

بهینه‌سازی توزیع نانوذرات سریم اکساید به عنوان حفاظت کننده پرتویی در محیط آبی دیونیزه

نورالدین عبدی قوشبلاغ^۱، اکرم آستانی^{۲،۳}، محمدحسین زارع^{۴*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: نانوذرات سریم اکساید (CONPs) به عنوان ماده حفاظت کننده پرتویی در برابر پرتوهای یونیزان، کاتالیزور و لایه عایق بر روی سلیکون کاربرد دارند. هدف از این مطالعه بهبود توزیع نانوذرات سریم اکساید در محیط آبی دیونیزه با استفاده از سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات (SDS) می‌باشد.

روش بررسی: مطالعه حاضر از نوع مقطعی- توصیفی است. ابعاد، تصاویر و ترکیب شیمیایی نانوسریا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به دست آمد. طیف جذبی فرابنفش- مرئی سوسپانسیون نانوسریا در حضور مواد فعال سطحی سدیم دودسیل سولفات و توپین ۲۰ خوانش و طول موج ماکزیمم جذب تعیین شد. میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با درصدهای وزنی متفاوت از سدیم دودسیل سولفات با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. برای افزایش پایداری توزیع سوسپانسیون، زمان سونیکاسیون با درصد وزنی ثابتی از SDS، افزایش داده شد و میانگین غلظت تعیین شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel و آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی آنالیز شدند و سطح اطمینان ۹۵٪ به عنوان سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج: مطابق تصاویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده در این مطالعه، شکل نانوسریا کروی بود که متشکل از سریم با درصد وزنی ۹۷/۹ و اکسید با درصد وزنی ۲/۱ بود. ابعاد نانوذرات ۲۹/۳ نانومتر تعیین شد. بیشترین جذب UV/VIS نانوسریا در طول موج ۳۱۸ نانومتر ثبت شد. میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با ۰/۴۵wt٪ از SDS افزایش معنی‌داری نسبت به حضور ۰/۰۵wt٪، ۰/۱۵wt٪ و ۰/۲۵wt٪ از SDS داشت ($P\text{-Value} < 0/001$). افزایش ۵ ساعته زمان سونیکاسیون، میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا را نسبت به طور معنی‌دار افزایش داد ($P\text{-Value} = 0/001$).

نتیجه‌گیری: برای افزایش پایداری توزیع نانوسریا می‌توان از سورفکتانت آنیونی SDS با درصد وزنی بهینه ۰/۴۵ استفاده کرد. هم چنین افزایش زمان سونیکاسیون به مدت ۵ ساعت می‌تواند جایگزین بهتری نسبت به افزایش درصد وزنی سورفکتانت آنیونی SDS برای دستیابی به توزیع پایدار باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات سریم اکساید (CONPs)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف جذبی

ارجاع: عبدی قوشبلاغ نورالدین، آستانی اکرم، زارع محمدحسین. بهینه‌سازی توزیع نانوذرات سریم اکساید به عنوان حفاظت کننده پرتویی در محیط آبی دیونیزه مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۶؛ ۲۶(۹): ۷۸۴-۹۵.

۱- دانشجو گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۲- استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک انسان و حیوان، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- استادیار گروه میکروپ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۴- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات پرتودرمانی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۳۰۴۰۰۶۷؛ پست الکترونیکی: mhzare2009@gmail.com؛ کدپستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰

Ce(3+) به عنوان جایگاه‌های فعال برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد تلقی می‌شود (۶،۷،۸).

میزان سمیت نانوذرات حلال و یا نانوذرات متالیک در ابعاد میکرون، وابسته به تنوع حل شدن عناصر در حلال و یا میزان پایداری شیمیایی ذرات دارد. یکی از نانوذرات متالیک که توانایی کاهش رساناهای بیولوژیک را دارد نانوذرات سریم اکساید متشکل از Ce(4+) می‌باشد. این نانوذرات به علت توانایی جذب امواج ماورابنفش، ویژگی آنتی‌اکسیدانی و تغییر سریع ظرفیت از Ce(4+) به Ce(3+) همراه با ذخیره‌سازی اکسیژن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. پتانسیل استاندارد بازیابی زوج (Eh) برای نانوذرات سریم اکساید $Eh_{Ce^{+4}/Ce^{+3}} = +1.15 V$ می‌باشد که بیش‌تر از پتانسیل استاندارد بازیابی زوج (Eh) برای رساناهای بیولوژیک است (۹).

پتانسیل زتا یک عامل مهم در چگونگی توزیع نانوذرات می‌باشد زمانی که پتانسیل زتا به حد کافی زیاد باشد (بدون در نظر گرفتن علامت منفی یا مثبت) تضمین کننده پایداری سوسپانسیون نانوذرات خواهد بود درحالی که در پتانسیل زتای پایین، نیروهای جاذبه به نیروهای دافعه غلبه کرده و منجر به تجمع نانوذرات در سوسپانسیون خواهد شد (۱۰).

تکنیک‌های بسیاری برای توزیع نانوذرات سریم اکساید وجود دارد که البته همه این تکنیک‌ها توزیع مناسبی را ندارند و در بسیاری از موارد نحوه توزیع وابسته به ابعاد نانوذرات سریم اکساید دارد. یکی از این تکنیک‌ها تغییر در ساختار شبکه‌ای نانوذرات و کاهش ابعاد نانوذرات می‌باشد که در این حالت با ترکیب $0.375/0$ مولار سریم نیترات $Ce(NO_3)_3$ و $0.5/0$ مولار هگزامتیلن تترامین (hexamethylenetetramine) در دمای اتاق و با کنترل زمان واکنش، توزیع مناسبی از نانوسریا با ابعاد ۳ الی ۱۲ نانومتر به دست می‌آید (۳). برای کاهش موثر ابعاد نانوذرات، محلول‌های آبی پلیمری و سورفکتانت‌ها به عنوان مواد افزودنی استفاده می‌شود که از تنش شدن نانوذرات جلوگیری می‌کنند هم چنین منجر به بهبود ویژگی‌های شیمیایی دارو می‌شود. پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، پلیمرهای محلول آبی و سدیم دودسیل سولفات (SDS)

فناوری نانو امکان ساخت و دست کاری ساختار مواد در ابعاد نانومتر را فراهم می‌سازد (۱). اخیراً نانوذرات به علت ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی، در زمینه‌های مختلفی از جمله کاربردهای صنعتی، مطالعه سمیت محیطی و تاثیرات آن‌ها بر سلامت انسان‌ها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند. نانو ذرات مختلف صنعتی، از موادی نظیر تیتانیوم اکسید، نقره، طلا، سلنید کادمیم، سریم اکساید و دیگر نانو ذرات کربن تشکیل شده‌اند که کاربردهای وسیعی در اهداف صنعت دارند اما نانو ذرات سریم اکساید ماده‌ای بسیار مهم با کاربردهایی وسیع در سلول‌های خورشیدی، سلول‌های سوختی، سنسورهای گاز، پمپ اکسیژن، شیشه و سرامیک است (۲).

نانوذرات سریم اکساید (CONPs) یا نانوسریا (Nanoceria) به علت ویژگی‌هایی منحصر به فرد و کاربرد گسترده‌ای که دارند بیش‌تر مورد بررسی قرار گرفته‌اند به طوری که می‌توان از این نانوذرات به عنوان کاتالیزور، مواد الکترولیتی سلول‌های سوختی اکسید جامد، لایه عایق بر روی سلیکون و یا در نانودرمانی به منظور کاهش التهاب‌های مزمن، استفاده نمود. هم چنین با توجه به خواص منحصر به فرد آن‌ها، در جذب پرتوهای ماورابنفش مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این ساختار مهندسی نانو ذرات سریم اکساید نشانگر توانایی این نانوذرات برای حفاظت پرتویی در برابر پرتوهای یونیزان است (۳،۴،۵).

نانوذرات سریم اکساید در ساختار خود شامل Ce(3+) و Ce(4+) می‌باشد که رادیکال‌های آزاد طی واکنش با Ce_3O_2 جاروب شده و CeO_2 ایجاد می‌شود و با توجه به خاصیت خود احیاکنندگی، CeO_2 طی یک فرایند شیمیایی تجزیه و دوباره Ce_3O_2 تولید خواهد شد تا ROS ها را جاروب نماید. توانایی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد توسط نانوسریا و یا به عبارتی فعالیت بیولوژیک نانوسریا از طریق نسبت Ce(3+) به Ce(4+) تعیین می‌شود که هر چقدر این نسبت بیش‌تر باشد خاصیت جاروبگری نانوسریا بیش‌تر خواهد بود و نسبت توزیع Ce(3+) به Ce(4+) وابسته به روش سنتز نانوسریا است بنابراین

شد. نانوذرات سریم اکساید (Cerium Oxide Nanoparticles) از شرکت US Research Nanomaterials (CONPs) و مواد سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات و تویین ۲۰ مورد استفاده در این مطالعه برای بهبود توزیع نانوذرات سریم اکساید در محیط آبی، از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند. تصاویر نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ساخت شرکت PHENOM تحت نام Phenom ProX در ابعاد ۴ میکرومتر ثبت و ترکیب شیمیایی آن با استفاده از آنالیز شیمیایی Region مشخص گردید. طیف جذبی UV/VIS سوسپانسیون نانوسریا پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان آماده سازی سوسپانسیون و ساکن شدن آن، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/VIS Double Beam 4802 Spectrometer) در محدوده طول موجی ۲۰۰ الی ۸۰۰ نانومتر در سه گروه زیر به دست آورده شد:

الف) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدون حضور سورفکتانت.

ب) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در حضور سورفکتانت SDS با درصدهای وزنی ۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۴۵ و ۰/۶۵.

ج) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با مقادیر ۱، ۳، ۷ و ۱۴ میکرولیتر از Tween 20 (g/ml) ۰/۰۵) به ازای ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون نانوسریا.

طول موج ماکزیمم (λ_{max}) نانوذرات سریم اکساید تعیین و در ادامه مطالعه جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد. غلظت گروه الف به دلیل مقایسه طیف جذبی UV/VIS نانوسریا، متفاوت با دو گروه ب و ج انتخاب شد. به منظور تعیین غلظت پایدار سوسپانسیون در زمان حضور و عدم حضور سورفکتانت SDS، میزان جذب UV/VIS در طول موج ماکزیمم λ_{max} خوانش و شش نمودار استاندارد برحسب غلظت (Concentration) - میزان جذب (Absorbance) برای سوسپانسیون های زیر ترسیم شد:

۱) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت های ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدون حضور سورفکتانت SDS.

سورفکتانت آنیونی هستند که در بسیاری از فرمولاسیون های دارویی مورد استفاده قرار می گیرند. استفاده از SDS و PVP همراه با دارو به منظور بهبود پایداری و خواص انحلالی برخی داروهای هیدروفوبیک می باشد. هر چند که ذرات به دست آمده به راحتی پس از تهیه و ذخیره سازی سوسپانسیون دوباره تجمع پیدا می کنند. ترکیب استفاده از پلیمر و مواد سورفکتانت منجر به پایداری ذرات از طریق جذب کمپلکس سورفکتانت- پلیمر بر روی ذرات می شود. داروهای محلول همراه با پلیمرها و سورفکتانت بایستی قابلیت تشکیل و پایداری نانوذرات دارویی را داشته باشند (۱۱). توزیع همگن و پایدار نانوذرات یکی از چالش های اصلی کاربرد نانوذرات در مطالعات درون تنی و برون تنی می باشد که بدین منظور متناسب با نوع مطالعه، از روش های مختلفی که در ادامه اشاره شده برای افزایش پایداری نانوذرات محلول استفاده می شود.

۱) استفاده از سورفکتانت های یونی و غیر یونی نظیر تویین ۲۰ یا ۸۰ (Tween 20 OR Tween 80)، پلی وینیل پیرولیدون، پلیمرهای محلول آبی و سدیم دودسیل سولفات.

۲) استفاده از لیپوزوم های کاتیونی نظیر DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate)

۳) استفاده از ترکیب متاسففات پلیمری نظیر سدیم هگزا متاسففات.

۴) استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی نظیر ورتکس، سونیکاتور حمامی، سونیکاتور پروبی هم چنین تغییر دما و مدت زمان سونوکیت، برای افزایش پایداری نانوذرات محلول وجود دارد.

هدف از این مطالعه بررسی بهبود توزیع نانوذرات سریم اکساید در محیط آبی دیونیزه با استفاده از سورفکتانت های سدیم دودسیل سولفات و تویین ۲۰ و هم چنین پارامتر زمان سونیکاسیون می باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مقطعی- توصیفی است که روی نانوذرات سریم اکساید توزیع شده در محیط آبی انجام

دمای ۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه سونیکاتور حمامی تحت فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، سونوکیت شدند و میزان جذب تمامی سوسپانسیون‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان سونیکاسیون در طول موج λ_{max} توسط اسپکتروفوتومتر خوانش و به وسیله منحنی استاندارد تعیین غلظت شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده به کمک نرم افزار Excel مورد بررسی قرار گرفته و منحنی استاندارد و طیف جذبی هر کدام از سوسپانسیون‌ها رسم و غلظت نهایی هر کدام از سوسپانسیون‌های نانوذرات سریم اکساید تعیین شد. مقدار قابل قبول ضریب هم بستگی برای خط برازش شده در تمامی منحنی‌های استاندارد، بالای ۹۵٪ در نظر گرفته شد. مقادیر P-Value با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی برای مقایسه کردن غلظت پایدار سوسپانسیون‌های مختلف، محاسبه شد. لازم به ذکر است سطح اطمینان ۹۵٪ به عنوان سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.72).

نتایج

شکل ۱ قسمت‌های الف و ب به ترتیب مربوط به تصاویر گرفته شده از نانوذرات سرم اکساید در ابعاد ۴ و ۶ میکرون است. که ابعاد نانوذرات ۲۹/۳ نانومتر تعیین شده است. و با توجه به آنالیز شیمیایی Region با درصد اطمینان ۹۷/۵، درصد وزنی سریم برابر با ۹۷/۹ تعیین شد و با درصد اطمینان ۸۱/۵، درصد وزنی اکسید برابر با ۲/۱ تعیین شده است (شکل ۱ قسمت ج). طیف جذبی UV/VIS نانوذرات سریم اکساید بدون حضور سورفکتانت مطابق شکل ۲ می‌باشد. مطابق این شکل، در محدوده‌ی طول موجی ۳۱۵ الی ۳۳۰ نانومتر یک ناحیه تقریباً یکنواخت در جذب داریم که بیش‌ترین جذب در طول موج ۳۱۸ نانومتر با مقدار جذب ۰/۵۰۴۱۴۲ رخ داده

(۲) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ۰/۰۵ (wt/%) سورفکتانت SDS.

(۳) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ۰/۱۵ (wt/%) سورفکتانت SDS.

(۴) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ۰/۲۵ (wt/%) سورفکتانت SDS.

(۵) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ۰/۴۵ (wt/%) سورفکتانت SDS.

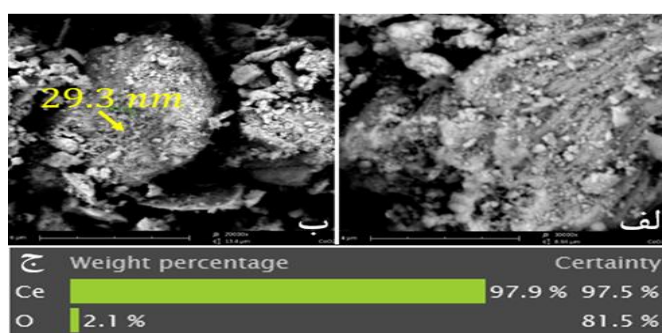
(۶) سوسپانسیون نانوسریا با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور ۰/۶۵ (wt/%) سورفکتانت SDS.

در سوسپانسیون گروه ۱ به دلیل عدم حضور سورفکتانت SDS غلظت‌های بالاتری از نانوسریا تهیه شد تا در صورت ته‌نشین شدن سوسپانسیون، غلظت پایداری از نانوسریا داشته باشیم. تمامی جذب‌های UV/VIS برای ترسیم منحنی استاندارد، بلافاصله پس از آماده‌سازی سوسپانسیون‌ها قرائت شد تا از تنش شدن نانوذرات در محیط آبی دیونیزه شده جلوگیری شود.

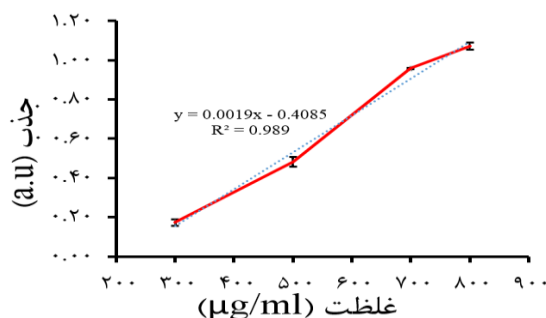
در هر دو مرحله تهیه طیف جذبی و ترسیم منحنی استاندارد به منظور افزایش پایداری توزیع، ابتدا سوسپانسیون‌های تهیه شده به مدت ۲ الی ۳ دقیقه با دستگاه Vortex (VIBROFIX VF1) به هم زده شدند و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد توسط امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز در سونیکاتور حمامی (D-78224 Singen/Htw) با توان ۳۴۰ وات سونوکیت شدند. برای افزایش پایداری توزیع نانوذرات سریم اکساید در محیط آبی زمان سونیکاسیون سوسپانسیون (با غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) همراه با ۰/۰۵ wt/%) سورفکتانت آنیونی SDS افزایش داده شد به طوری که سوسپانسیون‌های مورد نظر در پنج گروه جداگانه با مدت زمان‌های مختلف ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ ساعت در

با توجه به شکل ۳ با افزایش درصد وزنی سورفکتانت SDS در سوسپانسیون نانوسریا، ارتفاع پیک جذب افزایش یافت. با توجه به حضور سورفکتانت غیر یونی توپین ۲۰ در سوسپانسیون نانوسریا مطابق شکل ۴ با افزایش غلظت توپین ۲۰ پیک جذب نانوذرات سریم اکساید افزایش پیدا کرد اما با افزایش غلظت توپین ۲۰ از ۷ میکرو لیتر به ۱۴ میکرو لیتر در ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون نانوسریا، کاهش جذب مشاهده شد. هم چنین بر خلاف مشاهدات قبلی طول موج ماکزیمم نانوسریا از ۳۱۸ نانومتر به ۲۲۸ نانومتر تغییر یافت.

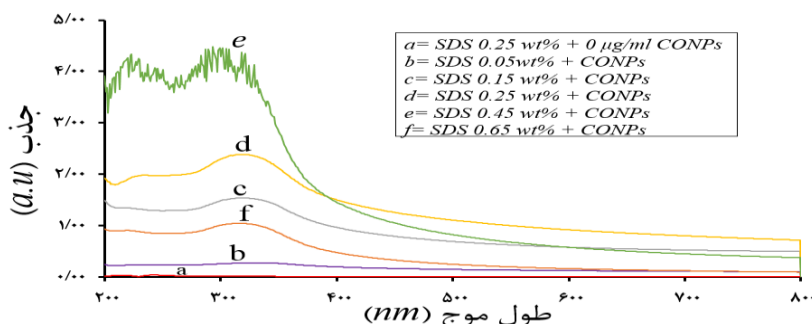
است. طیف جذبی سوسپانسیون نانوسریا در حضور سورفکتانت SDS با درصدهای وزنی صفر، ۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۴۵ و ۰/۶۵ مطابق شکل ۳ به دست آمد. به طوری که منحنی a در این شکل، مربوط به طیف جذبی محلول آبی SDS با درصد وزنی ۰/۲۵، هیچ گونه پیک جذبی در محدوده طول موجی ۲۰۰ الی ۸۰۰ نانومتر ندارد. اما پیک جذب UV/VIS همانند طیف جذبی سوسپانسیون نانوسریا در شکل ۲، برای تمامی درصدهای وزنی SDS در طول موج ۳۱۸ نانومتر رخ داده است.



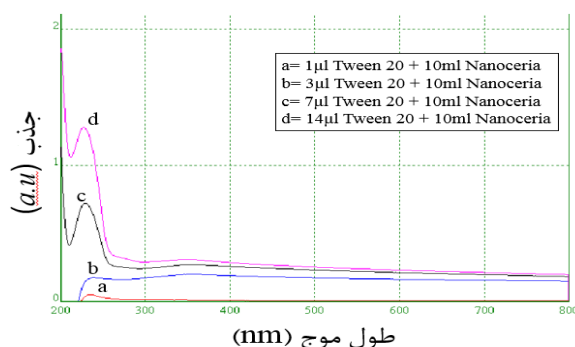
شکل ۱: بررسی ویژگی‌های ساختاری و ترکیب شیمیایی نانوذرات سریم اکساید. الف) تصاویر میکروسکوپ SEM با بزرگ‌نمایی ۴ میکرون از نانوسریا. ب) تصاویر میکروسکوپ SEM با بزرگ‌نمایی ۶ میکرون از نانوسریا. ج) نتایج آنالیز شیمیایی Region انجام شده بر روی نانوسریا.



شکل ۲: طیف جذبی نانوذرات سریم اکساید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی دوپرتویی



شکل ۳: طیف جذبی نانوذرات سریم اکساید در حضور غلظت‌های مختلف از سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات (SDS)



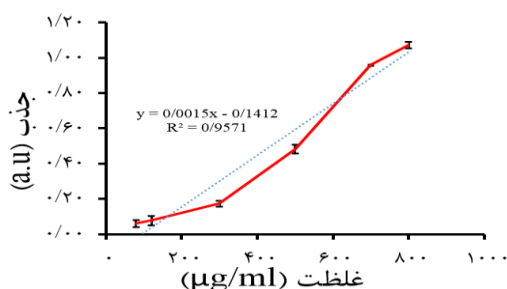
شکل ۴: طیف جذبی نانوذرات سریم اکساید در حضور غلظت‌های مختلف از سوفکتانت‌های غیریونی توپین ۲۰ (Tween 20)

سوسپانسیون نانوسریا در حضور ۰/۶۵wt از SDS، کاهش معنی‌داری نسبت به سوسپانسیون‌های c، d و e (۰/۰۱) $P_Value <$ داشت و افزایش معنی‌داری نسبت به سوسپانسیون b (۰/۰۱) $P_Value <$ داشت. نتایج مربوط به توزیع سوسپانسیون نانوسریا به همراه ۰/۰۵wt از SDS با زمان سونیکاسیون متفاوت در شکل ۸ آورده شده است. مطابق این شکل غلظت نهایی سوسپانسیون مذکور با مدت زمان‌های سونیکاسیون ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ ساعت به ترتیب برابر با ۱۹۱/۰۸، ۳۴۵/۱۰، ۳۵۷/۱۱، ۴۱۳/۰۰ و ۵۳۱/۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

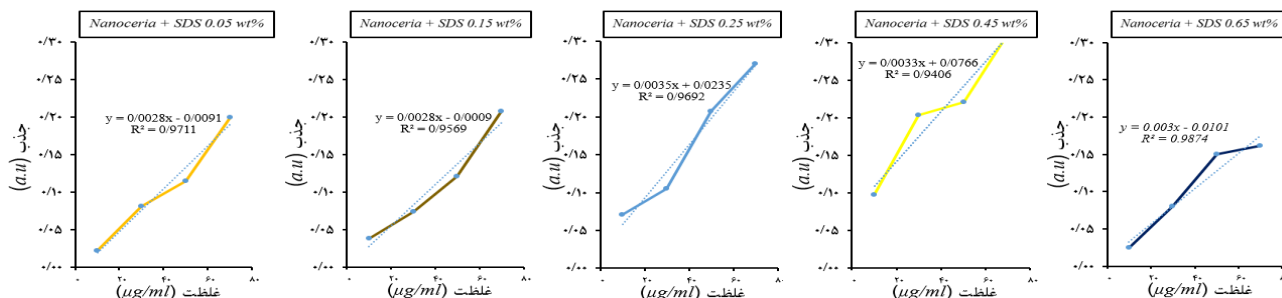
مطابق نتایج آنالیز آماری، غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با افزایش زمان سونیکاسیون، افزایش معنی‌داری داشت. میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با ۴ ساعت سونیکاسیون نسبت به سوسپانسیون نانوسریا با ۳ ساعت سونیکاسیون افزایش معناداری داشت (۰/۰۱) $P_Value =$. هم‌چنین میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با ۶ ساعت سونیکاسیون نسبت به سوسپانسیون نانوسریا با ۵ ساعت سونیکاسیون افزایش معناداری داشت (۰/۰۰۴) $P_Value =$ و هم‌چنین مطابق شکل ۸ سوسپانسیون نانوسریا با ۷ ساعت سونیکاسیون نسبت به سوسپانسیون نانوسریا با ۶ ساعت سونیکاسیون افزایش معناداری داشت (۰/۰۱) $P_Value =$. با افزایش زمان سونیکاسیون از ۴ ساعت به ۵ ساعت، افزایش معنی‌داری در میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا مشاهده نشد (۰/۸۱۲) $P_Value =$.

شکل ۵ منحنی استاندارد سوسپانسیون نانوسریا بدون حضور سوفکتانت را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل عدد هم‌بستگی خط برازش ۰/۹۸۹ محاسبه شد که بیش‌تر از معیار ۰/۹۵ برای منطقی بودن داده‌ها می‌باشد. منحنی‌های استاندارد سوسپانسیون نانوسریا همراه با درصدهای وزنی (wt/.) مختلف از SDS (۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۴۵ و ۰/۶۵ درصد) مطابق شکل ۶ ترسیم شد. مطابق این شکل، ضریب هم‌بستگی منحنی استاندارد سوسپانسیون نانوسریا با درصدهای وزنی ۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۴۵ و ۰/۶۵ درصد از سوفکتانت آنیونی SDS به ترتیب ۰/۹۷۱۱، ۰/۹۵۶۹ و ۰/۹۷۵۷ است که همه آن‌ها بالاتر از ۰/۹۵ هستند.

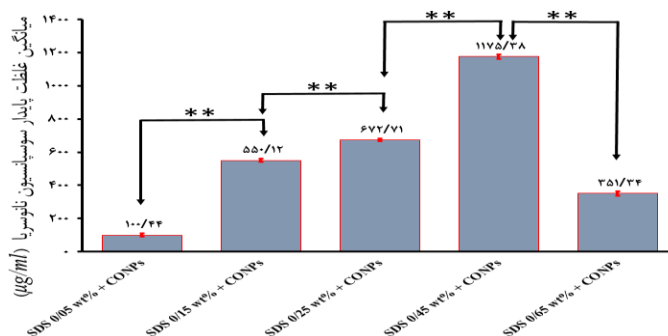
بنابراین با اطمینان بیش‌تری از معادله خط برازش برای تعیین غلظت‌های مجهول در مراحل بعدی استفاده شد. مطابق شکل ۲ میانگین جذب UV/VIS سوسپانسیون‌های a، b، c، d و f در طول موج ماکزیمم ۳۱۸ نانومتر به ترتیب برابر با ۰/۲۷۲۱۴۵، ۰/۱۵۳۹۴۲۳، ۰/۳۷۷۹۶۸، ۰/۳۶۸۰۰۳ و ۱/۰۴۳۹۲۶ است. غلظت هر کدام از سوسپانسیون‌های a، b، c، d و e با استفاده از معادله خط برازش منحنی‌های استاندارد شکل ۶، به ترتیب برابر با ۱۰۰/۴۴، ۵۵۰/۱۲، ۶۷۲/۷۱، ۱۱۷۵/۳۸ و ۳۵۱/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند (شکل ۷). مطابق شکل ۷ و نتایج محاسبه P-Value افزایش میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا با افزایش درصد وزنی سوفکتانت آنیونی SDS تا درصد وزنی ۰/۴۵ معنی‌دار بود (۰/۰۱) $P_Value <$ در صورتی که غلظت پایدار



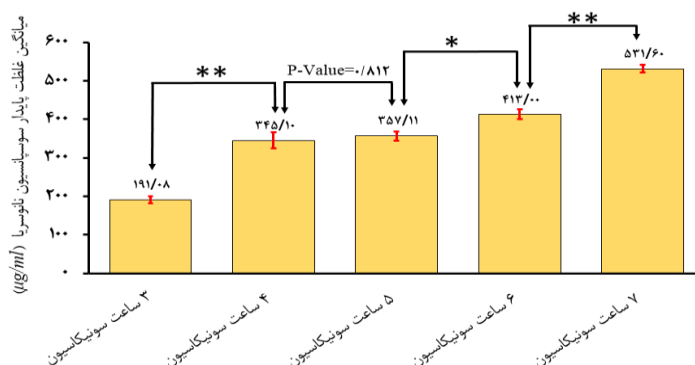
شکل ۵: منحنی استاندارد نانوذرات سریم اکساید بدون حضور سورفکتانت



شکل ۶: منحنی استاندارد نانوذرات سریم اکساید در حضور دردهای وزنی مختلف از سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات (SDS)



شکل ۷: تعیین میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا در حضور سورفکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات (SDS) با دردهای وزنی مختلف. علامت ** بیانگر مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۰۱ می باشد.



شکل ۸: تعیین میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا در حضور SDS ۰/۰۵wt% با زمان های سونیکاسیون متفاوت سوسپانسیون.

* بیانگر مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۱ و علامت ** بیانگر مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۰۱ می باشد. افزایش میانگین غلظت پایدار سوسپانسیون سونوکیت شده با مدت زمان ۵ ساعت نسبت به سوسپانسیون سونوکیت شده با مدت زمان ۴ ساعت معنی دار نبود. مقدار P-Value محاسبه شده برابر با ۰/۸۱۲ می باشد.

فرایند منجر به تشکیل یک سری میسل آب گریز خواهد شد که این تعامل آب گریز عامل دفع میسل‌های تشکیل شده از محیط آبی خواهد شد و به عبارتی سوسپانسیون دچار خود پلاریزاسیون می‌شود که توزیع همگنی از نانوذرات در سوسپانسیون نخواهیم داشت. بنابراین بیش‌ترین توزیع پایدار در نانوذرات CONPs نمی‌تواند در مقادیر بالا و یا پایین سورفکتانت SDS حاصل شود. مناسب‌ترین درصد وزنی SDS برای توزیع همگن و پایدار نانوذرات سریم CONPs طبق این مطالعه ۰/۴۵wt٪ است. که این مقدار برای نانوذرات مختلف به علت تفاوت در ابعاد، پتانسیل زتا، و غلظت سوسپانسیون تهیه شده متفاوت خواهد بود (۱۸،۱۹).

ویژگی‌های اپتیکی نانوذرات وابسته به عواملی هم چون، ابعاد نانوذرات، شکل، درصد وزنی عناصر، میزان تجمع و شاخص شکستگی در نزدیکی سطح نانوذرات است که منجر به تغییرات در طیف جذبی UV/VIS می‌شوند (۲۰،۲۱). بنابراین تغییر طیف جذبی نانوذره بیانگر تغییر یکی از پارامترهای معرفی شده است. مطابق نتایج این مطالعه در شکل ۴ با افزودن سورفکتانت غیریونی توپین ۲۰ به سوسپانسیون نانوسریا، توزیع پایداری از نانوسریا به دست می‌آید که با افزایش غلظت توپین ۲۰ از ۷ میکرومولار به ۱۴ میکرومولار (در ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون نانوسریا) طیف جذبی سوسپانسیون کاهش پیدا می‌کند بنابراین استفاده از غلظت بهینه از توپین ۲۰ برای افزایش توزیع نانوسریا می‌تواند حائز اهمیت باشد. اما نکته قابل توجه تغییر طول موج ماکزیمم نانوسریا از ۳۱۸ نانومتر به ۲۲۸ نانومتر می‌باشد. طبق مطالعه‌ای سورفکتانت غیریونی توپین ۲۰ می‌تواند منجر به کاهش قطر نانوذرات تا ۵۰٪ شود (۲۲).

بنابراین تغییر ابعاد نانوسریا در این مطالعه توسط توپین ۲۰، می‌تواند دلیلی برای تغییر طیف جذبی باشد. به طوری که این تغییر ابعاد نانوذرات می‌تواند عاملی برای مشاهده نتایج متفاوت در مطالعات بیولوژیکی باشد. به طوری که با کاهش ابعاد نانوذرات PLGA میزان جذب سلولی افزایش پیدا خواهد کرد (۲۳). به دلیل تغییر طول موج ماکزیمم نانوسریا در حضور

تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM نشان می‌دهد که شکل نانوذرات سریم اکساید به صورت کروی می‌باشد که قطر این کره‌های کوچک حدوداً ۲۹/۳ نانومتر است. تصاویری که در بسیاری از مطالعات از پودر نانوذرات سریم اکساید گرفته شده است تایید کننده این موضوع می‌باشد (۱۲،۱۳). ابعاد نانوذرات یکی از مشخصه‌های اصلی آن‌ها است که متناسب با کاربرد نانوذرات در مطالعات می‌توان با روش‌های مختلف سنتز و آماده‌سازی سوسپانسیون نانوذرات ابعاد دلخواهی از آن‌ها را به دست آورد. به طوری که سورفکتانت SDS می‌تواند منجر به کاهش ابعاد نانوذرات شود (۱۴).

مطابق نتایج مطالعه حاضر در شکل ۲، بیش‌ترین جذب UV/VIS سوسپانسیون نانوسریا در طول موج ۳۱۸ نانومتر رخ داد. با توجه به این که در مطالعات مختلف بیش‌ترین جذب را در طول موج‌های ۳۱۰ و ۲۹۸ نانومتر به دست آوردند. از دلایل اصلی تفاوت در پیک‌های جذبی به دست آمده می‌توان به متفاوت بودن مدل دستگاه‌های اسپکتروفوتومتر هم چنین تفاوت جنس و کیفیت کوت مورد استفاده، کالیبراسیون‌های مختلف دستگاه‌ها و سنتز متفاوت نانوذرات سریم اکساید اشاره نمود (۱۵،۱۶،۱۷).

مطابق نتایج ارائه شده در شکل ۳ همواره با افزایش درصد وزنی سورفکتانت SDS، افزایش غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا پس از ۲۴ ساعت از زمان آماده‌سازی سوسپانسیون مشاهده شد اما این روند در حضور سورفکتانت SDS با درصد وزنی ۰/۶۵ معکوس و غلظت پایدار سوسپانسیون با کاهش روبرو شد. به طوری که در مطالعه‌ای بر روی نانولوله‌های کربن تک جداره SWCNTs، افزایش درصد وزنی سورفکتانت SDS از ۱/۵wt٪ به ۲/۵wt٪ میزان جذب UV/VIS سوسپانسیون SWCNTs را کاهش داده و بر خلاف انتظار ارتفاع پیک جذبی در طول موج λ_{max} کاهش یافته است. سورفکتانت SDS پس از جذب شدن توسط نانوذرات یک تک لایه کامل از $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$ در اطراف نانوذرات تشکیل می‌دهد و اجازه جذب بیش‌تر SDS را نمی‌دهد و به حالت اشباع می‌رسد که این

افزودن قطعات یخ سعی شد تا جای ممکن تغییرات دمای سوسپانسیون بین ۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی گراد رخ دهد.

نتیجه گیری

مطابق نتایج مطالعه حاضر برای افزایش پایداری توزیع نانوذرات سریم اکساید می توان از سورفکتانت آنیونی SDS با درصد وزنی بهینه ۰/۴۵wt٪ استفاده کرد بکار بردن درصدهای وزنی کمتر و یا بیش تر از این مقدار توزیع پایدار مطلوبی از نانوذرات سریم اکساید را نتیجه نخواهد داد. حضور سورفکتانت غیر یونی توپین ۲۰ می تواند توزیع پایداری را از نانوسریا ایجاد کند اما طول موج ماکزیمم جذب نانوسریا را تغییر خواهد داد که می تواند دلیلی بر تغییر ساختار و به دنبال آن تغییر رفتار نانوسریا در مطالعات بیولوژیکی باشد. برای دستیابی به توزیع پایدار از نانوذرات سریم اکساید، افزایش زمان سونیکاسیون به مدت ۵ ساعت می تواند جایگزین بهتری نسبت به افزایش درصد وزنی سورفکتانت آنیونی SDS باشد زیرا افزایش SDS مطمئناً افزایش سمیت داروی ترکیبی را به دنبال خواهد داشت در صورتی که با افزایش زمان سونیکاسیون می توان در درصدهای وزنی پایین تری از SDS توزیع همگن و پایداری از نانوسریا داشت. میزان جذب سلولی، سمیت سوسپانسیون نانوسریا و مشاهده ویژگی های دارویی آن برای مثال خاصیت حفاظت پرتویی و آنتی اکسیدانی در توزیع های مختلف، می تواند متفاوت باشد بنابراین بررسی این ویژگی ها در حضور سورفکتانت های SDS و توپین ۲۰ مطالعات جدیدی را می طلبد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه تحقیقاتی کارشناسی ارشد نویسنده اول مصوب در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می باشد. از همکاری آزمایشگاه شیمی دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد در این مطالعه سپاسگزاریم. در ضمن تمامی منابع مالی توسط نویسنده اول تامین شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد. تمامی مسئولیت هر مطلب منتشر شده، شامل صحت و اعتبار تمامی مطالب آن، از جمله مطالب مربوط به اخلاق در پژوهش، بر عهده نویسندگان است.

سورفکتانت توپین ۲۰ در ادامه مطالعه جهت توزیع سوسپانسیون و بررسی ها بیش تر از سورفکتانت مذکور استفاده نشد. در مطالعات درون تنی و برون تنی بهترین حالت زمانی خواهد بود که در کم ترین دز از یک دارو بهترین نتایج گرفته شود در همین راستا در این مطالعه تلاش بر این شد که با درصد وزنی کمتری از سورفکتانت SDS، بهینه ترین توزیع از نانوذرات را داشته باشیم. مطابق شکل ۷ بیش ترین و کم ترین غلظتی از نانوذرات سریم اکساید که توسط سورفکتانت آنیونی SDS جذب و پایدار مانده به ترتیب برای سوسپانسیون های e و b می باشد که به ترتیب حاوی ۰/۰۵wt٪ و ۰/۴۵wt٪ از SDS هستند. با توجه به شکل ۸، با سونوکیت کردن سوسپانسیون نانوسریا (با غلظت نانوسریای ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر همراه با ۰/۰۵wt٪ سورفکتانت آنیونی) به مدت هفت ساعت می توان به غلظت پایدار ۵۳۱/۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوسریا دست یافت که مطابق شکل ۷ این غلظت تقریباً برابر با غلظت پایدار سوسپانسیون نانوسریا در حضور ۰/۱۵wt٪ سورفکتانت آنیونی SDS می باشد. بنابراین با افزایش زمان سونیکاسیون می توان به غلظت پایداری از نانوسریا در حضور درصد وزنی کمتری از سورفکتانت SDS دست یافت. طبق مطالعه ای بر روی نانوذرات SWCNTs، با افزایش دو ساعته ای زمان سونیکاسیون میزان جذب سوسپانسیون SWCNTs در طول موج λ_{max} تقریباً دو برابر می شود به عبارتی میزان غلظت پایدار حل شده در محلول آبی، دو برابر شده است. افزایش زمان سونیکاسیون سوسپانسیون نانوذرات باید کنترل شده باشد تا هم زمان با داشتن توزیع همگن مناسب از نانوذرات، ساختار نانوذرات در اثر امواج مکانیکی فراصوت به هم نخورد. به طوری که قطر نانوذرات در صورت افزایش زمان سونیکاسیون می تواند کاهش پیدا کند که این کاهش قطر در سونیکاتور پروبی مشهودتر از سونیکاتور حمامی می باشد (۲۷-۲۴، ۱۹). یکی از محدودیت های اصلی این مطالعه افزایش دمای سوسپانسیون در حین سونیکاسیون استوک های تهیه شده از نانوذرات بود که البته با کنترل دما توسط دماسنج و

References:

- 1-Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. *Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles*. *Nanoscale* 2011; 3(4):1411-20.
- 2-Park EJ, Choi J, Park YK, Park K. *Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells*. *Toxicology* 2008; 245(1-2): 90-100.
- 3- Zhang F, Chan SW, Spanier JE, Apak E, Jin Q, Robinson RD, Herman IP. *Cerium oxide nanoparticles: size-selective formation and structure analysis*. *Appl phy Lett* 2002; 80(1):127-9.
- 4- Wang C, Blough E, Dai X, Olajide O, Driscoll H, Leidy JW, et al. *Protective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on MC3T3-E1 Osteoblastic Cells Exposed to X-Ray Irradiation*. *Cellular Physiology Biochem* 2016; 38(4):1510-9.
- 5- Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. *Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles*. *Small* 2009; 5(24): 2848-56.
- 6-Velpula N, Ugrappa S, Kodangal S. *A role of radioprotective agents in cancer therapeutics: a review*. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2013; 2(6): 677-82
- 7-Baker CH. *Harnessing cerium oxide nanoparticles to protect normal tissue from radiation damage*. *Translational Cancer Res* 2013; 2(4): 343-58.
- 8-Abbasi MR. *Radioprotection of Military Forces: Past, Present and Future*. *J Mil Med* 2003; 5(1): 69-79.
- 9-Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. *Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro*. *Environmental Pollution* 2009; 157(4):1127-33.
- 10- Aljamali NM. *Zetasizer technique in biochemistry*. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2015 Apr 1;4(2):1.
- 11- Pongpeerapat A, Wanawongthai C, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K. *Formation mechanism of colloidal nanoparticles obtained from probucol/PVP/SDS ternary ground mixture*. *International J pharmaceutics* 2008; 352(1):309-16.
- 12- Agawane SM, Nagarkar JM. *Nano ceria catalyzed Ullmann type coupling reactions*. *Tetrahedron letters* 2011; 52(41): 5220-3.
- 13- Deshpande S, Patil S, Kuchibhatla SV, Seal S. *Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide*. *Appl Phys Lett* 2005; 87(13):133113.
- 14- Lee CL, Wan CC, Wang YY. *Synthesis of Metal Nanoparticles via Self Regulated Reduction by an Alcohol Surfactant*. *Advanced Functional Material* 2001; 11(5):344-7.
- 15- Karakoti AS, Singh S, Kumar A, Malinska M, Kuchibhatla SV, Wozniak K, et al. *PEGylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry*. *J Am Chem Society* 2009; 131(40):14144-5.
- 16- Sujana MG, Chattopadyay KK, Anand S. *Characterization and optical properties of nano-ceria synthesized by surfactant-mediated*

- precipitation technique in mixed solvent system.* Applied Surface Sci 2008; 254(22):7405-9.
- 17- Bahreyni-Toosi MH, Zare MH, Shakeri MT, Soudmand S. *In-vitro Study of Photothermal Anticancer Activity of Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes.* J Biom Physics Engineering 2017; 7(4): 317-32.
- 18- Shi Y, Ren L, Li D, Gao H, Yang B. *Optimization conditions for single-walled carbon nanotubes dispersion.* J Surface Engineered Materials Advanced Techno 2013; 3(1): 6-12.
- 19- Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.* J Nanoparticle Res 2009; 11(1):77-89.
- 20- Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, et al. *Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan.* Mar Drugs 2010; 8(5):1567-636.
- 21- Mallick K, Witcomb MJ, Scurrill MS. *Directional assembly of polyaniline functionalized gold nanoparticles.* J Physics: Condensed Matter 2007;19(19):196225.
- 22- Rao JP, Geckeler KE. *Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters.* Progress in Polymer Sci 2011; 36(7): 887-913.
- 23- Win KY, Feng SS. *Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs.* Biomaterials 2005; 26(15): 2713-22.
- 24- Shi Y, Ren L, Li D, Gao H, Yang B. *Optimization conditions for single-walled carbon nanotubes dispersion.* J Surface Engineered Material Advanced Techno 2013; 3(1):6-12.
- 25- Amini P, Mirtavoos-mahyari H, Motevaseli E, Shabeeb D, Musa AE, Cheki M, et al. *Mechanisms for radioprotection by melatonin; can it be used as a radiation countermeasure.* Curr Mol Pharmacol 2018; 12(1): 2-11.[Persian]
- 26- Goushbolagh NA, Farhood B, Astani A, Nikfarjam A, Kalantari M, Zare MH. *Quantitative Cytotoxicity, Cellular Uptake and Radioprotection Effect of Cerium Oxide Nanoparticles in MRC-5 Normal Cells and MCF-7 Cancerous Cells.* BioNano Sci 2018; 8(3): 769-77.
- 27- Abdi Goushbolagh N, Abedi Firouzjah R, Ebrahimnejad Gorji K, Khosravanipour M, Moradi S, Banaei A, et al. *Estimation of radiation dose-reduction factor for cerium oxide nanoparticles in MRC-5 human lung fibroblastic cells and MCF-7 breast-cancer cells.* Artif Cells, Nanomed, Biotechnol 2018;1-11. [Persian]

Optimization of condition for Cerium Oxide Nanoparticles dispersion as radioprotective agent in deionized water

Nouraddin Abdi Goushbolagh¹, Akram Astani^{2,3}, Mohammad hosein Zare^{1,4*}

Original Article

Introduction: Cerium oxide nanoparticles (CONPs or nanoceria) are used as radiation protection agent, a catalyst and an insulating layer on silicon substrates. The aim of this study was optimization of condition for cerium oxide nanoparticles dispersion with anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) in deionized water.

Methods: This study was a cross-sectional descriptive. The dimensions, image and chemical composition of nanoceria were obtained using scanning electron microscopy (SEM). UV/VIS absorption spectrum of nanoceria suspension in the presence of SDS and Tween 20 surfactants were recorded and maximum absorption wavelength was determined. To increase the stability of the suspension distribution, the sonication time with a constant weight percentage of SDS was increased and the mean concentration was determined. The data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test, and 95% confidence level was considered as the statistical significance level of the results.

Results: According to the SEM images taken in this study, the shape of a nanoceria was spherical, consisting of cerium with 97.9 wt% and oxide with 2.1 wt%. The dimensions of nanoparticles were determined 29.3 nm. UV/VIS maximum absorption was recorded at 318 nm. The mean sustained concentration of nanoceria suspension with 0.45 wt% of SDS had a significant increase than the presence of 0.05 wt%, 0.15 wt%, and 0.25 wt% of SDS (P-value = 0.001). An increase of 5 hours of sonication time resulted in a significant increase in the mean sustained concentration of nanoceria suspension (P-value = 0/000).

Conclusion: An anionic surfactant SDS with an optimum weight percentage of 0.45 can be used to increase the stability of the nanoceria distribution. Furthermore, increasing the sonication time for 5 hours can be a better alternative than increasing the weight percentage of anionic surfactant SDS to achieve a stable distribution.

Keywords: Cerium Oxide Nanoparticles (CONPs), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Scanning Electron Microscopy (SEM), Absorption Spectrum.

Citation: Abdi Goushbolagh N, Astani A, Zare MH. **Optimization of condition for Cerium Oxide Nanoparticles dispersion as radioprotection agent in deionized water.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(9): 784-95.

¹Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

²Zoonotic Diseases Research Center, School of Public Health, Sahid Sadoughi University of Medical, Yazd, Iran

³Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁴Radiotherapy Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09145235722, email: nouraddiin@gmail .com