

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DUNG DỊCH NANO BẠC SỬ DỤNG CHITOSAN LÀM CHẤT KHỬ/CHẤT ỔN ĐỊNH

Trần Vĩnh Hoàng¹, Nguyễn Xuân Mạnh¹, Vương Thị Kim Oanh²,
Lê Thị Mai Hoa³, Trần Đại Lâm^{2,*}

¹*Viện Kỹ thuật Hoá học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*

²*Viện Khoa học Vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

³*Vụ Giáo dục và Đào tạo, dạy nghề, Ban Tuyên giáo Trung ương*

*Liên hệ với tác giả: tddam@vast.ac.vn

Đến Toà soạn ngày: 9/8/2011; Nhận đăng ngày: 15/3/2012

1. MỞ ĐẦU

Bạc là một chất kháng khuẩn tự nhiên và không độc hại, kết hợp với sự phát triển của công nghệ đã phát hiện ra khả năng kháng khuẩn rất mạnh của bạc ở kích thước nano, với phổ diệt khuẩn rộng nên ngày nay nano bạc đã được nghiên cứu và ứng dụng ngày càng rộng rãi, tuy nhiên hạn chế là dung dịch nano bạc kém ổn định và dễ bị kết tụ [1 - 5]. Việc sử dụng các polyme với vai trò làm chất ổn định dung dịch các hạt nano kim loại đã được công bố, đáng chú ý là sử dụng các polyme tự nhiên như chitosan, alginate, CMC... tiện cho liên kết với các chất khác [4 - 10].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chitosan (CS) làm chất ổn định đồng thời vừa làm tác nhân khử. Các điểm mới trong bài báo này so với các công bố trước đây [2 - 10] bao gồm: i) phương pháp/điều kiện tổng hợp tương đối đơn giản; ii) không sử dụng chất khử (NaBH₄, glucose, arcobic acid...) và dung môi hữu cơ; iii) sản phẩm Ag/CS tạo ra ở dạng hạt (beads) nên khá thuận lợi trong bảo quản và sử dụng. So với công bố trước đây của nhóm nghiên cứu chúng tôi [1] thì môi trường phản ứng có sự thay đổi từ môi trường axit (tài liệu [1]) sang môi trường kiềm (bài báo này).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Chế tạo dung dịch nano Ag

Chuẩn bị dung dịch chitosan trong axit axetic, sau đó cho từ từ dung dịch AgNO₃ vào dung dịch chitosan và khuấy liên tục. Dung dịch này được cho phản ứng thủy nhiệt với nhiệt độ khảo sát từ 55 – 95 °C, nhiệt độ phản ứng được điều chỉnh bằng bình ổn nhiệt Memmert. Các mẫu phản ứng được lấy ra khỏi bình ổn nhiệt sau các khoảng thời gian là 2 – 24 giờ, để nguội và tiến hành xác định độ hấp thụ quang bằng máy đo UV- Vis. Sau khi xác định độ hấp thụ quang, hỗn hợp được bảo quản và theo dõi khả năng bảo vệ hệ keo của chitosan.

2.2. Thử hoạt tính kháng khuẩn, nấm của nano bạc

Khả năng kháng khuẩn, nấm của sản phẩm được kiểm tra thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là IC_{50} , MIC và MBC trên các chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica*; *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Lactobacillus fermentum*; và nấm *Candida albicans* (ATCC 10231). Các mẫu được thử hoạt tính bằng cách lấy 10 μ l dung dịch ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 200 μ l dung dịch vi khuẩn và nấm có nồng độ ở 5×10^5 CFU/ml, ủ ở 37 °C trong 24 giờ.

2.3. Các phương pháp nghiên cứu

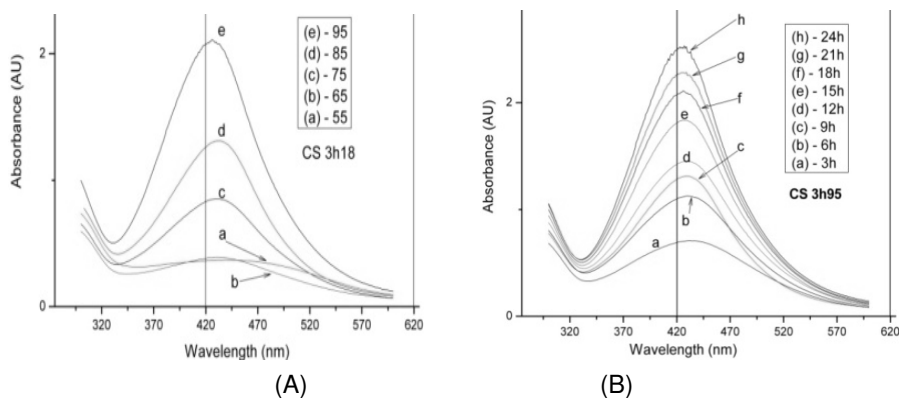
Phổ IR được đo trên máy Nicolet 6700 của hãng Thermo. Các ảnh TEM được chụp trên máy JEM 1010. Phổ XRD được phân tích trên máy D8-Advanced – Bruker. Phổ UV–Vis được tiến hành đo bằng máy đo Agilent– 8453. Các phép thử được tiến hành tại phòng thử hoạt tính sinh học thuộc Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các đặc trưng của dung dịch nano bạc

3.1.1. Đặc trưng bằng phổ UV–Vis

Phổ UV–VIS của sản phẩm do cùng một loại chitosan trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau trong cùng một thời gian cho thấy ở nhiệt độ thấp, phản ứng diễn ra chậm, hầu như không quan sát được pic đặc trưng (hình 1A, đường a, b), ngược lại tại vùng nhiệt độ cao các pic xuất hiện rõ ràng (hình 1A, đường c, d, e). Các kết quả đo cho thấy có xuất hiện các pic hấp thụ ở các bước sóng $425 \div 430$ nm, kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về phổ cộng hưởng plasmon bề mặt của nano bạc [1 - 10].



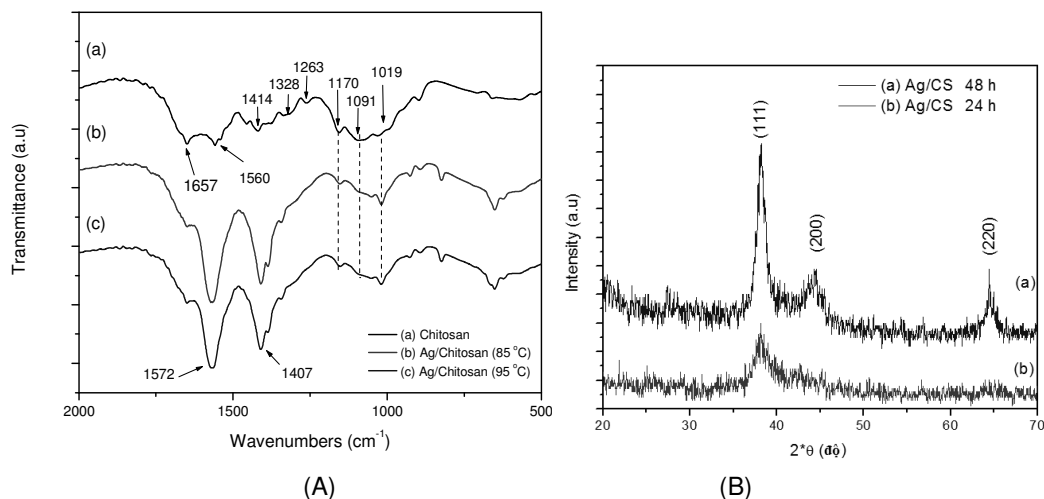
Hình 1. Phổ UV–Vis của dung dịch nano Ag: (A) tại các nhiệt độ khác nhau (phản ứng trong 18 h) và (B) tại các thời gian phản ứng khác nhau ở 95 °C

Theo các công bố này thì nano bạc được tạo thành do sự khử ion Ag^+ trong dung dịch bởi nhóm $-CHO$ do phản ứng mở vòng của chitosan, trong khi đó nhóm amin ($-NH_2$) đóng vai trò tạo phức với ion Ag^+ làm chúng dễ bị khử hơn so với Ag^+ tự do sau khi tạo ra nano bạc, nhóm amin đóng vai trò tạo liên kết với các ion Ag^+ còn dư ở trên bề mặt của nano bạc tạo làm cho các hạt nano bạc không kết tụ với nhau, do đó chitosan đóng vai trò làm chất ổn định, chúng tôi nhận

thấy, dung dịch nano Ag khử và ổn định bằng chitosan trong 48 giờ có thể bảo quản trong vòng 4 tháng mà chưa thấy sự kết tụ nào xuất hiện.

3.1.2. Phân tích phổ hồng ngoại (FT-IR)

Phổ IR của chitosan có chứa nano Ag tổng hợp ở 85 °C; 95 °C và của chitosan ban đầu được thể hiện ở hình 2A. Theo các tài liệu [5, 10], đối với phổ IR của chitosan, các pic dao động của liên kết của O-H của nhóm CH₂-OH là 1409 cm⁻¹, của C=O ở nhóm amit I là 1091 và 1031 cm⁻¹, dao động của liên kết N-H trong nhóm NH₂ 1638 cm⁻¹ và liên kết C-N của nhóm amin có dao động đặc trưng tại số sóng 1324 cm⁻¹, các dao động tại các số sóng 1155, 1067, 1030 và 894 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C-O-C. Phổ IR của mẫu chitosan chứa nano Ag có sự giảm cường độ của các pic tại các số sóng từ 1019 đến 1170 cm⁻¹, đây là các dao động ứng với liên kết C-O-C, điều này chứng tỏ cấu trúc của chitosan thay đổi. Ngoài ra, có sự thay đổi về cường độ của pic tại số sóng 1657 cm⁻¹, ứng với dao động của liên kết N-H, có thể do các hạt nano Ag tạo liên kết với phức với nhóm -NH₂ nên giao động yếu đi [5], đi kèm với sự giảm cường độ của pic tại số sóng 1657 cm⁻¹ là sự tăng cường độ của pic tại số sóng 1572 cm⁻¹ lên rất mạnh là do quá trình khử hình R'-CHO (do quá trình mở vòng của chitosan) thành nhóm R'COOH.



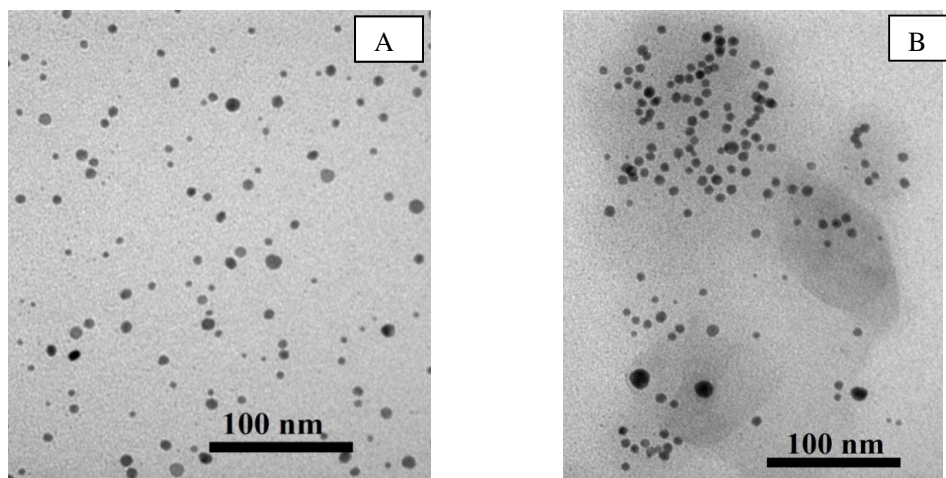
Hình 2. (A) Phổ IR của chitosan ban đầu (a) và sau phản ứng ở các nhiệt độ 85°C (b) và 95°C (c) trong 24 giờ và (B) phổ nhiễu xạ tia X (XRD) của nano bạc tổng hợp ở 95°C với các thời gian phản ứng khác nhau

3.1.3. Phổ nhiễu xạ tia X (XRD)

Qua phổ XRD (hình 2B) cho phép khẳng định sự có mặt của bạc đơn pha trong sản phẩm, tồn tại ở dạng thù hình lập phương với các pic nhiễu xạ của bạc bao gồm (111), (200), (220) tại các góc nhiễu xạ tương ứng là 39,2; 44,5 và 65° được thể hiện rõ nét trên phổ của mẫu có thời gian phản ứng 48 h, với mẫu phản ứng 24 h thì pic nhiễu xạ (111) thể hiện rõ nét, còn các pic sau thì hầu như không quan sát được, điều này chứng tỏ cấu trúc của nano bạc chưa hoàn thiện khi phản ứng trong 24 giờ và do đó thời gian phản ứng 48 giờ là thích hợp nhất. Độ bán mở vạch của pic nhiễu xạ (111) khá lớn, chứng kích thước hạt nhỏ. Tính toán kích thước hạt trung bình thông qua công thức Debye-Scherrer: $d = K\lambda / FWHM \cdot \cos\theta$ với d là đường kính trung bình của hạt (nm); $k = 0,89$; λ – là bước sóng của bức xạ tia X(nm); FWHM– là độ rộng bán mở vạch

(rad); θ – là góc nhiễu xạ (độ) thì với mẫu 24 giờ và 48 giờ kích thước hạt tính được lần lượt là $d_{24} = 7,7 \text{ nm}$ và $d_{48} = 8,3 \text{ nm}$.

3.1.4. Phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (TEM)



Hình 3. Ảnh TEM mẫu nano bạc phản ứng ở 95 °C với các thời gian phản ứng khác nhau: (A) 24 giờ và (B) là 48 giờ

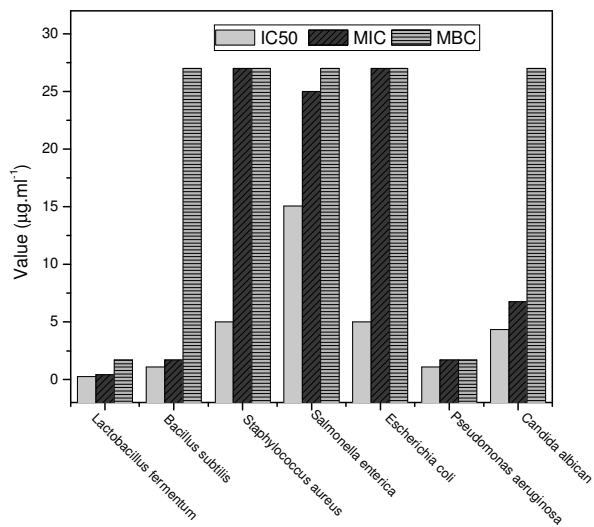
Ảnh TEM của mẫu phản ứng ở 95 °C trong các thời gian khác nhau (hình 3), khẳng định bạc thu được có kích thước nano, các hạt nano bạc có kích thước từ 5 - 12 nm, hình dạng hạt gần như là hình cầu, quan sát cho thấy kích thước hạt phân bố khá đều đặn, các hạt tồn tại độc lập, mức độ kết tụ thấp. Điều này chứng tỏ chitosan đã góp phần quan trọng trong việc ngăn chặn kết tụ, giúp hạt ổn định. Qua ảnh TEM chúng ta cũng thấy sau 48 h các hạt nano Ag có kích thước đồng đều hơn so với mẫu 24 giờ, còn nhìn chung, chênh lệch kích thước hạt không quá nhiều khi thời gian phản ứng tăng lên; Có thể chitosan đã góp phần ngăn cản sự lớn lên của các hạt nano bạc. Ngoài ra, từ ảnh TEM của một hạt nano bạc được phóng đại lên, chúng ta quan sát được cấu trúc lõi, vỏ của các hạt nano bạc. Như đã chứng minh trong công bố trước đây của chúng tôi [1], bao bọc xung quanh các hạt nano bạc là màng mỏng chitosan, lớp màng này có độ dày khoảng 2nm có vai trò quan trọng trong việc ổn định dung dịch keo bạc.

3.2. Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn, nấm của dung dịch nano Ag

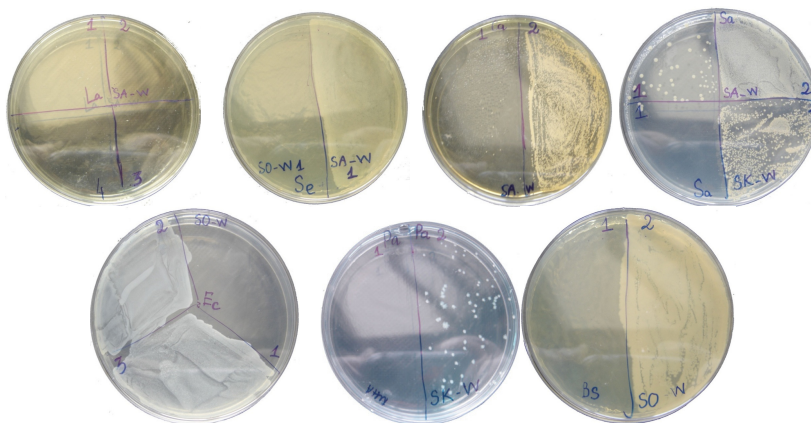
Các kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn được tóm tắt trên hình 4, kết quả chi tiết được cho ví dụ trong hình 5. Trên các đĩa petri (hình 5), ô số 1 là các ô có nồng độ chất kháng khuẩn là $C_0 = 27 \mu\text{g/ml}$. Các ô số 2 có nồng độ chất kháng khuẩn là $C' = C_0/4$. Các ô số 3 có nồng độ chất kháng khuẩn là $C'' = C_0'/4$. Một cách tổng quát ô số n có nồng độ chất kháng khuẩn là $C^{(n)} = C_0/4^n$. Nồng độ MBC được xác định tại ngăn không còn sự phát triển của vi khuẩn.

Kết quả thu được cho thấy sản phẩm có tính kháng khuẩn khá tốt đối với cả vi khuẩn gram âm và vi khuẩn gram dương. So sánh với 1 số chất kháng sinh ta thấy khả năng kháng khuẩn của nano bạc tốt hơn *Penicillin-Streptomycin* đáng kể cho chủng *Pseudomonas aeruginosa* (IC_{50} của nano Ag là 1,087 so với 4,5 $\mu\text{g/ml}$ của *Penicillin-Streptomycin*). So sánh tác dụng của nano bạc với *Ampicillin* cho chủng *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis* ta thấy hoạt lực là ngang bằng (IC_{50} cùng trong khoảng 0,05 ÷ 2 $\mu\text{g/ml}$); với chủng *Staphylococcus aureus* và

Escherichia coli tác dụng của nano bạc kém hơn khoảng 2 - 10 lần (IC_{50} của nano Ag khoảng 5 $\mu\text{g/l}$ so với 0,05 ÷ 2 $\mu\text{g/ml}$ của Ampicillin); với *Candida albican*, tác dụng của nano bạc kém hơn Amphotericin B khoảng 4 ÷ 9 lần.



Hình 4. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano Ag trên một số chủng vi khuẩn và nấm



Hình 5. Kết quả thử nghiệm kháng khuẩn trên đĩa petri, xác định thông số MBC

4. KẾT LUẬN

Dung dịch nano Ag đã chế tạo thành công bằng việc sử dụng chitosan vừa là tác nhân khử, vừa là chất ổn định, dung dịch tạo thành đã được thử nghiệm quá trình ổn định trong 4 tháng mà chưa có dấu hiệu của sự kết tụ các hạt nano bạc. Khảo sát được các đặc trưng của sản phẩm thu được. Phổ XRD cho thấy nano bạc đã được hình thành với pha duy nhất của Ag kích thước nano. Ảnh TEM cho thấy các hạt nano tạo thành có kích thước khá đều, kích thước hạt khoảng 7÷12 nm, các hạt nano Ag được bao bọc bởi một lớp chitosan dày khoảng 2 nm là nguyên nhân tạo ra độ bền cao, hạn chế sự kết tụ của các hạt nano Ag. Bước đầu thử khả năng kháng khuẩn thành công trên cả các vi khuẩn gram âm lẫn gram dương. Các kết quả cho thấy bạc có khả năng kháng khuẩn tốt ngay cả ở nồng độ thấp.

Lời cảm ơn. Các tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ tài chính của đề tài 59/2615/2010/HĐ-NĐT cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoang Vinh Tran, Lam Dai Tran, Cham Thi Ba, Hoang Dinh Vu, Thinh Ngoc Nguyen, Dien Gia Pham and Phuc Xuan Nguyen - *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **360** (1-3) (2010) 32-40.
2. Minmin Cai, Juilin Chen, Ji Zhou - *Applied Surface Science* **226** (2004) 422–426.
3. N. Vigneshwaran, N. M. Ashtaputre, P. V. Varadarajan, R. P. Nachane, K. M. Paralikar, R. H. Balasubramanya - *Materials Letters* **61** (2007) 1413–1418.
4. Dipak Kumar Bhui, Harekrishna Bar, Priyanka Sarkar, Gobinda Prasad Sahoo, Sankar Prasad De, Ajay Misra - *Journal of Molecular Liquids* **145** (2009) 33–37.
5. Dongwei Wei, Weiping Qian - *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **62** (2008) 136-142.
6. Pallab Sanpui, A. Murugadoss, P. V. Durga Prasad, Siddhartha Sankar - Ghosh, Arun Chattopadhyay, *International Journal of Food Microbiology* **124** (2008) 142-146.
7. M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed and M. M. Hasan - *J. Mater. Sci. Technol.* **24** (2) (2008).
8. Kuber C. Bhainsa, S. F. D'Souza - *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **47** (2006) 160-164.
9. N. Prakash, S. Jayapradeep, P. N. Sudha - 1st International Conference on Nanostructured Materials and Nanocomposites, 6 – 8 April 2009, Kottayam, India.
10. Z. M. dos Santos, A. L. P. F. Caroni, M. R. Pereira, D. R. da Silva, J. L. C. Fonseca - *Carbohydrate Research* **344** (2009) 2591–2595.

SUMMARY

STUDY ON SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLE CONTAINING SOLUTION USING CHITOSAN AS REDUCING/STABILIZING REAGENT

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized using chitosan as reducing and stabilizing agent via a green and facile method. First, AgNO₃ was mixed with chitosan solution, then, the mixture was heated up to 85 – 95°C for a certain period of time (2 - 48 h), in which AgNPs were formed and homogeneously distributed/penetrated inside chitosan chains. AgNPs were characterized by XRD, IR, TEM and UV-vis methods. The obtained results confirmed that AgNPs, whose the particle size of about 7 - 12 nm, were coated by chitosan layer, therefore are stable for at least 4 months without any significant agglomeration. Antibacterial test of AgNPs were investigated, confirming their enhanced antibacterial activities thanks to synergic properties of both AgNPs and chitosan.

Keywords. Silver nanoparticles, chitosan, antibacterial activity