

بهسازی و تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز

مرتضی حسن‌زاده کفشگری، محمد خرم*⁺

شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز

محسن منصوری، عبدالرضا صمیمی

زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده مهندسی شهید نیکبخت، گروه مهندسی شیمی

چکیده: درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان در ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی نقش اساسی دارد. از این رو، در این پژوهش، کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین، وزن مولکولی متوسط و کیتوزان با وزن مولکولی بالا (دارای ناخالصی و بهسازی شده) برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی با استفاده از یک روش آسان و دقیق مورد مطالعه قرار گرفت. درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان‌ها از روش طیف‌نمایی زیر قرمز تبدیل فوریه (روش موری و رابرت، خط مبنای a و روش باکستر و همکاران، خط مبنای b) و تیتراسیون پتانسیل سنجی خطی تعیین شد. در روش ارائه شده برای حذف ناخالصی‌ها و بهسازی درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با وزن مولکولی بالا، درجه‌ی استیل‌زدایی از ۶۰٫۱ به ۹۲٫۷ درصد افزایش چشمگیری پیدا کرد. نتیجه‌های به دست آمده با متوسط ریشه مجذور انحراف مطلق (σ_{RMSD}) مقایسه شد و همپوشانی روش‌های تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز را برای خط مبنای a نشان داد. بررسی درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان‌ها، افزایش درجه‌ی استیل‌زدایی را با افزایش ویسکوزیته و وزن مولکولی کیتوزان نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، درجه استیل‌زدایی، تیتراسیون پتانسیل سنجی، طیف‌نمایی زیر قرمز.

KEY WORDS: Chitosan, Degree of deacetylation, Potentiometric titration, Infrared spectroscopy.

مقدمه

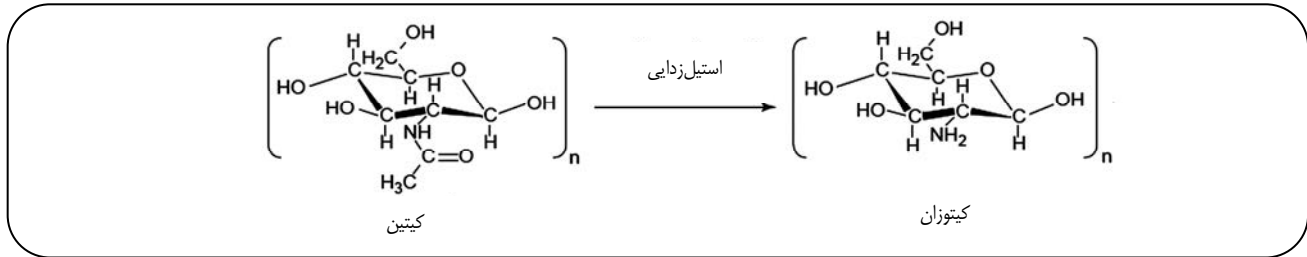
کیتین یک پلیمر زیست ساختار و دومین پلیمر فراوان موجود در زمین است که در ساختار موجوداتی همچون خرچنگ، میگو، حشره‌ها، برخی از قارچ‌ها و ریز جانداران یافت می‌شود، و ساختمان شیمیایی شبیه به سلولز دارد. کیتین، پلی ساکارید نیتروژن‌دار است که سفید رنگ، سخت، غیر الاستیک، دارای واکنش‌پذیری ضعیف و نامحلول در آب، محلول‌های غلیظ و محلول‌های قلیایی است. با انجام فرایند استیل‌زدایی بر روی کیتین، کیتوزان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید

با ساختار مولکولی نشان داده در شکل ۱ به دست می‌آید [۱ - ۳]. درجه‌ی استیل‌زدایی نسبت گروه‌های استیل گلوکز آمین به گروه‌های آمین موجود در ساختار کیتوزان را نشان می‌دهد. کیتوزان در pH کمتر از ۵٫۷ به صورت چند کاتیونی می‌باشد و به آسانی با ترکیب‌های دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفو لیپیدها واکنش می‌دهد. به‌دلیل وجود گروه‌های آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده

*E-mail: mkhorram@shirazu.ac.ir

*عهده دار مکاتبات

• آدرس دیگر: زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده مهندسی شهید نیکبخت، گروه مهندسی شیمی



شکل ۱- ساختمان مولکولی کیتین و کیتوزان.

موردها اختیاری است و در بیشتر موارد، این روش‌ها در تعیین دقیق درجه‌ی استیل‌زدایی همپوشانی کامل ندارند. بنابراین تعیین یک روش استاندارد که تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان را راضی کند لازم به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، تهیه‌ی کیتوزان با درصد استیل‌زدایی بالا و خالص و تعیین آسان درصد استیل‌زدایی کیتوزان می‌باشد. بنابراین، ابتدا از یک روش کاملاً ساده با استفاده از سانتیفریوژ با سرعت چرخش بالا برای خالص‌سازی کیتوزان و بهسازی درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان استفاده شد. سپس درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و کیتوزان با وزن مولکولی بالا (دارای ناخالصی و بهسازی شده) با روش‌های ساده و کاربردی تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. در پایان، روش مناسب برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با استفاده از کمترین متوسط ریشه مجذور انحراف مطلق درجه‌ی استیل‌زدایی به‌دست آمده مشخص شد.

بخش تجربی

مواد

کیتوزان با وزن مولکولی بالا (۶۰۰kDa)، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۴۰۰kDa) و کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین فراورده‌های شرکت Fluka (آمریکا) تهیه شد. هیدروکلریدریک اسید، سدیم هیدروکسید و استیک اسید تولید شرکت Merck (آلمان) خریداری شد و بدون هیچ خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

خالص‌سازی و بهسازی کیتوزان

کیتوزان (۱ گرم) در ۱۰۰ میلی لیتر محلول استیک اسید ۲٪ V/V حل شد. محلول کیتوزان تهیه شده برای جداسازی ذره‌ها و ناخالصی‌های موجود در آن، ابتدا با سرعت ۶۰۰۰ rpm در مدت

در محیط‌های اسیدی از حلالیت بهتری برخوردار است [۲، ۴، ۵]. فرایند استیل‌زدایی کیتین برای افزایش کیفیت کاربردی آن در زمینه‌های گوناگونی همچون زیست فناوری، درمان با دامنه‌ی گسترده‌ای از کاربردهای دارورسانی و ژن درمانی، تصفیه آب نوشیدنی و سم‌زدایی پساب‌های پر خطر، علوم غذایی، جذب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، غشا- غشاهای اسمز معکوس و غیره به کار می‌رود. کیتوزان با کیفیت دلخواه، دارای وزن مولکولی پایین و درجه‌ی استیل‌زدایی (DD) بالا است که حلالیت، چگالی و در مجموع رفتار شیمیایی، فیزیکی و زیستی متفاوتی را نسبت به کیتین نشان می‌دهد. وزن مولکولی کیتوزان به گرانیوی محلول و درجه‌ی استیل‌زدایی مربوط می‌باشد و بر اساس معادله‌ی مارک - هوینگ با گرانیوی و ثابت‌های مشخص شده براساس درجه‌ی استیل‌زدایی، تعیین می‌شود [۲]. به دلیل زمینه‌های کاربردی فراوان کیتوزان، افزایش درجه‌ی استیل‌زدایی بدون گروه‌های آمیدی و در نتیجه کیفیت آن بیش از پیش مورد توجه قرار گرفت. از این‌رو، استفاده از روش‌های دقیق، سریع و کارا برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان مهم و اساسی می‌باشد [۶، ۴]. بنابراین تعدادی از روش‌ها برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان شامل طیف سنجی مادون قرمز [۷]، طیف سنجی مادون قرمز نزدیک [۸]، طیف نور سنجی-UV [۹]، تیتراسیون کلوئیدی [۹]، تیتراسیون پتانسیل سنجی خطی [۶]، روش آنزیمی [۱۰]، رزونانس مغناطیس هسته [۱۱] و طیف نور سنجی سیرکولاردیکرویزم [۱۲] معرفی و به کار گرفته شده است.

ویژگی‌ها و پتانسیل کاربردی کیتوزان به درجه‌ی استیل‌زدایی ارتباط خیلی نزدیکی دارد و درجه‌ی استیل‌زدایی به عنوان یکی از پارامترهای مؤثر در ویژگی‌ها و رفتار این پلیمر می‌باشد. از طرفی پی بردن به تأثیرهای درجه‌ی استیل‌زدایی بر پارامترهای مورد بررسی در پژوهش‌ها، نیازمند صرف هزینه‌های زیادی برای خرید کیتوزان با درصد استیل‌زدایی متفاوت است. استفاده از روش‌های اشاره شده برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان در بیشتر

گروه‌های آمینی کیتوزان را مشخص می‌کند [۶۹].
درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان با استفاده از معادله‌ی (۱) محاسبه می‌شود [۱۷]:

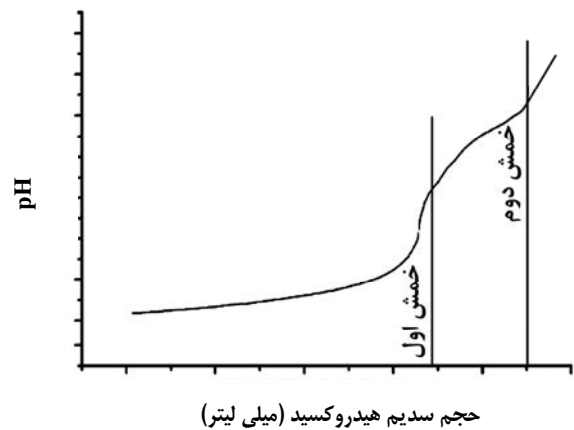
$$DD\% = \Delta V \times C_{NaOH} \times 10^{-3} \times 16 \times (M_{Chitosan} \times 0.994)^{-1} \quad (1)$$

که در آن ΔV حجم محلول سدیم هیدروکسید اضافه شده میان دو نقطه‌ی خمش، C_{NaOH} غلظت محلول سدیم هیدروکسید، $M_{Chitosan}$ وزن کیتوزان استفاده شده در محلول و اعداد ۱۶ و ۰.۹۹۴ به ترتیب وزن مولکولی مربوط و مقدار نظری گروه‌های آمینی کیتوزان می‌باشند.

برای بررسی درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل سنجی، پودر کیتوزان تازه و یا بهسازی شده (۰.۱۵ گرم) در ۲۵ میلی لیتر هیدروکلریدریک اسید ۰.۲ مولار با همزدن مداوم به مدت ۲۴ ساعت حل شد. بعد از آماده شدن محلول کیتوزان، محلول سدیم هیدروکسید ۰.۱ مولار به آرامی به سامانه افزوده و pH محلول با pH متر (METROHM 620, Swiss) اندازه گرفته شد. تغییر pH بر حسب حجم به کار گرفته شده از محلول سدیم هیدروکسید، مقدار حجم محلول سدیم هیدروکسید اضافه شده میان دو نقطه‌ی خمش را برای تعیین درجه‌ی استیلزدایی مشخص می‌کند.

طیف نمایی زیر قرمز و تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان

در روش طیف سنجی مادون قرمز، از میزان جذب گروه عاملی ثابت آمینی (A_M) و شدت جذب یک گروه عاملی مرجع (A_R) که با تغییر در درجه‌ی استیلزدایی تغییر نمی‌کند، برای تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان، بر اساس نسبت A_M / A_R استفاده می‌شود. بنابراین در این روش، جذب گروه‌های عاملی گوناگونی برای تعیین دقیق درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان مورد استفاده قرار می‌گیرد و هر یک از این گروه‌های عاملی انتخاب شده می‌باشند [۱۳]. از میان روش‌های گوناگون براساس گروه‌های عاملی در طیف سنجی مادون قرمز، موری و رابرت [۱۴] و همچنین باکستر و همکاران [۱۵]، روش‌های مناسبی را برای تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان معرفی کردند. همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، درجه‌ی استیلزدایی با محاسبه‌ی نسبت جذب در طول موج‌های 1655 cm^{-1} مربوط به گروه ثابت آمینی و 3450 cm^{-1} (گروه عاملی O-H) که



شکل ۲- نقاط هم‌ارزی اول و دوم در روش تیتراسیون پتانسیل سنجی در تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان.

زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Hettich EBA 20) شد. بیشتر ناخالصی‌های کیتوزان در لوله‌ی آزمایش ته‌نشین شدند. محلول بالای کیتوزان برای اطمینان بیشتر صاف شد. محلول صاف شده جدا شد و به آن محلول سدیم هیدروکسید ۲ مولار اضافه شد، تا زمانی که محلول کیتوزان به حالت ژل درآید. کیتوزان ژله‌ای تا زمانی که pH محلول به pH خنثی برسد، چند بار با آب مقطر شستشو داده شد. فرآورده‌ی نهایی در چند شبانه روز در دمای 35°C در آون خشک شد.

تیتراسیون پتانسیل سنجی و تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان

روش تیتراسیون پتانسیل سنجی یک روش ساده برای تعیین درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان می‌باشد، که توسط برو/اسیگناک پیشنهاد شده است [۶]. این روش با تجهیزها و مواد شیمیایی معمولی موجود در یک آزمایشگاه ساده به سرعت و به آسانی انجام پذیر است. روش تیتراسیون پتانسیل سنجی یک روش قابل اعتماد در تعیین دقیق درجه‌ی استیلزدایی کیتوزان بالاتر از ۸۰ درصد است [۱۳، ۸]. در این روش کیتوزان در مقدار مشخصی از محلول هیدروکلریدریک اسید حل شده و سپس با محلول سدیم هیدروکسید به صورت پتانسیل سنجی تیترو می‌شود. با رسم منحنی تغییرهای pH محلول تیترو شونده، نمودار تیتراسیون با دو نقطه‌ی خمش به دست می‌آید. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، نقطه‌ی خمش اول و دوم به ترتیب مربوط به نقطه‌ی هم‌ارزی هیدروکلریدریک اسید اضافی و تیتراسیون کیتوزان پروتون‌دار شده می‌باشد. تفاوت بین این دو نقطه، اسید مورد نیاز برای پروتون‌دار شدن

که براساس درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان و نسبت A_{1655} / A_{3450} توسط باکستر و همکاران پیشنهاد شده است [۱۵].
براساس شکل ۳، مقادیرهای جذب‌کنندگی برای پیوندهای آمینی و هیدروکسیلی کیتوزان به وسیله معادله‌های ریاضی که توسط سانبیس و بلاک ارائه شده است، محاسبه می‌شود:

$$\text{Log}_{10} (DF/DE) = A_{1655} \quad (۴)$$

$$\text{Log}_{10} (DG/DE) = A_{1655} \quad (۵)$$

$$\text{Log}_{10} (AB/AC) = A_{3450} \quad (۶)$$

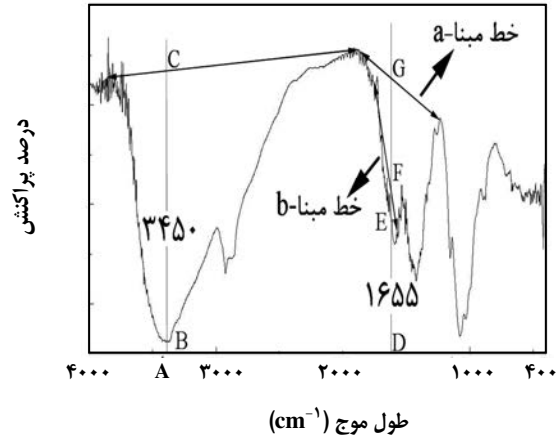
در حالی که DG (برای خط‌مبنای a) و DF (برای خط‌مبنای b)، AC، DE و AB ارتفاع مطلق پیوندهای جذب گروه‌های عاملی را در طول موج‌های مربوطه نمایش می‌دهند [۱۶]. بنابراین با اندازه‌گیری ارتفاع مطلق گروه‌های عاملی و تعیین لگاریتم براساس معادله‌های ریاضی اشاره شده، مقادیرهای جذب‌کنندگی پیوندها در معادله‌های (۲) و (۳) تعیین می‌شوند.

در این پژوهش، نمونه‌های خالص و بهسازی شده از کیتوزان و پتاسیم برمید در قالب فشرده و قبل از تجزیه طیف نمایی زیر قرمز در آن خشک شد. طیف نمونه‌های کیتوزان خالص و بهسازی شده با دستگاه طیف نمایی زیر قرمز (Jasco Inc, Maryland, USA)، با بازه‌ی فرکانس مابین 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1} و دقت 4 cm^{-1} گرفته شد. طیف زیر قرمز نمونه‌ها براساس روش‌های آورده شده مورد بررسی و درجه‌ی استیل‌زدایی آن‌ها تعیین شد.

نتیجه‌ها و بحث

بهسازی کیتوزان ناخالص

کیتوزان با درجه‌ی استیل‌زدایی زیر ۵۰ درصد دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کیتین است و افزایش آن به بالاتر از ۵۰ درصد، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کیتین را به کیتوزان تبدیل می‌کند [۲، ۱۴]. البته کیتوزان با درجه‌ی استیل‌زدایی نزدیک به ۱۰۰ درصد دارای کاربرد و ویژگی‌های چشمگیری می‌باشد که از آنها می‌توان به ویژگی ضد باکتریایی آن اشاره کرد [۲]. بنابراین، در کاربردهای نانوپزشکی، کیتوزان با درجه‌ی استیل‌زدایی نزدیک ۵۰ درصد قابل مصرف نیست و از سوی دیگر، کیتوزان با درجه‌ی استیل‌زدایی پایین لزج می‌باشد و استفاده از آن در فرایندهای گوناگون برای تهیه‌ی ذره‌های کیتوزانی بارور شده با دارو مناسب نمی‌باشد [۳]. به منظور بهسازی درجه استیل‌زدایی نمونه‌های کیتوزان،



شکل ۳- روش طیف نمایی زیر قرمز و خطوط مبنای a و b در تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان.

به‌عنوان گروه عاملی مرجع می‌باشند، به‌دست می‌آید. این دو روش، برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان در بازه‌ی ۱۵ تا ۸۰ درصد و برای نمونه‌های کیتوزانی شفاف و بلورین و کاملاً خشک شده مناسب می‌باشند [۱۳].

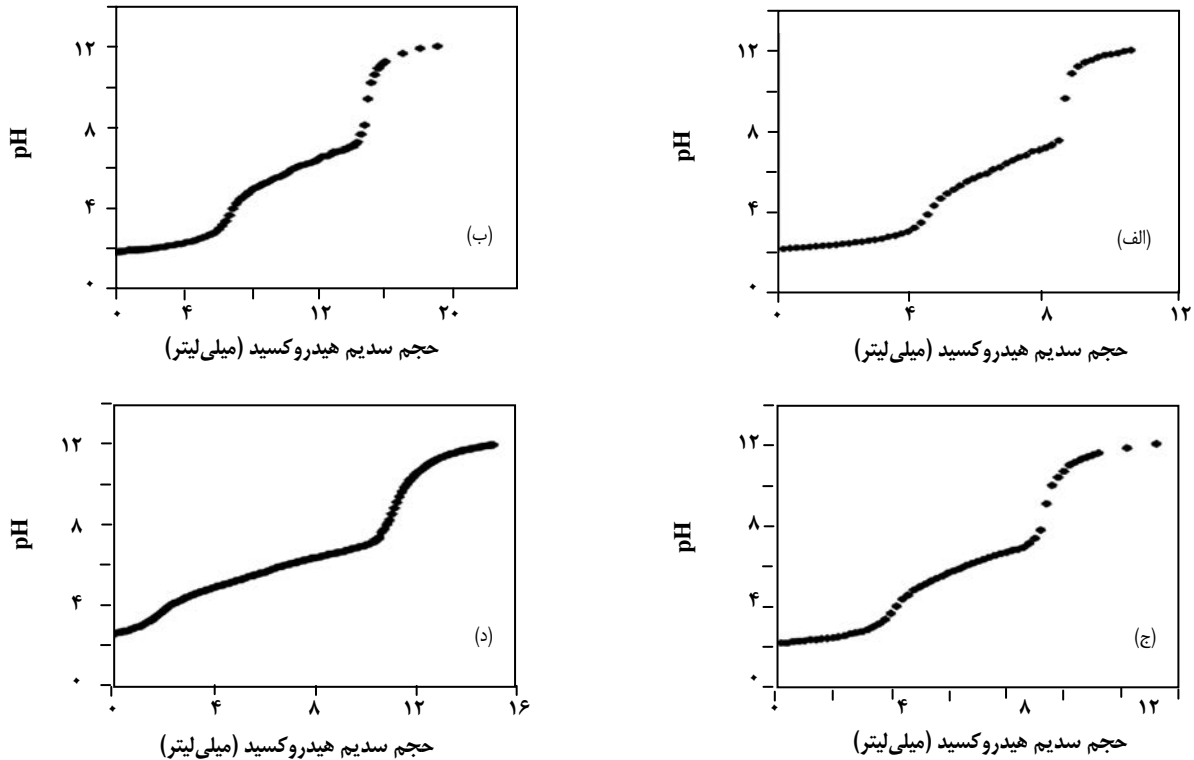
بر این اساس، همان‌گونه که در شکل ۳ آورده شده است، درجه‌ی استیل‌زدایی نمونه‌های کیتوزانی با استفاده از دو خط مبنای متفاوت محاسبه می‌شود، خط مبنای (a)، به وسیله‌ی دامزی و رابرتز [۱۶] و خط مبنای (b) توسط باکستر و همکاران [۱۵] پیشنهاد شده است. معادله‌های محاسباتی برای این دو خط مبنای در صورت زیر ارائه شده است، براساس خط مبنای (a) تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی به وسیله معادله (۲) انجام می‌شود:

$$DD\% = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 100 / 1.33 \right] \quad (۲)$$

که A_{1655} و A_{3450} به ترتیب مقدار جذب پیوند گروه آمیدی-I در 1655 cm^{-1} و مقدار جذب در پیوند هیدروکسیل کیتوزان را طول موج 3450 cm^{-1} نشان می‌دهند. عدد 1.33 اندازه‌ی نسبت اختلاف A_{1655} / A_{3450} را برای کیتوزان با استیل‌زدایی کامل نشان می‌دهد. در این معادله فرض شده است که اندازه‌ی این نسبت برای کیتوزان با استیل‌زدایی کامل صفر است و یک معادله‌ی خطی میان ثابت گروه N-acetyl و مقدار جذب‌کنندگی پیوند آمینی-I وجود دارد [۱۶، ۱۳].

تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی براساس خط مبنای (b)، از معادله (۳) امکان پذیر است:

$$DD\% = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right] \quad (۳)$$



شکل ۴- تیتراسیون پتانسیل سنجی کیتوزان با (الف) ویسکوزیته پایین، (ب) وزن مولکولی متوسط، (ج) وزن مولکولی بالا ناخالص، (د) وزن مولکولی بالا بهسازی شده.

استیل‌زدایی برای کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و بالا و همچنین کیتوزان بهسازی شده، با استفاده از معادله‌ی (۶) تعیین و در جدول ۱ آورده شده است. در این پژوهش کیتوزان بهسازی شده دارای بالاترین درجه‌ی استیل‌زدایی نسبت به کیتوزان ناخالص با وزن مولکولی بالا و دیگر نمونه‌های کیتوزانی می‌باشد. درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان به روش فرآوری کیتوزان از کیتین بستگی دارد [۲]، و دقت محاسبه درجه استیل‌زدایی با فرآوری کیتوزان خالص با مقدار قابل چشم‌پوشی از پروتئین‌ها بالاتر می‌رود، زیرا ناخالصی‌های پروتئین - فعال در میزان تغییر پروتون‌های موجود در روش تیتراسیون سدیم هیدروکسید خطا ایجاد می‌کند. ولی در این روش گروه‌های عاملی به صورت مستقیم اندازه‌گیری می‌شود، و از شناساگرهای رنگی که در روش‌هایی مانند تیتراسیون با هیدروژن برمید به کار گرفته می‌شود و دارای خطای فردی هستند استفاده نمی‌شود. در روش تیتراسیون با سدیم هیدروکسید همان گونه که از نتیجه‌ها مشخص است، درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با بهسازی نمونه ناخالص از ۶۰/۱ به ۹۲/۷ افزایش یافت و این نشان از افزایش

در ابتدا ناخالصی‌های موجود در پودر کیتوزان با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت چرخشی ۶۰۰۰ rpm جدا و با افزایش محلول سدیم هیدروکسید درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با حذف کافی گروه‌های استیل ($\text{CH}_3\text{-CO}$) و رهاسازی گروه‌های آمین (-NH) که به کیتوزان خاصیت کاتیونی می‌دهد افزایش یافت [۶،۱۱،۱۲].

تیتراسیون پتانسیل سنجی و درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان

برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی، محلول‌های کیتوزان با محلول سدیم هیدروکسید تیتراژ شدند و تغییر pH محلول‌های کیتوزان با پتانسیل‌سنج اندازه گرفته شد. نمودار تغییر pH برای محلول‌های کیتوزان در شکل ۴ آورده شده است. همان گونه که از این شکل مشخص است، نمودارها دارای دو نقطه‌ی خمش هم‌ارزی می‌باشند. اولین و دومین نقطه‌ی خمش، به ترتیب نقطه‌های هم‌ارزی از تیتراسیون هیدروکلریدریک اسید اضافی در محلول و تیتراسیون کیتوزان پروتون‌دار شده می‌باشد. مقدار اسید مورد نیاز برای پروتون‌دار کردن گروه‌های آمینی کیتوزان به وسیله‌ی تفاوت میان دو نقطه‌ی خمش تعیین شده است [۶،۹]. نتیجه‌های درجه‌ی

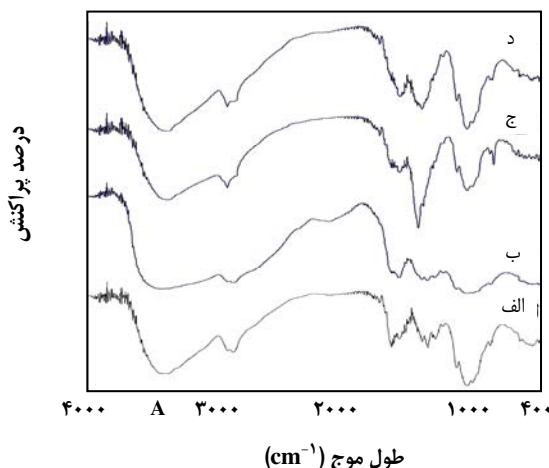
جدول ۱- درجه‌ی استیل‌زدایی تعیین شده کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل سنجی.

درصد درجه‌ی استیل‌زدایی	
تیتراسیون پتانسیل سنجی	کیتوزان
۷۱٫۳۱۴	ویسکوزیته‌ی پایین
۸۳٫۵۳۹	وزن ملکولی متوسط
۶۰٫۱۰۷	وزن ملکولی بالا (دارای ناخالصی)
۹۲٫۷۰۸	وزن ملکولی بالا (بهسازی شده)

جدول ۲- درجه‌ی استیل‌زدایی تعیین شده کیتوزان با روش طیف نمایی زیر قرمز.

درصد درجه‌ی استیل‌زدایی		
تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (b)	تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (a)	کیتوزان
۷۴٫۸۷۵	۷۰٫۷۰۷	ویسکوزیته‌ی پایین
۷۷٫۲۶۴	۷۳٫۹۰۸	وزن ملکولی متوسط
۸۴٫۵۲۱	۶۸٫۸۱	وزن ملکولی بالا (دارای ناخالصی)
۹۳٫۱۸۲	۸۲٫۶۱۷	وزن ملکولی بالا (بهسازی شده)

متوسط و با ویسکوزیته‌ی پایین در جدول ۲ آورده شده است. در شکل ۵ طیف زیر قرمز تمام نمونه‌ها نمایش داده شده است. در طیف زیر قرمز پودرهای کیتوزان، پیک‌هایی در طول موج‌های $3700-3300 \text{ cm}^{-1}$ وجود دارد که گروه‌های عاملی O-H و NH_2 را نشان می‌دهد. همچنین در طول موج 2876 cm^{-1} گروه عاملی CH_2 و در 1656 cm^{-1} گروه آمیدی CONH- و در طول موج 1554 cm^{-1} گروه آمیدی NH- باند دوم و در طول موج 1322 cm^{-1} گروه آمیدی NH- باند سوم و همچنین در طول موج 1083 cm^{-1} گروه عاملی C-O را نشان می‌دهد. درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با وزن مولکولی بالا، متوسط و با ویسکوزیته‌ی پایین با روش سابسیس و بلاک [۱۶] تعیین شده است. همان‌گونه که اشاره شد، در این روش از پیوند O-H برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی بر اساس خط مبنای (a) و یا (b) استفاده می‌شود که استفاده از کیتوزان کاملاً خشک را توصیه می‌کند، زیرا وجود مقدار ناچیز رطوبت، تغییر چشمگیری را در میزان درجه‌ی استیل‌زدایی سبب می‌شود. نتیجه‌های به‌دست آمده بر اساس خط مبنای (a) دارای پیش‌بینی خوبی برای درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین می‌باشد، ولی برای نمونه‌های دیگر کیتوزان نتیجه‌های مناسبی را نشان نداده است. محاسبه‌ی درجه‌ی استیل‌زدایی بر اساس خط مبنای (b) دارای پیش‌بینی به‌طور کامل مناسب‌تری نسبت به محاسبه‌های خط مبنای (a) برای کیتوزان با وزن مولکولی بالا و متوسط می‌باشد.



شکل ۵ - طیف نمایی زیر قرمز کیتوزان با (الف) ویسکوزیته پایین، (ب) وزن مولکولی متوسط، (ج) وزن مولکولی بالا ناخالص، (د) وزن مولکولی بالا بهسازی شده.

پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی کیتوزان و شبکه‌ای شدن منومرهای کیتوزانی می‌باشد. البته افزایش این پیوندهای هیدروژنی باعث افزایش وزن مولکولی کیتوزان بهسازی شده نیز می‌شود [۸، ۶].

طیف نمایی زیر قرمز و درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان

نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه طیف زیر قرمز کیتوزان با وزن مولکولی بالا (ناخالص و بهسازی شده)، کیتوزان با وزن مولکولی

جدول ۳- متوسط مجذور انحراف مطلق درجه‌ی استیل‌زدایی تعیین شده نمونه‌های کیتوزان.

روش	σ_{RMSD}
تیتراسیون پتانسیل سنجی : تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (a)	۹,۴۳
تیتراسیون پتانسیل سنجی : تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (b)	۱۳,۴۱
تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (a) : تجزیه طیف زیر قرمز- خط مبنا (b)	۱۱,۵۱

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، فرایند خالص‌سازی و بهسازی درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان دارای ناخالصی با یک روش ساده و جدید بررسی شد. درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با ویسکوزیته‌ی پایین، وزن مولکولی متوسط و بالا دارای ناخالصی و بهسازی شده با روش‌های تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز تبدیل فوریه تعیین شد. درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان ناخالص با وزن مولکولی بالا، با انجام خالص‌سازی و بهسازی، از ۶۰/۱۰۷ به ۹۲/۷۰۸ درصد به‌طور چشمگیری افزایش یافت. مقایسه‌ی روش‌های تجزیه درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان‌های گوناگون با استفاده از متوسط ریشه مجذور انحراف مطلق (σ_{RMSD})، نزدیکی روش‌های تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز با خط مبنا a را در تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی نشان می‌دهد. در مجموع، درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان‌ها، با افزایش وزن مولکولی و ویسکوزیته‌ی محلول کیتوزانی افزایش می‌یابد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۳ ۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

نتیجه‌های درجه‌ی استیل‌زدایی به‌دست آمده از تجزیه طیف زیر قرمز کیتوزان که در جدول ۲ گزارش شده است، تطابق مناسبی با نتیجه‌های به‌دست آمده از روش تیتراسیون پتانسیل سنجی دارد. در جدول ۳، متوسط ریشه مجذور انحراف مطلق داده‌های روش تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز تبدیل فوریه برای روش‌های تجزیه مورد استفاده آورده شده است. متوسط ریشه مجذور انحراف مطلق (σ_{RMSD}) از معادله‌ی (۷) محاسبه شده است:

$$\sigma_{\text{RMSD}} = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{DD}_{\text{tit}} - \text{DD}_{\text{IR}}}{\text{DD}_{\text{tit}}} \right)_i^2 \right]^{1/5} \times 100 \quad (7)$$

که n تعداد نمونه‌ها و i شمارنده‌تعداد نمونه‌ها، DD_{IR} و DD_{tit} به‌ترتیب درجه‌ی استیل‌زدایی محاسبه شده از تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز می‌باشند. مقایسه داده‌های محاسبه شده، به ترتیب بیشترین همپوشانی را برای روش‌های تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف‌نمایی زیر قرمز با خط مبنا a و کمترین را با خط مبنا b با ۹,۴۳ و ۱۳,۴۱ درصد نشان می‌دهد.

مراجع

- [1] Freier T., Montenegro R., Koh H. S., Shoichet M. S., Chitin-Based Tubes for Tissue Engineering in the Nervous System, *Biomaterials*, **26**, p. 4624 (2005).
 - [2] Ravi Kumar M. N. V., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, p. 1 (2000).
 - [3] Senel S., McClure S. J., Potential Applications of Chitosan in Veterinary Medicine, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **56**, p. 1467 (2004).
 - [4] Curotto E., Aros F., Quantitative Determination of Chitosan and the Percentage of Free Amino Groups, *Anal. Biochem*, **211**, p. 240 (1993).
- [۴] غیاث‌الدین ع.، شجاع‌الساداتی سیدعباس، واشقانی‌فراهانی ابراهیم، اصلاح و بهینه‌سازی فرایند استخراج

کیتین از پوست میگو، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۳۰، ص ۱ (۱۳۹۰).

- [6] Jiang X., Chen L., Zhong W., A New Linear Potentiometric Titration Method for the Determination of Deacetylation Degree of Chitosan, *Carbohydr. Polym.*, **54**, p. 457 (2003).
- [7] Sanan T., Kurita K., Ogura K., Iwakura Y., Studies on Chitin: 7.IR Spectroscopy Determination of Degree of Deacetylation, *Polymer*, **19**, p. 458 (1978).
- [8] Muzzarelli R. A. A., Rochetti R., Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.*, **5**, p. 461 (1985).
- [9] Tan S. C., Khor E., Tan T. K., Wong S. M., The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV Spectrophotometry Method of Determination, *Talanta*, **45**, p. 713 (1988).
- [10] Nanjo F., Katsumi R., Sakai K., Enzymatic Method for Determination of the Deacetylation of Chitosan, *Anal. Biochem*, **193**, p. 164 (1991).
- [11] Hiral A., Odani H., Nakajima A., Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by ¹H NMR Spectroscopy, *Polym. Bull.*, **26**, p. 87 (1991).
- [12] Domard A., Determination of N-Acetyl Content in Chitosan Samples by CD Measurements, *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, p. 333 (1987).
- [13] Kasaai M. R., A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N-acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy, *Carbohydr. Polym.*, **71**, p. 497 (2008).
- [14] Moore G. K., Roberts G. A. F., Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, p. 115 (1980).
- [15] Baxter A., Dillon M., Taylor K. D., Roberts G. A. F., Improved Method for IR Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, p. 166 (1992).
- [16] Khan T. a., Peh K. K., Ch'ng H. S., Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan: The Influence of Analytical Methods, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **5**, p. 205 (2002).