

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO DUNG DỊCH KEO TRÊN NỀN HẠT NANO BẠC CHẤT LƯỢNG CAO VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA CHÚNG

Đến tòa soạn 20-02-2021

Nguyễn Thị Ngọc Linh, Nguyễn Đình Vinh, Bùi Minh Quý, Nguyễn Thị Hồng Hoa

Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên

Lê Thế Tâm, Nguyễn Hoa Du

Trường đại học Vinh

Ngô Thanh Dung, Lê Trọng Lư

Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Lê Trọng Lư

Học Viện Khoa học và Công nghệ

SUMMARY

STUDY ON FABRICATION OF THE COLLOIDAL SOLUTION BASED ON HIGH QUALITY SILVER NANOPARTICLES TO ANTIFUNGAL ACTIVITY APPLICATION

In this paper, Ag nanoparticles (Ag NPs) were successfully fabricated by the chemical reduction method using tert-butylamine borane complex in the organic solvent at room temperature in which poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO) was used as the phase transfer ligand. TEM images show that Ag NPs with the average size below 10 nm were formed. The morphology, size and properties of Ag NPs were controlled by varying reaction time. Result shows that the after encapsulated by poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO), the surface of Ag NPs becomes hydrophilic and well-dispersed in water for at least 12 months. The colloidal silver solution presented considerable antifungal activity performance against Aspergillus glaucus. These findings suggest that the silver solution has potential for clinical applications.

Keywords: Ag NPs, the chemical reduction method, poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO), antifungal activity, Aspergillus glaucus.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, tình trạng nhiễm nấm nghiêm trọng đã góp phần đáng kể vào việc gia tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong ở những bệnh nhân bị suy giảm hệ miễn dịch do hóa trị liệu ung thư hoặc nhiễm HIV. Hầu hết các chất chống nấm hiệu quả hiện nay dựa trên polyen, triazol hoặc echinocandin. Tuy nhiên, việc sử dụng các thuốc chống nấm này thường đi kèm với các biến chứng khác nhau như độc tính của amphotericin B và tác dụng phụ của

một số azol [1–3]. Do đó, việc chế tạo các thuốc kháng nấm mới để tránh những tác dụng phụ của những thuốc hiện có đang trở nên cấp thiết.

Các hạt nano Ag với phổ kháng khuẩn rộng, chống lại cả chủng vi khuẩn gram dương và gram âm (bao gồm các chủng đa kháng) [4–6] và do đó chúng có thể là một tác nhân kháng nấm tiềm năng [7]. Lợi dụng sự nhạy cảm của vi khuẩn với các ion bạc [8], hệ nano keo bạc đã được nghiên cứu như một chất kháng khuẩn

tiềm năng để tiêu diệt các chủng vi khuẩn kháng thuốc và điều trị các bệnh truyền nhiễm khác. Ngoài ra, nano bạc cũng có thể được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm nấm cho hiệu quả cao và an toàn hơn so với thuốc diệt nấm tổng hợp [9]. Tuy nhiên, tác dụng chống nấm của Ag NPs còn ít được quan tâm, hiện nay mới chỉ có một số ít nghiên cứu về chủ đề này [10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp khử hóa học trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ phòng để chế tạo Ag NPs. Sự ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình hình thành nano Ag cũng được nghiên cứu để tìm ra điều kiện tối ưu. Ag NPs sau khi tổng hợp được chuyển pha bằng PMAO và khảo sát khả năng kháng nấm *Aspergillus glaucus*.

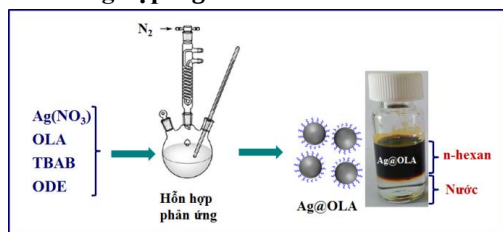
2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều là hóa chất tinh khiết của hãng Sigma-Aldrich, với độ sạch $\geq 99,9\%$ gồm: bạc nitrat (AgNO_3), oleylamin (OLA), *tert*-butylamin boran (TBAB), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), n-hexan (C_6H_{14}), cloroform (CHCl_3), 1-octadecen (ODE), natri hidroxit (NaOH) và poly(maleic anhydrit-alt-1-octadecen) (PMAO).

Nấm *Aspergillus glaucus* (*A. glaucus*) do khoa Vi sinh – Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp được sử dụng để thử hoạt tính kháng nấm, môi trường MH (Mueller Hinton) được sử dụng để nuôi cấy nấm.

2.2. Tổng hợp Ag NPs



Hình 1. Minh họa quy trình chế tạo Ag NPs

Các hạt nano Ag được tổng hợp bằng phương pháp khử hóa học sử dụng TBAB với sự có mặt của OLA trong dung môi ODE ở nhiệt độ phòng như thể hiện trong sơ đồ hình 1. Dung dịch A gồm 1,5 mmol AgNO_3 , 10 mmol OLA và 10 mL ODE được khuấy từ dưới dòng khí N_2 ở nhiệt độ phòng đến khi tan hoàn toàn. Dung dịch B gồm 0,3 mmol TBAB; 1,5 mmol OLA

và 0,5 mL ODE được rung siêu âm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ phòng. Nhỏ từ từ dung dịch B vào dung dịch A và duy trì trong thời gian 60 phút. Sản phẩm được rửa bằng dung môi n-hexan và etanol từ 3 ÷ 5 lần để thu các hạt nano Ag.

2.3. Chuyển pha Ag NPs

Ag NPs được tổng hợp trong dung môi hữu cơ bị bao phủ một lớp chất hoạt động bề mặt OLA do đó chúng phân tán trong dung môi không phân cực. Để ứng dụng trong y - sinh thì chúng phải phân tán trong nước. Do đó Ag NPs sau khi tổng hợp được chuyển pha. Quy trình chuyển pha Ag NPs được thực hiện như nghiên cứu trước của chúng tôi [11]. Cụ thể, 25 mg Ag NPs được phân tán trong 0,5 mL cloroform, rung siêu âm từ 3 ÷ 5 phút để đảm bảo các hạt phân tán đều. Tiếp theo, cho 0,5 gam poly(maleic anhydrit-alt-1-octadecen) (PMAO) vào 5 mL cloroform, rung siêu âm từ 3 ÷ 5 phút cho tan hoàn toàn. Trộn hai dung dịch này với nhau và rung siêu âm trong 10 phút để chúng phân tán đều. Khấy sản phẩm ở nhiệt độ phòng đến khi cloroform bay hết, thêm 6 mL dung dịch NaOH 1M rồi tiếp tục khuấy từ cho đến khi phân tán đều. Sản phẩm sau khi chuyển pha được rửa sạch bằng nước cất nhằm loại bỏ PMAO còn dư (quá trình này lặp lại nhiều lần) ta thu được các hạt nano Ag bọc PMAO có khả năng phân tán trong nước.

2.4. Kỹ thuật xác định các đặc trưng của Ag NPs

Hình thái và kích thước hạt nano Ag được xác định bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) trên thiết bị JEM 1010 (Nhật Bản). Phổ UV-Vis của các mẫu được ghi trên máy quang phổ Jasco V-670 (Nhật Bản).

2.5. Xác định hoạt tính kháng nấm của Ag NPs

Thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng nấm của vật liệu bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch [12]. 100 μL chủng nấm *A. glaucus* với mật độ 10^6 CFU/mL được cấy trên bề mặt môi trường MH agar. 100 μL dung dịch nano Ag với các nồng độ 0,3; 0,5 và 1,0 mg/mL được nhỏ vào các giếng thạch có đường kính 1 cm trên đĩa thử hoạt tính. Các đĩa thử hoạt tính được đặt vào tủ lạnh 4 ÷ 8 $^{\circ}\text{C}$ trong 8 giờ để dung dịch nano

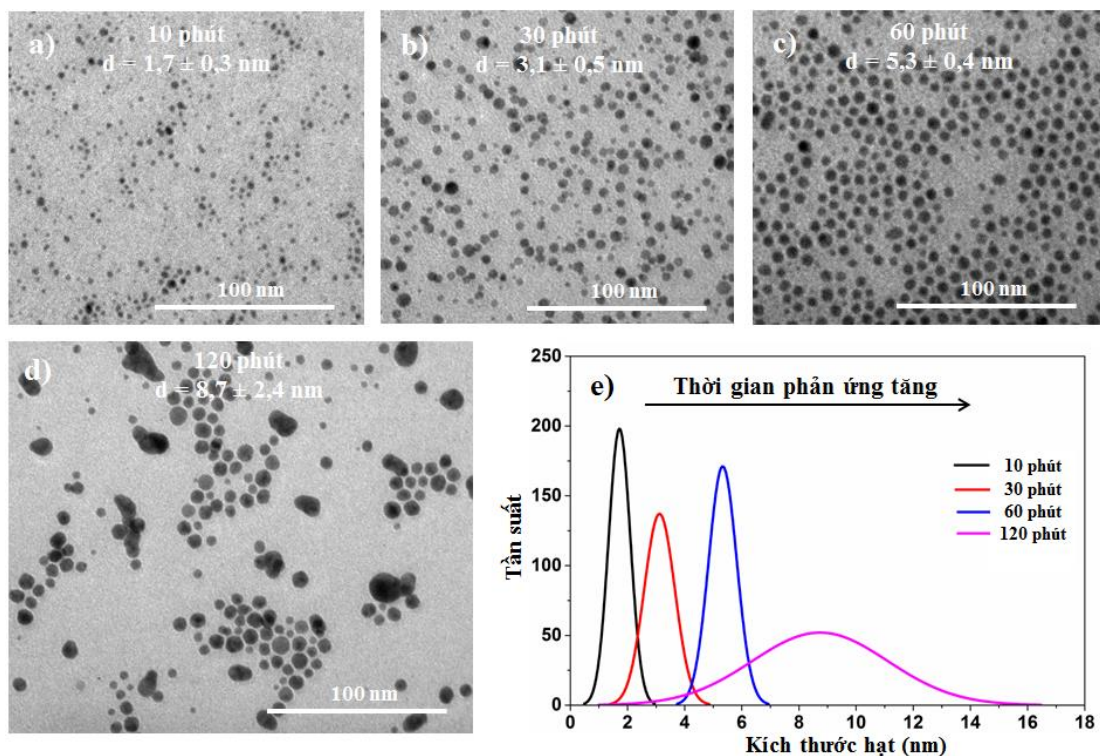
Ag khuếch tán vào thạch sau đó đặt vào tủ ẩm nuôi ở 37 °C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng nấm của vật liệu được đánh giá bằng kích thước vùng vô khuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

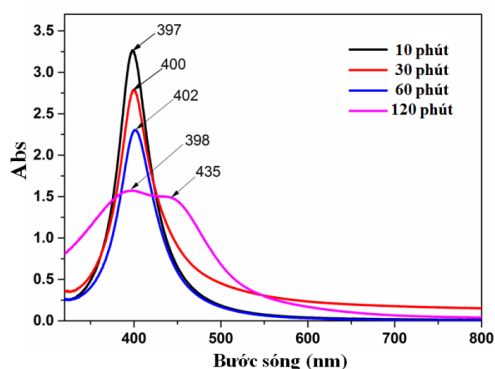
3.1. Đặc trưng tính chất Ag NPs

Hình 2 trình bày ảnh TEM và giản đồ phân bố kích thước hạt nano Ag dưới ảnh hưởng của thời gian phản ứng. Nhận thấy, mẫu chế tạo trong khoảng thời gian từ 10 ÷ 60 phút, các hạt thu được đều ở dạng hình cầu, biên hạt rõ ràng với kích thước tương đối đồng đều, sự phân bố kích thước hạt của các mẫu tương đối hẹp, đến 120 phút thì các hạt không đồng đều về hình dạng, sự phân bố kích thước hạt lớn. Cụ thể, mẫu chế tạo trong thời gian 10 phút thu được các hạt nano Ag có dạng hình cầu, hình dạng hạt chưa hoàn thiện với kích thước hạt trung bình đạt $1,7 \pm 0,3$ nm (hình 2a), sai số kích thước là 17,6 %. Khi tăng thời gian phản ứng lên 30 phút, hình dạng hạt không thay đổi

nhưng kích thước hạt trung bình tăng và đạt $3,1 \pm 0,5$ nm (hình 2b), với sai số kích thước là 16,1%. Tăng thời gian phản ứng lên 60 phút, các hạt nano có độ hoàn thiện cao về mặt hình thái, rất đồng đều, kích thước hạt trung bình tăng và đạt $5,3 \pm 0,4$ nm (hình 2c), với sai số kích thước giảm 7,5%. Mẫu chế tạo ở 120 phút, thu được các hạt nano có hình dạng kém đồng đều, xuất hiện sự trùng chập của nhiều hạt gây hiện tượng kết đám, trong trường hợp này kích thước hạt đạt $8,7 \pm 2,4$ nm, sai số kích thước hạt lớn 27,6%. Kết quả này cho thấy, xu hướng tăng kích thước hạt nano khi thời gian phản ứng tăng. Điều này có thể giải thích như sau: Khi thời gian phản ứng tăng, đã làm tăng thời gian chuyển động của các tiểu phân Ag, dẫn đến năng lượng bề mặt của các tiểu phân tăng, do đó chúng sẽ kết hợp với nhau để giảm tổng năng lượng bề mặt của các hạt trong hệ phản ứng, kết quả thu được các hạt có kích thước lớn hơn (hiệu ứng Ostwald) [13].



Hình 2. Ảnh TEM của Ag NPs được chuẩn bị tại thời gian phản ứng từ 10 ÷ 120 phút (a-d) và biểu đồ phân bố kích thước hạt (e)

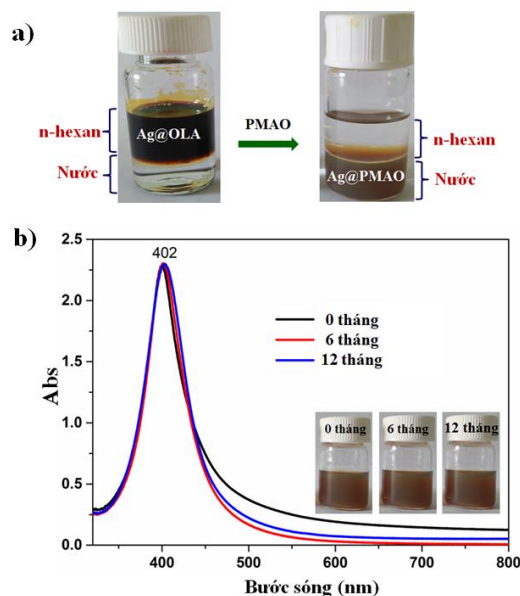


Hình 3. Phổ UV-Vis của Ag NPs được chuẩn bị tại thời gian phản ứng từ 10 ÷ 120 phút

Hình 3 trình bày phổ hấp thụ UV-Vis của Ag NPs được chuẩn bị tại thời gian phản ứng từ 10 ÷ 120 phút. Kết quả cho thấy, các mẫu chế tạo ở thời gian từ 10 đến 60 phút chỉ xuất hiện một đỉnh cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong phạm vi từ 397 ÷ 402 nm, đỉnh này đặc trưng cho nguyên tố Ag. Mẫu chế tạo tại thời gian phản ứng 120 phút xuất hiện hai đỉnh SPR tại 398 nm và 435 nm. Các nghiên cứu trước cho thấy, vị trí và hình dạng của sự hấp thụ plasmon bề mặt của Ag NPs phụ thuộc rất nhiều vào kích thước và hình dạng hạt. Theo lý thuyết Mie [14], chỉ có một vị trí SPR duy nhất trong quang phổ hấp thụ của các hạt nano kim loại hình cầu, trong khi các hạt dị hướng có thể tạo ra hai hoặc nhiều đỉnh SPR phụ thuộc vào hình dạng của các hạt. Như vậy, với các mẫu chế tạo tại thời gian phản ứng từ 10 đến 60 phút, chỉ quan sát thấy một vị trí SPR duy nhất, chứng tỏ các hạt nano Ag thu được có dạng hình cầu. Trong khi mẫu chế tạo ở 120 phút xuất hiện hai đỉnh SPR, điều này chứng tỏ Ag NPs thu được còn có dạng không phải hình cầu. Kết quả này đã được minh chứng bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua TEM như thể hiện trên hình 2. Trong bộ mẫu chế tạo được, mẫu có thời gian phản ứng 60 phút thu được các hạt dạng hình cầu, đồng đều, kích thước hạt $5,3 \pm 0,4$ nm, biên hạt rõ ràng, không có sự kết đám và cực đại hấp thụ SPR là 402 nm nên chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Chuyển pha các hạt nano Ag bằng PMAO
Như chúng ta đã biết, PMAO là một polyme

gồm có hai phần, phần kỵ nước là chuỗi hydrocarbon có chức năng giúp các phân tử PMAO bám vào hạt thông qua liên kết kỵ nước – kỵ nước với các phân tử OLA trên bề mặt hạt nano Ag, phần ưa nước chứa gốc anhydrit có vai trò giúp các hạt phân tán trong môi trường nước [11]. Hình 4a cho thấy Ag NPs trước khi bọc PMAO phân tán rất tốt trong n-hexan và hoàn toàn không phân tán trong nước. Sau khi bọc PMAO bề mặt của Ag NPs trở nên ưa nước và chúng phân tán tốt trong nước, các hạt lúc này hoàn toàn không phân tán trong n-hexan. Như vậy, có thể nhận định rằng lớp polyme đã bao phủ lên bề mặt các hạt, giúp chúng ổn định và phân tán tốt trong nước.



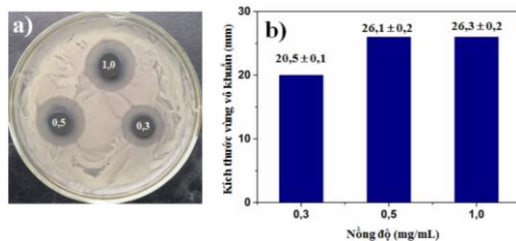
Hình 4. a) Hình ảnh Ag NPs (mẫu 60 phút) phân tán trong dung môi n-hexan và nước trước và sau khi bọc PMAO, b) Phổ UV-Vis và ảnh dung dịch của Ag NPs sau khi bọc PMAO phân tán trong nước được lưu trữ ở các thời gian khác nhau

Ngoài ra, phương pháp UV-Vis cũng được sử dụng để theo dõi những thay đổi quan sát được trong dung dịch Ag NPs. Phổ UV-Vis của dung dịch hạt nano Ag sau khi bọc PMAO được ghi lại trong khoảng thời gian từ 0 ÷ 12 tháng được thể hiện trong hình 4b. Theo Yadong Yin và cộng sự [15], khi mức độ oxy

hóa của các hạt nano tăng lên, đỉnh SPR giảm cường độ và quan sát thấy sự chuyển dịch của đỉnh SPR sang vùng bước sóng dài. Phổ UV-Vis chỉ ra trong hình 4b không thấy bất kỳ sự thay đổi nào ngay cả sau 12 tháng chế tạo. Như vậy, các hạt nano Ag sau khi bọc PMAO có độ bền và ổn định cao, phù hợp cho các mục đích y sinh.

3.3. Hoạt tính kháng nấm của dung dịch hạt nano Ag

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dung dịch hạt nano Ag@PMAO có khả năng kháng nấm được thể hiện ở các vòng tròn vô khuẩn thu được khá rõ nét (hình 5a). Cơ chế hoạt động của hạt nano Ag chống lại sự phát triển của vi sinh vật có thể được mô tả như sau: các hạt nano Ag có thể giải phóng ion Ag^+ ở trong và ngoài tế bào. Ion Ag^+ (mang điện tích dương) tương tác với thành tế bào (mang điện tích âm) làm biến đổi hình thái tế bào và tăng tính thấm màng hoặc rò rỉ tế bào gây chết tế bào. Ion Ag^+ có ái lực lớn với photpho và các phân tử sinh học có chứa lưu huỳnh có trong ngoại bào và các thành phần nội bào (DNA, protein), những phân tử sinh học này ảnh hưởng đến sự phân chia, sự hô hấp và sự sống của tế bào [16,17]. Ngoài ra, sự tương tác của ion Ag^+ với nhóm thiol có thể là nguyên nhân gây ra các dạng gốc oxy hóa tự do (ROS), dẫn đến ức chế enzym hô hấp và gây chết tế bào [18].



Hình 5. Hoạt tính ức chế nấm *A. glaucus* của dung dịch hạt nano Ag

Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng nấm của dung dịch nano Ag thể hiện khác nhau ở các nồng độ Ag sử dụng (hình 5b). Khi nồng độ hạt Ag tăng từ 0,3 ÷ 0,5 mg/mL, kích thước vòng vô khuẩn tăng từ 20,5 ÷ 26,1 mm điều

này có thể được giải thích bằng sự tăng số lượng ion Ag^+ giải phóng ra ngoài môi trường. Nếu tiếp tục tăng nồng độ hạt Ag đến 1,0 mg/mL thì kích thước vòng vô khuẩn thu được hầu như không tăng đạt 26,3 mm kết quả này có thể là do ảnh hưởng của lớp vỏ bọc PMAO nên khả năng khuếch tán ion Ag^+ ra ngoài môi trường bị cản trở.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp khử hóa học, các hạt nano Ag với kích thước nhỏ dưới 10 nm đã được chế tạo thành công trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ phòng. Hình thái, kích thước và tính chất của hạt nano Ag được điều khiển bằng cách thay đổi thời gian phản ứng. Hạt nano Ag chế tạo được thể hiện khả năng kháng nấm *A. glaucus* mạnh thông qua việc phá hủy tính toàn vẹn của màng, do đó chúng có nhiều tiềm năng cho các ứng dụng lâm sàng.

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo mã số B2020-TDV-04 (N.H.D)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pfaller, M. A. *et al.* (2014), Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 133–163.
2. Gorski, E. *et al.* (2011), Evaluation of hepatotoxicity with off-label oral-treatment doses of voriconazole for invasive fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 1, pp. 184–189.
3. Worth, L. J. *et al.* (2008), Optimizing antifungal drug dosing and monitoring to avoid toxicity and improve outcomes in patients with haematological disorders. *Intern. Med. J.*, 38, 521–537.
4. Saeb, A. T. M. *et al.* (2014), Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci. World J.*, 2014, 704–708.
5. Salvioni, L. *et al.* (2017), Negatively

charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations, *Int. J. Nanomedicine*, 12, 2517–2530.

6. Kedziora, A. *et al.* (2018), Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 444–460.

7. Huang, W. *et al.* (2020), Synergistic antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles and epoxiconazole against *setosphaeria turcica*. *J. Nanomater.*, 2020, 1–7.

8. Rai, M. *et al.* (2009), Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*, 27, 76–83.

9. Park, H. J. *et al.* (2006), A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathology Journal*, 22, 295–302.

10. Bocate, K. P. *et al.* (2019), Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 291, 79–86.

11. Nguyễn Thị Ngọc Linh, Trịnh Đình Khá, Lê Thị Thanh Tâm, Lê Trọng Lư, Lê Thế Tâm, Ngô Thanh Dung (2019), Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano Ag được tổng hợp trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ thấp. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 24, 106–111.

12. Holder, I. A. and Boyce, S. T. (1994), Agar well diffusion assay testing of bacterial

susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture, *Burns*, 20, 426–429.

13. Yamashita, Y. *et al.* (2017), Emulsion and emulsification technology. *Elsevier Inc.*

14. Novak, J. P. and Feldheim, D. L. (2000), Assembly of phenylacetylene-bridged silver and gold nanoparticle arrays. *JACS*, 122, 3979–3980.

15. Yin, Y. *et al.* (2002), Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *J. Mater. Chem.*, 12, 522–527.

16. Chandrasekaran, R. *et al.* (2016), Formulation of carica papaya latex-functionalized silver nanoparticles for its improved antibacterial and anticancer applications. *J. Mol. Liq.*, 219, 231–238.

17. Slavin, Y. N. *et al.* (2017), Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnology*, 15, 65–84.

18. Siritongsuk, P. *et al.* (2016), Two-phase bactericidal mechanism of silver nanoparticles against *burkholderia pseudomallei*. *PLoS One*, 11, 0168098–0168119.