

SYNTHESIS OF MIP MATERIAL SELECTIVE FOR RHODAMINE B, APPLICATION OF ANALYSIS RHODAMINE B IN FOOD

Nguyễn Minh Tú^{1*}, Nguyễn Quốc Hùng¹, Chu Văn Hải¹, Nguyễn Văn Trọng²

Abstract

Molecularly imprinted polymer (MIP) selective for Rhodamine b (Rhb) was synthesized by copolymerization between acrylamide (AM) and ethylenglycoldimethacrylate (EGDMA), with initiator azobisisobutyronitrile (AIBN). The maximum adsorption of Rhb by the MIP was 0.87mg/ 0.1g. Selectivity of the MIP for Rhb was 90%, higher than for rhodamine 6G, sudan I, sudan II (respectively 57%, 6.6% and 3.4%). Analysis protocol for Rhb was validated on some food bases (such as soft drink, chili powder), with clean-up stage by the MIP and analyzed on HPLC. Recoveries were obtained from 88 – 95.6% (with RSD_R 2.38 – 0.12%) for soft drink sample, and 80.8 – 94.7% (with RSD_R 1.67 – 0.37%) for chili powder sample. Method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were 10 ppb and 33 ppb respectively.

Keywords: Rhodamine b, molecularly imprinted polymer, HPLC.

1. MỞ ĐẦU

Rhodamine b (Rhb) là phẩm màu công nghiệp, thường được sử dụng trong công nghiệp nhuộm, hay kết hợp với auramine O để nhuộm màu trong kiểm tra vi sinh. Rhb nằm trong danh sách các chất có khả năng gây ung thư theo IARC [1]. Rhb đã được phát hiện sử dụng tạo màu cho bột ớt, con ruốc, tương ớt, hạt dưa.

Phương pháp sắc lỏng thường sử dụng để xác định dư lượng Rhb, với kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) để tinh sạch mẫu [2-6]. Phổ huỳnh quang cũng cho thấy phương pháp đáng tin trong việc xác định Rhb trong thực phẩm, với việc sử dụng hạt từ để chiết mẫu [7]. Ngày nay, vật liệu in dấu phân tử (MIP) cũng được điều chế cho phép tăng độ chọn lọc với chất cần phân tích, hạ giới hạn phát hiện của kỹ thuật đo, rút ngắn thời gian phân tích [8-10]. Tuy nhiên, tỷ lệ hấp phụ kém của vật liệu MIP sẽ dẫn đến việc sử dụng nhiều, vì thế làm tăng giá thành.

Trong bài này, chúng tôi tập trung tổng hợp vật liệu MIP dạng bột, dùng xử lý Rhb trên nền thực phẩm. Kỹ thuật FTIR, SEM, HPLC, sẽ được sử dụng cho việc đánh giá tính năng của vật liệu, và hiệu suất phân tích dư lượng Rhb trên nền nước ngọt, ớt bột.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Chất chuẩn Rhodamin B, Rhodamin 6G, Merck. Metanol; ethanol; n-hexane; acetonitrile (ACN) và axit axetic băng loại HPLC Grade, Merck; nước cất loại ion, Acrylamide; Ethylene glycol dimethacrylate; 2,2'-Azobis(2-methyl-propionitrile), Merck.

Máy SEM, FTIR Tensor 27 Bruker, UV-vis Thermo Scientific Evolution 600, HPLC Agilent 1260 với detector UV ở 550 nm, với cột Phenomenex Gemini-C18 (kích thước hạt 5 μ m, 250x4.6 mm, pha đệm 85% acetonitrile + 15% nước, 0.005M natri tripeptonate, chỉnh pH 3.5 với H_3PO_4 , vận tốc dòng 0.5mL/min-1.0 mL/min, thể tích tiêm 20 μ L).

2.2. Điều chế vật liệu MIP, NIP

0,14g Rhb + 0,8570g AM vào bình phản ứng, phân tán đều với 30mL ACN bằng siêu âm trong 15 phút. Để yên 12 giờ trong tối, thêm tiếp 1,7840g EGDMA + 1mL AIBN. Thêm tiếp 70mL ACN đánh siêu âm 15 phút. Ổn định nhiệt ở 70°C trong 10 giờ cho polyme đóng rắn hoàn toàn. Lọc rửa MIP bằng H_2O :Metanol (1:1). Chiết Soxhlet với dung môi Metanol liên tục trong 12 giờ. Sấy khô MIP ở 60°C. Điều chế NIP cũng tương tự nhưng không có Rhb.

2.3. Thực nghiệm kiểm tra khả năng hấp phụ vật liệu MIP, NIP

Chuẩn bị cột nhồi SPE 3ml với 0,1g bột MIP. Rút dung dịch chuẩn 10ppm Rhb lần lượt từ 1, 2, 4, 6, 8, 10ml. Thêm 1ml ACN và 10ml nước cất lắc đều. Lần lượt cho các dung dịch qua cột SPE. Rửa lại bằng 10-20ml nước cất. Rửa giải bằng 20ml metanol, làm khô, định mức thành 50ml bằng nước cất. Đo độ hấp thụ UV của dung dịch ở bước sóng 554nm. Thực hiện tương tự cho mẫu NIP.

2.4. Thực nghiệm khả năng lưu giữ Rhb của MIP

Đánh giá dựa trên hiệu suất thu hồi (H) ở ba nồng độ khác nhau 0,6; 1,0; 1,4ppm Rhb (Nồng độ C_{ly} thuyết). Thực hiện các bước rửa giải và định mức tương tự phần 2.3. Định lượng Rhb thu được (Nồng độ $C_{thực}$ tế) trên hệ thống HPLC. Thực hiện tương tự với mẫu MIP và NIP.

2.5. Định lượng Rhb nền mẫu nước ngọt, bột ớt

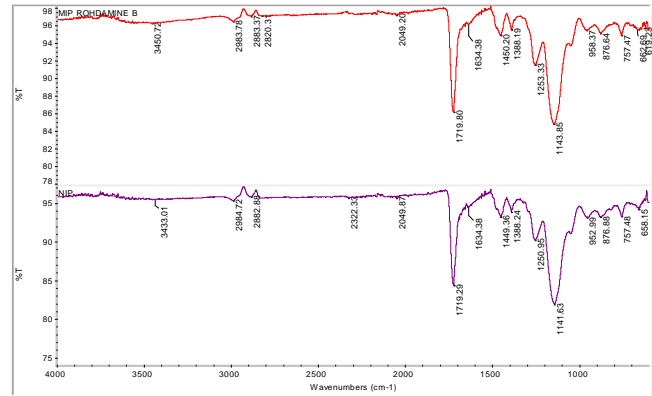
Mẫu nước ngọt được cho trực tiếp qua cột SPE, mẫu bột ớt được chiết với metanol. Dung dịch chiết được làm bay hơi hoàn toàn metanol. Phần còn lại được hòa tan với nước, rồi được chiết với cột nhồi vật liệu MIP. Rửa giải Rhb trong cột chiết bằng metanol. Dung dịch rửa giải được lọc qua bộ lọc 0,45 μ m. Sau đó dung dịch mẫu được chuyển đến hệ HPLC để tiến hành quá trình sắc ký: Pha động gồm 85% ACN 15% nước với 0,005M natriheptansunfonat, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng acid H₃PO₄. Cột RP-C18, 5 μ m, 4,6mm x 250mm; nhiệt độ cột: 30°C; Tốc độ dòng: 0,5ml/phút. Thể tích tiêm: 20 μ l. Detector: 550 nm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

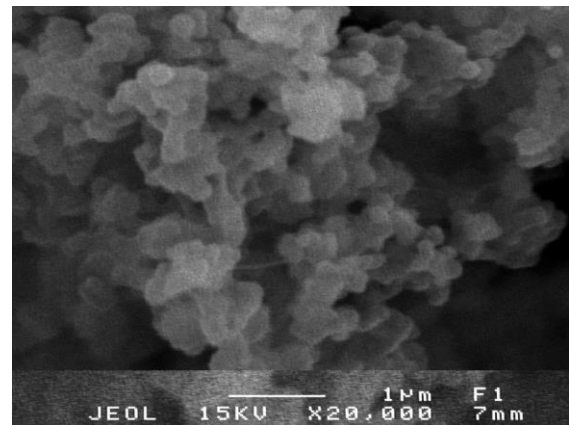
3.1. Đặc tính vật liệu MIP

Phổ FTIR của MIP và NIP (hình 1) cho thấy các băng tương tự nhau và đặc trưng của nhóm ethyleneoxide-methacrylate trong cấu trúc của copolymer: 1719 cm^{-1} (C=O), 1452 cm^{-1} (CH₂), 1387 cm^{-1} (CH₃), 1253 và 1146 cm^{-1} (C-O). Hai băng tại 1634 và trên 3400 cm^{-1} (N-H) thuộc nhóm amide -CONH₂. Nối C=O (nhóm amide) sẽ xuất hiện tại băng 1719 cm^{-1} .

Hình SEM của vật liệu MIP (hình 2) cho thấy hình thái tương đối đồng đều. Kích thước các hạt trong khoảng 0,2-0,4 μ m.



Hình 1: Phổ FTIR-ATR tinh thể kim cương của vật liệu MIP và NIP.



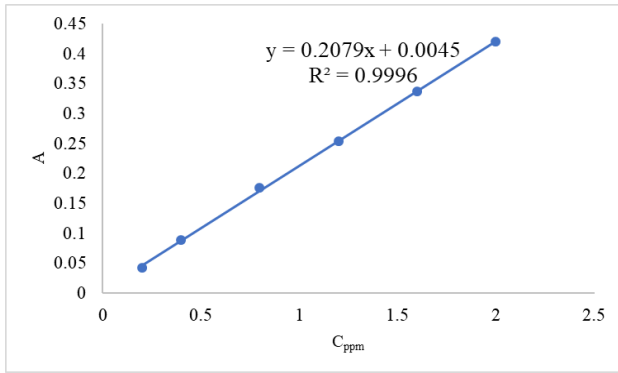
Hình 2: Hình SEM của vật liệu MIP.

3.2. Khả năng hấp phụ tối đa của MIP đối với Rhb

Độ hấp thụ tương ứng với nồng độ Rhb được trình bày trong bảng 1. Khi nồng độ Rhb tăng, độ hấp thụ cũng tăng tuyến tính, với hệ số tương quan $R^2=0,9996$ (hình 3). Điều này cho thấy sự hấp phụ và rửa giải Rhb tốt, vật liệu MIP có thể sử dụng cho phân tích Rhb.

Bảng 1: Nồng độ Rhb và độ hấp thụ ứng sau xử lý với cột SPE vật liệu MIP.

STT	1	2	3	4	5	6
V chuẩn 10ppm	1	2	4	6	8	10
C _{ppm}	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Độ hấp thu (A)	0,043	0,088	0,176	0,253	0,336	0,420



Hình 3: Đường biểu diễn độ hấp thụ tương ứng với nồng độ Rhb.

3.3. Hiệu suất lưu giữ của vật liệu

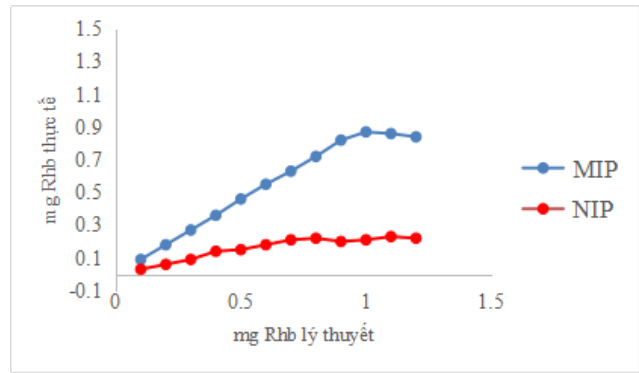
Vật liệu MIP cho thấy khả năng lưu giữ Rhb tốt hơn nhiều so với NIP. Hiệu suất đạt khoảng 92% tương ứng với 3 nồng độ thử nghiệm trên 0,1g vật liệu (Bảng 2). Sự hiện diện của Rhb trong quá trình kết mạng của MIP đã hình thành các khoảng trống tương ứng với lập thể của Rhb. Hệ quả là Rhb tương tác tốt với MIP và khó bị rửa trôi bởi nước, so với NIP [10]. Nhưng lại dễ dàng rửa giải bằng metanol.

Bảng 2: Bảng hiệu suất lưu giữ Rhb của MIP, NIP

C _{lý thuyết} (ppm)		0,6	1,0	1,4
MIP	A	0,120	0,196	0,271
	C _{thực tế} (ppm)	0,555	0,921	1,281
	H	92,5%	92,1%	91,5%
	H _{trung bình}	92,03%		
NIP	A	0,071	0,113	0,155
	C _{thực tế} (ppm)	0,318 7	0,3187	0,3187
	H	53,1%	52,4%	51,8%
	H _{trung bình}	52,4%		

3.4. Khả năng hấp phụ tối đa

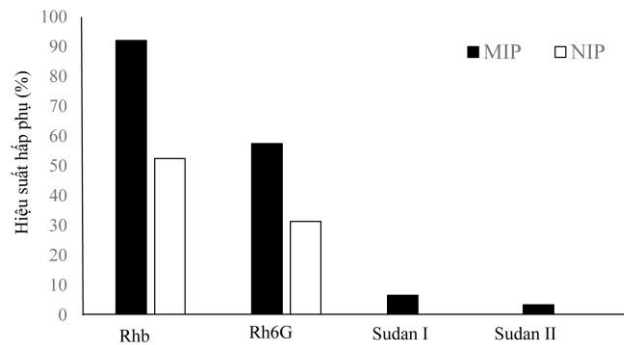
Khi tăng dần lượng Rhb từ 0,1 – 1,2mg trên 0,1g vật liệu MIP hay NIP. Khả năng hấp phụ tối đa của MIP đạt khoảng 0,9mg Rhb. Trong khi NIP rất kém, chỉ đạt khoảng 0,2mg Rhb (hình 4).



Hình 4: Đường biểu diễn khả năng hấp phụ tối đa Rhb của vật liệu MIP, NIP (mg Rhb/0,1g vật liệu).

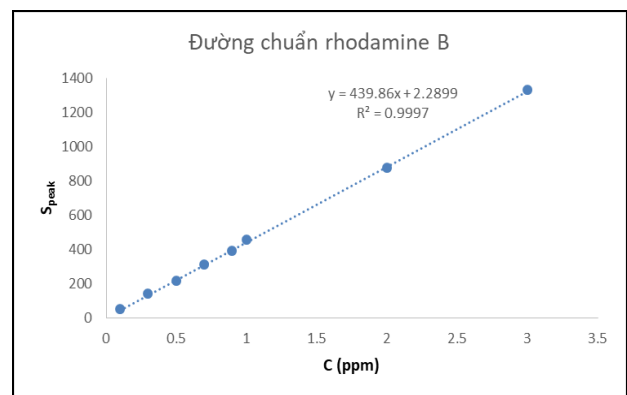
3.5. Đánh giá tính chọn lọc của vật liệu MIP

Với các phẩm màu có cấu trúc khác với Rhb thì khả năng hấp phụ trên MIP thấp hơn hẳn (hình 5). Điều này càng minh chứng cho sự chọn lọc của vật liệu MIP đối với Rhb.



Hình 5: Biểu đồ so sánh tính chọn lọc của MIP đối với màu Rhb, rhodamine 6G, sudan I, sudan II.

3.6. Phân tích Rhb trên nền mẫu nước ngọt, bột ốt



Hình 6: Đường xác định khoảng tuyến tính Rhb.

Khoảng tuyến tính của Rhb nằm trong khoảng 0,1-3ppm với hệ số tuyến tính $R^2=0,9997$ (hình 6).

Thêm chuẩn Rhb với ba nồng độ khác nhau trên nền mẫu nước ngọt hương dâu (màu đỏ), bột ớt (màu đỏ), xác định các thông số như MDL, MQL, hiệu suất thu hồi (H) (bảng 3).

Bảng 3: Giá trị MDL, MQL, hiệu suất thu hồi.

STT	C_{Rhbb} (ppm)	H (%)	MDL (ppm)	MQL (ppm)
Nước ngọt hương dâu	0,2	88	0,01	0,03
	0,8	90		
	2,2	95		
Bột ớt	0,2	85		
	0,8	88		
	2,2	95		

Giá trị hiệu suất thu hồi đạt được ở 3 nồng độ khác nhau đều đạt với quy định của AOAC [11].

4. KẾT LUẬN

Vật liệu MIP được điều chế đạt được những tính năng tốt như: Nồng độ hấp phụ tối đa trên 0,1g, độ chọn lọc, hiệu suất thu hồi tốt. Đạt các yêu cầu sử dụng trong phân tích dư lượng Rhb trong nền thực phẩm (nước ngọt, bột ớt). Quy trình phân tích đơn giản dễ áp dụng cho các nền mẫu khác.

Điều kiện tổng hợp vật liệu dễ dàng, cho vật liệu giá thành thấp, và có thể triển khai trên quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. International Agency for Research on Cancer (IARC), 16, 221 (1978).
- [2]. L. Gagliardi, G. Cavazzutti, D. De Orsi, G. Multari, HPLC determination of rhodamine B (C.I. 45170) products, *Chromatographia*, 43(1), 76-78 (1996).
- [3]. M. Soylak, Y.E. Unsal, E. Yilmaz, M. Tuzen, Determination of rhodamine B in soft drink, waste water and lipstick samples after solid phase extraction, *Food and Chemical Toxicology*, 49(8), 1796-1799 (2011).
- [4]. W. Yong, W. Na, determination of Rhodamine B in food using HPLC-UV method, *Chinese Food Science*, 1(2), 37-39 (2012).
- [5]. P. Qi, Z. Lin, J. Li, C. Wang, W.W. Meng, H. Hong, X. Zhang, Development of a rapid, simple and sensitive HPLC-FLD method for determination of rhodamine B in chili-containing products, *Food chemistry*, 164, 98-103 (2014).
- [6]. C. Tatebe, X. Zhong, T. Ohtsuki, H. Kubota, K. Sato, H. Akiyama, A simple and rapid chromatographic method to determine unauthorized basic colorants (rhodamine B, auramine O, and pararosaniline) in processed foods, *Food science & Nutrition*, 2(5), 547-556 (2014).
- [7]. A.A.A.A. Bahkeet, X.S. Zhu, Determination of Rhodamine B Pigment in Food Samples by Ionic Liquid Coated Magnetic Core/Shell $Fe_3O_4@SiO_2$ Nanoparticles Coupled with Fluorescence Spectrophotometry, *science journal of chemistry*, 5(1), 1-7 (2017).
- [8]. H. Liu, X. Lei, Y. Zhai, L. Li, Electrospun Nanofiber Membranes Containing Molecularly Imprinted Polymer (MIP) for Rhodamine B (Rh), *Advances in chemical Engineering and Science*, 2, 266-274 (2012).
- [9]. H. Men, H. Liu, Z. Zhang, J. Zhang, Y. Zhai, L. Li, Synthesis, properties and application research of atrazine $Fe_3O_4@SiO_2$ magnetic molecularly imprinted polymer, *Environmental Science and Pollution Research*, 19(6), 2271-2280 (2012).
- [10]. G.S. Xuan, Q.Y. Sun, X. Zheng, A New Molecularly Imprinted Polymer Prepared by Surface Imprinting Technique for Selective Adsorption towards Rhodamine B, *Advanced Materials Research*, 998-999, 19-22 (2014).
- [11]. Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC Official Methods of Analysis (2016).

Thông tin tác giả:

Nguyễn Minh Tú, Nguyễn Quốc Hùng

¹*Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm TPHCM.*

*Email: nmtu27@gmail.com; hungnq@case.vn