

## تولید کیتوزان از اسکلت داخلی ماهی مرکب هندی (*Uroteuthis duvauceli*) و بررسی خصوصیات کیفی محصول

علی طاهری\*، مصطفی غفاری<sup>۱</sup>، سجاد مرادی<sup>۲</sup>

۱. دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران.  
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۱۴

### چکیده

کیتوزان به عنوان یک پلیمر زیست تخریب پذیر به طور گسترده‌ای برای کاربردهای زیست پزشکی، مهندسی بافت و موارد درمانی استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر، تولید کیتوزان از اسکلت داخلی ماهی مرکب هندی (*Uroteuthis duvaucelii*) و بررسی خصوصیات کیفی کیتوزان‌های تولیدشده به دو روش مورد تحقیق قرار گرفت. در روش اول پودر خشک کیتین به آرامی به ارلن حاوی محلول ۵۰ درصد سود هیدروکسید سدیم در حال جوش اضافه شد و در روش دوم کیتین به محلول واکنش (هیدروکسید پتاسیم جامد، اتانول ۹۶ و مونواتیلن گلیکول با نسبت ۲:۱:۱) اضافه شد. برای تعیین ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی کیتوزان‌های استخراج شده، درصد استیل زدایی، وزن مولکولی، ویسکوزیته ظاهری، کریستاله شدن و تجزیه عنصری به روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز، ویسکومتری، پراش اشعه ایکس و CHN اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نشان داد وزن مولکولی کیتوزان روش اول در محدوده  $1/57 \times 10^5$  Da تا  $7/8 \times 10^4$  Da و کیتوزان روش دوم  $1/8 \times 10^4$  Da قرار دارد، درصد خاکستر کیتین ۰/۱۴، کیتوزان یک ۱/۵۶ و کیتوزان دو ۱/۴۳ حاصل شد. تجزیه عنصری کیتوزان اول، نشان داد مقادیر کربن، هیدروژن و نیتروژن به ترتیب ۱۲/۷۹، ۰/۱۷ و ۰/۲۲ درصد و در کیتوزان دوم ۱۲/۹۰، ۰/۳۴ و ۰/۲۰ درصد است. نتایج حاصل از FTIR درجه استیل زدایی کیتوزان مورد نظر را کمتر از ۲۰ درصد نشان داد که نسبت به کیتوزان‌های تجاری کم است. همچنین نتایج XRD نشان داد که کیتوزان دارای پیک‌های قوی در نواحی ۲۶، ۳۳، ۳۶، ۳۸ و ۴۶ درجه است. کیتوزان به دست آمده از ماهی مرکب دارای درجه داستیلاسیون پایینی بود که دلیل آن می‌تواند شرایط مختلف تهیه کیتوزان باشد.

واژگان کلیدی: کیتین، کیتوزان، ماهی مرکب، XRD، طیف‌سنجی زیر قرمز.

## ۱. مقدمه

کیتین یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی تجدیدپذیر است و از نظر میزان فراوانی آن در طبیعت دومین پلیمر بعد از سلولز شناخته شده است. واحدهای تشکیل‌دهنده کیتین آن استیل گلوکز آمین است که از اتصال زنجیره‌ای آن‌ها هموپلیمر کیتین تولید می‌شود (Tolaimate et al., 2000). دو شکل  $\alpha$  و  $\beta$  از کیتین وجود دارد که آن‌ها را با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد خود متمایز می‌کند. بلورهای  $\alpha$ -کیتین توسط پیوندهای هیدروژنی درونی تشکیل شده در حالی که  $\beta$ -کیتین به علت قرار گرفتن پیوندهای هیدروژنی بسیار ضعیف به صورت موازی در کنار هم تولید شده است به همین دلیل  $\beta$ -کیتین قابلیت انحلال بیشتری دارد (Jung and Zhao, 2014).

بعد از استیل زدایی پلیمر بدون گروه‌های آمیدی را کیتوزان می‌نامند و از کاربردی‌ترین مشتقات کیتین است که طی فرآیند استیل زدایی حاصل می‌شود. وجود ۵۰ درصد گروه‌های آمیدی را مرز بین کیتین و کیتوزان در نظر گرفته‌اند. پلیمری با درجه استیل زدایی کمتر از ۵۰ درصد را کیتین و بالاتر از ۵۰ درصد را کیتوزان می‌نامند (تقی زاده و همکاران، ۱۳۸۳). کیتوزان یک پلیمر غیر سمی، سازگار و زیست تخریب پذیر است که در طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست پزشکی از جمله پانسمان، مهندسی بافت، پوشش ایمپلنت و سیستم‌های عامل درمانی استفاده می‌شود (Yuan et al., 2011). همچنین کیتوزان به دلیل خواص بیولوژیک مطلوب خود از جمله تجزیه بیولوژیکی، فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دامنه کاربردی بسیاری دارد، اما متأسفانه به دلیل حلالیت پایین کیتوزان در آب، فرآیند تولید و استفاده عملی آن محدود شده است (Huang et al., 2014). پلیمر زیستی کیتوزان دارای توانایی منحصر به فردی در انعقاد و لخته‌سازی ذرات معلق و کلوئیدی، جذب روغن و گریس محلول و فلزات سنگین را دارا می‌باشد (Hossain and Iqbal, 2014).

اصلی‌ترین پارامترهایی که تأثیر مستقیم بر خواص کیتین و کیتوزان دارند عبارت‌اند از وزن مولکولی (Molecular weight, Mw)، درجه استیل زدایی (Degree of Deacetylation, DD) و میزان

بلورینگی (crystallinity) است. اما برای کاربردهای انسانی از جمله صنایع غذایی و پزشکی علاوه بر موارد بالا، درصد خلوص (محتوای خاکستر تولیدشده)، میزان رطوبت، محتوای فلزات سنگین و میزان پروتئین آن‌ها نیز تعیین می‌شود که ارتباط مستقیمی با روش و شرایط استخراج دارد. مراحل استخراج کیتین و تبدیل‌های بعدی آن به کیتوزان را می‌توان از نظر شیمیایی و یا با استفاده از روش‌های بیولوژیکی، مانند تخمیر میکروبی و واکنش‌های آنزیمی انجام داد. روش شیمیایی رایج‌ترین روش استخراج کیتوزان است، زیرا ترکیباتی که در این روش استفاده می‌شود ارزان قیمت بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است. در اثر اعمال قلیا، فرآیند استیل زدایی کیتین به سرعت تا درجه استیل زدایی حدود ۸۵-۷۵ درصد پیش می‌رود و در اثر فرآیند قلیایی به علت نفوذ مولکول‌های NaOH بین صفحات کریستالی کیتین و شکستن پیوندهای هیدروژنی بین آن‌ها فاصله ایجاد می‌شود. در نتیجه ساختار کیتین تخریب می‌شود، گروه‌های استیل حذف و کیتوزان استخراج می‌شود. بعد از آن اعمال دوباره قلیا تأثیر اندکی نشان می‌دهد زیرا مورفولوژی زنجیره‌های کیتین به صورتی است که گروه‌های امید باقیمانده برای مولکول‌های NaOH غیرقابل دسترس است (Gould et al., 1985). کیتوزان استخراج شده به روش شیمیایی از کیفیت بالاتری نسبت به روش‌های دیگر برخوردار است. همچنین در روش آنزیمی، آنزیم‌های مورد استفاده دارای قیمت بالا و سرعت واکنش پایین هستند و محدودیت تخمیر باکتریایی نسبت به روش شیمیایی مربوط به زمان است زیرا زمان لازم برای دوره تخمیر باکتریایی ۴۸ ساعت و برای تخمیر گونه‌های قارچی ۱۲۰ ساعت است که فرآیندی زمان‌بر است. با توجه به این که زمان کوتاه یکی از عوامل مهم در کیفیت محصول است انتظار می‌رود در روش تخمیر میکروبی و آنزیمی کیفیت محصول نسبت به روش شیمیایی پایین‌تر باشد (Flores et al., 2007).

معمولاً کیتین در اسکلت خارجی بسیاری از بی‌مهرگان و در دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها و برخی از جلبک‌ها یافت می‌شود (Tolaimate et al., 2000). ماهی مرکب یک منبع طبیعی تجدیدپذیر و به منزله یک منبع مهم شیلاتی سودآور است که ارزش

اسکلت داخلی ماهی مرکب از گونه‌ی ماهی مرکب هندی به صورت تازه از صیدگاه‌های چابهار جمع‌آوری گردید. به‌منظور بررسی سازگاری و هماهنگی در خواص، نمونه در فصل تابستان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها چندین بار با آب شیرین شستشو و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده آسیاب، سپس به‌صورت پودر با توری چشمه ریز غربال شدند (Chandumpai et al., 2004).

نمونه پودر به آرامی به محلول سود یک مولار اضافه شد که نسبت ماده جامد به محلول قلیایی یک به ۱۳ (W/V) بود. مخلوط واکنش در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و به‌مدت ۵ ساعت به‌طور پیوسته هم زده شد. محصول کیتین از طریق ۴ لایه گاز پانسمان و به کمک پمپ خلأ فیلتر شد و شستشو با آب مقطر دیونیزه ادامه یافت تا pH خنثی شود. سپس دو بار با متانول (هر بار ۱۰۰ میلی‌لیتر) شستشو شد و به سینی شیشه‌ای منتقل شد و یک‌شب در آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای تعیین دقیق درصد عملکرد بلافاصله وزن شد و پس از آن نمونه در دسیکاتور سرد شد. کیتین خشک شده در یک بطری پلی اتیلنی به‌خوبی بسته شد و برای تهیه کیتوزان و برای مطالعات بیشتر نگه داشته شد (Chandumpai et al., 2004).

## ۲.۲. آماده‌سازی کیتوزان از کیتین ماهی مرکب

دو روش متفاوت برای تولید کیتوزان از کیتین به کار رفت (شکل ۱). در روش اول پودر خشک کیتین که در مرحله قبل تهیه شده بود، به ارلن حاوی محلول سود ۵۰ درصد که در دمای جوش قرار داشت اضافه شد و روی یک مگنت استیرر قرار گرفت. نسبت جامد به محلول قلیایی یک به پانزده بود و دمای مخلوط واکنش در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. جهت جلوگیری از اکسیداسیون واکنش تحت اتمسفر نیتروژن انجام شد. پس از ۴ ساعت پودر کیتوزان توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ فیلتر شد و تا خنثی شدن pH آب خروجی با آب مقطر شستشو شد. کیتوزان حاصله از روی کاغذ صافی جمع‌آوری و در هوای محیط خشک گردید. در روش دوم به جای سود از هیدروکسید پتاسیم استفاده شد و کیتین به محلول

اقتصادی بالایی دارد. قلم ماهی مرکب (Pen)، در حال حاضر به‌عنوان جزء اصلی ضایعات این‌گونه ماهی در نظر گرفته می‌شود که غنی‌ترین منبع کیتین در میان ترکیبات جهان است (Huang et al., 2014). علاوه بر این استخراج  $\beta$ -کیتین از قلم ماهی مرکب به علت حضور مقادیر ناچیز مواد معدنی و کارتنوئیدها (کاهش زمان فرآیند معدنی‌زدایی و رنگ‌زدایی) در مقایسه با استخراج کیتین از پوست میگو و خرچنگ بسیار راحت و مقرون به‌صرفه است (Jung and Zhao, 2014). در مطالعه Jung و Zhao (۲۰۱۴) تغییرات ناشی از قلیا یا اسید بر روی ساختار، توانایی جذب رطوبت و واکنش داستیله شدن B-کیتین استخراج شده از ماهی مرکب بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد کیتین تیمار شده با قلیا یا اسید نسبت به حلال مقاوم بوده است که به نوبه خود میزان فعالیت بیولوژیکی کیتوزان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی، ماده ضد میکروبی و یا به‌عنوان پوشش‌های خوراکی و فیلم برای کاربردهای مختلف مواد غذایی را افزایش داد (Jung and Zhao, 2014). Abdou و همکاران (۲۰۰۸) تحقیقی بر روی استخراج و شناسایی کیتین و کیتوزان از شش منبع محلی در مصر انجام دادند. در مطالعه آن‌ها کیتین از قلم ماهی مرکب در محلول هیدروکسید سدیم غوطه‌ور شد که نسبت به داستیلاسیون در اتوکلاو واکنش بسیار بالاتری نشان داد، حتی بعد از ۱۵ دقیقه حرارت دادن درجه داستیلاسیون به ۹۰ درصد رسید (Abdou et al., 2008).

در کشور ایران با وجود منابع اولیه برای تولید کیتین و مشتقات ارزشمند آن مانند کیتوزان، این کار در ابعاد صنعتی صورت نگرفته است که یکی از دلایل آن کمبود اطلاعات از خصوصیات کیفی و عملکردی آن‌ها است. با توجه به اهمیت کیتوزان و کاربرد آن و با وجود ذخایر قلم ماهی مرکب در دریای عمان در این پژوهش استخراج کیتین و به دنبال آن جداسازی کیتوزان از قلم ماهی مرکب صورت گرفت و خواص فیزیکوشیمیایی کیتوزان تولید شده بررسی گردید.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. آماده‌سازی کیتین از اسکلت داخلی ماهی

مرکب

اتاق درون دسیکاتور نگه داری شد، وزن اولیه بلافاصله پس از خشک شدن مشخص شد. نمونه‌های خشک‌شده با گاز پانسمان پوشیده شدند و در یک محیط مرطوب درون دسیکاتور در دمای اتاق نگه‌داشته شدند و روزانه توزین انجام شد تا وزن به تعادل رسید. پس از آن درصد رطوبت از هر نمونه با توجه به وزن خشک اولیه محاسبه شد. ۴ تکرار برای هر نمونه انجام شد (Chandumpai *et al.*, 2004).

## ۵.۲. تعیین وزن مولکولی

برای بررسی وزن مولکولی نمونه‌ها از ویسکومتر سنج چرخشی استوانه‌ای (مدل LV DVIII Ultra شرکت بروکفیلد) استفاده شد. نمونه در اسید استیک ۰/۱۷ مولار (۱٪ حجمی/حجمی) حل شد و فیلتر گردید. ویسکوزیته محلول فیلتر شده در دمای ۲۵ °C سنجیده شد و بر اساس معادله ۱ وزن مولکولی متوسط سنجش شد.

$$[\eta] = kM^a \quad (1)$$

در این معادله،  $[\eta]$  ویسکوزیته ذاتی و ضرایب  $k$  و  $a$  ثابت ویسکومتریکی بود.  $k$  و  $a$  به ترتیب  $\text{cm}^3/\text{g}$  و  $0.078$  و  $0.76$  در دمای ثابت گزارش شده است. برای کیتوزان محلول سدیم استات ۰/۳ مولار و اسید استیک ۰/۲ مولار استفاده شد (Bronswijk, 1975).

## ۶.۲. تعیین درجه استیل زدایی

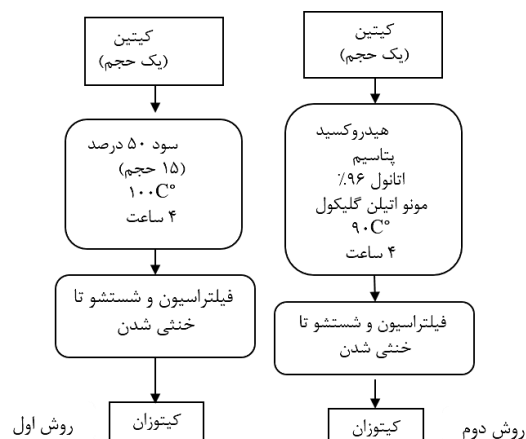
در این آزمون برای تعیین ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی کیتوزان از روش FT-IR استفاده شد. طیف زیرقرمز تمامی نمونه‌ها از روش تهیه قرص KBr (نسبت پلیمر به KBr برابر ۱ به ۱۰۰) به دست آمد. قبل از مخلوط کردن KBr و پلیمر هر دو جزء به مدت ۲۴ ساعت در آون ۸۰ درجه قرار داده شدند. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنج زیرقرمز (PerkinElmer مدل Rxi) مورد بررسی قرار گرفت، در این روش، درجه استیل زدایی کیتوزان با توجه به طیف FTIR از معادله ۲ محاسبه شد (Yen *et al.*, 2009).

(۲)

$$\text{DD}\% = 100 - [31.92 \times (A_{1320} - A_{1420}) - 12.20]$$

DD: درجه داستیلاسیون

$A_{1320}$ : میزان جذب در ناحیه ۱۳۲۰



شکل ۱ - فلوجارت تولید کیتوزان از کیتین ماهی مرکب به دو روش متفاوت.

واکنش حاوی نسبت ۲:۱:۱ از هیدروکسید پتاسیم جامد، اتانول ۹۶ (۲۵ درصد وزنی/وزنی) و مونواتیلن گلیکول (۲۵ درصد وزنی/وزنی) اضافه شد. واکنش در یک دستگاه سوکسله اتوماتیک (صنایع بخشی، ایران) انجام شد، کیتین به محلول واکنش در مخزن سوکسله اضافه و درجه حرارت در ۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. الکل با سیکل متناوب تقطیر شد و دوباره به مخزن باز گشت. بعد از ۴ ساعت از شروع واکنش فیلتراسیون توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ انجام و کیتوزان تا زمان خنثی شدن pH آب خروجی با آب مقطر شسته شد. پس از آن در دمای اتاق با جریان هوا خشک شد (Tolaimate *et al.*, 2000).

## ۳.۲. اندازه‌گیری مقدار خاکستر کیتوزان

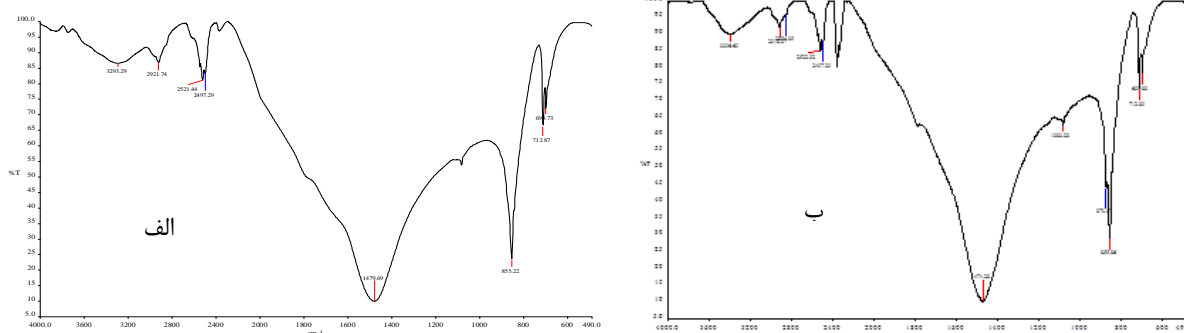
دو گرم نمونه کیتوزان را در بوته‌های چینی ریخته و سپس با استفاده از شعله نمونه‌ها را سوزانده تا تمام مواد آلی آن سوخته و به زغال تبدیل شود و بعد به مدت ۴ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با توجه به وزن نمونه اولیه و نمونه ثانویه، درصد خاکستر محاسبه شد (Brawin *et al.*, 2012).

## ۴.۲. فعالیت جذب رطوبت

فعالیت جذب رطوبت برای بررسی رطوبت کیتین و کیتوزان از ماهی مرکب تعریف شد. ۳ گرم نمونه دقیق وزن شد و به ظرف آزمایش انتقال یافت، در مرحله بعد در آون در دمای ۱۰۵-۱۰۰ درجه سانتی-گراد خشک شدند تا به وزن ثابت برسند، بعد در دمای

جدول ۱ - نتایج حاصل از ویسکوزیته و وزن مولکولی کیتوزان استخراج شده.

نمونه	ویسکوزیته ظاهری (m pa.s)	ویسکوزیته ویژه	وزن مولکولی (Da)
کیتوزان اول	۲/۰۵-۲/۸۹	۱/۰۵-۱/۸۹	$7/8 \times 10^4 - 1/57 \times 10^5$
کیتوزان دوم	۱/۳۰	۰/۳	$1/8 \times 10^4$



شکل ۲ - نمودار FTIR کیتوزان یک (الف) و کیتوزان دوم (ب) استخراج شده از قلم ماهی مرکب.

برای کیتوزان روش دوم برابر  $1/43$  درصد به دست آمد. درصد رطوبت برای کیتین  $0/13$  و برای کیتوزان اول و دوم  $0/15$  درصد گزارش شد و در روزهای بعد تغییری در رطوبت مشاهده نشد و سیر یکسانی داشت.

### ۲.۳. تجزیه عنصری

ویسکوزیته و وزن مولکولی (Mw) کیتوزان از دیگر ویژگی‌های بسیار مهم و مؤثر به‌عنوان عامل عملکردی و فیزیکیوشیمیایی است. در این مطالعه وزن مولکولی کیتوزان استخراجی در جدول ۱ آمده است. این وزن مولکولی از اختلاف درجه استیل زدایی، دما، اکسیژن محلول، زمان واکنش و اندازه ذره به‌دست می‌آید.

### ۳.۳. درجه استیل زدایی (FTIR)

در مطالعه حاضر درجه استیل زدایی کیتوزان کمتر از ۲۰ درصد گزارش شده است که مقدار آن نسبت به کیتوزان‌های تجاری کمتر است. برای بررسی‌های ساختاری و نیز تعیین درجه استیل زدایی کیتوزان، طیف FTIR نمونه تهیه و بررسی گردید. در تمامی این طیف‌ها پیک جذبی گروه‌های آمیدی در ناحیه  $1479/6 \text{ cm}^{-1}$  و گروه‌های هیدروکسی در ناحیه  $3450 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد. طیف FTIR از کیتوزان برای اطمینان از انجام استیل زدایی طی فرایند انجام شد که در شکل ۲ آمده است. نتایج طیف‌های به‌دست آمده در این شکل، اطلاعات کلی از

A1420: میزان جذب در ناحیه ۱۴۲۰

### ۷.۲. پراش پرتو ایکس (XRD)

برای تعیین ساختار بلوری نمونه‌های تهیه شده از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) PROMPD X'pert Analytical) استفاده شد، همه نمونه‌ها تا اندازه‌ی ۲۵ میکرومتر آسیاب شدند و با پودر اسید بوریک مخلوط و در شرایط یکسان طیف‌سنجی شد (Brugnerotto *et al.*, 2001).

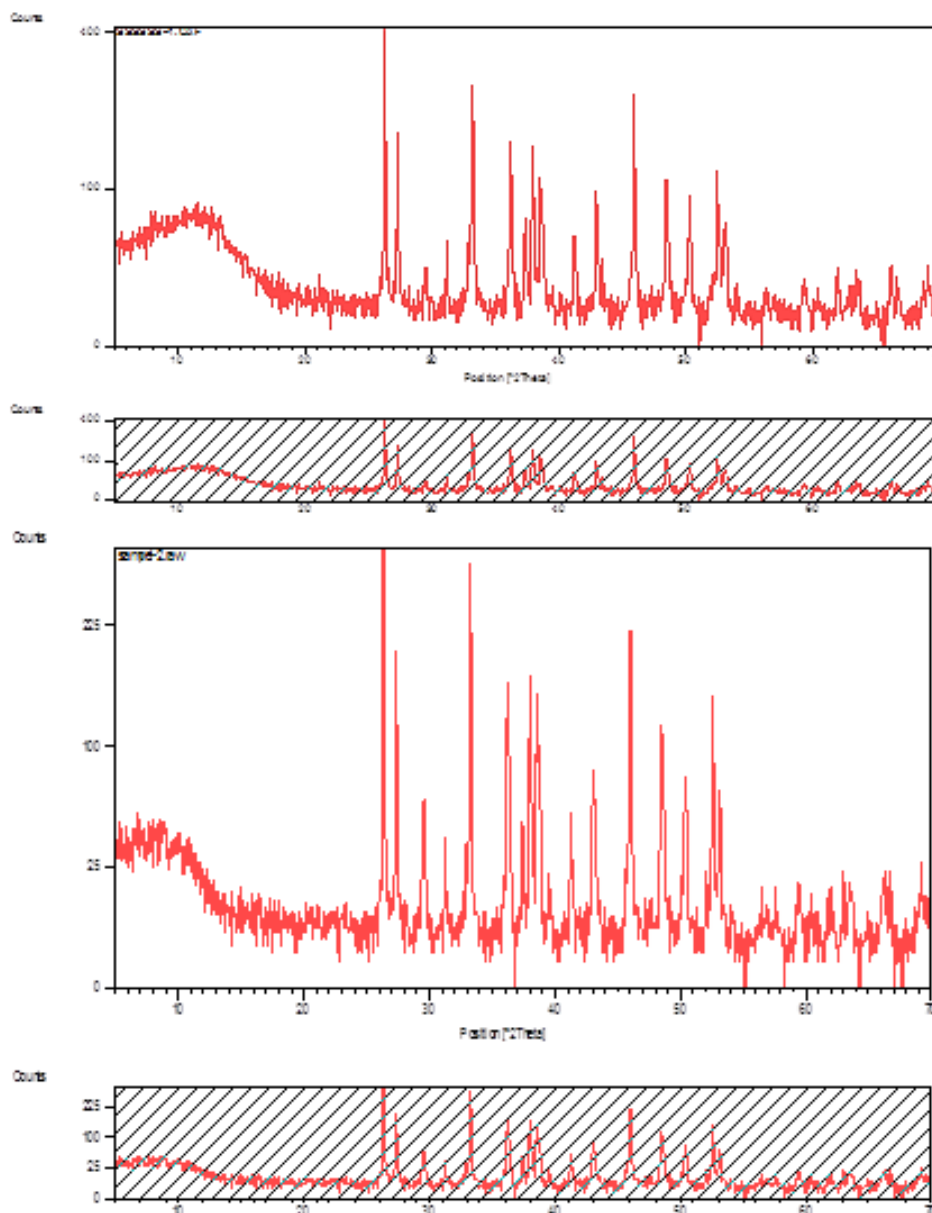
### ۸.۲. تجزیه عنصری

برای تجزیه عنصری CHN از دستگاه ThermoFinnigan مدل EA1112 استفاده گردید. مقدار کربن، نیتروژن و هیدروژن کیتوزان به روش تجزیه عنصری تعیین گردید. در این روش، حدود ۲ میلی‌گرم از کیتوزان در داخل کپسول نقره‌ای قرار داده شد و به داخل کوره دستگاه انتقال یافت. در این دستگاه عناصر کربن، هیدروژن و نیتروژن در مجاورت اکسیژن طی فرآیندهایی به ترتیب به  $\text{CO}_2$ ،  $\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{N}_2$  تبدیل شدند. همچنین مقادیر درصد کربن، هیدروژن و نیتروژن به ترتیب با تشخیص مادون قرمز و رسانایی الکتریکی معین شدند.

### ۳. نتایج

#### ۱.۳. درصد رطوبت و خاکستر

درصد خاکستر برای نمونه کیتین  $0/14$  درصد و برای نمونه کیتوزان روش اول برابر  $1/56$  درصد و



شکل ۳ - نمودار XRD کیتوزان یک (الف) و کیتوزان دوم (ب) استخراج شده از قلم ماهی مرکب.

ماهیت گروه‌های عاملی درگیر در نمونه را نشان می‌دهد. بررسی طیف‌های FTIR در نمونه کیتوزان اول، جذب‌هایی در ناحیه  $3447\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های  $\text{N-H}_2$  در ساختار آمید اولیه و  $\text{O-H}$  در حلقه پیرانوز،  $2921/7\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های  $\text{C=O}$  و  $\text{CH}$  در  $\text{COOH}$ ،  $2521/4\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{C-H}$ ،  $1479/6\text{cm}^{-1}$  و  $1068\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{CH}_3$  و جذب‌ها، جذب در ناحیه‌های بین  $650-1000\text{cm}^{-1}$  کشیدگی  $\text{C-H}$  حلقه پیرانوز و  $\text{N-H}$  (آمید) را نشان می‌دهد.

#### ۰.۴.۳. پراش پرتو ایکس (XRD)

بر اساس الگوی XRD که در شکل ۳ نشان

گروه‌های  $\text{OH}$  و  $\text{NH}$ ،  $2918/07\text{cm}^{-1}$  مربوط به ویراسیون  $\text{CH}_2$  در گروه  $\text{CH}_2\text{OH}$ ،  $2854/05\text{cm}^{-1}$  مربوط به ویراسیون  $\text{C-H}$  در حلقه پیرانوز،  $1479/6\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{CH}_3$ ،  $1083/20\text{cm}^{-1}$  مربوط به کشیدگی در حلقه  $\text{C-O}$ ،  $873/57\text{cm}^{-1}$  مربوط به ویراسیون  $\text{C=O}$  و جذب در ناحیه‌های بین  $650-1000\text{cm}^{-1}$  کشیدگی  $\text{C-H}$  حلقه پیرانوز و  $\text{N-H}$  (آمید) را نشان می‌دهد. بررسی طیف‌های FTIR در نمونه کیتوزان دوم، جذب‌هایی در ناحیه  $3447\text{cm}^{-1}$  مربوط به

ویراسیون  $\text{CH}_2$  در گروه  $\text{CH}_2\text{OH}$ ،  $2854/0.5 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ویراسیون C-H در حلقه پیرانوز،  $2521/4 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه C-H،  $1083/20 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1479/6 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به کشیدگی در حلقه C-O-C،  $1068 \text{ cm}^{-1}$  و  $873/57 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه C-O است. افزون بر این جذبها، جذب در ناحیههای بین  $1000 - 650 \text{ cm}^{-1}$  کشیدگی C-H حلقه پیرانوز و N-H (آمید) را نشان می‌دهد که این نتایج با نتایج مطالعات دیگر مشابه است. نتایج مطالعه Mohammed و همکاران (۲۰۱۳)، نشان می‌دهد در محدوده  $1606 \text{ cm}^{-1}$  -  $1566 \text{ cm}^{-1}$  گروه‌های آمین اولیه وجود دارند و در جذب‌های  $3450$ ،  $3262$ ،  $3114$  و  $1658 \text{ cm}^{-1}$  گروه‌های امید از کیتین داستیله شده به دست آمده است. جذب در  $3398 \text{ cm}^{-1}$  به نظر می‌رسد مربوط به گروه  $\text{NH}_2$  باشد. همچنین درجه داستیلاسیون برای نمونه‌های کیتین تعیین شده از طیف‌های FTIR برای نمونه تهیه شده با ۲۵ درصد سود کمتر از نمونه تهیه شده با ۵۰ درصد سود بود (Mohammed *et al.*, 2013). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه Mohammed و همکاران (۲۰۱۳) تطابق دارد و وجود گروه  $\text{NH}_2$  در جذب‌های  $3400 \text{ cm}^{-1}$  به بالا را نشان می‌دهد. در مطالعه Judawisastra و همکاران (۲۰۱۲)، با توجه به طیف FTIR در محدوده  $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  گروه‌های OH و  $\text{NH}_2$  اثبات شدند و محدوده  $1637 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه امید I است. نقطه اوج اول در محدوده  $1570 \text{ cm}^{-1}$  و نقطه اوج دوم در محدوده  $1118 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که به ترتیب مربوط به گروه NH و C-O-C است (Judawisastra *et al.*, 2012). نتایج تحقیق حاضر به علت وجود طیف در جذب‌های بالا با مطالعه Judawisastra و همکاران (۲۰۱۲) شباهت دارد. در مطالعه حبیبی و همکاران (۱۳۹۲)، طیف کیتوزان نشان از نوار جذبی در ناحیه  $444 \text{ cm}^{-1}$  داشت که می‌توان آن را به تداخل گروه‌های OH و NH مربوط دانست و نوار جذبی دو شاخه در ناحیه  $160 \text{ cm}^{-1}$  -  $1560 \text{ cm}^{-1}$  به گروه کربونیل متصل به امید است. جذب در ناحیه  $1658 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه (C=O) و ناحیه  $1594 \text{ cm}^{-1}$  معلق به گروه امید (NH<sub>2</sub>) است. نوارهای جذبی در ناحیه‌های  $102 - 1085 \text{ cm}^{-1}$  و

داده شده، کیتوزان دارای پیک‌های قوی در نواحی ۲۶، ۳۳، ۳۶، ۳۸ و ۴۶ درجه است که نشانه درجه بلورینگی کیتوزان به علت پیوندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی است. پراش پیک الگوی XRD در گستره‌ی 2θ از ۵ درجه تا ۷۰ درجه به دست آمده آمد.

### ۵.۳. تجزیه عنصری (CHN)

نتایج حاصل از تجزیه عنصری CHN برای نمونه کیتوزان یک مقادیر کربن، هیدروژن و نیتروژن را به ترتیب ۱۲/۷۹، ۰/۱۷ و ۰/۲۲ درصد و برای کیتوزان دوم به ترتیب ۱۲/۹۰، ۰/۳۴ و ۰/۲۰ نشان داد.

### ۴. بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش نتایج خاکستر برای نمونه‌های کیتین و کیتوزان یک و دو به ترتیب ۰/۱۴، ۱/۵۶ و ۱/۴۳ درصد و رطوبت برای کیتوزان‌ها ۰/۱۵ درصد به دست آمد. در مطالعه Zhao و Jung (۲۰۱۴) درصد خاکستر کیتین و کیتوزان ۰/۶۸ و ۰/۸۴ درصد و مقدار رطوبت ۲/۲۰ و ۱/۱۷ درصد گزارش شد (Jung and Zhao, 2014). در مطالعه منگلی زاده و همکاران (۱۳۹۳)، درصد خاکستر در کیتین و کیتوزان به ترتیب ۰/۵۹ درصد و ۱/۲ درصد و مقدار رطوبت ۱/۰۳ درصد و ۱/۲۵ درصد گزارش شده است (منگلی زاده و همکاران، ۱۳۹۳). در مطالعه حاضر مقدار خاکستر کیتوزان بالاتر از این مقدار اما درصد رطوبت کمتر به دست آمده است. این نتایج نشان داد که تقریباً مقدار خاکستر کیتین و کیتوزان استخراج شده از ماهی مرکب با سایر مطالعات چندان مشابه نیست. میزان خاکستر به دست آمده در کیتین کم بوده و برعکس در کیتوزان یک زیاد بوده که نشان می‌دهد مراحل کانی‌زدایی و پروتئین‌زدایی در آن به خوبی انجام نشده است اما کیتوزان دوم کانی‌زدایی و پروتئین‌زدایی بهتری نشان داد.

نتایج FTIR مطالعه حاضر نشان می‌دهد طیف‌های موجود در ناحیه  $3447 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های N-H<sub>2</sub> در ساختار امید اولیه و O-H در حلقه پیرانوز،  $2921/7 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های CH و C=O در  $2918/07 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به

به سایر عناصر بیشتر بوده که با مطالعه آن‌ها مطابقت داشته است. مطالعه اسدپور و همکاران (۱۳۸۱) نشان داد تجزیه عنصری کیتین پوسته سیست آرتیمیا بیانگر ۷/۶ درصد نیتروژن، ۴۸/۶ درصد کربن و ۷ درصد هیدروژن است. درصد نیتروژن و کربن کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتیمیا در مقایسه با دو نوع استخراج شده از پوسته خرچنگ و پوسته میگو تا حدی بیشتر است که به کارگیری کیتین پوسته سیست آرتیمیا را در زمینه‌های پزشکی مورد توجه قرار می‌دهد (اسدپور و همکاران، ۱۳۸۱).

در مطالعات بالا نتایج تجزیه عنصری نشان داد که درصد کربن در همه مطالعات نسبت به هیدروژن و نیتروژن بالاتر بوده که با توجه به بالا بودن درصد کربن در ساختمان کیتوزان ماهی مرکب، کاربردهای اختصاصی آن را در زمینه‌های پزشکی در مورد هموستاز، فرآیندهای دیالیز، سنتز پوست مصنوعی، نخ بخیه جراحی، زیست‌فناوری‌های محیطی، سم‌زدایی و پرتوزدایی را با اهمیت می‌سازد.

وزن مولکولی به پارامترهایی از قبیل درجه استیل زدایی و نوع منبع کیتوزان استخراجی بستگی دارد که در کاهش و افزایش وزن مولکولی مؤثر است. می‌توان گفت که با کاهش تعداد گروه‌های استامید پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی کاهش می‌یابد و به جای آن پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی افزایش می‌یابد. با به وجود آمدن پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی، وزن مولکولی و در نتیجه ویسکوزیته افزایش می‌یابد. طبق نتایج حاصل شده در این تحقیق وزن مولکولی کیتوزان یک در محدوده  $1.57 \times 10^5$  Da تا  $7.8 \times 10^4$  و کیتوزان دو  $1.8 \times 10^4$  دالتون به دست آمده آمد. در مطالعه حبیبی و همکاران (۱۳۹۲)، وزن مولکولی کیتوزان برابر  $4.1 \times 10^5$  Da مشخص شد. در مطالعه Mohammed و همکاران (۲۰۱۳)، جرم مولکولی تعدادی از نمونه‌های تجاری کیتوزان تعیین و در محدوده  $2-3.5 \times 10^5$  Da گزارش شده است. نتایج آن‌ها با نتایج به دست آمده از این پژوهش در مورد کیتوزان همخوانی دارد و وزن مولکولی افزایش یافته است.

### نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق قلم ماهی مرکب دریای عمان

۱۱۶۰ را می‌توان به کشش نامتقارن C-O-C مربوط دانست (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۲). در این مطالعه نمودار FTIR دو نمونه کیتوزان تولیدی را تایید نمود و اختلافی را در جذب گروه‌های عاملی نشان داد.

طبق نتایج به دست آمده کیتوزان دارای پیک-های قوی در نواحی ۲۶، ۳۳، ۳۶، ۳۸ و ۴۶ درجه در نمودار XRD هر دو نوع کیتوزان است. در مطالعه Huang و همکاران (۲۰۱۴)، مشاهده شده است که کیتوزان، دو قله کریستالی در محل‌های ۱۳/۵ و ۲۰ درجه دارد که اوج کریستالی گسترده در محدوده ۱۳/۵ درجه است که به ساختار بلورین و هیدراته کیتوزان که مولکول‌های آب در آن محدود است اشاره دارد. اوج کریستالی در محدوده ۲۰ درجه نشان از شبکه بلوری منظم کیتوزان است که به درجه بالایی از تبلور اشاره دارد (Huang et al., 2014). با توجه به نقاط اوج کریستالی در مطالعه Huang و همکاران (۲۰۱۴)، در این تحقیق نقاط اوج شاخصی مشاهده نشد که با مطالعه آن‌ها مطابقت ندارد. در مطالعه Kumari و همکاران (۲۰۱۴)، تمام نمونه‌های کیتین بازتاب قوی در محدوده ۱۰-۹ درجه را نشان دادند و در درجات بالاتر مقدار شدت کمتر شده است. پنج بازتاب کریستالی از کیتوزان در محدوده ۸۰-۱۰ درجه مشاهده شد که شدت اوج در محدوده‌های ۱۴/۴۵، ۲۰/۰۲، ۲۶/۷۰، ۳۷/۳۲ و ۵۴/۳۲ درجه بود (Kumari et al., 2014). نتایج این تحقیق نیز بازتاب‌هایی در محدوده‌های بالا نشان می‌دهد، اما نشان از بازتاب قوی در این نواحی نیست. شاخص‌های کریستالی به علت پیوندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی نشان‌دهنده درجه بلورینگی کیتوزان است که در این تحقیق نقاط شاخص استاندارد مشاهده نشده است.

در این تحقیق مقادیر کربن، هیدروژن و نیتروژن برای نمونه کیتوزان یک به ترتیب ۱۲/۷۹، ۰/۱۷، ۰/۲۲ درصد و برای کیتوزان دو ۱۲/۹۰، ۰/۳۴ و ۰/۲۰ درصد حاصل شد که مقدار کربن آن در هر دو نمونه زیاد است. در مطالعه منگلی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳)، نتایج حاصل از آزمون CHN نشان داد که مقدار کربن، هیدروژن و نیتروژن در کیتوزان استخراجی به ترتیب برابر ۳۵/۹۲، ۷/۰۲ و ۸/۶۶ درصد بود (منگلی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳). در این تحقیق نیز مقدار کربن نسبت



نشان داد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به دلیل حمایت مادی و معنوی برای انجام این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی نمایند.

## References

- Abdou, E.S., Nagy, K.S., Elsabee, M.Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99, 1359-1367.
- Barwin Vino, A., Ramasamy, P., Vairamani, S., Shanmugan, A., 2011. Physicochemical characterization of biopolymers chitin and chitosan extracted from squid *Doryteuthis sibogae* adam, 1954 pen. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2, 181-190.
- Bronswijk, W.V., 1975. Molecular weight determination by viscometry. In *Handbook of physical chemistry 301/302 for student in department of chemistry*. Australia: Western Australian Institute of Technology. pp. 127-130.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Chandumpai, A., Singhpibulporn, N., Faroongsarng, D., Sornprasit, P., 2004. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers*, 58, 467-474.
- Habibi, S., Allah Gholi Qassari, M.R., Shahriari Namin, P., 1392. Extract of chitosan from shrimp skin: identification and application of removal of reactive dyes 13, and acid 3 from aqueous solutions. *Science and Technology of Textile*, 3, 3-10.
- Hossain, M., Iqbal, A., 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 12, 153-160.
- Huang, J., Cheng, Z.-H., Xie, H.-H., Gong, J.-Y., Lou, J., Ge, Q., Wang, Y.-J., Wu, Y.-F., Liu, S.-W., Sun, P.-L., 2014. Effect of quaternization degree on physicochemical and biological activities of chitosan from squid pens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 545-550.
- Judawisastra, H., Hadyiswanto, I., Winiati, W., 2012. The effects of demineralization process on diameter, tensile properties and biodegradation of chitosan fiber. *Procedia Chemistry*, 4, 138-145.
- Jung, J., Zhao, Y., 2014. Alkali-or acid-induced changes in structure, moisture absorption ability and deacetylating reaction of  $\beta$ -chitin extracted from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Food Chemistry*, 152, 355-362.
- Kumari, S., Rath, P.K., 2014. Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeo rohita*) fish scales. *Procedia Materials Science*, 6, 482-489.
- Mangilzadeh, N., Jafarzadeh Haghighifard, N., Takdastan, A., Hormosinejad, M., 1393. Physicochemical characteristics of the biopolymer chitosan extracted from shrimp shell. *Journal of Polymer Science and Technology*, 27, 371-380.
- Mohammed, M.H., Williams, P.A., Tverezovskaya, O., 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31, 166-171.
- Taqizadeh, S.M., Takrosta, M., Davari, G., Yousefi, M., 1383. Preparation of chitosan with degree of de acetylation different and various methods of identifying. *Journal of Polymer Science and Technology*, 17, 291-297.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., Vottero, P., 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 41, 2463-2469.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H., Mau, J.-L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15-21.
- Yuan, Y., Chesnutt, B.M., Haggard, W.O., Bumgardner, J.D., 2011. Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4, 1399-1416.