

УДК 544.77.051

## ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ АГЕНТОВ И ХИТОЗАНА

© 2022 г. Т. С. Лялина<sup>1</sup>, \*, А. П. Луньков<sup>1</sup>, В. П. Варламов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: tatyanaashcherbinina88@gmail.com

Поступила в редакцию 19.08.2021 г.

После доработки 01.11.2021 г.

Принята к публикации 05.11.2021 г.

Уникальные особенности металлических наночастиц (НЧ) привлекают исследователей из различных областей науки, в том числе биомедицины, микробиологии, биотехнологии и сельского хозяйства. Биологическая активность НЧ зависит от их размерных характеристик, состава и физико-химических свойств, способа получения. Среди способов получения НЧ можно выделить химические, биологические и физические методы. В данном обзоре рассмотрены основные методы химического синтеза НЧ на основе металлов. Описаны преимущества и недостатки наиболее часто используемых восстанавливающих агентов. Особое внимание обращено на влияние условий синтеза на свойства НЧ. Рассмотрена возможность использования полисахаридов и, в частности, хитозана в качестве восстанавливающего агента и стабилизатора суспензии наночастиц.

**Ключевые слова:** наночастицы, антибактериальная активность, фунгицидная активность, противовирусная активность, противоопухолевая активность, стимуляторы роста, наноудобрения, хитозан

**DOI:** 10.31857/S0555109922020131

Металлические наночастицы (НЧ) представляют собой дисперсную систему, где дисперсной фазой является частица металла или его оксида, а дисперсионной средой, как правило, жидкость. В соответствии с современными представлениями в области нанотехнологий, НЧ представляют собой структуры размером от 1 до 100 нм (в одном измерении). Они обладают большим отношением площади поверхности раздела фаз к объему, то есть большой удельной поверхностью, которая растет с уменьшением размера частиц [1]. Эта особенность НЧ лежит в основе их уникальных свойств, таких как высокая реакционная способность, возникновение поверхностного плазмонного резонанса (ППР), то есть резонансных колебаний электронов при возбуждении поверхностного плазмона внешней электромагнитной волной. НЧ металлов используются для разработки биосенсоров [2, 3], показывают противопухолевую активность на клеточных культурах [4, 5], обладают противовирусной активностью [6, 7], характеризуются неспецифической токсичностью для бактерий [8, 9] и микроскопических грибов [10–12], используются в качестве носителя лекарственных препаратов [13, 14], оказывают стимулирующий эффект на рост растений и повышают их устойчивость к стрессам [15–17].

Учитывая возможности широкого применения НЧ, особое внимание направлено на изучение их токсичности для человека, животных и растений, а также влияния на окружающую среду. Токсичность металлов может варьировать в зависимости от степени их окисления, растворимости соединений или морфологии частиц, наличия лигандов, с которыми металл может образовывать комплексные соединения, от условий окружающей среды, времени воздействия, способа применения [18, 19].

НЧ описываются такими фундаментальными характеристиками, как форма, размер, полидисперсность, поверхностный заряд, время и степень агломерации, элементный состав, химический состав поверхности, площадь поверхности, кристаллическая структура и др. Данные параметры в значительной мере обусловлены методом синтеза НЧ.

**Методы формирования НЧ.** НЧ металлов в настоящее время получают с использованием нескольких подходов:

- 1) получение НЧ путем разрушения более крупных структур с использованием физических методов (распыление, помол, лазерная абляция и др.);
- 2) получение НЧ металлов с использованием микроорганизмов;

3) формирование наночастиц, содержащих металлы в восстановленной или ионизированной форме с использованием полимеров;

4) получение НЧ металлов и оксидов металлов с использованием восстанавливающих агентов.

Последние два подхода являются химическими и не требуют использования специализированного оборудования, благодаря чему они являются относительно недорогими и могут быть интересны с точки зрения дальнейшего практического использования. Настоящий обзор посвящен методам синтеза НЧ металлов и оксидов металлов с использованием восстанавливающих агентов. Рассмотрена возможность использования полисахаридов и, в частности хитозана и его производных, в качестве восстанавливающего агента и стабилизатора суспензии наночастиц.

**Синтез НЧ с использованием восстанавливающих агентов.** Для синтеза НЧ путем восстановления металлов из их солей используются такие агенты как гидразин-гидрат, боргидрид натрия, восстановители, содержащие борановую группу  $\text{BH}_3$ , спирты, формальдегид, аскорбиновая кислота, цитраты и др. Далее будут рассмотрены реагенты, наиболее часто применяемые для синтеза металлических наночастиц.

**Гидразин-гидрат.** Гидразин-гидрат является сильным восстановителем и широко применяется для выделения металлов из растворов их солей. В работе [20] с использованием комбинации гидразина-гидрата и его смеси с цитратом натрия в качестве восстанавливающего агента, были получены сферические НЧ Ag разного диаметра от 9 до 30 нм. Отмечалась агрегация и образование двух фракций НЧ, различающихся по размеру. Появление пика ППР в области 418 нм свидетельствовало о формировании металлических НЧ. Кристаллическая структура частиц соответствовала гранецентрированной кубической структуре Ag. При добавлении цитрата натрия пик оптического поглощения сдвигался в область 412 нм с формированием плеча в области 540 нм. Исследование влияния размера НЧ на антибактериальную активность на ряде бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) показало, что НЧ Ag размером 9 и 11 нм, имеют в 10 раз более низкую минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) по сравнению с частицами 23 и 30 нм.

Авторами [21] было выявлено, что при увеличении концентрации гидразин-гидрата с 2 до 10 мМ отмечается расширение пика ППР, соответствующее появлению НЧ Ag разнообразной структуры, отмечалось также снижение стабильности НЧ. Для предотвращения агрегации в состав реакционной смеси вводился поливинилпирролидон. При концентрации гидразина 6 мМ были получены наночастицы размером 10–15 нм. Было показа-

но, что НЧ Ag имеют гранецентрированную кубическую структуру, а их плоскости преимущественно ориентированы. Увеличение концентрации нитрата Ag от 2 до 4 мМ приводило к формированию второго пика поглощения в области 656 нм, что по мнению авторов свидетельствует об изменении морфологических характеристик частиц. При определении антибактериальной активности НЧ Ag в отношении *E. coli* и *S. aureus* методом диффузии в агар было показано, что частицы с высокой концентрацией нитрата Ag и гидразин-гидрата не показывают видимого антибактериального эффекта, в то время как при более низких концентрациях наблюдается образование зоны лизиса. Данный эффект авторы также объясняют изменением морфологии частиц, которая влияла на способность частиц к диффузии.

Сайковой с соавт. [22] было изучено влияние условий реакции на характеристики НЧ Cu. УФ-спектры продукта восстановления сульфата меди гидразин-гидратом при температуре 20–80° – широкие полосы поглощения с максимумом при длине волны  $\lambda = 600$  нм, характерным для комплекса аммония с медью. При нагревании до 90–100°C наблюдалось образование коллоида красного цвета с образованием пика ППР в районе  $\lambda = 590$  нм, что свидетельствовало о формировании металлической меди. Микроволновая обработка приводила к сдвигу пика ППР к 580 нм и сопровождалась повышением его интенсивности. Во избежание формирования оксида или гидроксида меди (I) в ходе восстановления реакцию проводили в щелочных условиях в присутствии комплексообразователей, которые поддерживают уровень ионов меди в растворе. Добавление комплексообразователей повышало выход частиц, что выражалось в повышении интенсивности ППР в присутствии тартрат-ионов. Присутствие сильных щелочей в составе реакционной смеси приводило к смещению реакции в сторону образования оксида меди (I). Повышение содержания соли меди приводило к формированию “медного зеркала” на стенках реакционного сосуда и сопровождалось снижением интенсивности ППР, при этом оптическое поглощение в красной области значительно возрастало.

Влияние поверхностно активных веществ зависело от их природы и концентрации. Додецилсульфат натрия способствовал образованию более мелких НЧ и снижал долю окисленных частиц. Добавление цетил-(триметил) бромид аммония приводило к резкому снижению интенсивности ППР и, следовательно, выходу НЧ Cu. Их выход значительно увеличивался при добавлении поливинилпирролидона, в концентрации 0.0001 М, но дальнейшее повышение концентрации приводило к снижению выхода НЧ Cu, что связано с координацией атомов кислорода в поливинилпирролидоне с ионами меди(II).

Для предотвращения образования оксида меди(II) и стабилизации суспензии в работе [23] в реакционную среду перед введением гидразин-гидрата к сульфату меди добавляли раствор низкомолекулярного хитозана. Размер полученных частиц составлял 100–200 нм. На основе хлорида меди были получены частицы размером до 5 нм, однако реакционная смесь была многокомпонентная, содержала гидразин-гидрат, а также поливиниловый спирт (стабилизатор), тринатрий цитрат (диспергирующий агент) и глицерин (растворитель) [24]. Оба вида частиц показали высокую фунгицидную активность.

Следует отметить, что гидразин-гидрат является крайне токсичным веществом для живых организмов и, в том числе для млекопитающих, в связи с чем, синтез НЧ металлов с использованием этого реагента требует соблюдение повышенных мер безопасности. По этой же причине, его присутствие в составе суспензии НЧ может вносить существенный вклад в биологическую активность полученных препаратов НЧ. Коллоиды, полученные с использованием данного редуцирующего агента, имеют тенденцию к агрегации и осаждению [21]. Для обеспечения стабильного синтеза НЧ металлов и высокого выхода с использованием гидразин-гидрата требуется подбор стабилизаторов и оптимизация условий синтеза.

**Борогидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ).** Борогидрид натрия часто используется в качестве редуцирующего агента. Донг с соавт. [25] установили, что при низкой температуре восстановление нитрата Ag с помощью  $\text{NaBH}_4$  в присутствии цитрата натрия завершается за 1 мин, и дальнейшего восстановления нитрата Ag не происходит даже через 50 ч. При добавлении  $2 \times 10^{-7}$  М  $\text{NaBH}_4$  при низкой температуре почти не было обнаружено потребления прекурсора. После нагревания до  $70^\circ\text{C}$  нитрат Ag постепенно расходуется, и через 4 ч его почти не остается. Количество  $\text{NaBH}_4$  в реакционной смеси влияло на морфологию частиц. Сферические и стержневидные НЧ Ag получали при низкой концентрации  $\text{NaBH}_4$  ( $2 \times 10^{-7}$  М), аналогично тем, которые были получены при восстановлении цитратом натрия в отсутствие борогидрида натрия. При средней концентрации  $\text{NaBH}_4$  ( $5 \times 10^{-6}$  М) были получены треугольные нанопризмы Ag, сопровождаемые некоторыми сферическими НЧ. При высокой концентрации  $\text{NaBH}_4$  ( $5 \times 10^{-4}$  М) в продукте преобладали небольшие сферические НЧ.

Исследование польских ученых [26] было посвящено изучению влияния кислорода на формировании частиц Ag в аналогичной системе (нитрат Ag – прекурсор, цитрат натрия – стабилизатор, борогидрид натрия восстанавливающий агент) [26]. При низких концентрациях  $\text{NaBH}_4$  НЧ Ag,

полученные при естественной концентрации кислорода примерно в 5 раз крупнее, чем НЧ Ag, синтезированные в инертной среде (в атмосфере аргона). При повышении концентрации  $\text{NaBH}_4$  при естественной концентрации кислорода в воздухе происходит уменьшение среднего размера НЧ, напротив в инертной среде повышение концентрации редуцирующего агента приводило к увеличению размера НЧ.

**Цитрат натрия.** В работе [27] при получении НЧ Ag при  $85^\circ\text{C}$  цитратным методом и анализе УФ-спектров коллоида было выявлено наличие нескольких пиков и расширение полосы поглощения, что авторы связывали с большим разбросом НЧ по размеру и форме. Данное предположение было подтверждено методом сканирующей электронной микроскопии.

Шрилекха с соавт. [28] сравнивали “зеленый” метод получения частиц Ag с использованием растительного экстракта и синтез с использованием цитрата натрия. Пик ППР химически синтезированных НЧ был обнаружен при длине волны 446 нм, тогда как в случае “зеленого”, так и химического синтеза оптическое поглощение синтезированных НЧ увеличивалось со временем. Для химически синтезированных НЧ Ag через 1 нед. наблюдалось смещение максимума поглощения в длинноволновую область одновременно с уменьшением интенсивности поглощения, что авторы связали с увеличением размера частиц. Был сделан вывод, что НЧ, синтезированные методом восстановления цитрата, менее стабильны по сравнению с НЧ, синтезированными “зеленым” методом. Наблюдаемый эффект, вероятно, происходил за счет содержания в растительных экстрактах стабилизирующих компонентов, а также описанного в литературе конкурентного механизма взаимодействия металлов и компонентов растительных экстрактов, которые обладают разной специфичностью связывания [29]. В работе [29] изучалось влияние дубильной кислоты – полифенольного соединения, содержащегося в растительных экстрактах, на синтез НЧ Ag путем восстановления нитрата Ag цитратным методом. Показано, что при добавлении дубильной кислоты наблюдался более узкий пик оптической абсорбции и формировались однородные сферические НЧ Ag, тогда как без нее НЧ характеризовались неоднородностью формы, что было показано методом трансмиссионной электронной микроскопии. При возрастании концентрации полифенола от 0 до  $2 \times 10^{-6}$  моль/л происходило уменьшение среднего размера НЧ Ag от  $98 \pm 53$  до  $16 \pm 5$  нм.

Следует отметить, что цитратный метод синтеза НЧ широко используется и для синтеза НЧ Au, применяемых при разработке сенсоров, а также в биомедицинских исследованиях [30, 31]. НЧ, полученные с использованием цитрата натрия в каче-

стве восстановителя, более узкодисперсны по сравнению с частицами, полученными восстановлением борогидрида натрия, однако имеют больший размер [32].

**Аскорбиновая кислота.** При использовании разных солей меди авторами [33] были получены частицы разной формы: в виде палочек (на основе ацетата меди, 250–350 нм в длину и 40–60 нм в толщину), треугольных пластинок (на основе хлорида меди, 150–250 нм) и сферические (на основе сульфата меди до 100 нм). Было показано, что данные частицы содержали в своем составе медь в виде оксида. Полученные НЧ ингибировали рост как грамположительных и грамотрицательных бактерий.

НЧ на основе хлорида меди с использованием аскорбиновой кислоты были синтезированы в работе [34], их размер составлял около 2 нм. Полученные НЧ оказались стабильными в течение 2 мес. хранения.

Изучение влияния рН реакционной среды, концентрации стабилизирующего агента поливинилпирролидона, а также времени реакции с аскорбиновой кислотой [35] показало, что в щелочной среде не происходило формирование НЧ, а при снижении рН с 7.0 до 3.0 происходило увеличение размера НЧ от 120 до 330 нм, сопровождавшееся смещением максимума спектра поглощения в видимой области с 584 до 600 нм. Проведение реакции более 3 ч не влияло на количество образовавшихся частиц, а увеличение концентрации поливинилпирролидона приводило к их укрупнению. Ингибирование роста *Fusarium oxysporum* и *Phytophthora capsici* НЧ Cu усиливалось с увеличением времени инкубации и уменьшением размера частиц.

С использованием аскорбиновой кислоты в качестве редуцирующего агента были получены НЧ Cu и Ag, а также их смесь [36]. Показано, что образцы имели характерные пики ППР для НЧ Ag (420 нм) и для НЧ Cu (550 нм). С увеличением концентрации прекурсора в реакционной смеси увеличивался и размер НЧ, с повышением концентрации стабилизатора хитозана происходило уменьшение размера частиц. Биметаллические НЧ Ag–Cu проявляли синергетическое антибактериальное действие по сравнению с антибактериальной активностью НЧ Ag или Cu. В то же время препарат, полученный путем смешивания готовых частиц металлов не показывал синергизма, в отличие от биметаллических НЧ.

**Полиольный синтез.** Преимуществом полиолов, как восстанавливающих агентов, является то, что они имеют высокую температуру кипения и хорошо растворяют соли металлов. Кроме того, многоатомные спирты обладают координирующими свойствами, благодаря чему обеспечивают функционализацию поверхности и коллоидную стабилизацию НЧ.

В работе [37] в качестве восстанавливающего агента использовали поливинилпирролидон и этиленгликоль. Авторы исследовали влияние времени, температуры реакции и концентрации прекурсора Ag на образование НЧ. Обнаружено, что при очень малом времени реакции и при низких температурах образуются многогранные пластины размером около 300 нм, характеризующиеся высокой полидисперсностью. При увеличении времени до 2 мин и температуры до 120°C наблюдали уменьшение размера частиц и образование сферических НЧ размером 10 нм с низкой полидисперсностью. Увеличение времени реакции свыше 2 мин приводило к постепенному возрастанию их размера. Оптимальная температура для получения однородной суспензии НЧ была 120°C, тогда как при температуре 60°C не происходило формирование зародышей частиц, а при температурах 150–160°C росло количество агрегатов. Увеличение концентрации нитрата серебра в реакционной смеси с 1.0 до 20 мМ приводило к увеличению размера НЧ с 11 до 20 нм без изменения полидисперсности и сопровождалось сдвигом максимума поглощения УФ-спектра в область более длинных волн.

При восстановлении ацетата меди этиленгликолем (ЭГ), в присутствии ТВИН 80 в качестве стабилизатора были получены НЧ Cu ( $\text{Cu}^0$ ) в условиях естественной концентрации кислорода [38]. При нагревании реакционной смеси до 190–200°C происходило полное восстановление металла и было обнаружено, что синтезированные НЧ образованы фазово-чистой медью без каких-либо примесей, таких как CuO,  $\text{Cu}_2\text{O}$  и  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

Этиленгликоль (ЭГ), диэтиленгликоль (ДЭГ) и тетраэтиленгликоль (ТТЭГ) были использованы для получения наноразмерного оксида цинка (ZnO) нагреванием ацетата цинка при 160°C [39]. Согласно предположению, гликоли, как хелатирующий агент, формируют комплексы растущих НЧ, в результате чего рост зерен ограничивается и затрудняется агломерация частиц. Размер синтезированных НЧ ZnO коррелировал с длиной цепи гликоля: с увеличением длины цепи гликоля средний размер частиц ZnO также увеличивается – 19.62 нм, 38.84 нм и 68.57 нм для ZnO/ЭГ, ZnO/ДЭГ и ZnO/ТТЭГ соответственно. Форма НЧ ZnO также изменялась в зависимости от длины цепи редуцирующего агента от сферической у (ZnO/ЭГ), сферической и стержневой у (ZnO/ДЭГ) до алмазоподобной структуры для (ZnO/ТТЭГ).

Благодаря широкому ряду многоатомных спиртов, различающихся по своим характеристикам можно адаптировать процесс синтеза для любых металлов и получать НЧ с разными характеристиками [40].

**Гидроксид натрия.** С использованием гидроксида натрия могут быть получены НЧ, состоящие

из гидроксидов и оксидов металлов. Например, НЧ оксида кобальта  $\text{Co}_3\text{O}_4$  были получены на основе ацетата кобальта [41]. Полученный в результате взаимодействия с  $\text{NaOH}$  гидроксид кобальта окислялся кислородом воздуха до оксида. НЧ  $\text{Co}_3\text{O}_4$  обладали кубической формой. Выраженность кубической структуры НЧ повышалась с увеличением концентрации  $\text{NaOH}$ . При высоких концентрациях гидроксида натрия (0.7 М  $\text{NaOH}$ ) происходило формирование агломератов и частиц  $\text{CoO}(\text{OH})$  нерегулярной формы. Показано, что агломерация НЧ приводила к снижению каталитической активности НЧ в реакции разложения метиленового синего по Фентону.

В работе [33] авторы исследовали влияние противоионов в солях меди на формирование НЧ с гидроксидом натрия. Микрофотографии, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, свидетельствуют о формировании НЧ волокнистой формы разной длины и толщины. Длина нановолокон увеличивалась в ряду ацетат меди, хлорид меди, сульфат меди. По наличию пика кислорода на энергодисперсионном спектре, авторы пришли к выводу, что полученные НЧ имеют в составе именно оксид меди.

НЧ оксида меди(II), синтезированные с использованием  $\text{NaOH}$  размером около 23 нм, обладали антимикробными свойствами [42] с МИК для *E. coli* 31.25 мкг/мл, для *Pseudomonas aeruginosa* – 125 мкг/мл, *S. aureus* – 62.5 мкг/мл.

**Растительные экстракты.** В настоящее время для синтеза НЧ металлов используют “зеленые” методы (растворы растительных экстрактов) [43, 44]. Растения содержат множество активных природных соединений, таких как алкалоиды, флавоноиды, сапонины, стероиды, дубильные вещества и др. Поскольку растительный экстракт содержит набор различных вторичных метаболитов, он действует как восстанавливающий и стабилизирующий агент. Для получения экстрактов могут быть использованы различные части растений: листья, стебли, корни, цветы, кора, плоды и семена различных растений. Например, были использованы экстракты полученные из семян граната [45], корней имбиря и чеснока [46], лепестков розы [47] и др. С использованием сока лимона были получены НЧ  $\text{Cu}$ , размером 20–30 нм, имеющие небольшой отрицательный дзета-потенциал [48]. Частицы характеризовались также появлением пика ППР в районе 615 нм. Полученные НЧ не содержали оксида меди и имели кристаллическую структуру, характерную для металлической меди. Показано, что они стимулируют рост побегов и корней голубинового гороха, а также увеличивали прирост сухой биомассы растения по сравнению с контролем.

Этот подход активно используется в последние годы как альтернативный, эффективный, не-

дорогой и экологически безопасный метод получения НЧ. Однако, при использовании такого подхода для формирования НЧ трудно определить истинную активность полученных НЧ ввиду присутствия в растительных экстрактах множества биологически-активных веществ. Еще одним недостатком такого подхода является сложность стандартизации ввиду значительной зависимости биохимических процессов в растениях от условий окружающей среды, что оказывает влияние на химический состав полученных экстрактов.

**Синтез НЧ в присутствии полисахаридов.** Физические и химические методы синтеза металлических НЧ обычно приводят к образованию побочных продуктов реакции, кроме того наблюдается неустойчивость конечного продукта при физиологических значениях pH [49]. Перечисленные выше факторы могут ограничивать применение НЧ металлов на практике.

Одна из стратегий для преодоления перечисленных недостатков НЧ и усиления их биологической активности – модификация НЧ металлов полисахаридами. Такие полисахариды как крахмал, целлюлоза, хитин, хитозан, циклодекстрин, альгинат, каррагинан и их производные находят широкое применение в области биомедицины. Эти полимеры обладают разнообразными свойствами и могут быть выделены из различных источников, растительного, животного и микробного происхождения.

Использование полисахаридов в качестве модификатора поверхности НЧ влияет на биосовместимость и стабильность наноматериала. Показано снижение токсичности *in vitro* НЧ  $\text{Cu}$  в результате включения в полисахаридную матрицу. Это одновременно повышало показатели воспалительного процесса в легких мышей [50]. Полисахариды успешно препятствовали агломерации НЧ оксида железа, способствовали их защите от макрофагов, увеличивая период их полувыведения [51]. Все чаще в научной литературе рассматривается так называемые “зеленые методы” синтеза НЧ на основе полисахаридов, в которых полисахарид используется в качестве восстановителя и стабилизатора образующихся НЧ [52, 53].

Хитозан – представляет собой линейный полисахарид, гетерополимер, состоящий из глюкозаминных и ацетилглюкозаминных звеньев, соединенных  $\beta$ -(1-4)-гликозидными связями. Хитозан является продуктом химической модификации хитина [54] с определенной степенью дезацетилирования (СД), как правило, более 50%, т.е. преимущественно состоящий из глюкозамина.

Основными физико-химическими характеристиками хитозана являются молекулярная масса (ММ) и СД. Стоит отметить, что распределение ацетилглюкозаминных и глюкозаминных звеньев

в структуре полимера также является важным параметром полисахарида [55]. Хитозан растворим только в кислой среде вследствие протонирования аминогруппы глюкозаминных звеньев биополимера. Среднее значение константы диссоциации хитозана  $pK_a = 6.5$  [56]. Из этого следует, что при  $pH < 6.5$  аминогруппы хитозана находятся в протонированной форме. При повышении  $pH$  водных растворов растворимость полимера значительно снижается. Этот факт значительно ограничивает возможность применения биополимера в растворе при физиологических условиях ( $pH$  близком к нейтральному). Деполимеризация и химическая модификация хитозана позволяют преодолеть проблемы, связанные с растворимостью полимера и повысить его биологическую активность.

Поликатионная структура определяет особые физико-химические свойства хитозана, отличающие его от других биополимеров и полисахаридов [57]. Хитозан и хитоолигосахариды характеризуются бактериостатической, фунгицидной, хелатирующей, антиоксидантной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями, а также являются биосовместимыми, биodeградируемыми и обладают низкой токсичностью [58].

**Синтез НЧ с использованием хитозана и его производных.** Хитозан и его производные могут использоваться в синтезе НЧ металлов как редуцирующие агенты. Возможность синтеза НЧ Ag в среде хитозана ( $\eta = 200 \text{ Па} \cdot \text{с}$ , СД 85%) была продемонстрирована в работе [59]. В растворе хитозана при  $95^\circ\text{C}$  в течение 12 ч наблюдалось формирование сферических НЧ Ag. Пик ППР на УФ-спектре при 419–424 нм указывал на формирование металлических НЧ. Основная фракция НЧ по данным трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) состояла из частиц размером 6–8 нм. Аминогруппы хитозана способны к образованию комплексов с ионами металлов, за счет чего хитозан является высокоэффективным полимерным хелатирующим агентом для ионов  $\text{Ag}^+$ . Таким образом, формирование НЧ Ag происходит в результате процесса, включающего комплексообразование  $\text{Ag}^+$  с аминогруппами и последующего восстановления до  $\text{Ag}^0$ , сопровождающегося процессом окисления хитозана. Исследование антибактериальной активности синтезированных НЧ Ag в отношении *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, показало, что МИК составили 10, 10 и 48 мкг/мл соответственно.

Карбоксиметилхитозан (СЗ 95%) был использован исследователями [60] в качестве матрицы для синтеза НЧ Ag под действием света. Формирование НЧ детектировали по появлению характерного пика на УФ-спектре. В помещённых в темноту контрольных образцах, содержащих  $\text{AgNO}_3$ , отсутствовал пик ППР. Таким образом, показа-

но, что образование НЧ Ag протекает только на свету. Размер НЧ составлял порядка 30–100 нм (по данным ТЭМ). Рентгеноструктурный анализ нанокompозита показал формирование поликристаллических металлических НЧ.

Нанокompозит на основе НЧ Ag и кватернизированного хитозана (ММ 250 кДа, СД 85%) был предложен в качестве субстрата для создания системы детекции Судана I и трициклазола с использованием поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света (ППРС) [61]. В качестве прекурсора использовался  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ . Синтез протекал в растворе кватернизированного хитозана под действием микроволнового излучения. В оптимальных условиях формировались НЧ размером около 19 нм (по данным ТЭМ). Было показано, что увеличение степени замещения кватернизированного хитозана приводило к образованию более крупных НЧ. Снижение молекулярной массы хитозана в результате деградации полимерной цепи в более жёстких условиях проведения синтеза вело к снижению стабильности наноматериала и образованию агломератов НЧ. Полученный нанокompозит был устойчив в водной среде в течение месяца, однако агрегировал в этаноле.

На основе тригидрата хлорида Au(III) были синтезированы НЧ Au [62], при этом хитозан (ММ  $\sim 1278 \pm 8$  кДа, СД  $89 \pm 2\%$ ) был использован как восстанавливающий и стабилизирующий агент для образования НЧ. Синтез проводили при нагревании до  $60^\circ\text{C}$  при перемешивании в течение 4 ч. В спектре коллоидных НЧ Au наблюдался максимум поглощения при  $\sim 525$  нм, характерный для сферических НЧ, что было подтверждено данными ТЭМ. По мере увеличения концентрации НЧ интенсивность поглощения ППР и интенсивность цвета коллоида увеличивались. Размер частиц составлял 10–20 нм. Использование фосфорновольфрамовой кислоты для окрашивания хитозана позволило визуализировать хитозановое покрытие в виде гомогенного ореола вокруг (примерно 3–4 нм). Показана низкая цитотоксичность данного нанокompозита на клетках макрофагов. НЧ Au обладали антибактериальной активностью в отношении *E. coli* и *S. aureus*. Методами проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии было показано, что преимущественным механизмом антибактериального действия является разрушение клеточной стенки бактерий.

Возможность синтеза НЧ Ag кубической формы в среде с хитозаном (ММ 190–310 кДа, СД 75–78%) под действием ультразвука была показана в работе [63]. Обработку раствора хитозана с  $\text{AgNO}_3$  ультразвуком проводили в течение часа при температуре 60–90°C. Наблюдалось увеличение размеров НЧ с ростом температуры реакции. Образцы полученных НЧ анализировали методами СЭМ и

ЭДС. Кубические структуры имели размер в пределах 120–450 нм. В качестве контрольного полисахарида для формирования НЧ был выбран крахмал. Наличие кубических структур наблюдали только в хитозане, что свидетельствует о значительном влиянии природы полисахарида на морфологию НЧ Ag.

**Хитозан и его производные в качестве стабилизатора НЧ металлов.** Для синтеза НЧ Ag с положительным зарядом поверхности был использован триметилхитозан ( $\eta$  3.6 мПа · с, СД 93.8%) в качестве стабилизатора [64]. В качестве восстанавливающего агента использовали глюкозу. Изучен процесс синтеза НЧ при разных концентрациях NaOH и глюкозы. Показано, что количество NaOH оказывало значительное влияние на скорость процесса и размер НЧ Ag. Методом ТЭМ было показано формирование сферических НЧ со средними размерами в пределах 60 нм. По результатам динамического светорассеяния (ДСР) средний размер частиц составлял 180 нм. С помощью элементного анализа доказано наличие Ag в частицах. Каталитическая активность полученных НЧ изучена по реакции восстановления нитрофенола с помощью  $\text{NaBH}_4$ . Показано, что скорость реакции возрастала линейно с увеличением количества катализатора. Антибактериальную активность синтезированных НЧ Ag в отношении 8 антибиотикорезистентных штаммов бактерий, среди которых 1 грамотрицательный и 7 грамположительных, оценивали по величине МИК, которая была в пределах 3.6 до 12.25 мкг/мл.

Фунгицидные свойства НЧ хитозана и нанокompозита на основе НЧ Ag и хитозана были изучены в работе [65]. Синтез НЧ осуществляли путем восстановления  $\text{AgNO}_3$  с помощью  $\text{NaBH}_4$  в среде с хитозаном. Результаты ТЭМ показали формирование НЧ сферической формы со средним размером ~373 нм и положительным зарядом поверхности 47.5 мВ. Образцы НЧ проявляли фунгицидный эффект в отношении *F. oxysporum*. Установлено, что фунгицидное действие НЧ связано с увеличением образования активных форм кислорода (АФК) в мицелии, и кроме того, НЧ оказывали влияние на синтез эргостерола, что сходно с действием азольных фунгицидов. При этом НЧ не имели значительной цитотоксичности в МТТ-тесте в концентрации до 400 мкг/мл на клетках карциномы легкого человека A549.

В качестве стабилизатора НЧ серебра был предложен водорастворимый N-метилированный тиомер хитозана (МТХ), синтезированный на основе низкомолекулярного хитозана (ММ 24.5 кДа, СД 74.9%) [66]. Известно, что тиольные функциональные группы способны к обратимому окислению и образованию ковалентных связей с металлами. Были определены размеры комплекса МТХ с серебром и нанокompозита на основе НЧ

Ag и МТХ. Наблюдалось образование сферических НЧ размером 9–15 нм, которые проявляли антибактериальные свойства на модельных микроорганизмах *E. coli* и *S. aureus*. Также НЧ обладали способностью ингибировать образование бактериальных биопленок на поверхности полистирола.

Многочисленные исследования показывают широкие возможности химического синтеза наночастиц металлов с разнообразными свойствами. НЧ металлов проявляют биологическую активность, существенно отличающую их от прекурсоров. При этом, их свойства (размер, заряд, биологическая активность) могут в значительной степени различаться в зависимости от условий синтеза. В рассмотренных работах наночастицы металлов в значительной мере неотделимы от дисперсионной среды, влияющей на их поверхностные свойства. Таким образом рассмотрение и исследование новых подходов и условий для синтеза НЧ является важной задачей. Например, наночастицы металлов могут быть модифицированы полисахаридами, в том числе хитозаном, что позволяет повысить их стабильность, снизить токсичность, изменить механизм воздействия на биологические объекты. Хитозан и его производные могут выступать в качестве восстанавливающих агентов и одновременно стабилизаторов при получении различных НЧ металлов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-90011 Аспиранты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сеггев Г.Б.* Нанохимия. М.: Издательство МГУ, 2003. 288 с.
2. *Wang J., Munir A., Li Zh., Zhou H.S.* // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 25. № 1. P. 124–129.
3. *Qiu J., Wang R., Liang R., Xia X.* // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 24. № 9. P. 2920–2925.
4. *Babaei A., Mousavi S., Ghasemi M., Pirbonyeh N., Soleimani M., Moattari A.* // Life Sci. 2021. P. 119652. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119652>
5. *Khandanlou R., Murthy V., Saranath D., Damani H.* // J. Mater. Sci. 2018. V. 53. № 5. P. 3106–3118.
6. *Cai L., Liu Ch., Fan G., Liu Ch., Sun X.* // Environ. Sci. Nano. 2019. V. 6. № 12. P. 3653–3669.
7. *Vargas–Hernandez M., Macias–Bobadilla I., Guevara–Gonzalez R.G., Rico–Garcia E., Ocampo–Velazquez R.V., Avila–Juarez L., Torres–Pacheco I.* // Agriculture. 2020. V. 10. № 10. P. 444. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100444>
8. *Gold K., Slay B., Knackstedt M., Gaharwar A.K.* // Adv. Ther. 2018. V. 1. № 3. P. 1700033. <https://doi.org/10.1002/adtp.1700033>
9. *Zia R., Riaz M., Farooq N., Qamar A., Anjum S.* // Mater. Res. Express. 2018. V. 5. № 7. P. 075012.

10. Malandrakis A.A., Kavroulakis N., Chrysikopoulos C.V. // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 703. P. 135557. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141287>
11. Abboud M.A.L. // *Res. Sq.* 2020. V. 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-125001/v1>
12. Chen J., Wu L., Lu M., Lu Sh., Li Z., Ding W. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.003656>
13. Farooq M., Novosad V., Rozhkova E., Wali H., Ali A., Fateh A., Neogi P., Neogi A., Wang Zh. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21331-y>
14. Beik J., Shiran M., Abed Z., Shiri I., Ghadimi-Daresajini A., Farkhondeh F., Ghaznavi H., Shakeri-Zadeh A. // *Med. Phys.* 2018. V. 45. № 9. P. 4306–4314.
15. Zhao L., Lu L., Wang A., Zhang H., Huang M., Wu H., Xing B., Wang Zh., Ji R. // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. № 7. P. 1935–1947.
16. Mohamed E.A. // *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2019. V. 52. № 17–18. P. 1276–1288.
17. Ahmed F., Javed B., Razzaq A., Mashwani Z. // *IET Nanobiotechnology.* 2021. V. 15. № 1. P. 68–78. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12002>
18. Egorova K.S., Ananikov V.P. // *Organometallics.* 2017. V. 36. № 21. P. 4071–4090. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00605>
19. Phogat N., Shadab A. K., Shankar Sh., Ansary A. A., Uddin I. // *Adv. Mater. Lett.* 2016. V. 7. № 1. P. 3–12. <https://doi.org/10.5185/amlett.2016.6048>
20. Guzmán M.G., Dille J., Godet S. // *Int. J. Mater. Metall. Eng.* 2008. V. 2. № 7. P. 100–107. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1062628>
21. Gurusamy V., Krishnamoorthy R., Gopal B., Veeraravagan V., Neelamegam P. // *Inorg. Nano-Metal Chem.* 2017. V. 47. № 5. P. 761–767.
22. Saikova S.V., Vorob'ev S.A., Nikolaeva R.B., Mikhailin Yu.L. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. V. 80. № 6. P. 1122–1127.
23. Vanti G.L., Masaphy S.K., Mahantesh S., Nargund V.B. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 156. P. 1387–1395.
24. Cao V. D., Nguyen P. P., Khuong V.Q., Nguyen C.K., Nguyen X.Ch., Dang C.H., Tran N.Q. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2014. V. 35. № 9. P. 2645–2648. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.9.2645>
25. Dong X., Ji X., Jing J., Li M., Li J., Yang W. // *J. Phys. Chem. C.* 2010. V. 114. № 5. P. 2070–2074. <https://doi.org/10.1021/jp909964k>
26. Wojtysiak S., Kudelski A. // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2012. V. 410. P. 45–51.
27. Piñero S., Camero S., Blanco S. // *J. Phys. Conf. Ser.* 2016. V. 755, № 1. P. 011001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/786/1/012020>
28. Sreelekha E., George B., Shyam A., Sajina N., Mathew B. // *Bionanoscience.* 2021. V. 11. № 2. P. 489–496.
29. La Spina R., Mehn D., Fumagalli F., Holland M., Reniero F., Rossi F., Gilliland D. // *Nanomaterials.* 2020. V. 10, № 10. P. 2031. <https://doi.org/10.3390/nano10102031>
30. Wang J., Munir A., Zhou H.S. // *Talanta.* 2009. V. 79, № 1. P. 72–76.
31. Storhoff J.J., Elghanian R., Mucic R.C., Mirkin C.A., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. № 9. P. 1959–1964.
32. Oliveira J.P., Prado A.R., Keijok W.J., Ribeiro M.R.N., Pontes M.J., Nogueira B.V., Guimarães M.C.C. // *Arab. J. Chem.* 2020. V. 13. № 1. P. 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.04.003>
33. Shankar S., Rhim J.-W. // *Mater. Lett. Elsevier*, 2014. V. 132. P. 307–311.
34. Xiong J., Wang Y., Xue Q., Wu X. // *Green Chem.* 2011. V. 13. № 4. P. 900.
35. Pham N.-D., Duong M.-M., Le M.-V., Hoang H.A., Pham L.-K.-O. // *Comptes Rendus Chim.* 2019. V. 22. № 11–12. P. 786–793. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.10.007>
36. Zain N.M., Stapley A.G.F., Shama G. // *Carbohydr. Polym.* 2014. V. 112. P. 195–202.
37. Torras M., Roig A. // *ACS Omega.* 2020. V. 5. № 11. P. 5731–5738. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03748>
38. Ramyadevi J., Jeyasubramanian K., Marikani A., Rajakumar G., Rahuman A.A. // *Mater. Lett. Elsevier B.V.* 2012. V. 71. P. 114–116.
39. Chieng B.W., Loo Y.Y. // *Mater. Lett.* 2012. V. 73. P. 78–82.
40. Fiévet F., Ammar–Merah S., Brayner R., Chau F., Giraud M., Mammari F., Peron J., Piquemal J.-Y., Sicard L., Viau G. // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry.* 2018. V. 47. № 14. P. 5187–5233.
41. Viljoen E.L., Thabede P.M., Moloto M.J., Mubiayi K.P., Dikiza B.W. // *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 2019. V. 14. № 4. P. 1131–1137.
42. Ahamed M., Alhadlaq H.A., Khan M.A.M., Karuppiah P., Al-Dhabi N.A. // *J. Nanomater.* 2014. V. 2014. P. 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/637858>
43. García-Hernández L., Flores-Saldivar J.A., Ramirez Ortega P., Flores Guerrero M.U. // *ECS Trans.* 2021. V. 101. № 1. P. 131–138.
44. Subashini K., Prakash S., Sujatha V. // *Mater. Res. Express.* 2020. V. 7. № 11. P. 115308. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abc979>
45. Nazar N., Bibi I., Kamal S., Iqbal M., Nouren S., Jilani K., Umair M., Ata S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 106. P. 1203–1210.
46. Yaqub A., Malkani N., Shabbir A., Ditta S.A., Tanvir F., Ali S., Naz M., Kazmi S.A.R., Ullah R. // *Curr. Microbiol. Springer US*, 2020. V. 77. № 9. P. 2287–2299.
47. Tiwari N., Pandit R., Gaikwad S., Gade A., Rai M. // *IET Nanobiotechnology.* 2017. V. 11. № 2. P. 205–211. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0003>
48. Shende S., Rathod D., Gade A., Rai M. // *IET Nanobiotechnology.* 2017. V. 11. № 7. P. 773–781. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0179>
49. Jamkhande P.G., Ghule N.W., Bamer A.H., Kalaskar M.G. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019. V. 53. P. 101174.
50. Worthington K.L.S., Adamcakova-Dodd A., Wongrakpanich A., Mudunkotuwa I.A., Mapuskar K.A., Joshi V.B., Allan Guymon C., Spitz D.R., Grassian V.H., Thorne P.S., Salem A.K. // *Nanotechnology.* 2013. V. 24. P. 395101.



51. *Abd Elrahman A.A., Mansour F.R.* // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019. V. 52. P. 702–712.
52. *Shavandi A., Saeedi P., Ali M.A., Jalalvandi E.* // *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications.* 2019. P. 267–304.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102555-0.00008-X>
53. *Yugay Y.A., Usoltseva R.V., Silant'ev V.E., Egorova A.E., Karabtsov A.A., Kumeiko V.V., Ermakova S.P., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N.* // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 245. P. 116547.
54. *Kou S., Peters L.M., Mucalo M.R.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 169. P. 85–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>
55. *Jiang T., James R., Kumbar S.G., Laurencin C.T.* // *Natural and Synthetic Biomedical Polymers.* / Eds: *S. Kumbar, C. Laurencin, M. Deng.* Elsevier. 2014. P. 91–113.
56. *Choi C., Nam J.-P., Nah J.-W.* // *J. Industrial and Engineering Chemistry.* 2016. V. 33. P. 1–10.
57. *Мухайлов С.Н., Варламов В.П.* // *Хитозан.* / Ред. К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов. М.: Изд. Центр “Биоинженерия РАН”, 2013. P. 5–17.
58. *Wang W., Xue C., Mao X.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4532–4546.
59. *Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., Ma X.* // *Carbohydr. Res.* 2009. V. 344. № 17. P. 2375–2382.
60. *Long Y., Ran X., Zhang L., Guo Q., Yang T., Gao J., Cheng H., Cheng T., Shi C., Su Y.* // *Mater. Lett.* 2013. V. 112. P. 101–104.
61. *Chen K., Shen Z., Luo J., Wang X., Sun R.* // *Appl. Surf. Sci.* 2015. V. 351. P. 466–473.
62. *Mendoza G., Regiel-Futyra A., Andreu V., Sebastián V., Kyzioł A., Stochel G., Arruebo M.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. V. 9. № 21. P. 17693–17701.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.6b15123>
63. *Raghavendra G.M., Jung J., Kim D., Varaprasad K., Seo J.* // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 152. P. 558–565.
64. *Chang T.Y., Chen C.C., Cheng K.M., Chin C.Y., Chen Y.H., Chen X.A., Sun J.R., Young J.J., Chiueh T.S.* // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2017. V. 155. P. 61–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.054>
65. *Dananjaya S.H.S., Erandani W.K.C.U., Kim C.-H., Nikapitiya C., Lee J., De Zoysa M.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 105. P. 478–488.
66. *Elshaarawy R.F.M., Ismail L.A., Alfaiji M.Y., Rizk M.A., Eltamany E.E., Janiak C.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 152. P. 709–717.

## Obtaining of Metal Nanoparticles Using Reducing Agents and Chitosan

T. S. Lyalina<sup>a, \*</sup>, A. P. Lunkov<sup>a</sup>, and V. P. Varlamov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: tatyanaashcherbinina88@gmail.com*

The unique features of metal nanoparticles (NPs) are used in various fields of science, including biomedicine, microbiology, biotechnology, and agriculture. The biological activity of NPs depends on their size characteristics, composition, physicochemical properties, and the formation method. Chemical, biological, and physical methods are used for obtaining NPs. The chemical methods for synthesis of NPs based on metals are considered in this review. The advantages and disadvantages of the most commonly used reducing agents are described. The effect of synthesis conditions on the properties of NPs are reviewed. The possibility of using polysaccharides and, in particular, chitosan as a reducing agent and stabilizer for a nanoparticles suspension is considered.

**Keywords:** nanoparticles, antibacterial activity, fungicidal activity, antiviral activity, antitumor activity, growth stimulants, nanofertilizers, chitosan