Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

مشخصه‌یابی سینتیکی و بیوشیمیایی نانوزیم نقره و بررسی اثر شرایط نگه‌داری بر فعالیت نانوزیمی و طول عمر نگه‌داری آن

سعیدرضا هرمزی جنگی*، زهرا دهقانی

آزمایشگاه شیمی و بیوشیمی هرمزی، ۹۸۶۱۳۳۴۳۶۷، زابل، ایران

چکیده: در پژوهش حاضر، نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده با یک روش ساده سنتز شدند و خواص نوری، اندازه، مورفولوژی و رفتار نانوزیمی نانوزیم‌های سنتز شده مشخص گردید. نتایج نشان داد که نانوزیم سنتزی فعالیت ویژه‌ای به بزرگی ۵/۰۲ میکرومولار در دقیقه از خود نشان می‌دهد که حاکی از فعالیت شبه–آنزیمی بالای آن است. بنابراین مشخصه‌یابی بیوشیمیایی به جهت اندازه‌گیری شرایط بهینه فرآیند نانوزیمی/آنزیمی بر نانوزیم‌های سنتزشده و بررسی میزان پایداری آنها در برابر تغییرات محیطی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که نانوزیم‌های سنتز شده در دامنه‌ی دمایی ۳۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دامنه‌ی pH برابر ۴/۵–۳/۵ بیشینه‌ی فعالیت شبه–آنزیمی خود را نشان می‌دهند. سپس اثر شرایط نگه‌داری بر فعالیت نانوزیمی و طول عمرنگه‌داری نانوزیم سنتزی بررسی گردید. نتایج نشان داد که فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات نقره اصلاح نشده تقریباً در حدود ۷۵ درصد و ۶۳ درصد به ترتیب پس از ۷ روز قرار گرفتن در معرض نور روز و اکسیژن هوا حفظ شد. همچنین مطابق مطالعات سینتیکی، پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده به‌ترتیب برابر ۰/۰۵ میلی‌مولار و ۱۱۳/۶ نانومولار در ثانیه محاسبه شد که نشان از قدرت نانوزیمی بالای آن دارد. در نهایت، ماندگاری (پایداری ذخیره سازی) نانوزیم های آماده شده نیز در شرایط نگهداری معمول (یعنی ۴ درجه سانتیگراد در تاریکی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این نانوزیم‌ها پس از ۱۰ روز ذخیره سازی، ۹۶ درصد فعالیت اولیه خود را ذخیره کردند.

واژگان کلیدی: پایداری ذخیره‌سازی نانوزیم، مشخصه‌یابی بیوشیمیایی نانوزیم، فعالیت نانوزیمی، نانوزیم نقره، پارامترهای سینتیکی

saeedrezahormozi@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه نانوذرات فلزی، به ویژه نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل خواص نوری بی‌نظیر، خواص ضد سرطانی و ضد باکتریایی عالی همراه با زیست سازگاری بالا، به طور گسترده در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند[۱]. به ویژه، توسعه سریع علم نانو و شیمی مواد باعث افزایش علاقه به تحقیق در مورد سنتز و خصوصیات نانومواد جدید از طریق روش‌های نوین و نوآورانه برای دستیابی به نانومواد جدید با فعالیت کاتالیزوری منحصر به فرد[۱، ۲]، خواص نوری بی‌نظیر[۳] و خواص دارویی عالی[۴] همراه با زیست سازگاری بالا[۵] گردید. در واقع، رسالت نانوزیست فناوری به عنوان یکی از جذاب‌ترین حوزه‌های نانوفناوری[۶، ۷]، سنتز و شناسایی این نانومواد با استفاده از رویکردهای متفاوت و سبز است. در میان نانومواد مختلف، از نانوذرات فلزی برای ساخت طیف وسیعی از نانوحسگرها و حسگرهای زیستی برای اندازه‌گیری گستره‌ی وسیعی از آنالیت‌ها مانند مواد منفجره[۸]، فلزات سنگین[۹] و مواد زیستی[۱۰] استفاده شده است. با این حال، کاربرد آنها در علم پزشکی نیز به ویژه برای طراحی آزمایش‌های هماتولوژیک برای تشخیص بیماری‌های مختلف به‌عنوان مثال بیماری‌های تخریب‌کننده اعصاب مورد توجه بوده است[۱۱].

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۳/۱۲
تاریخ پذیرش : ۱۴۰۲/۳/۲۹

همچنین نانوذرات اخیرا در شناسایی و درمان پاتوژن‌های نوظهور نظیر ویروس کرونا مورد استفاده قرار گرفته و نتایج بسیار مطلوبی را بدست داده‌اند[۱۲]. علاوه بر این، استفاده از فعالیت کاتالیزوری این نانوذرات برای کاربردهای عملی نیز مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است[۱۳، ۱۴]. رشته جدید کاتالیز بر پایه‌ی نانوزیم که به عنوان جایگزینی برای کاتالیز مبتنی بر آنزیم معرفی شده است، شیمی نانوزیم نامیده می‌شود. نانوزیم‌ها به عنوان نانومواد با فعالیت شبه آنزیمی بالا شناخته می‌شوند و می‌توانند برای شبیه‌سازی واکنش‌های آنزیمی در شرایط محیطی سخت (مثلاً دمای بالاتر و یا دامنه pH وسیع‌تر) استفاده شوند[۱۳، ۱۸–۱۵]. در واقع، آنزیم‌های طبیعی چندین ضعف را نشان می‌دهند که به شرح زیر است[۱۹]؛ (I) پایداری کم (محدوده حرارتی و دامنه pH باریک) (II) مشکل در بازیابی و (III) عدم قابلیت استفاده مجدد از آنزیم در واکنش‌ها به‌ویژه واکنش‌های صنعتی. معمولاً برای غلبه بر این مشکلات، فرآیند پایدارسازی آنزیم مدنظر بوده است[۲۲–۲۰]. روش دیگر برای غلبه بر این مشکلات، استفاده از نانوزیم‌هایی با پایداری و فعالیت شبه آنزیمی بالا در واکنش های کاتالیز شده با آنزیم است[۱۸]. در میان نانومواد مختلف با فعالیت شبه آنزیمی، نانوذرات مبتنی بر فلزات به دلیل فعالیت شبه آنزیمی بالا، پایداری بالا و خواص سبز منحصر به فرد، به عنوان جایگزینی عالی برای آنزیم‌ها در نظر گرفته می‌شوند[۱۱، ۱۵]. از میان این نانوزیم‌ها، نانوذرات نقره به دلیل آماده‌سازی ساده، ارزان قیمت بودن، زیست سازگاری و خواص نوری عالی و نیز فعالیت شبه پراکسیدازی بالا در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، این موضوع به خوبی شناخته شده است که خواص نوری نانوذرات نقره اصلاح نشده نسبت به شرایط محیطی (مانند نور، اکسیژن هوا و غیره) بسیار حساس است. از این رو، معمولاً نانوذرات نقره باید توسط تثبیت‌کننده‌ها (به عنوان مثال، پلیمرهای زیستی، تثبیت کننده های زیستی و غیره) اصلاح و تثبیت شوند تا ویژگی‌های نوری خود را حفظ کرده و بتوان آنها را برای کاربردهای عملی استفاده نمود. در این راستا، سنتز زیستی نانوذرات نقره با مواد زیستی مانند عصاره جلبک[۲۳]، کیتوزان[۲۴]، عصاره درمنه[۲۵]، ماکروجلبک[۲۶] و عصاره گیاه بارهنگ[۲۷] به عنوان هم تثبیت کننده و هم عامل احیا برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است تا بتوان از کاهش قابل توجه جذب نوری نانوذرات در طول ذخیره سازی آنها از طریق افزایش پایداری در برابر شرایط محیطی به واسطه محافظت با عوامل محافظتی جلوگیری نمود. به این طریق خواص نوری نانوذرات نقره برای کاربردهای علمی و طراحی حسگرهای رنگ سنجی قابل کاربرد می‌شوند. با این حال بر اساس بهترین دانش ما، اطلاعات علمی در مورد پایداری خواص کاتالیزوری نانوذرات نقره اصلاح نشده در برابر شرایط محیطی مانند نور و اکسیژن هوا محدود است. هم‌چنین تاکنون هیچ مطالعه‌ای برای مشخصه‌یابی بیوشیمیایی این نانوذرات انجام نشده و نیز پارامترهای سینتیکی آنها تعیین نشده است. از این رو، در این پژوهش، نانوذرات نقره اصلاح نشده سنتز و اندازه، خواص مورفولوژیکی، خواص اپتیکی و خواص نانوزیمی آنها مشخص شد. مشخصه‌یابی بیوشیمیایی به جهت اندازه‌گیری شرایط بهینه فرآیند نانوزیمی/آنزیمی بر نانوزیم‌های سنتزشده و بررسی میزان پایداری آنها در برابر تغییرات محیطی انجام پذیرفت. پس از آن، پایداری فعالیت نانوزیمی نانوزیم‌های آماده‌شده در شرایط مختلف ذخیره‌سازی بررسی شد و اثرات نور روز و اکسیژن هوا بر فعالیت نانوزیمی به عنوان شاخص آن بررسی گردیدند. در نهایت پایداری ذخیره‌سازی (طول عمر نگهداری) این نانوزیم‌ها به عنوان یک شاخص ویژه برای تعیین قابلیت به کارگیری آنها در کاربردهای عملی تعیین گردید. در نهایت مطالعات سینتیکی، برای تعیین پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده انجام پذیرفت.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و وسایل

تمامی مواد مورد استفاده در درجه‌ی آنالیز از شرکت مرک خریداری شدند. لازم به ذکر است که آب بدون یون از شرکت زلال طب شیمی تهیه شد. یک اسپکتروفتومتر مرئی–فرابنفش مدل Ultrospec 4000 تولید شده توسط Pharmacia Biotech برای بررسی رفتار جذبی نانوذرات نقره و نیز بررسی‌های نانوزیمی و اندازه‌گیری فعالیت ویژه و فعالیت نسبی نانوزیم نقره اصلاح نشده مورد استفاده قرار گرفت. pH تمامی محلول‌ها و نیز بافرهای مورد استفاده با یک pH متر مدل متراهم ۸۲۷ در مقادیر مورد نظر تنظیم شد. تصویر TEM از نانوزیم طراحی شده با میکروسکوپ الکترونی

عبوری (Zeiss، مدل EL10C) که با ولتاژ شتاب دهنده ۸۰ کیلو ولت کار می کند، ثبت شد. اندازه‌گیری DLS برای تعیین دقیق اندازه نانوزیم سنتز شده با استفاده از یک آنالایزر اندازه ذرات مدل SALD-301 V، Shimadzu انجام گردید.

۲-۲- سنتز نانوزیم نقره

نانوذرات نقره در این پژوهش با استفاده از روشی که قبلا گزارش شده سنتز شدند[۲، ۲۸]. برای این کار ۱۰ میلی لیتر مخلوط از محلول ۵۰ درصد حجمی نیترات نقره ۱۰/۰ میلی‌مولار و سدیم سیترات ۱۰/۰ میلی‌مولار تهیه شد و سپس با ۹۰ میلی لیتر آب بدون یون به حجم رسید. پس از ۲۰ دقیقه چرخش در دمای محیط ۹ میلی‌گرم سدیم بورهیدرات به آن افزوده شد و سنتز نانوزیم نقره اصلاح نشده برای ۲ ساعت ادامه یافت. سپس، نانوزیم سنتز شده بدون هیچ گونه اصلاح‌سازی یا پایدارسازی اضافی جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری شد.

۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت ویژه و باقی مانده شبه-پروکسیدازی نانوزیم سنتزشده

برای این کار، به یک میلی‌لیتر بافر استات (۰/۳ مولار با pH برابر ۴/۰)، ۲۰/۰ میکرولیتر محلول هیدروژن پراکسید (۸۰ میکرومولار)، و۵۰ میکرولیتر از محلول تترامتیل بنزیدین(غلظت نهایی در محلول واکنش، ۰/۴ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس، ۸۰ میکرولیتر نانوزیم به آن افزوده شد و محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط به حال خود رها شد. پس‌از آن برای برآورد فعالیت آنزیمی، جذب محصول واکنش اکسیداسیون در ۶۵۸ نانومتر ثبت شد. لازم به ذکر است که فعالیت ویژه نانوزیم ها ($\mu M\ min^{-1}$) با استفاده از ضریب جذب محصول اکسیداسیون در طول موج ۶۵۸ نانومتر (ε=39000) محاسبه شد. قابل ذکر است که فعالیت نسبی و باقیمانده نانوزیم ها به ترتیب با معادلات ۱ و ۲ محاسبه شدند[۱۹]:

$$\text{فعالیت نسبی} = \frac{\text{فعالیت}}{\text{فعالیت بیشینه}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

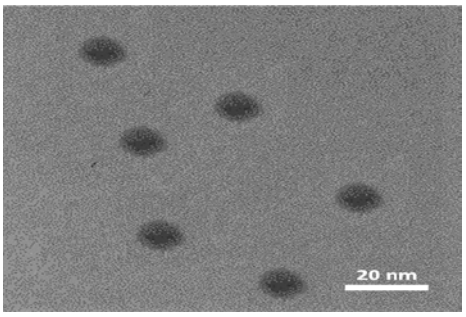
$$\text{فعالیت باقی‌مانده} = \frac{\text{فعالیت}}{\text{فعالیت کنترل}} \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی نانوزیم نقره اصلاح‌نشده

۳-۱-۱-بررسی اندازه و خواص مورفولوژیکی

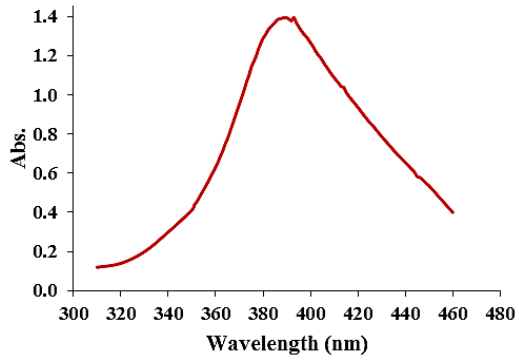
اندازه و خواص مورفولوژیکی نانوذرات نقره اصلاح نشده با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخص شد. در این راستا، تصویر TEM از نانوآنزیم آماده شده ثبت شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل نشان داده شده است، نانوذرات نقره آماده شده مورفولوژی یکنواخت با ذرات کروی را نشان دادند. علاوه بر این، نانوزیم‌های آماده شده توزیع اندازه باریکی را بین ۱۰/۳-۱۲/۶ نانومتر با اندازه متوسط ۱۱/۰ نانومتر نشان دادند.



شکل ۱. تصویر TEM نانوزیم سنتزشده.

۳-۱-۲-بررسی رفتار جذبی و ساختار کریستالی

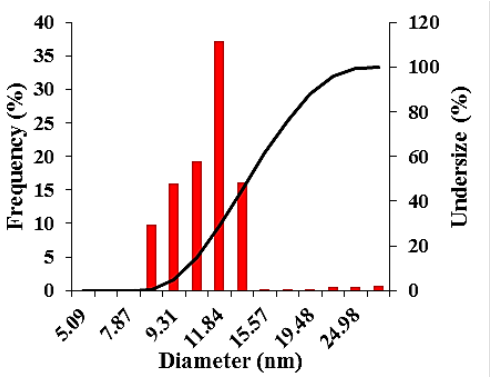
خواص نوری نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده با استفاده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش بررسی شد. برای این منظور طیف جذبی این نانوزیم‌ها در محدوده‌ی ۴۸۰-۳۳۰ نانومتر ثبت گردید و نتایج در شکل ۲ نشان داده شدند. همانطور که در این شکل مشخص است نانوزیم سنتز شده یک طیف نسبتاً متقارن در ناحیه مرئی با بیشینه‌ی جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر از خود نشان می‌دهد.



شکل ۲. طیف اسپکتروفتومتری نانوزیم نقره‌ی سنتز شده.

۳-۱-۳-بررسی توزیع اندازه ذرات

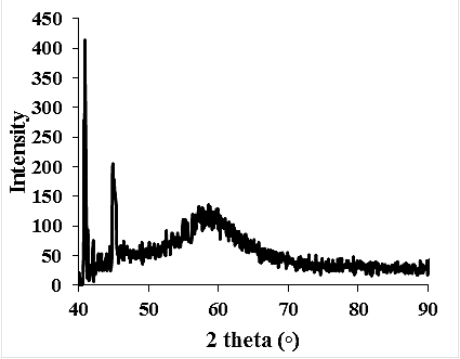
برای دقیق گزارش کردن توزیع اندازه ذرات نانوزیم نقره با توجه به تاثیر اندازه نانوزیم‌ها بر خواص شبه آنزیمی آنها[۱۱]، توزیع اندازه ذرات نانوزیم نقره اصلاح نشده با استفاده از آنالیز DLS برآورد گردید. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. مطابق این شکل نانوزیم‌های سنتزشده دامنه توزیع اندازه باریکی در محدوده ۸/۲-۱۳/۲ با اندازه میانگین ۱۱/۸ نانومتر نشان می‌دهند که با نتایج آنالیز TEM تطابق خوبی دارد.



شکل ۳. هیستوگرام DLS (توزیع اندازه ذرات) نانوزیم سنتزشده.

۳-۱-۴-بررسی خواص کریستالی

خواص کریستالی نانوزیم نقره سنتز شده با استفاده از آنالیز XRD بررسی گردید. نتایج این آنالیز در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، نتایج آنالیز پراش پرتو ایکس حاکی از وجود سه پیک در زوایای پراش برابر ۴۰/۵، ۴۴/۸، و ۵۹/۹ درجه برای نانوزیم نقره سنتز شده می‌باشد که مربوط به ساختار مکعبی نقره می‌باشد. طیف مشاهده شده با طیف گزارش شده برای نانوذرات سنتز شده در حضور سیترات (مشابه پژوهش حاضر) مشابهت و همخوانی خوبی دارد[۳۳].



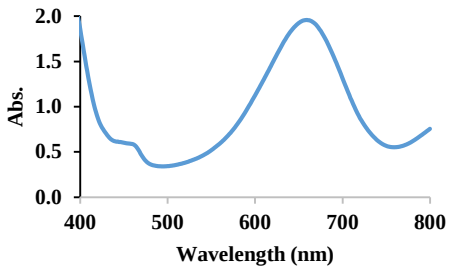
شکل ۴. الگوی XRD نانوزیم سنتز شده

۳-۱-۵-بررسی رفتار نانوزیمی

فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات نقره اصلاح نشده با استفاده از ۳،۳'،۵،۵'-تترامتیل بنزیدین (TMB) به عنوان سوبسترای پراکسیدازی و محصول اکسیداسیون آبی رنگ آن (یعنی Ox-TMB) به عنوان یک سیستم کاوشگر تجزیه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آنالیز که برای تعیین کمی فعالیت ویژه نانوزیم انجام گردید در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل قابل مشاهده است، در حضور TMB، نانوزیم های سنتز شده فرآیند اکسیداسیون TMB با پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کنند تا رادیکال کاتیون آبی رنگ مربوطه آن (Ox-TMB) با یک شانه‌ی جذبی در طول موجهای ۴۸۰-۴۴۰ نانومتر با بیشینه‌ی جذب در ۴۶۰ نانومتر و یک طیف متقارن در دامنه‌ی طول موجی ۷۵۰-۵۰۰ نانومتر با بیشینه‌ی جذب در طول موج ۶۵۸ نانومتر تولید شود. در واقع، در طول اکسیداسیون نانوزیم های نقره، رادیکال‌های هیدروکسیل فعال را با اثر بر پراکسید هیدروژن تولید می‌کنند[۲، ۸، ۱۰، ۱۳]. سپس رادیکال‌های تولید شده، مولکول‌های TMB را از طریق یک مسیر اکسیداسیون برگشت پذیر دو الکترونی به کاتیون رادیکال‌های مربوطه اکسید می‌کنند. لازم به ذکر است که زمانی که ۷۵ میکرومولار پراکسید هیدروژن به عنوان عامل اکسنده و pH محیط برابر ۴ باشد، فعالیت ویژه نانوزیم های آماده شده در حدود ۵/۰۲ میکرومولار در دقیقه محاسبه شد. در مقایسه با نانوذرات نقره پایدار شده با کیتوسان[۲۹] این نانوذرات فعالیت نانوزیمی بهتری نشان دادند. دلیل این امر می‌تواند مربوط به اثر محدودیت‌های نفوذ (در مورد نانوذرات پایدار شده با کیتوسان سوبسترا باید از پلیمر عبور کرده تا به جایگاه فعال برسد و واکنش رخ دهد)، در دسترس بودن جایگاه‌های فعال نقره برای واکنش با سوبسترای نانوزیمی[۲۰-۲۲] و نیز تفاوت اندازه ذرات نانوزیم‌ها[۱۱] باشد.

۳-۲- بررسی عملکرد بیوشیمیایی نانوذرات نقره

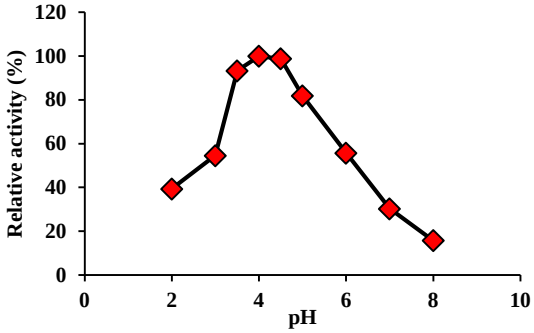
مشخصه‌یابی بیوشیمیایی نانوزیم سنتزشده با تعیین دامنه‌ی pH بهینه و نیز تعیین دامنه بهینه‌ی حرارتی برای بهترین عملکرد نانوزیم با بیشینه فعالیت شبه‌آنزیمی انجام پذیرفت.



شکل ۵. بررسی فعالیت ویژه شبه آنزیمی نانوزیم سنتز شده.

۳-۲-۱-تعیین دامنه‌ی pH بهینه

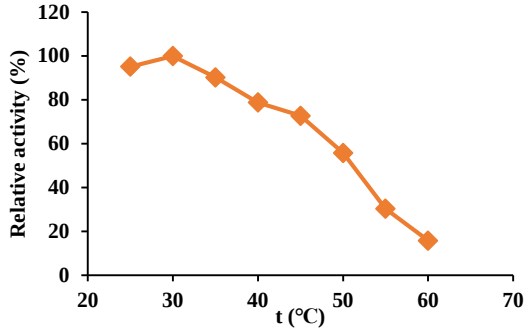
دامنه‌ی pH بهینه برای تعیین بهترین عملکرد نانوزیم نقره اصلاح نشده و نیز بررسی میزان پایداری این نانوزیم‌ها در مقابل تغییرات pH محیط از طریق اندازه‌گیری فعالیت نسبی نانوزیم در pHهای مختلف در محدوده‌ی ۸-۲ بررسی گردید. نتایج این آزمایشات در شکل ۶ نشان داده شده‌اند. مطابق این نتایج، بیشینه‌ی فعالیت نانوزیمی این نانوزیم‌ها در محدوده pH برابر ۴/۵-۳/۵ برآورد گردید. لازم به ذکر است که در pH برابر ۵ نیز در حدود ۸۲ درصد از فعالیت بیشینه‌ی نانوزیم حفظ می‌شود که نشان از پایداری بسیار خوب این نانوزیم‌ها در برابر تغییرات pH محیط می‌باشد[۲۰-۲۲].



شکل ۶ دامنه‌ی pH نانوزیم نقره اصلاح نشده (پایداری در برابر تغییرات pH محیط)

۳-۲-۲- تعیین دامنه‌ی حرارتی بهینه

دامنه‌ی حرارتی بهینه برای تعیین بهترین عملکرد نانوزیم نقره اصلاح نشده در دماهای مختلف و نیز بررسی میزان پایداری آنها در مقابل تغییرات دمایی محیط از طریق اندازه‌گیری فعالیت نسبی نانوزیم در محدوده‌ی دمایی ۶۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. نتایج این آزمایشات در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. مطابق این شکل بیشینه‌ی فعالیت نانوزیمی نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده در دمای برابر ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد برآورد گردید. البته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) این نانوزیم‌ها در حدود ۹۵ درصد از فعالیت بیشینه‌ی خود را حفظ می‌کنند که این کاهش ۵ درصدی در فعالیت نسبی قابل چشم‌پوشی می‌باشد. همچنین در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حدود ۹۰ درصد فعالیت نسبی نانوزیم حفظ شده است. به هرحال نتایج نشان می‌دهد که در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت نسبی نانوزیم‌های سنتزه شده رو به کاهش می‌گذارد که با روندهای گزارش شده با آنزیم‌های طبیعی مطابقت بالایی دارد[۲۰-۲۲]. مطابق این نتایج، نانوزیم سنتزشده دامنه حرارتی بسیار خوبی دارد و نسبت به تغییرات دمایی محیط به خوبی مقاومت نشان می‌دهد.



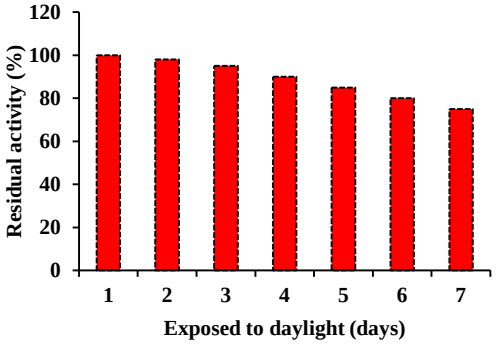
شکل ۷ . دامنه‌ی حرارتی نانوزیم نقره اصلاح نشده (پایداری در برابر تغییرات دمای محیط).

۳-۳- اثر شرایط نگه‌داری فعالیت و پایداری نانوزیم سنتزی

۳-۳-۱- اثر نور روز

اثر نور روز بر فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات نقره اصلاح نشده با قرار دادن آنها در معرض نور روز تحت نگهداری در دمای محیط به مدت ۷ روز ارزیابی شد. فعالیت نانوزیم‌های آماده‌شده در روز اول به‌عنوان کنترل (فعالیت کنترل) استفاده شد و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد، سپس فعالیت باقی‌مانده نانوزیم‌ها در برابر این کنترل به صورت روزانه برآورد شد تا پایداری آنها در مواجهه با نور روز بررسی شود. نتایج نشان داده شده در شکل ۸ نشان می دهند که فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزیم‌های آماده شده پس از قرار گرفتن در معرض نور روز کاهش یافته و پس از ۷ روز ذخیره سازی به حدود ۷۵ درصد از مقدار اولیه خود رسیده است. این کاهش فعالیت می‌تواند به تجمع نانوذرات توسط نور مرتبط باشد. تجمع

نانوذرات منجر به افزایش اندازه آنها شود. همانطور که قبلاً گزارش شده است افزایش اندازه نانوزیم‌ها در نهایت منجر به کاهش عملکرد کاتالیزوری و در واقع کاهش فعالیت نانوزیمی آنها می شود[۱۱]. علاوه بر این، نور روز می‌تواند اکسیداسیون سطحی این نانوذرات را کاتالیز کند که باعث کاهش فعالیت کاتالیزوری آنها می‌شود.

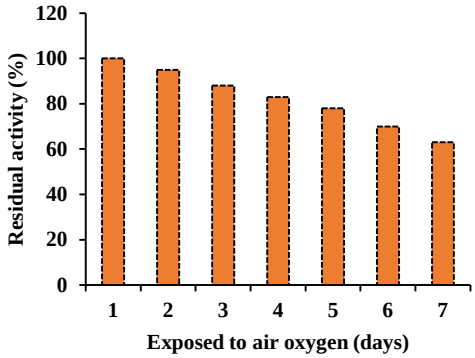


شکل ۸. تأثیر نور روز بر فعالیت شبه پراکسیداز نانوزیم‌های آماده شده

۳-۳-۲- اثر اکسیژن هوا

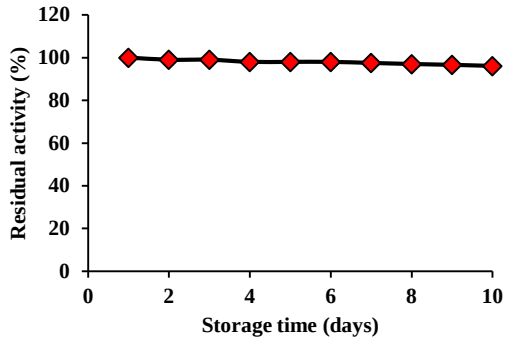
این یک موضوع کاملاً شناخته شده است که در هوای آزاد، اکسیژن هوا می‌تواند بر نانوذرات نقره‌ی اصلاح نشده تأثیر بگذارد، فرآیندهای اکسیداسیون سطحی را انجام دهد و در نتیجه فعالیت کاتالیزوری این نانوزیم‌ها را کاهش دهد. از این رو، اثر اکسیژن هوا بر فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات نقره اصلاح‌نشده با نگهداری آنها در هوای آزاد و دمای محیط به مدت ۷ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت نانوزیم‌های آماده شده در روز اول به عنوان کنترل استفاده شد و ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد، سپس فعالیت باقیمانده‌ی نانوزیم ها به صورت روزانه محاسبه شد تا پایداری آنها در مواجهه با اکسیژن هوا بررسی شود. قابل ذکر است، برای بدست آوردن نتایج دقیق‌تر، محلول‌های نانوزیم با فویل آلومینیم پوشانده شدند (برقراری شرایط تاریکی) تا تأثیر نور روز بر فعالیت آن‌ها حذف شود و بتوان تغییر در فعالیت نانوزیمی را تنها به اثر اکسیژن مرتبط دانست. نتایج نشان داده شده در شکل ۹ نشان می‌دهد که فعالیت این نانوزیم‌ها پس از قرار گرفتن در معرض اکسیژن هوا کاهش یافته و پس از ۷ روز نگهداری در هوای آزاد به حدود ۶۳ درصد رسیده است.

۳-۳-۳- پایداری ذخیره سازی (ماندگاری)



شکل ۹. اثر اکسیژن هوا بر فعالیت نانوزیمی نانوزیم نقره اصلاح نشده.

پایداری ذخیره‌سازی (طول عمر نگهداری) این نانوزیم‌ها به عنوان یک شاخص ویژه برای تعیین قابلیت به کارگیری آنها در کاربردهای عملی تعیین گردید. برای این کار ماندگاری (پایداری ذخیره سازی) نانوزیم های آماده شده در شرایط معمول ذخیره سازی نانوذرات نقره (یعنی ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۱۰ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل نشان داده شده است، نانوزیم های آماده شده حدود ۹۶ درصد از فعالیت اولیه خود را پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه در شرایط تاریک ذخیره کردند. با توجه به این نتایج، می توان نتیجه گرفت که در شرایط نگهداری مناسب، نانوذرات نقره اصلاح نشده می توانند به عنوان جایگزین های آنزیمی عالی برای انجام واکنش های کاتالیز شده توسط آنزیم با فعالیت شبه آنزیمی بالا و ماندگاری بسیار خوب استفاده شوند.



شکل ۱۰. پایداری ذخیره‌سازی (طول عمر نگهداری) نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده.

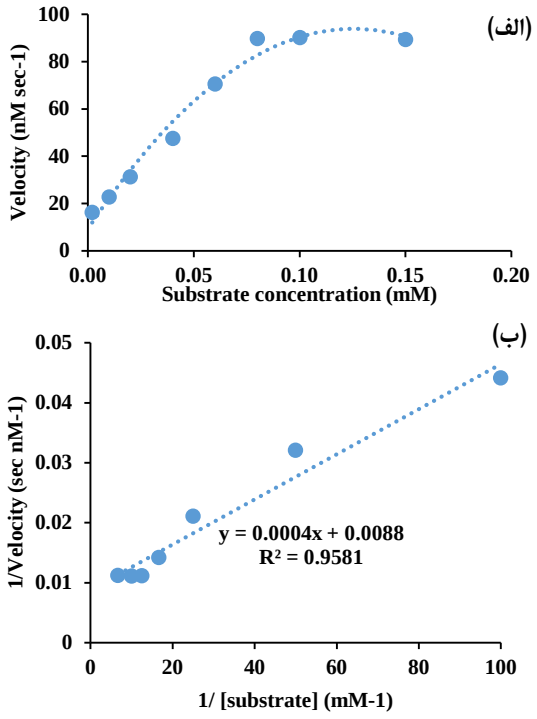
۳-۳- برآورد پارامترهای سینتیکی

مطالعات سینتیک برای برآورد پارامترهای سینتیکی (K_m و V_{max}) فرآیند نانوزیمی/آنزیمی کاتالیزشده با نانوزیم نقره اصلاح نشده به

عنوان نانوآنزیم شبه پراکسیدازی انجام پذیرفت. به خوبی شناخته شده است که مقدار V_{max} منعکس کننده ویژگی‌های ذاتی آنزیم/نانوزیم است و به عنوان بالاترین سرعت ممکن فرآیند آنزیمی/نانوزیمی (بازده کاتالیزوری) تعریف می‌شود که در این آستانه تمام مولکول‌های آنزیم یا تمام ذرات نانوزیم با سوبسترا اشباع شده باشند[۲۲-۲۰]. هرچه این عدد بیشتر باشد نشان بازده کاتالیزوری بالاتر آنزیم/نانوزیم می‌باشد. در مقابل تمایل سوبسترای یک آنزیم/نانوزیم برای برهمکنش با جایگاه فعال آن با مقدار K_m نمایه می‌شود که مقادیر کمتر آن به برهم‌کنش‌های قویتر بین سوبسترا و آنزیم/نانوزیم اشاره دارد[۱۹]. تخمین پارامترهای سینتیکی نانوزیم با اندازه گیری سرعت اولیه واکنش نانوزیمی به عنوان تابعی از غلظت سوبسترای آنزیمی انجام شد. برای این‌کار هیدروژن پراکسید به عنوان سوبسترای آنزیم انتخاب گردید زیرا نانوزیم نقره فعالیت شبه آنزیم پراکسیداز از خود نشان می‌دهد و بنابراین سوبسترای استاندارد آنزیم پراکسیداز برای برآورد پارامترهای سینتیکی این نانوزیم مورد استفاده قرار گرفت. منحنی میخائیل-منتن (Michealis-Menten) در شکل ۱۱-الف نشان داده شده است. همچنین نمودار خطی لاین‌ویور-بارک (Lineweaver-Burk) برای برآورد دقیق پارامترهای سینتیکی نانوزیم نقره اصلاح نشده تهیه شد و نتایج آن در شکل ۱۱-ب نشان داده شده‌اند. ارزیابی پارامترهای جنبشی K_m و V_{max} به ترتیب با استفاده از شیب و عرض از مبدأ نمودار خطی لاین‌ویور-بارک انجام پذیرفت[۲۰-۲۲]. لازم به ذکر است که معادله لاین‌ویور-بارک به صورت معادله ۳ تعریف می شود[۲۰-۲۲]:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (۳)$$

در شرایط بهینه‌ی عملکرد نانوزیم نقره (یعنی محدوده pH و دمای بهینه)، پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده به ترتیب برابر ۰/۰۵ میلی‌مولار و ۱۱۳/۶ نانومولار در ثانیه محاسبه شدند که نشان از قدرت نانوزیمی بالای آنها دارد. لازم به ذکر است که پارامترهای سینتیکی حاصل برای نانوزیم مذکور با پارامترهای سینتیکی گزارش شده برای نانوزیم‌های فلزی و آنزیم پراکسیداز مقایسه گردید و نتایج در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از قدرت نانوزیمی قابل مقایسه این نانوزیم با نانوزیم‌های گزارش شده است.



شکل ۱۰. برآورد پارامترهای سینتیکی نانوزیم نقره (الف) منحنی میخائیل-منتن و (ب) نمودار خطی لاین‌ویور-بارک.

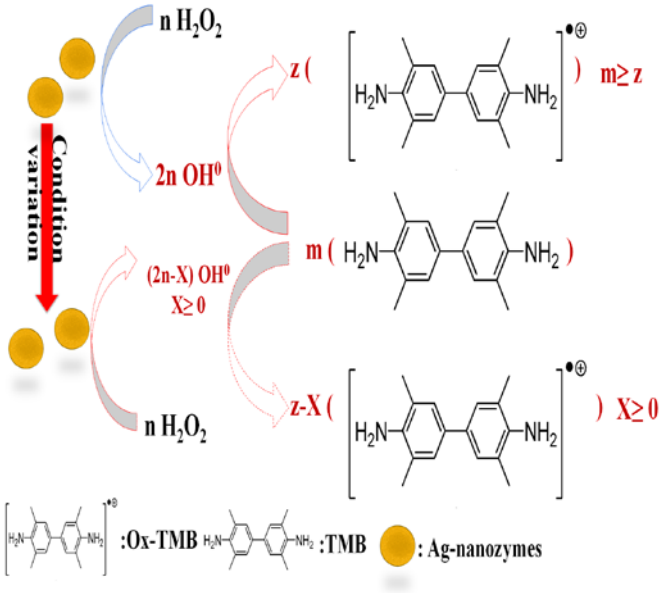
جدول ۱. مقایسه پارامترهای سینتیکی نانوزیم حاضر با نانوزیم‌های دیگر

نانوزیم	K_m (mM)	V_{max} (M sec^{-1})	مرجع
نانوذره آهن	۱۵۴	۹۸	[۳۰]
نانوکلاستر طلا	۰/۰۴	۲۷۵	[۳۱]
آنزیم پراکسیداز	۳/۷	۳۵	[۳۲]
نانوزیم نقره	۰/۰۵	۱۱۳/۶	این کار

۳-٤- اصول حاکم بر پژوهش

همانطور که ذکر شد، نانوذرات نقره با اثر بر هیدروژن پراکسید به تولید رادیکال‌های فعال هیدروکسیل می‌پردازند. این رادیکال‌ها سپس با گرفتن یک الکترون از مولکول TMB منجر به تولید کاتیون رادیکال مربوطه می‌شوند که با رنگ آبی خود قابل تشخیص است و همچنین افزایش جذب در ۶۵۸ نانومتر نیز مؤید اکسیداسیون موفق TMB می‌باشد. نکته قابل ذکر این است که هر چه قدرت کاتالیزوری نانوزیم نقره بیشتر باشد، رادیکال‌های هیدروکسیل بیشتری تولید نموده و در نتیجه میزان پیشرفت فرآیند اکسیداسیون TMB نیز افزایش می‌یابد و به دنبال آن جذب بیشتری در طول موج ۶۵۸ نانومتر قابل مشاهده خواهد بود[۲، ۸،

۱۳]. نانوذرات نقره فعالیت کاتالیزوری بسیار بالایی نشان می‌دهند، با این حال قرار گرفتن در معرض نور و یا اکسیژن می‌تواند فعالیت کاتالیزوری این نانوذرات و در نتیجه میزان تولید رادیکال‌های فعال هیدروکسیل را دستخوش تغییر نماید. به‌علاوه تغییرات pH و دمای محیط واکنش نیز می‌تواند بر فعالیت کاتالیزوری این نانوزیم‌ها مؤثر واقع شود. مطابق این نتایج، شکل ۱۲ برای نمایش اصول حاکم بر پژوهش حاضر ترسیم گردید.



شکل ۱۲. شماتیک مفهومی برای تفصیل اصول حاکم بر پژوهش حاضر

٤- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده با یک روش ساده سنتز شدند و خواص نوری، اندازه، مورفولوژی و رفتار نانوزیمی، نانوزیم‌های سنتز شده مشخص گردید. نتایج نشان داد که نانوزیم سنتزی فعالیت ویژه‌ای به بزرگی ۵/۰۲ میکرومولار در دقیقه از خود نشان می‌دهد که حاکی از فعالیت شبه-آنزیمی بالای آن است. بنابراین، مشخصه‌یابی بیوشیمیایی به جهت اندازه‌گیری شرایط بهینه فرآیند نانوزیمی/آنزیمی بر نانوزیم‌های سنتزشده و بررسی میزان پایداری آنها در برابر تغییرات محیطی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که نانوزیم‌های سنتز شده در دامنه‌ی دمایی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دامنه‌ی pH برابر ۴/۵-۳/۵ بیشینه‌ی فعالیت شبه-آنزیمی خود را نشان می‌دهند. سپس اثر شرایط نگه‌داری بر فعالیت نانوزیمی و طول عمرنگه‌داری نانوزیم سنتزی بررسی گردید. نتایج نشان داد که فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات نقره اصلاح نشده تقریباً در حدود ۷۵ درصد و ۶۳ درصد پس از ۷ روز قرار گرفتن در معرض نور روز و اکسیژن هوا به ترتیب حفظ شد. ماندگاری (پایداری ذخیره سازی) نانوزیم های آماده شده نیز در شرایط نگهداری معمول (یعنی ۴ درجه سانتیگراد در تاریکی) مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که نانوزیم ها پس از ۱۰ روز ذخیره سازی در حدود ۹۶ درصد فعالیت اولیه خود را ذخیره کردند. همچنین مطابق مطالعات سینتیکی، پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای نانوزیم‌های نقره اصلاح نشده به ترتیب برابر ۰/۰۵ میلی‌مولار و ۱۱۳/۶ نانومولار در ثانیه محاسبه شدند که نشان از قدرت نانوزیمی بالای آنها دارد.

مراجع

1. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, J. Chem. Sci., 132, 1 (2020).

2. S.R. Hormozi Jangi, Z. Dehghani, Z. Chemical Research and Nanomaterials, 1, (2023)

3. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Sens. Actuators B: Chem., 339, 129901 (2023).

4. A. Salehzadeh, A. Sadat Shandiz, A.S. Naeemi, Journal of Ilam University of Medical Sciences, 26, 52 (2018).

5. S.R. Hormozi Jangi, Chemical Research and Nanomaterials, 1, 1 (2023).

6. O.V. Salata. J. Nanobiotechnology, 2, 1 (2004).

7. P. Sánchez-Moreno, J. De Vicente, S. Nardecchia, J.A. Marchal, H. Boulaiz, Nanomaterials, 8, 935 (2018).

8. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, G. Absalan, Microchim. Acta, 187, 431 (2020).

9. K.R. Aadil, N. Pandey, S.I. Mussatto, H. J. Environ. Chem. Eng., 7, 103296 (2019).

10. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Microchem., 158, 105328 (2020).

11. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, G. Absalan, Anal. Chim. Acta, 1127, 1 (2020).

12. G. Nikaeen, S. Abbaszadeh, S. Yousefinejad, Nanomed., 15, 1501 (2020).

13. A.R. Hormozi Jangi, M.R. Hormozi Jangi, S.R. Hormozi Jangi, Chin. J. Chem. Eng., 28, 1492 (2020).

14. S.R. Hormozi Jangi, Chem. Papers, 1, 1 (2023).

15. M. Akhond, S.R. Hormozi Jangi, S. Barzegar, G. Absalan, Chem. Papers, 74, 1321 (2020).

16. S.R. Hormozi Jangi, H.K. Davoudli, Y. Delshad, M.R. Hormozi Jangi, A.R. Hormozi Jangi, Surf. Interfaces, 21, 100771 (2020).

17. B. Ahmadi-Leilakouhi, S.R. Hormozi Jangi, A. Khorshidi. Chem. Papers, 77, 1033 (2023).

18. Y. Ezhdehakosh Abolverdi, F. Honarasa, Chem. Res. Nano., 1, 30 (2022).

19. Y. Zhou, B. Liu, R. Yang, J. Liu, Bioconjug. Chem., 28, 2903 (2017).

20. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Process Biochem., 105, 79 (2021).

21. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, M. Process Biochem., 120, 138 (2022).

22. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Z. Dehghani, Process Biochem., 90, 102 (2020).

23. M. Kavousi, D. Fatemi, Pars Journal of Medical Sciences, 17, 17 (2022).

24. K. Shanmugaraj, M. Ilanchelian Microchim. Acta, 183, 1721 (2016).

25. S. Moulaie, A. Mirzaie, E. Aliasgari, KAUMS, 22, 487 (2018).

26. A. Salehzadeh, A. Sadat Shandiz, A.S. Naeemi, Journal of Ilam University of Medical Sciences, 26, 52-61 (2018).

27. G. Nikaeen, S. Yousefinejad, S. Rahmdel, F. Samari, S. Mahdavinia, Sci. Rep. 10, 9642 (2020).

28. H. Li, X. Yan, S. Qiao, G. Lu, X. Su, ACS Appl. Mater. Interfaces 10, 7737 (2018).

29. H. Jiang, Z. Chen, H. Cao, Y. Huang, Analyst, 137, 5560 (2012).

30. L. Gao, Z. Jie, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, Nat. Nanotechnol. 2, 577 (2007).

31. Y. Chang, Z. Zhang, J. Hao, W. Yang, J. Tang, Sens. Actuators B: Chem. 232, 692 (2016).

32. L. Wang, L. Yang, L. Chanfang, Z. Yang, Y. Liu, Y. Wang, H. Rao, W. Zhang, X. Wang, Sci. Rep. 10, 4432 (2020).

33. M. Skiba, A. Pivovarov, A. Makarova, V. Vorobyova, Chem. J. Mold. 13, 7 (2018).

Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

Kinetics and biochemical characterization of silver nanozymes and investigating impact of storage conditions on their activity and shelf-life

S. R. Hormozi Jangi*, Z. Dehghani

Hormozi Laboratory of Chemistry and Biochemistry, 9861334367, Zabol, Iran

Abstract: In this contribution, bare silver nanozymes were synthesized by a simple method, and their optical properties, size, morphology, crystalline structure, and nanozymatic behavior were evaluated. The as-prepared nanozymes reveal a specific activity as high as 5.02 μM min^{-1}, therefore, their biochemical characterization was performed to investigate their stability against environmental changes such as pH and temperature variations, revealing maximum nanozyme activity over pH range of 3.5-4.5 at 25-30 ℃. Thereafter, the impact of the storage conditions on the nanozyme activity and shelf-life were investigated, revealing that the activity of the as-prepared nanozymes was retained at about 75% and 63% after exposing to light and air oxygen for 7 days, respectively. Besides, based on kinetics studies, K_m, and V_{max} of these nanozymes were calculated as 0.05 mM and 113.6 nM sec^{-1}, in turn, revealing their high nanozyme activity and catalytic efficiency. Finally, the shelf-life (storage stability) of the as-prepared nanozymes was investigated under common storage conditions (i.e. 4°C in the dark), revealing that 96% of the initial activity of nanozymes was saved after 10 days of storage.

Keywords: Nanozyme storage stability, Nanozyme biochemical characterization, Nanozyme activity, Silver nanozyme, Kinetic parameters

*Corresponding Author Email: *saeedrezahormozi@gmail.com*