

# Phân tích đồng thời chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin sử dụng cảm biến điện hóa với điện cực graphene đa lớp chế tạo bằng phương pháp điện hóa trong dung môi hữu cơ

Trịnh Thị Tuyết<sup>1,2</sup>, Đỗ Thị Nhật Quyên<sup>1,2</sup>, Tạ Thị Thảo<sup>2</sup>, Vũ Thị Thu Hà<sup>1</sup>,  
Lê Thị Vinh Hạnh<sup>3</sup>, Lê Minh Thành<sup>4</sup>, Phạm Thị Hải Yến<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 19 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Hóa - Lý kỹ thuật, Học viện Kỹ thuật Quân sự, 236 Hoàng Quốc Việt, phường Cổ Nhuế 1, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Khoa Hóa và Môi trường, Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, phường Trung Liệt, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/6/2023; ngày chuyển phân biên 22/6/2023; ngày nhận phân biên 13/7/2023; ngày chấp nhận đăng 17/7/2023

## Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, 3 thuốc kháng sinh chloramphenicol (CAP), amoxicillin (AMX) và enrofloxacin (ENR) lần đầu tiên được phân tích đồng thời sử dụng cảm biến điện hóa. Điện cực graphene đa lớp dùng trong cảm biến được chế tạo trực tiếp, nhanh chóng từ graphite bằng phương pháp một bước áp thế điện hóa trong dimethyl sulfoxide. Các kỹ thuật chụp ảnh hiển vi điện tử quét và quét thế vòng điện hóa đã thể hiện cấu trúc dạng tấm nano đa lớp graphene của điện cực với diện tích hoạt động điện hóa lớn, hoạt tính điện hóa tốt. Điện cực cho tín hiệu oxy hóa điện hóa tương ứng với 3 kháng sinh tốt nhất khi chế tạo ở thế -5 V trong 20 s. Trong các điều kiện tối ưu, cảm biến đã thể hiện khả năng phân tích đa chất hiệu quả cao khi tín hiệu của 3 chất tách biệt rõ ràng và tuyến tính tốt với nồng độ của chúng ( $R^2 > 0,99$ ). Cảm biến có độ chính xác cao, độ nhạy tốt với giới hạn phát hiện của CAP, AMX và ENR lần lượt là 0,060, 0,381 và 0,109  $\mu\text{M}$ . Tính khả dụng của cảm biến được thể hiện qua độ thu hồi chấp nhận được của cả 3 kháng sinh khi phân tích đồng thời trong mẫu nước hồ.

**Từ khóa:** bóc lớp điện hóa, cảm biến điện hóa, graphene, phân tích đồng thời, thuốc kháng sinh.

**Chỉ số phân loại:** 1.4, 1.5, 2.4

## 1. Giới thiệu

Trong những năm gần đây, việc lạm dụng thuốc kháng sinh trong điều trị y tế và trong chăn nuôi đã và đang trở thành mối lo ngại toàn cầu. Ước tính lượng tiêu thụ thuốc kháng sinh trên toàn cầu trong chăn nuôi sẽ tăng 67% từ năm 2010 đến năm 2030 [1]. Dư lượng thuốc kháng sinh phát thải ra môi trường và trong thực phẩm có thể xâm nhập vào cơ thể con người và gây ra các vấn đề nghiêm trọng về sức khỏe. Một hậu quả vô cùng nghiêm trọng của việc lạm dụng thuốc kháng sinh là hiện tượng kháng thuốc kháng sinh, do tạo ra các vi khuẩn và các gen kháng kháng sinh. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), thuốc kháng sinh (ngay cả ở nồng độ thấp) có thể tạo điều kiện cho các chủng vi khuẩn kháng thuốc phát triển mạnh. WHO đã xếp kháng thuốc kháng sinh là một trong mười mối đe dọa hàng đầu đối với sức khỏe toàn cầu trong năm 2019 và đã cảnh báo việc tiêu thụ thuốc kháng sinh ở mức cao ở một số quốc gia đang dẫn đến sự xuất hiện của các bệnh nhiễm trùng siêu vi khuẩn chết người [2-4]. Ở Việt Nam, một số thuốc kháng sinh đã, đang được sử dụng trong chăn nuôi có thể kể đến là CAP, AMX và ENR. Trong đó, CAP là thuốc đã bị đưa vào danh sách cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh động vật thủy sản và trên cạn, ENR bị cấm sử dụng với động vật thủy sản [5]. Trong khi đó, AMX tuy vẫn được cấp phép sử dụng,

nhưng nhiều khi còn bị lạm dụng, sử dụng không đúng liều lượng và mục đích. Theo quy định của Ủy ban châu Âu, CAP bị cấm sử dụng trong khi giới hạn dư lượng tối đa (MRLs) của các thuốc kháng sinh trong các loại thịt là 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  với AMX và 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  với ENR [6].

Với các lý do trên, để xác định và kiểm soát hàm lượng, dư lượng kháng sinh trong thực phẩm cũng như nguồn nước, đòi hỏi phải có các phương pháp phân tích có độ chính xác và độ nhạy cao, có khả năng phân tích đa chất tốt để có thể phân tích được nhiều loại thuốc kháng sinh cùng lúc. Ngày nay, một số phương pháp phân tích thuốc kháng sinh như sắc ký lớp mỏng [7], điện di mao quản [8], sắc ký khí ghép nối khối phổ, sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lỏng siêu hiệu năng cao ghép nối khối phổ [9, 10] đã được sử dụng trong phân tích với hiệu quả cao. Tuy nhiên, chúng có chi phí đầu tư cao, vận hành phức tạp. Do vậy, phương pháp phân tích điện hóa đang là một phương pháp thay thế hiệu quả trong định tính và định lượng các thuốc kháng sinh do có quy trình phân tích đơn giản, nhanh chóng, xử lý mẫu đơn giản, tiết kiệm mà vẫn đảm bảo được tính chính xác và độ nhạy tốt [11].

Graphene là vật liệu chế tạo cảm biến điện hóa cho hiệu quả cao do có độ dẫn điện tốt, diện tích hoạt động lớn, tốc độ chuyển điện tích nhanh và cửa sổ điện hóa rộng. Các

\*Tác giả liên hệ: Email: haiyen25986@gmail.com

# Simultaneous analysis of chloramphenicol, amoxicillin, and enrofloxacin using electrochemical sensors with multilayer graphene electrodes fabricated by electrochemical methods in an organic solvent

Thi Tuyet Trinh<sup>1,2</sup>, Thi Nhat Quyen Do<sup>1,2</sup>, Thi Thao Ta<sup>2</sup>,  
Thi Thu Ha Vu<sup>1</sup>, Thi Vinh Hanh Le<sup>3</sup>,  
Minh Thanh Le<sup>4</sup>, Thi Hai Yen Pham<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,

19 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Military Technical Academy,

236 Hoang Quoc Viet Street, Co Nhue 1 Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>Faculty of Chemistry and Environment, Thuyloi University,

175 Tay Son Street, Trung Liet Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 19 June 2023; revised 13 July 2023; accepted 17 July 2023

## Abstract:

In this study, three antibiotics, chloramphenicol (CAP), amoxicillin (AMX), and enrofloxacin (ENR), were simultaneously analysed for the first time using electrochemical sensors. The multilayer graphene electrode used in the sensor was directly and rapidly fabricated from graphite through a one-step chronoamperometry method. Scanning electron microscopy and cyclic voltammetry techniques revealed the multilayer-graphene nanostructure of the prepared electrode with a large electrochemically active surface area and good electrochemical activity. The electrode exhibited the best electrochemical oxidation signals corresponding to the three antibiotics when fabricated at a potential of 5 V for 20 s. Under optimised conditions, the sensor demonstrated excellent multi-analyte analysis capability, with clear separation and good linearity of the signals of the three antibiotics ( $R^2 > 0.99$ ) in relation to their concentrations. The sensor exhibited high accuracy and sensitivity with detection limits of 0.060, 0.381, and 0.109  $\mu\text{M}$  for CAP, AMX, and ENR, respectively. The applicability of the sensor was demonstrated through acceptable recoveries of all three antibiotics when simultaneously analysed in a lake water sample.

**Keywords:** antibiotic, electrochemical exfoliation, electrochemical sensor, graphene, simultaneous analysis.

**Classification numbers:** 1.4, 1.5, 2.4

điện cực biến tính với graphene chủ yếu được chế tạo bằng phương pháp nhỏ giọt để đưa một lớp phủ của graphene lên bề mặt điện cực nền. Do graphene phân tán kém trong dung môi nước, dễ dàng bị kết tụ lại, từ đó làm cho lớp phủ không đồng đều ở các lần biến tính, cũng như làm giảm tính ổn định của lớp phủ trên bề mặt điện cực, từ đó dẫn đến độ tái lặp không được như mong muốn [12]. Một số nghiên cứu đã sử dụng dạng dẫn xuất của graphene như graphene oxit (GO) và graphene oxit dạng khử (rGO) để làm vật liệu biến tính điện cực. GO có khả năng phân tán tốt nên dễ dàng tạo lớp phủ đồng đều và bền vững [13]. Trong khi đó, rGO có mạch liên hợp được tái thiết lập gần giống với graphene giúp tăng khả năng trao đổi điện tích; thêm vào đó, một số nhóm chức còn tồn tại trong cấu trúc rGO hỗ trợ cho việc làm giàu chất phân tích lên bề mặt điện cực [14].

Với mục đích làm tăng độ nhạy và tăng khả năng phân tích đa chất khi phân tích đồng thời các thuốc kháng sinh CAP, AMX và ENR, nghiên cứu này hướng đến việc sử dụng vật liệu điện cực graphene thay vì các dẫn xuất của nó. Để tránh những hạn chế của việc biến tính bằng phương pháp nhỏ giọt, chúng tôi đã đưa ra một phương pháp biến tính bề mặt điện cực graphite bằng các tấm graphene một cách trực tiếp bằng kỹ thuật điện hóa. Phương pháp được thực hiện với quy trình một bước, đơn giản và tiết kiệm chi phí đã tạo nên một lớp bề mặt gồm các tấm graphene đa lớp. Phương pháp phân tích điện hóa sử dụng điện cực graphene chế tạo được đã thể hiện hiệu quả tốt khi phân tích đồng thời CAP, AMX và ENR trong môi trường nước. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên phân tích đồng thời 3 kháng sinh này bằng phương pháp điện hóa.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Hóa chất và thiết bị

CAP ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ ) (98%, Đức), AMX trihydrate ( $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (98%, Đức), ENR ( $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_3$ ) (99%, Đức), dimethyl sulfoxide  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$  (DMSO) (99%, Anh), ethanol (99%, Trung Quốc),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%, Đức),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%, Đức), KOH ( $\geq 85\%$ , Đức),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99,5\%$ , Đức),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $\geq 98\%$ , Đức),  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (99%, Trung Quốc) được sử dụng mà không cần tinh chế lại. Điện cực graphite có xuất xứ từ Nhật Bản (99,9% C).

Các phép đo điện hóa được tiến hành trên máy đo điện hóa đa năng CPA-HH5 tự chế tạo tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hệ đo điện hóa gồm 3 điện cực: điện cực làm việc là các điện cực được chế tạo, điện cực so sánh Ag/AgCl/KCl bão hòa và điện cực đối platin dạng sợi. Thiết bị chụp ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) S-4800 của Hitachi (Nhật Bản) được sử dụng để quan sát hình thái học, thành phần hóa học của vật liệu trên bề mặt điện cực.

## 2.2. Chế tạo điện cực biến tính graphene trong dung môi dimethyl sulfoxide

Bề mặt điện cực graphite được biến tính trực tiếp thành dạng graphene bằng việc bóc lớp bề mặt sử dụng kỹ thuật áp thế tĩnh trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO). Đầu tiên, bề mặt điện cực graphite (pG) được mài phẳng với giấy mài có độ nhám 5000, sau đó được làm sạch bằng việc ngâm rửa trong etanol 2 phút và tia rửa với nước cất 2 lần. Sau đó được đưa vào dung dịch DMSO chứa 5 mM KCl tiến hành biến tính bề mặt bằng việc áp một điện thế có giá trị âm, không đổi, được đặt vào hệ trong một thời gian nhất định. Điện cực sau khi chế tạo được ký hiệu là mLG. Thế đặt vào hệ và thời gian áp thế được khảo sát để lựa chọn các thông số phù hợp nhất.

## 2.3. Phân tích thuốc kháng sinh

Điện cực mLG được sử dụng để phân tích các thuốc kháng sinh CAP, AMX và ENR bằng phương pháp Von-Ampe hòa tan hấp phụ kỹ thuật sóng vuông (AdS-SWV). Ban đầu, điện cực được nhúng trong dung dịch phân tích (đệm phot phát - PBS) ở trạng thái mạch hở để hấp phụ làm giàu các kháng sinh lên bề mặt điện cực, sau đó thế trong mạch được quét theo chiều anot từ  $U_1 = -0,8$  V đến  $U_2 = 1,2$  V để ghi các tín hiệu dòng oxy hóa tương ứng với các thuốc kháng sinh. Các thông số khác của kỹ thuật AdS-SWV bao gồm: chiều cao sóng vuông 20 mV, bước nhảy thế 5 mV, thời gian mỗi bước thế 20 s và tần số sóng vuông 25 Hz.

Các điều kiện phân tích như pH của môi trường điện ly, thời gian hấp phụ làm giàu được tối ưu hóa trước khi xây dựng đường chuẩn phân tích.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Tính chất bề mặt điện cực mLG

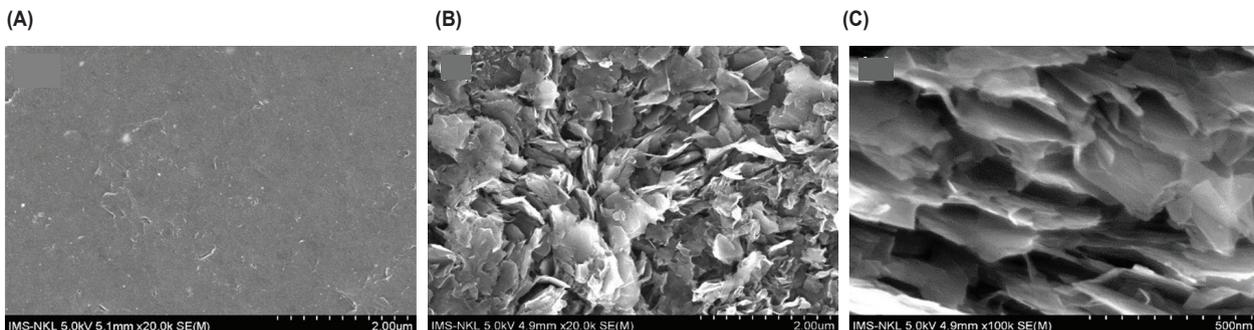
Hình thái học bề mặt điện cực được đánh giá qua các ảnh SEM ở các độ phóng đại khác nhau (hình 1). Theo đó, điện cực graphite ban đầu có bề mặt bằng phẳng, rải rác trên đó là các cạnh hẹp của các tấm graphite xếp phía ngoài của bề mặt điện cực (hình 1A). Hình ảnh này thể hiện rõ ràng đặc trưng cấu trúc tinh thể của graphite: bao gồm các lớp graphite xếp chồng lên nhau và liên kết bởi liên kết Van-der-Waal.

Ở cùng độ phóng đại với ảnh SEM của bề mặt pG, hình 1B lại cho thấy một cấu trúc bề mặt gồ ghề, lồi chõm của điện cực mLG. Kết quả được giải thích là do dưới tác động của việc áp thế âm để bóc lớp bề mặt điện cực, các ion kali được thu hút đến và xen kẽ vào giữa các lớp than chì làm mở rộng khoảng cách giữa các lớp đó. Do đó, tạo điều kiện thuận lợi cho các phân tử DMSO tiếp tục xen vào giữa và đóng vai trò cung cấp động lực để phá vỡ lực liên kết Van-der-Waal giữa các lớp graphite [15]. Kết quả là các lớp graphite trên bề mặt điện cực bị bung mở khỏi sự liên kết với các lớp khác và bóc tách ra thành các tấm graphene với hầu hết các cạnh hướng ra phía ngoài bề mặt. Ở độ phóng đại lớn hơn (100 K) (hình 1C), có thể thấy các tấm graphene có kích cỡ nano với bề dày cỡ vài nanomet và khoảng cách giữa các tấm graphene là từ 10 đến vài trăm nanomet. Như vậy, các tấm graphene có cấu trúc đa lớp. Cấu trúc bề mặt gồm các tấm graphene đa lớp sẽ làm tăng đáng kể diện tích hoạt động bề mặt của điện cực mLG so với điện cực pG ban đầu, do đó giúp tăng cường tín hiệu phân tích của các thuốc kháng sinh CAP, AMX, ENR.

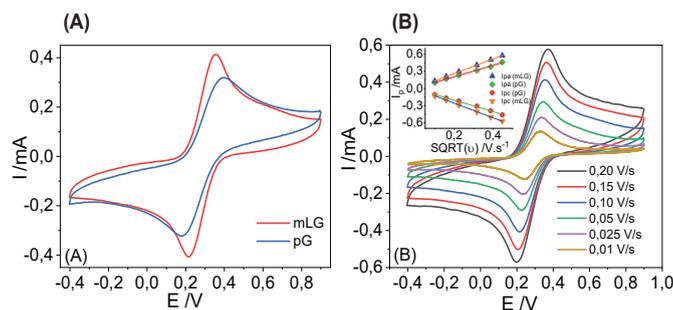
### 3.2. Tính chất điện hóa của điện cực chế tạo được

Hoạt tính điện hóa của các điện cực (pG và mLG) được nghiên cứu bằng phương pháp quét thế vòng (CV) trong dung dịch  $K_3[Fe(CN)_6]/PBS$  0,1 M pH 7 từ  $U_1 = 0,9$  V đến  $U_2 = -0,4$  V, tốc độ quét thế 0,1 V/s.

Kết quả đo trình bày trên hình 2 cho thấy, 2 peak xuất hiện trên các đường đo của cả 2 điện cực pG và mLG tương ứng với sự oxy hóa khử của hệ thuận nghịch  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  là rõ ràng, với chiều cao peak oxy hóa và peak khử là gần bằng nhau và các giá trị này tuyến tính với căn bậc hai của tốc độ quét thế (hình 2B). Điều này thể hiện hoạt tính điện hóa tốt của cả 2 điện cực, phản ứng thuận nghịch điện hóa diễn ra thuận lợi trên các điện cực. Tuy nhiên, khi so với các peak ghi được trên điện cực pG, các peak trên điện cực mLG sắc nhọn, rõ ràng và cao hơn, khoảng cách giữa hai peak ( $\Delta E_p$ ) hẹp hơn (0,138 V nhỏ hơn 0,215 V của pG) (hình 2A). Các kết quả này cho thấy, điện cực mLG có tính chất điện hóa tốt hơn điện cực pG.



Hình 1. Ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường của điện cực graphite (A) và graphene mLG chế tạo trong dung môi dimethyl sulfoxide ở các độ phóng đại khác nhau (B, C).



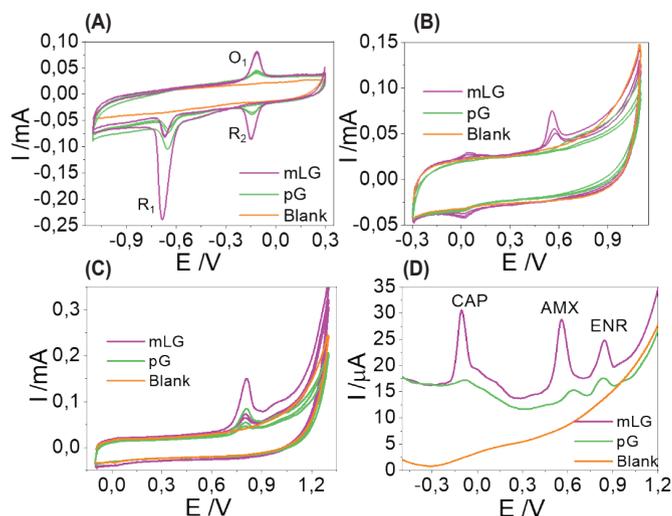
**Hình 2.** Đường CVs trong dung dịch  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM/PBS 0,1 M của 2 điện cực (A) và của điện cực mLG ở các tốc độ quét thể khác nhau (B). Sự phụ thuộc của chiều cao peak oxy hóa khử vào căn bậc hai của tốc độ quét thể (inset).

Sự khác biệt này được cho là do các tấm graphene kích thước nano đã thúc đẩy tốc độ chuyển điện tích trên bề mặt điện cực làm tăng độ sắc nhọn của peak và làm giảm  $\Delta E_p$ . Việc điều chỉnh chiều cao các peak đo được trên điện cực mLG tăng cao là do cấu trúc gồ ghề, lờ mờ của bề mặt điện cực làm tăng diện tích hoạt động điện hóa (ECSA) của nó. Diện tích hoạt động điện hóa trên bề mặt các điện cực có thể được tính theo phương trình Randle - Sevcik [16]. Kết quả ECSA tính được của điện cực mLG là  $0,35 \text{ cm}^2$ , cao gấp 1,3 lần so với ECSA của điện cực graphite ban đầu ( $0,27 \text{ cm}^2$ ). Sự tăng lên của ECSA khi điện cực graphite được biến tính thành dạng có cấu trúc các tấm graphene đa lớp hứa hẹn một khả năng làm tăng được độ nhạy của điện cực khi phân tích các thuốc kháng sinh.

### 3.3. Tính chất điện hóa của các thuốc kháng sinh trên điện cực đã chế tạo

Tính chất điện hóa của CAP, AMX và ENR trên điện cực mLG được đánh giá bằng phương pháp CV và phương pháp SW-AdSV khi đo trong nền đệm PBS có và không có các thuốc kháng sinh.

Trên đường CV của CAP quét theo chiều đi catot và chiều về anot (hình 3A) có thể dễ dàng quan sát thấy 1 peak khử rõ ràng, sắc nhọn ở chu kỳ quét đầu tiên tại thế cỡ  $-0,68 \text{ V}$  (peak  $R_1$ ). Sau đó, một peak oxy hóa xuất hiện ở khoảng thế  $-0,10 \text{ V}$  (peak  $O_1$ ), kéo theo đó là peak khử ở  $-0,15 \text{ V}$  (peak  $R_2$ ) bắt đầu xuất hiện từ chu kỳ thứ hai. Các peak này sắc nhọn và giảm mạnh ở chu kỳ thứ 2. Do trên đường đo trong dung dịch nền đệm PBS không quan sát thấy các peak này, nên chúng tương ứng với phản ứng điện hóa không thuận nghịch của CAP và phản ứng oxy hóa thuận nghịch của sản phẩm phụ sinh ra từ CAP [15]. Như vậy, bên cạnh peak khử trực tiếp CAP, peak oxy hóa  $O_1$  của sản phẩm khử CAP trên điện cực cũng khá rõ ràng, và cũng phụ thuộc vào hàm lượng CAP trong dung dịch phân tích. Do đó, trong trường hợp quan tâm đến tín hiệu anot, peak  $O_1$  này cũng có thể được sử dụng để phân tích CAP. Đối với AMX, khi so với đường đo trong dung dịch nền, đường đo trong dung dịch AMX xuất hiện một peak anot rõ ràng ở cỡ  $0,55 \text{ V}$  (hình 3B).



**Hình 3.** Đường CVs của các điện cực pG và mLG trong các dung dịch PBS pH 8,0 chứa chloramphenicol 100  $\mu\text{M}$  (A); amoxicillin 200  $\mu\text{M}$  (B); enrofloxacin 100  $\mu\text{M}$  (C); đường AdS-SWVs của các điện cực trong dung dịch chứa đồng thời chloramphenicol 5  $\mu\text{M}$ , amoxicillin 60  $\mu\text{M}$ , enrofloxacin 3  $\mu\text{M}$  (D).

Trong khi đó, trên đường đo trong dung dịch ENR, một peak oxy hóa được quan sát thấy ở khoảng thế  $0,81 \text{ V}$  (hình 3C) tương ứng với sự oxy hóa của ENR. Việc không quan sát thấy peak khử trên chiều quét ngược lại đã khẳng định phản ứng oxy hóa điện hóa của AMX và ENR là bất thuận nghịch. Như vậy, 3 thuốc kháng sinh CAP, AMX và ENR đều có tín hiệu tốt trên điện cực mLG và cao hơn nhiều lần so với tín hiệu tương ứng ghi được trên điện cực graphite ban đầu. Điều này là do diện tích hoạt động của điện cực sau khi biến tính tăng mạnh, đồng thời cấu trúc nano của điện cực có thể làm xúc tác cho phản ứng điện hóa của thuốc kháng sinh diễn ra được thuận lợi hơn. Tính chất này được thể hiện rõ ràng ở việc tín hiệu peak AMX trên điện cực mLG dịch về âm hơn với hình dạng sắc nhọn và rõ ràng hơn nhiều so với tín hiệu AMX trên điện cực pG ban đầu. Bên cạnh đó, các tín hiệu oxy hóa tương ứng với 3 kháng sinh ở vị trí khác biệt nhau đáng kể. Do đó, điện cực mLG có khả năng phân tích được đồng thời ba chất CAP, AMX, ENR sử dụng các peak oxy hóa này bằng cách thực hiện kỹ thuật quét thế anot có sự hấp phụ làm giàu để làm tăng độ nhạy.

Tín hiệu phân tích đồng thời 3 kháng sinh CAP 5, AMX 60 và ENR 3  $\mu\text{M}$  ghi bằng kỹ thuật Von-Ampe sóng vuông trình bày trên hình 3D, cho thấy, sự xuất hiện 3 peak oxy hóa trên cả 2 điện cực graphite và graphite biến tính bằng graphene đa lớp. Vị trí các peak tương ứng với CAP, AMX và ENR trên điện cực mLG lần lượt ở giá trị thế khoảng  $-0,10, 0,56$  và  $0,84 \text{ V}$ . Tín hiệu các peak này ghi được trên điện cực mLG cao hơn nhiều lần so với các peak ghi được trên điện cực graphite ban đầu: gấp 11,2 lần với CAP, 6,9 lần với AMX và 2,3 lần với ENR.

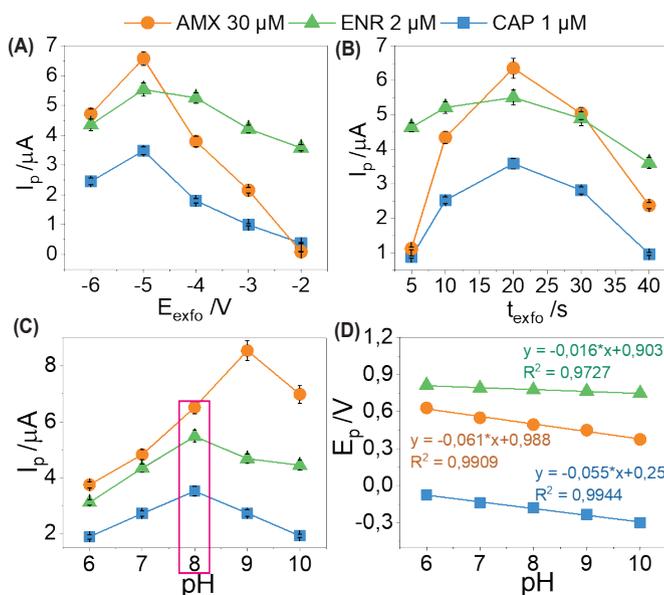
### 3.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu 3 thuốc kháng sinh trên điện cực mLG

Các điều kiện bao gồm điều kiện chế tạo điện cực (thể và thời gian bóc lớp chế tạo mLG) và điều kiện phân tích (pH dung dịch phân tích và thời gian hấp phụ làm giàu) được khảo sát để lựa chọn các điều kiện tối ưu nhất cho việc phân tích đồng thời 3 kháng sinh CAP, AMX và ENR sử dụng điện cực biến tính graphene đa lớp.

#### 3.4.1. Khảo sát ảnh hưởng của thế và thời gian bóc lớp tạo mLG đến tín hiệu chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin

Thế bóc lớp ( $E_{\text{exfo}}$ ) được thay đổi từ -2 đến -6 V với thời gian bóc lớp 20 s để đánh giá ảnh hưởng của nó đến tín hiệu kháng sinh đo được và kết quả được trình bày trên hình 4A. Theo đó, khi thế đặt vào hệ để bóc lớp tạo mLG càng âm, tín hiệu của 3 thuốc kháng sinh ghi được đều tăng dần. Tuy nhiên, khi thế bóc lớp là 6 V, tín hiệu ghi được lại giảm hơn so với thế -5 V. Điều này được cho là do với giá trị thế -6 V, việc bóc lớp xảy ra mạnh mẽ, đột ngột. Dẫn đến hệ quả là nhiều lớp bên ngoài bị bong hẵn ra khỏi bề mặt điện cực và các lớp còn lại trên bề mặt kết nối với nhau kém chặt chẽ hơn. Kết quả là diện tích hoạt động điện hóa và khả năng trao đổi electron trên điện cực chế tạo ở -6 V giảm so với -5 V. Do đó, -5 V được lựa chọn là thế bóc lớp để chế tạo điện cực mLG.

Với thế áp -5 V, thời gian áp thế biến tính điện cực ( $t_{\text{exfo}}$ ) được khảo sát nhằm lựa chọn được điều kiện tối ưu. Đáp ứng dòng peak oxy hóa của 3 kháng sinh theo  $t_{\text{exfo}}$  được thể hiện trên hình 4B. Theo đó, tín hiệu của 3 kháng sinh thu được tốt nhất ở  $t_{\text{exfo}}$  là 20 s.



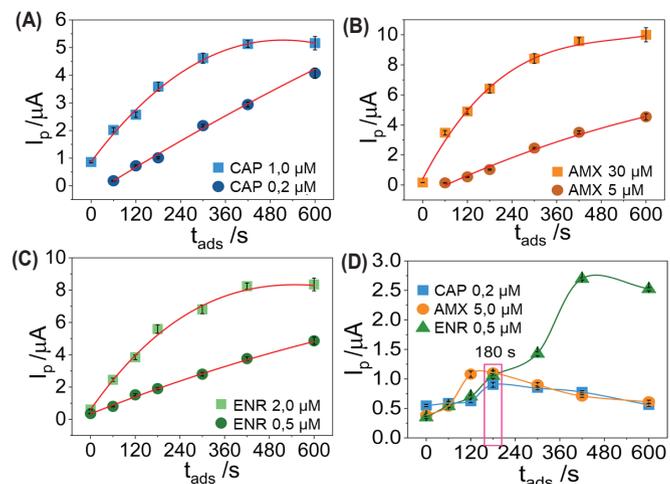
Hình 4. Sự phụ thuộc của chiều cao peak tương ứng với chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin vào thế bóc lớp (A), thời gian bóc lớp (B) chế tạo điện cực mLG, và vào pH dung dịch đo (C); sự phụ thuộc của thế đỉnh các peak vào pH dung dịch đo (D).

#### 3.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch điện ly đến tín hiệu chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin

pH dung dịch điện ly ảnh hưởng lớn đến trạng thái tồn tại của các chất trong dung dịch cũng như khả năng tạo phức, hấp thụ các chất lên bề mặt điện cực và ảnh hưởng đến cân bằng của phản ứng điện hóa khi có sự tham gia của ion  $\text{H}^+$ , do đó ảnh hưởng rõ ràng đến tín hiệu peak điện hóa ghi được. Do đó, tín hiệu AdS-SWV của phản ứng điện hóa của CAP, AMX và ENR trong dung dịch PBS 0,1 M ở các pH khác nhau từ 6,0 đến 10,0 được ghi lại để lựa chọn được điều kiện dung dịch phù hợp cho phép phân tích các chất này. Kết quả trình bày trên hình 4C cho thấy, với CAP và ENR, tín hiệu peak cao nhất ghi được trong dung dịch có pH 8, trong khi đó với AMX, tín hiệu peak tăng dần khi pH tăng dần từ 6 đến 9 và giảm nhẹ ở pH 10. Như vậy, để phân tích đồng thời ba chất CAP, AMX và ENR, pH 8 được lựa chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Đối với thế đỉnh peak ( $E_p$ ), sự biến thiên tuyến tính của  $E_p$  của cả 3 kháng sinh theo sự thay đổi của pH (hình 4D) đã chứng tỏ phản ứng oxy hóa điện hóa của ba chất đều có sự tham gia của  $\text{H}^+$ . Giá trị hệ số góc 0,055 và 0,061 của phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng với CAP và AMX là gần với giá trị lý thuyết của phương trình Nerst (0,059) ở điều kiện số proton bằng số electron. Như vậy, có thể kết luận rằng, phản ứng oxy hóa điện hóa của chúng có tỷ lệ số electron/số proton bằng 1. Riêng với ENR, với hệ số góc 0,016, tỷ lệ số electron/số proton tính ra được là 4/1.

#### 3.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian hấp phụ đến tín hiệu chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin

Thời gian hấp phụ ( $t_{\text{ads}}$ ) được khảo sát trong khoảng từ 0 đến 600 s khi ghi đo tín hiệu của các chất trong dung dịch PBS 0,1 M (pH 8). Tín hiệu các chất phụ thuộc vào thời gian hấp phụ được khảo sát riêng rẽ, đồng thời và được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Sự phụ thuộc của chiều cao peak vào thời gian hấp phụ tương ứng với chloramphenicol (A), amoxicillin (B) và enrofloxacin (C) khi đo riêng rẽ và khi đo đồng thời (D).

Các kết quả cho thấy, khi đo riêng rẽ từng chất, ở nồng độ thấp (CAP 0,2  $\mu\text{M}$ , AMX 5  $\mu\text{M}$ , ENR 0,5  $\mu\text{M}$ ), tốc độ hấp phụ của các chất lên bề diện cực là nhanh chóng. Ở các nồng độ lớn hơn, quá trình hấp phụ làm giàu các chất tăng nhanh ở trong khoảng 180 s đầu, sau đó thay đổi không đáng kể do quá trình hấp phụ dần đạt đến cân bằng. Khi đo đồng thời ba chất, tín hiệu peak của các chất tăng dần khi  $t_{\text{ads}}$  tăng dần đến 180 s. Sau đó, xu hướng biến đổi có sự khác biệt so với khi đo riêng rẽ từng chất: tín hiệu của CAP và AMX bị giảm dần, trong khi đó, tín hiệu của ENR tăng mạnh cho đến khi  $t_{\text{ads}}$  bằng 420 s và giảm nhẹ ở  $t_{\text{ads}}$  bằng 600 s (hình 5D). Điều này có thể là do có sự cạnh tranh hấp phụ giữa các chất, cụ thể ENR có khả năng dễ dàng được hấp phụ lên bề mặt điện cực mLG hơn CAP và AMX. Như vậy, thời gian hấp phụ làm giàu phù hợp cho việc phân tích đồng thời 3 chất CAP, AMX và ENR sử dụng điện cực mLG là 180 s.

### 3.5. Đường chuẩn, giới hạn phát hiện, độ tái lập khi phân tích đồng thời chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin

Các đường Von-Ampe hòa tan hấp phụ quét thế sóng vuông được tiến hành trong các dung dịch có nồng độ tăng dần của CAP, AMX và ENR trong khoảng thế từ 0,5 đến 1,2 V để thu được các peak oxy hóa riêng biệt tương ứng với 3 thuốc kháng sinh (hình 6A). Dải nồng độ xây dựng đường chuẩn của từng chất là: 0,05-2,0  $\mu\text{M}$  với CAP, 1,5-60  $\mu\text{M}$  với AMX và 0,1-4,0  $\mu\text{M}$  với ENR. Dòng peak oxy hóa ghi được của từng chất tăng tuyến tính với nồng độ của chúng theo phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng là:  $I_p (\mu\text{A}) = 3,42 \times C (\mu\text{M}) + 0,21$  ( $R^2 = 0,9904$ ) với CAP (hình 6C),  $I_p (\mu\text{A}) = 0,22 \times C (\mu\text{M}) - 0,08$  ( $R^2 = 0,9962$ ) với AMX (hình 6D), và  $I_p (\mu\text{A}) = 2,98 \times C (\mu\text{M}) - 0,31$  ( $R^2 = 0,9949$ ) với ENR (hình 6E).

Giới hạn phát hiện (LOD) của các kháng sinh được tính toán từ đường chuẩn ở các nồng độ thấp theo công thức  $\text{LOD} = 3\sigma/b$ , trong đó  $\sigma$  là độ lệch chuẩn của giá trị đo thực tế so với đường chuẩn và  $b$  là hệ số góc của đường chuẩn. Giá trị LOD tính được của các kháng sinh lần lượt là:  $\text{LOD}(\text{CAP}) = 0,060 \mu\text{M}$ ,  $\text{LOD}(\text{AMX}) = 0,381 \mu\text{M}$ ,  $\text{LOD}(\text{ENR}) = 0,109 \mu\text{M}$ .

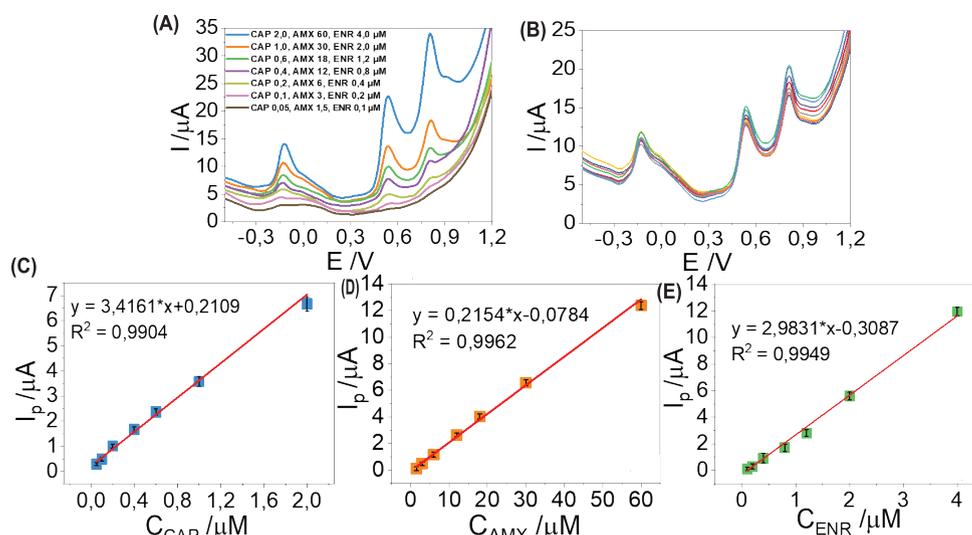
Bên cạnh đó, từ 8 lần đo đồng thời ba chất trên tám điện cực được làm mới (hình 6B), các giá trị RSD 7,1% với CAP, 6,5% với AMX và 7,1% với ENR tính toán được đã thể hiện độ tái lập tốt của điện cực khi phân tích đồng thời 3 kháng sinh.

Các kết quả trên đã chứng tỏ đặc tính tuyệt vời của vật liệu mLG đã giúp quy trình phân tích phân tích đồng thời CAP, AMX và ENR đạt được độ nhạy cao và độ tái lập tốt, có khả năng ứng dụng vào phân tích các mẫu thực tế.

### 3.6. Phân tích đồng thời chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin trong nền mẫu thực

Để chứng thực tính thực tiễn và độ tin cậy của phép phân tích, cảm biến với điện cực mLG được sử dụng để thử nghiệm phân tích đồng thời CAP, AMX và ENR trong mẫu nước Hồ Tây (Hà Nội). Đường đo trong mẫu nước Hồ Tây ban đầu không phát hiện thấy có các thuốc kháng sinh nghiên cứu. Sau đó, CAP, AMX và ENR được thêm vào mẫu với một nồng độ chính xác để thu được mẫu thêm chuẩn (spike sample). Các kháng sinh trong mẫu này được phân tích bằng phương pháp thêm chuẩn sử dụng kỹ thuật AdS-SWV.

Theo kết quả trình bày trong bảng 1, phép phân tích đồng thời CAP, AMX và ENR có độ thu hồi nằm trong khoảng giá trị độ thu hồi chấp nhận được theo quy định của Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống (AOAC) [17] đối với cả 3 thuốc kháng sinh. Điều này chứng tỏ phương pháp có



Hình 6. Đường Ad-SWVs đo đồng thời chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin ở các nồng độ khác nhau (A) và đo tái lập trên 8 điện cực được làm mới (B); đường chuẩn tương ứng với chloramphenicol (C), amoxicillin (D) và enrofloxacin (E).

độ đúng tốt. Bên cạnh đó, độ lặp lại tốt của kết quả phân tích thể hiện qua giá trị RSD thấp (<5%) của 3 lần đo đã thể hiện độ chụm tốt của phương pháp phân tích. Các kết quả này chứng tỏ, phương pháp AdS-SWV sử dụng điện cực mLG phân tích đồng thời CAP, AMX và ENR có độ chính xác cao.

**Bảng 1. Kết quả phân tích đồng thời chloramphenicol, amoxicillin và enrofloxacin trong nền mẫu nước Hồ Tây.**

Thuốc kháng sinh	Nồng độ thuốc kháng sinh (µM)		Recovery (%)	RSD (%)
	C <sub>thêm</sub>	*C <sub>trung bình</sub>		
CAP	0,1	0,107	107,0	2,5
AMX	3,0	2,95	98,3	4,8
ENR	0,2	0,201	100,6	1,2

\*C<sub>trung bình</sub>: nồng độ trung bình tính từ 3 lần đo.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, cảm biến sử dụng điện cực tiên tiến graphene đa lớp (mLG) lần đầu tiên được chế tạo trực tiếp từ điện cực graphite bằng kỹ thuật thể tinh một bước và lần đầu tiên được ứng dụng vào phân tích đồng thời 3 thuốc kháng sinh CAP, AMX và ENR. Các đặc tính nổi bật của điện cực như diện tích hoạt động điện hóa lớn, hoạt tính xúc tác điện hóa, xuất phát từ cấu trúc nano dạng tấm đa lớp là lý do chính giúp cho điện cực có hiệu quả cao trong việc cải thiện tín hiệu điện hóa của các kháng sinh. Sự tách biệt rõ ràng của các peak tương ứng với 3 chất để thể hiện khả năng phân tích đa chất tốt của điện cực, giúp cho cảm biến hoàn toàn có khả năng phân tích đồng thời 3 chất ở cùng điều kiện đo. Ở các điều kiện tối ưu khi chế tạo điện cực và trong quá trình phân tích, đường chuẩn xây dựng được khi đo đồng thời có độ tuyến tính tốt, dải tuyến tính rộng với cả 3 thuốc kháng sinh. Cảm biến có giới hạn phát hiện thấp, độ tái lặp tốt và chính xác cao. Khả năng ứng dụng điện cực được xác nhận bằng việc phân tích CAP, AMX và ENR trong nền mẫu nước Hồ Tây. Như vậy, bằng một phương pháp chế tạo đơn giản, nhanh chóng và tiết kiệm chi phí, điện cực graphene đa lớp thu được có độ nhạy tốt, độ ổn định cao và khả năng phân tích đa chất tuyệt vời, từ đó nâng cao hiệu quả phân tích đồng thời 3 thuốc kháng sinh CAP, AMX và ENR.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), mã số đề tài 104.06.2019.27. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] T.P.V. Boeckel, C. Brower, M. Gilbert, et al. (2015), "Global trends in antimicrobial use in food animals", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **112**(18), pp.5649-5654, DOI: 10.1073/pnas.1503141112.

[2] World Health Organization (2014), *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*, <https://www.who.int/publications/item/97892411564748>, accessed 8 June 2023.

[3] EClinicalMedicine (2021), "Antimicrobial resistance: A top ten global public health threat", *EClinicalMedicine*, **41**, DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.101221.

[4] J. O'Neill (2016), "Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations", *Review on Antimicrobial Resistance*, [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf), accessed 8 June 2023.

[5] Ministry of Agriculture and Rural Development (2016), *Circular 10/2016/TT-BNNPTNT, Promulgating The List of Veterinary Drugs Permitted for Circulation and Prohibited for Use in Vietnam* (in Vietnamese).

[6] The European Commission (2010), *Commission Regulation (EU) No. 37/2010 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin*, 72pp.

[7] R.E. Saraya, Y.F. Hassan, W.E. Eltoukhi, et al. (2023), "Application of the green analytical procedure index to the simultaneous analysis of co-formulated tinidazole and ciprofloxacin in pure form, tablet dosage form, and human plasma using an environmentally friendly micellar high-performance thin-layer chromatographic technology", *JPC - J. of Planar Chromat. - Modern TLC*, **36**, pp.21-30, DOI: 10.1007/s00764-023-00225-4.

[8] J. Yang, L. Chen, Q. Wang, et al. (2023), "Determination of nitroimidazole antibiotics based on dispersive solid-phase extraction combined with capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, **44**(7-8), pp.634-645, DOI: 10.1002/elps.202200114.

[9] I.S. Voronov, D.I. Falev, N.V. Ul'yanovskii, et al. (2023), "Suspect screening and semi-quantification of macrolide antibiotics in municipal wastewater by high-performance liquid chromatography-precursor ion scan tandem mass spectrometry", *Chemosensors*, **11**(1), DOI: 10.3390/chemosensors11010044.

[10] L. Li, Y. Yin, G. Zheng, et al. (2022), "Determining β-lactam antibiotics in aquaculture products by modified QuEChERS combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)", *Arab. J. of Chem.*, **15**(7), DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.103912.

[11] C. Liu, B. Li, M. Liu, et al. (2022), "Demand, status, and prospect of antibiotics detection in the environment", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **369**, DOI: 10.1016/j.snb.2022.132383.

[12] L. Fu, S. Mao, F. Chen, et al. (2022), "Graphene-based electrochemical sensors for antibiotic detection in water, food and soil: A scientometric analysis in CiteSpace (2011-2021)", *Chemosphere*, **297**, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134127.

[13] S.H. Yeh, M.S. Huang, C.H. Huang (2022), "Electrochemical sensors for sulfamethoxazole detection based on graphene oxide/graphene layered composite on indium tin oxide substrate", *J. of The Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **131**, DOI: 10.1016/j.jtice.2021.11.022.

[14] M. Shah, P. Kolhe, A. Roberts, et al. (2022), "Ultrasensitive immunosensing of Penicillin G in food samples using reduced graphene oxide (rGO) decorated electrode surface", *Colloids Surf. B: Bio.*, **219**, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112812.

[15] P. Yu, S.E. Lowe, G.P. Simon, et al. (2015), "Electrochemical exfoliation of graphite and production of functional graphene", *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **20**(5-6), pp.329-338, DOI: 10.1016/j.cocis.2015.10.007.

[16] M. Zhou, T. Tang, D. Qin, et al. (2023), "Hematite nanoparticle decorated MIL-100 for the highly selective and sensitive electrochemical detection of trace-level paraquat in milk and honey", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **376**, DOI: 10.1016/j.snb.2022.132931.

[17] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero (2010), "Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards", *Talanta*, **82**(5), pp.1995-1998, DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.071.