Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 34, No. 3, Autumn 2024 ORIGINAL ARTICLE

Design and preparation of Chitosan/Alginate nanoparticles containing BSA and In-vitro release study

Nazli Kashani Javid [1], Nasser Mohammadpour[2], Sepideh Arbabi Bidgoli[3]
[1] *Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2]*Razi Vaccine and Sera Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran*
[3]*Department of Toxicology–Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

Abstract

Background: Nanoparticles have received more and more attention in the vaccine and drug delivery systems field due to their specific properties. In particular, alginate and chitosan have been known as the most promising nano-carries. The present study aimed to develop alginate/chitosan nanoparticles as a carrier of BSA to Study In-vitro release condition.
Materials and methods: The nanoparticles were produced by the ionic gelation method in mild conditions and the aqueous environment, which leads to the production of particles with favorable size, shape, high entrapment efficiency, and controlled release characteristics.
Results: The synthesized nanoparticles of 60 nm in diameter and -32mv in zeta potential were considerably unparalleled and characterized by SEM, FTIR, and DSC. Nanoparticles resembled a spherical shell, smooth morphology, and homogeneous structure shown by SEM images. FTIR and DSC analyses confirmed conformational changes. Entrapment efficiency and loading capacity were 92% and 74%, respectively, via indirect method. The In-vitro BSA release profile and mechanism of BSA release from the nanoparticles were studied under simulated physiological conditions for various incubation periods. An initial burst effect revealed the release profile, followed by a continuous and controlled release phase.
Conclusion: Our results indicated the prepared nanoparticles could be appropriate for the convenient delivery of the desired drugs.
Keywords: *Nanoparticles, Chitosan, Alginate, BSA, Release.*

Cited as: Kashani Javid N, Mohammadpour N, Arbabi Bidgoli S. Design and preparation of Chitosan/Alginate nanoparticles containing BSA and In-vitro release study. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(3): **227-236.**

Correspondence to: *Nasser Mohammadpour*
Tel: *+98 9128000252*
E-mail: nasser_mohammadpour@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0001-6684-5004
Received: 5 Dec 2023; **Accepted:** 27 Feb 2024

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۲۲۷ تا ۲۳۶

Original Article

طراحی و تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی BSA و مطالعه انتشار آن در شرایط in-vitro

نازلی کاشانی جاوید[۱]، ناصر محمدپور دونیقی[۲]، سپیده اربابی بیدگلی[۳]

[۱] گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۲] موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۳] گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران ، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *نانوذرات به دلیل ویژگی‌های خاصی که دارند، در زمینه سیستم‌های واکسن و دارورسانی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور خاص، آلژینات و کیتوزان به عنوان امیدوار کننده‌ترین نانوحامل‌ها شناخته شده‌اند. هدف مطالعه حاضر، طراحی و تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی BSA و مطالعه انتشار آن در شرایط in-vitro بود.*

روش بررسی: *نانوذرات با روش ژل سازی یونی در شرایط ملایم و در محیط آبی تهیه شدند که منجر به حصول ذرات با اندازه و شکل مطلوب، راندمان به دام افتادن بالا و ویژگی های رهایش کنترل شده، شد.*

یافته‌ها: *نانوذرات سنتز شده با قطر ۶۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۳۲- mv به طور قابل توجهی امیدوارکننده بودند و با روش‌های FTIR ، SEM و DSC ارزیابی شدند. نانوذرات همانند یک پوسته کروی، دارای مورفولوژی سطح صاف و ساختار همگن بودند که توسط تصاویر SEM نشان داده شد. آنالیزهای FTIR و DSC تغییرات ساختاری را تایید کردند. میزان کارایی احتباس و ظرفیت بارگذاری به ترتیب ٪۹۲ و ٪۷۴ به روش غیرمستقیم به دست آمد. مشخصات آزادسازی BSA و مکانیسم آن تحت شرایط فیزیولوژیکی شبیه‌سازی شده و در شرایط in-vitro برای دوره-های انکوباسیون مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. انتشار در ابتدا بسیار سریع و به دنبال آن یک فاز رهاسازی مداوم و کنترل شده را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج به ما نشان داد که نانوذرات تهیه شده می‌توانند برای رسانش BSA مقبول باشند؛ لذا می‌توان آن را کاندیدای مناسب برای رسانش داروهای مختلف معرفی کرد.*

واژگان کلیدی: *نانوذرات، کیتوزان، آلژینات، BSA، آزادسازی.*

مقدمه

فناوری نانو توانایی کار در سطوح اتمی، مولکولی و سوپر مولکولی (در مقیاس ۱-۱۰۰ نانومتر) است، به منظور درک، ساخت و استفاده از ساختار، دستگاه و سیستم‌هایی که بطور بنیادین دارای خواص و عملکردهای جدیدی هستند و این خصوصیات از ساختار کوچک آنها ناشی می‌شود (۱). فناوری نانو در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی جایگاه ویژه‌ای دارد و استفاده از این تکنولوژی در درمان، پیشگیری و تصویربرداری هر روز در حال افزایش است. نانوذرات می‌توانند داروها یا بیومولکول‌ها را در ساختار داخلی خود به دام بیاندازند و یا بر روی سطح بیرونی خود جذب کنند. در حال حاضر نانوذرات به طور گسترده جهت عرضه داروها، پلی‌پپتیدها، پروتئین‌ها، واکسن‌ها، اسید نوکلئیک‌ها، ژن ها و غیره استفاده می‌شوند (۲). اخیرا استفاده از نانوذرات به عنوان حامل‌های رسانش آنتی‌ژن در واکسن توجه محققین را به خود جلب کرده است. نانوذرات با به دام انداختن آنتی‌ژن در ساختار خود می‌توانند روشی نوین جهت رسانش آنتی‌ژن ارائه

آدرس نویسنده مسئول: تهران،گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ناصر محمدپور دونیقی (email: nasser_mohammadpour@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-6684-5004
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

کنند که ممکن است مقدار تیتر آنها به محض تزریق به سرعت کاهش پیدا کند و یا پاسخ ایمنی موضعی و کوتاه مدت ایجاد کنند (۳). نانوذرات در جهت رسیدن به دوز درمانی مناسب از طریق هدفمندسازی، ایجاد پروفایل رهایش آهسته دارو و محافظت درون سلولی ترکیبات درمانی از تخریب و یا خروج به کار می‌رود (۴). در حال حاضر تحقیقات در مورد سیستم رسانش دارویی نانوذرات بر۴ مورد تمرکز دارد: (الف) انتخاب و ترکیب مواد حامل برای به دست آوردن سرعت مناسب رهایش دارو، (ب) اصلاح سطحی نانوذرات برای بهبود توانایی هدف‌گیری آنها، (ج) بهینه سازی آماده سازی نانوذرات برای افزایش قابلیت رسانش دارو، کاربرد آنها در کلینیک و امکان تولید در مقیاس صنعتی، (د) بررسی In-vivo جهت درک برهمکنش نانوذرات با خون و هدف قرار دادن بافت‌ها و ارگان‌ها.

مواد پلیمری که برای تهیه‌ی نانو ذرات جهت رسانش دارو استفاده می شوند، باید زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیری خوبی داشته باشند. برای این منظور، بسیاری از مواد پلیمری استفاده‌شده است .در میان آنها، پلی ساکارید ها محبوب ترین مواد پلیمری برای تهیه نانو ذرات جهت رسانش دارو هستند.

پلی ساکاریدها، پلیمرهای مونوساکاریدها هستند که در طبیعت، دارای منابع مختلفی از جمله منشاء جلبک (به عنوان مثال آلژینات)، منشاء گیاهی (به عنوان مثال پکتین)، منشاء میکروبی (مانند دکستران) و منشاء حیوانی (مانندکیتوزان) هستند. پلی ساکارید ها دارای تعداد زیادی از گروه های فعال، طیف گسترده ای از وزن مولکولی، ترکیب‌های شیمیایی متفاوت که به تنوع آنها در ساختار و خواص کمک می‌کنند، هستند. پلی ساکاریدها را می‌توان به دو گروه پلی الکترولیت ها و غیر پلی الکترولیت‌ها تقسیم کرد: گروه اول شامل پلی ساکارید های مثبت (کیتوزان) و پلی ساکارید ها با بار منفی (آلژینات، هپارین، اسید هیالورونیک، پکتین و ...) است. پلی ساکاریدها بسیار پایدار، ایمن، غیر سمی، هیدروفیل و زیست تخریب پذیر هستند. علاوه بر این، پلی ساکاریدها منابع فراوانی در طبیعت دارند و هزینه پردازش آنها کم است. بسیاری از پلی‌ساکارید های طبیعی دارای گروه‌های هیدروفیلی مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و آمینو هستند که می‌توانند پیوندهای غیر کووالانت با بافت‌های بیولوژیکی ایجاد کنند (۵).

کیتوزان و آلژینات جزو پلیمرهای طبیعی هستند که بعلت خواص زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و چسبندگی زیستی و البته خاصیت یاوری قابل قبول، توجه محققین زیادی را به منظور سیستم رسانش نوین واکسن به خود جلب کرده‌اند (۶).

کیتوزان، یک پلی ساکارید زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار با فعالیت ایمونولوژیک است که به عنوان چسبنده زیستی و جذب افزای موثر عمل می‌کند. همچنین به عنوان یک پلیمر نویدبخش جهت تشکیل سیستم های رسانش واکسن مورد توجه است (۷). ساختار کیتوزان اولین بار درسال۱۹۳۶ با استفاده از پراش اشعه‌ی ایکس توسط کلارک و اسمیت بدست آمد. اما با وجود یافته های بدست آمده، حدود۶۰ سال بعد، یعنی در سال ۱۹۹۷ تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت و بیش از ۲۰ سال است که اهمیت آن به عنوان یک حامل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۸).

اولین بار در سال ۱۹۸۰، از آلژینات با هدف انکپسوله‌کردن استفاده شد. بعد از آن تحقیقات روی توسعه و کاربردهای مختلف ذرات آلژینات ادامه داشتند (۹). آلژینات یک پلی‌ساکارید آنیونی محلول در آب است و تحت شرایط ملایم در حضور یک کاتیون دو ظرفیتی (Ca+2، Sr+2، Cu+2 وZn+2) می‌تواند اتصالات عرضی ایجاد کند. دارای خاصیت چسبندگی زیستی است و بنابراین ماندگاری دارو را افزایش می‌دهد. به‌علت تنوع خواص، آلژینات جهت توسعه‌ی سیستم‌های رسانش دارو مورد استفاده‌قرارگرفته‌است.

آلژینات به واسطه گروه‌های آنیونی کربوکسیلیک خود با گروه‌های کاتیونی آمینوی کیتوزان واکنش می‌دهد و ذرات کیتوزان-آلژینات را تشکیل می‌دهد (۱۰).

هدف کلی از این تحقیق تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان یه پروتئین مدل در دستیابی به سیستم رسانش نوین بود.

مواد و روشها

تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات

برای تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات از روش ژل‌سازی یونی (Ionotropic gelation) استفاده شد. ابتدا ۸ میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید به عنوان کراس لینکر به صورت قطره قطره به فاز مایی، سدیم آلژینات، تحت شرایط همزدن در دمای اتاق افزوده و طی یک ساعت هموژناسیون نانوذرات آلژینات حین هم‌زدن تشکیل شدند. سپس ۴ میلی‌لیتر محلول کیتوزان تهیه‌شده در محلول اسیداستیک را داخل بورت ریخته و به صورت قطره قطره به نانوذرات تشکیل شده اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت هموژناسیون نانوذرات کیتوزان آلژینات به دست آمدند. جهت

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

تنظیم pH محلول‌های اولیه از هیدروکریک اسید و سود استفاده شد. فاکتورهایی را که جهت بهینه‌سازی سنتز نانوذرات با شرایط مطلوب دنبال کردیم عبارت بودند از: غلظت آلژینات، غلظت کیتوزان، سرعت همزدن، pH، مدت زمان هموژناسیون، اندازه مگنت و شکل ظرف آزمایش.

تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان پروتئین مدل

به منظور تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان پروتئین مدل، در بدو امر محلول ۲درصد BSA آماده (۱۱) و ۳/۲ میلی‌لیتر از آن به محلول سدیم آلژینات اضافه شد. سپس کراس لینکر به صورت قطره قطره افزوده گردید. یک ساعت هموژناسیون انجام شد. پس از تشکیل نانوذرات آلژینات حاوی BSA، محلول کیتوزان اضافه و بعد از یک ساعت هموژناسیون در درمای اتاق و تحت شرایط هم‌زدن نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به دست آمدند.

اندازه ذره‌ای و بار سطحی نانوذرات

بارسطحی و میانگین اندازه‌ی ذرات توسط تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic light scattering :DLS) اندازه‌گیری‌شد. تعیین پتانسیل زتا براساس اصول الکتروفورتیک نانوذرات در سوسپانسیون‌های آبی رقیق‌شده است (۷) (۱۲) . بار سطحی ذرات در تمام مراحل تولید ذرات از اهمیت زیادی برخوردار است چراکه کارایی مراحل مختلف به طور مستقیم به ایجاد تعاملات الکترواستاتیک بستگی دارد (۱۳). در تکنیک پراکندگی نور دینامیکی برهمکنش نور با ماده بررسی می‌شود، شدت نور پراکنده شده با زمان تغییرکرده و می‌توان از آن در تعیین میانگین اندازه‌ی ذرات در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده کرد.

بررسی مورفولوژی و خصوصیات ظاهری نانوذرات

از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) جهت ارزیابی مورفولوژی نانوذرات کیتوزان/آلژینات شاهد و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل استفاده شد. بدین صورت که مقداری از نمونه سوسپانسیون تهیه‌شده از نانوذرات را بر روی ورق آلومینیوم ریخته و پس از خشک‌شدن کامل، یک لایه‌ی نازک طلا بوسیله فرآیند sputtering روی آن نشانده، سپس در دستگاه قرار داده و نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند (۴) .

بررسی ساختار و پیوندهای شیمیایی نانوذرات

ساختار نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه‌شده در این پژوهش توسط FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) مدل Thermo-Nicolet مورد بررسی قرارگرفت. بدین صورت که ابتدا نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه‌شده‌ی شاهد و سپس نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل را به وسیله دسیکاتور کاملا رطوبت‌گیری کرده (زیرا مولکول‌های آب در محدوده‌ی مادون قرمز پیک‌های پهنی ایجاد می‌کنند) و سپس در هاون عقیق گذاشته و به صورت پودر درآمدند. بعد از آن با KBr مخلوط شده (۹۵٪ KBr+۵٪ نمونه)، زیر دستگاه پرس قرارگرفته و در نهایت قرص تهیه شده جهت آنالیز در دستگاه قرار گرفت.

بررسی رفتار حرارتی نانوذرات

جهت توصیف رفتار حرارتی نانوذرات کیتوزان/آلژینات در حالت شاهد و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین مدل BSA ، از آنالیز (Differential Scanning Calorimetry :DSC) گرماسنجی روبشی تفاضلی استفاده شد. در این تکنیک چگونگی تغییر خواص حرارتی نمونه به‌عنوان تابعی از دما، بطور پیوسته اندازه-گیری می‌شود در حالی‌که با یک نمونه مرجع تحت یک برنامه‌ی دمایی کنترل‌شده باشند (۱۴) .

محاسبه‌ی درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگیری و کارایی احتباس

درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگیری و کارایی احتباس نانوذرات براساس روش غیر مستقیم و معادلات زیر محاسبه شد (۱۵). با توجه به وزن خشک ذرات و مقدار پروتئین انکپسوله شده در نانوذرات که از اختلاف بین مقدار کل پروتئین اولیه و میزان پروتئین انکپسوله نشده در سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی پروتئین بدست آمد و قبلا با تست بردفورد مطالعه شده بود.

(الف)

$$Nanoparticle\ yield(\%) = \frac{weight\ of\ nanoparticles}{weight\ of\ polymer\ and\ drug\ fed\ initially} \times 100$$

(ب)

$$Loading\ capacity(\%) = \frac{weight\ of\ drug\ in\ nanoparticles}{weight\ of\ nanoparticles} \times 100$$

(ج)

پروفایل انتشار BSA

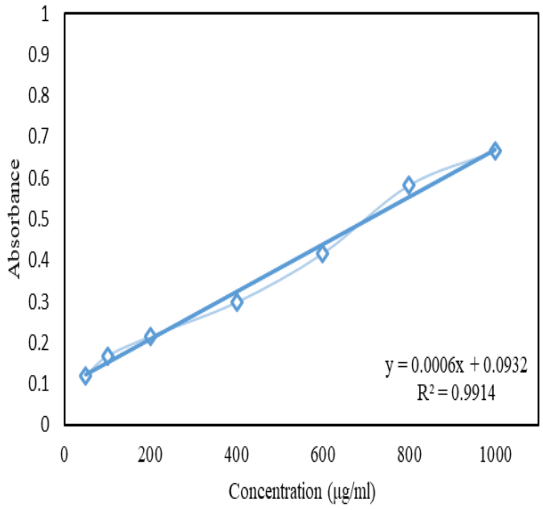
از بافر فسفات سالین با pH= ۷/۲ جهت بررسی میزان انتشار پروتئین از نانوذرات استفاده گردید. تیومرسال ۰/۰۱ درصد به عنوان نگهدارنده به بافر اضافه‌شد. ۱میلی‌گرم نانوذرات خشک‌شده

$$Entrapment\ efficiency(\%) = \frac{weight\ of\ drug\ in\ nanoparticles}{weight\ of\ drug\ fed\ initially} \times 100$$

حاوی پروتئین به تعدادی لوله‌ی در پیچدار منتقل و سپس به هر لوله ۱ میلی‌لیتر بافرفسفات سالین اضافه‌شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط شیکر انکوباسیون با دور ۷۵ rpm

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

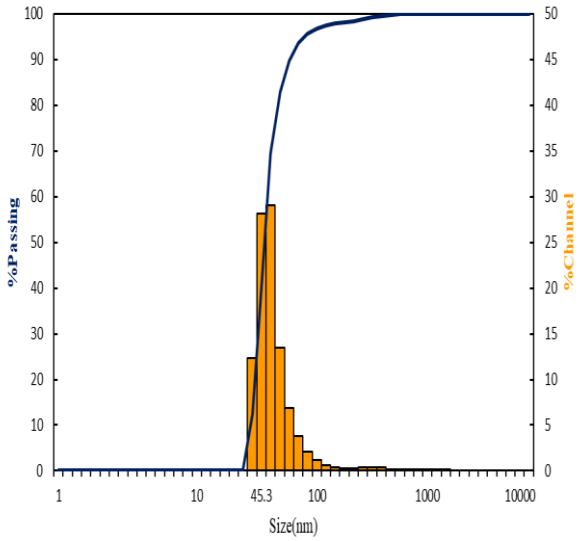
قـراردادهشـد. در زمـان‌هـای ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت، (سه یا یک) لوله را برداشـته و بـا دور ۱۲۰۰۰rpm، بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در دمـای ۱۵ درجـه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلـول رویـی را برداشـته و غلظت BSA به روش لوری اندازه‌گیری (شـکل ۱) و بـا توجـه بـه مقدار پروتئین اولیه بارگیری‌شده درصد آن محاسبه‌شد (۴).



شکل۱: منحنی استاندارد نمونه BSA روش لوری

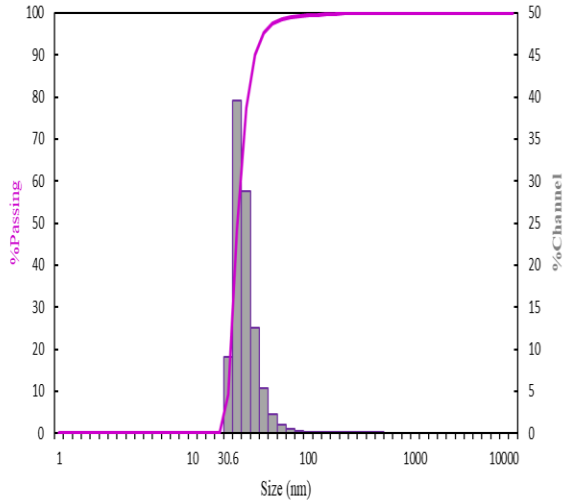
یافته‌ها

دو پلیمر طبیعی آلژینات و کیتوزان در این مطالعه جهت توسعه یک نانو حامل برای تحویل BSA، انتخاب شدند. مشخص شد که نانوذرات کیتوزان/آلژینات به راحتی با غلظت های نسبتاً کم پلیمر و کراسلینکر تشکیل می شوند. کاهش حلالیت پلیمر به دلیل ژل سازی یونی در حالی که کلرید کلسیم به محلول آلژینات در محیط آبی اضافه می شود، رخ می دهد. اگر غلظت کلرید کلسیم خیلی کم یا زیاد باشد، تشکیل ژل به درستی انجام نخواهد شد. با حضور کلسیم، برهمکنش یونی در همان زنجیره آلژینات رخ می‌دهد. مرحله بعدی فرآیند تهیه نانوذرات، پوشش نانوذرات آلژینات با بیوپلیمر کیتوزان بود. بر اساس آزمایش‌های اولیه، عوامل اصلی مؤثر بر اندازه و ویژگی‌های مورفولوژیکی نانوذرات عبارتند از غلظت پلیمرها و کراسلینکر، سرعت افزودن کراسلینکر، سرعت همزن، زمان همگن‌سازی، شکل ظرف و اندازه‌ی مگنت. هدف از مطالعه‌ی ما تهیه نانوذرات کیتوزان/آلژینات کروی با سطح صاف با اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰نانومتر بود. در ابتدا، نانوذرات از طریق یک پروتکل توصیف شده توسط Sarmento و همکاران تهیه شدند (۱۶)، اما نتایج نشان داد که نمودار توزیع اندازه بیش از یک پیک دارد. بنابراین روش سنتز نانوذرات به روش سرایی و همکاران تغییرکرد (۱۱) که نانوذرات آلژینات به صورت جداگانه بهینه می شد، نتایج تشکیل نانوذرات آلژینات با اندازه بیشتر از ۱۰۰ نانومتر بدست آمد. نهایتا با افزایش سرعت همزدن تا ۲۰۰۰ دور در دقیقه، تغییر شکل یا اندازه ظرف و آهنربا، نانوذرات آلژینات مناسب با اندازه متوسط ۴۵ نانومترتولید شدند. (شکل ۲) با توجه به این نتایج، گام بعدی برای سنتز نانوذرات کیتوزان/آلژینات برداشته شد. غلظت‌های مختلف کیتوزان آزمایش شدند. نانوذرات کیتوزان/آلژینات بهینه با غلظت آلژینات ۰/۳٪ w/v، غلظت کراسلینکر ۰/۱٪ w/v، غلظت کیتوزان ۰/۱٪ w/v و سرعت هم زدن ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به دست آمد. کاتیون‌های کلسیم در ابتدا با آلژینات با بار منفی از طریق ژلسازی یونی به هم متصل شدند تا اولین پوسته را تشکیل دهند و سپس کیتوزان با رقابت با کلسیم برای ایجاد پیوند متقابل با آلژینات، پوششی محکمتر را تشکیل داد. میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان/آلژینات و کیتوزان/آلژینات حاوی BSA ۳۰ و ۶۰ نانومتر به دست آمد (شکل‌های ۳ و ۴). افزودن کیتوزان باعث کاهش میانگین اندازه ذرات نانوذرات کیتوزان/آلژینات شد. به نظر می رسد که پیوند متقابل بین آلژینات و کیتوزان احتمالاً کشش سطحی را تغییر داده است که در نتیجه منجر به انقباض سطحی و کاهش اندازه ذرات نانوذرات می شود. درصد حصول نانوذرات، ظرفیت بارگذاری و کارایی احتباس برای BSA بر اساس معادلات (الف)، (ب) و (ج) به ترتیب ۸۰ ٪، ۷۴ ٪ و ۹۲ ٪ تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کارایی به دام افتادن بالاتری نسبت به مقدار گزارش شده توسط Sarmento و سرایی بود. شکل ۵ مراحل اجرا شده را به ترتیب برای تهیه و نگهداری نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA نشان می‌دهد.

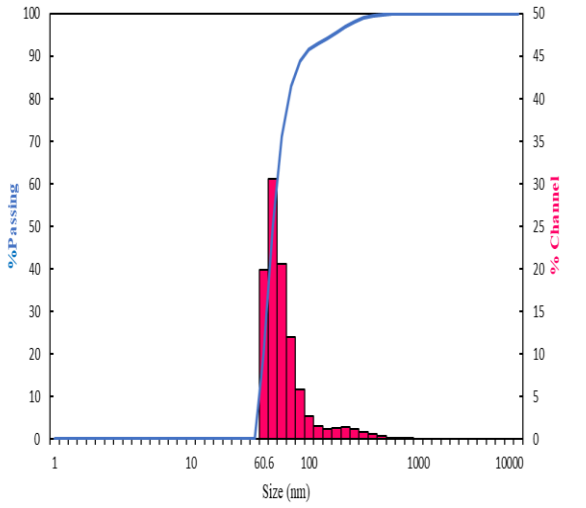


شکل۲: توزیع اندازه نانوذرات آلژینات در حالت بهینه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]



شکل ۳: توزیع اندازه ذره نانوذرات کیتوزان/آلژینات در حالت بهینه

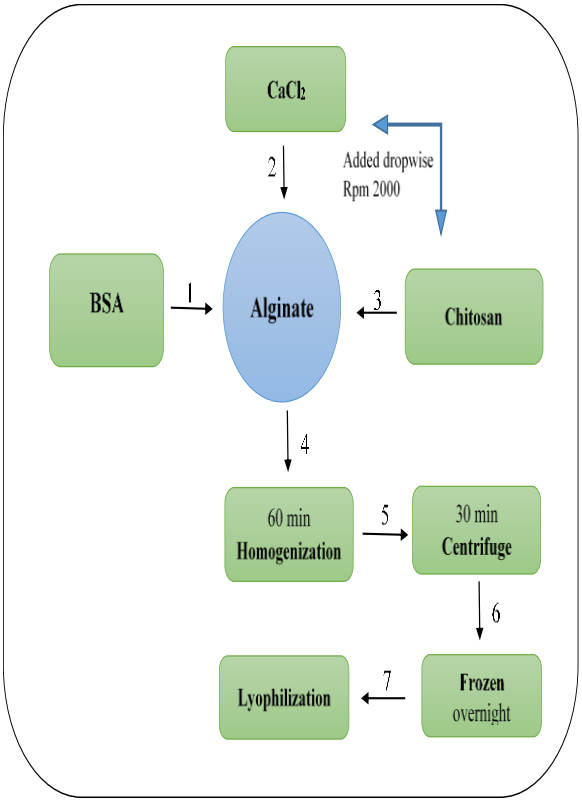


شکل ۴. توزیع اندازه ذره نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

بحث

مورفولوژی نانوذرات توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. تصویر و نمودار توزیع سایز ذرات در شکل ۶ نشان داده شده است. متوسط سایز و انحراف معیار محاسبه شده به ترتیب ۶۷/۸۵ و ۲۸/۳۶ نانومتر گزارش شد. بیشتر ذرات به شکل منظم با سطح صاف بودند. علاوه بر این، نانوذرات گسسته و بدون هیچ گونه تجمعی هستند.

در شکل ۷ طیف FTIR مربوط به کیتوزان، آلزینات و نانوذرات کیتوزان/آلژینات نشان داده شده است. چند پیک شاخص در طیف FTIR مربوط به کیتوزان وجود دارد. پیک پهن در محدوده‌ی جابه‌جایی cm^{-1} ۳۴۵۰ -۳۲۰۰ که مربوط به گروه‌های آمین و هیدروکسیل (ارتعاشات کششی OH- و پیوند هیدروژنی بین مولکولی)می‌باشد. پیک در محدوده‌ی cm^{-1} ۲۹۱۸ به علت ارتعاشات کششی OH- است. پیک cm^{-1} ۱۶۵۶ مربوط به کربونیل آمیدی است که در ساختار کیتوزان وجود دارد. پیک نزدیک به cm^{-1} ۱۳۸۰ ناشی از ارتعاشات کششی NH- آمید در ناحیه‌ی اثرانگشت طیف است. کشش متقارن C-O-C حوالی cm^{-1} ۱۰۸۰ قابل مشاهده است. پیک cm^{-1} ۶۱۳ بعلت ساختار ساکاریدی کیتوزان است (۱۷). درطیف FTIR مربوط به آلژینات پیک پهن محدوده‌ی cm^{-1} ۳۴۵۰ -۳۲۰۰ متعلق به ارتعاشات کششی OH- و پیوند هیدروژنی بین مولکولی است. نزدیک اعداد موجی cm^{-1} ۱۴۰۰-۱۷۰۰ ارتعاشات کششی کربونیل آمیدی مشاهده می‌شود.

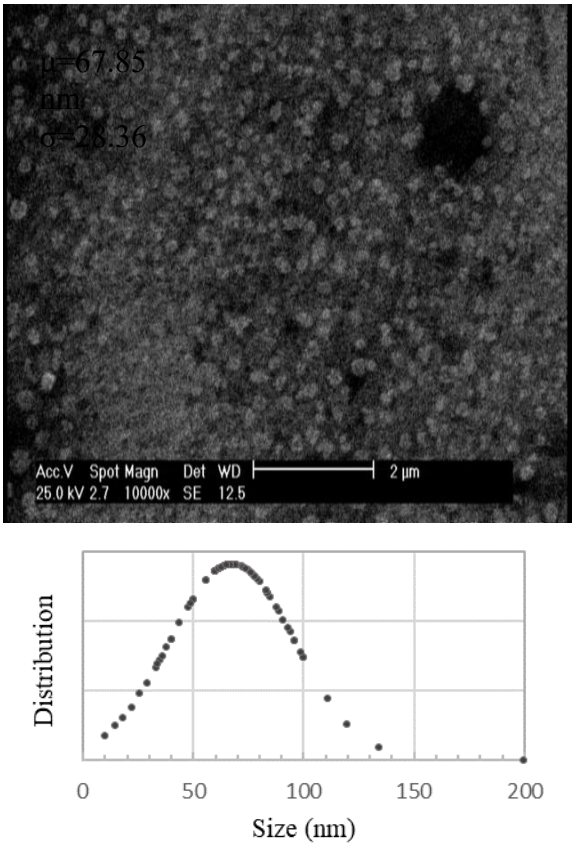


شکل ۵. مراحل سنتز نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

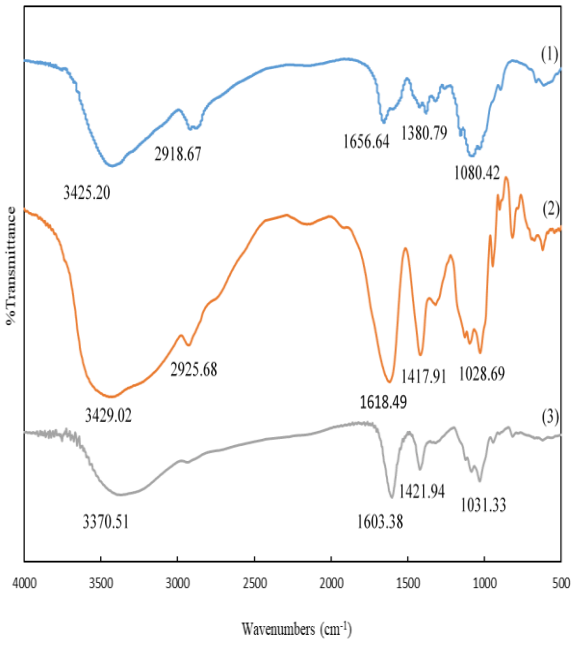
پیک‌های کربوکسیل ارتعاشات کششی متقارن نزدیک cm^{-1} ۱۶۱۸ و ارتعاشات کششی نا متقارن در cm^{-1} ۱۴۱۷قابل مشاهده است. پیک مشخص در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۰۲۸ نشان‌دهنده‌ی حلقه‌ی کربوهیدرات است (۱۸). در طیف FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات نیز پیک‌های آلژینات بعد از واکنش با کیتوزان از cm^{-1} ۱۶۱۸ به cm^{-1} ۱۶۰۳ و از cm^{-1} ۱۴۱۷ به cm^{-1} ۱۴۲۱ شیفت پیداکرده‌اند. همان طور که در شکل مقایسه‌ای مشخص است، پیک‌های کیتوزان نیز تغییراتی بعد از برهمکنش با آلژینات نشان داده‌اند. پیک آمیدی در cm^{-1} ۱۶۰۳ و cm^{-1} ۱۴۲۱ singlet شده است. علاوه بر این شدت پیک‌ها بعد از برهمکنش کاهش پیداکرده است. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که برهمکنش موثری

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

بین پلیمرها بعد از مخلوط شدن و تشکیل نانوذرات ناشی از بارهای مخالف آلژینات و کیتوزان وجود دارد، چراکه پیک‌های گروه‌های مولکولی مسئول برهمکنش یونی، تغییر کرده‌اند.

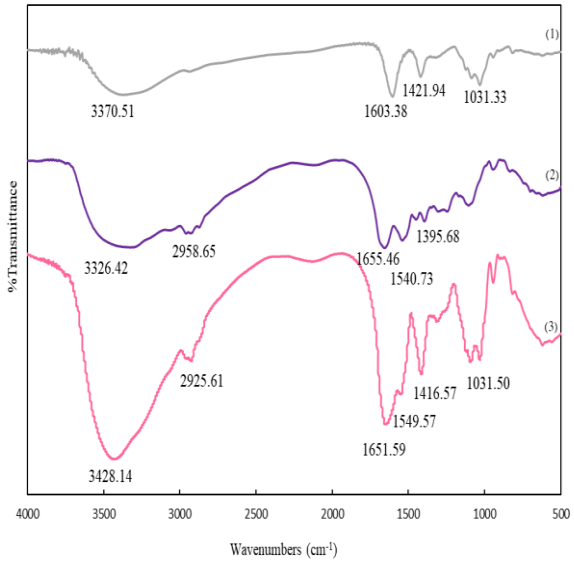


شکل۶: تصویر SEM نانوذرات کیتوزان/آلژینات- BSA



شکل۷. مقایسه‌ی طیف FTIR (۱)کیتوزان ، (۲) آلژینات و (۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات

شکل ۸ شکل مقایسه ایی پیک های FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات، BSA و نانوذرات آلژینات-کیتوزان حاوی BSA را به تصویر کشیده است. سه پیک شاخص درطیف FTIR مربوط به BSA وجود دارد. یک پیک قوی در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۶۵۵ پیوند آمیدI و کربونیل، آمیدII نزدیک cm^{-1} ۱۵۴۰ که متعلق به پیوند کششی C-N و خمشی N-H در آمیدهای نوع دوم است و نهایتا پیوند خمشی C-H که نزدیک cm^{-1} ۱۳۹۵ اتفاق می‌افتد که گاهی پیوند آمیدIII نامیده می‌شود. پیک پهن مربوط به ارتعاشات کششی OH– قابل مشاهده است با پیوندهای کششی متقارن و نامتقارن N-H که با شانه‌ی تیزتری روی آن قرار دارند. پیک‌های کوچکتری در محدوده‌ی cm^{-1} ۲۹۵۸ دیده‌می‌شود که به پیوند کششی C-H در ترکیبات آلیفاتیک اختصاص داده‌می‌شود (۱۹). در طیف FTIR نانوذرات کیتوزان/آلژینات-BSA مشاهده می‌شود که تغییراتی در پیک‌های شاخص BSA پس از بارگیری توسط نانوذرات کیتوزان/آلژینات ایجادشده است. بدین صورت که بعد از بارگیری توسط نانوذرات کیتوزان/آلژینات از cm^{-1} ۱۶۵۵ به cm^{-1} ۱۶۵۱ ، از cm^{-1} ۱۵۴۰ به cm^{-1} ۱۵۴۹ و cm^{-1} ۱۳۹۵ به cm^{-1} ۱۴۱۶ شیفت پیداکرده‌اند. بعلاوه همان طور که در شکل مقایسه‌ای مشخص است شدت این پیک‌ها بعد از بارگیری تغییراتی به همراه داشته است.

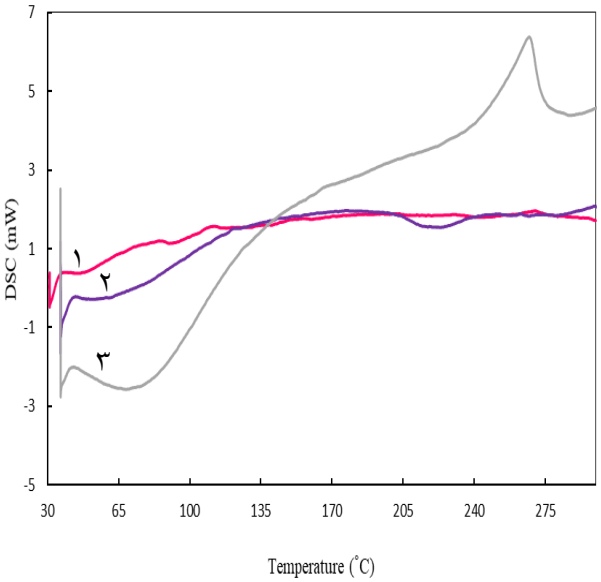


شکل۸. مقایسه‌ی طیف‌های FTIR (۱) نانوذرات کیتوزان/آلژینات، (۲) BSA و (۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA

ترموگرام‌های بدست آمده توسط DSC در شکل ۹ رسم شده است. اختلاف بین ترموگرام‌های مربوط به نانوذرات

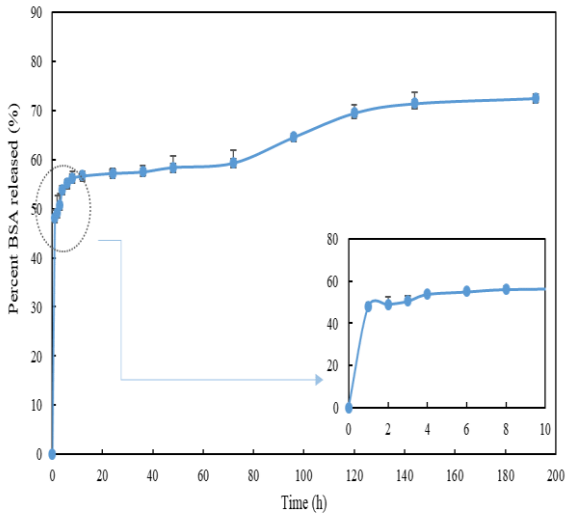
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

کیتوزان/آلژینات ، BSA و نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به صورت جداگانه را با تفاوتی که در پیک‌های اندوترمیک وجود دارد و جابه‌جایی دمایی که در پیک‌های تجزیه‌ی اگزوترمیک مشخص‌شده، نشان می‌دهد. پیک‌های اندوترمیک مربوط به از دست دادن آب گروه‌های آب‌دوست پلیمر می‌باشد، درحالی که پیک‌های اگزوترمیک نتیجه‌ی تخریب پلی‌الکترولیت‌ها به دلیل دهیدراته‌شدن، دپلیمریزاسیون و واکنش‌های پیرولیتی است (۲۰). ترموگرام نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA در مقایسه با BSA به تنهایی متفاوت بود که احتمالاً ترکیبی از دو نتیجه جداگانه را نشان می‌دهد. این بدان معنی است که یک تغییری در ترکیبات ذرات رخ داده است.



شکل ۹. مقایسه نمودارهای آنالیز حرارتی (۱) BSA، (۲) نانوذرات کیتوزان/آلژینات-BSA و(۳) نانوذرات کیتوزان/آلژینات

پروفایل انتشار تجمعی BSA از نانوذرات کیتوزان/آلژینات تهیه شده در شرایط in-vitro مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱۰ مشخص است، پروفیل رهاسازی در چند ساعت اول یک رهاسازی اولیه انفجاری را نشان می‌دهد و سپس وارد فاز رهاسازی مداوم و پایدار می‌شود. نانوذرات الگوی رهایش انفجاری را تقریباً ۵۰ درصد نشان دادند که دلیل آن جداشدن BSA هایی که به‌طور آزاد در سطح نانوذرات قرار داشتند و همچنین انتشار مولکول‌های BSA نزدیک به سطح نانوذرات بود. این مشاهدات با نتایج Sarmento و همکارانش مطابقت معقولی دارد. این پروفایل رهایش در ادامه یک رهایش کنترل شده در عرض ۱۴۴ ساعت را نشان داد. حداکثر انتشار (۷۰٪) پس از ۱۹۶ ساعت مشهود است. این مرحله ممکن است مربوط به رهاسازی BSA از هسته نانوذرات و تجزیه آهسته آنها باشد. داده‌های انتشار نشان داد که نانوذرات کیتوزان/آلژینات از BSA محافظت می‌کنند، ویژگی‌های زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیری دارند و انتشار مواد بارگیری‌شده را محدود می‌کند.



شکل۱۰. پروفایل آزادسازی BSA از نانوذرات کیتوزان/آلژینات

نتیجه گیری

در این پژوهش نانوذرات کیتوزان/آلژینات حاوی BSA به عنوان یک سیستم نوین واکسن رسانی هدفمند مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از روش ژل سازی یونی برای ساخت نانوذرات استفاده شد که در آن از حلال آلی استفاده نمی‌شود و روش بسیار آسان و ساده‌ای است و کمترین تنش به سیستم حین ساخت وارد می‌شود به این صورت که کلسیم کلرید به عنوان کراس‌لینکر قطره قطره به محلول آلژینات افزوده شد. نانوذرات کیتوزان/آلژینات بهینه با اضافه شدن کیتوزان در مرحله‌ی بعدی حاصل و بررسی شد. نانوذرات حاصل شده در هر مرحله از لحاظ اندازه و بار سطحی مورد بررسی قرارگرفتند. که نتایج نشان داد ذرات دارای میانگین اندازه زیر ۲۵۰ نانومتر هستند. با توجه به اینکه بهینه اندازه ذرات برای برداشت توسط سیستم ماکروفاژی و تحریک سیستم ایمنی، زیر ۳۰۰ نانومتر می‌باشد (اگرچه ذرات تا ۵ میکرون هم می‌توانند توسط این سیستم فاگوسیت شوند (۲۱، ۲۲). می‌توان نتیجه گرفت که این ذرات دارای کارایی لازم برای رسانش هر محموله‌ایی به سیستم ایمنی را دارا می‌باشند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که نانوذرات از کارایی محبوس‌سازی بالایی برخوردارند که این موضوع با توجه به مصرف کمتر BSA و استفاده‌ی حداکثر از آن اهمیت خاصی دارد. علاوه بر این رهش BSA از نانوذرات از یک روند آهسته پیروی می‌کند. نتایج نشان می‌داد که در طی ۱۹۶ ساعت حدود ۷۰ درصد از کل BSA آزاد شده است. که این خود می‌تواند یک مزیت برای سیستم آنتی‌ژن‌رسانی باشد.

تشکرو قدردانی

بدینوسیله از همراهی شرکت داروسازی مصون دارو که امکانات آزمایشگاهی را برای انجام این پروژه مهیا نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Roco MC. Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. Curr Opin Biotechnol 2003;14:337–46.

2. Ahirrao SP, Gide PS, Shrivastav B, Sharma P. Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. Res Rev J Pharm Nanotechnol 2014;2:1–6.

3. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. Front Cell Infect Microbiol 2013;3:1–13.

4. Naser M, Rezvan Y, Hossein Z. A New Antigen Delivery Vehicle Candidate: Orthochirus iranus Scorpion Venom Entrapped in Chitosan Nanoparticles. Br J Pharm Res 2015;7:264–75.

5. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:1650–62.

6. K. Garg N, Mangal S, Khambete H, K. Sharma P, K. Tyagi R. Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers. Recent Pat Drug Deliv Formul 2010;4:114.

7. Borges O, Borchard G, Verhoef JC, De Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. Int J Pharm 2005;299:155–66.

8. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The good, the bad and the ugly" of chitosans. Mar Drugs 2016;14:99.

9. Paques JP, Van Der Linden E, Van Rijn CJM, Sagis LMC. Preparation methods of alginate nanoparticles. Adv Colloid Interface Sci 2014;209:163–71.

10. Garrait G, Beyssac E, Subirade M. Development of a novel drug delivery system: Chitosan nanoparticles entrapped in alginate microparticles. J Microencapsul 2014;31:363–72.

11. Saraei F, Mohamadpour Dounighi N, Zolfagharian H, Moradi Bidhendi S, Khaki P, Inanlou F. Design and evaluate alginate nanoparticles as a protein delivery system. Arch Razi Inst 2013;68:139–46.

12. Loquercio A, Castell-Perez E, Gomes C, Moreira RG. Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans-cinnamaldehyde Entrapment. J Food Sci 2015;80:N2305–15.

13. 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. Carbohydr Polym 2009;77:599–606.

14. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. Eur J Pharm Biopharm 2008;68:513–25.

15. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. Drug Des Devel Ther 2016;10:483-507.

16. Sarmento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. Pharm Res 2007;24:2198–206.

17. Mirzaei F, Dounighi NM, Avadi MR, Rezayat M. A new approach to antivenom preparation using chitosan nanoparticles containing echiscarinatus venom as a novel antigen delivery system. Iran J Pharm Res 2017;16:858–67.

18. Sarmento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. Int J Pept Res Ther 2006;12:131–8.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]
[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]

19. Oudemans TFM, Boon JJ, Botto RE. FTIR and solid-state 13C CP/MAS NMR spectroscopy of charred and non-charred solid organic residues preserved in roman iron age vessels from the Netherlands. Archaeometry 2007;49:571–294.

20. Zohuriaan MJ, Shokrolahi F. Thermal studies on natural and modified gums. Polym Test 2004;23:575–9.

21. Hickey AR, Wenger TL, Carpenter VP, Tilson HH, Hlatky MA, Furberg CD, et al. Digoxin Immune Fab therapy in the management of digitalis intoxication: Safety and efficacy results of an observational surveillance study. J Am Coll Cardiol 1991;17:590–8.

22. Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. Expert Rev Vaccines 2010;9:1095–107.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.3.2.5]

[DOI: 10.61186/iau.34.3.227]