NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CẢM BIẾN SINH HỌC ĐIỆN HÓA TRÊN CƠ SỞ VI ĐIỆN CỰC BIẾN TÍNH XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT

Đến tòa soạn 22-03-2021

Nguyễn Thị Thơm, Phạm Thị Năm, Võ Thị Kiều Anh, Nguyễn Thị Thu Trang, Trần Đại Lâm Viện Kỹ thuật nhiệt đói, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Vũ Thị Thu

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

Phạm Ngọc Minh

Viện Công nghệ thông tin, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

Nguyễn Hải Bình

Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

SUMMARY

APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL BIO-SENSOR BASED ON MODIFIED MICRO-ELECTRODE TO DETECT PLANT PROTECTION DRUGS

In this study, electrochemical biosensors based on conductive polymer (polyaniline, PANi) and carbon nanomaterials (graphene, Gr) were fabricated on a screen-printed electrode (Pt-SPE) to detect plant protective drugs (Methamidophos). PANi films were synthesized onto microelectrodes using cyclic voltammetry (CV) then coated Gr film directly onto the electrode. The PANi/Gr bilayer hybrid material has good electrical conductivity, high porosity, good adhesion to biological molecules, and fast electronic transmission. PANi/Gr hybrid membranes were used to fabricate disposable acetylcholinesterase sensors to detect acetylthiocholine (ATCh). The electrochemical sensor is capable of detecting the Methamidophos with a detection limit of 1-50 ppm for a period of 10 minutes with the error permitted limit (15%). The electrochemical sensor provides a very promising technical solution to monitor topical acetylthiocholine levels in patients with neurological diseases and to identify neurotoxins such as sarin and pesticides.

Key words: *Electrochemical bio-sensors, graphene (Gr), polyaniline (PANi), acetylcholinesterase (AChE), plant protection drugs.*

1. GIỚI THIỆU

Gần đây, nhiều nghiên cứu tập trung vào phát triển các cảm biến điện hóa và cảm biến sinh học trên cơ sở của màng lai của polyme tương hợp sinh học và vật liệu nano dẫn điện [1]. Trong số các vật liệu nano dẫn điện, graphen (Gr) và các dẫn xuất của nó có các đặc tính tuyệt vời như: độ dẫn điện tốt, độ ổn định cơ học và tính linh hoạt tốt nên được ứng dụng nhiều trong hệ thống cảm biến điện hóa [2]. Polyanilin (PANi) với độ xốp cao, độ dẫn điện và độ bám dính tốt với phân tử sinh học nên thường được sử dụng trong cảm biến sinh học điện hóa. Hơn nữa, PANi có ba trạng thái hóa học khác nhau có thể được điều chỉnh bằng phương pháp điện hóa [3,4] và chúng nhạy với quá trình proton hóa/khử proton [5]. Ngoài ra, sự có mặt của các nhóm amin trong chuỗi polyme của PANi tạo thuận lợi để cố định enzym. Màng PANi/Gr hai lớp với độ dẫn điện tốt và sự truyền điện tử nhanh đã được chứng minh là có lợi trong lĩnh vực cảm biến điện hóa để phát hiện chất độc thần kinh [6,7] và theo dõi các proton được giải phóng từ gen qua quá trình khuếch đại [8].

Trong nghiên cứu này, điện cực trên cơ sở vi điện cực biến tính với PANi/Gr sẽ được ứng dụng như cảm biến sinh học điện hóa, sau đó được tích hợp với một hệ thiết bị đo điện hóa và modul truyền dẫn tín hiệu không dây (GSM/GPRS) để xác định dư lượng thuốc BVTV. Cơ chế của việc xác định thuốc BVTV là dựa trên sự ức chế hoạt động của enzyme acetylcholinesterase (AChE) bởi thuốc BVTV. Khi tiếp xúc với phân tử thuốc BVTV (methamidophos), hoạt động của enzyme AChE bị ức chế khiến nó sản sinh ra ít proton hơn so với bình thường. Sự chênh lệch về lượng proton sẽ được ghi nhận trên một thiết bị xử lý tín hiệu (được truyền dẫn không dây về trạm xử lý trung tâm) qua đó cho ta biết hàm lượng thuốc BVTV.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯỜNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Anilin (C₆H₅NH₂), Axit sunfuric (H₂SO₄), Kali Permanganat (KMnO₄), Acetylthiocholine (ATCh), Acetylcholinesterase (AChE), dung dịch đệm photphat (PBS), Glutaraldehyde (GA), Fe(NO₃)₃ là sản phẩm Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ. Điện cực carbon in lưới (SPE) ($\Phi = 3$ mm) là sản phẩm Quansense, Thái Lan. Mẫu graphen/Cu được cung cấp bởi Viện Khoa học vật liệu, Việt Nam.

2.2. Các phương pháp phân tích

Các thí nghiệm điện hóa được tiến hành trên thiết bị AUTOLAB PGSTAT302N (Metrohm, Hà Lan). Hình ảnh FE-SEM được chụp trên thiết bị S-4800 (Hitachi, Nhật Bản). Phổ FTIR của màng PANi được đo trên thiết bị Nicolet iS10, Thermo Scientific, Mỹ.

2.3. Chức năng hóa bề mặt vi điện cực (Chế tạo cảm biến sinh học theo chức năng hóa bề mặt)

Vi điện cực được chức năng hóa bề mặt bằng các vật liệu khác nhau theo các bước sau:

Tổng hợp màng PANi: Vi điện cực $(1 \times 3 \text{ cm})$ được phủ màng PANi bằng phương pháp quét thế vòng (CV) với khoảng thế quét từ -0,2 V tới +0,9 V, tốc độ quét 50 mV/s, 10 chu kỳ quét trong dung dịch H₂SO₄ 0,5 M chứa anilin 0,1 M.

Cố định màng graphen trên bề mặt vi điện cực: Màng Gr được chế tạo bằng phương pháp CVD trên đế Cu, sau đó được phủ lên vi điện cực bằng phương pháp loại đế Cu trong dung dịch muối Fe(NO₃)₃ 2% [9].

Cố định màng enzyme trên bề mặt vi điện cực: Enzym Acetylcholinesterase (AChE) được cố định trên màng PANi/Gr bằng cách phủ nhỏ giọt 1µl dung dịch AChE nồng độ 5 IU/µl trong đệm PBS (pH 7.4) lên bề mặt màng PANi/Gr và ủ ở 4°C, 24 h trong hơi glutaraldehyde (GA). Điện cực sau khi cố định AChE được rửa bằng dung dịch đệm PBS 20 mM (pH=7) để loại bỏ GA dư và các enzym không được cố định. Sau đó điện cực PANi/Gr/AChE tiếp tục được phủ thêm 2µl cơ chất acetylthiocholine (AChCl) nồng độ 5 mM.



Hình 1. Sơ đồ khối hệ thống tích hợp: cảm biến, xử lí/khuếch đại và truyền dữ liệu không dây

KÉT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 3.1. Đặc trưng tính chất của vi điện cực biến tính

Hình 2 là phổ FTIR của màng PANi phủ trên bề mặt điện cực bằng phương pháp điện hóa. Kết quả trên phổ FTIR xuất hiện các dao động đặc trưng cho PANi tại số sóng 3441 cm⁻¹ (dao động hóa trị N-H), 2920 cm⁻¹ (dao động hóa trị =C-H trong mạch vòng), 1594 cm⁻¹ (dao động C=N), 1509 cm⁻¹ (dao đông hóa tri C=C (dao động khung)); 1302 cm⁻¹ (dao động C-N); 1161, 825 và 520 cm⁻¹ (dao đông hóa tri C-H) [10,11]. Như vậy, màng PANi đã được tổng hợp điên hóa thành công trên bề mặt hê vi điên cực. Màng polyme dẫn có nhóm chức -NH được xác định bằng phổ FT-IR tạo khả năng liên kết với các vật liệu chức năng (graphen, enzym đặc hiệu) để xây dựng cảm biến sinh hoc điên hóa.





Hình 2. Phổ FT-IR của PANi tổng hợp bằng phương pháp điện hóa

Hình 3 là ảnh FE-SEM của màng Gr sau khi phủ trên bề mặt điện cực Pt/PANi. Kết quả cho thấy màng Gr rất mỏng và được phủ đều trên bề mặt điện cực Pt/PANi. Cấu trúc màng layerby-layer PANi/Gr được chế tạo thành công sẽ làm tăng độ nhạy, độ dẫn điện và thời gian truyền dẫn tín hiệu điện hóa của cảm biến.



Hình 3. Ảnh FE-SEM của màng graphen sau khi gắn lên điện cực Pt/PANi

Tính chất điện hóa của bề mặt vi điện cực biến tính được nghiên cứu bằng phổ xung sóng vuông nhằm hạn chế sự ảnh hưởng của điện áp đặt vào vật liệu sinh học, tăng độ nhạy của tín hiệu. Dòng điện phản hồi của vi điện cực được thể hiên trên hình 4.



Hình 4. Phổ SWV của vi điện cực biến tính trong khoảng thế -0,6V ÷ +0,6V, tần số quét 12,5 Hz, bước thế 5 mV, biên độ xung 50 mV trong dung dịch HCl 0,1 M

Kết quả phổ xung sóng vuông SWV trên hình 4 cho thấy màng PANi gắn Gr hoạt động điện hóa bình thường. Khi ů trong hơi glutaraldehyde (GA) thì có sư tao liên kết giữa màng polyme và GA, do GA không có tính chất hoạt động điện hóa và hiệu ứng che lấp bề mặt màng nên tín hiệu đường SWV sẽ giảm, tượng ứng tính chất điện hóa trên bề mặt cảm biến giảm. Khi tiếp tục gắn tiếp enzym AChE lên màng composite thì có thêm một lớp che chắn trên bề mặt, vì vậy đường hoạt động điện sẽ giảm nếu tiếp tục quét SWV. Nhưng nếu cho cơ chất AChCl vào thì do phản ứng giữa cơ chất và enzym sinh ra các điện tử và ion H+ nên tính chất điện hóa trên bề mặt cảm biến thay đổi, tín hiệu hoạt động điện hóa tăng lên. 3.2. Thử nghiệm hoạt tính của enzym cố

định trên điện cực

Hoạt tính của enzym AChE gắn cố định trên điện cực được thử nghiệm với nồng độ cơ chất AChCl 50 μ M. Sự thủy phân của cơ chất tại các vị trí hoạt động của enzym trên bề mặt cảm biến được ghi nhận bằng hai phương pháp áp thế và quét thế (Hình 5). Điều đó khẳng định enzym đã được gắn cố định trên điện cực và vẫn giữ được hoạt tính.



Hình 5. Ghi nhận phản ứng enzym-cơ chất trên bề mặt điện cực bằng phương pháp quét thế tại V = + 300 mV

Việc xác định dư lượng thuốc BVTV sử dụng cảm biến enzym dựa trên sự ức chế của thuốc BVTV tới hoạt tính của enzym đó. Tín hiệu liên quan đến hoat hóa của enzym càng manh thì càng thuận tiện cho việc theo dõi độ giảm của độ hoạt hóa khi có mặt thuốc BVTV. Do đó, viêc xác đinh nồng đô cơ chất bão hòa, nồng độ của cơ chất mà tại đó tín hiệu thu nhận giữ giá tri không đổi và màng enzym đã phản ứng hoàn toàn với cơ chất, đóng vai trò quan trọng đối với hoạt động của các cảm biến enzym. Đường chuẩn cơ chất của cảm biến enzym được thể hiện trên hình 6. Đáp ứng dòng điên đối với điên áp +300 mV được ghi nhận với nồng độ cơ chất tăng từ 1 tới 900 µM. Kết quả thu được cho thấy khi cơ chất AChCl đạt nồng độ trong khoảng 1 mM thì tín hiệu thu được đạt giá trị bão hòa và tín hiệu đầu ra không đổi. Vùng hoat đông tối ưu của cảm biến được xác định là nằm trong khoảng 50 -100 µM. Nghiên cứu thử nghiệm hoạt động của cảm biến ở các nồng đô lớn hơn (trên 100 µM) cho thấy dấu hiệu châm hoạt động của các cảm biến này khi có chất ức chế. Và hiển nhiên, vùng nồng độ thấp hơn (< 50 µM) sẽ cho tín hiệu ban đầu thấp, không thuận tiện cho phép đo xác đinh nồng đô thuốc BVTV.



Hình 6. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của tín hiệu đầu ra vào nồng độ cơ chất

3.3. Thử nghiệm xác định thuốc BVTV

Trong phần này chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng phát hiện thuốc BVTV của cảm biến đã chế tao được với một số thuốc thử nghiêm thuôc dòng lân hữu cơ (Methamidophos). Thử nghiệm được tiến hành bằng phương pháp áp thế tại điện thế +300 mV. Sư có mặt của thuốc BVTV trong dung dịch thử được biểu hiện thông qua sự ức chế phản ứng enzyme AChE với cơ chất AChCl, nói cách khác là sự sụt dòng trên đường áp thế. Đô dốc của đường suy giảm cường đô dòng điện trên đường áp thế khi có mặt thuốc BVTV tỉ lê với nồng độ thuốc BVTV (Hình 7).



Hình 7. Phát hiện thuốc BVTV họ Methamidophos sử dụng cảm biến điện hóa AChE bằng phương pháp áp thế

3.4. Xây dựng đường chuẩn xác định dư lượng thuốc BVTV

Việc tiến hành xây dựng đường chuẩn để xác định dư lượng mỗi loại thuốc BVTV được thực hiện cho từng cảm biến. Các cảm biến sau khi chế tạo được bảo quản ở 4⁰C và có thể sử dụng được trong vòng 30 ngày. Thời hạn sử dụng tối đa của mỗi cảm biến sau khi lấy ra khỏi nơi bảo quản là 24 h. Dưới đây là đường chuẩn xác định Methamidophos.



Hình 8. Đường chuẩn thuốc BVTV họ Methamidophos sử dụng cảm biến điện hóa AChE bằng phương pháp áp thế

3.5. So sánh kết quả đo trên thiết bị đã chế tạo với kết quả đo bằng phương pháp HPLC

Kết quả so sánh với phép đo trên thiết bị HPLC cho thấy, các kết quả trên thiết bị cảm biến điện hóa là đáng tin cậy, mặc dù có sai số lớn hơn so với phương pháp HPLC nhưng vẫn nằm trong giới hạn cho phép (sai số dưới 15%). Sai số lớn trong các phép đo với cảm biến enzyme là khó tránh khỏi do sự thay đổi nhất định trong hoạt tính của enzyme theo điều kiện đo. Đặc biệt, cảm biến điện hóa được chế tạo nhằm phục vụ việc đo đạc và phân tích tại hiện trường, trong thời gian khoảng 10 phút trên mỗi phép đo, điều này phương pháp HPLC không thực hiện được.

Các kết quả phân tích Methamidophos trên mẫu nước và mẫu rau bằng hai phương pháp HPLC và vi cảm biến tích hợp thiết bị điện hóa đã chế tạo được trình bày trong bảng 1 và bảng 2.

	0	1 1			
Nồng độ thực (ppm)	1	5	10	20	50
Nồng độ đo được trên HPLC	1.18 (±2.7%)	5.11 (±1.2%)	9.74 (±0.7%)	19.65 (±0.4%)	50.18 (±0.9%)
Nồng độ đo được trên thiết bị đã chế tạo	0.7 (±5.5%)	4.9 (±9.3%)	12.1 (±12.3%)	21.4 (±14.2%)	49.1 (±5.9%)

Bảng 1. Kết quả phân tích trên nền nước

Bảng 2. Kết quả phân tích trên nền rau

Nồng độ thực (ppm)	1	5	10	20	50
Nồng độ đo được trên HPLC	1.29 (±2.9%)	5.09 (±1.1%)	10.08 (±0.5%)	19.01 (±0.4%)	50.36 (±0.3%)
Nồng độ đo được trên thiết bị đã chế tạo	0.8 (±5.9%)	4.8 (±9.6%)	12.5 (±12.1%)	21.4 (±14.3%)	49.5 (±6.3%)

Kết quả kiểm tra dư lượng thuốc BVTV có thể được tính toán từ các dữ liệu hiển thị trên màn hình máy đo, hoặc màn hình máy tính. Tuy nhiên, chúng tôi tiến hành kết nối hệ thiết bị với modun dẫn truyền không dây GSM/GPRS nhằm đẩy dữ liệu này lên Google Drive, cho phép hiển thị trực tiếp nồng độ thuốc BVTV. Giao diện đăng nhập cho người sử dụng là tài khoản Google và giao diện người sử dụng là bảng Google spreadsheet nằm bên trong Google Drive (hình 9).

Google

Đăng nhập một lần. Truy cập tất cả.

Đăng nhập để tiếp tục sử dụng Gmail

	-	
Nhāp ema	iil của bạn	
	Tiếp theo	
-	Ban car	tra ciún

Hình 9. Giao diện truy cập tài khoản Google

⊞	DỮ LIỆU Tệp Chỉnh sử	🚖 🔳 a Xem Chèn Định dại	ng Dữ liệu	Công), cụ -	Tiện í	ch b
	e n a 7	₫ % .0 ₄ .0 <u>0</u> 123 ~	Arial	*	10	v	в
fx							
-	Α	в	С		D		
1	NÔNG ĐỘ	THUỐC TRỪ SÂU					
2	Thời gian	Nồng độ (ppm)					
3	14:27:54 ICT	2					
4	14:59:40 ICT	4					
5	15:29:27 ICT	8					
6							
7							

Hình 10. Hiển thị nồng độ thuốc trừ sâu trên thiết bị Client

Mỗi khi thiết bị Client nhận được dữ liệu từ thiết bị đo, thiết bị Client sẽ xử lý dữ liệu, sau đó gửi dữ liệu qua giao thức HTTP lên Google Spreadsheet của Google Drive. Nhưng Google Spreadsheet sẽ không hiển thị dữ liệu được ngay lập tức. Ứng dụng Web được viết trên nền Google Apps Script sẽ chuyển những dữ liệu nhận được từ giao thức HTTP sang giao thức HTTPS, là giao thức hợp lệ mà Google Spreadsheet chấp nhận, khi đó dữ liệu sẽ được hiển thị thành các cột và hàng tương ứng với thời gian mà dữ liệu đến được server.

4. KẾT LUẬN

Cảm biến sinh học điên hóa được chế tao thành công trên cơ sở polyme dẫn polyanilin (PANi) và graphen (Gr) có khả năng phát hiện thuốc BVTV họ Methamidophos. Màng PANi được tổng hợp lên các vi điện cực bằng phương pháp quét thế vòng tuần hoàn và màng Gr được tổng hợp bằng phương pháp lắng đọng hơi hóa học (CVD), sau đó chuyển trực tiếp lên màng polyme dẫn. Enzyme AChE được gắn cố định lên vi điện cực đã biến tính với PANi/Gr sử dụng hơi glutaraldehyde bão hòa. Cảm biến sinh học điện hóa chế tạo được có khả năng phát hiện thuốc BVTV với giới hạn phát hiện từ 1-50 ppm, thời gian 10 phút trên mỗi phép đo và được so sánh kết quả đo của phép đo HPLC với sai số nằm trong giới han cho phép (15%).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 104 .03-2018.344.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thi Thu Vu, Thi Ngoc Nga Dau, Cong Thanh Ly, Do Chung Pham, Thi Thanh Ngan Nguyen, Van Trinh Pham. Aqueous electrodeposition of (AuNPs/MWCNT-PEDOT) composite for high-afinity acetylcholinesterase electrochemical sensors. J. mater.Sci., 55, (2020), 9070-9081.

2. Yang Song, Yanan Luo, Chengzhou Zhu, He Li, Dan Du, Yuehe Lin. Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials, Biosensors and Bioelectronics, **76**, (2016), 195-212.

3. AJ Motheo, JR Santos Jr, EC Venancio, LHC Mattoso. Influence of different types of acidic dopants on the electrodeposition and properties of polyaniline films, Polymer, **39**, (1998), 6977-6982.

4. Amit Nautiyal, Jonathan E Cook, Xinyu Zhang. Tunable electrochemical performance of polyaniline coating via facile ion exchanges, Progress in Organic Coatings, **136**, (2019), 105309.

5. Hugo Jose Nogueira, Pedroza Dias Mello, Marcelo Mulato. Influence of galvanostatic electrodeposition parameters on the structure property relationships of polyaniline thin films and their use as potentiometric and optical pH sensors, Thin Solid Films, **656**, (2018), 14-21.

6. Thanh, Nguyen Van Tu, Nguyen Le Huy, Nguyen Tuan Dzung, Phan Ngoc Minh, Vu Thi Thu, Tran Dai Lam. Electrochemical immunosensor for detection of atrazine based on polyaniline/graphene, Journal of Materials Science and Technology, **32**, (2016), 539-544.

7. Liu, G., Wang, J., Barry, R., Petersen, C., Timchalk, C., Gassman, P.L., Lin, Y. Nanoparticlebased electrochemical immunosensor for the detection of phosphorylated acetylcholinesterase: An exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents, Chemistry - A European Journal, 14, 2008, 9951-9959.

8. Vu Thi Thu, Bui Quang Tien, Dau Thi Ngoc Nga, Ly Cong Thanh, Le Hoang Sinh, Le Cam Tu, Tran Dai Lam. Reduced graphene oxidepolyaniline film as enhanced sensing interface for the detection of loop-mediated-isothermalamplification products by open circuit potential measurement, RSC Advances, **8**, (2018), 25361-25367.

9. Trần Đại Lâm. Nghiên cứu, thiết kế, chế tạo hệ cảm biến sinh học trên cơ sở vật liệu carbon nano, khả năng truyền dữ liệu không dây để phân tích nhanh dư lượng một số thuốc bảo vệ thực vật trong nông sản. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Sở KHCN Hà Nội (2016).

10. Camalet J.L., Lacroix J.C., Nguyen T. Dung, Aeiyach S., Pham M.C., Petitjean J., Lacaze P. C., Aniline electropolymerization on platinum and mild steel from neutral aqueous media. Journal of Electroanalytical Chemistry, **485**(1), (2000), 13-20.

11. Q. Qin, J. Tao, and Y. Yang, Preparation and characterization of polyaniline film on stainless steel by electrochemical polymerization as a counter electrode of DSSC, Synthetic Metals, **160(11-12)**, (2010), 1167–1172.