

Е.А. Лисенков ¹, О.В. Стрюцький ², Л.П. Клименко ¹, В.Л. Демченко ²

СИНТЕЗ, СТРУКТУРА ТА АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА, СФОРМОВАНИХ У ПРИСУТНОСТІ ГІПЕРРОЗГАЛУЖЕНОЇ ІОННОЇ РІДИНИ

¹ Чорноморський національний університет імені Петра Могили

вул. 68 десантників, 10, Миколаїв, 54003, Україна, E-mail: ealysenkov@ukr.net

² Інститут хімії високомолекулярних сполук Національної академії наук України

Харківське шосе, 48, Київ, 02160, Україна

Наночастинки срібла (НЧС) завдяки розмаїттю їхніх форм та властивостей є перспективними при отриманні наноматеріалів різного функціонального застосування. На сьогоднішній день незалежно від методу отримання НЧС існує проблема стабілізації їхньої поверхні для запобігання агрегації, яка значно знижує їхню активність та перешкоджає рівномірному розподілу при отриманні наноматеріалів. Метою роботи був синтез наночастинок срібла з використанням олігомерної іонної рідини (ОІР) та вивчення їхньої структури та антимікробних властивостей. У роботі вперше використано розроблену нами аніонну ОІР гіперрозгалуженої будови як стабілізатор поверхні в синтезі НЧС. Синтез НЧС здійснювали відновленням іонів Ag у складі AgNO₃ тринатрійцитратом у присутності даної ОІР. Використовуючи методи ІЧ-спектроскопії, рентгеноструктурного аналізу, електронної мікроскопії та дисконфузійний метод було вивчено особливості структурної організації НЧС та їхні антимікробні властивості. Встановлено, що на поверхні сформованих НЧС знаходяться адсорбовані іонні та карбонільні групи і виявлено утворення комплексів типу «гість-господар» між ОІР та іонами срібла. Утворення НЧС та комплексів між ОІР та іонами срібла також підтверджується методом рентгеноструктурного аналізу. За даними електронної мікроскопії розмір синтезованих наночастинок варіюється від 5 до 16 нм, із середнім значенням 10.2 нм. Таке середнє значення дуже близьке до значенням $D = 9.3$ нм, отримане із результатів рентгеноструктурного аналізу. Синтезовані наночастинки срібла показали дуже високу інгібувальну здатність відносно грибків *S. albicans*, при цьому ширина зони інгібування d становила 34 мм. Також дуже високу активність порошок НЧС виявляє відносно грам-позитивних бактерій *S. aureus* ($d = 30$ мм) та грам-негативних бактерій *E. coli* ($d = 12$ мм). Розроблений нами підхід до синтезу НЧС у присутності ОІР як стабілізатора поверхні при певній функціоналізації останнього відкриває нові можливості в синтезі НЧС та отриманні високодисперсних систем на їхній основі, у тому числі функціоналізованих нанокомпозитних полімерних матеріалів з антимікробними властивостями.

Ключові слова: наночастинки срібла, іонна рідина, антимікробні властивості, рентгеноструктурний аналіз, електронна мікроскопія

ВСТУП

Наночастинки срібла (НЧС) є предметом інтенсивних досліджень протягом останніх двох десятиліть. Їхні унікальні фізико-хімічні та антимікробні властивості роблять НЧС придатними для багатьох застосувань, зокрема, в областях біомедицини, медичних приладів, функціонального текстилю, косметики, харчових упаковок, харчових добавок, електроніки, побутової техніки, стоматології, дезінфікуючих засобів тощо [1].

Області застосування НЧС та їхні кінцеві властивості здебільшого залежать від їхніх розмірів, здатності до агрегації, стану поверхні тощо [2]. Однак, синтез наночастинок певного

розміру та модифікації є нетривіальною задачею.

Серед перспективних способів отримання НЧС з регульованою формою, структурою та розмірами є застосування для стабілізації їхньої поверхні олігомерів та полімерів гіперрозгалуженої будови з відповідними кінцевими функціональними групами. Описано використання як таких поліетиленімінів, поліамідів, поліамідоамінів, поліетиленоксидів, полігліцеринів, поліестерполіолів, а також їхніх похідних та співполімерів [3–6]. Іншим ефективним підходом до формування НЧС є використання іонних рідин (ІР), які завдяки схильності до самоорганізації та сегрегації на молекулярному

рівні сприяють формуванню наночастинок заданої форми та розмірів [7, 8]. Однак інформація про використання для стабілізації поверхні НЧС гіперрозгалужених олігомерів та їхніх полімерних аналогів з кінцевими іонними групами, типовими для ІР (ГР-ОІР та ГР-ПІР відповідно), є дуже обмеженою [9, 10]. При цьому останні належать до апротонних катіонних поліелектролітів, в тому числі полііоноенового типу. Відомості про використання аніонних ГР-ОІР та ГР-ПІР як в протонній, так і апротонній формах в синтезі НЧС відсутні.

Важливим аспектом при отриманні НЧС є забезпечення їхньої здатності до утворення колоїдних розчинів в органічних розчинниках та воді, що значно підвищує їхню каталітичну та антимікробну активність і розширює можливості їхнього практичного застосування, зокрема для отримання функціональних полімерних матеріалів з антимікробними та фунгіцидними властивостями різного призначення [11–15]. З цією метою для модифікації поверхні НЧС використовують ПАР, полісахариди та їхні похідні тощо. Відома лише одна робота [9] з отримання водорозчинних НЧС, стабілізованих ГР-ОІР, а саме апротонного катіонного поліелектроліту полііоноенового типу. Використання аніонних ГР-ОІР та їхніх полімерних аналогів для модифікації поверхні НЧС для забезпечення їхньої розчинності в літературі не описано.

Найбільша кількість досліджень, яка стосується НЧС, присвячена переважно вивченню їхніх антибактеріальних властивостей. Антимікробна активність наночастинок срібла була описана в багатьох наукових роботах і залежить від їхніх розмірів та доступності їхньої поверхні [2, 16, 17]. Однак, покриття наночастинок полімерами або органічними сполуками значно знижує їхню інгібувальну здатність відносно умовно-патогенних та патогенних бактерій [18]. Однак, такий ефект спостерігається не для всіх стабілізованих наночастинок. Наприклад, використання хітозану для покриття НЧС продемонструвало високу інгібувальну активність проти *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *Salmonella typhimurium*, зменшуючи кількість колоній до 95 % після 4 годин контакту [19]. Також високу антимікробну активність демонструють наночастинок, модифіковані за

допомогою органічно-неорганічного стабілізатора $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}400$ [20]. Для такого типу НЧС ширина зони інгібування відносно бактерій *E. coli* та *S. aureus* становили 27 та 30 мм відповідно.

Отже, розробка нових підходів до синтезу стабілізованих наночастинок срібла із високою антимікробною активністю є актуальною задачею. Тому метою даної роботи був синтез нових стабілізованих за допомогою іонної рідини наночастинок срібла та вивчення їхньої структури та антимікробних властивостей.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Матеріали. Циклічний ангідрид 2-сульфо-бензойної кислоти (“Aldrich” $\geq 95\%$), N-метилімідазол (“Aldrich”, 99%), AgNO_3 (фарм) і тринатрійцитрат ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, фарм) використовували без додаткової очистки; гіперрозгалужений аліфатичний оліго-естерполіол Boltorn®H30 (“Perstorp” Sweden) ММ 3500 (еквівалентна ММ олігомеру за гідроксильними групами, визначена методом ацилювання, складає 117 г/екв) очищали шляхом переосадження з ацетону в етер з наступною сушкою в вакуумі (1–3 мм.рт.ст.) при температурі 25–30 °С протягом 6 год; диметилформамід (ДМФА) переганяли при залишковому тиску 1–3 мм.рт.ст, а етанол та діетиловий етер використовували без перегонки.

Синтез аніонної протонної олігомерної іонної рідини гіперрозгалуженої будови ГР-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂ здійснювали з раніше розробленою нами методикою [21–22] вичерпним ацилюванням олігоестерполіолу (містить 32 кінцеві первинні гідроксильні групи) циклічним ангідридом 2-сульфо-бензойної кислоти та наступною нейтралізацією продукту реакції N-метилімідазолом.

Для отримання наночастинок срібла використовували цитратний метод відновлення, запропонований Туркевичем для колоїдних частинок металів [23]. НЧС отримували відновленням срібла в складі AgNO_3 тринатрійцитратом [24] у присутності запропонованого нами іонвмісного олігомера гіперрозгалуженої будови ГР-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂ як стабілізатора їхньої поверхні. До 0.941 г (0.002202 екв) ГР-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂ в 22 мл води додавали 0.125 г (0.000734 екв) AgNO_3 в

8 мл води, перемішували суміш 10 хв за кімнатної температури, добавляли 0.731 г (0.002833 екв) $C_6H_5O_7Na_3$ в 30 мл води та перемішували ще 10 хв. Далі температуру розчину піднімали до 100 °С та кип'ятили зі зворотним холодильником 1 год. При цьому колір розчину змінювався від жовтого до коричневого. Розчин фільтрували, воду випарювали при 70–75 °С, отриманий у вигляді коричневого осаду продукт вакуумували при залишковому тиску 1–3 мм.рт.ст. і температурі 75–80 °С, промивали етанолом та сушили в вакуумі (1–3 мм.рт.ст.) при 75–80 °С. Вихід продукту 0.868 г. Отриманий продукт є порошком коричневого кольору, що обумовлено наявністю поверхневого стабілізаційного шару з макромолекул ГР-ОІР навколо наночастинок срібла. Отриманий порошок розчинний у воді та нерозчинний в органічних розчинниках.

Методи дослідження. ІЧ-спектри з перетворенням Фур'є знімали на спектрофотометрі "TENSOR 37" в спектральній області 600–4000 cm^{-1} .

УФ-спектри колоїдних розчинів стабілізованих наночастинок срібла були отримані за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-2400 PC у спектральній області 300–700 нм.

Отримані зразки досліджували методом ширококутової рентгенографії на дифрактометрі XRD-7000 (Shimadzu, Японія), з використанням CuK_{α} -випромінювання ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) і графітового монохроматора. Дослідження виконували методом автоматичного покрокового сканування в режимі $U = 30 \text{ кВ}$, $I = 30 \text{ мА}$ у інтервалі кутів розсіювання від 3.0 до 80 градусів, час експозиції становив 5 с.

Морфологічні особливості отриманих НЧС досліджували методом просвічувальної електронної мікроскопії (ПЕМ) з використанням мікроскопа PEM-125K.

Антимікробну активність наночастинок вивчали методом дифузії в агар на твердому поживному середовищі Мюллера-Хінтона для бактерій, та середовищі Сабуро – для candid. Чашки Петрі з поживним середовищем засівали 10 μ L інокуляту тест-мікроорганізмів *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* з розрахунку 2·10⁵ КУО/мл. Синтезовані НЧС масою 0.1 г та диски з контрольними антибіотиками

азитроміцину та ципрофлоксацину поміщали на поверхню поживного середовища, засіяного тест-мікроорганізмами. Чашки інкубували 24 год за температури 37 °С. Показником антимікробної активності була наявність чіткої вільної від мікроорганізмів зони навколо диска зразка з наночастинами срібла. Чим більша зона навколо диска, тим вища інгібуюча ефективність зразка. Контролем слугувала область на чашці Петрі, яка не містила антимікробних препаратів. Дослід повторювали тричі. Достовірність результатів оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

В запропонованому дослідженні вперше використано аніонну протонну ГР-ОІР в синтезі НЧС для стабілізації та модифікації їх поверхні. Як таку використано запропоновану нами раніше в [21–22] сполуку ГРП-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂ (рис. 1). Наявні в складі даної ГР-ОІР гетероциклічні катіони, карбонільні та залишкові гідроксильні групи згідно [9] здатні до адсорбції на поверхні НЧС, що забезпечує стабілізацію поверхні останніх та сприяє їхньому формуванню.

Як м'який відновник срібла в даній роботі використано тринатрійцитрат, який також сприяє стабілізації поверхні утворюваних НЧС [25].

НЧС синтезували відновленням іонів срібла в складі AgNO₃ тринатрійцитратом у присутності запропонованої нами сполуки ГРП-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂ як стабілізатора їхньої поверхні. При цьому співвідношення іонів срібла та іонних груп ГР-ОІР становило 1:3 за співвідношення іонів срібла і тринатрійцитрату 1:4. Отримані НЧС є водорозчинним порошками коричневого кольору, а їхній вихід (див. Експериментальну частину) є кількісним, що свідчить на користь повноти перебігу окисно-відновних реакцій та ефективність адсорбції стабілізатора на поверхні утворюваних НЧС. Слід відзначити, що розчинність синтезованих НЧС в воді відкриває широкі можливості їхнього використання для отримання різноманітних функціональних високодисперсних систем, зокрема гідрозолів та нанокомпозитних функціональних полімерних матеріалів на їхній основі. При цьому значно спрощуються методи введення НЧС до складу полімерних

матеріалів, отримуваних з розчинів, в тому числі методом електроспіннінгу [13].

Будову НЧС досліджували методами УФ-видимої та ІЧ з перетворенням Фур'є спектроскопії.

Поява широкої смуги поглинання поверхневого плазмонного резонансу ((ППР) валентних електронів наноструктур срібла з максимумом при ~ 421 нм в УФ-видимому спектрі зразка (рис. 2) свідчить про утворення

НЧС [26]. Попередні дослідження показують, що під час утворення НЧС сферичної або майже сферичної форми, на УФ-спектрах поглинання спостерігається лише один ППР, тоді як для анізотропних частинок на графіку спостерігаються два або три ППР відповідно до їхньої форми [27]. Для синтезованих у роботі НЧС спостерігається лише один ППР, що свідчить про сферичну або майже сферичну форму отриманих наночастинок.

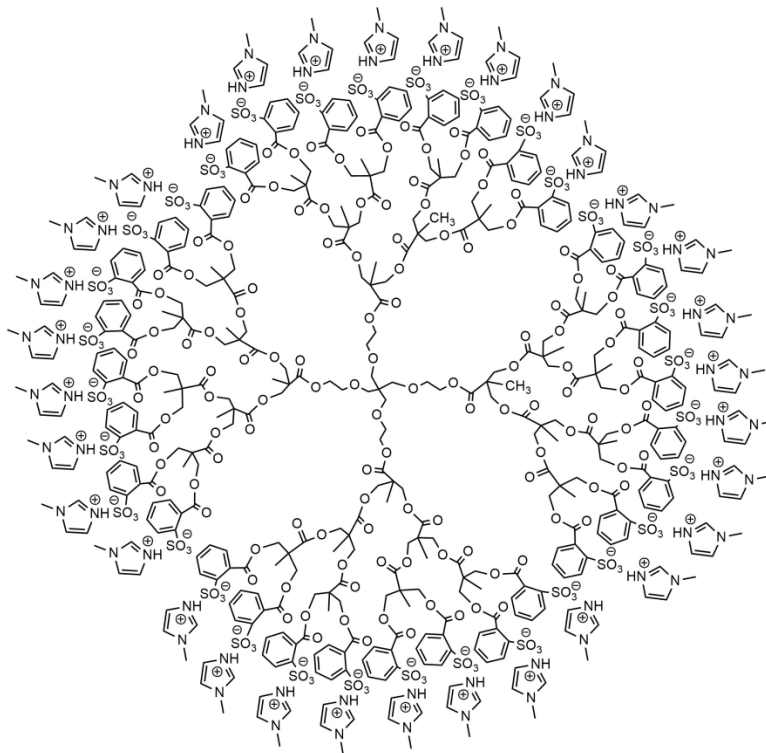


Рис. 1. ГРП-([SO₃]⁻[HMim⁺])₃₂

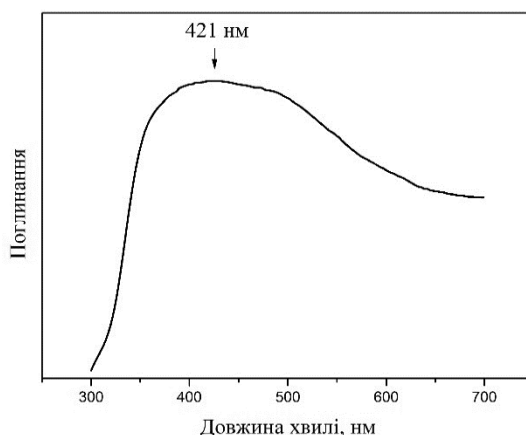


Рис. 2. Спектр поглинання синтезованих НЧС в УФ-видимому діапазоні

На рис. 3 приведено ІЧ-спектри вихідної ГР-ОІР (спектр 1) та НЧС (спектр 2). В ІЧ-спектрі НЧС в порівнянні з вихідною ГР-ОІР спостерігається значне зменшення інтенсивності смуги поглинання валентних коливань С=О зв'язків естерних груп, зсув і

зміна інтенсивностей смуг поглинання валентних коливань С-С (1360–1683 cm^{-1}) та С-Н (3000–3100 cm^{-1}) зв'язків ароматичної складової і валентних та комбінованих коливань $\text{N}^+\text{-H}$ (2300–3700 cm^{-1}).

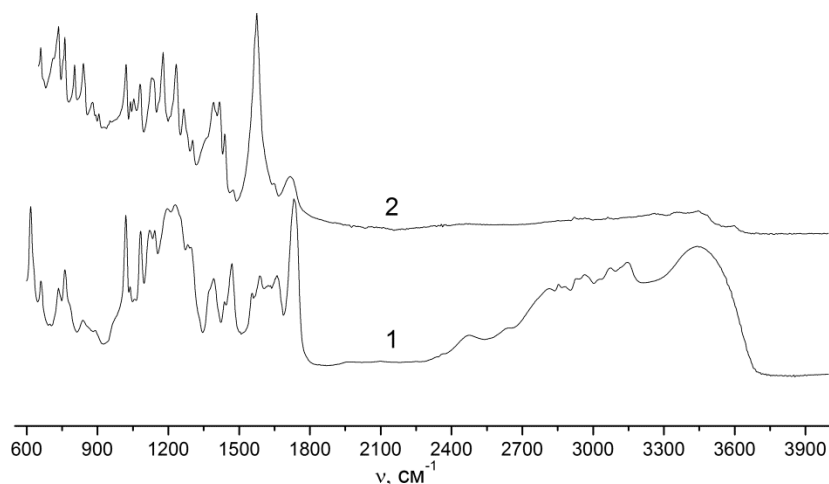


Рис. 3. ІЧ-спектри вихідної ГР-ОІР (1) та НЧС (2)

Це свідчить про адсорбцію карбонільних та іонних (їхньої катіонної складової) груп на поверхні сформованих НЧС [28] та утворення комплексів типу «гість-господар» між ГР-ОІР та іонами срібла. Слід зазначити, що в спектрі НЧС присутні інтенсивні смуги поглинання при 1418 та 1575 cm^{-1} , які відносяться до симетричних та асиметричних валентних коливань карбоксилатних аніонів тринатрійцитрату [29] та перекриваються з такими валентних коливань С-С зв'язків ароматичної складової і деформаційних коливань С-Н зв'язків метильних та метиленових груп ГР-ОІР. Це свідчить про наявність адсорбованого на поверхні синтезованих НЧС тринатрійцитрату та такого, що утворив комплекси з іонами срібла. При цьому тринатрійцитрат в поєднанні з ОІР виконує стабілізуючу дію по відношенню до утворюваних частинок колоїдного срібла.

Для встановлення структури отриманих наночастинок використовували метод ширококутового розсіяння рентгенівських променів.

На рис. 4 приведена крива розсіяння рентгенівських променів для синтезованого порошку наночастинок срібла. На дифрактограмі спостерігається велика кількість брегівських піків. Максимуми, які

відповідають кутам розсіяння 26.5°, 29.8°, 36.8°, 43.8°, 46.2°, 54.9°, 64.4°, 77.3°, вказують на наявність у системі кристалічної структури срібла і відповідають площинам (210), (122), (111), (200), (231), (142), (220), (311) відповідно [30]. Отже, результати рентгенівського розсіяння чітко показують, що наночастинок Ag, синтезовані відповідно до запропонованого у роботі методу, є кристалічними за своєю природою.

Слід зазначити, що на дифрактограмі присутні піки при 7.3°, 14.6°, 18.3° та 22.2°, які відносяться до цитрату срібла [31]. Це свідчить про наявність цитрат аніонів у складі НЧС, які, ймовірно, утворюють стабілізуючий адсорбований шар.

Оскільки синтезовані наночастинок срібла мають кристалічну структуру, то для них можна розрахувати ефективний розмір кристалітів, використовуючи формулу Шеррера (1) [32].

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta_m}, \quad (1)$$

де β – кутове розширення дифракційного максимуму (у радіанах), яке зазвичай визначається як ширина максимуму на половині його висоти («півширина»

максимуму) після попереднього вирахування фонового розсіяння; k – коефіцієнт, що залежить від кристаліта (якщо форма невідома, то $k = 0.9$); θ_m – кутове положення дифракційного максимуму. Для розрахунків ефективного розміру кристалітів для синтезованих частинок використовували

півширину максимумів, які вказують на кристалічну структуру срібла (рис. 5 а).

У таблиці 1 наведені значення півширин, положення максимумів та розраховані за формулою (1) розміри кристалітів для синтезованих НЧС.

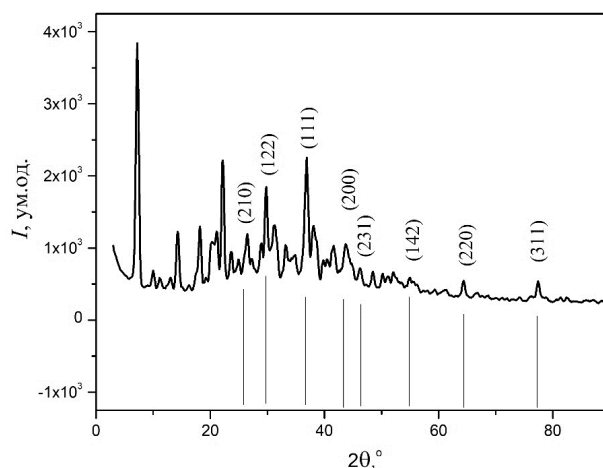


Рис. 4. Дифрактограма для НЧС

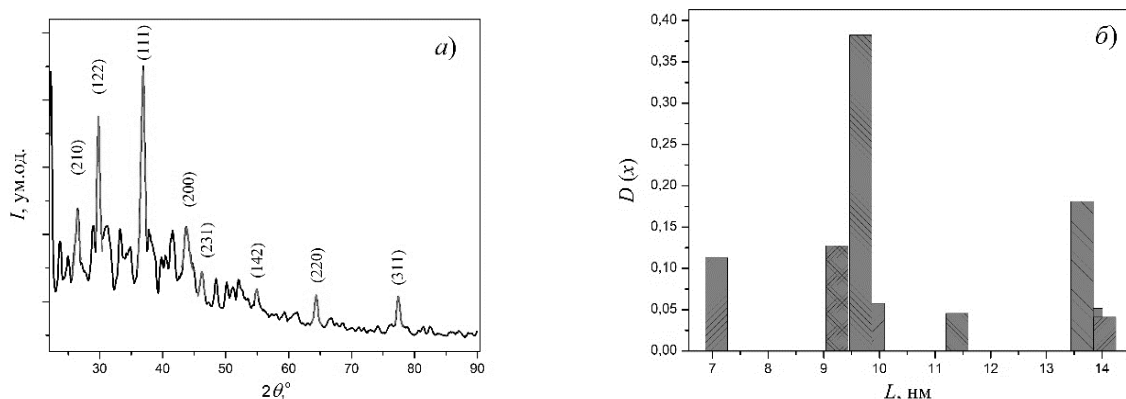


Рис. 5. Вибір кристалічних піків для аналізу у рамках рівняння Шеррера (а) та розподіл кристалітів за розмірами (б), отриманий із аналізу даних рентгенівського розсіяння

Таблиця 1. Значення параметрів дифракційних піків та розраховані параметри кристалітів

$\theta_m, ^\circ$	$\beta, ^\circ$	$S, \text{ум.од.}$	$L, \text{нм}$	$D(x)$
77.3	0.7268	336	13.8	0.05
64.4	0.6591	266	14.0	0.04
54.9	1.2491	732	7.0	0.11
46.2	0.8619	375	9.8	0.05
43.8	0.7411	295	11.3	0.04
36.8	0.8546	2479	9.6	0.38
29.8	0.5945	1174	13.6	0.18
26.5	0.8715	826	9.2	0.12

Розподіл за розмірами кристалічних утворень у досліджуваному матеріалі наведений на рис. 5 б. З рис. 5 б та таблиці 1 видно, що розмір кристалітів варіюється у межах від 7 до 14 нм. Найбільше представлена фракція кристалічних утворень має розмір 9.7 нм.

Більш узагальненим підходом для визначення середнього розміру нанокристалічних структур є метод Вільямсона-Холла [33]. Даний підхід ґрунтується на припущенні, що на ширину дифракційного піка впливають як розмір частинок, так і мікродеформація. Ці два параметри є незалежними один від одного та обидва описуються розподілом Коші-Лоренца. Рівняння Вільямсона-Холла має наступний вигляд:

$$\beta \cos \theta_m = \frac{k\lambda}{D} + 4\varepsilon \sin \theta_m, \quad (2)$$

де D – середній розмір нанокристалічних структур; ε – мікродеформація.

Для визначення D параметри, отримані із аналізу кристалічних піків, представили у

вигляді залежності $\beta \cos \theta_m (4 \sin \theta_m)$, яка, відповідно до підходу Вільямсона-Холла, повинна мати лінійний вигляд. Результати аналізу кристалічних піків представлені на рис. 6 у координатах рівняння (2).

З рис. 6 видно, що залежність $\beta \cos \theta_m (4 \sin \theta_m)$ є лінійною, яку можна описати рівнянням $y = ax + b$. Результати апроксимації приведені на рис. 6 (пряма лінія). Визначивши величину відрізка (b), який відтинає пряма на осі Oy , можна розрахувати середній розмір НЧС за формулою:

$$D = \frac{k\lambda}{b}. \quad (3)$$

Застосовуючи формулу (3) та значення $b = 0.0148$, встановили, що середній розмір НЧС становить 9.3 нм. Це значення добре корелює зі значеннями 7–14 нм, отриманими із рівняння Шеррера.

Для підтвердження утворення наночастинок та дослідження їхньої структурної організації використовували метод просвічуючої електронної мікроскопії.

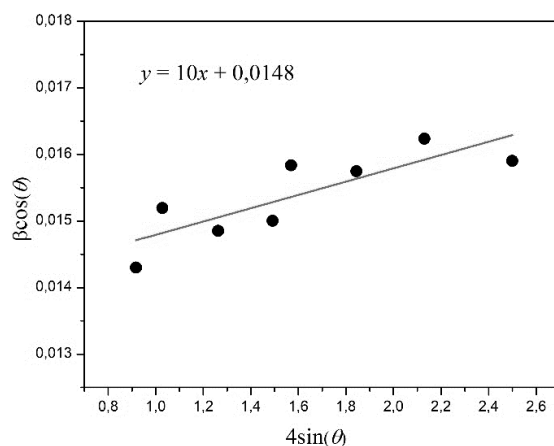


Рис. 6. Залежність $\beta \cos \theta_m$ від $4 \sin \theta_m$ для синтезованих НЧС

На мікрознімках, приведених на рис. 7, показано структуру порошоків отриманих матеріалів на різних масштабних рівнях. З рис. 7 а видно, що синтезований дрібнодисперсний порошок складається із маленьких частинок, які організовані у великі агрегати. Розміри таких агрегатів можуть варіюватися від 300 нм до декількох мікрометрів. На нижчому масштабному рівні (рис. 7 б) спостерігаються нанорозмірні

частинки, які організовані у розподібні структури.

Згідно з даними ІЧ-спектроскопії та рентгенографічного аналізу такі наночастинки характеризуються будовою типу «ядро-оболонка», де відновлене срібло є ядром, а ГР-ОП в поєднанні з тринатрійцитратом як стабілізатор формує оболонку.

Для визначення розмірів наночастинок мікрофотографії аналізували за допомогою

програмного комплексу ImageJ 1.49v. За результатами аналізу було побудовано діаграму розподілу частинок за розмірами (рис. 8).

Розмір частинок варіюється від 5 до 16 нм, із середнім значенням 10.2 нм. Таке середнє значення дуже близьке до значенням $D = 9.3$ нм, отримане із результатів рентгеноструктурного аналізу.

З рис. 8 видно, що розподіл частинок за розмірами має бімодальний характер. Максимуми на розподілі спостерігаються при значенні розмірів 8 та 12 нм. Положення цих максимумів дуже близьке до значень, отриманих при аналізі дифракційних піків у рамках рівняння Шеррера.

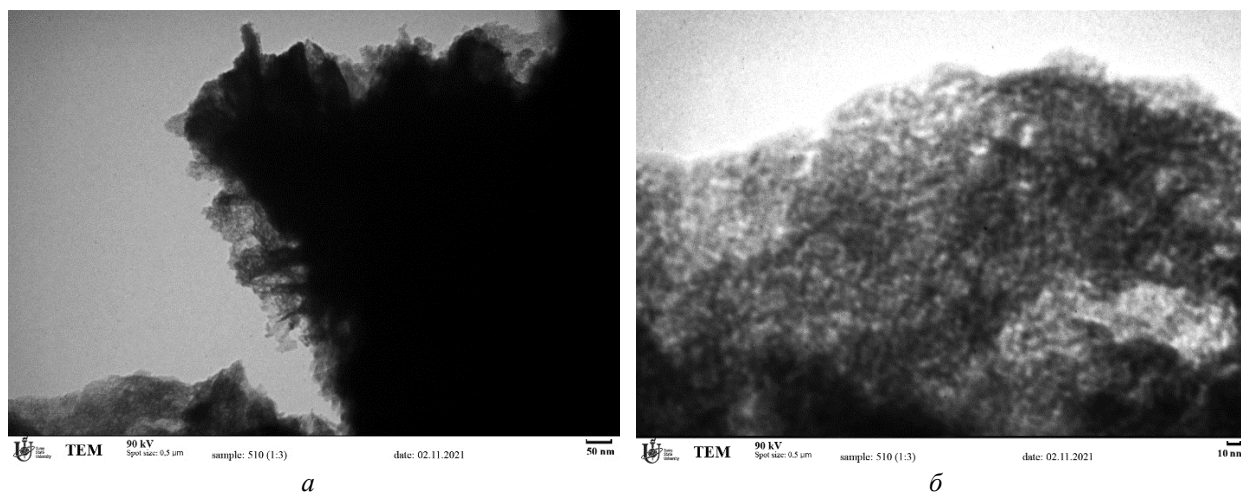


Рис. 7. Фотографії ПЕМ синтезованих НЧС у порошкоподібному стані при різному збільшенні: 33000 (а) та 108000 (б)

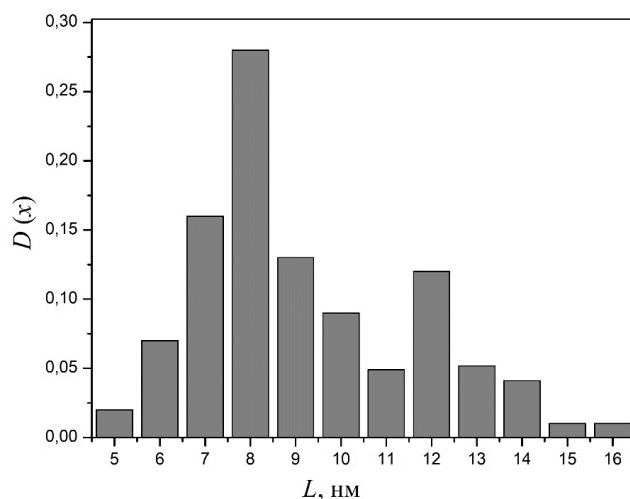


Рис. 8. Розподіл за розмірами НЧС, отриманий із результатів аналізу мікрофотографій

Отже, результати, отримані із даних мікроскопії та рентгеноструктурного аналізу, досить добре корелюють між собою та взаємодоповнюють один одного.

Наступним етапом нашого дослідження було встановлення антимікробних властивостей синтезованих наночастинок

срібла. Для аналізу обрали модельні бактерії золотистого стафілококу (*S. aureus*) та кишкової палички (*E. coli*), а також гриби – кандідабіліюча (*C. albicans*). *Staphylococcus aureus* є грам-позитивною, *Escherichia coli* є грам-негативною бактеріями, а *Candida albicans* є диплоїдним грибом. Для

встановлення інгібувальної активності відносно мікроорганізмів для синтезованих наночастинок срібла чашки Петрі засівали культурами бактерій та грибів. Для чистоти експерименту на чашках залишали контрольну зону, на якій могли вільно розвиватися мікроорганізми та класичні антибактеріальні препарати (ципрофлоксацин та азитроміцин).

На рис. 9 приведені фотографії чашок Петрі із різними мікроорганізмами. З рис. 9 видно, що синтезовані наночастинки срібла мають високу антимікробну активність, про що свідчить ширина зони інгібування (затримки росту мікроорганізмів). У табл. 2 наведені значення ширин зон інгібування для наночастинок срібла та класичних антибактеріальних препаратів.

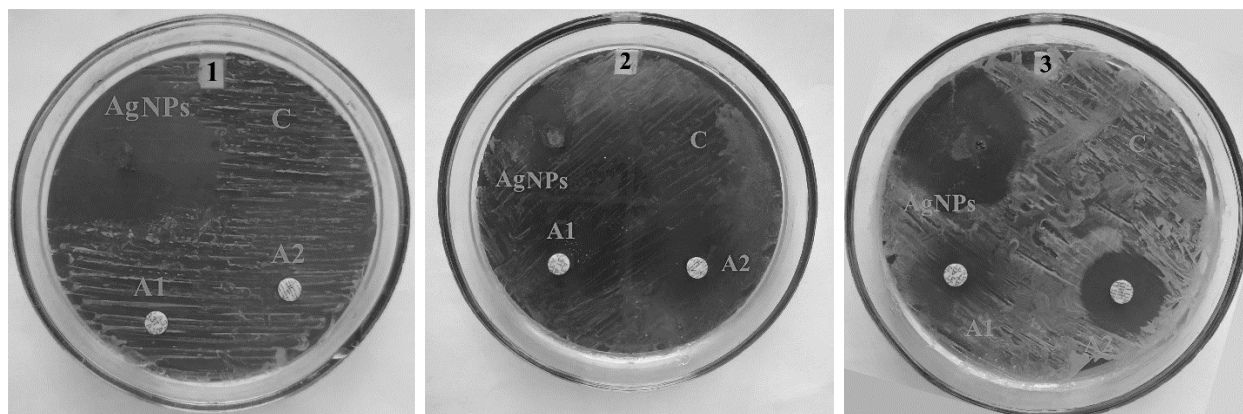


Рис. 9. Антимікробна активність наночастинок срібла (AgNP) та антибактеріальних препаратів азитроміцину (A1) та ципрофлоксацину (A2) відносно *C. albicans*– 1, *S. aureus* – 2, *E. coli* – 3. Літерою C позначена контрольна зона

Таблиця 2. Значення ширини зон інгібування для НЧС та антибактеріальних препаратів

	<i>S. aureus</i> , мм	<i>E. coli</i> , мм	<i>C. albicans</i> , мм
Ципрофлоксацин	20	12	0
Азитроміцин	15	8	0
НЧС	30	12	34

З рис. 9 та табл. 2 видно, що антибактеріальні препарати показали високу антимікробну активність проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій, проте, як і очікувалось, є нейтральними відносно грибків *C. albicans*. Однак, синтезовані наночастинки срібла показали дуже високу інгібуючу здатність відносно даних грибків, при цьому ширина зони інгібування становила 34 мм. Також дуже високу активність порошок НЧС проявляє відносно грам-позитивних бактерій *S. aureus*, при цьому ширина зони інгібування становить 30 мм, що у два рази більше, ніж для антибактеріального препарату азитроміцину. Відносно ж грам-негативних бактерій *E. coli*, наночастинки срібла проявляють аналогічну активність із препаратом ципрофлоксацином, ширина зони інгібування при цьому для обох

матеріалів становить 12 мм. Висока антимікробна активність отриманих стабілізованих наночастинок забезпечується, перш за все, малими розмірами та тонкою оболонкою із ГР-ОІР. Завдяки здатності стабілізатора до розчинення у воді, НЧС добре дифундують у поживне середовище і можуть вступати в контакт з мікроорганізмом. На нашу думку, механізм антимікробної дії НЧС, переважно, не пов'язаний з безпосереднім вивільненням іонів срібла. Для синтезованих у роботі НЧС, як і для більшості стабілізованих наночастинок характерний механізм, пов'язаний з прямим впливом НЧС на клітину мікроорганізму. При цьому, НЧС можуть накопичуватися на поверхні клітинної мембрани, спричиняти утворення великої кількості мембранних пор, проникати у

клітину разом з пориновими білками, що приводить до загибелі мікроорганізму [34].

Отже, синтезовані наночастинки срібла мають високу антимікробну активність та можуть застосовуватися як складові антисептичних матеріалів.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи було синтезовано нові стабілізовані за допомогою іонної рідини наночастинки срібла та вивчено їхню структуру та антимікробні властивості. Дані УФ-видимої спектроскопії вказують на утворення наночастинок срібла та їхню сферичну або квазісферичну форму. Дані ІЧ-спектроскопії свідчать про адсорбцію карбонільних та іонних (їхньої катіонної складової) груп на поверхні сформованих НЧС та утворення комплексів типу «гість-господар» між іонною рідиною та іонами срібла. Також у матеріалі існує адсорбований на поверхні синтезованих НЧС тринатрійцитрат та тринатрійцитрат, що утворив комплекси з іонами срібла. При цьому тринатрійцитрат в поєднанні з ОІР виконує

стабілізуючу дію по відношенню до утворюваних частинок колоїдного срібла. Результати рентгенівського розсіяння вказують на те, що наночастинки срібла є кристалічними за своєю природою, а розмір кристалітів варіюється у межах від 7 до 14 нм. Найбільше представлена фракція кристалічних утворень має розмір 9.7 нм. Використовуючи метод Вільямсона-Холла встановили, що середній розмір наночастинок срібла становить 9.3 нм. Згідно з даними ІЧ-спектроскопії та рентгенографічного аналізу, синтезовані наночастинки характеризуються будовою типу «ядро-оболонка», де відновлене срібло є ядром, а ГР-ОІР у поєднанні з тринатрійцитратом як стабілізатор формує оболонку. За даними електронної мікроскопії розмір частинок варіюється від 5 до 16 нм, із середнім значенням 10.2 нм. Синтезовані наночастинки срібла мають високу антимікробну активність відносно бактерій (*S. aureus*, *E. coli*) та мікотичної флори (*C. albicans*). Такі наночастинки можуть застосовуватися як складові антисептичних матеріалів.

Synthesis, structure and antimicrobial properties of silver nanoparticles formed in the presence of a hyperbranched ionic liquid

Е.А. Lysenkov, О.В. Stryutsky, L.P. Klymenko, V.L. Demchenko

*Petro Mohyla Black Sea National University
10 68 Desantnykiv Str., Mykolaiv, 54003, Ukraine, ealysenkov@ukr.net
Institute of Macromolecular Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
48 Kharkivske Shosse, Kyiv, 02160, Ukraine*

*Due to the variety of their forms and properties, silver nanoparticles (AgNPs) are promising for obtaining nanomaterials with various functional applications. Today, regardless of the method of obtaining AgNPs, there is a problem of stabilizing their surface to prevent aggregation, which significantly reduces their activity and prevents uniform distribution during the preparation of nanomaterials. The aim of this work was the synthesis of silver nanoparticles using an oligomeric ionic liquid (OIL) and the study of their structure and antimicrobial properties. In this work, for the first time, an anionic OIL with a hyperbranched structure developed by us was used as a surface stabilizer in the synthesis of AgNPs. The synthesis of AgNPs was carried out by the reduction of Ag ions in the composition of AgNO₃ with trisodium citrate in the presence of this OIL. Using the methods of UV-vis and FTIR spectroscopy, X-ray analysis, electron microscopy and the disc-diffusion method, the peculiarities of the structural organization of AgNPs and their antimicrobial properties were studied. UV-visible spectroscopy data indicate the formation of silver nanoparticles and their spherical or quasi-spherical shape. It was found that there are adsorbed ionic and carbonyl groups on the surface of the formed AgNPs, and the formation of host-guest complexes between OIL and silver ions was revealed using FTIR. The formation of AgNPs and complexes between OIL and silver ions is also confirmed by X-ray diffraction. According to electron microscopy, the size of the synthesized nanoparticles varies from 5 to 16 nm, with an average value of 10.2 nm. This average value is very close to the value of 9.3 nm obtained from the results of X-ray analysis. The synthesized silver nanoparticles showed a very high antimicrobial activity against *C. albicans* fungi, while the width of the inhibition zone (*d*) was 34 mm. Also, the AgNPs powder shows very high activity against gram-positive bacteria *S. aureus* (*d* = 30 mm) and gram-negative bacteria *E. coli* (*d* = 12 mm).*

The approach developed by us to the synthesis of AgNPs in the presence of OIL as a surface stabilizer with certain functionalization of the latter opens up new opportunities in the synthesis of AgNPs and the preparation of highly dispersed related systems, including functionalized nanocomposite polymer materials with antimicrobial properties.

Keywords: silver nanoparticles, ionic liquid, antimicrobial properties, X-ray analysis, electron microscopy

ЛІТЕРАТУРА

1. Islam M.A., Mohan V.J., Antunes E. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar // J. Environ. Manage. – 2021. – V. 281. – P. 111918.
2. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, N 6. – P. 1712–1720.
3. Stetsyshyn Y., Awskiuk K., Kusnezh V. et al. Shape-Controlled synthesis of silver nanoparticles in temperature-responsive grafted polymer brushes for optical applications // Appl. Surf. Sci. – 2019. – V. 463. – P. 1124–1133.
4. Lodeiro P., Achterberg E.P., Rey-Castro C., El-Shahawi M.S. Effect of polymer coating composition on the aggregation rates of Ag nanoparticles in NaCl solutions and seawaters // Sci. Total Environ. – 2018. – V. 631–632. – P. 1153–1162.
5. Zhao Y., Liu L., Li C. et al. Immobilization of polyethyleneimine-templated silver nanoparticles onto filter paper for catalytic applications // Colloids Surf., A. – 2019. – V. 571. – P. 44–49.
6. Bae J., Park H.J., Kim M.-R. Kim I. Dumbbell-type hyperbranched-polyglycidol-assisted green synthesis of metal nanoparticles // Nanosci. Nanotechnol. – 2017. – V. 17, N 10. – P. 7373–7380.
7. Husanu E., Chiappe C., Bernardini A. et al. Synthesis of colloidal Ag nanoparticles with citrate-based ionic liquids as reducing and capping agents // Colloids Surf. A. – 2018. – V. 538. – P. 506–512.
8. Meischein M., Fork M., Ludwig L. On the effects of diluted and mixed ionic liquids as liquid substrates for the sputter synthesis of nanoparticles // Nanomaterials. – 2020. – V. 10, N 3. – P. 525.
9. Tian N., Ni X.F., Shen Z.Q. Synthesis of main-chain imidazolium-based hyperbranched polymeric ionic liquids and their application in the stabilization of Ag nanoparticles // React. Funct. Polym. – 2016. – V. 101. – P. 39–46.
10. Schadt K., Kerscher B., Thomann R., Mülhaupt R. Structured semifluorinated polymer ionic liquids for metal nanoparticle preparation and dispersion in fluorinated compartments // Macromolecules. – 2013. – V. 46, N 12. – P. 4799–4804.
11. Shi Y.-Y., Sun B., Zhou Z. et al. Size-controlled and large-scale synthesis of organic-soluble Ag nanocrystals in water and their formation mechanism // Prog. Nat. Sci.: Mater. Int. – 2011. – V. 21, N 6. – P. 447–454.
12. Istiqola A., Syafiuddin A. A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges // J. Chin. Chem. Soc. – 2020. – V. 67, N 11. – P. 1942–1956.
13. Zhao D.M., Feng Q.M., Lv L.L., Li J. Fabrication and Characterization of Cellulose Acetate Ultrafine Fiber Containing Silver Nanoparticles by Electrospinning // Adv. Mater. Res. – 2011. – V. 337. – P. 116–119.
14. Xu Y., Li S., Yue X., Lu W. et al. Review of silver nanoparticles (AgNPs)-cellulose antibacterial composites // BioRes. – 2018. – V. 13, N 1. – P. 2150–2170.
15. Krishnan P.D., Banas D., Durai R.D. Silver nanomaterials for wound dressing applications // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12, N 9. – P. 821–844.
16. Lekha D.C., Shanmugam R., Madhuri K. et al. Review on Silver Nanoparticle Synthesis Method, Antibacterial Activity, Drug Delivery Vehicles, and Toxicity Pathways: Recent Advances and Future Aspects // J. Nanomaterials. – 2021. – V. 2021. – Article ID 4401829.
17. Lysenkov E., Stryutsky, O., Polovenko, L. Development of Nanocomposite Antimicrobial Polymeric Materials Containing Silver Nanoparticles // Nanomaterials: Applications and Properties (IEEE NAP 2022): Proc. Of 12th International Conference “Nanomaterials: Application and Properties” (September 11–16, 2022, Krakow, Poland).
18. Bruna T., Maldonado-Bravo F., Jara P., Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22, N 13. – P. 7202.
19. Sonawnae A., Mohanty J., Jacob M. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells // Int. J. Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 1805–18.
20. Zomorodian K., Veisi H., Mousavi S.M. et al. Modified magnetic nanoparticles by PEG-400- immobilized Ag nanoparticles (Fe₃O₄@PEG-Ag) as a core/shell nanocomposite and evaluation of its antimicrobial activity // Int. J. Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 3965–3973.
21. Shevchenko V.V., Stryutsky A.V., Klymenko N.S. et al. Protic and aprotic anionic oligomeric ionic liquids // Polymer. – 2014. – V. 55, N 16. – P. 3349–3359.

22. Xu W., Ledin P.A., Shevchenko V.V., Tsukruk V.V. Architecture, assembly, and emerging applications of branched functional polyelectrolytes and poly(ionicliquid)s // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2015. – V. 7, N 23. – P. 12570–12596.
23. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss Faraday Soc.* – 1951. – V. 11. – P. 55–75.
24. Rivas L., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J.V., Morcillo G. Growth of silver colloidal particles obtained by citrate reduction to increase their enhancement factor // *Langmuir*. – 2001. – V. 17, N 3. – P. 574–577.
25. Dawadi S., Katuwal S., Gupta A. et al. Current research on silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications // *J. Nanomater.* – 2021. – V. 2021. – Article ID 6687290.
26. Tripathi R.M., Kumar N., Shrivastav A. et al. Catalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized by Ficus panda leaf extract // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 2013. – V. 96. – P. 75–80.
27. Faghri Zonooz N., Salouti M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* p. ERI-3 // *Sci. Iran.* – 2011. – V. 18, N 6. – P. 1631–1635.
28. Kumar B., Smita K., Cumbal L., Debut A. Green synthesis of silver nanoparticles using andean blackberry fruit extract // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2017. – V. 24, N 1. – P. 45–50.
29. Barani H., Mahltig B. Using microwave irradiation to catalyze the in-situ manufacturing of silver nanoparticles on cotton fabric for antibacterial and UV-protective application // *Cellulose*. – 2020. – V. 27. – P. 9105–9121.
30. Meng Y. A Sustainable approach to fabricating Ag nanoparticles/PVA hybrid nanofiber and its catalytic activity // *Nanomaterials*. – 2015. – V. 5. – P. 1124–1135.
31. Djokic S. Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver Citrate Complexes // *Bioinorg. Chem. Appl.* – 2008. – V. 2008. – ArticleID 436458.
32. Seo D., Yoo C., Chung I.S. et al. Shape adjustment between multiply twinned and single-crystalline polyhedral gold nanocrystals: decahedra, icosahedra, and truncated tetrahedra // *J. Phys. Chem. C*. – 2008. – V. 112, N 7. – P. 2469–2475.
33. Mote V.D., Purushotham Y., Dole B.N. Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles // *J. Theor. Appl. Phys.* – 2012. – V. 6. – Art.N6.
34. Anees Ahmad S., Sachi Das S., Khatoon A. et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review // *Mater. Sci. Energy Technol.* – 2020. – V. 3. – P. 756–769.

REFERENCES

1. Islam M.A., Mohan V.J., Antunes E. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. *J. Environ. Manage.* 2021. **281**: 111918.
2. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. **73**(6): 1712.
3. Stetsyshyn Y., Awsiuk K., Kusnezh V., Raczowska J., Jany B.R., Kostruba A., Harhay K., Ohar H., Lishchynskyi O., Shymborska Y., Kryvenchuk Y., Krok F., Budkowski A. Shape-Controlled synthesis of silver nanoparticles in temperature-responsive grafted polymer brushes for optical applications. *Appl. Surf. Sci.* 2019. **463**: 1124.
4. Lodeiro P., Achterberg E.P., Rey-Castro C., El-Shahawi M.S. Effect of polymer coating composition on the aggregation rates of Ag nanoparticles in NaCl solutions and seawaters. *Sci. Total Environ.* 2018. **631–632**: 1153.
5. Zhao Y., Liu L., Li C. Ye B., Xiong J., Shi X. Immobilization of polyethyleneimine-templated silver nanoparticles onto filter paper for catalytic applications. *Colloids Surf., A*. 2019. **571**: 44.
6. Bae J., Park H.J., Kim M.-R. Kim I. Dumbbell-type hyperbranched-polyglycidol-assisted green synthesis of metal nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol.* 2017. **17**(10): 7373.
7. Husanu E., Chiappe C., Bernardini A., Cappello V., Gemmi M. Synthesis of colloidal Ag nanoparticles with citrate-based ionic liquids as reducing and capping agents. *Colloids Surf., A*. 2018. **538**: 506.
8. Meischein M., Fork M., Ludwig L. On the effects of diluted and mixed ionic liquids as liquid substrates for the sputter synthesis of nanoparticles. *Nanomaterials*. 2020. **10**(3): 525.
9. Tian N., Ni X.F., Shen Z.Q. Synthesis of main-chain imidazolium-based hyperbranched polymeric ionic liquids and their application in the stabilization of Ag nanoparticles. *React. Funct. Polym.* 2016. **101**: 39.
10. Schadt K., Kerscher B., Thomann R., Mülhaupt R. Structured semifluorinated polymer ionic liquids for metal nanoparticle preparation and dispersion in fluorinated compartments. *Macromolecules*. 2013. **46**(12): 4799.
11. Shi Y.-Y., Sun B., Zhou Z., Wu Y.-T., Zhu M.-F. Size-controlled and large-scale synthesis of organic-soluble Ag nanocrystals in water and their formation mechanism. *Prog. Nat. Sci.: Mater. Int.* 2011. **21**(6): 447.

12. Istiqola A., Syafiuddin A. A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *J. Chin. Chem. Soc.* 2020. **67**(11): 1942.
13. Zhao D.M., Feng Q.M., Lv L.L., Li J. Fabrication and Characterization of Cellulose Acetate Ultrafine Fiber Containing Silver Nanoparticles by Electrospinning. *Adv. Mater. Res.* 2011. **337**: 116.
14. Xu Y., Li S., Yue X., Lu W. Review of silver nanoparticles (AgNPs)-cellulose antibacterial composites. *BioRes.* 2018. **13**(1): 2150.
15. Krishnan P.D., Banas D., Durai R.D., Kabanov D., Hosnedlova B., Kepinska M., Fernandez C., Ruttkay-Nedecky B., Nguyen H.V., Farid A., Sochor J., Narayanan V.H.B., Kizek R. Silver nanomaterials for wound dressing applications. *Pharmaceutics.* 2020. **12**(9): 821.
16. Lekha D.C., Shanmugam R., Madhuri K., Dwarampudi L.P., Bhaskaran M., Kongara D., Tesfaye J.L., Nagaprasad N., Bhargavi V.L.N., Krishnaraj R. Review on Silver Nanoparticle Synthesis Method, Antibacterial Activity, Drug Delivery Vehicles, and Toxicity Pathways: Recent Advances and Future Aspects. *J. Nanomaterials.* 2021. **2021**: 4401829.
17. Lysenkov E., Stryutsky, O., Polovenko L. Development of Nanocomposite Antimicrobial Polymeric Materials Containing Silver Nanoparticles. In: *Nanomaterials: Applications and Properties (IEEE NAP 2022)*. Proc. of 12th International Conference "Nanomaterials: Applications and Properties" (September 11–16, 2022, Krakow, Poland).
18. Bruna T., Maldonado-Bravo F., Jara P., Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. **22**(13): 7202.
19. Sonawnae A., Mohanty J., Jacob M. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int. J. Nanomedicine.* 2012. **7**: 180505-18.
20. Zomorodian K., Veisi H., Mousavi S.M., Ataabadi M.S., Yazdanpanah S., Bagheri J., Mehr A.P., Hemmati S., Veisi H. Modified magnetic nanoparticles by PEG-400- immobilized Ag nanoparticles (Fe₃O₄@PEG-Ag) as a core/shell nanocomposite and evaluation of its antimicrobial activity. *Int. J. Nanomedicine.* 2018. **13**: 3965.
21. Shevchenko V.V., Stryutsky A.V., Klymenko N.S., Gumenna M.A., Fomenko A.A., Bliznyuk V.N., Trachevsky V.V., Davydenko V.V., Tsukruk V.V. Protic and aprotic anionic oligomeric ionic liquids. *Polymer.* 2014. **55**(16): 3349.
22. Xu W., Ledin P.A., Shevchenko V.V., Tsukruk V.V. Architecture, assembly, and emerging applications of branched functional polyelectrolytes and poly(ionic liquid)s. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. **7**(23): 12570.
23. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951. **11**: 55.
24. Rivas L., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J.V., Morcillo G. Current research on silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Langmuir.* 2001. **17**(3): 574.
25. Dawadi S., Katuwal S., Gupta A., Lamichhane U., Thapa R., Jaisi S., Lamichhane G., Bhattarai D.P., Parajuli N. Current research on silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *J. Nanomater.* 2021. **2021**: 6687290.
26. Tripathi R.M., Kumar N., Shrivastav A., Singh P., Shrivastav B.R. Catalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized by Ficus panda leaf extract. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013. **96**: 75.
27. Faghri Zonooz N., Salouti M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* p. ERI-3. *Sci. Iran.* 2011. **18**(6): 1631.
28. Kumar B., Smita K., Cumbal L., Debut A. Green synthesis of silver nanoparticles using andean blackberry fruit extract. *Saudi J. Biol. Sci.* 2017. **24**(1): 45.
29. Barani H., Mahltig B. Using microwave irradiation to catalyze the in-situ manufacturing of silver nanoparticles on cotton fabric for antibacterial and UV-protective application. *Cellulose.* 2020. **27**: 9105.
30. Meng Y. A Sustainable approach to fabricating Ag nanoparticles/PVA hybrid nanofiber and its catalytic activity. *Nanomaterials.* 2015. **5**: 1124.
31. Djokic S. Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver Citrate Complexes. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2008. **2008**: 436458.
32. Seo D., Yoo C., Chung I.S., Park S.M., Ryu S., Song H. Shape adjustment between multiply twinned and single-crystalline polyhedral gold nanocrystals: decahedra, icosahedra, and truncated tetrahedra. *J. Phys. Chem. C.* 2008. **112**(7): 2469.
33. Mote V.D., Purushotham Y., Dole B.N. Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles. *J. Theor. Appl. Phys.* 2012. **6**: 6.
34. Anees Ahmad S., Sachi Das S., Khatoun A., Tahir Ansari M., Afzal M., Hasnain M.S., Nayak A.K. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Mater. Sci. Energy Technol.* 2020. **3**: 756.

Надійшла 23.04.2023, прийнята 27.05.2024