

Разработка технологии биовосстановления ионов серебра в наночастицы с использованием экстрактов лекарственных растений

Чижи́к О. В.¹, Ковзунова О. В.¹, Мазур Т. В.¹, Кузовкова А. А.²

¹ *Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь, chizhikolga17@gmail.com*

² *Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Беларусь*

Резюме. Проведен скрининг растений и растительных *in vitro* культур на повышенное накопление биологически активных веществ (БАВ), являющихся восстанавливающими агентами для нитрата серебра. Подобраны способы получения растительных экстрактов. Получены данные по количественному содержанию фенольных соединений в экстрактах и *in vitro* культурах лекарственных растений. Дана оценка влияния разных концентраций нитрата серебра, времени синтеза, температуры и pH реакционной среды на количество синтезированных наночастиц серебра.

The technology of the silver ions bioreduction in nanoparticles elaboration using medicinal plants extracts. Chizhik O. V., Kovzunova O. V., Mazur T. V., Kuzovkova A. A. **Summary.** Medicinal plants and *in vitro* plant cultures have been screening on the content of biologically active substances (BAS) which are the reducing agents for silver nitrate. Methods of plant extracts obtaining have been selected. The data on the quantitative content of phenolic compounds in extracts of medicinal plants and *in vitro* cultures have been obtained. The effect of different concentrations of silver nitrate and reducing agents, synthesis time, the temperature and pH of the reaction medium influence on the number of synthesized silver nanoparticles synthesis have been determined.

В настоящее время бурно развивается область нанотехнологий, связанная с получением, изучением и применением частиц чистых элементов и их соединений. Наночастицы обладают высокой биологической активностью. Имея малые размеры (<100 нм), наночастицы способны проходить мембранные барьеры живых организмов, что нашло широкое применение в медицине, биологии и промышленности [1].

Для получения наночастиц в промышленных масштабах применяют различные физические и химические методы, сопряженные с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды и живых организмов. Существует очевидная потребность в альтернативных экономически эффективных и в то же время безопасных и экологически чистых методах производства наночастиц. В последние годы стали развиваться новые «зеленые», эко-дружелюбные технологии биогенного синтеза наночастиц с использованием живых организмов в качестве «биофабрик», в которых наночастицы образуются путем восстановления растворимых солей металлов [2]. В настоящее время биогенный синтез наночастиц металлов с использованием растительных систем (растительных экстрактов и *in vitro* культур растений) стал альтернативой физико-химическим подходам [1]. Производство наночастиц с использованием растений имеет важные преимущества перед другими биологическими системами. Низкая

стоимость выращивания, короткие сроки производства, безопасность и возможность регуляции необходимого объема продукции делают растения привлекательной платформой для синтеза наночастиц [1, 2].

При разработке технологии биогенного синтеза наночастиц с использованием растений важным этапом является выбор кандидатур на роль «биофабрик» и поставщиков восстанавливающих агентов. В качестве восстановителя ионов металлов в наночастицы могут выступать растительные фенольные соединения, обладающие сильными окислительно-восстановительными свойствами [1, 3], поэтому с этих позиций лекарственные растения — лучшие кандидатуры. Большое влияние на формирование наночастиц оказывают рН и температура растительного экстракта [1, 3, 4]. Установлению их оптимальных значений необходимо уделить особое внимание при разработке данной технологии. Изменение рН приводит к изменению заряда природных фитореагентов в составе экстракта, что влияет на их способность связывать и восстанавливать катионы и анионы металлов в процессе синтеза наночастиц, а это, в свою очередь, может влиять на их форму, размер и выход [3]. Повышение температуры способствует увеличению скорости реакции и эффективности синтеза наночастиц [5].

Цель исследований — установить условия биогенного синтеза наночастиц серебра с использованием экстрактов лекарственных растений.

Объектами исследования служили лекарственные растения и *in vitro* культуры лекарственных растений из коллекции отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС. Приготовление экстрактов исследуемых образцов лекарственных растений проведено по [6] с нашими модификациями. Суммы полифенолов определяли по [7], измерения проводили на фотоколориметре SOLAR при длине волны 765 нм в кювете толщиной 1 см. Все анализы проводили в трехкратной повторности, полученные результаты статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы Statistica 7.0, изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

На рис. 1 и табл. 1 представлено суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах *in vitro* культур и листьев *Silybum marianum*, *Agastache rugosa*, *Melittis sarmatica*, *Digitalis purpurea*, экстракты которых являются хорошими восстанавливающими агентами для синтеза наночастиц серебра.

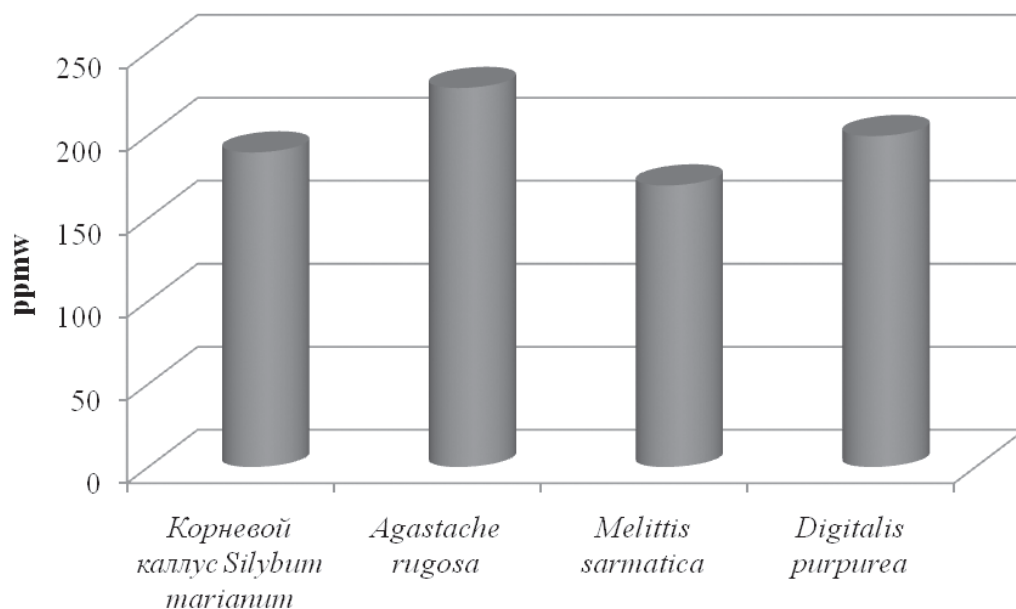


Рис. 1. Суммарное содержание фенольных соединений (ppmw) в *in vitro* культурах лекарственных растений (каллусы *Silybum marianum*, *Agastache rugosa*, культуры побегов *Melittis sarmatica*, *Digitalis purpurea*)

Восстановление наночастиц металлов из их солей сопровождается изменением цвета раствора из-за возбуждения поверхностного плазмонного резонанса, что указывает на формирование наночастиц. Для изучения интенсивности процесса биовосстановления наночастиц серебра из нитрата серебра с помощью полученных растительных экстрактов использовали водные растворы AgNO_3 (Sigma) в концентрациях 1×10^{-1} моль/л, 1×10^{-2} моль/л, 1×10^{-3} моль/л. Реакцию проводили в темноте во избежание фотоактивации AgNO_3 , при комнатной температуре (18°C) и pH 6,0. Биовосстановление AgNO_3 до ионов серебра на данном этапе наших исследований оценивали по изменению окраски раствора. Из работ других исследователей [3, 5] известно, что наночастицы серебра, полученные биовосстановлением, представляют собой красно-бурюю коллоидную смесь, т. е. чем больше синтезируется наночастиц серебра, тем более бурой будет окраска реакционной смеси. Как видно на рис. 2, в зависимости от природы экстракта и концентрации вносимого раствора AgNO_3 , окраска реакционной смеси варьировала от желтовато-зеленой до коричневой.

В табл. 2 представлены данные по времени развития окраски в экстрактах из *in vitro* культур лекарственных растений при комнатной температуре (18°C) и pH 6,0, т. е. времени, необходимого для формирования максимально возможного для данной культуры количества наночастиц серебра.

Таблица 1
Суммарное содержание фенольных соединений в листьях лекарственных растений (в пересчете на галловую кислоту, в мг/г сырого веса)

№ п/п	Культура	Среднее значение, мг/г сырого веса
1	<i>Agastache rugosa</i>	18,56±0,04
2	<i>Digitalis purpurea</i>	20,78±0,01
3	<i>Melittis sarmatica</i>	19,37±0,02
4	<i>Silybum marianum</i>	20,17±0,01

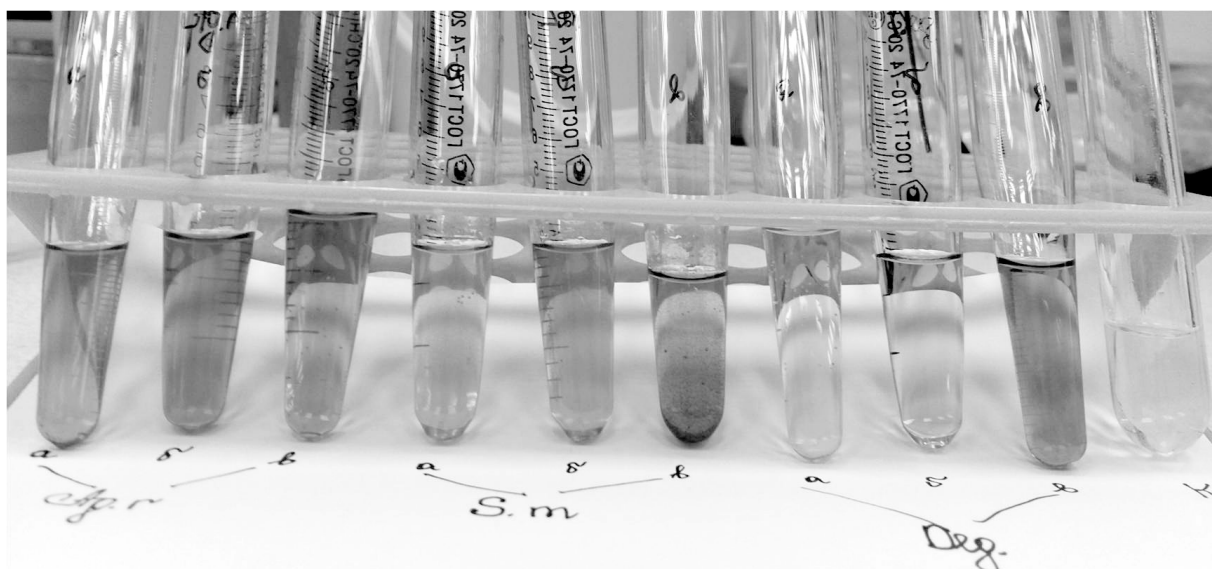


Рис. 2. Экстракты *in vitro* культур *Agastache rugosa*, *Silybum marianum*, *Digitalis purpurea*
Примечание: реакционная смесь, содержащая экстракты *in vitro* культур *Agastache rugosa*, *Silybum marianum*, *Digitalis purpurea* и водный раствор AgNO_3 в концентрациях 1×10^{-2} моль/л (а), 1×10^{-3} моль/л (б), 1×10^{-4} моль/л (в), К — контроль

Таблица 2

Время, необходимое для формирования максимально возможного количества наночастиц серебра в экстрактах из *in vitro* культур лекарственных растений с использованием водного раствора AgNO_3 в концентрации 1×10^{-2} моль/л

Культура	Время
<i>Silybum marianum</i> (корневой каллус)	13 мин
<i>Agastache rugosa</i> (каллусная культура)	10 мин
<i>Melittis sarmatica</i> (культура побегов)	20 мин
<i>Digitalis purpurea</i> (культура побегов)	16 мин

Показано, что наименьшее время, необходимое для формирования максимально возможного количества наночастиц серебра, характерно для экстрактов из *in vitro* культур *Agastache rugosa* (10 мин) и *Silybum marianum* (13 мин). Полученные данные коррелируют с высоким содержанием восстанавливающих агентов в этих экстрактах, особенно из каллуса *Agastache rugosa*. Наибольшее количество наночастиц серебра синтезировалось из экстракта корневого каллуса *Silybum marianum* с раствором AgNO_3 в концентрации 1×10^{-4} моль/л.

Как указывалось выше, большое влияние на формирование наночастиц оказывает pH растительного экстракта. Мы оценивали биовосстановление наночастиц серебра в растительных экстрактах при различных значениях pH: 1, 3, 5, 7, 9 и 11. Показано, что для образования наночастиц серебра в исследуемых экстрактах оптимальным является щелочное значение pH (максимум абсорбции реакционных смесей наблюдался при pH 9 и 11).

Другой важный физический фактор, влияющий на формирование наночастиц в экстрактах растений — температура. Был проведен ряд экспериментов, в которых реакционные смеси с водными растворами AgNO_3 в концентрациях 1×10^{-1} моль/л, 1×10^{-2} моль/л, 1×10^{-3} моль/л растворы в экстрактах лекарственных растений инкубировались при различных температурах (8, 18, 24, 35 и 45°C). В результате было установлено, что максимальный выход наночастиц серебра в экстракте *Agastache rugosa* наблюдался при концентрации AgNO_3 в растворе 1×10^{-2} моль/л и $t=24^\circ\text{C}$, в экстрактах *Silybum marianum* — при концентрации AgNO_3 1×10^{-2} моль/л и $t=18^\circ\text{C}$,

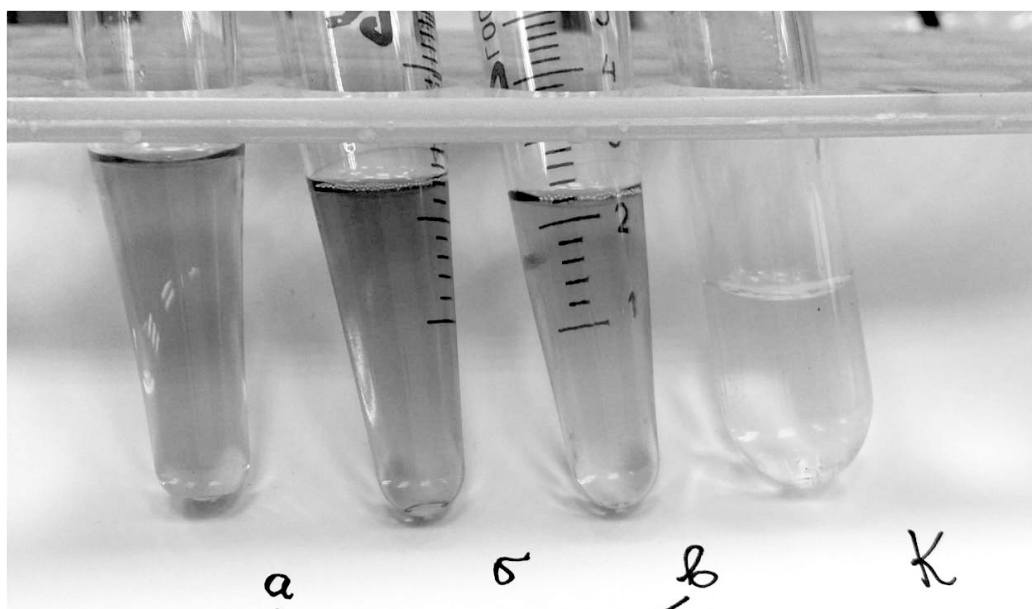


Рис. 3. Биовосстановление ионов серебра в наночастицы в экстракте *Melittis sarmatica* при температуре 35°C: а — концентрация AgNO_3 1×10^{-1} моль/л; б — 1×10^{-2} моль/л; в — 1×10^{-3} моль/л, К — контроль

Melittis sarmatica — 1×10^{-1} моль/л AgNO_3 и $t=35^\circ\text{C}$, *Digitalis purpurea* — 1×10^{-1} моль/л AgNO_3 и $t=24^\circ\text{C}$. На рис. 3 представлен результат эксперимента по образованию наночастиц в экстракте *Melittis sarmatica* с водным раствором AgNO_3 в различных концентрациях при температуре 35°C и pH 6,0.

Таким образом, нами установлены первичные условия биогенного синтеза наночастиц серебра с использованием различных экстрактов лекарственных растений. Максимальный выход наночастиц серебра показан для реакционной смеси экстракта из каллусной культуры *Silybum marianum* и водного раствора AgNO_3 в концентрации 1×10^{-3} моль/л, инкубированных при pH 9 и $t=18^\circ\text{C}$. Дальнейшие эксперименты будут направлены на выявление условий синтеза наночастиц серебра различной формы и размера.

Список литературы

1. Makarov V. V. «Green» Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. Acta nature, Vol 6, № 1 (20), 2014, P. 35–44.
2. Amit Kumar Mittal, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. J. Biotechnology advances, 2013, Vol. 31, P. 346–356.
3. Егорова Е. М. Наночастицы металлов в растворах: биохимический синтез, свойства и применение. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук, Москва, 2011.
4. Rodríguez-León Ericka. Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). Nanoscale Res Lett., 2013, Vol. 8(1), P. 318.
5. Lin L. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. Chemical Engineering Journal, 2010, Vol. 162, Issue 2, P. 852–858.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь, в 3-х т., том 2, 2008, с. 381.
7. Riedl K. M. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. J. Agric. And Food Chem., 2001, Vol. 49, № 10, P. 4917–4923.