

## بهینه‌سازی سنتز نانوذرات کیتوزان

سید محسن اصغری<sup>1\*</sup>، ساناز ابراهیمی سامانی<sup>2</sup>، زهرا سراج<sup>3</sup>، خسرو خواجه<sup>4</sup>، سامان حسینخانی<sup>4</sup>

1- استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

2- دانشجوی دکترای بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

3- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

4- استاد بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

\* رشت، کد پستی 48193833697

sm\_asghari@guilan.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/5/28 پذیرش مقاله: 93/6/10)

**چکیده** - نانوذرات زیست تخریب‌پذیر پلی‌مری به دلیل انکپسوله شدن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه‌اند. انکپسوله شدن مواد دارویی در نانوذرات پلی‌مری می‌تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد. پلی‌مرها به دو دسته طبیعی و سنتزی تقسیم می‌شوند. کیتوزان به عنوان یک پلی‌مر طبیعی می‌تواند کاربردهای زیادی را در دارورسانی داشته باشد. هدف این مطالعه بهینه‌سازی تولید نانوذرات کیتوزان برای استفاده در انتقال دارو است. نانوذرات کیتوزان بر اساس روش ionic gelation تهیه و تعیین ویژگی شدند. مورفولوژی نانوذرات و توزیع اندازه ذره، بار سطحی و شاخص پراکندگی (PDI) تعیین شدند. طیف FTIR در مورد نمونه‌های لیوفیلیزه ثبت شد و تشکیل نانوذرات را اثبات کرد. تحقیق حاضر نشان داده که اندازه ذرات و پتانسیل زتا را می‌توان با تغییر شرایط، از جمله استفاده از نسبت‌های مختلف وزنی و حجمی کیتوزان و تنظیم pH کنترل کرد.

**کلیدواژگان:** نانوذره کیتوزان، اندازه، پتانسیل زتا.

### 1- مقدمه

وزن‌های ملکولی مختلف وجود دارد و دارای ویژگی‌های جالب توجهی است که به موجب آن می‌تواند کاربردهای زیادی در صنعت و به ویژه انتقال دارو داشته باشد [6-9]. ذرات کیتوزان می‌توانند به صورت میکروکپسول، میکروسفر و نانوذرات تولید شوند [6]. کیتوزان از طریق گروه‌های آمین خود در واکنش‌های شیمیایی مختلف شرکت می‌کند [7]. برای تهیه نانوذرات کیتوزان حداقل چهار روش گزارش شده است که عبارتند از: Ionotropic Emulsification، Microemulsion diffusion، gelation

گستره وسیعی از پلی‌مرهای سنتزی و طبیعی می‌توانند به منظور آماده‌سازی نانوذرات زیست تخریب‌پذیر مورد استفاده قرار گیرند [2,1]. پلی‌مرهای طبیعی مزیت‌های زیادی را نسبت به پلی‌مرهای سنتزی دارند، به ویژه اینکه این پلی‌مرها غیرسمی، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگارند [3-5]. کیتوزان یک پلی‌مر داستیله شده طبیعی پلی‌کاتیونی است که از واحدهای N-استیل D-گلوکز آمین و D گلوکز آمین تشکیل شده است. کیتوزان در

PSS0012-22 ساخت شرکت Malvern برای اندازه‌گیری متوسط اندازه نانوذرات، اندازه بار ذرات و شاخص پراکندگی (poly dispersity index; PDI) و میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل Zeiss EM10C 80KW برای بررسی مورفولوژی نانوذرات به دست آمده کیتوزان استفاده شدند. از دستگاه سانتریفیوژ مدل Hettich برای سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون نانوذرات استفاده شد. فریز درایر برای خشک کردن نانوذرات حاصل استفاده شد.

## 2-2- تشکیل نانوذرات کیتوزان

نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ionic gelation آماده شدند. بر اساس این روش، کیتوزان‌های با وزن ملکولی پایین و متوسط تحت شرایط استیر ملایم در 800 rpm در استیک اسید 0/05% به مدت 24 ساعت حل شدند. غلظت‌های مختلف کیتوزان (0/75، 0/5، 0/25 mg/mL، 1/0، 1/2 و 2) به دست آمدند. pH محلول با استفاده از 0/5 M NaOH روی 5 تنظیم شد. سپس محلول کیتوزان با استفاده از فیلتر 0/45 μm Millipore برای حذف هر گونه کیتوزان حل نشده فیلتر شد. غلظت‌های مختلف سدیم تری‌پلی‌فسفات نیز با حل کردن TPP در آب دیونیزه (0/25، 0/75، 1، 1/2 و 1/5) به دست آمدند. pH محلول با استفاده از استیک اسید روی 4 تنظیم شد و سپس از میان فیلتر 0/22 μm Millipore عبور داده شدند. به منظور آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان، محلول TPP به آرامی به صورت قطره قطره، در نسبت‌های حجمی مختلف (2:1، 4:1، 5:1، 5:2 و 6:1 CS: TPP) به محلول کیتوزان در حال استیر اضافه شد. محلول با نسبت‌های مختلف در دمای اتاق به مدت 45 دقیقه با دور 800 rpm استیر شد. بخشی از این محلول‌ها برای تعیین اندازه، بار سطحی و شاخص پراکندگی (PDI) با استفاده از دستگاه Nanozeta Sizer در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. بخش دیگر محلول‌ها برای استفاده در آنالیزهای مورفولوژیکی با استفاده از SEM و FTIR با

Polyelectrolyte complex, solvent [10,7]. در میان این روش‌ها، روش ionic gelation به علت ساده بودن، عدم استفاده از حلال آلی و حرارت بالا بیشتر استفاده می‌شود. این روش بر پایه میان‌کنش الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین آزاد کیتوزان و گروه‌های پلی‌آنیون مثل تری‌پلی‌فسفات است و باعث تشکیل هیدروژلی از میکروذرات یا نانوذرات می‌شود که می‌توانند برای انکپسوله شدن و یا رهایش کنترل شده داروها و ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گیرند [11,6]. از جمله این موارد، استفاده از نانوذرات کیتوزان در انتقال داروهای پپتیدی است. استفاده از پپتیدها به خاطر اندازه کوچکتر، سمیت کمتر و عبور راحت‌تر از میان رگ‌های خونی در حال گسترش است. با این حال کاربرد پپتیدها به عنوان عوامل درمانی به دلیل حذف سریع آنها از جریان خون، اغلب به دلیل فیلتراسیون کلیوی، تخریب پروتئولیتیک سریع و جذب شدن توسط بافت‌های غیر هدف محدود شده است [12-14]. علوم دارویی از نانوذرات (NPs) به منظور کاهش سمیت و اثرات جانبی داروها استفاده می‌کنند. همان‌طور که اشاره شد، نانوذرات پلی‌مری طبیعی، از جمله کیتوزان، برتری‌هایی مثل زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری و سمیت کمتر را دارند و می‌توانند در انتقال داروهای پپتیدی مورد استفاده قرار بگیرند. در این مطالعه بهبودسازی نانوذرات کیتوزان به منظور کاربرد در سیستم‌های انتقال دارو بررسی شده است.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1- مواد

کیتوزان با وزن ملکولی پایین (75-85% داستیلاسیون)، کیتوزان با وزن ملکولی متوسط (80-85% داستیلاسیون)، سدیم تری‌پلی‌فسفات (TPP) و استیک اسید از Sigma-Aldrich خریداری شدند. فیلتر 0/45 μm و 0/22 μm (Millipore) برای حذف رسوبات و مواد حل نشده استفاده شدند. دستگاه تفرق نور دینامیک مدل Zetasizer

تنها و نانوذرات کیتوزان-TPP ثبت شد. به دنبال تشکیل میان‌کنش بین گروه آمین کیتوزان و گروه فسفات در TPP، تغییرات در طیف FTIR نانوذرات مشاهده شد.

استفاده از دستگاه فریزدرایر لیوفیلایز شدند.

### 2-3- تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات

اندازه، توزیع اندازه اصلی، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی در مورد نانوذرات به دست آمده با استفاده از دستگاه Nanozeta Sizer در طول موج 633 nm تعیین شد. نمونه‌ها در کوت پلی‌استرین قرار داده شدند و شدت پراکندگی در دمای 25 °C با ضریب شکست 1.335 اندازه‌گیری شد.

### 2-4- مورفولوژی ذرات

ویژگی‌های مورفولوژیکی نانوذرات فریز درای شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) تعیین شدند. یک قطره از نانوذرات لیوفیلایز شده به یک فلز متصل شده با طلا پوشیده شد و ویژگی‌های سطحی و شکل نانوذرات با استفاده از SEM مشاهده شد.

### 2-5- FTIR

طیف FTIR (محدوده  $6000-600\text{cm}^{-1}$ ) در مورد کیتوزان

## 3- نتایج

### 3-1- آماده‌سازی و تعیین خصوصیات نانوذرات

نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش ionic gelation آماده شدند. در مرحله اول این مطالعه، شرایط بهینه برای تشکیل نانوذرات با ویژگی‌های مطلوب مثل اندازه و بار سطحی مناسب مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین، غلظت‌های مختلف کیتوزان، نسبت‌های حجمی متفاوت کیتوزان/TPP و pH‌های مختلف محلول مورد سنجش قرار گرفت. جدول 1، آنالیز کمی اندازه ذره و بار سطحی را برای به دست آوردن نانوذرات نشان می‌دهد. برای هر غلظت محلول کیتوزان، نسبت‌های حجمی مختلف از TPP به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان در حال استیر شدن افزوده شد. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان می‌دهد تولید نانوذرات کیتوزان در محدوده خاصی از غلظت کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات امکان‌پذیر است (شکل 1).

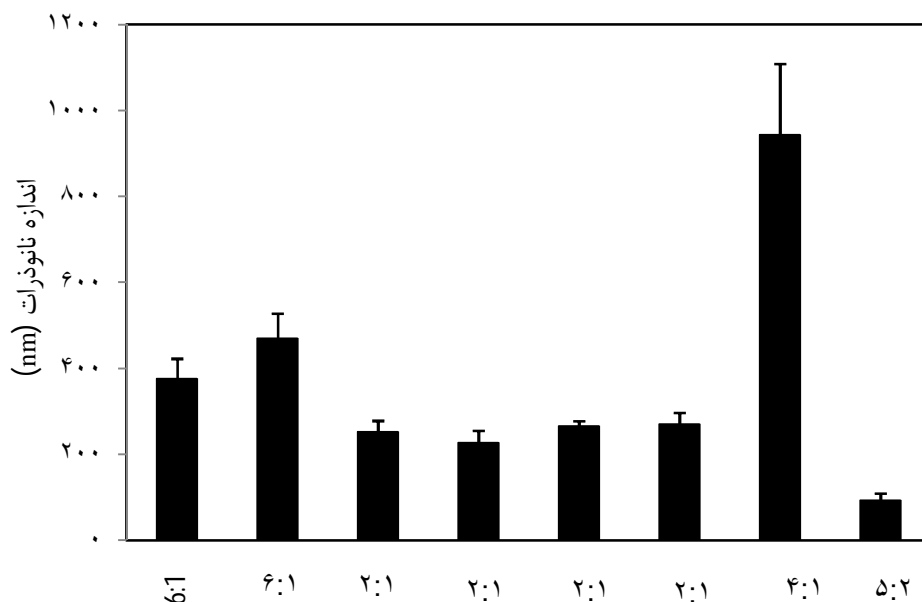
جدول 1 اندازه ذره، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان با وزن‌های ملکولی پایین و متوسط

نمونه	منبع	[CS]	[TPP]	نسبت حجمی (TPP: کیتوزان)	اندازه	پتانسیل زتا	PDI
1	پایین	0/25	0/25	06:01	375	8/6	0/192
2	متوسط	0/72	0/25	06:01	469	10	0/434
3	پایین	1/2	0/72	02:01	252	3/5	0/258
4	متوسط	1/2	0/72	02:01	226	7/4	0/263
5	پایین	1/5	1/2	02:01	266	7/9	0/244
6	متوسط	1/2	1/2	02:01	270	3/4	0/281
7	پایین	1/2	1/2	04:01	943	12/3	0/288
8	پایین	2	1	05:02	93	28/9	0/25

\* شرایط مختلف تشکیل نانوذرات بررسی شد

اندازه کوچکتری نسبت به سایر غلظت‌ها است (شکل‌های 2 و 3).

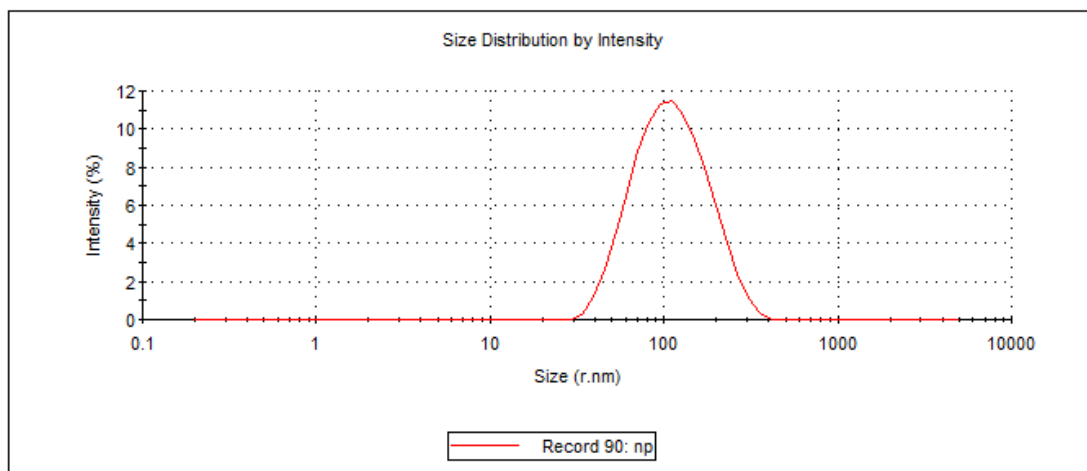
کیتوزان با غلظت 2mg/ml و TPP با غلظت 1mg/ml و نسبت حجمی 2:5، کیتوزان به تری‌پلی‌فسفات، دارای



نسبت‌های حجمی مختلف کیتوزان: تری پلی فسفات

شکل 1 نمایش اندازه نانو ذرات کیتوزان در شرایط مختلف (جدول 1)

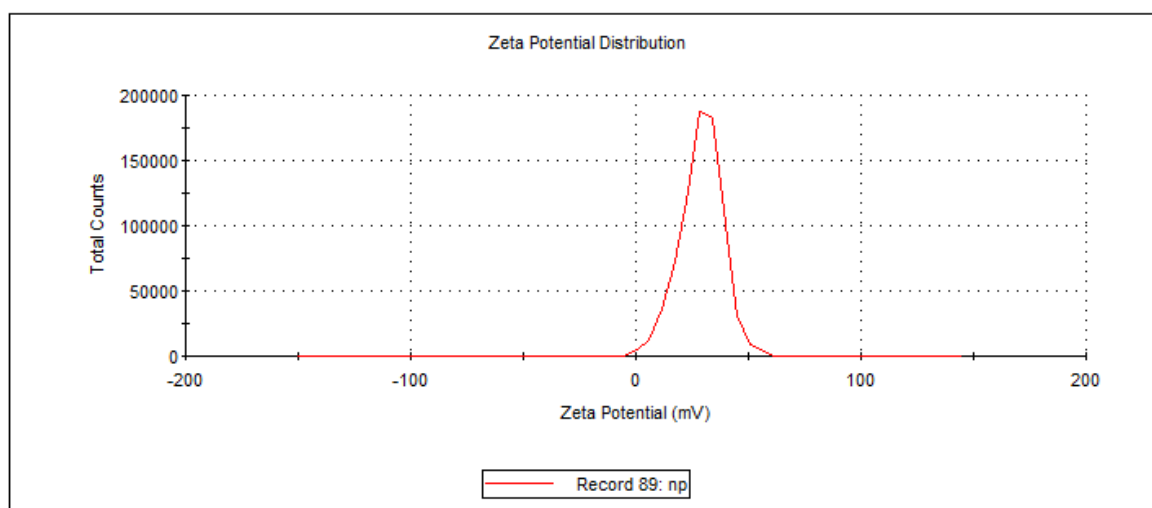
	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
<b>Z-Average (r.nm):</b> 93.15	<b>Peak 1:</b> 120.3	100.0	57.68
<b>PdI:</b> 0.250	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.960	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality:</b> Good			



شکل 2 اندازه نانوذرات کیتوزان (با وزن ملکولی پایین) حاصل از نسبت 5:2 کیتوزان: TPP. pH محلول کیتوزان و TPP به ترتیب 5 و 4 بود.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
<b>Zeta Potential (mV): 28.9</b>	<b>Peak 1: 28.9</b>	<b>100.0</b>	<b>9.30</b>
<b>Zeta Deviation (mV): 9.30</b>	<b>Peak 2: 0.00</b>	<b>0.0</b>	<b>0.00</b>
<b>Conductivity (mS/cm): 2.69</b>	<b>Peak 3: 0.00</b>	<b>0.0</b>	<b>0.00</b>

Result quality : **Good**



شکل 3 پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان (با وزن ملکولی پایین) حاصل از نسبت 5:2 کیتوزان:TPP. pH محلول کیتوزان و TPP به ترتیب 5 و 4 بود.

نیمه کروی را نشان دادند (شکل 4).

### FTIR -3-3

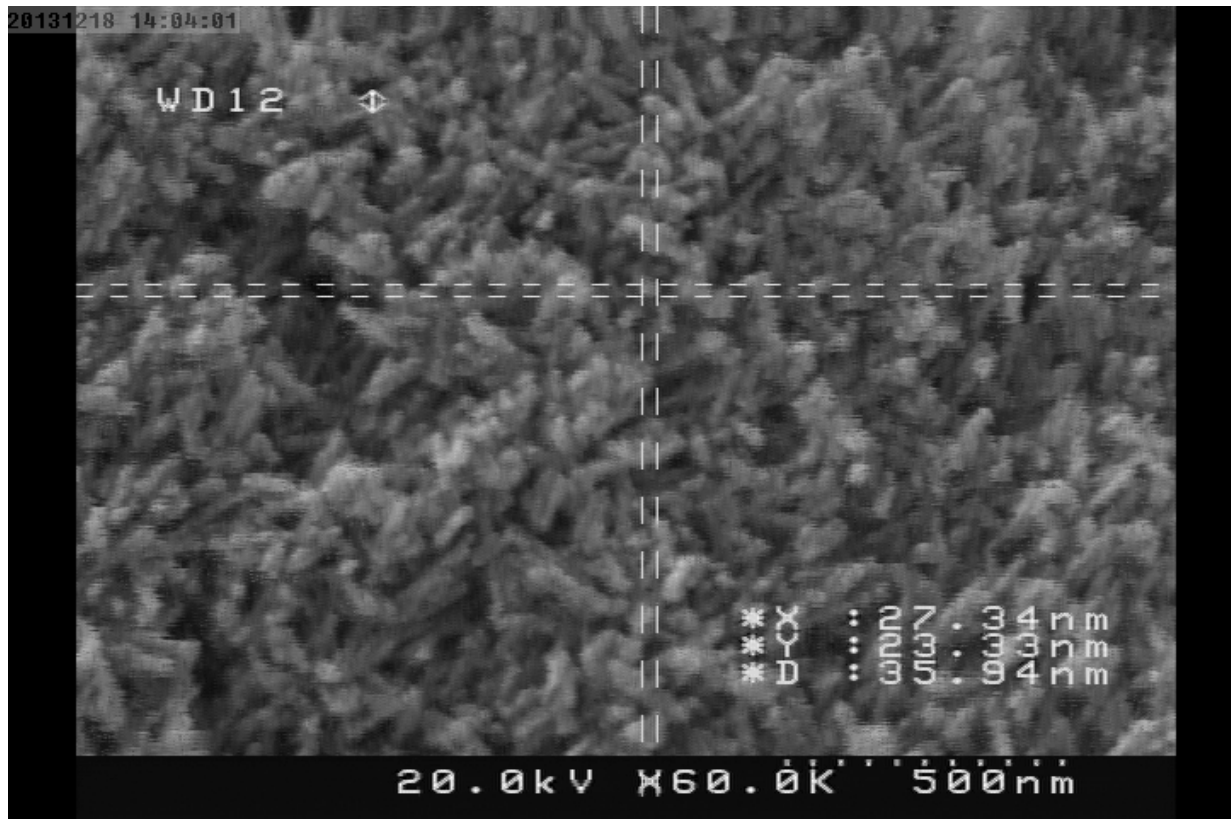
شکل 5 طیف FTIR کیتوزان تنها و نانوذرات کیتوزان-TPP را نشان می‌دهد. در طیف کیتوزان، پیک‌های در محدوده 3200-3400 ترکیبی از پیک‌های مربوط به گروه‌های کششی O-H و پیوندهای درون ملکولی هیدروژنی‌اند. پیک 1654 در کیتوزان مربوط به گروه‌های R-CO-NH<sub>2</sub> است.

در طیف نانوذرات کیتوزان تشکیل شده در شکل 6، طیف در نواحی بین 1000-1250 cm<sup>-1</sup> مربوط به TPP است و دو پیک در 1576cm<sup>-1</sup> و 1411 مربوط به گروه خمشی NH<sub>4</sub><sup>+</sup> است و این پیک‌ها نشان دهنده تشکیل میان‌کنش بین گروه‌های فسفات TPP و گروه‌های آمین کیتوزان‌اند.

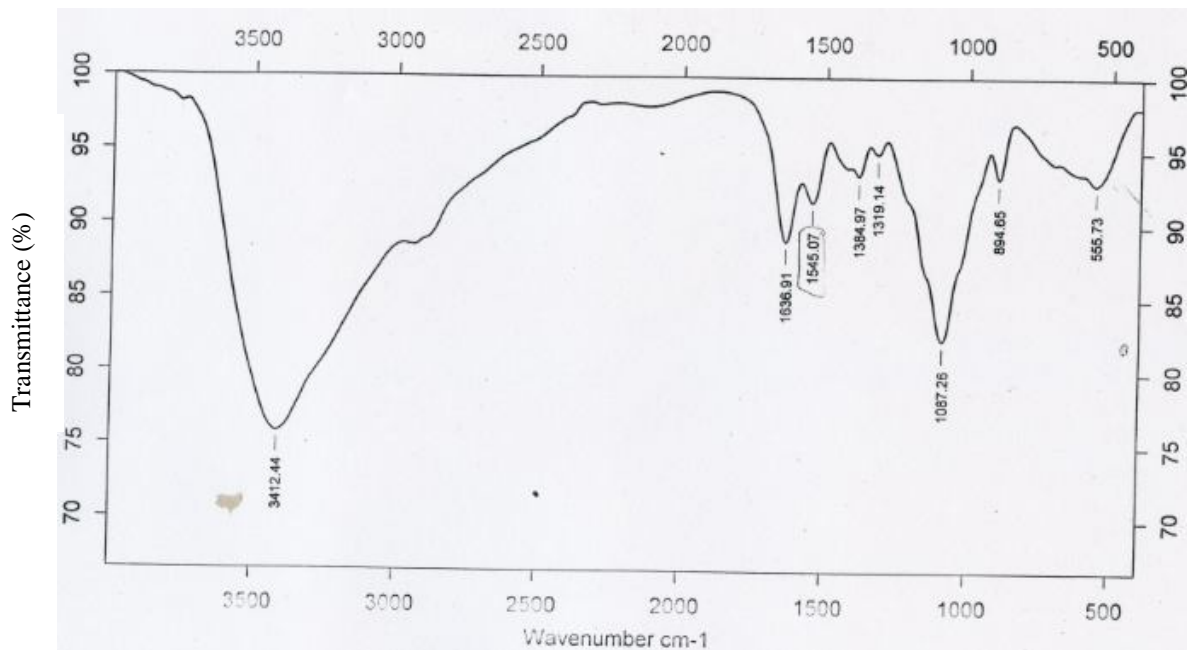
pH مناسب برای تولید نانوذرات کیتوزان در مورد محلول به ترتیب 5 و 4 بود. همان‌طور که TPP کیتوزان و محلول در جدول 1 نشان داده شده است، از مقادیر مختلف به‌دست آمده برای پتانسیل زتا، مقادیر نزدیک به +30 پایداری بیشتری خواهند داشت. نانوذرات برای مطالعات بعدی با استفاده از دستگاه فریزدرایر لیوفیلیزه شدند. همان‌طور که در جدول 1 مشاهده می‌شود اندازه نانوذرات کیتوزان با افزایش غلظت کیتوزان و اغلب با افزایش نسبت وزنی کیتوزان-TPP و یا کاهش بیش از اندازه این نسبت افزایش می‌یابد. در نسبت‌های بالاتر کیتوزان به TPP در برخی غلظت‌ها رسوبات ناپایداری دیده شد.

### 2-3- مورفولوژی نانوذرات

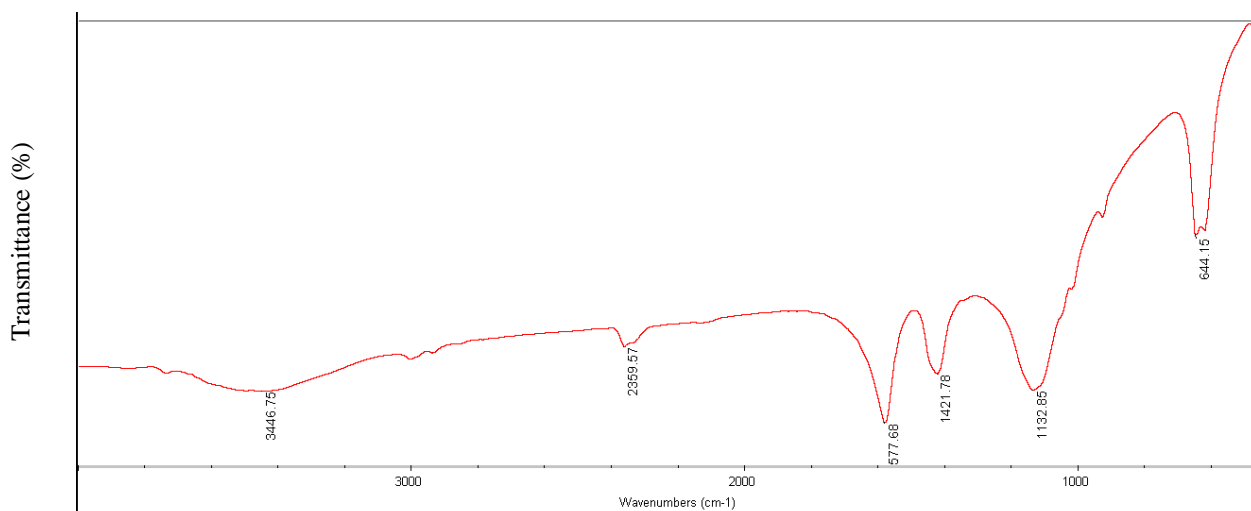
تصویربرداری SEM یک ساختار هموزن و تقریباً با شکل



شکل 4 تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نانوذرات کیتوزان تولید شده با کیتوزان وزن ملکولی پایین. غلظت کیتوزان 2mg/ml و نسبت کیتوزان به TPP 2:5 و pH محلول کیتوزان و TPP به ترتیب 5 و 4 بود.



شکل 5 طیف FTIR کیتوزان



شکل 6 طیف FTIR نانوذرات کیتوزان سنتز شده

زتا نیز شناخته می‌شود، روی کارایی انکپسوله شدن، پایداری کلونیدی و میان‌کنش ذره با سلول و محیط اطراف تأثیرگذار است. اندازه ذرات روی توانایی سیستم انتقال دارو برای نفوذ به بافت و رهایش مؤثر عوامل درمانی حایز اهمیت است. بنابراین پایداری ذره می‌تواند با بهینه‌سازی پتانسیل زتا افزایش یابد [16].

لی و همکاران اثر نسبت‌های مختلف وزنی کیتوزان/تری‌پلی‌فسفات را بررسی نمودند و به این نتیجه دست یافتند که در نسبت وزنی بالاتر از 3/75، نانوذرات با اندازه بزرگتری تشکیل می‌شوند. به طور کلی با افزایش نسبت وزنی کیتوزان به تری‌پلی‌فسفات غلظت کیتوزان در محلول افزایش یافته و گرانیروی محلول افزایش پیدا می‌کند، در نتیجه مقاومت فاز مایع در برابر پراکنده شدن افزایش پیدا کرده و اندازه نانوذرات تولیدی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر با افزایش نسبت وزنی کیتوزان به تری‌پلی‌فسفات، چگالی ماده ایجاد کننده پیوندهای عرضی در محلول کمتر شده، همچنین مولکول‌های کیتوزان با بار مثبت در محلول به علت افزایش گرانیروی افزایش یافته و به دلیل پیوندهای درون زنجیره‌ای هیدروژنی قوی که بین مولکول‌های کیتوزان وجود دارد تمایل کمتری به برقراری پیوندهای عرضی با TPP نشان

#### 4- بحث

نانوذرات کیتوزان-تری‌پلی‌فسفات از طریق روش ionic gelation در غلظت‌های مختلف تولید شدند تا اثرات غلظت کیتوزان، نسبت جرمی کیتوزان به TPP و pH محلول بر روی ویژگی‌های نانوذرات ارزیابی شود. مطالعات قبلی در مورد نانوذرات کیتوزان-TPP نشان داده‌اند که غلظت کیتوزان، نسبت کیتوزان به TPP و pH محلول بر روی اندازه ذرات و بار سطحی مؤثرند [15].

در این فرایند نانوذرات با اندازه بین 100 تا 1000 نانومتر، با بار سطحی بین 10 تا 30 mv تولید شدند. از این بررسی‌ها بهترین نتایج که دارای ویژگی‌های مطلوبی بودند، برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. شرایط بهینه برای سنتز نانوذرات به ترتیب زیر به دست آمد: 1) غلظت کیتوزان به TPP به ترتیب 2mg/ml و 1g/ml به دست آمد. 2) نسبت‌های حجمی کیتوزان به TPP 5:2 میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. 3) pH کیتوزان و TPP به ترتیب روی 5 و 4 تنظیم شد. 4) سرعت بهینه استیر در هنگام سنتز نانوذرات 800 rpm به دست آمد. هدف اولیه تعیین شرایطی بود که در آن نانوذرات با ویژگی‌های بهینه تولید شوند که اندازه و بار سطحی مناسب و کمترین شاخص پراکندگی را داشته باشند. بار سطحی که به عنوان پتانسیل

رقابت‌اند. یون‌های OH<sup>-</sup> به علت کوچک‌تر بودن براحتی به درون کیتوزان نفوذ کرده و ایجاد لایه رسوبی می‌کنند، در حالی که با اسیدی کردن pH تنها یون‌های P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup> در محیط وجود دارند. بنابراین کیتوزان به راحتی با TPP پیوند عرضی برقرار کرده و یک لایه ژلی تشکیل می‌شود [20,19].

در شرایط اسیدی گروه‌های آمین کیتوزان پروتونه می‌شوند و می‌توانند در ایجاد پیوندهای عرضی با یون‌های تری‌پلی‌فسفات شرکت کنند. اثر وزن ملکولی کیتوزان بر روی تشکیل نانوذرات بررسی و نشان داده شد که افزایش وزن ملکولی کیتوزان منجر به تولید ذرات با اندازه بزرگتر خواهد شد. بنابراین، با افزایش بیش از حد غلظت کیتوزان، میکروذرات تشکیل می‌شوند که این میکروذرات منجر به تشکیل رسوب و لخته‌های معلق می‌شود [17]. در واقع سه پدیده ممکن است در حین تشکیل نانوذرات مشاهده شود: حل شدن، توده‌ای شدن و سوسپانسیون شیری رنگ. بنابراین، تنها در غلظت مشخصی از کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات نانوذرات با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب تولید می‌شوند و رنگ محلول واکنش شیری رنگ و نیمه شفاف می‌شود. در غلظت‌های دیگر، یا رسوب در ظرف ته‌نشین می‌شود و یا هیچ‌گونه تغییری در رنگ محلول مشاهده نمی‌شود. این امر به خاطر آن است که غلظت تری‌پلی‌فسفات برای ایجاد پیوندهای عرضی با کیتوزان کافی نبوده و محلول تغییر خاصی نمی‌کند و شفاف باقی می‌ماند. همچنین افزایش غلظت تری‌پلی‌فسفات نسبت به کیتوزان منجر به تولید رسوب و تشکیل میکروذرات می‌شود [17]. از سوی دیگر وزن بالاتر کیتوزان با وزن ملکولی متوسط نسبت به کیتوزان با وزن ملکولی پایین نیز منجر به تشکیل ذرات با اندازه بزرگتری می‌شود [18]. این نتایج نشان دادند که نانوذرات کیتوزان می‌توانند پتانسیل استفاده در انتقال دارو را به عنوان حامل داشته باشند.

می‌دهند. از این رو با کاهش پیوندهای عرضی، اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد. با کاهش نسبت وزنی کیتوزان/تری‌پلی‌فسفات چگالی ماده ایجاد کننده پیوندهای عرضی در محلول افزایش پیدا می‌کند و یون‌های تری‌پلی‌فسفات به راحتی می‌توانند با گروه‌های آمین با بار مثبت کیتوزان پیوند عرضی برقرار کنند که این امر سبب می‌شود در مولکول‌های کیتوزان به طور کامل پیوندهای عرضی ایجاد شده و اندازه ذرات کاهش پیدا می‌کند. از این اصل می‌توان برای تولید نانوذرات با اندازه بسیار کوچکتری استفاده کرد. کاهش نسبت وزنی کیتوزان/تری‌پلی‌فسفات برای کاهش اندازه ذرات تا مقدار مشخصی امکان‌پذیر است. کاهش بیش از حد این نسبت وزنی باعث شده که غلظت کیتوزان در محلول کاهش یافته و از طرف دیگر چگالی ماده ایجاد کننده پیوند عرضی افزایش پیدا کند. به عبارت دیگر افزایش چگالی تری پلی فسفات در محلول به نزدیک شدن نانوذرات در کنار هم و توده‌ای شدن این ذرات منجر شده و سرانجام افزایش اندازه ذرات را در پی خواهد داشت. در نسبت‌های وزنی کمتر از یک، میکروذرات به آسانی تشکیل شده و به صورت لخته ته‌نشین می‌شوند. علت تشکیل میکروذرات، پایین آمدن چگالی بار سطحی ذرات به علت افزایش نسبت وزنی تری‌پلی‌فسفات به کیتوزان است؛ همچنین نیروهای دافع الکتروستاتیک که عامل اصلی پایداری این ذرات است برای پایداری ذرات مناسب نیستند و از این رو ذرات ته‌نشین می‌شوند. بنابراین تغییرات نسبت وزنی کیتوزان/تری پلی فسفات از پارامترهای مهم برای کاهش اندازه نانوذرات تولیدی است.

TPP حل شده در آب دیونیزه یون‌های OH<sup>-</sup> و هم P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup> را ایجاد می‌کند که همزمان در محلول TPP وجود دارند. در pH اولیه، یون‌های OH<sup>-</sup> با یون‌های P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup> برای اتصال به گروه‌های NH<sub>3</sub><sup>+</sup> کیتوزان در



## 5- منابع

- [11] Shahbazi M. A., Hamidi M. and Mohammadi-Samani S. (2013). Preparation, optimization, and in-vitro/in-vivo/ex-vivo characterization of chitosan-heparin nanoparticles: drug-induced gelation, *Journal of Pharmacy and pharmacology*, pp. 1118–1133.
- [12] Vladimir P. Torchilin and Anatoly N. Lukyanov (2003). Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions, *therapeutic focus*, pp. 252-273.
- [13] Morishita M. and A. Peppas N. (2006). The oral route possible for peptide and protein drug delivery, pp. 905-910.
- [14] Ratnaparkhi M.P. and Chaudhari S.P. (2011). Pandya V.A., *Peptides and Proteins in Pharmaceuticals*, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, pp. 1-9.
- [15] Cody B., Argyrios M. and Anargyros X. (2012). Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, *Biochemical Engineering Journal*, pp. 61-69.
- [16] ساسان مرادده، داود قرایلو، تنوری پتانسیل زتا و نحوه کارکرد دستگاه DLS (زتاسایزر) برای تعیین پتانسیل زتا.
- [17] Hirano S., Yoshida S., and Takabuchi N. (1993). N-[13C=O] Acetylchitosan and its digestibility by silkworms, *Carbohydrate Polymers*, pp. 137-140.
- [18] Paulino T., et al. (2007). Capacity of adsorption of  $Pb^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  from aqueous solutions by chitosan produced from silkworm chrysalides in different degrees of deacetylation, *Journal of Hazardous Materials*, pp. 139-147.
- [19] Mi F.A., Shyu S.S., Lee S.T. and Wong T.B. (1999). Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistant properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, pp. 1551-1564.
- [20] Kaloti M. and Bohidar H.B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, pp. 165–173.
- [1] Jayanth P. and Vinod L. (2012). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 61-71.
- [2] Natarajan J. and SN M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review, *International Journal of Health & Allied Sciences*, pp. 217-223.
- [3] Azadi A. and Hamidi M. (2013). Rouini M-R., Methotrexate-loaded chitosan nanogels as ‘Trojan Horses’ for drugdelivery to brain: Preparation and in vitro/in vivo characterization, *International Journal of Biological Macromolecules* pp. 523-530.
- [4] Yousefpour P., Atyabi F. and Dinarvand R. (2011). Vasheghani-Farahani E., Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation, *Drug*, pp. 367-375.
- [5] Rampinoa A., Borgogna M., Blasi b P. and Bellicha B. (2013), *Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability*, *International Journal of Pharmaceutics* xxx xxx– xxx.
- [6] Bulmera C., Margaritisa A. and Xenocostasb A. (2012). Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, *Biochemical Engineering Journal*, pp. 61-69.
- [7] Zhao L., Shi L., Zhang Zh., Chen J., Yang J. and Tang Zh. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, pp. 353-362.
- [8] Grenha A., *Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods*.
- [9] Patel J.K. and Jivani N.P. (2009), *Chitosan based nanoparticles in Drug Delivery*, *International journal of pharmaceutical sciences and Nanotechnology*, pp. 517-522.
- [10] Sudheesh K. Sh., Ajay K., Omotayo A. and Bhekie B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review, *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 46-58.