

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ROBAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ROBAR

**IZDELAVA NANODELCEV S SPONTANIM ZDRUŽEVANJEM
POLIMEROV IN LIPIDOV**

**FORMULATION OF NANOPARTICLES WITH SELF-ASSEMBLY
OF POLYMERS AND LIPIDS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

V prvi vrsti se želim zahvaliti mentorici doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar za potrpežljivo in skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo ter vso pomoč in napotke pri pripravi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi gospe Tatjani Hrovatič, tehnični sodelavki na Fakulteti za farmacijo, za pomoč pri izvedbi HPLC analiz ovalbumina. Nenazadnje se želim zahvaliti tudi svoji družini in Samu za vso podporo, vzpodbudo in neomajno razumevanje tekom pestre poti študija in nenazadnje dela diplomske naloge.

Na koncu bi se zahvalila še vsem tistim, ki jih nisem omenila, a so mi v času študija stali ob strani in mi pomagali.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

VSEBINA

POVZETEK

ABSTRACT

SEZNAM OKRAJŠAV

1. UVOD	10
1.1. NANODELCI	10
1.2. POLIMERI IN FOSFOLIPIDI	11
1.2.1. Hitosan	11
1.2.2. Pektin	12
1.2.3. Fosfolipidi	15
1.3. PROTEINI	17
1.3.1. Struktura proteinov	17
1.3.2. Lastnosti proteinov	17
1.3.3. Topnost proteinov	18
1.3.4. Nestabilnost proteinov	18
1.3.5. Protein ovalbumin	19
1.4. POLIELEKTROLITSKI KOMPLEKSI	20
1.4.1. Polielektrolitski nanokompleksi iz alginata in hitosana	21
1.4.2. Polielektrolitski nanokompleksi iz pektina in hitosana	23
1.4.3. Polielektrolitski nanokompleksi iz lecitina in hitosana	23
1.5. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITSKIH KOMPLEKSOV	26
1.5.1. Velikost delcev	26
1.5.2. Zeta potencial	26
1.5.3. Polidisperzni indeks	27
2. NAMEN DELA	28
3. EKSPERIMENTALNI DEL	29
3.1. MATERIALI	29
3.2. NAPRAVE	29
3.3. METODE	30
3.3.1. Izdelava nanodelcev	30
3.3.1.1. <i>Nanodelci iz pektina in hitosana</i>	30
3.3.1.2. <i>Nanodelci iz lecitina in hitosana</i>	32
3.3.2. Fizikalno vrednotenje nanodelcev	33

3.3.3 Določanje topnosti ovalbumina v različnih topilih in HPLC analitika ovalbumina	34
3.3.4. Določanje učinkovitosti vgrajevanja in vsebnosti ovalbumina v nanodelcih.....	35
3.3.4.1. <i>Nanodelci iz pektina in hitosana</i>	36
3.3.4.2. <i>Nanodelci iz lecitina in hitosana</i>	36
3.3.5. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev.....	37
3.3.5.1. <i>Prehajanje ovalbumina skozi membrano difuzijske vrečke (300 000 Da)</i> ...	37
3.3.5.2. <i>Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz pektina in hitosana</i>	37
3.3.5.3. <i>Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz lecitina in hitosana</i>	38
4. REZULTATI	39
4.1. NANODELCI IZ PEKTINA IN HITOSANA	39
4.1.1. Vpliv masnega razmerja pektin : hitosan na nastanek nanodelcev	39
4.1.2. Vpliv količine dodanega ovalbumina na lastnosti nanodelcev.....	41
4.1.3. Določevanje učinkovitosti vgrajevanja in vsebnosti ovalbumina v nanodelcih iz pektina in hitosana	43
4.1.4. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz pektina in hitosana.....	44
4.2. NANODELCI IZ LECITINA IN HITOSANA	46
4.2.1. Topnost ovalbumina v različnih topilih.....	46
4.2.2. Izdelava nosilnega sistema brez učinkovine.....	47
4.2.3. Izdelava nosilnega sistema z ovalbuminom	49
4.2.4. Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce.....	52
4.2.5. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev.....	53
5. SKLEP	55
6.LITERATURA	57

POVZETEK

Nanodelci so v našem primeru trdni koloidni delci (10-1000 nm), zgrajeni iz lipidov ali naravnih oziroma sinteznih polimerov. Predstavljajo perspektiven sistem za tarčno dostavo, povečanje biološke uporabnosti in podaljšano sproščanje učinkovin ter njihovo zaščito pred encimsko razgradnjo. Nanodelci so vedno bolj pomembni kot dostavni sistemi peptidov, proteinov, antigenov, oligonukleotidov in genov.

V diplomski nalogi smo proučevali nastanek nanodelcev iz dveh polimerov (hitosana in pektina) oziroma iz polimera in fosfolipida (hitosana in lecitina). Izdelali smo jih z metodo polielektrolitskega kompleksiranja. Kot modelno proteinsko učinkovino smo uporabili ovalbumin. Izdelanim nanodelcem smo določili povprečni premer z metodo fotonske korelacijske spektroskopije ter zeta potencial z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze. Ovrednotili smo tudi učinkovitost vgrajevanja, vsebnost ter hitrost sproščanja ovalbumina iz nanodelcev.

Na nastanek nanodelcev iz pektina in hitosana vpliva masno razmerje med pektinom in hitosanom ter količina dodanega ovalbumina. Izdelani nanodelci so imeli povprečni premer 300 do 400 nm ter zeta potencial -30 mV. V nanodelcih smo določili do 85 % učinkovitost vgrajevanja in do 46 % vsebnost ovalbumina. Z vgrajevanjem ovalbumina v nanodelce smo dosegli podaljšano sproščanje.

Na nastanek nanodelcev iz lecitina in hitosana vpliva vrsta dodanega lecitina in razmerje med lecitinom in hitosanom. Nanodelci iz Phospholipona 50 in 80 so imeli povprečni premer 100 do 260 nm in zeta potencial 40 mV. V nanodelcih iz Phospholipona 50 smo določili 7 % vsebnost ovalbumina in 20-29 % učinkovitost vgrajevanja, v nanodelcih iz Phospholipona 80 pa 3-5 % vsebnost ovalbumina in 17-18 % učinkovitost vgrajevanja. Številnejše ionske interakcije med lecitinom, ovalbuminom in hitosanom so vzrok, da je bilo sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz Phospholipona 50 počasnejše kot iz nanodelcev iz Phospholipona 80.

Zaključimo lahko, da smo modelno proteinsko učinkovino ovalbumin uspešno vgradili v nanodelce iz pektina in hitosana ter nanodelce iz lecitina in hitosana. Ugotovili smo, da lahko z izbiro ustreznih polimerov in fosfolipidov ter razmerja med njimi, vplivamo na velikost in naboj nanodelcev ter na vgrajevanje in sproščanje ovalbumina.

ABSTRACT

Nanoparticles, in this context, are solid colloidal particles (10-1000 nm), made of lipid or of natural or synthetic polymers. They represent a promising system for targeted delivery, increased bioavailability, prolonged drug release and protection against enzymatic degradation. Nanoparticles are becoming increasingly important as the delivery system of peptides, proteins, antigens, oligonucleotides and genes.

This dissertation deals with the formation of nanoparticles out of either two polymers (chitosan and pectin), or a polymer and a phospholipid (chitosan and lecithin). They were made with the method of polyelectrolyte complexation. Ovalbumin was used as a model protein. The mean size of nanoparticles was determined with the Photonic correlation spectroscopy method and the zeta potential with the laser Doppler electrophoresis method. Entrapment efficiency, loading capacity and release of ovalbumin from nanoparticles were also evaluated.

The formation of the nanoparticles of chitosan and pectin is influenced by the mass ratio between chitosan and pectin and the quantity of the added ovalbumin. The mean size of the produced nanoparticles ranged between 300 and 400 nm and the zeta potential was around -30 mV. The entrapment efficiency of ovalbumin was up to 85 % and the loading capacity up to 46 %. The study of the release of ovalbumin from nanoparticles exhibited a prolonged release profile.

The formation of the nanoparticles of chitosan and lecithin is influenced by the type of lecithin used as well as by the mass ratio between lecithin and chitosan. The nanoparticles of Phospholipon 50 and 80 had an average diameter from 100 to 260 nm and the zeta potential of 40 mV. The entrapment efficiency of ovalbumin in nanoparticles of Phospholipon 50 was 7 % and the loading capacity was 20-29 %, while the entrapment efficiency of ovalbumin in the nanoparticles of Phospholipon 80 was 17-18 % and the loading capacity 3-5 %. The reason why the release of ovalbumin was slower from the Phospholipon 50 nanoparticles than from the Phospholipon 80 nanoparticles are the numerous ionic interactions between lecithin, ovalbumin and hitosanom.

Finally, the results have shown that the model protein ovalbumin can be incorporated in both the nanoparticles of chitosan and pectin as well as the nanoparticles of chitosan and lecithin. The right choice of polymers and phospholipids and the mass ratios between them can have influence on the size and charge of nanoparticles and on the incorporation and release of ovalbumin.

SEZNAM OKRAJŠAV

d – povprečni premer delcev

Da – dalton

DA - delež acetiliranih glikozidnih enot hitosana (v %)

DE – stopnja esterifikacije

DLS – dinamično sipanje svetlobe

F_A – delež acetiliranih glikozidnih enot hitosana

HM – visoko metoksiliran

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

LM – nizko metoksiliran

ND – nanodelci

OVA - ovalbumin

PBS – izotonični fosfatni pufer

PCS – fotonska korelacijska spektroskopija

PI – polidisperzni indeks

pI – izoelektrična točka

PEK – polielektrolitski kompleks

UČ – učinkovitost vgrajevanja

VS – vsebnost

ZP – zeta potencial

λ - valovna dolžina

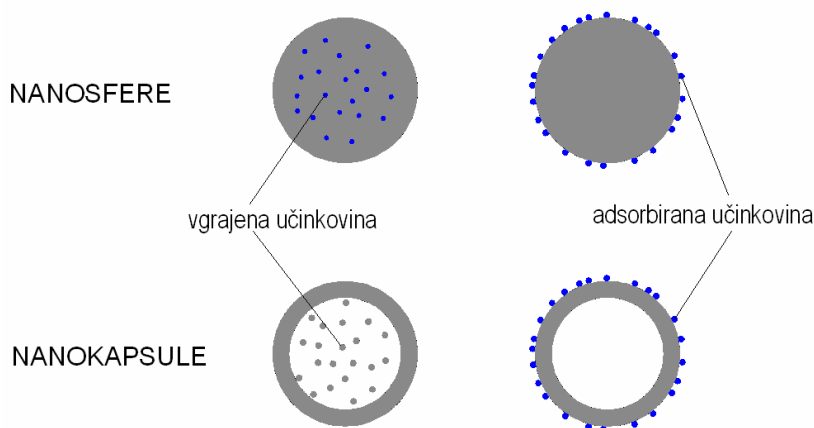
1.UVOD

1.1. NANODELCI

Nanodelci spadajo v skupino koloidnih nosilnih sistemov in ne predstavljajo samostojne farmacevtske oblike. So delci nanometrskih velikosti (1 do 1000 nm). Ločimo (1):

- Nanosfere, ki imajo ogrodni matriks, v katerem se porazdeli učinkovina
- Nanokapsule, ki imajo polimerno ovojnico in jedro

Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, v katerem je lahko učinkovina raztopljena ali dispergirana, lahko pa je učinkovina na nosilno ogrodje adsorbirana (Slika 1):



Slika 1: Prikaz nanosfer in nanokapsul z vgrajeno oz. adsorbirano učinkovino (1).

Njihova glavna prednost pred delci mikrometrskih velikosti je njihova majhnost, ki jim omogoča prehod skozi epitelij ali vstop v celice (2).

Nanodelci so pomembni dostavni sistemi peptidov, proteinov, antigenov, oligonukleotidov in genov. Takšni dostavni sistemi zaščitijo vgrajeno učinkovino pred njenim razpadom v gastrointestinalnem traktu (kemijska ali encimska razgradnja), podaljšajo čas sistemske cirkulacije in imajo nadzor nad sproščanjem učinkovine v kri (3).

1.2. POLIMERI IN FOSFOLIPIDI

Nanodelci izdelani iz polimerov oziroma polimerov in lipidov se uporabljajo za izboljšanje nekaterih lastnosti zdravilnih učinkovin kot so: slaba topnost v vodi, hiter metabolizem, ozek terapevtski indeks in toksični stranski učinki (4).

Zaradi nekaterih slabih lastnosti naravnih polimerov (slabo ohranjanje oblike zaradi nabrekanja, njihova sestava niha, lahko so kontaminirani...) se vedno bolj uporabljajo sintezni polimeri, ki pa so pogosto netopni v vodi in zahtevajo uporabo organskega topila (5).

Ogrodni materiali, ki se uporabljajo za izdelavo nanodelcev so:

- Sintezni polimeri

polimlečna kislina (PLA), kopolimeri polimlečne in poliglikolne kisline (PLGA), poliglikolna kislina (PGA), poli- ϵ -kaprolakton (PCL)

- Naravni polimeri

albumin, želatina, alginat, hitosan

- Trdni lipidi

stearinska kislina, cetilpalmitat, trigliceridi (2).

1.2.1. HITOSAN

Hitosan je polikationski polimer, ki ga pridobivajo z delno deacetilacijo hitina. Pri tem poteče delna hidroliza acetamidnih skupin pri visoki temperaturi in v zelo alkalnem mediju.

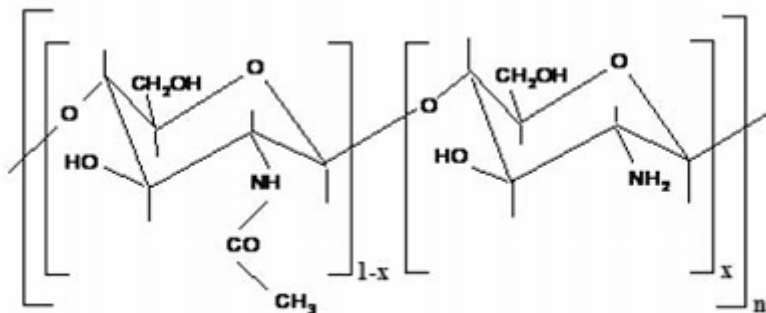
Hitin je sestavljen iz *N*-acetilglukozaminskih enot in je za celulozo drugi najbolj razširjen polimer v naravi (Slika 2). Najdemo ga predvsem v oklepih rakov ter pri nekaterih insektih in glivah. Zaradi njegove slabe topnosti v vodi se v farmaciji pogosteje uporablja hitosan (6).

Hitosan je šibka baza s pK_a 6,5 in molekulska masa med 10 in 1000 kDa (7).

V vodnih raztopinah na topnost vpliva stopnja deacetilacije hitosana. Hitosan s 40 % stopnjo deacetilacije je topen do pH 9, hitosan s 85 % stopnjo deacetilacije pa do pH 6,5 (8).

Stopnja deacetilacije hitosana (1- F_A oz. DD=100-DA), ki je namenjen komercialni uporabi je med 70 % in 90 %, in je definirana z frakcijo oziroma z deležem *N*-acetiliranih glikozidnih enot hitosana (F_A oz. DA) in pH vrednostjo raztopine.

Kemijsko je hitosan kopolimer $\beta(1\rightarrow4)$ povezanih enot glukoamina in *N*-acetilglukoamina (6).



Slika 2: Strukturna formula hitosana (6).

Hitosan ima dobro biološko kompatibilnost, je biorazgradljiv in nizko toksičen polielektrolit, namenjen predvsem za uporabo v medicinskih in farmacevtskih pripravkih ter prehrabeni industriji.

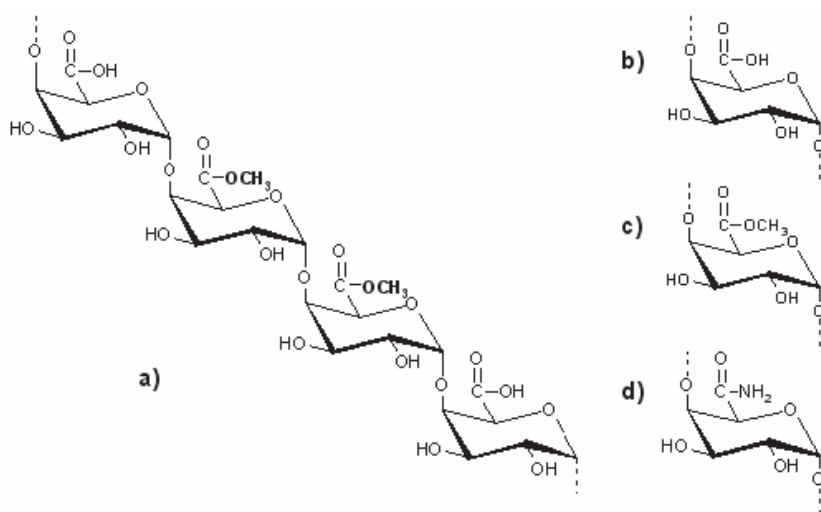
Nizka toksičnost je odvisna od stopnje deacetilacije, molekulske mase, čistote hitosana ter od načina aplikacije.

Molekulska masa, viskoznost in stopnja deacetilacije imajo pomembno vlogo pri nastanku in lastnostih delcev (7, 8). Viskoznost raztopin hitosana narašča z nižanjem temperature, z večanjem koncentracije hitosana in z večanjem stopnje deacetilacije (9).

1.2.2. PEKTIN

Pektin je anionski polisaharid, ki je sestavina celičnih sten večine rastlin. Kljub temu je število njegovih virov, ki se uporabljajo za komercialno uporabo zelo omejeno. Sposobnost pektinov za tvorbo gela je namreč odvisna od molekulske mase pektina in njegove stopnje esterifikacije.

Zaradi sprememb teh dveh parametrov ima pektin iz različnih virov različne sposobnosti geliranja. Zato odkrivanje velikih količin pektina v sadju samo po sebi ni dovolj za uporabo v komercialne namene (10). S pektinom so bogate predvsem lupine citrusov. Pektin vsebuje več kot 65 % poligalakturonske kisline povezane z α -1,4-glikozidnimi vezmi (11). Prisotne je tudi nekaj galakturonske kisline, ramnoze, arabinoze in galaktoze (Slika 3) (12). Molekulska masa pektina je 50-150 kDa. Je topen v vodi, in netopen v alkoholu in drugih organskih topilih. Rastopine pektina so najbolj stabilne pri pH 3-4. V alkalnih pogojih so nestabilne (13).



Slika 3: (a) Ponavljajoč segment pektina in funkcionalne skupine v njegovi verigi (b) karboksilna skupina (c) ester (d) amid (10).

Sposobnost pektina, da tvori gel je odvisna od molekulske mase, pH, prisotnosti sladkorjev, kalcijevih ionov (Ca^{2+}), temperature ter stopnje esterifikacije in amidiranja.

Pektini z manjšo molekulsko maso bolje reagirajo s Ca^{2+} in tvorijo bolj elastične gele, medtem ko pektini z večjo molekulsko maso tvorijo bolj viskozne gele. Z nižanjem pH pa se zmanjša število ioniziranih karboksilnih skupin pektina, kar privede do večje zmožnosti tvorbe gela. Prisotnost sladkorjev zmanjša količino vode za raztapljanje pektina, kar zmanjša možnost nastanka gela (10).

Stopnja esterifikacije (DE) je definirana kot razmerje med esterificiranimi *D*-galakturonskimi skupinami in vsemi *D*-galakturonskimi skupinami in je 60-90 % (10).

- Visoko metoksiliran (HM) pektin

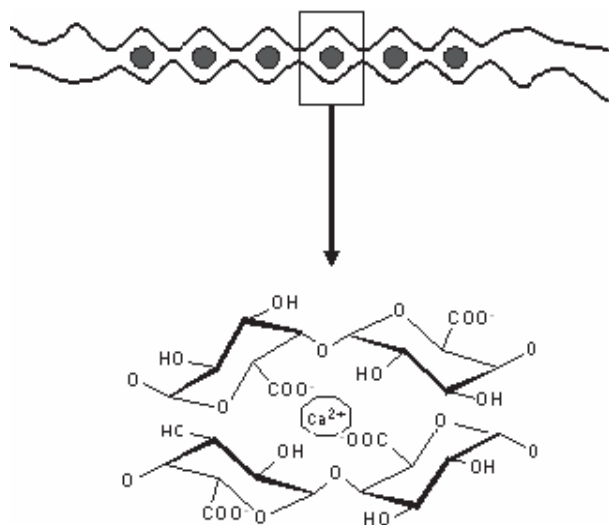
Za komercialno uporabo se uporablja pektin s 60-70 % DE (10). Visoko metoksiliran pektin lahko tvori gel v prisotnosti enostavnega sladkorja. Geliranje je posledica H-vezi in hidrofobnih interakcij (11). Zmožnost tvorbe gela je v ozkem območju pH 3 (10).

- Nizko metoksiliran (LM) pektin

Za komercialno uporabo se uporablja pektin s 20-40 % DE (10).

Nizko metoksiliran pektin tvori gel v prisotnosti dvovalentnih ionov in neodvisno od sladkorne komponente. Za razliko od HM pektina, LM pektini niso občutljivi na spremembo pH (10).

Če reagirajo negativno nabite karboksilne skupine pektina in kalcijevi ioni, nastane dobro poznana struktura »škatle za jajca« (Slika 4). Razlika med HM in LM pektinom je tudi v mehanizmu tvorbe gela s Ca^{2+} , saj je visoko metoksiliran pektin nezmožen premreženja s kalcijem (11).



Slika 4: Geliranje nizko metiliranega pektina s kalcijevimi ioni-Struktura »škatle za jajca« (10).

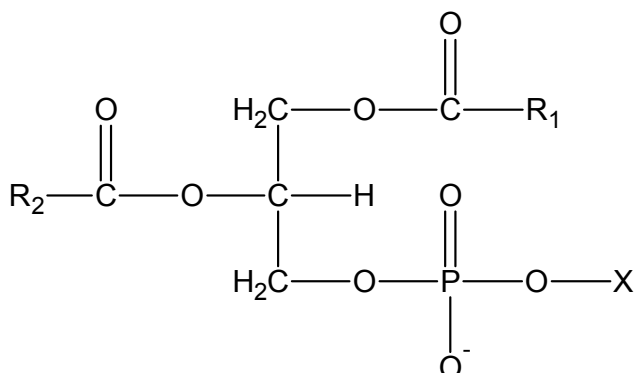
Amidiranje poveča gelske sposobnosti LM pektina. Amidirani pektini potrebujejo manj Ca^{2+} za tvorbo gela, medtem ko se pri visokih koncentracijah Ca^{2+} obarjajo. Racape s sodelavci je prišel do zaključka, da geliranje amidiranih pektinov ni mogoče razložiti s strukturo »škatle za jajca« saj lahko amidne skupine tvorijo tudi vodikove vezi (10).

1.2.3. FOSFOLIPIDI

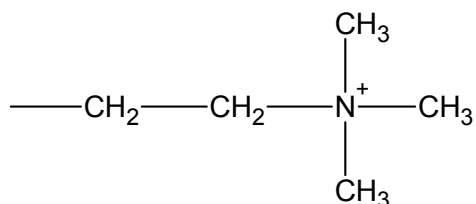
Fosfolipidi so sestavine bioloških membran, ki so skupaj z glikolipidi, holesterolom in beljakovinskimi molekulami poglavitni gradniki celičnih membran. V izdatni količini se fosfolipidi nahajajo v hrani. Ker fosfolipidi vsebujejo veliko količino nenasičenih maščobnih kislin so pomemben vir esencialnih maščobnih kislin (14, 16).

Lecitin sestavlja zmes fosfolipidov rastlinskega izvora (sojin lecitin) ali živalskega izvora (jajčni rumenjaki). Največji del fosfolipidov predstavljata fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin, ki se pogosto uporabljata za pripravo liposomov in micelov (4). Lecitin pa lahko vsebuje tudi druge glicerofosfolipide: fosfatidno kislino, fosfatidilserin in fosfatidilinozitol (14).

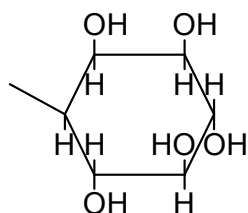
Kemijska struktura (Slika 5) fosfatidilholina in drugih sorodnih glicerofosfolipidov je:



X:



fosfatidilholin



fosfatidilinozitol

Slika 5: Strukturne formule glicerofosfolipidov (14).

R_1 in R_2 predstavljata maščobno kislinski del, ki se spreminja v dolžini verige in stopnji nasičenja. V splošnem velja, da na mestu R_1 prevladujejo nasičene (npr. palmitinska kislina), na mestu R_2 pa nenasičene (npr. oleinska kislina) maščobne kisline (14, 15).

Lecitin za komercialno uporabo je rjave do rumene barve, tekoča oziroma poltekoča snov, mastna na otip. Njegova konsistenca je odvisna od vsebnosti trigliceridov, prostih maščobnih kislin in vlage. Lahko ima specifičen vonj ali pa je brez vonja. Njegova relativna gostota je od 1,03-1,05. Pri fiziološkem pH je v obliki iona dvojčka. V raztopinah in vodnih disperzij ima pH 6,6. Izoelektrično točko ima pri pH 3,5 (14).

Lecitini se v farmacevtski industriji uporabljajo predvsem kot emulgatorji in stabilizatorji. Zasedimo jih lahko v obliki intravenskih in intramuskularnih injekcij, v pripravkih za parenteralno prehrano in v pripravkih za zunanjo uporabo (kreme in mazila) (14).

1.3. PROTEINI

Zaradi hitrega napredka rekombinantne tehnologije iščejo raziskovalci vedno več proteinov, ki bi bili uporabni za vgradnjo v peroralne farmacevtske oblike. Proteini se zaradi slabe biološke uporabnosti namreč uporabljajo le v parenteralnih farmacevtskih oblikah. V takšni obliki, bolniku otežujejo samostojno uporabo zdravila (večkratno odmerjanje) in povečajo stroške zdravljenja. V zadnjem času, zato prav nanodelci zbudajo največje zanimanje pri oblikovanju proteinov v peroralne farmacevtske oblike. Zavedati pa se moramo, da imajo proteini različne lastnosti in vsak posamezno zahteva določeno pot pri načrtovanju kakovostne, varne in učinkovite farmacevtske oblike (17).

1.3.1. STRUKTURA PROTEINOV

Proteini so makromolekule sestavljene iz več kot 100 aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidno vezjo. Zgradba proteinov:

- Primarna struktura

Primarno zgradbo proteinov določa aminokislinsko zaporedje. Med seboj so aminokislinske povezane s kovalentnimi vezmi ali peptidnimi vezmi.

- Sekundarna in terciarna struktura

Sekundarna struktura vsebuje elemente kot sta α -vijačnica in β -struktura. Elementi teh struktur se med seboj povezujejo in se na koncu zvijejo v terciarno strukturo. Za tvorbo stabilne terciarne strukture so pomembne nekovalentne vezi.

- Kvartarna struktura

Za kvartarno zgradbo je značilno povezovanje dveh ali več polipeptidnih verig v protein (16).

1.3.2. LASTNOSTI PROTEINOV

Pri fiziološkem pH (7,4) so proteini v obliki ionov dvojčkov, kar pomeni, da so istočasno pozitivno in negativno nabiti.

Pomembna lastnost proteinov je njihova molekulska masa, ki jo izračunamo iz molekulskih mas posameznih aminokislinskih ostankov. Vsak protein ima zaradi določenega zaporedja aminokislinskih ostankov značilno velikost, obliko in biološko aktivnost. Razvrščamo jih (16):

Glede na to, ali imajo v strukturi neproteinske komponente:

- Enostavne proteine, ki so sestavljeni samo iz aminokislinskih ostankov
- Konjugirane proteine, ki imajo v svoji strukturi dodatno komponento, imenovano prostetična skupina

Glede na njihovo biološko vlogo:

- Encime (npr. tripsin)
- Strukturne proteine (npr. kolageni)
- Obrambne proteine (npr. protitelesa)
- Transportne in skladiščne proteine (npr. hemoglobin)
- Regulatorne proteine (npr. tropomiozin)
- Receptorske proteine (npr. inzulin)
- Gibalne proteine in proteine, ki omogočajo krčenje mišic (npr. aktin in miozin)

1.3.3. TOPNOST PROTEINOV

Proteini so lahko v vodi topni ali skoraj netopni. Njihova slaba topnost omejuje njihovo uporabo. Na topnost proteinov vplivamo z izbiro ustreznega topila v katerem protein raztapljamo (15, 16).

1.3.4. NESTABILNOST PROTEINOV

Nestabilnost proteinov lahko razdelimo na kemijsko in fizikalno.

Kemijska nestabilnost so reakcije, ki spremenijo primarno strukturo proteina (npr. proteoliza in oksidacija).

Fizikalna nestabilnost proteinov pa so procesi, ki spremenijo konformacijo proteina v sekundarni, terciarni in kvartarni strukturi (npr. adsorpcija proteinov na površine in agregacija) (15, 16).

1.3.5. PROTEIN OVALBUMIN

Lastnosti ovalbumina

Ovalbumin je glavni protein jajčnega beljaka in je eden prvih proteinov izoliranih v čisti obliki. Predstavlja 60-65 % celotnega jajčnega beljaka. Zaradi njegove dostopnosti se v raziskavah uporablja za preučevanje strukture in lastnosti proteinov (18). V zadnjem času se uporablja v imunologiji za stimulacijo alergijskih reakcij pri testnih osebkih. Uporablja se tudi v proteomiki kot marker za kalibracijo elektroforeznih gelov. V medicini se uporablja v primeru zastrupitev s težkimi kovinami, na primer z železom, kjer je sposoben kelirati ione znotraj sulfhidrilnih vezi. Keliranje onemogoči absorpcijo kovin v gastrointestinalnem traktu in prepreči zastrupitev (19).

Ovalbumin je glikoprotein z relativno molekulsko maso 45000 Da. Sestavlja ga 386 aminokislin, kamor je vključenih tudi 6 cisteinov z eno samo disulfidno vezjo na mestu cistein 74 in cistein 121. Spada v družino serpinov. Le-ta vsebuje okrog 300 proteinov s podobno sestavo, vendar drugačno funkcijo. Vendar pa ovalbumin, prav tako kot globulini ali angiotenzinogen, ne inhibira serinske proteaze, tako kot to počnejo ostali serpini kot so encimi koagulacije, fibrinolize, komplemента (18).

Topnost ovalbumina

Na topnost ovalbumina vpliva aminokislinska struktura proteina, konfiguracija proteina (denaturiran ali v nativnem stanju) in lastnosti medija v katerem ga raztapljamo (pH, temperatura, tlak, vrsta in koncentracija soli in koncentracija proteina). Minimalna topnost ovalbumina je pri izoelektrični točki (pI), ki je 4,6. Interakcije med molekulami proteina v izoelektrični točki narastejo, ker so elektrostatske sile med molekulami proteina in molekulami vode najšibkejše. Zmanjša se število vodnih molekul, ki reagirajo z molekulami proteina, to vodi do nastanka idealnih pogojev za agregacijo in precipitacijo molekul proteina (20).

1.4. POLIELEKTROLITSKI KOMPLEKSI

Polielektrolitski kompleksi se preučujejo kot dostavni sistemi za zdravilne učinkovine, proteine, peptide, DNA. Največ raziskav je narejenih na polielektrolitskih kompleksih iz hitosana in naravnih polimerov (alginat, karagen, hialuronska kislina, ...).

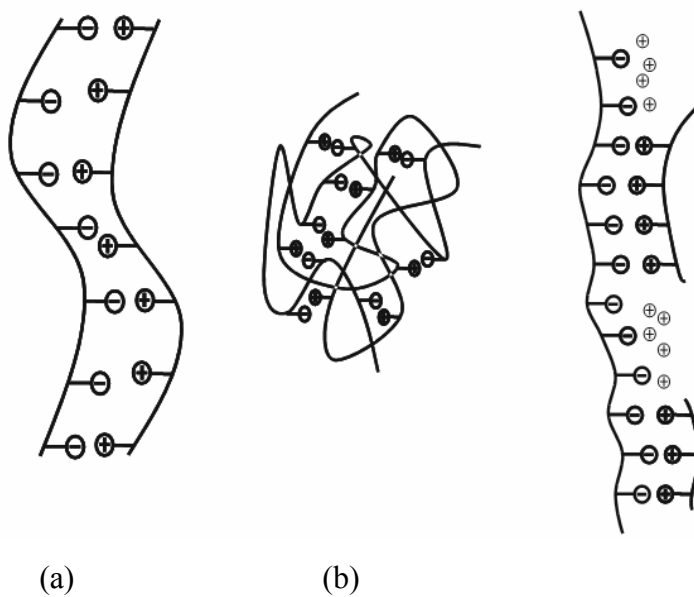
Pomembno je, da polielektrolitske komplekse proučujemo v njihovem fiziološkem okolju, saj se lahko le tako oceni njihova primernost za uporabo v farmaciji (21).

Polielektrolitski kompleksi nastanejo s spontanim združevanjem polianionov in polikationov, pri čemer pride do tvorbe intermolekularne vezi (ionska vez, H-vez, van der Waalsova vez) (22).

Na nastanek in stabilnost teh polielektrolitskih kompleksov lahko vplivamo s spreminjanjem lastnosti posameznih polielektrolitov (stopnja ionizacije posameznega polielektrolita, porazdelitev naboja, koncentracija polielektrolitov, razmerje polielektrolitov, ionska moč in pH disperznega medija) (22).

Glede na strukturne značilnosti začetnih polielektrolitov poznamo dve vrsti polielektrolitskih kompleksov: stehiometrične in nestehiometrične.

- Če gre za šibke polielektrolite, ki se zelo razlikujejo v molekularni masi in so združeni v nestehiometričnem razmerju, nastane polielektrolitski kompleks, ki ga sestavljajo dolge verige osnovnih polianionov, kompleksirane s krajšo verigo polikationov z nasprotnim nabojem (Slika 6). Takšne strukture so večinoma vodotopne (23).
- Pri močnih polielektrolitih, ki imajo podobno molekularno maso in so združeni v stehiometričnem razmerju, lahko nastaneta 2 vrsti polielektrolitskih kompleksov: model »lestve« in model »umešanega jajca«. Pri modelu lestve gre zgolj za konformacijsko prilagajanje polimerov, pri modelu »umešanega jajca« pa se v kompleks povezuje več polimernih verig. Takšne strukture so ponavadi netopne ali pa se med procesom izdelave oborijo (Slika 6) (23).



Slika 6: PEK v stehiometričnem razmerju (a) model »lestve« (b) model »umešanega jajca« v primerjavi s PEK v nestehiometričnem razmerju (23).

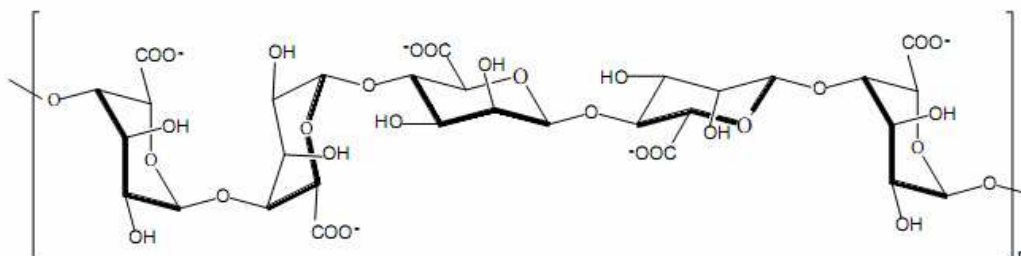
1.4.1. POLIELEKTROLITSKI NANOKOMPLEKSI IZ ALGINATA IN HITOSANA

Polielektrolitski kompleksi iz alginata in hitosana so najboljše proučevani dostavni sistemi. Komplex, ki nastane med tema dvema polimeroma je biorazgradljiv, biokompatibilen ter mehansko odpornejši, od ostalih polielektrolitskih kompleksov, na nižje vrednosti pH v katerem se hitosan raztoplja (7).

Študija biorazgradljivosti polielektrolitskega kompleksa iz hitosana in alginata je pokazala, da se sam hitosan (z nizko stopnjo deacetilacije) učinkovito razgradi z lizocimi, učinek teh encimov na polielektrolitski kompleks pa je zanemarljivo majhen. Encimska razgradnja polielektrolitskega kompleksa iz alginata in hitosana je ovirana zaradi močnih interakcij med njunima polimernima verigama (21).

V nastale polielektrolitske komplekse so že vgrajevali različne peptide, proteine in polinukleotide. Namen vgrajevanja teh snovi je, da obdržijo svojo strukturo in aktivnost ter njihova zaščita pred encimsko razgradnjo (24).

Alginat je naraven, anionski polisaharid sestavljen iz monomernih enot 1,4- α -D-manuronske kisline in α -L-guluronske kisline (Slika 7). Največ se uporablja v prehrambeni in farmacevtski industriji kot stabilizator, gelirno sredstvo in zgoščevalec (25).



Slika 7: Strukturna formula alginata (25).

Reakcija med pozitivno nabitim hitosanom in negativno nabitim alginatom vodi do nastanka polielektrolitskega kompleksa.

Takšen PEK lahko nastane na 2 načina:

- Enostopenjski proces, za katerega je značilno počasno kapljanje raztopine enega polimera (hitosan) v raztopino drugega polimera (alginat).
- Dvostopenjski proces, kjer najprej izdelamo pregel kalcijevega alginata. Pregel izdelamo tako, da vodni raztopini alginata počasi dodajamo Ca^{2+} . Zaradi povečevanja koncentracije Ca^{2+} nastanejo med alginatom in Ca^{2+} ionske interakcije in tvori se alginatni gel. Po dodatku raztopine pozitivno nabitega polimera (hitosan) se okrog alginatnega jedra tvori hitosanska membrana in nastanejo nanodelci (21).

Na sam nastanek in stabilnost polielektrolitskega kompleksa, vplivajo predvsem sestava uporabljenega alginata ter molekulska masa in stopnja deacetilacije hitosana. Negativno nabite karboksilne skupine manuronskih in guluronskih enot alginata tvorijo elektrostatske vezi z pozitivno nabitimi amino skupinami hitosana (25). Tako nastali kompleks ščiti vgrajeno učinkovino in omejuje sproščanje učinkovine bolj učinkovito kot pa hitosan oz. alginat sam. Pomembna lastnost takšnega sistema je tudi njegova netoksičnost, ki omogoča vgrajevanje različnih učinkovin (24).

1.4.2. POLIELEKTROLITSKI NANOKOMPLEKSI IZ PEKTINA IN HITOSANA

Če pektin stopa v interakcijo s polimerom nasprotnega naboja (npr. hitosanom), nastane polielektrolitski kompleks, saj pride do ionskih interakcij med pozitivno nabitimi skupinami hitosana in negativno nabitimi skupinami pektina (26). Za nastanek polielektrolitskega kompleksa mora biti pH medija med 3 in 6. Če je pH nižji (pod 2), pride do protonacije pektina in onemogočenih elektrostatskih interakcij, zato bo po vsej verjetnosti prišlo do interakcije preko H-vezi (11).

Podatkov o nanodelcih iz hitosana in pektina je zelo malo. Znana je raziskava, kjer so naredili PEK med hitosanom in pektinom pri različnem pH in različni molarni koncentraciji, vendar z enako ionsko močjo. Rezultati so potrdili tvorbo PEK med pektinom in hitosanom pri pH vrednostih v bližini njune pK_a vrednosti. pK_a hitosana je 6,3 zato je v območju pH 2-5 večina amino skupin hitosana protonirana. V nasprotju s tem, pa se je stopnja ionizacije pektina (pK_a 4) zmanjševala, z zmanjševanjem pH vrednosti medija. Pri nizkem pH so zato potrebne večje količine pektina, ki reagirajo z molekulami hitosana (26).

1.4.3. POLIELEKTROLITSKI NANOKOMPLEKSI IZ LECITINA IN HITOSANA

O nanodelcih iz lecitina in hitosana je bilo objavljenih zelo malo študij. Z različnimi metodami so preučevali velikost in površinski naboj nanodelcev z namenom vgradnje zdravilnih učinkovin. Ugotovili so, da na nastanek nanokompleksov iz lecitina in hitosana vpliva predvsem količina in pH hitosana (27). Hitosan je v kislem mediju pozitivno nabit, kar mu omogoča, da stopa v interakcijo z negativno nabitimi skupinami lecitina. Posledica je nastanek nanodelcev (4).

Morfologija nanodelcev

Nanodelce iz lecitina in hitosana so analizirali s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (angl. *Transmission electron microscopy, TEM*), ki omogoča celovit vpogled v strukturo preiskovanega materiala in z mikroskopijo na atomsko silo (angl. *Atomic force microscopy, AFM*), katera določa površinsko strukturo vzorca.

Sonvico s sodelavci je v vzorcih z razmerjem lecitin:hitosan = 20:1 s transmisijsko elektronsko mikroskopijo potrdil nastanek delcev velikosti 200-300 nm, z mikroskopom na

atomsko silo pa je potrdil velikost in obliko delcev. V primeru vzorcev brez dodanega hitosana so bili delci manjši in bolj ploščate oblike (27).

Gerelli Y. s sodelavci je strukturo nanodelcev preiskal še podrobneje z naslednjimi metodami (4):

- transmisijska elektronska mikroskopija s tehniko zamrzovanja (angl. *Cryo-Transmission electron microscopy, cryo-TEM*)
- statično sipanje laserske svetlobe (angl. *Static light scattering, SLS*)
- ozkokotno sipanje nevtronov (angl. *Small angle scattering of neutrons, SANS*)
ozkotno sipanje rentgenske svetlobe (angl. *X-ray, SAXS*)

Velikost in površinski naboj nanodelcev

Velikost in površinski naboj nanodelcev so analizirali z uporabo dinamičnega sipanja svetlobe (angl. *Dynamic light scattering, DLS*) ali fotonsko korelacijsko spektroskopijo (angl. *Photon Correlation Spectroscopy, PCS*) s pomočjo katere lahko merimo velikost delcev v območju od 1-1000 nm.

Sonvico F. je s sodelavci raziskoval vgradnjo lipofilne učinkovine v nanodelce iz lecitina in hitosana. Namen njihovega dela je bil proučiti procesne parametre, ki vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev in na njihovo strukturo. Preučevali so vpliv različnih molekulskih mas hitosana, različne viskoznosti raztopin hitosana in pH končne disperzije.

V vodno raztopino hitosana ($c = 0,025$ mg/ml do $0,4$ mg/ml) so injicirali alkoholno raztopino lecitina ($c = 25$ mg/ml). Nastali so nanodelci s premerom 70 nm z negativnim površinskim nabojem ($ZP = -52$ mV). Hitrost in način mešanja nista imela vpliva na nastanek nanodelcev. Vpliv na velikost delcev je imela različna koncentracija raztopine dodanega hitosana in njegova viskoznost.

V primeru masnega razmerja lecitin:hitosan = 5:1 oz. 20:1 so imeli delci pozitiven površinski naboj ($ZP = 40$ mV), velikost delcev je bila manjša od 280 nm in PI manjši od $0,2$. Z večanjem razmerja lecitin:hitosan (40:1) so se v koloidni disperziji pojavili vidni agregati.

Pri zadostni količini hitosana je površinski naboj pozitiven, majhne količine hitosana pa še ne zadostujejo za nevtraliziranje negativnega naboja fosfolipida.

Pri izdelavi nanodelcev iz čistega fosfatidilholina (ion dvojček), ki je glavna sestavina lecitina iz soje, ne pride do nastanka nanodelcev (27).

Vgrajevanje učinkovin v nanodelce

Novejši dostavni sistemi za vnos učinkovin v telo imajo prednosti, kot so: zaščita učinkovine v fizioloških pogojih, nadzorovano sproščanje učinkovine, zmanjšanje neželenih učinkov pri bolnikih, manjše število odmerkov samega zdravila. Pomembnejši dostavni sistemi postajajo nanodelci, v katerih je učinkovina lahko vključena v nosilni material, npr. polimer ali lipid. Primer takšnih nanodelcev so nanodelci iz lecitina in hitosana, v katere so že vgradili: progesteron, klobetazol-17-propionat, melatonin.

- **Progesteron**

Progesteron je lipofilna učinkovina, ki se uporablja v terapijah za zdravljenje raka. Za vgradnjo v nanodelce je bil izbran zaradi svoje nizke topnosti v vodi in slabe biološke uporabnosti. Učinkovitost vgrajevanja progesterona v nanodelce je bila 60 %, vsebnost progesterona v nanodelcih pa 3,5 % (27).

- **Klobetazol-17-propionat**

Klobetazol-17-propionat je kortikosteroid za lokalno uporabo. V uporabi je v obliki kreme, gela, raztopine, mazila in pene. Ima veliko stranskih učinkov.

Učinkovitost vgrajevanja v nanodelce (92 %) in vsebnost učinkovine (11 %) je bila precej večja kot v prejšnjih študijah, ki sta jih izvedla Sonvico ali Gerelli. Nanodelci so bili namreč narejeni z dodatkom izopropilmiristata. Klobetazol-17-propionat se je zaradi svoje lipofilne strukture vgradil v lipidni del nanodelca (28).

- **Melatonin**

Zelo zanimivo raziskavo je naredila Hafner s sodelavci. Pripravili so nanodelce iz lecitina in hitosana kot mukoadheziven nanosistem za transmukozno dostavo melatonina. Najprej so poiskali najbolj primeren fosfolipid (z najbolj negativnim nabojem) in primerno koncentracijo hitosana. Zanimali so jih predvsem koloidni nosilci z melatoninom z zadovoljivo učinkovitostjo vgrajevanja melatonina in obetajočimi mukoadhezivnimi lastnostmi. Raziskava je pokazala naraščanje velikosti delcev in ZP z naraščanjem vsebnosti hitosana in s povečevanjem negativnega naboja fosfolipida. Delci so izkazovali dobre bioadhezivne lastnosti. Učinkovitost vgrajevanja melatonina v nanodelce je bila od 26 % do 38 %, vsebnost melatonina v nanodelcih pa je bila od 4,9 % do 7,1 %, kar je primerljivo z ostalimi učinkovinami vgrajenimi v nanodelce iz lecitina in hitosana (9).

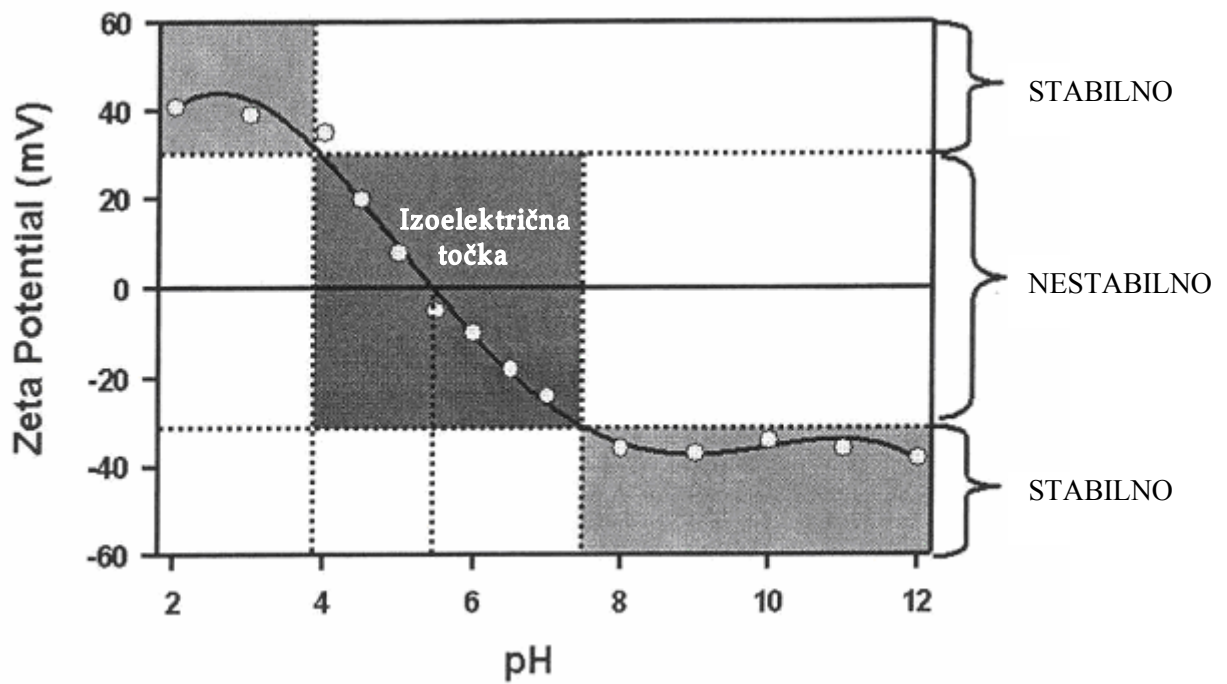
1.5. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITSKIH KOMPLEKSOV

1.5.1. VELIKOST DELCEV

Dinamično sipanje svetlobe (DLS) ali fotonska korelacijska spektroskopija je tehnika merjenja velikosti delcev v submikronskem območju. S pomočjo naprave Zetasizer izmerimo velikost delcev na podlagi Brownovega gibanja. Pri tem gre za naključno gibanje delcev, ki je posledica trkov z molekulami topila. Večji so delci, počasnejše je Brownovo gibanje. Razmerje med velikostjo delca in njegovo hitrostjo, kot posledico Brownovega gibanja, je podano v Stokes-Einsteinovi enačbi. Pri tem mora biti zagotovljena stabilnost temperature, saj pride v nasprotnem primeru do nenaključnega gibanja (29).

1.5.2. ZETA POTENCIAL

Elektrokinetični potencial ali zeta potencial (ZP) je razlika v potencialih med mejno plastjo in notranjostjo raztopine. Izražamo ga v mV. Vrednost zeta potenciala je zelo odvisna od narave trdne snovi, vrste medija, prevodnosti, koncentracije in vrste prisotnih ionov ter pH. Zeta potencial je pozitiven pri nizkem pH in negativen ali nižji pri visokem pH. pH, kjer je zeta potencial nič, se imenuje izoelektrična točka. V tej točki je koloidni sistem najmanj fizikalno stabilen. V primeru, da imajo vsi delci v disperziji močan pozitiven ali negativen zeta potencial potem se ti delci med seboj močno odbijajo in ni možnosti, da bi prišlo do flokulacije delcev. Če pa je zeta potencial zelo nizek, se delci med seboj ne odbijajo in v tem primeru pride do flokulacije. Disperzije, katerih delci, imajo zeta potencial večji od +30 mV ali manjši od -30 mV so ponavadi fizikalno stabilne (Slika 8) (30).



Slika 8: Prikaz odvisnosti zeta potenciala od pH (30).

1.5.3. POLIDISPERZNI INDEKS

Polidisperzni indeks (PI) je število brez enot, ki označuje interval porazdelitve velikosti delcev in ima vrednost med 0 in 1, pri čemer je 0 monodisperzen sistem (3).

2. NAMEN DELA

Cilj našega eksperimentalnega dela je izdelati nanodelce iz pektina in hitosana ter nanodelce iz lecitina in hitosana, z metodo spontanega združevanja polimerov oziroma polimerov in lipidov. Tekom diplomske naloge bomo iskali pogoje, ki so odločilni za nastanek delcev nanometrskih velikosti.

Preučevali bomo vpliv različnih parametrov na fizikalne lastnosti nanodelce:

- koncentracija hitosana
- razmerje med pektinom in hitosanom oz. lecitinom in hitosanom
- vrsta lecitina
- pH
- način in čas mešanja
- vgrajevanje ovalbumina v različnih koncentracijah

Izdelanim nanodelcem bomo določili velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial. V nanodelce z najboljšimi lastnostmi bomo vgrajevali modelni protein ovalbumin in jim poleg zgoraj navedenih parametrov določili tudi učinkovitost vgrajevanja in vsebnost ovalbumina. Spremljali bomo tudi hitrost sproščanja ovalbumina iz nanodelcev.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. MATERIALI

- hitosan (nizko-viskozni, 96 % stopnja deacetilacije), Fluka, Švica
- pektin (GENU LH101ASZ), Kelco BioPolymers, Atlanta, ZDA
- Phospholipon 80, Rhône-Poulenc, Nattermann Phospholipid GmbH, Nemčija
- Phospholipon 50, Lipoid, Nemčija
- Lipoid S 100, Lipoid, Nemčija
- Ovalbumin Grade II, albumin iz jajčnega beljaka (Sigma-Aldrich, USA)
- CaCl₂, Merck, Nemčija
- očetna kislina (100 %, brezvodna), Merck, Nemčija
- 37 % klorovodikova kislina, Merck, Nemčija
- natrijev klorid, Merck, Nemčija
- dinatrijev hidrogen fosfat , Merck, Nemčija
- kalijev klorid, Merck, Nemčija
- KH₂PO₄, Merck, Nemčija
- natrijev hidroksid, Merck, Nemčija
- 96 % etanol, Merck; Nemčija

3.2. NAPRAVE

- analizna tehtnica AG245, Mettler Toledo, Švica
- analizna tehtnica XS 205, Mettler Toledo, Švica
- magnetno mešalo RET, IKA, Nemčija
- magnetno mešalo RCT, IKA, Nemčija
- magnetno mešalo RO 15, IKA, Nemčija
- pH meter Seven Multi, Mettler Toledo, Švica
- ultrazvočna kad SONIS4 PIO, Iskra, Slovenija
- naprava za merjenje velikosti in zeta potenciala delcev, Zetasizer Nano-ZS, Malvern, Velika Britanija

- ultracentrifuga SIGMA 3K30, Nemčija
- centrifuga CENTRIC 322A, Tehnica, Slovenija
- HPLC instrument (Agilent 1100 Series) s kolono Zorbax GF-250 (4 μm ; 9,4 x 250 mm), ZDA
- homogenizator Ultra-Turrax T25, IKA, Nemčija
- pipeta ELINE 1000, Biohit, Finska
- filtri: Minisart, hidrofilni (0,2 μm), Sartorius, Nemčija
Minisart RC25, RC-membrana (0,45 μm), Sartorius, Nemčija
Millipore, Isopore membranski filter (0,1 μm), Millipore, Irska

3.3. METODE

3.3.1. IZDELAVA NANODELCEV

3.3.1.1. Nanodelci iz pektina in hitosana

Priprava raztopin pektina, kalcijevega klorida in hitosana

Raztopini kalcijevega klorida in pektina smo pripravili z raztapljanjem snovi v bidestilirani vodi. Raztopino hitosana smo pripravili tako, da smo hitosan raztopili v 1 % očetni kislini. pH raztopin pektina (pH 4,2) in hitosana (pH 3,9) smo uravnavali z 1 M HCl ali 1 M NaOH.

Izdelava nanodelcev iz pektina in hitosana

Disperzije nanodelcev smo pripravili tako, da smo v 16,5 ml 0,06 % (m/V) raztopine pektina s pH 4,2 (m (pektina) = 0,01 g) med mešanjem z magnetnim mešalom injicirali 1,05 ml raztopine CaCl_2 s koncentracijo 0,8495 mmol/l (m (CaCl_2) = 0,0001). Razmerje Ca^{2+} : pektin je bilo 1 : 100. Nastali pregel smo mešali še 10 min, nato pa smo vanj injicirali 3,55 ml raztopine hitosana različnih koncentracij (0,279 %; 0,139 %; 0,116 %; 0,107 %; 0,099 %; 0,093 %; 0,069 %; 0,046 % in 0,035 %) s pH 3,9 ter mešali še pol ure.

Vpliv razmerja pektin : hitosan na nastanek nanodelcev

Pripravili smo disperzije nanodelcev z različnimi razmerji pektin : hitosan (1 : 0,13; 1 : 0,17; 1 : 0,25; 1 : 0,33; 1 : 0,36; 1 : 0,38; 1 : 0,42; 1 : 0,5 in 1 : 1). Vzorce smo

centrifugirali 30 min pri 3500 obratih/min, da smo odstranili vidne agregate, nato pa smo v supernatantu določali velikost in zeta potencial delcev.

Izdelava nanodelcev iz pektina in hitosana z ovalbuminom

Nanodelce iz pektina in hitosana z ovalbuminom smo pripravili tako, da smo različne količine ovalbumina raztopili v 16,5 ml 0,06 % (m/V) raztopine pektina. Raztopino smo nato filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 μm . Nato smo v raztopino med mešanjem z magnetnim mešalom injicirali 1,05 ml raztopine CaCl_2 ($c = 0,8495 \text{ mmol/l}$). Nastali pregel smo mešali še 10 min, nato pa smo vanj injicirali 3,55 ml raztopine hitosana različnih koncentracij (0,279 %; 0,139 %; 0,116 %; 0,107 %; 0,099 %; 0,093 %; 0,069 %; 0,046 % in 0,035 %) s pH 3,9 ter mešali še pol ure.

Preverili smo tudi vpliv načina dodajanja ovalbumina med samim tehnološkim postopkom. V prvem primeru smo ovalbumin raztopili v raztopini pektina, v drugem primeru pa smo ga predhodno raztopili v fosfatnem pufru (pH 7) in ga nato po kapljicah dodajali 16,5 ml 0,06 % (m/V) raztopini pektina. V nadaljevanju smo postopali enako kot pri zgornjem postopku.

Vpliv količine dodanega ovalbumina na lastnosti delcev

V 0,06 % (m/V) raztopini pektina smo raztopili ovalbumin do končne koncentracije 0,1; 0,5; 1; 2 in 4 mg/ml. Nastalo raztopino smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 μm . V 16,5 ml te raztopine smo injicirali 1,05 ml raztopine CaCl_2 ($c = 0,8495 \text{ mmol/l}$) ter pustili mešati na magnetnem mešalu 10 min. Nato smo v raztopino injicirali 3,55 ml raztopine hitosana s koncentracijo 0,6918 mg/ml ($m(\text{hitosana}) = 0,0025 \text{ g}$) ter pustili mešati še naslednjih 30 min. Razmerje med pektinom in hitosanom je bilo v tem primeru 1:0,25. Vzorce smo centrifugirali 30 min pri 3500 obratih/min, da smo odstranili vidne agregate, nato pa smo v supernatantu določali velikost in zeta potencial delcev.

Tudi v tem primeru smo preverili vpliv načina dodajanja ovalbumina med samim tehnološkim postopkom. V prvem primeru smo ovalbumin raztopili v raztopini pektina, v drugem primeru pa smo najprej pripravili raztopino ovalbumina v fosfatnem pufru (pH 7) s koncentracijo 1,41 mg/ml. 3,55 ml te raztopine smo po kapljicah dodajali 16,5 ml 0,06 % (m/V) raztopini pektina. V nadaljevanju smo postopali enako kot pri zgornjem postopku.

3.3.1.2. Nanodelci iz lecitina in hitosana

Priprava raztopin lecitina in hitosana

Raztopine lecitina s koncentracijo 25 mg/ml smo pripravili z raztapljanjem lecitinov Lipoid S100, Phospholipon 80 in Phospholipon 50 v etanolu.

Priprava raztopin hitosana:

- a) raztopino hitosana v 0,275 M HCl ($c = 10 \text{ mg/ml}$) smo redčili s prečiščeno vodo do koncentracije 0,1 mg/ml
- b) raztopino hitosana v 3 % raztopini oetne kisline ($c = 1 \text{ mg/ml}$) smo redčili s prečiščeno vodo do koncentracije 0,1 mg/ml
- c) raztopina hitosana v 3 % raztopini oetne kisline ($c = 1 \text{ mg/ml}$)

Izdelava nanodelcev iz lecitina in hitosana

4 ml etanolne raztopine lecitina (Lipoid S100, Phospholipon 80, Phospholipon 50) s koncentracijo 25 mg/ml ($m = 100 \text{ mg}$ lecitina) smo injicirali skozi injekcijsko brizgo v 46 ml raztopine hitosana ($m = 4,6 \text{ mg}$ (a, b) oz. $m = 46 \text{ mg}$ (c) hitosana) med mešanjem z Ultraturraxom (IKA, Nemčija), tako da smo na koncu dobili razmerje lecitin : hitosan cca. 20:1 (m/m) (a, b) oz. 2:1 (m/m) (c).

Za primerjavo smo izdelali še koloidne disperzije lecitina in sicer z injiciranjem alkoholne raztopine lecitina v raztopino HCl oz. raztopino oetne kisline (brez hitosana).

Izdelava nanodelcev iz lecitina in hitosana z ovalbuminom

V primeru, da smo v nanodelce vgrajevali ovalbumin, smo le tega dodali v raztopino hitosana. Ko se je ovalbumin raztopil, smo raztopino prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,2 μm . Takšno raztopino smo nato uporabili za izdelavo nanodelcev po zgornjem postopku. Disperzije smo centrifugirali 30 min pri 3500 obratih/min, da smo odstranili vidne agregate, nato pa smo v supernatantu določali velikost in zeta potencial delcev.

Vpliv količine dodanega ovalbumina na lastnosti delcev

V raztopini hitosana ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) (a) smo raztopili ovalbumin, tako da smo dobili koncentracije 0,1; 0,5; 1; 2 in 4 mg/ml. Nastale raztopine smo prefiltrirali skozi filter 0,2

μm in jih uporabili pri izdelavi nanodelcev po zgornjem postopku. Disperzije smo centrifugirali 30 min pri 3500 obratih/min, da smo odstranili vidne agregate, nato pa smo v supernatantu določali velikost in zeta potencial delcev.

Za primerjavo smo izdelali še koloidne disperzije lecitina in sicer z injiciranjem alkoholne raztopine lecitina v raztopino ovalbumina, nakisano s HCl (vzorci brez hitosana).

Vpliv pH raztopine hitosana na lastnosti delcev

Pri izdelavi nanodelcev po zgornjem postopku smo ovalbumin raztapljali v raztopinah hitosana ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) (a), ki smo jim z 1 M HCl ali 1 M NaOH uravnavali pH na: 2,7; 3; 4; 5 in 6. Disperzije nanodelcev smo centrifugirali 30 min pri 3500 obratih/min, da smo odstranili vidne agregate, nato pa smo v supernatantu določali velikost in zeta potencial delcev.

3.3.2. FIZIKALNO VREDNOTENJE NANODELCEV

Povprečni premer in polidisperzni indeks (PI) nanodelcev smo ocenili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) z napravo Zetasizer Nano ZS. Polidisperzni indeks nam pove porazdelitev velikosti nanodelcev. Vrednosti PI blizu 0 kažejo na monodisperznost vzorca, kar pomeni, da so delci v disperziji zelo podobnih velikosti. Če pa je PI večji in se približuje 1, pomeni, da je vzorec polidisperzen.

Pogoji meritev:

- Temperatura: 25 °C
- Viskoznost disperznega medija: 0,8872 mPas (voda)
- Lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330 (voda)
- λ laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«): 633 nm
- Kot merjenja: 173°
- Celica: DTS0012, kiveta
- Število meritev: 1 - 3

Zeta potencial nanodelcev v disperziji smo ocenili z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze.

Pogoji meritev:

- Temperatura: 25 °C
- Viskoznost disperznega medija: 0,8872 mPas (voda)
- Lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330 (voda)
- Dielektrična konstanta disperznega medija: 78,5 (voda)
- Model: Smoluchowski; F(Ka) vrednost: 1,5
- Celica: DTS1060C, kapilarna celica
- Število ponovitev: 3

3.3.3 DOLOČANJE TOPNOSTI OVALBUMINA V RAZLIČNIH TOPILIH IN HPLC ANALITIKA OVALBUMINA

Topnost ovalbumina v različnih topilih

Topnost ovalbumina smo določali v etanolu in vodnih raztopinah različnih pH vrednosti (2, 3, 4, 5 in 6). V 10 ml medija smo dodali 40 mg ovalbumina ter na magnetnem mešalu mešali 24 ur. Nato smo vzorce prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µm ter vzorce pomerili s HPLC.

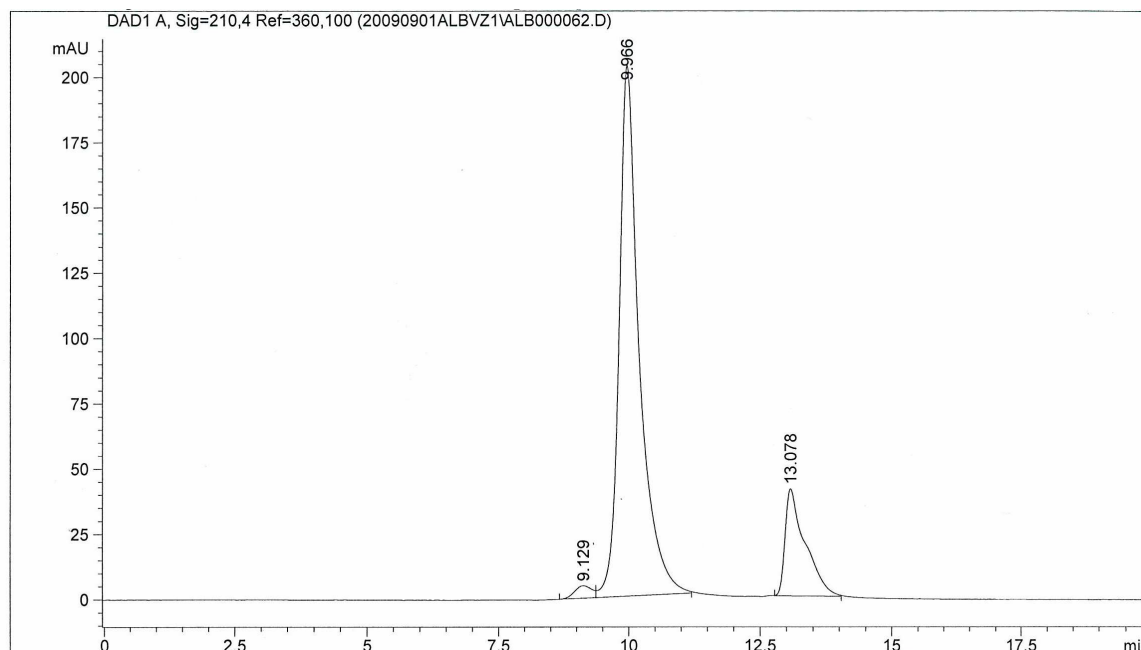
HPLC analitika

Koncentracijo ovalbumina v vzorcih smo izmerili s HPLC metodo. Za zaščito kolone pred morebitnimi agregati v vzorcih smo uporabili predkolono. Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo v 1L bidestilirane vode dodali 7,6 g NaCl in 2,84 g Na₂HPO₄, nato pa s fosforjevo kislino uravnali pH na 7,0.

Parametri meritve s HPLC:

- kolona: Agilent Zorbax Bio Series GF-250, 9,4 mm ID x 250 mm, 4µm
- mobilna faza: 130 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7
- pretok: 1 ml/min
- temperatura kolone: kontrolirana sobna (23 °C)
- detekcija: λ= 210 nm
- volumen injiciranja: 10 µl

Linearno odvisnost med koncentracijo in površino pod vrhovi smo dosegli v koncentracijskem območju med 0,006 mg/ml in 1,2 mg/ml. Retencijski čas za ovalbumin je znašal cca. 9,9 minut (Slika 9).



Slika 9: Kromatogram ovalbumina v supernatantu disperzije nanodelcev: Kromatografska vrhova z retencijskim časom $t_R \cong 9,1$ min in $t_R \cong 9,9$ min pripadata ovalbuminu. Kromatografski vrh z retencijskim časom $t_R \cong 13,1$ min pa pripada hitosanu.

3.3.4. DOLOČANJE UČINKOVITOSTI VGRAJEVANJA IN VSEBNOSTI OVALBUMINA V NANODELCIH

Učinkovitost vgrajevanja (UČ) smo izračunali kot razmerje med količino vgrajenega ovalbumina in količino ovalbumina, ki smo ga uporabili pri izdelavi disperzije nanodelcev (Enačba 1). Količino vgrajenega ovalbumina smo določali posredno, tako da smo od celotne količine uporabljenega ovalbumina ($m(ova)_c$) odšteli količino nevgrajenega ovalbumina ($m(ova)_{sup}$), ki smo ga določili v supernatantu po centrifugiranju.

$$U\check{C} = \frac{m(ova)_c - m(ova)_{sup}}{m(ova)_c}$$

Enačba 1

Vsebnost ovalbumina (VS) v nanodelcih smo izračunali tako, da smo od celokupne količine ovalbumina v disperziji ($m(ova)_c$) odšteli količino ovalbumina, ki je ostala v supernatantu ($m(ova)_{sup}$) ter vse skupaj delili s celokupno maso nanodelcev ($m_{ND} = m_{hitosana} + m_{lecitina} + m_{ovalbumina}$) (Enačba 2).

$$VS = \frac{m(ova)_c - m(ova)_{sup}}{m_{ND}}$$

Enačba 2

3.3.4.1. Nanodelci iz pektina in hitosana

Nanodelce smo izdelali po zgoraj opisanem postopku. Pri izdelavi smo uporabili 0,06 % (m/V) raztopino pektina, v kateri smo raztopili ovalbumin, tako, da smo dobili končne koncentracije 0,1, 0,5, 1, 2 in 4 mg/ml. Raztopine smo prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 μ m (da smo odstranili netopne komponente, ki so lahko prisotne v pektinu in ovalbuminu) in v njih določili koncentracijo ovalbumina z metodo HPLC (da smo poznali količino ovalbumina v celotni disperziji nanodelcev), nato pa jih uporabili za izdelavo nanodelcev.

Disperzije nanodelcev smo po izdelavi centrifugirali 1 h pri 28000 obratih/min. V supernatantu smo določali koncentracijo ovalbumina z metodo HPLC.

3.3.4.2. Nanodelci iz lecitina in hitosana

Nanodelce smo izdelali po zgoraj opisanem postopku. Pri izdelavi nanodelcev smo uporabili raztopino hitosana ($c = 0,6918$ mg/ml) v kateri smo raztopili ovalbumin, tako, da je bila končna koncentracija ovalbumina v raztopini 0,1, 0,5, 1, 2 in 4 mg/ml. Raztopine smo prefiltrirali skozi membranski filter (0,2 μ m), da smo odstranili netopne komponente, ki so lahko prisotne v ovalbuminu in hitosanu. Nato smo v raztopinah (iz hitosana in ovalbumina) določili koncentracijo ovalbumina z metodo HPLC in jih uporabili za izdelavo nanodelcev. Disperzije nanodelcev smo po izdelavi centrifugirali 1 h pri 28000 obratih/min. V supernatantu smo določali koncentracijo ovalbumina z metodo HPLC.

3.3.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA IZ NANODELCEV

3.3.5.1. Prehajanje ovalbumina skozi membrano difuzijske vrečke (300 000 Da)

Raztopino ovalbumina ($c = 4 \text{ mg/ml}$) v bidestilirani vodi oz. v vodi nakisani do pH 4,2 in pH 2,7 smo prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por $0,2 \text{ }\mu\text{m}$. S tako pripravljeno raztopino smo napolnili dializno vrečko ($V = 5 \text{ ml}$), ki smo jo potopili v 370 ml bidestilirane vode oz. fosfatnega pufru pH 7,4. Tudi medij smo predhodno prefiltrirali skozi filter z velikostjo por $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Medij v čaši z dializno vrečko smo mešali z magnetnim mešalom vsaj 24 ur. V določenih časovnih intervalih smo jemali vzorce zunanjega medija ($V = 2 \text{ ml}$) in jih analizirali s pomočjo HPLC. Na podlagi izmerjenih koncentracij ovalbumina smo izračunali mase sproščene ovalbumina ob določenem času (Preglednica I).

Preglednica I: Izračun celotne mase ovalbumina, ki je prešel dializno membrano v posameznem časovnem intervalu (V -volumen medija; V_1 -volumen vzorca)

čas (h)	konc. (mg/ml)	masa (mg)	Odvzem za analizo (mg)	celoten odvzem za analizo(mg)	celotna masa (mg)
0,25	$C_{0,25}$	$C_{0,25} * V = M_{0,25}$			$M_{0,25}$
0,5	$C_{0,5}$	$C_{0,5} * (V - V_1) = M_{0,5}$	$C_{0,25} * V_1 = m_{0,25}$	$m_{0,25}$	$M_{0,5} + m_{0,25}$
1	C_1	$C_1 * (V - 2V_1) = M_1$	$C_{0,5} * V_1 = m_{0,5}$	$m_{0,25} + m_{0,5}$	$M_1 + m_{0,25} + m_{0,5}$
2	C_2	$C_2 * (V - 3V_1) = M_2$	$C_1 * V_1 = m_1$	$m_{0,25} + m_{0,5} + m_1$	$M_2 + m_{0,25} + m_{0,5} + m_1$
3	C_3	$C_3 * (V - 4V_1) = M_3$	$C_2 * V_1 = m_2$	$m_{0,25} + m_{0,5} + m_1 + m_2$	$M_3 + m_{0,25} + m_{0,5} + m_1 + m_2$

3.3.5.2. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz pektina in hitosana

Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev smo določali z metodo dialize. Uporabili smo dializno vrečko z velikostjo por 300 000 Da. Nanodelce smo izdelali po zgoraj opisanem postopku. Pri izdelavi smo uporabili raztopino pektina, v kateri smo raztopili ovalbumin v koncentraciji 4 mg/ml . Koncentracijo ovalbumina v prefiltrirani ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) raztopini pektina smo določili s pomočjo HPLC, tako da smo poznali količino ovalbumina v celotni disperziji nanodelcev.

Dializno vrečko smo napolnili s 5 ml disperzije nanodelcev in jo potopili v 370 ml fosfatnega pufru (pH 7,4). Medij v čaši z dializno vrečko smo mešali z magnetnim

mešalom 24 ur. V določenih časovnih intervalih smo jemali vzorce zunanlega medija ($V = 2$ ml) in jih analizirali s pomočjo HPLC. Na podlagi izmerjenih koncentracij ovalbumina smo izračunali mase sproščenega ovalbumina ob določenem času (Preglednica I).

Za primerjavo smo spremljali prehajanje ovalbumina skozi difuzijsko membrano še iz vzorca, ki je vseboval samo pektin in ovalbumin (torej brez hitosana). V raztopini pektina smo raztopili ovalbumin v koncentraciji 4 mg/ml. Koncentracijo ovalbumina v prefiltrirani ($0,45 \mu\text{m}$) raztopini pektina smo določili s pomočjo HPLC, tako da smo poznali količino ovalbumina v celotni disperziji nanodelcev.

Takšno raztopino ($V = 5$ ml) smo napolnili v dializno vrečko in jo potopili v 370 ml fosfatnega pufra (pH 7,4). Medij v čaši z dializno vrečko smo mešali z magnetnim mešalom 24 ur. V določenih časovnih intervalih smo jemali vzorce zunanlega medija ($V = 2$ ml) in jih analizirali s pomočjo HPLC. Na podlagi izmerjenih koncentracij ovalbumina smo izračunali mase sproščenega ovalbumina ob določenem času (Preglednica I).

3.3.5.3. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz lecitina in hitosana

Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev smo določali z metodo dialize. Uporabili smo dializno vrečko z velikostjo por 300 000 Da. Nanodelce smo izdelali po zgoraj opisanem postopku. Začetna koncentracija ovalbumina v raztopini hitosana je bila 4 mg/ml. Koncentracijo ovalbumina v prefiltrirani ($0,2 \mu\text{m}$) raztopini hitosana smo določili s pomočjo HPLC, tako da smo poznali količino ovalbumina v celotni disperziji nanodelcev. Dializno vrečko smo napolnili s 5 ml disperzije nanodelcev in jo potopili v 370 ml fosfatnega pufra (pH 7,4) oz. prečiščene vode prefiltrirane skozi filter velikosti $0,45 \mu\text{m}$. Medij v čaši z dializno vrečko smo mešali z magnetnim mešalom 24 ur. V določenih časovnih intervalih smo jemali vzorce zunanlega medija in jih analizirali s pomočjo HPLC. Na podlagi izmerjenih koncentracij ovalbumina smo izračunali mase sproščenega ovalbumina ob določenem času (Preglednica I).

4. REZULTATI

4.1. NANODELCI IZ PEKTINA IN HITOSANA

Način izdelave nanodelcev je odvisen od uporabljenega polimera in učinkovine, ki jo vgrajujemo. Za nastanek nanodelcev iz pektina in hitosana s polielektrolitskim kompleksiranjem je pomemben predvsem pH posameznih raztopin. Pektin ima konstanto disociacije 3,5, zato je pri pH 4,2 negativno nabit, medtem ko ima hitosan konstanto disociacije 6,3 in je pri pH 3,9 pozitivno nabit. Izoelektrična točka ovalbumina je 4,6, zato ima pri pH 4,0 pozitiven naboj. Ker tako hitosan kot ovalbumin stopata v interakcijo z negativno nabitim pektinom, smo ovalbumin najprej raztopili v raztopini pektina. Po dodatku hitosana, je le-ta nato reagiral še s preostalimi negativno nabitimi karboksilnimi skupinami pektina. Želeli smo tudi ugotoviti, kakšen vpliv ima vgrajevanje modelnega proteina ovalbumina v nanodelce iz pektina in hitosana.

4.1.1. VPLIV MASNEGA RAZMERJA PEKTIN : HITOSAN NA NASTANEK NANODELCEV

Najprej smo ugotavljali kakšen vpliv ima masno razmerje med pektinom in hitosanom na velikost in zeta potencial nanodelcev. Količina pektina je bila v vseh vzorcih enaka, spreminjali smo le količino hitosana.

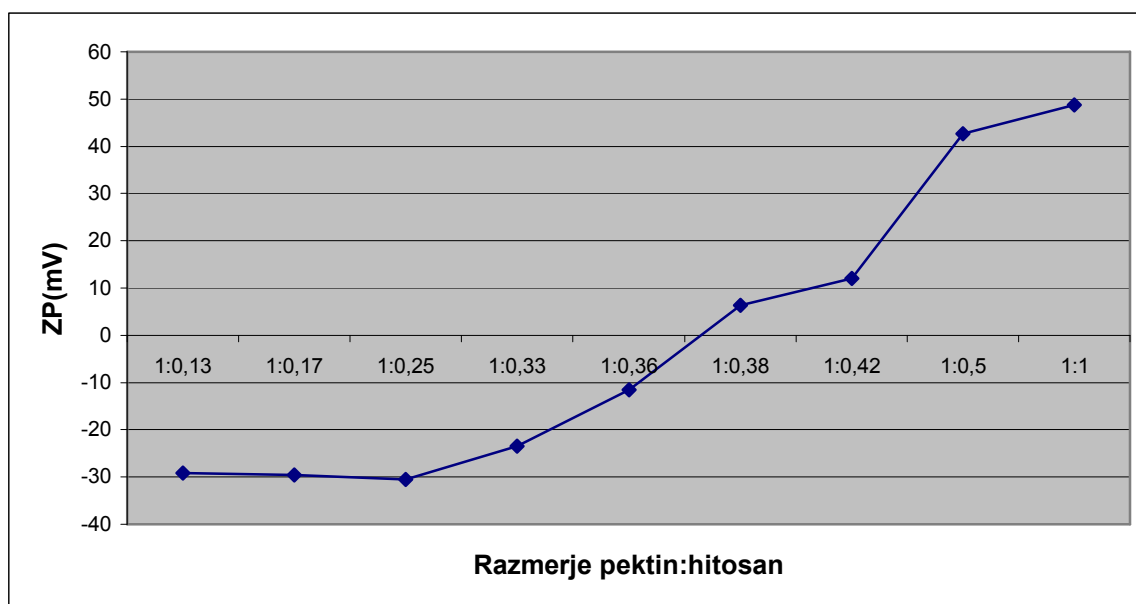
Preglednica II: Vpliv masnega razmerja pektin (P) : hitosan (H) na povprečni premer (d), polidisperzni indeks (PI) in zeta potencial (ZP) nanodelcev.

(pH (pektin) = 4,2; pH (hitosan) = 3,9; Ca^{2+} /pektin = 0,01; c (pektin) = 0,06 %)

P : H	d (nm)	PI	ZP (mV)
1 : 0,13	474,8 ± 6,9	0,31 ± 0,01	-29,2 ± 0,6
1 : 0,17	513,2 ± 6,4	0,36 ± 0,06	-29,6 ± 0,5
1 : 0,25	418,6 ± 1,1	0,26 ± 0,01	-30,5 ± 0,1
1 : 0,33	371,2 ± 5,9	0,28 ± 0,01	-23,5 ± 0,6
1 : 0,36	1903,5 ± 869,0	1,0	-11,6 ± 0,9
1 : 0,38	899,0 ± 12,3	0,24 ± 0,05	6,4 ± 0,1
1 : 0,42	503,6 ± 4,7	0,26 ± 0,01	12,4 ± 0,0
1 : 0,5	vidni delci	vidni delci	42,7 ± 1,2
1 : 1	vidni delci	vidni delci	48,7 ± 2,9

Rezultati v Preglednici II kažejo, da nastanejo najmanjši delci v primeru uporabljenih razmerij pektin : hitosan = 1 : 0,33 oz. 1 : 0,25. Povprečni premer delcev je 371 oz. 418 nm, polidisperzni indeks pa 0,28 oz. 0,26. V primeru zmanjševanja ali povečevanja razmerja na račun pektina nastanejo večji delci.

Pri razmerju pektin : hitosan = 1 : 0,36 oz. 1 : 0,38 imajo delci zeta potencial blizu 0, kar kaže na ravnotežje med pozitivnimi in negativnimi naboji. V tem primeru je fizikalna stabilnost delcev slaba, posledica pa je nastanek delcev mikrometerski velikosti. Vrednost zeta potenciala pod -30 mV in nad +30 mV je znak za dobro fizikalno stabilnost disperzij nanodelcev. Rezultati v Preglednici II in na Sliki 10 kažejo, da se zeta potencial spreminja z razmerjem pektin : hitosan. S povečevanjem razmerja na račun hitosana postaja vrednost zeta potenciala vedno bolj pozitivna. Vrednost zeta potenciala (-23,5 oz. -30,5 mV) najmanjših delcev, ki so nastali pri razmerju pektin : hitosan = 1 : 0,33 oz. 1 : 0,25 kaže na dobro fizikalno stabilnost disperzij.



Slika 10: Zeta potencial nanodelcev v odvisnosti od masnega razmerja pektin : hitosan.

Zaradi primerne velikosti delcev in dobre fizikalne stabilnosti disperzij smo se odločili, da bomo ovalbumin vgrajevali v polielektrolitski kompleks pektina in hitosana v razmerju 1 : 0,25.

4.1.2. VPLIV KOLIČINE DODANEGA OVALBUMINA NA LASTNOSTI NANODELCEV

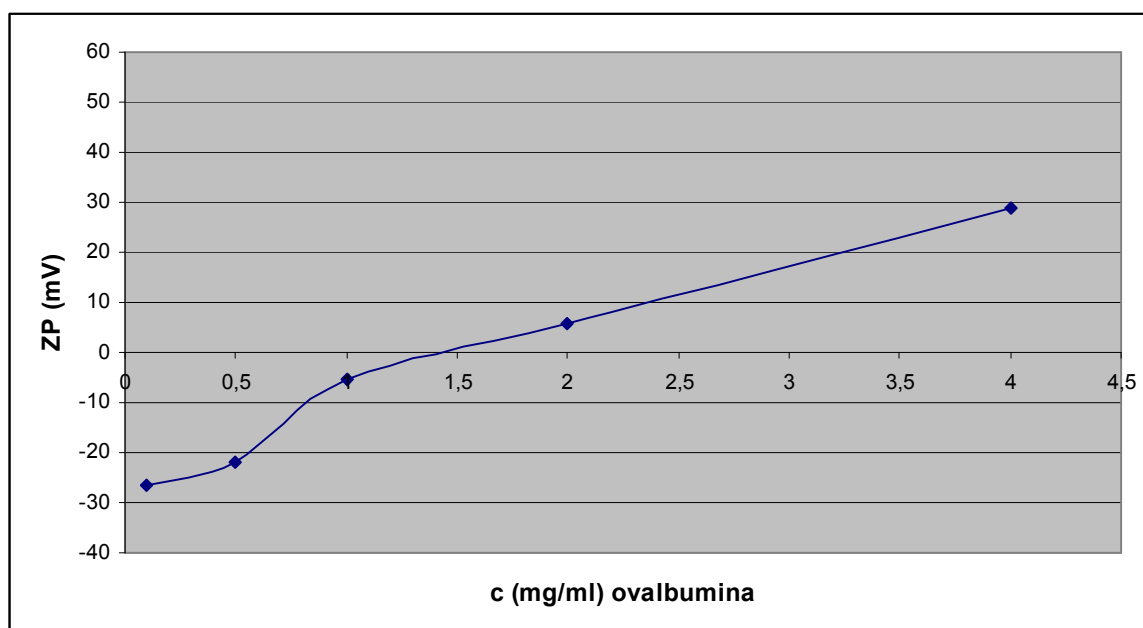
V polielektrolitske komplekse pektina in hitosana smo vgrajevali različne količine ovalbumina. Ovalbumin je amfoterna molekula, ki se lahko vključi v polielektrolitski kompleks pektina in hitosana z elektrostatsko interakcijo. Ugotovili smo, da hitrost mešanja in način dodajanja ovalbumina (v prvem primeru smo ovalbumin direktno raztopili v raztopini pektina, v drugem primeru pa smo v raztopino pektina dodali raztopino ovalbumina, ki smo ga predhodno raztopili v fosfatnem pufru) nista imela velike vloge pri nastanku nanodelcev.

Preglednica III: Vpliv začetne koncentracije ovalbumina v raztopini pektina na lastnosti nanodelcev iz pektina in hitosana. (pH (pektin) = 4,2; pH (hitosan) = 3,9; Ca^{2+} /pektin = 0,01; c (pektin) = 0,06 %; razmerje pektin : hitosan = 1 : 0,25)

OVA (mg/ml)	P : H : OVA	d (nm)	PI	ZP (mV)
0,1	1 : 0,25 : 0,2	411,4 ± 3,5	0,40 ± 0,01	-26,6 ± 0,8
0,5	1 : 0,25 : 0,8	306,4 ± 5,7	0,30 ± 0,01	-22,1 ± 0,5
1	1 : 0,25 : 1,7	vidni delci	0,95 ± 0,07	-5,2 ± 5,2
2	1 : 0,25 : 3,3	vidni delci	1,00	5,7 ± 0,1
4	1 : 0,25 : 6,6	421,3 ± 8,7	0,52 ± 0,01	28,7 ± 0,7

Opazili smo, da je po dodatku večje količine ovalbumina (koncentraciji 1 in 2 mg/ml) prišlo do obarjanja, ki je posledica interakcij med pozitivnimi naboji ovalbumina in hitosana ter negativnimi naboji pektina, ki vodijo v nastanek nenabitega kompleksa. Na to kaže tudi vrednost zeta potenciala v preglednici III, ki je blizu 0 (-5,2 oz. 5,7 mV). V primeru, da smo uporabili koncentracije ovalbumina manjše od 1 mg/ml oz. večje od 2 mg/ml, so nastali kompleksi nanometerskih velikosti (300 do 400 nm)

Ovalbumin in hitosan imata pri pH 4,2 pozitiven naboj, pektin pa negativnega. Ker dodamo ovalbumin raztopini pektina pred hitosanom, le-ta najprej interagira s pektinom, preostanek negativnih nabojev pektina pa nato stopa v interakcijo še s pozitivnimi naboji hitosana.



Slika 11: Zeta potencial nanodelcev iz pektina in hitosana v odvisnosti od začetne koncentracije ovalbumina v raztopini pektina.

Slika 11 prikazuje odvisnost zeta potenciala nanodelcev v odvisnosti od uporabljene začetne koncentracije ovalbumina v raztopini pektina. Ugotovimo lahko, da vrednost zeta potenciala narašča z naraščajočo koncentracijo ovalbumina. Vrednost zeta potenciala spremeni predznak pri uporabljeni koncentraciji ovalbumina 1,4 mg/ml. V tem primeru je razmerje pektin : hitosan : ovalbumin = 1 : 0,25 : 2,33.

V nadaljevanju smo si pogledali še vpliv variiranja količine hitosana v polielektrolitskem kompleksu na lastnosti nanodelcev z vgrajenim ovalbuminom.

Preglednica IV: Vpliv masnega razmerja pektin : hitosan : ovalbumin na lastnosti nanodelcev. Začetna koncentracija ovalbumina v raztopini pektina je bila 0,1 mg/ml.

(pH (pektin) = 4,2; pH (hitosan) = 3,9; Ca^{2+} /pektin = 0,01; c (pektin) = 0,06 %)

P : H : OVA	d (nm)	PI	ZP (mV)
1 : 0,13 : 0,2	398,2 ± 1,9	0,36 ± 0,06	-28,5 ± 0,1
1 : 0,17 : 0,2	418,2 ± 6,2	0,35 ± 0,05	-28,2 ± 0,0
1 : 0,25 : 0,2	411,4 ± 3,5	0,40 ± 0,01	-26,6 ± 0,8

Na podlagi rezultatov iz Preglednice IV lahko ugotovimo, da uporabljena razmerja med pektinom in hitosanom bistveno ne vplivajo na velikost in polidisperzni indeks nanodelcev. Delci so pri vseh razmerjih nabiti negativno, vrednosti zeta potenciala pa naraščajo s koncentracijo hitosana, kar je razumljivo, saj vse več negativnih skupin pektina stopa v interakcijo s pozitivno nabitimi skupinami hitosana.

4.1.3. DOLOČEVANJE UČINKOVITOSTI VGRAJEVANJA IN VSEBNOSTI OVALBUMINA V NANODELCIH IZ PEKTINA IN HITOSANA

Učinkovitost vgrajevanja nam pove kakšen % učinkovine, ki jo uporabimo pri izdelavi nanodelcev, se vgradi v nanodelce. Učinkovitost vgrajevanja bi bila 100 %, če bi se vgradila vsa učinkovina. Vsebnost učinkovine v nanodelcih pa nam pove, kakšen odstotek celotne mase nanodelcev predstavlja učinkovina.

Preglednica V: Vpliv začetne koncentracije ovalbumina v raztopini pektina na učinkovitost vgrajevanja (UČ) in vsebnost (VS) ovalbumina v nanodelcih iz pektina in hitosana.

(pH (pektin) = 4,2; pH (hitosan) = 3,9; Ca^{2+} /pektin = 0,01; c (pektin) = 0,06 %; razmerje pektin : hitosan = 1 : 0,25)

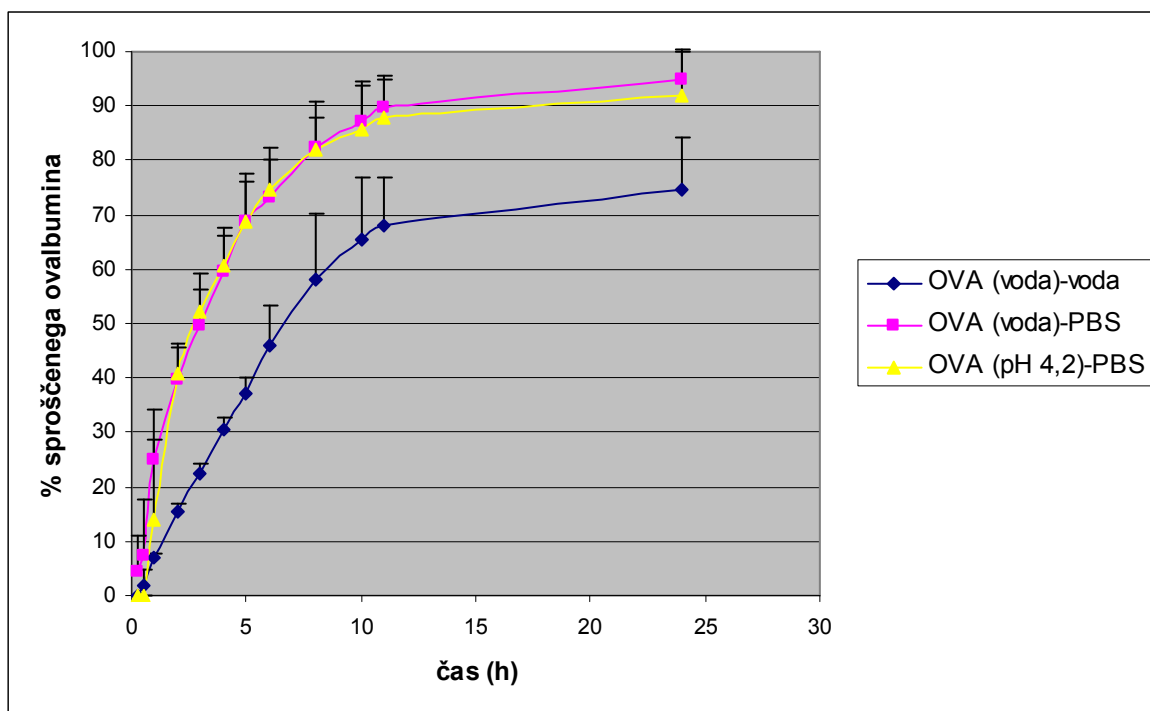
OVA (mg/ml)	VS TEORETIČNA (%)	VS (%)	UV (%)
0,1	11,69	6,22	73,05
0,5	39,85	31,38	86,64
1	56,98	45,82	84,92
2	72,59	35,39	51,87
4	84,12	4,2	5,32

Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce iz pektina in hitosana smo določali pri uporabi različnih začetnih koncentracij ovalbumina v raztopini pektina. Na podlagi rezultatov v Preglednici V lahko ugotovimo, da se v nanodelce vgradi od 5 do 86 % uporabljenega ovalbumina. Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina nekaj časa narašča z naraščajočo količino ovalbumina, nato pa začne upadati, ker ostane presežek ovalbumina, ki se ne kompleksira, topen v disperznem mediju in je zato prisoten v supernatantu. Podoben trend lahko opazimo tudi pri vsebnosti ovalbumina v nanodelcih.

4.1.4. SPROŠČANJE OVALBUMINA IZ NANODELCEV IZ PEKTINA IN HITOSANA

Pri poskusu sproščanja zdravilne učinkovine iz nanodelcev je potrebno ločiti raztopljeno učinkovino od učinkovine, ki je ostala vgrajena v nanodelce. Zaradi majhne velikosti nanodelcev je kvantitativna ločba težavna. Poleg centrifugiranja in filtriranja je ena izmed pogosto uporabljenih metod za določanje sproščanja zdravilnih učinkovin iz nanodelcev uporaba difuzijske vrečke. Metoda včasih ni najprimernejša, saj lahko difuzijska membrana ovira difuzijo učinkovine in tako vpliva na njen profil sproščanja.

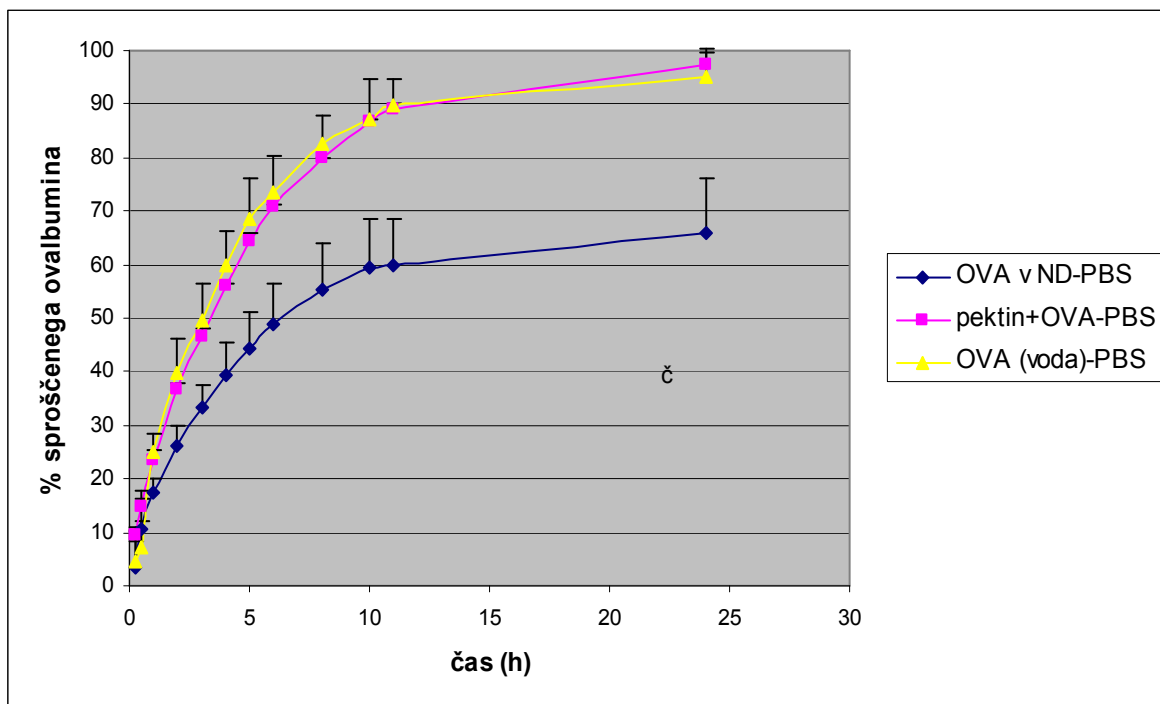
Da bi ugotovili, koliko sama membrana ovira oz. zadržuje difuzijo ovalbumina, smo najprej poskus izvedli s samo raztopino ovalbumina v vodi oz. pri pH 4,2, ki smo jo dali v difuzijsko vrečko, le-to pa v vodo oz. v fosfatni pufer pH 7,4.



Slika 12: Prehajanje ovalbumina (raztopina v vodi ali pri pH 4,2) skozi membrano difuzijske vrečke (300 000 Da) v vodo ali fosfatni pufer pH 7,4.

Na podlagi rezultatov na Sliki 12 lahko ugotovimo, da prvih 12 ur poteka difuzija ovalbumina skozi difuzijsko membrano dokaj linearno, nato pa se upočasni. Med difuzijo v vodo in fosfatni pufer je precejšnja razlika. Difuzija v fosfatni pufer poteka hitreje kot v

vodo. Po 12 urah preide skozi difuzijsko membrano v vodo 67,5 % ovalbumina, v fosfatni pufer pa 88 %. V nadaljevanju smo enako metodo uporabili za spremljanje sproščanja ovalbumina iz nanodelcev.



Slika 13: Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz pektina in hitosana v primerjavi z difuzijo prostega ovalbumina in raztopine ovalbumina in pektina skozi membrano difuzijske vrečke (300 000 Da) v fosfatni pufer pH 7,4.

Slika 13 prikazuje primerjavo difuzije ovalbumina iz raztopine samega ovalbumina in iz raztopine ovalbumina in pektina ter sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz pektina in hitosana. Ugotovimo lahko, da je sproščanje ovalbumina iz nanodelcev precej počasnejše v primerjavi z difuzijo proste učinkovine (iz raztopine samega ovalbumina kot tudi iz raztopine ovalbumina in pektina). Rezultat kaže na močne interakcije ovalbumina s polimeri, ki tvorijo nanodelce.

Da je do nastanka polielektrolitskih kompleksov dejansko prišlo, je bilo že dokazano z analizo IR spektrov in DSC analizo (31). V IR spektru so bili vrhovi nihanj vezi funkcionalnih skupin, ki sodelujejo pri interakcijah med polimeri premaknjeni oziroma spremenjeni, prav tako je prišlo do premika pikov po nastanku nanodelcev na termogramih, kar je dokaz za nastanek interakcij med polimeroma.

4.2. NANODELCI IZ LECITINA IN HITOSANA

Nanodelce iz lecitina in hitosana smo pripravili po postopku, ki ga je prvi opisal Sonvico s sodelavci (27). Ugotovili so, da so najbolj fizikalno stabilne disperzije nanodelcev, pri katerih so uporabili masno razmerje lecitin:hitosan = 20:1. To dejstvo smo uporabili pri pripravi nanodelcev iz različnih vrst lecitina (Phospholipon 50, Phospholipon 80 in Lipoid S100) in hitosana, v katere smo vgrajevali različne količine proteina ovalbumina. Proteini so namreč občutljive učinkovine, ki zahtevajo uporabo blagih metode vgrajevanja, zato smo jih vgradili v naravne polimere, ki ne zahtevajo uporabe organskih topil.

4.2.1. TOPNOST OVALBUMINA V RAZLIČNIH TOPILIH

Najprej smo želeli ugotoviti, katera faza (etanolna raztopina lecitina ali vodna raztopina hitosana) je bolj primerna za vključitev ovalbumina. Zato smo preverili topnost ovalbumina v etanolu in vodnih raztopinah različnih pH vrednosti.

Ugotovili smo, da je topnost ovalbumina v etanolu manjša od 0,1 mg/ml, kar preprečuje njegovo vključitev v etanolno raztopino lecitina. Topnost ovalbumina v vodi v pH območju od 2 do 6 pa je večje od 6 mg/ml, kar nam zadošča za vgrajevanje v nanodelce. Proteini imajo ionizirajoče skupine, in sicer karboksilne in amino skupine. Ker je naboj teh skupin odvisen od pH vrednosti, ima proteinska molekula pri različnem pH različen naboj. V izoelektrični točki je število pozitivnih nabojev enako številu negativnih nabojev, zato je v tem primeru elektrostatsko odbijanje med proteinskimi molekulami najmanjše in zato topnost najnižja. Pri ovalbuminu nismo opazili zmanjšanja topnosti v izoelektrični točki (pI = 4,6), topnost je bila še vedno večja od 6 mg/ml.

Topnost ovalbumina je preiskoval tudi Machado s sodelavci. Vendar s to razliko, da so se osredotočili na vpliv pH in soli (različna vrsta: NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ in koncentracija soli) na topnost ovalbumina. pH namreč vpliva na naravo in naboj proteina, medtem ko dodatek soli vpliva na elektrostatske vezi med molekulami. Ugotovili so, da topnost ovalbumina narašča z naraščanjem pH, minimalna topnost proteina je pri pH 4,6 in maksimalna pri pH 9,0, ne glede na vrsto in koncentracijo soli. Že 0,15 mol/l soli pa je lahko dovolj, da se spremeni konformacija proteina (20).

4.2.2. IZDELAVA NOSILNEGA SISTEMA BREZ UČINKOVINE

Izdelali smo disperzije nanodelcev, ki nastanejo s kompleksacijo različnih lecitinov (Phospholipon 50, Phospholipon 80 in Lipoid S100) s hitosanom ter določili njihove fizikalne lastnosti (povprečni premer, polidisperzni indeks, zeta potencial). Pod enakimi pogoji smo izdelali še koloidne disperzije z injiciranjem alkoholne raztopine lecitina v vodno fazo (brez hitosana).

Preglednica VIII: Povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial disperzij nanodelcev iz različnih vrst lecitina in hitosana. Alkoholno raztopino lecitina smo injicirali v vodno raztopino hitosana (disperzni medij: raztopina HCl s pH 2,8 oz. raztopina očetne kisline s pH 2,65).

Vrsta disperznega medija	Vrsta lecitina	lecitin:hitosan	d (nm)	PI	ZP (mV)
hitosan v raztopini HCl	Phospholipon 50	20:1	216,4	0,222	42,3
	Phospholipon 80		113,5	0,281	40,2
	Lipoid S100		113,5	0,228	22,8
hitosan v raztopini očetne kisline	Phospholipon 50	20:1	260,4	0,219	43
	Phospholipon 80		92,5	0,385	42,4
	Lipoid S100		129,7	0,209	19,3
	Phospholipon 50	2:1	516	0,505	58,4
	Phospholipon 80		265,3	0,537	57,6
	Lipoid S100		406,2	0,389	34,6

Na podlagi rezultatov v Preglednici VIII lahko ugotovimo, da vse vrste fosfolipidov tvorijo s hitosanom nanokomplekse. Hitosan je v kislem pozitivno nabit in stopa v interakcijo z negativno nabitimi fosfolipidi.

Preglednica IX: Povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial koloidnih disperzij različnih vrst lecitina (brez hitosana). Alkoholno raztopino lecitina smo injicirali v raztopino HCl s pH 2,8 oz. raztopino očetne kisline s pH 2,65.

Vrsta disperznega medija	Vrsta lecitina	d (nm)	PI	ZP (mV)
raztopina HCl	Phospholipon 50	151,3	0,153	-21,2
	Phospholipon 80	79,5	0,169	-8,4
	Lipoid S100	108,9	0,193	19,1
raztopina očetne kisline	Phospholipon 50	144,9	0,168	-14,5
	Phospholipon 80	85,9	0,209	-8,2
	Lipoid S100	111,4	0,189	19,2

Na podlagi rezultatov v Preglednici IX lahko ugotovimo, da so koloidni delci, ki nastanejo pod enakimi pogoji z injiciranjem alkoholne raztopine lecitina v vodno fazo (brez hitosana), precej manjši, imajo ožjo porazdelitev velikosti in nižjo absolutno vrednost zeta potenciala. Oba Phospholipona (50 in 80) dajeta delcem negativen naboj, ki je posledica prisotnosti negativno nabitih fosfolipidov (fosfatidna kislina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserin). Phospholipon 50, ki vsebuje najmanj 50 % fosfatidilholina, ima največji delež komponent z negativnim nabojem in je zato najverjetneje najprimernejši za interakcijo s pozitivno nabitim hitosanom. Phospholipon 80, ki vsebuje 73-76 % fosfatidilholina, vsebuje posledično manj komponent z negativnim nabojem, zato je tudi absolutna vrednost zeta potenciala delcev nekoliko manjša. Zeta potencial delcev iz Lipoida S100 pa je pozitiven. Lipoid S100 vsebuje glede na specifikacijo 94 % fosfatidilholina in torej najmanj negativno nabitih komponent.

Na podlagi rezultatov v Preglednici IX lahko tudi ugotovimo, da med delci, ki nastanejo po injiciranju alkoholnih raztopin lecitinov v raztopino HCl ali v raztopino očetne kisline bistvenih razlik ni, kar niti ni tako presenetljivo glede na to, da sta pH vrednosti medija s HCl in medija z očetno kislino podobna (2,80 oz. 2,65).

Kot smo že ugotovili se velikost delcev po interakciji lecitina s hitosanom poveča (Preglednica VIII in IX). Največje povečanje velikosti (iz 151 nm na 216 nm oz. iz 145 nm na 260 nm) lahko opazimo pri uporabi Phospholipona 50, ki brez hitosana daje delce z največjo absolutno vrednostjo zeta potenciala (-21,2 mV) in tako lahko stopa v interakcijo z večjo količino pozitivno nabitega hitosana. Vrednost zeta potenciala je v primeru koloidnih disperzij Phospholipona 50 in Phospholipona 80 (brez hitosana) negativna, v primeru dodanega hitosana pa spremeni predznak in postane pozitivna. V primeru Lipoida S100 pa že delci iz samega fosfolipida (brez hitosana) nosijo pozitiven naboj. V literaturi opisujejo, da v primeru uporabe čistega fosfatidilholina, ki je ion dvojček, izdelava nanokompleksov ni mogoča, saj naj bi bil negativen naboj fosfolipida nujno potreben za elektrostatsko interakcijo s hitosanom (14).

Ugotavljali smo tudi vpliv količine hitosana na fizikalne lastnosti nastalih kompleksov (Preglednica VIII). Ugotovimo lahko, da v primeru masnega razmerja lecitin:hitosan = 20:1 nastanejo manjši delci z nižjo absolutno vrednostjo zeta potenciala kot v primeru, če je razmerje lecitin:hitosan = 2:1. Hitosan se očitno kljub že pozitivnem naboju nanodelcev še vedno adsorbira na njihovo površino.

4.2.3. IZDELAVA NOSILNEGA SISTEMA Z OVALBUMINOM

Glede na to, da ovalbumin ni topen v etanolu, smo pri izdelavi nanodelcev z ovalbuminom le-tega raztopili v vodni fazi hitosana (pH 2,7). To ni najbolj optimalno, saj imata tako hitosan kot ovalbumin pri pH 2,7 pozitiven naboj in tako tekmujeta za negativna mesta lecitina.

Preglednica X: Vpliv začetne koncentracije ovalbumina v raztopini hitosana na lastnosti nanodelcev iz lecitina (Phospholipon 50 in Phospholipon 80) in hitosana.

c (OVA) (mg/ml)	Phospholipon 50			Phospholipon 80		
	d (nm)	PI	ZP (mV)	d (nm)	PI	ZP (mV)
0,1	247,1±1,7	0,263±0,01	42,9±0,1	119,0±0,7	0,339±0,04	43,3±0,5
0,5	292,8±1,2	0,272±0,01	42,7±0,5	136,7±0,9	0,415±0,01	42,1±0,5
1	319,8±0,5	0,288±0,01	39,9±0,4	136,9±2,9	0,590±0,12	46,4±2,4
2	242,4±1,3	0,421±0,02	39,1±0,5	148,8±0,4	0,535±0,02	41,7±0,9
4	220,3±2,2	0,200±0,01	24,2±0,0	187,8±13,3	0,553±0,02	29,7±2,6

Na podlagi rezultatov v Preglednici X lahko ugotovimo, da tudi v primeru vgrajevanja ovalbumina dobimo delce nanometrskih velikosti. Vrednosti zeta potenciala okrog 40 mV kažejo na dobro fizikalno stabilnost disperzij. V primeru največje uporabljene začetne koncentracije ovalbumina ($c = 4$ mg/ml) je vrednost zeta potenciala nekoliko nižja, verjetno zaradi višje koncentracije raztopljenega ovalbumina v disperznem mediju.

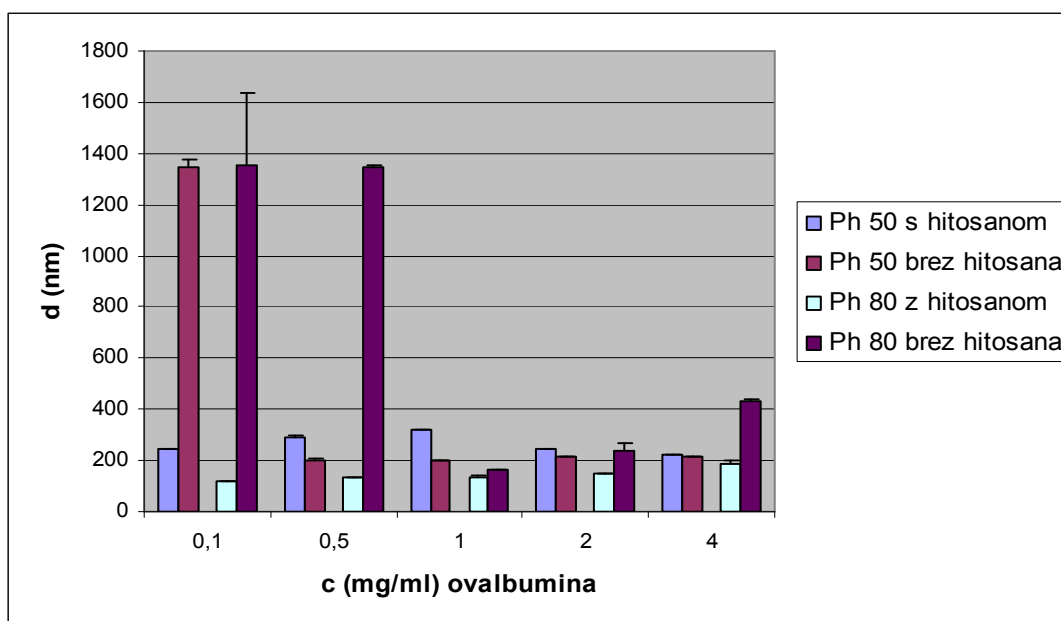
Za primerjavo smo izdelali disperzije po enakem postopku, le brez hitosana. V tem primeru so lahko stopale v interakcijo z negativno nabitimi skupinami lecitina samo pozitivno nabite skupine ovalbumina.

Preglednica XI: Vpliv začetne koncentracije ovalbumina v vodi (pH 2,7) na lastnosti struktur iz lecitina (Phospholipon 50 in Phospholipon 80), brez hitosana.

c (OVA) (mg/ml)	Phospholipon 50			Phospholipon 80		
	d (nm)	PI	ZP (mV)	d (nm)	PI	ZP (mV)
0,1	vidni delci	-	-6,1±0,5	vidni delci	-	6,8±0,7
0,5	203,5±1,8	0,149±0,01	23,1±2,6	vidni delci	-	11,2±4,1
1	198,2±1,3	0,126±0,05	27,9±0,5	161,5±0,9	0,265±0,02	26,6±1,3
2	214,2±1,1	0,105±0,01	28,6±1,5	235,7±35,0	0,499±0,03	27,2±0,8
4	215,6±0,2	0,080±0,02	22,5±0,1	431,3±6,9	0,559±0,01	19,2±0,0

Če primerjamo Preglednici IX in XI lahko ugotovimo, da so delci, ki nastanejo po injiciranju alkoholne raztopine lecitina v vodno fazo manjši, kot če injiciramo v vodno fazo, v kateri je raztopljen ovalbumin (v obeh primerih ni hitosana). Med vzorci je razlika tudi v predznaku zeta potenciala. Strukture brez ovalbumina so negativno nabite, delci z ovalbuminom pa nosijo pozitiven naboj, saj negativno nabite skupine lecitina vstopajo v interakcijo s pozitivno nabitim ovalbuminom. Izjema je pri injiciranju Phospholipona 50 v nakisano vodno raztopino (pH 2,7) ovalbumina s koncentracijo 0,1 mg/ml. Phospholipon 50 vsebuje več negativno nabitih komponent kot Phospholipon 80, zato ima na voljo več negativnih nabojev, ki bi stopali v interakcijo s pozitivno nabitim ovalbuminom. Koncentracija ovalbumina 0,1 mg/ml ne zadostuje za nastanek fizikalno stabilnih disperzij, na kar kaže tudi negativna vrednost zeta potenciala v Preglednici XI (-6,1 mV). Enako se zgodi pri injiciranju Phospholipona 80 v nakisano vodno raztopino (pH 2,7) ovalbumina s koncentracijo 0,1 mg/ml in 0,5 mg/ml. Šele pri dodatku ovalbumina v koncentraciji 1

mg/ml pride do nastanka nanodelcev velikosti okrog 160 nm in zeta potencialom približno 26 mV. Pri nadaljnjem povečevanju koncentracije ovalbumina nastajajo večji nanodelci.



Slika 14: Primerjava velikosti nanodelcev iz lecitina in ovalbumina z in brez hitosana.

Slika 14 nam prikazuje primerjavo velikosti nanodelcev iz lecitina in ovalbumina, z in brez dodanega hitosana. Zaključimo lahko, da nastanejo delci nanometrskih velikosti iz obeh vrst lecitinov pri uporabi ovalbumina v koncentracijah 1 oz. 2 mg/ml.

Preverili smo tudi vpliv pH vrednosti začetne raztopine hitosana in ovalbumina na lastnosti nanodelcev iz lecitina in hitosana.

Preglednica XII: Vpliv pH vrednosti začetne raztopine hitosana in ovalbumina na lastnosti nanodelcev iz lecitina (Phospholipon 50 in Phospholipon 80) in hitosana.

pH	Phospholipon 50			Phospholipon 80		
	d (nm)	PI	ZP (mV)	d (nm)	PI	ZP (mV)
2,7	242,4±1,3	0,421±0,02	39,6±0,3	148,8±0,4	0,535±0,02	41,3±1,1
3	170,3±0,2	0,295±0,01	35,7±0,7	121,7±0,4	0,491±0,01	33,8±0,6
4	201,7±4,7	0,498±0,04	-22,5±0,0	vidni delci	vidni delci	0,9±0,2
5	105,4±0,8	0,249±0,01	-26,2±1,5	204,3±1,4	0,325±0,01	-18,1±0,3
6	98,7±0,3	0,236±0,01	-28,6±0,2	60,8±0,1	0,210±0,01	-21,6±0,4

Na podlagi rezultatov v Preglednici XII lahko ugotovimo, da se s povečevanjem pH vrednosti začetne raztopine hitosana in ovalbumina velikost nastalih nanodelcev zmanjšuje. Višji je pH, manj je hitosan ioniziran, kar pomeni, da ga je manj na voljo za interakcijo z negativno nabitim lecitinom. Posledično nastanejo manjši delci z negativnim zeta potencialom.

4.2.4. UČINKOVITOST VGRAJEVANJA OVALBUMINA V NANODELCE

Preglednica XIII: Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce v odvisnosti od začetne koncentracije ovalbumina v raztopini hitosana.

		Učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v ND	
Začetna koncentracija ovalbumina (mg/ml)	Sestava: lecitin/hitosan/OVA	Phospholipon 50 (%)	Phospholipon 80 (%)
0,1	100 mg/4,6 mg/4,6 mg	30,8	23,5
0,5	100 mg/4,6 mg/23 mg	25,5	23,1
1	100 mg/4,6 mg/46 mg	28,9	17,7
2	100 mg/4,6 mg/92 mg	20,2	16,6
4	100 mg/4,6 mg/184 mg	10,2	13,3

Na podlagi rezultatov v Preglednici XIII lahko ugotovimo, da učinkovitost vgrajevanja ovalbumina v nanodelce narašča s padajočo začetno koncentracijo ovalbumina. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je pri višjih koncentracijah ovalbumin v presežku in da zmanjka negativnih skupin lecitina s katerimi bi stopal v interakcijo. Glede na to, da je dobro topen v vodi, se njegova koncentracija v vodni fazi (supernatant) povečuje, zato se posledično učinkovitost vgrajevanja zmanjšuje.

Amidi in sodelavci so ovalbumin vgrajevali v nanodelce iz *N*-trimetilhitosana, ki so jih izdelali z metodo ionskega premreženja s tripolifosfatom. Dosegli so učinkovitost vgrajevanja (UČ) do 95 % in vsebnost (VS) ovalbumina do 50 %. Pri dodatku večjih količin proteina se je vsebnost ovalbumina v nanodelcih zmanjšala in delci so agregirali,

kar opisujejo kot posledico večje koncentracije prostega ovalbumina v disperziji nanodelcev (32).

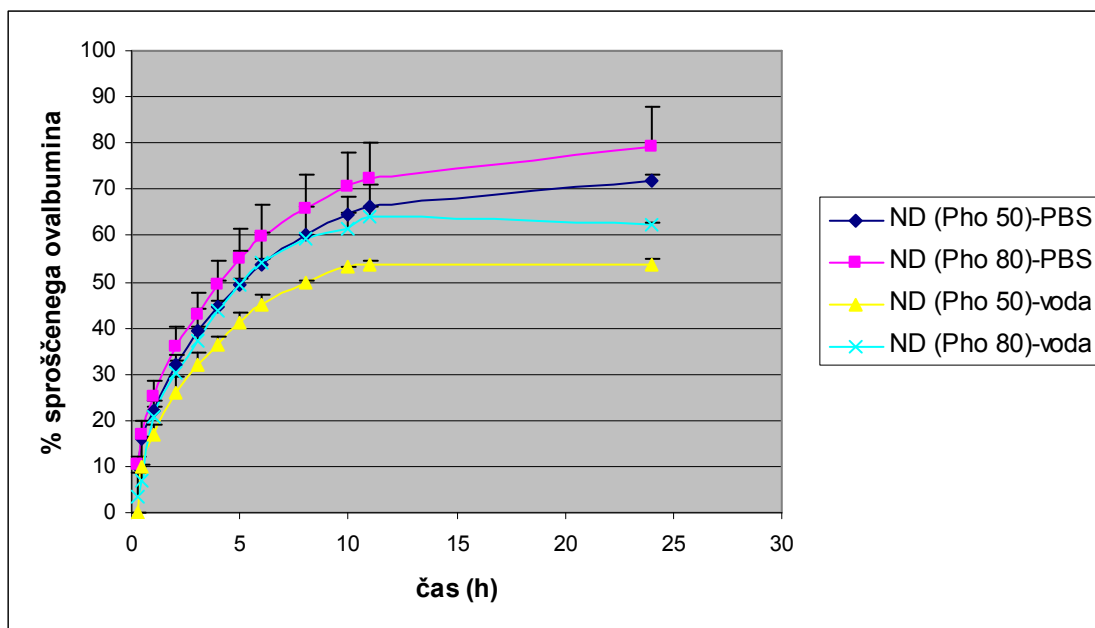
Preglednica XIV: Vsebnost ovalbumina v nanodelcih v odvisnosti od začetne koncentracije ovalbumina v raztopini hitosana.

c (OVA) (mg/ml)	Sestava: lecitin/hitosan/OVA	Teoretična vsebnost	Vsebnost OVA v ND	
			Phospholipon 50 (%)	Phospholipon 80 (%)
0,1	100 mg/4,6 mg/4,6 mg	4,21	0,59	0,46
0,5	100 mg/4,6 mg/23 mg	18,03	1,73	2,17
1	100 mg/4,6 mg/46 mg	30,54	6,54	3,27
2	100 mg/4,6 mg/92 mg	46,79	7,52	5,53
4	100 mg/4,6 mg/184 mg	63,76	6,29	8,19

Na podlagi rezultatov v Preglednici XIV lahko ugotovimo, da po pričakovanjih tako pri vzorcu s Phospholiponom 50 kot s Phospholiponom 80, vsebnost ovalbumina v nanodelcih narašča z naraščujočo začetno koncentracijo ovalbumina.

4.2.5. SPROŠČANJE OVALBUMINA IZ NANODELCEV

Glede na to, da so nastali delci zelo majhni, jih je zelo težko popolnoma ločiti od disperznega medija. Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz lecitina in hitosana smo določali s pomočjo uporabe difuzijske vrečke. Ovalbumin, ki se je sprostil, je difundiral skozi membrano in se porazdelil po celotnem disperznem mediju (voda oz. fosfatni pufer pH 7,4). Ob določenih časih smo vzorčili zunanji medij in v njem s HPLC določali koncentracijo ovalbumina.



Slika 15: Primerjava sproščanja ovalbumina iz nanodelcev različne sestave (metoda difuzijske vrečke) v vodo in fosfatni pufer s pH 7,4.

Slika 15 prikazuje primerjavo sproščanja ovalbumina iz nanodelcev v vodo in v fosfatni pufer. Ugotovimo lahko, da tako kot pri sami učinkovini tudi pri sproščanju ovalbumina iz nanodelcev poteka difuzija v fosfatni pufer hitreje kot v vodo. Po 11 urah urah preide skozi difuzijsko membrano v vodo 54 % ovalbumina, v fosfatni pufer pa 65 %.

Sproščanje ovalbumina iz nanodelcev, pri katerih smo kot lecitin uporabili Phospholipon 80 je hitrejše v primerjavi s sproščanjem iz nanodelcev, pri katerih smo kot lecitin uporabili Phospholipon 50. V 11 urah se je sprostil 69 % ovalbumina. To si lahko razlagamo s številnejšimi ionskimi interakcijami med hitosanom in Phospholiponom 50. Phospholipon 50 namreč vsebuje v primerjavi s Phospholiponom 80, manjši odstotek čistega fosfatidilholina in torej več fosfatidne kisline in ostalih fosfolipidov, kot so fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol. Le ti imajo negativen naboj in tvorijo interakcije s hitosanom. Ovalbumin ima izoelektrično točko pri 4,6. Konstanta disociacije hitosana je 6,3. Pri izdelavi nanodelcev raztopimo ovalbumin v vodni fazi hitosana (pri $\text{pH} < 4,6$). Pri takšnem pH nosita tako hitosan kot tudi ovalbumin pozitiven naboj in tako tekmujeta za interakcije z negativnimi naboji lecitina. V primeru, da ima lecitin več negativnih nabojev, so interakcije številnejše, kar očitno vpliva tudi na sproščanje učinkovine iz kompleksov. V tem primeru je namreč sproščanje ovalbumina iz nanodelcev počasnejše.

5. SKLEP

V diplomskem delu smo izdelali nanodelce iz dveh polimerov (pektina in hitosana) ter iz fosfolipida in polimera (lecitina in hitosana) z metodo polielektrolitskega kompleksiranja, ki ne vključuje povišane temperature in visokih strižnih sil. Kot modelno proteinsko učinkovino smo uporabili ovalbumin, ki je stabilen v širokem pH območju (pH 1,8 do 12,8).

V prvem delu naloge smo proučevali nanodelce iz pektina in hitosana. Nanodelce smo izdelali pri pH 4, pri katerem sta hitosan in ovalbumin pozitivno nabita, pektin pa negativno, kar omogoča nastanek ionski interakcij. Ugotovili smo, da na nastanek nanodelcev vpliva masno razmerje med pektinom in hitosanom ter količina dodanega ovalbumina, medtem ko način dodajanja ovalbumina in hitrost mešanja nista imela bistvenega vpliva. Nanodelci primerne velikosti (premera 300 do 400 nm) so nastali, če smo uporabili masno razmerje pektin:hitosan = 1:0,33 oziroma 1:0,25. Ti nanodelci so imeli zeta potencial približno -30 mV, kar nakazuje na dobro fizikalno stabilnost delcev. Z zmanjševanjem razmerja na račun pektina smo dobili delce mikrometrskih velikosti. V primeru vgrajevanja ovalbumina so nastali nanodelci, če smo pri izdelavi uporabili začetno koncentracijo ovalbumina manjšo od 1 mg/ml oz. večjo od 2 mg/ml. Zaključimo lahko, da so masna razmerja med posameznimi sestavinami nanodelcev zelo pomembna, saj vplivajo na zeta potencial delcev in s tem na fizikalno stabilnost disperzij. Učinkovitost vgrajevanja in vsebnost ovalbumina v nanodelcih sta odvisni od količine uporabljenega ovalbumina. Največjo učinkovitost vgrajevanja (85 %) in vsebnost (46 %) ovalbumina v nanodelcih smo dosegli v primeru, da smo uporabili začetno koncentracijo ovalbumina 1 mg/ml. Z vgrajevanjem ovalbumina v nanodelce smo dosegli podaljšano sproščanje: v prvih 10 urah se je sprostilo 60 %, v prvih 24 urah pa 67 % ovalbumina.

V drugem delu naloge smo proučevali nanodelce iz lecitina in hitosana. Ugotovili smo, da na nastanek nanodelcev vpliva vrsta dodanega lecitina in razmerje med lecitinom in hitosanom. V primeru uporabljenega masnega razmerja lecitin:hitosan = 20:1, so iz Phospholipona 50 nastali nanodelci s premerom 220-260 nm, iz Phospholipona 80 pa s premerom 100-120 nm. V obeh primerih so nanodelci nosili pozitiven naboj ($ZP = 40$ mV) za razliko od enako izdelanih struktur brez hitosana, ki so imele negativen zeta potencial. Lipoid S100 zaradi pomankanja naboja ni primeren za tvorbo nanodelcev. V primeru vgrajevanja ovalbumina (začetna koncentracija 1 do 2 mg/ml) smo dobili delce podobnih

velikosti. V nanodelcih iz Phospholipona 50 smo določili 7 % vsebnost ovalbumina in 20-29 % učinkovitost vgrajevanja, v nanodelcih iz Phospholipona 80 pa 3-5 % vsebnost ovalbumina in 17-18 % učinkovitost vgrajevanja. Phospholipon 50 vsebuje največ negativno nabitih fosfolipidov, ki vstopajo v interakcijo s pozitivno nabitimi fosfolipidi. Številnejše ionske interakcije med lecitinom, ovalbuminom in hitosanom so tudi vzrok, da je sproščanje ovalbumina iz nanodelcev iz Phospholipona 50 počasnejše kot iz nanodelcev iz Phospholipona 80.

Zaključimo lahko, da smo modelno proteinsko učinkovino ovalbumin z optimiziranim postopkom uspešno vgradili v nanodelce iz pektina in hitosana ter nanodelce iz lecitina in hitosana. Ugotovili smo, da lahko z izbiro ustreznih polimerov in fosfolipidov ter razmerja med njimi, vplivamo na velikost in naboj nanodelcev ter na vgrajevanje in sproščanje ovalbumina.

Samo s specifičnim pristopom za vsak protein lahko namreč izdelamo nanodelce, ki ohranijo strukturo in biološko aktivnost proteina in s tem prispevajo k njegovi nadaljni uporabi.

6. LITERATURA

1. Hosokawa M, Nogi K, Naito M, Yokoyama T: Nanoparticle Technology Handbook, 1st edition, Elsevier, Oxford, Amsterdam, 2007; 5-12, 51-56.
2. Du Y, Xu Y: Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 250: 215-226.
3. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MNV: Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release* 2007; 119: 77-85.
4. Gerelli Y, Di Bari MT, Deriu A, Cantù L, Colombo P, Como C, Motta S, Sonvico F, May R: Structure and organization of phospholipids/polysaccharide nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2008; 20: 104211.
5. Cegnar M, Kristl J: Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. *Medicinski razgledi* 2005; 44: 447-462.
6. Belgacem MN, Gandini A: Monomers, polymers and composites from renewable resources, 1st edition, Elsevier, Oxford, Boston, 2008; 517-542.
7. George M, Abraham TM: Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan- review. *Journal of Controlled Release* 2006; 114: 1-14.
8. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 287-291.
9. Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J: Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterization and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 381: 205-213.
10. Sriamornsak P: Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*, 2003; Vol. 3, No. 1-2, 207-228.
11. Hiorth M, Kjøniksen AL, Knudsen KD, Sande SA, Nyström B: Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan. *European Polymer Journal* 2005; 41: 1718-1728.

12. Chang KLB, Lin J: Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers* 2000; 43: 163-169.
13. Leung AY, Foster S: *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, 2nd edition, J.Wiley & Sons, New York, 1996; 413-414.
14. Planinšek D, Krbavčič A: Lecitin, analitična monografija. *Farmacevtski vestnik* 1998; 49: 179-199.
15. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; 210-258.
16. Boyer Rodney: *Temelji biokemije*, 1. izdaja, Študentska založba, Ljubljana, 2005; 69-97.
17. Lee HJ: Protein Drug Oral Delivery: The Recent Progress. *Archives of Pharmacal Research*, 2002; Vol. 25, No. 5, 572-584.
18. Huntington JA, Stein PE: Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B* 2001; 756: 189-198.
19. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ovalbumin> (dostopano 23.11.2009)
20. Machado FF, Coimbra JSR, Garcia Rojas EE, Minim LA, Oliveira FC, de Cássia S. Sousa R: Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT* 2007; 40: 1304-1307.
21. Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke B: Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74: 813-821.
22. Etrych T, Leclercq L, Boustta M, Vert M: Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media: A model study related to the case of body fluids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 25: 281-288.
23. Koetz J, Kosmella S: *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer Laboratory, Berlin, Nemčija, 2007; 5-46.
24. Gazori T, Khoshayand MR, Azizi E, Yazdizade P, Nomani A, Haririan I: Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers* 2009; 77: 599-606.

25. Li X, Xie H, Lin J, Xie W, Ma X: Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability* 2009; 94: 1–6.
26. Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, Zecchi V: Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 35: 435-441.
27. Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P: Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 324: 67-73.
28. Şenyiğit T, Sonvico F, Barbieri S, Özer Ö, Santi P, Colombo P: Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of Controlled Release* 2010; 142: 368-373.
29. Malvern Instruments Ltd. Size theory. *Zetasizer Nano User Manual*. MAN0317; 2008: 14-1 do 14-6.
30. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential Theory. *Zetasizer Nano User Manual*. MAN0317; 2008: 16-1 DO 16-11.
31. Nabergoj M: Izdelava hidrofилnih nanodelcev z metodo polielektrolitskega kompleksiranja; Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
32. Amidi M, Romeijn S, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jiskoot W: Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release* 2006; 111: 107-116.