

SỬ DỤNG HIỆN TƯỢNG CỘNG HƯỞNG PLASMON BỀ MẶT CỦA DUNG DỊCH NANO VÀNG ĐỂ XÁC ĐỊNH AMIKACIN TRONG MẪU DƯỢC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG HỌC

TÔ THỊ PHƯƠNG⁽¹⁾, TRẦN NGỌC BÍCH⁽¹⁾, NGUYỄN QUANG KHÁNH⁽¹⁾,
BÙI XUÂN THÀNH⁽¹⁾, PHẠM THỊ NGỌC MAI⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay ở Việt Nam, kháng sinh là một nhóm thuốc đặc biệt quan trọng vì bệnh lý nhiễm khuẩn nằm trong số những bệnh đứng đầu cả nước về tỷ lệ mắc bệnh cũng như tỷ lệ tử vong. Do đó, kháng sinh luôn được xem là một nhóm thuốc đặc biệt quan trọng trong y tế. Aminoglycosid 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 không phải là cơ chất của nhiều enzym bất hoạt aminoglycoside [1]. Cấu trúc phân tử của amikacin được hiển thị ở hình 1.

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 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 [2], phương pháp điện di mao quản [3], phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC [4, 5] đều có chung một số nhược điểm như hóa chất và thiết bị đắt tiền, vận hành phức tạp. Phương pháp phổ hấp thụ phân tử UV-Vis tuy có ưu điểm là đơn giản dễ vận hành nhưng lại gặp khó khăn khi xác định trực tiếp amikacin do amikacin có khả năng hấp thụ quang rất kém.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển phương pháp phân tích amikacin có độ nhạy và độ chính xác cao nhưng lại đơn giản và có chi phí thấp bằng cách sử dụng hiệu ứng plasmon bề mặt (SPR) của dung dịch hạt nano vàng (AuNPs) với khả năng thay đổi màu sắc từ đỏ sang xanh khi có mặt amikacin.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất tinh khiết phân tích: Chloroauric axit tetrahydrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), natri citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), natri clorua (NaCl), natri hydroxit (NaOH), axit clohidric (HCl), amikacin được mua từ Merck (Darmstadt, Đức) và Sigma-Aldrich (Mỹ).

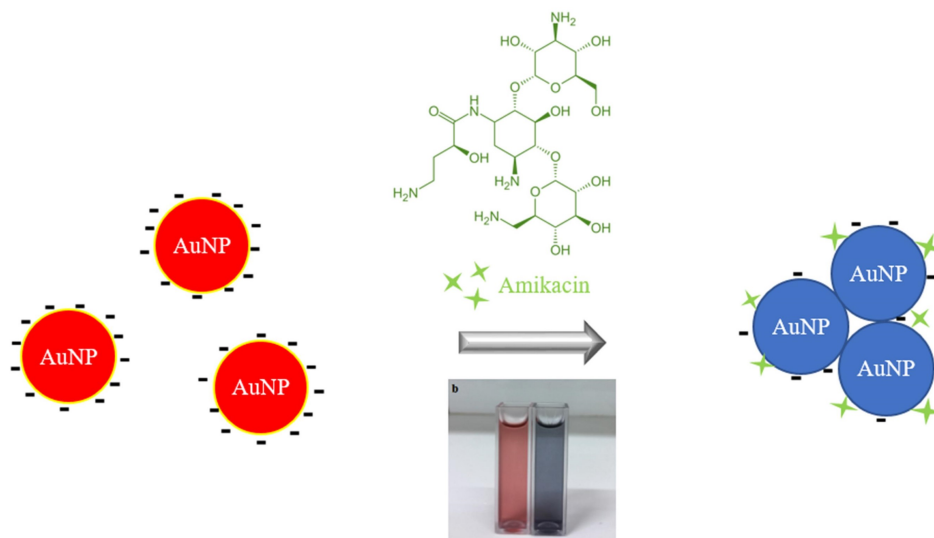
Máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS 1601 PC-Shimadzu (Nhật Bản), bước sóng làm việc từ 400-800nm, cuvet chiều dày 1cm.

2.2. Điều chế dung dịch nano vàng

Dung dịch nano Au được điều chế dựa theo phương pháp Turkevich sử dụng natri citrat làm chất khử để khử HAuCl_4 xuống Au^0 đồng thời các ion citrat hấp phụ trên bề mặt hạt Au cũng có tác dụng bảo vệ và làm ổn định hạt Au [6-8].

2.3. Nguyên tắc xác định Amikacin

Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của dung dịch nano vàng ổn định bằng citrat có màu đỏ tươi và được đặc trưng với một đỉnh hấp thụ cực đại xung quanh bước sóng 520 nm. Khi trong dung dịch chứa amikacin và nano vàng, amikacin sẽ hấp phụ 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 và khiến cho các hạt vàng co cụm lại. Dung dịch chuyển từ màu đỏ sang màu xanh và trên phổ hấp thụ phân tử UV-VIS xuất hiện một dải hấp thụ cực đại thứ hai xung quanh bước sóng 650 nm [9, 10].



Hình 1. Cơ chế của phương pháp xác định amikacin sử dụng hạt nano vàng

Thiết lập mối quan hệ giữa tỉ lệ độ hấp thụ quang ở hai bước sóng 650 nm và 520 nm với nồng độ amikacin làm tín hiệu phân tích để định lượng amikacin.

2.4. Xử lý và phân tích mẫu

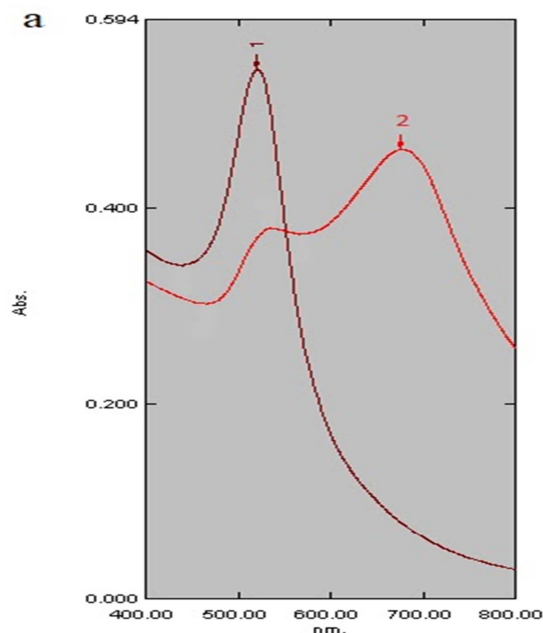
Một lượng mẫu thuốc tiêm chứa amikacin được chuyển trực tiếp vào bình định mức 25 mL, định mức đến vạch mức bằng nước cất thu được dung dịch mẫu. Cho 5 mL dung dịch nano Au có nồng độ 0,5 mM vào bình định mức dung tích 10 mL, thêm 160 μ L dung dịch NaCl 1 M, chỉnh pH = 6, thêm 900 μ L dung dịch mẫu, định mức đến vạch. Đợi 4 phút và đo tỉ lệ độ hấp thụ quang $Abs_{650/520}$. Hàm lượng amikacin được xác định bằng phương pháp đường chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu các điều kiện xác định amikacin

3.1.1. Khảo sát lựa chọn bước sóng cực đại (λ_{max})

Trên hình 2 là các phổ hấp thụ UV-Vis được ghi trong khoảng bước sóng 400-800 nm của dung dịch nano vàng khi không có mặt amikacin (đường 1) và khi có mặt amikacin (đường 2).



Hình 2. Phổ hấp thụ của dung dịch nano vàng khi có mặt amikacin

(1) Phổ hấp thụ quang của dung dịch nano vàng;

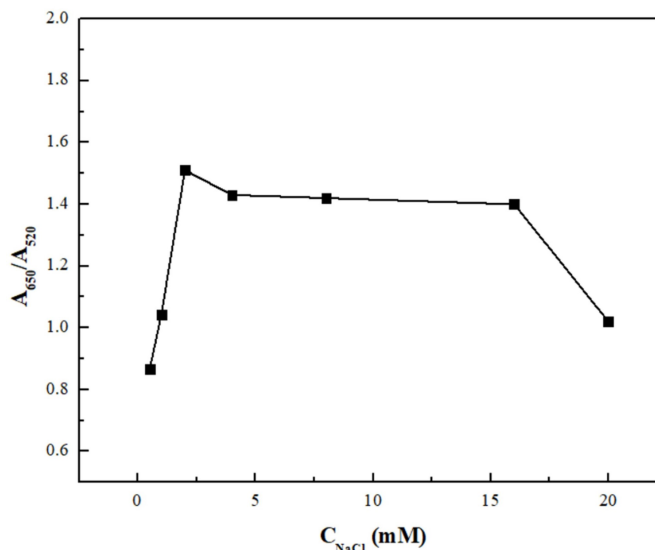
(2) Phổ hấp thụ của dung dịch nano vàng khi có mặt amikacin (10^{-6} M).

Đường 1 cho thấy phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch nano vàng có một đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 520 nm (dải hấp thụ cộng hưởng plasmon bề mặt). Đường 2 xuất hiện thêm một đỉnh cực đại ở bước sóng 650 nm khi cho thêm amikacin (10^{-6} M) vào dung dịch nano vàng. Nguyên nhân là do sự thay đổi kích thước hạt nano vàng khi có mặt amikacin dẫn đến sự thay đổi màu sắc của dung dịch nano Au từ đỏ sang xanh đồng thời gây ra sự dịch chuyển cực đại hấp thụ từ bước sóng 520 nm sang 650 nm [9-11].

Từ khảo sát trên chúng tôi lựa chọn hai bước sóng hấp thụ cực đại là 520 nm và 650 nm và sử dụng tỉ lệ độ hấp thụ quang tại 2 bước sóng này làm tín hiệu phân tích để định lượng amikacin.

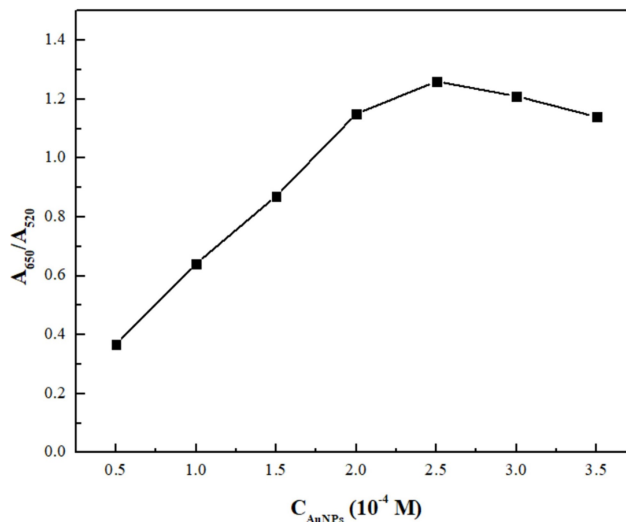
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối điện ly và nồng độ dung dịch nano Au

Nồng độ muối điện ly và nồng độ dung dịch nano Au là 2 yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng co cụm của hệ nano Au. Tiến hành khảo sát nồng độ muối NaCl trong khoảng từ 0,5 mM đến 20 mM, kết quả thực nghiệm (hình 3) cho thấy khi có mặt NaCl, khả năng co cụm của các hạt nano vàng tăng lên thể hiện qua tỉ lệ A_{650}/A_{520} tăng theo nồng độ NaCl, đạt bão hòa khi nồng độ NaCl là 2 mM và sau đó giảm dần. Do đó, chúng tôi chọn nồng độ NaCl là 2 mM là điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch muối NaCl

Nồng độ của dung dịch AuNPs không chỉ ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp mà còn ảnh hưởng đến khoảng tuyến tính của phương pháp xác định amikacin. Ở nồng độ dung dịch AuNPs thấp sẽ dễ dàng nhận biết sự thay đổi màu sắc của dung dịch khi có mặt amikacin. Tuy nhiên, nếu nồng độ dung dịch AuNPs quá thấp thì amikacin sẽ khó hấp thụ lên bề mặt các hạt AuNP. Tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{650}/A_{520} của dung dịch nano Au khi có mặt amikacin tăng dần và đạt giá trị lớn nhất tại nồng độ dung dịch AuNPs $2,5 \times 10^{-4}$ M trong khoảng khảo sát từ $0,5 \times 10^{-4}$ M đến $3,5 \times 10^{-4}$ M, do đó dung dịch nano Au $2,5 \times 10^{-4}$ M được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.

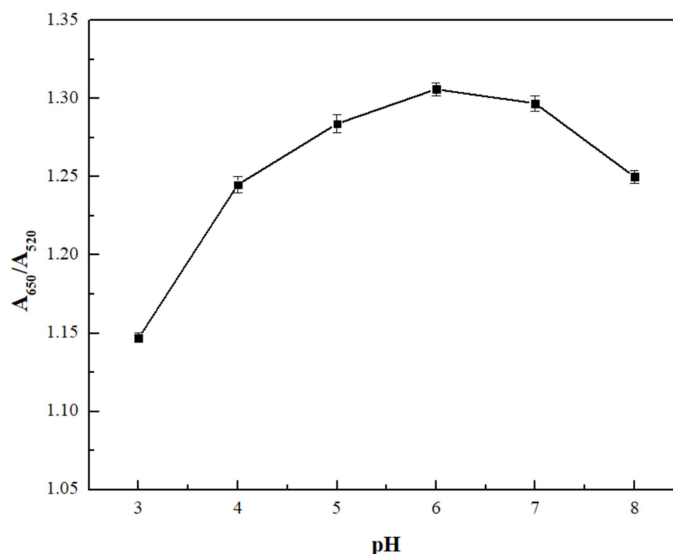


Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch AuNPs

3.1.3. Ảnh hưởng của pH

Nhờ lực tĩnh điện giữa các hạt citrat nano vàng tích điện âm nên dung dịch nano vàng có thể bền vững trong khoảng pH từ 3 - 8. Do đó, pH của dung dịch có ảnh hưởng tương đối lớn đến tỉ lệ độ hấp thụ quang A_{650}/A_{520} . Hình 5 cho thấy tỉ lệ độ hấp thụ quang A_{650}/A_{520} tăng trong khoảng pH 3 - 6, sau đó giảm mạnh trong khoảng pH từ 7 đến 8. Tại các giá trị pH lớn hơn 7 tỉ lệ độ hấp thụ quang giảm, chứng tỏ sự hấp phụ của các hạt nano vàng khi thêm amikacin ở pH cao giảm dần, do nhóm hydroxyl (-OH) trong phân tử amikacin phân li làm amikacin mang điện tích âm và khó hấp phụ trên bề mặt hạt citrat-nano Au cũng mang điện tích âm.

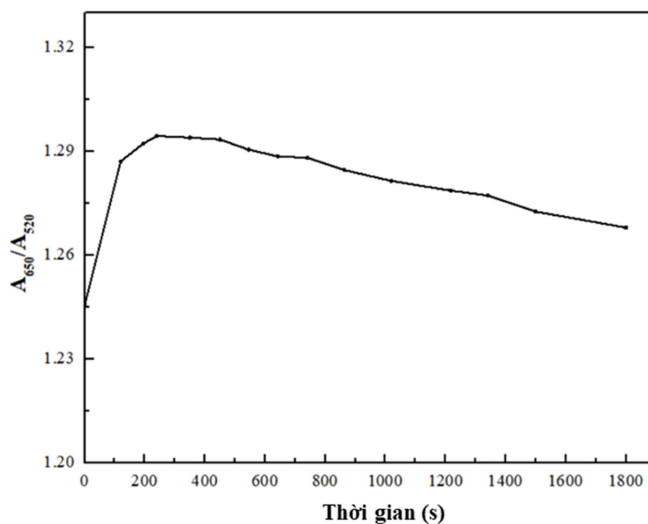
Ở giá trị pH 6, tỉ lệ độ hấp thụ quang A_{650}/A_{520} có giá trị lớn nhất sau ba lần đo lặp lại thí nghiệm. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi chọn pH 6 là giá trị tối ưu cho tất cả các khảo sát.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH

3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian

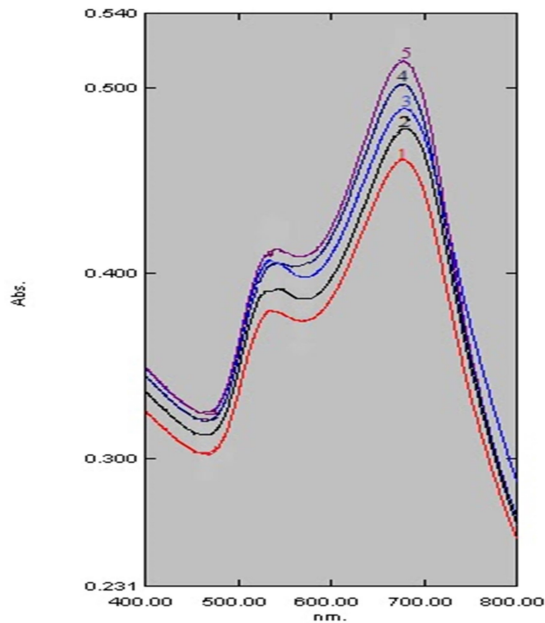
Ảnh hưởng của thời gian tới độ ổn định màu của dung dịch sau khi thêm amikacin được khảo sát trong thời gian 30 phút. Nhận thấy tỉ lệ độ hấp thụ quang A_{650}/A_{520} tăng nhanh ở 4 phút đầu sau đó giảm dần (hình 6), chứng tỏ hiện tượng co cụm của các hạt nano vàng bắt đầu xảy ra ngay khi trộn và kết thúc sau khoảng thời gian 4 phút. Tại điều kiện tối ưu, sau khi thêm amikacin có thể quan sát bằng mắt thường 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 4. Vì vậy, 4 phút là thời gian tối ưu được lựa chọn để phát hiện và định lượng amikacin.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian

3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ amikacin

Nồng độ amikacin được khảo sát trong khoảng 10^{-7} M - 5×10^{-6} M, các phổ UV-Vis của các dung dịch amikacin tương ứng trong khoảng bước sóng từ 400 - 800 nm được biểu diễn trên hình 7.



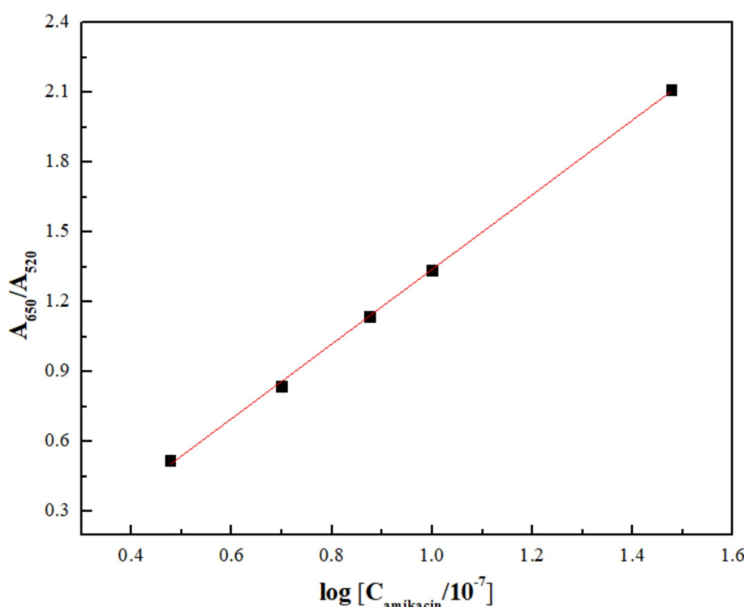
Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ amikacin. Đường 1-5: Phổ hấp thụ quang của dung dịch AuNPs với các nồng độ khác nhau lần lượt là 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 5×10^{-7} ; $3,5 \times 10^{-6}$; 5×10^{-6} M

Như có thể thấy trên hình 6, khi tăng nồng độ amikacin, độ hấp thụ quang của dải hấp thụ mới ở bước sóng 650 nm tăng dần, đồng thời độ hấp thụ quang ở bước sóng 520 nm giảm dần. Khi xây dựng mối quan hệ giữa tỉ lệ A_{650}/A_{520} và nồng độ amikacin, nhận thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, tỉ lệ A_{650}/A_{520} tăng tuyến tính với logarit của nồng độ amikacin. Đây là cơ sở để định lượng amikacin trong dung dịch hạt nano vàng.

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 3×10^{-7} đến $3,5 \times 10^{-6}$ M tại các điều kiện tối ưu vừa xác định ở trên (pH = 6; NaCl 2 mM, nano Au $2,5 \times 10^{-4}$ M, thời gian 4 phút). Kết quả cho thấy tỉ lệ độ hấp thụ quang tăng tuyến tính theo logarit nồng độ của amikacin trong khoảng từ $3,0 \times 10^{-7}$ - $3,5 \times 10^{-6}$ M. Đường chuẩn xây dựng trong khoảng nồng độ này có phương trình: $y = 1,602x - 0,2613$ hay $A_{650}/A_{520} = 1,602 \times \log\left(\frac{C_{amikacin}}{10^{-7}}\right) - 0,2613$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9994$.



Hình 8. Đồ thị xây dựng phương trình đường chuẩn

Độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại của phương pháp. Tiến hành đo lặp dung dịch amikacin ở các nồng độ $7,5 \times 10^{-7}$ M (~0,44 ppm); 10^{-6} M (~0,58 ppm) và $3,5 \times 10^{-6}$ M (~2,05 ppm) mỗi dung dịch đo lặp lại 5 lần. Kết quả độ lặp lại thu được với các mức nồng độ trên đạt giá trị độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) là 3,42%; 3,51%; 0,98% đáp ứng yêu cầu của Hiệp hội các nhà phân tích (AOAC).

Độ đúng được đánh giá qua hiệu suất thu hồi, tại 3 mức nồng độ $1,6 \times 10^{-6}$ mol/L, 2×10^{-6} mol/L và $2,4 \times 10^{-6}$ (đo lặp lại 5 lần), hiệu suất thu hồi đạt từ 98,32% - 102,43% đáp ứng yêu cầu của AOAC.

LOD và LOQ được xác định từ đường chuẩn, theo công thức $LOD = 3S_y/b$ và $LOQ = 10S_y/b$ với S_y là giá trị sai số của đường chuẩn. Kết quả thu được giá trị LOD là $7,2 \times 10^{-8}$ mol/L (0,042 ppm); LOQ là $2,4 \times 10^{-7}$ mol/L (0,14 ppm). Từ bảng 1 có thể thấy việc sử dụng hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt của dung dịch nano vàng để xác định amikacin bằng phương pháp quang học cho giới hạn phát hiện thấp hơn hẳn so với phương pháp điện di mao quản, phương pháp hóa phát quang và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, và cao hơn so với các phương pháp huỳnh quang. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như đơn giản, dễ thực hiện, phù hợp ứng dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm, có thể dùng để xác định amikacin trong mẫu phân tích có hàm lượng tương đối thấp.

Bảng 1. So sánh giới hạn phát hiện amikacin với một số phương pháp khác.

Phương pháp	LOD (ppm)	TLTK, năm
Sắc ký lỏng hiệu năng cao	0,15	[12], 2014
Điện hóa	0,022	[13], 2020
Điện di mao quản	49,81	[14], 2009
Hoá phát quang	2,97	[15], 2005
Huỳnh quang	0,001	[16], 2016
Quang học sử dụng AuNPs	0,042	Nghiên cứu này

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng thành công phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis sử dụng hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt của hạt nano vàng khi có mặt amikacin. Phương pháp có độ chính xác cao và giới hạn phát hiện rất thấp ($LOD = 7,2 \times 10^{-8}$ M) so với các phương pháp hiện nay đang sử dụng. Nghiên cứu này 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. Faten Farouk, Hassan M. E. Azzazy, Wilfried M. A. Niessen, *Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review*, Analytica Chimica Acta, 2015, **890**:21-43.
2. Jin-Zhong Xu, Jun-Jie Zhu, Hui Wang, Hong-Yuan Chen, *Nano-sized copper oxide modified carbon paste electrodes as an amperometric sensor for amikacin*, Analytical Letters, 2003, **36**:2723-2733.

3. Shigeyuki Oguri, Yasuyoshi Miki, *Determination of amikacin in human plasma by high-performance capillary electrophoresis with fluorescence detection*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996, **686**(2):205-210.
4. Gordana Brajanoski, Jos Hoogmartens, Karel Allegaert, Erwin Adams, *Determination of amikacin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection*, Journal of Chromatography B, 2008, **867**:149-152.
5. Deguang Li, Shun He, Yufang Deng, Guanglong Ding, Hanwen Ni, Yongsong Cao, *Development and validation of an HPLC method for determination of amikacin in water samples by solid phase extraction and pre-column derivatization*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, **93**:47-52.
6. John Turkevich, Peter Cooper Stevenson, James Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Discussions of the Faraday Society, 1951, **11**:55-75.
7. Jiaqi Dong, Paul L. Carpinone, Georgios Pyrgiotakis, Philip Demokritou, Brij M. Moudgil, *Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method*, Kona Powder and Particle Journal, 2020, **37**:224-232.
8. Nguyen Thu Ha, Nguyen Quang Khanh, Pham Thi Ngoc Mai, *Synthesis of nano gold particles towards application as sensor for acetamiprid determination*, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, 2019, **24**:163-167.
9. Emameian A., Ahangari A., Salouti M., Amirmozafari N., *Enhanced effect of Amikacin in conjugation with gold nanoparticles as a carrier to kill Pseudomonas aeruginosa*, Nanochemistry Research, 2020, **5**(2):179-184.
10. Tianyu Zheng, Yuen Yee Li Sip, Michael B. Leong, Qun Huo, *Linear self-assembly formation between gold nanoparticles and aminoglycoside antibiotics*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, **164**:185-191.
11. Kim T., Lee K., Gong M., Joo S. W., *Control of gold nanoparticle aggregates by manipulation of interparticle interaction*, Langmuir, 2005, **21**:9524-9528.
12. Mohamed Abdel-Tawab Korany, Rim Said Haggag, Marwa Adel Ragab, Osama Ahmed Elmallah, *Liquid chromatographic determination of amikacin sulphate after pre-column derivatization*, Journal of Chromatographic Science, 2014, **52**(8):837-847.
13. Neha Sharma, Sathish Panneer Selvam, Kyusik Yun, *Electrochemical detection of amikacin sulphate using reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite*, Applied Surface Science, 2020, **512**:145742.
14. Chang-Zhu Yu, You-Zhao He, Guo-Ni Fu, Hai-Yang Xie, Wu-Er Gan, *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, 2009, **877**(3):333-338.

15. J. M. Ramos Fernández, J. M. Bosque-Sendra, A. M. García-Campaña, F. Alés Barrero, *Chemiluminescence determination of amikacin based on the inhibition of the luminol reaction catalyzed by copper*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, **36**(5):969-974.
16. Javad Hassanzadeh, Babak Rezaei Moghadam, AliSobhani-Nasab, Farhad Ahmadi, Mehdi Rahimi-Nasrabadi, *Specific fluorometric assay for direct determination of amikacin by molecularly imprinting polymer on high fluorescent g-C₃N₄ quantum dots*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, **214**:451-458.

SUMMARY

USING SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) OF NANO GOLD SOLUTION FOR DETERMINATION OF AMIKACIN IN PHARMACEUTICAL SAMPLES BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

A simple and highly sensitive spectrophotometric method for detecting amikacin was developed based on the change in surface plasmon resonance (SPR) properties of gold nanoparticles (AuNPs). The change in the AuNPs solution colour from red to blue in the presence of trace amounts of amikacin makes the method visible to the naked eye. Furthermore, with the addition of amikacin, in the UV-Vis spectrum appears another absorption band at 650 nm, and the AuNPs solution also gave a linear increase of optical absorption ratio A_{650}/A_{520} with a logarithm of amikacin concentration in the range of 3×10^{-7} - 3.5×10^{-6} M. Under the optimum conditions, including 2.5×10^{-4} M gold nanoparticles solution, pH = 6 and 2 mM NaCl with an incubation time of 4 minutes, the proposed method achieved the low limit of detection (LOD) of 7.2×10^{-8} M, the limit of quantitation (LOQ) of 2.4×10^{-7} M, high precision (RSD < 5%). Therefore, the developed method can be applied to determine amikacin in pharmaceutical samples and in plasma and urine samples.

Keywords: Amikacin, UV-Vis, Au nanoparticles, hạt nano vàng.

Nhận bài ngày 08 tháng 10 năm 2022

Phản biện xong ngày 16 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 28 tháng 10 năm 2022

⁽¹⁾ *Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Liên hệ: Phạm Thị Ngọc Mai

Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội

Điện thoại: 0982.384.588; Email: m.t.n.pham@gmail.com