

Bài báo nghiên cứu

**TỔNG HỢP VẬT LIỆU SILICA GEL MANG CHẤT LỎNG ION
KHUNG PYRROLIDINE LÀM CỘT CHIẾT PHA RẮN
TRONG PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI**

KHÁNG SINH ENROFLOXACIN, NORFLOXACIN VÀ DIFLOXACIN

*Huỳnh Thị Thanh Tâm¹, Nguyễn Thái Thế¹, Nguyễn Diệu Linh¹, Đỗ Hoàng Ngọc Mai²,
Nguyễn Hồ Thùy Linh³, Đoàn Lê Hoàng Tân³, Trần Hoàng Phương^{1*}*

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trung tâm Kiểm nghiệm An toàn Thực phẩm Khu vực phía Nam, Viện Y tế Công cộng Thành phố Hồ Chí Minh

³Trung tâm Nghiên cứu Vật liệu Cấu trúc Nano và Phân tử, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: Trần Hoàng Phương – Email: thphuong@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 14-8-2022; ngày nhận bài sửa: 24-9-2022; ngày duyệt đăng: 25-9-2022

TÓM TẮT

Chúng tôi đã phát triển một loại vật liệu mới là sử dụng chất lỏng ion mang lên silica gel làm vật liệu chiết pha rắn để phân tích fluoroquinolones. Trong nghiên cứu này, 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide đã được tổng hợp và cố định lên silica gel (ILSPE). Cấu trúc của chất lỏng ion và chất lỏng ion gắn lên silica được phân tích bằng FT-IR, ¹H và ¹³C NMR, TGA-DT, SEM, BET và EDX. Vật liệu được hình thành dựa trên liên kết hydrogen và tương tác van der Waals giữa silica gel và chất lỏng ion. Pha tĩnh này chứng minh là vật liệu chiết pha rắn hiệu quả lưu giữ enrofloxacin, norfloxacin và difloxacin. Cuối cùng, vật liệu được áp dụng trong xử lý mẫu trùng gà và tôm chứa enrofloxacin và difloxacin với hiệu suất thu hồi cao (80-110%).

Từ khóa: 1-methylpyrrolidine; kháng sinh, fluoroquinolone; chất lỏng ion; silica gel; cột chiết pha rắn

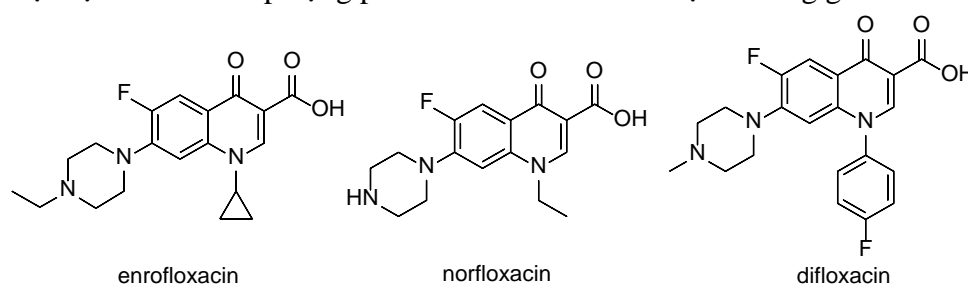
1. Giới thiệu

Quinolone là nhóm kháng sinh có nguồn gốc từ phòng thí nghiệm và được phát hiện lần đầu vào năm 1960 nhờ khám phá 7-chloroquinolone - một sản phẩm phụ trong quá trình tổng hợp chloroquine có tác dụng kháng khuẩn (Eliopoulos, Klimm, Eliopoulos, Ferraro, & Moellering Jr, 1993). Bước ngoặt quan trọng là đưa thêm vào khung quinolone một nguyên tử fluorine ở vị trí 6, tạo ra nhóm fluoroquinolone (FQ) mà chất đầu tiên là flumequine (Sharma, Jain, & Jain, 2009). Các FQ được sử dụng từ năm 1985, thuộc nhóm quinolone thế hệ II có phổ rộng trên cả vi khuẩn gram (-) và gram (+) (Appelbaum & Hunter, 2000). Các

Cite this article as: Huynh Thi Thanh Tam, Nguyen Thai The, Nguyen Dieu Linh, Do Hoang Ngoc Mai, Nguyen Ho Thuuy Linh, Doan Le Hoang Tan, & Tran Hoang Phuong (2022). Synthesis of pyrrolidin-1-ium ionic liquid grafted onto silica gel as solid-phase extraction sorbent to determine enrofloxacin, norfloxacin, and difloxacin antibiotic. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(9), 1494-1507.

FQ được dùng điều trị nhiễm khuẩn đường niệu và nhiều bệnh nhiễm trùng toàn thân. Hiện nay, các FQ tồn tại nhiều trong các thực phẩm như thịt, cá, trứng, sữa do việc sử dụng trong chăn nuôi (Goldman, 2004). Điều này đã gây ra nhiều vấn đề sức khỏe do dư lượng kháng sinh tăng cao trong thực phẩm. Tại Hoa Kỳ, FDA không chấp nhận dư lượng FQ trong thủy sản. Ở châu Âu, chính phủ cũng thiết lập những quy định về giới hạn dư lượng tối đa của FQ trong các sản phẩm thực phẩm cho người từ những năm 1990 (Toussaint, Chedin, Bordin, & Rodriguez, 2005). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã định lượng dư lượng các FQ trong nhiều nền bằng phương pháp khác nhau (Gajda, Posyniak, Zmudzki, Gbylik, & Bladek, 2012). Tại Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã ban hành Thông tư 10/2016/TTBNNPTNT về việc sử dụng thuốc và hóa chất trong chăn nuôi (enrofloxacin 100 µg/L và difloxacin 300 µg/L).

Ngày nay, một số phương pháp phân tích sử dụng cột chiết pha rắn (SPE) – giúp làm giàu mẫu và loại tạp, giúp phân tích chính xác hơn trên các thiết bị có độ nhạy kém. Chất lỏng ion (IL) đã được sử dụng nhiều trong lĩnh vực phân tích, đặc biệt là phương pháp SPE (Fontanals, Borrull, & Marcé, 2012). Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy IL gắn trên silica gel hay polymer dùng làm pha tĩnh SPE trong phân tích aryl amide (Zhao et al., 2014), kim loại nặng (Nguyen et al., 2022) và thuốc diệt cỏ triazine (Wang et al., 2015)... Trong nghiên cứu này, vật liệu chất lỏng ion gắn trên silica (ILSPE) được tổng hợp và ứng dụng trong phân tích đồng enrofloxacin (Enro), norfloxacin (Nor) và difloxacin (Di) bằng HPLC-MS/MS. IL được điều chế có khả năng điều chỉnh cấu trúc dựa trên phần anion và cation, do vậy dây alkyl C18 được gắn trên 1-methylpyrrolidine sẽ tăng tính kỵ nước và giúp cho quá trình lưu giữ chất phân tích tốt hơn. Ngoài ra, do trong cấu trúc phân tử các FQ (Hình 1) có chứa nhóm -COOH nên có thể tạo ra tương tác tĩnh điện tốt với cation của IL khi chất phân tích ở pH thích hợp. Nghiên cứu này tập trung vào việc đánh giá khả năng lưu giữ, rửa giải chất phân tích của vật liệu ILSPE và áp dụng phân tích trên nền mẫu thật là trứng gà và tôm.



Hình 1. Cấu trúc của enrofloxacin, norfloxacin và difloxacin

2. Vật liệu và phương pháp

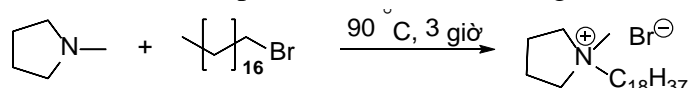
2.1. Hóa chất

1-Methylpyrrolidine, pyridine, tetrabutylammonium bromide, triphenylphosphine, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane và 1-bromooctadecane được mua từ Merck. Nitric acid, hydrochloric acid, acetone và ethanol được mua từ Xilong. Silica gel 60 (của Himedia, Ấn Độ) có kích thước trong khoảng 0,04-0,06 mm. Hóa chất dùng để phân tích HPLC thuộc loại

ting khiết như acetonitrile, methanol, phosphoric acid, ammonia, sodium hydroxide (Scharlau); difloxacin hydrochloride (99,4%) được mua từ Fluka, norfloxacin (99,5%) được mua từ Dr Ehrenstofer GmbH và enrofloxacin (99,7%) được mua Merck.

2.2. Quy trình tổng hợp IL

1-Methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide được điều chế theo quy trình ở Hình 2. Hỗn hợp 1-methylpyrrolidine (1,0 mmol) và 1-bromooctadecane (1,0 mmol) được đun hoàn lưu tại 90 °C trong 3 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, chất rắn được rửa bằng diethyl ether (3×10 mL) và làm khô. Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng FT-IR, NMR và MS.



Hình 2. Phản ứng tổng hợp chất lỏng ion 1-methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium bromide

2.3. Quy trình phủ IL trên silica gel

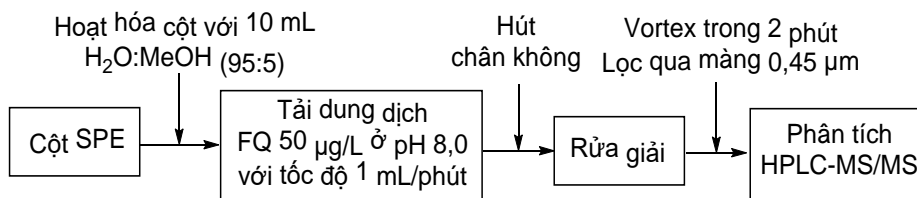
Việc hoạt hóa bề mặt silica gel và tẩm chất lỏng ion được thực hiện tương tự các nghiên cứu trước đây (Gharehbaghi & Shemirani, 2012). Trước khi phủ IL, silica gel được hoạt hóa với nitric acid (tỉ lệ 1:1,5 theo khối lượng) bằng cách đun nóng ở 80 °C trong 4 giờ. Sau đó, silica gel được rửa lại với nước cất, ethanol và sấy khô ở 120 °C trong 24 giờ. Silica gel đã hoạt hóa (3,0 g) và IL (1,0 g) được cho vào 20 mL methanol và khuấy đều bằng máy khuấy từ. Sau 4 giờ, hỗn hợp được li tâm để tách phần rắn. Vật liệu ILSPE được rửa bằng nước cất (3 x 50 mL) và sấy khô ở 130 °C trong 4 giờ.

2.4. Quy trình chuẩn bị cột chiết pha rắn

Cân chính xác 200 mg vật liệu ILSPE vào cột Strata SPE được cố định bằng 2 màng lọc 20 µm Molderd Frits cho loại 3 mL. Thực hiện cố định miếng frits với lực đẩy là như nhau cho từng cột. Kí hiệu và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.5. Quy trình khảo sát khả năng lưu giữ

Các dung dịch chuẩn gốc (5000 µg/5 mL) được pha trong methanol và bảo quản ở 4 °C. Các dung dịch chuẩn (250 µg/5 mL) được pha trong nước cất, bảo quản ở 4 °C và pha lại 2 tuần/lần. Quy trình khảo sát lưu giữ và rửa giải được tóm tắt trong Hình 3. Trong các thí nghiệm, 50 mL các dung dịch chuẩn hỗn hợp FQ 50 µg/L được cho qua cột SPE.



Hình 3. Quy trình chiết pha rắn

2.6. Quy trình xử lý và phân tích mẫu thật

Mẫu trứng gà và tôm được lấy tại các chợ, siêu thị trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu được lưu trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C. Quy trình chiết và làm sạch mẫu được đi qua 5 bước (Ramos et al., 2003). Đầu tiên, 5 g mẫu (trứng gà hoặc tôm) được xay nhuyễn và

đồng nhất. Kế đó, thêm 20 mL dung dịch đệm phosphate 0,2% pH = 8,0, tiến hành vortex trong 2 phút và đem đi ly tâm 15 phút. Thêm 10 mL hexane, vortex 2 phút, li tâm 15 phút để loại béo. Cho dung dịch mẫu sau khi được xử lí qua cột ILSPE và tiến hành khảo sát khả năng lưu giữ, hệ dung môi rửa giải. Sau đó thổi khô, định mức lên 1 mL bằng dung dịch pha động.

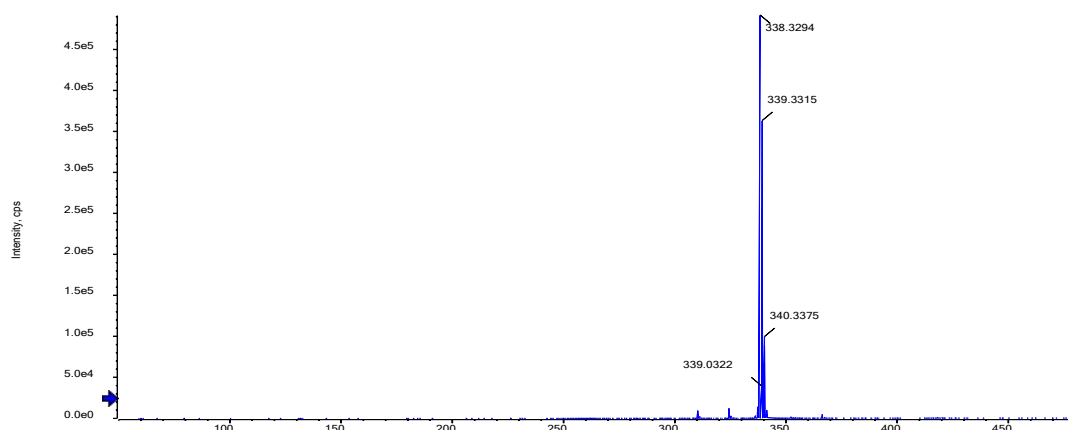
2.7. Phương pháp phân tích

Hóa chất được cân chính xác trên cân Ohaus 8025162. Phản ứng được tiến hành trên máy khuấy từ Phoenix RSM-01HP. pH được đo bằng điện cực Mettler – Toledo pH InLab © Expert Pro – ISM. Li tâm được thực hiện bằng PLC - 012, Gemmy Industrial Corp. Phổ hồng ngoại (FT-IR) được ghi trên máy Bruker E400. Phân tích nhiệt khối lượng (TGA) được thực hiện trên máy Q-500 (tốc độ gia nhiệt là 5 °C/phút). Phương pháp kính hiển vi điện tử quét (SEM) được thực hiện trên máy JSM-IT100 InTouchScope. Phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX) được ghi bằng thiết bị EMAX năng lượng EX - 400 EDX. Đường đẳng nhiệt lưu giữ N₂ ở 77 K được thực hiện trên máy Quantachrome Autosorb iQ2. Quá trình tải mẫu được khảo sát trên hệ thống Phenomenex. Quy trình phân tích được thực hiện trên máy sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép khối phổ (HPLC-MS/MS) của Shimadzu, RF-10XL, cột C18 (5 μm, 4,6 x 150 mm của Agilent). Điều kiện HPLC là thể tích tiêm: 100 μL, nhiệt độ buồng chứa cột: 40 °C, pha động là acetonitrile và đệm amonium formate 0,2% (pH = 3,5), chương trình gradient nồng độ. Điều kiện MS: polarity positive, gas temperature 325 °C, gas flow 8 L/phút, nebulier 50 Psi, Capillary 4000 V, solvent cut 5 phút.

3. Kết quả và thảo luận

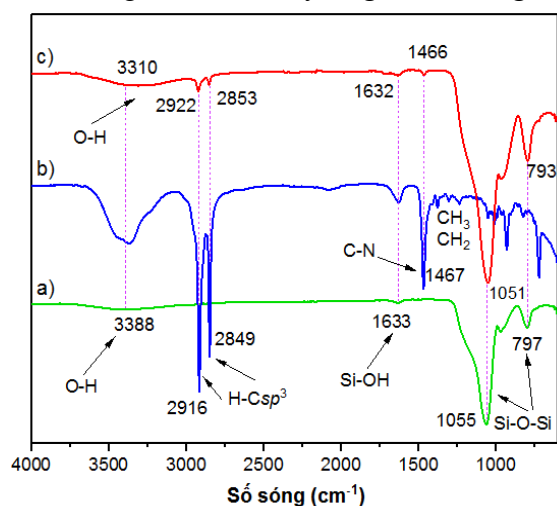
3.1. Xác định cấu trúc và tính chất của 1-methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium bromide

Phản ứng giữa 1-methylpyrrolidine và 1-bromooctadecane là phản ứng thế thân hạch lưỡng phân tử của amine bậc ba và hợp chất alkyl bromide bậc một (Hình 2). Ngoài ra, phản ứng được thực hiện trong điều kiện không dung môi, thời gian ngắn và hiệu suất cao. 1-Methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium bromide có dạng rắn, có màu nâu, hiệu suất cô lập 90%, nhiệt độ nóng chảy là 98 °C. Trên phổ hồng ngoại FT-IR (Hình 7b), có thể quan sát thấy các vân hấp thụ đặc trưng cho dao động kéo giãn của nối H-Csp³ tại 2916 cm⁻¹ và 2849 cm⁻¹. Bên cạnh đó, các vân hấp thụ yếu trong vùng 1470-1405 cm⁻¹ đặc trưng cho các dao động biến dạng của các nhóm -CH₃ và >CH₂ đặc trưng cho dây akyl mạch dài và của vòng pyrrolidine. Đặc biệt, tín hiệu của dao động nối C-N được xác nhận bởi vân hấp thụ tại 1467 cm⁻¹. Trên phổ ¹H NMR (500 MHz, MeOD) của hợp chất (Hình 4), có 6 loại tín hiệu cộng hưởng được ghi nhận trong vùng 4,0-0,5 ppm. Tín hiệu *singlet* tại 3,08 ppm (s, 3H) đặc trưng cho proton nhóm methyl gắn dị nguyên tử nitrogen của vòng pyrrolidine (N-CH₃). Các tín hiệu multiplet tại 3,58-3,51 ppm (m, 4H) và 3,41-3,36 ppm (m, 2H) đặc trưng cho proton của 3 nhóm methylene gắn xung quanh dị nguyên tử nitrogen (N-CH₂-). Nhóm -CH₃ của dây octadecyl được xác nhận bởi tín hiệu cộng hưởng triplet tại 0,90 ppm (t, J = 7,0 Hz, 3H). Các proton của các nhóm methylene còn lại được quan sát thấy dưới dạng mũi *singlet* tại 2,23 ppm (s, 4H) và multiplet tại 1,41-1,28 ppm (m, 32H).



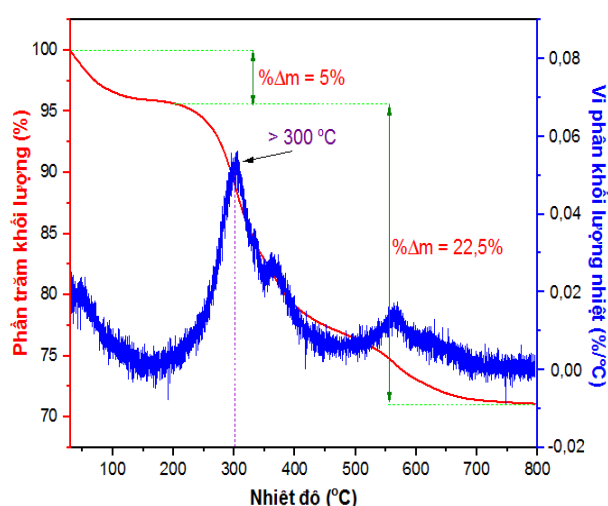
Hình 6. Khối phổ phân giải cao (HRMS) của 1-methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium bromide
3.2. Xác định cấu trúc và hình thái của vật liệu chất lỏng ion tẩm lên silica gel

Vật liệu được hình thành thông qua việc ngâm tẩm silica gel trong dung dịch chứa 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide ở nhiệt độ phòng. Tương tác vật lí giữa silica gel và IL bao gồm liên kết hydrogen và tương tác van der Waals (Vafaezadeh & Fattahi, 2014).



Hình 7. Phổ FT-IR của a) SiO₂, b) 1-methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium bromide và c) vật liệu ILSPE

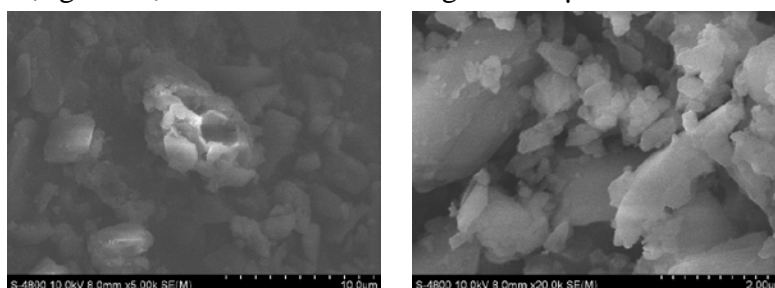
Trên phổ FT-IR của vật liệu (Hình 7c), các vân hấp thụ tại 1051 cm⁻¹ và 793 cm⁻¹ được cho là các tín hiệu dao động bất đối xứng và đối xứng của liên kết Si-O-Si (tương ứng với các tín hiệu tại 1055 cm⁻¹ và 797 cm⁻¹ của silica hoạt hóa ở Hình 7a). Ngoài ra, có thể thấy vật liệu ILSPE cũng có có vân hấp thụ tại 1632 cm⁻¹ đặc trưng cho nối Si-OH rộng từ giống như silica hoạt hóa ban đầu (tín hiệu 1633 cm⁻¹). Tuy nhiên, khi IL được phủ lên bề mặt silica gel, thì có sự chuyển dịch tín hiệu của dao động nối O-H từ 3388 cm⁻¹ sang 3310 cm⁻¹. Điều này có thể được giải thích là do việc hình thành liên kết hydrogen giữa các anion bromide và nguyên tử hydrogen trên nhóm O-H của silica gel hoạt hóa (Saleem et al., 2014). Bên cạnh đó, nối H-Csp³ đặc trưng cho các nhóm alkyl của IL trên vật liệu cũng được xác nhận bởi các vân hấp



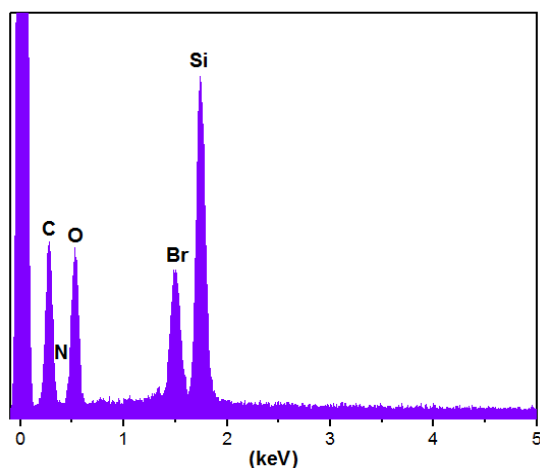
Hình 8. Giảm đồ phân tích nhiệt khối lượng (TGA và DT) của vật liệu

thu tại 2922 cm^{-1} và 2853 cm^{-1} , ứng với các tín hiệu 2916 cm^{-1} và 2849 cm^{-1} của 1-methyl-1-octylpyrrolidin-1-ium bromide. Ngoài ra, vân hấp thụ của dao động nối C-N cũng được quan sát ở 1466 cm^{-1} , ứng với tín hiệu ở 1467 cm^{-1} của IL. Do đó, có thể thấy rằng IL khung pyrrolidine phủ trên bề mặt SiO_2 đã được điều chế thành công.

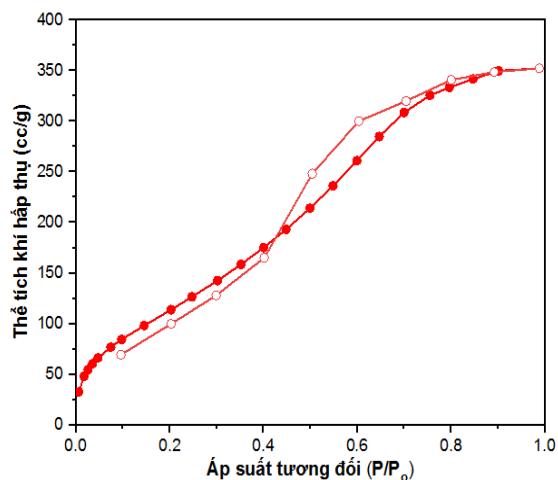
Độ bền nhiệt và khối lượng IL của vật liệu cũng đã được kiểm tra bằng giản đồ phân tích nhiệt khối lượng TGA (Hình 8). Dưới $150\text{ }^\circ\text{C}$, có sự sụt giảm khối lượng khoảng 5% do sự bay hơi của nước hoặc dung môi. Từ khoảng $300\text{ }^\circ\text{C}$ trở lên, có sự giảm khối lượng tương ứng với 22,5% lượng IL bị than hóa trong môi trường khí N_2 . Vì vậy, vật liệu có độ bền nhiệt dưới $300\text{ }^\circ\text{C}$. Bên cạnh đó, hình thái của vật liệu ILSPE đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng ảnh SEM. Vật liệu được điều chế có bề mặt cắt rất sắc và thô. Trước khi sử dụng vật liệu đã được rây đúng kích thước phù hợp. Ảnh SEM (Hình 9) của vật liệu cho thấy vật liệu thu được ở dạng các hạt có kích thước khoảng $50\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$.



Hình 9. Ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) của vật liệu ILSPE



Hình 10. Giản đồ phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX) của vật liệu



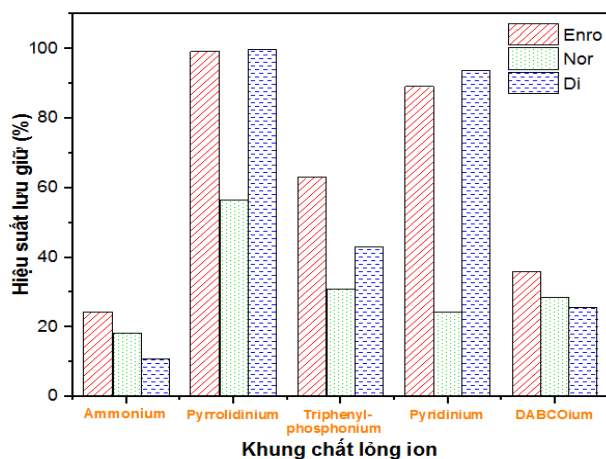
Hình 11. Đường đẳng nhiệt lưu giữ N_2 của vật liệu ILSPE ở $350\text{ }^\circ\text{C}$

Hàm lượng nguyên tố trên bề mặt silica gel gắn IL được đánh giá bằng phương pháp quang phổ tia X tán xạ năng lượng (EDX). Giản đồ EDX xác nhận sự hiện diện của các nguyên tố carbon, nitrogen, oxygen, silicon và bromine trong cấu trúc của vật liệu cho thấy sự phủ thành công của IL lên bề mặt silica gel (Hình 10). Ngoài ra, dựa trên đường đẳng nhiệt lưu giữ N_2 ở $350\text{ }^\circ\text{C}$ (Hình 11), diện tích bề mặt (BET) của vật liệu là $315,388\text{ m}^2/\text{g}$

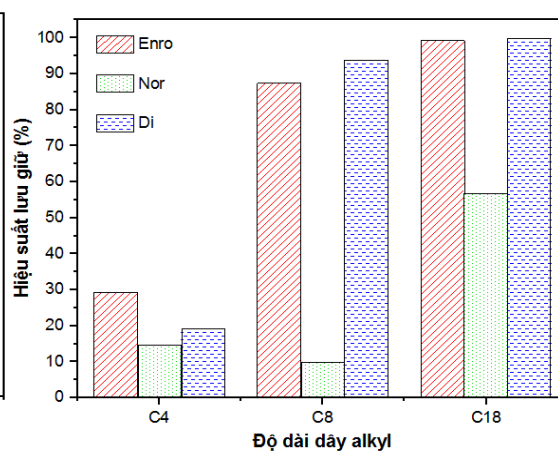
với và bán kính lỗ xốp trung bình là 18,137 Å. Có thể thấy rằng lớp phủ của IL trên silica làm giảm diện tích bề mặt của silica gel ban đầu (450,007 m²/g). Hơn nữa, bán kính lỗ xốp silica gắn IL thấp hơn silica gel hoạt hóa (25,996 Å).

3.3. Khảo sát khung chất lỏng ion trên nền silica gel

Bởi vì phân tử các FQ có chứa nhóm chức amine và carboxylic acid nên có thể tạo ra tương tác tĩnh điện tốt với cation hoặc anion của IL, do đó các IL khác nhau tẩm trên silica gel đã được khảo sát. Ban đầu, 5 IL khác nhau (khung ammonium, pyrrolidinium, triphenylphosphonium, pyridinium, 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octanium) được phủ lên bề mặt silica gel bằng phương pháp tẩm vật lý bởi việc hòa tan IL. Khả năng lưu giữ FQ của các vật liệu ILSPE khác nhau được mô tả ở Hình 12. Vật liệu silica gel tẩm tetrabutyl-ammonium bromide và 1-octadecyl-1,4-diazabicyclo[2.2.2]-octanium bromide cho khả năng lưu giữ thấp (dưới 40%). Mặc dù, khả năng lưu giữ của vật liệu silica gel tẩm triphenylphosphonium bromide cao hơn hai vật liệu trên nhưng vẫn không tốt như mong đợi. Với vật liệu silica gel tẩm 1-methyl-1-octadecylpyridinium bromide, khả năng lưu giữ Enro là 89,1% và Di là 93,8% trong khi chỉ 24% lượng Nor được lưu giữ. Đặc biệt, 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide tẩm trên silica gel cho thấy khả năng lưu giữ rất cao với Enro (99%) và Di (100%) mặc dù Nor chỉ có 56,8% được lưu giữ. Do vậy, vật liệu silica gel tẩm 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide được chọn cho nghiên cứu này.



Hình 12. Khảo sát khung IL trên silica gel



Hình 13. Khảo sát của gốc alkyl

3.4. Khảo sát ảnh hưởng độ dài dây alkyl trên khung pyrrolidinium

Thông thường, cấu trúc của IL có thể được điều chỉnh dựa trên phần anion và cation để có thể tận dụng những tính chất của nó vào mục đích sử dụng. Sự ảnh hưởng của nhóm alkyl trên cation trong IL đến khả năng lưu giữ mẫu cũng được quan sát (Hình 13). Vật liệu ILSPE chứa dây alkyl chứa 4 carbon (C4) lưu giữ kém cả ba chất phân tích Enro, Nor và Di (< 30%). Khi tăng gấp đôi độ dài dây alkyl (C8) thì khả năng lưu giữ của Enro (87,3%) và Di (93,8%) tăng lên rất đáng kể trong khi Nor giảm (9,8%). Do vậy, dây dài alkyl C18 được thiết kế gắn trên khung 1-methylpyrrolidine sẽ tăng tính kém phân cực làm cho tương tác kỵ nước giữa pha tĩnh và chất phân tích tăng lên và do đó giúp cho quá trình lưu giữ chất phân tích tốt hơn. Thực

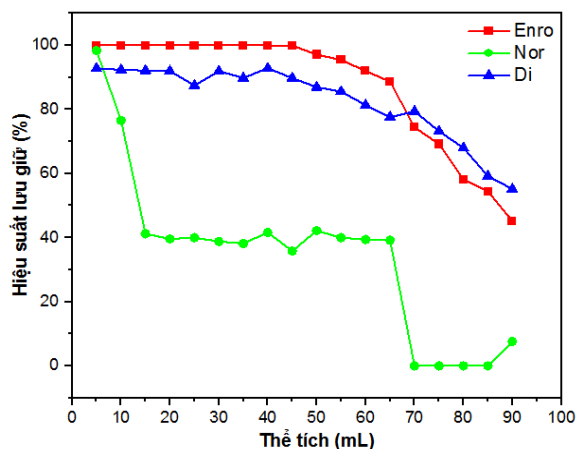
tế cho thấy, với vật liệu sử dụng 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide (C18) thì khả năng lưu giữ của Enro, Di và Nor lần lượt là 99%, 100% và 56,8%.

3.5. Khảo sát thể tích “breakthrough”

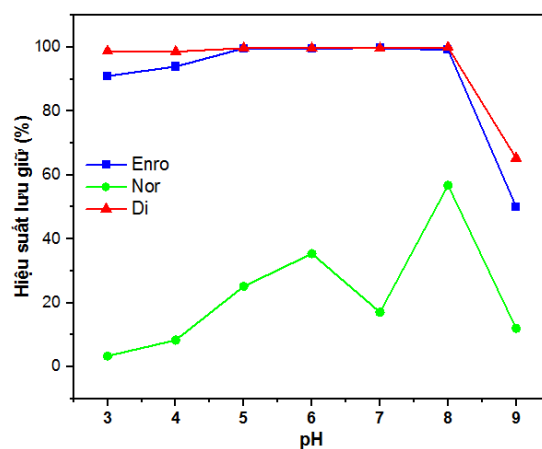
Thể tích breakthrough là thể tích tối đa của mẫu có thể tải qua pha tĩnh SPE mà không bị rò rỉ đáng kể chất phân tích. Cùng với thể tích dung dịch rửa giải cần thiết, thể tích breakthrough giúp xác định hệ số làm giàu của vật liệu. Nó đặc biệt được quan tâm khi xử lý các mức độ vết. Các thể tích breakthrough của các mẫu chuẩn chứa Enro, Nor và Di (mỗi loại 50 µg/L) được đánh giá bằng cách theo dõi phần trăm lưu giữ trong khi tăng thể tích mẫu trong khoảng 10-90 mL ở điều kiện tối ưu (Hình 14). Thể tích nạp tối đa được tìm thấy là 50 mL mà không có sự rửa trôi đáng kể của Enro và Di. Với Nor, sự lưu giữ được tìm thấy chỉ khoảng 40%.

3.6. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Độ pH của dung dịch góp phần ảnh hưởng đến sự tồn tại của các FQ. Để xem xét sự ảnh hưởng của môi trường đến trạng thái tồn tại và sự lưu giữ của mẫu trên vật liệu, pH của dung dịch cũng được khảo sát (Hình 15). Sau khi tối ưu, pH = 8,0 được chọn để khảo sát sự lưu giữ FQ trên cột ILSPE. Có thể thấy rằng ở pH = 8,0 (phù hợp giá trị pK_a), các nhóm -COOH của các FQ tồn tại ở dạng -COO⁻ nên tạo ra tương tác tĩnh điện tốt với cation 1-methyl-1-octadecylpyrrolidin-1-ium của IL. Vì vậy, hỗn hợp dung dịch chuẩn FQ được điều chỉnh đến pH = 8,0 bằng dung dịch đệm phosphate trước khi tải mẫu qua cột.



Hình 14. Khảo sát ảnh hưởng thể tích mẫu



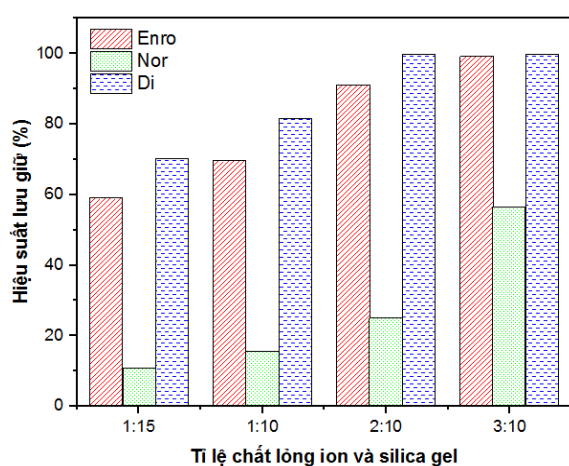
Hình 15. Khảo sát ảnh hưởng của pH

3.7. Khảo sát tỉ lệ chất lỏng ion và silica gel

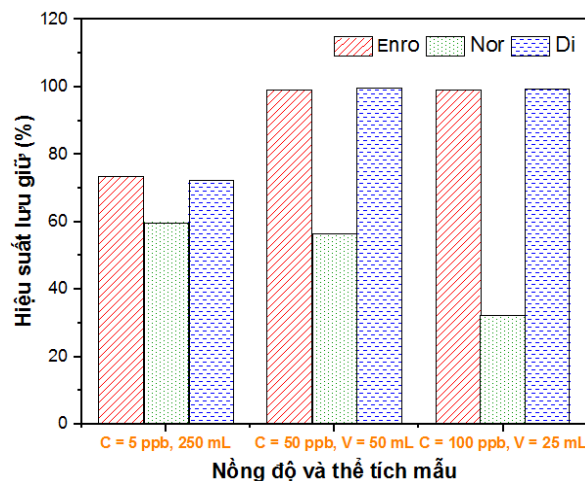
Để xem xét khả năng lưu giữ các FQ, các tỉ lệ khác nhau giữa khối lượng IL và silica gel cũng được được khảo sát lần lượt là 1:15, 1:10, 2:10, 3:10 và 4:10. Dựa vào kết quả được trình bày ở Hình 16, hiệu suất lưu giữ của vật liệu có tỉ lệ khối lượng của IL và silica gel là 3:10 được ghi nhận là tốt nhất. Khi tăng tỉ lệ này lên 4:10 thì vật liệu sẽ khó cho mẫu đi qua được. Do vậy, IL được tẩm lên silica gel theo tỉ lệ 3:10 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.8. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thể tích mẫu

Do nồng độ vết của các FQ trong thực tế rất khác nhau nên khả năng lưu giữ trên cột ILSPE cũng được quan sát với các thể tích và nồng độ khác nhau. Động học của quá trình được khảo sát trên các thể tích mẫu trong khoảng 25-250 mL chứa khoảng 2500 ng mỗi FQ. Khả năng lưu giữ của mỗi FQ từ các thể tích khác nhau của dung dịch nước được thể hiện trong Hình 17. Khả năng lưu giữ được thấy là ổn định ở thể tích 50 mL và nồng độ 50 µg/L, được chọn là thể tích và nồng độ mẫu tối ưu để làm việc.



Hình 16. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ chất lỏng ion và silica gel



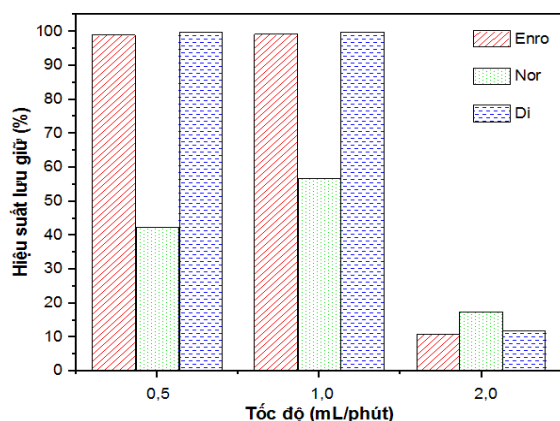
Hình 17. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thể tích mẫu

3.9. Khảo sát tốc độ tải mẫu qua cột

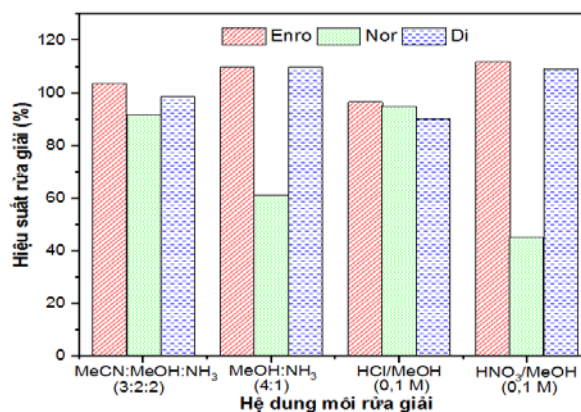
Tốc độ tải mẫu cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lưu giữ các chất phân tích của pha tĩnh. Dựa vào Hình 18, có thể thấy với tốc độ 0,5 và 1,0 mL/phút, khả năng lưu giữ Enro và Di là rất cao (>95%). Trong khi đó, khả năng lưu giữ của Nor tăng từ 42,2% lên 56,8%. Tuy nhiên, khi tốc độ tải mẫu tiếp tục tăng lên 2 mL/phút, pha tĩnh không lưu giữ được các chất phân tích (hiệu suất lưu giữ <20%). Do vậy, chúng tôi lựa chọn 1 mL/phút là tốc độ tải mẫu tối ưu qua cột trong các khảo sát này.

3.10. Khảo sát ảnh hưởng dung môi rửa giải

Việc rửa giải các FQ được nghiên cứu trên các hỗn hợp dung môi từ ít phân cực đến phân cực mạnh như MeOH:NH₃ 25% (4:1, v/v), MeCN:MeOH:NH₃ 25% (3:2:2, v/v/v), HCl 0,1 M trong methanol, HNO₃ 0,1 M trong methanol (Hình 19). Khi sử dụng MeOH:NH₃ 25% (4:1, v/v) và HNO₃ 0,1 M trong methanol thì Enro và Di đều được rửa giải 100% ra khỏi cột. Tuy nhiên, chỉ có 61% và 45% lượng Nor được rửa giải tương ứng với hai hệ dung môi này. Với hệ dung môi HCl 0,1 M trong methanol thì cả ba FQ đều được rửa giải tương đối tốt (>90%). Ngoài ra, hệ dung môi MeCN:MeOH:NH₃ 25% (3:2:2, v/v/v) cũng cho khả năng rửa giải hiệu quả với cả ba loại FQ này. Cụ thể, hiệu suất rửa giải của Enro, Nor và Di lần lượt là 103%, 92% và 98%. Do vậy, MeCN:MeOH:NH₃ 25% (3:2:2, v/v/v) được chọn là dung môi rửa giải tốt nhất cho quá trình này.



Hình 18. Khảo sát tốc độ tải mẫu



Hình 19. Khảo sát hệ dung môi rửa giải

3.11. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

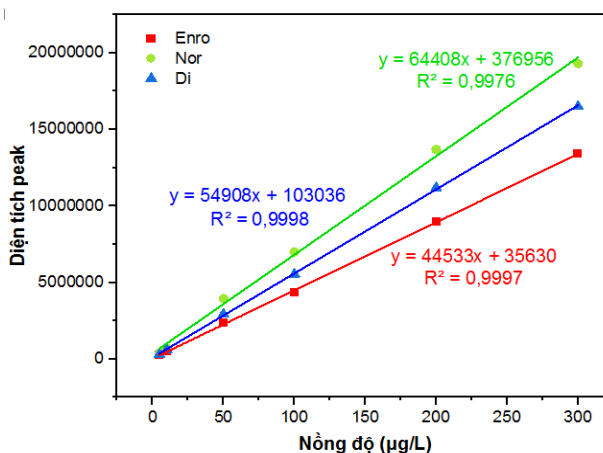
Trong các điều kiện thực nghiệm tối ưu hóa, các đường chuẩn cho Enro, Nor và Di là tuyến tính trong phạm vi nồng độ từ 5 µg/L đến 300 µg/L với hệ số tương quan cao từ 0,9976 đến 0,9998 (Hình 20). Để đánh giá độ chính xác của phương pháp, 6 lần lặp lại (mẫu thử) được thực hiện. Độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối được tính theo công thức bên dưới. Từ đó, các đặc tính định lượng của phương pháp hiện tại, bao gồm giới hạn phát hiện (LOD = 3SD) và giới hạn định lượng (LOQ = 10SD) đã được nghiên cứu và kết quả được tóm tắt trong **Bảng 1**. Như đã thấy ở bên dưới, LOD và LOQ thấp có thể đạt được với giá trị RSD của phương pháp là khoảng 25,33-30,88%.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

Bảng 1. LOD và LOQ của phương pháp

	Enro	Nor	Di
LOD (µg/L)	1,37	1,45	2,66
LOQ (µg/L)	4,58	4,84	8,86
RSD (%)	28,63	30,88	25,33



Hình 20. Đường chuẩn của các FQ

3.12. Ứng dụng phân tích dư lượng FQ trên mẫu thật

Để chứng minh giá trị của vật liệu silica tẩm chất lỏng ion trong các điều kiện tối ưu, các mẫu thật trứng và tôm được sử dụng để làm giàu và xác định Enro, Nor và Di bởi HPLC-MS/MS. Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu thật có thêm chuẩn (5 µg/kg) và các thí nghiệm tính hiệu suất thu hồi các FQ đã được sử dụng. Dựa vào Bảng 2, những kết quả này chỉ ra rằng hiệu suất thu hồi là hợp lý để phân tích vết trong

mẫu trứng và tôm. Kết quả so sánh với các nghiên cứu trước kia (Bảng 3) cho thấy vật liệu ILSPE có tiềm năng ứng dụng trong xử lý mẫu thật để phân tích các FQ.

Bảng 2. Ứng dụng ILSPE phân tích dư lượng FQ trong mẫu thật có thêm chuẩn (5 µg/kg)

Chất	Hiệu suất thu hồi (%)	
	Mẫu trứng gà	Mẫu tôm
Enro	102,6	87,8
Nor	65,6	23,7
Di	90,1	89,6

Bảng 3. So sánh kết quả nghiên cứu hiện tại với các nghiên cứu khác trên thế giới

Vật liệu pha tĩnh	Số lượng FQ	Mẫu	Hiệu suất thu hồi (%)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Hỗn hợp vật liệu C8 và trao đổi cation (Toussaint et al., 2005)	11	Thịt lợn	98,7-104,2	0,3	1,0
Vật liệu C18 và HLB (Lu et al., 2019)	11	Trứng, thịt gà	80-126	0,1-0,16	-
Vật liệu C18 (Bitas & Samanidou, 2016)	6	Tôm	96,3-102,6	16,7-33,3	-
Vật liệu isolate ENV+ (Bailac, Barrón, & Barbosa, 2006)	7	Thịt gà	70-85	0,15-0,5	-
Vật liệu chất lỏng ion tẩm silica (Nghiên cứu này)	3	Trứng và tôm	23,7-102,6	1,37-2,66	4,58-8,86

4. Kết luận

Vật liệu silica gel tẩm 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide đã được tổng hợp thành công với quy trình đơn giản. Vật liệu này có diện tích bề mặt là 315,388 m²/g với bán kính lỗ xốp trung bình là 18,137 Å, phù hợp làm pha tĩnh trong cột chiết pha rắn. Khả năng lưu giữ hiệu quả của cột ILSPE đối với Enro, Nor và Di đã được xác định thông qua các khảo sát điều kiện tối ưu (nồng độ mẫu tải 50 µg/L, pH = 8,0, tốc độ tải mẫu 1 mL/phút). Ngoài ra, khi sử dụng hệ dung môi MeCN:MeOH:NH₃ 25% (3:2:2, v/v/v) thì trên 90% lượng các FQ được rửa giải khỏi cột. Ngoài ra, vật liệu ILSPE được chứng minh là có tiềm năng trong phân tích dư lượng kháng sinh Enro và Di trên nền mẫu thật (trứng gà và tôm) với hiệu suất thu hồi cao (80-110%). Việc sử dụng vật liệu ILSPE bước đầu có khả năng ứng dụng trong quy trình xử lý và làm giàu Enro và Di, do đó cần được tiếp tục nghiên cứu cải thiện hiệu suất thu hồi của Nor và phát triển tiếp trên các FQ khác.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, mã số 102/2020/HĐ-QPTKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Appelbaum, P. C., & Hunter, P. A. (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 16(1), 5-15.
- Bailac, S., Barrón, D., & Barbosa, J. (2006). New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 580(2), 163-169.
- Bitas, Dimitrios, & Samanidou, Victoria F. (2016). Effective cleanup for the determination of six quinolone residues in shrimp before HPLC with diode array detection in compliance with the European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of separation science*, 39(24), 4805-4811.
- Eliopoulos, G. M., Klimm, K., Eliopoulos, C. T., Ferraro, M. J., & Moellering Jr., R. C.. (1993). In vitro activity of CP-99,219, a new fluoroquinolone, against clinical isolates of gram-positive bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(2), 366-370.
- Fontanals, Núria, Borrull, Francesc, & Marcé, Rosa M. (2012). Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 41, 15-26.
- Gajda, Anna, Posyniak, Andrzej, Zmudzki, Jan, Gbylik, Malgorzata, & Bladek, Tomasz (2012). Determination of (fluoro) quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 135(2), 430-439.
- Gharehbaghi, Maysam, & Shemirani, Farzaneh (2012). Ionic liquid modified silica sorbent for simultaneous separation and preconcentration of heavy metals from water and tobacco samples prior to their determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods*, 4(9), 2879-2886.
- Goldman, Emanuel (2004). Antibiotic abuse in animal agriculture: Exacerbating drug resistance in human pathogens. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10(1), 121-134.
- Lu, Zhuliangzi, Deng, Fenfang, He, Rong, Tan, Lei, Luo, Xiaoyan, Pan, Xinhong, & Yang, Zhicong. (2019). A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 151, 104213.
- Nguyen, T. T., Nguyen, H. D. T., Huynh, T. T. T., Dinh, D. M. H., Nguyen, T. H. L., Doan, L. H., T., . . . Tran, H. P.(2022). Ionic liquid-immobilized silica gel as a new sorbent for solid-phase extraction of heavy metal ions in water samples. *RSC Advances*, 12(31), 19741-19750. doi: 10.1039/D2RA02980D
- Ramos, Macarena, Aranda, Angela, Garcia, Elena, Reuvers, Thea, & Hooghuis, Henny (2003). Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 373-381.
- Saleem, Sarah, Saqib, Ahmad Nauman Shah, Mujahid, Adnan, Hanif, Muhammad, Mustafa, Ghulam, Mahmood, Tariq, . . . Khan, Abdur Rahman (2014). Extraction of Pb (II) from water samples by ionic liquid-modified silica sorbents. *Desalination and Water Treatment*, 52(40-42), 7915-7924.
- Sharma, Prabodh Chander, Jain, Ankit, & Jain, Sandeep (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm*, 66(6), 587-604.

- Toussaint, B, Chedin, M, Bordin, G, & Rodriguez, A. R. (2005). Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: I. Laboratory-validated method. *Journal of Chromatography A*, 1088(1-2), 32-39.
- Vafaezadeh, Majid, & Fattahi, Alireza (2014). Interaction of ionic liquids with the surface of silica gel using nanocluster approach: a combined density functional theory and experimental study. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 27(2), 163-167.
- Wang, Yuanpeng, Sun, Ying, Xu, Bo, Li, Xinpei, Wang, Xinghua, Zhang, Hanqi, & Song, Daqian (2015). Matrix solid-phase dispersion coupled with magnetic ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in oilseeds. *Analytica Chimica Acta*, 888, 67-74.
- Zhao, Handong, Dai, Bingye, Xu, Longhua, Wang, Xilong, Qiao, Xuguang, & Xu, Zhixiang (2014). Preparation and application of immobilised ionic liquid in solid-phase extraction for determination of trace acrylamide in food samples coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1787-1793.

SYNTHESIS OF PYRROLIDINIUM IONIC LIQUID GRAFTED ONTO SILICA GEL AS SOLID-PHASE EXTRACTION SORBENT TO DETERMINE ENROFLOXACIN, NORFLOXACIN, AND DIFLOXACIN ANTIBIOTIC

Huynh Thi Thanh Tam¹, Nguyen Thai The¹, Nguyen Dieu Linh¹, Do Hoang Ngoc Mai², Nguyen Ho Thuy Linh³, Doan Le Hoang Tan³, Tran Hoang Phuong^{1*}

¹University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

²Institute of Public Health, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Center for Innovative Materials and Architectures, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Tran Hoang Phuong – Email: thphuong@hcmus.edu.vn

Received: August 14, 2021; Revised: September 24, 2022; Accepted: September 25, 2022

ABSTRACT

We developed a new sorbent using ionic liquids grafted onto silica and applied it as solid-phase extraction in the analysis of fluoroquinolone antibiotic. In this study, 1-methyl-1-octadecylpyrrolidinium bromide was synthesized and grafted onto silica gel. The structure of ionic liquid and ILSPE material was characterized by FT-IR, ¹H and ¹³C NMR, TGA-DT, SEM, BET, and EDX. The material formed between silica gel and ionic liquids via hydrogen bond and van der Waals interaction. Ionic liquid grafted onto silica is an efficient sorbent for the preconcentration of enrofloxacin, norfloxacin, and difloxacin. Finally, it was applied to determine fluoroquinolones in actual samples (egg and shrimp) with high recovery (80-110%).

Keywords: 1-methylpyrrolidine; antibiotic; fluoroquinolone; ionic liquid; silica gel; solid-phase extraction