

TỔNG HỢP VẬT LIỆU IN DẤU PHÂN TỬ CHỌN LỌC QUERCETIN ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH QUERCETIN TRONG MẪU RAU

NGUYỄN VĂN TRỌNG*, VĂN THANH KHUÊ

Khoa công nghệ hóa học, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: nguyenvantrong@juh.edu.vn

Tóm tắt. Vật liệu polymer in dấu phân tử (MIP) chọn lọc cho quercetin (QC) được tổng hợp bằng phản ứng đồng trùng hợp giữa hai monomer acrylamide (AA) và 4-Vinyl piridine (4-VP) với chất liên kết chéo ethylenglycol dimethacrylate (EGDMA), quá trình đóng khối polyme nhờ chất khơi mào 1,1'-Azobis(cyclohexanecarbonitrile) (ACCN). Khả năng hấp thụ tối đa QC đạt được là 0,2544 mg/g vật liệu MIP. Tính chọn lọc của vật liệu MIP đối với QC là 94,80 %, cao hơn so với Catechin (10,23 %) đồng phân của QC. Qui trình phân tích QC đã được hiệu lực hóa trên nền mẫu rau. Hiệu suất thu hồi đạt được từ 91,16 % đến 94,50 %, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 0,56 ppm và 1,69 ppm. Mẫu rau được thu thập trên thị trường và được thực hiện quy trình phân tích đã nghiên cứu, mẫu được cho qua MIP và phân tích bằng HPLC với đầu dò UV, kết quả đã phản ánh được sự phù hợp của MIP trong việc chọn lọc đối với Quercetin.

Từ khóa: Quercetin, MIP, HPLC.

SYNTHESIS OF MOLECULAR IMPRINTING POLYMERS FOR EXTRACTION OF QUERCETIN FROM VEGETABLE SAMPLES

Abstract. Molecularity imprinted polymer (MIP) selected for quercetin (QC) was synthesized by the copolymerization reaction between acrylamide (AA), 4-Vinyl piridine (4-VP) and ethylenglycol dimethacrylate (EGDMA) with an initiator 1,1'-Azobis(cyclohexanecarbonitrile) (ACCN). The maximum absorbance of QC on MIP is 0.2544 mg/gMIP with the selectivity of 94.80 %, which is higher than that of the QC isomer Catechin (10.23 %). This procedure for QC analysis was implemented on vegetable samples, with sample preparation by MIP and sample analysis employing HPLC. Recovery yield was found to be 91.16 % to 94.50 % for vegetable samples. The method detection limit (LOD) and method quantitative limit (LOQ) were 0.56 ppm and 1.69 ppm, respectively. Vegetable samples were collected on the market which were rinsed through MIP and was analyzed by HPLC with UV detector, the results reflect the suitability of MIP in the selection of Quercetin.

Keywords. Quercetin, MIP, HPLC.

1 GIỚI THIỆU

Quercetin (3,3',4,5,7-penta-hydroxy flavone) (**Hình 7**) được biết đến như một hoạt chất chống oxy hóa mạnh nhất trong họ flavone, xuất hiện rộng rãi trong lá, quả và hoa của nhiều loại cây [1]. Quercetin là một flavonol phổ biến nhất có trong tự nhiên và đã thu hút sự quan tâm lớn từ nhiều nhà nghiên cứu vì tính chất sinh học và dược phẩm của nó rất có lợi cho sức khỏe của con người [2]. Quercetin được tìm thấy trong cả phần ăn được và không ăn được của một số loại trái cây, rau, lá và ngũ cốc. Nó có thể được sử dụng như một thành phần trong chất bổ sung trong đồ uống, thực phẩm có tác dụng chống oxy hoá mạnh và chống viêm, có tác dụng ngay cả ở nồng độ thấp. Quercetin được dùng làm nguyên liệu lĩnh vực thực phẩm chức năng, dược phẩm và mỹ phẩm [3]. Quercetin có nhiều trong tự nhiên tốt cho sức khỏe nên đã thu hút sự quan tâm lớn từ các nhà nghiên cứu vì chúng có khả năng giúp làm tăng tuổi thọ và cải thiện sức khỏe tim mạch. Những người sử dụng trái cây và rau củ có chứa nhiều quercetin thường sống lâu hơn với những người sử dụng thực phẩm chứa ít quercetin. Không chỉ vậy, quercetin làm giảm cholesterol xấu, làm tăng cholesterol tốt và làm giảm mảng bám trong động mạch [4]. Các nghiên cứu dịch tễ học cũng chỉ ra vai trò của chúng có thể ngăn ngừa các bệnh tim mạch và ung thư [5].

Kỹ thuật in dấu phân tử (MIP) đã phát triển mạnh mẽ và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sinh học, hóa học và đặc biệt trong lĩnh vực phân tích được sử dụng để tạo ra các loại chiết pha rắn

(SPE) chọn lọc cho hoạt chất cần phân tích [6]. MIP được tổng hợp bằng cách sử dụng các monomer chức năng phản ứng với các chất liên kết chéo với sự có mặt của chất đóng rắn, các monomer có vai trò tạo liên kết với các nhóm chức của phân tử mục tiêu. Sau khi phản ứng kết thúc, phân tử mục tiêu bị rửa giải ra khỏi vật liệu bằng dung môi thích hợp để lại những lỗ trống, chính lỗ trống này là nơi giữ lại các phân tử mục tiêu có trong mẫu khi cho mẫu đi qua MIP. Với vật liệu MIP này không những làm sạch được mẫu mà còn rất chọn lọc cho phân tử mục tiêu [7]. Trong phân tích thực phẩm, y học, nông nghiệp đã sử dụng kỹ thuật MIP để xử lý mẫu như xác định cefotiofur sodium, tetracycline trong sữa [8, 9], antidiabetic gliclazide trong huyết tương [10], thiamethoxam trong thuốc diệt côn trùng [11] ...

Trong những năm gần đây quercetin được nhiều bài báo công bố về việc xác định bằng nhiều phương pháp trong nhiều nền mẫu khác nhau, cụ thể như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [12,13], phương pháp TLC [14], phương pháp điện hóa [15], phương pháp quang [16]. Ngoài ra có một số nghiên cứu tổng hợp MIP chọn lọc cho quercetin [17, 18, 19], các nghiên cứu này đã nghiên cứu tổng hợp thành công MIP, đánh giá được đặc tính của MIP và khả năng hấp phụ của chúng. Tuy nhiên, những nghiên cứu này vẫn chưa ứng dụng cụ thể để xác định được quercetin trong nền mẫu phức tạp.

Mục tiêu của nghiên cứu này với mong muốn tổng hợp thành công MIP chọn lọc cho hoạt chất quercetin, các đặc tính của vật liệu sẽ được đánh giá trên các thiết bị hiện đại như SEM, FT-IR ... MIP sau khi tổng hợp thành công sẽ được thử nghiệm để phân tích trực tiếp quercetin trong nền mẫu rau thì là, ngò tây và hành tây đỏ.

2 THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

Hóa chất: Các hóa chất, 4 – vinyl piridine, acrylamide, ethylene glycol dimethacrylate và 1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile) được mua từ Sigma-Aldrich. Chất chuẩn quercetin 95 %, các dung môi methanol (MeOH), axit axetic băng, axit photphoric loại chuẩn sử dụng cho HPLC của hãng Merck. Các hóa chất khác được sử dụng đều đạt chuẩn phân tích, nước cất được sử dụng là loại không ion và có điện trở lớn hơn 18.5 MΩ.

Thiết bị: Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu này gồm:

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng của hãng Jasco LC-400 đầu dò DAD
- Hệ thống quang phổ UV-VIS sử dụng của hãng Thermo Scientific Evolution 600 UV-VIS
- Hệ thống quang phổ hồng ngoại sử dụng của hãng Bruker Tensor 27 FTIR
- Hệ thống quét hiển vi điện tử SEM sử dụng của hãng Hitachi S-4800 Scanning electron Microscope

2.2. Tổng hợp vật liệu MIP và NIP

Các vật liệu MIPs được tổng hợp với thành phần khác nhau theo **bảng 1**, bằng phản ứng giữa phân tử mục tiêu QC và monomer chức năng AA và 4-VP trong 10 mL hỗn hợp dung môi THF/MeOH/H₂O (2,5/6,5/1 v/v), hòa tan đánh siêu âm trong 15 phút. Sau đó, thêm chất liên kết chéo EGDMA và chất khơi mào phản ứng polymer hóa ACCN thực hiện phản ứng polymer hóa ở 80 °C trong 24 giờ trong bể cách thủy, suốt quá trình này khí N₂ được thổi liên tục. Cuối cùng vật liệu được nghiền và rây với kích thước 100 μm và tiến hành chiết soxhlet với dung môi MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v) trong 12 giờ đến khi vật liệu không còn QC rồi sấy khô ở 60 °C trong 4 giờ trước khi sử dụng. Vật liệu không in dầu (NIP) được thực hiện theo quy trình tương tự nhưng không sử dụng phân tử mục tiêu QC.

Nhiệt độ quá trình tổng hợp được khảo sát ở các nhiệt độ 60 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C và dung môi sử dụng chiết soxhlet được khảo sát qua các dung môi MeOH, ACN và hỗn hợp MeOH/CH₃COOH.

Bảng 1: Thành phần của MIPs

Polymer	Qercetin (mmol)	AA (mmol)	4-VP (mmol)	EGDMA (mmol)	ACCN (mmol)
MIP1	0,40	2,00	2,00	18,50	0,40
MIP2	0,40	2,00	4,00	18,50	0,40
MIP3	0,40	4,00	8,00	18,50	0,40

2.3. Kiểm tra cấu trúc của vật liệu

Đo phổ hồng ngoại (FT-IR): Vật liệu MIP được sấy ở 60 °C trong 4 giờ, sau đó được nghiền mịn, rây với kích thước 100 μm và trộn với KBr rắn đã sấy khô ở 120 °C trong 4 giờ và ép thành viên có đường kính 10 mm, bề dày từ 1÷2 mm, vật liệu NIP được tiến hành tương tự như MIP. Phổ hồng ngoại của hai vật liệu

này được đo trong khoảng bước sóng 500 cm^{-1} đến 4000 cm^{-1} với độ phân giải 4 cm^{-1} bằng thiết bị Bruker Tensor 27 FTIR.

Phân tích cấu trúc và hình thái bề mặt của vật liệu: Sau khi quá trình polymer hóa kết thúc, toàn bộ lượng polymer này được chiết soxhlet với dung môi MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v) trong 12 giờ để vật liệu không còn QC rồi sấy khô ở 60°C trong 4 giờ trước khi kiểm tra cấu trúc và hình thái bề mặt của vật liệu (MIP và NIP) bằng SEM (Hitachi S-4800 Scanning electron Microscope, Japan).

2.5. Khảo sát khả năng hấp phụ của vật liệu MIP

Hiệu suất thu hồi quá trình chiết: Chuẩn bị 3 cột SPE mỗi cột chứa 0,3 g vật liệu MIP, hoạt hóa bằng 10 mL ACN, thêm 1 mL dung dịch chuẩn QC có nồng độ 50 mg/L điều chỉnh tốc độ khoảng 1mL/phút, rửa tạp bằng 0,5 mL ACN, 12 mL H₂O, 10 mL hỗn hợp CAN/H₂O (2/8 v/v) và sau cùng là 10 mL hỗn hợp ACN/ H₂O (4/6 v/v). Rửa giải bằng 5 mL MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v).

Dung lượng hấp phụ: Chuẩn bị 4 cột SPE mỗi cột chứa 0,2 g vật liệu MIP, hoạt hóa bằng 10 mL ACN, thêm 1 mL dung dịch chuẩn QC có nồng độ 5, 10, 20, 35 mg/L lần lượt qua 4 ống SPE trên, điều chỉnh tốc độ khoảng 1mL/phút, rửa tạp bằng 0,5 mL ACN, 12 mL H₂O, 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (2/8 v/v) và sau cùng là 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (4/6 v/v). Rửa giải bằng 5 mL MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v).

Khả năng tái sử dụng: Chuẩn bị 1 cột SPE có chứa 0,3 g vật liệu MIP, hoạt hóa bằng 10 mL ACN, thêm 1 mL dung dịch chuẩn QC có nồng độ 5 mg/L điều chỉnh tốc độ khoảng 1mL/phút, rửa tạp bằng 0,5 mL ACN, 12 mL H₂O, 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (2/8 v/v) và sau cùng là 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (4/6 v/v). Rửa giải bằng 5 mL MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v). Màng MIP sau khi sử dụng sẽ được thu hồi lại và được chiết Soxhlet trong vòng 1 h. Sau đó sấy ở 60 °C và được sử dụng để lập lại quá trình chiết SPE, quá trình này lặp lại 4 lần.

Tất cả các dung dịch sau khi rửa giải được thổi khô bằng khí Nitơ, sau đó thêm chính xác 1 mL MeOH, dịch lọc này trước khi đưa vào hệ thống HPLC được đánh siêu âm trong 30 phút và lọc qua màng lọc 0,45 μm, dịch lọc còn lại bảo quản dịch ở 4 °C. Dung lượng hấp phụ (mg/L) và hiệu suất hấp phụ (%) được tính theo công thức 1 và 2 [7].

$$q = \frac{(C - C_1) \times V}{m} \quad (1)$$

$$H = \frac{(C - C_1)}{C} \quad (2)$$

Trong đó:

- C, C₁ Nồng độ dung dịch của chất bị hấp phụ ban đầu và khi đạt cân bằng hấp phụ tương ứng (mg/L).
- V: Thể tích dung dịch chất bị hấp phụ (mL)
- m: Khối lượng của vật liệu MIP (g)

2.6. Đánh giá khả năng chọn lọc của MIP đối với phân tử mục tiêu

Chuẩn bị 3 cột SPE mỗi cột chứa 0,3 g vật liệu MIP, hoạt hóa bằng 1 mL ACN, thêm 1 mL dung dịch chuẩn Catechin (*hình 7*) có nồng độ 100 mg/L điều chỉnh tốc độ khoảng 1 mL/phút, rửa tạp bằng 0,5 mL ACN, 12 mL H₂O, 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (2/8 v/v) và sau cùng là 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (4/6 v/v). Rửa giải bằng 5 mL MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v), dung dịch sau khi rửa giải được thổi khô bằng khí N₂, thêm chính xác 1 mL MeOH, dịch lọc này trước khi đưa vào hệ thống HPLC được đánh siêu âm trong 30 phút và lọc qua màng lọc 0,45 μm, dịch lọc còn lại bảo quản dịch ở 4 °C.

2.7. Ứng dụng vật liệu MIP xử lý mẫu, phân tích bằng HPLC

2.7.1. Điều kiện chạy sắc ký

Chuẩn và mẫu chứa QC được chạy với điều kiện HPLC như sau: cột Agilent C18 (200 mm × 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột tách 30 °C, bước sóng hấp thu 370 nm, thể tích mẫu 5 μL, pha động gồm MeOH/CAN/H₂O (40/50/10) với tốc độ dòng 0,6 mL/phút.

2.7.2. Chuẩn bị mẫu thử

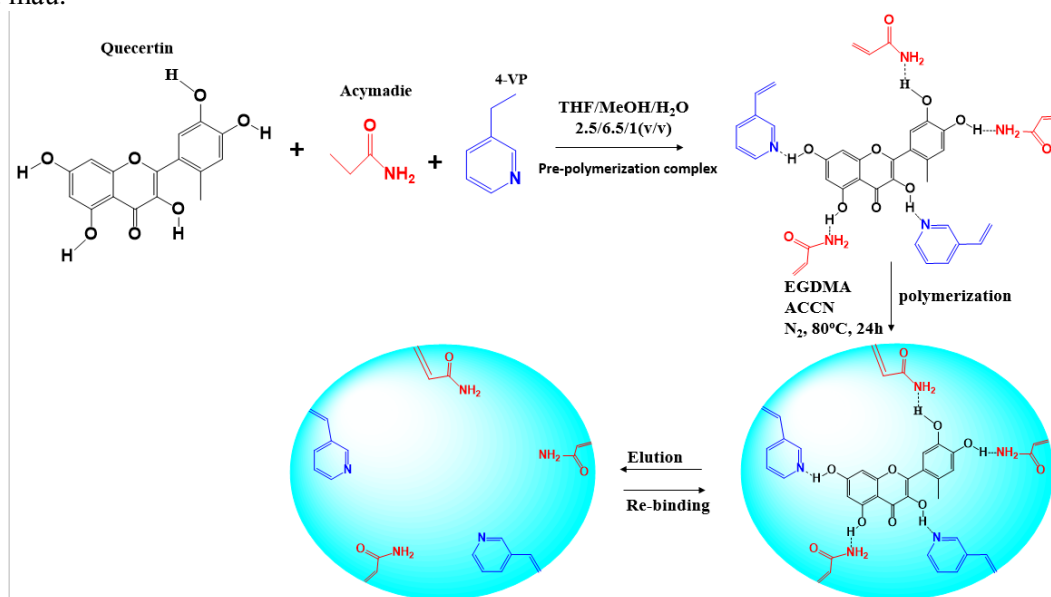
Mẫu rau (thì là, ngò tây và hành tây đỏ) được mua tại siêu thị, sau đó mẫu được đồng nhất, xay nhuyễn và cân chính xác khoảng 10 gam đối với thì là, ngò tây và 5 gam đối với hành tây đỏ cho vào ống xử lý mẫu. Thêm 10 mL MeOH, tiến hành đánh vortex và đánh siêu âm 30 phút, sau đó đem ly tâm và lọc lấy dung dịch chiết. Thực hiện quá trình trên 3 lần, toàn bộ dịch sau lọc định mức 100 mL bằng nước cất (dung dịch A). Chuẩn bị cột SPE chứa 0,3 gam MIP, hoạt hóa bằng 10 mL ACN, thêm 1 mL dung dịch A chứa QC

điều chỉnh tốc độ khoảng 1mL/phút, rửa tạp bằng 0,5 mL ACN, 12 mL H₂O, 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (2/8 v/v) và sau cùng là 10 mL hỗn hợp ACN/H₂O (4/6 v/v). Rửa giải bằng 5 mL MeOH/CH₃COOH (9/1 v/v). Dung dịch rửa giải thu được đuổi khô hoàn toàn bằng khí ni tơ và hòa tan cặn bằng 1 mL MeOH. Đánh vortex và siêu âm 1 phút, lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi phân tích bằng hệ HPLC.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp vật liệu MIP và NIP

Cơ chế tổng hợp MIP và NIP thông qua 3 giai đoạn, giai đoạn 1 xảy ra phản ứng liên kết hình thành phức giữa monomer chức năng AA và phân tử QC, đây là giai đoạn đánh dấu các vị trí liên kết cho việc bắt các phân tử mẫu.



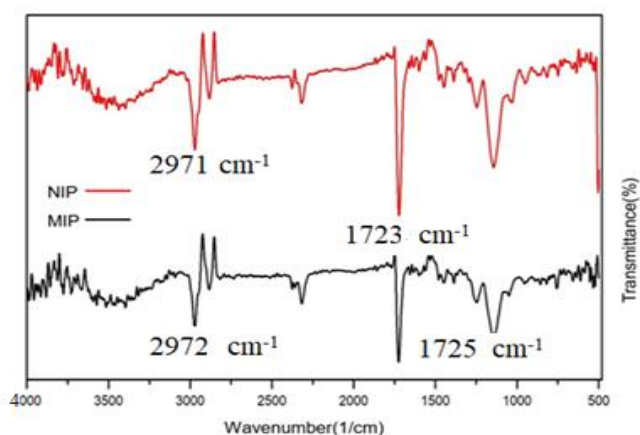
Hình 1: Sơ đồ minh họa quá trình in dầu phân tử QC

Các liên kết hình thành chủ yếu là N:H – N, và H – O:H, đây là loại liên kết hydrogen (khoảng 40 kJ/mol) kém bền nên dễ dàng có thể rửa giải phân tử mục tiêu. Giai đoạn 2, khi chất khơi mào quá trình trùng hợp ACCN và chất tạo liên kết chéo EGDMA được thêm vào, dưới tác dụng của nhiệt độ thì ACCN phân hủy thành các gốc tự do chúng tấn công và các liên kết đôi C=C của AA và EGDMA. Trong giai đoạn này oxy không khí được đuổi bằng khí ni tơ vì oxy cũng có khả năng tạo gốc tự do. Giai đoạn 3, gốc tự do hình thành từ ACCN lan truyền trên mạch phản ứng và trở thành tâm phản ứng, chúng kích thích vào AA và EGDMA phản ứng tiếp diễn trong 24h đến khi phản ứng kết thúc (không còn gốc tự do) sẽ tạo thành khối polymer. Tất cả các giai đoạn này được thể hiện trong hình minh họa (**hình 1**).

3.2. Đánh giá tính chất của vật liệu

3.2.1. Phân tích phổ FT-IR

Kết quả phân tích vật liệu NIP và MIP được thể hiện trong **hình 2** cho thấy rằng các mũi đặc trưng của vật liệu là tương đồng. Nhóm chức –OH và –NH thường có mũi hấp thụ trong khoảng 3200 cm⁻¹ đến 3600, nhóm C=O có mũi hấp thụ trong khoảng 1690 – 1760 cm⁻¹. Các mũi hấp thụ giữa NIP và MIP là tương tự nhau, tuy nhiên hầu hết các mũi hấp thụ trong NIP và MIP đều lệch vị trí, cụ thể như mũi C=O là 1723 cm⁻¹ (trong NIP) trôi về 1725 cm⁻¹ (trong MIP) hay mũi C-H là 2971 cm⁻¹ (trong NIP) trôi về 2972 cm⁻¹ (trong MIP) điều này minh chứng là do trong MIP các nhóm chức trong monomer (AA và 4-VP) đã thực hiện liên kết hydrogen với nhóm –OH của Quercetin, hay nói cách khác vật liệu MIP đã in được phân tử mục tiêu.

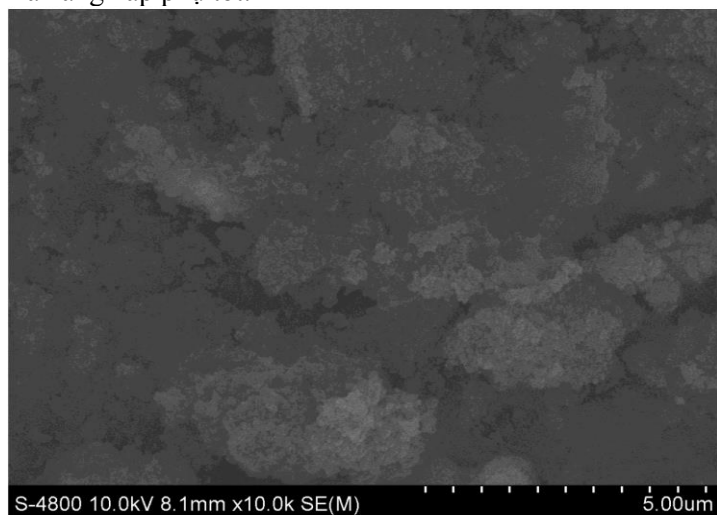


Hình 2. Phổ FT – IR của vật liệu tổng hợp NIP và MIP

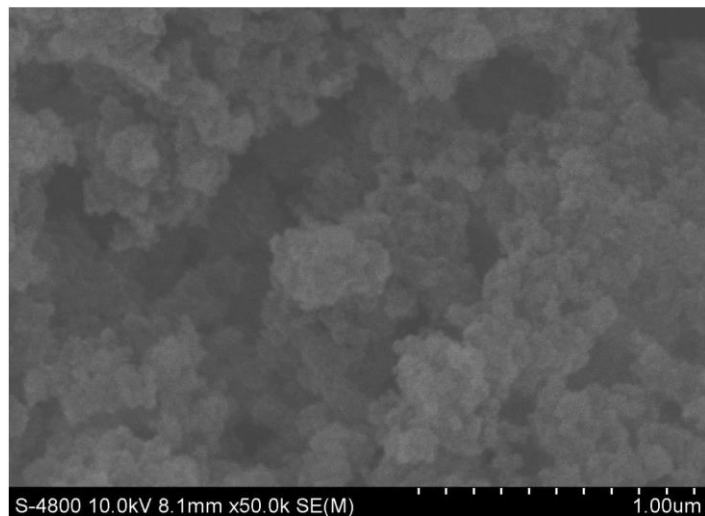
3.2.2. Phân tích cấu trúc và hình thái bề mặt của vật liệu

Từ ảnh chụp SEM của vật liệu có thể xác định được kích thước hạt của vật liệu khoảng 1-4 μm . Vật liệu tổng hợp có các lỗ xốp lớn giúp gia tăng khả năng tải dung dịch mẫu qua cột, đặc biệt gia tăng diện tích bề mặt vật liệu, từ đó có khả năng hấp phụ tốt.

A



B



Hình 3. Ảnh chụp SEM của vật liệu NIP (A) và MIP (B)

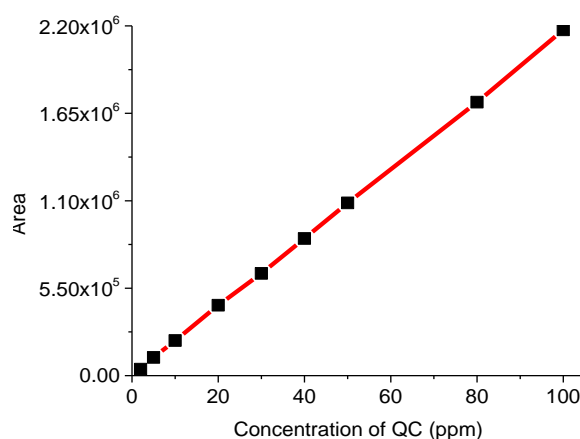
Vật liệu MIP *hình 3B*, sau khi rửa các phân tử mục tiêu ra khỏi vật liệu ta có thể thấy rằng hình thái bề mặt của vật liệu gồ ghề có nhiều không gian trống điều này chứng tỏ vật liệu đã được in dấu phân tử mục tiêu thành công, ngoài ra còn quan sát được các hạt phân bố khá đồng đều so với NIP. Đối với NIP *hình 3A*, vật liệu này cho thấy bề mặt láng mịn, không có nhiều không gian trống so với vật liệu đã in MIP.

3.3. Thẩm định phương pháp phân tích QC

Phương pháp phân tích QC được thẩm định trên thiết bị HPLC với đầu dò DAD, kết quả trong *bảng 2* và *hình 4* cho thấy đường chuẩn có khoảng tuyến tính rộng và độ tuyến tính cao, LOD và LOQ của phương pháp cũng phù hợp để xác định QC trong mẫu rau.

Bảng 2: Các thông số thẩm định

Thông số	Giá trị
Tung độ (a)	1940,2
Hệ số góc (b)	21630
Hệ số tương quan (R^2)	0,9999
Khoảng tuyến tính (ppm)	2 – 100
LOD (ppm, ước lượng theo SD (a))	0,558
LOQ (ppm, ước lượng theo SD(a))	1,691



Hình 4: Đồ thị đường chuẩn QC

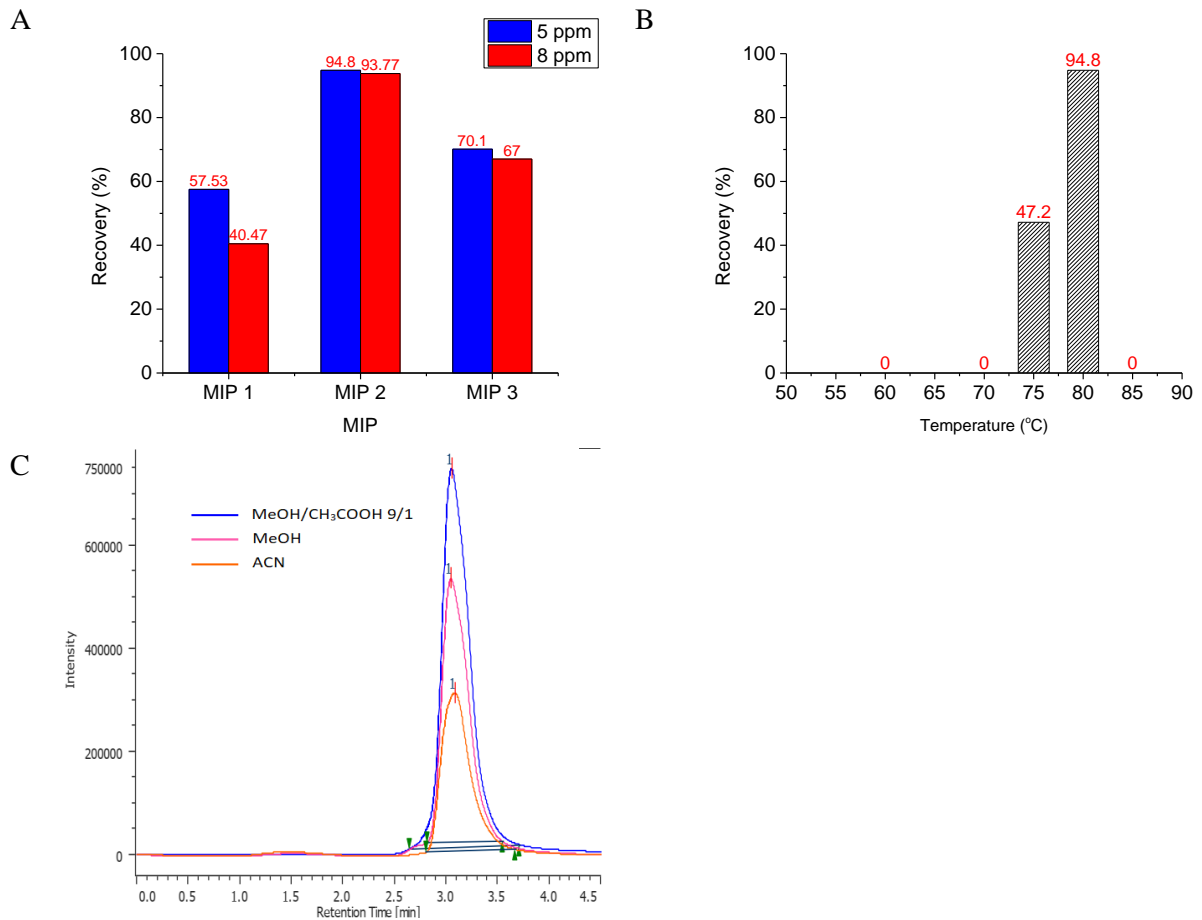
3.4. Tối ưu hóa các điều kiện tổng hợp vật liệu

Quá trình tổng hợp vật liệu, các điều kiện đã được tối ưu hóa với mục tiêu chọn được điều kiện tối ưu về tỷ lệ thành phần, nhiệt độ, dung môi chiết.

Tỷ lệ thành phần MIP: Tỷ lệ mol của tất cả các thành phần trong quá trình tổng hợp như phân tử mục tiêu, monomer chức năng, chất liên kết chéo và chất khơi mào phản ứng ảnh hưởng rất lớn tới chất lượng và hiệu quả của vật liệu. Trong *hình 5A*, tỷ lệ mol QC/AA/4-VP/EGDMA/ACCN (1/5/5/46,25/1) thể hiện qua *MIP 1*, tỷ lệ mol QC/AA/4-VP/EGDMA/ACCN (1/5/10/46,25/1) thể hiện qua *MIP 2* và tỷ lệ mol QC/AA/4-VP/EGDMA/ACCN (1/10/10/46,25/1) thể hiện qua *MIP 3*, kết quả cho thấy rằng *MIP 2* cho kết quả tốt nhất hiệu suất thu hồi đạt 94,8 % khi thử nghiệm với dung dịch chuẩn 5 ppm qua cột có chứa vật liệu MIP và 93,77 % khi sử dụng dung dịch chuẩn 8 ppm trong khi đó đối với *MIP 1* và *MIP 3* chỉ đạt 57 % và 70 %.

Nhiệt độ tổng hợp: Ở nhiệt độ 60 °C và 70 °C được đun liên tục trong 96 giờ nhưng vật liệu không đóng rắn hay nói cách khác quá trình polymer hóa không xảy ra điều này là do nhiệt độ không đủ lớn để chất khơi mào ACCN hoạt động. Ở 85 °C, sau 3 giờ đun liên tục quá trình đóng khối xuất hiện, tiếp tục đun thêm 1 giờ nữa để quá trình đóng khối kết thúc, vật liệu hình thành có màu vàng nâu và rất cứng không thể nghiền để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Ở nhiệt độ 75 °C và 80 °C quá trình polymer diễn ra trong vòng 24 h, hiệu quả ở hai nhiệt độ này được thể hiện trong *hình 5B*.

Dung môi chiết Soxhlet: Dung môi chiết Soxhlet được khảo sát bởi 3 loại gồm methanol, acetonitril và hỗn hợp methanol: acid acetic (9/1), các dung môi này được chiết trong 3 giờ với cùng một lượng vật liệu, lượng dung môi sau chiết được gom và định mức như nhau sau đó chạy trên hệ thống HPLC, kết quả được thể hiện trên *hình 5C*.



Hình 5: Tối ưu hóa các điều kiện tổng hợp MIP. (A) Tỷ lệ thành phần tổng hợp MIP, (B) Ảnh hưởng của nhiệt độ và (C) Sắc ký đồ khảo sát dung môi chiết soxhlet

Kết quả chỉ ra rằng hỗn hợp dung môi gồm methanol/acid acetic (9/1 v/v) đẩy QC ra khỏi vật liệu nhanh nhất và hiệu quả nhất, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của V. Pakade và các cộng sự [7]. Điều này được lý giải do có acid acetic làm pH giảm vì thế liên kết hydrogen giữa các monomer chức năng và Quercetin dễ dàng bị phá vỡ, vì vậy phân tử mục tiêu dễ dàng bị rửa giải ra khỏi vật liệu đã được in dấu.

3.5. Đánh giá khả năng hấp phụ của vật liệu đối với QC

Để đánh giá được khả năng sử dụng của vật liệu chúng tôi thông qua yếu tố như hiệu suất thu hồi, dung lượng hấp phụ, khả năng tái sử dụng và khả năng chọn lọc của vật liệu giữa MIP và NIP, từ đó khẳng định được vật liệu MIP mà chúng tôi tổng hợp có giá trị sử dụng cho việc xử lý mẫu để xác định quercetin hay không.

Hiệu suất thu hồi quá trình chiết: Hiệu suất thu hồi của quá trình chiết với các cột SPE chứa vật liệu MIP và NIP. Kết quả hình 6A cho thấy rằng, với vật liệu MIP (94,8 %) hiệu quả xử lý tốt hơn rất nhiều so với vật liệu NIP (47,53 %), điều này chứng tỏ rằng vật liệu MIP tổng hợp được phù hợp cho việc lưu giữ QC. Đối với NIP, tuy quá trình tạo vật liệu không thêm phân tử mục tiêu QC nhưng vẫn có khả năng lưu giữ phân tử là do chúng cũng có thành phần monomer chức năng AA và 4-VP trong cấu tạo, các phân tử này có thể lưu giữ QC trên bề mặt hạt nhờ vào các liên kết hydro yếu. Do không in dấu nên mẫu không thể len lõi sâu vào bên trong cấu trúc vật liệu nên chúng chỉ có thể bị lưu giữ một phần trên bề mặt, vì thế hiệu suất thu hồi không cao bằng MIP.

Dung lượng hấp phụ: Trong hình 6C và hình 6D, cho thấy ở giai đoạn đầu khi tăng nồng độ của phân tử mục tiêu thì giá trị q tăng mạnh nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ QC giá trị q tăng chậm đến một thời điểm q sẽ không tăng nữa, điều này do sự hấp phụ bão hòa của MIP đối với QC bị bão hòa. Trong nghiên cứu về hấp phụ phương trình hấp phụ của Langmuir (phương trình 3) thường được sử dụng để mô tả cho quá trình hấp phụ xảy ra đối với vật liệu rắn [19], trong nghiên cứu này chúng tôi cũng sử dụng phương trình này để

lý giải cho quá trình hấp phụ của vật liệu MIP. Từ kết quả khảo sát cho thấy sự hấp phụ của vật liệu MIP đối với dung dịch QC được mô tả tốt theo mô hình hấp phụ đẳng nhiệt Langmuir.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{q_m K_L} \quad (3)$$

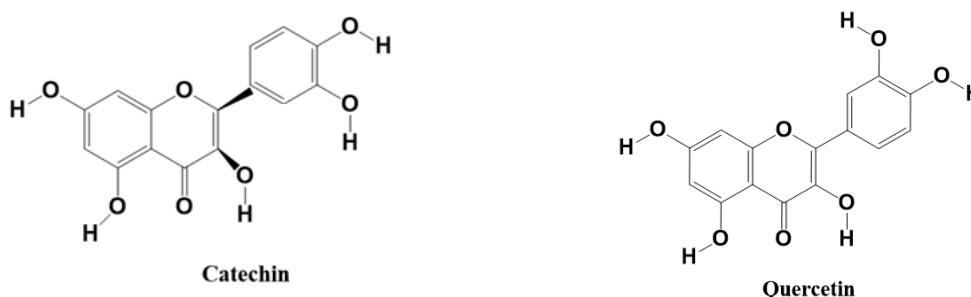
Trong đó:

- q_m (mg/g) là dung lượng hấp phụ đơn lớp cực đại
- C_e (mg/L) là nồng độ tại thời điểm cân bằng
- K_L (L/mg) là hằng số Langmuir

Dựa vào đồ thị biểu diễn phụ thuộc của C_e/q_e vào C_e đối với QC tính được giá trị dung lượng hấp phụ cực đại q_{max} là 0,2544 (mg/g) và hằng số Langmuir K_L là 0,1571 (L/mg) đối với MIP. Kết quả này cho thấy dung lượng hấp phụ của vật liệu rất tốt đặc biệt đối với vật liệu được in dấu, vấn đề này được giải thích là do kích thước hạt nhỏ, vật liệu xốp nên hấp phụ cao, cấu trúc bền vững của khung giúp lưu giữ tốt phân tử QC. Các dữ liệu trên minh chứng cho vật liệu MIP có khả năng lưu giữ và chọn lọc được phân tử mục tiêu QC.

Khả năng tái sử dụng của vật liệu: Vật liệu sau khi tổng hợp được sử dụng 5 lần lặp lại trên cùng một nồng độ chuẩn QC, kết quả trong hình 6B cho thấy hiệu quả tái sử dụng là rất kém chỉ sau 2 lần hiệu suất đã giảm chỉ còn 65,2 %, và tiếp tục giảm mạnh những lần tiếp theo, đến lần thứ 5 thì không còn khả năng lưu giữ phân tử mục tiêu. Điều này được lý giải vì các tâm hoạt động hay các vị trí liên kết không còn khả năng hoạt động và một phần do tạp chất, dung môi đã tác động tiêu cực dẫn đến hiện tượng “chai” như đã thấy. Mặc dù vật liệu đã được tổng hợp cũng như có tính chọn lọc cao đối với phân tử mục tiêu QC nhưng khả năng tái sử dụng là chưa cao dẫn đến hiệu quả kinh tế khi sử dụng vật liệu này thay cho các vật liệu có sẵn trên thị trường giảm đi đáng kể.

Tính chọn lọc của MIP đối với phân tử mục tiêu: Catechin được lựa chọn để khảo sát khả năng chọn lọc của vật liệu đối với QC vì Catechin là đồng phân với QC. Công thức cấu tạo hai hoạt chất này thể hiện trong hình 7 và kết quả thu được thể hiện trong hình 6E.

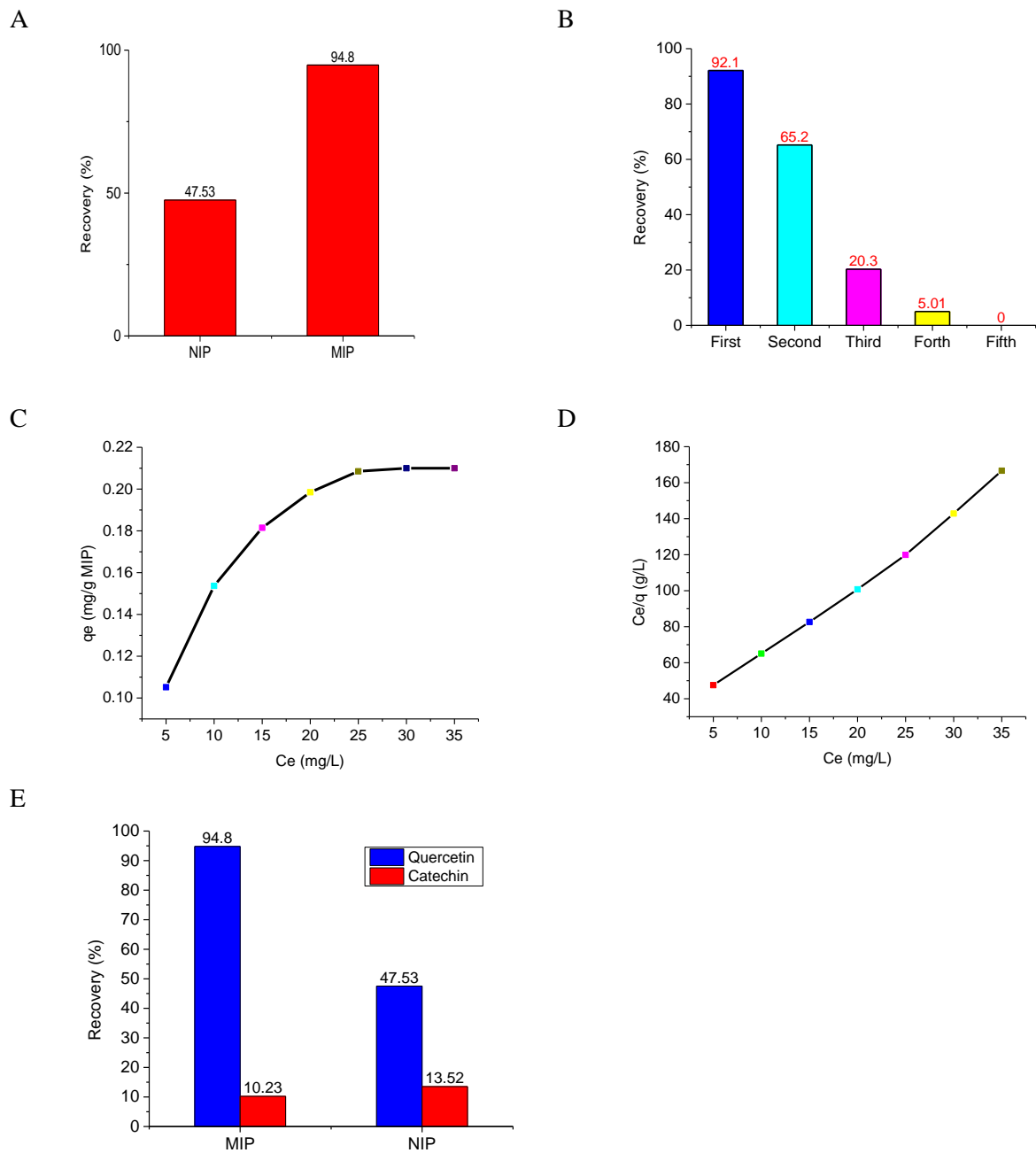


Hình 7: Công thức cấu tạo của Catechin và Quercetin

Hiệu suất thu hồi của Catechin và QC sau khi qua vật liệu MIP và NIP được tính dựa vào công thức (4).

$$\text{Hiệu suất thu hồi} = \frac{C_{\text{sau khi qua cột}}}{C_{\text{trước khi qua cột}}} \times 100 \quad (4)$$

Hình 6E, cho thấy rằng tính chọn lọc của MIP đối với QC cao hơn nhiều so với Catechin, đặc biệt với MIP cho hiệu suất thu hồi 94,8 % trong khi đó ở cùng điều kiện NIP chỉ cho 47,53 %, trong khi đó Catechin cho kết quả rất thấp lần lượt là 10,23 và 13,52 %. Kết quả khảo sát trên NIP luôn cho hiệu suất thấp, được giải thích là do các vị trí liên kết này chỉ có thể lưu giữ trên bề mặt và lưu giữ một số ít liên kết trong phân tử khảo sát, cấu trúc lỗ trống tạo khuôn in cũng không được hình thành nên chúng không thể lưu giữ một cách mạnh mẽ được. Các liên kết dùng lưu giữ phân tử khảo sát chỉ là liên kết hydro yếu nên khi trong môi trường phân cực có thể bị phá vỡ. Đây cũng là lý do vì sao chọn hỗn hợp dung môi methanol và acid acetic tỉ lệ thể tích 9/1 để phá vỡ các liên kết hydro rửa giải các phân tử mẫu ra khỏi khuôn đã in [9, 14].



Hình 6: Tính chất của vật liệu MIP và NIP. (A) Hiệu suất thu hồi giữa MIP và NIP; (B) Khả năng tái sử dụng của MIP; (C) Sự hấp phụ đẳng nhiệt Langmuir; (D) Đồ thị Scatchard của MIP cho QC và (E) Sự chọn lọc của MIP với QC và catechin

3.6. Ứng dụng phân tích mẫu

Mẫu rau thì là, ngò tây và hành tây đỏ được lựa chọn để xử lý bằng vật liệu MIP và sử dụng quy trình phân tích đã thẩm định, mỗi mẫu lặp phân tích lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy cả 03 mẫu trên QC đều được tìm thấy trong 100 gam mẫu lần lượt là 51,32 mg cho rau thì là, 22,49 mg cho rau ngò tây và 13,39 mg cho hành tây đỏ. Ngoài ra, cả 03 mẫu trên đều được thêm chuẩn, kết quả trong **bảng 3** cho thấy hiệu suất thu hồi được tìm thấy trong khoảng từ 91,14 % đến 95,27 %. Hiệu suất thu hồi của phương pháp được tính theo công thức:

$$R = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100$$

Trong đó: R: Hiệu suất thu hồi, %
 C_{m+c} : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn
 C_m : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thử
 C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết)

Bảng 3: Kết quả phân tích mẫu rau

Tên mẫu	Hàm lượng QC trong mẫu thử (mg/100 g)	Hàm lượng QC thêm vào (mg/100 g)	Hàm lượng QC tìm thấy (mg/100 g)	R (%)	RSD (%)
Thì là	51,32	10	9,55	94,50 ± 0,52	0,760 ± 0,210
Ngò tây	22,49	10	9,12	91,17 ± 0,67	0,027 ± 0,011
Hành tây đỏ	13,39	10	9,23	92,30 ± 0,58	0,025 ± 0,013

4 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, vật liệu MIP đã tổng hợp thành công với 2 monomer chức năng là AA và 4-VP với chất liên kết chéo EGDMA và chất khơi mào phản ứng đóng khối polymer ACCN. Các yếu tố như tỷ lệ thành phần của MIP, nhiệt độ phản ứng và dung môi chiết đã được tối ưu hóa. Ngoài ra, tính chất của vật liệu sau tổng hợp đã được minh chứng và kết quả cho thấy vật liệu tổng hợp được có độ chọn lọc cao với phân tử mục tiêu quercetin. Điểm nhấn của nghiên cứu này đã ứng dụng vật liệu này trong xử lý thành công mẫu rau để xác định quercetin, kết quả không những cho hiệu suất thu hồi cao mà còn có thể làm sạch và giàu mẫu lên nhiều lần. Có thể kết luận rằng vật liệu tổng hợp được là một vật liệu tuyệt vời với chi phí thấp để phân tích QC trong mẫu rau và những mẫu thực phẩm khác trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] X. Song, J. Li, J. Wang, L. Chen, "Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction," *Talanta*, vol. 80, pp. 694–702, 2009.
- [2] M. Suzery, A. N. Ningrum, B. Nudin, N. S. Mulyani, B. Cahyono, "Determination of Quercetin and Rutin in Red Galangal Rhizomes (*Alpinia purpurata*) and White Galangal (*Alpinia galanga*) with High Performance Liquid Chromatography Method," *Earth and Environmental Science*, vol. 292, 2019.
- [3] J. V. Piovesan and A. Spinelli, "Determination of Quercetin in a Pharmaceutical Sample by Square-Wave Voltammetry Using a Poly(vinylpyrrolidone)-Modified Carbon-Paste Electrode," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 25, no. 3, 517-525, 2014.
- [4] Y. L. Ma, Y. J. Chen, D. R. Wan, P. Chen, and R. Xu, "HPLC Determination of Quercetin in Three Plant Drugs from Genus *Sedum* and Conjecture of the Best Harvest Time," *Pharmacogn J*, vol. 9, no. 6, pp. 725-728, 2017.
- [5] M. Biesaga and K. Pyrzynska, "Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 39, pp. 95–107, 2009.
- [6] V. T. Nguyen, T. K. Van, T. T. Tran, M. T. Nguyen, "Synthesis Of Mip Material For Rhodamine B Selection And Its Application For Rhodamine B Analysis In Food Samples," *Industrial university of ho chi minh city journal of science and technology*, vol. 44, no. 2, pp. 5-14, 2020.
- [7] V. Pakade, S. Lindahl, L. Chimuka, C. Turner, "Molecularly imprinted polymers targeting Quercetin in high-temperature aqueous solutions," *Journal of Chromatography A*, vol. 1230, 15–23, 2012.

- [8] G. Cheng, J. Zhao, X. Wang, C. Yang, S. Li, T. Lu, X. Li, X. Wang, G. Zhu, "A highly sensitive and selective method for the determination of ceftiofur sodium in milk and animal-origin food based on molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-UV," *Food Chemistry*, vol. 347, 2021.
- [9] C. P. Aquino, A. Wong, L. A. Félix, S. Khan, G. Picasso, M. D.P.T. Sotomayor, "Evaluation of the performance of selective M-MIP to tetracycline using electrochemical and HPLC-UV method," *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 245, 2020.
- [10] I. Vasconcelos, P. H. R. da Silva, D. R. D. Dias, M. B. de F. Marques, W. da N. Mussel, T. A. Pedrosa, M. E. S. R. e Silva, R. F. de S. Freitas, R. G. de Sousa, C. Fernandes, "Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer (MIP) for solid-phase extraction of the antidiabetic gliclazide from human plasma," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 116, 2020.
- [11] C. F. Silva, L. F. Menezes, A. C. Pereira, C. S. Nascimento, "Molecularly Imprinted Polymer (MIP) for thiamethoxam: A theoretical and experimental study," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1231, 2021.
- [12] L. Wang, Q. Mei and D. Wan, "Simultaneous Determination by HPLC of Quercetin and Kaempferol in Three Sedum Medicinal Plants Harvested in Different Seasons," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 52, pp. 334–338, 2014.
- [13] P. C. Morrice, S. G. Wood, and G. G. Duthie, "High-performance liquid chromatographic determination of Quercetin and isorhamnetin in rat tissues using b-glucuronidase and acid hydrolysis," *Journal of Chromatography B*, vol. 738, pp. 413–417, 2000.
- [14] H. L. Teng, L. C. Guo, Z. N. Mei, "Study on the TLC identification and determination of the Quercetin in Berchemia lineata," *IEEE International Symposium on IT in Medicine and Education*, Guangzhou, China, 2011, pp. 39-42, doi: 10.1109/ITiME.2011.6132052.
- [15] C. G. Francisco, M. M. Olga and G. D. Teresa, "Determination of Quercetin and Luteolin in Paprika Samples by Voltammetry and Partial Least Squares Calibration," *Electroanalysis*, vol. 29, pp. 1– 10, 2017.
- [16] N. Pejic, V. Kuntic, Z. Vujic, S. Micic, "Direct spectrophotometric determination of Quercetin in the presence of ascorbic acid," *Il Farmaco*, vol. 59, pp. 21–24, 2004.
- [17] H. Yu, Z. Chen et al, "Synthesis and optimization of molecularly, imprinted polymers for Quercetin," *Society of Chemical Industry*, DOI 10.1002/pi.4172
- [18] N. Verma, N. Trehan, "Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for Quercetin," *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering*, vol. 17, pp 71-78, 2013.
- [19] Z. Chen, M. Wang et al, "Preparation of Quercetin Molecularly Imprinted Polymers," *Designed Monomers and Polymers*, vol. 15, pp. 93–111, 2012.

Ngày nhận bài: 02/10/2021

Ngày chấp nhận đăng: 10/01/2022