

Preparation and Optimization of Labeled Chitosan Nanoparticles and Evaluation of their Release from Transdermal Drug Delivery System

Mohsen Sadeghi¹, Fariba Ganji¹, and S. Mojtaba Taghizadeh²

1. Biomedical Engineering Department, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-113, Tehran, Iran.
2. Novel Drug Delivery Systems Department, Faculty of Polymer Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14975-112, Tehran, Iran

Received: 24 February 2015, accepted: 10 May 2015

ABSTRACT

Biocompatible nanoparticles are widely used in biomedical engineering. In this study, chitosan nanoparticles were prepared using ionic gelation method in view of two determining factors namely method of adding chitosan into the tripolyphosphate (TPP) solution and thermal shock application. With regard to the concentration of chitosan and TPP solutions as two variables, the mean particle size of chitosan nanoparticles and their preparation yield were optimized using response surface method. According to previous studies and some preliminary experiments, the chitosan and TPP solution concentration ranges were determined to be 0.5-2.5 mg/mL and 0.25-1.25 mg/mL, respectively. The optimum values of 1.25 mg/mL and 0.6 mg/mL were obtained for chitosan and TPP solution concentrations in the order given. The optimized response value for the chitosan nanoparticles size was found to be 54 nm and preparation yield was 62%. The zeta potential of resulting spherical nanoparticles was around 31 mV. Chitosan-fluorescein isothiocyanate (FITC) polymer was prepared based on the reaction between isothiocyanate functional group of FITC and primary amine functional group of chitosan. FTIR analysis was performed to demonstrate the presence of new bond formation. Labeled chitosan nanoparticles were prepared in the optimized condition using chitosan-FITC polymer. The release behavior of the labeled chitosan nanoparticles from transdermal patches was evaluated. The mean size of chitosan-FITC nanoparticles was determined to be 70 nm. Finally, it was shown that the chitosan nanoparticles were not able to release from acrylic adhesive film without using a method to speed up their diffusion.

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: fganji@modares.ac.ir

Keywords:

chitosan,
ionic gelation,
labeled nanoparticles,
optimization,
transdermal drug delivery.

تهیه و بهینه‌سازی نانوذرات نشان‌دار کیتوسان و بررسی رهايش آن از سامانه تراپوستی

محسن صادقی^۱، فریبا گنجی^{۱*}، سید مجتبی تقی‌زاده^۲

۱- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست‌پزشکی، صندوق پستی ۱۱۳-۱۴۱۱۵

۲- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، پژوهشکده علوم، گروه سامانه‌های نوین دارورسانی،

صندوق پستی ۱۱۲-۱۴۹۷۵

دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۵، پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۰

چکیده

نانوذرات پلیمری زیست‌سازگار کاربردهای گسترده‌ای در مهندسی زیست‌پزشکی دارند. در پژوهش حاضر، نانوذرات کیتوسان به روش ژل‌شدن یونی با در نظر گرفتن دو عامل مؤثر نحوه افزودن محلول تری‌پلی فسفات (TPP) به کیتوسان و اعمال شوک گرمایی تهیه شدند. با در نظر گرفتن دو متغیر غلظت کیتوسان و غلظت TPP، متوسط اندازه نانوذرات و مقدار بازده تهیه آنها با استفاده از روش پاسخ سطح و طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. بازده غلظت دو محلول کیتوسان و TPP برای بهینه‌سازی در پنج سطح، براساس مطالعات پیشین و پیش‌آزمون‌های انجام شده به ترتیب بین ۰/۵ mg/L تا ۲/۵ mg/L و ۰/۲۵ mg/L تا ۱/۲۵ mg/L معین شد. نانوذرات به‌دست آمده در شرایط بهینه، با غلظت کیتوسان و TPP به ترتیب ۱/۲۵ و ۰/۶ mg/L، دارای متوسط اندازه عددی ۵۴ nm و بازده تهیه ۶۲٪ بودند. از نظر شکل‌شناسی، نانوذرات در شرایط بهینه کروی بودند و بار سطحی آنها نیز ۳۱ mV بود. برای بررسی احتمال خروج نانوذرات کیتوسان از چسب آکریلی مصرفی در سامانه‌های تراپوستی، نانوذرات نشان‌دار کیتوسان با استفاده از واکنش میان گروه ایزوتیوسیانات در مولکول فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و گروه آمین نوع اول در کیتوسان تهیه شدند. تشکیل پیوند با دستگاه FTIR تأیید شد. متوسط اندازه عددی نانوذرات نشان‌دار کیتوسان ۷۰ nm به‌دست آمد. در نهایت نشان داده شد، نانوذرات کیتوسان، بدون روش‌های افزایش نفوذ، قابلیت خروج از چسب آکریلی ندارند.

واژه‌های کلیدی

کیتوسان،
ژل‌شدن یونی،
نانوذرات نشان‌دار،
بهینه‌سازی،
سامانه تراپوستی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

fganji@modares.ac.ir

مقدمه

از میان تمام روش‌های دارورسانی، روش خوراکی به‌عنوان رایج‌ترین روش شناخته شده دارای معایبی همچون تخریب دارو در معده و متابولیسم اولیه کبدی است. هدف از دارورسانی نوین، افزایش اثرگذاری دارو در مقدار کمتر و کاهش عوارض جانبی آن است. در داروسازی نوین، پوست به‌عنوان یکی از مسیرهای مهم انتقال دارو به بدن به‌شمار می‌آید و سامانه‌های دارورسانی تراپوستی (TDDS) که به‌پچ‌ها معروف‌اند، سهم عمده‌ای از محصولات دارویی را به خود اختصاص داده‌اند [۱-۴].

از جمله مزایای سامانه‌های دارورسانی تراپوستی در مقایسه با روش‌های رایج انتقال دارو می‌توان به ثابت نگه‌داشتن سطح دارو در پلاسما، خون برای مدت معین، حذف متابولیسم اولیه کبدی، حذف تخریب دارو با عوامل گوارشی، مناسب بودن برای داروهایی با نیمه‌عمر زیستی کم، مناسب بودن برای انتقال دارو به بیمارانی که به مشکلات گوارشی (مانند ناراحتی‌های معده، تهوع و استفراغ) و بلع مبتلا هستند و استقبال خوب از طرف بیمار اشاره کرد [۳-۵]. معایب و محدودیت‌های سامانه‌های دارورسانی تراپوستی نیز شامل محدودیت استفاده برای همه داروها (تنها برای داروهایی با وزن مولکولی کمتر از ۴۰۰ دالتون و ضریب توزیع بین ۱ و ۴ قابل استفاده است) و امکان ایجاد حساسیت‌های پوستی به‌وسیله دارو، چسب و سایر مواد به‌کار رفته در پچ است [۳-۵].

از مهم‌ترین محدودیت‌های این روش، کارانبودن داروهایی است که با وجود انحلال کم دارو در چسب، غلظت زیادی از آن در خون برای رسیدن به پنجره درمانی دارو نیاز است. برای بسیاری از داروها انحلال‌پذیری کم داروها در چسب سبب بارگذاری کم در سامانه و در نتیجه زمان رهایش کوتاه می‌شود. از روش‌های غلبه بر محدودیت انحلال‌پذیری کم دارو در سامانه‌های تراپوستی، استفاده از نانوسامانه‌ها به‌عنوان حامل دارو برای افزایش بارگذاری دارو در چسب است [۶،۷].

سروش‌نیا و همکاران [۸] سامانه تراپوستی داروی دسموپرسین استات (Desmopressin Acetate) را تهیه کردند. داروی دسموپرسین در چسب آکریلی نامحلول است. آنها برای افزایش انحلال دارو در چسب آکریلی از میکرومولسیون آب در روغن دارو استفاده کردند. پژوهش‌های بسیاری در زمینه استفاده از نانوذرات برای افزایش مقدار داروی موجود در سامانه انجام شده، اما تاکنون احتمال خروج این نانوذرات از سامانه‌های تراپوستی بررسی نشده است.

نانوذرات کیتوسان اولین بار در ۱۹۹۴ به روش شبکه‌ای شدن و ایجاد پیوند عرضی و معلق‌سازی (emulsification) تهیه شدند. پس

از آن، این نانوذرات به‌دلیل داشتن ویژگی‌های مناسب مطالعه شده، به روش‌های متفاوت دیگری نیز تهیه شدند که هر یک نانوذراتی با ویژگی‌های متفاوت را به‌دست می‌دهند [۹،۱۰].

Calvo اولین بار در ۱۹۹۷ از روش ژل‌شدن یونی استفاده کرد که اغلب به‌عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌های تهیه نانوذرات کیتوسان شناخته می‌شود. پلیمر کیتوسان حاوی گروه‌های عاملی آمینی است که با دریافت یون هیدروژن در محیط اسیدی به‌شکل مولکولی کاتیونی در آب حل می‌شود. بنابراین، با وجود یون آنیونی چندظرفیتی در محیط، برپایه جاذبه الکتروستاتیکی میان بارهای مثبت و منفی، احتمال تشکیل هیدروژل به‌وسیله این پلیمر وجود دارد. از میان آنیون‌های چندظرفیتی ریزمولکول، نمک سدیم تری‌پلی‌فسفات به دلیل سمی نبودن، اغلب به‌عنوان پلی‌آنیونی مناسب در روش ژل‌شدن یونی انتخاب می‌شود [۱۰،۱۱].

نانوذرات پلیمری نشان‌دار شده کاربرد گسترده در ردیابی سلول‌ها و نانوذرات در زمینه‌های مختلف مهندسی پزشکی نظیر دارورسانی و عکس‌برداری سلولی دارند. فلئوئورسان ایزوتیوسیانات (FITC) با داشتن خواصی نظیر زیست‌سازگاری، از جمله مواد فلئوئورسان پرکاربرد در این زمینه است. اتصال FITC به مولکول‌های کیتوسان براساس واکنش میان گروه ایزوتیوسیانات FITC و گروه آمین کیتوسان است [۱۴-۱۲]. در پژوهش‌های پیشین، نانوذرات نشان‌دار زیست‌سازگار کیتوسان با متوسط اندازه بزرگ و به روش ژل‌شدن یونی، بدون بررسی بازده تهیه آنها ساخته شدند [۱۲،۱۵]. در این پژوهش، نانوذرات پلیمری کیتوسان به روش ژل‌شدن یونی، با در نظر گرفتن عوامل فرایندی مختلف تهیه و دو عامل مهم غلظت کیتوسان و TPP برای دستیابی به کمترین اندازه و بیشترین بازده تهیه نانوذرات بهینه شدند. سپس، نانوذرات نشان‌دار شده کیتوسان با FITC در شرایط بهینه تهیه شدند. در نهایت، از آنجا که یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در استفاده از نانوذرات در سامانه‌های تراپوستی، امکان خروج نانوذرات از سامانه است، در این پژوهش، برای اولین بار خروج نانوذرات از چسب آکریلی، با استفاده از نانوذرات نشان‌دار کیتوسان بررسی شد.

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی کم (۱۹۰-۵۰ kDa) و FITC از شرکت Sig-ma-Aldrich تهیه شدند. استیک اسید خالص، سدیم هیدروکسید و نمک TPP از شرکت Merck خریداری شدند. چسب آکریلی Duro-

انتخاب روش تهیه مناسب

برای مقایسه دو روش Fan و Calvo از دو تفاوت اصلی این دو روش، یعنی دمای محلول‌های کیتوسان و TPP و نحوه افزودن محلول TPP به محلول کیتوسان استفاده شد. بدین منظور، سه آزمون با دوبر تکرار طراحی شد. این آزمون‌ها با شرایط کاملاً مشابه (غلظت محلول‌های کیتوسان و TPP معادل ۰/۵ mg/mL، pH محلول کیتوسان ۴/۷ و سرعت همزن ۷۰۰ rpm) طراحی شدند که تفاوت آنها در نحوه افزودن محلول TPP و دمای محلول‌های TPP و کیتوسان بود.

همچنین سایر عوامل مؤثر در تهیه نانوذرات، نظیر pH محلول کیتوسان، وزن مولکولی کیتوسان به کار رفته، سرعت همزن و نسبت کیتوسان به TPP با استفاده از پیش‌آزمون‌ها و مطالعات پیشین معین شده و برای کاهش تعداد آزمون‌ها ثابت در نظر گرفته شدند.

بهینه‌سازی بازده و اندازه نانوذرات کیتوسان

برای بهینه‌سازی اندازه و بازده ساخت نانوذرات پلیمری کیتوسان از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. بدین منظور، طرح مرکب مرکزی (CCD) با نرم‌افزار Design Expert 7.0.0، با پنج سطح به کار گرفته شد. دو متغیر مستقل غلظت کیتوسان و غلظت TPP به عنوان مهم‌ترین متغیرها انتخاب و با توجه به پیش‌آزمون‌ها و نیز مطالعات پیشین، محدوده این متغیرها معین شد. طرح مرکب مرکزی در طراحی آزمون شامل پنج تکرار در نقطه مرکزی، چهار نقطه فاکتوریل و چهار نقطه محوری بوده و برای هر نقطه، متوسط اندازه نانوذرات پلیمری و بازده ساخت نانوذرات به عنوان پاسخ در نظر گرفته شدند. همچنین آزمون‌ها برای به حداقل رساندن خطاهای پیش‌بینی نشده در پاسخ‌ها به طور تصادفی انجام شدند. در مرحله بعد، مدلی برای هر پاسخ پیشنهاد شد که آثار اصلی و متقابل هر متغیر را در پاسخ مدنظر به شکل عوامل آثار خطی و مربعی، اثر متقابل و نیز ضریب ثابت نشان می‌دهد.

تهیه نانوذرات نشان‌دار کیتوسان

برای تهیه نانوذرات نشان‌دار شده کیتوسان، ابتدا لازم است، مولکول FITC به پلیمر کیتوسان متصل شده، سپس نانوذرات کیتوسان تهیه شوند. این اتصال برپایه واکنش میان گروه ایزوتیوسیانات در FITC و گروه آمین موجود در کیتوسان است. بدین منظور، ابتدا ۱ g از پلیمر کیتوسان در ۱۰۰ mL استیک اسید ۰/۱ مولار حل شد. ۱۰۰ mL متانول بدون آب به آن افزوده و اختلاط به کمک همزن انجام شد. سپس، ۵۰ mL محلول FITC در متانول بدون آب با غلظت ۲ mg/mL به آرامی به محلول کیتوسان افزوده شد. واکنش به مدت ۴ h در دمای محیط و در شرایط بدون نور انجام شد. سپس، پلیمر کیتوسان

Tak 2582 از شرکت Henkel، پست‌لایه CoTran 9720 و لایه محافظ از جنس کاغذ نجسب مدل SC45 به ترتیب از شرکت‌های 3M آمریکا و بردارشیب ایران تهیه شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

تهیه نانوذرات کیتوسان

ابتدا نانوذرات کیتوسان به دو روش Fan و Calvo تهیه و متوسط اندازه آنها در این دو روش مقایسه شد. در مرحله بعد، متوسط اندازه و بازده تهیه نانوذرات در روش انتخاب شده بهینه شد. سپس، نانوذرات نشان‌دار شده با FITC تهیه و خروج آنها از سامانه تراپوستی بررسی شد.

تهیه نانوذرات کیتوسان به روش Fan

پلیمر کیتوسان با وزن مولکولی کم و غلظت‌های مشخص، در محلول آبی استیک اسید (با غلظت ۰/۴ برابر غلظت کیتوسان)، به مدت یک شب و به کمک همزن مغناطیسی حل شد. pH محلول کیتوسان با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ نرمال در محدوده ۴/۷-۴/۸ تنظیم شد. نمک تری‌پلی فسفات (TPP) نیز با غلظت مشخص در آب مقطر حل شد. برای حذف ناخالصی‌ها و ذرات حل نشده محلول‌های کیتوسان و TPP، این دو محلول به ترتیب از صافی‌های سرنگی ۰/۴۵ و ۰/۲۲ عبور داده شدند. سپس، محلول کیتوسان با حجم معین (نسبت جرمی کیتوسان به TPP معادل ۱:۳ در نظر گرفته شد)، در حمام آب با دمای ۶۰°C قرار داده شد. پس از ۱۰ min به حمام آب یخ منتقل شد که روی همزن مغناطیسی با سرعت ۷۰۰ rpm قرار داشت. بلافاصله حجم مشخصی از محلول TPP که از قبل در حمام آب یخ با دمای ۱°C±۳ قرار داشت، به طور ناگهانی به آن افزوده شد تا واکنش در حمام آب یخ به مدت ۱۰ min و تحت همزن انجام شود. تعلیق حاصل که حاوی نانوذرات کیتوسان است، برای بررسی‌های بیشتر استفاده شد [۱۶].

تهیه نانوذرات کیتوسان به روش Calvo

در این روش، ابتدا محلول‌های کیتوسان و TPP با غلظت‌های مشخص، به ترتیب در محلول آبی استیک اسید (v/v) ۱٪ و آب مقطر تهیه شدند. سپس، حجم مشخص از محلول حاوی TPP با پمپ سرنگی و قطره‌قطره، با سرعت ۰/۳ mL/min و در دمای محیط، به حجم مشخصی از محلول کیتوسان (نسبت جرمی کیتوسان به TPP برابر ۱:۳ است) افزوده شد که با سرعت ۸۰۰ rpm با همزن مغناطیسی تحت اختلاط قرار داشت. از محلول تعلیق حاوی نانوذرات حاصل برای بررسی‌های بعدی استفاده شد [۱۷].

آزمون FTIR برای پلیمر کیتوسان، نمک TPP و نانوذرات کیتوسان انجام شد. همچنین، کیفیت اتصال FITC به کیتوسان و اثر فرایند نشان‌دار کردن پلیمر بر کیفیت و خواص کیتوسان اولیه، برای پلیمر نشان‌دار شده نهایی و نیز پلیمر کیتوسانی که فرایند اتصال ماده فلئورسان را بدون وجود FITC طی کرده است، به کمک آزمون FTIR ارزیابی شد.

تهیه سامانه تراپوستی دارای نانوذرات نشان‌دار شده کیتوسان

خروج نانوذرات از سامانه تراپوستی، برای افزایش زمان رهایش و چه با هدف ورود نانوذرات به پوست یا حتی بدن فرد، همواره یکی از چالش‌ها در زمینه کاربرد نانوذرات در یک سامانه تراپوستی به‌شمار می‌رود که تاکنون بررسی نشده است. در این پژوهش، برای بررسی احتمال خروج نانوذرات از چسب‌های آکریلی مصرفی در سامانه‌های تراپوستی، پیچ دارای نانوذرات نشان‌دار شده کیتوسان به روش زیر تهیه شد.

تهیه محلول چسب حاوی نانوذرات نشان‌دار شده کیتوسان

50 mg از نانوذرات نشان‌دار شده با استفاده از حمام فراصوت با توان بیشینه و زمان 15 min در حلال اتیل استات (غلظت نانوذرات در حلال 50 mg/mL بود) پراکنده شد. سپس، وزن مشخصی از چسب آکریلی برای دستیابی به نسبت نانوذرات به وزن خشک چسب 5٪ به محلول اضافه شده و برای مدت یک شبانه‌روز تحت اختلاط قرار گرفت. برای تعیین درصد خشک چسب‌ها، ابتدا وزن مشخصی از چسب روی قطعه کوچکی از فویل آلومینیم که از پیش به‌دقت وزن شده منتقل شد و فویل در گرم‌خانه با دمای 60°C قرار گرفت. پس از اطمینان از تبخیر کامل حلال (با ثابت شدن وزن فویل حاوی چسب)، وزن دقیق فویل همراه با چسب معین و از معادله (2) درصد خشک محاسبه شد. آزمون سه مرتبه تکرار شد:

$$\text{درصد چسب خشک} = \frac{\text{وزن چسب خشک}}{\text{وزن چسب اولیه}} \times 100 \quad (2)$$

تهیه فیلم حاوی نانوذرات نشان‌دار

از پشت‌لایه CoTran 9720 و لایه محافظ مدل SC45 برای تهیه فیلم حاوی نانوذرات نشان‌دار استفاده شد. با استفاده از میکروسنج Mitutoyo مدل 101-651 ضخامت پشت‌لایه و لایه محافظ در نقاط متعددی اندازه‌گیری شد. محلول چسب تهیه شده با استفاده از فیلم‌کش مدل 3580 ساخت شرکت Elcometer آمریکا، برای دستیابی به ضخامت نهایی 70 μm روی پشت‌لایه کشیده و به مدت 30 min در

نشان‌دار شده با افزایش pH محلول تا 10، با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید 0/5 مولار ته‌نشین شد. پلیمر کیتوسان موجود در محلول به مدت 10 min و با سرعت 10000 g به کمک دستگاه مرکزگریز یخچال‌دار Mikro 220R ساخت شرکت Hettich از محلول جدا شده و مجدداً در محلول متانول-آب با نسبت 1:3 پراکنده شدند و محلول روماندا با میکروسکوپ فلئورسان بررسی شد. این مرحله آن قدر تکرار شد تا در محلول روماندا FITC آزاد مشاهده نشود. در نهایت، پلیمر نشان‌دار شده در استیک اسید 0/1 مولار حل شده، با استفاده از کیسه دیالیز 12000 دالتونی و در مقابل 2 L آب یون‌زدایی شده دیالیز شد. آب یون‌زدایی شده محیط رهایش هر 12 h عوض شد. در نهایت، کیتوسان نشان‌دار شده به مدت 24 h در فرایند خشک کردن انجام‌دای قرار گرفت. از این کیتوسان فراوری شده برای تهیه نانوذرات کیتوسان نشان‌دار استفاده شد [12, 15].

تعیین اندازه و بار سطحی نانوذرات

تعیین اندازه و بار سطحی نانوذرات کیتوسان با استفاده از دستگاه پراکنش دینامیکی نور (DLS) مدل Zetasizer Nano ZS ساخت شرکت Malvern انگلستان، در دمای 25°C انجام شد. در نهایت، متوسط اندازه عددی نانوذرات با بررسی نتایج حاصل از DLS به دست آمد.

تعیین بازده تهیه نانوذرات

برای تعیین بازده تهیه، ابتدا نانوذرات با دستگاه مرکزگریز یخچال‌دار، به مدت 25 min، با سرعت 18000 rpm در دمای 4°C از محلول اصلی جدا شده و سپس نمونه‌ها درون گرم‌خانه، در خلأ نسبی 0/8 atm به مدت 24 h در دمای محیط خشک شدند. در نهایت، از معادله (1) بازده تهیه نانوذرات معین شد. آزمون با سه مرتبه تکرار انجام شد:

$$(1) \quad \text{بازده ساخت} = \frac{\text{وزن نانوذرات تشکیل شده}}{\text{وزن مواد اولیه}}$$

بررسی شکل‌شناسی نانوذرات

شکل‌شناسی نانوذرات به کمک میکروسکوپ FE-SEM مدل HITACHI S4160 با ولتاژ 30 kV بررسی شد. نانوذرات نشان‌دار شده با FITC نیز با میکروسکوپ فلئورسان Olympus IX-71 ساخت ژاپن ارزیابی شدند.

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR)

برای بررسی پیوندها و برهم‌کنش مواد طی مراحل تهیه نانوذرات،

جدول ۱- اثر متغیرهای دما و نحوه افزودن محلول TPP.

متوسط اندازه عددی نانوذرات (nm)	متغیر اعمال شده			
	اثر دمای محلول‌ها		نحوه افزودن	
۱۸۲	ثابت در دمای محیط	-	یک‌باره	-
۲۳۱	ثابت در دمای محیط	-	-	قطره‌قطره
۱۳۴	-	اعمال شوک گرمایی	یک‌باره	-

چگالی و کاهش اندازه نانوذرات تشکیل شده و در ادامه نیز سردشدن سریع نانوذرات و کاهش مجدد انعطاف‌پذیری مولکول‌های کیتوسان و در نتیجه پایداری بیشتر نانوذرات نسبت داد. همچنین، اثر کاهش دمای محلول TPP بر کاهش اندازه نانوذرات را می‌توان افزایش سریع آپیوشی نانوذرات در محلول، به دلیل قرارگرفتن در دمای کم و در نتیجه کاهش احتمال برخورد بین ذرات و هسته‌های تشکیل شده و افزایش اندازه ذرات دانست. افزودن یک‌باره محلول TPP به محلول کیتوسان نیز با توجه به نتایج، سبب کاهش متوسط اندازه نانوذرات شد. دلیل این موضوع را می‌توان اثر افزایش آشفستگی و اختلاط محلول در اثر افزایش ناگهانی محلول TPP دانست و نیز تشکیل هسته‌های جدید و رشد نکردن هسته‌های نانوذرات تشکیل شده به دلیل نداشتن زمان کافی برای رشد دانست [۱۶].

در جدول ۲ مقادیر نهایی سایر عوامل مؤثر در تهیه نانوذرات آمده است که براساس مطالعات پیشین و پیش‌آزمون‌های انجام شده معین شده‌اند.

بهینه‌سازی بازده تشکیل و اندازه نانوذرات کیتوسان

در جدول ۳، متغیرهای مستقل و سطوح استفاده شده در بهینه‌سازی آمده است. همان‌طور که بیان شد، این سطوح براساس پیش‌آزمون‌ها و مطالعات پیشین انتخاب شدند. در جدول ۴، آزمون‌های طراحی شده و نتایج مربوط به هر آزمون آمده است. جدول‌های ۵ و ۶، نتایج حاصل از تحلیل واریانس (ANOVA) را به ترتیب برای مدل درجه دوم مربوط به اندازه نانوذرات و مدل خطی مربوط به بازده تهیه نانوذرات نشان

جدول ۳- متغیرهای مستقل و سطوح استفاده شده برای بهینه‌سازی بازده تهیه اندازه نانوذرات پلیمری کیتوسان.

سطوح و حدود متغیرها					نماد	متغیرهای مستقل
-α	-۱	۰	+۱	+α		
۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	A	غلظت کیتوسان (mg/mL)
۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	B	غلظت TPP (mg/mL)

دمای محیط و سپس ۱ h در گرم‌خانه ۶۰°C خشک شد. در نهایت، لایه محافظ روی چسب قرار داده شد و ضخامت نهایی اندازه‌گیری شد.

بررسی خروج نانوذرات نشان‌دار شده از چسب

چسب‌های حاوی نانوذرات با استفاده از پانچ کوبشی به دایره‌هایی با قطر ۱۳ mm بریده شد و در محلول بافر PBS با pH برابر ۷/۴ قرار داده شد. ظرف حاوی محلول در گرم‌خانه لرزان با دمای ۳۷°C و با سرعت ۱۴۰ تکان در دقیقه قرار داده شد. در زمان‌های ۲، ۵، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ h از محیط رهایش نمونه‌برداری شده و نمونه‌ها از لحاظ رهایش نانوذرات از چسب با استفاده از میکروسکوپ فلوروسان بررسی شدند.

نتایج و بحث

انتخاب روش تهیه مناسب

اثر دمای محلول‌های کیتوسان و TPP و نحوه افزودن محلول TPP به کیتوسان، به‌عنوان تفاوت‌های اصلی در دو روش Fan و Caolvo، بر متوسط اندازه نانوذرات در جدول ۱ آمده است. با توجه به نتایج، افزایش دمای محلول کیتوسان تا ۶۰°C و کاهش دمای محلول TPP تا ۳°C سبب کاهش متوسط اندازه نانوذرات کیتوسان شد. دلیل این موضوع را می‌توان به کاهش گرانشی و افزایش انعطاف‌پذیری زنجیرهای کیتوسان با افزایش دمای این محلول و در نتیجه افزایش

جدول ۲- مقادیر معین شده برای متغیرهای مؤثر در تهیه نانوذرات.

سرعت همزن (rpm)	نسبت کیتوسان به TPP (Cs:TPP)	وزن مولکولی کیتوسان	pH محلول کیتوسان
۸۰۰	۳:۱	کم	۴/۷ - ۴/۸

جدول ۴- جدول طراحی آزمون.

اندازه نانوذرات (nm)	بازده تهیه نانوذرات (%)	غلظت TPP (mg/mL)	غلظت کیتوسان (mg/mL)	آزمون‌ها
۴۵/۶۰	۷۵	۰/۵۰	۱/۰	۱
۱۰۱/۲۶	۶۵	۰/۵۰	۲/۰	۲
۶۱/۸۵	۸۳	۰/۷۵	۱/۵	۳
۹۶/۸۰	۶۶	۰/۷۵	۱/۵	۴
۷۲/۳۸	۵۸	۰/۷۵	۱/۵	۵
۶۲/۶۰	۵۲	۰/۲۵	۱/۵	۶
۷۵/۳۰	۶۲	۰/۷۵	۱/۵	۷
۲۳۸/۰۰	۸۷	۱/۲۵	۱/۵	۸
۳۹۵/۸۰	۷۵	۱/۰۰	۱/۰	۹
۲۰۸/۷۰	۸۴	۱/۰۰	۲/۰	۱۰
۵۰/۰۰	۷۵	۰/۷۵	۱/۵	۱۱
۲۰۵/۳۰	۸۵	۰/۷۵	۲/۵	۱۲
۶۷/۷۰	۵۲	۰/۷۵	۰/۵	۱۳

داده‌های پرت حاصل از آزمون‌ها معین شده و در نهایت مدل‌های زیر (براساس مقادیر حقیقی عوامل) برای اندازه نانوذرات پلیمری کیتوسان و بازده تهیه آنها به ترتیب با $R^2 = 0/9642$ و $R^2 = 0/8615$ پیشنهاد شدند.

$$(4) \quad \begin{aligned} \text{اندازه متوسط نانوذرات} &= 164.6 - 128.26A - 301.337B + 66A^2 + 319.35B^2 \\ \text{بازده} &= 17.03 - 14.87A - 37.74B \end{aligned}$$

مقادیر P برای هر یک از عوامل فرایند گزارش شده در جدول ANOVA و نیز ضریب‌های مدل ارائه شده، نشان می‌دهد، غلظت

جدول ۶- تحلیل واریانس (ANOVA) مدل مربوط به بازده تهیه نانوذرات حاصل از روش سطح پاسخ.

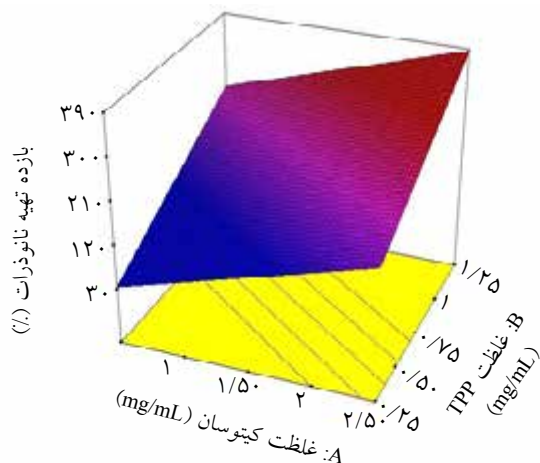
مقادیر P	میانگین مربعات	مجموع مربعات	منبع
۰/۰۰۰۴	۷۱۰/۵۹	۱۴۲۱/۱۷	مدل
۰/۰۰۱۸	۵۹۷/۰۵	۵۹۷/۰۵	غلظت کیتوسان
۰/۰۰۰۴	۹۶۱/۴۵	۹۶۱/۴۵	غلظت TPP
۰/۹۰۷۴	۲۸/۵۶	۲۲۸/۴۶	باقی مانده
-	۱۳/۹۴	۶۹/۷۱	بدون برازش
-	۵۲/۹۲	۱۵۸/۷۵	خطای خالص
-	-	۱۶۴۹/۶۴	کل

می‌دهند. با آستانه اطمینان ۰/۰۵ (سطح اطمینان ۹۵٪) و با توجه به مقادیر P گزارش شده برای دو پاسخ، مدل معنی‌داری حاصل شد. مدل‌های پیشنهاد شده به کمک آزمون بدون برازش نیز بررسی شد که مقادیر P برای پاسخ‌ها معنی‌دار نبود و در نتیجه برازش مدل‌ها تأیید شد. ضرایب مدل‌های پیشنهادی برای پیش‌بینی اندازه و بازده تهیه نانوذرات نیز به روش حداقل مربعات و با صرف نظر از برخی

جدول ۵- واریانس (ANOVA) مدل مربوط به اندازه ذرات حاصل از روش سطح پاسخ.

منبع	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیر P
مدل	۵۰۲۱۴/۲۱	۱۲۵۵۳/۵۵	۰/۰۰۰۱
غلظت کیتوسان	۱۳۱۸۳/۷۷	۱۳۱۸۳/۷۷	۰/۰۰۰۲
غلظت TPP	۲۱۳۳۰/۴۰	۲۱۳۳۰/۴۰	۰/۰۰۰۱
(غلظت کیتوسان) ۲	۶۲۴۲/۰۵	۶۲۴۲/۰۵	۰/۰۰۱۹
(غلظت TPP) ۲	۹۱۲۳/۴۱	۹۱۲۳/۴۱	۰/۰۰۰۶
باقی مانده	۱۸۶۶/۱۴	۲۶۶/۵۹	۰/۵۸۹۱
بدون برازش*	۶۵۵/۷۴	۲۱۸/۵۸	-
خطای خالص	۱۲۱۰/۴۰	۳۰۲/۶۰	-
کل	۵۲۰۸۰/۳۵	-	-

*Lack of fit



شکل ۲- نمودار سه‌بعدی مدل مربوط به بازده تهیه نانوذرات.

دقت کمتری دارد.

درنهایت، مقادیر بهینه غلظت کیتوسان و TPP برای دستیابی به بیشترین بازده تهیه و کوچک‌ترین اندازه نانوذرات در بازه معین شده متغیرها، با اندازه نانوذرات ۵۴ nm و بازده تهیه ۶۲٪، به ترتیب ۱/۲۵ و ۰/۶ mg/mL پیش‌بینی شد. مقادیر به‌دست آمده برای متوسط اندازه نانوذرات، در مقایسه با متوسط اندازه نانوذرات ۱۵۰ و ۱۵۴ nm که دوستگانی [۱۸] و Nagpal [۱۱] به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۳ با بهینه‌سازی متغیرهای روش ژل‌شدن یونی گزارش داده‌اند، کمتر بوده است که برای کاربردهای دارورسانی مناسب‌تر است. برای بررسی اعتبار شرایط بهینه، نانوذرات در این غلظت‌ها تهیه شدند که اندازه متوسط نانوذرات حاصل ۶۲/۳۸ nm و بازده تهیه آنها ۷۰٪ بود. نتیجه به‌دست آمده در محدوده تأیید شده نرم‌افزار، با سطح اطمینان ۰/۹۵٪ قرار داشت (جدول ۷).

بررسی شکل‌شناسی و بار سطحی نانوذرات در شرایط بهینه

شکل ۴، تصویر SEM نانوذرات را در شرایط بهینه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، اندازه نانوذرات در بازه تأیید شده نرم‌افزار بوده و از نظر شکل‌شناسی نیز از یکنواختی و کروی بودن مناسبی برخوردار هستند. شکل ۵، توزیع بار سطحی نانوذرات در شرایط بهینه را براساس قطر آن نشان می‌دهد. متوسط بار سطحی اندازه‌گیری شده برای نانوذرات، ۳۱ mV بود.

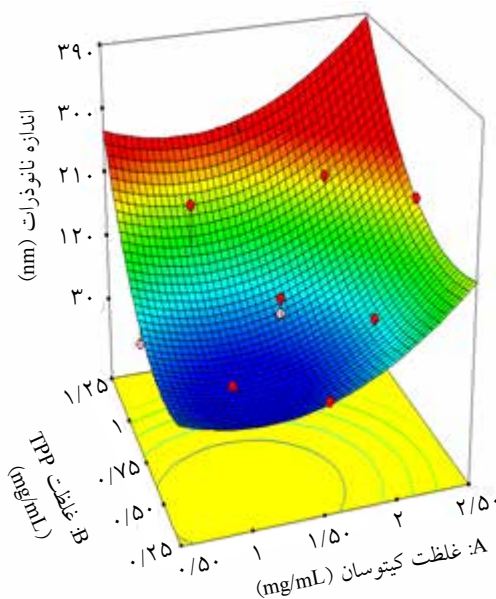
طیف FTIR

شکل ۶ طیف FTIR نمونه‌های FITC، کیتوسان نشان‌دار شده با FITC، پلیمر کیتوسان مرجع و نیز پلیمر کیتوسانی را نشان می‌دهد که فرایند نشان‌دارشدن را بدون وجود FITC طی کرده است. مقایسه

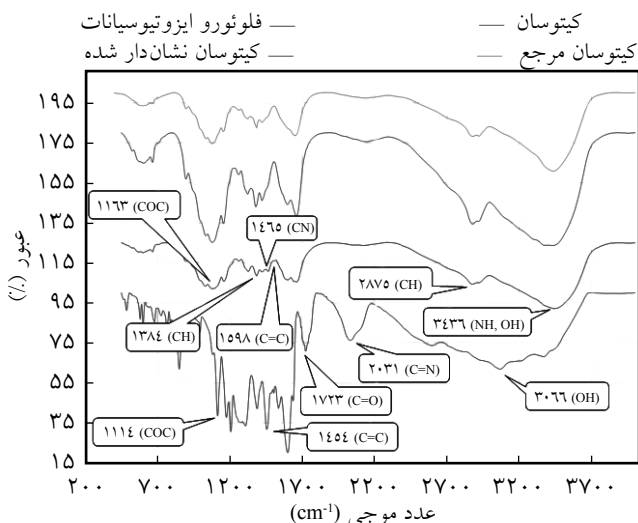
TPP با داشتن کوچک‌ترین مقدار P و بزرگ‌ترین ضریب در معادله بیشترین اثر را روی پاسخ‌ها دارد.

شکل ۱، نمودار سه‌بعدی مدل اندازه ذرات را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل می‌توان دریافت، در حالت کلی با افزایش غلظت کیتوسان و TPP، اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد. اما، در غلظت‌های کم کیتوسان، با افزایش غلظت TPP، اندازه نانوذرات به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد، در حالی که در غلظت‌های زیاد کیتوسان، با افزایش غلظت TPP تغییرات در اندازه نانوذرات کمتر است. در هر دو حالت با افزایش غلظت TPP، اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد. اما، از آنجا که در غلظت کم کیتوسان اندازه نانوذرات اولیه کوچک‌ترند، شدت تغییر اندازه نانوذرات نسبت به حالتی که غلظت کیتوسان زیاد بوده بیشتر است.

شکل ۲، نمودار سه‌بعدی مربوط به مدل بازده تهیه را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل می‌توان گفت، مطابق انتظار، با افزایش غلظت کیتوسان و TPP، بازده تهیه نانوذرات افزایش می‌یابد. دلیل این موضوع می‌تواند افزایش کیتوسان و TPP اولیه در دسترس برای انجام واکنش و در نتیجه افزایش پیشرفت واکنش ژل‌شدن یونی باشد. شکل ۳، نمودارهای مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی و باقی‌مانده را برای دو مدل مربوط به اندازه نانوذرت و بازده تهیه آنها نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، مدل مربوط به اندازه نانوذرات از لحاظ آماری معنی‌دار و دقیق است. مدل مربوط به بازده تهیه نانوذرات نیز با وجود معنی‌دار بودن آماری، به دلیل کم‌تر بودن مقدار R^2 در مقایسه با مقدار آن در مدل مربوط به اندازه نانوذرات،



شکل ۱- نمودار سه‌بعدی مدل مربوط به اندازه ذرات.



شکل ۶- طیف FTIR نمونه‌های کیتوسان نشان‌دار شده با FITC، پلیمر کیتوسان مرجع، FITC و نیز پلیمر کیتوسانی نشان‌دار شده بدون وجود FITC.

کیتوسان FITC و پیوند CN در گروه آمین نوع دوم ایجاد شده در اثر واکنش کیتوسان با FITC است [۱۹-۲۱].

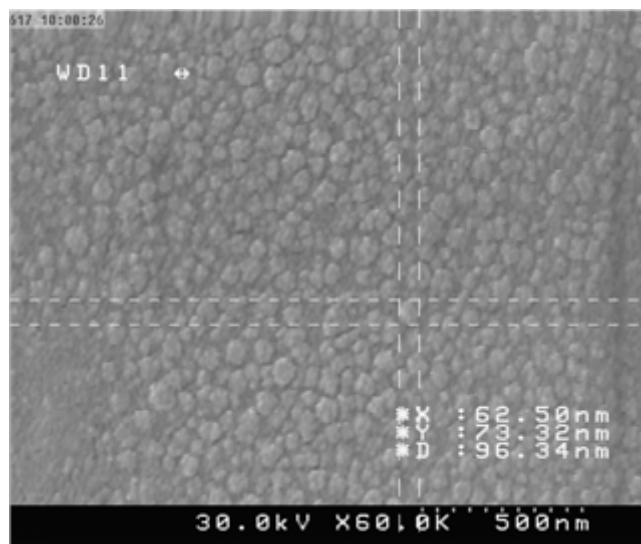
تفاوت‌های اصلی طیف FTIR کیتوسان و کیتوسان نشان‌دار شده در اعداد موجی ۱۴۶۵ و ۱۵۹۸ cm^{-1} است. این تفاوت احتمالاً به ترتیب مربوط به گروه‌های C=C موجود در حلقه‌های آروماتیکی FITC و CN جدید تشکیل شده میان FITC و کیتوسان است که می‌تواند نشان‌دهنده وجود FITC در نمونه کیتوسان نشان‌دار شده باشد. از طرفی، نبود پیک مربوط به پیوند C=N در محدوده طول موج cm^{-1} ۲۰۰۰ می‌تواند تأییدکننده شکسته شدن این پیوند و در نتیجه انجام واکنش میان FITC و کیتوسان باشد.

میکروسکوپی فلئورسان

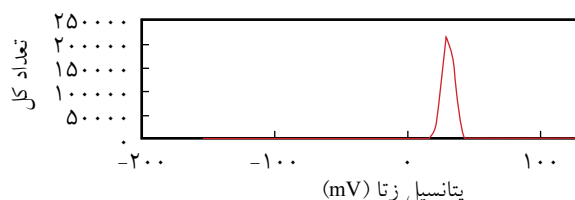
شکل ۷- تصاویر میکروسکوپی فلئورسان نانوذرات نشان‌دار شده پراکنده شده در آب مقطر را نشان می‌دهد. اتصال صحیح FITC به مولکول‌های کیتوسان و در نتیجه نشان‌دار شدن پلیمر کیتوسان و نانوذرات حاصل در شکل تأیید شده است.

تعیین اندازه نانوذرات نشان‌دار

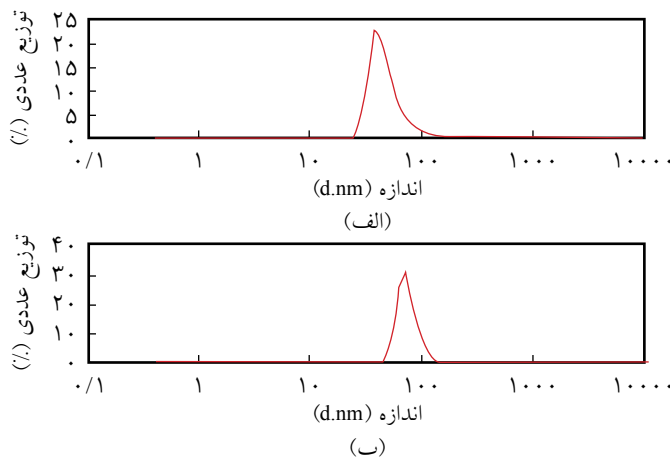
نتایج آزمون DLS برای متوسط عددی اندازه نانوذرات تهیه شده از پلیمر کیتوسان اولیه و نشان‌دار شده در شکل ۸ آمده است. متوسط اندازه عددی نانوذرات تشکیل شده با استفاده از پلیمر اولیه و نشان‌دار شده به ترتیب ۴۵ و ۷۰ nm به دست آمد. متوسط اندازه نانوذرات نشان‌دار کیتوسان به دست آمده، در مقایسه با نتیجه گزارش شده



شکل ۴- تصویر FESEM مربوط به نانوذرات در شرایط پهنه متغیرها. طیف عبارت‌اند از پیک در عدد موجی cm^{-1} ۳۰۶۶ که مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند OH گروه عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل است. پیک در ۱۳۸۷، ۱۴۵۴ و cm^{-1} ۱۵۹۹ مربوط به جذب کششی پیوندهای دوگانه C=C در حلقه‌های آروماتیکی و cm^{-1} ۱۱۱۴ مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند COC گروه اتری است. جذب در عدد موجی cm^{-1} ۱۷۲۳ مربوط به جذب کششی پیوند C=O در گروه‌های عاملی کربوکسیل و کتون است. پیک cm^{-1} ۲۰۳۱ مربوط به جذب کششی اورتون پیوند C=N در گروه ایزوتیوسیانات است [۱۹-۲۱]. مشخصه‌های اصلی طیف جذب FTIR برای نمونه کیتوسان نشان‌دار شده نیز عبارت‌اند از جذب در عدد موجی cm^{-1} ۳۴۳۶ که مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند NH گروه‌های آمین نوع اول کیتوسان و OH گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل کیتوسان و FITC است. جذب cm^{-1} ۲۸۷۵ که مربوط به ارتعاش‌های متقارن و نامتقارن پیوند CH در گروه CH_2 کیتوسان است. پیک‌های جذب در cm^{-1} ۱۳۸۴ و cm^{-1} ۱۶۵۹ به ترتیب مربوط به ارتعاش‌های خمشی گروه CH_2 کیتوسان و پیوند NH در آمین نوع اول کیتوسان است. جذب در cm^{-1} ۱۱۶۳ مربوط به ارتعاش کششی پیوند COC گروه اتری کیتوسان و FITC است. جذب در اعداد موجی ۱۰۷۸ و cm^{-1} ۱۴۶۵ به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای CO گروه هیدروکسیل



شکل ۵- نمودار توزیع بار سطحی نانوذرات در شرایط پهنه.



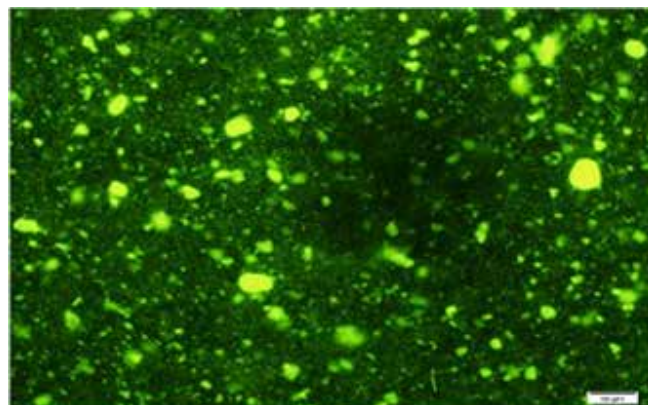
شکل ۸- نمودار توزیع عددی اندازه: (الف) نانوذرات اولیه و (ب) نشان‌دار شده کیتوسان.

بررسی خروج نانوذرات از سامانه‌های تراپوستی

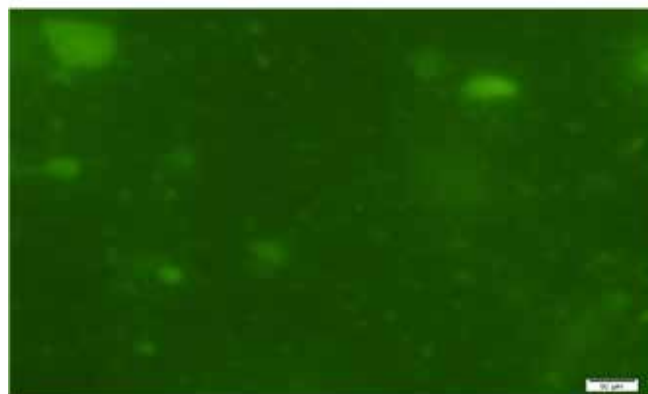
شکل ۷ تصاویر میکروسکوپی فلئورسان نانوذرات نشان‌دار شده پراکنده شده در آب مقطر و نانوذرات نشان‌دار شده موجود در چسب آکریلی را نشان می‌دهد. با وجود پراکندگی مناسب نانوذرات در چسب، اندازه مناسب نانوذرات نشان‌دار شده، صحت فرایند نشان‌دار کردن و نیز عملکرد مناسب نانوذرات نشان‌دار شده در زیر میکروسکوپ فلئورسان، نمونه‌های رهایش نانوذرات از چسب‌های آکریلی پس از بررسی نشانی از وجود نانوذرات نشان‌دار نداشته و می‌توان خارج‌نشدن نانوذرات از این دو چسب را، حداقل بدون استفاده از روشی برای افزایش نفوذ نتیجه گرفت.

نتیجه‌گیری

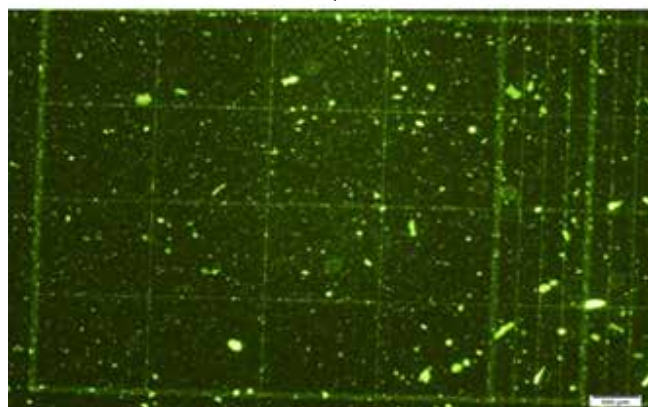
نانوذرات زیست‌سازگار نشان‌دار کاربرد گسترده در ردیابی سلول‌ها و نانوذرات در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی دارند. در این پژوهش، نانوذرات کیتوسان به روش ژل‌شدن یونی تهیه شدند و اثر دو عامل نحوه افزودن کیتوسان به TPP و دمای محلول‌های کیتوسان و TPP بر متوسط اندازه آنها بررسی شد. در نتیجه، افزایش ناگهانی محلول کیتوسان به TPP و اعمال شوک گرمایی سبب کاهش متوسط اندازه عددی نانوذرات نهایی می‌شود. در ادامه، با در نظر گرفتن دو متغیر غلظت کیتوسان و TPP، برای دستیابی به کمینه اندازه و بیشینه بازده تهیه نانوذرات بهینه شدند. مشخصه‌های نانوذرات در شرایط بهینه بررسی شدند که در نتیجه نانوذرات از بار سطحی، متوسط اندازه و شکل ظاهری مناسبی برخوردار بودند. نانوذرات نشان‌دار با استفاده



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۷- تصاویر میکروسکوپی فلئورسان نانوذرات نشان‌دار شده در: (الف) چسب آکریلی $10 \times$ ، (ب) چسب آکریلی $20 \times$ و (ج) آب مقطر.

توسط Huang و همکاران بسیار مناسب‌تر است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ به تهیه این نانوذرات موفق شده بودند (۲۲۳ nm) [۱۵].

تهیه سامانه تراپوستی

درصد خشک چسب آکریلی با سه مرتبه تکرار، از معادله (۲) برابر ۳۷٪ محاسبه شد. بر همین اساس، نسبت نانوذرات به چسب خشک محاسبه و سامانه تراپوستی حاوی نانوذرات تهیه شد.

نانوذرات نشان‌دار شده تهیه شد که در نتیجه، نانوذرات نشان‌دار کیتوسان از سامانه تراپوستی چسب آکریلی بدون روش‌های افزایش نفوذ خارج نشدند.

از پلیمر کیتوسان-FITC و براساس اتصال گروه ایزوتیوسیانات در FITC و گروه آمین کیتوسان تهیه کیتوسان متصل شده به FITC، با اندازه‌ای مناسب تهیه شدند. در نهایت، سامانه تراپوستی حاوی

مراجع

- Pakzad Y. and Ganji F., *Preparation and Study of Injectable Metronidazole System Based on Thermosensitive Chitosan Hydrogel for Periodontal Diseases*, MSc Thesis, Tarbiat Modares University, March 2014.
- Shabestari M.H. and Sarbolouki M., Novel Transdermal Drug Delivery Systems, *Iran. J. Dermatolog.*, **9**, 270-283, 2006.
- Prausnitz M.R. and Langer R., Transdermal Drug Delivery, *Nature Biotechnol.*, **26**, 1261-1268, 2008.
- Moghimi A. and Taghizadeh S.M., Skin Permeation Enhancers and their Effects on Narcotic Transdermal Drug Delivery Systems through Response Surface Experimental Design, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **26**, 459-473, 2014.
- Prausnitz M.R., Mitragotri S., and Langer R., Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 115-124, 2004.
- Jain P. and Banga A.K., Inhibition of Crystallization in Drug-in-Adhesive-Type Transdermal Patches, *Int. J. Pharmaceut.*, **394**, 68-74, 2010.
- Escobar-Chávez J., Díaz-Torres R., Rodríguez-Cruz I., Domínguez-Delgado C., Morales R., Ángeles-Anguiano E., and Melgoza Contreras L., Nanocarriers for Transdermal Drug Delivery, *Skin*, **19**, 3-17, 2012.
- Soroshnia A., Ganji F., and Taghizadeh S.M., Effect of Formulation Components on Transdermal Permeation of Desmopressin Acetate Microemulsion, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **33**, 27-32, 2014.
- Ravi K. and Majeti N.V., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27, 2000.
- Grenha A., Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods, *J. Drug Target.*, **20**, 291-300, 2012.
- Nagpal K., Singh S., and Mishra D., Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery, *Chem. Pharmaceut. Bull.*, **58**, 1423-1430, 2010.
- Huang M., Ma Z., Khor E., and Lim L.Y., Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells, *Pharmaceut. Res.*, **19**, 1488-1494, 2002.
- Huang M., Khor E., and Lim L.Y., Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Pharmaceut. Res.*, **21**, 344-353, 2004.
- Tallury P., Kar S., Bamrungsap S., Huang Y.F., Tan W., and Santra S., Ultra-Small Water-Dispersible Fluorescent Chitosan Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Specific Targeting, *Chem. Commun.*, **17**, 2347-2349, 2009.
- Yang C.H., Lin Y.S., Huang K.S., Huang Y.C., Wang E.C., Jong J.Y., and Kuo C.Y., Microfluidic Emulsification and Sorting Assisted Preparation of Monodisperse Chitosan Microparticles, *Lab Chip*, **9**, 145-150, 2009.
- Fan W., Yan W., Xu Z., and Ni H., Formation Mechanism of Monodisperse, Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles by Ionic Gelation Technique, *Colloid. Surface. B*, **90**, 21-27, 2012.
- Calvo P., López C.R., Vila-Jato J.L., and Alonso M.J., Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, *Pharmaceut. Res.*, **14**, 1431-1436, 1997.
- Dustgani A., Vasheghani-Farahani E., and Imani M., Determination of the Optimum Conditions for Production of Chitosan Nanoparticles, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **20**, 457-464, 2007.
- Pavia D.L., Lampman G.M., and Kriz G.S., *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, Thomson Learning, USA, 2001.
- Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G., and Grasselli J.G., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic, San Diego, 1991.
- Ghosh S.K., Ali M., and Chatterjee H., Studies on the Interaction of Fluorescein Isothiocyanate and Its Sugar Analogues with Cetyltrimethylammonium Bromide, *Chem. Phys. Lett.*, **561**, 147-152, 2013.