

Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Withania somnifera*

Keikha E.¹ MSc, Emamjomeh A.^{*1} PhD, Valizadeh M.² PhD, Fakheri B.¹ PhD

¹ Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, University of Zabol, Zabol, Iran

² Medicinal Plants Department, Agriculture Faculty, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

Today, nanosilver is one of the most commercialized nanomaterials. The demand for synthesis of nanosilver through biocompatible routes due to wide biomedical applications has increased. Use of plants and plant products as sustainable and renewable resources in the synthesis of nanoparticles is more advantageous over other biological routes. In the current study, biosynthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) using aqueous extract of *Withania somnifera* as a reducing agent is reported. Effect of parameters such as aqueous extract volume, AgNO₃ concentration, pH, and formation time was investigated and optimized by UV-visible spectroscopy in the synthesis of nanoparticles. At room temperature, the solution color started to change from pale yellow to dark brown due to the reduction of silver ion. The transmission electron microscopy (TEM) was applied for size and morphological analysis of nanoparticles. TEM result shows a spherical structure with an average size ranging from 24-35nm for silver nanoparticles.

Keywords

Biosynthesis [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/81000096>];

Silver Nanoparticles [Not in MeSH];

Withania somnifera [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Withania+somnifera>];

UV-Vis Spectrophotometry [Not in MeSH]

*Corresponding Author

Tel: +98 (54) 31232162

Fax: +98 (54) 31232045

Post Address: Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, University of Zabol, Zabol, Iran

Postal code: 53898615

aliimamjomeh@uoz.ac.ir

Received: September 25, 2019

Accepted: April 14, 2020

ePublished: June 10, 2020

بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه پنیرباد (*Withania somnifera*)

الهام کیخا MSc

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

عباسعلی امامجمعه* PhD

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

محرم ولیزاده PhD

گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشکده دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

براتعلی فاخری PhD

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده

امروزه، نانوذرات نقره از مهم‌ترین نانومواد تجاری محسوب می‌شوند. تقاضا برای سنتز نانوذرات از طریق روش‌های زیست‌سازگار به دلیل کاربردهای گسترده در زمینه زیست‌پزشکی در حال افزایش است. استفاده از گیاهان و محصولات گیاهی به عنوان منابع پایدار و تجدیدپذیر در سنتز نانوذرات از سایر روش‌های سنتز بیولوژیکی سودمندتر است. در مطالعه حاضر، بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه *Withania somnifera* به عنوان عامل کاهنده گزارش می‌شود. پارامترهای موثر بر بیوسنتز نانوذرات شامل حجم عصاره، غلظت نمک نقره‌نیترات، اثر pH و زمان واکنش توسط تکنیک اسپکتروسکوپی فرابنفش-مرئی بررسی و بهینه‌سازی شدند. تغییر رنگ محلول از زرد روشن به قهوه‌ای تیره در دمای اتاق به دلیل کاهیدگی یون‌های نقره مشاهده شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری تعیین شد که ذراتی با ساختار کروی و اندازه متوسط در حدود ۳۵-۲۴ نانومتر را نشان می‌دهد. **کلیدواژه‌ها:** بیوسنتز، نانوذرات نقره، گیاه پنیرباد، اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶

* نویسنده مسئول: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

مقدمه

در مقیاس نانو خواص مواد تغییر می‌کند و باعث تولید مواد جدیدی با عملکرد بالاتر و خواص جدیدتر می‌شود، بنابراین فناوری نانو توانسته است توجه کشورهای بزرگ و قدرت‌های اقتصادی را به خود جلب کند. فناوری نانو امکان دستکاری و آرایش دوباره اتم‌ها را در اختیار انسان قرار داده است تا آنها بتوانند با تغییر در چیدمان اتم‌ها علاوه بر امکان تولید مواد جدید با خواص دلخواه خود بتوانند موادی با ساختار ساده و ارزان تولید کنند. به دلیل اینکه قوانین فیزیک کلاسیک در ابعاد نانو تغییر می‌کنند و قوانین فیزیک کوانتوم حاکم می‌شود. مواد در مقیاس نانو از خود خصوصیات جدیدی نشان می‌دهند، برای مثال نقره در بدن انسان خاصیت ضدالتهابی دارد[1]. روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات وجود دارند. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش رسوب شیمیایی بخار، رسوب فیزیکی بخار، سایش لیزری، هم‌رسوبی، آئروسول، سل-ژل، میکروامولسیون یا مایسل معکوس، هیدروترمال اشاره کرد[2-4]. در اکثر این روش‌ها، از یک عامل کاهنده شیمیایی

مانند سدیم‌بورهایدرید برای کاهیدگی یون‌های فلزی و یک عامل تثبیت‌کننده مانند پلی‌وینیل‌پیرولیدون برای کنترل رشد ذرات و جلوگیری از تجمع آنها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه نانوذرات فلزی به عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است. توانایی عصاره‌های گیاهی برای کاهیدگی یون‌های فلزی از سال ۱۹۰۰ تاکنون شناخته شده است. مولکول‌های زیستی موجود در عصاره‌های گیاهی را به منظور کاهیدگی یون‌های فلزی به نانوذرات در یک فرآیند سنتزی تک‌مرحله‌ای موسوم به فرآیند سبز می‌توان مورد استفاده قرار داد. ماهیت و غلظت عصاره گیاه، غلظت محلول نمک فلز، pH، دما و مدت زمان تماس روی سرعت تولید نانوذرات، مقدار و خصوصیت آنها تأثیر می‌گذارند. از عواملی که باعث کاهیدگی یون فلز به نانوذرات می‌شود، می‌توان به متابولیت‌های گیاهی محلول در آب (آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی، تریپنئوئیدها، فلاونوئیدها و آمیدها) و کوآنزیم‌ها اشاره کرد[5]. در میان کاربردهای بسیار زیاد نقره، استفاده از خاصیت ضدباکتریایی آن برای مقاصد بهداشتی و پزشکی قابل توجه و اهمیت است.

گیاه *Withania somnifera* علفی، پایا، پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای و متعلق به تیره سیب‌زمینی است. این گیاه دارای برگ‌های متناوب، کامل، بیضوی و گل‌های کوچک و سفیدرنگ است[6]. میوه، کپسولی قرمز رنگ است که در پوششی کرم‌رنگ مستور شده است. این کپسول حاوی دانه‌های متعدد روغنی است. ماده موثره پنیرباد که در تمام اندام‌های گیاه اعم از ساقه، برگ، میوه، ریشه و بذر وجود دارد ویتانولید است که دو نوع عمده آن ماده ویتافرین A و D هستند که خاصیت ضدسرطانی دارند. ویتافرین A دارای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی است که در مهار رشد سلول‌های تومور استفاده می‌شود و اخیراً به عنوان عامل افزایش حافظه و با هدف بازیابی انحطاط عصبی، شکل‌گیری دندریت و شاخه‌شاخه شدن آن استفاده می‌شود.

بررسی اثر ضد میکروبی فلاونوئیدهای گونه سومنیفرا نیز توانمندی قابل توجهی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی از جمله *Staphylococcus aureus*، *Candida albicans* و *Escherichia coli* نشان داده است[7]. به طور کلی، نانوذرات نقره به عنوان یکی از بهترین کاندیدها برای درمان بیماری‌هایی که با تکثیر و مرگ سلولی در ارتباط هستند، مورد توجه است. در سال ۲۰۰۹، گزارشی منتشر شده است که نشان‌دهنده اثرات نانوذرات نقره در جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی فیبروبلاست‌های ریه انسان است. در یک مطالعه محققان با کمک خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره، موفق به تولید ظروف پلاستیکی شدند که قادر به نگهداری مواد غذایی در طولانی‌مدت بود. این ظروف تولیدی مواد غذایی را سه تا چهار برابر تازه‌تر نسبت به حالت معمولی نگه می‌دارند. این مطالعه به دلیل نگهداری مواد برای طولانی‌مدت بدون تغییر رنگ، مزه و خاصیت غذایی بسیار مورد توجه صنعت بسته‌بندی قرار گرفت[8]. بیوسنتز نانوذرات نقره با



شکل ۲) انتقال نمونه گیاهی به آزمایشگاه و خشک و پودر کردن آن

تهیه محلول‌ها

محلول استوک اولیه نقره‌نیترات (AgNO_3) با غلظت ۱/۰ مولار، از حل کردن ۱/۶۹۷ گرم نقره‌نیترات در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری، محلول اولیه سود یا سدیم‌هیدروکسید (NaOH) با غلظت ۱/۰ مولار، از حل کردن ۴/۰ گرم NaOH در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری و محلول اولیه اسیدکلریدریک (HCl) با غلظت ۱/۰ مولار، از حل کردن ۶۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد.

سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه پنیرباد

از عصاره گیاه هم به‌عنوان عامل کاهنده و هم پایدارکننده استفاده می‌شود. به‌منظور سنتز نانوذرات نقره، در تمامی مراحل آزمایش از نمک نقره‌نیترات و آب دیونیزه استفاده شد. به این منظور ۴ میلی‌لیتر محلول نقره‌نیترات یک‌میلی‌مولار به ۲ میلی‌لیتر عصاره به‌دست‌آمده در دمای اتاق اضافه و pH محلول توسط دستگاه pH متر قرائت شد. عمل کاهیدگی یون‌ها به‌سرعت انجام و رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره تغییر و پایدار باقی ماند که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات نقره است. به‌منظور تایید سنتز نانوذرات از محلول مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرانفش در محدوده ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر، طیف‌گیری شد.

بررسی پارامترهای موثر در سنتز نانوذرات

هدف از بهینه‌سازی پارامترهای مختلف، به‌دست‌آوردن نانوذراتی با سایز و اندازه کوچکتر و شکل یکنواخت‌تر است. پارامترهای بهینه‌شده شامل pH محیط واکنش، غلظت عصاره، غلظت محلول نقره‌نیترات و زمان انجام واکنش هستند و در نهایت خصوصیات نانوذرات حاصل به‌طور دقیق معین شد.

بهینه‌سازی مقدار pH

به‌منظور بهینه‌سازی مقدار pH، پنج سری محلول شامل ۲ میلی‌لیتر عصاره و ۴ میلی‌لیتر نمک نقره‌نیترات یک‌میلی‌مولار تهیه و pH محلول توسط دستگاه pH متر، ۵/۱۳ قرائت شد. با اضافه کردن یکی از دو محلول سدیم‌هیدروکسید و یا ۱/۰ مولار هیدروکلریک‌اسید، محلول‌هایی با pH برابر با ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ تهیه شدند (جدول ۱). همچنین طیف جذبی آنها در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر ثبت شد.

استفاده از عصاره استخراج‌شده از بذر لوبیای چشم بلبلی مورد بررسی قرار گرفت و اندازه و شکل نانوذرات با استفاده میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی و اشکال کروی و اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر گزارش شد^[9]. در سال ۲۰۰۸ با استفاده از عصاره گیاه چای سبز با نام علمی *Camellia sinensis* به‌عنوان عامل کاهنده و پایدارکننده، نانوذرات طلا و نقره سنتز شد که در این مطالعه با افزایش غلظت عصاره گیاه، نانوذرات کروی با اندازه ۳۰ تا ۴۰ نانومتر تولید شدند. ترکیبات فنولیک‌اسید از قبیل کافئین و تئوفیلین موجود در عصاره این گیاه، به‌عنوان مسئول تشکیل و پایداری نانوذرات سنتز‌شده، شناخته شدند^[10]. در مطالعه حاضر تلاش شده به بخشی از ظرفیت‌های موجود در گیاه پنیرباد که یکی از گیاهان کمیاب، ارزشمند و بومی در ایران است، پرداخته شود. گیاه پنیرباد گونه‌ای است که برای عموم و حتی مراکز علمی کمتر شناخته شده و متعلق به خانواده سیب‌زمینیان و یا سولاناسه است. این گیاه ارزش دارویی و غذایی بالایی دارد و بومی استان سیستان و بلوچستان است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی گیاه

برای جمع‌آوری نمونه گیاهی مورد نظر، بذرهای گیاه پنیرباد گونه *Withania somnifera* به مجتمع گلخانه‌ای دانشگاه زابل منتقل و در یک پشته به طول ۲۰ متر کشت شد و تا زمان میوه‌دهی (سه ماه)، به فاصله هر دو روز در هفته آبیاری قطره‌ای انجام گرفت (شکل ۱).

پس از آنکه گیاه به مرحله میوه‌دهی رسید مقداری از برگ‌های تازه آن جمع‌آوری و به پژوهشکده گیاهان دارویی و زینتی انتقال داده شدند. در آنجا، پس از شست‌وشو و زدودن گرد و خاک، با دقت کافی، در محیطی به دور از نور مستقیم خورشید (سایه) به مدت یک هفته قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. سپس توسط دستگاه آسیاب آزمایشگاهی کاملاً پودر و برای مصارف بعدی و عصاره‌گیری در یخچال در دمای ۴°C نگهداری شدند (شکل ۲).

به‌منظور به‌دست‌آوردن عصاره تازه، مقدار ۱ گرم پودر برگ گیاه مورد نظر به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیوار تقطیر اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰°C قرار داده شد. پس از سرد شدن مخلوط به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲، صاف و عمل فیلتراسیون انجام گرفت.



شکل ۱) گیاه پنیرباد کشت‌شده در گلخانه

سری محلول	حجم	pH	حجم نمک نقره‌نیترات (امیلی‌مولار (میلی‌لیتر)	حجم عصاره (میلی‌لیتر)
۱	۱۰	۲	۴	۲
۲	۱۰	۴	۴	۲
۳	۱۰	۶	۴	۲
۴	۱۰	۸	۴	۲
۵	۱۰	۱۰	۴	۲

بهینه‌سازی حجم عصاره

عصاره گیاه، به‌عنوان یک عامل احیاکننده برای احیای یون‌های Ag^+ به Ag^0 استفاده می‌شود و نقش مهمی در فرآیند احیاء و تشکیل نانوذرات نقره دارد. به این منظور برای بهینه‌سازی حجم عصاره گیاه پنیرباد پنج دسته محلول به‌طوری که هر دسته از محلول‌ها دارای غلظت متفاوتی از عصاره و غلظت ثابتی از نمک نقره‌نیترات (امیلی‌مولار باشند، تهیه شد (جدول ۲). تمامی مراحل ساخت هر پنج دسته محلول در pH ثابت انجام و طیف جذبی آنها در محدوده ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر ثبت شد.

جدول (۲) مراحل بهینه‌سازی حجم عصاره گیاه پنیرباد سنتز نانوذرات

سری محلول	حجم	pH	حجم نمک نقره‌نیترات (امیلی‌مولار (میلی‌لیتر)	حجم عصاره (میلی‌لیتر)
۱	۱۰	۸	۴	۱
۲	۱۰	۸	۴	۲
۳	۱۰	۸	۴	۳
۴	۱۰	۸	۴	۴
۵	۱۰	۸	۴	۵

بهینه‌سازی غلظت محلول نقره‌نیترات

برای بهینه‌سازی غلظت محلول نقره‌نیترات چهار دسته محلول با غلظت‌های متفاوت بین ۱ تا ۴ میلی‌مولار از محلول نقره‌نیترات و حجم ثابت از عصاره گیاه پنیرباد در بالن ۱۰ میلی‌لیتری ساخته شد. با کمک محلول سدیم‌هیدروکسید ۰/۱ مولار، pH محیط واکنش هر چهار محلول روی مقداری ثابت تنظیم شد (جدول ۳). با افزایش غلظت یون Ag^+ در محلول‌های مورد نظر، مقدار جذب که بیانگر مقدار نانوذرات تشکیل‌شده در محلول بود، افزایش یافت. طیف جذبی آنها در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر ثبت شد.

جدول (۳) بهینه‌سازی غلظت نمک نقره‌نیترات برای سنتز نانوذرات نقره

سری محلول	حجم	غلظت نمک نقره‌نیترات (میلی‌مولار)	pH	حجم نمک نقره‌نیترات (امیلی‌مولار (میلی‌لیتر)	حجم عصاره (میلی‌لیتر)
۱	۱۰	۱	۸	۴	۴
۲	۱۰	۲	۸	۴	۴
۳	۱۰	۳	۸	۴	۴
۴	۱۰	۴	۸	۴	۴

بهینه‌سازی زمان انجام واکنش

زمان اندازه‌گیری، مدت زمان بین مرحله به‌حجم‌رساندن محلول واکنش تا زمان طیف‌گیری است. پس از افزودن ۴ میلی‌لیتر نمک نقره‌نیترات با غلظت ۴ میلی‌مولار به ۲ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه و تنظیم pH مورد نظر روی pH ثابت و به‌حجم‌رساندن آن در بالن ژوژه حجمی واکنش تشکیل نانوذرات فلزی نقره و رشد آنها شروع می‌شود و تا زمانی که عامل کاهنده در عصاره گیاه پنیرباد برای کاهیدگی یون Ag^+ موجود باشد، واکنش تشکیل نانوذرات ادامه دارد. برای به‌دست‌آوردن زمان بهینه، پس از به‌حجم‌رساندن محلول واکنش، پس از ۱۵ دقیقه اولین نقطه جذبی در طول موج ۴۰۲ نانومتر، در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر ثبت شد و نقاط جذبی بعدی نیز با فاصله زمانی یادداشت شد.

استخراج نانوذرات نقره از محلول آن به‌منظور بررسی‌های بعدی

برای بررسی ساختاری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. به این منظور از سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه و مدت زمان ۳۰ دقیقه برای استخراج نانوذرات استفاده شد. نمونه سانتریفیوژشده با آب مقطر شست‌وشو داده و برای جداسازی ناخالصی‌ها با اولتراسونیک دیسپرس و دوباره سانتریفیوژ و با آب مقطر شست‌وشو شد. در نهایت رسوب در یخچال در دمای ۳°C قرار داده شد تا خشک شود.

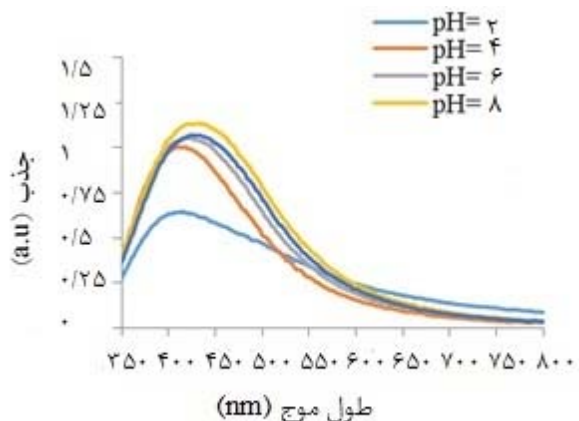
یافته‌ها

بررسی سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه پنیرباد

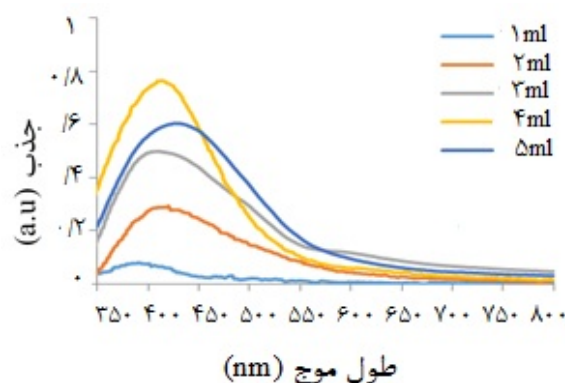
کاهیدگی یون‌های نقره با استفاده از عصاره‌های گیاهی مختلف به‌طور معمول توسط ویژگی‌های بصری و همچنین طیف مرئی-فرابنفش قابل پیگیری است. جذب نور در ساختار نانوذرات فلزی به پدیده تشدید پلاسمون سطحی (SPR) مربوط است. در تمام روش‌های سنتز، از شواهد مهم تشکیل ذرات نقره در مقیاس نانو، وجود نوار جذبی پهنی در ناحیه ۳۸۰-۴۵۰ نانومتر است. درواقع نقره در مقیاس نانو ویژگی‌های خاص نوری از خود نشان می‌دهد که دلیل ایجاد این پیک، برانگیختگی دسته‌جمعی الکترون‌های آزاد در ذرات ریز است. طبق تئوری می از برهم‌کنش نور با الکترون‌های ذرات ریز فلزی یک نوار جذبی به دست می‌آید که شکل و شدت آن به اندازه ذرات و چگونگی یکنواختی آنها و کلوخه‌ای‌شدن وابسته است [11]. همان‌طور که شدت پیک جذبی با گذشت زمان افزایش می‌یابد، به غلظت ذرات نقره نیز افزوده می‌شود. باند جذبی در طول موج‌های پایین‌تر با تقارن مناسب، نشان‌دهنده نانوذراتی با میانگین قطر کوچک و توزیع اندازه یکنواخت است [12]. افزایش اندازه ذرات، موجب جابه‌جایی بیشینه طیف به سمت طول موج‌های بلندتر می‌شود. درواقع مکان تشدید پلاسمون سطحی نانوذرات نقره با افزایش اندازه ذرات به سمت طول موج قرمز جابه‌جا می‌شود.

در عمل تغییر شدت پیک پلاسمون از طریق تغییر نسبت واکنشگرها و تغییر شرایط واکنش انجام می‌پذیرد. به همین دلیل

پیک شدیدتری است. در نهایت حجم ۴ میلی‌لیتر عصاره به‌عنوان حالت بهینه انتخاب شد (نمودار ۳). با افزایش میزان عصاره ابتدا میزان شدت جذب بیشینه مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره افزایش و سپس کاهش یافت و همچنین جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر مشاهده شد.



نمودار ۲) طیف جذبی نانوذرات نقره سنتز شده در pHهای مختلف



نمودار ۳) طیف جذبی نانوذرات نقره سنتز شده در حجم‌های متفاوت عصاره

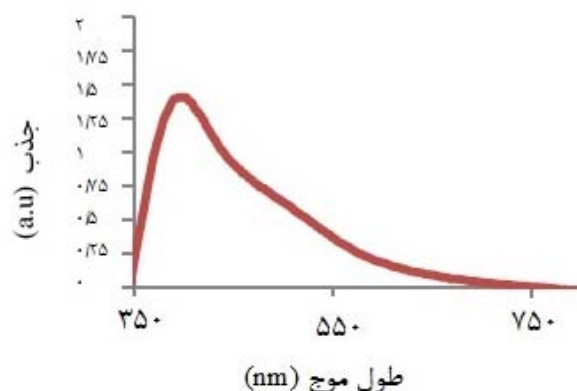
بررسی اثر غلظت نمک نقره‌نیترات بر روند انجام واکنش

غلظت یون فلزی نقره نیز بر روند تشکیل نانوذرات تاثیر می‌گذارد. با بررسی طیف جذبی فرابنفش- مرئی با افزایش غلظت یون فلزی از ۱ به ۴ میلی‌مولار باند جذبی تشدید پلاسمون سطحی شدیدتر می‌شود. با این حال جابه‌جایی محسوسی در غلظت‌های ۳ و ۴ میلی‌مولار به سمت طول موج‌های بلندتر مشاهده می‌شود که بیانگر سنتز ذراتی با میانگین قطر بیشتر است (نمودار ۴). بنابراین غلظت ۲ میلی‌مولار به دلیل دارا بودن پیک جذبی در طول موج‌های پایین‌تر (محدوده ۴۰۰ نانومتر) با تقارن مناسب به‌عنوان غلظت بهینه نمک نقره‌نیترات انتخاب شد.

بررسی اثر زمان بر روند انجام واکنش

بررسی تاثیر زمان بر روند واکنش نشان داد که جذب ناشی از رزونانس پلاسمون سطحی از زمان اولیه واکنش تا ۶۰ دقیقه پس از انجام آن در طول موج ثابت (۴۰۲ نانومتر) افزایش و پس از آن

در این مطالعه تاثیر حجم عصاره، غلظت نمک نقره‌نیترات فلزی و همچنین pH محیط و زمان انجام واکنش بهینه‌سازی و مورد بررسی قرار گرفت. سنتز نانوذرات نقره با کاهیدگی یون نقره Ag^+ به Ag^0 با چشم غیرمسلح به‌روشنی با تغییر رنگ نمونه از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای پررنگ قابل تشخیص بود. ماکزیمم جذب پیک حاصل با اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی در طول موج ۴۰۲ نانومتر با ماکزیمم جذب ۱/۴۰ نانومتر، نشان‌دهنده باند جذب تشدید پلاسمون سطحی برای نانوذرات نقره است (نمودار ۱).



نمودار ۱) طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی نانوذرات نقره سنتز شده بدون بهینه‌کردن پارامترهای موثر

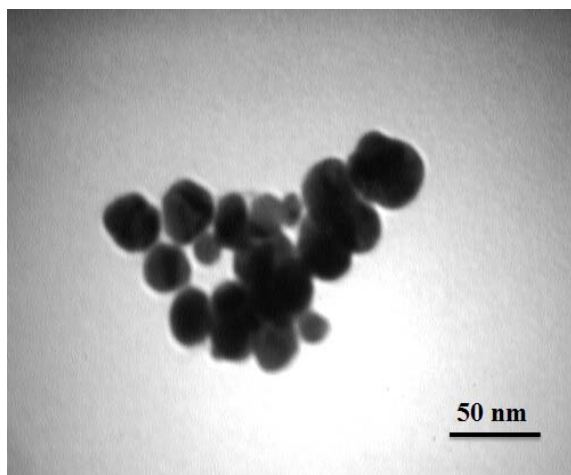
بررسی تاثیر pH بر واکنش

طیف جذبی فرابنفش- مرئی نانوذرات نقره سنتز شده در pHهای مختلف ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ در نمودار ۲ نشان داده شده است. با بررسی طیف فرابنفش- مرئی مشاهده می‌شود که نانوذرات نقره سنتز شده در محدوده وسیعی از pH پایدار هستند. گزارش‌های پیشین حاکی از این است که pH روی شکل نانوذرات تاثیر چشمگیری ندارد و تنها اندازه آنها را به میزان زیاد تحت تاثیر قرار می‌دهد و یکی از فاکتورهای بسیار مهم در سنتز نانوذرات است [13]. نتایج حاصل از تاثیرات pH روی سنتز نانوذرات نقره به کمک عصاره آبی گیاه پنیرباد نشان داد که این نانوذرات در محدوده وسیعی از pH پایدار هستند. با افزایش میزان pH شدت جذب پلاسمون سطحی ابتدا با شیب ملایمی افزایش و سپس در pH برابر با ۱۰ کاهش می‌یابد. با وجود شدت جذب بیشتر در pH برابر ۸، جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر (طول موج‌های قرمز) مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده افزایش اندازه نانوذرات است. پیک جذبی pH برابر ۴ دارای جابه‌جایی به سمت طول موج‌های پایین‌تر (طول موج‌های آبی) و در ناحیه ۴۲۰ نانومتر است. بنابراین برای حصول نانوذرات با اندازه کوچکتر pH برابر ۴ مناسب است.

بررسی اثر حجم عصاره

طیف جذبی گرفته‌شده از نانوذرات نقره در حجم‌های متفاوتی از عصاره آبی گیاه پنیرباد نشان می‌دهد که در ناحیه ۴۰۲ نانومتر حجم ۴ میلی‌لیتر عصاره دارای میزان جذب تا حدود کمی بیشتر و

و بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره به کمک عصاره آبی گیاه پنیرباد استفاده شد و به کمک میکروسکوپ الکترون عبوری مورفولوژی و سایز نانوذرات تعیین شد.

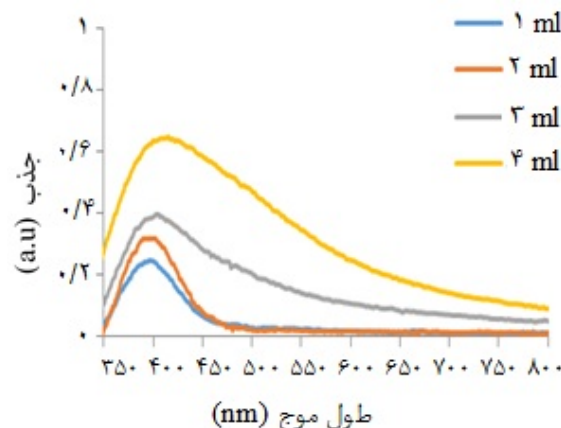


شکل ۳) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه پنیرباد

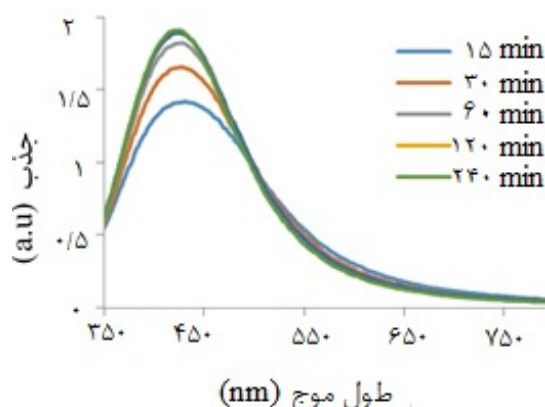
بحث

در چند دهه اخیر تهیه نانوذرات و مطالعه آنها توجه دانشمندان را در حوزه‌های گوناگون علوم بنیادی و کاربردی به خود جلب کرده است [14]. فناوری نانو اصطلاحاً به طراحی، بررسی خصوصیات، تولید و استفاده از ساختارها با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتریک گفته می‌شود. خواص شیمیایی و فیزیکی نظیر خواص نوری و الکترونیکی نانوذرات با توجه به اندازه کوچک آنها (۱۰۰-۱۰ نانومتر) قابل تغییر است [15]. در سال‌های اخیر نانوذرات فلزی به دلیل کاربردهای متنوع در زمینه‌های مختلف، به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [16]. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های بیولوژیکی (استفاده از قارچ‌ها، باکتری‌ها، توده زیستی و عصاره گیاهان) به دلیل ساده و کم‌هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیرسمی و داشتن سازگاری با محیط زیست توجه ویژه‌ای را نسبت به سایر روش‌ها به خود اختصاص داده است [17]. در زمینه تولید زیستی و بیولوژیکی نانوذرات، استفاده از عصاره گیاهان علاوه بر دلایل گفته شده به دلیل دسترسی آسان، کامل بودن واکنش، کم بودن زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف و یکنواخت و همگن بودن اندازه ذرات اهمیت بیشتری پیدا کرده است [18]. در میان نانومواد و نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی وابسته به اندازه توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند که از جمله آنها می‌توان به خواص نوری، شیمیایی، الکتریکی، کاتالیزتی و ضد میکروبی اشاره کرد [19]. نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی‌های مفیدی مانند میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا هستند که مجموعه این عوامل سبب شده است تا اثرات ضد میکروبی آنها در مقایسه با نقره افزایش چشمگیری داشته باشد [20]. سومینفرا یک گیاه با خواص دارویی

ثابت باقی می‌ماند (نمودار ۵). درنتیجه ایده‌آل‌ترین زمان برای سنتز نانوذرات نقره در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه است. در این حالت پیک‌های تیزتر و محلول قهوه‌ای پررنگ‌تری حاصل می‌شوند. در نهایت زمان ۶۰ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه برای سنتز نانوذرات نقره انتخاب شد. یکی از عوامل اثبات میزان پایداری نانوذرات فاکتور زمان است.



نمودار ۴) طیف جذبی نانوذرات نقره سنتز شده در غلظت‌های مختلف نمک نقره‌نیتрат



نمودار ۵) طیف جذبی نانوذرات نقره سنتز شده در زمان‌های مختلف

شرایط بهینه به‌دست‌آمده برای سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه پنیرباد

در نهایت pH برابر ۴، غلظت ۲ میلی‌مولار یون نقره‌نیترات، ۴ میلی‌لیتر عصاره و زمان ۶۰ دقیقه به‌عنوان شرایط بهینه برای سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه پنیرباد به دست آمد.

بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره سنتز شده با میکروسکوپ الکترون عبوری

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری، سنتز نانوذراتی کروی با اندازه‌ای در محدوده ۳۵-۲۴ نانومتر را نشان می‌دهد (شکل ۳). این روش تنها مورفولوژی و اندازه نانوذرات را ارائه می‌دهد. در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش- مرئی برای ویژگی‌یابی

ماکرومولکول‌های زیستی بیشتر برای کاهیدگی یون‌های نقره در دوزهای بالاتر است [29]. همچنین روش جوشاندن به‌منظور آماده‌سازی عصاره، به رهاسازی برخی کاهنده‌ها که نقش مهمی در تشکیل نانوذرات به عهده دارند، کمک می‌کند. مطالعه مقایسه‌ای برای تحقیق اثرات غلظت اولیه نقره‌نیترات بر اندازه نانوذرات با غلظت یکسان عصاره انجام شد. تکامل شدت جذب با افزایش غلظت اولیه نقره‌نیترات در نمودار ۴ نشان‌دهنده افزایش غلظت نانوذرات است. در نتیجه بالاترین غلظت نقره‌نیترات، بیشترین غلظت نانوذرات نقره را به دنبال داشته است که با نتایج هو/نگ مشابهت دارد [30]. با این حال جابه‌جایی محسوسی در غلظت‌های ۳ و ۴ میلی مولار به سمت طول موج‌های بلندتر مشاهده می‌شود که بیانگر سنتز ذراتی با میانگین قطر بیشتر است. بررسی تاثیر زمان بر روند واکنش (نمودار ۵) نشان داد که جذب ناشی از رزونانس پلاسما سطحی از زمان اولیه واکنش تا ۶۰ دقیقه پس از انجام آن در طول موج ثابت (۴۰۲ نانومتر) افزایش و پس از آن ثابت باقی می‌ماند. همچنین در گذر زمان تغییر چشمگیری در میزان جذب نانوذراتی که پایدار هستند رخ نمی‌دهد. در برخی نیز با گذشت زمان، میزان جذب به دلیل چسبندگی و تجمع نانوذرات سنتز شده کاهش می‌یابد. اساس سنتز نانوذرات، احیای یون‌های نمک آنها و درواقع خنثی‌شدن بار الکتریکی است [31]. تصویر TEM به‌منظور مقایسه اندازه، مورفولوژی و یکنواختی توزیع نانوذرات نقره تولید شده تهیه شد و اندازه متوسط نانوذرات بین ۲۵-۳۴ نانومتر و شکل آنها تقریباً کروی بود.

نتیجه‌گیری

تاکنون استفاده از عصاره گیاه پنیرباد برای کاهش زیستی یون‌های نقره گزارش نشده است. عصاره برگ این گیاه به‌راحتی قابل تهیه است و می‌توان گفت پتانسیل کاهشی بالایی در نرخ سنتز و تبدیل نانوذرات نقره دارد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از سرکار خانم شهلا رنجبر دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی به‌دلیل کمک در تصحیح علمی و نگارش این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده است. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: الهام کیخا (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ عباسعلی امام‌جمعه (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵٪)؛ محرم ولی‌زاده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ براتعلی فاخری (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با استفاده از گرنت معاونت پژوهشی دانشگاه زابل با شماره ۹-۹۶۱۸-GR-UOZ انجام شد.

مهم در طب سنتی محسوب می‌شود که منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال است [21]. به‌طور کلی مزیت تولید گیاهی نانوذرات به سایر روش‌های زیستی، بی‌خطر بودن و همچنین قابلیت‌های بالای گیاهان دارویی است که بسیار قابل اعتماد و سالم‌تر از باکتری، قارچ و مخمر برای تولید نانوذرات است [22]. همچنین نانوذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی می‌توانند با ریسک کمتری در موارد متعددی از جمله انتقال دارو در بدن کاربرد داشته باشند. به‌دلیل ارزان و در دسترس بودن، روش‌های زیستی مخصوصاً گیاهی نسبت به سایر روش‌ها از منظر اقتصادی نیز می‌توانند حایز اهمیت باشند و به‌دلیل نداشتن مشکلات گوناگون سایر روش‌ها، مورد توجه جدی قرار گیرند [23]. عصاره گیاهان غنی از پلی‌فنول‌هایی چون فلاونوئیدها است که ترکیباتی قدرتمند برای کاهش و تولید نانوذراتی از قبیل نانوذرات نقره هستند. بنابراین در بسیاری از مطالعات و همچنین در مطالعه حاضر از عصاره آبی اندام گیاه برای سنتز نانوذرات استفاده شده است [24, 25]. ترکیبات پلی‌فنولی علاوه بر خاصیت کاهندگی، توانایی پایدار کردن نانوذرات فلزی را نیز دارند. درواقع با افزودن ترکیب‌های پلی‌فنولی (مانند عصاره آبی گیاه پنیرباد) به محلول نقره‌نیترات، Ag^+ توسط ترکیب‌های پلی‌فنولی به نقره فلزی کاهش می‌یابد و همین ترکیب‌های پلی‌فنولی مانع از تجمع و کلوخه‌شدن ذرات نقره می‌شوند و نانوذرات نقره تشکیل می‌شوند [26]. طبق گزارشات، فعالیت بهینه بیومولکول‌ها به‌شدت نسبت به pH محیط مجاور حساس است [27]. اثرات pH روی سنتز نانوکریستال‌های نقره به وسیله عصاره آبی گیاه پنیرباد نشان داد که این نانوذرات در محدوده وسیعی از pH پایدار هستند. با افزایش میزان pH شدت جذب پلاسما سطحی ابتدا با شیب ملایمی افزایش و سپس در pH برابر با ۱۰ کاهش می‌یابد. با افزایش pH شدت جذب بیشتر و همچنین جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده افزایش اندازه نانوذرات است. یکی از پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره مقدار حجم عصاره گیاهی است. گزارش‌ها حاکی از آن است که با افزایش میزان عصاره، مقدار ترکیبات کاهنده و پایدارکننده نظیر ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ترپنوئیدی در محلول افزایش می‌یابد و میزان یون بیشتری در معرض کاهیدگی قرار می‌گیرند و جذب مربوط به رزونانس پلاسما سطحی نانوذرات نقره افزایش پیدا می‌کند [28]. طیف جذبی گرفته شده از نانوذرات نقره در حجم‌های متفاوت عصاره آبی گیاه پنیرباد (نمودار ۳) نشان می‌دهد که حجم ۴ میلی‌لیتر عصاره دارای بیشترین میزان جذب با تقارن مناسب و جابه‌جایی به سمت طول موج‌های پایین‌تر است. همان‌طور که شدت پیک جذبی افزایش می‌یابد، به غلظت ذرات نقره نیز افزوده می‌شود. باند جذبی در طول موج‌های پایین‌تر با تقارن مناسب، نشان‌دهنده نانوذراتی با میانگین قطر کوچک و توزیع اندازه یکنواخت است [12]. افزایش مقدار جذب با افزایش دوز عصاره، تولید بالاتر نانوذرات نقره را نشان می‌دهد که ناشی از حضور

torvum and their promising antimicrobial activity. *J Biopestic*. 2010;3(1):394-9.

16- Pourali P, Baseri Salehi M, Afsharnejad S, Behravan J. Biological production and evaluation of the antibacterial properties of gold nanoparticles. *J Microb World*. 2013;6(3):198-211. [Persian]

17- Mohaseli T, Pourseidi Sh. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of *Sesamum indicum* seeds. *Tarbiat Modares Univ Biothechnol*. 2015;6(1):10-20. [Persian]

18- Ashiri S, Safari J. Preparation of gold and silver nanoparticles in plant beds and their application. *Nanotechnology*. 2013;12(1):12-5. [Persian]

19- Jianrong Ch, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol Adv*. 2004;22(7):505-18.

20- Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2011;79(3):594-8.

21- Singh G, Kumar P. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera* L. *Indian J Pharm Sci*. 2011;73(4):473-8.

22- Karimi Andeani J, Kazemi H, Mohsenzadeh S, Safavi A. Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea wilhelmsii* plant. *Dig J Nanomater Biostruc*. 2011;6(3):1011-7.

23- Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *J Nanopart Res*. 2008;10(3):507-17.

24- Shankar SS, Ahmad A, Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol Prog*. 2003;19(6):1627-31.

25- Jha AK, Prasad K, Kumar V, Prasad K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf. *Biotechnol Prog*. 2009;25(5):1476-9.

26- Nune SK, Chanda N, Shukla R, Katti K, Kulkarni RR, Thilakavathy S, et al. Green nanotechnology from tea: Phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. *J Mater Chem*. 2009;19(19):2912-20.

27- Lukman AI, Gong B, Marjo CE, Roessner U, Harris AT. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *J Colloid Interface Sci*. 2011;353(2):433-44.

28- Dwivedi AD, Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2010;369(1-3):27-33.

29- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 2007;18(10):105104.

30- Huang J, Zhan G, Zheng B, Sun D, Lu F, Lin Y, et al. Biogenic silver nanoparticles by *Cacumen platycladi* extract: Synthesis, formation mechanism, and antibacterial activity. *Ind Eng Chem Res*. 2011;50(15):9095-106.

31- Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem*. 2011;13(10):2638-50.

1- Ahmadi H. Nanotechnology: Third millennium attitude. 1st Edition. Tehran: Iran's Industrial Research and Training Center; 2007. [Persian]

2- Nagarajan R. Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology. In: Nagarajan R, Alan Hatton T. Nanoparticles: Synthesis, stabilization, passivation, and functionalization. Washington, D.C.: ACS Publications; 2008.

3- Samat NA, Nor RM. Sol-gel synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Citrus aurantifolia* extracts. *Ceram Int*. 2013;39(suppl 1):S545-8.

4- Li F, Vipulanandan C, Mohanty KK. Microemulsion and solution approaches to nanoparticle iron production for degradation of trichloroethylene. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2003;223(1-3):103-12.

5- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv*. 2013;31(2):346-56.

6- Kothari SK, Singh CP, Vijay Kumar Y, Singh K. Morphology, yield and quality of ashwagandha (*Withania somnifera* L. Dunal) roots and its cultivation economics as influenced by tillage depth and plant population density. *J Horticul Sci Biotechnol*. 2003;78(3):422-5.

7- Abouzid S, El-Bassuony AA, Nasib A, Khan Sh, Qureshi J, Choudhary MI. Withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2010;3(1):23-7.

8- Carbone M, Donia DT, Sabbatella G, Antiochia R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *J King Saud Univ Sci*. 2016;28(4):273-9.

9- Mohammadi S, Pourseyedi Sh, Amini A. Green synthesis of silver nanoparticles with a long lasting stability using colloidal solution of cowpea seeds (*Vigna sp. L*). *J Environ Chem Eng*. 2016;4(2):2023-32.

10- Vilchis-Nestor AR, Sánchez-Mendieta V, Camacho-López MA, Gómez-Espinosa RM, Camacho-López MA, Arenas-Alatorre JA. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Mater Lett*. 2008;62(17-18):3103-5.

11- Park Y, Hong YN, Weyers A, Kim YS, Linhardt RJ. Polysaccharides and phytochemicals: A natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnol*. 2011;5(3):69-78.

12- Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2003;28(4):313-8.

13- Armendariz V, Herrera I, Jose-yacamán M, Troiani H, Santiago P, Gardea-Torresdey JL. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: Use of plants in nanobiotechnology. *J Nanopart Res*. 2004;6(4):377-82.

14- Maadi T, Ghahramanzade R, Yousefi M, Mohammadi F. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) via four kinds of plants extract and investigation of antimicrobial activity of these nanoparticles. *SHIMI VA MOHANDESI SHIMI IRAN*. 2014;33(4):1-9. [Persian]

15- Govindaraju K, Tamilselvan S, Kiruthiga V, Singaravelu G. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum*