

NGHIÊN CỨU TÍNH CHẤT QUANG CỦA VẬT LIỆU TỔNG HỢP TỪ VỎ BƯỞI ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG Y SINH HỌC

Vũ Thị Huyền*, Phạm Thu Thủy

Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Vật liệu phát huỳnh quang được sử dụng rộng rãi trong y sinh học, và cũng không ít chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng là những chất hóa học độc hại hoặc đắt tiền. Bên cạnh đó, việc chế biến sâu để tăng giá trị nông sản sau thu hoạch đang ngày càng được quan tâm. Trong công trình này, vỏ bưởi-một loại phế phụ phẩm trong nông nghiệp được sử dụng như một nguồn nguyên liệu hữu cơ ban đầu để tổng hợp ra chất có khả năng phát huỳnh quang hữu cơ và thân thiện với môi trường. Vỏ bưởi được xử lý ở nhiệt độ cao để thực hiện phản ứng carbon hóa tiền chất ban đầu. Vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi (VB) thu được được khảo sát tính chất quang và độ bền quang học theo thời gian. Kết quả thu được cho thấy, vật liệu thu được phát ra huỳnh quang màu xanh với bước sóng phát quang là 439 nm và có độ bền quang tối thiểu là 100 phút dưới tác động trực tiếp của ánh sáng trắng. Tiếp đó, vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi được thử nghiệm bước đầu với khả năng nhuộm tế bào vi khuẩn. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi soi trên bàn soi tử ngoại UV, mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang phát ra ánh sáng màu xanh, trong khi mẫu vi khuẩn không ủ với vật liệu phát huỳnh quang thì không hiển thị màu. Điều này cho thấy rằng, có thể sử dụng vật liệu phát huỳnh quang được tổng hợp từ vỏ bưởi để nhuộm tế bào vi khuẩn và quan sát trên bàn soi UV. Các kết quả này mở ra các nghiên cứu ứng dụng tiềm năng khác của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi trong lĩnh vực y sinh học.

Từ khóa: Vỏ bưởi, vật liệu phát huỳnh quang, nhuộm tế bào, vi khuẩn, tính chất quang, hình ảnh.

MỞ ĐẦU

Chất phát huỳnh quang là chất có khả năng phát ra ánh sáng ở bước sóng nào đó khi bị kích thích bởi một ánh sáng với bước sóng xác định. Chất phát huỳnh quang thường được sử dụng trong y sinh học như nhuộm tế bào, nhuộm DNA, đánh dấu các phân tử sinh học... Một số chất phát huỳnh quang phổ biến như ethidium bromide thường được sử dụng để nhuộm DNA, tuy nhiên đây là một chất độc, có thể gây ung thư cho người và động vật; hay Hoechst – một chất phát huỳnh quang được biết đến là ít độc tố với tế bào, nhưng lại tương đối đắt tiền. Ngoài thuốc nhuộm tổng hợp, còn có một số thuốc nhuộm có nguồn gốc tự nhiên như haemotoxylin và carmine. Tuy nhiên các thuốc nhuộm có nguồn gốc tự nhiên này cho mức độ hiện thị màu yếu và cần có chất tăng cường màu sử dụng kèm.

Thời gian gần đây một số chất phát quang từ thực vật đã được nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học như cảm biến/hình ảnh, quang điện tử, quang xúc tác, phân phối thuốc/gene, kỹ thuật mô, y học tái tạo, trị liệu ung thư... (Rabiee *et al.*, 2022). Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan tâm đến ứng dụng trong hình ảnh sinh học của vật liệu phát quang. Gần đây, nhóm tác giả Atchudant và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo chất phát quang từ vỏ quả kiwi nhằm sử dụng để quan sát tế bào người bình thường và tế bào ung thư trên kính hiển vi cho hình ảnh quan sát rõ nét, thể hiện sự tương thích sinh học và độc tính tế bào thấp (Atchudan *et al.*, 2022). Trước đó, năm 2017, nhóm tác giả Manaf và cộng sự cũng đã chế tạo chất phát quang từ vỏ cây cao lương để nhuộm tế bào N2a và tế bào A-375 (Manaf *et al.*, 2017).

Bên cạnh đó, bưởi là một loại thực phẩm bổ dưỡng và đem lại hiệu quả kinh tế cao với một số sản phẩm chế biến như nước ép bưởi, tinh dầu bưởi, rượu bưởi,... (Chavan *et al.*, 2018). Gần đây, việc đầu tư chế biến sâu để tăng giá trị nông sản đang ngày càng được chú trọng. Việc chế biến các sản phẩm từ vỏ bưởi - một loại phế phụ phẩm trong nông nghiệp chứa các phần chính như pectin, cellulose, tinh dầu, polyphenol, flavonoid... sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế của quả bưởi và giảm nguồn gây ra ô nhiễm môi trường. Gần đây, đã có một số nghiên cứu ứng dụng từ vỏ bưởi như trà túi lọc (Trần Thanh Trúc *et al.*, 2021), thành phần của dầu gội đầu (Nguyễn Thị Linh Tuyền *et al.*, 2023)... Vỏ bưởi cũng đã được sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp thành các chất phát huỳnh quang với khả năng phát quang mạnh, độ bền màu cao để phát hiện kháng sinh (Qi *et al.*, 2022), hay ion Fe^{3+} và L-Cysteine (Zhang *et al.*, 2022). Với khả năng phát huỳnh quang này kèm thêm độc tính thấp, thân thiện với môi trường và rẻ tiền, nó cũng có thể sử dụng thử nghiệm trong việc đánh dấu/ nhuộm các phân tử sinh học.

Do vậy, công trình này tập trung nghiên cứu tính chất quang của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi và bước đầu thử nghiệm sử dụng nó để nhuộm các tế bào vi khuẩn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Nguyên liệu chính sử dụng trong công trình này là vỏ bưởi Diễn và vi khuẩn *Salmonella enterica* VTCC 12277.

Tổng hợp vật liệu phát quang từ vỏ bưởi

Vỏ bưởi thu về được rửa sạch bằng nước vòi. Sau đó, cắt nhỏ thành từng miếng nhỏ có kích thước khoảng 1 cm x 5 cm. Sấy vỏ bưởi đã cắt nhỏ ở 80°C trong 20 giờ bằng tủ sấy SH-DO-250FG (Hàn Quốc). Tiếp theo, sử dụng chày và cối sứ nghiền nhỏ vỏ bưởi thành dạng bột/hạt nhỏ. Cân 5 gram vỏ bưởi và lấy 50 mL nước deion vào bình Teflon. Hỗn hợp này được ủ ở 200°C trong 2 giờ và sau đó, để nguội đến nhiệt độ phòng. Lọc bỏ cặn bằng giấy lọc và ly tâm ở 5000 rpm trong 30 phút. Dung dịch bên trên thu được là sản phẩm tạo thành – vật liệu phát huỳnh quang VB.

Khảo sát tính chất quang

Vật liệu tạo thành từ vỏ bưởi được khảo sát quang phổ hấp thụ bằng thiết bị quang phổ nhỏ giọt Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Mỹ) và quang phổ huỳnh quang bằng thiết bị quang phổ huỳnh quang nhỏ giọt Nanodrop 3300 (Thermo Scientific, Mỹ). Độ bền quang của vật liệu được khảo sát bằng để mẫu vật liệu dưới ánh sáng trắng trực tiếp, đo cường độ huỳnh quang sau mỗi 10 phút trong 100 phút.

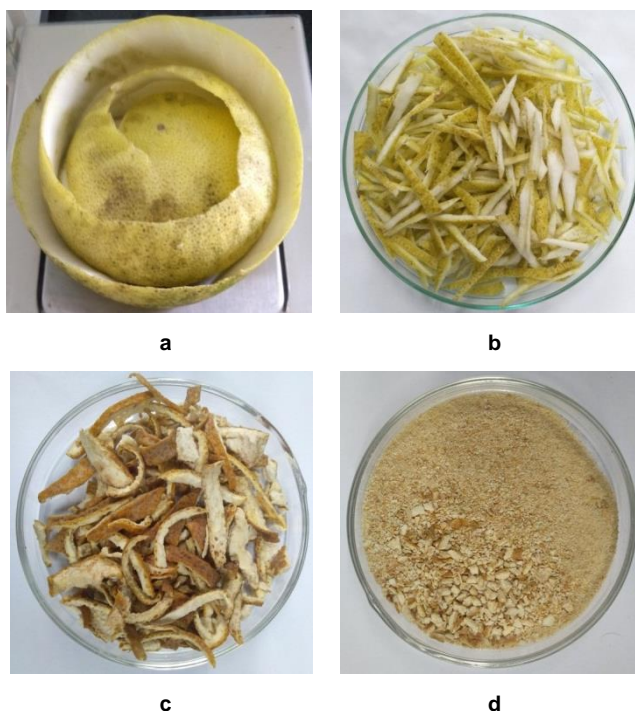
Thử nghiệm nhuộm tế bào vi khuẩn

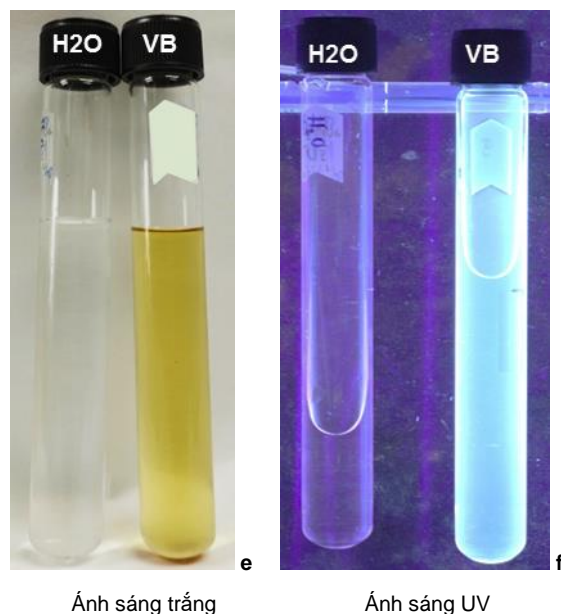
Vi khuẩn trữ đông được hoạt hóa và nuôi lỏng trên môi trường LB ở 37°C trong 16 giờ. Ủ vi khuẩn ở 95°C trong 10 phút để diệt chết hết vi khuẩn. Sau đó, ly tâm ở 5000 rpm trong 3 phút để loại bỏ dịch nuôi vi khuẩn, rửa lại 2 lần bằng đệm PBS (Phosphate Buffered Saline). Ủ vi khuẩn với vật liệu phát huỳnh quang VB trong đệm PBS trong 30 phút. Ly tâm loại bỏ dịch tan, rửa lại 3 lần bằng đệm PBS. Phân tán cặn thu được trong 50 µL PBS và quan sát hình ảnh trên bàn soi UV. Mẫu đối chứng là mẫu vi khuẩn không được ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất phát huỳnh quang từ vỏ bưởi

Vỏ bưởi tươi ban đầu được cắt nhỏ, sấy khô và nghiền nhỏ (Hình 1a-d). Vỏ bưởi sau khi được thực hiện phản ứng carbon hóa ở nhiệt độ cao thì thu được dung dịch màu vàng (Hình 1e). Khi bị kích thích bởi ánh sáng UV thì chất tạo thành có khả năng phát ra huỳnh quang màu xanh (blue) (Hình 1f) như một số công trình đã công bố gần đây (Qi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Hiện tượng này cho thấy rằng một số chất trong vỏ bưởi đã được carbon hóa tạo thành các chất có cấu trúc và bề mặt mới.

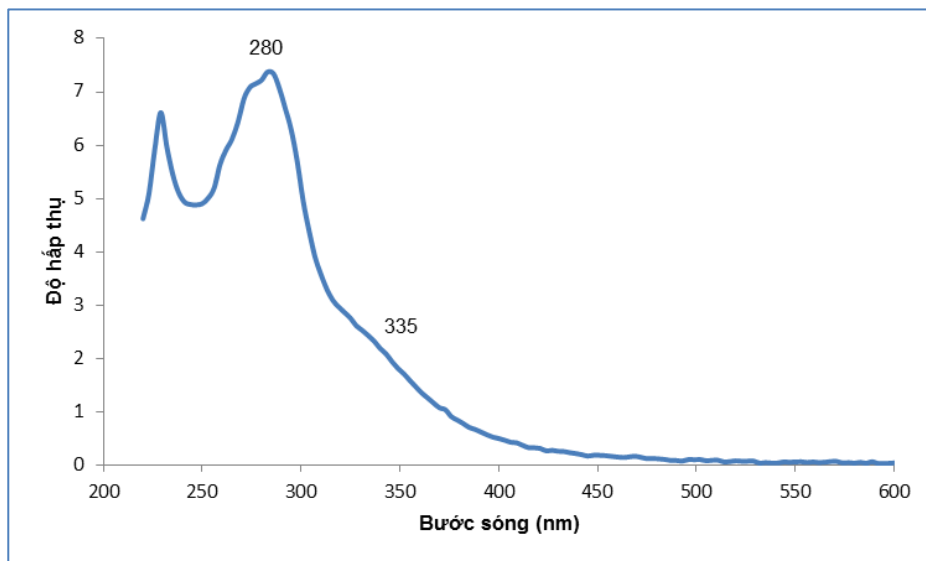




Hình 1. Vô bào (a-d) và vật liệu phát huỳnh quang tạo thành dưới ánh sáng trắng (e) và ánh sáng UV (f)

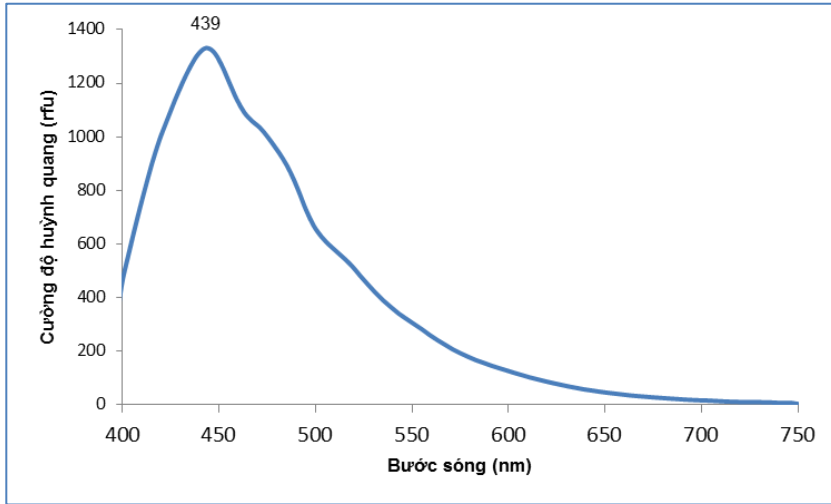
Tính chất quang của vật liệu tạo thành

Tính chất quang của vật liệu tạo thành được thể hiện qua phổ hấp thụ và phổ huỳnh quang của nó. Phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang tạo thành được khảo sát trong dải bước sóng từ 200 nm đến 750 nm trên thiết bị đo quang phổ hấp thụ nhỏ giọt (NanoDrop 8000). Kết quả thu được cho thấy, phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang VB xuất hiện các đỉnh hấp thụ cực đại tại bước sóng 280 nm và 335 nm (Hình 2). Trong đó, đỉnh hấp thụ tại bước sóng 280 nm xuất hiện được cho là do có sự dịch chuyển điện tử $n-\pi^*$ của liên kết $C=O$ trong nhóm carboxyl của vật liệu phát huỳnh quang VB, trong khi đó, đỉnh hấp thụ tại bước sóng 335 nm được cho là do có sự sửa đổi các thành phần khác nhau trên bề mặt vật liệu. Điều này chỉ ra rằng cấu trúc của vật liệu phát huỳnh quang VB tạo thành có chứa nhóm mang màu n - điện tử (cụ thể là nhóm carboxyl) và có cấu trúc liên hợp (Qi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).



Hình 2. Phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang VB

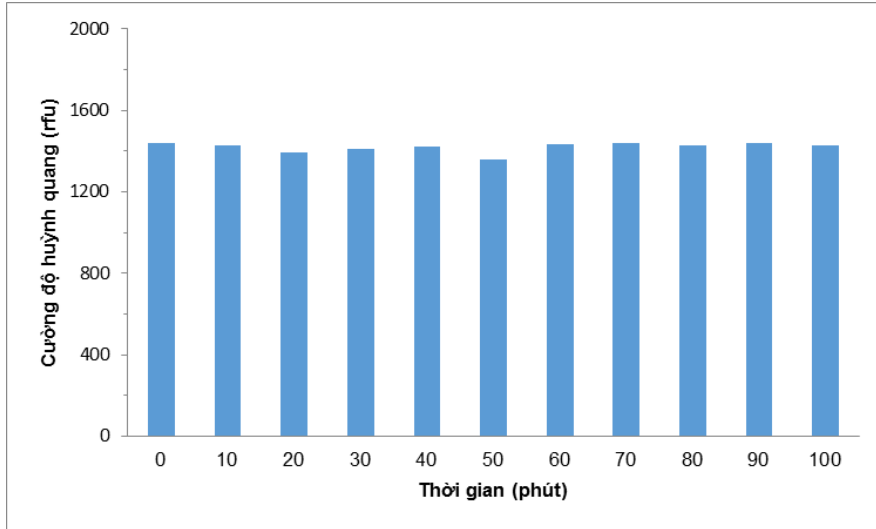
Quang phổ huỳnh quang của vật liệu tạo thành được ghi nhận bằng phương pháp đo quang phổ huỳnh quang nhỏ giọt (NanoDrop 3300). Phổ huỳnh quang cho thấy vật liệu phát quang VB phát ra ánh sáng màu xanh với đỉnh phát quang tại bước sóng là 439 nm khi bị kích thích bởi ánh sáng UV 312 nm (Hình 3).



Hình 3. Phổ huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB

Bên cạnh đó, tính ổn định của huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB dưới ánh sáng trắng theo thời gian. Mẫu được để dưới ánh sáng trắng, sau đó ghi nhận cường độ huỳnh quang khi bị kích thích bởi ánh sáng UV sau mỗi 10 phút trong khoảng 100 phút. Kết quả phân tích cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về cường độ huỳnh quang của vật liệu phát quang VB theo thời gian (Hình 4). Kết quả này thể hiện vật liệu phát huỳnh quang VB tạo thành khá ổn định, không bị tác động nhiều bởi ánh sáng trắng. Tính chất này giúp vật liệu phát huỳnh quang VB có thể thuận lợi thực hiện một số ứng dụng mà không cần phải bao bọc, bảo vệ khỏi ánh sáng trắng chiếu vào khi tiến hành thực nghiệm trong khoảng 100 phút.

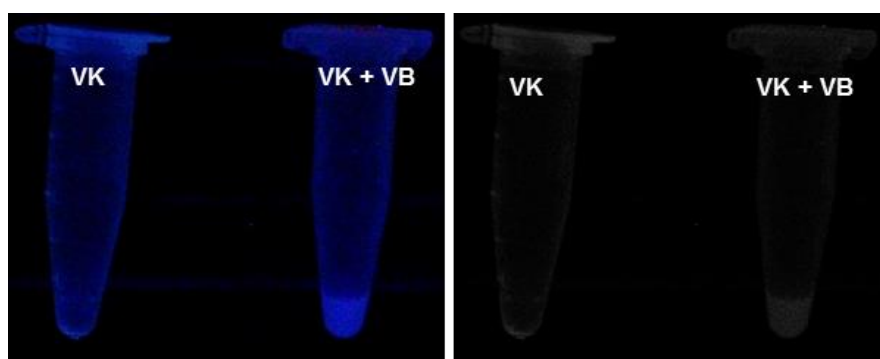
Như vậy, từ các kết quả phân tích trên có thể khẳng định rằng, từ vỏ bưởi (vật chất không phát huỳnh quang) có thể tạo thành vật liệu phát huỳnh quang màu xanh bền theo thời gian. Với tính chất huỳnh quang này, chất phát huỳnh quang từ vỏ bưởi có thể có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học.



Hình 4. Cường độ huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB theo thời gian

Định hướng ứng dụng trong y sinh học

Với tính chất huỳnh quang, vật liệu phát quang VB có thể thử nghiệm sử dụng với định hướng ứng dụng trong y sinh như phát hiện kim loại, kháng sinh, các tế bào... Trong báo cáo này, chúng tôi đã sử dụng nó để nhuộm tế bào vi khuẩn đã chết. Vi khuẩn sau khi diệt bằng nhiệt độ cao, ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB, loại bỏ dịch tan và rửa trôi vật liệu huỳnh quang bám dính được phân tán vào trong PBS và soi dưới ánh sáng UV. Hình ảnh ghi nhận được cho thấy, mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB phát ra ánh sáng màu xanh, trong khi mẫu vi khuẩn không ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB thì không có màu (Hình 5). Điều này cho thấy rằng vật liệu phát huỳnh quang VB có thể đã kết hợp với vi khuẩn bằng một cách thức nào đó, có thể là chúng đã xâm nhập vào trong tế bào vi khuẩn. Như vậy, sử dụng vật liệu phát huỳnh quang VB có thể nhuộm được tế bào vi khuẩn.



Hình 5. Ảnh màu (trái) và ảnh đen trắng (phải) của dung dịch vi khuẩn đã nhuộm bằng chất phát quang VB dưới ánh sáng UV

KẾT LUẬN

Công trình này đã nghiên cứu tổng hợp được vật liệu có khả năng phát huỳnh quang từ vỏ bưởi bằng cách carbon hóa tiền chất ban đầu ở nhiệt độ cao. Vật liệu thu được phát ra huỳnh quang màu xanh với bước sóng phát quang là 439 nm và có độ bền quang tối thiểu là 100 phút dưới tác động trực tiếp của ánh sáng trắng. Vật liệu phát huỳnh quang này được thử nghiệm bước đầu với khả năng nhuộm tế bào vi khuẩn đã chết. Hình ảnh soi trên bàn soi tử ngoại UV cho thấy mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang phát ra ánh sáng màu xanh, phân biệt khá rõ rệt với mẫu đối chứng. Kết quả này mở ra các ứng dụng tiềm năng khác của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi với việc sử dụng tính chất quang trong lĩnh vực y sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội trong đề tài mã số QG.24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdul Manaf SA, Hegde G, Mandal UK, Wui T, Roy PJCdd (2017). Functionalized Carbon Nano-scale Drug Delivery Systems From Biowaste Sago Bark For Cancer Cell Imaging. *Curr Drug Deliv*, 14(8): 1071-1077.
- Atchudan R, Chandra Kishore S, Gangadaran P, Jebakumar Immanuel Edison TN, Perumal S, Rajendran RL, Alagan M, Al-Rashed S, Ahn BC, Lee YR (2022). Tunable fluorescent carbon dots from biowaste as fluorescence ink and imaging human normal and cancer cells. *Environ Res*, 204(Pt D): 112365.
- Chavan P, Singh AK, Kaur G (2018). Recent progress in the utilization of industrial waste and by products of citrus fruits: A review. *J FoodProcess Eng*, 41(8), 12895.
- Nguyễn Thị Linh Tuyền, Lê Cường Nam, Nguyễn Trần Văn Anh, Hoàng Thị Thuỳ Dung, Nguyễn Minh Thông (2023). Bào chế dầu gội chứa vỏ bưởi, dầu kết, hương nhu. *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, 56: 16-22.
- Qi H, Huang D, Jing J, Ran M, Jing T, Zhao M, Zhang C, Sun X, Sami R, Benajiba N (2022). Transforming waste into value: pomelo-peel-based nitrogen-doped carbon dots for the highly selective detection of tetracycline. *RSC Adv*, 12(12): 7574-7583.
- Rabiee N, Iravani S, Varma RS (2022). Biowaste-Derived Carbon Dots: A Perspective on Biomedical Potentials. *Molecules*, 27(19): 6168.
- Trần Thanh Trúc, Mai Thành Thái, Mai Diễm Trinh, Nguyễn Trọng Tuân (2021). Nghiên cứu công nghệ chế biến trà túi lọc từ vỏ bưởi Năm Roi (*Citrus grandis* (L.) OSBECK). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57: 10-20.
- Zhang D, Zhang F, Liao Y, Wang F, Liu H (2022). Carbon Quantum Dots from Pomelo Peel as Fluorescence Probes for "Turn-Off-On" High-Sensitivity Detection of Fe³⁺ and L-Cysteine. *Molecules*. 27(13): 4099.

STUDY ON OPTICAL PROPERTIES OF POMELO PEEL - DERIVED MATERIALS FOR APPLYING IN BIOMEDICINE

Vu Thi Huyen*, Pham Thu Thuy

Faculty of Agriculture Technology, University of Engineering and Technology, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Fluorescent dyes are widely used in biomedicine, but most of them are either toxic or costly chemicals. In addition, deep processing of post-harvest agricultural products to enhance their value is receiving more attention. In this work, pomelo peel, an agricultural waste product, was used as a carbon source to synthesize an environmentally friendly and organic fluorescent substance. To perform the carbonization reaction, the pomelo peel was treated with high temperatures. The optical properties and fluorescent stability over time of the obtained product were investigated. The results showed that the emission wavelength of fluorescent material was 439 nm and it has fluorescent stability when exposed to long-term light (at least 100 minutes). Additionally, this fluorescent material was initially tested for its ability to stain bacterial cells. The results show that when ultraviolet light is irradiated, bacterial samples incubated with fluorescent materials have a blue color, while the control sample does not have any color. This means that fluorescent material from pomelo peel can be used to stain bacterial cells. These results demonstrated the huge potential of its to application in the biomedical field.

Keywords: Pomelo peel, fluorescent material, cell staining, bacteria, optical properties, imaging.

* Author for correspondence: Tel: 0399092919; Email: huyenvu@vnu.edu.vn