

Research Article**Research and development of non-enzymatic electrochemical sensors utilizing porous ZnO/graphene electrodes to determine xanthine**

Ta Ngoc Bach¹, Nguyen Xuan Viet², Nguyen Van Anh², Pham Quang Trung²,
Nguyen Thi Minh Thu², Phung Thi Thu³, Vu Hong Ky¹, Do Hung Manh¹, Vu Dinh Lam⁴,
Nguyen Huy Dan¹, Trinh Xuan Anh⁵, Ngo Thi Hong Le^{1,4*}

¹Institute of Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

³University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science
and Technology, Hanoi, Vietnam

⁴Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science
and Technology, Hanoi, Vietnam

⁵Hanoi University of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

(Received: 15 Jan 2024; Revised: 21 Jan 2024, Accepted: 02 Feb 2024)

Abstract

In this study, we developed a non-enzymatic electrochemical sensor using a porous graphene electrode modified with ZnO nanoparticles (ZnO/fPGE sensor) to determine xanthine (XA) content. The ZnO/fPGE sensor is fabricated using a hydrothermal method and CO₂ infrared laser writing technique on a polyimide film. The morphology, structure, and properties of the ZnO/fPGE were meticulously characterized using Raman spectroscopy, field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM), and Von-Ampe spectroscopy methods. The ZnO/fPGE sensor exhibited a broad linear response range from 1 μM to 100 μM , a low limit of detection (LOD) of 0.29 μM , high sensitivity at 7.05 $\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, and demonstrated effective resistance to common interferences such as uric acid, ascorbic acid, dopamine, glucose, and xanthine. Notably, the ZnO/fPGE sensor has created a conducive electrical environment for the advancement of high-performance electrochemical biosensors, specifically for the precise determination of xanthine levels in meat and fish products.

Keywords: electrochemical sensors, xanthine, porous graphene, ZnO nanoparticles, food safety

* Corresponding author: Ngo Thi Hong Le (E-mail: hongle@ims.vast.ac.vn)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4204>

Copyright © 2024 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Nghiên cứu và phát triển cảm biến điện hóa không gắn enzyme dựa trên điện cực ZnO/graphen xốp nhằm xác định xanthin

Tạ Ngọc Bách¹, Nguyễn Xuân Việt², Nguyễn Văn Anh², Phạm Quang Trung², Nguyễn Thị Minh Thu², Phùng Thị Thu³, Vũ Hồng Kỳ¹, Đỗ Hùng Mạnh¹, Vũ Đình Lâm⁴, Nguyễn Huy Dân¹, Trịnh Xuân Anh⁵, Ngô Thị Hồng Lê^{1,4}

¹Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Hóa học, Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học và công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

⁵Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, một cảm biến điện hóa không gắn enzyme sử dụng điện cực graphen xốp được biến tính với hạt nano ZnO (cảm biến ZnO/fPGE) đã được phát triển để xác định hàm lượng xanthin (XA). Cảm biến ZnO/fPGE được chế tạo bằng phương pháp thủy nhiệt và kỹ thuật ghi laser hồng ngoại CO₂ trên màng polyimide. Hình thái học, cấu trúc và tính chất của ZnO/fPGE được đặc trưng bằng các phương pháp đo phổ Raman, FE-SEM, và Von-Ampe. Cảm biến ZnO/fPGE đối với XA có khoảng hoạt động tuyến tính khá rộng (1 μ M-100 μ M), giới hạn phát hiện (LOD) thấp (0,29 μ M), độ nhạy cao (7,05 μ A. μ M⁻¹.cm⁻²) và khả năng kháng hiệu quả đối với các chất gây nhiễu thông thường (như acid uric, acid ascorbic, dopamin, glucose và xanthin). Cảm biến ZnO/fPGE đã cung cấp môi trường điện thuận lợi để phát triển các cảm biến sinh học điện hóa hiệu suất cao nhằm xác định xanthin trong các sản phẩm thịt, cá.

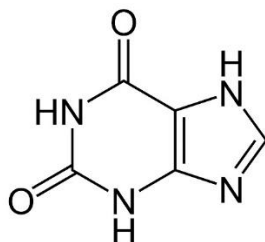
Từ khóa: cảm biến điện hóa, xanthin, graphen xốp, hạt nano ZnO, thịt.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc đảm bảo chất lượng, độ tươi của thịt và các sản phẩm thủy sản như cá ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm. Động vật sau khi bị giết mổ, một số hợp chất hữu cơ tham gia vào quá trình phân hủy dẫn đến thực phẩm bị biến đổi màu sắc và mùi vị trong suốt quá trình bảo quản [1, 2]. Do đó, việc đảm bảo chất lượng và độ tươi ngon của thịt, cá là yêu cầu quan trọng trong chế biến thực phẩm. Xanthin (C₅H₄N₄O₂) là một trong các sản phẩm của quá trình phân hủy Adenosine triphosphate (ATP) sau khi động vật bị giết mổ [3]. Sự tích tụ xanthin sẽ khiến cho thực phẩm như thịt, cá không còn tươi và có vị đắng. Vì vậy, nó được xem là một chất chỉ thị quan trọng để đánh giá độ tươi ngon của thịt/cá [3]. Cấu trúc hóa học của xanthin được đưa ra tại Hình 1.

Xanthin được xác định bằng các phương pháp khác nhau như HPLC (high performance liquid chromatography) [4], phổ khối [5], điện di mao quản [6] và cảm biến điện hóa [7-9].

Trong đó, kỹ thuật cảm biến sinh học điện hoá cung cấp phương pháp phân tích ưu việt hơn với độ chính xác cao, nhanh chóng, dễ sử dụng [3]. Đáng chú ý, do bản chất tự nhiên của enzyme, các cảm biến sinh học cố định enzyme xanthine oxidase (XOD) bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, pH, độ ẩm, hoá chất độc hại..., dẫn đến độ chính xác và độ nhạy của cảm biến bị ảnh hưởng [7]. Bên cạnh đó, việc cố định enzyme tương đối phức tạp và mất nhiều thời gian [7]. Do đó, các cảm biến sinh học không gắn enzyme nhận được nhiều sự quan tâm để phát triển những cảm biến sinh học điện hoá có độ chính xác cao và hiệu suất tốt.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của xanthin

Gần đây, nhờ có những tiến bộ trong công nghệ chế tạo nano, vật liệu 2D graphen và dẫn xuất của nó với các ưu điểm về tính chất nổi bật được ưu tiên nghiên cứu trong lĩnh vực cảm biến sinh học [10-12]. Đáng chú ý hơn, graphen được tạo ra bởi laze (được biết đến là $LIG = \text{laser-induced graphene}$) sử dụng công nghệ chuyển đổi quang nhiệt của màng polyimide thành cấu trúc graphen xốp 3D liên tục khi chiếu xạ xung laze trong không khí. LIG có độ dẫn điện cao và diện tích bề mặt riêng lớn, linh hoạt trong việc tạo khuôn, không chứa hóa chất, thời gian chế tạo nhanh và chi phí thấp [13]. Có thể sản xuất với số lượng lớn, dẫn đến ứng dụng tiềm năng trong công nghiệp [14, 15]. So với graphen được chế tạo bằng các phương pháp khác, LIG có thể cải thiện hiệu suất truyền điện tích, độ dẫn điện tốt và nhiều vị trí hoạt động để chức năng hóa, đây là điều kiện cần thiết để phát triển cảm biến sinh học [14, 16]. Mặt khác, các vật liệu nano oxide kim loại được sử dụng rộng rãi trong tiếp cận biến tính điện cực [17-19]. Trong số đó, vật liệu nano ZnO được xem xét phổ biến trong các nghiên cứu này do có độ rộng vùng cấm lớn, bền hoá học và khả năng tương thích sinh học tốt và động học trao đổi điện tử cao [19]. Một vài công bố liên quan như: Cảm biến không gắn enzyme phát hiện cortisol trong nước bọt sử dụng ZnO -graphen đã được phát triển, cảm biến này có giới hạn phát hiện rất thấp là $0,15 \text{ nM}$ [20]; Cảm biến sinh học xanthin không gắn enzyme sử dụng hợp chất nanocompozit RGO/ZnO trên lá kẽm được chế tạo bởi Zhang và cộng sự, cảm biến này cho thấy độ nhạy là $2,10 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ và giới hạn phát hiện là $1,67 \mu\text{M}$ [7]. Santos và cộng sự [21] đã chứng minh rằng các thanh ZnO được tổng hợp bằng cách mạ điện trên LIG có khả năng truyền điện tử điện hóa nhanh với hằng số tốc độ $1,24 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ cho $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ và do đó đạt được tiếp điểm điện phù hợp bên trong LIG/ZnO . Điện cực dựa trên hạt nano ZnO NP/graphen đóng vai trò là chất xúc tác trong cảm biến sinh học không gắn enzyme là một hướng nghiên cứu mới, thời sự.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã xây dựng một cảm biến điện hoá không gắn enzyme sử dụng điện cực graphen xốp biến tính bằng hạt nano ZnO . Điện cực này được sử dụng để xác định xanthin. Kết quả cho thấy, cảm biến này hoạt động hiệu quả với độ nhạy cao, phạm vi tuyến tính rộng và giới hạn phát hiện thấp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Dụng cụ, thiết bị

Cân phân tích (AY 220, Shimadzu – Nhật Bản); Tủ sấy (Medcenter Einrichtungen GmbH, Đức); Tủ hút chân không (Model 281A); Bơm hút chân không (Model DOA-P504-BN, GAST – Mỹ); Máy ly tâm (Hermle); Bể siêu âm (Ultrasonic LC 60 H); và một số dụng cụ thí nghiệm khác.

Hình thái học bề mặt và đặc trưng cấu trúc của các mẫu được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM - Hitachi S4800) và máy đo nhiễu xạ tia X Bruker D8 với bức xạ Cu-K α ($k = 1,5406 \text{ \AA}$); Dữ liệu tán xạ Raman được thu thập bằng máy quang phổ tán xạ Raman (LabRAM HR Evolution-Horiba Inc.). Phổ FT-IR được đo bằng máy quang phổ Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Hệ điện hóa Autolab (Metrohm PGSTAT30 Potentiostat Galvanostat) được sử dụng để thực hiện các phép đo điện hóa ba điện cực. ZnO/Graphen xốp, Graphene và Ag/AgCl lần lượt hoạt động như điện cực làm việc, điện cực đối và điện cực so sánh.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Hypoxanthin (99%), xanthin (99%), acid uric (99%), glucose (99%), dopamin (99%), acid ascorbic (99%), dung dịch đệm photphat (PBS, pH=7) (99%), KCl (99%), NaOH (99%), metanol (99,5%) và Zn(CHCO).2H₂O (99%), etanol (99,5%) được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich. Kali ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆], 99%), kali ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆], 99%) được cung cấp bởi hãng Xilong (Trung Quốc). Nước khử ion đã được áp dụng cho tất cả các thí nghiệm.

2.3. Quy trình thực nghiệm

2.3.1. Chế tạo điện cực Graphen/Polyimide xốp (fPGE)

Polyimide (PI): Tấm màng polyimide dày 125 μm có kích thước 210 x 297 mm được cắt thành 30 tấm PI nhỏ hơn bằng máy cắt laze (Universal Laser Systems VLS3.50 Laser). Kích thước của mỗi tấm được xác định là 42 x 49 mm. Các thông số máy được thiết lập như sau: công suất, tốc độ xử lý và tần số xung của chùm tia laze CO₂ lần lượt được đặt ở mức 5,6 W, 13% và 500 PPI. Các tấm PI được làm sạch trong etanol ba lần bằng rung siêu âm và sấy khô ở 60°C trong 10 phút.

Chế tạo điện cực graphen xốp fPGE: Màng graphen được chế tạo trên tấm polyimide bằng cách đặt các tấm PI vào máy laze đã thiết lập các điều kiện chế tạo tối ưu cho chùm tia laze CO₂: công suất 3,12 W, tốc độ xử lý 6,6%, tần số xung là 1000 PPI. Đường kính của điện cực làm việc thu được là 1,8 mm. Tiếp theo, điện cực fPGE được lắp vào khuôn inox 0.1 mm và phủ keo silica lên để tạo lớp cách điện mỏng trên điện cực fPGE. Sau đó, điện cực fPGE được rửa sạch bằng nước cất 2 lần để loại bỏ bụi bẩn sau đó sấy khô ở $t = 60^\circ\text{C}$ trong vòng 5 phút.

2.3.2. Chế tạo điện cực ZnO/Graphene/Polyimide (ZnO/fPGE)

Hạt nano ZnO (NP) được tổng hợp bằng phương pháp thủy nhiệt. Cụ thể, các tiền chất Zn(CHCO).2H₂O, NaOH, metanol có tỷ lệ mol 1:1:25 được hòa tan riêng biệt trong nước cất (tỷ lệ mol metanol và nước cất là 1:1) rồi trộn đều. và khuấy trong 1 giờ. Dung dịch màu trắng sữa thu được và điện cực fPGE được cho vào bình Teflon, bình này được đặt vào bình

thủy nhiệt bằng thép. Quá trình thủy nhiệt được thực hiện ở 200°C trong 4 giờ. Điện cực được lấy ra và rửa nhiều lần bằng nước cất. Cuối cùng, điện cực được ủ ở 100°C trong 2 giờ để tăng cường độ bám dính giữa các hạt nano ZnO và fPGE.

2.3.3. Đo đặc trưng điện hóa

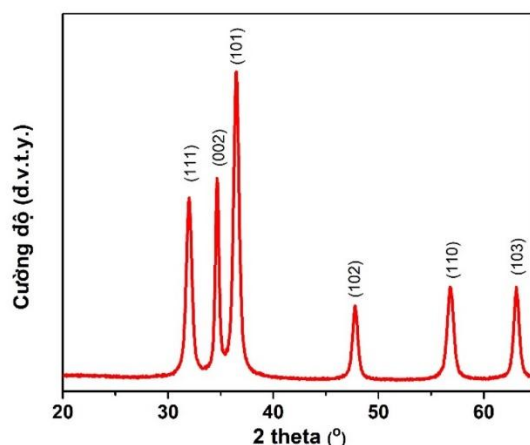
Đặc trưng điện hóa của các điện cực chế tạo fPGE và ZnO/fPGE đã được nghiên cứu bằng phương pháp vôn-ampe vòng (CV) trong dung dịch $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mM ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ được pha theo tỷ lệ mol là 1:1) chứa KCl 0,1 M được áp thế từ -0,2V – 0,6V với các tốc độ quét khác nhau. Các thí nghiệm đo phổ vôn-ampe xung vi phân (DPV) được thực hiện trong dung dịch PBS (1X, pH 7,0) có chứa xanthin, hypoxanthin và acid uric. DPV được ghi từ -0,4 V đến 0,6 V với biên độ xung 50 mV và xung 50 ms.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các đặc trưng lý hóa của hạt nano ZnO và graphene xốp (fPGE)

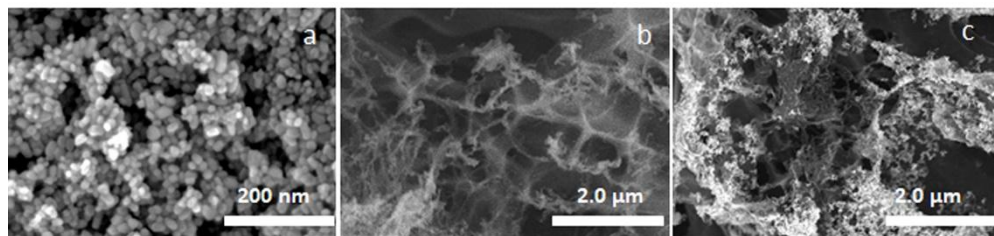
Trong nghiên cứu này, hạt nano ZnO được chế tạo bằng phương pháp thủy nhiệt trong môi trường NaOH và methanol, các hạt ZnO chế tạo được có hình dạng cầu. Bên cạnh đó, graphene xốp trên đế dẻo polyimide được chế tạo bằng laser dựa trên CO_2 . Quy trình chế tạo được trình bày chi tiết ở phía trên. Trong phương pháp này, ngoài vật liệu ban đầu là màng polyimide và thiết bị laser không cần phải sử dụng các hóa chất khác. Vì vậy, màng graphene thu được sạch, không lẫn các tạp chất.

Đặc tính cấu trúc của hạt nano ZnO được nghiên cứu bằng phép đo nhiễu xạ tia X với bức xạ $\text{Cu} - K_\alpha$ ở bước sóng 0,154 nm, sử dụng thiết bị đo nhiễu xạ tia X D8 Bruker. Số liệu thu được với góc đo 2θ từ 10 đến 65 độ. Hình 2 biểu diễn giản đồ X-ray của hạt nano ZnO được tổng hợp bằng phương pháp thủy nhiệt ở 200°C với thời gian thủy nhiệt là 4 giờ. Như quan sát thấy, các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của ZnO tương ứng với các mặt phẳng mạng lần lượt là: (100), (002), (101), (102), (110), (103) và (112) theo hướng 2θ từ 20 đến 60 độ. Do vậy, tất cả hạt nano ZnO tổng hợp được đều có cấu trúc tinh thể wurtzite lục giác, phù hợp với các báo cáo trước đó [22, 23]. Ngoài các đỉnh nhiễu xạ của ZnO, không quan sát thấy bất kỳ đỉnh nhiễu xạ khác, điều này chỉ ra độ tinh khiết của hạt nano ZnO tổng hợp được. Giản đồ nhiễu xạ X-ray của ZnO được trình bày tại Hình 2.



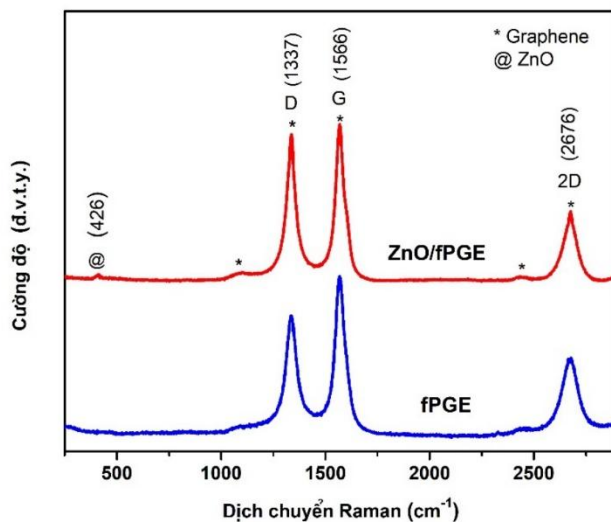
Hình 2. Giản đồ nhiễu xạ X-ray của ZnO

Hình thái học của các mẫu hạt nano ZnO, fPGE và ZnO/fPGE được quan sát qua ảnh hiển điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM) (Hình 3). Kết quả ảnh FE-SEM cho thấy các hạt nano ZnO có dạng hình cầu với kích thước khoảng 20 nm (Hình 3a). Trên Hình 3b có thể quan sát thấy cấu trúc xốp của fPGE, trong đó đường kính của các lỗ rỗng lên đến cỡ vài micromet và thành lỗ khoảng 100 nm. Các thành và lỗ rỗng này tạo thành một mạng lưới liên kết với nhau và có thể làm tăng cường độ dẫn điện của màng fPGE. Bằng phương pháp thủy nhiệt, các hạt nano được lắng đọng lên trên bề mặt fPGE. Hình 3c cho thấy các hạt nano ZnO phân tán khá đều trên trên các thành lỗ rỗng của graphene và màng ZnO/fPGE đã chế tạo được.



Hình 3. Ảnh SEM của hạt ZnO (a), fPGE (a) và ZnO/fPGE

Để xác định cấu trúc tinh thể của graphene, nghiên cứu đã sử dụng phổ tán xạ Raman, đây là phương pháp có ưu thế về khả năng phát hiện các pha tinh thể với độ nhạy cao. Phổ Raman của fPGE, ZnO/fPGE đều xuất hiện 3 đỉnh D, G và 2D tương ứng với ba vạch tán xạ Raman tại vị trí số sóng là 1337 cm^{-1} , 1566 cm^{-1} và 2676 cm^{-1} (Hình 4). Đỉnh D xuất hiện được cho là do sự hiện diện của các khuyết tật và/hoặc tạp chất trong cấu trúc lục giác sp^2 . Đỉnh G có liên quan đến dao động trong mặt phẳng của các nguyên tử carbon lai hóa sp^2 trong khi đỉnh 2D là kết quả của dao động mạng hai phonon trong cấu trúc graphene [24, 25]. Tỷ lệ cường độ cực đại 2D và G (I_{2D}/I_G) phụ thuộc vào số lượng lớp graphene, lớn hơn 1 đối với graphene đơn lớp và nhỏ hơn 1 đối với graphene đa lớp [26]. Ngoài tỷ lệ I_{2D}/I_G , số lớp graphene cũng được suy ra từ vị trí, hình dạng và độ bán rộng cực đại (FWHM) của đỉnh 2D. FWHM có thể được fit từ hàm Lorentz của đỉnh 2D.

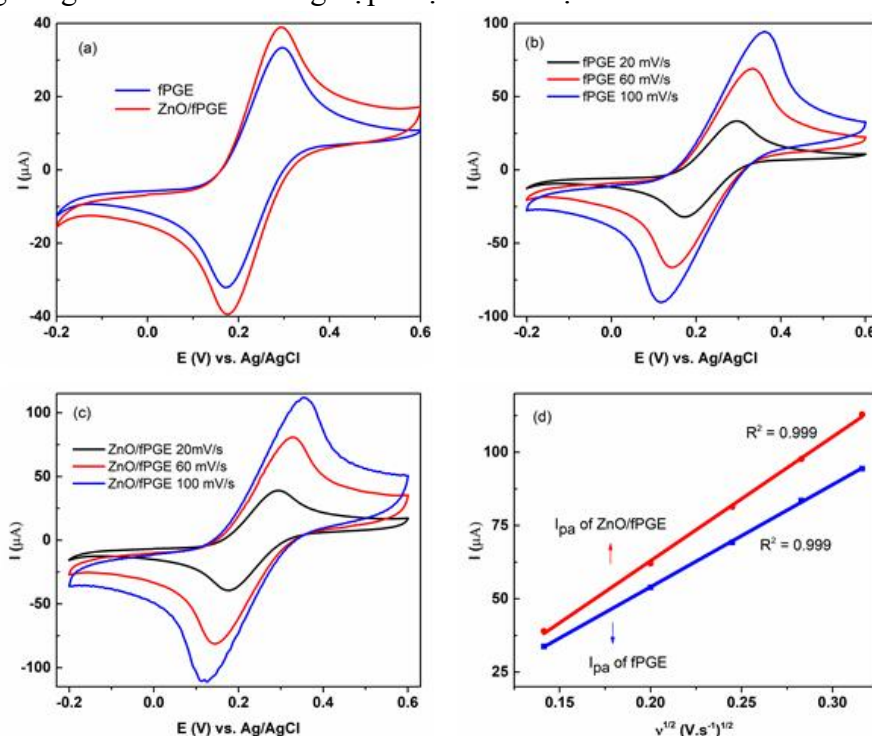


Hình 4. Phổ Raman của fPGE và ZnO/fPGE

Từ Hình 4, các giá trị được tính toán của I_{2D}/I_G , I_D/I_G và FWHM cho fPGE và ZnO/fPGE tương ứng là 0,67 (<1); 0,77; 89 cm^{-1} và 0,7; 0,92; 86 cm^{-1} . Kết quả này ngụ ý rằng fPGE và ZnO/fPGE là màng graphene đa lớp. Chất lượng của graphene trong fPGE có thể được dự đoán dựa trên tỷ lệ I_D/I_G , tỷ lệ này càng cao, chất lượng graphene càng tốt và ngược lại. Có thể thấy rằng tỷ lệ I_D/I_G của ZnO/fPGE cao hơn so với fPGE, có thể khẳng định rằng các hạt nano ZnO đã lắng đọng lên trên fPGE làm tăng số lượng khuyết tật trên bề mặt graphene. Hơn nữa, vạch tán xạ Raman tại vị trí số sóng 426 cm^{-1} trong mẫu ZnO/fPGE tương ứng với mode hoạt động Raman E_2 (cao) của cấu trúc hình lục giác ZnO [27], có thể khẳng định sự tồn tại của các hạt nano ZnO trong ZnO/fPGE. Màng ZnO/fPGE được chế tạo thành công.

3.2. Tính chất điện hóa của hệ điện cực fPGE và ZnO/fPGE

Đặc tuyến điện hóa của các điện cực fPGE và ZnO/fPGE được khảo sát bằng phương pháp CV các với tốc độ quét khác nhau trong dung dịch $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4}]$ 5 mM (M KCl 0,1). Trong Hình 5a, với tốc độ quét 20 mV/s, có thể thấy rằng sự khác nhau giữa thế đỉnh píc khử E_{pa} và píc oxi hóa E_{pa} của ZnO/fPGE ($\Delta E_p = 118$ mV) nhỏ hơn so với fPGE ($\Delta E_p = 123$ mV), trong khi cường độ dòng điện cực đại anốt (I_{pa}) tăng khoảng 1,15 lần, do đó động học chuyển electron và hoạt tính xúc tác điện của điện cực ZnO/fPGE nhanh hơn và tốt hơn [28, 29]. Đường cong CV của các trường hợp được đưa ra tại Hình 5.



Hình 5. Đường cong CV (a) fPGE, ZnO/fPGE trong dung dịch $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4}]$ 5mM /M KCl 0,1 với tốc độ quét of 20 mV/s ; (b, c) CV của fPGE and ZnO/fPGE ở tốc độ quét khác nhau (20, 60, 100 mV/s), và (d) đồ thị của I_{pa} - $v^{1/2}$

Trong phương pháp von-ampe, tốc độ quét (v) ảnh hưởng đến động học của phản ứng xảy ra trên bề mặt điện cực như hệ số chuyển điện tử, hằng số tốc độ chuyển điện tử và bản

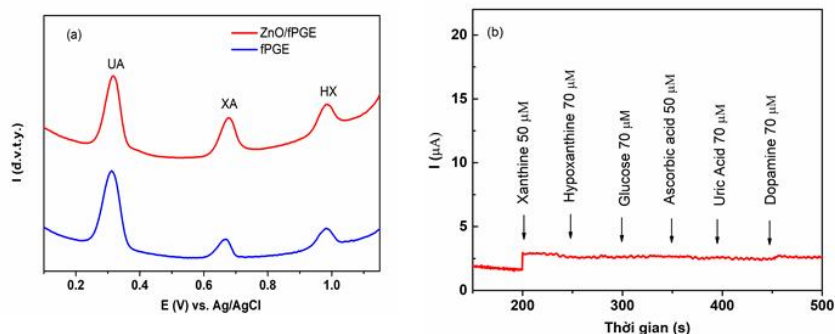
chất của quá trình điện hóa trên bề mặt điện cực. Đường cong CV ở các tốc độ quét khác nhau được biểu diễn trong Hình 5b, c. Cặp oxi hóa khử $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$ được coi là đầu dò oxi hóa khử để nghiên cứu các tính chất điện hóa [28]. Tỷ lệ giữa dòng đáp ứng cực đại anốt và catốt của fPGE và ZnO/fPGE được xác định tương ứng là 0,98 và 1,04, do đó phản ứng oxi hóa khử trên cả hai điện cực là thuận nghịch [30,31]. Diện tích bề mặt hoạt động điện được tính theo phương trình Randles-Sevcik [29,32], như sau:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C \quad (1)$$

Trong đó I_p và n lần lượt là dòng điện đáp ứng cực đại và số điện tử trao đổi ($n = 1$) trong hệ $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$, A là diện tích bề mặt điện cực, D là hệ số khuếch tán của $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$ ($6.8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), ν tốc độ quét (V s^{-1}) và C nồng độ $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$. Hình 5d cho thấy dòng điện cực đại anốt (I_{pa}) của fPGE và ZnO/fPGE là tuyến tính với căn bậc hai của tốc độ quét. Kết quả này chỉ ra rằng quá trình oxy hóa $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$ được kiểm soát bởi quá trình khuếch tán [26-30]. Từ độ dốc của $I_{pa}-\nu^{1/2}$, diện tích bề mặt hiệu dụng của fPGE và ZnO/fPGE được xác định là $0,099 \text{ cm}^2$ và $1,2 \text{ cm}^2$, cao hơn lần lượt là 3,96 lần và 4,8 lần so với diện tích bề mặt điện cực thực tế ($0,0254 \text{ cm}^2$). Kết quả trên cho thấy điện cực fPGE và ZnO/fPGE có độ xốp tuyệt vời và độ linh hoạt cơ học tốt. Diện tích bề mặt hiệu dụng của ZnO/fPGE cao hơn so với fPGE, hoạt tính xúc tác của nó cho quá trình oxy hóa xanthin dự kiến sẽ cải thiện đáng kể. Vì vậy, điện cực ZnO/fPGE được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Tính chọn lọc của cảm biến ZnO/fPGE

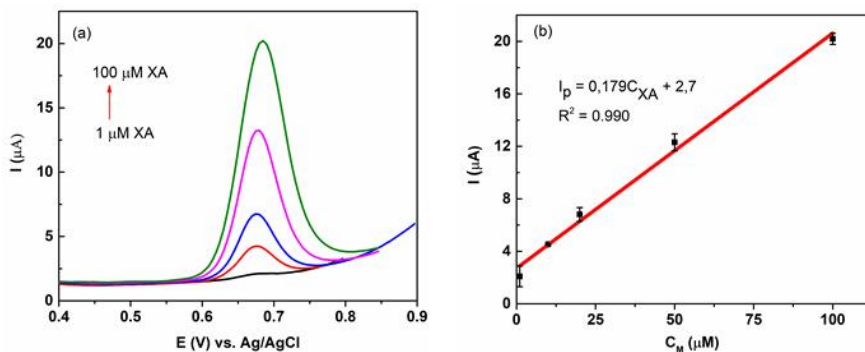
Theo báo cáo, Adenosine triphosphate có trong thịt, cá sẽ biến mất trong vòng 2-24 giờ sau khi động vật chết, nồng độ các chất được tạo ra trong quá trình phân hủy thịt như hypoxanthin, xanthin và acid uric sẽ tích lũy dần theo thời gian bảo quản [33]. Để kiểm tra độ chọn lọc của cảm biến XA dựa trên điện cực ZnO/fPGE cần nghiên cứu khả năng xác định XA trong dung dịch chứa đồng thời cả UA và HXA. Vì vậy, một hỗn hợp bao gồm ba chất có cùng nồng độ $50 \mu\text{M}$ đã được pha trong PBS (1X, pH 7,0), dung dịch được đo bằng kỹ thuật DPV trong khoảng điện thế 0 - 1,1V (Hình 6a). Ba đỉnh anốt tương ứng với quá trình oxy hóa UA (0,302 V), XA (0,661 V) và HXA (0,971 V) được quan sát thấy trên đường cong đo DPV của điện cực ZnO/fPGE. Khoảng phân tách điện thế cực đại là 150 mV (UA-XA) và 200 mV (XA-HXA), đủ lớn để phát hiện ba chất phân tích này cùng một thời điểm [34, 35]. Vì vậy, cảm biến ZnO/fPGE có tiềm năng trong phân tích đồng thời cũng như riêng lẻ các chất phân tích acid uric, xanthin và hypoxanthin. Để đánh giá độ chọn lọc của cảm biến ZnO/fPGE, một số chất gây nhiễu tiềm ẩn đã được thêm vào khi thực hiện bằng phương pháp đo dòng-thời gian ở điện thế + 0,661 V. Phản ứng đo cường độ dòng điện được ghi lại khi thêm $50 \mu\text{M}$ xanthin và các chất gây nhiễu bao gồm $70 \mu\text{M}$ hypoxanthin, $70 \mu\text{M}$ acid uric, $70 \mu\text{M}$ acid ascorbic, $70 \mu\text{M}$ glucose và $70 \mu\text{M}$ dopamin như trong Hình 6b. Phản ứng của cảm biến ZnO/fPGE đối với các chất gây nhiễu có tín hiệu dòng tăng không đáng kể so với xanthin. Những kết quả này xác nhận tính chọn lọc cao của cảm biến ZnO/fPGE trong việc phát hiện xanthin. Ngoài ra, cảm biến ZnO/fPGE được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4°C có đáp ứng dòng sau 3 ngày, 10 ngày và 20 ngày lần lượt là 98,2%, 93,5% và 85,2% so với đáp ứng dòng ban đầu [36].



Hình 6. (a) DPV của cảm biến fPGE và ZnO/fPGE trong dung dịch chứa 50 μM UA, XA, và HXA trong PBS (1X, pH 7.0), (b) Đặc tuyến đáp ứng dòng của cảm biến ZnO/fPGE khi thêm thứ tự các chất of 50 μM xanthin, 70 μM glucose, 50 μM hypoxanthin, 70 μM ascorbic acid, 70 μM dopamine, and 70 μM uric acid trong PBS (1X, pH 7.0) ở 0,661 V

3.4. Lập đường chuẩn xác định xanthin bằng phương pháp (DPV)

Phương pháp DPV rất thuận lợi cho việc đánh giá khoảng đáp ứng tuyến tính, độ nhạy và giới hạn phát hiện của cảm biến. Hình 7a là đường cong DPV trên điện cực ZnO/fPGE với các nồng độ XA khác nhau. Dòng điện cực đại tăng tuyến tính khi tăng nồng độ XA trong khoảng 1 μM – 100 μM tuân theo phương trình hồi quy tuyến tính: $I_p \text{ (mA)} = 0,009 C_{XA} + 0,13$ ($R^2 = 0,992$). Giới hạn phát hiện (LOD) được tính là 0,29 μM dựa trên công thức $3,3S_d/S$, trong đó S_d là độ lệch chuẩn của tín hiệu trắng: 0,0159 (n = 4, Bảng 1), Độ nhạy = S/A , trong khi S là độ dốc hiệu chỉnh đường cong tuyến tính trong Hình 7b và A là diện tích bề mặt, được tính là $7,05 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Giá trị cường độ dòng của các mẫu trắng được đưa ra tại Bảng 1.



Hình 7. (a) Đường DPV của cảm biến ZnO/fPGE xác định XA với việc thêm liên tục các nồng độ XA khác nhau (1 μM–100 μM) trong PBS (1X, pH 7.0), (b) đường tuyến tính I_p phụ thuộc nồng độ XA

Bảng 1. Giá trị cường độ dòng của các mẫu trắng

Mẫu	1	2	3	4
i (μA)	0,122	0,145	0,151	0,133

So sánh với các công bố về cảm biến XA không gắn enzyme, có thể thấy cảm biến ZnO/fPGE có khoảng đáp ứng tuyến tính rộng hơn, giới hạn phát hiện thấp, độ nhạy cao so

với $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{rGO}$ [35] với khoảng tuyến tính 2-10 μM và giới hạn phát hiện 0,65 μM , cảm biến Ag/AgCl (4B-PGE) [37] khoảng tuyến tính 8-36 μM và độ nhạy 1,742 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$. Trong khi đó, mặc dù các cảm biến Pyrolytic graphite [38], $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ (Nafion) [39] có giới hạn phát hiện khá cao (lần lượt là 10 μM và 2,35 μM) nhưng hoạt động tuyến tính lại rộng hơn (lần lượt là 10-500 μM và 50-500 μM) so với cảm biến được chế tạo trong nghiên cứu này. Từ phân tích trên có thể thấy cảm biến ZnO/fPGE là một cảm biến có tiềm năng ứng dụng lớn trong việc phát hiện xanthin.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chế tạo thành công cảm biến điện hóa có tính chọn lọc cao dựa trên điện cực graphen xốp được biến tính với hạt nano ZnO sử dụng phương pháp ghi laser CO_2 trực tiếp, đơn giản và chi phí thấp. Điện cực ZnO/fPGE cung cấp môi trường thuận lợi cho các phản ứng điện hóa trực tiếp không dùng enzyme, tạo ra cảm biến hiệu quả. Ngoài ra, việc tích hợp giữa các hạt nano ZnO và fPGE mang lại độ điện động tốt hơn cho cảm biến XA với khoảng tuyến tính là 1,0 μM -100 μM , giới hạn phân tích LOD là 0,29 μM và độ nhạy là 7,05 $\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Kết quả này mở ra khả năng ứng dụng thực tế tuyệt vời của hệ cảm biến $\text{ZnO}/\text{graphene}$ trong phân tích chất lượng thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Bộ khoa học và công nghệ Việt Nam với mã số đề tài NĐT. 70.e-ASIA/19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. W.X.L. Felicia, K. Rovina, N.Md N. Aqilah, J.M. Vonnice, K.W. Yin, and N. Huda, "Assessing meat freshness via nanotechnology biosensors: Is the world prepared for lightning-fast pace methods?," *Biosensors*, vol. 13, no. 2, pp. 217, 2023.
- [2]. J.H. Hwang, Y. Kim, H. Choi, and K.G. Lee, "ATP degradation products as freshness indicator of flatfish during storage," *Food Science and Biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 1891–1897, 2019.
- [3]. K.H. Erna, K. Rovina, and S. Mantihal, "Current detection techniques for monitoring the freshness of meat-based products: A review," *Journal of Packaging Technology and Research*, vol. 5, no. 1, pp. 127 - 141, 2021.
- [4]. N. Cooper, R. Khosravan, C. Erdmann, J. Fiene, and J.W. Lee, "Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies," *Journal of Chromatography B*, vol. 837, no. 1-2, pp. 1-10, 2006.
- [5]. R. Parker, W. Snedden, and R.W.E. Watts, "Mass-spectrometric identification of hypoxanthine and xanthine ("oxypurines") in skeletal muscle from two patients with congenital xanthine oxidase deficiency (xanthinuria)," *Biochemical Journal*, vol. 115, no. 1, pp. 103-108, 1969.
- [6]. Z.K. Shihabi, M.E. Hinsdale, and A.J. Bleyer, "Xanthine analysis in biological fluids by capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography B*, vol. 669, no. 1, pp. 163-169, 1995.
- [7]. X. Zhang, J. Dong, X. Qian, and Ch Zhao, "One-pot synthesis of an RGO/ZnO nanocomposite on zinc foil and its excellent performance for the nonenzymatic sensing of xanthine," *Sensors Actuators B*, vol. 221, pp. 528–536, 2015.

- [8]. M.Z.H. Khan, M.S. Ahommed, and M. Daizy, "Detection of xanthine in food samples with an electrochemical biosensor based on PEDOT: PSS and functionalized gold nanoparticles," *RSC Advances*, vol. 10, no. 59, pp. 36147–36154, 2010.
- [9]. S. Yazdanparast, A. Benvidi, S. Abbasi, and M. Rezaeinasab, "Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensor using poly (l-aspartic acid)/MWCNT bio-nanocomposite for xanthine detection: A meat freshness marker," *Microchemical Journal*, vol. 149, pp. 104000, 2019.
- [10]. M. Pumera, "Graphene in biosensing," *Materials Today*, vol. 14, no. 7-8, pp. 308-315, 2011.
- [11]. K. ghanbari and F. Nejabati, "Construction of novel nonenzymatic Xanthine biosensor based on reduced graphene oxide/polypyrrole/CdO nanocomposite for fish meat freshness detection," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 13, no.2, pp. 1411-1422, 2019.
- [12]. K. Ghanbari and F. Nejabati, "Ternary nanocomposite-based reduced graphene oxide/chitosan/Cr₂O₃ for the simultaneous determination of dopamine, uric acid, xanthine, and hypoxanthine in fish meat," *Analytical Methods*, vol. 12, pp. 1650–1661, 2020.
- [13]. Z. F. Wan, S. J. Wang, B. Haylock, J. Kaur, P. Tanner, D. Thiel, R. Sang, I. S. Cole, X. P. Li, M. Lobino, and Q. Li, "Tuning the sub-processes in laser reduction of graphene oxide by adjusting the power and scanning speed of laser," *Carbon*, vol. 141, pp. 83 –91, 2019.
- [14]. Z. Wan, N.-T. Nguyen, Y. Gao, and Q. Li, "Laser induced graphene for biosensors," *Sustainable Materials and Technologies*, vol. 25, pp. e00205, 2020.
- [15]. R. Rahimi, M. Ochoa, W. Yu, and B. Ziaie, "Highly stretchable and sensitive unidirectional strain sensor via laser carbonization," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 8, pp. 4463 –4470, 2015.
- [16]. V. P. Wanjari, A. S. Reddy, S. P. Duttagupta, and S. P. Singh, "Laser-induced graphene-based electrochemical biosensors for environmental applications: a perspective," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 30, pp. 42643–42657, 2023.
- [17]. G. Xue, W. Yu. L. Yutong, Z. Qiang, L. Xiuying, T. Yiwei, and L. Jianrong, "Construction of a novel xanthine biosensor using zinc oxide (ZnO) and the biotemplate method for detection of fish freshness," *Analytical Methods*, vol. 11, pp. 1021, 2019.
- [18]. H. Jeong, J. Yoo, S. Park, J. Lu, S. Park, and J. Lee, "Non-enzymatic glucose biosensor based on highly pure TiO₂ nanoparticles," *Biosensors*, vol. 11, no. 5, pp. 149, 2021.
- [19]. M. L. M. Napi, S. M. Sultan, R. Ismail, K. W. How, and M. K. Ahmad, "Electrochemical-Based Biosensors on Different Zinc Oxide Nanostructures: A Review," *Materials*, vol. 12, no. 18, pp. 2985, 2019.
- [20]. V. P. Wanjari, A. S. Reddy, S. P. Duttagupta, and S. P. Singh, "Laser-induced graphene-based electrochemical biosensors for environmental applications: a perspective," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 30, pp. 42643–42657, 2023.
- [21]. N. F. Santos, J. Rodrigues, S. O. Pereira, A. J. S. Fernandes, T. Monteiro, and F. M. Costa, "Electrochemical and photoluminescence response of laser-induced graphene electrodeposited ZnO composites," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 01, pp. 17154, 2021.
- [22]. S. Park, S. An, H. Ko, C. Jin, C. Lee. "Synthesis of nanograined ZnO nanowires and their enhanced gas sensing properties," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 4, no. 7, pp. 3650–3656, 2012.
- [23]. J. Ali, R. Irshad, B. Li, K. Tahir, A. Ahmad, M. Shakeel, Z.U.H. Khan, "Synthesis and characterization of phytochemical fabricated zinc oxide nanoparticles with enhanced antibacterial and catalytic applications," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 183, pp. 349–356, 2018.

- [24]. L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus and M. S. Dresselhaus, "Raman spectroscopy in graphene," *Phys. Rep.*, vol. 473, no. 5-6, pp. 51-87, 2009.
- [25]. J. Wu, M. Lin, X. Cong, H. Liu a and P. Tan, "Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 5, pp. 1822, 2018.
- [26]. Y. Bleu, F. Bourquard, A.-S. Loir, V. Barnier, F. Garrelie and C. Donnet, "Raman study of the substrate influence on graphene synthesis using a solid carbon source via rapid thermal annealing," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 50, no.11, pp.1630-1641, 2019.
- [27]. A. Marzouki, C. Sartet, N. Haneche, G. Patriarche, A. Lusson, V. Sallet and M. Oueslati, "Fabrication and characterization of ZnO:Sb/n-ZnO homojunctions," *Appl. Phys. A*, vol. 127, no. 6, pp. 471, 2021.
- [28]. A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical methods fundamentals and applications," *John Wiley & Sons, Inc.* Second Edition, 2001.
- [29]. R. S. Nicholson, "Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics," *Anal. Chem.*, vol. 37, no. 11, pp. 1351–1355, 1965.
- [30]. A. Marzouki, C. Sartet, N. Haneche, G. Patriarche, A. Lusson, V. Sallet and M. Oueslati "Fabrication and characterization of ZnO:Sb/n-ZnO homojunctions," *Appl. Phys. A*, vol. 127, no. 6, pp. 471, 2021.
- [31]. V. J. Sinanoglou, P. Zoumpoulakis, C. Fotakis, N. Kalogeropoulos, A. Sakellari, S. Karavoltsos and I. F. Strati, "On the Characterization and Correlation of Compositional, Antioxidant and Colour Profile of Common and Balsamic Vinegars," *Antioxidants*, vol. 7, no. 10, pp. 139, 2018.
- [32]. R. S. Nicholson and I. Shain, "Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems," *Anal. Chem.*, vol, 36, no. 4, pp. 706–723, 1964.
- [33]. L. Zhang, S. Li, J. Xin, H. Ma, H. Pang, L. Tan and X. Wang, "A non-enzymatic voltammetric xanthine sensor based on the use of platinum nanoparticles loaded with a metal-organic framework of type MIL-101(Cr). Application to simultaneous detection of dopamine, uric acid, xanthine and hypoxanthine," *Microchimica. Acta.*, vol. 186, no.573, pp. 9, 2019.
- [34]. N. T. V. Hoan, N. N. Minh, N. T. H. Trang, L. T. T. Thuy, C. V. Hoang, T. X. Mau, H. X. A. Vu, P. T. K. Thu, N. H. Phong and D. Q. Khieu, "Simultaneous Voltammetric Determination of Uric Acid, Xanthine, and Hypoxanthine Using CoFe₂O₄/Reduced Graphene Oxide-Modified Electrode," *Hindawi Journal of Nanomaterials*, Article ID 9797509 1-15, 2020.
- [35]. N. T. H. Le, N. X. Viet, N. V. Anh, T. N. Bach, P. T. Thu, N. T. Ngoc, D. H. Manh, V. H. Ky, V. D. Lam, V. Kodelov, S. Von Gratowski, N. H. Binh and T. X. Anh, "Non-Enzymatic Electrochemical Sensor based on ZnO Nanoparticles/Porous Graphene for the Detection of Hypoxanthine in Pork Meat," *AIP Advanced*, 14, 2024.
- [36]. N. Vishnu, M. Gandhi, D. Rajagopal and A. S. Kumar, "Pencil graphite as an elegant electrochemical sensor for separation-free and simultaneous sensing of hypoxanthine, xanthine and uric acid in fish samples," *Anal. Methods*, vol. 9, pp. 2265-2274, 2017.
- [37]. R. Goyal, A. Mittal, and S. Sharma, "Simultaneous voltammetric determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid," *Electroanalysis*, vol. 6, pp. 609–611, 1994.
- [38]. A. S. Kumar and P. Swetha, "Ru(DMSO)₄Cl₂ nano-aggregated Nafion membrane modified electrode for simulateneous electrochemical detection of hypoxanthine, xanthine and uric acid," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 642, pp. 135-142, 2010.