

# تهیه و ارزیابی عملکرد نانوذره‌های آلژینات پوشش داده شده با تری‌متیل کایتوسان (TMC) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) برای رسانش خوراکی انسولین

سمانه کمیجانی، سمیره هاشمی نجف آبادی\*<sup>+</sup>

گروه مهندسی زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مرتضی رفیعی تهرانی

گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

**چکیده:** در بیماران دیابتی، ترشح انسولین از لوزالمعده مختل شده که منجر به تزریق روزانه انسولین می‌شود. تزریق انسولین سبب ایجاد عفونت، درد و تنش در درازمدت می‌شود. دارورسانی خوراکی انسولین می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تزریق باشد. هرچند در رسانش خوراکی، به دلیل تخریب آنزیمی در دستگاه گوارش، پایداری کم در pH معده و سلدهای فیزیکی مخاط روده، زیست‌دسترس پذیری انسولین پایین است. بنابراین، ساخت سامانه‌های کارآمد حامل، مانند نانوذره‌ها، می‌تواند راه حل مناسبی برای محافظت از داروهای حساس مانند انسولین باشد. هدف از این پژوهش، تهیه یک سامانه آلژینات/ تری‌متیل کایتوسان (TMC)/ پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در اندازه نانو به منظور کنترل رهایش انسولین از آن و افزایش زمان ماندگاری نانوذره در دستگاه گوارش است. نخست، اندازه نانوذره‌ها و بازده به دام افتادن (EE) انسولین، بهینه‌سازی شده و شرایط بهینه برای نسبت‌های انسولین/ آلژینات، TMC/ آلژینات و دور همزن، به ترتیب برابر با ۱، ۴/۵ و ۵۰۰ rpm به دست آمد. سپس، در شرایط بهینه، نانوذره‌های آلژینات بارگذاری شده با انسولین، تهیه شده و به دنبال آن، با TMC پوشش داده شدند و سرانجام، نانوذره‌ها توسط متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول (mPEG) پگیله شدند. پس از بهینه‌سازی شرایط، اندازه نانوذره‌ها و EE به ترتیب ۱۹۵ نانومتر و ۹۲/۳۹٪ به دست آمد و بازده بارگذاری (LE) انسولین در نانوذره‌ها ۲۱/۷۵٪ محاسبه شد. برهمکنش بین لایه‌های گوناگون نیز، با آزمون FT-IR تأیید شده و بررسی رهایش انسولین در محیط‌های شبیه سازی شده معده (SGF) و روده (SIF) انجام شد. این مطالعه‌ها نشان دادند که بیشترین میزان رهایش انسولین، در طی ۶ ساعت اولیه بوده و پس از آن، روند رهایش به تقریب ثابت می‌شود. همچنین با پگیله کردن نانوذرات، میزان رهایش انسولین به مقدار چشمگیری افزایش می‌یابد.

**واژه‌های کلیدی:** انسولین؛ آلژینات؛ تری‌متیل کایتوسان؛ متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول؛ دارورسانی خوراکی

**KEYWORDS:** Insulin; Alginate; Trimethylchitosan; Methoxy polyethylene glycol; Oral drug delivery.

+E-mail: s.hashemi@modares.ac.ir

\*عهده دار مکاتبات

## مقدمه

دیابت وقتی رخ می‌دهد که لوزالمعده نتواند انسولین تولید کند و یا بدن نتواند به طور مؤثر از انسولین تولیدشده استفاده کند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، در سرتاسر جهان، به تقریب سه میلیون نفر در سال، به دلیل بیماری دیابت از بین می‌روند و طبق آمار فدراسیون بین‌المللی دیابت، پیش‌بینی شده که جمعیت بیماران مبتلا به دیابت، از ۴۱۵ میلیون نفر در سال ۲۰۱۵ میلادی به ۶۴۲ میلیون نفر در سال ۲۰۴۰ برسد [۱]. بیماران دیابتی نوع ۱ برای داشتن یک زندگی عادی، نیازمند تزریق روزانه انسولین هستند که ناخوشایند، دردناک و همچنین دارای اثرهای زیان‌آور است. تلاش‌های گسترده‌ای در سرتاسر جهان برای توسعه سامانه‌های دارورسانی غیرتهاجمی، به ویژه از مسیر خوراکی، صورت گرفته است. مسیر خوراکی بسیار پذیرفته شده است، هرچند رسانش مستقیم داروهای پپتیدی و پروتئینی از این مسیر امکان‌پذیر نیست. در رسانش خوراکی، مانع‌هایی مانند وجود محیط اسیدی معده، حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک و انتشار ضعیف انسولین از مخاط روده، سبب زیست‌دسترسی‌پذیری کم انسولین می‌شوند. برای غلبه بر این مانع‌ها و افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری، از روش‌های گوناگون از جمله سامانه‌های حامل دارو استفاده می‌شود. به دلیل برتری‌های بسیار، امروزه تمرکز بیش‌تری روی نانوذره‌های پلیمری به عنوان سامانه‌های دارورسانی وجود دارد [۲]. سامانه‌های حامل پلیمری برای رسانش انسولین، باید زیست‌تخریب‌پذیر، غیر سمی، زیست‌سازگار و بدون اثر ایمنی‌زایی باشند. همچنین، به راحتی تهیه و مشخصه‌یابی شوند و بهتر است آب‌دوست و ارزان باشند [۳]. کایتوسان، دکستران، آلژینات، پلی (۷-گلوتامیک اسید) و هیالورونیک اسید، به عنوان پلیمرهای طبیعی و پلی (لاکتیک اسید) (PLA)، پلی (لاکتیک-کو-گلاکولیک اسید) (PLGA)، پلی کاپرولاکتون (PCL)، پلیمرهای اکریلیک و پلی‌آلیل‌آمین، به عنوان پلیمرهای مصنوعی، به منظور پوشینه‌دار کردن انسولین برای رسانش خوراکی، به کار می‌روند [۴].

آلژینات یک پلی‌ساکارید طبیعی است که به دلیل زیست‌سازگاری، مخاط‌چسبی و زیست‌تخریب‌پذیری عالی و شرایط ژل شدن ملایم، به عنوان حامل برای داروهای پپتیدی و پروتئینی استفاده می‌شود [۵]. سدیم آلژینات، ویژگی‌های یگانه ایجاد اتصال‌های عرضی را در حضور کاتیون‌های چند بنیانی، مانند  $Ca^{+2}$  دارد. آلژینات

به pH حساس است، در pH اسیدی معده، پایدار، ولی در pH بازی روده ( $pH > 6$ ) متورم شده و شروع به حل شدن می‌کند. مشکل اصلی استفاده از ذره‌های آلژینات خالص به عنوان سامانه دارورسانی، رهایش سریع مولکول‌های بارگذاری شده و بازده کم پوشینه‌دارسازی دارو است. تخلخل ژل که به نسبت بزرگ است، سبب نشت دارو و انتشار بیش‌تر آن از شبکه ژل می‌شود. برای غلبه بر این مشکل، پلیمرهای گوناگونی مانند کایتوسان [۸-۶] و مشتق‌های آن [۹]، دکستران سولفات [۱۰] و پکتین [۱۱]، در ترکیب با سدیم آلژینات استفاده می‌شوند که با این پلیمر پیوند الکترواستاتیکی برقرار می‌کنند [۵]. سارمنتو<sup>(۱)</sup> و همکاران، نشان دادند که کمپلکس‌های آلژینات/کایتوسان پس از بهینه‌سازی، نانوذره‌هایی با بازده تجمعی ۹۲٪ و درجه بارگذاری ۱۴/۳٪ تشکیل دادند که قادر است ساختار ثانویه انسولین را که برای فعالیت زیستی آن نیاز است، حفظ کند. همچنین، این نانوذره‌های حدود ۵۰٪ از انسولین را به مدت ۲۴ ساعت در شرایط pH معده حفظ کردند، درحالی‌که در شرایط pH روده، رهایش گسترده‌تر و در حدود ۷۵٪ بود [۷].

کایتوسان یک پلی‌ساکارید کاتیونی طبیعی، آب‌دوست، غیرسمی و زیست‌سازگار با خاصیت مخاط‌چسبی است [۵،۱۲]. ولی کایتوسان تنها در محیط اسیدی معده محلول است و در محیط‌های خنثی و بازی، بار مثبت خود را از دست داده و رسوب می‌کند. برای غلبه بر این محدودیت، از مشتق‌های کایتوسان استفاده می‌شود که همواره دارای بار مثبت و در pH های بالاتر محلول هستند [۱۳]. یکی از این مشتق‌ها، تری‌متیل‌کایتوسان (TMC) است که یک پلی‌ساکارید قابل‌حل در آب، با قابلیت استفاده در انواع کارکردها، به‌ویژه تهیه نانوذره‌ها است [۱۴]. همانند کایتوسان، TMC ویژگی‌های مخاط‌چسبی دارد و به عنوان یک افزایش‌دهنده جذب عمل می‌کند [۴]. برای نمونه، سندری<sup>(۲)</sup> و همکاران، ویژگی‌های افزایش نفوذ نانوذره‌های کایتوسان و TMC بارگذاری شده با انسولین را مطالعه کردند. مطالعه‌های آزمایشگاهی با استفاده از تک‌لایه سلولی Caco-2، تأثیر نانوذره‌های تولیدشده را بر افزایش جذب انسولین نشان داد که این اثر افزایشی، برای نانوذره‌های کایتوسان و TMC همانند بود؛ اما این افزایش به ترتیب، از طریق سازوکارهای باز کردن اتصال‌های محکم و اندوسیتوز رخ داد [۱۵]. استفاده از کایتوسان و مشتق‌های آن، ممکن است به دلیل تأثیر روی غشای پلاسمایی و یا برهم‌کنش

(۱) Sarmento

(۲) Sandri

از شرکت آکسفورد، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) از شرکت فلوکا و بقیه مواد از شرکت مرک خریداری شدند.

#### دستگاه‌ها

دستگاه‌های پمپ سرنگی مدل Longer Pump میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>(۴)</sup> (SEM) مدل Philips، دستگاه تعیین اندازه ذره‌ها مدل Malvern، طیف سنج تشدید مغناطیس هسته‌ای<sup>(۵)</sup> (NMR) مدل Bruker، تبدیل فوریه فرسرخ<sup>(۶)</sup> (FT-IR) مدل PerkinElmer (Frontier)، سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل Hettich و الیزا خوان مدل Ewarness به کار گرفته شد.

#### روش‌ها

##### ساخت تری‌متیل کایتوسان (TMC)

برای ساخت TMC، ابتدا ۱ گرم کایتوسان، به ۵۰ میلی‌لیتر NMP که روی همزن در حال چرخش بود، افزوده شد. پس از گذشت ۵ ساعت و در شرایط دمایی بین ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس، به مخلوط به‌دست‌آمده، ۵ میلی‌لیتر متیل یدید افزوده شد و این عمل در بازه‌های زمانی یک ساعت، دو مرتبه دیگر تکرار شد. متیل یدید سمی و فرار است، به همین دلیل، افزودن و انتقال آن حتماً باید زیر هود، با پوار و همراه با بازچرخانی انجام شود. پس از گذشت ۲۴ ساعت و با افزودن استون به محلول، رسوب به‌صورت کامل ایجاد شده و با استفاده از کاغذ صافی، قیف بوختر و پمپ خلأ، جدا شد. طی این فرایند، در ساختار کایتوسان، به جای هیدروژن‌های متصل به آمین نوع اول، متیل متصل می‌شود. به منظور خالص سازی رسوب به دست آمده (تبادل یون  $\text{I}^-$  با  $\text{Cl}^-$ )، از کیسه دیالیز با برش وزن مولکولی<sup>(۷)</sup> ۱۲ کیلوالتون استفاده شد. خالص سازی به مدت ۲۴ ساعت در محیط آب نمک ۱۰٪ وزنی انجام شده و پلیمر خالص سازی شده، با استفاده از استون رسوب کرد. پس از خشک کردن، رسوب به دست آمده با روش طیف‌سنجی H-NMR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۲۲].

##### محلول‌های لازم برای ساخت نانوذرات

محلول انسولین با حل کردن آن در هیدروکلریک‌اسید در  $\text{pH} = 2.2$  تهیه شد. محلول‌های آلزینات ( $0.63 \text{ w/v} \%$ ) و

با پروتئین‌ها یا اجزای سلولی دارای بار منفی، منجر به ایجاد سمیت شود [۱۶،۱۷]. پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) یک پلیمر زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر، بسیار آب‌دوست و غیر سمی است و به طور عمده به عنوان یک پلیمر پیوندی استفاده می‌شود و به گونه‌ای اتصال‌های عرضی ایجاد می‌شوند که با تشکیل کانال‌هایی، سامانه توانایی رهایش دارو را داشته باشد [۱۸،۱۹]. اتصال PEG به کایتوسان و مشتق‌های آن، می‌تواند زیست‌سازگاری و همچنین، حلالیت کایتوسان و مشتق‌های آن را در محیط‌های آبی افزایش دهد [۱۷،۱۸]. مائو<sup>(۱)</sup> و همکاران نشان دادند که صرف نظر از وزن مولکولی PEG، TMC پگیله شده به طور کامل و در تمام pH ها قابل حل در آب است و پگیله کردن TMC منجر به افزایش زیست‌سازگاری آن می‌شود [۱۷،۲۰]. کاهش سمیت TMC با پگیله کردن، توسط جینتاپاتاناکیت<sup>(۲)</sup> و همکاران تأیید شد. همچنین، این پژوهش نشان داد که به دلیل نفوذ زنجیره‌های PEG به درون موکوس و برهمکنش‌های یونی بین TMC پگیله شده و دارای بار مثبت، با اجزای سیالیک اسید لایه موکوس و دارای بار منفی، ویژگی‌های مخاط چسبی TMC افزایش می‌یابد [۲۱].

هدف از این پژوهش، پوشش دادن نانوذره‌های آلزینات بارگذاری شده با انسولین، توسط TMC و سپس پگیله کردن آن‌ها، به منظور کنترل و ایجاد تأخیر در رهایش انسولین و افزایش زمان ماندگاری نانوذره‌ها در دستگاه گوارش است. همچنین، این سامانه ترکیبی با حضور PEG، می‌تواند به منظور محدود کردن اثر سامانه ایمنی نیز استفاده شود.

#### بخش تجربی

##### مواد

انسولین انسانی از شرکت داروسازی اکسیر، آلزینات با مقدار بالای گلورونیت از شرکت BDH، کایتوسان با درجه استیل زدایی بیش از ۹۰٪ از شرکت اکروس، متوکسی پلی اتیلن گلایکول فعال شده با سوکسینیمیدیل والریک اسید (mPEG-SVA) از شرکت لایسان بیو اینک، N-متیل پیرولیدون<sup>(۳)</sup> (NMP) از شرکت مرک، کلسیم کلرید از شرکت سیگما، متیل یدید

(۱) Mao

(۲) Jintapattanakit

(۳) N-methyl Pyrrolidone (NMP)

(۴) Scanning Electron Microscopy (SEM)

(۵) Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

(۶) Fourier Transform Infrared (FTIR)

(۷) Molecular Weight Cut-off

واکنش دادند. سپس، این محلول با همان شرایط پیشین سانتیفریوژ شده و نانوذره‌های جدا شده و با آب مقطر شسته شدند [۲۳].

### طراحی آزمایش‌ها

با توجه به مطالعه‌های انجام شده، سه متغیر نسبت آلزینات به انسولین، نسبت آلزینات به TMC و دور همزن، به‌عنوان متغیرهای مؤثر بر فرایند تولید نانوذره‌های انتخاب شده [۷،۲۴] و اثر آن‌ها بر اندازه نانوذره‌ها و EE بررسی شده و مقادیرهای بهینه برای این پاسخ‌ها به دست آمد. بررسی متغیرها و به دست آوردن پاسخ‌های بهینه با استفاده از طراحی باکس - بنکن در سه سطح و ۵ تکرار در شرایط مرکزی، با استفاده از نرم افزار طراحی آزمایش‌ها (Design-Expert version 7.0.0) انجام شد. فهرست متغیرهای بررسی شده و سطوح آن‌ها در جدول ۱ و آزمایش‌های طراحی شده در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

### ارزیابی اندازه نانوذره‌ها و پتانسیل زتا

میانگین اندازه هیدرودینامیکی و پتانسیل زتای نانوذرات، توسط طیف سنجی همبستگی فوتون<sup>(۱)</sup> (PCS) و با استفاده از دستگاه تعیین اندازه ذره‌ها، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و زاویه شناسایی ۹۰ درجه اندازه‌گیری شد. برای تعیین عامل‌های گفته‌شده، محلول‌های تازه تهیه‌شده، با آب مقطر رقیق شدند تا غلظت محلول در محدوده قابل تشخیص برای دستگاه زتا سائزر قرار گیرد.

### ارزیابی تشکیل لایه‌ها در نانوذره‌ها با آزمون FTIR

حضور لایه‌های TMC و PEG روی سطح نانوذرات، توسط FT-IR مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی شکل نانوذره‌ها با SEM

به منظور بررسی ریخت‌شناسی و تغییر شکل نانوذره‌ها پس از افزودن لایه‌ها، پودر لیوفیلیزه نانوذره‌های آلزینات، آلزینات - TMC و آلزینات - PEG - TMC با روشی از جنس طلا پوشش داده‌شده و با SEM تصویربرداری شدند.

اندازه‌گیری بازده به دام افتادن (EE) و بازده بارگذاری (LE) انسولین برای تعیین مقدار انسولین به دام افتاده در نانوذرات، از روش غیرمستقیم استفاده شد. در این روش، EE با کم کردن مقدار

کلسیم کلرید (۲۰ میلی‌مولار)، به ترتیب با انحلال ۰/۰۶۳ گرم آلزینات و ۰/۲۹۴ گرم کلسیم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شدند. برای حل شدن آلزینات، محلول آن به مدت ۲۴ ساعت روی همزن هم زده شد. همچنین، محلول TMC با حل کردن آن در آب مقطر، مطابق طراحی آزمایش تهیه شد. سپس، pH محلول‌های آلزینات و TMC، به ترتیب روی ۴/۹ و ۵ تنظیم شد. محلول ۰/۱ مولار تریس‌هیدروکلرید، با حل کردن ۱۵۸ میلی‌گرم تریس‌هیدروکلرید در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و pH آن روی ۵ تنظیم شد. برای تهیه محلول mPEG-SVA (۰/۱ w/v)٪، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از آن با جرم مولکولی ۱۰ کیلودالتون در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تریس‌هیدروکلرید با pH=۵ حل شد. سپس pH محلول به نزدیک pH فیزیولوژیکی رسانده شد. به‌منظور استفاده از محلول‌های یادشده برای تهیه نانوذره، تمامی آن‌ها با صافی سرنگی ۰/۴۵ میکرون صاف شدند [۷،۲۳].

### تهیه نانوذرات

در این پژوهش، نانوذره‌های بارگذاری شده با انسولین با روش ژل شدن یونی آلزینات با کلسیم کلرید و به دنبال آن، تشکیل کمپلکس پلی‌الکترولیت بین آلزینات و TMC تهیه شده و سرانجام توسط mPEG-SVA پگیله شدند.

چکیده‌وار، مقدار ۲۳/۵ میلی‌لیتر محلول آلزینات (۰/۰۶۳ w/v)٪، pH=۴/۹، با ۵ میلی‌لیتر محلول انسولین، مخلوط شد. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید (۲۰ میلی‌مولار) به صورت قطره قطره و با استفاده از پمپ سرنگی، در مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت هم زدن مشخص (طبق طراحی آزمایش)، به محلول زیرین افزوده شد. سپس، محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن هم زده شد. در مرحله بعد، ۵ میلی‌لیتر محلول TMC (pH=۵) به صورت قطره قطره و با استفاده از پمپ سرنگی، در مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت هم زدن مشخص (طبق طراحی آزمایش)، به محلول به دست آمده از مرحله پیشین، افزوده شد. سپس، محلول به دست آمده، به منظور شکل گیری بهتر نانوذره‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن هم زده شد. محلول دارای نانوذره‌ها، به مدت ۲۰ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتیفریوژ شده و نانوذره‌ها جدا شدند [۷]. در انتها، نانوذرات، پس از شستشو با آب مقطر، به درون محلول mPEG-SVA (۰/۱ w/v)٪ منتقل شده، درون محلول توزیع شده و به مدت ۱۵ دقیقه، با شدت هم زدن ملایم،

(۱) Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

جدول ۱- متغیرهای آزمایش و سطح‌های انتخابی برای طراحی باکس- بنکن، به منظور تولید نانوذره‌ها.

متغیر	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
A: TMC / آلزینات	۲۰۰	۳/۲۵	۴/۵۰
B: انسولین / آلزینات	۱	۲	۳
C: دور همزن (rpm)	۲۰۰	۵۰۰	۸۰۰

جدول ۲- طراحی باکس- بنکن برای بررسی اثر عامل‌های مؤثر بر اندازه نانوذره‌ها و EE و نتیجه‌های به دست آمده.

شماره آزمایش	متغیرها				پاسخها
	A: TMC / آلزینات	B: انسولین / آلزینات	C: دور همزن (rpm)	اندازه نانوذرات (nm)	
۱	۳/۲۵	۱	۲۰۰	۸۰۹/۲	۹۱/۲۵
۲	۳/۲۵	۲	۵۰۰	۲۹۲/۵	۷۷/۳۰
۳	۲/۰۰	۱	۵۰۰	۵۱۱۴/۰	۹۰/۳۰
۴	۳/۲۵	۲	۵۰۰	۵۳۷/۵	۸۵/۳۴
۵	۲/۰۰	۲	۸۰۰	۴۵۳/۵	۸۴/۸۶
۶	۲/۰۰	۲	۲۰۰	-	۸۲/۵۰
۷	۳/۲۵	۲	۵۰۰	-	۸۴/۳۹
۸	۴/۵۰	۱	۵۰۰	۱۹۷/۷	۸۷/۹۴
۹	۳/۲۵	۱	۸۰۰	۵۶۷/۵	۹۳/۸۵
۱۰	۳/۲۵	۲	۵۰۰	۵۳۰/۹	۸۴/۸۶
۱۱	۴/۵۰	۳	۵۰۰	۴۳۶/۷	۸۰/۸۴
۱۲	۲/۰۰	۳	۵۰۰	۴۹۶/۱	۸۰/۱۳
۱۳	۴/۵۰	۲	۲۰۰	۳۰۹/۲	۸۵/۳۴
۱۴	۴/۵۰	۲	۸۰۰	۲۴۸/۷	۹۰/۵۴
۱۵	۳/۲۵	۳	۲۰۰	-	۷۰/۹۱
۱۶	۳/۲۵	۳	۸۰۰	۷۵۵/۲	۷۰/۹۱
۱۷	۳/۲۵	۲	۵۰۰	۵۴۴/۰	۸۶/۲۸

تفاوت بین مقدار کل انسولین اولیه استفاده شده برای تهیه نانوذره‌ها و مقدار انسولین آزاد در مایع رویی پس از جدا شدن نانوذرات، به عنوان درصدی از وزن خشک نانوذرات، بازده بارگذاری نامیده می‌شود و با استفاده از معادله (۲) محاسبه شد. وزن خشک نانوذره‌ها، پس از خشک کردن محلول منجمد شده نانوذره‌ها، در دستگاه خشک کن انجمادی به دست آمد.

انسولین آزاد موجود در مایع رویی محلول سانتریفیوژ شده دارای نانوذره‌ها، از مقدار کل انسولین استفاده شده برای ساخت نانوذره‌ها و طبق معادله (۱) محاسبه شد.

$$EE = \frac{\text{وزن انسولین در مایع رویی} - \text{وزن کل انسولین}}{\text{وزن کل انسولین}} \times 100 \quad (1)$$

روی ۱/۲ تنظیم شد. برای تهیه محلول SIF، ۶/۸ گرم  $KH_2PO_4$  در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌شده، با ۷۷ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار سدیم هیدروکسید مخلوط شده و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. pH محلول به دست آمده، ۶/۸ بوده و سرانجام، به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

برای بررسی رهائش انسولین از نانوذرها در هریک از دو محیط SGF و SIF به صورت جداگانه، مقدار مناسبی از پودر لیوفیلیزه نانوذرها در آب مقطر پراکنده شده و درون کیسه دیالیز با برش وزن مولکولی ۱۲ کیلوالتون ریخته شد. سپس، کیسه دیالیز در ۵ میلی‌لیتر از محیط رهائش SGF یا SIF فرو برده شد. ظرف شیشه‌ای دارای این مجموعه در گرمخانه لرزان با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰ rpm قرار گرفت. در فاصله‌های زمانی معین، میزان ۱ میلی‌لیتر از محیط اطراف کیسه دیالیز برداشته شده و توسط همان مقدار از محیط تازه و گرم (۳۷ °C) جانشین شد، به طوری که حجم کل محیط آزادسازی، در طول زمان ثابت باقی ماند. همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شده و میزان جذب داروی موجود در نمونه‌های رهائش، با روش بردفورد با استفاده از الایزا خوان اندازه‌گیری شد.

### نتیجه‌ها و بحث

#### ارزیابی ساختار پلیمر TMC با آزمون NMR

گروه‌های آمین نوع اول کایتوسان، دارای  $pK_a$  حدود ۶ هستند که در pH خنثی باعث حلالیت کم آن‌ها در محلول آبی و کاهش توانایی افزایش نفوذ می‌شود. کربوکسیله کردن گروه‌های آمین و یا هیدروکسیل و پگیله کردن گروه‌های آمین، روش‌های سودمندی برای بهبود حلالیت آبی کایتوسان در pH خنثی هستند. اصلاح‌های دیگر، شامل ایجاد گروه‌های آمین چهارتایی، باعث پایداری، بار مثبت مستقل از pH و همچنین حلالیت آبی در pH خنثی می‌شود. بیش‌ترین چهارتایی شدن، توسط تری‌متیله شدن جزئی گروه آمین به دست می‌آید که منجر به تولید TMC می‌شود [۲۶]. مسیر ساخت TMC در شکل ۱ نشان داده شده است.

همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، طی مرحله‌های ساخت TMC، به جای هیدروژن‌های متصل به گروه آمین در ساختار کایتوسان، متیل قرار می‌گیرد. افزایش حلالیت، به جایگزینی گروه‌های آمینی نوع اول با گروه‌های آمینی چهارتایی، در موقعیت کربن دوم در کایتوسان وابسته است. به منظور تأیید ساختار پلیمر TMC ساخته شده، از آزمون NMR استفاده شد.

$$(۲) \times ۱۰۰ = \frac{\text{وزن انسولین در مایع رویی} - \text{وزن کل انسولین}}{\text{وزن خشک نانوذرها}}$$

برای تعیین مقدار انسولین آزاد در مایع رویی، محلول دارای نانوذرها در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و میزان انسولین آزاد موجود در مایع رویی، با روش بردفورد با استفاده از الایزا خوان اندازه‌گیری شد.

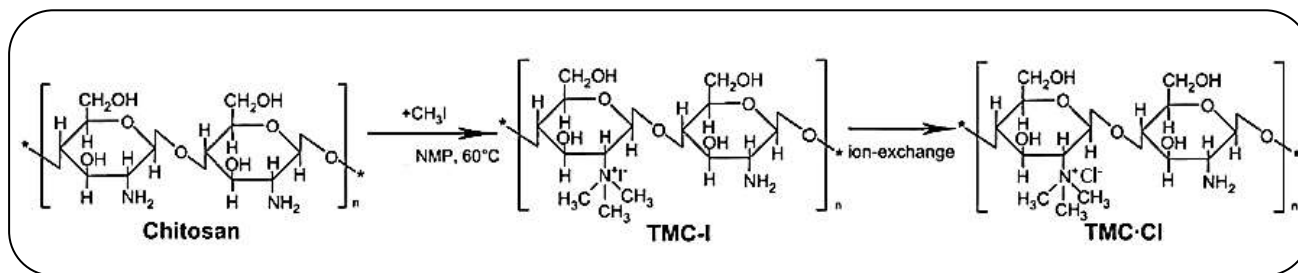
#### روش بردفورد

برای تعیین میزان انسولین موجود در مایع رویی نمونه‌های سانتریفیوژ شده و همچنین، نمونه‌های رهائش، از روش بردفورد استفاده شد. در این روش، حجم معینی از نمونه دارای انسولین، تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و با بافر مناسب به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید. سپس، یک میلی‌لیتر از معرف بردفورد به محلول افزوده شده و پس از گذشت ۲ تا ۶ دقیقه پس از اختلاط، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه با سه بار تکرار در ظرف الایزا ریخته شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط الایزا ریدر (Ewarsness- آمریکا) خوانده شد [۲۵].

برای تهیه معرف، میزان ۱۰۰ میلی گرم کوماسی بریلینت آبی جی ۲۵۰ در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ حل شده و به محلول به دست آمده، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر فسفریک اسید ۸۵٪ (w/v) آرام آرام افزوده شد. سپس، مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به محلول به دست آمده اضافه شد. محلول به دست آمده را می‌توان برای مدت طولانی در دمای ۴ °C نگهداری کرد. این محلول برای چند هفته پایدار است؛ با این وجود، ممکن است طی این مدت، رنگ از محلول رسوب نماید؛ در نتیجه می‌بایست پیش از هر بار استفاده آن را از صافی عبور داد. برای استفاده از معرف، ۵۰ میلی لیتر از این محلول با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق شده و از کاغذ صافی گذرانده شد. محلول ایجاد شده می‌تواند برای مدت ۱ هفته در دمای ۴ °C نگهداری شود [۲۵].

#### بررسی رهائش انسولین از نانوذرها در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF) و روده (SIF)

محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF) (بافر HCl در pH = ۱/۲) و روده (SIF) (بافر فسفات در pH = ۶/۸)، برای انجام مطالعه‌های آزادسازی دارو استفاده شدند. برای تهیه محلول SGF، ۲ گرم سدیم کلرید در ۷ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید حل شده و سرانجام، با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و pH محلول



شکل ۱- مسیر ساخت TMC [۲۷].

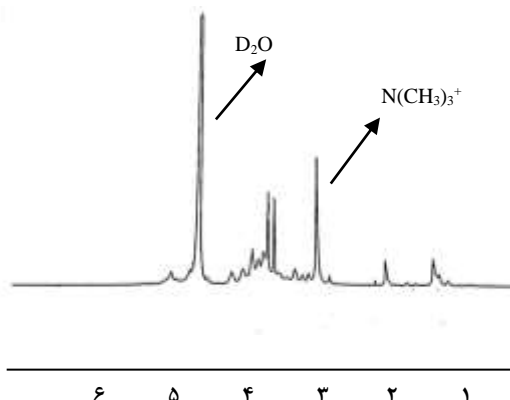
با تعداد مرحله‌های واکنش، زمان واکنش و درجه‌های گوناگون استیل‌زدایی کایتوسان، تغییر داد. مقدار DQ برای TMC ساخته شده، ۲۹/۷۶ محاسبه شد. TMC با DQ حدود ۱۰٪ در بازه‌ی pH ۹-۱ قابل حل است و بدون در نظر گرفتن درجه استیل‌زدایی و وزن مولکولی، DQ حدود ۴۰٪ بیش‌ترین حل‌پذیری را دارد [۲۷]. TMC با DQ بیش از ۲۰٪ قادر به باز کردن اتصالات محکم به هم چسبیده است. میزان بهینه DQ برای رسانش پروتئین‌ها و ترکیب‌ها با وزن مولکولی پایین از میان بافت مخاطی، حدود ۴۰ تا ۵۰٪ است [۲۸] بنابراین، مقدار ۲۹/۷۶ برای TMC تهیه شده قابل قبول است.

#### تعیین اثر عامل‌های مؤثر بر اندازه نانوذره‌ها و بازده به‌دام‌افتادن (EE)

به منظور بررسی میزان اثر متغیرهای انتخاب شده، بر اندازه نانوذره‌ها و EE و بهینه‌سازی نانوذره‌ها، از طراحی باکس-بنکن با ۵ تکرار در شرایط مرکزی استفاده شد. طراحی یاد شده، به همراه نتیجه‌های به دست آمده از اندازه‌گیری پاسخ‌ها، در جدول ۲ داده شده است. مدل‌سازی و بهینه‌سازی اندازه نانوذره‌ها، با صرف نظر کردن از نتیجه‌های به دست آمده از آزمایش‌های ۶ و ۷ و ۱۵ انجام شد، زیرا اندازه ذره‌های ساخته شده در این آزمایش‌ها بسیار بزرگ بود، که ممکن است به دلیل تجمع نانوذره‌ها باشد. برای تعیین عامل‌های مؤثر، p-value هر عامل محاسبه شد.  $p < 0.05$  نشان دهنده معنی دار بودن تأثیر عامل است.

#### بررسی اندازه نانوذره‌ها

برای بررسی اندازه نانوذره‌ها، از مدل درجه سوم<sup>(۱)</sup> ( $p < 0.05$ ) استفاده شد. آنالیز واریانس<sup>(۲)</sup> (ANOVA) مدل و عامل‌های مؤثر بر اندازه نانوذره‌ها، در جدول ۳ ارائه شده‌اند.

شکل ۲- طیف <sup>1</sup>H NMR تری‌متیل کایتوسان تهیه شده.

شکل ۲ طیف NMR تری‌متیل کایتوسان را نشان می‌دهد. در این شکل، پیک ظاهر شده در ناحیه ۳ ppm، نشان دهنده گروه N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> است که تأیید کننده ساخت موفقیت آمیز TMC است [۲۶، ۲۷]. از طرفی، TMC تهیه شده به راحتی در آب با pH خنثی و بازی حل شد، که این هم دلیلی بر متیله شدن گروه آمین در کایتوسان است.

تراکم بار TMC با درجه متیله شدن گروه آمین در کایتوسان، یا همان درجه چهارتایی شدن<sup>(۱)</sup> (DQ) تعیین می‌شود که یک عامل کلیدی برای دارا بودن ویژگی‌های مخاط‌چسبی و افزایش‌دهی نفوذ در برابر مخاط روده است [۲۷]. مقدار DQ را می‌توان با استفاده از معادله (۳) محاسبه کرد [۲۷، ۲۸].

$$DQ\% = \left[ \frac{[(CH_3)_3]}{[H]} \times \frac{1}{9} \right] \times 100 \quad (3)$$

که در آن [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] و [H] به ترتیب، انتگرال پیک‌های مربوط به گروه متیل سه تایی و هیدروژن است. درجه DQ را می‌توان

(۱) Degree of Quaternization (DQ)

(۲) Cubic

(۳) Analysis of Variance (ANOVA)

جدول ۳- آنالیز واریانس عامل‌های مؤثر بر اندازه نانوذره‌ها.

عامل مؤثر	مجموع مربعات	F-value	p-value
A: TMC / آلزینات	$6.189 \times 10^6$	411,78	0.0003
B: انسولین / آلزینات	$1.048 \times 10^6$	69,75	0.0036
C: دور همزن (rpm)	$1.831 \times 10^6$	121,80	0.0016
AB	$5.897 \times 10^6$	392,35	0.0003
AC	$1.737 \times 10^6$	115,59	0.0017
BC	$8.836 \times 10^5$	58,78	0.0046
A <sup>2</sup>	$4.001 \times 10^5$	26,62	0.0141
B <sup>2</sup>	$1.298 \times 10^6$	86,33	0.0026
C <sup>2</sup>	$4.968 \times 10^5$	33,05	0.0105
مدل	$2.034 \times 10^7$	135,31	0.0009

برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین انسولین و پلیمر، اندازه نانوذره‌ها کاهش می‌یابد.

#### بررسی بازده به‌دام‌افتادن (EE)

آنالیز واریانس مدل و عامل‌های مؤثر بر EE در جدول ۴ داده شده‌است.

مطابق با نتیجه‌های ANOVA، نسبت انسولین / آلزینات تنها عاملی است که دارای p-value کمتر از ۰.۰۵ است و در نتیجه، بیش‌ترین تاثیر را روی EE دارد. نرم‌افزار برای EE مدل خطی را پیشنهاد داد و با توجه به عامل‌های مؤثر، سرانجام رابطه به شکل معادله (۵) مشخص شد.

$$EE = +83,97 + 0,86(A) - 7,57(B) + 1,27(C) \quad (5)$$

با افزایش میزان انسولین، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین انسولین و آلزینات بیش‌تر شده و این امر موجب به دام افتادن بیش‌تر انسولین درون نانوذره‌ها می‌شود. بنابراین، همان‌گونه که از معادله (۵) هم مشخص است، با کاهش نسبت انسولین / آلزینات (B)، EE افزایش می‌یابد.

نمودار اثر عامل‌های طراحی بر EE در شکل ۳ ارائه شده است. این شکل نیز نشان می‌دهد که با کاهش نسبت انسولین / آلزینات، EE افزایش می‌یابد و تغییر نسبت TMC / آلزینات تاثیر معنی داری روی EE ندارد.

مطابق با نتیجه‌های آنالیز واریانس، هر سه عامل دور همزن، نسبت TMC / آلزینات و نسبت انسولین / آلزینات روی اندازه نانوذره‌ها تاثیرگذار بودند ( $p < 0.05$ ) و رابطه نهایی برای اندازه نانوذره‌ها، به شکل معادله (۴) مشخص شد.

$$\text{Size} = +476,23 - 1243,93(A) + 1144,78(B) - 1171,77(C) + 1214,22(AB) + 1141,53(AC) - 105,093(BC) + 387,3(A)^2 + 697,57(B)^2 + 659,32(C)^2 \quad (4)$$

معادله (۴) نشان می‌دهد که با افزایش دور همزن (C) و نسبت TMC / آلزینات (A) و کاهش نسبت انسولین / آلزینات (B)، اندازه نانوذره‌ها کاهش می‌یابد. در تحلیل این نتیجه‌ها، می‌توان گفت که با افزایش میزان TMC که دارای بار مثبت است، نسبت به آلزینات که دارای بار منفی است (کاهش TMC / آلزینات)، برهم‌کنش‌های بین TMC و ذره‌های آلزیناتی و در نتیجه قطر لایه TMC که ذره‌های آلزیناتی را می‌پوشاند، بیش‌تر می‌شود و اندازه نانوذره‌های بزرگ‌تر می‌شود که این نتیجه همانند با نتیجه سارمنتو و همکاران در ساخت نانوذره‌های آلزینات / کایتوسان است [۷].

با افزایش دور همزن، تنش وارد شده به نانوذرات، در هنگام تشکیل شدن بیش‌تر است و در نتیجه نانوذره‌ها با اندازه کوچک‌تر ساخته می‌شوند. با افزایش میزان انسولین نسبت به آلزینات (کاهش نسبت انسولین / آلزینات) نیز، به دلیل بیش‌تر شدن

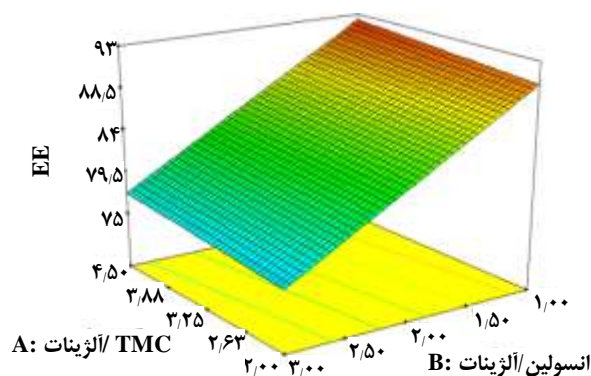


جدول ۴- آنالیز واریانس عامل‌های مؤثر بر EE.

عامل مؤثر	مجموع مربعات	F-value	p-value
A: TMC/آلژینات	۵/۹۰	۰/۳۹	۰/۵۴۲۱
B: انسولین/آلژینات	۴۵۸/۲۹	۳۰/۴۵	۰/۰۰۰۱ <
C: دور همزن (rpm)	۱۲/۹۰	۰/۸۶	۰/۳۷۱۴
مدل	۴۷۷/۰۹	۱۰/۵۶	۰/۰۰۰۹

در این پژوهش، ۰/۳۲ است که در ساخت نانوذره‌ها، مقدار دلخواهی به شمار می‌آید.

پتانسیل زتا یک شاخص مناسب برای نشان دادن بار سطحی در دسترس روی سطح نانوذره‌ها است. از آنجا که آلژینات یک پلی‌انیون بوده و دارای بار منفی است و TMC پلیمری با بار مثبت است، با افزودن محلول TMC به نانوذره‌های آلژینات و اندازه‌گیری پتانسیل زتا، دیده شد که بار سطحی نانوذره‌ها، از یک مقدار منفی به مقدار مثبت میل می‌کند که این امر نشان دهنده پوشانده شدن ذره‌های آلژیناتی با پلیمر TMC است.



شکل ۳- اثر عامل‌های مؤثر بر EE.

#### ارزیابی تشکیل لایه‌ها در نانوذره‌ها با آزمون FT-IR

برای تایید تشکیل لایه‌ها و اتصال آن‌ها به یکدیگر، از نانوذره‌های به دست آمده پس از نشان دادن هر لایه، آزمون FT-IR به عمل آمد. شکل ۴، الف تا ج، به ترتیب مربوط به طیف‌های FT-IR پلیمر آلژینات، نانوذره‌های آلژینات - TMC و آلژینات - TMC-PEG است. پیک در بازه‌ی ۱۰۳۰، مربوط به C-O-C کششی بوده که این پیوند در هر سه نانوذره آلژینات، آلژینات - TMC و آلژینات - TMC-PEG وجود دارد [۳۱-۲۹]، ولی در نانوذره‌های آلژینات - TMC-PEG عمیق‌تر شده است که دلیل این امر را می‌توان به حضور پیوند C-O-C در ساختار PEG نسبت داد، که این خود تأییدی بر حضور PEG در نانوذره‌های سه لایه است. پیک ۱۵۶۰-۱۶۴۰، مربوط به آمین نوع اول خمشی است که پیک‌های ۱۶۰۷ در نانوذره‌های دولایه و ۱۵۵۳ در نانوذره‌های سه‌لایه می‌تواند مربوط به این پیوند باشد [۳۰]. پیک در بازه‌ی ۲۹۰۰ مربوط به پیوند CH کششی منظم متیل (CH<sub>3</sub>) و متیلن (CH) است که این پیوند را در هر سه طیف می‌بینیم [۳۱-۲۹، ۲۷] که عمیق‌تر شدن این پیک در طیف FTIR نانوذره‌های آلژینات - TMC-PEG، حضور زنجیره‌های PEG را تأیید می‌کند.

#### شرایط بهینه برای اندازه نانوذره‌ها و EE

هدف از بهینه سازی در این پژوهش، یافتن شرایط بهینه برای کمینه شدن اندازه نانوذره‌ها و بیشینه شدن EE بود که با استفاده از نتیجه‌های به دست آمده برای پاسخ‌ها (جدول ۲) و پس از مدل سازی آن‌ها، شرایط بهینه پیشنهادی با نرم افزار به دست آمد. آزمایش تأیید نقطه بهینه و مقایسه آن با نتیجه به دست آمده از مدل انجام شد که نتیجه‌های آن در جدول ۵ ارائه شده است. در این شرایط، مقدار به دست آمده از آزمایش، با اطمینان ۹۵٪ نزدیک به نقطه پیش بینی بود. نتیجه‌های به دست آمده برای اندازه و EE نانوذره‌ها در مقایسه با مطالعه‌های دیگر [۶،۷،۹،۱۵]، بسیار دلخواه هستند.

#### ارزیابی توزیع اندازه نانوذره‌ها و پتانسیل زتا

توزیع اندازه نانوذره‌ها، با عنوان شاخص پراکندگی<sup>(۱)</sup> (PDI) گزارش می‌شود و مقدار آن بین صفر تا یک تغییر می‌کند. هرچه این مقدار به صفر نزدیک‌تر باشد، توزیع اندازه نانوذره‌ها بهتر خواهد بود. PDI به دست آمده برای نانوذره‌های بهینه

(۱) Poly Dispersity Index (PDI)

جدول ۵ - شرایط بهینه پیشنهادی توسط نرم افزار و تأیید شده با آزمایش برای اندازه نانوذرها و EE.

اندازه نانوذرات (nm)		دور همزن (rpm)	انسولین / آلژینات	TMC / آلژینات
پاسخ پیشنهاد شده توسط مدل	پاسخ آزمایش تأیید کننده			
۱۹۵	۱۹۷	۵۰۰	۱	۴٫۵
EE				
پاسخ پیشنهاد شده توسط مدل	پاسخ آزمایش تأیید کننده			
۹۲٫۳۹	۹۰٫۵۸			

مربوط به گروه کربونیل (CO) در آمید باشد که در دو طیف دیگر دیده نمی‌شود و نشان‌دهنده پیوند گروه‌های آمینی TMC با گروه‌های کربوکسیل mPEG-SVA است [۳۰]. پیک ۱۲۵۹ در نانوذره‌های دولایه و پیک ۱۲۹۶ در نانوذره‌های سه‌لایه مربوط به پیوند C-N در آمید است. این پیوند، وقتی ظاهر می‌شود که mPEG-SVA به آمین نوع دوم مربوط به TMC متصل می‌شود، که این پیک در آلژینات دیده نمی‌شود و همچنین در نانوذره‌های سه‌لایه عمیق‌تر است که این موضوع تاییدی بر اتصال PEG به نانوذرها است [۳۰].

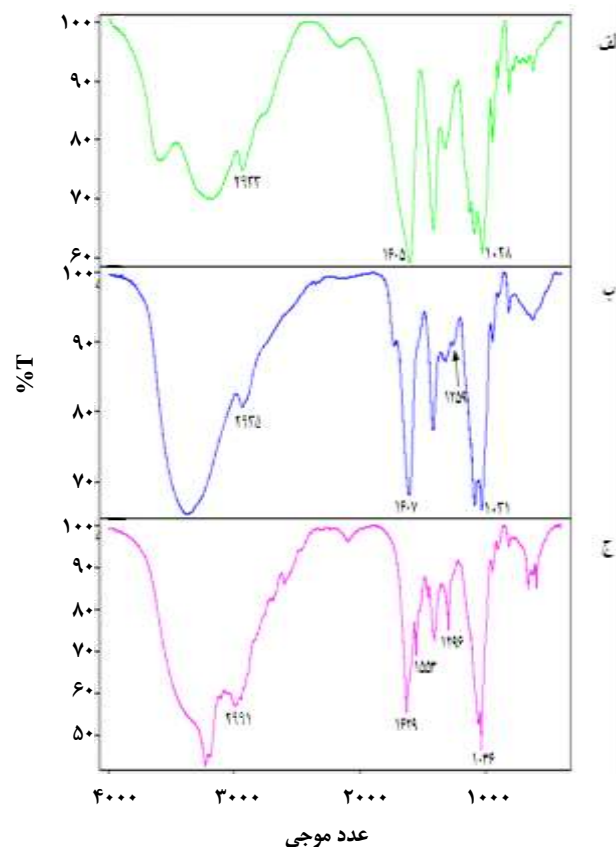
#### بررسی سطح نانوذرها با SEM

به منظور بررسی شکل ظاهری نانوذره‌های تهیه شده با نسبت‌های بهینه، از نانوذره‌های آلژینات، آلژینات - TMC و آلژینات - TMC - PEG آزمون SEM به عمل آمد که در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

همان‌گونه که در شکل مشخص است، نانوذرها پس از پوشش داده شدن با TMC و PEG، به طور کامل به شکل کروی درآمده‌اند، دارای مورفولوژی به تقریب یکسانی هستند و اندازه آن‌ها نسبت به نانوذره‌های آلژیناتی کوچک‌تر شده که این موضوع می‌تواند به دلیل وجود پیوندهای الکترواستاتیکی بین آلژینات با بار منفی و TMC با بار مثبت باشد. همچنین، تصویرها نشان دهنده پراکندگی مناسب نانوذرها به صورت منفرد و توده نشدن آن‌ها است و میانگین اندازه نانوذره‌های نهایی از روی تصویرها، حدود ۵۰ نانومتر به دست آمد.

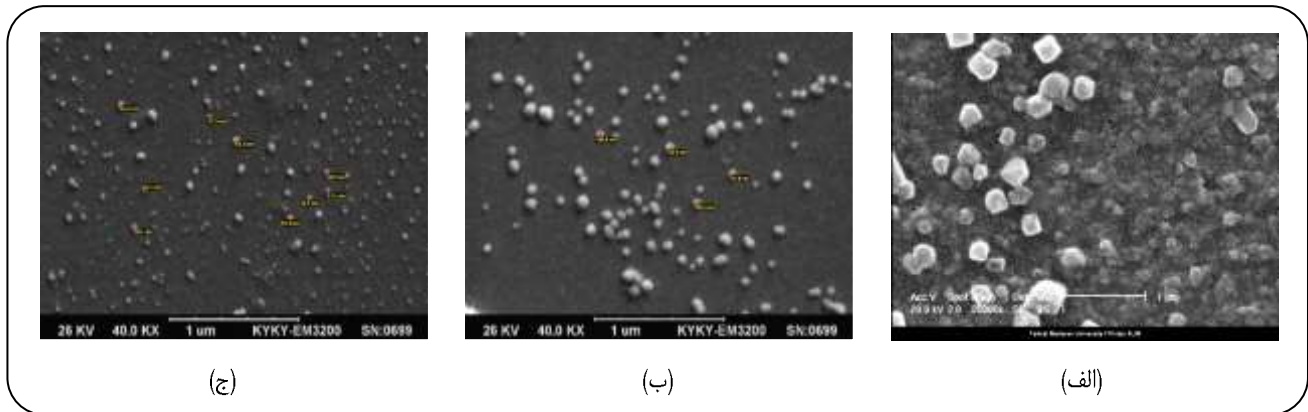
#### بررسی بازده بارگذاری (LE) انسولین

به منظور بررسی LE، مایع رویی نمونه‌های سانتیفریوژ شده که دارای انسولین به دام نیفتاده درون نانوذره‌های تولید شده



شکل ۴- طیف FT-IR نانوذرها: (الف) آلژینات، (ب) آلژینات-TMC، (ج) آلژینات-TMC-PEG.

پیک ۳۶۵۰-۳۲۰۰ مربوط به گروه عاملی هیدروکسی (OH) است که در همه‌ی نانوذرها دیده می‌شود. به طور معمول این پیک به صورت پهن است [۲۹،۳۰] همچنین، پیک ۳۳۰۰-۳۵۰۰ بیانگر آمین نوع اول و از گونه‌ی کششی است که در طیف‌های مربوط به نانوذره‌های آلژینات - TMC و آلژینات - TMC - PEG مشاهده می‌شود [۲۹-۳۱]. پیک ۱۶۲۹ در نانوذره‌های سه‌لایه، می‌تواند



شکل ۵ - تصاویرهای SEM از نانوذره‌ها: (الف) آلژینات، (ب) آلژینات-TMC، (ج) آلژینات-TMC-PEG.

و انسولین در محیط اسیدی برمی‌شود، اما به دلیل این که حلالیت انسولین ( $pI = 5.3$ ) در محیط بازی SIF کمتر از محیط اسیدی SGF است، رهایش در محیط SIF کمتر شده است. از سویی، رهایش انفجاری اولیه می‌تواند مربوط به رهایش بخشی از انسولین باشد که در حین ساختن نانوذره‌ها، درون شبکه پلیمری به دام نیفتاده، بلکه با برهمکنش‌های ضعیفی در سطح نانوذره‌ها یا نزدیک به سطح آن قرار گرفته است و تمایل دارد که به بیرون از سطح نانوذره‌ها حرکت کند. بیش‌ترین مقدار رهایش دارو از نانوذره‌های پگیله شده در طی ۶ ساعت اولیه بوده (به ترتیب ۷۵٪ و ۶۳٪ در محیط‌های SGF و SIF) و پس از آن، روند رهایش بسیار کند شده و به تقریب ثابت می‌شود.

در نانوذره‌های تهیه شده، آلژینات نقش اساسی را در حساسیت نسبت به pH بازی می‌کند، بدین صورت که آلژینات در pH اسیدی معده، پایدار، اما در pH بازی روده ( $pH > 6$ ) متورم شده و شروع به حل شدن می‌کند. بنابراین، نسبت آلژینات به پلیمرهای دیگر، در تهیه نانوذره‌ها، عامل بسیار مهمی در بهینه سازی میزان رهایش خواهد بود و می‌توان با تغییر این نسبت، شرایط را به سمت رهایش بیش‌تر در روده جهت داد. عوادی و همکاران، نانوذره‌های انسولین را با استفاده از کایتوسان و صمغ عربی تهیه کردند. آن‌ها نیز رهایش بیش‌تر انسولین در محیط اسیدی ( $pH = 1.2$ ) را نسبت به محیط بازی ( $pH = 6.8$ )، به دلیل ویژگی‌های متفاوت صمغ عربی در pH‌های گوناگون گزارش کردند [۳۲].

برای تعیین سازوکار رهایش دارو از سامانه‌های تهیه شده، مقادیرهای تجربی داروی آزاد شده با مدل تجربی ( $M_t / M_\infty = kt^n$ )

با نسبت‌های بهینه است، به‌دقت جدا شده و مقدار داروی آزاد در آن، با روش بردفورد اندازه‌گیری شد. برای نانوذره‌های بهینه آلژینات - TMC، LE برابر با ۳۱/۱۹٪ و برای نانوذره‌های پگیله شده ۲۱/۷۵٪ به دست آمد.

LE نشان می‌دهد که دارو چه درصدی از وزن نانوذره‌ها را به خود اختصاص داده و تفاوت بین مقدارهای به دست آمده برای نانوذره‌های پگیله شده و پگیله نشده، به هدررفت مقداری از دارو در طی فرایند دومین سانتریفیوژ در مرحله‌های ساخت نانوذره‌ها شود.

#### بررسی رهایش انسولین از نانوذره‌های بهینه، در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF) و روده (SIF)

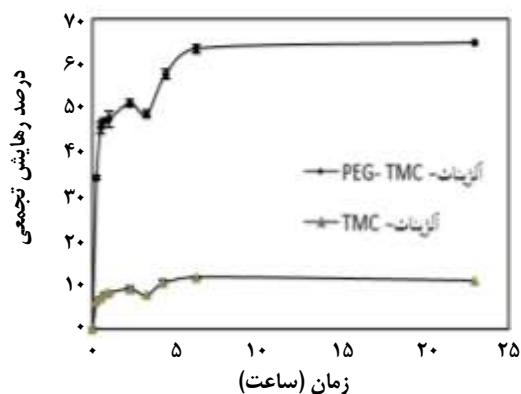
نتیجه‌های آزمایش‌های مربوط به رهایش انسولین از نانوذره‌های آلژینات - TMC و آلژینات - TMC-PEG در محیط‌های رهایش SGF ( $pH = 1.2$ ) و SIF ( $pH = 6.8$ )، به ترتیب در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند. همان‌گونه که در شکل‌های ۶ و ۷ دیده می‌شود، با پگیله کردن نانوذره‌ها، رهایش انسولین به میزان چشمگیری افزایش یافته است. دلیل افزایش رهایش انسولین پس از پگیله کردن نانوذره‌ها، می‌تواند این باشد که به دلیل آبدوست بودن انسولین، در زمان فرایند پگیله کردن نانوذره‌ها، انسولین به سطح نانوذره‌ها نزدیک شده و رهایش بیش‌تر می‌شود.

در این پژوهش، طی ۱۵ دقیقه اول، رهایش انفجاری<sup>(۱)</sup> انسولین از نانوذره‌های آلژینات - TMC-PEG در هر دو محیط دیده شد که در محیط‌های SGF (شکل ۶) و SIF (شکل ۷) به ترتیب برابر ۴۲٪ و ۳۴٪ بود. رهایش بیش‌تر در SGF به حلالیت بالای TMC

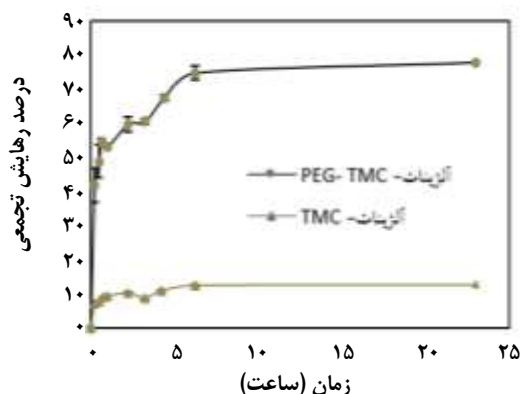
(۱) Burst Release

جدول ۶ - نتیجه‌های برازش داده‌های رهائش با مدل تجربی.

سازوکار رهائش	برازش مدل تجربی		نانوذره	pH سیال شبیه‌سازی شده
	R <sup>2</sup>	n		
نفوذ شبه فیکتی	۰/۸۴۲	۰/۱۲۸	آلژینات - TMC	۱/۲
نفوذ شبه فیکتی	۰/۹۳۶	۰/۱۳۷	آلژینات - TMC - PEG	
نفوذ شبه فیکتی	۰/۷۷۱	۰/۱۳۱	آلژینات - TMC	۶/۸
نفوذ شبه فیکتی	۰/۸۴۱	۰/۱۲۶	آلژینات - TMC - PEG	



شکل ۷ - رهائش تجمعی انسولین از نانوذره‌های آلژینات - TMC و آلژینات - TMC - PEG در محیط SIF (pH = ۶/۸).



شکل ۶ - رهائش تجمعی انسولین از نانوذره‌های آلژینات - TMC و آلژینات - TMC - PEG در محیط SGF (pH = ۱/۲).

به دست آمد. بررسی اندازه نانوذرها با استفاده از دستگاه تعیین اندازه ذرها و تصویرهای SEM نشان دادند که اندازه نانوذره‌های بهینه در مقیاس نانو است. در نتیجه، نانوذره‌ها می‌توانند در مجرای روده جذب شوند. بازده به دام افتادن برای نانوذره‌های بهینه، برابر با ۹۰/۵۸٪ به دست آمد و بررسی نمونه‌ها با آزمون FT-IR، تشکیل سه لایه را در نانوذره‌های آلژینات-PEG-TMC تأیید کرد. تصویرهای SEM نشان دهنده کروی بودن نانوذره‌ها، پراکندگی مناسب به صورت منفرد و توده نشدن آن‌ها بود. با نسبت‌های بهینه، بازده بارگذاری برای نانوذره‌های آلژینات-TMC و آلژینات-PEG-TMC، به ترتیب برابر با ۳۱/۱۹٪ و ۲۱/۷۵٪ به دست آمد که این میزان بارگذاری در مقایسه با سایر نتیجه‌های گزارش شده، مقدار مناسبی است. نانوذره‌های آلژینات-TMC، تنها حدود ۱۳٪ داروی درون‌گیری شده خود را در طی ۲۴ ساعت آزاد نمودند، در حالی‌که برای نانوذره‌های پگیله شده، رهائش انسولین افزایش چشمگیری داشت.

برازش شد. در این مدل " $M_t / M_\infty$ " کسری از دارو است که در زمان  $t$  رهائش پیدا کرده،  $k$  ثابت سرعت نفوذ و  $n$  شاخص توانی سازوکار انتقال دارو است [۳۳]. مقدارهای محاسبه شده برای سامانه‌ها بر اساس این مدل، در جدول ۶ نشان داده شده است. از آنجا که  $n$  در همه سامانه‌ها کمتر از ۰/۵ است، بیانگر رفتار رهائش نفوذ شبه فیکتی<sup>(۱)</sup> است که در آن منحنی جذب مانند منحنی فیکتی ولی با رویکرد آهسته‌تر است.

### نتیجه گیری

در این پژوهش، یکی از مشتق‌های کایتوسان به نام تری‌متیل‌کایتوسان، با حل‌پذیری آسان در آب، تهیه و با آزمون NMR تأیید شد. با انجام طراحی آزمایش، شرایط ساخت نانوذره‌ها بهینه سازی شد و شرایط بهینه برای ساخت نانوذره‌ها به صورت  $TMC/ALG = 1$  انسولین / آلژینات و  $500$  rpm = دور همزن،

(۱) Pseudo- Fickian Diffusion

### قدردانی

با سپاس فراوان از سرکار خانم دکتر الهه مرتضویان و جناب آقای دکتر غلامرضا بربری و کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقات داروسازی صنعتی که در به ثمر رسیدن این پژوهش صمیمانه همکاری کردند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰

هدف از این پژوهش، پوشش دادن نانوذره‌های آلژینات بارگذاری شده با انسولین، توسط TMC و سپس پگیله کردن آنها، به منظور کنترل و ایجاد تأخیر در رهایش انسولین و افزایش زمان ماندگاری نانوذره‌ها در دستگاه گوارش بود. به علاوه، این سامانه ترکیبی با حضور PEG می‌تواند به منظور محدود کردن اثر سامانه ایمنی نیز استفاده شود.

### مراجع

- [1] Li L., Jiang G., W. Yu G., Liu D., Chen H., Liu Y., Tong Z., Kong X., Yao J., [Preparation of Chitosan-Based Multifunctional Nanocarriers Overcoming Multiple Barriers for Oral Delivery of Insulin](#), *Mater. Sci. Eng. C*, **70**: 278–286 (2017).
- [2] Schiffter H. A., "The Delivery of Drugs – Peptides and Proteins", Second Edi., Vol. 1. Elsevier (2011).
- [3] Mukhopadhyay P., Mishra R., Rana D., Kundu P. P., [Strategies for Effective Oral Insulin Delivery with Modified Chitosan Nanoparticles: A Review](#), *Progress in Polymer Science*, **37**(11): 1457–1475 (2012).
- [4] Fonte P., Araújo F., Silva C., Pereira C., Reis S., Santos H. A., Sarmiento B., [Polymer-Based Nanoparticles for Oral Insulin Delivery: Revisited Approaches](#), *Biotechnol. Adv.*, **33**(6): 1342–1354 (2015).
- [5] Tahtat D., Mahlous M., Benamer S., Khodja A. N., Oussedik-Oumehdi H., Laraba-Djebari F., [Oral Delivery of Insulin from Alginate/Chitosan Crosslinked by Glutaraldehyde](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **58**: 160–168 (2013).
- [6] Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Sampaio P., Neufeld R., Ferreira D., [Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery](#), *Pharm. Res.*, **24**(12): 2198–2206 (2007).
- [7] Sarmiento B., Ribeiro A. J., Veiga F., Ferreira D. C., Neufeld R. J., [Insulin-Loaded Nanoparticles are Prepared by Alginate Iontropic Pre-Gelation Followed by Chitosan Polyelectrolyte Complexation](#), *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**(5): 1–9 (2007).
- [8] Sarmiento B., Ferreira D. C., Jorgensen L., van de Weert M., [Probing Insulin's Secondary Structure after Entrapment Into Alginate/Chitosan Nanoparticles](#), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **65**(1): 10–17 (2007).
- [9] Mansourpour M., Mahjub R., Amini M., Ostad S. N., Shamsa E. S., Rafiee-Tehrani M., Dorkoosh F. A., [Development of Acid-Resistant Alginate/Trimethyl Chitosan Nanoparticles Containing Cationic  \$\beta\$ -Cyclodextrin Polymers for Insulin Oral Delivery](#), *AAPS PharmSciTech*, **16**(4): 952–62 (2015).

- [10] Woitiski C. B., Sarmento B., Carvalho R. A., Neufeld R. J., Veiga F., [Facilitated Nanoscale Delivery of Insulin Across Intestinal Membrane Models](#), *Int. J. Pharm.*, **412**(1-2): 123–131 (2011).
- [11] BAJPAI J., BAJPAI A. K., MISHRA S., [Dynamics of Controlled Release of Potassium Nitrate from a Highly Swelling Binary Biopolymeric Blend of Alginate and Pectin](#), *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, **43**(1): 165–186 (2007).
- [۱۲] مولوی، بهناز؛ حبیبی، علیرضا؛ فتاحی، علی؛ بهینه سازی فرایند انکپسوله سازی دارو در میکروذره‌های کروی چیتوسان با استفاده از روش الکترواسپری هم محور، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴) ۳۵: ۷۱ تا ۸۵ (۱۳۹۵).
- [13] Bayat A., Dorkoosh F. A., Dehpour A. R., Moezi L., Larijani B., Junginger H. E., Rafiee-Tehrani M., [Nanoparticles of Quaternized Chitosan Derivatives as a Carrier for Colon Delivery of Insulin: Ex Vivo and in Vivo Studies](#), *Int. J. Pharm.*, **356**(1-2): 259–266 (2008).
- [14] de Britto D., de Moura M. R., Aouada F. A., Mattoso L. H.C., Assis O. B.G., [N,N,N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles as a Vitamin Carrier System](#), *Food Hydrocoll.*, **27**(2): 487–493 (2012).
- [15] Sandri G., Bonferoni M. C., Rossi S., Ferrari F., Boselli C., Caramella C., [Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: in Vitro \(Caco-2 model\) and ex Vivo \(excised rat jejunum, duodenum, and ileum\) Evaluation of Penetration Enhancement Properties](#), *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **11**(1): 362–71 (2010).
- [16] Casertari L., Vllasaliu D., Castagnino E., Stolnik S., Howdle S., Illum L., [PEGylated Chitosan Derivatives: Synthesis, Characterizations and Pharmaceutical Applications](#), *Prog. Polym. Sci.*, **37**(5): 659–685 (2012).
- [17] Mao S., Shuai X., Unger F., Wittmar M., Xie X., Kissel T., [Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Poly\(ethylene glycol\)-graft-trimethyl Chitosan Block Copolymers](#), *Biomaterials*, **26**(32): 6343–6356 (2005).
- [18] Malhotra M., Lane C., Tomaro-Duchesneau C., Saha S., Prakash S., [A Novel Method for Synthesizing PEGylated Chitosan Nanoparticles: Strategy, Preparation, and in Vitro Analysis](#), *Int. J. Nanomedicine*, **6**: 485–494 (2011).
- [19] Samimi A., Ghadiri M., [Production of Nanoparticle Assemblies by Electro-Spraying and Freeze-Drying of Colloids: A New Method to Resolve Handling Problem of Nanoparticles](#), *Iran J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **27**(2): 69-79 (2008).
- [20] Mao S., Germershaus O., Fischer D., Linn T., Schnepf R., Kissel T., [Uptake and Transport of PEG-Graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer-Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells](#), *Pharm. Res.*, **22**(12): 2058–2068 (2005).
- [21] Jintapattanakit A., Junyaprasert V. B., Kissel T., [The Role of Mucoadhesion of Trimethyl Chitosan and PEGylated Trimethyl Chitosan Nanocomplexes in Insulin Uptake](#), *J. Pharm. Sci.*, **98**(12): 4818–4830 (2009).

- [22] Sadeghi A.M.M., Dorkoosh F.A., Avadi M.R., Saadat P., Rafiee-Tehrani M., Junginger H.E., Preparation, Characterization and Antibacterial Activities of Chitosan, N-Trimethyl Chitosan (TMC) and N-diethylmethyl Chitosan (DEMC) Nanoparticles Loaded with Insulin Using Both the Iontropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Methods, *Int. J. Pharm.*, **355**(1–2): 299–306 (2008).
- [۲۳] نبوی‌منش، محمدمهدی؛ "پوشش‌دهی سطح جزایر لانگرهانس با استفاده از ترکیب روش کپسوله کردن و پیگلیه کردن"، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، (۱۳۹۱).
- [24] Mortazavian E., Amini M., Dorkoosh F.A., Amini H., Khoshayand M.R., Amini T., Rafiee-Tehrani M., Preparation, Design for Optimization and in Vitro Evaluation of Insulin Nanoparticles Integrating Thiolated Chitosan Derivatives, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **24**(1): 40–49 (2014).
- [25] Bradford M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**(1–2): 248–254 (1976).
- [26] Sieval A.B., Thanou M., Kotze A.F., Verhoef J.C., Brussee J., Junginger H.E., Preparation and NMR Characterization of Highly Substituted N-trimethyl Chitosan Chloride, *Carbohydr. Polym.*, **36**(2–3): 157–165 (1998).
- [27] Mourya V.K., Inamdar N.N., Trimethyl Chitosan and Its Applications in Drug Delivery, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **20**(5): 1057–1079 (2009).
- [28] Verheul R.J., Amidi M., van der Wal S., van Riet E., Jiskoot W., Hennink W.E., Synthesis, Characterization and in Vitro Biological Properties of O-Methyl Free N,N,N-Trimethylated Chitosan, *Biomaterials*, **29**(27): 3642–3649 (2008).
- [29] Coates J., "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach", in: "Encycl. Anal. Chem.", John Wiley & Sons, pp. 10815–10837, (2000).
- [30] Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., "Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry. Cengage Learning", Harcourt College Publishers, (2009).
- [31] Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grondahl L., Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS, *Biomacromolecules*, **8**(8): 2533–41(2007).
- [32] Avadi M.R., Sadeghi A.M.M., Mohammadpour N., Abedin S., Atyabi F., Dinarvand R., Rafiee-Tehrani M., Preparation and Characterization of Insulin Nanoparticles Using Chitosan and Arabic Gum with Ionic Gelation Method, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **6**(1): 58–63 (2010).
- [33] Ritger P.L., Peppas N.A., A Simple Equation for Description of Solute Release. I: Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable Devices in the form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs, *J. Control. Release*, **5**(1): 23–36 (1987).