

Dynamic Parameters in Preparing Chitosan Nanoparticles with Incorporation Method Using Novel Drug Delivery Systems

S.M. Taghizadeh^{1*} and R. Safaei Javan²

1. Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14965-115, Tehran, Iran

2. Department of Science and Research, Islamic Azad University, P.O. Box: 19395-4158, Tehran, Iran

Received 26 May 2009, accepted 18 May 2010

ABSTRACT

Polymeric nanoparticles with biodegradable and biocompatible polymers are good candidates in peptide drugs delivery systems. In this study, we successfully prepared chitosan nanoparticles including salicylic acid as a model drug by emulsion cross-linking "in oil" method. The various dynamic parameters are considered, including the speed of stirrer, the duration of injecting the aqueous phase into oil phase and the condition of precipitation of particles. It is found that the optimum conditions are achieved at 2000 rpm when the aqueous phase is added within 30 min into the oil phase. According to optimum conditions the nanoparticles of chitosan (the peak of size distribution in 100 nm) were prepared and the drug content and the release behavior were estimated. The results demonstrate, that the drug content of nanoparticles is 35% (w/w). The release behavior of nanoparticles during first 4 hour conform best to Higuchi model and thereafter up to maximum 48 h the amount of drug released is negligible.

Key Words:

novel drug delivery systems,
chitosan, nanoparticle,
emulsion crosslinking,
salicylic acid

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: s.m.taghizadeh@ippi.ac.ir

بررسی اثر عوامل دینامیکی بر تولید نانوذرات کیتوسان به روش تلفیق برای استفاده در سامانه های نوین دارورسانی

سید مجتبی تقی زاده^{۱*}، راحله صفایی جوان^۲

۱- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵

۲- تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، صندوق پستی ۴۱۵۸-۱۹۳۹۵

دریافت: ۸۸۳/۵، پذیرش: ۸۹۳/۲۸

چکیده

نانوذرات پلیمری با پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیر، انتخاب مناسبی هستند به عنوان حامل داروهای ناپایدار یا داروهایی که در لوله گوارش جذب کمی دارند. در این پژوهش، نانوذرات کیتوسان حاوی سالیسیلیک اسید به عنوان داروی مدل، به روش امولسیون شبکه ای شونده در روغن تهیه شد. عوامل مختلف دینامیکی شامل سرعت هم زن، زمان اضافه کردن فاز آبی به فاز روغنی و مراحل جداسازی با توجه به نحوه اضافه کردن فاز آبی به فاز روغنی بررسی شد. پس از آن، با یافتن پارامترهای بهینه، محتوا و رهایش دارو از نانوذرات فرمول بندی بهینه مطالعه شد. نتایج نشان داد با این روش، فرمول بندی بهینه با سرعت هم زن ۲۰۰۰ rpm و اضافه کردن فاز آبی طی ۳۰ min به فاز روغنی، کوچک ترین ذرات (بیک توزیع اندازه ذرات در محدوده ۱۰۰ nm) حاصل می شوند. مقدار محتوای داروی این ذرات ۳۵٪ (وزنی- وزنی) است. رفتار رهایشی آنها تا ۴ ساعت اول از مدل هیگچی پیروی می کند و پس از آن تا ۴۸ h رهایش اندازه گیری شد که مقدار آن ناچیز بود.

واژه های کلیدی

سامانه های نوین دارورسانی،

نانوذره، کیتوسان،

امولسیون شبکه ای شونده،

سالیسیلیک اسید

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

مقدمه

امروزه، مطالعه پیرامون خاصیت زیست چسبندگی شکل خوراکی داروهایی که جذب ضعیفی دارند، توجه زیادی را جلب کرده است. چسبندگی به غشای موکوسی در لوله گوارش می تواند به عنوان مخاط چسبندگی معرفی شود. از زمانی که مخاط چسبندگی توانست مدت اقامت حامل های دارویی در ناحیه جذب را با ترکیب دو عامل مخاط چسبندگی و استفاده از شیوه های انتقال داروی کنترل شده افزایش دهد، جذب داروهای ناپایدار بهبود زیادی یافت [۴-۱]. لانگر و همکاران اولین گروهی بودند که نشان دادند، عبور با تأخیر از لوله گوارش که به وسیله پلیمرهای زیست چسبنده ایجاد می شود، منجر به افزایش دست یابی زیستی این داروها می شود [۵]. یکی از مهم ترین و جذاب ترین کاربردهای سامانه های نانوذرات مخاط چسب برای استعمال خوراکی داروهای پیتیدی است.

کیتوسان با نام علمی پلی $[\beta(1 \rightarrow 4) \text{D-آمینو-۲-داکسی-D-گلوکوپیرانوز}]$ پلیمری زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است که از فرایند استیل زدایی بازی کیتین به دست می آید [۶]. مطالعات نشان داده است، قدرت مخاط چسبندگی نانوذرات کیتوسان می تواند ناشی از مقدار سطح موکوس در روده کوچک باشد و علت آن احتمالاً نفوذ عمیق نانوغوی های کیتوسان به درون لایه موکوس و چسبندگی آنها به این بافت است [۷، ۱۶]. به علت وجود گروه های (NH_3^+) در کیتوسان این ذرات با سطح موکوس که بار منفی دارد، پیوندهای الکتروستاتیک قوی تشکیل می دهند. افزون بر این نوع پیوند، وجود پیوندهای آب گریز و پل های نمکی هم گزارش شده است [۸، ۹]. افزایش زمان اقامت دارو و تماس بهتر و کارآمدتر نانوغوی های کیتوسان با دیواره روده کوچک می تواند به وضوح مقدار جذب دارو را بهبود بخشد [۷، ۱۶]. این یافته ها کارآمدی کیتوسان را برای انتقال داروهای ناپایدار تأیید می کند و انتخاب آن را برای استفاده در این پژوهش مناسب کرده است.

سالیسیلیک اسید، اسید آروماتیک با فرمول مولکولی $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$ و نام شیمیایی ۲-هیدروکسی بنزوئیک اسید است که هم در رده فنول ها و هم در رده کربوکسیلیک اسیدها دسته بندی و از پوست درخت بید استخراج می شود. این دارو برای درمان جوش، آکنه، زگیل و میخچه به کار می رود [۱۰]. نیمه عمر کوتاه، دست یابی زیستی کم آن و تحریک مجرای گوارش، این دارو را مدل مناسبی برای استفاده در سامانه های نوین انتقال دارو کرده است.

پژوهش های انجام شده نشان می دهد، قابلیت کپسولی شدن داروهای پیتیدی به مقدار زیادی به روش به کار رفته برای تهیه نانوذرات وابسته است [۱]. تاکنون راه های مختلفی برای تهیه و ساخت نانوذرات پلیمری گزارش شده است که از این میان می توان به روش های

پلیمر شدن و امولسیون انتشار و تبخیر حلال اشاره کرد [۱۱]. روش های امولسیون به دو گروه امولسیون در آب و امولسیون در روغن دسته بندی می شوند. روش امولسیون در روغن بیشترین مقدار بازده کپسولی شدن داروها را در مقایسه با سایر روش ها نشان داده است [۱]. تاکنون با روش امولسیون شبکه ای شونده در روغن، تنها ذراتی در محدوده میکرون به دست آمده است [۱۴-۱۲]. پژوهش ها نشان می دهند، مقدار رهایش دارو از ذرات، به اندازه آنها بستگی دارد [۱۵] که عوامل مختلفی روی اندازه ذرات نهایی مؤثر است. با توجه به گسترده بودن عوامل و اثر آنها روی مراحل مختلف ساخت ذرات، در مقالات گوناگون هر کدام روی تعدادی از آنها کار کرده اند. به عنوان مثال راجیش و همکاران اثر سه عامل غلظت محلول کیتوسان، سرعت هم زن و غلظت دارو [۱۶] و بیرو و همکاران اثر چهار عامل سرعت هم زن، غلظت کیتوسان، مقادیر مواد فعال سطحی و گلو تار آلدهید را در ساخت و بهینه سازی میکروذرات کیتوسان بررسی کرده اند [۱۳، ۱۲]. در این پژوهش، اثر عوامل دینامیکی، شامل سرعت هم زن، مدت زمان اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی و سرعت و مدت زمان گریز از مرکز برای دست یابی به ذراتی در مقیاس نانو که به روش امولسیون شبکه ای شونده در روغن تهیه می شوند، بررسی شده است. از مزایای این روش، رسوب هم زمان پلیمر و دارو به شیوه تلفیق است و سامانه را برای انتقال کنترل شده داروهای ناپایدار مناسب تر می سازد. هم چنین، در این روش نه تنها ساختار دارو هیچ آسیبی نمی بیند، بلکه بدون نیاز به خشکاندن انجمادی، ذراتی کاملاً کروی و غیر چسبنده به دست می آید که نگهداری آنها به سادگی امکان پذیر است. از این نانوذرات می توان در انتقال داروهای پیتیدی، واکسن و DNA استفاده کرد [۱۹-۱۴].

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی ۷۸۰۰۰۰ و درجه استیل زدایی (DD) ۶۷/۵ از شرکت Fluka سوئیس تهیه و DD آن به مقدار مورد نظر (۷۵) بر اساس روش ارائه شده توسط مؤلف [۲۱، ۲۰]، تغییر داده شد. سالیسیلیک اسید از شرکت تماد ایران خریداری شد. پارافین و اسپن ۸۰ از شرکت Merck آلمان و پترولیوم اتر و گلو تار آلدهید از شرکت Aldrich آمریکا تهیه شد.

دستگاه ها

در این پژوهش، برای شکل شناسی ذرات از میکروسکوپ الکترون پویشی (SEM) مدل Tescan vega ساخت جمهوری چک

شکل شناسی و اندازه نانوذرات

شکل نانوذرات با میکروسکوپ الکترون پویشی نشان داده شد. توزیع و متوسط اندازه ذرات به کمک پراکندگی نور لیزر اندازه گیری شد.

بررسی برهم کنش کیتوسان و سالیسیلیک اسید

برای بررسی برهم کنش کیتوسان و سالیسیلیک اسید از هر یک به تنهایی و هم چنین از فیلم حاصل از خشکاندن محلول این دو در استیک اسید ۱ درصد (V/V)، طیف زیر قرمز گرفته شد.

محتوا و نحوه رهایش دارو از نانوذرات

محتوای دارو با حل کردن مقدار مشخصی از نمونه ها (۰/۰۱ g) در ۶ mL استیک اسید ۱ درصد (V/V) انجام شد که حلال مشترک دارو و پلیمر است. غلظت سالیسیلیک اسید در استیک اسید به وسیله طیف بینی UV معین شد. برای اندازه گیری رهایش دارو در زمان های مختلف، مقدار مشخصی از نمونه ها (۰/۰۰۶ g) پس از قرار دادن در کیسه دیالیز، در ظرف های تیره گذاشته شد. سپس، به آن ۱۰ mL بافر فسفات (pH=۷/۴) اضافه شد. ظرف ها در دستگاه انکوباتور لرزان با سرعت ۸۰ rpm و دمای ۳۷°C قرار گرفت. در فواصل زمانی معین ۳ mL از محلول مزبور برداشته و با ۳ mL بافر تازه جایگزین شد. مقدار داروی رهایش یافته با طیف بینی UV معین و با مدل هیگوچی و درجه صفر بر اساس معادله های (۱) و (۲) مقایسه شد [۱۰]. تمام آزمایش ها ۳ مرتبه تکرار شد:

معادله هیگوچی

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad (1)$$

معادله درجه صفر

$$Q_t = K_H t \quad (2)$$

Q_t ، مقدار داروی رهایش یافته در زمان t و K_H ثابت رهایش است.

نتایج و بحث

اثر سرعت هم زن

با توجه به طراحی آزمون انجام شده، برای تعیین اثر سرعت هم زن، تصاویر میکروسکوپ الکترون پویشی نمونه ها در سرعت های مختلف ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۵۰۰ rpm تهیه و بررسی شدند. این تصاویر در شکل ۲ ارائه شده است. این شکل نشان می دهد، سرعت هم زن در اندازه نهایی

استفاده شد. توزیع و متوسط اندازه ذرات با دستگاه پراکندگی نور لیزر مدل SEM-633 ساخت شرکت Sematech فرانسه بررسی و از دستگاه مرکز گریز بیخچال دار مدل 2-16 KC ساخت شرکت Sigma آلمان برای جداسازی نانوذرات استفاده شد.

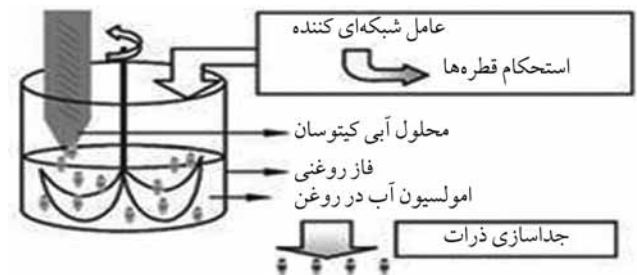
روش ها

تهیه نانوذرات

به طور کلی در این روش، امولسیون آب در روغن با امولسیون کردن محیط آبی کیتوسان در روغن ایجاد می شود. این امولسیون پایدار با استفاده از یک عامل شبکه ای کننده مثل گلو تار آلدهید، مستحکم می شود (شکل ۱) [۱۱].

در این پژوهش، فاز روغنی شامل ۲۵/۱۶ g پارافین مایع و ۰/۴ mL اسپن ۸۰ است. فاز آبی شامل ۴/۵ mL استیک اسید ۱ درصد (V/V) به علاوه ۰/۴۵ g کیتوسان و ۰/۰۴۵ g سالیسیلیک اسید است. پس از اضافه شدن این دو فاز، به مقدار ۰/۰۸ mL گلو تار آلدهید ۲۵ درصد (V/V) به مخلوط اضافه شد و تا تکمیل شدن واکنش، هم زدن ادامه یافت. سپس، دو فاز طی مراحل رسوب گیری از هم جدا شدند. دما در طول مدت آزمایش روی ۴۰°C ثابت نگه داشته شد.

به منظور بررسی اثر پارامترهای فرایند بر شکل و اندازه ذرات نهایی، آزمایش ها در ۳ مرحله طراحی شد. در مرحله اول، زمان اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی به عنوان پارامتر ثابت، ۱۲۰ min و سرعت هم زن به عنوان پارامتر متغیر در نظر گرفته شد. سرعت های انتخاب شده به ترتیب ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۵۰۰ rpm بودند. در مرحله بعد، سرعت هم زن به عنوان عامل ثابت روی ۲۰۰۰ rpm تنظیم و اثر زمان اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی به عنوان عامل متغیر در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ min بررسی شد. پس از یافتن سرعت و مدت زمان بهینه، در مرحله سوم، سرعت و مدت زمان گریز از مرکز برای جداسازی ذرات بررسی و بهینه شد و هر بار بازده فرایند محاسبه شد.



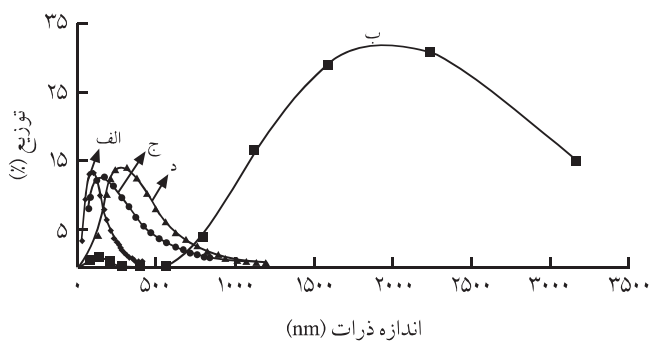
شکل ۱ - طرح کلی تهیه نانوذرات کیتوسان به روش امولسیون در روغن.

ذرات مؤثر است [۲۲]، به طوری که ذرات حاصل از سرعت هم‌زن ۱۰۰۰ rpm در محدوده میکرومتر بودند. با افزایش سرعت هم‌زن تا ۲۰۰۰ rpm اندازه ذرات کاهش یافت و به محدوده نانومتر رسید. با افزایش سرعت هم‌زن تا ۳۵۰۰ rpm تغییری در اندازه ذرات مشاهده نشد. لازم به ذکر است، شکل ذرات در هر سه حالت کاملاً کروی با سطحی صاف بودند. با توجه به نتایج حاصل سرعت بهینه ۲۰۰۰ rpm انتخاب شد.

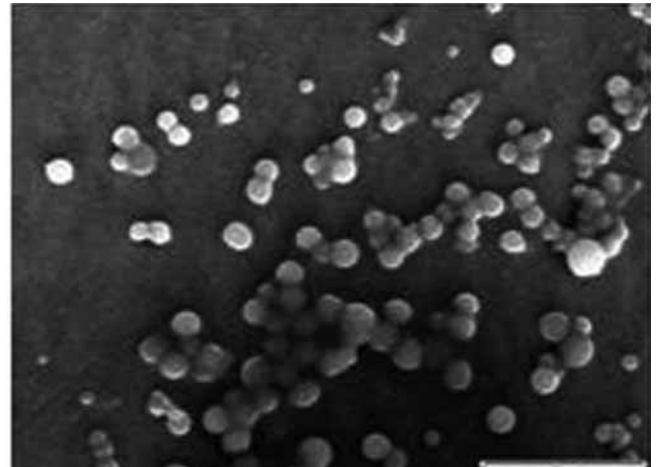
اثر مدت زمان افزودن فاز آبی به فاز روغنی

با توجه به مشخص شدن سرعت بهینه هم‌زن (۲۰۰۰ rpm)، برای تعیین اثر مدت زمان افزودن فاز آبی به فاز روغنی، زمان‌های ۱۲۰، ۹۰، ۶۰ و ۳۰ min در نظر گرفته شد و توزیع اندازه ذرات با پراکندگی نور لیزر به دست آمد (شکل ۳).

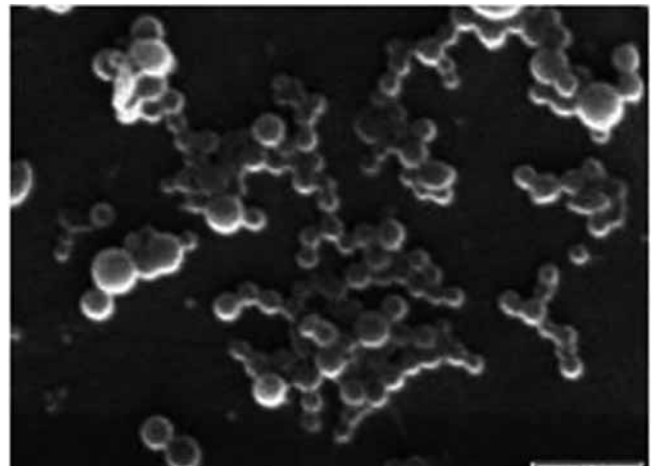
نتایج نشان می‌دهد، کوچک‌ترین ذرات هنگامی به دست می‌آیند که دو فاز طی ۳۰ min به یک‌دیگر اضافه شوند. در این حالت، پیک توزیع اندازه ذرات در محدوده ۱۰۰ nm قرار می‌گیرد. در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش این زمان تا ۶۰ min، توزیع اندازه ذرات دو قله‌ای می‌شود، به طوری که بخش کوچکی از آنها در همان محدوده ۱۰۰ nm است که مشابه زمان ۳۰ min است. ولی، به دلیل ناپایداری سامانه که ناشی از نبود عامل شبکه‌ای کننده است، بخش عمده‌ای از ذرات در این زمان به یک‌دیگر می‌چسبند. در نتیجه، اندازه آنها به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد و پیک دوم در محدوده ۲۰۰۰ nm دیده می‌شود. اما، با افزایش بیشتر این زمان تا ۹۰ min، به دلیل برخورد بیشتر ذرات با تیغه‌های هم‌زن، اندازه ذرات ریزتر و توزیع آنها تک‌قله‌ای می‌شود. با گذشت زمان از ۹۰ به ۱۲۰ min، به دلیل طولانی شدن زمان هم‌خوردن و نبود عامل شبکه‌ای کننده، ذرات دوباره به هم چسبیده و اندازه آنها افزایش می‌یابد (شکل ۴). هم‌چنین، بررسی‌های انجام شده توسط پژوهش‌گران نشان می‌دهد، بین اندازه قطره‌های اضافه شده به



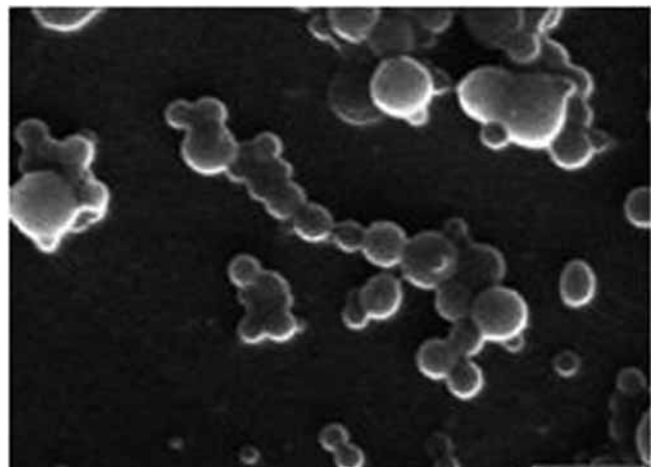
شکل ۳ - نمودار توزیع اندازه ذرات، فاز آبی به فاز روغنی در مدت زمان‌های: (الف) ۳۰ min، (ب) ۶۰ min، (ج) ۹۰ min و (د) ۱۲۰ min.



(الف)

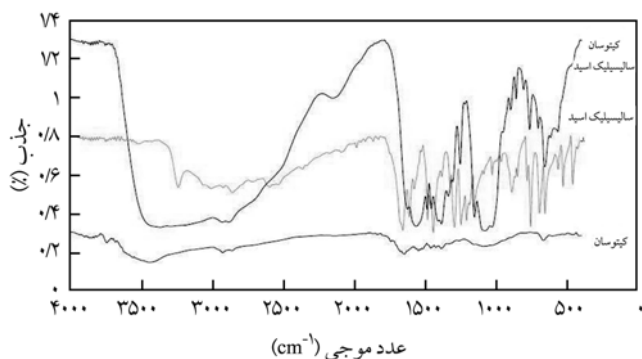


(ب)



(ج)

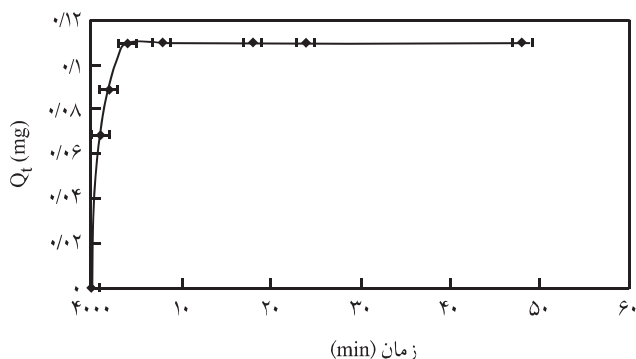
شکل ۲ - تصاویر SEM ذرات حاصل از سرعت‌های مختلف هم‌زن: (الف) ۱۰۰۰ rpm با بزرگ‌نمایی ۱۵۰۰ برابر، (ب) ۲۰۰۰ rpm با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر و (ج) ۳۵۰۰ rpm با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر.



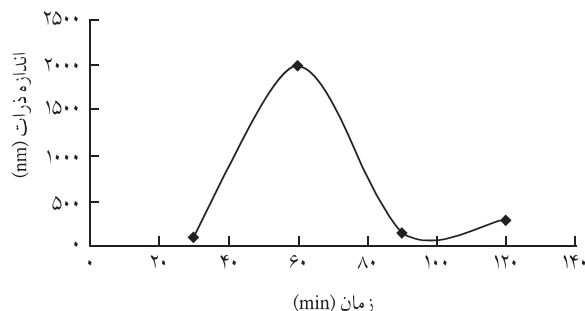
شکل ۵ - طیف زیرقرمز از کیتوسان، سالیسیلیک اسید و محلول این دو در استیک اسید ۱ درصد (V/V).

بررسی برهم کنش کیتوسان و سالیسیلیک اسید

طیف زیرقرمز از کیتوسان، سالیسیلیک اسید و محلول این دو در استیک اسید ۱ درصد (V/V) در شکل ۵ نشان داده شده است. پیک مربوط به ارتعاش کششی متقارن گروه کربونیل ساده در سالیسیلیک اسید (پیش از این که به آنیون کربوکسیلات تبدیل شود) در 1656 cm^{-1} ظاهر می شود. با تبدیل آن به گروه آنیون کربوکسیلات و اختلاط با کیتوسان، به طول موج 1565 cm^{-1} جا به جا شده است. هم چنین، پیک مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن گروه کربونیل در 1442 cm^{-1} در آنیون کربوکسیلات به طول موج 1385 cm^{-1} جا به جا شده است. از طرفی، پیک مربوط به ارتعاش خمشی آمین نوع دوم کیتوسان که در طول موج 1635 cm^{-1} ظاهر می شود، در اثر تبدیل به گروه NH_3^+ و اختلاط با سالیسیلیک اسید، در طول موج 1612 cm^{-1} مشاهده می شود. پیک های مربوط به ارتعاشات کششی گروه آمین با پیک های مربوط به گروه های OH اسیدی پوشانده شده است. در ساختار کیتوسان پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی وجود دارد که با افزودن استیک اسید در دمای محیط، پیوندهای هیدروژنی حذف و گروه NH_2 به NH_3^+ تبدیل شده است. در مرحله بعد



شکل ۶ - نمودار رهائش نانوذرات بهینه در ۴۸ h.



شکل ۴ - نمودار اندازه ذرات بر اساس زمان اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی.

فاز روغنی و اندازه ذرات حاصل رابطه ای خطی وجود دارد [۱۵]. بنابراین در پژوهش حاضر، قطره های فاز آبی با سرعت و اندازه ای یکنواخت به فاز روغنی اضافه شد.

اثر سرعت و مدت زمان گریز از مرکز

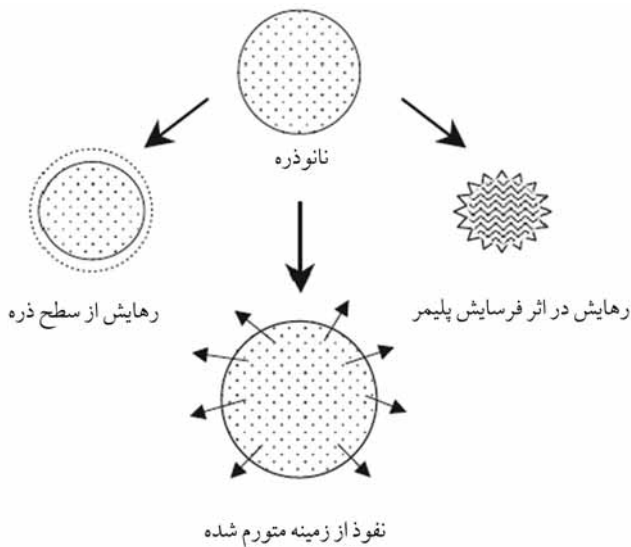
با توجه به مشخص شدن سرعت بهینه هم زن (2000 rpm) و مدت زمان بهینه اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی (30 min)، نمونه ها به منظور بررسی اثر سرعت و مدت زمان گریز از مرکز تهیه شد. برای این منظور، اثر سرعت و مدت زمان گریز از مرکز روی مقدار بازده فرایند بررسی شد. مقدار بازده بر اساس معادله (۳) محاسبه و خلاصه نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان می دهد، با افزایش سرعت تا 15000 rpm و زمان تا 60 min بازده فرایند افزایش یافته و پس از آن ثابت می ماند. بنابراین، سرعت 15000 rpm و مدت زمان 60 min به ترتیب به عنوان سرعت و مدت زمان بهینه فرایند جداسازی مشخص شد:

$$\text{بازده فرایند} = \frac{W}{W_0} \quad (3)$$

و W_0 و W به ترتیب وزن اولیه مواد و وزن رسوب حاصل است.

جدول ۱ - بهینه سازی سرعت و مدت زمان گریز از مرکز.

سرعت گریز از مرکز (rpm)	زمان (min)	بازده (%)
۵۰۰۰	۳۰	-
۱۰۰۰۰	۳۰	۴۶
۱۵۰۰۰	۳۰	۵۴
۱۵۰۰۰	۶۰	۸۰
۱۵۰۰۰	۱۲۰	۸۰



شکل ۸- ساز و کارهای رهایش دارو از سامانه های ذره ای.

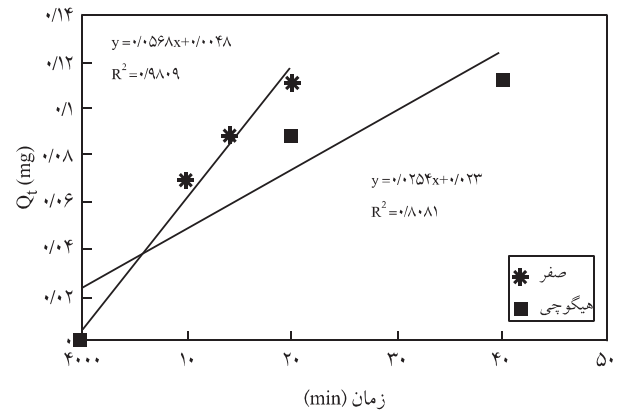
با مدل هیگوجی مطابقت دارد که نشان می دهد، رهایش دارو به طور آهسته و طبق قانون نفوذ فیک انجام شده است. به نظر می رسد، به علت شبکه ای شدن پلیمر و وجود پیوندهای یونی بین کیتوسان و سالیسیلیک اسید، مقدار رهایش دارو از این سامانه عمدتاً مربوط به داروی موجود روی سطح ذرات بوده است و داروی موجود در عمق ذرات رهایش محدودی داشته است.

نتیجه گیری

در این پژوهش، عوامل دینامیکی ساخت نانوذرات کیتوسان حاوی سالیسیلیک اسید به روش امولسیون شبکه ای شونده در روغن بررسی و بهینه سازی شد. اگرچه تا کنون از ریزگویی های حاصل از این روش به عنوان حامل های دارویی استفاده شده است، اما فرایند بهینه ای برای ساخت نانوذرات گزارش نشده است. یافته های حاصل از این پژوهش نشان داد، با این روش می توان نانوذرات کیتوسان حاوی دارو با شکل و ساختاری مناسب به دست آورد. رهایش دارو از این ذرات از قانون فیک پیروی می کند.

مراجع

1. Takeuchi H., Yamamoto H., and Kawashima Y., Mucoadhesive Nanoparticulate Systems for Peptide Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 39-54, 2001.



شکل ۷- نمودار رهایش دارو از نانوذرات طبق مدل هیگوجی و درجه صفر.

که سالیسیلیک اسید اضافه شده است، پیوندهای یونی که بسیار قوی تر از پیوندهای هیدروژنی هستند، بین گروه NH_3^+ کیتوسان و COO^- سالیسیلیک اسید برقرار شده است. چون الکترون خواهی اتم نیتروژن از اتم اکسیژن بیشتر است، بیشتر پیوندهای یونی بین دو گروه یاد شده برقرار و درصد خیلی کمی هم بین COO^- سالیسیلیک اسید و CH_2OH^+ کیتوسان برقرار می شود.

محتوا و رهایش دارو از نانوذرات

با توجه به مشخص شدن مقادیر بهینه سرعت هم زن (۲۰۰۰ rpm) و مدت زمان اضافه شدن فاز آبی به فاز روغنی (۳۰ min) و بهینه سازی سرعت و مدت زمان گریز از مرکز (۶۰ min، ۱۵۰۰۰ rpm)، نمونه در شرایط مزبور به منظور تعیین محتوا و رهایش دارو از نانوذرات تهیه شد. محتوای دارو در نانوذرات تولید شده با این روش ۳۵٪ به دست آمد. رهایش دارو طی ۴۸ h اندازه گیری شد (شکل ۶) و در ۴ ساعت اولیه با مدل هیگوجی و معادله درجه صفر مطابقت داده شد. نتایج نشان می دهد، رهایش در این زمان با مدل هیگوجی مطابقت بهتری دارد (شکل ۷) و پس از آن تا ۴۸ h مقدار رهایش ناچیز بود.

رهایش دارو از سامانه ذره ای کیتوسان شامل سه ساز و کار مختلف شامل رهایش از سطح ذرات، نفوذ از خلال زمینه متورم شده و رهایش با فرسایش پلیمر است (شکل ۸). در اکثر موارد رهایش دارو از بیش از یک ساز و کار پیروی می کند [۲۲]. رهایش این سامانه در ۴ ساعت اولیه

2. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., and Dhawan S., Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs, *Int. J. Pharm.*, **274**, 1-33, 2004.

3. Zhou Sh., Deng X., and Li X., Investigation on a Novel Core-coated Microspheres Protein Delivery System, *J. Control. Rel.*, **75**, 27-36, 2001.
4. De Campos A.M., Diebold Y., Carvalho E.L.S., Sanchez A., and Jose Alonso M., Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: In Vitro Stability, In Vivo Fate, and Cellular Toxicity, *Pharm. Res.*, **21**, 803-810, 2004.
5. Longer M.A., Ch'ng H.S., and Robinson J.R., Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery III: Oral Delivery of Chlorothiazide Using a Bioadhesive Polymer, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 406-411, 1985.
6. George M. and Abraham T.E., Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan - A Review, *J. Control. Rel.*, **114**, 1-14, 2006.
7. Van der Merwea S.M., Verhoeft J.C., Kotze A.F., and Junginger H.E., N-Trimethyl Chitosan Chloride as Absorption Enhancer in Oral Peptide Drug Delivery, Development and Characterization of Minitablet and Granule Formulations, *Eur. J. Harm. Biopharm.*, **57**, 85-91, 2004.
8. Harding S.E., Mucoadhesive Interactions, *Biomed. Soc. Tran.*, **31**, 1036-1041, 2003.
9. Dhawan S., Singla A., and Sinha V., Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods, *Pharm. Sci. Technol.*, **5**, 1-7, 2004.
10. Gifani A., Taghizadeh M., Seifkordi A.A., and Ardjmand M., Preparation and Investigation the Release Behaviour of Wax Microspheres Loaded with Salicylic Acid, *J. Microencapsul.*, **iFirst**, 1-8, 2008.
11. Chenguang L., Yulong T., Chengsheng L., Xiguang C., and Lejun Y., Preparations, Characterizations and Applications of Chitosan-based Nanoparticles, *J. Ocean University of China*, **6**, 237-243, 2007.
12. Biroa E., Nemetha A.S., Feczkoa T., Totha J., Sisaka J., and Gyenisa Cs., Three-step Experimental Design to Determine the Effect of Process Parameters on the Size of Chitosan Microspheres, *Chem. Eng. Proc.*, **48**, 771-779, 2009.
13. Biroa E., Nemetha A.S., Feczkoa T., Totha J., Sisaka J., and Gyenisa Cs., The Influence of Process Parameters on The Size of Chitosan Microspheres Studied by Experimental Design, *Partec*, 9-12, 2007.
14. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., and Dhawan S., Chitosan Nicospheres as a Potential Carrier for Drugs, *Int. J. Pharm.*, **274**, 1-33, 2004.
15. Jameela S.R., Kumary T.V., Lal A.V., and Jayakrishnan A., Progesterone-loaded Chitosan Microparticles: A Long Acting Biodegradable Controlled Delivery System, *J. Control. Rel.*, **52**, 17-24, 1998.
16. Dubey R. and Parikh R.H., Two-stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres, *AAPS Pharm. Sci. Technol.*, **5**, 20-28, 2004.
17. Borges O., Borchard G., Verhoeft J.C., Sousa A., and Junginger H., Preparation of Coated Nanoparticles for a New Mucosal Vaccine Delivery System, *Int. J. Pharm.*, **299**, 155-166, 2005.
18. Sarmento B., Ribeiro A., Veiga F., Sampaio P., Neufeld R., and Ferreira D., Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery, *Pharm. Res.*, **24**, 2198-2206, 2007.
19. Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Hino T., and Niwa T., Properties of a Peptide Containing DL-Lactide: Glycolide Copolymer Nanospheres Prepared by Novel Emulsion Solvent Diffusion Methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 41-48, 1998.
20. Taghizadeh S.M., Takrousta M., Davari G., and Yousefi M., Preparation of Chitosan with Different Degree of Deacetylation and Comparison of Its Different Characterization Methods, *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **5**, 291-297, 1383.
21. Taghizadeh S.M. and Davari G., Preparation, Characterization and Swelling Behavior of N-Acetylated and Deacetylated Chitosans, *Carbohydr. Polym.*, **64**, 9-15, 2006.
22. Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., and Aminabhavi T.M., Recent Advances on Chitosan-based Micro and Nanoparticles in Drug Delivery, *J. Control. Rel.*, **100**, 5-28, 2004.