

Preparation and optimization of chitosan nanoparticles as carrier of anti-Alzheimer tacrine drug and size estimation of nanoparticles by chemometrics

M. Khanmohammadi*

H. Elmizadeh**

G. Hassanzadeh***

M. Nassiri-Asl****

*Associate Professor of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

**M.Sc. in Analytical Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

***Associate Professor of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

****Associate Professor of Pharmacology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*Abstract

Background: Drug delivery systems were developed to improve the efficiency of drugs and minimize toxic side effects during the 1980s and 1990s. Nanoparticles have the ability to deliver a wide range of drugs to different areas of the body for sustained periods of time.

Objective: The aim of this study was to prepare and optimize chitosan nanoparticles as carrier of anti-alzheimer tacrine drug and to estimate particle size by chemometrics.

Methods: This experimental study was conducted at chemistry school of Imam Khomeini International University in Qazvin during 2011-2012. Chitosan nanoparticles were prepared by spontaneous emulsification method. In order to optimize the method of chitosan nanoparticles preparation, Design of Experiment (DOE) was employed using Box-Behnken design. Also, chitosan nanoparticles containing tacrine were prepared using the optimal synthesis method provided by the experimental design. The relationship between particle size and Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopy was employed to introduce a method for estimation of particle size in chitosan nanoparticles. Partial least squares (PLS) technique was applied to estimate average particle size based on DRIFT spectra. Forty two chitosan nanoparticles samples with different particle size were analyzed by DRIFT spectrometry and the data were processed by PLS-NAS. Size and morphology of nanoparticles were determined by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM).

Findings: According to Box–Behnken experimental design results, 0.52% NaCl as an electrolyte, 10% Span 80 as a surfactant and 4.86 mL Glutaraldehyde Saturated Toluene (GST) as a chemical cross-linking agent are optimum amounts to prepare the lowest size and spherical morphology of nanoparticles. The mean particle size of the designed nanoparticles was 33.64 to 74.87 nm. Percent yield and drug loading percent of chitosan nanoparticles that were synthesized according to the optimal method were 90% and 13.4±0.51%, respectively. The estimated sizes of chitosan nanoparticles give promise to a robust and reliable calibration that were confirmed with a correlation coefficient (R²) of 0.98 and a Root Mean Square Error (RMSE) of 3.59.

Conclusion: With regards to the results, an optimized method for the preparation of chitosan nanoparticles as carrier of anti-alzheimer drug can be presented with smaller particle size and spherical morphology using Box-Behnken experimental design.

Keywords: Nanoparticles, Tacrine, Drug Delivery Systems, Alzheimer Disease

Corresponding Address: Hamideh Elmizadeh, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Norouzian St., Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Email: k.elmizadeh@yahoo.com

Tel: +98-912-7851240

Received: 9 Apr 2013

Accepted: 26 Aug 2013

تهیه و بهینه‌سازی نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل داروی آنتی‌آلزامر تاکرین و تخمین اندازه نانوذرات با روش شیمی سنجی

دکتر مرجان نصیری اصل ****

دکتر غلامرضا حسن‌زاده ***

حمیده علمی‌زاده **

دکتر محمدرضا خانمحمدی خرمی *

* دانشیار شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین
 ** دانش آموخته کارشناسی ارشد شیمی تجزیه دانشکده علوم پایه دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین
 *** دانشیار تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
 **** دانشیار فارماکولوژی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، خیابان نوروزیان، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، تلفن ۰۹۱۳۷۸۵۱۳۴۰

Email: k.elmizadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۴

* چکیده

زمینه: سیستم‌های حامل دارو طی دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ میلادی، به منظور بهبود اثربخشی داروها و به حداقل رساندن اثرات سمی آن‌ها توسعه یافتند. نانوذرات توانایی حمل محدوده گسترده‌ای از داروها را به قسمت‌های مختلف بدن برای مدت زمان طولانی دارند.

هدف: مطالعه به منظور تهیه و بهینه‌سازی نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل داروی آنتی‌آلزامر و تخمین اندازه نانو ذرات با روش شیمی‌سنجی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در سال تحصیلی ۹۰-۱۳۸۹ در قزوین انجام شد. نانوذرات کیتوسان به وسیله روش امولسیون‌سازی خود به خودی تهیه و این روش طراحی آزمایش از نوع Box-Behnken بهینه شد. سپس نانوذرات کیتوسان حاوی داروی تاکرین با روش بهینه ارایه شده، تهیه شدند. رابطه بین اندازه ذرات و اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوری از نوع انعکاسی پخشی (DRIFT) به منظور معرفی یک روش برای تخمین اندازه ذرات در نانوذرات کیتوسان به کار برده شد. روش برگشت حداقل مربعات جزئی (PLS) به منظور تخمین میانگین اندازه ذرات بر پایه طیف DRIFT به کار رفت. ۴۲ نمونه نانوذرات کیتوسان با اندازه ذرات متفاوت توسط اسپکتروسکوپی DRIFT تحلیل و داده‌ها به وسیله PLS-NAS پردازش شدند. اندازه و مورفولوژی نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی از نوع گسیل میدانی (FE-SEM) تعیین شد.

یافته‌ها: مطابق طراحی آزمایش Box-Behnken مقادیر بهینه برای تهیه نانو ذرات کیتوسان با کم‌ترین اندازه ذرات و مورفولوژی کروی شامل موارد زیر بود: نمک کلرید سدیم به عنوان الکترولیت ۰/۵۲٪، Span 80 به عنوان سورفکتانت ۱۰٪ و تولوئن اشباع با گلوترآلدهید (GST) به عنوان عامل برقرارکننده پیوند عرضی ۴/۸۶ میلی‌لیتر. میانگین اندازه نانوذرات طراحی شده ۳۳/۶۴ تا ۷۴/۸۷ نانومتر بود. درصد بازده و درصد بارگذاری داروی تاکرین در نانوذرات کیتوسان که مطابق روش بهینه سنتز شدند به ترتیب ۹۰ و $13/4 \pm 0/51$ درصد بود. اندازه‌های تخمینی نانوذرات کیتوسان نشان‌دهنده یک کالیبراسیون قوی و قابل اعتماد بود که به وسیله ضریب همبستگی (R^2) ۰/۹۸ و خطای ریشه میانگین مربعات (RMSE) ۳/۵۹ تأیید شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، با به کارگیری روش طراحی آزمایش Box-Behnken می‌توان روش بهینه‌ای برای تهیه نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل داروی آنتی‌آلزامر با اندازه ذرات کوچک‌تر و مورفولوژی کروی ارایه نمود.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، تاکرین، سیستم‌های انتقال دارو، بیماری آلزامر

* مقدمه:

دارو را جذب و کپسوله نمایند و بدین وسیله آن را در مقابل تخریب آنزیمی و شیمیایی محافظت کنند. پلیمرهای مورد استفاده در نانوذرات به دو صورت آب‌دوست و آب‌گریز هستند. نانوذرات بر پایه پلیمرهای

نانوذرات در حامل‌های دارو بسیار با اهمیت هستند؛ زیرا توانایی حمل انواع دارو را به قسمت‌های مختلف بدن در زمان مناسب دارند.^(۱) نانوذرات حامل دارو به صورت نانو کپسول‌ها و نانوکره‌ها وجود دارند. این حامل‌ها قادرند

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در سال تحصیلی ۹۰-۱۳۸۹ در دانشکده شیمی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین انجام شد. مواد و دستگاه‌های مورد استفاده در این کار تحقیقاتی عبارت بودند از: کیتوسان (شرکت suvchem)، گلوترآلدهید ۵۰ درصد، سورفکتانت (Span 80) و روغن بزرک و تاکرین (شرکت سیگما).

سایر مواد شیمیایی متعلق به شرکت مرک بود. طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز میانه از شرکت 460Madison (امریکا)، دستگاه اسپکتروفتومتری (UV-Vis) از شرکت 350 Cam Spec و میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM)، مدل ۵۴۱۶۰، ساخت شرکت Hittach کشور ژاپن بود.

نانوذرات کیتوسان براساس طراحی آزمایش Box-Behnken و به روش امولسیون‌سازی خود به خودی تهیه شد. درصد وزنی/حجمی کلرید سدیم (NaCl) در مرحله آبی به عنوان یک الکترولیت، درصد حجمی/حجمی span 80 در مرحله روغنی به عنوان یک سورفکتانت غیر یونی و حجم (میلی لیتر) عامل برقرارکننده پیوند عرضی (GST)، به عنوان عوامل طراحی، در روش پاسخ سطح در نظر گرفته شدند. بازه تغییرات هر یک از این عوامل مؤثر به شرح زیر انتخاب شد: درصد NaCl در مرحله آبی ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵، درصد span 80، ۲، ۶ و ۱۰ و GST به میزان ۲، ۴ و ۶.

بدین منظور ۱۰ میلی لیتر روغن بزرک حاوی مقدار مورد نیاز سورفکتانت (Span 80) در یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری قرار داده شد و مقدار مورد نیاز از ژل کیتوسان به صورت قطره قطره به مرحله روغنی فوق، تحت همزن مغناطیسی ملایم اضافه گردید. سپس ۵ میلی لیتر استون و همچنین حجم مورد نیاز از تولوئن اشباع با گلوترآلدهید (GST) به سیستم فوق اضافه شد و عمل هم زدن بدون استفاده از درپوش در مدت زمان کافی ادامه یافت. سوسپانسیون نانوذرات به دست آمده توسط دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا و سپس

آب‌دوست مانند کیتوسان گزینه مناسبی برای سیستم‌های حامل دارو هستند؛ زیرا خاصیت خون سازگاری دارند و از بین نمی‌روند.^(۳و۲)

کیتوسان یک پلی‌ساکارید خطی زیست سازگار است که از N-استیل‌زدایی کیتین به دست می‌آید. ساختار کیتوسان شبیه سلولز است. کیتوسان خواص شیمیایی و زیستی منحصر به فردی دارد که به علت وجود گروه‌های آمین و هیدروکسیل در ساختار آن است و خواص آن عبارتند از: غیرسمیت، زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، قابلیت جذب سطحی روی سطوح باردار منفی به علت ماهیت پلی‌الکترولیتی آن در محیط‌های اسیدی، قابلیت تشکیل ژل، خون سازگاری، سازگاری با سلول و بافت و اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی.^(۴)

تاکرین اولین دارویی است که توسط اداره کل غذا و دارو برای درمان آلزایمر متوسط، پذیرفته شده است. فرمول شیمیایی تاکرین $C_{13}H_{14}N_2$ است. تاکرین هیدروکلراید قابل انحلال در آب و اکثر حلال‌های آلی است.^(۵)

طراحی Box-Behnken به منظور بهینه‌سازی تعدادی از آزمون‌ها برای تعیین برهمکنش‌های بین متغیرهای مورد مطالعه و تأثیر آن‌ها در بخش‌های مختلف واکنش انجام می‌شود.^(۶و۷)

اسپکتروسکوپی مادون قرمز میانه و نزدیک نیز هنگام پیوستن با روش‌های شیمی سنجی چند متغیره، برای پیش‌گویی خصوصیات نمونه استفاده می‌شوند. بنابراین سرعت و دقت تحلیل با به کارگیری روابط ریاضی به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد.^(۸-۱۰)

نانو و میکرو ذرات کیتوسان در مطالعه‌های پیشین معمولاً به عنوان حامل داروهای آب‌گریز تهیه شدند.^(۱۱و۱۲) مطالعه حاضر با هدف تهیه و بهینه‌سازی نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل داروی آنتی‌آلزایمر و تخمین اندازه نانو ذرات با روش شیمی‌سنجی انجام شد.

عمل شستشو توسط حلال‌های تولوئن و استون انجام شد. براساس طراحی آزمایش انجام شده، ۱۵ نمونه نانو ذرات کیتوسان مطابق مقادیر طراحی شده برای هر عامل تهیه شدند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقدار عوامل مؤثر و پاسخ مربوط در هر آزمایش

متغیر وابسته Y=اندازه ذرات	متغیرهای مستقل			نمونه‌ها
	X ₃ عامل برقرارکننده (GST)	X ₂ الکترولیت (NaCl)	X ₁ سورفکتانت (Span80)	
۴۱/۰۰	۰	۰	۰	۱
۷۴/۸۷	-۱	۱	۰	۲
۲۶/۳۰	-۱	-۱	-۱	۳
۴۲/۲۵	۰	-۱	-۱	۴
۵۱/۵۲	-۱	۰	۱	۵
۳۷/۶۰	-۱	-۱	۰	۶
۶۸/۷۲	۰	۱	۱	۷
۷۴/۴۳	۱	۱	۰	۸
۵۸/۷۱	۰	۱	-۱	۹
۳۳/۶۴	۰	-۱	۱	۱۰
۴۱/۴۸	۱	-۱	۱	۱۱
۳۸/۵۰	۰	۰	۰	۱۲
۳۶/۰۹	۰	۰	۰	۱۳
۶۵/۳۰	۱	۰	-۱	۱۴
۳۹/۱۵	۱	-۱	۰	۱۵

متغیرها از تحلیل رگرسیون استفاده و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. اندازه ذرات و مورفولوژی آن‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی از نوع گسیل میدانی با قدرت ۱۵ کیلووات تعیین شد. میانگین اندازه نانو ذرات سنتز شده توسط نرم‌افزار microstructure measurement به طور دقیق محاسبه شد. ظرفیت بارگذاری دارو در حامل‌های دارو با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر با ماوراء بنفش ارزیابی و برای تحلیل تجزیه‌ای نمونه‌های ساخته شده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز میانه از نوع انعکاس پخشی استفاده شد. اندازه نانو ذرات توسط مدل آماری PLS-NAS پیشگویی شد و با ضریب همبستگی (R^2) و خطای ریشه میانگین مربعات (RMSE) تحلیل آماری شد.

* یافته‌ها:

بهبودسازی شامل تخمین ضرایب در مدل ریاضی و پیش‌بینی پاسخ و بررسی صحت مدل بود که با توجه به ضرایب به دست آمده از تحلیل رگرسیون، بهترین معادله برای یک مدل رگرسیون چند جمله‌ای به صورت زیر بود:

$$Y_{\text{particle size}} = 38.53 - 0.912X_1 + 15.37X_2 + 2.358X_3 + 4.65X_1X_2 - 9.78X_1X_3 - 0.77X_2X_3 + 2.34X_1^2 + 9.95X_2^2 + 7.75X_3^2$$

Y=اندازه ذرات

X₁=مقدار سورفکتانت مصرفی (Span80)

X₂=مقدار NaCl مصرفی به عنوان الکترولیت

X₃=مقدار تولوئن اشباع شده با گلوترالدهید

توانایی پیش‌بینی کلی مدل که معمولاً به وسیله اندازه‌گیری R^2 شرح داده می‌شود و معیاری از میزان تطبیق‌پذیری مدل است حدود ۹۶/۱۴ درصد بود. عدم انطباق (Lack_of_fit) که معیاری از ناکارآمدی مدل در داده‌های موجود در دامنه آزمایش و بیان‌گر مقایسه بین خطای خالص و خطای باقی‌مانده در آزمایش‌های تکراری است، حدود ۰/۱۴ به دست آمد که نشان‌دهنده انطباق مناسب داده‌ها با مدل بود. اندازه ذرات در صورت به کار بردن مقدار متوسطی از GST و با کاهش درصد NaCl دارای مقادیر کمینه بودند (شکل شماره ۱).

به منظور تعیین ظرفیت بارگذاری تاکرین در نانوذرات کیتوسان حاوی دارو، ۵۰ میلی‌گرم نانوذرات کیتوسان حاوی دارو در ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال و اتانول مرک با نسبت حجمی برابر (۱:۱) به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس ذرات را با سانتیفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا و محلول رویی از کاغذ وات من عبور داده شد.^(۱۳)

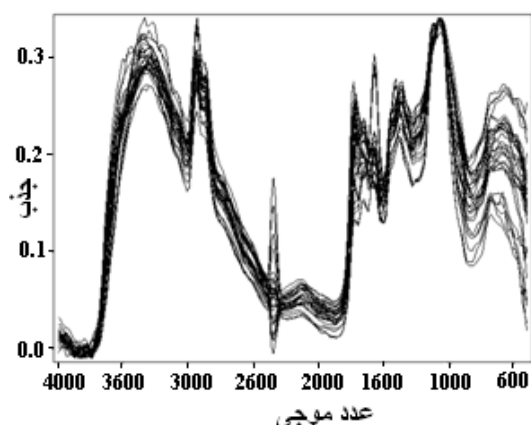
در این مطالعه بارگذاری داروی تاکرین بر روی نانوذرات کیتوسان در حین ساخت نانو ذرات انجام شد. بدین منظور ابتدا تاکرین با نسبت جرمی برابر با پلیمر (۱:۱) در ۵ میلی‌لیتر ژل کیتوسان به کمک همزن مغناطیسی حل شد. سپس ژل کیتوسان حاوی دارو قطره قطره به کمک میکروپمپ به یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری، حاوی ۱۰ میلی‌لیتر روغن بزرک (مقدار بهینه از سورفکتانت Span 80)، تحت همزن مغناطیسی با دور ملایم اضافه شد. سپس بقیه مراحل مطابق روش ساخت نانوذرات کیتوسان بدون دارو انجام شد.

از نرم‌افزار Design-Expert (ساخت آمریکا) برای طراحی آزمایش استفاده شد. برای تشخیص اهمیت

استفاده شد. ظرفیت بارگذاری داروی تاکرین در نانوذرات کیتوسان به عنوان حامل دارو $13/4 \pm 0/51$ درصد تعیین شد.

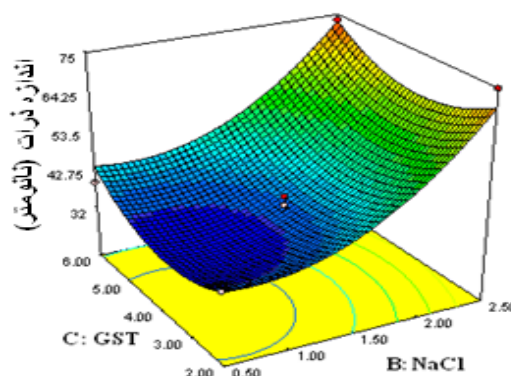
طیف نانوذرات کیتوسان دارای گروه‌های عاملی آمین آزاد، هیدروکسیل و گروه‌های اتری بود. پیک ناحیه ۳۴۴۶ مربوط به آب موجود در ماده، پیک ناحیه ۲۹۱۶ و ۲۸۸۶ مربوط به C-H، پیک ناحیه ۱۰۸۹ مربوط به گروه‌های اتری و پیک‌های ناحیه ۱۳۸۰ و ۱۴۲۳ مربوط به کشش گروه‌های C-O و گروه‌های الکلی است. گروه‌های آمینو در ناحیه ۱۳۰۰ تا ۱۷۰۰ عدد موجی واقع شدند (شکل شماره ۳).

شکل ۳- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز میانه نانوذرات کیتوسان



تحلیل شیمی سنجی به منظور تخمین میانگین اندازه نانو ذرات کیتوسان انجام شد. در این مطالعه از تمام ناحیه تبدیل فوریه مادون قرمز میانه برای تحلیل شیمی سنجی کالیبراسیون چند متغیره (PLS1) استفاده شد. طیف‌های DRIFT نمونه‌های نانوذرات کیتوسان گرفته شد. سپس اندازه نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش کالیبراسیون چند متغیره PLS پیشگویی شد. برای اینکه PLS بهترین نتایج پیشگویی را حاصل نماید، تعداد عوامل مورد استفاده در PLS باید بهینه شوند. در روش PLS ارتباط بین x و y خطی است و تعداد اجزای مورد نیاز برای توصیف مدل برابر با ابعاد مدل است. یکی از رایج‌ترین شیوه‌ها برای به

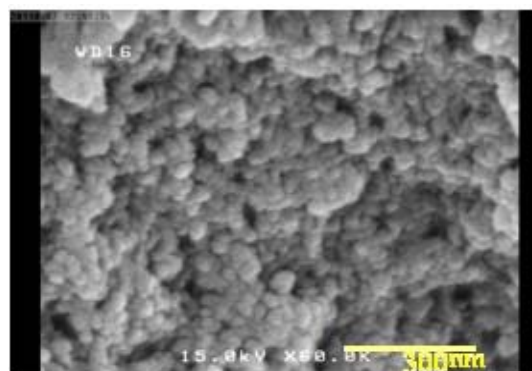
شکل ۱- نمودار سطح مربوط به متغیرهای NaCl و GST



با توجه به عوامل مؤثر در روش تهیه نانوذرات کیتوسان بهترین شرایط عبارت بودند از: ۵۲/۰ درصد NaCl، ۱۰ درصد Span 80 و ۴/۸۶ میلی‌لیتر GST. میانگین اندازه ذرات نانو ذرات کیتوسان مطابق شرایط بهینه، با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert مقدار ۲۸/۴۶ نانومتر پیش‌بینی شد.

نانو ذرات کیتوسان تهیه شده کاملاً کروی و میانگین اندازه ذرات آن‌ها ۳۰ نانومتر بود که به مقدار به دست آمده توسط مدل نزدیک بود (شکل شماره ۲).

شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات کیتوسان



محتوای دارو با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در بیش‌ترین طول موج دارو ۲۴۰ نانومتر در مقابل شاهد حقیقی تحلیل شد. از نانوذرات کیتوسان بدون دارو تحت شرایط ذکر شده به عنوان محلول شاهد

بهینه سنتز شدند به ترتیب ۹۰ و $۱۳/۴ \pm ۰/۵۱$ درصد بود. در این مطالعه هدف از بهینه نمودن روش تهیه نانوذرات، رسیدن به نانوذرات پلیمری زیست سازگار با اندازه ذرات کوچک‌تر و مورفولوژی کروی بود که مطالعه‌های قبلی به این موفقیت دست نیافتند و نتوانستند نانوذرات را از لحاظ اندازه و مورفولوژی بهینه کنند.^(۱۵،۱۴) همچنین در این مطالعه با استفاده از شیمی سنجی، یک روش جدید جهت تخمین میانگین اندازه ذرات ارایه شد. نانوذرات کیتوسان با اندازه ذرات مختلف توسط طیف سنجی DRIFT تحلیل و داده‌ها توسط مدل PLS-NAS پردازش شدند. اندازه‌های تخمین زده شده نانوذرات کیتوسان نشان دهنده یک کالیبراسیون قوی و قابل اعتماد بود که به وسیله ضریب همبستگی $۰/۹۸$ و خطای ریشه میانگین مربعات $۳/۵۹$ تأیید شدند. این کار ایده جدیدی برای تخمین میانگین اندازه ذرات است که در مطالعه‌های پیشین انجام نشده است.

* مراجع:

1. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002; 6: 319-27
2. Zhang Y, Huo M, Zhou J, et al. Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: Synthesis, characterization, micellization and cytotoxicity evaluation. *Carbohydr Polym* 2009; 77: 231-8
3. Trapani A, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. *Int J Pharm* 2009 Jun 22; 375 (1-2): 97-106
4. Boonsongrit Y, Mitrevej A, Mueller BW. Chitosan drug binding by ionic interaction, *Eur J Pharm Biopharm* 2006 Apr; 62 (3): 267-74

دست آوردن تعداد عوامل بهینه، ارزیابی تقاطعی (cross validation) است. جهت محاسبه تعداد عوامل بهینه، ارزیابی تقاطعی یکتایی (Leave one out) یا به عبارتی دیگر، خارج نمودن یک نمونه استاندارد در هر زمان کالیبراسیون انجام شد. عامل بهینه در این مطالعه ۲ بود. (از مدل ریاضی PLS-NAS با ۲ عامل بهینه به منظور تخمین اندازه نانوذرات استفاده شد). با استفاده از متغیر ریاضی کنارد استون ۲۹ نمونه به عنوان ست کالیبراسیون و ۱۳ نمونه به عنوان مجموعه ارزیابی انتخاب شدند. نتایج آماری مدل ارایه شده عبارت بودند از: ضریب همبستگی $۰/۹۸$ و خطای ریشه میانگین مربعات $۳/۵۹$ (جدول شماره ۲).

جدول ۲- اندازه واقعی و پیشگویی شده نانوذرات کیتوسان با مدل PLS-NAS برای ست ارزیابی

نمونه‌ها	اندازه واقعی ذرات	اندازه پیشگویی شده ذرات توسط مدل PLS-NAS
۱	۴۱	۴۲/۱۸
۲	۴۱	۴۲/۱۲
۳	۷۴/۸۷	۷۳/۲۹
۴	۷۴/۸۷	۷۴/۴۴
۵	۵۱/۵۲	۴۳/۳۶
۶	۵۱/۵۲	۴۴/۷۶
۷	۳۷/۶	۳۸/۷۰
۸	۶۸/۷۲	۶۸/۶۵
۹	۷۳/۳۳	۶۹/۴۰
۱۰	۷۳/۳۳	۷۰/۲۰
۱۱	۵۸/۷۱	۵۷/۳۵
۱۲	۴۱/۳۸	۴۰/۳۹
۱۳	۳۸/۵	۳۶/۴۴
خطای ریشه میانگین مربعات		۳/۵۹
ضریب همبستگی		۰/۹۸

* بحث و نتیجه گیری:

در این مطالعه نانوذرات کیتوسان با میانگین اندازه ذرات $۳۳/۶۴$ تا $۷۴/۸۷$ نانومتر و مورفولوژی کروی به عنوان حامل داروی آنتی آلیزایمر تاکرین با استفاده از روش طراحی آزمایش تهیه شدند. درصد بازده و درصد بارگذاری دارو در نانوذرات کیتوسان که مطابق روش

5. Galisteo M, Rissel M, Sergent O, et al. Hepatotoxicity of tacrine: occurrence of membrane fluidity alterations without involvement of lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Jul; 294 (1): 160-7
6. Khajvand T, Chaichi MJ, Nazari O, et al. Application of Box-Behnken design in the optimization of catalytic behavior of a new mixed chelate of copper (II) complex in chemiluminescence reaction of luminal. *J Lumin* 2011; 131: 838-42
7. Aslan N, Cebeci Y. Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel* 2007; 86: 90-7
8. Thomas M, Ghosh SK, George KC. Characterization of nanostructured silver orthophosphate. *Mater Lett* 2002; 56: 386-92
9. Savchyn P, Karbovnyk I, Vistovskyy V, et al. Vibrational properties of LaPO₄ nanoparticles in mid-and far-infrared domain. *J Appl Phys* 2012; 112: 124309-124309-6
10. Dhanaraju MD, Mani Kumar R, Nithya P, et al. Controlled delivery of antiretroviral drug loaded chitosan cross linked microspheres. *Arch Appl Sci Res* 2009; 1: 279-86
11. Saboktakin MR, Tabatabaee R, Maharramov A, et al. Design and characterization of chitosan nanoparticles as delivery systems for paclitaxel. *Carbohydr Polym* 2010; 82: 466-71
12. Lee E, Lee J, Lee IH, et al. Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel. *J Med Chem* 2008 Oct 23; 51 (20): 6442-9
13. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, et al. Significant delivery of tacrine into the brain using magnetic chitosan microparticles for treating Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods* 2009 Mar 15; 177 (2): 427-33
14. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, et al. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine* 2010 Feb; 6 (1): 144-52
15. Dhanya KP, Santhi K, Dhanaraj SA, Sajeeth CI. Formulation and evaluation of chitosan nanospheres as a carrier for the targeted delivery of lamivudine to the brain. *International J Comprehensive Pharmacy* 2011; 2: 1-5