

Sposób otrzymywania stabilnych suspensji nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania na drodze redukcji chemicznej stabilnych suspensji nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym do zastosowań w katalizie oraz jako substancji biobójczych.

Dzięki unikatowym właściwościom fizykochemicznym nanocząstki srebra znajdują szereg zastosowań w wielu dziedzinach nauki i przemysłu, wśród których wyróżnić należy m.in. biologię, medycynę, elektronikę, optykę, spektroskopię oraz katalizę. Szeroki wachlarz zastosowań nanocząstek srebra wynika jednak przede wszystkim z ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, którą wykazują w stosunku do wielu patogennych bakterii, grzybów chorobotwórczych oraz wirusów. Jak wynika z literatury fachowej i patentowej, aktywność biologiczną nanocząstek srebra można dodatkowo modelować nie tylko przez kontrolę ich rozmiaru oraz kształtu, ale także przez zastosowanie specyficznych stabilizatorów organicznych bądź nieorganicznych, które zaadsorbowane na powierzchni nanocząstek zapewniają im trwałość, a dodatkowo są także pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane w procesy dezaktywacji drobnoustrojów chorobotwórczych.

Wśród licznych metod syntezy suspensji wodnych nanocząstek srebra (hydrozoli) główną rolę odgrywa metoda redukcji chemicznej, w której przez zastosowanie odpowiedniego układu stabilizator/mieszanina oksydacyjno-redukcyjna można kontrolować rozmiar, kształt oraz właściwości powierzchniowe nanocząstek srebra.

Syntezę stabilnych suspensji nanocząstek srebra ujawniono przykładowo w opisach i zgłoszeniach patentowych PL 176202(B1), PL 210388(B1), PL 211422(B1), PL 390437(A1), PL 401528(A1), a także w wielu opracowaniach literatury fachowej.

W większości znanych przypadków wytwarzania suspensji nanocząstek srebra metodą redukcji chemicznej, źródłem jonów srebra – są dobrze rozpuszczalne w wodzie sole srebra, zaś substancjami stabilizującymi utlenione formy reduktora, bądź inne dodatkowe związki chemiczne, które na skutek selektywnej adsorpcji na granicy faz ciało stałe/ciecz nadają nanocząstkom ujemny ładunek powierzchniowy – *Alexander Kamyshny, Slomo Magdassi*, „Aqueous Dispersion of Metallic Nanoparticles – Preparation, Stabilization and Application”, *Nanoscience, Colloidal and Interfacial Aspects Edited by Victor M. Starov*, CRC Press, New York, 1st edn., 2009, vol. 147, ch. 25, pp. 747-778.

Doniesienia literaturowe wskazują jednak, że nanocząstki srebra charakteryzujące się dodatnim ładunkiem powierzchniowym są materiałem bardziej pożądanym w zastosowaniach praktycznych, m.in. znacznie podnoszą wydajność analizy w powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS) – *Sharah M. Ngola, Jingwu Zhang, Breeana L. Mitchell, Narayan Sundararajan*, Strategy for improved analysis of peptides by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) involving positively charge nanoparticles, *J. Raman Spectrosc.* 2008, 39, 611-619, a także są bardziej efektywne w zwalczaniu bakterii i wirusów bowiem na skutek przyciągających oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi mogą w łatwy sposób wchodzić w interakcje z drobnoustrojami - *Alexander Kamyshny, Slomo Magdassi*, „Aqueous Dispersion of Metallic Nanoparticles – Preparation, Stabilization and Application”, *Nanoscience, Colloidal and Interfacial Aspects Edited by Victor M. Starov*, CRC Press, New York, 1st edn., 2009, vol. 147, ch. 25, pp. 747-778.

Pomimo znaczenia praktycznego nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym, nie są obecnie znane efektywne metody wytwarzania ich stabilnych suspensji. Jest to spowodowane faktem, że większość prostych kationów nieorganicznych, mogących potencjalnie pełnić rolę stabilizatorów takich nanocząstek, występuje w roztworach

wodnych w postaci akwakompleksów niemających zdolności stabilizacji zredukowanych atomów w formie klasterów srebra. Z tego też powodu, w znanych rozwiązaniach dotyczących syntezy dodatnio naładowanych nanocząstek srebra stosuje się wysokocząsteczkowe związki organiczne jak surfaktanty (np. bromek cetylotrimetyloamoniowy CTAB), polielektrolity (poli(chlorowodorek diallilodimetyloamoniowy) (PDDA), poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH), polietylenoimina (PEI), spermina)), poliaminokwasy (polilizyna (PLL)) czy białka (albumina ludzka (HSA)), które w głównej mierze zapewniają stabilizację steryczną.

Prostota tego typu rozwiązań, wynikająca z zastosowania stabilizacji sterycznej w syntezach dodatnio naładowanych nanocząstek srebra niesie jednak za sobą również znaczne ograniczenia. Przede wszystkim obecność wysokocząsteczkowych związków organicznych w suspensjach wodnych (hydrozolah) powoduje, że właściwości biobójcze nanocząstek są osłabiane, bądź maskowane. Obecność organicznej otoczki na powierzchni nanocząstek srebra utrudnia uwalnianie srebra jonowego, które odgrywa istotną rolę w mechanizmach aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek. Ponadto równowagi między stężeniem stabilizatora zaadsorbowanego na powierzchni nanocząstek oraz stężeniem niezwiązanych molekuł obecnych w suspensjach, uniemożliwiają efektywne wytwarzanie monowarstw nanocząstek srebra o wysokim stężeniu powierzchniowym w procesach samoorganizacji monowarstw. Z tego też powodu tak stabilizowane suspensje nanocząstek srebra są również mało efektywne jako katalizatory.

Pewną metodą eliminacji wskazanych wyżej niedogodności były próby zastąpienia wysokocząsteczkowych związków organicznych przez molekuły aminokwasów, a w szczególności przez cysteinę, która w odpowiednich warunkach pH miała nadawać nanocząstkom srebra dodatni ładunek powierzchniowy. W typowym podejściu do powyższego problemu, nanocząstki srebra wytwarzano w redukcji jonów srebra dostarczonych w postaci azotanu srebra borowodorkiem sodu,

a następnie prowadzono tzw. wymianę liganda na granicy faz ciało stałe/roztwór, dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór L-cysteiny o kontrolowanym stężeniu molowym. Zakładano bowiem, że dojdzie do wytworzenia wiązania kowalencyjnego między powierzchniowymi atomami srebra oraz atomami siarki, zaś dzięki protonacji grup aminowych cysteiny w $\text{pH} < 5,4$ nanocząstki będą wykazywały dodatni ładunek powierzchniowy.

Niestety liczne prace badawcze dowiodły, że tego typu hydrozole są niestabilne, gdyż następuje szybka agregacja nanocząstek srebra będąca konsekwencją tworzenia się wiązań wodorowych między molekułami cysteiny zaadsorbowanymi na sąsiednich nanocząstkach. Dodatkowo wykazano, że w tych warunkach dochodzi do wytworzenia wiązań disiarczkowych pomiędzy molekułami cysteiny, w związku z czym proces adsorpcji molekuł cysteiny na powierzchni srebra nie przebiega efektywnie.

Szereg informacji na ten temat dostępnych jest w doniesieniach literaturowych:

- Saikat Mandal, Anand Gole, neeta Lala, Rejesh Gonnade, Vivek Ganvir, Murali Sastry, "Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds" *Langmuir* 2001, 17, 6262-6268.
- Seong-Ho Choi, See-Hee Lee, Young-Mi Hwang, Kwang-Pill Lee, Hee-Dong Kang, "Interaction between the surface of the silver nanoparticles prepared by γ -irradiation and organic molecules containing thiol group" *Radiation Physics and Chemistry* 2003, 67, 517-521.
- Zheng Ping Li, Xiu Rui Duan, Cheng Hui Liu, Bao An Du, "Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles" *Analytical Biochemistry* 2006, 351, 18-25.

- Cuiyu Jing, Yan Fang, "Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption behaviors of L-cysteine on gold/ silver nanoparticles" *Chemical Physics* 2007, 332, 27-32.

-Anikó Szalai, Áron Sipos, Edit Csapó, László Tóth, Mária Csete, Imre Dékány, "Comparative study of plasmonic properties of cyteine-functionalized gold and silver nanoparticle aggregates" *Plasmonic* 2013, 8, 53-62.

Nie ujawniono natomiast ani w literaturze fachowej, ani patentowej metody otrzymywania za pomocą redukcji chemicznej stabilnych suspensji nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym, stabilizowanych L-cysteina.

Zagadnieniem technicznym postawionym przed wynalazkiem jest opracowanie wydajnej metody otrzymywania stabilnych suspensji nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym, pozbawionych wysokocząsteczkowych związków polimerowych, polielektrolitów bądź surfaktantów jako stabilizatorów, a bazujących w tym zakresie na niskocząsteczkowych związkach organicznych, takich jak aminokwasy.

Rozwiązanie tak postawionego zagadnienia wymaga znalezienia takiego związku chemicznego, który po wprowadzeniu do układu reduktor/stabilizator, zapewni redukcję jonów srebra i formowanie nanocząstek w obecności niskocząsteczkowych stabilizatorów organicznych takich jak aminokwasy.

Rozwiązanie tak postawionego zagadnienia wymaga jednocześnie znalezienie dla układu reduktor/stabilizator takiego reduktora, który nie wchodziłby w reakcję z jonogennymi grupami obecnymi w molekułach stabilizatora, które na skutek protonacji mają nadawać nanocząstkom dodatni ładunek powierzchniowy, a ponadto oprócz obu tych podstawowych warunków koniecznych dla znalezienia efektywnego układu reduktor/stabilizator, dodatkowo należy rozwiązać problem zakresu stężeń poszczególnych reagentów w mieszaninie reakcyjnej oraz warunków prowadzenia procesu (w tym głównie temperatury, wartości pH

oraz stężenia tlenu rozpuszczonego w suspensji, ze względu na możliwe reakcje z molekułami stabilizatora).

Okazało się nieoczekiwanie, że postawione wyżej zagadnienia techniczne spełnia układ reduktor/ stabilizator, w którym do syntezy nanocząstek srebra używa się jako czynnika redukującego borowodorku sodu, w mieszaninie z jonami srebra skompleksowanymi uprzednio (tj. przed reakcją redukcji) przez cząsteczki L-cysteiny, a wprowadzonymi do wodnego środowiska reakcji w postaci azotanu(V) bądź octanu.

Zgodnie z wynalazkiem sposób otrzymywania stabilnych suspensji nanocząstek srebra o dodatnim ładunku powierzchniowym na drodze redukcji chemicznej, z użyciem borowodorku sodu jako czynnika redukującego, rozpuszczalnych w wodzie soli srebra jako źródła jonów srebra oraz L-cysteiny jako stabilizatora, charakteryzuje się tym, że jony srebra, wprowadzone do wodnego środowiska reakcji w postaci azotanu(V) srebra w stężeniu molowym w mieszaninie reakcyjnej wynoszącym od 1 mM do 12,5 mM lub octanu srebra w stężeniu molowym w mieszaninie reakcyjnej wynoszącym od 0,8 mM do 9,4 mM, kompleksuje się L-cysteiną, wprowadzoną do środowiska reakcji tak aby stosunek liczby moli jonów srebra do liczby moli L-cysteiny był nie wyższy niż 250, po czym dokonuje się redukcji chemicznej skompleksowanych jonów srebra, stosując jako reduktor borowodorek sodu, w stężeniu molowym w mieszaninie reakcyjnej wynoszącym od 0,12 mM do 6,7 mM, a najlepiej od 0,5 do 2,5 mM, przy czym roztwór reduktora wprowadza się do zakwaszonego roztworu kompleksów jonów srebra z L-cysteiną, zachowując pH mieszaniny reakcyjnej w przedziale od 2 do 4.

Regulację wartości pH środowiska reakcji przeprowadzi się przy użyciu kwasu nieorganicznego, takiego jak kwas siarkowy(VI) lub organicznego takiego jak kwas octowy, bądź też przez wprowadzenie nadmiaru L-cysteiny.

Korzystnie, zakres temperatur dla prowadzenia reakcji, w anaerobowych bądź aerobowych warunkach, wynosi 5°C do 40°C, a najlepiej 18°C do 35°C.

Wytworzone tym sposobem suspensje nanocząstek srebra po odmyciu nadmiaru reagentów, np. za pomocą metody ultrafiltracji membranowej, są stabilne w temperaturze otoczenia dla stężenia wagowego nanocząstek nie przekraczającego 230 mg/l (dla pH od 3 do 10 oraz dla umiarkowanych wartości siły jonowej), do sześciu miesięcy. Dodatkowo wykazują one właściwości biobójcze przeciw wybranym szczepom bakterii gram dodatnich oraz gram ujemnych, a także grzybom chorobotwórczym.

W odróżnieniu od dodatnio naładowanych nanocząstek srebra stabilizowanych przez wysokocząsteczkowe związki organiczne, nanocząstki otrzymane sposobem według wynalazku wykazują doskonałe właściwości adsorpcyjne na ujemnie naładowanych powierzchniach stałych, a ponadto dzięki możliwości regulowania ich ładunku powierzchniowego przez zmiany pH możliwe jest wytwarzanie monowarstw i multiwarstw nanocząstek o kontrolowanym stężeniu powierzchniowym, co ma szczególnie istotne znaczenie w zastosowaniach praktycznych.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest to, że stanowiąca jego istotę efektywna metoda syntezy suspensji nanocząstek srebra za pomocą redukcji chemicznej, pozwala wytwarzać kuliste nanocząstki o kontrolowanych rozmiarach (w zakresie od 5 do 55 nm), a także o ładunku powierzchniowym, który można zmieniać zarówno stosunkiem molowym reduktor/ stabilizator, jak również takimi parametrami jak pH czy siła jonowa suspensji.

Innymi zaletami opisywanej wyżej metody otrzymywania suspensji nanocząstek srebra jest wykorzystanie dobrze rozpuszczalnych, relatywnie tanich soli jako źródła jonów srebra, zastosowanie handlowo dostępnych niskocząsteczkowych związków organicznych

i nieorganicznych, a także możliwość łatwego regulowania parametrów syntezy (temperatury, pH reakcji) w przystępny sposób.

Korzystnym też, w odniesieniu do innych, znanych metod syntezy nanocząstek srebra, takich jak m.in. metody elektrochemiczne, sonochemiczne czy biologiczne, jest to, że proces otrzymywania suspensji nanocząstek srebra metodą redukcji chemicznej, charakteryzuje się prostotą i łatwością przeprowadzania reakcji w niskich temperaturach oraz wyeliminowaniem wysoce toksycznych rozpuszczalników organicznych. Ponadto, oczyszczanie wytworzonych według wynalazku suspensji nanocząstek srebra z nadmiaru nieprzereagowanych reagentów, które mogą obniżać stabilność hydrozoli, korzystnie przeprowadza się za pomocą ultrafiltracji membranowej, z wykorzystaniem komór filtracyjnych zaopatrzonych w membrany polieterosulfonowe o kontrolowanej wielkości porów. Kontrolę postępu oczyszczania można prowadzić przy pomocy pomiaru konduktometrycznego przewodnictwa elektrycznego roztworu lub przy pomocy pomiaru absorbancji widma w zakresie UV-vis.

Podstawowymi zaletami suspensji otrzymanych zgodnie z wynalazkiem jest to, że względu na ich właściwości fizykochemiczne, a w szczególności dodatnią wartość ładunku powierzchniowego, istnieje znaczna liczba możliwości zastosowania ich do modyfikowania powierzchni stałych (głównie ujemnie naładowanych), np. włókien tekstylnych w celu nadania im właściwości biobójczych, podobnie można modyfikować powierzchnie wybranych nośników, np. węglowych lub tlenkowych w celu ich wykorzystania jako potencjalnych katalizatorów o kontrolowanych właściwościach, szczególnie pożądanym w wielu reakcjach organicznych m.in. selektywnego uwodorniania. Ponadto, te suspensje mogą zostać użyte do modyfikacji powierzchni z zastosowaniem innych technik, jak np. spin coating czy dip coating. Dodatkowo mogą one stanowić dodatek lub modyfikator substancji płynnych, jak np. farb o właściwościach biobójczych, bioszkieł czy substancji kontrastowych. Ze względu na swoje unikatowe właściwości

suspensje te mogą być stosowane w powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS), gdzie zaobserwowano podobną wartość wzmocnienia sygnału markerowych pasm rodaminy R6G jak dla powszechnie syntezowanych hydrozoli z użyciem borowodorku sodu czy cytrynianu trisodu.

Wynalazek w kilku praktycznych przykładach jego realizacji, został szczegółowo objaśniony poniżej.

Przykład 1

Trójszyjną kolbę okrągłodenną o pojemności 100 ml zaopatrzoną w chłodnicę zwrotną oraz mieszadło mechaniczne łopatkowe, umieszczoną na łaźni wodnej o temperaturze 25°C, napełniono 40 ml roztworu azotanu(V) srebra o stężeniu 2,5 mM. Warunki anaerobowe zapewniono przez 30 minutowe przepuszczanie przez układ reakcyjny argonu. Następnie do roztworu azotanu(V) srebra wkroplono 1,2 ml 1,42 mM roztworu L-cysteiny (również sporządzonego w warunkach anaerobowych). Tak sporządzony roztwór o pH 3,4 mieszano ze stałą prędkością 170 obr/min. przez 10 minut. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 0,5 ml 10 mM borowodorku sodu. Mieszanie ze wskazaną prędkością kontynuowano przez 40 minut. Otrzymaną suspensję poddano ultrafiltracji membranowej z wykorzystaniem kolumny filtracyjnej zaopatrzonej w membranę polietersulfonową (MNW 100 000). Roztwór filtrowano do osiągnięcia przewodnictwa odcieku 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Przykład 2

Sposób otrzymywania nanocząstek srebra według przykładu 1, zmieniono tak, że pH mieszaniny reakcyjnej obniżono do wartości 2,5 za pomocą kwasu octowego.

Przykład 3

Sposób otrzymywania nanocząstek srebra według przykładu 1, zmieniono tak, że prowadzono proces w warunkach aerobowych, przy czym pH

mieszaniny reakcyjnej obniżono do wartości 2,5 za pomocą kwasu siarkowego(VI).

Przykład 4

Sposób otrzymywania nanocząstek srebra według przykładu 1 zmieniono tak, że jako prekursor jonów srebra zastosowano roztwór octanu srebra o stężeniu 1,42 mM w ilości 40 ml.

Przykład 5

Sposób wytwarzania nanocząstek srebra według przykładu 1 zmieniono tak, że temperaturę mieszaniny reakcyjnej podwyższono do 40°C, a czas reakcji wydłużono do 60 minut.

W tabeli poniżej zestawiono wybrane właściwości fizykochemiczne nanocząstek srebra otrzymanych według przykładów nr 1 do 5 ilustrujących istotę wynalazku

Lp Przykład	Kształt nanocząstek	Wielkość średnia [nm]	Współczynnik polidispersji	Wartość potencjału zeta [mV] dla pH 5,5 I=0,1 mM	Położenie maksimum pasma absorpcyjnego λ [nm]
1	kuliste	15±3	0,321	48±4	396
2	kuliste	5±2	0,209	55±2	389
3	kuliste	10±2	0,234	52±2	392
4	kuliste	15±5	0,523	54±2	398
5	kuliste	5±2	0,316	41±4	384

PEŁNOMOCNIK

Andrzej Stachowski
Rzecznik Patentowy