

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

مقاله تحقیقاتی

بهینه‌سازی و مشخصه‌یابی نانوذرات طلای سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی (*Oenothera biennis*)

به روش تاگوچی

مهلا اسدی، امین باقی‌زاده*

پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:

Oenothera biennis

سنتز زیستی

طراحی آزمایش تاگوچی

نانوذرات طلا

نانوبیوتکنولوژی

مقدمه: فرآیند تولید نانومواد شامل تهیه مواد اولیه، سنتز نانومواد در مقیاس تجاری و استفاده از آنها در بسیاری از زمینه‌های پزشکی، بهداشت، کشاورزی، داروسازی، شیمی و غیره می‌باشد. **هدف:** تولید اقتصادی و سبز نانوذرات طلا با اندازه‌های کمتر از ۲۰ نانومتر توسط عصاره بذر گل مغربی (*Oenothera biennis*) تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مؤثر و بهینه شده از اهداف اصلی این پژوهش می‌باشد. **روش بررسی:** عصاره بذر گل مغربی، با کمک امواج فراصوت تهیه شد. محلول نمک کلرید طلای ۰/۱ میلی مولار تهیه و پس از افزودن به عصاره گیاهی با غلظت‌های معین و آزمون pH های مختلف، نمونه‌ها در دمای‌های متفاوت انکوباسیون و در مدت زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. از میان نمونه‌های تهیه شده، ۱۶ نمونه بر اساس جدول آرایه‌های متعامد آزمایش تاگوچی و با استفاده از نرم‌افزار Minitab18، انتخاب و استفاده شد. **نتایج:** نتایج نشان داد از بین ۱۶ حالت پیشنهادی مبتنی بر روش تاگوچی، غلظت ۲۰۰:۴۰۰ میکرولیتر نمک طلا به عصاره گیاهی، $pH = 10$ ، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت سطوح بهینه هر فاکتور می‌باشند. نمونه بهینه جهت آنالیزهای طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، پتانسیل زتا (Zeta potential) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری، اندازه نانوذرات سنتز شده را بین ۱۰ - ۲ نانومتر نشان داد. **نتیجه‌گیری:** بیوسنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گل مغربی با استفاده از روش تاگوچی، روشی موفق، مقرون به صرفه و با زمان‌بری کوتاه است.

۱. مقدمه

نسبت به حالتی که مواد در حالت توده‌ای (Bulk)، هستند، نانو، علم مطالعه مواد و دستکاری آنها در مقیاس اتم، به طور قابل ملاحظه‌ای تغییر می‌کند. از این‌رو، فناوری نانو، مولکول و ماکرومولکول است به نحوی که ویژگی‌های آنها طراحی، مشخصه‌یابی، تولید و کاربرد مواد، ابزار و سیستم‌ها

مخفف‌ها: FTIR، طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز؛ XRD، پراش پرتو ایکس؛ TEM، میکروسکوپ الکترونی عبوری؛ S/N، نسبت سیگنال به اختلال؛ DLS، پراکندگی نور دینامیکی؛ UV-Vis، طیف سنج مرئی - فرابنفش

* نویسنده مسئول: a.baghizadeh@kgut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹ دی ۱۳۹۷؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۲۳ شهریور ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ آبان ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.75.102

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

توسط کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتر است [۱]. در سال‌های اخیر همگرایی بین فناوری نانو و زیست‌شناسی زمینه جدیدی از فناوری نانو را ایجاد کرده است. نانوبیوتکنولوژی (ریز زیست‌فناوری)، علم استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند اکتینومیسست‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، مخمرها و همچنین گیاهان در تعدادی از فرآیندهای بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است [۲۰]. این زمینه نسبتاً جدید بر ایجاد، راه‌اندازی و استفاده از مواد در مقیاس نانو در بیوتکنولوژی پیشرفته تمرکز کرده است [۳]. سنتز ذرات در مقیاس نانومتر از طریق میکروارگانیسم‌ها و همچنین گیاهان، اولویت رشته نانوبیوتکنولوژی است [۲]. نانوذره، نانوماده‌ای است که اندازه هر سه بعد آن مشابه و در مقیاس نانو، است [۴]. اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم زیاد نانوذرات منجر به تغییرات قابل توجهی در ویژگی آنان شده است. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های الکتریکی نوری، فیزیکی و شیمیایی در کاربردهای کاتالیزوری، سنسورهای شیمیایی، اجزای الکترونیکی، تصویربرداری تشخیصی، پزشکی، تولیدات و پروتکل‌های دارویی استفاده می‌شوند. نانوذرات فلزی طلا، نقره، پلاتین و پالادیوم در پزشکی، داروسازی و صنایع آرایشی کاربرد گسترده دارند [۲]. خاصیت نوری-الکتریکی (Optoelectronic) مربوط به شکل و اندازه، نسبت سطح به حجم زیاد، زیست‌سازگاری بسیار بالا و سمیت کم از مهم‌ترین ویژگی نانوذرات طلا است که نانوذرات طلا را به ابزار مهم نانوبیوتکنولوژی تبدیل کرده است [۵-۸]. به طور کلی روش‌های سنتز نانوذرات به سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی شناخته می‌شوند. در روش‌های فیزیکی با استراتژی بالا به پایین توسط فشار مکانیکی، تابش انرژی زیاد، ایجاد خراش توسط انرژی حرارتی یا الکتریکی، ذوب شدن و تبخیر یا تراکم، نانوذرات تولید می‌شوند که به دلیل تولید نانوذرات با توزیع یکنواخت و نبود آلودگی حلال‌ها روش مفیدی است اما زباله‌های تولید

شده حین فرآیند تولید، این روش را به روشی گران تبدیل کرده است [۹]. روش‌های شیمیایی با استراتژی پایین به بالا، مانند تکنیک میکرومولوسیون (Microemulsion technique)، سنتز هیدروترمال (Hydrothermal synthesis) و غیره، به دلیل استفاده از حلال‌های شیمیایی مضر برای محیط زیست، مناسب نمی‌باشند [۹]. سنتز نانوذرات از طریق میکروارگانیسم‌هایی مانند اکتینومیسست‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، جلبک‌ها و همچنین گیاهان به عنوان کارخانه‌های بیولوژیکی (Biofactores)، روشی تمیز، غیرسمی و سازگار با محیط زیست، با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاص و با قابلیت تولید در اندازه، شکل و ترکیبات مختلف است [۱۰]. در مقایسه با میکروارگانیسم‌ها، کاربرد گیاهان به دلیل عدم نیاز به فرآیندهای خاص، پیچیده و چند مرحله‌ای مانند خالص‌سازی، آماده‌سازی و نگهداری محیط کشت کارآمدتر است [۲]. بنابراین سنتز نانوذرات توسط گیاهان، سریع‌تر، ارزان‌تر و در مقیاس بیشتری نسبت به میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد [۱۱-۱۵]. تقاضای قابل توجه برای تولید نانوذرات سبز، مطالعه جامعی را آغاز کرده است که نشان می‌دهد، استفاده از عصاره گیاهان مؤثرترین راه برای تولید نانوذرات سازگار با محیط زیست است [۱۶، ۱۷]. اندام‌های مختلف گیاهی، بذور، صمغ و ترشحات، جهت تهیه عصاره گیاهی در فرآیند تولید نانوذرات فلزی و اکسید فلزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مراحل شکل‌گیری نانوذرات شامل تشکیل هسته به صورت کاهش یون‌های فلزی، تجمع اتم‌ها و رشد هسته پس از ترکیب ذرات ریزتر و تغییر شکل و اندازه آنان تحت شرایط اعمال شده و سپس پایداری نانوذرات به کمک ترکیبات گیاهی، است [۱۸-۲۱]. عصاره گیاهی حاوی ترکیبات فعال آکالوئیدی، اسید فنولیک، پلی فنول، پروتئین‌ها، تربنئیدها، فلاونوئیدها و قند است که مسئول کاهش یون‌های فلزی، پوشش‌گذاری و پایداری نانوذرات سنتز شده، می‌باشند. اختلاف در نوع و

(tocopherol)، متیونین (Methionine)، آلانین (Alanine)، اسید آلفا لینولنیک (Alpha-linolenic acid)، تیروزین (Tyrosine)، امگا ۶ (Omega 6)، موسیلاژ (Mucilage)، گالیک اسید (Gallic acid)، کافئیک اسید (Caffeic acid)، اولئیک اسید (Oleic acid) و پ-کوماریک اسید (P-coumaric acid) است [۳۴]. بذور گیاه گل مغربی به دلیل دارا بودن ترکیبات مناسب از جمله ترکیبات فنلی، پلی فنلی، آمینو اسیدها، فلاونوئیدها، ترپن‌ها و حلقه‌های آروماتیک که در کاهش و سنتز نانوذرات طلا و پوشش دار کردن و پایدار کردن آنان نقش دارند در این پژوهش انتخاب شده‌اند. رویکرد روش طراحی آزمایش‌های تاگوچی که توسط دکتر جنیچی تاگوچی (Genichi Taguchi) در سال ۱۹۸۰ معرفی شده است [۳۵]، برای دستیابی به طراحی فرآیند مقاوم به شرایط محیطی و تغییرپذیری (Robust) اجزای آن و کاهش تغییرات بر اساس هدف طراحی است که شامل سه مرحله طراحی سیستم بر اساس اصول مهندسی و علمی، طراحی پارامتر با هدف کاهش تغییرپذیری و طراحی تحمل‌پذیری جهت تعیین پارامترهای حساس می‌باشد. در رویکرد تاگوچی تجزیه و تحلیل در درجه اول بر روی نسبت سیگنال به اختلال (Signal-to-noise ratio) (S/N) متمرکز شده است [۳۶]. پارامترهای قابل کنترل یا سیگنال (Signal) سهم مهمی در کاهش تغییرات محصول و افزایش کیفیت آن دارند. پارامترهای غیرقابل کنترل یا اختلال (Noise) نیز ممکن است بر کیفیت محصول تأثیر داشته باشند اما توسط آزمایش‌گر انتخاب نمی‌شوند [۳۶]. تاکنون بیوسنتز و بهینه‌سازی نانوذرات طلا توسط عصاره گیاهان مختلفی مانند توت، زعفران، عناب، گوجه فرنگی و سایر خانواده‌های گیاهی به روش سنتی و یا به کمک روش آماری تاگوچی، گزارش شده است [۳۷-۴۶]، اما گزارشی از بیوسنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گیاه گل مغربی و سایر جنس‌های خانواده Onagraceae منتشر نشده است. بنابراین در این

غلظت ترکیبات فعال موجود در عصاره گیاهان، اساس تغییر در اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده است [۲۲]. هیدروکسیل، کربونیل، آمین و متوکسیدها، گروه‌های عاملی اصلی، مسئول واکنش با پیش‌سازهای هستند که در ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، آلکالوئیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها یافت می‌شوند [۲۳]. تجزیه و تحلیل ترموگرافی نانوذرات طلای سنتز شده توسط عصاره برگ عناب نشان داده است که بیومولکول‌های موجود در عصاره برگ در پوشش‌دار کردن و پایدار نگه‌داشتن نانوذرات طلای سنتز شده، مؤثر بوده‌اند [۲۴]. فناوری عصاره‌گیری گیاهان دارویی، شامل روش‌های سنتی و روش‌های جدید است. روش عصاره‌گیری با کمک امواج فراصوت (Ultrasonic – assisted extraction) [۲۵]، روشی نوین و زیست سازگار است که با حلال کمتر و در کوتاهترین زمان، با ارتعاش امواج فراصوت با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز، باعث ایجاد حفرات نامتقارن به هم پیوسته در داخل ماده گیاهی و شکسته شدن دیواره سلولی شده و در نهایت منجر به خروج سریع مواد می‌شود [۲۶]. عوامل مهم تأثیرگذار در این روش، رطوبت ماده گیاهی، کاهش اندازه ذره‌ای، دما و طول مدت عصاره‌گیری است [۲۷، ۲۸]. این روش ساده، ارزان و مؤثر است و در افزایش بازده عصاره‌گیری و سرعت واکنش نقش دارد و از آنجا که به دمای بالا نیاز ندارد، در عصاره‌گیری مواد حاوی ترکیبات حساس به دما، مفید است [۲۹]. گیاه گل مغربی با نام انگلیسی evening primrose (EP) و نام علمی *Oenothera biennis* از خانواده Onagraceae، منبع غنی اسیدهای چرب اشباع نشده است. این گیاه حاوی ۸-۱۴ درصد گامالینولئیک اسید می‌باشد که بیشتر از سایر گیاهان مشابه و مهم‌تر از سایر روغن‌های گیاهی حاوی این ماده است [۳۰-۳۳]. این اسید چرب در بدن به ترکیبات مهم تنظیم‌کننده فشار خون و سیستم عروقی تبدیل می‌شود. گل مغربی حاوی ترکیبات ضدسرطان مانند ویتامین ای (Alpha-

محصول یا فرآیند، سطوح مشخصی دارند و تحت کنترل هستند. ۲- عوامل اختلال که بر فرآیند واکنش اثر دارند اما از نظر فنی قابل کنترل نیستند و اغلب منبع اصلی نوسان هستند. هدف از طراحی آزمایش تاگوچی، ایجاد بهترین حالت برای عوامل قابل کنترل است به نحوی که کمتر تحت اثر عوامل اختلال قرار گیرند [۴۷، ۴۸]. در این پژوهش، از روش طراحی آزمایش تاگوچی به منظور بهینه‌سازی نانوذرات طلای تولید شده توسط عصاره بذر گل مغربی استفاده شد و فاکتورهای مؤثر در بهینه‌سازی نانوذرات طلا، مانند نسبت غلظت نمک طلا به عصاره گیاهی، pH محلول، دمای واکنش و زمان انکوباسیون (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل آزمایشات برای این آزمایش با وجود ۴ فاکتور در ۴ سطح متفاوت برای هر فاکتور (جدول ۱)، ۲۵۶ حالت است (رابطه ۱)

$$X = N^F \quad \text{رابطه ۱:}$$

که در آن N تعداد سطوح، F تعداد فاکتورها و X تعداد کل آزمایشات است. از آنجاکه انجام این تعداد آزمایش، زمان‌بر و هزینه‌بر است برای کاهش تعداد آزمایشات، استفاده از جداول آرایه‌های متعامد (Orthogonal Array) روش تاگوچی پیشنهاد می‌شود تا تنها کسری از حالات، مورد آزمایش قرار گیرد. انتخاب آرایه متعامد مناسب به درجه آزادی آزمایش بستگی دارد و درجه آزادی آزمایش برابر است با مجموع درجه آزادی همه فاکتورها و درجه آزادی هر فاکتور نیز برابر است با تعداد سطوح هر فاکتور منهای یک. بنابراین درجه آزادی این آزمایش ۱۲ محاسبه می‌شود. برای انتخاب آرایه متعامد مناسب، درجه آزادی آرایه متعامد باید با درجه آزادی کل آزمایش مساوی یا بزرگ‌تر باشد. لذا از جداول پیشنهادی روش تاگوچی، جدول آرایه متعامد L_{16} انتخاب شد. این جدول نشان می‌دهد چه تعداد آزمایش بایستی انجام شود و در هر آزمایش، هر فاکتور در چه سطحی از مقادیر انتخابی، باشد (جدول ۲).

پژوهش تلاش شده است تا علاوه بر بررسی امکان بیوستتاز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گل مغربی، بهینه‌سازی شرایط سنتز اعم از غلظت، pH، دما و زمان به کمک روش آماری تاگوچی به منظور صرفه‌جویی در زمان و هزینه نیز صورت گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه مواد و آماده‌سازی محلول‌ها

نمک کلروآئوریک اسید (chloroauric acid) (HAuCl_4) از شرکت مرک (Merck Co.) خریداری شد. برای تهیه محلول ذخیره ۰/۱ میلی‌مولار نمک مذکور، ۰/۰۴ گرم نمک طلا وزن و با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بذر گل مغربی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. جهت حذف آلودگی بذور، شستشو با آب مقطر انجام شد. به منظور ضدعفونی، بذور به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و پس از هر مرحله ضدعفونی، چند مرتبه توسط آب مقطر آبکشی شدند. سپس بذور در هوای آزاد خشک و توسط دستگاه آسیاب ($Wagtech/3303$) پودر شدند. جهت تهیه عصاره بذر گل مغربی، مقدار ۱ گرم بذر پودر شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ترکیب شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولتراسونیک ($Tecno-Gaz S.P.A./Tecna6$) قرار داده شد. سپس محلول حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تصفیه و در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با pH ۶/۸-۶/۴ به عنوان عصاره نهایی مورد استفاده قرار گرفت.

۲.۲. بهینه‌سازی شرایط سنتز نانوذرات طلا به روش تاگوچی

در روش تاگوچی عوامل مؤثر در آزمایش‌ها دو دسته‌اند: ۱- عوامل قابل کنترل که در طراحی آزمایش و طراحی نهایی

جدول ۱. فاکتورها و سطوح مورد بررسی در ارزیابی راندمان بیوسنتز نانوذرات طلا

فاکتورها	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
A نسبت غلظت نمک طلا به عصاره گیاهی	۱۰۰:۴۰۰	۱۰۰:۵۰۰	۱۵۰:۴۵۰	۲۰۰:۴۰۰
B pH	۷	۸	۱۰	۱۲
C °C دما	۳۰	۵۰	۶۰	۷۰
D زمان	۳۰ دقیقه	۱ ساعت	۴ ساعت	۲۴ ساعت

جدول ۲. ۱۶ آرایه متعامد بر اساس روش تاگوچی در سنتز نانوذرات طلا

شماره آزمایش	A غلظت	B pH	C دما	D زمان
۱	۱۰۰:۴۰۰	۷	۳۰	۳۰
۲	۱۰۰:۴۰۰	۸	۵۰	۱
۳	۱۰۰:۴۰۰	۱۰	۶۰	۴
۴	۱۰۰:۴۰۰	۱۲	۷۰	۲۴
۵	۱۰۰:۵۰۰	۷	۵۰	۴
۶	۱۰۰:۵۰۰	۸	۳۰	۲۴
۷	۱۰۰:۵۰۰	۱۰	۷۰	۳۰
۸	۱۰۰:۵۰۰	۱۲	۶۰	۱
۹	۱۵۰:۴۵۰	۷	۶۰	۲۴
۱۰	۱۵۰:۴۵۰	۸	۷۰	۴
۱۱	۱۵۰:۴۵۰	۱۰	۳۰	۱
۱۲	۱۵۰:۴۵۰	۱۲	۵۰	۳۰
۱۳	۲۰۰:۴۰۰	۷	۷۰	۱
۱۴	۲۰۰:۴۰۰	۸	۶۰	۳۰
۱۵	۲۰۰:۴۰۰	۱۰	۵۰	۲۴
۱۶	۲۰۰:۴۰۰	۱۲	۳۰	۴

۳.۲. بیوسنتز نانوذرات طلا

تنظیم شد. جهت اعمال تیمار دمایی از حمام آب گرم (Memmert) استفاده شد. نمونه‌ها در مدت زمان مشخص هر آزمایش (سطوح ۳۰ دقیقه، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت) در دمای تعیین شده (سطوح ۳۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از انجام ۱۶ آزمایش، تغییر رنگ نمونه‌ها حاکی از آغاز سنتز نانوذرات می‌باشد که با ثبت طیف UV-Vis و مشاهده پیک در محدوده ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر، سنتز نانوذرات

در این مطالعه ۱۶ آزمایش بر اساس روش طراحی تاگوچی (جدول ۲) تهیه شد. بدین‌منظور در هر آزمایش سطح مورد نظر نسبت غلظت نمک طلا به عصاره گیاهی (از سطوح ۱۰۰:۵۰۰، ۱۰۰:۴۰۰، ۱۵۰:۴۵۰ و ۲۰۰:۴۰۰) انتخاب شد و سپس pH هر نمونه بر اساس سطح هر آزمایش (از بین سطوح ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲) توسط HCl و NaOH ۱ مولار

تأیید می‌شود. سپس از محلول کلوئیدی هر نمونه جهت تعیین اندازه نانوذرات سنتز شده توسط DLS استفاده و از اندازه نانوذرات به عنوان پاسخ جهت انجام محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار Minitab 18 استفاده شد. در روش تاگوچی به دو روش آنالیز واریانس و یا نسبت S/N نتایج آزمایش‌ها بررسی می‌شوند. نسبت S/N میزان حساسیت مشخصه کیفی محصول نسبت به پارامترهای غیرقابل کنترل در یک فرآیند است. طراحی فرآیند با بالاترین نسبت سیگنال به نویز، منجر به ایجاد بهترین کیفیت با حداقل واریانس است و بیانگر این است که متغیر پاسخ بیشتر تحت اثر متغیرهای قابل کنترل است تا متغیرهای غیرقابل کنترل [۴۸]. نسبت S/N متغیر پاسخ در سه حالت، مقدار اسمی - بهتر (Nominal is better)، مقدار کوچک‌تر - بهتر (Smaller is better) و مقدار بزرگ‌تر - بهتر (Larger is better) سنجیده می‌شود. از مقدار کوچک‌تر - بهتر زمانی استفاده می‌شود که بخواهیم متغیر پاسخ را تا حد ممکن کمینه نماییم (رابطه (۲)).

۳. نتایج

۳.۱. نتایج تغییر رنگ و آنالیز UV-Vis و DLS

پس از ترکیب نمک طلا با عصاره بذر گل مغربی، تنظیم pH، دما و گذشت زمان موردنظر هر یک از ۱۶ آزمایش تعیین شده توسط روش تاگوچی (جدول ۲)، رنگ محلول کلوئیدی (شکل ۱) پس از گذشت حدود ۱۰ ثانیه از ترکیب نمک طلا و عصاره، از رنگ نارنجی عصاره به طیف‌های رنگی متفاوت قهوه‌ای روشن، سبز تیره، قرمز و بنفش تیره، تغییر رنگ داشت که نشان دهنده سنتز سریع نانوذرات طلا توسط عصاره بذر این گیاه است و این تغییر رنگ پس از ۲۴ ساعت ثابت و بدون تغییر ماند. طیف‌های حاصل از آنالیز طیف سنجی مرئی-فرابنفش ۱۶ نمونه بر اساس زمان ثبت شد. شکل ۲ (A-D) بیانگر طیف‌های بررسی سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گل مغربی به ترتیب در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۴ ساعت و ۲۴ ساعت می‌باشد. با توجه به شکل ۲ (A)، پیک پهن و خوابیده نمونه یک، نشانه کاهش سنتز نانوذرات بود که نسبت به نمونه‌های هفت، ۱۲ و ۱۴ در مدت زمان یکسان ۳۰ دقیقه، تأثیر نامناسب سطوح پایین سه فاکتور غلظت، pH و دما در نمونه یک را نشان داد. سه نمونه دیگر (نمونه‌های هفت، ۱۲ و ۱۴) دارای پیک مناسبی هستند

تأیید می‌شود. سپس از محلول کلوئیدی هر نمونه جهت تعیین اندازه نانوذرات سنتز شده توسط DLS استفاده و از اندازه نانوذرات به عنوان پاسخ جهت انجام محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار Minitab 18 استفاده شد. در روش تاگوچی به دو روش آنالیز واریانس و یا نسبت S/N نتایج آزمایش‌ها بررسی می‌شوند. نسبت S/N میزان حساسیت مشخصه کیفی محصول نسبت به پارامترهای غیرقابل کنترل در یک فرآیند است. طراحی فرآیند با بالاترین نسبت سیگنال به نویز، منجر به ایجاد بهترین کیفیت با حداقل واریانس است و بیانگر این است که متغیر پاسخ بیشتر تحت اثر متغیرهای قابل کنترل است تا متغیرهای غیرقابل کنترل [۴۸]. نسبت S/N متغیر پاسخ در سه حالت، مقدار اسمی - بهتر (Nominal is better)، مقدار کوچک‌تر - بهتر (Smaller is better) و مقدار بزرگ‌تر - بهتر (Larger is better) سنجیده می‌شود. از مقدار کوچک‌تر - بهتر زمانی استفاده می‌شود که بخواهیم متغیر پاسخ را تا حد ممکن کمینه نماییم (رابطه (۲)).

$$S/N = \frac{-10 \log_{10}(Y_1^2 + Y_2^2 + \dots + Y_n^2)}{n} \quad \text{رابطه ۲}$$

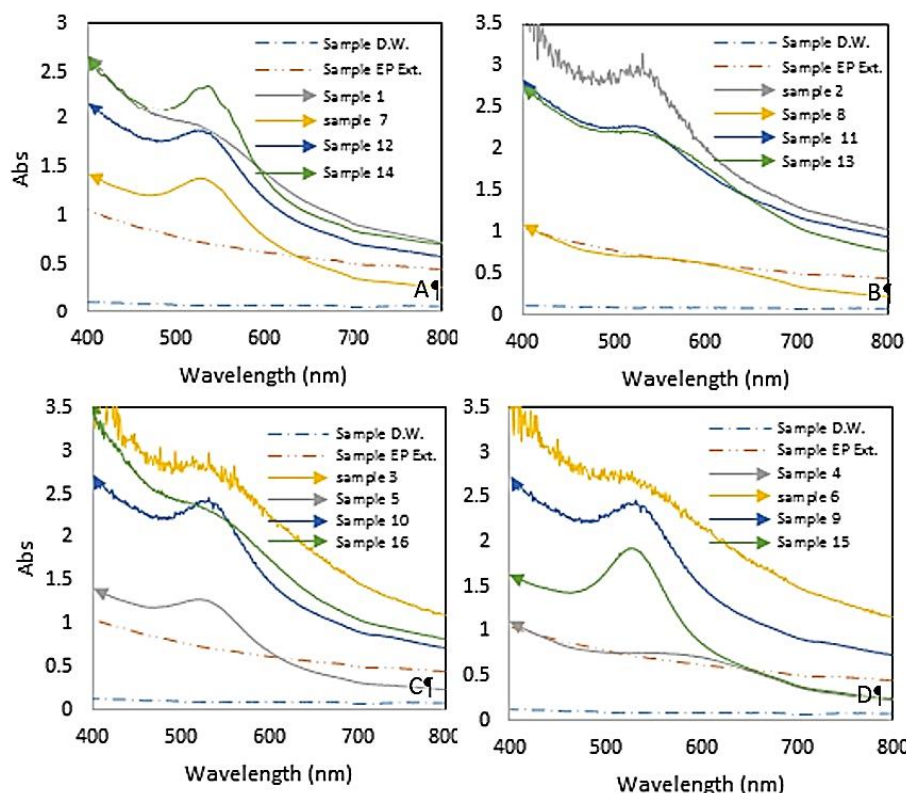
که در آن Y متغیر پاسخ برای هر آزمایش و n تعداد تکرار هر آزمایش است. آزمایشی که بالاترین S/N را داشته باشد، بهترین حالت سطوح پارامترها را در بین ۱۶ آزمایش دارد [۳۶].

۴.۲. مشخصه‌یابی نانوذرات طلای سنتز شده

پس از آنالیز نتایج و تعیین سطوح بهینه هر فاکتور توسط روش تاگوچی، نمونه بهینه در آنالیزهای FTIR



شکل ۱. عصاره خالص گیاهی و تغییر رنگ نمونه‌های مورد بررسی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نمک طلا



شکل ۲. طیف UV-Vis نانوذرات سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی (A) پس از ۳۰ دقیقه (B) پس از ۱ ساعت (C) پس از ۴ ساعت (D) پس از ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون

که بیانگر سنتز مناسب نانوذرات طلا بود. با توجه به قسمت‌های (D و C, B) در شکل ۲ نمونه‌های چهار، هشت و ۱۶ پیک جذبی نامناسبی داشتند که بیانگر سنتز کم نانوذرات طلا بود و با توجه به یکسان بودن pH در آنان ($pH = 12$) در سطوح متفاوت غلظت، دما و زمان، اثر منفی pH زیاد در سنتز نانوذرات توسط عصاره بذر گل مغربی دیده می‌شود. همچنین با توجه به کاهش پیک نمونه چهار نسبت به نمونه‌های هشت و ۱۶، اثر منفی pH زیاد در مدت زمان طولانی، مورد تأیید قرار می‌گیرد. مزید توضیح اینکه در نمونه ۱۲ ($pH = 12$)، در مدت ۳۰ دقیقه اثر منفی pH دیده نمی‌شود و پیک مناسبی نشان داده است. در نمونه‌های با غلظت کم، اثر pH مشهودتر بود، بدین‌صورت که اگر غلظت

کم و pH بالا باشد، سنتز بیشتری صورت می‌گیرد. دمای بالا در مدت زمان طولانی اثر منفی در سنتز نانوذرات طلا داشت. جدول ۳ بیانگر اندازه تعیین شده نانوذرات سنتز شده در ۱۶ نمونه مورد آزمایش توسط آنالیز پراکندگی دینامیکی نور است. بر اساس آن، نانوذرات سنتز شده در ۱۶ نمونه، در اندازه‌های متفاوت $1/3 - 15/2$ نانومتر بود. داده‌های این جدول جهت تعیین سطوح بهینه ۴ فاکتور مورد بررسی استفاده شد.

۲.۳. نتایج آنالیز تاکوچی و تعیین سطح بهینه در هر فاکتور نانوذرات طلای سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی در ۱۶ آزمایش، توسط پراکندگی دینامیکی نور، تعیین اندازه شد که اندازه نانوذرات در جدول شماره ۳ آورده شده است. شرایط بهینه، تأثیر مجزا و متقابل پارامترهای غلظت، pH، دما و زمان به روش تاکوچی توسط نرم‌افزار Minitab18 به هدف سنتز نانوذرات طلا با اندازه کوچک، پس از تحلیل داده‌های اندازه نانوذرات طلا و بررسی نمودار اثر خالص برای نسبت سیگنال به اختلال فاکتورها (S/N)، تعیین شد (شکل ۳ (A-E)). در این پژوهش هرچه نسبت S/N بیشتر باشد بهتر است و نانوذرات طلا در اندازه کوچک‌تر سنتز می‌شوند (رابطه ۲). با توجه به شکل ۳ (A)، بین چهار سطح نسبت غلظت ۱۰۰:۴۰۰، ۱۰۰:۵۰۰، ۱۰۰:۴۰۰ و ۱۵۰:۴۵۰ و ۲۰۰:۴۰۰ میکرولیتر نمک طلا به عصاره گیاهی، سطح ۲۰۰:۴۰۰ میکرولیتر بهترین سطح تعیین شد، همچنین نسبت غلظت ۱۰۰:۴۰۰ نیز در سنتز نانوذرات در اندازه کوچک تأثیر دارد، اما دو سطح ۱۰۰:۵۰۰ و ۱۵۰:۴۵۰ منجر به تشکیل نانوذرات با اندازه بزرگ می‌شدند. شکل ۳ (B)، بهترین سطح pH را در بین چهار سطح ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲، سطح $pH = 10$

نشان داده است. سه سطح دیگر pH (۱۲ و ۸ و ۷) منجر به تشکیل نانوذرات طلا با اندازه بزرگتر نسبت به $pH = 10$ می‌شدند. بر اساس نتایج شکل ۳ (C)، در بین چهار سطح دمای ۳۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه تعیین شد. محدوده دمایی ۵۰ - ۳۰ درجه سانتی‌گراد در سنتز نانوذرات طلا در اندازه کوچک اثر مثبت دارد و با افزایش دما تا ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد، اندازه نانوذرات طلا افزایش یافت. بهترین زمان سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گل مغربی، زمان ۲۴ ساعت در بین چهار زمان متفاوت ۳۰ دقیقه، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت، تعیین شد. ضمناً تفاوت بسیار کمی بین زمان ۴ ساعت و ۲۴ ساعت در شکل ۳ (D) دیده می‌شود. همچنین زمان، غلظت، pH و دما، به ترتیب تأثیرگذارترین فاکتورها در سنتز نانوذرات طلا بودند (شکل ۳ (A-D)).

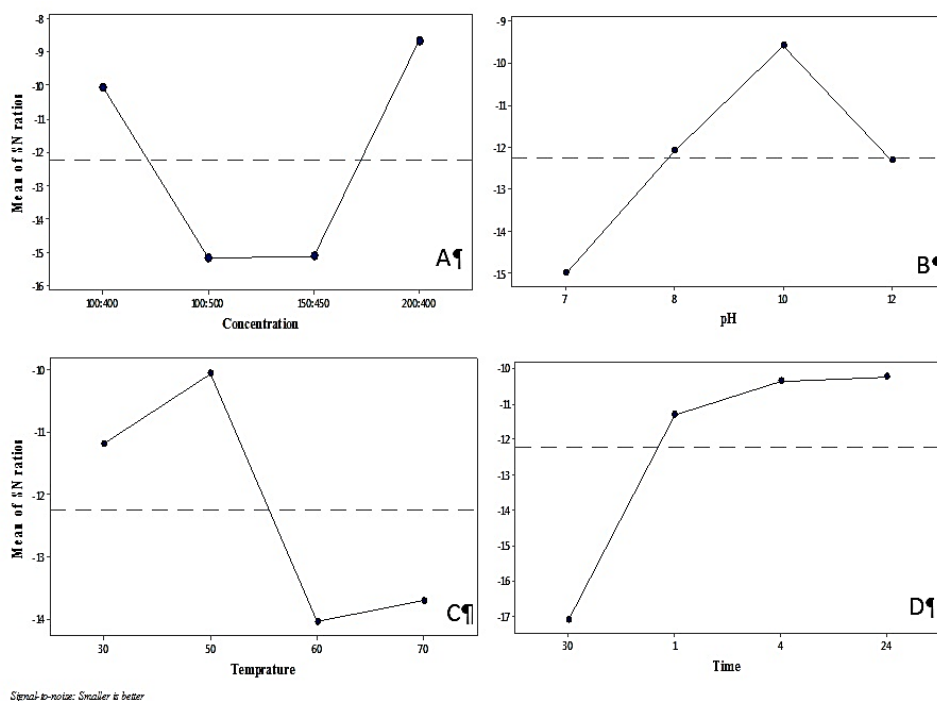
شرایط بهینه سنتز نانوذرات طلا در اندازه کوچک، غلظت ۲۰۰:۴۰۰ میکرولیتر نمک طلا به عصاره گیاهی، $pH = 10$ ، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان تقریبی ۲۴ - ۴ ساعت است که برای تهیه نمونه بهینه جهت انجام آنالیزهای دستگاهی FTIR، XRD، TEM و Zeta potential استفاده شد.

۳.۳. نتایج آنالیز FTIR

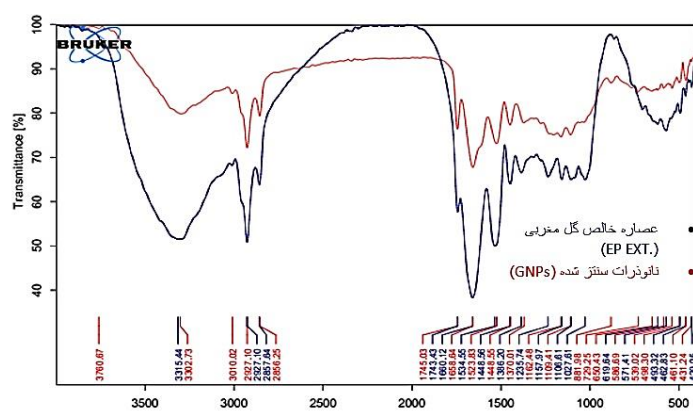
به منظور بررسی حضور و اتصال بیومولکول‌ها به نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی و تأیید نقش آنها در کاهش یون طلا و تشکیل و پایداری نانوذرات طلا، از طیف FTIR پودر محلول کلئیدی نانوذرات طلا سنتز شده و پودر عصاره بذر گل مغربی استفاده شد (شکل ۴). در هر دو طیف، حضور باند پهن و با شدت جذب بالا

جدول ۳. نتایج اندازه تعیین شده نانوذرات طلا توسط آنالیز پراکندگی دینامیکی نور

شماره آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
اندازه نانوذرات (nm)	۷/۱	۳/۸	۲	۱/۹	۳/۱	۳/۴	۱۵/۲	۶/۷	۱۳/۳	۵/۶	۲/۱	۶/۷	۳/۴	۳/۶	۱/۳	۳/۴



شکل ۳. تعیین سطوح بهینه سنتز نانوذرات طلا در اندازه مناسب توسط عصاره بذر گل مغربی به روش تاگوچی (A) بررسی تأثیر غلظت (B) بررسی تأثیر pH (C) بررسی تأثیر دما (D) بررسی تأثیر زمان



شکل ۴. الگوی FTIR نانوذرات سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی

در طول موج $3302/73 \text{ cm}^{-1}$ و $3115/44 \text{ cm}^{-1}$ نشانه حضور نوسانات کششی گروه عاملی O-H الکل، فنل و کربوکسیلیک اسید و همچنین نوسانات انبساطی N-H در آمیدها و آمین‌ها بود. باندهای محدوده $2856/25 \text{ cm}^{-1}$ تا $2927/10 \text{ cm}^{-1}$ نیز مربوط به نوسانات کششی آمین نوع دوم (N-H) و C-H آلکین‌ها و آلدهیدها بود. طول موج‌های $1448/55 \text{ cm}^{-1}$ تا $1746/00 \text{ cm}^{-1}$ نشانه حضور گروه‌های عاملی C=O، C=C و C=N آلدهید، آلکن، استر، اسید استیک، آمید I پروتئین و آمینو اسید موجود در عصاره گیاهی و حلقه‌های آروماتیک عصاره خالص می‌باشد. وجود طول موج‌های $1386/20 \text{ cm}^{-1}$ تا $650/43 \text{ cm}^{-1}$ نشانه حضور الکل نوع اول، اتر، کربوکسیلیک، فسفات و حلقه‌های آروماتیک قوی، آمید III

با اندیس‌های میلر ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰، ۳۰۰ و ۲۲۲ در موقعیت‌های حدود ۳۹ درجه، ۴۴ درجه، ۶۵ درجه، ۷۸ درجه و ۸۲ درجه داشتند. حضور این پیک‌ها با پیک‌های استاندارد طلا همخوانی دارد و این طیف صحت سنتز نانوذرات طلا را برای ما ثابت کرد.

۵.۳. نتایج آنالیز پتانسیل زتا

با توجه به شکل ۶ میزان بار الکتریکی موجود در سطح نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی ۳۴/۸- میلی‌ولت تعیین شد که بیانگر نیروی دافعه میان نانوذرات و عدم تجمع آنان بود که باعث پایداری نانوذرات سنتز شده شد.

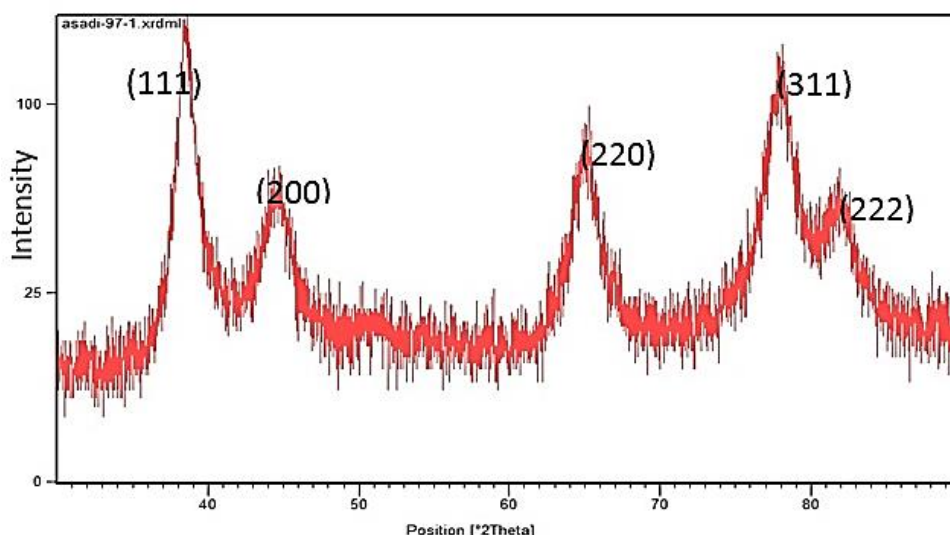
۶.۳. نتایج TEM

عکس TEM نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی ثبت شد (شکل ۷). اندازه نانوذرات سنتز شده در اندازه تقریبی ۲-۱۰ نانومتر به اشکال کروی و چند وجهی، تعیین شد. این عکس نتیجه آنالیزهای DLS، FTIR و پتانسیل زتا را تأیید می‌کند.

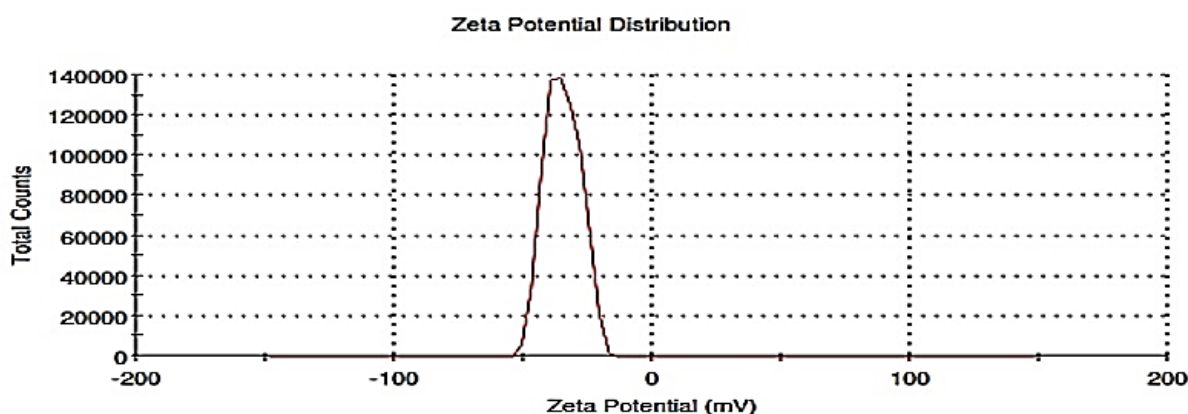
پروتئین‌ها و آمین‌های آلیفاتیک بود. وجود بیومولکول‌های کربونیل، فلاونوئید، تانن و سایر ترکیبات فنلی در فرآیند کاهش یون طلا و تشکیل نانوذرات طلا نقش بسزایی داشتند [۳۶]. طیف FTIR دو نمونه پودری عصاره خالص و نانوذرات طلا سنتز شده مشابه یکدیگر هستند با این تفاوت که طیف نانوذرات طلا شدت نسبتاً کمتری نسبت به عصاره خالص دارد که این کاهش شدت پیک‌ها به دلیل فعالیت ترکیبات مختلف فنلی، پلی‌فنلی، قندها، الکل‌ها و پروتئین‌های موجود در عصاره بود. در طول موج $1500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ و $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ کاهش شدت پیک مشهودتر بود. در محدوده 800 cm^{-1} پیک نانوذرات طلا نسبت به عصاره خالص شدت بیشتری دارد که نشانه دخیل بودن ترکیبات C-H حلقه‌های آروماتیک در کاهش یون‌های طلا بود [۴۵-۴۲].

۴.۳. نتایج آنالیز XRD

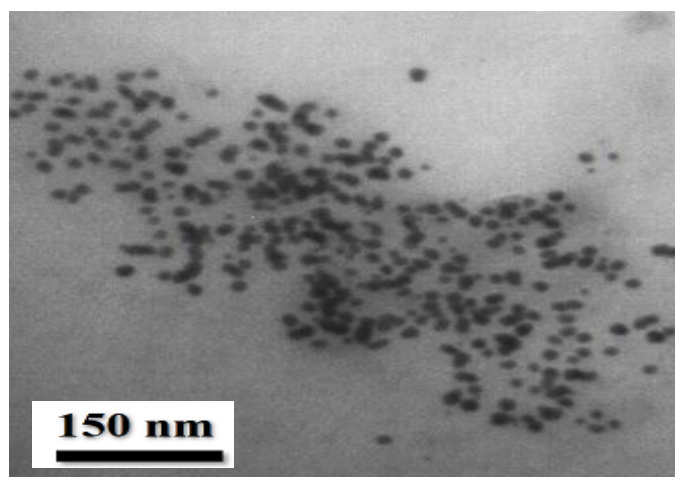
طیف XRD نانوذرات سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی پس از ساتریفیوژ محلول کلوتیدی و خشک کردن نمونه ثبت شد. با توجه به شکل ۵، نانوذرات طلا پنج پیک



شکل ۵. الگوی XRD نانوذرات سنتز شده توسط عصاره بذر گل



شکل ۶. نمودار حاصل از پتانسیل زتا موجود در سطح نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی



شکل ۷. عکس TEM نانوذرات طلای سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی

۴. بحث

در بیشتر موارد سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره گیاهی، محلول کلئیدی حاصل رنگ قرمز و یا بنفش تیره پیدا کرده است که به دلیل خاصیت نوری نانوذرات طلا می‌باشد و طیف UV-Vis نمونه‌ها در محدوده ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر پیک مشخصی دارد که نشانه حضور نانوذرات طلا می‌باشد [۴۹، ۴۵، ۴۴، ۳۹]. خلیل و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پژوهش خود در زمینه سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره برگ زیتون تحت تیمار غلظت عصاره و pH بیان نمودند که در اثر غلظت پایین عصاره برگ و pH بالا نانوذرات مثلثی، شش ضلعی و

کروی سنتز شدند در حالی که با افزایش غلظت و کاهش pH نانوذرات کروی در اندازه کوچکتر سنتز شده است [۴۱]. هانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر متقابل غلظت و زمان را در سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره برگ کافور در دمای محیط را بررسی کردند. آنان بیان کردند با افزایش غلظت عصاره برگ کافور از ۰/۱ به ۰/۵ پیک‌های جذبی نانوذرات طلا سنتز شده در مدت زمان‌های ۲، ۲۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه افزایش یافتند و سپس با افزایش غلظت عصاره به ۱ گرم پودر برگ کافور، در مدت زمان ۶۰ دقیقه پیک جذبی به اندازه تقریبی مدت زمان ۹۰ دقیقه با غلظت ۰/۵ گرم افزایش یافت

[۵۰]. آرمنداریز و همکاران در سال ۲۰۰۴ پس از بررسی نتایج بیوسنتز نانوذرات طلا توسط توده زیستی جو دوسر بیان داشتند که در $pH=2$ نانوذرات ۸۲-۲۵ نانومتر سنتز شدند و با افزایش pH تا حدود ۳ و ۴ اندازه نانوذرات کاهش یافت. آنان دلیل این اثر را تمایل نانوذرات به تجمع و ایجاد نانوذرات بزرگتر در $pH=2$ دانستند، همچنین بیان داشتند در pH بالاتر گروه‌های عاملی بیشتر مانند کربونیل و هیدروکسیل برای اتصال به نانوذرات وجود دارند در نتیجه به طور همزمان یون‌های بیشتر طلا به گروه‌های عاملی به طور جداگانه متصل و نانوذرات کوچکتر تشکیل می‌شوند و pH را یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در شکل و اندازه نانوذرات بیان کردند [۵۱]. گریک و پینچس در سال ۲۰۰۶ بیان داشتند میزان نانوذرات با افزایش دما نسبت مستقیم دارد و همچنین بیان داشتند که نانوذرات میله‌ای و صفحه‌مانند طلا در دماهای بالا تشکیل می‌شوند در حالی‌که نانوذرات کروی در دماهای بالاتر تشکیل می‌شوند [۵۲]. دیودی و گوپال افزایش در نوک پیک طیف UV-Vis پس از گذشت زمان از ۱۵ دقیقه به یک ساعت را گزارش نمودند و همچنین بیان داشتند که افزایش زمان پس از مدت مذکور فقط تغییرات کمی را ایجاد می‌کند [۲۰]. نتایج فوق‌الذکر در زمینه تأثیر فاکتورهای غلظت، زمان، دما و pH در سنتز و تشکیل نانوذرات طلا، با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. نتایج طیف XRD در تحقیق حاضر حضور ۵ پیک مشابه با پیک‌های استاندارد طلا را نشان داد [۵۳]. بنابراین طیف XRD نمونه بهینه صحت سنتز نانو ذرات طلا را برای ما اثبات کرده است و نشان می‌دهد نانوذرات طلا اساساً بلورین هستند [۴۱]. شبستریان و همکاران در سال ۲۰۱۶ میزان بار الکتریکی منفی موجود در سطح نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره آبی گیاه سماق در pH طبیعی ($pH = 7/2$) را ۲۵/۳- بیان کردند و نتیجه گرفتند که نانوذرات طلا با ترکیبات آنیونی پراکنده شده‌اند و ذرات نسبت به انفجار الکترواستاتیک نسبتاً پایدار بوده‌اند

[۴۴]. الگابوری و همکاران در سال ۲۰۱۶ سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره گیاهان مورد تحقیق را بررسی نمودند و میزان بار الکتریکی سطحی نانوذرات طلا در تمامی نمونه‌ها منفی گزارش شد که بیانگر پایداری نانوذرات سنتز شده است [۴۰]. سنتز سبز نانوذرات طلا و نقره توسط عصاره برگ بکرایی توسط راو و پاریا در سال ۲۰۱۵ و بهینه‌سازی شرایط نسبت یون فلزی به عصاره برگ، pH ، دما، سورفاکتانت‌های سطح گیاه و رنگ منبع نوری نشان داد که در سنتز نانوذرات طلا، دما و سورفاکتانت‌ها اثر مهمی دارند و نانوذرات نقره و طلا در اندازه‌های به ترتیب ۱۳ و ۲۳ نانومتر سنتز شدند و مناسب بودن روش تاگوچی در سنتز سبز و تولید اقتصادی، ساده و در مقیاس زیاد را تأیید می‌کند [۴۲]. در این پژوهش، هدف بهینه‌سازی نانوذرات طلای سنتز شده توسط عصاره بذر گل مغربی در اثر تیمار ۴ فاکتور نسبت غلظت نمک طلا به عصاره گیاهی (بر حسب میکرولیتر)، pH ، دما و زمان در ۴ سطح مختلف به روش آماری تاگوچی است. نسبت ۲۰۰:۴۰۰ میکرولیتر غلظت نمک طلا به عصاره گیاهی، $pH = 10$ ، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴-۲۴ ساعت در سنتز نانوذرات طلا در اندازه کمتر از ۲۰ نانومتر توسط روش تاگوچی و نرم‌افزار Minitab18 به عنوان سطوح بهینه فاکتورهای غلظت، pH ، دما و زمان بیان شدند. نتایج TEM سنتز ذرات کروی در اندازه تقریبی ۱۰ نانومتر را تأیید کرده است. نتایج این پژوهش استفاده از روش تاگوچی به منظور صرفه‌جویی در هزینه و زمان، سنتز نانوذرات طلا در شرایط بهینه با هدف سنتز در اندازه‌های هدف و همچنین میزان تولید مناسب را تأیید می‌نماید. پیشنهاد می‌شود فاکتورها و سطوح دیگر نیز در بیوسنتز توسط عصاره بذر گل مغربی، بررسی شود، همچنین دیگر جنس‌های خانواده Onagraceae با وجود دارا بودن ترکیبات مؤثره و عدم ارائه تحقیقات بیوسنتز توسط آنان، نیاز به بررسی در این زمینه را دارند.

۵. نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج نشان داد عصاره گل مغربی توانایی زیادی در سنتز نانوذرات طلا دارد. علاوه بر اینکه نتایج نشان می‌دهد روش تاگوچی برای کاهش تعداد آزمایشات فاکتوریل در فرآیند تشخیص همزمان فاکتورهای موثر و بهینه بر سنتز نانوذرات طلا بسیار مؤثر و مفید است.

آزمایشات، تفسیر نتایج آزمایشات و تصحیح و تنظیم مقاله توسط نویسنده دوم صورت گرفته است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تضاد منفعی در مقاله مذکور وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

اجرای آزمایشات و نوشتن مقاله توسط نویسنده اول انجام شده است و طراحی آزمایشات، نظارت بر حسن اجرای

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای دکتر حسن کریمی مله به جهت راهنمایی‌های ارزنده ایشان در انجام آزمایشات و تفسیر نتایج حاصله اعلام می‌دارند.

منابع

1. European Commission, Nanotechnologies, Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities, 2013, p. 406.
2. Shah M, Fawcett D, Sharma S, Tripathy SK and Poinern GEJ. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials (Basel)* 2015; 8(11): 7278-308.
3. Goodsell DS, John Wiley & Sons, Biomedicine in action, 2004, 337.
4. ISO/TC 229, ISO/TS 80004-2: 2015 Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-objects, 2015.
5. Yeh Y-C, Czeran B and Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012; 4(6): 1871-80.
6. Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC and Baxter SC. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging, *Acc. Chem. Res.* 2008; 41(12): 1721-30.
7. Hu M, Chen J, Li Z-Y, Au L, Hartland GV, Li X, Marquez M and Xia Y. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2006; 35(11): 1084-94.
8. Khlebtsov N and Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40(3): 1647-71.
9. Dhand C, Dwivedi N, Loh XJ, Jie Ying AN, Verma NK and Beuerman RW. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive overview. *RSC Advances*. 2015; 105003-37.
10. Mohanpuria P, Rana NK and Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications, *J. Nanoparticle Res.* 2008; 10(3): 507-17.
11. Makarov VV, Love AJ, Sinitsyna OV, Makarova SS, Yaminsky IV and Talianky ME. "Green" nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*. 2014;

- 6(20): 35-44.
12. Swami A, Selvakannan PR, Pasricha R and Sastry M. One-step synthesis of ordered two-dimensional assemblies of silver nanoparticles by the spontaneous reduction of silver ions by pentadecylphenol langmuir monolayers. *J. Phys. Chem. B*. 2004; 108(50): 19269-75.
13. Jha AK, Prasad K, Prasad K, Kulkarni AR, Plant system: Nature's nanofactory. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2009; 73(2): 219-23.
14. Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, Pyne S and Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009; 348 (1-3): 212-6.
15. Shankar SS, Rai A, Ahmad A and Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J. Colloid Interface Sci*. 2004; 275(2): 496-502.
16. Protima R, Rauwel E. Emerging Trends in Nanoparticle Synthesis Using Plant Extracts for Biomedical Applications. *Glob J Nano*. 2017; 1(3): 555562. doi: 10.19080/GJN.2017.01.555562.
17. Singh M, Kumar M, Kalaivani R, Manikandan S and Kumaraguru AK. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013; 36(4): 407-15.
18. Akhtar MS, Panwar J and Yun YS. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chem. Eng*. 2013; 1(6): 591-602.
19. Malik P, Shankar R, Malik V, Sharma N and Mukherjee TK. Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis. *J. Nanoparticles* 2014; 1-14.
20. Dwivedi AD and Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010; 369 (1-3): 27-33.
21. Mittal AK, Chisti Y and Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv*. 2013; 346-56.
22. Li X, Xu H, Chen Z-S and Chen G. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *J. Nanomaterials* 2011; 1-16.
23. Benelli G. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review, *Parasitol. Res*. 2016; 115(1): 23-34.
24. Aljabali A, Akkam Y, Al Zoubi M, Al-Batayneh K, Al-Trad B and Abo Alrob O. Synthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of *Ziziphus zizyphus* and their Antimicrobial Activity. *Nanomaterials (Basel)*. 2018; 8(3): 174.
25. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, In: *Ultrasonics Sonochemistry* 2001; 8(3): 303-13.
26. Luque-García J and Luque de Castro M. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chem*. 2003; 22(1): 41-7.
27. Romdhane M, Gourdon C and Casamatta G. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics* 1995; 33(3): 221-7.
28. Salisová M, Toma S and Mason TJ. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochem*. 1997; 4(2): 131-4.
29. Zolfaghari B and Yegdaneh A. Recent

- advances in extraction methods of medicinal plant components. *J. Herbal Drugs*. 2010; 1(1): 50-4.
30. Granica S, Czerwińska ME, Piwowarski JP, Ziaja M and Kiss AK. Chemical Composition, Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Extracts Prepared from Aerial Parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok Obtained after Seeds Cultivation. *J. Agric. Food Chem*. 2013; 61(4): 801-10.
31. Ratz-Lyko A, Arct J, Herman A, Pytkowska K and Majewski S. The effect of enzymatic hydrolysis on the biological properties of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis* and *Nigella sativa* seedcake by-products from oil pressing. *International J. Food Science and Technol*. 2014; 49(7): 1689-98.
32. Wettasinghe M, Shahidi F and Amarowicz R. Identification and quantification of low molecular weight phenolic antioxidants in seeds of Evening primrose (*Oenothera biennis* L.), *J. Agricultural and Food Chem*. 2002; 50(5): 1267-71.
33. Yunusova SG, Yakupova LR, Ivanova AV, Safiullin RL, Galkin EG and Yunusov MS. Fatty acid composition of *oenothera biennis* seed oil during storage. Antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds* 2010; 46(2): 278-82.
34. Vines G. Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants. Plantlife International; 2004. www.plantlife.org.uk.
35. Taguchi G. Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes. *Asian Productivity Organization*. 1986. 191 pp.
36. Kumar RS, Sureshkumar K and Velraj R. Optimization of biodiesel production from *Manilkara zapota* (L.) seed oil using Taguchi method. *Fuel*. 2015; 140: 90-96. doi: 10.1016/j.fuel.2014.09.103.
37. Abootorabi Z, Poorgholami M, Hanafi-Bojd MY and Hoshyar R. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Barberry and Saffron Extracts. *Modern Care J*. 2016; 13(4): e13000.
38. Yulizar Y, Ariyanta HA and Abdurrachman L. Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum* L.) extract and its interaction study with melamine. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. 2017; 12(2): 212-8.
39. Bindhani BK, Panigrahi AK, Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Neem (*Azadirachta indica* L.) Leaf Extract and Its Biomedical Applications. *International J. Advanced Biotechnology and Res*. 2014; 5(3): 457-64.
40. Elbagory AM, Cupido CN, Meyer M and Hussein A. Large Scale Screening of Southern African Plant Extracts for the Green Synthesis of Gold Nanoparticles using Microtitre-Plate Method. *Molecules* 2016; 21(11): 1498.
41. Khalil MMH, Ismail EH and El-Magdoub F. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract, 1st Nano Updates, *Arabian J. Chem*. 2012; 5(4): 431-7.
42. Rao KJ and Paria S. Aegle marmelos leaf extract and plant surfactants mediated green synthesis of Au and Ag nanoparticles by optimizing process parameters using taguchi method. *ACS Sustainable Chem. Eng*. 2015; 3(3): 483-91.
43. Sett A, Gadewar M, Sharma P, Deka M and Bora U. Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Dillenia indica*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2016; 7(2): 025005.
44. Shabestarian H, Homayouni-Tabrizi M, Soltani M, Namvar F, Azizi S and Mohamad R.

Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. *Materials Res.* 2017; 20(1): 264-70.

45. Yasmin A, Ramesh K and Rajeshkumar S. Optimization and stabilization of gold nanoparticles by using herbal plant extract with microwave heating. *Nano Convergence.* 2014. 1(1): 12. doi: 10.1186/s40580-014-0012-8.

46. Ghahremanzadeh R, Yazdi Samadi F, Yousefi M, Green Synthesis of gold nanoparticles using three medicinal plant extracts as efficient reducing agents. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 2019; 38(1): 1-10.

47. Hong C-W. Using the Taguchi Method for Effective Market Segmentation. *Expert System Appl.* 2012; 39(5): 5451-9.

48. Yao AWL and Chi SC. Analysis and design of a Taguchi-Grey based electricity demand predictor for energy management systems. *Energy Convers. Manag.* 2004; 45(7): 1205-17.

Sivamai PTR. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Characterization by using Plant Essential Oil Menthapiperita and their Antifungal Activity against Human Pathogenic Fungi. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2014; 05(05): 1-6.

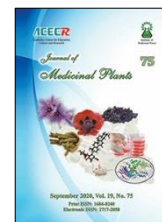
50. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X and *et all.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf. *Nanotechnol.* 2007; 18(10): 105104-15.

51. Armendariz V, Herrera I, peralta-videa JR, Jose-yacaman M, Troiani H, Santiago P. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. *J. Nanoparticle Res.* 2004; 6(4): 377-82.

52. Gericke M and Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* 2006; 83 (1-4): 132-40.

53. Joint committee on powder diffraction standards. *Analytical Chem.* 1970; 42(11): 81A-81A.

How to cite this article: Asadi M, Baghizadeh A. Optimization and characterization of biosynthesized gold nanoparticles by *Oenothera biennis* seed extract using Taguchi method. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(75): 102-117. doi: 10.29252/jmp.19.75.102



Research Article

Optimization and characterization of biosynthesized gold nanoparticles by *Oenothera biennis* seed extract using taguchi method

Mahla Asadi, Amin Baghizadeh*

Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Oenothera biennis
Biosynthesis
GNPs
Nanobiotechnology
Taguchi experiment design

ABSTRACT

Background: The process of producing nanomaterials involves the procurement of ingredients, the production of nanomaterials on commercial scale, and their use in many fields of medicine, health, agriculture, pharmacy, chemistry, and so on. **Objective:** Economical and green production of gold nanoparticles with sizes less than 20 nm by evening primrose seed extract under the influence of effective and optimized environmental factors is one of the main objectives of this study. **Methods:** Extract of evening primrose seeds were prepared by Ultrasonic-assisted extraction. HAuCl₄ solution was prepared in 1 mM and after adding to the extract plant with a specific concentration ratio and pH adjustment, the samples were incubated for a specified period. From the prepared samples, 16 samples were selected and used according to the Taguchi orthogonal array and using Minitab18 software. **Results:** The results show that among the 16 proposed recommendations based on the Taguchi method, the concentration of 200:400 µL of gold chloride to the plant extract, pH = 10, temperature of 50 °C and 24 hours are the optimum levels of each factor. The optimal sample for spectral and microscopic analysis of the Fourier Infrared (FTIR) spectrometer, X-ray diffraction (XRD), Zeta potential (ZP) and transient electron microscopy (TEM) was investigated. The results of TEM shows that the size of synthesized nanoparticles by are between 2-10 nm. **Conclusion:** biosynthesis of GNPs by EP seed extract using Taguchi method is cost effective, less time-consuming and successful.

Abbreviations: FTIR, Fourier Transform-Infrared Spectroscopy; XRD, X-Ray Diffraction; TEM, Transmission Electron Microscopy; S/N, Signal-to-Noise ratio; DLS, Dynamic light scattering; UV-Vis, Ultraviolet-Visible

* Corresponding author: a.baghizadeh@kgut.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.102](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.102)

Received 30 December 2018; Received in revised form 14 September 2019; Accepted 12 November 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)