زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 1، بهار و تابستان 1394

سنتزسبز و تعیین مشخصات نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی بذر گیاه کنجد

طاهر محصلی[1]، شهرام پورسیدی[2*]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

2- استادیار بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[*] کرمان، صندوق پستی، 761694111

spseyedi@uk.ac.ir.com

(دریافت مقاله: 92/6/22 پذیرش مقاله: 94/3/2)

چکیده- فناوری نانو شامل تحقیق و توسعه فناوری در محدوده فضاهای 1 تا 100 نانومتر بوده و در این فناوری ذراتی با اندازه‌های بسیار کوچک و در مقیاس‌های اتمی ساخته و دست ورزی می‌شوند. عصاره‌های گیاهی می‌توانند به عنوان یک مسیر سبز برای سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار بگیرند. در این تحقیق بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره بذر گیاه کنجد انجام شد. به عصاره بذری، نیترات نقره اضافه شده و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. اثرات سه غلظت نیترات نقره (1mM ، 2mM و 3mM) بر روی سنتز نانوذرات نقره بررسی شد. آنالیزهای اسپکتروسکوپی جذب UV-Visible، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، پراش اشعه ایکس (XRD) و اسپکتروسکوپی نشر اتمی (ICP) به منظور بررسی تولید نانوذرات انجام شدند. آنالیز طیف سنجی UV-Visible و وجود پیک در 420 نانومتر حاکی از سنتز زیستی این نانوذرات در عصاره بوده و عکس TEM شکل نانوذرات را کروی و میانگین اندازه آن‌ها را در حدود 14 نانومتر تعیین کرد. آنالیز XRD نانو کریستال‌های سنتز شده به وسیله عصاره را نشان داد، همچنین Inductively Coupled Plasma (ICP) درصد تبدیل یون نقره به نانوذره نقره را حدود 99/61 درصد تعیین کرد.

کلیدواژگان: بیوسنتز، نانوذرات نقره، بذر کنجد، طیف سنجی UV-Visible.

1- مقدمه

نانوتکنولوژی چشم داشتی بر اساس نوآوری‌های تکنولوژیکی مهم در قرن 21 است. تحقیق و توسعه در این رشته خیلی سریع در سراسر جهان رشد کرده است. یکی از محصولات مهم این فعالیت ذرات فلزی در مقیاس نانومتری است و در اندازه کمتر از 100 نانومتر تعریف می‌شوند. نانوذرات فلزی به دلیل خواص نوری منحصربه‌فرد، خاصیت کاتالیتیک، کاربردهای الکتریکی و مغناطیسی مورد توجه قرار گرفته‌اند [1]. امروزه در سراسر جهان به سبب شیوع بیماری‌های عفونی به دلیل باکتری‌های بیماری‌زای مختلف و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک شرکت‌های داروسازی و محققان برای عوامل ضد باکتری جدید در حال جستجو هستند [2]. بنابراین نانوذرات نقره به عنوان عوامل آنتی باکتریال، آنتی ویروس

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

و ضد فساد توسعه پیدا کرده‌اند [3]. تعدادی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای توسعه نانوذرات فلزی به‌کاربرده شده‌اند [4]. در سال‌های اخیر روش بیوسنتز با استفاده از عصاره گیاهان توجه بیشتری را نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی به خود اختصاص داده است [5]. سنتز سبز ساده، کم هزینه، غیرسمی، سازگار با محیط زیست و کارآمد برای بهره‌برداری هستند [6]. استفاده از عصاره گیاهان برای سنتز نانوذرات به واسطه یک فرایند بیولوژیکی به لحاظ محیطی بسیار سودمند است. Gardea-Torresdey و همکاران برای اولین بار تولید نانوذرات طلا و نقره را در گیاهان زنده گزارش کردند [۷،۸]. دوبی و همکاران نانو ذرات نقره و طلا را با استفاده از عصاره برگ *Rosa rugosa* سنتز کردند، که شکل نانو ذرات کروی و بعضی هم به صورت مثلثی و شش گوش بودند. این نانو ذرات با استفاده از مقدار پایین عصاره برگ و بدون هیچ مواد شیمیایی و مراحل فیزیکی اضافی تهیه شده و پایداری نانو ذرات سنتز شده در PHهای مختلف بررسی شد [9]. سنتز نانو ذرات نقره با استفاده ازگل شمعدانی[1] و چریش[2] در محدوده 1-10 نانومتر و متوسط 6 نانومتر انجام شد. در غلظت 1mg/ml نانو ذرات نقره از رشد سلول‌های سرطانی تا 30% جلوگیری کرد و در غلظت 5mg/ml بیش از 60% از رشد آن‌ها جلوگیری کرد [10].

یافته‌های بدست آمده توسط Roy و Barik از سنتز نانوذرات نقره عصاره برگ گیاه *Ipomoea aquatica* نشان داد که فاکتورهای مختلفی مانند منبع گیاهی، ترکیبات ارگانیک در عصاره برگ خام، غلظت $AgNO_3$، دما و نیز رنگدانه‌های برگ همگی بر خواص نانوذرات تأثیر می‌گذارند [11]. برخی گیاهان توانایی بالایی برای تولید نانو ذرات دارند. از عصاره برگ کافور[3] برای تولید ذرات نانو طلا و نقره استفاده شده است. ترکیبات پلی‌ال و هتروسیکلیک موجود در برگ این گیاه مسئول احیاء یون‌های نقره یا طلا و پایداری ذرات نانو تولید شده هستند [12].

همچنین سنتز نانوذرات طلا و نقره با استفاده از عصاره *Centella asiatica* [13]، عصاره میوه آمله [14]، عصاره گیاه آلوئه ورا [15]، عصاره پوست و پودر دارچین [16] و ریشه گیاه شیرین بیان [17] انجام شده است. به دلیل ویژگی‌های ضد میکروبی قوی، نانوذرات نقره در برنامه‌های کاربردی متنوعی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند. نانوذرات نقره یک عامل موثر کشنده در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت [5]، حتی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. اخیراً نشان داده شده است که نانوذرات نقره فعالیت ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را افزایش می‌دهند [18]. کنجد با نام علمی *Sesamum indicum* و از خانواده Pedaliaceae می‌باشد که دارای خواص دارویی زیادی می‌باشد و در اینجا سنتز نانوذرات نقره به وسیله عصاره بذری آن گزارش شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه عصاره بذری

ابتدا 50 گرم از بذر گیاه کنجد با سدیم هیپوکلریت 30% به مدت 5 دقیقه ضدعفونی و بعد از آن 3 بار و هر بار یک دقیقه با آب مقطر شسته شدند. در ادامه بذرها با الکل 70% به مدت 2دقیقه ضدعفونی و در نهایت 3 بار و هر بار 2 دقیقه با آب مقطر شسته شدند. سپس به میزان 2 برابر وزن بذر آب استریل اضافه شد و پس از آن در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته به صورت شبانه روزی در محیطی کاملاً تاریک قرار گرفت. بعد از یک هفته عصاره حاصل از آن با کاغذ واتمن شماره 40 صاف شد و از آن برای تهیه نمونه استفاده شد.

2-2- بیوسنتز نانوذرات نقره

برای تیمار عصاره از نیترات نقره با غلظت‌های 1، 2 و 3

1. Pelargonium Graveolens
2. Azadirachta Indica
3. Cinnamomum Camphora

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

میلی‌مولار استفاده شد. به این ترتیب که 5ml از عصاره به 15ml آب استریل اضافه شد و غلظت‌های مذکور جداگانه به محلول اضافه گردید در حالی که به شاهد نیترات نقره اضافه نشد. عصاره‌های تیمار شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و با مشاهده اولین تغییر رنگ نمونه‌ها نسبت به شاهد با دستگاه اسپکتروفتومتری UV-vis خوانده شد. تغییر رنگ محلول‌ها از زرد کمرنگ به خرمایی نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره و کاهش Ag^{+} به Ag^{0} است.

2-3- تعیین ویژگی‌های نانوذرات نقره

طیف جذبی نانوذرات سنتز شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب UV-vis از نوع Scan Drop محصول شرکت analyticgena کشور آلمان انجام شد. مقدار 4 میکرولیتر از عصاره حاوی نانو ذرات را در سل‌های 16 تایی به طوری که حباب نگیرد ریخته و در جایگاه تعبیه شده دستگاه قرار گرفت و میزان جذب مشاهده شد. سپس دستگاه میکروسکوپ الکترونی مدل LEO912-AB ساخت شرکت LEO واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید باهنر کرمان به منظور تعیین شکل نانو ذرات نقره و اندازه آن‌ها در این تحقیق استفاده شد. برای آنالیز TEM (میکروسکوپ الکترونی عبوری) در ابتدا سطح گرید با لایه نازکی از فورم وار[1] پوشیده شد و یک قطره از نمونه روی آن قرار گرفت و بعد از خشک شدن عکس آن تهیه شد.

ICP[2] یا اسپکتروسکوپی نشر اتمی برای تعیین غلظت باقی‌مانده یون‌های نقره در نمونه استفاده شد. ابتدا از نیترات نقره 3 نمونه استاندارد(50، 100 و 200ppm) تهیه شد. با استفاده از این 3 نمونه دستگاه کالیبره شد و نمونه تیمار شده با بیشترین پیک طیف UV-visible آنالیز شد. برای این کار 5ppm از عصاره تیمار شده با آب دیونیزه به حجم 50ppm رسید و در نهایت درصد تبدیل یون فلزی به نانوذره فلزی است محاسبه شد.

پس از اینکه فرایند سنتز نانوذرات نقره تکمیل شد، به منظور تغلیظ نانوذرات بیوسنتز شده، محلول کلوئیدی نانوذرات با دور 18000rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و به منظور شستشو و پراکنده کردن نانوذرات ته نشین شده، با اضافه کردن آب دو بار یونیزه ، عمل سانتریفیوژ 3 بار تکرار گردید. پس از هر بار سانتریفیوژ فاز رویی جدا و به ماده ته نشین شده آب دو بار یونیزه اضافه گردید. پس از عمل سانتریفیوژ، سوسپانسیون باقی‌مانده بر روی ویفر سیلیکونی نشانده شد و نمونه خشک شده برای تجزیه و تحلیل XRD مورد استفاده قرار گرفت.

3- نتایج

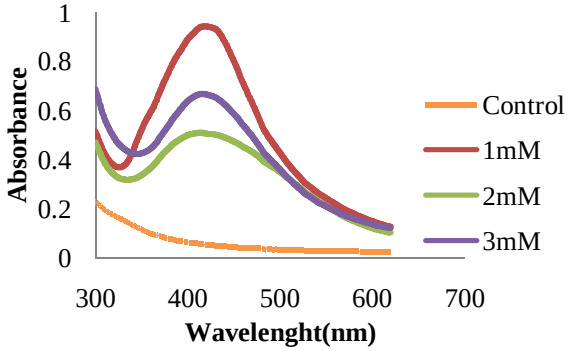
3-1- مطالعات طیفی uv-vis

در اثر احیای یون‌های نقره و تولید نانوذرات، رنگ نمونه‌ها از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تبدیل شد که با منابع هم‌خوانی داشت و نشان دهنده تولید سوسپانسیون کلوئیدی (Hydrosol) نانو ذرات نقره بود.جهت اثبات وجود نانوذرات نقره در نمونه‌ها، طیف UV- visible از آن‌ها تهیه شد. یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانوذرات فلزی خواص نوری آن‌ها بوده، که متناسب با شکل و اندازه نانو ذرات تغییر می‌کند. در نانو ذرات فلزی تشدید پلاسمون سطحی[3] مسئول خواص نوری منحصر به فرد آن‌هاست که تحت فاکتورهایی از قبیل اندازه نانو ذرات، شکل نانو ذرات، فاصله آن‌ها از همدیگر و ضریب شکست محیط پیرامون تغییر می‌کند [19]. با توجه به اینکه نانوذرات نقره بین 400 تا 500 نانومتر جذب نور دارند، شکل 1 نشان می‌دهد که مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در 420 نانومتر برای نانوذرات

1. Form Var
2. Inductively Coupled Plasma
3. Surface Plasmon Resonance

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

نقره رخ داده است. و همچنان که در نمودار پیداست غلظت 1mM نسبت به دو غلظت دیگر نیترات نقره، جذب بهتری داشته است و سنتز بیشتر نانوذرات را نشان می‌دهد بنابراین وجود پیک در این محدوده که با استفاده از دستگاه طیف سنج فرابنفش تشخیص آن وجود دارد گامی در جهت ثابت کردن سنتز شدن نانوذرات نقره می‌باشد. جا به جا شدن پیک‌ها و تغییر در شدت آن‌ها و ایجاد تغییرات در رنگ‌های مشاهده شده عواملی هستند که به اندازه نانوذرات وابسته‌اند. به بیان دیگر ویژگی‌های نوری نانوذرات نقره به شدت وابسته به قطر نانوذرات است. طیف سنجی UV- visible می‌تواند روشی ساده و قابل اعتماد برای نظارت بر پایداری محلول‌های نانوذرات مورد استفاده قرار گیرد. اما زمانی که نانوذرات بی ثبات شوند پیک اصلی به دلیل تخلیه نانوذرات پایدار به شدت کاهش می‌یابد.



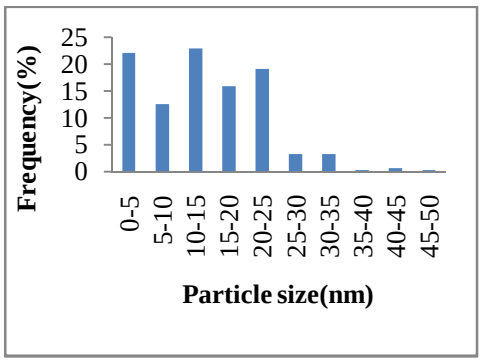
شکل 1 طیف جذبی از نانوذرات نقره در دمای 30درجه سانتی‌گراد با سه غلظت نیترات نقره (1mM، 2mM و 3mM) و 5ml عصاره کنجد.

2-3- مطالعات TEM

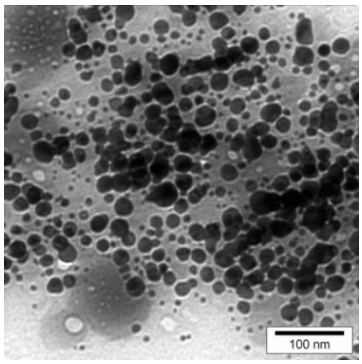
به منظور مقایسه اندازه، مورفولوژی و یکنواختی توزیع نانوذرات تولید شده تصویر TEM تهیه شد. مشخص است که ذرات به طور عمده به شکل کروی بوده و قطر آن‌ها در گستره 10-15 نانومتر بوده و در برخی از نواحی به صورت انباشته یا پراکنده کنار هم قرار دارند. سپس نمودار توزیع اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده نیز ترسیم شد و بر طبق آن میانگین اندازه ذرات در نمونه در حدود 14 نانومتر بود. (شکل 2)

3-3- مطالعه ICP

اسپکتروسکوپی نشر اتمی ICP[1] میزان یون‌های باقی‌مانده نقره را بعد از زمان تعادل تعیین می‌کند. درصد تبدیل یون فلزی نقره به نانو ذره فلزی نقره را می‌توان به وسیله فرمول $Q=(c0-cf/c0)\times100$ بدست آورد. c_0 و c_f به ترتیب غلظت ابتدایی و انتهایی یون فلزی بر حسب (mg/L) است و Q درصد تبدیل یون فلزی به نانوذره فلزی است [20].



(الف)



(ب)

شکل 2 الف) نمودار اندازه و فراوانی نانوذرات که متوسط اندازه نانوذرات را در حدود 14 نانومتر تعیین کرد. ب) عکس TEM از نانوذرات نقره سنتز شده در دمای 30درجه سانتی‌گراد و 5ml عصاره کنجد.

ICP درصد تبدیل یون نقره را به نانوذره نقره را 99/61%

1. Inductively Coupled Plasma

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

تعیین کرد که نشان دهنده حضور نانوذرات نقره در عصاره بذرتیمار شده کنجد می‌باشد و نتایج حاصل از اسپکترفوتومتر UV-visible را تایید می‌کند (جدول 1).

جدول 1 نتیجه بدست آمده از آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروسکوپی نشر اتمی(ICP)

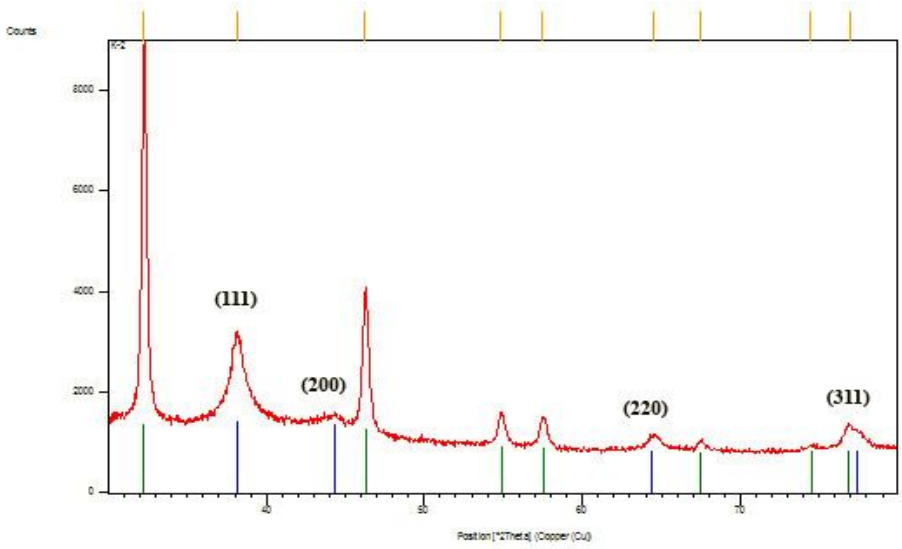
عصاره بذر گیاه	C0 (mg/L)	cf (mg/L)	Q (%)
%10	169/8734	0/658	99/61

4-3- مطالعه XRD

بر اساس نمودار 3 الگوی XRD، اندیس‌های میلر در سطوح (111)، (200)، (220) و (311) که به ترتیب مربوط به زاویه‌های 38.143^o، 46.255^o، 64.51^o، 77.011^o بوده که وجود نانو کریستال‌های نقره را در عصاره گیاه کنجد ثابت می‌کند.

4- بحث

امروزه، تهیه نانوذرات زیستی با توجه به کارایی آن‌ها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است؛ از سوی دیگر، افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرایندهای زیستی، استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست را برای تهیه غیرسمی نانو مواد زیستی ضروری کرده است. اگرچه راه‌های گوناگون زیستی برای تهیه زیستی نانوذرات فلزی شناخته شده‌اند، استفاده از موجودات زنده یا دیگر واسطه‌ها برای تهیه نانوذرات فلزی گران و همراه با محدودیت است .بنابراین، تهیه زیستی آسان از نانوذرات با کنترل اندازه و شکل در روش‌های ارائه شده از اهمیت فراوانی برخوردار است. استفاده از بسترهای گیاهی برای تهیه نانو مواد یک روش نوظهور و طبق اصول شیمی سبز است . گیاهان زیادی وجود دارند که قابلیت ساخت نانوذرات و استفاده در چنین صنعت ارزشمند و گران‌بهایی را دارند ولی هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند .بسیاری از این گیاهان هنوز مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند و ترکیبات نانویی درون آ نها شناخته نشده است. با توجه به پیشرفت صنعت، نیاز به تولید ترکیبات نانویی برای انواع مصارف تجاری و کاربردی رو به افزایش است. در بین نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان، کاربردهای فراوانی داشته و می‌توانند به عنوان نانوذرات تجاری محسوب شوند.



شکل 3 الگوی XRD از نانوذرات نقره تولید شده در عصاره آبی گیاه کنجد

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

سنتز این نانوذرات با استفاده از روش‌های فیزیکوشیمیایی به دلیل ناسازگاری با محیط زیست برای مصرف کنندگان و محققان جذابیت زیادی ندارند. بنابراین روش‌های سنتز زیستی به دلیل زیست سازگار بودن در اولویت قرارگرفته‌اند. طبق نتایج می‌توان گفت که گیاه دارویی کنجد قابلیت سنتز نانوذرات را دارد و با توجه به این که تاکنون استفاده از این گیاه به منظور کاهش زیستی یون‌های نقره گزارش نشده است، نتایج حاصل کارکرد خوب این گیاه را به وضوح نشان می‌دهد، لذا برای اولین بار می‌توان بیان کرد که این گیاه به عنوان یک کارخانه زنده می‌تواند برای تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار بگیرد. بنابراین می‌توان گفت که گیاه کنجد غیر از نقش دارویی ویژه ای که دارد می‌تواند برای تولید نانوذرات نقره برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده شود.

5- منابع

[1] Ankamwar, B., Damle, C., Ahmad, A., Sastry, M. (2005) Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. J Nanosci Nanotechnol. 5, 1665–1671

[2] Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., De, S.P., Misra, A. (2009) Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. Colloids and Surfaces A. 339, 134-139.

[3] Dinesh, S., Karthikeyan, S., Arumugam, P. (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* root extract. Archives of Applied Science Research. 4 (1), 178-187.

[4] Chandran, SP., Chaudhary. M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M. (2006) Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. Biotechnol Prog. 22, 577–83.

[5] Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, N.J., Jr, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, Water Res. 42, 3066–3074.

[6] Das, R.K., Borthakur, B.B., Bora, U. (2010) Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. Materials Letters. 64, 1445-1447.

[7] Dubey, Sh. P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. (2010) Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. Process Biochemistry. 45, 1065-1071.

[8] Dubey, Sh.P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. (2010) Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. Colloids and Surfaces A. 364,34-41.

[9] Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J.G., Dokken, K., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., Jose-Yacaman., M. (2002) Formation and growth of Au nanoparticles insidelive Alfalfa plants, Nano Lett. 2, 397-401.

[10] Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J.G., Dokken, K., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., Jose-Yacaman., M. (2003) Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticlels, Langmuir 19, 1357-1361.

[11] Huang, J., Li, Q., Sun, D, et al. (2007) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. Nanotechnology. 18, 104-14.

[12] .Manonmani, V., Juliet, V. (2011) Biosynthesis Of Ag Nanoparticles For The Detection Of Pathogenic Bacteria In Food. IPEDR. 14, 307-311.

[13] Prabha Dubey, Sh., Lahtinen, M., Sarkka, H., Sillanpaa, M. (2010) Bioprospective of Sorbus aucuparia leaf extract in development of silver and gold Nanocolloids . J. Colloids and Surfaces. 80, 26-33.

[14] Roy, N., Barik, A. (2010) Green Synthesis of Silver Nanoparticles from the Unexploited Weed Resources. Journal of Nanotechnology and Applications pp. 95-101.

[15] Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., and Minaian, S. (2007) Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and Escherichia coli, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 3, 168-171.

[16] Safaepour, M., Shahverdi, A.R., Shahverdi, H.R., Khorramizadeh, M.R., Gohari, A.R. (2009) Green Synthesis of Small Silver Nanoparticles Using Geraniol and Its Cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164, Avicenna J Med Biotech 1, 111-115.

[17] Vaidyanathan, R., Kalishwarala, K., Gopalram, Sh., Gurunathan, S. (2009) Nanosilver—The burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. Biotechnology Advances. 27, 924-937

[18] Willets, K., Van Duyne, A., (2007) Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. Annu. Rev. Phys; Chem. 58, 267–97.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]

[19] Yin, H., Langford, R., and Burrell, R. (1999) Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing, The Journal of burn care & rehabilitation. 20, 195.
[20] Smitha, S.L., Philip, D., Gopchandran, K.G. (2009) Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. Spectrochimica Acta. 74, 735-739.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-25]