

## نانوذرات نقره حاصله از عصاره بلوط: راه حل محلی مشکلات رودخانه قره‌سو ایرج مسگرزاده<sup>۱</sup>، علیرضا اکبرزاده<sup>۲</sup>، رحمت الله رحیمی<sup>۳\*</sup>

۱- دانشجوی دکتر شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران iraj\_mesgarzadeh@iust.ac.ir

۲- دانشجوی دکتر شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران a\_akbarzadeh@iust.ac.ir

۳- نویسنده مسئول، استاد تمام، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران rahimi\_rah@iust.ac.ir

### چکیده

در کلیه مصارف سنتی از پوسته‌های بلوط، نقش‌آفرین اصلی تا حدودی خود تانن‌ها می‌باشند. پوسته‌های بلوط مملو از تانن‌ها بوده و از این رو، مقدار کل ترکیبات تانن در جریان این تحقیق برآورد گردیده است. سنتز نانو ذرات نقره توسط ضایعات بلوط ایرانی یک سنتز سبز محسوب می‌شود چرا که در جریان این تحقیق، از یک روش تک ظرفی، دوستدار محیط زیست، ساده، ارزان و بدون اتلاف انرژی استفاده شده است. تجزیه و تحلیل‌های توزیع اندازه ذرات بر مبنای میکروسکوپی الکترونی روبشی و ارزیابی قابلیت ضد میکروبی بر روی نمونه آب آلوده رودخانه قره‌سو نشان‌دهنده نسبت بحرانی نمک نقره به واکنشگر کاهنده/پایدار کننده بوده و یا بعبارت دیگر نشان‌دهنده ارتباط مستقیم خواص میکروبی با پایداری نانوذرات نقره در سوسپانسیون کلوتیدی می‌باشد. در نسبت بحرانی، بواسطه خنثی‌سازی بارهای روی سطح باکتری بوسیله این مواد فعال سطحی در غلظت بهینه از این واکنشگر انباشته‌گر، پایداری کلوتیدی محلول و به تبع آن اثربخشی باکتری‌کشی افت پیدا خواهد کرد. در واقع، سوای نقش‌های کاهندگی و پایدارکنندگی برای تانن، نقش سومی موسوم به واکنشگر سازماندهی‌کننده نیز می‌توان معرفی کرد؛ به این ترتیب که با نوآرایی‌های درون مولکولی تاننها می‌توانند سرعت هسته‌زایی و رشد نانوذرات نقره را تحت سیطره خود در بیاورند.

### کلمات کلید

ارزیابی قابلیت ضد میکروبی، بلوط ایرانی، سنتز سبز، میکروسکوپی الکترونی روبشی، نانو ذرات نقره.

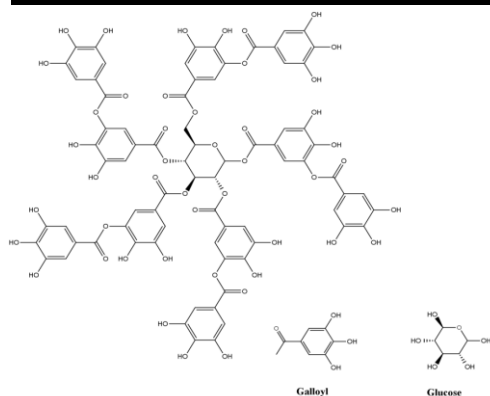
### ۱- مقدمه

عبارت تانن برگرفته از واژه باستانی سلتی است که برای بلوط بکار می‌رفته است. بیت-اسمیت<sup>۱</sup> تانن‌ها را ترکیبات فنولیک محلول در آب با وزن مولکولی بین ۵۰۰ و ۳۰۰۰ معرفی می‌کنند، به طوری که این ترکیبات واکنش‌های معمول فنولیک را از خود نشان می‌دهند و خواص خاصی همچون قابلیت ترسیب آلکالوئیدها، ژلاتین‌ها و دیگر پروتئین‌ها را دارند. هسلم<sup>۲</sup> در تلاش بر تاکید بر مشخصه چندتایی بودن گروه‌های فنولی این ترکیبات، واژه پلی‌فنول را به جای تانن بکار برده است. ایشان خاطر نشان می‌کند که تانن‌ها نه تنها با پروتئین‌ها و آلکالوئیدها بلکه با پلی‌ساکاریدها نیز کمپلکس می‌شوند و وزن‌های مولکولی

پوسته میوه بلوط در ایران از دیرباز برای آب‌بند کردن مشک بکار می‌رفته است. مصرف سنتی دیگر این پوسته‌ها (خصوصاً جفت)، بواسطه قابلیت ترسیب پروتئین توسط آنها در دباغی کردن و تبدیل پوست حیوانات به چرم بوده است. این پوسته‌ها زخم‌های پوستی را بطرز موثری بهبود بخشیده و التهاب و خونریزی را کاهش می‌دادند. از میوه بلوط و کلاهدک آن به ترتیب در تهیه آرد و مربا نیز استفاده می‌شده است. در کلیه مصارف سنتی نامبرده از پوسته بلوط، نقش‌آفرین اصلی تا حدودی خود تانن‌ها می‌باشند

<sup>1</sup> Bate-Smith

<sup>2</sup> Haslam



شکل ۱- ساختار شیمیایی تانیک اسید؛ یک پنتاگالوئیل گلوکز که یکی از سه گروه هیدروکسی هر واحد گالوئیل آن به نوبه خود استری شده است. در این تحقیق، در وهله اول مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره پوسته میوه بلوط ایرانی<sup>۳</sup> تعیین مقدار می‌شود، و در ادامه بر گرفته از قابلیت این دسته از ترکیبات در دخالت و اثربخشی بعنوان عوامل کیلیت‌کننده/کاهنده، سنتز و تشکیل نانوذرات نقره از یون نقره مورد بررسی قرار می‌گیرد. ضمناً به منظور تطابق بهتر با اصول شیمی سبز سعی شده است روش سنتزی بکار رفته تک ظرفی و تک مرحله‌ای باشد و در دمای اتاق و بدون اعمال هر نوع انرژی اعم از گرمایی و یا الکتریکی انجام بگیرد. در نهایت به منظور داشتن یک رویکرد مقابله‌ای با ضایعه‌های زیست-محیطی - بوسیله گیاه‌پالایی<sup>۴</sup> با گیاهان همان زیست‌بومی که ضایعه در آن حادث شده است- قابلیت و اثربخشی ضد میکروبی این نانوذرات تثبیت شده در بستر عصاره پوسته میوه بلوط بر نمونه آب میکروبی جمع‌آوری شده از رودخانه قره‌سو ارزیابی می‌شود.

## ۲- روش انجام تحقیق

### • مواد

نیتрат نقره ( $AgNO_3$ )، معرف فولین-سیوکالتو (F-C)<sup>۵</sup>، تانیک اسید و سدیم کربنات همگی از شرکت مرک (آلمان) و اتانول  $96^\circ$  از شرکت کیمیا الکل زنجان (ایران) تهیه شدند. در تهیه کلیه محلولهای مائی آب دیونیزه بکار رفت.

### • روش کار

تا ۲۰۰۰۰ از این ترکیبات نیز قابل گزارش‌اند. ترکیبات فنولیک می‌توانند بواسطه کیلیت کردن فلز بر موجودیت یا فعالیت بیولوژیکی یونهای فلزی اثر بگذارند. سایدروفورهای باکتریایی شناخته شده‌اند که گروههای فنولی چندتایی و تمایل بالا نسبت به فلزات اصلی چون آهن دارند. تشابه بین الگوی جانمایی بر ارتو-دی‌هیدروکسی سایدروفور و الگوهای جانمایی بر تانن‌های متراکم و هیدرولیز شونده، وجود تمایل بسیار بالا نسبت به فلزات را برای تانن‌ها پیش‌بینی می‌کند. کیلیت کردن یون فلزی می‌تواند پتانسیل ردوکس آن فلز را تغییر بدهد و یا از شرکت کردن آن در واکنشهای شیمیایی جلوگیری کند (Hagerman, 2011).

ریموند<sup>۱</sup> و همکارانش طی بررسی‌های خود بر الگوهای جانمایی در pH پایین، ابتدا فرض را بر پروتوندار شدن دو مرحله‌ای لیگاند‌های دودندانه‌ای کتکولات در کمپلکس آهن-انتروباکتین<sup>۲</sup> و تشکیل پیوند از نوع کتکولاتی قرار می‌دهند، اما نتایج تحقیقاتشان نشان می‌دهد که در این محدوده pH، تشکیل کمپلکس به نفع تشکیل پیوند از نوع سالیسیلاتی (شما ۱) می‌باشد بطوریکه پروتوندار شدن گروه فنولات در موقعیت پارا به تغییر نوع تشکیل پیوند انجامیده و نقره از طریق اکسیژن کربونیل و اکسیژن پروتون‌زدایی شده فنولات موقعیت متا کتوردینه می‌گردد (Raymond, 1979).



شما ۱- گروههای کیلیت‌کننده کتکولات/سالیسیلات تکه‌های گالوئیلی تانن‌های هیدرولیز شونده مشتقاتی از گالیک اسید (۳ و ۴ و ۵-تری هیدروکسی بنزوئیک اسید) می‌باشند. گالیک اسید با یک هسته پلی‌اول استری می‌شود و گروههای گالوئیل می‌توانند به استری شدن ادامه داده یا بطور اکسایشی تشکیل اتصالات عرضی بدهند و بدین ترتیب تانن‌های هیدرولیز شونده پیچیده‌تر تشکیل دهند. گالوتانن‌ها - استرهای پلی‌گالوئیل گلوکز (شکل ۱)- ساده‌ترین تانن‌های هیدرولیز شونده می‌باشند (Hagerman, 2011).

<sup>3</sup> Quercus Brantii

<sup>4</sup> Phytoremediation

<sup>5</sup> Folin-Ciocalteu

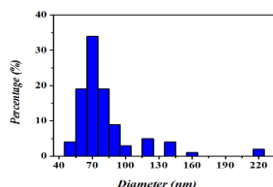
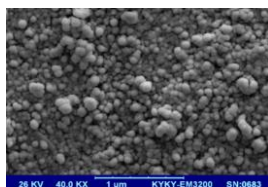
<sup>1</sup> Raymond

<sup>2</sup> Enterobactin

### ۳- نتایج

تشکیل کروموفورهای آبی از کمپلکس‌های مولیبدن و تنگستن بواسطه کاهش معرف F-C (هترو پلی اسیدی از فسفومولبیدات-فسفوتنگستات) در حضور ترکیبات فنولی در محیط قلیایی که با اسپکتروسکوپی فرابنفش- مرئی در ۷۲۵ نانومتر تایید می‌گردد، خود مبنایی در توسعه یک روش جهت تعیین مقدار اینگونه از ترکیبات می‌باشد ( McLeod, 1974; Pell, 2001; European Pharmacopoeia Commission, 2004; Gülçin, 2007). پوسته‌های بلوط بسته به جای-جای گیاه محتوی انواع مختلفی از تانن‌ها - خصوصاً گالوتانیک اسید و کوئرسی‌تانیک اسید- در مقادیر مختلف می‌باشند (Medical Economics Company Thomson, 2004; Medical Economics Company Thomson, 2004). در این بررسی، کل محتوای ترکیبات فنولیک بر مبنای تانیک اسید ۱۷/۶٪ وزنی- وزنی می‌باشد.

نانوذرات نقره با میکروسکوپی الکترونی روبشی شناسایی شده‌اند. این تصاویر SEM، از پوشش‌دهی نانوذرات سنتزی با لایه نازکی از طلا (Sputter coating) ثبت شده‌اند (شکل ۲). برای این تصاویر بوسیله نرم افزار Image J یکصد ذره شمارش شده است. بنابراین می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که اندازه نانوذرات برای نسبت ۱:۲ (نسبت حجم برداشتی از نمک نقره به حجم برداشتی از عصاره)، برای حدود ۶۵٪ کل ذرات ۴۵-۷۵ نانومتر می‌باشد. در این نسبت، کمپلکس‌های تانیک اسید با حداکثر تعداد اتمهای نقره در اطراف گروه‌های O-دی‌هیدروکسی فنیل خود اشباع می‌شوند و هسته‌زایی سریع انجام می‌گردد که در نتیجه اندازه ذرات کوچکتری عاید می‌شود. از طرف دیگر در همین نسبت بواسطه برخورد‌های موثرتر اتمهای نقره کیلیت شده با این هسته‌ها، رشد سریعتر این هسته‌ها نیز رخ می‌دهد که به نوبه خود به ذراتی با اندازه کوچکتر ختم می‌شود ( Santhanam, 2009; Paria, 2013).



الف- نسبت حجمی ۱:۳

بلوط ایرانی با نام علمی *Quercus brantii* که بیش از ۵۰٪ نواحی جنگلی زاگرس را می‌پوشاند، گونه درختی غالب در این ناحیه غربی ایران می‌باشد (Yazdian, 2000). میوه‌های افتاده به پای درخت، از منطقه‌ای تحت عنوان چالابه (کرمانشاه، ایران) جمع‌آوری شدند. پوسته<sup>۱</sup> آنها جدا، در دمای اتاق خشک و بوسیله هاون خرد گردید. با خیساندن<sup>۲</sup> ۷/۵ گرم از پودر پوسته در ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ در یک ظرف در بسته حلال برای مدت ۱ هفته، محلول استوک از عصاره تهیه گردید. این محلول فیلتر شد و فیلتر شده آن جهت ادامه آزمایشات و به منظور رقت‌دهی‌های متعاقب در یخچال نگهداری شد.

جهت تعیین مقدار کل ترکیبات فنولیک از روش فولین- سیوکالتو استفاده شد، بطوریکه معرف مربوطه به همین نام (۱ نرمال) به محلول عصاره ۱/۵٪ وزنی-حجمی اضافه گردید. در ادامه به این مخلوط، محلول سدیم کربنات اضافه و بعد از یک استراحت ۴۰ دقیقه‌ای جذب محلول قرائت شد. همچنین کلیه مراحل فوق‌الذکر بر روی محلول‌های استاندارد با غلظت‌های متفاوت از تانیک اسید (۲/۰-۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) اعمال شد و از قرائت جذب هر محلول منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید (McLeod, 1974).

بر مبنای حجم‌های برداشتی مختلف از محلول استوک نیترات نقره (۵۰ میلی‌مولار) و محلول استوک عصاره (۱۵٪ وزنی-حجمی)، محلول‌هایی با نسبت‌های حجمی مختلف (۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۲:۱ و ۳:۱) در بالن‌های حجمی ۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد، بطوریکه کلیه این محلول‌ها با آب دیونیزه تا خط نشانه رقت داده شدند. به منظور بررسی و تشخیص اندازه و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره از میکروسکوپ الکترونی روبشی ( SEM, KYKY-EM3200, China) در ۲۶ kV استفاده گردید.

فعالیت ضد میکروبی عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده بر نمونه آب گردآوری شده از رودخانه قره سو (پل کهنه، کرمانشاه) با انتشار بر پلیت‌های محتوی آگار خون<sup>۳</sup> بعنوان محیط کشت مشخص گردیده است. این رودخانه با پساب‌های باکتریایی آلوده شده است. به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره، نمونه‌های کنترل نیز در جریان این ارزیابی بکار برده شده‌اند. پلیت‌ها به جهت کشت باکتری و مخمر برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار گرفته‌اند.

<sup>1</sup> Pericarp

<sup>2</sup> Maceration

<sup>3</sup> Blood Agar

کشی آرام تر در سطح نانوذرات در نسبت حجمی ۱:۲ (الگوی ۲) محقق شود.

در غلظت‌های کمتر از این غلظت بهینه (نسبت حجمی ۱:۳)، خنثی‌سازی کامل بار اتفاق نمی‌افتد و در غلظت‌های بالاتر از این حد (نسبت‌های حجمی ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱) به دلیل معکوس شدن توازن بار، نانوذرات پایداری کلئیدی‌شان را باز می‌یابند. این پایداری کلئیدی منجر به تراکم و انباشت ناموثر و متعاقباً میکروبی‌کشی سریع‌تر یا آنی می‌شود (Song, 2007).

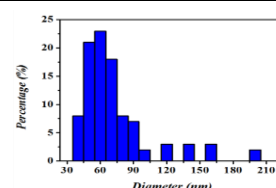
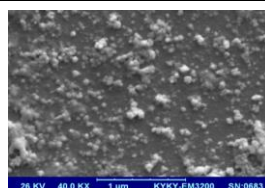


شکل ۳- ارزیابی قابلیت ضد میکروبی نسبت‌های حجمی ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۲:۱ و ۳:۱ (به ترتیب الگوهای ۵-۱)، عصاره (الگوی ۶)، پساب باکتریایی (الگوی ۷) و نمونه‌های کنترل (الگوی ۸ و ۹).

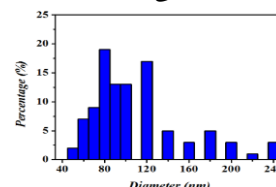
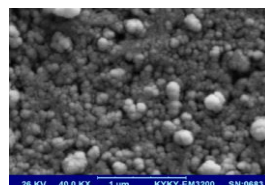
#### ۴- نتیجه گیری

میکروسکوپی الکترونی راه مناسبی برای به نمایش درآوردن ذرات در مقیاس نانو می‌باشد. اینکه اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات چگونه است و چگونه تغییر می‌یابد به این بستگی دارد که تا چه حد اتم‌های نقره بواسطه تکه‌های گالوئیلی کیلیت شده‌اند (هسته‌زایی) و تا چه حد ذرات با این اتم‌های نقره کیلیت شده برخورد دارند (رشد). بررسی‌های میکروسکوپی نشان دادند که در نسبت بهینه ۱:۲ (نسبت حجم برداشتی از نمک نقره به حجم برداشتی از عصاره) اندازه ذرات کوچکتر بوده و توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تر می‌گردد. در همین نسبت بحرانی و برگرفته از ارزیابی‌های قابلیت ضد میکروبی، تراکم و انباشت موثرتر نانوذرات درگیر در بستر عصاره با کلونی‌های باکتریایی باعث از بین رفتن پایداری کلئیدی محلول حاوی نانوذرات می‌شود و در نتیجه روند میکروبی‌کشی با سرعت آهسته‌تری انجام می‌گیرد.

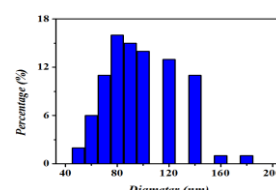
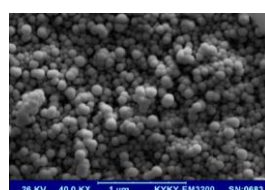
در کل انتظار می‌رود که این نوع نحوه تولید نانوذرات از بقایای مواد گیاهی بومی - که حافظ انرژی، دوستدار محیط زیست، ساده و کارا می‌باشد- بتواند کارایی‌های بیشتری در حوزه‌های حذف آلاینده‌ها و پالایش پساب و آب‌های سطحی پیدا کند. از اینرو جایدهی این گونه از نانوذرات در بسترهای متخلخل کاری است که همینک به آن اهتمام داریم.



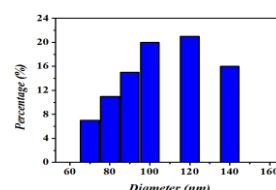
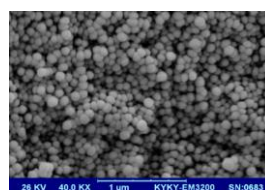
ب- نسبت حجمی ۱:۲



ج- نسبت حجمی ۱:۱



د- نسبت حجمی ۲:۱



ه- نسبت حجمی ۳:۱

شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی و نمودار مربوط به توزیع اندازه‌ی نانوذرات نقره سنتز شده در نسبت‌های حجمی مختلف از نیترات نقره به عصاره پوسته میوه بلوط.

الگوهای آنتی‌بیوگرام (شکل ۳) با روش انتشار بر روی پلیت و در برابر نمونه‌های کنترل (الگوهای ۸ و ۹) به دست آمده‌اند. نمونه‌ها بر روی سطح پلیت‌های محتوی آگار خون پییت شده‌اند (الگوهای ۱ تا ۷). لکه‌های سفید رنگ نشان‌دهنده حضور کلونی-های باکتری می‌باشد. نانوذرات نقره در ساختارهای میسلی سورفکتانهای گیاهی درگیرند. افزایش محلول نانوذرات محتوی مقدار مشخصی از این سورفکتانهای گیاهی به این سوسپانسیون باکتریایی می‌تواند منجر به تراکم و انباشت این نانوذرات - بوسیله یک مکانیزم خنثی‌سازی بار بین بارهای ناهمنام سطح سلول باکتری و سورفکتانهای یونی- شود. پایداری کلئیدی پایین این نانوذرات منجر به کاهش غلظت موثر نقره در محیط مائی عصاره می‌شود. تراکم و انباشت بواسطه مکانیزم خنثی‌سازی، در یک مقدار مشخصی از عامل تراکم‌کننده عاید می‌شود. به نظر می‌رسد که در این تحقیق، تراکم و انباشت موثرتر و روند میکروبی-

۵- منابع

1. A. E. Hagerman 2011. The Tannin Handbook, retrieved from <<http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>> (May 27, 2016).
2. Harris, W. R., Carrano, C. J., Cooper, S. R., Sofen, S. R., Avdeef, A. E., McArdle, J. V., and Raymond, K. N. 1979. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 19. Stability constants and electrochemical behavior of ferric enterobactin and model complexes, J Am Chem Soc, Vol. 101, P. 6097-6104.
3. Yazdian, F. 2000. Distribution area of oak forests in Iran, Ph.D. Thesis, Science and Research Campus of Islamic Azad University, Tehran, Iran, 313p + appendix (in Persian).
4. McLeod, M. N. 1974. Plant tannins- Their role in forage quality, Nutr Abstr Rev, Vol. 44, P. 803-815.
5. Schofield, P., Mbugua, D. M., and Pell, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review, Anim Feed Sci Technol Vol. 91, P. 21-40.
6. European Pharmacopoeia Commission 2007. Determination of tannins in herbal drugs. In: European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> ed.; Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines: Strasbourg, France, P. A286.
7. Gülçin, I., Sat, I. G., Beydemir, S., Elmastas, M., and Küfrevioğlu, Ö. I. 2004. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas*L.), Food Chem, Vol. 87, P. 393-400.
8. Medical Economics Company Thomson 2004. Oak In: Physicians' desk reference for herbal medicines, 3<sup>rd</sup> ed., Healthcare, P. 597-598.
9. Medical Economics Company Thomson 2004, Oak Gall In: Physicians' desk reference for herbal medicines, 3<sup>rd</sup> ed., Thomson Healthcare, P. 598-599.
10. Sivaraman, S. K., Elango, I., Kumar, S., and Santhanam, V. 2009. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds, Current Science, Vol. 97, P. 1055- 1059.
11. Rao, K. J., and Paria, S. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous Aegle marmelos leaf extract. Mater Res Bull, Vol. 48, P. 628-634.
12. Pal, S., Tak, Y. K., and Song, J. M. 2007, Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol, Vol. 73, P. 1712-1720.

