

## بهینه سازی شرایط ساخت سبز نانوذره های نقره از عصاره آبی برگ های کاهو<sup>۱</sup> Optimizing the Conditions of Silver Nanoparticles Green Synthesis from Aqueous Extract of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Leaves

راضیه پروانه، محمد اعتمادی\*، اصغر رمضانیان و مریم توحیدی<sup>۲</sup>

### چکیده

توسعه ی فناوری های سازگار با محیط زیست در ساخت مواد از اهمیت قابل توجهی برای گسترش کاربردهای زیستی آنها برخوردار است. امروزه، انواع نانوذره ها به روش ساخت سبز و با ترکیب شیمیایی، اندازه و مورفولوژی به طور کامل مشخص، ساخته شده و کاربردهای آنها در بسیاری از حوزه های پیشرفته فناوری مورد بررسی قرار گرفته است. این بررسی به منظور یافتن شرایط بهینه ساخت نانوذره های نقره از عصاره آبی برگ کاهو صورت گرفت. بدین منظور، غلظت های مختلف نیترات نقره و عصاره آبی، نسبت های مختلف عصاره ی آبی و نیترات نقره، طیف های نوری متفاوت و غلظت های مختلف عصاره ی آبی مورد بررسی قرار گرفت. از میان تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش، عصاره ی آبی شامل ۲۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار و نسبت ۱:۱ در زیر نور آبی به مدت ۲۴ ساعت بیشینه جذب را نشان داد و نتایج طیف سنجی پراش اشعه ایکس نیز کریستالی شدن نانوذره های را در این تیمار تایید کرد.

**واژه های کلیدی:** ساخت سبز، نانوذره های نقره، عصاره ی آبی کاهو.

### مقدمه

فناوری نانو را می توان به عنوان دست کاری در ماده به گونه ای که دست کم یکی از ابعاد آن در محدوده مقیاس نانو (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) قرار گیرد، تعریف نمود (۴۱). ذره های تولید شده در مقیاس نانو به دلیل مساحت سطحی ویژه بسیار بزرگ، انرژی سطحی زیاد و محدودیت کوانتومی، از ویژگی های منحصر به فرد مختلف نوری، مغناطیسی، الکتریکی و غیره برخوردار هستند (۴۱). امروزه تمایل به تولید و استفاده از مواد با ابعاد نانومتری با توجه به ویژگی های جالب این مواد روز به روز در حال افزایش است. در میان نانوذره های فلزی، نانوذره نقره به دلیل کاربردهای گسترده آن در زمینه های مختلف زیست فناوری و پزشکی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲، ۴، ۳۶). از جمله کاربردهای این نانوذره می توان به تحویل دارو، استفاده در پمادها، استفاده در نانو داروها (۵)، حسگرهای شیمیایی (۳۱)، ذخیره ی داده (۱۹)، زیست شناسی یاخته ای (۱)، مواد آرایشی و کشاورزی (۱۱) اشاره نمود. همچنین، نانو ذره ی نقره دارای فعالیت ضد میکروبی (۴۵)، ضد سرطانی (۳۵)، ضد التهابی (۷) و ضد ویروسی (۴۰، ۴۷) نیز می باشد.

با وجود گزارش های مختلف و متناقض مبنی بر سمیت نانو ذره های نقره (۲۴)، نقش آن به عنوان یک ماده ی ضد عفونی کننده و ضد میکروبی ثابت و شناخته شده است (۲۶، ۴۳). داده های مستند موجود و خواص این نانو ذره ها، باعث شد که پژوهشگران روی ساخت سبز<sup>۳</sup> آنها پژوهش و گزارش هایی را نیز منتشر کنند (۴۱)، همچنین، می توان به روش های متفاوتی برای تهیه و ساخت مواد نانو نیز اشاره نمود که از جمله آن می توان به قوس الکتریکی، احیای شیمیایی (۱۰)، فرسایش لیزری (۴۶) و امواج

میکروویو (۹،۴۴) اشاره نمود، اما نانو ذره‌های حاصل از این روش‌ها به دلیل استفاده از مواد خطرناک شیمیایی، پرتوایی، انجام واکنش‌ها در شرایط ویژه (دما و فشار)، گران بودن مواد و زمان‌بر بودن، خطرهایی را برای محیط‌زیست دارند (۳۵). از این رو، نیاز به روش‌هایی با هزینه پایین، عدم تولید مواد سمی و همچنین بدون آسیب‌های زیست‌محیطی روبه‌افزایش می‌باشد. یکی از روش‌های ایمن تولید نانو ذره‌ها، تولید به روش زیستی (سبز) است که امروزه توجه به این روش برای تولید نانو ذره‌ها، روبه‌افزایش است (۲۹،۳۲،۳۳). سبز ساخت نانو ذره‌ها شامل استفاده از گیاهان و یا برش‌های گیاهی، برای فرایند انتقال یون‌های فلزی از حالت اصلی خود به محدوده‌ی نانو (مقیاس ۱-۱۰۰ نانومتر) می‌باشد (۱۶). فرآیند ساخت سبز، کارآمد، ساده و مقرون به صرفه است (۱۶). همچنین در این روش، نیازی به کشت‌های حفاظت‌شده در مقیاس بزرگ نیست (۱۶) و این فرآیند مانند تولید نانوذره‌های به وسیله‌ی ریزاندامواره‌ها، خطری برای محیط‌زیست ایجاد نمی‌کند (۲۵).

گیاهان به علت فراوانی، سازگاری با محیط‌زیست و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد، گزینه‌ای مناسب برای تولید نانوذره‌های به روش ساخت سبز محسوب می‌شوند (۲۴). تاکنون پژوهش‌های زیادی در رابطه با ساخت نانوذره‌های نقره با استفاده از گیاهان مختلف به گزارش شده است که تورسیدی و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تولید نانوذره‌های نقره توسط گیاهان را گزارش کرده‌اند (۱۲). تاکنون تولید زیستی نانوذره‌های نقره به وسیله گیاهانی مانند *Catharanthus roseus*، *Piper longum*، *Azadirachta indica*، *Acalypha indica*، *Ocimum sanctum* (۴۱). کاهو بانام علمی *Lactuca sativa* L. مهم‌ترین سبزی سالادی برگ سبز می‌باشد که به عنوان یک گیاه برگ‌ی یک‌ساله از تیره کلاه‌پرک‌سانان (Astraceae) شناخته می‌شود و بیشترین سطح تولید را در میان محصول‌های سالادی در دنیا به خود اختصاص داده است (۳۸). کاهو دارای متابولیت‌های ثانویه از جمله ترپنوئیدها، فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (۲۷). مواد شیمیایی از جمله پلی‌فنل‌ها، گلوکاتیون، متالوتیونین‌ها و آسکوربات مسوول ساخت نانوذره‌های نقره هستند (۱۷) و به همین دلیل در این پژوهش، کاهو به عنوان گیاه مورد استفاده برای ساخت سبز، انتخاب گردیده است.

عوامل متعددی در ساخت سبز نانوذره‌های نقره دخالت دارند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به پی‌اچ محیط واکنش (۱۲)، دما (۲۹)، روش تولید و یا فن مورد استفاده (۲۷)، مدت‌زمان (۵)، فشار (۴۱)، نور (۱۳) و غلظت نیترات نقره و عصاره (۱۶) اشاره نمود. در این پژوهش برای اولین بار، شرایط بهینه برای تولید نانوذره‌های نقره از عصاره آبی کاهو مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد مورد استفاده

در این پژوهش از نیترات نقره با درصد خلوص ۹۹ درصد به عنوان ماده حاوی یون نقره و همچنین از برگ‌های تازه کاهو به منظور تهیه عصاره آبی استفاده گردید. بدین منظور برگ تازه کاهو به مقدار ۲۰ گرم، ۴۰ گرم و ۶۰ گرم، وزن گردید. سپس ۲ تا ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شد و به وسیله‌ی پارچه، خشک شد. سپس برگ‌ها به صورت ریز خردشده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بشر، ریخته شدند. برای تهیه عصاره آبی، محلول حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از بیرون آوردن از حمام آب گرم و رسیدن به دمای محیط، عصاره حاصل از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد (۲۱).

### آماده‌سازی محلول برای ساخت نانوذره‌های نقره

هریک از آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شدند. آزمایش اول، به منظور یافتن شرایط بهینه برای ساخت نانوذره‌های نقره صورت گرفت. در این آزمایش نیترات نقره در ۲ غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، حجم عصاره آبی گیاه ثابت (۲ میلی‌لیتر) در نظر گرفته شد و با نسبت‌های مختلف نیترات نقره و عصاره آبی شامل ۱:۱، ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ در زیر طیف‌های نوری مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. تغییر رنگ عصاره از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای، نشان‌دهنده تشکیل نانوذره‌های نقره می‌باشد (۸).

در آزمایش دوم به منظور یافتن غلظت بهینه عصاره آبی کاهو، برگ کاهو به میزان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم وزن گردید. سپس به صورت ریز خردشده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد و پس از خنک شدن از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. محلول نیترات نقره نیز با غلظت ۱

و ۲ میلی‌مولار تهیه شد و عصاره‌ی آبی به‌دست آمده به نسبت ۱:۶ (۲ میلی‌لیتر عصاره آبی و ۱۲ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره) با یکدیگر مخلوط‌شده و به مدت ۲۴ ساعت در زیر نور سفید قرار داده شد. طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی پس از ۲ و ۲۴ ساعت در نمونه‌ها بررسی شد.

آزمایش سوم به‌منظور یافتن بهترین غلظت از عصاره صورت گرفت. عصاره‌ی گیاهی به نسبت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ رقیق شد تا تاثیر عصاره‌ی رقیق‌شده بر ساخت سبز نانوذره‌ها نیز موردبررسی قرار گیرد. همچنین، عصاره‌ی رقیق‌نشده به‌عنوان کنترل قرار داده شد. حجم محلول واکنش یکسان و ۶ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

در آزمایش چهارم به‌منظور یافتن بهترین طیف نوری برای ساخت نانوذره‌های نقره، بهترین تیمار از ۲ آزمایش قبل در زیر طیف نوری سبز، آبی، قرمز و سفید نیز موردبررسی قرار گرفت.

### شناسایی ویژگی‌های نانوذره‌های ساخته‌شده

نانوذره‌های تولیدشده با استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی (UV-vis) تجزیه و تحلیل نوری گردیدند. بدین منظور ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول‌های به‌دست‌آمده، حاوی نیترات نقره و عصاره‌ی آبی کاهو، برداشته شد و به وسیله طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی با دستگاه Epoch (مدل Bio Tek Instruments/USA)، جذب در طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر موردبررسی قرار گرفت (۳). همچنین، به‌منظور تشخیص ساخت نانوذره‌های نقره، پی بردن به نوع شبکه کریستالی و اندازه‌ی نانوذره‌های نقره از طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (X-ray diffraction)، استفاده شد. پس از یافتن شرایط بهینه، بهترین نمونه برای بررسی صحت ساخت نانوذره‌های نقره برای طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس به آزمایشگاه فرستاده شد. نمونه به‌دست آمده ۳ بار با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوبات ایجادشده با آب مقطر شسته شد. رسوبات شسته‌شده، در آب مقطر حل شده و به حجم ۷ میلی‌لیتر رسانده شد و برای طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس، ارسال گردید. اسکن توسط دستگاه پراش اشعه ایکس با زاویه ۲ تا و محدوده اسکن ۳۵ تا ۸۵ انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### تشکیل نانوذره‌های نقره

نانوذره‌های نقره در شرایط آزمایشگاهی و از ساخت سبز عصاره آبی برگ‌های کاهو ایجاد شدند. در روش ساخت سبز، ترکیب‌های موجود در عصاره‌ی گیاهی، یون‌های نقره را طی یک واکنش کاهشی به نانوذره‌های نقره تبدیل می‌کنند. به‌خوبی مشخص شده است که نانوذره‌های نقره به‌دلیل رزونانس پلاسمون سطحی که مربوط به القاء الکترون آزاد در نانوذره‌های نقره می‌باشد، باعث می‌شود که رنگ محلول حاصل از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تغییر کند (۱۸). در این پژوهش، عصاره اولیه بدون رنگ بود و بعد از واکنش، رنگ عصاره به‌تدریج به قهوه‌ای مایل به قرمز تبدیل شد (شکل ۱). تشکیل نانوذره‌های نقره در عصاره به وسیله‌ی طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی با بیشینه جذب حدود ۴۵۰ نانومتر توسط این ذره‌ها، مشخص گردید.

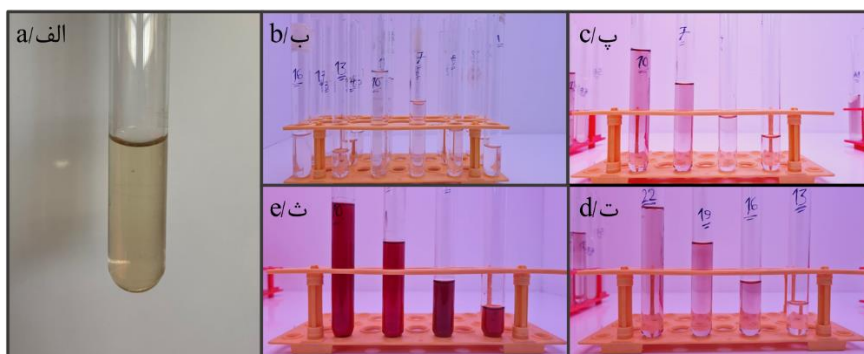


Fig. 1. Changes in color of reaction solution ( $\text{AgNO}_3$  and aqueous plant extract). A) primary aqueous plant extract; B) primary reaction solution; C) reaction solution after 2 hr.; D) reaction solution after 4 hr.; E) reaction solution after 24 hr.

شکل ۱- تغییر رنگ محلول واکنش (نیترات نقره و عصاره آبی گیاه). الف) عصاره آبی گیاه، ب) محلول اولیه واکنش، پ) محلول واکنش بعد از ۲ ساعت، ت) محلول واکنش بعد از ۴ ساعت، ث) محلول واکنش بعد از ۲۴ ساعت.

### اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره

شکل ۲ جذب طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی که حاصل واکنش ۲ غلظت نیترات نقره ۱ میلی مولار و ۲ میلی مولار با ۳ غلظت مختلف عصاره آبی کاهو شامل ۲۰ گرم، ۴۰ گرم و ۶۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد را به مدت ۲ ساعت و ۲۴ ساعت در دمای محیط، نشان می‌دهد. بیشینه جذب صورت گرفته در تمامی نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید، رخ داد. از بین تمام تیمارهای مورد آزمایش، بیشترین مقدار جذب در غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره و ۴۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره پس از ۲۴ ساعت صورت گرفت؛ اما باید در نظر داشت که میزان جذب بیشتر از ۲ می‌باشد که می‌توان دلیل آن را تجمع نانوذره‌های نقره و یا انجام یک واکنش کنترل نشده در محلول دانست (۲۳). به همین دلیل که جذب بیشتر از ۲ نمی‌تواند مطلوب باشد، غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره و ۴۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌مولار نیترات نقره به همراه ۶۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را می‌توان مناسب‌ترین انتخاب دانست. یافته‌ها حاکی از آن است که در غلظت‌های پایین نیترات نقره، کیفیت و کمیت نانوذره‌های نقره مطلوب‌تر است (۲۳) و همچنین بر اساس گزارشی Song و همکاران (۲۰۰۹)، جذب کمتر از ۲ بر توزیع بهتر نانوذره‌های نقره دلالت دارد (۳۷). بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بهترین نمونه در این آزمایش غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره به همراه ۶۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در نور سفید می‌باشد.

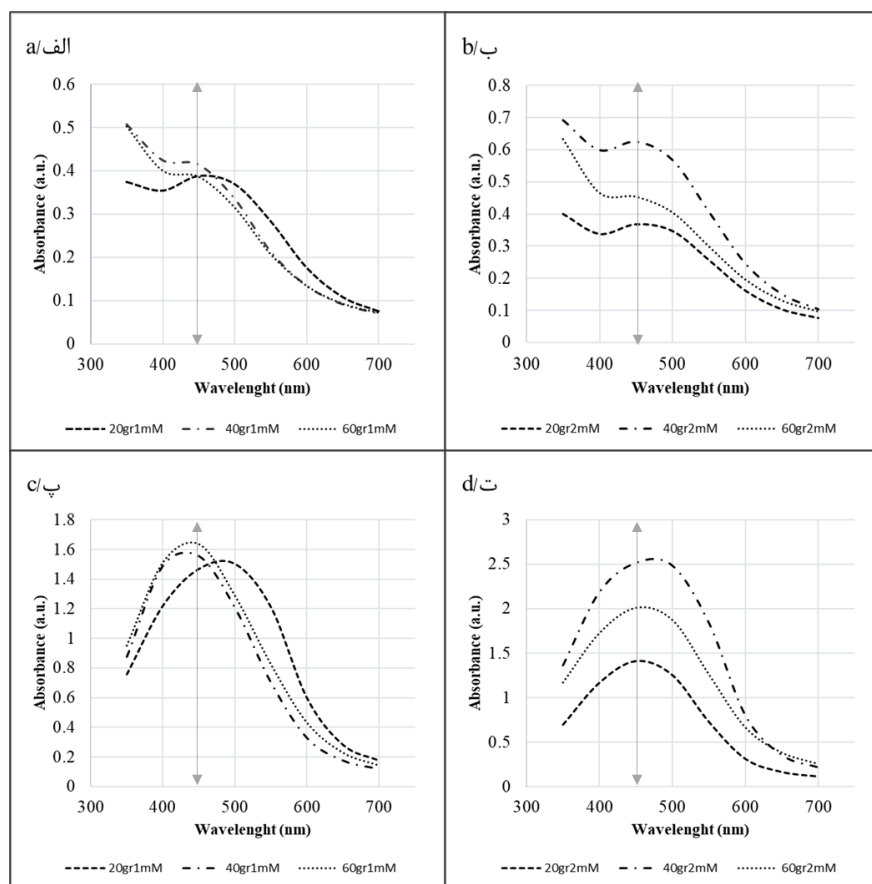


Fig. 2. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles 1:6 ratio. a and b, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM  $\text{AgNO}_3$  after 2 hours under white light. c and d, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM  $\text{AgNO}_3$  after 24 hours under white light

شکل ۲- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره‌های نقره، نسبت ۱:۶ (الف و ب) به ترتیب غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید. پ و ت) به ترتیب، غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید.

با توجه به اینکه با افزایش غلظت نیترات نقره در محلول، شکل ذره‌ها تغییر، اندازه‌ی ذره‌ها افزایش و مقدار هدایت الکتریکی نانوذره‌های نقره کاهش پیدا می‌کند (۱۵)، نسبت‌های متفاوت از نیترات نقره ۱ میلی‌مولار و ۲ میلی‌مولار به همراه مقدار ثابت عصاره آبی گیاه شامل نسبت ۱:۴، ۱:۲ و ۱:۱ به منظور کاهش غلظت آن در محلول در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

### تأثیر نسبت‌های مختلف نیترات نقره و عصاره آبی

در شکل ۳ طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی برای نسبت ۱:۴ (۲ میلی‌لیتر عصاره آبی و ۸ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره) نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار به همراه غلظت‌های مختلف عصاره آبی شامل ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، محلول نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار به همراه عصاره‌ی آبی ۴۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر پس از ۲۴ ساعت بیشینه جذب را نشان داد. با توجه به دلایل گفته شده، استفاده از غلظت‌های کمتر نیترات نقره برای ساخت سبز نانوذره‌ها تیمار مناسب‌تری است، بنابراین در نسبت ۱:۴ (۲ میلی‌لیتر عصاره آبی و ۸ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره) محلول حاصل شامل ۴۰ گرم برگ کاهو به همراه ۱۰۰ میلی‌آب مقطر و نیترات نقره ۱ میلی‌مولار، گزینه‌ی مناسبی است.

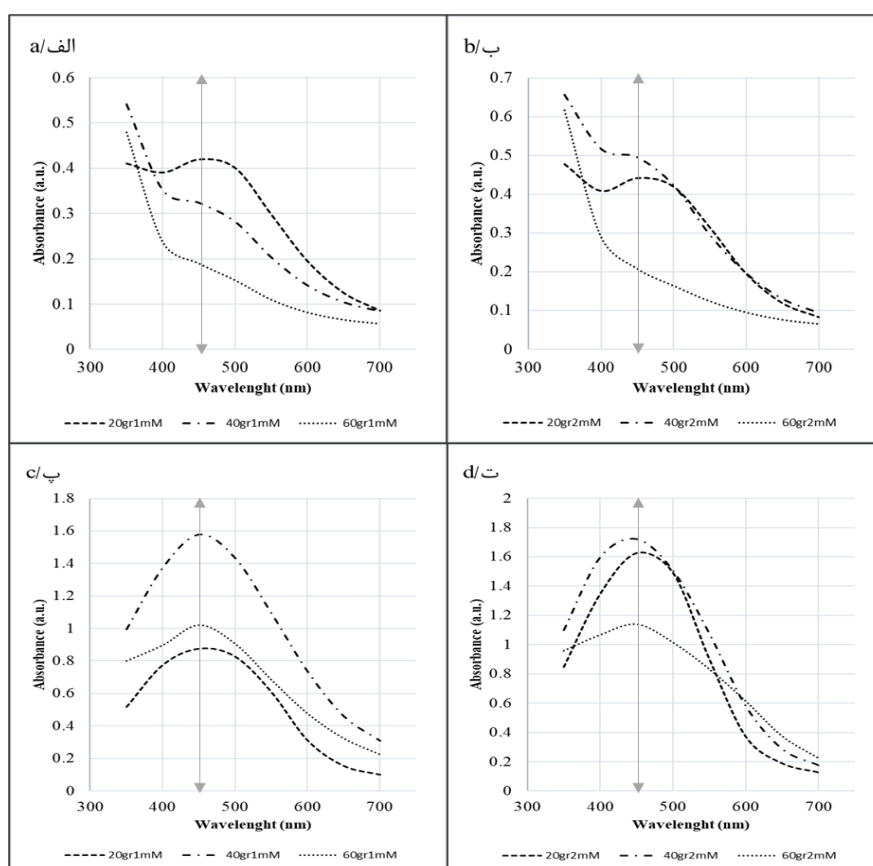


Fig. 3. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles 1:4 ratio, a and b, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM AgNO<sub>3</sub> after 2 hours under white light. c and d, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM AgNO<sub>3</sub> after 24 hours under white light

شکل ۳- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره‌های نقره، نسبت ۱:۴، الف و ب) به ترتیب غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید. پ و ت) به ترتیب، غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید.

نسبت‌های ۱:۲ (۲ میلی‌لیتر عصاره آبی و ۴ میلی‌لیتر نیترات نقره) و ۱:۱ (۲ میلی‌لیتر عصاره آبی و ۲ میلی‌لیتر نیترات نقره) نیز مورد بررسی قرار گرفت. در نسبت ۱:۲، ۲۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار بیشترین جذب را داشت؛ اما به دلیل امکان تجمع نانوذره‌های تولید شده در نمونه‌ی ۲ میلی‌مولار، بهترین نمونه در این آزمایش

غلظت ۲۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به همراه نیترات نقره ۱ میلی مولار می باشد. در نسبت ۱:۱ نیز بیشینه جذب متعلق به نمونه ی ۲۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و نیترات نقره ۱ میلی مولار بود. نتایج طیف سنجی فرابنفش/ مرئی این ۲ نسبت در شکل های ۴ و ۵ قابل مشاهده است.

در شکل ۶ مشاهده می شود که با افزایش غلظت عصاره، رنگ محلول تیره تر و با توجه به نمودارها، شدت جذب افزایش یافته است که این می تواند نشان دهنده افزایش تولید و رشد سریع نانوذره های نقره باشد؛ اما فرایند کاهش یون های نقره در این محلول به دلیل انجام واکنش کاهشی کنترل نشده توسط عصاره ی گیاهی است (۲۳) که می تواند منجر به تغییر شکل و اندازه ی ذره ها در محلول شود. در نتیجه، بهترین غلظت و نسبت برای ساخت سبز نانوذره های نقره از عصاره کاهو نسبت ۱:۱، عصاره ۲۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و غلظت نیترات نقره ۱ میلی مولار می باشد.

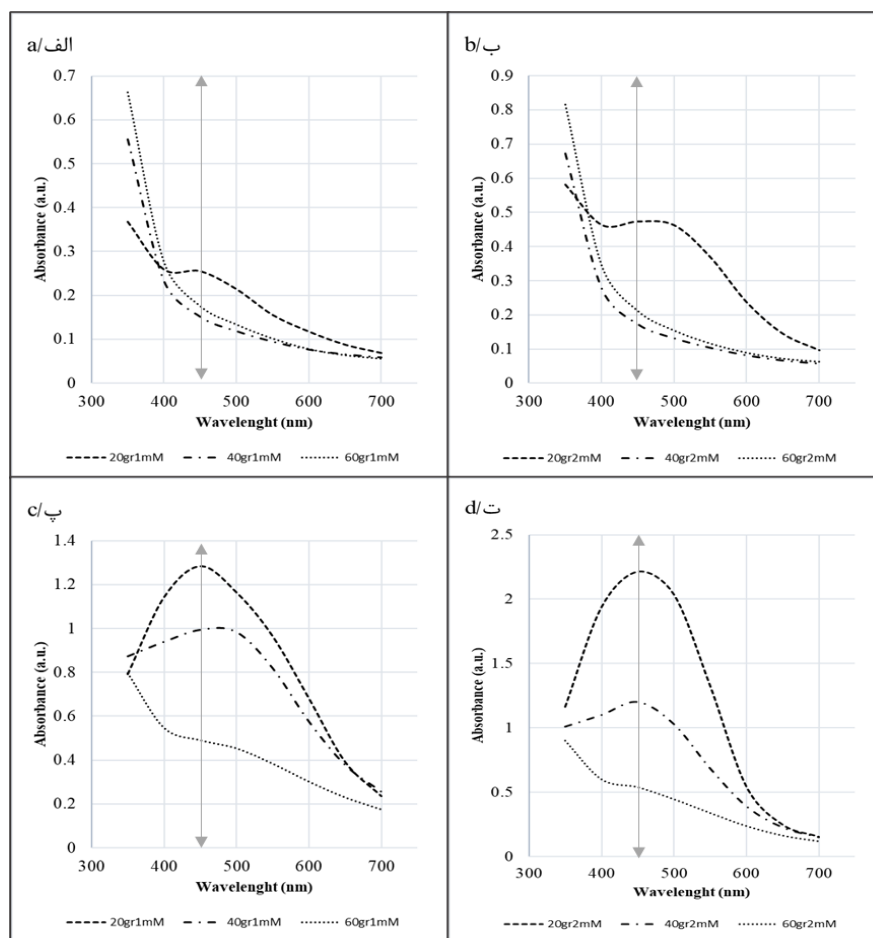


Fig. 4. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles 1:2 ratio, a and b, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM AgNO<sub>3</sub> after 2 hours under white light. c and d, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM AgNO<sub>3</sub> after 24 hours under white light

شکل ۴- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره های نقره، نسبت ۱:۲، الف و ب) به ترتیب غلظت های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی مولار پس از ۲ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید. پ و ت) به ترتیب، غلظت های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی مولار پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید.

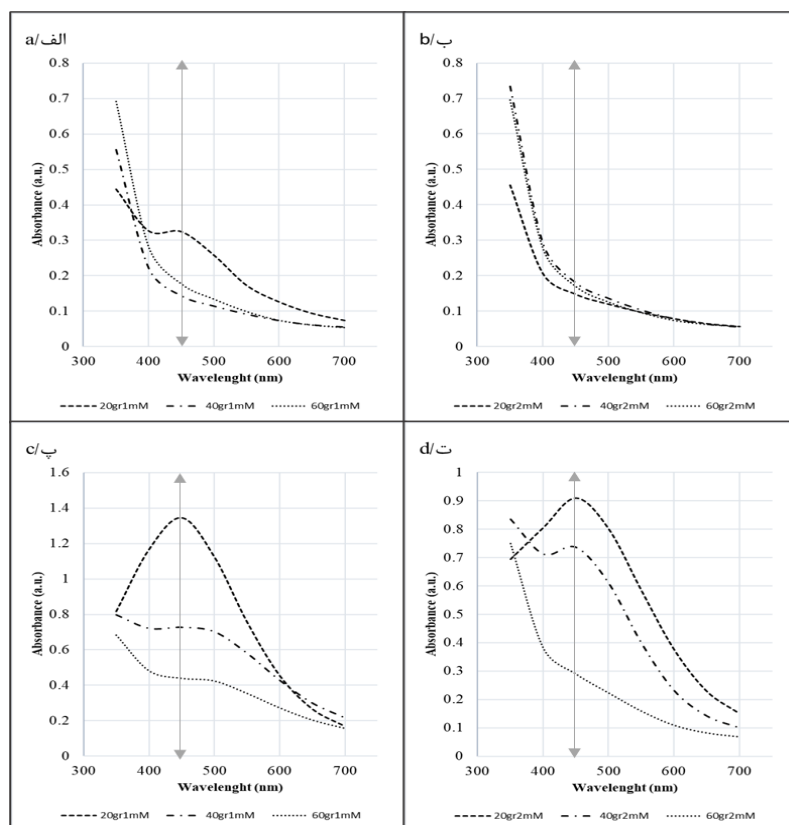


Fig. 5. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles 1:1 ratio, a and b, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM  $\text{AgNO}_3$  after 2 hours under white light. c and d, respectively, different concentrations of aqueous extract and 1 and 2mM  $\text{AgNO}_3$  after 24 hours under white light

شکل ۵- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره‌های نقره، نسبت ۱:۱، الف و ب) به ترتیب غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید. پ و ت) به ترتیب، غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ و ۲ میلی‌مولار پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در زیر نور سفید.

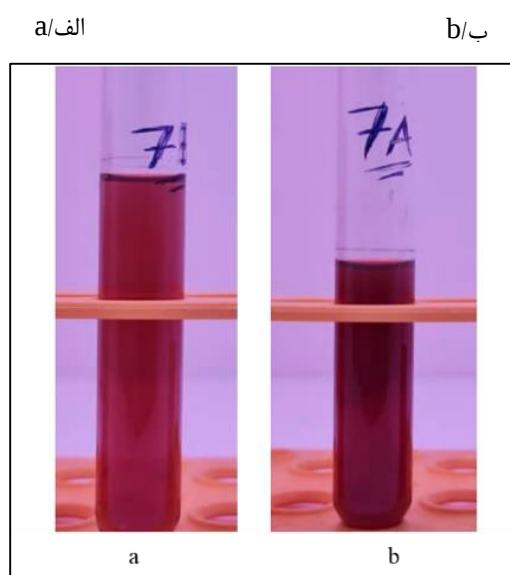


Fig. 6. a, 1:6 ratios of aqueous plant extract (20 gr lettuce leaf in 100 ml distilled water) and 1 mM  $\text{AgNO}_3$ . b, 1:6 ratios of aqueous plant extract (60 gr lettuce leaf in 100 ml distilled water) and 1 mM  $\text{AgNO}_3$ .

شکل ۶- الف) نسبت ۱:۶ عصاره آبی (۲۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و نیترات نقره ۱ میلی‌مولار، ب) نسبت ۱:۶ عصاره آبی (۶۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و نیترات نقره ۱ میلی‌مولار.

### تاثیر طیف‌های نوری مختلف و نسبت‌های متفاوت نیترات نقره و عصاره آبی

نور در فرآیند ساخت سبز نانوذره‌های نقره به دلیل افزایش رزونانس پلاسمون سطحی (۱۴) و کنترل مورفولوژی و ویژگی‌های نانوذره‌های (۳۹) از اهمیت بالایی برخوردار است. به همین جهت، برای یافتن شرایط بهینه و کاهش مدت زمان ساخت نانوذره‌های نقره، نسبت‌های مختلف بهترین غلظت عصاره آبی (۲۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره شامل ۱:۱، ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ در زیر نورهای آبی، قرمز و سبز به مدت ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس شکل ۷، طیف‌سنجی فرابنفش/ مرئی نشان می‌دهد که نور قرمز و سبز پس از ۲ ساعت هیچ بیشینه جذبی را در نسبت‌های مختلف نداشته‌اند، اما در زیر نور آبی نمونه‌ی با نسبت ۱:۱ بیشترین جذب را در بین سایر نسبت‌های مورد استفاده از خود نشان داد. آبی با تاثیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های موجود در عصاره‌ی گیاه، فرایند ساخت را سرعت می‌بخشد (۲۲)، به همین دلیل نمونه‌ی با نسبت ۱:۱ به دلیل غلظت عصاره‌ی بیشتر نسبت به سایر نمونه‌ها بیشینه جذب را به خود اختصاص داده است. بر اساس یافته‌های پیشین، استفاده از نور آبی مدت زمان ساخت سبز را کاهش داده و تغییر رنگ محلول به دلیل افزایش رزونانس پلاسمون سطحی، سریع‌تر اتفاق می‌افتد (۲۲).

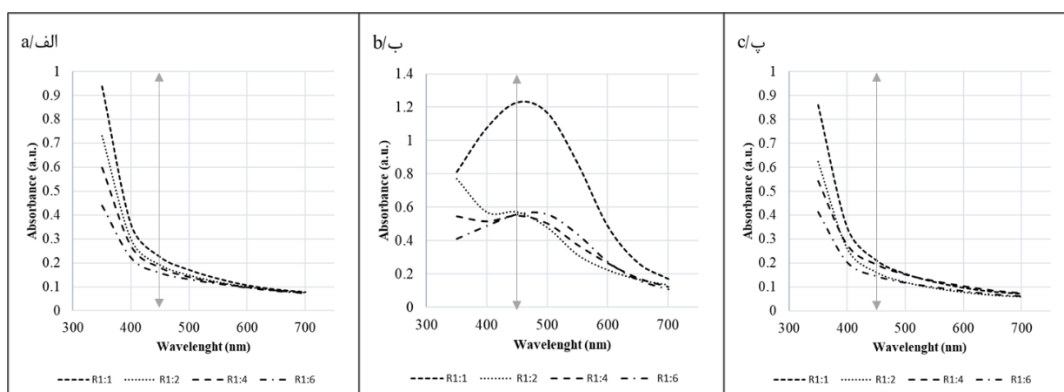


Fig. 7. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles, a, b and c, respectively different ratio of aqueous plant extract and  $\text{AgNO}_3$  under red, blue and green light

شکل ۷- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره‌های نقره، الف، ب و پ) به ترتیب نسبت‌های مختلف عصاره و نیترات نقره زیر نور قرمز، آبی و سبز.

### تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی در زیر طیف‌های نوری متفاوت

مولکول‌های زیستی موجود در عصاره‌ی آبی گیاهان عامل محافظت‌کننده از تجمع نانوذره‌های نقره می‌باشند (۲۰). در شکل ۸ طیف سنجی فرابنفش/ مرئی، نشان می‌دهد که نمونه‌ها در زیر نور قرمز هیچ بیشینه جذبی را نداشته‌اند. نمونه‌ها در زیر نور سفید، آبی و سبز بیشینه جذب را از خود نشان داده که این مقدار در زیر نور آبی و سفید بیشترین میزان را داشت. در بین عصاره‌های رقیق شده، بیشترین جذب مربوط به محلول کنترل (عصاره رقیق نشده) بود که در زیر نور آبی به میزان ۱/۹ و در زیر نور سفید ۱/۳ بود که این می‌تواند به دلیل وجود مولکول‌ها و ترکیب‌های زیستی بیشتر در این عصاره باشد که به عنوان یک عامل محافظت‌کننده و واکنشگر در فرآیند کاهش یون‌های نقره عمل می‌کنند (۲۱). در شکل شماره ۹ محلول واکنش در زیر طیف نوری سفید، آبی، سبز و قرمز مشاهده می‌شود.

با توجه به آزمایش‌های انجام شده، بهترین غلظت عصاره برای ساخت سبز نانوذره‌های نقره، مقدار ۲۰ گرم برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، بهترین غلظت نیترات نقره میزان ۱ میلی‌مولار، بهترین نسبت عصاره و نیترات نقره ۱:۱ و بهترین نور برای ساخت، نور آبی می‌باشد که پس از ۲۴ ساعت در دمای محیط، بیشترین میزان جذب را به خود اختصاص داده است.

### طیف سنجی پراش اشعه ایکس (X-ray diffraction)

بر اساس شکل ۱۰ الگوی XRD، اندیس‌های میلر در سطوح (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۲۲۲) که به ترتیب ۴۴/۲، ۳۷/۵۵، ۶۴/۲ و ۸۱/۷ درجه را نشان می‌دهند، وجود نانو کریستال‌های نقره را در عصاره آبی گیاه کاهو ثابت می‌کند.

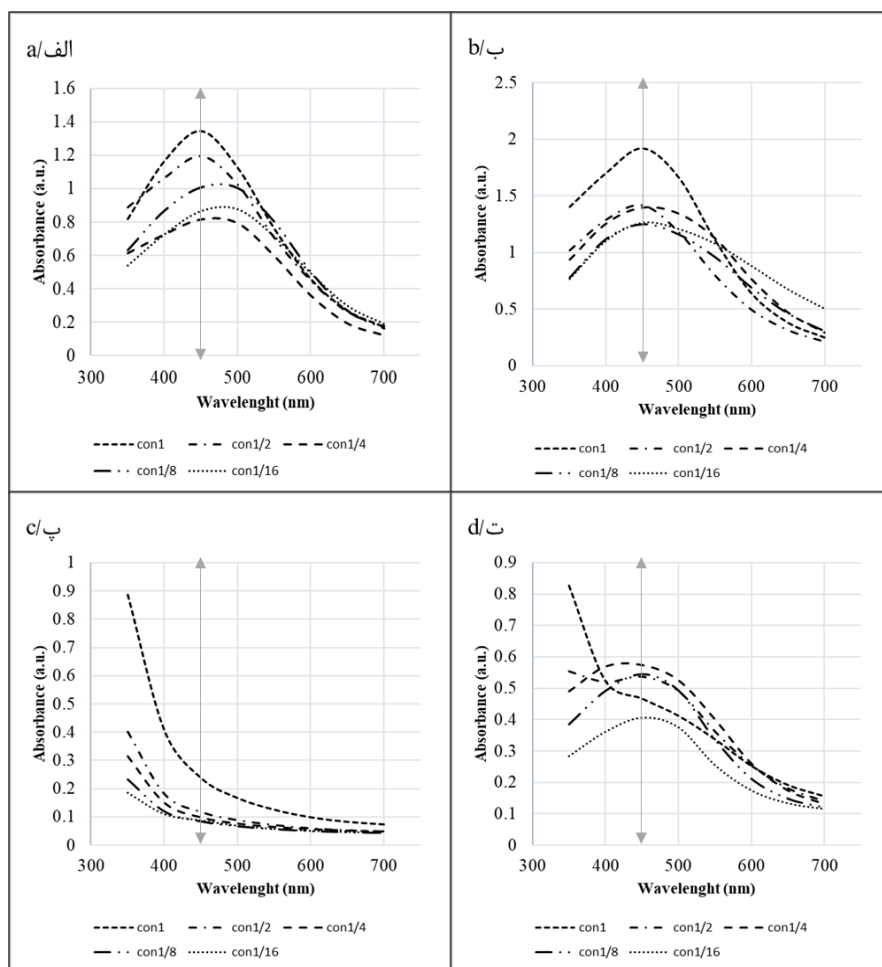


Fig. 8. UV/Vis spectroscopy of silver nanoparticles with diluter extract, a, b, c and d, respectively different concentration of aqueous plant extract and 1 mM  $\text{AgNO}_3$  under whit, blue, red and green light.

شکل ۸- طیف سنجی فرابنفش/ مرئی نانوذره‌های نقره، عصاره رقیق‌شده، الف، ب، پ و ت) به ترتیب غلظت‌های مختلف عصاره آبی و نیترات نقره ۱ میلی‌مولار زیر نور سفید، آبی، قرمز و سبز.

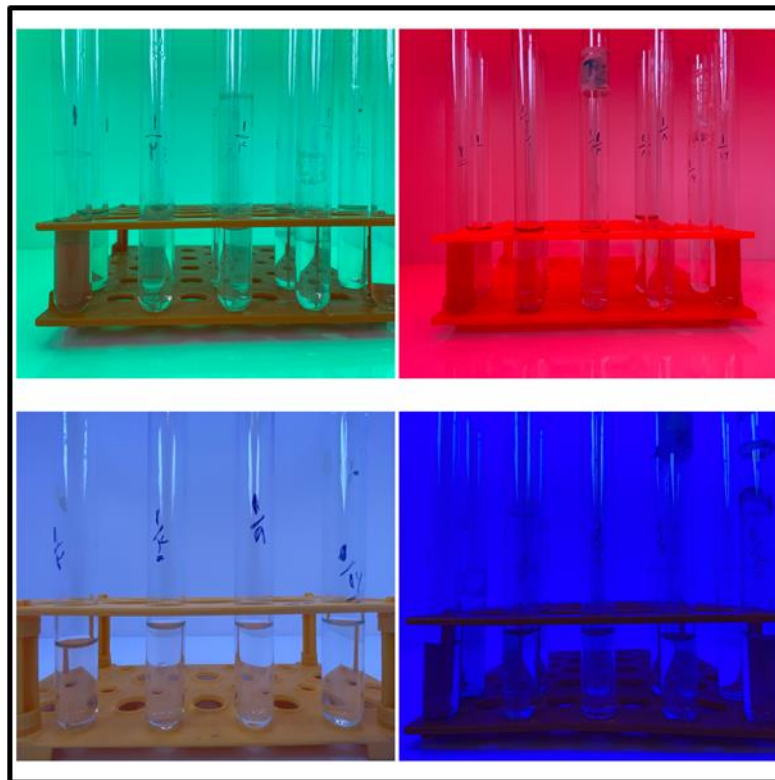


Fig. 9. Different concentration of lettuce leaves aqueous extract under green, red, white and blue lights.

شکل ۹. غلظت‌های متفاوت عصاره آبی برگ کاهو در نورهای سبز، قرمز، سفید و آبی.

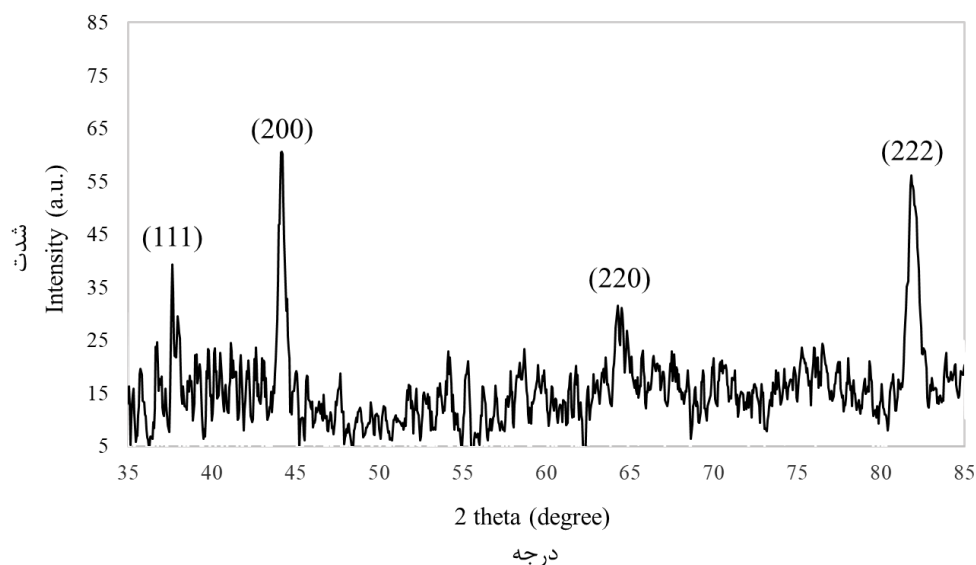


Fig. 10. XRD pattern of silver nanoparticles synthesized from aqueous extract of lettuce leaf.

شکل ۱۰- الگوی پراش اشعه ایکس نانوذره‌های ساخته‌شده از عصاره آبی برگ کاهو.

## نتیجه گیری

بر اساس آزمایش‌های انجام شده، شرایط بهینه برای ساخت سبز نانوذره‌های نقره از عصاره‌ی آبی برگ کاهو، استفاده از ۲۰ گرم برگ کاهو در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای تهیه عصاره‌ی آبی، محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی‌مولار و نسبت ۱:۱ نیترات نقره و عصاره‌ی آبی می‌باشد که به دلیل وجود مولکول‌های زیستی بیشتر در محلول واکنش است. همچنین، استفاده از

نور آبی به مدت ۲۴ ساعت بیشترین جذب را از خود نشان داد که البته در مدت زمان ۲ ساعت نیز میزان جذب در این نور ۱/۲۵ بود اما پس از ۲۴ ساعت جذب افزایش یافته که نشان دهنده‌ی ساخت بیشتر و توزیع یکنواخت‌تر نانوذره‌های نقره می‌باشد. بنابراین می‌توان بیان کرد که این گیاه به‌عنوان یک کارخانه زنده می‌تواند برای تولید نانوذره‌های نقره مورد استفاده قرار گیرد.

## References

## منابع

1. Abdal Dayem, A., M.K. Hossai, S.B. Lee, K. Kim. Saha, S.K. Yang, G.-M. Choi, and H.Y. Cho. 2017. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 18(1): 120.
2. Anthony, K. J. P., M. Murugan, and S. Gurunathan. 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles from the culture supernatant of *Bacillus marisflavi* and their potential antibacterial activity. *J. Ind. Eng. Chem.* 20(4): 1505-1510.
3. Azarbani, F., and Shiravand, S. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles by *Ferulago macrocarpa* flowers extract and their antibacterial, antifungal and toxic effects. *Green Chem. Lett. Rev.* 13(1): 41-49.
4. Cao, G. 2004. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. Imperial College Press.
5. Carabineiro, S. A. C. 2017. Applications of gold nanoparticles in nanomedicine: Recent advances in vaccines. *Molecules*, 22(5): 857.
6. Darroudi, M., M.B. Ahmad, R. Zamiri, A. Zak, A.H. Abdullah, and N.A. Ibrahim. 2011. Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 6:677.
7. David, L., B. Moldovan, A. Vulcu, L. Olenic, M. Perde-Schrepler, E. Fischer-Fodor, A. Florea, M. Crisan, I. Chiorean, and S. Clichici. 2014. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 122: 767-777.
8. Dousti, B., F. Nabipour, and A. Hajiamraei. 2019. Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities. *Razi J. Medic. Sci.* 26(6): 105-117.
9. Fatimah, I. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Parkia speciosa* Hassk pods assisted by microwave irradiation. *J. Adv. Res.* 7(6): 961-969.
10. Faure, C., A. Derré, and W. Neri. 2003. Spontaneous formation of silver nanoparticles in multilamellar vesicles. *J. Phys. Chem.* 107(20): 4738-4746.
11. Fukui, H. 2018. Development of new cosmetics based on nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook* (pp. 399-405). Elsevier.
12. Gardea-Torresdey, J.L., E. Gomez, J.R. Peralta-Videa, J.G. Parsons, H. Troiani, and M. Jose-Yacaman. 2003. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4): 1357-1361.
13. Gericke, M., and A. Pinches. 2006. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83(1-4):132-140.
14. Gu, X., T. Qiu, W. Zhang, and P.K. Chu. 2011. Light-emitting diodes enhanced by localized surface plasmon resonance. *Nanoscale Res. Lett.* 6(1): 1-12.
15. Htwe, Y., W. Chow, Y. Suda, and M. Mariatti. 2019. Effect of silver nitrate concentration on the production of silver nanoparticles by green method. *Mater. Today Commun.* 17: 568-573.
16. Hussain, I., N. Singh, A. Singh, H. Singh, and S. Singh. 2016. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnol. Lett.* 38(4): 545-560.
17. Iravani, S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 13(10): 2638-2650.
18. Jegadeeswaran, P., R. Shivaraj, and R. Venckatesh. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastrum* leaf. *Dig. J. Nanomater. Biostruc.*, 7(3): 991-998.
19. Kaur, R., J. Singh, and S. Tripathi. 2017. Incorporation of inorganic nanoparticles into an organic polymer matrix for data storage application. *Curr. Appl. Phys.* 17(5), 756-762.
20. Khalil, M. M., E. H. Ismail, K. Z. El-Baghdady, and D. Mohamed. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab. J. Chem.* 7(6): 1131-1139.
21. Krithiga, N., A. Rajalakshmi, and A. Jayachitra. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of *Clitoria ternatea* and *Solanum nigrum* and study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. *J. Nanosci.*
22. Kumar, B., Y. Angulo, K. Smita, L. Cumbal, and A. Debut. 2016. Capuli cherry-mediated green synthesis of silver nanoparticles under white solar and blue LED light. *Particuology*, 24: 123-128.
23. Mahiuddin, M., P. Saha, and B. Ochiai. 2020. Green Synthesis and Catalytic Activity of Silver Nanoparticles Based on Piper chaba Stem Extracts. *Nanomaterials*, 10(9): 1777.
24. McGillicuddy, E., I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, P. Dockery, M. Prendergast, N. Rowan, and D. Morris. 2017. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* 575: 231-246.

25. Mittal, A.K., Y. Chisti, and U.C. Banerjee. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.* 31(2), 346-356.
26. Morones, J.R., J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J.T. Ramírez, and M.J. Yacaman. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10): 2346.
27. Noumedem, J., D. Djeussi, L. Hritcu, M. Mihasan, and V. Kuete. 2017. *Lactuca sativa*. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 437-449). Elsevier.
28. Rai, A., A. Singh, A. Ahmad, and M. Sastry. 2006. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir*, 22(2): 736-741.
29. Rajeshkumar, S., C. Malarkodi, G. Gnanajobitha, K. Paulkumar, M. Vanaja, C. Kannan, and G. Annadurai. 2013. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. *J. Nanostruct. Chem.* 3(1): 1-7.
30. Raju, D., U.J. Mehta, and S. Hazra. 2011. Synthesis of gold nanoparticles by various leaf fractions of *Semecarpus anacardium* L. tree. *Trees*, 25(2): 145-151.
31. Roy, K. 2012. 'Green'synthesis of silver nanoparticles by using grape (*Vitis vinifera*) fruit extract: Characterization of the Particles and Study of Antibacterial Activity
32. Sadeghi, B. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Olea europaea*. *Int J. Nano Dimens.* 5(6): 575-581.
33. Salehi, M., N. Reisia, and S. Mehrabian. 2011. Antibacterial effect of external shell of *Pistacia vera* extract. *Islamic Azad Uni. Microb. Biotech. Res. J.* 3(1): 53-59.
34. Sánchez-Navarro, M.d.C., C.A. Ruiz-Torres, N. Niño-Martínez, R. Sánchez-Sánchez, G.A. Martínez-Castañón, I. DeAlba-Montero, and F. Ruiz. 2018. Cytotoxic and bactericidal effect of silver nanoparticles obtained by green synthesis method using annona muricata aqueous extract and functionalized with 5-fluorouracil. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2018.
35. Senapati, S., A. Syed, S. Moez, A. Kumar, and A. Ahmad. 2012. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. *Mater. Lett.* 79:116-118.
36. Shahverdi, A.R., A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, and S. Minaian. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed.: Nanotech. Biol. Med.* 3(2): 168-171.
37. Song, S., X. Liu, J. Jiang, Y. Qian, N. Zhang, and Q. Wu. 2009. Stability of triazophos in self-nanoemulsifying pesticide delivery system. *Colloids and Surfaces A: Surf. A Physicochem. Eng.* 350(1-3): 57-62.
38. Spehia, R. S., M. Devi, J. Singh, S. Sharma, A. Negi, S. Singh, N. Chauhan, D. Sharma, and J.C.Sharma. 2018. Lettuce growth and yield in hoagland solution with an organic concoction. *Int. J. Veg. Sci.* 24(6): 557-566.
39. Stamplecoskie, K.G., and J.C Scaiano.. 2010. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 132(6): 1825-1827.
40. Sun, R.W.-Y., R. Chen, N.P.-Y. Chung, C.-M. Ho, C.-L.S. Lin, and C.-M. Che. 2005. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem. Comm.* (40): 5059-5061.
41. Thakkar, K.N., S.S. Mhatre, and R.Y. Parikh. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med.* 6(2): 257-262.
42. Tran, Q.H., A.-T. and Le. 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci-NanoSci.* 4(3): 033001.
43. Vijayan, S.R., P. Santhiyagu, R. Ramasamy, P. Arivalagan, G. Kumar, K. Ethiraj, and B. R. Ramaswamy. 2016. Seaweeds: a resource for marine bionanotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 95: 45-57.
44. Wijnhoven, S.W., W.J. Peijnenburg, C.A. Herberts, W.I. Hagens, A.G. Oomen, E.H. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, and D. Van De Meent. 2009. Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2): 109-138.
45. Zhang, J., G. Si, J. Zou, R. Fan, A. Guo, and X. Wei. 2017. Antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by *fatsia japonica* leaf extracts for preservation of citrus fruits. *J. Food Sci.* 82(8): 1861-1866.
46. Zhang, Y., F. Chen, J. Zhuang, Y. Tang, D. Wang, Y. Wang, A. Dong, and N. Ren. 2002. Synthesis of silver nanoparticles via electrochemical reduction on compact zeolite film modified electrodes. *Chem. Comm.* (23):2814-2815.
47. Zodrow, K., L. Brunet, S. Mahendra, D. Li, A. Zhang, Q. Li, and P.J. Alvarez. 2009. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Res.* 43(3): 715-723.

## Optimizing the Conditions of Silver Nanoparticles Green Synthesis from Aqueous Extract of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Leaves

R. Parvaneh, M. Etemadi\*, A. Ramezani and M. Tohidi<sup>1</sup>

The development of environmentally friendly technologies in synthesizing materials is of considerable importance for expanding their biological applications. Today, various types of nanoparticles have been synthesized by the method of green synthesis with a well-defined chemical composition, size, and morphology and their applications in many advanced fields of technology have been studied. This study was performed to find the optimal conditions for the green synthesis of silver nanoparticles from an aqueous extract of lettuce leaves. To find the optimal condition, different concentrations of silver nitrate and aqueous extract, different ratios of aqueous extract and silver nitrate, different light spectra with different concentrations of aqueous extract were studied. The results showed that the aqueous extract containing 20 g of lettuce leaves in 100 ml of distilled water, 1 mM silver nitrate concentration, and 1:1 ratio under blue light for 24 hours had the maximum absorption rate among other samples. The results of X-ray diffraction spectroscopy also confirm the crystallization of nanoparticles in this sample.

**Keywords:** Green synthesis, silver nanoparticle, aqueous extract of lettuce

---

1. M.Sc. Student, Assistant Professor, and Professor, Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University; Assistant Professor, Department of Nano Chemical Engineering, School of Advanced Technologies, Shiraz University, Shiraz, Iran, respectively.

\* Correspondence Author, E-mail: (m.etemadi@shirazu.ac.ir).