

تهیه نانوذرات آلومینا به روش تخریب حرارتی با استفاده از کمپلکس باز شیف

آلومینیوم و بررسی فعالیت ضدسرطانی ترکیبات تهیه شده

زینب عباسی^۱، مهدی صالحی^{۱*}، علی خالقیان^۲^۱سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده شیمی، گروه شیمی معدنی^۲سمنان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده بیوشیمی

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۱۷

تاریخ تصحیح: ۹۹/۰۲/۳۱

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۱

چکیده

در کار حاضر، یک لیگاند باز شیف از تراکم ۵- برم ۲- هیدروکسی بنز آلدهید با ۸- آمینو کوئینولین به همراه کمپلکس این لیگاند با فلز آلومینیوم تهیه شدند. ترکیبات سنتز شده با روش‌های آنالیز عنصری و طیف‌سنجی FTIR و انتقال الکترونی UV-Vis شناسایی شدند. نمونه آلومینایی با ساختار نانومتری توسط روش تخریب حرارتی، از کمپلکس باز شیف آلومینیوم بدست آمد. برای این منظور از کمپلکس آلومینیوم برای تولید نانو آلومینا استفاده شد. برای شناسایی فاز، میزان بلورینگی و تعیین اندازه بلورک‌های محصول از آنالیز پراش اشعه X و به منظور بررسی نوع پیوندها از آنالیز طیف سنجی FTIR استفاده شد. همچنین پارامترهای سلولی و فاصله بین صفحه ای از روی الگوی XRD توسط آنالیز ریتولد محاسبه شد. برای مشخصه‌یابی سطح و شکل ذرات از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM استفاده شد. ترکیبات سنتز شده برای بررسی خاصیت ضدسرطانی بر روی سلول‌های MKN-45 و LS174T مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های سرطانی در غلظت‌های متفاوت در مدت زمان مشخص تیمار شده و پاسخ سلول‌های سرطانی به غلظت‌های مختلف ترکیبات با روش آزمون رنگ سنجی MTT ارزیابی شد. این ترکیبات از تقسیم سریع سلول‌ها ممانعت کرده و باعث کند شدن روند تکثیر سلول‌های سرطانی شدند. ترکیبات، تکثیر سلول‌های تیمار شده را در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش دادند. طبق نتایج بدست آمده، تیمار سلول‌ها با غلظت افزایش‌دهنده ترکیبات، رشد سلولی را به طور وابسته به غلظت در مدت زمان مشخص کاهش داد.

کلمات کلیدی: کمپلکس باز شیف، فعالیت ضدسرطانی، نانوآلومینا، تخریب حرارتی، آزمون رنگ سنجی MTT.

۱- مقدمه

نانوتکنولوژی یکی از جذاب‌ترین و مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی می‌باشد و قابلیت‌های خود را در کاربردهای گوناگون یکی پس از دیگری عرضه می‌کند. در زمینه انتقال دارو و کاربردهای پزشکی نانو ذرات توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند و نانو فناوری در پیشرفت این زمینه از کاربردها نقش قابل ملاحظه‌ای داشته است. از بین نانو مواد، نانو آلومینا ماده‌ای با کاربردهای بسیار وسیع است و موضوع پژوهش‌های علمی متعددی قرار گرفته است. کلمه آلومینا به یک سری از جامدات غیر آلی دارای فرمول شیمیایی $Al_2O_3(H_2O)_n$ گفته می‌شود. ساختار اکسیدهای آلومینا و هیدروکسیدهای آن به صورت یون‌های آلومینیوم

در یک کئوردیناسیون شش تایی از اتم‌های اکسیژن و یا یون‌های هیدروکسیل می‌باشد. این هشت وجهی‌های کئوردیناسیونی به صورت هگزاگونال یا مکعبی تکرار شده‌اند. مشتقات آلومینا از نظر شیمیایی بسیار پایدار، واکنش ناپذیر و داری استحکام بالا می‌باشند و استفاده از آن‌ها به عنوان اجزاء دما بالا، بستر کاتالیست‌ها و ایمپلنت‌های پزشکی، مواد ساینده و ابزارهای برش، عایق‌ها و اجزاء الکتریکی، کوره‌ها، قطعات الکتریکی و کاتالیست در صنعت حائز اهمیت است [۱-۵].

از طرفی دیگر امروزه پژوهش و تلاش‌های فراوانی برای شناخت و درمان بیماری سرطان انجام می‌شود. سعی محققان بر آن است که در شیمی درمانی از داروهای شیمیایی با منشاء زیستی یا سنتزی استفاده کنند. این روش از مهمترین و موثرترین روشهای درمان سرطان می‌باشد. داروهایی که برای درمان استفاده می‌شوند، با مهار مکانیسم‌های موثر در تقسیم سلولی از رشد و تکثیر سلول سرطانی جلوگیری کرده (داروهای سیتواستاتیک) و یا منجر به مرگ سلول سرطانی می‌شوند (داروهای سیتوتوکسیک). حساسیت سلول‌های سرطانی که به سرعت در حال رشد و تکثیر هستند، به داروهای سیتوتوکسیک بسیار بیشتر از سلول‌های سالم است. داروهای هدفمند در درمان سرطان با تداخل در رشد و تقسیم سلول‌ها، مانع گسترش و رشد تومور می‌شوند. درمان‌های هدفمند می‌توانند بسیار مؤثرتر از سایر درمان‌ها از جمله شیمی درمانی و رادیوتراپی باشد و آسیب کمتری به سلول‌های سالم وارد کنند. امروزه اکثر داروهایی که در درمان سرطان استفاده می‌شوند، داروهای برهمکنش کننده با DNA می‌باشند و مکانیسم اثر آنها شامل اختلال در فرآیند پردازش DNA می‌باشد. این اختلال با القا آپوپتوز منجر به مرگ سلولی می‌شود. برخی از داروهای ضدسرطان به صورت غیر اختصاصی با DNA برهمکنش کرده و موجب آسیب به ژنوم می‌شوند و برخی داروهایی جدید به صورت اختصاصی عمل می‌کنند و به توالی خاصی از DNA متصل می‌شوند.

امروزه محققان به دنبال مشتقات طبیعی با فعالیت بیولوژیکی ذاتی هستند و مطالعات فراوانی در حال انجام شدن می‌باشد. در زمینه درمان سرطان شیمی‌دانان به سمت سنتز مواد جدید با قابلیت مقابله با سلول‌های سرطانی با عوارض جانبی کمتر و اثر بیشتر روی آورده‌اند. برخی باز شیف‌ها و کمپلکس‌های متناظر آنها خواص بیوشیمیایی و دارویی از خود نشان می‌دهند و در بعضی موارد این ترکیبات موجب تسریع عمل دارو می‌شوند. به عنوان مثال برخی کمپلکس‌های باز شیف پتانسیل بالایی برای شیمی درمانی و کاربرد در زمینه ضد سلول‌های سرطانی دارند [۶]. در سال‌های اخیر توجه قابل ملاحظه‌ای به شیمی کمپلکس‌های باز شیف شامل دهنده‌های نیتروژن و اکسیژن در زمینه‌ی کاربردهای بیولوژیکی شده است [۷-۹]. با انتخاب گروه‌های الکترون دهنده و الکترون کشنده در ساختار باز شیف، می‌توان بر همکنش‌های الکترونی و فضایی در اطراف مرکز فلزی را تنظیم کرد و با تغییر لیگاند کمپلکس‌هایی با خواص و اهداف تعیین شده تولید کرد [۱۰-۱۲]. ماهیت یون فلزی و لیگاند، مکان کئوردینه شدن لیگاند، آب‌دوستی و حضور گروه‌های قطبی بر فعالیت‌های بیولوژیکی اثر قابل ملاحظه‌ای دارد. بر

طبق نتایج می‌توان گفت تقریباً کمپلکس‌هایی که در آن‌ها لیگاند باز شیف به فلز کئوردینه می‌شود، فعالیت بیشتری در مقایسه با لیگاندها در برابر میکرو ارگانسیم‌ها از خود نشان می‌دهند.

این مطالعه به منظور سنتز ترکیبات باز شیف جدید و بررسی اثر آن‌ها بر رشد و تکثیر لاین‌های سلولی سرطانی MKN-45 و LS174T طراحی شده است. این بررسی به صورت *In vitro study* انجام شده و اثرات ضدسرطانی ترکیبات و تأثیر مواد بر تکثیر سلولی با استفاده از روش Microculture Tetrazolium Test (MTT) و آپتوز سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. در کار حاضر سنتز و استفاده از کمپلکس‌های باز شیف آلومینیوم به عنوان عامل ضدسرطان انجام شده است. از آنجا که در علم نانو خواص ترکیبات به نحو مطلوبی بهبود می‌یابد، بدین منظور نانو ذرات از روش تخریب حرارتی و با استفاده از کمپلکس‌های سنتز شده به عنوان ماده خام در دماهای مختلف، تهیه شدند. در این قسمت از کار به طور مستقیم، از کمپلکس‌های معدنی به عنوان ماده آغازین، جهت سنتز نانوذرات استفاده شده است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده

۸- آمینو کوئینولین، دی ایزوپروپیل اتر، دی متیل سولفوکسید و آلومینیوم نیترات نه آبه از شرکت مرک خریداری شده و بدون خالص سازی مجدد استفاده شدند. اتانول و متانول دارای درجه‌ی خلوص صنعتی بوده و بعد از تقطیر در آزمایشگاه، مورد استفاده قرار گرفتند. رده سلول‌های سرطانی MKN-45 (سرطان معده) و LS174T (سرطان کولورکتال) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت به صورت آماده خریداری شد. محلول PBS جهت شستشوی فلاسک کشت و سلول‌ها بکار رفت. سلول‌ها در انکوباتور (Memmert) در دمای ۳۷ درجه و پنج درصد دی اکسید کربن نگه داری شدند. نمک MTT و نمک‌های لازم در مطالعات بیوشیمی از سیگما تهیه شد. برای خواندن جذب در مطالعات بیوشیمی از دستگاه اسپکتروفوتومتر و ELISA Reader (BioTek) استفاده شد.

۲-۲- تجهیزات و دستگاه‌های آزمایشگاهی

طیف‌های FTIR ترکیبات به صورت قرص KBr با دستگاه FTIR SHIMADZU، نقطه‌ی ذوب با دستگاه THERMO SCIENTEFIC 9100، آنالیز عنصری توسط دستگاه Elementar Vario CHNSO و طیف الکترونی با دستگاه UV-1650PC SHIMADZU انجام شد. الگوی XRD ترکیب آلومینا با دستگاه BRUKER (D8 ADVANCE) مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر SEM با دستگاه HITACHI S-4160 در شرکت تابان برای بررسی مورفولوژی، بدست آمد.

۲-۳- سنتز لیگاند باز شیف Hqsal^{Br}

این لیگاند باز شیف طبق روش ارائه شده از واکنش تراکمی که در شکل (۱) نشان داده شده است، بدست آمد [۱۳]. بدین منظور، ۵ میلی مول (۱/۰۰۵ گرم) ۵- برمو ۲- هیدروکسی بنز آلدهید در دی ایزو پروپیل اتر حل شده و به آن در حین هم زدن محلول حاوی ۵ میلی مول (۰/۷۲۱ گرم) ۸- آمینو کوئینولین به صورت قطره قطره اضافه شد. این محلول به مدت ۲ ساعت تحت شرایط بازروانی قرار گرفت. پس از تبخیر حلال بلورهای نارنجی رنگ لیگاند، تحت خلأ صاف و خشک شد. لیگاند Hqsal^{Br} با فرمول مولکولی $C_{16}H_{11}BrN_2O$ ، Mol.Wt: 327/18 g/mol و به حالت کریستال‌های نارنجی رنگ می‌باشد. بازده واکنش ۸۸ درصد محاسبه شد و لیگاند توسط روش طیف سنجی FTIR مورد شناسایی قرار گرفت.

۲-۴- سنتز کمپلکس باز شیف آلومینیوم

۳ میلی مول (۰/۹۸۱ گرم) از لیگاند Hqsal^{Br} در حداقل اتانول حل شد. سپس ۱ میلی مول آلومینیوم نیترات (۰/۳۷۵ گرم) در اتانول حل شده و به محلول لیگاند در حین هم زدن به صورت قطره قطره اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت بازروانی شد. رسوب بدست آمده پس از صاف کردن تحت خلأ با ۱۰ میلی لیتر اتر شستشو داده شد و در هوا خشک گردید. بازده واکنش ۸۹ درصد محاسبه شد. کمپلکس بدست آمده، با فرمول مولکولی $C_{48}H_{30}AlBr_3N_6O_3$ و Mol.Wt: 1005.50 g/mol به رنگ نارنجی روشن، با نقطه تجزیه بالاتر از ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. داده‌های طیف FTIR بر حسب cm^{-1} از قرص KBr و طیف الکترونی ترکیب در حلال DMSO در بخش سوم ارائه شده است. نتایج حاصل از آنالیز عنصری این کمپلکس به صورت زیر می‌باشد:

Anal. Calcd. for $C_{48}H_{30}AlBr_3N_6O_3$ (%): C, 57.34; H, 3.01; N, 8.36. Found (%): C, 51.31; H, 2.92; N, 8.5.

۲-۵- سنتز اکسید آلومینیوم به روش تخریب حرارتی

یک گرم از کمپلکس باز شیف آلومینیوم بعد از توزین با ترازوی دقیق دیجیتالی، در بوته به کوره از پیش گرم شده با دمای نهایی ۸۰۰ درجه و به مدت زمان ۱ ساعت منتقل گردید و پس از تجزیه کمپلکس در درون کوره، پودر سفید نانو آلومینا به عنوان محصول نهایی بدست آمد. تصاویر SEM، FTIR و الگوی XRD بدست آمده از محصول مورد نظر به منظور شناسایی و بررسی مورفولوژی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

۲-۶- مطالعه خواص ضدسرطانی ترکیبات سنتز شده**۲-۶-۱- کشت سلول‌های سرطانی**

رده‌های سلولی مورد استفاده در این مطالعه (LS174T و MKN-45) از نوع سلول‌های چسبنده به کف ظرف کشت می‌باشند که جهت ارزیابی اثرات سیتوتوکسیسیته ترکیبات مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (FBS) و پنی سیلین/ استرپتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها رشد داده شدند. جهت جدا نمودن

سلول‌ها از فلاسک از محلول تریپسین EDTA استفاده شد. شمارش سلول‌ها با لام هموسایتومتر انجام گردید. در تمامی تست‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید، که این مقدار همواره بالای ۹۰ درصد بود. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. انکوباسیون در این شرایط تا زمانی ادامه یافت که سلول‌ها از نظر تراکم به میزان مشخصی (در حدود هشتاد درصد فلاسک) رسیدند. قبل و بعد کار تمام محیط و وسایل کار استریل شدند.

۲-۶-۲- تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها (Trypan Blue Assay)

برای انجام آزمایش، در شرایط استریل ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی یکنواخت با حجم برابر تریپان بلو مخلوط شده و پس از گذشت چند دقیقه، ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط با استفاده از لام هموسایتومتر و در خانه‌های مربوط شمارش شد. تریپان بلو از رنگ‌هایی است که به دلیل وجود پمپ‌های غشایی وارد سلول زنده نمی‌گردد و فقط در سلول‌های مرده نفوذ می‌کند، لذا سلول‌های مرده رنگ آبی به خود می‌گیرند که با شمارش آن‌ها و با استفاده از فرمول زیر درصد زنده بودن سلول‌ها تعیین می‌گردد:

$$۱۰۰ \times \text{مجموع سلول‌ها} / \text{تعداد سلول‌های زنده} = \text{درصد زنده بودن سلول‌ها}$$

به منظور بررسی سلول‌ها باید قبل از شروع آزمایش بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده باشند. درصد زنده ماندن پایین صحت و دقت آزمایش را کاهش می‌دهد.

۲-۶-۳- تهیه غلظت‌های مختلف ترکیبات

به منظور تعیین اثرات ترکیبات سنتز شده روی سلول‌های سرطانی متغیر غلظت در مدت زمان ۴۸ ساعت، در این تحقیق در نظر گرفته شد. محلول اولیه هر ترکیب دارای غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر بود. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های متفاوت برابر با صفر، ۱/۱۰، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیبات، تیمار شدند و پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه مراحل کار به صورت سه بار تکرار انجام شد.

۲-۶-۴- بررسی اثرات سیتوتوکسیسیته ترکیبات با استفاده از آزمون رنگ سنجی MTT و سنجش حیات سلول‌ها

روش MTT یک روش رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری میزان حیات سلول و اثرات سیتوتوکسیک ترکیبات می‌باشد. این ماده یک نمک تترازولیوم محلول در آب و زرد رنگ می‌باشد. در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز که فقط در سلول‌های زنده فعال می‌باشند، در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شده و به بلورهای بنفش رنگ فورمازون غیر محلول تبدیل می‌شود، لذا با استفاده از روش رنگ‌سنجی در طول موج ۵۴۰-۵۷۰ نانومتر میزان فورمازون که توسط حلال به شکل محلول در آمده، اندازه‌گیری شده و بدین وسیله میزان توده سلول‌های زنده تعیین می‌گردد [۱۴-۱۵].

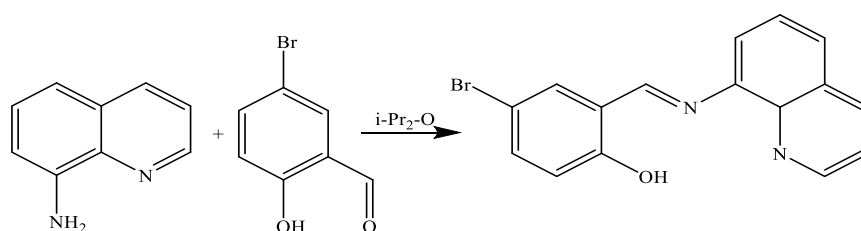
به منظور بررسی تأثیرات سیتوتوکسیک ترکیبات به روش MTT بعد از انتقال سوسپانسیون حاوی $۱۰^3 \times ۵$ سلول به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای و پس از گذشت ۲۴ ساعت و یک دست شدن سلول‌ها، به هر چاهک محیط کشت جدید همراه غلظت‌های

مختلف ترکیبات تهیه شده اضافه شد. چاهکی که تنها حاوی محیط کشت فاقد سلول بود به عنوان بلانک و چاهک‌های پلیت کشت که شامل محیط کشت و سلول بودند، به عنوان کنترل سلول‌های زنده به کار برده شدند. پلیت‌های آماده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و فشار ۵ درصد CO₂ قرار گرفتند. با توجه به اینکه زمان ۴۸ ساعت برای انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف در نظر گرفته شده بود، بعد از اتمام زمان انکوباسیون، پلیت کشت سلول مورد نظر از انکوباتور خارج و مورد بررسی قرار داده شد. برای تهیه محلول MTT به غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر که به طور معمول در این روش استفاده می‌شود، ۵۰ میلی گرم از پودر MTT در ده میلی لیتر PBS حل شده و سپس توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده شد و پس از شیک به مدت ۵ دقیقه پلیت به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. سپس به هر چاهک پلیت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه پلیت در دمای ۳۷ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. چاهک کنترل به عنوان درصد زنده بودن صد درصد سلول‌ها در نظر گرفته شد و جذب مابقی چاهک‌ها نسبت به کنترل مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از فرمول، درصد مهار و زنده بودن سلول‌ها بدست آمد و میزان کشندگی ترکیبات از نمودارهای وابسته به غلظت و انجام محاسبات آماری محاسبه شد. اثرات ترکیبات سنتز شده بر قدرت تکثیر سلولی سلول‌های سرطانی در بخش نتایج، بحث شده است.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- شناسایی لیگاند باز شیف Hqsal^{Br}

این لیگاند باز شیف طی واکنش تراکمی که در شکل زیر نشان داده شده است، تهیه شده و ساختار آن شناسایی شد.



شکل (۱): روش سنتز باز شیف Hqsal^{Br}.

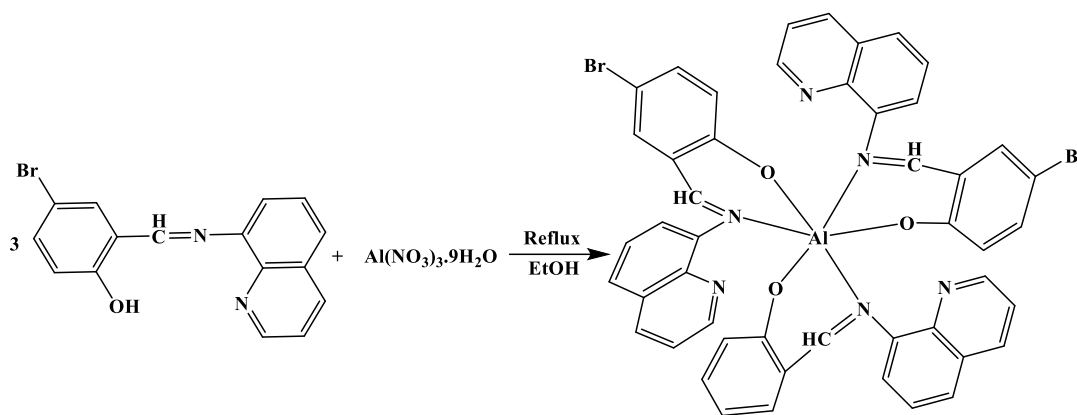
در طیف FTIR لیگاند نوار مربوط به ارتعاش کششی C=N در ۱۶۱۶ cm⁻¹ مشاهده می‌شود و نوار ارتعاش کششی C=O که در طیف مربوط به ۵- برموسالسیسیل‌آلدهید مشاهده می‌شود، حذف شده است. همچنین حذف ارتعاشات کششی N-H آمینی انجام تراکم را ثابت می‌کند. سایر نتایج طیف FTIR لیگاند، در جدول (۱) آورده شده است. طیف زیر قرمز این ترکیب در شکل (۴- الف) ارائه شده است.

جدول (۱): نتایج طیف FTIR لیگاند Hqsal^{Br}.

نوع پیوند	نوع ارتعاش	عدد موجی (cm ⁻¹)
C=N	کششی	۱۶۱۶
C=C	کششی آروماتیک	۱۵۵۸ و ۱۴۹۶
C-O	کششی	۱۲۸۲
OH	کششی	۳۱۳۲

۳-۲- شناسایی کمپلکس آلومینیوم

از واکنش لیگاند Hqsal^{Br} با Al(NO₃)₃.9H₂O کمپلکس باز شیف آلومینیوم تشکیل شد که واکنش سنتز و ساختار پیشنهادی آن در شکل زیر نشان داده شده است:



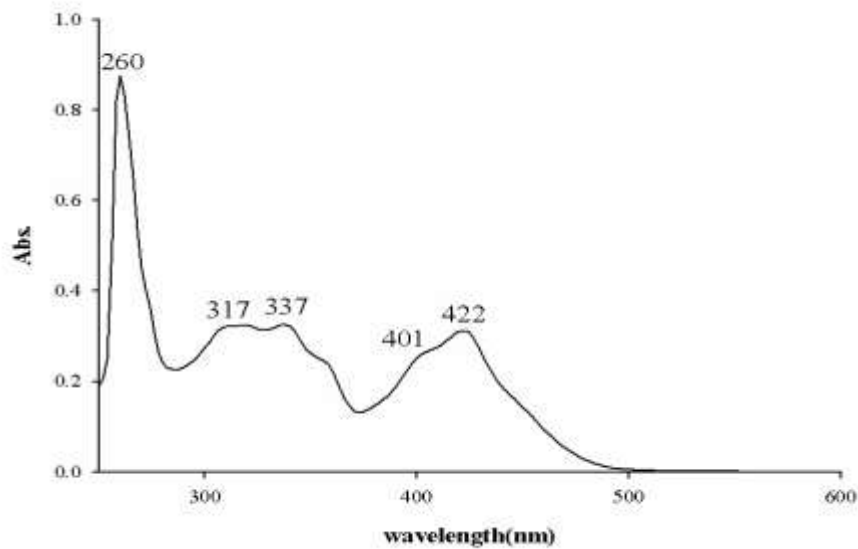
شکل (۲): روش سنتز کمپلکس آلومینیوم.

شکل (۴-ب)، طیف FTIR کمپلکس آلومینیوم را نشان می‌دهد. در این طیف نوار موجود در ۱۶۰۸ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش کششی C=N است که نسبت به لیگاند اولیه به اعداد موجی پایین‌تر منتقل شده است. نتایج دیگر طیف FTIR در جدول (۲) آورده شده است:

جدول (۲): نتایج طیف FTIR کمپلکس آلومینیوم.

نوع پیوند	نوع ارتعاش	عدد موجی (cm-1)
C=N	کششی	۱۶۰۸
C=C	کششی آروماتیک	۱۵۲۹ و ۱۴۵۶
C-O	کششی	۱۱۶۶

شکل (۳) طیف الکترونی کمپلکس آلومینیوم با غلظت ۱۰^{-۵} مولار در حلال DMSO را نشان می‌دهد. طیف انتقال الکترونی این ترکیب در ناحیه فرابنفش شامل پیک‌هایی در ۲۶۰، ۳۱۷، ۳۳۷، ۴۰۱ و ۴۲۲ نانومتر می‌باشد، که نشان‌دهنده انتقالات درون لیگاندی و فلز به لیگاند می‌باشد.

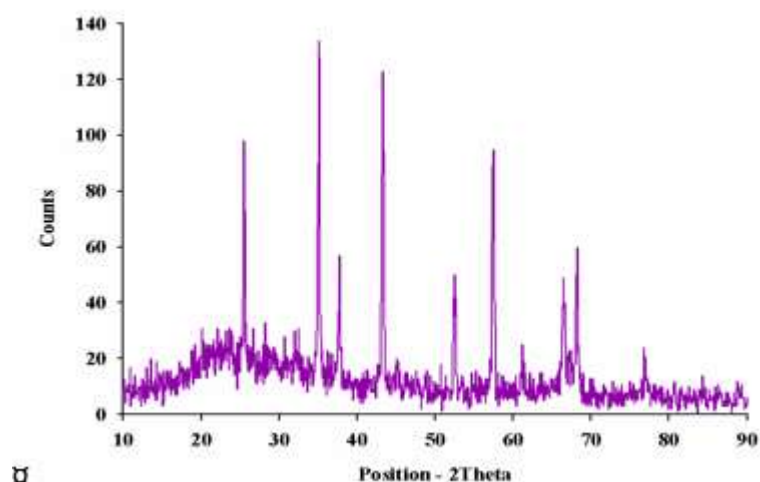


شکل (۳): طیف الکترونی کمپلکس آلومینیوم با غلظت 10^{-5} mol/L در حلال DMSO.

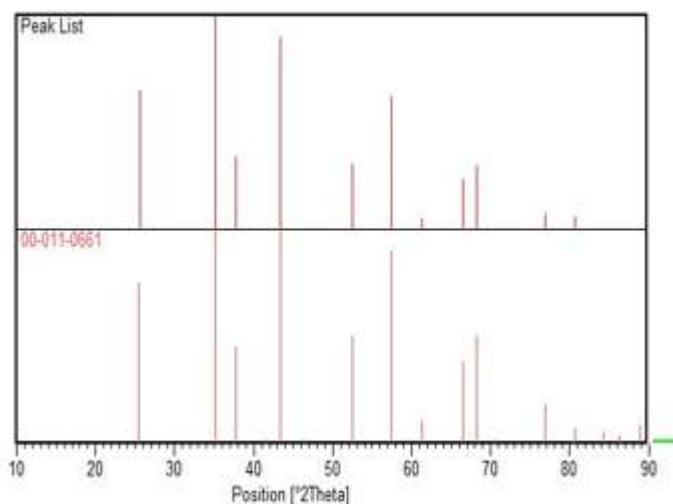
۳-۳- شناسایی و تأیید ساختار نانو آلومینا حاصل از کمپلکس آلومینیوم

۳-۳-۱- بررسی الگوی XRD نانو آلومینا

الگوی XRD ترکیب نانوالومینای سنتز شده با استفاده از روش تخریب حرارتی حالت جامد و با ماده اولیه کمپلکس باز شیف آلومینیوم در شکل (۴) نشان داده شده است. همچنین مقایسه الگوی XRD با رفرنس مربوط به آلفا آلومینای مرجع در شکل (۵)، نشان دهنده تطابق کامل این ماده با مرجع می باشد [۱۶-۱۷]. پیک‌های محدوده ۱۰ تا ۹۰ درجه (بر حسب 2θ) در طیف نمونه با کارت استاندارد شماره JCPDS=00-011-0661 مطابقت دارد. بر اساس این تصویر قله‌های پراش با 2θ برابر $25/5350$ ، $35/0943$ ، $37/7142$ ، $43/3308$ ، $57/4568$ و $68/1795$ مربوط به Al_2O_3 با ساختار رومبوهدرال با گروه فضایی R-3c می باشد و شدیدترین قله در 2θ برابر $35/0943$ می باشد.



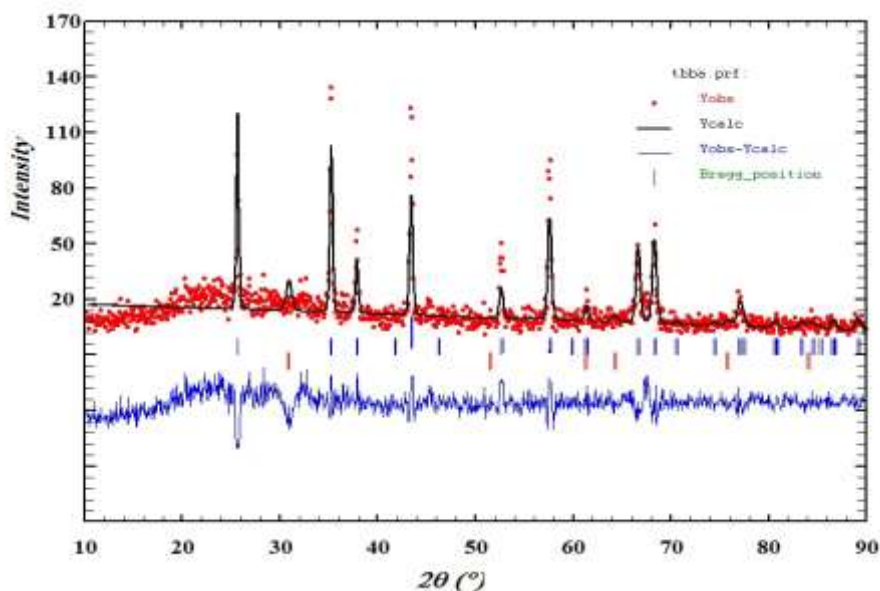
شکل (۴): الگوی XRD نمونه نانوالومینای سنتز شده.



شکل (۵): مقایسه الگوی XRD نانوالومینای سنتز شده و نمونه مرجع.

شکل (۶) الگوی XRD و آنالیز ریتولد نمونه نانوالومینا را نشان می‌دهد. الگوی XRD نمونه سنتز شده نشان دهنده تشکیل نانوذره آلفا آلومینا می‌باشد که در آن ترکیب فازی از طریق تکنیک پودر اشعه X و تحلیل ساختاری از طریق برنامه‌ی Full prof مورد بررسی قرار گرفت. خطوط قرمز نشان دهنده شدت‌ها می‌باشد و خطوط سیاه رنگ داده‌های محاسبه شده هستند و خطوط آبی رنگ اختلاف یا میزان پراکندگی مقادیر تجربی و محاسبه‌ای را نشان می‌دهد. طبق نتایج بدست آمده این الگو با ساختار رومبوهدرال تطابق دارد و دارای گروه فضایی R-3C می‌باشد. الگوی حاصل دارای سه فاز می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که الگوی XRD تطابق خوبی با الگوی آلفا آلومینا دارد. در این نمونه درصد خلوص فاز آلفا آلومینا برابر شصت و هشت درصد می‌باشد.

برای محاسبه فاصله بین صفحه‌های (d_{hkl}) ، از رابطه براگ $(n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta)$ استفاده شد که در آن، λ طول موج پراش اشعه ایکس $(\lambda = 0.154 \text{ nm})$ و n مرتبه پراش اصلی است که برابر ۱ در نظر گرفته می‌شود. پارامترهای سلولی و فاصله بین صفحه‌ای از روی الگوی XRD مربوط و آنالیز ریتولد محاسبه شده و در جدول (۳) گزارش شده است.



شکل (۴): الگوی XRD و آنالیز ریتولد نمونه‌ی نانوالومینای سنتز شده.

جدول (۳): فاصله بین صفحه‌ای، پارامترهای شبکه و اطلاعات آنالیز ریتولد نمونه.

a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha = \beta$ (°)	γ (°)	R_{Bragg}	R_f	χ^2	$\text{Sin}\theta$	d (nm)
۴/۷۱۶۴	۴/۷۱۶۴	۱۳/۰۰۹۱	۹۰	۱۲۰	۲/۵۵	۲/۴	۲/۵۵	۰/۳۰۲۲	۰/۲۵۵

جدول (۴) نشان دهنده‌ی اندازه کریستال نانوماده سنتز شده می‌باشد. اندازه‌ی کریستال با استفاده از معادله‌ی شرر $(t = 0.9\lambda / B_{1/2} \cos \theta)$ محاسبه شده که در آن λ طول موج اشعه X (۰/۱۵۴ نانومتر)، θ زاویه پراش در نقطه اوج پیک و $B_{1/2}$ پهنای پیک در نصف ارتفاع بیشینه (FWHM) بر حسب رادیان و t برابر اندازه متوسط بلورک می‌باشد که در اینجا برابر ۲۴ نانومتر محاسبه شده است.

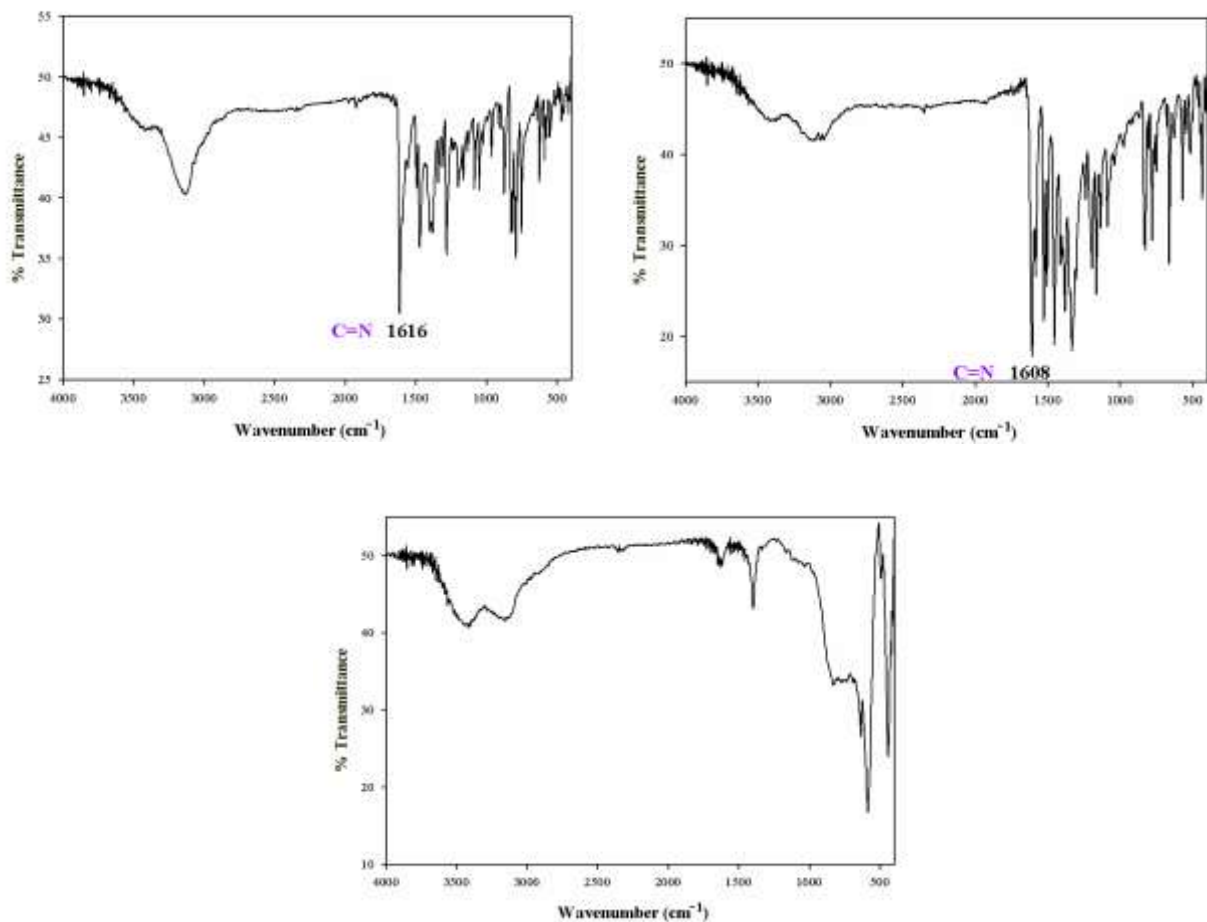
جدول (۴): اطلاعات حاصل از معادله شرر.

2θ	θ	$\text{Cos}\theta$	$B_{1/2}$ (°)	$B_{1/2}$ (rad)	t (nm)
۳۵/۱۸۳۳	۱۷/۵۹	۰/۹۵۳۲	۰/۳۴۶۸	۰/۰۰۶۰	۲۴

۲-۳-۳- بررسی طیف FTIR نانو آلومینا

شکل (۷-ج) طیف FTIR مربوط به نانوالومینا سنتز شده در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ را نشان می‌دهد. با توجه به طیف FTIR مدهای نوسانی در ناحیه $900-400 \text{ cm}^{-1}$ که مربوط به نوسانات کششی و خمشی پیوند Al-O می‌باشد، نمایان است.

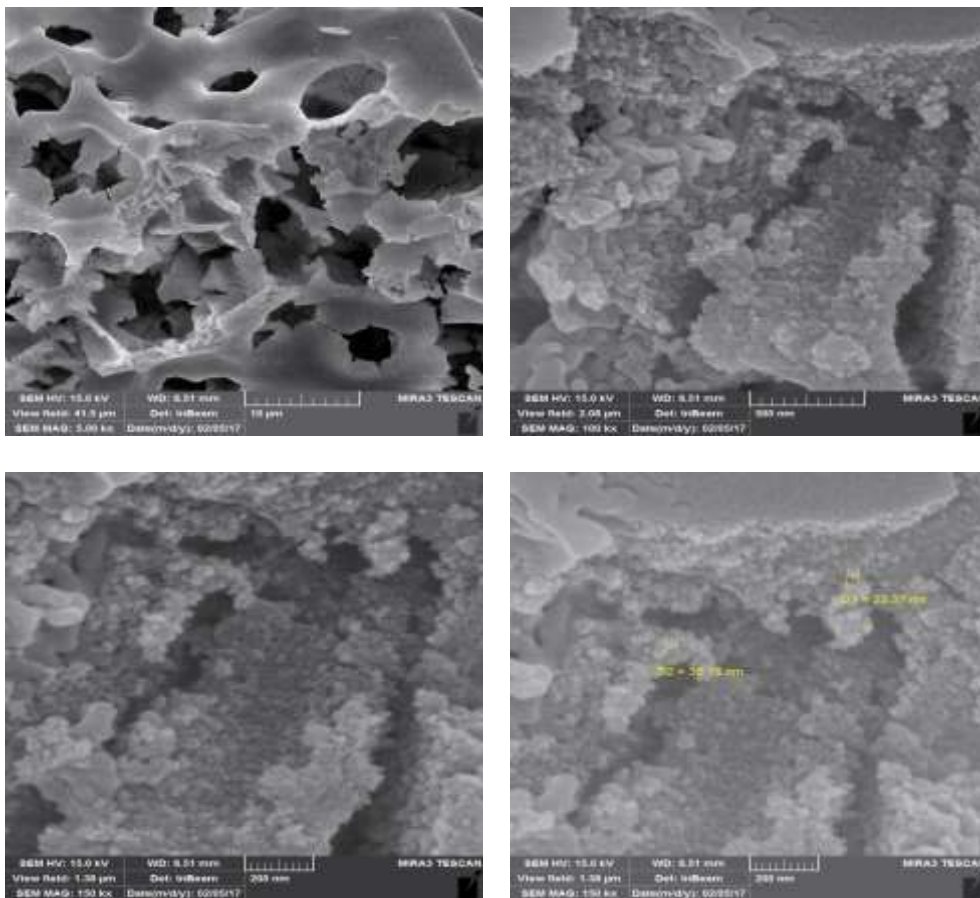
از مقایسه این طیف با شکل طیف مربوط به کمپلکس آلومینیوم، مشخص می‌شود که ناحیه ی پیک‌های مربوط به فاز آلی حذف شده و یا از شدت آنها کاسته شده است. پیک موجود در ناحیه ی 1625 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی هیدروکسید و همچنین باند پهن جذبی حول 3425 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسید می‌باشد. مدهای نوسانی ظاهر شده در 586 cm^{-1} و 443 cm^{-1} مربوط به آلومینای اکتاهدرال و حضور AlO_6 می‌باشند که مشخصه ی باند جذبی آلفا آلومینا هستند و با نتیجه آنالیز پراش اشعه X این نمونه در توافق می‌باشند [۱۸-۱۹].



شکل (۷): طیف FTIR (الف): لیگاند Hqsal^{Br} ، (ب): کمپلکس آلومینیوم و (ج): نانوذره آلومینا.

۳-۳-۳- بررسی مورفولوژی نانو آلومینا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

از تصاویر میکروسکوپ الکترونی برای بررسی ریخت‌شناسی سطوح نمونه، اندازه دانه‌ها و نحوه‌ی در کنار هم قرار گرفتن آن‌ها استفاده می‌شود. شکل (۸) تصاویر SEM مربوط به نانو ذره آلفا آلومینا در دمای ۸۰۰ درجه سانتیگراد را نشان می‌دهد. نمونه بصورت کریستالی و دارای مورفولوژی پارتیکل بوده و دارای خلوص بالا می‌باشد. وجود ذرات ریز در اندازه‌های ۲۰-۳۰ نانومتر در شکل مشخص می‌باشد و نشان‌دهنده‌ی کریستال‌های فاز آلفا آلومینا می‌باشد.



شکل (۸): تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌ی آلفا آلومینا.

۳-۴- بررسی خواص ضدسرطانی ترکیبات

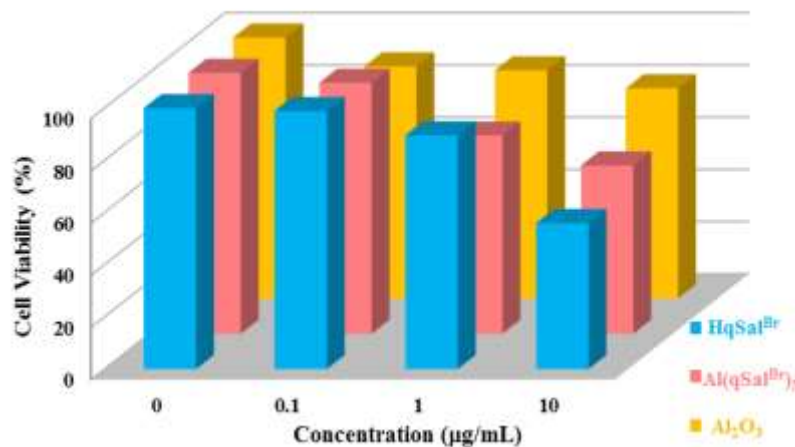
۳-۴-۱- نتایج حاصل از بررسی بقای سلول‌های سرطانی

به منظور بررسی اثر ترکیبات سنتز شده روی بقای سلول‌ها و همچنین مطالعات بازدارنده رشد سلولی، سلول‌های سرطانی در محیط RPMI 1640 حاوی ده درصد FBS، کشت داده شدند. بعد از اینکه تعداد سلول‌ها به اندازه کافی رسید و درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۰ درصد شد، سلول‌ها برای بررسی بقا با غلظت‌های صفر تا ده میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیبات

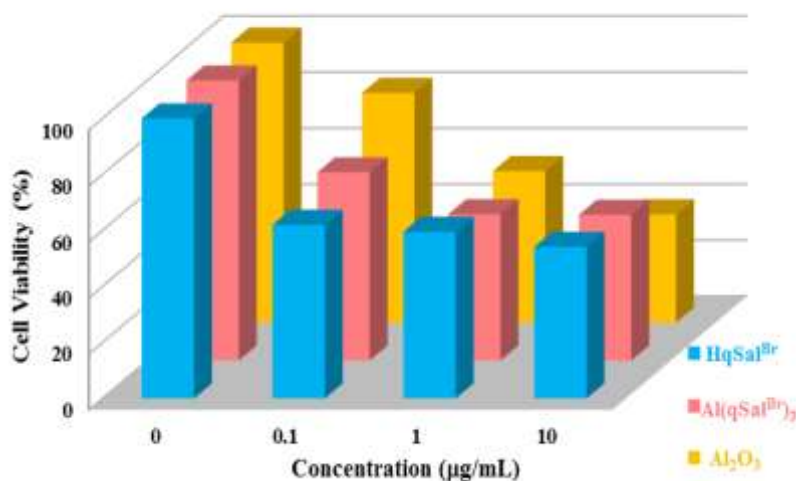
تیمار شدند. تیمار سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت در زمان ۴۸ ساعت صورت گرفت و نتایج در شکل‌های (۹) و (۱۰) آورده شده است.

خاصیت سیتوتوکسیسیته لیگاند $HqSal^{Br}$ و کمپلکس آلومینیوم و نانوالومینا سنتز شده از این کمپلکس بر روی سلول‌های سرطانی MKN-45 و LS174T بررسی شد. با توجه به نتایج درصد بقای سلول‌ها بعد از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت، در اثر افزایش غلظت، کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌ها مشاهده شد. رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیبات سنتز شده پس از تیمار بیشترین میزان کاهش را نشان می‌دهد. این کاهش مربوط به فعال شدن بیشتر آپوپتوز سلول‌های سرطانی در تیمار با غلظت بالاتر ترکیبات سنتز شده می‌باشد.

نتایج نشان می‌دهد که سه ترکیب مورد استفاده در این قسمت از کار اثر ضدسرطانی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی LS174T دارند و میزان بقای این سلول‌ها در غلظت‌های برابر نسبت به سلول‌های MKN-45 کمتر می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که کلیه ترکیبات سنتز شده دارای اثرات ضد توموری قابل توجهی بر ضد لاین سلولی می‌باشند و باعث کاهش تکثیر سلول‌های توموری در مراحل اولیه سرطانی و افزایش آپوپتوز سلول‌ها می‌شوند. آپاپتوز یک مکانیسم دفاعی سلول‌ها در برابر سرطانی شدن است و اختلال در این فرایند به عنوان عامل ایجاد و گسترش سرطان به شمار می‌آید. بایستی توجه داشت که نوع برهم کنش بین ترکیبات و سیستم‌های زیستی بستگی به فاکتورهای مختلف نظیر غلظت، pH محیط، زمان و دما دارد. در واقع می‌توان گفت که نوع برهم کنش و تأثیرات سیتوتوکسیک ترکیبات شیمیایی بر سیستم‌های بیولوژیکی می‌تواند با توجه به این عوامل تنظیم شود. تأثیر قابل توجه ترکیبات سنتز شده در القای آپاپتوز می‌تواند حائز اهمیت باشد و نتایج بدست آمده اشاره به این امر دارد که ترکیبات سنتز شده می‌توانند کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بعدی و در نتیجه طراحی داروهایی با خاصیت ضدسرطانی باشند.



شکل (۹): در صد بقای سلول‌های تیمار شده با ترکیبات در غلظت‌های مختلف پس از گذشت ۴۸ ساعت روی سلول‌های MKN-45.



شکل (۱۰): در صد بقای سلول‌های تیمار شده با ترکیبات در غلظت‌های مختلف پس از گذشت ۴۸ ساعت روی سلول‌های LS174T.

۴- نتیجه گیری

با توجه به این که از جمله معضلات شایع در دنیای پزشکی مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر داروهای ضد تومور می‌باشد، پیدا کردن ترکیبات ضدسرطانی جدید با بیشترین فعالیت و کمترین اثرات جانبی بسیار لازم و ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون پژوهش‌های متعددی بر روی انواع کمپلکس‌های معدنی و فعالیت بیوشیمیایی آن‌ها انجام شده است. از آنجا که در علم نانو خواص ترکیبات به نحو مطلوبی بهبود می‌یابد، ترکیبات سنتزی معدنی به عنوان ماده اولیه برای سنتز نانو اکسیدهای فلزی استفاده شدند. بدین منظور نانو ذرات از روش تخریب حرارتی و با استفاده از کمپلکس‌های سنتز شده به عنوان ماده خام در دماهای مختلف، تهیه شدند. در این قسمت از کار به طور مستقیم، از کمپلکس‌های معدنی به عنوان ماده آغازین، جهت سنتز نانوذرات استفاده شده است. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد سرطانی ترکیبات تهیه شده نشان می‌دهد که کلیه ترکیبات دارای اثرات ضد توموری قابل توجهی بر ضد لاین سلولی می‌باشند و باعث کاهش تکثیر سلول‌های توموری در مراحل اولیه سرطانی شدند. بیشترین اثرات مهاری رشد بر روی سلول‌های سرطانی در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ترکیبات مشاهده شد و مشاهده شد به طور کلی ترکیبات اثر ضدسرطانی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی LS174T دارند و میزان بقای این سلول‌ها در غلظت‌های برابر نسبت به سلول‌های MKN-45 کمتر می‌باشد.

۵- مراجع

- [1] Z. Li, H. Wang, S. He, Y. Lu, M. Wang, *Mater. Lett.* **60** (2006) 356.
- [2] F. Mirjalili, M. Hasmaliza, L.C. Abdullah, *Ceram. Int.* **36** (2010) 1253.
- [3] Z. Yonggang, *Inorg. Chem. Ind.* **3** (2001) 6.
- [4] M. Shojaie-Bahaabad, E. Taheri-Nassaj, *Mater. Lett.* **62** (2008) 3364.
- [5] A. Afkhami, M. Saber-Tehrani, H. Bagheri, *J. Hazard. Mater.* **181** (2010) 836.

- [6] I.P. Ejidike, P.A. Ajibade, *Rev. Inorg. Chem.* **35** (2015) 191.
- [7] S. Kumar, D.N. Dhar, P.N. Saxena, *journal of scientific and industrial research*, **68** (2009) 181.
- [8] S. Arulmurugan, *Rasayan J. Chem.* **6** (2010) 385.
- [9] A.M. Abu-Dief, I.M.A. Mohamed, *J. Basic Appl. Sci.* **4** (2015) 119.
- [10] M. Rezaeivala, H. Keypour, *Coord. Chem. Rev.* **280** (2014) 203.
- [11] C. Ecjhao, I.J. Patel, S.J. Parmar, *Synthesis (Stuttg.)* **7** (2010) 617.
- [12] W. Radecka-Paryzek, V. Patroniak, J. Lisowski, *Coord. Chem. Rev.* **249** (2005) 2156.
- [13] J. Sirirak, W. Phonsri, D.J. Harding, P. Harding, P. Phommon, W. Chaoprasa, R.M. Hendry, T.M. Roseveare, H. Adams, *J. Mol. Struct.* **1036** (2013) 439.
- [14] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **65** (1983) 55.
- [15] Z. Shokohi-pour, H. Chiniforoshan, A.A. Momtazi-borojeni, B. Notash, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **162** (2016) 34.
- [16] J. Shah, M.R. Jan, *J. Ind. Eng. Chem.* **20** (2014) 3604.
- [17] H. Li, H. Lu, S. Wang, J. Jia, H. Sun, X. Hu, *Ceram. Int.* **35** (2009) 901.
- [18] K.R. Nemade, S.A. Waghuley, *Ceram. Int.* **40** (2014) 6109.
- [19] M. Salehi, E. Arabsarhangi, *Int. Nano Lett.* **5** (2015) 141.

