تهیه نانوذرات طلا با استفاده از ال-آلانین و پایدار کردن آنها با کیتوسان

داود زارع [۱و۳*]، عظیم اکبرزاده[۲]، شهرام تنگستانی‌نژاد[۱]، مجید مقدم[۱]، رحمت اله رحیمی[۴]، نسیم برارپور[۲]

۱- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه شیمی

۲- تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه پایلوت بیوتکنولوژی

۳- تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان

۴- تهران، دانشگاه علم و صنعت، دانشکده شیمی

پیام‌نگار: **Zare_davood@yahoo.com**

چکیده

نانوذرات طلا یکی از پُرکارترین نانوذرّات فلزی می‌باشند که در زمینه‌های مختلف بخصوص نانوزیست فناوری[1]، کاربرد دارند. در این مقاله،تهیه نانوذرات طلا به روش شیمیایی و با استفاده از اِل ـ آلانین به عنوان عامل کاهنده و نیز، پیش مادّهٔ مورد استفاده، تتراکلرید طلای سه آبه، بحث و بررسی شده است. همچنین، به منظور پایدار کردن این ذرات، از کتیوسان به عنوان یک مادهٔ فعال‌کننده سطح (سورفکتانت) طبیعی استفاده شده است. نانوذرات طلای به دست آمده توسط طیف‌سنجی فرابنفش ـ مرئی و میکروسکوپ الکترونی عبوری، شناسایی شده و نیز اندازه و شکل آنها مشخص گردید. نتایج نشان داد که اندازهٔ این ذرات ۴۰-۱۵ نانومتر، ذرات، کروی شکل و توزیع آنها مناسب بوده است. همچنین، وجود نوار جذبی متقارن با ماکزیمم جذب ۵۴۴ نانومتر، حاکی از تشکیل نانوذرات طلا بوده است. بررسی پایداری این ذرات، که در مورد آنها از کیتوسان به عنوان پایدارکننده استفاده شده است، به روش طیف‌سنجی مرئی ـ فرابنفش، نشان داد که آنها به مدّت ۲۰ روز پایدار می‌باشند.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، کاهش شیمیایی، ال- آلانین، کیتوسان

۱ـ مقدمه

مرور مطالب منتشر شده در رابطه با تحقیقات و کاربردهای نانوتکنولوژی، حاکی از استفاده گسترده از طلا در صنایع مختلف است. سؤال این است که، چه خصوصیاتی طلا را به عنوان یک مادهٔ ایده‌آل برای چنین کاربردهای گسترده‌ای مطرح می‌کند؟ طلا به صورت توده یک فلز زردرنگ، نرم، خنثی با ساختار مکعّبی مراکز وجوه پر fcc[2] و دمای ذوب ۱۰۶۸°C می‌باشد. این خصوصیات، لزوماً درنانو ذرات طلا مشاهده نمی‌شوند. طلا در مقیاس نانو، خصوصیات و ویژگی‌هایی را

1. Nanobiotechnology

2. Face Centered Cubic

بروز می‌دهد که آن را به فلز مهمی در فرایندها و محصولات نانو تکنولوژی متعدد تبدیل می‌کند. خنثی بودن طلا و مقاومت آن در مقابل اکسیداسیون سطحی یکی از خصوصیات مهم این ماده است. همچنین خواص اپتیکی طلا در مقیاس نانو بسیار جالب است، به علاوه در حال حاضر ثابت شده است که نانو ذرات طلا در تعدادی از واکنش‌های مهم تجاری بصورت کاتالیتیکی فعال بوده و دارای شیمی سطح مناسبی برای الحاق مولکول‌های گوگرد، نظیر تیول‌ها، می‌باشند که منجر به آرایش از پایین به بالا در ساختارهای مفید و موردنظر می‌شوند. براساس این خصوصیات بی‌نظیر، کاربردهای جدید نانوتکنولوژی با استفاده از طلا در حال گسترش است. این کاربردها شامل کشاورزی، مواد و تجهیزات الکترونیکی، کاربردهای نظامی، معالجه سرطان و تکنیک‌های داروهای زیستی، بازبینی سیالات موجود در بدن، کاتالیست‌های جدید برای کنترل آلودگی، پیل‌های سوختی و فرایندهای شیمیایی می‌باشند[۶-۱].

از جمله مسائل دیگری که اهمیت تولید نانوذرات طلا را مشخص می‌کند، استفاده از این ذرات به منظور ایجاد روش‌های نوین برای تشخیص انواع بیماری‌های ژنتیکی و پاتوژنیک است که معمولاً در این موارد از اتصال رشته‌های DNA به نانوذرات طلا و نیز اتصال آنتی‌بادیِ آنتی‌ژن بیماریها به این نانوذرات، استفاده می‌شود[۸-۷].

علاوه بر این، با توجه به فعالیت بالای نانوذرات طلا و تمایل آنها به اتصال با زیست مولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها، می‌توان کاربردهای متعددی را برای این ذرات در نظر گرفت، مثلاً از نانوذرات طلای متصل‌شده به پپتیدها، می‌توان بعنوان برچسب‌هایی[۱] برای زیست تشخیص بواسطه خواص‌نوری[۲]، پروب‌هایی[۳] به منظور تصاویر سلولی[۴] و یا حامل‌های عوامل دارویی استفاده کرد[۱۰-۹]. همچنین می‌توان با استفاده از نانوذرات طلا و اتصال این ذرات به پپتیدها، پروتئین‌ها، DNAها و پلیمرهای زیست شیمیایی، کمپلکس‌ها و مواد جدیدی تولید کرد که در شناسایی بیماری‌های مختلف و کاربردهای متعدد پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند[۱۳-۱۱].

برای تهیه نانوذرات، روش‌های مختلفی وجود دارد، که با به کارگیری آنها ذراتی با ویژگی‌های مختلف تولید می‌شوند. اما در حالت کلی می‌توان گفت اندازه، شکل و توزیع نانوذرات، مهمترین عوامل مورد توجه پژوهشگران در تهیه نانوذرات محسوب می‌شود. از جمله روش‌های تهیه نانوذرات طلا، روش کاهش شیمیایی[۵] است که در این روش، به منظور کاهش یون‌های طلا از یک کاهنده استفاده می‌شود. تا به حال از کاهنده‌های متعدد آلی و معدنی از قبیل (سدیم/پتاسیم بورهیدرات)[۱۴]، هیدرازین[۱۵] و نمک های تارتارات[۱۶]، سدیم سیترات[۱۷] و اسکوربیک اسید[۱۹-۱۸]، جهت کاهش و تولید نانوذرات طلا استفاده شده است. استفاده از آمینواسیدها نیز به منظور تهیه نانوذرات طلا و پلاتین در مواردی گزارش شده است که در قسمت بحث و نتایج، بیشتر بدین موضوع پرداخته می‌شود. یکی از روش‌های تهیه نانوذرات طلا روش ترکویچ است که این تحقیق با بهینه کردن این روش، استفاده از یک آمینواسید (ال-آلانین) را بعنوان کاهش‌دهنده معرفی می‌کند، که موضوعی نو و جدید در تهیه نانوذرات طلاست [۲۱-۲۰]؛ همچنین پایدارکننده‌های مختلفی در تهیه نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند که می‌توان به پلیمرهایی مثل پلی اتیلن گلایکول (با جرم‌های مولکولی مختلف)[۲۳-۲۲]، پلی‌وینیل‌الکل[۲۴]، پلی‌وینیل‌پیرولیدون (با جرم‌های مولکولی مختلف) [۲۶-۲۵] و فعال‌کننده‌های سطح از قبیل سدیم دودسیل سولفات [۲۶-۲۵]، توئین۸۰[۶]، تریتون[۷] [۲۷] و کربوهیدرات‌هایی از قبیل کیتوسان[۸][۲۸] اشاره کرد.

همانطور که اشاره شد اهمیت تهیه نانوذرات طلا با توجه به کاربردهای متعدد آنها کاملاً مشهود است. همچنین، اندازهٔ این ذرات، توزیع اندازه ذرات و پایداری آنها فاکتورهای مهم دیگری هستند که قابل توجه‌اند. یکی دیگر از مواردی که حائز اهمیت است نحوه تهیه این ذرات به منظور کاربرد آنها در نانوپزشکی و نانوبیوتکنولوژی می‌باشد. در این تحقیق، از آمینواسید ال-آلانین به منظور کاهش یون‌های طلا و تولید نانوذرات طلا استفاده شده است و از آنجائیکه این ماده (ال-آلانین) بی ضرر است، استفاده از این ذرات را در تحقیقات نانو پزشکی بیشتر مورد توجه قرار می‌دهد. همچنین برای پایدار کردن نانوذرات طلا از سورفکتانت طبیعی کیتوسان استفاده شده است؛ علاوه بر آن، این مقاله تاثیر کلی پایدار کننده‌ها بر پایداری نانوذرات را بررسی می‌کند.

1. Labels
2. Optical Biodetection
3. Probes
4. Cellular Imaging
5. Chemical Reduction
6. Tween 80
7. Triton
8. Chitosan

۲ـ مواد و روشها

۲ـ۱ مواد

تتراکلریدطلای سه‌آبه[1]، ال-آلانین، کیتوسان (با جرم مولکولی متوسط) که همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شده‌اند. لازم به‌ذکر است که در تمام مراحل این آزمایش از آب بدون یون (دیونیزه) استفاده شده است.

۲ـ۲ سنتز نانو ذرات طلا

محلول‌های تتراکلریدطلای سه‌آبه، ال- آلانین و کیتوسان (که در استیک اسید ۱٪ حل شده) به ترتیب با غلظت های۲ میلی‌مولار، ۵/ ۲ مولار و ۳/۳٪ در آب دیونیزه تهیه شدند. در سنتز نانوذرات طلا از روش ترکویچ[2] (تصحیح شده توسط این آزمایشگاه)، استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میلی‌لیتر محلول تتراکلرید طلای سه‌آبه، بر روی همزن مغناطیسی تا نقطه جوش حرارت داده شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر عامل کاهنده (ال- آلانین) قطره قطره به این محلول اضافه گردید. حرارت دادن تا تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به قرمز/صورتی ادامه یافت. با انجام این تغییر، نانوذرات طلا تولید گردید. محلول حاصل به سرعت خنک شد و جهت پایدار کردن این ذرات، ۳ میلی لیتر محلول ۳/۳٪ کیتوسان به محلول اضافه گردید.

۲ـ۳ روش‌های شناسایی

۲ـ۳ـ۱ طیف سنجی فرابنفش-مرئی[3]: تشکیل شدن نانوذرات طلا با اسکن محلول حاوی نانوذرات طلا با استفاده از اسپکترومتر دو پرتوی مدل ۱۶۰۱ از شرکت شیمادزو[4] در طول موج‌های بین ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر، تأیید گردید.

۲ـ۳ـ۲ میکروسکوپ الکترونی عبوری[5]: بررسی اندازه، شکل و توزیع نانوذرات طلای سنتز شده، بر روی فیلم پوشیده شده از قطرات نانو ذرات طلا، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل جی-ای-او-ال ۲۰۱۰[6] انجام شد.

1. HAuCl4.3H2O
2. Turkevich
3. UV-Vis Spectroscopy
4. Shimadzu
5. Transmission Electron Microscopy
6. JEOL-JEN 2010

۳ـ بررسی نتایج

نانو ذرات طلا را می توان به روش کاهش شیمیایی که یکی از معروفترین آنها روش ترکویچ است، سنتز کرد. در روش کاهش شیمیایی، یون‌های طلا توسط یک عامل کاهنده کاهش می‌یابند و به نانوذرات طلا تبدیل می‌شوند ؛ به منظور کاهش یون‌های طلا می‌توان از معرف‌های مختلفی استفاده کرد، مثلاً کیم‌لینگ[7] و همکارانش [۲۹] با استفاده از روش ترکویچ، نانو ذراتی به اندازهٔ ۱۲۰-۹ نانومتر را در حضور اسکوربیک اسید و سدیم سیترات بدست آوردند، در حالی که بارگاوا[8] و همکارانش [۲۱] با استفاده از آمینواسیدهای تیروزین[9]، آرژنین[10] و مخلوط گلیسیرین- تیروزین، نانوذرات طلا به اندازهٔ ۱۵-۵ نانومتر را سنتز کردند، همچنین جوشی[11] و همکارانش [۲۰] نانو ذرات طلا را با استفاده از لایزین[12] سنتز کردند و نیز ما[13] و همکارانش [۳۰] در حضور آمینو- دکستران به عنوان عامل کاهنده و محافظت کننده، نانو ذراتی به اندازه ۲۵-۱۰ نانومتر، تهیه کردند. گرچه روش‌های سنتز نانوذرات به روش کاهش شیمیایی از زمان تورکویچ تاکنون تکامل یافته است، اما استفاده از آمینواسیدها بعنوان پیش ماده‌ای غیر سمی به منظور کاهش یون‌های طلا و تولید نانوذرات طلا از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. در این تحقیق از آمینواسید ال- آلانین استفاده شده است. آمینواسیدها با اکسید شدن به صورت آلفا-کتواستر[14] در خواهند آمد و آلانین نیز از همین اصل تبعیت می‌کند و به یک آلفا-کتواستر تبدیل می‌شود که این ترکیب با نام پیرووات[15] شناخته شده است (شکل (۱- الف) اکسید شدن آلانین را در یک سیستم زنده نشان می‌دهد[۳۱]).

با اکسید شدن آلانین گاز آمونیاک آزاد می‌شود و از آنجائیکه یک گروه کربوکسیلیک اسید نیز وجود دارد آمونیاک ایجاد شده با اسید تولید یون آمونیوم می‌کند که در آب نیز محلول است (البته مکانیسم‌های دقیق بسیاری از واکنش‌های اکسایش –کاهش ناشناخته‌اند و فقط بر پایه برخی شواهد و فرضیات، مکانیسم‌ها ارائه می‌شوند). بنابراین، در طی واکنش، آنیون تترا کلرید طلا ($AuCl_4^-$) نقش اکسنده را ایفا

7. Kimling
8. Bhargava
9. Tyrosine
10. Arginine
11. Joshi
12. Lysine
13. Ma
14. α-ketoester
15. Pyruvate

می‌کند و با توجه به پتانسیل کاهش مناسبی که دارد(شکل (۱- ب)) سبب اکسایش کربن آلفا[1] می‌شود و پس از انجام عمل اکسایش، کربنِ آلکانی به کربنِ کربنیل تبدیل می‌گردد (شکل (۱- ج)) و الکترون حاصل شده صرف کاهش یونهای طلا به فلز طلا می‌شوند (یعنی، همزمان، آنیون تترا کلرید طلا الکترون گرفته و به طلا تبدیل می‌شود).

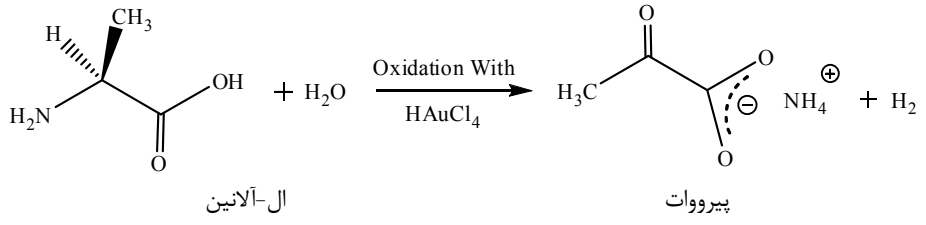
پس از تهیه نانوذرات طلا، جهت حصول اطمینان از تشکیل نانوذرات طلا از محلول کلوئیدی آن، طیف UV-Vis در محدودهٔ طول موج ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر، گرفته می‌شود که پیک ماکزیمم در طول موج ۵۴۴nm نشان دهنده تشکیل شدن این ذرات می‌باشد(شکل (۲)) [۳۴-۳۲]. از آنجا که نانوذرات به اندازه‌های مختلف تشکیل می‌شوند، بسته به اندازه شان، دارای پیک‌های جذبی متفاوتی هستند. ونگر[2] و همکارانش، هامبرت[3] و همکارانش، و کومار جنا[4] و همکارانش، به ترتیب نانو ذرات طلا را به اندازه های ۵۰-۵ نانومتر، ۲۰ و ۵±۶۰ نانومتر سنتز کردند که به ترتیب در طول موجهای ۵۲۷، ۵۲۵ و ۵۳۲ نانومتر دارای ماکزیمم جذب بودند که مبین تغییر ماکزیمم جذب نانو ذرات طلا با تغییر اندازه ذرات سنتز شده می‌باشد [۳۳،۳۲،۲۶].

از آنجائیکه از این ذرات در اتصال به پروتئین‌ها و آنزیم‌های خاص استفاده خواهد شد (بعنوان کاربرد آنها در تحقیقات آتی) پایداری این ذرات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ منظور از پایداری در اینجا عدم توده‌ای شدن[5] این ذرات است. بهمین منظور، نانوذرات طلای تهیه شده و پایدار شده با کیتوسان را در یک ظرف نمونه ریخته و در یخچال نگهداری می‌کنند و هر ۵ روز یکبار از نمونه درون یخچال نمونه‌ای برای طیف‌سنجی فرابنفش-مریی گرفته می‌شود که این کار به مدت یک ماه انجام شد و نتایج این طیف‌ها مبین پایداری این ذرات در مدت ۲۰ روز می‌باشد (زیرا طیف فرابنفش- مریی این نمونه‌ها نسبت به طیف اولیه تغییر چندانی نداشته‌است). اما پس از روز بیستم، طیف فرابنفش-مریی این ذرات نسبت به طیف استاندارد (طیف روز اول) تغییر کرده و جابجایی قرمز[6] (جابجایی به طرف طول موج‌های بیشتر) داشته که بیانگر تغییرات ایجاد شده در نانوذرات طلا می‌باشد (نانوذرات طلا توده‌ای شده‌اند) (شکل (۲)).

(الف) L-Alanine + D(T)PN + H_2O ⇌ پیرووات + NH_4^+ + D(T)PNH

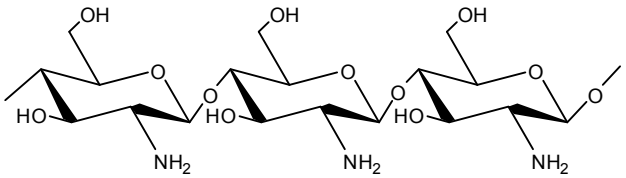
(ب) $AuCl_4^- + 3e^- \longrightarrow Au + 4Cl^-$ $\quad E^\circ = 1.002$

(ج)



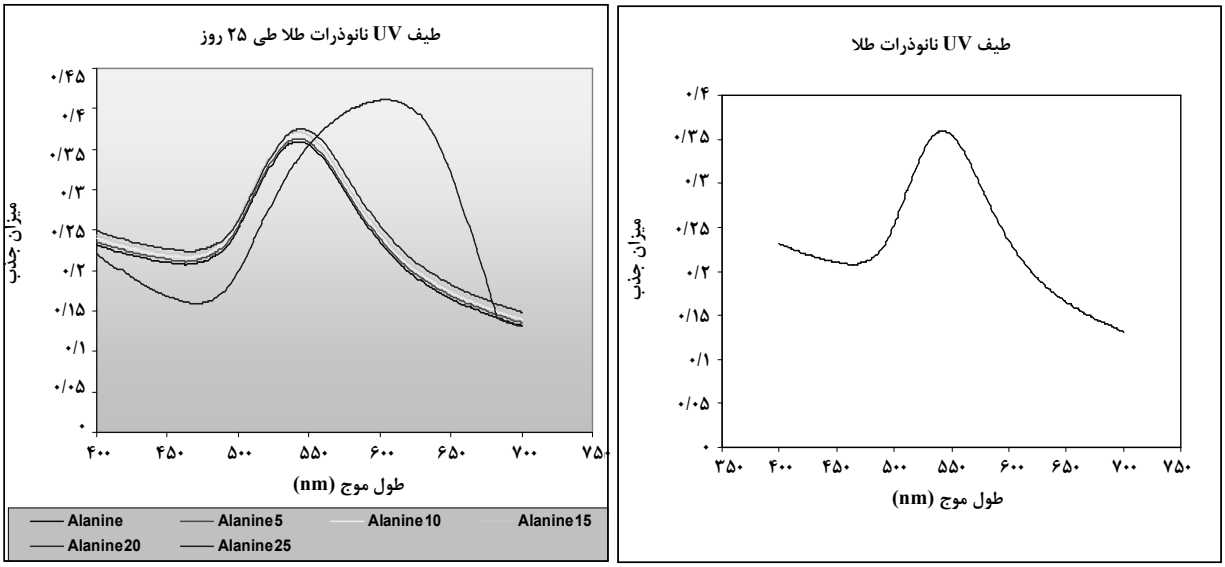
ال-آلانین پیرووات

(د)



شکل ۱ـ (الف) واکنش اکسایش ال-آلانین در یک سیستم زنده، (ب) مکانیسم اکسایش آلانین توسط $HAuCl_4$، (ج) کاهش یون $AuCl_4^-$، (د) ساختار کیتوسان

1. α-carbon
2. Wanger
3. Humbert
4. Kumar jena
5. Aggregation
6. Red shift



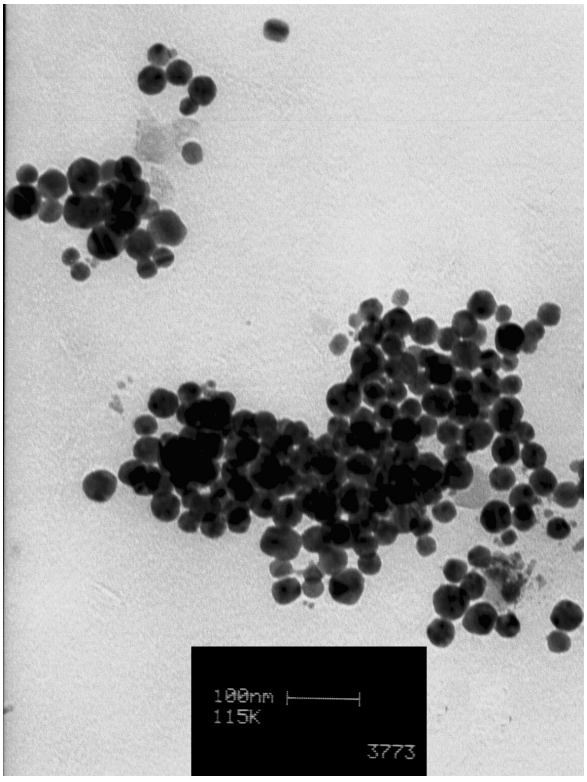
(الف) (ب)

شکل ۲- (الف) طیف فرابنفش نانوذرات طلا، (ب) طیف‌های فرابنفش نانوذرات طلا در طول ۲۵ روز

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری، قطر نانو ذرات، در حدود ۴۰-۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شده است (شکل (۳)). بنابراین با یک روش ساده و تک مرحله‌ای که در آن آلانین و کیتوسان (با ساختاری که در شکل (۱-د) نشان داده شده است) به عنوان عوامل کاهنده و محافظ[1] در نظر گرفته شدند ، نانوذرات طلا با اندازه ۴۰-۱۵ نانومتر سنتز شدند که به مدت ۲۰ روز پایدار بودند.

۴ـ نتیجه‌گیری

تهیه نانوذرات طلا به روشی سریع و در عین حال استفاده از کاهنده‌ای بی ضرر، روشی بسیار حائز اهمیت در کاربردهای پزشکی و بیولوژیکی این نانوذرات محسوب می‌شود. همچنین پایداری این ذرات با استفاده از پایدار کننده‌ای طبیعی (کیتوسان) از نکات جالب توجه دیگر این تحقیق محسوب می‌شود.از طرف دیگر پس از اکسایش آلانین ترکیبی با نام پیرووات تشکیل می‌شود که نه تنها سمی و مضر نیست، بلکه یکی از داروهای مهم در پزشکی می‌باشد که این عامل یکی از موضوعات قابل توجه در تهیه نانوذرات طلا با استفاده از این آمینواسید است و نهایت اینکه با توجه به کلیه موارد یاد شده و نتایج حاصل شده، اعم از استفاده از کاهندهٔ غیر سمی، محصولات جانبی مفید (از دیدگاه پزشکی)، پایداری خوب و اندازهٔ مناسب، این روش و این ذرات، به عنوان کاندیدی ایده‌آل در فعالیت‌ها و کاربردهای نانوپزشکی، نانوزیست فناوری و سایر زمینه های مرتبط، معرفی می‌شود.



شکل ۳- تصویر میکروسکپ الکترونی عبوری از نانوذرات طلا

1. Protecting agents

مراجع

[1] Watanabe, K.; Menzel, D.; Nilius, N.; Freund, H-J. "Photochemistry on Metal Nanoparticles" *Chem. Rev.*, 106, 4301(2006).

[2] Salata, O. "Nanoparticles – known and unknown health risks" *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1, (2004).

[3] Mirkin, C.A.; Taton, T.A.; " Materials Chemistry: Semiconductors Meet Biology" *Nature*, 405, 626, (2000).

[4] Yang, P.; Zhang, W.; Du, Y.; Wang, X. "Hydrogenation of nitrobenzenes catalyzed by platinum nanoparticle core-polyaryl ether trisacetic acid ammonium chloride dendrimer shell nanocomposite " *Journal of Molecular Catalysis A,* 260, 4, (2006).

[5] Daniel M.C.; Astruc, D.;" Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology" *Chem. Rev.* 104, 293, (2004).

[6] Thompson D.T. " Using gold nanoparticles for catalysis" *Nanotoday,* 2(4), 40, (2007)

[7] Nam J., Thaxton C.S. and Mirkin C.A.; " Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins"; *Science,* 301, 1884, (2003)

[8] Klein L.; and Mirkin C.A. " Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease " *PNAS*, 102(7), 2273, (2005)

[9] Wei, H.; Zhang, X.; Cheng, C.; Cheng, S-X.; Zhuo, R-X. "Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery" *Biomaterials*, 28, 99, (2007).

[10] Torchilin, V.P. "Multifunctional nanocarriers" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1532, (2006).

[11] Seeman, N.C. "Biochemistry and Structural DNA Nanotechnology: An Evolving Symbiotic Relationship" *Biochemistry,* 42, 7259, (2003).

[12] Vijayanathan, V.; Thomas, T.; Thomas, T.J. "DNA Nanoparticles and Development of DNA Delivery Vehicles for Gene Therapy" *Biochemistry*, 41, 14085, (2002).

[13] Okugaichi, A.; Torigoe, K.; Yoshimura, T.; Esumi, K. "Interaction of cationic gold nanoparticles and carboxylate-terminated poly(amidoamine) dendrimers" *Colloids and Surfaces A.*, 273, 154, (2006).

[14] Walker, C.H.; John, J.V.St.; Wisian-Neilson, P. "Synthesis and Size Control of Gold Nanoparticles Stabilized by Poly (methylphenylphosphazene) " *J. Am. Chem. Soc.,* 123, 3846, (2001).

[15] Kawasaki, H.; Nishimura, k.; Arakawa, R. "Influence of the Counterions of Cetyltrimetylammonium Salts on the Surfactant Adsorption onto Gold Surfaces and the Formation of Gold Nanoparticles" *J. Phys. Chem. C.*, 111, 2683, (2007).

[16] Das, R.N.; Pramanik, P. "Chemical synthesis of fine powder of lead magnesium niobate using niobium tartarate complex" *Materials Letters,* 46, 7, (2000).

[17] Schulz-Dobrick, M,; Sarathy, K.V.; Jansen, M. "Surfactant-Free Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles" *J. Am. Chem. Soc.,* 127, 12816, (2005).

[18] Vemula, P.K.; Aslam, U.; Mallia, V.A.; John, G. "In Situ Synthesis of Gold Nanoparticles Using Molecular Gels and Liquid Crystals from Vitamin-C Amphiphiles" *Chem. Mater.,* 19, 138, (2007).

[19] Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. "Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods" J. *J. Phys. Chem. B.,* 105, 4065, (2001).

[20] Joshi, H.; Shirude, P.S.; Bansal, V.; Ganesh, K.N.; Murali Sastry, M. "Isothermal Titration Calorimetry Studies on the Binding of Amino Acids to Gold Nanoparticles" *J. Phys. Chem. B*., 108, 11535, (2004).

[21] Bhargava, S.K.; Booth, J.M.; Agrawal, S.; Coloe, P.; Kar, G. "Gold Nanoparticle Formation during Bromoaurate Reduction by Amino Acids" *Langmuir,* 21, 5949, (2005).

[22] Haba, Y.; Kojima, C.; Harada, A.; Ura, T.; Horinaka, H.; Kono, K. "Preparation of Poly(ethylene glycol)-Modified Poly(amido amine) Dendrimers Encapsulating Gold Nanoparticles and Their Heat-Generating Ability" *Langmuir*, 23, 5243, (2007).

[23] Bodnar, M.; Hartmann, J. F.; Borbely, J. "Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-*N*-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles" *Biomacromolecules*, 7, 3030, (2006).

[24] Tripathy, P.; Mishra, A.; Ram, S. " Immobilizing Au-nanocolloids in co-branched polymer molecules in presence of gluconic acid in poly(vinyl alcohol) in hot water " *Materials Chemistry and Physics,* 106, 379, (2007).

[25] Salvati, R.; Longo, A.; Carotenuto, G., De Nicola, S.; Pepe, G.P.; Nicolais, L.; Barone, A. "UV–vis spectroscopy for on-line monitoring of Au nanoparticles size during growth" *Applied Surface Science*, 248, 28(2005).

[26] Wagner, J.; Kohler, J.M. "Continuous Synthesis of Gold Nanoparticles in a Microreactor" *Nano Lett.*, 5(4), 685, (2005)

[27] Lu, C.; Zu, Y.; Yam, V.W-W. "Nonionic surfactant-capped gold nanoparticles as postcolumn reagents for high-performance liquid chromatography assay of low-molecular-mass biothiols" *Journal of Chromatography A*, 1163, 328, (2007).

[28] Huang, H.; Yang, X. "Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate" *Biomacromolecules*, 5, 2340, (2004).

[29] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech A. "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited" *J. Phys. Chem. B*., 110, 15700, (2006).

[30] Ma, Y.; Li, N.; Yang, C.; Yang, X. "One-step synthesis of amino-dextran-protected gold and silver nanoparticles and its application in biosensors" *Anal. Bioanal. Chem.*,

382, 1044, (2005).
[31] Gordon M., Tomkins, K., Lemone Yielding, and Jean Curran; "Steroid Hormone Activation of L-Alanine Oxidation Catalyzed by a Subunit of Crystalline Glutamic Dehydrogenase" *Biochemistry,* 47**,** 270, (1961).
[32] Humbert, C.; Busson, B.; Abid, J.-P.; Six, C.; Girault, H. H.; Tadjeddine, A. "Self-assembled organic monolayers on gold nanoparticles: A study by sum-frequency generation combined with UV–vis spectroscopy" *Electrochimica Acta*, 50, 3101, (2005).
[33] Kumar Jena, B.; Raj C.R. "Synthesis of Flower-like Gold Nanoparticles and Their Electrocatalytic Activity Towards the Oxidation of Methanol and the Reduction of Oxygen" *Langmuir*, 23*,* 4064, (2007).
[34] Sardar, R.; Park, J-W.; Shumaker-Parry J.S. "Polymer-Induced Synthesis of Stable Gold and Silver Nanoparticles and Subsequent Ligand Exchange in Water" *Langmuir*, 23, 11883, (2007).