

TỔNG HỢP XANH VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA NANO VÀNG TỪ CHIẾT XUẤT LÁ CÂY NGŨ GIA BÌ

NGUYỄN THỊ LAN HƯƠNG^{1*}, BẠCH THỊ MỸ HIỀN²

¹Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh

²Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên hệ: nguyenthilanhuong@iuh.edu.vn

DOIs:

Tóm tắt. Hiện nay, các hạt nano Vàng (AuNPs) đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học do chúng có tiềm năng ứng dụng hứa hẹn làm vật liệu phân phối thuốc/tác nhân kháng viêm trực tràng thông qua đường uống. Tuy nhiên, AuNPs cũng được biết đến như là vật liệu có tính kháng khuẩn mạnh, gây ra ảnh hưởng tiêu cực lên hệ vi sinh đường ruột. Bên cạnh đó, việc sử dụng AuNPs tổng hợp từ nguồn hóa chất công nghiệp độc hại sẽ tác động xấu đến sức khỏe con người, không phù hợp trong ứng dụng lâm sàng. Trong công trình này, các hạt nano Vàng hình cầu, kích thước nhỏ hơn 50 nm đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tiếp cận xanh, sử dụng dịch chiết của lá cây Ngũ Gia Bì đóng vai trò làm chất khử và chất ổn định. Khảo sát kháng khuẩn cho thấy, ngay cả ở nồng độ nano Vàng cao các hạt nano Vàng thể hiện khả năng kháng khuẩn thấp đối với 5 chủng vi khuẩn lần lượt là *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ $7,03 \pm 1,05$ mm đến $8,67 \pm 0,58$ mm. Mẫu nano Vàng thu được không thể hiện tính kháng khuẩn đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* ở tất cả các nồng độ khảo sát. Như vậy, với tính kháng khuẩn không quá mạnh, các hạt nano Vàng được tổng hợp từ dịch chiết của lá cây Ngũ Gia Bì có thể trở thành vật liệu tiềm năng trong ứng dụng phân phối thuốc.

Từ khóa. Tổng hợp xanh, nano Vàng, Ngũ Gia Bì, hoạt tính sinh học, kháng khuẩn.

1 GIỚI THIỆU

Các hạt nano với kích thước từ 10^{-7} đến 10^{-9} m với các đặc tính hóa lý độc đáo đã tạo ra một bước tiến vượt bậc trong khoa học vật liệu trong những thập kỷ gần đây [1]. Các hạt nano, đặc biệt là nano Vàng dạng dung dịch keo đã được các nghệ nhân sử dụng trong nhiều thế kỷ do màu sắc rực rỡ được tạo ra từ sự tương tác của chúng với ánh sáng nhìn thấy. Gần đây hơn, những đặc tính quang điện tử độc đáo này đã được nghiên cứu và sử dụng trong các ứng dụng công nghệ cao như quang điện hữu cơ, đầu dò cảm giác, tác nhân điều trị, phân phối thuốc trong các ứng dụng sinh học và y tế, chất dẫn điện tử và xúc tác [2]. Các đặc tính quang học và điện tử của các hạt nano Vàng có thể điều chỉnh được bằng cách thay đổi kích thước, hình dạng, hóa học bề mặt hoặc trạng thái tập hợp [3]. Các hạt nano Vàng cũng nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trong lĩnh vực sinh học, do thể hiện nhiều tính chất tốt hơn so với vật liệu kích thước lớn chủ yếu do kích thước hạt bé, dẫn đến diện tích bề mặt vượt trội. Trong lĩnh vực này, nano Vàng đã được báo cáo là một chất kháng khuẩn hiệu quả. Cơ chế chính xác về tác dụng kháng khuẩn của nano Vàng cho đến nay vẫn chưa được khám phá đầy đủ, nhưng khả năng kháng khuẩn vượt trội của chúng đã được công nhận một cách rộng rãi [4].

Có nhiều phương pháp tiếp cận để tổng hợp nano Vàng, bao gồm các phương pháp hóa học, sinh học và vật lý. Tuy nhiên, các phương pháp trên vẫn còn một số nhược điểm sau: điều kiện tổng hợp phức tạp và chi phí cao, sử dụng các hóa chất nguy hiểm, tiêu tốn năng lượng [5]. Do tính đơn giản, thân thiện với môi trường, tiết kiệm chi phí và không chứa bất kỳ hóa chất độc hại nào, nên tổng hợp nano kim loại (MNPs) có nguồn gốc thực vật đang được nhiều nhà khoa học lựa chọn [6-7].

Trong một số nghiên cứu trong nước, tác giả Đoàn Văn Hồng Thiện cùng cộng sự đã tổng hợp hạt nano Vàng thành công sử dụng chiết xuất chanh năm 2014 [8]. Các hạt nano Vàng kích thước trung bình là $13,6 \pm 5,48$ nm có nhiều tiềm năng ứng dụng trong cảm biến sinh học, xúc tác hay kỹ thuật sinh học. Năm 2018, tác giả Nguyễn Ngọc Khánh Anh cùng cộng sự đã tổng hợp thành công nano Vàng từ dịch chiết lá trà, ứng dụng trong mỹ phẩm [9]. Các hạt nano Vàng được hình thành có hình cầu với kích thước 13,78 nm. Năm 2021, tác giả Nguyễn Thị Lan Hương đã sử dụng dịch chiết vỏ dứa để tổng hợp các hạt nano Vàng kích

thước từ 5 đến 15 nm ứng dụng trong lĩnh vực kháng khuẩn [10]. Công trình này chứng minh hiệu quả sử dụng nguồn phế thải nông nghiệp - chiết xuất vỏ dừa, trong việc khử các ion vàng và ổn định các hạt nano Vàng. Các hạt nano Vàng dạng keo ổn định trong dung dịch hơn một tuần và phân tán tốt trong môi trường nước.

Trong một số nghiên cứu trên thế giới, tác giả Ahmad và nhóm nghiên cứu của ông đã tổng hợp các hạt nano Vàng từ dịch chiết của loài rêu Ailen năm vào 2003 [11]. Các hạt nano Vàng thu được có hình cầu và có kích thước khác nhau từ 30 đến 50 nm. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu đã chỉ ra rằng các hạt nano Vàng có tiềm năng ứng dụng lớn trong các lĩnh vực như công nghệ DNA tái tổ hợp và kỹ thuật protein. Năm 2012, tác giả Laura Castro cùng với các cộng sự của mình đã nghiên cứu và sử dụng dịch chiết từ rong biển Cava để tổng hợp nano Vàng [12]. Kết quả các hạt nano Vàng thu được có dạng hình cầu và có kích thước là 30 nm. Năm 2019, các tác giả Thangamani và Bhuvaneshwari đã tổng hợp các hạt nano Vàng có tính kháng khuẩn bằng cách sử dụng chiết xuất từ lá *Simarouba glauca* [13]. Nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng dung dịch nano Vàng tổng hợp từ chiết xuất lá *Simarouba glauca* có khả năng kháng khuẩn rất tốt và có thể kháng lại vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* và các chủng vi khuẩn khác. Cần chú ý rằng, khi sử dụng chiết xuất thực vật để điều chế nano Vàng, lớp hữu cơ trong dịch chiết sẽ bao quanh các hạt nano này và tạo ra dung dịch nano Vàng có độ bền tương đối tốt. Mặt khác, hạt nano tổng hợp được sẽ có nhiều đặc tính khác nhau do sự đa dạng của các hợp chất hữu cơ có trong chiết xuất của các loại thực vật. Do đó, nhiều loại thực vật mới vẫn đang được tìm tòi nghiên cứu để điều chế nano Vàng với độ bền cao hơn và sở hữu nhiều tính chất ưu việt hơn. Bệnh viêm ruột, bao gồm viêm loét đại tràng và bệnh Crohn, đã ảnh hưởng đến 0,5% dân số phương Tây và ngày càng trở nên phổ biến ở các nước mới công nghiệp hóa [14]. Bệnh viêm ruột là một bệnh tái phát và không thể chữa khỏi, đặc trưng bởi tình trạng viêm đường ruột mãn tính và có nhiều triệu chứng khác nhau, chẳng hạn như tiêu chảy dai dẳng, đau bụng và mệt mỏi. Trong công cuộc tìm kiếm các tác nhân mới chữa bệnh viêm ruột, AuNPs đã được các nhà khoa học chứng minh là vật liệu tiềm năng, khi thành công thực hiện nghiên cứu ứng dụng AuNPs chống viêm trên chuột [15]. Tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn mạnh của AuNPs đã hạn chế ứng dụng của vật liệu này thông qua đường uống, do ảnh hưởng tiêu cực đến hệ vi sinh đường ruột. Do đó, việc nghiên cứu tổng hợp xanh AuNPs có tính kháng khuẩn thấp hoặc không thể hiện tính kháng khuẩn để tăng cường ứng dụng phân phối thuốc thông qua đường uống là cấp thiết.

Trong công trình này, chúng tôi lần đầu tiên sử dụng lá cây Ngũ Gia Bì (*Schefflera heptaphylla*) để chế tạo thành công nano Vàng. Ngũ gia bì chân chim là loại cây gỗ, có thể cao tới hơn 10 mét, được nhận biết bởi hình dạng lá kép đặc trưng bao gồm 6-9 lá chét, mỗi lá trong giống như hình bàn chân con vịt, mọc so le, cuống có bẹ. Thường nở hoa trong khoảng từ tháng 2 đến tháng 3 và ra quả trong khoảng từ tháng 4 đến tháng 5. Tại Việt Nam, ngũ gia bì chân chim là loại cây có biên độ sinh thái rộng, phân bố ở cả vùng thấp và vùng núi cao, mọc nhiều tại các tỉnh miền Bắc. Cây ngũ gia bì chân chim là một loại thuốc dân gian được sử dụng nhiều nơi trong nước và trên thế giới. Tại Việt Nam, chúng được sử dụng để chống hạ đường huyết, tăng lực, chữa phong thấp, chân sưng đau, da lở ngứa do thấp nhiệt [16]. Tại Hồng Kông, lá ngũ gia bì chân chim được xem như thành phần chính trong một loại trà thảo mộc có tác dụng điều trị cảm lạnh thông thường. Tại Trung Quốc, lá được sử dụng trong chữa đau lưng, nhức xương, bong gân, tiêu hóa kém, còi xương trẻ em. Thành phần hóa học của loài này chứa một số hợp chất như: triterpenoid saponin, flavonoid, tinh dầu, acid hữu cơ. Một số loại acid hữu cơ như: oleanolic acid, phenolic acid. Trong tinh dầu có chứa monoterpen, beta-pinene, sesquiterpen [17]. Trong đó, phenolic acid được đã được chứng minh là chất khử tốt để tạo ra các hạt nano kim loại. Điều này cho thấy, việc sử dụng chiết xuất từ lá Ngũ Gia Bì để tổng hợp nano Vàng là khá triển vọng. Các thông số tổng hợp tối ưu gồm thời gian phản ứng, nồng độ ion vàng và nhiệt độ được khảo sát. Các thiết bị phân tích hóa lý gồm XRD, SEM, FTIR, EDX được sử dụng để đặc trưng các hạt nano Vàng sau khi tổng hợp ở các điều kiện tối ưu. Sau đó, nano Vàng được mang đi kiểm tra khả năng kháng 6 chủng vi khuẩn, trong đó có 3 vi khuẩn Gr (-) gồm *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*, 3 vi khuẩn Gr (+) gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus*.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn được lấy từ Phòng thí nghiệm vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Muối vàng ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) được mua từ công ty Acros

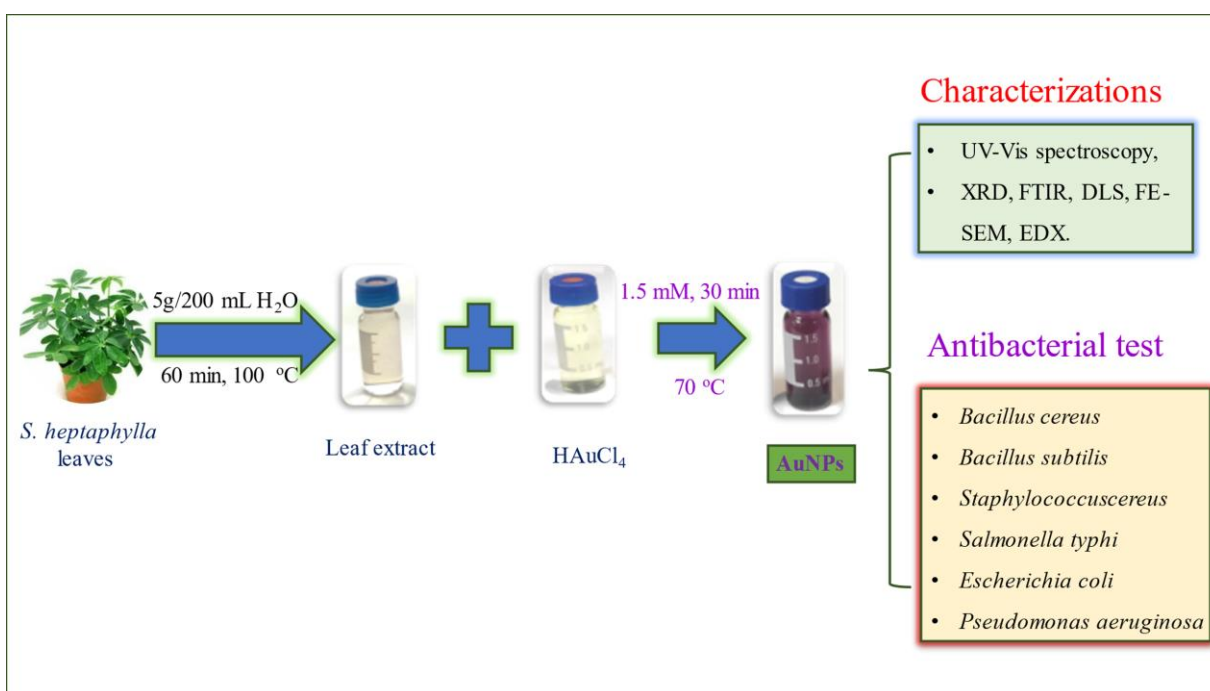
Organics (Belgium). Mueller Hinton Agar (MHA) và Yeast extract mua từ công ty HiMedia (Ấn Độ). Peptone và sodium chloride đặt từ công ty JHD Chemical – Trung Quốc. Đĩa kháng sinh giấy tẩm sẵn Gentamycin được cung cấp bởi công ty Nam Khoa Bio Tek. (Việt Nam). Ethanol 96% nguồn gốc từ Việt Nam.

2.2 Điều chế dịch chiết

Lá ngũ gia bì sau khi lấy về, chọn những lá già, sẫm màu, lớn, không bị dập, sau đó rửa sạch bằng nước vòi và rửa lại bằng nước cất để loại bỏ chất bẩn. Sau khi được làm sạch, tiến hành cắt nhỏ lá để chiết lấy dịch chiết. Khối lượng lá ngũ gia bì chân chim là 5 g và lượng nước cất dùng để chiết là 200 mL, thời gian chiết là 60 phút tại nhiệt độ sôi 100 °C. Sau đó dịch chiết được lọc qua giấy lọc để tách phần nước trong, phần cặn và lá ngũ gia bì sau khi chiết sẽ được bỏ đi, dịch chiết được bảo quản trong bình kín và sử dụng trong ngày.

2.3 Qui trình tổng hợp nano Vàng

Qui trình điều chế AuNPs sử dụng dung dịch HAuCl₄ và dịch chiết theo tỉ lệ 1:1 theo sơ đồ Hình 1. Phép đo UV-Vis với độ hấp thụ cực đại đặc trưng của AuNPs ở 540 nm đã được sử dụng để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng [17]. Nghiên cứu đặc trưng tính chất hóa lý và khảo sát khả năng kháng khuẩn được thực hiện đối với các hạt AuNPs tổng hợp ở ba điều kiện tối ưu.



Hình 1: Sơ đồ tổng hợp AuNPs từ dịch chiết lá Ngũ Gia Bì

2.4 Khảo sát các yếu tố tổng hợp ảnh hưởng đến khả năng tạo nano Vàng

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Thực hiện phản ứng giữa dung dịch Au³⁺ và dịch chiết lá ngũ gia ở các điều kiện sau: nồng độ 0,5 mM; nhiệt độ 50°C, tỉ lệ dịch chiết: Au³⁺ là 1 : 1; thời gian tổng hợp tương ứng lần lượt là: 10, 20, 30, 40 phút. Sau mỗi thí nghiệm, mẫu được mang đi đo UV-Vis để xác nhận sự hình thành của nano Vàng. Phổ UV-Vis của nano Vàng có peak đặc trưng trong khoảng 540-570 nm. Thời gian tổng hợp tối ưu được lựa chọn dựa trên cường độ và vị trí của peak 540-570 nm. Cường độ peak càng cao, số lượng hạt nano Vàng trong dung dịch được tạo thành càng nhiều.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ phản ứng

Sự ảnh hưởng của nồng độ phản ứng đến khả năng tạo nano Vàng được khảo sát dựa trên việc thực hiện phản ứng giữa dung dịch Au^{3+} và dịch chiết lá ngũ gia bì ở các điều kiện: thời gian 30 phút; nhiệt độ 50°C; tỉ lệ dịch chiết: Au^{3+} là 1 : 1 ; bốn nồng độ khảo sát tương ứng là 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM và 2 mM.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Sự ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến khả năng tạo nano Vàng được khảo sát dựa trên việc thực hiện phản ứng giữa dung dịch Au^{3+} và dịch chiết lá ngũ gia bì ở các điều kiện: thời gian 30 phút, nồng độ 1,5 mM; tỉ lệ dịch chiết: Au^{3+} là 1 : 1 ; tương ứng với các nhiệt độ lần lượt là 40, 50, 60, 70, 80°C.

2.5. Phương pháp phân tích các đặc tính hóa lý của AuNPs

Kính hiển vi điện tử quét (FE-SEM) thực hiện trên máy FE-SEM S4800 (Nhật Bản) được vận hành để nghiên cứu hình thái và kích thước của các hạt nano vàng. Phân bố kích thước động học của hạt nano Vàng được phân tích trên máy Horiba SZ-100. Phương pháp phổ tán xạ năng lượng tia X sử dụng đầu dò tích hợp trên máy FE-SEM S4800 đã phân tích thành phần các nguyên tố có trong mẫu nano Vàng. Phương pháp nhiễu xạ tia X đã được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc tinh thể của mẫu nano vàng trên máy Shimadzu 6100 diffractometer (Nhật Bản). Máy XRD với bức xạ $CuK\alpha$ có bước sóng 1,5406 nm hoạt động ở dòng điện 30 mA, điện áp 40 kV có tốc độ quét 0,05 °/s, bước nhảy 0,02° trong phạm vi 2 θ từ 10° đến 80°. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được sử dụng để kết luận sự hiện diện của các nhóm chức hữu cơ có trong mẫu nano vàng, thực hiện trên máy quang phổ 27 Bruker Tensor (Đức) trong phạm vi số sóng 4000-500 cm^{-1} . Ngoài ra, độ bền của dung dịch nano Vàng theo thời gian cũng được đánh giá, dựa trên thế zeta của dung dịch.

2.6. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của nano Vàng

Các mẫu nano Vàng ở 4 nồng độ 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm được khảo sát khả năng kháng 6 chủng vi khuẩn, trong đó có 3 vi khuẩn Gr (-) gồm *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*, 3 vi khuẩn Gr (+) gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus*, sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch trên môi trường MHA.

Bảo quản giống: Cây ria vi khuẩn trên môi trường LB, đem ủ ở 37 °C từ 16-24 giờ và chọn ra các khuẩn lạc đặc trưng. Tăng sinh các khuẩn lạc đặc trưng không bị nhiễm trên môi trường lỏng LB rồi ủ ở 37 °C, lắc với tốc độ 150 rpm trong 24 giờ. Đồng thời chuẩn bị sẵn glycerol vô trùng, eppendorf đã hấp vô trùng. Sau đó, tiến hành bơm 150 μ L dịch vi khuẩn với 150 μ L glycerol 50%, bảo quản trong tủ lạnh đông sâu ở -80°C để giữ giống cho quá trình thí nghiệm.

Tăng sinh giống: Rã đông vi khuẩn sau khi lấy ra từ tủ đông sâu bằng cách hạ nhiệt độ từ từ xuống để tránh vi khuẩn sốc nhiệt và chết. Sau đó thực hiện quá trình hoạt hóa vi khuẩn bằng cách tăng sinh với 5 mL môi trường LB ủ ở 37 °C trong khoảng thời gian từ 16-24 giờ.

Pha loãng bằng nước muối sinh lý huyền phù vi khuẩn sau khi được tăng sinh cho đến khi đạt được độ đục khoảng từ $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, tương đương 0.5 McFarland, sử dụng trong khảo sát hoạt tính kháng khuẩn.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

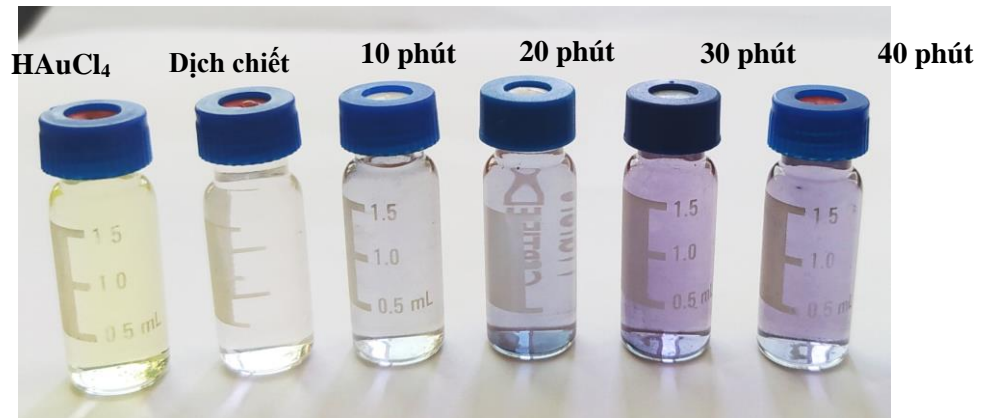
Khả năng kháng vi sinh vật được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp Bauer [19]. Mỗi đĩa Petri chứa 20 – 25 mL môi trường Mueller-Hinton Agar đã được vô trùng và bơm 100 μ L dịch vi khuẩn đã tăng sinh, trải đều cho đến khi bề mặt thạch khô hoàn toàn. Đục lỗ thạch chứa 30 μ L dịch chiết nano ở 4 nồng độ khác nhau, đối chứng (+) là đĩa kháng sinh Gentamicin, đối chứng (-) là dịch chiết, yếu tố kiểm soát nước cất vô trùng. Dung dịch nghiên cứu được thấm vào môi trường thạch trong 2 giờ và sau đó được đem ủ ở 37 °C trong 18-24 giờ trên các đĩa Petri tại 4 °C. Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần.

Sự đánh giá hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện thông qua đường kính vòng kháng khuẩn. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn được xử lý bằng phần mềm Statgraphics18.

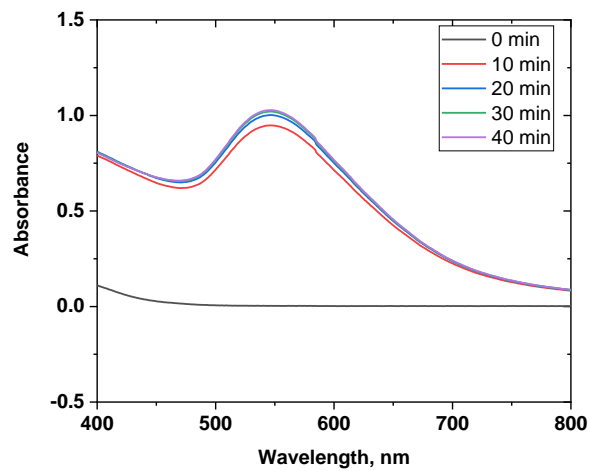
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát điều kiện tổng hợp nano Vàng

Kích thước của các hạt nano Vàng thu được bị ảnh hưởng lớn bởi ba thông số tổng hợp chính gồm thời gian phản ứng, nồng độ ion kim loại, và nhiệt độ phản ứng. Tổng hợp nano Vàng ở các điều kiện tối ưu sẽ tạo ra dung dịch nano Vàng với kích thước hạt hợp lý, khó bị keo tụ hơn theo thời gian do có độ bền vững nhiệt động cao hơn.

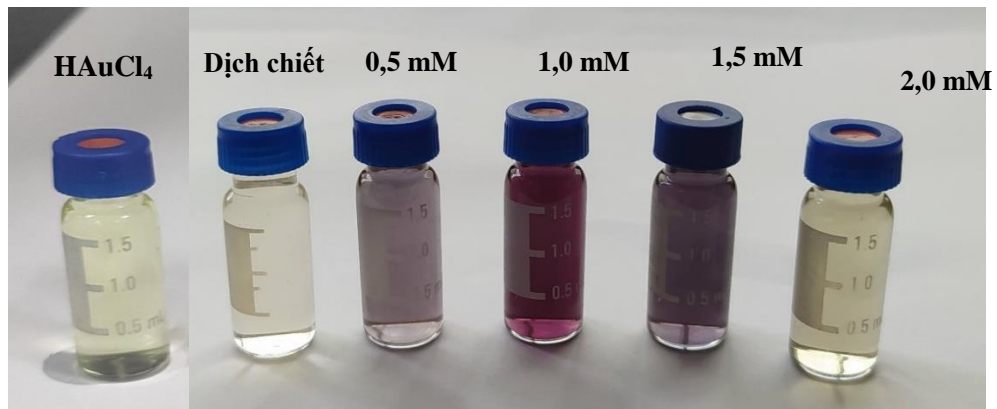


Hình 2: Ảnh mẫu của dung dịch nano Vàng tổng hợp theo các mốc thời gian

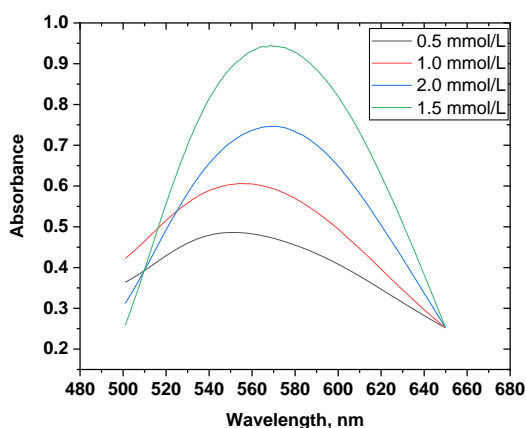


Hình 3: Phổ UV-Vis của dung dịch nano Vàng tổng hợp theo các mốc thời gian

Dung dịch nano đi đo quang một lần sau mỗi 10 phút để tìm ra thời gian tổng hợp tối ưu (Hình 2), trong khi đó nhiệt độ và nồng độ ion được giữ cố định. Kết quả UV-Vis (Hình 3) chỉ ra rằng, 30 phút là thời gian tối ưu để tổng hợp nano Vàng. Độ hấp thụ quang học hầu như không thay đổi với thời gian tổng hợp lớn hơn 30 phút, cho thấy lượng nano Vàng sinh ra là cực đại.

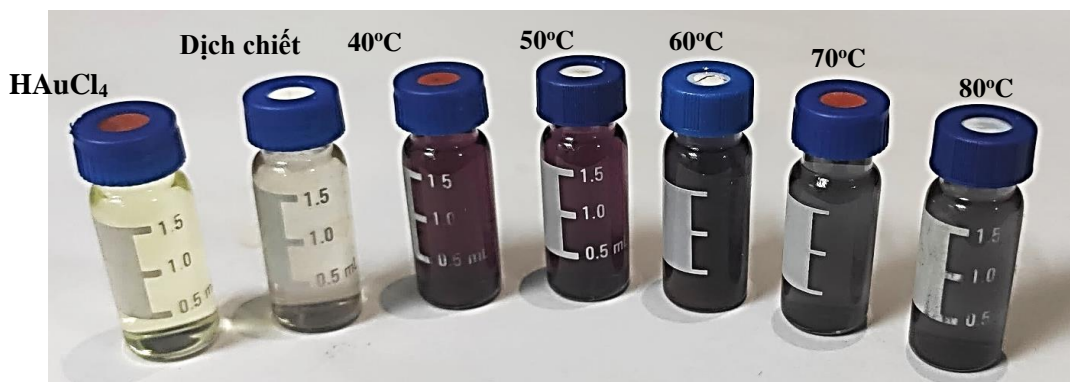


Hình 4: Ảnh của các mẫu nano Vàng tổng hợp theo các nồng độ khác nhau

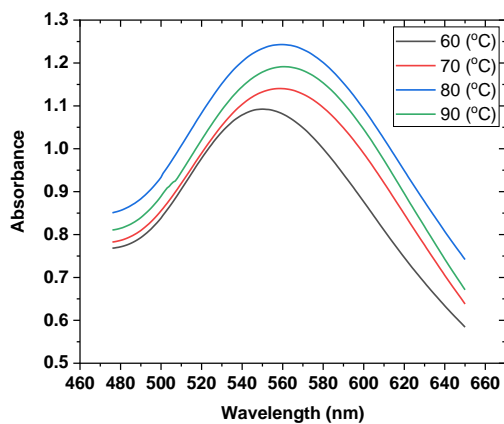


Hình 5: Phổ UV-Vis của các mẫu nano Vàng tổng hợp theo các nồng độ khác nhau

Dung dịch HAuCl_4 có nồng độ ion Au^{3+} trong khoảng 0,5-2 mM đã được khảo sát, trong khi giữ cố định thời gian và nhiệt độ (Hình 4). Nồng độ ion ảnh hưởng mạnh đến sự hình thành của hạt nano. Nồng độ ion Au^{3+} càng cao, số lượng hạt nano sinh ra càng nhiều, dẫn đến độ hấp thụ quang học càng lớn. Độ hấp thụ quang học là cao nhất tại nồng độ Au^{3+} 1,5 mM. Tại nồng độ Au^{3+} cao hơn, số lượng hạt nano tạo ra quá nhiều, các hạt nano có thể dính lại với nhau gây ra hiện tượng keo tụ, làm độ hấp thụ quang học giảm. Dựa vào cường độ peak trong khoảng 540-570 nm, xác định được nồng độ tối ưu để tổng hợp nano Vàng là 1,5 mM.



Hình 6: Ảnh của các mẫu nano Vàng tổng hợp theo các nhiệt độ khác nhau



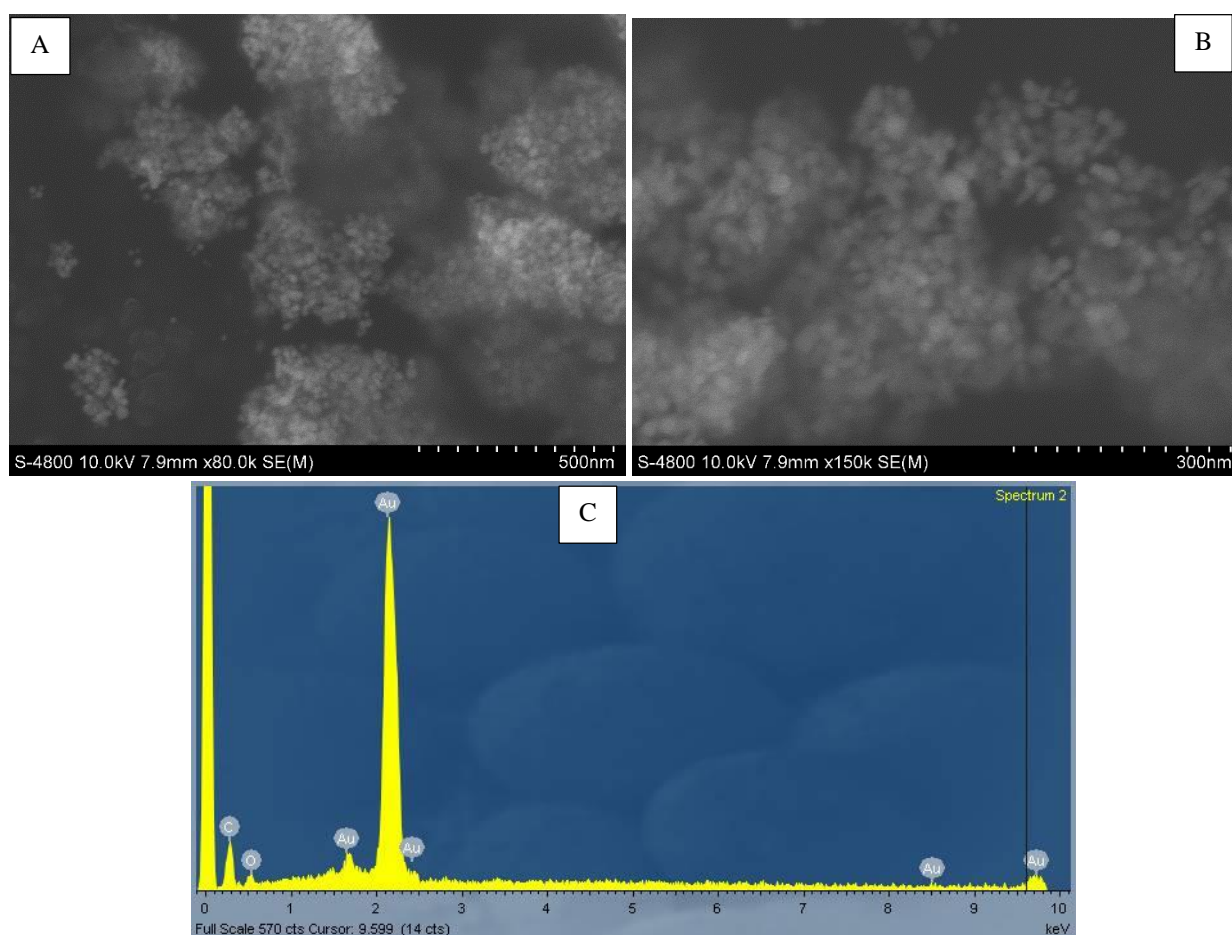
Hình 7: Phổ UV-Vis của các mẫu nano Vàng tổng hợp theo các nhiệt độ khác nhau

Cuối cùng, nồng độ và thời gian được giữ cố định để khảo sát nhiệt độ tổng hợp trong khoảng 60-90 °C (Hình 6). Kết quả UV-Vis chỉ ra rằng, độ hấp thụ quang học tăng khi nhiệt độ tăng từ 60°C đến 80°C, sau đó đạt cực đại ở 80 °C. Ở nhiệt độ cao hơn, mật độ quang giảm do số lượng hạt nano giảm. Nguyên nhân số và chất lượng giảm nhanh do các phân tử chuyển động nhanh, dẫn đến hạt nano tạo thành nhanh, dễ bị keo tụ. Như vậy, nhiệt độ tối ưu để tổng hợp nano Vàng là 80 °C.

3.2 Đặc trưng hóa lý của nano Vàng

Hình thái, kích thước và phân tích thành phần nguyên tố

Kích thước và hình thái bề mặt của các hạt nano được xác định bằng ảnh chụp SEM (Hình 8A&B). Thành phần nguyên tố hóa học của mẫu nano Vàng được phân tích bằng phương pháp quang phổ tán sắc năng lượng tia X (Hình 8C). Ảnh SEM cho thấy rằng các hạt nano Vàng có dạng hình cầu kích thước dưới 50 nm, các hạt tách rời riêng biệt, không quan sát thấy sự keo tụ hoặc dính chùm lại với nhau. Đối với phân tích EDX, tín hiệu nguyên tố Au lần lượt tại 2,1, 8,5 và 9,7 keV. Hàm lượng vàng trong mẫu nano khoảng 68,87%, carbon 27,92% và oxy 3,21%. Hàm lượng carbon và oxy trong mẫu nano Vàng là do sự hiện diện của lớp chất hữu cơ bao quanh các hạt nano, có vai trò như một lớp giáp ngoài làm tăng độ bền vững của các hạt nano này. Sự xuất hiện của lớp hữu cơ có thể là do ion Au^{3+} có điện tích cao đã tương tác mạnh hơn với các nhóm chức phân cực của các phân tử hữu cơ trong dịch chiết.



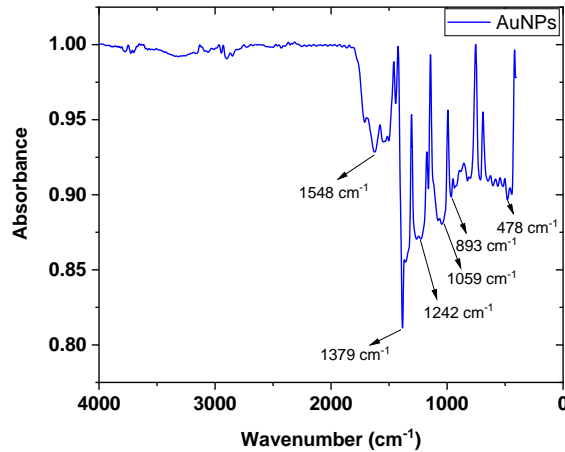
Hình 8: Ảnh SEM mẫu nano Vàng ở độ phóng đại 500 nm (A), độ phóng đại 300 nm (B) và Phổ EDX (C)

Kết quả phân tích FT-IR

Kết quả phân tích FTIR của mẫu nano Vàng cho thấy sự xuất hiện các dải phổ ở các đỉnh 1548, 1379, 1242, 1059, 893, và 478 cm^{-1} (Hình 9). Dựa trên kết quả phân tích phổ FTIR, có thể xác định được các nhóm chức của các phân tử hữu cơ chứa trong dịch chiết để ổn định các hạt nano Vàng [20]. Sự xuất hiện các peak trong phổ FTIR là nhờ vào sự thay đổi momen lưỡng cực của các liên kết cộng hóa trị trong phân tử hữu cơ.

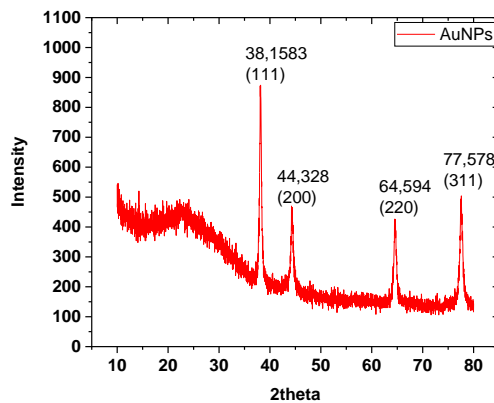
cơ phân tử sẽ hấp thụ năng lượng hồng ngoại ở những tần số nhất định, từ đó dẫn đến sự xuất hiện của các dải hấp thụ.

Các đỉnh phổ ở 1458 và 1059 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết N-H và C-N. Các đỉnh phổ tại số sóng 1379 cm^{-1} tương ứng với các liên kết C-O trong nhóm cacboxylic acid. Các đỉnh phổ ở khoảng 1242 và 893 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của các nhóm OH trong polysaccharide. Các phân tử hữu cơ chứa các nhóm chức này đã bám vào các hạt nano sau khi kết thúc phản ứng, đóng vai trò là chất ổn định, ngăn cản sự keo tụ dung dịch nano Vàng. Ngoài ra, liên kết Au-O cũng được tìm thấy thông qua sự xuất hiện peak ở vị trí 478 cm^{-1} . Điều này cũng đã chứng minh sự tồn tại của lớp chất hữu cơ bao quanh hạt nano Vàng, tương quan với kết quả phân tích EDX.



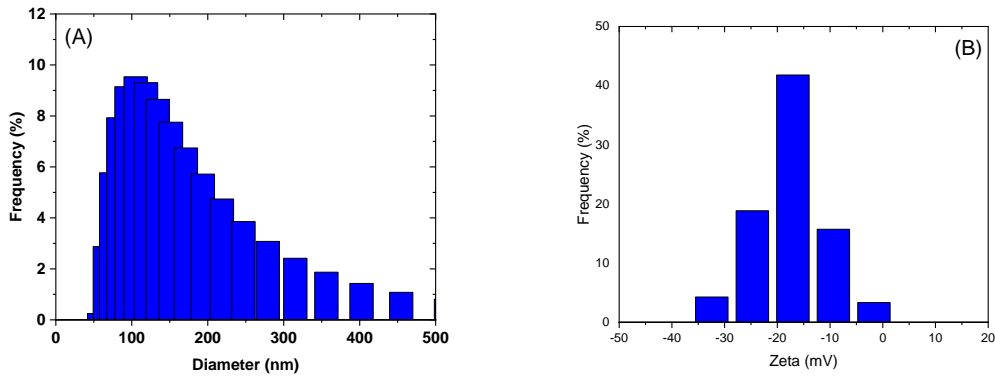
Hình 9: Phổ FTIR của mẫu nano Vàng

Cấu trúc tinh thể của mẫu nano Vàng được xác định bởi giản đồ XRD, (Hình 10). Trên giản đồ XRD của mẫu nano Vàng xuất hiện các peak nhiễu xạ 2θ ở các vị trí $38,1583^\circ$, $44,328^\circ$, $64,594^\circ$ và $77,578^\circ$, tương ứng với các mặt phẳng nhiễu xạ (111), (200), (220) và (311). Các thông số thu được trùng khớp với tinh thể lập phương tâm diện của nguyên tố vàng với giản đồ XRD chuẩn PDF ICDD 00-004-0784 [21]. Có thể thấy, mặt có đỉnh cao nhất trong giản đồ XRD của nano Vàng là mặt (111), chứng minh rằng các tinh thể nano phát triển ưu tiên theo mặt này. Như vậy, xác định chiều rộng bán đỉnh theo mặt (111) này có thể tính ra kích thước trung bình của tinh thể theo phương trình Debye-Scherrer $d = 0,9\lambda/\beta\cos\theta$, với ' λ ' là nguồn bức xạ tia X ($1,540\text{ nm}$), ' β ' là $(\pi/180) \times \text{FWHM}$ (full width at half maximum - chiều rộng bán đỉnh, radian); d là đường kính trung bình của tinh thể (nm), và ' θ ' là góc nhiễu xạ Bragg. Theo công thức này, kích thước trung bình của tinh thể nano Vàng là $21,4\text{ nm}$.



Hình 10: Giản đồ XRD của mẫu nano Vàng

Từ biểu đồ phân bố kích thước hạt nano Vàng (Hình 11A) ta thấy được kích thước hạt nano Vàng phân bố không đồng đều trong dung dịch. Phân bố kích thước hạt nằm trong khoảng từ 65-450 nm, tập trung chủ yếu nhiều nhất trong khoảng kích thước từ 117-150 nm. Nano Vàng trong dung dịch có kích thước trung bình của hạt là 148,5 nm. Cần chú ý rằng, đây là kích thước động học của hạt nano Vàng, lớn hơn nhiều so với kích thước hạt được xác định bởi kính hiển vi điện tử quét. Nguyên nhân là phân bố kích thước động học của hạt nano Vàng được xác định bởi kỹ thuật phân tán ánh sáng động học, đã tính cả đường kính lớp hữu cơ bao quanh lõi nano Vàng. Sự khác biệt về kích thước xác định bởi hai kỹ thuật, cũng là minh chứng cho sự tồn tại của lớp hữu cơ đã đóng vai trò lớp giáp làm bền hạt nano Vàng trong dung dịch.

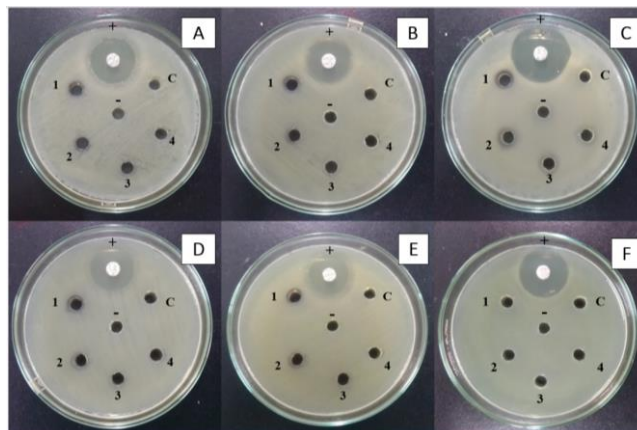


Hình 11: Phân bố kích thước hạt (A) và thế zeta (B) của nano Vàng trong dung dịch

Độ bền của dung dịch nano Vàng có thể được đánh giá thông qua giá trị thế zeta (Hình 11B). Như đã thấy trong Hình 11B, các hạt nano Vàng đều mang điện tích âm với giá trị điện tích trung bình -17,6 mV. Cần lưu ý rằng có hai cơ chế ổn định chính đối với các nano Vàng tổng hợp từ dịch chiết. Cơ chế đầu tiên dựa trên sự tương tác tĩnh điện giữa các hạt nano Vàng tích điện. Giá trị thế zeta lớn hơn 30 mV hoặc nhỏ hơn -30 mV là cần thiết để các hạt nano Vàng bền trong dung dịch, vì sở hữu lực đẩy mạnh giữa hai hạt mang điện cùng dấu [22]. Cơ chế thứ hai liên quan đến hiệu ứng không gian của các phân tử hữu cơ bao quanh lõi nano Vàng. Các phân tử hữu cơ này hoạt động như một lớp bảo vệ để ngăn các hạt nano dính vào nhau. Trên thực tế, dung dịch nano Vàng được tổng hợp từ dịch chiết Ngũ Gia Bì đã tồn tại song song cả hai cơ chế làm bền kể trên, do đó mẫu nano thu được ổn định trong hơn hai tuần mà không có bất kỳ thay đổi nào về màu sắc hoặc sự keo tụ.

3.3 Khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của dung dịch nano Vàng từ dịch chiết lá cây Ngũ Gia Bì được thử nghiệm với 6 loại vi khuẩn, trong đó có 3 chủng vi khuẩn Gr (-) gồm *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*, 3 chủng Gr (+) gồm: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus*.



Hình 12: Kết quả kháng khuẩn của các hạt nano Vàng

Trong hình, ta có:

A: *Bacillus cereus*, B: *Bacillus subtilis*, C: *Staphylococcus cereus*, D: *Salmonella typhi*, E: *Escherichia coli*, F: *Pseudomonas aeruginosa*. (+): Đối chứng dương (Gentamicin); (-): Đối chứng âm (dịch chiết); N1: Dung dịch nano vàng ban đầu 80 ppm; N2: Dung dịch nano Vàng với nồng độ 40 ppm; N3: Dung dịch nano Vàng với nồng độ 20 ppm; N4: Dung dịch nano Vàng với nồng độ 10 ppm.

Bảng 2. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn của nano Vàng

Vi khuẩn	Đối chứng (+) (mm)	Nồng độ dung dịch nano Vàng			
		80 ppm (mm)	40 ppm (mm)	20 ppm (mm)	10 ppm (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	21,33 ^a ± 0,58	7,67 ^b ± 0,58	6	6	6
<i>Bacillus subtilis</i>	21,67 ^a ± 0,58	8,67 ^b ± 0,58	7,33 ^c ± 1,15	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,33 ^a ± 0,58	7,37 ^b ± 1,18	6	6	6
<i>Salmonella typhi</i>	22,33 ^a ± 1,15	7,33 ^b ± 0,67	6	6	6
<i>Escherichia coli</i>	20,67 ^a ± 1,53	7,03 ^a ± 1,05	6	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,67 ^a ± 1,15	6	6	6	6

Trong cùng một hàng các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa ($\alpha = 0,05$)

Theo bảng 2, kết quả nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của nano Vàng cho thấy, nano Vàng được tổng hợp từ lá cây Ngũ Gia Bì có khả năng kháng 5 chủng vi khuẩn lần lượt là *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 7,03^a ± 1,05 mm đến 8,67^b ± 0,58 mm. Mẫu nano Vàng thể hiện tính kháng khuẩn mạnh nhất đối với chủng *Bacillus subtilis* với đường kính vòng kháng là 8,67^b ± 0,58 mm. Mẫu nano Vàng thu được hoàn toàn không thể hiện tính kháng khuẩn đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* ở tất cả các nồng độ khảo sát. Bên cạnh đó, mẫu dung dịch nano Vàng tổng hợp từ dịch chiết lá Ngũ Gia Bì chỉ thể hiện khả năng kháng khuẩn bắt đầu từ nồng độ 80 ppm đối với các chủng vi khuẩn nghiên cứu, còn ở nồng độ dưới 40 ppm hầu như không thể hiện tính kháng khuẩn đáng kể. Chủng *Bacillus subtilis* cũng là chủng duy nhất quan sát được vòng kháng khuẩn với đường kính 7,33^c ± 1,15 ở nồng độ nano Vàng 40 ppm.

Đối với một số nghiên cứu trước đó như sử dụng dung dịch nano Vàng từ dịch chiết từ lá cây *Pistacia atlantica* với 4 chủng *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* đều thể hiện đường kính vòng kháng khuẩn ≥ 20 mm. Hoặc loài *Vitex negundo* cũng được thực hiện kháng khuẩn với 4 chủng trên thì đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 17,7 đến 22 mm [23]. Do đó, có thể thấy được dung dịch nano Vàng được tổng hợp từ dịch chiết Ngũ Gia Bì thể hiện khả năng kháng khuẩn rất yếu.

4 KẾT LUẬN

Tinh thể nano Vàng tinh khiết có kích thước hạt dưới 50 nm đã được điều chế thành công theo hướng tiếp cận xanh từ dịch chiết lá Ngũ Gia Bì. Trong công trình này, dịch chiết lá Ngũ Gia Bì đã được chứng minh là hiệu quả của trong việc khử các ion vàng thành các hạt nano và ổn định các hạt nano Vàng. Các hạt nano Vàng có thế zeta -17,6 mV ổn định trong dung dịch hơn một tuần và phân tán tốt trong môi trường nước. Đối với khảo sát kháng khuẩn, các hạt nano Vàng thể hiện khả năng kháng khuẩn chống lại năm loại vi khuẩn *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 7,03^a ± 1,05 mm đến 8,67^b ± 0,58 mm. Mẫu nano Vàng thu được không thể hiện tính kháng khuẩn đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa*. Khả năng không kháng

khuẩn khi sử dụng ở nồng độ thấp hơn 40 ppm cho thấy nano Vàng tổng hợp xanh từ dịch chiết lá Ngũ Gia Bì có tiềm năng ứng dụng trong phân phối thuốc thông qua đường uống, mà không ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đường ruột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z. Aguilar, E. Drexler, Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology, *Nanomater. Med. Appl*, pp. 543–4, 2012.
- [2] X. Hu et al., Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 8:990, pp. 1-17. doi: 10.3389/fbioe.2020.00990
- [3] Zheng Hua et al., Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection, *Biosensor and Bioelectronics*. vol. 179, p. 113076, 2021.
- [4] V. Soni et al., Sustainable and green trends in using plant extracts for the synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review, *Environ. Res.*, vol. 202, p. 111622, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.ENVRES.2021.111622.
- [5] V. D. Doan et al., Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of *Codonopsis pilosula* roots for antibacterial and catalytic applications, *J. Nanomater.*, vol. 2020, pp. 1–18, Jun. 2020, doi: 10.1155/2020/8492016.
- [6] C. Vishwasrao et al. Green synthesis of silver nanoparticles using sapota fruit waste and evaluation of their antimicrobial activity, *Waste and Biomass Valorization*, vol. 10, pp. 2353–2363, 2019.
- [7] Princy Kaithavelikkakath Francis et al. A novel green synthesis of gold nanoparticles using seaweed *Lobophora variegata* and its potential application in the reduction of nitrophenols. *Part. Sci. Technol.* 2018, 1–6.
- [8] Đ. V. H. Thiện và các cộng Sự, Sử dụng nước ép chanh tổng hợp nano Vàng, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. 30, pp. 22–28, 2014.
- [9] N. N. K. Anh, N. T. T. Nhung, and N. T. D. Huong, Điều chế hạt nano Vàng sử dụng chất khử trong lá trà định hướng ứng dụng trong mỹ phẩm, *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54(7), pp. 77–78, 2018, doi: 10.22144/ctu.jvn.2018.126.
- [10] N. T. L. Hương, Tổng hợp xanh nano Vàng bằng dịch chiết vỏ trái thơm và ứng dụng làm xúc tác cho phản ứng xử lý 4-Nitrophenol, *J. Sci. Technol. - IUH*, vol. 49, no. 01, pp. 5–14, 2021, doi: 10.46242/jstiuh.v49i01.1644.
- [11] A. Ahmad et al., Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, thermomonosporasp, *ACS symp. Ser. Am. Chem. Soc.*, vol. 19, pp. 3550 – 3553, 2003.
- [12] L. Castro et al., Biological synthesis of metallic nanoparticles using algae, *IET Nanobiotechnology*, vol. 7, no. 3, pp. 109–116, 2013, doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0041.
- [13] N. Thangamani and N. Bhuvaneshwari, Green synthesis of gold nanoparticles using *Simarouba glauca* leaf extract and their biological activity of micro-organism, *Chem. Phys. Lett.*, vol. 732, 2019, doi: 10.1016/j.cplett.2019.07.015.
- [14] G. G Kaplan, The global burden of IBD: from 2015 to 2025, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 12(12), pp. 720–727, 2015.
- [15] S. Zhu et al., Orally administered gold nanoparticles protect against colitis by attenuating Toll-like receptor 4- and reactive oxygen/nitrogen species-mediated inflammatory responses but could induce gut dysbiosis in mice, *J Nanobiotechnol*, vol. 16, pp. 1-18, 2018.
- [16] Y. Wang et al., The Genus *Schefflera*: a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, p.1–53, 2020. doi.org/10.1016/j.jep.2020.113675.
- [17] Y. Liu et al., Efficient extraction of anti-inflammatory active ingredients from *Schefflera octophylla* leaves using ionic liquid-based ultrasonic assisted extraction coupled with HPLC. *Molecules*, vol. 24(16), p.1–13, 2019. doi.org/10.3390/molecules24162942.
- [18] V. D. Doan et al., Noble metallic nanoparticles from waste *Nypa fruticans* fruit husk: Biosynthesis, characterization, antibacterial activity and recyclable catalysis, *Arab. J. Chem.*, vol. 13, no. 10, pp. 7490–7503, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.08.024.
- [19] A. W. Bauer et al., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), p.493–496, 1996.
- [20] T. T. Vo et al., Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles from *Lactuca indica* leaf extract and their application in catalytic degradation of toxic compounds, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 30, no. 2, pp. 388–399, 2020, doi: 10.1007/s10904-019-01197-x.
- [21] V.D. Doan et al., Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Litsea cubeba* Fruit Extract for Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol,” *J. Nanomater.*, vol. 2020, pp. 1–10, Jun. 2020, doi: 10.1155/2020/4548790.
- [22] V. Malapermal et al., Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) using silver nanoparticles, *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 1294–1305, 2017, doi:

10.1016/j.sjbs.2015.06.026.

- [23] M. Hamelian et al., Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using Pistacia extract. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 93, p.1–10, 2018. doi.org/10.1016/j.jtice.2018.07.018.

GREEN SYNTHESIS AND STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GOLD NANOPARTICLES OBTAINED FROM *SCHEFFLERA HEPTAPHYLLA* LEAVES EXTRACT

NGUYEN THI LAN HUONG^{1*}, BACH THI MY HIEN²

¹*Institute Of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh city*

²*Faculty of Chemical Enginerring, Industrial University of Ho Chi Minh city*

nguyenthilanhuong@iuh.edu.vn

Abstract. Currently, gold nanoparticles (AuNPs) are attracting the attention of scientists because of their potential applications as promising drug delivery materials/anti-inflammatory agents in the rectum via oral administration. However, AuNPs are also known to have strong antibacterial properties, causing negative effects on the gut microbiota. Besides, the use of AuNPs synthesized from toxic commercial chemicals will adversely affect human health and may not suitable for clinical applications. In this work, gold nanoparticles in spherical shape with size of less than 50 nm were successfully synthesized by a green approach, using the leaf extract from *Schefflera heptaphylla* plant as a reducing and a stabilizing agents. Antibacterial study showed that gold nanoparticles even at high gold concentration revealed a week resistant property to 5 strains of bacteria, including *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* with antibacterial ring diameter ranging from 7.03 ± 1.05 mm to 8.67 ± 0.58 mm. The obtained gold nano sample did not show antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* strain at all investigated concentrations. Thus, with not too strong antibacterial properties, gold nanoparticles synthesized from *Schefflera heptaphylla* leaf extract can become a potential material in drug delivery application.

Keywords. Green synthesis, gold nanoparticles, *Schefflera heptaphylla*, biological activity, antibacterial activity.

Ngày nhận bài: 23/07/2022

Ngày chấp nhận đăng: 25/10/2022