

ویژگی‌یابی پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات طلا و بررسی خواص آنتی‌باکتریایی آنها با استفاده از عصاره آبی گیاه چای ترش *Hibiscus sabdariffa* L.

مرضیه مهرزاده^{۱*}، جعفر ولی‌زاده^۲، علی قاسمی^۳

۱- کارشناسی ارشد فیتوشیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲- استاد، عضو هیأت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳- مربی، عضو هیأت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
* آدرس مکاتبه: زاهدان، بلوار دانشگاه، سازمان مرکزی دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، صندوق پستی: ۹۸۷-۹۸۱۵۵، کدپستی: ۹۸۱۶۷-۹۸۱۶۷-۴۵۸۴۵
تلفن: ۱۲۴۵۲۳۳۵ (۰۵۴)، فکس: ۱۲۴۴۶۵۶۵ (۰۵۴)
پست الکترونیک: marzie.mehrzade@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۵

تاریخ تصویب: ۹۶/۳/۳۰

چکیده

مقدمه: در طول دهه گذشته، تحقیقات بر روی روش‌های توسعه یافته ساده، پاک، غیرسمی، مقرون به صرفه و زیست سازگار سنتز نانوذرات متمرکز شده است.

هدف: هدف از مطالعه حاضر مشخصه‌یابی و سنتز زیستی نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی کاسبرگ گیاه چای ترش و بررسی فعالیت ضد میکروبی آنها می‌باشد.

روش بررسی: بیوسنتز نانوذرات طلا توسط برهم کنش نمک طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) با عصاره آبی کاسبرگ گیاه چای ترش انجام شد. به منظور حصول نانوذراتی با شکل یکنواخت و کروی، پارامترهای مؤثر بر بیوسنتز نانوذرات شامل حجم عصاره، غلظت نمک طلا، اثر pH و زمان واکنش توسط تکنیک اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی مورد بررسی و بهینه‌سازی شدند. همچنین از میکروسکوپ الکترونی عبوری و تکنیک پراش اشعه ایکس برای ویژگی‌یابی بیشتر نانوذرات استفاده شد. در نهایت خواص آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا، به روش انتشار با دیسک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: طیف‌های جذبی حاصله پیک‌های قوی در طول موج ۵۷۰ نانومتر از خود نشان دادند، که یک طول موج مشخص برای نانوذرات طلا می‌باشد. مطالعات میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد نانوذرات طلا دارای شکل کروی و با قطر میانگین ۱۰-۵ نانومتر بوده، این نانوذرات دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری هافنیا آلوای می‌باشند.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش نانوذرات طلا به کمک عصاره آبی چای ترش سنتز شده و فعالیت فعالیت آنتی‌باکتریایی نسبتاً خوبی نسبت به باکتری‌های گرم منفی از خود نشان دادند.

کل واژگان: بیوسنتز، چای ترش، فعالیت ضد میکروبی، نانوذرات طلا



مقدمه

امروزه تحقیق‌ها و کاربردهای فناوری نانو به شکل گسترده‌ای در حال توسعه می‌باشد. یکی از مهم‌ترین شاخه‌های فناوری نانو، نانوذره‌ها بوده؛ نانوذرات فلزی گوناگون از قبیل نقره، طلا، پلاتین، تیتانیوم، پالادیوم، آهن، آلومینیوم و مس به دلیل اهمیت‌شان مورد توجه بسیاری از پژوهشگران هستند. که در این میان نانوذره‌های طلا از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. طلا به شکل انبوه و توده یک فلز زردرنگ، نرم، خنثی با ساختار مکعب مراکز وجوه پر و دمای ذوب ۱۰۶۸۵ است. همچنین بی‌اثر بودن طلا و مقاومت آن در برابر اکسایش سطحی یکی از ویژگی‌های مهم این ماده است. اما این ویژگی‌ها لزوماً در نانوذره‌های طلا مشاهده نمی‌شوند. طلا در مقیاس نانو، ویژگی‌هایی را بروز می‌دهد که آنرا فلز مهمی در فرایندهای فناوری نانو تبدیل می‌کند [۱-۳].

به دلیل سهولت ساخت نانوذرات طلا و سمیت کمتر آنها نسبت به نانومواد دیگر و همچنین سطح زیاد نسبت به حجم-شان که سبب واکنش بهتر این ذرات با بیومولکول‌ها می‌شود، این نانوذرات در انتقال دارو و ژن [۴، ۵] در درمان سرطان [۶] و به عنوان حسگر زیستی در تشخیص بافت‌های سرطانی [۷] و میکروارگانیسم‌ها [۸] کاربرد فراوان یافته‌اند. با توجه به کاربرد رو به رشد نانوذرات طلا و نیاز روزافزون با ارایه‌ی روش‌هایی برای ساخت نانوذراتی که آلودگی‌های زیست محیطی دربر نداشته باشند، ضرورت تولید این نانوذرات توسط سیستم‌های زیستی احساس می‌شود [۹].

روش‌های متفاوت فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای سنتز نانوذرات طلا وجود دارد. سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی به دلیل معایبی از جمله چند مرحله بودن فرآیند سنتز، وابسته بودن به دستگاه‌های پیشرفته، نیاز به صرف انرژی زیاد و تولید مواد آلوده‌کننده محیط زیست؛ با محدودیت روبرو است. بنابراین، روش‌های زیستی سنتز نانوذرات با استفاده مستقیم [۱۰] و غیرمستقیم (عصاره، تراوش) از موجودات زنده مانند باکتری‌ها [۱۱]، قارچ‌ها و گیاهان [۱۳] مطرح شده است. در سال‌های اخیر روش بیوسنتز با

استفاده از عصاره گیاهان توجه بیشتری را نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی به خود اختصاص داده است [۱۴].

سنتز سبز ساده، کم هزینه، غیرسمی، سازگار با محیط زیست و کارآمد برای بهره‌برداری هستند [۱۵]. عصاره برگ گیاهان که غنی از پلی‌فنیل‌هایی مانند فلاونوئیدها هستند، عوامل قدرتمندی به عنوان احیاءکننده در سنتز نانوذرات طلا خواهند بود. بنابراین در بسیاری از مقالات به استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات اشاره شده است [۱۶].

نتایج پژوهش‌های اوسلا (Olusola) و همچنین یاردینجیا (Yurdiansyah) و همکاران نشان داد که کاسبرگ خشک گیاه چای ترش حاوی فلاونوئید، آنتوسیانین و مقدار بالایی اسید مانند اگزالیک اسید، سوکسینیک اسید و اسیدهای آلی است. به علاوه مقدار اسید آسکوربیک چای ترش در مقایسه با خانواده مرکبات بیشتر می‌باشد. در آزمایش‌های انجام شده حضور آهن، فسفر، کلسیم، منگنز، آلومینیوم، سدیم، پتاسیم، موسیلاژ، گوسپیتین، هیبستین، پروتئین و مواد معدنی و غیره مشاهده شده است. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در مورد این گیاه، گیاه حاوی ترکیبات پلی‌فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد [۱۷، ۱۸]. ترکیب‌های پلی‌فنلی ترکیب‌های کاهنده‌ای هستند که علاوه بر خاصیت کاهندگی، توانایی پایدار کردن نانو ذرات فلزی را دارند [۱۹].

در سال‌های اخیر، مقاومت دارویی در بسیاری از باکتری‌های پاتوژن به طور قابل توجهی افزایش یافته که درمان عفونت‌ها را دشوار کرده است. بنابراین ما به داروهای بی‌خطر و مؤثر برای درمان عفونت‌های مقاوم به دارو نیاز داریم [۲۰]. نانوذرات فلزی از میان تمامی اهدافی که بیشتر عنوان شده، دارای خواص آنتی‌باکتریایی امیدوارکننده‌ای به دلیل سطح زیاد نسبت به حجم‌شان هستند. افزایش مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها و توسعه گونه‌های مقاوم موجب علاقه قابل توجه پژوهشگران به اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی شده است [۲۱، ۲۲]. از آنجا که نانوذرات، پایه و اساس نانو تکنولوژی می‌باشد، لذا استفاده از آنها در پزشکی، چشم‌انداز جدیدی را در مبارزه بر علیه باکتری‌های پاتوژن باز نموده است



دانشگاه سیستان و بلوچستان مطابق با اصول علمی به قسمت هرباریوم (۵۱۷۲) دانشگاه منتقل، خشک و آماده شد.

در فرایند استخراج عصاره اندام هوایی (کاسبرگ) گیاه جای ترش مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور دقیقاً مقدار ۵ گرم از پودر گیاه توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم Kern را توزین کرده و به درون ارلن مایری که حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه می‌باشد منتقل کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد توسط همزن برقی مدل IKA KS 130 basic بهم زده می‌شود. پس از خنک شدن، عصاره توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. جهت حذف ناخالصی‌های احتمالی باقی‌مانده، عصاره توسط دستگاه سانتریفیوژ Sigma مدل 3-30k به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره به دست آمده جهت استفاده‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده می‌شود [۳۰].

سنتز نانوذرات طلا

از عصاره گیاه هم به عنوان عامل کاهنده و هم پایدارکننده استفاده می‌شود. جهت سنتز نانوذرات طلا، در تمامی مراحل آزمایش از نمک طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ساخت شرکت سیگما-آلدریج و آب دیونیزه استفاده شده است. بدین منظور مقدار ۴ میلی‌لیتر از محلول طلای یک میلی مولار به ۲ میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده در دمای اتاق اضافه و pH محلول توسط دستگاه pH متر (Metrohm 827 pH lab) ساخت آلمان مقدار ۲/۴۳ قرائت شد. عمل کاهش نمک طلا به سرعت با تغییر رنگ محلول از صورتی به ارغوانی مشاهده شد و پایدار باقی ماند که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد. به جهت اطمینان از سنتز نانوذرات طلا، ۱ میلی‌لیتر از محلول موردنظر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش مدل UNICO UV-2100 طیف‌گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۱].

بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در سنتز نانوذرات طلا

هدف از بهینه‌سازی پارامترهای مختلف، به دست آوردن

[۲۴، ۲۳]. جهت این امر، ابتدا باید فعالیت ضد میکروبی نانوذرات را سنجیده، سپس در صورت امکان برای مصارف دارویی از آن استفاده کرد. انواعی از نانوذرات مانند نانوسیلور، نانوتیتانیوم و نانوذرات روی دارای فعالیت آنتی‌باکتریال هستند [۲۵، ۲۴].

پژوهش‌های متعددی سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاهان را گزارش کرده‌اند. تشکیل نانوذرات طلا در گیاه یونجه اولین بار توسط گرادا (Gardea) و همکارانش گزارش شد که به شکل‌های مکعبی، بیست وجهی و دوقلو در اندازه‌های ۴ و ۶-۱۰ نانومتر بوده‌اند [۱۰]. شانکار (Shankar) و همکارانش احیای یون‌های طلا توسط برگ گل شمعدانی و عصاره لیمو را گزارش کردند [۲۷، ۲۶]. برگ گیاه *Chenopodium album* یون‌های طلا را در ابعاد نانومتریکی با اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر با شکل کروی کاهش داده است [۲۸]. گریس (Grace) و همکاران در مطالعه خود، نانوذرات طلا را سنتز نموده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن را مورد بررسی و سپس تأثیر ضد میکروبی نانوذرات را به روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا، میکوکوکوس لوتوس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلای مطالعه نمودند. میانگین اندازه نانوذرات طلا در این مطالعه ۱۵-۱۲ نانومتر و نیز غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بود، همچنین عنوان کردند در این غلظت، نانوذرات طلا هیچ تأثیر ضد میکروبی نداشته است [۲۴]. در مطالعه حاضر علاوه بر ویژگی‌یابی و بررسی پارامترهای مؤثر بر بیوسنتز نانوذرات طلا از عصاره آبی کاسبرگ جای ترش، تأثیر نانوذرات طلای سنتز شده بر روی چند گونه باکتری بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده سازی و تهیه عصاره گیاه

گیاه جای ترش با نام علمی *Hibiscus sabdariffa* L. از خانواده مالواسه آ گیاهی استوایی با پتانسیل‌های اقتصادی قابل توجه است که در بیشتر نقاط دنیا به نام روسل شناخته می‌شود [۲۹]. اندام هوایی این گیاه جمع‌آوری شده از باغ بوتانیک



انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) و چهار باکتری گرم منفی اشرشیاکلا (*E. coli* ATCC 25922)، هافنیا آلوای (*Hafnia alvei* PTCC 1289)، سالمونلا انتریکا (*Salmonella enterica subsp.* Enterica ATCC 13076) و شوانلا (*Shewanella sp.* PTCC 1711) تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا هر یک از باکتری‌ها در محیط کشت مایع کشت داده شد (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، شیکر با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت) پس از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری سوسپانسیون معادل غلظت نیم مک فارلند آماده شد و از هر سوسپانسیون باکتریایی حجم ۰/۱ میلی‌لیتر (10^8 cfu/ml) آگار تلقیح کرده و به صورت انبوه با سواب کشت داده شد. در ادامه دیسک‌های کاغذی (۶ میلی‌متری) آغشته شده به محلول نانوذره طلا روی کشت باکتری مربوطه گذاشته شد و در نهایت پلیت‌ها را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر دیسک را بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد. به منظور مقایسه چگونگی اثر آنتی-باکتریایی نانوذرات طلا علیه باکتری‌های مورد آزمایش، حساسیت این باکتری‌ها به دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های کوآموکسی کلاو مورد بررسی قرار گرفت [۳۲].

نتایج

مطالعه طیف جذبی فرابنفش- مرئی سنتز نانوذرات طلا

سنتز نانوذرات طلا با کاهش یون طلا از Au^{3+} به Au^0 با چشم غیرمسلح به روشنی با تغییر رنگ نمونه از صورتی به ارغوانی قابل تشخیص می‌باشد. ماکزیمم جذب پیک حاصل با اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی در طول موج ۵۸۰ نانومتر (شکل شماره ۱) نشان‌دهنده باند جذب شدید پلاسمون سطحی برای نانوذرات طلا می‌باشد. البته می‌توان آنرا با تغییر عوامل مؤثر بر پیک پلاسمون جابه‌جا کرد. یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانوذرات فلزی خواص نوری آنها بوده، که متناسب با شکل و اندازه نانوذرات تغییر می‌کند. در نانوذرات فلزی

نانوذراتی با سایز و اندازه کوچکتر و شکل یکنواخت‌تر می‌باشد. به عبارتی به دنبال شرایطی هستیم تا بتوان با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- فرابنفش بهینه‌سازی پارامترهای مختلف را انجام داده و با طیف‌گیری توسط این دستگاه، به راحتی سنتز و یا عدم سنتز نانوذرات را تشخیص دهیم. بدین‌منظور چهار پارامتر حجم عصاره، pH محلول، غلظت نمک طلا و زمان انجام واکنش جهت بهینه‌سازی مورد بررسی قرار گرفتند. بهینه‌سازی جهت سنتز نانوذرات طلا با استفاده از حجم‌های متفاوتی از عصاره (۱، ۲، ۳، ۴) میلی‌لیتر و حجم ثابت ۴ میلی‌لیتر از نمک طلا ۱ میلی‌مولار در pH ثابت به عنوان عامل احیاکننده صورت گرفت. پس از مشخص شدن حجم بهینه عصاره برای بررسی تأثیرات pH بر روی سایز و سرعت سنتز نانوذرات طلا، pH محلول‌های واکنش با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید و هیدروکلریدریک اسید (ساخت شرکت مرک آلمان) ۰/۱ مولار بر روی (۴، ۵، ۶، ۷، ۸) تنظیم و pH مناسب مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی غلظت نمک طلا بر روی روند واکنش، آزمایش‌ها با غلظت‌های متفاوت محلول نمک طلا (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵) میلی‌مولار تکرار شد، سپس تأثیر زمان بر روی روند سنتز نانوذرات مورد بررسی قرار گرفته و طیف جذبی هر مرحله در محدوده ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد.

بررسی مورفولوژی نانوذرات طلا

جهت ویژگی‌یابی و بررسی مورفولوژی نانوذرات طلای سنتز شده، یک یا چند نمونه را بر طبق شرایط بهینه ساخته و نانوذرات را از محلول استخراج کرده و توسط دستگاه میکروسکوپ الکترون عبوری مدل Zeiss - EM10C - 80KV ساخت آلمان و دستگاه پراش پرتو ایکس فیلیپس مدل (X'Pert) ساخت آلمان مورد بررسی ساختاری قرار می‌دهیم.

بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات طلا

فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلای سنتز شده با روش دیسک دیفیوژن بر روی دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) و



شدیدتری می‌باشد، در نهایت حجم ۲ میلی‌لیتر از عصاره به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

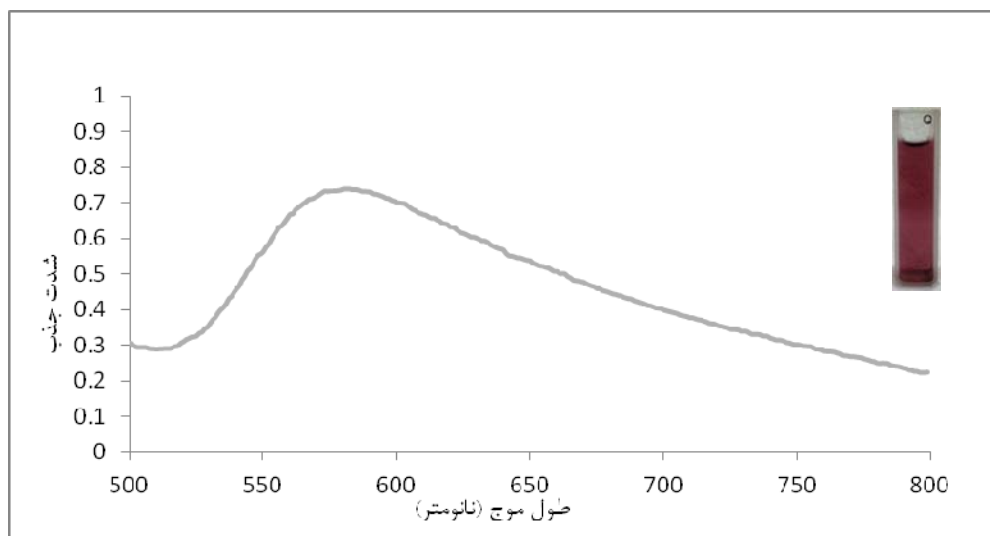
بررسی تأثیر pH بر روی واکنش

طیف جذبی فرابنفش- مرئی نانوذرات طلائی سنتز شده در pH های مختلف ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در (شکل شماره ۳) نشان داده شده است. با افزایش pH باند جذب تشدید پلاسمون سطحی با شیب ملایمی افزایش و در pH برابر ۸ در نهایت جذب کاهش می‌یابد. می‌توان گفت در pH های پایین‌تر به دلیل اندازه نسبتاً بزرگ نانوذرات طیف جذبی پهن‌تری نسبت به pH های بالاتر مشاهده می‌شود [۳۴]. با بررسی طیف فرابنفش- مرئی مشاهده شد که نانوذرات طلائی سنتز شده در محدوده وسیعی از pH پایدار هستند. جابه‌جایی در طول موج بیشینه از ۵۸۰ نانومتر به ۵۷۰ نانومتر در pH برابر با ۷ نشان‌دهنده تغییر در اندازه یا شکل نانوذرات می‌باشد که در نهایت به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

تشدید پلاسمون سطحی مسئول خواص منحصر به فرد آنهاست که تحت تأثیر فاکتورهایی از قبیل اندازه نانوذرات، شکل نانو ذرات، فاصله آنها از همدیگر و ضریب شکست محیط پیرامون تغییر می‌کند [۳۳]. در عمل تغییر شدت پیک پلاسمون از طریق تغییر نسبت واکنش‌گرها و تغییر شرایط واکنش انجام می‌پذیرد.

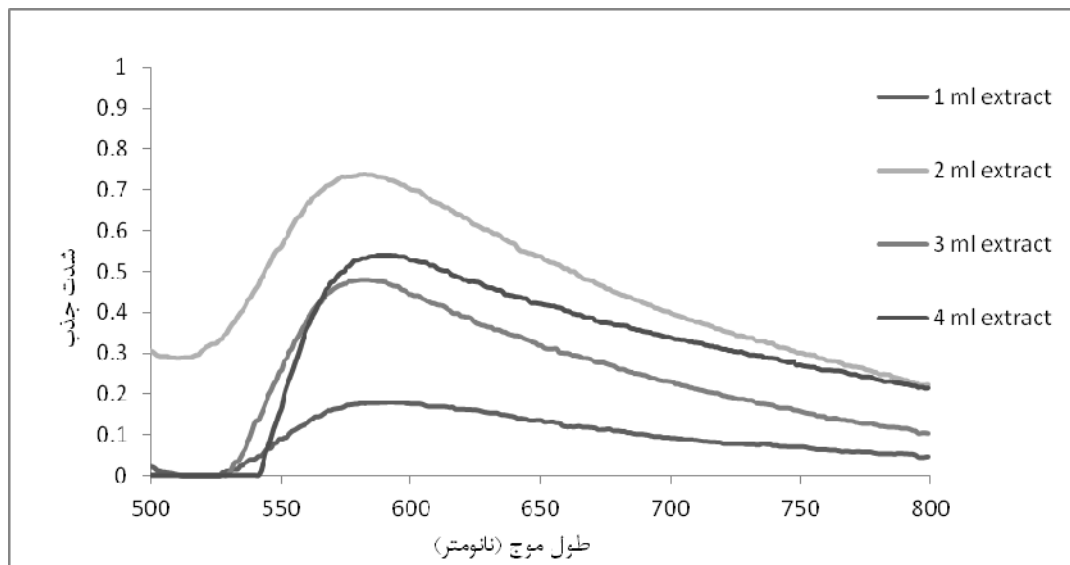
اثر حجم عصاره بر روی واکنش

عصاره گیاه به عنوان یک عامل احیاءکننده جهت احیاء یون‌های Au^{3+} به Au^0 استفاده می‌شود. به طوری که غلظت عصاره نقش مهمی در فرایند احیاء شدن ایفا می‌کند. هر چه غلظت عصاره بیشتر باشد، احیا شدن یون‌های Au^{3+} سریع‌تر انجام می‌شود که نتیجه آن تشکیل سریع نانوذرات طلا خواهد بود [۲۸]. طیف جذبی گرفته شده از نانوذرات طلا در حجم‌های متفاوتی از عصاره آبی کاسبرگ جای ترش (شکل شماره ۲) نشان می‌دهد که در ناحیه ۵۸۰ نانومتر حجم ۲ میلی‌لیتر از عصاره دارای بیشترین میزان جذب و پیک

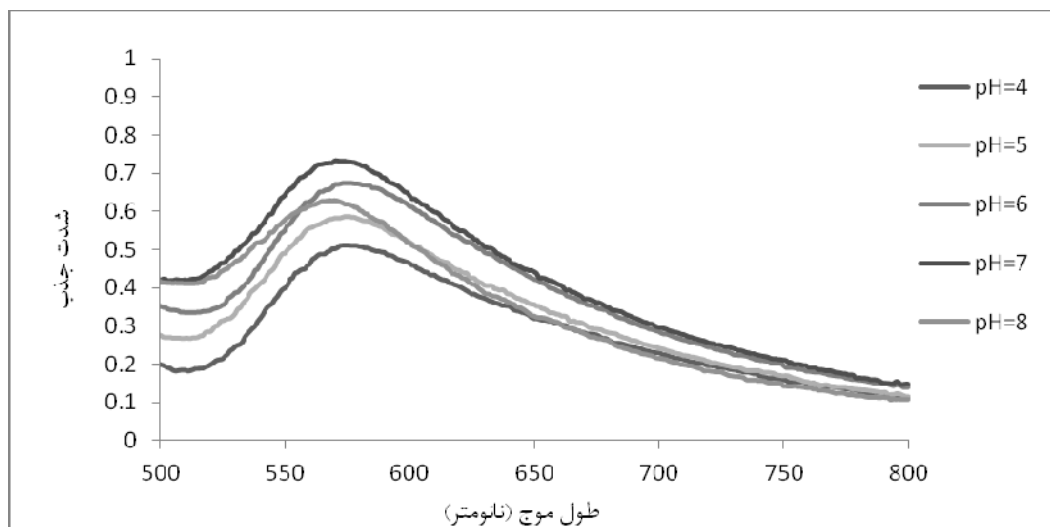


شکل شماره ۱- طیف جذبی نانوذرات طلائی سنتز شده با استفاده از عصاره آبی کاسبرگ جای ترش پیش از اعمال شرایط بهینه





شکل شماره ۲- طیف جذبی نانوذرات طلا در مقادیر متفاوتی از حجم عصاره آبی کاسبرگ چای ترش (ml extract نشان‌دهنده مقدار حجم برداشته شده از عصاره آبی گیاه جهت سنتز نانوذرات طلا می‌باشد).



شکل شماره ۳- تأثیر pH های مختلف بر طیف جذبی نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از عصاره آبی کاسبرگ گیاه چای ترش

پلاسمون سطحی بسیار پهنی که نشان‌دهنده تشکیل نانوذراتی با اندازه درشت و غیریکنواخت و همچنین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار نیز طیف‌های جذبی ضعیفی که نشان‌دهنده سنتز کم و یا عدم سنتز نانوذرات است مشاهده می‌شود. در میان غلظت‌های متفاوت یون‌های فلزی، غلظت یک میلی‌مولار

بررسی اثر غلظت نمک طلا بر روند انجام واکنش غلظت یون‌های فلزی طلا نیز بر روند تشکیل نانوذرات تأثیر خواهند گذاشت. بدین‌صورت که با بررسی طیف جذبی فرابنفش- مرئی (شکل شماره ۴) با افزایش غلظت یون‌های فلزی از ۱ میلی‌مولار به ۵ میلی‌مولار باند جذبی تشدید

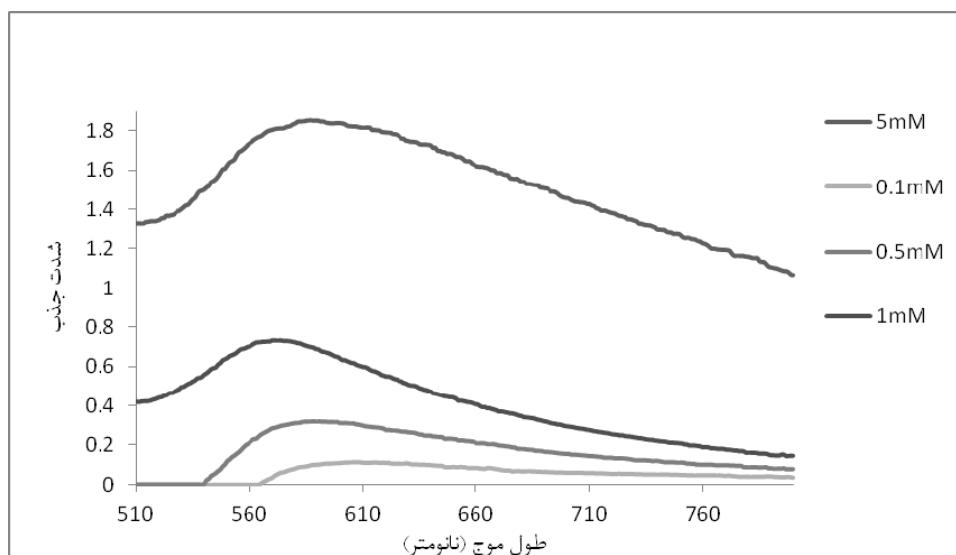


واکنش تا ۴۰ دقیقه پس از انجام واکنش در طول موج ثابت (۵۷۰ نانومتر) افزایش و پس از آن ثابت باقی می‌ماند. در نتیجه ایده‌آل‌ترین زمان برای سنتز نانوذرات طلا در فاصله زمانی ۴۰ دقیقه می‌باشد در این حالت پیک‌ها تیزتر و رنگ محلول بنفش پرنگ‌تر حاصل می‌شود. در نهایت زمان ۴۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه جهت سنتز نانوذرات طلا انتخاب شد.

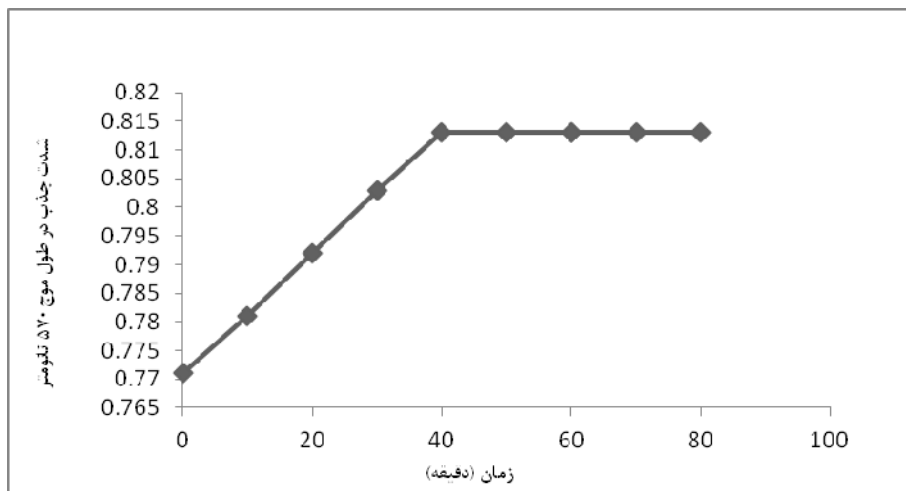
از نمک طلا دارای بیشترین جذب بیشینه است که در نهایت ۴ میلی‌لیتر از نمک طلا ۱ میلی‌مولار به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

تأثیر زمان بر روند انجام واکنش

بررسی تأثیر زمان بر روند واکنش (شکل شماره ۵) نشان داد که جذب ناشی از رزونانس پلاسمون سطحی از زمان اولیه



شکل شماره ۴- طیف جذبی نانوذرات طلا تشکیل شده در اثر غلظت‌های مختلف نمک طلا (mM نشان‌دهنده غلظت محلول نمک طلا می‌باشد)



شکل شماره ۵- نمودار میزان جذب نانوذرات طلا سنتز شده در زمان‌های مختلف



تشکیل شده‌اند. اندازه متوسط نانوذرات را می‌توان به کمک رابطه دبی- شرر (فرمول شماره ۱) محاسبه کرد.

فرمول ۱:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos\theta$$

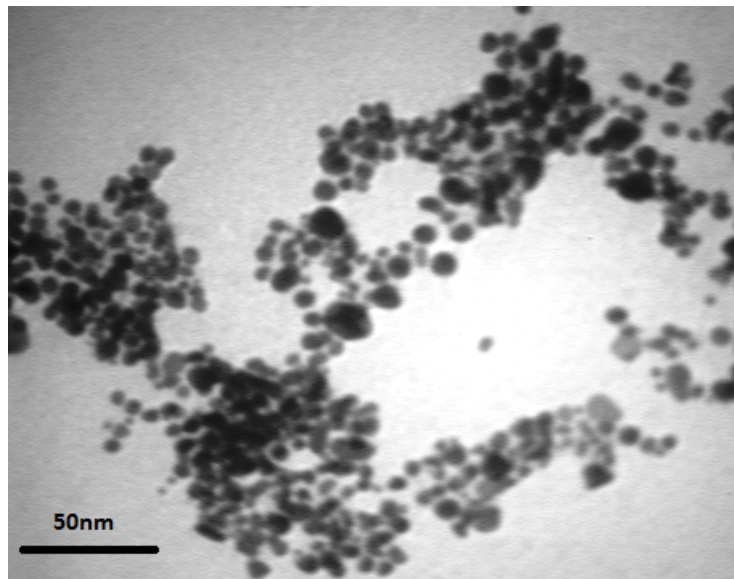
که β ، پهنای پیک‌ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ طول موج اشعه X برابر با $1/54$ نانومتر، θ زاویه بین پرتو بازتابش و تابش و D اندازه دانه‌های بلوری می‌باشد. میانگین اندازه دانه‌های بلوری نانوذرات طلا سنتز شده $4/9$ تا $9/87$ نانومتر برآورد شدند. که این نتایج با داده‌های حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری و نتایج به دست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی مطابقت دارد.

بررسی اثر آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلای سنتز شده بر روی ۴ باکتری گرم منفی و ۲ باکتری گرم مثبت در (جدول شماره ۱) نشان داده شده است. به منظور اطمینان از اثر آنتی‌باکتریایی نانوذرات سنتز شده در این پژوهش، مقایسه با تأثیر آنتی‌بیوتیک استاندارد به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

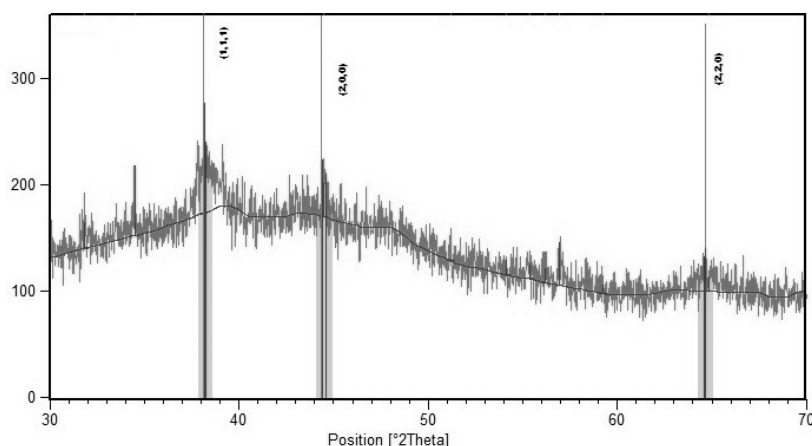
بررسی مورفولوژی نانوذرات طلا سنتز شده با میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) و پراش اشعه ایکس (XRD)

پس از به دست آوردن شرایط بهینه به کمک اسپکتروسکوپی فرابنفش - مرئی، به منظور مقایسه اندازه، مورفولوژی و یکنواختی توزیع نانوذرات طلا تولید شده تصویر TEM از آنها تهیه شد. نتایج حاصل از عکس‌های میکروسکوپ الکترونی (شکل شماره ۶) نشان داد اندازه متوسط نانوذرات بین ۵-۱۰ نانومتر بوده و شکل ذرات تقریباً کروی است. روش دیگری که برای ویژگی‌یابی نانوذرات طلا مورد استفاده قرارگرفت الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) می‌باشد. از این روش می‌توان برای تعیین ساختار کریستالی نانوذرات هم استفاده کرد. الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات طلا (شکل شماره ۷) در نواحی $38/25$ ، $44/60$ ، $64/68$ نانوذرات پیک‌های شارپ و تیزی را نشان می‌دهند که دلیلی بر سنتز نانو ذرات طلا می‌باشد. آنالیز ساختاری نشان می‌دهد که نانوذرات داری ساختار بلوری با شاخص‌های میلر (۱ ۱ ۱)، (۲ ۰ ۰)، (۲ ۲ ۰) در شبکه مکعبی می‌باشند. از مقایسه شدت پیک‌ها در می‌یابیم که پیک (۱ ۱ ۱) از سایر پیک‌ها شدیدتر است در نتیجه صفحات بلوری نانوذرات بیشتر در این جهت



شکل شماره ۶- تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از واکنش ۴ میلی‌لیتر از محلول ۱ میلی‌مولار طلا (III) با ۲ میلی‌لیتر از عصازده آبی کاسیرگ جای ترش در pH برابر با ۷ و دمای اتاق در زمان ۴۰ دقیقه





شکل شماره ۷- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره آبی کاسبرگ چای ترش

جدول شماره ۱- نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات طلا سنتز شده از عصاره آبی کاسبرگ چای ترش در مقایسه با آنتی بیوتیک کوآموکسی کلاو

قطر هاله عدم رشد برحسب میلی متر		میکروارگانسیمها (باکتریها)	ردیف
آنتی بیوتیک کوآموکسی کلاو	نانوذرات طلا		
۳۵	۱۴	هافنیاآلوی	۱
۲۸	۱۳	اشرشیاکلائی	۲
۳۰	۱۱	سالمونلا انتریکا	۳
۲۹	۱۰	شوانلا	۴
۲۵	۷	استافیلوکوکوس اورئوس	۵
۲۵	۷	انتروکوکوس فکالیس	۶

موارد متعددی از جمله انتقال دارو در بدن کاربرد داشته باشد به دلیل ارزان و سهل الوصول بودن روش‌های زیستی مخصوصاً گیاهی نسبت به سایر روش‌ها از منظر اقتصادی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد و به دلیل نداشتن مشکلات گوناگون سایر روش‌ها، مورد توجه جدی قرار گیرد [۳۶].

عصاره گیاهان غنی از پلی فنول‌هایی چون فلاونوئیدهاست که ترکیباتی قدرتمند جهت کاهش و تولید نانوذراتی از قبیل AuNPs هستند. بنابراین در بسیاری از پژوهش‌ها، و همچنین در این پژوهش از عصاره آبی اندام گیاه جهت سنتز نانوذرات استفاده شده است [۳۷، ۳۸]. نتایج حاصل از پژوهش اوسلا و همچنین یاردینجیا و همکاران نشان داد که کاسبرگ خشک گیاه چای ترش حاوی فلاونوئید، آنتوسیانین و مقدار بالایی

با توجه به نتایج، فعالیت آنتی باکتریایی نانوذرات طلای سنتز شده بر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده قرار گرفته در این مطالعه می‌باشد، به طوری که بیشترین قطر عدم رشد مربوط به باکتری هافنیا آلوی (۱۴ میلی متر) می‌باشد.

بحث

به طور کلی مزیت تولید گیاهی نانوذرات بر سایر روش‌های زیستی، بی خطر بودن و همچنین قابلیت‌های بالای گیاهان دارویی است که بسیار قابل اعتماد و سالم تر از باکتری، قارچ و مخمر برای تولید نانوذرات است [۳۵]. همچنین نانوذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی با ریسک کمتری می‌تواند در



مورد بحث می‌باشد [۳۳]. همچنین بلابر و همکارانش طیف جذبی نانوذرات کروی ساخته شده از Au, Ag, Al, K, Na را به صورت تئوریک مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که ماکزیمم جذب برای هر فلز تابعی از اندازه کره می‌باشد [۴۲].

یکی از پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات طلا مقدار حجم عصاره گیاهی می‌باشد، گزارش‌ها حاکی از آن است که با افزایش میزان عصاره، مقدار ترکیبات کاهنده و پایدارکننده نظیر ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و تروپونئیدی در محلول افزایش یافته و میزان یون بیشتری را در معرض کاهش قرار می‌دهند و جذب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا افزایش می‌یابد [۲۸]. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش با افزایش میزان عصاره ابتدا میزان شدت جذب بیشینه مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا افزایش و سپس کاهش می‌یابد و همچنین جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلندتر صورت می‌گیرد. این رخداد ممکن است به دلیل جذب یون‌های فلزی توسط مولکول‌های زیستی حاضر در عصاره، منجر به کاهش تعداد یون‌های در دسترس جهت واکنش احیاء شود. بنابراین سرعت تشکیل نانوذرات طلا را پایین می‌آورد [۳۹]. تحقیقات نشان می‌دهد که در سنتز نانوذرات، در غلظت‌های کمتر از میزان بهینه پایدارکننده، سبب می‌شود عمل پایدارسازی نانوذرات به طور کامل انجام نگرفته و ذرات درشت‌تری به دست آید. افزون بر آن، افزودن غلظت‌های بیشتر از میزان بهینه، سبب تجمع ذرات پایدارکننده به دور خود شده که در نتیجه آن نیز پایدارسازی به طور کامل انجام نشده و ذرات درشت‌تری حاصل می‌شود و افت در شدت پیک نشان‌دهنده افزایش اندازه ذرات و افزایش پهنای آن نشان‌دهنده افزایش توزیع اندازه ذرات است [۴۳].

گزارش‌های پیشین حاکی از این است که pH به روی شکل نانوذرات تأثیر چشمگیری ندارد و تنها اندازه آنها را به میزان زیاد تحت تأثیر قرار می‌دهد و یکی از فاکتورهای بسیار مهم در سنتز نانوذرات می‌باشد [۴۴]. نتایج حاصل از تأثیرات pH بر روی سنتز نانوذرات طلا به کمک عصاره آبی کاسبرگ جای ترش نشان داد که این نانوذرات در محدوده وسیعی از pH پایدار هستند. با افزایش میزان pH شدت جذب پلاسمون

اسید مانند اگزالیک اسید، سوکسینیک اسید و اسیدهای آلی است. به علاوه مقدار اسید آسکوربیک جای ترش در مقایسه با خانواده مرکبات بیشتر می‌باشد. [۱۷، ۱۸].

ترکیبات پلی فنولی علاوه بر خاصیت کاهندگی، توانایی پایدار کردن نانوذرات فلزی را نیز دارند. در واقع با افزودن ترکیب‌های پلی فنولی (همانند عصاره آبی کاسبرگ گیاه چای- ترش) به محلول (HAuCl₄), Au³⁺ توسط ترکیب‌های پلی فنولی به طلای فلزی کاهش می‌یابد و همین ترکیب‌های پلی فنولی مانع از تجمع و کوخه شدن ذرات طلا می‌شوند و نانوذرات طلا تشکیل می‌شوند [۱۹]. تغییر رنگ مشاهده شده از صورتی کم‌رنگ به ارغوانی در اثر برهم کنش عصاره گیاهی و محلول نمک طلا با نتایج حاصل از پژوهش کریمی و همکاران [۳۵]، داس و همکاران [۱۵] و شانکار و همکاران [۲۷] کاملاً مشابه بود. تغییر رنگ محلول واکنش اولین نشانه از تولید نانوذرات طلا محسوب می‌شود.

طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی یک روش مهم جهت تعیین شکل‌گیری و پایداری نانوذرات فلزی در محلول آبی می‌باشد. رنگ محلول کلونئیدی طلا منسوب به رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، ناشی از نوسانات جمعی الکترون‌های آزاد القا بوسیله تعامل با میدان الکترومغناطیسی است که برای هر نوع ذرات در هر اندازه، مختص خود آن نانوذرات و به دلیل پدیده پلاسمونیک قابلیت جذب نور در ناحیه طیف جذبی فرابنفش - مرئی می‌باشند [۳۹]. نتایج مشابه در پژوهش‌های نارایانان (Narayanan) و همکاران در حدود ناحیه ۵۳۶ نانومتر [۴۰] و فلیپ و همکاران در ناحیه ۵۷۳ نانومتر گزارش [۴۱] شد. طیف جذبی اولیه حاصل از اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی عصاره آبی کاسبرگ جای ترش حاوی نانوذرات طلا پیک جذبی قوی و پهنی را در ۵۸۰ نانومتر نشان داد.

جذب نور توسط نانوذرات فلزی از قانون بیر پیروی می‌کند، یعنی با تغییر غلظت نانوذرات فلزی جذب نور به صورت خطی تغییر پیدا می‌کند. از عوامل مؤثر بر پیک پلاسمون، شکل و اندازه نانوذرات است. با افزایش اندازه نانوذرات، اثراتی چون جابه‌جایی قرمز و پهن شدن پیک رزونانس دیده می‌شود. تغییر شکل نانوذرات باعث تغییر شکل هندسی سطح آنها و موقعیت پیک حاصل شده وابسته به تعداد و لبه‌های شکل نانوذره



ذرات، احیای یون‌های نمک آنها و در واقع خنثی شدن بار الکتریکی است [۵۰]. در این مطالعه فرایند سنتز نانوذرات در طی مدت ۴۰ دقیقه و در دمای اتاق انجام گرفت که نشان‌دهنده سرعت بالای این روش و بی‌نیازی آن به دماهای بالا جهت تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد. نتایج حاصل با پژوهش گوداک و همکاران [۴۹] مطابقت دارد. نتایج پراش اشعه ایکس به دست آمده در این تحقیقات کاملاً مشابه نتایج منتشرشده قبلی است [۴۵، ۴۶].

عکس‌برداری الکترونی عبوری، سنتز نانوذرات طلای کروی شکل را در اندازه‌ای با دامنه بین ۵ تا ۱۰ نانومتر نشان می‌دهد، ناراینیان و همکاران سنتز نانوذرات را در محدوده اندازه بین تقریباً ۶-۶۰ نانومتر گزارش کردند [۳۰]. شی (Shi) و همکاران نیز با استفاده از گیاه *Pycnoporus sanguineus* نانوذرات طلا را با اندازه‌ای در محدوده ۳۰-۶۰ نانومتری سنتز کردند [۵۱].

فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات به طور عمده بستگی به سایز نانوذرات و مساحت سطح شان دارد [۵۲]. به این دلیل که نانوذرات کوچکتر نسبت سطح به حجم بیشتری داشته، افزایش سطح تماس شان با میکروارگانیسم موجب بالارفتن فعالیت‌های بیولوژیکی و شیمیایی شان می‌شود [۵۳]. مطالعات ابراز داشته‌اند که تفاوت بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به ساختار دیواره سلولی آنها مربوط می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره سلولی نازکتری هستند که استحکام کمی دارد و از طرف دیگر سطح بیرونی باکتری‌های گرم منفی لایه‌ای از لیپولی ساکارید وجود دارد که دارای بار منفی است. بنابراین وجود بار مثبت بر روی یون‌های طلا برای داشتن فعالیت ضد میکروبی به دلیل بر هم کنش الکترواستاتیک میان بار منفی دیواره سلولی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذره ضروری می‌باشد [۵۴]. شواهد قابل دسترس و حاصل از تحقیق ژاروو (Zharov) و همکاران مکانیسم تأثیر ضدباکتریایی واکنش‌های فوتوکاتالیک نانوذرات طلا را نشان می‌دهد. در طی مطالعه این محقق مشخص شده است که آسیب اکسیداتیو اولیه روی دیواره سلولی رخ می‌دهد که در آن سطح فوتوکاتالیستی نانوذرات طلا تماس اولیه با سلول سالم را فراهم می‌آورد. پس از، از بین رفتن حفاظت دیواره سلولی

سطحی (SPR) ابتدا با شیب ملایمی افزایش یافته سپس در pH برابر با ۸ کاهش می‌یابد. شدت جذب بیشتر و همچنین جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (طول موج‌های آبی) به وضوح در طیف جذبی از ۵۸۰ به ۵۷۰ نانومتر در pH برابر با ۷ رخ می‌دهد که نشان‌دهنده کاهش اندازه نانوذرات می‌باشد. نتایج مشابه در پژوهش‌های واگمر (Waghmare) و همکاران گزارش شد [۴۵]. به نظر می‌رسد که در pH های بالاتر با هیدرولیز گسترده یون (III) Au روبه‌رو هستیم به طوری که باعث به وجود آمدن گونه‌های پایدار هیدروکسیدهای یون طلا شد و در نهایت موجب جلوگیری از ورود یون به واکنش احیاء زیستی شود [۴۶]. پیش از این پهن شدن طیف‌ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات گزارش شده است [۴۷].

بر اساس نتایج به دست آمده در غلظت‌های پایین نمک فلزی طلا (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) کاهش میزان جذب پلاسمون سطحی مشاهده می‌شود که می‌تواند به دلیل عدم تشکیل مناسب نانوذرات طلا باشد و همچنین در غلظت‌های بالای نمک فلزی (۵ میلی‌مولار) افزایش شدت جذب پلاسمون سطحی و همچنین جابه‌جایی به سمت طول موج‌های قرمز را شاهد هستیم که نشان‌دهنده سنتز نانوذراتی درشت، شکل غیریکنواخت و تجمع یافته باشد پیش از این نتایج مشابه در پژوهش‌های زیستی گزارش شده است [۴۹، ۴۸، ۳۷]. با افزایش غلظت یون فلزی، سایز نانوذرات افزایش یافته و جذب بیشتری مشاهده می‌شود چرا که یون‌های بیشتری در معرض کاهش قرار خواهند گرفت [۲۸]. همچنین در پی این افزایش جذب، اندازه نانوذرات سنتز شده کمی زیاد شده که این افزایش در اندازه، به دلیل اتصال نانوذرات به یکدیگر می‌باشد [۳۴]. در غلظت‌های پایین یون فلزی، سرعت تشکیل نانوذرات طلا آهسته می‌باشد بنابراین جذب ضعیفی نیز مشاهده می‌شود [۲۸].

یکی از عوامل اثبات میزان پایداری نانوذرات فاکتور زمان می‌باشد. مشاهدات نشان می‌دهد، نانوذراتی که پایدار هستند در گذر زمان تغییر چشمگیری در میزان جذب آنها رخ نمی‌دهد. در برخی نیز با گذشت زمان، میزان جذب به دلیل چسبندگی و تجمع نانوذرات سنتز شده کاهش می‌یابد. اساس سنتز نانو-



نانوذرات طلا باشد و همان‌طور که در مطالعه آروگوئه و همکاران اشاره شد خواص هر کدام از نانوذرات متأثر از ویژگی‌های درونی آن از جمله قطر نانوذرات می‌باشد [۵۸]. همچنین نانوذرات طلای سنتز شده توسط متوکومار (Muthukumar) و همکاران با سایز ۳ تا ۹ نانومتر دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی بیشتر بر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد [۵۳]. در مطالعاتی که لی و همکاران بر روی اثر ضد میکروبی نانوذرات طلا بر روی باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلاهی و گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اروئوس انجام شد، مشاهده شد که نانوذرات طلا بیشترین اثر را بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اروئوس داشته است [۵۹].

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه دارویی چای ترش قابلیت سنتز نانوذرات طلا را داشته و قابل ذکر است که تاکنون استفاده از این گیاه به منظور کاهش زیستی یون‌های طلا گزارش نشده است. نتایج حاصل کارکرد خوب این گیاه در دما و فشار استاندارد (اتاق) را نشان می‌دهد. و به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات طلا می‌توان از آنها جهت از بین بردن عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد. بنابراین می‌توان گفت گیاه چای ترش غیر از نقش دارویی ویژه‌ای که دارد می‌تواند جهت تولید نانوذرات طلا برای مصارف پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین تحقیقات بیشتر جهت شناسایی کاربرد این نانوذرات پیشنهاد می‌شود.

آسیب اکسیداتیو در غشای سیتوپلاسمی صورت می‌گیرد. از طرف دیگر فعالیت فوتوکاتالیستی به تدریج نفوذپذیری سلول را افزایش می‌دهد و محتویات درونی سلول آزاد شده و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. همچنین ممکن است نانوذرات طلای آزاد، دسترسی به غشای سلول‌های آسیب‌دیده را به دست آورد و حمله مستقیم بعدی بر روی اجزای داخل سلولی می‌تواند مرگ سلول‌ها را تسریع کند [۵۵].

اکثر تحقیقات نشان داده‌اند که نانوذرات با اندازه‌ی کوچکتر از ۱۰ نانومتر سمیت بیشتری داشته و دارای خواص ضدباکتریایی قوی‌تری می‌باشد. مزیت کاربرد نانوذرات طلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم مقاومت باکتری‌ها به این نانوذرات، طیف اثر وسیع و عدم اثرگذاری سوء بر سلول‌های انسانی است [۵۶]. نکته مهم این است که در این چند دهه اخیر از نانوذرات طلا به عنوان یک آنتی‌باکتریال قوی استفاده می‌کنند به طوری که می‌توان گفت نانوذرات به ویژه نانوذرات طلا در حذف باکتری‌های مقاوم به دارو نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۵۷]. نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از عصاره آبی کاسبرگ چای ترش به روش دیسک دیفیوژن بروی ۶ گونه باکتری مؤثر بوده با این تفاوت که فعالیت بیشتری روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان می‌دهند. همچنین بیشترین قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری هافنیا آلوی با قطر (۱۴ میلی‌متر) مشاهده شد.

مطالعات آرگوت (Aruguete) و همکاران نشان از تأیید خواص ضدباکتریایی نانوذرات طلا داشته بخصوص در مطالعه‌ای که بر روی فیبرهای کتانی متأثر از نانوذرات طلا انجام شد. اختلافات مشاهده شده با این تحقیق بر روی مهار رشد باکتریایی می‌تواند مربوط به تفاوت در شکل و قطر

منابع

1. Watanabe K, Menzel D, Nilus N and Freund H-J. Photochemistry on Metal Nanoparticles. *Chem. Rev.* 2006; 106: 4301- 4320.

2. Thompson DT. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nanotoday* 2007; 2 (4): 40-43.



3. Sekhon BS. Nanotechnology in agri-food production: An overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2014; 7: 31 - 53.
4. Bhattarai SR, Bahadur R, Aryal S, Bhattarai N, Young Kim S, Keun Yi H, and et al. Hydrophobically modified chitosan/ gold nanoparticles for DNA delivery. *J. Nanopart Res.* 2008; 10: 151-162.
5. Li J, Wang X, Wang Ch, Chen B, Dai Y, Zhang R and et al. The enhancement effect of gold nanoparticles in drug delivery and as biomarkers of drug- resistant cancer cells. *Chem Med Chem* 2007; 2: 374 - 378.
6. Huff TB, Tong L, Zhao Y, Hansen MN, Cheng JX and Wei A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine* 2007; 2 (1): 125-132.
7. Choi JW, Kang DY, Jang YH and et al. Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle-antibody complex: Colloids and Surfaces A. *Physicochem. Eng.* 2008; 313: 655 - 659.
8. Dungchaia W, Siangprohb W, Chaicumpac W, Tongtawed P and Chailapakula O. Salmonella typhi determination using voltammetric amplification of nanoparticles: A highly sensitive strategy for metalloimmunoassay based on a copper-enhanced gold label. *Talanta* 2008; 77: 727-732.
9. Mohanpuria P, Rana NK and Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Nanopart. Res.* 2008; 10: 507-517.
10. Gardea-Torresdey JL, Parsons JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE and Santiago P. Formation and growth of au nanoparticles inside live Alfalfa plants. *Nano Lett.* 2002; 2 (4): 397-401.
11. Soltani Nejad M, Khatami M and Shahidi Bonjar GH. Streptomyces somaliensis mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Nanomedicine J.* 2015; 2 (3): 217-222.
12. Khatami M, Soltani Nejad M and Pourseyedi S. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using mustard and its characterization. *Int. J. Nanosci. Nanotech.* 2015; 11 (4): 281-288.
13. Khatami M, Soltani Nejad M, Khatami M and Keikvousi K. Antimicrobial effect of silver nanoparticles synthesized using weed seed exudates against of Bacillus cereus and Acinetobacter baumannii. *J. Microbi. World* 2015; 8 (122): 18-25.
14. Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross NJ, Jr L, Surampalli RY and Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res.* 2008; 42: 3066 - 3074.
15. Das RK, Borthakur BB and Bora U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of Centella asiatica. *Materials Letters* 2010; 64: 1445 - 1447.
16. Mata YN, Torres E, Blazquez ML, Ballester A, Gonzalez F and Munoz JA. Gold (III) Biosorption and Bioreduction with the Brown Alga Fucus Vesiculosus. *J. Hazard. Mater.* 2009; 166: 612 -618.
17. Olusola OA, Olusola AO, Bada SO and Obi FO. Comparative Study on the Effect of Hibiscus sabdariffa Calyx Anthocyanins and Ascorbate on 2, 4-Dinitrophenylhydrazine-induced Damage in Rabbits, *Am. J. Biochem.* 2012; 2 (2): 1-6.
18. Yurdiansyah A and Suhartanti D. Test Activities Antifungal Methanol Extract Red Flowers Rosella Calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) on Candida albicans, As In Vitro, and Screening Phytochemicals. *IC-GWBT.* 2012, 23-24.
19. Nune SK, Chanda N, Shukla R and et al. Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2009; 19: 2912 - 2920.
20. Babypadmini S and Appalaraju B. Extended spectrum lactamases in urinary isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae prevalence and susceptibility pattern in a tertiary



- care hospital. *Indian J. Med. Microbio.* 2004; 22 (3): 172-174.
- 21.** Sahayaraj K and Rajesh S. Synthesis and antimicrobial applications: Bionanoparticles. *Science against Microbial Pathogens* 2011, pp: 228 - 244.
- 22.** Ahmed S, Ahmad M, Swami BL and Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, *J. Adv. Res.* 2016; 7: 17-28.
- 23.** Chen WY, Lin JY, Chen WJ, Luo L, Wei-Guang DE and Chen YC. Functional gold nanoclusters as antimicrobial agents for antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine (Lond).* 2010; 5 (5): 755-764.
- 24.** Grace AN and Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles: A brief study. *Colloids Surf. A.* 2007; 297 (1-3): 63-70.
- 25.** Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J and et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutants to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine* 2008; 4 (3): 237-240.
- 26.** Shankar SS, Ahmad A, Pasricha R and Sastry S. Bio reduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *J. Mater. Chem.* 2003; 13: 1822-1826.
- 27.** Shanker SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A and Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms: *Nat. Mater.* 2004; 3: 482-488.
- 28.** Dwivedi AD and Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2010; 369: 27 - 33.
- 29.** Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chavez-Soto M and Tortoriello J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from Hibiscus sabdariffa in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine* 2004; 11 (5): 375-382.
- 30.** Narayanan KB and Sakthivel N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Materials Letters* 2008; 62: 4588 - 4590.
- 31.** Huang D, Lia F, Molesa S, Redinger D and Subramanian V. Gold Nanoparticles: Properties and Applications. *J. Electrochem. Soc.* 2003; 150: 412 - 417.
- 32.** Azizian Shermeh O, Valizadeh V, Noroozifar M, Ghasemi A and Valizadeh M. Optimization, characterization and anti microbial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *EJMP.* 2016; 4: 1 - 18.
- 33.** Haes AJ, Haynes CL, McFarland AD, Schatz GC and et al. Plasmonic materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy, *MRS Bulletin* 2005; 30: 368-375
- 34.** Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA and Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* 2002; 116: 55-67.
- 35.** Karimi Andeani J, Kazemi H, Mohsenzadeh S and Safavi A. Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea Wilhemsii* plant. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2011; 6 (3): 1011-1016.
- 36.** Mohanpuria P, Rana NK and Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J. Nanopart. Res.* 2009; 10: 507 - 517.
- 37.** Shankar SS, Ahmad A and Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19 (6), 1627 - 1631.
- 38.** Jha AK, Prasad K and Kumar V. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25 (5): 1476 - 1479.
- 39.** Philip D and Unni C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf. *Physica E;* 2011; 43: 1318 - 1322.



40. Narayanan KB and Sakthivel N. Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Characterization* 2010; 61: 1232 - 1238.
41. Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E*. 2010; 42: 1417 - 1424.
42. Blaber MG, Arnold MD, Harris N, Ford MJ and Cortie MB. Plasmon absorption in nanospheres: a comparison of sodium, potassium, aluminium, silver and gold. *Physica B*. 2007; 184-394.
43. Foroghird S, Khatibzadeh M. Green synthesis of silver nanoparticles used in conductive inks using sonochemical method. *IJCCE*. 2015; 1 (34): 1-9. (In Persian).
44. Armendariz V, Herrera I, Peralta-Videa JR and Jose-Yacaman M. Size Controlled Gold Nanoparticle Formation by *Avena Sativa* Biomass: Use of Plants in Nanobiotechnology. *J. Nanopart. Res.* 2004; 6: 377.
45. Waghmare SS, Deshmukh AM and Sadowski Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2014; 8 (2): 138-146.
46. Mironov IV and Makotchenko EV. The Hydrolysis of $AuCl_4^-$ and the Stability of Aqua chloro hydroxo complexes of Gold (III) in Aqueous Solution. *J. Solution. Chem.* 2009; 38: 725-737.
47. Shenya DS, Mathewa J and Philip D. Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. *Spectrochimica Acta Part A: Spectrochim. Acta Mol.* 2011; 79: 254 - 262.
48. Zhou Y, Lin W, Huang J, Wang W, Gao Y, Lin L, Li Q and Du M. Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: roles of biocompounds and other attributes of the extracts. *Nanoscale Res. Lett.* 2010; 5: 1351 - 1359.
49. Ghodake GS, Deshpande NG, Lee YP and Jin ES. Pear fruit extract-assisted room temperature biosynthesis of gold nanoplates. *Colloids Surf. B*. 2010; 75: 584 - 589.
50. Zakeri M and Fasihi J. Synthesis of gold nanoparticles using biomass of wheat and investigation of effective parameters. *IJCCE*. 2011; 30 (2): 35-41. (In Persian).
51. Shi C, Zhu N, Cao Y and Wu P. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline. *Nanoscale Res. Lett.* 2015; 10: 147.
52. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF and Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium, *Nano Lett.* 2006; 6: 866-870.
53. Muthukumar T, Sudhakumari, Sambandam B, Aravinthan A, Sastry TP and Kim JH. Green synthesis of gold nanoparticles and their enhanced synergistic antitumor activity using HepG2 and MCF7 cells and its antibacterial effects. *Process Biochem.* 2016; 51 (3): 384 - 391.
54. Guzman M, Dille J and Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nano particles against gram-positive and gramnegative bacteria. *Nanomedicine* 2012; 8: 37-45.
55. Zharov Vp, Mercer KE, Galitovskaya EN and Smeltzer MS. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys. J.* 2006; 90 (2): 619-27.
56. Wang F, Wang Y, Dou Sh, Xiong M and et al. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multi drug resistance in cancer cells. *ACS Nano*. 2011; 5 (5): 3679 - 3692.
57. Grace AN and Pandian K. Quinolone Antibiotic-Capped Gold Nanoparticles and Their Antibacterial Efficacy Against Gram Positive And



Gram Negative Organisms. *J. Bionanoscience* 2007; 1 (2): 96-105.

58. Aruguete DM and Hochella MF. Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications. *J. Environ. Chem.* 2010; 7 (1): 3-9.

59. Lee KD, Nagajyothi PC, Sreekanth TVM and Soonheum P. Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using *Inonotus obliquus* and their antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. *JIEC.* 2015; 26: 67-72.



Characterization of Effective Parameters on the Synthesized Gold Nanoparticles and Investigating their Antimicrobial Activities Using Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* L.

Mehrzadeh M (M.Sc.)^{1*}, Valizadeh J (Ph.D.)², Ghasemi A (B.Sc.)²

1- Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistanand & Baluchestan, Zahedan, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistanand Baluchestan, Zahedan, Iran

* Corresponding author: Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistanand & Baluchestan, Zahedan, Iran

Tel: +98-54-12452335, Fax: +98-54-12446565

E-mail: marzie.mehrzade@yahoo.com

Abstract

Background: During the last decade research have been focussed on developing simple, clean, non-toxic, cost effective and ecofriendly protocols for synthesis of nanoparticles.

Objective: The current study aim to characterization and biosynthesis of gold nano particles (Au NPs) using calyx aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. and study of their antimicrobial activity.

Methods: Gold nano particles (AuNPs) were biosynthesized by using $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and the calyx aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. In order to gain the best AuNPs with a uniform shape and size, parameters affecting on synthesis such as: volume of plant extract, pH of the reaction, concentration of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ solution, time of reaction were investigated and optimized by UV-Vis spectrophotometry. Moreover, transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD) were used for further characterization of the nanoparticles. Finally, the antibacterial properties of gold nanoparticles were evaluated by disc diffusion method.

Results: The results of transmission electron image identified the formation of spherical nanoparticles with a size range of 5-10nm. A sharp peak with a maximum absorbance of 570nm was observed which is the characteristic wavelength of gold nanoparticles. The highest inhibition were obtained with the gold nanoparticles against *Hafnia alvei* bacteria.

Conclusion: In this study, the gold nanoparticles synthesized by calyx aqueous extract of *H. sabdariffa* L. and they have relatively good antibacterial activity against Gram-negative bacteria.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., Antibacterial activity, Biosynthesis, Gold Nanoparticles

