

TỔNG HỢP XANH NANO BẠC SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT THÂN RỄ ĐẠI HOÀNG (*RHEUM PALMATUM*) VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN

Hoàng Đức Thuận*, Nguyễn Đình Thị Thanh Tuyền
Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng, Số 10 Huỳnh Văn Nghệ, Bàu Long, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: thuanhoang@lhu.edu.vn

ARTICLE INFO

Ngày Nhận:
Ngày hoàn thiện:
Ngày chấp nhận:
Ngày đăng:

KEYWORDS

Tổng hợp xanh
Rheum palmatum
Nano bạc
hoạt tính kháng khuẩn

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các hạt nano bạc (AgNPs) được tổng hợp từ dịch chiết thân rễ *Rheum palmatum* và AgNO₃. Các thông số như thể tích dịch chiết, thể tích dung dịch bạc nitrat, thời gian tổng hợp, nhiệt độ tổng hợp, thể tích PVP 1%, thể tích TSC 0,5% được khảo sát để lựa chọn điều kiện tổng hợp. Tính chất quang học của hạt nano bạc được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis; kích thước của hạt nano bạc được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả nghiên cứu đã tổng hợp được các hạt nano bạc có dạng hình cầu với đường kính hạt trung bình khoảng 10 - 30 nm. Khảo sát đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của nano bạc bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch Kirby-Bauer và xác định MIC bằng phương pháp pha loãng trong ống nghiệm. Các hạt nano bạc tổng hợp có khả năng ức chế *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Candida spp.* ở nồng độ MIC lần lượt là 12,5 µg/mL, 3,125 µg/mL, 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL.

GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING *RHIZOMA RHEI PALMATI* EXTRACT AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Hoang Duc Thuan*, Nguyen Dinh Thi Thanh Tuyen
Faculty of Pharmacy, Lac Hong University, 10 Huynh Van Nghe Street,
Buu Long Ward, Bien Hoa City, Dong Nai Province Viet Nam

*thuanhoang@lhu.edu.vn

ARTICLE INFO

Received:
Revised:
Accepted:
Published:

KEYWORDS

Green synthesis
Rheum palmatum
Silver nanoparticle
Antibacterial activity

ABSTRACT

In this study, silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized from extracts *rhizoma Rhei palmati* and AgNO₃. The parameters as extract volume, silver nitrate solution volume, synthesis time, synthesis temperature, 1% PVP volume, 0.5% TSC volume were investigated to select the optimal synthesis conditions. Optical properties, size morphology of silver nanoparticles after synthesis were determined by UV-Vis absorption spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM). The size morphology of silver nanoparticles by TEM showed that the particles were spherical and polygonal, about 10 - 30 nm in size. This research evaluates the antibacterial and antifungal activities of silver NPs synthesized by agar diffusion method Kirby-Bauer and the MIC value by broth dilution method. The synthesized AgNPs were resistant to *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida spp.* at MIC concentrations of 12.5 µg/mL, 3.125µg/mL, 12.5 µg/mL, and 12.5 µg/mL, respectively.

Doi: <https://doi.org/10.54644/jtexxxxxx>

1. Giới Thiệu

Đại hoàng (*Rheum palmatum*) là dược liệu có trong danh mục cây thuốc Việt Nam, được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc dân gian và bài thuốc y học cổ truyền. Các nghiên cứu đã cho thấy Đại hoàng có nhiều hoạt tính sinh học như khả năng kháng khuẩn trên nhiều loại vi khuẩn như tụ cầu, trực khuẩn lỵ, *Vibrio cholerae*, *Bacteroides fragilis*,...[1,2]. Thành phần hóa học chính trong dược liệu Đại hoàng là các dẫn chất polyphenol như anthraquinon, tanin,...[2].

Theo truyền thống thì các hạt nano thường tổng hợp bằng các phương pháp vật lý và hóa học. Các phương pháp này thường tổng hợp nhanh các hạt nano tuy nhiên thường dẫn đến sự hiện diện của một số hóa chất độc hại được hấp thụ trên bề mặt và không thân thiện môi trường. Tổng hợp xanh là phương pháp sử dụng các nguồn tự nhiên như enzyme vi sinh vật, thực vật và chiết xuất thực vật để tổng hợp các hạt nano. Phương pháp tổng hợp xanh hướng đến việc giảm thiểu sử dụng và tạo ra các chất độc hại, giảm thiểu ô nhiễm môi trường [3]. Trong những năm gần đây, nano bạc luôn thu hút sự chú ý của các nhà khoa học trên thế giới, xuất phát từ những tính chất độc đáo cũng như phạm vi ứng dụng rộng lớn như sử dụng làm chất xúc tác, đầu dò sinh học hay chất hiện hình [4,5]... Đặc biệt, nhờ vào hoạt tính kháng khuẩn hiệu quả, nano bạc được xem là giải pháp tiềm năng cho nhiều vấn đề về nhiễm khuẩn sinh học, bao gồm cả vi khuẩn đề kháng kháng sinh [6]. Nano bạc thể hiện tác dụng diệt khuẩn trên một lượng lớn các loài vi khuẩn, những loài được nghiên cứu nhiều nhất là tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, liên cầu tan máu *Streptococcus aureus*, trực khuẩn mũ xanh *Pseudomonas aeruginosa* và phẩy khuẩn tả *Vibrio cholerae*, nấm *Candida albican* [7,8]. Nhờ vào tính chất kháng khuẩn mạnh, nano bạc đã được sử dụng nhiều trong chất phủ bề mặt, băng vết thương, trang thiết bị y tế tráng bạc, các thiết bị để ghép vào cơ thể như ống thông trong tim mạch, tiết niệu [9]. Phương pháp tổng hợp xanh giúp giảm nồng độ bạc sử dụng và giúp ổn định các nano bạc bằng cách kết hợp các phân tử sinh học như protein, acid amin, polysaccharid, alkaloid, tannin, phenolic, saponin, terpenoid, vitamin, những hợp chất có sẵn trong dược liệu vừa đóng vai trò là tác nhân đồng thời đã được chứng minh tác dụng trị liệu. Trong hai thập kỷ trở lại đây, trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về tổng hợp nano bạc sử dụng các dịch chiết dược liệu cũng như hoạt tính của các hạt nano bạc [10]. Ở Việt Nam, cũng đã có những công bố sử dụng dịch chiết dược liệu để tổng hợp nano bạc như sử dụng dịch chiết lá Bàng *Terminalia catappa*, dịch chiết cây Hạnh *Citrus microcarpa* [11]... Trong nước chưa có công bố khoa học sử dụng dịch chiết Đại hoàng để tổng hợp nano bạc. Trên thế giới, các nghiên cứu tổng hợp xanh nano bạc sử

dụng dịch chiết cây Đại hoàng đã được công bố những năm gần đây. Năm 2017, Selvaraj Arokiyaraj và cộng sự đã tổng hợp nano bạc sử dụng rễ của loài *Rheum palmatum*, kết quả cho thấy nano bạc hình cầu với kích thước 121 ± 2 nm [12]. Nghiên cứu chưa công bố độ ổn định của nano bạc tạo thành sau quá trình tổng hợp, nhiệt độ tổng hợp, thời gian tổng hợp, kích thước hạt còn lớn. Do vậy, đề tài tiến hành khảo sát các thông số tổng hợp nano bạc sử dụng dịch chiết thân rễ Đại hoàng ở Việt Nam và thử hoạt tính kháng khuẩn của nano bạc tạo thành.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu: thân rễ của *Rheum palmatum* được mua từ bệnh viện Y học cổ truyền Tp HCM. Dược liệu được lưu trữ tại Bộ môn Dược liệu – khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng. Dược liệu được xay nhỏ và rây qua rây 2 mm. Dược liệu được xác định độ ẩm theo phương pháp mất khối lượng làm khô theo Phụ lục 9.6 Dược điển Việt Nam V.

Hóa chất tổng hợp nano bạc: bạc nitrat (AgNO_3), polyvinylpyrrolidone (PVP), trisodium citrate dihydrate (TSC) của hãng Merck.

Hóa chất thử nghiệm kháng khuẩn: môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck – Đức), môi trường Brain Heart Infusion (BHI, Merck – Đức), Penicillin G (1.000.000 IU, Mekophar).

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 12228, *Candida* spp. ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 của Bộ môn Vi sinh, Khoa Dược Đại học Lạc Hồng.

2.2 Tổng hợp nano bạc

2.2.1 Chuẩn bị nguyên liệu tổng hợp nano bạc

Chuẩn bị cao thân rễ Đại hoàng: Cân 100 g dược liệu Đại hoàng (độ ẩm 11,06%) cho vào erlen 1000 mL, thêm 800 mL nước cất, tiến hành đun erlen trên bếp cách thủy ở 80 °C trong 4 giờ, sau đó lọc qua giấy lọc xếp nếp. Chiết lặp lại 3 lần để thu được dịch chiết. Dịch chiết được cô thu hồi dung môi trên bếp cách thủy để thu được cao đặc Đại hoàng.

Chuẩn bị dịch chiết Đại hoàng 5%: cân 5,00 g cao Đại hoàng cho vào bình định mức 100 mL, thêm nước cất đến vạch, khuấy đều cho tan thu được dịch chiết Đại hoàng 5%.

Chuẩn bị dung dịch PVP 1%: Cân 1,00g PVP cho vào becher 250 mL, thêm 100 mL nước cất, khuấy đều cho tan.

Chuẩn bị dung dịch TSC 0,5%: Cân 0,50 g TSC cho vào becher chứa 100 mL PVP 1%, khuấy đều cho tan.

Chuẩn bị dung dịch bạc nitrat 0,1 M: Cân 1,70 g AgNO_3 cho vào bình định mức 100 mL, cho nước cất đến vạch. Thu được dung dịch AgNO_3 0,1 M.

2.2.2 Quy trình tổng hợp nano bạc

Dịch chiết dược liệu được tạo hỗn hợp và tiến hành phản ứng tổng hợp nano bạc với dung dịch AgNO_3 trên

bếp khuấy từ với tốc độ 400 vòng/phút. Các thông số tiên hành khảo sát: thể tích dịch chiết Đại hoàng 5%, thể tích dung dịch AgNO₃ 0,1 M, thời gian tổng hợp, nhiệt độ tổng hợp, thể tích PVP 1,0 %, thể tích TSC 0,5 %.

Dựa trên kết quả đo phổ UV-Vis, cảm quan của mẫu nano bạc tạo thành để chọn ra thông số thích hợp để tổng hợp nano bạc. Các mẫu tổng hợp có đỉnh hấp thụ cực đại nằm trong vùng 400 - 500 nm đặc trưng cho sự hình thành nano bạc [13,14] và ổn định trong thời gian bảo quản, không có biến đổi về màu sắc và không bị tủa.

2.2.3 Xác định tính chất, cấu trúc nano bạc

Tính chất quang học của nano bạc được xác định bằng Phổ UV-Vis trên máy UV Thermo EVO300 PC tại bộ môn Hóa phân tích-Kiểm nghiệm, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng.

Kích thước và sự phân bố các hạt nano bạc được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) đo trên máy JEM-1400, Nhật Bản tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam – Hà Nội kết hợp phần mềm Image Tool.

2.3 Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Vi khuẩn được cấy hoạt hóa trong môi trường BHI, ủ 37 °C trong 24 h để có độ đục bằng độ đục Mc Farland 0,5 (OD tại 600 nm từ 0,08 - 0,10) tương đương với 1,0 - 1,5.10⁸ CFU/ml. Pha loãng 100 lần để được mẫu có nồng độ 1,0 - 1,5.10⁶ CFU/ml cho thử nghiệm [15].

Lưu ý: mẫu vi khuẩn/nấm phải được sử dụng trong vòng 15 phút sau khi pha loãng.

2.3.1 Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Trải đều vi khuẩn trên nền thạch MHA (độ dày thạch 3,5-4,5 mm), đục các giếng đường kính 6 mm. Cho vào mỗi giếng 100 µL dung dịch:

- Giếng a: Dung dịch nano bạc 100 µg/mL
- Giếng b: Dung dịch nano bạc 50 µg/mL
- Giếng c: Nước cất
- Giếng d: Penicillin G (100 µg/mL)

Sau đó ủ mẫu 24 giờ ở 37 °C, quan sát đường kính vòng kháng khuẩn [15]. Thực hiện 3 lần lấy kết quả trung bình.

2.3.2 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu

Giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) thực hiện theo phương pháp pha loãng trong ống nghiệm. Cho vào các ống nghiệm (giống nhau về kích thước, thể tích) mẫu thử (nano bạc), mẫu đối chiếu (penicillin G) với nồng độ giảm dần (pha loãng trong môi trường MHB) như sau:

Bảng 1. Nồng độ nano bạc trong thử nghiệm MIC

Ống	Nồng độ nano bạc (µg/mL)	Ống	Nồng độ nano bạc (µg/mL)
1	100	6	3,125
2	50	7	1,563
3	25	8	0,781
4	12,5	9	0,390
5	6,25	10	0,195

Cho 400 µL vi khuẩn vào các ống nghiệm chứa sẵn 4 mL mẫu thử. Quan sát độ đục các ống sau 24 giờ từ ống có nồng độ nano bạc thấp nhất đến cao nhất. MIC là

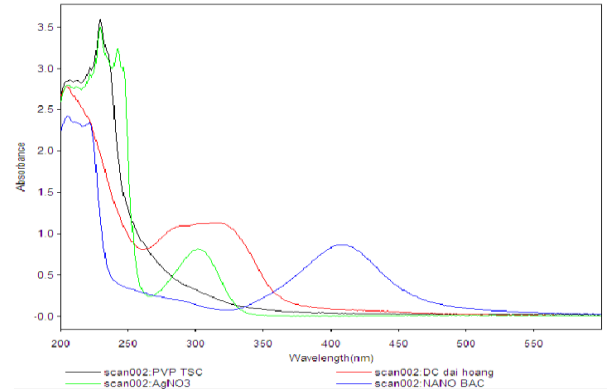
nồng độ thấp nhất của mẫu thử trong ống nghiệm ức chế sự phát triển của vi khuẩn [16].

Thực hiện song song với mẫu chứng âm (môi trường và vi khuẩn) và chứng dương (môi trường). Chứng âm phải có sự phát triển của vi khuẩn (đục), chứng âm không có sự phát triển của vi khuẩn (trong) sau 24 giờ.

3. Kết quả và thảo luận

Khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp UV-Vis

Thực hiện quét phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch AgNO₃, dịch chiết Đại hoàng, dung dịch PVP, dung dịch TSC, nano bạc trong khoảng bước sóng 200-600 nm. Kết quả được biểu diễn ở Hình 1.

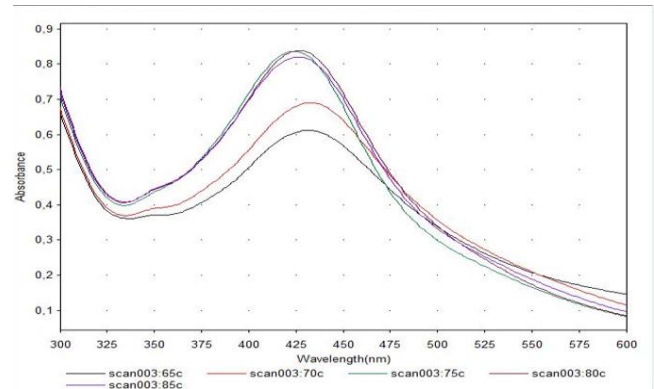


Hình 1. Khảo sát độ đặc hiệu của nano bạc

Dung dịch AgNO₃, dịch chiết Đại hoàng, dung dịch PVP, TSC không có phổ hấp thụ ở bước sóng 400-450 nm. Mẫu nano bạc cho đỉnh hấp thụ cực đại nằm trong khoảng bước sóng 400-450 nm. Do vậy định tính nano bạc bằng phương pháp UV-Vis có tính đặc hiệu.

3.1 Khảo sát nhiệt độ tổng hợp nano bạc

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện: 4 mL dung dịch AgNO₃ 0,01 M, 1 mL dịch chiết Đại hoàng 5%, thời gian phản ứng 40 phút, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi nhiệt độ tổng hợp nano bạc từ 65 °C - 85 °C. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả biểu diễn ở Hình 2.



Nhiệt độ (°C)	65	70	75	80	85
Đỉnh hấp thụ cực đại (nm)	432	432	424	427	426
Độ hấp thụ (A)	0,6114	0,6900	0,8355	0,8379	0,8196

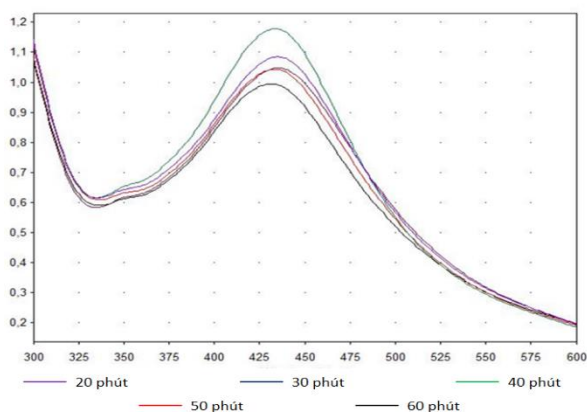
Hình 2. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo nhiệt độ

Các mẫu nano bạc tạo thành cho đỉnh hấp thụ cực đại tại các bước sóng nằm trong khoảng 400 đến 450 nm là

liên quan đến sự hình thành các hạt nano kim loại bạc và chiều cao của nó cung cấp thông tin về nồng độ của các hạt nano kim loại bạc [13,14]. Khi tăng nhiệt độ thì có sự dịch chuyển vị trí các đỉnh hấp thụ trong khoảng 424-432 nm, các mẫu nano bạc tổng hợp ở nhiệt độ 75-85 °C cho đỉnh hấp thụ cực đại ổn định ở 424-427 nm. Kết quả này theo hiện tượng plasmon bề mặt cho phép dự đoán các mẫu nano bạc tổng hợp nhiệt độ từ 75 – 85°C kích thước nhỏ, ổn định hơn các mẫu được tổng hợp ở nhiệt độ thấp hơn [17]. Dựa vào kết quả độ hấp thụ và đỉnh hấp thụ cực đại, nhiệt độ thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 75 °C.

3.2 Khảo sát thời gian tổng hợp nano bạc

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện: 4 mL dung dịch AgNO₃ 0,01 M, 1 mL dịch chiết Đại hoàng 5%, nhiệt độ tổng hợp là 75 °C, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi thời gian tổng hợp các mẫu nano bạc từ 20 – 60 phút. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả được biểu diễn ở Hình 3.



Thời gian (phút)	20	30	40	50	60
Đỉnh hấp thụ cực đại (nm)	434	435	434	434	432
Độ hấp thụ (A)	1,0548	1,0277	1,1651	1,0206	0,9834

Hình 3. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo các thời gian tổng hợp

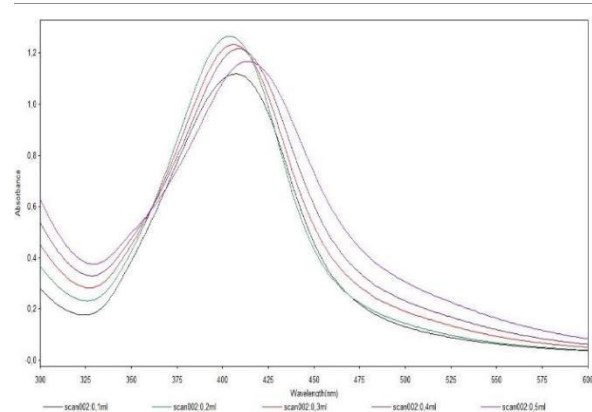
Khi thay đổi thời gian tổng hợp thì các mẫu nano bạc tạo thành có vị trí đỉnh hấp thụ gần như không thay đổi trong phạm vi bước sóng 432 – 435 nm. Kết quả này có thể khẳng định các hạt nano bạc tạo ra có kích thước nhỏ ổn định trong thời gian từ 20 đến 60 phút, ở thời gian 40 phút mẫu nano bạc tạo ra có đỉnh hấp thụ cực đại 434 nm với độ hấp thụ lớn nhất là 1,1651. Thời gian thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 40 phút.

3.3 Khảo sát thể tích dịch chiết thân rễ Đại hoàng 5%

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện nồng độ AgNO₃ 0,01 M, nhiệt độ phản ứng 75 °C, thời gian phản ứng 40 phút, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi thể tích dịch chiết thân rễ Đại hoàng 5% từ 0,1 đến 0,5 mL. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả được biểu diễn ở Hình 4.

Khi thay đổi thể tích dung dịch Đại hoàng 5% thì các mẫu nano bạc tạo thành cho các đỉnh hấp thụ cực đại dao động từ 404-414 nm và dịch chuyển theo hướng bước sóng tăng dần khi tăng thể tích dịch chiết Đại hoàng 5% trong tổng hợp nano bạc. Với các mẫu nano bạc tổng hợp với thể tích Đại hoàng 5% thì cho các vị trí đỉnh hấp thụ

gần như không thay đổi trong phạm vi bước sóng 404 – 406 nm, và cho độ hấp thụ cực đại tại mẫu nano bạc tổng hợp từ 0,2 mL dịch chiết Đại hoàng 5% (độ hấp thụ 1,2655). Do đó, thể tích dịch chiết Đại hoàng 5% thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 0,2 mL.

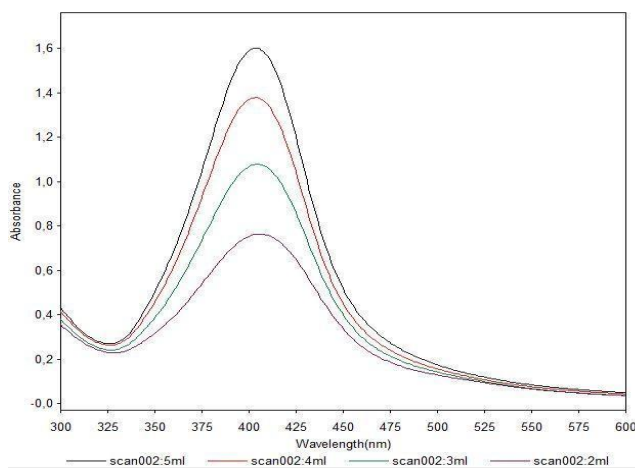


Thể tích (mL)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Đỉnh hấp thụ cực đại (nm)	404	404	406	409	414
Độ hấp thụ (A)	1,1183	1,2655	1,2332	1,2167	1,1676

Hình 4. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo thể tích dịch chiết thân rễ Đại Hoàng 5%

3.4. Khảo sát thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01M

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện: 0,2 mL dịch chiết thân rễ Đại hoàng 5%, nhiệt độ phản ứng 75 °C, thời gian phản ứng 40 phút, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01 M từ 2 đến 5 mL. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả được biểu diễn ở Hình 5.



Thể tích AgNO ₃ 0,01M (mL)	2,0	3,0	4,0	5,0
Đỉnh hấp thụ cực đại (nm)	406	404	404	404
Độ hấp thụ (A)	0,7633	1,0770	1,3776	1,6004

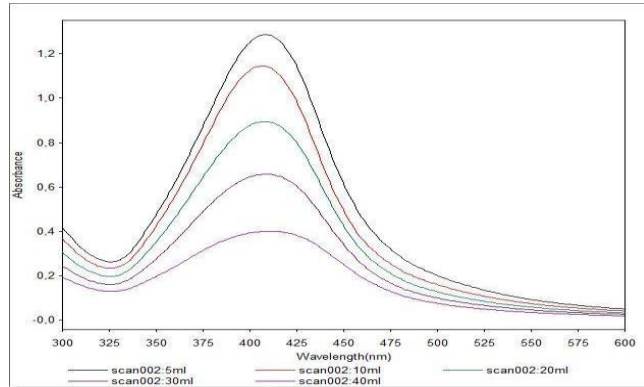
Hình 5. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01M

Khi thay đổi thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01 thì các mẫu nano bạc tạo thành có vị trí đỉnh hấp thụ cực đại gần như không thay đổi trong phạm vi bước sóng 404 – 406 nm. Kết quả này có thể khẳng định các hạt nano bạc tạo ra có kích thước nhỏ ổn định với thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01M từ 2,0 – 5,0 mL. Tổng hợp nano bạc với 5,0 mL dung dịch AgNO₃ 0,01M cho đỉnh hấp thụ cực

đại tại bước sóng 404 nm với độ hấp thu nhiều nhất 1,6004. Thể tích dung dịch AgNO₃ 0,01M thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 5,0 mL.

3.5. Khảo sát thể tích dung dịch PVP 1%

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện: 0,2 mL dịch chiết thân rễ Đại hoàng 5%, 4 mL dung dịch AgNO₃ 0,01 M, nhiệt độ phản ứng 75 °C, thời gian phản ứng 40 phút, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi thể tích dung dịch PVP 1% từ 5 đến 40 mL. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả được biểu diễn ở Hình 6.



Thể tích PVP 1% (mL)	5	10	20	30	40
Đỉnh hấp thu cực đại (nm)	408	407	408	408	412
Độ hấp thu (A)	1,2865	1,1450	0,8945	0,6573	0,4005

Hình 6. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo thể tích dung dịch PVP 1%

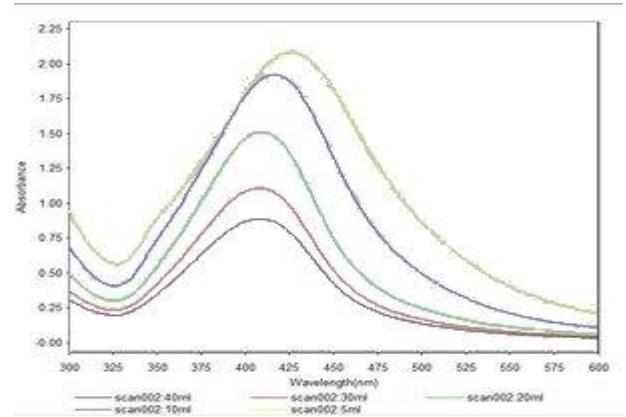
Khi tăng thể tích dung dịch PVP 1% từ 5 – 30 mL thì các mẫu nano bạc tạo thành có đỉnh hấp thu cực đại gần như không đổi tại bước sóng 407–408 nm nhưng độ hấp thu của các mẫu giảm dần, mẫu nano bạc tổng hợp với 40 mL dung dịch PVP 1% thì cho đỉnh hấp thu cực đại tại bước sóng lớn hơn tại 412 nm. Mẫu nano bạc tổng hợp với 10 mL dung dịch PVP 1% cho đỉnh hấp thu tại bước sóng nhỏ nhất tại 407 nm và ổn định trong thời gian bảo quản. Thể tích dung dịch PVP 1% thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 10 mL.

3.6. Khảo sát thể tích dung dịch TSC 0,5%

Tiến hành khảo sát ở cùng điều kiện: 0,2 mL dịch chiết thân rễ Đại hoàng 5%, 4 mL dung dịch AgNO₃ 0,01 M, 10 mL dung dịch PVP 1%, nhiệt độ phản ứng 75 °C, thời gian phản ứng 40 phút, tốc độ khuấy 400 vòng/phút, thay đổi thể tích dung dịch TSC 1% từ 5 đến 40 mL. Các mẫu nano bạc tạo thành được đo phổ UV-Vis, kết quả được biểu diễn ở Hình 7.

Khi tăng thể tích dung dịch TSC thì các mẫu nano bạc tạo thành cho đỉnh hấp thu cực đại ở bước sóng giảm dần từ 427 nm xuống còn 408 nm và độ hấp thu cũng giảm dần. Vai trò trợ phân bố của TSC đã thể hiện rõ khi càng tăng thể tích thì đỉnh hấp thu ở các bước sóng giảm dần, theo hiện tượng plasmon bề mặt thì hiện tượng ứng với các kích thước hạt nano bạc giảm dần. Các mẫu nano bạc tổng hợp với thể tích TSC 5% là 5 mL, 10 mL, 20 mL có hiện tượng tủa sau 7 ngày bảo quản. Nguyên nhân là do lượng TSC trong dung dịch không đủ để bảo vệ các hạt nano bạc tránh khỏi sự kết tụ. Các mẫu nano bạc tổng hợp với thể tích TSC 5% là 30 mL, 40 mL ổn định trong

thời gian bảo quản. Mẫu nano bạc tổng hợp với 30 mL dung dịch TSC 5% cho độ hấp thu lớn hơn mẫu nano bạc tổng hợp với 40 mL TSC 5% và ổn định. Thể tích dung dịch TSC 5% thích hợp để tổng hợp nano bạc trong khảo sát này là 30 mL.



Thể tích TSC 0,5% (mL)	5	10	20	30	40
Đỉnh hấp thu cực đại (nm)	427	416	409	408	408
Độ hấp thu (A)	2,0851	1,9213	1,5128	1,1074	0,8859

Hình 7. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc tổng hợp theo thể tích dung dịch TSC 5%

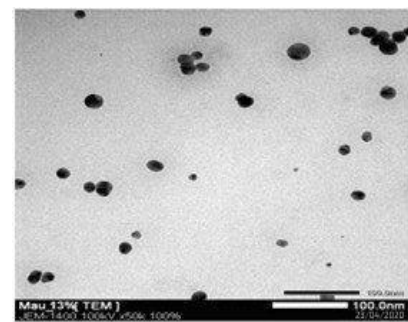
3.7. Kết quả phân tích ảnh TEM

Kết quả khảo sát cho các thông số tối ưu tổng hợp nano bạc trong dịch chiết thân rễ Đại hoàng như Bảng 1.

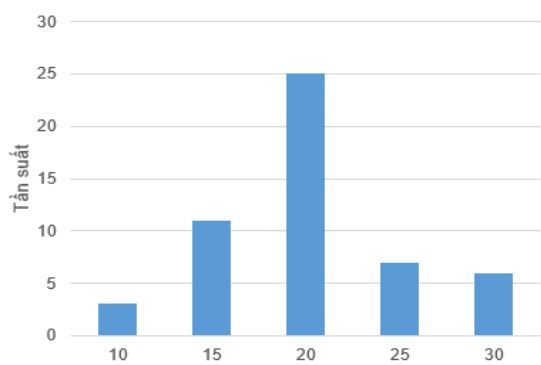
Bảng 2. Bảng thông số tổng hợp nano bạc

Tác nhân tổng hợp	Thông số
Dịch chiết Đại hoàng 5%	0,2 mL
Dung dịch AgNO ₃ 0,01M	4 mL
Dung dịch PVP 1%	10 mL
Dung dịch TSC 0,5%	30 mL
Nhiệt độ phản ứng	75 °C.
Thời gian phản ứng	40 phút
Tốc độ khuấy	400 vòng/phút

Thực hiện tổng hợp nano bạc với các thông số như Bảng 2. Mẫu nano bạc tạo thành được đem đo phổ UV-Vis và đo kích thước bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả TEM được trình bày ở Hình 7. Kết quả cho thấy các hạt nano bạc có dạng hình cầu với đường kính hạt trung bình khoảng 10 - 30 nm.



Hình 8. Ảnh TEM hạt nano bạc ở thước đo 100 nm



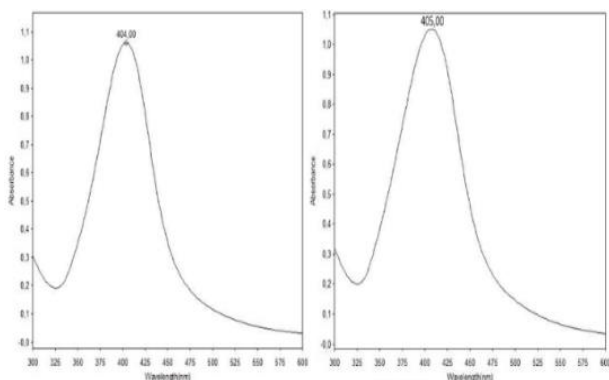
Hình 9. Biểu đồ phân bố kích thước hạt nano bạc ở thước đo 100 nm

3.8. Xác định độ ổn định của nano bạc tổng hợp

Mẫu nano bạc sau khi tổng hợp được bảo quản ở nhiệt độ 30°C, nơi khô ráo, thoáng mát, sau 6 tháng mẫu được kiểm tra độ ổn định bằng phương pháp UV-Vis.



Hình 10. Màu sắc dung dịch nano bạc ban đầu và sau 6 tháng bảo quản

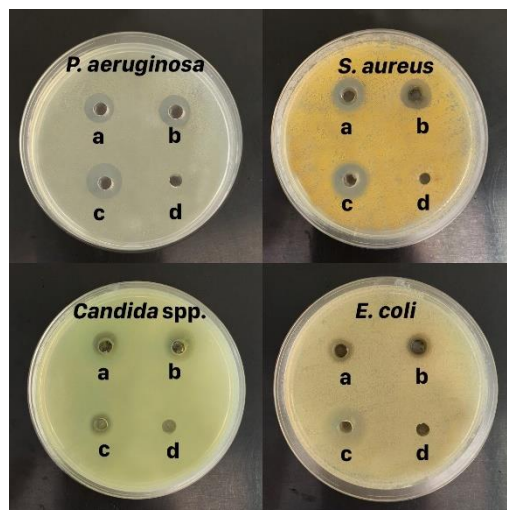


Hình 11. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc ban đầu và mẫu nano bạc sau 6 tháng bảo quản

Mẫu nano bạc sau 6 tháng không bị đục, không có tủa, giữ nguyên trạng thái màu sắc như ban đầu. Phổ UV-Vis của mẫu nano bạc sau 6 tháng bảo quản vẫn cho đỉnh hấp thụ tại bước sóng 405 nm tương ứng phổ UV-Vis với mẫu ban đầu, không xuất hiện đỉnh hấp thụ bất thường; mẫu nano bạc cho độ hấp thụ là 1,307 tương ứng với độ hấp thụ của mẫu trước bảo quản. Dựa vào kết quả phổ UV-Vis và cảm quan của mẫu nano bạc, có thể khẳng định mẫu nano bạc tạo thành ổn định trong thời gian 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ 30 °C, nơi khô ráo, thoáng mát.

3.9. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn

3.9.1 Xác định hoạt tính kháng khuẩn



Hình 12. Hoạt tính kháng khuẩn của mẫu nano bạc
a: nano bạc 100 µg/mL, b: nano bạc 50 µg/mL,
c: Penicillin G 100 µg/mL, d: nước

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn

Vi khuẩn, nấm	Đường kính kháng khuẩn (mm)		
	nano bạc 100 µg/mL	nano bạc 50 µg/mL	Penicillin G 100 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	11±0,3	11±0,4	11±0,2
<i>S. aureus</i>	14±0,4	10±0,5	12±0,3
<i>E. coli</i>	8±0,3	8±0,5	6±0,2
<i>C.albicans</i>	10±0,5	9±0,4	8±0,3

Kết quả quan sát vòng kháng khuẩn cho thấy mẫu nano bạc tổng hợp từ dịch chiết Đại hoàng 5% cho các vòng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn và nấm khảo sát, có ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn và nấm. Vì vậy, mẫu nano bạc tổng hợp sử dụng dịch chiết Đại hoàng có hoạt tính kháng khuẩn trên *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*.

3.9.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu

Kết quả xác định MIC mẫu nano bạc tổng hợp từ dịch chiết Đại hoàng trên các chủng *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C.albicans* lần lượt là 12,5 µg/mL, 3,125 µg/mL, 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm MIC

Vi khuẩn, nấm	MIC của nano bạc (µg/mL)	MIC của Penicillin (µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	12,5	30
<i>S. aureus</i>	3,125	3,75
<i>E. coli</i>	12,5	15
<i>C.albicans</i>	12,5	7,5

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của mẫu nano bạc trong nghiên cứu này cũng tương ứng với kết quả kháng khuẩn của Selvaraj Arokiyaraj và cộng sự công bố năm 2017 tổng hợp nano bạc sử dụng rễ của loài *Rheum palmatum* và thử hoạt tính kháng khuẩn cho kết quả kháng khuẩn mạnh trên *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* [12].

4. Kết luận

Đề tài đã tổng hợp thành công nano bạc sử dụng dịch chiết thân rễ Đại hoàng với điều kiện tổng hợp là: nhiệt độ tổng hợp là 75 °C, thời gian tổng hợp là 40 phút, thể tích dịch chiết Đại hoàng là 0,2 mL ở nồng độ 5%, thể tích dung dịch AgNO₃ ở nồng độ 0,01 M là 4 mL, thể tích dung dịch PVP 1% là 10 mL, thể tích dung dịch TSC 0,5% là 30 mL. Kết quả TEM cho thấy các hạt nano bạc có dạng hình cầu với đường kính hạt trung bình khoảng 10 - 30 nm. Kết quả tổng hợp nano bạc có kích thước nhỏ hơn so với kết quả nghiên cứu của Selvaraj Arokijaraj công bố năm 2017 là 121 ± 2 nm. Điều đó cho thấy việc sử dụng thêm các chất bảo vệ có thể cải thiện kích thước hạt tốt hơn và ổn định hơn. Mẫu nano bạc cho khả năng kháng khuẩn các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* và *Candida spp.* với MIC lần lượt là 3,125 µg/mL, 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL.

5. Cảm ơn

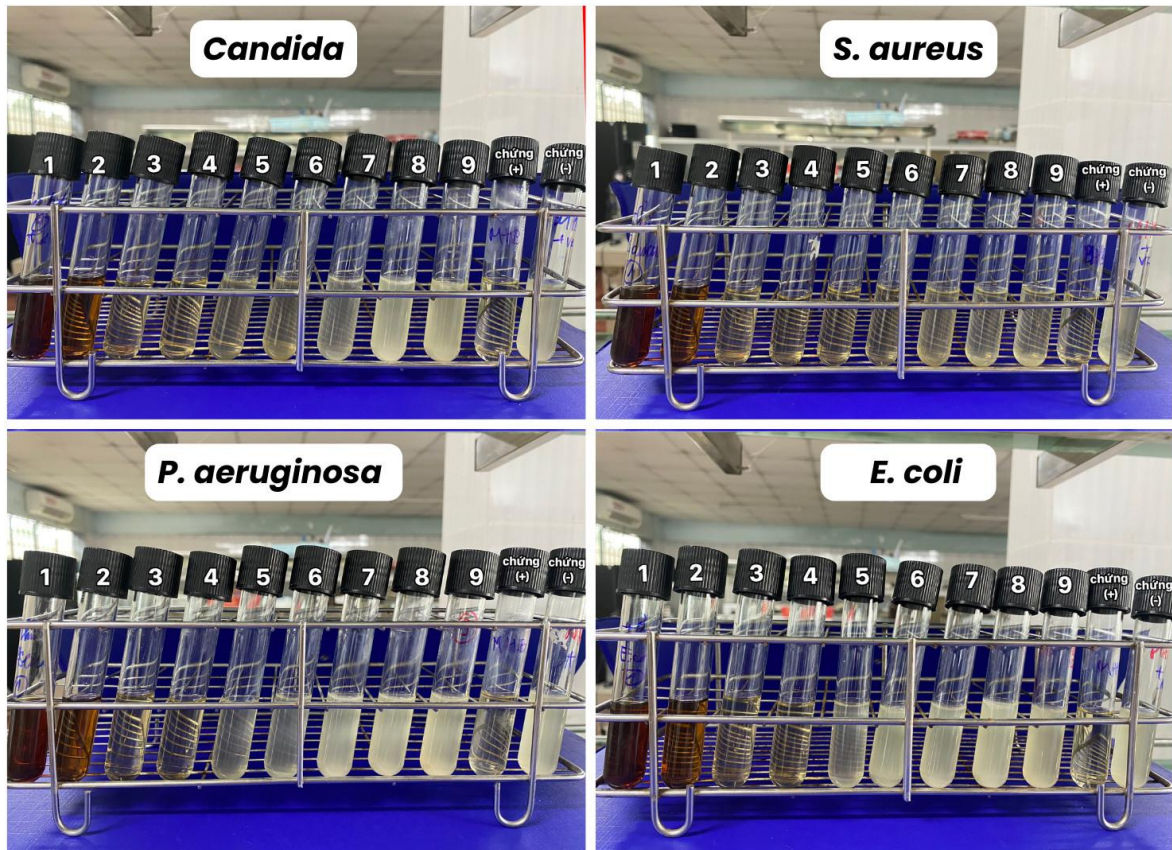
Nghiên cứu là đề tài cấp cơ sở mã số (LHU-RF-MP-19-03-13). Cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện tốt nhất cho nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

6. Tài liệu tham khảo

- [1] Magda M.Aly; Nehad M. Gungumjee, Antimicrobial efficacy of *Rheum palmatum*, *Curcuma longa* and *Alpinia officinarum* extracts against some pathogenic microorganisms. African Journal of Biotechnology. **2011**, 10(56), pp. 1205-12063.
- [2] Koaikowaka; Helena D.Smonar; Anna Malm, Antimicrobial activity and total content of polyphenols of *Rheum L.* species growing in Poland. Central European Journal of Biology. **2010**, 5(6), pp. 814-820.
- [3] Aman Gour; Narendra Kumar Jain, Advances in green synthesis of nanoparticles. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. **2019**, 47(3), pp 844-851.
- [4] Kyeong-Seok Lee; Mostafa A. El-Sayed, Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. The Journal of Physical Chemistry B. **2009**, 110 (39), pp. 19220-19225.
- [5] Narayan Pradhan; Anjali Pal; Tarasankar Pal , Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. **2002**, 196 (3), pp. 247-257.
- [6] S. Ashokkumar; S. Ravi; V. Kathiravan; S. Vel murugan, Synthesis of silver nanoparticles using *A. indicum* leaf extract and their antibacterial activity. 2015, 134 (2), pp. 34-39.
- [7] V. Gopinath; D. MubarakAli; S. Priyadarshini; N. Meera Priyadarshini; N. Thajuddin; P. Velusamy, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2012, 96, pp. 69-74.
- [8] Deenadayalan Ashok Kumar; V. Palanichamy; Selvaraj Mohana Roopan, Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. **2014**, 127, pp. 168-171.
- [9] Chen Jyh-Ping; Chiang Yun, Bioactive electrospun silver nanoparticles-containing polyurethane nanofibers as wound dressings. Journal of nanoscience and nanotechnology. **2010**, 10(11), pp. 7560-7564.
- [10] Khwaja Salahuddin Siddiqi; Azamal Husen; Rifaqat A. K. Rao, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. Journal of Nanobiotechnology. **2018**, 16(14), pp. 32-41
- [11] Huỳnh Thị Mỹ Linh, Nghiên cứu tổng hợp hạt nano bạc từ dung dịch bạc nitrat bằng tác nhân khử dịch chiết nước lá bàng. Luận văn Thạc sĩ. **2013**.
- [12] S. Arokijaraj; S. Vincent; M Saravanan; Y. Lee; Young K. Oh; Kyoung H.Kim, Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. **2017**, 45(2), pp. 372-379.
- [13] Shujahadeen B. Aziz; Omed Gh. Abdullah; Dlear R. Saber; Mariwan A. Rasheed; Hameed M. Ahmed, Investigation of metallic silver nanoparticles through UV-Vis and optical micrograph techniques. Int. J. Electrochem. Sci. **2017**, 2(12), pp. 363 – 373.
- [14] Liu Y.; Chen S.; Zhong L.; Wu G., Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. Radiation Physics and Chemistry. **2009**, 3(78), pp. 251–255.
- [15] T.G. Gini; G. Jeya Jothi, In vitro screening of antibacterial and antifungal activity of *Marsilea quadrifolia* (Marsileaceae) Linn. Extract. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics. **2015**, 3 (4), pp. 313-329.
- [16] G. Bagherzade; M.M. Tavakoli; M.H. Namaei, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of Saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. **2017**, 7 (3), pp. 227-233.
- [17] Vincenzo Amendola; Osman M. Bakr; Francesco Stellacci, A Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method: Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly. Plasmonics. **2010**, 5, pp. 85–97

7. Phụ lục



Phụ lục 1. Kết quả thử nghiệm MIC của mẫu nano bạc tạo thành