

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH CHẾ TẠO VẬT LIỆU CHITOSAN DẠNG HẠT VỚI CẤU TRÚC RỖNG

Phạm Thị Phương Thùy^{1*}, Lê Thái Hoàng², Trương Thị Nhung¹, Nguyễn Thị Cẩm Tuyền¹

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn,
P. Tây Thạnh, Q. Tân Phú, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bộ môn Kỹ thuật Môi trường, Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, Khu phố 6, P. Linh Trung,
Q. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Phạm Thị Phương Thùy <thuyptp@hufi.edu.vn >
(Ngày nhận bài: 12-09-2019; Ngày chấp nhận đăng: 29-02-2020)

Tóm tắt. Chitosan được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y dược nhờ khả năng tương thích sinh học cao. Trong đó, vật liệu dạng hạt rỗng được quan tâm nghiên cứu nhờ hiệu suất hấp thụ thuốc cao và khả năng phóng thích thuốc ổn định trong thời gian dài. Các nghiên cứu trước đây cho thấy để tổng hợp hạt chitosan có cấu trúc rỗng người ta phải sử dụng dung môi hữu cơ và tác nhân tạo liên kết độc hại, làm ảnh hưởng đến tính an toàn sinh học của vật liệu. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là chế tạo hạt chitosan với cấu trúc rỗng bằng phương pháp đơn giản và an toàn. Chitosan được tổng hợp từ chitin sau đó được đưa vào quá trình tạo hạt với tác nhân sodium tripolyphosphate (STPP). Kết quả cho thấy hạt với đường kính lỗ rỗng lớn nhất được tạo ra từ chitosan với khối lượng phân tử 205,6 kDa và nồng độ chitosan 2% (w/v) trong trong acetic acid 1% (v/v) tại pH = 9 của dung dịch STPP.

Từ khóa: chitosan, hạt rỗng, sodium tripolyphosphate

Effects of fabrication conditions on formation of chitosan hollow beads

Pham Thi Phuong Thuy^{1*}, Le Thai Hoang², Truong Thi Nhung¹, Nguyen Thi Cam Tuyen¹

¹Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh City University of Food Industry, 140 Le Trong Tan St., Tay Thanh Ward,
Tan Phu Dist., Ho Chi Minh City, Vietnam

²Department of Environmental Engineering, International University, Vietnam National University Ho Chi Minh
City, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc Dist., Ho Chi Minh City, Vietnam

* Correspondence to Pham Thi Phuong Thuy <thuyptp@hufi.edu.vn>
(Received: 12 September 2019; Accepted: 29 February 2020)

Abstract. Chitosan has been widely used in biomedical fields due to its high biocompatibility. Especially, chitosan beads with hollow interior are gaining attention because they can absorb more drugs and release them in a sustained manner. Previous studies showed that the formation of chitosan hollow beads required organic solvents and toxic crosslinking reagents, which might limit their application in biological systems. Therefore, this study aims to fabricate chitosan beads with a core/shell structure by using simple ionic gelation in mild conditions. Chitosan synthesized from chitin was used in bead formation with sodium tripolyphosphate (STPP) as a crosslinking agent. Beads with the largest core diameter are obtained from a 2% (w/v) 205.6 kDa chitosan solution in 1% acetic acid at pH = 9 of the STPP solution.

Keywords: chitosan, hollow bead, sodium tripolyphosphate

1 Mở đầu

Chitosan được quan tâm nghiên cứu nhiều nhờ những đặc tính ưu việt của nó như không độc, dễ phân hủy sinh học và khả năng tương thích sinh học cao. Các ứng dụng của chitosan có thể kể đến như màng chitosan trong thực phẩm để bảo quản trái cây [1], màng chitosan để điều trị bỏng [2], chitosan dạng hạt, dạng nano trong dược phẩm [3] và môi trường [4]. Đáng chú ý là với khả năng bám dính lên bề mặt niêm mạc và xâm nhập vào tế bào biểu mô, chitosan dạng hạt được ứng dụng nhiều trong việc dẫn truyền thuốc [3]. Tuy nhiên, để tăng hàm lượng thuốc được hấp thụ thì cấu trúc rỗng phù hợp hơn cấu trúc hạt dạng đặc [5]. Các hạt chitosan cấu trúc rỗng thường được chế tạo bằng cách sử dụng bản mẫu như hạt keo, chất hoạt động bề mặt hoặc các giọt nhũ tương [6]. Trong các phương pháp này, vật liệu mục tiêu được phủ hoặc trùng hợp trên bề mặt của mẫu, sau đó bản mẫu được loại bỏ có chọn lọc để tạo thành cấu trúc rỗng. Tuy nhiên, kỹ thuật chế tạo này liên quan đến việc sử dụng dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng khắc nghiệt, do đó ảnh hưởng đến khả năng tương thích sinh học của các hạt chitosan. Vì vậy, phương pháp tổng hợp hạt chitosan rỗng an toàn, thân thiện với môi trường đang được quan tâm nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, hạt chitosan với cấu trúc rỗng được chế tạo bằng cách tạo gel ionic trong sodium tripolyphosphate (STPP). Đây là phương pháp được sử dụng khá phổ biến trong việc tổng hợp chitosan dạng hạt ứng dụng làm vật liệu tải thuốc, nhưng các công bố liên quan đến khả năng tạo hạt rỗng vẫn còn rất hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến cấu trúc hạt như tính chất của chitosan (độ deacetyl hóa, khối lượng phân tử), nồng độ

chitosan và pH của dung dịch STPP, từ đó đưa ra điều kiện tối ưu để tạo hạt có cấu trúc rỗng có tính ứng dụng cao trong các lĩnh vực y dược.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là chitin có nguồn gốc từ vỏ tôm (Việt Nam) và chitosan thương mại (Showa Chemicals Inc., Nhật Bản, p.). Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm NaOH (Trung Quốc, p.), acetic acid (Trung Quốc, p.), sodium acetate (Trung Quốc, p.), sodium tripolyphosphate (STPP) ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (Trung Quốc, p.), toluidine blue (Sigma, p.a.) và potassium polyvinyl sulfat (Wako, Nhật Bản, p.a.).

2.2 Phương pháp

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình deacetyl hóa chitin

Chitin được ngâm trong dung dịch NaOH 60% theo tỉ lệ 1:40 (w/v) trong các khoảng thời gian khác nhau (30–120 phút) trên máy khuấy từ gia nhiệt ở 90 °C. Khi kết thúc phản ứng, mẫu được lọc và rửa nhiều lần bằng nước cất đến khi pH của nước rửa là trung tính, sau đó sấy đến khối lượng không đổi ở 40–50 °C. Ở mỗi thời gian, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Ảnh hưởng của khối lượng phân tử chitosan đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

Mẫu chitosan thu được sau khi deacetyl hóa chitin được dùng để tạo hạt. Dung dịch chitosan 2% (w/v) được pha trong dung dịch acetic acid 1% (v/v), dung dịch STPP được pha trong nước cất với nồng độ 1% (w/v). Hạt chitosan được tổng hợp bằng cách dùng ống nhỏ giọt chứa 20 mL dung dịch chitosan nhỏ từ từ vào 300 mL dung dịch

STPP ở pH = 9. Hỗn hợp được đặt trên máy khuấy từ và khuấy với tốc độ 120 rpm trong 2 giờ để cấu trúc hạt ổn định. Các hạt chitosan sau đó được lọc, rửa với nước cất và quan sát hình dạng dưới kính hiển vi quang học Olympus CX23 với trác vi thị kính WF10X/18 mm. Hạt chitosan tạo thành được cắt đôi để xác định độ rỗng của hạt; kích thước độ dày thành hạt được đo bằng thước đo trác vi thị kính. Mẫu chitosan tạo hạt có độ rỗng lớn nhất được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH dung dịch STPP đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

Quá trình tạo hạt được thực hiện tương tự như mô tả ở trên, trong đó pH của dung dịch STPP được giữ ở các giá trị 3, 7 và 9 (máy đo pH Mettler Toledo S220-K). Xác định độ rỗng của hạt chitosan tạo thành để đánh giá ảnh hưởng của pH dung dịch STPP đến cấu trúc hạt. Điều kiện pH dung dịch STPP tạo hạt có độ rỗng lớn nhất được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chitosan đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

Trong thí nghiệm này, dung dịch chitosan được khảo sát ở các nồng độ 2, 3 và 4% (w/v). Dung dịch STPP được cố định ở nồng độ 1% (w/v) trong điều kiện pH đã được xác định trước đó. Xác định độ rỗng của hạt chitosan tạo thành để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chitosan đến cấu trúc hạt.

Xác định độ deacetyl hóa

Độ deacetyl hóa (degree of deacetylation – DDA) được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [7]. Hòa tan 0,1 g chitosan trong 20 mL dung dịch acetic acid 1% (v/v). Pha loãng dung dịch chitosan bằng nước cất với tỉ lệ 1:30 (v/v); sau đó được bổ sung chỉ thị toluidine blue và chuẩn độ bằng dung dịch potassium polyvinyl sulfate (1/400 N). Độ deacetyl hóa được tính theo công thức

$$DDA (\%) = \left(\frac{X/161}{X/161 + Y/203} \right) \times 100$$

trong đó, $X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times V$; $Y = 0,5 \times \frac{1}{100} - X$; V là thể tích của dung dịch potassium polyvinyl sulfate 1/400 N (mL); $f = 1,006$ [4].

Xác định khối lượng phân tử của chitosan

Khối lượng phân tử của chitosan được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt [8]. Chitosan được hòa tan trong hệ dung môi CH_3COOH 0,2 M và CH_3COONa 0,1 M ở 30 °C. Dung dịch chitosan được bơm vào nhớt kế mao quản (nhớt kế Ostwald) để xác định thời gian chảy, từ đó tính được độ nhớt rút gọn của dung dịch. Mối quan hệ giữa độ nhớt rút gọn và nồng độ dung dịch chitosan được biểu diễn bằng phương trình hồi quy tuyến tính ($y = ax + b$, với y là độ nhớt đặc trưng của mẫu chitosan). Mặt khác, độ nhớt đặc trưng $[\eta]$ được tính theo phương trình Mark–Houwink

$$[\eta] = k \times M_v^\alpha$$

trong đó, M_v là khối lượng phân tử trung bình; k , α là hằng số phụ thuộc vào nhiệt độ và hệ dung môi. Ở 30 °C và hệ dung môi sử dụng trong nghiên cứu này, $k = 1,424 \times 10^{-3}$ và $\alpha = 0,96$ [8].

2.3 Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ngẫu nhiên 3 lần, các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình deacetyl hóa chitin

Với mục tiêu tạo ra các phân tử chitosan có khối lượng phân tử khác nhau ở quy mô phòng thí nghiệm trong thời gian ngắn, NaOH có nồng độ tương đối cao đã được sử dụng trong quá trình deacetyl hóa chitin. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình deacetyl hóa chitin cho thấy thời gian deacetyl hóa càng dài thì

chitosan thu được có độ deacetyl hóa càng cao dẫn đến khối lượng phân tử càng giảm (Bảng 1). Chitin sau khi được deacetyl hóa ở 90 °C với dung dịch NaOH 60% trong thời gian 30 phút đã chuyển hóa thành chitosan với độ deacetyl hóa cao (93,13%). Đáng chú ý là khi tăng thời gian phản ứng lên 60–120 phút, độ deacetyl hóa đo được theo phương pháp chuẩn độ đạt 100%. Jiang và Xu [9] và de Moura và cs. [10] cũng cho thấy độ deacetyl hóa tỷ lệ thuận với thời gian phản ứng trong NaOH. Tuy nhiên, DDA đo được của nghiên cứu này cao hơn, có thể được giải thích do nồng độ NaOH được sử dụng là 60% so với 42,1% trong công bố của de Moura và cs. [10].

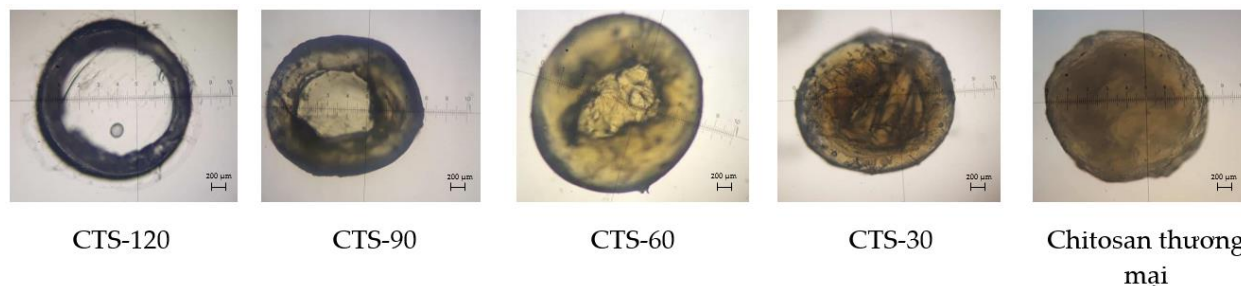
3.2 Ảnh hưởng của khối lượng phân tử chitosan đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

Sử dụng mẫu chitosan với khối lượng phân tử khác nhau để tạo hạt trong dung môi sodium tripolyphosphate theo phương pháp tạo gel ion với nồng độ chitosan và STPP lần lượt là 2% (w/v) và 1% (w/v). Trước khi tạo hạt, chitosan (pKa = 6,3) được hòa tan trong dung dịch acid acetic 1% (v/v). Ở điều kiện này, nhóm $-NH_2$ trong phân tử chitosan được proton hoá thành NH_3^+ . Mặt khác, các mẫu chitosan được tổng hợp trong nghiên cứu

này có độ deacetyl hóa đều lớn hơn 90%. Vì vậy, nhóm NH_3^+ sẽ chiếm ưu thế và các liên kết hydro giữa các nhóm acetyl trong phân tử chitosan sẽ bị phá vỡ [11]. Hình 1 cho thấy hạt được tạo thành có cấu trúc hình cầu, là kết quả của sự liên kết ngang giữa các nhóm chức $-NH_3^+$ trong phân tử chitosan với nhóm chức $-P_3O_{10}$ trong phân tử STPP. Hạt tạo thành từ các mẫu chitosan được deacetyl hóa từ vỏ tôm có cấu trúc rỗng, trong khi hạt tạo thành từ chitosan thương mại thì có cấu trúc đặc sau khi cắt đôi (Hình 1). Có thể chitosan tạo liên kết ngang với các nhóm $-P_3O_{10}$ trong phân tử STPP thành dạng mạng lưới [12]. Chitosan thương mại có khối lượng phân tử lớn (1086 kDa) nên các liên kết ngang đan xen với nhau tạo ra mạng lưới dày đặc. Trong khi đó, mẫu chitosan được deacetyl hóa từ vỏ tôm sau 120 phút có khối lượng phân tử thấp (205,6 kDa) nên các liên kết ngang ít, không đan xen vào nhau và bám lên thành hạt tạo cấu trúc rỗng bên trong. Kết quả cũng cho thấy sự tương quan giữa khối lượng phân tử của chitosan và độ rỗng của hạt, trong đó chitosan với khối lượng phân tử thấp nhất tạo được hạt có độ rỗng lớn nhất. Vì vậy, mẫu CTS-120 được chọn để khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian deacetyl hóa đến tính chất của chitosan

Mẫu	Thời gian deacetyl hóa (phút)	Độ deacetyl hóa (%)	Khối lượng phân tử (kDa)
CTS-30	30	93,13 ± 2,29	844,4 ± 23,7
CTS-60	60	100	747,3 ± 18,1
CTS-90	90	100	571,9 ± 40,9
CTS-120	120	100	205,6 ± 10,7



Hình 1. Hình thái hạt tổng hợp từ các mẫu chitosan khác nhau

3.3 Ảnh hưởng của pH của dung dịch STPP đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

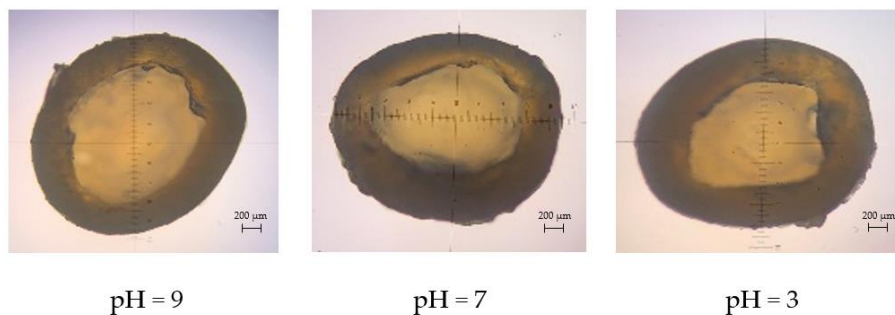
Chitosan là một polymer có thể chế tạo thành vật liệu dạng hạt và khả năng tạo hạt phụ thuộc vào điều kiện pH của môi trường [13]. Trong nghiên cứu này, khả năng tạo hạt của chitosan được khảo sát trong dung dịch STPP ở pH 3, 7 và 9. Kết quả cho thấy ở cả ba điều kiện pH khảo sát, hạt chitosan tạo thành đều có cấu trúc rỗng (Hình 2). Ở pH = 3, hạt có kích thước nhỏ nhất với đường kính lỗ rỗng là 1306,23 μm và độ rỗng này tăng dần theo pH, đạt giá trị 1490,33 μm và 1709,5 μm tương ứng khi pH của dung dịch STPP là 7 và 9 (Bảng 2).

Mi và cs. cho rằng các liên kết ngang giữa STPP và chitosan sẽ tăng lên và bền hơn trong môi trường acid làm cho hạt bền hơn [14]. Khi tăng pH của dung dịch STPP, các liên kết ngang giãn ra làm cho hạt có kích thước lớn hơn trong môi trường

acid, tương đồng với kết quả thu được trong nghiên cứu này. Ở pH = 9, hạt chitosan tạo thành có đường kính lỗ rỗng lớn nhất, vì vậy dung dịch STPP được cố định ở pH = 9 trong khảo sát tiếp theo.

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chitosan đến khả năng tạo hạt cấu trúc rỗng

Trong thí nghiệm này, nồng độ của dung dịch STPP được cố định ở 1% (w/v), pH = 9 và nồng độ dung dịch chitosan được khảo sát ở 2, 3 và 4% (w/v). Nồng độ chitosan nhỏ hơn 2% cũng được khảo sát, nhưng hạt tạo thành không bền và bị vỡ khi khuấy trong dung dịch STPP. Bảng 3 cho thấy hạt rỗng chỉ được tạo thành với nồng độ dung dịch chitosan 2%. Khi tăng nồng độ chitosan lên 3%, hạt được tạo thành nhưng không có cấu trúc rỗng và nồng độ 4% không tạo được hạt có cấu trúc hình cầu.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH của dung dịch STPP đến cấu trúc rỗng của hạt chitosan

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH dung dịch STPP đến kích thước hạt chitosan

pH	Đường kính hạt (μm)	Đường kính lỗ rỗng (μm)
3	2292,48 \pm 59,29	1306,23 \pm 40,17
7	2397,68 \pm 33,09	1490,33 \pm 59,29
9	2507,27 \pm 62,14	1709,50 \pm 104,37

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chitosan đến kích thước hạt

Nồng độ chitosan (%)	Đường kính hạt (μm)	Đường kính lỗ rỗng (μm)
2	2524,80 \pm 13,15	1766,48 \pm 54,74
3	2428,37 \pm 20,08	0
4	Không tạo hạt được	

Khi cho dung dịch chitosan vào STPP, liên kết ngang của các nhóm chức điện tích âm của STPP với điện tích dương của chitosan hình thành dẫn đến quá trình tạo hạt hình cầu. Nồng độ của mỗi dung dịch ảnh hưởng đến kích thước hạt [15]. Theo Ibrahim và cs., khi cho chitosan vào dung dịch STPP thì một monomer của STPP sẽ tương tác với 2 monomer của chitosan [16]. Vì vậy, khi tăng nồng độ chitosan lên 4%, cao hơn so với nồng độ STPP, lượng STPP sẽ không đủ để hình thành các liên kết ngang và các liên kết sẽ bị giãn ra dẫn đến không tạo được hạt hình cầu. Dương Thị Ánh Tuyết và cs. tổng hợp hạt nano chitosan với tác nhân tạo liên kết ngang là STPP cũng cho thấy khi tăng nồng độ chitosan thì kích thước hạt nhỏ lại [17], tương đồng với kết quả của nghiên cứu này ở các nồng độ chitosan 2% và 3% (w/v).

4 Kết luận

Hạt chitosan có cấu trúc rỗng được tổng hợp bằng cách tạo gel ion trong sodium tripolyphosphate. Chitosan với khối lượng phân tử 205,6 kDa tạo được hạt hình cầu với đường kính lỗ rỗng 1766,48 μm tại nồng độ 2% (w/v) và pH = 9 của dung dịch sodium tripolyphosphate. Mục tiêu của nghiên cứu này là chế tạo hạt chitosan với cấu trúc rỗng và khả năng ứng dụng làm vật liệu dẫn truyền thuốc. Do đó, điều kiện để tạo được hạt có kích thước rỗng lớn được lựa chọn để có thể tăng lượng thuốc hấp thụ trong hạt. Các khảo sát về độ bền của hạt trong môi trường dẫn truyền thuốc, hiệu suất hấp thụ và phóng thích thuốc sẽ được tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo hợp đồng số 125/HĐ-DCT.

Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn các bạn sinh viên Vũ Thị Thắm, Trần Thị Khánh Băng, Lê Thị Bích Ly lớp 06DHSB đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Wang H, Qian J, Ding F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(2):395-413.
2. Baxter RM, Dai T, Kimball J, Wang E, Hamblin MR, Wiesmann WP, McCarthy SJ, Baker SM. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013;101(2):340-348.
3. Cheung RCF, Ng TB, Wong TH, Chan WY. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*. 2015;13(8):5156-5186.
4. Kanmani P, Aravind J, Kamaraj M, Sureshbabu P, Karthikeyan S. Environmental applications of chitosan and cellulosic biopolymers: A comprehensive outlook. *Bioresource Technology*. 2017;242:295-303.
5. Svirskis D, Seyfoddin A, Chalabi S, In Kim JH, Langford C, Painter S, Al-Kassas R. Development of mucoadhesive floating hollow beads of acyclovir with gastroretentive properties. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2014;19(5):571-576.
6. Yang ZC, Tang CH, Gong H, Li X, Wang J. Hollow spheres of nanocarbon and their manganese dioxide hybrids derived from soft template for supercapacitor application. *Journal of Power Sources*. 2013;240:713-720.
7. Tōei K, Kohara T. A conductometric method for colloid titrations. *Analytica Chimica Acta*. 1976;83:59-65.
8. Knaut JZ, Kasaai MR, Bui VT, Creber KAM. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*. 1998;76(11):1699-1706.
9. Jiang CJ, Xu MQ. Kinetics of Heterogeneous Deacetylation of β -Chitin. *Chemical Engineering & Technology*. 2006;29(4):511-516.

10. de Moura CM, de Moura JM, Soares NM, de Almeida Pinto LA, Moura CMD, Moura JMD, Soares NM, Pinto LADA. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(4):351-355.
11. Philippova OE, Korchagina EV, Volkov EV, Smirnov VA, Khokhlov AR, Rinaudo M. Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87(1):687-694.
12. Lee S, Mi F, Shen Y, Shyu S. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. *Polymer*. 2001; 42(5):1879-1892.
13. Xu H, Matysiak S. Effect of pH on chitosan hydrogel polymer network structure. *Chemical Communications*. 2017;53(53):7373-7376.
14. Mi F, Shyu S, Wong T, Jang S, Lee S, Lu K. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *Journal of Applied Polymer Science*. 1999;74(5):1093-1107.
15. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1997;63(1):125-132.
16. Ibrahim H, El-Bisi M, Taha G, El-Alfy E. Chitosan nanoparticles loaded antibiotics as drug delivery biomaterial. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(10):085-090.
17. Tuyết DTA, Khương VQ, Phương PH, Phong NTP. Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano chitosan làm chất hấp phụ protein ứng dụng trong dẫn truyền thuốc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh*. 2011;14(T6):54-61.