

# ELECTROCHEMICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF SILVER NANOPARTICLES

Vasyliiev G.S., Vorobyova V.I., Pylypenko I.V., Linyuchev O.G.

*National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute". Prosp. Peremohy, 37, Kyiv-03056, Ukraine.*

In this paper, green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the aqueous extracts of apricot, grape and black currant wastes as reducing and capping agents, has been discussed. Cyclic voltammetry study was performed to determine the antioxidant activity of the AgNPs. The antiradical activity of the synthesized nanoparticles was evaluated by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) power assays. The antiradical activity followed the descending order: grape pomace extract – AgNPs > apricot pomace extract - AgNPs > currant pomace – AgNPs. A good correlation between electrochemical and spectrophotometric techniques was established.

**Keywords:** silver nanoparticles, antioxidant activity, antiradical activity, cyclic voltammetry.

## ЕЛЕКТРОХІМІЧНА ТА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНА ОЦІНКА АНТИОКСИДАНТНОЇ ЗДАТНОСТІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

Васильєв Г.С., Воробйова В.І., Пилипенко І.В., Лінючев О.Г.

*Національний технічний університет України «Київський політехнічний Інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, пр-т. Перемоги 37, 03056*

На сьогодні світове виробництво нанчастинок срібла (AgNP<sub>s</sub>), за різними оцінками, становить в межах 360–450 тон на рік. Передові позиції в цьому рейтингу займають США, Європейський Союз і Японія [1-5]. Дослідження у цій сфері активно ведуть також країни колишнього СНД, Австралія, Канада, Китай, Південна Корея, Ізраїль, Сінгапур, Бразилія і Тайвань. В останніх звітах міжнародної програми Project on Emerging Nanotechnologies (PEN, (<http://www.nanotechproject.org>)) повідомляється про 1814 споживчих товарів від 622 компаній у 32 країнах, що займаються одержанням та комерційною

реалізацією продуктів з AgNP<sub>s</sub>. На сьогоднішній день виготовляють як порошки так і суспензії наночастинок з розмірами до 250 нм. До числа компаній-виробників AgNP<sub>s</sub> відносяться: BlueNano, Cambrios, Agfa, Blue Nano, Carestream Advanced Materials, CimaNanotech, Dow Chemical, PolyIC, Ferro, Saint-Gobain, Sigma Technologies, Suzhou NanoGrid Technology and Sumitomo Metals and Mining, Nano Silver Manufacturing Sdn Bhd, Nova Centrix, Advanced Nano Products Co.Ltd., Ames Goldsmith Corporation, Creative Technology Solutions Co. Ltd., Applied Nanotech Holdings, Inc., NanoMas Technologies, Inc., ras materials, SILVIX Co.,Ltd. and Bayer Material Science AG.

Властивості даних наночастинок є поліфункціональними. Наразі вже достовірно встановлено, що AgNP<sub>s</sub> проявляють антимікробні, протигрибкові, антивірусні, каталітичні/фотокаталітичні, антиоксидантні/антирадикальні та інші властивості. Різноманітність функціональних властивостей обумовлює можливість їх практичного застосування в різних галузях: водоочищення та водопідготовка, текстильна, харчова промисловості, хімічні виробництва, медицина/біомедицина тощо.

Особливо цікавими і в той же час найменше вивченими є антиоксидантні/антирадикальні властивості AgNP<sub>s</sub>. Тема вільних радикалів продовжує привертати підвищену увагу з боку наукового співтовариства. Вільним радикалом вважається хімічна сполука, що має один або більше неспарених електронів. Висока реакційна здатність радикалів у фізіологічних умовах призводить до прискорення процесів окиснення, що руйнують молекулярну основу клітини, і викликає в результаті численні патологічні стани. Сполуки, здатні зв'язувати неспарені електрони з утворенням менш активних або зовсім неактивних радикалів, називають антиоксидантами. Використання антиоксидантів (АО) – речовин, що переривають радикально-ланцюгові процеси окислення в об'єктах органічного і неорганічного походження, отримало поширення останнім часом в різних областях хімії, біології та медицини.

Незважаючи на чисельність наукових досліджень у напрямі пошуку та синтезу сполук, що мають антиоксидантну/антирадикальну дію, зберігається потреба в додаткових експериментальних даних із вивчення антирадикальних властивостей наночастинок металів, а особливо нанодисперсій срібла. Антиоксиданти неорганічного походження широко використовуються в складі лікарських засобів, в косметології, харчовій промисловості.

Існує багато способів/методів синтезу AgNPs, до них відносяться фізичні, хімічні та біологічні методи [6]. Багато з фізичних та хімічних методів синтезу є дорогими або використовувати токсичні речовини, що роблять їх несприятливим для синтезу і обмежує їх використання у медичній/біомедичній галузях. Для зниження вартості виробництва AgNPs хімічними методами та усунення небажаних побічних продуктів розроблені нові методи синтезу NPs з використанням рослин, грибів та бактерій, що використовують відновники рослинного походження для відновлення та стабілізації наночастинок. Тому особливої актуальності набув «зелений»/фітохімічний синтез нанодисперсій срібла з використанням органічних сполук рослинної сировини або продуктів переробки агропромислового комплексу [7].

Рослинні екстракти містять велику кількість вторинних метаболітів (поліфенольні сполуки, насичені та ненасичені кислоти, альдегіди і т.д.), які мають окислювально-відновні властивості і виконують функцію відновників і стабілізаторів наночастинок. Слід зазначити, що при «зеленому» синтезі нанодисперсій срібла, органічні сполуки природного походження, що залучені у реакції синтезу, також мають антиоксидантні властивості, що обумовлює синергічний ефект [8].

Тому актуальним є проведення «зеленого»/фітохімічного синтезу нанодисперсій срібла з використанням рослинних екстрактів як відновлюючого та стабілізуючого компонентів і вивчення їх антиоксидантних/антирадикальних властивостей.

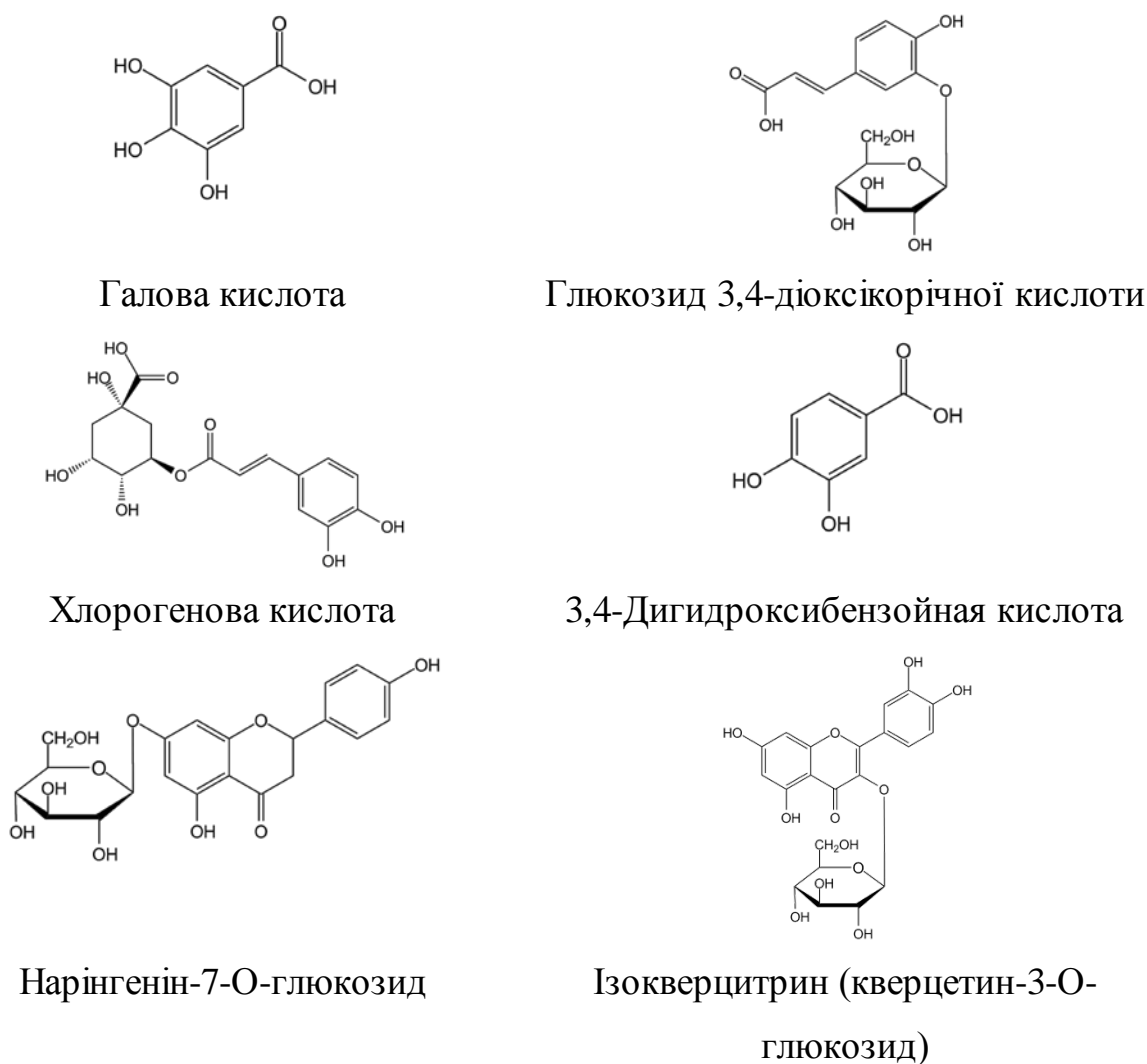
Зростаючий інтерес до антиоксидантів обумовлює збільшення кількості методів оцінки ефективності цих речовин/систем. На даний час існує багато

методів дослідження антиоксидантної активності. Їх класифікують за різними ознаками (за типом джерела окиснення, типом сполук, що окиснюються, за способом визначення окисненої сполуки). Серед методів визначення антирадикальних властивостей антиоксидантів (АО) у модельних системах значне місце посідають реакції зі стабільними радикалами – 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилом (DPPH) та катіон-радикалом 2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABTS<sup>•+</sup>). За способом реєстрації антиоксидантної активності методи можна поділити на волюмометричні (ґрунтуються на вимірювання об'єму поглинутого кисню), фотометричні, хемілюмінесцентні, флуоресцентні, електрохімічні [9].

Низькомолекулярні сполуки рослинних екстрактів (катехін, кверцетин та інші) все частіше використовують як антиоксиданти. Антиоксиданти взаємодіючи з радикальними частинками, проявляють свою активність переважно в реакціях переносу електрона і/або протона, а подібні взаємодії мають електрохімічну природу [10]. У зв'язку з цим застосування електрохімічних методів дослідження при вивченні антиоксидантної активності обумовлено не тільки визначенням концентрацій окиснених і відновлених форм в розчині, а й можливістю дослідити взаємодії антиоксидантів на рівні дослідження механізму реакцій. Це дозволяє не тільки визначати активність досліджуваної сполуки в реакціях переносу електрона, але і класифікувати антиоксиданти за способом впливу на активні форми кисню або стійкі радикали. Таким чином, можливо дослідити механізм дії антиоксидантів і передбачати їх активність на основі аналізу електрохімічної характеристик окиснення сполуки. Ще більш актуальним цей метод для рослинних екстрактів, що є сумішшю органічних сполук.

Попереднє дослідження компонентного складу водних екстрактів жмихів винограду, смородини та абрикосу показало, що основними класами сполук, що в них домінують є поліфенольні сполуки, а саме флавоноїди та органічні кислоти: галова, хлорогенова, кавова, кумаринова, ферулова. У екстрактах

жмиха винограду та смородини, також в значній кількості присутні антоціанові сполуки (рис. 1).



**Рис. 1.** Основні ідентифіковані компоненти рослинних екстрактів

Методом циклічної вольтамперометрії встановлено окисно-відновлювальні характеристики рослинних екстрактів, та показано, що всі розглянуті екстракти мають високу відновлювальну здатність та можуть бути використані для синтезу наночастинок [11]. В процесі синтезу нанодисперсій срібла не вся кількість рослинного екстракту може бути затрачена на відновлення іонів срібла, а отже антиоксидантний ефект нанодисперсій срібла буде представляти сумарною дією як синтезованих НЧ, так і залишковою кількістю «зелених» органічних сполук.

Метод DPPH• (з використанням вільного радикалу), є одним із розповсюджених непрямих методів оцінки загальної антиоксидантної активності. DPPH• не реагує з флавоноїдами, які не містять гідроксильних груп у В-кільці, а також з ароматичними кислотами, що містять тільки одну гідроксильну групу. Метод базується на властивості стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH•) реагувати з донорами протонів, включно з фенолами. Враховуючи компонентний склад екстрактів, що використані для зеленого синтезу, вище зазначений метод є актуальним. У випадку дослідження антиоксидантних властивостей нанодисперсій срібла, синтезованих з використанням рослинних екстрактів, використання сукупності електрохімічного і спектрального методів є також доцільним.

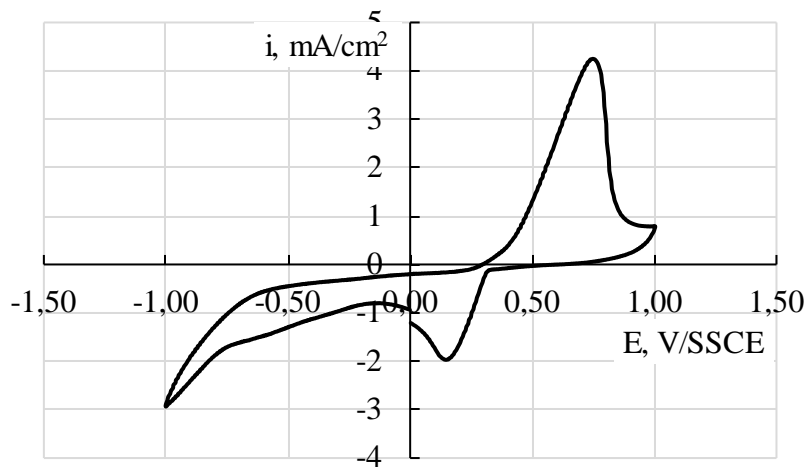
Метою роботи було проведення «зеленого»/фітохімічного синтезу наночастинок срібла (AgNPs) при використанні водних екстрактів жмихів винограду (*Vitis vinifera.*) (ЕЖВ), абрикосу (*Prunus armeniaca*) (ЕЖА), чорної смородини (*Ribes nigrum L.*) (ЕЖС) та дослідження антиоксидантних/антирадикальних властивостей нанодисперсій срібла електрохімічними та спектроскопічними методами.

### **Результати та їх обговорення**

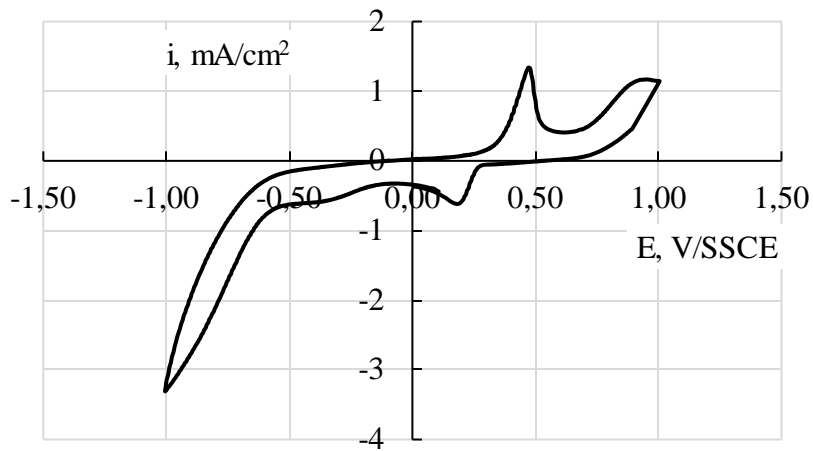
Антиоксидантну активність нанодисперсій срібла оцінювали електрохімічним методом циклічної вольтамперометрії, антирадикальну активність визначали спектрофотометричним методом відносно модельної системи радикалів 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу (DPPH).

***Дослідження окисно-відновлювальної характеристики (антиоксидантної активності) нанодисперсій срібла методом зняття циклічних вольтамперних кривих***

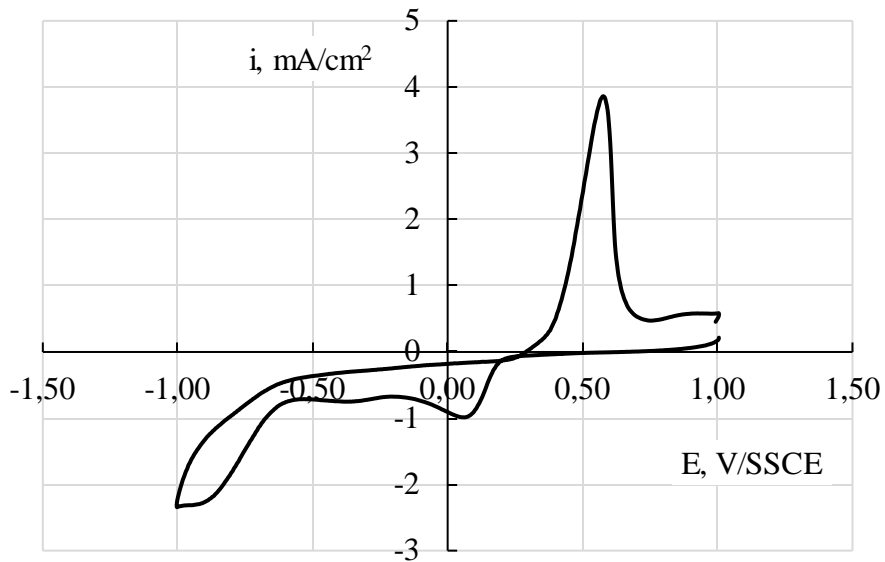
При знятті циклічних вольтамперних кривих в системі нанодисперсії срібла ЕЖА-AgNPs (рисунок 2 а) на кривій помітно два чітких піки, один з яких відповідає окисненню утворених наночастинок срібла, а інший — відновленню іонів срібла.



**а**



**б**



**в**

**Рис. 2.** Циклічні вольтамперограми нанодисперсій срібла ЕЖА-AgNP (а), ЕЖВ-AgNP (б), ЕЖС-AgNP (в) (швидкість сканування 100 мВ/с; ацетатний буфер 0,1 М (рН 4) та NaClO<sub>4</sub> (70:28:2))

Окислення протікає необоротно. При зміні напрямку розгортки на катодній частині кривої з'являється пік при потенціалі  $-0,18\text{ В}$ , що відповідає відновленню продукту хімічної реакції попередньо сформованих продуктів окислення рослинного екстракту. Циклічна вольтамперограма зразка AgNP, що синтезована з використанням екстракту вичавки чорної смородини як відновника, демонструє два піки окислення при  $0,38$  і  $0,42\text{ В}$  (рис. 2 в). Загально визнано, що різні розміри нанодисперсій срібла AgNP мають різні вольтамперометричні профілі [12]. Анодний пік при  $0,21\text{ В}$  обумовлений окисленням наночастинок металів у розмірі квантових точок на вуглецевому електроді [13]. Окислення  $\text{Ag}^{(0)}$  в  $\text{Ag}^+$  підтверджується наявністю піку в діапазоні від  $0,05$  до  $0,45\text{ В}$  [14].

З отриманих циклічних кривих помітно, що в кожному з розчинів рослинних екстрактів відбувається відновлення та окиснення іонів срібла та наночастинок срібла, відповідно. Отримані два піки з'являються у всіх розчинах при потенціалах  $0,1-0,2$  та  $0,45\text{ В}$  (відносно хлорид срібного електроду порівняння), але з різними густинами струму. Це пов'язано з тим, що в кожному розчині знаходиться різна кількість наночастинок срібла і сила струму буде більшою в тому розчині, де більша концентрація наночастинок. Найбільша сила струму зафіксована в розчині екстракту винограду та розчині абрикосу після синтезу наночастинок.

Отже антиоксидантні властивості нанодисперсій срібла синтезованих з екстрактом абрикосу та винограду вищі. Ці результати частково узгоджуються зі ступенем перетворення для іонів срібла. Він максимальний для екстракту винограду ( $93,91\%$ ) та приблизно рівний для абрикосу та смородини ( $65,65$  та  $65,86\%$  відповідно).

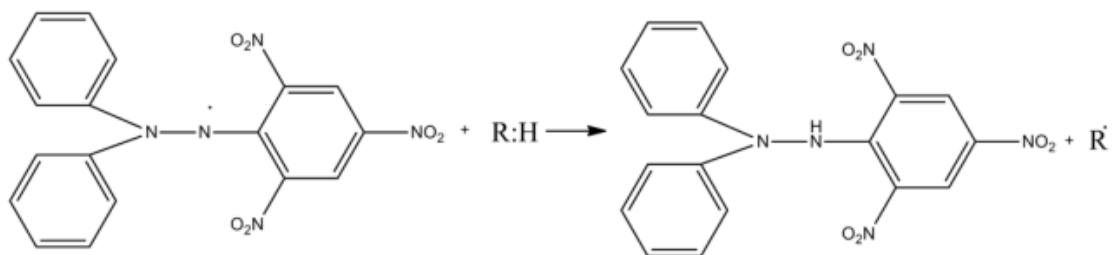
***Дослідження антирадикальних властивостей відносно модельної системи радикалів 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразу (DPPH) та з катіон-радикалом АБТС.***

ДФПГ існує у вигляді стабільного вільного радикала внаслідок делокалізації неспареного електрона по всій молекулі. Делокалізація сприяє виникненню фіолетового забарвлення, що характеризується смугою



поглинання приблизно при  $\lambda=520$  нм. При додаванні до розчину ДФПГ, сполуки що може виступати донором атома водню, фіолетовий колір поступово зникає, а розчин набуває блідо-жовтого забарвлення (обумовленого наявністю пікрильної групи) внаслідок утворення гідразину ДФПГ-Н.

На рис. 3 наведено схему відновлення ДФПГ до ДФПГ-Н.



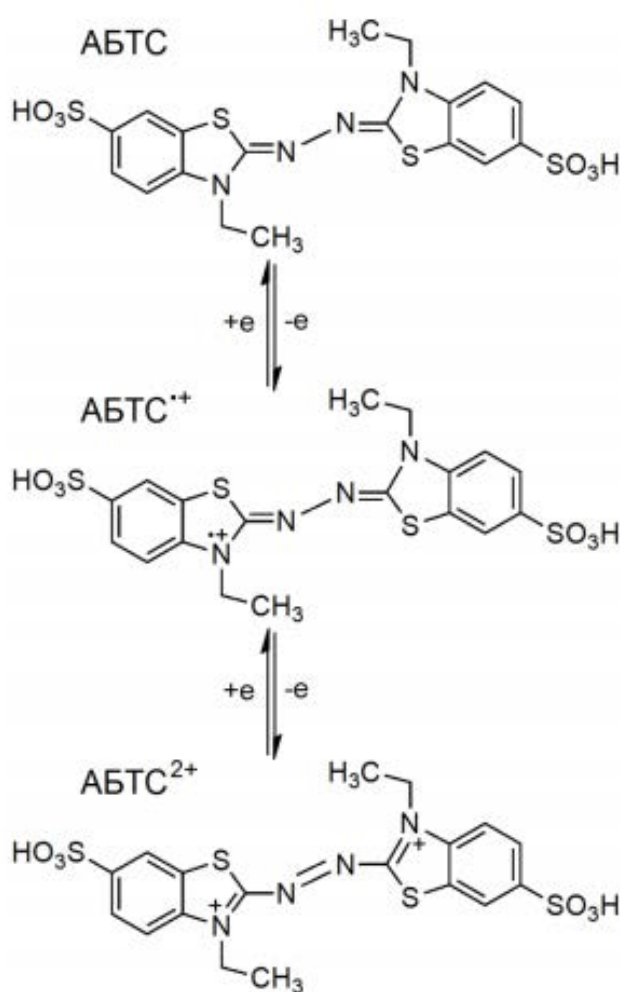
**Рис. 3.** Схема відновлення ДФПГ

Із табл. 1 видно, що система нанодисперсії ЕЖВ – AgNPs виявила найбільшу радикалпоглинальну активність. Активність системи знаходиться в межах 60,2 – 34,7%. В порівнянні з комерційним антиоксидантом бутильованим гідроксианізолом (ВНА) досліджувані нанодисперсії срібла проявляють відносно високу антирадикальну активність.

**Таблиця 1.** Результати визначення антирадикальної активності сполук

Концентрація, мг/мл	Радикал-поглинальна активність, % (%)			
	ЕЖА – AgNPs	ЕЖВ – AgNPs	ЕЖС – AgNPs	ВНГ
0.1	31.0±0.1	60.2±0.1	59.1±0.1	37.1±0.1
0.2	38.3±0.1	71.8±0.1	68.5±0.1	41.4±0.1
0.4	49.6±0.1	80.4±0.1	70.7±0.1	59.6±0.1
0.6	61.6±0.1	90.9±0.1	89.6±0.1	68.4±0.1
1.5	77.6±0.1	99.0±0.1	97.0±0.1	87.3±0.1

Ще одним з розповсюджених методів дослідження антирадикальних властивостей є метод, що передбачає використання катіон-радикала АБТС. Генерація катіон-радикала 2,2'-азино-біс-(3-етилбензтіазолін-6-сульфо кислоти) створює основу для спектроскопічного вимірювання антирадикальної дії розчинів чистих речовин, екстрактів та різних водних сумішей (рис. 4). Враховуючи те, що АБТС<sup>•+</sup> це катіон-радикал, можна припустити, що взаємодія зі сполуками-донорами електронів носитиме дещо інший характер ніж у випадку ДФПГ.



**Рис. 4.** Схема утворення катіон-радикала АБТС.

Якщо у випадку реакції нанодисперсій срібла синтезованих з використанням рослинних екстрактів з ДФПГ в етанолі найбільш імовірним є перебіг реакції за двома конкуруючими процесами: НАТ – hydrogen atom

transfer (механізм взаємодії поліфенольних сполук із радикалами, що полягає у прямому переносі атома водню від фенолу до радикала) і SPLET – sequential proton loss electron transfer (механізм взаємодії фенольних сполук із вільними радикалами, що полягає у послідовній дисоціації молекули фенолу з переносом електрона до радикала), то у випадку реакції із катіон-радикалом АБТС найбільш імовірним є реалізація механізму ET-PT – electron-transfer proton-loss (механізм взаємодії фенольних сполук із вільними радикалами, що полягає у переносі електрона з послідуєчим переносом протона від молекули фенолу до радикала).



В табл. 2 наведено кількісні характеристики радикал-поглинальної активності нанодисперсій срібла з катіон-радикалом АБТС. Дані табл. 1 та 2 свідчать, що всі досліджувані сполуки виявляють більшу антирадикальну дію в реакції з ДФПГ ніж з катіон-радикалом АБТС. Реакції ДФПГ і катіон-радикала АБТС з нанодисперсіями срібла можна розділити на концентрації більш і менш ефективні порівняно з комерційним антиоксидантом.

**Таблиця 2.** Результати визначення антирадикальної активності сполук

Концентрація, мг/мл	Радикал-поглинальна активність, %			
	ЕЖА – AgNPs	ЕЖВ – AgNPs	ЕЖС – AgNPs	ВНТ
0.1	5.3±0.1	10.2±0.1	9.1±0.1	11.1±0.1
0.4	25.6±0.1	53.4±0.1	20.5±0.1	29.9±0.1
0.6	40.6±0.1	60.8±0.1	37.1±0.1	55.7±0.1
1.5	54.2±0.1	79.5±0.1	48.2±0.1	68.4±0.1

Для досліджуваних систем ефективними є концентрації більші 0,4 мг/мл. Отримані результати свідчать, що результати спектрофотометричних даних узгоджуються з результатами електрохімічних досліджень визначення антирадикальної/антиоксидантної здатності.

**Таблиця 3.** Деколонізація нанодисперсій срібла з катіон-радикалом АБТС

	ЕЖА – AgNPs
	ЕЖВ – AgNPs
	ЕЖС – AgNPs

### **Висновки**

Дослідження окисно-відновлювальної антиоксидантної характеристики нанодисперсій методом зняття циклічних вольтамперних кривих свідчить, що всі розглянуті системи нанодисперсій срібла мають високу антиоксидантну активність. Антиоксидантна активність розглянутих систем нанодисперсій зменшується у напрямку екстракт ЕЖВ-AgNP > ЕЖА-AgNP > ЕЖС-AgNP. Отримані результати свідчать, що результати спектрофотометричних даних узгоджуються з результатами електрохімічних досліджень визначення.

### **Література**

[1] Carocho M., Ferreira I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives //Food and chemical toxicology. – 2013. –Т. 51. – С. 15-25.

[2] Yen G. C., Duh P. D., Tsai H. L. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid and gallic acid //Food chemistry. – 2002. – Т. 79. – №. 3. – С. 307-313.

[3] Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E //Analytical biochemistry. – 1999. –Т. 269. – №. 2. – С. 337-341.

[4] Kiokias S., Proestos C., Varzakas T. A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts//Current Research in Nutrition and Food Science Journal. – 2016. – T. 4. – №.Special Issue Carotenoids March 2016. – C. 25-37.

[5] Maqsood S. et al. Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review//Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2014. – T. 13. – №.6. – C. 1125-1140.

[6] Barba F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review //Trends in Food Science & Technology. – 2016. – T. 49. – C. 96-109.

[7] Dudonné S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays //Journal of agricultural and food chemistry. – 2009. – T. 57. – №. 5. – C. 1768-1774.

[8] Kamath S. D. et al. Determination of total phenolic content and total antioxidant activity in locally consumed food stuffs in Moodbidri, Karnataka, India //Advances in Applied Science Research. – 2015. – T. 6. – C. 99-102.

[9]. Zhang Y. et al. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants //LWT-Food Science and Technology. – 2015. – T. 63. – №. 1. – C. 569-574.

[10] Hara K. et al. Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay //Data in brief. – 2018. – T. 17. – C. 870-875.

[11] Vasylyev G.S., Vorobyova V.I., Kuzmenko O.M., Skiba M.I. electrochemical evaluation of reducing Ability of plant extracts / Promising Materials and Processes in Applied Electrochemistry – 2019 :Monograph /: KNUTD, 2019,. – pp. 246-267. ISBN 978-617-7506-48-4

[12] Ndikau, M., Noah, N. M., Andala, D. M., & Masika, E. (2017). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Citrullus lanatus Fruit Rind Extract. International Journal of Analytical Chemistry 1–9.

[13] Chekin F., & Ghasemi, S. (2014). Silver nanoparticles prepared in presence of ascorbic acid and gelatin, and their electrocatalytic application. Bulletin of Materials Science, 37(6):1433-1437

[14] Khan Z. U. H., Khan A., Shah A., Wan P., Chen Y., Khan G. M., Khan H. U. (2016). Enhanced photocatalytic and electrocatalytic applications of green synthesized silver nanoparticles. Journal of Molecular Liquids 220:248–257.