

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH KHÁNG SINH KANAMYCIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HUỖNH QUANG SỬ DỤNG VẬT LIỆU TỔ HỢP g-C₃N₄/AuNPs

Đến tòa soạn: 19-03-2025

Nguyễn Thị Dung¹, Trần Thị Phương¹, Trần Ngọc Bích¹, Lê Thị Mai Anh, Phạm Gia Bách¹,
Chu Thị Huệ¹, Nguyễn Thị Ánh Hoàng¹, Phạm Thị Ngọc Mai^{1*}

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Email*: m.t.n.pham@gmail.com

SUMMARY

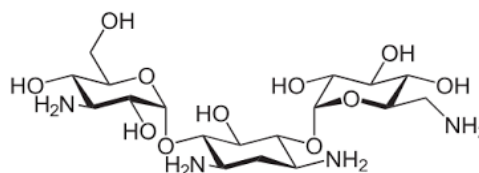
STUDY ON THE FLUORESCENCE DETERMINATION OF KANAMYCIN USING COMBINATION OF g-C₃N₄/AuNPs

The risk of exposure to aminoglycoside antibiotic resistance genes increases the incidence of infections caused by drug-resistant bacteria, leading to clinical treatment failure with kanamycin. This situation necessitates the urgent implementation of new strategies to control antibiotic resistance. In this study, we developed a highly sensitive fluorescence “on-off” nanosensor for kanamycin detection based on the interaction between g-C₃N₄ and gold nanoparticles (AuNPs). The addition of AuNPs to the g-C₃N₄ solution resulted in fluorescence quenching (off effect). However, in the presence of kanamycin, the fluorescence signal was restored due to the analyte binding to AuNPs and releasing g-C₃N₄ (on effect). Under optimal conditions (6 mM Na₂SO₄, pH 7.0, incubation time of 15 minutes), the method demonstrated a wide linear range from 10 nM to 500 nM with high accuracy (RSD < 5%). This approach was successfully applied for kanamycin detection in pharmaceutical samples, highlighting its potential for antibiotic residue monitoring and antibiotic resistance mitigation.

Keywords: Kanamycin, g-C₃N₄, AuNPs, antibiotic detection, fluorescence probe, on-off fluorescence, nanosensor.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kanamycin (KAN) là một loại kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn Gram âm và Gram dương bằng cách can thiệp vào quá trình tổng hợp protein và làm suy giảm tính toàn vẹn của màng tế bào của chúng thông qua liên kết với tiểu đơn vị ribosome 30S [1], [2]. Hiện nay, KAN được sử dụng rộng rãi làm phụ gia thức ăn chăn nuôi, thuốc thú y và thuốc trừ sâu để ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm và thúc đẩy tăng trưởng động vật.



Hình 1. Công thức cấu tạo của kanamycin

Tuy kanamycin có đặc tính kháng khuẩn tốt, việc sử dụng quá liều có thể dẫn đến tồn dư trong các thực phẩm có nguồn gốc từ động vật hay trong cơ thể con người, gây ra những vấn đề nghiêm trọng cho sức khỏe như dị ứng, tổn thương thận, rối loạn thính giác, suy hô hấp... thậm chí gây khó khăn trong điều trị do hiện tượng

kháng thuốc [3]. Do đó việc phát triển một phương pháp nhanh chóng, đơn giản, có độ nhạy cao và đặc hiệu để xác định dư lượng kanamycin là rất cần thiết. Cho đến nay đã có một số phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định KAN như phương pháp quang phổ Raman [4], điện di mao quản [5], sắc ký lỏng - khối phổ [6], sắc ký lỏng [7], điện di mao quản [8], ... Trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển một qui trình phân tích mới để xác định kanamycin dựa trên phương pháp huỳnh quang do phương pháp này có những ưu điểm như phân tích đơn giản, nhanh chóng, hiệu quả về chi phí nhưng vẫn đảm bảo độ nhạy và độ chọn lọc cao.

Các thuốc thử huỳnh quang truyền thống như fluorescein và rhodamine có nhược điểm là tổng hợp phức tạp và có độc tính cao dẫn đến làm giảm đáng kể hiệu quả của phương pháp. Graphitic carbon nitride, $g-C_3N_4$, là một ứng cử viên tiềm năng có thể thay thế cho các thuốc thử huỳnh quang truyền thống, nhờ các ưu điểm như chi phí thấp, hiệu suất phát huỳnh quang cao, phổ kích thích rộng, khả năng tương thích sinh học tốt, độ ổn định, không độc hại [7]. Các tấm nano $g-C_3N_4$ được hình thành từ các đơn vị tri - s - triazine, thu được bằng cách trùng ngưng nhiệt các tiền chất giàu nitơ như cyanamide, dicyanamide, melamine, ure và thiourea [10]. Các nhóm chức của $g-C_3N_4$ có thể cung cấp các vị trí liên kết với phân tử chất mục tiêu, từ đó có ứng dụng rộng rãi trong chụp ảnh sinh học, cảm biến huỳnh quang xét nghiệm axit nucleic, phát hiện ion kim loại nặng và độc tố sinh học... [11], [12].

Gần đây, sự truyền năng lượng giữa các vật liệu huỳnh quang, như CQDs, $g-C_3N_4$ và các hạt nano kim loại plasmon, ví dụ như nano kim loại vàng (AuNPs), đã thu hút được sự chú ý trong lĩnh vực y sinh, đặc biệt là trong ứng dụng cảm biến. Do

hiệu ứng trường cục bộ từ các hạt nano kim loại và sự dịch chuyển đỉnh phát xạ do liên kết plasmon bề mặt, hiệu ứng “tắt” huỳnh quang của $g-C_3N_4$ khi có mặt AuNPs đã được công bố trong một số nghiên cứu [13].

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng hệ $g-C_3N_4$ /AuNPs để xác định kháng sinh kanamycin dựa trên hiệu ứng “tắt-bật” huỳnh quang của hệ. Khi có mặt hạt nano Au, huỳnh quang của $g-C_3N_4$ bị dập tắt do hiệu ứng plasmon của các hạt nano vàng, tương ứng với trạng thái “tắt”. Khi có mặt kanamycin, phân tử kanamycin chứa nhóm chức -NH tương tác mạnh với AuNPs và giải phóng $g-C_3N_4$, tín hiệu huỳnh quang của dung dịch khi đó được hồi phục, tương ứng với trạng thái “bật”. Độ hồi phục huỳnh quang của hệ $g-C_3N_4$ /AuNPs tỷ lệ tuyến tính với nồng độ kanamycin, cho phép xác định kanamycin trong khoảng tuyến tính rộng 10 nM đến 500 nM và giới hạn phát hiện rất thấp 3 nM so với các phương pháp truyền thống. Phương pháp phân tích sau khi được đánh giá về hiệu quả sử dụng được áp dụng vào để phân tích một số mẫu được phẩm trên thị trường tại Hà Nội.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hoá chất

Các hóa chất tinh khiết phân tích: kanamycin (99 %, TRC, Canada), melamine ($C_3H_6N_6$; 99%; Fisher ChemicalTM), natri citrate ($Na_3C_6H_5O_7$ >99%; Merck, Đức); axit chloroauric ($HAuCl_4$ 99 %; 30 wt. % HCl; Acros/Thermo Scientific, USA), natri clorua (NaCl; 99,5 %; Fisher Chemical), natri hydroxit (NaOH; >96 %; Fisher Chemical), đồng sulfat ($CuSO_4.5H_2O$, 98%, Xilong, China), ... và một số hóa chất khác. Nước sử dụng trong quá trình pha chế là nước khử ion.

2.2. Thiết bị

Phép đo phổ huỳnh quang được thực hiện trên máy huỳnh quang F-4700 (Hitachi), với bước sóng kích thích là 360 nm và phổ phát xạ được ghi trong khoảng từ 380 - 600 nm. Phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) được ghi trên thiết bị quang phổ UV-1601 (Shimadzu). Quy trình tổng hợp vật liệu sử dụng lò nung Nabertherm HTC08/14.

2.3. Quy trình tổng hợp g-C₃N₄, g-C₃N₄/AuNPs

Tổng hợp vật liệu g-C₃N₄: Vật liệu được tổng hợp theo quy trình đã được chúng tôi nghiên cứu trước đây [13]. Nhiệt phân 6 g melamine ở nhiệt độ 520 °C trong 4 giờ. Làm nguội đến nhiệt độ phòng, thu được chất rắn g-C₃N₄. Vật liệu thu được có khả năng phát ánh sáng xanh lá khi được chiếu ánh sáng UV.

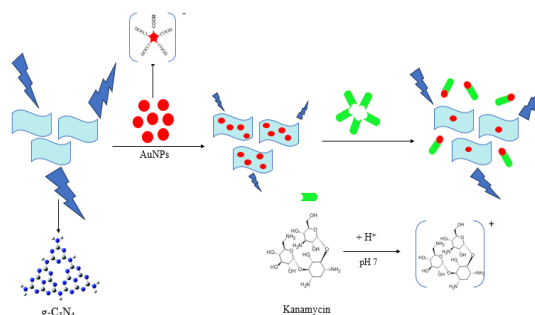
Tổng hợp vật liệu g-C₃N₄/AuNPs: AuNPs được tổng hợp theo phương pháp Turkevich trong đó HAuCl₄ được khử thành Au bằng natri citrate [13]. Cân một lượng chính xác bột g-C₃N₄ trên cân phân tích, sau đó được hòa tan bằng nước khử ion và rung siêu âm dung dịch 5 phút. Lọc dung dịch này qua màng 0,22 μm. Sau đó, trộn 2,0 mL dung dịch g-C₃N₄ 3 mg/mL và 4,0 mL dung dịch AuNPs 2 nM lắc đều và để yên dung dịch trong vòng 20 phút để tương tác giữa g-C₃N₄ và AuNPs xảy ra hoàn toàn. Dung dịch g-C₃N₄/AuNPs có màu đỏ rượu vang dưới ánh sáng thường và không phát quang dưới đèn UV. Cuối cùng, dung dịch g-C₃N₄/AuNPs được bảo quản ở tủ lạnh 4°C và thời gian bảo quản tối đa 3 tháng.

2.4. Xác định kanamycin bằng phương pháp huỳnh quang sử dụng tổ hợp g-C₃N₄/AuNPs

2.4.1. Nguyên tắc xác định kanamycin

Dung dịch g-C₃N₄ phát quang mạnh tại bước sóng 440 nm khi được kích thích tại

bước sóng 360 nm. Khi thêm các hạt nano vàng (AuNPs), cường độ phát xạ huỳnh quang của hỗn hợp g-C₃N₄/AuNPs giảm đi rõ rệt do hiệu ứng bộ lọc trong (Inner Filter Effect), trong đó g-C₃N₄ đóng vai trò chất cho (donor) và AuNPs đóng vai trò chất nhận (acceptor) năng lượng. Khi thêm kanamycin vào hỗn hợp g-C₃N₄/AuNPs, kanamycin tương tác với các hạt AuNPs và giải phóng các hạt g-C₃N₄ ra khỏi tổ hợp g-C₃N₄/AuNPs (Hình 2). Khi đó cường độ phát xạ huỳnh quang của g-C₃N₄ lại hồi phục. Độ hồi phục huỳnh quang khi có mặt kanamycin được ghi lại như tín hiệu phân tích của phương pháp.



Hình 2. Cơ chế xác định kanamycin

2.4.2. Quy trình xác định kanamycin

Thêm 300 μL dung dịch Na₂SO₄ 0,1 M và 500 μL dung dịch kanamycin cân xác định nồng độ vào 2 mL dung dịch g-C₃N₄/AuNPs, định mức trong bình 5 mL bằng nước khử ion và ủ trong 15 phút. Đo phổ huỳnh quang của dung dịch trên máy quang phổ huỳnh quang với các điều kiện đo: bước sóng kích thích λ = 360 nm; phổ phát xạ được quét trong vùng bước sóng từ 380 - 600 nm. Tính độ hồi phục huỳnh quang (F-F₀) ở bước sóng 440 nm, trong đó F và F₀ lần lượt là tín hiệu huỳnh quang khi có và không có kanamycin, để từ đó xác định nồng độ kanamycin.

2.4.3. Quy trình xử lý mẫu

Các mẫu được phẩm có chứa kanamycin được thu thập ngẫu nhiên từ nhiều hiệu thuốc khác nhau tại địa bàn Hà Nội, gồm

cả thuốc sử dụng cho người và thuốc sử dụng cho động vật dưới dạng dung dịch tiêm và viên nén: Hanvet Kanamycin 10%; Vemedim Kanamycin 20%; Navetco Kanamycin 10% và Kanamycin Sulfate với hàm lượng Kanamycin trên nhãn lần lượt là 100 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml và 500 mg.

Quy trình xử lý mẫu thuốc tiêm dạng dung dịch: Lắc đều mẫu thuốc, hút chính xác khoảng 14,5 ml mẫu, chuyển vào bình định mức 25,0 mL và định mức đến vạch bằng nước khử ion. Pha loãng bằng nước khử ion với các tỷ lệ phù hợp để dung dịch đo có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính.

Quy trình xử lý mẫu thuốc dưới dạng viên nén: Cân chính xác 95,8 mg thuốc có chứa kanamycin trên cân phân tích, hòa tan bằng nước khử ion. Sau đó lọc để loại bỏ các tạp chất không tan, chuyển phần dung dịch thu được vào bình định mức 25,0 mL và định mức đến vạch bằng nước khử ion thu được dung dịch mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Tối ưu các điều kiện xác định kanamycin bằng phương pháp huỳnh quang sử dụng g-C₃N₄/AuNPs

Để tăng cường độ nhạy của phương pháp phát hiện KAN, tiến hành khảo sát các điều kiện bao gồm: nồng độ muối điện ly, pH, thời gian ủ,... dựa trên tối ưu độ hồi phục huỳnh quang ($F-F_0$) khi có KAN.

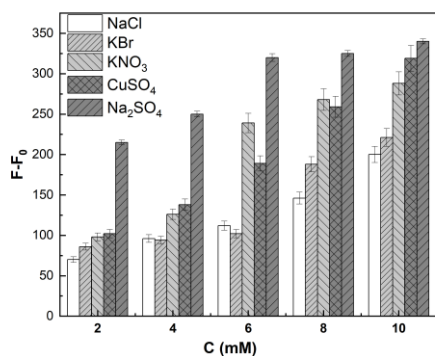
3.1.1. Ảnh hưởng của dung dịch muối điện ly

Nồng độ chất điện ly có ảnh hưởng đến trạng thái kết tụ của AuNPs và còn có thể xem như chất khơi mào cho tương tác

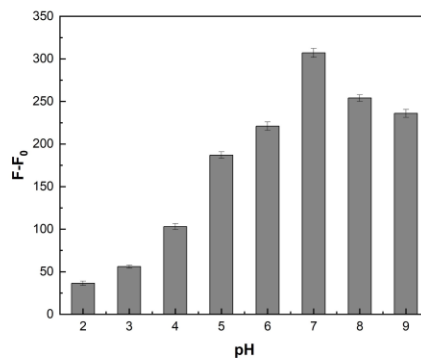
giữa AuNPs và KAN. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các muối điện ly như KNO₃, CuSO₄, NaCl, KBr và Na₂SO₄ với các nồng độ khác nhau đến độ hồi phục huỳnh quang của hệ g-C₃N₄/AuNPs khi có mặt KAN nồng độ 100 nM được biểu diễn trong Hình 3a. Với CuSO₄ tín hiệu huỳnh quang hầu như không được hồi phục do các ion Cu²⁺ hoạt động như chất dập tắt huỳnh quang (quencher), thông qua cơ chế nhận năng lượng từ g-C₃N₄, làm giảm khả năng phát huỳnh quang. Các chất điện ly khác đều tăng cường khả năng phục hồi huỳnh quang bằng cách làm suy giảm lớp điện kép xung quanh AuNPs và tăng cường lực hút tĩnh điện giữa kanamycin và AuNPs. Trong đó Na₂SO₄ thể hiện hiệu ứng tăng cường cao nhất, có thể do điện tích kép của ion SO₄²⁻. Na₂SO₄ 6,0 mM được chọn là điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của pH

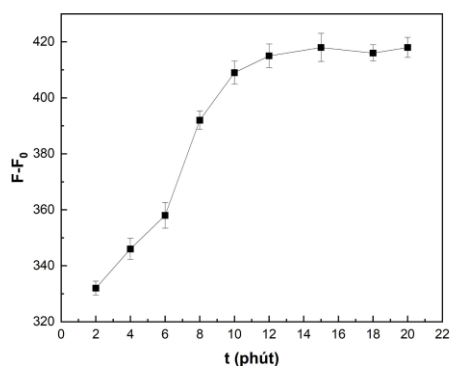
Lựa chọn pH phù hợp sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho tương tác giữa AuNPs và kanamycin. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH trong khoảng từ 2,0 đến 9,0 đến độ hồi phục huỳnh quang của g-C₃N₄/AuNPs khi có mặt kanamycin nồng độ 100 nM (Hình 3b) cho thấy ($F-F_0$) tăng theo pH và đạt cực đại ở pH 7,0. Như chúng ta đã biết, các hạt AuNPs điều chế bằng phương pháp citrate có điện tích âm cực đại trên nhóm COO⁻ của lớp vỏ citrate ở khoảng pH 6,7 (12), còn kanamycin có điện tích dương trên nhóm -NH₂ ở pH < pK₁ = 9. Vì vậy, tại pH 7,0, lực tương tác tĩnh điện giữa kanamycin và AuNPs được tối ưu và cho giá trị ($F-F_0$) là lớn nhất.



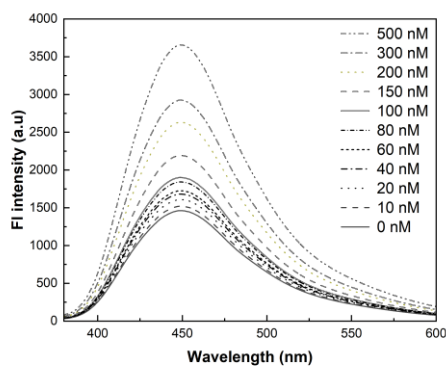
(a)



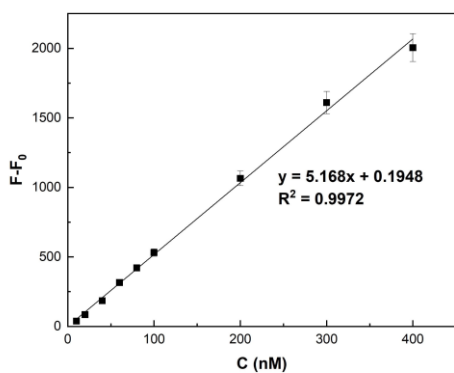
(b)



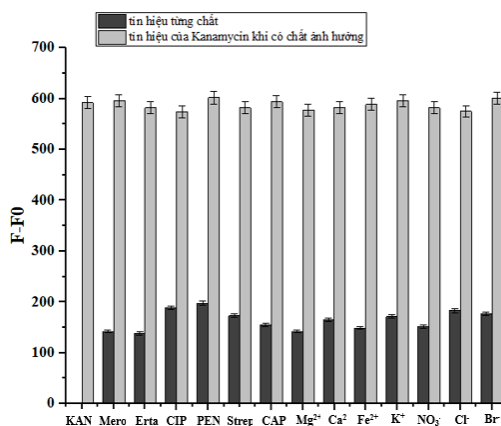
(c)



(d)



(e)



(f)

Hình 3. (a) Ảnh hưởng của muối điện ly; (b) Ảnh hưởng của pH; (c) Ảnh hưởng của thời gian ủ đến độ hồi phục huỳnh quang của dung dịch $g-C_3N_4/AuNPs$ khi thêm kanamycin; (d) Phổ huỳnh quang của $g-C_3N_4/AuNPs$ với các nồng độ kanamycin khác nhau từ 0 đến 500 nM; (e) Đường chuẩn xác định kanamycin; (f) Độ chọn lọc của kanamycin.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian

Thời gian ủ cho phép kanamycin có đủ thời gian để liên kết với hạt nano vàng. Thời gian ủ được khảo sát trong khoảng từ 0-20 phút từ khi thêm kanamycin 100 nM vào dung dịch g-C₃N₄/AuNPs. Như thể hiện trong hình 3c, cường độ huỳnh quang tăng đáng kể sau khi thêm KAN và ổn định sau 15 phút. Do đó, 15 phút được chọn là thời gian ủ tối ưu.

3.2. Đánh giá phương pháp

3.2.1. Xây dựng đường chuẩn và đánh giá độ tuyến tính, LOD và LOQ

Phổ huỳnh quang của dung dịch g-C₃N₄/AuNPs ở các nồng độ kanamycin khác nhau từ 10 nM đến 500 nM tại các điều kiện tối ưu được cho trong Hình 3d. Kết quả cho thấy khi thêm kanamycin, cường độ huỳnh quang của dung dịch g-C₃N₄/AuNPs tăng theo nồng độ của kanamycin. Hình 3d cho thấy quan hệ tuyến tính giữa độ hồi phục huỳnh quang (F-F₀) và nồng độ KAN trong khoảng nồng độ khảo sát, với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 5,168x + 0,1948$, trong đó x là nồng độ KAN (nM) và y là độ hồi phục huỳnh quang F-F₀, hệ số tương quan cao $R^2 = 0,9972$.

LOD, LOQ lần lượt là 3,0 nM và 9,9 nM được xác định từ đường chuẩn bằng cách sử dụng phương trình $LOD = 3,3.Sy/b$ và $LOQ = 10.Sy/b$. Kết quả chứng minh rằng phương pháp của chúng tôi thể hiện độ nhạy cao hơn so với các phương pháp khác như điện di mao quản (13,7.10⁶ nM) [12], HPLC (51,5.10³ nM) [13], hấp thụ phân tử UV-Vis (9,24 nM) [14], ...

3.2.2. Độ chụm và độ đúng

Kết quả khảo sát độ chụm với các mức nồng độ 20, 50, 150 nM cho giá trị độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) lần lượt là 3,8 %; 2,9 % và 4,4 %. Độ lệch của

đường chuẩn, tại 3 mức nồng độ trên đạt từ 2,9 % - 4,4 %, đều đáp ứng yêu cầu của Hiệp hội các nhà phân tích (AOAC) [15].

Dựa trên các kết quả khảo sát đã thực hiện, có thể thấy phương pháp huỳnh quang sử dụng hệ vật liệu g-C₃N₄/AuNPs có độ nhạy, độ chính xác đạt yêu cầu theo AOAC, phù hợp để áp dụng vào phân tích hàm lượng kanamycin trong mẫu thực tế.

3.2.3. Độ chọn lọc

Độ chọn lọc của phương pháp được đánh giá bằng cách khảo sát ảnh hưởng của các kháng sinh khác như meropenem (Mero), streptomycin (Step), ciprofloxacin (CIP), chloraphenicol (CAP), ertapenem (Erta), penicilin (PEN) và các ion như Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, K⁺, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻. Ở nồng độ 100 nM, không có chất nào trong số các kháng sinh hay ion trên thể hiện bất kỳ hiệu ứng ảnh hưởng nào đối với g-C₃N₄/AuNPs/kanamycin. Ngoài ra, độ hồi phục huỳnh quang của kanamycin khi có mặt các chất ảnh hưởng thay đổi khá ít, từ -3,5 - 1,2 %, cho thấy phương pháp có độ chọn lọc đáp ứng nhu cầu phân tích (Hình 3f).

3.3. Phân tích mẫu thực tế

Phương pháp đã được áp dụng vào để xác định hàm lượng kanamycin trong một số mẫu dược phẩm đang lưu hành trên thị trường. Kết quả cho thấy sự sai khác giữa hàm lượng kanamycin khi phân tích bằng phương pháp huỳnh quang sử dụng hạt nano vàng và hàm lượng trên nhãn dao động trong khoảng từ -3,16 % đến 1,60%. Phân tích thống kê sự sai khác giữa hàm lượng đo được và hàm lượng trên nhãn dựa vào kiểm định t-test cho giá trị P-value > 0,05, cho thấy sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD), với n = 5 (năm lần phân tích lặp cho mỗi mẫu). (Bảng 1)

Bảng 1. Hàm lượng kanamycin trong một số mẫu dược phẩm trên thị trường

Mẫu	Tên mẫu	Hàm lượng đo bằng phương pháp huỳnh quang \pm SD (n=5)	Hàm lượng trên nhãn	Sai khác (%)
1	Hanvet Kanamycin 10%	98,53 \pm 0,05 mg/mL	100 mg/mL	-1,50
2	Vemedim Kanamycin 20%	203,26 \pm 0,10 mg/mL	200 mg/mL	1,60
3	Navetco Kanamycin 10%	97,44 \pm 0,12 mg/mL	100 mg/mL	-2.60
4	Kanamycin sulfate	484,27 \pm 0,07 mg	500 mg	-3,16

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, vật liệu g-C₃N₄/AuNPs đã được thử nghiệm thành công về khả năng ứng dụng trong phương pháp huỳnh quang để định lượng Kanamycin thuộc nhóm aminoglycoside hay được sử dụng trong việc điều trị ở người hay động vật. Một ưu điểm nổi bật là phương pháp này cho phép phát hiện kanamycin - một phân tử không có đặc tính phát huỳnh quang và khả năng hấp thụ ánh sáng yếu mà không cần phải dẫn xuất hóa như các phương pháp truyền thống là HPLC, UV- Vis... Dựa trên hiệu ứng tắt bật huỳnh quang của tổ hợp, có thể xác định kanamycin trong khoảng nồng độ từ 10 nM đến 500 nM, giới hạn phát hiện thấp 3,0 nM. Đây là lần đầu tiên hệ vật liệu g-C₃N₄/AuNPs được ứng dụng thành công trong việc phát hiện kanamycin trong mẫu dược phẩm, mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi trong việc kiểm soát dư lượng kháng sinh cũng như phát hiện nhiều chất phân tích khác trong môi trường, thực phẩm và y sinh nhằm bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.23.75 của Đại học quốc gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anbiaee G., Feizpour R., Khoshbin Z., et al. (2023). A simple tag-free fluorometric aptasensing assay for sensitive detection of kanamycin. *Anal Biochem*, **672**, 115183.
2. Cui W., Liu J., Zhao W., et al. (2023). An enzyme-free and label-free fluorescent aptasensor for sensitive detection of kanamycin in milk samples based on hybridization chain reaction. *J Food Compos Anal*, **120**, 105300.
3. Liu Y., Guan B., Xu Z., et al. (2023). A fluorescent assay for sensitive detection of kanamycin by split aptamers and DNA-based copper/silver nanoclusters. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, **286**, 121953.
4. Li G., Pang W., Bian Y., et al. (2024). A surface-enhanced Raman scattering and colorimetric dual-mode aptasensor for ultrasensitive detection of kanamycin based on DNA hydrogel network fishing the MIL-101@AuNP nanohybrids. *Sens Actuators B Chem*, **414**, 135937.
5. Yu C.-Z., He Y.-Z., Fu G.-N., et al. (2009). Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B*, **877**(3), 333–338.
6. Wang X., Yang S., Li Y., et al. (2018). Optimization and application of parallel

- solid-phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 11 aminoglycoside residues in honey and royal jelly. *J Chromatogr A*, **1542**, 28–36.
7. Chen S.-H., Liang Y.-C., and Chou Y.-W. (2006). Analysis of kanamycin A in human plasma and in oral dosage form by derivatization with 1-naphthyl isothiocyanate and high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, **29(5)**, 607–612.
 8. Chen S.-H., Liang Y.-C., and Chou Y.-W. (2006). Analysis of kanamycin A in human plasma and in oral dosage form by derivatization with 1-naphthyl isothiocyanate and high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, **29(5)**, 607–612.
 9. Yuan Y., Yan J., Liu J., et al. (2023). Ex_g-C₃N₄ as a novel fluorescent probe for sensitive detecting ClO⁻ in water samples with portable test strip. *Anal Chim Acta*, **1239**, 340715.
 10. Cárdenas A., Vázquez A., Obregón S., et al. (2021). New insights into the fluorescent sensing of Fe³⁺ ions by g-C₃N₄ prepared from different precursors. *Mater Res Bull*, **142**, 111385.
 11. Jigyasa, Singh H., and Rajput J.K. (2021). Graphitic carbon nitride nanosheets (g-C₃N₄ NS) as dual responsive template for fluorescent sensing as well as degradation of food colorants. *Food Chem*, **343**, 128451.
 12. Xie H., Bei F., Hou J., et al. (2018). A highly sensitive dual-signaling assay via inner filter effect between g-C₃N₄ and gold nanoparticles for organophosphorus pesticides. *Sens Actuators B Chem*, **255**, 2232–2239.
 13. Pham H.N., Luong M.H., Nguyen D.T., et al. (2024). Development of fluorescence nanosensor based on “off-on” effect of graphitic carbon nitride - gold nanoparticles system for amikacin quantification. *Mater Chem Phys*, **311**, 128562.
 14. UV-visible spectroscopic detection of kanamycin based on target-induced growth of gold nanoparticles - Analytical Methods (RSC Publishing).
 15. Sánchez-Martínez M.L., Aguilar-Caballos M.P., and Gómez-Hens A. (2004). Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. *J Pharm Biomed Anal*, **34(5)**, 1021–1027.