

Nghiên cứu tạo chế phẩm nano vàng/carboxymethyl chitosan bằng kỹ thuật bức xạ ứng dụng làm chất chống oxy hóa

Lê Quang Luân^{1*}, Nguyễn Thành Long², Nguyễn Hải Nam³, Đỗ Thị Phượng Linh⁴

¹Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh

²Công ty Vắcxin và Sinh phẩm Nha Trang

³Công ty Bía Dung Quốc

⁴Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 20.3.2015, ngày chuyển phản biện 26.3.2015, ngày nhận phản biện 6.5.2015, ngày chấp nhận đăng 11.5.2015

Các chế phẩm nano vàng có kích thước 5,2; 6,7 và 7,3 nm được tạo ra bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma các dung dịch Au^{3+} (HauCl_4) có nồng độ tương ứng là 0,25; 0,5 và 1mM sử dụng carboxymethyl chitosan làm chất ổn định. Các đặc trưng quang học và kích thước hạt của chế phẩm nano vàng được xác định bằng phương pháp đo phổ UV-Vis và chụp ảnh TEM. Hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng ở các nồng độ 0,025-0,5mM cũng được xác định bằng phương pháp sử dụng chất bắt gốc tự do ABTS (để đánh giá khả năng chống oxy hóa của AuNPs) và kết quả nhận được cho thấy, khi nồng độ nano vàng càng cao thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao và thời gian phản ứng xảy ra càng nhanh. Ở nồng độ 0,375mM, hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng đạt hiệu quả cao nhất chỉ trong 3-5 phút. Hoạt tính chống oxy hóa của nano vàng có xu hướng tăng dần theo thời gian và cao hơn so với acid ascorbic ở cùng nồng độ sử dụng. Các kết quả đạt được cho thấy, chế phẩm nano vàng/carboxymethyl chitosan tạo được theo phương pháp chiếu xạ này có thể được sử dụng làm nguyên liệu tiềm năng để sản xuất các sản phẩm chống oxy hóa dùng trong các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm.

Từ khóa: ABTS, carboxymethyl chitosan, chất chống oxy hóa, chiếu xạ, nano vàng.

Chỉ số phân loại 2.9

Đặt vấn đề

Nhiều nghiên cứu cho thấy, nano vàng có ứng dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong mỹ phẩm, nano vàng có tính chống oxy hóa rất mạnh và được bổ sung vào các sản phẩm chăm sóc da để loại bỏ các gốc tự do và ức chế các phản ứng oxy hóa giúp trẻ hóa da hiệu quả. Trong ứng dụng công nghiệp, nano vàng có thể được sử dụng làm xúc tác hiệu quả hay phủ điện cực giúp chống oxy hóa và ăn mòn. Trong y học, nano vàng có ái lực rất lớn với các tế bào ung thư, chính vì vậy chúng được ứng dụng để chẩn đoán và tầm soát khối u hoặc làm chất dẫn truyền thuốc điều trị ung thư. Nano vàng đã được chứng minh là có khả năng hấp thụ ánh sáng và chuyển hóa toàn bộ năng lượng này thành nhiệt trong thời gian gần như tức thì ($\sim 10^{-12}$ giây) và do đó nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng bức xạ laser bước sóng ~ 520 nm, bức xạ laser cận hồng ngoại bước sóng ~ 800 nm để kích thích làm nóng hạt nano vàng sau khi đã được hướng đích, tập trung đến các mô ung thư cần điều trị [1-3]. Các nghiên cứu mới đây cho thấy, khi xạ trị kết hợp tiêm nano vàng thì có thể tiêu

diệt dứt điểm khối u trong thời gian ngắn [4-8].

Vật liệu nano chủ yếu được chế tạo bằng phương pháp từ trên xuống (top - down) và phương pháp từ dưới lên (bottom - up). Phương pháp top - down là phương pháp tạo vật liệu có kích thước nano từ vật liệu khối ban đầu hay từ hạt có kích thước lớn hơn bằng cách nghiền cơ học, ăn mòn laser, điện phân kết hợp siêu âm... [9]. Phương pháp bottom - up là phương pháp tạo các hạt nano từ các ion bằng nhiều cách khác nhau như khử hóa học (dùng các tác nhân hóa học như citric acid, vitamin C, NaBH_4 , cồn, ethylene glycol để khử ion kim loại thành kim loại [10]); khử vật lý (dùng các tác nhân vật lý như điện tử, sóng điện từ năng lượng cao như tia gamma, tia tử ngoại, tia laser khử ion kim loại thành kim loại [9]); khử hóa lý (kết hợp cả vật lý và hóa học như điện phân kết hợp với phương pháp siêu âm để chế tạo các hạt nano, dây nano, ống nano, bột nano...) và khử sinh học (sử dụng các tác nhân như nấm, vi khuẩn, virus có khả năng khử ion vàng tạo nguyên tử vàng kim loại [11, 12]).

*Tác giả chính: Tel: 0913711223; Email: lequangluan@gmail.com

PREPARATION OF GOLD/ CARBOXYMETHYL CHITOSAN NANOPARTICLES BY RADIATION TECHNIQUE FOR APPLICATION AS AN ANTIOXIDANT

Summary

Gold nanoparticles (AuNPs) with the sizes of 5.2, 6.7 and 7.3 nm have been synthesised by γ -irradiation of Au^{3+} solutions with the corresponding concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0mM using carboxymethyl chitosan as stabiliser. The optical characteristics and particle sizes of AuNPs have been determined by UV-Vis spectra and TEM images respectively. The antioxidant activity of AuNPs has been investigated at the concentrations of 0.025mM and 0.5mM using ABTS scavenging activity. The results have shown that the higher concentration of AuNPs displays the stronger antioxidant activity and the faster reaction time. The highest antioxidant activity has been found at the concentration of 0.375mM within 2-3 minutes. The antioxidant activity of AuNPs increases by the increase of reaction time and is higher than that of ascorbic acid. Thus, gold/carboxymethyl chitosan nanoparticles prepared by γ -irradiation method can be potentially utilised for the production of antioxidant products in pharmaceuticals, functional foods and cosmetics.

Keywords: ABTS, antioxidant, carboxymethyl chitosan, gold nanoparticles, γ -irradiation.

Classification 2.9

Phương pháp điều chế keo vàng nano bằng bức xạ gamma Co-60 có nhiều thuận lợi so với các phương pháp khác [13] như phản ứng thực hiện trong điều kiện thường, hiệu suất cao; tạo ra hạt vàng nano với trạng thái ổn định và tinh khiết cao, không bị nhiễm bẩn bởi các oxit kim loại như khi sử dụng các phương pháp khác, dễ dàng kiểm soát kích thước hạt vàng thông qua điều chỉnh suất liều chiếu xạ và nồng độ các chất phản ứng. Thêm vào đó, chiếu xạ tia γ là phương pháp khá thân thiện với môi trường, không để lại bất kỳ dư lượng độc hại nào, có khả năng áp dụng trên quy mô lớn và đáp ứng được yêu cầu sản xuất sạch. Quá trình

khử ion kim loại bằng bức xạ có thể được kiểm soát mà không cần sử dụng thừa các chất khử hay tạo ra những sản phẩm oxy hóa trung gian không mong muốn trong quá trình sản xuất. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm ứng dụng công nghệ bức xạ để tạo ra chế phẩm vàng nano có kích thước hạt nhỏ được ổn định bằng carboxymethyl chitosan, một sản phẩm polymer tự nhiên tan trong nước và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nhằm hướng tới sản xuất và ứng dụng làm chất chống oxy hóa trong chẩn đoán, điều trị ung thư.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Muối vàng hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sử dụng trong nghiên cứu là của Merck, Đức. Chất ổn định carboxymethyl chitosan (CM-chitosan) do Koyou Chemical Industrial Co. Ltd, Nhật Bản cung cấp. ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) là của Biobasic, Canada và các hóa chất tinh khiết khác như sodium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) là của Sigma, Mỹ.

Tạo chế phẩm vàng nano - CM-chitosan bằng phương pháp chiếu xạ

Các dung dịch chiếu xạ có nồng độ Au^{3+} là 0,25; 0,5 và 1mM ổn định trong CM-chitosan ở các nồng độ 0,25; 0,5 và 1% được tạo ra từ các dung dịch gốc (stock) 10mM Au^{3+} và 2% CM-chitosan theo các tỷ lệ phù hợp với nước khử ion và được điều chỉnh đến pH ~ 8 bằng dung dịch NH_4OH 2,5%. Tiến hành chiếu xạ các hỗn hợp nêu trên trong dải liều 4-8 kGy bằng nguồn xạ gamma Co-60 SVST-Co-60/B tại Trung tâm Nghiên cứu và triển khai công nghệ bức xạ với suất liều là 1,3 kGy/h. Dung dịch chứa các hạt nano vàng - CM-chitosan tạo ra được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định các đặc trưng của chế phẩm

Để đo phổ tử ngoại (UV: Ultra Violet), các mẫu vàng nano được pha loãng trong nước khử ion sao cho nồng độ Au^{3+} là 0,1mM và tiến hành đo trên máy quang phổ UV-Vis (UV-2401PC, Shimadzu, Nhật Bản). Kích thước và phân bố kích thước hạt vàng nano trong sản phẩm chiếu xạ được xác định bằng phương pháp chụp ảnh hiển vi điện tử (TEM: Transmission Electron Microscope) trên thiết bị hiển vi điện tử truyền qua (JEM 1400, JEOL, Nhật Bản) theo phương pháp của Arya và cộng sự [14].

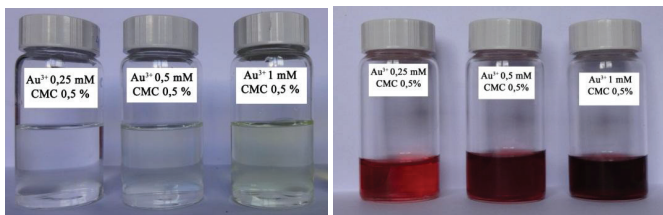
Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm vàng nano

Hoạt tính oxy hóa của chế phẩm vàng nano được xác định theo phương pháp sử dụng ABTS làm chất có khả năng phản ứng với các chất chống oxy hóa. Dung dịch gốc tự do ABTS^{•+} được chuẩn bị bằng cách pha dung dịch K₂S₂O₈ (7,4mM) với dung dịch ABTS (2,6mM) ở tỷ lệ 1:1 và giữ trong điều kiện tối ở nhiệt độ 4°C. 1 ml dung dịch gốc tự do ABTS^{•+} được cho vào 0,6 ml dung dịch nano vàng - CM-chitosan và tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 734 nm tại các thời điểm 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 và 60 phút. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo phương pháp của Re [15] và Thaipong [16].

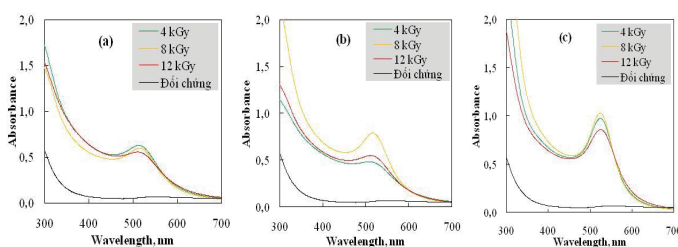
Kết quả và thảo luận

Xác định liều chuyển hóa bão hòa để tạo vàng nano - CM-chitosan

Kết quả hình 1 cho thấy, sau khi chiếu xạ thì các ion Au³⁺ trong dung dịch bị khử thành các hạt vàng dạng nano và làm cho dung dịch có màu đỏ tím, đồng thời có đỉnh hấp thụ ($\lambda_{\max}$) dao động trong khoảng 510–526 nm (hình 2). Đây là đỉnh hấp thụ cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng của vàng nano do sự dao động cộng hưởng giữa photon ánh sáng tới với electron vùng dẫn của vàng nano, hiện tượng này không có đối với vàng khối [17, 18].



Hình 1: dung dịch Au³⁺/CM-chitosan trước khi chiếu xạ (trái) và chế phẩm nano vàng - CM-chitosan hình thành sau khi chiếu xạ



Hình 2: phổ UV-Vis của dung dịch chứa 0,25 (a); 0,5 (b) và 1mM Au³⁺ (c) trong 0,5% CM-chitosan ở các liều xạ khác nhau

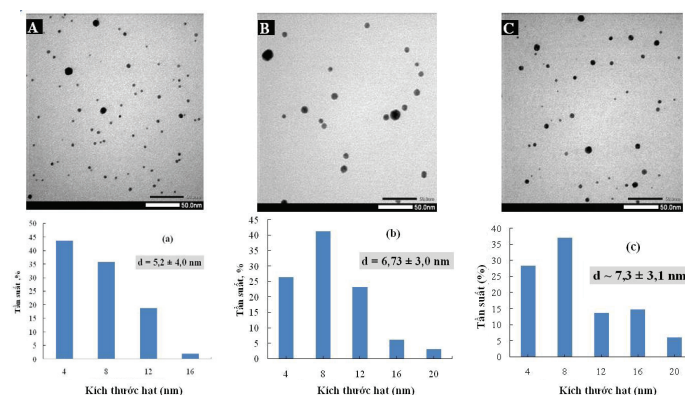
Liều chuyển hóa bão hòa là liều xạ mà tại đó các ion Au³⁺ trong dung dịch chiếu xạ bị khử hoàn toàn thành Au⁰ (vàng kim loại) và khi đó mật độ quang (OD) đạt

giá trị cực đại. Giá trị $\lambda_{\max}$ và OD của các mẫu chiếu xạ ở các liều khác nhau được trình bày trong bảng 1 cho thấy, khi chiếu xạ dung dịch 0,25mM Au³⁺/0,5% CM-chitosan thì $\lambda_{\max} \sim 510$ nm và giá trị OD đạt giá trị lớn nhất (0,6292) tại liều xạ 4 kGy và sau đó giảm dần khi tăng liều xạ lên 8 và 12 kGy. Kết quả này cho thấy, liều 4 kGy chính là liều dịch chuyển bão hòa và khi tăng liều chiếu thì các gốc tự do $\cdot\text{OH}$ sinh ra từ các phản ứng phân ly bức xạ sẽ oxy hóa các hạt nano vàng vừa tạo ra thành dạng cụm, làm giảm số lượng hạt vàng nano và giảm độ hấp thụ của dung dịch. Sự khác biệt về vị trí đỉnh hấp thụ gây ra có thể là do kích thước khác nhau của các hạt nano vàng - CM-chitosan hình thành tại các liều chiếu khác nhau. Kết quả bảng 1 cũng cho thấy, đối với dung dịch có nồng độ 0,5mM Au³⁺/0,5% CM-chitosan thì liều chuyển bão hòa cũng xác định được là 4 kGy với đỉnh hấp thụ cực đại ở $\lambda_{\max} \sim 511$ nm và giá trị OD = 0,7901. Trong khi đó, đối với dung dịch 1mM Au³⁺/0,5% CM-chitosan thì liều chuyển bão hòa là 8 kGy với đỉnh hấp thụ cực đại ở $\lambda_{\max} \sim 524$ nm và giá trị OD = 1,0299.

Bảng 1: độ hấp thụ (optical density) của các chế phẩm nano vàng - CM-chitosan theo liều chiếu xạ

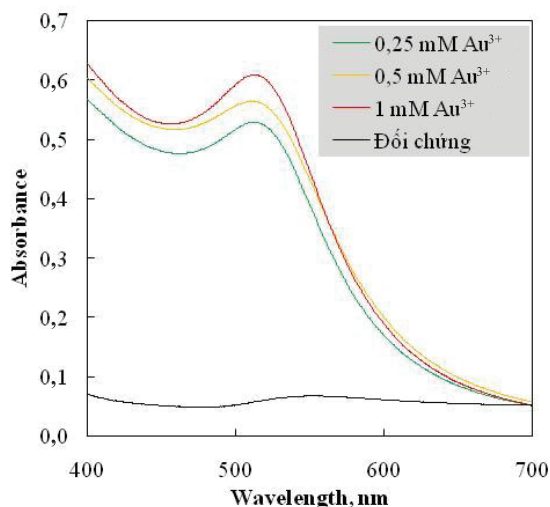
Mẫu	Liều xạ, kGy	$\lambda_{\max}$ (nm)	OD (A)
0,25mM Au ³⁺ / 0,5% CM-chitosan	4	507,0	0,6292
	8	510,0	0,5981
	12	515,0	0,5498
0,5mM Au ³⁺ / 0,5% CM-chitosan	4	511,0	0,7901
	8	513,5	0,5569
	12	516,0	0,4831
1mM Au ³⁺ / 0,5% CM-chitosan	4	526,0	0,9757
	8	524,0	1,0299
	12	524,0	0,8591

Ảnh hưởng của nồng độ Au³⁺ đến kích thước hạt vàng nano



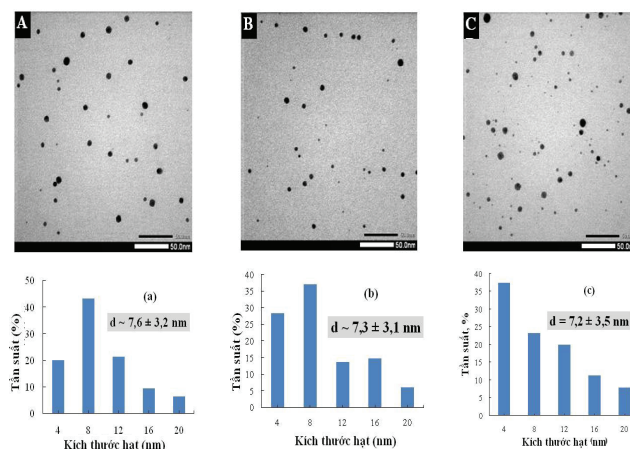
Hình 3: ảnh TEM và đồ thị phân bố kích thước hạt nano vàng - CM-chitosan tạo được từ các dung dịch muối vàng trong 0,5% CM-chitosan với nồng độ Au³⁺ lần lượt là 0,25mM (A, a); 0,5mM (B, b) và 1mM (C, c)

Một trong những công cụ được sử dụng nhiều và có độ tin cậy cao để xác định kích thước hạt vàng là kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Đây là thiết bị nghiên cứu vi cấu trúc vật rắn, sử dụng chùm điện tử có năng lượng cao chiếu xuyên qua mẫu vật rắn mỏng và sử dụng các thấu kính từ để tạo ảnh với độ phóng đại cực lớn. Ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử truyền qua cho phép xác định được kích thước của các hạt nano. Trong nghiên cứu này, hình ảnh TEM của các hạt nano vàng - CM-chitosan tạo được từ các dung dịch có nồng độ Au^{3+} khác nhau và phân bố kích thước hạt của chúng được trình bày ở hình 3. Dễ dàng quan sát thấy các hạt vàng nano tạo được có dạng hình cầu, với kích thước tương đối đồng đều và sự phân bố kích thước hạt là tương đối hẹp. Kích thước trung bình của hạt vàng nano trong sản phẩm có xu hướng tăng theo sự gia tăng của nồng độ Au^{3+} trong dung dịch chiếu xạ. Cụ thể là, ở nồng độ Au^{3+} 0,25mM, hạt vàng nano tạo ra có kích thước trung bình vào khoảng 5,2 nm. Khi tăng nồng độ Au^{3+} lên 0,5mM, kích thước trung bình hạt vàng nano tăng lên 6,7 nm và khi nồng độ Au^{3+} đạt 1mM thì kích thước trung bình hạt vàng nano là khoảng 7,3 nm. Ngoài ra kết quả nhận được từ hình 4 cũng cho thấy, khi gia tăng nồng độ Au^{3+} thì giá trị OD có gia tăng lên nhưng λ_{max} thay đổi không đáng kể. Kết quả một lần nữa chứng minh rằng, khi gia tăng nồng độ Au^{3+} thì kích thước hạt vàng nano trong sản phẩm tăng lên nhưng không đáng kể, chính vì vậy, nồng độ 1mM Au^{3+} được lựa chọn để khảo sát ở các thí nghiệm tiếp theo.



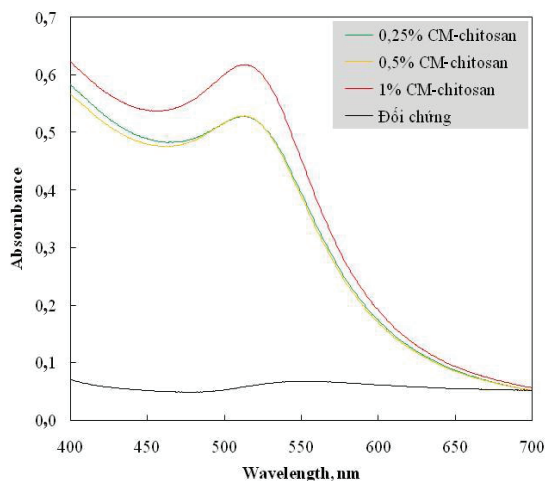
Hình 4: phổ UV-Vis của các chế phẩm nano vàng - CM-chitosan tạo được từ các dung dịch có nồng độ Au^{3+} khác nhau

Ảnh hưởng của nồng độ chất ổn định đến kích thước hạt vàng nano



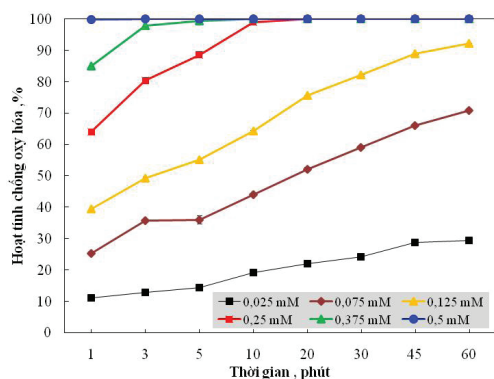
Hình 5: ảnh TEM và đồ thị phân bố kích thước hạt vàng nano - CM-chitosan được tạo ra từ các dung dịch có chứa 1mM Au^{3+} trong CM-chitosan có nồng độ lần lượt là 0,25% (A, a); 0,5% (B, b) và 1% (C, c)

Trong chế tạo vàng nano nói riêng và nano kim loại nói chung, chất ổn định có ảnh hưởng rất lớn đến kích thước hạt nano. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, khi tăng nồng độ chất ổn định thì kích thước hạt vàng nano hình thành giảm nhẹ (hình 5 và 6). Cụ thể là, khi nồng độ CM-chitosan ở mức 0,25% thì kích thước hạt nano vàng tạo ra là 7,6 nm và khi tăng nồng độ CM-chitosan lên 0,5% thì kích thước hạt nano vàng có xu hướng giảm nhẹ còn ~7,2 nm và hầu như tương đương với khi sử dụng nồng độ CM-chitosan 1%. Như vậy có thể thấy, khi sử dụng CM-chitosan làm chất ổn định thì sự gia tăng nồng độ chất ổn định cũng như nồng độ Au^{3+} không làm thay đổi nhiều kích thước hạt vàng nano trong sản phẩm tạo thành và để tạo hạt nano vàng có kích thước ~7 nm thì nồng độ Au^{3+} là 1mM trong dung dịch CM-chitosan 0,5% là phù hợp.



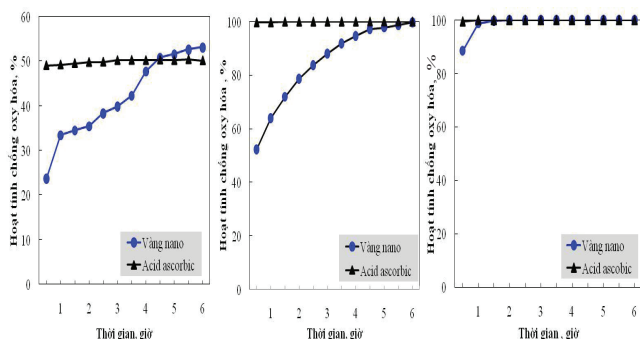
Hình 6: phổ UV-Vis của các chế phẩm nano vàng - CM-chitosan tạo được từ dung dịch có nồng độ CM-chitosan khác nhau

Hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm vàng nano



Hình 7: hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng - CM-chitosan ở các nồng độ khác nhau

Vàng là kim loại có hoạt tính chống oxy hóa rất tốt và hoạt tính này càng được cải thiện hơn khi vàng ở dạng nano. Theo kết quả công bố của Esumi và cộng sự [19], khi nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của vàng nano cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa của vàng nano cao hơn 80 lần so với acid ascorbic (một chất chống oxy hóa điển hình). Kết quả nhận được trên hình 7 cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa tăng theo thời gian và phụ thuộc vào nồng độ chế phẩm nano vàng - CM-chitosan áp dụng. Tuy nhiên, sau 60 phút, hoạt tính chống oxy hóa của các chế phẩm nano vàng ở các nồng độ 0,025-0,125mM vẫn chưa đạt đến trạng thái bão hòa, dù hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng có nồng độ 0,125mM đã đạt 92,23%. Đối với dung dịch vàng nano có nồng độ cao hơn (0,25, 0,35 và 0,5mM) thì hiệu quả chống oxy hóa tối đa đạt được tương ứng sau 20, 5 và 1 phút. Như vậy, nồng độ dung dịch vàng nano càng cao thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao và xảy ra càng nhanh, những mẫu dung dịch vàng nano ở nồng độ thấp cần phải có thời gian phản ứng đủ dài để đạt được trạng thái chống oxy hóa cao nhất.



Hình 8: so sánh hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng - CM-chitosan (AuNPs) và acid ascorbic theo thời gian ở cùng nồng độ 0,025mM (a); 0,075mM (b); và 0,125mM (c)

Khi so sánh (khả năng duy trì hoạt tính ổn định phải được so sánh giữa hoạt tính ngay sau khi tạo được và sau một thời gian bảo quản nhất định) hoạt tính chống oxy hóa của vàng nano và acid ascorbic ở cùng nồng độ theo thời gian nhận được ở kết quả như hình 8. Có thể thấy rằng, hoạt tính chống oxy hóa của vàng nano có xu hướng tăng dần theo thời gian, trong khi đối với acid ascorbic là hầu như không thay đổi. Điều này có thể giải thích là do acid ascorbic hòa tan hoàn toàn trong nước, do đó khi phản ứng với gốc tự do xảy ra ở dạng đồng thể và sau khi phản ứng thì các phân tử acid ascorbic không còn khả năng khử gốc tự do tiếp được nữa trong khi phản ứng của các phân tử vàng là phản ứng dị pha giữa hạt vàng nano dạng rắn với gốc tự do trong dung dịch dạng lỏng nên quá trình sẽ diễn ra lâu hơn. Tuy nhiên, sau phản ứng thì các hạt vàng nano vẫn tồn tại và tiếp tục phản ứng với các gốc tự do khác trong dung dịch. Như vậy, hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm nano vàng có thể sẽ cao hơn cũng như lâu dài và ổn định hơn.

Kết luận

Đã xác định được liều chiếu xạ bão hòa để tạo hạt nano vàng - CM-chitosan bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma từ dung dịch chứa Au^{3+} trong khoảng 0,25-1,0mM, sử dụng chất ổn định CM-chitosan với nồng độ 0,25-1,0%. Chế phẩm nano vàng tạo ra được có kích thước nhỏ (5,2-7,6 nm). Chế phẩm nano vàng có nồng độ 1mM trong 0,5% chất ổn định có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn và bền hơn so với acid ascorbic ở cùng nồng độ sử dụng. Sản phẩm nano vàng được tạo ra bằng công nghệ bức xạ có nhiều ưu điểm và được xem là loại nguyên liệu rất tiềm năng để sản xuất các sản phẩm chống oxy hóa trong công nghiệp dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm...

Tài liệu tham khảo

- [1] Gu H.Y, Chen Z, Sa R.X, Yuan S.S, Chen H.Y, Ding Y.T, Yu A.M (2004), "The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation", *Biomater*, **25**, pp.3445-3451.
- [2] Huang X, El-Sayed M.A (2010), "Gold nanoparticles: Optimal properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy", *J. Adv. Res*, **1**, pp.13-28.
- [3] Yang Y, Matsubara S, Nogami M, Sho J (2007), "Controlling the aggregation behavior of gold nanoparticles", *Mater. Sci. Eng. B*, **140**, pp.172-176.
- [4] Alkilany A.M, Murphy C.J (2010), "Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far?", *J. Nanopart. Res*,

12, pp.2313-2333.

[5] Ghosh P, Han G, De M, Kim C.K, Rotello V.M (2008), "Gold nanoparticles in delivery applications", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, pp.1307-1325.

[6] Kim J.K, Seo S.J, Kim H.T, Kim K.H, Chung M.H, Kim K.R, Ye S.J (2012), "Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles", *Phys. Med. Biol.*, **57**, pp.8309-8323.

[7] Bhattacharya R, Mukhopadhyay D, Mukherjee P (2010), "Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, pp.346-361.

[8] Seol S.K, Kim D, Jung S, Chang W.S, Bae Y.M, Lee K.H, Hwu Y (2012), "Effect of citrate on polyvinylpyrrolidone-stabilized gold nanoparticle size of gold nanoparticle capped with polyvinylpyrrolidone", *Physica B*, **405**, pp.906-911.

[9] Simakin A.V, Voronov V.V, Shafeev G.A, Brayner R, Verdraz F.B (2001), "Nanodisks of Au and Ag produced by laser ablation in liquid environment", *Chem. Phys. Lett.*, **348**, pp.182-186.

[10] Gautam G.P, Singh G.P, Ram S (2006), "A simple polyol synthesis of silver metal nanopowder", *Mater. Sci.*, **157**, pp.5-10.

[11] Sadowski Z, Maliszewska I.H, Grochowalska B, Polowczyk I, Kozlecki T (2008), "Synthesis of silver nanoparticles using microorganism", *Mater. Sci. Poland*, **26(2)**, pp.419-424.

[12] Sinha S, Pam L, Chanda P, Sen S.K (2009), "Nanoparticles fabrication using ambient biological resources", *J. Appl. Biosci.*, **19**, pp.1113-1130.

[13] Chen P, Song L, Liu Y, Fang Y (2007), "Synthesis of silver nanoparticles by γ - ray irradiation in acetic water solution containing chitosan", *Mater.Chem. Phys.*, **76(7)**, pp.1165-1168.

[14] Aryal S, Remant B.K.C, Khil M.S, Dharmaraj N, Kim H.Y (2007), "Radical scavenger for the stabilization of gold nanoparticles", *Mater. Lett.*, **61**, pp.4225-4230.

[15] Re R, Pellegrini P, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, pp.1231-1237.

[16] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Zavallos L.C, Byrne D.H (2006), "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts", *J Food Compos. Anal.*, **19**, pp.669-675.

[17] Luo Y (2008), "Size-controlled preparation of dendrimer - protected gold nanoparticles: A sunlight irradiation-based strategy", *Mater. Lett.*, **62**, pp.3770-3772.

[18] Shen M, Du Y, Hua N, Yang P (2006), "Microwave irradiation synthesis and self-assembly of alkylamine-stabilized gold nanoparticles", *Powder Technol.*, **162**, pp.64-72.

[19] Esumi K, Jakei N, Yoshimura T (2003), "Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **32**, pp.117-123.