



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2012147112/28, 06.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.11.2012

(45) Опубликовано: 20.03.2014 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2441225 C1, 27.01.2012. RU 2447444 C1, 10.04.2012. RU 2426109 C1, 10.08.2011. RU 92539 U1, 20.03.2010. RU 2160898 C1, 20.12.2000. US 2008251394 A1, 16.10.2008.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр. Ленина, 30,  
Национальный исследовательский Томский  
политехнический университет, отдел  
правовой охраны результатов  
интеллектуальной деятельности

(72) Автор(ы):

Перевезенцева Дарья Олеговна (RU),  
Горчаков Эдуард Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
"Национальный исследовательский Томский  
политехнический университет" (RU)

**(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛУТАТИОНА В МОДЕЛЬНЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ЦИКЛИЧЕСКОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ НА ГРАФИТОВОМ ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ КОЛЛОИДНЫМИ ЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к электроаналитической химии, направлено на определение глутатиона и может быть использовано в анализе в модельных водных растворах методом циклической вольтамперометрии по высоте анодного максимума на анодной кривой. Способ определения глутатиона заключается в определении методом циклической вольтамперометрии, при котором происходит электрокаталитическое окисление глутатиона на графитовом электроде, модифицированного частицами серебра. Способ согласно изобретению включает модифицирование графитовых электродов коллоидными

частицами серебра из золя серебра в течение 300 с при потенциале электролиза -1,0 В с последующей регистрацией анодных максимумов электроокисления глутатиона на анодной кривой при скорости развертки потенциала 100 мВ/с на фоне 0,1 М раствора NaOH в диапазоне потенциалов от -1,0 до 1,0 В, концентрацию глутатиона определяют по высоте анодных максимумов вольтамперных кривых в диапазоне потенциалов от 0,30 до 0,60 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода методом добавок аттестованных смесей. Изобретение обеспечивает повышение чувствительности способа определения глутатиона. 2 пр., 1 табл., 2 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012147112/28, 06.11.2012**(24) Effective date for property rights:  
**06.11.2012**

Priority:

(22) Date of filing: **06.11.2012**(45) Date of publication: **20.03.2014 Bull. 8**

Mail address:

**634050, g.Tomsk, pr. Lenina, 30, Natsional'nyj  
issledovatel'skij Tomskij politekhnicheskij  
universitet, otdel pravovoj okhrany rezul'tatov  
intellektual'noj dejatel'nosti**

(72) Inventor(s):

**Perevezentseva Dar'ja Olegovna (RU),  
Gorchakov Ehdvard Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
professional'nogo obrazovanija "Natsional'nyj  
issledovatel'skij Tomskij politekhnicheskij  
universitet" (RU)**

**(54) METHOD OF DETERMINING GLUTATHIONE IN STANDARD TEST AQUEOUS SOLUTIONS VIA CYCLIC VOLTAMMETRY ON GRAPHITE ELECTRODE, MODIFIED WITH COLLOIDAL SILVER PARTICLES**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method of determining glutathione involves determination by cyclic voltammetry, wherein there is electrocatalytic oxidation of glutathione on a graphite electrode modified with silver particles. The method according to the invention involves modifying graphite electrodes with colloidal silver particles from a silver sol for 300 s at electrolysis potential of -1.0 V, followed by recording anodic maxima of electrooxidation of glutathione on an anodic curve

with potential sweep rate of 100 mV/s on a background of 0.1 M NaOH solution in the potential range from -1.0 V to 1.0 V; concentration of glutathione is determined from the height of anodic maxima of current versus voltage curves in the potential range from 0.30 V to 0.60 V relative a saturated silver chloride electrode by standard addition method.

EFFECT: high sensitivity of the method of determining glutathione.

2 ex, 1 tbl, 2 dwg

Изобретение относится к аналитической химии, а именно к способам определения содержания глутатиона в водных растворах методом циклической вольтамперометрии.

Предложена методика вольтамперометрического определения глутатиона в модельных растворах на платиновом электроде в растворе фонового электролита 0,05 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при сканировании потенциала от 0,0 до 1,3 В со скоростью развертки потенциала 20 мВ/с. Нижняя граница определяемых содержаний глутатиона составляет 1,9·10<sup>5</sup> М. [Будников Г.К., Зиятдинова Г.К., Валитова Я.Р. Электрохимическое определение глутатиона // Журнал аналитической химии. - 2004. - Т.59. - №6. - С.645-648]. Недостатком является низкая чувствительность определения глутатиона и использование дорогостоящего индикаторного платинового электрода.

Предложена методика электрохимического определения глутатиона в водных растворах биологически активных веществ в режиме катодной вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде в боратном буферном растворе фонового электролита при рН 9,18 и сканировании потенциала от 0,0 до -0,8 В со скоростью развертки потенциала 20 мВ/с. Предел обнаружения составляет 6,3·10<sup>-5</sup> моль/л. [Короткова Е.И., Дорожко Е.В. Патент №2441225 от 27.01.2012. Бюл. №3 // Способ определения глутатиона в биологически активных добавках методом катодной вольтамперометрии]. Недостатком является низкая чувствительность определения глутатиона и использование токсичного индикаторного ртутно-пленочного электрода.

Предложен способ определения глутатиона методом циклической вольтамперометрии в модельных растворах, имитирующих состав вина, состоящий из 12% этанола, 0,05 М винной кислоты с добавлением NaOH до рН 3,6 на угольно-пастовых электродах из различных углеродсодержащих материалов в растворе фонового электролита 0,1 М KCl при сканировании потенциала от -0,5 до +1,3 В со скоростью 100 мВ/с. Предел обнаружения глутатиона на угольно-пастовом электроде, приготовленном из графита, составляет 4,47·10<sup>-6</sup> М; на угольно-пастовом электроде, приготовленном из микросфер, составляет 6,32·10<sup>-6</sup> М; на угольно-пастовом электроде, приготовленном из нанотрубок, равен 5,48·10<sup>-6</sup> М. [Apetrei C., Apetrei I.M., De Saja J. A. and Rodriguez -Mendez M. L. Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of antioxidants. // Sensors. - 2011. - V.11. - P. 328-1344]. Недостатком является низкая чувствительность определения глутатиона для всех предложенных модификаций графитового электрода и использование сложносоставного фонового электролита.

Предложен способ определения глутатиона методом циклической вольтамперометрии в растворе фонового электролита 0,05 М Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> при рН 9,2 на ртутно-капающем электроде, при сканировании потенциала от -0,8 до -0,2 В со скоростью 5 мВ/с. Нижняя граница определяемых содержаний составляет 1,5·10<sup>-4</sup> моль/л [D. Huska, O. Zitka, V. Adam, M. Beklova, S. Kfizkova, L. Zeman, A. Hota, L. Havel, J. Zehnalek, R. Kizek A sensor for investigating the interaction between biologically important heavy metals and glutathione // Czech J. Anim. Sci., 52, 2007 (2): 37-43]. Недостатком является низкая чувствительность определения глутатиона и использование токсичного индикаторного ртутно-капающего электрода.

Предложена методика определения глутатиона методом циклической вольтамперометрии в эритроцитах человека на стеклянном электроде, модифицированном фталоцианидом кобальта в поли-1-лизин пленке в 0,1 моль буферном растворе при рН 7,4 n-1-пиперазин-К, N-бис (2-этансульфо)кислоте). Предел обнаружения составляет 15 нмоль/л. [Luz, R. Cassia Silva; Damos, Flavio Santos; Gandra,

Paulo Guimares; De Macedo, Denise Vaz; Tanaka, Auro Atsushi; Kubota, Lauro Tatsuo Electrochemical determination of reduced glutathione in human erythrocytes // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2007. - V. 387. - №5. - P. 1891]. Недостатком является использование стеклянного электрода с трудно модифицируемой поверхностью и использование сложного фонового электролита.

Предложена методика определения сульфгидридных (тиоловых) и дисульфидных групп в цельной крови в режиме инверсионно-вольтамперометрического титрования на платиновом электроде в фоновом растворе аммиачного буфера с pH 9,5 при сканировании потенциала от -0,1 до 0,4 В со скоростью развертки потенциала 250 мВ/с. Нижняя граница определяемых содержаний сульфгидридных (тиоловых) соединений составляет  $1,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л, дисульфидных -  $4,6 \cdot 10^{-3}$ . [Захарчук Н.Ф., Борисова Н.С., Титова Т.В. Исследование тиолсульфидного равновесия в цельной крови и ее фракциях методом инверсионно-вольтамперометрического титрования // Журнал аналитической химии. - 2008. - Т.63. - №2. - С.189-198, прототип.]

В работе была поставлена задача, снизить предел и нижнюю границу определяемых содержаний глутатиона по величине анодного максимума на циклической кривой? полученного на графитовом электроде (ГЭ), модифицированном коллоидными частицами серебра методом циклической вольтамперометрии.

Поставленная задача достигается тем, что проводят электроокисление глутатиона на поверхности модифицированного ГЭ. Модифицирование поверхности ГЭ коллоидными частицами серебра проводят из золя серебра (мольное соотношение  $\text{HAuCl}_4:\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  1:1) в течение 300 с при потенциале электролиза  $E_3 = -1,0$  В. Вольтамперные зависимости регистрируют в растворе фонового электролита 0,1 М NaOH при скорости развертки? равной 100 мВ/с в диапазоне потенциалов от -1,0 до 1,0 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода (нас.х.э.). Концентрацию глутатиона определяют по высоте анодного максимума на вольтамперных кривых в диапазоне потенциалов от 0,3 до 0,6 В. Новым в способе является то, что для получения полезного сигнала, зависящего от концентрации глутатиона, используется ГЭ, модифицированный коллоидными частицами серебра, позволяющий увеличить каталитическую активность за счет увеличения рабочей поверхности электрода увеличением числа активных центров и большей электрокаталитической активностью коллоидных частиц серебра по сравнению с поверхностью платинового электрода.

В предлагаемом способе впервые установлена способность глутатиона окисляться на ГЭ, модифицированном коллоидными частицами серебра, полученными по цитратной методике.

В качестве индикаторного электрода применяли ГЭ, модифицированный коллоидными частицами серебра (в прототипе применяли платиновый электрод).

Использование таких электродов обусловлено высокой химической и электрохимической устойчивостью графита, широкой областью рабочих потенциалов, простотой нанесения модификатора, механического обновления поверхности и требованиями техники безопасности (не используются опасные или вредные вещества при работе с электродом).

В данном изобретении предлагается способ модифицирования поверхности электрода коллоидными частицами серебра из золя (мольное соотношение  $\text{HAuCl}_4:\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  1:1). Модифицированная поверхность электрода чувствительна к присутствию глутатиона в растворе, что позволяет судить о его наличии.

Предлагаемый в заявляемом изобретении фон 0,1 М NaOH позволяет определять

низкие содержания глутатиона с хорошей воспроизводимостью концентрацию равной  $1 \cdot 10^{-12}$  моль/л, что соответствует минимально определяемой концентрации (в прототипе предел обнаружения  $4,47 \cdot 10^{-6}$  М).

5 На фиг.1 представлены циклические вольтамперные кривые глутатиона с поверхности графитового электрода, предварительно электрохимически модифицированного коллоидными частицами серебра. Кривая 1ан, 1кат ветвь - фон 0,1 М NaOH; кривая 2ан, 2кат ветвь -  $C_{GSH}=2 \cdot 10^{-12}$  моль/л; кривая 3ан, 3кат ветвь -  $C_{GSH}=4 \cdot 10^{-12}$  моль/л.

10 Таким образом, установленные условия впервые позволили количественно определять содержание глутатиона на основе реакции электрокаталитического окисления глутатиона на поверхности графитового электрода, предварительно электрохимически модифицированного коллоидными частицами серебра. Кривая 1 - фон 0,1 М NaOH, кривая 2 -  $C_{GSH}=2 \cdot 10^{-12}$  моль/л, кривая 3 -  $C_{GSH}=4 \cdot 10^{-12}$  моль/л (фиг.2).

15 Предлагаемый вольтамперометрический способ позволил улучшить метрологические характеристики анализа глутатиона, повысить чувствительность определения (1-10 моль/л), что на несколько порядков ниже по сравнению с прототипом (табл.1).

20 Примеры конкретного выполнения

Пример 1. Измерения были проведены в модельном растворе. Графитовый электрод помещают в электрохимическую ячейку (кварцевый стаканчик), заполненную 10 мл золя серебра (мольное соотношение  $HAuCl_4:Na_3C_6H_5O_7$  1:1).

25 Проводят электролиз раствора для модификации ГЭ коллоидными частицами серебра при условии:  $E_3=-1,0$  В,  $\tau_3=300$  с. Для проверки работы электрода снимают вольтамперную кривую электроокисления серебра при скорости развертки 50 мВ/с в диапазоне от -0,50 до 1,00 В. На кривой регистрируется волна окисления серебра при  $E=0,0 \pm 0,1$  В. Наличие волны серебра свидетельствует об электроконцентрировании серебра из цитратного золя серебра на поверхности графитового электрода. Затем проводят электролиз еще раз при тех же условиях, но не проводят развертку вольтамперной кривой. Полученный модифицированный графитовый электрод ополаскивают бидистиллированной водой и помещают в другую электрохимическую ячейку (кварцевый стаканчик), заполненную 10 мл 0,1 М раствора NaOH. Не проводя накопления регистрируют анодную ветвь, а затем катодную ветвь циклической вольтамперной кривой фонового электролита при скорости развертки 100 мВ/с, начиная с потенциала минус 1,0 и до плюс 1,0 В. На анодной ветви вольтамперной кривой фонового электролита не наблюдается максимум в диапазоне потенциалов от 0,3 до 0,6 В. При добавлении раствора глутатиона происходит увеличение высоты максимума в диапазоне потенциалов от 0,3 до 0,6 В.

Пример 2. Измерения были проведены в водопроводной воде.

45 Графитовый электрод помещают в электрохимическую ячейку (кварцевый стаканчик), заполненную 10 мл золя серебра (мольное соотношение  $HAuCl_4:Na_3C_6H_5O_7$  1:1). Проводят электролиз раствора для модификации ГЭ коллоидными частицами серебра при условии:  $E_3=-1,0$  В,  $\tau^3=300$  с. Для проверки работы электрода снимают вольтамперную кривую электроокисления серебра при скорости развертки 50 мВ/с в диапазоне от -0,50 до 1,00 В. На кривой регистрируют волну окисления серебра при  $E=0,0 \pm 0,1$  В. Наличие волны серебра свидетельствует об электроконцентрировании серебра из цитратного золя серебра на поверхности графитового электрода. Затем проводят электролиз еще раз при тех же условиях, но

не проводят съемку вольтамперной кривой. Потом полученный модифицированный графитовый электрод ополаскивают бидистиллированной водой и помещают в другую электрохимическую ячейку (кварцевый стаканчик), заполненную 10 мл водопроводной воды с добавлением 1 мл 1 М раствора NaOH. Не проводя накопления регистрируют анодную ветвь, а затем катодную ветвь циклической вольтамперной кривой фонового электролита при скорости развертки 100 мВ/с, начиная с потенциала минус 1,0 и до плюс 1,0 В. На анодной ветви вольтамперной кривой фонового электролита не наблюдается максимум в диапазоне потенциалов от 0,3 до 0,6 В.

Затем добавляют 0,02 мл аттестованной смеси глутатиона концентрации  $1 \cdot 10^{-12}$  моль/дм<sup>3</sup> и не проводя накопления регистрируют анодную ветвь, а затем катодную ветвь циклической вольтамперной кривой фонового электролита при скорости развертки 100 мВ/с, начиная с потенциала минус 1,0 и до плюс 1,0 В. На анодной ветви вольтамперной кривой фонового электролита наблюдается максимум в диапазоне потенциалов от 0,3 до 0,6 В. (относительно нас.х.э.).

Делают 0,02 мл добавку аттестованной смеси глутатиона и снова регистрируют аналитический сигнал. По разнице высоты анодного максимума пробы и добавки вычисляют концентрацию глутатиона в растворе.

Таким образом, впервые установлена способность количественного определения глутатиона по анодным максимумам.

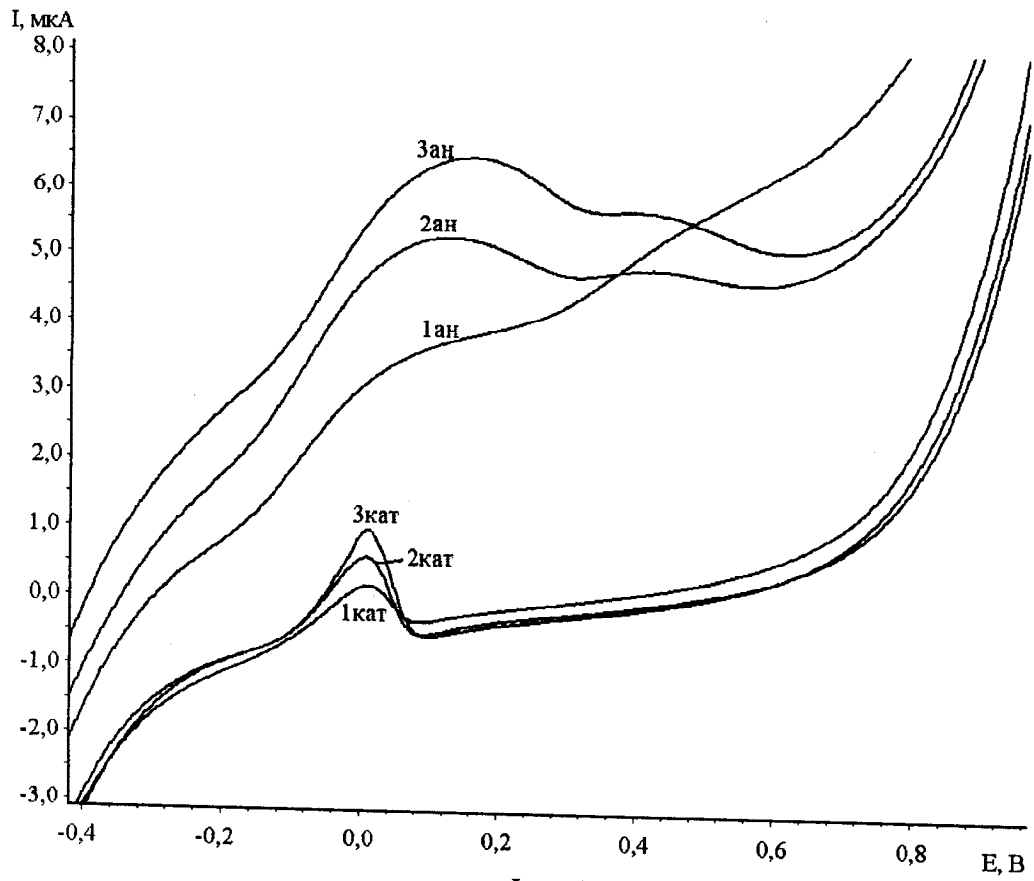
Предложенный способ прост, не используются токсические вещества из-за их отрицательного физиологического действия. Способ может быть применен в любой химической лаборатории, имеющей компьютеризированные анализаторы типа ГА или полярограф. Предложенный способ может быть использован для определения глутатиона в водных растворах.

Способ определения глутатиона в модельных водных растворах методом циклической вольтамперометрии на графитовом электроде, модифицированном коллоидными частицами серебра

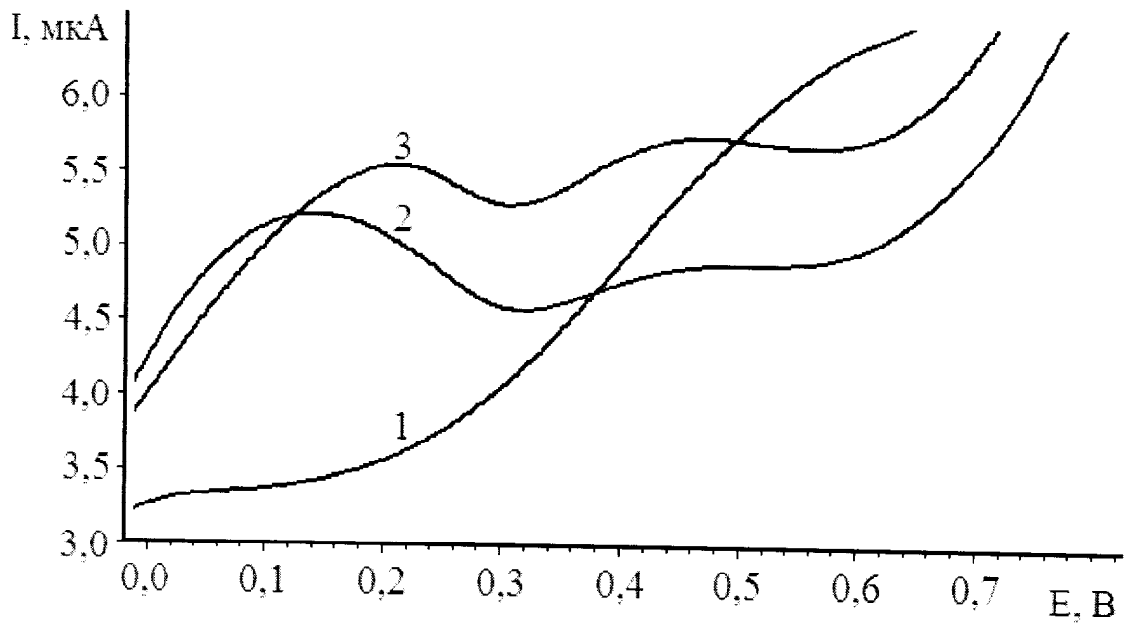
Таблица 1			
Объект исследования	Введено, G <sub>GSН</sub> , моль/л	Найдено, G <sub>GSН</sub> , моль/л	Sr. (t <sub>0</sub> , 95) n=6
0,1 М NaOH	$4 \cdot 10^{-12}$	$(3,82 \pm 1,87) \cdot 10^{-12}$	0,489
Водопроводная вода	$2 \cdot 10^{-12}$	$(2,02 \pm 0,78) \cdot 10^{-12}$	0,305

#### Формула изобретения

Способ определения глутатиона в модельных водных растворах методом циклической вольтамперометрии на графитовом электроде, модифицированном коллоидными частицами серебра, включающий модифицирование графитовых электродов коллоидными частицами серебра из золя серебра в течение 300 с при потенциале электролиза -1,0 В с последующей регистрацией анодных максимумов электроокисления глутатиона на анодной кривой при скорости развертки потенциала 100 мВ/с на фоне 0,1 М раствора NaOH в диапазоне потенциалов от -1,0 до 1,0 В, концентрацию глутатиона определяют по высоте анодных максимумов вольтамперных кривых в диапазоне потенциалов от 0,30 до 0,60 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода методом добавок аттестованных смесей.



Фиг. 1



Фиг.2