

تهیه کیتوسان با وزن‌های مولکولی متفاوت به وسیله کنترل شرایط عملیاتی فرایند دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای و بررسی تخلخل داربست‌های تهیه شده

نکیسا یعقوبی^{۱*}، حمید میرزاده^۲ و حسین وکیلی^۳

- ۱- استادیار مهندسی شیمی، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران
- ۲- استاد مهندسی پلیمر، دانشکده مهندسی پلیمر، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد مهندسی پلیمر، دانشکده مهندسی پلیمر، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲، بازنگری: اردیبهشت ۱۳۹۲، پذیرش: خرداد ۱۳۹۲

چکیده: در این پژوهش نمونه‌های کیتوسان با وزن‌های مولکولی و درجه‌های دی‌استیله شدن متفاوت از طریق فرایند دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای تهیه شد. دمای واکنش، زمان و تعداد مراحل واکنش به‌عنوان عامل‌های مؤثر در نظر گرفته شدند. در این پژوهش، با هدف دستیابی به کیتوسانی با درجه دی‌استیله شدن بالا همراه با کنترل وزن مولکولی بدون تغییر در ساختار مولکولی آن، پایگاه داده‌ای تهیه شد. نتیجه‌ها نشان داد تعداد مراحل و مدت زمان هر مرحله از دی‌استیله شدن، وزن مولکولی کیتوسان را به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌دهند، به‌گونه‌ای که می‌توان دو نمونه کیتوسان هر دو با درصد دی‌استیله شدن ۹۰٪ ولی با جرم مولکولی‌های متفاوت در گستره $105 \times 466 \times 105$ تا 293×105 به‌دست آورد. نتیجه‌ها نشان می‌دهد بیشترین وزن مولکولی که می‌توان از فرایند دی‌استیلاسیون چند مرحله‌ای، بدون افت درجه دی‌استیله شدن (۹۶٫۶۷٪)، به‌دست آورد $105 \times 5/32$ است. همچنین مطالعات ریخت‌شناسی نشان می‌دهد وزن مولکولی کیتوسان تأثیر قابل توجهی بر اندازه حفرات داربست‌های تهیه شده دارد به‌گونه‌ای که دارای یک مقدار بحرانی است.

واژه‌های کلیدی: کیتین، کیتوسان، وزن مولکولی، درجه دی‌استیله شدن، گرانروی ذاتی

مقدمه

افزودنی‌های آرایشی، عملیات نساجی برای فعالیت‌های ضد میکروبی [۲]، فیبرهای جدید برای منسوجات، صفحات عکاسی، فیلم‌های زیست تخریب پذیر [۳]، میکوکپسول‌های ایمپلنت شده برای کنترل رهایش دارو و ... [۴ تا ۶]. منابع متفاوت تأمین کیتین، فرایندها و شرایط عملیاتی، همگی منجر به به‌دست آمدن کیتین‌ها و کیتوسان‌هایی با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت می‌شوند [۷]. وزن مولکولی و درصد دی‌استیله شدن (DD) نمونه‌ها کاربرد

کیتین دومین پلیمر طبیعی فراوان، بعد از سلولز است. کیتوسان که مشتق دی‌استیله شده کیتین است در کنار سایر ویژگی‌های مفید بیوپلیمری زیست سازگار، آنتی باکتریال و الکترولیت غیر مضر نسبت به محیط است. به خاطر این خواص ویژه، این بیوپلیمر دارای کاربردهای متنوعی است [۱]، از جمله در نخ جراحی، مواد التیام استخوان، پوشش زخم‌ها، تصفیه آب، کروماتوگرافی،

وزن مولکولی در درجه‌دی‌استیله شدن بالا، روشی برای تهیه نمونه‌های متفاوت کیتوسان توسعه یافته است. تأثیر تمامی شرایط عملیاتی بر وزن مولکولی و درجه‌دی‌استیله شدن بررسی شده و با استفاده از روش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای، امکان کنترل وزن مولکولی و درجه‌دی‌استیله شدن فراهم شده و در نتیجه یک پایگاه داده‌ای جدید برای تهیه کیتوسان‌هایی با وزن‌های مولکولی و درجه‌دی‌استیله شدن متفاوت با روش چند مرحله‌ای ارائه شده است.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

کیتین مورد استفاده در این آزمایش‌ها از پوست میگو خلیج فارس (PGC)، طبق روشی که در پژوهش‌های پیشین انجام گرفته بهینه و [۱۵ و ۱۶]، استخراج شده است. دی‌استیله شدن با محلول NaOH ۵۰-۴۰٪ وزنی در دمای ۸۵ تا ۱۱۰ °C تحت جو نیتروژن انجام شده است. عملیات چند مرحله‌ای (۳، ۴ و ۵ مرحله) برای ۰٫۵، ۱، ۱٫۵ و ۲ ساعت طراحی و اجرا شده است و هر کدام از این مراحل با شستشو و خشک کردن از هم تفکیک شده‌اند [۱۷]. شرایط واکنش دی‌استیله شدن در جدول ۱ نشان داده شده است. سری‌های (PGC-1 تا PGC-9) و (PGC-10 تا PGC-11) هر کدام به ترتیب نشان دهنده عملیات چند مرحله‌ای و پیوسته هستند.

روش تهیه داربست‌های متخلخل از کیتوسان

در این پژوهش برای تهیه داربست‌های متخلخل بر پایه کیتوسان از روش خشک کردن انجمادی^۱ استفاده شد [۱۹]. نخست محلول ۱٪ وزنی - وزنی از پودر کیتوسان در استیک اسید ۲٪ مولار تهیه شد و سپس به وسیله دستگاه خشک کن انجمادی، Freezdryer-sublimator 5- zirbus خشک شد. بر این اساس اسفنج متخلخلی از کیتوسان تهیه شد که قطر میانگین حفرات آن به نوع حلال، جرم مولکولی کیتوسان، غلظت محلول کیتوسان و دمای انجماد بستگی دارد. در این روش سه مرحله انجماد، خشک کردن اولیه و خشک کردن ثانویه در سیکل زمانی مشخص به

آن‌ها را مشخص می‌کند، لذا یکی از عوامل اصلی مؤثر بر ویژگی‌های کیتوسان، وزن مولکولی آن است. پژوهش‌های زیادی در ارتباط با وزن مولکولی کیتوسان انجام شده است [۸ تا ۱۰]. عبدالمهدی و همکارانش روشی برای کنترل وزن مولکولی بدون تأثیر بر ویژگی‌های ساختاری آن ارائه دادند [۱۱]. پارک و همکارانش ویژگی‌های مکانیکی کیتوسان را با انتخاب وزن مولکولی و سامانه حلال مناسب کنترل کردند [۱۲]. السارا و همکارانش تأثیر وزن مولکولی و درجه‌دی‌استیله شدن کیتوسان را مشخص کردند [۱۳]. لیو و همکارانش کیتوسان‌هایی با وزن‌های مولکولی متفاوت و درجه‌دی‌استیله شدن مشابه تهیه کردند و نشان دادند که عامل اصلی که ویژگی‌های آنتی باکتریال کیتوسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد وزن مولکولی آن است [۱۴]. همان‌طور که ذکر شد وزن مولکولی عامل بسیار مهم در چنین کاربردهایی محسوب می‌شود. هم‌چنین ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی، زیستی و رئولوژیکی کیتوسان تابعی از وزن مولکولی آن هستند. در پژوهش‌های پیشین انجام شده در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران [۱۵ تا ۱۸]، نشان داده شده که روش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای می‌تواند برای افزایش درجه دی‌استیله شدن کیتوسان مؤثر باشد و در نتیجه کاربردهای زیست‌پزشکی کیتوسان به دست آمده به عنوان عامل انعقاد خون توسعه یابد. در این پژوهش‌ها تفاوت قابل توجهی در میزان تیتروژن و درجه دی‌استیله شدن کیتوسان به دست آمده از دو روش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای و پیوسته گزارش شده است [۱۶]. به همین دلیل در این پژوهش روش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای به عنوان روشی که توانایی کنترل وزن مولکولی را دارد استفاده شده است. این پژوهش بر دستیابی به نمونه‌هایی از کیتوسان به تقریب به‌طور کامل دی‌استیله شده، بدون تخریب زنجیره‌های پلیمری تمرکز کرده است. این تخریب پلیمری ناشی از زمان اقامت طولانی مولکول‌های پلیمر تحت شرایط واکنشی مانند محیط به شدت بازی و دمای بالای است که برای رسیدن به درجات بالاتری از میزان دی‌استیله شدن اعمال می‌شوند. در این پژوهش با هدف کنترل

1. Freeze Drying

کیتوسان به دلیل داشتن گروه‌های آمینی و هیدروکسیل در ساختار خود توانایی ایجاد پیوند عرضی با عامل ایجاد کننده پیوند عرضی مانند گلو تار آلدهید را دارد. برای تهیه نمونه‌های پیوند عرضی یافته، قبل از خشک کردن محلول ۱٪ وزنی - وزنی در دستگاه خشک کن انجمادی، به آن حدود ۲ میلی لیتر محلول ۲٪ وزنی - وزنی گلو تار آلدهید افزوده شد و پس از این که محلول به طور کامل همگن شد آن را خشک کردیم. در این حالت نمونه‌های اسفنج کیتوسان به وسیله گلو تار آلدهید پیوند عرضی می‌یابند.

تعیین درجه دی‌استیله شدن

برای تعیین درجه دی‌استیله شدن کیتین روش‌های متفاوتی پیشنهاد شده است [۲۰ تا ۲۲]. در این پژوهش درجه دی‌استیله شدن با روش پیشنهاد شده تاکاری و همکارانش [۲۰]، با استفاده از طیف‌سنج زیرقرمز FTIR تعیین شده است. در این روش درجه دی‌استیله شدن توسط نسبت جذب پیوند آمید II در 1550 cm^{-1} به جذب پیوند در 2878 cm^{-1} تعیین می‌شود. نمونه‌های کیتوسان با KBr به طور مکانیکی مخلوط شده پس از تهیه قرص، طیف FTIR آن به وسیله اسپکترومتر Bruker IFS-48 گرفته شد. جدول ۳ تغییر DD تحت شرایط متفاوت را نشان می‌دهد.

جدول ۳ تجزیه عنصری و درجه دی‌استیله شدن نمونه‌های کیتوسان در شرایط عملیاتی متفاوت

کیتوسان	DD%	N/C	H wt%	C wt%	N wt%
PGC-۱	۹۳٫۳۰	۰٫۱۹۰	۷٫۱	۳۹٫۹	۷٫۶
PGC-۲	۹۳٫۳۰	۰٫۱۹۰	۷٫۱	۴۰٫۵	۷٫۷
PGC-۳	۹۰٫۰۰	۰٫۱۸۸	۷٫۱	۳۹٫۸	۷٫۵
PGC-۴	۹۳٫۳۰	۰٫۱۹۰	۷٫۳	۳۷٫۳	۷٫۱
PGC-۵	۹۰٫۰۰	۰٫۱۸۶	۷٫۰	۳۶٫۶	۶٫۸
PGC-۶	۹۹٫۰۰	۰٫۱۹۵	۷٫۱	۴۱٫۰	۸٫۰
PGC-۷	۹۶٫۶۷	۰٫۱۹۱	۷٫۲	۴۰٫۲	۷٫۷
PGC-۸	۹۸٫۳۴	۰٫۱۹۳	۷٫۲	۳۹٫۳	۷٫۶
PGC-۹	۹۹٫۰۰	۰٫۱۹۵	۷٫۲	۳۸٫۹	۷٫۸
PGC-۱۰	۸۶٫۶۷	۰٫۱۸۶	۶٫۹	۴۲٫۹	۸٫۰
PGC-۱۱	۸۵٫۰۰	۰٫۱۸۵	۶٫۹	۴۲٫۷	۷٫۹

جدول ۱ شرایط عملیاتی واکنش‌های دی‌استیله شدن

کیتوسان	تعداد مراحل	مدت هر مرحله (h)	درجه حرارت (°C)
PGC-۱	۳	۲	۴۴
PGC-۲	۳	۱	۹۰
PGC-۳	۳	۱٫۵	۸۵
PGC-۴	۵	۰٫۵	۹۰
PGC-۵	۳	۲	۷۰
PGC-۶	۳	۲	۱۱۰
PGC-۷	۳	۱٫۵	۱۱۰
PGC-۸	۴	۱	۱۱۰
PGC-۹	۴	۲	۱۱۰
PGC-۱۰	۱	۴	۱۱۰
PGC-۱۱	۱	۶	۱۱۰

ترتیب مطابق جدول ۲ انجام گرفت. ابتدا با کاهش دما تا -30°C درجه سلسیوس نمونه را منجمد کردیم و برای اطمینان از انجماد کامل محلول دمای آن را تا -40°C درجه سلسیوس کاهش دادیم، این مرحله در فشار اتمسفری انجام شد. پس از مرحله انجماد تقلیل فشار در محفظه دستگاه ایجاد شد تا خشک کردن کامل انجام گیرد.

جدول ۲ شرایط خشک کردن نمونه‌های کیتوسان در مدت ۲۴ h

۱) فریز کردن اولیه، 4h ، -30°C		
۲) کاهش دما تا -40°C جهت اطمینان از انجماد کامل در اتمسفر		
۳) زمان استراحت ۴ h		
دمای محلول (°C)	فشار محفظه (mbar)	زمان توقف (h)
۴ (-۴۰)	۱۲ (۴)	۴ (۴)
۵ (-۳۰)	۱۲ (۵)	۴ (۵)
۶ (-۲۰)	۱۲ (۶)	۴ (۶)
۷ (-۱۰)	۱۵ (۷)	۳ (۷)
۸ (۰)	۲۵ (۸)	۲ (۸)
۹ (+۱۰)	۲۰ (۹)	۲ (۹)
۱۰ (+۲۰)	۱۲ (۱۰)	۱ (۱۰)

شده‌اند. مقدارهای $a = 0.76$ و $K = 0.078 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، توسط سایر پژوهشگران پیشنهاد شده‌اند [۲۵].

مقدار ۰٫۰۵ گرم کیتوسان خشک شده به طور دقیق وزن شده و در ۲۵۰ میلی لیتر حلال ($\text{CH}_3\text{COONa}: 0.2 \text{ M}; \text{CH}_3\text{COOH}: 0.3 \text{ M}$) حل شد. گرانی در $30 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ در یک حمام دمای ثابت اندازه‌گیری شد. گرانی ذاتی با رابطه $[\eta] = C (\eta_{\text{red}} - 0)$ و برون‌یابی کردن منحنی گرانی کاهش یافته با غلظت، تا غلظت صفر، تعیین شد. وزن مولکولی میانگین محاسبه شده برای نمونه‌های کیتوسان (PGC-1 تا PGC-11) در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴ پایگاه داده پیشنهاد شده برای تهیه کیتوسان با درجه دی‌استیل شدن بالا و وزن‌های مولکولی متفاوت

Mv	DD%	تعداد مراحل	مدت هر مرحله (h)	دما ($^\circ\text{C}$)	کیتوسان
1.03×10^5	۹۳/۳۰	۳	۲	۴۴	PGC-۱
2.90×10^5	۹۳/۳۰	۳	۱	۹۰	PGC-۲
3.95×10^5	۹۰/۰۰	۳	۱٫۵	۸۵	PGC-۳
3.83×10^5	۹۳/۳۰	۵	۰٫۵	۹۰	PGC-۴
3.97×10^5	۹۰/۰۰	۳	۲	۷۰	PGC-۵
4.66×10^5	۹۹/۰۰	۳	۲	۱۱۰	PGC-۶
5.32×10^5	۹۶/۶۷	۳	۱٫۵	۱۱۰	PGC-۷
4.11×10^5	۹۸/۳۴	۴	۱	۱۱۰	PGC-۸
2.93×10^5	۹۹/۰۰	۴	۲	۱۱۰	PGC-۹
2.87×10^5	۸۶/۶۷	۱	۴	۱۱۰	PGC-۱۰
3.37×10^5	۸۵/۰۰	۱	۶	۱۱۰	PGC-۱۱

نتیجه‌ها و بحث

XRD کیتوسان‌های تهیه شده

جهت شناسایی نمونه‌های کیتوسان الگوی XRD تهیه شد (شکل ۱) که نشان دهنده طبیعت بلوری آن است. الگوی XRD همه نمونه‌های کیتوسان تهیه شده دارای دو پیک بلورینی در (2θ) ۱۰ و ۲۰ است که در تطابق با الگوی XRD نمونه استاندارد کیتوسان است [۲۵].

هم‌چنین تجزیه عنصری CHN، با استفاده از Elemental-Analysen systems GmbH-Germany analyzer، برای تعیین مقدار نیتروژن نمونه‌های کیتوسان به کار گرفته شده است. نتیجه‌های تجزیه عنصری CHN نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

تعیین وزن مولکولی

تعیین دقیق وزن مولکولی کیتوسان بسیار مهم و اساسی است و روش‌های متفاوتی برای تعیین وزن مولکولی کیتوسان پیشنهاد شده است. گرانی ذاتی یک محلول پلیمری، چه پلیمرهای الکترولیتی و چه غیر الکترولیتی، به میانگین وزن مولکولی، M_v ، آن پلیمر ارتباط دارد که از معادله مارک-هوانگ به دست می‌آید:

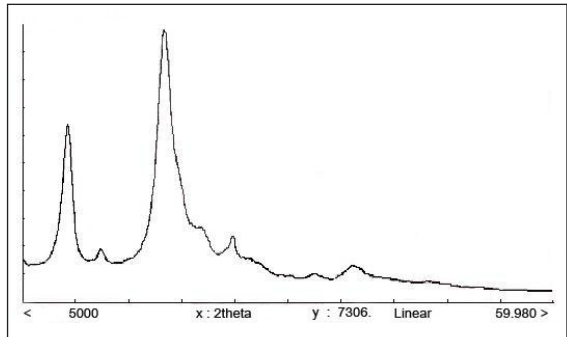
$$[\eta] = KM_v^a$$

که در آن K ثابتی است که به نوع پلیمر و سامانه حلال به کار رفته و دما بستگی دارد. این مقادیر به صورت تجربی با مقایسه گرانی‌های ذاتی محلول‌های پلیمری با وزن‌های مولکولی تعیین شده با روش‌های غیر وابسته، تعیین می‌شوند. مقدارهایی برای K و a در کیتوسان که با DD در سامانه حلال متفاوت تغییر می‌کند، توسط پژوهشگران گزارش شده است [۲۳ و ۲۴].

در این پژوهش کیتوسان با وزن مولکولی میانگین (M_v) تعیین شده با استفاده از روش گرانی‌سنجی محلول رقیق شناسایی می‌شود. توجه به این نکته ضروری است که روش گرانی‌سنجی برای تعیین وزن مولکولی، یک روش مطلق نیست. به کارگیری این روش مستلزم درجه‌بندی آزمایش‌های مورد استفاده با استفاده از نمونه‌ای با وزن مولکولی مشخص است. برای جلوگیری از خطای ناشی از روش گرانی‌سنجی در تعیین وزن مولکولی میانگین، درجه‌بندی دقیق آزمایش‌ها ضروری است. در این مطالعه، نتیجه‌های تجربی با استفاده از نمونه‌های Fluka با وزن‌های مولکولی مشخص در گستره‌های بالا ($10^5 \times 6 = M_w \text{ high molecular weight}$) و پایین ($10^5 \times 1.5 = M_w \text{ low molecular weight}$) درجه‌بندی

اهمیت است. رشد بافت در زمینه‌های متخلخل مطلوب است زیرا امکان درگیری و محکم شدن ماده کاشته شده در اطراف بافت را فراهم می‌کند [۲۶].

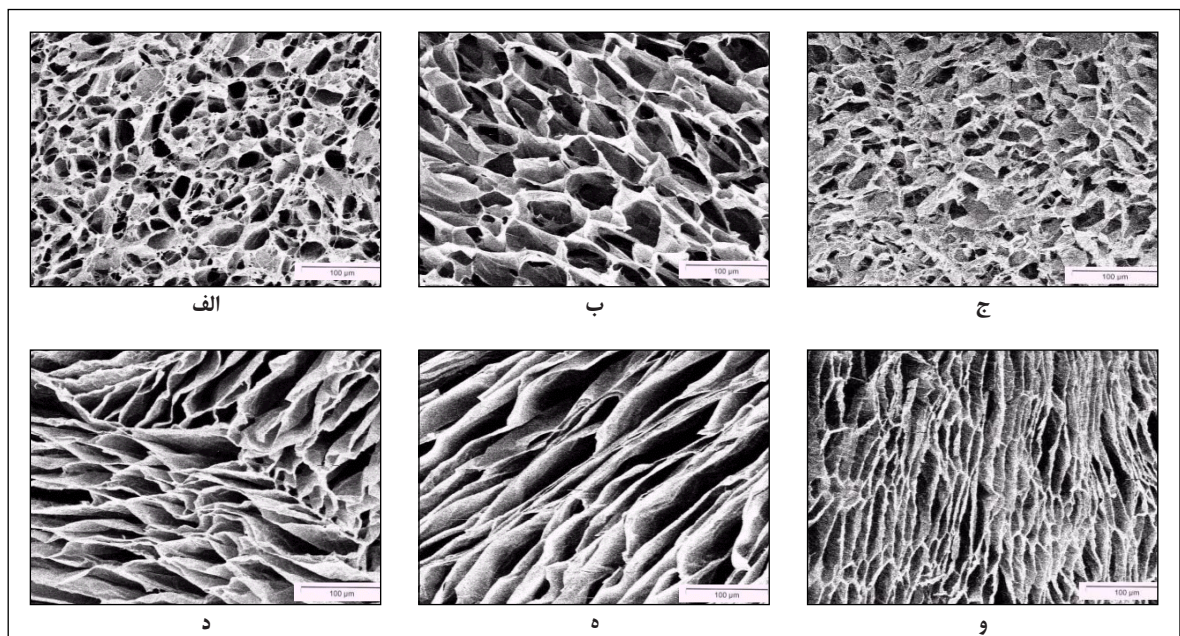
در این پژوهش با کنترل وزن مولکولی کیتوسان، اندازه حفرات داربست‌ها کنترل شد. قطر تخلخل‌های ایجاد شده در سطح و توده داربست‌های تولید شده بر پایه کیتوسان به کمک میکروسکوپ الکترونی، SEM مدل Cambridge S 360، مورد مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که پیش از این توضیح داده شد، تعدادی داربست به روش خشک کردن انجمادی تهیه شد [۱۹]. شکل ۲ تصاویرهای میکروسکوپ الکترونی این نمونه‌ها را نشان می‌دهد و می‌توان دید چگونه اندازه حفرات داربست‌های تهیه شده از کیتوسان‌هایی با وزن‌های مولکولی متفاوت تحت تأثیر وزن مولکولی قرار می‌گیرند. نتیجه‌ها نشان می‌دهد داربست‌های تهیه شده از کیتوسان با وزن مولکولی میانگین ($MMW = 4.11 \times 10^4$ PGC-8) در مقایسه با داربست‌های تهیه شده از کیتوسان با وزن مولکولی پایین ($LMW = 1.03 \times 10^4$ PGC-1)، دارای اندازه حفره‌های



شکل ۱ الگوی XRD کیتوسان تهیه شده به روش دی‌استیله شدن چندمرحله‌ای

تأثیر وزن مولکولی بر تخلخل داربست‌های تهیه شده

تخلخل یکی از ویژگی‌های مهم زیست‌ماده‌هاست که می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی مطلوب یا نا مطلوب در نظر گرفته شود. وجود حفره در زیست‌ماده باعث می‌شود تا تنش در آن ناحیه متمرکز شده و استحکام مکانیکی کاهش یابد. اما برای چسبندگی سلولی و رشد بافت وجود تخلخل لازم است. در این حالت اندازه تخلخل در موقعیت‌هایی که رشد بافت مورد نظر است، حائز



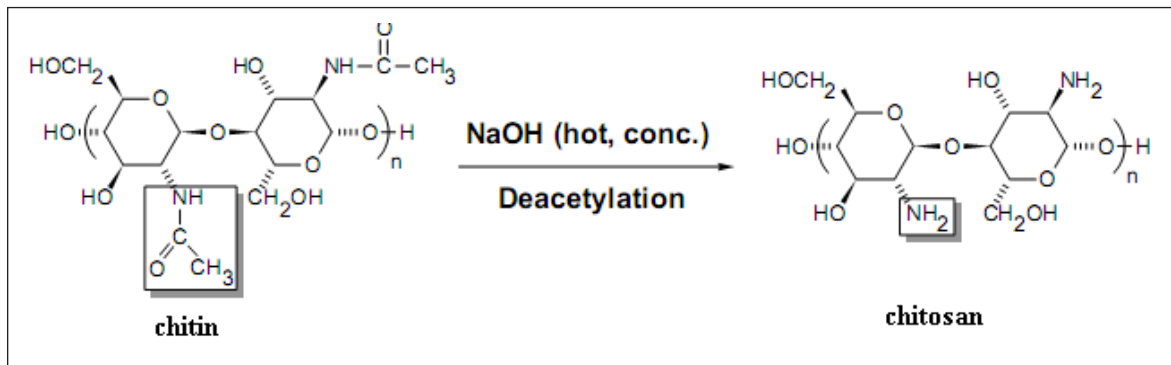
شکل ۲ تصویر SEM داربست‌های تهیه شده از کیتوسان با: الف) وزن مولکولی بالا (HMW)، ب) کیتوسان با وزن مولکولی میانگین (MMW)، ج) کیتوسان با وزن مولکولی پایین (LMW)؛

تصویر SEM از برش عرضی داربست‌های تهیه شده از کیتوسان با: د) وزن مولکولی بالا (HMW)، ه) کیتوسان با وزن مولکولی میانگین (MMW)، و) کیتوسان با وزن مولکولی پایین (LMW)

مدت واکنش، درجه حرارت واکنش، طبیعت عامل قلیایی و منبع طبیعی استخراج کیتین همگی در پژوهش‌های پیشین ما [۱۵ و ۱۷]، مطالعه و بهینه شده‌اند. درجه دی‌استیله شدن برای مطالعه ویژگی‌های مرتبط و زمینه‌های کاربردی کیتوسان بسیار مهم و ضروری است. مقدار نیتروژن نیز یکی دیگر از عامل‌های مهم دیگر در تعیین مشخصات نمونه‌های کیتوسان است و بسته به میزان دی‌استیله شدن، میزان نیتروژن در نمونه‌ها افزایش می‌یابد (شکل ۳). وقتی کیتین به کیتوسان تبدیل می‌شود میزان استیل در گروه‌ها کاهش و میزان نیتروژن افزایش می‌یابد. به‌طور معمول بسته به درجه DD، مقدار نیتروژن در کیتوسان ۵-۸٪ است. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است با افزایش نسبت N/C در نمونه‌های کیتوسان، درجه دی‌استیله شدن افزایش می‌یابد. هم چنین در بررسی نسبت N/C، به‌عنوان یک عامل مهم، مشاهده می‌شود با افزایش این نسبت در نمونه‌های (PGC-11 تا PGC-10) تحت دمای ۱۱۰ °C تا نمونه‌های (PGC-5 تا PGC-1) تحت دمای ۴۴ °C تا ۹۰ °C تغییرات DD به‌تقریب خطی است در حالی که از (PGC-2، PGC-4، PGC-1) تا نمونه (PGC-7) تغییرات ناگهانی است. از این پدیده می‌توان نتیجه گرفت هر گاه افزایش دمای واکنش با تغییر در سایر شرایط عملیاتی (مدت واکنش و تعداد مراحل عملیاتی) و همزمان شود، تغییر در ویژگی‌های کیتوسان به‌دست آمده شدید خواهد بود و وقتی تغییر در شرایط عملیاتی همزمان اتفاق نیفتد، پروفایل تغییر ویژگی‌های کیتوسان به‌تقریب خطی خواهد بود. همان‌طور که

درشت‌تری هستند. به عبارت دیگر تا این مرحله با افزایش وزن مولکولی اندازه حفرات نیز افزایش می‌یابد اما پس از آن با افزایش بیشتر وزن مولکولی کیتوسان ($5,32 \times 10^5$ MMW: PGC-7) اندازه حفره‌های داربست‌های تهیه شده کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر، وزن مولکولی کیتوسان تأثیر قابل توجهی بر اندازه حفره‌های داربست‌های تهیه شده دارد، اما دارای یک مقدار بحرانی است. این نتیجه‌گیری می‌تواند به‌وسیله معادله استوک-اینشتین [۲۷]، توجیه شود. همان‌طور که انتظار داریم با افزایش جرم مولکولی و افزایش گرانیروی محلول پلیمر، اندازه تخلخل‌ها افزایش یافته ولی در نمونه‌هایی با گرانیروی و جرم مولکولی بالا حجیم بودن زنجیرهای پلیمری باعث می‌شود که بلورهای یخ توانایی رشد و بزرگ شدن را نداشته باشند زیرا از طرف محلول بر جاذبه‌های تشکیل شده فشاری وارد می‌شود که رشد بلورهای یخ را کند و در نهایت موجب کوچک شدن اندازه حفرات تشکیل شده در اسفنج متخلخل نهایی می‌شود. افزون‌بر این با افزایش جرم مولکولی و افزایش طول زنجیرهای پلیمری، حلقه‌های پلیمری تشکیل شده exclusive volume بیشتری داشته به همین خاطر اندازه تخلخل‌ها از نمونه PGC-8 به نمونه PGC-7 کاهش می‌یابد [۲۸].

تأثیر شرایط واکنش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای بر درجه دی‌استیله شدن و نسبت نیتروژن به کربن کیفیت و ویژگی‌های کیتوسان تهیه شده با شرایط عملیاتی واکنش دی‌استیله شدن تغییر می‌کند. تأثیر عامل‌های واکنش نظیر



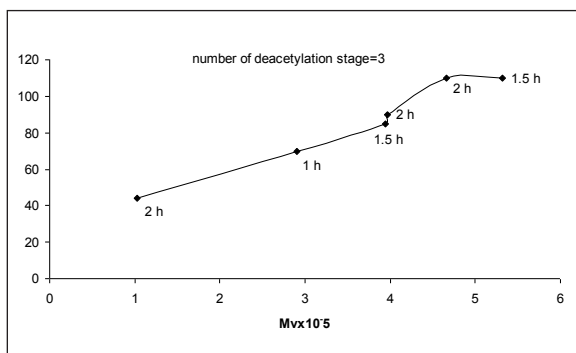
شکل ۳ ساختار کیتین و کیتوسان

مولکولی اتفاق بیفتد و نمونه به دست آمده دارای وزن مولکولی در گستره پایین (LMW) گردد. به عبارت دیگر با کنترل عامل‌های مؤثر بر واکنش چند مرحله‌ای موفق به به دست آوردن نمونه‌ای با DD بالا و وزن مولکولی متوسط شده‌ایم.

نتیجه‌ها نشان می‌دهد در نمونه‌های تهیه شده وزن مولکولی در گستره $10^5 \times 5.32 - 1.03$ تغییر می‌کند ولی DD از ۸۵٪ پایین‌تر نمی‌آید. یکی از نمونه‌های با ارزش این پژوهش PGC-6 است با وزن مولکولی $10^5 \times 4.66$ و DD ۹۹٪. رسیدن به چنین نتیجه‌ای نشان دهنده این است که شرایط عملیاتی دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای شامل تعداد، درجه حرارت و مدت هر مرحله می‌تواند به گونه‌ای کنترل شود که به کیتوسانی با خواص ویژه رسید.

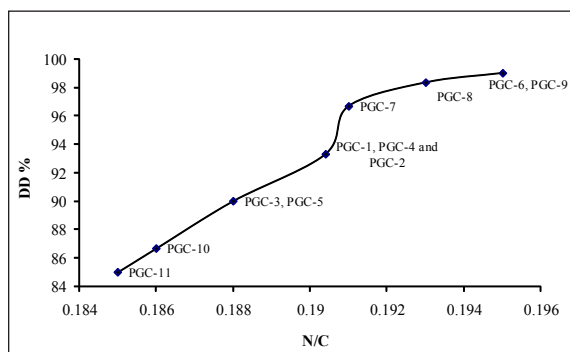
تأثیر دما بر وزن مولکولی

شکل ۵ تغییرات وزن مولکولی را به عنوان تابعی از دمای واکنش نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود وقتی تعداد مراحل واکنش ثابت می‌ماند، وزن مولکولی با افزایش دمای واکنش افزایش قابل توجه دارد. اما وقتی دمای واکنش در 110°C ثابت بماند کمترین مدت واکنش در هر مرحله منجر به کیتوسانی با وزن مولکولی بالاتر در شرایط یکسان خواهد شد. این تغییرها با نتیجه‌های به دست آمده از پژوهشی که ما بروی سینتیک واکنش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای انجام داده‌ایم در تطابق است [۱۸].



شکل ۵ تغییرهای وزن مولکولی کیتوسان با دمای واکنش در مدت‌های واکنش متفاوت (دی‌استیلاسیون ۳ مرحله‌ای)

انتظار می‌رود وقتی فقط مدت زمان مراحل عملیاتی و یا کل زمان واکنش تغییر کند (شکل ۴، بعد از PGC-7) پروفایل DD دوباره خطی می‌شود. پس همان‌طور که مشاهده می‌شود DD، که به‌طور مستقیم به نسبت N/C بستگی دارد، خود نیز با شرایط واکنش دی‌استیله شدن تحت تأثیر قرار می‌گیرد.



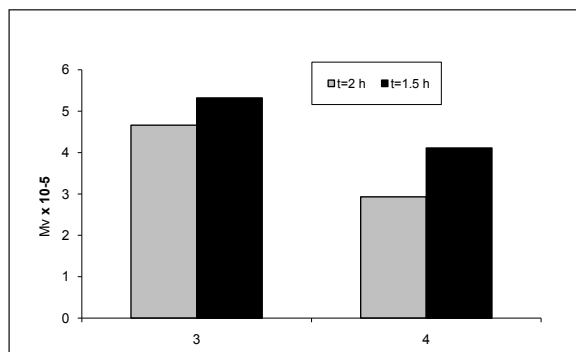
شکل ۴ درجه دی‌استیله شدن نمونه‌های کیتوسان به عنوان تابعی از نسبت نیتروژن به کربن

تأثیر شرایط واکنش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای بر وزن مولکولی همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، روش دی‌استیله شدن چند مرحله‌ای نه تنها بر روی درجه دی‌استیله شدن بلکه روی وزن مولکولی نمونه‌های کیتوسان تأثیر می‌گذارد. در بیشتر پژوهش‌های گزارش شده توسط پژوهشگران قبلی مشاهده می‌شود با افزایش DD وزن مولکولی کیتوسان به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [۲۲]، ولی نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد، جدول ۴، با کنترل شرایط واکنش می‌توان کاهش در وزن مولکولی را کنترل کرد. به گونه‌ای که بیشترین وزن مولکولی گزارش شده در این پژوهش 5.32×10^5 است، (وزن مولکولی در گستره متوسط MMW)، برای نمونه‌ای با DD=۹۶٪، در حالی که وقتی نمونه به حالت دی‌استیله شدن کامل (DD=۹۹٪) می‌رسد وزن مولکولی کاهش قابل توجهی نمی‌کند (4.66×10^5) و هنوز در گستره متوسط (MMW) قرار دارد. این در حالی است که اگر چنین افزایشی در DD در یک روش پیوسته یک مرحله‌ای اتفاق می‌افتاد، انتظار می‌رفت یک کاهش قابل مشاهده در وزن

بود. این درحالی‌ست که بیشترین وزن مولکولی در همین شرایط با اندک کاهش در مدت واکنش به‌دست آمده. تحت این شرایط وزن مولکولی ۱۴٪ افزایش می‌یابد (از $4,66 \times 10^5$ به $5,32 \times 10^5$) در حالی‌که DD فقط ۲,۴٪ کاهش می‌یابد (از ۹۹ به ۹۶,۶۷٪). به نظر می‌رسد می‌توان فرض کرد تغییرات وزن مولکولی نیز همانند DD ناشی از تأثیرات ریخت‌شناسی است [۱۷].

تأثیر تعداد مراحل واکنش بر وزن مولکولی

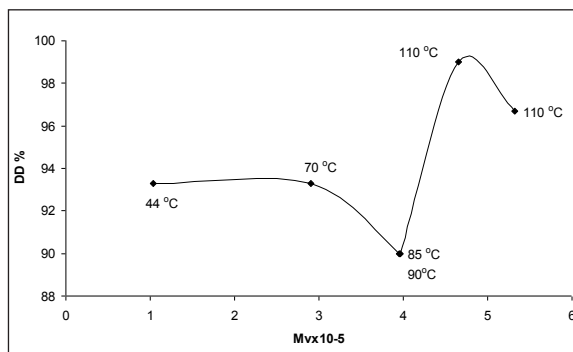
تعداد مراحل واکنش یک نقش اساسی در گستره وزن مولکولی بازی می‌کند. شکل ۷ نشان دهنده تغییرات وزن مولکولی با تعداد مراحل واکنش در دمای ثابت 110°C است. در این شکل، نمونه‌های کیتوسان در دمای واکنشی مشابه و تعداد مراحل متفاوت (۳ و ۴ مرحله‌ای) تحت دو سری متفاوت از مدت واکنش (۱,۵ و ۲ ساعت) بررسی شده‌اند. در هر دو سری از آزمایش‌ها افزایش تعداد مراحل واکنش منجر به وزن مولکولی کمتر می‌شود. هم‌چنین با افزایش مدت عملیات، به‌عنوان یک نتیجه از تأثیر زمان واکنش در عملیات چند مرحله‌ای، وزن مولکولی کاهش می‌یابد. درحالی‌که عملیات پیوسته چنین روندی را نشان نمی‌دهد. برای واکنش یک مرحله‌ای وقتی مدت تماس با محیط بازی از ۴ به ۶ ساعت افزایش یافته، وزن مولکولی از $3,37 \times 10^5$ به $2,87 \times 10^5$ افزایش یافته است (جدول ۴). به همین دلیل در واکنش‌های یک مرحله‌ای، بر عکس عملیات چند مرحله‌ای، وقتی مدت تماس افزایش می‌یابد وزن مولکولی هم افزایش می‌یابد.



شکل ۷ وزن مولکولی نمونه‌های کیتوسان با تعداد مراحل واکنش در دمای 110°C

تأثیر درجه دی‌استیل‌شدن بر وزن مولکولی

شکل ۶ وزن مولکولی کیتوسان را به‌عنوان تابعی از درجه دی‌استیل‌شدن و دمای واکنش نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در گستره دمایی ۴۴ تا 90°C درجه سلسیوس وزن مولکولی با کاهش DD افزایش می‌یابد؛ اما وقتی در واکنش دی‌استیل‌شدن چند مرحله‌ای دما از 90°C به 110°C درجه سلسیوس افزایش می‌یابد، شاهد افزایش وزن مولکولی با افزایش DD می‌شویم به‌گونه‌ای که DD به مقدار بیشینه خود می‌رسد. این نتیجه مشابه نتیجه به‌دست آمده از بررسی تأثیر دما و نسبت N/C است که نشان دهنده آن است که در واکنش دی‌استیل‌شدن چند مرحله‌ای وقتی دما بالا (110°C) باشد، عملیات به‌وسیله مدت واکنش کنترل می‌شود. چنان‌چه در ادامه تغییرات منحنی شکل ۵، با تغییر اندکی در مدت واکنش (از ۱,۵ تا ۲ ساعت) دوباره شاهد کاهش وزن مولکولی با افزایش DD هستیم. حتی در عدم تغییر دما، در دمای بالا، وزن مولکولی با مدت واکنش تحت تأثیر قرار می‌گیرد. این رفتار متفاوت فقط می‌تواند با تأثیر پیچیده واکنش دی‌استیل‌شدن چند مرحله‌ای بر ساختار کیتوسان تحت شرایط عملیاتی متفاوت توجیه شود. به‌عنوان یک نتیجه مهم، وقتی واکنش دی‌استیل‌شدن چند مرحله‌ای در درجه حرارت بالا انجام می‌شود، مهم‌ترین عامل کنترل، مدت واکنش هر مرحله خواهد بود. بیشترین مقدار DD در دمای 110°C ، مدت هر مرحله واکنشی برابر ۲ ساعت و تعداد مراحل واکنشی برابر ۳ به‌دست می‌آید که تحت این شرایط وزن مولکولی $4,66 \times 10^5$ خواهد



شکل ۶ تغییرات وزن مولکولی با درجه دی‌استیل‌شدن در دما و مدت زمان‌های متفاوت (دی‌استیل‌سیون ۳ مرحله‌ای)

کیتوسان با خواص ویژه ارایه شده است. بنابراین، بر اساس زمینه کاربردی می‌توان شرایط عملیاتی را به گونه‌ای کنترل کرد که به نمونه‌ای با وزن مولکولی و درجه دی‌استیله شدن منطبق با نیازهای آن کاربرد رسید. استفاده از این پایگاه داده باعث صرفه جویی در زمان و نیروی کار خواهد بود.

از نتیجه‌های این پژوهش می‌توان در کنترل اندازه تخلخل داربست‌های متخلخل بر پایه کیتوسان استفاده نمود، چنانچه نتیجه‌ها نشان داده شد با تنظیم جرم مولکولی کیتوسان می‌توان تخلخل داربست‌ها را کنترل کرد.

نتیجه گیری

نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد روش عملیات چند مرحله‌ای دی‌استیله شدن می‌تواند در دستیابی به کیتوسانی با درجه دی‌استیله شدن بالا به همراه وزن‌های مولکولی متفاوت مؤثر باشد و در نتیجه کاربرد صنعتی آن را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین نتیجه‌های این پژوهش منجر به دستیابی به درجه‌های بالایی از دی‌استیله شدن (بالای ۹۰٪) به همراه وزن‌های مولکولی در گستره $10^5 \times 5.32 - 1.03$ می‌شود. با استفاده از نتیجه‌های این پژوهش پایگاه داده‌ای برای تهیه

مراجع

- [1] Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E.; Progress in Polymer Science, 36, 981-1014, 2011.
- [2] Shin, Y.; Yoo, D.I.; Jang, J.; J. Appl. Polym. Sci., 80, 2495-2501, 2001.
- [3] Hirano, Sh.; Akiyama, Y.; J. Sci. Food Agric., 69, 91-94, 2006.
- [4] Sezer, A.D.; Akbuga, J.; J. Microencapsulation, 16, 687-696, 1999.
- [5] Bartkowiak, A.; Hunkeler, D.; J. Chem. Mater., 11, 2486-2492, 1999.
- [6] Suzuki, M.; Honda, H.; Kobayashi, T.; Wakabayashi, T.; Yoshida, J.; Takahashi, M.; J. Brain. Tumor. Pathol., 13, 127-132, 1996.
- [7] Brzozowski, K.; Stepnowski, P.; Int. J. Biolog. Macromol., 45, 56-60, 2009.
- [8] Honary, S.; Maleki, M.; Karami, M.; Tropical J. Pharmaceutical Res., 8, 53-61, 2009.
- [9] Hou, Z.; Zhang, M.; Liu, B.; Yan, Q.; Yuan, F.; Xu, D.; Gao, Y.; Food Hydrocolloids, 26, 205-211, 2012.
- [10] Kim, K.W.; Min, B.J.; Kim, Y.T.; Kimmel, R.; Cooksey, K.; Park, S.I.; LWT-Food Science and Technology, 44, 565-569, 2011.
- [11] Abd-Elmohdy, F.A.; El-Sayed, Z.; Essam, S.; Hebeish, A.; J. Carb. Polym., 82, 539-542, 2010.
- [12] Park, S.Y.; Marsh, K.S.; Rhim, J.W.; J. Phys. Prop., 67, 194-197, 2002.
- [13] Alsarraa, I.A.; Seema, S.B.; Zhang, H.; Evans, B.A.; Neau, S.H.; J. Biomaterials, 23, 3637-3644, 2002.
- [14] Liu, N.; Chen, X.G.; Park, H.J.; Liu, C.G.; Liu, C.S.; Meng, X.H.; Yu, L.J.; J. Carb. Polym., 64, 60-65, 2006.
- [15] Yaghobi, N.; Mirzadeh, H.; Hormozi, F.; Iran. J. Polym. Sci. Technol., 15, 55-63, 2002.
- [16] Mirzadeh, H.; Yaghobi, N.; Amanpour, S.; Ahmadi, H.; Mohagheghi, M.; Hormozi, F.; Iran. Polym. J., 11, 63-689, 2002.
- [17] Yaghobi, N.; Mirzadeh, H.; Iran. Polym. J., 13, 131-136, 2004.
- [18] Yaghobi, N.; Hormozi, F.; J. Carb. Polym., 81, 892-896, 2010.
- [19] Vakili, A.; Preparation of Porous Chitosan with Different Molecular Weight Using Lyophilizing System, MSc Thesis, Amirkabir University of Technology, 2003.

- [20]Takanori, S.; Kurita, K.; Iwakura, Y.; J. Polymer, 19, 458-459, 1978.
- [21]Ahmad-Khan, T.; Khiang-Peh, K.; Ch'ng, H.S.; J. Pharmaceutical Scie., 5, 205-212, 2002.
- [22]Cherkasova, E.I.; Smirnova, L.A.; Smirnov, V.F.; J. Polym. Sci. Series B., 48, 80-83, 2006.
- [23]Wang, W.; Bo, Sh.; Li, Sh.; Qin, W.; J. Biolog. Macromol., 13, 281-285, 1991.
- [24]Roberts, G.A.F.; Chitin chemistry, The Macmillan Press, Basingstoke, Great Britain, chapter 2, 64-80, 1992.
- [25]Li, M.C.; Liu, C.; Xin, M.H.; Zha, H.; Wang, M.; Feng, Z.; Sun, X.L.; J. Chem. Res. Chinese U., 21, 114-116, 2003.
- [26]Sundararajan, V.M.; Howard, W.T.M.; J. Biomaterials, 20, 1133-1142, 1999.
- [27]Atala, A.; Lanza, R.P.; Methods of Tissue Engineering, Part B, Academic Press, California, USA, Chapter 60, 697-704, 2002.
- [28]Sperling, L.H.; Introduction to physical polymer science, Wiley 2001.