

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Cao Minh Trí

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO SẮT TỪ BIẾN TÍNH DẪN XUẤT
HEMATIN HÒA TAN ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG LÀM XÚC TÁC
GIẢ SINH HỌC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Cao Minh Trí

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO SẮT TỪ BIẾN TÍNH DẪN XUẤT
HEMATIN HÒA TAN ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG LÀM XÚC TÁC
GIẢ SINH HỌC**

**Chuyên ngành : Hóa Hữu cơ
Mã số : 8440144**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

Hướng dẫn 1 : TS. NGUYỄN TẤN TÀI

Hướng dẫn 2 : PGS.TS. TRẦN NGỌC QUYÊN

Thành phố Hồ Chí Minh – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi. Dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu nên các kết quả nghiên cứu trong luận văn này đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào được công bố. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn của tôi là trung thực, nếu sai thì tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

TP.HCM, ngày tháng năm 2022

Cao Minh Trí

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn thạc sĩ này, tôi xin chân thành bày tỏ lời cảm ơn đến Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Quý thầy cô Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng. Đặc biệt hơn, tôi xin gửi lời cảm ơn nhất đến Thầy hướng dẫn khoa học của tôi, TS. Nguyễn Tấn Tài (trường Đại học Trà Vinh), PGS.TS. Trần Ngọc Quyên (Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) - người Thầy đã định hướng, trực tiếp dẫn dắt và chỉ bảo tôi trong suốt thời gian học tập, thực hiện nghiên cứu khoa học này.

Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn đến các anh, chị, em ở phòng thí nghiệm thuộc Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ; các anh, chị, em Khu thí nghiệm tập trung của trường Đại học Trà Vinh đã giúp tôi hoàn thành tốt luận văn này.

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ	Chữ viết tắt
1	Horseradish peroxidase	HRP
2	Fe ₃ O ₄ từ tính	NP
3	polyamidoamine	PAMAM
4	polyanilin	PANi
5	Gelatin – Hematin	Ge-He
6	(3-trimethoxysilyl) propyl-ethylenediamine	TSPED
7	Gelatin – Hematin/Fe ₃ O ₄	Fe-GeHe
8	UV-Vis spectrum	UV-Vis
9	Dynamic Light Scattering	DLS
10	X-ray diffraction	XRD
11	Vibrating sample magnetometer	VSM
12	Field Emission Transmission Electron Microscope	FETEM
13	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	FTIR
14	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)	ABTS
15	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	DPPH

DANH MỤC CÁC BẢNG

STT	BẢNG	TRANG
1	Bảng 2.1 Hóa chất thí nghiệm	29
2	Bảng 3.1 Hiệu suất kháng oxy hóa của Catechin và Polycatechin	60

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

STT	HÌNH	TRANG
1	Hình 1.1 Cơ chế xúc tác của enzyme HRP với sự có mặt H ₂ O ₂ và cơ chất thơm (phenol)	4
2	Hình 1.2 Cơ chế giả định của phản ứng trùng hợp dùng xúc tác HRP	5
3	Hình 1.3 Cấu trúc của Hematin	6
4	Hình 1.4 Cơ chế tổng hợp hệ PEG – Hematin	7
5	Hình 1.5 Cơ chế tổng hợp và cấu trúc hóa học của chitosan, chitosan-SH và chitosan-g-hem	9
6	Hình 1.6 Cấu trúc Gelatin	10
7	Hình 1.7 Sơ đồ minh họa tổng hợp Gelatin –Hematin	12
8	Hình 1.8 Cấu trúc mạng tinh thể của oxide sắt	13
9	Hình 1.9 Cơ chế hình thành các hạt nano	15
10	Hình 1.10 Sơ đồ minh họa tổng hợp pyranopyrazole	17
11	Hình 1.11 Cấu trúc tổng quát của Flavonoid	18
12	Hình 1.12 Công thức cấu tạo của Rutin	19
13	Hình 1.13 Công thức cấu tạo Catechin	19
14	Hình 1.14 Sơ đồ minh họa tổng hợp dẫn xuất hòa tan hematin-polyethylene glycol	21
15	Hình 1.15 chitosan-hematin	21
16	Hình 1.16 Máy quang phổ UV-Vis	23

17	Hình 1.17 Máy đo kích thước hạt - particle size	23
18	Hình 1.18 Kính hiển vi điện tử quét SEM	24
19	Hình 1.19 Hiện tượng nhiễu xạ tia X từ hai mặt phẳng mạng tinh thể	25
20	Hình 1.20 Máy đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FTIR	26
21	Hình 3.1 Phổ FT-IR của Fe ₃ O ₄	36
22	Hình 3.2 Biểu đồ XRD của Fe ₃ O ₄	36
23	Hình 3.3 Đường cong từ hóa của Fe ₃ O ₄	37
24	Hình 3.4 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe ₃ O ₄	38
25	Hình 3.5 Phổ FT-IR của Fe ₃ O ₄ -TSPED	39
26	Hình 3.6 Biểu đồ XRD của Fe ₃ O ₄ -TSPED	40
27	Hình 3.7 Đường cong từ hóa của Fe ₃ O ₄ -TSPED	41
28	Hình 3.8 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe ₃ O ₄ - TSPED	42
29	Hình 3.9 Sự tán xạ ánh sáng động (DLS) của Fe ₃ O ₄ -TSPED	43
30	Hình 3.10 Phổ FT-IR của Ge-He và Fe-GeHe	44
31	Hình 3.11 Đường cong từ hóa của Fe-GeHe.	45
32	Hình 3.12 Đường cong từ hoá của Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ -TSPED và Fe-GeHe	45

33	Hình 3.13 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe-GeHe.	46
34	Hình 3.14 Sự tán xạ ánh sáng động (DLS) của Fe-GeHe.	47
35	Hình 3.15 Phổ hấp thụ UV-Vis của Rutin	48
36	Hình 3.16 Độ hấp thụ ở bước sóng 350 nm của Rutin theo thời gian bởi HRP	49
37	Hình 3.17 Độ hấp thụ ở bước sóng 350 nm của Rutin theo thời gian bởi Fe-GeHe	49
38	Hình 3.18 Độ hấp thụ phụ thuộc vào thời gian của quá trình oxy hóa Rutin khi có Fe-GeHe (không có H ₂ O ₂), có H ₂ O ₂ (không có Fe-GeHe) và có cả Fe-GeHe với H ₂ O ₂ ở bước sóng 350 nm.	50
39	Hình 3.19 Phổ UV-Vis của enzyme HRP	51
40	Hình 3.20 Phổ UV-Vis của xúc tác giả sinh học Fe-GeHe	52
41	Hình 3.21 Độ hấp thụ theo thời gian của HRP	53
42	Hình 3.22 Độ hấp thụ theo thời gian của Fe-GeHe	53
43	Hình 3.23 Độ hấp thụ của enzyme HRP theo nồng độ H ₂ O ₂	54
44	Hình 3.24 Độ hấp thụ xúc tác giả sinh học Fe-GeHe theo nồng độ H ₂ O ₂	55
45	Hình 3.25 Phổ HPLC-MS (a), phổ ion của hỗn hợp phản ứng (b cho dimer ở RT là 10.39 phút và c cho catechin ở RT là 11.47 phút)	56

46	Hình 3.26 Phản ứng trùng hợp catechin và các dimer catechin dự đoán.	58
47	Hình 3.27 Biểu đồ so sánh hiệu suất kháng oxy hóa của Catechin và Poly catechin	60

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	v
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1 ENZYME HRP.....	3
1.1.1 Sơ lược	3
1.1.2 Nghiên cứu về HRP.....	5
1.2 HEMATIN.....	6
1.2.1 Nguồn gốc.....	6
1.2.2 Cấu tạo và tính chất	7
1.2.3 Cơ chế xúc tác của hematin.....	8
1.2.4 Nghiên cứu về Hematin.....	8
1.3 GELATIN.....	10
1.3.1 Cấu tạo và tính chất	10
1.3.2 Nghiên cứu về Gelatin.....	12
1.4 HẠT NANO SẮT TỪ	14
1.4.1 Sơ lược	14
1.4.2 Phương pháp chế tạo.....	14
1.4.3 Ứng dụng.....	18
1.5 TỔNG QUAN VỀ HỢP CHẤT POLYPHENOL.....	19
1.6 TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU.....	21
1.7 CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VẬT LIỆU	23
1.7.1 Xác định độ hấp thụ và bước sóng cực đại của sản phẩm bằng máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis).....	23

1.7.2	Xác định kích thước hạt của sản phẩm bằng máy particles size measurement	24
1.7.3	Xác định bề mặt hình thái học của sản phẩm bằng kính hiển vi điện tử quét (TEM)	25
1.7.4	Xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phổ nhiễu xạ tia X (XRD) 25	
1.7.5	Xác định nhóm chức của sản phẩm tạo thành bằng máy quang phổ hồng ngoại FTIR.....	26
1.8	PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA	27
1.8.1	Phương pháp ABTS	27
1.8.2	Phương pháp DPPH:	28
1.9	MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU.....	28
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM		29
2.1	THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT THÍ NGHIỆM	29
2.2	TỔNG HỢP HẠT NANO TỪ Fe ₃ O ₄	30
2.3	TỔNG HỢP HẠT NANO Fe ₃ O ₄ BỌC TSPED	30
2.4	TỔNG HỢP LIÊN HỢP GELATIN-HEMATIN	31
2.5	TỔNG HỢP HỆ XÚC TÁC GELATIN-HEMATIN/Fe ₃ O ₄	31
2.6	ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ Fe-GeHe.....	31
2.6.1	Oxy hóa Rutin	31
2.6.2	Oxy hóa ABTS:.....	32
2.6.3	Ứng dụng của xúc tác giả sinh học để trùng hợp Catechin ...	33
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		35
3.1	ĐẶC TÍNH CỦA HẠT NANO Fe ₃ O ₄	35
3.1.1	Cấu trúc hóa học hạt nano.....	35
3.1.2	Cấu trúc tinh thể hạt nano.....	35
3.1.3	Đặc tính từ tính của hạt nano.....	36
3.1.4	Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano	36
3.2	ĐẶC TÍNH CỦA HẠT NANO Fe ₃ O ₄ BỌC TSPED.....	37
3.2.1	Cấu trúc hóa học hạt nano.....	37

3.2.2	Cấu trúc tinh thể hạt nano.....	37
3.2.3	Đặc tính từ tính của hạt nano.....	38
3.2.4	Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano	38
3.3	ĐẶC TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ Fe-GeHe	40
3.3.1	Cấu trúc hóa học hạt nano.....	40
3.3.2	Đặc tính từ tính của hạt nano.....	41
3.3.3	Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano	42
3.4	ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC.....	44
3.4.1	Oxy hóa Rutin.....	44
3.4.2	Oxy hóa ABTS	47
3.5	ỨNG DỤNG XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC ĐỂ TRỪNG HỢP CATECHIN	50
3.6	ĐÁNH GIÁ QUÁ TRÌNH TRỪNG HỢP BẰNG XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC	52
	CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	54
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	1
	PHỤ LỤC	1

MỞ ĐẦU

Hoseradish peroxidase (HRP) là một loại enzyme chứa heme sử dụng hydrogen peroxide (H_2O_2) để oxi hóa nhiều loại hợp chất hữu cơ và vô cơ [1]. Tuy nhiên, HRP bị mất hoạt tính khi H_2O_2 có nồng độ cao và có giá thành đắt, không tự tổng hợp được. Do đó, việc nghiên cứu tạo ra xúc tác nhằm thay thế HRP ngày càng được quan tâm.

Hematin là một hợp chất hình thành từ heme có trong máu, có cấu trúc và khả năng xúc tác tương tự như enzyme HRP trong phản ứng tạo liên kết ngang hình thành hydrogel. Tuy nhiên, hematin chỉ hòa tan trong dung dịch có pH cao, không hiệu quả trong điều kiện nước có pH từ thấp đến trung tính vì cấu trúc porphyrin trong hematin là một nhóm chức không tan trong nước. Để giải quyết vấn đề này, nhóm nghiên cứu của thầy Trần Ngọc Quyển đã tổng hợp thành công dẫn xuất Gelatin-Hematin nhằm thay thế enzyme HRP trong phản ứng tạo liên kết hydrogel. Nghiên cứu đã chứng minh được Ge-He là chất xúc tác giả sinh học mới thay thế enzyme HPR để điều chế hydrogel. Mặc dù, Ge-He đã thể hiện xuất sắc chức năng thay thế HRP nhưng vẫn chưa có báo cáo nói về việc thu hồi xúc tác, đặc biệt xúc tác có ứng dụng trong y sinh.

Nanozyme là các enzyme nhân tạo dựa trên các nano. Bằng cách mô phỏng hiệu quả các vị trí xúc tác của enzyme tự nhiên hoặc chứa các nguyên tố đa hóa trị cho các phản ứng, các nanozyme đã thành công vai trò là chất thay thế trực tiếp các enzyme tự nhiên để xúc tác. Peroxidase bao gồm một nhóm lớn các enzyme xúc tác cho quá trình oxy hóa cơ chất với sự có mặt của H_2O_2 . Trong số đó, các hạt nano Fe_3O_4 từ tính (NP) với các chức năng giống như peroxidase được nghiên cứu vào năm 2007. Người ta cũng phát hiện ra rằng khi các hạt nano sắt từ tiếp xúc với các tế bào sống, là chất mang thuốc hoặc chất tương phản thì sự hiện diện của H_2O_2 sẽ kích hoạt phản ứng xúc tác để tạo ra các gốc tự do và thậm chí các hạt nano từ tính có thể tiêu diệt 80% tế bào HeLa. Nghiên cứu cũng cho rằng khi các hạt nano từ tính được sử dụng trong cơ thể người thì thể hiện hết hoạt tính xúc tác và an toàn sinh học.

Việc kết hợp giữa hệ xúc tác Gelatin –Hematin và Fe_3O_4 là ứng dụng tiềm năng nhằm thu hồi xúc tác để sản phẩm đạt được độ tinh khiết cao hơn nhờ việc không còn lẫn xúc tác sau phản ứng, giảm giá thành và tiết kiệm vật liệu.

Từ những cơ sở khoa học trên, chúng tôi chọn đề tài “*Nghiên cứu tổng hợp nano sắt từ biến tính dẫn xuất hematin hòa tan và định hướng ứng dụng làm xúc tác giả sinh học*” để thay thế vai trò xúc tác của enzyme HRP trong phân tích sinh hóa. Hơn nữa, hệ nano sắt từ biến tính dẫn xuất hematin có thể thu hồi sau khi phản ứng để có thể ứng dụng trong các phản ứng như : tổng hợp polyaniline, polyrutin, polycatechin...

Nội dung nghiên cứu bao gồm:

1. Tổng hợp hạt nano từ Fe_3O_4 có kích thước nhỏ và ổn định từ.
2. Tổng hợp hạt nano từ Fe_3O_4 bọc TSPED.
3. Tổng hợp hạt nano từ được biến tính dẫn xuất gelatin-hematin hòa tan.
4. Đánh giá hiệu quả oxy hóa enzyme của xúc tác giả từ tính.
5. Ứng dụng của xúc tác từ tính trong phản ứng trùng hợp catechin.
6. Đánh giá quá trình trùng hợp catechin của xúc tác giả từ tính.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 ENZYME HRP

1.1.1 Sơ lược

Horseradish (*Amoracia Rusticana*) là loại thảo mộc lâu năm được trồng ở các vùng ôn đới trên thế giới chủ yếu do giá trị thực phẩm của rễ cây. Đây cũng là một nguồn giàu peroxidase, một loại enzyme có chứa heme sử dụng hydrogen peroxide (H_2O_2) để oxi hóa nhiều loại hợp chất hữu cơ và vô cơ [1]. Do bản chất oxy hóa của peroxidase, HRP được ứng dụng thực tế trong nhiều lĩnh vực: chất khử màu thuốc nhuộm, xử lý nước thải sinh học (loại bỏ chất gây ô nhiễm nhóm phenolic và amin), khử mùi hôi lợn, phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể (ELISA), xúc tác trong cảm biến sinh học và chẩn đoán, tổng hợp polymer và chất hữu cơ, ứng dụng trong điều trị ung thư và các bệnh lý [2]. Các phản ứng tạo liên kết ngang nhờ enzyme cho thấy tính tương thích sinh học và hữu ích cho việc hình thành hydrogel in situ và in vitro. Trong đó, liên kết ngang được xúc tác bởi enzyme HRP có tốc độ tạo gel nhanh, dễ xử lý và do có sẵn lượng chất nền sinh học lớn nên nó trở thành phương pháp phù hợp cho các ứng dụng y sinh như: kỹ thuật mô, y học tái sinh, vận chuyển thuốc, chữa lành vết thương cùng nhiều ứng dụng in vivo và in vitro khác. Ngoài ra, HRP còn xúc tác cho một loạt phản ứng với các chất nền và nhóm chức khác nhau [3].

Trong những năm gần đây, các phương pháp tạo liên kết ngang hình thành hydrogel xúc tác bởi enzyme trở nên phổ biến. Đặc biệt là enzyme HRP do khả năng tự điều chỉnh cao để thu được hydrogel với các đặc tính như mong muốn. Phản ứng tạo liên kết ngang xúc tác bởi HRP ngay lập tức xảy ra khi trộn các polymer giàu phenol với HRP và H_2O_2 . Dựa trên tính năng tạo gel độc đáo này, các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng các tính chất khác nhau của hydrogel như thời gian tạo gel, độ cứng, tốc độ phân hủy có thể dễ dàng thao tác bằng cách thay đổi nồng độ HRP và H_2O_2 . Các ứng dụng dùng xúc tác HRP trong việc hình thành hydrogel in situ: Các hydrogel Dex-TA, HA-g-Dex-TA, Dex-TA/Hep-TA, Dex-TA/platelet lysate, GPT/PRP, HATyr được ứng dụng trong tái tạo sụn, các hydrogel CPT/rutin, Gtn-HPA, CPT, GH, GHT ứng dụng

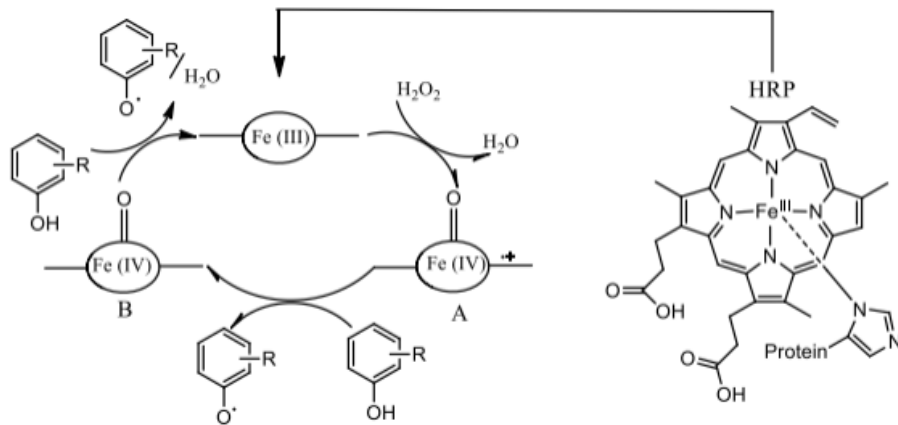
trong chữa lành vết thương, Gtn-HPA ứng dụng trong kỹ thuật mô não, GPT ứng dụng trong tái tạo cơ xương, CMC-Ph ứng dụng trong kỹ thuật mô mỡ, Tet-TA ứng dụng trong điều trị bệnh động mạch ngoại biên, HA-TA ứng dụng trong điều trị ung thư... [4].

Nhìn chung, phản ứng tạo liên kết ngang xúc tác bởi HRP là một phương pháp hữu ích để hình thành hydrogel. Tốc độ gel hóa có thể được điều chỉnh bằng nồng độ HRP để tạo thành hydrogel từ vài giây đến vài phút. Gel hóa nhanh đảm bảo hình thành gel cục bộ, phù hợp cho việc vận chuyển thuốc và chất kết dính mô. Gel hóa chậm cho phép lấp đầy các vết thương có hình dạng bất thường bằng tiền chất gel, dẫn đến sự gắn kết giữa hydrogel và mô tự nhiên. Mật độ liên kết ngang có thể được điều chỉnh bằng nồng độ H_2O_2 để tạo thành hydrogel với tính chất cơ học tương đương với các mô tự nhiên. Thay đổi mật độ liên kết ngang cũng có thể thay đổi tốc độ giải phóng của các protein. Điểm nhấn của phản ứng xúc tác bởi HRP là khả năng miễn dịch tiềm tàng của enzyme do nguồn gốc thực vật của nó. Tuy nhiên, sự an toàn của HRP cần được thiết lập trước khi phê duyệt lâm sàng các hệ hydrogel, và vẫn còn phải nghiên cứu xem liệu peroxidase của con người có thể xúc tác cho liên kết ngang của các liên hợp polymer-phenol hay không. Nếu enzyme không được giữ lại trong hydrogel thì không cần quan tâm đến sự an toàn của HRP. Để đạt được mục đích này, hydrogel không có enzyme được hình thành bằng cách trộn hỗn hợp polymer-phenol và H_2O_2 thông qua một ống tiêm có phủ hematin hoặc các hạt HRP. Những phương pháp đầy hứa hẹn này mở đường cho các ứng dụng lâm sàng của hydrogel [5].

Cơ chế xúc tác của enzyme HRP với sự có mặt H_2O_2 [1,2,4,6,7]:

Giai đoạn đầu là quá trình xúc tác có sự tương tác giữa Fe(III) của enzyme ở trạng thái nghỉ với H_2O_2 . Trong phản ứng này, một phân tử nước được giải phóng với quá trình oxy hóa tâm sắt heme thành hợp chất A. Hợp chất A có trạng thái oxy hóa cao gồm một tâm Fe(IV) oxoferryl và một gốc cation porphyrin (Por.+FeIV=O). Giai đoạn hai là bước chuyển 2 electron đơn để đưa hợp chất A về trạng thái nghỉ của enzyme. Việc khử electron đầu tiên của gốc cation porphyrin cần phải có chất nền khử (phenol hoặc dẫn xuất của

anillin) để hình thành hợp chất B (Fe(IV)=O). Việc khử electron thứ hai đưa hợp chất B về trạng thái nghỉ của enzyme.



Hình 1.1. Cơ chế xúc tác của enzyme HRP với sự có mặt H₂O₂ và cơ chất thơm (phenol)

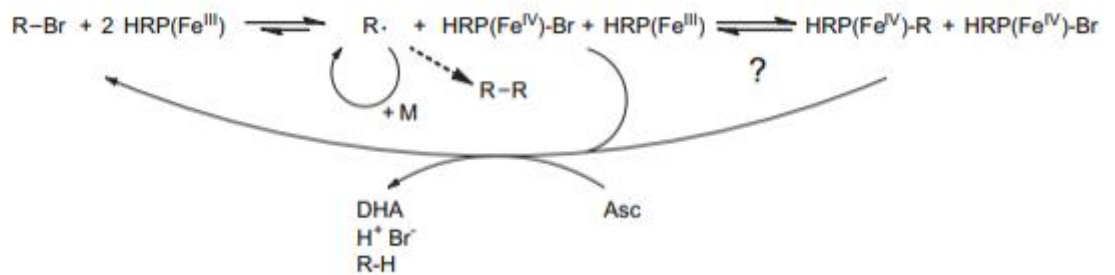
“Enzyme nhân tạo”, một thuật ngữ do Breslow đặt ra để gọi những hợp chất hóa học phỏng sinh học nhằm mục đích bắt chước các nguyên tắc chung và thiết yếu của các enzyme tự nhiên bằng cách sử dụng nhiều loại vật liệu thay thế bao gồm cả chất xúc tác không đồng nhất. Enzyme peroxidase đại diện cho một họ lớn các chất oxy hóa thường xúc tác các phản ứng sinh học với ái lực cơ chất cao và tính đặc hiệu trong các điều kiện tương đối ôn hòa, do đó cung cấp một loạt các ứng dụng thực tế trong nhiều lĩnh vực khoa học [2]. Enzyme HRP là một metalloenzyme đóng vai trò xúc tác quan trọng trong thực tế, là một nguồn giàu peroxidase, một loại enzyme có chứa heme sử dụng hydrogen peroxide (H₂O₂) để oxy hóa nhiều loại hợp chất hữu cơ và vô cơ.

1.1.2 Nghiên cứu về HRP

Năm 2007, Selene M. A.G. U. d. Souza và các cộng sự đã khảo sát về khả năng HRP trong việc khử màu thuốc nhuộm và loại bỏ độc tố từ nước thải. Trong đó, thuốc nhuộm là Remazol Turquoise Blue G 133%, Lanaset Blue 2R và nước thải từ dệt nhuộm được thu thập từ nhà xưởng ở Santa Catarina ở pH 4.0. Từ đó, kết quả thu được cho thấy rằng HRP có thể khử màu rất nhanh chỉ sau 5 phút tiếp xúc với khả năng là 59% và có thể xử lý độc tố từ nước thải một

cách dễ dàng với khả năng giảm 10% tử vong trước và sau khi sinh vật tiếp xúc với nước thải [8].

Năm 2011, Severin J. Sigg và các cộng sự đã sử dụng HRP làm xúc tác cho quá trình polymer hoá N – isopropyl – acrylamide và alkyl bromide trong điều kiện chất hoạt hoá được tái tạo bằng phản ứng trùng hợp gốc chuyển điện tử phóng xạ không có peroxide. Kết quả thu được rất khả quan khi tổng hợp thành công các polymer đã khử bromide ở chỉ số phân tử 1,44 và có trọng lượng trung bình từ 50.000 đến 200.000 gmol^{-1} . Tuy đây không phải là một kết quả cao nhưng đã mở ra một hướng mới trong việc sử dụng HRP vào polymer hoá [3].



Hình 1.2. Cơ chế giả định của phản ứng trùng hợp dùng xúc tác HRP [3].

Với những tiềm năng như thế, HRP hiện đang được nghiên cứu và sử dụng trong nhiều ứng dụng công nghiệp và y tế, chẳng hạn như xử lý nước thải, điều chế polymer, xét nghiệm enzym kết hợp, cảm biến sinh học, bộ dụng cụ chẩn đoán và xét nghiệm miễn dịch...

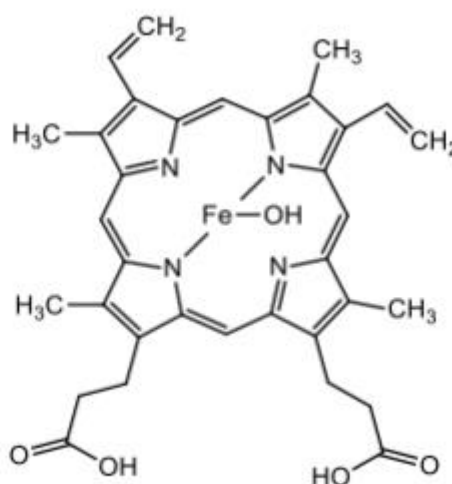
1.2 HEMATIN

1.2.1 Nguồn gốc

Hematin là sản phẩm thu được thông qua quá trình chuyển đổi từ heme trong tế bào hồng cầu từ người. Trong mỗi tế bào hồng cầu là hemoglobin, việc phân huỷ của hemoglobin nhận được sản phẩm là 4 đơn vị heme. Một đơn vị heme chứa một vòng porphyrin và một nguyên tử Fe^{2+} ở chính giữa liên kết bằng liên kết và hai liên kết phối trí. Mỗi đơn vị heme ở trạng thái tự do không ổn định, sau đó chúng nhanh chóng bị oxy hóa thành hematin [9].

1.2.2 Cấu tạo và tính chất

Nhiều nghiên cứu được thực hiện để tìm ra xúc tác có hoạt tính tương tự thay thế. Heme là một ferriprotoporphyrin không có điện tích và hematin là hydroxyferriprotoporphyrin với cấu trúc được mô tả trong Hình 1.3. Heme tự do không ổn định và nhanh chóng bị oxy hóa thành hematin. Hematin được sử dụng như một chất xúc tác thay thế đầy hứa hẹn của HRP cho quá trình trùng hợp các dẫn xuất phenol với các chất nền như p-cresol, p-hydroxyphenylacetate... Mặc dù hoạt lực của hematin không lớn bằng HRP về hàm lượng sắt đơn vị, nhưng độ hoạt động trên mỗi đơn vị trọng lượng là lớn hơn đáng kể. Hơn nữa, hematin rẻ hơn 500 lần so với HRP trên mỗi đơn vị hoạt lực peroxidase. Do đó, quá trình trùng hợp được xúc tác với hematin của các dẫn xuất phenol sẽ mang lại những lợi thế tương tự như HRP trong khi giảm chi phí chất xúc tác. Hematin ổn định hơn trong dung dịch so với HRP. Tuy nhiên, hematin chỉ hòa tan trong dung dịch có pH cao, không hiệu quả trong điều kiện nước có pH từ thấp đến trung tính vì cấu trúc porphyrin trong hematin là một nhóm chức không tan trong nước. Để giải quyết vấn đề này và nâng cao khả năng hòa tan trong nước, nhiều nghiên cứu nhằm biến tính hematin đã được thực hiện [10,11-13].



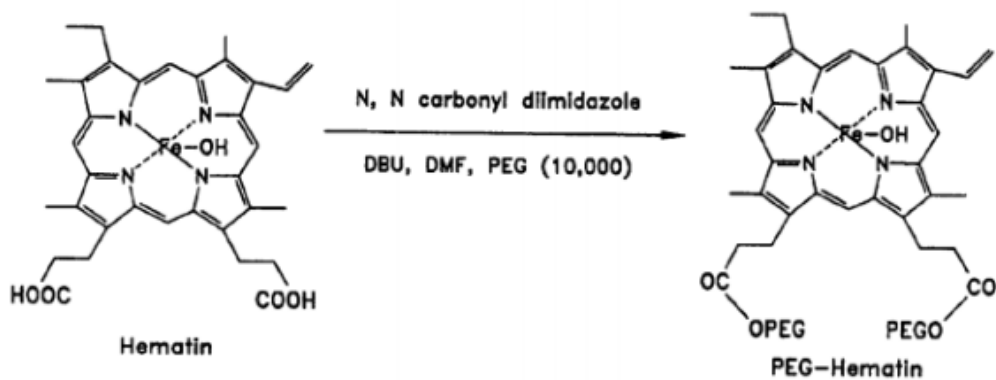
Hình 1.3 Cấu trúc của Hematin [4].

1.2.3 Cơ chế xúc tác của hematin

Cơ chế xúc tác của hematin với sự có mặt của H_2O_2 : Cơ chế xúc tác vòng của hematin cũng tương tự cơ chế xúc tác của enzyme HRP. Lõi $Fe(III)$ là tác nhân xúc tác chính với sự hiện diện của H_2O_2 . Đầu tiên, H_2O_2 oxy hóa hợp chất $Fe(III)$ thành hợp chất $Fe(IV^+)$ có khả năng oxy hóa cao nhất. Sau đó hợp chất $Fe(IV^+)$ nhận electron từ vòng polymer để trở về trạng thái nghỉ ban đầu và bắt đầu một chuỗi xúc tác mới. Polymer vòng mất 1e trở thành $R\cdot$ có khả năng kết hợp với một gốc $R\cdot$ khác tạo thành chuỗi polymer.

1.2.4 Nghiên cứu về Hematin

Năm 2008, F. Bruno và cộng sự đã tổng hợp dẫn xuất PEG – Hematin và đánh giá khả năng thay thế enzyme HRP làm xúc tác cho phản ứng tổng hợp polymer dẫn polyanilin (PANi). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng việc điều chỉnh hematin bằng PEG không ảnh hưởng đến cấu trúc heme, nồng độ trung bình của hematin trong mẫu PEGHematin khoảng 67% tính theo trọng lượng. Hoạt tính của PEG – Hematin cao khoảng 30 lần so với hematin tự nhiên ở pH 4.0. Phản ứng trùng hợp anilin bằng xúc tác PEG – Hematin chứng minh tính linh hoạt và khả năng của nó trong việc tổng hợp PANi dẫn một cách ổn định [14, 6].



Hình 1.4 Cơ chế tổng hợp hệ PEG – Hematin [6].

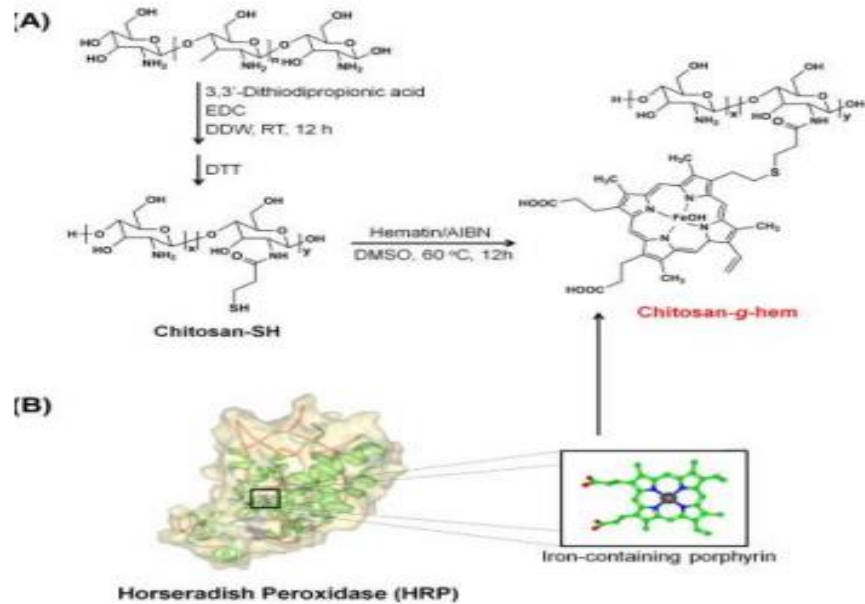
Năm 2010, Kohri và cộng sự đã điều chế polyethylene glycol-containing hematin (PEGylated hematin) bằng phản ứng Mitsunobu, sử dụng hematin và polyethylene glycol (PEG) monomethyl ether. Sau đó, họ so sánh PEGylated hematin, hematin và HRP như một chất xúc tác cho quá trình trùng hợp arbutin

trong dung dịch đệm pH 7.0. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng và nồng độ H_2O_2 đến khối lượng phân tử của polyarbutin: Mn tăng từ 2000 - 5100 trong khi độ đa phân tán vẫn giữ ở khoảng 2. Khi giảm nồng độ H_2O_2 từ 1.7-1.0 wt% thì khối lượng phân tử thu được sau 24h trùng hợp giảm. Khi sử dụng lượng H_2O_2 lớn hơn (3.3 wt%) thì chỉ thu được các polymer có khối lượng phân tử thấp hơn. Rõ ràng, dư lượng H_2O_2 đã ức chế hoạt tính của PEGylated hematin. Với hematin làm chất xúc tác, hầu hết arbutin vẫn không bị trùng hợp, chỉ thu được một lượng nhỏ oligomer với Mn khoảng 500. Mặt khác, phản ứng trùng hợp với xúc tác HRP (30 μ g), phản ứng dừng lại sau 2h và Mn của polyarbutin thu được khoảng 2000. Khi tăng lượng HRP (3 mg), Mn giảm xuống còn khoảng 1000. Có thể kết luận, sự gia tăng tỷ lệ HRP so với monomer làm giảm khối lượng phân tử. Hiện tượng này vẫn chưa được giải thích. Ngược lại, quá trình trùng hợp được xúc tác bởi PEGylated hematin vẫn tiếp tục lâu hơn và Mn đạt được khoảng 5100 sau 24h. Khi dùng lượng PEGylated hematin ít hơn thì Mn vẫn đạt được khoảng 5000, mặc dù thời gian phản ứng lên đến 3 ngày. Sau khi kết tủa, hiệu suất của polyarbutin là khoảng 80% [15].

Năm 2010, Shinji Sakai và cộng sự đã nghiên cứu và cho thấy tính khả thi khi dùng hematin làm chất xúc tác thay thế cho HRP tạo gel tại chỗ bằng polymer nhóm Phenolic Hydroxyl (Ph) ứng dụng trong vận chuyển thuốc và kỹ thuật mô. Các kết quả in vitro chứng minh rằng sự phụ thuộc của quá trình gel hóa vào nồng độ H_2O_2 khác với quá trình gel hóa của HRP nhưng có thể kiểm soát tương tự. Ngoài ra, khả năng tạo gel không gây hại cho các tế bào động vật có vú cũng được chứng minh bằng nghiên cứu trên tế bào. Kết quả in vivo phân tích các mô xung quanh gel sau khi tiêm hematin dưới da chứng tỏ không có tác dụng gây hại cụ thể nào [16].

Năm 2014, J.H. Ryu và cộng sự đã tổng hợp thành công dẫn xuất chitosan-g-hem để thay thế enzyme HRP trong điều chế hydrogel sinh học. Kết quả nghiên cứu cho thấy chitosan-g-hem có độ ổn định cấu trúc và quá trình tạo gel xảy ra hiệu quả trong môi trường có H_2O_2 nồng độ cao trong cùng điều kiện với enzyme HRP. Chitosan-g-hem cho thấy khả năng hòa tan và hoạt tính mạnh hơn so với hematin. Các hydrogel được điều chế bằng chitosan-g-hem

thể hiện độ bám dính mô tốt hơn so với hydrogel được hình thành bằng các phương pháp điều chỉnh pH thông thường [2].



Hình 1.5 Cơ chế tổng hợp và cấu trúc hóa học rõ hơn của chitosan, chitosan-SH và chitosan-g-hem [2].

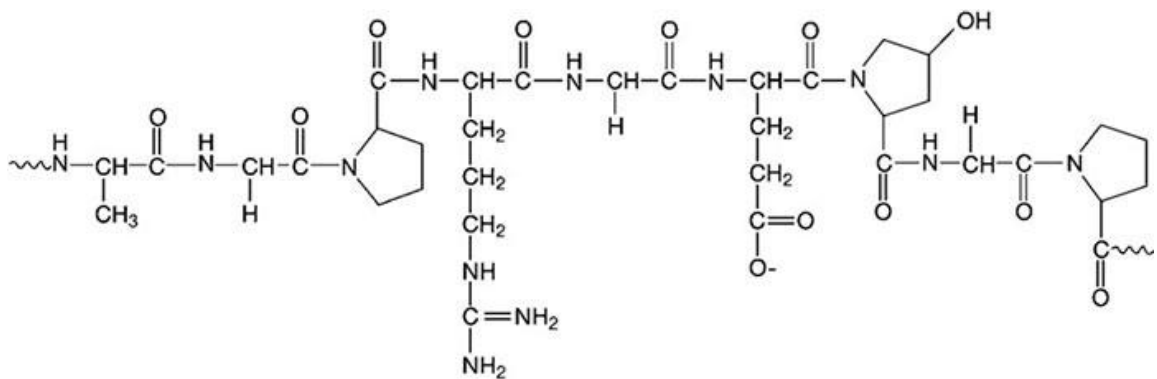
Năm 2016, Amin và cộng sự đã phát triển các hạt nano poly (lactic-coglycolic acid) (PLGA) bằng cách gắn hematin lên bề mặt nhằm nghiên cứu sự nội hóa chọn lọc của các tế bào khối u. Các tế bào ung thư cổ tử cung ở người (tế bào HeLa) được điều trị bằng các hạt nano kết hợp với hematin và dùng kính hiển vi huỳnh quang để đánh giá sự hấp thu của chúng. Nghiên cứu chứng minh vai trò của hematin trong việc hấp thu các hạt nano và việc đánh giá các đặc tính hướng đích đối với tế bào ung thư sẽ mở đường cho vật liệu nanomedicine [17].

1.3 GELATIN

1.3.1 Cấu tạo và tính chất

Gelatin thu được bằng cách biến tính nhiệt của collagen từ da, xương động vật và hiếm khi là vảy cá. Gelatin là một chuỗi amino acid gồm 3 acid amin chủ yếu là glycine, proline, hydroproline. Trong phân tử gelatin, các acid amin liên kết với nhau tạo thành chuỗi xoắn ốc có khả năng giữ nước. Gelatin chứa các cấu trúc xoắn proline mở rộng bên trái kết hợp với 300 đến 4000

amino acid. Sự hiện diện của hàm lượng pyrrolidine cao hơn trong gelatin dẫn đến sự hình thành gel mạnh hơn. Độ bền của màng gelatin do sự hiện diện của các chuỗi xoắn ba. Hàm lượng xoắn ba càng lớn, độ bền của màng càng cao và tính chất trương nở trong nước càng thấp. Các đặc tính tạo gel của gelatin có thể bị thay đổi bằng cách đưa vào các liên kết ngang hóa học bằng cách sử dụng transglutaminase để liên kết lysine với glutamine dư hoặc glutaraldehyde để liên kết lysine với lysine [18]. Gelatin là một vật liệu phân hủy sinh học đã được sử dụng rộng rãi cho các mục đích dược phẩm và y tế và được chứng minh là an toàn sinh học trong suốt lịch sử lâu dài của các ứng dụng lâm sàng [19].



Hình 1.6 Cấu trúc gelatin.

Gelatin là đại phân tử được đánh giá hàng đầu cho việc chế tạo các vật liệu sinh học khác nhau. Các hoạt tính sinh học của nó hỗ trợ sự kết dính của tế bào và tương tác với các phân tử báo hiệu được kỳ vọng để ứng dụng trong mang tế bào và tái tạo mô. Các tính năng hóa lý của nó, đặc biệt là mật độ liên kết ngang có thể điều chỉnh, động học suy thoái và tính chất gel giúp gelatin có tính linh hoạt cao cho việc thiết kế các phương tiện vận chuyển thuốc. Biến tính hóa học gelatin cho phép tăng cường ổn định thuốc và hiệu quả gắn thuốc cao hơn. Ngoài các ứng dụng riêng, gelatin cũng đã được kết hợp thành công trong nhiều vật liệu tổng hợp tái tạo như kỹ thuật mô, cơ xương. Việc sử dụng kết hợp gelatin với các vật liệu sinh học khác giúp cho việc phân hủy vật liệu và giải phóng thuốc có kiểm soát linh hoạt hơn, đồng thời duy trì và tăng cường các tính chất của vật liệu khối (điển hình là ceramics và polymer). Nhìn chung, việc biến tính hóa học gelatin hay sự kết hợp của gelatin với các vật liệu sinh

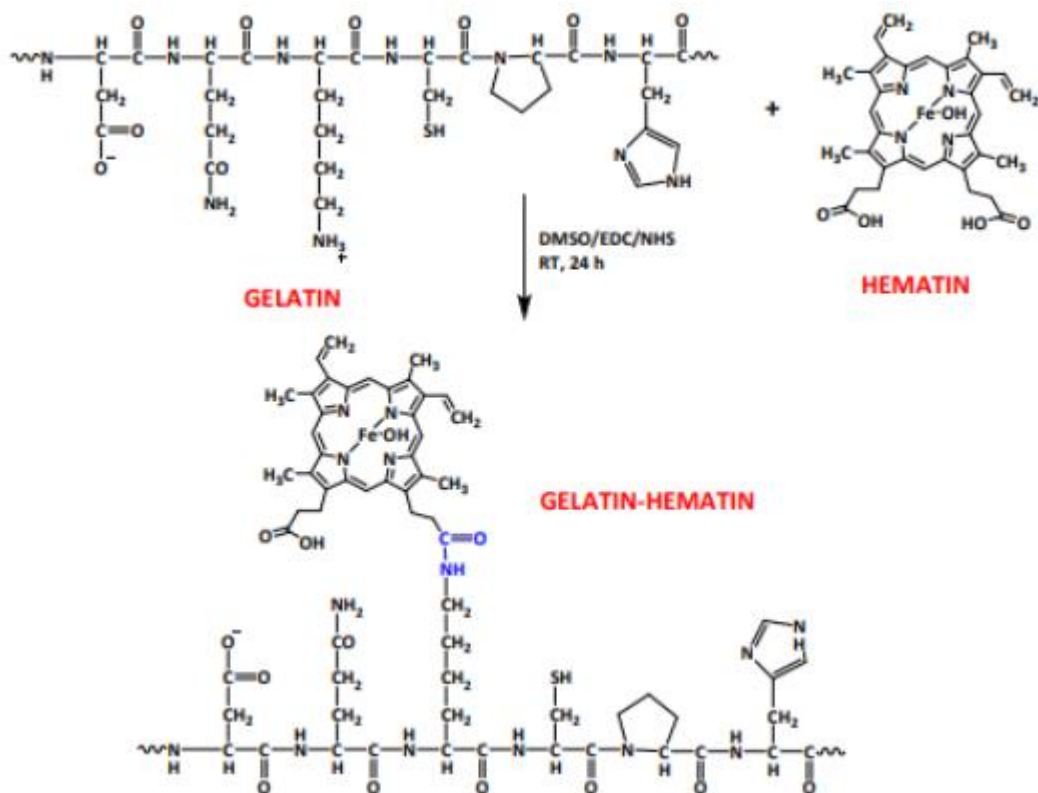
học khác cho thấy tiềm năng của nó trong các lĩnh vực vận chuyển thuốc và kỹ thuật mô [7].

1.3.2 Nghiên cứu về Gelatin

Li và cộng sự đã tổng hợp dẫn xuất gelatin dạng tiêm có khả năng kiểm soát sự phân phối của các yếu tố tăng trưởng và hình thành mạch. Gelatin được chọn làm vật liệu sinh học với số lượng lớn vì gelatin là sản phẩm của quá trình thủy phân một phần collagen và được sử dụng rộng rãi như một phương tiện phân phối thuốc do khả năng phân hủy sinh học và tính tương hợp sinh học tuyệt vời của nó. Trái ngược với collagen, gelatin là một polymer sinh học nhân tạo và như một vật liệu làm scaffold, nên không phải lo ngại về tính sinh miễn dịch và sự lây truyền mầm bệnh liên quan đến collagen. Hơn nữa, độ bền cơ học của hệ gelatin có thể được điều chỉnh dễ dàng bằng mật độ liên kết ngang. Một số phương pháp khác để điều chế gel gelatin như liên kết ngang bằng ánh sáng, hóa học hoặc enzyme. Trong đó, liên kết ngang bằng enzyme là phổ biến vì điều kiện phản ứng đơn giản. Tuy nhiên, tương tự như các hydrogel khác, việc giải phóng các yếu tố tăng trưởng từ gel gelatin nguyên chất là một quá trình khuếch tán thụ động, và do đó, khả năng phân phối các yếu tố tăng trưởng được kiểm soát bị hạn chế. Để giải quyết vấn đề này, Li và cộng sự đã phát triển một phương pháp mới để kết hợp cả heparin và tyramine vào các chuỗi gelatin. Heparin được kết hợp với gelatin vì heparin có các vùng liên kết với nhiều yếu tố tăng trưởng, đặc biệt với VEGF-một glycoprotein liên kết với heparin. Sự liên kết của VEGF với heparin làm ổn định các yếu tố tăng trưởng, bảo vệ chúng khỏi sự biến tính và phân hủy protein, và sau đó kéo dài thời gian giải phóng bền vững của chúng. Tyramine được gắn lên chuỗi gelatin để tăng thêm các liên kết ngang sau khi tiêm. Khi dung dịch có nguồn gốc từ gelatin này được trộn với hydrogen peroxide (H_2O_2) và horseradish peroxidase (HRP), một phản ứng xúc tác enzyme sẽ diễn ra và tạo thành hydrogel có thể tiêm được. Dẫn xuất gelatin này được đánh giá thông qua quá trình tạo gel và các tính chất cơ học của nó. Họ cũng đã kiểm tra động học giải phóng và hoạt tính sinh học của VEGF được giải phóng từ gel. Cuối cùng, một thử nghiệm màng đệm của

phôi gà và các thí nghiệm trên động vật được thực hiện để kiểm tra hiệu lực của dẫn xuất gelatin -VEGF tiêm này đối với sự hình thành mạch in vivo [20].

Năm 2021, Trần Ngọc Quyển và cộng sự đã tổng hợp hệ dẫn xuất Gelatin – Hematin làm chất xúc tác trong điều chế hydrogel sinh học. Kết quả nhận được cho thấy với 10 mM H₂O₂, thời gian tạo gel của Gelatin–Tyramine do Gelatin – Hematin xúc tác tương tự như enzyme HRP. Hình thái của cả Ge–Tyr hydrogel đều giống nhau với cấu trúc đồng nhất. Ngoài ra, khả năng tồn tại của fibroblast là hơn 80% trong môi trường nuôi cấy chứa 100% Ge – Tyr hydrogel chiết xuất được xúc tác bởi Ge-He, do đó chỉ ra rõ ràng rằng không có thành phần gây độc tố. Dựa trên những nghiên cứu này, Ge – He có thể là một chất xúc tác sinh học mới thay thế enzyme HRP để điều chế hydrogel có thể tiêm bằng enzyme và cho các ứng dụng y sinh [1].



Hình 1.7 Sơ đồ minh họa tổng hợp Gelatin – Hematin [1].

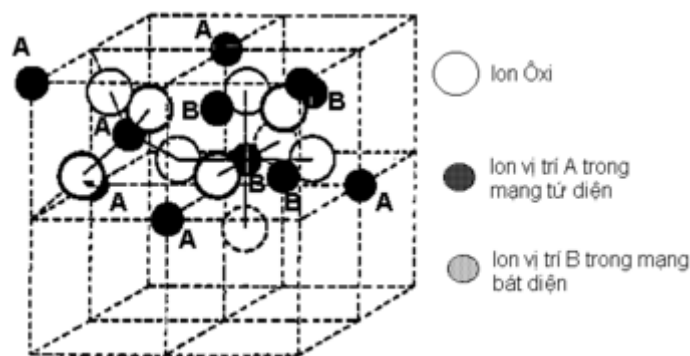
Mặc dù những vật liệu trên đã thực hiện xuất sắc chức năng xúc tác của mình, nhưng vẫn chưa thấy báo cáo về việc thu hồi xúc tác. Do đó, trong nghiên cứu này, với việc tiếp nối những kết quả của nhóm nghiên cứu trước, chúng tôi

chọn Gelatin – Hematin làm chất nền để phát triển khả năng thu hồi nhằm hoàn thiện hơn chức năng xúc tác của vật liệu.

1.4 HẠT NANO SẮT TỪ

1.4.1 Sơ lược

Nano sắt từ có công thức hóa học là Fe_3O_4 hoặc $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$. Oxide sắt từ nằm trong nhóm ferrite có cấu trúc spinel đảo và công thức hóa học được viết lại thành $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4^{2-}$, trong đó ion Fe^{2+} và một nửa số ion Fe^{3+} chiếm vị trí lỗ trống bát diện, một nửa số ion Fe^{3+} còn lại chiếm vị trí lỗ trống tứ diện.



Hình 1.8 Cấu trúc mạng tinh thể của oxide sắt từ [21].

Khi oxide sắt từ khi đạt đến kích thước nano xuất hiện một số sự thay đổi tính chất, đặc biệt là tính chất từ. Oxide sắt từ lúc này được xem là vật liệu siêu thuận từ, nhưng chúng lại nhạy với từ trường hơn và có từ độ lớn như của chất sắt từ. Do đó, khi áp từ trường, vật liệu xuất hiện từ tính và đáp ứng lại từ trường ngoài, nhưng khi ngừng áp từ trường thì vật liệu không còn từ tính nữa. Đây là một đặc điểm rất quan trọng khi ứng dụng vật liệu siêu thuận từ trong y sinh học.

1.4.2 Phương pháp chế tạo

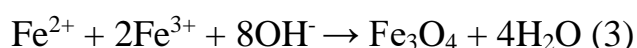
Vật liệu khối được nghiền nhỏ đến kích thước nano (top-down): Đây là phương pháp khá đơn giản và dựa trên nguyên tắc loại bỏ một phần hoặc chia nhỏ vật liệu khối. Phương pháp tiếp cận này thường được sử dụng trong ngành công nghiệp điện tử, chúng bao gồm hàng loạt công nghệ như lắng đọng pha hơi hóa học, lắng đọng pha hơi vật lý, khắc (quang khắc, khắc sử dụng chùm

điện tử, tia X), ăn mòn ướt và ăn mòn plasma... mục đích chính là tạo ra cấu trúc chức năng ở kích cỡ micro hoặc nano.

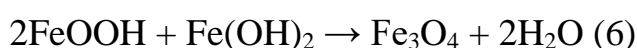
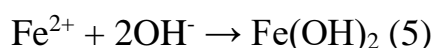
Hình thành hạt nano từ các nguyên tử (bottom-up): Phương pháp tiếp cận từ dưới lên liên quan đến việc tạo ra cấu trúc ở cấp độ nano thông qua sắp xếp nguyên tử. Quá trình này diễn ra một cách tự phát, trong đó các nguyên tử, phân tử được lắp ghép thành một cấu trúc ổn định và cân bằng nhiệt động. Sản phẩm cuối cùng được tạo ra thông qua quá trình lắp ghép này thường có năng lượng nhỏ, ít khuyết tật. Dựa vào bản chất của quá trình điều chế, người ta có thể phân loại quá trình tổng hợp nano thành phương pháp vật lý, phương pháp hóa học, sinh học và tự lắp ghép. Mỗi phương pháp đều có những ưu và nhược điểm riêng, dưới đây chỉ trình bày một số phương pháp phổ biến.

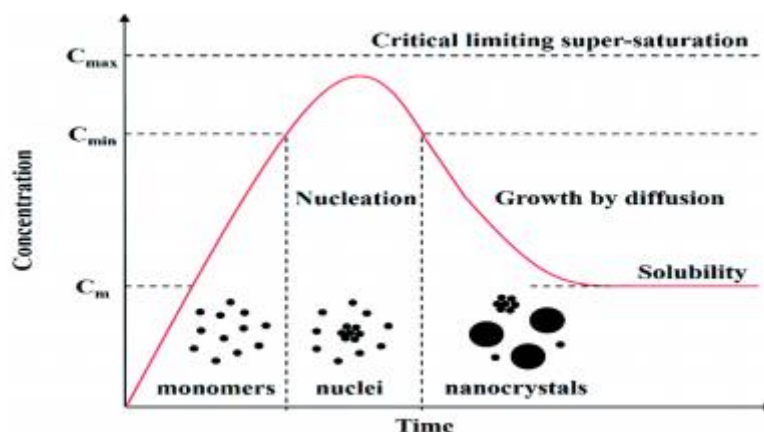
Phương pháp đồng kết tủa và phương trình phản ứng hình thành Fe_3O_4

Phương pháp kết tủa từ dung dịch: khi nồng độ của chất đạt đến một trạng thái bão hòa tới hạn, trong dung dịch sẽ bắt đầu xuất hiện những mầm kết tủa. Các mầm kết tủa đó sẽ khuếch tán của vật chất từ dung dịch lên bề mặt của các mầm cho đến khi mầm trở thành hạt nano. Để thu được hạt có độ đồng nhất cao, người ta cần phân tách hai giai đoạn hình thành mầm và phát triển mầm. Trong quá trình phát triển mầm, cần hạn chế sự hình thành của những mầm mới. Phương pháp đồng kết tủa được xem là phương pháp hóa học đơn giản nhất để tổng hợp các hạt nano oxit sắt. Phản ứng của phương pháp:



Phản ứng không xảy ra một cách trực tiếp mà được hình thành thông qua các giai đoạn:



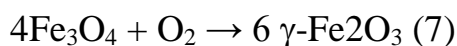
Cơ chế hình thành hạt nano Fe₃O₄

Hình 1.9 Cơ chế hình thành các hạt nano.

Khi nồng độ các phân tử của các chất được tạo thành đạt đến trạng thái bão hòa tới hạn, trong dung dịch sẽ xuất hiện các mầm kết tụ. Các mầm kết tụ đó sẽ phát triển thông qua quá trình khuếch tán các phân tử chất được tạo thành từ dung dịch lên bề mặt của các mầm cho đến khi hình thành nên các hạt nano. Đây là cơ chế hình thành hạt nano được thể hiện trên Hình 1.9.

Quá trình hình thành hạt nano thông qua hai giai đoạn: hình thành mầm và phát triển mầm. Quá trình hình thành mầm: Sự tăng nồng độ của phân tử đến gần nồng độ bão hòa tới hạn (C_{max}), khi đó trong dung dịch sẽ xuất hiện các mầm. Quá trình phát triển mầm thành các hạt nano: Trong quá trình này, nồng độ dung dịch giảm do một lượng phân tử đã chuyển thành các hạt nano.

Theo phương trình (3) để hình thành Fe₃O₄ thì tỷ lệ mol hợp lý giữa Fe²⁺ và Fe³⁺ là 1:2 và được thực hiện trong môi trường bazơ (pH từ 8 đến 14). Do Fe₃O₄ rất dễ bị oxi hóa, nên trong suốt quá trình tổng hợp hạt nano Fe₃O₄, khí Nito được đưa vào hệ thống để ngăn ngừa tạo thành γ -Fe₂O₃.



Ưu điểm lớn nhất của phương pháp đồng kết tủa này ở chỗ dễ thực hiện, lượng hóa chất sử dụng ít và sản phẩm hạt nano thu được cho là khá cao.

Kích thước và hình dạng của các hạt nano sắt từ có thể được điều chỉnh thông qua việc thay đổi các thông số sau như độ pH, nồng độ các ion trong dung dịch, nhiệt độ, tỷ số nồng độ của $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

Bao phủ bề mặt hạt nano bởi chất silane

Các hạt nano sau khi được tổng hợp chúng có xu hướng kết tụ lại với nhau thành từng đám, điều này dẫn đến hạt nano kém ổn định và phân tán không tốt trong dung môi. Hầu hết các ứng dụng của các hạt nano đều đòi hỏi độ ổn định trong thời gian dài và với ứng dụng trong y sinh còn đòi hỏi thêm yếu tố không độc trong khoảng thời gian ấy. Do vậy, người ta thường dùng phương pháp bao bọc hạt nano bởi chất hoạt hóa bề mặt, phương pháp tuy phức tạp nhưng có nhiều ứng dụng hơn, đặc biệt là ứng dụng quan trọng nhất trong y sinh.

Sự thay đổi bề mặt hạt nano bằng cách hấp thụ chất silane là một trong những phương pháp hiệu quả để làm tăng độ ổn định của hạt nano trong các dung môi khác nhau.

Sự hình thành liên kết giữa chất silane với hạt nano

Chất (3-trimethoxysilyl) propyl-ethylenediamine (TSPED) được dùng để bao bọc bề mặt hạt nano Fe_3O_4 . Bề mặt của các hạt nano khi chưa được xử lý chỉ được phủ bởi các nhóm $-\text{OH}$. Sau khi được xử lý, bề mặt hạt được phủ bởi các phân tử TSPED chứa nhóm NH_2 . Phản ứng silane hóa bề mặt hạt nano Fe_3O_4 bằng TSPED diễn ra theo 3 giai đoạn:

- Giai đoạn 1 (quá trình thủy phân): Nhóm alkoxide ($-\text{OC}_2\text{H}_5$) được thay thế bằng nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) để hình thành nhóm hoạt động silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) trên phân tử TSPED.

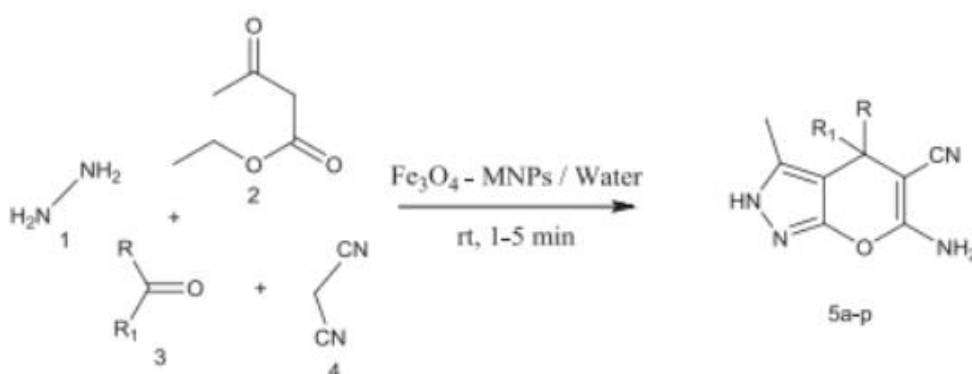
- Giai đoạn 2 (quá trình ngưng tụ): Nhóm silanol này sẽ liên kết với silanol khác và hình thành liên kết siloxane ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) thông qua phản ứng khử nước.

- Giai đoạn 3 (quá trình hình thành liên kết): Các nhóm OH trên hạt nano liên kết cộng hóa trị với các nhóm OH trên chất silane.

1.4.3 Ứng dụng

Năm 2010, Hong-Yan Lü và cộng sự đã sử dụng hạt nano oxide sắt từ Fe_3O_4 là chất xúc tác để tạo phản ứng giữa các hợp chất 1,2 – diamine và 1,2 – dicarbonyl trong dung môi nước nhằm tổng hợp các dẫn xuất quinoxaline với năng suất cao. Chất xúc tác là oxide sắt từ Fe_3O_4 có thể được thu hồi bằng cách sử dụng nam châm bên ngoài và được tái sử dụng trong năm chu kỳ với hoạt tính gần như ổn định. Kết quả thu nhận cho thấy rằng Fe_3O_4 có hoạt tính xúc tác rất tốt với kết quả đạt từ 80% cho đến 96% ở lần lượt 1, 5, 10, 20 mol trong dung môi nước. Phương pháp này mang lại ưu điểm nổi bật là quy trình sản xuất đơn giản, điều kiện phản ứng nhẹ, sản lượng năng suất cao, sử dụng dung môi lành tính, dễ dàng phân tách và tái sử dụng lại chất xúc tác [22].

Năm 2014, Mahmoud. Abd El Aleem. Ali. Ali. El-Remaily nghiên cứu về khả năng sử dụng nano oxide sắt từ Fe_3O_4 để tổng hợp các pyranopyrazole thông qua chuỗi các phản ứng từ hỗn hợp hydrazine hydrate, ethyl acetoacetate, aldehydes/ketones và malononitrile trong nước ở nhiệt độ phòng. Kết quả ghi nhận được rằng Fe_3O_4 đạt hiệu suất tổng hợp ở mức 88 – 97% và Fe_3O_4 có thể tái sử dụng 14 lần mà không làm giảm hoạt tính đáng kể. Phương pháp này cung cấp các ưu điểm đáp ứng các nguyên tắc hoá học xanh, thời gian phản ứng ngắn, năng suất cao, dễ dàng tinh chế và tách kinh tế từ chất xúc tác [23].



Hình 1.10 Sơ đồ minh họa tổng hợp pyranopyrazole [23].

Một vài nghiên cứu gần đây cho thấy hạt nano oxide sắt từ Fe_3O_4 là chất xúc tác cho một số phản ứng oxy hóa tương tự như enzyme HRP [24]. Nano

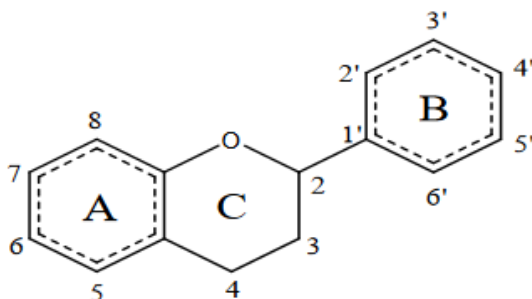
oxide sắt từ Fe_3O_4 có tính chất của một oxidase nên được dùng để thay thế enzyme HRP để phát hiện H_2O_2 cũng là ứng dụng để phân hủy hợp chất Phenol và Anilin [25].

Qua những nghiên cứu trên cho thấy rằng, các hạt nano oxide sắt từ Fe_3O_4 có khả năng đáp ứng những yêu cầu về khả năng tạo sản phẩm năng suất cao, giá thành rẻ, dễ tinh chế, thu hồi và tái sử dụng dễ dàng nhờ vào từ tính, đồng thời không mang độc tố và tương thích sinh học cao với cơ thể con người. Chính vì thế, việc tổng hợp nên hệ xúc tác giả từ tính Gelatin – Hematin/ Fe_3O_4 thay thế cho HRP là hướng phát triển tiềm năng trong tương lai.

1.5 TỔNG QUAN VỀ HỢP CHẤT POLYPHENOL

Polyphenol là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên và được chứng minh là có khả năng kháng oxy hóa vô cùng hiệu quả. Polyphenol có thể bảo vệ cơ thể, giúp cơ thể chống lại nhiều loại bệnh khác nhau do các gốc tự do gây ra. Đặc điểm chung của chúng là trong phân tử có vòng thơm (vòng benzen) chứa một hay hai, ba... hoặc nhiều nhóm hydroxyl (OH) gắn trực tiếp vào vòng benzen. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí của các nhóm OH với bộ khung hóa học mà các tính chất lý hoá học hoặc hoạt tính sinh học của các polyphenol thay đổi.

Hợp chất polyphenol (Flavonoid): Những hợp chất thuộc họ flavonoid có số lượng rất lớn và được nghiên cứu nhiều nhất trong các hợp chất polyphenol. Cho đến nay đã có hơn 8000 hợp chất thuộc họ flavonoid đã được phát hiện. Chúng có bộ khung hóa học $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6'$.



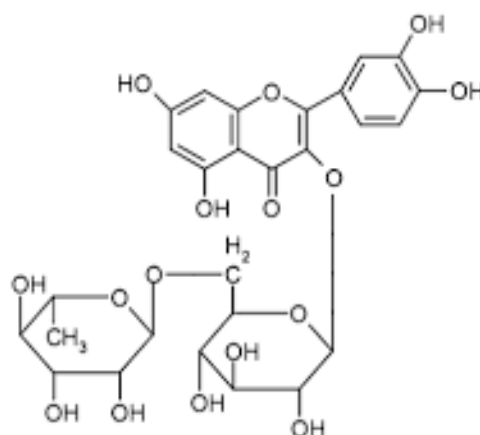
Hình 1.11 Cấu trúc tổng quát của Flavonoid

Dựa vào bản chất của cấu trúc cơ bản, flavonoid được phân chia thành nhiều phân lớp khác nhau, ví dụ: (i) Vòng dị tố (đóng và mở), (ii) sự có hoặc

không có liên kết đôi C2=C3 và nhóm carbonyl ở C4 và (iii) vị trí của vòng B (ở vị trí C2 hoặc C3). Hầu hết các flavonoid đều có nhóm thế OH ở vị trí C5 và C7 còn vòng B thường có nhóm thế ở vị trí C3' và C4'.

Tác dụng sinh học của nhóm Flavonoid: một trong những cơ chế sinh học quan trọng nhất của Flavonoid là hoạt tính sinh học có tác dụng chống oxy hóa, có thể triệt tiêu các gốc tự do có hại cho quá trình sinh lý bệnh lý, giúp cơ thể động vật và người phòng bệnh [26].

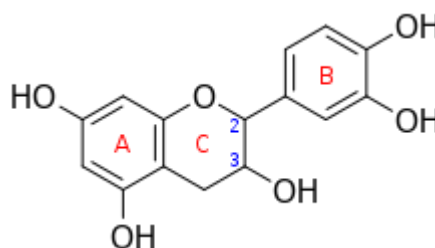
❖ Rutin: là một glucozit thuộc nhóm Flavonoid mà phần agycon là quercetin và phần đường là rutinose. Có công thức phân tử là $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$



Hình 1.12 Công thức cấu tạo của Rutin

Rutin kết tinh có dạng bột màu vàng hơi xanh lục, không mùi, không vị. Khó tan trong nước lạnh, cồn lạnh, chỉ tan trong nước sôi và cồn nóng. Rutin có nhiều ứng dụng trong y học như phòng chống biến cố xơ vữa động mạch, có tác dụng bảo vệ dạ dày bằng cách ức chế Peroxit hóa lipid và tăng hoạt tính chống oxy hóa trong tổn thương dạ dày do ethanol.

❖ Catechin: là flavan-3-ol, một phenol tự nhiên thuộc nhóm Flavonoid. Có công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_6$



Hình 1.13 Công thức cấu tạo Catechin

Catechin là hợp chất không màu, tan trong nước. Catechin là một chất chống oxy hóa mạnh, có khả năng ức chế phản ứng của gốc tự do. Catechin sở hữu hai vòng benzen (gọi là vòng A và B) và vòng dị vòng dihydropyran (vòng C) với nhóm hydroxyl trên carbon 3. Công thức cấu tạo của catechin với nhiều nhóm hydroxyl đảm bảo khả năng kháng oxy hóa mạnh của nhóm hợp chất catechin [27].

1.6 TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

Như đề cập trên Enzyme HRP là một metalloenzyme đóng vai trò xúc tác quan trọng trong thực tế mặc dù vậy nhiều khuyết điểm của nó cũng được chỉ ra. Do đó, nhiều nghiên cứu đã giải quyết vấn đề trên.

Tình hình nghiên cứu trên thế giới:

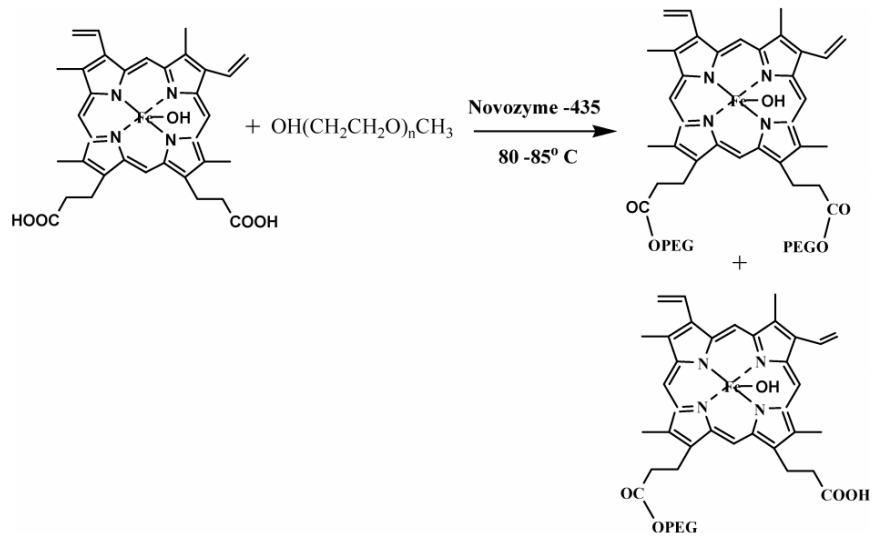
Năm 2007, Carlos Regalado và cộng sự hay nhóm nghiên cứu của Debnath đã đề xuất sử dụng nhiều loại chất hoạt động bề mặt để cải thiện khả năng hòa tan trong nước hoặc phân tán enzyme trong dung môi hữu cơ [5, 8].

Nhóm nghiên cứu của Morawsky cũng giới thiệu phương pháp gây đột biến sinh học của HRP bằng vi sinh vật *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*, kết quả cho thấy enzyme HRP đột biến bền hơn với H_2O_2 cũng như ổn định được hoạt tính đến $70^\circ C$ [16].

Năm 2011, Zakharova và cộng sự đã giới thiệu nhiều phương pháp biến tính hóa học vòng porphyrin hoặc phần protein trong enzyme HRP để tăng độ bền và hoạt tính. Tuy nhiên kết quả thu được không được cải thiện đáng kể dù thực hiện nhiều phương pháp biến tính khác nhau [24].

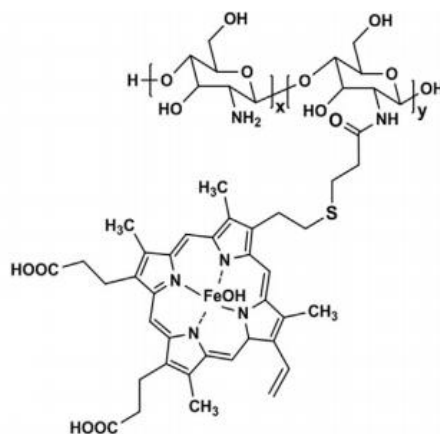
Bên cạnh các giải pháp để nâng hiệu quả ứng dụng của enzyme HRP, hướng nghiên cứu tổng hợp các xúc tác giả sinh học trên cơ sở hematin cũng giành được nhiều sự quan tâm. Năm 2014, Nagarazan và cộng sự đã tổng hợp dẫn xuất hòa tan hematin-polyethylene glycol và đánh giá khả năng thay thế vai trò của enzyme HRP làm xúc tác cho phản ứng tổng hợp polymer dẫn polyanilin. Kết quả cho thấy hematin-polyethylene glycol xúc tác cho phản ứng

trên tuy nhiên nghiên cứu không thấy kết quả so sánh với hoạt tính của enzyme HRP [1].



Hình 1.14 Sơ đồ minh họa tổng hợp dẫn xuất hòa tan hematin-polyethylene glycol

Cùng xu hướng nghiên cứu trên, năm 2014 Ryu và cộng sự cũng tổng hợp dẫn xuất chitosan-hematin để thay thế enzyme HRP trong tổng hợp hydrogel sinh học. Kết quả nghiên cứu cho thấy chitosan-hematin có độ ổn định cấu trúc và hoạt tính trong môi trường có H_2O_2 nồng độ cao trong cùng điều kiện với HRP. Tuy nhiên trong nghiên cứu không thấy các tác giả đề cập đến hoạt tính so sánh với HRP khi ở môi trường có H_2O_2 nồng độ thấp hay rất thấp như trong các phản ứng điều chế *in situ* các gel sinh học [2].



Hình 1.15 chitosan-hematin

Rafael và cộng sự (*Journal of The Electrochemical Society* 2016) đã nghiên cứu biến tính hematin trên điện cực carbon và đánh giá biểu hiện điện

hóa của bề mặt điện cực biến tính nhằm định hướng ứng dụng thay thế enzyme peroxidase trong chế tạo cảm biến [25].

Năm 2016, Kunkun và cộng sự biến tính carbon nano tube với hematin và ứng dụng làm xúc tác cho phản ứng oxi hóa aniline trong nước thải [3].

Trên cơ sở điện cực biến tính hematin, nghiên cứu của Rafael năm 2017 đã chế tạo cảm biến phát hiện H_2O_2 ở nồng độ rất thấp-nanomol [25].

Năm 2018, Erica Pinchon và cộng sự cũng biến tính hematin trên điện cực carbon nanotube đa lớp. Điện cực biến tính đã tăng độ chuyển electron cho quá trình oxi hóa cũng như tăng mật độ dòng của điện cực [4].

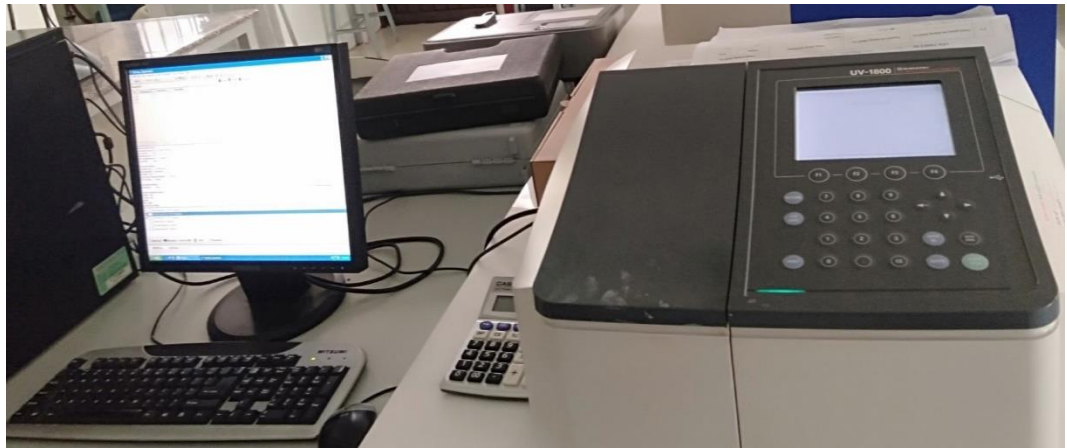
Tình hình nghiên cứu trong nước:

Với tình hình nghiên cứu trong nước hiện nay chưa có các công bố liên quan đến biến tính và ứng dụng dẫn xuất của hematin. Theo tìm hiểu của chúng tôi hiện chỉ có 1 nghiên cứu về phân lập enzyme HRP trong củ cải sau đó sử dụng xác định hàm lượng thủy ngân trong nước thải và một nghiên cứu sử dụng enzyme HRP biến tính lên hạt nano vàng định hướng chế tạo cảm biến trong xét nghiệm năm 2016 [6, 14].

1.7 CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VẬT LIỆU

1.7.1 Xác định độ hấp thụ và bước sóng cực đại của sản phẩm bằng máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis)

Máy quang phổ UV-Vis là một thiết bị dùng để định tính và phân tích định lượng. Máy quang phổ UV-Vis vận hành trên cơ sở đo độ hấp thụ ánh sáng đặc trưng cũng như độ truyền quang ở các bước sóng khác nhau, nhờ đó kết quả thu được nhanh và chính xác.

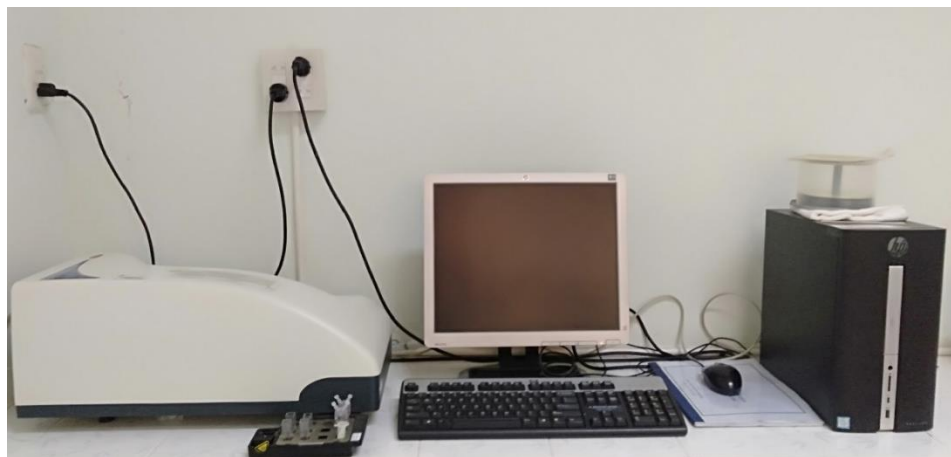


Hình 1.16 Máy quang phổ UV-Vis

1.7.2 Xác định kích thước hạt của sản phẩm bằng máy particles size measurement

Máy đo kích thước hạt được thực hiện phép đo thông qua sự tán xạ ánh sáng của các hạt.

Máy đo kích thước hạt có khả năng đo hạt từ 1nm - 6 μ m. Đo được sự phân bố kích thước hạt của những vật liệu như: bột, nhũ tương, huyền phù, bao gồm cả nền mẫu như đất, cát...



Hình 1.17 Máy đo kích thước hạt - particle size

1.7.3 Xác định bề mặt hình thái học của sản phẩm bằng kính hiển vi điện tử quét (TEM)

Là một thiết bị nghiên cứu vi cấu trúc vật rắn, sử dụng chùm điện tử có năng lượng cao chiếu xuyên qua mẫu vật rắn mỏng và sử dụng các thấu kính từ để tạo ảnh với độ phóng đại lớn (có thể tới hàng triệu lần), ảnh có thể tạo ra trên màn huỳnh quang, hay trên film quang học, hay ghi nhận bằng các máy chụp kỹ thuật số. Được sử dụng hầu hết những nghiên cứu về hình thái, siêu cấu trúc vi sinh vật, các đặc tính hóa miễn dịch tế bào cũng như những vật liệu có kích thước nano. Trong bài này kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được dùng để xác định bề mặt hình thái học của Fe_3O_4 .



Hình 1.18 Kính hiển vi điện tử truyền qua TEM

1.7.4 Xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phổ nhiễu xạ tia X (XRD)

Nhiễu xạ tia X là thiết bị dùng để nghiên cứu, xác định pha cấu trúc tinh thể của vật liệu. XRD là một trong những phương pháp quan trọng nhất được sử dụng trong nghiên cứu hóa học của chất rắn và khoa học vật liệu.

Nguyên lý hoạt động của phương pháp dựa trên hiện tượng nhiễu xạ tia X. Khi chiếu chùm tia X vào vật liệu kết tinh, nó sẽ bị phản xạ bởi các mặt phẳng tinh thể. Họ mặt phẳng tinh thể nào có giá trị d thỏa mãn điều kiện phản xạ theo định luật Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

trong đó: n – bậc nhiễu xạ (n là số nguyên)

λ – bước sóng của tia X

d – khoảng cách giữa hai mặt phẳng tinh thể lân cận

θ – góc giữa tia tới và mặt phẳng phản xạ sẽ cho một cực đại nhiễu xạ tại vị trí góc θ tương ứng trên giản đồ nhiễu xạ.

Đối với mỗi loại vật liệu kết tinh, giản đồ nhiễu xạ tia X là duy nhất và được đặc trưng bởi một bộ vạch nhiễu xạ. Từ giản đồ nhiễu xạ tia X, ta có thể thu được các thông tin về cấu trúc, thành phần pha, thành phần hóa học của mẫu, xác định được chính xác hằng số mạng tinh thể. Ngoài ra, ta cũng xác định được kích thước hạt trung bình từ công thức gần đúng Scherrer:

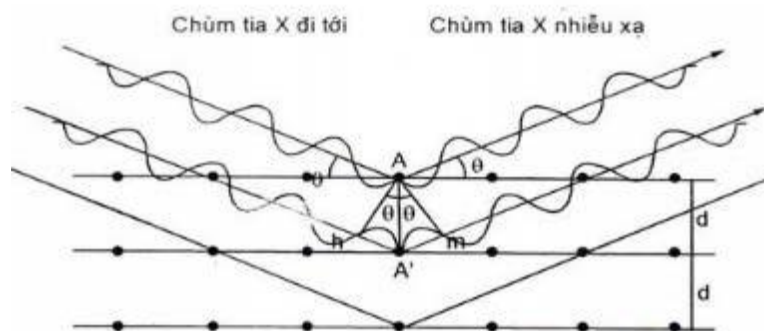
$$0.9\lambda L = \beta \cdot \cos\theta$$

Trong đó: L - kích thước hạt, đơn vị Å

λ - bước sóng tia X, ở đây $\lambda = 1,5406$ Å

β - độ bán rộng của vạch nhiễu xạ, đơn vị rad

θ - góc nhiễu xạ



Hình 1.19 Hiện tượng nhiễu xạ tia X từ hai mặt phẳng mạng tinh thể

1.7.5 Xác định nhóm chức của sản phẩm tạo thành bằng máy quang phổ hồng ngoại FTIR

FTIR là kỹ thuật dùng để phân tích những phân tử có khả năng hấp thụ bức xạ hồng ngoại để cho hiệu ứng phổ dao động. Qua đó, xác định tương đối

cấu trúc phân tử của một hợp chất hay các nhóm chức có mặt trong hợp chất đó. Kỹ thuật này còn dùng để xác định các nhóm chức trong một hợp chất chưa biết, để nhận biết một hợp chất hữu cơ hay dùng để đánh giá độ tinh khiết của một hợp chất bằng cách so sánh phổ của chất phân tích với phổ chuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng máy đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FTIR để xác định nhóm chức của vật liệu Fe_3O_4 đã tổng hợp được.



Hình 1.20 Máy đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FTIR

1.8 PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA

1.8.1 Phương pháp ABTS

Nguyên tắc: ABTS^+ ([2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] là một gốc tự do bền phát huỳnh quang màu xanh có bước sóng hấp thụ đặc trưng là 734 nm. Khi bổ sung một hợp chất có khả năng kháng oxy hóa, ABTS^+ sẽ bị khử về dạng không màu dẫn đến độ hấp thụ bước sóng đặc trưng giảm [28].

Phương pháp ABTS^+ được tiến hành như sau:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm enzyme HRP và ABTS 100 nmol trong dung dịch đệm phosphate. Sau đó thêm 61,5 μL dung dịch H_2O_2 (16,25 nM, 1 μmol). Phản ứng bắt đầu từ khi thêm dung dịch H_2O_2 . Màu của dung dịch là màu xanh lục sau đó chuyển sang màu vàng nhạt; cho thấy quá trình biến đổi ABTS^+ là quá trình oxy hóa. Sự biến đổi ABTS^+ được ghi nhận qua phổ UV-Vis ở bước sóng 420 nm

$$\text{ABTS}^+ (\%) = \frac{(A-B)}{A} * 100\%$$

Trong đó, A là giá trị mật độ quang của mẫu trắng và B là của mẫu thử.

1.8.2 Phương pháp DPPH:

Nguyên tắc: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) có khả năng tạo gốc tự do bền trong dung dịch MeOH bão hòa. Dung dịch DPPH có màu tím đậm với độ hấp thụ tối đa ở 517 nm. Màu tím này thường sẽ chuyển thành màu vàng khi có chất chống oxy hóa trong môi trường. Cho các chất thử vào dung dịch, nếu chất có khả năng quét gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của DPPH [28].

Phương pháp DPPH được mô tả như sau : 0,5mL mẫu thử cho vào dd DPPH (40 μ g/mL trong methanol 80%) ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tỷ lệ bắt gốc DPPH được tính theo công thức:

$$\text{DPPH} (\%) = \frac{(A-B)}{A} * 100\%$$

Trong đó, A là giá trị mật độ quang của mẫu trắng và B là của nhóm mẫu thử.

1.9 MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Chế tạo thành công hạt nano từ Fe₃O₄ có kích thước nhỏ và ổn định từ
- Chế tạo thành công nano từ Fe₃O₄ bọc TSPED
- Chế tạo thành công hệ nano từ được biến tính dẫn xuất gelatin-hematin hòa tan
- Đánh giá hiệu quả oxy hóa enzyme của xúc tác giả từ tính.
- Ứng dụng của xúc tác từ tính trong phản ứng trùng hợp catechin.
- Đánh giá quá trình trùng hợp catechin của xúc tác giả từ tính.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1 THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT THÍ NGHIỆM

Thiết bị: Các thiết bị được đặt tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam như: Cân 4 số lẻ, máy khuấy cơ, bể siêu âm, máy li tâm, hệ thống cô quay chân không, máy quang phổ UV-Vis, phổ hồng ngoại FT-IR (Nicolet 5700; Thermo Electron Corporation, MA, USA), kính hiển vi điện tử truyền phát xạ trường (FETEM) (Hitachi S-4800, Nhật Bản), máy phân tích hạt nano SZ-100, từ kế mẫu rung (Bruker - Magnetic B-E10).

Hóa chất

Bảng 2.1 Hóa chất thí nghiệm

Hoá chất	Nguồn gốc
Gelatin	Merk Chemicals (Darmstadt, Đức)
Dimethylsulfoxide (DMSO)	
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Acros organics (Hoa Kỳ)
Horseradish peroxidase (HRP, 216 units.mg ⁻¹)	
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	
1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC, MW 191.71 g/mol)	
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ)
FeCl ₃ .6H ₂ O	
Hematin (MW 633.49 g/mol)	
1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl (DPPH)	
2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	

(3-trimethoxysilyl)propylethylenediamine	
NH ₃ (20%) Rutin Catechin	Trung Quốc

2.2 TỔNG HỢP HẠT NANO TỪ Fe₃O₄

Phương pháp tiến hành: Cho 1351 mg FeCl₃.6H₂O và 695 mg FeCl₂.4H₂O được hòa tan trong 50 mL nước cất và đánh siêu âm; sau đó cho 20 mL HCl nồng độ 0.1 M vào hỗn hợp muối sắt. Hỗn hợp được khuấy cơ với tốc độ 800 vòng/phút, trong 15 phút với điều kiện khí N₂. Nhỏ giọt từ từ 40 mL dung dịch NH₃ có nồng độ 1M vào hỗn hợp dung dịch đang khuấy cơ cho đến khi dung dịch có màu đen (pH = 11) thu kết tủa bằng phương pháp ly tâm, dùng nam châm tách kết tủa. Sau đó, rửa sạch bằng nước cất 3 lần và ethanol 2 lần, tiếp theo làm khô ở nhiệt độ 60 °C. Cuối cùng, thu được sản phẩm là các hạt nano Fe₃O₄ có màu đen.

+ Đánh giá các đặc tính của hạt nano sắt từ Fe₃O₄: cấu trúc (FT-IR, XRD), kích thước hạt (TEM), từ tính (VSM).

2.3 TỔNG HỢP HẠT NANO Fe₃O₄ BỌC TSPED.

Phương pháp tiến hành: Dùng hạt nano Fe₃O₄ vừa thu được phân tán vào 200 mL nước cất và đánh siêu âm trong 30 phút trước khi thêm vào 180 ml methanol (62 %) ở nhiệt độ phòng. (3-trimethoxysilyl) propyl-ethylenediamine được thêm từ từ vào trong hỗn hợp dung dịch đang khuấy cơ trong 24 giờ với sự có mặt của khí N₂ và với điều kiện dung dịch kị sáng. Sau đó, hỗn hợp dung dịch được ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút thu được kết tủa và dùng nam châm tách kết tủa ra. Kết tủa được rửa sạch với nước cất cho đến khi pH = 7 và sau đó đông khô mẫu. Thu được hạt nano từ tính Fe₃O₄ bọc TSPED.

+ Đánh giá các đặc tính của hạt nano từ Fe₃O₄ bọc TSPED: cấu trúc (FT-IR, XRD), kích thước hạt (TEM, DLS), từ tính (VSM).

2.4 TỔNG HỢP LIÊN HỢP GELATIN-HEMATIN

Phương pháp tiến hành: Gelatin 200 mg được hòa tan trong 20 mL DMSO ở nhiệt độ 60 °C. Hòa tan 91 mg Hematin trong 100 mL DMSO. Sau đó cho 56 mg EDC và 33 mg NHS vào dd hematin, khuấy 30 phút. Dung dịch được khuấy trong điều kiện kị sáng sau đó nhỏ giọt dung dịch Gelatin vào dung dịch Hematin. Sau 24 h phản ứng, hỗn hợp dung dịch thu được đem thẩm tách với nước cất bằng cách sử dụng màng lọc với ngưỡng trọng lượng phân tử (MWCO) là 12–14 kDa trong 4–5 ngày và sau đó được đông khô.

+ Đánh giá Gelatin-Hematin bằng phổ FT-IR.

2.5 TỔNG HỢP HỆ XÚC TÁC GELATIN-HEMATIN/Fe₃O₄

Cho 100 mg Fe₃O₄ đã được silan hoà tan vào 50 mL nước cất và 50 mg Ge – He hoà tan trong 50 mL nước cất, sau đó đánh siêu âm trong 30 phút. Tiếp theo, 40 mg EDC và 20 mg NHS được sử dụng để kích hoạt nhóm chức carboxylic của Ge – He vào dung dịch Ge-He. Sau 30 phút, hỗn hợp Ge-He/EDC/NHS được thêm từ từ vào dung dịch Fe₃O₄ và khuấy cơ trong 24 giờ trong điều kiện dung dịch kị sáng ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dung dịch này được thẩm tách với màng thẩm tách Cellulose Membrane MWCO 12 – 14 kDa trong 3 ngày và cuối cùng sẽ đông khô để thu được sản phẩm khô.

+ Đánh giá các đặc tính của hệ xúc tác từ tính Gelatin – Hematin/Fe₃O₄: cấu trúc (FT-IR), kích thước hạt (TEM, DLS), từ tính (VSM).

2.6 ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ Fe-GeHe

2.6.1 Oxy hóa Rutin

Thí nghiệm được thực hiện bằng cách đo sự xuất hiện của sản phẩm trong môi trường phản ứng bằng phương pháp phổ UV – Vis. Tổng thể tích của hỗn hợp phản ứng là 3.5 mL. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 20 µL rutin 10 mM; 0.4 mL Fe-GeHe ở 57.14 ppm (còn HRP là : 0.1 mL HRP 3.6 units. mg⁻¹); 0.2 mL H₂O₂ 12.18 mM (so với 0.1 mL H₂O₂ 12.18mM trong thí nghiệm với HRP), và photphate pH=5.5 được thêm vào để đạt đến 3.5mL. Hỗn hợp phản ứng được quét ở các bước sóng từ 300 đến 500 nm, và sau đó chọn bước sóng cực đại ở 350 nm

- Đánh giá ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới tốc độ oxy hóa rutin:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm 20 μL rutin 10 mM; 0.4 mL Fe-GeHe ở 57.14 ppm (còn HRP là : 0.1 mL HRP 3.6 units. mg^{-1}); 0.2 mL H_2O_2 12.18 mM (so với 0.1 mL H_2O_2 12.18mM trong thí nghiệm với HRP), và photphate pH=5.5 được thêm vào để đạt đến 3.5mL. Phổ hấp thụ của mẫu trong thời gian phản ứng từ 1 – 200 giây được ghi lại, với cường độ hấp thụ ở bước sóng cực đại 350 nm. So sánh phổ hấp thụ của xúc tác giả sinh học với enzyme HRP.

- Đánh giá ảnh hưởng của H_2O_2 và enzyme đến rutin bị oxy hóa:

Ba mẫu hỗn hợp phản ứng (giống như trên) được thực hiện như sau : mẫu 1 (không có enzym và có sự hiện diện của H_2O_2), mẫu 2 (có enzym và không có sự hiện diện của H_2O_2), và mẫu 3 (sự có mặt của cả enzyme và H_2O_2). Phản ứng được thực hiện trong môi trường kỵ sáng ở 60 phút trước khi đo trên máy quang phổ UV-Vis. So sánh độ hấp thụ của 3 mẫu hỗn hợp phản ứng trong thời gian 60 phút.

2.6.2 Oxy hóa ABTS:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm xúc tác giả sinh học 2 nmol (HRP cũng 2 nmol) và ABTS 100 nmol trong dung dịch đệm photphate. Sau đó thêm 61,5 μL dung dịch H_2O_2 (16,25 nM, 1 μmol). Phản ứng bắt đầu từ khi thêm dung dịch H_2O_2 . Màu của dung dịch là màu xanh lục sau đó chuyển sang màu vàng nhạt; cho thấy quá trình biến đổi ABTS^+ là quá trình oxy hóa. Sự biến đổi ABTS^+ được ghi nhận qua phổ UV-Vis ở bước sóng 340 nm và 420 nm trong thời gian từ 1-15 phút.

- Đánh giá sự phụ thuộc của thời gian phản ứng với tốc độ oxy hóa ABTS:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm xúc tác giả sinh học 2 nmol (HRP cũng 2 nmol) và ABTS 100 nmol trong dung dịch đệm photphate. Sau đó thêm 61.5 μL dung dịch H_2O_2 (16,25 nM, 1 μmol), dùng dung dịch đệm photphate điều chỉnh về pH=6. Độ hấp thụ của phản ứng ở bước sóng 340 nm và 420 nm được ghi nhận lại trên máy quang phổ UV-Vis với thời gian từ 0-200 giây.

- Đánh giá sự phụ thuộc của nồng độ H_2O_2 vào tốc độ oxy hóa ABTS:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm xúc tác giả sinh học 2 nmol (HRP cũng 2 nmol) và ABTS 100 nmol trong dung dịch đệm photphate. Sau đó thêm dung dịch H_2O_2 có nồng độ từ 0,1-0,3 mL; dùng dung dịch đệm photphate điều chỉnh về pH=6. Độ hấp thụ của phản ứng ở bước sóng 340 nm và 420 nm được ghi nhận lại trên máy quang phổ UV-Vis với nồng độ H_2O_2 từ 0,1-0,3 mL.

2.6.3 Ứng dụng của xúc tác giả sinh học để trùng hợp Catechin

a. Tổng hợp và xác định cấu trúc Poly catechin

Để phản ứng trùng hợp catechin xảy ra thì phản ứng phải trong môi trường kỵ sáng và không có oxy. Catechin pha loãng trong EtOH ở nồng độ 5 mg/mL. Sau đó cho 10 mL Catechin vào bình cầu, thêm 50 mL Fe-GeHe đã tan trong EtOH vào và 5 mL H_2O_2 ở nồng độ 0.12%. Sau ba giờ phản ứng thu được hỗn hợp dung dịch và đem hỗn hợp cô quay thu được chất rắn. Chất rắn được rửa nhiều lần với axeton và EtOH ở 96°C. Sau đó, cho chất rắn vào trong dung dịch EtOH có từ trường để tạo thành kết tủa và dùng nam châm để lấy xúc tác ra. Dung dịch còn lại sau khi lấy chất xúc tác ra, rửa nhiều lần bằng EtOH và sau đó làm bay hơi ở nhiệt độ 60°C. Các sản phẩm sấy khô được phân tích bằng HPLC-MS để xác định danh tính của các hợp chất và hiệu suất của phản ứng trùng hợp.

b. Đánh giá hoạt tính sinh học của Poly catechin bằng DPPH:

So sánh khả năng bắt gốc tự do của catechin và poly catechin bằng phương pháp DPPH. Cách tiến hành: 5.91 mg DPPH trong 30 mL ethanol (A). Pha catechin ở nồng độ từ 1-100ppm trong ethanol (B). Lấy 2 mL(A) + 2 mL(B) ủ ở 37°C trong vòng 30 phút. Đo độ hấp thụ mẫu ủ ở bước sóng 515 nm (OD). Mẫu blank 2 ml dd DPPH + 2 mL ethanol. Đo độ hấp thụ của mẫu blank ở 515 nm. Tương tự cũng pha Poly catechin ở nồng độ từ 1-100ppm trong ethanol (B). Cách tiến hành cũng giống như catechin.

$$\text{Hiệu suất kháng oxy hóa } \%h = \frac{OD_{blank} - OD_{sample}}{OD_{blank}} * 100\%$$

OD_{sample}: độ hấp thụ mẫu.

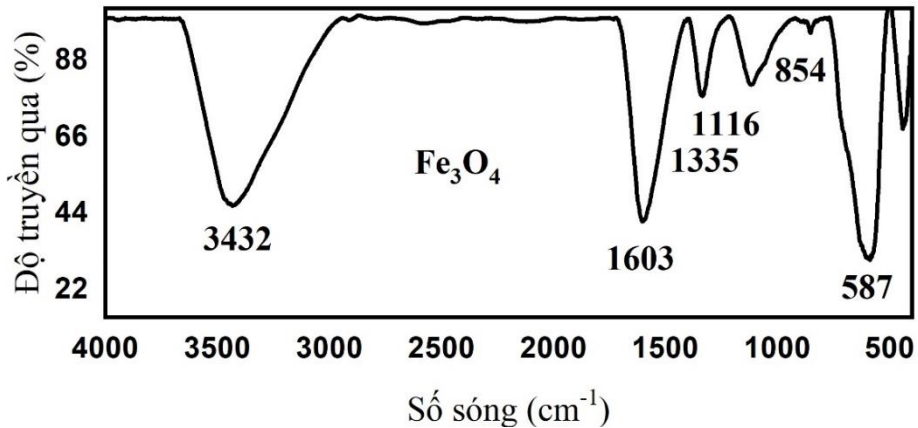
OD_{blank}: độ hấp thụ mẫu trắng.

DPPH là chất có màu tím được phát hiện ở bước sóng 515 nm, khi điện tử lẻ tự do của DPPH kết hợp với Hydro từ chất chống oxy hóa như catechin/poly catechin dung dịch phản ứng sẽ chuyển từ màu tím sang màu vàng cam. Do đó khả năng làm sạch gốc tự do DPPH hay hiệu suất kháng oxy hóa của một chất càng cao thì sự hấp thụ quang phổ ở bước sóng 515 nm của phản ứng DPPH càng giảm và ngược lại.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 ĐẶC TÍNH CỦA HẠT NANO Fe_3O_4

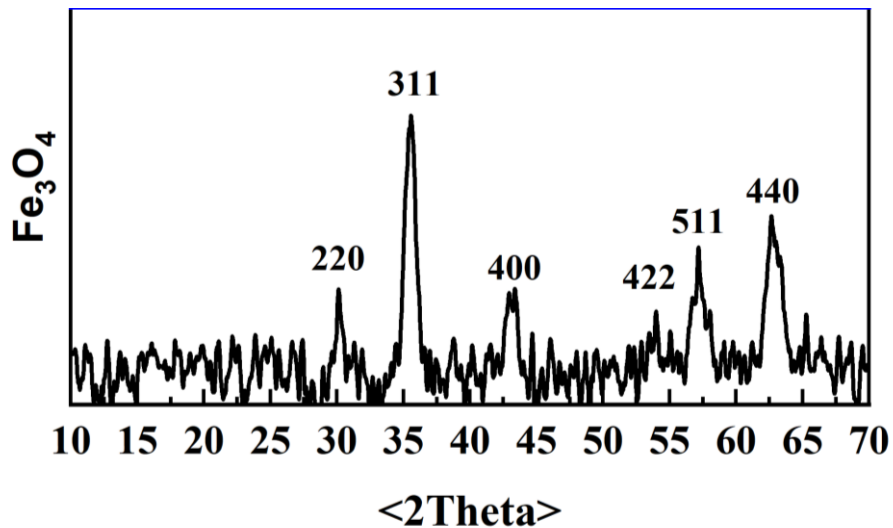
3.1.1 Cấu trúc hóa học hạt nano



Hình 3.1 Phổ FT-IR của Fe_3O_4

Sự hình thành các hạt nano từ tính ở hình 3.1 quan sát thấy trong dao động mạnh ở bước sóng 587 cm^{-1} và 3432 cm^{-1} ở hình (a) tương ứng với liên kết Fe-O và kéo dài O-H, được cho là do sự hiện diện của FeOH trong Fe_3O_4 .

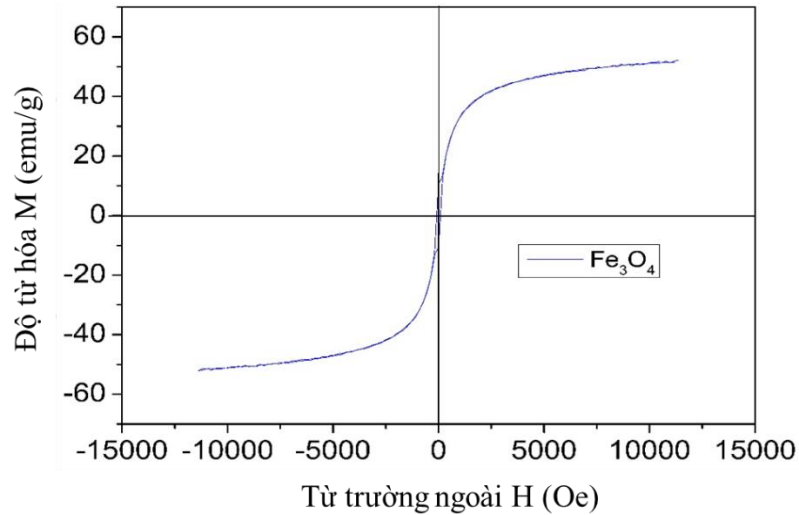
3.1.2 Cấu trúc tinh thể hạt nano



Hình 3.2 Giải đồ XRD của Fe_3O_4

Từ giản đồ XRD cho thấy, hình Fe_3O_4 các đỉnh nhiễu xạ (220), (311), (400), (422), (511) và (440) phù hợp với các đỉnh nhiễu xạ của Fe_3O_4 chuẩn (phụ lục 5) do vậy các hạt nano thu được chủ yếu là Fe_3O_4 .

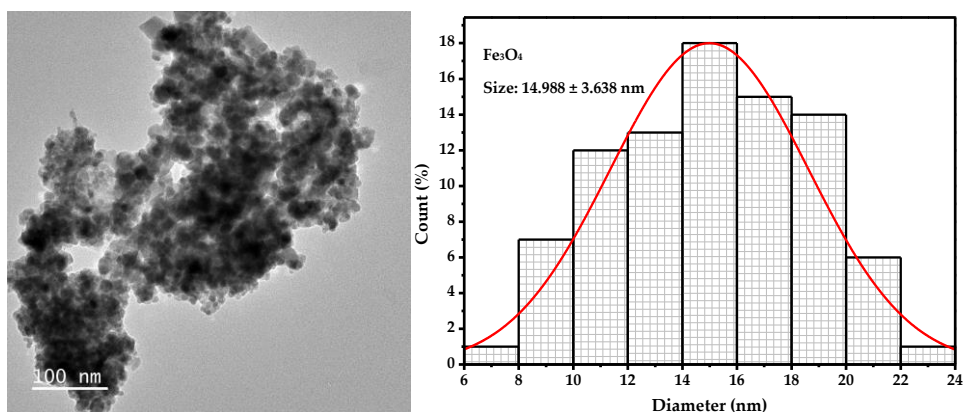
3.1.3 Đặc tính từ tính của hạt nano



Hình 3.3 Đường cong từ hóa của Fe_3O_4

Đường cong từ hóa của các hạt nano từ Fe_3O_4 tổng hợp được là tương đối tốt. Độ bão hòa từ các hạt nano từ Fe_3O_4 là 51,28 emu/g. Lực kháng từ cũng như từ dư có giá trị không đáng kể, do vậy hạt nano Fe_3O_4 thu được từ thực nghiệm này có thể xem là siêu thuận từ.

3.1.4 Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano

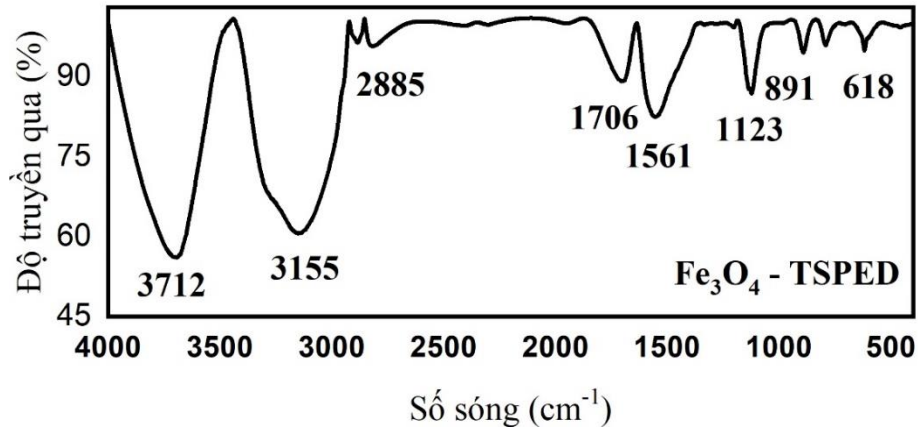


Hình 3.4 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe_3O_4

Từ hình TEM cho thấy các hạt nano Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -TSPED và Fe-GeHe là các đơn phân, có dạng hình cầu và kích thước đồng đều. Từ hình đồ thị hàm Gaussian (phân phối chuẩn) thì ta thấy hạt nano có kích thước nhỏ và có kích thước trung bình tăng dần ở 14.988 ± 3.638 nm.

3.2 ĐẶC TÍNH CỦA HẠT NANO Fe_3O_4 BỌC TSPED

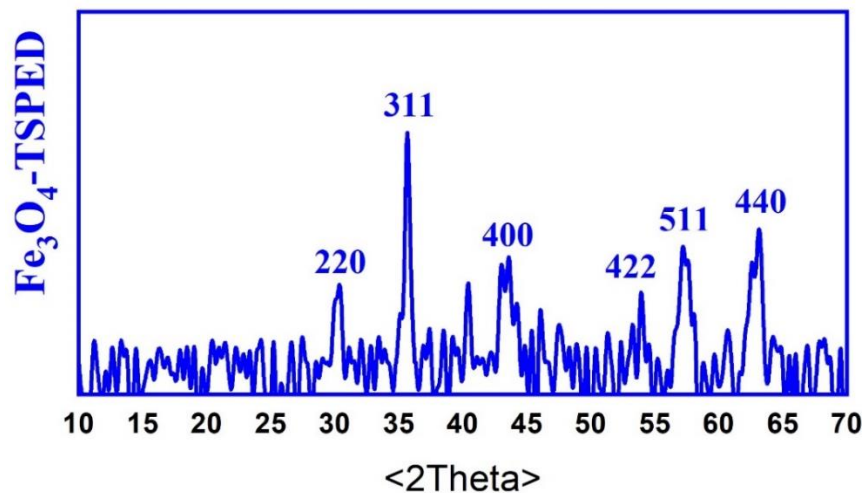
3.2.1 Cấu trúc hóa học hạt nano



Hình 3.5 Phổ FT-IR của Fe_3O_4 -TSPED

Sau khi phủ TSPED lên bề mặt của các hạt nano Fe_3O_4 , đỉnh đặc trưng của liên kết Fe-O được chuyển sang 618 cm^{-1} ở hình (b) trong khi sự hấp phụ của các nhóm silane phù hợp với các dải ở 1123 cm^{-1} và 891 cm^{-1} ở hình (b), được xác nhận là SiO-H và nhóm liên kết Si-O-Si. Ngoài ra, sự kéo dài OH xuất hiện ở 3712 cm^{-1} ở hình (b) được cho là SiO_2 -SiOH.

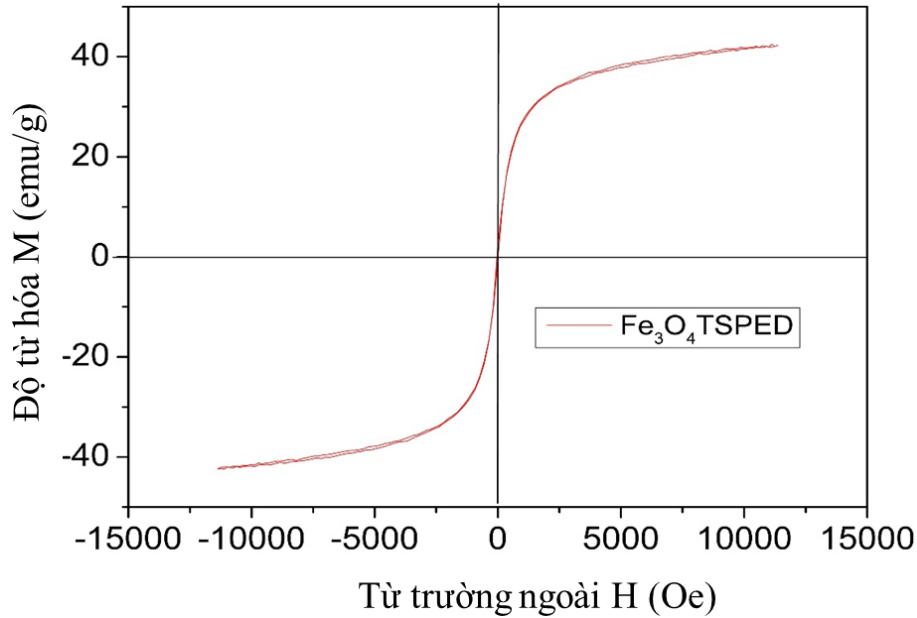
3.2.2 Cấu trúc tinh thể hạt nano



Hình 3.6 Giảm đồ XRD của Fe_3O_4 -TSPED

Từ hình 3.6 với đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của Fe_3O_4 được tìm thấy chứng tỏ lớp phủ SiO_2 không làm thay đổi pha. Chứng tỏ hạt nano khi phủ lớp TSPED không ảnh hưởng tới cấu trúc tinh thể của Fe_3O_4 .

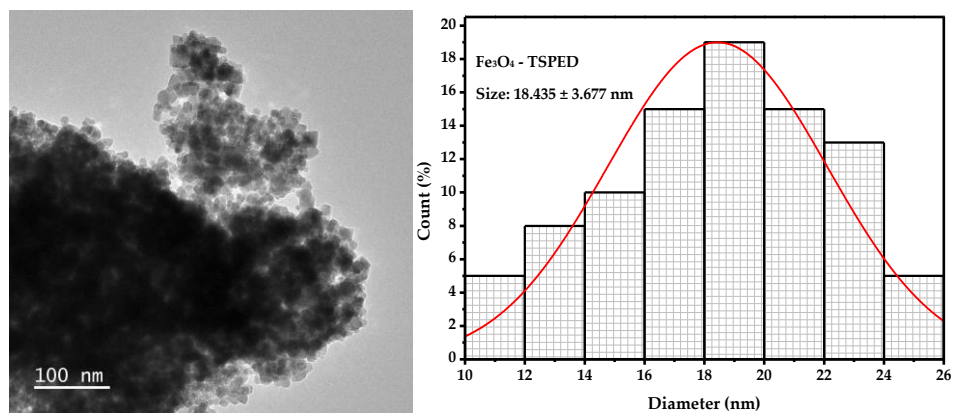
3.2.3 Đặc tính từ tính của hạt nano



Hình 3.7 Đường cong từ hóa của Fe_3O_4 -TSPED

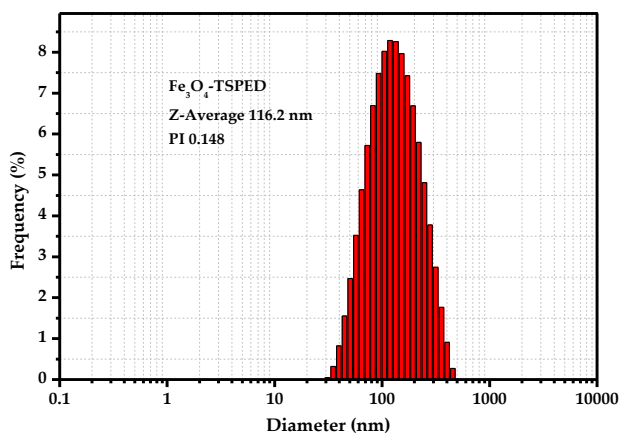
Đường cong từ hóa của hạt nano từ Fe_3O_4 -TSPED tổng hợp được là tương đối tốt. Độ bão hòa từ hạt nano từ Fe_3O_4 -TSPED là 41.86 emu/g. Lực kháng từ cũng như từ dư có giá trị không đáng kể, do vậy hạt nano Fe_3O_4 phủ TSPED thu được từ thực nghiệm này có thể xem là siêu thuận từ.

3.2.4 Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano



Hình 3.8 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe_3O_4 - TSPED

Từ hình TEM cho thấy hạt nano Fe_3O_4 -TSPED là các đơn phân, có dạng hình cầu và kích thước đồng đều. Từ hình đồ thị hàm Gaussian (phân phối chuẩn) thì ta thấy các hạt nano có kích thước nhỏ và có kích thước trung bình có kích thước trung bình ở 18.435 ± 3.677 nm.



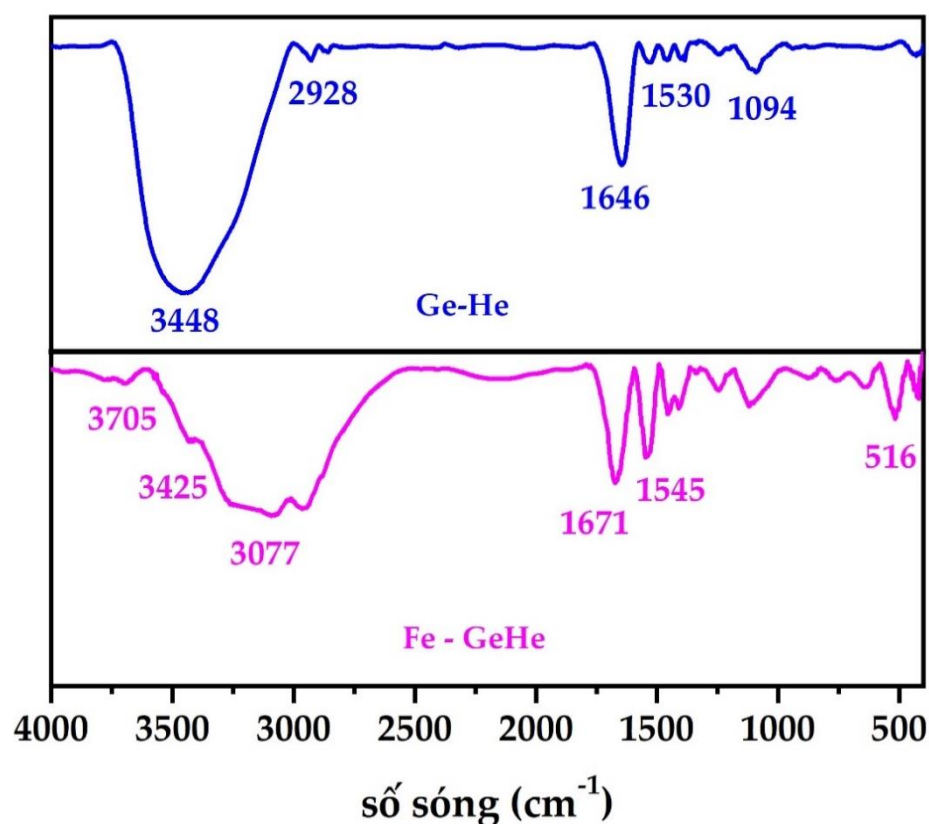
Hình 3.9 Sự tán xạ ánh sáng động (DLS) của Fe_3O_4 -TSPED

Tuy nhiên phổ tán xạ laze động (DLS) của Fe_3O_4 -TSPED là 116.2 nm với chỉ số PI giảm dần nhưng nhỏ hơn 0.4 nên các hạt nano tạo thành phân tán ổn định và có giá trị cao hơn nhiều so với kết quả của phương pháp FETEM.

Hiện tượng này có thể được giải thích là do sự hydrat hóa của Fe_3O_4 -TSPED trong dung dịch nước (đo DLS là đo trong dung dịch nên sẽ có hiện tượng lớp nước phủ bên ngoài vật liệu, còn đo TEM thì môi trường được làm khô chân không nên kết quả DLS sẽ lớn hơn TEM). Các kết quả này cũng chứng minh cho cấu hình dự đoán của Fe_3O_4 -TSPED.

3.3 ĐẶC TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ Fe-GeHe

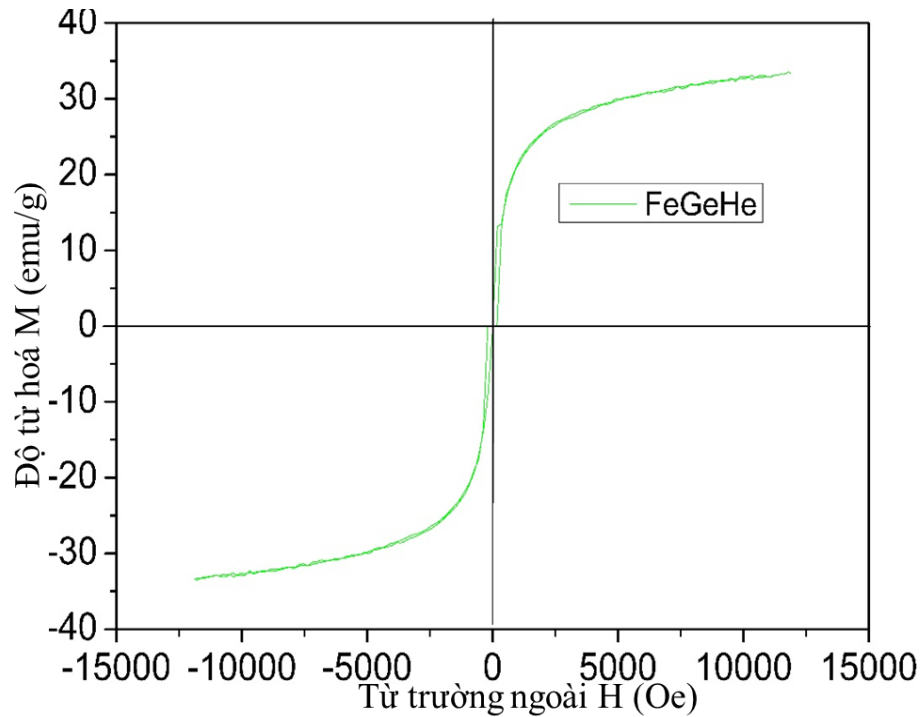
3.3.1 Cấu trúc hóa học hạt nano



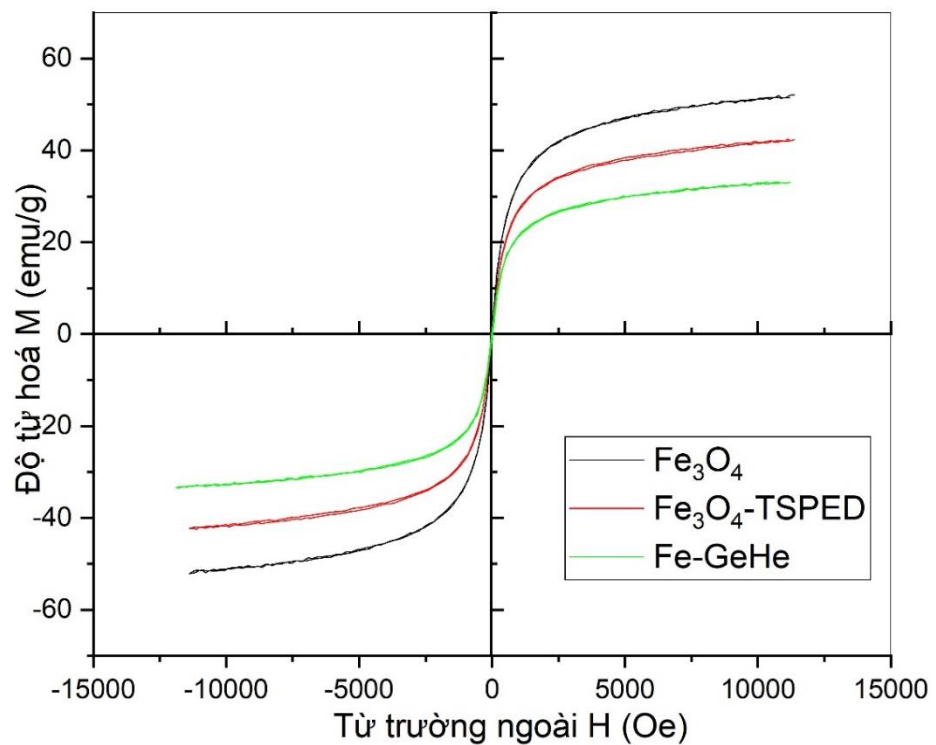
Hình 3.10 Phổ FT-IR của Ge-He và Fe-GeHe

Phổ của Ge-He ở hình 3.9 phù hợp với bài báo trước [33] với các cực đại cơ bản ở 3448 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} và 1094 cm^{-1} ở hình được gán cho các nhóm hydroxyl (OH), $-\text{CH}=\text{CH}_2$, amide I ($\text{HNC}=\text{O}$), amide II ($\text{C}=\text{N}$), và góc Fe-O trong Hematin tương ứng. Hơn nữa, enzyme từ tính Fe-GeHe ở hình (d) đã được xác định bằng sự xuất hiện của cả tín hiệu Fe và Ge-He với các dải đỉnh liên quan được chỉ ra ở trên. Sự sụt giảm đáng kể ở đỉnh 3705 cm^{-1} ở hình 3.9 đã được ghi nhận, điều này được cho là do sự xuất hiện của Ge-He trên bề mặt Fe_3O_4 -TSPED, cho thấy sự hình thành của Fe-GeHe.

3.3.2 Đặc tính từ tính của hạt nano



Hình 3.11 Đường cong từ hóa của Fe-GeHe.

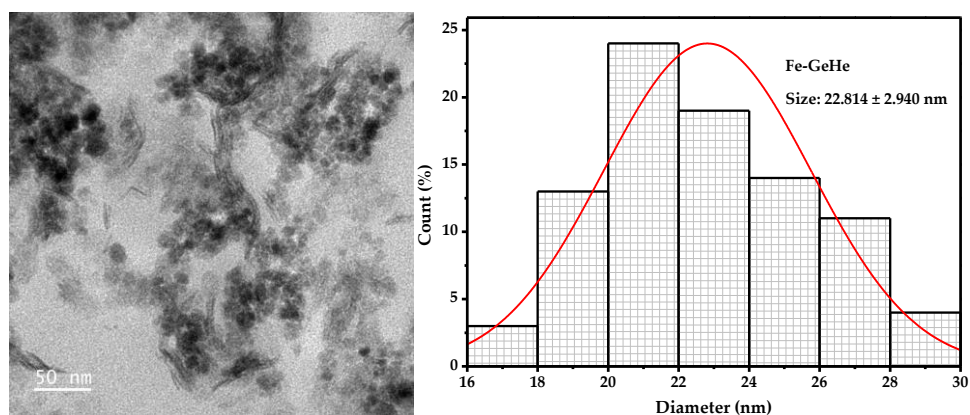


Hình 3.12 Đường cong từ hóa của Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -TSPED và Fe-GeHe
 Độ bão hòa từ các hạt nano từ Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -TSPED và Fe-GeHe lần lượt là 51,28 emu/g; 41.86 emu/g và 32,59 emu/g. Sự khác biệt về độ bão hòa từ là

do lớp phủ TSPED và GeHe trên bề mặt hạt nano từ Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -TSPED có độ bão hòa từ lớn hơn so với FeGeHe, có thể do lớp phủ GeHe dày hơn so với lớp phủ TSPED (do khi phủ vật liệu càng nhiều lớp sẽ dẫn đến sự che chắn từ tính càng nhiều, nguyên nhân dẫn đến độ suy giảm độ bão hòa từ của vật liệu).

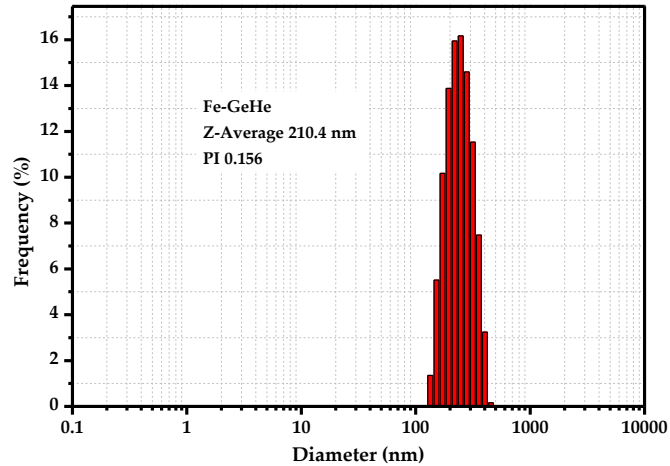
Lực kháng từ cũng như từ dư có giá trị không đáng kể, do vậy các hạt nano Fe_3O_4 và hạt nano Fe_3O_4 phủ TSPED và GeHe thu được từ thực nghiệm này có thể xem là siêu thuận từ (tính siêu thuận từ cho phép vật liệu phản ứng ngay với dưới tác động của từ trường ngoài, các pha rắn và pha lỏng dễ dàng phân tách, nhưng khi ngừng tác động thì vật liệu sẽ không còn từ tính).

3.3.3 Sự phân bố kích thước và hình thái của hạt nano



Hình 3.13 Ảnh TEM (bên trái) phân bố kích thước TEM và đồ thị hàm GAUSSIAN (bên phải) của Fe-GeHe.

Từ hình TEM cho thấy xúc tác giả Fe-GeHe là các đơn phân, có dạng hình cầu và kích thước đồng đều. Từ hình đồ thị hàm Gaussian (phân phối chuẩn) thì ta thấy hạt nano có kích thước nhỏ và có kích thước trung bình ở 22.814 ± 2.940 nm.



Hình 3.14 Sự tán xạ ánh sáng động (DLS) của Fe-GeHe.

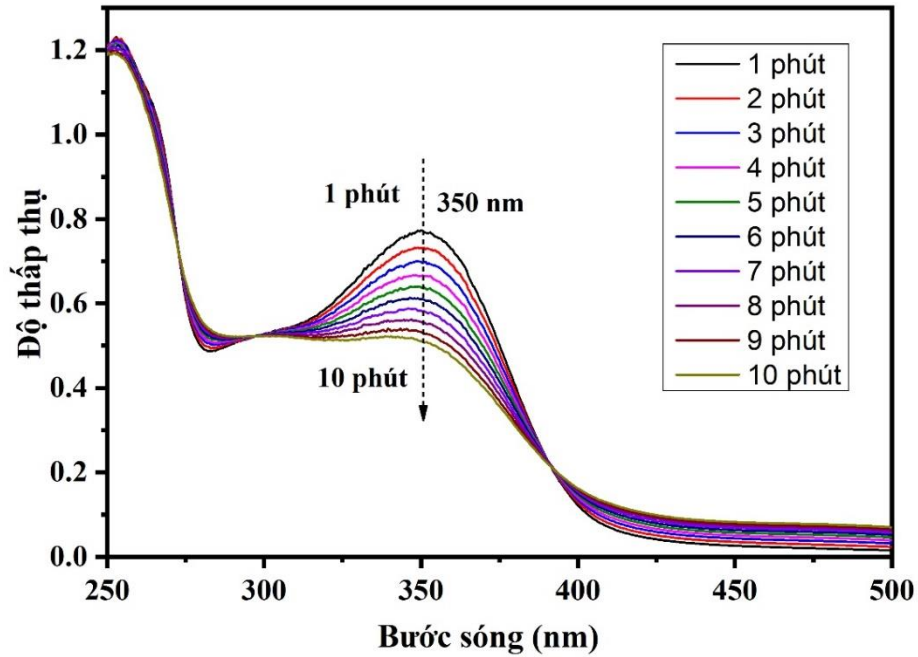
Tuy nhiên phổ tán xạ laser động (DLS) của Fe-GeHe là 210.4 nm với chỉ số PI giảm dần nhưng nhỏ hơn 0.4 nên hạt nano tạo thành phân tán ổn định và có giá trị cao hơn nhiều so với kết quả của phương pháp FETEM.

Hiện tượng này có thể được giải thích là do sự hydrat hóa của Fe-GeHe trong dung dịch nước (đo DLS là đo trong dung dịch nên sẽ có hiện tượng lớp nước phủ bên ngoài vật liệu, còn đo TEM thì môi trường được làm khô chân không nên kết quả DLS sẽ lớn hơn TEM). Các kết quả này cũng chứng minh cho cấu hình dự đoán của Fe-GeHe.

3.4 ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC

3.4.1 Oxy hóa Rutin

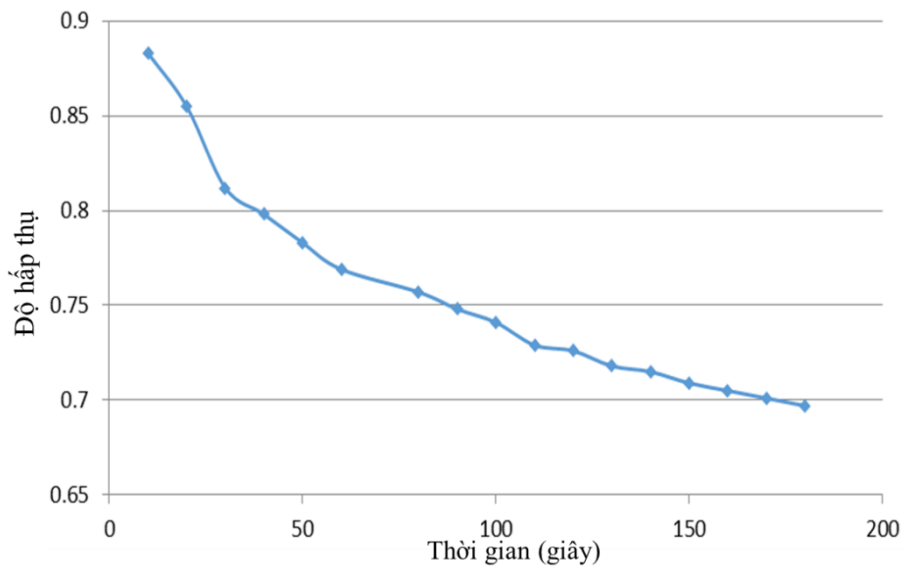
- Đánh giá sự phụ thuộc của thời gian phản ứng với tốc độ oxy hóa Rutin



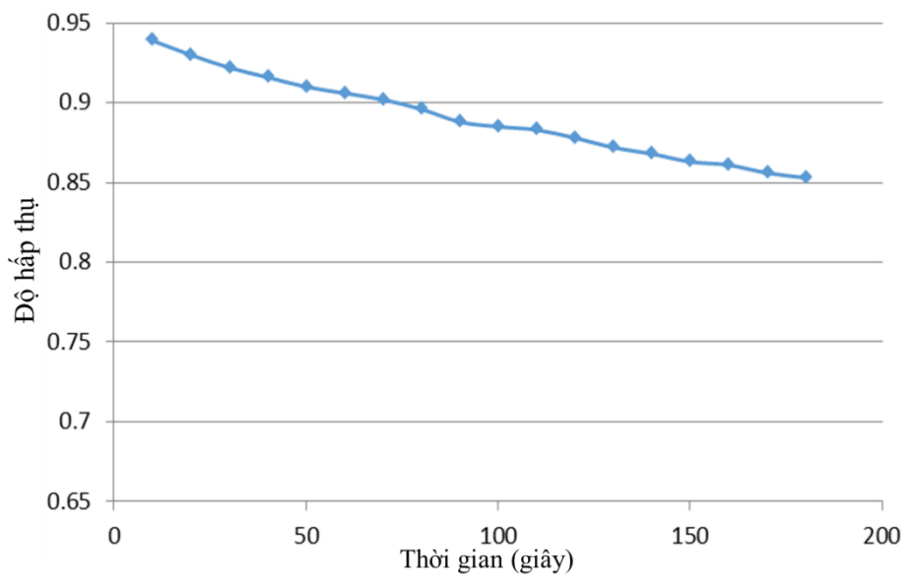
Hình 3.15 Phổ hấp thụ UV-Vis của Rutin

Phổ hấp thụ của flavonoid bao gồm hai dải hấp thụ. Dải I nằm trong dải 310-380 nm (với A_{\max} khoảng 350-370 nm) trong khi dải II nằm trong dải 240-290 nm (với A_{\max} khoảng 260-270 nm). Hình trên cho thấy sự thay đổi độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng trong quá trình oxy hóa Rutin thông qua xúc tác từ Fe-GeHe. Sự hiện diện của Rutin đã được xác nhận bởi hai cực đại hấp thụ ở 250nm và 350nm phù hợp với bài báo công bố trước đây [34]. Các đường hấp thụ rutin giảm dần trong khoảng thời gian 10 phút, cho thấy hoạt động của peroxidase bắt nguồn từ Fe-GeHe và Rutin là cơ chất cho Fe-GeHe.

Phổ hấp thụ của Rutin bởi enzyme HRP ở bài báo [34] và bởi Fe-GeHe ở hình 3.15 thì đều giảm theo thời gian phản ứng và đều ghi nhận ở bước giống cực đại 350 nm. Chứng tỏ quá trình oxy hóa Rutin bởi enzyme HRP và Fe-GeHe giống nhau.



Hình 3.16 Độ hấp thụ ở bước sóng 350 nm của Rutin theo thời gian bởi HRP



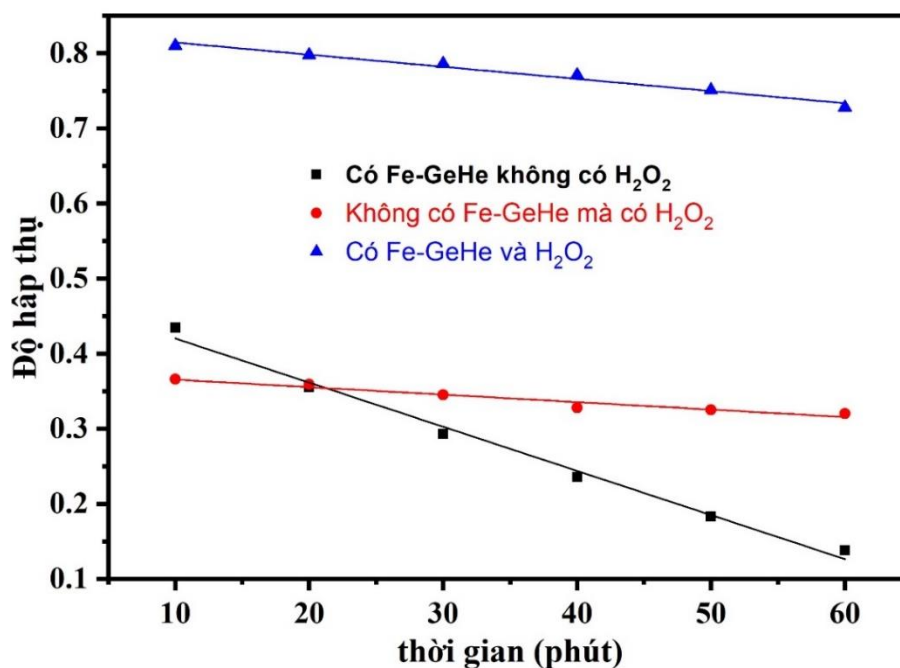
Hình 3.17 Độ hấp thụ ở bước sóng 350 nm của Rutin theo thời gian bởi Fe-GeHe

Từ hình 3.16 và 3.17 thì độ hấp thụ của Rutin bởi enzyme HRP và của Fe-GeHe đều giảm theo thời gian phản ứng. Ở hình 3.16 thì quá trình oxy hóa Rutin bởi enzyme HRP không ổn định. Ở những giây đầu tiên thì độ hấp thụ của Rutin bởi HRP giảm nhanh chóng, sau đó thì tốc độ oxy hóa Rutin chậm lại do khả năng hấp thụ HRP giảm dần. Còn ở hình 3.17 thì tốc độ oxy hóa

Rutin bởi Fe-GeHe giảm dần đều theo thời gian. Chứng tỏ quá trình oxy hóa của Rutin bởi xúc tác giả Fe-GeHe ổn định hơn enzyme HRP.

- Đánh giá ảnh hưởng của H_2O_2 và enzyme đến rutin bị oxy hóa:

Sự phụ thuộc vào thời gian của quá trình oxy hóa Rutin với sự có mặt của Fe-GeHe (không có H_2O_2), có H_2O_2 (không có Fe-GeHe) và có cả Fe-GeHe với H_2O_2 ở bước sóng 350 nm được trình bày ở hình



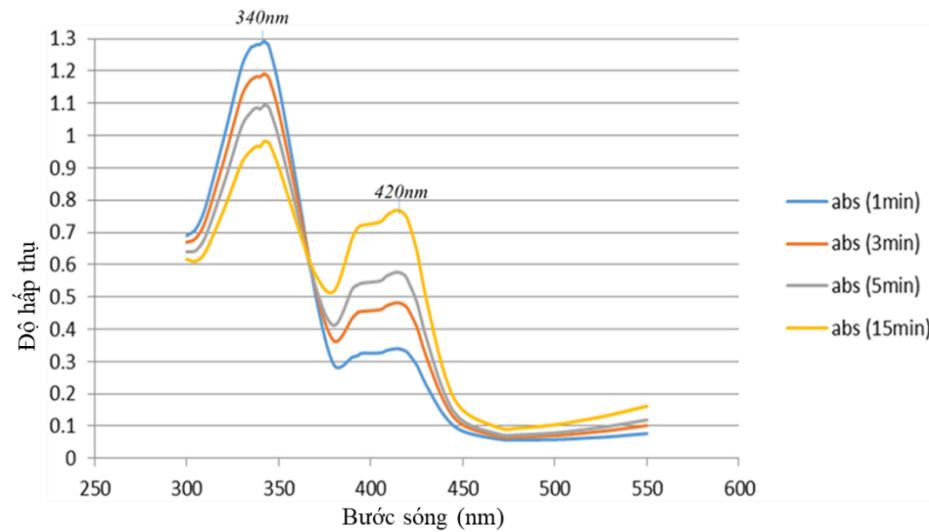
Hình 3.18 Độ hấp thụ phụ thuộc vào thời gian của quá trình oxy hóa Rutin khi có Fe-GeHe (không có H_2O_2), có H_2O_2 (không có Fe-GeHe) và có cả Fe-GeHe với H_2O_2 ở bước sóng 350 nm.

Từ hình, ta thấy mức độ oxy hóa của Rutin được tìm thấy khi có mặt Fe-GeHe / H_2O_2 cao hơn nhiều so với trong phản ứng không có H_2O_2 . Trong quá trình xúc tác 60 phút, lượng rutin trong hỗn hợp đã bị oxy hóa hoàn toàn. Rõ ràng là tốc độ oxy hóa rutin dường như không thay đổi trong thời gian 60 phút ở phản ứng không sử dụng enzyme.

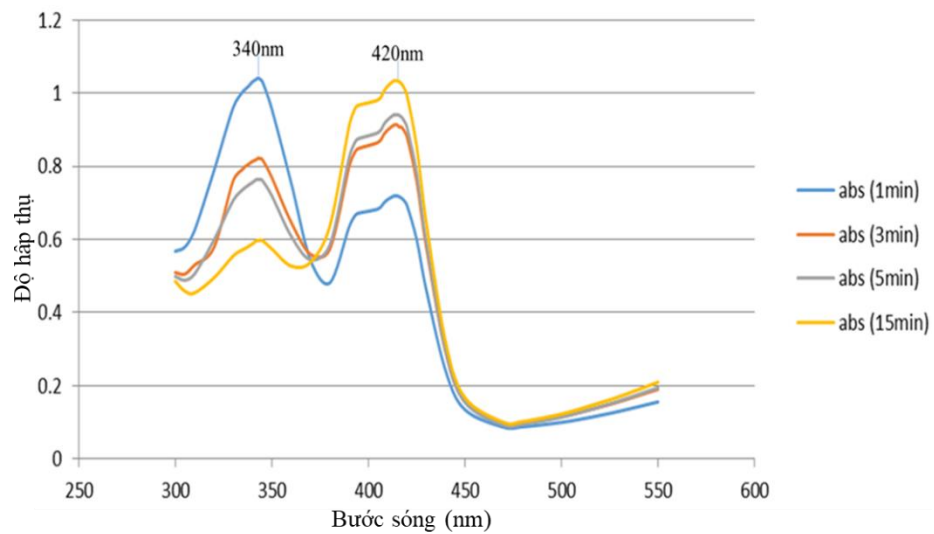
Những kết quả này cho thấy rõ ràng vai trò xúc tác của Fe-GeHe/ H_2O_2 phù hợp với HRP/ H_2O_2 trong phản ứng oxy hóa rutin [45].

3.4.2 Oxy hóa ABTS

- *Phổ UV-Vis oxy hóa ABTS*



Hình 3.19 Phổ UV-Vis của enzyme HRP

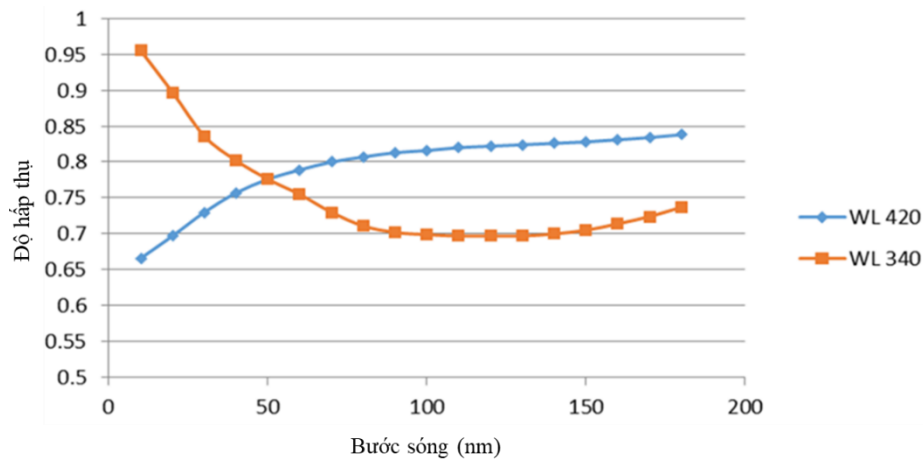


Hình 3.20 Phổ UV-Vis của xúc tác giả sinh học Fe-GeHe

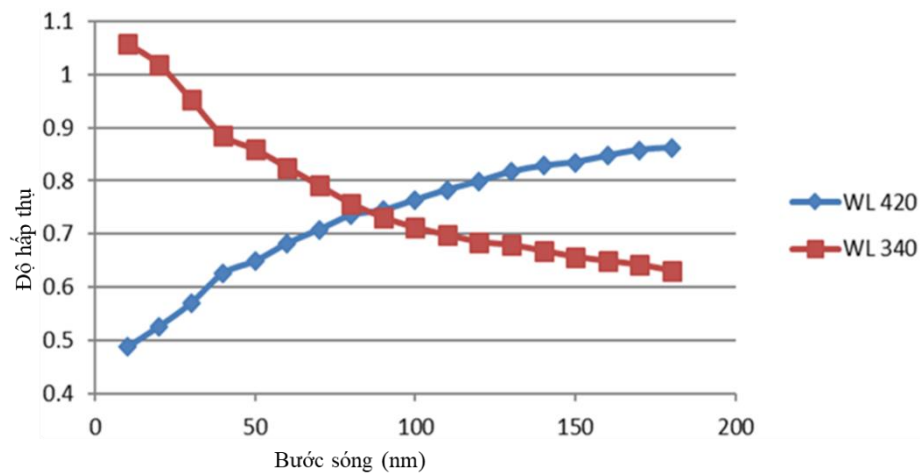
Phương pháp ABTS được sử dụng là phương pháp so màu để xác định tác dụng của enzyme HRP. Màu dung dịch phản ứng chuyển sang màu xanh lục cho thấy hình thành $ABTS^+$, sau đó chuyển sang màu vàng nhạt, cho thấy quá trình oxy hóa diễn ra. Từ hình phổ UV-Vis của enzyme HRP và xúc tác giả sinh học Fe-GeHe đều cho thấy độ hấp thụ của xúc tác giả sinh học Fe-GeHe giống với enzyme HRP đều đạt bước sóng cực đại ở 340 nm và 420 nm. Có sự thay đổi đáng kể độ hấp thụ được đo ở 1 phút và 3 phút của Fe-GeHe giống với

enzyme HRP. Sau 3 phút thì tốc độ phản ứng chậm lại ở cả enzyme HRP và Fe-GeHe ở 2 bước sóng 340 nm và 420 nm. Từ hình phổ 3.19 và hình phổ 3.20 chứng tỏ xúc tác giả sinh học Fe-GeHe có tốc độ phản ứng nhanh hơn enzyme HRP.

- *Đánh giá sự phụ thuộc của thời gian phản ứng với tốc độ oxy hóa ABTS*



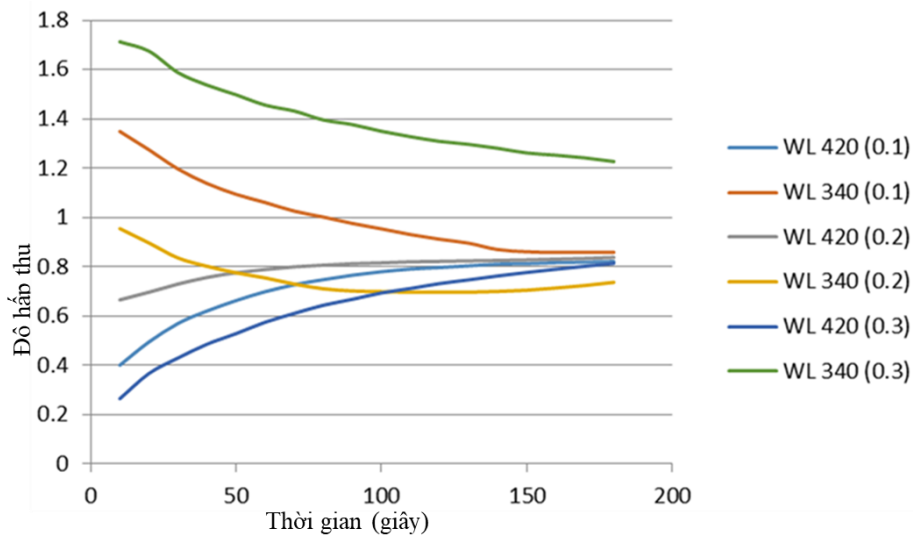
Hình 3.21 Độ hấp thụ theo thời gian của HRP



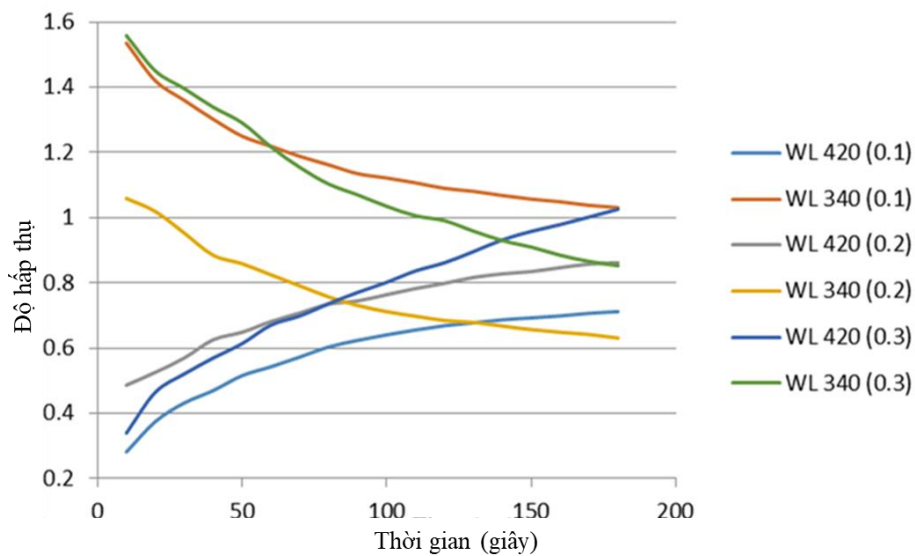
Hình 3.22 Độ hấp thụ theo thời gian của Fe-GeHe

Từ hình 3.21 và 3.22 của quá trình oxy hóa ABTS thì ta thấy ABTS bị oxy theo thời gian của Fe-GeHe giống với enzyme HRP. Ở hình 3.22 cho thấy xúc tác giả sinh học Fe-GeHe ở tăng dần đều ở bước sóng 420 nm và giảm dần đều ở bước sóng 340 nm chứng tỏ tốc độ oxy hóa theo gian của xúc tác giả sinh học Fe-GeHe nhanh hơn enzyme HRP.

- *Đánh giá sự phụ thuộc của nồng độ H_2O_2 vào tốc độ oxy hóa ABTS:*



Hình 3.23 Độ hấp thụ của enzyme HRP theo nồng độ H_2O_2



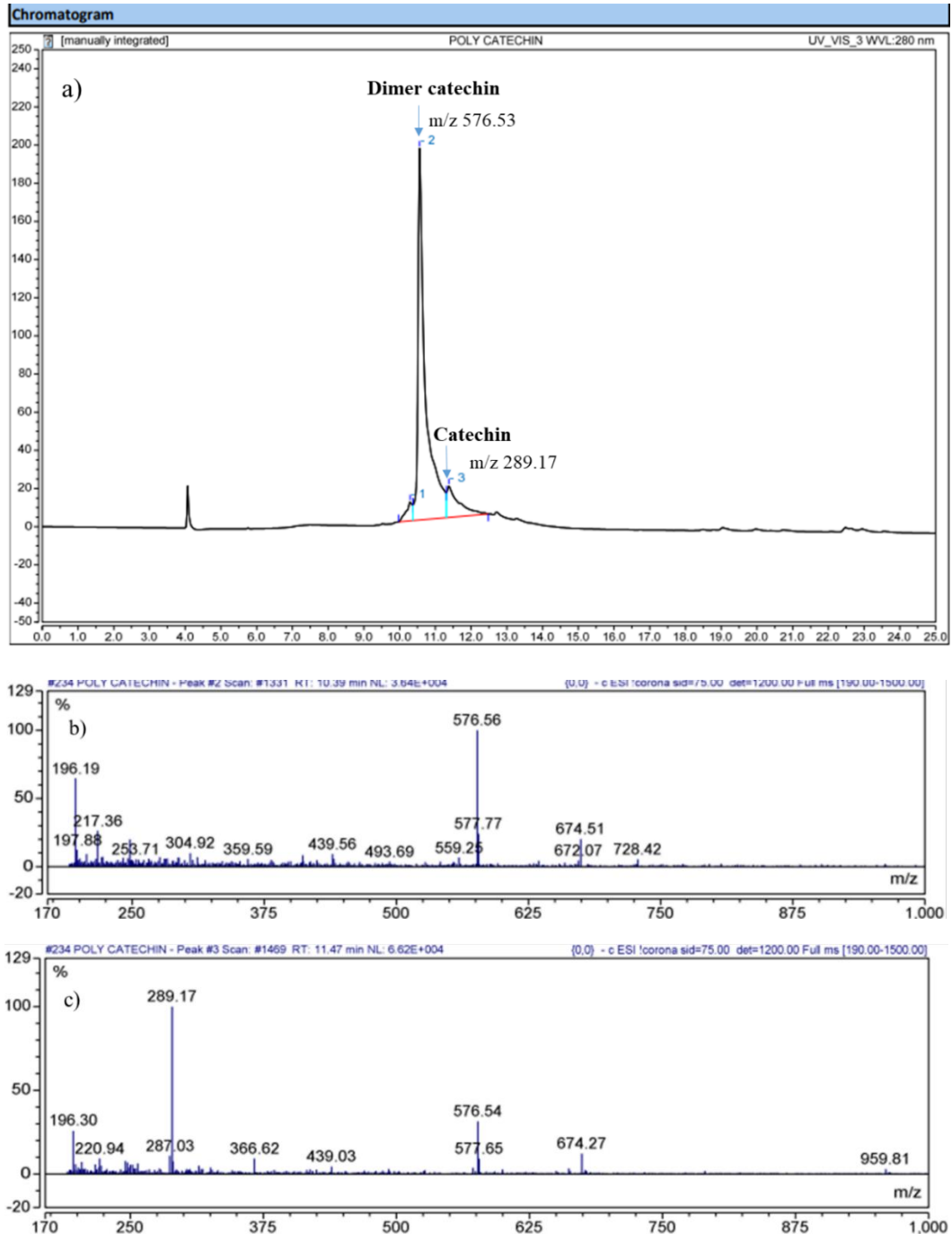
Hình 3.24 Độ hấp thụ xúc tác giả sinh học Fe-GeHe theo nồng độ H_2O_2

Từ hình hình 3.23 và 3.24 ta thấy độ hấp thụ của quá trình oxy hóa ABTS của enzyme HRP và xúc tác giả sinh học Fe-GeHe giảm ở bước sóng 340 nm và tăng ở bước sóng 420 nm theo nồng độ H_2O_2 nhưng không đáng kể. Ở bước sóng 420 nm thì độ hấp thụ của xúc tác giả sinh học Fe-GeHe tăng dần đều hơn so với enzyme HRP.

Từ những kết quả cho xúc tác giả sinh học Fe-GeHe thay thế được enzyme HRP trong phản ứng oxy hóa ABTS.

3.5 ỨNG DỤNG XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC ĐỀ TRỪNG HỢP CATECHIN

- Kết quả HPLC-MS

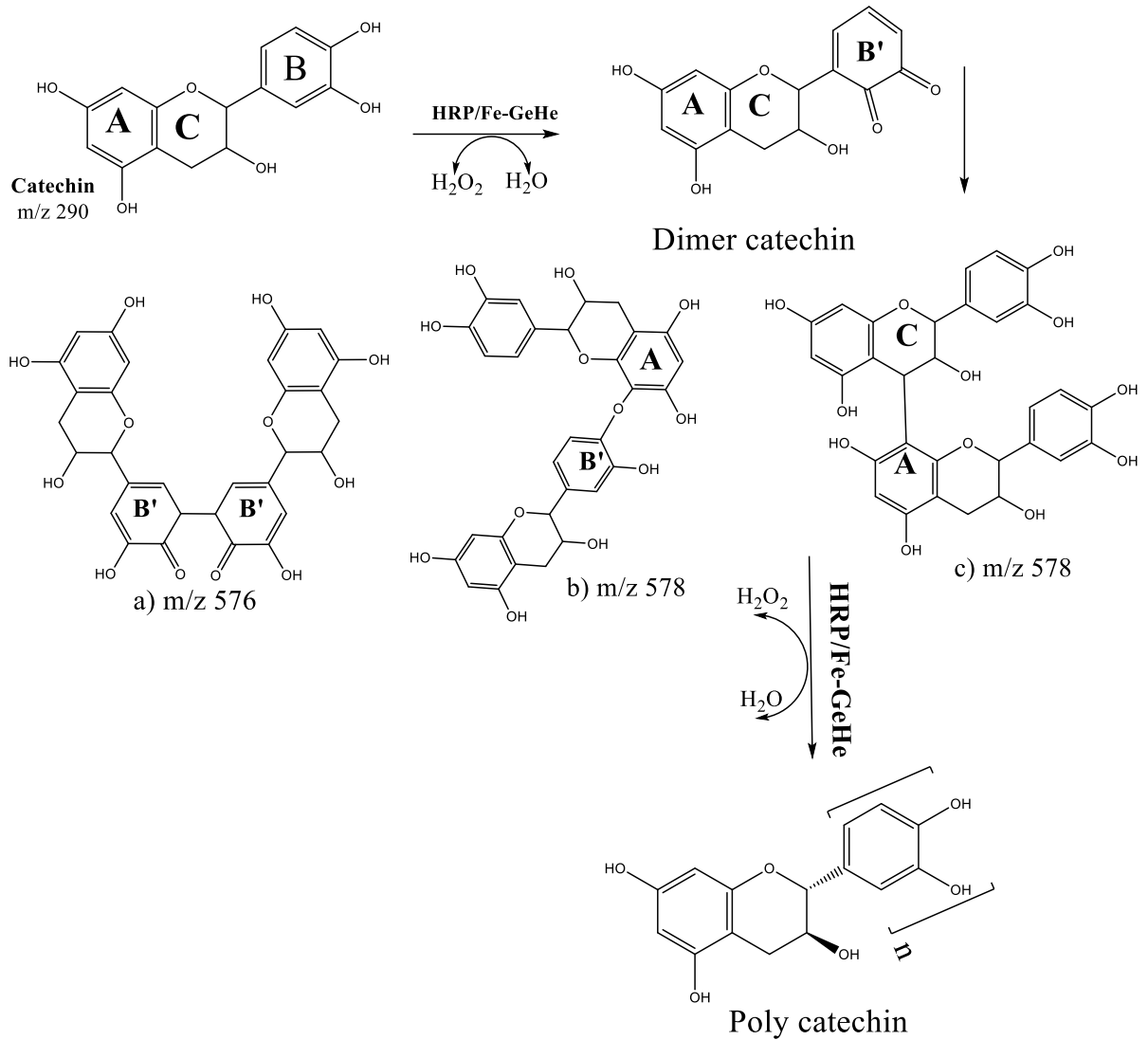


Hình 3.25 Phổ HPLC-MS (a), phổ ion của hỗn hợp phản ứng (b cho dimer ở RT là 10.39 phút và c cho catechin ở RT là 11.47 phút)

Hỗn hợp của phản ứng được tạo thành bằng cách oxy hóa catechin và sản phẩm được phân tích trên HPLC-MS được thể hiện trên hình 3.25. Theo hình a) thì thời gian lưu của dimer và catechin được hình thành lần lượt ở 10,39 phút và 11,47 phút với tỉ lệ m/z lần lượt là 576,56 và 289,17. Các đỉnh hoàn toàn không tách biệt nhau có tỉ lệ điện tích dương các đỉnh ở 10,39 phút 88,49%, ở 11,47 phút là 4,47%. Giá trị m/z ở hình b) là 576,56 và 577,77 cho thấy khả năng là Dimer catechin với khối lượng phân tử là 576 hoặc 578. Còn ở hình c) thì các ion phân tử catechin thể hiện ở đỉnh m/z là 289,17.

Từ kết quả HPLC-MS của quá trình trùng hợp catechin cho thấy quá trình trùng hợp xảy ra với hiệu suất cao 88,49% khi có đỉnh Dimer catechin ở thời gian lưu 10,39 phút. So sánh m/z của hình b) với các tài liệu tham khảo thì có 3 khả năng dimer catechin được tạo thành như dưới hình 3.25. Để xác định chính xác cấu trúc hóa học của dimer cần làm sạch qua sắc ký cột và chạy phổ H-NMR để xác định.

Vậy quá trình oxy hóa catechin bằng xúc tác giả sinh học Fe-GeHe giống với enzyme HRP được kiểm soát và hình thành dimer catechin trong phản ứng trùng hợp catechin.



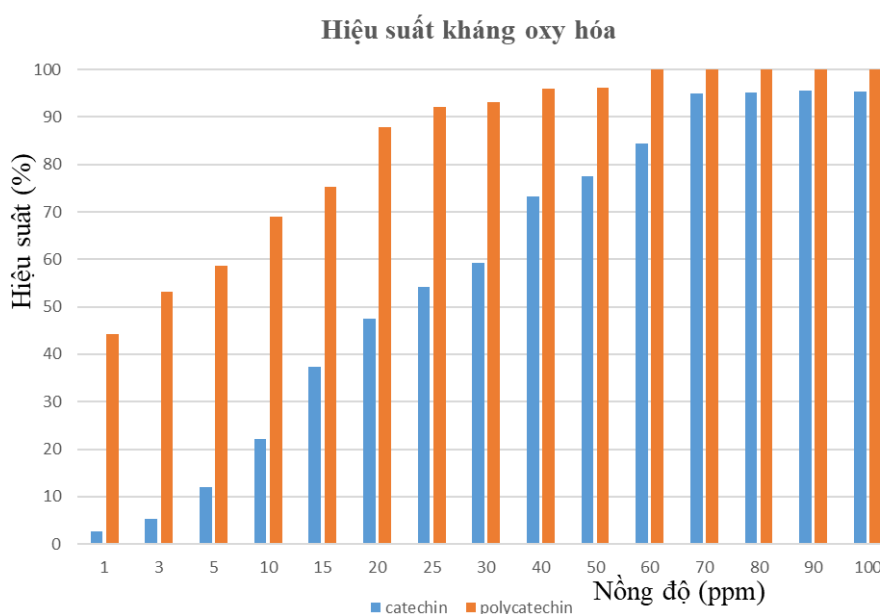
Hình 3.26 Phản ứng trùng hợp catechin và các dimer catechin dự đoán.

3.6 ĐÁNH GIÁ QUÁ TRÌNH TRÙNG HỢP BẰNG XÚC TÁC GIẢ SINH HỌC

Bảng 3.1 Hiệu suất kháng oxy hóa của Catechin và Polycatechin

Concentration (ppm)	Catechin (%)	Polycatechin (%)
1	2,6030	44,1798
3	5,2331	53,1368
5	12,039	58,5411
10	22,2072	69,0854
15	37,4458	75,3590

20	47,4241	87,8306
25	54,1486	92,1768
30	59,2462	93,1594
40	73,2375	96,0317
50	77,4132	96,1451
60	84,3004	100
70	95,038	100
80	95,0651	100
90	95,4718	100
100	95,3633	100



Hình 3.27 Biểu đồ so sánh hiệu suất kháng oxy hóa của Catechin và Poly catechin

Kết quả cho thấy Catechin và Poly catechin có hiệu suất kháng oxy hóa cao chứng tỏ khả năng chống oxy hóa mạnh. Trong đó Poly catechin có hiệu suất kháng oxy hóa cao hơn Catechin. Từ nồng độ 60 ppm thì Poly catechin có hiệu suất kháng oxy 100%. Chứng tỏ xúc tác giả sinh học Fe-GeHe là tác nhân dùng để tổng hợp từ catechin lên Poly catechin có hoạt tính oxy hóa mạnh hơn ban đầu; là ứng dụng quan trọng của xúc tác giả trong quá trình trùng hợp catechin.

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này hạt nano Fe_3O_4 có kích thước nhỏ khoảng 14nm được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa. Khi phủ Fe_3O_4 -TSPED và Fe-GeHe thì kích thước phủ tương đối đồng đều khoảng 3-4nm tương ứng là 18nm và 22nm. Các hạt nano Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -TSPED và Fe-GeHe mang tính chất siêu thuận từ. Điều này giúp hạt đáp ứng tốt với từ trường ngoài và tái phân tán sau khi ngừng tác động của từ trường ngoài, một tính chất quan trọng đối với các ứng dụng trong y sinh.

Kết quả nghiên cứu cho thấy xúc tác giả sinh học Fe-GeHe có hoạt tính oxy hóa Rutin và khả năng bắt gốc tự do ABTS giống như enzyme HRP và hoàn toàn thay thế được enzyme HRP về hoạt tính.

Xúc tác giả sinh học Fe-GeHe có ứng dụng quan trọng trong việc trùng hợp catechin lên thành poly catechin có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh hơn catechin.

Kiến nghị có nhiều nghiên cứu hơn về hạt nano Fe_3O_4 gắn với He(COOH)₄-alginate-cystamine hoặc gelatin-tyramine để có nhiều ứng dụng trong y sinh. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình trùng hợp từ catechin thành poly catechin sử dụng Fe-GeHe. Tinh sạch mẫu sau khi trùng hợp và chạy phổ H-NMR để xác định cấu trúc của sản phẩm tạo thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Veitch, N. C. (2004). *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
2. Garg, B., Bisht, T., & Ling, Y. C. (2015). *Graphene-based nanomaterials as efficient peroxidase mimetic catalysts for biosensing applications: an overview*. *Molecules*, 20(8), 14155-14190.
3. Khanmohammadi, M., Dastjerdi, M. B., Ai, A., Ahmadi, A., Godarzi, A., Rahimi, A., & Ai, J. (2018). *Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications*. *Biomaterials science*, 6(6), 1286-1298.
4. Bae, J. W., Choi, J. H., Lee, Y., & Park, K. D. (2015). *Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications*. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(11), 1225-1232.
5. Zhang Genfa and Purnendu K. Dasgupta (1992), “*Hematin as a Peroxidase Substitute in Hydrogen Peroxide Determinations*”, *Anal. Chem.* 1002, 64, 517-522.
6. Sakai, S., & Nakahata, M. (2017). *Horseradish peroxidase catalyzed hydrogelation for biomedical, biopharmaceutical, and biofabrication applications*. *Chemistry–An Asian Journal*, 12(24), 3098-3109.
7. Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology letters*, 37(11), 2139-2145.
8. Selene M. A.G. U. d. Souza, Eliane F., Antonio A.U.d. Souza (2007), “*Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)*”, *Journal of Hazardous Materials* 147 (2007) 1073 – 1078.
9. Debnath S, Das D and Das PK, *Unsaturation at the surfactant head: influence on the activity of lipase and horseradish peroxidase in reverse micelles*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1): 163-168, 2007.

10. Ryu, J. H., Lee, Y., Do, M. J., Jo, S. D., Kim, J. S., Kim, B. S., ... & Lee, H. (2014). *Chitosan-g-hematin: Enzyme-mimicking polymeric catalyst for adhesive hydrogels*. *Acta biomaterialia*, 10(1), 224-233.
11. Akkara, J. A., Wang, J., Yang, D. P., & Gonsalves, K. E. (2000). *Hematin-catalyzed polymerization of phenol compounds*. *Macromolecules*, 33(7), 2377-2382.
12. Zhang, G., & Dasgupta, P. K. (1992). *Hematin as a peroxidase substitute in hydrogen peroxide determinations*. *Analytical chemistry*, 64(5), 517-522.
13. Roy, S., Fortier, J. M., Nagarajan, R., Tripathy, S., Kumar, J., Samuelson, L. A., & Bruno, F. F. (2002). *Biomimetic synthesis of a water soluble conducting molecular complex of polyaniline and liginosulfonate*. *Biomacromolecules*, 3(5), 937-941.
14. Trần Thị Hồng, Trần Hoàng Thanh, *Nghiên cứu phương pháp sử dụng enzyme enzyme peroxidase chiết tách từ củ cải trắng để xác định hàm lượng thủy ngân trong nước ô nhiễm*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 24: 23-27, 2008.
15. Article, R. (2012). *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical applic ... Page 1 of 5 Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agen*. *Imaging*: 1-5.
16. Sakai, S., Moriyama, K., Taguchi, K., & Kawakami, K. (2010). *Hematin is an alternative catalyst to horseradish peroxidase for in situ hydrogelation of polymers with phenolic hydroxyl groups in vivo*. *Biomacromolecules*, 11(8), 2179-2183.
17. Amin, M. L., Kim, D., & Kim, S. (2016). *Development of hematin conjugated PLGA nanoparticle for selective cancer targeting*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 138-143.
18. Pal, K., Banthia, A. K., & Majumdar, D. K. (2007). *Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications*. *Aaps Pharmscitech*, 8(1), E142-E146.

19. Yamamoto, M., Ikada, Y., & Tabata, Y. (2001). *Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 12(1), 77-88.
20. Li, Z., Qu, T., Ding, C., Ma, C., Sun, H., Li, S., & Liu, X. (2015). *Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis*. Acta biomaterialia, 13, 88-100.
21. Nguyễn Đình Tiến Dũng (2020), “*Nghiên cứu tổng hợp và nang hóa nano sắt từ lên liposome định hướng ứng dụng làm vật liệu mang thuốc*”, Học viện khoa học và công nghệ – 04/2020.
22. Hong-Yan Lü, Shu-Hong Yang, Jia Deng, and Zhan-Hui Zhang (2010), “*Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles as New, Efficient, and Reusable Catalysts for the Synthesis of Quinoxalines in Water*”, Aust. J. Chem. 2010, 63, 1290–1296.
23. Mahmoud. Abd El Aleem. Ali. Ali. El-Remaily (2014), “*Synthesis of pyranopyrazoles using magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as efficient and reusable catalyst*”, Tetrahedron 70 (2014) 2971 – 2975
24. Hu A-L, Liu Y-H, Deng H-H, et al. *Fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glucose and l-lactate detection*. Biosens Bioelectron. 2014; 61:374–378.
25. Nagvenkar AP, Gedanken A. Cu₀. 89Zn₀. 11O, *A New Peroxidase-Mimicking Nanozyme with High Sensitivity for Glucose and Antioxidant Detection*. ACS Appl Mater Interfaces. 2016; 8:22301–22308.
26. G. S. Zakharova, I. V. Uporov and V. I. Tishkov, *Horseradish Peroxidase: Modulation of Properties by Chemical Modification of Protein and Heme*, Biochemistry (Moscow), 76, 13:1391-1401, 2011.
27. Boots, A.; Hanenen, G.; Bast (2008), *A Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical*. European Journal of Pharmacology, 585, 325-337.
28. Matsuzaki T, Hara Y (1985). *Antioxidative Activity of Tea Leaf Catechins*.
29. Abramovic H, Grobin B, Poklar NU, et al (2017). *The Methodology Applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteau Assays Has a Large*

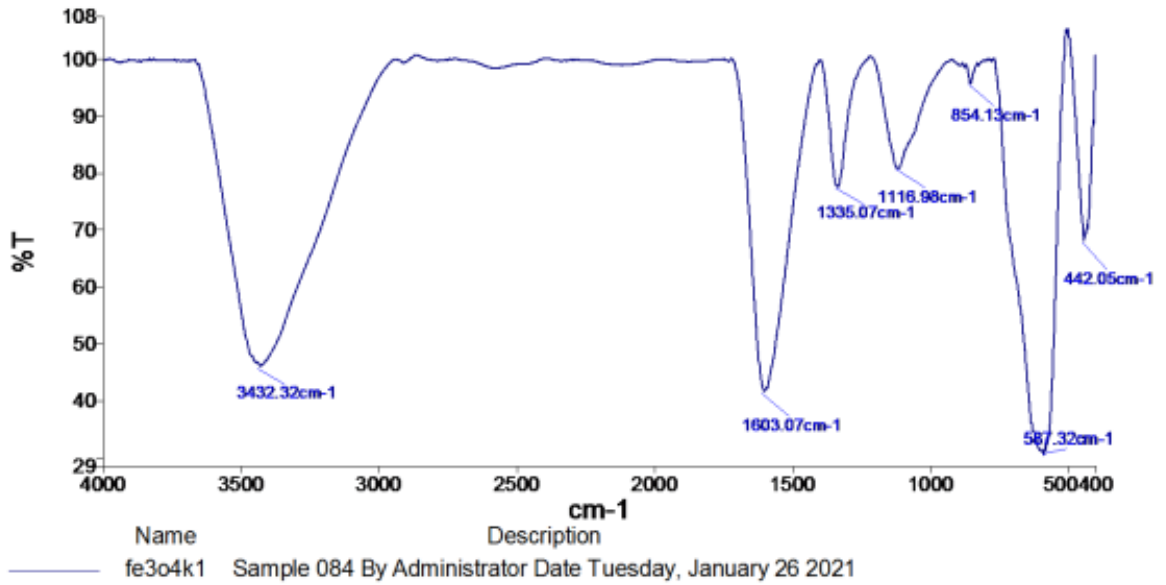
- Influence on the Determined Antioxidant Potential. Acta Chim Slov*, 64, 491-9.
30. Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, et al (2018). *Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants*. *Food Chemistry*, 241, 480-92.
 31. Espinosa Ruiz C, Cabrera L, Lopez-Jimenez JA, et al (2018). *Effects of long-term ingestion of white tea on oxidation produced by aging and acute oxidative damage in rats*. *J Physiol Biochem*, 74, 171-7.
 32. Rafael M. Buoro, Othon S. Campos, Raphael P. Bacil, and Silvia H. P. Serrano, *Insights toward the Electrochemical Behavior of Hematin Using a Hematin Modified Glassy Carbon Electrode*, *Journal of The Electrochemical Society*, 163 (10): G178-G185, 2016.
 33. 66. Ahmadi, S., Chia, C.H., Zakaria, S., Saeedfar, K., Asim, N. (2012). *Synthesis of Fe₃O₄ nanocrystals using hydrothermal approach*. *J. Magn. Mater.* 324: 4147-4150.
 34. Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R.J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E., Parak, F. (2003). *Magnetic drug targeting - Biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment*. *J. Drug Target*. 11: 139-149.
 35. Behdadfar, B., Kermanpur, A., Sadeghi-aliabadi, H., Morales, P. (2012). *Journal of Solid State Chemistry Synthesis of high intrinsic loss power aqueous ferrofluids of iron oxide nanoparticles by citric acid-assisted hydrothermal-reduction route*. *J. Solid State Chem*. 187: 20-26.
 36. Biehl, P., von der Lühe, M., Dutz, S., và Schacher, F.H. (2018). *Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings*. *Polymers (Basel)*. 10.
 37. *Book Review (2001).*: 2001.
 38. Latos-Brozio, M.; Masek, A. *Structure—Activity relationships analysis of monomeric and polymeric poly-phenols (quercetin, rutin and catechin) obtained by various polymerization methods*. *Chem. Biodivers*. 2019, 16.

39. Kurisawa, M.; Chung, J.E.; Kim, Y.J.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Amplification of *Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization*. *Biomacromolecules* 2003, 4, 469–471.
40. Latos-Brozio, M.; Masek, A.; Piotrowska, M. *Novel Polymeric Biomaterial Based on Naringenin*. *Materials* 2021, 14, 2142.
41. Latos-Brozio, M.; Masek, A.; Piotrowska, M. *Thermally Stable and Antimicrobial Active Poly(Catechin) Obtained by Reaction with a Cross-Linking Agent*. *Biomolecules* 2020, 11, 50.
42. Brien, R.W.O., Midmore, B.R., Lamb, A., Hunter, R.J. (2006). *Electroacoustic Studies of Moderately Concentrated Colloidal Suspensions*.: 301-312.
43. Tonami, H., Uyama, H., Nagahata, R., & Kobayashi, S. (2004). *Guaiacol oxidation products in the enzyme-activity assay reaction by horseradish peroxidase catalysis*. *Chemistry letters*, 33(7), 796-797.
44. Tan Phuoc Ton, Van Toan Nguyen, Phuong Doan, Dinh Trung Nguyen, Thi Phuong Nguyen, Chan Khon Huynh, Thi Cam Quyen Ngo, Le Hang Dang and Ngoc Quyen Tran. (2021). *Hematin-conjugated gelatin as an effective catalyst for preparing biological hydrogels*. *New J. Chem.* 45:18327.
45. Sasa Savic, Katarina Vojinovic, Sanja Milenkovic, Andrija Smelcerovic, Marc Lamshoeft, Zivomir Petronijevec (2013). *Enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase: Kinetic mechanism and identification of a dimeric product by LC–Orbitrap mass spectrometry*. *Food Chemistry*, Volume 141, Issue 4, Pages 4194-4199.
46. Keiding, S., Johansen, S., Winkler, K., Tonnesen, K., & Tygstrup, N. (1976). *Michaelis-Menten kinetics of galactose elimination by the isolated perfused pig liver*. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 230(5), 1302-1313.
47. El Khomsi, M.; Kara, M.; Hmamou, A.; Assouguem, A.; Al Kamaly, O.; Saleh, A.; Ercisli, S.; Fidan, H.; Hmouni, D. *In Vitro Studies on the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Total Polyphenol Content of*

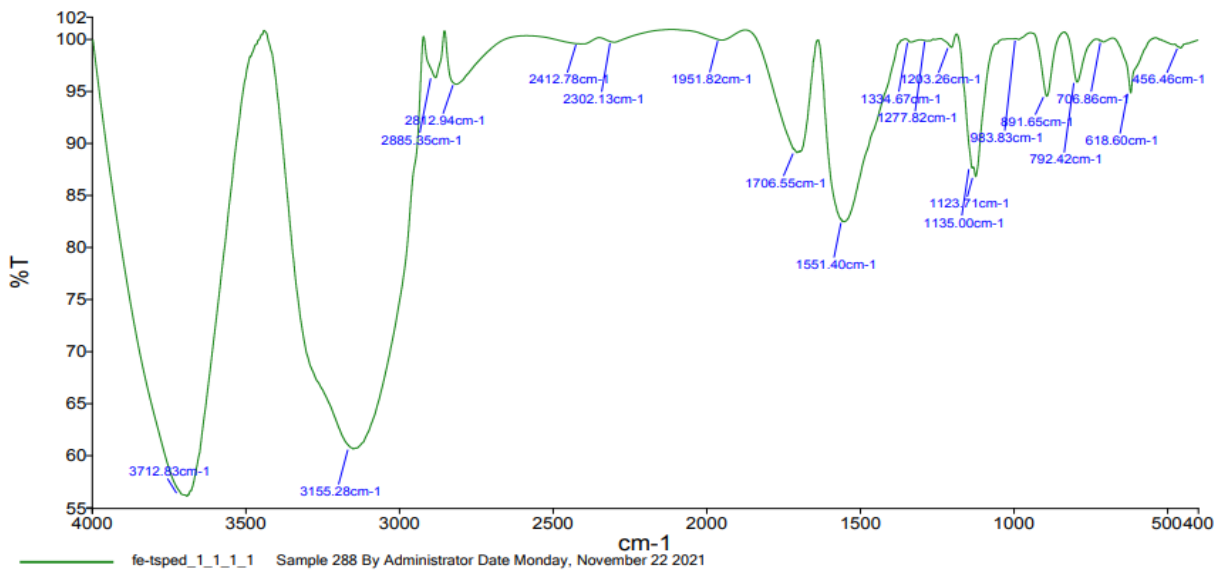
- Cynara humilis* from Moulay Yacoub Area (Morocco). *Plants* 2022, 11, 1200.
48. Ritchie, R. J., & Prvan, T. (1996). *Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics*. *Biochemical Education*, 24(4), 196-206.
49. Chen, Z., Xu, L., Liang, Y., & Zhao, M. (2010). *pH-sensitive water-soluble nanospheric imprinted hydrogels prepared as horseradish peroxidase mimetic enzymes*. *Advanced Materials*, 22(13), 1488-1492.
50. Tran, N. Q., Joung, Y. K., Lih, E., Park, K. M., & Park, K. D. (2010). *Supramolecular hydrogels exhibiting fast in situ gel forming and adjustable degradation properties*. *Biomacromolecules*, 11(3), 617-625.
51. Buchanan, I. D., & Nicell, J. A. (1997). *Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol*. *Biotechnology and bioengineering*, 54(3), 251-261.

PHỤ LỤC

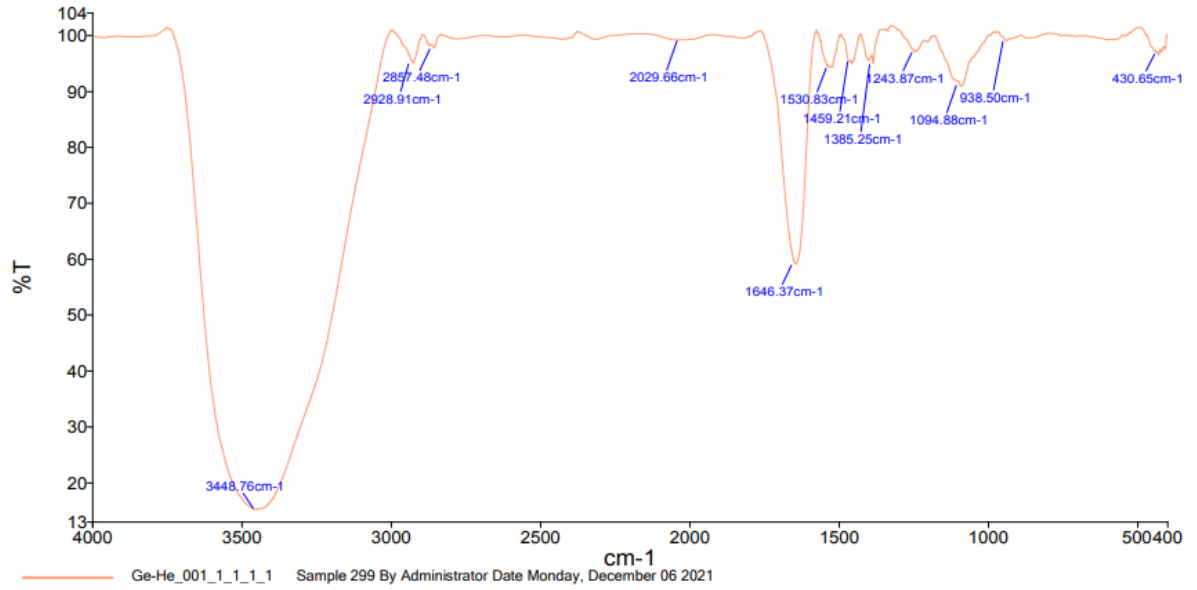
Phụ lục 1 Phổ FTIR của Fe₃O₄



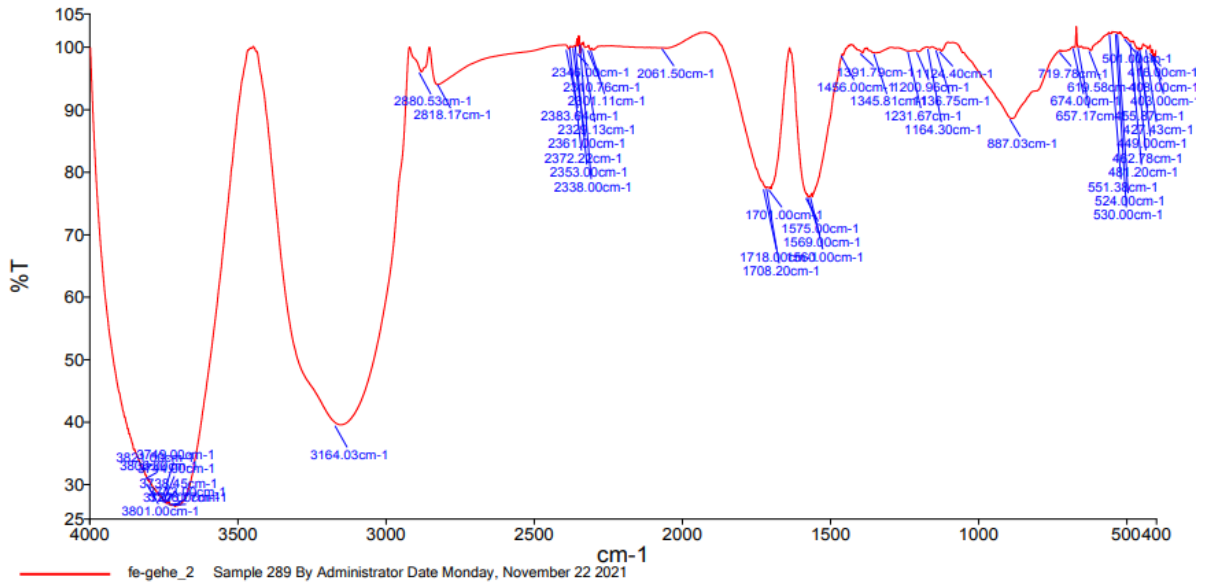
Phụ lục 2 Phổ FTIR của Fe₃O₄-TSPED



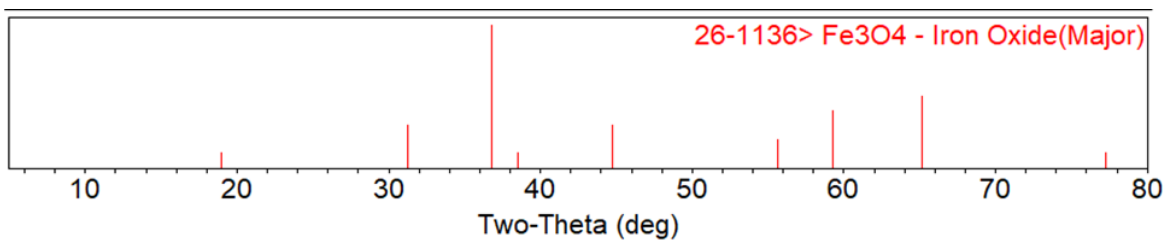
Phụ lục 3 Phổ FTIR của GeHe



Phụ lục 4 Phổ FTIR của Fe-GeHe



Phụ lục 5 Phổ XRD chuẩn của Fe₃O₄



Phụ lục 6 DLS của Fe₃O₄-TSPED

2021.11.23 12:26:30

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

116.nsz

Measurement Results

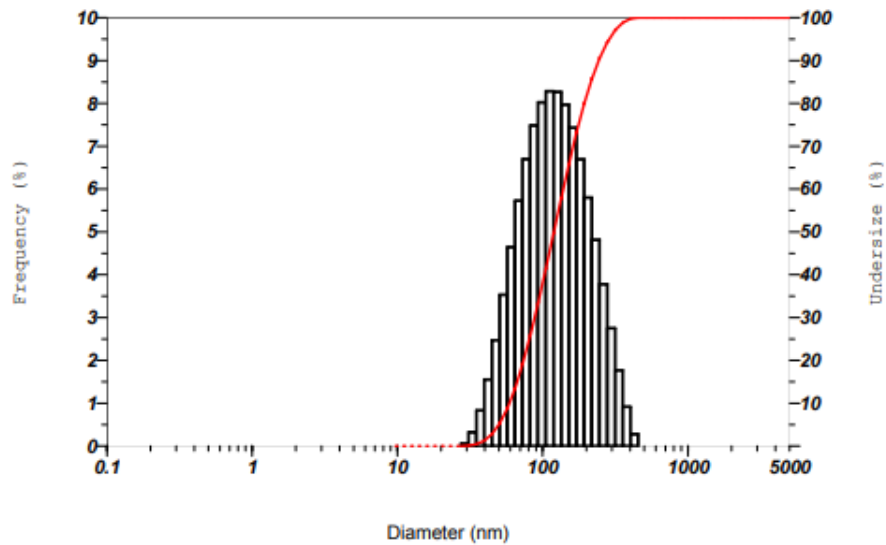
Date : Tuesday, November 23, 2021
Measurement Type : Particle Size
Sample Name : Fe-TSPED
Scattering Angle : 90
Temperature of the Holder : 25.0 °C
Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa·s
Transmission Intensity before Meas. : 7855
Distribution Form : Broad
Distribution Form(Dispersity) : Polydisperse
Representation of Result : Scattering Light Intensity
Count Rate : 2381 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	137.4 nm	74.0 nm	111.9 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	137.4 nm	74.0 nm	111.9 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 116.2 nm
PI : 0.148



Explore the future

Automotive Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

Phụ lục 7 DLS của Fe.GeHe

2021.11.23 12:37:20



HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

210.nsz

Measurement Results

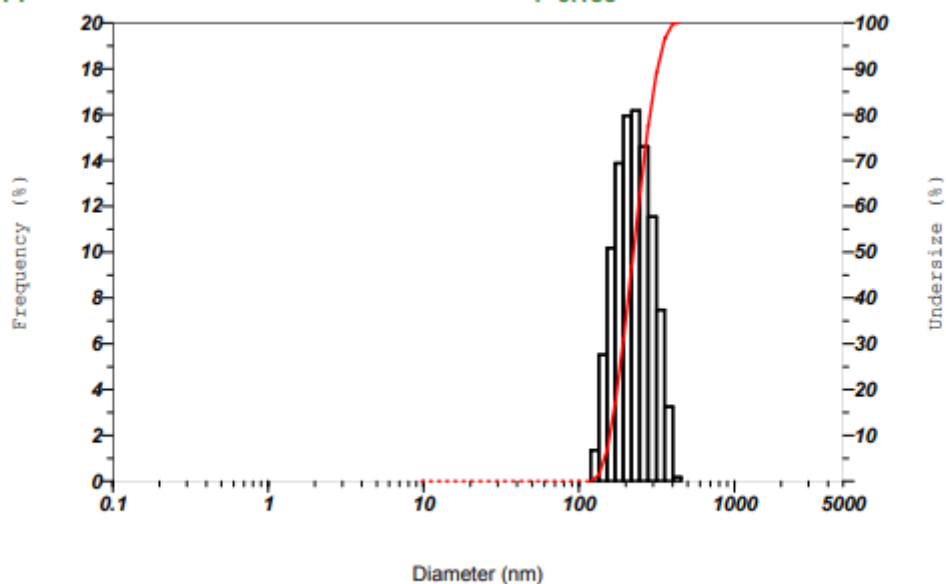
Date : Tuesday, November 23, 2021
Measurement Type : Particle Size
Sample Name : Fe-GeHe
Scattering Angle : 90
Temperature of the Holder : 25.0 °C
Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa-s
Transmission Intensity before Meas. : 19404
Distribution Form : Broad
Distribution Form(Dispersity) : Polydisperse
Representation of Result : Scattering Light Intensity
Count Rate : 2356 kCPS

Calculation Results

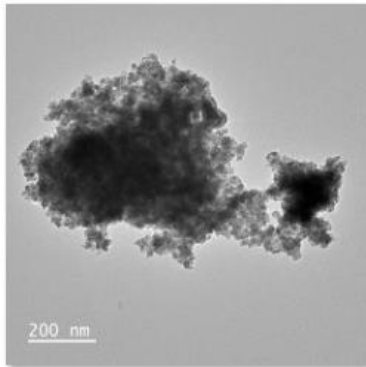
Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	232.0 nm	61.1 nm	231.2 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	232.0 nm	61.1 nm	231.2 nm

Cumulant Operations

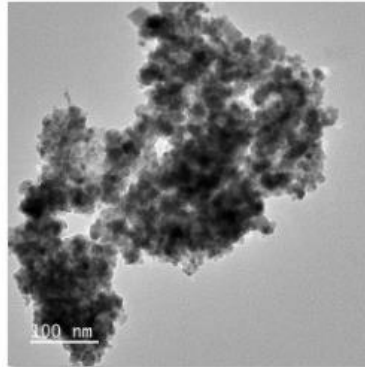
Z-Average : 210.4 nm
PI : 0.156



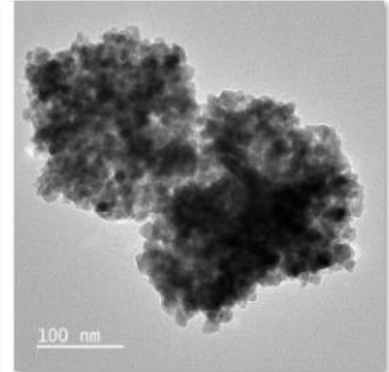
Phụ lục 8 Hình TEM của Fe₃O₄



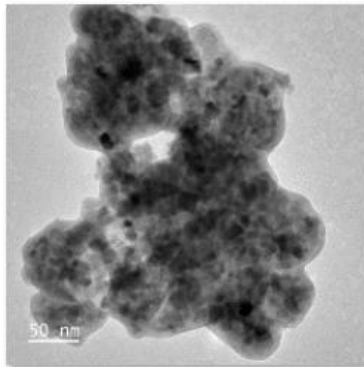
Rio9_120kV_Mau 1_20kX_2393



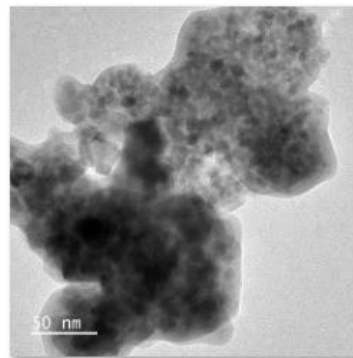
Rio9_120kV_Mau 1_40kX_2392



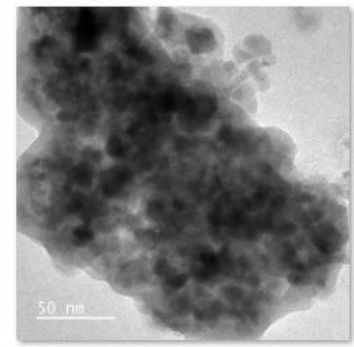
Rio9_120kV_Mau 1_50kX_2391



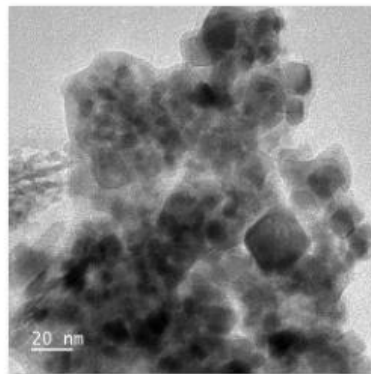
Rio9_120kV_Mau 1_60kX_2390



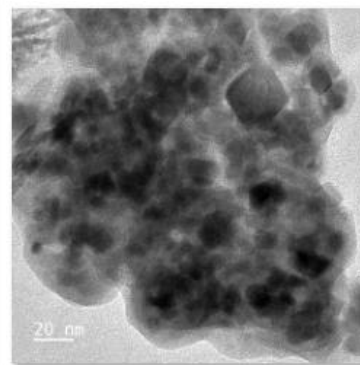
Rio9_120kV_Mau 1_80kX_2389



Rio9_120kV_Mau 1_100kX_2388

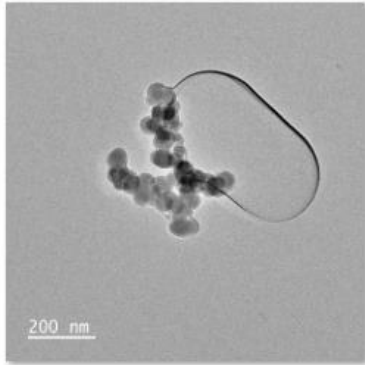


Rio9_120kV_Mau 1_120kX_2386

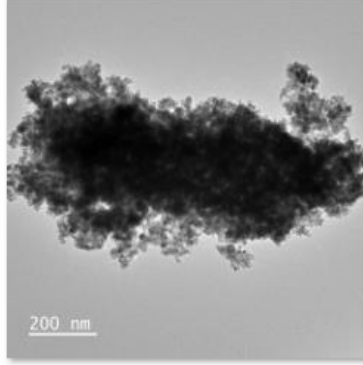


Rio9_120kV_Mau 1_120kX_2387

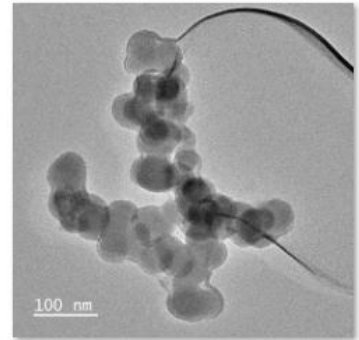
Phụ lục 9 Hình TEM của Fe₃O₄-TSPED



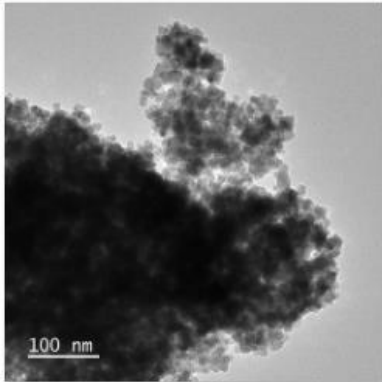
Rio9_120kV_Mau 2_20kX_2395



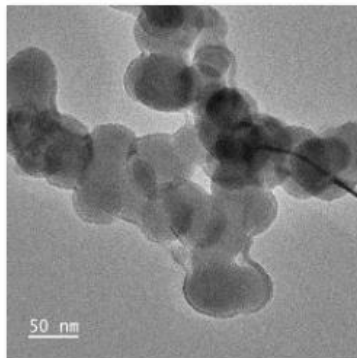
Rio9_120kV_Mau 2_20kX_2398



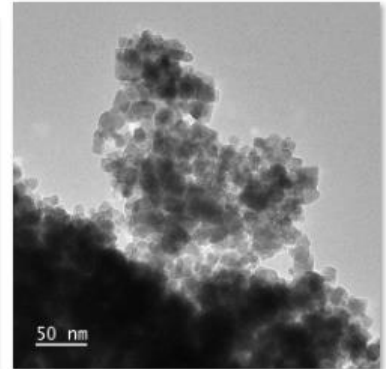
Rio9_120kV_Mau 2_40kX_2396



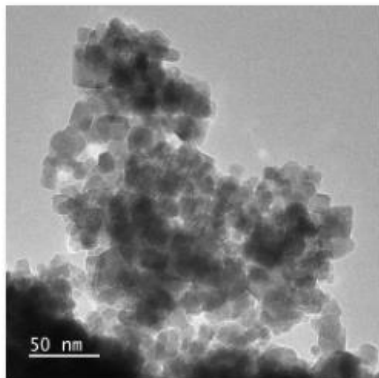
Rio9_120kV_Mau 2_40kX_2399



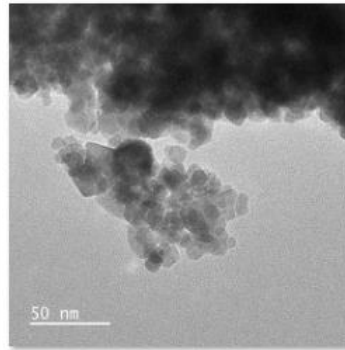
Rio9_120kV_Mau 2_60kX_2397



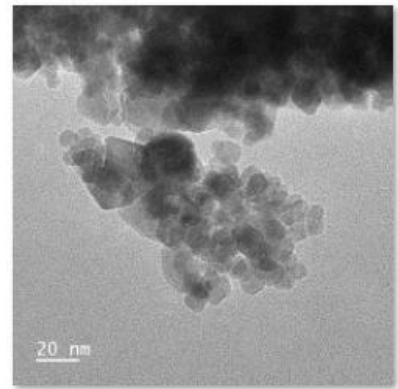
Rio9_120kV_Mau 2_60kX_2400



Rio9_120kV_Mau 2_80kX_2401

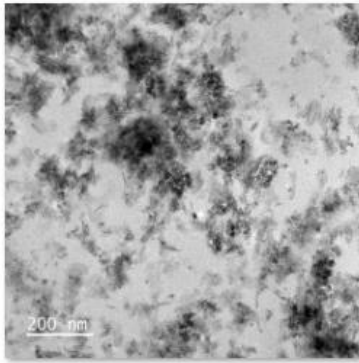


Rio9_120kV_Mau 2_100kX_2402

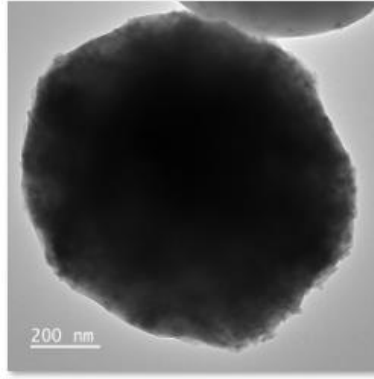


Rio9_120kV_Mau 2_120kX_2403

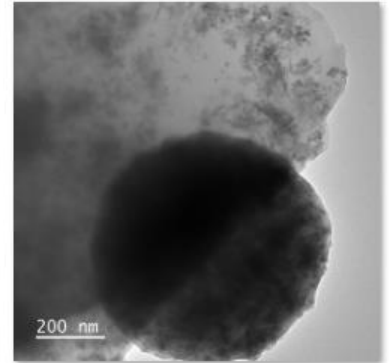
Phụ lục 10 Hình TEM của Fe-GeHe



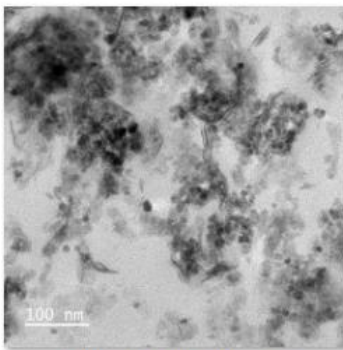
Rio9_120kV_Mau 3_20kX_2404



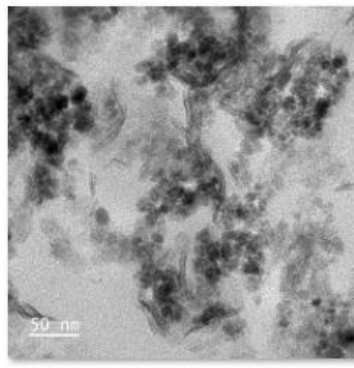
Rio9_120kV_Mau 3_20kX_2413



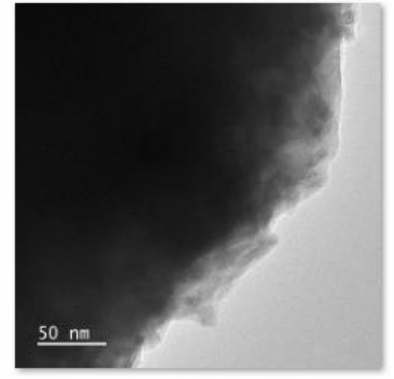
Rio9_120kV_Mau 3_20kX_2414



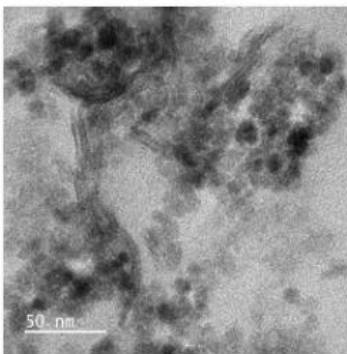
Rio9_120kV_Mau 3_40kX_2405



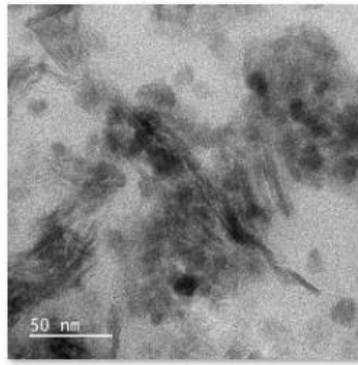
Rio9_120kV_Mau 3_60kX_2406



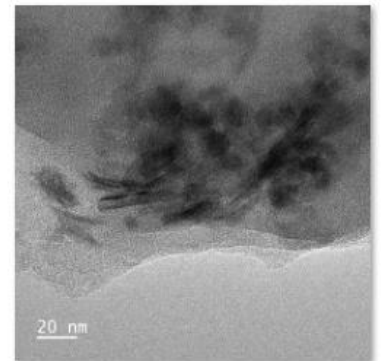
Rio9_120kV_Mau 3_80kX_2412



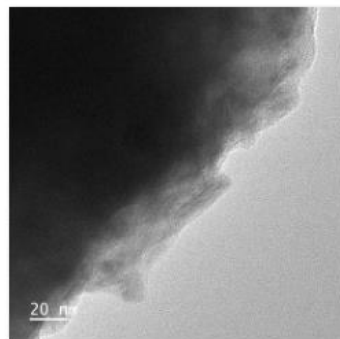
Rio9_120kV_Mau 3_100kX_2408



Rio9_120kV_Mau 3_100kX_2409



Rio9_120kV_Mau 3_120kX_2410



Rio9_120kV_Mau 3_120kX_2411