

سنتز سبز و مشخصه یابی نانوذرات روی اکسید با استفاده از عصاره گیاه زوفای ایرانی و بررسی ویژگی‌های ضداکسیدانی و ضدباکتریایی

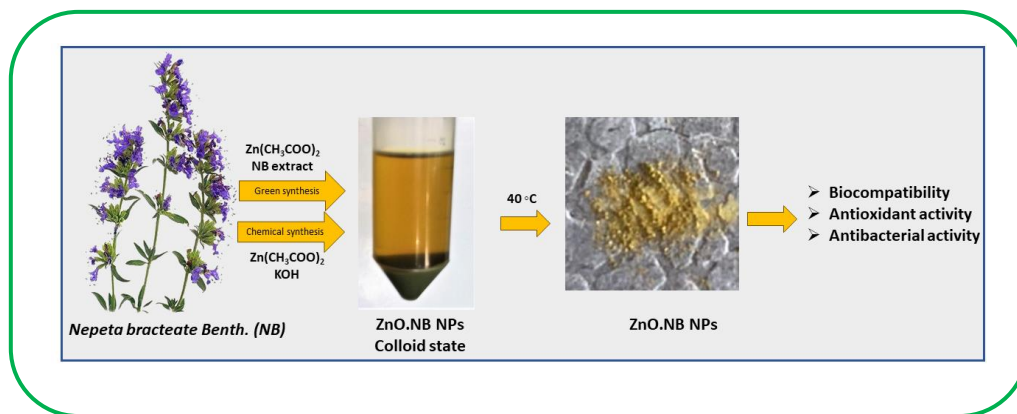
فاطمه الاسدی و آزاده مشکینی*

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱ اسفند ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۲۶ اسفند ۱۴۰۳

چکیده: روش‌های سنتز سبز نانوذرات به دلیل سادگی، کاهش هزینه، زمان و انرژی بیشتر نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی برتری دارند. هدف از مطالعه حاضر، سنتز سبز نانوذرات روی اکسید، (ZnO.NB)، زیست‌سازگار با استفاده از عصاره گل گیاه زوفای ایرانی (*Nepeta bracteate Benth.*) و بررسی و مقایسه اثرهای ضداکسیدانی و ضدباکتریایی آن با نانوذرات روی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی است. بر اساس بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی انجام شده، نانوذرات ZnO.NB دارای ساختار ورتزیت هگزاگونال، کروی شکل با اندازه ۵۸/۵ نانومتر و بار سطحی ۱۹- میلی‌ولت هستند. بررسی‌های زیستی نشان داد که نانوذرات ZnO.NB ایمن‌تر و زیست‌سازگارتر از نانوذرات روی اکسید هستند. همچنین، ویژگی‌های ضداکسیدانی نانوذرات ZnO.NB، ۳/۵ برابر نانوذرات ZnO بود. از سوی دیگر، مشخص شد که اثر ضدباکتریایی نانوذرات ZnO.NB علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی کمتر از نانوذرات ZnO است. بنابراین، استفاده از عصاره گیاه در حین سنتز نانوذرات روی اکسید، ویژگی‌های جدیدی به این نانوذرات می‌بخشد که می‌تواند دامنه کاربرد این نانوذرات را در حوزه‌های مختلف گسترده‌تر کند.

کلید واژه: سنتز سبز، نانوذرات روی اکسید، خاصیت ضداکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی



۱- مقدمه

مورد زیان‌های بالقوه نانوذرات روی اکسید وجود دارد. یکی از اشکالات مهم، سمیت بالقوه آن‌ها است که نگرانی‌های زیست محیطی و بهداشتی را افزایش می‌دهد [۲ و ۳]. در این راستا، توجه زیادی به سنتز سبز نانوذرات به عنوان یک رویکرد سازگار با محیط‌زیست و موجودات زنده شده است [۴]. روش‌های سنتز سبز شامل استفاده از عصاره‌های طبیعی، عصاره‌های گیاهی یا منابع میکروبی، کمتر کردن اتکا به مواد شیمیایی خطرناک و کاهش اثرهای زیست‌محیطی مرتبط با مسیرهای سنتز معمولی است. این روش‌ها معمولاً در شرایط واکنش ملایم‌تر عمل می‌کنند و

نانوذرات روی اکسید به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد و کاربردهای چند منظوره در صنایع مختلف، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این نانوذرات به‌عنوان کاتالیست، پوشش در مقابل پرتوهای فرابنفش، فعالیت ضدباکتریایی در تولید لوازم آرایشی و نیز در منسوجات و لوازم الکترونیکی استفاده می‌شوند. در زمینه پزشکی، نانوذرات روی اکسید برای سامانه‌های دارورسانی و کاربردهای تصویربرداری استفاده می‌شوند [۱]. با این حال، با وجود استفاده گسترده از آن‌ها، نگرانی‌هایی در

۳۰ میلی لیتر کاهش یابد. پس از سانتریفیوژ مخلوط واکنش (۴۰۰۰ دور بر دقیقه)، pH محلول رویی بر روی ۹ تنظیم و به عنوان عصاره گیاه زوفای ایرانی در نظر گرفته شد.

۲-۲- سنتز نانوذرات روی اکسید با عصاره گل گیاه زوفا

مقدار ۰/۱۶ میلی مول روی استات در ۳۶ میلی لیتر آب بدون یون حل شد. دمای محلول به ۴۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. سپس ۱۸ میلی لیتر از عصاره گیاه زوفا به صورت قطره قطره به محلول قبلی افزوده شد. سپس، به مدت ۲ ساعت درون اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ مخلوط واکنش (۴۰۰۰ دور بر دقیقه، ۱۰ دقیقه)، رسوب حاصل با آب بدون یون شسته شد و برای خشک شدن در آن با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. این نانوذرات ZnO.NB نام گرفتند.

۲-۳- سنتز نانوذرات روی اکسید به روش شیمیایی

مقدار ۰/۵۹ میلی مول روی استات در ۵۰ میلی لیتر اتانول حل و به آن ۴ میلی لیتر پتاسیم هیدروکسید ۱/۵ میلی مولار افزوده شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت با همزن مغناطیسی به هم زده شد. پس از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور بر دقیقه، ۱۰ دقیقه)، رسوب حاصل با اتانول شسته شد. نانوذرات به دست آمده جهت خشک شدن در آن ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند [۹].

۲-۴- دستگاهها

برای شناسایی گروه های عاملی از طیف سنج فرورسرخ تبدیل فوریه نیکولت آواتار مدل ۳۷۰ استفاده شد. برای بررسی ریخت نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی میرا ۳ تسکن مدل XMU استفاده شد. عناصر تشکیل دهنده نانوذرات با استفاده از طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس تعیین شد. بار سطحی نانوذرات با استفاده از دستگاه پتانسیل زتا Z8000 ساخت فرانسه در pH ۷/۴ سنجش شد. فاز بلوری نانوذرات با دستگاه پراش پرتو ایکس اکسپلورر مدل GNR ساخت ایتالیا تعیین شد.

۲-۵- سنجش محتوای فنولی و فلاونوئیدی

برای سنجش محتوای فنولی، ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره گیاه و نانوذرات (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به طور جداگانه با فولین-سیوکالتو (رقیق شده ۱۰:۱ حجمی/حجمی) مخلوط شد و پس از ۳ دقیقه، ۵۰۰ میکرو لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به هر نمونه اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور بر دقیقه، ۱۰ دقیقه) شدند. میزان جذب در ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری و محتوای فنولی بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد. برای سنجش فلاونوئیدها، ۵۰ میکرو لیتر از نمونه ها با ۴۰۰ میکرو لیتر

مصرف انرژی را کاهش می دهند و فرآیند تولید را پایدارتر می کنند. علاوه بر این، استفاده از عوامل زیست تولید اغلب ویژگی های تثبیت کننده و عملکردی منحصر به فردی را به نانوذرات می دهند. در مقایسه با منابع میکروبی، استفاده از عصاره های استخراج شده از گیاهان در سنتز نانوذرات، بیشتر مورد اقبال قرار گرفته است. این امر بدلیل تنوع وسیع گیاهان و دسترسی بالا به آنها می باشد. همچنین گیاهان در مقیاس بزرگتر بدون نیاز به فرآیندهای تخمیر پیچیده، کشت می شوند و فرآیند سنتز را ساده تر و مقرون به صرفه تر می کنند. افزون بر این، عصاره های گیاهی معمولاً غیر بیماری زا هستند و حداقل خطر آلودگی را به همراه دارند. این می تواند از نظر ایمنی و سهولت حمل و نقل در مقایسه با سامانه های میکروبی مفید باشد، که ممکن است به کنترل دقیق تری برای جلوگیری از آلودگی نیاز داشته باشند [۵].

در این مطالعه از عصاره استخراج شده از گل های گیاه زوفای ایرانی با نام علمی *Nepeta bracteate Benth* به جای مواد شیمیایی، برای سنتز سبز نانوذرات روی اکسید استفاده شد. ایران یکی از خواستگاه های اصلی رویش این گیاه است. گیاه زوفا یکی از جنس های بزرگ خانواده نعنا است که با نام "پونه سا" شناخته شده است. این گیاه بطور سنتی به عنوان آرام بخش، ضد سرافه، ضد التهاب و ضد سرطان استفاده می شود. بررسی متون در مورد جنبه های شیمیایی و زیستی گیاه نشان می دهد که ترکیب های فعال در گونه های پونه سا شامل چندین ترکیب پلی فنولی و گلوکوزیدهای آنها (هیدروکسی بنزوئیک، اسیدهای کافنیک)، فلاونوئیدها (سیرسیماریتین، سالویرتین، لوتولین، آپیزن) و دی ترپنوئیدهای آبتان است [۶-۸]. در این مطالعه ویژگی های فیزیکی-شیمیایی و زیستی نانوذرات سنتز شده به روش سبز با نانوذرات روی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

۲- روش های تجربی

۲-۱- تهیه عصاره گیاهی از گل گیاه زوفا

گیاه زوفا ایرانی از منطقه تنگ سرخ واقع در شمال غرب شیراز (استان فارس، ایران) در اردیبهشت ماه ۱۳۹۹ جمع آوری و در هر بار یوم دانشگاه فردوسی مشهد با شماره E-1670 FUMH توسط دکتر عاطفه پیرانی اسگویی تایید و ثبت شد. برای تهیه عصاره از گل گیاه زوفا، گل های گیاه جدا و در دمای اتاق در فضای تاریک خشک شدند. ۱۰ گرم از پودر گل گیاه زوفا به ۱۰۰ میلی لیتر محلول استون و آب (نسبت ۷۰:۳۰ حجمی/حجمی) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس مخلوط صاف و محلول زیر صافی با همزن مغناطیسی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به هم زده شد تا حجم آن به

دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید (MTT) با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت و تشکیل رسوب‌های بنفش رنگ، به سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$Survival (\%) = \frac{A_s - A_n}{A_c} \times 100$$

A_s جذب سلول‌های تیمار شده با نانوذرات، A_n جذب نانوذرات، A_c جذب سلول‌های تیمار نشده.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات

برخلاف نانوذرات روی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی که سفید رنگ هستند، نانوذرات روی اکسید سنتز شده با عصاره گل گیاه زوفای ایرانی به رنگ قهوه‌ای بودند. روی استات هنگامی که در یک محیط آبی تحت فشار و گرما قرار می‌گیرد، به روی هیدروکسید و استات تبدیل می‌شود. پس از آن، در یک محیط قلیایی، به آنیون $Zn(OH)_4^{2-}$ و سپس به روی اکسید تبدیل می‌شود. وجود ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی در گیاه منجر به پروتون‌زدایی آن‌ها در محیط قلیایی می‌شود و تعامل با یون‌های روی را تسهیل می‌کند. این ترکیب‌ها در طول سنتز به عنوان مولکول‌های الگو و نیز عامل کاهنده عمل می‌کنند و بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات تأثیر می‌گذارند. گفتنی است که استفاده از ترکیب‌های قالب در سنتز نانوذرات بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها تأثیر دارد. تا کنون از عصاره گیاهان مختلف برای سنتز نانوذرات روی اکسید استفاده شده است [۱۱]. ترکیب‌های فعال موجود در عصاره گیاه به عنوان عامل کاهنده عمل نموده و باعث کاهش یون‌های فلزی و تشکیل نانوذرات فلزی می‌شوند. اما از آنجا که ترکیب‌های فعال گیاه در اغلب موارد ضعیف هستند و در چنین شرایطی کنترل ریخت و اندازه نانوذرات مشکل است، برای افزایش سینتیک و اکنش و کنترل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات از روش آب‌گرمایی نیز استفاده می‌شود. البته این مسئله در مورد ترکیب‌های فعال تمام گیاهان و یا بخش‌های مختلف گیاه ممکن است صدق نکند. همچنین شرایط جغرافیایی که گیاه در آن رشد کرده است و نیز روش عصاره‌گیری بر محتوای ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی تأثیر می‌گذارد که این امر بر بهینه‌سازی روش سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهان موثر است [۵]. به عنوان نمونه پژوهشگران از عصاره برگ گیاه زوفا برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند. برای سنتز این نانوذرات از روش آب‌گرمایی استفاده نشده است ولی زمان و اکنش تا ۲۴ ساعت افزایش یافته است

آب بدون یون مخلوط و پس از افزودن سدیم نیترات ۵ درصد (۵ دقیقه)، آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (۶ دقیقه) و سود ۱ مولار، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب در ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت فلاونوئیدها با استفاده از منحنی استاندارد کاتچین تعیین شد.

۲-۶- تعیین فعالیت ضداکسیدانی

۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، در اتانول با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار حل شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نانوذرات با غلظت‌های متفاوت و پراکنده شده در اتانول با ۲۰۰ میکرولیتر محلول DPPH مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری مخلوط واکنش در تاریکی و سپس حذف نانوذرات با استفاده از سانتریفیوژ، جذب محلول رویی در ۵۱۷ نانومتر سنجش و درصد ظرفیت کاهش رادیکالی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$Scavenging (\%) = [1 - \frac{A_s}{A_c}] \times 100$$

در معادله فوق A_s جذب نمونه و A_c جذب شاهد (محلول DPPH) است [۱۰].

۲-۷- بررسی فعالیت ضدباکتریایی

در این مطالعه از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی با شماره ATCC25922 و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با شماره ATCC25923 استفاده شد. غلظت‌های مختلف نانوذرات سنتز شده که در بافر فسفات پراکنده شده بودند، به $10^6 \times 7/5$ CFU/میلی‌لیتر سلول باکتری اضافه و پس از ۲۴ ساعت برخواش در شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد زنده‌مانی باکتری‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

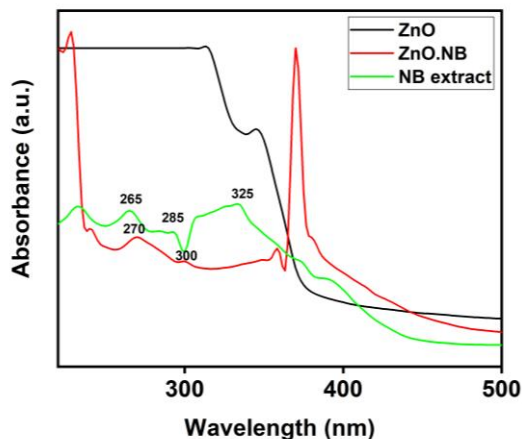
$$Survival (\%) = \frac{A - (B + C)}{D - B}$$

در این معادله، A جذب باکتری‌های تیمار شده، B جذب محیط کشت، C جذب نانوذرات، D جذب باکتری‌های تیمار نشده است.

۲-۸- بررسی زیست‌سازگاری نانوذرت

غلظت‌های مختلف نانوذرات پراکنده شده در بافر فسفات به 10^4 سلول نرمال پوستی موش (NIH3T3) در شرایط آزمایشگاهی اضافه شد. پس از نگهداری سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی جریان گاز CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۶ درصد، به سلول‌ها ۱۵ میکرولیتر محلول ۳-(۴،۵-دی‌متیل تیازولیل)-۵،۲-۵-

عصاره گیاه همسو هستند [۱۵]. در نتیجه، جدای از تشکیل دقیق، این احتمال وجود دارد که نانوذرات سنتز شده از طریق روش سبز، اجزایی از عصاره گیاه را نیز در خود جای داده که بر خواص مختلف نانوذرات تأثیر می‌گذارد.



شکل ۱. طیف فرابنفش-مرئی نانوذرات و عصاره گیاه زوفای ایرانی.

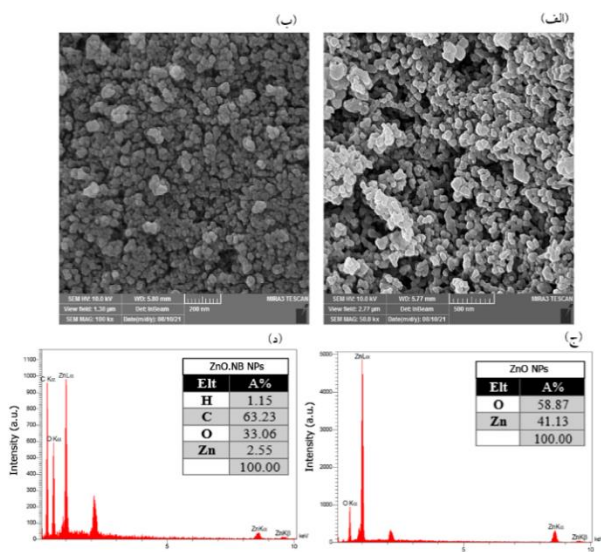
شیمی سطح نانوذرات سنتز شده با استفاده از طیف فرسرخ بررسی شد (شکل ۲). مشابه طیف عصاره گیاه زوفا، نوار وسیع مشاهده شده در محدوده 3400 cm^{-1} با ارتعاش‌های کششی گروه‌های OH در هر دو طیف ZnO.NB و ZnO مطابقت دارد. گروه‌های هیدروکسیل در طیف نانوذرات ZnO، احتمالاً مربوط به مولکول‌های آب جذب‌شده به سطح نانوذره و در طیف نانوذرات ZnO.NB مربوط به ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی عصاره گیاه است. در طیف عصاره، نوار جذبی در 2829 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه‌های C-H در آلکان‌ها نسبت داده می‌شود. ارتعاش‌های کششی گروه‌های C=O و C=C در محدوده عدد موج 1620 cm^{-1} مشاهده می‌شود که مربوط به حلقه آروماتیک فنول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای آمینه است. نوار جذبی در 1410 cm^{-1} به ارتعاش‌های کششی گروه‌های CH_2 و CH_3 در فلاونوئیدها مرتبط است. همان‌طور که در شکل ۲ (ب و ج) نشان داده شده است، نوارهای موجود در طیف عصاره زوفا به طور مشابه در طیف نانوذرات ZnO.NB شناسایی شده‌اند که نشان دهنده ادغام ترکیب‌های عصاره در ساختار این نانوذرات است. نوار جذبی در عدد موج 440 cm^{-1} با ارتعاش کششی پیوند Zn-O مرتبط است که در طیف نانوذرات ZnO و ZnO.NB نیز مشهود است.

که این امر بر توزیع اندازه ذرات تأثیرگذار بوده است [۱۲].

با توجه به اینکه ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی گیاه در سنتز نانوذرات موثر هستند، محتوای فنولی و فلاونوئیدی در عصاره گیاه زوفای ایرانی و نانوذرات ZnO.NB اندازه‌گیری شد. مقدار ترکیب‌های فنولی در یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه و نانوذرات به ترتیب برابر با 0.213 و 0.729 میلی‌گرم گالیک اسید بر میلی‌لیتر و مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی به ترتیب برابر با 0.135 و 0.085 میلی‌گرم کاتچین بر میلی‌لیتر بود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گیاهان متعلق به جنس پونه‌سا، حاوی ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی متعددی است که شامل مشتق‌های فنولیک اسید مانند کافئیک اسید، هیدروکسی بنزوئیک و همچنین ترکیب‌های فلاونوئیدی مانند سیرسیماریتین، سالویژنین، لوتنولین، آپیزنین است [۸]. این ترکیب‌ها می‌توانند در فرآیند سنتز نانوذرات ZnO نقش کلیدی ایفا کنند. ترکیب‌های فنولی به عنوان عوامل کاهنده عمل کرده و Zn^{2+} را به ZnO تبدیل می‌کنند، در حالی که فلاونوئیدها با پیوند به سطح نانوذرات، از تجمع آن‌ها جلوگیری کرده و پایداری ساختار نهایی را بهبود می‌بخشند. سازوکار پیشنهادی شامل سه مرحله است: (۱) ابتدا یون‌های Zn^{2+} با گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربوکسیلیک ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کمپلکس تشکیل می‌دهند، (۲) سپس ترکیب‌های فنولی با انتقال الکترون، Zn^{2+} را کاهش داده و منجر به تشکیل $\text{Zn}(\text{OH})_2$ می‌شوند، و (۳) در نهایت، در اثر از دست دادن آب $\text{Zn}(\text{OH})_2$ در شرایط دمایی مناسب، نانوذرات ZnO شکل می‌گیرند.

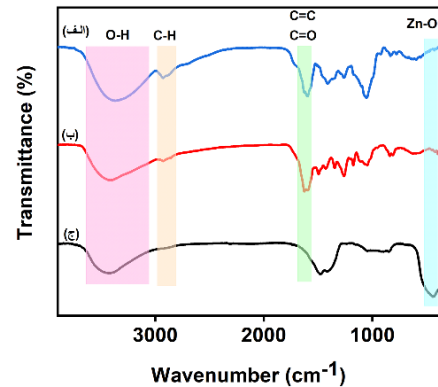
همان‌طور که در طیف فرابنفش-مرئی نانوذرات ZnO.NB نشان داده شده است (شکل ۱)، پیک مشخصی در طول موج 370 nm وجود دارد که نشان‌دهنده سنتز مناسب نانوذرات روی اکسید است. با توجه به مطالعات قبلی، مشخص شده است که نانوذرات ZnO بر اساس ویژگی‌های ساختاری و اندازه ذرات، پیک جذب گسترده‌ای در محدوده طول موج 340 تا 380 nm دارند. در مقایسه با طیف نانوذرات ZnO، شدت این پیک در طیف نانوذرات ZnO.NB بیشتر شده است. این افزایش نشان دهنده افزایش بازده تولید نانوذرات است. علاوه بر این، پیک مورد نظر به سمت طول موج‌های بلندتر منتقل شده است که نشان‌دهنده افزایش اندازه نانوذرات است [۱۳] و [۱۴]. همچنین، ترکیب‌های فعال موجود در عصاره نیز می‌توانند رزونانس الکترون‌ها را در سطح نانوذرات تغییر دهند و در نتیجه منجر به تغییر در شدت و انتقال بیشینه پیک جذبی نانوذرات شوند. افزون بر این، دو پیک در طول موج‌های 270 و 300 nm در طیف نانوذرات ZnO.NB قابل تشخیص هستند که با پیک‌های مرتبط با ترکیب‌های فعال در عصاره‌های گیاهی در طول موج‌های 265 و 285 nm ، مانند آپیزنین و لوتنولین موجود در

ریخت نانوذرات در کنترل خواص مختلف مانند ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و نوری بسیار مهم است. برای بررسی ریخت نانوذرات سنتز شده، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد (شکل ۴ (الف و ب)). تصویرهای به دست آمده نشان داد که هر دو نانوذرات ZnO و ZnO.NB دارای ساختار کروی با توزیع تقریباً یکنواخت هستند. بر اساس تحلیل این تصویرها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ، میانگین اندازه نانوذرات ZnO، $49/1 \pm 7/4$ نانومتر و برای نانوذرات ZnO.NB، $58/5 \pm 2/7$ نانومتر به دست آمد.



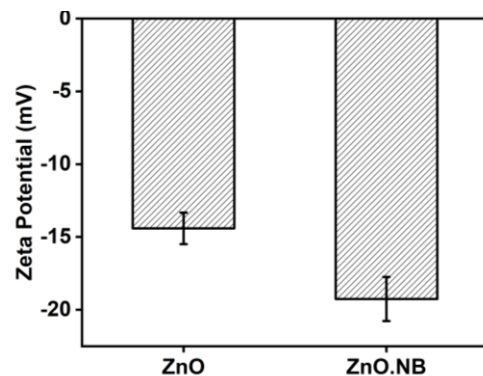
شکل ۴. بررسی ریخت نانوذرات (الف) ZnO، (ب) ZnO.NB و طیف پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات سنتز شده (ج و د).

در طیف پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات ZnO، پیک‌های مربوط به عناصر شیمیایی O و Zn شناسایی شدند که سنتز موفقیت‌آمیز و بدون ناخالصی این نانوذرات را تایید می‌کند (شکل ۴ (ج)). به طور مشابه، پیک‌های O و Zn در طیف نانوذرات ZnO.NB مشهود بود که سنتز ریستی دقیق نانوذرات ZnO.NB را تایید کرد (شکل ۴ (د)). با این حال، دو عنصر اضافی، H و C نیز در این طیف شناسایی شدند. وجود این عناصر که نشان‌دهنده هیدروکربن‌های زیستی در ترکیب‌هاست، ادغام اجزای عصاره گیاه زوفا در ساختار نانوذرات ZnO.NB را تایید می‌کند. همان‌طور که مشاهده شد، درصد اتمی C در این نانوذرات ۶۳/۲۳ درصد است که نشان‌دهنده حضور قابل توجه عوامل زیستی در نانوذرات ZnO.NB است. علاوه بر این، افزایش درصد عنصر O در ساختار نانوذرات ZnO.NB در مقایسه با نانوذرات ZnO



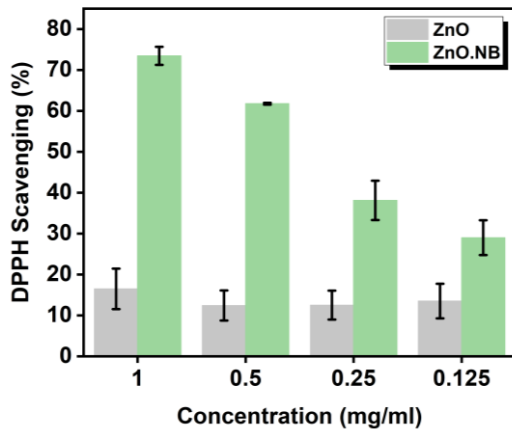
شکل ۲. طیف فرسرخ عصاره زوفا (الف)، نانوذرات ZnO (ب) و ZnO.NB (ج).

پایداری نانوذرات در محیط، تحت تأثیر بار سطحی آن‌ها است که می‌تواند اتصال آن‌ها به سطوح مختلف از جمله غشای سلول‌های انسانی یا باکتری را تقویت یا تضعیف کند. علاوه بر این، نقش مهمی در پایداری پراکندگی نانوذرات در محیط دارد. برای ارزیابی بار سطحی نانوذرات سنتز شده، آزمایش پتانسیل زتا انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO.NB بار سطحی منفی در محدوده -۱۹ میلی‌ولت تحت شرایط pH فیزیولوژیک از خود نشان می‌دهند. بار منفی نانوذرات ZnO.NB به پروتون‌زدایی گروه‌های شیمیایی خاص از جمله گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل موجود در ساختار فنول‌ها و فلاونوئیدها در عصاره گیاه زوفا نسبت داده می‌شود. حضور این گروه‌های شیمیایی یونیزه شده روی سطح ZnO.NB در pH قلیایی منجر به بار سطحی منفی برای نانوذرات می‌شود. بار سطحی نانوذرات ZnO، -۱۴ میلی‌ولت اندازه‌گیری شد که مطابق با گزارش‌های قبلی بود [۱۶].



شکل ۳. اندازه‌گیری بار سطحی نانوذرات سنتز شده در pH ۷/۴.

است، فعالیت ضداکسیدانی نانوذرات ZnO.NB با افزایش غلظت روند صعودی نشان می‌دهد. به طور ویژه، با افزایش غلظت نانوذرات ZnO.NB از ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، درصد فعالیت ضداکسیدانی از حدود ۳۰ درصد به بیش از ۷۰ درصد افزایش یافت. در مقابل، فعالیت ضداکسیدانی نانوذرات روی اکسید در تمام غلظت‌ها زیر ۲۰ درصد باقی ماند. قابلیت ضداکسیدانی مشاهده‌شده در نانوذرات ZnO.NB احتمالاً به حضور عوامل فنولی و فلاونوئیدی در سطح نانوذرات نسبت داده می‌شود. در این پژوهش، فنول‌ها و فلاونوئیدها با اهدای الکترون، تبدیل رادیکال‌های DPPH به DPPH₂ را تسهیل می‌کنند و در نتیجه کاهش رنگ آبی، به فعالیت ضداکسیدانی کمک می‌کنند.



شکل ۶. بررسی فعالیت ضداکسیدانی نانوذرات سنتز شده با استفاده از ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل.

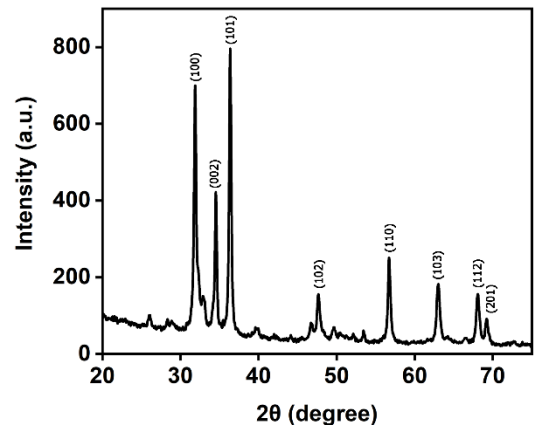
۳-۳- فعالیت ضدباکتریایی

همان‌طور که در شکل ۷ (الف و ب) مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذرات ZnO.NB، میزان زنده‌مانی هر دوسویه باکتری گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی کاهش یافت. فعالیت ضدباکتریایی این نانوذرات در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار بیشتر از باکتری اشرشیا کلی می‌باشد. بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات ZnO نشان داد که در مقایسه با نانوذرات ZnO.NB، این نانوذرات توان بسیار بیشتری در مهار رشد باکتری‌ها دارند. برای مقایسه دقیق‌تر، از شاخص MIC که کمینه غلظت لازم برای مهار کامل رشد باکتری‌ها است، استفاده شد. برای نانوذرات ZnO و ZnO.NB علیه باکتری اشرشیا کلی شاخص MIC به ترتیب برابر با ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شاخص

می‌توان به وجود فنول‌ها و فلاونوئیدها نسبت داد. الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات ZnO.NB، نشان‌دهنده ساختار ورتزیت هگزگونال با پیک‌های مشخص در زاویه‌های ۳۲/۷۷، ۳۴/۴۲، ۳۶/۲۵، ۴۷/۵۴، ۵۶/۶۰، ۶۲/۸۶، ۶۶/۳۷ و ۶۹/۱۰ درجه است که به ترتیب مربوط به صفحه‌های (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳)، (۱۱۲) و (۲۰۱) و مطابق با JCPDS شماره ۹۶-۴۱۷۹-۹۰۰ می‌باشد (شکل ۵). شدت بالای پیک (۱۰۱) نشان‌دهنده فاز غالب ورتزیت است و پیک (۰۰۲) بیانگر احتمال رشد ترجیحی در راستای محور c می‌باشد. برای تخمین اندازه بلورک‌ها از معادله شرر استفاده شد (معادله ۱) و مقدار آن برابر با ۵۲/۳ نانومتر بود.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

که در آن D اندازه بلورک (nm)، K ثابت شرر (۰/۹)، λ طول موج پرتو (Cu Kα = ۰/۱۵۴ nm)، β پهنای پیک در نیمه بیشینه (FWHM) و θ نصف زاویه پراش است.

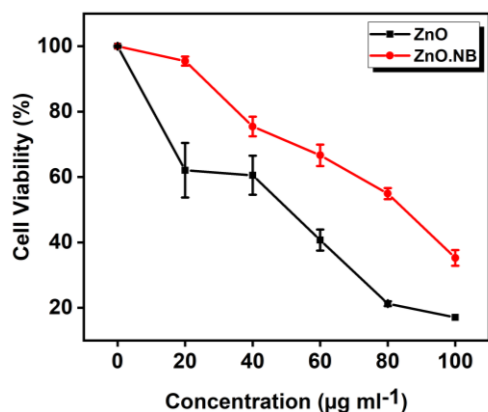


شکل ۵. الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات ZnO.NB.

۳-۲- فعالیت ضداکسیدانی

در این پژوهش از ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل برای ارزیابی ویژگی‌های ضداکسیدانی نانوذرات استفاده شد. ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل، یک رادیکال آزاد پایدار است که معمولاً برای بررسی فعالیت ضداکسیدانی ذرات استفاده می‌شود. اساس این روش بر کاهش ۲،۲-دی-فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل با ضداکسیدان‌ها است که منجر به کاهش رنگ آبی می‌شود. فعالیت ضداکسیدانی نانوذرات ساخته شده در غلظت‌های ۰/۱۲۵ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده

برای بررسی دقیق‌تر شاخص IC_{50} که معادل غلظتی از نانوذره که ۵۰ درصد رشد سلول‌ها را مهار می‌کند، استفاده شد. شاخص IC_{50} برای نانوذرات ZnO و ZnO.NB به ترتیب $1/14 \pm 80/40$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و $0/95 \pm 38/46$ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از نرم افزار پریم محاسبه شد.

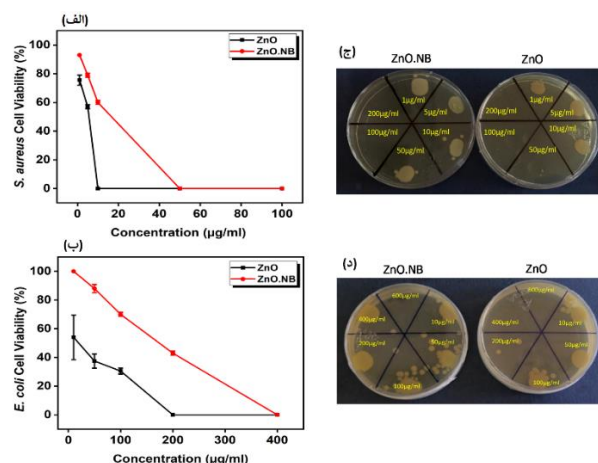


شکل ۸. بررسی سمیت نانوذرات سنتز شده بر سلول‌های عادی پوست (NIH3T3).

۴- نتیجه گیری

سنتز نانوذرات ZnO با استفاده از عصاره گیاهی و روش آب‌گرمایی در مقایسه با روش‌های مرسوم که با استفاده از پتاسیم هیدروکسید، سدیم هیدروکسید و یا کاهنده‌های قوی‌تر در دمای اتاق یا دماهای بالاتر انجام می‌شود، چندین برتری دارد. اول این‌که، استفاده از عصاره‌های گیاهی با اصول سنتز سبز همخوانی دارد و با کاهش وابستگی به مواد شیمیایی، فرآیند را دوستدار محیط زیست می‌کند. دوم این‌که، ترکیب‌های فعال گیاه هم به عنوان کاهنده و هم به عنوان الگو یا قالب عمل می‌کنند که بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی نانوذرات موثر است. سوم این‌که، استفاده از عصاره گیاهی در سنتز نانوذرات به دلیل داشتن ترکیب‌های فعال مانند فنول‌ها و فلاونوئیدها، ویژگی‌های مطلوبی را به نانوذرات می‌دهند و آن‌ها را به طور بالقوه برای کاربردهای هدفمند در زمینه‌های مختلف مناسب‌تر می‌سازد. در این بررسی، سنتز نانوذرات روی اکسید با عصاره استخراج شده از گل گیاه زوفای ایرانی منجر به تولید نانوذراتی با اندازه‌ای تقریباً برابر با نانوذرات روی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی شد ولی فعالیت ضداکسیدانی بسیار بیشتری را از خود نشان دادند. از سوی دیگر، اگرچه فعالیت ضدباکتریایی ZnO.NB کمتر از نانوذرات ZnO بود، اما نانوذرات ZnO.NB زیست-سازگارتر بودند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده،

MIC برابر با ۵۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. افزون بر این، شاخص MBC که کمینه غلظت لازم برای از بین رفتن باکتری است، بررسی شد. بر اساس نتایج ارائه شده در شکل ۷ (ج و د)، برای نانوذرات ZnO.NB و ZnO علیه باکتری *اشرشیا کلی*، شاخص MBC به ترتیب برابر با ۶۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، شاخص MBC، برابر با ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. عوامل مختلفی که بیشتر به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات بر می‌گردد، مانند اندازه، ریخت، بلورینگی، شیمی سطح نانوذره و نیز سینتیک رهایش یون، روی بر فعالیت زیستی نانوذرات تاثیر می‌گذارد [۱۷ و ۱۸]. همچنین، وجود ترکیب‌های زیست فعالی که بر روی سطح نانوذرات ZnO.HO وجود دارد، احتمالاً اثرهای سمی نانوذره را تعدیل می‌کنند.



شکل ۷. بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده. مهار رشد باکتری (الف) *استافیلوکوکوس اورئوس* و (ب) *اشرشیا کلی*. تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ج) و باکتری *اشرشیا کلی* (د).

۴-۳- بررسی زیست‌سازگاری نانوذرات

بر اساس گزارش‌های قبلی نانوذرات ZnO دارای سمیت بر سلول‌های عادی بدن موجودات زنده بویژه انسان است [۲]. برای بررسی زیست‌سازگاری نانوذرات سنتز شده، سمیت این نانوذرات بر سلول‌های عادی پوست موش NIH3T3 بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با نانوذرات ZnO.NB، زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با نانوذرات ZnO، با افزایش غلظت با سرعت بسیار بیشتری کاهش می‌یابد. این نتایج نشان‌دهنده سمیت بسیار بیشتر نانوذرات ZnO در مقایسه با نانوذرات ZnO.NB می‌باشد.

- [7] M. Zhang, M. Chen, Y. Hou, C. Fan, H. Wei, L. Shi, G. Ma, J. Zhang, *Molecules* **26** (2021).
- [8] F. Nejad-Alimoradi, M. Khodashenas, F. Rezanejad. *Iran. J. Med. Aromat. Plants Res.* **40**, 417 (2024).
- [9] J. Zhang, R. Zhang, L. H. Zhao, S. Q. Sun. *CrystEngComm.* **14**, 613 (2011).
- [10] A. Meshkini. *Waste Biomass Valor.* **96**, 1015 (2017).
- [11] S. Zeghoud, H. Hemmami, B. Ben Seghir, I. Ben Amor, I. Kouadri, A. Rebiai, M. Messaoudi, S. Ahmed, P. Pohl, J. Simal-Gandara. *Mater. Today Commun.* **33**, 104747 (2022).
- [12] A. Balciunaitiene, V. Puzeryte, V. Radenkovs, I. Krasnova, P. B. Memvanga, P. Viskelis, P. Streimikyte, J. Viskelis, *Molecules* **27**, 7700 (2022).
- [13] E. G. Goh, X. Xu, P. G. McCormick. *Scr. Mater.* **78**, 49 (2014).
- [14] T. Rajabnia, A. Meshkini. *Process Biochem.* **65** 186 (2018).
- [15] R. A. Holser, *Spectroscopy*, 1-5 (2012).
- [16] C. H. Pan, W. Te Liu, M. Y. Bien, I. C. Lin, T. C. Hsiao, C. M. Ma, C. H. Lai, M. C. Chen, K. J. Chuang, H. C. Int. *J. Nanomed.* **9**, 3631 (2014).
- [17] S. V. Gudkov, D.E. Burmistrov, D.A. Serov, M.B. Rebezov, A.A. Semenova, A. B. Lisitsyn, *Front. Phys.* **9**, 641481 (2021).
- [18] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seenii, N.H.M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad. *Nano-Micro Lett.* **7**, 219 (2015).

ZnO.NB می‌تواند جایگزین مناسبی برای نانوذرات ZnO در صنایع مختلف بویژه صنایع غذایی و آرایشی و بهداشتی باشد.

سپاسگزاری

این مقاله براساس طرح پژوهشی تصویب شده با کد ۳/۵۵۵۳۳ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید.

*عده دار مکاتبات

ایران، استان خراسان رضوی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی (a.meshkini@um.ac.ir)

مراجع

- [1] S. Jha, R. Rani, S. Singh. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **336**, 1437 (2023).
- [2] V. G. Reshma, P. V. Mohanan. *Colloids Surf. B Biointer.* **157**, 182 (2017)
- [3] A. Czyżowska, A. Barbasz. *Int. J. Environ. Health Res.* **32**, 885 (2022).
- [4] R. V. Bordiwala. *Results Chem.* **5**, 100832 (2023).
- [5] A. R. Bagheri, N. Aramesh, M. S. Hasnain, A. K. Nayak, R. S. Varma. *Chem. Phys. Impact.* **7**, 100255 (2023).
- [6] E. L. Yang, Y. Hou, G. X. Ma, L. J. Zou, X. D. Xu, H. F. Wu, J. S. Yang, H. W. Wei, C. Z. Fan, Z. C. Sun, L. L. Shi, *Front. Chem.* **10**, 944972 (2022).