

## NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP CQDs/AuNPs ỨNG DỤNG PHÁT HIỆN HUỖNH QUANG KHÁNG SINH AMIKACIN TRONG MẪU DƯỢC PHẨM

Đến tòa soạn 04-11-2022

Phạm Thị Mai Anh, Nguyễn Đình Thi, Phạm Hồng Ngọc, Nguyễn Quang Khánh,  
Nguyễn Thị Ánh Hương, Phạm Thị Ngọc Mai\*

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Email: m.t.n.pham@gmail

### SUMMARY

#### SYNTHESIS OF CQDs/AuNPs FOR FLUORESCENCE DETECTION OF ANTIBIOTIC AMIKACIN IN PHARMACEUTICAL SAMPLES

*In this study, carbon quantum dots and gold nanoparticles (CQDs/AuNPs) nanocomposite was synthesized for detection of antibiotic amikacin by using fluorescence signal. The method is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between carbon quantum dots (CQDs) and gold nanoparticles (AuNPs), whereas the fluorescence emission of CQD was quenched by FRET-induced AuNPs. When amikacin was added to the CQDs/AuNPs system, due to high affinity between N-H groups in amikacin molecule and AuNPs, the strong combination of amikacin and AuNPs released the CQDs from the AuNPs and restore the CQD fluorescence. The CQDs/AuNPs system can detect amikacin in aqueous solution (pH 4.0, NaCl saline) sensitively (ppb level) with a short response time (2 min). The results show that the fluorescence recovery has a good linear relationship with amikacin concentration in the range of  $10^{-7}$  M to  $10^{-5}$  M. The developed method was applied for determination of antibiotic amikacin in pharmaceutical samples.*

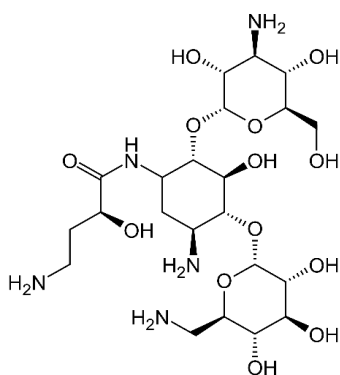
**Keywords:** Amikacin determination, UV-Vis, Fluorescence, Carbon quantum dots.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, bệnh lý nhiễm khuẩn nằm trong số những bệnh đứng đầu cả về tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Do đó, kháng sinh luôn được xem là một nhóm thuốc đặc biệt quan trọng trong y tế [1-3]. Aminoglycoside là nhóm thuốc kháng sinh có phổ tác dụng cho vi khuẩn gram âm, trong nhóm này, amikacin là kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng nhất và hoạt tính mạnh nhất vì cấu trúc của amikacin (Hình 1) không phải là cơ chất của nhiều enzym bất hoạt aminoglycoside [1-6].

Gần đây, các nghiên cứu hướng tới các phương pháp xác định hàm lượng amikacin trong dược phẩm nhằm đánh giá chất lượng thuốc cũng như trong các dịch sinh học nhằm đánh giá hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân đang rất được quan tâm. Tuy nhiên các phương pháp phổ biến để xác định amikacin hiện nay như phương pháp điện hóa [7], phương pháp điện di mao quản [8], phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC [9, 10], v.v đều sử dụng hóa chất và thiết bị đắt tiền, quy trình vận hành phức tạp. Bên cạnh đó, do amikacin hấp thụ quang rất kém, nên thường cần dẫn xuất hoá để

tạo các dẫn xuất có khả năng hấp thụ quang hoặc phát quang.



Hình 1. Cấu trúc phân tử của Amikacin

Chấm lượng tử carbon (CQDs) được biết đến như một loại vật liệu nano có thể tổng hợp bằng các phương pháp đơn giản, thân thiện với môi trường và sử dụng tài nguyên sinh khối. Ngoài ra, CQDs cũng là vật liệu sở hữu các đặc tính quang học và điện tử vô cùng độc đáo. Những đặc điểm này đã giúp CQDs có các ứng dụng đa dạng trong lĩnh vực cảm biến mới để phát hiện các ion kim loại và các hợp chất hữu cơ [11, 12], đặc biệt là trong các cảm biến huỳnh quang.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt ra mục tiêu là tổng hợp nanocomposite CQDs/AuNPs ứng dụng phát hiện huỳnh quang kháng sinh amikacin. Nguyên tắc phát hiện amikacin dựa trên sự trao đổi phối tử và hiện tượng truyền năng lượng cộng hưởng Förster (FRET) giữa chấm lượng tử carbon (CQDs) và các hạt nano vàng (AuNPs) [13, 14]. Phương pháp huỳnh quang có độ nhạy và độ chọn lọc cao, độ chính xác tương đương so với hầu hết các phương pháp phân tích truyền thống khác, cho phép ứng dụng để xác định nồng độ chất ở mức hàm lượng cỡ ppb trong các đối tượng mẫu khác nhau.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất tinh khiết phân tích:  $\text{HAuCl}_4$ , natri clorua ( $\text{NaCl}$ ), natri hydroxit ( $\text{NaOH}$ ), acid citric ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ), natri citrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), glucoze, amikacin (Sigma).

Máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS 1601 PC-Shimadzu (Nhật Bản), bước sóng làm việc từ 400-800 nm, cuvet có chiều dày 1cm.

Máy huỳnh quang (F-4700, HITACHI, Nhật Bản) sử dụng cuvet bốn mặt trong suốt có chiều dày 1 cm.

### 2.2. Tổng hợp vật liệu CQDs, CQDs/AuNPs

Vật liệu CQDs được tổng hợp bằng cách nung 10 g acid citric ở 180 °C trong 24 giờ. Sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng, thu được chất lỏng có độ nhớt cao. Hòa tan chất lỏng thu được bằng nước ấm, ly tâm (10000 vòng/phút), gạn lấy phần chất rắn sấy khô và cân để định lượng CQDs. Phần dung dịch thu được sẽ bảo quản ở 4 °C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Dung dịch CQDs được sử dụng làm chất khử để khử  $\text{HAuCl}_4$  từ  $\text{Au}^{3+}$  xuống  $\text{Au}^0$  tạo ra vật liệu CQDs/AuNPs nanocomposite.

### 2.3. Nguyên tắc xác định amikacin

Quang phổ huỳnh quang của dung dịch CQDs được đặc trưng với một đỉnh phát xạ cực đại xung quanh bước sóng 460 nm. Khi thêm AuNPs, dung dịch CQDs chuyển từ màu nâu sang màu đỏ tươi do sự hình thành của các hạt AuNPs và cường độ phát xạ huỳnh quang của dung dịch tại 460 nm giảm mạnh do hiện tượng dập huỳnh quang của các hạt AuNPs.

Khi trong dung dịch chứa amikacin và CQDs/AuNPs, amikacin sẽ hấp phụ lên trên bề mặt các hạt nano vàng nhờ liên kết giữa Au - NH. Khi đó, điện tích âm trên bề mặt hạt Au giảm, làm giảm lực đẩy tĩnh điện đồng thời làm cho các hạt nano vàng co cụm lại. Dung dịch tương ứng chuyển từ màu đỏ sang màu xanh và cường độ phát xạ huỳnh quang của dung dịch được hồi phục.

Thiết lập mối quan hệ giữa độ hồi phục huỳnh quang  $(F-F_0)/F_0$  ở bước sóng 460 nm với nồng độ amikacin, trong đó F và  $F_0$  lần lượt là tín hiệu huỳnh quang khi có và không có amikacin, để làm cơ sở định lượng amikacin bằng phương pháp huỳnh quang.

### 2.4. Xử lý và phân tích mẫu

Các mẫu thuốc tiêm có chứa amikacin được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Mẫu thuốc tiêm chứa amikacin được chuyển trực

tiếp vào bình định mức 25 mL, định mức đến vạch mức bằng nước cất thu được dung dịch mẫu. Cho 2 mL dung dịch CQDs/AuNPs vào lọ thủy tinh dung tích 10 mL, thêm 90  $\mu$ L dung dịch NaCl 1M, chỉnh pH 4, thêm 300  $\mu$ L dung dịch mẫu, sau đó thêm nước để thể tích toàn bộ dung dịch đạt đủ 3 mL. Đợi 2 phút và đo độ hồi phục huỳnh quang ở bước sóng 460 nm. Hàm lượng amikacin được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn.

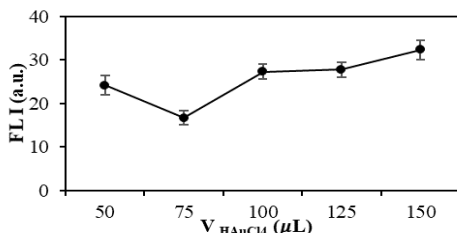
### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Tối ưu các điều kiện xác định amikacin

##### 3.1.1. Khảo sát thể tích H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>

Hình 2 biểu diễn ảnh hưởng của các thể tích H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 10 mM khác nhau tới tín hiệu huỳnh quang của dung dịch CQDs đo tại bước sóng 460 nm.

Có thể thấy khi thêm H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, tín hiệu huỳnh quang của dung dịch CQDs giảm xuống và đạt cực tiểu ở thể tích 75  $\mu$ L/1 mL dung dịch CQDs. Au<sup>3+</sup> bị khử về Au<sup>0</sup> gây nên hiện tượng tắt huỳnh quang do hiệu ứng FRET.



Hình 2. Ảnh hưởng của thể tích H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 10mM tới cường độ huỳnh quang của dung dịch CQDs

Sản phẩm thu được có màu đỏ hồng của nano vàng, chứng tỏ vật liệu nanocomposite CQDs/AuNPs đã được tổng hợp thành công. Từ kết quả khảo sát trên Hình 2, chúng tôi lựa chọn thể tích dung dịch H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> tối ưu khi tổng hợp CQDs/AuNPs là 75  $\mu$ L/1 mL dung dịch CQDs để định lượng amikacin trong các thí nghiệm tiếp theo.

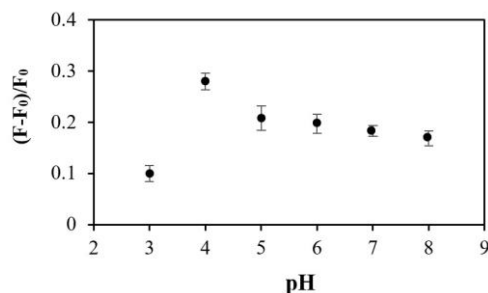
##### 3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Sự có mặt của muối điện ly như NaCl là tác nhân khơi mào cho sự co cụm của các hạt nano Au; do vậy sẽ ảnh hưởng lớn đến độ hồi phục huỳnh quang của dung dịch CQDs/AuNPs khi có mặt amikacin. Kết quả khảo sát cho thấy, độ hồi phục huỳnh quang đạt giá trị cực đại tại

nồng độ NaCl là 0,03M, sau đó giảm dần. Do đó, nồng độ muối NaCl 0,03M được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.

##### 3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH

pH là một trong các yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến độ hồi phục huỳnh quang của CQDs/AuNPs khi có mặt chất phân tích [15]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH trong khoảng pH từ 3,0 đến 8,0 cho thấy độ hồi phục huỳnh quang của dung dịch CQDs/AuNPs khi có mặt amikacin phụ thuộc tương đối nhiều vào pH (Hình 3). Giá trị  $(F-F_0)/F_0$  đạt cực đại ở pH 4,0 sau đó giảm dần khi thay đổi pH từ 4,0 xuống 8,0. Amikacin mang điện tích dương tại các giá trị pH < pI ~5,0 (điểm đẳng điện của amikacin), còn các hạt AuNPs có điện tích âm ở pH thấp, vì vậy các phân tử amikacin có thể liên kết tốt với AuNPs thông qua tương tác tĩnh điện tại các giá trị pH < 5; làm phá hủy cấu trúc của tổ hợp nano CQDs/AuNPs [13] và hồi phục huỳnh quang cho dung dịch CQDs. Ở pH < 4, mật độ điện tích âm trên bề mặt AuNPs giảm, dẫn đến giảm hiệu ứng FRET giữa CQDs và AuNPs [14].



Hình 3. Ảnh hưởng của pH tới độ hồi phục huỳnh quang của dung dịch CQDs/AuNPs

Từ kết quả khảo sát ở Hình 3, pH 4,0 được chọn là giá trị pH tối ưu của dung dịch do tại giá trị này độ hồi phục huỳnh quang  $(F-F_0)/F_0$  là lớn nhất.

##### 3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian

Ảnh hưởng của thời gian đến độ hồi phục huỳnh quang của dung dịch CQDs/AuNPs khi thêm amikacin được khảo sát trong 30 phút. Kết quả thực nghiệm cho thấy độ hồi phục huỳnh quang ở bước sóng 460 nm tăng nhanh ở 2 phút đầu; sau đó giảm nhẹ, chứng tỏ hiện tượng co cụm của các hạt nano vàng bắt đầu

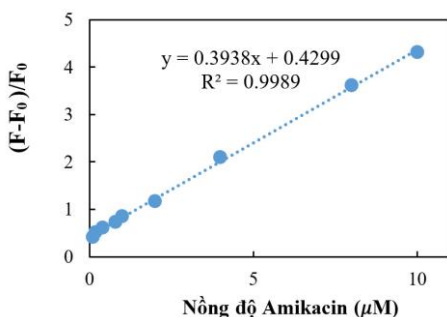
xảy ra ngay khi trộn và kết thúc sau khoảng thời gian 2 phút. Ngoài ra, bằng mắt thường có thể quan sát thấy, sau khi thêm amikacin, dung dịch chuyển màu từ đỏ sang xanh (tương ứng với sự co cụm của các hạt AuNPs) và màu bền vững ở khoảng phút thứ 2. Vì vậy, 2 phút là thời gian tối ưu được lựa chọn để phát hiện và định lượng amikacin.

### 3.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ

#### Amikacin

Nồng độ dung dịch amikacin được khảo sát trong khoảng từ  $10^{-7}$  đến  $10^{-4}$  M, độ hồi phục huỳnh quang của các dung dịch amikacin được đo trên máy quang phổ huỳnh quang ở bước sóng 460 nm và được biểu diễn trên Hình 4.

Từ Hình 4 có thể thấy khi tăng nồng độ amikacin, độ hồi phục huỳnh quang của các dung dịch chuẩn amikacin ở bước sóng 460 nm tăng tuyến tính với nồng độ amikacin và đây sẽ là cơ sở để định lượng amikacin bằng phương pháp này.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ Amikacin

### 3.2. Đánh giá phương pháp

Đánh giá phương pháp phân tích thông qua khảo sát khoảng tuyến tính, xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chụm, độ đúng.

Tiến hành đo các dung dịch amikacin có nồng độ khác nhau từ  $10^{-7}$  đến  $10^{-4}$  M tại các điều kiện tối ưu vừa xác định ở trên (pH 4,0; NaCl 0,03 M; 75 µL dung dịch H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 10 mM; thời gian 2 phút). Kết quả cho thấy tỉ lệ độ hồi phục huỳnh quang tăng tuyến tính theo nồng độ của amikacin trong khoảng từ  $10^{-7}$  đến  $10^{-5}$  M. Xây dựng đường chuẩn trong khoảng nồng độ này thu được phương trình:  $y = 0,3938x + 0,4299$  với hệ số tương quan cao  $R^2 = 0,9989$ .

Độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại: Đo lặp 7 lần dung dịch amikacin ở các nồng độ  $5 \times 10^{-7}$  M (~0,29 ppm);  $10^{-6}$  M (~0,59 ppm) và  $5 \times 10^{-6}$  M (~2,93 ppm). Kết quả thu được với các mức nồng độ trên cho giá trị độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) lần lượt là 3,28 %; 4,55 %; 3,68 % đáp ứng yêu cầu của Hiệp hội các nhà phân tích (AOAC).

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi, tại 3 mức nồng độ trên, hiệu suất thu hồi cao đạt từ 95,7 % - 101,3 %, đáp ứng yêu cầu của AOAC.

LOD và LOQ được xác định từ đường chuẩn, theo công thức  $LOD = 3S_y/b$  và  $LOQ = 10S_y/b$ . Kết quả thu được giá trị LOD là  $3 \times 10^{-8}$  mol/L; LOQ là  $10^{-7}$  mol/L.

### 3.3. Kết quả phân tích hàm lượng Amikacin trong mẫu thuốc

Kết quả phân tích một số mẫu dược phẩm chứa amikacin bằng phương pháp huỳnh quang sử dụng dung dịch CQDs/AuNPs được cho trong Bảng 1 cùng với các thông tin về mẫu. Kết quả sự sai khác giữa hàm lượng mẫu so với trên nhãn trong khoảng 1,6 % đến 8,4 %, cho thấy phương pháp có khả năng định lượng Amikacin cho độ tin cậy cao.

Bảng 1. Kết quả phân tích kháng sinh amikacin trong một số mẫu dược phẩm

Tên thuốc	Hàm lượng ghi trên nhãn (mg)	Hàm lượng đo được (mg)	Sai khác so với trên nhãn (%)
<b>Itamekacin</b> (LSX: P0400120)	500	506,8	+1,6
<b>Itamekacin</b> (LSX: P071120)	500	491	-1,8
<b>Vinphacine</b> (LSX: 231020)	500	458	-8,4
<b>Vinphacine</b> (LSX: 071120)	500	510	+2,0
<b>Amikacin</b> (LSX: S0234561)	500	479	-4,2

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp thành công vật liệu nanocomposite CQDs/AuNPs và ứng dụng để định lượng amikacin có trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp huỳnh quang. Phương pháp có độ chính xác cao và giới hạn phát hiện rất thấp ( $LOD = 3 \times 10^{-8} M$ ) so với các phương pháp hiện nay đang sử dụng. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và đã được áp dụng để xác định amikacin trong 5 mẫu dược phẩm. Nghiên cứu có thể mở rộng ra để xác định hàm lượng amikacin trong các đối tượng sinh học như nước tiểu và huyết tương góp phần đánh giá hiệu quả điều trị kháng sinh cho các bệnh nhân.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Hướng dẫn sử dụng kháng sinh Bộ y tế 2015.

[2] Nguyễn Thị Nữ, Lê Thái Bình, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trường Đông, Nguyễn Ngọc Sơn, Nguyễn Thị Kim Thường, Chu Thị Huệ, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hoàng, Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Hà Trần Hưng, Vũ Anh Phương, Đỗ Thị Trang (2021), “Nghiên cứu định lượng một số kháng sinh aminoglycoside bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C4D)”, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 26, Số 2, 60-64.

[3] Thai Binh Le, Peter C. Hauser, Thi Ngoc Mai Pham, Thi Lan Phuong Kieu, Thi Phuong Quynh Le, Quoc Anh Hoang, Dinh Chi Le, Thi Anh Huong Nguyen, Thanh Duc Mai (2020), “Low-cost and versatile analytical tool with purpose-made capillary electrophoresis coupled to contactless conductivity detection: Application to antibiotics quality control in Vietnam”, Electrophoresis, 41, 1980-1990.

[4] Lê Thái Bình, Ngô Hữu Tuệ, Chu Thị Huệ, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hoàng (2019), “Nghiên cứu định lượng một số kháng sinh beta lactam kết hợp với sulbactam bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C4D)”, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 24, số 4, tr. 177-182.

[5] Nguyễn Thị Hà Thu, Dương Minh Ngọc, Nguyễn Thị Thùy Linh, Phạm Thị Ngọc Mai, “Sử dụng hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt của dung dịch nano vàng để xác định meropenem trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp quang học”, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, tập 24, số 3/2019, tr 119-123.

[6] Luong Thi My Hanh, Pham Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Minh Diep, Nguyen Xuan Truong, (2019), “An HPLC-UV method for determination of moxifloxacin in pharmaceutical formulations”, Tạp chí phân tích Hoá, Lý và Sinh học, Tập 24, số 2, tr. 222-227.

[7] Sharma, Neha, Selvam, Sathish Panneer, and Yun, Kyusik (2020), “Electrochemical detection of amikacin sulphate using reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite”, Applied Surface Science, 512, 145742.

[8] Chang-Zhu Yu, You-Zhao He, Guo-Ni Fu, Hai-Yang Xie, Wu-Er Gan (2009), “Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection”, Journal of Chromatography B, 877, 333-338.

[9] Lella Kalyani, Chava Venkata Nageswara Rao (2018), “Stability indicating RP-HPLC method development and validation of

*cefepime and amikacin in pure and pharmaceutical dosage forms*", Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 54(3), 17258.

[10] Benjamín Santos, Maria Luisa Sayalero, Aránzazu Zarzuelo, José M. Lanao (2002), "Determination of amikacin in biological tissues by HPLC", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 25(2), 287-297.

[11] R. Mohammadi, H. Naderi-Manesh, L. Farzin, Z. Vaezi, N. Ayarri, L. Samandari et al. (2022), "Fluorescence sensing and imaging with carbon-based quantum dots for early diagnosis of cancer: A review", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 212, 114628.

[12] Chu, Han-Wei, et al. (2020), "Carbon quantum dots for the detection of antibiotics

and pesticides", Journal of Food & Drug Analysis, 28(4), Article 5.

[13] R. K. Sajwan and P. R. Solanki (2022), "A hybrid optical strategy based on graphene quantum dots and gold nanoparticles for selective determination of gentamicin in the milk and egg samples", Food Chemistry, 370, 131312.

[14] V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith, and M. Ishikawa (2008), "Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2469-95.

[15] E. S. Glazer and S. A. Curley (2011), "Non-invasive radiofrequency ablation of malignancies mediated by quantum dots, gold nanoparticles and carbon nanotubes", Therapeutic Delivery, 2, 1325-30.