

TỔNG HỢP VẬT LIỆU IN DẤU PHÂN TỬ CHỌN LỌC CHO RHODAMINE B, ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH RHODAMINE B TRONG THỰC PHẨM

VAN-TRONG NGUYEN, THANH-KHUE VAN, THANHTHUY TRAN, MINH-TU NGUYEN
Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh
nguyenvantrong@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Vật liệu polymer in dấu phân tử (MIP) chọn lọc cho rhodamine B (RhB) đã được tổng hợp bằng phản ứng đồng trùng hợp giữa acrylamide (AM) và ethylenglycol dimethacrylate (EGDMA), với chất khơi mào azobisisobutyronitrile (AIBN). Khả năng hấp thụ tối đa RhB đạt được là 8,7 mg/0,1g vật liệu MIP. Tính chọn lọc của vật liệu MIP đối với RhB là 92,03 %, cao hơn so với tính chọn lọc trên phẩm màu rhodamine 6G, sudan I, sudan II (lần lượt là 57,4 %, 6,55 % và 3,36 %). Quy trình phân tích RhB đã được hiệu lực hóa trên nền mẫu thực phẩm nước ngọt, siro và bột ớt. Hiệu suất thu hồi đạt được từ 86,5 – 95,6 % cho mẫu nước ngọt, 81,8 – 95,6 % và 80,8 – 94,7 % cho mẫu bột ớt. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 10 µg/L và 33 µg/L. Cuối cùng chúng tôi ứng dụng phân tích RhB trong nền mẫu nước ngọt, siro và bột ớt, cả hai mẫu này đều không phát hiện RhB.

Từ khóa: Rhodamine B, MIP, HPLC.

SYNTHESIS OF MIP MATERIAL FOR RHODAMINE B SELECTION AND ITS APPLICATION FOR RHODAMINE B ANALYSIS IN FOOD SAMPLES

Abstract. Molecularly imprinted polymer (MIP) selected for rhodamine B (RhB) was synthesized by the co-polymerization reaction between acrylamide (AM) and ethylenglycol dimethacrylate (EGDMA) with an initiator azobisisobutyronitrile (AIBN). The maximum absorbance of RhB on MIP is 0.87 mg/ 0.1 g with the selectivity of 92.03%, which was higher than the Rhb absorbance on Rhodamine 6G, sudan I, sudan II (57.4 %, 6.55 %, and 3.36 % respectively). This procedure for RhB analysis was implemented on a number of food samples such as drinking water and chilli powder, with sample preparation by MIP and sample analysis employing HPLC. Recovery yield was found to be 86.5-95.6% for a drinking water sample and 80.8-94.7 % for chilli powder sample. The method detection limit (MDL) and method quantitative limit (MQL) were 10 ppb và 33 ppb respectively.

Keyword. Rhodamine B, MIP, HPLC.

1 GIỚI THIỆU

Rhodamine B được biết đến là một thuốc nhuộm tổng hợp có màu hồng, được sử dụng chủ yếu trong lĩnh vực nhuộm vải sợi. Thuốc nhuộm rhodamine B phát huỳnh quang, do đó có thể phát hiện dễ dàng bằng huỳnh quang kế, nó được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghệ sinh học như kính hiển vi huỳnh quang, quang phổ huỳnh quang tương quan, phân tích dòng chảy tế bào và ELISA [1]. Trước sự phát triển ngày càng cao, nhu cầu đời sống của con người, ngoài ăn no mặc ấm thì nhu cầu ăn ngon mặc đẹp ngày càng được người ta chú trọng và quan tâm nhiều. Năm bắt được thị hiếu đó của người tiêu dùng, các cơ sở chế biến thức ăn đã sản xuất ra nhiều thực phẩm màu sắc sặc sỡ, bắt mắt và rất thu hút. Đi kèm theo màu sắc sặc sỡ ấy là hiểm họa rui ro tiềm ẩn đối với sức khỏe người tiêu dùng. Để sản xuất ra nhiều sản phẩm bắt mắt đó các cơ sở sản xuất sử dụng nhiều loại phẩm màu công nghiệp, các phẩm màu này được mua dễ dàng, giá rẻ so với phẩm màu tự nhiên được sử dụng trong thực phẩm. Trong nhiều phẩm màu công nghiệp thì phẩm màu rhodamine B thường được sử dụng do có màu sắc thoả mãn các tiêu chí như màu bắt mắt, sặc sỡ cho các sản phẩm như hạt dưa, bột ớt, ruốc, tương ớt... Phẩm màu công nghiệp nói chung, rhodamine B nói riêng gây độc hại đối với con người và không có tên trong danh mục phụ gia thực phẩm do Bộ y tế ban hành [2-3]. Rhodamine B tích lũy trong cơ thể con người sẽ gây ra tác hại cho gan, thận, hệ sinh sản, hệ thần kinh cũng như gây ra bệnh ung thư [4]. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng khi thử nghiệm trên chuột và rhodamine B được kết luận là nguyên nhân gây ung thư [1, 5]. Gần đây, báo đài liên tục phát hiện các cơ sở sản xuất ở TP.HCM sử dụng phẩm màu công nghiệp cho gia vị,

thực phẩm và các loại thuốc đông y... có những thời điểm 80% mẫu bột ớt bị nhiễm rhodamine B ở các tỉnh trên cả nước, cá biệt có những tỉnh bị nhiễm 100% [6].

Trước thực trạng đó thì yêu cầu về xử lý mẫu để xác định hàm lượng rhodamine B trong mẫu thực phẩm đang được quan tâm. Hiện tại cách xử lý mẫu đang được sử dụng rộng rãi là chiết mẫu với dung môi methanol sau đó lọc dịch chiết nhưng cách xử lý này không loại bỏ được nền mẫu phức tạp. Hay người ta còn dùng kỹ thuật chiết pha rắn SPE, QuEChERS, MSPE ... tuy có thể loại được một phần nền mẫu nhưng độ chọn lọc không cao [7-8]. Để hạn chế các nhược điểm của các phương pháp trên thì kỹ thuật chế tạo vật liệu in dấu phân tử MIP (Molecularly Imprinted Polymers) là kỹ thuật mới nổi thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu bởi độ chọn lọc cao với một nhóm hợp chất góp phần rút ngắn thời gian xử lý mẫu đồng thời giảm thiểu được ảnh hưởng của nền mẫu đặc biệt với các nền mẫu phức tạp. Gần đây, có nhiều nghiên cứu đã tổng hợp thành công vật liệu MIP để ứng dụng phân tích rhodamine trong nền mẫu bột ớt [2], trong nền mẫu thực phẩm [4]. Những nghiên cứu trên đã có kết quả nghiên cứu với độ tin cậy cao đáng khích lệ, tuy nhiên vẫn chưa ứng dụng vật liệu để phân tích rhodamine B cho nhiều nền mẫu khác nhau.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp vật liệu MIP chọn lọc cho rhodamine B. Vật liệu này được đánh giá các đặc tính như khả năng hấp phụ của vật liệu, tính chọn lọc... và được áp dụng để xử lý trên mẫu thực phẩm nước ngọt, siro và bột ớt.

2 THỰC NGHIỆM

2.1 Thiết bị và hóa chất

- Các hóa chất rhodamine B, rhodamine 6G $\geq 99.0\%$, acrylamide, ethylene glycol dimethacrylate, sodium 1-heptanesulfonate và 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) được mua của Sigma-Aldrich. Dung môi methanol (MeOH), ethanol, n-hexane, acetone và acetic acid băng 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 M Ω .
- Máy HPLC của Agilent Technologies 1260 Infinity. Với cột tách RP-C18 (5 μ m, 4,60 mm \times 250 mm) và đầu dò DAD.
- Máy đo quang Thermo Scientific Evolution 600 UV-VIS.
- Máy đánh siêu âm.
- Cân phân tích Sartorius TE214S
- Hệ thống chiết Soxhlet.
- Tủ sấy tủ sấy Shellab.
- Máy cất nước không ion Thermo Scientific Barnstead Easypure II.
- Các dụng cụ thủy tinh khác.

2.2 Tổng hợp vật liệu MIP và NIP

2.2.1 Quy trình tổng hợp

Quá trình tổng hợp vật liệu MIP bằng phản ứng giữa phân tử mẫu Rhodamine B (140 mg) và monomer chức năng AM (857 mg) trong 30 mL dung môi acetonitrile, đánh siêu âm trong 15 phút. Sau đó, thêm 1784 mg EGDMA, 1mL AIBN và 70mL ACN thực hiện phản ứng polymer hóa ở 70 °C trong 10 giờ trong bếp cách thủy, suốt quá trình này khí N₂ được thổi liên tục. Sản phẩm được lọc, rửa qua với nước và methanol (1:1), sấy khô ở 60 °C trong 4 giờ. Cuối cùng đem nghiền và rây với kích thước 100 μ m. Vật liệu không in dấu (NIP) được thực hiện theo quy trình tương tự nhưng không sử dụng phân tử mẫu Rhodamine B.

2.2.2 Loại bỏ phân tử mẫu

Sau khi tổng hợp MIP và NIP, các thành phần còn dư sau phản ứng và phân tử mẫu đã in được loại bỏ hoàn toàn bằng chiết Soxhlet với dung môi methanol trong 12 giờ, quá trình này được thực hiện đến khi chiết hết phân tử mẫu ra khỏi MIP, sử dụng thiết bị UV-VIS ở bước sóng 400 – 600 nm để kiểm soát quá trình. Cuối cùng đem sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong tủ sấy.

2.2.3 Đánh giá tính chất của vật liệu

Để chứng minh hình thái và cấu trúc của vật liệu đã tổng hợp thành công, mẫu vật liệu được đo phổ hồng ngoại và chụp ảnh SEM.

Đo phổ hồng ngoại (FT-IR): Vật liệu MIP và NIP được sấy ở 60 °C trong 4 giờ, sau đó 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.

Đo kích thước hạt (SEM): Mẫu MIP và NIP được chụp tại Viện công nghệ Hóa học - VAST bằng thiết bị kính hiển vi điện tử quét (SEM) để đánh giá hình dạng và kích thước hạt của vật liệu.

2.2.4 Đánh giá khả năng hấp phụ của vật liệu đối với phân tử mẫu

Cân chính xác 0,1 g vật liệu MIP và NIP sau khi đã loại bỏ hoàn toàn phân tử mẫu vào 2 ống SPE loại dung tích 3 mL. Rửa cột bằng nước rồi bằng MeOH, cho dung dịch chứa rhodamine B với 3 nồng độ khác nhau 0,6 mg/L; 1,0 mg/L và 1,4 mg/L. Sau đó rửa tạp chất bằng 10 mL nước cất và rửa giải bằng MeOH, dung dịch thu được định mức tới 50 mL đo quang tại 550 nm.

Tiến hành lập đường chuẩn của rhodamine B với nồng độ 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 0,8 mg/L; 1,2 mg/L; 1,6 mg/L; và 2,0 mg/L đo trên máy Thermo Scientific Evolution 600 UV-VIS ở 550 nm.

2.2.5 Đánh giá khả năng chọn lọc của MIP đối với phân tử mẫu

Cân chính xác 0,1 g vật liệu MIP và NIP sau khi đã loại bỏ hoàn toàn phân tử mẫu vào 2 ống SPE loại dung tích 3 mL. Rửa cột bằng nước rồi bằng MeOH, cho dung dịch chứa rhodamine 6G; sudan I và sudan II với 3 nồng độ khác nhau 0,5 mg/L; 1,0 mg/L và 2,0 mg/L. Sau đó rửa tạp bằng 10 mL nước cất và rửa giải bằng MeOH, dung dịch thu được định mức tới 50 mL đo quang tại 550 nm. Tiến hành lập đường chuẩn của rhodamine 6G với nồng độ 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 1,0 mg/L; 1,4 mg/L; và 2,0 mg/L đo ở 527 nm, của sudan I với nồng độ 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L; 2,0 mg/L và 2,5 mg/L đo ở 494 nm, của sudan II là 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 1,0 mg/L; 1,4 mg/L; và 2,0 mg/L đo ở 494 nm.

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

2.3.1 Lập đường chuẩn Rhodamine B bằng HPLC

Đường chuẩn rhodamine B được lập trong khoảng 0,1 đến 3,0 ppm với điều kiện cho HPLC như sau:

- Cột RP- C18 (5 μ m×4,6mm ×250mm)
- Nhiệt độ cột tách 30 °C
- Bước sóng hấp thu 550 nm
- Thẻ tích mẫu 20 μ L.
- Pha động gồm 85 % ACN; 15 % nước với 0,005M sodium 1-heptanesulfonate, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng acid H₃PO₄.

2.3.2 Chuẩn bị mẫu thử

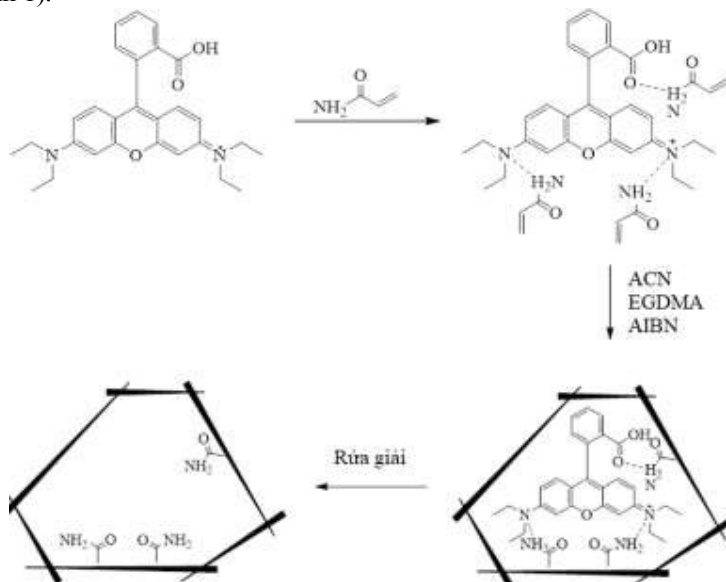
Mẫu nước ngọt hương dâu, bột ớt và siro dâu là 3 loại mẫu thực phẩm sẵn có trên thị trường được chọn. Cả 3 mẫu được xử lý bằng cách chiết rhodamine B có trong mẫu với dung môi MeOH, sau đó đun cách thủy đến cạn rồi hòa tan bằng nước sau đó chiết SPE với vật liệu MIP. Rửa giải rhodamine B trong cột chiết bằng MeOH định mức tới 50 ml bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, sau đó dung dịch mẫu sẽ được chuyển vào bộ phận mẫu của HPLC để tiến hành quá trình sắc ký. Mỗi mẫu được tiến hành thêm rhodamine B chuẩn với 3 nồng độ khác nhau 0,2 mg/L; 0,8 mg/L và 2,2 mg/L.

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 giữa monomer chức năng AM và phân tử mẫu rhodamine B, đây là giai đoạn đánh dấu các vị trí liên kết cho việc bắt các phân tử mẫu. Các liên kết hình thành chủ yếu là N:H – N, và O – H:O, đây là loại liên kết kém bền nên dễ dàng có thể rửa giải phân tử mẫu. Giai đoạn 2, khi chất khơi mào quá trình polymer hóa AIBN và chất tạo

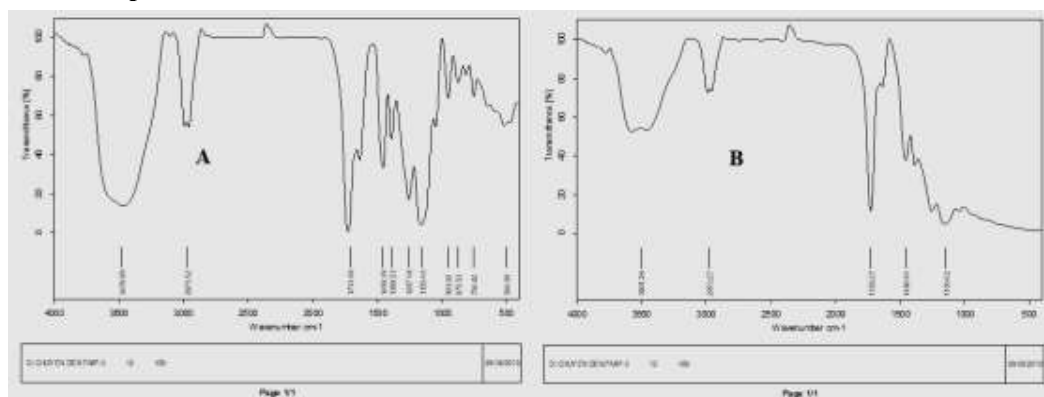
liên kết chéo EGDMA được thêm vào, dưới tác dụng của nhiệt độ thì AIBN phân hủy thành các gốc tự do chúng tấn công và các liên kết đôi C=C của AM và EGDMA. Trong giai đoạn này oxy không khí đã được đuổi đi bằng khí nitơ vì oxy cũng có khả năng tạo gốc tự do. Giai đoạn 3, gốc tự do hình thành từ AIBN lan truyền trên mạch phản ứng và trở thành tâm phản ứng, chúng kích thích vào AM và EGDMA phản ứng tiếp diễn trong 10h đến khi phản ứng kết thúc (không còn gốc tự do) sẽ tạo thành khối polymer. Đồng thời trong quá trình tổng hợp dung môi ACN cũng bay hơi. Tất cả các giai đoạn này được thể hiện trong hình minh họa (hình 1).



Hình 1. Hình minh họa in dấu phân tử Rhodamine B

3.2 Đánh giá tính chất của vật liệu

3.2.1 Phân tích phổ FT-IR



Hình 2. Phổ FT – IR của vật liệu tổng hợp NIP (2A) và MIP (2B)

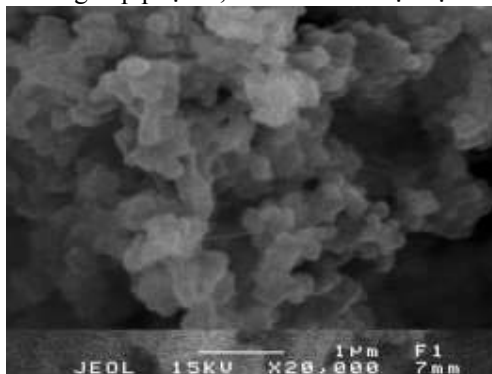
Kết quả phân tích vật liệu được thể hiện trong hình 2, với hình 2A là vật liệu không in dấu NIP, hình 2B là vật liệu đã được in dấu MIP, trong đó có thể thấy được sự tương đồng của các tín hiệu đặc trưng của vật liệu. Cụ thể, tín hiệu đôi là vân phổ hấp thụ đặc trưng dao động giãn bất đối xứng của liên kết N-H khi có kể đến liên kết hydro ở $\nu = 3501 \text{ cm}^{-1}$ (Hình 2A) và 3479 cm^{-1} (Hình 2B), tín hiệu này cũng có thể kể đến dao động của nhóm -OH đã được cộng hưởng chồng lên phổ. Tín hiệu ở $\nu = 2971 \text{ cm}^{-1}$ là dao động đặc trưng cho liên kết C-H của gốc methyl trong phân tử EGDMA. Liên kết đôi C=C trong phân tử AM chưa được rửa sạch nên vẫn còn xuất hiện trong phổ đồ ở $\nu = 1650 \text{ cm}^{-1}$ và cũng phải kể đến liên kết uốn

N-H cũng có thể quan sát tại tần số sóng này. Liên kết C=O trong công thức của AM và EGDMA xuất hiện với tín hiệu ở $\nu = 1713 \text{ cm}^{-1}$.

Các tín hiệu ở $\nu = 1257 \text{ cm}^{-1}$, 1389 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} và 754 cm^{-1} trong mẫu NIP là các dao động đặc trưng của liên kết uốn bất đối xứng C-H trong nhóm methylene $-\text{CH}_2$. Ở vùng bức xạ này có sự khác biệt về cường độ giữa MIP và NIP, nguyên do là mẫu MIP có in dấu các phân tử rhodamine B. Việc rửa các phân tử này ra là không hoàn toàn, nên lượng rhodamine B còn tồn tại và len lỏi trong cấu trúc vật liệu dẫn đến việc hấp thụ lớn, dẫn đến việc chồng lên và che mất các mũi đặc trưng khác. Tại vùng sóng dưới 1000 cm^{-1} này là dao động của liên kết C=C trong vòng benzen thuộc phân tử rhodamine B [9-10].

3.2.2 Phân tích quét kính hiển vi điện tử SEM

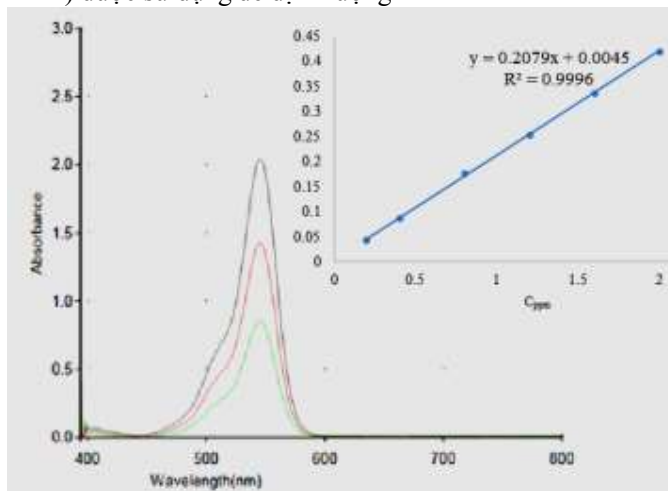
Từ ảnh chụp SEM của vật liệu có thể xác định được kích thước hạt của vật liệu khoảng $0,2 - 0,3 \mu\text{m}$. Vật liệu tổng hợp có các lỗ xốp lớn giúp gia tăng khả năng tải dung dịch mẫu qua cột, đặc biệt gia tăng diện tích bề mặt vật liệu, từ đó có khả năng hấp phụ tốt, hình ảnh của vật liệu được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Ảnh chụp SEM của vật liệu MIP

3.3 Đánh giá khả năng hấp phụ của vật liệu đối với rhodamine B

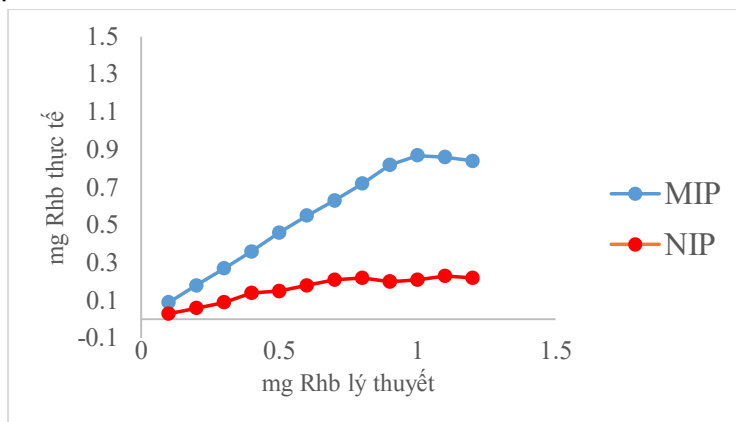
Do nền mẫu khá đơn giản và phương pháp sử dụng UV-VIS có ưu điểm là nhanh và tiện lợi để định lượng nên chúng tôi dùng phổ hấp thụ UV-VIS để đánh giá khả năng hấp phụ của vật liệu của rhodamine B. Kết quả trên phổ đồ của vật liệu cho thấy $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$, và phương trình đường chuẩn ở bước sóng này với $R^2 = 0.9996$ (hình 4) được sử dụng để định lượng rhodamine B.



Hình 4. Phổ hấp thụ và đường chuẩn của Rhodamine B

Khả năng hấp phụ của MIP và NIP đối với phân tử mẫu rhodamine B được đánh giá bằng cách cố định khối lượng MIP và NIP là 0,1 g, sau đó thay đổi hàm lượng rhodamine B tăng dần, các điều kiện khác sẽ

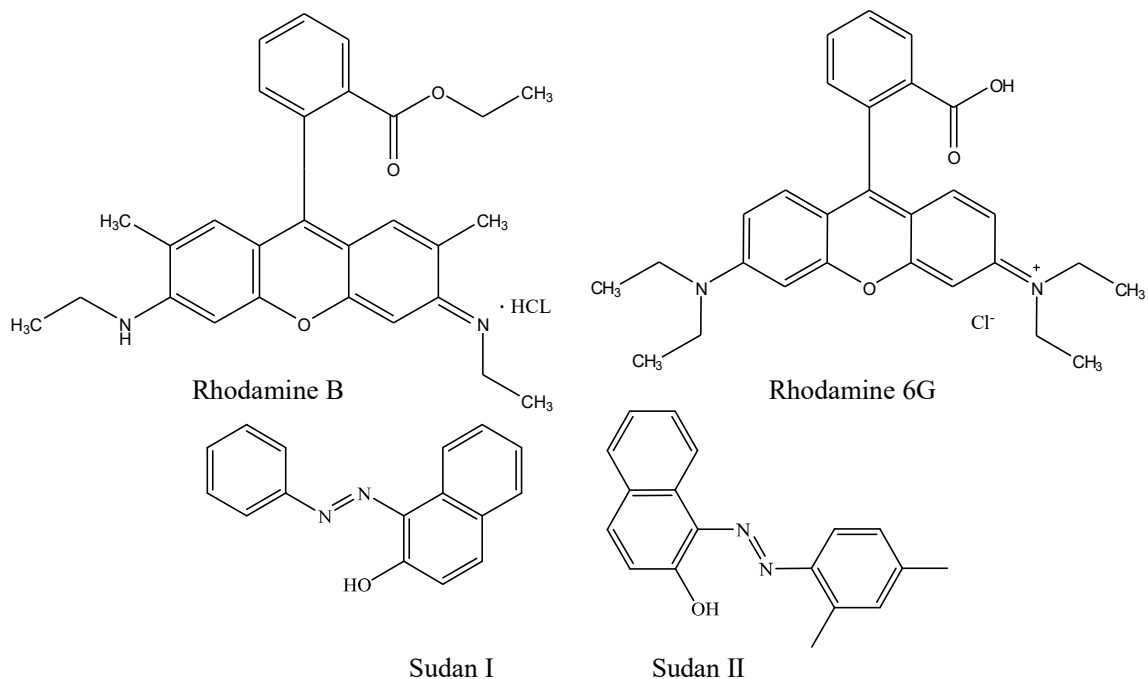
được duy trì giống nhau giữa các lần thí nghiệm. Kết quả thu được đã thể hiện như hình 5, trong đó đối với MIP khả năng hấp phụ cực đại là 0,87 mg rhodamine B trên 0,1 g vật liệu, còn đối với NIP thì thấp hơn nhiều 0,23 mg.



Hình 5. Khả năng hấp phụ của vật liệu MIP và NIP (mg RhB/0,1g MIP/NIP)

Kết quả cho thấy dung lượng hấp phụ của vật liệu là rất tốt, đặc biệt đối với vật liệu được in dầu phân tử. 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 được tạo bởi EGDMA giúp bắt giữ tốt phân tử rhodamine B. Ngoài ra, NIP cũng có khả năng bắt giữ phân tử rhodamine B vì chúng cũng có thành phần monomer chức năng AM trong cấu tạo. Các phân tử khi đó có thể bắt giữ rhodamine B trên bề mặt hạt nhờ vào các liên kết hydro yếu. Do không in dầu phân tử nên mẫu đã không thể len lõi sâu vào cấu trúc vật liệu được, chúng chỉ có thể bị bắt giữ một phần trên bề mặt làm cho khả năng hấp phụ của vật liệu không cao. Tất cả các dữ liệu trên chứng minh rằng vật liệu MIP mà chúng tôi tạo ra, có khả năng bắt giữ được phân tử mẫu rhodamine B.

3.5 Đánh giá khả năng chọn lọc của MIP đối với phân tử mẫu



Hình 6. Công thức cấu tạo của các hoạt chất khảo sát

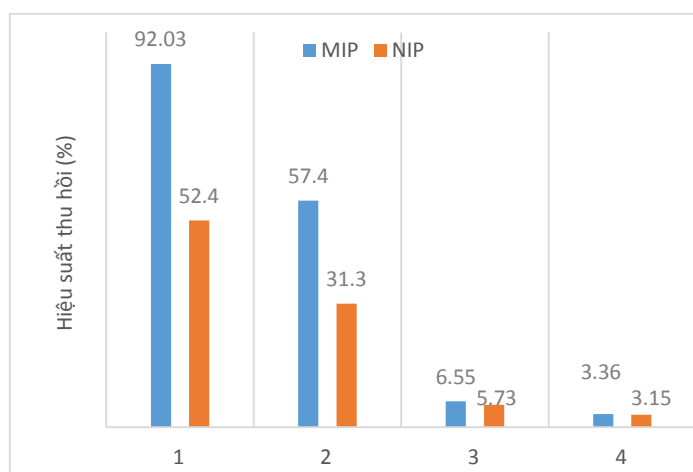
Vì rhodamine 6G có công thức cấu tạo tương đồng với rhodamine B, và sudan I; sudan II là những hoạt chất thường có trong nền mẫu nên chúng được chọn để làm các chất khảo sát đánh giá sự chọn lọc của MIP và NIP đối với phân tử mẫu. Công thức cấu tạo được thể hiện trong hình 6.

Đối với 3 hoạt chất trên, chúng tôi tiến hành lập đường chuẩn với số liệu được thể hiện trong bảng 1, và dựa vào các đường chuẩn này để kiểm soát hiệu suất thu hồi sau quá trình hấp phụ của vật liệu.

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

Bảng 1. Thông số phương trình đường chuẩn

Tên hoạt chất	Bước sóng (nm)	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan (R ²)
Rhodamine B	550	y = 0,2079x + 0,0045	0,9996
Rhodamine 6G	527	y = 0,1906x - 0,0034	0,9999
Sudan I	494	y = 0,0077x + 0,0169	0,9981
Sudan II	494	y = 0,0472 - 0,0044	0,9973



Hình 7. Khả năng chọn lọc của vật liệu MIP:

(1) Rhodamine B; (2) Rhodamine 6G; (3) Sudan I; (4) Sudan II

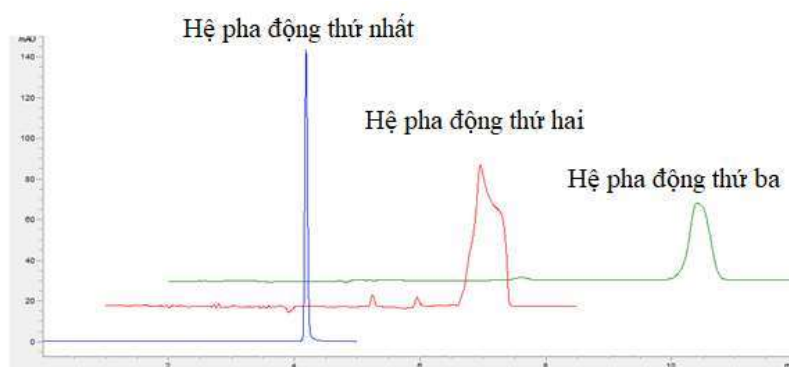
Sau khi đánh giá tính chọn lọc của MIP đối với hợp chất rhodamine B, rhodamine 6G, sudan I và sudan II, có thể thấy được vật liệu in dấu MIP chọn lọc cao với chất đã in dấu là rhodamine B, còn các chất lạ như sudan I và sudan II độ chọn lọc rất thấp. Tuy nhiên, đối với đồng phân như rhodamine 6G vẫn có được mức chọn lọc trung bình, nguyên nhân có thể lý giải là do sudan I và sudan II là các phân tử lạ, có cấu trúc phân tử khác biệt hoàn toàn với chất đã in dấu trong khuôn in là rhodamine B. Ở 2 chất này thiếu đi các vị trí liên kết cần thiết để các tâm liên kết trên khuôn bắt giữ. Nhìn vào công thức cấu tạo thì vị trí cần để nhận dạng phân tử bắt giữ phải có gốc -COOH và các liên kết hydro N:H - N thì phân tử lạ này không đáp ứng được điều đó. Bên cạnh đó, khi xét đến tính chọn lọc với đồng phân của nó là rhodamine 6G thì tuy có cùng công thức phân tử nhưng công thức cấu tạo cũng như hình dạng không gian của phân tử không còn giữ được như mẫu đã in nên việc nhận dạng sẽ bị bỏ sót dẫn đến hiệu suất không cao. Có thể thấy 3 vị trí liên kết đã xác định, trong công thức cấu tạo rhodamine 6G đã mất đi một vị trí tại gốc -COOH nhưng vẫn còn 2 vị trí tại N. Điều đó có thể lý giải tại sao MIP đã chọn lọc rhodamine 6G kém hơn rhodamine B. Kết quả khảo sát trên NIP luôn cho hiệu suất thấp, cũng có thể giải thích như phần trước đó, do các vị trí liên kết này chỉ có thể bắt giữ trên bề mặt và bắt 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 bắt giữ một cách mạnh mẽ được. Các liên kết dùng để bắt giữ phân tử khảo sát chỉ là liên kết hydro yếu nên khi trong môi trường phân cực mạnh như H₂O có thể bị phá vỡ. Đây cũng là lý do vì sao chọn dung môi methanol

để phá vỡ các liên kết hydro rửa giải các phân tử mẫu ra khỏi khuôn đã in [9-10].

3.6. Ứng dụng phân tích mẫu

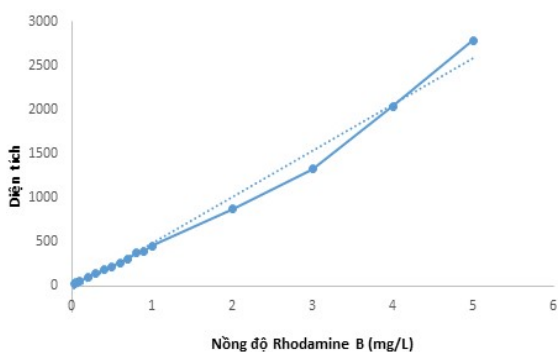
3.6.1. Lập đường chuẩn xác định rhodamine B bằng HPLC

Để xây dựng phương pháp xác định rhodamine B trên thiết bị HPLC, chúng tôi tiến hành tối ưu thông số của phương pháp như thành phần pha động, pH của pha động, LOD, LOQ, RSD và khoảng tuyến tính. Để khảo sát đối với pha động, 3 hệ khác nhau đã được lựa chọn [5]: pha động thứ nhất gồm 85% ACN - 15% nước với 0,005M sodium 1-heptanesulfonate, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng acid H_3PO_4 ; pha động thứ hai gồm 85% MeOH-15% nước với 0,005M sodium 1-heptanesulfonate, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng acid H_3PO_4 ; pha động thứ ba gồm 85% ACN - 15% nước với 0,005M triethyl amine, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng acid H_3PO_4 . Kết quả sắc ký đồ nhận được thì hệ pha động thứ nhất cho mũi sắc ký đối xứng và có tín hiệu cao nhất, vì vậy hệ này được chọn cho các bước tiếp theo (hình 8).

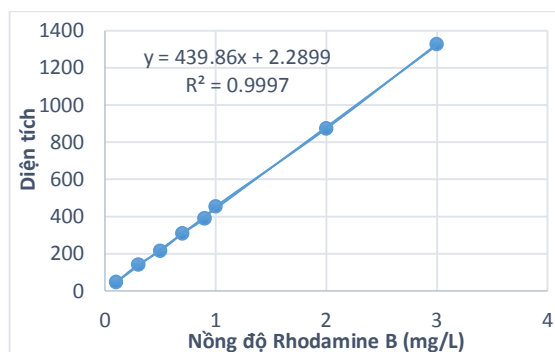


Hình 8. Sắc ký đồ của pha động khảo sát

Các giá trị LOD và LOQ tiếp tục được khảo sát thông qua thao tác chạy phân tích 12 lần đường nền và pha loãng chuẩn đến khi tín hiệu cao gấp 3 lần tín hiệu nền. Kết quả thu được giới hạn phát hiện là 0,01 mg/L (LOD), từ đó giới hạn định lượng được ước tính là 0,033 mg/L (LOQ). Khoảng tuyến tính được khảo sát trên chất chuẩn từ 0,03 mg/L đến 5,00 mg/L (hình 9), kết quả cho thấy với rhodamine B tuyến tính trong khoảng 0,033 đến 3 mg/L, với phương trình đường chuẩn là $y = 439,86x + 2,2899$ ($R^2 = 0,9997$), trong đó: x là nồng độ rhodamine B; y là diện tích của mũi sắc ký tương ứng (hình 10). Kết quả này có LOD và LOQ thấp hơn rất nhiều so với nghiên cứu khác [2].



Hình 9. Khảo sát khoảng tuyến tính



Hình 10. Đồ thị đường chuẩn của rhodamine B

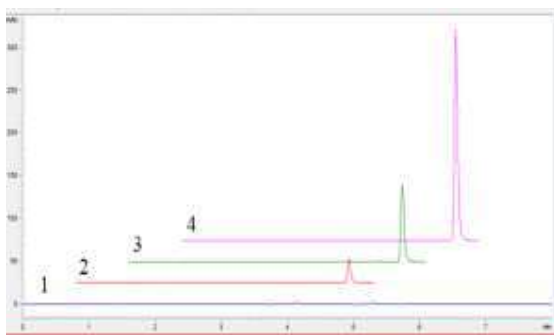
3.6.2 Ứng dụng phân tích mẫu thực phẩm

Chúng tôi sử dụng 3 loại mẫu thông dụng trên thị trường và có khả năng bị lạm dụng rhodamine B làm phẩm màu là nước ngọt hương dâu, siro dâu và bột ớt. Tiến hành trích ly rhodamine B bằng dung môi

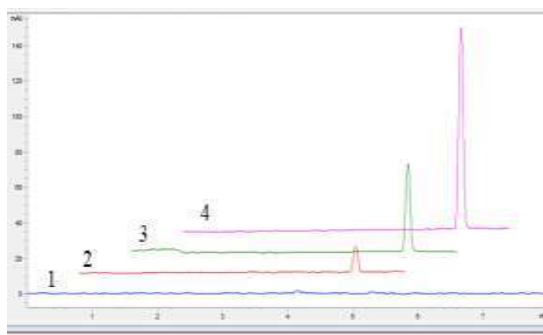
MeOH với sự hỗ trợ của sóng siêu âm, sau đó hỗn hợp được lọc và làm khô trên bếp cách thủy rồi hòa tan lại bằng nước cất. Cho dung dịch này qua cột chiết SPE có chứa MIP, và tiến hành phân tích trên HPLC theo điều kiện đã khảo sát ở mục 3.6.1. Kết quả cho thấy cả 3 mẫu trên đều không phát hiện rhodamine B (hình 11, 12 và 13), sắc ký đồ cũng chỉ ra rằng nền mẫu sau khi xử lý sạch và không còn nhiều tạp chất. Chúng tôi cũng thực hiện thêm chất chuẩn vào cả 3 nền mẫu trên và kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 86,50 % đến 95,40 % (xem trong bảng 2). Điều này chứng tỏ cùng với vật liệu MIP, phương pháp phân tích mà chúng tôi xây dựng là phù hợp để phân tích rhodamine B trong mẫu thực phẩm.

Bảng 2. Kết quả phân tích mẫu thực phẩm

Tên mẫu	Hàm lượng rhodamine B có trong mẫu thử (mg/L)	Nồng độ của rhodamine B (mg/L)		Hiệu suất thu hồi (%)	Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%)
		Hàm lượng thêm vào	Hàm lượng tìm thấy		
Nước ngọt hương dâu	Không phát hiện	0,2	0,1786	88,40	1,14
			0,1762	88,00	
			0,1732	86,50	
		0,8	0,7188	90,00	0,32
			0,7202	90,00	
			0,7243	90,50	
		2,2	2,1035	95,60	0,44
			2,0988	95,40	
			2,0868	94,80	
Siro dâu	Không phát hiện	0,2	0,1753	87,60	3,46
			0,1635	81,80	
			0,1683	84,10	
		0,8	0,6986	87,30	0,96
			0,7057	88,20	
			0,7116	89,00	
		2,2	2,0979	95,40	0,16
			2,0972	95,30	
			2,1043	95,60	
Bột ớt	Không phát hiện	0,2	0,1696	84,80	1,64
			0,1671	83,50	
			0,1617	80,80	
		0,8	0,700	87,50	0,46
			0,6971	87,10	
			0,7029	87,90	
		2,2	2,0829	94,70	0,48
			2,0716	94,20	
			2,0638	93,80	



Hình 11. Sắc ký đồ phân tích mẫu siro dầu (1) mẫu thử; (2) thêm chuẩn 0,2 mg/L; (3) thêm chuẩn 0,8 mg/L; (4) thêm chuẩn 2,2 mg/L.



Hình 12. Sắc ký đồ phân tích mẫu bột ớt (1) mẫu thử; (2) thêm chuẩn 0,2 mg/L; (3) thêm chuẩn 0,8 mg/L; (4) thêm chuẩn 2,2 mg/L.

4 KẾT LUẬN

Vật liệu in dầu phân tử cho phân tử mẫu rhodamine B đã được chúng tôi tổng hợp thành công. Kết quả thực nghiệm đã chứng minh vật liệu chế tạo là chọn lọc cao cho rhodamine B và đã được ứng dụng để xử lý mẫu thực phẩm với hiệu suất thu hồi tốt (>85%). Kết quả thu được đã mở ra hướng ứng dụng vật liệu in dầu phân tử và phương pháp phân tích chúng tôi đã xây dựng khi phân tích rhodamine B trong các mẫu thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Ozkantar, M. Soylak, M. Tuzen. Spectrophotometric detection of rhodamine B in tap water, lipstick, rouge, and nail polish samples after supramolecular solvent microextraction. *Turkish Journal of Chemistry*, 2017, 41, 987 – 994.
- [2] X. Liu, X. Zhang, Q. Zhou, B. Bai, and S. Ji. Spectrometric determination of rhodamine b in chili powder after molecularly imprinted solid phase extraction. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2013, 34, 3381 – 3386.
- [3] Quyết định 3724/2001/QĐ-BYT. Về việc ban hành quy định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm.
- [4] X. Su, X. Li, J. Li, M. Liu, F. Lei, X. Tan, P. Li, and W. Luo. Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and determination of Rhodamine B in food, *Food Chemistry*, 2015, 171, 292-297.
- [5] Nguyen, T., Francis, M. B. Practical synthetic route to functionalized rhodamine dyes. *Organic Letters*, 2003, 5, 3245–3248.
- [6] Trần Thanh Nga. Xác định Rhodamine B trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng detector UV, Luận văn cao học, Đại học Khoa học tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, 2011.
- [7] X. R. Qing, G. W. Chao, W. X. Bing, L. Q. Yan, and D. F. Yan. Determination of Rhodamine B in Condiment by HPLC-FLD-DAD, *China Condiment*, 2013, 08.
- [8] A. A. A. A. Bakheet, X. S. Zhu. Determination of Rhodamine B Pigment in Food Samples by Ionic Liquid Coated Magnetic Core/Shell Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles Coupled with Fluorescence Spectrophotometry, *Science Journal of Chemistry*, 2017, 5(1), 1-7.

Ngày nhận bài: 02/07/2019

Ngày chấp nhận đăng: 11/05/2020