

УДК 547.995.12:544.546.57

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРО-СУКЦИНИЛ ХИТОЗАН И ИХ АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2022 г. В. А. Александрова¹, *, А. М. Фоторянская¹, **, В. С. Садыкова²

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, Москва 119991 Россия

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

**e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 26.03.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Для формирования наночастиц серебра методом восстановления из ионов металла в присутствии восстановителя D-глюкозы при комнатной температуре в качестве полимерной матрицы было использовано водорастворимое производное хитозана – сукцинил хитозан. Синтез наночастиц серебра можно также осуществлять без восстановителя при термической активации системы с использованием щелочи (NaOH) в качестве ускорителя процесса. О наличии наночастиц серебра в полученных коллоидных растворах судили по появлению полосы поглощения в спектрах электронного плазмонного резонанса ($\lambda_{\text{max}} = 417$ нм). Показано, что использование дополнительного компонента – полиэтиленоксида в макромолекулярной системе позволило получить наночастицы серебра малого размера (1–3 нм). Результаты исследований антимикробной активности в опытах *in vitro* полученных коллоидных растворов, содержащих наночастицы серебра, подтвердили, что уменьшение размеров наночастиц серебра приводило к расширению спектра антибактериальной активности в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Bacillissubtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922) и к проявлению выраженного антифунгального действия по отношению к *Aspergillus niger* INA 00760.

Ключевые слова: наночастицы серебра, хитозан, сукцинил хитозана, антимикробная активность, зеленый синтез

DOI: 10.31857/S055510992205004X

В последнее время значительно возрос интерес исследователей к зеленой химии. В соответствии с основными положениями этого научного направления методы синтеза выбираются так, чтобы как исходные, так и синтезированные вещества были безвредными для человека и окружающей среды [1]. Методы химического восстановления ионов металлов в растворе полимера часто используются для создания наноконструкций [2–4]. С учетом требований, которые предъявляются к зеленой химии, выбор сукцинил хитозана в качестве полимерной матрицы для создания наноконструкций, является обоснованным.

Водорастворимое производное хитозана – сукцинил хитозан является нетоксичным, биодegradуемым полимером, для которого характерна антиоксидантная, иммуностимулирующая и др. активности [5, 6]. Важно отметить, что сукцинил хитозан безопасен при внутривенном введении, что позволяет использовать этот полимер в системах доставки противоопухолевых препаратов [7, 8].

При химическом восстановлении ионов серебра, обычно в качестве восстановителей используют такие вещества, как боргидрид натрия, амины, гидразин, формальдегид и др., не относящиеся к числу безопасных для здоровья человека и для окружающей среды. Наночастицы серебра можно получать с использованием экстрактов различных растений. Однако, получаемые при этом коллоидные растворы представляют собой сложную смесь различных веществ, что затрудняет идентификацию компонентов реакционной системы [9, 10].

Наночастицы металлов можно получать с использованием методов радиационно-химического и фотохимического восстановления, а также при воздействии микроволнового облучения [11–13]. Для проведения таких исследований необходимы дорогостоящие установки и специально оборудованные помещения.

С учетом вышеизложенного исследовали возможность разработки простого экологичного способа синтеза наночастиц серебра в матрице сукци-

нил хитозана при комнатной температуре или при термической активации системы, как в присутствии восстановителя, так и без него.

Цель работы – получение и изучение антимикробной активности композитов на основе сукцинил хитозана и наночастиц серебра.

МЕТОДИКА

Материалы. В качестве полимерной матрицы-стабилизатора в работе использовали сукцинил хитозан (СХТЗ) производства ООО “Биопрогресс” (Россия). Молекулярная масса (ММ) хитозана, из которого был получен СХТЗ – 200 кДа, степень дезацетилирования – 85%. Для проведения реакции в гомогенных условиях в качестве растворителя использовали воду (бидистиллят, 18МОМ \times см⁻¹), азотнокислое серебро (AgNO₃), щелочь (NaOH) и D-глюкозу (марки х. ч.), полиэтиленоксид (ПЭО) с молекулярной массой 7×10^5 ЗХК “Экотек” (Россия).

Синтез наночастиц серебра в матрице сукцинил хитозана. При комнатной температуре. СХТЗ растворяли в бидистиллированной воде при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке. К 5 мл раствора полимера (0.25% по массе) при перемешивании добавляли водный раствор AgNO₃, с таким расчетом, чтобы его концентрация в растворе полимера составляла 0.0018 М. Затем в реакционную смесь добавляли восстановитель (D-глюкозу) в соотношении AgNO₃ : D-глюкоза, равном 1 : 5 (моль/моль). В полученную реакционную смесь по каплям добавляли 0.1 М NaOH (20–100 мкл). В ходе эксперимента из реакционной смеси отбирали пробы для определения оптической плотности коллоидного раствора ($\lambda_{\max} = 417$ нм) при различной концентрации щелочи.

При термической активации системы. СХТЗ растворяли в бидистиллированной воде при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке. К 2.5 мл раствора СХТЗ (1% по массе) при перемешивании добавляли 2.5 мл водорастворимого ПЭО (10% от массы СХТЗ). В полученную реакционную смесь добавляли 60 мкл 0.1 М раствор NaOH, а затем водный раствор AgNO₃, с таким расчетом, чтобы его концентрация в реакционной смеси составляла 0.0018 М. После тщательного перемешивания реакционную смесь нагревали до 70°C в течение 3 ч. Синтез проводили в токе аргона. При проведении эксперимента наблюдали изменение окраски рабочего раствора от бледно-желтого до коричневого.

УФ-спектроскопия. Спектры полученных растворов регистрировали на УФ-спектрофотометре “SPECORD M-40” (“Carl Zeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при

25°C, в качестве раствора сравнения использовали бидистиллированную воду.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Размеры наночастиц серебра в коллоидном растворе на основе СХТЗ изучали при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) “LEO 912 AB Omega” (“Leo Electron Microscopy”, Великобритания).

Микробные штаммы, питательные среды, условия культивирования. Антимикробную активность растворов наночастиц оценивали методом диффузии в агар по диаметру зоны отсутствия роста культур. Антибактериальную активность оценивали с помощью тест-штаммов: грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, и *Staphylococcus aureus* 209P. Для оценки фунгицидной активности использовали плесневый гриб *Aspergillus niger* INA 00760.

Тест-культуру *B. subtilis* ATCC 6633 выращивали на среде Гаузе № 2 следующего состава (г/л): триптон – 2.5 (или бульон Хоттингера – 30 мл), пептон – 5, хлорид натрия – 5, глюкоза – 10; *S. aureus* 209P выращивали на среде МПА (“ЗАО НИЦФ”, Россия), а *E. coli* ATCC 25922 на среде LB (триптон-соевый агар). Культуру *A. niger* INA 00760 выращивали на среде Чапека. Предварительно культуры бактерий выращивали в течение суток в пробирках на скошенном питательном агаре, после чего клетки суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5×10^8 КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Культуру гриба выращивали в течение 5 сут. Все тест-культуры получены из коллекции культур НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Россия). В качестве контроля использовали стандартные диски с амфотерицином В для грибов (40 мкг, “НИИ Пастера”, Россия) и амоксиклавом (амоксициллин/клавулоновая кислота) для бактерий (20/10 мкг, “НИИ Пастера”, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Одним из условий зеленой химии является синтез веществ из возобновляемых в природе источников сырья. Известно, что для синтеза полимеров ряда хитина и хитозана используют природный полисахарид – хитин, который широко распространен в природе и, в частности, содержится в панцире и клешнях крабов, креветок, насекомых и др. организмов.

С целью разработки простого и экологичного способа синтеза наночастиц серебра (НЧAg) в настоящей работе в качестве матрицы был использован СХТЗ, который получают путем взаимодействия хитозана с янтарным ангидридом. Структура элементарных звеньев полимера приведена на

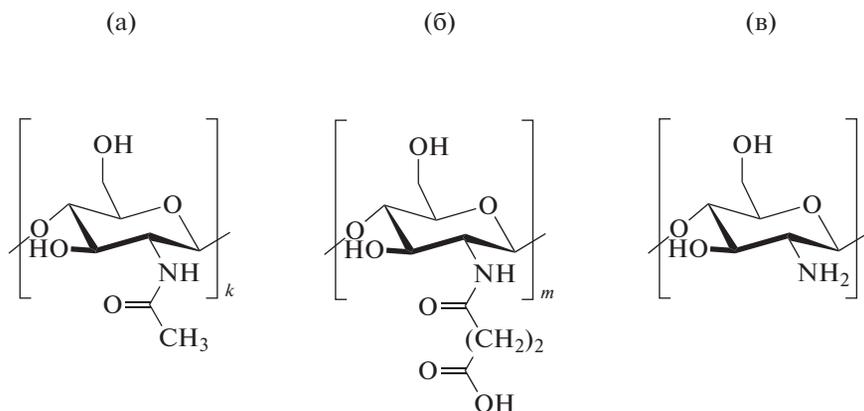


Рис. 1. Структура мономерных звеньев СХТЗ.

рис. 1, где k -N-ацетилглюкозамин. Этот полимер является полиэлектролитом, в структуре которого присутствуют как карбоксильные $-\text{COOH}$ группы (m), так и первичные аминогруппы $-\text{NH}_2$ (n). При этом мольное соотношение этих групп составляло: k -0.15, m -0.75 и n -0.1.

Для синтеза НЧАг из ионов Ag^+ в матрице СХТЗ была исследована возможность проведения процесса при комнатной температуре с использованием в качестве восстановителя D-глюкозы. При этом для ускорения процесса восстановления ионов Ag^+ в НЧАг использовали водный раствор NaOH. Анализ полученных результатов (рис. 2) показал, что постепенное увеличение количества NaOH в реакционной среде приводило к росту оптической плотности образующихся при этом НЧАг (кривые 1–5, рис. 2). О наличии НЧАг в системе судили по появлению полосы поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ нм}$) в УФ-спектрах коллоидных растворов. Дальнейшее увеличение количества ускорителя (NaOH) выше 60 мкл в реакционной смеси было нецелесообразно, поскольку приводило к образованию более крупных НЧАг. Подтверждением этого служит отсутствие четко выраженного максимума полосы поглощения характерной для НЧАг (кривые 6–8, рис. 2). Отметим также, что при этом не происходило дальнейшего увеличения оптической плотности синтезированных НЧАг. В результате проведенных исследований было установлено оптимальное соотношение AgNO_3 и восстановителя D-глюкозы, которое составляло 1 : 5 (моль/моль). Известно, что при проведении реакции химического восстановления ионов Ag^+ в НЧАг обычно используется большой избыток восстановителя [14, 15]. Таким образом, использование ускорителя процесса восстановления ионов серебра позволило значительно снизить необходимый избыток восстановителя в реакционной среде. В результате проведенных предварительных

исследований также была определена оптимальная концентрация раствора NaOH – 0.1 М, которая позволяла регулировать процесс образования НЧАг при восстановлении ионов Ag^+ в растворе СХТЗ.

Вопросу стабилизации НЧАг в растворе полимера уделяется особое внимание, поскольку эти частицы легко подвергаются окислению и склонны к агрегации. Для снижения вероятности ассоциирования образующихся НЧАг помимо основного полимера СХТЗ был введен дополнительный компонент – полиэтиленоксид (ПЭО). Известно, что ПЭО относится к числу нетоксичных полимеров, что дает возможность его использования в фармацевтике в качестве связую-

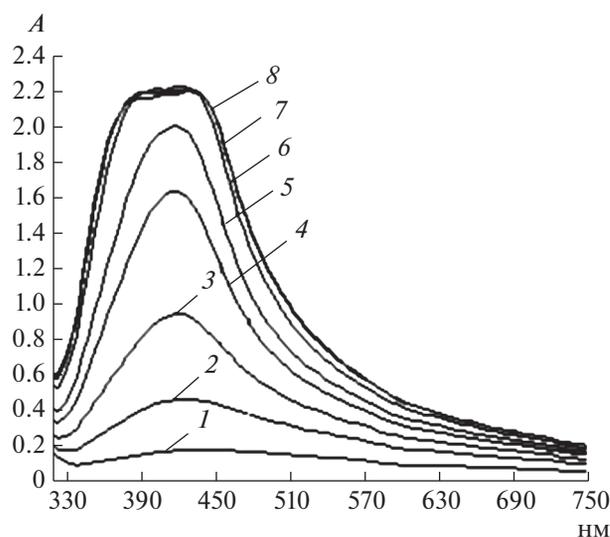


Рис. 2. Спектры оптического поглощения растворов НЧАг в матрице СХТЗ с различным содержанием NaOH в системе: 1 – 20, 2 – 30, 3 – 40, 4 – 50, 5 – 60, 6 – 80, 7 – 90, 8 – 100 мкл. Соотношение Ag^+ : D-глюкозы в реакционной смеси 1 : 5 моль/моль.

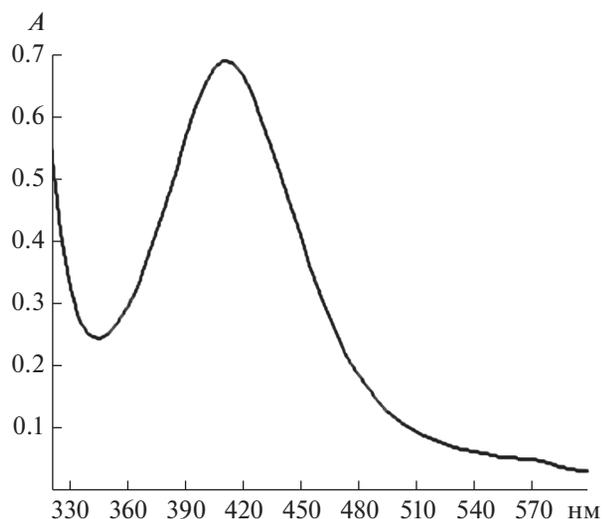


Рис. 3. Спектр оптического поглощения коллоидного раствора с НЧАg в матрице СХТЗ (разбавление 1 : 4).

щего компонента при приготовлении лекарственных препаратов.

Синтез НЧАg также можно проводить без восстановителя при термической активации системы. При этом в качестве ускорителя восстановления ионов Ag^+ также использовали NaOH. Представленные на рис. 3 результаты подтвердили, что полученный при восстановлении ионов Ag^+ в матрице СХТЗ с добавлением ПЭО коллоидный раствор, содержал НЧАg (полоса поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 417 \text{ nm}$).

Оценку формы и размера синтезированных НЧАg проводили с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Из представленных на рис. 4 данных можно заключить, что синтезированные НЧАg имели

сферическую форму. Введение дополнительного компонента ПЭО в количестве 10% от массы основного полимера приводило к образованию НЧАg размером 1–6 нм (рис. 4а, система: СХТЗ-ПЭО₁-НЧАg). Увеличение содержания ПЭО до 20% приводило к образованию более мелких частиц 1–3 нм (рис. 4б, система: СХТЗ-ПЭО₂-НЧАg). О стабильности НЧАg, синтезированных в матрице СХТЗ, судили по отсутствию уменьшения оптической плотности НЧАg в УФ-спектрах полученных коллоидных растворов после их выдержки в темноте при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

В настоящее время проблема разработки новых подходов к созданию нетоксичных биodeградируемых композитных материалов и расширение спектра их биологической активности является актуальной. Условия синтеза наночастиц серебра в полимерной матрице оказывают существенное влияние на размер частиц. Известно, что размер НЧАg являются важной характеристикой, определяющей их бактерицидную активность. Ранее при исследовании биологической активности НЧАg, синтезированных из ионов Ag^+ в растворе СХТЗ при воздействии микроволнового облучения, авторами было показано, что такие частицы (размер 9–34 нм) проявляют выраженную антибактериальную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429) [16]. Исследована возможность уменьшения размеров НЧАg, образующихся в матрице СХТЗ, путем введения в систему дополнительного компонента ПЭО, препятствующего ассоциации образующихся НЧАg. Результаты ПЭМ (рис. 4) подтвердили, что введение ПЭО в систему позволило снизить размер образующихся НЧАg (1–3 нм).

Исследование антимикробной активности коллоидных растворов НЧАg, полученных в матрице

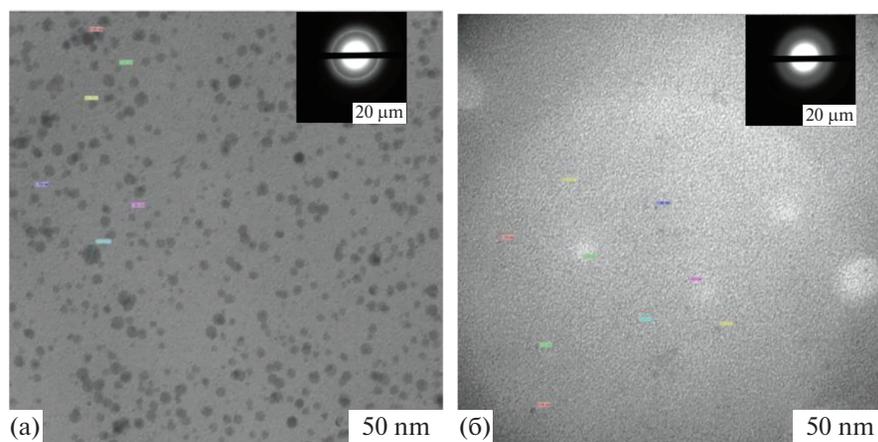


Рис. 4. Электронная микрофотография и дифракционная картина пленки (на врезке): а – СХТЗ-ПЭО₁-НЧАg (10% ПЭО); б – СХТЗ-ПЭО₂-НЧАg (20% ПЭО).

Таблица 1. Антимикробная активность растворов СХТЗ-ПЭО-НЧAg в отношении условно патогенных бактерий и грибов (зона угнетения роста, мм)

Вещества	Зона, мм			
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. niger</i> INA 00760
СХТЗ-ПЭО ₁ -НЧ Ag, 88 мкг/мл	12	нет	13	13
Контроль, СХТЗ-ПЭО ₁	нет	нет	нет	нет
СХТЗ-ПЭО ₂ -НЧ Ag, 84 мкг/мл	11	12	12	12
Контроль СХТЗ-ПЭО ₂	нет	нет	нет	нет
Амоксилав/клавулоновая кислота, 20/10 мкг	31	27	23	—
Амфотерицин, 40 мкг	—	—	—	12

* — не тестировали; d лунки = 10 мм ПЭО₁ — 10%; ПЭО₂ — 20% от массы СХТЗ.

СХТЗ с добавлением ПЭО показало, что уменьшение размера НЧAg в системе приводило к расширению спектра антибактериальной активности системы в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также к появлению выраженного антифунгального действия наноконструктивных систем в отношении *A. niger* INA 00760 (табл. 1).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан зеленый синтез наночастиц серебра из ионов в матрице нетоксичного биодegradуемого сукцинил хитозана. Синтез НЧAg можно осуществлять при комнатной температуре с использованием в качестве восстановителя D-глюкозы и ускорителя процесса NaOH. Помимо этого синтез НЧAg в матрице СХТЗ можно проводить без восстановителя при термической активации системы. Показано, что применение дополнительного компонента ПЭО в системе позволило получить НЧAg малого размера 1–3 нм.

Исследование антимикробной активности в опытах *in vitro* полученных коллоидных растворов, содержащих НЧAg, показало, что уменьшение размеров НЧAg приводило к расширению спектра антибактериальной активности (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* 209P, *E. coli* ATCC 25922), по сравнению с более крупными частицами исследованными ранее [16], и к проявлению антифунгального действия по отношению к *A. niger* INA 00760.

Полученные наноконструктивы, стабилизированные сукцинил хитозаном, могут найти применение при разработке биодegradуемых пленочных покрытий для лечения открытых ран и ожогов, а также при создании антибактериальных препаратов (аэрозоли, мази, жидкие пластыри и другие материалы).

В связи с сильно возросшей в последнее время резистентностью различных микроорганизмов к антибиотикам возникает необходимость разра-

ботки альтернативных подходов к получению антимикробных и противовирусных средств с иным механизмом действия на основе экологически безопасных веществ.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Anastas P.T., Warner J.C.* Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford, N.Y.: Oxford University Press, 1998, 148 p.
2. *Gurusamy V., Krishnamoorthy R., Gopal B., Veeraravagan V., Neelamegam P.* // Inorg. Nano-Metal Chem. 2017. V. 47. № 5. P. 761–767.
3. *Dong X., Ji X., Jing J., Li M., Li J., Yang W.* // J. Phys. Chem. C. 2010. V. 114. № 5. P. 2070–2074.
4. *Wojtylak S., Kudelski A.* // Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp. 2012. V. 410. P. 45–51.
5. *Skorik Y.A., Kritchenkov A.S., Moskalenko Y.E., Golyshev A.A., Raik S.V., Whaley A.K., Vasina L.V., Sonin D.L.* // Carbonhydr. Polymers. 2017. V. 166. P. 166–172.
6. *Колесов С.В., Бадыкова Л.А., Мударисова Р.Х.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 73–79.
7. *Kato Y., Onishi H., Machida Y.* // Biomaterials. 2000. V. 21. № 15. P. 1579–1585.
8. *Panvin A.A., Golyshev A.A., Skorik Y.A., Zhuravskii S.G., Sonin D.L.* // Pharm. Chem. J. 2017. V. 50. № 11. P. 711–714.
9. *Yaqub A., Malkani N., Shabbir A., Ditta S.A., Tanvir F., Ali S. et al.* // Curr. Microbiol. Springer US. 2020. V. 77. № 9. P. 2287–2299.
10. *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>
11. *Barrera N., Guerrero L., Debut A., Santa-Cruz P.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 7. P. 1–18.
12. *Milad Torabfam, Hoda Jafarizadeh-Malmiri* // Green Process Synthesis. 2018. № 7. P. 530–537.

13. *Torabfam M., Jafarizadeh-Malmiri H.* //Green Process. Synth. 2018. № 7. P. 530. <https://doi.org/10.1515/gps-2017-0139>
14. *Вишнякова Е.А., Сайкова С.В., Жарков С.М., Лихацкий М.Н., Михлин Ю.Л.* // Журн. Сибирского федерального ун-та. Сер. Химия. 2009. Т. 2. № 1. С. 48–55.
15. *Помогайло А.Д., Джардималиева Г.И.* Металлополимерные гибридные нанокомпозиты. М.: Наука, 2015. 494 с.
16. *Александрова В.А., Фutoryanskaya А.М., Садыкова В.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 5. С. 497–502.

The Method of Obtaining Nanocomposites Silver-succinyl Chitosan and Their Antimicrobial Activity

V. A. Aleksandrova^{a, *}, A. M. Futoryanskaya^{a, **}, and V. S. Sadykova^b

^a Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^b Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

**e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru

To form silver nanoparticles by reduction from metal ions in the presence of a reducing agent, D-glucose, at room temperature, a water-soluble derivative of chitosan, succinyl chitosan, was used as a polymer matrix. The synthesis of silver nanoparticles can also be carried out without a reducing agent by thermal activation of the system using alkali (NaOH) as an accelerator. The presence of silver nanoparticles in the obtained colloidal solutions was judged by the appearance of an absorption band in the electron plasmon resonance spectra ($\lambda_{\max} = 417$ nm). It has been shown that the use of an additional component, polyethylene oxide, in a macromolecular system makes it possible to obtain small silver nanoparticles (1–3 nm). The results of in vitro studies of antimicrobial activity of the obtained colloidal solutions containing silver nanoparticles confirm that a decrease in the size of silver nanoparticles leads to an expansion of the spectrum of antibacterial activity of strains of gram-positive and gram-negative bacteria (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* 209P, *E. coli* ATCC 25922) and to the manifestation of a pronounced antifungal action in relation to *A. niger* INA 00760.

Keywords: silver nanoparticles, chitosan, succinyl chitosan, antimicrobial activity, green synthesis