

И. В. Лагута, Т. В. Фесенко, О. Н. Ставинская, Л. М. Шпак,
О. И. Дзюба

Биосинтез наночастиц серебра с использованием экстрактов стевии

(Представлено академиком НАН Украины Н. Т. Картелем)

Синтезированы наночастицы серебра с использованием экстрактов стевии медовой (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni). Показано, что на скорость формирования наночастиц влияют условия культивирования растений. Установлено, что в присутствии экстракта, полученного из каллуса, образование наночастиц происходит быстрее, чем с использованием экстрактов растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*. Синтезированные наночастицы серебра изучены методами УФ и ИК спектроскопии.

Ключевые слова: биосинтез, наночастицы серебра, экстракты стевии, каллус, *ex situ*, *in vitro*.

Биологический синтез наночастиц металлов считается нетоксичным, экологически чистым и экономически эффективным, поскольку в качестве восстановителей и стабилизаторов наночастиц используют растительные экстракты [1]. В то же время растительные экстракты, полученные из выращенных в грунте растений, имеют и некоторые недостатки. Так, в природных условиях растения подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, что может влиять на образование в растениях активных соединений [2] и, соответственно, сказываться на восстановительной способности экстрактов. Альтернативным источником получения активных веществ являются культивируемые *in vitro* клетки и ткани растений. Метод культуры клеток и тканей имеет ряд преимуществ для производства ценных метаболитов растений [3]. Это, прежде всего, независимость выхода продукта от климатических условий, сезона года, возможность получения экологически чистого продукта по сравнению с природным сырьем. Дополнительным преимуществом также может быть возможность управлять развитием растений в течение вегетационного периода, создавать благоприятные условия выращивания, осуществлять отбор сырья в тех фазах развития растений, когда они имеют самую высокую концентрацию необходимых восстановителей / стабилизаторов.

Цель проведенного исследования заключалась в изучении процесса образования наночастиц серебра с использованием экстрактов стевии медовой (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) в зависимости от условий культивирования растения.

В качестве растительного сырья использовали свежие листья стевии медовой (*S. rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) культивируемой в Национальном ботаническом саду им. Н. Н. Гришка НАН Украины. В качестве источника ионов серебра использовали нитрат серебра ("Merck", 99%).

Экстракты были приготовлены из культуры тканей (каллуса), а также из растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*. В последнем случае, после стерилизации, семена помещали в питательную среду Мурасиге–Скуга в стеклянные колбы и выращивали при

16-часовом искусственном освещении. Для получения каллуса на свежих листьях делали поперечные надрезы, не доходя до края листка, затем их помещали на модифицированную среду Мурасиге–Скуга, содержащую соли железа FeCl_3 (до 40 мг/л), витамины В1, В6 и тидиазурон (до 0,2 мг/л).

Биологически активные вещества извлекали из листьев растений путем экстракции в 70% раствор этанола согласно методике, описанной в работе [4]. В емкости помещали по 1 г мелко нарезанных листьев, заливали 100 мл 70% раствора этанола и ставили на паровую баню на 30 мин. Полученную вытяжку остужали до комнатной температуры, доводили до начального объема и фильтровали.

Общее количество фенольных соединений в экстрактах определяли методом Фолина–Чоколтеу. Для определения общего фенольного индекса [5] к 1 мл экстракта в 70% спирте последовательно добавляли 11,5 мл воды, 5 мл 20%-го раствора карбоната натрия, 1,25 мл реактива Фолина–Чоколтеу и 6,25 мл воды, так что суммарный объем раствора составлял 25 мл. Раствор перемешивали в течение получаса, измеряли поглощение при 750 нм и рассчитывали общий фенольный индекс согласно [5].

Количественное определение флавоноидов проводили по методике, основанной на их способности образовывать окрашенный комплекс с хлоридом алюминия. В качестве стандарта использовали лютеолин-7-гликозид (цинарозид) [6].

Качественный анализ содержащихся в экстрактах флавоноидов проводили с использованием метода тонкослойной хроматографии [7]. Реперными соединениями для хроматографического анализа служили рутин, кверцетин, кверцетрин, морин, гесперидин и метил-изофлаван.

Для получения наночастиц серебра к 1 мл растительного экстракта добавляли 10 мл раствора нитрата серебра ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Синтез наночастиц проводили при 40 °С при непрерывном перемешивании. Изменение цвета экстрактов от желтоватого до коричневого наблюдали приблизительно через 30 мин после добавления раствора AgNO_3 , что свидетельствовало об образовании наночастиц серебра.

Спектры поглощения экстрактов растений и растворов наночастиц серебра регистрировали в диапазоне длин волн 200–800 нм при 25 °С на спектрофотометре Perkin Elmer UV–VIS Lambda 35 (скорость сканирования 480 нм/мин, толщина кварцевой кюветы 10 мм).

ИК спектры пропускания растворов записывали на однолучевом ИК спектрофотометре с фурье-преобразованием Thermo Nicolet NEXUS FT-IR (“Nicolet”, США) в интервале частот 4000–400 см^{-1} (разрешение 4 см^{-1} , число сканов пробы 50). Определенное количество раствора наносили на KRS подложку, высушивали около 5 мин и регистрировали спектр.

Согласно литературным данным [1], растительные экстракты, используемые для синтеза наночастиц металлов, содержат большое количество вторичных метаболитов, которые обладают окислительно-восстановительным потенциалом и выполняют функцию восстановителей и стабилизаторов наночастиц. К растительным метаболитам относятся сахара, алкалоиды, терпеноиды, белки, полифенольные кислоты и флавоноиды. В процессе синтеза наночастиц эти биоактивные соединения играют различную роль. Например, установлено [8], что именно фенольные соединения и флавоноиды участвуют в образовании наночастиц серебра. Также показано, что существует линейная зависимость между антиоксидантной активностью экстрактов растений и их способностью восстанавливать ионы металлов до наночастиц [9]. Результаты ИК спектроскопии наночастиц, синтезированных с использованием растительных экстрактов, показали, что образующиеся наночастицы часто ассоциированы и с белками, которые, по-видимому, их также восстанавливают и стабилизируют.

лизируют [10]. Принимая во внимание вышеизложенное, можно сделать вывод, что в биосинтезе наночастиц основную роль играет состав и концентрация биологически активных соединений, содержащихся в растительных экстрактах.

В табл. 1 представлены данные о составе экстрактов стевии, полученные методами тонкослойной хроматографии и УФ спектроскопии.

Результаты хроматографического анализа экстрактов показали, что во всех исследованных образцах присутствуют кверцетрин и рутин. Как видно из таблицы, экстракты содержат разное количество фенольных соединений и флавоноидов. Наибольшее количество биологически активных соединений содержится в культуре ткани. Это, вероятно, связано с тем, что при повреждении листьев происходит увеличение содержания фенольных соединений и флавоноидов в растении [11].

В табл. 1 также приведены значения общего фенольного индекса для полученных экстрактов, характеризующие восстановительную способность присутствующих в них соединений. Сопоставление полученных значений фенольного индекса с соответствующими данными для аскорбиновой кислоты [12] позволяет заключить, что содержание антиоксидантов в экстрактах эквивалентно концентрации аскорбиновой кислоты от 2,0 до 5,4 ммоль. Таким образом, исследуемые экстракты имеют высокое содержание антиоксидантов и, соответственно, являются перспективным сырьем для синтеза наночастиц металлов.

Об образовании наночастиц серебра судили по изменению окраски растворов и по изменениям в УФ спектрах. Для всех исследуемых экстрактов после добавления к ним раствора нитрата серебра наблюдали резкое изменение окраски раствора и появление желто-коричневого цвета, характерного для наночастиц серебра. Визуальное сравнение интенсивности окраски растворов свидетельствует о том, что формирование наночастиц при взаимодействии с экстрактом, полученным из каллуса, происходит быстрее, чем с экстрактами растений, выращенных *in vitro* и *ex situ*.

На рис. 1 представлены УФ спектры реакционной смеси раствора нитрата серебра и исследуемых экстрактов. Как видно из рисунка, во всех спектрах присутствует полоса с максимумом поглощения при 451 нм, характерная для плазмонного резонанса наночастиц серебра [13]. Поскольку синтез всех образцов проводили в одинаковых условиях, о скорости реакции и концентрации синтезированных наночастиц можно судить по интенсивности пика при 451 нм. Из спектров видно, что концентрация наночастиц в реакционной смеси с экстрактом из каллуса заметно превышает их концентрацию в смесях с экстрактами растений, выращенных в условиях *in vitro* и *ex situ*.

ИК спектры всех исследуемых образцов имели практически одинаковый набор полос поглощения и отличались только интенсивностью и небольшим смещением некоторых полос. На рис. 2 представлены ИК спектры экстракта стевии *in vitro* и раствора наночастиц серебра в присутствии этого экстракта. В спектрах можно выделить следующие характер-

Таблица 1. Содержание фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах стевии

Вид экстракта	Общий фенольный индекс, отн. ед.	Эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты, ммоль/л	Количество флавоноидов, мг %	Идентифицированные флавоноиды
<i>In vitro</i>	8,0	4,0	0,9	Кверцетрин, рутин
<i>Ex situ</i>	4,0	2,0	0,6	Кверцетрин, рутин
Каллус	10,8	5,4	1,5	Кверцетрин, рутин

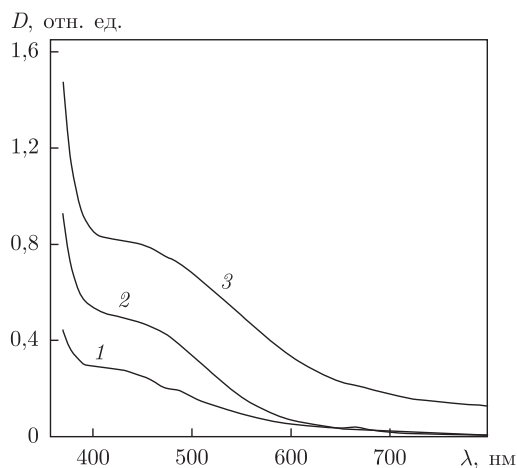


Рис. 1. УФ спектры растворов наночастиц серебра, синтезированных с использованием экстрактов стевии: 1, 2 — растения, выращенные *ex situ* и *in vitro*; 3 — каллус. Время реакции 30 мин

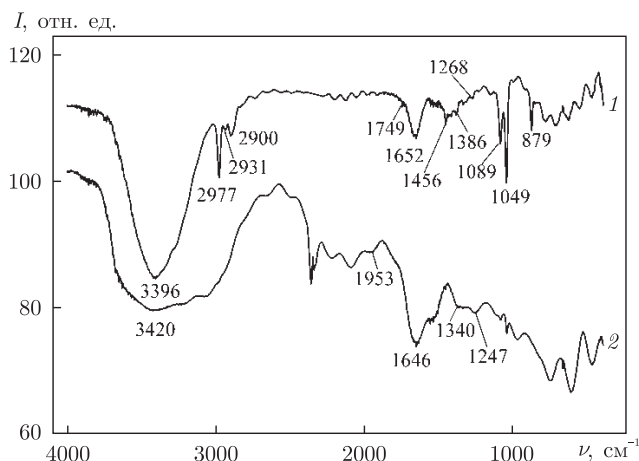


Рис. 2. ИК спектры экстракта стевии (1) и раствора синтезированных наночастиц серебра (2)

ные области поглощения: $2850\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, $1460\text{--}1750\text{ см}^{-1}$, $1008\text{--}1159\text{ см}^{-1}$, $400\text{--}890\text{ см}^{-1}$ и область вблизи 3400 см^{-1} [14].

Во всех спектрах исследуемых экстрактов присутствует широкая полоса поглощения в области 3396 см^{-1} , которая относится к валентным колебаниям ОН-групп в спиртах и фенольных соединениях. Деформационным колебаниям ОН-группы в фенолах соответствует полоса при 1419 см^{-1} . Полосы при 2977 , 2931 и 2900 см^{-1} характеризуют валентные колебания алифатических СН, СН₂, СН₃ групп, а при 1456 и 1386 см^{-1} соответствуют их деформационным колебаниям.

В диапазоне $1460\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ проявляются валентные колебания С=C и С=О связей в ароматических кольцах, альдегидах и кетонах. Наблюдаемые пики при 1652 см^{-1} можно отнести к валентным колебаниям карбонильной группы пиранозного кольца, при 1749 см^{-1} — к карбоксильной группе, полосы при 1577 , 1558 , 1521 , 1471 см^{-1} могут принадлежать валентным колебаниям С=C связи бензольного кольца. Полосы поглощения с максимумами при 1268 и 1089 см^{-1} относятся к валентным колебаниям С–О связи в простых ароматических эфирах и свидетельствуют о наличии соединений с метоксильными группа-

ми. Обнаруженные полосы поглощения в области 1008–1159 см⁻¹, по-видимому, принадлежат валентным колебаниям С–О связи в спиртовых группировках в составе углеводных компонентов, а полосы поглощения при 400–890 см⁻¹ характеризуют различные связи пиранозного кольца.

На основании данных ИК и УФ спектроскопии можно предположить, что в экстракте стевии присутствуют флавоноиды, гликозиды флавоноидов, фенолкарбоновые кислоты, метоксилированные производные всех этих соединений и стевииозиды (гликозиды из экстракта растений рода *Стевия*) [14].

Сходство между спектрами 1 и 2 на рис. 2, с некоторыми изменениями в положении пиков, явно указывает на присутствие в образце 2 компонентов растительного экстракта, которые могут служить стабилизаторами наночастиц серебра. В спектре наночастиц серебра вместо полосы при 3396 см⁻¹ наблюдается полоса при 3420 см⁻¹, что позволяет предположить, что гидроксильные группы полифенольных соединений, входящих в состав экстракта, принимают участие в восстановлении ионов серебра и формировании наночастиц. Это подтверждает и появление в спектре наночастиц серебра новой полосы поглощения при 1953 см⁻¹, которая характеризует связь наночастицы с кислородом гидроксильной группы [15]. Уменьшение интенсивности и сдвиг в низкочастотную область полос валентных колебаний СО и СН₃ групп также указывает на их участие в образовании наночастиц серебра [15].

Таким образом, полученные результаты показывают, что экстракты стевии медовой (*S. rebaudiana* (Vertoni)) являются перспективным сырьем для синтеза наночастиц металлов. При этом условия культивирования растения влияют на концентрацию в них биологически активных соединений и, соответственно, на скорость формирования наночастиц серебра. Синтез наночастиц с использованием экстракта, полученного из каллуса, происходит быстрее, чем с экстрактами из растений, выращенных в условиях *in vitro* и *ex situ*. Карбонильная, алкильная и гидроксильная группы, присутствующие в активных компонентах экстрактов стевии (флавоноиды, гликозиды флавоноидов, фенолкарбоновые кислоты и метоксилированные производные этих соединений и стевииозиды), вероятно, обеспечивают и восстановление ионов серебра, и стабилизацию наночастиц.

Цитированная литература

1. *Travani S.* Green synthesis of metal nanoparticles using plants // *Green Chem.* – 2011. – **13**. – P. 2638–2650.
2. *Харборн Дж.* Биохимия фенольных соединений. – Москва: Мир, 1968. – 448 с.
3. *Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 356 с.
4. *Комарова М. Н., Николаева Л. А., Регир В. Г.* Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: методические указания к лабораторным занятиям. – Санкт-Петербург: Гос. хим.-фарм. академия, 1998. – 60 с.
5. *Alonso A. M., Domínguez C., Guilleán D., Barroso C. G.* Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – **50**. – P. 3112–3115.
6. *Андреева В. Ю., Калинин Г. И.* Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. S. L // *Химия раст. сырья.* – 2000. – № 1. – С. 85–88.
7. *Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М.* Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1973. – 591 с.
8. *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.

9. Zhou Y., Lin W., Huang J., Wang W., Gao Y., Lin L., Li Q., Lin L., Du M. Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: roles of biocompounds and other attributes of the extracts // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – **5**. – P. 1351–1359.
10. Gopinath V., Priyadarshini S., Meera Priyadharsshini N., Pandian K., Velusamy P. Biogenic synthesis of antibacterial silver chloride nanoparticles using leaf extracts of *Cissus quadrangularis* Linn // *Mater. Lett.* – 2013. – **91**. – P. 224–227.
11. Лагута И. В., Ставинская О. Н., Оранская Е. И., Чернявская Т. В. Взаимодействие аскорбиновой кислоты с высокодисперсным кремнеземом // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 12. – С. 152–157.
12. Tadhani M. B., Patel V. H., Subhash R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus // *J. Food Compos. Anal.* – 2007. – **20**. – P. 323–329.
13. Raut R. W., Lakkakula J. R., Kolekar N. S., Mendhulkar V. D., Kashid S. B. Phytosynthesis of silver nanoparticle using *Gliricidia sepium* (Jacq.) // *Curr. Nanosci.* – 2009. – **5**. – P. 117–122.
14. Yilmaz M., Turkdemir H., Akif Kilic M., Bayram E., Cicek A., Mete A., Ulug B. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana* // *Mater. Chem. Phys.* – 2011. – **130**. – P. 1195–1202.
15. Khan M., Khan M., Adil S. F., Tahir M. N., Tremel W., Alkathlan H. Z., Al-Warthan A., Siddiqui M. R. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Pulicaria glutinosa* extract // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – **8**. – P. 1507–1516.

References

1. Irvani S. *Green Chem.*, 2011, **13**: 2638–2650.
2. Harborne J. B. *Biochemistry of phenolic compounds*, Moscow: Mir, 1968 (in Russian).
3. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. *Methods of tissue culture in physiology and biochemistry*, Kiev: Naukova Dumka, 1980 (in Russian).
4. Komarova M. N., Nikolaeva L. A., Regir V. G. *Phytochemical analysis of medicinal plants: guidelines for laboratory studies*, Saint-Petersburg: State Chemical-Pharmaceutical Academy, 1998 (in Russian).
5. Alonso A. M., Domianquez C., Guillelan D., Barroso C. G. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**: 3112–3115.
6. Andreeva V. Yu., Kalinkina G. I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2000, No 1: 85–88 (in Russian).
7. Grodzinskii A. M., Grodzinskii D. M. *Brief handbook on plants physiology*, Kiev: Naukova Dumka, 1973 (in Russian).
8. Ahmad N., Sharmab S., Alama Md. K., Singh V. N., Shamsi S. F., Mehta B. R., Fatma A. *Colloids Surf. B*, 2010, **81**: 81–86.
9. Zhou Y., Lin W., Huang J., Wang W., Gao Y., Lin L., Li Q., Lin L., Du M. *Nanoscale Res. Lett.*, 2010, **5**: 1351–1359.
10. Gopinath V., Priyadarshini S., Meera Priyadharsshini N., Pandian K., Velusamy P. *Mater. Lett.*, 2013, **91**: 224–227.
11. Laguta I. V., Stavinskaya O. N., Oranskaya E. I., Chernyavskaya T. V. *Dop. NAN of Ukraine*, 2009, No 12: 152–157 (in Russian).
12. Tadhani M. B., Patel V. H., Subhash R. *J. Food Compos. Anal.*, 2007, **20**: 323–329.
13. Raut R. W., Lakkakula J. R., Kolekar N. S., Mendhulkar V. D., Kashid S. B. *Curr. Nanosci.*, 2009, **5**: 117–122.
14. Yilmaz M., Turkdemir H., Akif Kilic M., Bayram E., Cicek A., Mete A., Ulug B. *Mater. Chem. Phys.*, 2011, **130**: 1195–1202.
15. Khan M., Khan M., Adil S. F., Tahir M. N., Tremel W., Alkathlan H. Z., Al-Warthan A., Siddiqui M. R. *Int. J. Nanomedicine*, 2013, **8**: 1507–1516.

Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Национальный ботанический сад
им. Н. Н. Гришко НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 14.07.2015

І. В. Лагута, Т. В. Фесенко, О. М. Ставинська, Л. М. Шпак, О. І. Дзюба

Біосинтез наночастинок срібла з використанням екстрактів стевії

Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ

Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України, Київ

Синтезовано наночастинки срібла з використанням екстрактів стевії медової (Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni). Показано, що на швидкість формування наночастинок впливають умови культивування рослин. Встановлено, що за наявності екстракту, отриманого з калусу, утворення наночастинок відбувається швидше, ніж з використанням екстрактів рослин, вирощених в умовах ex situ та in vitro. Синтезовані наночастинки срібла вивчено методами УФ та ІЧ спектроскопії.

Ключові слова: біосинтез, наночастинки срібла, екстракти стевії, калус, ex situ, in vitro.

I. V. Laguta, T. V. Fesenko, O. N. Stavinskaya, L. M. Shpak, O. I. Dzyuba

Biosynthesis of silver nanoparticles using Stevia extracts

Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

M. M. Gryshko National Botanic Garden of the NAS of Ukraine, Kiev

Silver nanoparticles are synthesized using Stevia rebaudiana extracts. It is shown that the rate of nanoparticles formation is affected by plant cultivation conditions. It is found that, in the presence of the extract from callus, the formation of nanoparticles occurs faster than in the presence of extracts from plants grown under conditions of ex situ and in vitro. The synthesized silver nanoparticles were studied by UV and IR spectroscopies.

Keywords: biosynthesis, silver nanoparticles, Stevia extracts, callus, ex situ, in vitro.