

УДК 544.653.22

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА

© Д. О. Перевезенцева¹, Э. В. Горчаков²*Статья поступила 11 ноября 2014 г.*

Изучено электрохимическое поведение глутатиона методом циклической вольтамперометрии с применением графитовых электродов, модифицированных наночастицами золота и микроосадком золота. В случае использования наночастиц золота в качестве модификатора при $E = 0,05$ В в сильнощелочной среде на катодной ветви циклической вольтамперограммы наблюдается увеличение высоты «обратного» максимума с ростом концентрации глутатиона. Высота «обратного» максимума глутатиона линейно зависит от его концентрации в растворе в диапазоне 1 – 14 $\mu\text{моль/л}$. Это позволило разработать простую, чувствительную и экспрессную методику определения глутатиона с пределом обнаружения 0,7 $\mu\text{моль/л}$.

Ключевые слова: глутатион; графитовый электрод; наночастицы золота; вольтамперометрический метод.

Глутатион — 2-амино-5-{[2-[(карбоксиметил)амино]-1-(меркаптометил)-2-оксоэтил]амино}-5-оксопентановая кислота, трипептид γ -глутамилцистеинилглицин — принимает активное участие во многих окислительно-восстановительных превращениях в организме человека и животных и обеспечивает функционирование ряда SH-зависимых ферментов. Уменьшение содержания глутатиона (GSH) в эритроцитах у новорожденных приводит к возникновению гемолитической анемии, поражениям печени [1]. Разработка высокочувствительных методов определения GSH в различных объектах является важной аналитической задачей. В последнее время для определения GSH все

чаще используют электрохимические методы благодаря их простоте, экспрессности и чувствительности, в частности, вольтамперометрические методы с применением различных электродов (табл. 1). Как видно из табл. 1, ртутно-пленочный электрод (РПЭ), который ограниченно используют в лабораториях из-за токсичности, не является чувствительным. По сравнению с ним платиновый электрод обладает большей чувствительностью [3, 4]. Электроды на основе различных модификаций углерода позволяют уменьшить предел обнаружения GSH на несколько порядков величины [5 – 7]. Модифицирование индикаторных электродов наночастицами металлов, их оксидов и гидроксидов позволяет улучшить чувствительность определения и уменьшает пределы обнаружения аминокислот [8 – 10]. Модифицирование поверхности углеродсодержащих электродов наночастицами золота для определения серосодержащих аминокислот явля-

¹ ФГБОУ ВПО Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия; e-mail: dop@tpu.ru

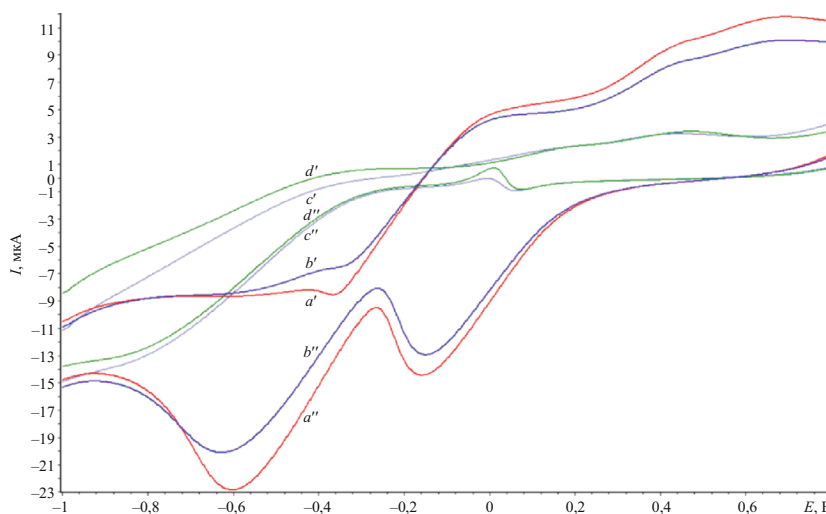
² ФГБОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет, г. Ставрополь, Россия.

Таблица 1. Аналитические характеристики некоторых электродов для определения глутатиона

Электрод	Модификатор	pH	ПО, $\mu\text{моль/л}$	Интервал определяемых концентраций, $\mu\text{моль/л}$	Ссылка
РПЭ	—	9,2	150,0	—	[2]
Pt	—	1,3	20,0	—	[3]
Pt	—	4,0	20,0	1 – 10000	[4]
ГЭ	Микросферы	3,6	6,4	—	[5]
ГЭ	Нанотрубки	3,6	5,5	—	[5]
УПЭ	Графит	3,6	4,5	—	[5]
УПЭ	FC	7,0	2,1	2,2 – 3,0	[6]
УПЭ	Нанотрубки, аминазин	4,0	0,16	0,3 – 18,3	[7]
УПЭ	Нанопорошок $\text{Cu}(\text{OH})_2$	7,0	0,03	1 – 50	[8]
СГЭ	Наночастицы NiO	7,2	100,0	200 – 6000	[9]

Примечание. УПЭ — угольнопастовый электрод, СГЭ — стеклографитовый электрод, FC — 2,7-бис(этил)ферроценилфлуорен-9-он.

Рис. 1. Циклические вольтамперограммы GSH в растворе фонового электролита 0,1 М NaOH при использовании ГЭ-Au: $C_{\text{GSH}} = 2$ пмоль/л — $a'a''$, $C_{\text{GSH}} = 4$ пмоль/л — $b'b''$ и ГЭ-Au_{nano}: $C_{\text{GSH}} = 2$ пмоль/л — $c'c''$, $C_{\text{GSH}} = 4$ пмоль/л — $d'd''$ (скорость развертки потенциала — 0,1 В/с)



ется актуальной задачей. Например, модифицирование графитового электрода наночастицами золота позволило снизить предел обнаружения цистеина на пять порядков величины [11].

Целью данной работы является изучение возможности использования графитовых электродов, модифицированных наночастицами золота (ГЭ-Au_{nano}), для определения глутатиона и разработка чувствительного вольтамперометрического способа его определения в водных растворах.

В работе использовали вольтамперометрический анализатор ТА-4 (ООО «Томьяналит», г. Томск) с трехэлектродной ячейкой. Очистку поверхности ГЭ проводили механическим способом с помощью фильтровальной бумаги. В качестве индикаторного электрода использовали графитовые электроды, модифицированные наночастицами золота (ГЭ-Au_{nano}) и микроосадком золота, осаждаемого из раствора HAuCl_4 с концентрацией 10 мг/л (ГЭ-Au). Вспомогательным и электродом сравнения служили насыщенные хлоридсеребряные электроды.

Модифицирование поверхности ГЭ наночастицами золота проводили по следующей методике. Электрод помещали в электрохимическую ячейку (кварцевый стакан объемом 20 мл), заполненную 10 мл 0,1 М HCl с добавкой 0,1 мл золя золота, приготовленного согласно методике, описанной в работе [12]. При потенциале электролиза $-1,0$ В в течение 300 с модифицировали поверхность индикаторного электрода золотыми наночастицами, после чего электрод вынимали из раствора, ополаскивали бидистиллированной водой и помещали в электрохимическую ячейку с 0,1 М NaOH для вольтамперометрического определения GSH.

Модифицирование поверхности ГЭ микроосадком золота проводили следующим образом. Электрод помещали в электрохимическую ячейку с 10 мл раствора HAuCl_4 (10 мг/л). Золото электрохимически осаждали на поверхность ГЭ при потенциале накопления $-1,0$ В в течение 30 с. Затем электрод вынимали из

раствора, ополаскивали бидистиллированной водой и помещали в фоновый электролит (0,1 М NaOH) для вольтамперометрического определения GSH. Растворы GSH ($C = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) готовили растворением точной навески в воде. Серии растворов с меньшей концентрацией GSH получали последовательным разбавлением исходного раствора непосредственно перед измерениями.

Электрохимическое поведение GSH изучали в растворе фонового электролита NaOH с применением ГЭ-Au и ГЭ-Au_{nano} (рис. 1).

Как видно из рис. 1, в случае использования ГЭ-Au на циклической вольтамперограмме GSH (2 пмоль/л) при сканировании в области потенциалов от $-1,0$ до $+0,8$ В наблюдаются три волны при потенциалах $E_{a1} = 0,0$ В, $E_{a2} = 0,4$ В, $E_{a3} = 0,6$ В (см. рис. 1, анодная ветвь, кривая a'). При сканировании в области потенциалов от $+0,8$ до $-1,0$ В зарегистрированы два максимума при $E_{k1} = -0,16$ В и $E_{k2} = -0,6$ В (см. рис. 1, катодная ветвь, кривая a''). При увеличении концентрации GSH в два раза (4 пмоль/л) высоты анодных (кривая b') и катодных максимумов (кривая b'') уменьшаются, что обусловлено адсорбцией GSH на поверхности электрода.

В случае использования ГЭ-Au_{nano} при концентрации GSH 2 пмоль/л на анодной ветви циклической вольтамперограммы при сканировании потенциала в области от $-1,0$ до $+0,8$ В наблюдается волна при потенциале $E_a = 0,4$ В (кривая c' , рис. 1). При увеличении концентрации GSH (4 пмоль/л) высота анодного максимума возрастает в два раза по сравнению с высотой для первой добавки (кривая d'). При сканировании в области потенциалов от $+0,8$ до $-1,0$ В наблюдается «обратный» максимум при $E_k = 0,05$ В (катодная ветвь, кривая c''), высота которого при увеличении концентрации GSH от 2 до 4 пмоль/л пропорционально возрастает в два раза (катодная ветвь, кривая d'').

Появление на вольтамперограмме «обратного» катодного пика (кривая c'') при использовании

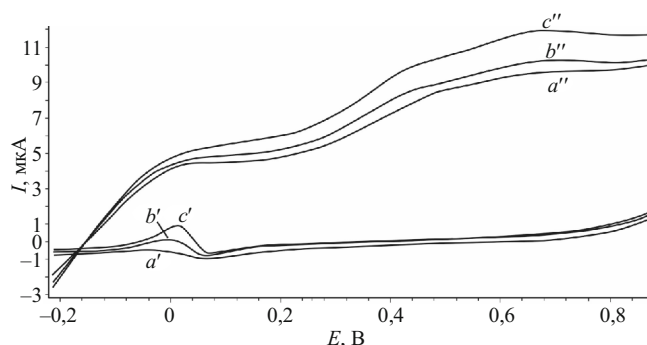


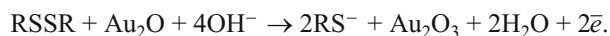
Рис. 2. Циклические вольтамперограммы GSH, полученные при использовании ГЭ-Au_{nano}: фоновая кривая — $a'a''$; $C_{\text{GSH}} = 4$ пмоль/л — $b'b''$; $C_{\text{GSH}} = 8$ пмоль/л — $c'c''$

ГЭ-Au_{nano}, возможно, связано с окислением оксида золота [13, 14]:



Аналогичный процесс окисления был обнаружен для серебра ($\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}_2\text{O}$) в щелочном растворе [15] и для золота, осажденного на поверхности ртутного электрода, катализирующего восстановление кислорода [16].

В этом случае «обратный» катодный максимум в присутствии GSH на катодной ветви циклической вольтамперограммы может быть описан схемой:



Пропорциональное увеличение высоты «обратного» максимума также обнаружено в присутствии 4 и 8 пмоль/л GSH (рис. 2, кривые b' , c'). При дальнейшем увеличении концентрации GSH высота «обратного» максимума линейно зависит от концентрации GSH (рис. 3). Эта зависимость линейна в области концентраций от 2 до 14 пмоль/л при использовании ГЭ-Au_{nano}.

Методика вольтамперометрического определения глутатиона. Фоновый электролит 0,1 М NaOH объемом 10 мл помещали в электрохимическую ячейку, его вольтамперограммы регистрировали в режиме циклической вольтамперометрии при следующих условиях: скорость развертки потенциала — 0,100 В/с, потенциал пика фиксируется в области $E = -0,4 - 0,3$ В. В фоновый электролит добавляли 20 мкл раствора GSH с концентрацией 1 пмоль/л, полученный раствор перемешивали в течение 1 мин и затем регистрировали циклическую вольтамперограмму GSH.

Таблица 2. Результаты определения GSH в модельных водных растворах ($n = 6$; $P = 0,95$)

Объект исследования	Введено, C_{GSH} , моль/л	Найдено, C_{GSH} , моль/л	S_r
0,1 М NaOH	$4 \cdot 10^{-12}$	$(3,82 \pm 1,87) \cdot 10^{-12}$	0,489
Водопроводная вода	$2 \cdot 10^{-12}$	$(2,02 \pm 0,78) \cdot 10^{-12}$	0,305

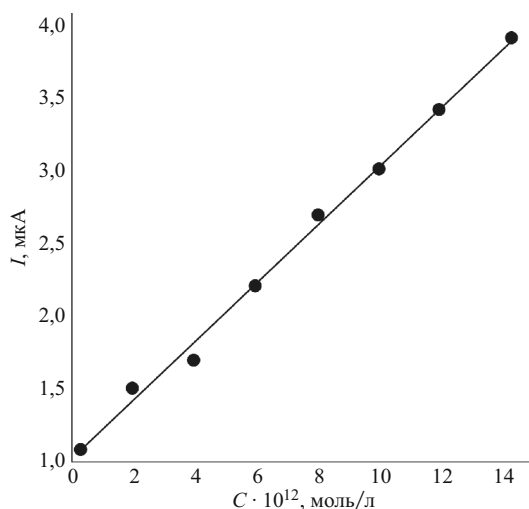


Рис. 3. Зависимость тока пика окисления от концентрации GSH на ГЭ-Au_{nano} в 0,1 М NaOH

Далее добавляли 20 мкл раствора GSH (1 пмоль/л), перемешивали раствор в течение 1 мин и записывали другую циклическую вольтамперограмму GSH. Все измерения проводили при температуре $T = 20 - 25$ °С и давлении $P = 750$ мм рт. ст. Каждую вольтамперограмму записывали по два раза. После измерения расчет выполняли по методу стандартных добавок.

Результаты определения GSH в водных растворах представлены в табл. 2.

Предел обнаружения GSH, рассчитанный по 3σ-критерию, равен 0,7 пмоль/л. На основании полученных результатов был разработан вольтамперометрический способ определения GSH в водных растворах с использованием ГЭ-Au_{nano} [17]. Повышение чувствительности определения GSH происходит за счет увеличения его «обратного» максимума, что позволило при использовании ГЭ-Au_{nano} снизить предел обнаружения на четыре порядка величины по сравнению с известным в литературе методом [8] с применением УПЭ, модифицированного наночастицами гидроксида меди (II).

Таким образом, изучено электрохимическое поведение глутатиона на графитовых электродах, модифицированных наночастицами золота, методом циклической вольтамперометрии в растворе фонового электролита (0,1 М NaOH). Обнаружено увеличение высоты «обратного» максимума на катодной ветви вольтамперограммы глутатиона по сравнению с высотой «обратного максимума» модификатора при потенциале 0,05 В в щелочной среде при использовании графитового электрода, модифицированного наночастицами золота. Увеличение высоты «обратного» максимума глутатиона связано с процессом окисления глутатиона на ГЭ-Au_{nano}.

Предложен способ определения глутатиона в модельных растворах в следующих условиях: скорость развертки потенциала — 0,100 В/с; потенциал пика

фиксируется в области $E = -0,4 - 0,3$ В. Зависимость тока пика «обратного» максимума от концентрации глутатиона линейна в области концентраций 1 – 14 $\mu\text{моль/л}$, предел обнаружения, рассчитанный по 3 σ -критерию, составляет 0,7 $\mu\text{моль/л}$. На основании полученных результатов разработана простая, чувствительная и экспрессная методика определения глутатиона.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Гараева С. Н., Редкозубова Г. В., Постолати Г. В.** Аминокислоты в живом организме. — Кишинев: АН Молдовы, 2009. — 552 с.
2. **Huska D., Zitka O., Adam V., et al.** A sensor for investigating the interaction between biologically important heavy metals and glutathione / Czech J. Anim. Sci. 2007. Vol. 52. N 2. P. 37 – 43.
3. Пат. 2441225 РФ. Способ определения глутатиона в биологически активных добавках методом катодной вольтамперометрии / Короткова Е. И., Дорожко Е. В.; опубл. 27.01.12., бюл. № 3.
4. **Будников Г. К., Зиятдинова Г. К., Валитова Я. Р.** Электрохимическое определение глутатиона / Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59. № 6. С. 645 – 648.
5. **Apetrei C., Apetrei I. M., De Saja J. A. et al.** Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of antioxidants / Sensors. 2011. Vol. 11. P. 328 – 1344.
6. **Raof J. B., Ojani R., Karimi-Maleh H.** Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor / Appl. Electrochem. 2009. Vol. 39. P. 1169 – 1175.
7. **Ensafi Ali. A., Taei M., Khayamian T.** Voltammetric measurement of trace amount of glutathione using multiwall carbon nanotubes as a sensor and chlorpromazine as a mediator / J. Solid State Electrochem. 2010. Vol. 14. P. 1415 – 1423.
8. **Safavi A., Maleki N., Farjami E., et al.** Electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode / Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 81. P. 7538 – 7543.
9. **Chee S. Y., Flegel M., Pumera M.** Regulatory peptides desmopressin and glutathione voltammetric determination on nickel oxide modified electrodes / Electrochem. Comm. 2011. Vol. 13. P. 963 – 965.
10. **Compton R. G.** The use of nanoparticles in electroanalysis: a review / Anal. Bioanal. Chem. 2006. Vol. 384. P. 601 – 619.
11. **Perevezentseva D. O., Gorchakov E. V.** Voltammetric determination of cysteine at a graphite electrode modified with gold nanoparticles / Solid State Electrochem. 2012. Vol. 16. N 7. P. 2405 – 2410.
12. **Коршунов А. В., Перевезенцева Д. О., Коновчук Т. В., Миронец Е. В.** Влияние дисперсного состава зольей серебра и золота на их электрохимическую активность / Изв. Томского политех. ун-та. 2010. Т. 317. № 3. С. 6 – 13.
13. **Burke L., Nugent P.** The electrochemistry of Gold: I The redox behavior of metal in aqueous media / Gold Bull. 1997. Vol. 30. P. 43 – 53.
14. **Burke L. D., Lyons M.** Modern aspects of electrochemistry. N 18. / Eds. R. White, J. Bockris, B. Conway. — New York: Plenum Press, 1986. P. 169 – 182.
15. **Брайнина Х. З.** Об обратимых пиках на поляризационных кривых / Электрохимия. 1988. Т. 13. С. 678 – 680.
16. **Korshunov A. V., Yosypchuk B., Heyrovsky M.** Voltammetry of aqueous chloroauric acid with hanging mercury drop electrode / Collect. Czech. Chem. Comm. 2011. Vol. 76. P. 929 – 936.
17. Пат. 2528584 РФ. Способ определения глутатиона в модельных водных растворах методом циклической вольтамперометрии на графитовом электроде, модифицированном коллоидными частицами золота / Perevezentseva D. O., Gorchakov E. V., Seitzhanova M. A. Appl. 19.03.13; publ. 20.09.14. [in Russian].

REFERENCES

1. **Garaeva S. N., Redkozubova G. V., Postolati G. V.** Amino-kisloty v zhivom organizme. — Chişinău: Moldavian Acad. Sci., 2009. — 552 p. [in Russian].
2. **Huska D., Zitka O., Adam V., et al.** A sensor for investigating the interaction between biologically important heavy metals and glutathione / Czech J. Anim. Sci. 2007. Vol. 52. N 2. P. 37 – 43.
3. Pat. 2441225 RF. Sposob opredeleniya glutatiiona v biologicheskikh aktivnykh dobavkakh metodom katodnoi vol'tamperometrii / Korotkova E. I., Dorozhko E. V.; publ. 27.01.12., Byul. N 3. [in Russian].
4. **Budnikov G. K., Ziyatdinova G. K., Valitova Ya. R.** Élektrokhimicheskoe opredelenie glutatiiona / Zh. Anal. Khimii. 2004. Vol. 59. N 6. P. 645 – 648. [in Russian].
5. **Apetrei C., Apetrei I. M., De Saja J. A. et al.** Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of antioxidants / Sensors. 2011. Vol. 11. P. 328 – 1344.
6. **Raof J. B., Ojani R., Karimi-Maleh H.** Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor / Appl. Electrochem. 2009. Vol. 39. P. 1169 – 1175.
7. **Ensafi Ali. A., Taei M., Khayamian T.** Voltammetric measurement of trace amount of glutathione using multiwall carbon nanotubes as a sensor and chlorpromazine as a mediator / J. Solid State Electrochem. 2010. Vol. 14. P. 1415 – 1423.
8. **Safavi A., Maleki N., Farjami E., et al.** Electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode / Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 81. P. 7538 – 7543.
9. **Chee S. Y., Flegel M., Pumera M.** Regulatory peptides desmopressin and glutathione voltammetric determination on nickel oxide modified electrodes / Electrochem. Comm. 2011. Vol. 13. P. 963 – 965.
10. **Compton R. G.** The use of nanoparticles in electroanalysis: a review / Anal. Bioanal. Chem. 2006. Vol. 384. P. 601 – 619.
11. **Perevezentseva D. O., Gorchakov E. V.** Voltammetric determination of cysteine at a graphite electrode modified with gold nanoparticles / Solid State Electrochem. 2012. Vol. 16. N 7. P. 2405 – 2410.
12. **Korshunov A. V., Perevezentseva D. O., Konovchuk T. V., Mironets E. V.** Vliyanie dispersnogo sostava zolei serebra i zlota na ikh élektrokhimicheskuyu aktivnost' / Izv. Tomskogo politekh. un-ta. 2010. Vol. 317. N 3. P. 6 – 13. [in Russian].
13. **Burke L., Nugent P.** The electrochemistry of Gold: I The redox behavior of metal in aqueous media / Gold Bull. 1997. Vol. 30. P. 43 – 53.
14. **Burke L. D., Lyons M.** Modern aspects of electrochemistry. N 18. / Eds. R. White, J. Bockris, B. Conway. — New York: Plenum Press, 1986. P. 169 – 182.
15. **Brainina Kh. Z.** Ob obratimyykh pikakh na polyarizatsionnykh krivyykh / Élektrokhimiya. 1988. Vol. 13. P. 678 – 680. [in Russian].
16. **Korshunov A. V., Yosypchuk B., Heyrovsky M.** Voltammetry of aqueous chloroauric acid with hanging mercury drop electrode / Collect. Czech. Chem. Comm. 2011. Vol. 76. P. 929 – 936.
17. Pat. 2528584 RF. Sposob opredeleniya glutatiiona v model'nykh vodnykh rastvorakh metodom tsiklicheskoi vol'tamperometrii na grafitovom élektrode, modifitsirovannom kolloidnymi chastsitsami zlota / Perevezentseva D. O., Gorchakov E. V., Seitzhanova M. A. Appl. 19.03.13; publ. 20.09.14. [in Russian].