نشریه علمی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی علوم و فناوری رنگ/ ۱۵، ۱۴۰۰(۱)، ۵۴-۴۷
نوع مقاله: پژوهشی
20.1001.1.17358779.1400.15.1.5.0

معرفی روشی جهت سنتز سبز نانوذرات کربنی و بررسی سمیت سلولی آن

فاطمه اشرافی تفرشی[۱]، سیده فاطمه قاسمی[۱]، فاطمه سادات هدی[۱]، ندا اسفندیاری[۲*].

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، صندوق‌پستی: ۱۹۸۳۹۶۹۴۱۱.

۲ـ استادیار، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، صندوق‌پستی: ۱۹۸۳۹۶۹۴۱۱.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

چکیده

در سال‌های اخیر روش‌های سنتز نقاط کربنی از پیش ماده‌های گیاهی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. در این مطالعه سنتز سبز نقاط کربنی با دو ابزار متفاوت و بررسی سمیت سلولی آن‌ها انجام شد. بررسی اندازه ذرات سنتز شده و ریخت‌شناسی با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری، میکروسکوپ نیروی اتمی و روش تفرق نور پویا مورد بررسی قرار گرفت. سپس از یک رده سلولی به منظور تعیین سمیت سلولی استفاده شد. نتایج حاصله تشکیل نقاط کربنی در محدوده ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر را با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نشان دادند. همچنان شکل کروی ذرات و اندازه متوسط آن‌ها مشخص شد. برخلاف اندازه کوچک‌تر نقاط کربنی در استفاده از اتوکلاو پوشش تفلونی نسبت به روش دیگر، هر دو روش فاقد سمیت سلولی معنی دار بر روی رده سلولی مورد آزمایش بودند. لذا هر دو روش به علت اندازه مناسب و عدم سمیت، کارایی لازم برای اهداف مختلف را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: سنتز سبز، نقاط کربنی، سمیت سلولی، روش MTT.

Introducing a Method for Green Synthesis of Carbon Nanoparticles and its Cytotoxicity

F. Ashrafi Tafreshi, S. Fatemeh Ghasemi, F. Sadat Hoda, N. Esfandiari*
Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Sahid Beheshti university, P. O. Box: 1983969411, Tehran, Iran.
Received: 01-04-2020 Accepted: 11-07-2020 Available online: 08-02-2021

Abstract

In recent years, synthesis of carbon dots from plant precursors has received great attention. In the present study, the green synthesis of carbon dots with two different methods and their cytotoxicity was compared. The size and morphological properties of carbon dots have been analyzed by facility of DLS, AFM, and TEM. Then cytotoxicity assay was performed. UV-Vis spectrum observed an absorption band at 250-280 nm suggesting the formation of carbon dots. Also, size and morphological properties of carbon dots were done. Despite the smaller size of the carbon dots in Teflon lined stainless-steel autoclave, both methods lacked significant cytotoxicity. Therefore, both methods have the necessary efficiency for different purposes due to their appropriate size and non-toxicity. J. Color Sci. Tech. 15(2021), 47-54©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Green synthesis, Carbon dots, Cytotoxicity, MTT assay.

***Corresponding author: Ne_esfandiari@sbu.ac.ir**

۱ـ مقدمه

درطول دهه اخیر گشایش روزنه‌هایی در علم نانوفناوری نقش بسزایی در پیشرفت رشته‌های مختلف داشته است [۱]. نانوذرات به طور کلی ذراتی هستند که اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر دارند و دارای یک بعد یا ابعاد بیشتری هستند. نقاط‌کربنی[1] نانو ذره‌هایی با اندازه کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر هستند که به علت مزایای منحصر بفرد در کاربردهای زیستی کارایی دارند [۲]. از جمله عوامل تاثیرگذار در خواص نقاط‌کربنی اندازه و خواص سطح آن‌ها می‌باشد. نقاط‌کربنی با دو روش بالا به پایین و پایین به بالا سنتز می‌گردند. در روش بالا به پایین از شیوه‌های فیزیکی، الکتروشیمیایی، شیمیایی، ماکروویو، هیدروترمال و در روش پایین به بالا از شیوه‌های تراکم، پلیمریزاسیون، کربونیزاسیون و غیرفعال‌سازی استفاده می‌شود [۳].

از جمله روش‌های متداول که برای سنتز نقاط‌کربنی استفاده می‌شود شامل روش هیدروترمال، مایکروویو و پیرولیز است. بسیاری از این روش‌های سنتز گران قیمت، زمان‌بر و پیچیده است بنابراین دسترسی به یک روش ایده‌آل همیشه به عنوان یک چالش محسوب شده است. از سوی دیگر استفاده از روش‌های سبز با کمک پیش ماده‌های موجود در طبیعت در کاهش دغدغه‌های زیست‌محیطی نقش به‌سزایی دارند. این نقاط‌کربنی ویژگی‌های ذاتی منبع کربنی را دارا می باشند. از سوی دیگر به دلیل خواص فلورسانس، سازگاری زیستی بالا با محیط و عدم ایجاد سمیت برای بافت و سلول زنده، مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند [۴].

در سال‌های اخیر به دلیل مزایای اشاره شده تمرکز بر سنتز نقاط‌کربنی از مواد زیست‌سازگار افزایش یافته است. جهت تولید این ذرات از جمله منابع مورد استفاده می‌توان به هندوانه، سیر، سیب‌زمینی، آب‌میوه، گوجه‌فرنگی و حتی مواد دورریز متفاوت اشاره کرد. یکی از کاربردهای مهم نقاط‌کربنی در حوزه زیست‌حسگرها است. به عنوان مثال به چندین کار پژوهشی در این زمینه می‌توان اشاره کرد. تیونگ[2] و همکارانش از پوست پرتقال جهت سنتز نقاط‌کربنی با روش پیرولیز به منظور شناسایی یون آهن [۵] استفاده کردند. شن[3] و همکارانش جهت شناسایی همین یون از سیب‌زمینی به روش هیدروترمال استفاده کرد. اشرفی[4] [۶] و همکارانش از نقاط‌کربنی سنتز شده از گل‌کلم به روش هیدروترمال جهت سنجش سموم شیمیایی استفاده کردند [۷].

همچنان این نقاط‌کربنی زیست‌سازگار با داشتن گروه‌های کربوکسیل و آب‌دوست در سطح‌شان و همچنین سطح عملکردی مناسب، پایداری بسیار خوبی در محیط آبی داشته و این قابلیت را دارند که از مسیر ادراری و کلیه‌ها دفع شوند. بنابراین یکی از موثرترین و کم خطرترین روش‌ها به منظور دارورسانی و تصویربرداری به سلول و بافت هدف هستند [۸]. که در این زمینه می‌توان به تحقیقات ژانگ[5] و همکارانش اشاره کرد که با اتصال اسید فولیک با نقاط‌کربنی جهت شناسایی اختصاصی سلول‌های سرطانی و تشخیص آن‌ها اقدام کردند [۹].

در این مطالعه از گیاه گل‌کلم از خانواده شب‌بویان (Cruciferae) به عنوان منبع‌کربنی سنتز استفاده شد. این گیاه شامل ترکیباتی مثل ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، مواد معدنی و گلوکوزینولات‌ها می‌باشد. در این میان گلوکوزینولات‌ها یکی از مهم‌ترین مواد شیمیایی گیاهی موجود در محصولات شب‌بویان هستند که ترکیبات حاوی گوگرد با فعالیت ضدسرطانی دارند و مسئول طعم تند گیاهان شناخته شده است. همانطورکه اشاره گردید روش‌های سنتز اغلب پیچیده و نیاز به امکانات خاص دارد لذا هدف از این تحقیق معرفی یک روش آسان و دردسترس با حداقل امکانات و مقایسه آن از لحاظ کیفیت نقاط‌کربنی سنتز شده و همچنان زیست‌سازگاری با روش‌های رایج است. منبع این سنتز هیدروترمال گیاه گل‌کلم است که با کمک دو ابزار مختلف فرآیند سنتز انجام شد. یکی از این ابزارها اتوکلاو پوشش تفلونی و دیگری ارلن ساختگی است. که هر دو ابزار بصورت موازی جهت بررسی کیفیت سنتز ارلن ساختگی مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از سنتز نقاط‌کربنی و بررسی اندازه آن‌ها، مشخصه یابی با کمک دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی[6] و روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری با وضوح بالا[7]، میکروسکوپ نیروی اتمی[8] و روش تفرق نور پویا[9] مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت نقاط‌کربنی حاصل از دو روش سنتز بر روی رده سلول فیبروبلاست موشی NIH/3T3 با کمک MTT مورد بررسی قرار گرفت.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

در این تحقیق میوه گل‌کلم از سطح استان تهران خریداری شد. بافر فسفات (PBS, Phosphate buffered saline) با pH =۷، نمک MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazo- lium Bromide] و دی متیل سولفواکساید (DMSO) از شرکت سیگما، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، سرم جنین گاوی (FBS, Fetal Bovine Serum)، محیط کشت سلولی RPMI (Roswell

1- Carbon dots
2- Tiong
3- Shen
4- Ashrafi
5- Zhang
6- UV-Vis Spectrometer
7- High-Resolution Electron microscope Transmission
8- Atomic force microscope
9- Dynamic light scattering

Park Memorial Institute و آنزیم تریپسین به همراه ۰٫۰۵٪ EDTA از شرکت Gibco خریداری شد. فلاسک، فالکن استریل جهت آزمون‌های سلولی و پلیت سلولی ۹۶ خانه هم از SPL تهیه گردید. رده سلول فیبروبلاست موشی NIH/3T3 از پژوهشگاه رویان خریداری شد.

۲ـ۲ـ سنتز سبز نقاط‌کربنی

بدین ترتیب پس از تهیه گل‌کلم و شستشو با آب مقطر با کمک آب میوه‌گیری عصاره آن تهیه شد و پالپ‌های آن با کمک صافی پارچه‌ای جداسازی گردید. سپس از آب گل‌کلم جهت سنتز هیدروترمال نقاط‌کربنی استفاده گردید. در این تحقیق ارلنی ساخته شد که درب آن بصورت کامل و پیچی بسته می‌شد. سپس با کمک نخ‌نسوز در نقاط تعبیه شده درب ارلن کاملا محکم بسته شد (شکل ۱- الف). در کنار این ارلن ساختگی به منظور بررسی و مقایسه درستی سنتز از اتوکلاو پوشش تفلونی رایج استفاده گردید (شکل ۱- ب). سپس آب گل‌کلم تهیه شده یک بار بصورت مجزا در ارلن ساختگی ریخته شد و درب آن پیچ شد و سپس به کمک نخ نسوز درب کاملا محکم بر روی ارلن بسته شد تا تلاش گردد از خروج بخارات از ظرف جلوگیری به‌عمل آید و شرایط کربونیزیشن فراهم گردد. با توجه بر تحقیقات صورت گرفته قبلی [۷] دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت جهت سنتز در نظر گرفته شد. لذا ارلن در آون در شرایط ذکر شده قرار داده شد (شکل ۲ (الف)). یکبار دیگر هم آب تهیه شده از گل‌کلم در اتوکلاو پوشش تفلونی در آون در همان دما و زمان اشاره شده در بالا قرار داده شد (شکل ۲ (ب)). پس از سپری شدن زمان لازم ارلن و اتوکلاو تفلونی از آون خارج شدند و پس از سرد شدن درب آن‌ها باز گردید و محلول قهوه‌ای رنگ تیره خارج و با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول شفاف بالایی جداسازی و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های آتی نگهداری شد.

شکل ۱: بررسی روش‌های سنتز نقاط‌کربنی، الف) ارلن ساختگی، ب) اتوکلاو پوشش تفلونی.

شکل ۲: تهیه آب گل‌کلم و سپس حرارت دادن در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۵ ساعت که نتیجه آن کربونیزه شدن و به دست آمدن محلول قهوه‌ای تیره است. الف) ارلن ساختگی و ب) اتوکلاو پوشش تفلونی.

۲ـ۳ـ مشخصه‌یابی نقاط‌کربنی سنتز شده

نقاط کربنی سنتز شده اغلب دارای جذب فرابنفش ـ مرئی قابل توجهی می‌باشند بدین منظور نقاط‌کربنی سنتز شده از آب گل‌کلم در هر دو روش در ابتدا توسط دستگاه طیف‌سنج فرا بنفش ـ مرئی مدل PerkinElmer Ls 45. مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه ذرات سنتز شده در هر دو روش توسط آزمون پراکندگی نور دینامیکی که برای اندازه‌گیری اندازه ذرات سنتز شده در محیط مایع است، مورد سنجش قرار گرفتند. انتشار نور دینامیکی با استفاده از دستگاه Malvern ساخت کشور انگلستان انجام شد. همچنین شکل و ریخت‌شناسی سطحی نانوذرات سنتز شده در هر دو روش توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (Nanosurf ساخت کشورسوئیس) و میکروسکوپ الکترونی عبوری با وضوح بالا (FEI TEC9G20 ساخت کشور هلند) بررسی شدند. در تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی یک قطره از محلول نقاط‌کربنی روی صفحه میکا که لایه رویی آن جدا شده بود قرار داده شد و سپس تا خشک شدن کامل آن در دمای اتاق و دور از گرد و غبار قرار داده شد. در نهایت نمونه خشک شده توسط میکروسکوپ مذکور بررسی گردید.

۲ـ۴ـ بررسی سمیت سلولی نقاط‌کربنی سنتزشده

رده سلول نرمال فیبروبلاست موشی به منظور سنجش سمیت در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS, FetalBovin Serum) و ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵٪ نگه‌داری گردید. جهت شمارش سلول‌ها محیط کشت رویی فلاسک تخلیه گشته و با بافر فسفات شست و شو انجام شد. پس از خارج کردن بافر به منظور جداشدن سلول‌ها از کف ظرف، آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه گردید. سپس محیط کشت حاوی FBS به فلاسک اضافه گردید تا اثر آنزیم تریپسین خنثی گردد. پس از این مرحله، محلول جداسازی گردید و پس از سانتریفیوژ محیط کشت رویی تخلیه و محیط جدید به آن اضافه شد و سلول‌های رسوب داده شده در محیط جدید پیپتاژ شدند. به دنبال آن، جهت بررسی سمیت نقاط کربن سنتز شده، به میزان $۱۰^{۴} \times ۵$ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نانوذرات سنتز شده همراه با محیط کشت کامل در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و $۲۰۰۰\ \mu g\ ml^{-1}$ در چاهک‌های پلیت جایگزین شد و به انکوباتور منتقل گردید. آزمایش طوری طراحی گردید که از هر غلظتی سه مرتبه تکرار گردد. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت هر پلیت تخلیه و سه مرحله با PBS شست وشو داده شد. در نهایت میزان سمیت با روش MTT تعیین گردید و آزمایش در سه تکرار مجزا انجام شد. به این ترتیب ۵۰ میلی‌گرم از نمک MTT با نسبت ۱۰٪ به محیط کشت کامل در پلیت اضافه و سپس به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. در نهایت محیط هر چاهک خارج گشته و دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. در نهایت جذب آن با دستگاه الایزاریدر (BIOTEK ELX 80) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بر روی رفرنس ۶۳۰ خوانده شد.

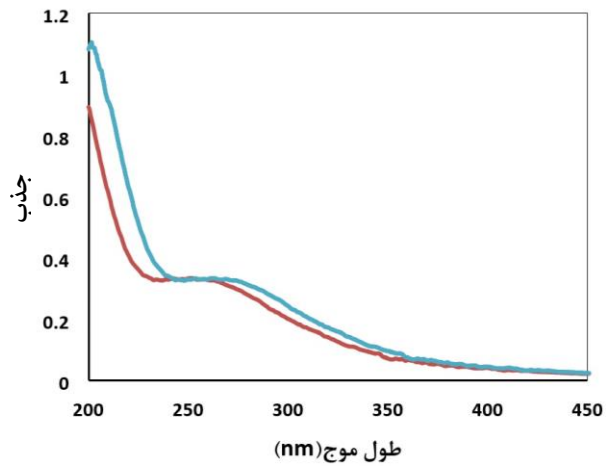
۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ مقایسه دو روش سنتز

در سال‌های اخیر استفاده از شیمی سبز در تولید نانوذرات رو به افزایش است [۱۰]. در این پژوهش دو حالت جهت سنتز هیدروترمال نقاط‌کربنی در نظر گرفته شد که باهم مقایسه شدند. در حالت اول روش سنتز در ارلن ساختگی درپوش‌دار که از قبل تهیه شده بود و در حالت دوم روش معمول که با کمک اتوکلاو پوشش تفلونی انجام می‌گیرد. روش هیدروترمال به‌عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های از پایین به بالا برای تولید نقاط‌کربنی شناخته شده است. هیدروترمال به عنوان روشی بر پایه شکل‌گیری و رشد بلورها در اثر واکنش‌های شیمیایی و تغییرات قابلیت انحلال مواد در یک محلول آبی، تحت دما و فشار مناسب شناخته می‌شود [۱۱]. روش هیدروترمال در مقایسه با سایر روش‌های مرسوم مزایایی دارد که می‌توان به ذخیره انرژی، سادگی، قیمت ارزان، کاهش آلودگی‌های احتمالی (چون واکنش در محیط بسته انجام می‌شود)، پخش‌شدگی بهتر، سرعت بالای واکنش، تنظیم ریخت‌شناسی بهینه، دمای عملیاتی کمتر در حضور حلال مناسب و غیره اشاره کرد. برخلاف تمام مزایا در این روش نیاز به اتوکلاو پوشش تفلونی اجتناب‌ناپذیر است. این اتوکلاو جهت فراهم آوردن دمای بالا توام با فشار بالا می‌باشد که در نتیجه کربنی‌شدن به صورت بهینه انجام می‌گردد. ولی دسترسی به این اتوکلاو مشکل و هزینه‌بر است. هدف از این پژوهش معرفی یک روش ساده و ارزان‌قیمت و معرفی یک ابزار در دسترس جهت سنتز نقاط‌کربنی می‌باشد.

از گل‌کلم به عنوان منبع کربن برای سنتز نقاط‌کربنی در دو حالت استفاده از اتوکلاو پوشش تفلونی و ارلن ساختگی استفاده گردید. در نهایت پس از سپری شدن سنتز طی ۵ ساعت ماده قهوه‌ای رنگ تیره‌ای حاصل شد که نشان‌دهنده کربنی‌شدن هر دو روش سنتز بود. خواص اپتیکی نقاط‌کربنی ساخته شده در هر دو روش توسط آزمون UV-Vis مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ مشهود است نمونه‌های سنتزی در هر دو روش دارای جذب در ناحیه ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر است که بدین ترتیب سنتز نقاط‌کربنی را به اثبات می‌رساند که این طیف جذبی با سایر مقالات نقاط کربنی مطابقت دارد [۷].

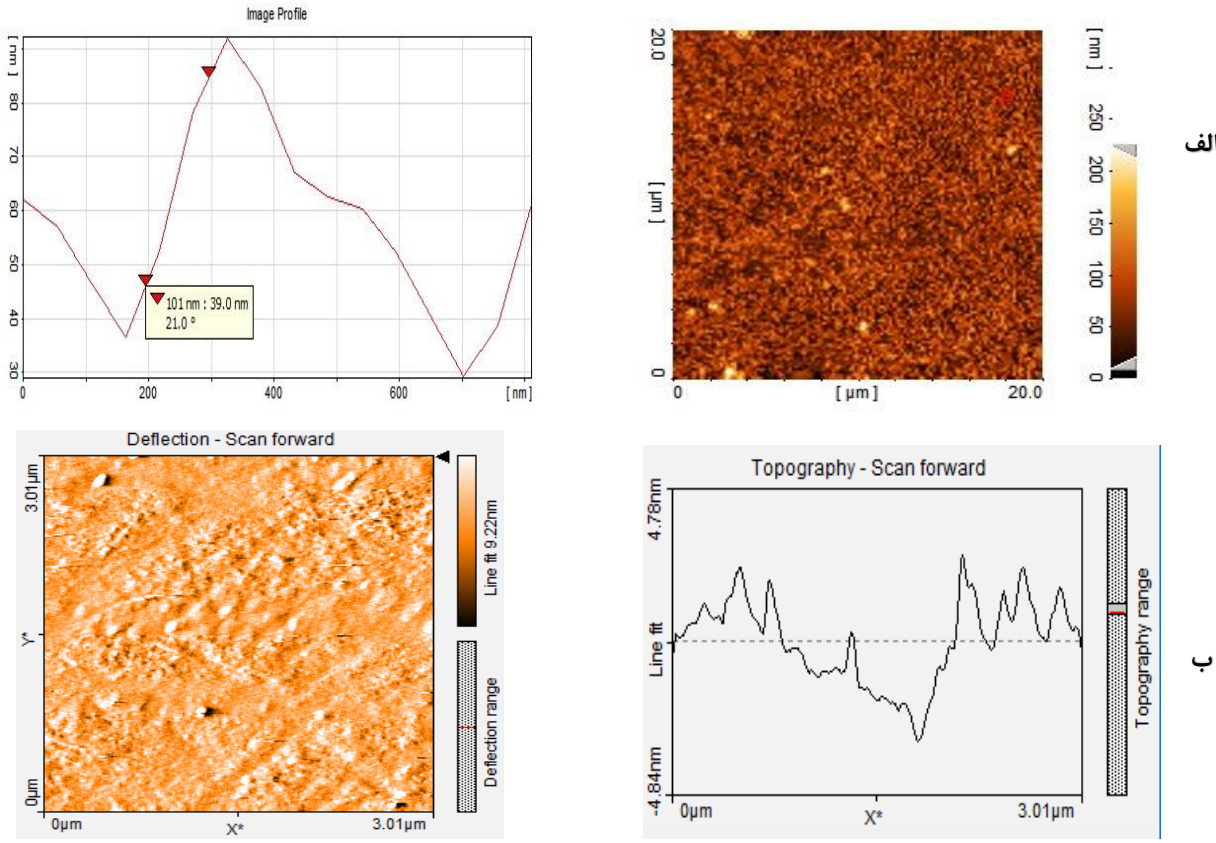
سپس نقاط‌کربنی سنتز در هر دو روش با استفاده از آزمون‌های HRTEM، DLS و AFM مشخصه‌یابی شد. شکل ۴ (الف) و شکل ۴ (ب) نشان دهنده ریخت کروی ذرات سنتز شده است که توسط



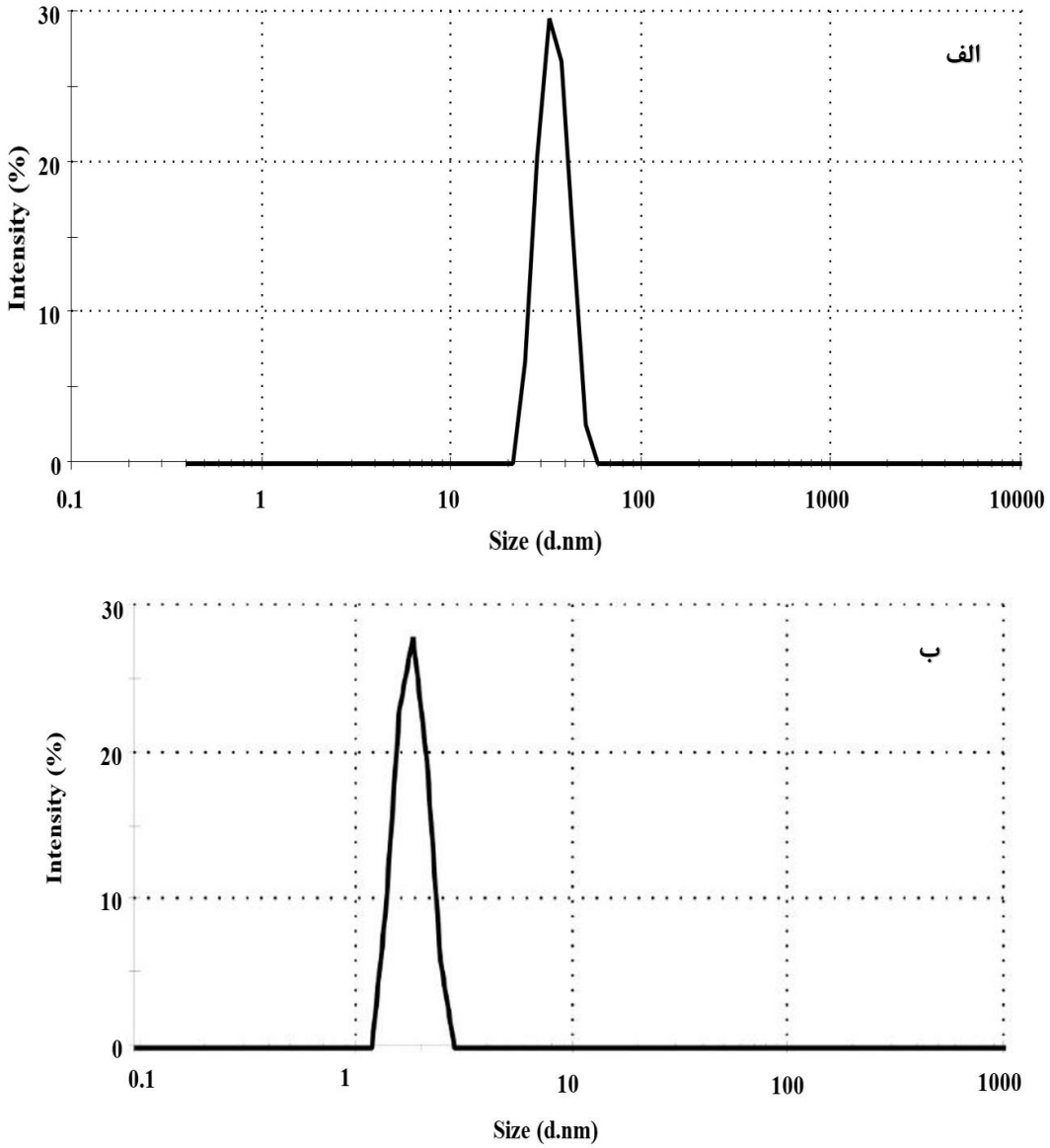
شکل ۳: طیف جذبی نقاط‌کربنی در سنتز در ارلن ساختگی (آبی) و اتوکلاو سنتزی (قرمز).

میکروسکوپ AFM مشاهده شده بود. در سنتزی که در ارلن صورت گرفت، توزیع اندازه ذرات حدود ۳۹ نانومتر و در سنتزی که توسط اتوکلاو پوشش تفلونی صورت گرفت، اندازه ذرات حدودا ۴ نانومتر بود.

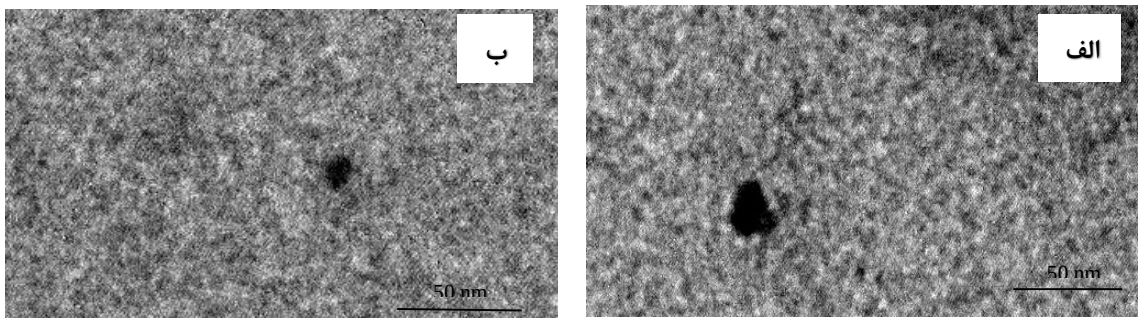
همچنین در پژوهش‌های دیگر بر روی نقاط‌کربنی سبز تصویر AFM توزیع حدودا زیر ۱۰ نانومتر که مربوط به ۳-۴ لایه گرافیت بود را نشان دادند. که بعضا برخی از این نمونه‌ها نقاط‌کربنی در اندازه متفاوت‌اند و علت آن می‌تواند ناشی از انباشته شدن ذرات روی یکدیگر باشد [۷]. همچنین آزمون پراکندگی نورمکانیکی DLS نانو ذرات سنتز شده توسط ارلن در اندازه‌ای حدود ۳۸ نانومتر هستند (شکل ۵ (الف)). اما در روشی که با اتوکلاو بود اندازه‌ی نانو ذرات سنتز شده بین محدوده ۵-۴ نانومتر به دست آمد (شکل ۵ (ب)) همچنین در گزارش‌های پیشین نتایج DLS در مورد نقاط‌کربنی سبز میانگین قطری زیر ۱۰ نانومتر را داشتند و یا در برخی تحقیقات اندازه‌های کوچک‌تر و در حدود ۲-۱ نانومتر را نشان می‌دادند [۱۲]. به منظور بررسی دقیق‌تر اندازه و ریخت ذرات سنتز شده از آزمون HRTEM در این تحقیق استفاده شد. نتایج HRTEM حاکی از ساختار کروی نقاط‌کربنی سنتز شده در هر دو روش مختلف بود (شکل ۶). از سوی دیگر اندازه ذرات سنتز شده به دست آمده از هر دو روش سنتز با آزمون‌های قبلی در این تحقیق هم‌خوانی داشت.



شکل ۴: مشخصه یابی نقاط‌کربنی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) الف) ارلن ساختگی و ب) اتوکلاو پوشش تفلونی.



شکل ۵: مشخصه‌یابی نقاط‌کربن با استفاده روش تفرق نور پویا (DLS) الف) ارلن ساختگی و ب) اتوکلاو پوشش تفلونی.

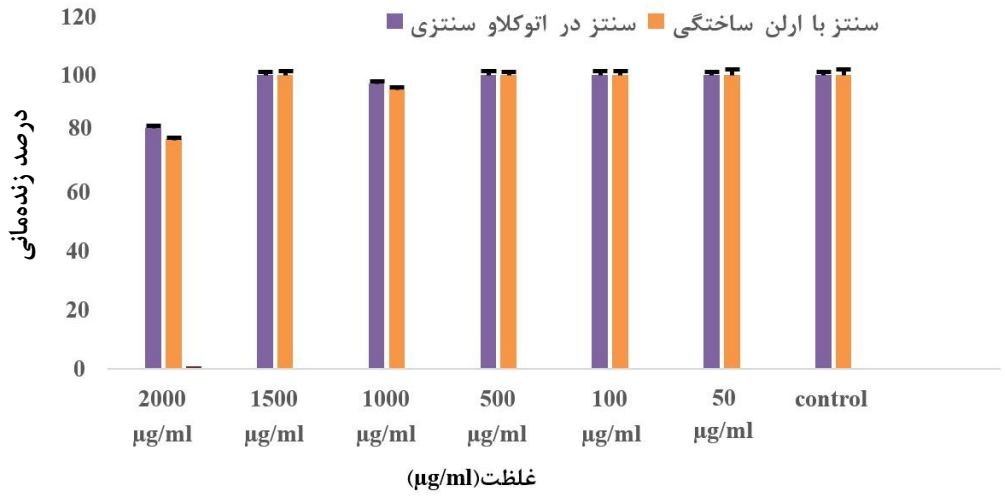


شکل ۶: تصویر HRTEM نقاط‌کربنی سنتز شده الف) ارلن ساختگی و ب) اتوکلاو پوشش تفلونی.

نتایج حاصل از مشخصه‌یابی نقاط‌کربنی سنتز شده حاکی از این است که روش سنتز هیدروترمال با ارلن درپوش‌دار ساختگی از لحاظ اندازه بزرگتر از روش اتوکلاو پوشش تفلونی است. پیش‌بینی می‌گردد که احتمالا در روشی که از اتوکلاو پوشش تفلونی استفاده می‌شود به دلیل فشار و دمای بالا و همچنین یکنواختی آن ، نسبت به روشی که در ارلن صورت گرفت کربنی شدن بهینه‌تر و بنابراین اندازه ذرات اندکی کوچک‌تر است. البته در برخی از گزارش‌های قبلی مانند استفاده از روش هیدروترمال رنگدانه‌های سرامیکی بر پایه اکسید کرم ذراتی با اندازه متوسط ۸۸ نانومتر هم تولید شده است که از اندازه ذرات سنتزی در ارلن به مراتب خیلی بیشتر است [۱۳]. از سوی دیگر در پژوهشی دیگر اندازه نقاط‌کربنی سنتزی از گیاه سیر به روش هیدروترمال معادل ۱۱ نانومتر تخمین زده شد [۱۴]. لذا مقایسه با تحقیقات پیشین حاکی از این قضیه است که شاید اندازه ذرات سنتز شده با روش اتوکلاو سنتزی قدری کوچک‌تر از روش سنتز در ارلن ساختگی باشد ولی این دو روش قابلیت رقابت تنگاتنگ را با هم دارا هستند.

۳ـ۲ـ سمیت سلولی

هدف کلی آزمون MTT به منظور بررسی سلول‌های زنده است. اساس این روش مبتنی بر فعالیت میتوکندری می‌باشد که در سلول‌های زنده به صورت پایدار است. بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده ارتباط مستقیمی با فعالیت میتوکندری دارند. MTT پودر نمک تترازولیوم زرد رنگ محلول درآب است که توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده شکسته و با تولید NADH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگی به نام فورمازان می‌شود. این رسوب به وسیله دی متیل سولفوکساید (DMSO) قابلیت انحلال درآب را دارد. از سویی دیگر سلول‌های مرده چنین توانایی را نداشته و بنابراین سیگنالی را نشان نمی‌دهند. هرچه سلول فعال‌تر میزان رنگ آن نیز بیشتر خواهد شد. شکل ۷ نتایج MTT به دست آمده از سلول فیبروبلاست موشی NTH/3T3 را نشان می‌دهد که نقاط‌کربنی سنتز شده با دو روش مختلف در غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ۲۰۰۰ µg/ml مورد بررسی قرار گرفتند. نانوذرات معمولا از طریق اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند و در سیتوپلاسم تجمع می‌یابند. همین‌طور پودر نمک تترازالیوم محلول MTT نیز قادر به نفوذ به درون سلول است، سپس پس از ۴۸ ساعت بررسی آن با دستگاه الایزاریدر صورت گرفت. همان طور که در نمودار نشان داده می‌شود از کم‌ترین غلظت یعنی ۵۰ µg/ml تا غلظت ۱۵۰۰ µg/ml هیچگونه سمیتی برای سلول در هر دو روش سنتز مشاهده نشد و تنها در بالاترین غلظت یعنی ۲۰۰۰ µg/ml سمیت بسیار کمی نشان داده شد. و بدین ترتیب سازگاری بالایی مشاهده شد که تقریبا ۸۰٪ سلول‌ها بعد از تیمار با نقاط‌کربنی سنتز شده با هر دو روش زنده مانده بودند. این یافته در مطالعات محققان دیگر به وضوح مشاهده می‌شود که نقاط‌کربنی سبز چنین سازگاری زیستی بالایی با سلول‌های انسانی دارند و اکثرا به مقدار خیلی ناچیز، آن هم در طولانی مدت، برای سلول سمی هستند و یا اینکه اثرات سمیت را نشان نمی‌دهند [۱۵].



شکل ۷ : نتایج حاصل از MTT با روش سنتز با ارلن ساختگی (سبز) و اتوکلاو پوشش تفلونی (نارنجی).

۴ـ نتیجه‌گیری

این پژوهش با تمرکز بر روی روش سنتز هیدروترمال نقاط‌کربنی استوار بود. یک روش متداول سنتز هیدروترمال استفاده از اتوکلاو پوشش تفلونی است. در این تحقیق شرایط اتوکلاو پوشش تفلونی، شبیه‌سازی در یک ابزار در دسترس شد. بدین منظور از یک ارلن آزمایشگاهی استفاده گردید که دربی برای آن درنظر گرفته شده بود که بطور محکم بر روی آن پیچ می‌گردید و از سوی دیگر برای جلوگیری از خروج بخارات در حین سنتز از نخ نسوز کمک گرفته شد. هدف از این آزمایش جایگزینی اتوکلاو پوشش تفلونی که از قیمت بالایی برخوردار بود با یک روش جایگزین بود. سپس پس از فراهم آوردن شرایط سنتز یکسان برای هر دو حالت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت نتایج از لحاظ اندازه ذرات سنتز شده با سه روش AFM ، DLS و HRTEM مقایسه گردید. نتایج موید این قضیه بود که اندازه ذرات سنتز شده در روش ساختگی اندکی بزرگ‌تر از اتوکلاو پوشش تفلونی بود ولی همچنان در محدوده ذرات نانو و زیر ۱۰۰ نانومتر بود. نتایج آزمون‌های سمیت سلولی نشان داد که نقاط‌کربنی سنتز شده در هر دو روش سنتزی فاقد سمیت سلولی قابل مشاهده‌ای مخصوصا در غلظت‌های متعارف استفاده از این ذرات بودند. چنین خصوصیت و ویژگی این نقاط‌کربنی به علت داشتن پیش‌سازهای طبیعی و تجدیدپذیر بوده و ثابت کننده این موضوع است که نقاط کربنی سبز با سمیت بسیار کم و یا حتی بدون سمیت، این امکان را فراهم آورده است تا به عنوان حسگرهای دارورسان، به منظور رسیدن به سلول و بافت، هدف خاص طراحی و سنتز شوند. بنابراین استفاده از این ارلن در مواردی که دسترسی به اتوکلاو پوشش تفلونی فراهم نباشد به عنوان یک ابزار جهت سنتز هیدروترمال قابل توصیه است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از داوران گرامی که با پیشنهادات ارزشمندشان در بهبود این مقاله نقش به سزایی ایفا کردند.

۵ـ مراجع

1. P. Gong, Z. Lei, Y. Xiang-ai, L. Xicheng, D. Xiuli, Z. Qiao, T. Zhenzhen, S. Jing, L. Zhe, Y. Jinmao, Multifunctional fluorescent PEGylated fluorinated graphene for targeted drug delivery: An experiment and DFT study. *Dyes Pigm.* 162(2019), 573-582.
2. N. Esfandiari, Z. Bagheri, H. Ehtesabi, Z. Fatahi, H. Tavana, H. Latifi, H. Effect of carbonization degree of carbon dots on cytotoxicity and photo-induced toxicity to cells. *Heliyon.* 5(2019), Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02940.
3. K. J. Mintz, Y. Zhou, R. M. Leblanc, Recent development of carbon quantum dots regarding their optical properties, photoluminescence mechanism, and core structure. *Nanoscale.* 11(2019), 4634-4652.
4. S. Sharma, S. K. Mehta, A. O. Ibhadon, S. K. Kansal, Fabrication of novel carbon quantum dots modified bismuth oxide (α-Bi_2O_3/C-dots): material properties and catalytic applications. *J. Colloid Interface Sci.* 533(2019), 227-237.
5. A. N. L. Tiong, N. K. Wong, J. F. Y. Fong, X. Tan, S. M. Ng, A sustainable alternative to synthesis optical sensing receptor for the detection of metal ions. *Opt. Mater.* 40(2015), 132-138.
6. J. Shen, S. Shang, X. Chen, D. Wang, Y. Cai, Facile synthesis of fluorescence carbon dots from sweet potato for Fe3+ sensing and cell imaging. *Mater. Sci. Eng.* C. 76(2017), 856-864.
7. F. Ashrafi Tafreshi, Z. Fatahi, S. F. Ghasemi, A. Taherian, N. Esfandiari, Ultrasensitive fluorescent detection of pesticides in real sample by using green carbon dots. *Plos one.* 15(2020), Doi: 10.1371/journal.pone.0230646.
8. A. Myint, W. K. Rhim, J. M. Nam, J. Kim, Y. Lee, Water-soluble, lignin-derived carbon dots with high fluorescent emissions and their applications in bioimaging. *J Ind Eng Chem.* 66(2018), 387-395.
9. J. Zhang, X. Zhao, M. Xian, C. Dong, S. Shuang, Folic acid-conjugated green luminescent carbon dots as a nanoprobe for identifying folate receptor-positive cancer cells. *Talanta.* 183(2018), 39-47.
10. م. قراگوزلو، س. نقیبی، سنتز سبز نانوذرات اکسید روی از طریق تجزیه حرارتی کمپلکس روی بهدست آمده از فنیل آلانین. نشریه علمی علوم و فناوری رنگ. (۱۳۹۶)۱۱، ۲۶۳-۲۵۷.
11. X. Zheng, G. Ding, H. Wang, G. Cui, P. Zhang, One-step hydrothermal synthesis of carbon dots-polymer composites with solid-state photoluminescence. *Mater. Lett.* 238(2029), 22-25.
12. Z. Fatahi, N. Esfandiari, H. Ehtesabi, Z. Bagheri, H. Tavana, Z. Ranjbar, H. Latifi, Physicochemical and cytotoxicity analysis of green synthesis carbon dots for cell imaging. *Excli. J.* 18 Doi:10.17179/excli2019-1465, 2019.
13. ع. بابایی دارانی، م. خواجه‌امنیان، س. اردشیری، ح. زارع، ساخت و بررسی مشخصات ساختاری نانورنگدانه های سرامیکی Cr_2O_3، $CoCr_2O_4$ و Al_2O_3-$2Cr_2O_3$ به روش هیدروترمال. *نشریه علمی علوم و فناوری رنگ.* (۱۳۹۷)۱۲، ۲۸۰-۲۷۱.
14. S. Zhao, M. Lan, X. Zhu, H. Xue, T.W. Ng, X. Meng, C.S. Lee, P. Wang, W. Zhang, Green synthesis of bifunctional fluorescent carbon dots from garlic for cellular imaging and free radical scavenging. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7(2015), 17054-17060.
15. L. Li, L. Li, C. P. Chen, F. Cui, Green synthesis of nitrogen-doped carbon dots from ginkgo fruits and the application in cell imaging. *Inorg. Chem. Commun.* 18(2017), 227-231.