



چکیده

اخیرا نانوذرات زیست تخریب پذیر، به عنوان سامانه های نوین دارورسانی مورد توجه ویژه قرار گرفته اند. کیتوسان یکی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با بدن انسان است و همین خاصیت، امکان استفاده از آن را در زمینه های دارورسانی فراهم می سازد. هدف از این تحقیق، تعیین عوامل مؤثر و شرایط بهینه برای تهیه نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش ژل شدن یونی است. پارامترهای مطالعه شده شامل غلظت و pH محلول کیتوسان، نسبت مقدار کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات و وزن مولکولی کیتوسان است. بدین منظور، روش آماری تاگوچی برای طراحی آزمایش ها به کار رفت و اثر هر یک از متغیرها، در سه سطح مورد بررسی قرار گرفت. اندازه نانوذرات کیتوسان به وسیله دستگاه پراکنش نور لیزر معین گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت کیتوسان بیشترین اثر و وزن مولکولی آن کمترین اثر را بر اندازه نانوذرات تهیه شده از کیتوسان دارد. شرایط بهینه برای تهیه نانوذراتی با ابعاد کمتر از ۲۰۰ nm عبارت است از: غلظت ۱ mg/mL محلول کیتوسان در pH = ۵، نسبت ۳ مقدار کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات و وزن مولکولی برابر با ۲۰۰,۰۰۰ دالتون. متوسط اندازه نانوذرات تهیه شده در شرایط بهینه در حدود ۱۵۰ nm بود.

واژه های کلیدی

نانوذرات،
کیتوسان، ژل شدن یونی،
بهینه سازی، روش تاگوچی

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:
evf@modares.ac.ir

بخشی از این مقاله در هشتمین سمینار بین المللی علوم و تکنولوژی پلیمر (ISPST2007) ارائه شده است.

Determination of the Optimum Conditions for Production of Chitosan Nanoparticles

A. Dustgani¹, E. Vasheghani-Farahani^{1*} and M. Imani²

1. Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115/143, Tehran, Iran

2. Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14965/115, Tehran, Iran

Abstract

Biodegradable nanoparticles are intensively investigated for their potential applications in drug delivery systems. Being a biocompatible and biodegradable polymer, chitosan holds great promise for use in this area. This investigation was concerned with determination and optimization of the effective parameters involved in the production of chitosan nanoparticles using ionic gelation method. Studied variables were concentration and pH of the chitosan solution, the ratio of chitosan to sodium tripolyphosphate therein and the molecular weight of chitosan. For this purpose, Taguchi statistical method was used for design of experiments in three levels. The size of chitosan nanoparticle was determined using laser light scattering. The experimental results showed that concentration of chitosan solution was the most important parameter and chitosan molecular weight the least effective parameter. The optimum conditions for preparation of nanoparticles were found to be 1 mg/mL chitosan solution with pH=5, chitosan to sodium tripolyphosphate ratio of 3 and chitosan molecular weight of 200,000 daltons. The average nanoparticle size at optimum conditions was found to be about 150 nm.

Key Words

nanoparticles,
chitosan, ionic gelation,
optimization, Taguchi method

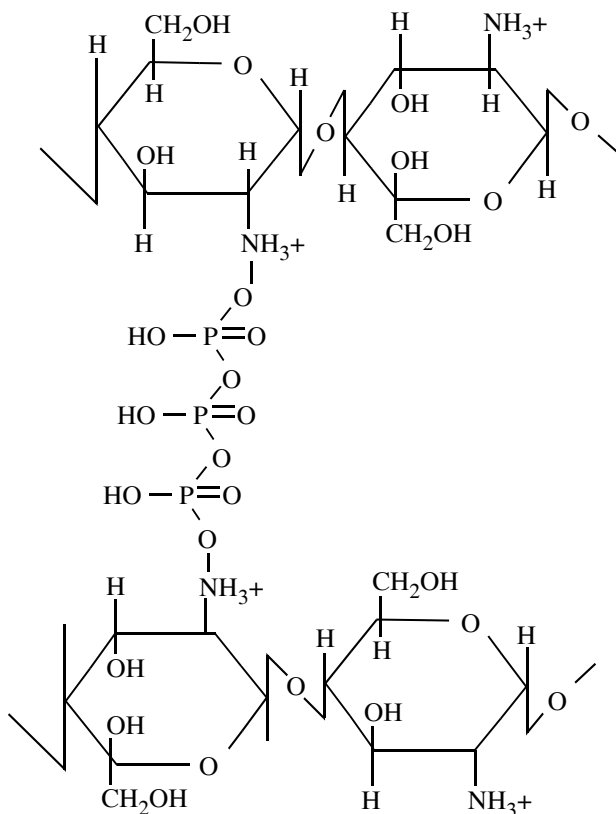
(* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: evf@modares.ac.ir

مقدمه

فیزیکی از راه ایجاد نیروهای الکتروستاتیکی به جای استفاده از اتصالات شیمیایی برای جلوگیری از آثار نامطلوب شبکه ای شدن شیمیایی، مورد توجه قرار گرفته است. سدیم تری پلی فسفات (TPP) یکی از این مواد پلی آنیونی است که می تواند از راه برقراری نیروهای الکتروستاتیکی بین گروه های فسفات خود و گروه های آمینی کیتوسان به این پلیمر (شکل ۲) متصل شود [۱۳،۱۴]. پس از آن که Bodmeier و همکاران [۱۵] تهیه کمپلکس TPP-CS را از طریق چکاندن قطره های TPP در محلول کیتوسان گزارش کردند، بسیاری از محققان این قابلیت را بررسی [۲۱-۱۶] و از آن برای تهیه نانوذرات کیتوسان استفاده کرده اند. در این روش، کیتوسان در یک محلول اسیدی ضعیف حل می شود. سپس، این محلول با غلظت مناسب با محلول TPP در غلظت مشخص مخلوط می گردد. در اثر ایجاد کمپلکس بین یون های با بار مخالف، کیتوسان به شکل ذرات کروی درآمده و محلول حالت کلوئیدی پیدا می کند. برخی از این ذرات دارای ابعاد نانومتری هستند که باید از بقیه ذرات جدا شوند.

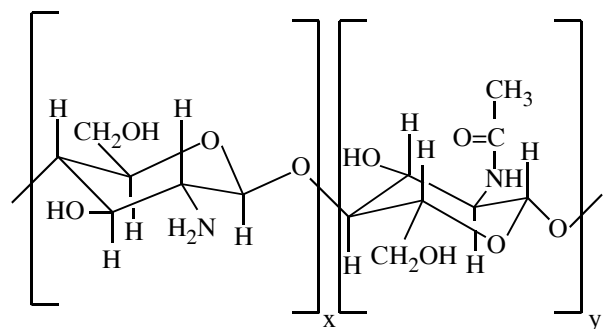
در این مطالعه، نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش ژل شدن یونی تهیه و اثر متغیرهای فرایند بر اندازه نانوذرات با استفاده از طراحی آزمایش ها به روش تاگوجی مطالعه شد. همچنین، شرایط بهینه برای تهیه نانوذرات با حداقل اندازه کمتر از ۲۰۰ nm معین گردید.



شکل ۲- نحوه اتصال کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات.

در سال های اخیر، تهیه نانوذرات به عنوان حامل های دارو، یکی از زمینه های پژوهشی مورد توجه در سامانه های نوین دارورسانی بوده است. یکی از مشخصات مطلوب نانوذرات حامل دارو زیست سازگاری آنهاست به نحوی که با بدن انسان سازگاری مناسبی داشته و برای آن مضر نباشد. بدین منظور، باید در تهیه این نانوذرات از موادی استفاده شود که زیست تخریب پذیر بوده و پس از انجام عمل دارورسانی تجزیه شوند و بدون داشتن اثر جانبی مضر از بین بروند. پلیمر طبیعی کیتوسان یکی از مناسب ترین موادی است که تا کنون برای این منظور شناسایی و مطالعه شده است. کیتوسان پلیمری زیست تخریب پذیر، زیست سازگار و زیست چسبنده است که توجه زیادی را برای مقاصد درمانی با دامنه وسیعی از کاربردهای دارورسانی و ژن درمانی جلب کرده است [۵-۱]. کیتوسان کوپلیمری متشکل از گلوکوز و N-استیل گلوکوز آمین است که به وسیله پیوندهای (۱-۴) β -گلوکوزیدی به هم اتصال یافته اند (شکل ۱).

کیتوسان از راه واکنش استیل زدایی کیتین، که دومین زیست پلیمر از نظر فراوانی در طبیعت است، به دست می آید. این پلیمر دارای گروه های آمین آزاد علاوه بر گروه های هیدروکسیل است که می تواند منجر به تولید مشتقات مختلف از آن شود [۳،۱]. کیتوسان برای تهیه میکروذرات حامل داروی انسولین [۶] و پردنیزولون سدیم فسفات [۷] به کار رفته است. نانوذرات کیتوسان برای انتقال مواد دارویی مانند انسولین [۸] دوگوزروبیسیین (Doxorubicin) [۹] و نیز پلاسמיד DNA [۱۰] استفاده شده اند. یکی از روش های تهیه نانوذرات کیتوسان استفاده از مواد شبکه ای کننده مانند گلو تار آلدهید، گلی اکسال و اتیلن گلیکول از راه پیوند شیمیایی است [۱۱،۱۲]. این مواد اگر چه عوامل شبکه ای کننده خوبی هستند، اما به علت سمی بودن در کاربردهای زیستی قابل استفاده نیستند. کیتوسان در محیط اسیدی به علت باردار شدن گروه های آمینی موجود در آن به شکل پلی کاتیونی درآمده و می تواند با گونه های دارای بار منفی مانند سولفات و فسفات اتصال یافته و تولید ژل کند. ایجاد اتصالات



شکل ۱- ساختار شیمیایی کیتوسان.

تجربی

شد. مایع روی ذرات ته نشین شده به وسیله نمونه گیر برداشته شد و به کمک گریز مرکز یخچال دار در دمای 10°C و شتاب 35000 g به مدت 30 min ذرات باقی مانده در آن جدا شدند. ذرات به دست آمده دارای ابعاد نانومتری است که برای بررسی اندازه و شکل آنها به ترتیب از دستگاه پراکنش نور لیزر و میکروسکوپ الکترون پویشی استفاده گردید.

بررسی اثر متغیرهای فرایند بر اندازه نانوذرات کیتوسان

با توجه به مطالعات گذشته [۲۳، ۲۴]، اثر متغیرهایی مانند غلظت، pH، محلول کیتوسان، نسبت کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات و وزن مولکولی کیتوسان انتخاب و اثر آنها بر اندازه ذرات مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به این که روش ژل شدن یونی بیشتر یک فرایند شیمیایی است، بنابراین از بررسی عواملی مانند دور هم زن، شکل هندسی ظرف واکنش و نوع هم زن، که بیشتر جنبه فیزیکی دارند، خودداری شده است. بدون شک این عوامل نیز می توانند بر اندازه ذرات موثر باشند. بنابراین، برای انتخاب عوامل موثر می توان از روش های غربال گری مانند پلاکت برمن (Plackett-Berman) استفاده کرد. به منظور تعیین اثر متغیرهای شیمیایی اشاره شده در بالا روش آماری تاگوچی برای طراحی آزمایش ها به کار رفت. طراحی آزمایش ها برای بررسی هر یک از عوامل یاد شده در سه سطح (جدول ۱) و بر اساس آرایه L_9 تاگوچی انجام گرفت (جدول ۲). هر یک از آزمایش ها حداقل دو بار تکرار و پاسخ هر آزمایش (اندازه نانوذرات) به وسیله دستگاه پراکنش نور لیزر معین شد. پس از انجام آزمایش ها نتایج به دست آمده با نرم افزار 4-Qualitek تجزیه و تحلیل شده و اثر هر یک از متغیرهای فرایند بر اندازه ذرات تهیه شده معین شد و شرایط بهینه برای تولید نانوذرات با حداقل اندازه به دست آمد.

جدول ۲- طراحی آزمایش ها برای تهیه نانوذرات کیتوسان بر اساس آرایه L_9 تاگوچی.

آزمایش	A (mg/mL)	B	C	D (Da)
۱	۱	۳	۲/۰	۱۵۰۰۰۰
۲	۱	۴	۳/۵	۲۰۰۰۰۰
۳	۱	۵	۵/۰	۴۰۰۰۰۰
۴	۲	۳	۳/۵	۴۰۰۰۰۰
۵	۲	۴	۵/۰	۱۵۰۰۰۰
۶	۲	۵	۲/۰	۲۰۰۰۰۰
۷	۳	۳	۵/۰	۲۰۰۰۰۰
۸	۳	۴	۲/۰	۴۰۰۰۰۰
۹	۳	۵	۳/۵	۱۵۰۰۰۰

مواد

در این پژوهش، از کیتوسان با وزن های مولکولی ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلو دالتون (محصول شرکت سیگما) با درجه استیل زدایی به ترتیب ۸۵، ۶۵ و ۶۰ درصد، سدیم تری پلی فسفات (محصول شرکت فلوکا) و استیک اسید گلاسیال، سدیم هیدروکسید و محلول هیدروکلرید اسید (همگی از شرکت مرک) استفاده گردید.

دستگاه ها

از دستگاه گریز مرکز مدل B۱۶ ساخت شرکت B. Braun برای جداسازی اولیه ذرات و از گریز مرکز یخچال دار با سرعت زیاد ساخت شرکت آمریکایی Beckman برای جداسازی نهایی نانوذرات استفاده شد. برای بررسی توزیع و متوسط اندازه نانوذرات دستگاه پراکنش نور لیزر ساخت شرکت Sematech فرانسه و برای بررسی شکل شناسی نانوذرات، میکروسکوپ الکترون پویشی (SEM) مدل XL۳۰ محصول شرکت Philips به کار گرفته شد.

روش ها

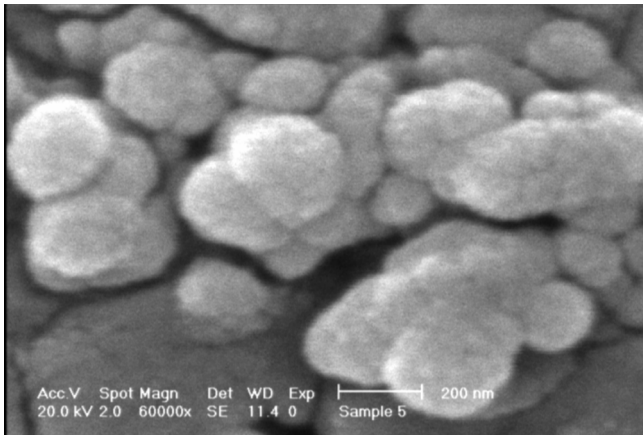
تهیه نانوذرات کیتوسان

برای تهیه نانوذرات کیتوسان از روش ژل شدن یونی استفاده شد [۲۳، ۱۸]. برای این منظور، محلولی با غلظت 2 mg/mL از کیتوسان در استیک اسید ۲٪ وزنی و محلولی با غلظت 1 mg/mL از سدیم تری پلی فسفات تهیه گردید. 2 mL از محلول سدیم تری پلی فسفات به شکل قطره قطره به وسیله نمونه گیر به 5 mL از محلول کیتوسان اضافه شده و با هم زن مغناطیسی در سرعت 400 rpm هم زده شد. محلول با پیشرفت فرایند ژل شدن یونی به تدریج به سمت کلئیدی شدن پیش می رود. محلول کلئیدی به دست آمده شامل نانوذرات و میکروذرات کیتوسان است. بنابراین، ابتدا به کمک گریز مرکز با سرعت 12000 rpm و به مدت 20 min ذرات میکرومتری جداسازی

جدول ۱- مقادیر هر یک از متغیرهای فرایند در سطوح مختلف.

سطح	متغیر	۱	۲	۳
A	غلظت محلول کیتوسان (mg/mL)	۱	۲	۳
B	نسبت کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات	۳	۴	۵
C	pH محلول کیتوسان	۲	۳/۵	۵
D	وزن مولکولی کیتوسان (Da)	۱۵۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۴۰۰۰۰۰

نتایج و بحث

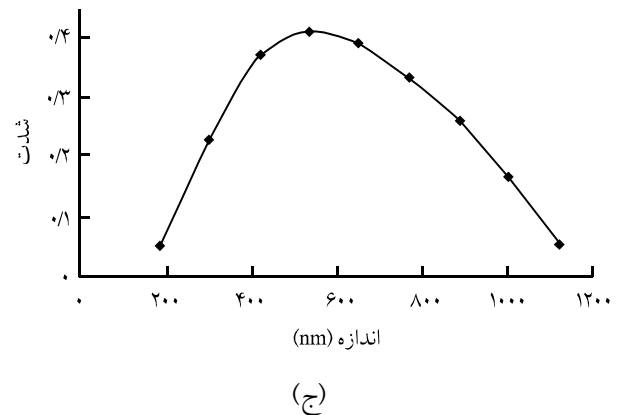
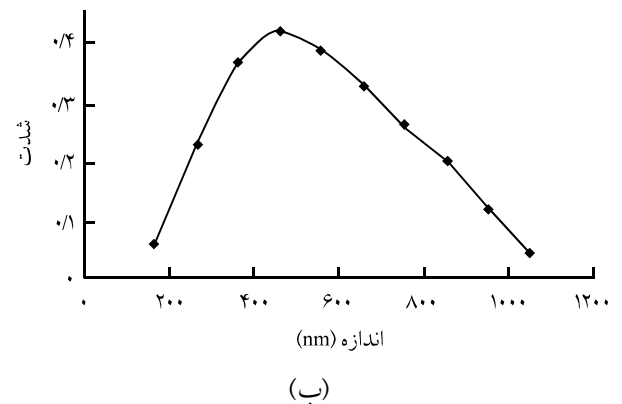
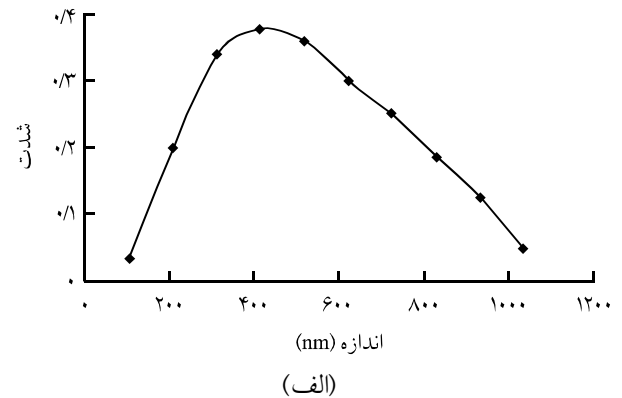


شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات کیتوسان.

میکروسکوپ الکترون پوشی نانوذرات کیتوسان را نشان می‌دهد. نانوذرات تهیه شده کروی شکل اند، اما برخی از آنها به هم چسبیده‌اند. باید توجه داشت که برای تهیه تصویر میکروسکوپ الکترون پوشی نمونه‌ها، محلول حاوی نانوذرات روی پایه‌های فلزی مخصوص قرار داده شده‌است. در این حالت، نانوذرات دارای پایداری کافی نبوده و طی فرایند خشک کردن به یکدیگر می‌چسبند. با توجه به نوع میکروسکوپ الکترونی استفاده شده در این پژوهش، شکل حاصل بهترین شکلی است که پس از چندین بار تکرار عکس برداری با میکروسکوپ یاد شده حاصل گردید. با توجه به شکل مشخص می‌شود که نانوذرات کروی کیتوسان به خوبی قابل شناسایی هستند. در جدول ۳، اندازه متوسط ذرات به دست آمده در آزمایش‌های مختلف که بر اساس آرایه L9 تاگوجی انجام گرفته با دو بار تکرار نشان داده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد، اندازه ذرات تهیه شده در محدوده نانومتراند و سطوح انتخاب شده برای بررسی اثر متغیرهای فرایند مناسب است. در شکل‌های ۵ - الف تا د اثر هر یک از متغیرهای فرایند روی اندازه نانوذرات، نشان داده شده‌است که با استفاده از تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمایش‌ها با نرم‌افزار ۴-Qualitek به دست آمده‌است. با توجه به نتایج آمده در این شکل‌ها مشاهده می‌شود، با کاهش غلظت محلول کیتوسان، افزایش pH، کاهش نسبت کیتوسان به سدیم تری‌پلی‌فسفات و کاهش وزن مولکولی کیتوسان، اندازه نانوذرات حاصل کاهش می‌یابد. این نتایج را می‌توان بدین ترتیب تفسیر کرد که با افزایش غلظت محلول کیتوسان گر انرژی محلول افزایش یافته و مقاومت فاز مایع در برابر پراکنده شدن افزایش می‌یابد، در نتیجه ذرات بزرگتر تشکیل می‌شود.

افزایش اندازه نانوذرات با افزایش غلظت محلول کیتوسان توسط Gan و همکاران [۲۴] و نیز Zhang و همکاران [۲۵] گزارش شده‌است.

نمودار توزیع اندازه ذرات تهیه شده از محلول کیتوسان با غلظت ۲ mg/mL و وزن‌های مولکولی ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوالتون به ترتیب در شکل ۳ نشان داده شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، همه ذرات به دست آمده دارای ابعاد نانومتر هستند و اثر وزن مولکولی کیتوسان بر اندازه متوسط ذرات حائز اهمیت نیست. شکل ۴ تصویر



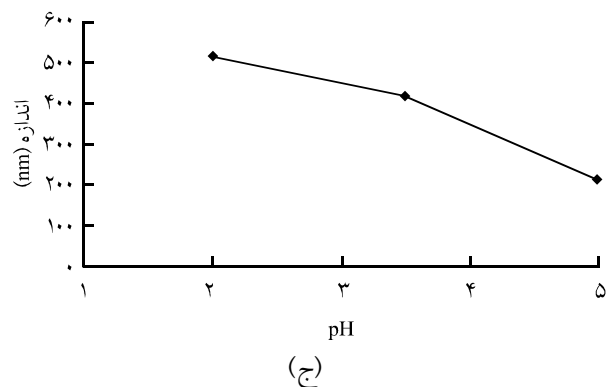
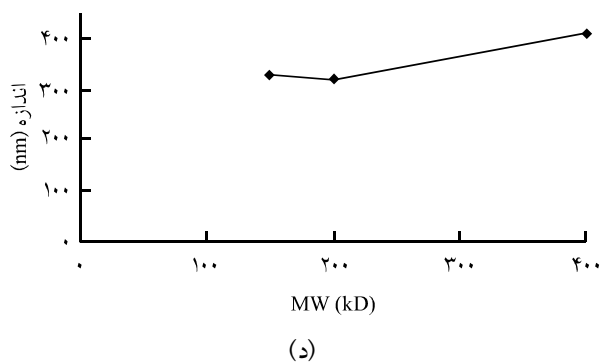
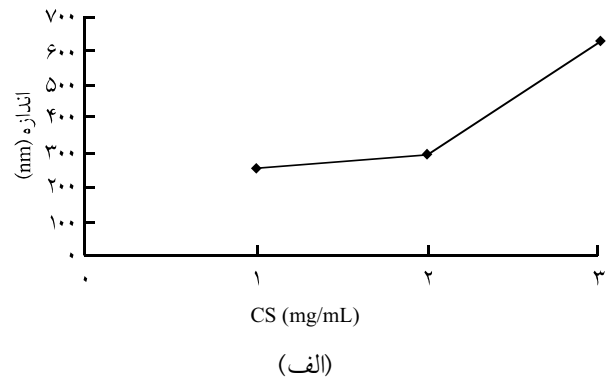
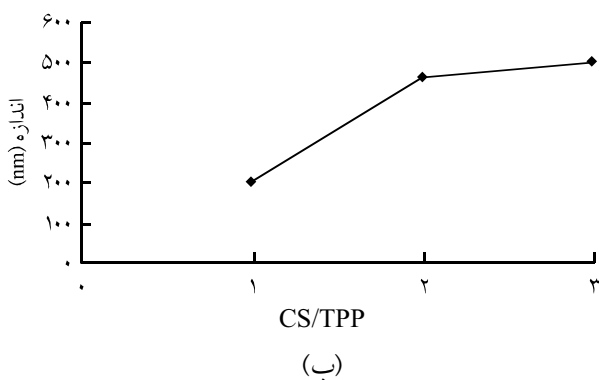
شکل ۳- نمودار توزیع اندازه نانوذرات کیتوسان با وزن‌های مولکولی مختلف: (الف) ۱۵۰ kD، (ب) ۲۰۰ kD و (ج) ۴۰۰ kD.

جدول ۳- اندازه متوسط نانوذرات تهیه شده در آزمایش های مختلف آرایه L9 تاگوجی.

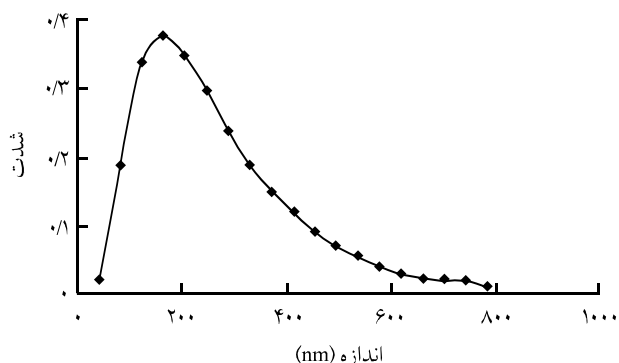
آزمایش	[CS]	CS/TPP	pH	MW	اندازه متوسط ذرات در آزمون (nm)	
					اول	دوم
۱	۱	۳	۲/۰	۱۵۰۰۰۰	۲۲۴	۲۲۸
۲	۱	۴	۳/۵	۲۰۰۰۰۰	۳۰۴	۳۱۱
۳	۱	۵	۵/۰	۴۰۰۰۰۰	۲۳۲	۲۱۸
۴	۲	۳	۳/۵	۴۰۰۰۰۰	۱۷۲	۱۸۰
۵	۲	۴	۵/۰	۱۵۰۰۰۰	۲۵۰	۲۳۷
۶	۲	۵	۲/۰	۲۰۰۰۰۰	۴۹۸	۴۹۴
۷	۳	۳	۵/۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۵	۲۳۱
۸	۳	۴	۲/۰	۴۰۰۰۰۰	۸۳۶	۸۷۰
۹	۳	۵	۳/۵	۱۵۰۰۰۰	۷۸۴	۸۲۹

اثر نسبت کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات را می توان به این شکل توجیه کرد که کاهش این نسبت به معنی کاهش غلظت محلول کیتوسان یا افزایش غلظت سدیم تری پلی فسفات است. در مورد کاهش غلظت کیتوسان همان ساز و کاری، که قبلاً اشاره شد، برقرار است. ولی، درباره افزایش غلظت TPP، با توجه به این که چگالی ماده شبکه ای کننده افزایش می یابد، بنابراین شبکه متراکم تری ایجاد می شود که منجر به کاهش تورم نانوذرات تشکیل شده در محلول می گردد و ذراتی با اندازه کوچکتر به وجود می آید.

این وابستگی بین CS/TPP با اندازه نانوذرات کیتوسان توسط Alonso و همکاران [۲۰، ۲۶] و نیز Gan و همکاران [۲۴] بررسی شده و به نتایج مشابهی دست یافته اند. با افزایش pH محلول کیتوسان، انحلال پذیری آن و ساز و کار برهم کنش گروه های یونی با بار مخالف کاهش یافته و میزان گروه های یونی با بار مثبت در محلول کاهش می یابد. بنابراین، در مراحل اولیه تهیه نانوذرات شبکه ضعیف تری تشکیل می شود و تنش ناشی از هم زدن راحت تر می تواند آن را پراکنده کند و در نتیجه اندازه ذرات تشکیل شده کاهش می یابد. همچنین، با افزایش pH، گرانیوی محلول کیتوسان به دلیل کم شدن انحلال پذیری



شکل ۵- اثر هر یک از متغیرهای فرایند بر اندازه نانوذرات: (الف) غلظت محلول کیتوسان، (ب) نسبت کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات، (ج) pH محلول کیتوسان و (د) وزن مولکولی محلول کیتوسان.



شکل ۷. نمودار توزیع اندازه نانوذرات کیتوسان در حالت بهینه.

نتیجه گیری

در این پژوهش نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش ژل شدن یونی به عنوان روشی سریع، کارا و بی نیاز به استفاده از مواد شیمیایی سمی و مضر تهیه شد. نتایج آزمایش های LLS نشان می دهد، اندازه این ذرات کمتر از ۶۰۰ nm است. نتایج طراحی آزمایش ها با استفاده از روش آماری تاگوچی نشان می دهد، با کاهش غلظت محلول کیتوسان، افزایش pH محلول کیتوسان، کاهش نسبت کیتوسان به سدیم تری پلی فسفات و کاهش وزن مولکولی کیتوسان مقدار اندازه نانوذرات تولید شده کاهش می یابد. غلظت محلول کیتوسان دارای بیشترین اثر و وزن مولکولی آن دارای کمترین اثر بر اندازه ذرات تولید شده اند. شرایط بهینه تهیه نانوذرات با استفاده از تحلیل آماری نتایج عبارت است از: $[CS] = 1 \text{ mg/mL}$, $pH = 5$, $CS/TPP = 3$, $Mw = 200 \text{ kD}$. در این شرایط نانوذرات کیتوسان با اندازه تقریبی ۱۵۰ nm به دست آمد. با توجه به این که نانوذرات مصرفی در کاربردهای دارویی هر قدر کوچکتر باشند (کمتر از ۲۰۰ nm) مناسب تراند، بنابراین نانوذرات کیتوسان تهیه شده در شرایط بهینه می توانند به عنوان حاملی مناسب برای مصارف دارورسانی به کار روند.

تشکر و قدردانی

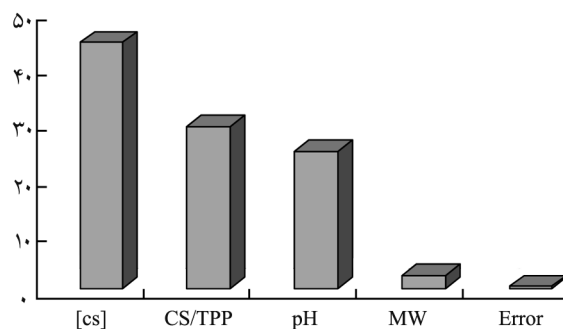
از پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران و آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی دانشگاه تربیت مدرس که با فراهم کردن امکانات، انجام آزمایش ها را میسر کردند و نیز ستاد توسعه فناوری نانو که از این پژوهش حمایت کرده است، تشکر و قدردانی می شود.

جدول ۴. سطوح متغیرهای فرایند تهیه نانوذرات در حالت بهینه.

نام متغیر	مقدار	سطح
غلظت محلول کیتوسان	۱ mg/mL	۱
نسبت کیتوسان به TPP	۳	۱
pH محلول کیتوسان	۵/۰	۳
وزن مولکولی کیتوسان	۲۰۰۰۰۰۰ Da	۲

آن کاهش می یابد و همان طور که اشاره شد، این امر منجر به کاهش اندازه ذرات می شود. Gan و همکاران [۲۴] نیز اثر pH را در نسبت های مختلف CS/TPP بررسی کرده و به نتیجه مشابهی دست یافته اند، با این تفاوت که حداقل اندازه نانوذرات را در $pH = 5/5$ گزارش کرده اند. درباره وزن مولکولی کیتوسان نیز باید گفت که افزایش وزن مولکولی باعث افزایش گرانروی محلول و در نتیجه ازدیاد مقاومت فاز مایع در برابر پراکنده شدن ناشی از هم زدن می شود. بنابراین، با افزایش وزن مولکولی کیتوسان، نانوذرات با ابعاد بزرگتری تشکیل می شوند. این نتیجه توسط تمام گروه هایی که روی وزن مولکولی کار کرده اند، گزارش شده است.

تجزیه و تحلیل نتایج آمده در جدول ۳ با استفاده از نرم افزار نشان می دهد که مقادیر متغیرهای فرایند تهیه نانوذرات در حالت بهینه به شکل مقادیر ارائه شده در جدول ۴ است. میزان اثر هر یک از متغیرها بر اندازه نانوذرات به شکل نمودار ستونی در شکل ۶ نشان داده شده است. بر این اساس، غلظت کیتوسان دارای بیشترین اثر و وزن مولکولی آن دارای کمترین اثر بر اندازه نانوذرات است. مقدار اندازه نانوذرات در حالت بهینه با استفاده از نرم افزار اشاره شده در حدود ۱۵۰ nm است. برای بررسی درستی این مقدار، نانوذرات کیتوسان در شرایط بهینه معین شده به کمک نرم افزار، تهیه شده و به وسیله دستگاه پراکنش نور لیزر بررسی شد. میانگین اندازه نانوذرات به دست آمده در این حالت، ۱۶۲ nm بود (شکل ۷) که با نتیجه حاصل از نرم افزار تطابق خوبی دارد.



شکل ۶. نمودار ستونی میزان اثر هر یک از متغیرهای فرایند در حالت بهینه.

مراجع

1. Illum L., Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient, *Pharm. Res.*, **15**, 1326-1331, 1998.
2. Dodane V. and Vilivalam V.D., Pharmaceutical Applications of Chitosan, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1**, 246-253, 1998.
3. Felt O., Buri P. and Gurny R., Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 979-993, 1998.
4. Yao K.D., Peng T., Yin Y.J. and Xu M.X., Microcapsules/Microspheres Related to Chitosan, *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **35**, 155-180, 1995.
5. Kas H.S., Chitosan: Properties, Preparations and Application to Microparticulate Systems, *J. Microencapsulation*, **14**, 689-711, 1997.
6. Varshosaz J. and Alinangri R., Effect of Citric Acid on Insulin Loaded Chitosan Microspheres, *Iran. Polym. J.*, **14**, 647-656, 2005.
7. Mahdavi H., Taghizadeh S.M., Mivehchi H. and Khanbeigi F., The Effect of Chitosan Molecular Weight on the Rate of Drug Release of Prednisolone Sodium Phosphate from Chitosan Microspheres Prepared by Spray Dryer, *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **19**, 231-237, 2006.
8. Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J., Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles, *Pharm. Res.*, **16**, 1576-1591, 1999.
9. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A. and Alonso M.J., Chitosan Nanoparticles as Delivery Systems for Doxorubicin, *J. Control. Release*, **73**, 255-267, 2001.
10. Chew J.L., Wolfowicz C.B., Mao H.Q., Leong K.W. and Chua K.Y., Chitosan Nanoparticles Containing Plasmid DNA Encoding House Dust Mite Allergen, Der p 1 for Oral Vaccination in mice, *Vaccine*, **21**, 2720-2729, 2003.
11. Akbuga J. and Durnaz G., Preparation and Evaluation of Crosslinked Chitosan Microspheres Containing Furosemide, *Int. J. Pharm.*, **111**, 217-222, 1994.
12. Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A. and Gurny R., *Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 19-34, 2004.
13. Kawashima Y., Handa T., Takenaka H., Lin S.Y. and Ando Y., Novel Method for the Preparation of Controlled-release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-chitosan, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 264-268, 1985.
14. Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takenaka H. and Lin S.Y., The Effect of Thickness and Hardness of the Coating Film on the Drug Release of Theophylline Granules, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2469-2474, 1985.
15. Bodmeier R., Oh K.H. and Pramart Y., Preparation and Evaluation of Drug-Containing Chitosan Beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **15**, 1475-1494, 1989.
16. Shirashi S., Imai T. and Otagiri M., Controlled Release of Indomethacin by Chitosan-Polyelectrolyte Complex: Optimization and In Vivo: In Vitro Evaluation, *J. Control. Release*, **25**, 217-225, 1993.
17. Sezer A.D. and Akbuga J., Controlled Release of Piroxicam from Chitosan Beads, *Int. J. Pharm.*, **121**, 113-116, 1995.
18. Aydin Z. and Akbuga J., Chitosan Beads for the Delivery of Salmon Calcitonin: Preparation and Characteristics, *Int. J. Pharm.*, **131**, 101-103, 1996.
19. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jata J.L. and Alonso M.J., Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Protein and Vaccines, *Pharm. Res.*, **14**, 1431-1436, 1997.
20. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jata J.L. and Alonso M.J., Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **63**, 125-132, 1997.
21. Shu X.Z. and Zhu K.J., A Novel Approach to Prepare Tripolyphosphate/Chitosan Complex Beads for Controlled Release Drug Delivery, *Int. J. Pharm.*, **201**, 51-58, 2000.
22. Calvo P., Boughaba A.S., Appel M., Fattal E., Alonso M.J. and Couvreur P., Oligonucleotide-Chitosan Nanoparticles as New Gene Therapy Vector, *Proceedings of 2nd World Meeting APGI/APV*, Paris, 1111-1112, 1998.
23. Katas H. and Alpar H.O., Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles for SIRNA Delivery, *J. Control. Release*, **115**, 216-225, 2006.
24. Gan Q., Wang T., Cochrane C. and McCarron P., Modulation of

- Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gen Delivery, *J. Colloid Surfac.*, **44**, 65-73, 2005.
25. Zhang H., Oh M., Allen C. and Kumacheva E., Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery, *Biomacromolecules*, **5**, 2461-2468, 2004.
26. Janes K.A. and Alonso M.J., Depolymerized Chitosan Nanoparticles for Protein Delivery: Preparation and Characterization, *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**, 2769-2776, 2003.