

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет
имени Д. И. Менделеева»

Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских
препаратов

Кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств

Направление подготовки:
18.04.01 Химическая технология

Программа:
Современные технологии и аналитические методы исследований в
производстве лекарственных и косметических средств

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«Синтез нанодисперсий с использованием компонентов растительного
происхождения»**

Заведующий кафедрой

д. х. н., доцент

А. Н. Кусков

Руководитель

к.х.н, доцент

А. В. Кухаренко

Обучающийся

А. Н. Степакова

Москва, 2021

АННОТАЦИЯ

Выпускная квалификационная работа «Синтез нанодисперсий с использованием компонентов растительного происхождения» посвящена созданию методики для синтеза нанодисперсии серебра с помощью экстрактов растений. Особенностью данного способа является использование более экологичного подхода к синтезу наночастиц серебра за счет приготовления УЗ-экстрактов из растительного сырья, а также использования воды в качестве растворителя. Экспериментальным путем было подобрано растительное сырье для синтеза, условия синтеза (температура, значение рН, отношение нитрат серебра : экстракт), изучены свойства полученных нанодисперсий: их устойчивость, размер, а также антимикробная активность.

Выпускная квалификационная работа изложена на 75 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов и выводов. Включены 9 таблиц, 28 рисунков и список цитируемой литературы из 57 наименований.

ANNOTATION

The final qualification work "Synthesis of nanodispersions using components of plant extract" is devoted to the creation of a technique for the synthesis of silver nanodispersion using plant extracts. A feature of this method is the use of a more environmentally friendly approach to the synthesis of silver nanoparticles by preparing ultrasonic extracts from plant materials, as well as using water as a solvent. The plant raw material for synthesis, synthesis conditions (temperature, pH value, silver nitrate : extract ratio) were selected experimentally, the properties of the obtained nanodispersions were studied: their stability, size, and antimicrobial activity.

The final qualifying work is set out on 75 pages of typewritten text and consists of an introduction, a literature review, an experimental part, a discussion of the results and conclusions. 9 tables, 26 figures and a list of cited literature of 57 titles are included.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 Аналитический обзор	9
1.1 Общее представление о наночастицах: их свойства и роль в живых организмах ..	9
1.2 Основные свойства наночастиц серебра	11
1.3 Способы синтеза металлических наночастиц	13
1.3.1 Химические способы синтеза наночастиц	14
1.3.2 Физические способы синтеза наночастиц	15
1.3.3 Биологические способы синтеза наночастиц	15
1.4 Механизм реакции образования наночастиц металлов в результате биосинтеза из экстрактов растений	16
1.5 Факторы, влияющие на протекание биосинтеза и на морфологические характеристики НЧ	18
1.6 Основные метаболиты растений, принимающие участие в образовании наночастиц	20
1.6.1 Фенольные соединения	21
1.6.2 Терпеноиды (компоненты эфирных масел)	22
1.6.3 Алкалоиды	23
1.6.4 Сапонины	25
1.6.5 Мажорные компоненты семейства Яснотковые	26
1.7 Основные способы приготовления экстрактов растений	28
1.7.1 Классические способы экстракции	28
1.7.2 Микроволновая экстракция	29
1.7.2 Ультразвуковая экстракция	29
1.8 Методики синтеза наночастиц серебра из экстрактов растений	30
1.9 Методы исследования нанодисперсий серебра	33
1.9.1 Спектроскопические методы исследования	33

1.9.2 Сканирующая электронная микроскопия	34
1.9.3 Исследования на антимикробную активность.....	38
2 Экспериментальная часть	41
2.1 Оборудование, исходные материалы, реактивы и используемая посуда.....	41
2.2 Получение экстракта из листьев шалфея способом мацерации.....	42
2.8 Результаты и обсуждения.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	63

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НЧ – наночастицы

AgNP – наночастицы серебра

РС – растительное сырье

УЗЭ – ультразвуковая экстракция

МВЭ – микроволновая экстракция

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЛВ – лекарственное вещество

ЛФ – лекарственная форма

ИРЧ – измерение размера частиц

БАВ – биологически активные вещества

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день существует ряд подходов к синтезу наночастиц металлов: химический, физический и биологический. Последний вызывает интерес, особенно биологические способы синтеза наночастиц металлов с помощью экстрактов растений, которые в последнее время все чаще рассматриваются как быстрая, экологичная и легко масштабируемая технология. Образование наночастиц металлов происходит за счет восстановления метаболитами растений (компонентами фенольного происхождения, терпенами и др.), которые переходят в экстракт. Поэтому на сегодняшний день актуален вопрос о совершенствовании методов биологического синтеза, расширения круга используемого сырья, а также об изучении свойств получаемых нанодисперсий. Более того, наночастицы некоторых металлов, полученные путем биосинтеза обладают интересными фармакологическими свойствами из-за сорбции на их поверхности компонентов из экстракта, что расширяет круг их применения. По этим причинам вопрос оптимизации биологических способов синтеза наночастиц металлов актуален в настоящий момент.

Среди существующих методик синтеза редко решается вопрос об оптимизации условий экстракции из растительного сырья, в частности, ускорения процесса экстракции без потери эффективности, использования более экологически совместимых растворителей. Также решения требует вопрос о подборе условий синтеза нанодисперсий металлов: выбор растительного сырья, температуры ведения синтеза и значения pH. Не менее важным является вопрос о дальнейшем применении нанодисперсий, полученных таким способом, так как наличие в продукте синтеза метаболитов из растительного сырья, делает их более совместимыми с живыми организмами. Это мотивирует задуматься о возможности введения нанодисперсий некоторых металлов (например, серебра) в лекарственные препараты или использование в качестве активного компонента в косметических средствах. Вышеописанные проблемы требуют комплексного подхода к их решению и всестороннего изучения, как каждого этапа синтеза нанодисперсии металла, так и оценки по ряду показателей (морфологические свойства, микробиологическая активность) уже готового продукта синтеза.

Исходя из вышесказанного, **целью** данной работы является создание методики для синтеза нанодисперсии серебра с помощью экстрактов растений.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие **задачи**:

- подобрать условия экстракции метаболитов из растительного сырья: сравнить эффективность мацерации и ультразвуковой экстракции;

- подобрать условия синтеза (отношение компонентов, рН, температура, время синтеза) нанодисперсии серебра с помощью экстрактов из растительного сырья;
- оценить стабильность полученной нанодисперсии серебра;
- оценить антимикробную активность получаемых экстрактов и нанодисперсии серебра по отношению к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*;
- изучить морфологию получаемых наночастиц (форма, размер) с помощью методов СЭМ и ИРЧ;
- оценить возможность получения нанодисперсий серебра с помощью различных представителей семейства Яснотковые;
- сравнить результаты синтеза наночастиц серебра, синтезированных с помощью семейства Яснотковые и семейства Астровые

Работа состоит из введения, 10 глав, заключения и списка использованной литературы.

Список цитируемых источников содержит 57 наименований.

1 Аналитический обзор

1.1 Общее представление о наночастицах: их свойства и роль в живых организмах

Нанотехнология – наука, занимающаяся изучением различных наноструктур или наноматериалов. Одним из объектов нанотехнологии являются наночастицы – частицы, размер которых находится в диапазоне от 1 до 100 нм. Многообразие свойств наночастиц (морфология, размер, соотношение между площадью и объемом) позволяет внедрять их в различные отрасли: здоровье, механика, оптика, химическая промышленность, электроника, космическая промышленность, энергетика, катализ, одноэлектронные транзисторы, нелинейные оптические устройства и фотоэлектрохимическое применение. Поэтому в последнее время вопрос о совершенствовании методик синтеза наночастиц остается открытым, поэтому в последнее время было создано множество методов их синтеза [1, 2]. Наночастицы металлов обладают уникальными физико-химическими, оптоэлектронными и биохимическими свойствами. Они используются для различных целей в промышленности, фармацевтике, медицине и технике [3]. Некоторые из них обладают антибактериальными свойствами из-за их большого отношения площади поверхности к объему, что представляет интерес для исследователей из-за развития устойчивых штаммов (по причине растущей устойчивости микробов к ионам металлов и антибиотикам). [5] Несмотря на существование в природе большого количества металлов, лишь немногие из них могут находиться в наноструктурированной форме. К таким металлам можно отнести золото, серебро, палладий и платину [5,6]. Среди вышеупомянутых металлов, наночастицы серебра привлекают внимание благодаря их уникальным характеристикам, из-за которых их используют в различных областях, прежде всего в фармацевтике. Их преимущественным свойством является высокая антибактериальная активность против широкого спектра бактерий без какой-либо токсичности для живых организмов [7]. Появление устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов, особенно множественной устойчивости к лекарственным средствам, приводит к тому, что ученым приходится получать новые соединения, обладающие антимикробными свойствами. Например, антимикробная активность серебра без токсичности для клеток человека может сделать их подходящей заменой антибиотикам [7,8].

Наночастицы также применяют для специфической доставки многих лекарств. На сегодняшний день лекарства, которые используют в традиционных ЛФ имеют ряд существенных недостатков, например: ненаправленное действие, невозможность

поддержание оптимальной терапевтической концентрации ЛВ, недостаточная биосовместимость и другие. Все эти недостатки можно нивелировать, применяя транспорт ЛВ с помощью наночастиц прямо в очаг патологического процесса. Например, можно пролонгировать действие ЛВ и в результате снизить частоту приема лекарства, преодолеть биологические барьеры (ГЭБ), добиться селективного действия на клетки-мишени. Также интересное применение НЧ – визуализация очага патологического процесса [9]. Это позволяет использовать НЧ для диагностики, например, наночастицы золота использовались для выявления опухолей, ангиогенеза, диагностики генетических заболеваний и генетических нарушений. Наночастицы оксида железа могут применяться для лечения рака, гипертермии, доставки лекарств, восстановления тканей, маркировки клеток, нацеливания и иммуноанализа, детоксикации биологических жидкостей, магнитно-резонансной томографии и магнитно-чувствительной доставки лекарств [10-12]. Наночастицы серебра используются в противомикробных целях, а также в противораковых, противовоспалительных и ранозаживляющих средствах [11]. Благодаря своим биосовместимым, нетоксичным, самоочищающимся, совместимым с кожей, антимикробным и дерматологическим свойствам, наночастицы цинка и титана используются в биомедицинских, косметических, ультрафиолетовых агентах и в различных передовых процессах обработки [12].

С помощью металлических наночастиц можно вводить в организм человека широкий спектр медицинских добавок, таких как гидрофильные и гидрофобные вакцины, лекарства и молекул биологических наночастиц. Они широко используются для улучшения лечения и диагностики заболеваний. Применение наночастиц для доставки лекарств включает носители лекарств при таких расстройствах, как опухоли, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера [13].

Наночастицы могут пересекать гематоэнцефалический барьер из-за своего размера, который всегда был препятствием для прохождения лекарств к пораженной области. Благодаря небольшому размеру металлических наночастиц их также можно использовать при лечении рака головного мозга [13].

Основные направления использования нанодисперсий представлены на рисунке 1.

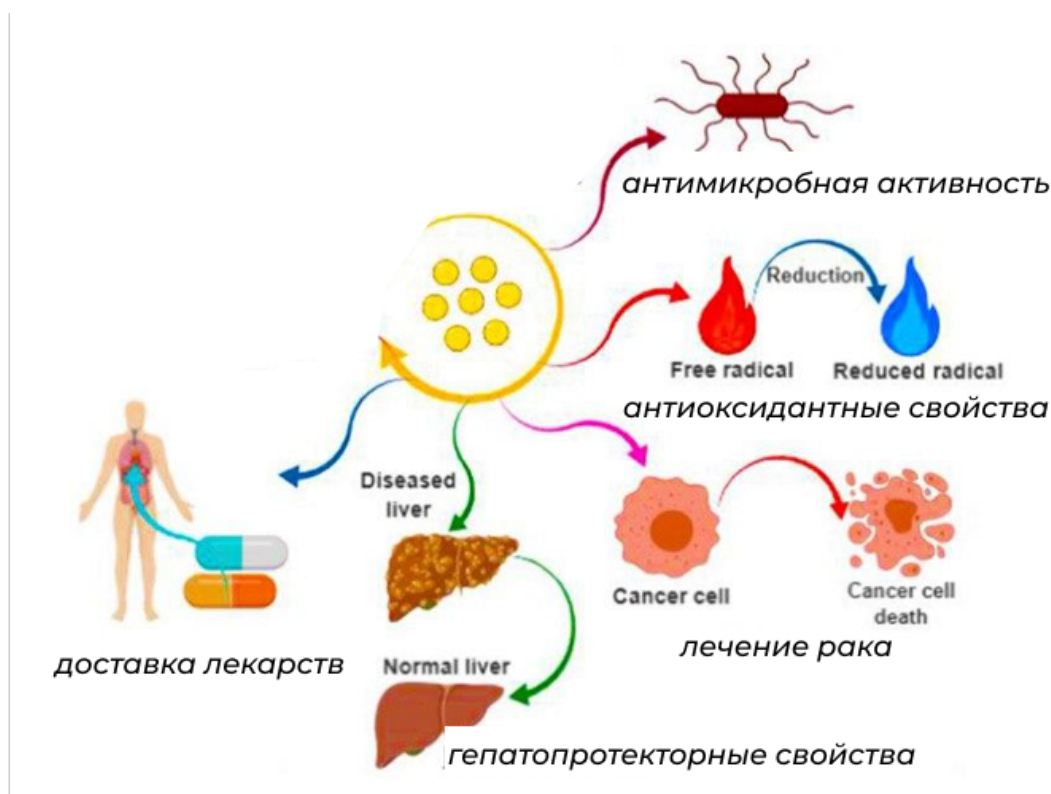


Рис. 1 – основные направления использования наночастиц различных металлов

По причине достаточно широкого применения наночастиц стоит вопрос о том, как синтезировать частицы с различными размерами, формами и свойствами. Отсюда вытекает проблема о выборе методик синтеза нанодисперсий.

1.2 Основные свойства наночастиц серебра

Среди всех наночастиц благородных металлов, наночастицы серебра являются уникальными в области нанотехнологий. Они завоевали интерес благодаря своим уникальным свойствам, таким как: химическая стабильность, хорошая проводимость, каталитические, антибактериальные, противовирусные и противогрибковые свойства [2]. По оценкам, в год производится около пятисот тонн наночастиц серебра, что делает их одним из наиболее коммерциализируемых наноматериалов. Благодаря своим лечебным и антимикробным свойствам наночастицы серебра были включены в более чем 200 потребительских товаров, включая одежду, лекарства и косметику. Их расширяющиеся области применения объединяют химиков, физиков, материаловедов, биологов и врачей, и фармакологов. Этот благородный металл обладает сильным ингибирующим и бактерицидным действием, а также обладает противогрибковым, противовоспалительным и антиангиогенным действием [1]. В медицине НЧ серебра часто добавляют в перевязочные материалы для ран, кремы для местного применения, антисептические спреи и ткани.

Серебро в наноформе действует как антисептик и проявляет широкий биоцидный эффект против микроорганизмов за счет разрушения их одноклеточной мембраны, тем самым нарушая их ферментативную активность.

Синтез наночастиц серебра представляет большой интерес для научного сообщества из-за их широкого применения [2].

Физические свойства наночастиц серебра. Некоторые физико-химические свойства AgNPs, включая размер (площадь поверхности), форму, поверхностный заряд и поверхностные сорбированные соединения, агрегацию и скорость растворения, особенно важны для определения их биологических взаимодействий и воздействий на организм. Более мелкие частицы имеют большую площадь поверхности и, следовательно, обладают большим токсическим потенциалом. Часто используемые серебряные наноструктуры в биомедицинской области включают серебряные сферические наночастицы, нанопроволоки, наностержни, нанопластины и нанокубы. Исследования показали, что биологические эффекты AgNPs зависят от различных поверхностных зарядов их покрытий, которые могут влиять на взаимодействие AgNPs с живыми системами [14].

Оптические свойства наночастиц серебра. Оптические свойства нанодисперсий серебра являются результатом их особого взаимодействия со светом, которое вызывает коллективные когерентные колебания их свободных электронов. Колебание свободных электронов приводит либо к радиационному распаду с сильным видимым рассеянием света, либо к безызлучательному распаду, который вызывает преобразование энергии фотона в тепловую энергию. Эти два механизма распада были легко использованы в биодиагностике и визуализации (оба используют радиационный распад плазмонного резонанса) и терапевтических (используя безызлучательный распад плазмонного резонанса).

Токсикологические свойства наночастиц серебра. Существует несколько возможных способов воздействия наночастиц серебра на пациентов, например, кожный контакт, пероральное введение, вдыхание и кровообращение. Макрофаги – первые клетки, с которыми наночастицы серебра встречаются в организме человека. Токсичность AgNP (<10 нм) в основном опосредована высвобождаемыми ионами серебра Ag^+ , при этом печень является основным органом-мишенью, за ней следуют селезенка, легкие и почки. Одно исследование показало, что эффект AgNP размером как 20 нм, так и 100 нм на крыс, получавших дозы 6 мг/кг массы тела, выражался в увеличении массы селезенки. Кроме того, параметры клинической химии также указывали на повреждение печени. Отдельное исследование ингаляционной токсичности наночастиц серебра показало, что они оказывали влияние на нейтральные муцины в слизистой оболочке дыхательных путей крыс, подвергавшихся воздействию серебряные наночастицы в концентрациях 0,5-61 мкг/м³.

Примечательно, что другое исследование показало, что наночастицы серебра оказывают незначительное влияние на носовую полость и легкие. Кроме того, сообщалось, что уровни серебра, о которых сообщалось у рабочих, производящих наноматериалы, подвергшихся воздействию серебра с концентрацией 0,35–1,35 г/м³, составляли всего 0,0135–0,034 мг/м³ для крови и 0,043 мг/м³ для мочи, и не было никаких существенных результатов об их состоянии здоровья [5,6].

1.3 Способы синтеза металлических наночастиц

Из-за больших перспектив и возможностей применения наночастиц и наноматериалов, за последние десятилетия появляются новые методы синтеза NP или совершенствуются старые методы синтеза [1].

В основе методов получения наночастиц лежит реакция восстановления водных растворов металлов. Процесс протекает по следующей схеме [12]:



Традиционно наночастицы синтезируются химическими и физическими методами. На рисунке 2 представлена схема с основными подходами для синтеза наночастиц.



Химические

Синтез осуществляют путем добавления восстановителя:

- боргидрид натрия (NaBH_4);
- цитрат натрия;
- аскорбат натрия



Биологические

Синтез может осуществляться с помощью:

- экстрактов растений;
- бактерий;
- фунгицидов



Физические

Синтез может осуществляться с помощью:

- испарение в электрической дуге;
- золь метод;
- механический помол;
- соно-химия;

Рис. 2 – Выбор возможного пути синтеза наночастиц металлов

Можно выделить два подхода к синтезу наночастиц: нанотехнология типа «снизу-вверх» ("*bottom-up*" *nanotechnology*) и нанотехнология типа «сверху-вниз» ("*top-down*" *nanotechnology*). Оба метода рассматривают физические, химические и биологические методы синтеза. Различие этих методик заключается в том, что в нисходящем методе процесс получения начинается с более крупных частиц и затем с помощью различных химических и физических методов происходит их уменьшение. Метод «снизу-вверх» основан на том, что на начальном этапе синтеза используются, наоборот, атомы или группы атомов, которые являются «строительными блоками» для образования более крупных частиц [1].

Биологические методы синтеза относят к нанотехнологии типа «снизу-вверх» (рисунок 3) [2].

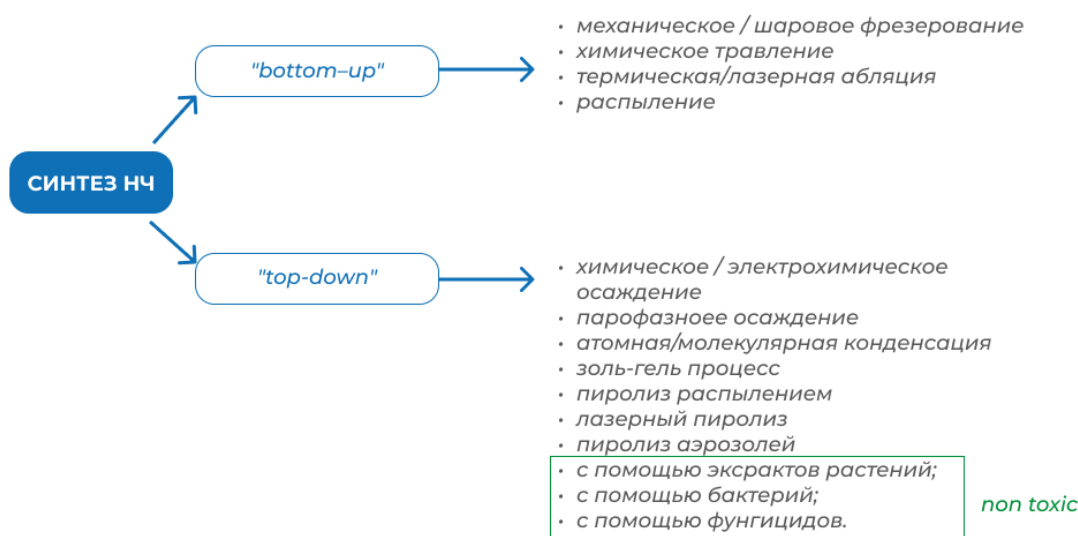


Рис. 3 – восходящие и нисходящие методы синтеза металлических наночастиц

Способы синтеза с использованием ультразвукового излучения, лазерной абляции, химического осаждения из газовой фазы, микроволнового излучения и электрического тока дорогостоящие, но большим минусом является необходимость использовать токсичные растворители, химикаты, которые потенциально опасны для окружающей среды и живых организмов [1].

1.3.1 Химические способы синтеза наночастиц.

В подходе «снизу-вверх», химическое восстановление является наиболее распространенной схемой синтеза наночастиц серебра. Для восстановления ионов серебра в водных или неводных растворах используются органические и неорганические реагенты, такие как боргидрид натрия (NaBH_4), цитрат натрия, аскорбат натрия, водород, реагент

Толлена, N, N-диметилформамид (ДМФ) и блок-сополимеры полиэтиленгликоля. Одним из самых больших преимуществ этого метода является то, что большое количество наночастиц синтезируются за достаточно короткий промежуток времени. Но использование химического способа синтеза наночастиц серебра имеет недостаток: используемые химические вещества токсичны и приводят к образованию неэкологичных побочных продуктов [2].

1.3.2 Физические способы синтеза наночастиц

Относятся к методам синтеза «сверху-вниз», наночастицы обычно синтезируются методом испарения – конденсации с использованием трубчатой печи при атмосферном давлении. Получение наночастиц серебра с использованием трубчатой печи имеет множество недостатков, поскольку оно требует большого пространства и потребление большого количества энергии, одновременно повышая температуру окружающей среды вокруг исходного материала. Также требует много времени для достижения термостабильности: типичная трубчатая печь требует энергии, превышающей несколько киловатт, и времени предварительного нагрева в несколько десятков минут для достижения стабильной рабочей температуры [2].

1.3.3 Биологические способы синтеза наночастиц

Альтернативой этим способам является биосинтез NP, который можно осуществить с помощью экстрактов растений, микроорганизмов, а также путем выделения наночастиц из растительного сырья. Большим преимуществом такого подхода к синтезу наночастиц является то, что на их поверхности не остаются вещества, которые неприменимы при введении в организм человека, в противовес химически приготовленным наночастицам (которые по этой причине не подходят для медицинского применения). Кроме того, в результате химического синтеза побочные продукты, образующиеся в результате синтеза, являются токсичными для окружающей среды. Физические методы синтеза также имеют некоторые недостатки, например, требуют больших затрат энергии и не являются экономически выгодными [14–16]. Таким образом, биосинтез наночастиц с помощью растений является экологичным, экспрессным и экономически доступным. Ещё один важный момент заключается в том, что наночастицы, полученные путём биосинтеза не содержат опасных материалов на своей поверхности, что позволяет их вводить внутрь живых организмов. Ещё одним преимуществом является то, что, варьируя условия реакции

можно получать наночастицы различных форм и размеров. По этим причинам биосинтез наночастиц обладает явными преимуществами перед традиционными методами [17]. Биосинтез также можно осуществлять с помощью бактерий. Точный механизм этой реакции не выявлен, считается, что молекулы белка обладают сродством к серебру, и некоторые части молекулы могут выполнять роль центров нуклеации. Грибы вида *Fusarium oxysporum* способны к восстановлению водных растворов нитрата серебра, диаметром 20-50 нм [18]. Но, среди различных биологических методов получения AgNPs, синтез с помощью микроорганизмов не является промышленно осуществимым из-за требований асептических условий и необходимости их регулярного поддержания [2].

Резюмируя, можно отметить, что ответственность каждого исследователя заключается в том, чтобы сделать акцент на альтернативном способе синтеза наночастиц серебра, который не только экономически эффективен, но и одновременно должен быть экологически безопасным. С этой точки зрения, «зеленый» синтез выступает в качестве соответствующего этим критериям метода [2].

1.4 Механизм реакции образования наночастиц металлов в результате биосинтеза из экстрактов растений

Схема образования наночастиц в растительном экстракте представлена на рисунке 3 [18].

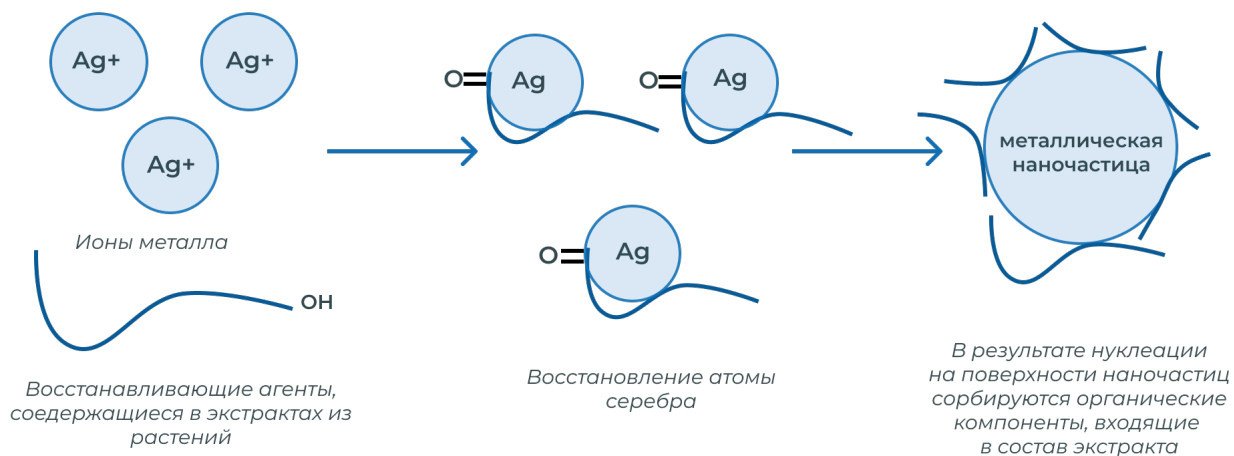
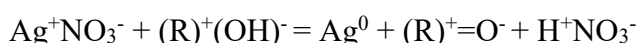


Рис. 3 – схема получения наночастиц из экстрактов растений

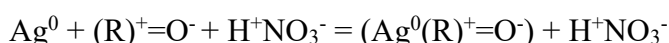
Ионы металла связываются с восстанавливающими метаболитами и стабилизирующими агентами, восстанавливаясь до атомов металлов. Полученный комплекс атома металла с метаболитом взаимодействует с другими комплексами, формируя металлическую наночастицу, затем происходит рост и слияние отдельных

мелких наночастиц в более крупные за счет процесса переконденсации до тех пор, пока частицы не примут форму и размер, стабильные в данных условиях. Биологически активные вещества, которые переходят в раствор во время экстракции (такие, как фенольные соединения, флавоноиды, терпеноиды) играют ключевую роль в восстановлении ионов металлов. В общем виде этот процесс можно описать с помощью следующего механизма [19]:

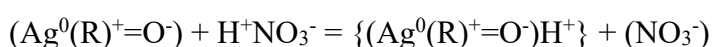
1. Восстановление атомов серебра (химическая реакция)



2. Образование зародышей (ван-дер-ваальсовское взаимодействие)



3. Рост и образование наночастиц серебра (мицелл)



Источником восстановителей ионов серебра служат экстракты лекарственных растений. С помощью метода ИК-спектрии было установлено, что за восстановление серебра отвечают низкомолекулярные соединения экстракта [18]. О метаболитах растений, способных восстанавливать серебро более подробно говорится в следующей главе.

Методом ИК-Фурье-спектрии обнаруживается, что очень часто терпеноиды ассоциируются с наночастицами. Более того, некоторые ученые придерживаются мнения, что именно терпеноиды играют ключевую роль в образовании наночастиц. Окислительная способность терпенов объясняется следующим образом: диссоциация ОН-групп метаболитов приводит к образованию резонансных структур, которые способны к окислению [20].

Говоря об окислительной способности фенольных соединений, можно предположить, что в основу процесса заложена способность флавоноидов к кето-енольной таутомеризации, в результате которой высвобождается реакционноспособный атом водорода, который обладает способностью вступать в редокс процесс [21].

Как было сказано ранее, наночастицы серебра стабилизируются метаболитами. Вероятно, это связано с хелатирующей способностью многих флавоноидов. Такая особенность флавоноидов объясняет их способность сорбироваться на поверхности металлов.

Восстановление солей сопровождается изменением цвета раствора от зеленого до фиолетового, темно-розового или красного в зависимости от того, какие реагенты являются исходными, так, например, при получении наночастиц серебра раствор становится красным

[18]. Как правило, окончание реакции фиксируют по изменению цвета реакционной системы.

1.5 Факторы, влияющие на протекание биосинтеза и на морфологические характеристики НЧ

В результате биосинтеза наночастиц металла образуются наночастицы самых разнообразных форм и с различным разбросом размеров. Это связано с тем, что на эти параметры оказывает влияние множество факторов: способ приготовления экстрактов, природа растительного сырья, температура ведения синтеза, природа растворителя, значение рН, электрохимический потенциал самого металла. Рассмотрим подробнее влияние этих факторов [18].

В зависимости от используемого экстракта растения, можно получить наночастицы разных размеров и форм, некоторые данные по растениям и форме получаемых наночастиц приведены в таблице 1.

Таблица 1 – зависимость формы наночастиц от используемого растения в биосинтезе

Название растения	Форма и размер получаемых наночастиц	Ссылка
<i>Nicotiana benthamiana</i> Табак Бентхама	Метод позволяет получать наночастицы (золота, железа, серебра) размером от 10 до 400 нм сферической, трехгранной, пентагональной и гексагональной формы.	[18]
Листья герани	Восстановление раствора нитрата серебра	
<i>Azadirachta indica</i> Листья Ним	Конкурентное восстановление ионов золота и серебра, в результате центральная часть наночастицы состоит из золота, внешняя из серебра	
<i>Cinnamttum canphora</i> Коричник камфорный	Серебряные трехгранные частицы	
<i>Aloe vera</i> Алое вера	Золотые трехгранные частицы	
<i>Cycas</i> Листья Саговника	Получение серебряных наночастиц размером от 2 до 6 нм	
Экстракты фруктов, вин, различные сорта чая	Использование разных сортов чая приводит к получению наночастиц различных размеров и формы	

Продолжение таблицы 1

<i>Pelargonium graveolens</i> Герань пахучая	Частицы золота икосаэдрической формы размером 20–40 нм	[22]
<i>Cymbopogon flexuosus</i> Лимонное сорго	Золотые наносферы и нанотреугольники размером 0.05–18 мкм	
<i>Azadirachta indica</i> ним, азадирахта индийская	Золотые плоские треугольники и шестиугольники размером 50– 100 нм	
<i>A. indica</i>	Сферические наночастицы серебра размером 5-25 нм	
<i>Aloe barbadensis</i>	Кубических частиц In ₂ O ₃ размером 5–50 нм	
<i>Ocimum basilicum</i> Базилик душистый	Серебряные наночастицы	

Такое разнообразие обусловлено тем, что в состав различных растений входят различные антиоксиданты, вступающие в реакции. Поэтому, прежде чем проводить синтез необходимо выбрать то растительное сырье, которое будет содержать в большом количестве восстановители различных классов (например, фенольные соединения).

Выбранный способ экстракции оказывает прямое влияние на то, какое количество компонентов из РС перейдет в растворитель и будет потом вступать в реакцию восстановления. Поэтому на начальных этапах работы необходимо определиться со способом экстракции и сделать выбор в сторону того, который позволяет извлекать большее количество антиоксидантов. Подробнее возможные способы экстракции будут рассматриваться в одной из следующих глав, так как этот вопрос требует более детального рассмотрения.

Поговорим о растворителях: полярность растворителя оказывает влияние на геометрическую форму получаемых AgNPs. По этой теме существует исследование, где сравнивалось влияние на форму НЧ гексана, этилглицоля и глицерин. В двух последних растворителях формируются наночастицы и агрегаты, а в менее полярном гексане образуются исключительно агрегаты AgNPs. Результаты этого исследования мотивируют сделать выбор в сторону более полярного растворителя [23].

Значение pH раствора при синтезе влияет на полученный результат, это связано с тем, что pH оказывает влияние прежде всего на то, в какой форме компоненты экстракта РС будут находиться, что напрямую влияет на способность восстанавливать ионы металлов. Например, для получения золя серебра наиболее интенсивная окраска, и соответственно, максимум длины поглощения в видимом диапазоне. Наиболее

оптимальное значение $pH=5$. В остальных случаях раствор золя окрашен в слабый цвет или реакция вовсе не протекает. В случае [24] оптимальными значениями оказалось $pH=3$ и $pH=4$. Неоднократные исследования подтверждают то, что ведение реакции в слабокислой среде наиболее эффективно. Вероятно, при таком значении pH больше количество групп вовлекаются в химический процесс. В слабокислой среде наблюдаются образование агрегатов НЧ [18].

Влияние температуры прежде всего описывается правилом Вант-Гоффа: чем выше температура, тем выше скорость реакции. Но все равно необходимо подбирать оптимальные значения температур, так как в некоторых случаях ведение биосинтеза при слишком высоких температурах делает доминантным процесс нуклеации, нежели восстановление. Также при слишком высоких значениях температур возможна деструкция фитокомпонентов.

Температура, при которой протекает синтез – важный критерий. Как правило, наблюдается прямая зависимость: с ростом температуры усиливается поглощение полученного золя. Но при значениях температуры выше $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ происходит деструкция компонентов экстракта, что приводит к образованию коричневого осадка.

Как уже упоминалось выше, электрохимический потенциал металла тоже играет важную роль в процессе. Легче будут восстанавливаться металлы, имеющие положительное значение потенциала. Серебро, как раз, относится к металлам, имеющим значение электродного потенциала больше нуля ($E_{Ag} = +0,799$) [18].

Из всего вышесказанного, можно сделать вывод, что с достоверной точностью определить то, какой продукт реакции получится с точки зрения его морфологического строения практически невозможно. Можно провести аналогию с хроматографическими методами анализа, где каждый фактор хроматографической системы оказывает влияние на время выхода компонента. Изменив хотя бы ненамного какой-либо из параметров, получается уже отличный результат. Так и в ситуации с биосинтезом нанодисперсий металлов: необходимо учесть всю совокупность факторов, чтобы получить воспроизводимый результат.

1.6 Основные метаболиты растений, принимающие участие в образовании наночастиц

Известно, что растения могут восстанавливать металлы в своих органах, тканях и на поверхности. Это связано с антиоксидантами, которые входят в их состав. Соответственно, эти компоненты, при добавлении растворителя могут экстрагироваться. Экстракты из

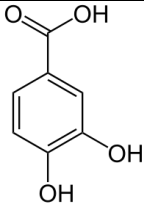
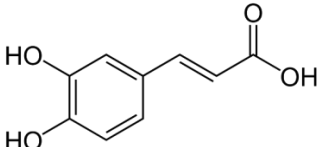
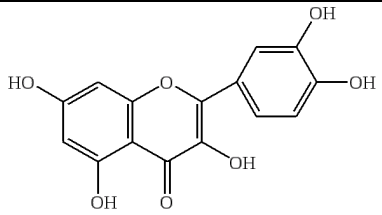
растительного сырья, которые применяют для синтеза наночастиц различных металлов, содержат в больших количествах метаболиты, обладающие окислительно-восстановительным потенциалом, восстанавливают и стабилизируют наночастицы. К ним можно отнести терпеноиды, компоненты фенольного ряда, алкалоиды, белки, а также полифенольные кислоты, сахара и сапонины [25]. Далее мы рассмотрим эти основные компоненты, особенности их строения и какую роль они играют в восстановлении. Также оценим мажорные компоненты семейства растений Яснотковые.

1.6.1 Фенольные соединения

В первую очередь хочется поговорить о фенольных соединениях, веществах, которые способны легко переходить даже в полярные растворители и встречаются во многих видах РС. Фенольные соединения – вещества, молекулы которых содержат хотя бы одно ароматическое кольцо, к которому прикреплены одна или несколько гидроксильных групп. Под термином «фенолы в растениях» понимают совокупность простых фенолов, фенольных кислот, кумаринов, флавоноидов, стилбенов, танинов, лигнанов и лигнинов. Известно около 10000 различных структур фенольных веществ, которые широко распространены в лекарственном растительном сырье [26]. Такое многообразие фенольных соединений объясняется тем, что к фенольному каркасу могут быть присоединены другие молекулы сахаров, полипептидов и т.д. Например, танины, которые образованы олигомерами галловой кислоты (гидролизуемые танины), флавона (негидролизуемые танины) [27].

Классификация фенольных соединений: Фенольные соединения можно классифицировать следующим образом (таблица 2): группа $C_6 - C_1$ ряда, представлена оксibenзойными кислотами (п-оксibenзоная, салициловая, галловая), широко распространены в растениях, в основном они содержатся в связанной форме; очень распространенная группа фенольных соединений. группа $C_6 - C_3$ ряда, представлена производными коричной кислоты и кумаринами, (кофейная кислота, феруловая), кумарин. Соединения $C_6 - C_3 - C_6$ ряда представляют собой обширную группу фенольных веществ и имеют повсеместное распространение в растениях. В группу флавоноидов входят и красящие вещества, такие как антоцианы. Многообразие флавоноидов обуславливается тем, то они встречаются в растениях не только в свободном виде, но и в виде глюкозидов [28, 29].

Таблица 2 – Классификация фенольных соединений

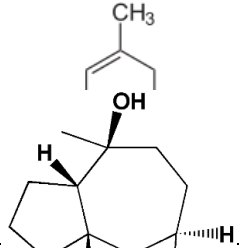

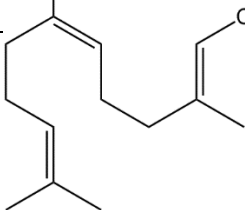
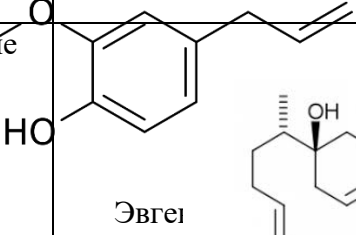
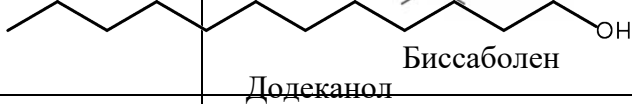
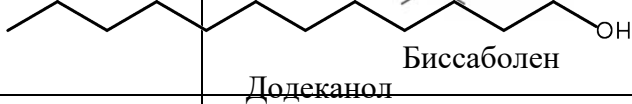
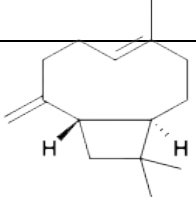
Класс фенольных соединений	Пример
Производные оксибензойной кислоты	 <p data-bbox="997 492 1332 526">Протокатеховая кислота</p>
Производные коричной кислоты	 <p data-bbox="1037 705 1300 739">Кофейная кислота</p>
Флаваноиды	 <p data-bbox="1093 952 1236 985">Лютеолин</p>

Как правило, из РС флавоноиды выделяют с помощью экстракции различными растворителями (самым оптимальным растворителем является 70 % раствор этилового спирта).

1.6.2 Терпеноиды (компоненты эфирных масел)

Эфирные масла являются сложными смесями летучих душистых веществ, образующихся в растениях, в основном имеющих терпеноидную природу. Терпеноидами называют углеводороды и их различные кислородные производные: спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, эфиры, лактоны и т.д. Углеродный скелет терпенов образован из изопреновых звеньев. В состав эфирных масел входят монотерпены, сесквитерпены, а также вещества ароматического и алифатического строения (таблица 3). Монотерпены имеют брутто формулу $C_{10}H_{15}$. Монотерпеноиды бывают алифатическими (мирцен, гераниол, линалоол), моноциклические (ментол, цинеол, лимонен), бициклические (пинен, карен, камфен, туйон). К сесквитерпенам принадлежат соединения состава $C_{15}H_{24}$. Они, аналогично монотерпенам, разделяются на алифатические (фарнезол), моноциклические (биссаболон), бициклические (кадинен) и трициклические (аромадендрен) [28, 30].

Таблица 3 – Классификация эфирномасличных компонентов

Класс эфирномасличных компонентов	Трициклические	Примеры
Монотерпены	Моноциклические	 Веридифлорол
	Бициклические	 Веридифлорол
	Алифатические	 Фарнезол
	Алифатические	
Вещества		
Сесквитерпены ароматического строения	Моноциклические	 Эвгел
Вещества алифатического строения		 Биссаболен
	Бициклические	 Додеканол
		 бета-Кариофиллен

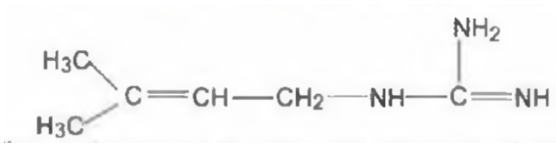
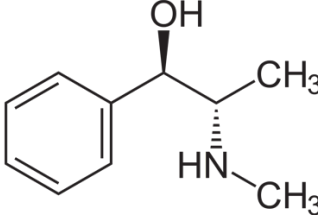
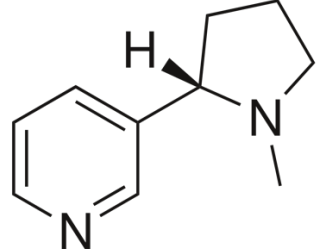
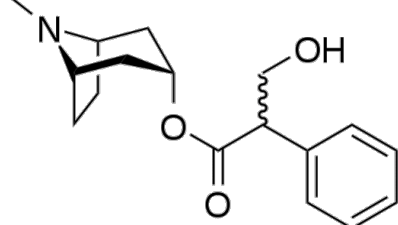
Компоненты эфирных масел содержатся во многих растениях, например в семействе Яснотковые, Астровые, Зонтичные и т.д. [28].

1.6.3 Алкалоиды

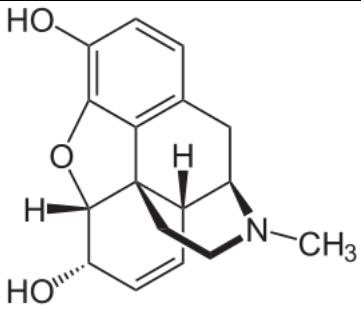
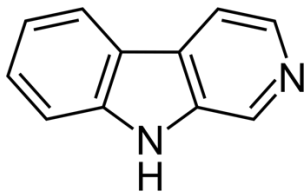
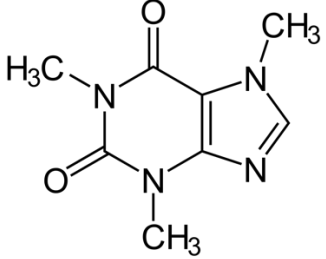
Алкалоидами называют азотсодержащие соединения основного характера. Отсюда и образуется название данного класса соединения, т. е. подобны щелочам. Алкаиды обладают

обширной биологической активностью. Большинство алкалоидов, встречающихся в растениях, имеют гетероциклическую структуру. Классификация алкалоидов представлена в Таблице 4. Более простые амины (метиламин, диметиламин и т.д), не смотря на их основной характер не относят к алкалоидам [28, 29].

Таблица 4 – классификация алкалоидов

Алкалоиды без гетероциклов в молекуле	 <p style="text-align: center;">Галогин</p>
Алкалоиды экзоциклические	 <p style="text-align: center;">Эфедрин</p>
Группа пирролидина, пиридина и пиперидина	 <p style="text-align: center;">Никотин</p>
Производные пирролидина и пиперидина (группа тропана)	 <p style="text-align: center;">Атропин</p>

Продолжение таблицы 3

Производные изохинолина	 <p>Морфин</p>
Производные индола	 <p>Бета-Карболин</p>
Производные пурина	 <p>Кофеин</p>

Также встречаются представители таких классов, как производные пирролизидина, хинолизидина, хинолина, имидазола, хиназолина, дитерпеновые (изопреноидные) алкалоиды и стероидные алкалоиды.

Если говорить о представителях семейства Яснотковые, то можно сказать, что их состав не богат алкалоидами. Чаще обнаруживаются дитерпеновые алкалоиды, причем их локализация, как правило, в корне растения. Также стоит отметить, что в области изучения данного семейства РС проведено мало исследований по изучению алкалоидного состава.

1.6.4 Сапонины

Сапонины, являющиеся составной частью терпеноидов – природные гликозиды на основе сапогенинов терпеноидного или стероидного ряда, обладающие высокой поверхностью активностью. Сапонины хорошо растворимы в воде, и при взбалтывании

образуют пену. Сапонины входят в состав чабреца и тимьяна, в небольших количествах в шалфее лекарственный [28, 29].

1.6.5 Основные компоненты семейства Яснотковые

Род *Salvia* из семейства *Lamiaceae* включает почти 900 видов, культивируемых или выращиваемых в качестве сорняков по всему миру, в основном в районах Центральной и Южной Америки, а также Средиземноморья и Южной Африки. Продукт этого растения используется в кулинарии в качестве пряностей и в фармацевтических целях. Существует множество исследований метаболитов рода *Salvia*. В этом растительном сырье присутствуют флавоноиды, сложные эфиры кофейной кислоты, розмариновая кислота, фенольные соединения такие, как карнозоловая кислота, карнозол [31].

Исходя из литературных данных рассмотрим мажорные компоненты различных представителей растительного сырья, изучаемого в рамках данного исследования. Так, шалфей очень богат флавоноидами, которые относят к эфирномасличным компонентам. Некоторые из них встречаются в виде гликозидов. В состав шалфея входят апигенин, лютеолин, рутин и другие флавоноиды [31], представленные на рисунке 4.

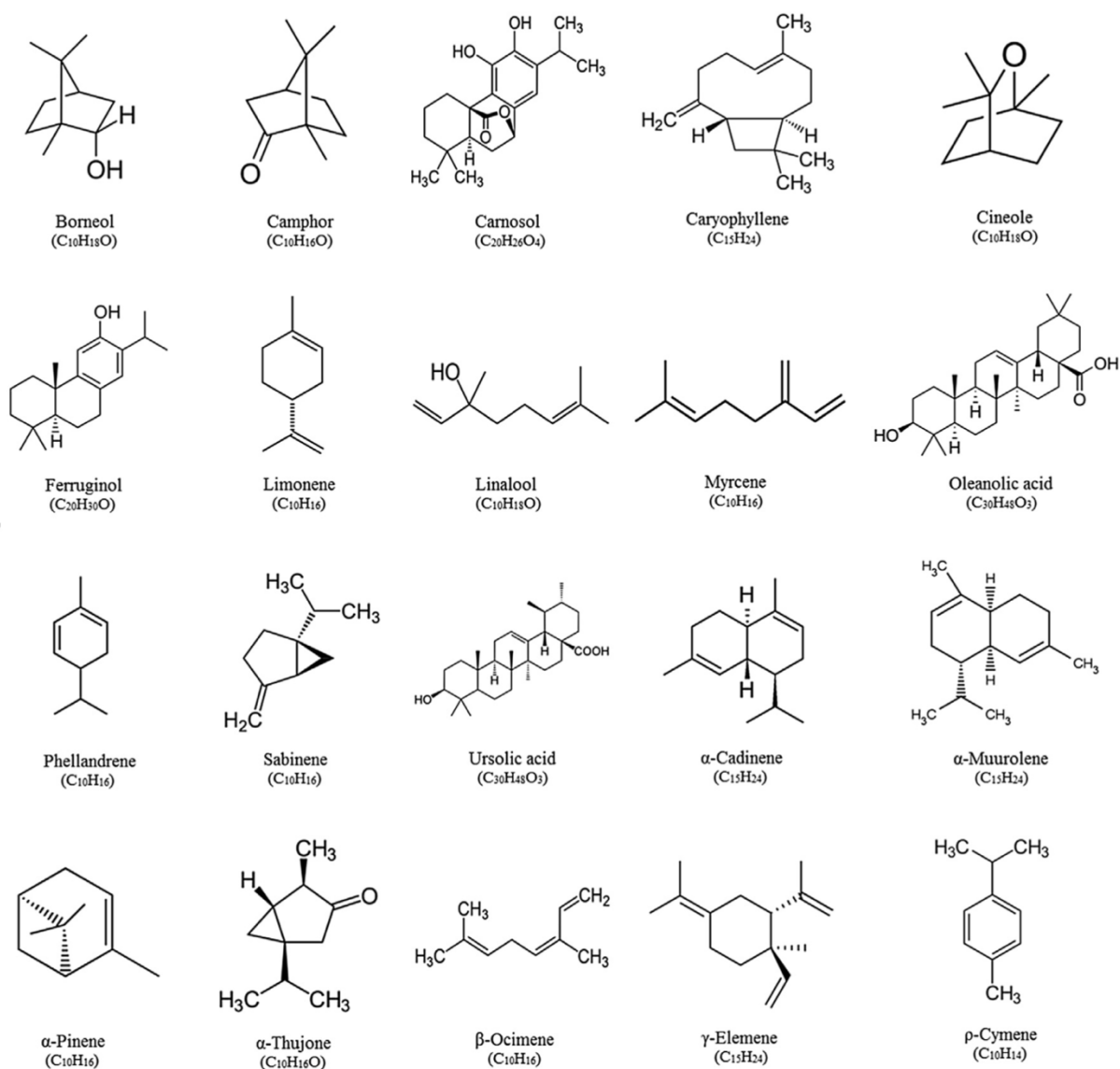


Рис. 5 – компоненты терпеноидного ряда, входящие в состав шалфея

Данные компоненты обладают антиоксидантной активностью, поэтому можно прогнозировать их восстановительные свойства по отношению к ионам металлов [32].

1.7 Основные способы приготовления экстрактов растений

1.7.1 Классические способы экстракции

Классические методы экстракции растворителем для извлечения фитоэстрогенов, такие как мацерация, экстракция в аппарате Сокслета, экстракция с обратным холодильником, экстракция паром являются эффективными и распространенными по сегодняшний день [33]. Вместе с тем, традиционные методы экстракции требуют больших затрат растворителя, времени, а также зачастую оказываются мало воспроизводимыми.

Самый распространенный способ экстракции фитоэстрогенов из вышеперечисленных – экстракция в аппарате Сокслета, который представляет собой круглодонную колбу с растворителем, резервуар, куда помещается растительное сырье, и обратный холодильник. При нагреве испаренный растворитель проходит через сырье и затем снова возвращается с экстрагированными компонентами в круглодонную колбу [34].

1.7.2 Микроволновая экстракция

Принцип действия микроволновой экстракции основан на поглощении полярными веществами микроволнового излучения, что приводит к изменению дипольного момента молекул. Горячий растворитель позволяет эффективно выделять термически стабильные компоненты.

Эффективность микроволновой экстракции зависит от используемого растворителя. Экстракцию проводят в закрытых контейнерах из материалов, устойчивых к высоким температурам, например тефлон. Основные преимущества микроволновой экстракции включают сокращенное время экстракции, уменьшенный размер экстракционного устройства, уменьшенное количество расходуемого растворителя [35].

1.7.2 Ультразвуковая экстракция

Еще один эффективный способ извлечения БАВ из ЛРС – это ультразвуковая экстракция. Использование ультразвука облегчает высвобождение определяемых компонентов из растительной матрицы. Кавитация – наиболее важное явление, влияющее на эффективность ультразвукового извлечения. В результате этого процесса в растворителе образуются пузыри и полости, которые возникают из-за резких локальных перепадов давления. При постоянной интенсивности ультразвука, устанавливается динамическое равновесие между образующимися и коллапсирующими пузырьками. В результате чего жидкость интенсивно перемешивается, что способствует увеличению интенсивности массопердачи биологически активных компонентов [35,36]. По сравнению с традиционными методами экстракции, при использовании ультразвуковой экстракции увеличивается эффективность извлечения БАВ, скорость экстракции, снижается температура экстрагирования и увеличивается диапазон выбора растворителей. Оборудование простое и недорогое по сравнению с другими методами, такими как сверхкритическая флюидная и микроволновая экстракции [37].

1.7.2 Сверхкритическая флюидная экстракция

Для экстрагента сверхкритическое состояние достигается при определенных условиях: температуре и давлению критической точки. Сверхкритическая жидкость обладает газоподобными свойствами: диффузией, вязкостью, поверхностным натяжением, плотностью, способностью к сольватации (сольватированию) подобно жидкости [33, 37]. Сверхкритические жидкости проникают в образцы растительного материала почти так же, как и газы. Чаще всего используемым экстрагирующим агентом является двуокись углерода, из-за ее дешевизны, низкой токсичности и легкодостижимыми критическими параметрами ($T = 31,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 74,8 \text{ атм}$). Оксид углерода (IV), как неполярное вещество способен растворять неполярные или умеренно полярные соединения. Воду также довольно часто применяют в качестве растворителя, но это менее резонно в силу более трудного достижения критических параметров [38]. К преимуществам сверхкритической флюидной экстракции можно отнести быструю скорость приготовления экстракта (как правило, менее 30 минут), уменьшение использования экологически несовместимых растворителей [33, 38].

1.8 Методики синтеза наночастиц серебра из экстрактов растений

Группа ученых Deerika Tripathia и др. [39] синтезировали наночастицы серебра следующим образом: для проведения экстракции использовались свежие листья витании *Withania coagulans* (индийское растение). Сначала их дважды промывали дистиллированной водой. Затем 5 г листьев витании кипятили в 100 мл деионизированной воды, затем полученный экстракт профильтровали через фильтровальную бумагу и оставили на хранение при температуре 4 °C. Раствор нитрата серебра готовили с добавлением деионизированной воды, изучался влияние концентрации нитрата серебра, для этого сравнили концентрацию. Далее раствор нитрата серебра смешивался с экстрактом листьев витании в различных соотношениях (1:1, 1:2, 1:5 и 1:9). Эти смеси экстрактов растения и нитрата серебра были оставлены при температуре 27 °C при постоянном перемешивании. Конец реакции определяли по изменению цвета реакционной системы. Максимум поглощения полученного золя серебра составил 445 нм, были получены наночастицы сферической формы со средним размером 14 нм.

К листьям Традесканции бледной (*Tradescantia pallida*) [40] после сушки был добавлен раствор 80% метанола (для перехода антоцианов, входящих в состав растения в

раствор). Затем экстракт был профильтрован и оставлен на хранении в темном месте при температуре 4 °С. Затем 3 мл полученного экстракта были разбавлены деионизованной водой до 10 мл, в дальнейшем разбавленный раствор использовался для синтеза наночастиц серебра. Перед добавлением нитрата серебра раствор был нагрет до 60–80 °С. Концентрация раствора нитрата серебра составила 0.01 М. Окончание реакции отмечали по изменению цвета раствора из желтого в желто-коричневый, что свидетельствует об образовании наночастиц серебра в растворе. Максимум поглощения полученного золя серебра составил 394 нм. Размер полученных наночастиц составил 98 нм.

Особенностями способа, предложенного учеными [41] является добавление цитратного буферного раствора к экстракту какао. Процедура синтеза была следующей: водно-ацетоновый раствор (массовое соотношение 1:3,5) экстракта какао (2 мас.%) вводили в водный раствор нитрата серебра (1 мас.%), нагретый с обратным холодильником до температуры кипения; Реакционную смесь нагревали в течение 15 минут и затем охлаждали до комнатной температуры. И для сравнения аналогичным образом был приготовлен экстракт какао, в который был введен цитрат натрия. В результате эксперимента выяснилось, что наибольшее количество наночастиц серебра сферической формы было получено при следующем соотношении реагентов и экстракта: AgNO_3 : цитрат натрия : экстракт какао 1:6:1,5. При таком способе синтеза размер наночастиц варьировался от 30 до 40 нм.

Биосинтез наночастиц серебра с использованием водного экстракта листьев мыльного дерева (*Reetha*) и шикакая (*Acacia concinna*) [42] осуществляли путем добавления 50 мл экстракта листьев к реакционной смеси, состоящей из 10 мл AgNO_3 (1×10^{-3} М) и 5 мл (0,625 %) аммиака. Наночастицы серебра, образованные из экстрактов листьев вышеупомянутых растений, сначала отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 25 минут с последующим центрифугированием при 15000 об/мин в течение 30 минут и промывкой гранул деионизованной водой. Гранулы хранили и использовали для дальнейшей характеристики. Максимум поглощения наночастиц составил 400 нм, форма полученных наночастиц оказалась сферической, а их размер составил 50 нм.

Путь синтеза, описанный в источнике [39] следующий: на первом этапе был приготовлен экстракт из *Acorus calamus*. Для этого растительное сырье сначала измельчили, затем к 1 г измельченного растительного сырья добавляли 100 г деионизированной воды. Экстракт оставляли на 20 часов, после нагревали его при температуре 60 °С в течении 10 минут и оставили на хранение при 4 в темном месте. Далее полученный экстракт смешивали с водным раствором AgNO_3 концентрацией 1 мМ в соотношении 1:5 и выдерживания смеси при комнатной температуре в течение 24 часов. После инкубации

образовавшиеся наночастицы серебра собирали центрифугированием при 18000 об/мин. Собранный осадок трижды промывали дважды дистиллированной водой и сушили при комнатной температуре. Длина волны максимума поглощения полученного золя равна 452 нм. Форма полученных наночастиц – сферическая, а их размер составил 31,86 нм.

В случае [44] экстракт был приготовлен из высушенного шалфея. Затем смешивали 0,2 грамма растительного сырья с 10 мл дистиллированной воды. Экстракцию проводили при кипячении в течении 5 минут, а затем к экстракту шалфея добавляли раствор нитрата серебра концентрацией 1 ммоль/л в соотношении 1:9. Биосинтез проводили в течении 6 часов, окончание реакции фиксировали по изменению цвета реакционной системы. Полученные наночастицы имели сферическую форму и размер в диапазоне от 19 до 125 нм.

F. Rodríguez-Felix Astrid G. Lopez-Cota [1] в своем исследовании использовали для приготовления экстракта отходы Сафлоры (*Carthamus tinctorius*). В качестве растворителя для экстракта использовали дистиллированную воду. Масса навески РС была равна 3 г, а объем растворителя 20 мл. Затем экстракт обрабатывали ультразвуком в течении 99 минут при частоте 40 кГц. Затем полученный экстракт центрифугировали при 4400 об/мин в течении 15 минут. Наночастицы серебра были синтезированы путем смешения полученного экстракта с 30 мл 0,1 М раствора нитрата серебра, реакцию проводили в темноте во избежание фотоактивации серебра. Окончание реакции фиксировали по изменению цвета реакционной системы. Раствор наночастиц серебра центрифугировали при 4400 об/мин в течение 15 мин при 25 °С. Осадок отделяли и сушили при комнатной температуре. Для дальнейших исследований использовался мелкодисперсный сухой порошок.

Savithramma, N и другие ученые проводили синтез следующим образом: 5 г измельченного *Svensonia hyderabadensis* помещали в колбу на 250 мл, добавляли 100 мл дистиллированной воды и кипятили в течение 10 минут при 100 ° С. Затем экстракт отфильтровали. Нитрат серебра концентрацией 1 ммоль/л по каплям, при постоянном перемешивании добавляли к 5 мл полученного экстракта из листьев *Svensonia hyderabadensis*. Температура реакционной смеси была равна 50-60 ° С [13].

Ученые получали [45] нанодисперсию серебра с помощью экстракта Рябчика (*Fritillaria*). Для этого 10 г измельченного растительного сырья добавляли к 100 мл деионизированной воды и кипятили 15 минут на водяной бане. Затем, после фильтрования, выпаривали растворитель на ротормом растворителе. При синтезе AgNPs по каплям добавляли 10 мл экстракта к 0.01 М водному раствору нитрата серебра. Цвет реакционной системы менялся спустя 30 минут. После инкубации реакционную смесь сушили на воздухе и центрифугировали для дальнейших исследований.

Для получения водного экстракта растения 100 г высушенных ветвей листьев конопли (*C. Sativa*) были залиты в контейнер, содержащий 1000 мл кипяченой воды. Затем экстракт оставили отстаиваться в течение 4-х часов. Далее экстракт фильтровали и упаривали. «Зеленый» синтез AgNPs проводили путем смешивания 100 мл AgNO_3 с концентрацией 10^{-3} М и 200 мл экстракта конопли. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании магнитной мешалкой в течение 12 часов при комнатной температуре. В конце периода реакции образовался коллоидный раствор черного цвета [46].

1.9 Методы исследования нанодисперсий серебра

Так как образование наночастиц сопровождается изменением цвета раствора, то это фиксируется прежде всего с помощью методов спектроскопии (в видимой и УФ-областях), а более детальную информацию о размерах и форме наночастиц можно получить микроскопическими методами, такими, как атомно-силовая микроскопия (АСМ) и просвечивающая электронная микроскопия [47].

1.9.1 Спектроскопические методы исследования

Для золей серебра длина волны максимума поглощения в видимой области равна примерно 450 нм [43-46]. Пример спектра поглощения золя серебра в видимой области показан на рисунке 6.

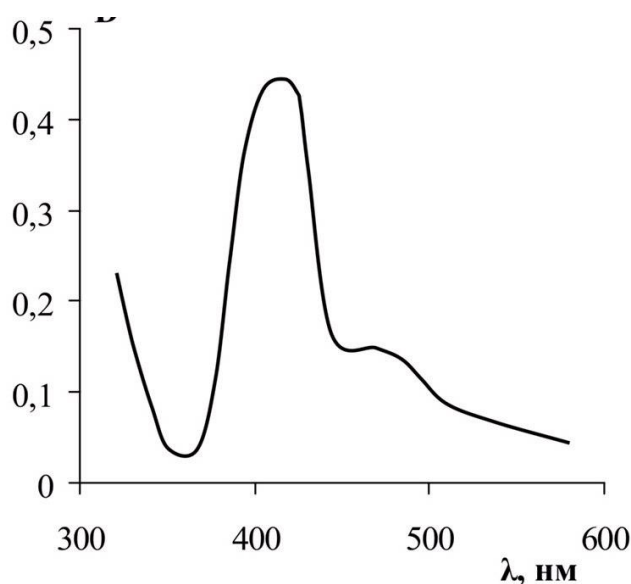


Рис. 6 – спектр поглощения нанодисперсии серебра в видимой области

Например, группа ученых [48] УФ-видимые спектры получали с использованием спектрометра УФ-видимого излучения Cary 50 от Varian, и спектры записывали в диапазоне длин волн 300-800 нм. Базовые уровни были записаны с использованием деионизированной воды, перед измерением оптической плотности коллоидных растворов, раствор разбавляли водой 1:30, чтобы оставаться в пределах отклика поглощения спектрометра, так и диапазона концентраций, согласно закону Бера.

Полученную нанодисперсию серебра снимали относительно экстракта Рябчика (*Fritillaria*). Полученная нанодисперсия имела максимум поглощения на длине волны 430 нм [45]. У экстракта из РС при этой длине волны отсутствовал максимум поглощения (Рисунок 7).

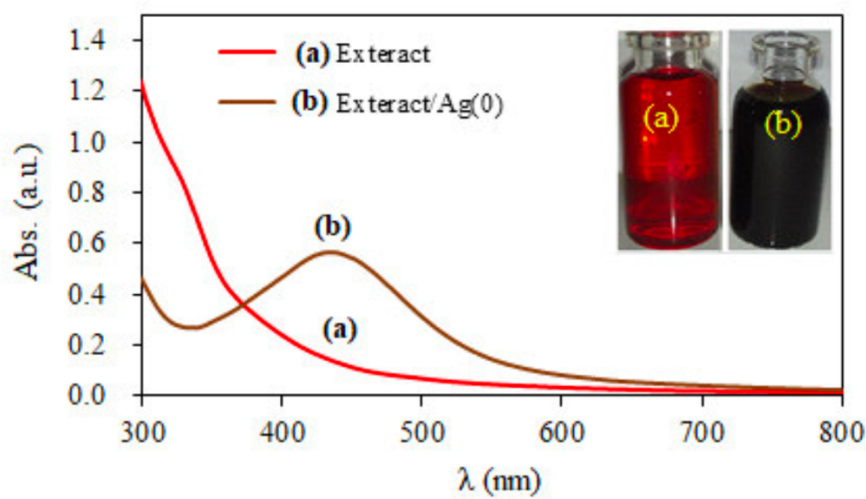


Рис. 7 – спектр поглощения нанодисперсии серебра в видимой области

1.9.2 Сканирующая электронная микроскопия

Размер наночастиц определяют также методом сканирующей электронной микроскопии. Схема электронного микроскопа включает в себя источник электронов (как правило, это металлы при вакууме, высокой температуре или в электрическом поле), оптическую систему для фокусировки электронов и камеру с образцом, детекторы и систему для вакуумирования. Источником сигналов в методе СЭМ являются прежде всего вторичные электроны и отраженные электроны [60]. Этот метод позволяет получать изображение наночастиц и, соответственно, данные о их размере и форме. Примеры снимков наночастиц серебра различной формы и размеров представлены на рисунке 8.

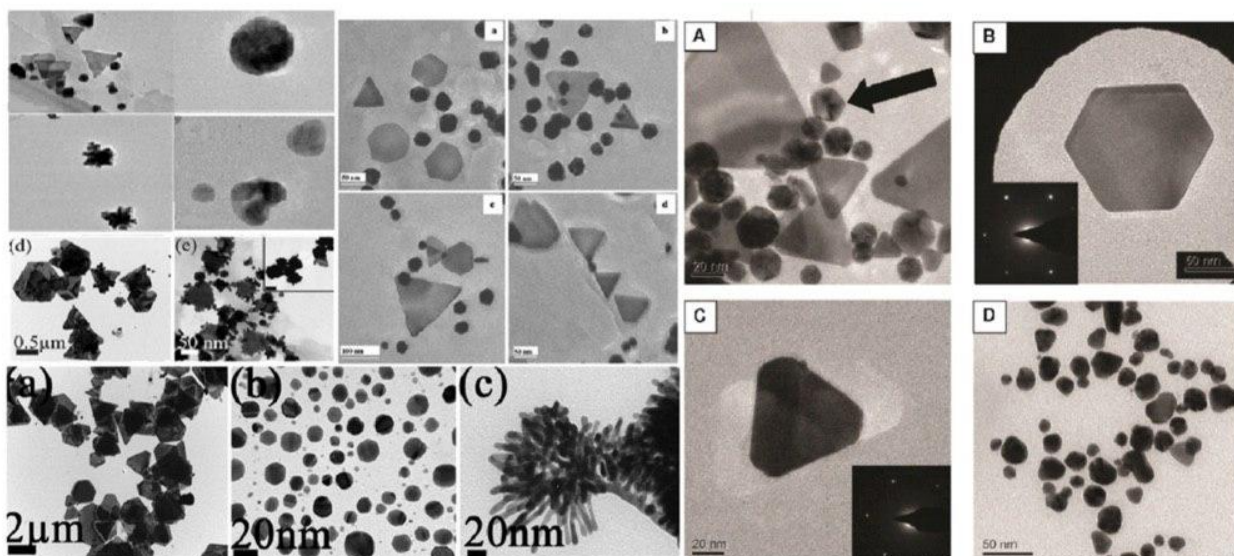


Рис. 8 – изображения наночастиц серебра различной формы, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии

Измерение с помощью электронной микроскопии, как правило измерение осуществляется следующим образом: Образцы НЧ различного размера, диспергированные в этаноле, наносят на покрытые углеродом медные сетки, и автоэмиссионный сканирующий электронный микроскоп, оборудованный сканирующей просвечивающей электронной микроскопией, который используется для получения трансмиссионные изображения AgNP различного размера при низком разрешении. Изображения наночастиц серебра представлено на рисунке 9:

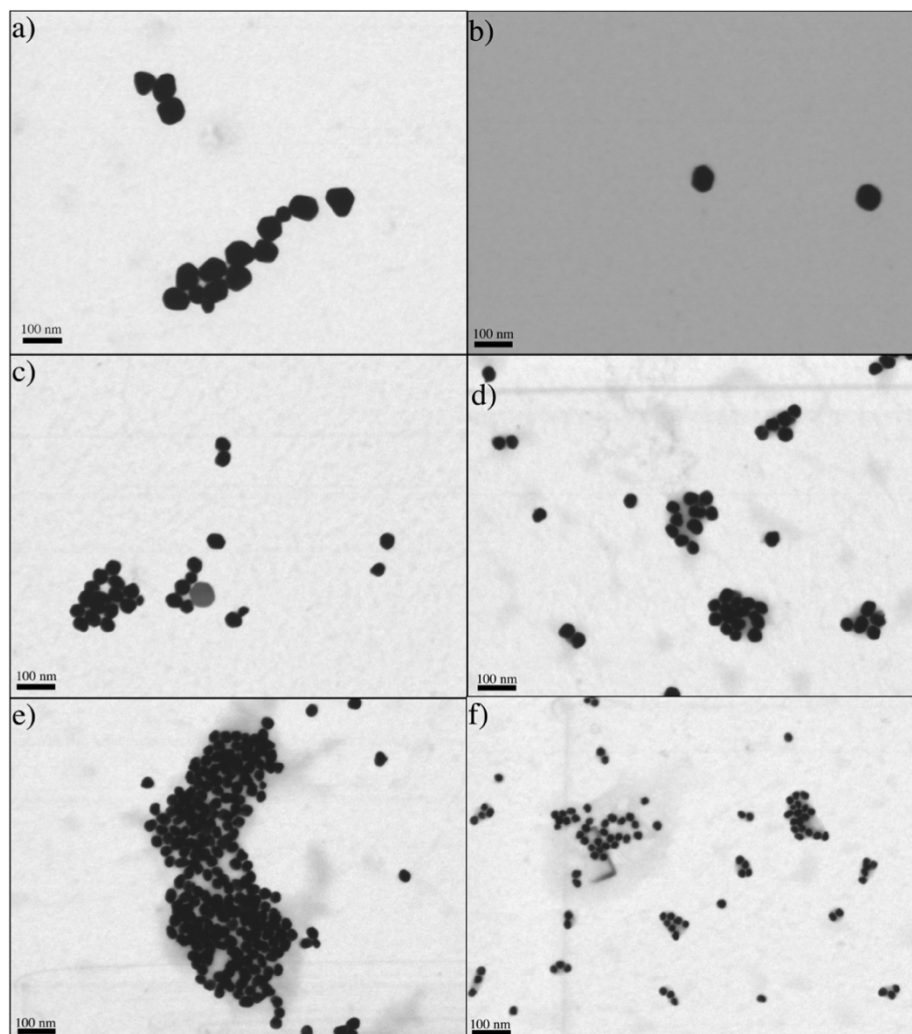


Рис. 9 – изображения НЧ серебра, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии

Важно учесть, что перед работой на микроскопе необходимо особым образом подготовить образец. Так как микроскоп работает при вакууме, то нет возможности работать с раствором. Поэтому перед анализом необходимо либо выпарить растворитель, либо центрифугировать полученную нанодисперсию серебра.

Например, в [1] помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL (JEOL, Ltd, Токио, Япония) анализировали форму и размер наночастиц серебра, полученных из водного экстракта отходов сафлора (*Carthamus tinctorius*L.). Рабочее напряжение составляло 200 кВ с полевой эмиссионной нитью. Аликвоту 100 мкл (100 мкг в 500 мкл дистиллированной воды) суспензии наночастиц помещали на медный штатив и давали высохнуть перед анализом. СЭМ-микрофотографии наночастиц серебра (рисунок 9)

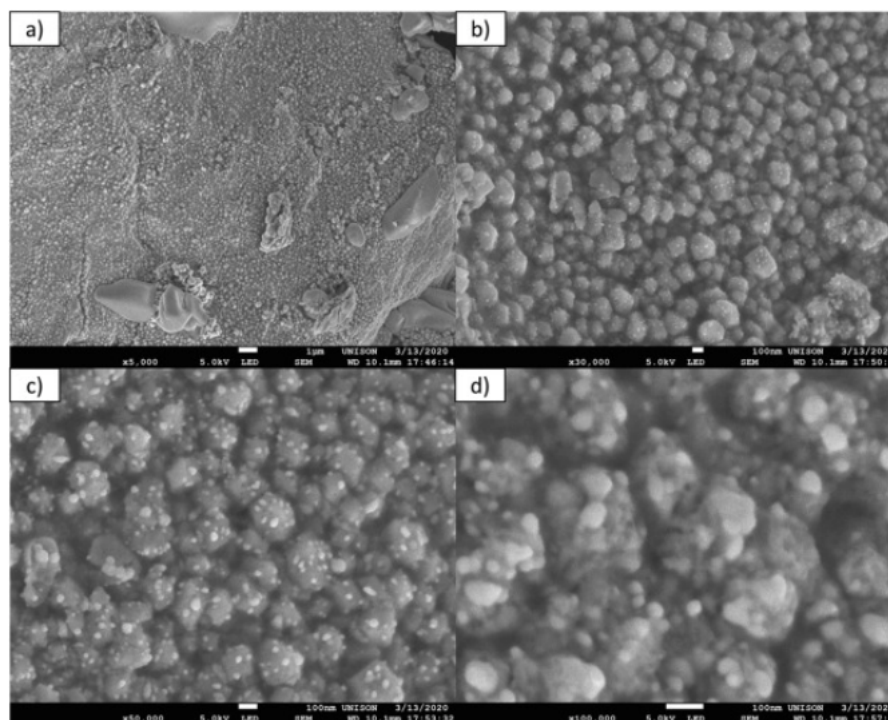


Рис. 9 – изображения НЧ серебра, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии

Во-первых, наблюдаются слегка агломерированные частицы сферической формы. Диапазон наночастиц от 2 до 50 нм соответствует распределению частиц по размерам. Стабилизация наночастиц осуществляется за счет включения на поверхность наночастиц таких молекул, как белки, полисахариды и флавоноиды, присутствующие в водном экстракте сафлоры. Они связываются с поверхностью в основном через амино-, гидроксильные и ароматические кольцевые группы.

В [45] с помощью метода СЭМ определяли размеры и форму полученных AgNPs, средний размер синтезированных частиц составлял 45 нм с диапазоном размеров 20–100 нм. Биосинтезированные наночастицы серебра имели сферическую форму.

Структура AgNPs была исследована с помощью микрофотографий, полученных методом СЭМ. НЧ в основном имели сферическую форму. Наблюдаются более крупные частицы серебра, которые образуются из-за агрегации НЧ, вызванной испарением растворителя. Также было подтверждено, что НЧ стабилизируются компонентами экстракта [46].

Также важно оценить распределение получаемых наночастиц по размерам, это можно осуществить с помощью лазерного измерителя. Преимущество этого метода заключается в том, что не возникает необходимости разделения нанодисперсии на твердую и жидкую составляющие, так как метод позволяет работать с растворами. Суть метода заключается в том, после попадания лазерного излучения на частицы различной формы

происходит светорассеяние. В зависимости от размера частиц изменяется и направление рассеянного света [50].

1.9.3 Исследования на антимикробную активность

Серебро – хорошо известное противомикробное средство против более чем 650 микроорганизмов из разных классов, таких как грамотрицательные и грамположительные бактерии, грибы или вирусы. При использовании наночастиц серебра значительно увеличивается площадь поверхности, которая воздействует на микроорганизмы [2].

На антимикробную активность AgNPs влияет ряд факторов:

1. Размер наночастиц;
2. Ионная сила раствора;
3. Значение pH раствора;

Определение антимикробной активности наночастиц серебра осуществляют с помощью диско-диффузионного метода.

В таблице 5 представлены результаты исследования на антимикробную активность AgNPs, полученных с помощью различных экстрактов растений.

Таблица 5 – антимикробная активность наночастиц серебра, полученных с помощью экстрактов растений

Растение, с помощью которого был получен экстракт	Микроорганизмы к которым проверяется антимикробная активность	Ссылка
Алоэ вера (<i>Aloe vera</i>)	<i>E. coli</i>	[51]
Паслен страшный (<i>Solanus torvum</i>)	<i>P. aeruginosa, S. aureus, A. flavus and Aspergillus niger</i>	[52]
Триантема портулаковая (<i>Trianthema decandra</i>)	<i>E. coli and P. aeruginosa</i>	[53]
Атибала (<i>Abutilon indicum</i>)	<i>S. typhi, E. coli, S. aureus and B. subtilis</i>	[54]
Челнобородник лимонный (<i>Cymbopogon citratus</i>)	<i>P. aeruginosa, P. mirabilis, E. coli, Shigella flexaneri, S. somenei and Klebsiella pneumonia</i>	[55]
<i>Svensonia hyderabadensis</i>	<i>A. niger, Fusarium oxysporum, Curvularia lunata and Rhizopus arrhizus</i>	[56]

Например, в случае исследования антимикробной активности мексиканских ученых наблюдается активность AgNPs по отношению к золотистому стафилококку

(*Staphylococcus aureus*) и к Флуоресцирующей псевдомонаде (*Pseudomonas fluorescens*) [1].

Наночастицы серебра /51/, полученные с помощью экстракта из листьев *Svensonia hyderabadensis* были исследованы на антимикробную активность с помощью ДДМ. По результатам AgNPs обладали активностью по отношению к таким патогенным микроорганизмам, как *Escherichia coli* (10 мм), *Pseudomonas aeruginosa* (7 мм), *Klebsiella Pneumoneae* (15 мм).

В случае /52/ AgNPs обладали активностью по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*.

1.10 Выводы из аналитического обзора

– Среди всех существующих на сегодняшний день методов получения НЧ особый интерес вызывают биологические методы синтеза, так как они обладают рядом преимуществ над химическими и физическими способами синтез, – простота выполнения синтеза, отсутствие необходимости работы с токсичными растворителями, дешевизна метода. Использование в качестве источников метаболитов экстрактов растений вызывает больший интерес, так как это метод более реально масштабировать.

– На протекание реакции, а также на морфологию получаемых частиц оказывают влияние такие факторы, как значение температуры, значение рН, соотношение между компонентами и способ экстракции. Поэтому для достижения наилучших результатов стоит вопрос об оптимизации условий синтеза.

– Среди множества способов экстракции метаболитов из РС более доступными являются УЗЭ и мацерация. Также преимуществом этих подходов к экстракции является их дешевизна и доступность.

– Качественное подтверждение образования нанодисперсии серебра производят с помощью метода спектроскопии в видимой области. Как правило, максимум поглощения приходится на диапазон длин волн 400-440 нм.

– Изучение морфологии (размер, форма) НЧ производят прежде всего с помощью метода СЭМ и ИРЧ

2 Экспериментальная часть

2.1 Оборудование, исходные материалы, реактивы и используемая посуда

- серебро азотнокислое по ГОСТ 1277-75;
- измельченные листья шалфея (*Salvia officinalis*);
- измельченные цветки ромашки (*Chamomilla officinalis* L.);
- измельченные листья чабреца (*Thymus vulgaris*);
- измельченные листья мяты (*Mentha piperita* L.);
- измельченный розмарин (*Rosmarinus officinalis* L.);
- измельченная душица (*Origanum vulgare*);
- измельченный пустырник (*Leonurus*);
- измельченный базилик (*Ocimum basilicum*);
- свежие листья эвкалипта (*Eucalyptus cinerea*);
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- колба плоскодонная по ГОСТ 25336-82;
- кислота соляная по ГОСТ 3118-77;
- воронки конические стеклянные по ГОСТ 25336-82;
- колбы мерные вместимостью 5, 25, 50 см³ по ГОСТ 1770-74;
- стаканы химические вместимостью 50 см³ по ГОСТ 1770-74;
- фильтровальная бумага;
- вата медицинская по ГОСТ 5556-75, Россия;
- электроплитка по ГОСТ 14919-83;
- весы аналитические по ГОСТ 16474-74;
- ультразвуковая ванна Elmasonic S30 Н (объем 2,75 л, частота ультразвука 37 кГц)
- спектрофотометр Shimadzu;
- спектрофотометр ЮНИКО 120;
- измерительные кюветы толщиной 0,5 мм
- лазерный измеритель размера частиц с внешним зондом Nanotrac Ultra 253 (Microtrac Inc., США)
- сканирующий электронный микроскоп JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-max Inca Energy (JOEL; Япония; Oxford Instruments; Великобритания).

2.2 Получение экстракта из листьев шалфея способом мацерации

Навеску шалфея массой 0,2 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливали 10 мл растворителя и оставляли на 24 часа отстаиваться при комнатной температуре в месте без доступа света. После этого полученный экстракт фильтровали через фильтр в мерную колбу вместимостью 10 мл.

2.3 Получение экстракта из листьев шалфея способом ультразвуковой экстракции

Навеску шалфея массой 0,5 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 50 мл растворителя и оставляли в ультразвуковой ванне на 15 минут. После этого полученный экстракт фильтровали через фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл.

2.4 Получение экстракта из мяты способом ультразвуковой экстракции

Навеску мяты массой 0,5 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 50 мл растворителя и оставляли в ультразвуковой ванне на 15 минут. После этого полученный экстракт фильтровали через фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл.

2.5 Получение экстракта из чабреца способом ультразвуковой экстракции

Навеску чабреца массой 0,5 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 50 мл растворителя и оставляли в ультразвуковой ванне на 15 минут. После этого полученный экстракт фильтровали через фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл.

2.6 Получение экстракта из цветков ромашки способом ультразвуковой экстракции

Навеску чабреца массой 0,5 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 50 мл растворителя и оставляли в ультразвуковой ванне на 15 минут. После этого полученный экстракт фильтровали через фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл.

2.7 Приготовление раствора нитрата серебра концентрацией 1 ммоль/л

Навеску нитрата серебра массой 0,0426 г взвешивали на аналитических весах и переносили в мерную колбу объемом 250 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

2.8 Результаты и обсуждения

Сравнение мацерации и ультразвуковой экстракции. Способ экстракции также оказывает влияние на время реакции и выход продукта. В рамках нашего исследования мы сравнили способ ультразвуковой экстракции и более традиционный способ экстракции – мацерацию. Второй способ экстракции достаточно эффективный, но более длительный: 24 часа против 15 минут. Таким образом, использование ультразвуковой экстракции позволяет сократить время экстракции до 15 минут без потери эффективности.

Синтез наночастиц. Первоначально в качестве источника метаболитов было принято использовать экстракт шалфея, так как ранее на кафедре аналитической химии КубГУ я исследовала компоненты, переходящие в экстракт с помощью хроматографических методов [57]. Изначально предполагалось, опираясь на литературные данные, что время синтеза золя серебра составит 6 часов, но в нашем случае раствор постепенно принял красный цвет спустя час, что говорило об образовании золя серебра. Это можно объяснить тем, что в процессе экстракции в раствор перешло достаточное количество метаболитов из шалфея лекарственного, что способствовало более быстрому протеканию процесса. Изменение цвета в ходе процесса синтеза представлено на рисунке 10.

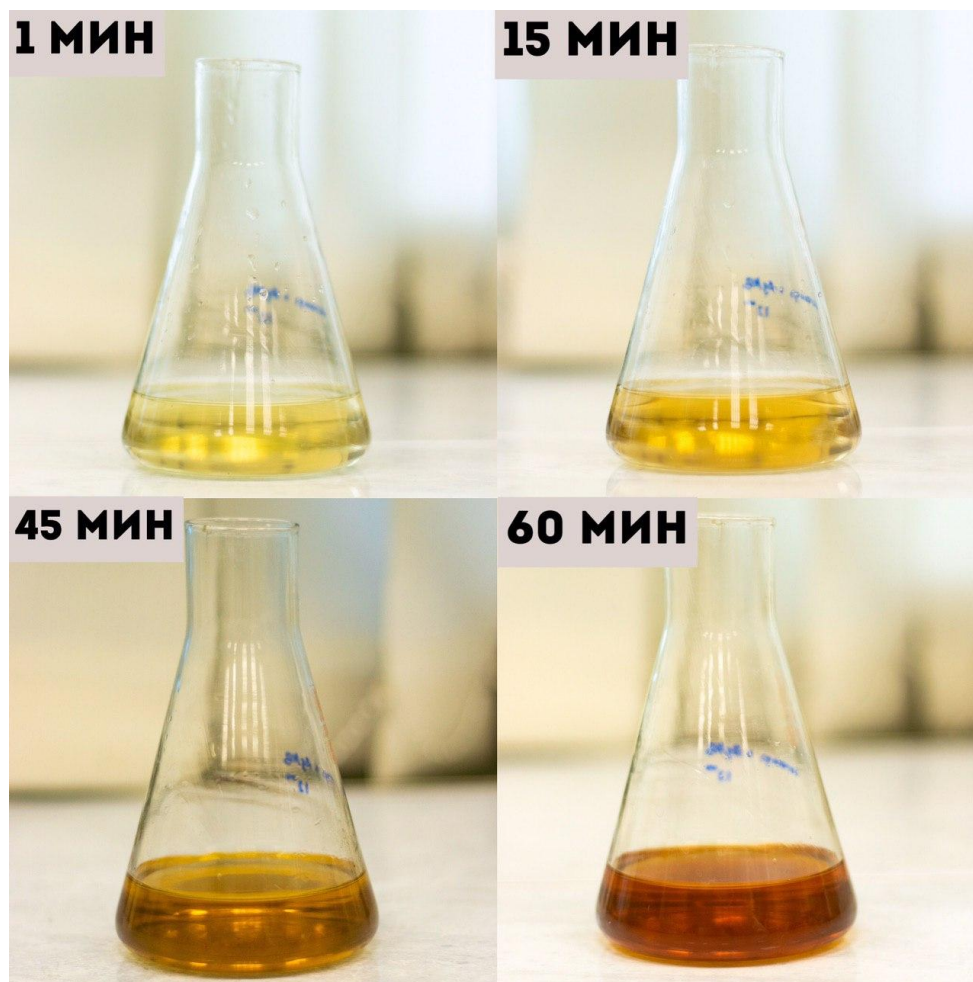


Рис. 10 – изменение цвета реакционной системы во время синтеза

Спекроскопия полученного золя. В результате были получены спектры золя серебра, максимум поглощения в видимой области составил 440 нм, что соответствует литературным данным. Спектр полученной нанодисперсии представлен на рисунке 11.

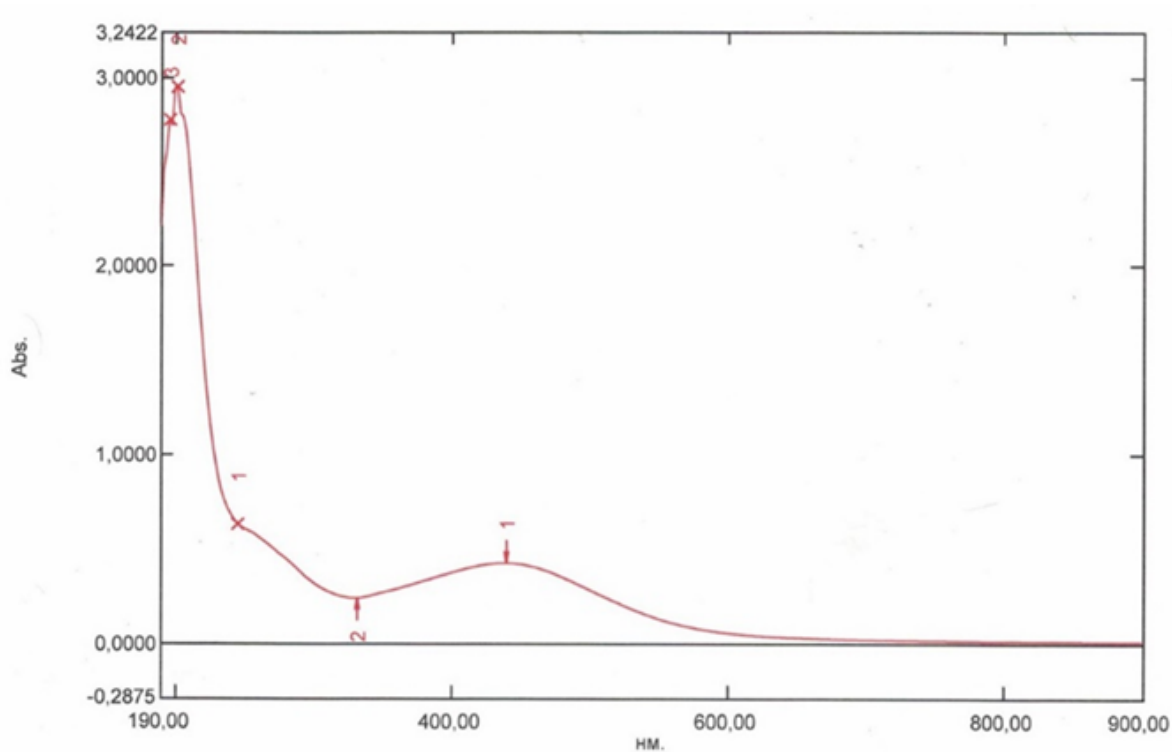


Рис. 11 – спектр нанодисперсии серебра

Дальнейшая оптимизация условий синтеза проводится с помощью экстракта из листьев шалфея лекарственного.

Оптимизация отношения экстракт:раствор нитрата серебра. Объемное соотношение между экстрактом и раствором AgNO_3 является важным параметром для протекания реакции между компонентами системы. Сравнивались отношения экстракт:раствор нитрата серебра = 1:9 и экстракт:раствор нитрата серебра = 3:7. Созревание окраски происходит быстрее во втором случае. В дальнейшем работали с этим соотношением.

Оптимизация температуры реакционной смеси. На следующем этапе работы осуществлялась оптимизация температуры реакции. Для этого проводили синтез при разных температурах 40 °С, 60 °С, 80 °С, 100 °С и по окончании реакции получали спектральные данные в видимом диапазоне спектра (рисунок 12).

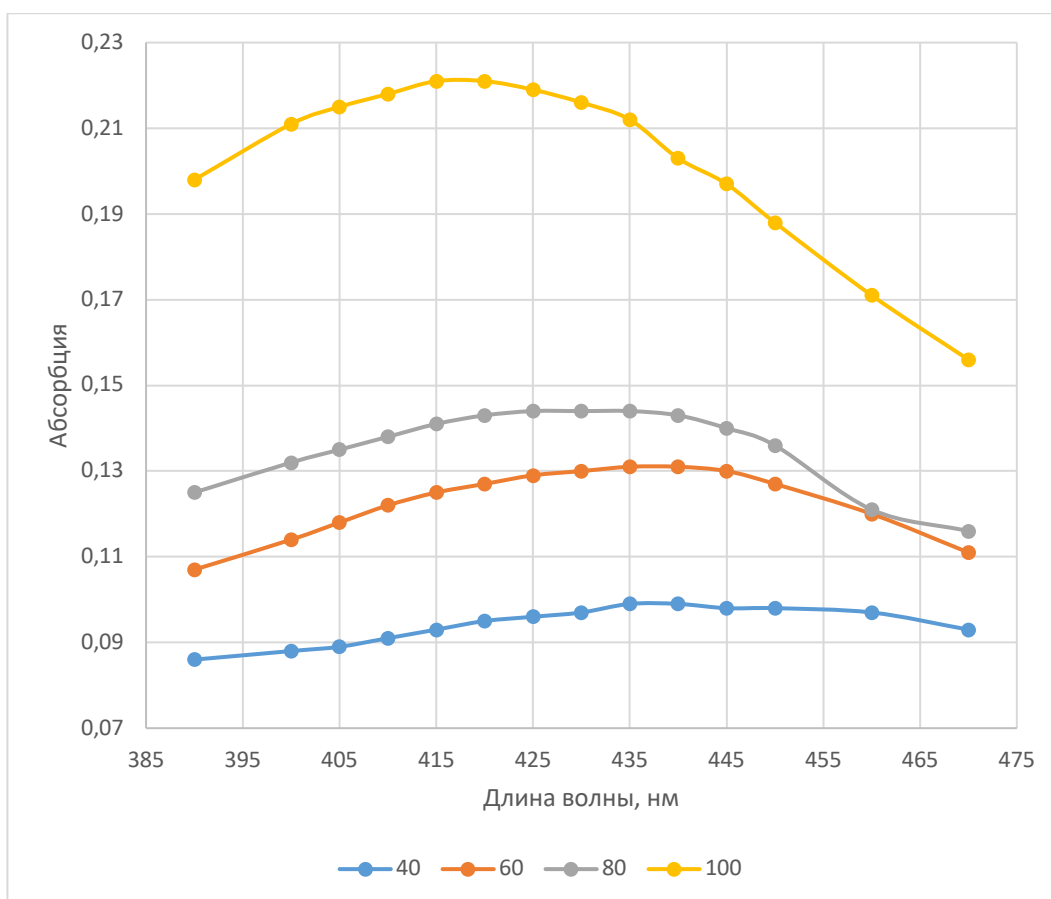


Рис. 12 – спектр нанодисперсии серебра, полученный при различных температурах: 40 °С, 60 °С, 80 °С, 100 °С, в диапазоне длин волн 390-480 нм

Как видно на спектральных данных, оптическая плотность на максимуме поглощения возрастает с ростом температуры, что скорее всего связано с увеличением скорости реакции при нагревании. Интересно, что максимум поглощения при увеличении температуры сдвигается в сторону УФ области спектра, что может быть связано с различием размеров образующихся наночастиц. Можно сделать вывод, что оптимальная температура реакции 100 °С.

Оптимизация pH реакционной смеси. Так как значение pH реакционной смеси оказывает большое влияние на результат синтеза, то возникает необходимость установить оптимальное значение этого параметра. Согласно литературным данным нанодисперсии серебра образуются в слабокислой среде, поэтому проводили синтез при разных значения pH: 3, 4, 5, 6. Определенного значения pH в каждой реакционной смеси добивались с помощью добавления раствора соляной кислоты (Таблица 6).

Таблица 6 – Концентрация и объем соляной кислоты

Значение pH	C_{HCl} , моль/л	V_{HCl} , мл
-------------	--------------------	----------------

3	$5 * 10^{-2}$	1
4	$5 * 10^{-2}$	0,1
5	$4 * 10^{-4}$	5
6	$4 * 10^{-4}$	0,5

По окончании реакции получали спектральные данные в видимом диапазоне спектра (Рисунок 13).

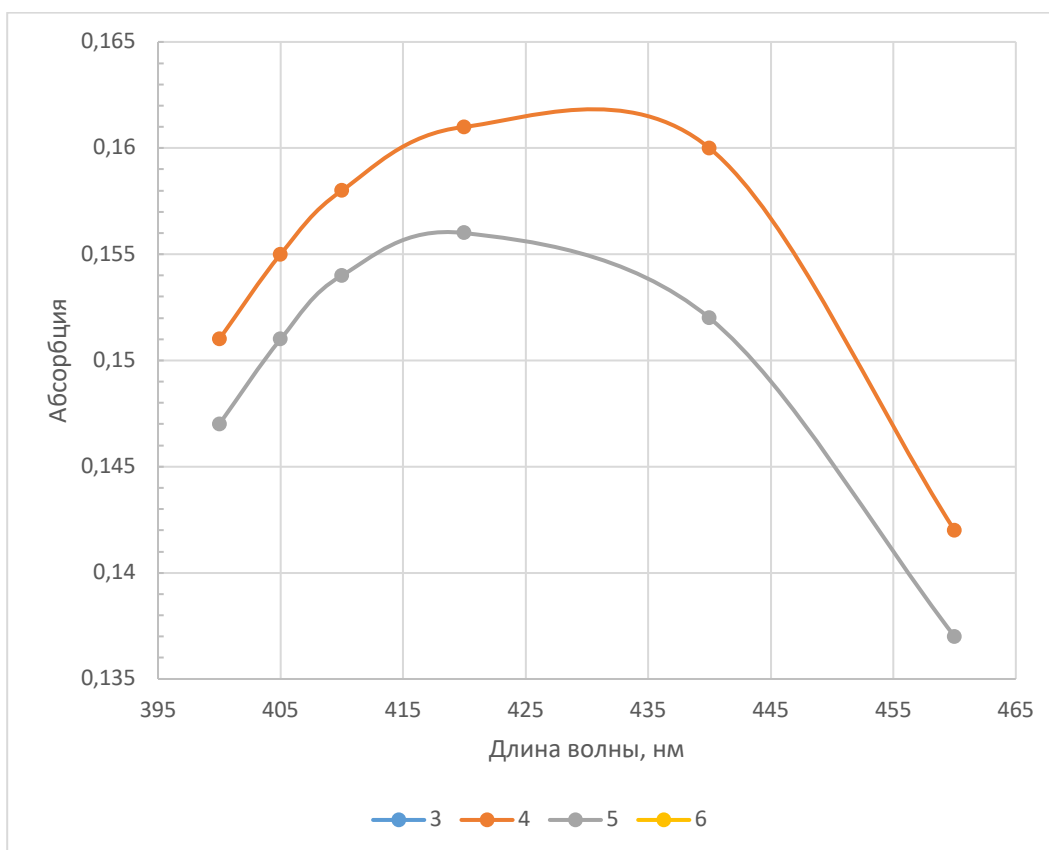


Рис. 13 – спектр нанодисперсии серебра, полученный при различных значениях рН: 3, 4, 5, 6 в диапазоне длин волн 400-460 нм

Как видно на спектральных данных, оптическая плотность на максимуме поглощения резко отличается при разных значениях рН. Например, при рН = 3 и при рН = 6 нанодисперсия не образуется, так как на спектрах вовсе отсутствуют максимум поглощения. При значениях рН = 4, рН = 5 наблюдаются сопоставимые значения оптических плотностей, но наиболее высокое значение абсорбции при рН = 4, соответственно дальнейшие синтезы необходимо вести при этом значении рН.

Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта чабреца. Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта из чабреца проводили при следующих

условиях: температура 100 °С, рН = 4, время синтеза 1 час. На рисунке 10 представлен спектр полученной нанодисперсии (Рисунок 10), длина волны максимума поглощения 430 нм, что сопоставимо с литературными данными (Рисунок 14).

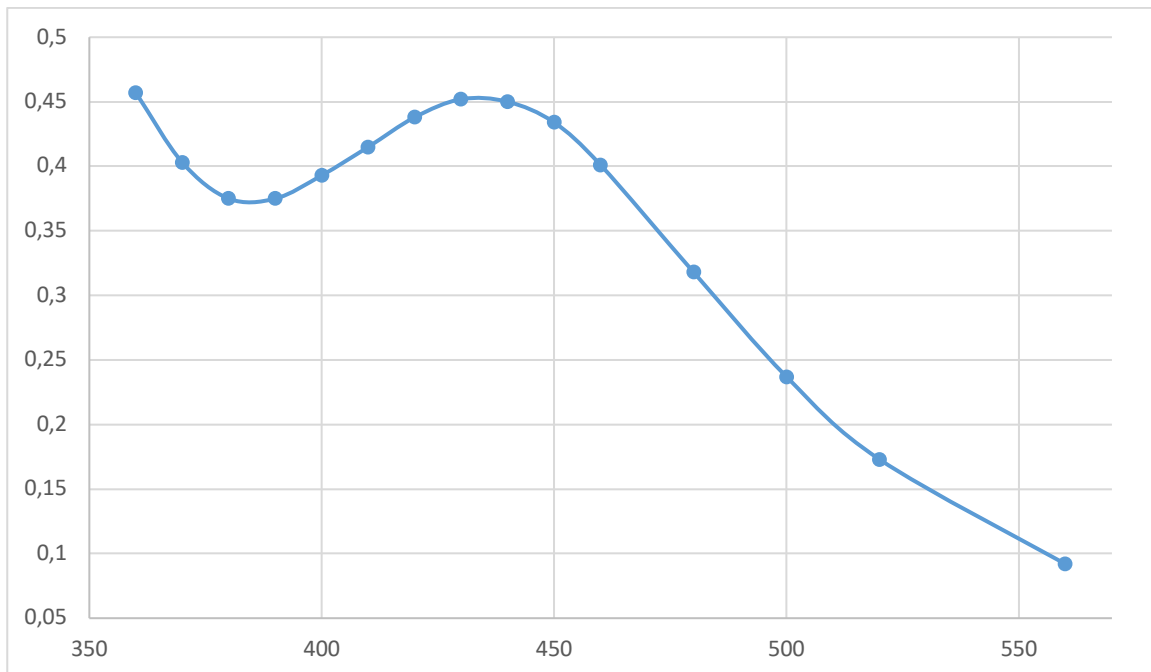


Рис. 14 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта чабреца

Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта мяты. Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта из мяты проводили при следующих условиях: температура 100 °С, рН = 4, время синтеза 1 час. На рисунке 10 представлен спектр полученной нанодисперсии (Рисунок 15), длина волны максимума поглощения 440 нм, что сопоставимо с литературными данными.

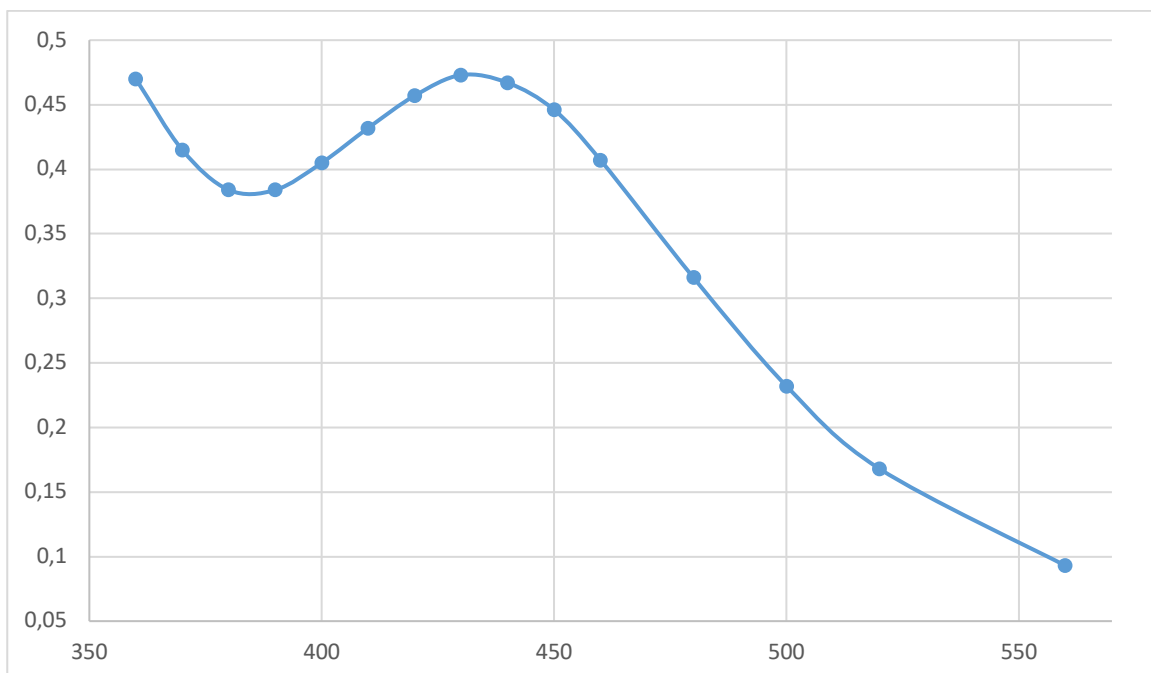


Рис. 15 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта мяты

Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстрактов других представителей семейства Яснотковые. Подобранные условия синтеза были опробованы и для других представителей семейства Яснотковые: Розмарина (*Rosmarinus officinalis L.*), Душицы (*Origanum vulgare*), Пустырника (*Leonurus*) и Базилика (*Ocimum basilicum*).

На спектре нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта розмарина, имеется максимум поглощения при 440 нм. Интересно то, что с помощью экстракта розмарина синтез идет за 3 минуты. Что явно отличает его от других представителей этого семейства (рисунок 16).

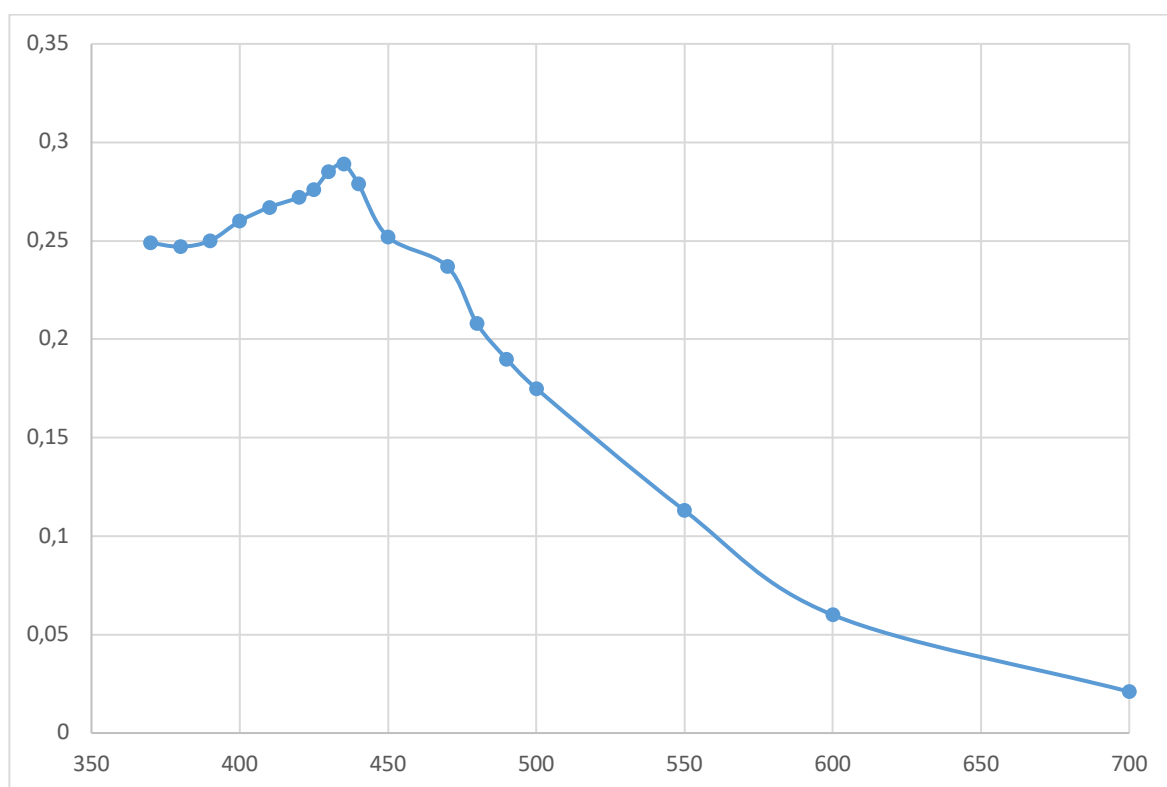


Рис. 16 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта розмарина

Далее была получена нанодисперсия серебра с помощью экстракта Душицы. У полученной нанодисперсии наблюдаются достаточно высокие значения оптической плотности на максимуме поглощения (рисунок 17).

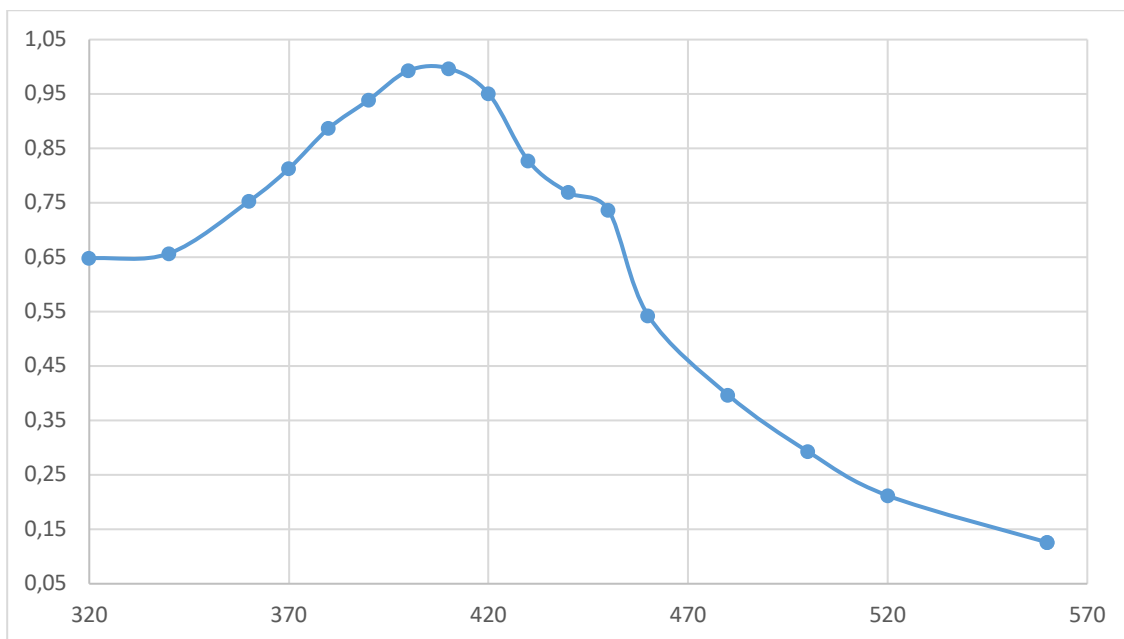


Рис. 17 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта душицы

Также была получена нанодисперсия серебра с помощью экстракта пустырника. Поведение при проведении синтеза и результаты спектроскопии в видимой области коррелируют с другими представителями этого семейства (шалфей, мята, чабрец) (рисунок 18).

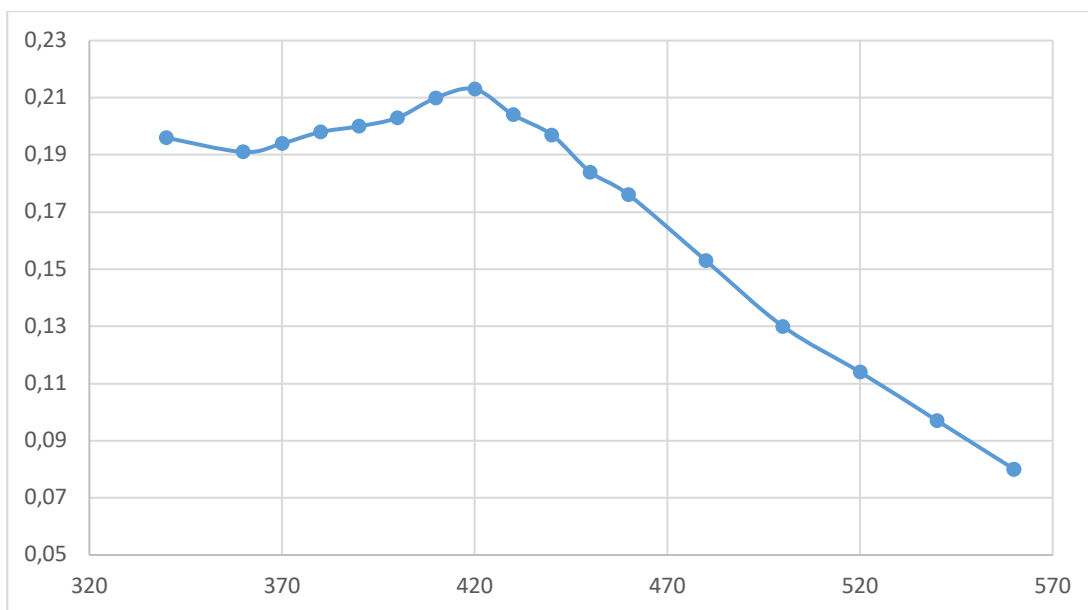


Рис. 18 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта пустырника

С использованием в качестве восстановителя экстракта базилика получается крайне неустойчивая нанодисперсия серебра. Красная окраска сохраняется в течении двух минут, после идет изменение окраски на коричневый цвет, что свидетельствует о неустойчивости нанодисперсии серебра.

Синтез нанодисперсии серебра с помощью представителя семейства Астровые (ромашка). Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта из цветков ромашки проводили при следующих условиях: температура 100 °С, рН = 4, время синтеза 1 час. На рисунке 10 представлен спектр полученной нанодисперсии (рисунок 19), длина волны максимума поглощения 440 нм, что сопоставимо с литературными данными.

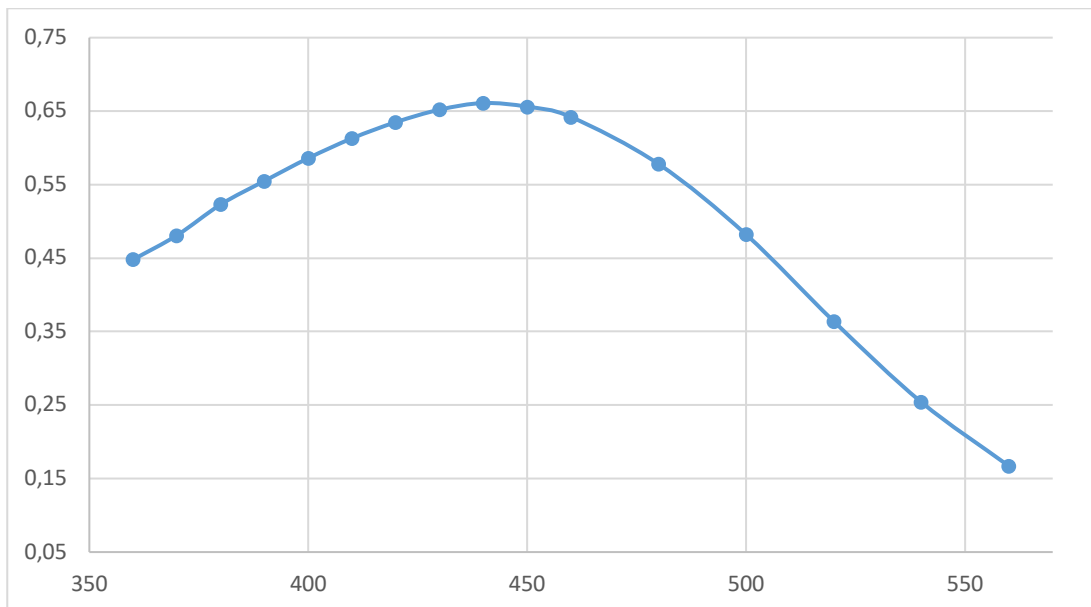


Рис. 19 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта цветов ромашки

Синтез нанодисперсии серебра с помощью представителя семейства Миртовые (Эвкалипт). Синтез нанодисперсии серебра с помощью экстракта из листьев эвкалипта проводили при следующих условиях: температура 100 °С, рН = 4, время синтеза 1 час. На рисунке 10 представлен спектр полученной нанодисперсии (рисунок 20), длина волны максимума поглощения 440 нм, что сопоставимо с литературными данными.

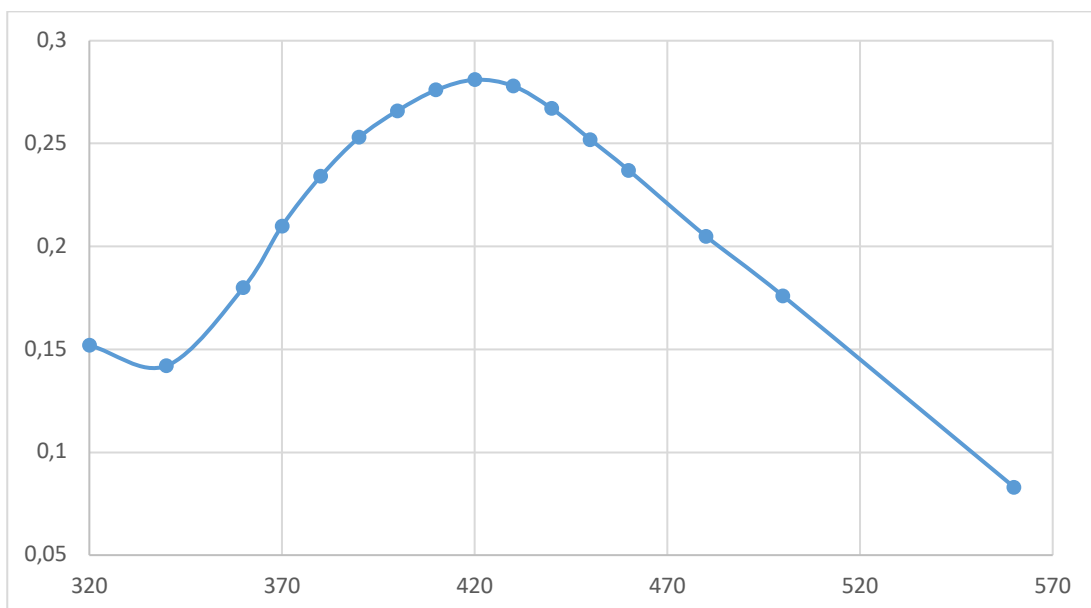


Рис. 20 – спектр нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта эвкалипта

Сравнение результатов синтеза с помощью представителей семейства Яснотковые, Астровые и Миртовые. Для сравнения эффективности синтеза нанодисперсий серебра с помощью представителей семейства Яснотковые и Астровые, сравним время синтеза. Окончание реакции фиксируется по изменению цвета реакционной системы до красного. Синтез с использованием экстрактов шалфея, мяты и чабреца в среднем идет 40 минут. До изменения окраски в системе с использованием экстракта ромашки проходит 1 час 30 минут. Можно сделать вывод, что использование в качестве источника метаболитов представителей семейства Яснотковые ускоряет синтез. Если сравнивать поведение при синтезе AgNPs с помощью представителей семейства Яснотковые и Миртовые, то можно сказать, что они сопоставимы. Но значения оптических плотностей нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта эвкалипта значительно ниже по сравнению с семейством Яснотковые, можно сделать заключение, что концентрация наночастиц серебра в первом случае ниже, вероятно это связано с тем, что в эвкалипт входит меньше компонентов фенольного ряда.

Определение антимикробной активности экстрактов из РС. Для определения антимикробной активности использовали дискодиффузионный метод (ДДМ). В рамках данного исследования изучалась антимикробная активность экстрактов из шалфея, ромашки, мяты, чабреца. Данные экстракты потенциально обладают антимикробной активностью. В качестве тест-организмов использовали *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*. Исследование проводилось следующим образом: приготовили суспензию из тест-организмов из предварительно выращенных тестовых культур. Затем полученные суспензии тест-организмов вносились в чашку Петри на поверхность питательной среды и распределились по поверхности с помощью шпателя Дригальского. На следующем этапе наносят стерильные диски с исследуемым веществом. В результате исследования были получены следующие данные (Таблица 7).

Таблица 7 – антимикробная активность экстрактов шалфея, мяты, чабреца и ромашки

Тест-культура	Результат
УЗ-экстракт шалфея	
<i>Escherichia coli</i>	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт чабреца	
<i>Escherichia coli</i>	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт мяты	
<i>Escherichia coli</i>	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт ромашки	
<i>Escherichia coli</i>	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–

Экстракты из растительного сырья не обладают антимикробной активностью по отношению к вышеуказанным микроорганизмам. Вероятнее всего, такой результат связан со способом приготовления экстракта.

Определение антимикробной активности нанодисперсий серебра, приготовленных с помощью экстрактов из РС. Для определения антимикробной активности использовали дискодиффузионный метод (ДДМ). В рамках данного исследования изучалась антимикробная активность нанодисперсий серебра, синтезированных с помощью экстрактов из шалфея, ромашки, мяты, чабреца. В качестве тест-организмов использовали *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*. Исследование проводилось следующим образом: приготовили суспензию из тест-организмов из предварительно выращенных тестовых культур. Затем полученные

суспензии тест-организмов вносились в чашку Петри на поверхность питательной среды и распределились по поверхности с помощью шпателя Дригальского. На следующем этапе наносят стерильные диски с исследуемым веществом. Визуально фиксировали зоны диффузии препарата. В результате исследования были получены следующие данные (Таблица 8).

Таблица 8 – антимикробная активность наночастиц серебра, полученных с помощью экстрактов шалфея, мяты, чабреца и ромашки

Тест-культура	Результат
УЗ-экстракт шалфея	
<i>Escherichia coli</i>	13 мм 17 мм 14 мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт чабреца	
<i>Escherichia coli</i>	12 мм 14 мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт мяты	
<i>Escherichia coli</i>	15 мм 13 мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–
УЗ-экстракт ромашки	
<i>Escherichia coli</i>	13 мм 16 мм

<i>Staphylococcus aureus</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–

Нанодисперсии серебра, полученные с помощью различных экстрактов растений, обладают средней антимикробной активностью по отношению к *Escherichia coli* (рис 21-24)

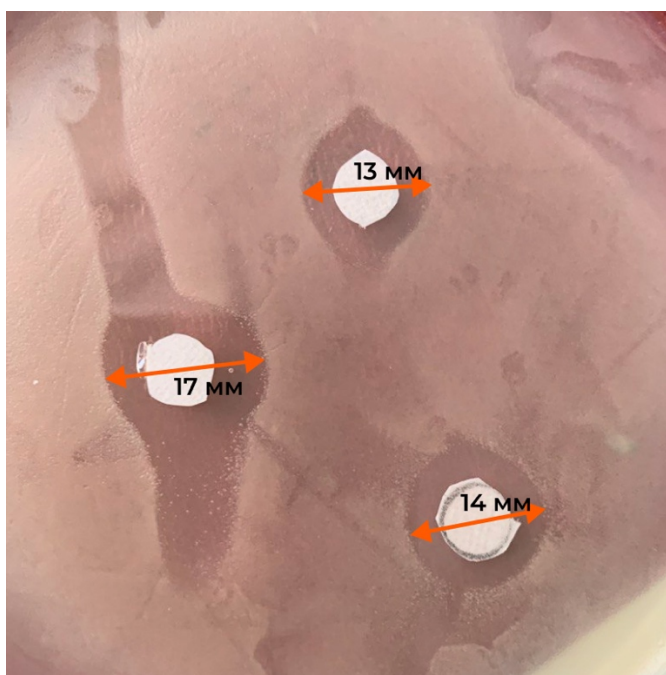


Рисунок 21 – антимикробная активность по отношению к *Escherichia coli* нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта шалфея

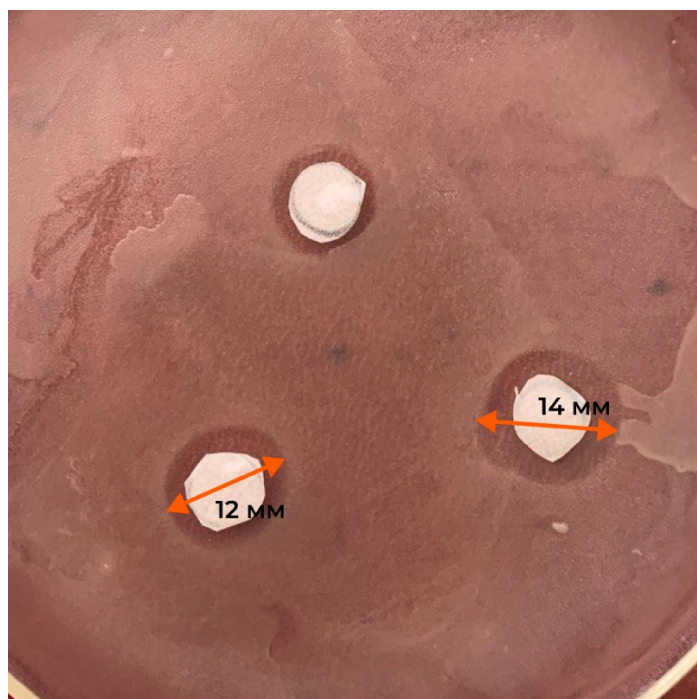


Рисунок 22 – антимикробная активность по отношению к *Escherichia coli* нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта чабреца

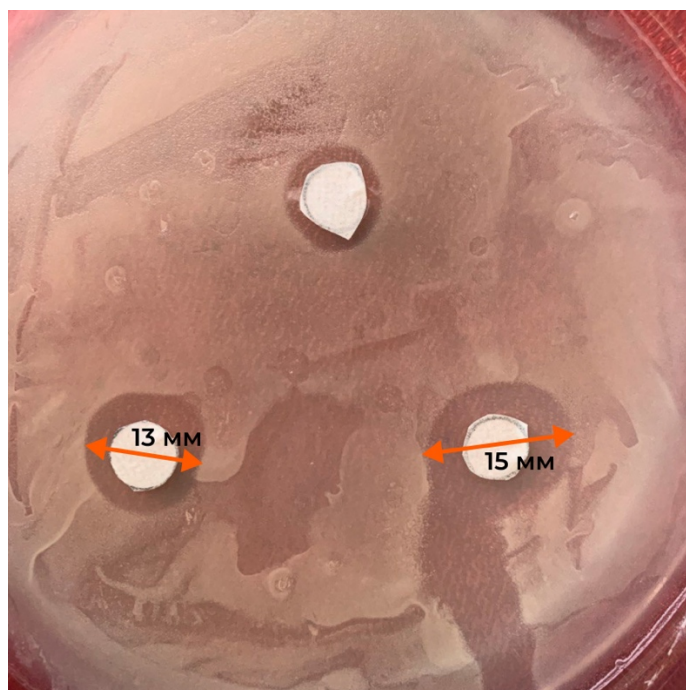


Рисунок 23 – антимикробная активность по отношению к *Escherichia coli* нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта мяты

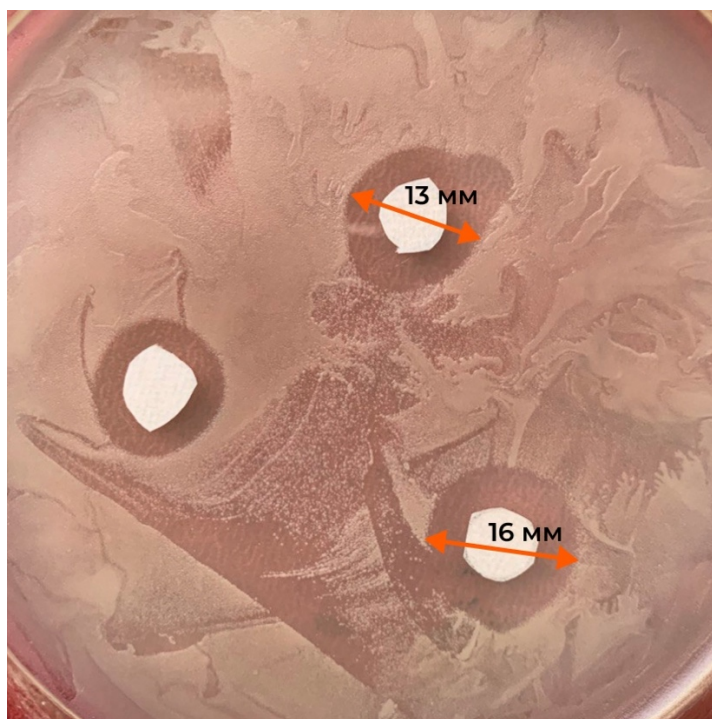


Рисунок 24 – антимикробная активность по отношению к *Escherichia coli* нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта ромашки

Оценка стабильности нанодисперсии серебра. Для оценки стабильности золя серебра использовали спектроскопию в видимой области. После экспозиции нанодисперсии серебра в течение двух, семи и четырнадцати, тридцати суток. На полученных спектрах (рисунок 25) не наблюдается смещение максимума, что не подтверждает образование агрегатов из наночастиц серебра, соответственно, получаемые нанодисперсии серебра стабильны. Вероятнее всего, в качестве стабилизатора выступают органические молекулы, которые перешли в экстракт.

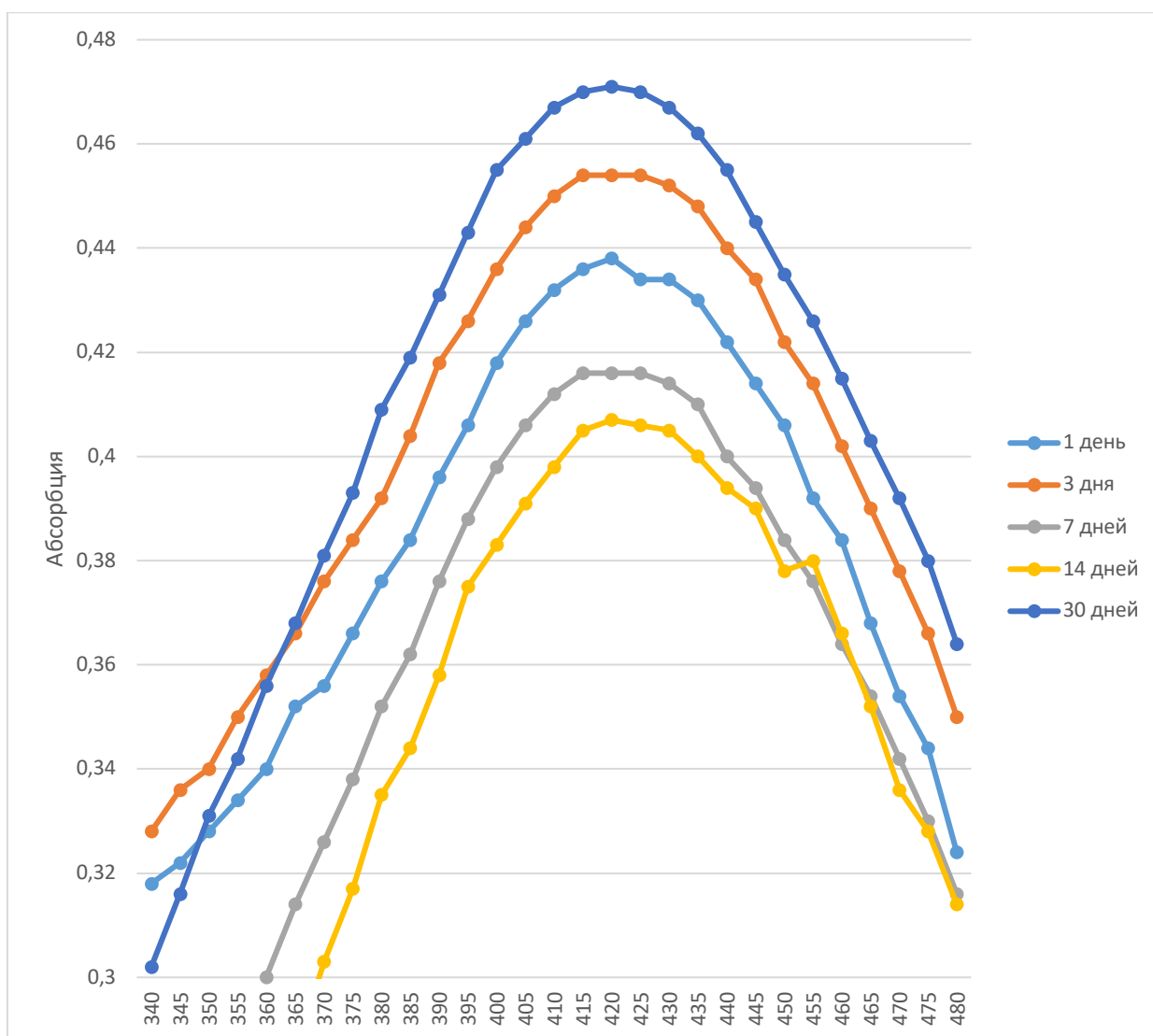


Рисунок 25 – спектры в УФ и видимой областях нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта шалфея, измеренные в разные интервалы времени

Определение распределения наночастиц серебра по размерам. Определение размеров НЧ проводилось в жидкой фазе с помощью лазерного измерителя частиц. Измерения размера частиц выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования им. Д.И. Менделеева.

Результаты измерения представлены на рисунке и в таблице 9 и на рисунке 26.

Таблица 9 – распределение, полученных в результате биосинтеза наночастиц, по размерам

Размер частиц, нм	Содержание частиц, %
144,5	0,02
121,5	0,09
102,2	0,36
85,90	1,29
72,30	3,89
60,80	9,03

51,10	15,32
43,00	19,90
36,10	21,67
30,40	19,62
25,55	8,81

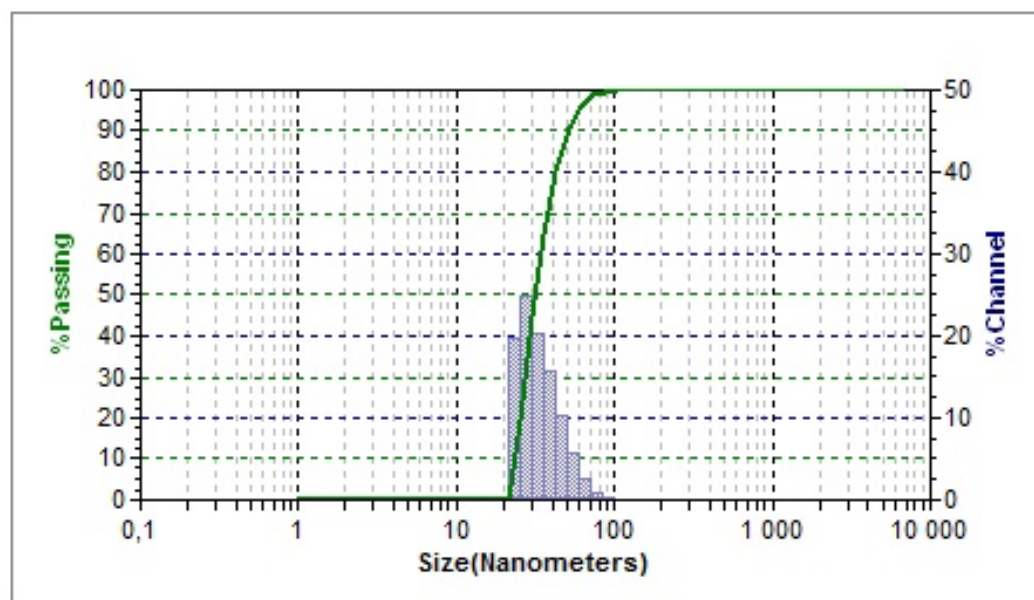


Рисунок 26 – Распределение наночастиц серебра по размерам

Как видно из полученных данных, размеры полученных частиц находятся в диапазоне от 25,5 до 100 нм, подтверждает, что образующаяся в результате синтеза нанодисперсия имеет в своем составе наноструктурированные частицы серебра. Большая часть наночастиц имеет размер 36,10 нм.

Сканирующая электронная микроскопия. Оценку форму получаемых наночастиц производили с помощью метода сканирующей электронной микроскопии, измерение проводилось на приборе JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-max Inca Energy (JOEL; Япония; Oxford Instruments; Великобритания). Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования им. Д. И. Менделеева. Были получены снимки представителей семейства Яснотковые (шалфей) и Астровые (Ромашка). Подготовка образцов к анализу осуществлялась следующим образом: полученные нанодисперсии серебра сушили при температуре 80 °С, для избавления от лишней влаги, далее они наносились на предметные столики. Обработка результатов СЭМ осуществлялась с помощью программы Image J. Далее рассмотрим каждый случай подробнее.

Установка точной морфологии наночастиц серебра, полученных с помощью экстракта шалфея несколько затруднена (Рисунок 27), так как наночастицы находятся в

агрегированном состоянии. Процесс агрегирования НЧ мог возникнуть в процессе подготовки образца к измерениям. Размер агрегата равен примерно 70 мкм. На снимке видны более мелкие агрегаты размером 13 мкм, 7 мкм. Удалось оценить поверхность получаемых наночастиц серебра: она имеет пористую, немного рыхлую структуру, вероятно, они могут эффективнее сорбировать на своей поверхности химические соединения.

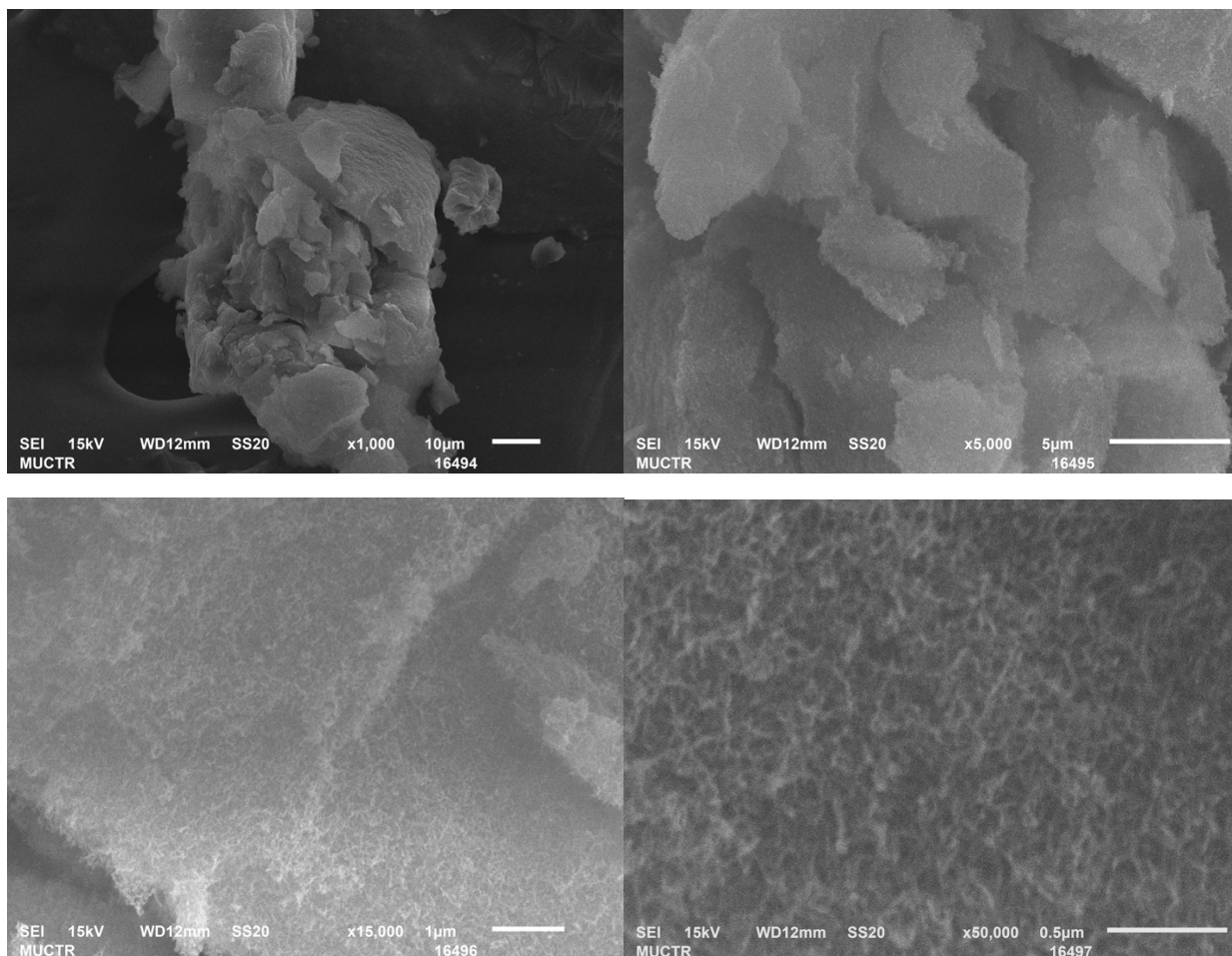


Рисунок 27 – СЭМ-снимки нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта Шалфея

На снимке НЧ серебра, полученных с помощью экстракта из цветков Ромашки наблюдается образование более мелких агрегатов кубической формы (Рисунок 28).

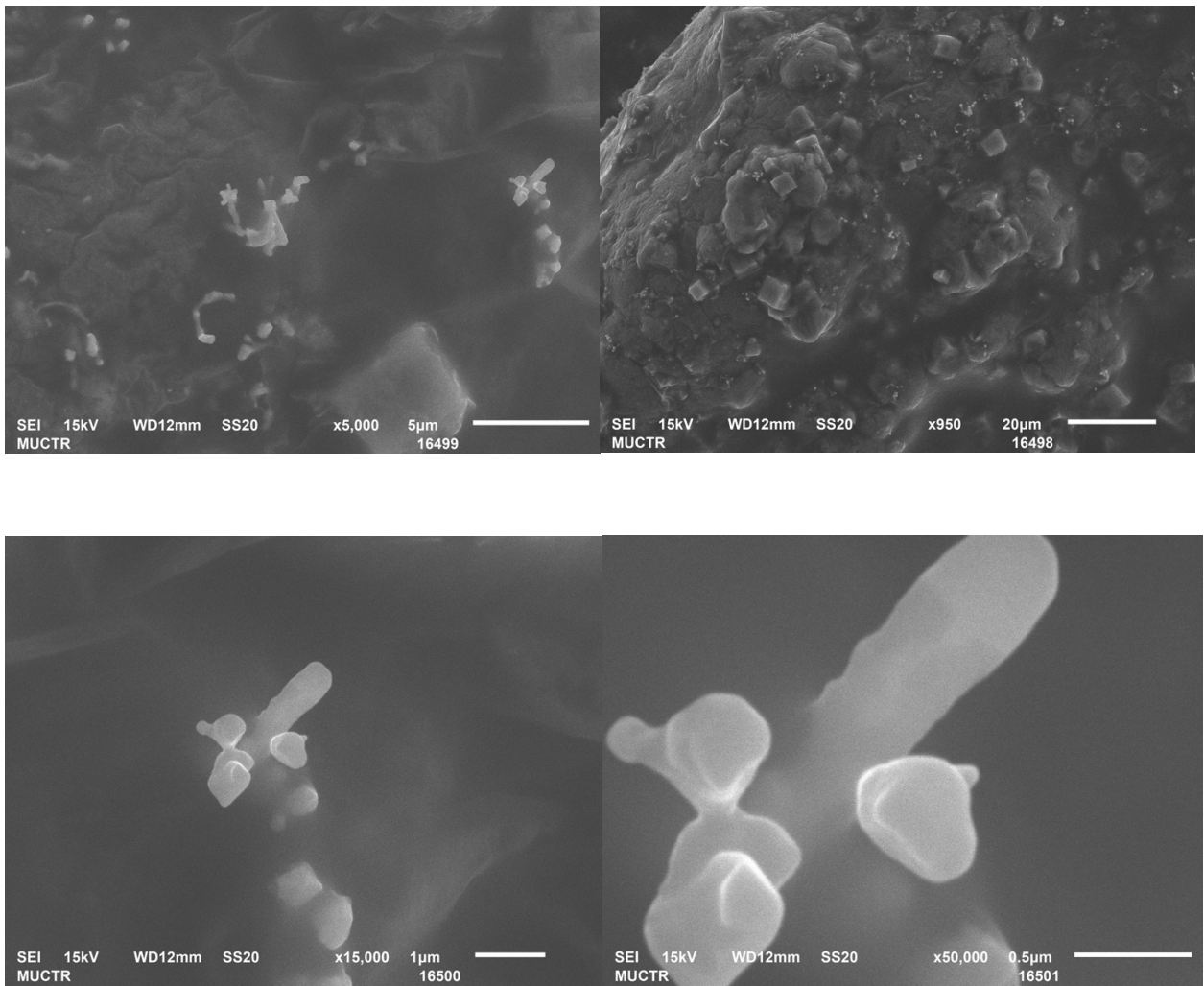


Рисунок 28 – СЭМ-снимки нанодисперсии серебра, полученной с помощью экстракта Ромашки

ВЫВОДЫ

- 1 Показано, что экстракцию нужно проводить с использованием способа УЗ-экстракции длительностью 15 минут
- 2 Определены условия получения нанодисперсий: температура реакции – 100 °С, оптимальное значение рН = 4. Время синтеза при таких условиях составляет 1 час
- 3 Показано, что нанодисперсия полученная с использованием экстракта шалфея стабильна в течение месяца.
- 4 Определен размер и морфология частиц, полученных с использованием экстракта шалфея, он составил 36,10 нм.
- 5 Получены нанодисперсии серебра с помощью экстрактов чабреца, мяты, душицы, пустырника и розмарина. Для данных нанодисперсий были получены спектры в видимом диапазоне, максимумы поглощения составили 440 нм, 440 нм, 410 нм, 420 нм, 440 нм.
- 6 Установлено, нанодисперсия серебра обладает средней антимикробной активностью по отношению к *Escherichia coli*

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Rodríguez-Felix, F. Sustainable-green synthesis of silver nanoparticles using safflower (*Carthamus tinctorius L.*) waste extract and its antibacterial activity // *Heliyon*. – 2021. – V. 7. – P. 1–11.
- 2 Shakeel A., A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise // *Heliyon*– V. 7 – 2021 – P. 1–11.
- 3 Linic, S. Photochemical transformations on plasmonic metal nanoparticles // *Nat. Mater.* – 2015. – V.14 – P. 567–576.
- 4 Yoon, W.-J. Plasmon-enhanced optical absorption and photocurrent in organic bulk heterojunction photovoltaic devices using self-assembled layer of silver nanoparticles // *Sol. Energy Mater.* – 2010 – V. 94 – P. 128–132.
- 5 Elechiguerra, J.L. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. // *J. Nanobiotechnol.* – V. 3.– 2005. – P. 6.
- 6 Khlebtsov, N. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies//*Chem. Soc. Rev.* – V. 40 – 2011. – P. 1647–1671.
- 7 Leid, J.G., Ditto, A.J., Knapp, A., Shah, P.N., Wright, B.D., Blust, R., Christensen, L., Clemons, C., Wilber, J., Young, G.W. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. // *J. Antimicrob. Chem.* – 2011 – V.67 – P. 138–148.
- 8 Modi, S.R., Collins, J.J., Relman, D.A. Antibiotics and the gut microbiota // *J. Clin. Investig.* – 2014. – V. 124. – P. 4212–4218.
- 9 Крутяков, Ю. А., Кудринский, А. А., Оленин, А.Ю.. Синтез и свойства наночастиц серебра // *Успехи химии*. – 2008. – № 77.– с. 242-269.
- 10 Iv, M. et al. / Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumor // *Nanomedicine* – 2011. – V. 10. – P. 993–1018.
- 11 Ahamed, M. et al. / Silver nanoparticle applications and human health. //*Clin. Chim. Acta.* – 2010. – V. 411. – P.1841–1848.
- 12 Ambika, S. et al. Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Vitex negundo L.* extract: spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin // *J. Photochem. Photobiol.* – 2015–V. 149 – P. 143–148.

- 13 Savithramma, N. Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Svensonia Hyderabadensis* Leaf Extract and Evaluation of their Antimicrobial Efficacy // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2012. – V. 3. – P. 1117–1121.
- 14 Gade, A., Bonde, P., Ingle, A., Marcato, P., Duran, N., Rai, M. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nano- particles // *J. Biobased Mater. Bioenergy* – 2008 – V. 2. – P. 243–247.
- 15 Ouda, S.M. Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Res // *J. Microbiol.* – 2014 – V. 9. – P. 34–42.
- 16 Wei, X., Luo, M., Li, W., Yang, L., Liang, X., Xu, L., Kong, P., Liu, H. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO_3 // *Bioresour. Technol.* – 2012. – V. 103. – P. 273–278.
- 17 Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B., Dey, G., Mukherjee, P., Ghatak, J., Tyagi, A., Kale, S Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a nonpathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum* // *Nanotechnology*. – 2008. – V. 19. – P. 75103–75110.
- 18 Макаров, В. В. и др. «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений // *Acta Naturae*. – 2014. – P. 37–46.
- 19 С.И. Расмагин, В.И. Крыштоб, И.К. Новиков. Свойства наночастиц серебра в присутствии диспрозия // *Журнал технической физики* – 2018. – № 12 – с. 1868-1872.
- 20 Shiv Shankar, S., et al. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes // *Mater. Chem* – 2003. – V. 13. – P. 1822–1846.
- 21 Sharma S., Alam M., Singh V., Shamsi S.F., Mehta B., Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil// *colloids Surf. B: Biointerfaces*. – V. 81 – 2010 – P. 81–86.
- 22 Горелкин, П. и др. Синтез наночастиц с использованием растений // *Перспективные проекты в нанотехнологиях* – 2008. – № 77. – С. 242-249
- 23 Низамов. Т. И. Синтез и химическое модифицирование поверхности анизотропных наночастиц серебра: 02.00.04 – физическая химия: дата защиты: 2014. – Москва. – 26 с.
- 24 Sathishkumar, M., Sneha, K., Yun, Y.S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity // *Bioresour. Technol.* – 2010. – V. 101. – P. 7958–7965.

- 25 Ahmad N., Sharmab S., Alama Md. K., Singh V. N., Shamsi S. F., Mehta B. R., Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil // *Colloids Surf. B.* – 2010. – 81. – P. 81–86.
- 26 Тараховский Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. / Тараховский Ю. С. – Пушино: Synchronobook, 2013 – 311 с.
- 27 Nour, V. HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves / V. Nour, I. Trandafir, C. Cosmulescu // *Journal of Chromatographic Science.* – 2012 – P. 234–242.
- 28 В. В. Карпук Фармакогнозия. – Минск: БГУ, 2011. – 334 с.
- 29 Запрометов, М.Н. Основы биохимии фенольных соединений / М.Н Запрометов. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
- 30 Д. А. Муравьева, И. А. Самылина, Г. П. Яковлев Фармакогнозия. – 4 изд. – Москва: Медицина, 2007. – 656 с.
- 31 Pirtarighat. Ssynthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment // *Journal of Nanostructure in Chemistry* – 2019 – V.9 – P. 1–9.
- 32 Ahmad Ghorbani, Mahdi Esmaeilzadeh. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components // *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* – 2017. – V. 7. – P. 1403-1409.
- 33 Raheja, S. Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential / S. Raheja, A. Girdhar, V. Lather, D. Pandita // *Trends in Food Science & Technology.* – 2019.
- 34 Luquede, C. Soxhlet extraction Pastand presentpanacea // *Journal of Chromatography A.* – 2010. – № 16 – P. 2383–2389.
- 35 Romanik G. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2007. – V. 70. – P. 253–261.
- 36 Busby, M.G. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: singledose administration to healthy men // *The American Journal of Clinical Nutrition.* – 2002. – V. 75. – P. 126-136.
- 37 Romanik G. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2007. – V. 70. – P. 253–261.
- 38 Bajer, T. Ventura Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants // *Science.* – 2007. – V. 30. – P. 122-127.

- 39 Tripathia, D., Modib, A., Narayanb, G. Green and cost effective synthesis of silver nanoparticles from endangered medicinal plant *Withania coagulans* and their potential biomedical properties // *Materials Science and Engineering*. – 2019. – 100. – P. 152-164.
- 40 Reddy, N., Rani M, Arvind Kumar Gupta, S. Sudha Rani. Purple heart plant leaves extract-mediated silver nanoparticle synthesis: Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract Jayachandra // *Materials Science and Engineering*. – 2019. – V. 99. – P. 1105–1114.
- 41 Ranoszek-Soliwoda, K. et al. The synthesis of monodisperse silver nanoparticles with plant extracts // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – V. 177. – P. 19–24.
- 42 Sura, K. et al. Green synthesis of Silver nanoparticles using the plant extract of *Shikakai* and *Reetha* Ujjal // *ScienceDirect Materials Today: Proceedings*. – 2018. – V. 5. – P. 2321–2329.
- 43 Reddy, N., Rani, M., Sudha, S. Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract Jayachandra Rani // *European Journal of Medicinal Chemistry Received* – 2014. – V. 14.
- 44 Pirtarighat, S. Synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment // *Journal of Nanostructure in Chemistry* – 2019 – V.9 – P.1–9.
- 45 Hemmati, S. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Fritillaria* flower extract and their antibacterial activity against some human pathogens // *Journal of Nanostructure in Chemistry*. – 2018. – *в печати*.
- 46 Savithramma, N., Novel Green Synthesis, Chemical Characterization, Toxicity, Colorectal Carcinoma, Antioxidant, Anti-Diabetic, and Anticholinergic Properties of Silver Nanoparticles: A Chemopharmacological Study // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2021. – *в печати*.
- 47 Горелкин, П., Калинина, Н., Лав, А. Синтез наночастиц с использованием растений // *Перспективные проекты в нанотехнологиях*. – 2008. – V. 77. – P. 242–249.
- 48 Kevin, G. Stampleskoskie and Juan C. Scaiano Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *Journal of Physical Chemistry*. – 2010. – V 7. – P. 233-440
- 49 Деев, И. С. Исследование методом сканирующей электронной микроскопии деформации микрофазовой структуры полимерных матриц при механическом нагружении // *Труды ВИАМ*. – 2014. – № 7.

- 50 Shimadzu: excellence in science. – Москва. – URL: <https://www.shimadzu.ru/principle-measurement-0> (дата обращения: 20. 05. 2021). – Текст: электронный.
- 51 Zhang, Y., Yang, D., Kong, Y., Wang, X., Pandoli, O., Gao, G. Synergetic antibacterial effects of silver nanoparticles *Aloe Vera* prepared via a green method // Nano Biomed Eng. – 2010. – V. 2. – P.252–257.
- 52 Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthiga, V., Singaravelu G. Biogenic silver nanoparticles by *Solanumtorvum* and their promising antimicrobial activity // J Biopest – 2010. – V. 3. – P. 394–399.
- 53 Geethalakshmi, R. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Trianthema decandra* extract and evaluation of their anti-microbial activities // Int J Eng Sci Technol. – 2010. – V. 2. – P. 970–975.
- 54 Sadeghi, B. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature // Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc. – 2015. – V. 134. P. 310–315.
- 55 Kumarasamyraja, D. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *acalypha indica* and its antimicrobial activity // Int J Pharm Biol Sci. – 2013. – V. 4. – P. 469–476.
- 56 Sun, S., Zeng, H., Raoux, S. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe Co, Mn) nanoparticles // Am Chem Soc. – 2004. – V. 126.– P. 273.
- 57 Рябоконтъ Л.П., Милевская В.В., Киселева Н.В., Степакова А.Н. / Оптимизация условий извлечения терпенов и их производных из шалфея для последующего хромато-масс анализа - // Химия: достижения и перспективы – Ростов-на-Дону -2019 – с.119