

**NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN ĐIỆN CỰC ĐĨA THAN THỦY TINH ĐƯỢC
BIẾN TÍNH VỚI
L-CYSTEIN VÀ VÀNGNANO CHO PHƯƠNG PHÁP VON-AMPE HÒA TAN ANOT
XUNG VI PHÂNXÁC ĐỊNH AXIT URIC**

Đến tòa soạn 21 - 1 - 2014

**Nguyễn Hải Phong, Lê Thị Lành, Hoàng Thị Lệ Hiền, Trần Thị Phương Diệp,
Nguyễn Văn Hợp**

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Trần Thị Tố Loan

Trường Trung học Phổ thông số 4 - Bồ Trách, Tỉnh Quảng Bình

SUMMARY

**STUDY ON DEVELOPMENT OF GLASSY CARBON DISK ELECTRODE MODIFIED WITH
L-CYSTEIN AND NANOPARTICLES-GOLD FOR DIFFERENTIAL PULSE
ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF URIC ACID**

A new gold nanoparticles-modified electrode was fabricated by self-assembling gold nanoparticles to the surface of the L-cysteine-modified glassy carbon electrode (GC/L-cys/Au-nano). The modified electrode showed an excellent characteristics for differential pulse anodic stripping voltammetric (DP-ASV) determination of uric acid (UA) in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS) (pH = 4.1). The anodic currents of UA on the modified electrode were 12-fold to that of the bare GC. Kinetic parameters of the UA electrode process such as electron transfer coefficient (α) and electron transfer rate constant (K_s) were calculated. Influences of the factors such as pH, concentration of L-cysteine (L-cys), deposition potential (E_{dep}) and time (t_{dep}) on stripping current of UA were investigated. The DP-ASV with the modified electrode gained high sensitivity (1.49 $\mu A/\mu M$), low detection limit (2.7 μM at $E_{dep} = +200$ mV and $t_{dep} = 20$ s) and good linear range in the UA concentration of 2.0 – 40 μM . The proposed method was successfully applied for the detection of UA in human urine and serum samples (without the samples treatment) with satisfactory results: good accuracy with recovery of 108 – 126% and good repeatability with relative standard deviation (RSD) of 1.2 – 2.7% ($n = 3$).

Keywords: Uric acid, DP-ASV, Gold nanoparticles, L-cysteine.

1. MỞ ĐẦU

Axit uric (2, 6, 8-trihydroxypurine, UA) là sản phẩm cuối cùng và cũng là sản phẩm chính của quá trình chuyển hóa purin trong cơ thể con người. Đối với một người khỏe mạnh, nồng độ bình thường của UA là 0,24–0,52 mM trong huyết thanh và 1,4 – 4,4 mM trong nước tiểu. Sự thay đổi bất thường của UA trong huyết thanh và nước tiểu có thể dẫn đến một số bệnh như bệnh gút, viêm phổi, suy thận, bệnh tim mạch và hội chứng Lesch - Nyhan [1], [2], [3]. Chính vì vậy, việc xác định hàm lượng UA trong các mẫu sinh học như nước tiểu và huyết thanh sẽ cung cấp các thông tin quan trọng về các bệnh liên quan đến UA[4]. Trong nhiều năm qua, để xác định UA, người ta sử dụng nhiều phương pháp khác nhau như: phương pháp phân tích trắc quang, sắc ký lỏng, enzyme, điện hóa,... Phương pháp trắc quang bị ảnh hưởng mạnh của axit ascorbic[2]; Phương pháp enzyme có độ chọn lọc cao, nhưng khá đắt tiền. Phương pháp phân tích điện hóa đạt được độ chọn lọc tốt, chi phí phân tích rẻ và tốn ít thời gian hơn nên được quan tâm nhiều [5]. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã phát triển điện cực biến tính với kim loại kích thước nano để xác định thành công UA trong các mẫu sinh học như vàng nano[2], [6], đồng nano [7], paladi nano [8], bạc nano [9]. Một hướng nghiên cứu khác là phát triển các điện cực làm việc được biến tính với các chất vô cơ và hữu cơ của kim loại kích thước nano như ruteni oxit [10], holmi florua [11], bạc

hexacyano ferat(III) [3],... Mặt khác, các điện cực làm việc được biến tính với các polyme hữu cơ bằng phương pháp điện hóa cũng được phát triển để xác định UA như biến tính điện cực than thủy tinh bằng axit poly-4-aminobutyric [12], biến tính điện cực vàng bằng L-cysteine (L-cys)[14].

Trong bài báo này, chúng tôi thông báo các kết quả nghiên cứu chế tạo điện cực đĩa than thủy tinh (GC) được biến tính với L-cys và vàng nano (Au-nano) để xác định UA trong các mẫu nước tiểu và huyết thanh bằng phương pháp von-ampe hòa tan.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

- Máy phân tích điện hóa 693 VA Proccessor kèm hệ điện cực 694 VA-Stand và máy 797 VA Computrace của hãng Metrohm, Thụy Sĩ. Hệ điện cực gồm: điện cực làm việc là điện cực GC có đường kính $2,8 \pm 0,1$ mm; điện cực so sánh bạc – bạc clorua (KCl 3 M) và điện cực đối là Pt;
- Máy cất nước hai lần Aquatron của hãng Bibby Sterilin, Anh.
- Máy đo pH ký hiệu pH55 của hãng Martini, Rumani.
- Dung dịch đệm photphat (PBS) được pha từ KH_2PO_4 và K_2HPO_4 tinh khiết của Kanto, Nhật Bản.
- Dung dịch L-cystein được pha từ L-cystein của Merck, Đức.
- Dung dịch chuẩn axit uric được pha hàng ngày từ hóa chất tinh khiết của Merck, Đức và được bảo quản ở -4°C .
- Nước sạch để pha hóa chất là nước cất 2 lần.

2.2. Chuẩn bị điện cực làm việc

Điện cực GC được mài với bột Al_2O_3 kích thước 0,05 μm đến bóng rồi tia rửa bằng nước sạch; Tiếp theo, ngâm điện cực GC trong dung dịch KOH 2 M trong 10 phút; Rửa bằng nước sạch và ngâm rửa trong bể siêu âm chứa dung dịch H_2SO_4 2 M trong 15 phút. Lấy điện cực ra và tia rửa bằng nước sạch.

Sau đó làm sạch bằng cách quét von-ampe vòng (CV) từ 0 mV đến 1000 mV trong dung dịch PBS 0,5 M, pH = 7,0 với tốc độ quét thế (v) là 100 mV/s. Sau đó lấy điện cực ra và tia rửa bằng nước sạch.

Tiến hành biến tính điện cực GC bằng cách phủ màng L-cys lên bề mặt điện cực bằng cách quét von-ampe vòng (CV) trong khoảng thế từ -1500 mV đến +2500 mV trong dung dịch chứa PBS 0,1 M, pH = 7,0 và L-cys $1,0 \cdot 10^{-3}$ M với $v = 100$ mV/s (quét 20 vòng); Lấy điện cực ra, tia rửa bằng nước sạch, rồi ngâm điện cực trong dung dịch vàng nano trong 12 giờ ở 4°C . Dung dịch vàng nano có kích thước hạt vàng từ 5 đến 15 nm được các tác giả [15] tạo ra bằng cách sử dụng chitosan và chitosan oligosaccharit làm chất khử và chất ổn định. Lấy điện cực ra và tia rửa bằng nước sạch. Lúc này trên bề mặt điện cực GC đã được phủ một lớp L-cys và vàng nano. Đây là điện cực làm việc cho các nghiên cứu. Sau mỗi lần làm việc điện cực được bảo quản trong PBS 0,1 M (pH = 7,0).

2.3. Tiến trình phân tích UA

Tiến hành xác định UA theo phương pháp von-ampe hòa tan anot xung vi

phân (DP-ASV), điện cực làm việc là điện cực chế tạo như ở mục 2.2. Tiến trình phân tích như sau: mẫu nước tiểu hoặc mẫu huyết thanh được đưa vào bình điện phân với 3 điện cực chứa PBS 0,1 M, pH = 4,1. Tiến hành làm giàu UA lên bề mặt điện cực làm việc ở thế điện phân làm giàu (E_{dep}) +200 mV và thời gian điện phân làm giàu (t_{dep}) 20 s, dung dịch được khuấy với tốc độ không đổi ω là 2000 vòng/phút; Sau khi làm giàu ngừng quay điện cực và nghỉ 10 s (t_{rest}). Tiếp theo ghi đường von-ampe hòa tan bằng kỹ thuật von-ampe xung vi phân: Quét thế anot (E_{range}) từ +200 mV đến +800 mV, biên độ xung (ΔE) 80 mV, thời gian sống của xung (t_{pulse}) 40 ms, bước thế (U_{step}) 6 mV và thời gian mỗi bước thế (t_{step}) 0,3 s (tốc độ quét thế $v = 20$ mV/s). Đường von-ampe hòa tan có dạng đỉnh. Định lượng UA bằng phương pháp thêm chuẩn với 3 – 4 lần thêm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc tính điện hóa của UA trên điện cực làm việc

Khảo sát đặc tính điện hóa của UA trên 3 loại điện cực làm việc: **i)** điện cực GC; **ii)** điện cực GC được biến tính với vàng nano (được ký hiệu là GC/Au-nano); **iii)** điện cực GC được biến tính với L-cys và vàng nano (được ký hiệu là GC/L-cys/Au-nano) bằng phương pháp DP-ASV và phương pháp CV, nhưng trước khi quét CV tiến hành làm giàu UA lên bề mặt điện cực làm việc ở $E_{\text{dep}} = +200$ mV và $t_{\text{dep}} = 60$ s.

Kết quả khảo sát đường CV trong khoảng thế từ -200 mV đến +800 mV

với $v = 100 \text{ mV/s}$ cho thấy, đối với cả 3 kiểu điện cực, đều xuất hiện đỉnh anot (hay đỉnh oxy hóa UA), không xuất hiện đỉnh catot. Có thể cho rằng quá trình điện hóa của UA trên bề mặt điện cực làm việc là quá trình bất thuận nghịch.

Kết quả ở hình 1 cho thấy: điện cực GC/Au-nano cho cường độ dòng đỉnh hòa tan (I_p) nhỏ nhất và độ lặp lại của I_p kém với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) là 5,6% ($n = 4$); So với điện cực GC không biến tính, điện cực GC/L-cys/Au-nano có I_p lớn gấp 12 lần và I_p có độ lặp lại tốt với RSD là 2,8% ($n = 4$). Như vậy có thể xác định UA bằng phương pháp DP-ASV sử dụng điện cực GC/L-cys/Au-nano.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ L-cys và số vòng quét CV để tạo màng L-cys

I_p của UA phụ thuộc vào nồng độ của L-cys và số vòng quét CV (n_{CV}) để tạo màng L-cys trên bề mặt điện cực GC [14], [16].

Kết quả khảo sát trong khoảng nồng độ L-cys 0,5 mM – 8,0 mM cho thấy, nồng độ L-cys thích hợp là $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$. Ở nồng độ đó, I_p trung bình ($I_{p, TB}$) của UA sau 4 phép đo lặp lại là 23,5 μA với RSD là 2,3%.

I_p của UA với n_{CV} trong khoảng từ 20 đến 60 vòng là giảm dần. Giá trị n_{CV} bằng 20 vòng được lựa chọn để biến tính điện cực GC với L-cys.

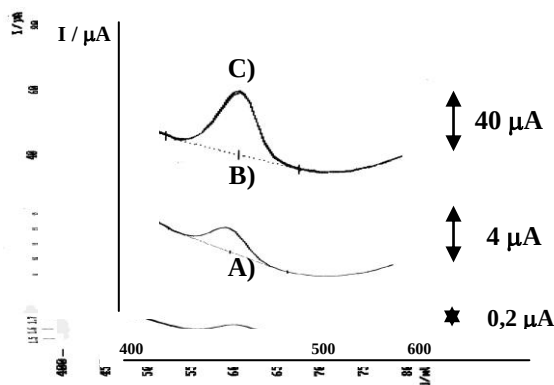
3.3. Ảnh hưởng của pH

Trong dung dịch PBS 0,1 M ($\text{pH} = 2,2$), I_p của UA lớn nhất, nhưng độ lặp lại kém nhất với RSD là 18,6% ($n = 4$) (hình 2). Trong khoảng $\text{pH} = 3,2 - 4,8$, I_p thay đổi không đáng kể, nhưng khi pH lớn hơn 4,8 thì I_p giảm mạnh. Giá trị $\text{pH} = 3,0 - 5,0$ là thích hợp; $\text{pH} = 4,1$ được chọn cho các thí nghiệm sau.

Về lý thuyết, giữa giá trị thế đỉnh hòa tan (E_p) và pH của dung dịch có quan hệ theo phương trình Nernst như sau [11], [14]:

$$E_p = E^{0'} - 0,0591 \frac{p}{n} \quad (1)$$

Trong đó, n và p là số điện tử và số proton trao đổi của UA, $E^{0'}$ là thế oxy hóa khử tiêu chuẩn điều kiện của cặp oxy hóa khử của UA. Như vậy, từ hệ số góc của phương trình nêu ở hình 2 (chấp nhận $n = 2$ [9], [11], [14]) và phương trình (1) dễ dàng suy ra số proton trao đổi của UA trên điện cực GC/L-cys/Au-naono là 2. Điều này cũng phù hợp với kết quả được thông báo ở [16].



Hình 1. Các đường DP-ASV của UA 30 μM trong PBS 0,1 M (pH = 4,1) trên 3 loại điện cực: A) GC/Au-nano; B) GC và C) GC/L-cys/Au-nano. ĐKTN: như ở mục 2.3 (thay mẫu thật là dung dịch UA)

3.4. Ảnh hưởng của tốc độ quét thế

Giữa I_p và căn bậc hai của tốc độ quét thế ($v^{1/2}$) có tương quan tuyến tính tốt với $r = 0,9993$ trong khoảng $v = 20\text{--}120$ mV/s (hình 3) theo phương trình.

$$I_p = (-3,67 \pm 1,35) + (3,33 \pm 0,16) v^{1/2} \quad (2)$$

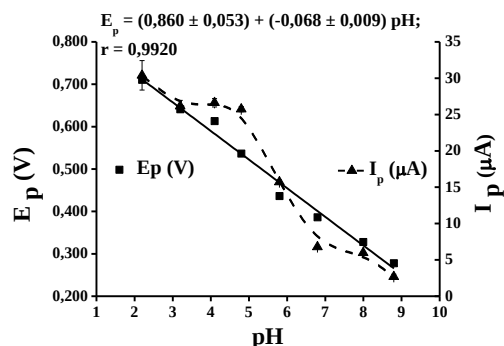
Mặt khác, giữa E_p và $\ln(v)$ cũng có tương quan tuyến tính tốt với $r = 0,9814$ theo phương trình.

$$E_p = (0,587 \pm 0,020) + (0,020 \pm 0,005) \ln(v) \quad (3)$$

Theo Laviron E. [17], đối với một hệ bất thuận nghịch, giữa E_p và $\ln(v)$ có tương quan tuyến tính với hệ số góc là $RT/(1 - \alpha)nF$ như ở phương trình.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{RTK_s}{(1-\alpha)nF} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln v \quad (4)$$

Trong đó, E^0 là thế oxy hóa khử tiêu chuẩn của cặp oxy hóa khử liên hợp, $R = 8,314$ J/molK, $T = 298\text{K}$ (25°C), $F = 96500$ C.mol $^{-1}$, n là số điện tử trao đổi và α là hệ số chuyển điện tử. Từ (3) và (4), có $RT/(1 - \alpha)nF = 0,020$. Như đề cập ở trên, số điện tử mà một phân tử



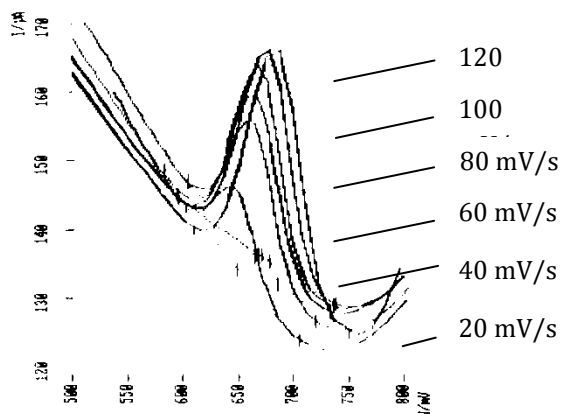
Hình 2. Sự phụ thuộc của E_p và I_p ($n = 4$) của UA vào pH trong PBS 0,1 M trên điện cực GC/L-cys/Au-nano (điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 0,1 M). ĐKTN: $C_{UA} = 30 \mu\text{M}$, các ĐKTN khác như ở hình 1

UA trao đổi là 2 ($n = 2$), suy ra hệ số chuyển điện tử (α) là 0,358.

Cũng có thể thấy rằng, giữa E_p và v cũng có tương quan tuyến tính tốt ($r = 0,9806$) theo phương trình.

$$E_p = (0,643 \pm 0,007) + (0,0004 \pm 0,0001)v \quad (5)$$

Theo Yang S. [18], giá trị E^0 trong phương trình (4) bằng đoạn cắt trên trục tung trong phương trình (5) và bằng 0,643 V. So sánh (3) và (4), suy ra:



Hình 3. Các đường DP-ASV của UA ở tốc độ quét thế từ 20 – 120 mV/s. ĐKTN như ở hình 2; pH = 4,1

$$0,587 = 0,643 - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{RTK_s}{(1-\alpha)nF} \quad (6)$$

Trong đó, K_s là hằng số tốc độ chuyển điện tử.

Từ phương trình (6) với các giá trị R , T , F , n và α đã biết, tính được $K_s = 861 \text{ s}^{-1}$.

3.5. Ảnh hưởng của các yếu tố khác

Thế và thời gian điện phân làm giàu (E_{dep} và t_{dep}):

I_p của UA tăng khi tăng $E_{\text{dep}} = -800 - +200 \text{ mV}$, sau đó giảm dần từ $+200$ đến $+800 \text{ mV}$. Mặt khác, I_p của UA tăng tuyến tính với t_{dep} trong khoảng t_{dep} từ 5 đến 20 s ($r = 0,9983$) và sau đó hầu như không thay đổi. $E_{\text{dep}} = +200 \text{ mV}$ và $t_{\text{dep}} = 20 \text{ s}$ là thích hợp.

Biên độ xung (ΔE) và tốc độ quay điện cực (ω):

I_p của UA tăng tuyến tính với $\Delta E = 10 - 100 \text{ mV}$ ($r = 0,9991$). Mặt khác, I_p của UA thay đổi không nhiều khi $\omega = 400 - 3000$ vòng/phút. Giá trị ΔE và ω được chọn tương ứng là 80 mV và 2000 vòng/phút.

3.6. Độ tin cậy của phương pháp DP-ASV

3.6.1. Độ lặp lại của dòng đỉnh hòa tan

Độ lặp lại của I_p được đánh giá qua RSD của I_p ở 3 nồng độ khác nhau của UA. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, đối với cả 3 nồng độ, I_p của UA đạt được độ lặp lại tốt với RSD đều nhỏ hơn 4% ($n = 9$).

3.6.2. Khoảng tuyến tính, độ nhạy và giới hạn phát hiện

Kết quả từ 3 thí nghiệm song song cho thấy, giữa I_p và nồng độ của UA có tương quan tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ từ $2,0$ đến $40 \mu\text{M}$ ($r = 0,9983$)

với độ nhạy là $1,49 \pm 0,10 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ và giới hạn phát hiện là $2,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

3.7. Áp dụng thực tế

Phương pháp DP-ASV dùng điện cực GC/L-Cys/Au-nano được áp dụng để xác định trực tiếp UA (tức là không qua giai đoạn xử lý mẫu) trong 03 mẫu nước tiểu và 03 mẫu huyết thanh (thu được bằng cách ly tâm mẫu máu) được lấy ngẫu nhiên từ 3 người có sức khỏe bình thường ở Thành phố Huế. Định lượng UA bằng phương pháp thêm chuẩn.

Kết quả ở bảng 2 và hình 4 cho thấy:

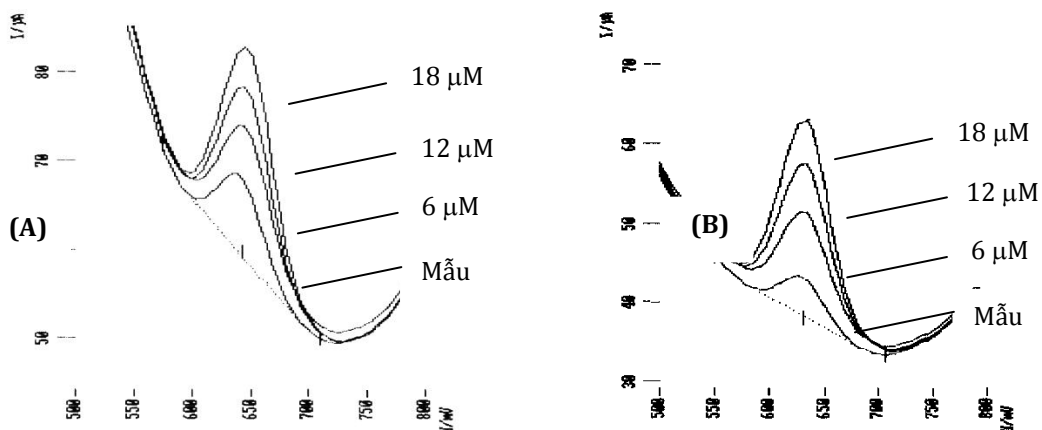
- Phương pháp đạt được độ đúng tốt với độ thu hồi (Rev) dao động trong khoảng 108% đến 126% và độ lặp lại tốt với RSD nhỏ hơn 2,7% ($n = 3$).

- Nồng độ của UA trong các mẫu nước tiểu và huyết thanh đều ở mức bình thường. Riêng nồng độ của UA trong 01 mẫu (mẫu HT1) ở mức cảnh báo [1], [2], [3].

Bảng 1. Các giá trị $I_{p,TB}$ và RSD ở các nồng độ UA khác nhau

Thông số	Nồng độ UA (μM)		
	6	20	40
$I_{p,TB}$ ($n = 9$)	4,97	19,0	40,9
RSD _{TN} (%)	3,6	2,1	0,9

ĐKTN: PBS 0,1 M (pH = 4,1); phương pháp DP-ASV dùng GC/L-Cys/Au-nano; $E_{\text{dep}} = +200 \text{ mV}$; $t_{\text{dep}} = 20 \text{ s}$; $\Delta E = 80 \text{ mV}$; $\omega = 2000$ vòng/phút; $v = 20 \text{ mV/s}$.



Hình 4. Các đường DP-ASV của mẫu thực tế và 3 lần thêm chuẩn (mỗi lần thêm 6 μM UA): (A) –mẫu nước tiểu (NT1); (B)–mẫu huyết thanh (HT1). ĐKTN: như ở bảng 1

Bảng 2. Kết quả xác định nồng độ UA trong mẫu nước tiểu(NT) và mẫu huyết thanh (HT) ($n = 3$)

Mẫu	Nồng độ UA trong mẫu (mM) ^(a)	Nồng độ UA thêm vào mẫu (mM)	Nồng độ UA tìm thấy (mM)	Rev (%)	RSD (%)
NT1	$1,51 \pm 0,07$	1,20	2,81	108	1,9
NT2	$2,43 \pm 0,08$	1,20	3,94	126	2,7
NT3	$2,96 \pm 0,06$	1,20	4,31	113	2,0
HT1	$0,61 \pm 0,02$	0,60	1,34	121	2,4
HT2	$0,40 \pm 0,03$	0,60	1,11	119	1,2
HT3	$0,51 \pm 0,02$	0,60	1,22	118,0	2,03

^(a): Các giá trị trong cột là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$).ĐKTN: như ở bảng 1

4. KẾT LUẬN

Điện cực GC/L-Cys/Au-nano có thể dùng cho phương pháp DP-ASV để xác định nhạy và trực tiếp UA trong nước tiểu và huyết thanh mà không cần phân hủy mẫu trước khi phân tích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Các xét nghiệm thường quy áp dụng trong thực hành lâm sàng, Nhà XB Y học, Hà Nội (2012).
2. Kannan P., John S. A., *Analytical*

Biochemistry, Vol. 386, pp. 65–72(2009).

3. Noroozifar M., Motlagh M.K., Taheri A., *Talanta*, Vol. 80, pp. 1657–1664(2010).

4. Wang M. Y., Xu X. Y., Yang ., Zhang S. Y., Yang X. J., *Journal of Applied Electrochemistry*, Vol. 38, pp. 1269 – 1274(2008).

5. Tang H., Hu G., Jiang S., Liu X., *Journal of Applied Electrochemistry*, Vol. 39 pp. 2323 - 2328(2009).

6. Wang C., Yuan R., Chai Y., Chen (xem tiếp tr.85)