

الْحَمْدُ لِلَّهِ



دانشگاه صنعتی اصفهان  
دانشکده مهندسی نساجی

## رهایش دوکسورویسین از نانو الیاف یا نانو ذرات کربوکسی متیل کیتوسان

پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی نساجی - الیاف

آزاده فخارمنش

اساتید راهنما

دکتر حسین توانایی

دکتر محمد مرشد

اساتید مشاور

دکتر تقی خیامیان



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی نساجی

پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی نساجی-الیاف خانم آزاده فخارمنش

تحت عنوان

رهايش دوکسورویسین از نانو الیاف یا نانو ذرات کربوکسی متیل کیتوسان

در تاریخ ۱۳۹۱/۱۰/۲۵ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

- |                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| دکتر حسین توانایی        | ۱- استاد راهنمای پایان نامه   |
| دکتر محمد مرشد           | ۲- استاد راهنمای پایان نامه   |
| دکتر تقی خیامیان         | ۳- استاد مشاور پایان نامه     |
| دکتر سید عبدالکریم حسینی | ۴- استاد داور                 |
| دکتر امیر عبدالملکی      | ۵- استاد داور                 |
| دکتر صدیقه برهانی        | سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده |

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،  
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع  
این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به

پدرم، بزرگ استادم که درس تلاش و زندگی را از او آموختم و  
به مادرم، الهه مهر، مظهر صبر و مهربانی که هرچه دارم از اوست و

به همسرم که بهانه ایست برای زیستنم.

## تشکر و قدر دانی

سپاس بی کران یزدان بی همتا را که منت بر من نهاد تا سینه ام مخزن قطره ای از علم بی پایانش گردد. حال که توفیق جمع آوری و تهیه این مجموعه را یافته‌ام بر خود واجب می‌دانم از تمامی عزیزانی که در طی انجام این پژوهش از راهنمایی و یاری‌شان بهره‌مند گشته‌ام تشکر و قدردانی می‌نمایم.

در ابتدا صمیمانه‌ترین تقدیرها تقدیم به پدر بزرگوار و مادر دلسوز و مهربانم که همواره حامی و مشوقم بوده‌اند و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی‌ام بدون دعای خیر، و برکت وجودشان غیرممکن بود. هم‌چنین از همسر مهربانم که با عشق و صبر، همواره همراه و یاور من بوده و هست بی‌نهایت سپاس‌گزاری می‌نمایم. از اساتید ارجمند و جناب آقای دکتر حسین توانایی و جناب آقای دکتر محمد مرشد که با سعه صدر و صبوری مرا راهنمایی نموده و با ارائه نظرات سازنده و رهنمودهای بی‌دریغشان در پیشبرد این پایان‌نامه سعی تمام مبذول داشتند، کمال تشکر را دارم. هم‌چنین از جناب آقای دکتر تقی خیامیان، استاد مشاور ارجمند که در طول این تحقیق با رهنمودهای خود مرا مورد لطف خویش قرار دادند، صمیمانه سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر عبدالکریم حسینی و جناب آقای دکتر امیر عبدالملکی که زحمت بازخوانی و داوری این مجموعه را به عهده داشتند، نیز صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## چکیده

در این تحقیق، ابتدا تهیه نانوالیاف زیست تخریب پذیر کربوکی متیل کیتوسان حاوی داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین و سپس ارزیابی رهایش داروی مذکور از بستر پلیمری مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور محلول هایی حاوی ۳ تا ۵٪ وزنی - حجمی کربوکی متیل کیتوسان و ۱۶/۷، ۲۵ و ۳۴٪ دوکسوروبیسین نسبت به وزن پلیمر در مخلوط حلال های تری فلورواستیک اسید و دی کلرومتان با نسبت های حجمی ۸۰:۲۰، ۸۵:۱۵ و ۹۰:۱۰ تهیه شده و با استفاده از روش الکتروریسی، نانوالیاف مورد نظر تولید گردید. نتایج نمونه های بالا نشان داد که فقط محلول حاوی ۴٪ کربوکی متیل کیتوسان در مخلوط حلال های تری فلورواستیک اسید و دی کلرومتان با نسبت حجمی ۸۵:۱۵ منجر به تولید نانوالیاف یکنواخت شده است. به منظور بررسی غلظت دارو بر قطر نانوالیاف الکتروریسی شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و نرم افزار measurement استفاده شد. قطر نانوالیاف حاوی ۱۶/۷٪، ۲۵٪ و ۳۴٪ به ترتیب ۳۹۰-۴۶۰ نانومتر بود. علیرغم تلاش های انجام گرفته، دستیابی به قطرهای پایین تر امکان پذیر نبود. با استفاده از طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR) شکل گیری واکنش احتمالی بین پلیمر و دارو بررسی شد. به منظور بررسی تاثیر افزودن دوکسوروبیسین بر ریز ساختار نانوالیاف کربوکی متیل کیتوسان از آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد. نتایج XRD نشان داد که دوکسوروبیسین به صورت بلور در بستر بلورین کربوکی متیل کیتوسان قرار می گیرد. رهایش دارو از وب نانوالیاف حاوی دوکسوروبیسین، در محیط بافر فسفات  $\text{pH} = 7.4$  مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین مقدار دوکسوروبیسین در محیط بافر فسفات، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت دارو بر پروفایل و سرعت رهایش دارو از وب نانوالیاف تاثیر دارد. دوکسوروبیسین از وب نانوالیاف حاوی ۱۶/۷٪ دوکسوروبیسین مکانیسم انتشار غیر فیکتی و از وب نانوالیاف حاوی ۲۵٪ و ۳۴٪ دوکسوروبیسین از مکانیسم انتشار فیکتی آزاد شده است. با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت نانوالیاف کربوکی متیل کیتوسان حاوی دوکسوروبیسین توانایی رهایش دارو به صورت کنترل شده را داشته و می تواند به عنوان یک سیستم رهایش کنترل شده دوکسوروبیسین برای شیمی درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** نانوالیاف، کربوکی متیل کیتوسان، دوکسوروبیسین، انتقال دارو

## فهرست مطالب

| صفحه                  | عنوان  |
|-----------------------|--|
| ۱                     | چکیده  |
| <b>فصل اول: کلیات</b> |  |
| ۲                     | ۱-۱ مقدمه  |
| ۳                     | ۱-۱-۱ کیتین  |
| ۴                     | ۱-۱-۲ کیتوسان  |
| ۵                     | ۱-۱-۳ اصلاح کیتوسان  |
| ۶                     | ۲-۱ کر بوکسی متیل کیتوسان  |
| ۸                     | ۱-۲-۱ درجه استخلاف کر بوکسی متیل کیتوسان                           |
| ۸                     | ۱-۲-۱ (الف) روش تیتراسیون  |
| ۸                     | ۱-۲-۱ (ب) روش رانهیلد  |
| ۹                     | ۲-۲-۱ عوامل موثر بر خواص و درجه کر بوکسی متیل کیتوسان              |
| ۱۱                    | ۳-۲-۱ طیف سنجی   |
| ۱۱                    | ۳-۲-۱ (الف) طیف FTIR کیتوسان و کر بوکسی متیل کیتوسان               |
| ۱۱                    | ۳-۲-۱ (ب) پراش اشعه ایکس   |
| ۱۲                    | ۳-۲-۱ (ج) طیف H NMR کیتوسان و کر بوکسی متیل کیتوسان                |
| ۱۳                    | ۳-۲-۱ (د) طیف C NMR کیتوسان و کر بوکسی متیل کیتوسان                |
| ۱۵                    | ۳-۱ نانو الیاف   |
| ۱۵                    | ۱-۳-۱ روشهای مختلف تولید نانوالیاف پلیمری                          |
| ۱۶                    | ۲-۳-۱ الکتروریسی   |
| ۱۷                    | ۳-۳-۱ پارامترهای مؤثر بر قطر و مورفولوژی نانوالیاف                 |
| ۱۹                    | ۴-۳-۱ کاربردهای نانوالیاف  |
| ۲۱                    | ۴-۱ سیستم های رهایش دارو   |
| ۲۲                    | ۱-۴-۱ مدل های ارائه شده برای نحوه قرار گیری دارو در بستر نانوالیاف |
| ۲۳                    | ۲-۴-۱ سینتیک رهایش دارو از وب نانوالیاف                            |
| ۲۵                    | ۳-۴-۱ مکانیسم های رهایش دارو از وب نانوالیاف                       |
| ۲۸                    | ۴-۴-۱ نانوالیاف مورد استفاده در سیستم های رهایش کنترل شده دارو     |
| ۲۸                    | ۵-۱ شیمی درمانی  |
| ۲۹                    | ۶-۱ داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین                                    |
| ۳۰                    | ۱-۶-۱ خواص فیزیکی و شیمیایی دوکسوروبیسین                           |
| ۳۰                    | ۲-۶-۱ کاربرد دوکسوروبیسین در درمان سرطان                           |
| ۳۱                    | ۷-۱ مروری بر تحقیقات انجام شده بر روی رهایش داروی دوکسوروبیسین     |
| ۳۵                    | ۸-۱ اهداف تحقیق  |

## فصل دوم: اساس تجربی



|    |   |
|----|---|
| ۳۶ | ۱-۲ مقدمه   |
| ۳۶ | ۱-۲-۲ مواد به کار رفته در این تحقیق به شرح زیر می باشد:   |
| ۳۷ | ۲-۲-۲ وسایل مورد استفاده  |
| ۳۸ | ۳-۲ نرم افزارهای مورد استفاده   |
| ۳۸ | ۴-۲ تعیین وزن مولکولی نمونه کربوکسی متیل کیتوسان  |
| ۳۹ | ۵-۲ تولید کربوکسی متیل کیتوسان  |
| ۳۹ | ۶-۲ تعیین درجه کربوکسی متیله شدن  |
| ۴۰ | ۷-۲ تهیه محلول های کربوکسی متیل کیتوسان و کربوکسی متیل کیتوسان حاوی دو کسورویسین جهت الکتروریسی |
| ۴۱ | ۸-۲ الکتروریسی محلول ها   |
| ۴۱ | ۹-۲ اندازه گیری هدایت الکتریکی  |
| ۴۲ | ۱۰-۲ محاسبه رطوبت بازیافتی  |
| ۴۲ | ۱۱-۲ میکروسکوپ نوری   |
| ۴۲ | ۱۲-۲ میکروسکوپ الکترونی روبشی   |
| ۴۳ | ۱۳-۲ طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز  |
| ۴۴ | ۱۴-۲ پراش اشعه ایکس   |
| ۴۴ | ۱۵-۲ رهایش دارو   |
| ۴۴ | ۱-۱۵-۲ تهیه محلول استاندارد بافر فسفات  |
| ۴۵ | ۲-۱۵-۲ محاسبه غلظت اشباع دو کسورویسین در بافر فسفات   |
| ۴۵ | ۳-۱۵-۲ رسم منحنی کالیبراسیون دو کسورویسین در محیط بافر  |
| ۴۶ | ۴-۱۵-۲ اندازه گیری مقدار بارگیری موثر دارو در نانوالیاف   |
| ۴۶ | ۵-۱۵-۲ بررسی رهایش دارو در محیط بافر فسفات  |
| ۴۷ | ۶-۱۵-۲ محاسبه میزان درصد داروی آزاد شده در هر نمونه   |
| ۴۸ | ۱۶-۲ آنالیز آماری   |

### فصل سوم: نتایج و بحث

|    |  |
|----|--|
| ۴۹ | ۱-۳ مقدمه  |
| ۴۹ | ۲-۳ الکتروریسی نانوالیاف کربوکسی متیل کیتوسان حاوی داروی دو کسورویسین            |
| ۴۹ | ۱-۲-۳ انتخاب حلال مناسب جهت تهیه محلول الکتروریسی                                |
| ۵۰ | ۲-۲-۳ شرایط بهینه الکتروریسی کربوکسی متیل کیتوسان بدون دارو                      |
| ۵۰ | ۳-۲-۳ تعیین ویسکوزیته بهینه محلول پلیمر برای الکتروریسی                          |
| ۵۲ | ۴-۲-۳ اثر هدایت الکتریکی حلال ها بر مورفولوژی نانوالیاف                          |
| ۵۳ | ۵-۲-۳ تاثیر افزودن دو کسورویسین در محلول پلیمر بر قطر نانوالیاف الکتروریسی شده   |
| ۵۵ | ۳-۳ منحنی کالیبراسیون رهایش دارو در محیط بافر فسفات                              |
| ۵۷ | ۱-۳-۳ نتایج تعیین میزان غلظت اشباع دو کسورویسین در بافر فسفات                    |
| ۵۷ | ۲-۳-۳ نتایج تعیین میزان بارگیری موثر دو کسورویسین در وب نانوالیاف الکتروریسی شده |

|         |   |
|---------|---|
| ۵۸..... | ۳-۳-۳ بررسی تاثیر درصد دوکسورویسین بر نرخ رهایش دارو.....                                     |
| ۵۹..... | ۳-۳-۴ مکانیسم رهایش دارو از وب نانوالیاف.....   |
| ۵۹..... | ۳-۳-۵ تعیین سینتیک رهایش دارو از وب نانو الیاف .....  |
| ۶۰..... | ۳-۳-۶ بررسی سرعت رهایش .....  |
| ۶۱..... | ۳-۴-۱ بررسی طیف FTIR نانوالیاف.....   |
| ۶۲..... | ۳-۴-۲ مطالعه ساختار نانوالیاف کربوکسی متیل کیتوسان حاوی دوکسورویسین توسط پراش اشعه ایکس ..... |

#### فصل چهارم: نتیجه گیری و پیشنهادات

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| ۶۴..... | ۴-۱ نتیجه گیری کلی ..... |
| ۶۶..... | ۴-۲ پیشنهادات .....      |
| ۶۷..... | پیوست .....              |
| ۸۱..... | مراجع .....              |

## فصل اول

### کلیات

#### ۱-۱ مقدمه

امروزه نانو ساختارها در حوزه های وسیعی از علوم مختلف مورد توجه قرار گرفته اند. نانو الیاف و نانو ذرات از جمله نانو ساختارهای مهم به شمار می آیند. نانو الیاف و نانو ذرات پلیمری، به واسطه ی خواص برجسته شان، انتخاب مناسبی برای بسیاری از کاربردهای مهم در فناوری های پیشرفته می باشند که از آن جمله می توان به نانو کامپوزیت ها، نانو سنسورها و کاربردهای پزشکی شامل پوشش های زخم، سیستم های انتقال دارو و داربست های مهندسی بافت اشاره کرد. در مصرف داروها به صورت متداول، تنها جزء کوچکی از دارو به جایگاه مناسب در بدن می رسد و بخش اعظم آن در طی متابولیسم و ترشح آنزیم دفع می گردد. هر دارویی یک محدوده درمانی بر حسب غلظت دارد که بالای این غلظت سمی و پایین این غلظت بی اثر می باشد. اهمیت رهایش داروی کنترل شده و روش های دست یابی به این مهم، بعدا بیشتر توضیح داده می شوند. در این کار تحقیقاتی رهایش داروی دوکسوروبیسین<sup>۱</sup> از بستر کربوکسی متیل کیتوسان<sup>۲</sup> مورد مطالعه و بررسی قرار خواهد گرفت. کربوکسی متیل کیتوسان از مشتقات کیتوسان<sup>۳</sup> می باشد که به نوبه خود از مشتقات کیتین<sup>۴</sup> می باشد. در ادامه توضیحاتی در رابطه با این سه پلیمر، داده می شود.

---

<sup>1</sup> Doxorubicin

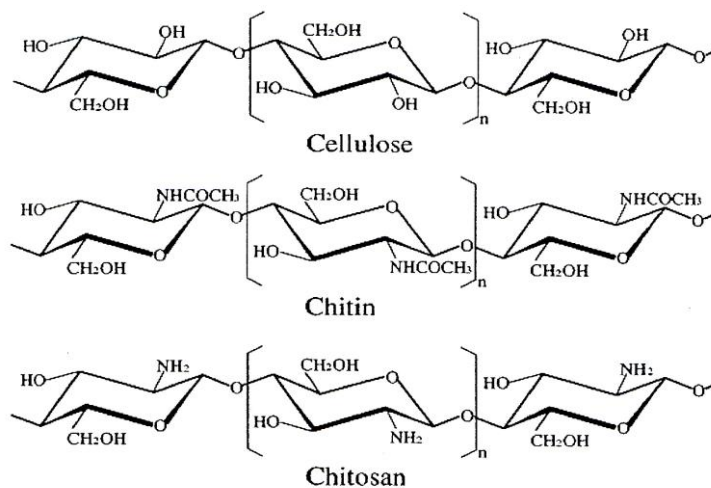
<sup>2</sup> Carboxymethyl Chitosan

<sup>3</sup> Chitosan

<sup>4</sup> Chitin

## ۱-۱-۱ کیتین

کیتین یک پلی ساکارید است که تاکنون بیش از سیصد منبع متفاوت از جمله گیاهان و بی مهرگان دریایی، حشرات، باکتری ها، جلبک ها، قارچ ها، خزها و نرم تنان برای استخراج این زیست پلیمر مورد مطالعه قرار گرفته اند. در حال حاضر، مهم ترین منابع اولیه برای استخراج به صرفه اقتصادی آن، پوسته سخت پوستان دریایی همچون میگو، خرچنگ و ... است. کیتین که یک پلیمر کربوهیدراتی یا پلی ساکاریدی بوده و از مهم ترین انواع زیست پلیمرها به شمار می آید، مانند سلولز از حلالیت کمی برخوردار است. پلیمرهایی که اکثراً امروزه در زمینه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرند مواد سنتزی هستند که در مقایسه با سلولز، کیتین و کیتوسان از زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بسیار کمتری برخوردار می باشند، در حالی که کیتین و کیتوسان در این موارد حتی از سلولز هم پیشی گرفته و از خواص بارزی نظیر خواص ویژه جذبی، غیر سمی بودن و فعالیت های شیمیایی خاص نیز برخوردار می باشند [۱]. ساختار شیمیایی کیتین و کیتوسان در طرح ۱-۱ آمده است.



طرح ۱-۱ ساختار شیمیایی سلولز، کیتین و کیتوسان [۱]

کیتین در سه فرم ساختاری  $\alpha$  و  $\beta$  و  $\gamma$  وجود دارد که تفاوت آن ها در نوع قرارگیری حلقه های گلوکزی زنجیره ها می باشد. در فرم  $\alpha$ ، حلقه های گلوکزی از زنجیره های مختلف غیر هم راستا هستند ولی در فرم بتا این حلقه ها هم راستا می باشند. در فرم گاما ترکیبی از هر دو حالت  $\alpha$  و بتا دیده می شود.  $\alpha$  کیتین از هر دو نوع بتا و گاما پایدارتر می باشد و در شرایط مناسب فرم گاما به فرم  $\alpha$  تبدیل می شود. سختی  $\alpha$  کیتین بیشتر از دو نوع دیگر است و در بخش های استخوانی بدن جانداران یافت می شود. ولی انواع بتا و گاما انعطاف پذیری را فراهم می کنند [۲]. در فرم  $\alpha$  زنجیره ها به صورت متراکم و با حداقل فاصله از همدیگر قرار دارند و نسبت به دو فرم دیگر، پیوندهای هیدروژنی بیشتری دارند. در نوع  $\alpha$ ، نواحی اندکی برای جذب آب وجود دارد که می تواند به علت وجود پیوندهای هیدروژنی درون و بین زنجیره ای، و بین صفحه ای باشد. این امر باعث سختی و استحکام و نفوذ ناپذیری کوتیکول سخت پوستان نسبت به آب می شود [۳].

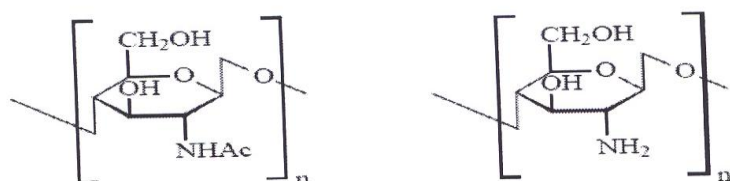
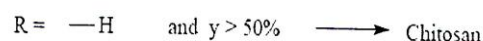
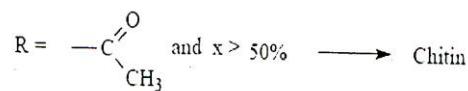
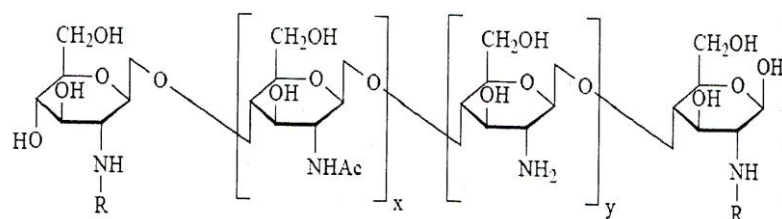
## ۲-۱-۱ کیتوسان

کیتوسان که مهم ترین مشتق کیتین می باشد، به کمک استیل زدایی حرارتی کیتین، و یا مستقیماً از طریق استخراج آن از مواد خام و یا تبدیل زیستی با استفاده از آنزیم تولید می شود. در حال حاضر کیتوسان تجاری به روش استیل زدایی حرارتی کیتین بدست می آید. در محیط قلیایی (سود سوزآور) دمای بالاتر از ۸۰ درجه سانتیگراد، حدود ۷۵٪ پیوندهای استامیدی کیتین شکسته می شوند. با اینکه همه ی گروه های هیدروکسیل به راحتی استیل زدایی نمی شوند، اما با طولانی کردن زمان فرایند قلیایی شدن، می توان واکنش را تا استیل زدایی کامل پلیمر ادامه داد، اما در این حالت پلیمرهایی با وزن مولکولی کم تولید می شوند چون وقتی که کیتین بیش از ۸۰٪ استیل زدایی شود، درجه پلمریزه شدن و طول زنجیرها کاهش می یابد [۳]. لازم به ذکر است که کیتوسان در دیواره سلولی قارچ ماکورروکسی<sup>۱</sup> موجود و قابل استخراج می باشد. به این منظور ابتدا کشت باکتری انجام شده و سپس در استخراج، کیتوسان تولید می شود. در این روش مقدار کیتوسان استخراجی، ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ وزن اولیه قارچ ماکورروکسی می باشد [۳].

کیتوسان پلیمری خطی با ساختار  $\beta$  - (1 → 4) - ۲-آمینو-۲-دی اکسی - D - گلوکوپیرانوز می باشد که همه یا بخشی از واحدهای N- گلوکزآمین در آن استیل زدایی شده اند. فرمول مولکولی کیتوسان به صورت  $(C_6H_{11}NO_4)_n$  می باشد. طرح ۲-۱ تفاوت ساختار شیمیایی کیتین و کیتوسان را به صورت واضح نشان می دهد. در حقیقت تفاوت بین کیتین و کیتوسان در تعداد گروه استیل آن ها می باشد. در کیتین بیش از ۵۰٪ واحدهای ساختاری دارای گروه های استامید می باشند در حالی که در کیتوسان بین ۷۰٪ تا ۹۰٪ واحدها، دارای گروه های آمین می باشند.

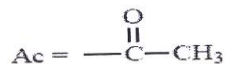
---

<sup>1</sup> Macur Rouxi



Chitin

Chitosan



طرح ۱-۲ تفاوت ساختار مولکولی کیتین و کیتوسان [۳]

به طور خلاصه می توان گفت که اصطلاحات کیتین و کیتوسان به طور مشخص برای یک ترکیب ثابت و خاص به کار برده نمی شود. کیتین در واقع یک پلی N-استیل گلوکز آمین است که خیلی کم استیل زدایی شده است در حالی که کیتوسان همان ساختار مشابه کیتین است که تا حد امکان استیل زدایی شده است، ولی نه به اندازه ای که بتوان آن را یک پلی گلوکز آمین نامید.

با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی کیتوسان، این ماده کاربردهای فراوانی را در صنایع گوناگون دارد. به عنوان مثال در زمینه ی زیست-پزشکی می توان به کاربردهایی مانند التیام زخم، پوست مصنوعی، مهندسی بافت استخوان و غضروف اشاره کرد. تشکیل فیلم جهت نگهداری مواد غذایی و عصب مصنوعی از دیگر کاربردهای کیتوسان می باشد. کیتوسان همچنین در صنایع آرایشی - بهداشتی، داروسازی، زیست فناوری، کشاورزی، کاغذ سازی، پالایش فلزات سنگین، تصفیه آب و غیره کاربرد دارد. عدم حلالیت کیتوسان یکی از مشکلات آن می باشد. کربوکسی متیله کردن کیتوسان بر این مشکل فائق آمده و باعث بهبود حلالیت آن در آب می گردد.

### ۱-۱-۳ اصلاح کیتوسان

به دلیل پتانسیل کیتین و کیتوسان در کاربردهای تکنولوژیکی و بیوپزشکی، این دو بیوپلیمر طبیعی، در تحقیقات توجه زیادی را به خود جلب نموده اند. هر چند که در بیشتر زمینه ها، اکثر توجهات معطوف به کیتوسان است. کیتوسان در مقایسه با کیتین دارای دو مزیت می باشد؛ اول این که، برای حل کیتین، بایستی از حلال های سمی از

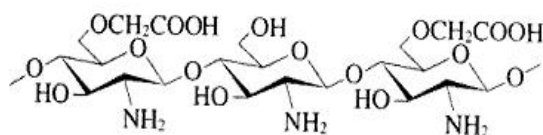
قبیل لیتیم کلراید و دی متیل استامید استفاده کرد، در صورتی که کیتوسان در محلول های اسیدی رقیق حل می شود. مزیت دیگر کیتوسان، قابلیت انجام واکنش های مختلف، خاصیت ضد میکروب و انعقاد خون می باشد. این ویژگی ها به گروه های آمین موجود در ساختار کیتوسان ربط داده می شود، همانطور که قبلاً ذکر گردید. در حال حاضر، کیتوسان به طور عمده از استیل زدایی حرارتی کیتین به دست می آید. تحقیقات نشان می دهد که تولید برخی از مشتقات کیتوسان که با اصلاح ساختار این پلیمر صورت گرفته است، باعث ایجاد مزایای واضحی در کاربردهای بیولوژیکی و بیوپزشکی آن شده است [۴].

اصلاح ساختار کیتوسان به دو روش فیزیکی و شیمیایی امکان پذیر است. اصلاحات فیزیکی، در ارتباط با شکل و بلورینگی ساختار و اصلاح شیمیایی، شامل شاخه دار کردن، تغییر گروه های عاملی یا برداشتن آنها می باشد. در اصلاح فیزیکی وزن مولکولی پلیمر تغییر می یابد. در اصلاح شیمیایی، با افزودن گروه های عاملی خاصیت جذب فلزات تغییر می یابد و باعث افزایش حلالیت در محدوده ی وسیع تر pH می گردد [۵]. برخی از این فرایندها شامل تیول-کیتوسان برای جداسازی جیوه، استیلاسیون مجدد برای افزایش حلالیت، آسیلاسیون<sup>۱</sup> برای افزایش حلالیت در حلال های آلی و کربوکسی متیله کردن برای کسب حلالیت در آب می باشد [۴، ۵، ۶، ۷]. از جمله ی این فرایندها، فرایند کربوکسی متیله کردن کیتوسان است که حاصل آن کربوکسی متیل کیتوسان می باشد.

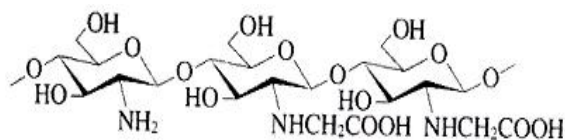
## ۱-۲ کربوکسی متیل کیتوسان

کربوکسی متیل کیتوسان یکی از مشتقات کیتوسان است که دارای خواص جالبی مانند قابلیت بالای جذب یون های فلزی [۵] و محدوده ی وسیع تر حلالیت [۷] می باشد. کربوکسی متیل کیتوسان همچنین خواص بیولوژیکی مناسبی را جهت کاربردهای زیست-پزشکی دارا می باشد. این ماده از اتصال گروه های کربوکسی متیل به کیتوسان ایجاد می شود. موقعیت قرارگیری گروه کربوکسی متیل می تواند به صورت نوع N، (اتصال گروه کربوکسی متیل به گروه آمین) نوع O، (اتصال کربوکسی متیل به گروه هیدروکسیل نوع اول) و یا نوع N-O، (اتصال کربوکسی متیل به هر دو گروه آمین و هیدروکسیل) باشد. طرح ۱-۳ ساختار مولکولی O<sup>-</sup>، N<sup>-</sup>، و O<sup>-</sup>-N<sup>-</sup> کربوکسی متیل کیتوسان را نشان می دهد.

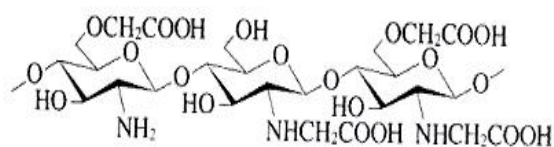
<sup>1</sup> Acylation



(a)



(b)



(c)

طرح ۱-۳ ساختار مولکولی (a) -O کربوکسی متیل کیتوسان، (b) -N کربوکسی متیل کیتوسان و (c) -O-N کربوکسی متیل کیتوسان [۸]

محل قرارگیری گروه های کربوکسی متیل علاوه بر اینکه به منشاء کیتوسان اولیه بستگی دارد، به شرایط واکنش، نوع واکنش دهنده ها، و هم چنین استوکیومتری آنها نیز وابسته است.

برخی مطالعات نشان می دهد که تغییر شرایط واکنش می تواند موجب تولید -N و -O یا -N-O کربوکسی متیل کیتوسان شود. به عنوان مثال در دمای محیط، در محلول ایزوپروپانول/ سدیم هیدروکسید، واکنش بین کیتوسان و مونو کلرواستیک اسید به تولید -O کربوکسی متیل کیتوسان می انجامد. درحالی که با افزایش دما، -N کربوکسی متیل کیتوسان تولید می شود. دی آبرو<sup>۱</sup> نشان داد که از واکنش بین کیتوسان و مونوکلرواستیک اسید در محلول ۲- پروپانول و سدیم هیدروکسید آبی در دمای اتاق، -N-O کربوکسی متیل کیتوسان تولید می شود. این مسئله نشان می دهد که گروه های هیدروکسیل متصل به اتم های کربن در موقعیت های ۳ و ۶ از واحد گلوکوپیرانوز و هم چنین گروه آمین متصل به اتم کربن ۲، مکان هایی در دسترس برای انجام واکنش می باشند.

لازم به ذکر است که فرایند کربوکسی متیله شدن به ندرت کامل می گردد و برخی از گروه های هیدروکسیل و آمین، آزاد باقی می مانند. چنانچه کیتوسان به طور کامل داستیله نشده باشد، واحدهایی مثل ۲-استامید و ۲-دی اکسی -D- گلوکوپیرانوز ناشی از استیل زدایی نشدن کامل کیتین نیز در ساختار کربوکسی متیل کیتوسان نیز شکل می گیرد. به این ترتیب تعداد واحدهای متفاوت در ساختار کربوکسی متیل کیتوسان، به حداقل ۱۲ واحد می رسد [۸].

<sup>1</sup> De Abrue



## ۱-۲-۱ درجه استخلاف<sup>۱</sup> کربوکسی متیل کیتوسان

تعیین درجه استخلاف گروه های کربوکسی متیل، بر روی زنجیر مولکولی کیتوسان توسط دو روش تیتراسیون و رانهیلد<sup>۲</sup> امکان پذیر است.

### ۱-۲-۱ (الف) روش تیتراسیون

برای تعیین درجه استخلاف کربوکسی متیل کیتوسان به روش تیتراسیون، ۰/۳ گرم از آن در ۳۰ میلی لیتر محلول ۰/۱ مولار کلریدریک اسید حل گردیده و سپس با محلول ۰/۱ مولار سدیم هیدروکسید تیتراسیون می گردد. درجه ی استخلاف با توجه به معادلات ۱-۱ و ۲-۱ محاسبه می شود.

$$DS = 161A / (M_{CMCH} - 58 A) \quad \text{معادله ۱-۱}$$

$$A = V_{NaOH} \times C_{NaOH} \quad \text{معادله ۲-۱}$$

$V_{NaOH}$  و  $C_{NaOH}$  به ترتیب حجم و مولاریته ی محلول سدیم هیدروکسید و  $M_{CMCH}$ ، جرم کربوکسی متیل کیتوسان را بر حسب گرم نشان می دهد. ۱۶۱ و ۵۸ در معادله ۱-۱ به ترتیب وزن مولکولی گلوکزآمین (واحد ساختاری کیتوسان) و گروه کربوکسی متیل را نشان می دهند [۴].

### ۱-۲-۱ (ب) روش رانهیلد

در روش رانهیلد، درجه استخلاف گروه های کربوکسی متیل روی موقعیت های O-6، O-3 و N-2 به کمک طیف H NMR به صورت زیر تعیین می گردد [۴].

$$f_6 = 0/5 (I_a - I_c) / (I_b + I_d)$$

$$f_3 = I_c / (I_b + I_d)$$

$$f_2 = 0/5 I_e / (I_b + I_d)$$

$$F = f_2 + f_3 + f_6$$

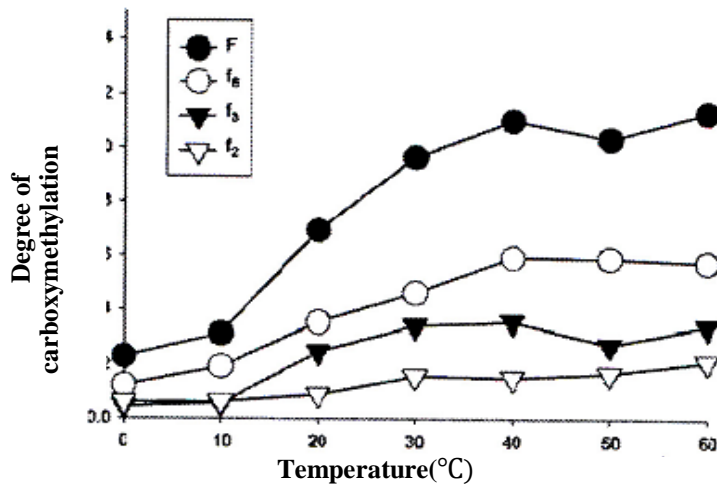
a, b, c, d و e موقعیت های مختلف رزونانس پروتون ها در طیف را نشان می دهند و I، شدت پیک ها در این موقعیت ها است.  $f_2$ ،  $f_3$  و  $f_6$  به ترتیب درجه ی کربوکسی متیله شدن در موقعیت های O-6، O-3 و N-2 می باشند. F درجه کربوکسی متیله شدن کل است.

<sup>1</sup> Degree of Substitution

<sup>2</sup> Ragnhild

## ۲-۲-۱ عوامل مؤثر بر خواص و درجه کربوکسی متیله شدن کربوکسی متیل کیتوسان

چن<sup>۱</sup> و پارک<sup>۲</sup> اعلام کردند که با تغییر شرایط دما می توان راندمان کربوکسی متیله شدن و محدوده حلالیت کربوکسی متیل کیتوسان را تغییر داد. با توجه به شکل ۱-۱، افزایش دمای واکنش منجر به افزایش درجه کربوکسی متیله شدن می شود. درجه کربوکسی متیله شدن بالاتر و به عبارت دیگر درجه های استخلاف بالاتر، ناحیه ی عدم انحلال را به سمت pH های کمتر سوق می دهد [۷]. به عنوان مثال، کربوکسی متیل کیتوسان تهیه شده در دمای ۱۰-۰ °C در تمام محدوده ی pH، در آب حل می شود. با افزایش دمای واکنش کربوکسی متیله شدن، کربوکسی متیل کیتوسان تولید شده، در محدوده ای نزدیک به pH=7 در آب نامحلول است. این محدوده در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. چن و پارک تجمع زنجیره های با درجه استیله شدن بالا و ایجاد گروه های آمید در اثر خشک شدن تحت حرارت را دلایل احتمالی نواحی عدم انحلال اعلام نموده اند [۷].



شکل ۱-۱ تغییرات درجه کربوکسی متیله شدن در مقابل دما (F: درجه کل کربوکسی متیله شدن، f<sub>6</sub>: درجه کربوکسی متیله شدن در موقعیت O-6، f<sub>3</sub>: درجه کربوکسی متیله شدن در موقعیت O-3، f<sub>2</sub>: درجه کربوکسی متیله شدن در موقعیت N-2)

[۷]

<sup>1</sup> Chen

<sup>2</sup> Park

| Sample   | Temperature (°C) <sup>a</sup> | Solubility (pH) <sup>b</sup>                           |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
|----------|-------------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
|          |                               | 1  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1        | 0                             | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 1] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 2        | 10                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 2] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 3        | 20                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 3] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 4        | 30                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 4] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 5        | 40                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 5] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 6        | 50                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 6] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| 7        | 60                            | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for sample 7] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |
| Chitosan | -                             | [Bar chart showing solubility at pH 1-13 for Chitosan] |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |

شکل ۱-۲ محدوده حلالیت کربوکسی متیل کیتوسان (محدوده سفید: محلول و محدوده سیاه: نامحلول) [۷]

دو<sup>۱</sup> و شی<sup>۲</sup> [۴] واکنش کربوکسی متیله شدن را روی یک نمونه کیتوسان با وزن مولکولی ۴۰۵ کیلو دالتون<sup>۳</sup>، تحت شرایط مختلف انجام دادند. نتایج آزمایشات نشان داد که به طور کلی درجه استخلاف و راندمان کربوکسی متیله شدن، با افزایش زمان در هر دو واکنش آلکیله شدن (از ۲ تا ۱۲ ساعت) و کربوکسیلاسیون (از ۲ تا ۵ ساعت)، افزایش

می یابند. اما، افزایش دما فقط واکنش آلکیله شدن را افزایش می دهد. نتایج در جدول ۱-۱ آورده شده است.

جدول ۱-۱ تاثیر دما و زمان بر راندمان و درجه استخلاف کربوکسی متیل کیتوسان [۴]

| CS $M_v$<br>(kDa) | Alkalization |          | Carboxylation |          | Yield (%) | DS   |
|-------------------|--------------|----------|---------------|----------|-----------|------|
|                   | Temp. (°C)   | Time (h) | Temp. (°C)    | Time (h) |           |      |
| 405               | RT           | 2        | 60            | 3        | 34.8      | 0.82 |
|                   |              |          |               | 4        | 67.7      | 0.98 |
|                   |              |          |               | 6        | 79.3      | 1.17 |
|                   |              | 12       | 60            | 2        | 80.9      | 0.88 |
|                   |              |          |               | 3        | 85.0      | 1.14 |
|                   | -15          | 12       | 60            | 5        | 93.6      | 1.19 |
|                   |              |          |               | 3        | 83.2      | 1.02 |
|                   |              |          |               | 3        | 63.5      | 0.73 |

DS: degree of substitution

<sup>1</sup> Du

<sup>2</sup> Hsieh

<sup>3</sup>  $1\text{Da} = (1/N_A)\text{gram}$ ,  $N_A =$  عدد آووگادرو

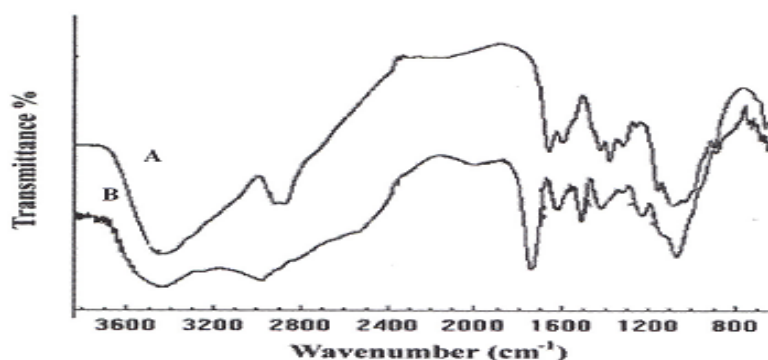
## ۳-۲-۱ طیف سنجی

## ۳-۲-۱ (الف) طیف FTIR کیتوسان و کربوکسی متیل کیتوسان

اگرچه بررسی کامل خصوصیات کربوکسی متیل کیتوسان به دلیل ساختار پیچیده آن مشکل است اما طیف سنجی قادر به مشخص نمودن ویژگی های ساختاری کربوکسی متیل کیتوسان می باشد. پیک های عمده در طیف کیتوسان شامل موارد زیر است:

۱. پیک قوی و پهن کششی O-H و N-H در ناحیه  $3400\text{ cm}^{-1}$
۲. پیک کششی C-H در محدوده  $2890\text{ cm}^{-1}$
۳. پیک  $1659\text{ cm}^{-1}$  ناشی از گروه C=O در گروه های استامید
۴. پیک  $1590\text{ cm}^{-1}$  ناشی از تغییر شکل زاویه ای پیوندهای N-H از گروه های آمین
۵. پیک  $1378\text{ cm}^{-1}$  ناشی از تغییر شکل زاویه ای متقارن  $\text{CH}_3$
۶. پیک مربوط به زنجیر پلی ساکاریدی شامل ارتعاش های گلوکزیدی C-O و C-O-C در محدوده  $897-1153\text{ cm}^{-1}$

تفاوت در طیف های FTIR کیتوسان و کربوکسی متیل کیتوسان به وضوح قابل تشخیص می باشند؛ پیک پهن تر در محدوده  $3400\text{ cm}^{-1}$ ، ماهیت آبدوستی کربوکسی متیل کیتوسان را در مقایسه با کیتوسان نشان می دهد. پیک قوی در  $1588\text{ cm}^{-1}$  و پیک متوسط در  $1411\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده ی تغییر شکل محوری متقارن و نامتقارن COO است و تشکیل گروه های کربوکسی متیل را تایید می کند. شکل ۳-۱ طیف FTIR کیتوسان و کربوکسی متیل کیتوسان را نشان می دهد [۸].



شکل ۳-۱ طیف FTIR کیتوسان (A) و کربوکسی متیل کیتوسان (B) [۸]

## ۳-۲-۱ (ب) پراش اشعه ایکس

مطالعات پراش اشعه ایکس با زاویه باز نشان داده است که کربوکسی متیله کردن کیتوسان، موجب تغییرات عمده در آرایش زنجیرهای پلیمری آن می گردد. مطابق شکل ۴-۱، در نمودار پراش اشعه ی ایکس، پودر کربوکسی متیل