

## مقاله پژوهشی

# مشخصه یابی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه درمنه خراسانی و بررسی برهمکنش آن با پروتئین سرم آلبومین انسانی

آزاده حکمت\* و راضیه رمضان کریمی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۲/۰۸/۲۹

## چکیده

نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل مزایای بی شماری که دارند، به یکی از پرطرفدارترین نانوذرات در زمینه داروسازی تبدیل شده‌اند. سنتز زیستی نانوذرات مزایای متعددی مانند در دسترس بودن، مقرون به صرفه بودن، سمیت کم، بازده بالا و زیست سازگاری تسببت به سایر روش‌های سنتز دارد. پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA) فراوان‌ترین پروتئین در سیستم گردش خون است و میزان اتصال نانوذرات به این پروتئین در میزان دسترسی بافت هدف به نانوذرات موثر است. هدف از این پژوهش، بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره الکلی گیاه بومی درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica*) و بررسی تغییرات ساختاری ایجاد شده بر HSA در هنگام اتصال با نانوذرات نقره از طریق تکنیک‌های طیف سنجی جذب مرئی-فرابنفش، فلورسانس و دورنگ نمای دورانی (CD) و همچنین آنالیز پتانسیل زتا بود. نانوذرات نقره بیوسنتز شده کروی شکل بوده و دارای میانگین اندازه  $21/89 \pm 33/40$  نانومتر، بار سطحی منفی و پایداری متوسط بودند. مطالعات جذب نوری و خاموشی نشر فلورسانس نشان داد HSA با نانوذرات نقره برهمکنش داده و مقدار ثابت اتصال AHS و نانوذرات نقره  $1/62 \times 10^4 M^{-1}$  بدست آمد. با توجه به پارامترهای ترمودینامیک محاسبه شده، نیروی هیدروفوب در این اتصال نقش اصلی داشته است. ساختار دوم HSA در هنگام برهمکنش با نانوذرات تاحدودی تغییر کرد اما ساختار اصلی پروتئین حفظ شد. منفی تر شدن بار سطحی پروتئین پس از افزودن نانوذرات نقره، بیانگر اتصال پروتئین به سطح نانوذرات نقره بود. این پژوهش نشان داد نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره درمنه خراسانی تغییرات اندکی در ساختار HSA پس از برهمکنش با آن ایجاد می کنند، بنابراین این نانوذرات می توانند به عنوان یک کاندیدای دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** درمنه خراسانی، بیوسنتز، پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA)، طیف سنجی، نانوذرات نقره.

## ۱- مقدمه

به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان مانند زیست سازگاری (Biocompatible)، پایداری شیمیایی و زیستی و همچنین افزایش نسبت سطح به حجم، در صنایع دارویی و پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. از میان نانوذرات فلزی، نانوذرات

گسترش فناوری نانو در دو دهه اخیر موجب ایجاد پیشرفت‌های شگرفی در صنایع مختلف شده است. نانوذرات

\* عهده‌دار مکاتبات: آزاده حکمت

نشانی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۴۵۲۰۱، دورنگار: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۱۶۶۰، پست الکترونیکی: hekmat@ut.ac.ir

شده‌اند [۱۱،۱۲]. سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی نسبت به سایر روش‌های سنتز زیستی (به عنوان مثال استفاده از ریزجانداران (Microorganism) بسیار ساده‌تر بوده و نیاز به کشت سلول نیز ندارد [۱۲]. گیاه درمنه (*Artemisia*) متعلق به خانواده کاسنیان (*Asteraceae*) است و در مناطق معتدل اروپا، آسیا، شمال آمریکا و آفریقا رویش دارد. این جنس شامل ۲۰۰ الی ۵۰۰ گونه یا زیرگونه و ۵ زیر جنس است بیشتر گونه‌های این جنس چند ساله (Perennial plant) (پایا) هستند و فقط ۱۰ گونه یک یا دو ساله هستند [۱۳،۱۴]. گونه‌های دارویی متعددی از این جنس گزارش شده است [۱۴]. تاکنون ۳۵ گونه از جنس درمنه در ایران شناسایی شده که از لحاظ پراکنش، تراکم و پوشش پس از گون (*Astragalus*) از مهمترین گونه‌های گیاهی ایران می‌باشد [۱۳،۱۴]. در ایران چند گونه انحصاری از این گیاه وجود دارد که درمنه کوهسری (*Artemisia melanolepis*)، درمنه کرمانی (*Artemisia kermanensis*) و درمنه خراسانی (*Artemisia khorasanica*) را می‌توان نام برد [۱۳،۱۵،۱۶]. درمنه خراسانی بوته‌ای، چندساله، دارای ۴۵ cm ارتفاع، رنگ سبز متمایل به خاکستری، دارای ساقه‌های بارور متعدد و پوشیده از کرک متراکم است. این گونه بیشتر در مناطق خراسان واقع در ناحیه رویشی ایران-توران پراکنش دارد [۱۳،۱۶]. در سال‌های اخیر بیوسنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات نقره از گونه‌های مختلف درمنه توسط پژوهشگران انجام پذیرفته است. از جمله آن می‌توان به بیوسنتز نانوذرات نقره از عصاره درمنه یکساله (*A. annua*) [۱۷-۱۹]، *A. pallens* [۲۰]، *A. quttensis* [۲]، درمنه ارسبارانی (*A. marschalliana*) [۲۱]، درمنه خراسانی (*A. khorassanica*) [۲۲]، درمنه دشتی (*A. sieberi*) [۲۳]، درمنه شرنی ویانا (*A. tschernieviana*) [۲۴]، درمنه ترکمنی (*A. turcomanica*) [۲۵] و درمنه تورنفورشیانا (*A. tournefortiana*) [۲۶] اشاره نمود که البته در اکثر این پژوهش‌ها بر فعالیت ضد میکروبی و ضدسرطانی نانوذرات نقره بیوسنتز شده تاکید شده است و به بررسی برهمکنش این نانوذرات با پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های

نقره به دلیل کارایی در درمان زخم‌ها، سوختگی‌ها و عفونت‌های میکروبی توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. افزون بر آن، نانوذرات نقره در بسته‌بندی محصولات غذایی و مکمل‌های غذایی، صنایع نساجی، صنایع الکترونیک، وسایل آرایشی و بهداشتی، ضد عفونی‌کننده‌های آب و اسپری‌های خانگی نیز کاربرد دارند [۳-۱]. مطالعات اخیر نشان داده است نانوذرات نقره با کاهش متابولیسم گلوکاتیون، افزایش میزان گونه فعال اکسیژن (ROS)، کاهش سطح آنتی‌اکسیدانت، تخریب عملکرد میتوکنندری و توقف چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی موجب القای مرگ سلولی در آن‌ها گردند [۴]. همچنین نانوذرات نقره می‌تواند با بیوماکرومولکول‌ها به ویژه پروتئین‌ها [۵،۶] و اسیدهای نوکلئیک [۷] برهمکنش داده و موجب تغییرات ساختاری در آن‌ها گردند. پروتئین سرم آلبومین انسانی (HSA) فراوان‌ترین پروتئین در سیستم گردش خون (حدود ۶۰ درصد پروتئین‌های پلاسما) است که مسئولیت حفظ فشار انکوتیک (Oncotic pressure)، حفظ pH خون، برقراری تعادل دمایی در مایعات بدن و همچنین وظیفه نقل و انتقال مواد، توزیع و متابولیسم بسیاری از لیگاندها همچون (اسیدهای چرب، آمینواسیدها و داروها) که از طریق بیرون‌زادی (Exogenous) یا درون‌زادی (Endogenous) وارد و یا خارج از سلول می‌شوند را بر عهده دارد. این پروتئین از لحاظ ساختاری شامل ۳ زیرواحد (Domain) شبیه به هم (Homolog)، تک رشته، قلبی شکل، با ۵۸۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۷/۵ کیلو دالتون است و از سلول‌های کبدی ترشح می‌شود [۸-۱۰].

با رواج استفاده از نانومواد، خطر آلودگی‌های زیست‌محیطی و امکان تولید محصولات جانبی به ویژه توسط نانوذرات سنتز شده با روش‌های شیمیایی نگرانی‌هایی را در میان پژوهشگران ایجاد کرده است. لذا روش‌های سنتز زیستی (Green synthesis) جهت سنتز نانوذرات فلزی زیست‌سازگار معرفی شده‌اند و به عنوان جایگزینی آسان و مناسب برای روش‌های سنتز شیمیایی و فیزیکی معرفی

طراحی نانوذرات نقره با کاربرد دارویی در اختیار متخصصین قرار دهد.

## ۲- فعالیت‌های تجربی

پروتئین سرم آلبومین انسانی (به صورت پودر خشک، فاقد چربی و خلوص ۹۹٪) از شرکت سیگما آلد ریچ (آمریکا) تهیه شد. تریس بازی (Tris-base, Tris hydroxymethyl aminomethane) از شرکت سیناژن (ایران) خریداری گردید. نقره (I) نیترات ( $AgNO_3$ ) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

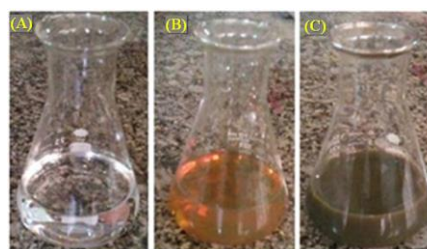
اندام هوایی گیاه درمنه خراسانی در مرحله گل‌دهی در شهریورماه ۱۳۹۸ از شهرستان اسفراین در استان خراسان شمالی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده با نمونه هرباریومی موجود در بانک مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی IBRC P1000272 تطبیق و تایید گردید. جهت تهیه عصاره، برگ‌های تازه گیاه درمنه خراسانی در جریان هوا قرار داده شدند و سپس در سایه کاملاً خشک شدند. برگ‌ها توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر و درون ظرف‌های شیشه‌ای نگهداری شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به روش سوکسله (Soxhlet extraction) [۳۱] استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر برگ گیاه به ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ h صورت گرفت و در پایان حلال بوسیله دستگاه تبخیر روتاری (Rotary evaporator) مدل Rv10 digital (ساخت آلمان) حذف گردید. در انتها، با کم کردن وزن لوله‌های خالی، میانگین وزن خشک عصاره بدست آمد.

جهت بیوسنتز نانوذرات نقره روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره ( $Ag^+$ ) با استفاده از عصاره استخراج شده از درمنه خراسانی انجام گرفت [۳۱، ۳۲]. در ابتدا ۰/۱۲ g از عصاره خشک گیاه در ۱ لیتر آب دیونیزه حل شد (غلظت  $0.12 \text{ g.L}^{-1}$ ). سپس به عصاره ۱۰۰ mL نمک نقره (I) نیترات ۱ میلی‌مولار اضافه گردید. عصاره تیمار شده در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی به مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد. در طی

خون پرداخته نشده است. این درحالی است که نانوداروها پس از ورود به سیستم گردش خون با پروتئین‌های خون به ویژه HSA برهمکنش خواهند داشت. در نتیجه، HSA بطور گسترده‌ای به عنوان یک پروتئین مدل در ارزیابی برهمکنش پروتئین و نانوداروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگر میزان اتصال نانوداروها به HSA زیاد باشد نه تنها موجب القای تغییر ساختاری در پروتئین می‌شوند، بلکه میزان نفوذ نانوداروها به بافت‌های هدف نیز کاهش می‌یابد. از دیگر سو اگر مقدار کمی از نانوداروها به HSA متصل شود، امکان سمیت دارویی بسیار بالا می‌گردد [۱، ۱۰، ۲۷، ۲۸]. بنابراین بررسی برهمکنش نانوداروها با HSA از منظر طراحی داروها بسیار مهم است [۱، ۱۰]. مطالعات بسیاری در زمینه برهمکنش نانوذرات نقره با HSA انجام پذیرفته به عنوان نمونه Maji و همکاران برهمکنش نانوذرات نقره استخراج شده از *Alstonia scholaris* را بررسی نموده و نشان دادند نانوذرات نقره بیوسنتز شده با HSA ایجاد کمپلکس نموده و تغییرات ساختاری اندکی بر پروتئین ایجاد می‌کند [۲۹]. Shahabadi و همکاران نیز نتایج مشابهی از برهمکنش نانوذرات نقره استخراج شده از درختچه گیلاس وحشی با HSA بدست آوردند و نشان دادند که ساختار دوم HSA در حضور نانوذرات نقره حفظ می‌گردد [۳۰]. بر طبق مطالعات پیشین نوع روش سنتز نانوذرات می‌تواند در میزان برهمکنش نانوذرات با پروتئین مؤثر باشد [۱۱، ۳۰]، لذا انجام مطالعاتی که تاثیر روش سنتز نانوذرات را بر میزان برهمکنش با پروتئین‌های خون به ویژه HSA بررسی کنند در صنایع دارویی و زیست‌پزشکی لازم و ضروری می‌باشد. درمنه خراسانی بومی ایران، ارزان قیمت و در دسترس بوده و تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه برهمکنش نانوذرات بیوسنتز شده با استفاده از عصاره این گیاه و HSA انجام پذیرفته است. لذا در این مطالعه ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از عصاره الکلی گیاه بومی درمنه خراسانی سنتز شد و سپس به بررسی برهمکنش آن با HSA با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی پرداخته شد. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات کاربردی در

طیف‌های جذب مرئی محلول‌های حاوی عصاره گیاهی و نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش مدل Varian Cary 100 Bio شرکت اجیلنت تکنولوژی (Agilent Technologies) (ساخت آمریکا) در طول موج‌های بین ۳۶۰ تا ۵۰۰ nm رویش شد. غلظت نانوذرات بیوسنتز شده با استفاده از ضریب جذب مولی (Molar absorptivity)  $4.97 \times 10^4 \text{ dm}^3 \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$  در طول موج ۴۲۰ nm [۱] و با استفاده از قانون بیر-لامبرت (Beer-Lambert law) محاسبه شد. جهت تعیین فازهای بلورین (کریستالی)، اندازه‌گیری ثابت‌های کریستالی و محاسبه اندازه نانوذرات نقره بیوسنتز شده از الگوی پراش اشعه ایکس حاصل از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس (X-ray diffraction (XRD)) مدل Seifert 3003 TT (ساخت آلمان) با منبع لامپ آند مسی  $\text{CuK}\alpha$  با طول موج ۱/۵۴۰۶ آنگستروم استفاده شد. جهت تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی (Transmission Electron Microscopy (TEM)) مدل EM10C-100 KV شرکت زیس (ساخت آلمان) با ولتاژ اعمالی ۱۲۰ kV برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد. ریخت‌شناسی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط آنالیز دستگاهی میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)) مدل SIGMA VP-500 شرکت زیس (ساخت آلمان) با ولتاژ زیر ۳۰ کیلوولت و تحت فشار خلاء (۵-۱۰ Torr) و مجهز به دتکتورهای طیف‌سنجی تفکیک انرژی (EDS) و Mapping مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده‌سازی نمونه، پودر نانوذرات نقره روی یک سطح هادی از جنس آلومینیوم پخش شد و سپس با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده شد تا موجب رسانای سطحی شود، به طوری که مسیر باریکه‌های الکترونی برگشتی را تغییر ندهد. قطر میانگین نانوذرات نقره به صورت آماری توسط نرم‌افزار ImageJ با اندازه‌گیری تصادفی ۲۵ نقطه متفاوت از تصویر محاسبه گردید. شعاع هیدرودینامیک و پتانسیل زتا نانوذرات نقره بیوسنتز شده با

فرآیند سنتز، یون‌های  $\text{Ag}^+$  در معرض ترکیبات احیاکننده عصاره (مانند آلدئید، کتون، تریپن و آلفا تریپنول) قرار گرفته و از این طریق احیای نمک نقره (I) نیترات آغاز گردید. احیای کامل یون‌های  $\text{Ag}^+$  به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محلول قابل ردیابی است [۳۲]. رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی به محلول نقره (I) نیترات، از بی‌رنگ (شکل ۱A) به رنگ نارنجی مایل به قرمز (شکل ۱B) پس از ۳۰ دقیقه از زمان شروع واکنش و به رنگ قهوه‌ای تیره (شکل ۱C) پس از ۶۰ دقیقه از زمان شروع واکنش تغییر نمود. تغییر رنگ نشان دهنده احیای نقره (I) نیترات و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است [۳۲-۱۸]. جهت بدست آوردن غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده، محلول کلونیدی با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ min توسط سانتریفیوژ دامل (Dome) مدل Centric 250 IVD (ساخت اسلوونی) سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و به منظور شستشو و پراکنده نمودن نانوذرات ته نشین شده، با اضافه کردن آب دیونیزه، عمل سانتریفیوژ ۳ بار تکرار گردید. پس از هر بار سانتریفیوژ، فاز رویی جدا شد و به ماده ته نشین شده آب دیونیزه اضافه شد. پس از عمل سانتریفیوژ، سوسپانسیون باقی‌مانده بر روی ویفر سیلیکونی (Wafer silicon) (شرکت غرب آپادانا، ایران) پخش شد تا خشک گردد [۳۱]. ۰/۲ mg از پودر نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه درمنه خراسانی وزن شد و در داخل میکروتیوپ‌ها ریخته شد و مقدار ۱ mL بافر تریس بازی (۰/۱ M، pH ۷/۴) به آن‌ها افزوده شد و پس از ۲۰ min سونیکاسیون توسط التراسونیک مدل WUC D10H (ساخت کره جنوبی)، جهت مطالعات بعدی نگهداری شدند.



شکل ۱: تغییر رنگ محلول عصاره گیاهی پس از افزودن نمک نقره (I) نیترات بعد از: (A) صفر، (B) ۳۰ و (C) ۶۰ دقیقه از شروع واکنش.

مختلف نانوذرات نقره (۸، ۱۵، ۲۵، ۴۶، ۹۲، ۱۳۹، ۱۸۵، ۲۳۲، ۲۷۸، ۳۲۴ و ۳۷۱)  $\mu\text{M}$  در دماهای ۲۷ و  $37^\circ\text{C}$  ثبت گردید. ضخامت کووت‌های کوارتز در آزمایش‌ها ۱ cm و پهنای شکاف مورد استفاده در تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ nm تنظیم گردید. از آنجا که جذب اشعه توسط خاموش کننده موجب کاهش سیگنال تهیج و نشر (فیلتراسیون داخلی) می‌شود. جهت تصحیح اثر فیلتراسیون داخلی از معادله ۱ [۱،۱۰] استفاده شد:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(Ab_{ex} + Ab_{em})/2} \quad (1)$$

در این معادله  $F_{corr}$  و  $F_{obs}$  بیانگر شدت نشر فلورسانس مشاهده شده و شدت نشر فلورسانس تصحیح شده است.  $Ab_{em}$  و  $Ab_{ex}$  بیانگر جذب محلول در طول موج‌های تحریک و نشر است.

تغییرات ساختاری HSA در حضور نانوذرات نقره، با استفاده از طیف‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی Model 215, Aviv (ساخت آمریکا) ثبت شد. ابتدا طیف CD نمونه HSA ( $\mu\text{M}$ ) (ساخت آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت و سپس طیف‌های CD پس از افزودن نانوذرات نقره (۴۶، ۱۸۵ و  $371 \mu\text{M}$ ) در محدوده طول موج‌های ۱۹۵-۲۶۰ nm با استفاده از کووت کوارتز، طول مسیر ۰/۱ cm، رزولوشن ۰/۲ nm و سرعت اسکن  $20 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  در دمای  $37^\circ\text{C}$  ثبت شد. نتایج بر حسب بیضی‌واری مولی (Molar ellipticity) ثبت شد. سپس درصد محتوای ساختار دوم پروتئین در عدم حضور و حضور نانوذرات نقره با استفاده از نرم‌افزار CDNN محاسبه شد.

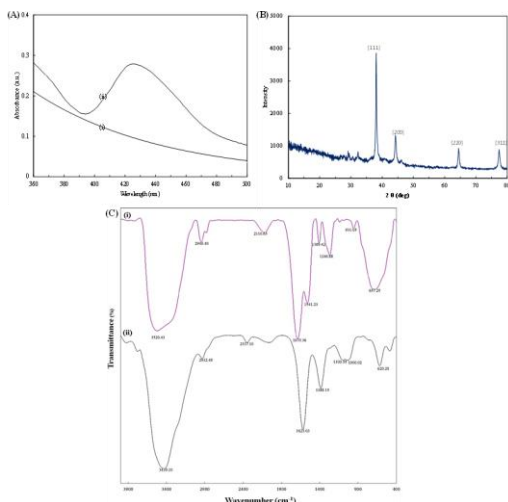
اختلاف پتانسیل بین آخرین لایه محلول در بر گیرنده ذرات کلئید و اولین لایه غیرمتحرک از حلال اطراف ذرات کلئید را پتانسیل الکتروستاتیک یا پتانسیل زتا ( $\zeta$ ) می‌نامند [۳۳]. پتانسیل زتا نمونه‌های HSA ( $14/25 \mu\text{M}$ ) در حضور و عدم حضور نانوذرات نقره ( $371 \mu\text{M}$ ) بوسیله دستگاه زتا آنالایزر شرکت مالورن (ساخت انگلیس) در دمای  $37^\circ\text{C}$  اندازه‌گیری شد.

استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پراکندگی نور پویا (Dynamic light scattering (DLS)) و زتا پتانسیل آنالایزر شرکت مالورن (Malvern) (انگلیس) در طول موج ۶۵۷ nm و زاویه ثابت  $90^\circ$  اندازه‌گیری گردید. اعداد حاصل از میانگین از ۳ آزمایش گزارش شد. جهت بررسی گروه‌های عاملی موجود در ذرات Ag و عصاره گیاهی، طیف‌های عبوری امواج فروسرخ توسط طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)) مدل Nexus 870 ESP شرکت ترمونیکولت (ساخت آمریکا) در محدوده اعداد موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  ثبت گردید.

ابتدا ۲ میلی گرم پودر پروتئین سرم آلبومین با ترازو وزن شد و به آن  $800 \mu\text{L}$  بافر تریس بازی (۰/۱ M، pH ۷/۴) اضافه شد. سپس  $300 \mu\text{L}$  از نمونه پروتئین به سل نمونه یا کووت (Cuvette) کوارتز اضافه شد و با افزودن بافر به حجم  $800 \mu\text{L}$  (غلظت  $14/25 \mu\text{M}$ ) رسید. طیف جذبی مرئی-فرابنفش پروتئین در طول موج‌های ۲۰۰-۴۰۰ nm نسبت به کووت شاهد (شامل بافر) با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش در دمای  $37^\circ\text{C}$  روبش شد. در مرحله بعد نانوذرات نقره سنتز شده با غلظت‌های متفاوت ۸، ۱۵، ۲۵، ۴۶، ۹۲، ۱۳۹، ۱۸۵، ۲۳۲، ۲۷۸، ۳۲۴ و  $371 \mu\text{M}$  به کووت حاوی پروتئین تیترا شد و طیف جذبی در دمای  $37^\circ\text{C}$  روبش شد. در این سری آزمایش‌ها کووت شاهد شامل بافر و نانوذرات نقره (در غلظت‌های مورد بررسی) و فاقد پروتئین بود.

اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی HSA، با استفاده از اسپکترومتر فلورسانس مدل MPF-7 شرکت هیتاچی (ساخت آمریکا) بررسی شد. جهت کنترل دما در طی هر آزمایش، از حمام با کنترل دمایی استفاده شد. طول موج‌های تحریک و نشر در تمام آزمایش‌ها به ترتیب ۲۹۵ و ۳۴۸ nm تنظیم شد. غلظت نمونه HSA  $14/25 \mu\text{M}$  بود. ابتدا طیف نشر فلورسانس HSA مورد بررسی قرار گرفت سپس طیف‌های نشر فلورسانس HSA پس از افزودن غلظت‌های

بزرگتر (۲۰۰-۱۰۰ nm) دارای بیشینه جذب نوری در محدوده طول موج ۵۰۰ nm هستند [۳۵]. بنابراین، نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش دارای اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودند.



شکل ۲: (A) طیف جذب مرئی عصاره استخراج شده (i) و نانوذرات نقره بیوسنتز شده (ii)، (B) الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره بیوسنتز شده و (C) طیف FT-IR عصاره استخراج شده (i) و نانوذرات نقره بیوسنتز شده (ii) از گیاه درمنه خراسانی.

الگوی پراش اشعه ایکس به منظور اثبات بیوسنتز نانوکریستال‌های فلزی نقره، بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۲B مشاهده می‌گردد، موقعیت پیک‌های پراش مشخصه نانوذرات نقره بیوسنتز شده در مقادیر 2θ (زاویه تفرق) (۳۸/۲۱، ۴۶/۲۸، ۶۴/۵۷ و ۷۷/۴۹ درجه قرار داشتند که به ترتیب مربوط به صفحات کریستالین (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) ساختار مکعبی وجوه پر (Face Centered Cubic) نقره می‌باشد و در نتیجه حضور کریستال‌های نانونقره تایید گردید. همچنین الگوی پراش بدست آمده، با کارت استاندارد مرکز بین‌المللی داده‌های پراش اشعه ایکس (International Centre for Diffraction Data (ICDD)) مربوط به نقره با شماره ۰۴-۰۷۸۳ منطبق بود [۱۸-۲۰]. پژوهش‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی اغلب ساختار بلورین مکعبی وجوه پر را دارا هستند [۱۸-۲۱، ۳۵]. پیک‌های ضعیف مشاهده شده

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آنالیز یک طرفه واریانس (One-way analysis of variance) تجزیه و تحلیل شد و سطح معنی‌دار بودن  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج و بحث

همان‌گونه که ذکر شد تغییر رنگ محلول‌های مورد آزمایش از بی‌رنگ به قهوه‌ای، نخستین نشانه از سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه بومی درمنه خراسانی است (شکل ۱) که به علت ایجاد پدیده رزونانس پلاسمون سطحی روی داده است [۱۸-۲۱، ۳۲]. شکل ۲A(i) طیف جذبی ناحیه مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده از گیاه درمنه خراسانی دارای بیشینه جذب نوری ( $\lambda_{max}$ ) در طول موج ۴۲۰ nm بود را نشان می‌دهد در حالی که در طیف جذبی ناحیه مرئی عصاره گیاه (شکل ۲A(ii)) چنین بیشینه‌ای مشاهده نشد. ایجاد این بیشینه جذب نوری در طول موج‌های بین ۴۰۰-۵۰۰ nm به علت پدیده رزونانس پلاسمون سطحی می‌باشد [۳۱، ۳۲]. این نتایج با یافته‌های قنبر و همکاران که نانوذرات نقره را با استفاده از گیاه *A. quttensis* سنتز نمودند [۲] و خلیلی و همکاران که نانوذرات نقره (AgNPs) را با استفاده از گیاه *A. tschernieviana* سنتز نمودند کاملاً تطابق دارد [۳۴]. نتایج مشابهی توسط رشیدیان و همکاران برای نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از گیاه *A. khorassanica* گزارش شده است [۲۲]. ذکر این نکته حائز اهمیت است که در پژوهش حاضر عصاره از برگ گیاه *A. khorassanica* به روش سوکسله و توسط حلال متانولی استخراج شد. همچنین مدت زمان تغییر رنگ محلول به قهوه‌ای پس از افزودن نقره (I) نیترات ۶۰ min بود. اما در مطالعه رشیدیان و همکاران عصاره به روش ماسراسیون با حلال اتانولی استخراج شد و مدت زمان تغییر رنگ محلول به قهوه‌ای پس از افزودن نقره (I) نیترات ۱۲۰ دقیقه بود. طیف جذبی ناحیه مرئی می‌تواند اطلاعاتی از اندازه تقریبی نانوذرات را نیز نشان دهد. نانوذرات نقره با اندازه کوچک (۵۰-۱۰ nm) دارای بیشینه جذب نوری در محدوده طول موج ۴۰۰ nm نانومتر و نانوذرات نقره با اندازه

عدد موج  $3520/43 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات کششی گروه‌های O-H (هیدروکسیل فنول و الکل) و  $\text{NH}_2$  (آمین) را نشان داد [۱۹،۲۱]. پیک در عدد موج  $2940/40 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات کششی گروه‌های C-H متابولیت‌های گیاهی را نشان داد [۲۱]. پیک قابل مشاهده در اعداد موج  $1670/36 \text{ cm}^{-1}$  و  $1541/23 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات خمشی گروه‌های N-H (آمید I و II پروتئین‌ها) را نشان داد [۱۹]. پیک در عدد موج  $1389/42 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات خمشی در گروه‌های O-H فنول و پیک در عدد موج  $1246/88 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات کششی در گروه‌های C-N آمین آروماتیک را نشان داد [۲۰]. پیک در عدد موج  $931/05 \text{ cm}^{-1}$  وجود گروه‌های آروماتیک را نشان داد. پیک در عدد موج  $627/25 \text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات خارج صفحه CH سیستم‌های اتیلن C=C (cis) را نشان داد [۲۰]. در طیف فروسرخ نانوذرات بیوسنتز شده، جابجایی، افزایش یا کاهش شدت و حذف در برخی پیک‌ها نسبت به طیف عصاره مشاهده شد. جابجایی پیک‌ها نشانگر نقش گروه‌های عاملی در اتصال نانوذرات نقره می‌باشد [۳۲]. پس از بیوسنتز نانوذرات نقره پیک در عدد موج  $3520/43 \text{ cm}^{-1}$  (مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های O-H و  $\text{NH}_2$ ) به عدد موج  $3439/10 \text{ cm}^{-1}$ ، پیک در عدد موج  $2940/40 \text{ cm}^{-1}$  (مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های C-H) به عدد موج  $2923/48 \text{ cm}^{-1}$ ، پیک در عدد موج  $1670/36 \text{ cm}^{-1}$  (مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های N-H آمید I) به عدد موج  $1623/03 \text{ cm}^{-1}$  و پیک در عدد موج  $627/25 \text{ cm}^{-1}$  به عدد موج  $620/20 \text{ cm}^{-1}$  جابجا شدند. همچنین پیک‌ها در اعداد موج  $1541/23 \text{ cm}^{-1}$  و  $931/05 \text{ cm}^{-1}$  حذف گردیدند که می‌تواند بیانگر آن باشد که اتصال گروه‌های N-H در احیای نقره نقش داشته‌اند [۳۲، ۲۰]. کاهش شدت پیک در عدد موج  $1670/36 \text{ cm}^{-1}$  نقش گروه‌های N-H در اتصال نانوذرات نقره به عصاره را نشان داد [۳۲]. ظهور پیک در اعداد موج  $1100/55 \text{ cm}^{-1}$  و  $1000/02 \text{ cm}^{-1}$  که مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های C-O الکل، کربوکسیلیک اسید، استر و اتر گروه‌های عاملی پروتئین‌ها و متابولیت است، بیانگر نقش این

در الگوی پراش، مربوط به کریستالی شدن ترکیبات زیستی و پروتئین‌ها بر سطح نانوذرات نقره است. وجود این پیک‌ها در پژوهش‌های پیشین نیز گزارش شده است [۱۸، ۱۹]. وجود قله‌های تیز در الگوی پراش نیز نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با درجه کریستالی خوبی سنتز شده است. فاصله بین صفحات اتمی موازی (Inter planner distance) برای پیک‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) به ترتیب  $43/92$ ،  $30/08$ ،  $32/73$  و  $35/48 \text{ A}$  بدست آمد. با استفاده از معادله شرر (Scherrer equation) (معادله ۲) [۳۶]، اندازه کریستال نانوذرات نقره محاسبه گردید. در این رابطه،  $D$  اندازه کریستال (برحسب نانومتر)،  $\lambda$  طول موج اشعه ایکس،  $\beta$  پهنای پیک در نیمه ارتفاع (Full width at half maximum) یا FWHM (برحسب رادیان) و  $\theta$  زاویه پراکنندگی است.

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

براساس این معادله، اندازه نانوذرات نقره  $40$  نانومتر در پیک (۱۱۱) و  $45 \text{ nm}$  در پیک (۲۰۰) بدست آمد. آفاجانیان و همکاران پس از استخراج نانوذرات نقره از گونه *A. annua* به نتایج مشابهی دست یافتند و اندازه نانوذرات نقره سنتزی آن‌ها در حدود  $46$  نانومتر بدست آمد [۱۷]. باساوگودا (Basavegowda) و همکاران نیز نتیجه مشابهی برای اندازه و شکل نانوذرات نقره بیوسنتز شده از گونه *A. annua* بدست آوردند [۱۸]. پژوهش‌های بسیاری اثبات نموده است که اثرات سمی نانوذرات به شکل، اندازه آن‌ها و جذب یون‌های فلزی وابسته است و نشان داده شده است که نانوذرات کروی شکل سمیت بسیار پایین تری نسبت به نانوذرات دندریتی (Dendritic) دارند [۳۷-۳۹]. بنابراین نانوذرات نقره بیوسنتز شده از گیاه درمنه خراسانی احتمالاً سمیت اندکی در بدن خواهند داشت.

شکل ۲C طیف عبوری امواج فروسرخ عصاره استخراج شده از درمنه خراسانی و نانوذرات نقره بیوسنتز شده را نشان می‌دهد. در طیف فروسرخ عصاره استخراج شده، پیک در

شده بر روی نمونه است که با هدف افزایش وضوح تصویر SEM انجام گردید. میرزایی و همکاران نیز طیف EDS مشابهی را پس از بیوستن نانوذرات نقره بدست آوردند [۴۳]. نقشه اشعه ایکس توزیع ذرات (X-map) نیز بیانگر توزیع پراکندگی یکنواخت نقره در نمونه بود. تصاویر میکروگراف میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نشان داد که نانوذرات بیوستن شده کروی شکل هستند (شکل ۳B). هیستوگرام پراکندگی (Histogram distribution) نانوذرات نقره بیوستن شده (نمودار الحاقی در شکل ۳B) نیز نشان داد نانوذرات میانگین قطر (Average particle diameter)  $21/89 \pm 33/40$  nm را دارا بودند.

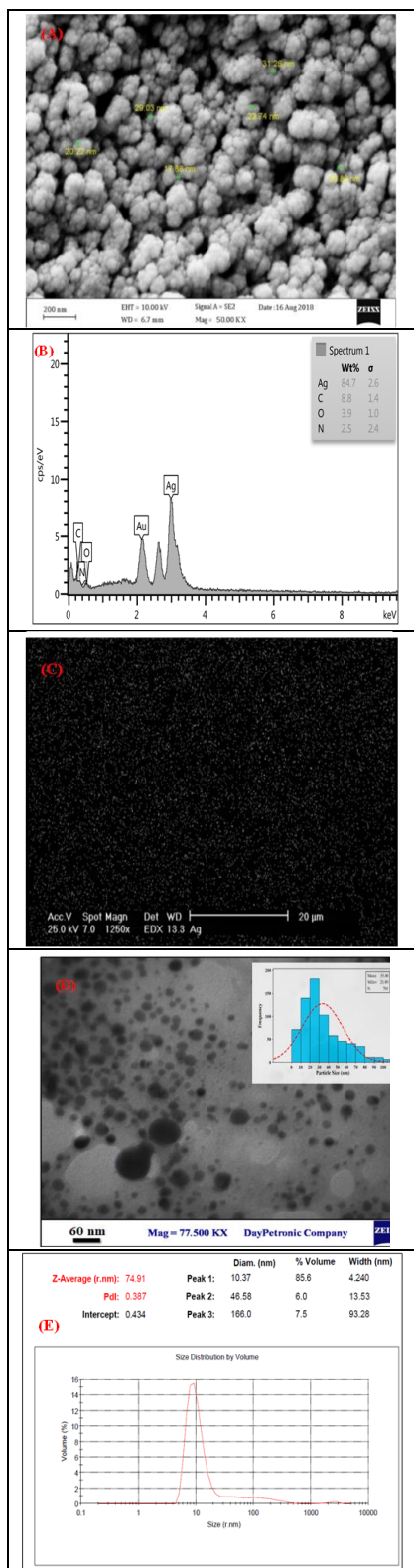
نتایج بدست آمده از سنجش پراکندگی نور پویا (شکل ۳C) بیانگر میانگین قطر  $74/91$  nm و شاخص پراکندگی ذرات (Polydispersity index (PDI))  $0/37$  برای نانوذرات بیوستن شده بود. شاخص پراکندگی ذرات معیاری برای ارزیابی یکنواختی نمونه بر اساس اندازه آن است. از آنجا که شاخص پراکندگی نانوذرات نقره بین  $0/4$  -  $0/1$  بدست آمد، بنابراین نانوذرات بیوستن شده یکنواختی متوسطی (Moderately monodisperse) را دارا بودند [۴۴]. همان گونه که مشاهده می گردد میانگین قطر نانوذرات نقره بیوستن شده از تکنیک پراکندگی نور پویا و میکروسکوپ الکترونی با یکدیگر تطابق نداشت. اساس سنجش پراکندگی نور پویا، اندازه گیری قطر هیدرودینامیک چندلایه ها است و در آن ابتدا ثابت انتشار (Diffusion coefficient) ذرات محاسبه می گردد. این تکنیک کل ذرات (نه فقط هسته های غنی از الکترون) شامل پایدارکننده ها و پوشش های سطحی را به طور همزمان بررسی می کند [۴۴، ۴۵]. این در حالی است که میکروسکوپ الکترونی تنها بخش های با دانسیته الکترونی بالا هر ذره در فاز خشک را به صورت مجزا بررسی می کند [۴۵]. از آنجا که نانوذرات بیوستن شده در این پژوهش پوششی از متابولیت ها و پروتئین های عصاره گیاه را در برداشتند (بر طبق مطالعات طیف سنجی فرورسرخ)، لذا پراکندگی نوری بیشتری در آن ها رخ داده است و در نتیجه

گروه های عاملی در سنتز نانوذرات نقره است [۳۲]. بنابراین، تغییرات مشاهده شده در پیک ها بیانگر آن است که ترکیبات درون عصاره گیاه در منته خراسانی مانند فنل ها و الکل ها به عنوان یک عامل احیایی (Reducing agent) و پایدارکننده در سنتز نانوذرات نقره نقش ایفا می کنند [۲، ۱۹]. گروه های آروماتیک پروتئین ها و گروه های عاملی که در ترکیبات هتروسیکلیک یافت می شوند، می توانند نقش اساسی در احیای یون های نقره به نانوذرات نقره داشته باشند و نانوذراتی زیست سازگار تولید کنند [۴۰]. پس از احیای یون های نقره و تشکیل نانوذرات نقره، سطح نانوذرات می تواند توسط گروه های عاملی مانند آمین، کربوکسیل و سولفات به پایداری برسد که به فرآیند کپینگ (Capping) یا پوشش مولکولی مشهور است [۴۱]. وجود پیک های مربوط به گروه های عاملی آمیدی در طیف نانوذرات نقره، بیانگر تشکیل لایه پروتئینی اطراف نانوذرات است که حضور این پروتئین ها می تواند موجب افزایش توانایی اتصال نانوذرات گردد [۴۲]. این لایه می تواند به عنوان یک پوشش عمل کند و از تجمع و چسبیدن نانوذرات به هم در محلول جلوگیری کند. همچنین گروه های آمین موجود در عصاره می تواند موجب پایداری نانوذرات گردد [۴۲].

شکل و اندازه نانوذرات نانوذرات نقره بیوستن شده از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (Fe-SEM)، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۳A نشان داده شده است نانوذرات نقره بیوستن شده کروی شکل و دارای همگنی متوسطی (Moderate homogeneity) بودند. میانگین قطر نانوذرات بیوستن شده با استفاده از نرم افزار Image J محاسبه شد و  $29$  nm بدست آمد. همچنین در نانوذرات تا حدودی تمایل به تجمع دیده شد که می تواند به دلیل وجود نیروی واندروالسی بین نانوذرات باشد. طیف EDS حضور عناصر نقره، کربن، اکسیژن و نیتروژن را در نانوذرات بیوستن شده نشان داد که بیانگر حضور  $84/7$  درصد فلز نقره در نانوذرات بود. حضور پیک طلا (Au) در طیف EDS مرتبط با طلا پوشش داده



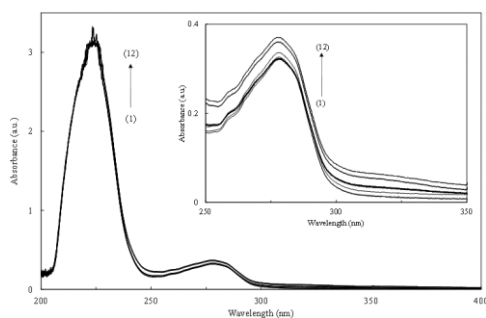
بیشتری در این زمینه باید انجام پذیرد.



میانگین قطر ذرات بدست آمده از سنجش‌های پراکندگی نور پویا عدد بزرگتری را نشان داده است. سینک و همکاران نیز در مطالعات پراکندگی نور پویا و میکروسکوپ الکترونی عدم تطابق میانگین اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از سیانوباکتری‌ها را مشاهده نمودند و آن را به پوشیده شدن نانوذرات در درون پوششی از مولکول‌های زیستی نسبت دادند [۴۶]. نظیر این مشاهده در پژوهش دیگر نیز گزارش شده است [۴۵].

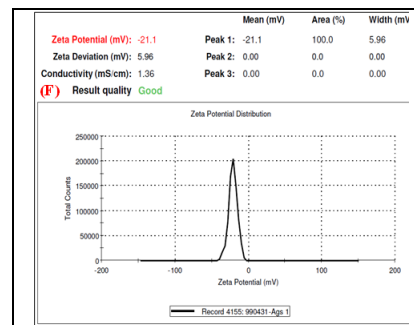
پتانسیل در صفحه لغزشی/برشی (Slipping/Shear plane) یک ذره کلئیدی که تحت میدان الکتریکی حرکت می‌کند، پتانسیل زتا نام دارد. خواص شیمی فیزیکی سوسپانسیون‌ها و کلئیدها تا حد زیادی به خواص سطح مشترک ذره و حلال وابسته است، لذا تعیین مقدار پتانسیل زتا در شناسایی خواص سوسپانسیون‌ها و کلئیدها کاربرد دارد [۴۴]. با توجه به نمودار توزیع بار سطحی، پتانسیل زتای نانوذرات بیوسنتز شده  $-21/10$  میلی‌ولت برآورد شد (شکل ۳D). هنگامی که پتانسیل زتا نانوذرات  $20-30 \pm$  میلی‌ولت باشد، نانوذرات پایداری متوسط (Moderately stable) دارند [۴۴]. بنابراین نانوذرات بیوسنتز شده در این پژوهش دارای پایداری متوسط بودند. تشکیل لایه پروتئینی اطراف نانوذرات می‌تواند با ایجاد دافعه الکترواستاتیک منجر به افزایش پتانسیل زتای نانوذرات گردد [۴۴]. بنابراین پتانسیل زتای منفی مشاهده شده می‌تواند بیانگر وجود پوشش مولکولی اطراف نانوذرات باشد. پتانسیل‌های زتای برای نانوذرات نقره بیوسنتز شده از گونه *A. tschernieviana* برابر با  $5 \text{ mV}$  - [۴۷]، از گونه *A. marschalliana* برابر با  $31-21 \text{ mV}$  [۲] و از گونه *A. quttensis* برابر با  $20-2$  [۲] گزارش شده است. با بررسی پتانسیل زتای نانوذرات نقره بیوسنتز شده از چند گونه مختلف گیاه درمنه می‌توان بیان داشت به علت وجود پوششی از ترکیبات و متابولیت‌های عصاره گیاه در اطراف نانوذرات، مقدار پتانسیل زتای نانوذرات بیوسنتز شده از گونه‌های مختلف درمنه متفاوت است [۴۸]. البته مطالعات

پروتئین HSA پدیده هایپرکرومیک در طیف جذبی رخ می دهد [۴۹]. پژوهش های اخیر نشان داده است پس از ورود نانوذرات به درون پلاسماي خون، نانوذرات و HSA به یکدیگر متصل شده و سپس به قسمت های مختلف بدن حمل می شوند. پدیده برهمکنش پروتئین-نانوذرات در پلاسما به "پروتئین کرونا (Protein corona)" مشهور است [۵۰]. ویژگی نانوذرات در شرایط درون تنی (*in vivo*) پس از تشکیل پروتئین کرونا تغییر می یابد و معمولاً نیروی اصلی برای تشکیل پروتئین کرونا، برهمکنش های غیر کووالانسی بین پروتئین ها و نانوذرات می باشد [۵۰]. جهت بدست آوردن پارامترهای اتصال و یافتن نیروی دخیل در این برهمکنش و تشکیل پروتئین کرونا طیف سنجی فلورسانس انجام پذیرفت.



شکل ۴: طیف های جذبی پروتئین سرم آلبومین (غلظت  $14/25 \mu\text{M}$ ) در عدم حضور (۱) و حضور غلظت های مختلف نانوذرات نقره بیوستز شده (۲-۱۲). نمودار الحاقی طیف جذبی پروتئین سرم آلبومین در محدوده طول موج های ۲۵۰-۳۵۰ نانومتر در در عدم حضور (۱) و حضور غلظت های مختلف نانوذرات نقره (۲-۱۲) را نشان می دهد.

از آنجا که فلورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار، دینامیک و خصوصیات پروتئین موجود در محلول می باشد، لذا با استفاده از طیف سنجی نشر فلورسانس مطالعات تغییرات ساختاری HSA در حضور غلظت های مختلف نانوذرات نقره انجام شد [۸]. HSA تنها یک باقی مانده (Residue) اسید آمینه تریتوفان (Trp) در موقعیت ۲۱۴ دارد [۱۸]. این اسید آمینه در نزدیکی سطح پروتئین، در مارپیچ دوم از زیر دمین (Subdomain) IIA قرار دارد [۱۸]. بنابراین هرگونه تغییر در قطبیت اطراف تریتوفان را می توان با تغییر در بیشینه نشر فلورسانس ارزیابی نمود [۱،۴۹].

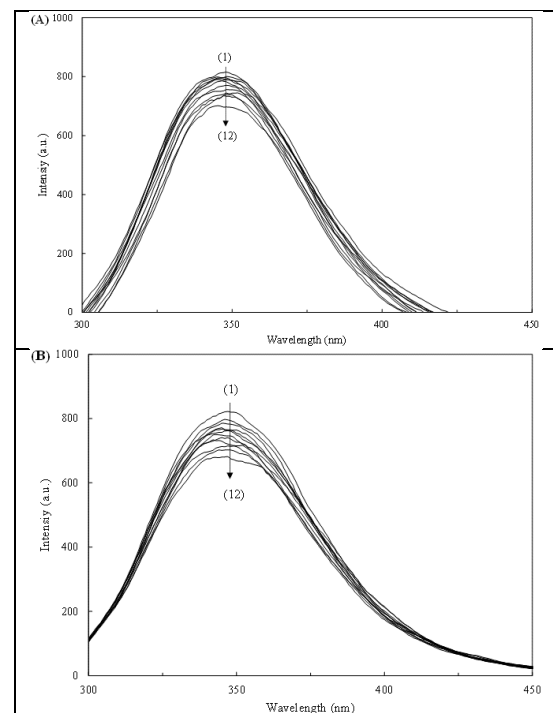


شکل ۳: (A) تصویر FE-SEM، (B) EDS، (C) نقشه توزیع ذرات (MAP)، (D) تصویر TEM و هیستوگرام بدست آمده از آن، (E) نمودار توزیع اندازه نانوذرات حاصل از سنجش پراکندگی نور پویا و (F) نمودار توزیع بار سطحی نانوذرات نقره بیوستز شده از گیاه درمنه خراسانی.

جهت بررسی برهمکنش بین نانوذرات نقره بیوستز شده و HSA طیف جذبی پروتئین در عدم حضور و حضور نانوذرات نقره با استفاده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش بررسی شد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می گردد طیف جذبی مرئی-فرابنفش پروتئین HSA دو بیشینه جذب در طول موج های ۲۳۰ و ۲۸۰ nm را نشان داد که به ترتیب مربوط به پیوندهای پپتیدی پروتئین و انتقالات  $\pi$  به  $\pi^*$  در حلقه اسیدهای آمینه تریتوفان (Trp)، تیروزین (Tyr) و فیل آلانین (Phe) می باشد [۸]. بیشینه جذب در این طول موج ها همچنین وابسته به اسکلت ساختاری (Micro-environment structure) و میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک پروتئین است. پس از افزودن غلظت های مختلف نانوذرات نقره افزایش جذب یا هایپرکرومیک (Hyperchromic) در هر دو بیشینه جذبی مشاهده گردید، اما جابجایی (Shift) در طول موج بیشینه مشاهده نشد. پدیده هایپرکرومیک در جذب نوری بیانگر ایجاد کمپلکس بین نانوذرات و پروتئین در حالت پایه (Ground-state) است [۴۹]. به عبارت دیگر افزایش جذب در هر دو طول موج بیانگر ایجاد تغییرات ساختاری اندک و همچنین تغییر در میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک پروتئین در نتیجه برهمکنش نانوذرات نقره با HSA است. نتایج ژانگ (Zhang) و همکاران نیز نشان داد پس از افزودن نانوذرات نقره با اندازه تقریبی ۴۰ nm به

همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانوذرات نقره، شدت نشر فلورسانس در طول موج بیشینه (۳۴۸ nm) در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ °C کاهش یافت و جابجایی شاخصی در بیشینه نشر مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد میکرومحیط اطراف تریپتوفان در غلظت‌های بالاتر از نانوذرات نقره تغییر کرده است [۱]. در مطالعات Beg و همکاران نیز پس از افزودن نانوذرات نقره بیوسنتز شده به HSA کاهش شدت نشر فلورسانس پروتئین بدون جابجایی در بیشینه جذب مشاهده شد و نتیجه گرفتند که پروتئین بر سطح نانوذرات جذب شده است و کاهش نشر فلورسانس به علت نزدیکی محل اتصال به تریپتوفان و تشکیل کمپلکس نانوذرات نقره-HSA است [۹]. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاهش یا خاموشی (Quenching) نشر فلورسانس در مطالعه حاضر نیز ناشی از اتصال HSA بر سطح نانوذرات نقره بیوسنتز شده (تشکیل پروتئین کرونا) می‌باشد.

همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانوذرات نقره، شدت نشر فلورسانس در طول موج بیشینه (۳۴۸ nm) در هر دو دمای ۲۷ و ۳۷ °C کاهش یافت و جابجایی شاخصی در بیشینه نشر مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد میکرومحیط اطراف تریپتوفان در غلظت‌های بالاتر از نانوذرات نقره تغییر کرده است [۱]. در مطالعات Beg و همکاران نیز پس از افزودن نانوذرات نقره بیوسنتز شده به HSA کاهش شدت نشر فلورسانس پروتئین بدون جابجایی در بیشینه جذب مشاهده شد و نتیجه گرفتند که پروتئین بر سطح نانوذرات جذب شده است و کاهش نشر فلورسانس به علت نزدیکی محل اتصال به تریپتوفان و تشکیل کمپلکس نانوذرات نقره-HSA است [۹]. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاهش یا خاموشی (Quenching) نشر فلورسانس در مطالعه حاضر نیز ناشی از اتصال HSA بر سطح نانوذرات نقره بیوسنتز شده (تشکیل پروتئین کرونا) می‌باشد.



شکل ۵: طیف‌های نشر فلورسانس پروتئین سرم آلبومین (غلظت ۰.۱ μM) در عدم حضور (۱) و حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بیوسنتز شده (۲-۱۲) در دمای ۲۷ °C (A) و ۳۷ °C (B).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

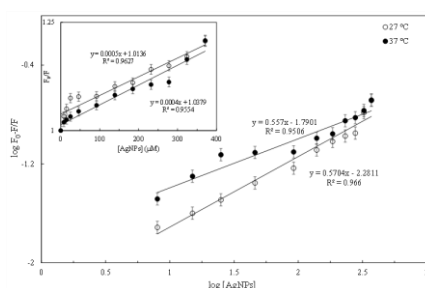
در معادله ۳،  $F_0$  و  $F$  به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس HSA در غیاب و حضور نانوذرات نقره است.  $K_{SV}$  بیانگر ثابت استرن-ولمر و  $[Q]$  بیانگر غلظت کل خاموش کننده (نانوذرات نقره) است.  $\tau_0$  بیانگر نیمه عمر فلوروفور و  $k_q$  نیز بیانگر ثابت سرعت خاموشی پروتئین می‌باشد. شکل ۶ نمودار استرن-ولمر یا میزان  $F_0/F$  در مقابل غلظت خاموش کننده (نانوذرات نقره بیوسنتز شده) را در دو دمای ۲۷ و ۳۷ °C نشان می‌دهد. همان‌گونه که در این شکل مشاهده می‌شود نمودارها به صورت خط راست بدست آمد. معمولاً مشاهده خط راست

این زمینه لازم است. لازم بذکر است میزان ثابت اتصال با افزایش دما از ۲۷ به ۳۷ °C، افزایش چشم گیر (تقریباً سه برابر) یافت که گویای تاثیر دما در برهمکنش HSA و نانوذرات نقره است. با توجه به مقادیر n بدست آمده یک جایگاه اتصال برای برهمکنش HSA و نانوذرات نقره وجود دارد. با استفاده از ثابت های اتصال بدست آمده و معادلات ۵ و ۶ مقدار تغییرات انرژی آزاد گیبس ( $\Delta G^\circ$ )، تغییرات آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) و تغییرات آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) اتصال نانوذرات نقره به HSA محاسبه شد [۱].

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5)$$

$$\ln k = \frac{-\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (6)$$

در رابطه فوق R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق می باشد. مقدار  $\Delta G^\circ$  منفی بدست آمده در هر دو دما (جدول ۱) بیانگر خودبخودی بودن فرآیند اتصال HSA و نانوذرات نقره می باشد [۱،۱۰]. مقدار مثبت  $\Delta H$  بیانگر گرماگیر بودن فرآیند اتصال نانوذرات نقره بیوسنتز شده و HSA است که با افزایش ثابت اتصال از دمای ۲۷ به ۳۷ °C کاملاً تطابق دارد. بر طبق مقالات هنگامی که  $\Delta H^\circ > 0$  و  $\Delta S^\circ > 0$  باشد، برهمکنش لیگاند با ماکرومولکول از نوع هیدروفوب است [۱،۱۰]. با توجه به جدول ۱ و مثبت بودن هر دو مقدار  $\Delta H^\circ$  و  $\Delta S^\circ$  در اتصال HSA و نانوذرات نقره نیروی هیدروفوب نقش اصلی را ایفا کرده است.



شکل ۶: نمودار اصلاح شده استرن-ولمر برای تعیین مقادیر ثابت های اتصال نانوذرات نقره و HSA در دماهای ۲۷ و ۳۷ °C. نمودار الحاقی نمودارهای استرن-ولمر برهمکنش اتصال نانوذرات نقره و HSA.

در نمودار استرن-ولمر بیانگر خاموشی دینامیک و انحراف از خط راست بیانگر خاموشی استاتیک است [۵۲]. اما در بسیاری از موارد، خاموشی استاتیک هم می تواند منجر به ایجاد خط راست در نمودار استرن-ولمر گردد [۱،۵۲]. با استفاده از معادله ۳ مقدار  $K_q$  در هر دو دما بدست آمد (جدول ۱). با توجه به پژوهش های پیشین، هرگاه مقدار  $K_q$  از مقدار محدود کننده  $2 \times 10^{11} M^{-1}S^{-1}$  بیشتر باشد خاموشی از نوع استاتیک است [۸،۹،۴۹،۵۲]. از آنجا که مقادیر  $K_q$  محاسبه شده بیشتر از این مقدار محدود کننده است، بنابراین خاموشی نشر فلورسانس HSA در حضور نانوذرات نقره در هر دو دما از نوع استاتیک است. خاموشی دینامیک و استاتیک با استفاده از تغییرات دمایی نیز از یکدیگر قابل تشخیص است [۱،۸،۵۲]. همان گونه که در شکل ۶ نشان داده شده است با افزایش دما از ۲۷ به ۳۷ °C مقدار  $K_{SV}$  از  $M^{-1}$   $0.4 \times 10^3$  به  $0.5 \times 10^3$  کاهش یافت که بیانگر خاموشی نشر فلورسانس از نوع استاتیک است. این نتایج با داده های طیف سنجی جذبی مرئی-فرابنفش مبنی بر ایجاد کمپلکس بین نانوذرات نقره و HSA کاملاً منطبق است. در مرحله بعد، پارامترهای اتصال در دمای ۲۷ و ۳۷ °C با استفاده از معادله اصلاح شده استرن ولمر (معادله ۴) تعیین شدند [۱،۱۰،۵۱] که در جدول ۱ قابل مشاهده است.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (4)$$

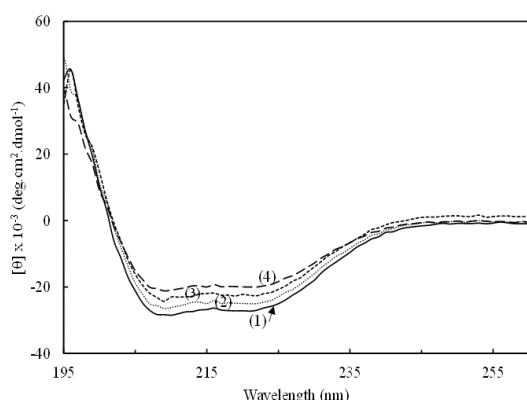
در معادله فوق  $K_a$  ثابت اتصال ایجاد کمپلکس و n تعداد جایگاه های اتصال می باشد. نشان داده شده است که مقدار عددی ثابت اتصال متوسط دارو/لیگاند با HSA معمولاً در محدوده  $10^6 - 10^4 M^{-1}$  است [۱۰]. داروها یا لیگاند هایی که اتصال متوسط با HSA دارند در سیستم خون به خوبی انتقال می یابند و به میزان موثر در بافت هدف رهاسازی می شوند [۱۰]. ثابت اتصال محاسبه شده در دمای ۳۷ °C در این محدوده قرار گرفت، بنابراین نانوذرات نقره بیوسنتز شده در این پژوهش می توانند به صورت موثر در خون توسط HSA منتقل شده و به بافت هدف برسند، البته مطالعات بیشتری در



جدول ۱: محاسبه ثابت‌های استرن-ولمر و اتصال، تعداد جایگاه‌های اتصال و پارامترهای ترمودینامیک اتصال نانوذرات نقره و HSA در دماهای ۲۷ و ۳۷ °C.

$\Delta S^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	n	$K_A$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q$ (M <sup>-1</sup> .S <sup>-1</sup> )	$K_{Sv}$ (M <sup>-1</sup> )	دما (°C)
۳۶۴/۰۱	۸۷/۸۶	-۲۱/۳۵	۰/۵۷	۰/۵۲×۱۰ <sup>۴</sup>	۵×۱۰ <sup>۱۰</sup>	۰/۵۰×۱۰ <sup>۳</sup>	۲۷
		-۲۴/۹۹	۰/۵۶	۱/۶۲×۱۰ <sup>۴</sup>	۴×۱۰ <sup>۱۰</sup>	۰/۴۰×۱۰ <sup>۳</sup>	۳۷

تغییرات ساختاری اندکی در پروتئین HSA می‌گردند، تطابق دارد [۹].



شکل ۷: طیف CD آلومین (۱۴/۲۵ μM) در غیاب (۱) و حضور نانوذرات نقره بیوسنتز شده با غلظت‌های ۴۶ μM (۲)، ۳۷۱ μM (۳) و ۱۸۵ μM (۴) در دمای ۳۷ °C.

جدول ۲- محتوای ساختار دوم HSA در غیاب و حضور نانوذرات نقره بیوسنتز شده در دمای ۳۷ °C.\*

محتوای پیچ‌های نامنظم (%)	محتوای صفحات بتا (%)	محتوای مارپیچ آلفا (درصد)	غلظت نانوذرات (میکرومولار)
24/97 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> ۲۲/۱۴	52/87 <sup>a</sup>	۰
26/39 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> ۲۲/۳۹	51/19 <sup>a</sup>	۴۶
<sup>b</sup> ۲۷/۰۳	<sup>b</sup> ۲۴/۹۶	<sup>b</sup> ۴۸/۰۱	۱۸۵
29/14 <sup>c</sup>	<sup>c</sup> ۲۷/۱۸	<sup>c</sup> ۴۳/۶۸	۳۷۱

\*حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد. (P<۰/۰۵).

پتانسیل الکتروستاتیک یا پتانسیل زتا اختلاف پتانسیل بین آخرین لایه محلول دربرگیرنده ذرات کلئوئید و اولین لایه غیر متحرک از حلال اطراف ذرات کلئوئید می‌باشد [۹،۴۴]. برهمکنش نانوذرات و پروتئین، وابسته به بار سطحی نانوذرات و پروتئین می‌باشد، لذا پتانسیل زتای HSA در غیاب

طیف دورنگ نمای دورانی در ناحیه فرابنفش دور جهت مطالعه ساختار دوم پروتئین‌ها در محلول‌های آبی به کار می‌رود [۴۹]. مقادیر بیضی‌واری مولی (θ) در طول موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ nm، جهت بررسی محتوای مارپیچ آلفا و مقدار بیضی‌واری مولی در طول موج ۲۱۷ nm به عنوان شاخصی برای بررسی محتوای صفحات بتا موجود در پروتئین استفاده می‌گردد [۱،۴۹]. همان‌طور که در شکل ۷ و جدول ۲ قابل مشاهده است، در طیف CD بدست آمده برای HSA دو قله منفی در طول موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ nm قابل مشاهده است که نشان می‌دهد HSA درصد بالایی از مارپیچ آلفا در ساختار دوم خود دارد. این نتیجه با مطالعات پیشین تطابق دارد [۱،۴۹]. پس از افزودن نانوذرات نقره با غلظت ۴۶ μM، محتوای مارپیچ آلفا آلومین تغییر معنی‌داری را نسبت به پروتئین در عدم حضور نانوذرات نشان نداد. با افزایش غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده (۱۸۵ μM) محتوای مارپیچ آلفا کاهش معنی‌داری یافت که همراه با افزایش در محتوای صفحات بتا و رندوم کویل‌ها بود. در غلظت بالاتر (۳۷۱ μM) محتوای مارپیچ آلفا کاهش محسوس‌تری یافت. احتمالاً باقی‌مانده آمینواسیدهای زنجیره اصلی پلی‌پپتید آلومین به نانوذرات نقره (در غلظت بالا) متصل شده، شبکه پیوندهای هیدروژنی اندکی تغییر یافته و پیوندهای هیدروژنی جدید با ساماندهی کمتر تشکیل شده‌اند. اما ساختار HSA در هنگام اتصال نانوذرات حفظ شده است [۱۸،۹]. به عبارت دیگر تشکیل کمپلکس HSA و نانوذرات نقره موجب ایجاد تغییر در ساختار دوم پروتئین نشده است. این نتایج با مشاهدات بگ و همکاران که نشان دادند نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از *Pongamia pinnata* موجب ایجاد

خراسانی کم هزینه و آسان می‌باشد، بنابراین این نانوذرات کروی می‌توانند با انجام مطالعات بیشتر، به عنوان کاندیدای دارویی در طراحی نانوداروها مورد استفاده قرار گیرند.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری کارشناسان مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی در پیشبرد این پژوهش تشکر می‌گردد.

### مراجع

- [1] M.S. Ali, M. Altaf, H.A. Al-Lohedan, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **173**, 2017, 108.
- [2] F. Ghanbar, A. Mirzaie, F. Ashrafi, H. Noorbazargan, M. Dalirsaber Jalali, S. Salehi, S.A. Sadat Shandiz, *IET Nanobiotechnology*, **11**, 2017, 485.
- [3] S.L. Abram, K.M. Fromm, *Chemistry—A European Journal*, **26**, 2020, 10948.
- [4] R. Rank Miranda, M. Pereira da Fonseca, B. Korzeniowska, L. Skytte, K. Lund Rasmussen, F. Kjeldsen, *Journal of Nanobiotechnology*, **18**, 2020, 1.
- [5] Z. Zhao, G. Li, Q.S. Liu, W. Liu, G. Qu, L. Hu, Y. Long, Z. Cai, X. Zhao, G. Jiang, *Journal of Hazardous Materials*, **414**, 2021, 125582.
- [6] A. Hekmat, Z. Roshani, *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, **10**, 2020, 2294.
- [7] D. Kovacs, N. Igaz, M.K. Gopisetty, M. Kiricsi, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 2022, 839.
- [8] A. Hekmat, S. Hatamie, E. Bakhshi, *Nanomedicine Journal*, **8**, 2021, 1.
- [9] M. Beg, A. Maji, A.K. Mandal, S. Das, M.N. Aktara, P.K. Jha, M. Hossain, *Journal of Molecular Recognition*, **30**, 2017, e2565.
- [10] S. Tayyab, M.K.A. Magesvaran, M.Z. Kabir, N.F.W. Ridzwan, S.B. Mohamad, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **39**, 2021, 3565.
- [11] W. Younas, F.U. Khan, M. Zaman, D. Lin, A. Zuberi, Y. Wang, *Science of The Total Environment*, **845**, 2022, 157366.
- [12] T.A.J. de Souza, L.R.R. Souza, L.P. Franchi, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **171**, 2019, 691.
- [13] F. Hamidi, G. Karimzadeh, S.R. Monfared, M. Salehi, *Turkish Journal of Biology*, **42**, 2018, 329.
- [14] D.M. Kasote, M.S. Khyade, J.H. Lee, A.A. Ghadge, in *Bioactives and Pharmacology of Medicinal Plants*, Apple Academic Press, **17**, 2023, 95.
- [15] K.S. Bora, A. Sharma, *Pharmaceutical Biology*, **49**, 2011, 101.
- [16] Y. Zhang, J. Xu, Y. Yang, B. Sun, K. Wang, L. Zhu, *Environmental Science & Technology*, **54**, 2020, 5560.
- [17] A. Aghajanyan, L. Gabrielyan, R. Schubert, A. Trchounian, *AMB Express*, **10**, 2020, 1.
- [18] N. Basavegowda, A. Idhayadhulla, Y.R. Lee, *Materials Science and Engineering: C*, **43**, 2014, 58.
- [19] N. Khattoon, R. Ahmad, M. Sardar, *Biochemical Engineering Journal*, **102**, 2015, 91.
- [20] S.M. Arde, P.R. Salokhe, A.H. Mane, R.S. Salunkhe, *Chemical Science Review and Letters*, **17**, 2014, 557.
- [21] S. Salehi, S.A.S. Shandiz, F. Ghanbar, M.R. Darvish, M.S. Ardestani, A. Mirzaie, M. Jafari, *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 2016, 1835.

و حضور نانوذرات نقره بیوسنتز شده بررسی گردید (جدول ۳). مقدار پتانسیل زتای HSA به دلیل منفی بودن بار سطحی پروتئین آلبومین  $16/09$  mV - بدست آمد که این مقدار با مطالعات پیشین تطابق دارد [۲۸،۱۶]. پس از افزودن نانوذرات نقره به محلول پروتئین، مقدار بار سطحی  $25/11$  mV - بدست آمد که نشان داد پروتئین به سطح نانوذرات نقره متصل گردیده است. در اثر این اتصال بار منفی بیشتری بر سطح نانوذرات قرار گرفته است و این امر موجب پایداری نانوذرات نقره گردیده است [۹،۲۹]. براساس مقدار بار سطحی منفی نانوذرات نقره و HSA، نیروی اصلی در برهمکنش بین نانوذرات و پروتئین نمی‌تواند از نوع الکترواستاتیک باشد. با توجه به اندازه نانوذرات نقره وجود پیوند واندروالسی نیز محتمل نمی‌باشد. بنابراین پیوند فیزیکی دیگری مانند هیدروفوب در این اتصال نقش دارد که با نتیجه بدست آمده از تعیین پارامترهای ترمودینامیک کاملاً تطابق دارد.

### جدول ۳- تغییرات پتانسیل زتا HSA در غیاب و حضور

نانوذرات نقره بیوسنتز شده در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ .

پتانسیل زتا (mV)	نمونه
$-16/09^a$	پروتئین آلبومین سرم انسانی
$-21/10^b$	نانوذرات نقره
$-25/11^c$	پروتئین آلبومین سرم انسانی + نانوذرات نقره

\*حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می‌باشد. ( $P < 0/05$ ).

### ۴- نتیجه گیری

نتایج طیف‌سنجی جذب مرئی-فرابنفش، فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی و همچنین آنالیز پتانسیل زتا نشان داد نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره الکلی گیاه بومی درمنه خراسانی تغییرات شاخصی در ساختار HSA پس از برهمکنش با آن ایجاد نمی‌کنند. همچنین برهمکنش HSA با نانوذرات نقره بیوسنتز شده به صورت خودبخودی بوده و نیروی هیدروفوب نقش اصلی در این برهمکنش را ایفا نموده است. از آنجا که بیوسنتز نانوذرات نقره از گیاه درمنه

- [38] A. Roy, O. Bulut, S. Some, A.K. Mandal, M.D. Yilmaz, *RSC Advances*, **9**, 2019, 2673.
- [39] R. Chokkareddy, G.G. Redhi, S. Kanchi, S. Ahmed, "Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Application", *Eds*, 2018, 113.
- [40] E. Ahmed, A. Hafez, F. Ismail, M. Elsonbaty, H. Abbas, R. Eldin, *Global Adv Res J Microbiol*, **4**, 2015, 36.
- [41] M.M. El-Sheekh, H.Y. El-Kassas, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **15**, 2014, 6773.
- [42] A.K. Tomer, T. Rahi, D.K. Neelam, P.K. Dadheech, *International Microbiology*, **22**, 2019, 49.
- [43] Y. Mirzaei, S.M. Hamad, A.A. Barzinjy, V.M. Faris, M. Karimpour, M.H. Ahmed, *Emergent Materials*, **5**, 2022, 1705.
- [44] S. Bhattacharjee, *Journal of Controlled Release*, **235**, 2016, 337.
- [45] A. Rawle, *Surface Coatings International. Part A, Coatings Journal*, **86**, 2003, 58.
- [46] G. Singh, P.K. Babele, S.K. Shahi, R.P. Sinha, M.B. Tyagi, A. Kumar, *J. Microbiol. Biotechnol*, **24**, 2014, 1354.
- [47] H. Khalili, S.A. Sadat Shandiz, F. Baghbani-Arani, *Journal of Cluster Science*, **28**, 2017, 1617.
- [48] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, *Journal of Advanced Research*, **7**, 2016, 17.
- [49] W. Zhang, Q. Zhang, F. Wang, L. Yuan, Z. Xu, F. Jiang, Y. Liu, *Luminescence*, **30**, 2015, 397.
- [50] H. Mohammad-Beigi, Y. Hayashi, C.M. Zeuthen, H. Eskandari, C. Scavenius, K. Juul-Madsen, T. Vorup-Jensen, J.J. Enghild, D.S. Sutherland, *Nature Communications*, **11**, 2020, 1.
- [51] A. Hekmat, A.A. Saboury, A. Divsalar, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **8**, 2012, 968.
- [52] C. Albrecht, R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, by Editor, Springer, City, 2008, Chap. Chapter.
- [22] S. Rashidian, A.B. Keshtali, A. Mirzaie, *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, **26**, 2018, 1039.
- [23] N. Kaviani, M. Osfoori, *Modares Journal of Biotechnology*, **9**, 2018, 23.
- [24] H. Khalili, F. Baghbani-arani, *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, **25**, 2017, 91.
- [25] N. Fathi, F. Tafvizi, A. Mirzaie, *Journal of Medicinal Plants*, **19**, 2020, 163.
- [26] R. Movagharnia, F. Baghbani-Arani, *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*, **22**, 2018, 31.
- [27] F. Yang, Y. Zhang, H. Liang, *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 2014, 3580.
- [28] A. Hekmat, F. Salavati, S. Hesami Tackallou, *Protein Journal*, **39**, 2020, 268.
- [29] A. Maji, M. Beg, A.K. Mandal, S. Das, P.K. Jha, M. Hossain, *Process Biochemistry*, **60**, 2017, 59.
- [30] N. Shahabadi, S. Zendehecheshm, M. Mahdavi, *Chemistry Select*, **8**, 2023, e202204672.
- [31] G.M. Sulaiman, W.H. Mohammed, T.R. Marzooq, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**, 2013, 58.
- [32] W.K.A. Wan Mat Khalir, K. Shameli, S.D. Jazayeri, N.A. Othman, N.W. Che Jusoh, N.M. Hassan, *Frontiers in Chemistry*, **8**, 2020, 620.
- [33] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li, *Journal of Colloid and Interface Science*, **261**, 2003, 402.
- [34] H. Khalili, S.A. Sadat Shandiz, F. Baghbani-Arani, *Journal of Cluster Science*, **28**, 2017, 1617.
- [35] I. De Leersnyder, H. Rijckaert, L. De Gelder, I. Van Driessche, P. Vermeir, *Nanomaterials*, **10**, 2020, 1394.
- [36] H. Hamidian, S. Alibigi, T. Tavakoli, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **39**, 2020, 1.
- [37] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, "The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment", *ACS Publications*, City, 2003, 107, 668.