(مقاله پژوهشی)

سنتز سبز نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) و ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی آن

سید هاشم اخلاقی فیض آباد[1*]، محمد مهرشاد[1]، حمید شهیدی مقدم[2]، سید ابوالفضل موسوی[3]

۱. گروه شیمی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد شیمی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۳. دانش آموخته کارشناسی شیمی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱

چکیده

گیاه دارویی زنیان متعلق به خانواده چتریان است. در این تحقیق ابتدا عصاره آبی زنیان تهیه شده و از این عصاره برای کاهش یون نقره به نانوذرات نقره استفاده شد. نانوذرات حاصله از این روش توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف سنج مادون قرمز، اسپکتروسکوپی فرابنفش- مرئی و آنالیز اندازه ذرات مشخصه یابی شدند. آنالیز اندازه ذرات، میانگین ۴۰ نانومتر را برای نانوذرات سنتزی نشان داد. به علاوه، خواص آنتی اکسیدانی عصاره آبی و نیز محلول محتوی نانوذرات نقره با استفاده از روش DPPH اندازه‌گیری شد. در ادامه محتوای فنلی تام عصاره مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت.

واژه های کلیدی: زنیان، سنتز سبز، نانوذرات نقره، میکروسکوپ الکترونی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی .

*مسئول مکاتبات: hashemakhlaghi@hotmail.com

۱ – مقدمه

زنیان گیاهی دارویی با نام علمی *Trachyspermum ammi* L. متعلق به خانواده چتریان است (۷). زنیان از قدیم به عنوان ادویه و نگهدارنده مواد غذایی مورد استفاده بوده است. در طب سنتی از بذر و ریشه گیاه زنیان به عنوان تونیک و زیاد کننده تنفس و برای مداوای ترش کردن به کار می‌رود. در طب مدرن افزون بر این خواص به عنوان ضد عفونی کننده قوی، برای تقویت هاضمه و در مصرف خارجی به عنوان درمان رماتیسم کاربرد دارد (۴). عصاره بذر زنیان در داروهای ضد سرفه و مشتقات اپوکسی به کار می‌رود. در هند و افغانستان به عنوان طعم دهنده در غذاهای آماده و انواع نان به کار می‌رود. با توجه به مقاومت روز افزون باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مشتق از میکروارگانیسم‌ها، دستیابی به عوامل ضد میکروبی جدید و موثر امری ضروری و اجتناب ناپذیراست. محققان بر اهمیت استفاده از پتانسیل درمانی گیاهان دارویی در این زمینه تاکید کرده‌اند و معتقدند یکی از گونه‌های دارویی که می‌تواند به عنوان عامل ضد باکتری به کار رود، گیاه زنیان است. پژوهشگران معتقدند از آنجا که تیمول و پیش‌سازهای آن به عنوان مهمترین مواد ضد باکتریایی، با درصد بالایی در اسانس این گیاه وجود دارند، بجز در مورد سودوموناس آئروژینوزا[1] ، اسانس گیاه در رقت‌های بالا اثر ضد باکتریایی قوی از خود نشان داده لذا اثرات ضد میکروبی آن حائز اهمیت می‌باشد (۳). امروزه یکی از بهترین منابع آنتی اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنلی گیاهان می‌باشند (۹). آنتی اکسیدان‌های پلی فنلی یک گروه ویژه از متابولیت های ثانویه را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت ها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکال های آزاد اکسیژن و سایر گونه‌های فعال ایفا می کنند، به طوری که از بروز بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های التهابی، سرطان، دیابت، سکته قلبی، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری می‌نمایند (۵). ترکیبات فنلی شامل گروه کثیری از متابولیت‌های ثانوی است که بسیاری از ترکیبات حلقوی مثل ترکیبات فنلی، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، لیگنین‌ها و حتی اسیدهای آمینه حلقوی مانند تریپتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. این ترکیبات شامل تعداد زیادی از مواد موجود در گیاهان بوده که همگی دارای یک حلقه آروماتیک هستند که بر روی آن یک یا چند عامل هیدروکسیل قرار دارد. ترکیبات فنولی به علت اینکه اغلب به حالت ترکیب با قندها و به صورت گلیکوزید می‌باشند، در آب محلول بوده و در واکوئل سلول‌ها قرار دارند. ترکیبات فنلی به نوبه خود نسبت به اکسیداسیون آنزیمی خیلی حساس بوده و از این رو این مواد ممکن است در طی عملیات استخراج به علت اثر آنزیم‌های اختصاصی فنلاز موجود در سلول‌ها از بین بروند. استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان به کمک الکل جوشان معمولاً مانع از اثر اکسیداسیون آنزیمی شده و از این رو این روش جهت استخراج ترکیبات فنولی به کار می‌رود. روش‌های کلاسیک جهت تشخیص ترکیبات ساده فنلی از روی رنگ شدید سبز، ارغوانی، آبی یا سیاهی که این مواد به حالت محلول با محلول آبی کلرید آهن ٪۱ ایجاد می‌کنند، می باشد(۵). تعداد زیادی از ترکیبات فنولی(بخصوص فلاونوئیدها) را می‌توان بر روی کروماتوگرام از روی رنگ یا فلورسانس حاصله تحت اثر نور فرابنفش تشخیص داد که این رنگ‌ها در اثر مجاورت کروماتوگرام با بخار آمونیاک تغییر یا تشدید می‌یابد. ترکیبات فنلی همگی آروماتیک بوده و از این رو دارای باند جذبی در طیف ماورابنفش می‌باشند. به علاوه طیف ترکیبات فنلی به طور بسیار مشخصی در اثر مجاورت با ترکیبات قلیایی طول موج بالاتری را جذب می‌کنند. یکی از مهمترین انواع آنتی اکسیدان‌های طبیعی، مواد پلی فنولی نظیر ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و سایر مواد پلی فنولی می‌باشند که خصوصیات ضدموتاسیون، ضدسرطان و کاهش قند خون را دارا هستند (۱۰). نانوذرات نقره به علت خواص ضد باکتریایی خود کاربرد گسترده پیدا کرده‌اند. این ذرات بسته به نوع کاربرد، خواص فیزیکی و سیستم زنده درگیر، در اندازه و شکل‌های مختلفی به کار می‌روند. البته در مورد استفاده از آن ها بایستی در محدوده‌ای باشد که ضمن تخریب میکروارگانیسم‌ها و عوامل بیگانه بر سلول‌های انسانی بی اثر باشد. نانوذرات نقره علاوه بر خواص ضد باکتریایی، ویژگی‌هایی از قبیل اثرات ضد قارچی و ضدالتهابی، سازگاری با محیط زیست،

1-Pseudomonas Aeruginosa

غیر محرک و غیر حساسیت زا بودن، عدم ایجاد مقاومت در برابر میکروارگانیسم‌ها، مقاومت در برابر حرارت و پایداری زیاد را دارا هستند. خواص ضد باکتریایی ذرات باعث شده است که در زخم پوشش‌ها، پانسمان‌های زخم و کلیه وسایلی که در فرایند ترمیم زخم نقش دارند، کاربرد گسترده‌ای داشته باشند. استفاده از این ذرات در بیوسنسورها به منظور تشخیص و درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان نیز بسیار ارزشمند است . بعلاوه به کارگیری نقره در کاترها و پروتزهای عروقی ضمن کاهش کلون زایی، مقاومت باکتریایی را بالا می‌برد. روش سنتز نانوذرات نقره از نکات حائز اهمیت در به کارگیری این مواد است، زیرا نانوذرات نقره علاوه بر روش‌های فیزیکی - شیمیایی به صورت بیولوژیکی از طریق قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز سنتز می‌شوند. نانو ذرات نقره از پر کاربرد ترین ذرات در حوزه نانو پس از نانو لوله‌های کربن هستند. نانوذرات نقره عمدتا به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای که از خود نشان می‌دهند در بخش‌های الکترونیکی، نوری، دارویی، بهداشتی و کاتالیتیکی کاربرد فراوان دارند. بنابراین سنتز این ذرات از اهمیت بسزایی برخوردار است. یکی از دلایل کاربرد گسترده این ذرات، به دلیل خاصیت ضد باکتری آنها است. در واقع نانوذرات نقره برای عوامل بیماری زا یک سم تلقی می شوند درحالی که برای بدن انسان، غذاها و بافت‌ها بی ضررند (۱). رامتکه و همکاران توانستند از عصاره آبی برگ گیاه *Ocimum sanctum* نانودرات نقره با ابعاد ۱۸ نانومتر سنتز کنند (۸). در گزارشی دیگر تجردی و همکاران، روش های سنتز نانوذرات نقره را گزارش کردند (۲). سومان و همکاران در سال ۲۰۱۴، تولید نانوذرات طلا را از عصاره ریشه گیاه *Morinda citrifolia* گزارش دادند. برای مشخصه یابی نانوذرات از تکنیک‌های XRD, FTIR, TEM،FE-SEM, EDX و اسپکتروسکوپی UV-Vis استفاده کردند. مشخصه سنتز نانوذرات یک پیک در ۵۴۰ نانومتر بود که توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis تعیین شد . XRD ساختار مکعبی را برای نانوذرات طلا نشان داد. FTIR نقش احتمالی پروتئین‌ها را در تشکیل و تثبیت نانوذرات آشکار ساخت. FE-SEM آشکار کرد که شکل ذرات سه گوش و اغلب کروی هستند. TEMبه وضوح نشان داد که اندازه نانوذرات از ۱۲/۱۷ تا ۳۸/۲۶ نانومتر متغیر می‌باشد (۱۲). آن و همکاران در سال ۲۰۰۸ تایید کردند که پوشش نانوذرات نقره در کاهش رشد میکروبی مارچوبه موثر بوده و باعث افزایش زمان ماندگاری آن شده است. همچنین گزارش کردند که کارایی نانوذرات نقره با ابعاد کوچکتر بیشتر از نانوذرات نقره با ابعاد بزرگ تر می‌باشد که این ناشی از سطح در دسترس بیشتر برای برهم کنش با سلول میکروب می‌باشد (۶).

۲ - مواد و روش‌ها

۲– ۱- مواد شیمیایی

کلیه مواد استفاده شده در این پروژه با خلوص تجزیه‌ای می‌باشند. ۱و۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل، یدروکلریدریک اسید، سدیم هیدروکسید، نیترات نقره، معرف فولین، سدیم کربنات همگی از شرکت مرک تهیه شدند.

۲ -۲- دستگاه‌ها

طیف‌های جذبی و داده‌های جذبی توسط دستگاه‌های طیف سنج جذبی Apel PD-303S UV و PG instrument t70 ثبت شدند. اندازه‌گیری pH با دستگاه pH متر ,pH P353) EDT instrument) انجام شد. همچنین برای اندازه‌گیری وزنی از ترازوی دیجیتال A&D HR-200 استفاده شد. برای جداسازی از سانتریفیوژ Sigma مدل 2-16K و التراسونیک UP200H استفاده شد.

۲– ۳- تهیه محلول‌ها

محلول $AgNO_3$ با غلظت ۳ mM از حل کردن ۰/۰۵ گرم از $AgNO_3$ در بالن ژوژه ۱۰۰میلی‌لیتر تهیه شد. محلول اولیه سود NaOH با غلظت ۰/۱ M از حل کردن ۰/۴ گرم NaOH در بالن ژوژه ۱۰۰ mL تهیه شد. محلول اولیه اسید کلریدریک HCl با غلظت ۰/۱ M از حل کردن ۶۶۰ میکرولیتر اسید کلریدریک در بالن ژوژه ۱۰۰ mL تهیه شد.

۲– ٤- مراحل آماده‌سازی عصاره زنیان

۱۰گرم از پودر خشک شده به درون بشر حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردید. در این زمان به مدت یک ساعت

توسط استیرر هم زده شده و همزمان از انرژی امواج فراصوت (فرکانس 30kHz) استفاده گردید. در انتها عصاره آبی زنیان توسط کاغذ صافی واتمن صاف و برای مراحل بعدی در یخچال نگهداری شد.

۲- ۵- تهیه نانوذرات نقره

برای تهیه نانوذرات نقره با شکل و اندازه یکنواخت اثر پارامترهای مختلف از جمله تاثیر تغییر pH، غلظت عصاره، غلظت $AgNO_3$ و همچنین تاثیر گذشت زمان بر تشکیل نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. توسط داده های جذبی بهینه سازی پارامترهای مختلف موثر بر اندازه نانوذرات انجام گرفت. نقش دستگاه طیف سنج مرئی- فرابنفش به دلیل سادگی کار و سرعت در بهینه سازی پررنگ است. به طوری که با طیف گیری می‌توان سنتز نانو ذرات را تشخیص داد.

۲-٦- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-٦-۱- روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

این روش اولین بار توسط بولیش در سال ۱۹۵۸ میلادی ارائه شد که بعدها توسط پژوهشگران دیگر اصلاح گردید و یکی از مهمترین روش‌های ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی گونه‌های گیاهی می‌باشد. اثر آنتی اکسیدانی اسانس‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (scavenging radical capacity) به کمک ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این روش DPPH یک رادیکال پایدار است که ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن، به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH، در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتی اکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می‌کند. قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌های موجود، با تغییر رنگ ارغوانی محلول آبی دی فنیل پیکریل هیدرازیل به رنگ زرد مشخص می گردد. در ابتدا از عصاره، محلول آبی با غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm تهیه شدند و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول ها با ۲mL محلول ۰/۱ mM از DPPH مخلوط شدند. محلول در شرایط دمای اتاق و بدون نور با سرعت کم هم زده شد و بعد از گذشت ۹۰ دقیقه جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری و درصد بازداری براساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$IP\% = ((A_{blank}-A_{sample})/A_{blank}) \times 100$$

IP%: درصد بازداری آنتی اکسیدان‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد.

A_{blank} : جذب شاهد (که حاوی ۲ mL آب مقطر و ۲ mL از محلول DPPH می باشد).

A_{sample} : جذب نمونه

در مرحله بعد، غلظت عصاره‌ای که بازداری ۵۰ درصد در برابر رادیکال‌ها را فراهم می‌کند، از نمودار رسم شده براساس بازدارندگی عصاره برحسب غلظت عصاره محاسبه می‌گردد.

IC_{50}: غلظتی از آنتی اکسیدان می‌باشد که در آن قدرت بازداری عصاره‌ها ۵۰ درصد است.

۲-٦-۲- روش فولین جهت اندازه گیری محتوای فنولی تام

عموماً برای اندازه گیری محتوای فنولی تام از روش فولین- سیکالتواستفاده میشود. واکنشگر فولین - سیوکالتو یا واکنشکر فولین فنول یا روش تعیین هم‌ارزی گالیک اسید نیز می‌نامند مخلوطی از فسفومولبیدات و فسفو تنگستات است که برای سنجش آنتی اکسیدان‌های فنولی و پلی فنولی به روش رنگ سنجی(colorimetric)استفاده می‌شود. این واکنشگر به افتخار Otto Folin, Vintila Ciocalteu, و Willey Glover Denis به این نام می‌نامند. این واکنشگر فقط برای اندازه‌گیری فنول نیست بلکه با هرگونه مواد احیا شونده؛ واکنش می‌دهند. از اینرو ظرفیت احیای کل نمونه اندازه‌گیری می‌شود نه فقط ترکیبات فنولی. این واکنشگر را باید از واکنشگر فولین متمایز نمود چرا که واکنشگر فولین برای سنجش‌وآشکارسازی‌آمین‌ها و ترکیبات دارای سولفوراستفاده می‌گردد (۱۱). محتوای فنلی تام در نمونه‌های عصاره‌های گیاهی توسط روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. بر طبق

این روش، در لوله آزمایش به ۰/۵ میلی لیتر عصاره‌ها با غلظت ppm ۱۰۰۰ و همچنین محلول‌های استاندارد گالیک اسید (ppm ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ با سه تکرار) مقدار نیم میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و نیز ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و به شدت همزده و بعد از ۵ دقیقه مقدار ۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۵٪ اضافه و مخلوط شد. بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی و در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. محتوای فنلی تام در نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک بیان شد.

۲-۷- بهینه سازی پارامترهای موثر در سنتز نانوذرات نقره

۲-۷-۱- بهینه سازی pH

جهت بهینه سازی مقدار pH، محلولی شامل ۱ میلی‌لیتر عصاره و ۵ میلی‌لیتر نیترات نقره (3mM) تهیه شد. با اضافه کردن یکی از دو محلول NaOH و HCl با غلظت ۰/۱ مولار، هفت سری محلول با pHهای ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ تهیه شد (جدول ۱). جذب همه محلول‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جدول ۱-بهینه سازی pH برای تهیه نانوذرات نقره

حجم محلول	PH محلول	حجم نیترات نقره 3mM	حجم عصاره (mL)	سری محلول (mL)
۱۰	٤	۵	۱	۱
۱۰	۵	۵	۱	۲
۱۰	٦	۵	۱	۳
۱۰	۷	۵	۱	٤
۱۰	۸	۵	۱	۵
۱۰	۹	۵	۱	٦
۱۰	۱۰	۵	۱	۷

۲-۷-۲- بهینه سازی حجم عصاره

هرچه غلظت عصاره بیشتر باشد، احیاء شدن یون‌های Ag^{+} سریعتر انجام می‌شود که نتیجه آن تشکیل نانوذرات نقره خواهد بود. برای بهینه سازی غلظت گیاه، پنج دسته محلول ساخته شد. بطوری که هر دسته از محلول‌ها دارای غلظت های متفاوتی از عصاره بودند در حالی که غلظت نمک نیترات نقره (۳میلی مولار) در هر پنج دسته، ثابت بود. حجم محلول نیترات نقره استفاده شده ۵ میلی لیتر و حجم نهایی مخلوط عصاره و نیترات نقره برای تمام آزمایشات ۱۰ میلی لیتر در نظر گرفته شد و در صورت لزوم با آب مقطر حجم به ۱۰ می رسید (جدول ۲). برای هر دسته از محلول‌ها که پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه تغییر رنگ دادند و به سمت قهوه‌ای متمایل شدند، بلافاصله طیف جذبی آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی - فرابنفش ثبت شد. لازم به ذکر است که محلول بلانکی که استفاده شد شامل عصاره گیاه و آب مقطر بود.

جدول ۲- محلول‌های ساخته شده جهت بهینه سازی حجم عصاره

حجم محلول	PH محلول	حجم نیترات نقره 3mM	حجم عصاره (mL)	سری محلول (mL)
۱۰	۸	۵	۱	۱
۱۰	۸	۵	۲	۲
۱۰	۸	۵	۳	۳
۱۰	۸	۵	٤	٤

۲-۷-۳- بهینه سازی محلول نیترات نقره

هر دسته از محلول‌ها غلظت عصاره ثابت و حجم آن برابر ۳ میلی لیتر در نظر گرفته شد اما پنج حجم مختلف از محلول نیترات نقره ۳ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت. در حجم های بالاتر محلول نیترات نقره، واکنش تقریبا سریع بوده و تغییر رنگ محسوسی مشاهده شد و بلافاصله داده‌های جذبی تک تک آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت شد. حجم نهایی محلول شامل عصاره و محلول نیترات نقره به ۱۰ میلی لیتر رسانیده شد (جدول ۳).

جدول ۳- محلول‌های ساخته شده جهت بهینه سازی غلظت عصاره (حجم)

سری محلول (mL)	حجم عصاره (mL)	حجم نیترات نقره 3mM	PH محلول	حجم محلول
۱	۳	۱	۸	۱۰
۲	۳	۲	۸	۱۰
۳	۳	۳	۸	۱۰
٤	۳	٤	۸	۱۰
٥	۳	٥	۸	۱۰

۲-۷-٤- بهینه سازی مدت زمان انجام واکنش

پنج نمونه محلول شامل ۳ میلی لیتر از عصاره گیاه مذکور به اضافه ۳ میلی لیتر از نمک نیترات نقره ۳ میلی مولار تهیه و برای مدت زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰دقیقه قرار داده شدند (لازم به ذکر است که دمای واکنش همه محلول‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد بودند). پس از گذشت زمان‌های مذکور، داده جذبی هر یک از محلولها در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت شد.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی قدرت آنتی اکسیدانی گیاه به روش (DPPH)

برای بررسی قدرت آنتی اکسیدانی به روش DPPH، از پارامتر IC_{50} استفاده می شود. برای بدست آوردن IC_{50}، ابتدا منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری بر حسب غلظت رسم شد و معادله خط نمودار بدست آمد. سپس در محور y، ۵۰ قرار داده شد. مقدار X ، پارامتر IC_{50} را نشان می دهد که غلظتی از آنتی اکسیدان می باشد که در آن قدرت بازداری عصاره ها ۵۰ در صد است.

معادله خط: $Y= 36.9 + 0.2\ X$

غلظت بازداری ۵۰ درصد برای عصاره آبی IC_{50} = ppm 54.9 به دست آمد.

در حالتی که نانوذرات نقره در محلول وجود دارد خواص آنتی اکسیدانی خیلی بیشتر از محلول عصاره تنها می‌باشد. بر اساس معادله خط محلول نانوذرات نقره حاوی عصاره زنیان، غلظت بازداری ۵۰ درصد برای عصاره آبی حاوی نانوذرات نقره $IC_{50} = 30.3$ ppm به دست آمد.

معادله خط: $Y= 42.9 + 0.2\ X$

۳-۲- تعیین محتوای فنلی تام

با مشخص شدن معادله خط حاصل از نمودار استاندارد گالیک اسید، محتوای فنلی تام نمونه های مورد نظر بر حسب میلی گرم گالیک اسید به ازای گرم عصاره خشک (mg GAE/ g dried extract) تعیین شد. نتایج آزمون محتوای فنلی‌تام برحسب گالیک اسید برای عصاره و محلول نانوذرات نقره با غلظت ۱۰۰۰ppm اندازه‌گیری شد و جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (جدول ۴).

معادله خط نمودار استاندارد گالیک اسید

$Y= 0.02 + 0.008\ X$

جدول ٤- نتایج آزمون ترکیبات فنلی کل برحسب گالیک اسید برای عصاره و محلول نانوذرات نقره

	فولین سیوکالتو	
محلول	جذب	TPC mg GAE/g
نانوذرات نقره	0.214	21.74
عصاره	0.244	26.36

۳-۳- شرایط بهینه بدست آمده برای سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه زنیان

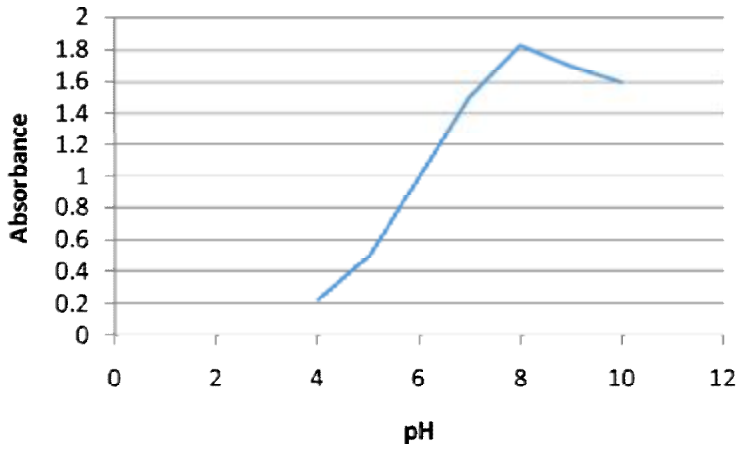
پس از بهینه سازی پارامترهای مختلف برای بدست آوردن بهترین شرایط ممکن جهت سنتز نانوذراتی با سایز کوچکتر و شکل یکنواخت تر، نتایج آن به طور خلاصه در جدول زیر نشان داده شد (جدول ۵). نتایج نشان داد که تغییر هر پارامتر می‌تواند تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر تهیه نانو مواد داشته باشد و سرعت احیای نقره توسط عصاره گیاه را تغییر دهد بعد از حصول شرایط بهینه، یک نمونه از محلول مورد نظر ساخته شد و پس از سنتز نانوذرات و تشکیل رنگ قهوه‌ای پر رنگ، داخل سانتریفیوژ (۶۰ دقیقه) قرار داده شد تا آب اضافی آن جدا و فقط نانوذرات در ظرف باقی بمانند. سپس ظرف در داخل یخچال قرار داده شد. و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۵- شرایط بهینه بدست آمده برای سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه زنیان

مقدار بهینه pH	حجم عصاره (mL)	حجم محلول نقره (mL) با غلظت 3mM	مقدار بهینه زمان
۹	۳	۳	دقیقه

۳-۳-۱- بهینه سازی pH

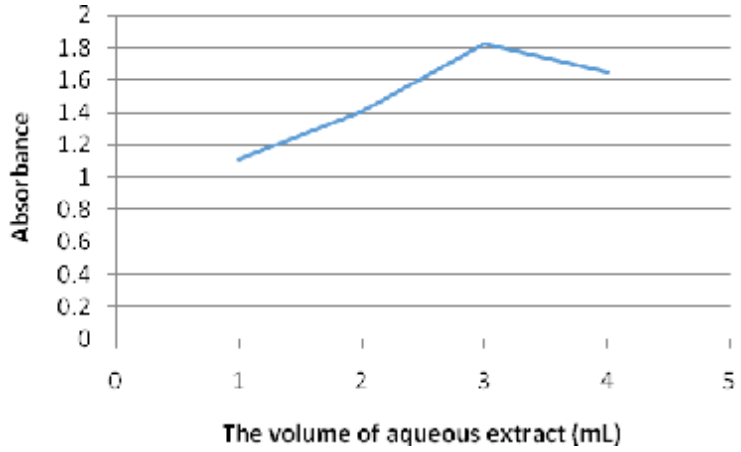
بیشترین میزان جذب را pH = 8 دارا می باشد. می‌توان نتیجه گرفت که در pH برابر با ۸ بر اساس شکل پیک و طیف جذبی اسپکتروفتومتری نانو ذرات نقره پایدار بوده و اندازه آنها نسبتا کوچکتر می‌باشد. به همین دلیل pH = 8 به عنوان بهینه انتخاب شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- تغییرات جذبی مربوط به نانوذرات نقره در pH مختلف

۳-۳-۲- بهینه سازی حجم عصاره

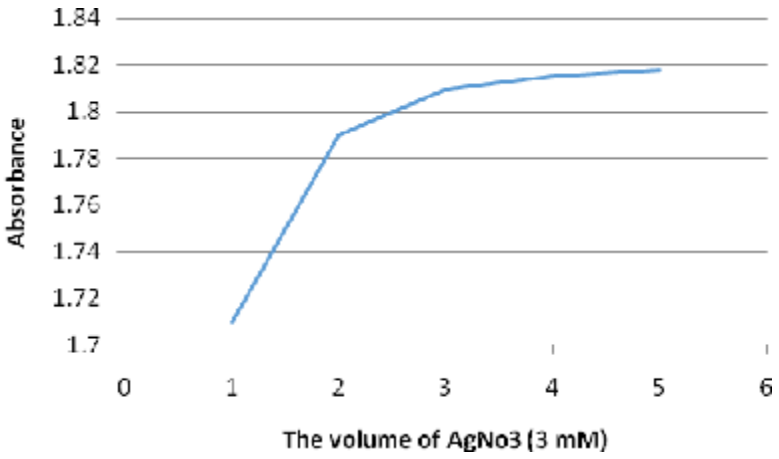
حجم‌های متفاوتی از عصاره مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت حجم ۳ میلی لیتر از عصاره گیاه به عنوان حجم بهینه انتخاب شد زیرا طیف جذبی بالاتری از خود نشان داد. شرایط انجام واکنش عبارت بودند از : محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۳ میلی‌مولار، pH = ۸ ،دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و زمان واکنش ۳۰ دقیقه (نمودار ۲).



نمودار ۲- جذب اسپکتروفتومتری محلول‌های حاوی نانوذرات نقره درحجم‌های مختلف از عصاره .(بهینه سازی عصاره).

۳-۳-۳- بهینه سازی حجم محلول نیترات نقره

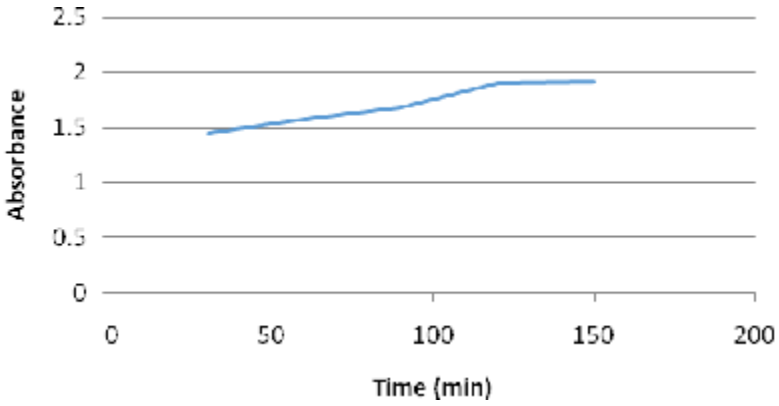
ابتدا محلول 3mM از نمک نیترات نقره تهیه شد و سپس حجم‌های متفاوتی از این محلول وارد واکنش شد. در نهایت حجم ۳ میلی لیتر نمک نیترات نقره با غلظت ۳ میلی مولار به عنوان حجم بهینه شده انتخاب گردید. بعد از این حجم جذب محلول تغییرات قابل توجهی نشان نداد. شرایط انجام واکنش : محلول حاوی ۳ میلی لیتر از عصاره و حجم‌های مختلف از محلول نمک نیترات نقره (3mM)، دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، pH =۸ و زمان واکنش ۳۰ دقیقه (نمودار ۳).



نمودار ۳- جذب اسپکتروفتومتری محلول‌های حاوی نانوذرات نقره در حجم های متفاوت از محلول نیترات نقره.

۳-۳-٤- بهینه سازی زمان واکنش

مشاهده شد که به محض مخلوط کردن واکنشگرها با یکدیگر تغییر رنگ رویت شد. جهت بهینه سازی، جذب محلول واکنش در چند زمان اندازه‌گیری شد. با توجه به بیشترین جذب، زمان لازم برای رسیدن به این جذب به عنوان زمان بهینه انتخاب شد. همان طور که در شکل ۴-۸ آمده است زمان بهینه برای این سنتز سبز ۱۲۰ دقیقه می‌باشد (نمودار ۴).



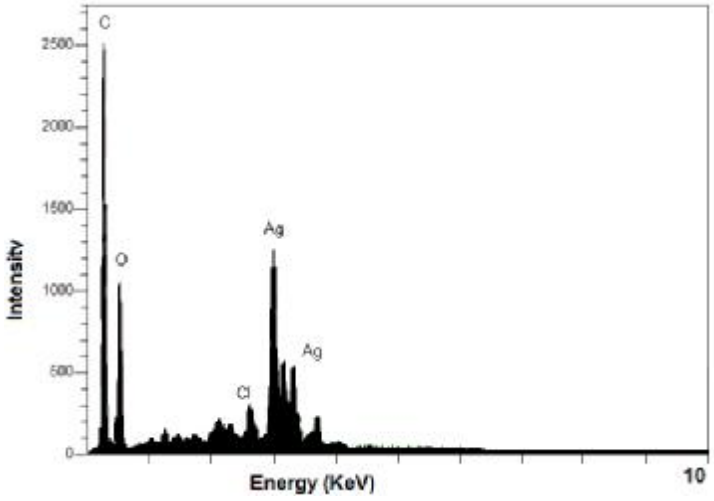
نمودار ٤- جذب نانوذرات نقره در زمان‌های مختلف (بهینه سازی زمان)

۳-٤- روش جداسازی نانو ذرات نقره از محلول

برای جداسازی نانوذرات نقره از محلول، از سانتریفیوژ با دور بالا و مدت زمان ۶۰ دقیقه استفاده شد. نمونه سانتریفیوژ شده را با آب مقطر شستشو داده و برای جداسازی ناخالصی ها با اولتراسونیک دیسپرس و دوباره سانتریفیوژ و با آب مقطر شستشو داده شد. نانوذرات جمع آوری شده برای آزمون های بعدی به ویال اپندرف منتقل شده و در یخچال نگهداری شدند.

۳-۵- شناسایی مواد با استفاده از آنالیز EDAX

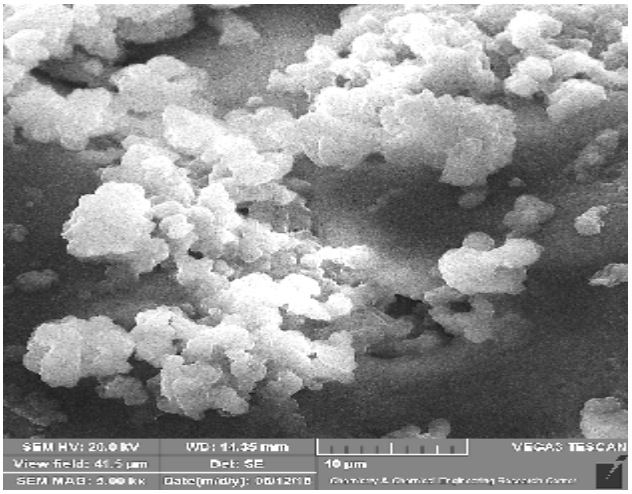
نانوساختارهای نقره توسط پراکنش انرژی اشعه ایکس (EDAX) مورد مطالعه قرار گرفتند و حضور عنصر نقره به خوبی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- طیف EDAX نانوساختار نقره

۳-۶- بررسی ساختاری نانو ذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

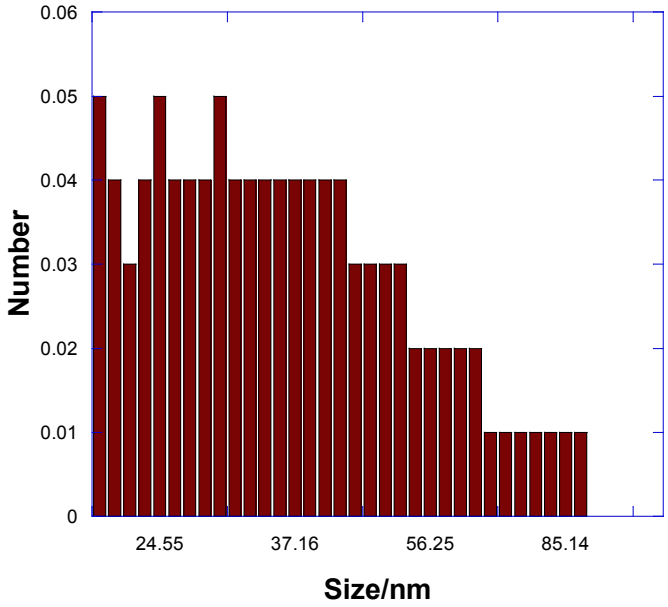
یکی از روش‌های ویژگی یابی نانو ذرات فلزی، استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی است که به کمک آن می‌توان شکل و اندازه نانو ذرات سنتز شده را مشخص کرد. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بدست آمده از نانو ذرات نقره تحت شرایط بهینه ذکر شده)نشان از سنتز نانومواد کروی می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات نقره تولید شده توسط عصاره آبی زنیان

۳-۷- آنالیز اندازه ذرات

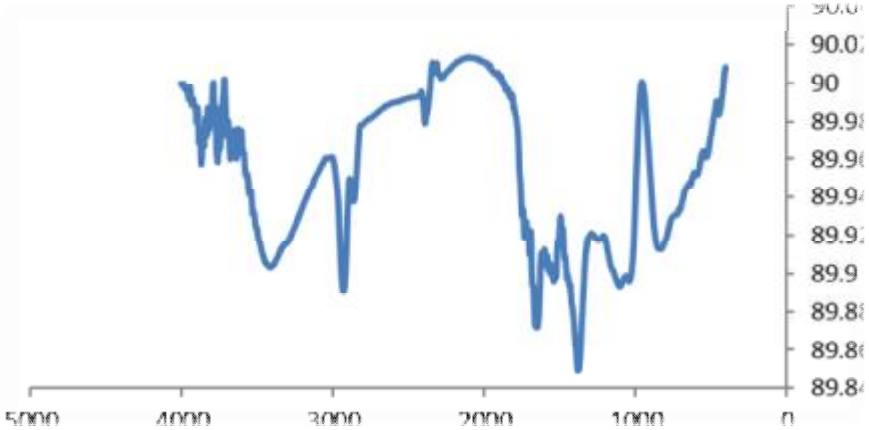
یکی دیگر از آنالیزها برای اندازه‌گیری قطر ذرات روش particle size analyzer است که نمودار آن در شکل ۴-۱۱ آمده است. همان طور که در شکل مشخص است اندازه بزرگترین ذرات ۸۶ نانومتر بوده و همچنین میانگین اندازه ذرات ۴۰ نانومتر است. ذرات دارای توزیع نسبتا یکنواخت در محدوده ۲۰-۳۰ نانومتر دارا می باشند (شکل ۳).



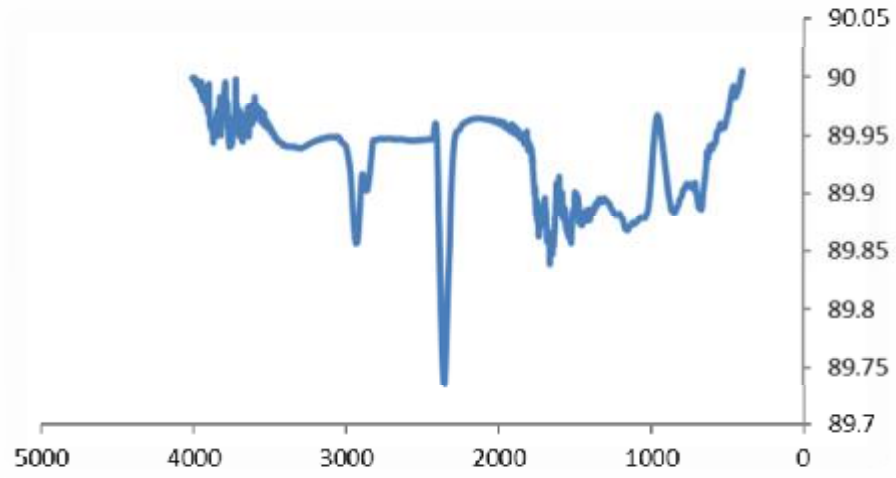
شکل ۳- آنالیز اندازه ذرات که میانگین ٤٠ نانومتر را برای ذرات نقره سنتزی نشان داده است.

۳-۸- آنالیز عصاره و نانوذرات نقره با استفاده از طیف بینی مادون قرمز

طیف مادون قرمز از عصاره بذر زنیان (شکل ۴) و محلول محتوی نانوذرات نقره (شکل ۵) آمده است. با توجه به شکل می‌توان گروه‌های عاملی OH و همچنین C-H آلیفاتیک و آروماتیک و همچنین گروه کربونیل را مشاهده نمود که با ترکیبات ثانویه موجود در عصاره همخوانی دارند.



شکل ٤- طیف مادون قرمز عصاره زنیان



شکل ۵- طیف مادون قرمز نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره زنیان

٤- نتیجه گیری

امروزه تهیه نانوذرات زیستی با توجه به کارایی آنها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است. از سویی دیگر افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرایندهای زیستی، استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست را برای تهیه غیر سمی نانومواد زیستی ضروری کرده است. اگر چه راه‌های گوناگون زیستی برای تهیه زیستی نانو مواد فلزی شناخته شده-اند، استفاده از موجودات زنده و دیگر واسطه‌ها برای تهیه نانومواد فلزی گران و همراه با محدودیت است. استفاده از بستر گیاهی برای سنتز نانوذرات یک روش نوظهور و بر طبق شیمی سبز است و روشی ساده نسبت به روش‌های پیچیده چون الکتروشیمیایی و فتوشیمیایی است. در این تحقیق ابتدا بررسی‌های فیتوشیمیایی برای سنجش قدرت آنتی اکسیدانی و مقدار فنل کل انجام شد. پس از آن از عصاره آبی گیاه زنیان جهت تهیه زیستی نانوذرات نقره استفاده شد.. اگر چه مطالعات نشان داده که استخراج عصاره با برخی حلال‌های آلی بهتر صورت می‌گیرد و نهایتا نانوذراتی با اندازه کوچکتر تهیه می‌شود و تمایل برای کلوخه‌ای شدن کمتر است اما هدف این تحقیق تهیه نانو مواد بر اساس شیمی سبز است. در این تحقیق تنها حلال مصرفی آب بوده که هم ارزان است و هم منطبق با اصول شیمی سبز و هیچ اثر مخرب زیست محیطی ندارد.

٥- منابع

٤. عماد، م. ۱۳۷۸. شناسایی گیاهان دارویی، صنعتی، مرتعی و جنگلی و موارد مصرف آنها، انتشارات توسعه روستایی، تهران..

5.Ames, B. N., Shigenaga, M., Hagen, T. M. 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 22.

6.An, J., Zhang, M., Wang, S., Tang, J. 2008. *Food Science and Technology*, 41(6): 1100.

7.Mozaffarian, V. 2013. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang

١. انصاری، ش. و پازوکی، م. ۱۳۹۰. نانوذرات نقره و خاصیت ضدمیکروبی آن، *ماهنامه فناوری نانو*، سال دهم، ٤١-٣٣.

٢. تجردی، ا. و کیازاده، ع . ١٣٨٦. مقایسه روش‌های تولید نانوذرات نقره، *ماهنامه فناوری نانو*، سال ششم، صفحه ٢١٧-٢٢٢.

٣. زرگری، ع. ١٣٧٦. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران.

Moaser Publications. Tehran, Iran. Pp 1201-1202.
8.Ramtek, C., Chakrabarti Bijayasarangi T. 2013. *Journal of Chemistry*, 2013: 1.
9.Shahidi, F. 2000. Mol. Nutr. Food Res. 44: 63.
10.Shun, Y. M., Wen Y. H., Yong C. Y., Jian G. S. 2003. *Chinese Chemical Letters*, 14: 810.
11.Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent, *Method Enzymol*, 299: 152.
12.Suman, T. Y., Radhika Rajasree, S. R., Ramkumar, R., Rajthilak, C., Perumal, P. 2014. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118: 11.

(Original Research Paper)

Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Aqueous Extracts of *Trachyspermum ammi* L. Seed and Evaluation of the Antioxidant Activity of this Extract

Hashem Akhlaghi Feizabad1[*1], Mohammad Mehrshad [1], Hamid Shahidi Moghaddam[2], Abolfazl Mousavi[3]

1-Department of Chemistry, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2-Msc Graduated of Chemistry, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
3-BSc Graduated of Chemistry, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Received:09/03/2019 Accepted:22/05/2019

Abstract

Research into the preparation of nanomaterials has increased during the past few decades due to the unique industrial properties of these materials. The nanoparticles produced by chemical methods have generated concern due to the hazardous and toxic materials used to make them and possible environmental damage. Silver nanoparticles are of interest because of their biological and medical applications. However the toxic nature of some of the chemical methods to make nanomaterials are in contrast with principles of green chemistry. For this reason, a variety of biological systems have been used. In this study, aqueous extracts of Ajowan (Trachyspermum ammi L.) were prepared and this extract was used to reduce silver (I) to silver nanoparticles. Ajowan, a herbaceous plant, belongs to the family Umbelliferae. The nanoparticles obtained by this method were characterized by transmission electron microscopy, infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy and particle size analysis, which showed an average diameter of 40 nm for synthetic nanoparticles. In addition, the antioxidant properties of the aqueous extract and a solution containing silver nanoparticles was measured using the DPPH technique. Finally, the total phenolic content of the extract was evaluated.

Keywords: Trachyspermum ammi L., Green Synthesis, Silver Nanoparticles, Electron Microscopy, Antioxidant Activity.

[*] Corresponding Author: hashemakhlaghi@hotmail.com