

Правительство Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

УДК 66.017, 541.13, 543.  
Рег. № НИОКТР 121061000160-2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

\_\_\_\_\_ С. В. Микушев

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ  
ПРОЕКТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ПРИКЛАДНОЙ ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОГО  
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ: 2024 Г. ЭТАП 4  
(заключительный)

Руководитель НИР:

Зав. лаб. геохимического анализа нефти \_\_\_\_\_ А. Ю. Арбенин

Санкт-Петербург 2024

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР, Зав. лаб. геохимического анализа нефти, к.х.н.	_____	А. Ю. Арбенин (введение, заключение, раздел 1,2,3)
	подпись, дата	
Отв. исполнитель, инженер	_____	А. А. Петров (раздел 1,2,3)
	подпись, дата	
Исполнители: Профессор, д.х.н.	_____	Д. О. Кирсанов (раздел 4)
	подпись, дата	
Доцент, к.х.н.	_____	Е. Г. Земцова (раздел 3)
	подпись, дата	
Доцент, к.х.н.	_____	А. А. Селютин (раздел 4)
	подпись, дата	
С.н.с., к.х.н.	_____	Е. В. Алексеева (раздел 4)
	подпись, дата	
С.н.с., к.ф.-м.н.	_____	П. М. Корусенко (раздел 4)
	подпись, дата	
Нормоконтроль	_____	
	подпись, дата	

## РЕФЕРАТ

Отчет 107 с., 1 кн., 92 рис., 6 табл., 28 источн.

ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ, ЭЛЕКТРОХИМИЯ, ХИМИЧЕСКОЕ  
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ,  
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ, УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОДЫ,  
АМИНОКИСЛОТЫ, ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ, ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЯ,  
РЕГУЛЯРИЗАЦИЯ

Цель исследования: разработка методов электрохимического анализа соединений с близкими окислительно-восстановительными потенциалами, но различными коэффициентами диффузии, при помощи ячеек с различной геометрией, обеспечивающих особые диффузионные условия, необходимые для повышения разрешающей способности.

В рамках проекта была проведена разработка требующихся для реализации разрабатываемых методов анализа конструкций электрохимических ячеек и материалов электродов, моделей их работы, алгоритмов матобработки данных, синтез модельных аналитов и разработка методов дериватизации неэлектроактивных аналитов, разработка методов активации поверхности электродов для создания условий протекания электрохимических реакций аналитов в пределах рабочих окон электролитов, верификация моделей на экспериментальных ячейках, проверка алгоритмов обработки данных на модельных аналитах и их смесях.

Полученные данные позволили выявить возможности проведения электрохимического определения соединений с близкими окислительно-восстановительными потенциалами и различными коэффициентами диффузии на примере аминокислот, олигопептидов и их производных индивидуально и в смесях при помощи разработанных подходов.

## СОДЕРЖАНИЕ

Перечень примененных сокращений .....	6
Введение .....	7
<b>1</b> Разработка подходов к конструированию электрохимических ячеек и материалов электродов. ....	9
1.1 Ультрамикроэлектродные ансамбли.....	9
1.2 Ячейка с электродом, расположенным в глубине канала поперечно сообщающегося с ламинарным потоком раствора аналит. ....	14
1.3 Ячейка с отделённым мембраной рабочим электродом .....	15
1.4 Ячейка с эквидистантными независимыми рабочими электродами	17
<b>2</b> Создание экспериментальной базы исследования.....	18
2.1 Получение ансамблей ультрамикроэлектродов темплатным методом.....	18
2.2 Получение ансамблей ультрамикроэлектродов при помощи литографии.....	24
2.3 Изготовление ячейки для проведения анализа при помощи ансамблей ультрамикроэлектродов .....	30
2.4 Изготовление ячейки с отделённым мембраной рабочим электродом	31
2.5 Изготовление ячейки с эквидистантными планарными электродами .....	32
2.6 Получение электроактивных производных модельных аналитов.	33
<b>3</b> Разработка методов анализа соединений с близким окислительно-восстановительным потенциалом и разными коэффициентами диффузии и их смесей .....	41
3.1 Способ представления данных для интерпретации результатов электрохимического анализа.....	41
3.2 Метод регуляризации нахождения приближенного решения интегрального уравнения Фредгольма 1-го рода.....	42
3.3 Исследование электрохимического поведения ансамблей ультрамикроэлектродов полученных темплатным методом и оценка	

перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами. ....	44
3.4 Оптимизация способа моделирования электрохимического отклика ансамбля ультрамикроразрядных электродов.....	46
3.5 Оптимизация геометрии ансамблей ультрамикроразрядных электродов, выбор способа измерения.....	53
3.6 Исследование электрохимического поведения ансамблей ультрамикроразрядных электродов полученных литографическим методом и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами. ....	66
3.7 Применение метода регуляризации для анализа функций распределения концентраций модифицированных ферроценом олигопептидов по коэффициентам диффузии.....	82
3.8 Исследование электрохимических процессов, протекающих в ячейке с отделённым мембраной планарным рабочим электродом, и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами. ....	92
3.9 Исследование электрохимических процессов, протекающих в ячейке с эквидистантными рабочими электродами, и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами	94
4 Перспективы развития предложенных подходов .....	95
Заключение .....	104
Список использованной литературы .....	105

## Перечень примененных сокращений

В настоящем отчете о НИР применяются следующие сокращения и обозначения:

ЦВА	- циклическая вольтамперограмма
УМЭ	- ультрамикродатродный ансамбль
DCHCD	- dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	- 4-(dimethylamino)pyridine
FMCA	- ferrocene monocarboxylic acid
FCA	- ferrocene carboxaldehyde
ДЭС	- двойной электрический слой
ЯМР	- ядерный магнитный резонанс
FMOC	- Fluorenylmethyloxycarbonyl

## Введение

Классические химические методы анализа активно вытесняются аппаратными: появление таких методов как хроматография, вольтамперометрия, потенциометрия, термогравиметрия и т.д. позволило значительно расширить спектр анализируемых соединений, расширить границы качественного и количественного анализа. Электрохимические методы представляют особый интерес, так как их применение с учётом современной элементной базы ведёт к миниатюризации оборудования вплоть до носимых и встраиваемых в гаджеты сенсоров, что выгодно отличает их от таких методов как масспектрометрия, хроматография, калориметрия и т.д. Современные электрохимические анализаторы, позволяющие реализовать хроноамперометрию, потенциометрию, вольтамперографию, кондуктометрию активно применяются в природоохране, медицине, промышленной автоматике, контроле пищевых продуктов, фармацевтике, горном деле и многих других областях. Однако у каждого метода есть свои ограничения, связанные с применяемым в анализе электрохимическим процессом, составом электролитов и конструкцией ячейки. Для примера можно рассмотреть один из простейших методов – кондуктометрию: данный метод активно применяется для контроля концентрации солей в воде, так как он легко реализуется аппаратно и при этом проводимость раствора надёжна связана с концентрацией солей при постоянстве других параметров эксперимента. Однако данный метод определяя проводимость никак не может различить вклады в общий перенос зарядов различных ионов, что делает его непригодным для анализа многокомпонентных смесей. Когда подобные задачи определения смесей решаются потенциометрически, в силу высокой селективности возникает потребность создания сенсоров, количество которых совпадает с количеством аналитов. Что же касается вольтамперометрических методов, то они принципиально пригодны для анализа многокомпонентных смесей одним электродом, но при выполнении двух условий: все компоненты разряжаются на электроде в условиях анализа, компоненты имеют различный окислительно-восстановительный потенциал. Однако есть ряд аналитических задач, в которых аналиты не имеют значимых отличий в потенциале: например, гомологический ряд аналитов или же это продукты дериватизации электрохимически не активных

аналитов.

Нашей научной группой было принято решение исследовать возможность проведения электрохимического анализа подобных систем. В ходе проекта были разработаны подходы к вольтамперометрическому и хроноамперометрическому анализу электроактивных соединений и их смесей при помощи электрохимических ячеек различной геометрии, моделей их работы, алгоритмов матобработки данных, которые могут представлять интерес для развития аналитической химии и приборостроения. Также были получены результаты, которые могут быть применены для дериватизации электрохимически неактивных органических соединений, имеющих аминную, карбоксильную и гидроксильную группы.

# 1 Разработка подходов к конструированию электрохимических ячеек и материалов электродов.

## 1.1 Ультрамикроэлектродные ансамбли.

Ультрамикроэлектроды – это электроды с размерами менее диффузионного слоя, получаемого в ходе электрохимического эксперимента. Несмотря на создание данных электродов в 1942 году [1], особенности их электрохимического поведения были описаны намного позже, так как исходно они создавались для локализации электрохимического анализа в биологических экспериментах: особые диффузионные режимы работы ультрамикроэлектродов были обнаружены и объяснены независимо М. Флейшманом [2] и Р. М. Вайтманом [3], публикации датируются 1980 годами, хотя имеется значительно более ранний документ - отчет 1975 года, в котором подробно описано представление М. Флейшманом микроэлектрода работающего в квазистационарном режиме и механизм его действия [4].

Использование ультрамикроэлектродов позволяет за счет чисто диффузионных процессов добиться стационарного вольтамперометрического отклика без специальных гидродинамических условий, как в случае вращающегося дискового электрода. Данный эффект достигается за счет наличия вклада радиальных составляющих диффузии: с увеличением расстояния от геометрического центра электрода увеличивается объем слоя равной толщины. Площадь эквидистантной поверхности также увеличивается, что предотвращает истощение аналита в слоях, удаленных от поверхности электрода (Рисунок 1).

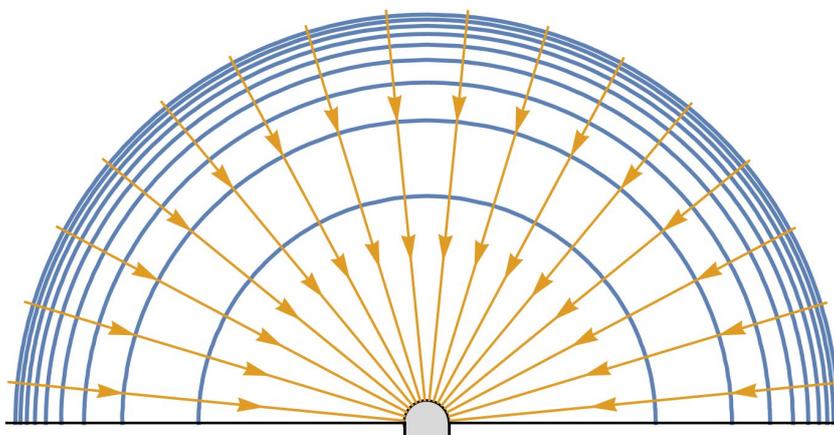


Рисунок 1 – схема работы индивидуального ультрамикроэлектрода.

Помимо стационарного отклика, для ультрамикроэлектродов также характерно высокое отношение основного (фарадеевского) сигнала к емкостному, поскольку их площадь мала, а плотность тока разряда электроактивных частиц, напротив, приобретает большие значения [5]. Сам по себе стационарный отклик интересен тем, что ток в этом режиме является функцией потенциала, и полученную в эксперименте временную зависимость можно рассматривать как параметрическую. В результате на основе ультрамикроэлектродов могут быть изготовлены датчики, чрезвычайно удобные для хроноамперометрии [6]. Несмотря на высокую плотность тока, из-за малой площади одиночный ультрамикроэлектрод имеет довольно низкий суммарный ток, что привело к началу активного изучения ультрамикроэлектродных массивов, часто выполненных в виде небольших сенсоров. Однако поведение массивов микроэлектродов оказалось отлично от поведения параллельно подключенных единичных ультрамикроэлектродов [7], что объяснялось пересечением полусфер диффузии.

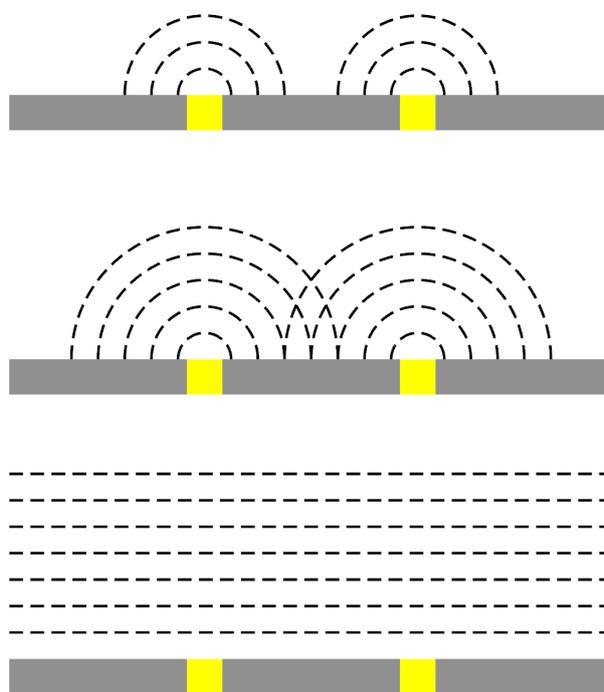


Рисунок 2 – Поведение ансамблей ультрамикроэлектродов.

В массиве может наблюдаться и стационарная вольтамперограмма, но для этого взаимное удаление должно быть значительным, может реализоваться

переходный режим, в котором происходит частичное пересечение полусфер, при малых расстояниях ансамбль будет себя вести как планарный электрод.

Переходный режим работы ансамбля ультрамикроэлектродов приводит к получению вольтамперограмм отличных как от стационарных, так и от нестационарных, при переходе от одного диффузионного режима к другому форма меняется плавно (Рисунок 3)

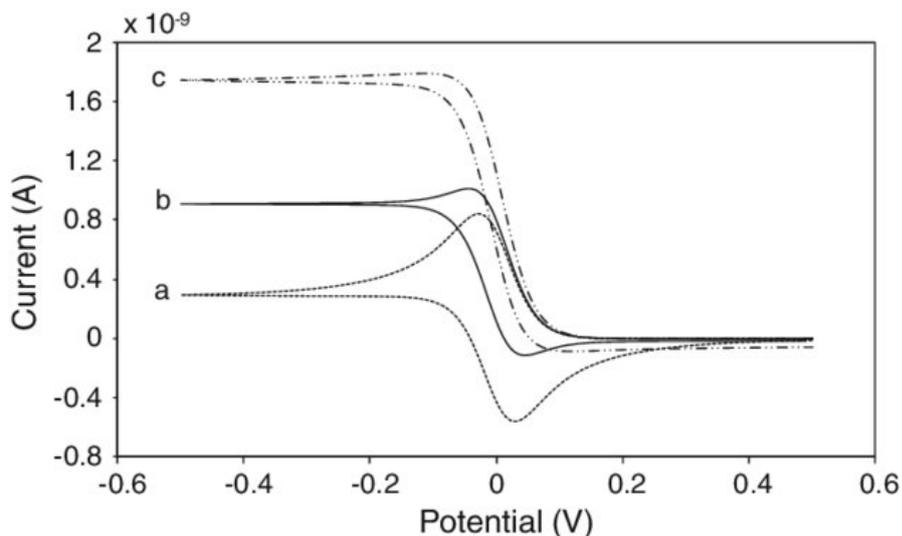


Рисунок 3 – Формы вольтамперограмм ансамблей микроэлектродов при разных режимах диффузии [8]

Доля пересечения полусфер в ходе регистрации вольтамперограммы связана в первую очередь с взаимным удалением ультрамикроэлектродов, но также она будет зависеть от скорости развертки (подобные эксперименты можно часто встретить в литературе [9,10,11]) и от коэффициента диффузии аналита, так как рост сферы напрямую с ним связан. Последнее навело нас на мысль о том, что изменение характера кривой от нестационарной к стационарной при фиксации остальных параметров может быть аналитическим сигналом, отвечающим за коэффициент диффузии аналита, что может быть применено для анализа соединений с близким окислительно-восстановительным потенциалом. Однако для реализации данного анализа требуется количественный критерий оценки этого перехода. Эта задача легла в основу дальнейшей работы.

Для проверки работоспособности предложенного подхода изначально была построена модель работы ансамбля микроэлектродов: было проведено моделирование электрохимических процессов на отдельных электродах в рамках

ячеек Вороного определенного радиуса, что производилось при помощи программного пакета COMSOL® Multiphysics. Геометрия эксперимента была выбрана аксиально симметричная двухмерная, поскольку такой вариант расчетов занимает меньшее время. Форма электрода аппроксимировалась цилиндрическим углублением радиуса 0.25 мкм и глубины 0.2 мкм, что соответствует данным СЭМ-изображений, на дне которого находится поверхность электродной реакции. Модель геометрического описания представлена ниже (Рисунок 4)



Рисунок 4 - Геометрическая схема углубленных ультрамикроэлектродов

Данная геометрия описывает наиболее часто встречающийся метод создания ансамблей – создание перфорированного слоя изолятора на планарном проводнике [12,13,14].

В качестве граничного условия отсутствия потока было определено равенство нулю градиента концентрации.

Поток:

$$J = -D * \nabla C \dots \dots \dots \text{Уравнение 1}$$

Граничное условие отсутствия потока:

$$\nabla C(z, r) = 0 \dots \dots \dots \text{Уравнение 2}$$

Граничное условие электродной реакции (уравнение Батлера-Фольмера):

$$D \cdot \frac{\partial C_{red}}{\partial z} = k * (C_{red} * e^{\frac{\alpha F \eta}{RT}} - C_{ox} e^{-\frac{(1-\alpha) F \eta}{RT}}) \dots \dots \dots \text{Уравнение 3}$$

В результате были получены теоретические циклические вольтамперограммы ансамбля погруженных микроэлектродов (Рисунок 5), форма которых свидетельствует о существенном влиянии перекрытия диффузионных слоев на характер протекания электродного процесса, и, следовательно, указывает на возможность использования электродов указанной геометрии для анализа веществ с различным коэффициентом диффузии и близким окислительно-восстановительным потенциалом

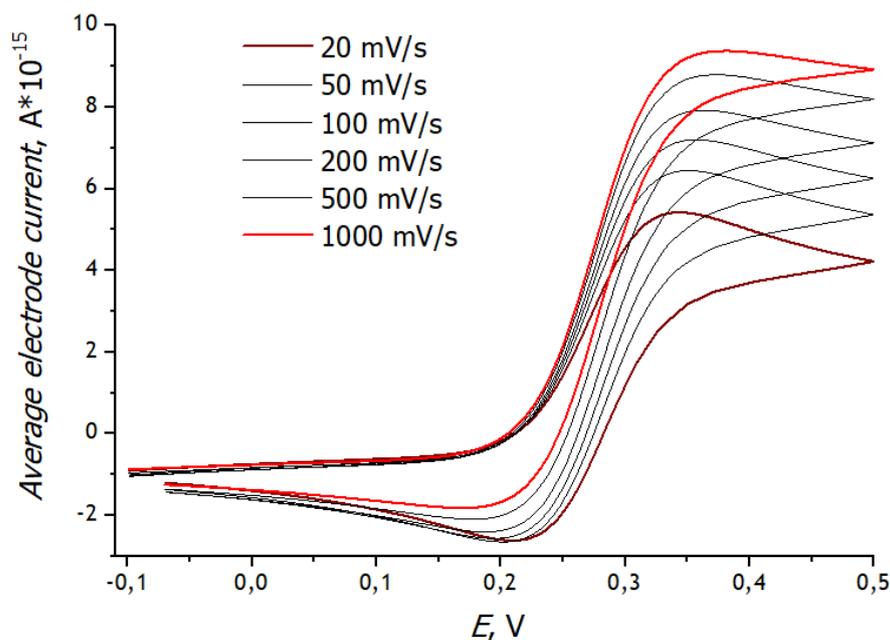


Рисунок 5 - Теоретические ЦВА микроэлектродного ансамбля с дисковыми микроэлектродами углубленными в слой изолятора.

Для создания ансамблей были выбраны две технологии: темплатный синтеза перфорированных плёнок, позволяющий создать слой изолятора на планарном проводнике с массивом неупорядоченных перфораций и литография – метод позволяющий создать аналогичную структуру, но с упорядоченным массивом перфораций. Преимущество первого заключается в простоте аппаратного оформления, однако неупорядоченность получаемого ансамбля, очевидно, значительно изменяет его электрохимическое поведение. Литографический метод требует значительно более дорогостоящего и сложного оборудования, но позволяет реализовать любую структуру ансамбля.

Для проведения анализа оптимально использовать трёхэлектродную схему: рабочий электрод (ансамбль ультрамикроэлектродов), противоэлектрод и электрод

сравнения, однако с учетом конструкции планарных электродов с нерабочей обратной стороной и торцами ячейка должна предполагать локализацию контакта с электролитом.

## 1.2 Ячейка с электродом, расположенным в глубине канала поперечно сообщаемого с ламинарным потоком раствора аналит.

Расчет ячейки с электродом, расположенным в глубине канала, поперечно сообщаемого с ламинарным потоком раствора аналита, производился с использованием метода конечных элементов в программе COMSOL® Multiphysics. Расчет обтекания канала осуществлялся с учетом турбулентного потока с использованием модели RANS для низких чисел Рейнольдса с применением k-ε модели. Расчет велся в двухмерном приближении с использованием прямоугольной картированной сетки с граничными элементами (Рисунок 6).

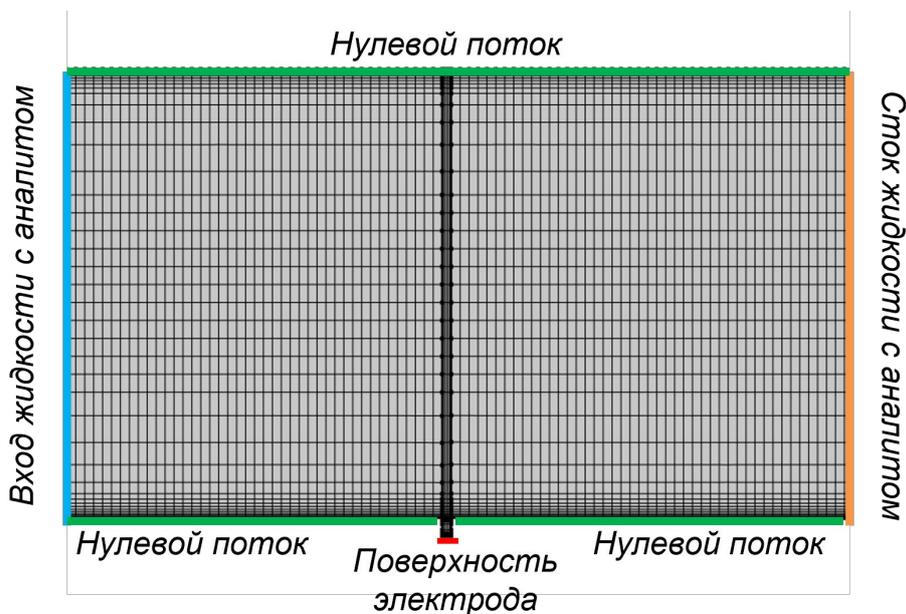


Рисунок 6 – Расположение граничных условий в расчетной области и прямоугольная картированная сетка, использованная в расчете

Граничное условие обтекания сетки использовалось в приближении нулевого скольжения. Ниже (Рисунок 7) приведены профили установления предельного диффузионного тока в описанной ячейке для веществ с отличающимися коэффициентами диффузии.

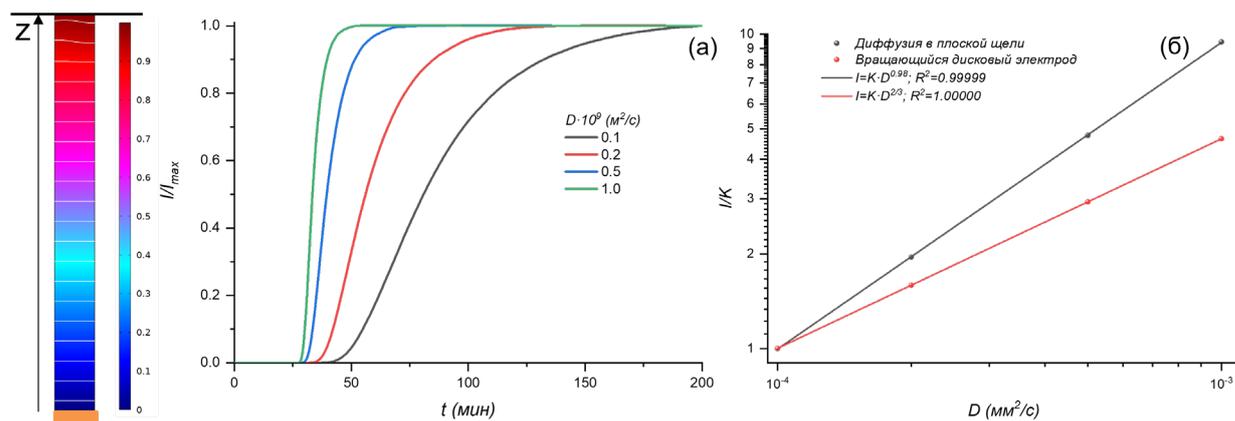


Рисунок 7 – Зависимость тока от времени при установлении предельного диффузионного тока и распределение концентрации аналита в канале (а); зависимость предельного диффузионного тока от коэффициента диффузии (б) в сравнении с аналогичной зависимостью для вращающегося дискового электрода

Показатель 0.98 степени зависимости тока от коэффициента диффузии указывает на слабую зависимость толщины диффузионного слоя от коэффициента диффузии, что способствует лучшему разрешению сигналов веществ с различными коэффициентами диффузии. Тем не менее, представляет существенные затруднения точная фиксация момента прохождения фронта жидкости, содержащей аналит, мимо канала (щели) с расположенным на дне рабочим электродом. В связи с этим может быть предложена схема измерения в ячейке с перемешиванием и отделенным неселективной мембраной рабочим электродом.

### 1.3 Ячейка с отделённым мембраной рабочим электродом

Поскольку результаты моделирования ячейки с электродом, расположенным в глубине канала, поперечно сообщающегося с ламинарным потоком раствора аналита, показали неэффективность применения для анализа аналитов с близким окислительно-восстановительным потенциалом и разными коэффициентами диффузии, было предложено использовать ту же логику – создание условий локализации аналита в момент начала анализа: использование ячейки с перемешиванием основной зоны и рабочим электродом, отделенным от остального объёма мембраной. Данная конструкция может позволить в весьма короткий период времени ввести пробу в ячейку и равномерно распределить её по объёму, при этом благодаря мембране на рабочем электроде перемешивание не затрагивает

электролит в ней находящийся. Таким образом начало диффузии через мембрану определено довольно с высокой точностью в силу быстроты ввода пробы и интенсивности перемешивания, траектория диффузии по всей поверхности одинакова в силу однородности толщины мембраны (Рисунок 8).

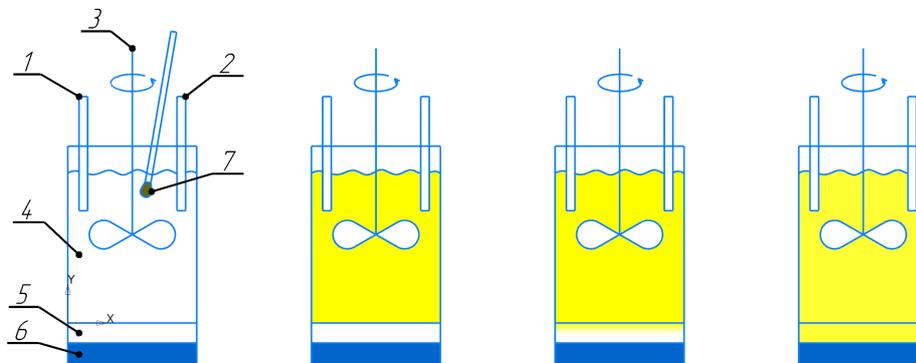


Рисунок 8 – Схема работы ячейки с отделенным мембраной рабочим электродом: 1 – электрод сравнения, 2 – противоэлектрод, 3 – мешалка, 4 – электролит, 5 – мембрана, 6 – рабочий электрод, 7 – вводимый раствор аналита.

Математическая модель функционирования ячейки строилась на основании уравнения линейной диффузии с двумя граничными условиями первого рода (уравнения 4-6). Здесь  $h$  – толщина мембраны.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \dots \dots \dots \text{Уравнение 4}$$

$$C(x = 0) = C_0 \cdot H(t) \dots \dots \dots \text{Уравнение 5}$$

$$C(x = h) = 0 \dots \dots \dots \text{Уравнение 6}$$

Решение уравнения 4 с граничными условиями 5, 6 было получено с использованием преобразования Лапласа. Зависимость плотности тока рабочего электрода от времени будет представлена уравнением 7.

$$i(t) = nF \cdot L^{-1} \left[ \sqrt{\frac{D}{s}} \cdot \frac{1}{sh\left(\sqrt{\frac{s}{D}}h\right)} \right] \dots \dots \dots \text{Уравнение 7}$$

В уравнении 7  $s$  – комплексная частота,  $L^{-1}$  – оператор обращения преобразования Лапласа.

## 1.4 Ячейка с эквидистантными независимыми рабочими электродами

Моделирование функционирования ячейки с эквидистантными электродами может быть проведено в приближении линейной диффузии с двумя граничными условиями первого рода (уравнения 4-7) или в двумерном приближении с учетом влияния диффузии аналитов из внешней среды вглубь межэлектродного пространства (Рисунок 9).

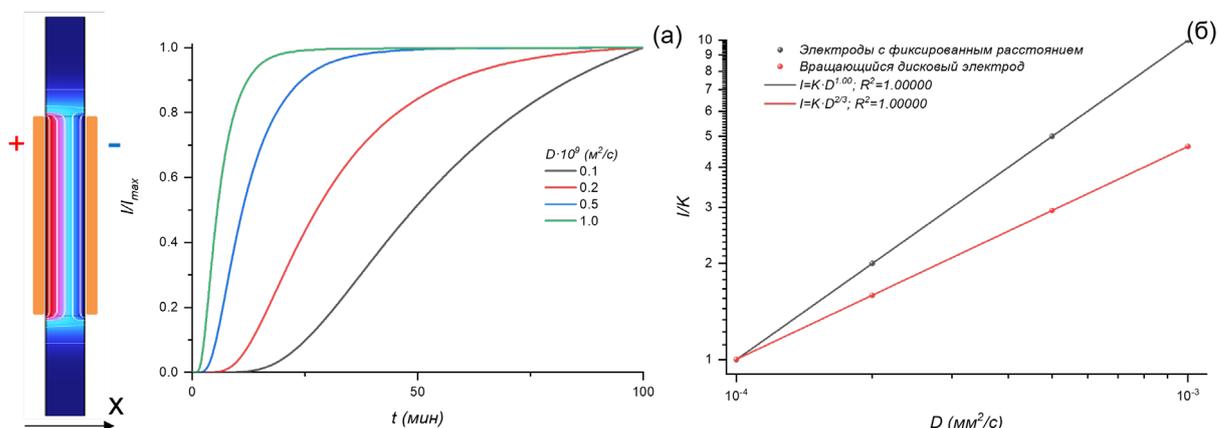


Рисунок 9 – Зависимость тока от времени при установлении предельного диффузионного тока и распределение концентрации аналита в межэлектродном пространстве (а); зависимость предельного диффузионного тока от коэффициента диффузии (б) в сравнении с аналогичной зависимостью для вращающегося дискового электрода

На основании данных моделирования в конечных элементах может быть сделан вывод о применимости модели линейной диффузии вплоть до межэлектродных расстояний, не превышающих 0.1 мм. В дальнейших экспериментах для соблюдения этого условия был использован сепаратор с толщиной 37.5 мкм. Можно отметить, что диффузия аналита из внешнего пространства не оказывает существенного влияния на эффективную величину толщины диффузионного слоя. В связи с этим при проведении дальнейших расчетов использовалась модель линейной диффузии и уравнение 7 с применением численного обращения преобразования Лапласа методом Гавера-Штэфеста.

## 2 Создание экспериментальной базы исследования.

### 2.1 Получение ансамблей ультрамикрорезисторов темплатным методом

Изначально в проекте была рассмотрена возможность создания ансамблей ультрамикрорезисторов темплатным методом при помощи эмульсионного полистирола в качестве темплата. Создавать ансамбли предполагалось по следующей схеме (Рисунок 10): нанесение микросфер, нанесение слоя ксерогеля оксида титана, удаление темплата, импульсное электрохимическое осаждение серебра.

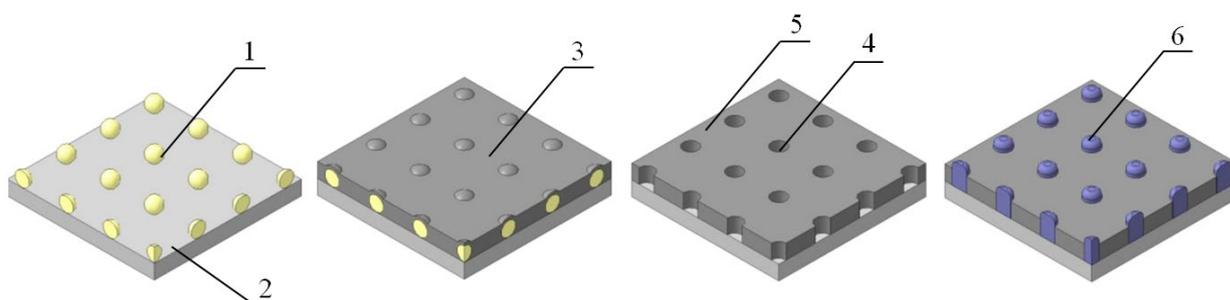


Рисунок 10 – Блок-схема получения образца с полусферическими микрочастицами серебра. 1 – микросферы ПС, 2 – подложка из кремния со слоем хрома, 3 - гель  $TiO_2$ , 4 - перфорации, 5 – ксерогель  $TiO_2$ , 6 - микрочастицы серебра

При этом становится возможным создания как электродов в виде перфораций в слое изолятора на поверхности слоя проводника (4), так и микроэлектродов возвышающихся над поверхностью слоя изолятора (6).

Изначально для получения микросфер Полимеризация стирола проводилась в двугорлой колбе с обратным холодильником и подключенной термопарой при  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  и перемешивании (400 об./мин). Исходная смесь предварительно барботировалась аргоном в течение 15 минут до загрузки инициатора и все время после.

Состав исходной смеси:

- 6 г стирола ( $C_8H_8$ );
- 50 г дистиллированной воды ( $H_2O$ );
- 0,01 г персульфата калия ( $K_2S_2O_8$ ) в качестве инициатора.

Реакция полимеризации шла 4 часа (Рисунок 11):

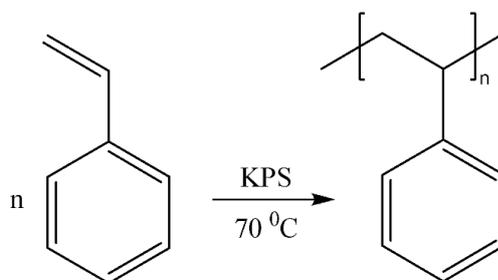


Рисунок 11 – Схема реакции полимеризации стирола

После завершения процесса полимеризации полученную эмульсию охлаждали до комнатной температуры и использовали для дальнейшей работы. Микроскопия выявила возможность получения микросфер близкого размера (Рисунок 12)

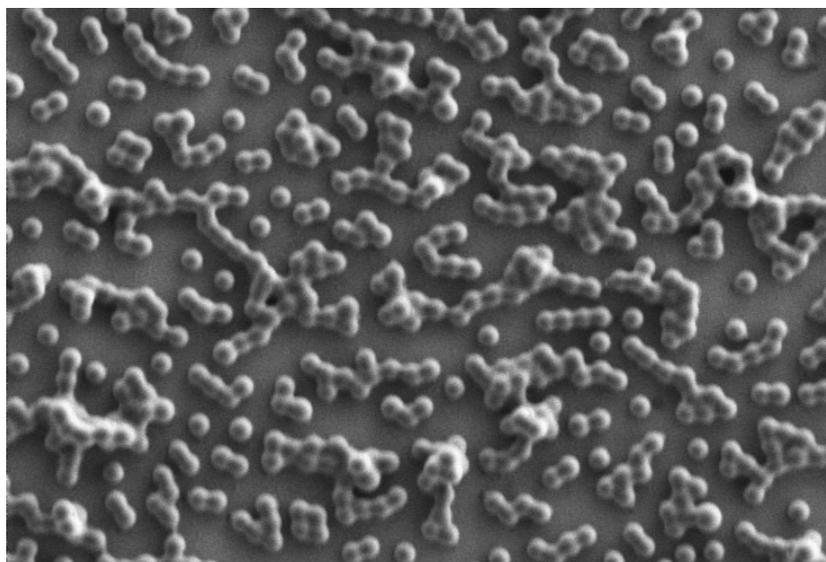


Рисунок 12 – Микрофотография микросфер полистирола

В материаловедении весьма часто применяется темплатирование полимерными сферами аналогичными, полученным нами, что связано с их возможностью упаковки в коллоидный кристалл [15]. В нашем же случае данное свойство не только не пригодно для получения требуемых объектов, но и вредно, так как способно оказать негативное влияние в силу агрегации частиц.

Для создания темплата с равномерным распределением частиц на поверхности подложки было решено применить электрофоретическое осаждение, которое в отличие от классических методов нанесения, таких как dip coating, drop casting, spin coating, spray coating, может в теории позволить избежать коалесценции частиц.

Для электрофоретического осаждения полистирольных микросфер из эмульсии были подготовлены пластинки из полированного кремния размером 2\*1 см<sup>2</sup>. На кремний предварительно с помощью магнетронного напылителя Quorum 150T Plus был нанесен слой хрома толщиной 200 нм для улучшения проводимости подложки. Из исходной эмульсии (содержание ПС 0.12 г/мл) отбирались аликвоты 30, 20, 15 и 5 мкл и из них в колбах на 200 мл были приготовлены растворы 18 мкг/мл, 12 мкг/мл, 9 мкг/мл и 3 мкг/мл соответственно. Электрофоретическое анодное осаждение проводилось при комнатной температуре с использованием источника питания постоянного тока Б5-50 при напряжении 60 В в течение 30 секунд. В качестве катода использовалась платиновая проволока. Расстояние между электродами было зафиксировано и равно 1 см.

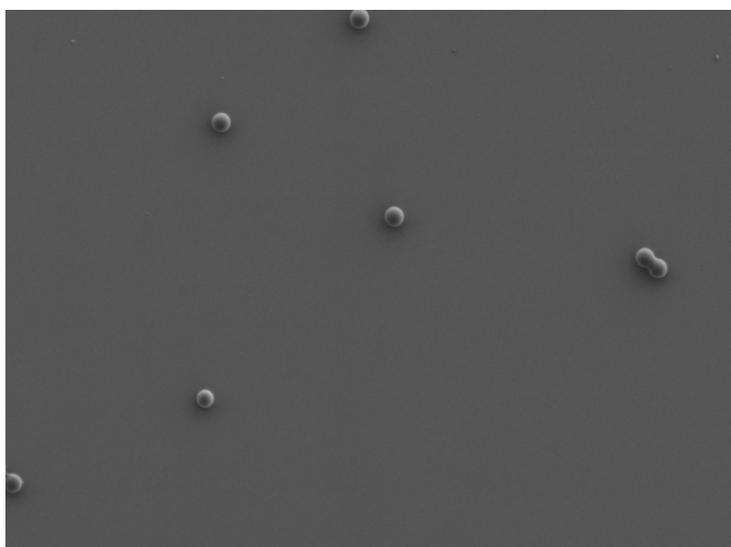


Рисунок 13 – Электронная микрофотография поверхности подложки после электрофоретического осаждения микросфер

В результате серии экспериментов было качественно показано, что при идентичных условиях осаждения меняя концентрацию суспензии можно управлять плотностью частиц на поверхности подложки (Таблица 1)

Таблица 1 – Взаимоудаление частиц при ЭФО

Концентрация, мкг/мл	18	12	9	3
Взаимоудаление, мкм	3	7	10	25



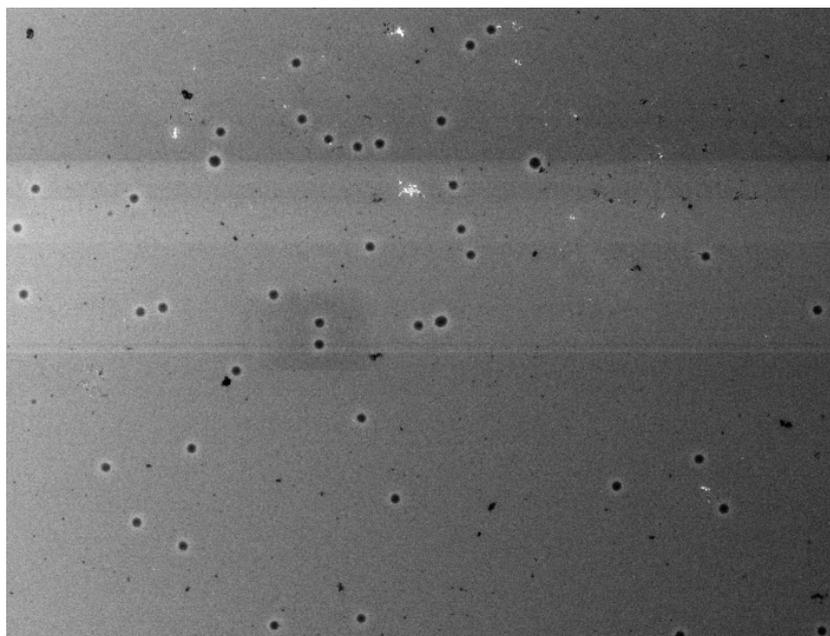


Рисунок 15 – Микрофотография распределения перфораций образца, полученного теплатированием при помощи суспензии концентрацией 18 мкг/мл

При этом получение образца с перфорированной пленкой на основе темплата, осажденного из суспензии с меньшей концентрацией, закономерно показало увеличение взаимоудаления перфораций (Рисунок 16).

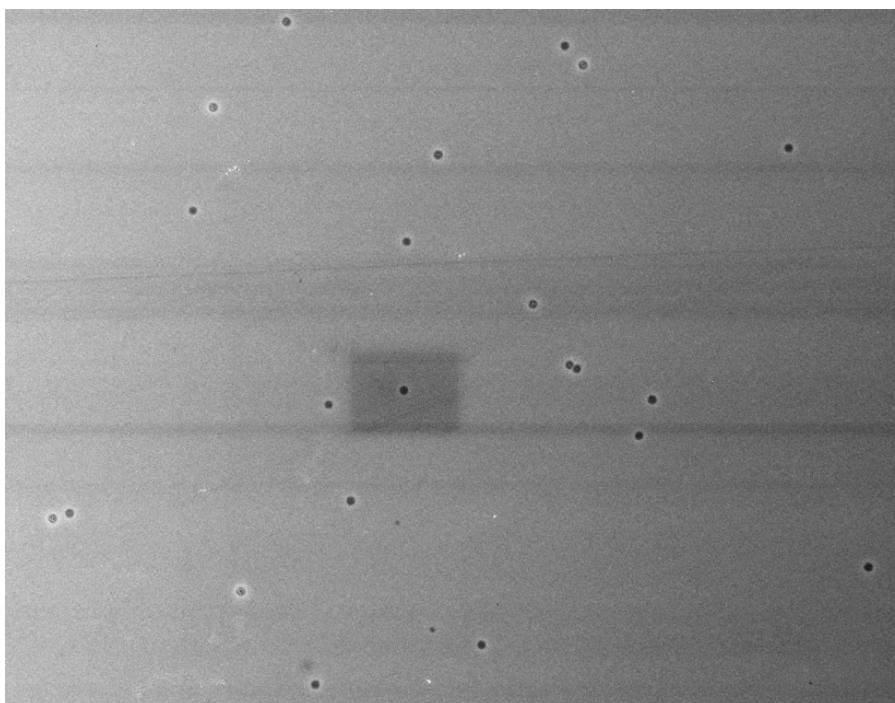


Рисунок 16 - Микрофотография распределения перфораций образца, полученного теплатированием при помощи суспензии концентрацией 12 мкг/мл

В результате проведенных экспериментов была установлена возможность получения перфорированных пленок ксерогеля оксида титана с применением в качестве темплата электрофоретически осажденных микросфер. При этом показано, что плотность перфораций может варьироваться изменением концентрации исходной суспензии полимерных микросфер.

Для получения золотых ультрамикродатодов данная методика была повторена для кемния с нанесенным на поверхность слоем золота (Рисунок 17).

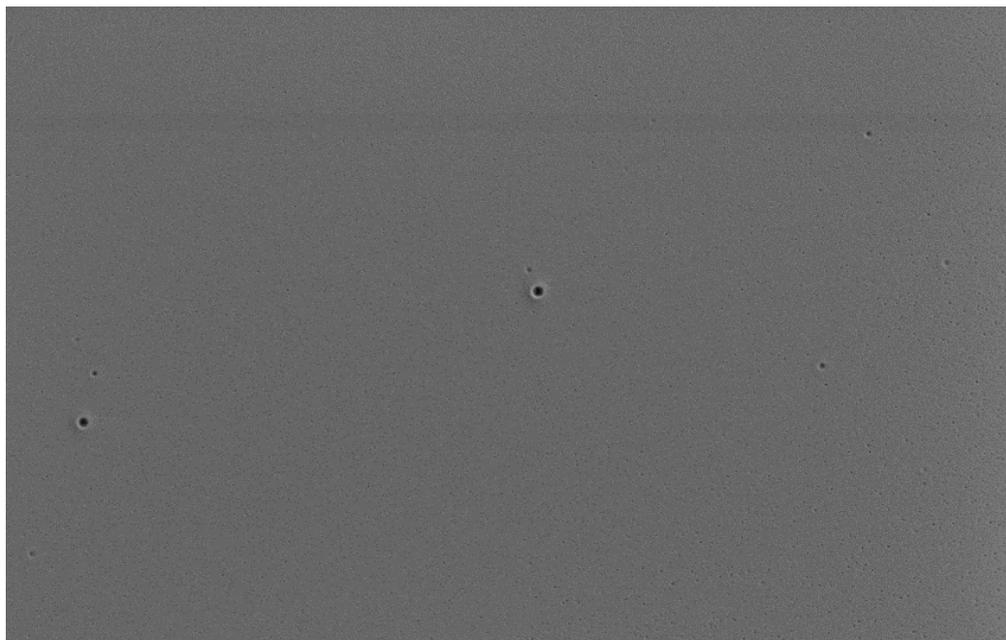


Рисунок 17 - Электронная микрофотография перфорированной пленки ксерогеля на золотом слое подложки.

Для получения массивов ультрамикродатодов возвышающихся над поверхностью слоя изолятора было применено импульсное электрохимическое осаждение, позволяющее осажать металлы в тонких каналах за счет нивелирования эффекта обеднения электролита паузами, восстанавливающими концентрацию за счет диффузии.

Для электрохимического осаждения серебра был приготовлен раствор следующего состава:

- 3,15 г нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ );
- 11 г сульфосалициловой кислоты ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$ ). Применяется в качестве поверхностно-активного вещества и комплексообразователя;
- гидрат аммиака ( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) для поддержания  $\text{pH}=9$ .

Полученный раствор доводился до метки деионизованной водой в мерной колбе на 100 мл. Электрохимическое осаждение серебра производилось методом электрохимического темплатного синтеза на приборе потенциостат-гальваностат Ellins P-45X с использованием серебряного анода. Осаждение проводилось в полипропиленовой ячейке с перемешиванием при помощи магнитной мешалки. В качестве рабочего электрода выступал образец титана, покрытый текстурированным диоксидом титана.

Для осаждения серебра из раствора производилось 1000 циклов при следующей последовательности импульсов и пауз (Таблица 2)

Таблица 2 - Режим Э/Х осаждения серебра

Е, В	-1	0,3	2	0
τ, мс	5	10	6	5

Реакция на катоде:  $\text{Ag}^+ + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Ag}^0$

Реакция на аноде:  $2\text{H}_2\text{O} - 4\bar{e} \rightleftharpoons 4\text{H}^+ + \text{O}_2$

В результате были получены массивы с различным взаиморасположением серебряных ультрамикроразрядов (Рисунок 18).

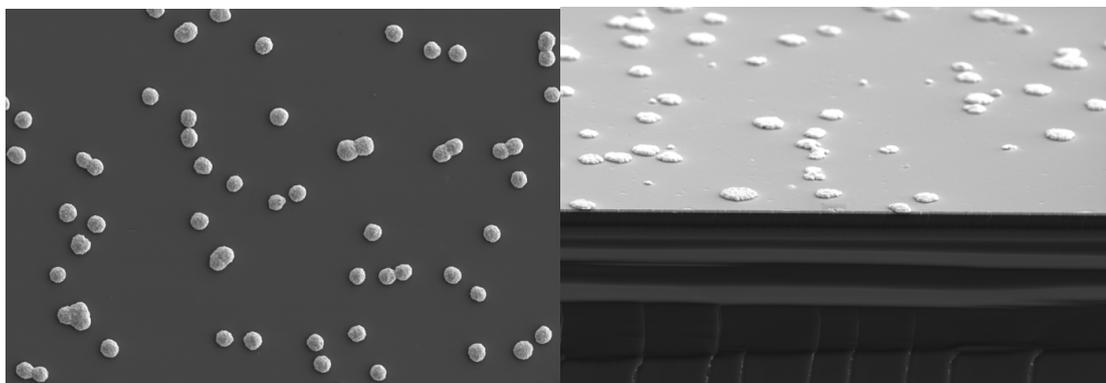


Рисунок 18 - Электронная микрофотография электрохимически осажденного серебра в перфорации полученные хардтемплатированием с применением полистирольных микросфер.

## 2.2 Получение ансамблей ультрамикроразрядов при помощи литографии

Изготовление структур для исследования проводилось с использованием напыления вакуумным испарением металлов и оптической литографии. Рабочий

процесс обработки показан на схеме (Рисунок 19)

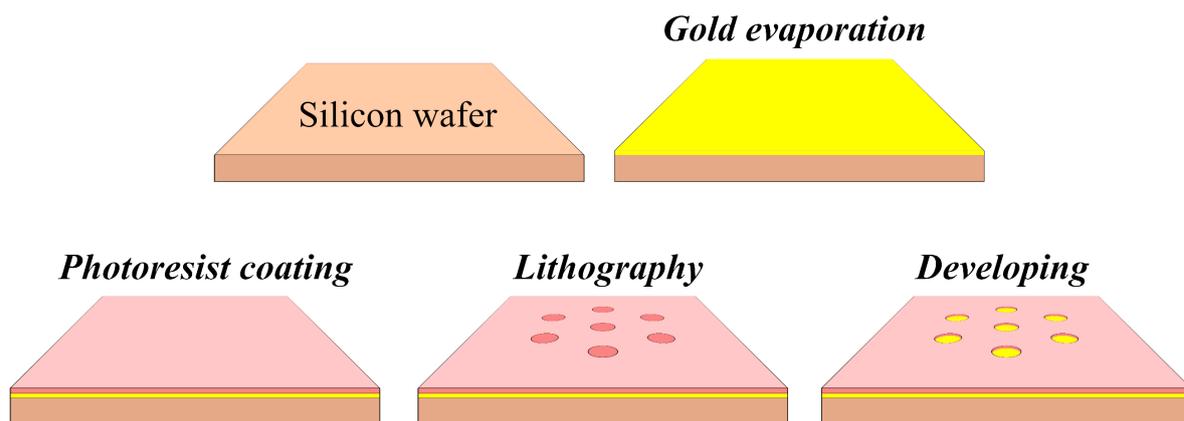


Рисунок 19 - Схема получения микроэлектродных ансамблей.

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 гексоганально 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.

Ниже (Рисунок 20) приведены СЭМ-изображения ансамблей ультрамикроэлектродов с заявленными межэлектродными расстояниями 10, 20, 50 и 100 мкм.

а

б

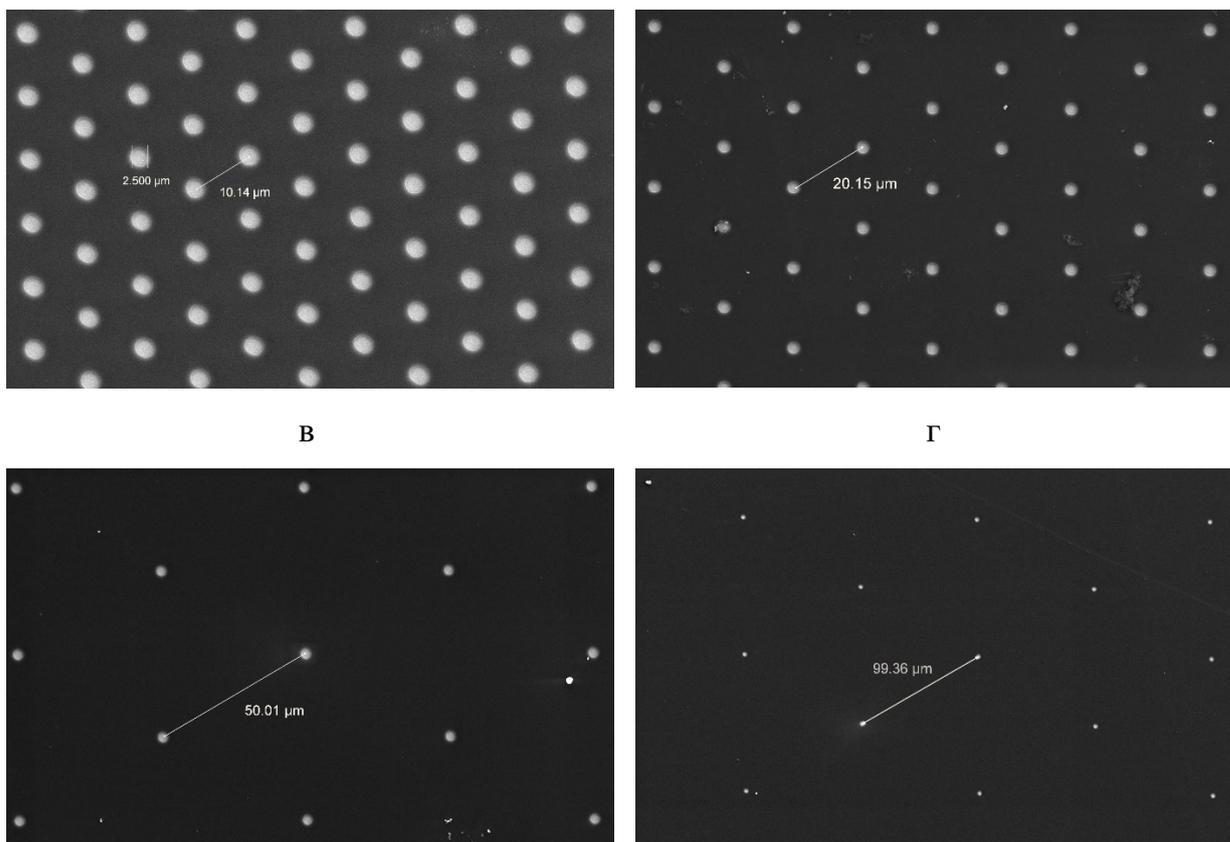


Рисунок 20 – изображения ансамблей ультрамикрорезисторов диаметра 2.5  $\mu\text{m}$  с заявленными межэлектродными расстояниями 10, 20, 50 и 100  $\mu\text{m}$ .

Согласно СЭМ-изображениям, приведенным на рисунке 43, ансамбли УМЭ представляют собой множества гексагонально упакованных отверстий в фоторезисте, обнажающих поверхность золота. Для каждого из ансамблей УМЭ были выполнены измерения расстояний между электродами при помощи программного обеспечения SmartTiff (Zeiss). Для расстояний между одиннадцатью различными парами электродов были выполнены одиннадцатикратные измерения расстояний между электродами внутри каждой из пар. Для каждой из пар была проведена проверка на соответствие отклонений нормальному распределению по составному критерию [16]. Первой частью составного критерия является вычисление величины  $d_x$  (уравнение 30) и сравнением его с максимальным и минимальным допустимым значениями, соответствующими числу степеней свободы и требуемой доверительной вероятности. При доверительной вероятности 0.95 и 11 результатах измерений диапазон допустимых значений  $d_x$  составляет 0.72-0.91.

$$d_x = \frac{\sum_i |R_i - R_{cp}|}{S\sqrt{n(n-1)}} \dots \dots \dots \text{Уравнение 8}$$

Верхняя граница среднеквадратического отклонения ( $S_\beta$ ) рассчитывалась по уравнению 31 ( $S$  – стандартное отклонение).

$$S_\beta = S(1 + \sqrt{\frac{2}{n-1}}) \dots \dots \dots \text{Уравнение 9}$$

Обозначение  $n$  соответствует числу выполненных измерений. Вторая часть составного критерия требует нахождения числа отдельных измерений, отклонение которых от среднего значения превышает  $2.5 \cdot S_\beta$ . Результаты измерений не противоречат гипотезе о нормальном распределении в случае, если число таких измерений ( $N$ ) не превышает 1.

Результаты измерений для ансамбля с заявленным межэлектродным расстоянием 20  $\mu\text{м}$  приведены в таблице 3.

Таблица 3 – результаты измерений межэлектродных расстояний для ансамбля с заявленным расстоянием 20  $\mu\text{м}$

№	$2.5 \cdot S_\beta, \mu\text{м}$	N	$d_x$	Соблюдение Н.Р.	R, $\mu\text{м}$
1	0.58	0	0.88	Да	20.42±0.15
2	0.21	0	0.86	Да	20.21±0.06
3	0.43	0	0.78	Да	20.27±0.11
4	0.22	0	0.88	Да	20.18±0.06
5	0.54	0	0.84	Да	20.14±0.15
6	0.34	0	0.83	Да	20.10±0.09
7	0.43	0	0.85	Да	20.38±0.12
8	0.45	0	0.81	Да	20.36±0.13
9	0.17	0	0.77	Да	20.17±0.04
10	0.25	0	0.90	Да	20.22±0.07
11	0.21	0	0.79	Да	20.21±0.07

Поскольку в каждом отдельном случае результаты измерений не противоречат нормальному распределению, доверительный интервал при доверительной вероятности 0.95 был вычислен с использованием стандартного отклонения среднего и коэффициента Стьюдента, равного 2.26.

В таблице 4 приведены данные измерений межэлектродных расстояний в ансамблях с заявленными расстояниями 10, 20, 50 и 100  $\mu\text{м}$ .

Таблица 4 – результаты измерений межэлектродных расстояний для ультрамикрoэлектродов с различным заявленным расстоянием

№	$R_{10\mu\text{м}}, \mu\text{м}$	$R_{20\mu\text{м}}, \mu\text{м}$	$R_{50\mu\text{м}}, \mu\text{м}$	$R_{100\mu\text{м}}, \mu\text{м}$
1	10.12±0.10	20.42±0.15	50.13±0.12	100.23±0.15
2	10.20±0.08	20.21±0.06	50.00±0.12	98.43±0.15
3	10.15±0.05	20.27±0.11	50.14±0.05	100.08±0.20
4	10.22±0.08	20.18±0.06	50.17±0.05	100.21±0.16
5	10.18±0.08	20.14±0.15	50.23±0.07	98.46±0.12
6	10.20±0.06	20.10±0.09	49.83±0.11	100.29±0.10
7	10.22±0.05	20.38±0.12	50.14±0.09	100.95±0.22
8	10.30±0.05	20.36±0.13	50.03±0.14	100.92±0.18
9	10.17±0.09	20.17±0.04	50.24±0.09	98.48±0.08
10	10.17±0.06	20.22±0.07	50.19±0.07	98.42±0.13
11	10.18±0.07	20.21±0.07	49.88±0.12	100.11±0.11

В каждом из столбцов таблицы присутствуют результаты, которые значительно отличаются как друг от друга, так и от заявленного межэлектродного расстояния. В связи с этим необходимо дополнительное исследование влияния искажений геометрии ансамблей УМЭ на электрохимическое поведение. В таблице 3 приведены значения величин, необходимых для проверки гипотезы о нормальном распределении расстояний между электродами в ансамблях УМЭ. Для моделирования такого влияния необходимы сведения о законе распределения расстояний между электродами.

Таблица 5 – данные составного критерия распределений результатов измерения расстояний между электродами в ансамблях

$R_{\text{заявленное}}, \mu\text{м}$	$2.5 \cdot S_{\beta}, \mu\text{м}$	N	$d_x$	Соблюдение Н.Р.
10	0.17	0	0.75	Да
20	0.38	0	0.84	Да
50	0.49	0	0.86	Да
100	3.69	0	0.92	Нет

В случае заявленного межэлектродного расстояния 100 мкм нормальный закон распределения не соблюдается. Проверка распределения на соответствие логарифмическому нормальному закону распределения также показала нарушение гипотезы. В связи с этим, для моделирования влияния функции распределения на условия массопереноса в ансамбле с заявленным межэлектродным расстоянием 100 мкм использовалось равномерное распределение в границах наибольшего и наименьшего экспериментальных значений. Для определения влияния искажений геометрии на электрохимическое поведение ансамблей были получены модельные функции  $\gamma(D \cdot t)$  для ансамблей со случайной геометрией, характеризуемой функцией распределения  $F(R)$ , где  $R$  – расстояние между ультрамикрoэлектродами, с использованием уравнения 32.

$$\gamma(D \cdot t) = \int_{R_{min}}^{R_{max}} \gamma_R(D \cdot t) F(R) dR \dots \dots \dots \text{Уравнение 10}$$

Ниже (Рисунок 21) представлены графики зависимостей функций  $\gamma(D \cdot t)$  от диффузионной длины, рассчитанных с учетом характера распределения числа электродов по межэлектродным расстояниям, в сравнении с функциями  $\gamma(D \cdot t)$ , рассчитанными исходя из усредненного значения межэлектродного расстояния.

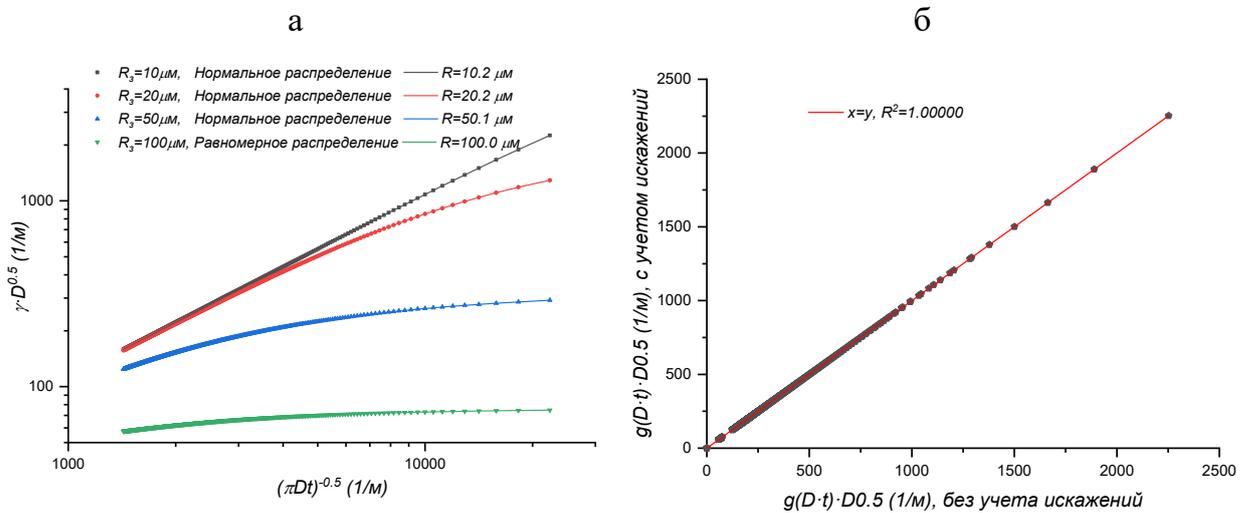


Рисунок 21 – зависимости  $\gamma(D \cdot t)$ , полученные с учетом и без учета искажений (а) и их зависимость друг от друга.

Согласно полученным расчетным данным, искажения, связанные с имеющими место статистически значимыми отклонениями геометрии ансамбля от заявленной, не могут оказать существенное влияние на электрохимическое поведение ансамблей УМЭ, что можно связать с симметричностью функций

распределения, приводящей к компенсации положительных и отрицательных отклонений. Таким образом, можно заключить, что полученные методом фотолитографии ансамбли ультрамикроэлектродов пригодны для дальнейшего использования.

### 2.3 Изготовление ячейки для проведения анализа при помощи ансамблей ультрамикроэлектродов

Для проведения анализа требуется трёхэлектродная схема, включающая электрод сравнения, рабочий электрод и противоэлектрод. Рабочий электрод в нашем случае – это массив микроэлектродов на планарной подложке, электрод сравнения – наиболее часто применяемый в практике вольтамперометрии – хлорсеребрянный, противоэлектрод – платиновый. Для постоянства площади массива и во избежание контакта электролита с незащищенными участками пластины рабочего электрода было предложено сделать в ячейке патрубков с уплотнением для прижимки к рабочей поверхности. В результате была изготовлена ячейка следующей конструкции (Рисунок 22)

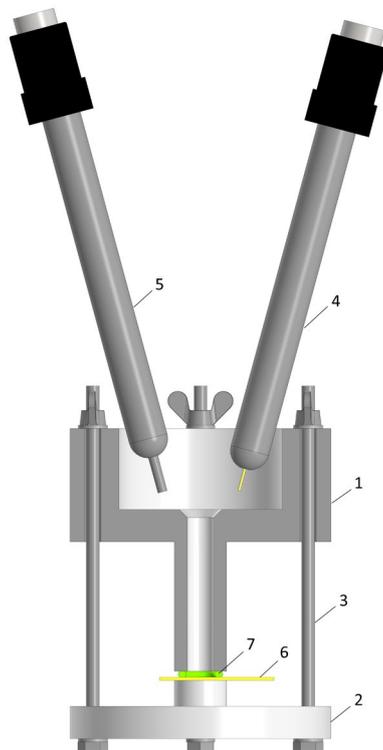


Рисунок 22 – Конструкция электрохимической ячейки для проведения анализа с использованием электродов с массивами ультрамикроэлектродов: 1 – стакан с патрубком, 2 – опора, 3 крепёжные элементы, 4 – противоэлектрод, 5 – электрод сравнения, 6 – рабочий электрод, 7 – уплотнение.

## 2.4 Изготовление ячейки с отделённым мембраной рабочим электродом

На основе ячейки для работы с ультрамикротодами путём небольшой доработки конструкции была создана ячейка для работы с отделённым мембраной рабочим электродом и перемешиванием основного объёма (Рисунок 23).

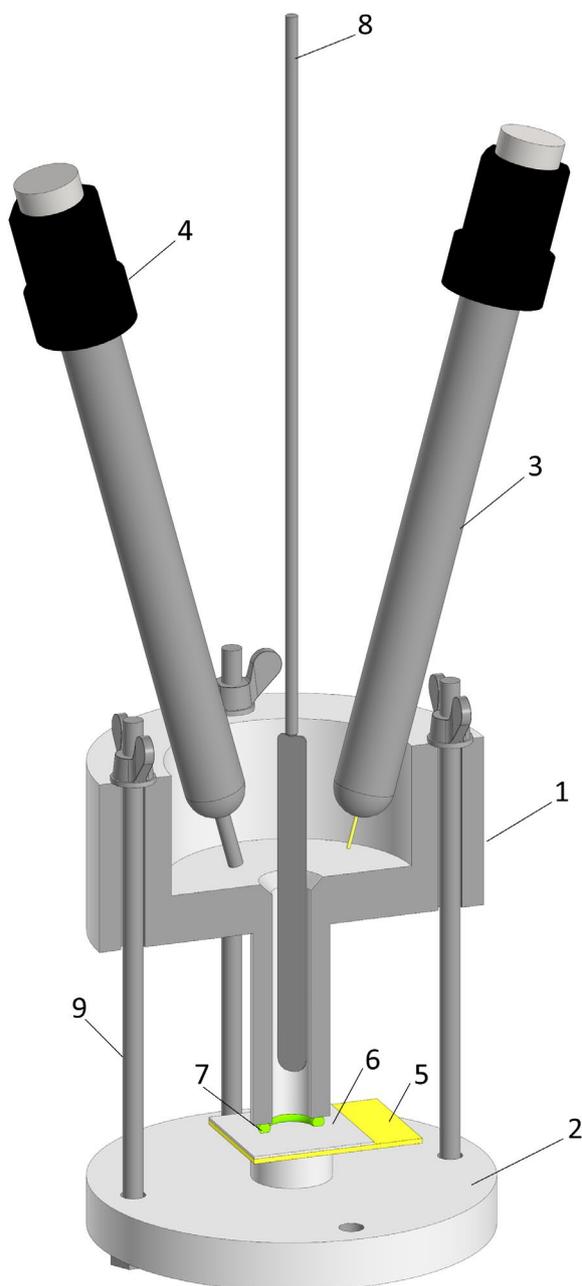


Рисунок 23 – Конструкция ячейка для работы с отделённым мембраной рабочим электродом: 1 – стакан с патрубком, 2 – опора, 3 – противозлектрод, 4 – электрод сравнения, 5 планарный электрод, 6 – мембрана, 7 уплотнение, 8 – мешалка, 9 – крепёжные элементы.

## 2.5 Изготовление ячейки с эквидистантными планарными электродами

Для создания ячейки требовалось крепление двух плоских рабочих электродов на равном расстоянии по нормали к поверхности. Для этого было решено ввести между электродами сепаратор и сжать их между двумя слоями изолятора (Рисунок 24)

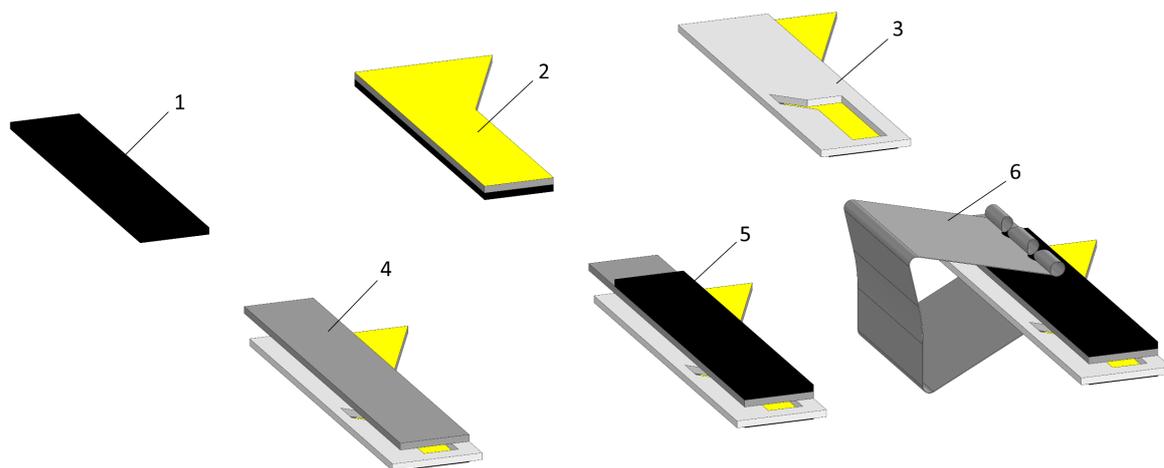


Рисунок 24 – Конструкция фиксатора рабочих электродов: 1 – изолятор, 2 – I рабочий электрод, 3 – сепаратор, 4 - II рабочий электрод, 5 – изолятор, 6 – зажим.

Форма сепаратора подбиралась так, чтобы между электродами образовывался канал с выходом снизу и сверху, что обеспечивало бы затекание электролита и выход воздуха. Рабочие электроды не повторяли друг друга, что было сделано для разнесения в пространстве контактных площадок.

Рабочие электроды погружались в стакан с электролитом вместе с электродом сравнения и противоэлектродом - таким образом получалась измерительная ячейка. Погружение производилось с учетом того, что выход канала должен быть выше уровня электролита – 1 (Рисунок 25). Рабочие электроды подключались к бипотенциостату зажимами типа «крокодил».

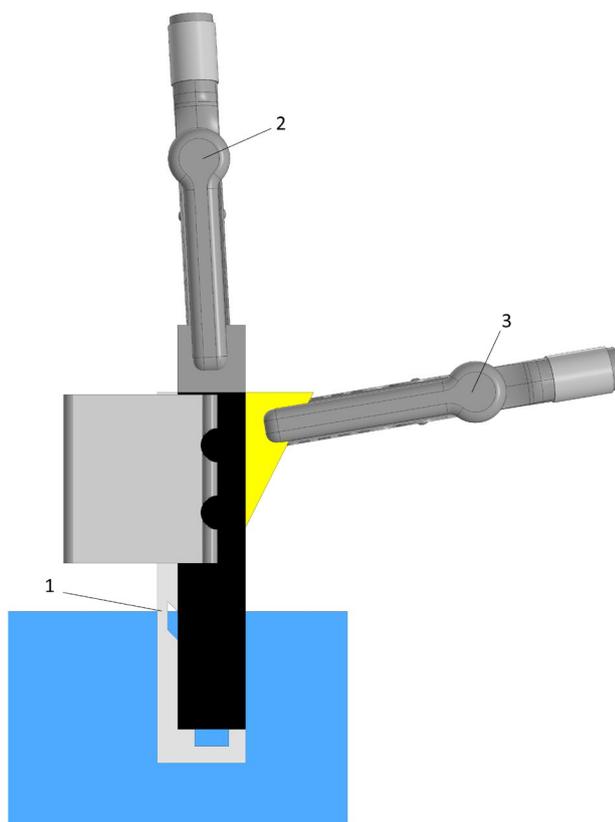


Рисунок 25 – Схема установки фиксатора рабочих электродов в ячейку.

## 2.6 Получение электроактивных производных модельных аналитов

В силу поставленной задачи разработки метода анализа соединений с различным коэффициентом диффузии, но близким окислительно-восстановительным потенциалом, идеальными кандидатами для модельных аналитов будут гомологи или олигомеры с различным числом звеньев с одинаковой электроактивной группой.

В качестве первого класса аналитов были выбраны олигопептиды дериватизированные путём этерификации их терминальной карбоксильной группы с ферроценметанолом. Исходные олигопептиды были синтезированы по методу Меррифильда: 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 AАРТЕС 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 0.4М, DIEA 1М, MPiP 20%. Схема синтеза приведена ниже (Рисунок 26)

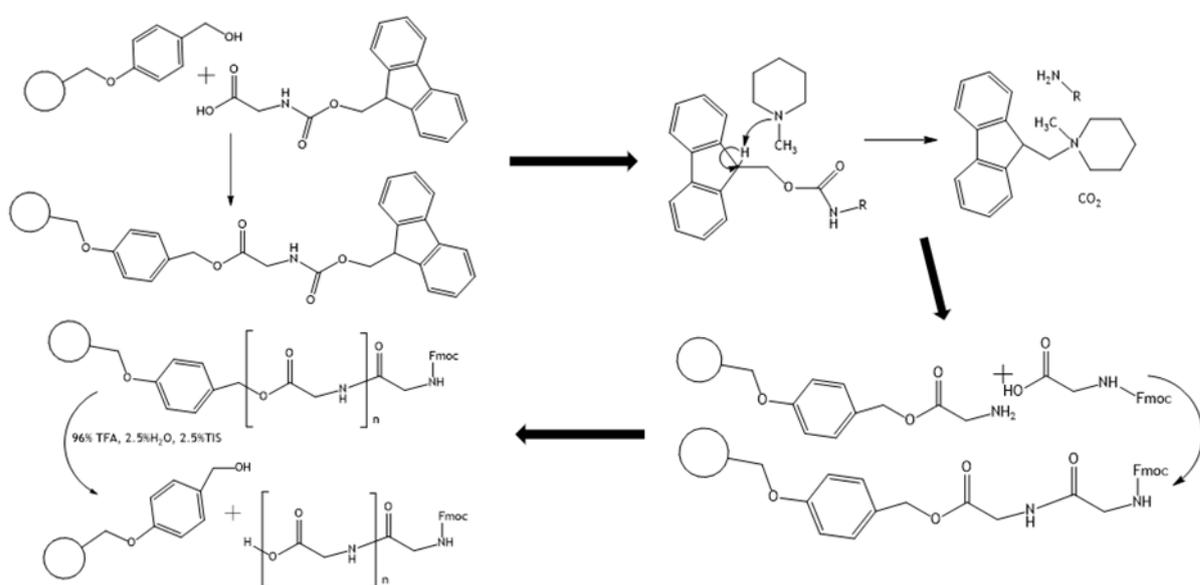


Рисунок 26 – Схема твердофазного синтеза пептидов.

Далее производилась отшивка продукта трифторуксусной кислотой. Синтез ферроценматенольных производных производился посредством этерификации карбодиимидным методом ферроценметанола и FMOС-защищенного пептида.

Для производных структура была подтверждена масс-спектрометрией (Рисунок 27, Рисунок 28)

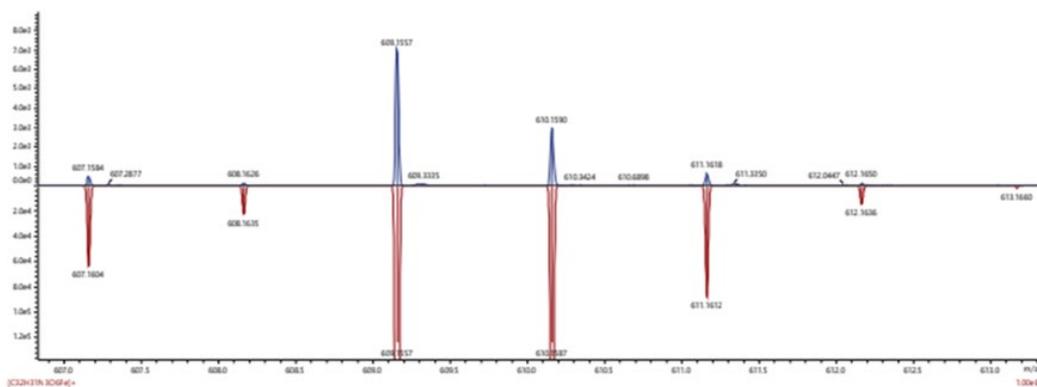


Рисунок 27 – Масс-спектр триглицеинового эфира ферроценметанола

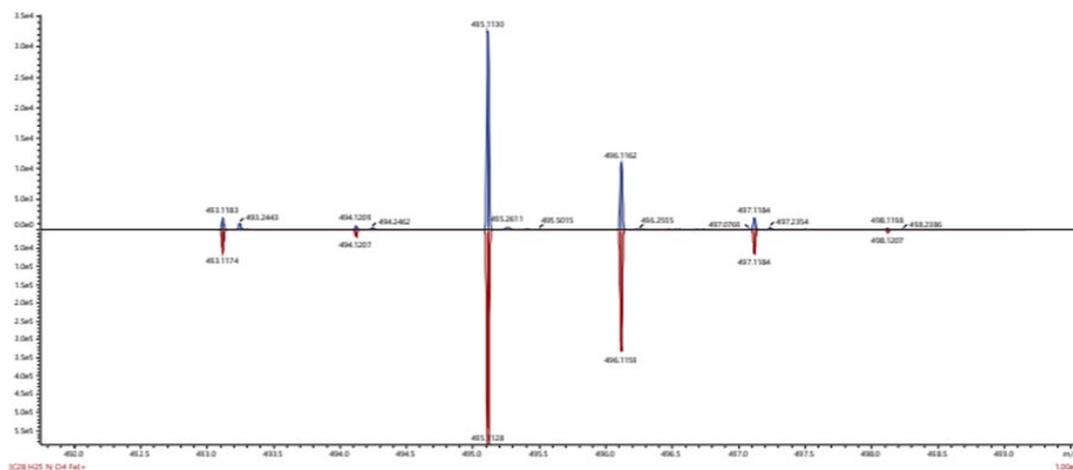


Рисунок 28 – Масс-спектр глицеинового эфира ферроценметанола

Второй метод дериватизации заключался в образовании ферроценкарбоновой кислоты амидной связи с терминальной аминогруппой олигопептида с применением реагентной базы пептидного синтеза до отшивки от смолы Ванга (Рисунок 29).

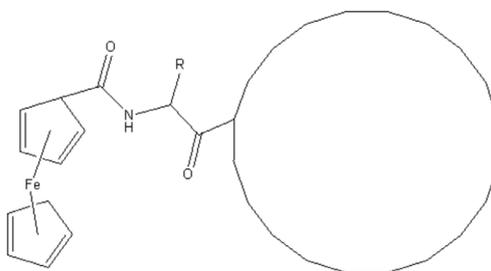


Рисунок 29 – Схема прививки ферроценкарбоновой кислоты

Структура триглицинового производного была подтверждена масспектрометрией (Рисунок 30)

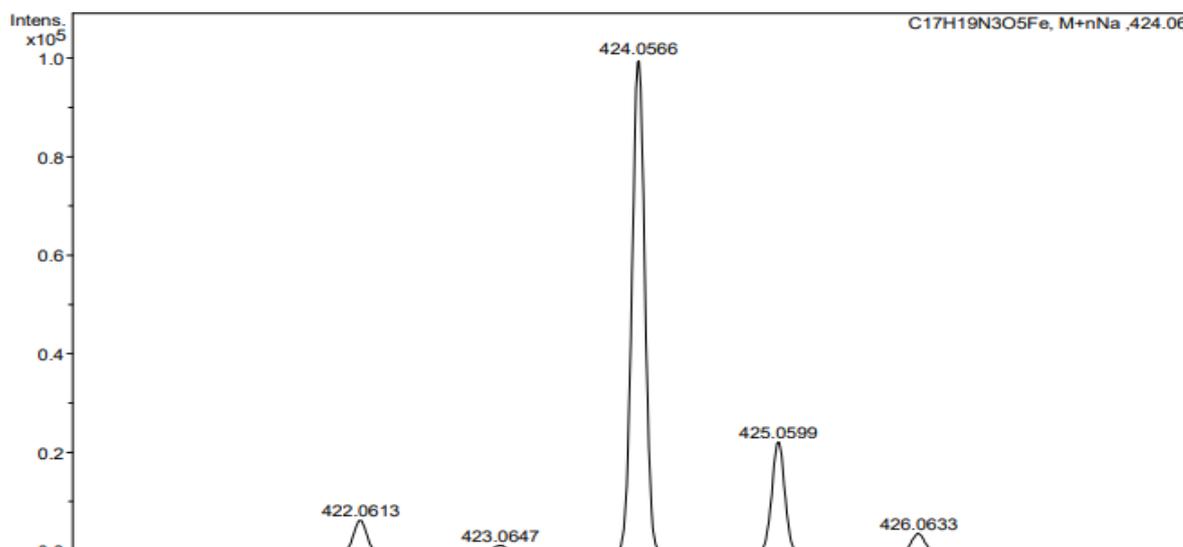


Рисунок 30 – Масс-спектр триглицинового производного ферроценкарбоновой кислоты.

Третьим подходом к получению модельных аналитов стало получение производных свободных аминокислот и ферроценкарбальдегида с дальнейшим восстановлением боргидридом. Данный подход интересен тем, что в производном отсутствует сложноэфирная связь склонная к гидролизу и при этом дериватизация может происходить без прививки к твёрдой матрице (Рисунок 31).

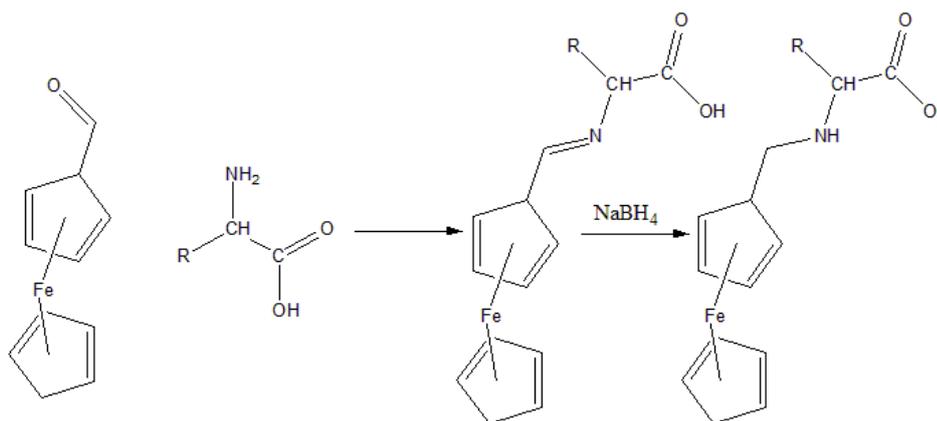


Рисунок 31 – Схема дериватизации аминокислот при помощи ферроценкарбальдегида

Изначально был проведён синтез глицинового производного: водный щелочной раствор глицина и раствор альдегида в ДМФА смешивались и при 80°C выдерживались при перемешивании в течение 2 ч. Затем реакционная смесь

охлаждалась до комнатной температуры и в неё по каплям добавлялся боргидрид натрия. Затем смесь выдерживалась при комнатной температуре в течение 1 ч, охлаждалась до 5<sup>0</sup>С и доводилась 10% серной кислотой до рН=5. Из полученной реакционной смеси этилацетатом экстрагировался побочный продукт, образующийся при восстановлении избытка ферроценкарбальдегида – ферроценметанол, основной продукт в этилацетате нерастворим. Далее смесь переносилась в избыток этилового безводного спирта, упаривалась на ротационном испарителе и фильтровалась от выпавшего сульфата натрия. Затем смесь упаривалась, продукт выкристаллизовывался в виде желтых мелких кристаллов, которые растворялись в воде при добавлении небольшого избытка поташа. Структура была подтверждена <sup>1</sup>HNMR и масспектрометрией (Рисунок 32)

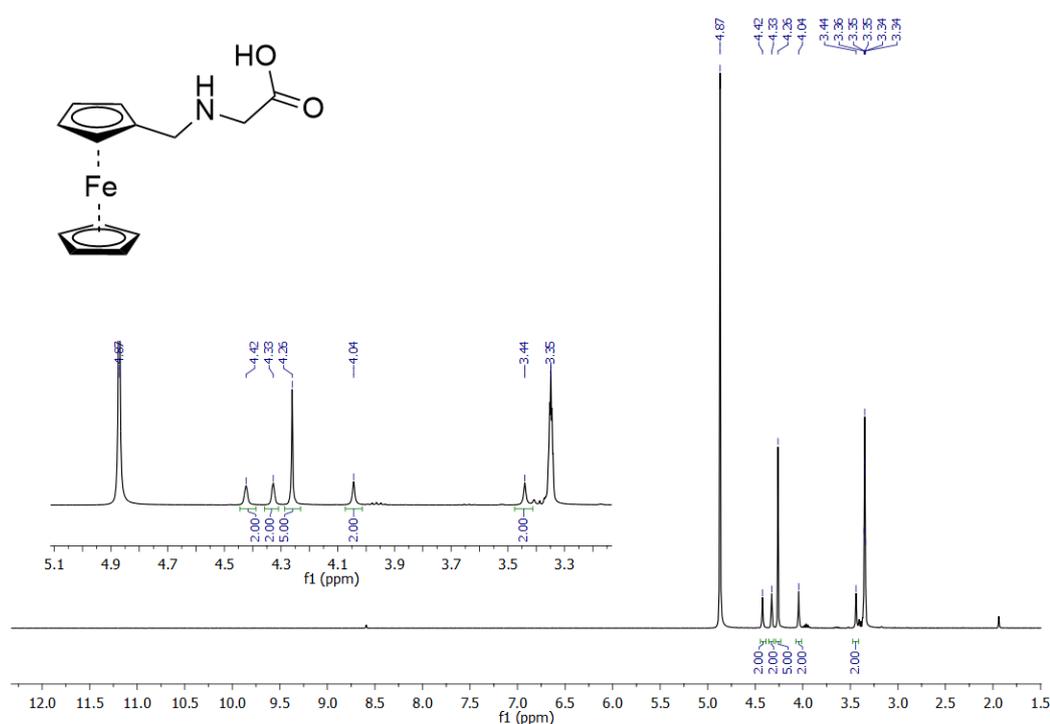


Рисунок 32 - <sup>1</sup>H ЯМР спектр N-ферроценилметилглицина

<sup>1</sup>H ЯМР измерения были проведены в ресурсном центре «Магнитно-резонансные методы исследования» ресурсного парка СПбГУ на приборе Bruker 400 МГц Avance.

Полученный <sup>1</sup>H ЯМР спектр подвергается однозначной интерпретации. Отчётливо выделяются 7 сигналов, два из которых соответствуют химическим сдвигам растворителя – дейтерометанола (синглет с δ 4.87 и квинтет с δ 3.35). Оставшиеся 5 пиков были проинтегрированы и отнесены к протонам N-

ферроценилметилглицина. Протоны замещённого циклопентаденильного кольца имеют различное химическое окружение, и, как следствие, имеют различные химические сдвиги: сигналы двух протонов в  $\alpha$ -положении к метиленовой группе при атоме азота глицина сдвинуты в область более слабого поля за счёт дезэкранирования (4.42, s, 2H). Протоны, находящиеся в  $\beta$ -положении к данной метиленовой группе находятся в более сильном поле (4.33, s, 2H), и химический сдвиг их сигналов ближе к сигналам протонов незамещённого циклопентаденильного кольца (4.26, s, 5H). Метиленовая группа, находящаяся между двумя дезэкранирующими группами: вторичным атомом азота и циклопентаденильным кольцом имеет сигнал, смещённый в сильное поле (4.04 s, 2H). Метиленовая группа в составе глицидного фрагмента имеет типичный для данного положения химический сдвиг (3.44 s, 2H). Сигналы протонов карбоксильной группы и вторичного атома азота имеют слишком широкую форму, из-за чего их выделение в самостоятельные сигналы на спектре не представляется возможным.

Наличие продукта конденсации ферроценкарбальдегида с глицином подтверждается отсутствием сигнала карбонильного атома водорода исходного ферроценкарбальдегида в диапазоне  $\delta$  9.0-10.0. Полнота дальнейшего восстановления полученного имина ферроценкарбальдегида с глицином до N-ферроценилметилглицина подтверждается консистентным соотношением интегральных площадей сигнала метиленовой группы при циклопентаденильном кольце и сигналов самих колец.

По аналогичной методике было получено производное аминоксановой кислоты. Масс-спектр соединения в омыленной поташем форме показала соответствующую массу M+N и M+K, а также (Рисунок 33)



имеет химический сдвиг, смещённый в сильное поле (4.05, s, 2H). Оставшиеся метиленовые группы фрагмента аминокснковой кислоты представлены четырьмя пиками. Метиленовая группа, примыкающая к вторичному атому азота имеет наиболее сильнопольный сдвиг (2.92, t, 2H). CH<sub>2</sub>-группа в α-положении к карбоксильной группе может быть отнесена к сигналу в более слабом поле (2.25, t, 2H). Оставшиеся три метиленовые группы имеют близкие по значению химические сдвиги, характерные для алифатических фрагментов, и могут быть отнесены к сигналам: δ 1.65 (4H), δ 1.39 (2H).

Наличие продукта конденсации ферроценкарбальдегида с аминокснковой кислотой подтверждается отсутствием сигнала карбонильного атома водорода исходного ферроценкарбальдегида в диапазоне δ 9.0-10.0. Полнота дальнейшего восстановления полученного имина ферроценкарбальдегида с аминокснковой кислотой до N-ферроценилметиламинокснковой кислоты подтверждается консистентным соотношением интегральных площадей сигнала метиленовой группы при циклопентадиенильном кольце и сигналов самих колец.

### 3 Разработка методов анализа соединений с близким окислительно-восстановительным потенциалом и разными коэффициентами диффузии и их смесей

#### 3.1 Способ представления данных для интерпретации результатов электрохимического анализа

В зависимости от того, какого характера информация об анализируемой смеси известна а priori, рационально использовать различные способы представления результата анализа. Так, если заранее известен качественный состав смеси, включающий сведения обо всех имеющих место электрохимически активных компонентах, наиболее рационально представление данных в виде вектора, содержащего значения концентраций этих известных компонентов, или гистограммы. Если же заранее не известно, какими электрохимическими и транспортными характеристиками обладают входящие в состав смеси вещества, а также количество индивидуальных редокс-пар, такой способ представления данных, очевидно, не может быть применен. В отсутствие сведений о качественном составе смеси (исключая информацию о том, что все компоненты смеси имеют близкие электрохимические потенциалы), способ представления данных должен отвечать требованиям возможности проведения качественного анализа наряду с количественным.

В этом последнем случае удобно воспользоваться способом представления данных в виде дифференциальной функции распределения концентрации в координатах, отражающих электрохимические и транспортные свойства. Вполне очевидно, что в случае наличия в системе конечного множества индивидуальных редокс-пар, эта функция будет представлять собой сумму  $\delta$ -функций вида:

$$\varphi(E_0, k_0, D, \dots) = \sum_i C_i \delta(E_0 - E_{0,i}; k_0 - k_{0,i}; D - D_i; \dots) \frac{1}{[E_0] \cdot [k_0] \cdot [D] \dots}$$

.....Уравнение 11

В случае же, когда в системе присутствует множество веществ, обладающих также и близкими коэффициентами диффузии, такими, что два ближайших друг к другу элемента этого множества можно считать неразличимыми, функцию



левой части  $i(t)$  (уравнение 13) могут привести к сколь угодно большим отклонениям искомой функции  $\varphi(D)$ . В случае, если известна погрешность  $\Delta$  экспериментально определяемой функции  $i_\Delta(t)$ , для истинного единственного решения  $\varphi(D)$  известно [17], что при точно заданной  $f(D,t)$  порождаемая ей функция  $i(t)$  отстоит от приближенно известной  $i_\Delta(t)$  на величину  $\Delta$ . Поскольку существует множество функций  $\varphi_\Delta(D)$ , удовлетворяющих данному условию, необходим критерий отбора, позволяющий выбрать среди этого множества функций такую, которая наилучшим образом удовлетворяет известным заранее свойствам функции  $\varphi(D)$ . Нахождение такой функции  $\varphi_r(D)$  (регуляризованного решения) осуществляется при помощи регуляризующего оператора.

В случае нахождения решения в виде непрерывной гладкой функции, регуляризующий оператор может быть построен по принципу минимизации регуляризующего функционала  $M$  (уравнение 14).

$$M(\alpha) = \int_{t_{min}}^{t_{max}} \left( \int_{D_{min}}^{D_{max}} \varphi_r(D) f(D, t) dD - i_\Delta(t) \right)^2 dt + \alpha \int_{D_{min}}^{D_{max}} \left( p(D) \cdot \varphi_r^2(D) + q(D) \cdot \left( \frac{d\varphi_r}{dD} \right)^2 \right) dD \dots\dots\dots \text{Уравнение 14}$$

Первое слагаемое, входящее в функционал  $M$  представляет собой невязку между измеряемым неточным сигналом  $i_\Delta(t)$  и функцией  $i_r(t)$ , порождаемой функцией распределения  $\varphi_r(D)$ . Второе слагаемое представляет собой так называемый стабилизирующий функционал, минимизация которого отдельно от первого слагаемого приводит к нахождению наиболее гладкой функции среди  $\varphi_r(D)$ . Параметр регуляризации  $\alpha$  является свободным и может быть определен по невязке исходя из равенства невязки (первое слагаемое правой части уравнения 15) величине  $\Delta$ , если она известна экспериментально. Подбор параметра регуляризации по невязке осуществляется путем вычисления регуляризованных решений при различных значениях параметра и выборе среди них такого, которое удовлетворяло бы описанному требованию с заданной точностью. Возможность подбора параметра регуляризации по невязке связана с тем, что последняя является неубывающей функцией от  $\alpha$  [17].

Итерационный подход к построению регуляризующего оператора, реализуемый в данной работе, основан на модификации неотрицательных функций  $p(D)$  и  $q(D)$  путем увеличения их значений после каждой итерации в тех частях

области определения, где найденная функция  $\varphi_{r,\alpha}(D)$ , представляющая собой регуляризованное решение, не удовлетворяет некоторым требованиям. Первый этап итерационного построения  $M$  сводится к введению увеличенных значений  $p(D)$  и  $q(D)$  в тех областях, где в ходе выполнения итерации были обнаружены отрицательные значения, что объясняется требованием неотрицательности функции распределения концентрации по параметрам. Второй этап необходим для отыскания максимумов функции распределения и введения увеличенных значений  $p(D)$  в тех частях области определения, которые наиболее отстоят от ближайшего к ним максимума. В результате применения двухэтапного итерационного построения регуляризующего оператора реализуется нахождение регуляризованного решения  $\varphi_{r,\alpha}(D)$ , отвечающего требованиям неотрицательности функции распределения и узости составляющих ее пиков.

В случае, когда про функцию  $\varphi(D)$  известно, что она не состоит из конечного множества узких  $\delta$ -образных максимумов (например, при анализе молекулярно-массового распределения электрохимически активных полимеров), применение второго этапа итерационного построения регуляризующего оператора не требуется. В случае, если анализ экспериментальных кривых не предполагает возможность оценки отклонения исследуемой зависимости от истинной, вместо подбора параметра регуляризации по невязке использовался метод определения квазиоптимального  $\alpha$  на основании критерия наибольшей устойчивости (минимизации нормы производной функции  $\|d\varphi_{r,\alpha}(D)/d\log(\alpha)\|$ ).

Для реализации описанных алгоритмов получения регуляризующих операторов был использован язык программирования Python и библиотеки NumPy [19] и SciPy [20].

### **3.3 Исследование электрохимического поведения ансамблей ультрамикроразрозродов полученных темплатным методом и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами.**

Для электродов полученных нанесением перфорированного слоя ксерогеля диоксида титана на поверхность кремния покрытого слоем золота были зарегистрированы циклические вольтамперограммы ферроценметанола в воде в

фосфатном буфере: экспериментальные данные (Рисунок 35) не дают однозначной информации о справедливости модели применительно к системе, полученной на практике, поскольку наблюдаются существенные отклонения от предложенной ранее модели, что, вероятно, связано с протеканием побочных процессов, таких как зарядка двойного электрического слоя в порах ксерогеля. В результате кривые имеют значительное уширение, которое можно связать с высокой ёмкостью абсолютно не характерной для ультрамикроразрядов.

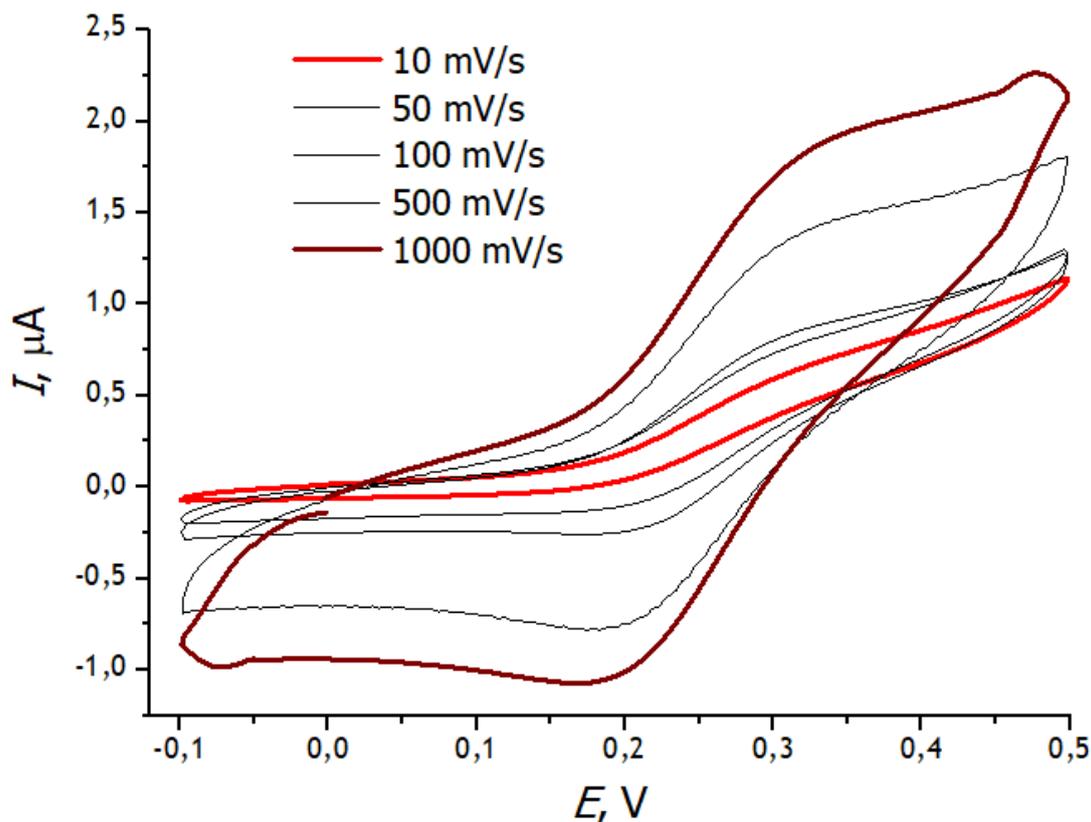


Рисунок 35 - Экспериментальные ЦВА микроэлектродного ансамбля, полученного методом темплатного синтеза.

Исследования ультрамикроразрядов возвышающихся над поверхностью слоя изолятора показали другую картину: в силу того, что электроды состояли из серебра они не обладали инертностью золотых электродов, однако как было показано в публикации [21] ток растворения серебряного рабочего электрода зависит от концентрации вещества, содержащего сульфогидрильную группу, в силу окислительно-восстановительного процесса, переводящего две сульфогидрильные группы в дисульфидный мостик.

Для анализа электрохимического поведения на образце с микрочастицами серебра взаимодействием  $\sim 25$  мкм были зарегистрированы циклические вольтамперограммы цистеина концентрацией  $10^{-6}$  М в фосфатном буфере рН=6 (Рисунок 36), выявившие отклик на аналит, при этом данные электроды уже не обладали высокой ёмкостью, что характерно для микроэлектродов в целом.

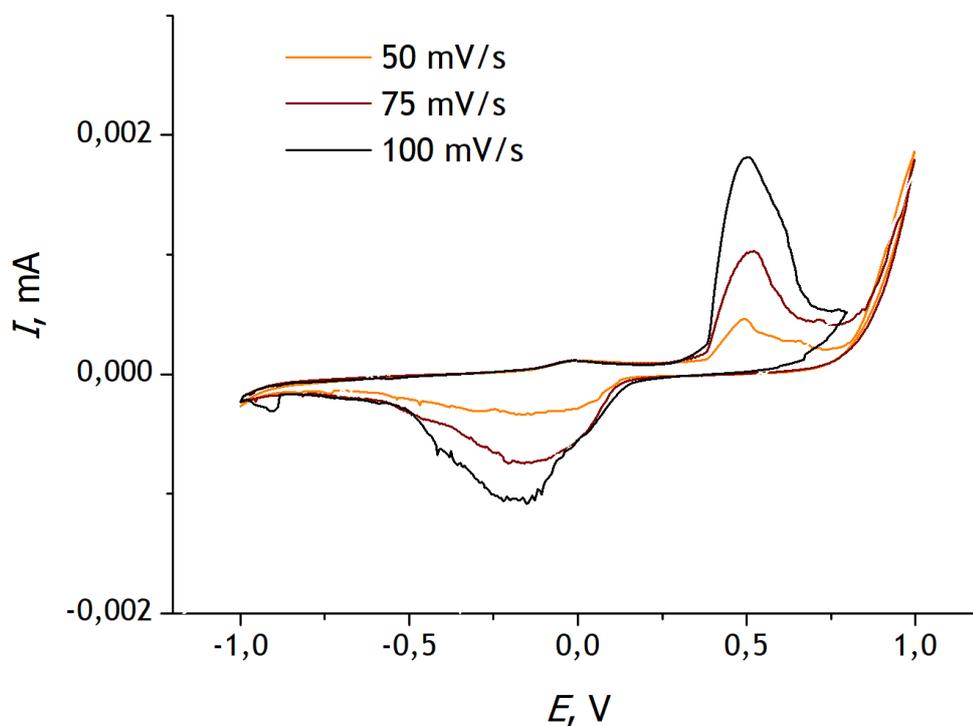


Рисунок 36 - ЦВА цистеина при скоростях 50, 75 и 100 мВ/с

Однако изменение формы кривой характерное для планарных электродов указывало на то, что отдельные ультрамикроэлектроды имели сильное пересечение полусфер диффузии в ходе увеличения потенциала. Таким образом данный подход хоть и может представлять интерес для анализа аминокислот с сульфгидрильной группой в силу малой ёмкости электрода, но из-за отсутствия изменения формы кривой в сигмоидальную данный материал не пригоден для решения поставленной задачи.

### 3.4 Оптимизация способа моделирования электрохимического отклика ансамбля ультрамикроэлектродов

В первую очередь, производилась оценка влияния способа моделирования (в трехмерной системе координат с учетом симметрии или двухмерная с

использованием снижения размерности путем аппроксимации трансляционного многоугольника кругом эквивалентной площади) на сходимость модели.

В обоих случаях для получения численного решения была использована среда для моделирования в конечных элементах COMSOL Multiphysics®, модуль «Транспорт химических веществ» (Chemical Species Transport).

Для сравнения способов представления задачи, были построены циклические вольтамперограммы модельной редокс-пары, имеющей стандартный электродный потенциал 0.24 В, коэффициент диффузии обоих компонентов пары  $7.4 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с, обменный коэффициент  $\alpha=0.5$  и константу скорости электродного процесса 0.05 см/с. Была выбрана скорость развертки 50 мВ/с, равновесный потенциал для установления начальных условий эксперимента, равный 0.25 В, диапазон потенциалов 0.01-0.5 В. Модельная ЦВА формировалась в течение 5 циклов. Общая концентрация компонентов редокс-пары была выбрана равной 1 М. Усредненная плотность тока ансамбля УМЭ рассчитывалась из отношения интегрального тока электрода к площади ячейки. Межэлектродные расстояния в ансамблях УМЭ при расчете составили 10, 20, 50 и 100 мкм.

Задание граничного условия при поверхности электрода соответствовало ГУ 3-го рода на основании уравнения Батлера-Фольмера (уравнение 15) с заданием пилообразной временной зависимости потенциала электрода (Рисунок 37), отвечающей условиям проведения ЦВА.

$$D_{red} \frac{\partial C_{red}}{\partial z} = -D_{ox} \frac{\partial C_{ox}}{\partial z} = k_0 [C_{red} e^{\alpha \frac{nF}{RT}(E(t)-E_0)} - C_{ox} e^{-(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E(t)-E_0)}] \dots \dots \dots \text{Уравнение 15}$$

При необходимости моделирования иного метода анализа может быть задана соответствующая функция E(t), что не потребует замены самого граничного условия.

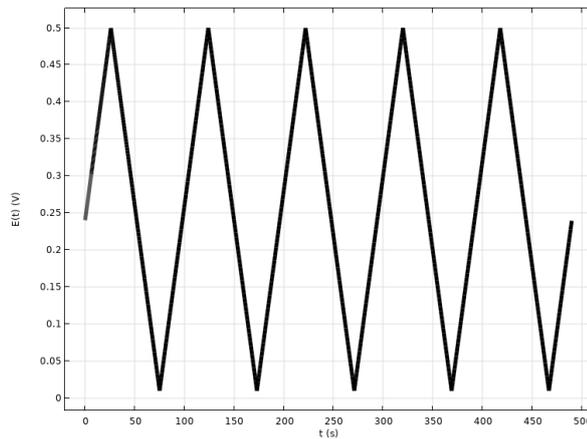


Рисунок 37 – Форма пилообразной временной зависимости потенциала электрода от времени, используемой при расчете ЦВА

В случае геометрии с осевой симметрией использовалась прямоугольная картированная сетка с переменным размером элемента. Размер элемента задавался с экспоненциальным увеличением по мере удаления от поверхности электрода. При моделировании трехмерной диффузии использовалась трансляция граничной треугольной сетки, сформированной на верхних и нижних параллельных гранях области расчета. В результате трехмерная сетка представляла собой набор треугольных призм. Размерное выражение для зависимости размера элемента от удаления от поверхности электрода использовалось то же, что и в случае с двумерной постановкой задачи с осевой симметрией. По умолчанию использовались базисные полиномы первого порядка. Расчетные сетки двумерной и трехмерной моделей представлены ниже (Рисунок 38).

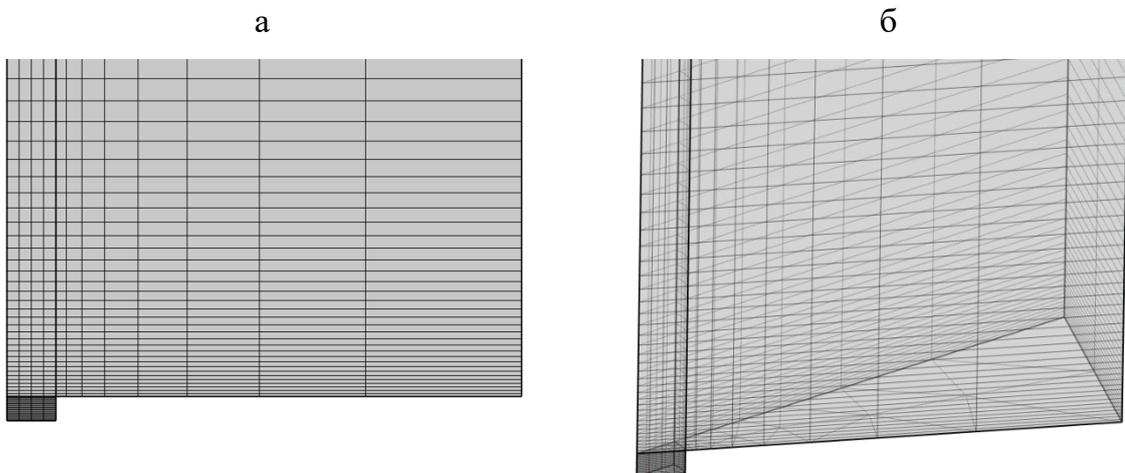


Рисунок 38 – Расчетные сетки в двумерной модели с осевой симметрией (а) и в трехмерной модели (б)

При моделировании равновесных электродных реакций вместо уравнения Батлера-Фольмера может быть применено условие Дирихле, связывающее концентрации окисленной и восстановленной форм вещества с потенциалом через уравнение Нернста. Использование условия Дирихле позволяет универсализировать решение дифференциального уравнения, поскольку последнее в этом случае будет представлять собой свертку первой производной по времени временной зависимости концентрации на поверхности электрода с функцией двух переменных (времени и коэффициента диффузии), вид которой будет индивидуальным для каждого ансамбля УМЭ и может быть получен при изучении хроноамперометрической кривой, как рассчитанной путем численного моделирования, так и выявленной экспериментальным путем (функция  $g(\tau, D)$  уравнение 16). Хроноамперометрическая кривая, полученная при постоянном потенциале, будет являться сверткой функции  $g(t, D)$  с дельта-импульсом производной поверхностной концентрации, что позволяет без труда найти  $g(t, D)$ . Результат применения теоремы о свертке для представления вольтамперного отклика в виде интегрального уравнения можно найти в монографии М.Р. Вяселева [22].

$$i(t) = -nF \sqrt{\frac{D_{red}}{\pi}} \int_0^t \frac{dC_{red}(0,\tau)}{d\tau} g(t - \tau, D_{red}) d\tau \dots \dots \dots \text{Уравнение 16}$$

Для проверки сходимости результатов моделирования, полученных при использовании трехмерной и двумерной геометрии, были построены ЦВА ансамблей ультрамикроэлектродов с межэлектродными расстояниями 10, 20, 50 и 100 мкм (подробнее о параметрах системы см. экспериментальные и расчетные методы). Соответствующие кривые приведены ниже (Рисунок 39).

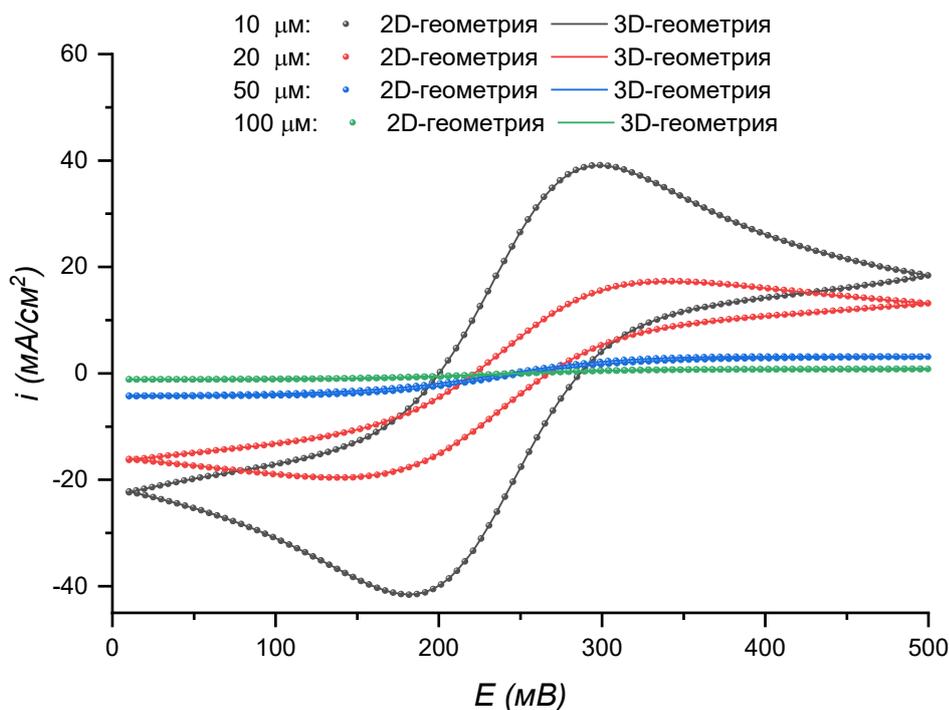


Рисунок 39 – Циклические вольтамперограммы, полученные в трехмерной модели (сплошные линии) и двумерной модели с осевой симметрией (точки)

Представленные кривые представляют весь диапазон от типичных нестационарных ЦВА (ансамбль с расстоянием 10 мкм) через переходные формы (20, 50 мкм) до типичных стационарных сигмоидальных кривых (100 мкм). Для сравнения результатов вычислялась интегральная относительная невязка между результатами моделирования двумя способами по формуле интегрирования с квадратом (уравнение 17).

$$\rho = 100\% \cdot \sqrt{\frac{\int [i_{3D}(E) - i_{2D}(E)]^2 dE}{\int i_{3D}^2(E) dE}} \dots \dots \dots \text{Уравнение 17}$$

Невязки, вычисленные по уравнению 25, между результатами моделирования в двумерной и трехмерной геометрии для ансамблей с межэлектродными расстояниями 10, 20, 50 и 100 мкм составили, соответственно, 0.09%, 0.39%, 0.37% и 0.41%. Общее время расчета с использованием среды COMSOL Multiphysics для двух наборов из четырех ЦВА составило 7 мин 36 сек в случае трехмерной геометрии и 43 сек в случае двумерной геометрии с осевой симметрией, что означает 90% экономии времени на вычисления при более чем 99.5% сходимости результатов расчета. Это указывает на рациональность использования метода понижения размерности.

Дальнейшая оптимизация методики расчета производилась на основании исследования на сеточную сходимость при различных порядках базисного полинома метода конечных элементов (дискретизация с порядком базисного полинома 1, 2 и 3). Модельные данные были получены для параметризованной сетки, размер элемента внутри каждого домена в которой обратно пропорционален параметру разбивки  $m$ , общему для всей модели. Особенности построения сетки подробнее описаны в разделе расчетных методов. Вид расчетных сеток, построенных при различных рассматриваемых параметрах разбивки  $m$  представлен ниже (Рисунок 40).

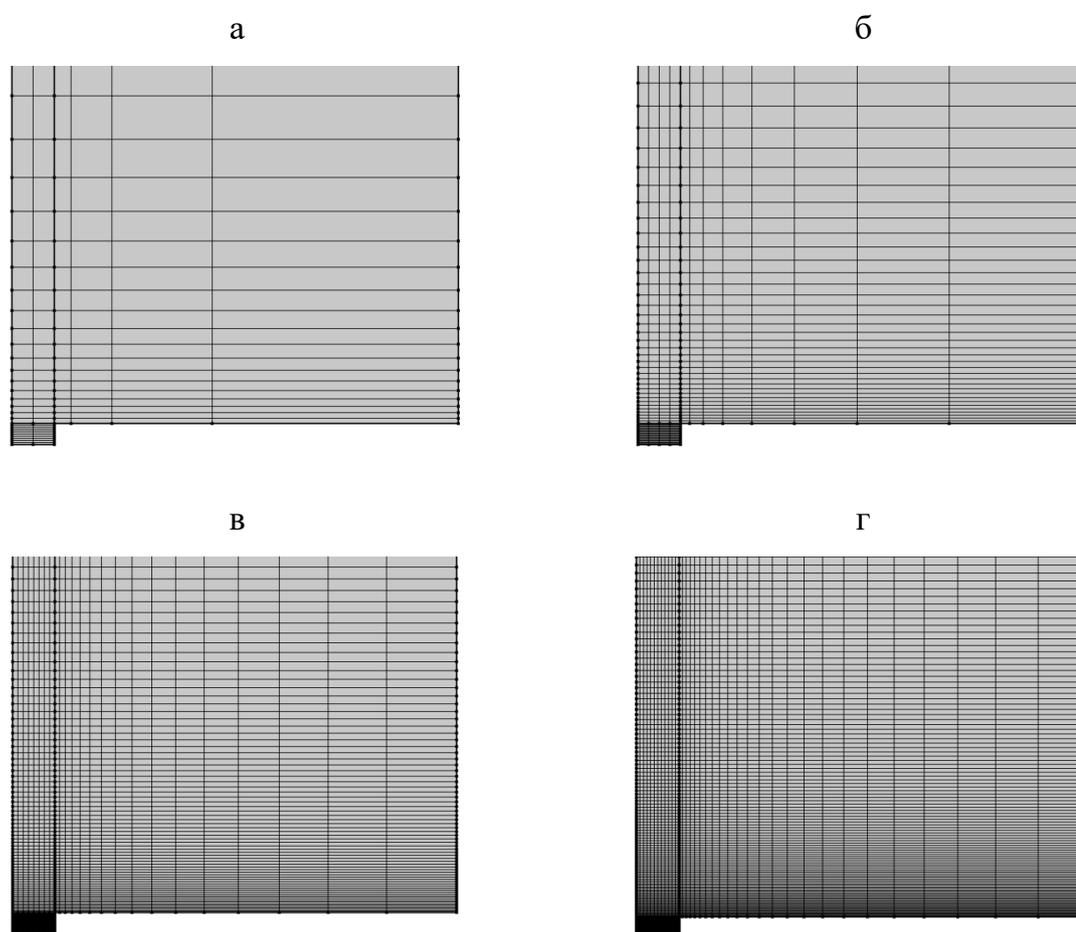


Рисунок 40 – Варианты расчетной сетки при параметрах разбивки 0.5 (а), 1 (б), 2 (в) и 3 (г)

Изменение качества модели по мере сгущения сетки отслеживалось на основании отклонения результата расчета от последнего (полученного на сетке с

наибольшим сгущением при наивысшем порядке базисного полинома) по метрике, представленной в уравнении 17.

Исследование на сеточную сходимость производилось для геометрии ансамбля с наивысшей невязкой по результатам сравнения с трехмерной геометрией (Рисунок 41).

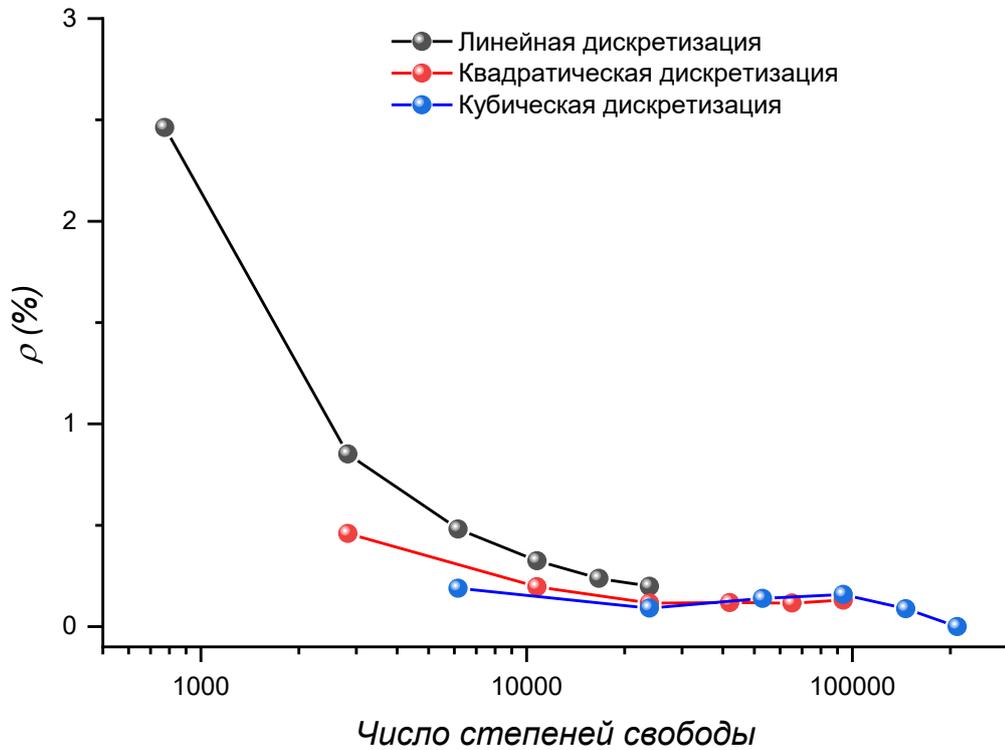


Рисунок 41 – Зависимость метрики  $\rho$  от числа степеней свободы при различных порядках базисного полинома

По результатам проверки на сеточную сходимость было решено использовать сетку с параметром разбивки 1.5 и порядком базисного полинома 2. При дальнейшем увеличении числа степеней свободы не наблюдается значимого увеличения сходимости, при этом время расчета возрастает по мере увеличения числа степеней свободы. Сравнение кривых, полученных для выбранной дискретизации задачи и эталонной кривой представлено на графике (Рисунок 42).

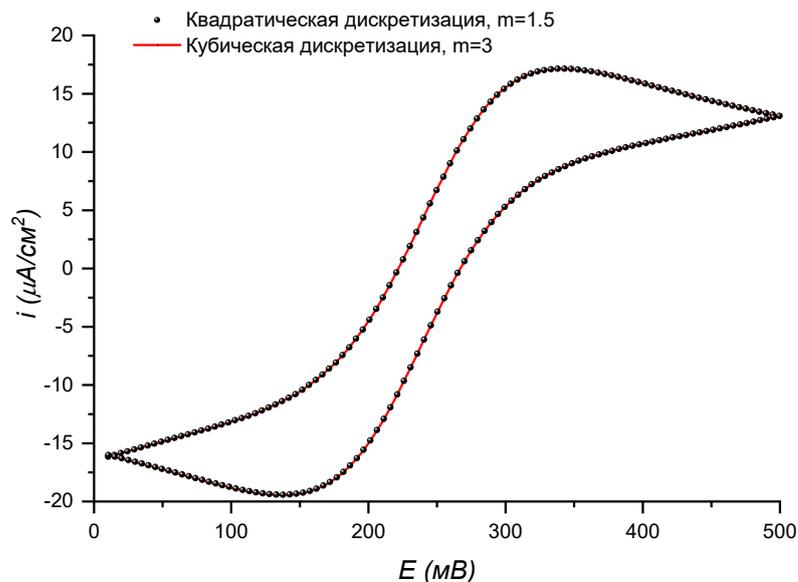


Рисунок 42 – Сходимость результатов, полученных при различных способах дискретизации задачи

### 3.5 Оптимизация геометрии ансамблей ультрамикроэлектродов, выбор способа измерения

В первую очередь, с целью подтверждения применимости электрохимических методов на основе ансамблей ультрамикроэлектродов, необходимо привести исследование линейной независимости функций  $f(D, t)$  (см. уравнение 14). В предельном случае равновесных концентраций веществ-участников электродного процесса на поверхности электродов, на основании теоремы о свертке, результат применения которой представлен в уравнении 22, а также исходя из линейности оператора свертки, для доказательства линейной независимости результатов вольтамперометрии с любой формой развертки по потенциалам достаточно доказательства линейной независимости функций  $g(t, D)$  (см. уравнение 22), полученных при разных  $D$ . Последнее может быть в силу линейности уже, в свою очередь, оператора преобразования Лапласа, выполнено для функции  $G(s, D)$ , что позволит существенно сократить время на вычисления путем замены уравнения нестационарной диффузии с зависимой переменной концентрации  $C(t, z, r)$  (уравнение 11.3) уравнением 18 с зависимой переменной  $\hat{C}(s, z, r) = \mathcal{L}[C(t, z, r)]$ .

$$s\hat{C} - C(0, z, r) = D\left(\frac{\partial^2 \hat{C}}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 \hat{C}}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial \hat{C}}{\partial r}\right) \dots \dots \dots \text{Уравнение 18}$$

Линейная независимость изучалась путем вычисления определителя Вронского как функции переменной  $s$  при различных расстояниях между электродами в ансамбле для наборов из 10 коэффициентов диффузии, расположенных равномерно внутри интервала. В качестве единой метрики линейной независимости функций в ансамбле использовался интеграл определителя Вронского по переменной  $s$ . Указанная метрика может быть также использована для сравнения ансамблей ультрамикродатчиков с различным расстоянием между электродами, поскольку чем ближе к нулю будет интегральная характеристика на основе определителя Вронского, тем меньше будет минимальный уровень погрешности, при котором функции вольтамперного отклика для разных коэффициентов диффузии нельзя будет различить между собой.

На графике (Рисунок 43) приведены зависимости интеграла определителя Вронского от расстояния между электродами в ансамбле для различных диапазонов коэффициентов диффузии.

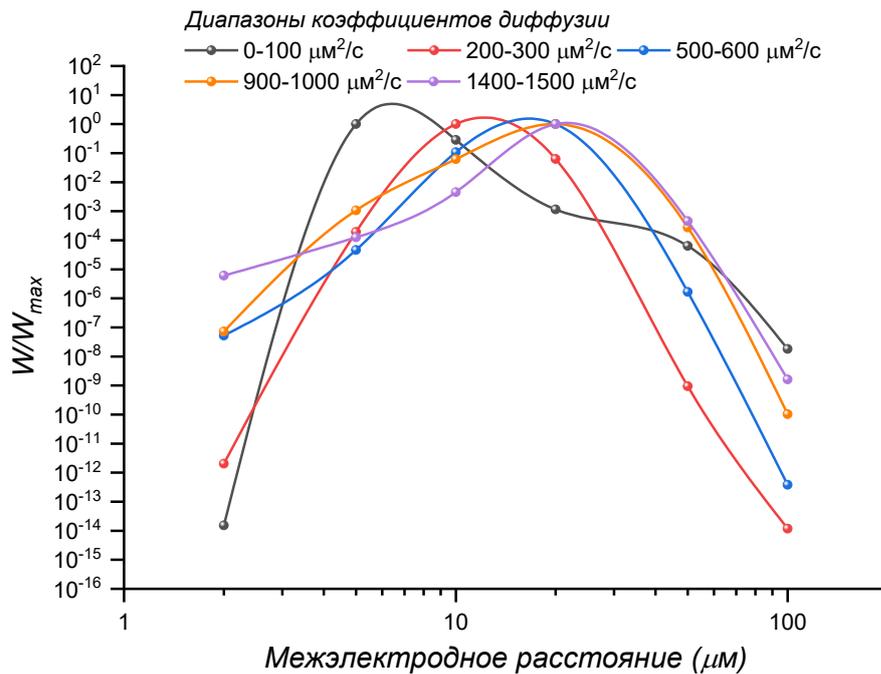


Рисунок 43 – Зависимость определителя Вронского от расстояния между электродами

Кроме очевидного неравенства нулю определителя Вронского для всех рассматриваемых конфигураций ансамблей, легко также заметить, что для каждого из диапазонов коэффициентов диффузии наблюдается достаточно резкий максимум (учитывая логарифмическую шкалу по оси ординат). Кроме того, положение этого

максимума смещается в сторону более существенных расстояний между электродами в ансамбле по мере того, как увеличивается среднее значение в диапазоне. Это объясняется способностью ансамблей ультрамикроэлектродов функционировать в двух предельных режимах, сравнимых по виду вольтамперных зависимостей с линейной полубесконечной диффузией и сферической полубесконечной диффузией. Проявление пространственных ограничений диффузии, следствием которого является возможность разрешения сигналов веществ с различными коэффициентами диффузии, наблюдается в переходном режиме, когда сферический профиль изоповерхностей концентрации сосуществует с плоским (Рисунок 44).

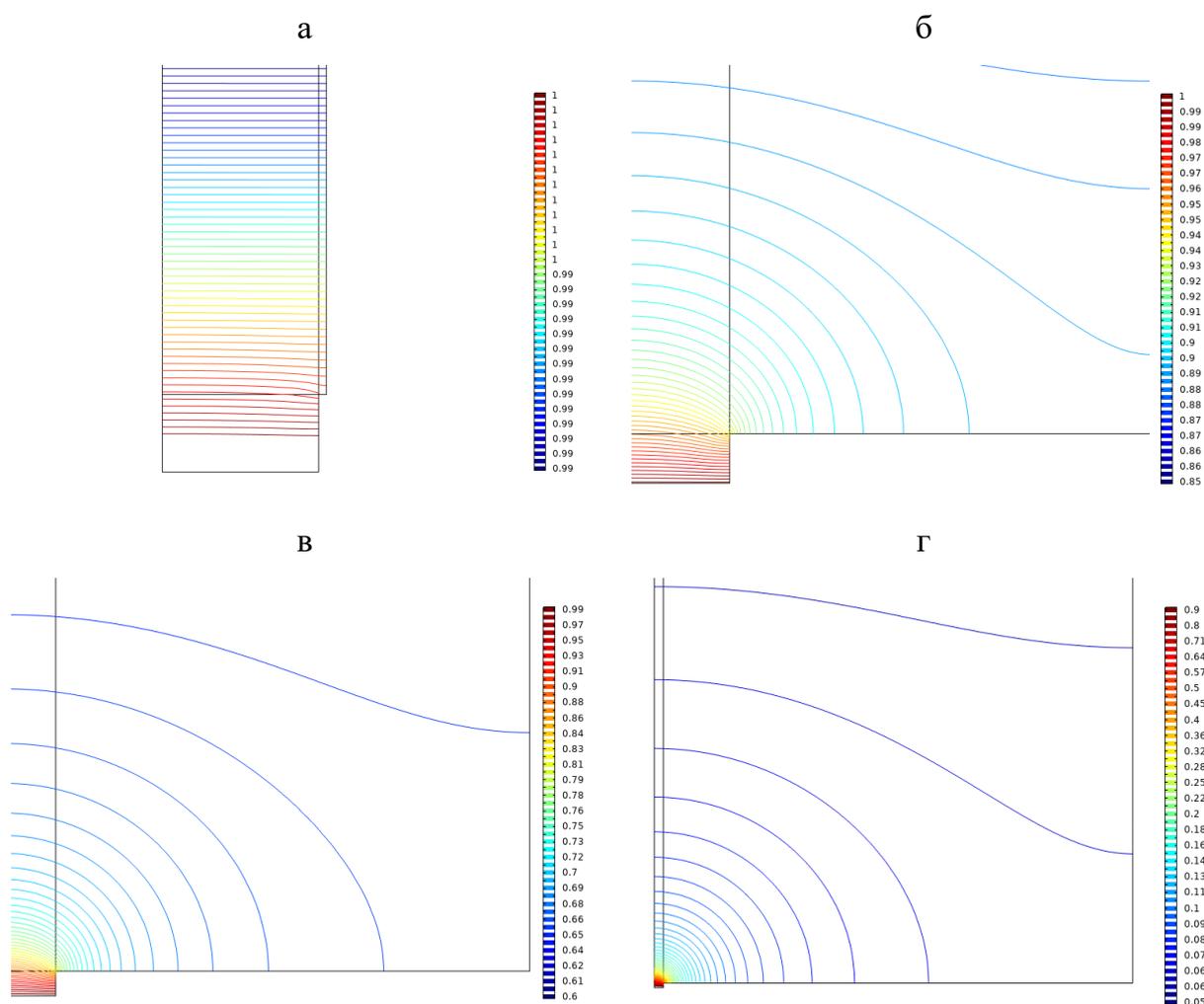


Рисунок 44 – Изолинии действительной части преобразования Лапласа концентрации при  $s=0.1(1/c)$  для ансамблей ультрамикроэлектродов с расстояниями 2  $\mu\text{m}$  (а), 10  $\mu\text{m}$  (б), 20  $\mu\text{m}$  (в) и 100  $\mu\text{m}$  (г) в безразмерном выражении

По мере увеличения расстояния между электродами, возрастает доля общего перепада концентраций между объемом раствора и поверхностью электрода, заключенная внутри области, в которой изолинии имеют форму дуги окружности. Эту область можно рассматривать как домен сферической диффузии. Ситуация наилучшего разрешения сигналов соответствует случаю, где около трети всего падения концентраций сосредоточено в области сферической диффузии (расстояние между электродами 20 мкм). Отклонение в сторону малых межэлектродных расстояний приводит к исчезновению сферического домена, в сторону больших – к исчезновению линейных доменов. Графики функций  $G(s, D)$ , характерных для обоих случаев представлены ниже (Рисунок 45).

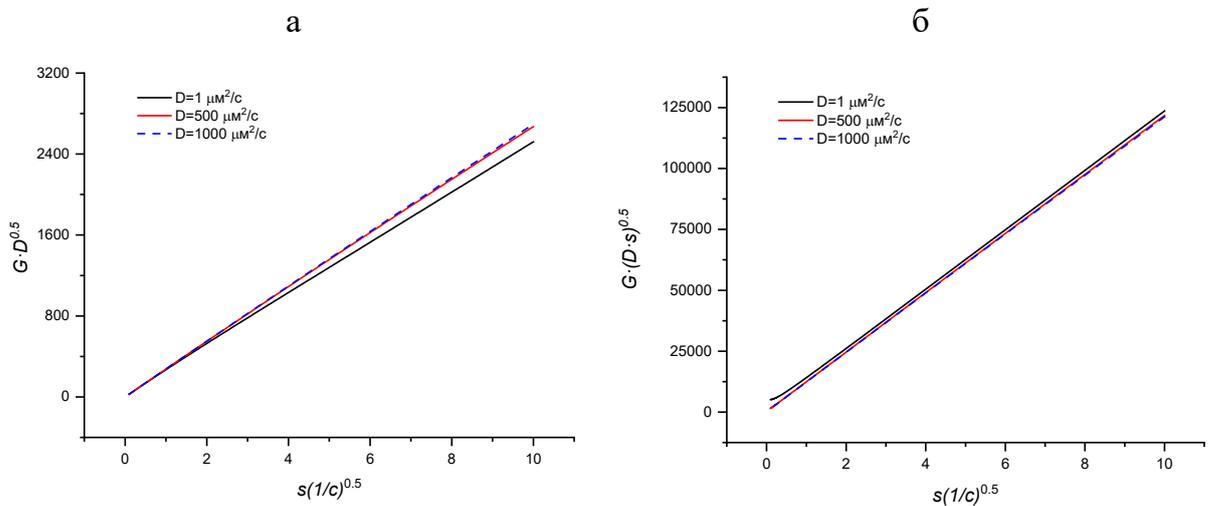


Рисунок 45 – Графики действительной части функций  $G(s,D)$  в случае преобладания линейных доменов (межэлектродное расстояние 2  $\mu\text{м}$ , а) и в случае преобладания сферического домена (межэлектродное расстояние 250  $\mu\text{м}$ , б)

При преобладании линейного домена, происходит линейаризация кривых при построении функции  $G$  от корня из частотной переменной  $s$ , что, при применении обратного преобразования Лапласа и свертке функции  $g(t,D)$  с дельта-импульсом потенциала приведет к уравнению Коттрелла, характерному для линейной полубесконечной диффузии. Нетрудно убедиться в линейной зависимости даже двух функций такого вида.

На графике (Рисунок 46) представлена зависимость интеграла определителя Вронского от межэлектродного расстояния для широкого диапазона коэффициентов диффузии ( $1 \cdot 10^{-12}$ - $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ).

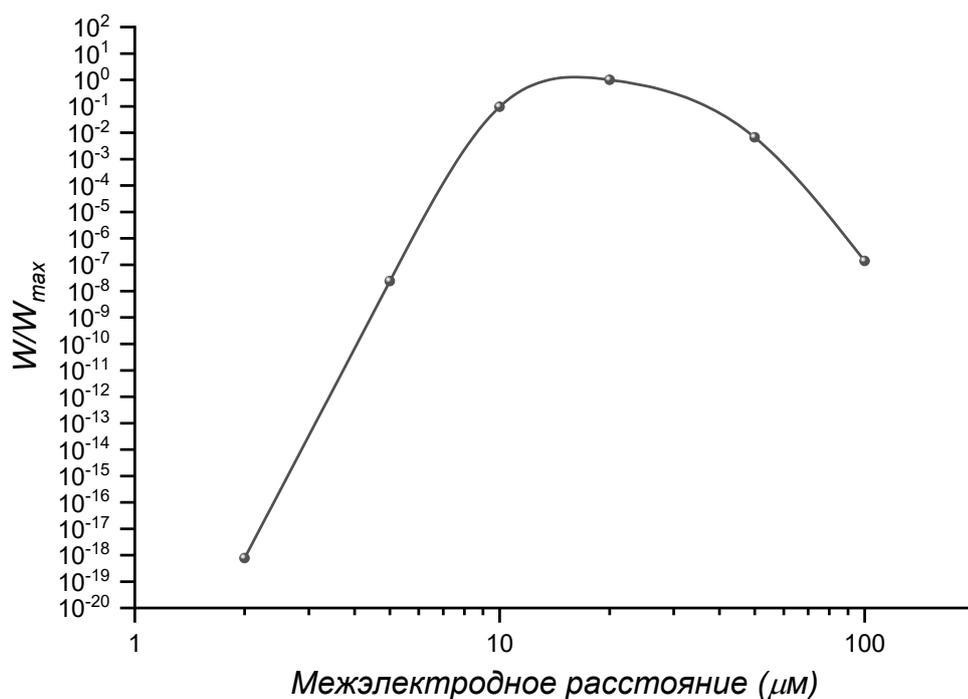


Рисунок 46 – Зависимость интеграла определителя Вронского от расстояния между УМЭ в ансамбле в диапазоне коэффициентов диффузии  $1 \cdot 10^{-12}$ - $1 \cdot 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с

Максимум зависимости интеграла определителя Вронского, определенного для указанного диапазона коэффициентов диффузии, от расстояния между электродами приходится на 20 мкм. Это хорошо соотносится с данными, полученными в работе [23].

Учитывая универсальность функции  $G(s, D)$  для любых вольтамперометрических методов при равновесной концентрации на поверхности электрода, линейная независимость сигналов веществ с различными коэффициентами диффузии при использовании ансамблей УМЭ может считаться подтвержденной. Дальнейший подбор оптимальных условий эксперимента, включающий варьирование различных временных разверток потенциала поверхности электрода, должен строиться на основании устойчивости результата анализа к малым отклонениям (погрешностям) экспериментальных данных.

Функции  $g(t, D)$  могут быть получены в критериальной форме  $\gamma(D \cdot t)$  зависимости функции  $g$  от квадрата «длины диффузии»  $D \cdot t$ . Сравнение результатов вычислений, проведенных для ансамбля ультрамикроразрозродов с межэлектродным расстоянием 20 мкм путем варьирования обоих параметров  $t$  и  $D$  и путем

варьирования фактора  $D \cdot t$  было проведено в диапазоне значений диффузионной длины от нуля до 700  $\mu\text{м}$  на выборке в 30000 точек. Ниже представлены (Рисунок 47) результаты сравнения.

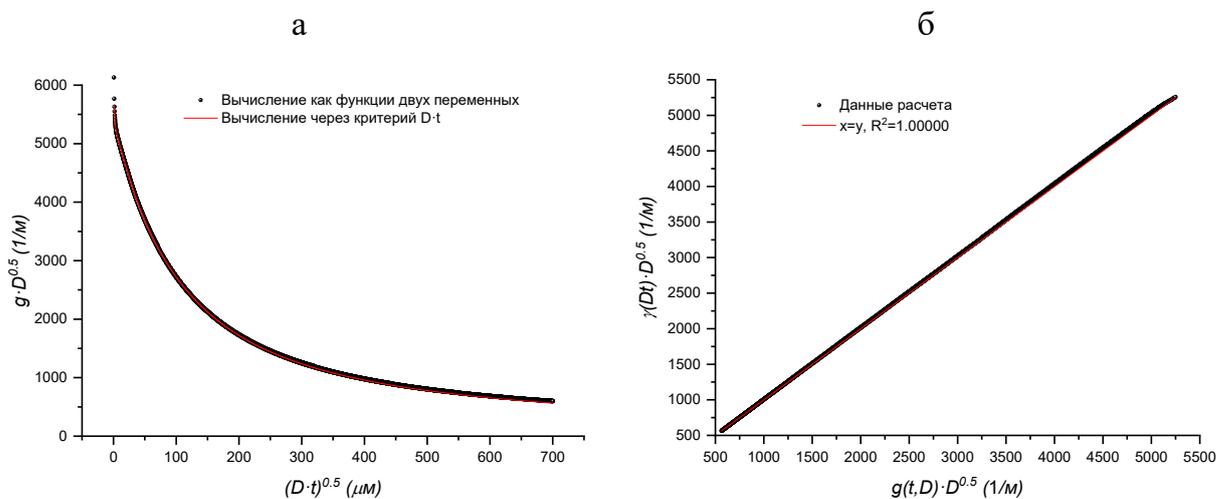


Рисунок 47 – Результаты сравнения функций  $g(t, D)$  и  $\gamma(D \cdot t)$ : зависимости ядра свертки от длины диффузии (а) и те же данные в виде зависимости  $\gamma(D \cdot t)$  от  $g(t, D)$  (б)

Использование длины диффузии позволяет использовать в качестве ядра для уравнения свертки  $\gamma(D \cdot t)$  как функцию одной переменной, уникальную для каждого из ансамблей ультрамикродов.

Для имитации погрешности экспериментальной аппаратуры использовались данные хроноамперометрии при постоянном потенциале и циклической вольтамперометрии, полученные для ферроцен-метанола на плоском золотом электроде с использованием потенциостата-гальваностата Elins P-40X. Использовались значения относительной погрешности в зависимости от времени от начала измерения. Для исследования устойчивости решения интегрального уравнения Фредгольма методом регуляризации варьировался средний уровень погрешности.

Для оценки отклонения рассчитанного состава от истинного использовались отклонения положения максимумов функции распределения, а также их интегралов соответствующих концентрации соответствующих веществ. В случае рассмотрения непрерывных функций распределения, рассчитывалась квадратичная невязка по формуле 25.

Для оценки общего уровня абсолютной погрешности входящего сигнала использовалась квадратичная метрика (уравнение 19).

$$\rho = \int_{t_{min}}^{t_{max}} [i(D, t) - i_{ист}(D, t)]^2 dt \dots \dots \dots \text{Уравнение 19}$$

Ниже (Рисунок 48) приведены результаты нахождения регуляризованного решения с использованием модельных хроноамперограмм при различных уровнях относительной погрешности.

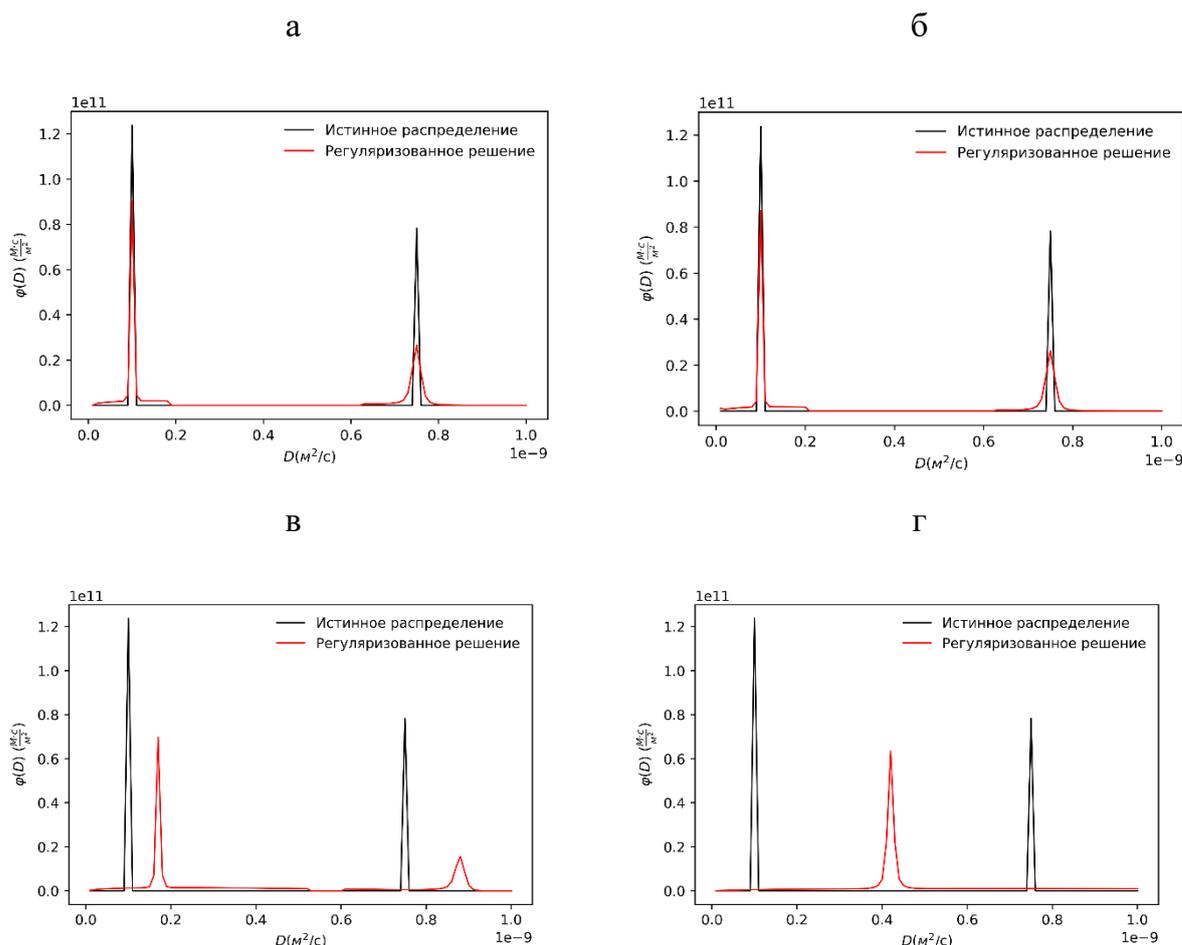


Рисунок 48 – Рассчитанные из хроноамперограмм функции  $\varphi(D)$  при уровнях относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г)

Можно отметить явную потерю устойчивости решения к малым отклонениям при уровне погрешности более  $1 \cdot 10^{-4}$ , поскольку число максимумов функции распределения, полученной методом регуляризации, не соответствует истине. Появление единственного максимума при высоких значениях уровня относительной погрешности связаны с возрастанием свободного параметра регуляризации, что приводит к сглаживанию соседних пиков. Чем выше погрешность и ближе

расположение максимумов, тем меньше вероятность получения решения в виде двух разделенных пиков.

Ниже (Рисунок 49) приведены модельные хроноамперограммы, полученные при тех же уровнях погрешности, а также аппроксимирующая функция, рассчитанная исходя из полученной функции распределения  $\varphi(D)$ .

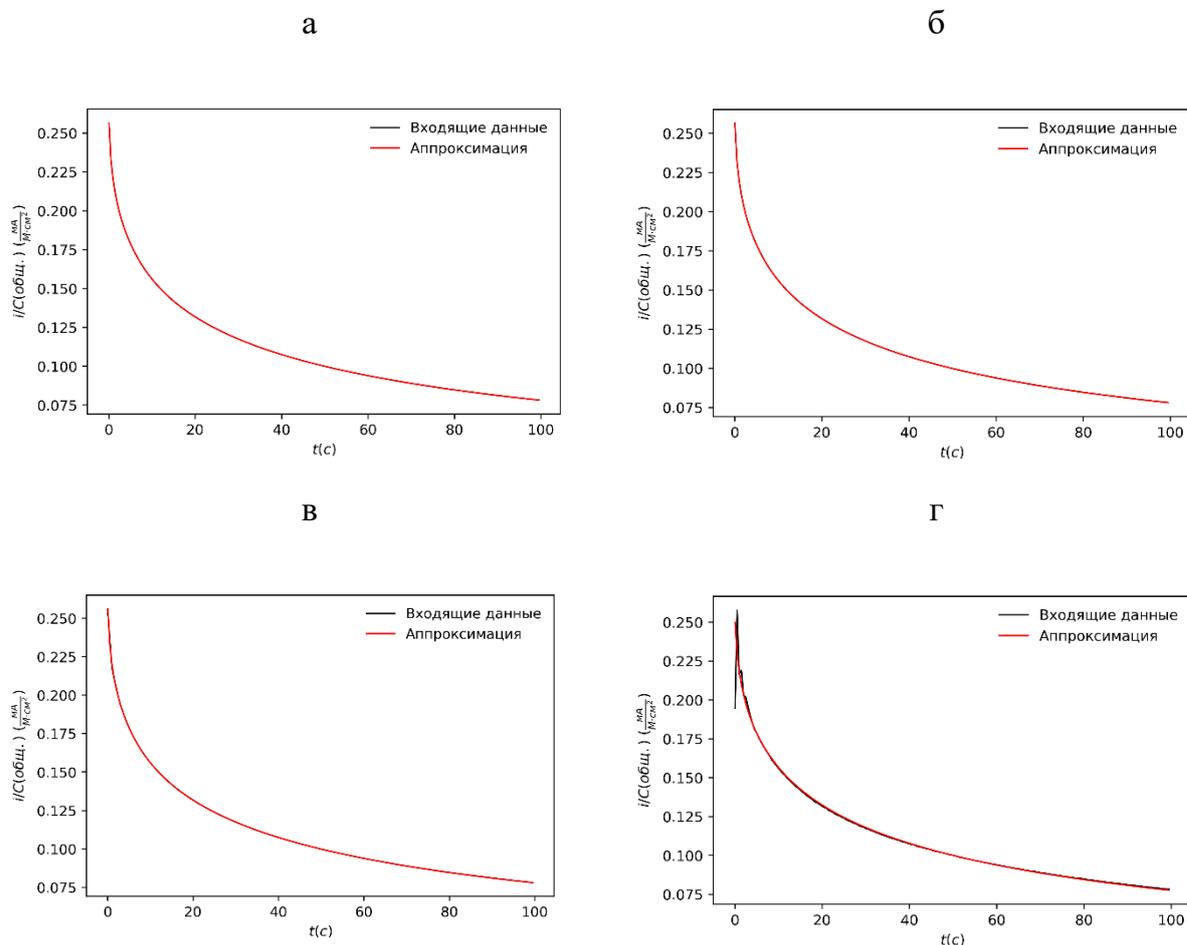


Рисунок 49 – Сравнение модельных хроноамперометрических кривых с результатом аппроксимации при уровнях относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г)

Регуляризованные решения (Рисунок 50) были получены из модельных циклических вольтамперограмм при различных уровнях погрешности.

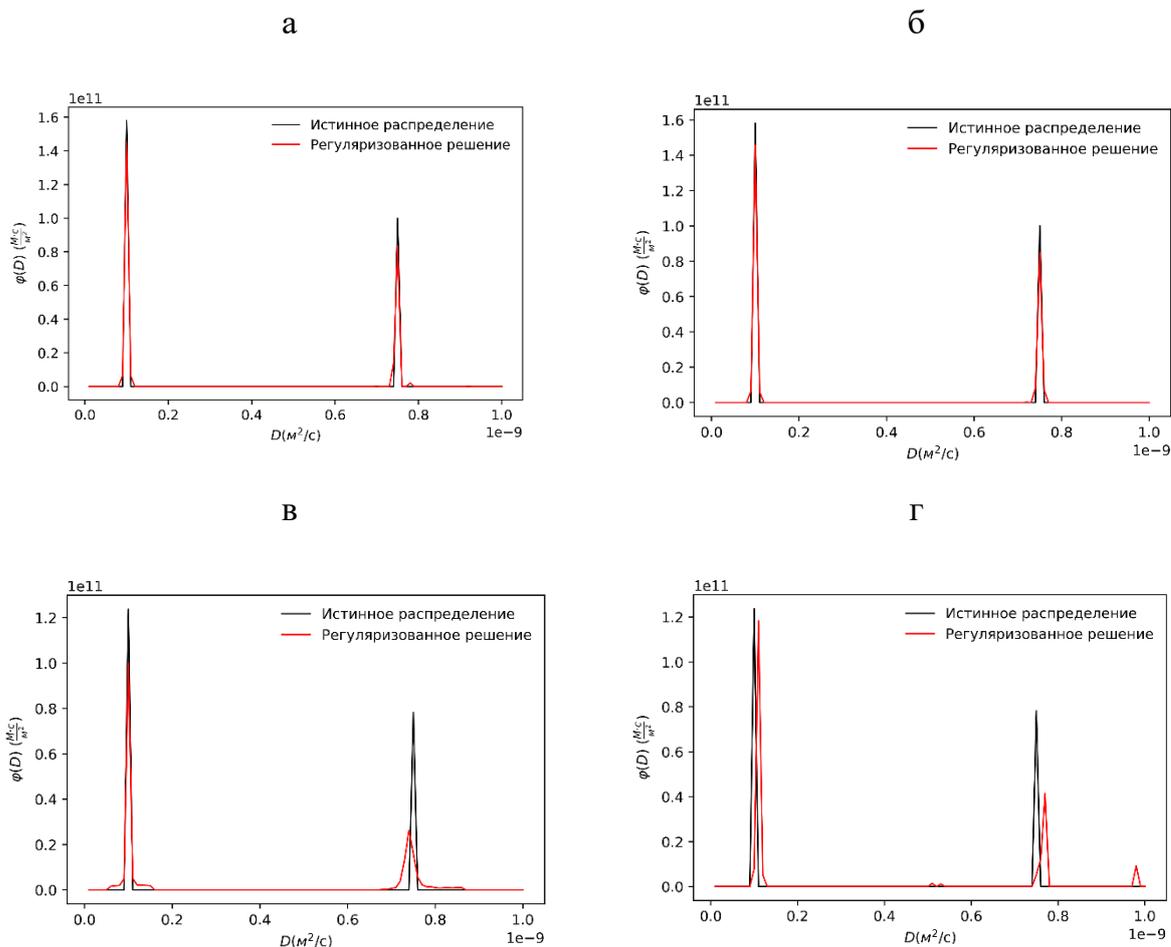


Рисунок 50 – Рассчитанные из модельных циклических вольтамперограмм функции  $\varphi(D)$  при уровнях относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г)

Можно отметить, что устойчивость положения пиков сохраняется при более высоких уровнях погрешности. Модельные циклические вольтамперограммы представлены ниже (Рисунок 51).

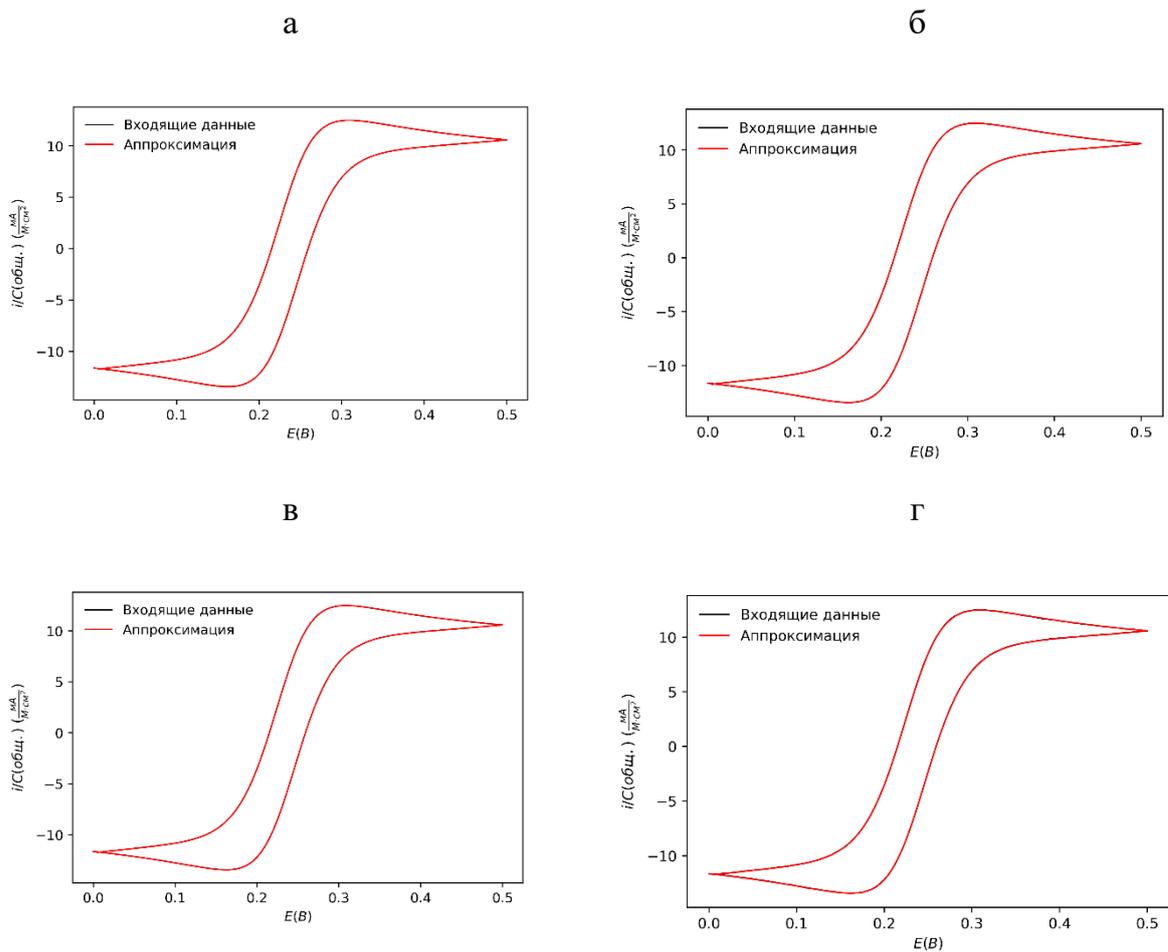


Рисунок 51 – Сравнение модельных циклических вольтамперограмм с результатом аппроксимации при уровнях относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г)

Ниже (Рисунок 52) представлены зависимости отклонений концентрации и положения пика, полученных при анализе модельных хроноамперограмм и циклических вольтамперограмм, от интегральной абсолютной ошибки. На рисунке отражены только данные для тех функций  $\varphi(D)$ , где число значимых максимумов соответствует истинному.

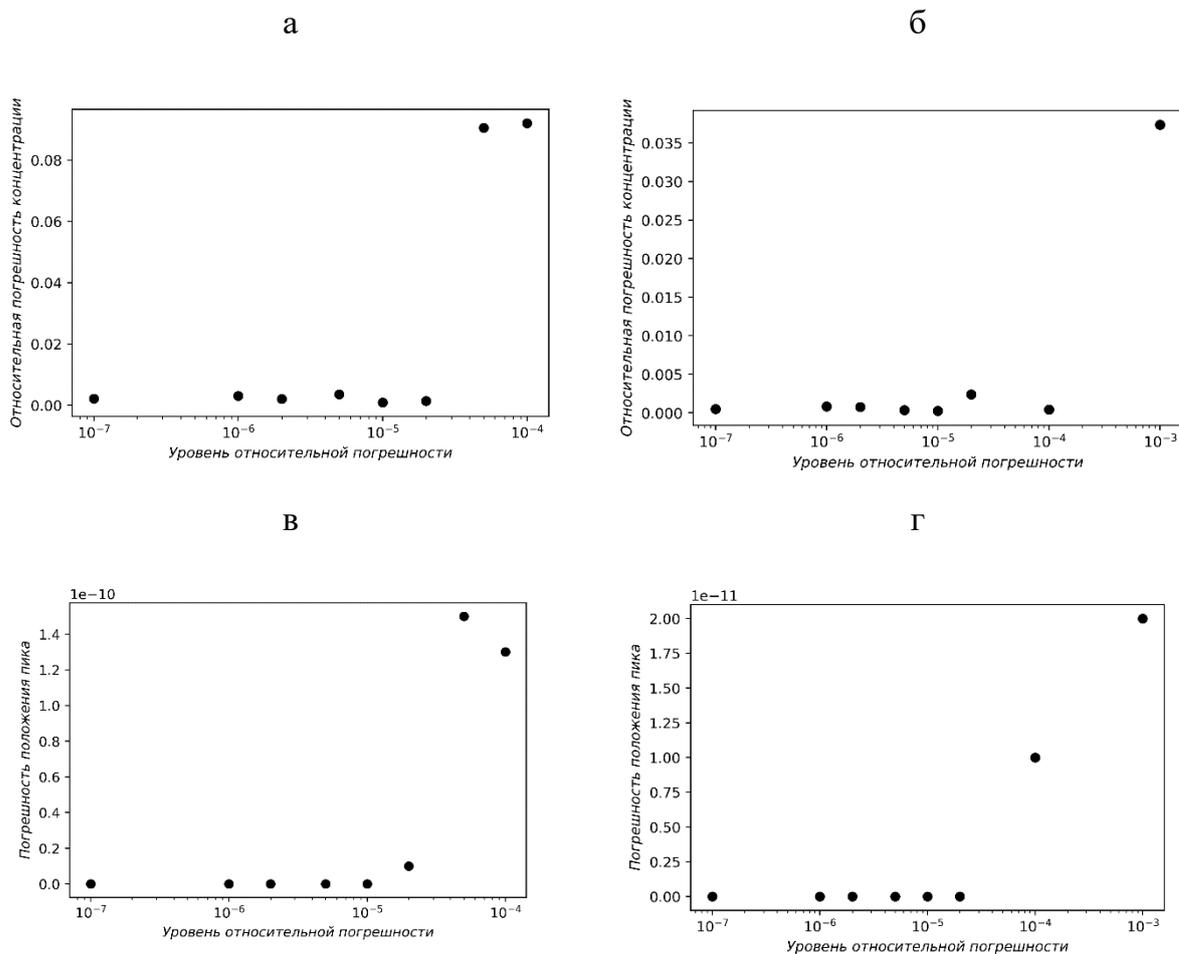


Рисунок 52 – Зависимости относительного отклонения концентрации от уровня относительной погрешности в случае определения по хроноамперограмме (а) и по ЦВА (б), а также абсолютного отклонения положения пика (в – по хроноамперограмме, г – по ЦВА)

Как можно видеть из полученных зависимостей (Рисунок 52), для метода ЦВА можно ожидать более точных результатов анализа узких функций распределения, что, вероятно, связано с характером погрешности экспериментальных данных. В случае хроноамперометрии, высокие начальные токи приводят к высоким погрешностям в начальном участке кривой, содержащем основную информацию. Кроме того, как показано в работе [23], для циклических вольтамперограмм на ансамблях УМЭ характерны смещения положения пиков в зависимости от коэффициента диффузии, что может способствовать лучшему разрешению сигналов.

Оценка применимости метода к анализу непрерывных функций распределения концентрации по коэффициентам диффузии производилась на

примере бимодальной непрерывной функции распределения, составленной из двух логарифмически нормальных кривых. Ниже (Рисунок 53) приведены сравнения функций распределения  $\varphi(D)$ , полученных при различных уровнях относительной погрешности, с истинными функциями распределения.

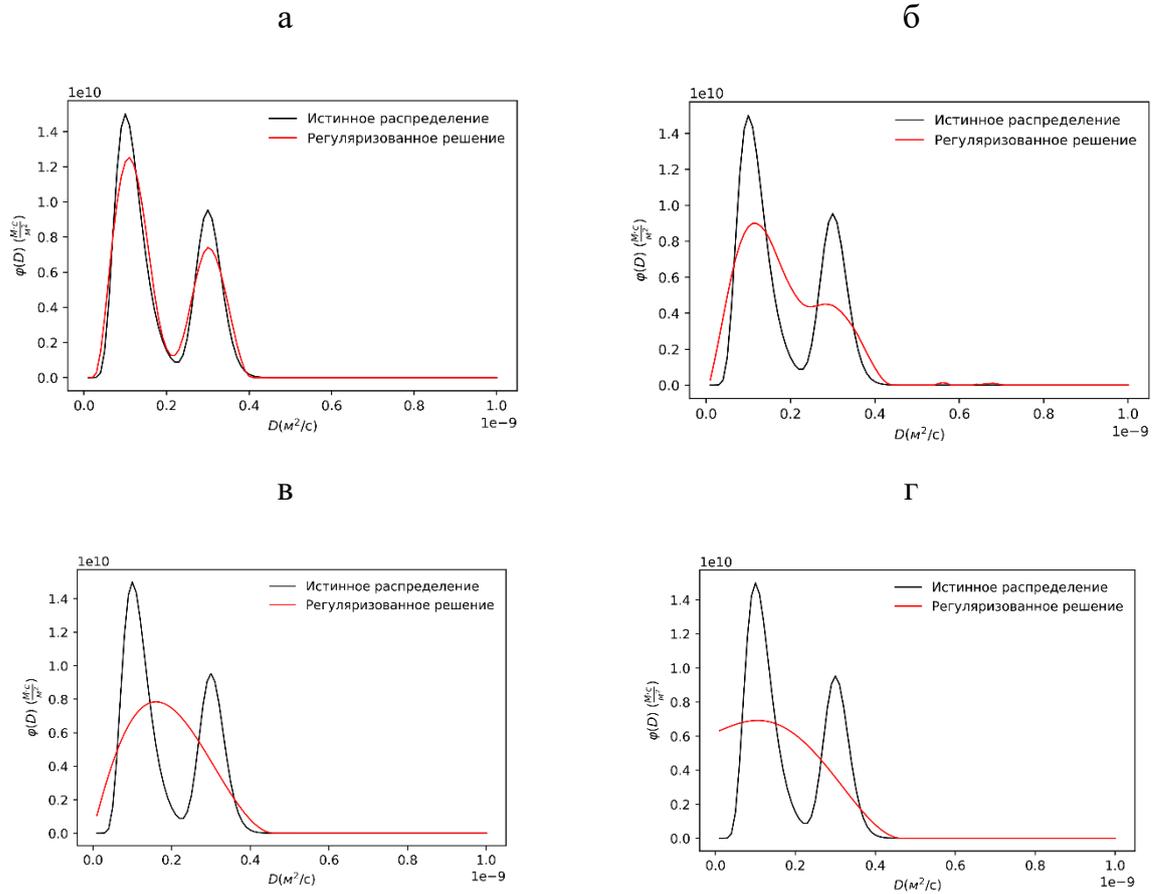


Рисунок 53 – Функции  $\varphi(D)$ , рассчитанные из хроноамперограмм при уровнях погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г) в сравнении с истинной функцией распределения

Как и в случае узких функций распределения, число пиков перестает соответствовать истинному при уровне относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-4}$ , что связано с возрастанием свободного параметра, которое приводит к избыточному сглаживанию. Рисунок 54 содержит функции  $\varphi(D)$ , полученные при различных уровнях погрешности из модельных циклических вольтамперограмм.

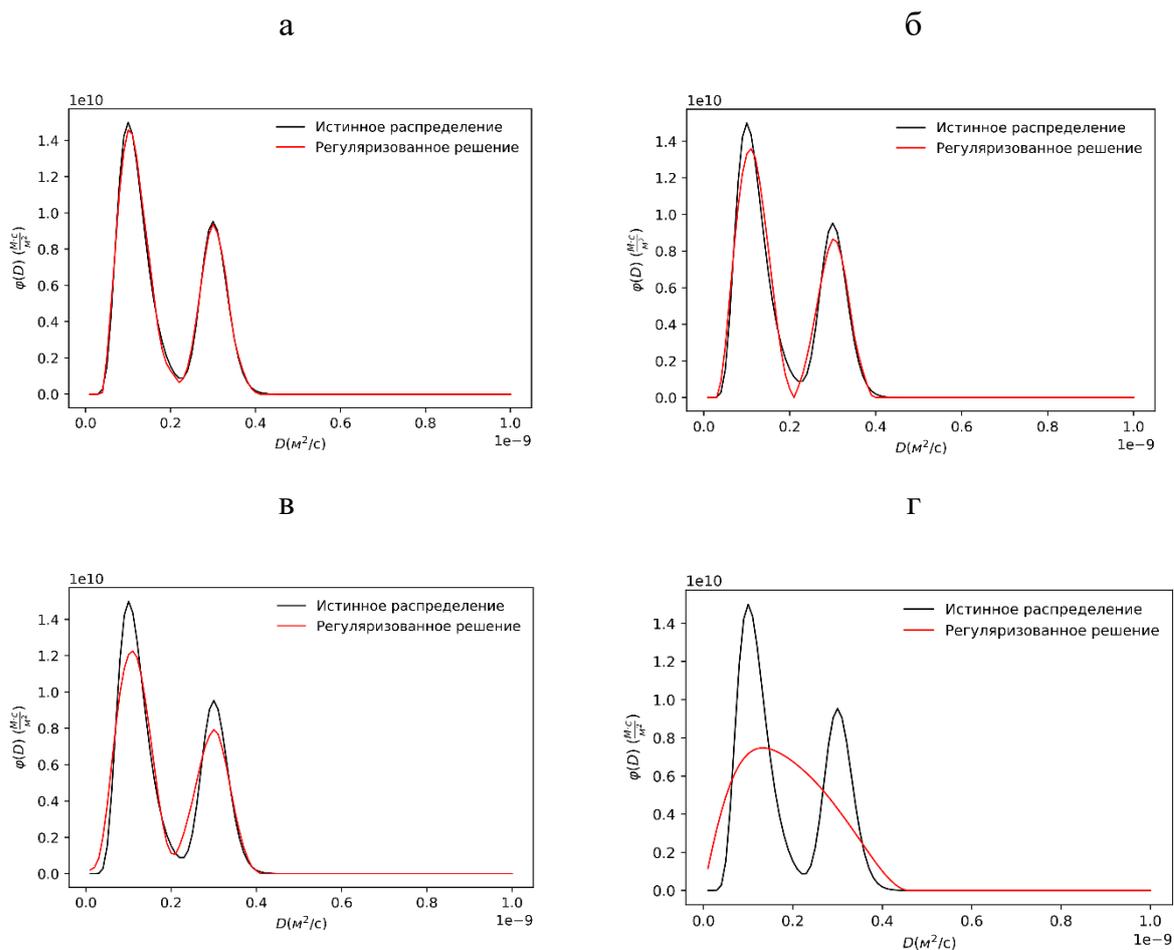


Рисунок 54 – Функции  $\varphi(D)$ , рассчитанные из ЦВА при уровнях погрешности  $1 \cdot 10^{-6}$  (а),  $1 \cdot 10^{-5}$  (б),  $1 \cdot 10^{-4}$  (в),  $1 \cdot 10^{-3}$  (г) в сравнении с истинной функцией распределения

Количество максимумов функции распределения соответствует истинному вплоть до уровня относительной погрешности  $1 \cdot 10^{-4}$ , что вновь указывает на большую устойчивость регуляризованного решения при применении ЦВА в сравнении с хроноамперометрией. На графиках (Рисунок 55) приведены зависимости интегральной квадратичной невязки от интегральной квадратичной ошибки в обоих случаях.

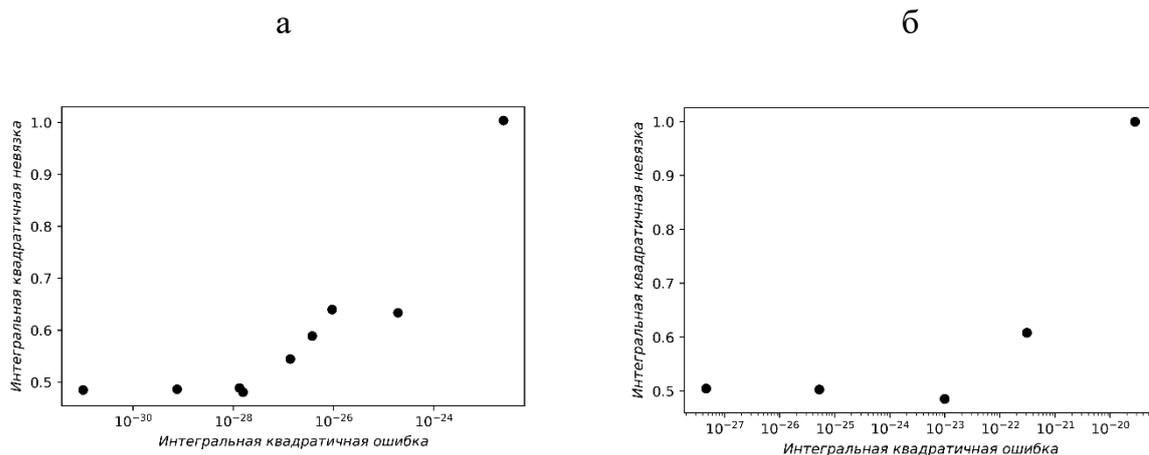


Рисунок 55 – Зависимости интегральной квадратичной невязки от интегральной квадратичной ошибки входящих данных для хроноамперометрии (а) и ЦВА (б)

Концу участка слабой зависимости интегральной невязки от ошибки входящих данных в случае хроноамперометрии соответствует уровень относительной погрешности  $5 \cdot 10^{-5}$ , в случае ЦВА -  $1 \cdot 10^{-4}$ . Это указывает на предпочтительность метода ЦВА в сравнении с методом хроноамперометрии для анализа непрерывных функций распределения  $\varphi(D)$ . Дополнительным аргументом в пользу использования метода ЦВА является возможность варьирования скорости развертки для оптимизации условий эксперимента, а также возможное дополнительное улучшение разрешения сигналов веществ в случае, если равновесный электродный потенциал входящих в состав смеси веществ отличается.

### 3.6 Исследование электрохимического поведения ансамблей ультрамикроразрозродов полученных литографическим методом и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами.

Для подтверждения гипотезы перехода формы вольтамперограммы для полученного литографическим методом ансамбля ультрамикроразрозродов был проведен эксперимент: при помощи рабочего электрода с взаиморазрозродом ультрамикроразрозродов 20 мкм были зарегистрированы вольтамперограммы  $10^{-4}M$

ферроценметанола в фосфатном буфере pH=6 с различной скоростью развертки (Рисунок 58).

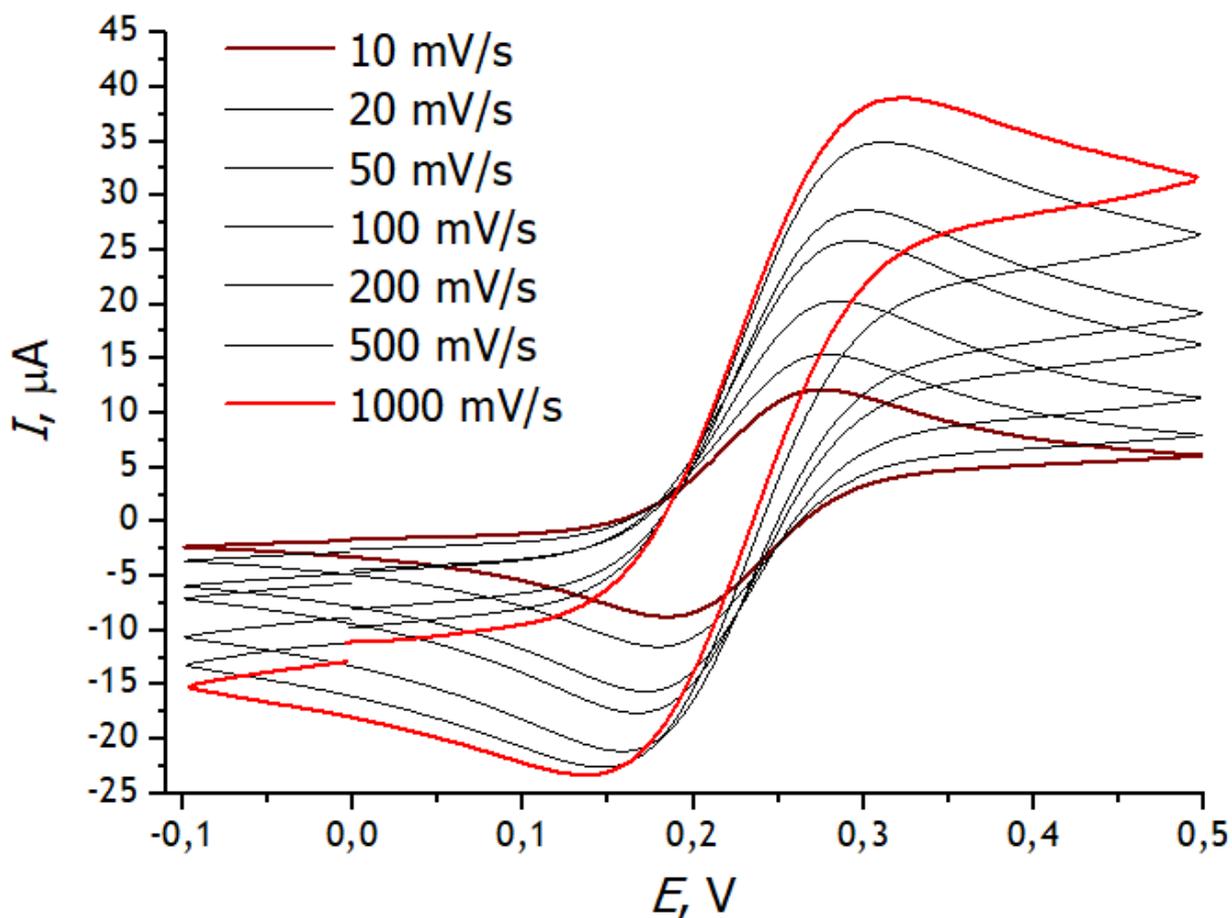


Рисунок 56 - Экспериментальные вольтамперные кривые ферроценметанола на микроэлектродном ансамбле с межэлектродным расстоянием 20 мкм при различных скоростях развертки.

Последовательное изменение формы кривых явно свидетельствует о переходе к стационарному режиму. Соответственно имеется перспектива анализа кривых в переходном режиме для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами.

Также для проверки возможности предсказания поведения ансамблей было проведено моделирование процесса, протекающего на рабочем электроде: на одном графике вольтамперные кривые для скорости развертки 100 мВ/с, полученные в результате расчетов и эксперимента (Рисунок 59). Таким образом, следует заключить, что углубленные ультрамикроэлектродные массивы, разделенные слоем

изолятора пригодны для электрохимического анализа и их поведение прогнозируемо.

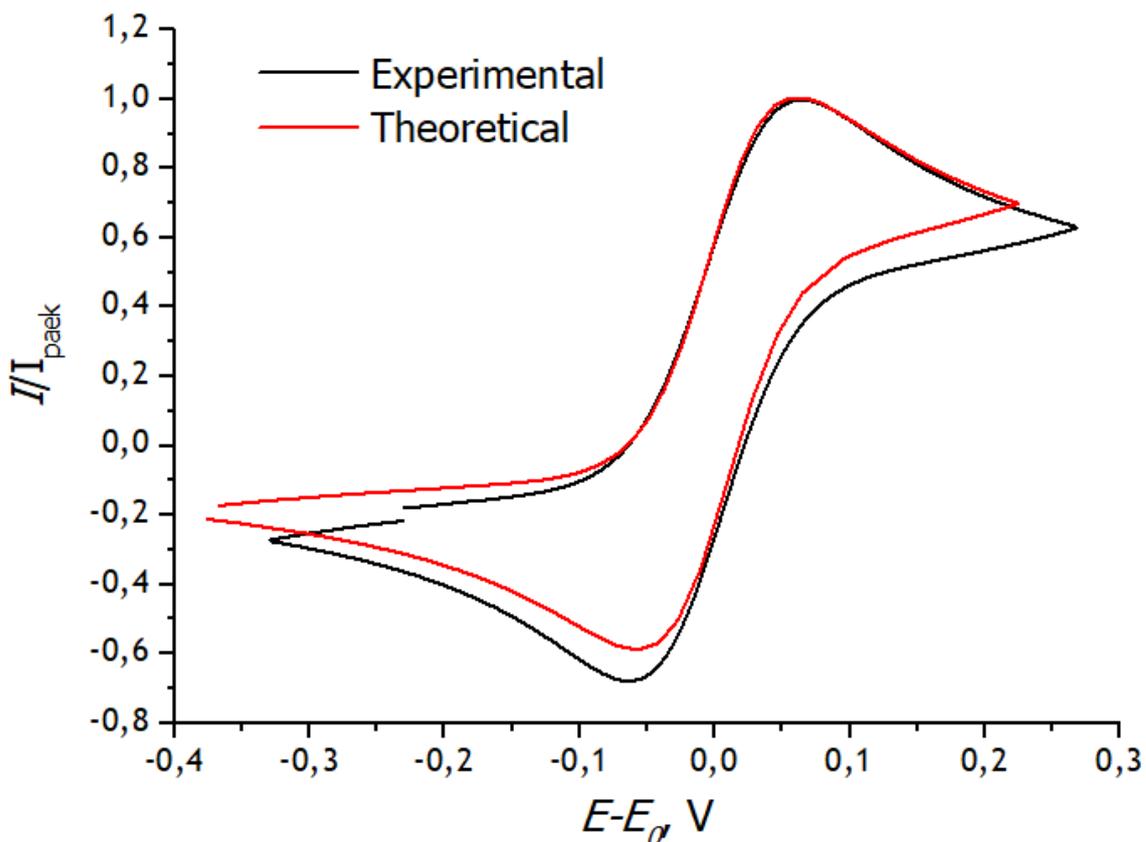


Рисунок 57 - Вольтамперные кривые для сравнения теории и эксперимента

При рассмотрении кривых (Рисунок 58) было обнаружено не только изменение формы, но и отклонение потенциала пика. Для подтверждения гипотезы были построены зависимости смещения потенциала пика от скорости развертки для экспериментальных и теоретических данных (Рисунок 60). Теоретические и экспериментальные данные демонстрируют достаточно высокую сходимость (среднеквадратическое отклонение в пределах 3 мВ, что также говорит в пользу точности использованной модели.

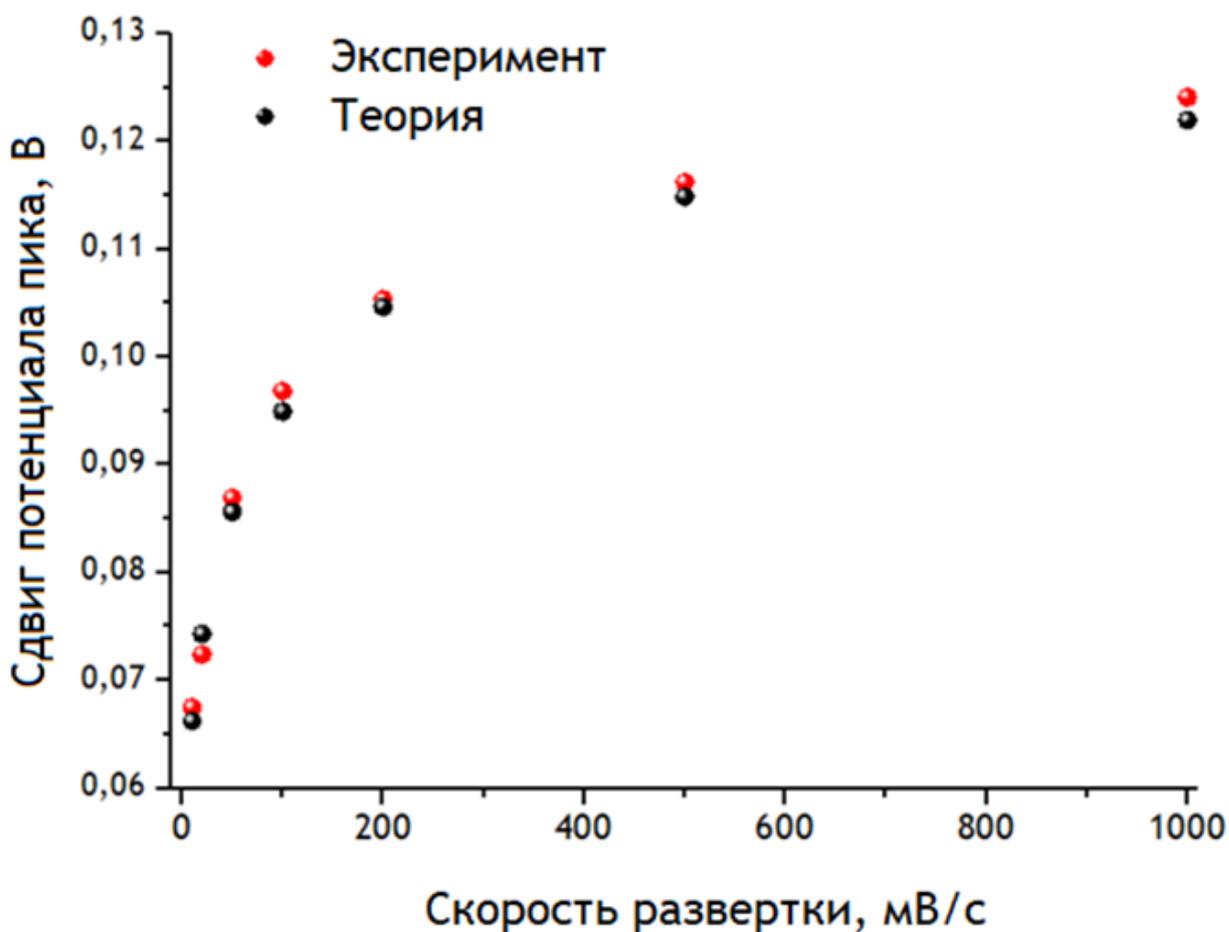
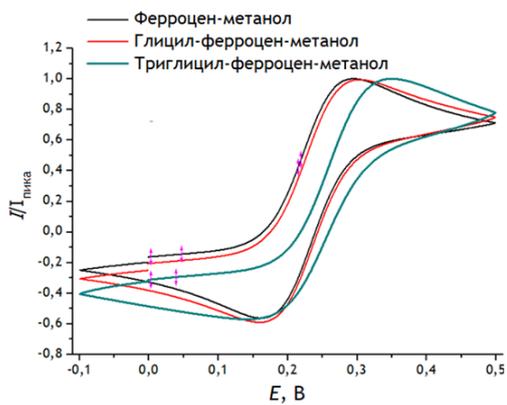
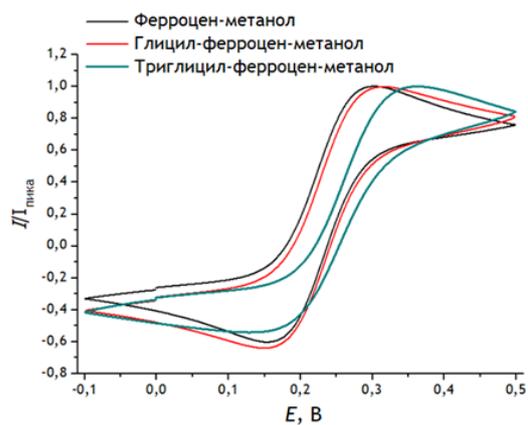


Рисунок 58 - Сравнение экспериментальных и теоретических данных о смещении потенциала пика ферроцен-метанола при изменении скорости развертки.

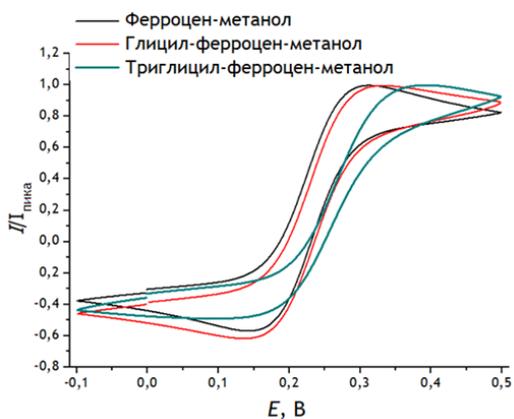
Подобный сдвиг может быть применен в качестве численной меры оценки стационарности, а значит и анализа соединений с равным потенциалом и различными коэффициентами диффузии. Для проверки гипотезы было проведено построение вольтамперных кривых для ферроцен-метанола, модифицированного пептидными фрагментами (моноглицин и триглицин). В результате были зарегистрированы аналогичные серии кривых и построены графики зависимости смещения потенциала пика от скорости развертки. Ниже (Рисунок 61) приведены циклические вольтамперограммы для ферроцен-метанола, глицин-ферроцен-метанола и триглицин-ферроцен-метанола при различных скоростях развертки.



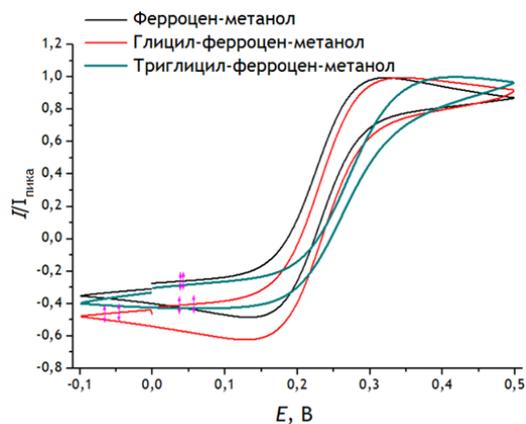
10 мВ/с



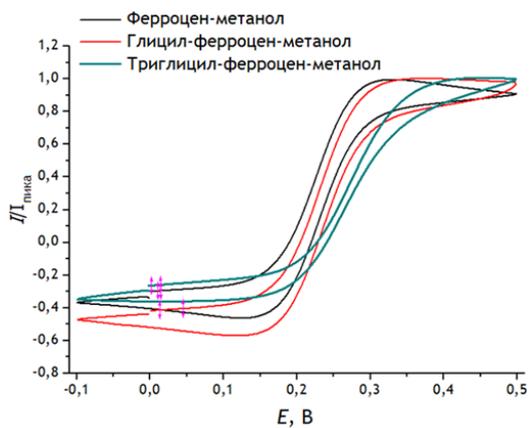
20 мВ/с



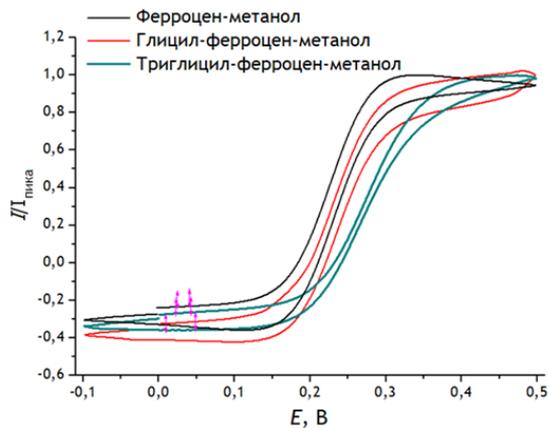
50 мВ/с



100 мВ/с



200 мВ/с



500 мВ/с

Рисунок 59 - Циклические вольтамперограммы модифицированных ферроцен-метанолов.

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

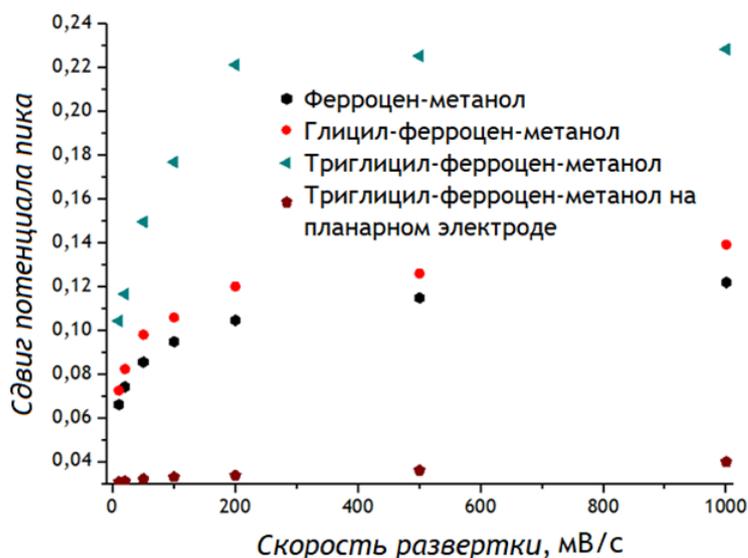
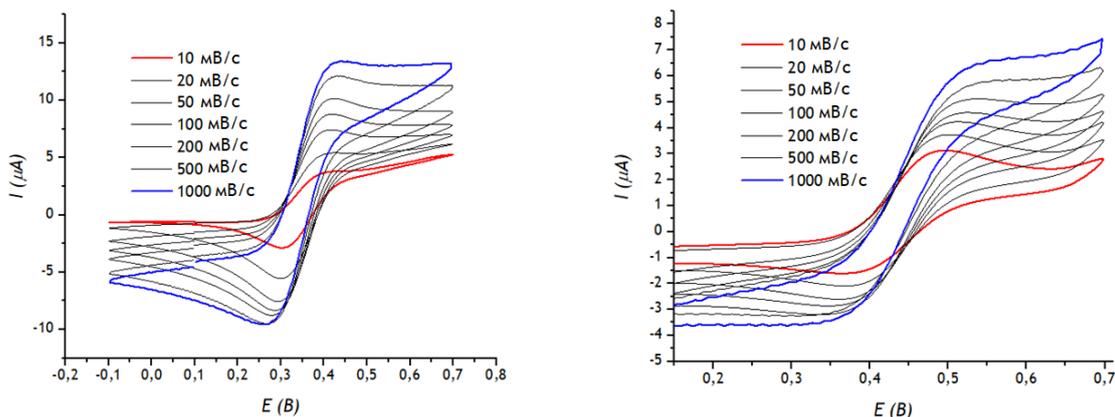


Рисунок 60 - Зависимость смещения пика от скорости развертки для модифицированных ферроцен-метанолов для ультрамикродродного ансамбля с межэлектродным расстоянием 20 мкм в сравнении с аналогичной зависимостью для планарного электрода.

Приведенные на графике (Рисунок 62) 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.

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 63).



Ферроцен-карбоновая кислота      Триглицил-ферроцен-карбоновая кислота

Рисунок 61 - 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 64). 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.

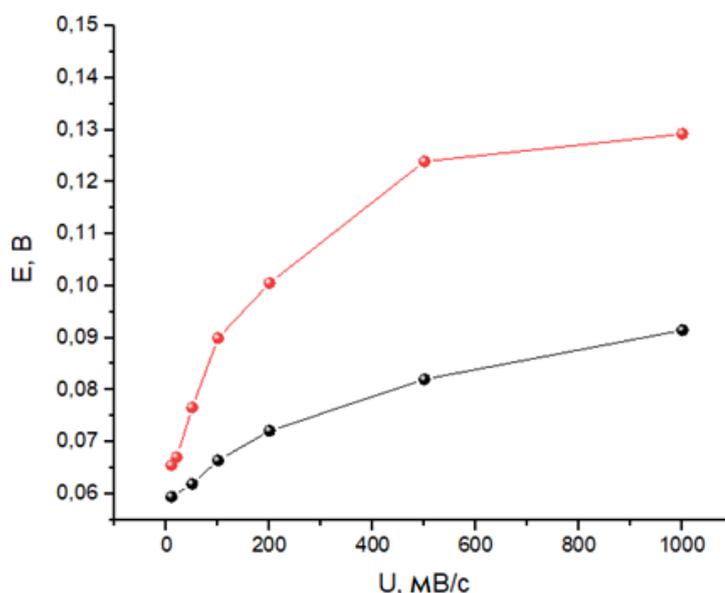


Рисунок 62 - Зависимости сдвига потенциала пика от скорости развертки для ферроцен-карбоновой кислоты (черный) и глицил-ферроцен-карбоновой кислоты (красный).

В дальнейшем, 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.

Для более убедительного обоснования применимости определения смещения потенциала пика 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 65):

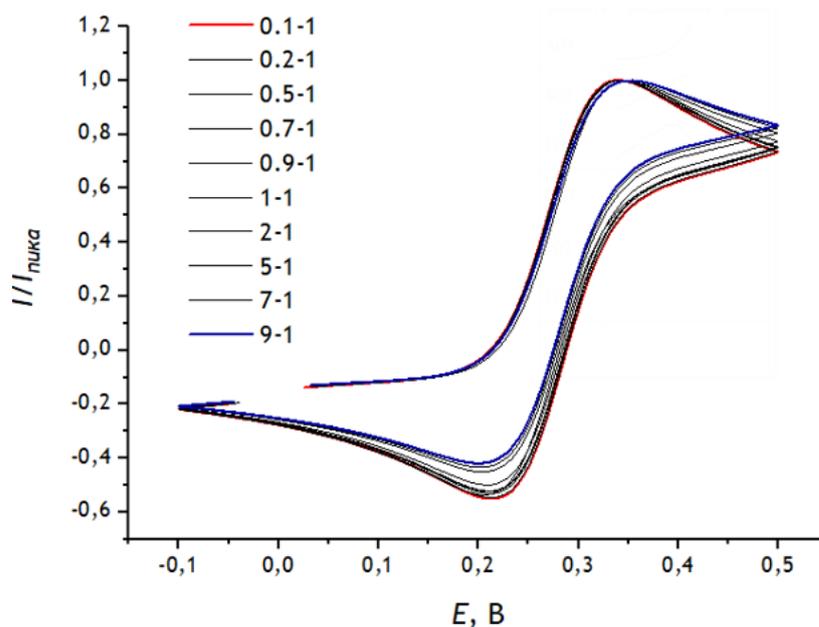


Рисунок 63 - Смесевые циклические вольтамперограммы с различными соотношениями веществ. Ультрамикроэлектродный ансамбль 20 мкм, скорость развертки 10 мВ/с.

По модельным данным были построены зависимости (Рисунок 66) 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.

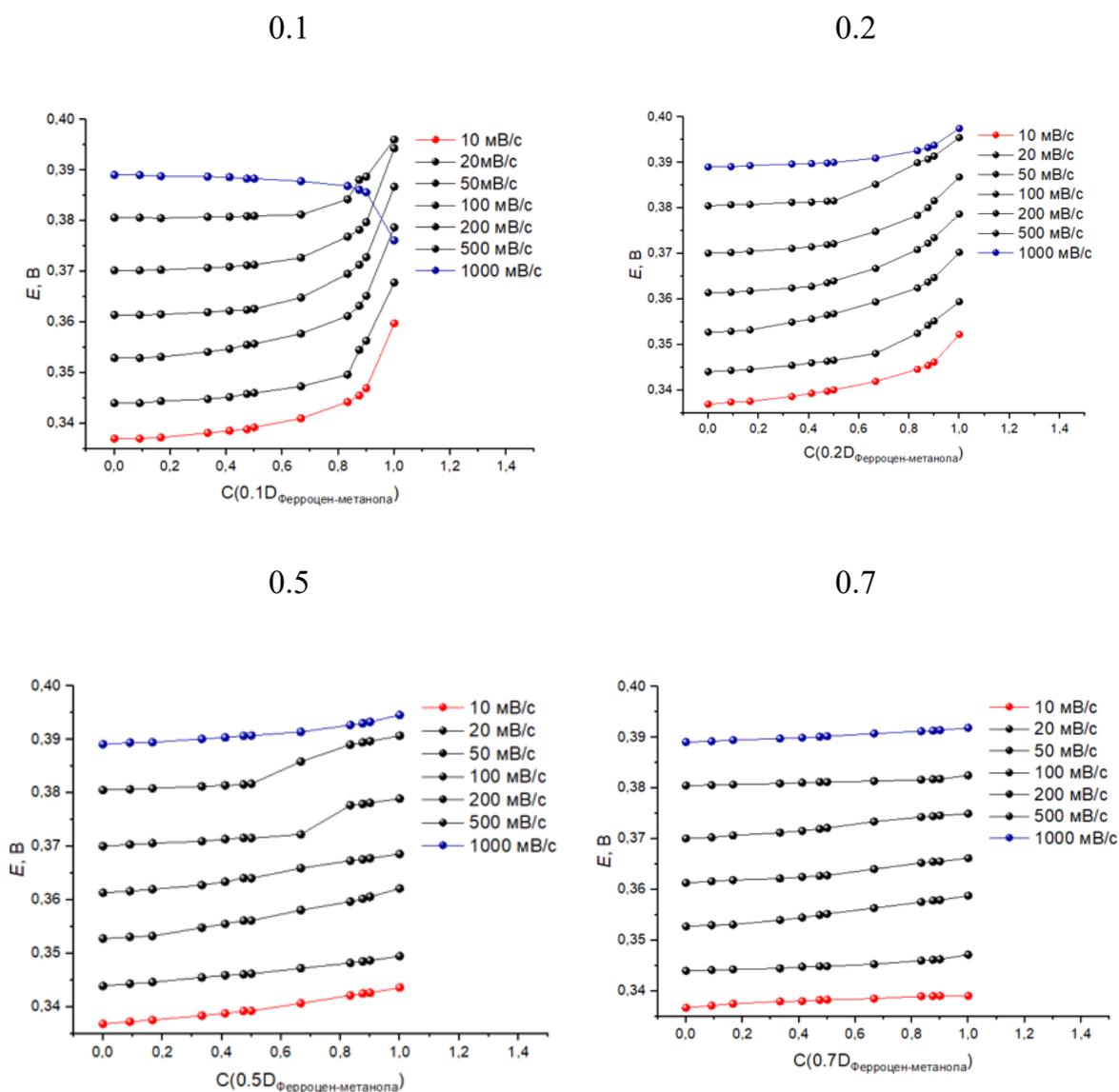


Рисунок 64 - Зависимость потенциала окислительного пика от доли «высокомолекулярного» соединения для различных скоростей развертки.

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 67).

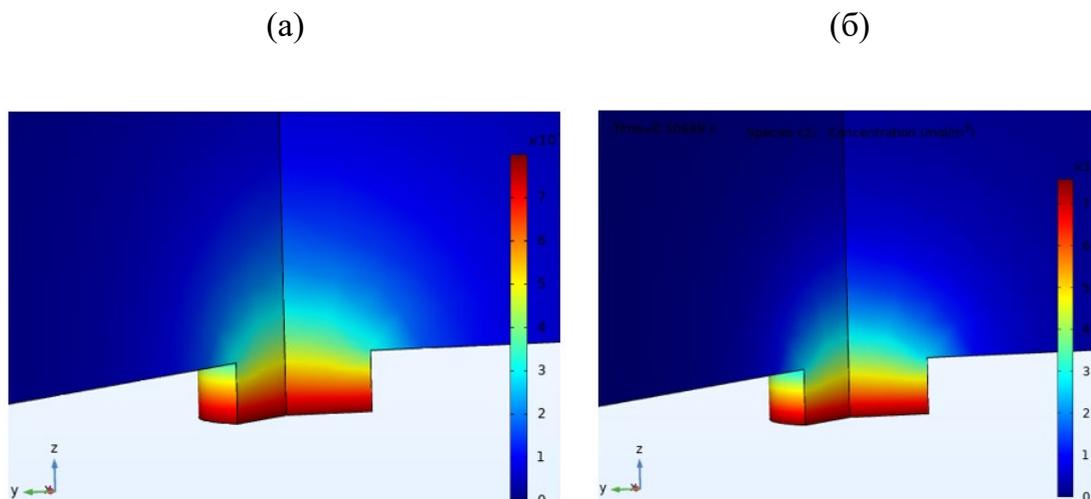


Рисунок 65 - Цветовые диаграммы концентрации в ультрамикрорезродных ансамблях на момент достижения конца первой ветви вольтамперограммы для скорости развертки 100 (а) и 1000 (б) мВ/с.

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 68)

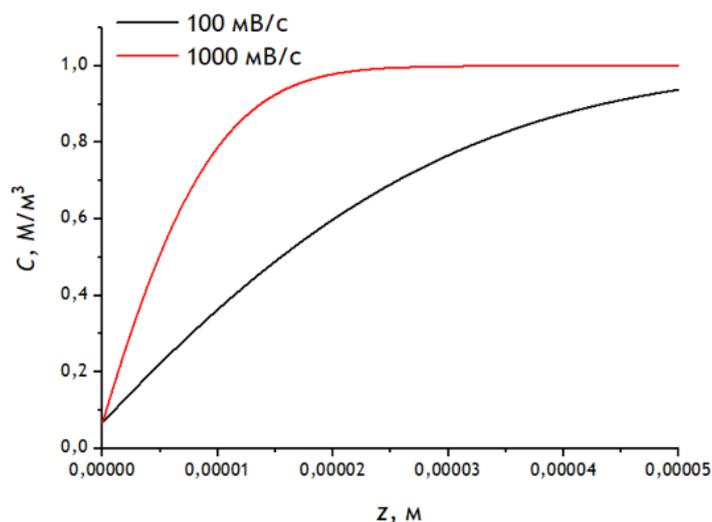


Рисунок 66 - Концентрационные профили для циклической вольтамперограммы при перенапряжении 0.069 В для различных скоростей развертки в планарной геометрии.

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 69).

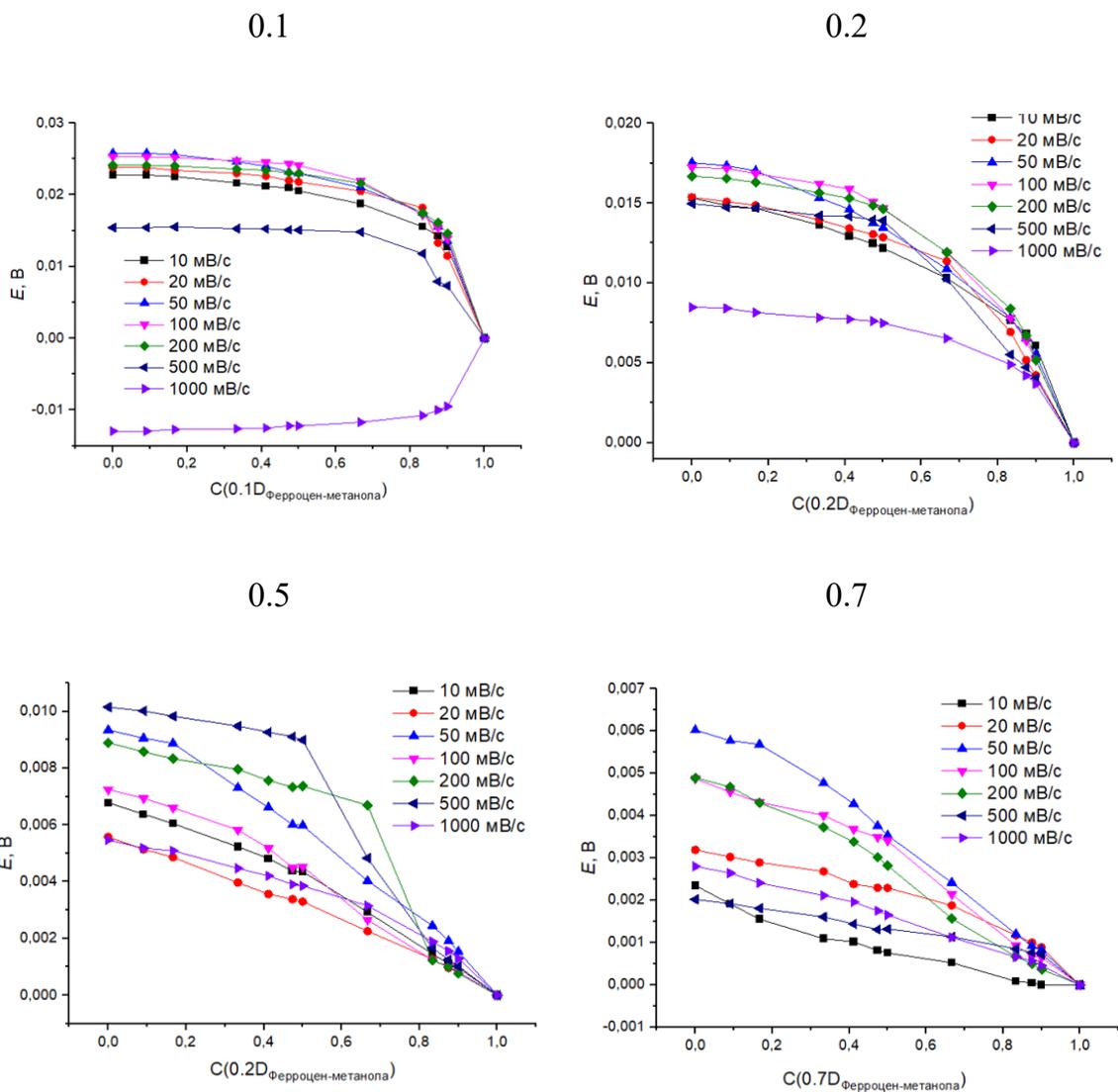


Рисунок 67 - Зависимость смещения потенциала окислительного пика относительно пика чистого высокомолекулярного соединения от его доли для различных скоростей развертки.

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.

Были построены зависимости теоретического предела обнаружения от скорости развертки для веществ с различным коэффициентом диффузии (Рисунок 70)

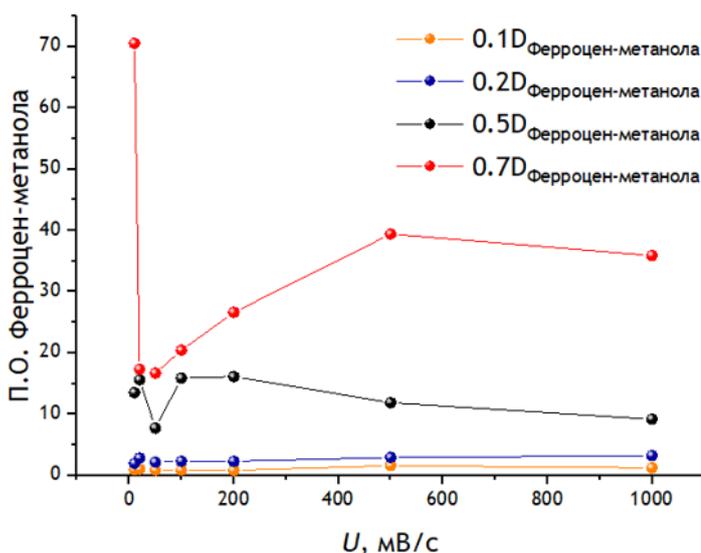


Рисунок 68 - Зависимость теоретического предела обнаружения низкомолекулярного продукта от скорости развертки для пар веществ с различными соотношениями коэффициентов диффузии.

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 71)

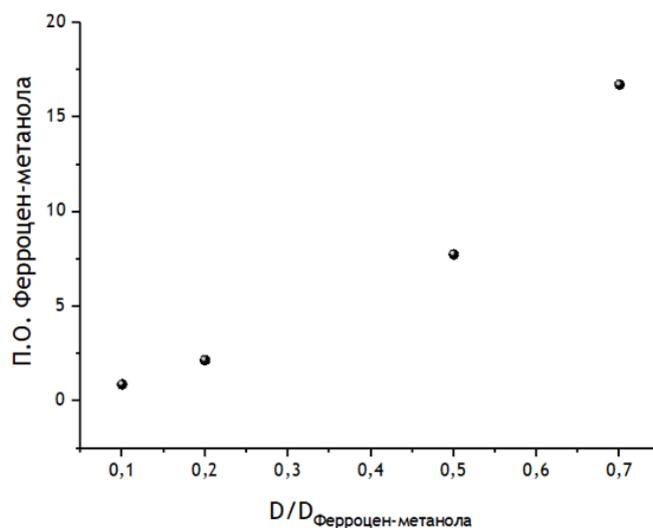


Рисунок 69 - Зависимость теоретического предела обнаружения «низкомолекулярного» продукта в смеси от коэффициента диффузии «высокомолекулярного» компонента.

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 72)

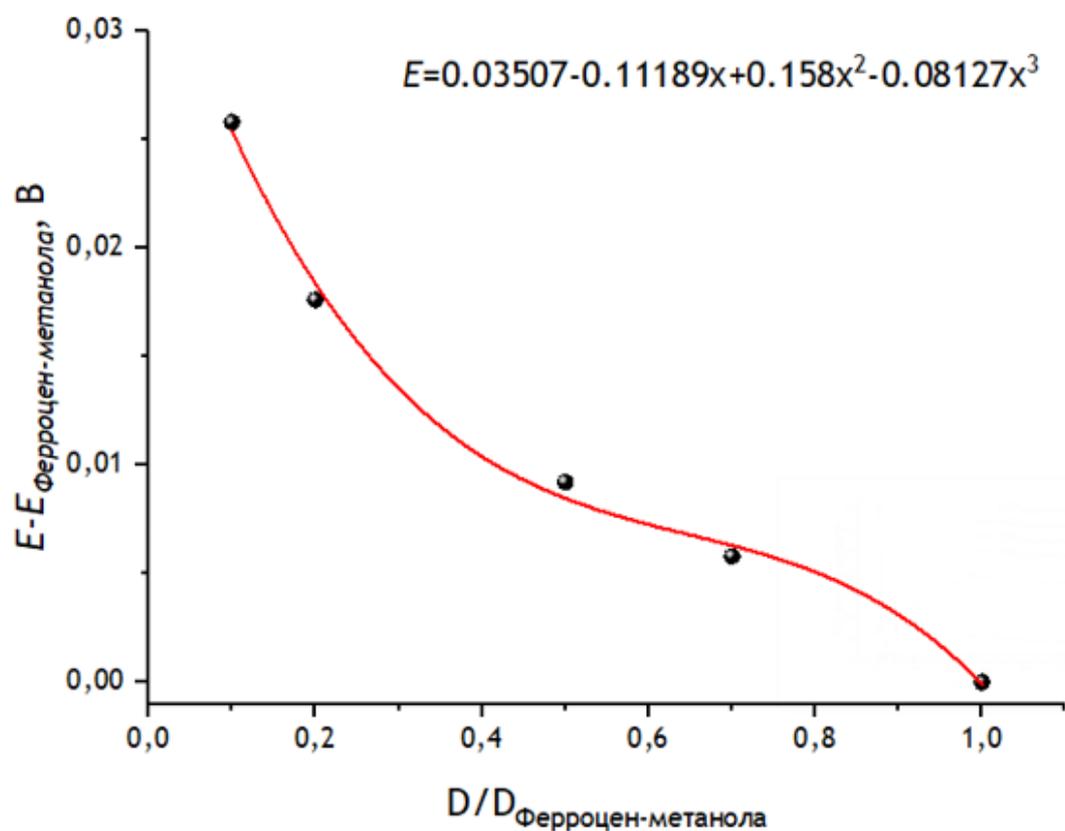


Рисунок 70 - Теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола.

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, представленной на графике (Рисунок 73), значение коэффициента диффузии триглицил-ферроцен-метанола составит 0.06 от коэффициента диффузии ферроцен-метанола).

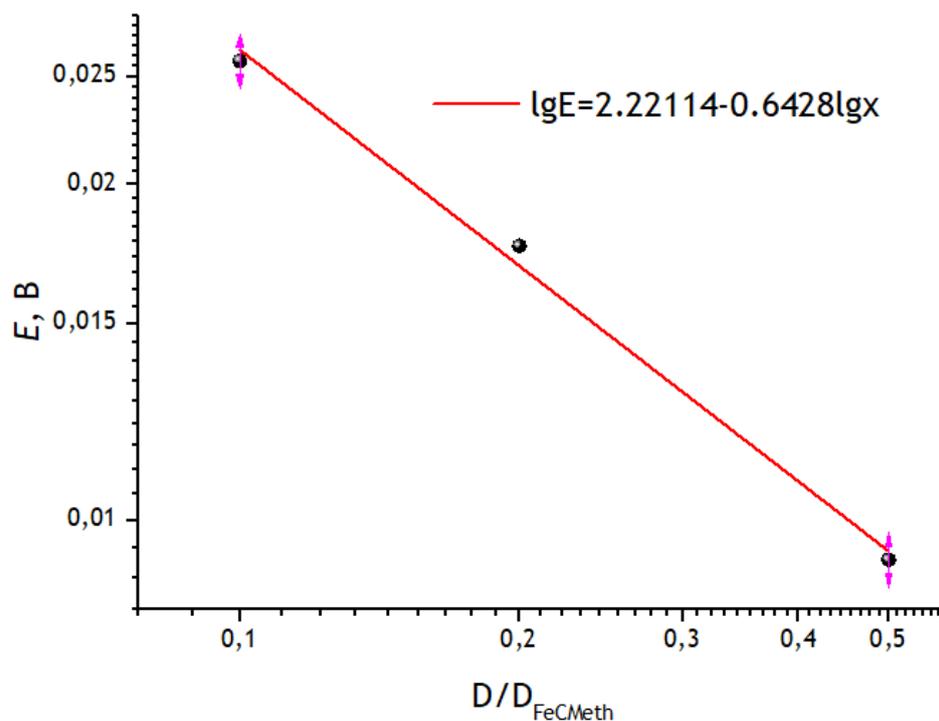


Рисунок 71 - Теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола – билогарифмическая линеаризация начального участка кривой.

Если сопоставить эти данные с зависимостью (Рисунок 65) путем аналогичной степенной аппроксимации модельной зависимости (Рисунок 74), 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

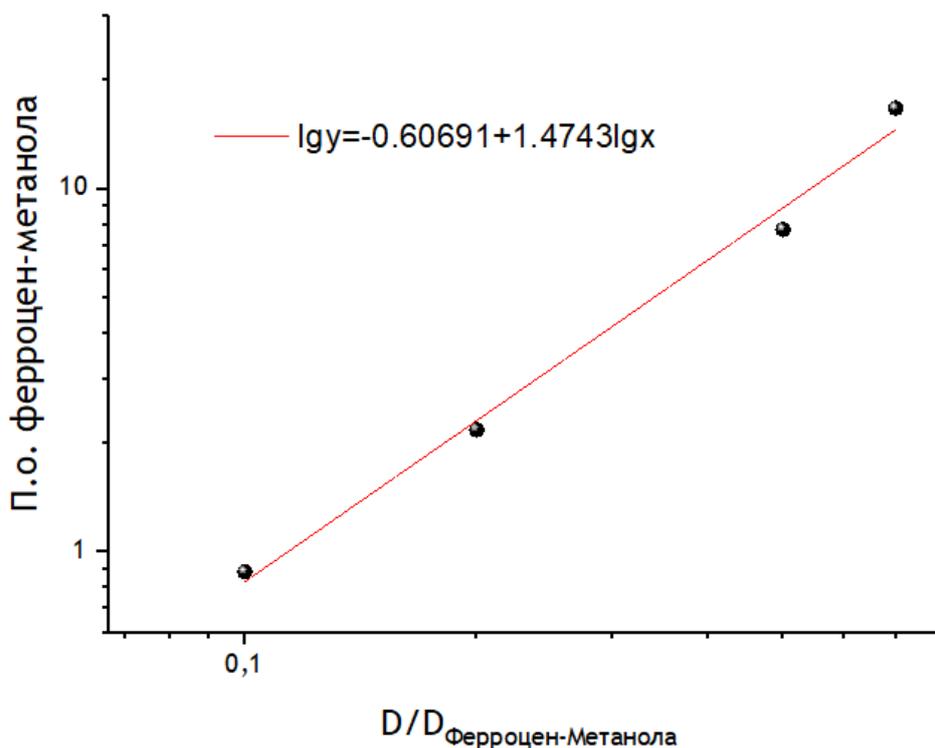


Рисунок 72 - Теоретическая зависимость смещения потенциала пика от соотношения коэффициента диффузии электрохимически активного олигопептида и ферроцен-метанола – билогарифмическая линейаризация.

В связи с успешным подтверждением влияния коэффициента диффузии деполяризатора на форму вольтамперных кривых, был сделан вывод о целесообразности применения метода регуляризации для установления функций распределения концентраций веществ по коэффициентам диффузии.

### 3.7 Применение метода регуляризации для анализа функций распределения концентраций модифицированных ферроценом олигопептидов по коэффициентам диффузии

В первую очередь, в качестве объектов исследования выступили индивидуальные модельные соединения, кривые  $\varphi(D)$  которых должны содержать единственный узкий пик. Ниже (Рисунок 75) приведены сравнения кривых ЦВА, полученных экспериментально, с кривыми, полученными путем аппроксимации регуляризованным решением, полученные для ферроцен-метанола, а также рассчитанные регуляризованные решения для  $\varphi(D)$ .

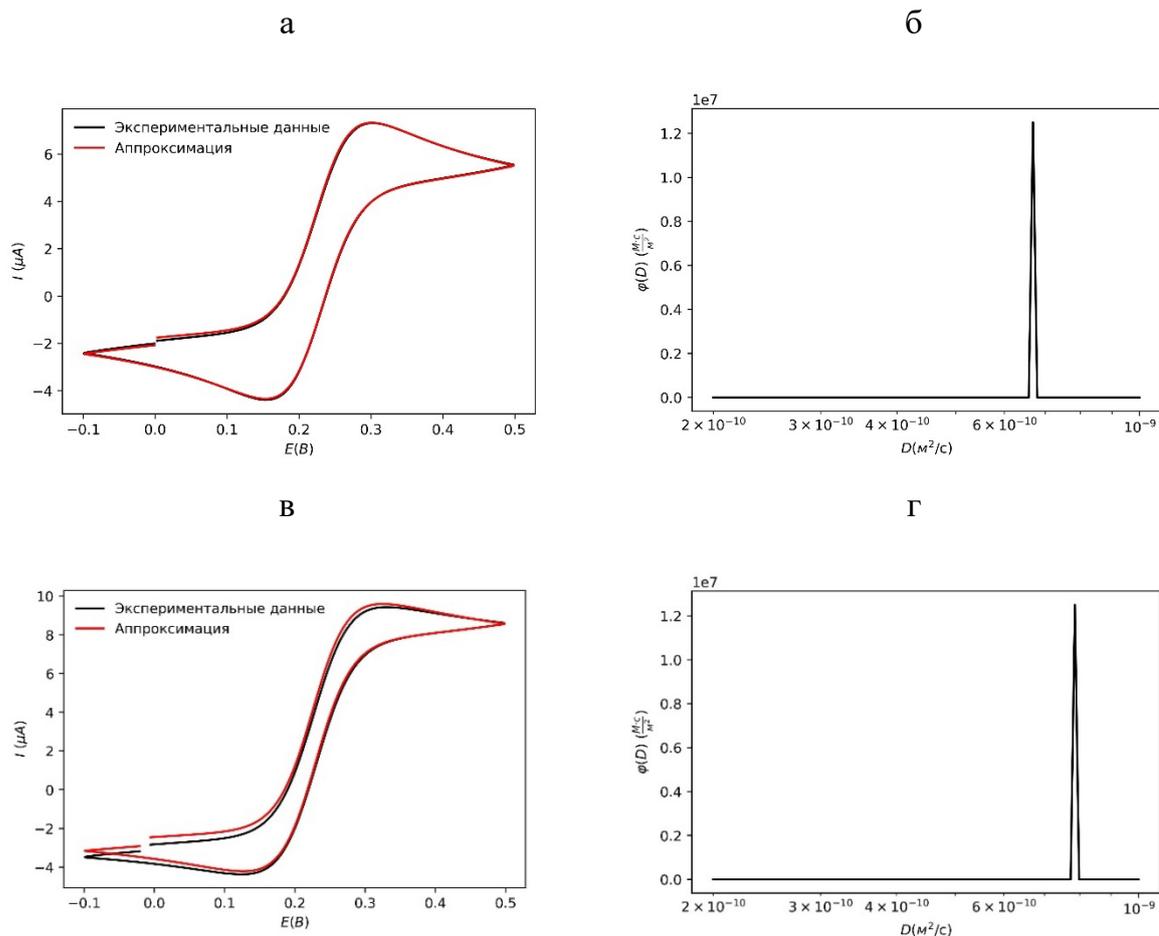


Рисунок 73 – ЦВА ферроцен-метанола при скоростях развертки 20 и 200 мВ/с (а и в), а также рассчитанные функции распределения  $\phi(D)$

Функции распределения  $\phi(D)$  имеют единственный узкий максимум, расположенный в пределах  $6.5-8 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с, что хорошо соотносится с литературным значением коэффициента диффузии ферроцен-метанола, которое составляет  $7.4 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с [23].

Аналогичные измерения, выполненные для производной глицина и ферроцен-метанола, демонстрируют бимодальные функции распределения (Рисунок 76).

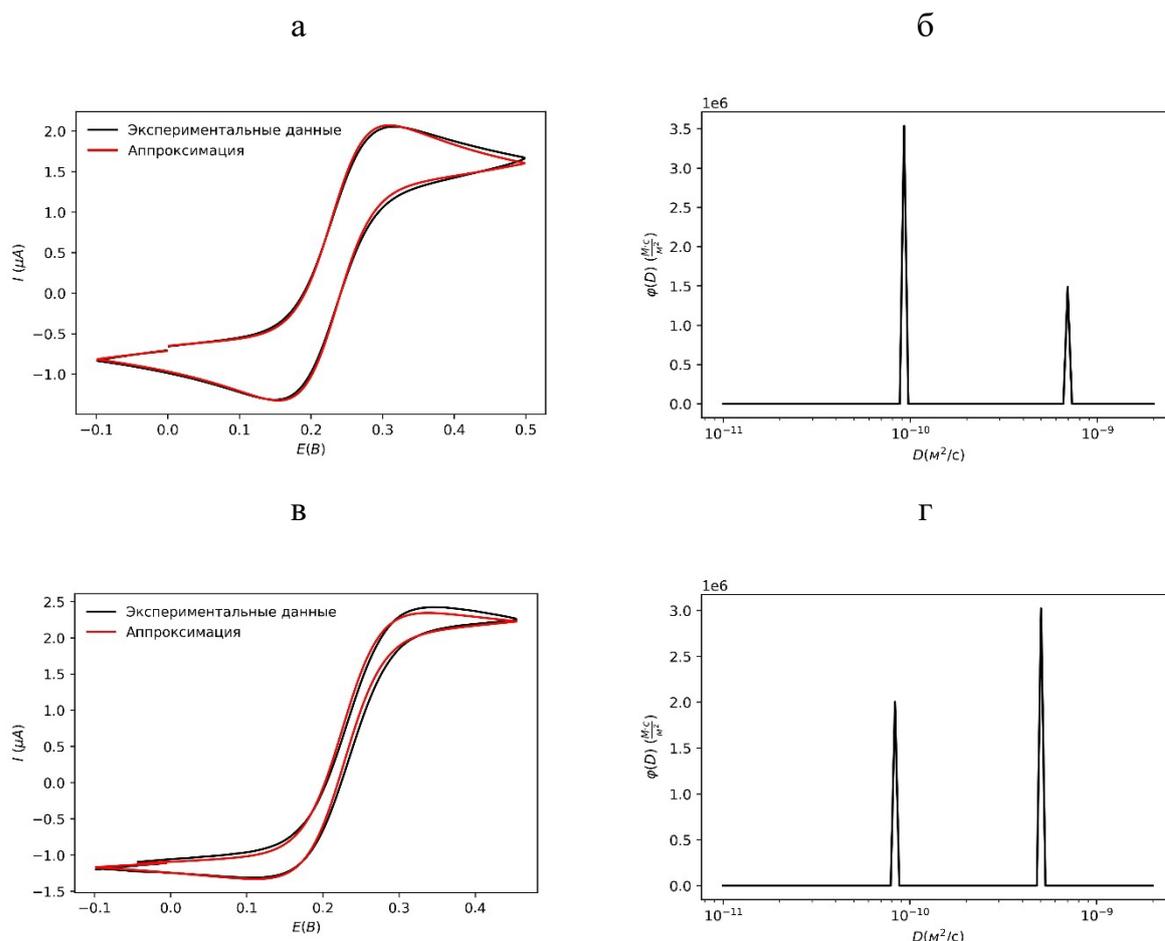


Рисунок 74 - ЦВА глицил-ферроцен-метанола при скоростях развертки 20 и 200 мВ/с (а и в), а также рассчитанные функции распределения  $\varphi(D)$

Положение первого из максимумов соответствует ранее измеренному в [23] значению коэффициента диффузии глицил-ферроцен метанола, положение второго максимума может соответствовать примеси свободного ферроцен-метанола. Наличие примеси ферроцен-метанола в значимых количествах может указывать на протекание реакции гидролиза эфирной связи между ферроцен-метанолом и глицином. Ранее подобные реакции были отмечены у других ферроценсодержащих эфиров в смешанных водно-органических растворителях [24,25].

В случае данных, полученных для триглицил-ферроцен-метанола, необходимо отметить существенное влияние емкостного тока, а также смещение стандартного электродного потенциала, сопровождающееся возможным наличием побочных электродных процессов (выражающихся в сглаживании максимумов в катодной области кривой), что затрудняет обработку данных в рамках принятой модели (Рисунок 77).

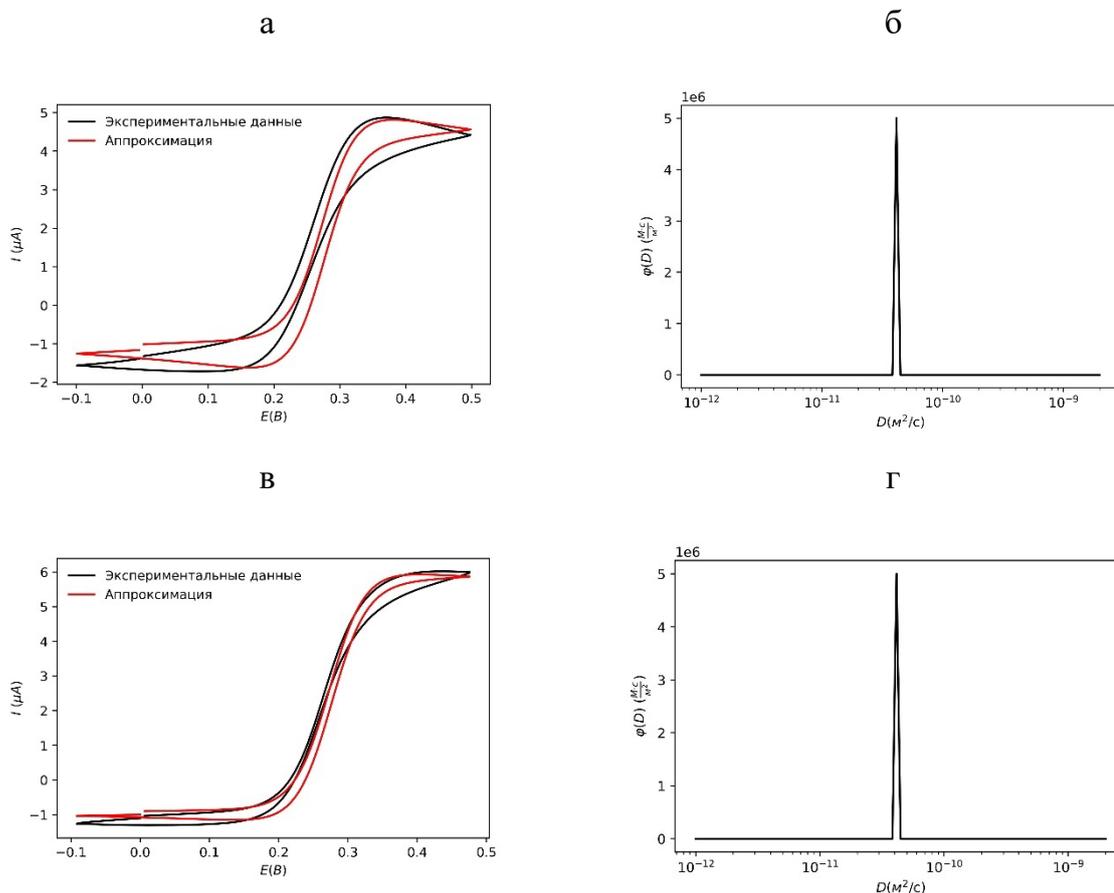


Рисунок 75 - ЦВА триглицид-ферроцен-метанола при скоростях развертки 20 и 200 мВ/с (а и в), а также рассчитанные функции распределения  $\varphi(D)$

Несмотря на очевидно большую невязку между экспериментальными данными и их аппроксимацией, значения коэффициента диффузии, определяемые из максимума функции распределения, составляют  $4-5 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ , что также соотносится с данными из [23]. Тем не менее, вероятность протекания реакции гидролиза нельзя исключать и в этом случае, учитывая существенные отклонения аппроксимирующих кривых от экспериментальных.

Исходя из полученных экспериментальных зависимостей можно заключить, что результаты обработки данных при помощи выбранной модели поддаются интерпретации и совпадают с ранее полученными в других работах значениями коэффициентов диффузии исследуемых веществ. В числе значимых недостатков использования метода циклической вольтамперометрии для анализа кривых распределения веществ по коэффициентам диффузии можно назвать влияние падения напряжения на внешнем сопротивлении, наличие вклада емкостной составляющей тока, а также возможный вклад побочных электродных процессов.

Последнее особенно существенно при исследовании сложных смесей, содержащих различные электрохимически активные компоненты. Кроме того, наличие различных механизмов электродной реакции или существование зависимости тока обмена или электродного потенциала от коэффициента диффузии, связанной с электронными эффектами в соединениях или стерическими затруднениями, будет искажать результаты аппроксимации, что требует усложнения модели, которое может привести к увеличению времени расчета или возникновению избыточного количества параметров, лишаящих результат практического смысла. Тем не менее, в случае простых равновесных электродных реакций, как в случае с ферроцен-метанолом, предложенная модель может давать адекватный результат.

Рассматривая вольтамперограммы эфиров ферроценметанола нельзя не отметить наличие значимого смещения стандартного потенциала в сторону более высоких значений по мере увеличения длины цепи (Рисунок 78).

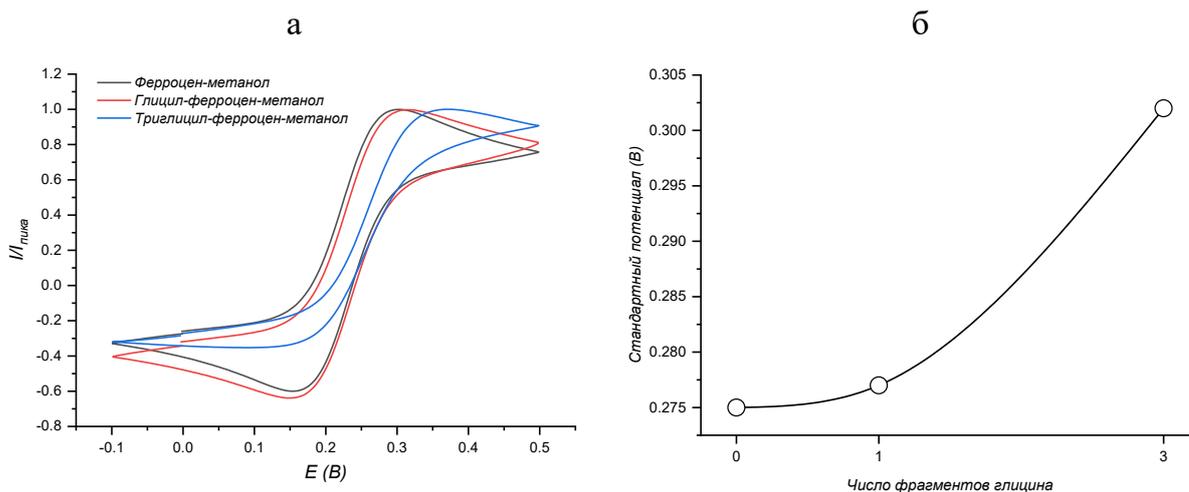


Рисунок 76 – Циклические вольтамперограммы ферроцен-метанола и его эфиров при скорости развертки 20 мВ/с (а) и зависимость стандартного электродного потенциала от числа фрагментов глицина в составе молекулы

Значения стандартного электродного потенциала были скорректированы исходя из значения потенциала ферроцен-метанола (0.275 В относительно ХСЭ).

Наличие существенного сдвига потенциала требует учета при построении модельных ЦВА, используемых для аппроксимации экспериментальных данных. В случае данных, полученных для глицил-ферроцен-метанола, необходимо учитывать возможное наличие в составе раствора ферроцен-метанола в количестве до 30% (по данным рисунка 75). С учетом коррекции, выполненной путем прямого вычитания

модельной кривой ферроцен-метанола, данные будут представлены следующим образом (Рисунок 79).

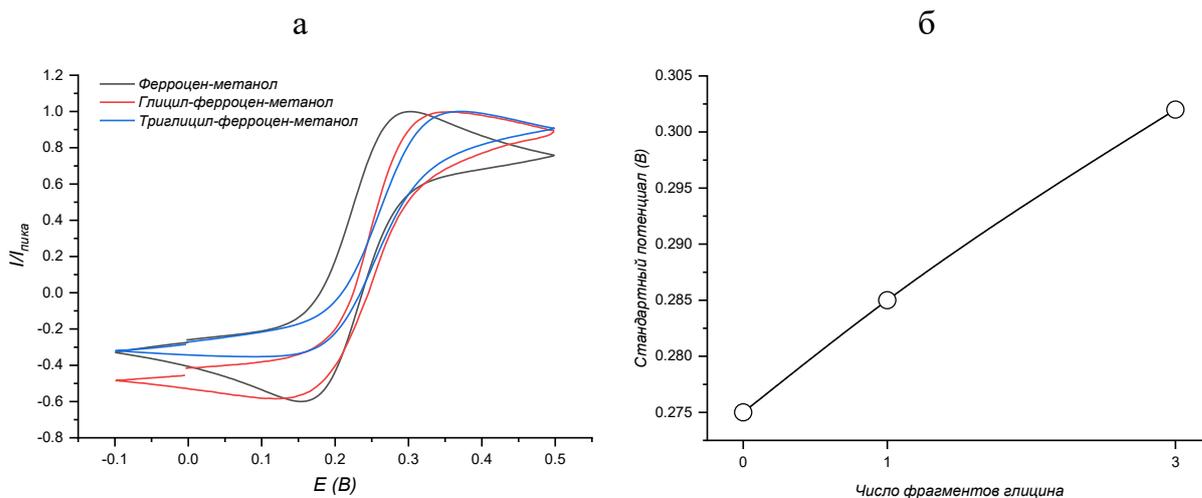


Рисунок 77 – Циклические вольтамперограммы ферроцен-метанола и его эфиров при скорости развертки 20 мВ/с (а) и зависимость стандартного электродного потенциала от числа фрагментов глицина в составе молекулы с учетом коррекции

Скорректированные с учетом предполагаемой мольной доли примеси ферроцен-метанола 30% данные демонстрируют более высокую степень сходства между кривыми эфиров ферроцен-метанола и меньшее сходство между вольтамперными кривыми ферроцен-метанола и его производных. Кроме того, зависимость стандартного электродного потенциала для скорректированных данных представляет собой выпуклую вверх кривую, что резко отличает ее от выпуклой вниз кривой, полученной исходя из данных без коррекции. В дальнейших расчетах для аппроксимации зависимости стандартного электродного потенциала от коэффициента диффузии использовалось уравнение 19.

$$E_0 = 0.275 + 0.056 \cdot \left(1 - \left(\frac{D}{D_{FM}}\right)^{0.13}\right) \dots \dots \dots \text{Уравнение 19}$$

Аппроксимация зависимости величины стандартного электродного потенциала от коэффициента диффузии уравнением 33 приведена ниже (Рисунок 80).

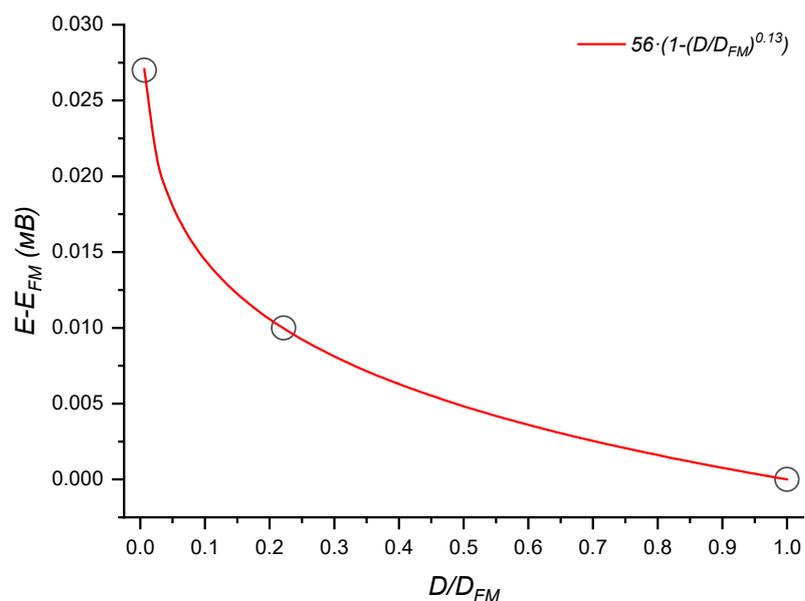


Рисунок 78 – Зависимость смещения стандартного электродного потенциала относительно ферроцен-метанола от коэффициента диффузии

В связи с затруднениями, вызванными возможным протеканием реакции гидролиза эфиров ферроцен-метанола, приготовление их стабильных водных растворов, необходимых для верификации предложенной модели, невозможно. Тем не менее, интерес представляет уточнение вида функций распределения  $\varphi(D)$  для гидролизующегося глицил-ферроцен-метанола с использованием полученных с учетом выявленной зависимости стандартного электродного потенциала от длины цепи. Результаты повторной аппроксимации приведены ниже (Рисунок 81).

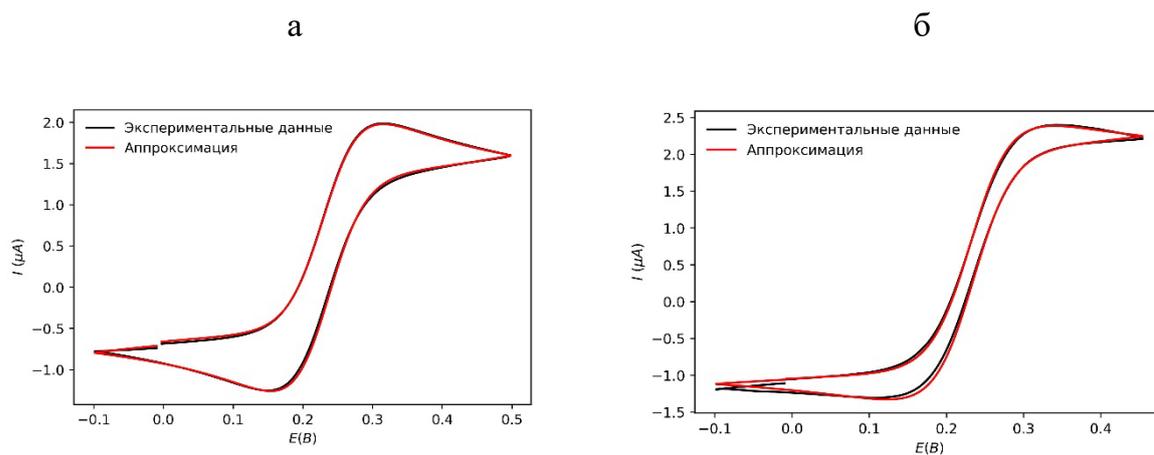


Рисунок 79 – Результаты аппроксимации ЦВА-кривых глицил-ферроцен-метанола с учетом зависимости потенциала от коэффициента диффузии при скоростях развертки 20 мВ/с (а) и 200 мВ/с (б)

Данные на рисунке 79 представляют собой регуляризованные решения, полученные для сетки коэффициентов диффузии, содержащей значения коэффициентов диффузии глицил-ферроцен-метанола и свободного ферроцен-метанола исходя из предположения о присутствии только двух этих компонентов, выдвинутого на основании предыдущего анализа. Необходимо отметить лучшее качество аппроксимации в сравнении с полученными ранее результатами. Мольная доля ферроцен-метанола в смеси по уточненным данным составила 19% для скорости развертки 20 мВ/с и 27% для скорости развертки 200 мВ/с. Учитывая очередность эксперимента (измерения проводились по возрастанию скорости развертки), это может указывать на рост степени гидролиза во времени.

С учетом описанных ранее затруднений, дальнейшее рассмотрение возможностей метода по анализу смесей может потребовать дополнительного теоретического рассмотрения. Наличие значительного смещения стандартного потенциала веществ с изменением числа входящих в состав фрагментов глицина применительно к выбранной системе модельных соединений создает вопрос о возможности анализа смесей таких веществ без использования ансамблей ультрамикродатчиков. Для ответа на данный вопрос было проведено дополнительное моделирование, учитывающее действительные значения коэффициентов диффузии веществ, входящих в систему и их стандартные электродные потенциалы. Были построены тернарные диаграммы, отражающие зависимость стандартного отклонения мольной доли компонента с наименьшей концентрацией от состава смеси в случае анализа с использованием ансамбля ультрамикродатчиков и в случае проведения вольтамперометрии на плоском электроде (Рисунок 82). На том же рисунке также дана диаграмма с размеченными областями обнаружения (голубая область) и количественного определения (синяя область).

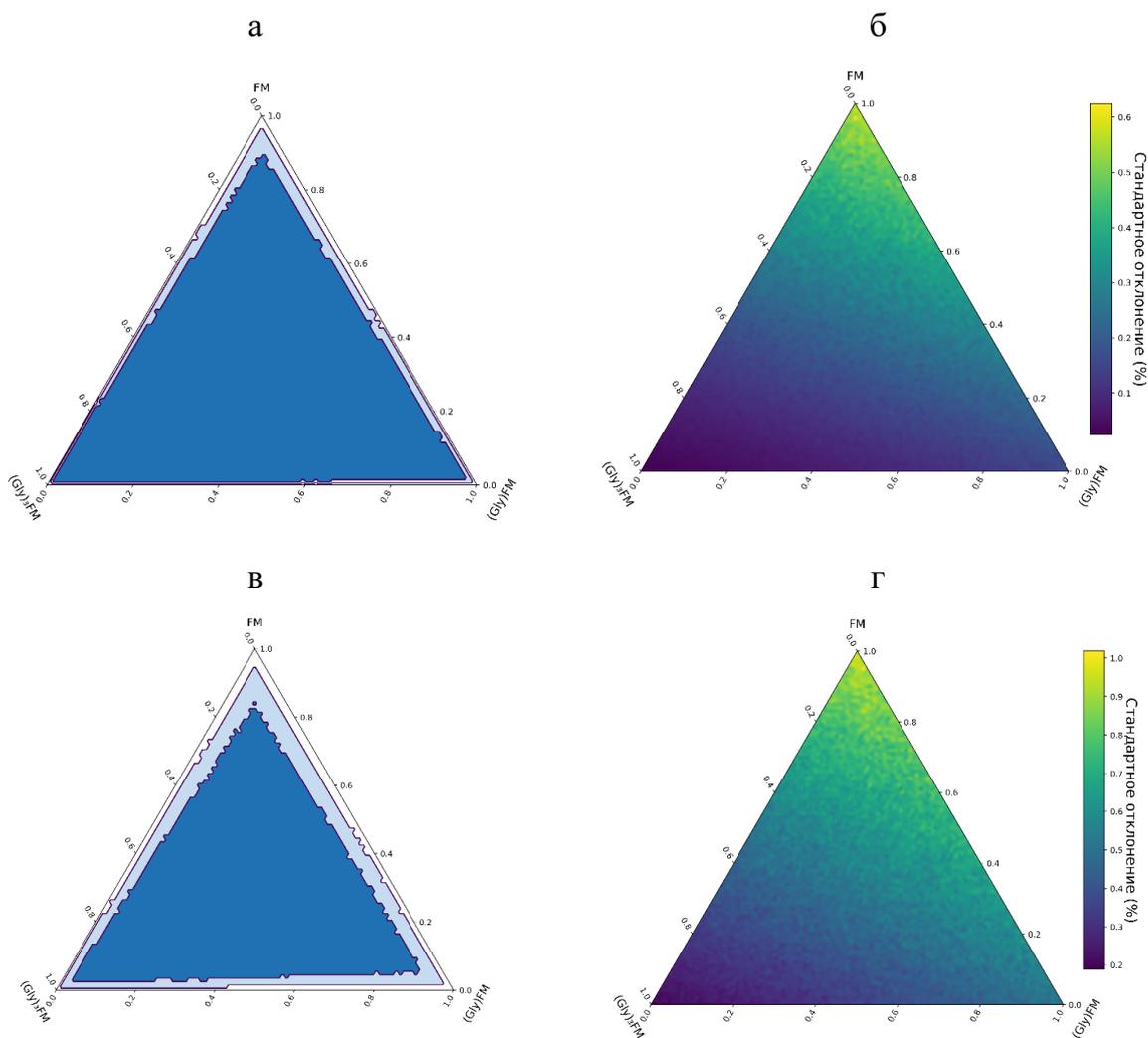


Рисунок 80 – Разметка областей обнаружения (голубая область) и количественного определения (синяя область) в случае анализа с использованием ансамбля УМЭ (а) и в случае анализа с использованием плоского электрода (в); распределение стандартного отклонения в зависимости от состава смеси для ансамбля УМЭ (б) и для плоского электрода (г)

Диаграммы были построены с использованием библиотек `mpltern` [26] и `Matplotlib` [27].

Доля области количественного определения от общей площади графика для ансамблей УМЭ составляет 85%, для плоского электрода – 69%, доля области обнаружения 97% и 88% соответственно. Таким образом, можно заключить, что с точки зрения расширения пределов обнаружения и количественного определения веществ в тройной системе модельных соединений использование ансамблей УМЭ является эффективным решением.

- Положения максимумов функций распределения  $\varphi(D)$ , полученных на основании обработки экспериментальных циклических вольтамперограмм, близки к литературным значениям.
- Бимодальный характер функции распределения, измеренной для глицил-ферроцен-метанола, указывает на возможность протекания реакции гидролиза эфиров ферроцен-метанола в водных растворах.
- Значение стандартного электродного потенциала эфиров ферроцен-метанола существенно зависит от количества фрагментов глицина в составе молекулы.
- Наличие вклада емкостных токов и возможных побочных электродных процессов ухудшает сходимость модельных данных с экспериментальными, что указывает на целесообразность замены метода циклической вольтамперометрии на другую схему измерения, менее чувствительную к влиянию этих факторов.
- Нестабильность состава смесей, связанная с возможным протеканием реакции гидролиза эфирной связи, не позволяет провести дальнейшее экспериментальное подтверждение возможности применения предложенного метода с использованием выбранной модельной системы.
- Дополнительное теоретическое сравнение методов на основе ЦВА плоского электрода и ЦВА ансамблей УМЭ с учетом наличия зависимости стандартного электродного потенциала рассматриваемых эфиров от количества фрагментов глицина, показывает преимущество предложенного подхода с точки зрения пределов количественного определения компонентов.
- Для окончательной проверки применимости предложенного метода необходимо проведение дополнительных экспериментов, связанных со сменой модельной системы (например, заменой растворителя или модельных электрохимически активных соединений).

### 3.8 Исследование электрохимических процессов, протекающих в ячейке с отделённым мембраной планарным рабочим электродом, и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами.

Были получены экспериментальные функции установления диффузионного тока мембраны при использовании N-ферроценилметилглицина и ферроценилметиламиногексановой кислоты в качестве модельных деполяризаторов, обладающих близкими электрохимическими потенциалами и отличающимися коэффициентами диффузии, а также их смеси. Для этого растворы деполяризаторов вводились в электрохимическую ячейку последовательно после завершения установления предельного тока предшествующих веществ. Момент добавки фиксировался независимым золотым рабочим электродом. Экспериментальная хроноамперограмма представлена ниже (Рисунок 83)

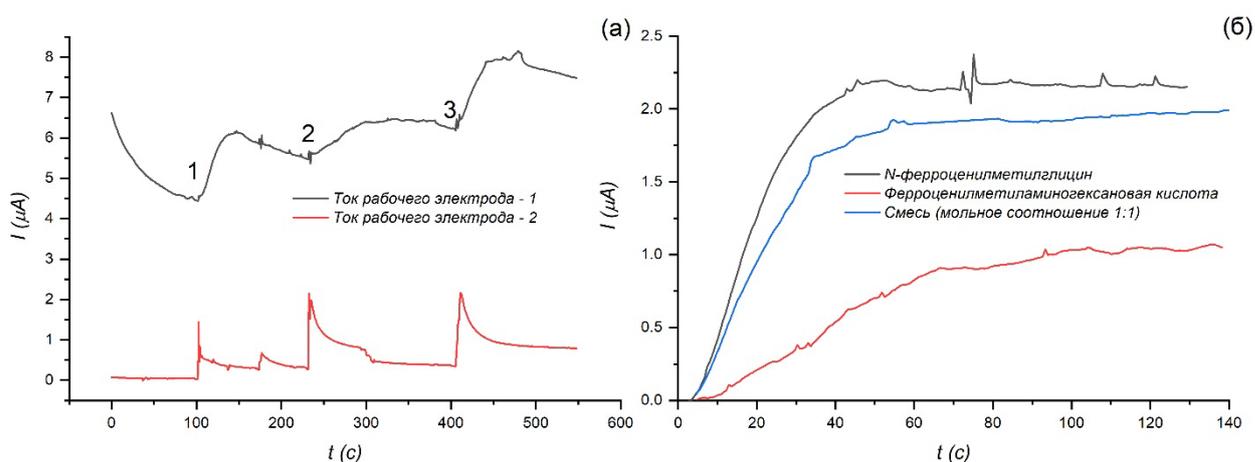


Рисунок 81 – Исходная хроноамперограмма (а) и хроноамперограммы, подготовленные к анализу путем вычитания базовой линии и приведения шкалы времени относительно добавки соответствующего компонента

На графике цифрами обозначены моменты добавок деполяризаторов по порядку (1 - N-ферроценилметилглицин, 2 – ферроценилметиламиногексановая кислота, 3 – смесь компонентов в мольном соотношении 1:1). Приведенные к моменту добавки и избавленные от базовой линии хроноамперограммы были проанализированы с использованием метода регуляризации для восстановления распределений концентраций компонентов по коэффициентам диффузии. Ниже

(Рисунок 82) приведены результаты обработки полученных экспериментальных зависимостей.

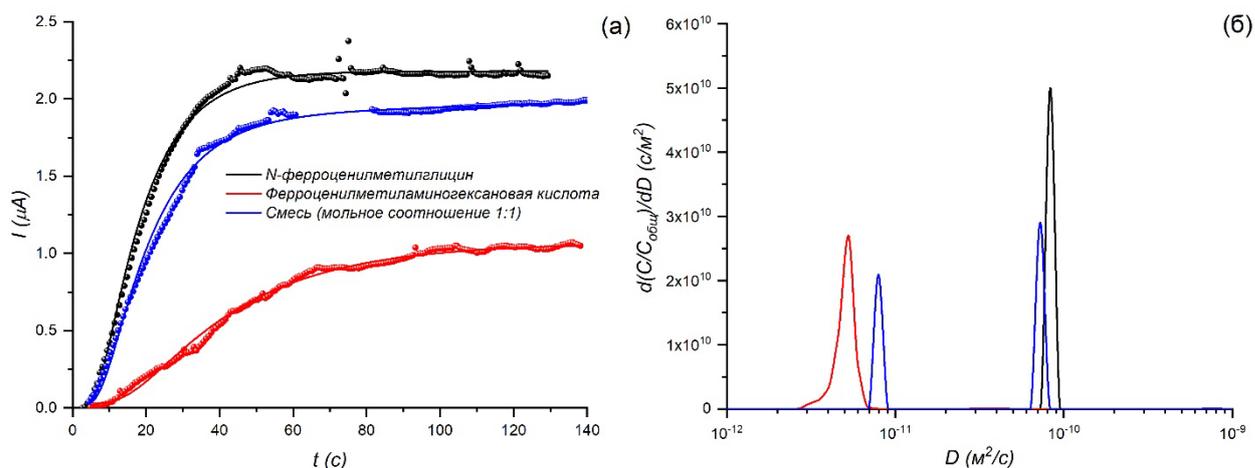


Рисунок 82 – Аппроксимирующие кривые (а) и регуляризованные решения для нормированных функций распределения концентрации веществ по коэффициентам диффузии (б); легенда общая для двух графиков

Необходимо отметить, что несмотря на существенный уровень шума экспериментальных данных, используемая модель позволяет разрешить сигналы двух присутствующих в системе индивидуальных веществ. Тем не менее, коэффициенты диффузии обнаруживаемых веществ в мембране, отвечающие положениям максимумов функций распределения, отличаются в случае смеси и в случае индивидуальных компонентов, что особенно заметно в случае ферроценметиламиногексановой кислоты. При этом параметр регуляризации для индивидуального соединения ферроценаминокапроновой кислоты составляет  $10^{-37}$  против  $10^{-42}$  для смеси веществ, что выражается в большем уширении пика и его асимметрии, что говорит о меньшей надежности данного решения. Тем не менее, полученные результаты доказывают возможность применения предложенного метода обработки к анализу экспериментальных данных хроноамперометрии. Дальнейшее совершенствование техники эксперимента может позволить снизить уровень шума и увеличить точность детектирования веществ в смесях.

### 3.9 Исследование электрохимических процессов, протекающих в ячейке с эквидистантными рабочими электродами, и оценка перспектив применения для анализа соединений с различным коэффициентом диффузии и близкими окислительно-восстановительными потенциалами

Нами была получена экспериментальная хроноамперограмма смеси ферроценилметиламиногексановой кислоты и N-ферроценилметилглицина в мольном соотношении 1:1. Результаты анализа хроноамперограммы методом регуляризации приведены ниже (Рисунок 85).

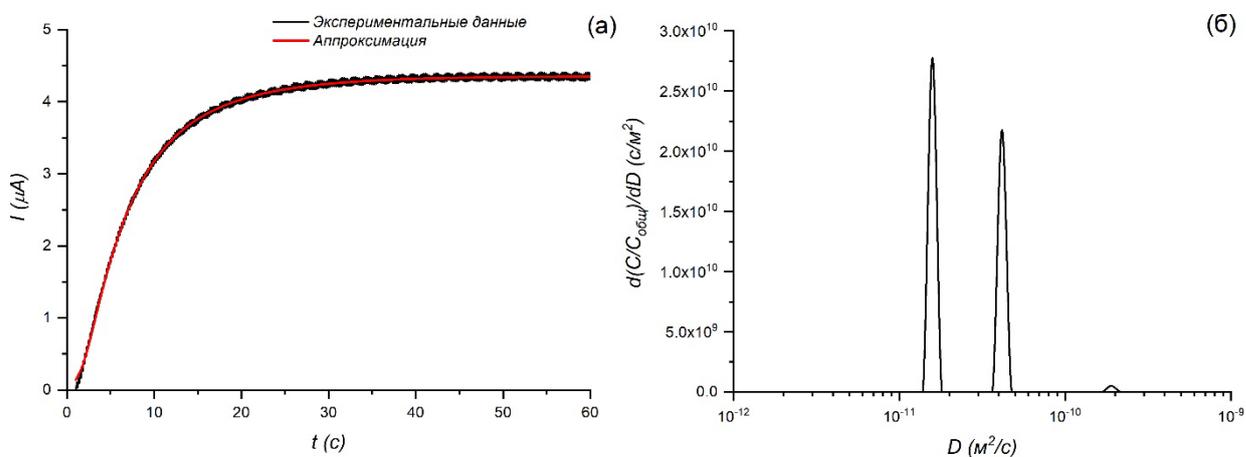


Рисунок 83 – Хроноамперометрическая кривая (а) и регуляризованное решение для нормированной функции распределения концентрации по коэффициентам диффузии веществ (б)

Представленное регуляризованное решение получено при параметре регуляризации  $10^{-41}$  и демонстрирует хорошую сходимость модельной и экспериментальной хроноамперограмм. Рассчитанная функция распределения содержит два основных максимума, близких по величине, наличие которых можно интерпретировать как присутствие двух независимо диффундирующих деполаризаторов. Небольшой по величине побочный максимум в области высоких значений коэффициента диффузии может быть связан с несколько большей невязкой на начальном участке кривой, в связи с чем может считаться несущественным. Полученные данные указывают на возможность использования предложенного алгоритма обработки данных для анализа функций распределения концентраций веществ по коэффициентам диффузии в случае двухкомпонентных смесей.

#### 4 Перспективы развития предложенных подходов

Предложенные методы обработки циклических вольтамперограмм УМЭ в переходном режиме, предполагающие оценку их стационарности путём определения сдвига потенциала пика, имеют под собой физическую модель. Однако есть подходы, которые, не оперируя моделями поведения определяют взаимосвязи аналитических сигналов и анализируемых параметров системы. Многие из таких подходов применяются в особом разделе химии – хемометрике – дисциплине, применяющая математические, статистические и другие методы, основанные на формальной логике, для построения или отбора оптимальных методов измерения и планов эксперимента, а также для извлечения наиболее важной информации при анализе экспериментальных данных.

Хемометрические методы пригодны как для качественного, так и для количественного анализа. Одним из наиболее известных количественных методов активно применяемых в хемометрике является проекция на латентные системы [28]. В ходе работы был опробован электрохимический анализ растворов гиалуроновой кислоты при помощи мультисенсорной системы, состоящей из 15 потенциометрических детекторов, не обладающих высокой селективностью относительно аналита. Однако за счёт выявления соотношения вклада единичных сигналов и концентрации кислоты удалось построить регрессионную модель ПЛС: ниже приведен график «измерено-предсказано» (Рисунок 84)

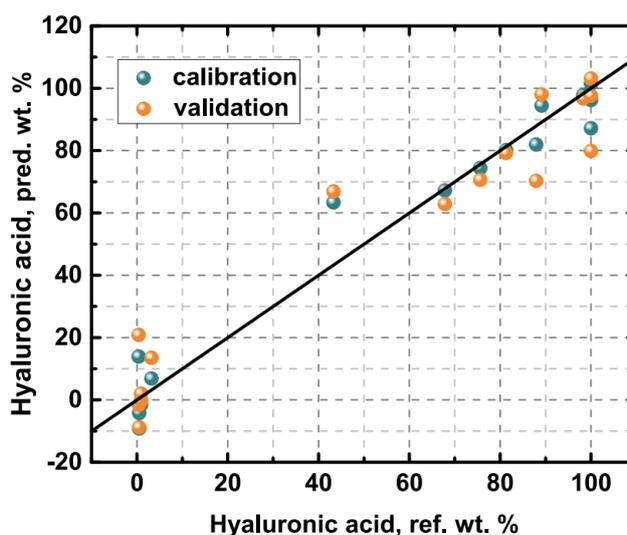


Рисунок 84 – График «измерено-предсказано» для регрессионной модели ПЛС.

Данный подход интересен для обработки вольтамперометрических кривых градуировочных кривых, полученных на ансамблях ультрамикроразрядных электродов, так как способен одновременно обрабатывать весь массив экспериментальных точек.

Нами 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 85).

В качестве альтернативного метода можно привести метод наименьших квадратов по линейной зависимости тока от концентрации OLS по току (произвольно выбранное значение – точка вольтамперной зависимости под номером 325). Валидация этого метода представлена ниже (Рисунок 86).

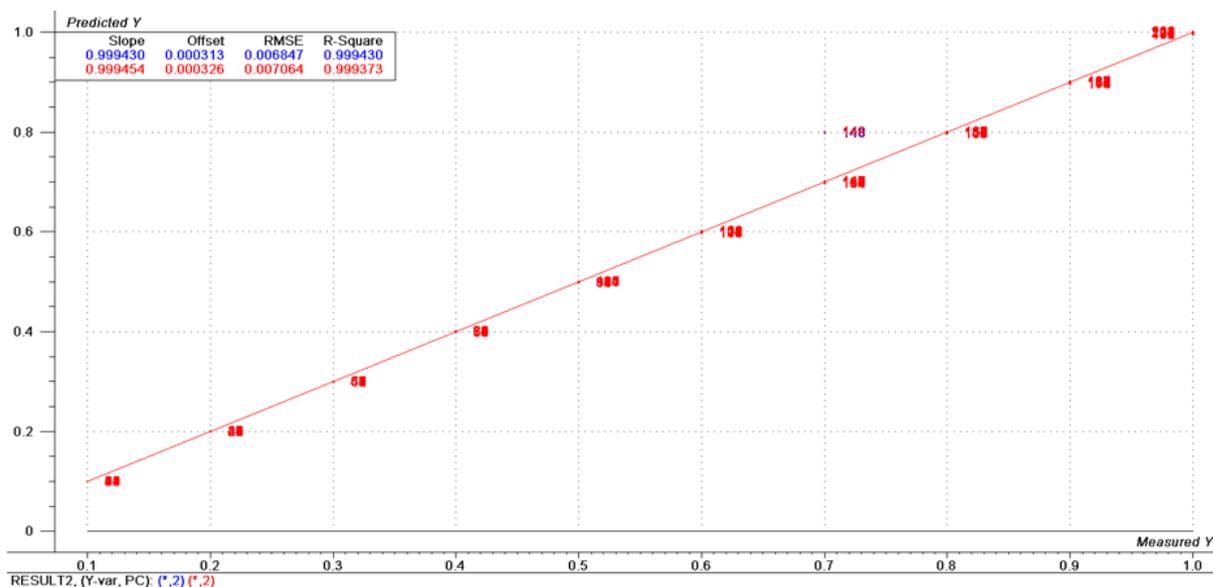


Рисунок 85 - зависимость предсказанного сигнала от сигнала, полученного в результате виртуального эксперимента для ПЛС по общей концентрации.

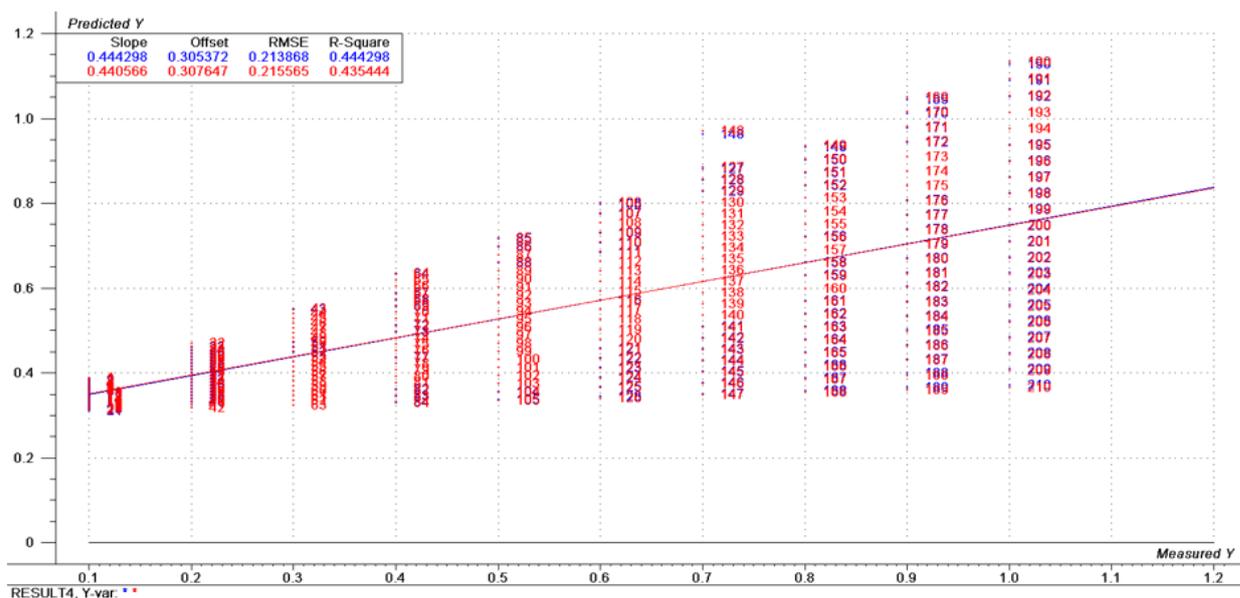


Рисунок 86 - Зависимость предсказанного сигнала от сигнала виртуального эксперимента для аппроксимации линейными зависимостями с использованием метода наименьших квадратов.

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 87).

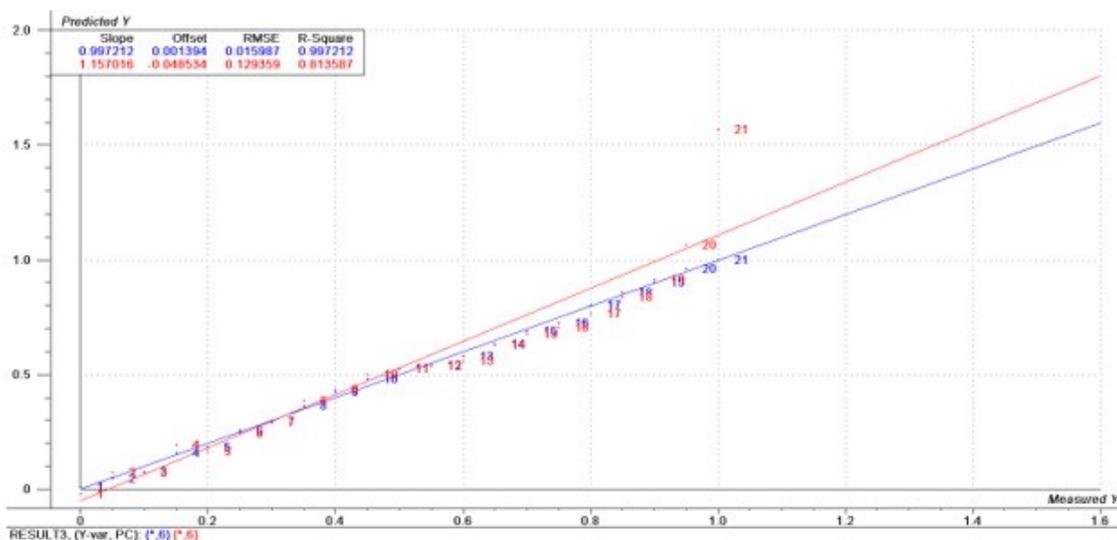


Рисунок 87 - Зависимость предсказанного сигнала от сигнала виртуального эксперимента при построении модели на основе зависимости нормированного тока от соотношения концентраций.

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. Таким образом хемометрический подход имеет определённые перспективы для анализа соединений с близкими ОВР и различными коэффициентами диффузии.

Предложенные в работе подходы используют разность диффузионного поведения, но не затрагивают вопросы электрохимических реакций аналитов. В основном нами были использованы электроактивные производные, полученные прививкой ферроцена, отвечающего за разрядку на инертном электроде, однако применение неинертных, а электрокаталитически активных материалов электрода позволит упростить анализ исключив этап дериватизации и расширить спектр анализируемых веществ.

Нами была исследовано поведение планарных пастовых электродов, содержащих гексацианоферраты переходных металлов в растворах сульфата

магния: была зарегистрирована серия ЦВА, имеющих следующий вид (Рисунок 89), параметры электродов с различными переходными металлами сведены в таблицу

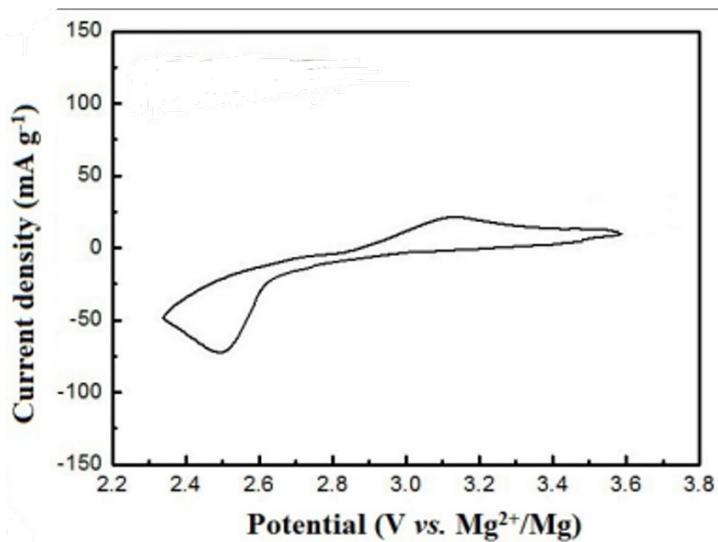


Рисунок 88 – Вид ЦВА в растворе  $\text{MgSO}_4$  с использованием электродов содержащих  $\text{M}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Таблица 6 – Результаты анализа электрохимического поведения синтезированных образцов в водном растворе  $1\text{M MgSO}_4$  против  $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}$ .

Element	$E_{\text{ox}}$ (V)	$E_{\text{red}}$ (V)	$Q_{\text{calc}}$ ( $\text{mAh g}^{-1}$ )	$Q_{\text{exp}}$ ( $\text{mAh g}^{-1}$ )
CuHCF	3.45	2.88	64.3	21.0
		2.51		
NiHCF	3.10	2.81	65.4	19.2
		2.47		
MnHCF	3.15	2.84	72.7	9.8
		2.67		
CoHCF	3.15	2.49	75.6	6.1
FeHCF	3.47	2.63	66.3	1.5
ZnHCF	3.42	2.56	86.6	2.4

Нами была предпринята попытка модификации ансамбля ультрамикроструктур при помощи электрофоретического осаждения частиц золя гексацианоферрата меди: ниже приведены элементные карты, полученные при помощи энергодисперсионной спектральной приставки сканирующего микроскопа (Рисунок 90)

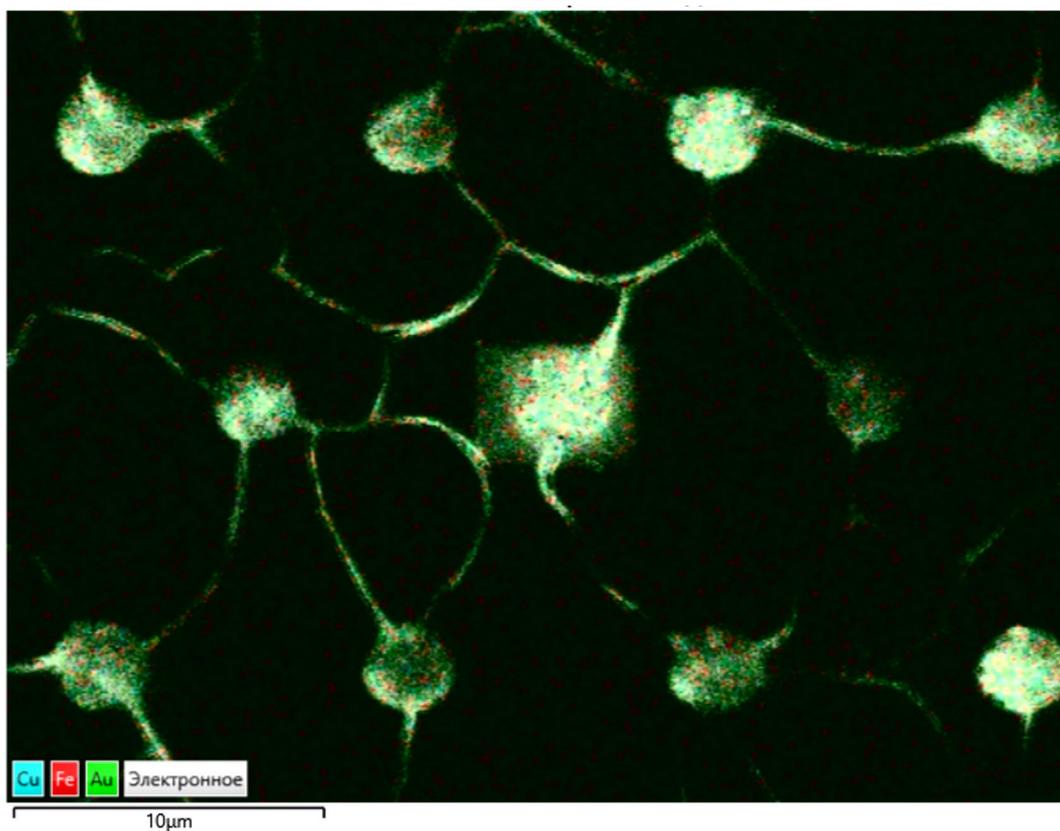


Рисунок 89 – Электронная микрофотография с элементной картой образца массива ультрамикроэлектродов модифицированного гексацианоферратом меди.

Несмотря на локализацию гексацианоферрата меди на открытых участках золотого подслоя электрофоретическое осаждение приводит к разрушению слоя резиста. Полученные данные указывают на перспективность подхода к модификации в случае применения стойких перфорированных слоёв изоляторов.

Еще одним кандидатом для модификации химического состава электродов являются углеродные нанотрубки – материалы высокой электропроводности, обладающие химической стойкостью и в случае модификации электрокаталитическими свойствами. В нашей работе при помощи ячейки, описанной в разделе 2.3 были построены ЦВА с использованием титанового электрода покрытого многослойными серосодержащими нанотрубками из спиртовой суспензии в присутствии в электролите перекиси водорода (Рисунок 90)

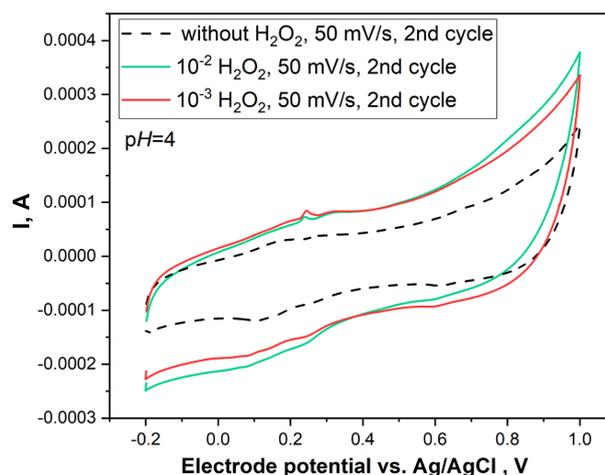


Рисунок 90 - ЦВА S-MWCNTs/Ti в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и без.

Было предложено нанести нанотрубки из суспензии на массив ультрамикродатчиков, однако экспериментально было выяснено, что резист не стоек к этиловому спирту.

Таким образом одним из направлений развития метода является решение материаловедческой задачи создания литографических массивов ультрамикродатчиков с высокой химической стойкостью, что позволит без разрушения структуры проводить модификацию состава электрокаталитически активными соединениями.

Предложенный подход на основе метода регуляризации при анализе экспериментальных данных электрохимического отклика рабочего электрода, отделенного неселективной мембраной, может быть модифицирован при условии использования селективных электродов, что может быть реализовано значительно проще, чем в случае литографических УМЭ ансамблей. Это было продемонстрировано с использованием в качестве модельной системы цистеина и глутатиона, взаимодействующих с электродом покрытым слоем серебра.

Были получены циклические вольтамперограммы покрытого мембраной серебряного электрода с добавлением глутатиона и цистеина (Рисунок 91). Диффузия компонентов к поверхности серебряного электрода отслеживалась по уменьшению величины пика восстановления серебра на катодной ветви ЦВА.

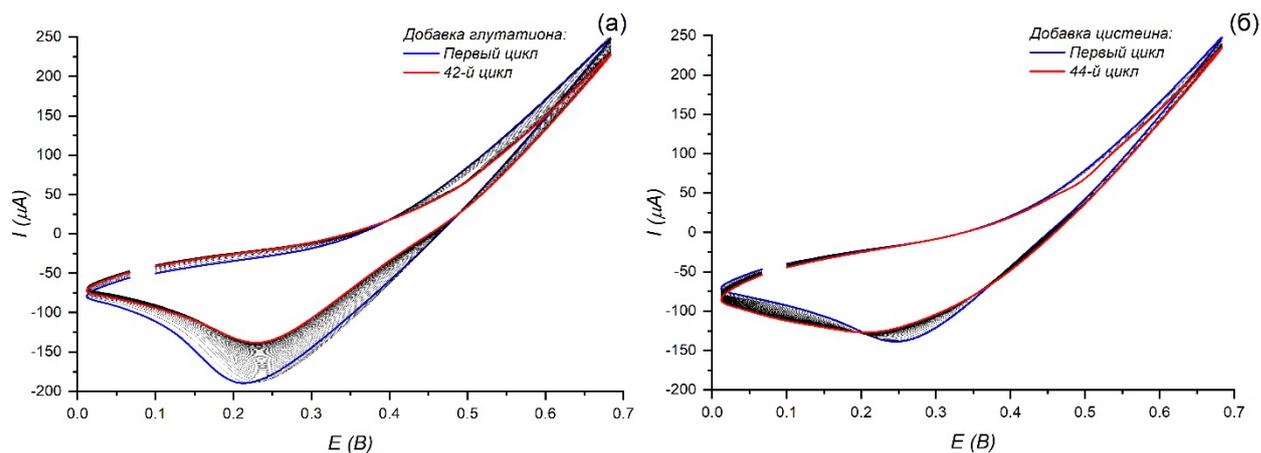


Рисунок 91 – Циклические вольтамперограммы серебряного электрода после добавления глутатиона (а) и цистеина (б)

Полученные зависимости изменения тока пика от номера цикла были отнесены к временной шкале исходя из скорости развертки и ширины вольтамперограммы. Кривые установления пика восстановления  $\text{Ag}^+$  и результат их обработки с применением метода регуляризации приведены ниже (Рисунок 92).

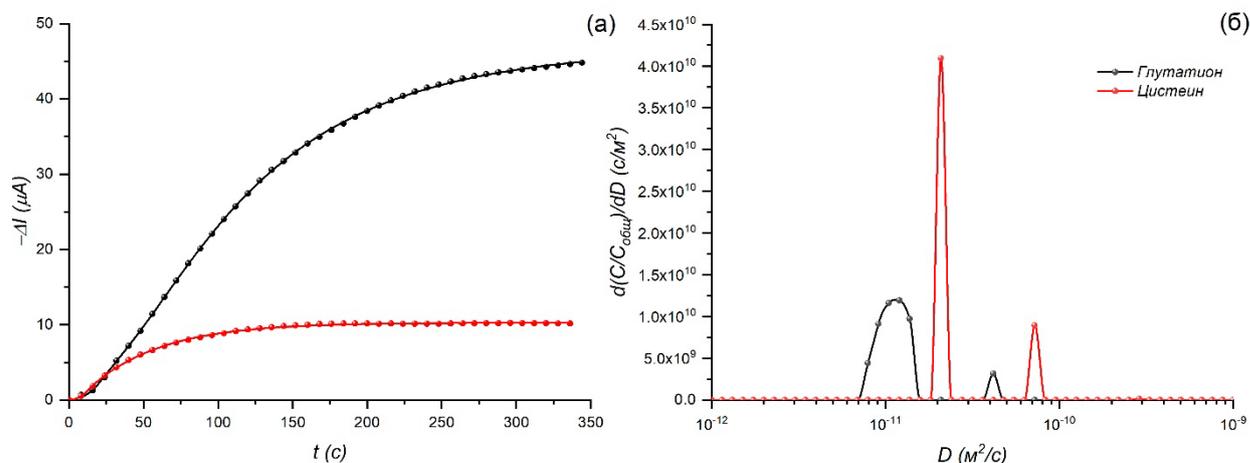


Рисунок 92 – Кривые установления тока пика восстановления  $\text{Ag}^+$  (а) и регуляризованные решения для нормированных функций распределения концентраций веществ по коэффициентам диффузии

Наблюдается существенно различие положений основного максимума двух исследованных компонентов, что качественно соответствует литературным данным о более медленной диффузии глутатиона. При этом в обоих случаях наблюдается побочный пик, наличие которого может быть обусловлено неидеальным соответствием модели, разработанной для стационарного граничного условия

первого рода, условиям измерения ЦВА. Тем не менее, при дальнейшем учете этого обстоятельства, в будущем может быть получена более удовлетворительная модель, которая позволит уверенно различать цистеин и глутатион в смесях.

## Заклучение

Нашей научной группой была исследована возможность проведения электрохимического анализа соединений с близкими окислительно-восстановительными потенциалами и различными коэффициентами диффузии. В ходе проекта были разработаны подходы к вольтамперометрическому и хроноамперометрическому анализу электроактивных соединений и их смесей при помощи электрохимических ячеек различной геометрии, моделей их работы, алгоритмов матобработки данных, которые могут представлять интерес для развития аналитической химии и приборостроения. Также были получены результаты, которые могут быть применены для дериватизации электрохимически неактивных органических соединений, имеющих аминную, карбоксильную и гидроксильную группы.

Наиболее важные результаты достигнуты для вольтамперометрического анализа с применением ансамблей ультрамикроразрядных электродов, хроноамперометрического анализа в четырёхэлектродных ячейках с эквидистантными рабочими электродами и трёхэлектродных ячейках с отделенным мембраной рабочим электродом при использовании метода обработки данных, построенного на применение метода регуляризации для анализа функций распределения концентраций аналитов по коэффициентам диффузии. Данный подход обладает научной новизной, теоретически обоснован, его применимость для количественного анализа соединений различными коэффициентами диффузии даже в случае совпадения окислительно-восстановительных потенциалов подтверждена экспериментально.

## Список использованной литературы

---

1. Davies, Philip W., and Frank Brink Jr. "Microelectrodes for measuring local oxygen tension in animal tissues." *Review of Scientific Instruments* 13.12 (1942): 524-533.
2. Bond, Alan M., M. Fleischmann, and J. Robinson. "Voltammetric measurements using microelectrodes in highly dilute solutions: theoretical considerations." *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry* 172.1-2 (1984): 11-25.
3. Wightman, R. M. (1981). Microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry*, 53(9), 1125A–1134A.
4. Lui, H. Y. S. (1975). Applications of micro-electrodes to electrochemical kinetics (Doctoral dissertation, University of Southampton).
5. Smirnov, Waldemar, et al. "Integrated all-diamond ultramicroelectrode arrays: optimization of faradaic and capacitive currents." *Analytical chemistry* 83.19 (2011): 7438-7443.
6. Gomez, H., G. Riveros, and D. Ramirez. "Chronoamperometric Cu (II) Analysis at Gold Ultramicroelectrodes in Concentrated Sulfuric Acid Solutions." *International Journal of Electrochemical Science* 12.2 (2017): 985-993.
7. Bard, A. J., Crayston, J. A., Kittlesen, G. P., Varco Shea, T., & Wrighton, M. S. (1986). Digital simulation of the measured electrochemical response of reversible redox couples at microelectrode arrays: consequences arising from closely spaced ultramicroelectrodes. *Analytical Chemistry*, 58(11), 2321-2331.
8. Lavacchi, A., Bardi, U., Borri, C., Caporali, S., Fossati, A., & Perissi, I. (2009). Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®. *Journal of Applied Electrochemistry*, 39, 2159-2163.
9. Heinze, J. (1993). Ultramicroelectrodes in electrochemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(9), 1268-1288.
10. Walsh, D. A., Lovelock, K. R. J., & Licence, P. (2010). Ultramicroelectrode voltammetry and scanning electrochemical microscopy in room-temperature ionic liquid electrolytes. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4185.

- 
11. Laborda, E., González, J., Martínez-Ortiz, F., & Molina, A. (2020). Voltammetry at microelectrodes of reversible electrode reactions with complex stoichiometry: A general analytical theoretical framework. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 113932.
  12. Orozco, J., Fernández-Sánchez, C., & Jiménez-Jorquera, C. (2010). Ultramicroelectrode array based sensors: A promising analytical tool for environmental monitoring. *Sensors*, 10(1), 475-490.
  13. Feeney, R., & Kounaves, S. P. (2000). Microfabricated ultramicroelectrode arrays: Developments, advances, and applications in environmental analysis. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 12(9), 677-684
  14. Zoski, C. G., & Wijesinghe, M. (2010). Electrochemistry at Ultramicroelectrode Arrays and Nanoelectrode Ensembles of Macro-and Ultramicroelectrode Dimensions. *Israel Journal of Chemistry*, 50(3), 347-359.
  15. Shinde, S. S., & Park, S. (2015). Oriented colloidal-crystal thin films of polystyrene spheres via spin coating. *Journal of Semiconductors*, 36(2), 023001.
  16. Родинков О. В., Бокач Н. А., Булатов А. В. Основы метрологии физико-химических измерений и химического анализа //СПб.: ВВМ. – 2010. – Т. 133. – С. 14.
  17. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. "Методы решения некорректных задач." (1979).
  18. Петров, М. П., Войтылов, А. В., Войтылов, В. В., & Трусков, А. А. (2017). Электрооптические свойства коллоидных систем. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика. Химия*, 4(2), 102-130.
  19. Harris, C.R., Millman, K.J., van der Walt, S.J. et al. Array programming with NumPy. *Nature* 585, 357–362 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2649-2. (Publisher link).
  20. Pauli Virtanen, Ralf Gommers, Travis E. Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, Evgeni Burovski, Pearu Peterson, Warren Weckesser, Jonathan Bright, Stéfan J. van der Walt, Matthew Brett, Joshua Wilson, K. Jarrod Millman, Nikolay Mayorov, Andrew R. J. Nelson, Eric Jones, Robert Kern, Eric Larson, CJ Carey, İlhan Polat, Yu Feng, Eric W. Moore, Jake VanderPlas, Denis Laxalde, Josef Perktold, Robert Cimrman, Ian Henriksen, E.A. Quintero, Charles R Harris, Anne M. Archibald, Antônio H. Ribeiro, Fabian Pedregosa, Paul van Mulbregt, and SciPy 1.0 Contributors. (2020) *SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. Nature Methods*, 17(3), 261-272.

- 
21. Arbenin, A., Zemtsova, E. G., Ermakov, S. S., Gas'kov, A. M., Baburova, P. I., Sokolova, D. N., ... Smirnov, V. M. (2020). Three-component working electrode micron-sized Ag particles/TiO<sub>2</sub> layer/Ti: template electrochemical synthesis and potential use as electrochemical sensor for glutathione detection. *Materials Research Express*.
22. Вяселев, М.Р. (1989). Обобщенная теория вольтамперометрии – монография // Казань: издательство Казанского университета. – 1989 – с. 11.
23. Arbenin, Andrey Yu, et al. "Prospects of Application of Ultramicroelectrode Ensembles for Voltammetric Determination of Compounds with Close Standard Electrode Potentials and Different Diffusion Coefficients." *Chemosensors* 10.10 (2022): 433.
24. Cully N., Park J., Watts W. E. Bridged ferrocenes. Part 14. A kinetic study of the hydrolysis of [m] ferrocenophan-1-yl acetates // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. – 1979. – №. 7. – С. 947-950.
25. Appoh F. E., Sutherland T. C., Kraatz H. B. Changes in the hydrogen bonding pattern in ferrocene peptides // *Journal of organometallic chemistry*. – 2004. – Т. 689. – №. 25. – С. 4669-4677.
26. Yuji Ikeda (2024) «yuzie007/mpltern: 1.0.4». Zenodo. doi: 10.5281/zenodo.11068993.
27. J. D. Hunter, "Matplotlib: A 2D Graphics Environment", *Computing in Science & Engineering*, vol. 9, no. 3, pp. 90-95, 2007
28. Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130.