

球面对称设计优化胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒的制备条件

钟志容^{1,2},袁晓佳¹,张志荣¹,宋庆国¹,何勤^{1*} (1.四川大学华西药学院,成都 610041;2.泸州医学院,四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨以三甲基壳聚糖为材料制备胸腺五肽纳米粒的制备条件。方法 离子胶凝法制备胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒 (Tp5-TMC-NP),用球面对称设计优化制备条件,以粒径和包封率为评价指标,考查 TMC浓度 (X_1)、海藻酸钠浓度 (X_2)、Tp5加入量 (X_3)三个指标对制备条件的影响,将实验结果用数学方法处理并进行方程模型拟合,根据拟合方程及由此绘制的反应曲面图 (Response Surface Plot)考察指标的最优值和各因素相对应的最佳取值范围。结果 以优化条件制得纳米粒粒径 110.6 nm,药物包封率 78.8%。结论 制备方法简便,具有工业化生产的可行性。

关键词:球面对称设计;胸腺五肽;纳米粒

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2007)02-0104-04

Optimizing the Preparation of Thymopentin Loaded Oral N-trimethyl Chitosan Nanoparticles by Central Composite Design

ZHONG Zhi-rong^{1,2}, YUAN Xiao-jia¹, ZHANG Zhi-rong¹, SONG Qing-guo¹, HE Qin^{1*} (1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Lu Zhou Medical College, Luzhou 646000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the preparation of thymopentin loaded oral modified-chitosan nanoparticles (Tp5-TMC-NP). **METHODS** Thymopentin loaded oral N-trimethyl chitosan nanoparticles were prepared by ionic gelation. To optimize the preparation, central composite design (CCD) employed. We studied the N-trimethyl chitosan (TMC) concentration, the Sodium Alginate concentration and the thymopentin (Tp5) addition, particle diameter and encapsulation efficiency being the evaluation index. Mathematical equations and respond surface plot were used to relate the evaluation index and the factors studied, so as to define the most suitable levels of the three factors. **RESULTS** According to these levels, an optimized Tp5-TMC-NP formulation was prepared, resulting in a particle size of 110.6nm and encapsulation efficiency 78.8%. **CONCLUSION** The optimized preparation is simple with the probability for industrialization.

KEY WORDS: central composite design; thymopentin; nanoparticles

壳聚糖^[1]是甲壳素脱乙酰化的产物,具有跨黏膜的吸收促进作用。但在中性和碱性环境中,壳聚糖失去电荷,失去其吸收促进作用。三甲基壳聚糖 (TMC)^[2-4]是壳聚糖的衍生物,它和壳聚糖一样能打开紧密连接、促进细胞旁路转运,且在中性及碱性环境中均具有吸收促进作用^[5]。

合成多肽胸腺五肽 (Tp5),其氨基酸序列与胸腺生成素 II 的第 32~36 位的五肽片段相同,具有胸腺生成素 II 自身的免疫学活性,被认为是胸腺生成素 II 的活性部位。肽类药物虽然具有生理功能上的高效性和专一性,但如果采用口服给药,它们大多数没有治疗活性;而采用注射给药时,由于它们的生物半衰期极短,又必需反复注射,给患者带来很多痛苦和不便。纳米粒近年来被认为是靶向内吞,也可以通过细胞旁路穿过肠道黏膜而被吸收。而当微粒的粒径小于 10 μm 时,可作为给药系统的有效载体。根据文献报道,纳米粒的粒径在 40~200 nm 时,既可以通过细胞旁路,也可以被 M 细胞摄取并通过小肠上皮细胞间隙 Peyer 氏结区域进入门脉系统^[6]。由于粒径过小会使包封率及载药量减小,失去临床

应用的可能,因此本实验拟将微粒的粒径控制在 200 nm 以下。本实验以合成的三甲基壳聚糖为载体,制备载胸腺五肽的三甲基壳聚糖纳米粒,采用球面设计优化制备条件。

1 实验材料与仪器

三甲基壳聚糖 (自制);胸腺五肽 (四川源基制药有限公司);其余试剂均为市售分析纯产品。

BP211 DSartorius 电子天平 (美国双杰兄弟有限公司);Cintra 10e 紫外可见分光光度计 (GBC Scientific Equipment);85-2 型恒温磁力搅拌器 (巩义市英峪予华仪器厂);CTO-10AVP 日本岛津高效液相色谱;贝克曼 Allegra 22R 台式高速离心机;Nano Sz900 激光纳米粒度测量仪。

2 实验方法

2.1 Tp5-TMC-NP 的制备

本实验选用沉淀胶凝法制备胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒 (Tp5-TMC-NP),取适量 Tp5 加入适宜浓度的三甲基壳聚糖溶液中,在磁力搅拌的情况之下用针管滴加海藻酸钠溶液适量,滴加完毕之后在继续搅拌即得 Tp5-TMC-NP。

作者简介:钟志容 (1974-),女,2004 届硕士研究生

* 通讯作者:何勤,电话: (028)85502532 E-mail: qinhe317@126.com

2.2 试验设计

根据单因素实验结果,以所制备的纳米粒粒径和包封率为评价指标,选择对 Tp5-TMC-NP性质影响较显著的 3 个因素为考察对象,即 TMC 浓度 (X₁)、海藻酸钠浓度 (X₂)、Tp5 加入量 (X₃)。三因素安排的实际水平见表 1。根据球面设计原理^[7]设计的各次实验安排见表 2。

表 1 球面设计中自变量及其水平

Tab 1 Independent variables and their levels investigated in the central composite design

Factor	Factor level in coded fom				
	- $\sqrt{3}$	- 1	0	1	$\sqrt{3}$
X ₁	0.5	0.92	1.5	2.08	2.5
X ₂	0.5	0.92	1.5	2.08	2.5
X ₃	2	2.42	4	5.58	6

表 2 三因素实验设计及实验结果

Tab 2 Experimental design for three factors and experimental results

No.	TMC /(mg/mL)	ALGINATE /(mg/mL)	Tp5 /mg	D ₁ /nm	EE ₁ /%	D ₂ /nm	EE ₂ /%	OD
1	0.92	0.92	2.42	108.2	65.2	0.9119	0.304	0.5265
2	0.92	0.92	5.58	106.9	65.3	0.9159	0.306	0.5294
3	0.92	2.08	2.42	158.9	67.8	0.7534	0.356	0.5179
4	0.92	2.08	5.58	160.3	73.7	0.7491	0.474	0.5959
5	2.08	0.92	2.42	213.6	76.3	0.5825	0.526	0.5535
6	2.08	0.92	5.58	216.4	80.6	0.5738	0.612	0.5926
7	2.08	2.08	2.42	210.7	71.4	0.5916	0.428	0.5032
8	2.08	2.08	5.58	218.9	83.1	0.5659	0.662	0.6121
9	0.5	1.5	4	102.4	58.3	0.9300	0.166	0.3929
10	2.5	1.5	4	388.0	69.4	0.0375	0.388	0.1206
11	1.5	0.5	4	117.9	73.2	0.8816	0.464	0.6396
12	1.5	2.5	4	104.8	79.8	0.9225	0.596	0.7415
13	1.5	1.5	2	110.5	76.1	0.9047	0.522	0.6872
14	1.5	1.5	6	132.8	84.3	0.8350	0.686	0.7568
15	1.5	1.5	4	109.7	80.2	0.9072	0.604	0.7402

3.2 模型拟合

采用 STATISTICA 统计学处理软件,将实验结果用多元三次方程模型进行拟合,得出粒径、EE 和综合指标以及各因素之间关系的方程。

SIZE = 301.8456 - 278.594X₁ + 33.41339X₂ - 49.7129X₃ + 145.2670X₁² - 41.3702X₁X₂ + 0.534325X₁X₃ + 11.41699X₂² + 0.152395X₂X₃ + 6.184453X₃² + 0.634981X₁X₂X₃

R = 0.95464

EE = 13.30182 + 61.97745X₁ + 17.51427X₂ - 0.831965X₃ - 16.8232X₁² - 6.48433X₁X₂ + 0.799606X₁X₃ - 4.17324X₂² + 1.236096X₂X₃ - 0.154901X₃² + 0.376285X₁X₂X₃

R = 0.99135

OD = - 0.425102 + 1.397261X₁ + 0.125192X₂ -

2.3 粒径及包封率的测定

采用激光粒度测定仪测定粒径。

将制得的 Tp5-TMC-NP 胶体溶液 15 000 r·min⁻¹ (4℃) 条件下离心 2 h,用 HPLC 测定上清液中 Tp5 的含量,按下式计算包封率 (EE%)^[8]:

EE% = [(x_t-x_f) / x_t] × 100%

式中 x_t 为胶体溶液中 Tp5 的总量, x_f 为上清液中的游离 Tp5 的量。

3 结果

3.1 实验设计安排及结果

根据球面设计三因素五水平,实验安排和粒径、包封率的值见表 2。粒径、包封率均标准化为 0~1 间的“归一值”,各指标“归一值”求算几何平均数,得总评“归一值”(Overall Desirability, OD)。

0.002114X₃ - 0.479540X₁² - 0.027973X₁X₂ + 0.011022X₁X₃ - 0.045740X₂² + 0.021635X₂X₃ - 0.003270X₃² - 0.001246X₁X₂X₃

R = 0.956 92

其中 X₁, X₂, X₃ 分别为三甲基壳聚糖浓度、海藻酸钠浓度、Tp5 加入量。从拟合度可以看出,几项指标均能用多元方程较好地拟合。

3.3 反映面的优化

根据各指标的拟合方程,固定一个因素的水平,分别绘制各考察指标与另外两个实验因素的三维反应曲面图,分别见图 1、图 2 和图 3。由曲面图综合考虑判断,确定在试验范围内,各指标值为最优时的各因素最佳取值范围(点),结果见表 3。

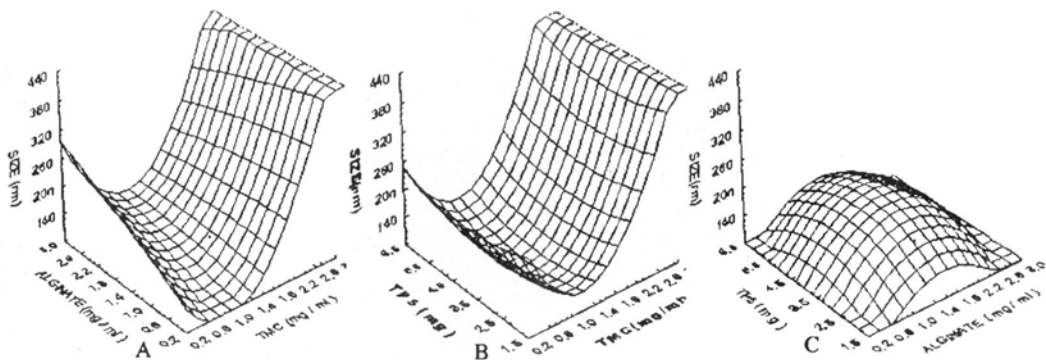


图 1 粒径作为考察指标固定一个因素,考察另两个因素的反映曲面图

Fig 1 Predicted response surfaces of size as a function of the formulation variables

(A) X_1 与 X_2 , $X_3 = 5$; (B) X_1 与 X_3 , $X_2 = 1.5$; (C) X_2 与 X_3 , $X_1 = 1.5$

(A) X_1 and X_2 , $X_3 = 5$, (B) X_1 and X_3 , $X_2 = 1.5$, (C) X_2 and X_3 , $X_1 = 1.5$

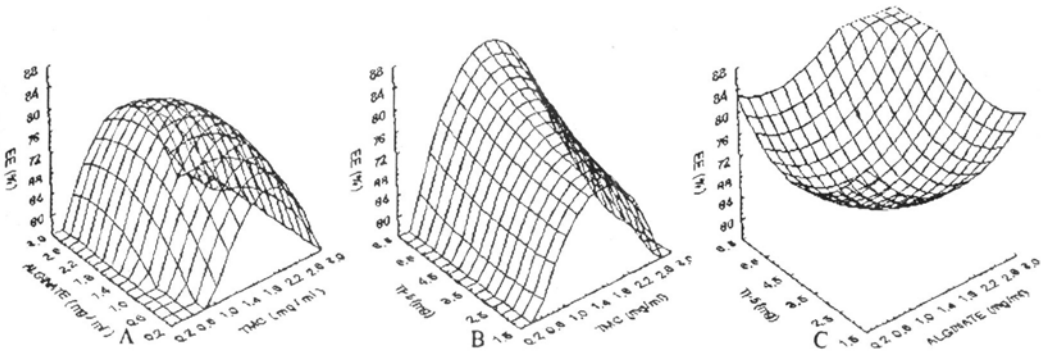


图 2 包封率作为考察指标固定一个因素,考察另两个因素的反映曲面图

Fig 2 Predicted response surfaces of EE as a function of the formulation variables

(A) X_1 与 X_2 , $X_3 = 5$; (B) X_1 与 X_3 , $X_2 = 1.5$; (C) X_2 与 X_3 , $X_1 = 1.5$

(A) X_1 and X_2 , $X_3 = 5$, (B) X_1 and X_3 , $X_2 = 1.5$, (C) X_2 and X_3 , $X_1 = 1.5$

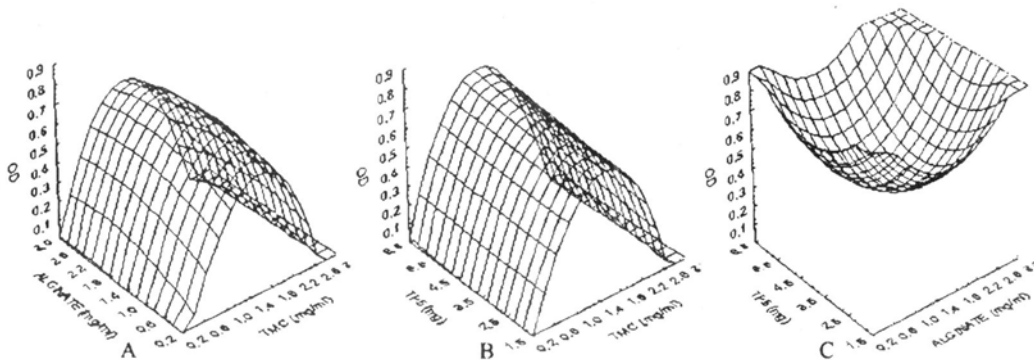


图 3 总归一值作为考察指标固定一个因素,考察另两个因素的反映曲面图

Fig 3 Predicted response surfaces of OD as a function of the formulation variables

(A) X_1 与 X_2 , $X_3 = 5$; (B) X_1 与 X_3 , $X_2 = 1.5$; (C) X_2 与 X_3 , $X_1 = 1.5$ (A) X_1 and X_2 , $X_3 = 5$, (B) X_1 and X_3 , $X_2 = 1.5$, (C) X_2 and X_3 , $X_1 = 1.5$

表 3 预测各因素最佳取值范围(点)

Tab 3 Predicted optimum ranges (points) of the independent variables

Response variable	Predicted optimum range (point)		
	C_{TMC}	$C_{Alginate}$	C_{Tp5}
Size	0.5-1.5	1.0-1.5	2.0-5.5
EE	1.5-2.0	1.0-2.0	4.0-6.0
OD	1.0-2.0	1.5-2.5	4.0-6.0

3.4 优化条件吻合性实验

根据优化结果,预测最优制备条件为:三甲基壳聚糖浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,海藻酸钠浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Tp5 加入量为 5 mg ,在此条件下各指标的预测值见表 4,按该条件制备三批胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒样品,测定各指标平均值,结果见表 4。计算载药量 $DL = (\text{总的 Tp5 量} - \text{上清液中的 Tp5}) / \text{载体材料的量}$,为 17.51% 。Zeta 电位值为 41.2 mV 。所制备纳米粒粒径分布及电泳照片分别见图 4,图 5。

表 4 优化条件制备纳米粒各指标的预测值和实测值

Tab 4 Comparison of the observed and predicted Values of the response variables of nanoparticle prepared under the optimum condition

Response variables	Predicted response	Observed response	Bias /% *
Size /nm	107.3	110.6	-3.08
EE /%	79.8	78.8	-1.25
Overall desirability	0.7384	0.7218	-2.25

Note: * Bias was calculated as (predicted value - observed value) / predicted value × 100%



图 4 Tp5-TMC-NP电镜照片

Fig 4 The TEM micrograph of Tp5-TMC-NP

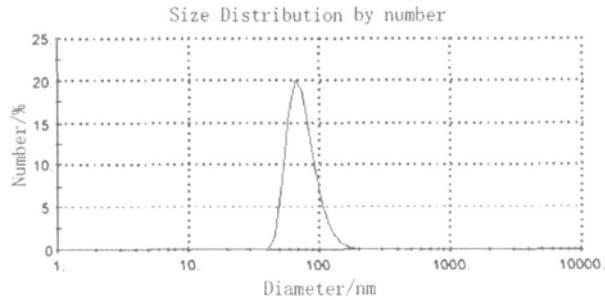


图 5 粒径分布测定结果

Fig 5 Results of size distribution determination

从表 4中可以看出,优化后的各指标实测值与预测值相吻合,优化后的胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒的各考察指标均比较理想,说明优化成功。

4 讨论

4.1 用壳聚糖制备纳米粒的方法有乳化胶联法,喷雾干燥法,乳滴聚结法,沉淀胶凝法等^[9-10], Tp5为多肽类药物,在对其进行操作的过程中要求条件不可剧烈,而沉淀胶凝法条

件温和,易于得到均一、可调整粒径范围的纳米粒,因此本试验中选用沉淀胶凝法制备 Tp5-TMC-NP,利用带正电的三甲基壳聚糖和带负电的胶凝剂作用,形成胶体分散系统。

4.2 预试验中发现 TMC-NP上清液与 Tp5-TMC-NP上清液及 Tp5对照液的紫外吸收光谱相似,均在 Tp5的最大吸收波长 275 nm处有吸收,因此选用 HPLC法检测其含量。

参考文献

[1] ZHAO H L, MOU D K. Progress on the application of chitin, chitisan and the derivatives[J]. Shandong Med J(山东医药), 2004, 44(17): 59-60.

[2] THANOU M, FLOREA B I, LANGEMEYER M W E, *et al.* N-trimethyl chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug buselelin in vitro (Caco-2 cell) and *in vivo* (rats) [J]. Pham Res, 2000, 17(1): 27-48.

[3] RANALDI G, MARIGLIANO L, VERPIGNANI L, *et al.* The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line[J]. J Nutr Biochem, 2002(3): 157-167.

[4] HUANG M, WU W. Protein and polypeptide oral delivery system [J], Chin J Clin Pham (中国临床药学杂志), 2004, 13(3): 183-187.

[5] RANALDI G, MARIGLIANO L, VERPIGNANI L, *et al.* The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line[J]. J Nutr Biochem, 2002(13): 157-167.

[6] MATHIOWITZ E, JACOB J S, *et al.* Biological erodable microspheres as potential oral drug delivery system[J]. Nature, 1997, 386: 410-414.

[8] YUAN X J, ZHANG ZH R, HE Q. Determination of the entrapment efficiency in Thymopentin N-trimethyl chitosan nanoparticles [J]. West China J Pham Sci(华西药科学杂志). 2005, 20(2): 131-133.

[9] TOKUMITSU H, HIRATSUKA J, SAKURAI Y, *et al.* Gadolinium neutron capture therapy using novel gadopentetic acid chitosan complex nanoparticles: in vivo growth suppression of experimental melanoma solid tumor[J]. Cancer Lett, 2000, 150(2): 177-182.

[10] SHIKATA F, TOKUMITSU H, ICHIKAWA H, *et al.* In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron capture therapy of cancer[J]. Eur J Pham Biopham, 2002, 53(1): 57-63.

收稿日期: 2006-08-26