



Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Pimpinella affinis* Leaf and Stem Extracts and Evaluation of Their Cytotoxic Effects Against Human Breast Cancer Cells Under In-vitro Condition

Esmailpour K^a, Shourian, M^{b*}

^a Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, 4199613776, Iran

^{b*} Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, 4199613776, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Esmailpour K, Shourian, M. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Pimpinella affinis* Leaf and Stem Extracts and Evaluation of Their Cytotoxic Effects Against Human Breast Cancer Cells Under In-vitro Condition. . Journal of Cell and Tissue. 2023; 14(3):

doi <https://10.61186/JCT.14.3.217>

KEYWORDS

Breast cancer
Gold nanoparticle
Green synthesis
Pimpinella affinis
MCF-7 cell line

ABSTRACT

Aim: Nowadays, one of the great challenges of mankind is to find a suitable way for the treatment of cancer. Recent developments show that nanotechnology has a significant impact on the prevention, diagnosis and treatment of cancer. In nanotechnology, there are different physical and chemical methods to produce nanoparticles but mostly chemical methods are used. The nanoparticles produced using these methods are harmful to health due to the absorption of chemical species on their surface. In order to eliminate this big problem, biological methods such as the use of fungi, bacteria and plants have replaced other methods for the synthesis of nanoparticles which is called green synthesis. It is cheaper, simpler and non-toxic than other methods. The use of plants for the synthesis of nanoparticles has become more important than other biological methods due to the elimination of the difficult step of cell culture maintenance.

Material and Methods: In this study, gold nanoparticles were formed after treating the HAuCl₄ solution with the aqueous extract of Anarijeh plant with the scientific name *Pimpinella affinis*. In this research, different amounts of aqueous extracts of leaves and stems of *Pimpinella affinis* were used for the synthesis of gold nanoparticles. UV-Visible spectroscopy and DLS methods were used to evaluate nanoparticles and determine their average size and stability. Also, SEM method was used to investigate their morphology. FTIR method was used to determine the functional groups of the aqueous extract and synthesized gold nanoparticles; in addition GC/MS device was used to determine the composition of the extract. Finally, MTT analysis was used to

* Corresponding author. Tel& Fax: 01333333647

E-mail address: shourian@guilan.ac.ir

DOI: <https://10.61186/JCT.14.3.217>

Received: 5 Sep. 2023; Received in revised form: 2 Nov. 2023; Accepted: 4 Nov. 2023

Original Article

©Author



investigate the cytotoxic effects of nanoparticles on MCF-7 cell line along with treatments of 24, 48 and 72 hours.

Results: The results of the analysis were showed that the optimal concentration of the *Pimpinella affinis* extract for the synthesis of gold nanoparticles is 1 mg/ml. The synthesized gold nanoparticles using the mentioned concentration of the extract have an average size of 20 nanometers with a zeta potential of -61 mV which has the best stability. They had a spherical shape with a polydispersity equal to 0.7. The results of FTIR analysis show the presence of hydroxyl, simple carbonyl groups and hydrocarbon functional groups in the compounds of the extract. Experiments showed that phenolic and carboxylic compounds play the most important role in the reduction of gold salt. Also, proteins and lipids have made gold nanoparticles stable. The essential compounds identified in the extract by GC/MS method include Phenolic and flavonoid compounds and terpenes which are confirmed by the FTIR spectrum. The treatment time of 48 hours for MCF-7 cell line is the best time for the toxicity of nanoparticles with IC50 equal to 384.2 µg/ml, which was determined by MTT analysis.

Conclusion: According to the above findings, it can be concluded that *Pimpinella affinis* is one of the suitable options for the synthesis of gold nanoparticles, and it can be done with more studies on nanoparticles synthesized using this plant, considered it as one of the efficient methods to achieve the goal of proper treatment for breast cancer.



سنتز سبز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره برگ و ساقه گیاه اناریجه و بررسی سمیت آن بر روی سلول‌های سرطان پستان انسانی در شرایط آزمایشگاهی

کوثر اسماعیل پور^۱، مصطفی شوریان^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد، بیوشیمی، علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، esmailpour@msc.guilan.ac.ir
^۲ هیأت علمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، shourian@guilan.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
سرطان پستان نانوذرات طلا سنتز سبز اناریجه رده سلولی MCF-7	<p>هدف: فناوری نانو تأثیر به‌سزایی در درمان بیماری سرطان دارد. روش‌های ساخت نانوذرات به کمک مواد زیستی که به آن‌ها سنتز سبز می‌گویند به دلیل ارزان‌تر و غیرسمی بودن نسبت به سایر روش‌ها برای سنتز نانوذرات برتری دارند. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از تیمار محلول HAuCl₄ با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی برگ و ساقه‌ی گیاه اناریجه با نام علمی <i>Pimpinella affinis</i>، نانوذرات طلا تشکیل شدند. برای مشخصه‌یابی نانوذرات طلای سنتز شده از طیف‌سنجی UV-Visible، دستگاه DLS، SEM و FTIR و همچنین از دستگاه GC/MS برای تعیین ترکیبات عصاره استفاده شد. آثار سمیت سلولی نانوذرات طلا و عصاره‌ی گیاهی با استفاده از رنگ‌سنجی MTT بر روی رده سلولی MCF-7 همراه با تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از غلظت ۱ mg/ml از عصاره به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد که دارای میانگین اندازه ۲۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۶۱- میلی‌ولت بودند. نانوذرات طلا دارای شکل کروی همراه با چندپراکندگی برابر ۰/۷ بودند و ترکیبات فنولی و کربوکسیلی و ترپن‌ها بیشترین نقش را در تشکیل و پایداری نانوذرات طلا ایفا نمودند. ترکیبات اساسی شناسایی شده در عصاره توسط روش GC/MS شامل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ترپن‌ها بود. در روش MTT، برتری سمیت سلولی نانوذرات طلا علیه سلول‌های MCF-7 نسبت به عصاره و زمان تیمار ۴۸ ساعت، همراه با IC₅₀ برابر با ۳۸۴/۲ μg/ml به دست آمد. نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که استفاده از گیاه اناریجه در ساخت نانوذرات طلا می‌تواند برای درمان سرطان پستان مؤثر واقع شود.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۱۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳	

۱- مقدمه

سرطان یک بیماری مخرب است که مرگ و میر سالانه آن در حال افزایش است و درمان آن جزء یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها برای بشر می‌باشد (۱). از بین انواع سرطان‌ها، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان و دومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است (۲). تا به امروز شایع‌ترین درمان‌های سرطان محدود به شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی

* نویسنده مسئول؛ تلفن: و فکس: ۰۱۲۳۳۳۳۳۴۷

آدرس پست الکترونیک: shourian@guilan.ac.ir

است که علی‌رغم پیشرفت‌های زیادی که داشته‌اند، درمان سرطان هنوز دارای معایب بزرگی است. مهم‌ترین مضراتی که در درمان‌های کنونی سرطان با آن روبه‌رو هستیم شامل: غلظت ناکافی داروها برای وارد شدن به محل تومور، توزیع عمومی و غیر اختصاصی عوامل ضدتوموری در بدن، آسیب به بافت‌های سالم، سمیت عمومی و عوارض جانبی طولانی مدت است. در مجموع، همه این عوامل کاربرد بالینی روش‌های ذکر شده را محدود می‌سازد، بنابراین به روش‌های درمانی کارآمدتر و مناسب‌تری برای درمان سرطان در انسان نیاز است (۱، ۳). مسئله کلیدی در درمان سرطان، دستیابی به غلظت مناسب عامل درمانی در محل‌های تومور با هدف از بین بردن سلول‌های سرطانی و در عین حال به حداقل رساندن آسیب به سلول‌های طبیعی است که در این راستا نانوفناوری سرطان، انقلابی جدید برای درمان سرطان به وجود آورده است. فناوری نانو شامل دست‌کاری و ایجاد مواد در مقیاس نانو برای تولید محصولات با خواص جدید است. پیشرفت‌های اخیر نشان می‌دهد که فناوری نانو تاثیر به‌سزایی در پیشگیری، تشخیص و درمان بیماری سرطان خواهد داشت (۳). خروجی اصلی فناوری نانو، توسعه مواد جدید در مقیاس نانومتر از جمله نانوذرات است. نانوذرات، ذراتی با اندازه‌های کمتر از میکرون و معمولاً بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. عملکرد نانوذرات هم به مقادیر قابل اندازه‌گیری آن‌ها مانند جرم، حجم و بار الکتریکی و هم به ویژگی‌های درونی آن‌ها مانند واکنش‌پذیری بستگی دارد (۴). از خواص عمده نانوذرات می‌توان به داشتن تنوع زیاد، ویژگی‌های سطحی منحصر به فرد، واکنش‌پذیری بسیار بالا، حلالیت بالا، سمیت کم، دسترسی زیستی و استفاده از روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تر برای تولید آن‌ها اشاره نمود. استفاده از نانوذرات راه‌کاری قانع‌کننده برای حذف تدریجی سلول‌های سرطانی بدون آسیب جدی به سلول‌های طبیعی را فراهم می‌کند (۵، ۶). نانوذرات می‌توانند ذرات فلزی و غیرفلزی باشند. نانوذرات فلزی دارای اشکال هندسی مختلف هستند اما معمولاً به صورت کروی هستند و در حالت یونی، سیستم‌های کلوئیدی را تشکیل می‌دهند (۴). از بین نانوذرات مختلف، نانوذرات فلزی طلا (GNPs) به دلیل داشتن خواص منحصر به فرد مانند ضریب جذب قوی فتوالکتریک، سهولت در سنتز، نسبت سطح به جرم بالا، عدد اتمی بالا ($Z=79$)، فعالیت بالای نانوذرات طلا و تمایل زیاد آن‌ها به اتصال به بیومولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها، به‌طور خاص در بسیاری از زمینه‌ها از جمله در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۷). برای تولید نانوذرات به‌طور کلی روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی وجود دارد و به دو نوع اصلی روش‌های پایین به بالا (bottom up methods) و روش‌های بالا به پایین (top-down methods) دسته‌بندی می‌شوند. مشکل اصلی روش بالا به پایین، تغییر در شیمی سطح و خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات است و نانوذرات با کیفیت مناسب سنتز نمی‌شود و به‌طور کلی اکثر روش‌های سنتز نانوذرات، پیچیده و زمان‌بر می‌باشند. علاوه بر این، سنتز نانوذرات طلا با روش‌های شیمیایی به علت جذب گونه‌های شیمیایی بر روی سطح نانوذرات ممکن است اثرات نامطلوب زیستی ایجاد کند و در نهایت برای سلامتی مضر باشد. اما سنتز نانوذرات با استفاده از میکروارگانیزم‌ها یا گیاهان که در دسته‌ی سنتز نانوذرات به روش پایین به بالا قرار دارند به‌طور بالقوه می‌توانند این مشکلات را مرتفع سازند (۸). در سال‌های اخیر از گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها برای تولید نانوذرات فلزی استفاده شده است که به آن سنتز سبز می‌گویند و نسبت به سایر روش‌ها، ارزان‌تر، ساده‌تر و غیرسمی است (۹، ۱۰). در میان موجودات زنده مختلف که مورد مطالعه قرار می‌گیرد، گیاهان در سنتز نانوذرات فلزی به دلیل مزیتی که نسبت به سایر فرآیندهای بیولوژیکی دارند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و آن مزیت، حذف مرحله پیچیده نگهداری کشت سلولی است. همچنین سنتز نانوذرات با استفاده از گیاهان به دلیل سادگی، عدم بیماری‌زایی و سازگاری با محیط زیست اهمیت زیادی پیدا کرده است (۸). علاوه بر آن وجود ترکیبات گیاهی در نانوذرات باعث جلوگیری از اثرات مخرب عوامل محیطی مانند نوسان pH، حمله آنزیمی و تخریب بیوشیمیایی احتمالی می‌شود. از طرفی شواهد نشان می‌دهد که ترکیبات ساختاری متنوعی که از گیاهان به دست می‌آید قادر به پیشگیری و درمان سرطان است. فعالیت درمانی این عوامل به کلاس‌های ساختاری مختلفی از جمله آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، ترکیبات گوگردی ارگانو و پلی‌فنول‌ها تعلق دارد.

از رایج‌ترین پلی‌فنول‌های طبیعی می‌توان به اسیدهای فولیک و فلاونوئیدها اشاره نمود. فلاونوئیدها حدود دو سوم ترکیبات پلی‌فنولی را تشکیل می‌دهند. طیف وسیعی از خواص ضدتوموری به این عوامل مشتق شده از گیاهان نسبت داده شده است و شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیر، ضد حساسیت، ضد فعالیت‌های متاستاتیک و ضدالتهاب می‌شوند. از طرفی بیشتر داروهای شیمی‌درمانی که در حال حاضر در محیط‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد، محصولات طبیعی یا مشتقات نیمه سنتزی این ترکیبات موجود در گیاهان است اما علی‌رغم فواید مهم آن‌ها برای سلامتی، اثر بخشی محصولات طبیعی به دلیل حلالیت کم در آب، جذب کم، دسترسی کم و ماندگاری کوتاه مدت در سیستم بیولوژیکی تضعیف می‌شود و برای از بین بردن این ضعف‌ها از نانو فرمولاسیون به عنوان حامل دارو برای درمان استفاده می‌شود. در نتیجه، ادغام گیاه‌درمانی و فناوری‌نانو در هدف‌های درمان بالینی می‌تواند پاسخ‌دهنده‌تری را برای بیماران به ارمغان آورد (۱، ۱۱). تاکنون سنتز نانوذرات طلا با استفاده از گیاهان متعددی در خارج و داخل ایران انجام شده است از جمله: سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاهان *coriander*, *Punica granatum*, *Hibiscus*, *Magnolia*, *Kobus*، *Nasturtium nasturtium*، *Pelargonium graveolens* و میوه *Sambucus ebulus* که تعدادی از آن‌ها از نظر خواص ضدسرطانی نانوذرات طلای سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته شده است (۱۲، ۱۳) مانند سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره *Curcuma Kwangsiensis*، *Couroupita guianensis* و چغندر (۷، ۱۴، ۱۵).

در این پژوهش از عصاره ساقه و برگ گیاه *Pimpinella affinis* با نام محلی اناریجه برای سنتز سبز نانوذرات طلا استفاده شده است. *P. affinis* یکی از گونه‌های مهم خانواده *Apiaceae* است. گیاهی معطر، دو ساله با ارتفاع ۲۰ تا ۱۱۰ سانتی‌متر با گل‌آذین‌های سفید و میوه‌های بیضی شکل که در مناطق مختلف ترکمن، ایران، افغانستان، عراق، سوریه و فلسطین رشد می‌کند و در ایران به صورت وحشی بیشتر در مناطق شمالی با هوای سرد پراکنده است (۱۶). از این گیاه در طب عامیانه ایران به عنوان مسکن، مدر، اشتها آور، آرام‌بخش، ضد اسپاسم، ضد میکروب، ضد قارچ، آنتی‌اکسیدانت و افزایش دهنده شیر مادر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). بنابراین یکی از دلایل گزینش گیاه مذکور، بومی بودن آن است، از طرفی تا آنجایی که می‌دانیم توجه بسیار کمی به کاربردهای بالینی نانوذرات سنتز شده به وسیله این گیاه مخصوصاً در درمان سرطان شده است و در این زمینه روی گیاه مذکور مطالعات چندانی صورت نگرفته است. علاوه بر این اناریجه گیاهی دارویی است و در طب سنتی ایران کاربرد فراوان دارد. این گیاه دارای منابع ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه مختلف است (۱۸). متابولیت‌های ثانویه به خصوص ترکیبات فنولی موجود در آن، خاصیت آنتی‌اکسیدانتی فوق‌العاده‌ای دارند و به همین علت این گیاه خاصیت ضدسرطانی دارد. به علت داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی، عصاره گیاه اناریجه با احیای نمک طلا می‌تواند نانوذرات کاربردی با اندازه مناسب را تولید کند و نیز به علت قرارگیری عوامل آنتی‌اکسیدانت گیاه بر روی نانوذرات طلای سنتز شده، می‌تواند به صورت غیرمستقیم اثر سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی داشته باشد. در نتیجه عصاره آبی *P. affinis* می‌تواند با سنتز و تثبیت نانوذرات طلا، برای اصلاح‌سازی نانوداروهای ضدسرطان و در نهایت در تولید دارویی موثر برای درمان سرطان کمک کننده باشد. بنابراین به علت شیوع فراوان و روزافزون سرطان مخصوصاً سرطان پستان بر آن شدیم تا در این پژوهش، نانوذرات طلا بر پایه عصاره آبی ساقه و برگ گیاه اناریجه را ساخته و به بررسی خصوصیات و ویژگی‌های نانوذرات طلا سنتز شده بپردازیم و اثرات سمیت آن‌ها را بر روی رده سلولی *MCF-7* در سرطان پستان مورد بررسی قرار دهیم. در این پژوهش، پس از عصاره‌گیری از گیاه اناریجه، برای شناسایی ترکیبات درون عصاره از دستگاه GC/MS استفاده شده است. سپس برای تعیین خصوصیات نانوذرات سنتز شده از روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Visible)، دستگاه تفرق نور پویا (DLS)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنج فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده شده است و در

نهایت از غلظت بهینه‌ی نانوذرات طلای سنتر شده برای بررسی سمیت سلولی آن‌ها بر روی رده سلول‌های سرطانی MCF-7 در سرطان پستان در انسان به‌وسیله آزمایش MTT assay با تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته شد.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی گیاه اناریجه: ساقه و برگ گیاه *P. affinis* از منطقه رحیم‌آباد در شهرستان رودسر واقع در استان گیلان تهیه شدند. پس از آن، نمونه‌های جمع آوری شده کاملاً با آب شهری شستشو داده شدند و در محیط سایه، زمان داده شد تا کاملاً خشک شوند. پس از خشک شدن، گیاه توسط آسیاب خانگی به‌صورت پودر تهیه شد. برای تهیه عصاره، ابتدا مقدار ۲/۵ گرم از پودر برگ و ساقه گیاه به ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه در حال جوش اضافه شد و خروجی ارلن توسط فویل پوشانیده شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای جوش باقی ماند. پس از سرد شدن نمونه، مخلوط حاصل دو بار از کاغذ صافی، به‌منظور حذف ذرات جامد موجود در نمونه و تهیه‌ی یک عصاره با درصد خلوص بالا و شفاف، عبور داده شد. عصاره حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت حداکثر ۴ روز و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل دو ماه پایدار باقی ماند.

سنتر سبز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاهی: برای سنتر سبز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی گیاه اناریجه تهیه شده به‌عنوان کاهنده و پایدارکننده، از هشت غلظت متوالی ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲ و ۳ (mg/ml) به‌منظور تعیین غلظت بهینه‌ی عصاره برای سنتر نانوذرات طلا پایدار با اندازه‌های مناسب استفاده شد. حجم نهایی برای محلول واکنش ۱۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد و برای رقیق‌سازی و غلظت‌سازی عصاره، از آب دیونیزه استفاده شد. روند آزمایش به‌این‌صورت است که ابتدا مقدار آب دیونیزه مدنظر درون ویال‌ها ریخته شد و سپس ویال‌ها روی گرمکن همزن‌دار مغناطیسی قرار داده شد و با تنظیم دور ۶۰۰ (RPM) به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد. سپس معادل یک میلی‌گرم نمک طلا به هر یک از ویال‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۲ دقیقه، به هر یک از ویال‌ها مقدار مشخص شده از عصاره‌ی آبی اناریجه به آرامی افزوده شد (۱۹)، پس از گذشت ۹۰ دقیقه با بررسی تغییر رنگ در هر یک از ویال‌ها به تعیین و بررسی تولید نانوذرات پرداخته شد.

تعیین مشخصات نانوذرات طلای سنتر شده: ابتدا برای تایید سنتر نانوذرات طلای سنتر شده و تعیین ویژگی آن‌ها از دستگاه طیف سنج UV-Visible موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گیلان استفاده شد. جذب نانوذرات طلا در ناحیه مرئی حدود ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر است (۲۰)، برای بررسی کامل جذب و تغییرات آن، نانوذرات طلای سنتر شده در طیف‌های جذبی بین محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفته شد. در صورت عمل کرد مناسب عصاره آبی *P. affinis* و توانایی آن در احیای یون‌های طلا و تبدیل آن به نانوذرات طلا در این محدوده، طیف جذبی حاصل از رزونانس پلاسمون سطحی (LSPR) نانوذرات طلا سنتر شده قابل مشاهده خواهد بود. بامقایسه‌ی طیف جذبی نانوذرات طلا ایجاد شده به‌وسیله‌ی غلظت‌های مختلف از عصاره، اندازه، غلظت و میزان توزیع نانوذرات طلای تولید شده مورد مقایسه قرار گرفته شد و غلظت بهینه عصاره برای سنتر نانوذرات طلا به‌دست آمد. به‌منظور تعیین میانگین اندازه، نحوه توزیع و میزان پایداری نانوذرات طلای سنتر شده از دستگاه اندازه‌گیری پتانسیل‌زتا یا تفرق دینامیک نور (DLS) موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گیلان استفاده شد. این دستگاه علاوه بر اندازه‌گیری اندازه نانوذرات موجود در کلئوئید و تعیین میانگین اندازه نانوذرات، شاخص عدم تجانس (PDI) را هم برای هر نمونه اندازه‌گیری می‌کند که نشان‌دهنده میزان یکنواختی یا عدم یکنواختی اندازه نانوذرات در یک کلئوئید است (۲۱). با استفاده از اندازه‌گیری مقدار پتانسیل‌زتا نیز به تعیین میزان پایداری نانوذرات سنتر شده پرداخته شد.

برای تعیین مورفولوژی نانوذرات طلائی سنتز شده با استفاده از غلظت بهینه به دست آمده از عصاره، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) متعلق به دانشکده فنی دانشگاه تهران، انستیتو نفت تهران استفاده شد. برای شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره که در فرآیند احیای یون‌های طلا به نانوذرات طلا نقش ایفا نموده‌اند و همچنین گروه‌هایی که نانوذرات طلائی سنتز شده را پوشش داده‌اند و باعث پایداری آن‌ها شده‌اند از طیف سنج FTIR موجود در آزمایشگاه شیمی دانشکده علوم پایه در دانشگاه گیلان استفاده شد. برای آنالیز FTIR، نانوذرات طلائی تازه سنتز شده با استفاده از غلظت بهینه عصاره با دور ۸۰۰۰ RPM و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند و با اضافه کردن آب دیونیزه به رسوب حاصل حاوی نانوذرات طلا، سوسپانسیون جدید تهیه شد. سپس جهت آماده‌سازی و خشک کردن نمونه‌ها که شامل عصاره گیاهی و نانوذرات طلا سنتز شده به وسیله عصاره گیاهی است، از روش فریزدرای استفاده شد و آنالیز FTIR بر روی آن‌ها انجام شد.

سنجش سمیت سلولی: در این مطالعه به بررسی عمل کرد رده سلولی *MCF-7* (خریداری شده از بانک سلولی پاستور) مربوط به سرطان پستان در انسان، نسبت به عصاره آبی گیاه اناریجه و نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از این عصاره پرداخته شد. در مرحله اول، سلول‌های *MCF-7* درون چاهک کشت داده شدند و پلیت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با CO₂ ۵ درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، عصاره آبی گیاه *P.affinis* و نانوذرات طلائی سنتز شده به وسیله غلظت بهینه از عصاره در پنج رقت زنجیره‌ای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ همراه با سه بار تکرار غلظت به چاهک‌های دارای سلول اضافه شدند، همچنین سه چاهک پلیت برای بیشترین غلظت از نمک طلا (HAuCl₄.3H₂O) تعبیه شد تا اثر نمک طلا بر سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. تیمار در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت. پس از پایان زمان تیمار سلول‌ها، آزمایش MTT انجام شد و نتایج تغییر رنگ نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد. برای بررسی درصد بقا (Viability) سلول‌های *MCF-7* تیمار شده با عصاره و نانوذرات طلا، از رابطه ۱ استفاده شد.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{میانگین جذب هر نمونه تیمار شده}}{\text{میانگین عدد کنترل (بلانک)}} \times 100 \quad (1)$$

۳- نتایج

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنج جرمی

با استفاده از آنالیز GC/MS، ترکیبات موجود در عصاره گیاه اناریجه تعیین شد. با توجه به جدول ۱ که نشان‌دهنده ترکیبات شناسایی شده در آنالیز GC/MS است، ترکیبات غالب موجود در عصاره اناریجه شامل ترکیبات فنولی مختلف، ترپن‌ها، ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات آلکالوئیدی، گلیکوزیدی و لیپیدی است که همگی آن‌ها، مخصوصاً ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاه اناریجه در سنتز نانوذرات طلائی پایدار مشارکت دارند.

Name	%
4H-pyran-4-one-2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (DDMP)	17.902

P-Cymene	10.535
Scoparone	6.836
Benzenemethanol, alpha, alpha, 4-trimethyl	6.829
Tetrahydroquinoline	6.605
6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (HTT)	6.302
Oleic acid	6.216
Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	6.089
Hydroquinone	5.987
Catechol	5.090
Acetic acid	4.048
N,N-Dimethylaminoethanol	3.965
Caffeine	3.562
Butyrolactone	3.388
2-Hydroxy-1-(1'-pyrrolidyl)-1-buten-3-one	2.719
Linoelaidic acid	2.676
4-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one	2.169
2-Propenamide	1.465
3-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole	0.892
Octadecanoic acid	0.781
9H-pyrido(3,4-b)indole	0.737
9-12 octadecadienoic acid(Z,Z)	0.730
Phenol	0.710

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه اناریجه به وسیله آنالیز GC/MS؛ ترتیب ترکیبات از بیشترین مقدار به کمترین مقدار طبقه بندی شده است.

ترکیبات شناسایی شده در این روش برای گیاه اناریجه طبق جدول ۱ بیان می‌کند که بیشتر ترکیبات عصاره شامل ترکیبات فنولی مانند اسکوپارون، ترکیبات فلاونوئیدی مانند DDMP، مونوترپن‌ها مانند p-cymene و مشتقات آن، ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌مانند هیدروکوئینون و HTT، لیپیدها شامل لینولئیک‌اسید، استئاریک‌اسید و اولئیک‌اسید و آلکالوئیدها مانند بتاکربولین می‌باشد. به‌طور کلی عصاره برگ و ساقه گیاه *P. affinis* با توجه به متابولیت‌های ثانویه موجود در آن، توانایی احیای یون‌های طلا به نانوذرات طلا را دارد.

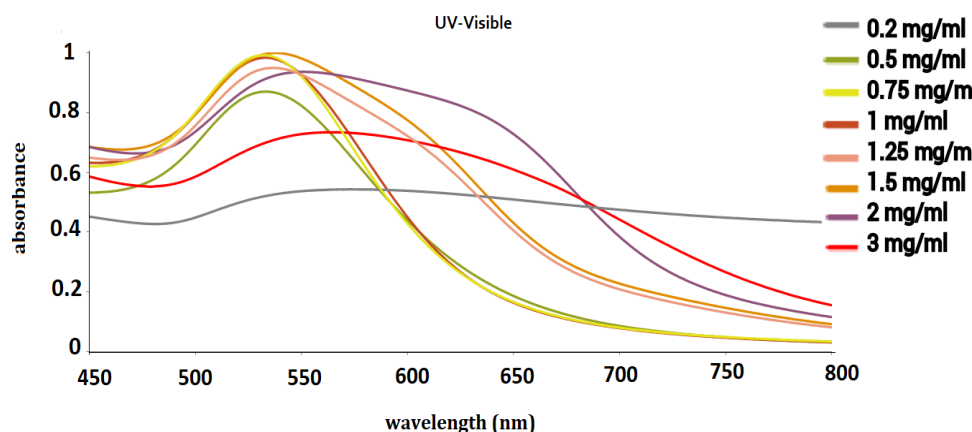
طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش از نانوذرات حاصل از سنتز سبز

به‌منظور تعیین غلظت بهینه از عصاره آبی گیاه اناریجه برای سنتز نانوذرات طلا، از غلظت‌های مختلف عصاره استفاده شد. با افزایش غلظت عصاره آبی گیاه اناریجه از کمترین مقدار (۰/۲ mg/ml) تا بیشترین مقدار (۳ mg/ml)، به ترتیب از a تا h در دمای ثابت ۷۰ درجه سانتی‌گراد، دور ثابت RPM ۶۰۰ و زمان‌دهی ثابت ۹۰ دقیقه، تغییر رنگ از زرد کم‌رنگ به رنگ‌های آبی متمایل به طوسی، قرمز یا قوتی، بنفش و سپس آبی متمایل به طوسی مشاهده شد (شکل ۱). تغییر رنگ به سمت قرمز یا قوتی نشان دهنده‌ی کاهش یون‌های طلا (Au^{3+}) به اتم طلا (Au^0) و تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد (۲۲). که ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی نانوذرات طلا است. بنابراین تغییر رنگ کلئوئید به سمت قرمز و بنفش به عنوان شاهد اولیه تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد و در ادامه این فرآیند اتفاق افتاده با مطالعه‌ی داده‌های حاصل از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش قابل بررسی است (۲۰). حداکثر طول موج جذبی نانوذرات طلا سنتز شده در غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه اناریجه بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر

ظاهر شد (شکل ۲)، به طوری که با استفاده از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲ و ۳ (mg/ml) از عصاره، حداکثر طول موج جذبی (λ_{max}) برای نانوذرات طلا تولید شده به ترتیب از غلظت کم به زیاد عصاره ۵۳۷، ۵۳۳، ۵۳۳، ۵۳۲، ۵۷۹، ۵۳۳، ۵۳۳، ۵۳۷، ۵۳۷، ۵۵۲ و ۵۶۳ نانومتر و حداکثر میزان جذب آن‌ها به ترتیب از راست به چپ ۰/۵۴۴، ۰/۸۷۰، ۰/۹۹۲، ۰/۹۸۵، ۰/۹۵۴، ۰/۹۹۹، ۰/۹۳۶ و ۰/۷۳۵ به دست آمد. باتوجه به نتایج حاصل از تولید نانوذرات طلا به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اناریجه، تشکیل رنگ‌های مختلف در کلوئید و بررسی نتایج حاصل از طیف‌سنج مرئی-فرابنفش آن‌ها بیانگر آن است که مقدار عصاره گیاهی مصرف شده، نقش مهمی در اندازه و غلظت نانوذرات سنتز شده و پراکندگی آن‌ها دارد که باعث تغییر در موقعیت حداکثر طول موج جذبی در طیف‌سنج مرئی-فرابنفش می‌شود. در نمودار ایجاد شده از بررسی طیف‌سنج مرئی-فرابنفش برای نانوذرات طلا تولید شده در مطالعه حاضر (شکل ۲)، با استفاده از غلظت ۰/۲ mg/ml از عصاره منحنی با شدت جذب کمتر و ایجاد پیک وسیع نسبت به سایر نمونه‌ها ایجاد شده است و در مشاهدات بصری نیز تغییر رنگ کلوئید به آبی متمایل به طوسی مشاهده شد. نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که حداکثر طول موج جذبی تشکیل شده حاصل از آنالیز طیف‌سنج مرئی-فرابنفش با شدت جذب کمتر به معنای تشکیل تعداد کمتر نانوذرات در طول فرآیند است (۲۳)، بنابراین تشکیل تعداد بسیار کم از نانوذرات طلا به دلیل استفاده از رقت کم عصاره به عنوان عامل کاهنده در این غلظت تایید شد. با افزایش غلظت عصاره اناریجه تا غلظت ۱/۵ mg/ml، در محلول واکنش، حداکثر طول موج جذبی در محدوده ۵۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر مشاهده شد. به طوری که شدت پیک ایجاد شده برای نانوذرات طلا تولید شده در غلظت ۰/۵ mg/ml از عصاره، دارای پهنای نسبتاً کم است و با افزایش غلظت عصاره به ۰/۷۵ mg/ml و ۱، شدت پیک بلندتری در طول موج ۵۳۰ نانومتر، کاهش بیشتر پهنای زیر نمودار و متقارن تر شدن پیک مشاهده شد. افزایش شدت پیک نشان دهنده تولید نانوذرات بیشتر در محلول است. در ادامه این مطالعه، با افزایش بیشتر غلظت عصاره در مطالعه حاضر به ۲ mg/ml و بیشتر از آن، با کاهش جذب و افزایش پهنای زیر نمودار همراه است، جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر حاصل به دلیل به وجود آمدن تعدادی نانوذرات طلا تجمع یافته است که افزایش اندازه در تعدادی از نانوذرات طلا را به همراه دارد (۲۴). بهینه‌ترین غلظت از عصاره آبی گیاه اناریجه برای سنتز نانوذرات طلا در این آزمایش مقدار ۰/۷۵ mg/ml و ۱ به دست آمد. زیرا حداکثر شدت پیک جذبی تشکیل شده در نمودار مرئی-فرابنفش برای نانوذرات تولید شده با استفاده از این غلظت‌ها در طول موج‌های پایین‌تر، همراه با پیک قله‌ای‌تر و مساحت زیر نمودار متقارن‌تر ظاهر شد. این نتیجه بیان‌کننده آن است که توزیع اندازه نانوذرات تولید شده در این غلظت از عصاره نسبت به سایر غلظت‌ها بازده بیشتری دارد و دارای پلی‌دیسپرسیتی کمتر است.



شکل ۱: طیف رنگی ایجاد شده توسط نانوذرات طلا تولید شده به وسیله غلظت‌های مختلف از عصاره اناریجه؛ تغییر رنگ از a تا h به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲، ۳ mg/dl از عصاره آبی اناریجه ایجاد شد. از سمت چپ به راست با افزایش غلظت عصاره، رنگ نانوذرات طلا تشکیل شده از زرد کم‌رنگ به آبی متمایل به طوسی، قرمز و سپس بنفش به دلیل تغییر در اندازه و خاصیت SPR نانوذرات، تغییر نمود.



شکل ۲: طیف جذبی مرئی-فرابنفش نانوذرات طلای تولید شده؛ در نتیجه‌ی واکنش نمک طلا با غلظت‌های مختلف از عصاره آبی برگ و ساقه‌ی گیاه اناریجه پیک هایی در طول موج ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر ایجاد شد.

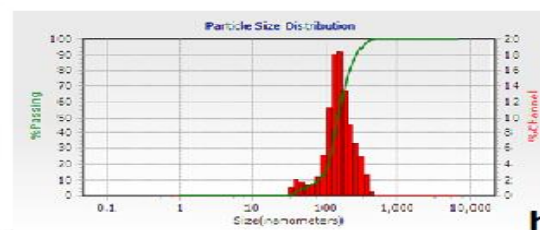
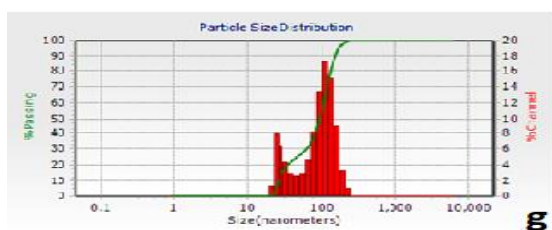
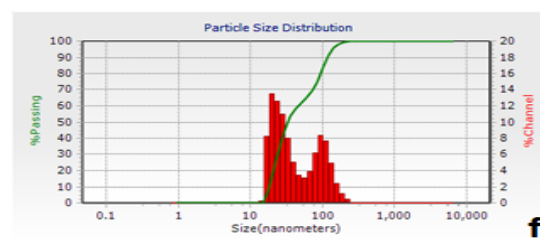
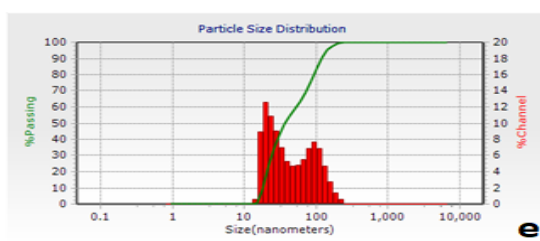
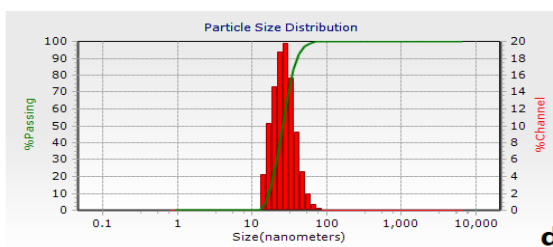
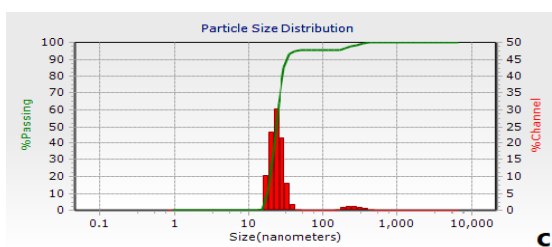
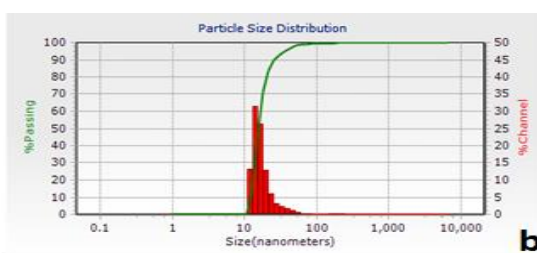
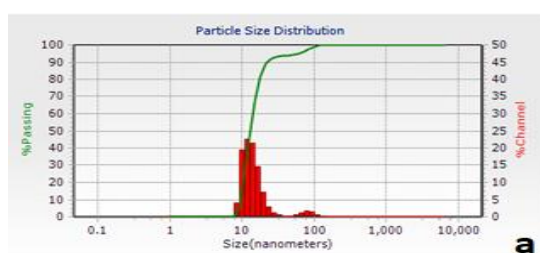
نتایج حاصل از تفرق نور پویا نانوذرات طلای احیا شده توسط عصاره گیاه اناریجه

طبق نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت عصاره اضافه شده، میانگین اندازه در نانوذرات طلای تولید شده، افزایش یافت. نتایج به دست آمده از آنالیز DLS کاملاً با نمودار طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش هم‌خوانی دارد (شکل ۳). یکی از راه‌های سنجش پایداری نانوذرات تولید شده، بررسی پتانسیل‌زای نانوذرات است. هرچه میزان قدرمطلق عدد حاصله بیشتر باشد، کلئوئیدها پایدارترند و در نتیجه نانوذرات میل به تجمع و رسوب و مدت طولانی‌تری پایدار باقی می‌مانند. در این پژوهش به جز در حالت استفاده از غلظت ۰/۲ mg/ml از عصاره‌ی اناریجه برای سنتز نانوذرات طلا، سایر غلظت‌ها دارای نانوذرات طلا پایداری بودند اما نانوذرات تولید شده با استفاده از غلظت ۱ mg/ml از عصاره با داشتن پتانسیل‌زای برابر با ۶۱- میلی‌ولت، دارای پایداری بسیار بالایی است (جدول ۲).

نمونه‌هایی که توزیع اندازه مناسب داشته باشند PDI آن‌ها برابر با ۰/۱ تا ۰/۲ می‌باشد و عددهای بالاتر از این مقدار نشان‌دهنده‌ی وجود عدم یکنواختی اندازه در یک کلئوئید است. با مقایسه نمودارها و PDI به دست آمده برای هر کلئوئید توسط دستگاه DLS، این نتیجه گرفته شد که در همه نمودارها به جز در نمودار d، توزیع اندازه نانوذرات دارای پلی‌دیسپرسیتهی بسیار بالایی است. اما در نمودار d توزیع اندازه نانوذرات طلا نسبت به سایرین یکنواخت‌تر است و دارای پلی‌دیسپرسیتهی کمتری می‌باشد و میزان ۰/۷ برای آن گزارش شده است. نتیجه‌گیری نهایی حاصل از مطالعات بر روی داده‌های دستگاه DLS در این پژوهش به این صورت است که نانوذرات تولید شده با استفاده از ۱ mg/ml از عصاره آبی گیاه اناریجه، به دلیل پایداری بیشتر (پتانسیل‌زای برابر با منفی ۶۱ میلی‌ولت) و پلی‌دیسپرسیتهی کمتر (برابر با ۰/۷) با میانگین اندازه ۲۶ نانومتر به عنوان غلظت بهینه از عصاره برای سنتز نانوذرات طلا در مراحل بعدی در این تحقیق تعیین شد.

جدول ۲: خلاصه‌ای از نتایج حاصل از بررسی نانوذرات با استفاده از دستگاه DLS

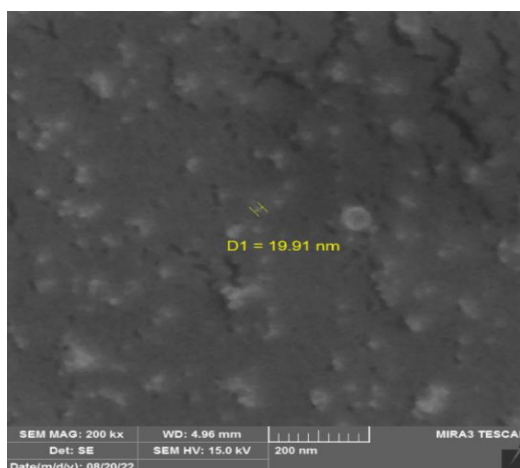
Stability	Zeta potential (mV)	PDI	Average size of gold nanoparticles	The concentration of the extract used (mg/ml)	shape
Low stable	-13	8.46	14	0.2	a
stable	-36	8.94	16	0.5	b
stable	-39	2.60	24	0.75	c
Very stable	-61	0.78	26	1	d
stable	-41	2.30	37	1.25	e
stable	-40	3.09	39	1.5	f
stable	-37	1.82	96	2	g
stable	-37	1.86	151	3	h



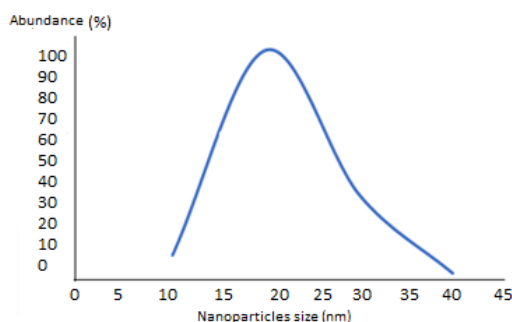
شکل ۳. نمودار DLS حاصل از نانوذرات طلائی تشکیل شده به وسیله غلظت‌های مختلف از عصاره آبی گیاه اناریچه؛ نمودار a (نانوذرات تولید شده به وسیله ۰/۲ mg/ml از عصاره آبی اناریچه)، b (۰/۵ mg/ml)، c (۰/۷۵ mg/ml)، d (۱ mg/ml)، e (۱/۲۵ mg/ml)، f (۱/۵ mg/ml)، g (۲ mg/ml) و h (۳ mg/ml) را نشان می‌دهد.

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی حاصل از نانوذرات سبز اناریجه

شکل ۴، نشان داد که با اضافه کردن ۱ mg/ml از عصاره به مخلوط واکنش، نانوذرات طلا تشکیل شده کروی شکل ایجاد شده است و دارای میانگین سایز تقریباً ۲۰ نانومتر همراه با مقداری پراکندگی سایز می‌باشند. داده‌های شکل ۵، باتوجه به نتایج حاصل از SEM توسط نرم‌افزار digimizer به دست آمده است و نشان دهنده‌ی فراوانی و میانگین سایز نانوذرات طلا می‌باشد. میانگین اندازه نانوذرات طلای تولید شده با استفاده از عصاره آبی گیاه اناریجه حدود ۲۰ نانومتر به دست آمد. که با نتایج حاصل از DLS هم‌خوانی دارد.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از غلظت ۱ mg/ml از عصاره آبی گیاه اناریجه؛ نانوذرات طلا دارای شکل کروی با میانگین اندازه حدود ۲۰ نانومتر همراه با پلی‌دیسپرسیتی برابر ۰/۷ می‌باشند.



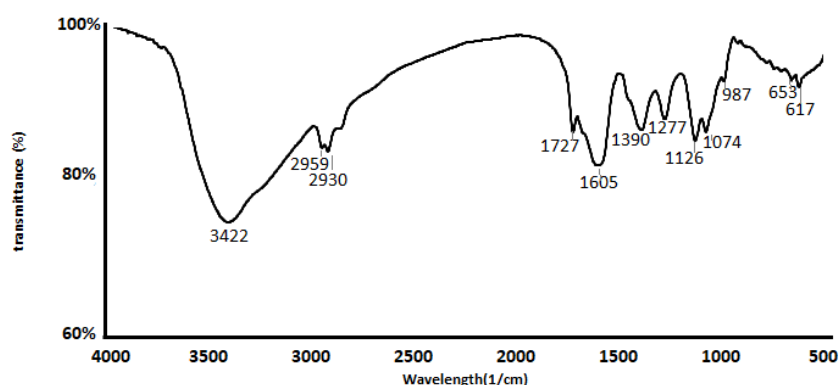
شکل ۵: منحنی توزیع اندازه نانوذرات طلا حاصل از آنالیز تصاویر SEM؛ این نمودار توسط نرم‌افزار Digimizer رسم شده است.

نتایج حاصل از طیف‌سنج فوریه مادون قرمز

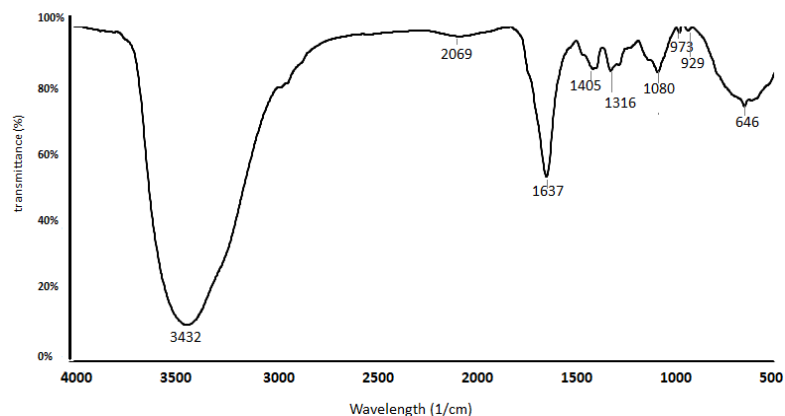
برای مشخص نمودن گروه‌های عاملی غالب موجود در عصاره گیاه اناریجه و همچنین بررسی و تعیین گروه‌های عاملی از عصاره که در احیای یون‌های طلا به اتم‌های طلا و ایجاد پایداری آن‌ها در کلئوئید نقش داشته‌اند از طیف‌سنج FTIR استفاده شد. نتایج به دست آمده به‌طور خلاصه در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده است. به کمک مراجع موجود برای تفسیر نمودار FTIR می‌توان طیف به دست آمده را بررسی نمود و به شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره پرداخت. باتوجه به نمودار ۳-۶، طیف FTIR عصاره را قبل از احیا نمک طلا نشان می‌دهد که هر باند ایجاد شده در آن نشان‌دهنده وجود گروه‌های عاملی خاصی در عصاره

است. جذب شدید در ناحیه 3422 cm^{-1} ، به نوسانات کششی گروه عاملی هیدروکسیل (O-H) مربوط می‌شود. جذب در 2959 cm^{-1} ، بیان‌کننده وجود نوسانات کششی پیوندهای C-H در زنجیره آسیل است بنابراین به وجود لیپیدهای موجود در عصاره اشاره دارد. جذب در ناحیه 2930 cm^{-1} ، نیز می‌تواند بیان‌کننده وجود نوسانات کششی پیوندهای C-H در زنجیره هیدروکربنی و لیپیدهای موجود در عصاره باشد و یا به آمین‌های نوع دوم (N-H) که در پروتئین‌های گیاه وجود دارد، مرتبط باشد. جذب در ناحیه 1727 cm^{-1} ، مربوط به گروه‌های کربونیل (کشش CO) است. بنابراین اثبات‌کننده وجود گروه‌های کربونیل ساده مانند کربوکسیل و کتون در عصاره اناریجه هستند. تشکیل باند قوی در ناحیه 1605 cm^{-1} از FTIR عصاره اناریجه، مربوط به آمید I (N-H) است که در پروتئین‌های گیاه اناریجه وجود دارد. همچنین می‌تواند نشان‌دهنده وجود گروه‌های عاملی کربوکسیلات نیز باشد. جذب در 1390 cm^{-1} ، به وجود کربوکسیلات و یا گروه‌های فنولی حاوی پیوند O-H اشاره دارد، همچنین می‌تواند به ارتعاشات کششی C-N در آمین‌های آلیفاتیک مربوط باشد. جذب در ناحیه 1277 cm^{-1} ، مربوط به وجود پروتئین‌ها در عصاره می‌باشد. جذب در مجموعه پیک‌های 1126 cm^{-1} ، 1074 cm^{-1} و 987 cm^{-1} ، به باند C-H اشاره دارد که می‌تواند مربوط به کربوهیدرات‌ها و لیپیدهای عصاره باشد و یا به ارتعاشات کششی C-N در آمین‌های آلیفاتیک یا الکل‌ها و یا فنول‌ها مربوط باشد. جذب در 653 cm^{-1} و 617 cm^{-1} ، بیان‌کننده وجود گروه‌های C-H (استیلن یا آلکین)، ترکیبات الکلی (O-H) و یا ترکیبات دی‌سولفید (C-S) در عصاره است. برای یافتن گروه‌های عاملی شرکت‌کننده در احیای نانوذرات و شناسایی عوامل پوشش‌دهنده آن‌ها، آنالیز FTIR بر روی نانوذرات طلای سنتز شده نیز انجام شد (شکل ۷).

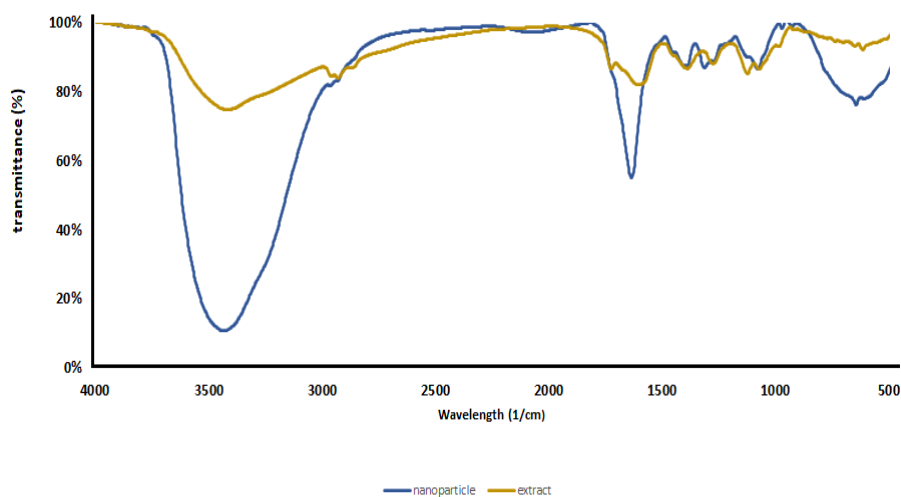
با استفاده از مقایسه دو طیف ایجاد شده در آنالیز FTIR مربوط به عصاره آبی گیاه اناریجه و نانوذرات طلا سنتز شده، کم یا زیاد شدن شدت بعضی از جذب‌ها و همچنین حذف یا به‌وجود آمدن بعضی جذب‌های دیگر مشاهده شد (شکل ۸). با مقایسه هر دو طیف FTIR تشخیص داده شد که با تغییرات گروه COOH به OH، جذب قوی در ناحیه 3422 cm^{-1} و 2959 cm^{-1} ظاهر شده است. پیک قوی در 1637 cm^{-1} احتمال زیاد به نشستن گروه‌های کربوکسیل و یا به‌طور کلی گروه‌های کربونیل ساده و پروتئین‌ها (گروه‌های آمیدی) بر سطح نانوذرات است. مقایسه دوطیف به‌دست آمده، نشان‌دهنده مشارکت ترکیبات فنولی، لیپیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات دارای گروه‌های کربوکسیلات موجود در عصاره آبی گیاه اناریجه در احیا و سنتز نانوذرات طلا و پایداری آن‌ها است.



شکل ۶: نمودار FTIR عصاره آبی گیاه اناریجه/ین نمودار نشان‌دهنده پیک‌های جذبی FTIR برای عصاره آبی گیاه اناریجه در نواحی مشخص شده است.



شکل ۷: نمودار FTIR نانوذرات طلا؛ نانوذرات طلای ظیف‌سنجی شده، با استفاده از ۱ mg/ml از عصاره آبی گیاه اناریچه تولید شده‌اند.



شکل ۸: ادغام دو نمودار FTIR عصاره و نانوذرات طلا، به منظور یافتن تغییرات قبل و پس از سنتز نانوذرات طلا

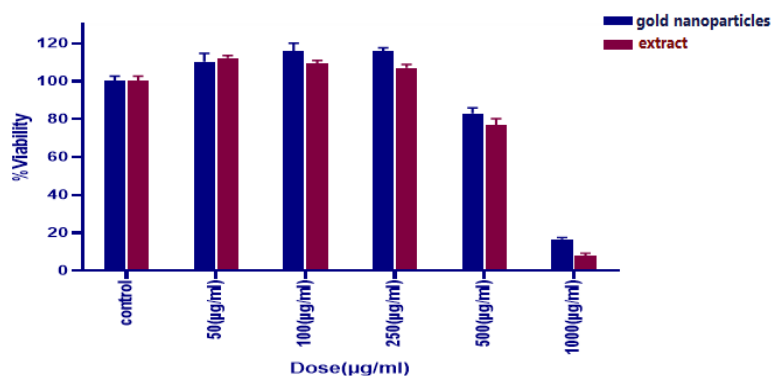
با مقایسه‌ی دوطیف FTIR حاصل از عصاره اناریچه و نانوذرات طلا سنتز شده (شکل ۸)، می‌توان نتیجه گرفت که با تغییرات گروه COOH به OH، پیک قوی در ناحیه 3432 cm^{-1} ظاهر شده است که نشان دهنده‌ی کاهش یون‌های طلا به کمک پروتئین‌ها و کربوکسیلیک اسیدها و ترکیبات فنولی موجود در عصاره است، به علاوه گروه‌های OH برای پایداری نانوذرات طلا روی آن‌ها قرار گرفته‌اند. همچنین وجود ترکیبات حاوی کربوکسیلیک اسید و آمین‌های آزاد حاصل از پروتئین‌های عصاره بر روی نانوذرات طلا باعث پایداری نانوذرات به مدت طولانی شدند (۲۵). به‌طور کلی با بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که طیف FTIR حاصل از عصاره اناریچه و نانوذرات سنتز شده به‌وسیله‌ی آن، بیشتر به وجود گروه‌های هیدروکسیل و آمیدی و کربونیل اشاره دارد که مربوط به ترکیبات فنولی و الکلی فراوان و پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها و لیپیدها در عصاره است که نشان می‌دهد ترکیبات فنولی و کربوکسیلیک و آمیدی موجب احیا نمک طلا و پروتئین‌ها و گلیکوزیدها و لیپیدها باعث پایداری نانوذرات طلا شده‌اند. همچنین، با مقایسه نتایج حاصل از GC/MS و FTIR عصاره‌ی گیاه اناریچه، وجود ترکیبات دارای گروه‌های عاملی شناسایی شده قابل قبول است.

نتایج آزمایش سمیت سلولی

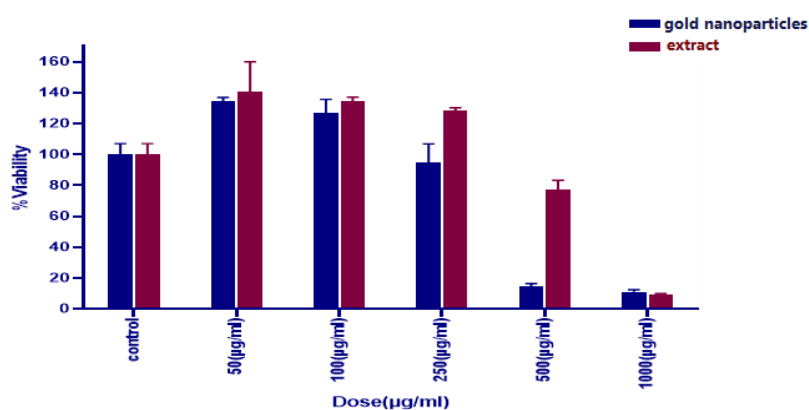
از آنجایی که ترکیبات آنتی‌اکسیدانت و ضد سرطان بسیاری در عصاره گیاه وجود دارد و همین ترکیبات بیشترین سهم را در تولید نانوذرات طلا و پایداری آن‌ها دارند، اثر سمیت سلولی نانوذرات طلا و عصاره آبی گیاه اناریچه با استفاده از روش MTT روی سلول‌های سرطانی رده *MCF-7* مربوط به سرطان پستان در انسان مورد ارزیابی قرار گرفته‌شد. در این آزمایش از عصاره آبی گیاه اناریچه با غلظت 1 mg/ml و همچنین نانوذرات طلای سنتز شده با غلظت 0.1 mg/ml استفاده شده است. به منظور مقایسه‌ی اثر سمیت عصاره آبی گیاه اناریچه به‌تنهایی و نانوذرات طلای سنتز شده به‌وسیله‌ی غلظت 1 mg/ml از عصاره آبی گیاه اناریچه که ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره و سطح نانوذرات است از غلظت‌های مشابه برای مقایسه‌ی آن‌ها استفاده شده است. همچنین سه چاهک پلیت برای بیشترین غلظت از نمک طلا (یون‌های طلا) تعبیه شد تا اثر نمک طلا بر سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. خوانش نمونه‌های تیمار شده پس از مدت زمان تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، توسط دستگاه الیزا انجام شد و درصد زنده‌مانی سلول‌های *MCF-7* مورد ارزیابی قرار گرفته شد. در شکل ۹، گذر میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از مقدار کنترل، در غلظت‌های کم از عصاره و نانوذرات، تحریک رشد و افزایش تعداد سلول‌ها در هنگام تیمار سلول‌های مورد نظر با غلظت‌های 250 ، 100 ، 50 طی ۲۴ ساعت تیمار به‌دست آمد اما کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها از مقدار کنترل در تیمار با غلظت‌های بالا از عصاره و نانوذرات به وقوع پیوست. این نتیجه، در غلظت‌های 1000 و 500 از عصاره و نانوذرات طلا، به سمیت آن‌ها بر روی سلول‌های *MCF-7* اشاره دارد و باعث توقف رشد یا کشته شدن سلول‌ها شده است. در اغلب مواد آنتی‌اکسیدان و داروهای شیمی‌درمانی نیز نتایج در غلظت‌های کم و زیاد بدین‌صورت می‌باشد به‌طوری‌که غلظت‌های کم از داروها و مواد آنتی‌اکسیدان باعث تحریک رشد سلول‌های سرطانی می‌شود درحالی‌که با افزایش غلظت آن‌ها، اثر مهارکنندگی و توقف رشد را بر سلول‌های سرطانی دارند (۲۶). IC_{50} (نیمه حداکثر غلظت بازدارندگی) محاسبه شده برای عصاره $627/2$ و برای نانوذرات طلا $710/5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد.

شکل ۱۰، برای تیمار ۴۸ ساعته همانند تیمار ۲۴ ساعته، در غلظت‌های پایین عصاره و نانوذرات افزایش رشد سلول‌ها اتفاق افتاده است. اما با افزایش غلظت آن‌ها مخصوصاً افزایش غلظت نانوذرات طلای سنتز شده به‌وسیله عصاره آبی گیاه اناریچه، باعث توقف رشد سلولی و یا حذف سلول‌های *MCF-7* شده است. IC_{50} محاسبه شده برای عصاره $631/3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ و برای نانوذرات طلا $384/2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ طی ۴۸ ساعت تیمار سلولی به‌دست آمده است. این نتیجه نشان می‌دهد که افزایش غلظت نانوذرات طلا، سمیت قابل توجهی روی سلول‌های *MCF-7* طی تیمار ۴۸ ساعت دارد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت، درصد بقا سلول‌ها به‌شدت کاهش یافته است.

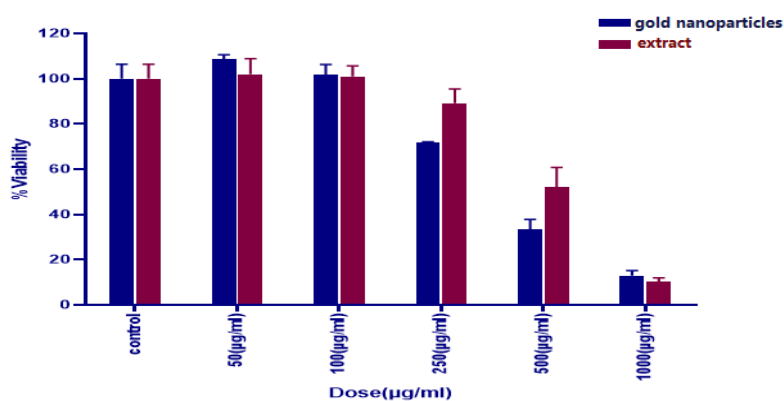
باتوجه به شکل ۱۱، می‌توان به این نتیجه رسید که اثر مطلوب سمیت عصاره به‌تنهایی و نانوذرات طلا روی سلول‌های *MCF-7* نسبت به تیمار در ۴۸ ساعت تغییر چندانی نداشته است. IC_{50} محاسبه شده برای عصاره $510/8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ و برای نانوذرات طلا $382/9 \text{ } \mu\text{g/ml}$ طی ۷۲ ساعت به‌دست آمده است. با بررسی هر سه زمان تیمار نتیجه گرفته شد که اثربخش‌ترین زمان تیمار به‌وسیله‌ی نانوذرات طلای سنتز شده و عصاره برای از بین بردن سلول‌های سرطانی *MCF-7*، زمان ۴۸ ساعت است، همچنین عملکرد نانوذرات طلا به‌دلیل IC_{50} کمتر و در نتیجه نیاز به غلظت کمتر برای توقف رشد سلول‌های سرطانی و یا حذف آن‌ها نسبت به عصاره مناسب‌تر است.



شکل ۹: نمودار درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات طلا و عصاره اناریجه. درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۲۴ ساعت تیمار شدن توسط پنج غلظت مختلف عصاره و نانوذرات طلا سننژ شده به وسیله عصاره گیاه اناریجه.



شکل ۱۰: نمودار درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۴۸ ساعت تیمار با نانوذرات طلا و عصاره اناریجه. درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۴۸ ساعت تیمار شدن توسط پنج غلظت مختلف عصاره و نانوذرات طلا سننژ شده به وسیله عصاره گیاه اناریجه.



شکل ۱۱: نمودار درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۷۲ ساعت تیمار با نانوذرات طلا و عصاره اناریجه. درصد بقا سلول‌های *MCF-7* پس از ۷۲ ساعت تیمار شدن توسط پنج غلظت مختلف عصاره و نانوذرات طلا سننژ شده به وسیله عصاره گیاه اناریجه.

۴- بحث

نانوذرات فلزی طلا به دلیل داشتن خواص منحصر به فرد مانند سنتز آسان، نسبت سطح به جرم بالا، واکنش پذیری بالا و غیرسمی بودن در بسیاری از زمینه‌ها از جمله برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است (۶، ۷). در سال‌های اخیر روش سنتز سبز و استفاده از گیاهان برای تولید نانوذرات فلزی بسیار مورد توجه قرار گرفته است که نسبت به روش‌های دیگر ارزان‌تر، ساده‌تر و غیرسمی است (۹). مقاله‌ی حاضر شامل گزارش سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی برگ و ساقه گیاه اناریجه (*Pimpinella affinis*)، مشخصه‌یابی نانوذرات طلای سنتز شده و ارزیابی سمیت سلولی آن‌ها بر رده سلول سرطانی MCF-7 است. همان‌طور که گفته شد، تولید نانوذرات به این روش مقرون به صرفه است و در زمان کوتاهی قابل انجام است. در این پژوهش، برای یافتن ترکیبات اساسی موجود در عصاره گیاه اناریجه، آنالیز GC/MS با استفاده از عصاره گیاهی تهیه شده انجام شد. ترکیبات مهم شناسایی شده شامل ترکیبات فنولی مانند اسکوپارون، ترکیبات فلاونوئیدی مانند DDMP، مونوترپن‌ها مانند p-cymene و مشتقات آن، ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند هیدروکوئینون و HTT، لیپیدها شامل لینولئیک اسید، استئاریک اسید و التیک اسید و آلکالوئیدها مانند بتاکربولین می‌باشد. به‌طور کلی عصاره برگ و ساقه گیاه اناریجه (*Pimpinella affinis*) (باتوجه به متابولیت‌های ثانویه‌ای که دارد توانایی احیای یون‌های طلا به نانوذرات طلا را دارد. از آن جایی که عوامل مختلف از جمله روش عصاره‌گیری، نوع حلال، موقعیت جغرافیایی و فصلی که گیاه تهیه شده است و خیلی از عوامل دیگر، در استخراج انواع ترکیبات و میزان استخراج ترکیبات از گیاهان تأثیر بسزایی دارد، در نتیجه ترکیبات به دست آمده از عصاره گیاه اناریجه در این مقاله می‌تواند تا حدودی با نتایج حاصل از بررسی‌های ترکیبات حاصل از آن در مقالات دیگر متفاوت باشد. اما به‌طور کلی نتایج حاصل نشان می‌دهد، ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان فراوان در این گیاه وجود دارد. در مقاله‌ای به وجود p-cymene و مشتقات آن و اکتادکانوئیک اسید در قسمت‌های هوایی *Pimpinella* اشاره شده است (۱۸). در مقاله‌ای دیگر بیان شده است که *Pimpinella affinis* دارای ترکیبات مونوترپن زیادی مانند p-cymene و sesquiterpene می‌باشد (۲۷). همچنین در مقاله‌ای، ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان ترکیبات موثر در ویژگی‌های بیولوژیک گیاه اناریجه گزارش شده است (۱۷).

طی تیمار نمک طلا با استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه اناریجه در مشاهدات بصری، با افزایش غلظت عصاره در محلول واکنش تغییر رنگ کلئوئید از زرد کم‌رنگ به آبی متمایل به طوسی، قرمز یاقوتی و بنفش اتفاق افتاد که باتوجه به گزارشاتی که از قبل توسط مقالات مختلف ثبت شده است، این تغییر رنگ نشان دهنده‌ی کاهش یون‌های طلا (Au^{3+}) به اتم طلا (Au^0) و تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد (۲۲). همچنین در مقاله‌ای دیگر، طی سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره برگ مگنولیا (*Magnolia Kobus*) در مشاهدات بصری، تغییر رنگ از بی‌رنگ به قرمز یاقوتی مشاهده شد. رنگ قرمز یاقوتی ایجاد شده ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی نانوذرات طلا است. کاهش یون‌های طلا به نانوذرات طلا را می‌توان در نتیجه‌ی اضافه کردن عصاره به محلول واکنش و مشاهده‌ی تغییر رنگ محلول تشخیص داد و در ادامه این فرآیند اتفاق افتاده، با مطالعه‌ی داده‌های حاصل از طیف‌سنجی UV-Visible قابل بررسی و اثبات است (۲۰). معمولاً برای بررسی خصوصیات اندازه نانوذرات از آنالیز طیف UV-Visible در محدوده‌ی طول موج بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر استفاده می‌شود (۱۳). ظهور پیک نمودار بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر در طیف‌سنج مرئی-فرابنفش به دلیل پدیده رزونانس پلاسمون سطحی ناشی از نوسانات جمعی الکترون‌ها، تأییدکننده‌ی تشکیل نانوذرات طلا است که در بسیاری از مقالات گزارش شده است (۱۳، ۲۲، ۲۸) و وابستگی زیادی به اندازه و شکل نانوذرات و همچنین محیط شیمیایی واکنش دارد (۲۲). تغییر در هر کدام از این پارامترها منجر به جابه‌جایی در موقعیت پیک می‌شود. بنابراین یکی از راه‌های بهینه‌سازی پارامتر فرآیند واکنش برای به دست آوردن حداکثر بازده از نانوذرات طلای سنتز شده به‌وسیله‌ی عصاره گیاهی، تعیین مقدار بهینه از عصاره مصرفی برای سنتز نانوذرات طلا می‌باشد (۲۳). در این پژوهش،

حداکثر طول موج جذبی نانوذرات طلا سنتز شده در غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه اناریجه بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ظاهر شد و بدین صورت است که با استفاده از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲ و ۳ (mg/ml) از عصاره، حداکثر طول موج جذبی (λ_{max}) برای نانوذرات طلای تولید شده به ترتیب از غلظت کم به زیاد عصاره ۵۷۹، ۵۳۳، ۵۳۳، ۵۳۳، ۵۳۷، ۵۳۷، ۵۵۲ و ۵۶۳ نانومتر و حداکثر میزان جذب آن‌ها به ترتیب ۰/۵۴۴، ۰/۸۷۰، ۰/۹۹۲، ۰/۹۸۵، ۰/۹۵۴، ۰/۹۹۹، ۰/۹۳۶ و ۰/۷۳۵ به دست آمد. با توجه به مطالعات دیگر حداکثر طول موج جذبی حاصل از نانوذرات طلا در محدوده ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ظاهر می‌شود (۲۲). برای مثال در مقالات دیگر، حداکثر طول موج حاصل از سنتز نانوذرات طلا به وسیله عصاره *Pelargonium graveolens* در محدوده ۵۳۸ نانومتر و یا به وسیله عصاره *Punica granatum* در ۵۶۸ نانومتر قرار دارد (۱۳). این نتایج کاملاً اثبات کننده‌ی صحت نتایج حاصل از مقاله‌ی حاضر می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از تولید نانوذرات طلا به وسیله‌ی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اناریجه، تشکیل رنگ‌های مختلف در کلونید و بررسی نتایج حاصل از طیف‌سنج UV-Visible آن‌ها بیانگر آن است که مقدار عصاره‌ی گیاهی مصرف شده، نقش مهمی در اندازه و غلظت نانوذرات سنتز شده دارد. همان‌طور که گفته شد، مقدار عصاره اضافه شده، به علت تغییر در اندازه و نحوه‌ی پراکندگی نانوذرات سنتز شده باعث تغییر در موقعیت حداکثر طول موج جذبی در طیف‌سنج UV-Visible می‌شود. پیش از این پژوهش‌هایی بر مبنای تأثیر حجم عصاره مصرفی بر نانوذرات تشکیل شده ثبت شده است. نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که حداکثر طول موج جذبی تشکیل شده‌ی حاصل از آنالیز طیف‌سنج UV-Visible با شدت جذب کمتر به معنای تشکیل تعداد کمتر نانوذرات در طول فرآیند کاهش است و بالعکس، هرچه میزان جذب آن بیشتر باشد به معنای آن است که بازده سنتز نانوذرات بیشتر است. با افزایش غلظت عصاره تشکیل نانوذرات طلا سرعت می‌بخشد و کاهش غلظت آن، منجر به پراکندگی نانوذرات و ایجاد پیک وسیع در طول موج‌های بیشتر می‌شود. افزایش رقت عصاره باعث تولید نانوذرات با ایجاد پیک قله‌ای تر می‌شود. این تفاسیر در مقالات مختلف از جمله در سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاه *Hibiscus sabdariffa* نیز صدق می‌کند (۲۳).

در مقاله حاضر، با افزایش غلظت عصاره از مقدار ۰/۵ mg/ml به بالا، در محلول واکنش، در حداکثر طول موج جذبی نانوذرات طلای تولید شده red shift اتفاق افتاد و به سمت طول موج‌های بیشتر جابه‌جا شد. این رویداد، نشان دهنده‌ی افزایش در اندازه نانوذرات طلای تولید شده می‌باشد و با نتایج مطالعات نیومن منطبق است (۲۸). در نمودار ایجاد شده از بررسی طیف‌سنج UV-Visible برای نانوذرات طلای تولید شده در غلظت ۰/۲ mg/ml از عصاره، پیک وسیع ایجاد شد و در مشاهدات بصری نیز تغییر رنگ کلونید به آبی متمایل به طوسی مشاهده شد که با پیک‌های دیگر ایجاد شده در غلظت‌های بالاتر از عصاره متفاوت بود. این رویداد نشان دهنده‌ی تشکیل تعداد بسیار کم از نانوذرات طلا به دلیل استفاده از رقت کم عصاره به عنوان عامل کاهنده می‌باشد. با افزایش غلظت عصاره اناریجه تا غلظت ۱/۵ mg/ml، در محلول واکنش، به علت افزایش غلظت عصاره در محلول، شدت پیک نمودار یا شدت جذب در حداکثر طول موج جذبی در نمودار افزایش یافت. همچنین به علت جابه‌جایی حداکثر طول موج جذبی به سمت طول موج‌های بلندتر و وقوع Red shift، افزایش در اندازه‌ی نانوذرات طلا دیده شد و در غلظت‌های بالاتر از عصاره (۲ و ۳ mg/ml)، ایجاد پیک با مساحت زیر نمودار وسیع‌تر و جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بزرگتر به علت وجود مقدار کمی نانوذرات تجمع یافته، ایجاد شد (۲۴). حداکثر شدت پیک جذبی تشکیل شده در نمودار UV-Visible برای نانوذرات تولید شده با استفاده از غلظت‌های ۰/۷۵ mg/ml و ۱ از عصاره آبی گیاه اناریجه، در طول موج‌های پایین‌تر، همراه با پیک قله‌ای تر و مساحت زیر نمودار متقارن تر ظاهر شد. این نتیجه بیان کننده‌ی آن است که توزیع اندازه نانوذرات تولید شده در این غلظت از عصاره نسبت به سایر غلظت‌ها مناسب‌تر و دارای پلی‌دیسپرسیتهی کمتر است. همچنین بازده سنتز نانوذرات طلا با استفاده از این غلظت عصاره بیشتر از سایر غلظت‌ها می‌باشد. بنابراین بهینه‌ترین غلظت از عصاره آبی گیاه اناریجه برای سنتز

نانوذرات طلا در این آزمایش مقدار 0.75 mg/ml و 1 به دست آمد. برای تأیید این تفاسیر به دست آمده در پژوهش حاضر، به بررسی نتایج حاصل از مقالات دیگر پرداخته شد. در مقاله‌ای بیان شده است که از کیتوزان (دومین پلی ساکارید در طبیعت) برای سنتز نانوذرات طلا استفاده شده است. با افزایش غلظت کیتوزان، تغییر رنگ محلول از صورتی به قرمز یاقوتی اتفاق افتاد و حداکثر طیف جذبی حاصل از نوسان پلاسمون سطحی نانوذرات در محدوده بین 520 تا 530 نانومتر ظاهر شد و نشان داده شد که با افزایش غلظت کیتوزان، شدت نوار پلاسمون سطحی نیز افزایش می‌یابد. همچنین ارتباط بین اندازه‌ی نانوذرات و بیشینه طول موج جذبی در این مطالعه بررسی شده است و نشان داده است که افزایش غلظت کیتوزان از میزان 0.1% ، 0.2% ، 0.3% ، 0.4% و 0.5% به ترتیب از راست به چپ دارای حداکثر جذب در طول موج‌های 526 ، 526 ، 525 ، 524 و 525 نانومتر می‌باشد. با افزایش غلظت کیتوزان، شدت حداکثر پیک جذبی ایجاد شده افزایش می‌یابد و به سمت طول موج‌های پایین‌تر جابه‌جا می‌شود و این نشان دهنده‌ی کاهش اندازه نانوذرات تشکیل شده می‌باشد (۲۸) در پژوهشی دیگر، طیف UV-Visible محلول کلئیدی با استفاده از عصاره گیاه *Hibiscus cannabinus* برای سنتز نانوذرات طلا به دست آمد و با اضافه کردن مقادیرهای مختلف 5 ، 10 ، 20 و 30 میلی لیتر از عصاره در محلول نمک طلا پس از 90 دقیقه، واکنش مورد بررسی قرار گرفت و این نتیجه گرفته شد که افزایش مقدار عصاره در محلول واکنش باعث جابه‌جایی پیک نمودار به سمت طول موج‌های طولانی‌تر و ایجاد منحنی زیر نمودار باریک‌تر می‌شود (۱۳).

پس از بررسی آنالیز طیف سنج UV-Visible، برای یافتن غلظت بهینه از عصاره و همچنین بررسی توزیع اندازه و میزان پایداری نانوذرات تولید شده با استفاده از غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه اناریجه، به بررسی آنالیز حاصل DLS پرداخته شد. طبق نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت عصاره، میانگین اندازه در نانوذرات طلای تولید شده، افزایش یافت. نتایج به دست آمده از آنالیز DLS کاملاً با طیف‌های به دست آمده به وسیله‌ی UV-Visible مطابقت داشت. بررسی داده‌های حاصل از DLS نشان داد که اندازه نانوذرات طلا تولید شده در غلظت 1 mg/ml از عصاره نسبت به سایر غلظت‌ها بهترین نتیجه با پلی‌دیسپرسیتهی کمتر را دارد و غلظت 1 mg/ml از عصاره به عنوان غلظت بهینه عصاره برای سنتز نانوذرات طلا در مراحل بعدی تعیین شد. نتایج حاصل از DLS در مقاله‌ای که به بررسی و تعیین ویژگی نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از چهار عصاره گیاهی *Salvia officinalis*، *Lippia citriodora*، *Punica granatum*، *Pelargonium graveolens* و *S. officinalis* دارای محدوده اندازه 1 تا 8 نانومتر هستند در حالی که نانوذرات سنتز شده به وسیله عصاره *P. granatum* در محدوده 30 تا 70 نانومتر می‌باشند. این نتایج به دست آمده تأیید کننده‌ی نتایج حاصل از طیف مرئی-فرابنفش آن‌ها است. زیرا حداکثر طول موج جذبی سه نمونه اول به ترتیب در محدوده 538 ، 536 و 535 نانومتر ظاهر شد که نشان دهنده‌ی ایجاد نانوذرات کوچک‌تر است و حداکثر طول موج حاصل از نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *P. granatum* در طول موج 568 نانومتر ظاهر شد. طول موج بالاتر نشان دهنده ایجاد نانوذرات با اندازه‌ی بزرگ‌تر می‌باشد (۲۹). یکی از راه‌های سنجش پایداری نانوذرات تولید شده، بررسی پتانسیل زتای به دست آمده با استفاده از دستگاه زتاسایزر است و طبق آن، هرچه میزان قدرمطلق عدد حاصله بیشتر باشد، کلئیدها پایدارترند و در نتیجه نانوذرات میل به تجمع و رسوب و مدت طولانی‌تری پایدار باقی می‌مانند. در این مقاله به جز در حالت استفاده از غلظت 0.2 mg/ml از عصاره‌ی اناریجه برای سنتز نانوذرات طلا، سایر غلظت‌ها با توجه به عدد پتانسیل‌زتا به دست آمده، دارای نانوذرات پایداری بودند اما نانوذرات تولید شده با استفاده از غلظت 1 mg/ml از عصاره با داشتن پتانسیل زتای برابر با -61 میلی‌ولت، دارای پایداری بسیار بالایی است. در مقاله‌ای که بر روی مقایسه سنتز نانوذرات طلا با استفاده از چهار گیاه مختلف مطالعه داشت، نانوذرات تهیه شده در تمام نمونه‌ها دارای پتانسیل‌زتا منفی بود و در محدوده -10

تا ۳۰- میلی‌ولت به‌دست آمد. بدین‌صورت که نانوذرات طلای سنتز شده به‌وسیله عصاره گیاهان *Pelargonium graveolens*، *Salvia officinalis* و *Lippia citriodora* به‌ترتیب دارای پتانسیل‌زتا ۲۳-، ۱۷- و ۲۰- میلی‌ولت بودند که نزدیک به هم است، درحالی‌که پتانسیل زتای عصاره گیاه *P. granatum* مقدار کمتری را نشان داد و برابر با ۱۲- میلی‌ولت بود که مطابق با نتایج میانگین قطر ذرات است و از ثبات کمتری برخوردار است و بنابراین تمایل بیشتری برای تجمع و تشکیل ذرات بزرگ‌تر دارد (۲۹).

برای شناسایی و تعیین مورفولوژی نانوذرات طلای سنتز شده، از غلظت بهینه عصاره آبی گیاه اناریجه برابر با ۱ mg/ml و تحلیل نتایج حاصل از دستگاه SEM استفاده شد. بررسی‌های حاصل از SEM نشان داد که نانوذرات طلای سنتز شده به‌صورت کروی با میانگین اندازه ۲۰ نانومتر هستند و مقدار کمی پلی‌دیسپرسیته دارند. میانگین اندازه‌ی به‌دست آمده کاملاً با نتیجه‌ی حاصل از DLS نمونه مطابقت دارد. SEM، قطر متوسط نانوذرات در یک تصویر را از روی ویژگی‌های هندسی نانوذرات (مساحت، محیط و میانگین اندازه) محاسبه می‌کند و امکان نمونه برداری از نانوذرات بدون مواد آلی اطراف آن را فراهم می‌کند. بنابراین اندازه به‌دست آمده در آن همان اندازه اصلی نانوذرات است (۲۹). نانوذرات طلا که با روش شیمیایی و سنتز سبز سنتز می‌شوند عمدتاً کروی هستند که در بسیاری از مقالات حاصل از سنتز سبز نانوذرات طلا اثبات شده است (۲۰). به‌دلیل اندازه‌گیری نانوذرات همراه با شعاع هیدرودینامیکی آن‌ها در روش DLS، اندازه نانوذرات اندازه‌گیری شده به روش DLS می‌تواند تا ۱/۳ برابر اندازه قطر اصلی نانوذرات که به‌روش SEM اندازه‌گیری می‌شوند، باشد. در مقاله‌ای نیز نانوذرات نقره سنتز شده با روش DLS دارای اندازه متوسط ۷۸ نانومتر اندازه‌گیری شدند درحالی‌که در روش میکروسکوپ الکترونی اندازه متوسط ۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و اختلاف اندازه‌ی آن‌ها نیز ۱/۳ به دست آمد که این نتایج کاملاً با مشاهدات دیگر هم‌خوانی دارد (۲۴).

برای یافتن گروه‌های عاملی موجود در عصاره که در احیای نانوذرات طلا و پایداری آن‌ها نقش داشتند، بر روی عصاره و نانوذرات طلای سنتز شده آنالیز FTIR انجام شد. نتایج حاصل از مطالعات FTIR عصاره گیاه اناریجه و نانوذرات طلا تشکیل شده به‌وسیله آن، نشان داد که وجود باند قوی در ناحیه 3422 cm^{-1} ، به نوسانات کششی گروه عاملی هیدروکسیل مربوط می‌شود. باند قوی در حوالی این ناحیه در بسیاری از گیاهان دیگر از جمله گیاه *R. rugosa* و *M. kobus* تشکیل شده است که به‌وجود ترکیبات- فنولی و الکل‌های آزاد در عصاره گیاه اشاره دارند (۹، ۲۰). جذب در ناحیه 2959 cm^{-1} ، بیان‌کننده‌ی وجود نوسانات کششی پیوندهای C-H در زنجیره هیدروکربنی است بنابراین به وجود لیپیدهای موجود در عصاره اشاره دارد. جذب در ناحیه‌ی cm^{-1} ۲۹۳۰، نیز می‌تواند بیان‌کننده‌ی وجود نوسانات کششی پیوندهای C-H در زنجیره هیدروکربنی و لیپیدهای موجود در عصاره باشد و یا به آمین‌های نوع دوم (N-H) که در پروتئین‌های گیاه وجود دارد، مرتبط باشد. این محدوده از پیک‌های جذبی ایجادشده در آنالیز FTIR در نانوذرات سنتز شده با عصاره گیاه *C. guianensis* نیز وجود دارد (۷). جذب در ناحیه‌ی cm^{-1} ۱۷۲۷، مربوط به گروه‌های کربونیل (کشش) CO است. بنابراین اثبات‌کننده‌ی وجود گروه‌های کربونیل ساده مانند کربوکسیل و کتون در عصاره اناریجه هستند. وجود این باند جذبی در مقالات دیگر نیز گزارش شده است از جمله در مطالعه‌ی سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره برگ *Rosa rugosa* به عنوان عامل کاهنده، باند قوی ایجادشده در cm^{-1} ۱۷۰۸ نشان- دهنده‌ی وجود کربوکسیلات در این گیاه می‌باشد که ممکن است مسئول کاهش یون‌های فلزی به نانوذرات فلزی باشند. همچنین در مقاله‌ای که به بررسی سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره برگ *Magnolia Kobus* پرداخته شده است، وجود باند در ناحیه‌ی cm^{-1} ۱۷۳۶ اشاره به وجود گروه‌های کربنیل در عصاره‌ی گیاهی دارد (۹، ۲۰). تشکیل باند قوی در ناحیه cm^{-1} ۱۶۰۵ از FTIR عصاره اناریجه، مربوط به آمید (N-H) I است که در پروتئین‌های عصاره گیاه اناریجه وجود دارد. همچنین می‌تواند نشان‌دهنده‌ی وجود گروه‌های عاملی کربوکسیلات نیز باشد. در گیاه *R. rugosa* و مگنولیا نیز تشکیل باند نزدیک به ناحیه‌ی

ذکر شده، به وجود گروه‌های آمین اشاره دارد (۹، ۲۰). جذب در ناحیه 1390 cm^{-1} ، به وجود کربوکسیلات و یا گروه‌های فنولی حاوی پیوند O-H اشاره دارد، همچنین می‌تواند به ارتعاشات کششی C-N در آمین‌های آلیفاتیک مربوط باشد. جذب در این ناحیه در عصاره‌ی حاصل از گل‌های *C. guianensis* نیز به چشم می‌خورد (۷). جذب در ناحیه 1277 cm^{-1} ، مربوط به وجود پروتئین‌ها در عصاره می‌باشد. جذب در مجموعه پیک‌های 1126 cm^{-1} ، 1074 و 987 ، به باند C-H اشاره دارد که می‌تواند مربوط به کربوهیدرات‌های عصاره باشد و یا به ارتعاشات کششی C-N در آمین‌های آلیفاتیک یا الکل‌ها و یا فنول‌ها مربوط باشد. در FTIR حاصل از عصاره برگ *R. rugosa* نیز بیان شده که وجود باند در 1041 cm^{-1} نشان دهنده‌ی وجود گروه‌های هیدروکسیلی (آب و یا الکل آزاد) می‌باشد (۹). به‌علاوه در عصاره‌ی گل‌های *C. guianensis* نیز وجود باند در 1073 cm^{-1} به آمین‌های آلیفاتیک و وجود الکل‌ها و فنول‌ها اشاره دارد (۷). در مقاله‌ای دیگر نیز که مربوط به طیف FTIR حاصل از عصاره *Centella asiatica* است، ایجاد پیک در 1130 cm^{-1} به وجود فنل‌ها اشاره نموده است (۲۵). جذب در 653 و 617 cm^{-1} ، بیان کننده‌ی وجود گروه‌های C-H (استیلن یا آلکین)، ترکیبات الکی (O-H) و یا ترکیبات دی‌سولفید (C-S) در عصاره است.

در مقاله حاضر، با مقایسه‌ی دوطیف FTIR حاصل از عصاره اناریجه و نانوذرات طلا سنتز شده، می‌توان نتیجه گرفت که با تغییرات گروه COOH به OH، پیک قوی در ناحیه 3432 cm^{-1} ظاهر شده است که نشان دهنده‌ی کاهش یون‌های طلا به کمک پروتئین‌ها و کربوکسیلیک اسیدها و ترکیبات فنولی موجود در عصاره است، به‌علاوه گروه‌های OH برای پایداری نانوذرات طلا روی آن‌ها قرار گرفته اند. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات نانوذرات با استفاده از *C. guianensis* مطابقت دارد (۷). همچنین وجود ترکیبات حاوی کربوکسیلیک اسید و آمین‌های آزاد حاصل از پروتئین‌های عصاره بر روی نانوذرات طلا باعث پایداری نانوذرات به‌مدت طولانی شدند (۲۵). به‌طور کلی با بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که طیف FTIR حاصل از عصاره اناریجه و نانوذرات سنتز شده به‌وسیله‌ی آن، بیشتر به وجود گروه‌های هیدروکسیل و آمیدی و کربونیل اشاره دارد که مربوط به ترکیبات فنولی و الکی فراوان و پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها و لیپیدها در عصاره است که نشان می‌دهد ترکیبات فنولی و کربوکسیلی و آمیدی موجب احیا نمک طلا و پروتئین‌ها و گلیکوزیدها و لیپیدها باعث پایداری نانوذرات طلا شده اند.

در نهایت، برای ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات سنتز شده از روش MTT استفاده شد. نتایج حاصل از سمیت سلولی به‌روش MTT برای عصاره آبی گیاه اناریجه و نانوذرات طلای سنتز شده به‌وسیله‌ی عصاره آبی گیاه اناریجه نشان داد که عصاره و نانوذرات حاصل از آن، سمیت مطلوبی روی سلول‌های سرطانی MCF-7 دارند و مناسب‌ترین زمان اثربخشی آن‌ها زمان تیمار در ۴۸ ساعت به‌دست آمد که طی آن، عملکرد نانوذرات طلا به‌دلیل IC_{50} برابر با $384/2\text{ }\mu\text{g/ml}$ و در نتیجه نیاز به غلظت کمتر، برای متوقف کردن سلول‌های سرطانی نسبت به عصاره با IC_{50} برابر با $631/3\text{ }\mu\text{g/ml}$ بیشتر و بهتر است. ارزیابی زنده ماندن سلول‌ها بعد از تیمار با ماده‌ی مورد نظر با استفاده از روش MTT در بسیاری از آنالیزها مورد استفاده قرار می‌گیرد. مانند مقاله‌ای که اثرات نانوذرات سنتز شده به‌وسیله عصاره *C. guianensis* را مورد بررسی قرار داد و اثبات کرد که نانوذرات در این مقاله دارای سمیت سلولی قابل توجه علیه سلول‌های سرطانی HL60 دارند. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که متوقف کردن رشد سلول و یا کشتن سلول می‌تواند مکانیسم احتمالی ناشی از اثر سمیت نانوذرات طلای سنتز شده به‌روش سبز باشد (۷) همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که علت گذر میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از مقدار کنترل، در برخی غلظت‌های دارو در آنالیز MTT آن است که، بسیاری از داروهای ضدسرطان در غلظت‌های کم برای سلول‌های سرطانی نقش تغذیه‌ای دارند و باعث افزایش رشد آن‌ها می‌شوند. در نتیجه نمودار زنده‌مانی حاصل از آن‌ها از میزان کنترل آن‌ها افزایش می‌یابد، در صورتی که

همان دارو در غلظت‌های بالا به سلول‌های سرطانی شوک وارد می‌کند و اثر سمیت سلولی دارد و در نهایت باعث توقف رشد و یا حذف سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۶).

۵- نتیجه‌گیری

امروزه یکی از چالش‌های بزرگ بشر، یافتن راهی مناسب برای درمان بیماری سرطان است. فناوری نانو در سال‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده است و در بسیاری از تحقیقات به مطالعه بر روی گیاهان برای یافتن راهی مؤثر برای درمان قطعی سرطان و بررسی مکانیسم‌های مولکولی که توسط آن یک عامل باعث ایجاد سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شود، پرداخته شده است. استفاده از گیاهان در سنتز سبز یکی از روش‌های سریع، ارزان و سالم برای دست‌یابی به نانوذرات مطلوب است. در این مطالعه، تشکیل نانوذرات طلا چند دقیقه پس از تیمار $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ با غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ و ساقه گیاه اناریجه با نام علمی *Pimpinella affinis* به عنوان عامل احیاکننده و پایدارکننده، همراه با تغییر رنگ به سمت قرمز یا قوتی اتفاق افتاد. برای مشخصه‌یابی نانوذرات طلای سنتز شده از روش طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش، دستگاه تفرق نور پویا، میکروسکوپ الکترونی روبشی، تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد. بررسی نتایج طیف‌سنجی UV-Visible و DLS، نشان داد که نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از غلظت یک mg/ml از عصاره دارای حداکثر طول‌موج جذبی 533 nm میانگین اندازه 26 نانومتر و پتانسیل زتا منفی 61 میلی‌ولت بودند که اشاره به پایداری مطلوب آن‌ها دارد و آن غلظت از عصاره به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد. تصاویر SEM نشان داد که نانوذرات طلا دارای شکل کروی همراه با پلی‌دیسپرسیتهی برابر 0.7 بودند. نتایج حاصل از FTIR، نشان داد که ترکیبات فنولی و کربوکسیلی و ترپن‌ها بیشترین نقش را در احیا نمک طلا و پایداری نانوذرات طلا ایفا می‌کنند. پس از تهیه عصاره اناریجه مقداری از آن برای تعیین ترکیبات عصاره با دستگاه GC/MS مورد بررسی قرار گرفته شد. ترکیبات اساسی شناسایی شده در عصاره توسط روش GC/MS به‌طور کلی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، ترپن‌ها، گلیکوزیدها و لیپیدها به دست آمد که با نتایج حاصل از FTIR هم‌خوانی دارد. در نهایت برای بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات طلا و عصاره گیاه از روش رنگ‌سنجی MTT بر روی رده سلولی MCF-7 همراه با تیمارهای 24 ، 48 و 72 ساعت صورت گرفت. با بررسی داده‌ها این نتیجه حاصل شد که نانوذرات طلا سنتز شده به‌وسیله عصاره گیاه اناریجه دارای سمیت بیشتری علیه سلول‌های MCF-7 نسبت به عصاره گیاه بود. همچنین زمان تیمار 48 ساعت برای سلول‌ها در آنالیز MTT، به عنوان زمان بهینه برای سمیت نانوذرات طلا همراه با IC_{50} برابر با $384/2 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. با استفاده از یافته‌های فوق می‌توان به این نتیجه رسید که گیاه اناریجه به‌علت داشتن خاصیت درمانی ضد سرطانی بالقوه و بومی کشور ایران بودن، یکی از گزینه‌های مناسب برای سنتز نانوذرات طلا باشد و می‌توان با مطالعات و اصلاح سازی‌های بیشتر بر روی نانوذرات سنتز شده با استفاده از این گیاه، آن را به‌عنوان یکی از روش‌های کارآمد به منظور رسیدن به هدف درمان مناسب برای بیماری سرطان پستان در نظر گرفت. بنابراین، پژوهش حاضر می‌تواند بینش ارزشمندی در توسعه نانودرمان‌ها برای یافتن راهی مؤثر و غیرسمی برای درمان سرطان مخصوصا سرطان پستان ارائه دهد.

۶- منابع

1. Kashyap D, Tuli HS, Yerer MB, Sharma A, et al., editors. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. Seminars in cancer biology; 2021: Elsevier.
2. El-Sahli S, Hua K, Sulaiman A, Chambers J, et al. A triple-drug nanotherapy to target breast cancer cells, cancer stem cells, and tumor vasculature. Cell death & disease. 2021 1;12(1):1-10.

3. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug discovery today*. 2010 19-20;15(19-20):842-50.
4. Strambeanu N, Demetrovici L, Dragos D, Lungu M. Nanoparticles: Definition, classification and general physical properties. *Nanoparticles' promises and risks*: Springer; 2015. p. 3-8.
5. McNeil SE. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009 3;1(3):264-71.
6. Rosa S, Connolly C, Schettino G, Butterworth KT, et al. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer nanotechnology*. 2017 1;8(1):1-25.
7. Geetha R, Ashokkumar T, Tamilselvan S, Govindaraju K, et al. Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nanotechnology*. 2013 4;4(4):91-8.
8. Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008 1;71(1):80-5.
9. Dubey SP, Lahtinen M, Sillanpää M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010 1-3;364(1-3):34-41.
10. Bahare HD, Ataollah SSS, Maryam A. Evaluation of metalloproteinase matrix MMP9 gene expression and effect of silver nanoparticles toward Colon cancer cell line (HT29) *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. 2019 4 1.13;9(4):344-52.
11. Zahra G, Adeleh D, Said A, Maryam S. Evaluation of the anticancer effects of Samarium nanoparticles synthesized by extract of ginger on HCT116 colorectal cancer cells. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. 2020 4 29 Feb.;10(4):202-13.
12. Ebrahimzadeh MA, Alizadeh SR, Hashemi Z. Green synthesis of gold nanoparticles using *Sambucus ebulus* fruit extract, characterization, and antileishmanial, antibacterial, antioxidant, and photocatalytic activities. *European Journal of Chemistry*. 2023 2;14(2):223-30.
13. Ahmed S, Ikram S. Biosynthesis of gold nanoparticles: a green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016;161:141-53.
14. Chen J, Li Y, Fang G, Cao Z, et al. Green synthesis, characterization, cytotoxicity, antioxidant, and anti-human ovarian cancer activities of *Curcuma kwangsiensis* leaf aqueous extract green-synthesized gold nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021 3;14(3):103000.
15. Haraty Rad S, Sorinezami Z, Ghaffari Moghaddam M, Khajeh M, et al. Green synthesis of gold nanoparticles with beet extract and investigation of its anti-cancer properties. *Nanoscale*. 2022 1;9(1):128-35.
16. Askari F, Sefidkon F, Sharifi Ashorabadi E. Effects of planting date and seed origin on yield, essential oil and compositions content of *Pimpinella affinis* Ledeb. in Iran. *Iranian Journal of Natural Resources Research*. 2012 1;1(1):24-30.
17. Esmaili F, Tajik H, Mehdizadeh T, Mayeli M. Determination and comparison of antioxidant activity and phenolic content of *Pimpinella affinis* hydroethanolic extract and essential oil. *Studies in Medical Sciences*. 2017 5;28(5):311-20.
18. Nasir A, Yabalak E. Investigation of antioxidant, antibacterial, antiviral, chemical composition, and traditional medicinal properties of the extracts and essential oils of the *Pimpinella* species from a broad perspective: a review. *Journal of Essential Oil Research*. 2021 5;33(5):411-26.
19. Shourian M, Ghourchian H, Boutorabi M. Ultra-sensitive immunosensor for detection of hepatitis B surface antigen using multi-functionalized gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2015;895:1-11.
20. Song JY, Jang H-K, Kim BS. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry*. 2009 10;44(10):1133-8.
21. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release*. 2016;235:337-51.

22. Pandey S, Oza G, Mewada A, Sharon M. Green synthesis of highly stable gold nanoparticles using *Momordica charantia* as nano fabricator. *Arch Appl Sci Res*. 2012 2;4(2):1135-41.
23. Mishra P, Ray S, Sinha S, Das B, et al. Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of *Hibiscus sabdariffa* and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;105:264-72.
24. Maliszewska I, Szewczyk K, Waszak K, editors. Biological synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*; 2009: IOP Publishing.
25. Das RK, Borthakur BB, Bora U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. *Materials Letters*. 2010 13;64(13):1445-7.
26. Calabrese EJ. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine: Re-framing the dose-response relationship. *EMBO reports*. 2004 S1;5(S1):S37-S40.
27. Rahmani B, Shiraz NZ, Masnabadi N, Masoudi S, et al. Volatile Constituents of *Alococarpum erianthum* (DC) H. Riedl & Kuber. *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. and *Pimpinella affinis* Ledeb. Three Umbelliferae Herbs Growing Wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2008 3;20(3):232-5.
28. Malathi S, D Balakumaran M, T Kalaichelvan P, Balasubramanian S. Green synthesis of gold nanoparticles for controlled delivery. *Advanced Materials Letters*. 2013 12;4(12):933-40.
29. Elia P, Zach R, Hazan S, Kolusheva S, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:4007.