

Paper Type: Original Article



The Composition of Essential Oil and Antimicrobial Properties of *Vaccaria hispanica* Extracts and Its Green-Synthesized Zinc Nanoparticles

Golara Golmohammadi¹, Rasool Asghari Zakaria^{*2} , Azadeh Hekmat¹, Sakineh Padyab²

¹Department of Biology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

²Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran;*(Professor: Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir).

Citation:

Golmohammadi, G., Asghari Zakaria, R., Hekmat, A. & Padyab, S. (2025). The composition of essential oil and antimicrobial properties of *Vaccaria hispanica* extracts and its green-synthesized zinc nanoparticles. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 38 (Issue No. 1), PP. 87-105.

Received: 2024.04.26

Accepted: 2024.06.05

Abstract

Introduction: Utilizing plant extracts for synthesizing nanoparticles has garnered significant interest as an eco-friendly approach. This research was conducted to investigate the green synthesis of zinc nanoparticles using the aerial parts extract of the cow cockle (*Vaccaria hispanica*) and determine their antibacterial properties.

Methods: The size and structure of synthesized zinc nanoparticles were confirmed using a scanning electron microscope (SEM), dynamic light scattering (DLS) and Fourier transform infrared spectrometer (FTIR). Also, the antibacterial properties of the methanolic and aqueous extracts of cow cockle aerial parts and seeds were investigated on the bacteria by disc diffusion method using tetracycline as a control.

Results: Analysis of variance showed that the size of the inhibition zone in the plates containing two kinds of gram-negative (*Escherichia coli*) and gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria was significantly affected by the species of bacteria, extraction method (aqueous and alcoholic), different concentrations of the extract and the interaction effect of the bacteria species and the concentration of the extracts. *E. coli* showed a larger inhibition zone than *S. aureus*, which indicated its greater sensitivity to cow cockle extract. Antibacterial properties of cow cockle aerial parts and seed extracts increased significantly with increasing concentration. Also, the size of the inhibition zone in the plates containing *E. coli* and *S. aureus* bacteria increased significantly by increasing the concentration of zinc nanoparticles from 0.5 to 2 mg/mL.

Conclusion: In general, aerial parts and seed extracts of *V. hispanica* and green-synthesized nanoparticles showed good antibacterial properties against *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

Keywords: Antibacterial Properties, Green Synthesis, Minimum Inhibitory Concentration, *Vaccaria hispanica*, Zinc

ترکیبات اسانس و خواص ضد میکروبی عصاره گیاه جغجگ (*Vaccaria hispanica*) و نانو ذرات روی سنتز شده با آن

گل‌آرا گل محمدی^۱، رسول اصغری زکریا^۲، آزاده حکمت^۳، سکینه پادیاب^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
^۲ استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
^۳ استادیار بیوفیزیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
^۴ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
 (*نویسنده مسئول: r-asghari@uma.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۷

چکیده

مقدمه: استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات به عنوان یک رویکرد سبز مورد توجه بوده است. این تحقیق با هدف بررسی سنتز سبز نانوذرات روی با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جغجگ (*Vaccaria hispanica*) و تعیین خواص ضد باکتریایی آن‌ها انجام شد.

روش‌ها: اندازه و ساختار نانوذرات روی سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) تأیید شد. همچنین خواص ضد باکتریایی عصاره متانولی و آبی اندام هوایی و بذر جغجگ نیز روی این باکتری‌ها به روش انتشار دیسک با استفاده از تتراسایکلین به عنوان شاهد بررسی شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اندازه ناحیه بازدارندگی در پلیت‌های حاوی دو نوع باکتری گرم منفی (*E. coli*) و گرم مثبت (*S. aureus*) به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع باکتری، روش استخراج (آبی و الکلی)، غلظت‌های مختلف عصاره و اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره قرار گرفت. در باکتری *E. coli* ناحیه مهار بزرگتری نسبت به *S. aureus* مشاهده شد که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر آن بود. خواص ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی و دانه جغجگ با افزایش غلظت به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین اندازه هاله در محیط حاوی باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* با افزایش غلظت نانوذرات روی از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور قابل توجهی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: در مجموع، عصاره اندام هوایی و دانه جغجگ و نانوذرات روی سنتز شده خواص ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای در برابر باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* نشان دادند.

کلیدواژه‌ها: جغجگ، حداقل غلظت بازدارنده، خواص ضد باکتریایی، سنتز سبز، نانوذرات روی

مقدمه

عصاره‌های گیاهی برای تولید نانوذرات مختلف فلزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از دلایل عمده استفاده از عصاره گیاهان برای تولید نانوذرات، ارزان بودن، غیرسمی بودن آن‌ها و تولید نانوذرات با خلوص بالا است. همچنین نانوذراتی که از گیاهان به دست می‌آیند دارای پایداری بیشتر و همچنین توزیع اندازه یکنواخت‌تر ذرات نسبت به روش‌های دیگر است [1]. سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی یکی از رویکردهای مهم در تولید این مواد است، زیرا ترکیبات ثانویه، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و کوآنزیم‌های موجود در گیاهان پتانسیل احیای نمک فلزات و تبدیل آن‌ها به نانوذرات را دارند. نانوذرات فلزی تولید شده به روش سبز، دارای طیف وسیعی از کاربردهای دارویی هستند. از جمله این کاربردها می‌توان به انتقال دارو یا ژن، تشخیص بیماری‌ها یا پروتئین‌ها و مهندسی بافت اشاره کرد [2]. روش‌های مرسوم سنتز نانوذرات اغلب شامل استفاده از مواد شیمیایی سمی و فرآیندهای انرژی‌بر است که نگرانی‌هایی را در مورد پایداری محیط‌زیست و سلامت انسان ایجاد می‌کند. در نتیجه، علاقه فزاینده‌ای به توسعه رویکردهای سنتز سازگار با محیط زیست یا «سبز» با استفاده از منابع طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی وجود دارد [3].

نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) دارای ویژگی‌های منحصر به فرد شیمیایی، فیزیکی، نوری و بیولوژیکی هستند. این نانوذرات به طور گسترده در بسیاری از کاربردها مانند محیط زیست، کاتالیزور، نوری، کشاورزی و زیست‌پزشکی استفاده می‌شود. نانوذرات ZnO عمدتاً به عنوان عوامل ضد میکروبی در پانسمان زخم، منسوجات و بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود. به طور کلی، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات به اندازه و شکل آن‌ها بستگی دارد. نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات، واکنش‌پذیری آن‌ها را افزایش می‌دهد، که به نوبه خود اثرات ضد میکروبی آن‌ها را تقویت می‌کند. در حال حاضر، به دلیل افزایش باکتری‌های مقاوم، محققان بر روی توسعه NPs به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها تمرکز دارند [4]. به طور معمول، نانوذرات ZnO با خلوص بالا را می‌توان در مقیاس بزرگ از طریق روش‌های شیمیایی و فیزیکی تولید کرد. به رغم مزایای این روش‌ها، به دلیل استفاده از مواد شیمیایی در فرآیندهای سنتز که باعث تولید ضایعات خطرناک می‌شود و به سمیت ذاتی نانوذرات کمک می‌کند، اشکالات عمده‌ای در رابطه با هزینه تولید بالا و اثرات زیست‌محیطی آن‌ها وجود دارد. در نتیجه، علاقه به توسعه یک روش سنتز زیست‌محیطی بی‌خطر، زیست سازگار، ساده و ارزان‌تر این نانوذرات افزایش یافته است [5]، [6]. به عنوان مثال، استفاده از ریزموجوداتی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها برای سنتز نانوذرات ZnO و نیز گیاهان جایگزین بسیار خوبی برای روش‌های سنتز شیمیایی و فیزیکی معمولی است [7]، [8]، [9].

گیاه جفجفک (*Vaccaria hispanica*) گیاهی علفی، یک‌ساله دارویی و زینتی متعلق به تیره *Caryophyllaceae* است. این گونه در آسیا، جنوب آفریقا، استرالیا، آمریکای شمالی و جنوبی رشد می‌کند [10]. جفجفک در چین و هند به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود و از دانه آن برای درمان بیماری تکرر ادرار، التهاب و ترشح شیر استفاده می‌شود [11]. دانه‌ها دارای نشاسته، پپتیدهای حلقوی و ساپونین‌های بیس‌دسموزیدی دارای خواص ضد سرطانی هستند. این گیاه دارای خواص ضد HIV، ضدالتهابی، ضد باکتریایی و همچنین ضد قارچی است [12]. ساپونین به عنوان یک ماده مغذی دارای خاصیت ضد کلسترولی و ضد قارچی است و از طرفی باعث تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود. در صنعت نیز از ساپونین‌ها به عنوان امولسیون کننده، تثبیت کننده، مواد کف کننده و مواد افزودنی در شامپوها استفاده می‌شود [13]، [14]. این گیاه بذر فراوانی تولید می‌کند که بذور آن از نظر فیزیکی شبیه کلزا است اما از نظر ترکیب متفاوت است [12]، [15]. ترکیبات مفید بذر و ویژگی‌های زراعی مطلوب علاقه به اهلی‌سازی جفجفک را برای استفاده به عنوان یک محصول ایجاد کرده است. علاوه بر این، عصاره‌های بذر جفجفک دارای خواص بالقوه ضد سرطانی است [16]، [17]. پروتئین‌ها و به طور خاص پپتیدهای حلقوی حاصل از دانه جفجفک طیف گسترده‌ای از خواص ضد میکروبی را دارا هستند [18]. علاوه بر اجزای اساسی، دانه‌های جفجفک همچنین دارای اجزای زیست‌فعال مانند آلکالوئیدها، اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها و استروئیدها هستند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی را نشان می‌دهند و می‌توانند بازارهای بالقوه‌ای داشته باشند [15]. تلاش‌های زیادی برای تجاری‌سازی این گونه انجام شده است و تلاش برای اهلی‌سازی این گونه ادامه دارد [19].

با توجه به خواص منحصر به فرد گیاه جفجفک و اهمیت آن در صنایع دارویی و غذایی و همچنین با توجه به اهمیت روش‌های نوین تولید نانوذرات و از طرفی اهمیت نانوذرات بیوسنتز شده جهت از بین بردن باکتری‌های مختلف، این تحقیق با هدف سنتز سبز

نانوذرات روی با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جغجنگ و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی آن‌ها از جمله اندازه و ساختار و نیز بررسی خواص ضدباکتریایی (باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*) عصاره و نانوذرات حاصل از آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و باکتری

نمونه‌های ساقه و برگ (اندام هوایی) گیاه جغجنگ در مرحله رشد رویشی از شهرستان شبستر استان آذربایجان شرقی با طول و عرض جغرافیایی ۳۵°۱۹′۳۸″ و ۳۱°۸′۴۵″ درجه جمع‌آوری گردید. بذور مورد استفاده گیاه نیز پس از رسیدگی کامل گیاه از همان منطقه جمع‌آوری شد. باکتری‌های مورد مطالعه شامل *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* بود که از کشت مجدد باکتری‌های موجود در آزمایشگاه تهیه شد.

تهیه عصاره آبی و متانولی گیاه جغجنگ

عصاره اندام هوایی و بذور گیاه به‌طور جداگانه تهیه شد. ابتدا اندام هوایی گیاه و بذور با آب شست‌وشو و به مدت ۴ روز در دمای ۴۰°C در آون خشک شد. در مرحله بعد با دستگاه خردکن آسیاب و کاملاً پودر گردید. پودر حاصل از اندام هوایی گیاه و بذور هر کدام به‌طور جداگانه به دو قسمت تقسیم شد تا یک عصاره آبی و یک عصاره متانولی تهیه شود. فرآیند عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون و نسبت ۱:۱۵ (یک گرم نمونه گیاهی به ۱۵ میلی‌لیتر حلال) انجام شد. نمونه حاصل پس از عبور از کاغذ صافی در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و نمونه رویی به عنوان عصاره نهایی گیاهی برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت هر چهار محلول تهیه‌شده با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت سه روز روی شیکر قرار داده شد. در مرحله بعد عصاره‌های متانولی را یک بار از کاغذ صافی عبور داده و در روتاری به مدت ۲ ساعت جهت خالص‌سازی کامل قرار داده شد. عصاره‌های آبی را از ارنل و کیوم مدل JP-40V عبور داده و به مدت یک روز در دمای ۶۰°C در آون قرار داده شد.

سنتز سبز نانوذرات روی

تهیه نانوذرات روی با استفاده از سولفات روی هیدراته ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ۴ میلی‌مولار انجام شد. مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول فوق به کمک همزن برقی مغناطیسی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی گیاه در طی چند مرحله به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه و به صورت قطره قطره یک میلی‌لیتر سود (NaOH) پنج مولار به آن اضافه شد تا pH محلول به ۱۲ افزایش یابد. با افزایش pH محلول، رنگ آن به شیری-زرد تغییر نموده و تا ۴ ساعت فرآیند هم‌زدن ادامه یافت. با افزایش دمای دستگاه همزن برقی مغناطیسی به ۵۰°C ذراتی به رنگ شیری روشن در محلول مشاهده می‌شود که بیانگر سنتز نانوذرات روی بود [20]. سپس محلول مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب نهایی جمع‌آوری و توسط دستگاه فریزدرای خشک شد. پودر نهایی برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰°C- نگهداری شد.

بررسی خصوصیات نانوذرات

مورفولوژی نانوذرات روی حاصل به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (LEO 1430, Zeiss, Oberkochen, آلمان) مورد ارزیابی دقیق قرار گرفت. تشکیل نانوذرات فلزی توسط طیف‌سنجی FTIR (شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) بررسی شد. توزیع بار الکتریکی سطحی نانوذرات روی با دستگاه شرکت Horiba، (ژاپن) انجام شد. آنالیز توزین حرارتی (TGA) یکی از روش‌های آنالیز حرارتی ساده و کاربردی است که تغییرات جرم نمونه را در اثر افزایش دما اندازه‌گیری می‌کند. برای این منظور از دستگاه Q600 شرکت TA (آمریکا) استفاده شد. در صورتی که رویدادهای حرارتی در آنالیز TGA نزدیک به یکدیگر باشند، تشخیص آن‌ها با مشکل روبرو خواهد شد که به این خاطر از مشتق توزین حرارتی (DTG) استفاده شد که با استفاده از دستگاه DTG60 شرکت شیمادزو (ژاپن) انجام گردید. اندازه متوسط نانوذرات روی سنتز شده با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، شرکت Horiba، (ژاپن) تعیین شدند.

استخراج اسانس گیاه جفجفک و آنالیز آن به کمک کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی GC-Mass

تهیه اسانس گیاه جفجفک از اندام هوایی (ساقه و برگ گیاه) آن به وسیله تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر انجام شد. بدین منظور ابتدا گیاه در هاون دستی کوبیده شد. سپس داخل کلونجر ریخته و مقدار کمی آب دوبار تقطیر اضافه گردید سپس عملیات تقطیر انجام شد. در نهایت عصاره‌های تهیه شده تا تجزیه و تحلیل بیشتر در یخچال نگهداری شدند. تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی اسانس آبی اندام هوایی گیاه به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی با آشکارساز طیف‌سنجی جرمی ساخت شرکت Agilent آمریکا (Agilent 7890B series GC) با ستون GC پوشش داده شده با سیلیکون پلی متیل (۰/۲۵ نانومتر × ۳۰ متر) انجام شد. شناسایی و تعیین کمیت ترکیبات اسانس با مقایسه طیف جرمی آن‌ها با الگوی مربوط به نمونه‌های معتبر و شاخص‌های بازداری (RI) آن‌ها نسبت به n-آلکان‌های C9-C21 و تطبیق الگوی طیفی با الگوهای موجود در بسته کتابخانه طیفی موسسه ملی استاندارد و فناوری (NIST) با درصد شباهت بالای ۸۵ درصد انجام گرفت و مقادیر درصد نسبی اجزاء با در نظر گرفتن مجموع تمام پیک‌ها محاسبه شد [21].

بررسی فعالیت ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک

بعد از آماده‌سازی شیشه‌های حاوی محلول آگار، در اتوکلاو قرار داده شدند. بعد از استریل در زیر هود درب شیشه‌ها را باز کرده و پس از خنک شدن مقداری از محیط کشت را در پتری‌های ۸ سانتی ریخته شد. پتری‌ها کاور شده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد تا از آلوده نبودن آن‌ها اطمینان حاصل شود. روز بعد در زیر هود استریل از باکتری‌هایی (*S. aureus*) به عنوان باکتری گرم مثبت و *E. coli* (به عنوان باکتری گرم منفی) که در محیط مایع طی کشت شبانه رشد کرده بود، بر اساس غلظت ۰/۵ مک‌فارلند به درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت جامد انتقال و با هوک استریل کاملاً پخش شد. سپس عصاره آبی و الکلی اندام هوایی و بذور گیاه جفجفک در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۰، ۱/۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و نانوذرات روی حاصل از عصاره آبی و الکلی اندام هوایی گیاه در غلظت‌های ۰/۵۰، ۱/۰، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توسط سمپلر به دیسک‌های بلانک اضافه و دیسک‌ها در پتری قرار داده شد. دیسک تتراسایکلین (۳۰ μg/Disc) به عنوان شاهد در وسط پتری قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های ایجاد شده توسط کولیس اندازه‌گیری گردید [4].

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی

حداقل غلظت مهارکنندگی عبارت است از حداقل غلظتی که می‌تواند از رشد واضح و قابل مشاهده باکتری‌ها جلوگیری کند. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از روش رقیق‌سازی استفاده شد. بدین منظور، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع به فالدون ۵۰ میلی‌لیتری در شرایط استریل منتقل شد. سپس میزان ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (*S. aureus*) به عنوان باکتری گرم مثبت و *E. coli* (به عنوان باکتری گرم منفی) به محیط کشت اضافه گردید و پس از مخلوط شدن کامل با محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای در سه تکرار اضافه شد. در چاهک اول ردیف اول از عصاره مورد نظر ۲۰۰ میکرولیتر (حاوی ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره) به ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی باکتری اضافه شد. سپس با سمپلر محلول کاملاً مخلوط شد. بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به چاهک بعدی اضافه گردید و عمل مخلوط کردن تکرار شد. این کار تا چاهک ۱۲ ادامه یافت و ۱۰۰ میکرولیتر چاهک آخر دور ریخته شد. در انتها یک چاهک برای کنترل مثبت حاوی محیط کشت مایع و باکتری و یک چاهک حاوی محیط کشت مایع برای کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت ۹۶ خانه حاوی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به انکوباتور با درجه حرارت مناسب منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فرآیند مورد نظر برای نانوذرات روی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم (حاوی ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات) به جای عصاره گیاه مذکور انجام شد. برای تعیین کمترین غلظت بازدارنده نمونه‌ای از هر ۱۲ چاهک انتخاب و در زیر هود محتوای داخل چاهک روی محیط کشت جامد پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. همچنین محتوای چاهک‌های کنترل مثبت و کنترل منفی نیز در پتری حاوی محیط کشت جامد پخش شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان کمترین غلظت بازدارنده گزارش گردید [4].

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات به صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار برای هر یک از عصاره‌های بذری یا اندام هوایی گیاه انجام شد که در آن نوع باکتری به‌عنوان فاکتور اول، شیوه استخراج عصاره به‌عنوان فاکتور دوم و غلظت عصاره یا نانوذرات روی به‌عنوان فاکتور سوم لحاظ شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون ANOVA در سطح احتمال ($p < 0.01$) و مقایسات میانگین به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 انجام گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز عصاره جغجغک به روش GC-Mass

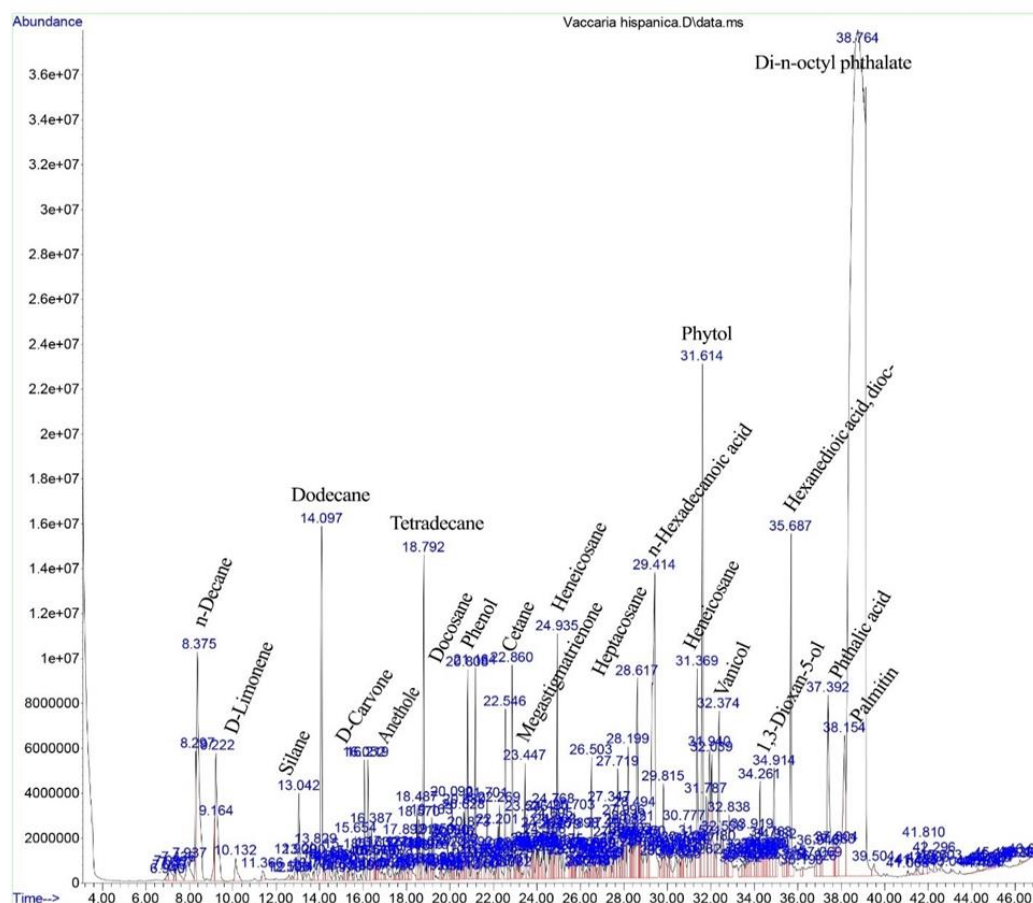
ترکیبات موجود در اسانس گیاه جغجغک به روش GC-MS انجام شد که کروماتوگرام حاصل از تجزیه اسانس در شکل ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش از ۴۳ ترکیب در اسانس گیاه جغجغک شناسایی شد که مهم‌ترین آن‌ها (با درصد بیشتر از ۰/۱ درصد) در جدول ۱ ارائه شده است. ترکیبات n-Decane (۲/۶۶ درصد)، D-Limonene (۱/۴۳ درصد)، Dodecane (۱/۷۴ درصد)، Tetradecane (۱/۲۱ درصد)، Hexadecane (۱/۰۴ درصد)، Megastigmatrienone (۱/۱۱ درصد)، Heptacosane (۱/۰۹ درصد)، Hexadecanoic acid (Palmitic acid) (۳/۴۲ درصد)، Heneicosane (۱/۰۱ درصد)، Phytol (۲/۱۲ درصد)، 9,12,15-Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) (۱/۰۷ درصد)، Octadecanoic acid (Stearic acid) (۰/۷۵ درصد)، Bis(2-ethylhexyl) phthalate (۲/۰۵ درصد)، Palmitin (۱/۶۵ درصد) و Di-n-octyl phthalate (۴۵/۱۷ درصد)، بیشترین مقدار را در اسانس این گیاه به خود اختصاص داد.

فیتول (3, 7, 11, 15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) یک الکل دی‌ترین غیر اشباع غیر حلقوی است که به‌عنوان یک ماده معطر در بسیاری از ترکیبات معطر و محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. در زمینه‌های دارویی، فیتول فعالیت‌های ضد درد و آنتی‌اکسیدانی و همچنین اثرات ضد التهابی و ضد حساسیت از خود نشان داده است [22]. دی‌لیمونین (D-limonene) یک مونوترپن تک‌حلقه‌ای است که دارای فعالیت شیمیایی پیشگیرانه در برابر بسیاری از انواع سرطان است [23]. داماسینون (Damascenone) یکی از ترکیبات شیمیایی معطر است که به‌رغم غلظت بسیار کم، عامل اصلی رایحه گل بوده و یک ماده شیمیایی معطر مهم مورد استفاده در عطرسازی است [24]. لینالول (Linalool) یک مونوترپن الکل است. از فواید آن می‌توان به ضد التهاب و کاهش‌دهنده درد، ضد تشنج بسیار قدرتمند، آرام‌بخش، دورکننده حشرات، ضد استرس، ضد میکروب اشاره کرد [25]. کارواکرول (Carvacrol) یک فنول و از مشتقات مونوترپن طبیعی است که به‌عنوان یک مهارکننده رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود. تیمول یک فنل مونوترپنوئیدی فرار طبیعی با خواص دارویی ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و التیام‌دهنده است [26]. اوژینول (Eugenol) یک مولکول فنولی طبیعی با خواص ضد عفونی‌کننده قوی و ضد درد است [27]. آنتول به‌طور گسترده در اسانس گیاهان یافت می‌شود که دارای اثرات ضد اسپاسم، ترش‌حی و ضد باکتریایی است [28]. مگاستیگماترینون (Megastigmatrienone)، که با نام دیگر «تابانون» نیز شناخته می‌شود، یک ماده فرار و معطر است که یک ترکیب کلیدی در طعم تنباکو به‌شمار می‌رود [29]. اکتادکاترینوئیک اسید (اسید لینولنیک) (Octadecatrienoic Acid) اسید چرب غیر اشباع است که در غشاهای تیلاکوئیدی گیاهان فتوسنتزی و همچنین بسیاری از روغن‌های دانه وجود دارد [30]. علاوه بر این، ترکیبات آلی مانند سیکلوهگزان، بیس (۲-اتیل هگزیل) (ترفتالات، بیس (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) و تعدادی از اسید چرب‌های مهم مانند لینولنیک اسید، استئاریک اسید، پالمیتیک اسید و پالمیتین که کاربرد زیادی در صنایع مختلف دارند، در این گیاه مشاهده شدند.

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیفسنجی جرمی اسانس اندام هوایی گیاه جفجفک

Table 1- The results of Gas Chromatography-Mass spectrometry analysis of *V. hispanica* aerial parts essential oil

No.	Compounds	CAS#	Retention Time	Total (%)
1	3-Methylnonane	005911-04-6	7.435	0.18
2	Cyclohexane, (2-methylpropyl)-	001678-98-4	7.939	0.32
3	n-Decane	000124-18-5	8.237	2.66
4	D-Limonene	005989-27-5	9.221	1.43
5	Linalool	000078-70-6	10.131	0.30
6	Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	017865-32-6	13.043	0.48
7	Cyclopentane, 1-hexyl-3-methyl-	061142-68-5	13.827	0.20
8	Dodecane	000112-40-3	14.096	1.74
9	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-	002244-16-8	15.183	0.18
10	Pentadecane	000629-62-9	16.053	0.38
11	Trans-Anethole (Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-)	004180-23-8	16.219	0.60
12	p-Cymen-2-ol (Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-)	000499-75-2	16.385	0.30
13	Carvacrol (Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-)	000499-75-2	16.631	0.14
14	Thymol (Benzenemethanol, 4-(1-methylethyl)-)	000089-83-8	16.699	0.12
15	Eugenol (Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-)	000097-53-0	17.895	0.31
16	beta.Damascenone	023696-85-7	18.485	0.23
17	Tetradecane	000629-59-4	18.794	1.21
18	Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	001758-88-9	19.160	0.20
19	Hexadecane	000544-76-3	20.808	1.04
20	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	000096-76-4	21.162	0.65
21	Megastigmatrione	038818-55-2	22.547	1.11
22	Cetane	000544-76-3	22.862	0.70
23	Heneicosane	000629-94-7	23.737	0.55
24	1-Iodo-2-methylundecane	073105-67-6	24.933	0.78
25	Pentadecane	000629-62-9	25.174	0.40
26	Hentriacontane	000630-04-6	25.374	0.23
27	Tetradecanoic acid	000544-63-8	25.900	0.34
28	Octadecane	000593-45-3	26.501	0.62
29	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (Phthalic acid)	000084-69-5	27.720	0.41
30	Hexadecane, 3-methyl-	006418-43-5	27.995	0.26
31	Heptacosane	000593-49-7	28.618	1.09
32	Palmitic acid	000057-10-3	29.414	3.42
33	Eicosane	000112-95-8	29.814	0.73
34	Heneicosane	000629-94-7	31.370	1.01
35	Phytol (3, 7, 11, 15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol)	000150-86-7	31.617	2.12
36	9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	000463-40-1	32.040	0.75
37	Octadecanoic acid (Stearic acid)	000057-11-4	32.372	1.07
38	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	000103-23-1	35.685	1.32
39	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	027554-26-3	37.802	0.32
40	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	000117-81-7	37.390	2.05
41	Palmitin (Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester)	000542-44-9	38.157	1.65
42	Di-n-octyl phthalate (000117-84-0	38.763	45.17
43	Octadecanoic acid, (2-Monostearin)	000621-61-4	41.813	0.21



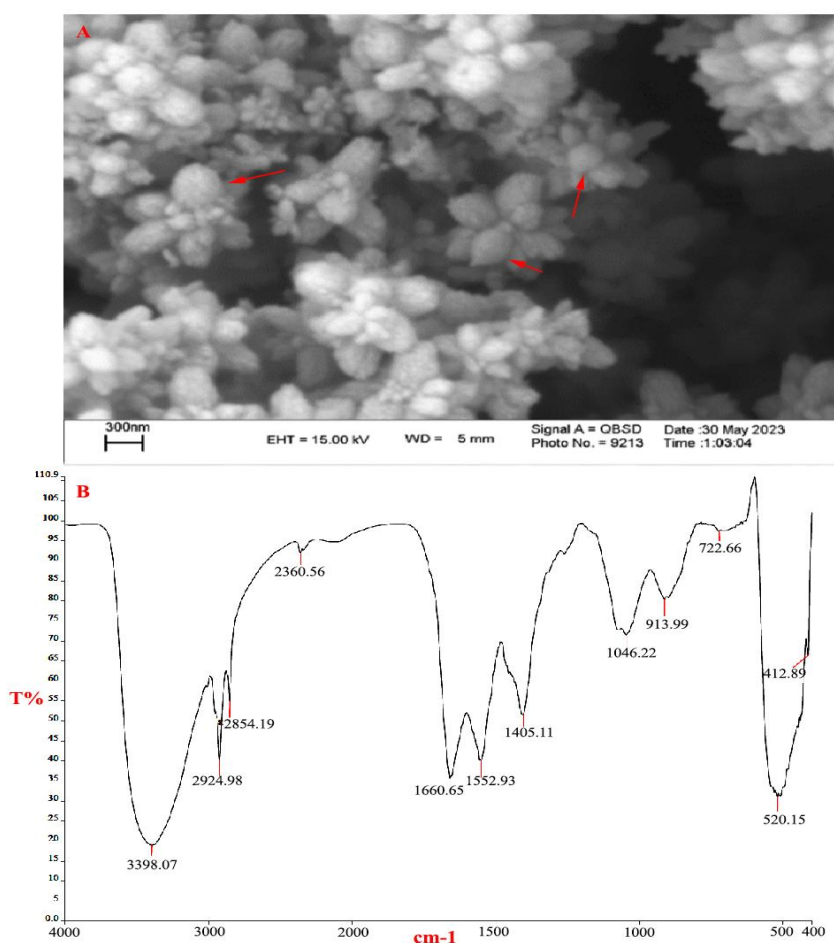
شکل ۱- کروماتوگرام حاصل از تجزیه GC-MS اسانس اندام هوایی گیاه جغجغک (برای جزئیات بیشتر از شکل ۱ به پیوست ۱ مراجعه شود)
Figure 1- Chromatogram from GC-MS analysis of *V. hispanica* aerial parts essential oil

ویژگی‌های ساختاری نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی گیاه جغجغک

در این مطالعه سنتز سبز نانوذرات روی با استفاده از اثرات احیاکنندگی عصاره جغجغک بر یون‌های روی انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات روی تغییر رنگ محلول است. با افزودن عصاره گیاهی به محلول سولفات روی، تغییر فوری رنگ محلول به رنگ شیری روشن مشاهده شد. تغییر در رنگ مخلوط واکنش نشانه اصلی ایجاد نانوذرات است [20]. مورفولوژی سطح و توزیع ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۵ kv به دست آمد (شکل ۲A). هر چه اندازه قطر نانوذرات سنتز شده کوچک‌تر باشند، سطح تماس افزایش یافته و خواص آن‌ها از جمله خواص ضدباکتریایی افزایش می‌یابد. طبق نتایج به دست آمده اندازه نانوذرات سنتز شده روی بین ۳۰ تا ۴۵ نانومتر بود. تجزیه و تحلیل SEM یکی از روش‌های رایج برای تصویربرداری ریزساختار و مورفولوژی سطح نانوذرات است [31].

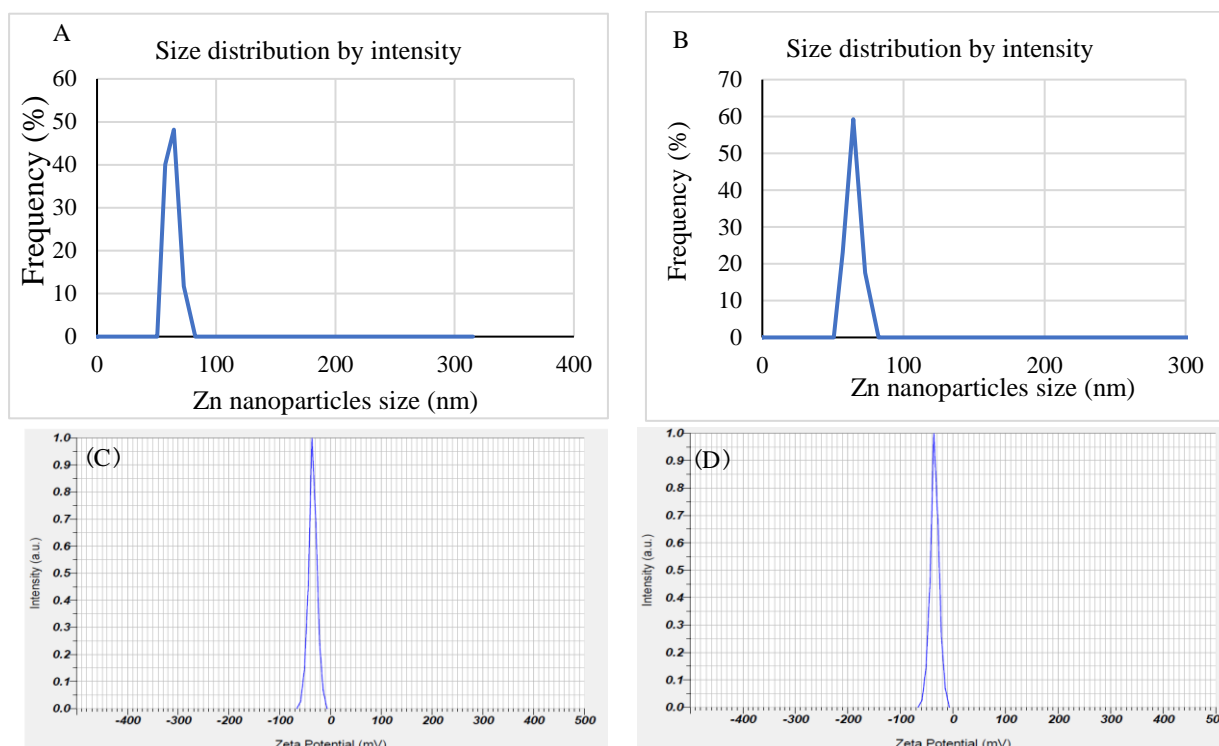
به منظور بررسی ترکیبات و پیوندهای موجود در عصاره‌های آبی و الکلی اندام هوایی و بذر و مشارکت احتمالی آن‌ها در سنتز و تثبیت نانوذرات روی از روش FTIR استفاده شد. وجود پیک‌های دوگانه و پشت سرهم در تصاویر FTIR (شکل ۲B) نانوذرات روی در نواحی ۳۵۰۰-۴۰۰۰ نمایانگر ارتعاشات کششی گروه H-O است. همچنین وجود پیک‌های دوتایی و پیک‌های کشیده در ناحیه ۳۵۰۰-۲۸۰۰ نمایانگر حضور نانوذرات فلزی است. همچنین در نواحی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ پیک‌های کششی مربوط به پیوندهای C=O، O-C و N-H بود. از آنجایی که ترکیبات آلی عصاره‌های گیاهی در اطراف نانوذرات قرار می‌گیرند و باعث پایداری نانوذرات می‌شوند، لذا در طیف FTIR طیف‌های مربوط به این گروه‌های آلی دیده می‌شوند (شکل ۲B). مشاهدات تأیید کرد که نانوذرات روی سنتز

شده با متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی) جفجفک پوشیده شده‌اند. بررسی توزیع اندازه نانوذرات به روش DLS ابعاد نانوذرات سنتز شده را تأیید کرد. به طوری که نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی و الکلی گیاه جفجفک به ترتیب دارای اندازه متوسط $4/8 \pm 5/8$ و $4/7 \pm 60/4$ نانومتر بودند (شکل ۳A و ۳B). همچنین پتانسیل زتا برای تعیین پایداری نانوذرات روی اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه مقادیر پتانسیل زتا می‌توانند منفی یا مثبت باشند، مقادیر بالای -30 میلی‌ولت یا $+30$ میلی‌ولت به کیفیت و پایداری کافی نانوذرات کمک می‌کند و امکان نگهداری این نانوذرات را برای مدت طولانی‌تری فراهم می‌کند [32]، [33]. بر این اساس، میانگین پتانسیل زتا نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی و الکلی گیاه جفجفک به ترتیب $-32/4$ و $-35/6$ میلی‌ولت بود که نشان‌دهنده پایداری بالای آن‌ها است (شکل ۳C و ۳D).



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) فلش‌ها نانوذرات روی سنتز شده با استفاده از عصاره آبی اندام هوایی جفجفک با اندازه مطلوب را نشان می‌دهند (A)، طیف FTIR نانوذرات روی سنتز شده را نشان می‌دهد. در این شکل محور افقی (cm^{-1}) نشان‌دهنده عدد موج در محدوده معمول 4000 تا 400 است که به عنوان معیاری برای مشخص کردن فرکانس‌های جذب یا انتشار نور فرسرخ استفاده می‌شود. محور عمودی (T%) بیان‌گر درصد انتقال (transmittance) است که به معنای میزان نوری است که از نمونه عبور کرده است. قله‌های (Peaks) مشاهده‌شده در نمودار جذب‌های مشخص در فرکانس‌های خاصی از نور را نشان می‌دهند. این قله‌ها به ترتیب از چپ به راست نشان‌دهنده گروه‌های عاملی هیدروکسیل ($\text{OH}-$)، $\text{C}-\text{H}$ ، $\text{C}\equiv\text{N}$ ، کربونیل ($\text{C}=\text{O}$)، $\text{N}-\text{O}$ یا $\text{N}-\text{H}$ ، $\text{C}-\text{H}$ bending، $\text{C}-\text{O}$ یا $\text{C}-\text{N}$ ، و گروه‌های عاملی مربوط به مواد معدنی و فلزی هستند

Figure 2- A) Scanning electron microscope (SEM) image of zinc nanoparticles synthesized using aqueous extract of the aerial parts of *V. hispanica* with the desired size, and b) FTIR spectrum of the synthesized zinc nanoparticles. In this figure, the horizontal axis (cm^{-1}) represents the wave number in the typical range of 4000 to 400 cm^{-1} , which is used as a measure to characterize the frequencies of infrared light absorption or emission. The vertical axis (%T) represents the percentage of transmittance, which means the amount of light that has passed through the sample. The peaks observed in the graph indicate specific absorptions at specific frequencies of light. From left to right, these peaks represent hydroxyl ($-\text{OH}$), $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, carbonyl ($\text{C}=\text{O}$), $\text{N}-\text{O}$ or $\text{N}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$ bending, $\text{C}-\text{O}$ or $\text{C}-\text{N}$ functional groups, and functional groups related to minerals and metals



شکل ۳- توزیع اندازه (DLS) و پتانسیل زتا نانوذرات روی سنتز شده با استفاده از عصاره آبی (A و C) و عصاره الکلی (B و D) اندام هوایی گیاه جغجنگ

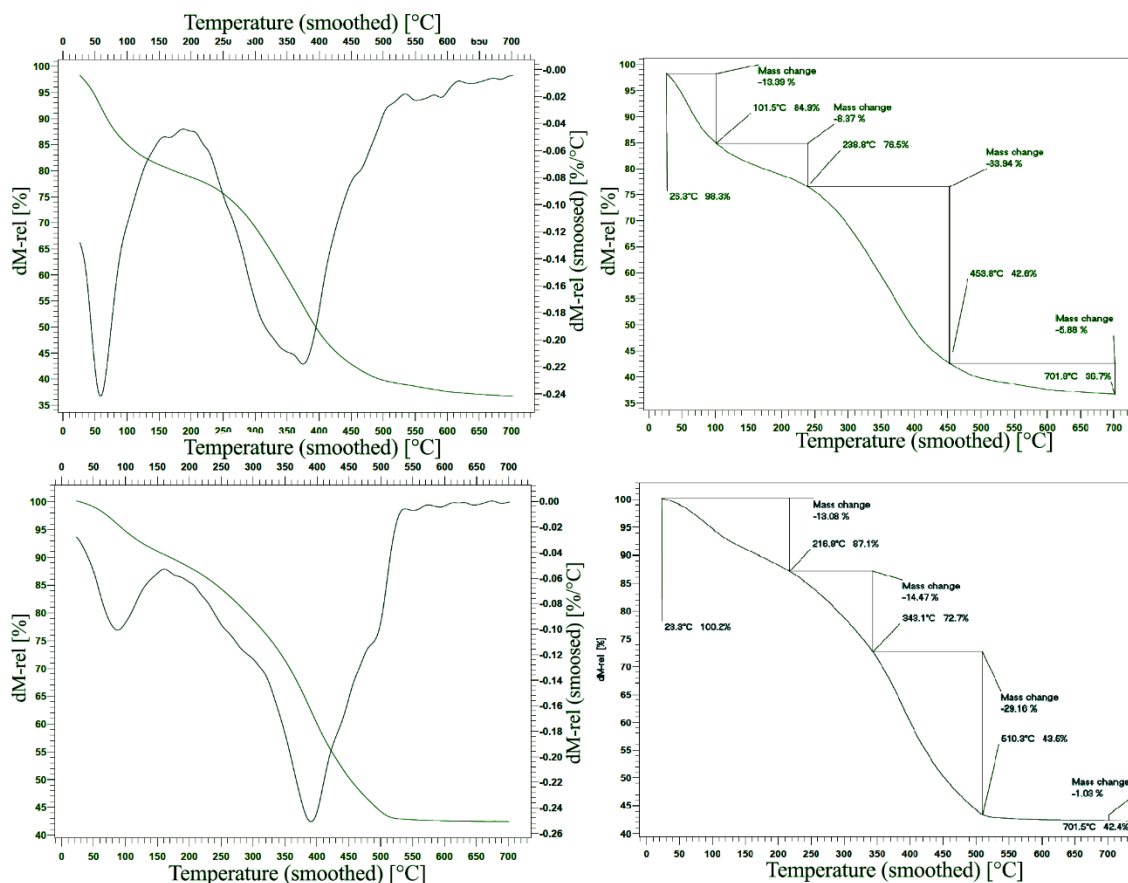
Figure 3- Size distribution (DLS) and zeta potential of zinc nanoparticles synthesized using aqueous (A and C) and alcoholic extracts (B and D) of *V. hispanica* aerial parts

پایداری حرارتی نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی و الکلی گیاه جغجنگ با آنالیز وزنی حرارتی (TGA) و مشتق توزین حرارتی (DTG) تعیین شد (خطا منبع مرجع یافته نشده). برای نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی منحنی‌های TGA کاهش وزن اولیه ۱۳ درصدی از دمای محیط تا ۱۰۱ درجه سانتی‌گراد را نشان داد که با حذف آب جذب شده در سطح همراه بود. کاهش وزن قابل توجه دیگری (حدود ۴۲ درصد) از ۱۰۱ تا ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد، همراه با دو پیک در حدود ۲۳۸ و ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد در منحنی DTG، ناشی از حذف گروه‌های عملکردی مشاهده شد. کاهش وزن دیگری (۶ درصد) از ۴۵۰ تا ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که نشان‌دهنده تجزیه ترکیب آلی و فروپاشی ساختار نانوذرات بود. برای نانوذرات روی حاصل از عصاره الکلی نیز منحنی‌های TGA کاهش وزن اولیه ۱۳ درصدی از دمای محیط تا ۲۱۶ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد که با حذف آب جذب شده در سطح همراه بود. کاهش وزن قابل توجه (حدود ۴۴ درصد) از ۲۱۶ تا ۵۱۰ درجه سانتی‌گراد، همراه با دو پیک در حدود ۳۴۳ و ۵۱۰ درجه سانتی‌گراد در منحنی DTG، ناشی از حذف گروه‌های عملکردی مشاهده شد. کاهش وزن (در حدود ۰.۱٪) نیز از ۵۱۰ تا ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. شدت پیک‌ها متناسب با شیب تغییرات وزنی در نمودار TGA است. پیک‌های باریک‌تر و شدیدتر مربوط به تغییرات وزنی بالاتر و شیب بیشتر است. همچنین با مشاهده سطح زیر پیک‌ها می‌توان میزان تغییرات جرم نمونه را مقایسه کرد.

اثرات ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی و عصاره بذری جغجنگ به کمک روش انتشار دیسک

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در مورد اثرات ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی نشان داد که اندازه هاله تولید شده در پلیت‌های حاوی دو گونه باکتری گرم منفی (*E. coli*) و گرم مثبت (*S. aureus*) به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع باکتری، شیوه استخراج عصاره (عصاره آبی و الکلی برگ) و غلظت‌های مختلف استفاده شده از عصاره قرار داشت (جدول ۲). همچنین اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره ($p < 0.01$) و اثر متقابل شیوه استخراج عصاره اندام هوایی و غلظت آن ($p < 0.05$) معنی‌دار به دست آمد ولی سایر اثرات متقابل معنی‌دار نبود. معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره نشان می‌دهد که رفتار دو نوع باکتری

مورد استفاده در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه جغجغک یکسان نبود. همچنین، اثر متقابل شیوه استخراج عصاره اندام هوایی و غلظت آن نیز در مورد این دو صفت معنی دار شد که نشان‌دهنده رفتار متفاوت غلظت‌های عصاره در دو شیوه استخراج بود. ولی معنی دار نشدن اثر متقابل نوع باکتری و شیوه استخراج عصاره نشان داد که پاسخ دو گونه باکتری در عصاره‌های آبی و الکلی اندام هوایی گیاه جغجغک یکسان بود (جدول ۲). با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره و نیز اثر متقابل شیوه استخراج عصاره اندام هوایی و غلظت آن، مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره اندام هوایی جغجغک برای هر یک از باکتری‌ها و در هر یک از شیوه‌های استخراج انجام شد که در شکل‌های ۵A و ۵B نشان داده شده‌اند.



شکل ۴- منحنی آنالیز وزنی حرارتی (TGA) تغییرات وزن نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی (بالا-سمت راست) و الکلی (پایین-سمت راست) اندام هوایی گیاه جغجغک و منحنی مشتق توزین حرارتی (DTG) نانوذرات روی سنتز شده از عصاره آبی (بالا-سمت چپ) و الکلی (پایین-سمت چپ) اندام هوایی در محدوده دمایی ۲۵-۷۰۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 4- Thermal gravimetric analysis (TGA) curve of changes in the weight of zinc nanoparticles synthesized using aqueous (top-right) and alcoholic (bottom-right) extracts of *V. hispanica* aerial parts, and the thermal gravimetric derivative curve (DTG) of Zn nanoparticles synthesized from its aqueous (top-left) and alcoholic (bottom-left) extracts in the temperature range of 25-700 °C

جدول ۲- میانگین مربعات فعالیت ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی و بذر گیاه جغجغک از لحاظ قطر هاله

Table 2- Mean square of antibacterial activity of *V. hispanica* aerial parts and seeds extracts in terms of inhibition zone diameter

Source of variation	df	Mean square of inhibition zone	
		Seed extract	Aerial parts extract
Species of bacteria (A)	1	0.2314**	0.1829**
Extraction method (B)	1	0.0003 ^{ns}	0.0457**
Concentration of extract (C)	6	7.7604**	7.1956**
A × B	1	0.0004 ^{ns}	0.0179 ^{ns}
B × C	6	0.0017 ^{ns}	0.0124*
A × B × C	6	0.0083 ^{ns}	0.0054 ^{ns}
Error	56	0.005	0.0043
Coefficient of variation (%)	-	3.52	3.29

	Df	F value	P value
Group	4	47.43	P < 0.001

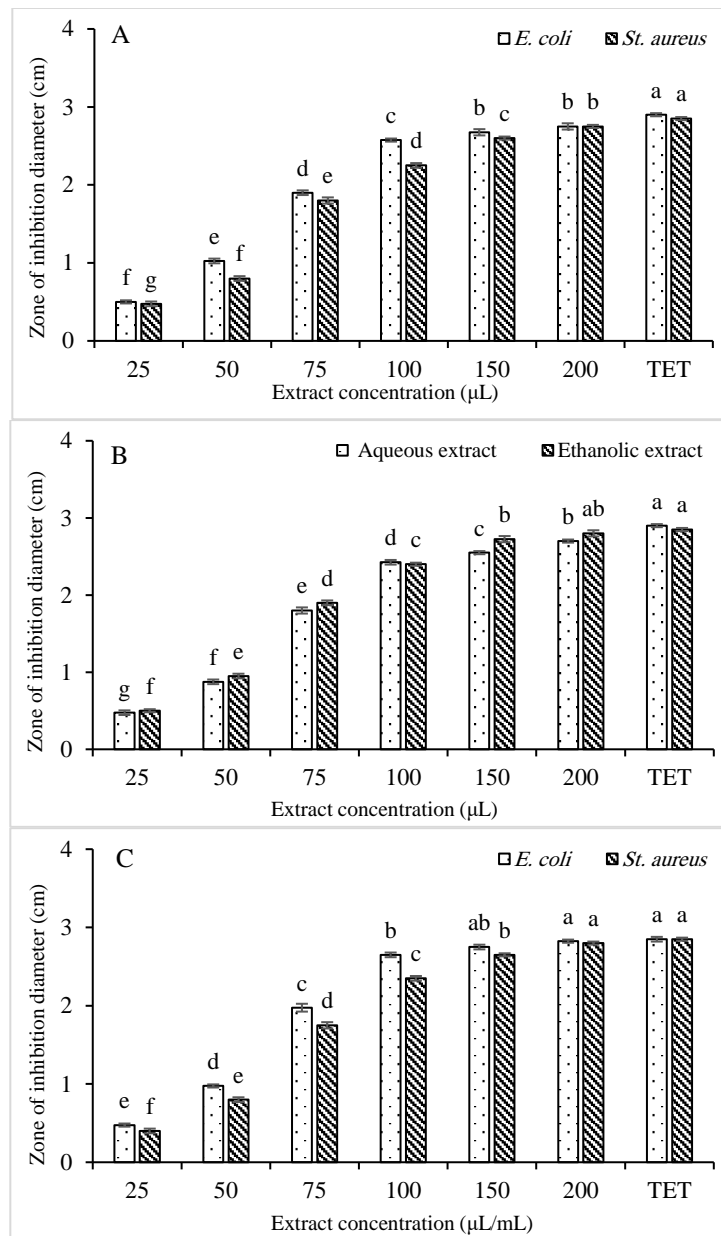
ns: not significant, and *, **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively
(Concentration of extract) غلظت عصاره (Extraction method) شیوه استخراج عصاره (Type of bacteria) نوع باکتری

ns: غیرمعنی‌دار و *, **: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و یک درصد

همان‌طوری که در شکل ۵A مشاهده می‌شود، بین دو گونه باکتری (باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus*) از نظر حساسیت در برابر غلظت‌های مختلف عصاره اندام هوایی گیاه جغجغک اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری که باکتری *E. coli* در اکثر موارد نسبت به تیمار اعمال شده دارای قطر هاله بزرگتر و در نتیجه حساس‌تر از باکتری *S. aureus* بود. با افزایش غلظت عصاره، اندازه هاله‌ها افزایش داشت. این مورد در هر دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus* صادق بود. طبق نتایج حاصل بزرگترین هاله (۲۷/۵ میلی-متر) مربوط به دیسک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اندام هوایی بود که در پلیت حاوی هر دو باکتری *E. coli* و باکتری *S. aureus* مشاهده شد (شکل ۵A) هم‌چنین تفاوت بین دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* از لحاظ اندازه هاله تولید شده در تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره اندام هوایی معنی‌دار بود ولی در تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اندام هوایی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. طبق نتایج حاصل، خاصیت ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی گیاه جغجغک وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، به طور معنی‌داری افزایش یافت. در باکتری *E. coli* درصد اندازه هاله تشکیل شده در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اندام هوایی با تیمار شاهد تتراسایکلین تفاوت معنی‌داری نداشت. در حالی که در مورد باکتری *S. aureus* درصد قطر هاله برابر با شاهد (تتراسایکلین)، در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اندام هوایی به دست آمد که نشان‌دهنده حساسیت کمتر این باکتری در مقایسه با باکتری *E. coli* بود.

از سوی دیگر هرچند در غلظت‌های پایین عصاره اندام هوایی (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) بین دو شیوه استخراج عصاره اندام هوایی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت به ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر اندازه هاله تولید شده در عصاره الکلی به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره آبی بود (شکل ۵B). این امر نشان می‌دهد که در عصاره الکلی ترکیبات ضدباکتری بیشتر بوده است که در غلظت‌های بالاتر اثر خود را نشان می‌دهند. به طوری که اندازه هاله تشکیل شده در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر عصاره الکلی اختلاف معنی‌داری با شاهد (تتراسایکلین) نداشت. در حالی که در همین غلظت اندازه هاله در عصاره آبی به طور معنی‌دار کمتر از تتراسایکلین بود (شکل ۵B).

در مورد اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی و آبی بذری نیز تجزیه واریانس داده‌های حاصل نشان داد که نوع باکتری و غلظت‌های مختلف استفاده شده از عصاره بذری گیاه جغجغک به طور معنی‌دار ($p < 0.01$) اندازه هاله تولید شده را در دو گونه باکتری گرم منفی (*E. coli*) و گرم مثبت (*S. aureus*) تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲). هم‌چنین اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره بذری در مورد این دو صفت معنی‌دار به دست آمد ولی شیوه استخراج عصاره (عصاره آبی و الکلی بذری) و سایر اثرات متقابل معنی‌دار نبود. معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره نشان می‌دهد که رفتار دو نوع باکتری مورد استفاده در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه جغجغک یکسان نبود. ولی معنی‌دار نشدن اثر اصلی شیوه استخراج عصاره و نیز اثر متقابل نوع باکتری و شیوه استخراج عصاره نشان داد که پاسخ دو گونه باکتری در عصاره‌های آبی و الکلی بذری این گیاه یکسان بود. هم‌چنین، اثر متقابل شیوه استخراج عصاره بذری و غلظت آن نیز در مورد این دو صفت معنی‌دار نشد که نشان‌دهنده رفتار مشابه غلظت‌های عصاره در هر دو شیوه استخراج بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره بذری جغجغک برای هر یک از گونه‌های باکتری انجام شد که در شکل ۵C نشان داده شده‌است. طبق شکل ۵C، دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus* از نظر حساسیت در برابر غلظت‌های مختلف عصاره بذری گیاه جغجغک تفاوت معنی‌داری نشان دادند. به‌طوری که باکتری *E. coli* در همه غلظت‌های مورد استفاده غیر از بالاترین غلظت (۲۰۰ میکرولیتر) دارای قطر هاله بزرگتر و در نتیجه حساسیت بیش‌تر نسبت به باکتری *S. aureus* بود. هم‌چنین در هر دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus*، اندازه هاله با افزایش غلظت عصاره افزایش نشان داد (شکل ۵C). در هر دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* بزرگترین هاله (۲۸/۲ میلی-متر) مشاهده شده مربوط به دیسک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر عصاره بذری بود که در مورد باکتری *E. coli* با غلظت ۱۵۰ میکرولیتر آن تفاوت معنی‌داری نداشت. به طوری که در باکتری *E. coli* درصد اندازه هاله تشکیل شده در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره بذری با تیمار شاهد تتراسایکلین تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این باکتری در مقایسه با باکتری *S. aureus* است. در حالی که در مورد باکتری *S. aureus* فقط در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر عصاره بذری، اندازه قطر هاله با شاهد (تتراسایکلین) برابر بود.



شکل ۵- اندازه هاله ناشی از فعالیت ضدباکتریایی عصاره اندام هوایی و بذری گیاه جفجفک در غلظت‌های مختلف: (A) اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره اندام هوایی، (B) اثر متقابل شیوه استخراج و غلظت عصاره اندام هوایی، و (C) اثر متقابل نوع باکتری و غلظت عصاره بذری. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است. مقادیر انحراف استاندارد در سه تکرار آزمایش به صورت نوار خط نشان داده شده‌اند.

Figure 5- The size of the inhibition zone caused by the antibacterial activity of *V. hispanica* aerial and seeds extracts used in different concentrations: (A) the interaction between the species of bacteria and the concentration of the aerial plant extract, (B) the interaction between the extraction method and the aerial plant extract concentration, and (C) interaction effect of bacterial species and seed extract concentration. Different letters in each column indicate statistically significant differences at the 1% probability level in Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The standard deviation values in three experiment replicates are shown as error bars

اثرات ضدباکتریایی نانوذرات روی حاصل از سنتز سبز با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جفجفک

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) اندازه هاله تولیدشده در پلیت‌های حاوی دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus* به طور معنی‌دار ($p < 0.01$) تحت تأثیر اثرات اصلی نوع باکتری، شیوه استخراج عصاره و غلظت‌های مختلف استفاده شده از نانوذرات روی حاصل از سنتز سبز با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جفجفک قرار گرفت. همچنین اثر متقابل نوع باکتری و غلظت نانوذرات روی در این مورد معنی‌دار به دست آمد ولی سایر اثرات متقابل معنی‌دار نبود. معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت نانوذرات روی نشان

می‌دهد که رفتار دو نوع باکتری مورد استفاده در غلظت‌های مختلف این نانوذرات یکسان نبود. ولی معنی‌دار نشدن اثر متقابل نوع باکتری و شیوه استخراج عصاره نشان داد که پاسخ دو گونه باکتری در نانوذرات روی حاصل از عصاره‌های آبی و الکلی اندام هوایی این گیاه یکسان بود. همچنین، اثر متقابل شیوه استخراج عصاره و غلظت نانوذرات روی نیز در مورد این صفت معنی‌دار نشد که نشان‌دهنده رفتار مشابه غلظت‌های نانوذرات در هر دو شیوه استخراج بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع باکتری و غلظت نانوذرات روی، مقایسه غلظت‌های مختلف در هر یک از گونه‌های باکتری انجام شد که در شکل‌های ۶A و ۶B نشان داده شده‌است.

جدول ۳- میانگین مربعات فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات روی حاصل از سنتز سبز با استفاده از عصاره الکلی و آبی اندام هوایی گیاه جغجغک

Table 3- Mean square of antibacterial activity of green-synthesized zinc nanoparticles using alcoholic and aqueous extract of *V. hispanica* aerial parts

Source of variation	df	Mean square of inhibition zone
Species of bacteria (A)	1	0.1323**
Extraction method (B)	1	0.0902**
Concentration of nanoparticles (C)	4	9.7354**
A × B	1	0.0062 ^{ns}
A × C	4	0.2941**
B × C	4	0.0284 ^{ns}
A × B × C	4	0.0081 ^{ns}
Error	40	0.0107
Coefficient of variation (%)	-	4.64

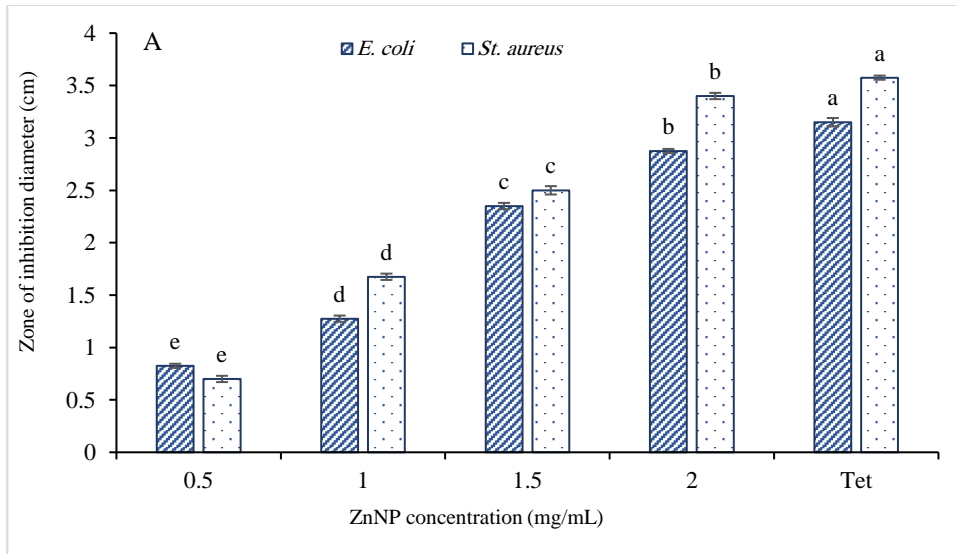
ns: not significant, and *, **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively

(Concentration of Zinc nanoparticles) روی، غلظت نانوذرات روی (Extraction method) شیوه استخراج عصاره، (Type of bacteria) نوع باکتری

ns: غیرمعنی‌دار و *، **: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و یک درصد

همان‌طوری که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بین دو گونه باکتری از نظر حساسیت در برابر غلظت‌های مختلف نانوذرات روی اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. به‌طوری که باکتری *E. coli* در اکثر موارد نسبت به تیمارهای اعمال شده حساس‌تر از باکتری *S. aureus* بود. اندازه هاله‌های ایجاد شده در محیط کشت حاوی باکتری *E. coli* و *S. aureus* با افزایش غلظت نانوذرات روی از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری افزایش یافت. به این معنی که ممانعت از رشد باکتری‌ها در هر دو گونه *E. coli* و *S. aureus* توسط نانوذرات روی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش یافت. اثر شیوه استخراج عصاره اندام هوایی گیاه *V. hispanica* در سنتز نانوذرات روی از لحاظ اندازه هاله معنی‌دار به دست آمد که در آن اندازه هاله تشکیل شده در عصاره الکلی (۲/۰۱ سانتی‌متر) بیشتر از عصاره آبی (۱/۸۹ سانتی‌متر) بود. Jahan & Arju (2022) [34]، با بررسی تأثیر خواص ضدباکتریایی نانوذرات مس، آهن و نقره سنتز سبز شده بیان کردند که باکتری‌های گرم منفی (*E. coli*) نسبت به گرم مثبت (*S. aureus*) در برابر نانوذرات سنتز سبز شده حساس‌تر بودند، که با نتایج حاصل از پژوهش ما مطابقت دارد، به طوری که باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری *E. coli* در برابر غلظت‌های برابر نانوذرات روی سنتز سبز شده از عصاره اندام هوایی گیاه جغجغک مقاومت بیشتری داشت (شکل ۶). نانوذرات با هدف قرار دادن غشاء سلولی باکتری پتانسیل غشایی پلازما را ناپایدار می‌کند که این امر باعث کاهش سطح آدنوزین-تری‌فسفات (ATP) درون سلول باکتری شده و موجب مرگ آن می‌شود [35]. علاوه‌براین، نانوذرات فلزی به خصوص نقره، روی و مس با ورود به درون سلول باکتری موجب تغییر در فعالیت آنزیم‌های کلیدی و در نتیجه مرگ باکتری‌ها می‌شود [36]. Karan و همکاران (2024) [37] با بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه آقظی (*Sambucus nigra*) بر باکتری‌های کشت شده بیان کردند که این نانوذرات از رشد باکتری *E. coli* ممانعت می‌کند. هم‌چنین Castañeda-Aude و همکاران (2023) [31] گزارش کردند که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه بهار نارنج (*Citrus aurantium*) رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* را مهار می‌کنند که با نتایج ما در این پژوهش مطابقت داشت. حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* برای عصاره آبی و الکلی گیاه به ترتیب ۴۶۸/۷۵ و ۹۳۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای نانوذرات روی ۱۵۶/۲۵ و ۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. سنتز سبز نانوذرات فلزی از گیاهان دارویی به دلیل زیست‌سازگاری بالاتر، پایدارتر، سمیت کم، تولید ارزان

و فرآیند تولید آسان نسبت به روش های شیمیایی بسیار مهم است. وجود میزان بالای ترکیبات دارویی و با ارزش همانند فلاونوئیدها، فنل ها، آنتوسیانین ها، تانن ها و آلکالوئیدها در گیاهان دارویی امکان تثبیت، اکسیداسیون و در نتیجه سنتز نانوذرات فلزی را فراهم می کند [38].



شکل ۶- اندازه هاله تولید شده تحت تأثیر اثر متقابل نوع باکتری و غلظت نانوذرات روی سنتز شده با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جفجفک. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT) است. مقادیر انحراف استاندارد در سه تکرار آزمایش به صورت نوار خط نشان داده شده اند.

Figure 6- The size of the inhibition zone produced under the influence of (A) the interaction between the species of bacteria and the concentration of zinc nanoparticles synthesized using the aerial part of *V. hispanica*. Different letters in each column indicate statistically significant differences at the 1% probability level in Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The standard deviation values in three experiment replicates are shown as error bars.

نتیجه گیری

به طور کلی، در این پژوهش نشان داده شد که نانوذرات روی را می توان با استفاده از عصاره اندام هوایی گیاه جفجفک به عنوان یک عامل کاهنده بیولوژیکی تولید کرد. همچنین مشخص شد که ممانعت از رشد باکتری ها در هر دو گونه *S. aureus* و *E. coli* توسط عصاره اندام هوایی و بذر گیاه جفجفک و نیز نانوذرات روی حاصل، وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت افزایش می یابد. هم چنین مشخص شد که در غلظت های برابر عصاره، باکتری *E. coli* نسبت به باکتری *S. aureus* حساس تر بود.

اعلام تعارض منافع

در این پژوهش که مستخرج از پایان نامه دانشجو است، هیچ یک از پژوهشگران تعارض منافی ندارند.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه محقق اردبیلی بابت فراهم نمودن امکان اجرای این آزمایش اعلام می دارند.

منابع

- [1] Mandal, D., Bolander, M. E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G. & Mukherjee, P. (2006). The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 485-492. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0179-3>
- [2] Sre, P. R., Reka, M., Poovazhagi, R., Kumar, M. A. & Murugesan, K. (2015). Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 1137-1144. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.08.019>
- [3] Anastas, P. T. & Warner, J. C. (1998). Principles of green chemistry. *Green chemistry: Theory and practice*, 29, 14821-14842.
- [4] Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H. & Abdul Rahman, N. A. (2019). Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0368-z>
- [5] Agarwal, H., Menon, S., Kumar, S. V. & Rajeshkumar, S. (2018). Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chemico-Biological Interactions*, 286, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.008>
- [6] Haidarizadeh, M., Alijani, F., Ashengroph, M. & atashi, S. (2023). Comparison of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial effects of *Camellia sinensis* black tea and green tea leaf extract on plant pathogenic bacteria (*Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*) and human pathogenic b. *Applied Biology*, 36 (2). doi: 10.22051/jab.2023.42286.1528. <https://doi.org/10.22051/jab.2023.42286.1528>
- [7] Selvarajan, E. & Mohanasrinivasan, V. J. M. L. (2013). Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* VITES07. *Materials Letters*, 112, 180-182. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.09.020>
- [8] Thi, T. U. D., Nguyen, T. T., Thi, Y. D., Thi, K. H. T., Phan, B. T. & Pham, K. N. (2020). Green synthesis of ZnO nanoparticles using orange fruit peel extract for antibacterial activities. *RSC advances*, 10 (40), 23899-23907. <https://doi.org/10.1039/D0RA04926C>
- [9] Ashengroph, M. & Fattahi, S. (2024). Characterization and optimization of biosynthesized silver nanoparticles by resting cells of *Aspergillus niger* using Taguchi methods. *Applied Biology*, 36 (4). <https://doi.org/10.22051/jab.2023.42560.1539>
- [10] Meesapyodsuk, D., Balsevich, J., Reed, D. W. & Covello, P. S. (2007). Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding β -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*, 143 (2), 959-969. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088484>
- [11] Feng, L., Zhang, X., Hua, H., Qiu, L., Zhang, L. & Lv, Z. (2012). *Vaccaria segetalis* extract can inhibit angiogenesis. *Asian Biomedicine*, 6 (5), 683-692. <https://doi.org/10.5372/1905-7415.0605.108>
- [12] Balsevich, J. J., Ramirez-Erosa, I., Hickie, R. A., Dunlop, D. M., Bishop, G. G. & Deibert, L. K. (2012). Antiproliferative activity of *Saponaria vaccaria* constituents and related compounds. *Fitoterapia*, 83 (1), 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.010>
- [13] Jiang, H., Wu, Y., Wang, H., Ferguson, D. K. & Li, C. S. (2013). Ancient plant use at the site of Yuergou, Xinjiang, China: implications from desiccated and charred plant remains. *Vegetation History and Archaeobotany*, 22, 129-140. <https://doi.org/10.1007/s00334-012-0365-z>
- [14] Zhou, G., Wu, H., Wang, T., Guo, R., Xu, J., Zhang, Q., Tang, L. & Wang, Z. (2017). C-glycosylflavone with rotational isomers from *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert seeds. *Phytochemistry Letters*, 19, 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.01.017>
- [15] Sang, S. M., Lao, A. N., Chen, Z. L., Uzawa, J. & Fujimoto, Y. (2000). Three new triterpenoid saponins from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2 (3), 187-193. <https://doi.org/10.1080/10286020008039910>
- [16] Tian, M., Huang, Y., Wang, X., Cao, M., Zhao, Z., Chen, T., ... & Zhou, X. (2021). *Vaccaria segetalis*: a review of ethnomedicinal, phytochemical, pharmacological, and toxicological findings. *Frontiers in Chemistry*, 9, 666280. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.666280>
- [17] Ma, C. H., Fan, M. S., Lin, L. P., Tang, W. D., Lou, L. G., Ding, J. I. A. N. & Huang, C. G. (2008). Cytotoxic triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10 (2), 177-184. <https://doi.org/10.1080/10286020701394381>
- [18] Efthimiadou, A., Karkanis, A., Bilalis, D. & Katsenios, N. (2012). Cultivation of cow cockle (*Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert): an industrial-medical weed. *Industrial Crops and Products*, 40, 307-311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.033>
- [19] Willenborg, C. J. & Johnson, E. N. (2013). Influence of seeding date and seeding rate on cow cockle, a new medicinal and industrial crop. *Industrial Crops and Products*, 49, 554-560. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.028>
- [20] Mohd Yusof, H., Abdul Rahman, N. A., Mohamad, R., Zaidan, U. H. & Samsudin, A. A. (2020). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by cell-biomass and supernatant of *Lactobacillus plantarum* TA4 and its antibacterial and biocompatibility properties. *Scientific Reports*, 10 (1), 19996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76402-w>
- [21] Reddy, D. N. (2019). Essential oils extracted from medicinal plants and their applications. *Natural Bio-Active Compounds: Volume 1: Production and Applications*, 237-283. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_9
- [22] Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... & Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>
- [23] Anandakumar, P., Kamaraj, S. & Vanitha, M. K. (2021). D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of Food Biochemistry*, 45 (1), e13566. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13566>

- [24] Isoe, S., Katsumura, S., & Sakan, T. (1973). The synthesis of Damascenone and β -Damascone and the possible mechanism of their formation from carotenoids. *Helvetica Chimica Acta*, 56 (5), 1514-1516. <https://doi.org/10.1002/hlca.19730560508>
- [25] Kamatou, G. P. & Viljoen, A. M. (2008). Linalool—A review of a biologically active compound of commercial importance. *Natural Product Communications*, 3 (7). <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300727>
- [26] Escobar, A., Perez, M., Romanelli, G. & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (12), 9243-9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- [27] Ulanowska, M. & Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7), 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- [28] Marinov, V. & Valcheva-Kuzmanova, S. (2015). Review on the pharmacological activities of anethole. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 2 (2), 14-19.
- [29] Slaghenaufi, D., Perello, M. C., Marchand, S. & de Revel, G. (2016). Quantification of megastigmatrienone, a potential contributor to tobacco aroma in spirits. *Food Chemistry*, 203, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.034>
- [30] Ide, T., Murata, M. & Sugano, M. (1995). Octadecatrienoic acids as the substrates for the key enzymes in glycerolipid biosynthesis and fatty acid oxidation in rat liver. *Lipids*, 30 (8), 755-762. <https://doi.org/10.1007/BF02537803>
- [31] Castañeda-Aude, J. E., Morones-Ramírez, J. R., De Haro-Del Río, D. A., León-Buitimea, A., Barriga-Castro, E. D. & Escárcega-González, C. E. (2023). Ultra-small silver nanoparticles: a sustainable green synthesis approach for antibacterial activity. *Antibiotics*, 12 (3), 574. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030574>
- [32] Godeto, Y. G., Ayele, A., Ahmed, I. N., Husen, A. & Bachheti, R. K. (2023). Medicinal plant-based metabolites in nanoparticles synthesis and their cutting-edge applications: An overview. *Secondary Metabolites from Medicinal Plants*, 1-34. CRC Press.
- [33] Liu, Y., Yang, G., Baby, T., Tengjisi, Chen, D., Weitz, D. A. & Zhao, C. X. (2020). Stable polymer nanoparticles with exceptionally high drug loading by sequential nanoprecipitation. *Angewandte Chemie*, 132 (12), 4750-4758. <https://doi.org/10.1002/ange.201913539>
- [34] Jahan, N., & Arju, S. N. (2022). A Sustainable approach to study on antimicrobial and mosquito repellency properties of silk fabric dyed with neem (*Azadirachta indica*) leaves extractions. *Sustainability*, 14 (22), 15071. <https://doi.org/10.3390/su142215071>
- [35] Jeevanandam, J., Kiew, S. F., Boakye-Ansah, S., Lau, S. Y., Barhoum, A., Danquah, M. K. & Rodrigues, J. (2022). Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale*, 14 (7), 2534-2571. <https://doi.org/10.1039/D1NR08144F>
- [36] Ahmed, R. H. & Mustafa, D. E. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles mediated by traditionally used medicinal plants in Sudan. *International Nano Letters*, 10 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-00291-9>
- [37] Karan, T., Erenler, R., Gonulalan, Z. & Kolemen, U. (2024). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus nigra* leaves: elucidation, antimicrobial, antioxidant activities and quantification of phenolics. *Chemical Papers*, 78 (1), 473-481. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-03103-9>
- [38] Ishak, N. A. I. M., Kamarudin, S. K., Timmiati, S. N., Sauid, S. M., Karim, N. A. & Basri, S. (2023). Green synthesis of platinum nanoparticles as a robust electrocatalyst for methanol oxidation reaction: Metabolite profiling and antioxidant evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 382, 135111. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135111>