графиков хорошо заметно, что скорость развертки существенно влияет на приращение потенциала пика при изменении концентрационного соотношения. Для количественной оценки этого влияния была предложена величина теоретического предела обнаружения «низкомолекулярного» вещества, которая определялась на уровне сигнала, равного допустимому часовому смещению потенциала хлорид-серебряного электрода сравнения. На практике при определении смещения потенциала

пика по сравнению с равновесным влияние дрейфа потенциала будет минимальным, здесь же было принято решение использовать эту величину в качестве условной. Ее значение составляет 0.12 мВ.

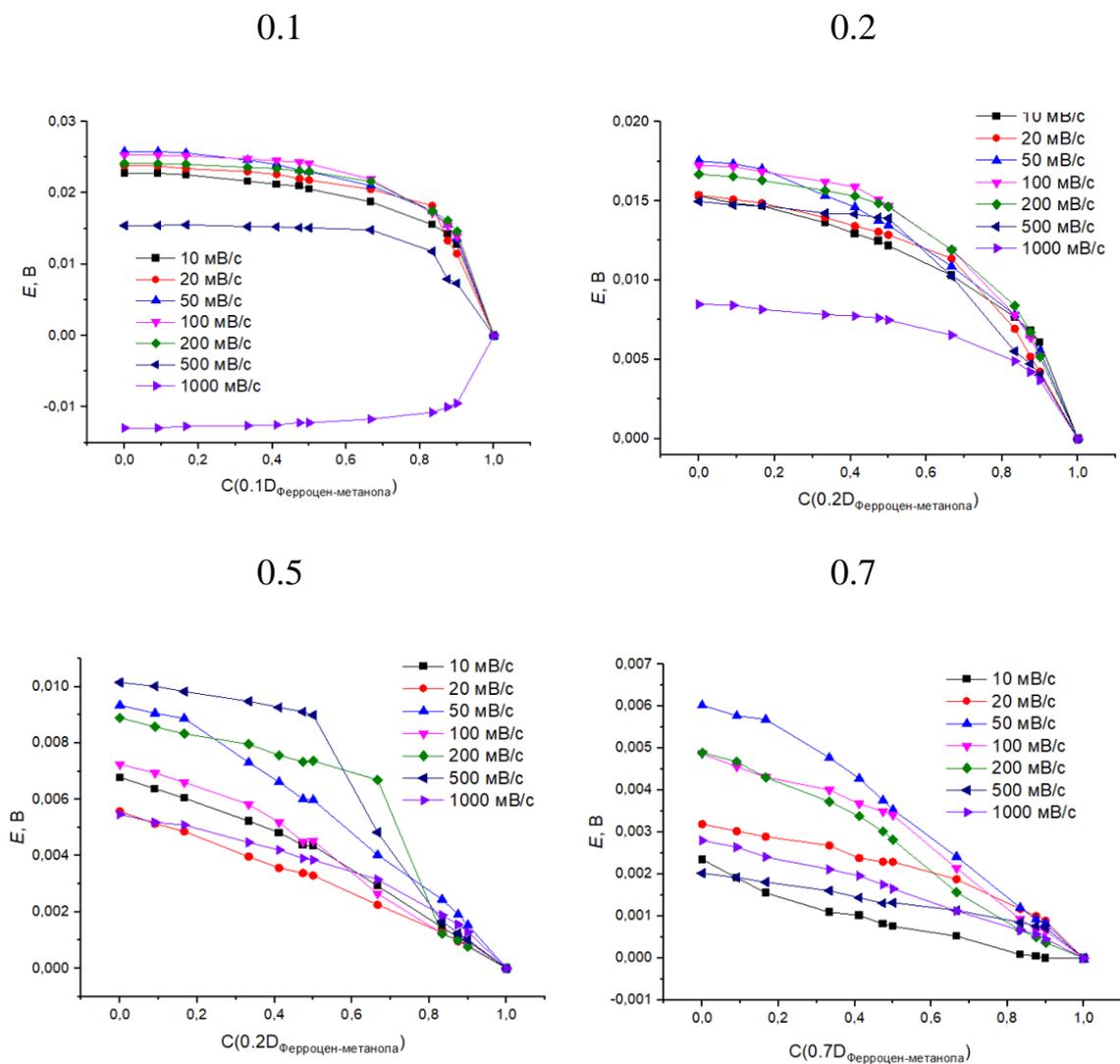


Рисунок 34 - зависимость смещения потенциала окислительного пика относительно пика чистого высокомолекулярного соединения от его доли для различных скоростей развертки.

Были построены зависимости теоретического предела обнаружения от скорости развертки для веществ с различным коэффициентом диффузии (Рисунок 35)

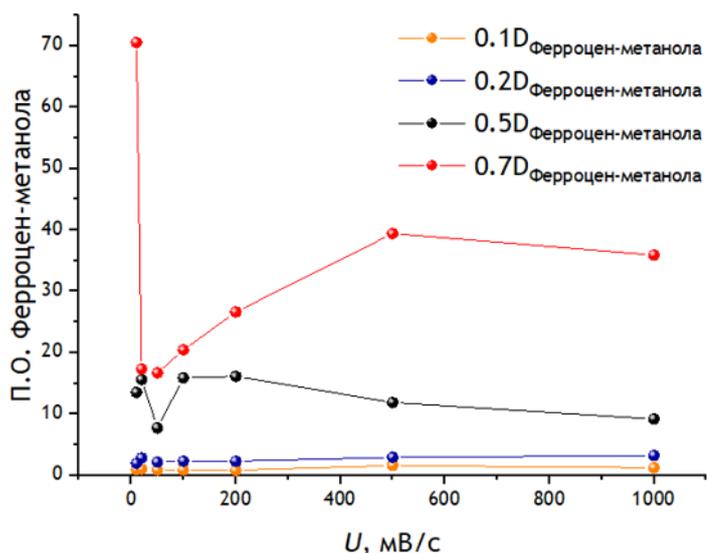


Рисунок 35 - зависимость теоретического предела обнаружения низкомолекулярного продукта от скорости развертки для пар веществ с различными соотношениями коэффициентов диффузии.

Можно отметить, что для всех представленных пар веществ минимум предела обнаружения находится в районе скорости развертки 50 мВ/с. Кроме того, заметна тенденция к резкому возрастанию предела обнаружения по мере роста коэффициента диффузии «высокомолекулярного» компонента.

Для оптимальной скорости развертки в 50 мВ/с был построен график зависимости предела обнаружения от коэффициента диффузии (Рисунок 36)

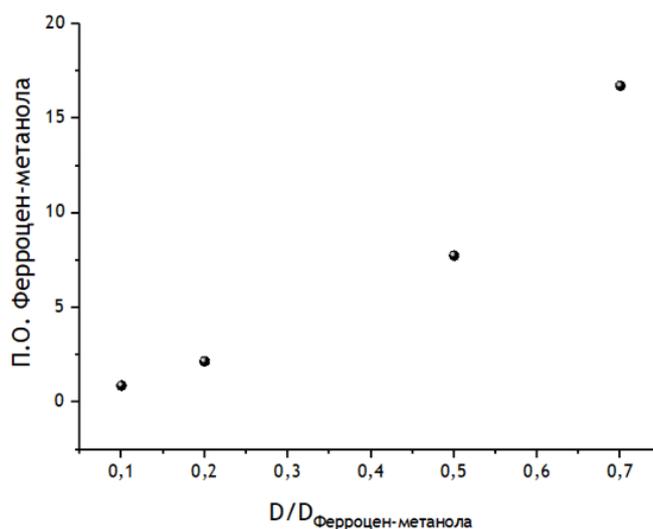


Рисунок 36 - зависимость теоретического предела обнаружения «низкомолекулярного» продукта в смеси от коэффициента диффузии «высокомолекулярного» компонента.

Можно прогнозировать различимость примеси «низкомолекулярного» продукта на уровне процентов в том случае, если его коэффициент диффузии в десять раз превышает коэффициент диффузии «высокомолекулярного» продукта, а также наличие тенденции к уменьшению предела обнаружения по мере уменьшения соотношения коэффициентов диффузии «высокомолекулярного» вещества к «низкомолекулярному». Наибольшее значение эти данные приобретают при сопоставлении с экспериментальными данными, указывающими на значение коэффициента диффузии различных исследуемых веществ олигопептидной природы.

Для того, чтобы иметь возможность приблизительно определять коэффициент диффузии пептидных соединений, была построена зависимость сдвига потенциала относительно потенциала ферроцен-метанола от соотношения коэффициентов диффузии, аппроксимированная полиномом третьей степени (Рисунок 37)

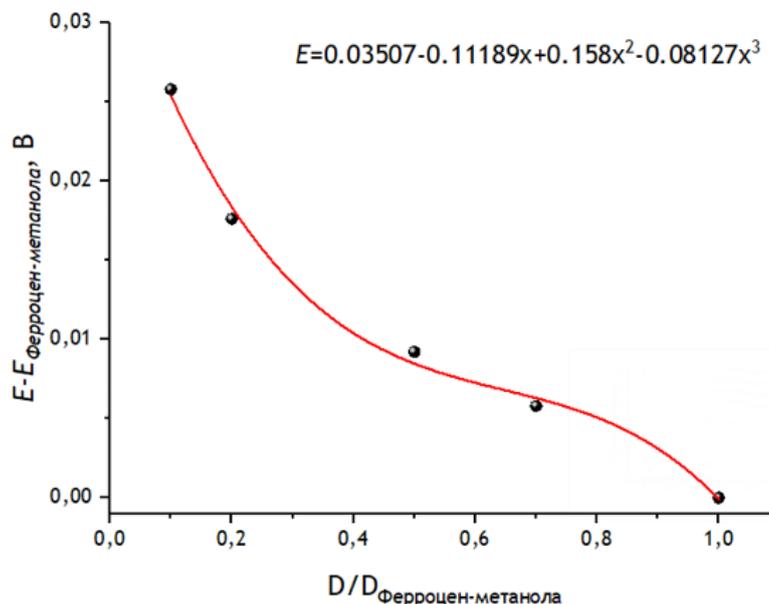


Рисунок 37 - теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола.

Можно дать приблизительную оценку коэффициентов диффузии для ферроцен-метанола, модифицированного одной и тремя молекулами

глицина, используя теоретическую зависимость, представленную на рисунке 30. Для моноглицил-ферроцен-метанола коэффициент диффузии составит 0.22 от коэффициента диффузии ферроцен-метанола, для триглицил-ферроцен-метанола – менее 0.1 (при применении билогарифмической линеаризации начального участка зависимости рисунка 31, представленной на графике (Рисунок 38), значение коэффициента диффузии триглицил-ферроцен-метанола составит 0.06 от коэффициента диффузии ферроцен-метанола).

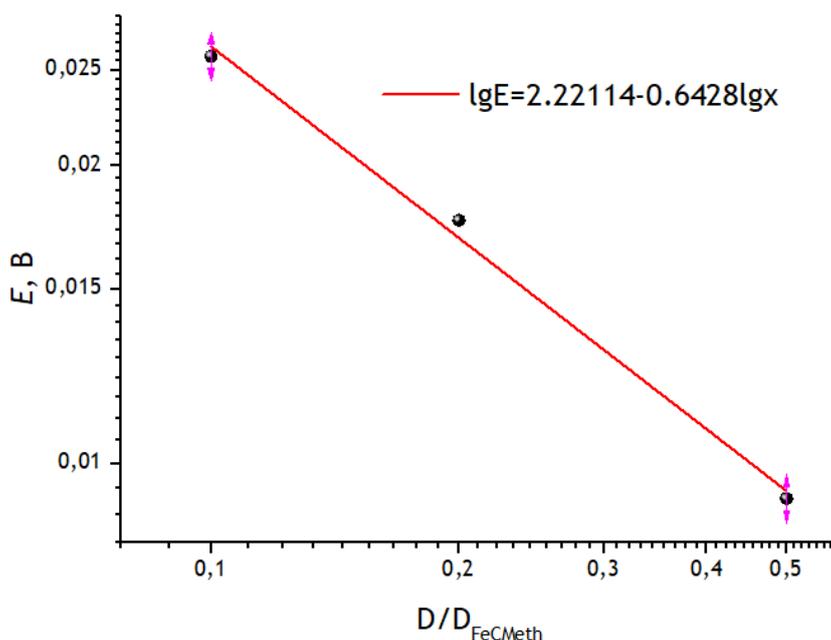


Рисунок 38 - теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола – билогарифмическая линеаризация начального участка кривой.

Если сопоставить эти данные с зависимостью на рисунке 29 путем аналогичной степенной аппроксимации модельной зависимости (Рисунок 39), можно предварительно предсказать возможный предел обнаружения, который равен 2.6% для примеси ферроцен-метанола в моноглицил-ферроцен-метаноле и 0.4% для аналогичной примеси в триглицил-ферроцен-метаноле.

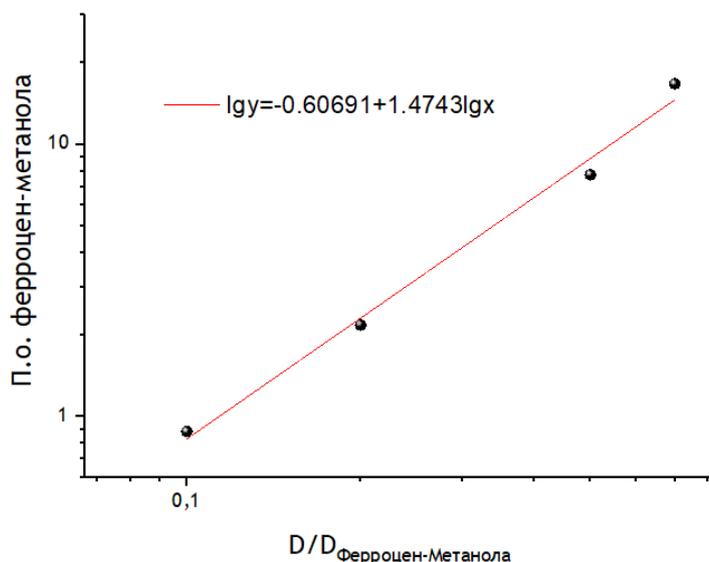


Рисунок 39 - теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола – билогарифмическая линейаризация.

На основании проведенного выше анализа результатов можно сделать следующее обобщение:

1) Особенности массопереноса в ультрамикроэлектродных ансамблях существенно влияют на форму кривых веществ с различным коэффициентом диффузии.

2) Чем меньше коэффициент диффузии, тем больше смещение формы кривой в сторону стационарного поведения.

3) Рост олигопептидной последовательности сопровождается уменьшением коэффициента диффузии и увеличением наблюдаемого смещения потенциала пика, что снижает предел обнаружения низкомолекулярных примесей.

4) Теоретически прогнозируемый предел обнаружения для модельного соединения ферроцен-метанола в смеси с моно- и триглицид-ферроцен-метанолом составляет, соответственно, 2.6% и 0.4%.

5) С учетом присутствия в смесях продуктов твердофазного пептидного синтеза молекул, число звеньев в которых превышает 3, можно

предположить применимость метода для обнаружения и количественного определения низкомолекулярных примесей, сигнализирующих о недостаточной эффективности процесса синтеза.

6. Разработка метода количественного определения аналитов в смеси с применением нескольких типов активных материалов с обработкой аналитического сигнала при помощи метода проекции на латентные структуры.

Построение модели на основе проекции на латентные структуры осуществлялось для набора смесевых циклических вольтамперограмм бинарных смесей глицил-ферроцен-метанола, ферроцен-метанола и триглицил-ферроцен-метанола. В качестве аналитического сигнала в методе ПЛС использовался ток при заданном потенциале, в альтернативном методе – сдвиг потенциала пика. В качестве источника данных использовались результаты конечноэлементного моделирования.

В первую очередь была предпринята попытка построения PLS по общей концентрации, поскольку в случае разрешимости данной системы методом PLS может быть получен метод с наибольшей простотой интерпретации данных.

Результаты валидации (перекрестной проверки) по разбиению на 20 сегментов по 10 точек зависимости представлены на графике (Рисунок 40).

В качестве альтернативного метода можно привести метод наименьших квадратов по линейной зависимости тока от концентрации OLS по току (произвольно выбранное значение – точка вольтмперной зависимости под номером 325). Валидация этого метода представлена ниже (Рисунок 41).

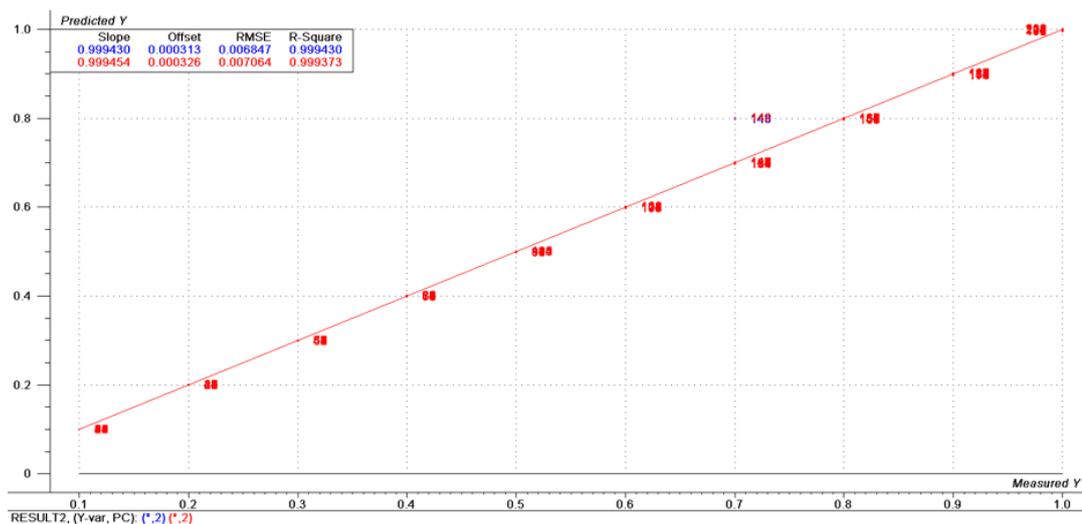


Рисунок 40 - зависимость предсказанного сигнала от сигнала, полученного в результате виртуального эксперимента для ПЛС по общей концентрации.

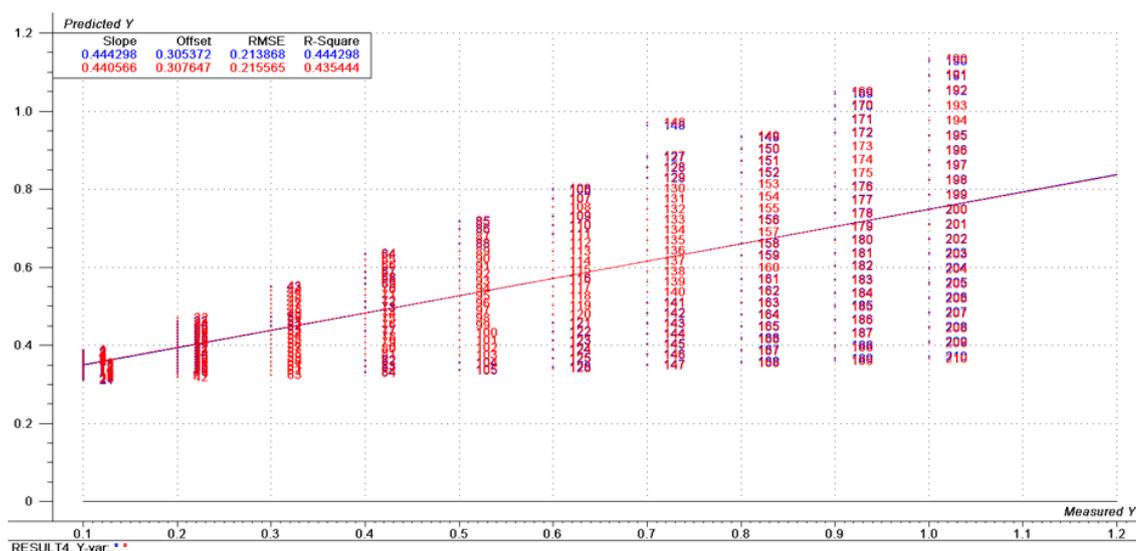


Рисунок 41 - зависимость предсказанного сигнала от сигнала виртуального эксперимента для аппроксимации линейными зависимостями с использованием метода наименьших квадратов.

Как видно из данных, значения R^2 , представленные на общей зависимости расчетного и “экспериментального” значения для метода проекции на латентные структуры, превосходят аналогичные значения для

метода наименьших квадратов, что указывает на рациональность использования метода PLS.

Тем не менее, представленные данные нельзя считать ценными с точки зрения определения соотношений концентраций, что, в конечном счете и является целью выполнения работы по созданию количественного метода. По этой причине были подготовлены данные по проекции на латентные структуры для соотношений концентраций. Результаты валидации представлены ниже (Рисунок 42).

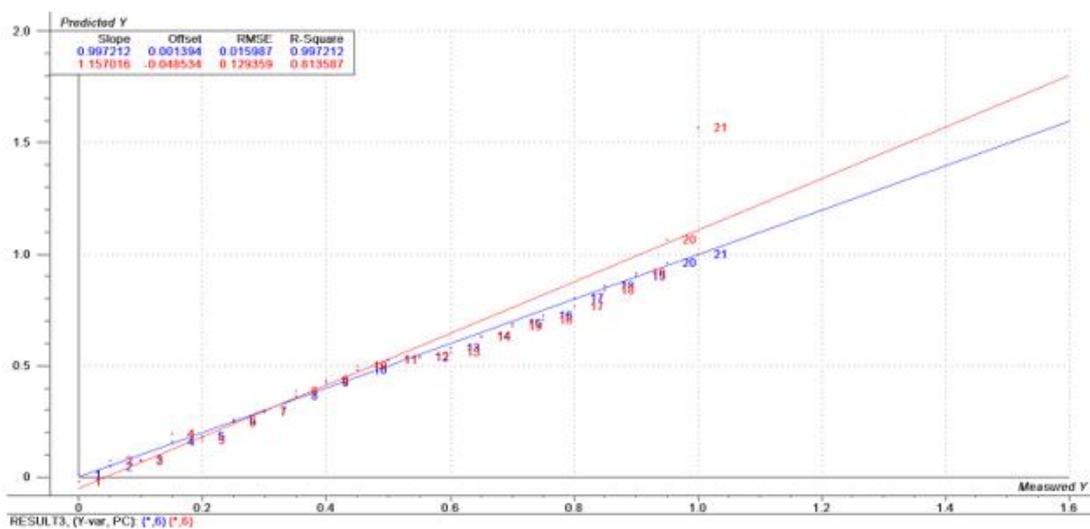


Рисунок 42 - зависимость предсказанного сигнала от сигнала виртуального эксперимента при построении модели на основе зависимости нормированного тока от соотношения концентраций.

В результате применения метода проекции на латентные структуры была установлена неразрешимость системы с использованием концентрационных зависимостей тока при заданном потенциале без установления связей между соседними точками. При этом ПЛС, основанная на токах, нормированных на ток пика, позволяет разрешить полученные модельные данные.

Для осуществления количественного анализа с учетом неизвестного коэффициента диффузии примеси может быть предложен альтернативный

метод основанный на построении характеристических поверхностей, представленных в виде зависимости потенциала окислительного пика от коэффициента диффузии примеси и ее процентной доли в смеси для выбранного основного вещества с заданным коэффициентом диффузии. Для каждого отдельного межэлектродного расстояния может быть построена соответствующая поверхность в указанных координатах, сечение которой плоскостью, перпендикулярной оси потенциалов пиков, будет давать зависимость в координатах доля примеси - коэффициент диффузии примеси. При построении двух и более таких зависимостей на одном графике можно однозначно определить точку, отображающую коэффициент диффузии примеси и её концентрацию. При этом чем больше используемых ультрамикродных ансамблей, тем выше точность метода. Ниже (Рисунок 43) представлены калибровочные поверхности, полученные в результате конечноэлементного моделирования.

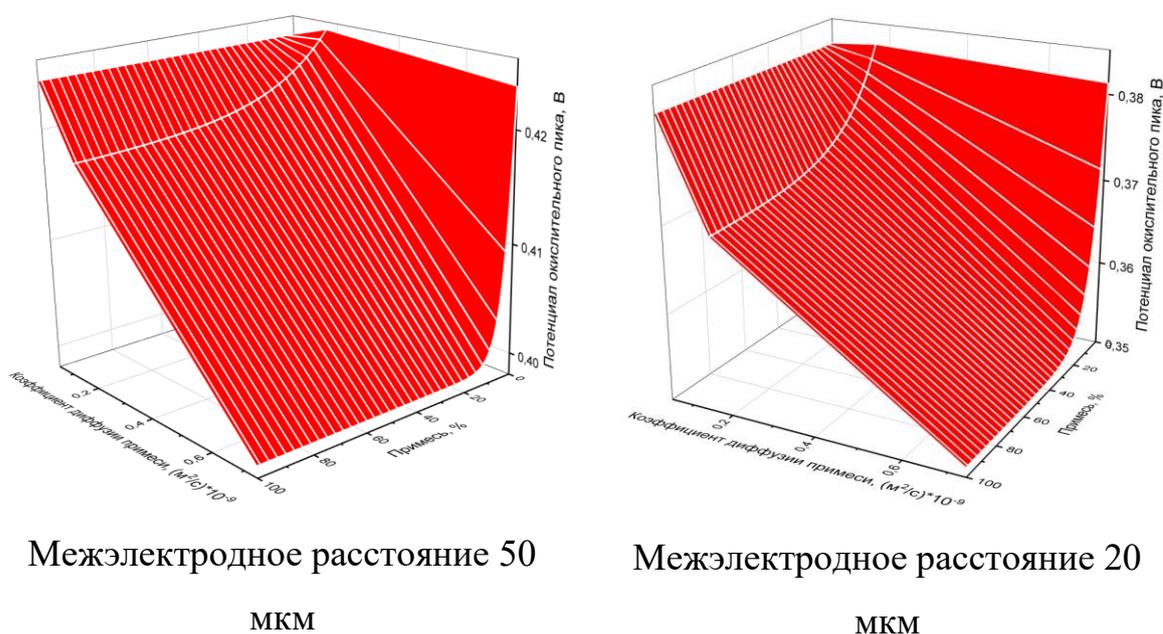


Рисунок 43 - поверхности потенциала окислительного пика в зависимости от концентрации и коэффициента диффузии примеси.

Для иллюстрации работоспособности методики использовалась одна из точек калибровочной зависимости (примесь моноглицин в триглицине при

доле примеси 10%). Потенциалы окислительных пиков для ансамблей с межэлектродным расстоянием 10, 20 и 50 мкм составляют 344.1 мВ, 377.8 мВ и 422.9 мВ соответственно. Кривые, полученные в результате сечения поверхностей представлены ниже (Рисунок 44).

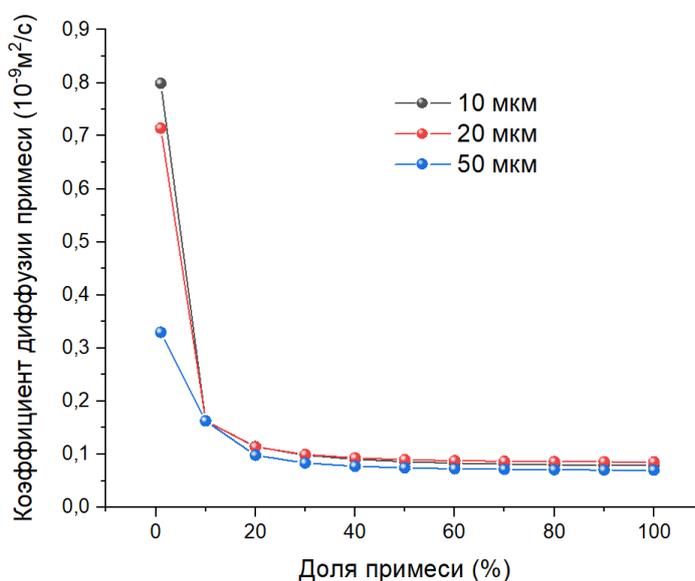


Рисунок 44 - кривые сечения поверхности потенциалов окислительного пика изопотенциальной плоскостью для различных УМЭ-ансамблей.

Видно, что единственная точка пересечения изопотенциальных кривых соответствует концентрации примеси 10% и коэффициенту диффузии $0.1628 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, что соответствует исходному предположению. Таким образом, можно заключить, что при помощи построения калибровочных поверхностей для заданных коэффициентов диффузии основного вещества смеси могут быть получены данные о коэффициенте диффузии примеси и о ее доле в составе смеси.

В случае многокомпонентной системы можно трактовать полученные таким способом данные как концентрация и коэффициент диффузии некоторой усредненной примеси. Соответствие подобного “среднепотенциального” коэффициента диффузии среднечисленному требует

дальнейшего изучения, однако уже на данном этапе можно предположить возможные качественные выводы.

Появление в системе примеси с низким коэффициентом диффузии в малых концентрациях может быть истолковано как неполное протекание одной из последних стадий синтеза. Напротив, значительная доля примеси, коэффициент диффузии которой близок к 0.5 коэффициента диффузии целевого (основного) продукта, может сигнализировать о неполноте протекания реакций в середине процесса твердофазного синтеза.

Исходя из полученных результатов можно заключить о создании методики количественного анализа смеси, состоящей из двух аналитов, коэффициент диффузии одного из которых не известен. Тем не менее, поскольку метод был разработан и проверен для данных виртуального эксперимента, требуется проведение непосредственного измерения ЦВА соответствующих систем с целью установления работоспособности метода на практике.

7. Заключение

В результате проведенной работы были выявлены закономерности электрохимического поведения в водных электролитах электроактивных аминокислот и ферроценовых производных аминокислот и олигопептидов в электрохимических ячейках с массивами ультрамикроэлектродов инертной и электрокаталитически активной природы в качестве рабочих электродов. На основе полученных данных были разработаны методы количественного определения, использующие циклическую вольтамперометрию.

Экспериментальные данные указывают на возможность эффективного применения ансамблей инертных ультрамикроэлектродов для количественного вольтамперометрического ферроценовых производных олигопептидов. Расчетные данные показали границы концентрационного диапазона определения соединений с равным окислительно-восстановительным потенциалом с различными коэффициентами диффузии. Таким образом разработанный подход позволит использовать вольтамперометрию для определения соединений в смеси, что при использовании планарных электродов и оценке по пику предельного тока является невозможным.

Список используемых источников

- 1 Bandodkar A. J. et al. Re-usable electrochemical glucose sensors integrated into a smartphone platform //Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 101. – С. 181-187.
- 2 Wang M. et al. A wearable electrochemical biosensor for the monitoring of metabolites and nutrients //Nature Biomedical Engineering. – 2022. – Т. 6. – №. 11. – С. 1225-1235.
- 3 Zoski C. G. Ultramicroelectrodes: design, fabrication, and characterization //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2002. – Т. 14. – №. 15-16. – С. 1041-1051.
- 4 Kim J., Bard A. J. Application of the Koutecky-Levich method to the analysis of steady state voltammograms with ultramicroelectrodes //Analytical chemistry. – 2016. – Т. 88. – №. 3. – С. 1742-1747.
- 5 Danis L. et al. Fabrication of carbon, gold, platinum, silver, and mercury ultramicroelectrodes with controlled geometry //Analytical chemistry. – 2015. – Т. 87. – №. 5. – С. 2565-2569.
- 6 Soh K. L. et al. Diamond-derived microelectrodes array for electrochemical analysis //Diamond and Related Materials. – 2004. – Т. 13. – №. 11-12. – С. 2009-2015.
- 7 Dobre N. et al. Cyclic voltammetry of silver nanoparticles on platinum, gold and glassy carbon electrodes //Rev. Chim. – 2014. – Т. 65. – С. 578-581.