

СТАТЬИ

УДК 579.64:579.66

**ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ЭКСТРАКТАХ
GLYCYRRHIZA URALENSIS FISCH.,
ПОЛУЧЕННЫХ ПОСЛЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ**

Мураталиева А.Дж., Джуманазарова А.З., Гуцалюк Н.В., Шпота Е.Л.

*Институт химии и фитотехнологии Национальной академии наук Киргизской Республики,
Бишкек, e-mail: aigule@mail.ru*

В работе проведены исследования, связанные с выяснением влияния наночастиц серебра в водных экстрактах солодки (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) на проявление бактериостатических свойств. Для этих целей предварительно были получены экстракты солодки мацерацией и озвучиванием ультразвуком в течение 10, 30, 50, 80 и 120 минут. Отделенные от твердого остатка экстракты были центрифугированы в течение 40 минут при 8000 об./мин. с целью освобождения экстракта от не растворившихся веществ. Затем в указанных экстрактах были синтезированы наночастицы серебра при различных условиях. Смеси экстракта солодки (ЭС) и раствора нитрата серебра (НС) в соотношениях 7:1, 6:2, 4:4, 2:6 нагревались в течение 30 минут при температуре 70 °С. Цвет смесей менялся от светло-чайного до серо-зеленого, в некоторых смесях наблюдалось выпадение осадка. Изучение УФ-спектров полученных смесей не показало наличие полос поглощения наночастиц серебра. Поэтому были подобраны другие условия – при соотношении ЭС:НС 2:98 и инкубировании смеси при комнатной температуре. Цвет смеси менялся от светло-желтого до красно-коричневого, а затем до серо-зеленого; осадок в этих смесях не выпадает длительное время. В УФ-спектрах имело место поглощение в области 430 нм, характеризующее возникновение наночастицы серебра. При проведении испытаний полученных образцов выраженную бактериостатическую активность для большинства микроорганизмов показали образцы, содержащие наночастицы серебра по сравнению с чистыми экстрактами.

Ключевые слова: экстракты солодки, мацерация, ультразвук, наночастицы серебра, нитрат серебра, биологическая активность, спектры поглощения, «зелёный» синтез

**STUDY OF BACTERIOSTATIC PROPERTIES
OF SILVER NANOPARTICLES IN EXTRACTS OF GLYCYRRHIZA
URALENSIS FISCH OBTAINED AFTER ULTRASONIC TREATMENT**

Muratalieva A.Dj., Djumanazarova A.Z., Gutsalyuk N.V., Shpota E.L.

*Institute of Chemistry and Phytotechnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic,
Bishkek, e-mail: aigule@mail.ru*

In the work, studies were carried out related to the elucidation of the effect of silver nanoparticles in aqueous extracts of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) on the manifestation of bacteriostatic properties. For these purposes, licorice extracts were obtained by maceration and sonication for 10, 30, 50, 80 and 120 minutes previously. The extracts separated from the solid residue were centrifuged for 40 minutes at 8000 rpm in order to free the extract from insoluble substances. Then, in these extracts, silver nanoparticles were synthesized under various conditions. Mixtures of licorice extract (SE) and silver nitrate solution (NS) in ratios of 7:1, 6:2, 4:4, 2:6 were heated for 30 minutes at a temperature of 70°C. The color of the mixtures changed from light tea gray-green color, in some mixtures precipitation was observed. The study of the UV spectra of the obtained mixtures did not show the presence of absorption bands of silver nanoparticles. Therefore, other conditions were chosen: at an ES:NS ratio of 2:98 and incubation of the mixture at room temperature. The color of the mixture changed from light yellow to red-brown color, and then to gray-green color; the sediment in these mixtures does not precipitate for a long time. UV spectra exhibited absorption in the region of 430 nm, which characterizes the appearance of silver nanoparticles. When testing the obtained samples, samples containing silver nanoparticles showed a pronounced bacteriostatic activity for most microorganisms compared to pure extracts.

Keywords: licorice extracts, maceration, ultrasound, silver nanoparticles, silver nitrate, biological activity, absorption spectra, “green” synthesis

В развитии современных нанотехнологий значительную роль играют исследования наночастиц металлов. Это обусловлено, прежде всего, широким спектром возможностей их практического применения, в которых используются специфические свойства как самих наночастиц, так и модифицированных ими материалов [1].

Наночастицы серебра оказались наиболее эффективными, поскольку облада-

ют хорошей антимикробной активностью. Для синтеза наночастиц серебра было разработано множество методов, включая физические и химические [2; 3].

Зелёный синтез наночастиц оказался лучшим методом из-за более медленной кинетики, лучшего контроля и управления над ростом кристаллов и их стабилизацией. Растительные экстракты, как восстанавливающие и стабилизирующие агенты, получили особое внимание,

в частности из-за поддержания асептической среды во время процесса [4-6].

Нами изучена солодка уральская, экстракты которой могут представить интерес для «зелёного» синтеза наночастиц серебра. Известно, что это лекарственное растение обладает противовирусными, антиоксидантными, противовоспалительными, противоязвенными, противораковыми и анти-ВИЧ свойствами благодаря присутствию глицирризина и флавоноидов в качестве основных ингредиентов [7].

В работе [8] экстракт солодки получали экстрагированием в течение 1 часа в дистиллированной воде при 100 °С. Авторы работы [9] экстракт солодки получали кипячением в деионизированной воде при 100 °С в течение 5 минут.

Для нас представляло интерес получить наночастицы серебра в экстрактах солодки, полученных мацерацией, а также в экстрактах, полученных под воздействием ультразвука, и сравнить их биологическую активность. Установлено [10], что ультразвуком частотой 19-44 кГц из растений с сокращением времени экстракции на 1-2 порядка можно извлекать флавоноиды, дубильные вещества, фенолгликозиды, связанные кумарины, антоцианы, фенолкарбоновые кислоты. При этом, как правило, имеет место не только значительное ускорение процесса извлечения из растений полезных веществ, но и увеличение, по сравнению с другими методами экстрагирования, выхода основного продукта.

Цель исследования – влияние наночастицы серебра из водного экстракта солодки (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) на бактериостатические свойства.

Материалы и методы исследования

Нами были исследованы корни *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., собранные в Ат-Башинском районе с. Кура-Булун (в районе теплицы) 18.08.2019 года.

Корень солодки был тонко измельчен. Экстракцию веществ из корней солодки проводили путем мацерации, а также озвучиванием в ультразвуковой ванне DSA50-SK (W=50; F=40 кГц). Время озвучивания длилось 10, 30, 50, 80 и 120 мин. В первых трех случаях температура поддерживалась на уровне 48-50 °С, а при воздействии в течение 80 и 120 минут температуру довели до 98-100 °С.

В работе использован нитрат серебра («х.ч.»); готовили растворы концентрацией 10⁻³ М. Для доведения pH реакционной смеси до требуемых значений использовали 10%-ный раствор аммиака. Для приготовления растворов, а также для экстракции использовали дистиллированную воду.

Для изучения взаимодействия экстрактов солодки (ЭС), полученных разными способами, и нитрата серебра (НС) готовили смеси в различных соотношениях ЭС:НС – 7:1, 6:2, 4:4, 2:6 и 2:98.

Смеси после мацерации и воздействия ультразвуком отфильтровали от твердых остатков, фильтраты были центрифугированы в течение 40 минут при обороте 8000 об./мин.

Для дальнейшего использования объем всех экстрактов, полученных при разных условиях, был доведен до первоначального объема 100 мл путем добавления дистиллированной воды; экстракты хранились в холодильнике.

Для сравнения состава экстрактивных веществ после мацерации и действия ультразвука были изучены их УФ-спектры.

На рисунке 1 представлены УФ-спектры и фото образцов экстрактов солодки (ЭС) и смесей экстракта с раствором нитрата серебра (НС) в соотношениях 7:1, 6:2, 4:4, 2:6. Эти смеси были подогреты в течение 30 минут при температуре 70 °С. При этом произошло изменение цвета от светло-чайного до красно-коричневого, затем до грязно-зеленого для соотношений 4:4 и 2:6.

На рисунке 2 представлены УФ-спектры и фото образцов экстрактов солодки (ЭС) и смесей экстракта с раствором нитрата серебра (НС) в соотношениях 2:98. Смесь инкубировалась при комнатной температуре.

Спектры поглощения регистрировались на приборе СФ-2000, Россия.

Из характера УФ-спектров на рис. 1 можно видеть, что при таких соотношениях образование наночастиц серебра не происходит, образцы смесей темнеют и теряют свою прозрачность, начинает выпадать осадок.

Далее были подобраны другие соотношения ЭС и НС и условия проведения реакции, при которых формировались бы наночастицы серебра. Из характера УФ-спектров на рис. 2 можно видеть образование наночастиц: только при инкубировании в соотношении экстракт : нитрат серебра 2:98 появились в УФ-спектрах полосы поглощения, ответственные за образование наночастиц серебра, цвет смеси менялся от светло-желтого до красно-коричневого, а затем серо-зеленого; осадок в смесях не выпадает длительное время.

Для сравнительного изучения бактериостатических свойств экстрактов солодки нами подготовлены образцы под номерами от 1 до 10, представленные в таблице 1. В таблице приняты обозначения: ЭС – экстракт солодки; НС – нитрат серебра; УЗ – ультразвук.

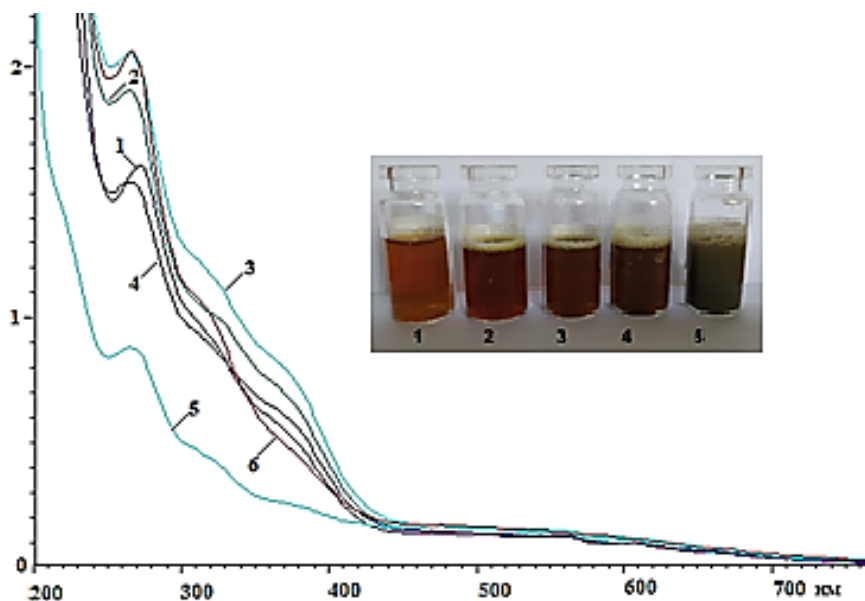


Рис. 1. УФ-спектры и фото образцов: 1 – чистый экстракт солодки (ЭС); соотношения ЭС:НС: 2 – 7:1; 3 – 6:2; 4 – 4:4; 5 – 2:6

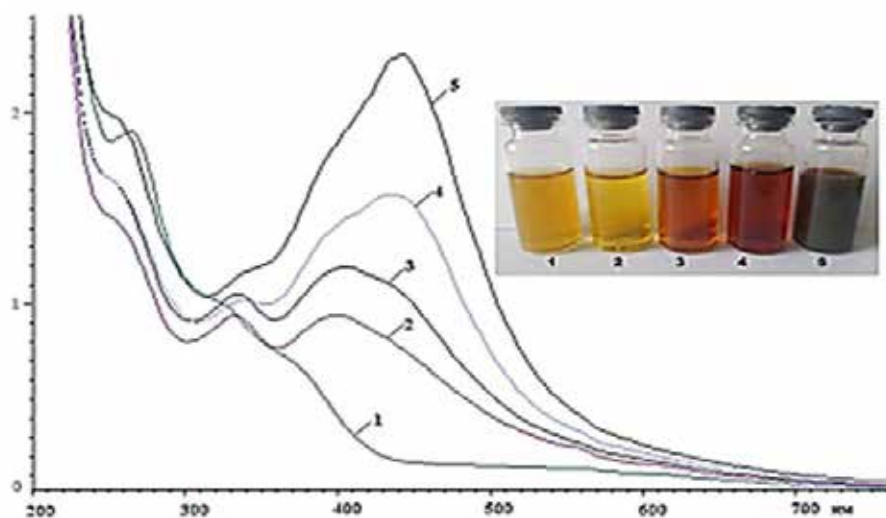


Рис. 2. УФ-спектры и фото образцов: 1 – чистый экстракт солодки; соотношение ЭС:НС 2:98; 2 – через 1 час; 3 – через 3 часа; 4 – через сутки; 5 – через 3 суток

Таблица 1

Нумерация различных образцов экстрактов солодки, полученных при различном времени озвучивания, и их смесей с нитратом серебра

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Продукт	ЭС, мацерация	ЭС: НС (4:4)	ЭС после 50 мин. УЗ	ЭС после 50 мин. УЗ; ЭС:НС (4:4)	ЭС после 80 мин. УЗ	ЭС после 80 мин. УЗ; ЭС:НС (4:4)	ЭС после 120 мин. УЗ	ЭС после 120 мин. УЗ; ЭС:НС (4:4)	ЭС после 80 мин. УЗ; ЭС:НС (2:98)	ЭС после 10 мин. УЗ; ЭС:НС (2:98)

Таблица 2

Влияние наночастиц серебра на бактериостатические свойства водных растворов
Glycyrrhiza uralenses Fisch

№	Микрофлора	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>Bacillus subtilis</i> штамм 26D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2	<i>Bacillus subtilis</i> штамм BR1256	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+
3	<i>Bacillus subtilis</i> штамм M1	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> штамм B4050	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
5	<i>Pseudomonas sp.</i> (штамм 2)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus sp.</i> (штамм 4)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
7	<i>Fusarium sp.</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	-	+
8	<i>Alternaria sp.</i>	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+
9	<i>Trichodérma viride</i>									-	-
10	<i>Trichodérma sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

(+) – есть выраженная зона подавления роста штамма.

(+/-) – очень слабая зона подавления роста штамма.

(-) – зона подавления роста штамма отсутствует.

Нумерация образцов в таблице 1 (горизонтальная) соответствует аналогичной нумерации в таблице 2.

Результаты исследования и их обсуждение

Бактериостатическое действие экстрактов исследуемых растений (основных и с наночастицами серебра) на микрофлору определяли методом засева сплошного газона тест-штаммов микрофлоры на чашки Петри с РПА (рыбо-пептонный агар), с последующим размещением на нём дисков из фильтровальной бумаги D=5,0 мм, предварительно смоченных исследуемым экстрактом.

В качестве тест-культур микрофлоры использованы различные штаммы, полученные из природных объектов, а также музейные штаммы, принадлежащие к роду *Bacillus* и *Pseudomonas*. В качестве тестовых культур микромицетов использованы различные штаммы рода *Trichodérma* и *Alternaria*.

О бактериостатическом эффекте исследуемых образцов судили по наличию выраженной зоны подавления роста тест-культуры либо по отсутствию таковой зоны. В таблице 2 приведены результаты испытаний образцов 1-10 (табл. 1) на выявление бактериостатических свойств.

Из анализа данных таблицы 2 можно видеть, что практически все образцы с 1 по 8, из которых (1, 3, 5, 7) представляют собой чистые экстракты и экстракты, содержащие нитрат серебра в соотношении 4:4 (2, 4, 6,

8), но не содержащие наночастиц серебра, индифферентны ко всем рассмотренным микроорганизмам, кроме образцов 1, 7, 8, которые проявили бактериостатическую активность по отношению к *Bacillus sp.* (штамм 4), образец 8 – по отношению *Fusarium sp.* Однако другая картина наблюдается для образцов 9, 10, содержащих в разных степенях наночастицы серебра. Так, образец 9 проявляет выраженную бактериостатическую активность по отношению *Bacillus subtilis* штамм 26D, *Pseudomonas sp.*, *Alternaria sp.*, *Trichodérma sp.*, а образец 10 проявляет активность ко всем микроорганизмам, кроме *Bacillus subtilis* штамм 26D, *Pseudomonas fluorescens* штамм B4050, *Trichodérma viride*.

Заключение

Таким образом, можно сделать заключение, что чистые экстракты солодки, независимо получены они озвучиванием или нет, в том числе экстракты, содержащие нитрат серебра без образования наночастиц, индифферентны практически ко всем изученным микроорганизмам. Картина меняется для образцов, в которых получены наночастицы серебра: круг микроорганизмов, на которые они оказывают выраженное бактериостатическое действие, значительно увеличивается, т.е. наличие наночастиц серебра в экстрактах имеет существенное значение для проявления бактериостатической активности.

Список литературы

1. Samuei A.R., Divya S., Sindu S., Arumugam P. Studies on synthesis, characterization and application of silver nano-particles using mimosa pudica leaves. International journal of pharmacy and pharmaceutical Science. 2014. Vol. 2. P. 453-455.
2. Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Res Pharm Sci. 2014. Vol. 9. P. 385-406.
3. Sivaganam S., Abraham J. Biosynthesis of silver nanoparticles. Africanjournal of Biotechnology. 2013. Vol. 14. P. 2038-2049.
4. Dinesh S., Karthikeyan A., Arumugam P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* root extract. Scholars research library. Archives of applied science research. 2012. Vol. 4. P. 178-187.
5. Naheed A., Sharma S. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of Ananas Cosmosus. Green and sustainable chemistry. 2012. Vol. 2. P. 141-147.
6. Koyyati R., Nagati V., Merugu R., Manthuradigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanus sativus* var. Longipinnatus leaf extract and evaluation of their anti-oxidant and anti-bacterial activity. International journal of medicine and pharmaceutical sciences. 2013. Vol. 3. P. 89-100.
7. Shen S., Chang Z., Liu J., et al. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extract by three-liquidphase extraction systems. Sep Purif Technol. 2007. Vol. 53 P. 216–223.
8. Yue Huo, Priyanka Singh, Yeon Ju Kim, and etc. Biological synthesis of gold and silver chloride nanoparticles by *Glycyrrhiza uralensis* and *in vitro* applications. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2018. № 46(2). P. 303-312. DOI: 10.1080/21691401.2017.1307213.
9. Sreelakshmy V., Deepa M.K., Mridula P. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* Root Extract for the Treatment of Gastric Ulcer. J Develop Drugs. 2016. Vol.5. P. 152. DOI:10.4172/2329-6631.1000152.
10. Молчанов Г.И. Ультразвук в фармации. М.: Медицина, 1980. 176 с.